

Curso 2009/10
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/34
I.S.B.N.: 978-84-7756-980-0

NAYRA INMACULADA RODRÍGUEZ PERESTELO

**Metabolitos secundarios aislados
de *Maytenus jelskii* (Celastraceae).
Estudio de relación estructura-actividad**

Directores

**ISABEL LÓPEZ BAZZOCCHI
IGNACIO ANTONIO JIMÉNEZ DÍAZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

A mis padres y a Gabi

Agradecimientos

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a mis directores, Isabel y Antonio, por la dedicación y apoyo brindado durante todo el tiempo que he pasado en el laboratorio. Gracias por los sabios consejos dados en todo momento y por supuesto por introducirme en el maravilloso mundo de los Productos Naturales.

Al Gobierno Autónomo de Canarias y a la entidad "Caja Canarias" por la ayuda prestada para la realización de esta Tesis Doctoral.

A todo el personal del I.U.B.O, del CSIC, a todos los miembros de apoyo a la investigación y al personal de seguridad, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de esta tesis Doctoral y de muchas otras.

En este trabajo han colaborado diferentes grupos de investigación, a los cuales me gustaría agradecer la ayuda prestada:

A los Drs. Mercedes Campillo y Leonardo Pardo y todo su grupo, por acogerme en la estancia que realicé en Barcelona. Gracias por hacerme sentir como una más del grupo y por enseñarme una visión distinta de la investigación. A Mercedes e Iván, especialmente, por todo su apoyo y generosa ayuda en los estudios 3D-QSAR.

Al Dr. Gonzalo Mena-Rejón, por realizar los ensayos frente a Giardia y los estudios QSAR de compuestos antiparasitarios. Gracias también por las vivencias compartidas en Tenerife.

Al Dr. Harukuni Tokuda por la evaluación de la actividad inhibidora del virus Epstein-Barr.

A la Dra. Lucía San Andrés, por su inestimable ayuda con la nomenclatura química.

También me gustaría dedicar algunas palabras y agradecer a mis compañeros de "penurias" de mi grupo y a los Doctores que forman parte de él.

A Antonio, un excelente profesor y mejor persona, por hacerme apuntar todo en un papel jeje, pero sobre todo por contagiarme sus ganas de trabajar en el laboratorio.

A Isabel (la jefa), por la confianza depositada en mí desde el primer momento, por todos los momentos compartidos, tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por tus consejos y tu sincera amistad.

Al Profesor Gavín, por sus enseñanzas de resonancia magnética nuclear, los buenos momentos compartidos en los viajes a Bolivia y por decirme lo "guapa" que estaba siempre que iba vestida de azulgrana.

A Laïla, por los buenos momentos que compartimos en los amigos invisibles, en Barcelona...

A Chana, por su carácter alegre y por sus ánimos durante la escritura de esta Tesis.

A Ninoska (Ninos), una de las personas más especiales que he conocido en mi vida, gracias amiga por tu amistad, por tu ayuda en todo momento y por ese pedacito de chocolate que me dabas todas las tardes y que me mantenía en pie jeje.

A Nayely, la mexicana más loca que he conocido y que, sin duda, conoceré nunca. Gracias por hacerme disfrutar del picante como si fuera una verdadera mexicana. Nunca olvidaré todos los momentos que

compartimos, gracias amiga por aguantarme y entenderme, estaré eternamente agradecida. Hago extensivo mi agradecimiento a Rubén, su compañero de penurias, jeje, muchas gracias por tu amistad.

A Nuria (Furis), la “secretaria” del labo, a la que le salen jefes por todas partes jeje, por ser una bellísima persona, gracias por tu amistad, tu apoyo y ayuda en todo momento. Sabes que siempre podrás contar conmigo.

A Cristina y Carolina, por su desinteresada ayuda en mis comienzos en el laboratorio y todos los momentos que compartimos.

A David (“Deivid”), por sus sabias palabras en todo momento y las vivencias compartidas tanto dentro como fuera del laboratorio (¡estee, permiiiiitame!).

A Juan Carlos (el bolí), por su inestimable amistad, por ser un excelente compañero de laboratorio y por acabar todas las discusiones con la frase: “todo es relativo, nada es absoluto”.

A Oli (Tintín), por ser como eres, alemán jeje, por tu gran sentido del humor, pero sobre todo por tu sincera amistad. Nos vemos en el lago Constanza!!

A Sandra (ratones), por ser la alegría del laboratorio (cuando le “tocaba” estar con nosotros jeje), gracias por tu amistad y por tus palabras de apoyo en todo momento.

A Lolo y a Leti, por los buenos momentos vividos, en especial en las caminatas al Teide, las reuniones de amigo invisible, las chuletadas... jeje. Gracias por vuestras palabras de apoyo (que tanta falta me hacían) en este último tramo de la Tesis.

A Liliána, por su amistad, por las cenas de arepas venezolanas, ¡jamás he visto una arepa tan bien formada! jeje, y por supuesto por esa expresión tan graciosa: ¡ascooo!

A Alex (adoxonio, tuuuuu eres mariachi?) y Alejandro (el chileno) por todos los buenos momentos que compartimos tanto dentro como fuera del laboratorio.

Quisiera agradecer a todos los compañeros que han pasado por el laboratorio (Alfredo Tupayachi, Alberto Giménez, Carlos Alberto (Lomito), Carmen Teresa, Sara (Sarandonga), Javier Rincón, Efraín, Gonzalo, Marvin Núñez, Marvin Chávez, Morena, Ana Miriam y María Luisa (MLK), gracias por su compañerismo, por todo lo que compartimos y sobre todo por enriquecerme de sus diferentes culturas durante sus estancias en nuestro grupo.

En especial a Morena y Ana Miriam (mis salvadoreñas favoritas jeje) por su gran calidez humana y por su inestimable y sincera amistad. Gracias amigas, siempre las tendré presentes en mi corazón.

A todos los compañeros de otros laboratorios del instituto, por la ayuda prestada cuando fue necesaria y por todos los congresos y fiestas compartidas. Sin todos ustedes esta etapa no hubiera sido tan placentera.

A las chicas de “farmacia” (Lorena y Kati) y a Tere y Mayte por todo su apoyo durante la escritura de la tesis y por todo lo vivido con ellas este último año.

A mis amigos de carrera, Angelito, Elena (bicho), Sandra, Vický, Vanesa, Elia y Dimitri por los buenos momentos compartidos y por continuar con nuestra amistad.

Y por último, que no menos importante, a mi familia:

A mi padre, por todo su cariño, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado en mi vida, animarme cuando fue necesario y enseñarme a echarle cara a la vida, pero sobre todo por ser el mejor padre del mundo.

A mi madre, por su amor incondicional, por ser tan comprensiva conmigo y apoyarme en todo momento. Gracias por tus consejos y por guiarme siempre por el buen camino, te quiero mucho.

A mis hermanos, Zeben y René, por aguantarme durante estos 30 años de vida, aunque yo también he aguantado eh! Jeje, gracias por ser los mejores hermanos que podría tener.

A Nuria (mi cuñada) por todo su apoyo durante estos años, en especial en los meses que estuve en Barcelona. Gracias por todo.

A toda mi familia en general, especialmente a mis abuelas y a mi padrino Fernando por sus palabras de ánimo durante la escritura de esta Tesis.

Y por último a Gabi, el apoyo más importante para mí durante todos estos años. La persona que más ha tenido que soportar mi mal humor en los momentos críticos de la tesis jeje. Gracias por tu paciencia, comprensión, amistad, amor... todo. Sin ti este camino se hubiera hecho interminable. Tqm.

Mil Gracias

Abreviaturas

| | |
|-------------------|--|
| 3D-QSAR | (<i>three-Dimensional Quantitative Structure-Activity. Relationships</i>) Estudio cuantitativo de la relación estructura-actividad en tres dimensiones |
| Ac ₂ O | Anhídrido acético |
| AT | Antígenos Tempranos |
| c | Cuaternario |
| CADD | (<i>Computer-Assisted Drug Design</i>) Diseño de fármacos asistido por ordenador |
| CC | Cromatografía en columna |
| CCF | Cromatografía en capa fina |
| CCFAR | Cromatografía en capa fina de alta resolución |
| CD21 | Receptor celular |
| Células A-549: | Línea celular de carcinoma humano de pulmón |
| Células BEL-7402 | Línea celular de carcinoma de hígado |
| Células COLO-205 | Línea celular de carcinoma de colon |
| Células HCT-8: | Línea celular de carcinoma humano de colon |
| Células HeLa: | Línea celular de carcinoma de cérvix humano |
| Células Hep-2: | Línea celular de carcinoma de laringe humano |
| Células Hepa-3B: | Línea celular de carcinoma de hígado |
| Células HL-60: | Línea celular leucemia mieloide humana |
| Células HT-29: | Línea celular de carcinoma humano de colon |
| Células KB: | Línea celular de carcinoma nasofarínge |
| Células L-1210: | Línea celular linfocíticas de leucemia de ratón |
| Células MCF-7: | Línea celular de carcinoma humano de pecho |
| Células MEL-28: | Línea celular de melanoma humano |
| Células P-388: | Línea celular monocítica de leucemia de ratón |
| Células VA-13 | Línea celular tumoral de pulmón |
| Células Vero: | Línea celular de riñón de mono verde africano |
| CEM | Cromatografía de exclusión molecular |
| col. | Colaboradores |
| COSY | <i>Correlation Spectroscopy</i> |
| CS: | Cepa salvaje |
| d | Doblete |
| dd | Doble doblete |
| DC | Dicroísmo circular |
| DEPT | <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> |
| DE ₅₀ | Dosis que produce el 50% de la respuesta máxima |
| DL | Dosis letal |
| DMAP | 4-Dimetilaminopiridina |
| DMDO | Dimetildioxano |

| | |
|---------------------|---|
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPPH: | 1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo |
| dt | Doble triplete |
| EM | Espectrometría de Masas |
| EMAR | Espectrometría de Masas de Alta Resolución |
| eq | Equivalente |
| ESI | Ionización por electroespray |
| FDA | (<i>Food Drug Administration</i>) |
| g | Gramos |
| Gp350 | Proteína de la envoltura del VEB |
| h | Horas |
| HMBC | <i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherent</i> |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| HSQC | <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> |
| HSV | Virus del Herpes simplex 1 |
| Hz | Hertzio |
| IC | Índice de confianza |
| IL | Interleucinas |
| ILU | Índice de lesión ulcerosa |
| iNOS | Oxido nítrico sintasa inducible |
| IR | Infrarrojo |
| IT | Índice terapéutico |
| <i>J</i> | Constante de acoplamiento |
| LES | Lupus eritematoso sistémico |
| LMP-1 | Proteína de membrana expresada durante las infecciones latentes |
| m | Multiplete |
| <i>m/z</i> | Unidades de masa |
| MDR | (<i>MultiDrug Resistance</i>) multirresistencia a fármacos |
| MIF _s | (<i>Molecular Interaction Fields</i>), campos de interacción molecular |
| MIP | (<i>Molecular interaction potencial</i>), potenciales de interacción molecular |
| NCI | (<i>Internacional Cancer Institute</i>) Instituto Nacional del Cáncer de USA |
| NF- κ B | Factor de Transcripción kappaB |
| PDB | (<i>Protein Data Bank</i>), banco de datos que recoge las estructuras de las proteínas. |
| Pgp | (<i>P-glycoprotein</i>) glicoproteína P |
| PLS | (<i>Partial Least Square</i>), análisis multivariante de mínimos cuadrados parciales |
| Py | Piridina |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear |
| RMN ¹³ C | Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13. |
| RMN ¹ H | Resonancia Magnética Nuclear de Protón |
| ROE | <i>Rotatory Overhauser Effect</i> |

| | |
|------------|--|
| ROESY | <i>Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy</i> |
| s | Singlete |
| sa | Singlete ancho |
| SAR | <i>(Structure-Activity Relationship)</i> , relación estructura-actividad |
| t | Triplete |
| t.a. | Temperatura ambiente |
| TB | Tuberculosis |
| TPA | 13-Acetato-12-O-tetradecanoil-forbol |
| UV | Ultravioleta |
| VEB | Virus Epstein-Barr |
| VIH | Virus de la Inmunodeficiencia Humana |
| α_D | Rotación óptica |
| δ | ppm (partes por millón) |

*Metabolitos secundarios aislados de Maytenus
jelskii (Celastraceae). Estudios de relación
estructura-actividad*

ÍNDICE

página

1. Introducción



1.1. Productos naturales

3

1.2. Familia Celastraceae

11

2. Objetivos



3. Descripción botánica, recolección, extracción y fraccionamiento cromatográfico de *Maytenus jelskii*



3.1. Descripción botánica

25

3.2. Recolección

27

3.3. Extracción y fraccionamiento cromatográfico

28

3.3.1. Hojas

28

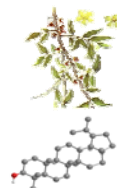
3.3.2. Corteza de raíz

29

3.3.3. Frutos

30

4. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS, FRUTOS Y CORTEZA DE RAÍZ de *M. jelskii*



4.1. Triterpenos

4.1.1. Introducción

37

4.1.1.1. Actividades biológicas de los triterpenos aislados de celastráceas

39

4.1.1.1.1 Triterpenos de la serie del dammarano

40

4.1.1.1.2. *D:B* friedobaccharanos

41

4.1.1.1.3. Triterpenos del taraxerano y glutinano

42

4.1.1.1.4. Triterpenos de la serie del friedelano

42

4.1.1.1.5. Triterpenos del oleano y ursano

44

4.1.1.1.6. Triterpenos de la serie del lupano

45

4.1.2. Resultados y discusión

49

4.1.3. Parte Experimental

63

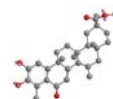
4.1.3.1. Separación cromatográfica de los triterpenos aislados de las hojas y la corteza de la raíz de *Maytenus jelskii*

63

4.1.3.2. Datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos de los nuevos triterpenos

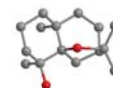
65

4.2. Celastroloides



| | |
|---|-----|
| 4.2.1. Introducción | 71 |
| 4.2.1.1. Actividades biológicas de los celastroloides | 78 |
| 4.2.1.1.1. Actividad insecticida | 78 |
| 4.2.1.1.2. Actividad antioxidante | 78 |
| 4.2.1.1.3. Actividad antimicrobiana | 79 |
| 4.2.1.1.4. Actividad anticancerígena | 81 |
| 4.2.1.1.5. Actividad antiinflamatoria | 82 |
| 4.2.1.1.6. Actividad antiviral | 83 |
| 4.2.2. Resultados y discusión | 85 |
| 4.2.3. Parte Experimental | 105 |
| 4.2.3.1. Separación cromatográfica de los celastroloides aislados de la corteza de la raíz de <i>Maytenus jelskii</i> | 105 |
| 4.2.3.2. Datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos de los nuevos celastroloides | 106 |

4.3. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos



| | |
|---|-----|
| 4.3.1. Introducción | 113 |
| 4.3.1.1. Actividades biológicas de sesquiterpenos y alcaloides sesquiterpénicos dihidro- β -agarofurano | 118 |
| 4.3.1.1.1. Actividad antialimentaria e insecticida | 119 |
| 4.3.1.1.2. Actividad inhibidora del proceso fotosintético | 120 |
| 4.3.1.1.3. Actividad antituberculosa | 122 |
| 4.3.1.1.4. Actividad antiviral | 123 |
| 4.3.1.1.5. Actividad citotóxica | 125 |
| 4.3.1.1.6. Actividad inmunosupresora | 127 |
| 4.3.1.1.7. Actividad antiinflamatoria | 128 |
| 4.3.1.1.8. Actividad relajante intestinal | 129 |
| 4.3.1.1.9. Actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos | 130 |
| 4.3.1.1.10. Actividad inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr | 132 |
| 4.3.1.2. Aproximaciones a la síntesis de sesquiterpenos agarofuranos | 134 |
| 4.3.2. Sesquiterpenos aislados de las hojas de <i>M. jelskii</i> | 137 |
| 4.3.2.1. Resultados y discusión | 139 |
| 4.3.2.2. Parte experimental | 189 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.2.2.1. Separación cromatográfica de los sesquiterpenos aislados de las hojas | 189 |
| 4.3.2.2.2. Datos físicos y espectroscópicos de los nuevos sesquiterpenos aislados de las hojas de <i>M. jelskii</i> | 190 |
| 4.3.3. Sesquiterpenos aislados de los frutos de <i>M. jelskii</i> | 211 |
| 4.3.3.1. Resultados y discusión | 213 |
| 4.3.3.2. Parte experimental | 259 |
| 4.3.3.2.1. Separación cromatográfica de los sesquiterpenos aislados de los frutos | 259 |
| 4.3.3.2.2. Datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos de los nuevos sesquiterpenos aislados de los frutos de <i>M. jelskii</i> | 260 |

5. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

5.1. Actividad antiparasitaria frente a *G. intestinalis*

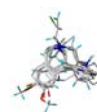
| | |
|-------------------------------|-----|
| 5.1.1. Introducción | 293 |
| 5.1.1.1 Giardiasis | 293 |
| 5.1.1.2. Epidemiología | 294 |
| 5.1.1.3. Sintomatología | 295 |
| 5.1.1.4. Tratamiento | 296 |
| 5.1.2. Resultados y discusión | 298 |




5.2. Actividad inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr

| | |
|--|-----|
| 5.2.1. Introducción | 307 |
| 5.2.1.1. Cáncer | 307 |
| 5.2.1.2. Virus y Cáncer | 309 |
| 5.2.1.3. Virus Epstein-Barr | 310 |
| 5.2.1.3.1. Ciclo vital del VEB | 312 |
| 5.2.1.3.2. Epidemiología | 313 |
| 5.2.1.3.3 Patogénesis | 314 |
| 5.2.1.3.4. Agentes quimiopreventivos: inhibición de la activación del virus Epstein-Barr | 315 |
| 5.2.2. Resultados y discusión | 317 |

6. Diseño de fármacos asistido por ordenador

| | |
|---------------------|-----|
| 6.1. Estudios QSAR | 329 |
| 6.1.1. Introducción | 329 |



| | |
|--|---|
| 6.1.2. Resultados y discusión | 331 |
| 6.2. Estudios 3D-QSAR | 336 |
| 6.2.1. Introducción | 336 |
| 6.2.1.1. Discovery Studio 2.1 | 337 |
| 6.2.2. Resultados y discusión | 339 |
| 6.2.2.1. Estudios SAR | 347 |
| 6.2.2.2. Estudios 3D-QSAR | 349 |
| 6.2.2.2.1. Modelo 3D-QSAR de sesquiterpenos como agentes quimiopreventivos | 349 |
| 6.2.2.2.2. Modelo 3D-QSAR de agentes quimiopreventivos descritos en la bibliografía química | 357 |
| 6.2.2.2.3. Comparación de los modelos 3D-QSAR obtenidos con los sesquiterpenos y los compuestos de la bibliografía | 366 |
| 7. Técnicas experimentales | |
| |  |
| 7.1. Técnicas espectroscópicas y espectrométricas | 371 |
| 7.1.1. Resonancia magnética nuclear (RMN) | 371 |
| 7.1.2. Rotación óptica ($[\alpha_D]$) | 371 |
| 7.1.3. Espectroscopía infrarroja (IR) | 372 |
| 7.1.4. Espectroscopía ultravioleta (UV) | 372 |
| 7.1.5. Dicroísmo circular (DC) | 372 |
| 7.1.6. Espectrometría de masas de baja resolución (EM) | 372 |
| 7.1.7. Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) | 372 |
| 7.2. Técnicas cromatográficas | 373 |
| 7.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF) | 373 |
| 7.2.2. Cromatografía preparativa en capa fina (CPCF) | 373 |
| 7.2.3. Cromatografía en capa fina de alta resolución (CCFAR) | 373 |
| 7.2.4. Cromatografía en columna (CC) | 374 |
| 7.2.5. Cromatografía de exclusión molecular (CEM) | 374 |
| 7.3. Programas informáticos | 374 |
| 8. Conclusiones |  |
| 9. Anexos |  |
| 9.1. Índice de productos nuevos en la bibliografía química | 381 |



1. Introducción

1. Introducción

1.1. Productos naturales

Los productos naturales se definen como sustancias químicas de bajo peso molecular, sintetizadas por los seres vivos. Estos compuestos y sus derivados han sido utilizados para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades desde el inicio de la historia¹.

La importancia de los productos naturales como fuente para el desarrollo de nuevos fármacos está avalada por datos estadísticos, planteándose en la literatura, que se estima que la probabilidad de que cada uno de ellos posea actividad farmacológica es treinta veces mayor que la probabilidad de que una sustancia sintética exhiba ese tipo de actividad. Por otro lado, existe una fuerte tendencia a nivel mundial por lograr una mayor calidad de vida, lo que ha incrementado el consumo de productos dietéticos, nutracéuticos y farmacéuticos obtenidos a partir de fuentes naturales, sobre todo en los grandes mercados internacionales (Europa, Estados Unidos, Japón, entre otros).

La investigación en productos naturales como fuente de fármacos alcanzó su máximo interés en el periodo comprendido entre 1970 y 1980, debido fundamentalmente, al impulso que le dio la industria farmacéutica a las sustancias no sintéticas. Sin embargo, en la década de los 90 se produce un descenso en la investigación de productos naturales debido, en gran medida, a los avances en la química combinatoria, la aparición de técnicas de evaluación *in vitro* de alto

¹ Phillipson, J. D. *Phytochemistry*. **2001**, 56, 237-243.

rendimiento (*High-throughput in vitro screening*), al desinterés por las enfermedades infecciosas y a los avances en la biología celular y la genómica².

A pesar de que durante los años 1980-1990 la química combinatoria aportó a la literatura gran cantidad de ejemplos de quimiotecas con cientos de nuevos compuestos, su poco éxito en la identificación de nuevas cabezas de serie, ha llevado a reconocer que el número de compuestos no determina la calidad de las quimiotecas moleculares, sino que ésta viene determinada por la diversidad y las características similares que tengan las moléculas con los fármacos actuales (*drug-likeness*), como el tamaño, la solubilidad, los heterociclos que presenten, los centros quirales, etc. Esto ha provocado un renovado interés por los productos naturales en la búsqueda de diversidad química y la obtención de nuevas cabezas de serie^{3,4}.

Los productos naturales, por tanto, constituyen un buen punto de partida para el descubrimiento de nuevos fármacos^{5,6}, ya que se pueden considerar “estructuras privilegiadas”⁷ que han sido seleccionadas por la evolución por su capacidad de interactuar con una amplia variedad de proteínas y otras dianas biológicas⁸.

En el año 2007 Newman y Cragg publicaron⁹ su tercer análisis en la búsqueda de fármacos, cubriendo el periodo 1981-2006. El análisis mostró la continua contribución de la naturaleza, no sólo como fuente de potenciales agentes quimioterapéuticos, sino también como compuestos líderes que aportaron una cierta inspiración para la semisíntesis o síntesis total de nuevos fármacos. En este análisis los fármacos fueron clasificados como:

N: productos naturales

ND: derivado de productos naturales (semisíntesis)

S: sintético

S*: compuesto sintetizado utilizando un farmacóforo de un producto natural.

² Koehn, F. E.; Carter, G. T. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 206-220.

³ Rouhi, A. M. rediscovering natural products. *Chem. Eng. News.* **2003**, *81*, 77-91.

⁴ Butler, M. S. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2141-2153.

⁵ Newman, D. J.; Cragg, G. M.; *Nat. Prod. Chem. Drug Discov.* **2010**, 3-27.

⁶ Lee, K. H. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 500-516.

⁷ Evans, B. E.; Rittle, K. E.; Bock, M. G.; Di Pardo, R. M.; Reindinger, R. M.; Whitter, W. L.; Lundel, G. F.; Veber, D. F.; Anderson, P. S.; Chang, R. S. L.; Lotti, V. J.; Hirshfield, J. J. *Med. Chem.* **1988**, *31*, 2235-2240.

⁸ Koch, M. A.; Waldmann, H. *Drug Discov. Today.* **2005**, *10*, 471-483.

⁹ Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477.

NM: mimético a un producto natural (S/NM o S*/NM)

En la figura 1.1 se muestra un análisis similar al anterior, igualmente realizado por Newman y col., pero extendido hasta octubre de 2008¹⁰.

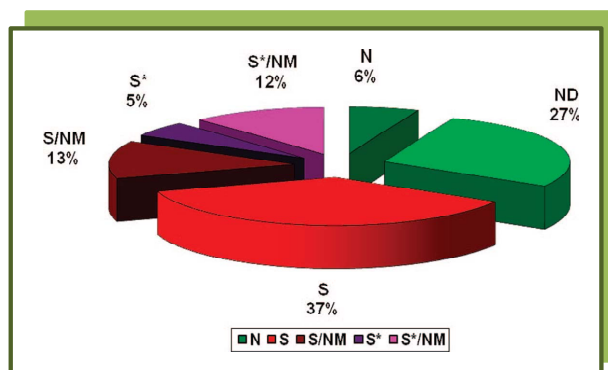


Figura 1.1. Nuevas entidades químicas (N = 1024) entre 1981-2008 (*Chem. Rev.* **2009**).

De estos datos, el 67% de los compuestos son formalmente sintéticos, pero el análisis indica que el 17% de éstos corresponden a las clases S* ó S*/NM y el 13% pertenecen al grupo S/NM. Además, desde el año 2007, los compuestos obtenidos por síntesis total siguen aportando sólo un 37% del total. Por tanto, podemos concluir de este análisis que alrededor de un 60% de las nuevas entidades químicas identificadas entre 1981 y 2008 son productos naturales, análogos semisintéticos o compuestos sintetizados basándose en sus farmacóforos, especialmente en el área del cáncer¹⁰.

El proceso de desarrollo de un fármaco es largo, costoso y conlleva un alto riesgo económico, ya que la investigación y desarrollo de un nuevo medicamento requiere una media de 12 a 24 años y un costo de unos 1,4 billones de dólares por medicamento. Además, sólo uno de cada 15 a 25 candidatos supera la evaluación de eficacia y baja toxicidad (tanto en animales como en humanos) que se requieren para su comercialización. Por otro lado, en algunos casos la inversión realizada no se recupera una vez comercializado el medicamento, debido a la gran competencia existente en el mercado.

¹⁰ Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3012-3043.

Las fases implicadas en el proceso de desarrollo de un fármaco (figura 1.2)¹¹ son las siguientes:

✓ Fase preclínica: Se evalúa la seguridad en animales: toxicidad aguda, genotoxicidad (farmacocinética y farmacodinamia).

✓ Fase I: En esta fase se realizan estudios de farmacocinética y farmacodinamia que proporcionan información preliminar sobre el efecto y la seguridad del producto en sujetos sanos, y orientarán la pauta de administración más apropiada para ensayos posteriores.

✓ Fase II: Representa el segundo estadio en la evaluación de una nueva sustancia en el ser humano. Se realiza en pacientes que padecen la enfermedad y tiene como objetivo, proporcionar información preliminar sobre la eficacia del producto y establecer la proporción dosis-respuesta.

✓ Fase III: Son ensayos destinados a evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento experimental, intentando reproducir las condiciones de uso habituales y considerando las alternativas terapéuticas disponibles en la indicación estudiada. Se realiza con una muestra de pacientes más amplia que en la fase anterior y representativa de la población general a la que irá destinado el medicamento.

✓ Fase IV: Son ensayos clínicos que se realizan con un medicamento después de su comercialización. Estos ensayos podrán ser similares a los descritos en las fases I, II y III, si estudian algún aspecto aún no valorado o condiciones de uso distintas de las autorizadas como podría ser una nueva indicación.

Actualmente, alrededor de 100 compuestos derivados de productos naturales se encuentran en las diferentes fases de desarrollo y además al menos 100 están en fase preclínica¹². La mayoría de estos compuestos derivan de plantas y microorganismos y se estudian, predominantemente, por su uso en cáncer o para enfermedades infecciosas, pero además existen otras áreas terapéuticas ampliamente estudiadas, como la inmunosupresión, enfermedades cardiovasculares, neurológicas, entre otras.

¹¹ Lombardino, J. G.; Lowe III, J. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 853-862.

¹² Harvey, A. L. *Drug Discov. Today.* **2008**, 13, 894-901.

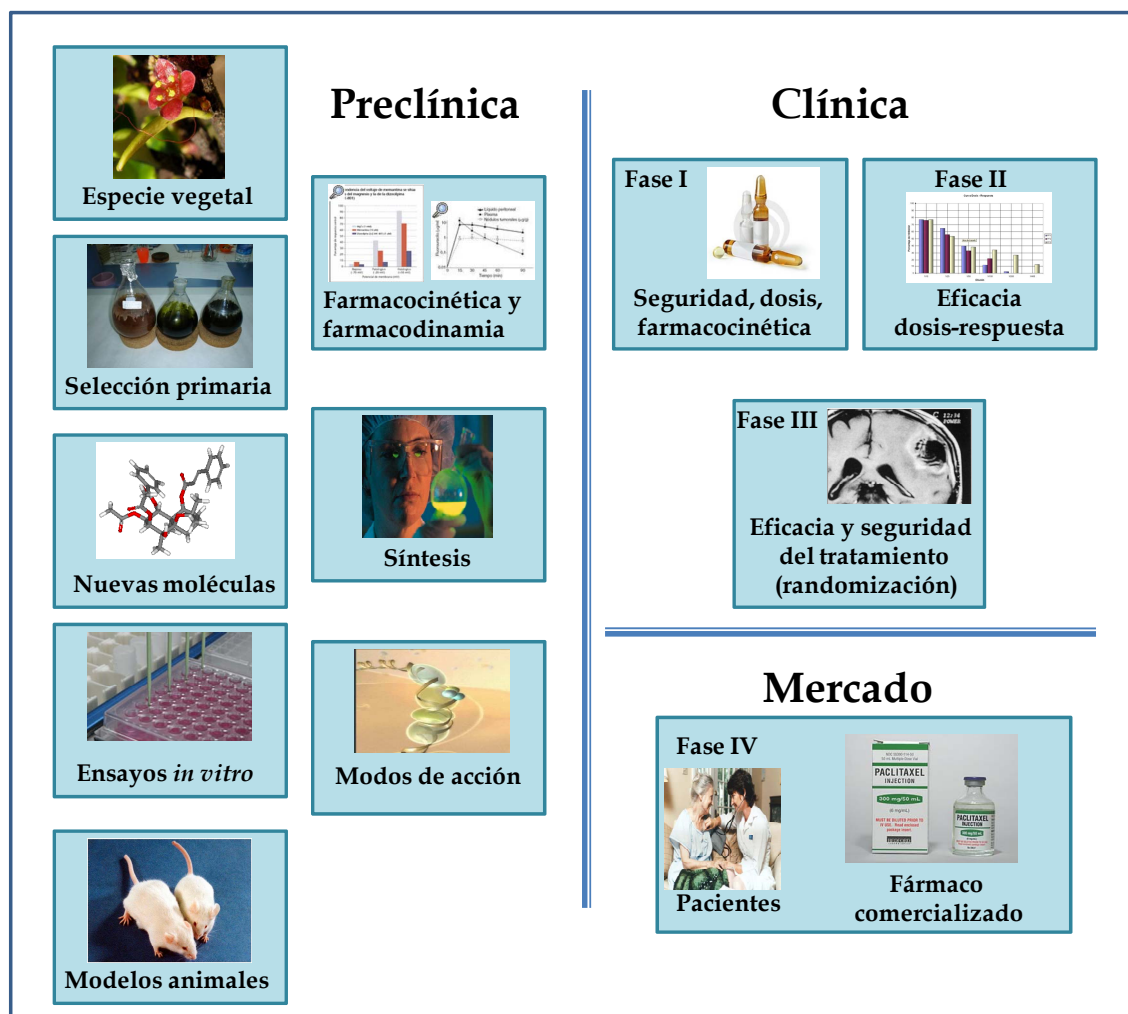


Figura 1.2. Proceso en el descubrimiento de un nuevo fármaco.

A continuación comentaremos algunos ejemplos de productos naturales o derivados que se encuentran en fase clínica, así como su aplicación terapéutica.

Como ejemplo de derivados de productos naturales de plantas que se encuentran en fase clínica para el tratamiento de las enfermedades infecciosas y parasitarias, que son la segunda causa de muerte en el mundo llegando a 15 millones de fallecidos cada año, podemos citar (figura 1.3):

- **Artemisona (BAY 44-9585)** es un derivado semisintético de la artemisina, aislada por primera vez en 1971 de *Artemisia annua* (Asteraceae), una planta nativa de China. El desarrollo clínico y preclínico de Artemisona se ha hecho en colaboración con Medicines from Malaria Venture (MMV), Mahidol University Bangkok y Bayer AG, para el tratamiento de infecciones causadas por *Plasmodium falciparum*.

- **Calanolida A**, una cumarina, aislada de los frutos y ramas del árbol *Calophyllum lanigerum* var. *Astrocoriaem* (Guttiferae), que ha sido desarrollada por la farmacéutica Sarwak Medichem Pharmaceutical y se encuentra en fase II para el tratamiento del VIH. Además, posee actividad frente a cepas de *Micobacterium tuberculosis*, lo que podría resultar prometedor para el tratamiento de pacientes que presentan co-infección, tanto del VIH como de tuberculosis.

- **PA-457 (Bevirimat)**, el ácido 3-O-(3',3'-dimetil-succinil)-betulínico, aislado de las hojas de *Syzygium claviflorum* (Mirtaceae) es un derivado semisintético del triterpeno de la serie del lupano, el ácido betulínico, frecuente en especies de la familia Celastraceae. Éste ha sido desarrollado por la casa farmacéutica Panacos como antiviral, encontrándose en fase II. PA-457 es una clase de fármaco anti-retroviral con un nuevo mecanismo de acción.

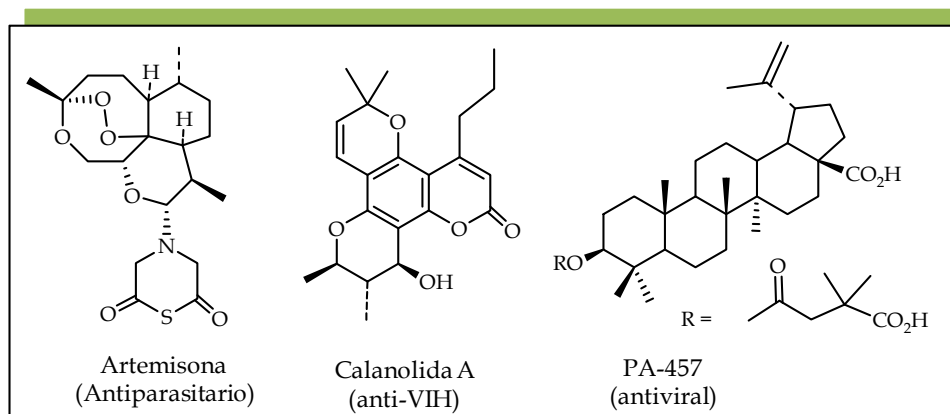


Figura 1.3. Ejemplos de derivados de productos naturales en fase clínica.

Algunos ejemplos de fármacos derivados de plantas presentes en la categoría de analgésicos y para el tratamiento de enfermedades neurológicas, tales como la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson, las migrañas o la esclerosis múltiple, se nombran a continuación (figura 1.4):

- **DA-5018** en fase II, es un análogo sintético de la capsaicina, aislada de numerosas especies del género *Capsicum* (Solanaceae) y desarrollado como analgésico no narcótico.

- **Dexanabinol**, un dextrocannabinoide desarrollado por la farmacéutica Pharmos, es un neuroprotector no psicotrópico que se encuentra en ensayos clínicos en fase III para el tratamiento de daños traumáticos cerebrales.

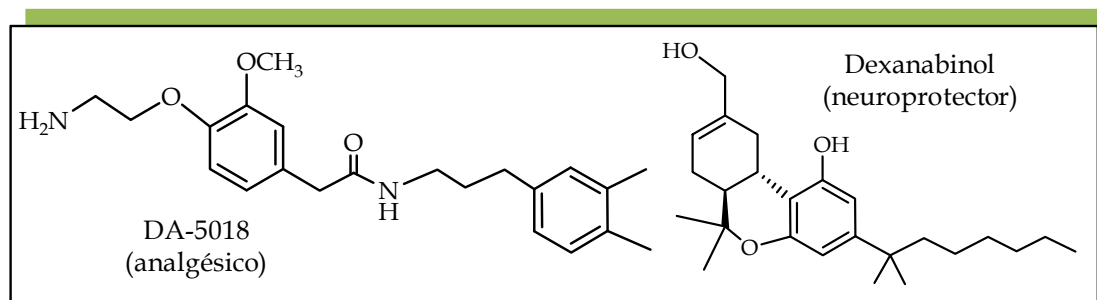


Figura 1.4. Ejemplos de derivados de productos naturales en fase clínica.

Existen actualmente fármacos en estudio clínico para minimizar enfermedades metabólicas como la diabetes o enfermedades cardiovasculares, constituyendo estas últimas la primera causa de mortalidad en el mundo. Entre estos fármacos podemos citar:

- **P-57 (P-57-AS3)** es un glicósido esteroidal que se encuentra en el extracto de *Hoodia gordonii* (Asclepiadaceae), tradicionalmente usada en el desierto de Kalahari para evitar la sensación de hambre y sed. P-57 es un estimulante de la saciedad, desarrollado por Phytopharm y Unilever para el tratamiento oral de la obesidad. Actualmente se encuentra en fase clínica II (figura 1.5).

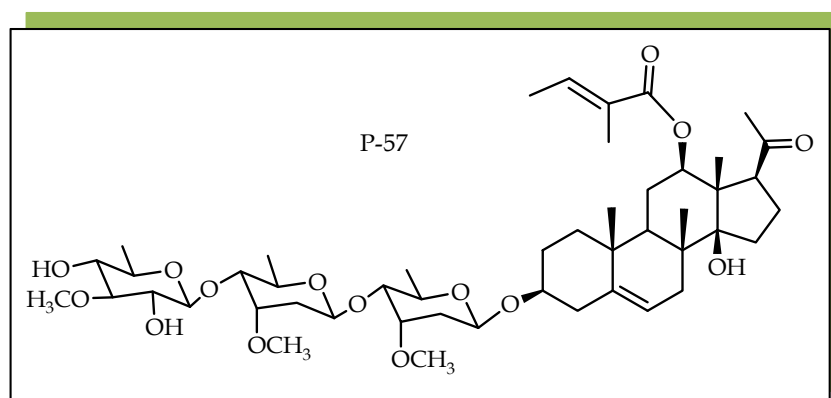


Figura 1.5. Ejemplo de un derivado de producto natural para el tratamiento de enfermedades metabólicas.

Los compuestos derivados de plantas han jugado un papel fundamental en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Debemos tener en cuenta que alrededor de 7,9 millones de muertes en el año 2007 fueron a causa de esta enfermedad y se espera que esta cifra aumente a 11,5 millones de muertes en el año 2030¹³. Así, como ejemplos de productos naturales con potencial anticancerígeno podemos citar

¹³ <http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>

al Taxol¹⁴, la Camptotecina¹⁵ o los alcaloides de la Vinca¹⁶ (vinblastina y vincristina). Actualmente existen muchos otros compuestos derivados de plantas que están en fase clínica¹⁰.

| Ejemplo de fármacos anticancerígenos basados en productos naturales en fase clínica ¹⁷ | | | |
|---|--------------|--|---|
| Nombre | Fase clínica | Farmacéutica | Referencia |
| ABI-007 (suspensión) | Fase III | American Biosciences | <i>J. Nat. Prod.</i> 2004 , 67, 232-244 |
| DHA-paclitaxel | Fase III | Luitpold | http://www.luitpold.com |
| Diflomotecan (BN-80915) 100 | Fase II | Ipsen | <i>Nat. Prod. Rep.</i> 2005 , 22, 162-195 |
| Gimatecan (ST-1481) | Fase II | Novartis/Sigma-Tau | <i>Nat. Prod. Rep.</i> 2005 , 22, 162-195 |
| Sulfato de vincristina TCS (OncoTCS)/Marqibo | Fase III | Enzon Pharmaceuticals/Inex Pharmaceuticals/Hann a Biosciences | <i>Oncol. Issues.</i> 2007 , 34-39 |
| Bruceantina | Fase II | Nacional Cancer Institute | <i>Curr. Opin. Pharmacol.</i> 2001 , 1, 364-369 |
| Roscovitina (CYC 202) | Fase II | Cyclacel | http://www.cyclacel.com |

Los datos mencionados nos indican que los productos naturales constituyen una parte primordial en el desarrollo de nuevos fármacos. Además, debido a la pérdida acelerada de biodiversidad y a la necesidad de nuevos agentes para curar enfermedades que no tienen el tratamiento adecuado (parasitarias, cáncer, infecciones resistentes...), hace que la investigación en productos naturales aislados de plantas superiores siga resultando prioritario.¹⁸

¹⁴ Wani, M. C. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 2325-2327.

¹⁵ Wall, M. E. *Med. Res. Rev.* **1998**, 18, 299-314.

¹⁶ Johnson, I. S. *et al.* *Cancer. Res.* **1963**, 23, 1390.

¹⁷ Saklani, A.; Kutty, S. K. *Drug Discov. Today.* **2008**, 13, 161-171.

¹⁸ Balunas, J. M.; Kinghorn, K. *Life Sciences.* **2005**, 78, 431-441.

1.2. Familia Celastraceae

La familia Celastraceae se conoce como “familia agridulce” (*bittersweet*) y está constituida por plantas trepadoras de hojas en general persistentes o caducas. Generalmente, poseen flores pequeñas, verdosas o blancas, actinomorfas, en general hermafroditas, a veces unisexuales por aborto; cáliz y corola tetrámeras o pentámeras; ovario de 4 a 5 compartimentos, en cada uno con 1 ó 2 sedimentos seminales generalmente ortótropos; fruto en cápsulas o bayas y semillas rodeadas por lo común de un tejido carnososo, tal vez procedente del tegumento.

Esta familia consta de 92 géneros y 1350 especies y presenta una distribución subcosmopolita, ya que sus especies se desarrollan preferentemente en todas las zonas tropicales y subtropicales del mundo, con irradiación hacia climas templados o templado-fríos, con ausencia en las regiones árticas; así, esta familia presenta una distribución pantropical (figura 1.6). Los géneros más representativos^{19,20} son *Maytenus* (388 especies), *Euonymus* (414 especies), *Cassine* (121 especies) y *Celastrus* (330 especies)²¹.

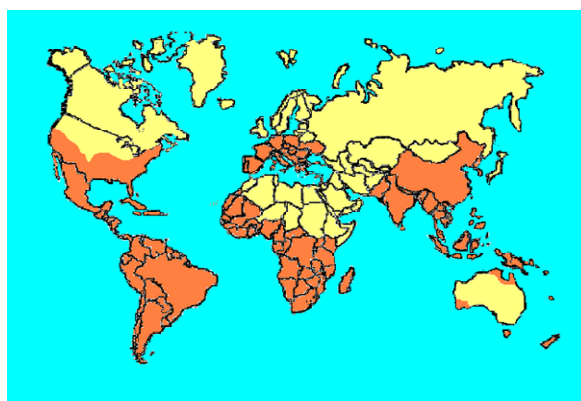


Figura 1.6. Distribución geográfica de las especies de la familia Celastraceae.

La clasificación botánica de esta familia ha experimentado cambios debido a las hibridaciones²². Así, el género *Maytenus* incluye, las especies antiguamente incluidas en *Gymnosporia* y algunas especies de *Rhacoma* hoy día están incluidas en

¹⁹ Woodland, D. W. *Contemporary Plant Systematics*; Prentice-Hall, New Jersey, 1991.

²⁰ Heywood, V. H. *Flowering Plants of the World*; Oxford University Press, New York, 1993.

²¹ Benedí, C. (ed.). 1997, Celastraceae. Pp. 175-181 En Castroviejo, S.; Aedo, C.; Benedí, C; Laínz, M.; Muñoz, G. F.; Nieto, F. G.; Paiva, J. Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. VIII: Haloragaceae-Euphorbiaceae. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid, 375.

²² Brüning, R.; Wagner, H. *Phytochemistry*, 1978, 17, 1821-1858.

el género *Crossopetalum*, lo que ha dado lugar a que muchas especies tengan varios sinónimos.

Clasificación taxonómica de la familia Celastraceae

| | |
|--------------|------------------------------|
| División: | Spermathophyta |
| Subdivisión: | Magnoliophyta (Angiospermas) |
| Clase: | Manoliatae |
| Subclase: | Rosidae |
| Suborden: | Celastranae |
| Orden: | Celastrales |
| Familia: | Celastraceae |

Usos etnobotánicos de las celastráceas

Numerosas especies de la familia Celastraceae son conocidas por su uso en la medicina tradicional en todo el mundo, siendo una fuente de importantes metabolitos secundarios bioactivos. A continuación, se citan los ejemplos más significativos, centrándonos fundamentalmente en el género *Maytenus*.

En primer lugar es necesario citar el uso en Asia de *Tripterygium wilfordii*, conocida comúnmente en China como “lei gong teng”, sin lugar a dudas, la especie más estudiada y de la que se han aislado mayor número de principios activos²³. Las raíces molidas de esta especie se han usado en China durante siglos por sus propiedades insecticidas²⁴ y estudios llevados a cabo para



identificar los principios activos de ésta y otras especies con propiedades insecticidas, condujeron al aislamiento del alcaloide wilfordina y el triterpeno celastrol²⁵. En 1972, Kupchan y col. aislaron, de las raíces de esta especie, los nuevos

²³ Brinker, A. M.; Ma, J.; Lipski, P. E.; Raskin, I. *Phytochemistry*, **2007**, 68, 732-766.

²⁴ Chou, T. Q.; Mei, P. F. *J. Physiol.* **1936**, 10, 529-534.

²⁵ Beroza, M. J. *Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 2136-2138.

diterpenos triepoxídicos, **triptolida**, triptiolida y triptonida con una potente actividad antileucémica²⁶.

Por otra parte, extractos crudos y extractos refinados de *T. wilfordii* se están usando en clínica para el tratamiento de la artritis reumatoide, espondolitis anquilosante, enfermedades autoinmunes y diversas afecciones dérmicas.²⁷ Además, existen patentes sobre el uso de la raíz seca de esta especie como antitumoral y de la actividad del extracto clorofórmico como inmunosupresor y antiinflamatorio²⁸.



Centrándonos en el género *Maytenus*, podemos citar en primer lugar a *Maytenus senegalensis*, conocida comúnmente como “bademi”, que posee numerosos usos en la medicina tradicional. Así, las hojas pulverizadas y bebidas en jugo de leche son usadas como vermífugo; la corteza machacada y mezclada con agua posee propiedades anticancerígenas, antiparasitarias y antisépticas²⁹.

Otro ejemplo del género *Maytenus* es la especie conocida como “chuchuhuasca” (*Maytenus chuchuhuasca*³⁰). Esta planta es utilizada por los indígenas para el tratamiento del reumatismo y como afrodisíaco. De forma tópica, es empleado como antitumoral en el cáncer de piel y para combatir la soriasis. En los últimos años se ha ampliado de forma considerable la bibliografía sobre la “chuchuhuasca” y



²⁶ Kupchan, S. M.; Court, W. A.; Dailey, J. R.; Gilmore, C. J.; Bryan, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 7194-7195.

²⁷ Wang, X. W.; Xie, H. *Drugs of the Future.* **1999**, *24*, 991-997.

²⁸ Zheng, J. R.; Fang, J. L.; Gu, K. X.; Yin, Y. Q.; Xu, L. F.; Gao, J. W.; Yu, Y. H.; Sun, H. Z. *Acta Acad. Med. Sin.* **1987**, *9*, 323-328.

²⁹ González, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Moujir, L.; Jiménez, I. A. *Studies in Natural Products Chemistry, Bioactive Natural Products*; Vol 23. Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier, Amsterdam. **2000**, *23*, 649-738.

³⁰ Colas, R. *Les Plantes amazoniennes designées sous le nom de “Chuchuhuasca”*. These Imprimerie André Lesot; París, **1937**.

diversas especies del género *Maytenus* han recibido este nombre (*M. chuchuhuasca*, *M. krukovii*, *M. colassi* y *M. laevis*)³¹.

Maytenus ilicifolia (congorosa) es bien conocida por sus aplicaciones en la medicina tradicional, para el tratamiento de la gastritis, dispepsias y las úlceras gastrointestinales³². Esta última es la que mayor atención recibió desde el punto de vista farmacológico por parte de los científicos y en la actualidad existe suficiente información clínica y pre-clínica que permite suponer que la congorosa es un agente antiulceroso de probada eficacia y seguridad terapéutica.



Como representante de la familia en las Islas Canarias se encuentra *Maytenus canariensis*, arbusto de ambiente termófilo, que recibe el nombre local de “peralillo”. Los agricultores y pastores lo usan como estimulante suave, mascando sus hojas para aliviar la fatiga. Sus frutos machacados se utilizan externamente para rebajar tumoraciones en la piel y abscesos cutáneos y la infusión de sus hojas contra el reuma³³.

Otras especies de *Maytenus* que podemos citar por sus usos en la medicina tradicional son:

- *Maytenus acuminata* (raíces) y *Maytenus aquifolium* (hojas): dolencias de estómago y úlceras.
- *M. blepharodes* (ramas): fiebre y malaria
- *M. boaria* (parte aérea): erupciones de la piel
- *M. ebenifolia* (corteza): alucinógena
- *M. emarginata* (frutos): purificar la sangre
- *M. heterophylla* (hojas): dismenorrea

³¹ González, J. G. Delle Monache, G.; Delle Monache, F.; Marini-Bettolo, G. B. J. *Ethnopharmacol.* **1982**, 5, 73-77.

³² Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. **2007**, 6 (1), 11-22.

³³ Otero, J. *Nuestras hierbas medicinales*; Caja Insular de Ahorros, Santa Cruz de Tenerife, **1984**.

- *M. obscura* (hojas): cáncer
- *M. peduncularis* (raíz): dolor de espalda
- *M. vitisidaea* (hojas): diarrea, infecciones urinarias
- *M. cuneifolia* (raíz): enfermedades venéreas

Metabolitos secundarios aislados de la familia Celastraceae

De celastráceas se han aislado una gran variedad de metabolitos secundarios, destacando los terpenoides y glucósidos cardiotónicos, los cuales presentan una amplia gama de actividades biológicas^{29,34}. El grupo más numeroso de compuestos bioactivos de esta familia son los terpenoides, dentro de los cuales se encuentran los **celastroloides** y los **sesquiterpenos dihidro-β-agarofuranos**, que son considerados indicadores quimiotaxonómicos de esta familia (figura 1.7).

Los celastroloides son un grupo pequeño de metabolitos que están restringidos a las raíces de las especies de esta familia y que engloba a los nortriterpenometilénquinonas, los derivados fenólicos y los dímeros y trímeros triterpénicos. A este tipo de metabolitos, especialmente a los nor-triterpenos se les atribuye un gran número de actividades biológicas. Así, por ejemplo la **tingenona**, presenta actividad citotóxica frente a las líneas celulares Hep-G2, H-4-II y SK-Mel-28 con CI₅₀ de 1,9, 2,7 y 1,7 μM, respectivamente³⁵ y actividad antimicrobiana frente a diferentes bacterias³⁶. El **celastrol** es otro compuesto prometedor como antiinflamatorio en modelos animales³⁷, para el tratamiento de enfermedades como la artritis, lupus y el Alzheimer. Además, el celastrol ha presentado buenos resultados como antiproliferativo en numerosas líneas celulares. La efectividad en un modelo animal³⁸ y la eficacia terapéutica en un ensayo doble ciego³⁹ en pacientes que padecían artritis reumatoide, estimularon los estudios dirigidos a una aplicación clínica. En la actualidad, el celastrol se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento de esta enfermedad. Cabe destacar, que, además, ha sido

³⁴ Spivey, A.; Weston, M.; Woodhead, S. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 43-59.

³⁵ Setzer, W. N.; Holland, M. T.; Bozeman, C. A.; Rozmus, G. F.; Setzer, M. C.; Moriarity, D. M.; Reeb, S.; Vogler, B.; Bates, R. B.; Haber, W. A. *Planta Med.* **2001**, *67*, 65-69.

³⁶ Sotanaphun, U.; Lipipum, V.; Suttisri, R.; Bavovada, R. *Planta Med.* **1999**, *65*, 450-452.

³⁷ Paris, D.; Patel, N.; Quadros, A.; Linan, M.; Bakshi, P.; Ait-Ghezala, G.; Mullan, M. *Neuroscience letters.* **2007**, *415*, 11-16.

³⁸ Li, H.; Jia, Y. F.; Pan, Y.; Pan, D. J.; Li, D.; Zhang, L. X. *Acta Pharmacol. Sin.* **1997**, *18*, 270-273.

³⁹ Tao, X.; Younger, J.; Fan, F. Z.; Wang, B.; Lipsky, P. E. *Arthritis and Rheumatism.* **2002**, *46*, 1735-1743.

seleccionado como un ejemplo que pone de manifiesto el hecho de que la medicina tradicional sigue siendo la mejor alternativa en la búsqueda de principios activos con potencial terapéutico^{40,41}.

Los sesquiterpenos y alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano presentan una amplia gama de actividades biológicas entre las que destacan la insecticida y antialimentaria⁴², revertidora de la multirresistencia a fármacos⁴³ e inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr^{44,45}, así como actividad anti-VIH⁴⁶, entre otras. Este tipo de compuestos son considerados “estructuras privilegiadas”, dada sus características estructurales y el amplio espectro de actividades que presentan^{34,47}.

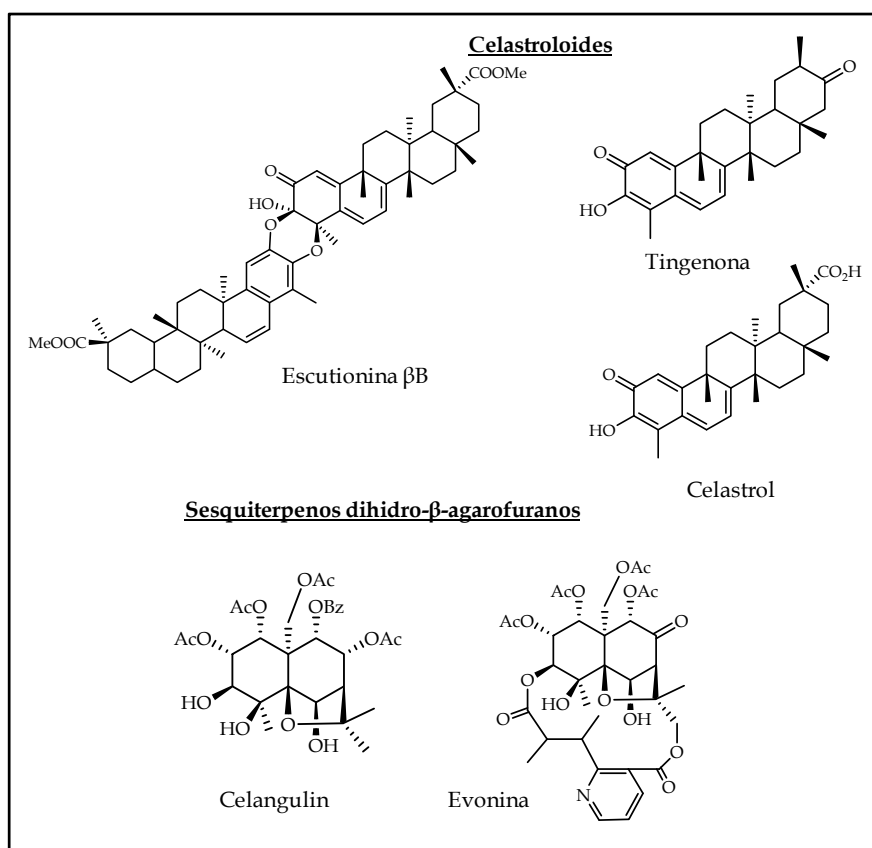


Figura 1.7. Ejemplos de celastroloides y sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos.

⁴⁰ Corson, T. W.; Crews, C. M. *Cell*. **2007**, *130*, 769-774.

⁴¹ Kim, D. H.; Shin, E. K.; Kim, Y. H.; Lee, B. W.; Jun, J. G.; Park, J. H. Y.; Kim, J. K. *European Journal Clinical Investigation*. **2010**, *39*, 819-827.

⁴² Núñez, M. J.; Guadaño, A.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; González-Coloma, A.; Bazzocchi, I. L. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 14-18.

⁴³ Torres-Romero, D.; Muñoz-Martinez, F.; Jiménez, I. A.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Bazzocchi, I. L. *Org & Biomol Chem.* **2009**, *7*, 5166-5172.

⁴⁴ Mendoza, C.; Jiménez, I. A.; Tokuda, H.; Kushida, H.; Bazzocchi, I. L. *Chem. Biodivers.*, **2005**, *2*, 286-294.

⁴⁵ Perestelo, N. R.; Jiménez, I. A.; Tokuda, H.; Hayashi, H.; Bazzocchi, I. L. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 127-132.

⁴⁶ Duan, H.; Takaishi, Y.; Bando, M.; Kido, M.; Imakura, Y.; Lee, K. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 357-361.

⁴⁷ Gao, J. M.; Wu, W. J.; Zhag, J. W.; Konishi, Y. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1153-1189.

Los **diterpenos** son poco frecuentes en esta familia, sin embargo, se han aislado con esqueleto de isopimarano, abietano y abietatrieno. Estos últimos, poseen estructuras muy oxidadas como la **triptolida**, un triepóxido aislado de las raíces de *Tripterigyum wilfordii*, especie usada en China para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Un derivado semisintético de la triptolida, la sal sódica de la 14-succinil-triptolida (PG490-88), que se encuentra en ensayos clínicos, ejerce un efecto antiproliferativo y proapoptótico en células epiteliales prostáticas humanas, así como regresión tumoral de colon y esófago^{40,48} (figura 1.8). Actualmente, la triptolida se ha descrito como un potente antitumoral, presentándose como un inhibidor de la angiogénesis en varios ensayos⁴⁹.

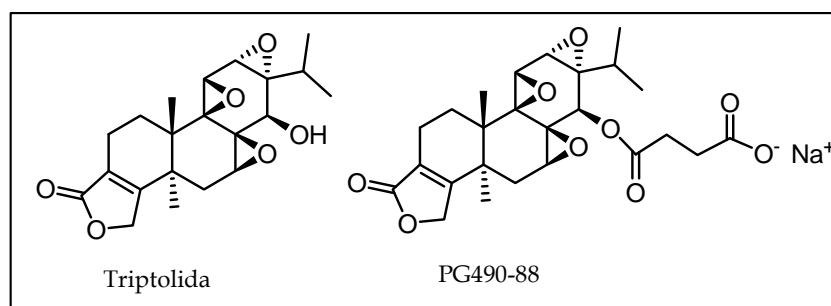


Figura 1.8. Ejemplos de diterpenos de celastráceas.

⁴⁸ Chin, Y. W.; Balunas, M. J.; Chai, H. B.; Kinghorn, A. D. *The AAPS Journal*. **2006**, *8*, 239.

⁴⁹ He, M. F.; Huang, Y. H.; Wu, L. W.; Ge, W.; Shaw, P. C.; But, P. P. H. *Int. J. Cancer*. **2010**, *126*, 166-178.



2. Objetivos

2. Objetivos

Una de las fuentes más importantes en la búsqueda de moléculas bioactivas son las plantas que crecen en los bosques tropicales. En particular, América Latina posee una gran diversidad etnobotánica, basada en la interacción de la diversidad biológica y cultural, lo que se manifiesta en el extenso uso tradicional de las plantas con fines medicinales por los diferentes grupos étnicos americanos.

Entre las plantas superiores la familia Celastraceae fue reconocida por la FDA (*Food Drugs Administration*) como una de las más prometedoras para su estudio, dada su amplia distribución botánica, naturaleza química y complejidad de sus metabolitos y fundamentalmente por las actividades farmacológicas de sus especies.

En el curso de las investigaciones realizadas en especies de esta familia, se han aislado numerosos metabolitos secundarios biológicamente activos como triterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, entre otros, con actividad antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatoria, antialimentaria e insecticida, antiviral (anti-VIH), quimiopreventiva y revertidora de la multirresistencia a fármacos.

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

- ✓ Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios del extracto etanólico de las **hojas** de *Maytenus jelskii* Zahlbruchner y de los extractos *n*-hexano:éter dietílico (1:1) de la **corteza de la raíz** y de los **frutos** de la misma especie.

- ✓ Estudio de la actividad inhibidora de la activación del **virus Epstein Barr** de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de las hojas y los frutos de *M. jelskii*, en la búsqueda de potenciales agentes quimiopreventivos.
- ✓ Estudios de relación estructura-actividad (SAR) y desarrollo de un **modelo 3D-QSAR** de **sesquiterpenos** aislados de celastráceas como inhibidores de la activación del virus Epstein Barr.
- ✓ **Revisión bibliográfica** de compuestos de origen natural con actividad inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr y desarrollo de un modelo 3D-QSAR.
- ✓ Evaluación y estudios QSAR de dímeros y trímeros triterpénicos aislados de celastráceas, como potenciales agentes terapéuticos en el tratamiento de la Giardiasis.
- ✓ Estudio de las cuestiones que se susciten a lo largo de la investigación.



3. Descripción botánica, recolección, extracción y fraccionamiento cromatográfico

3. Descripción botánica, recolección, extracción y fraccionamiento cromatográfico de *Maytenus jelskii* Zahlbruchner.

3.1. Descripción botánica.

- Género *Maytenus*

El género *Maytenus* fue descrito en una obra pre-Linneo por Feuillée bajo el nombre de "maitén" basándose en la especie *Maytenus boaria*. Posteriormente, fue Molina en 1972 quien describió esta especie, no obstante cometió algunos errores morfológicos, lo que motivó que algunos botánicos confundieran su descripción ubicándola en otras familias o creando otros géneros. Se encuentran aproximadamente 388 especies de este género, desde los trópicos a climas cálidos.

Este género presenta como caracteres taxonómicos ser árboles o arbustos con hojas alternas, enteras o dentadas y pequeñas estípulas deciduas. Inflorescencias racemosas, mimoso-paniculadas o fasciculadas; flores principalmente en 5 partes, de blancas a verde amarillentas o a veces rojizas, pétalos imbricados en la prefloración; ovario confluyente con el disco anular-aplanado, 2 celdas con 1 ó 2 óvulos por celda. Fruto capsular ovoide, 2 ó 3(4) celdas, principalmente 1 semilla, de amarilla a anaranjada con un arilo blanco.

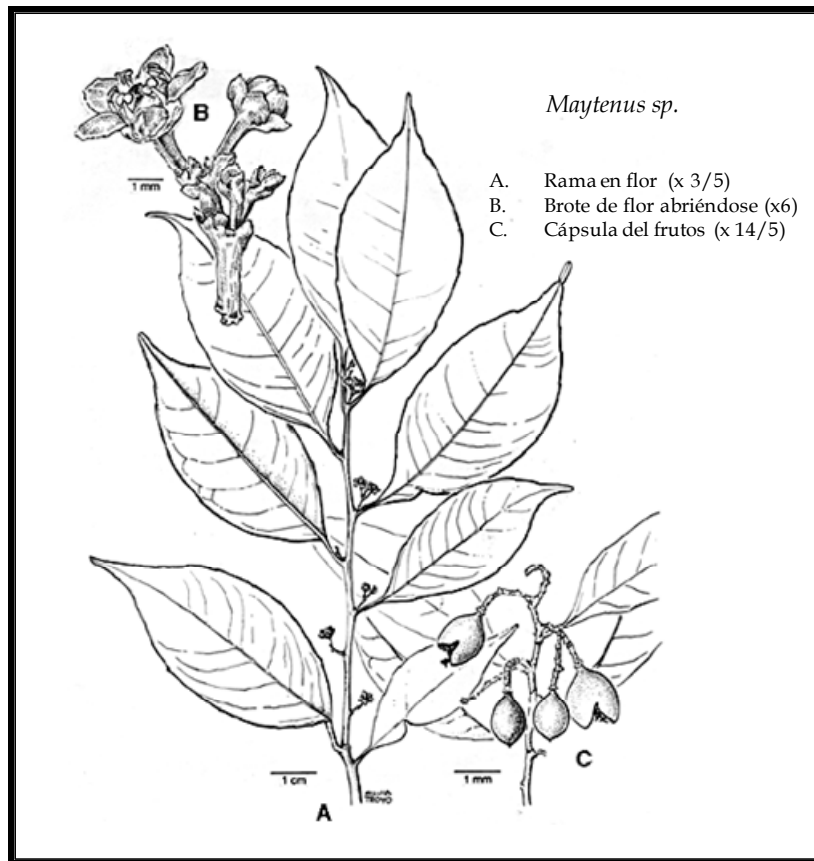


Figura 3.1. Características taxonómicas del género *Maytenus*.

- *Maytenus jelskii* Zahlbruchner

Arbusto o arbolillo de 2 a 4 metros de altura, propio de los bosques montanos andinos, crece en suelos pedregosos entre altitudes de 2700 a 3300 metros de altitud, ramoso de hojas con disposición alterna cortamente pecioladas, coriáceas de borde entero, de base y ápice agudos, sin estípula; flores inconspicuas verdosas axilares, de cáliz con 5 sépalos unidos en la base, corola de 5 pétalos libres en el ápice y coalescentes en la base; androceo con 5 estambres cortos insertos en un disco conspicuo alternos con los pétalos; ovario súpero embebido en el disco 2-4 locular, estilo corto con estigma lobado; el fruto es una cápsula loculicida dehiscente que se abre por 3 valvas bilobadas y contienen por lo común de 2 a 3 semillas de arilo anaranjado.

- Posición Sistemática

| | |
|-------------------|--------------------------------------|
| División | Spermathophyta |
| Subdivisión | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliatae |
| Subclase | Rosidae |
| Superorden | Celastranae |
| Orden | Celastrales |
| Familia | Celastraceae |
| Género | <i>Maytenus</i> |
| Especie | <i>Maytenus jelskii</i> |
| Nombre científico | <i>Maytenus jelskii</i> Zahlbruchner |

- Distribución : La especie *Maytenus jelskii* se encuentra en zonas de Bolivia, Perú y Ecuador.



Figura 3.2. Mapa de distribución de *Maytenus jelskii*.

3.2 Recolección

La especie fue **recolectada** en diciembre de 1998 (hojas) y posteriormente en el año 2006 (raíz y frutos) en la Comunidad de Huayllobamba-Urguillos, provincia de Urubamba, Cusco, Perú, a 3200 metros de altitud. La recolección fue llevada a cabo por el profesor Alfredo Tupayachi Herrera y un espécimen se encuentra

depositado en el Missouri Botanical Garden Herbarium (Voucher referencia: CUZ 29845).

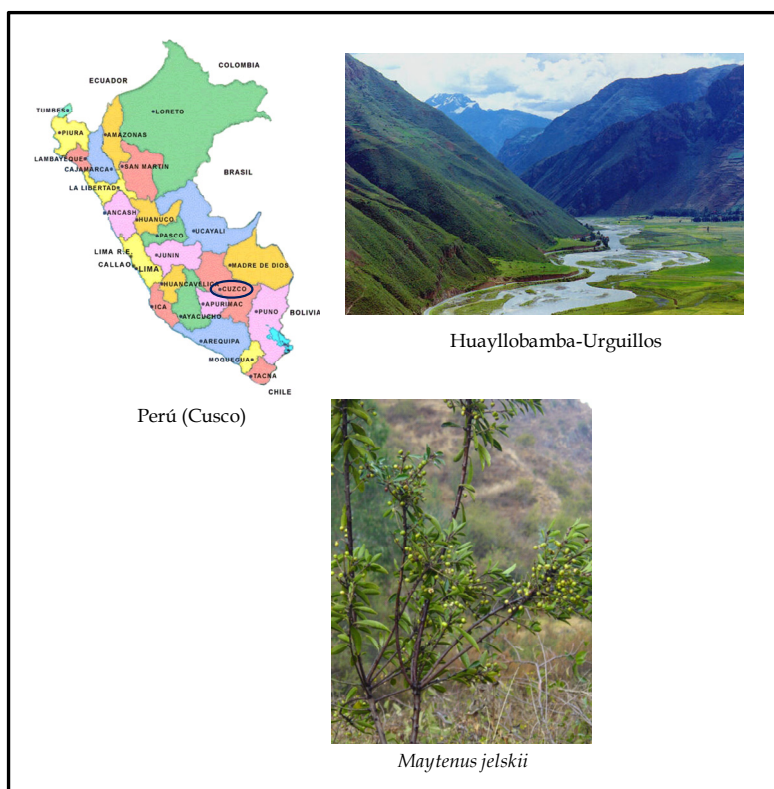


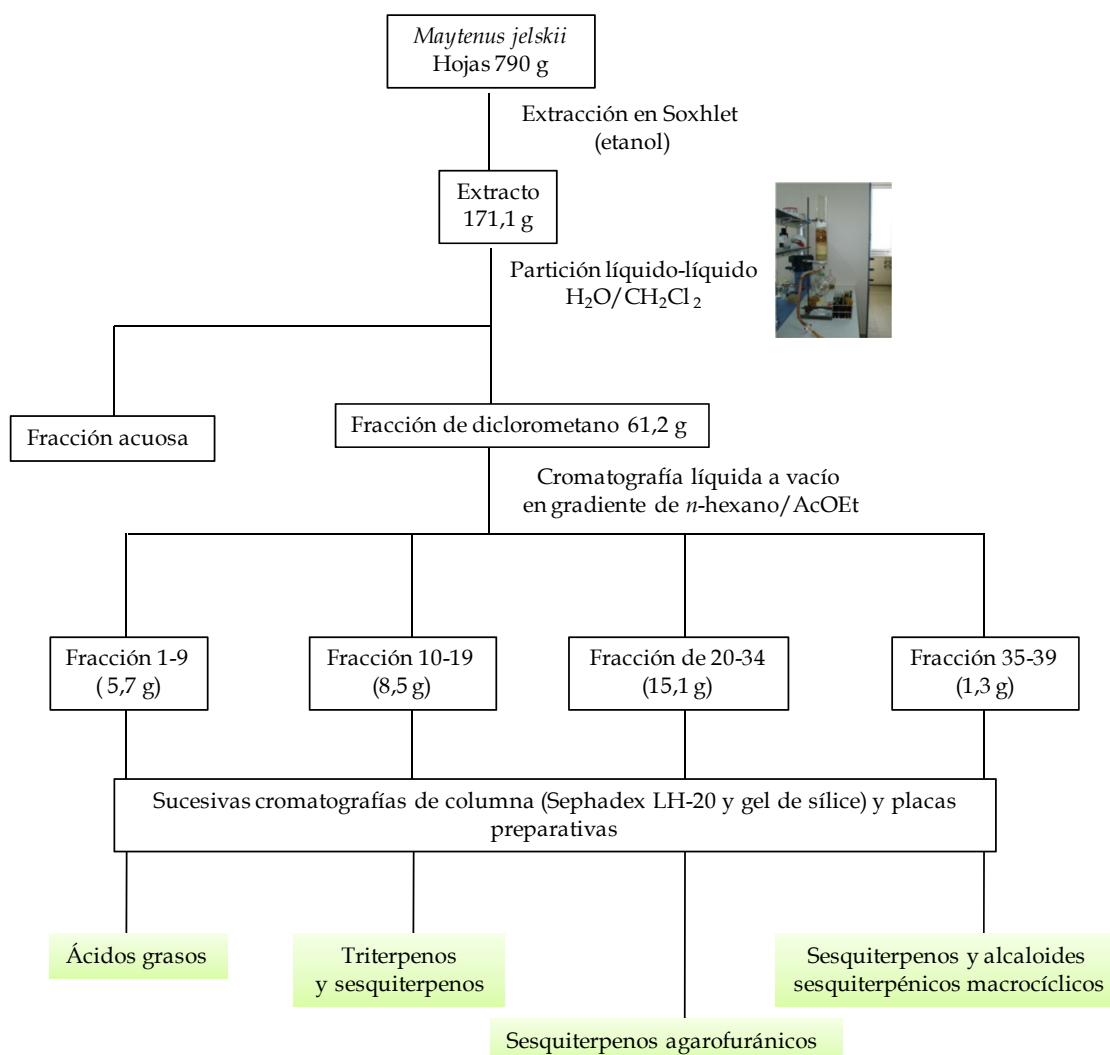
Figura 3.3. Zona de recolección e imagen de *Maytenus jelskii*.

3.3. Extracción y fraccionamiento cromatográfico.

3.3.1. Hojas

La hojas de *Maytenus jelskii* (790 g) se extrajeron a reflujo con etanol en un Soxhlet hasta agotamiento, obteniéndose tras evaporación del disolvente 171,1 g de extracto etanólico. El extracto etanólico se suspendió en agua y se extrajo cuatro veces con diclorometano dando lugar, al evaporar el disolvente, a 61,2 g de fracción orgánica. La fracción de diclorometano (61,2 g) se fraccionó, posteriormente, mediante cromatografía líquida a vacío sobre gel de sílice, usando como eluyente una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo de polaridad creciente.

Así, de manera general, se obtuvieron alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos, sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos y triterpenos (esquema 3.1). En la parte experimental de cada uno de los capítulos de la presente Memoria, se detalla la clase de metabolito y las cantidades aisladas.

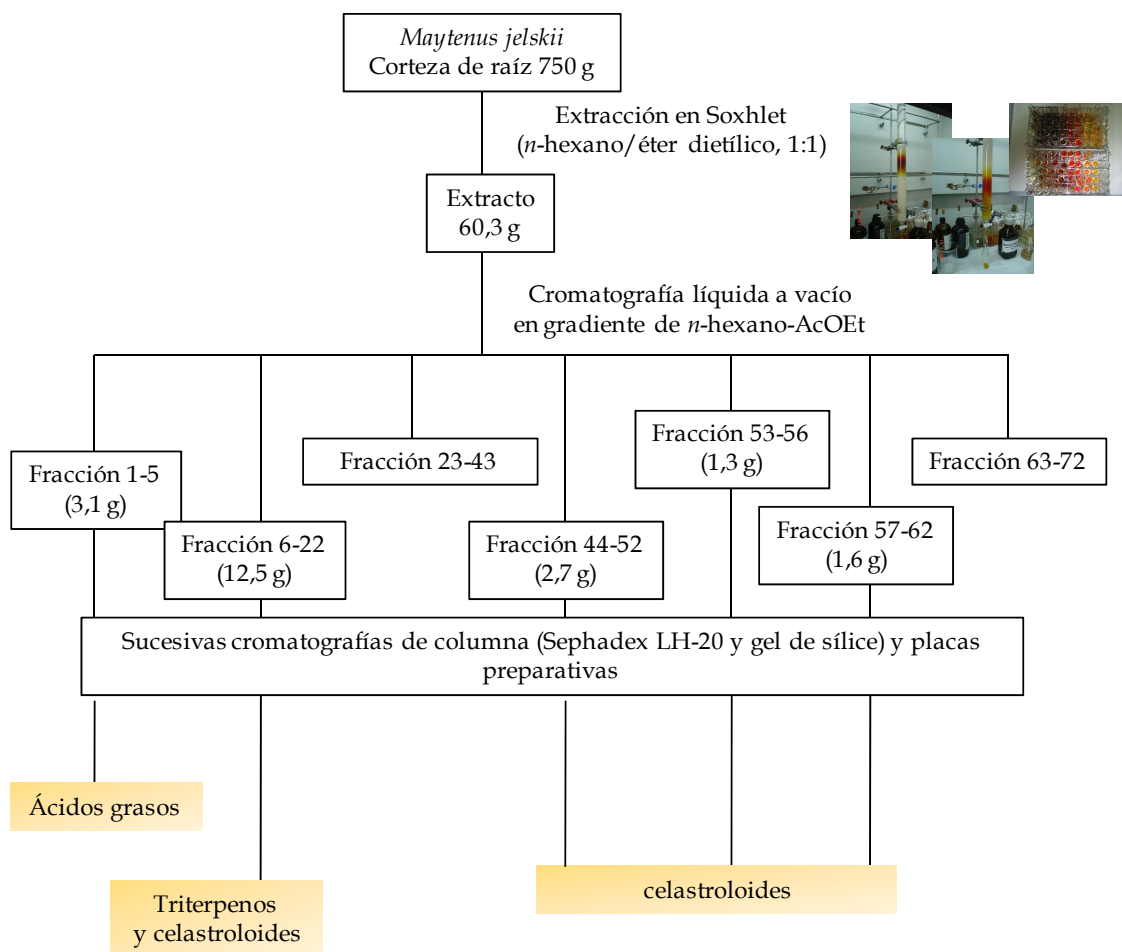


Esquema 3.1. Separación cromatográfica de los metabolitos secundarios de las hojas de *Maytenus jelskii*.

3.3.2. Corteza de raíz

La corteza de las raíces (750 gramos), finamente divididas, se extrajeron con una mezcla de *n*-hexano/éter dietílico (1:1) en un equipo Soxhlet a reflujo durante 48 horas, obteniéndose 60,3 gramos de un extracto de color rojizo. El extracto se fraccionó, posteriormente, sobre una columna de Sephadex LH-20, usando como eluyente *n*-hexano-cloroformo-metanol (2:1:1). Se recogieron 72 fracciones que se reunieron en grupos de acuerdo con la similitud presentada en cromatografía en capa fina. Los diferentes grupos se sometieron a sucesivas cromatografías sobre gel de sílice en columnas y placas preparativas, usando como eluyente mezclas de *n*-hexano, acetato de etilo, acetona, diclorometano, éter dietílico y dioxano. Así, de manera general, se obtuvieron triterpenos y celastrolídeos. En la parte experimental

de cada uno de los capítulos de la presente Memoria, se detalla el tipo de metabolito y las cantidades aisladas.

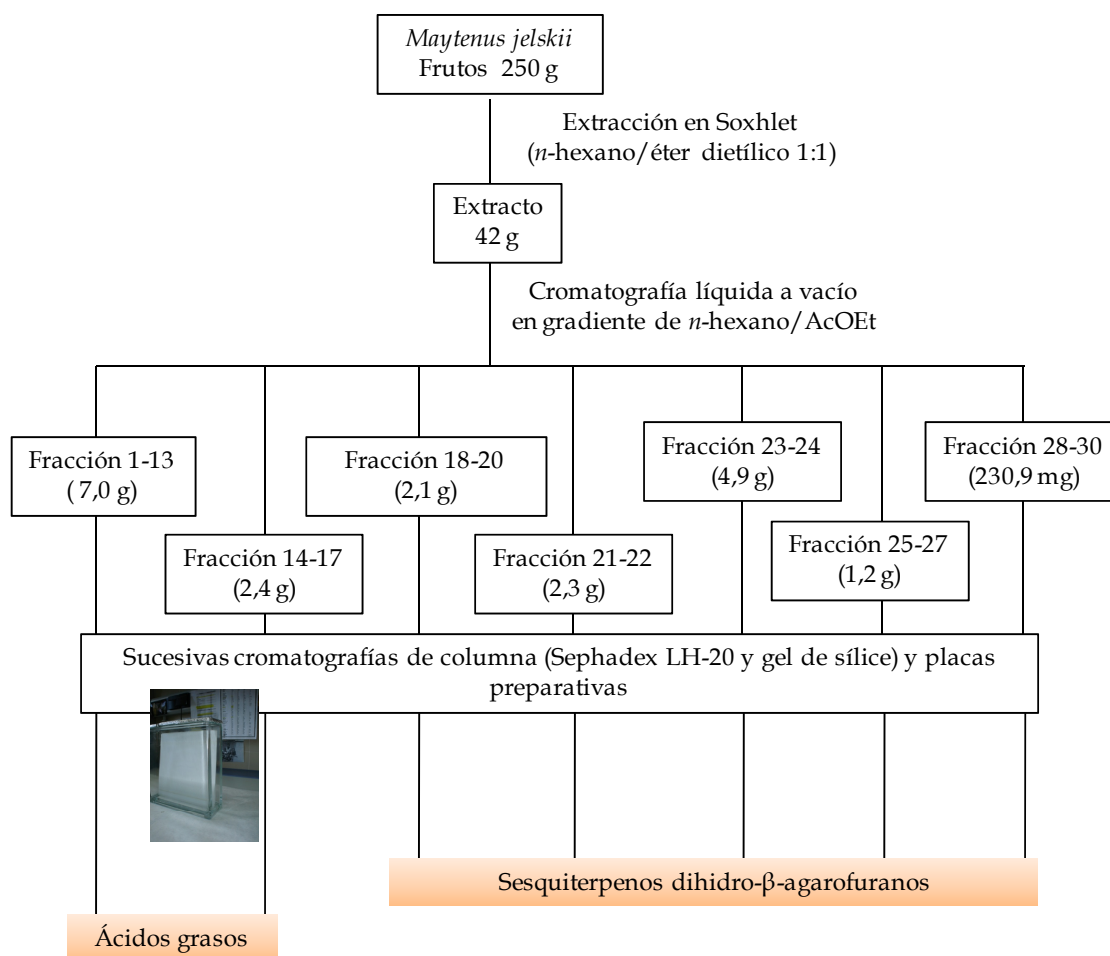


Esquema 3.2. Separación cromatográfica de los metabolitos secundarios de la corteza de raíz de Maytenus jelskii.

3.3.3. Frutos

Los frutos molidos (250 g) se extrajeron con una mezcla de *n*-hexano-éter dietílico (1:1) en un equipo Soxhlet a reflujo durante 48 horas y tras eliminación del disolvente a vacío, se obtuvieron 42 gramos de extracto. El extracto fue fraccionado mediante una cromatografía líquida en columna por gravedad, usando gel de sílice fina, utilizando como eluyente una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo de polaridad creciente, reuniéndose 30 fracciones. Estas fracciones fueron reunidas, de acuerdo con la similitud que presentaban en cromatografía en capa fina, en siete grupos que se purificaron mediante sucesivas cromatografías sobre gel de sílice en columna, sephadex LH-20 y placas preparativas, usando como eluyentes mezclas

de *n*-hexano, acetona, acetato de etilo, éter dietílico, dioxano, diclorometano y cloroformo. Se obtuvieron así, treinta sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano, que denominamos de **S-26** a **S-55**.

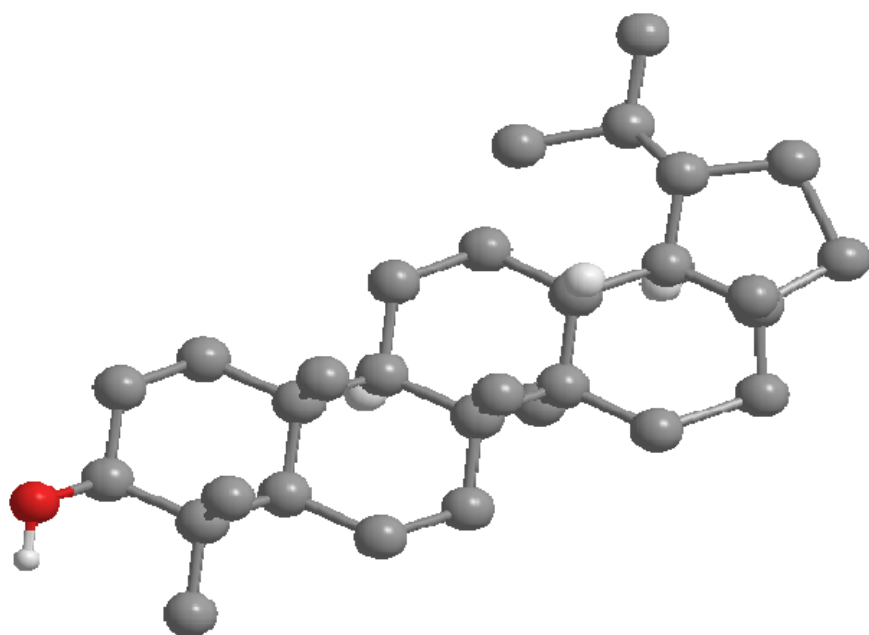


Esquema 3.3. Separación cromatográfica de los metabolitos secundarios de los frutos de *Maytenus jelskii*.

A continuación pasamos a discutir los resultados obtenidos del estudio fitoquímico de las distintas partes de la planta, haciendo, previamente, una pequeña introducción de cada una de las clases de metabolitos descritos en esta Memoria. A fin de facilitar la descripción de los diferentes metabolitos aislados, los hemos agrupado según sus características estructurales en: triterpenos, celastroloides y sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos, sin considerar la parte de la planta o el extracto del que se aislaron.



*4. Estudio fitoquímico
de las hojas, frutos y
corteza de raíz de
Maytenus jelskii*



4.1. Triterpenos

4.1.1. Introducción

Los **triterpenos** son, por definición, compuestos C_{30} constituidos por seis unidades de isopreno (C_5H_8). Estos compuestos constituyen un amplio grupo de metabolitos secundarios, con más de 5000 compuestos descritos hasta el momento, que pueden dividirse en diferentes familias químicas, siendo metabolitos frecuentes en numerosas especies vegetales.

Estos terpenos se forman por la unión de dos unidades de farnesil pirofosfato, que da lugar al escualeno, el cual es epoxidado enantioselectivamente por la cara β mediante acción enzimática, formándose el 2,3*S*-epoxiesqualeno¹. La mayoría de los esqueletos triterpénicos, tanto tetracíclicos como pentacíclicos, derivan de la ciclación de dos posibles conformeros de este epóxido, el *silla-bote-silla-bote* y el *silla-silla-silla-bote*. Una apertura regioselectiva del grupo epóxido mediante protonación y a través de una secuencia de adiciones electrofílicas a los dobles enlaces presentes, da lugar a la formación de los correspondientes anillos, generándose dos intermedios claves, el **catión dammarenilo** y el **catión protosterilo**, tal como se muestra en la figura 4.1.1^{2,3}.

Los esteroides se forman a partir del catión protosterilo, que da lugar al cicloartenol en plantas y al lanosterol en animales y hongos, originando este último el colesterol, que es el principal esteroide animal que forma parte de las membranas

¹ Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*, 2009, 3ª edc., Wiley-Blackwell, Oxford. Inglaterra.

² Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. P. T. *Phytochemistry*. 2004, 65, 261-291.

³ Connolly, J. D.; Hill, R. A. *Nat. Prod. Rep.* 2008, 25, 794-830.

celulares y es precursor de las hormonas sexuales, los ácidos biliares y la vitamina D, entre otras moléculas de interés fisiológico.

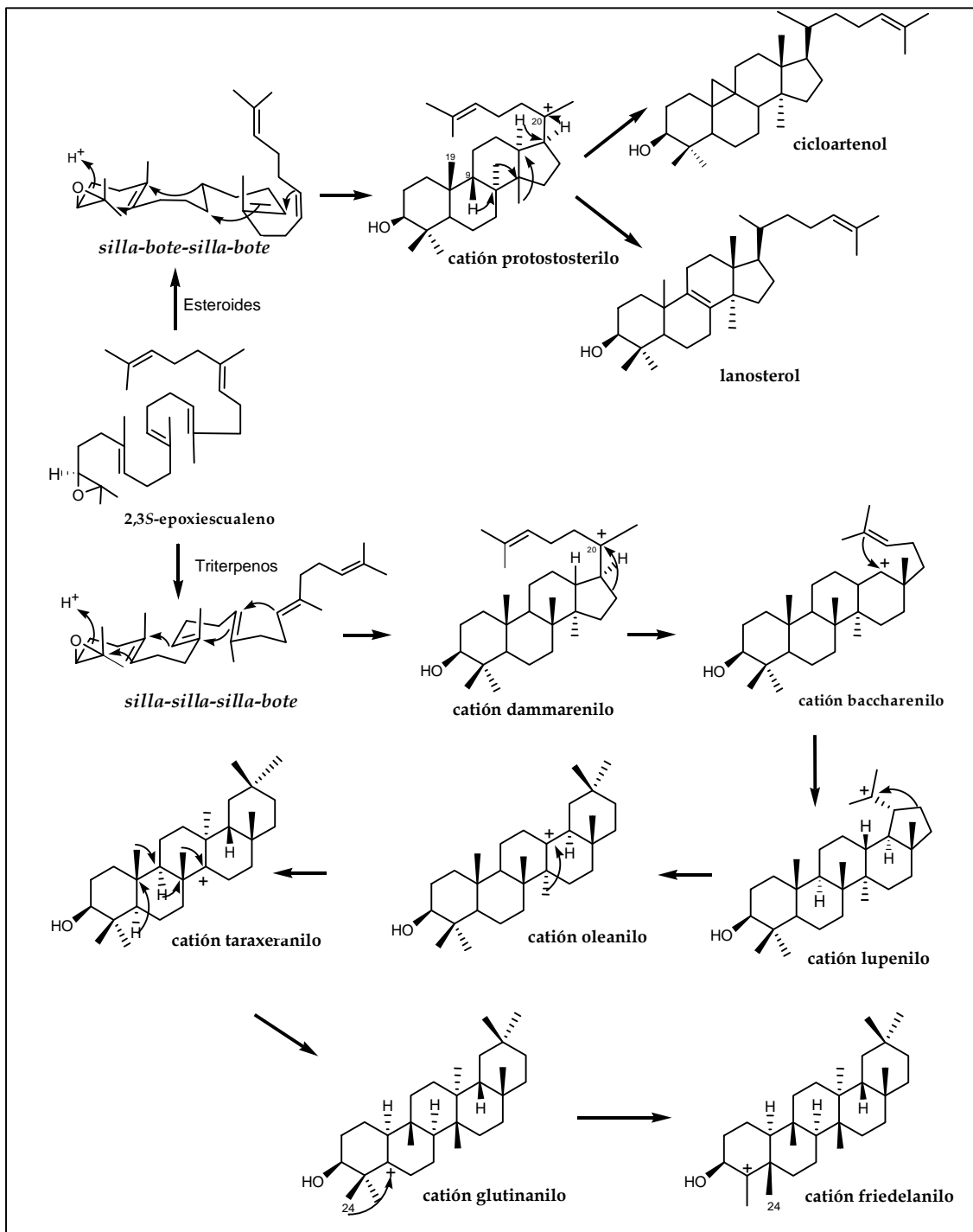


Figura 4.1.1 Biosíntesis de triterpenos y esteroides.

Los triterpenos pentacíclicos se biosintetizan a partir del **catión dammarenilo** y están constituidos por un esqueleto de 30 carbonos, que pueden estar dispuestos en cinco anillos de seis miembros, como en el caso de los triterpenos con esqueleto

de **oleano**, **taraxerano**, **friedelano** y **glutinano**, o bien en cuatro anillos de seis miembros y uno de cinco, como son los triterpeno con esqueleto de **lupano**.

La familia Celastraceae no está exenta de ser productora de triterpenos, y los esqueletos de los triterpenos aislados de especies de ésta corresponden a las series del dammarano⁴, *D:B*-friedobaccharano⁵, lupano⁶, ursano⁷, oleano, taraxerano⁸, glutinano⁷ y friedelano⁹.

Las nor-triterpenometilénquinonas constituyen un grupo de nor-*D:A*-friedooleanos insaturados y oxigenados. En la naturaleza, estos pigmentos se encuentran restringidos a las raíces de las especies de la familia Celastraceae y se consideran indicadores quimiotaxonómicos de ésta¹⁰. Desde 1978 se les conoce como celastroloides y se incluyen entre ellos a los compuestos del mismo tipo que presenten grupos fenólicos^{11,12}. La complejidad estructural, el alto grado de funcionalización y las actividades biológicas que presentan este grupo de terpenoides han provocado que su estudio sea intenso. Dada las peculiares características estructurales de estos metabolitos, los abordaremos en un capítulo separado (capítulo 4.2.).

4.1.1.1. Actividades biológicas de triterpenos aislados de especies de celastráceas

En los últimos años, se ha incrementado el interés por los triterpenos, debido al amplio rango de actividades biológicas que presentan¹³, entre las que cabe destacar las actividades antimicrobiana, antiinflamatoria, antitumoral, anti-VIH, así como para el tratamiento de la tuberculosis y la circulación.

⁴ Chávez, H.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; González, A. G. *Tetrahedron*. **1997**, 53 (18), 6465-6472.

⁵ Núñez, M. J.; López, M. R.; Jiménez, I. A.; Moujir, L. M. Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L. *Tetrahedron Lett*. **2004**, 45 (39), 7367-7370.

⁶ González, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Ravelo, A. G.; Luis, J. G.; Domínguez, X. A. *Rev. Latinoam. Quim*. **1989**, 20, 17.

⁷ Dantanarayan, A. P.; Kumar, N. S.; Muthukuda, P. M.; Balasubramaniam, S. *Phytochemistry*. **1983**, 22, 473-474.

⁸ González, A. G.; López, I.; Ferro, E. A.; Ravelo, A. G.; Gutiérrez, J.; Aguilar, M. A. *Biochem. Syst. Ecol*. **1986**, 14, 479-480.

⁹ Cota, A. B.; Macarenhas, Y. P.; Silva, G. D. F.; De Souza, J. R. *Acta Crystallogr. Section C*. **1990**, C46, 2, 326-327.

¹⁰ Hegnauer, R. *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Basel: Birkhäuser **1996**.

¹¹ Brüning, R.; Wagner, H. *Phytochemistry*. **1978**, 17, 1821-1858.

¹² Gunatilaka, A. A. L. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. **1996**, 67, 1.

¹³ Kuo, R. Y.; Qian, K.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K. H. *Nat. Prod. Rep*. **2009**, 26, 1321-1344.

Así, moléculas comunes como el **β -sitosterol**¹⁴ (figura 4.1.2), esteroide presente en casi todas las plantas superiores, han sido objeto de la atención de numerosos grupos de investigación en los últimos años. Cabe destacar que estudios realizados con este esteroide han mostrado que posee actividad antiinflamatoria y antipirética, con un efecto similar a la hidrocortisona y la oxifenbutazona, con la ventaja de presentar un amplio margen de seguridad debido a su mínimo efecto ulceroso, lo que le confiere un alto valor terapéutico. Además, se ha descrito como posible fármaco para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata¹⁵.

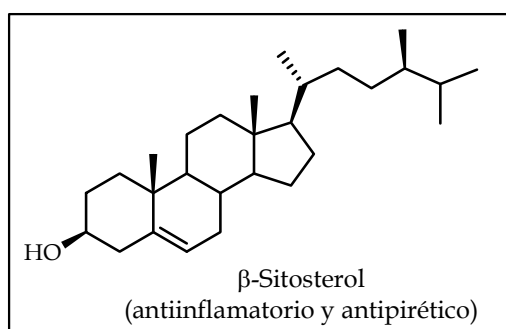


Figura 4.1.2. Esteroide más frecuente en las celastráceas.

4.1.1.1.1. Triterpenos de la serie del dammarano

Los triterpenos de tipo dammarano son realmente escasos en las celastráceas y sólo existen en la bibliografía dos referencias del aislamiento de compuestos con este esqueleto en especies de esta familia^{3,16}. Respecto a la actividad biológica, se ha determinado que los dammaranos pueden presentar actividad citotóxica, como es el caso de **elabunina** (figura 4.1.3), compuesto que fue moderadamente tóxico frente a una línea celular de leucemia, L-1210¹⁶.

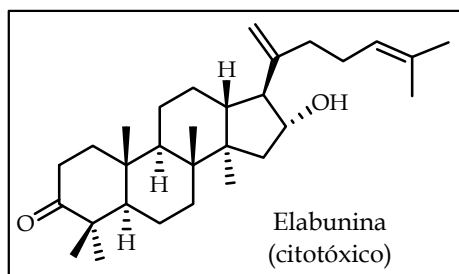


Figura 4.1.3. Ejemplo de triterpeno con esqueleto de dammarano.

¹⁴ Ovesna, Z.; Vachalkova, A.; Horvathova, K. *Neoplasma*. **2004**, 51, 407-414.

¹⁵ Wilt, T. J.; Macdonald, R.; Ishani, A. *BJU International*. **1999**, 83 (9), 976-983.

¹⁶ Kubo, I.; Fukuhara, K. *J. Nat. Prod.* **1990**, 53, 968-971.

4.1.1.1.2. D:B-friedobaccharanos

En el 2004 se describen los compuestos, **leonal** y **baruol** (figura 4.1.4), aislados de las especies *Maytenus blepharodes* y *M. chiapensis*, respectivamente⁵, que representan los primeros ejemplos en la bibliografía química de triterpenos tetracíclicos con un esqueleto de *D:B*-friedobaccharano. Aún cuando el catión *D:B*-friedobaccharanilo había sido postulado como intermedio en la biosíntesis de los triterpenos de la serie del baccharano, e incluso del shionano, hasta el momento no se había aislado ningún compuesto que lo confirmara. Respecto a la actividad biológica de estos compuestos, el baruol es capaz de inhibir la actividad de la β -glucoronidasa, diana utilizada en la búsqueda de agentes hepatoprotectores.

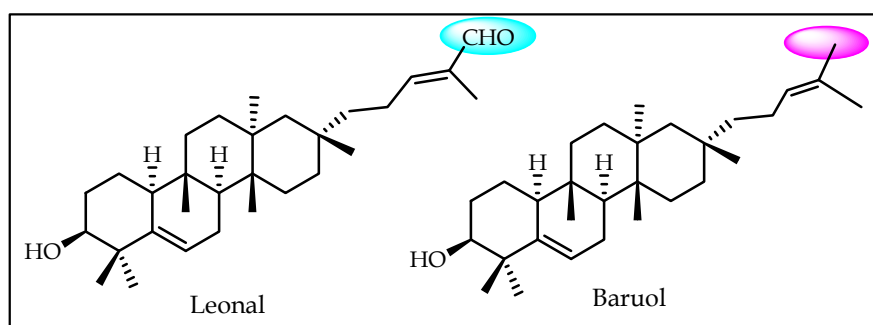


Figura 4.1.4. Ejemplo de triterpenos con esqueleto de *D:B*-friedobaccharanos.

Recientemente Y. Zhang y col.¹⁷ publicaron el aislamiento y elucidación estructural de tres nuevos baccharanos aislados de *Salacia chinensis* (Celastraceae) (figura 4.1.5), que junto con el baruol y el leonal son los únicos ejemplos de triterpenos de este tipo descritos en la literatura química.

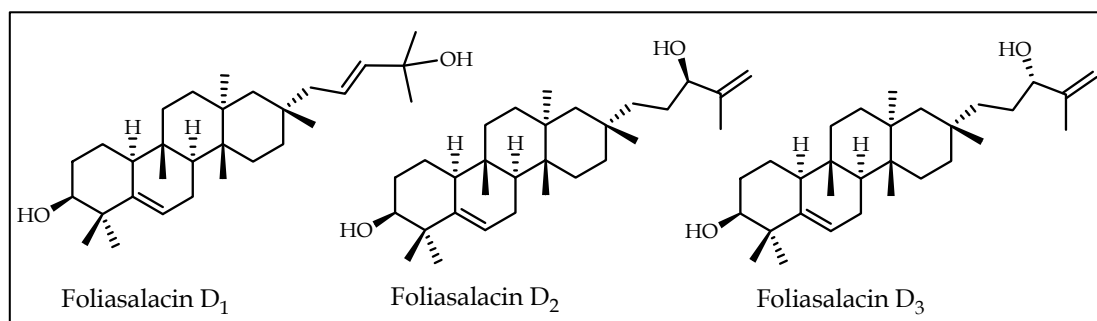


Figura 4.1.5. Estructura de *D:B*-friedobaccharanos aislados de *Salacia chinensis*.

¹⁷ Zhang, Y.; Nakamura, S.; Wang, T.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. *Tetrahedron*. **2008**, *64*, 7347-7352.

4.1.1.1.3. Triterpenos del taraxerano y glutinano

Los triterpenos con esqueleto de taraxerano y glutinano no son muy abundantes en las celastráceas. En 1997 fue descrito el **ácido triptocalico**¹⁸ y además, se han aislado compuestos conocidos como es el caso de los derivados **29-hidroxiado del glutinol** y **taraxerol**, aislados de la corteza de la raíz de *Hippocratea excelsa*¹⁹ (figura 4.1.6). Recientemente, se han aislado de *Euonymus hamiltonianus* tres nuevos triterpenos de la serie del glutinano²⁰. Sin embargo, no se conoce actividad biológica de los triterpenos con esqueleto de taraxerano y glutinano.

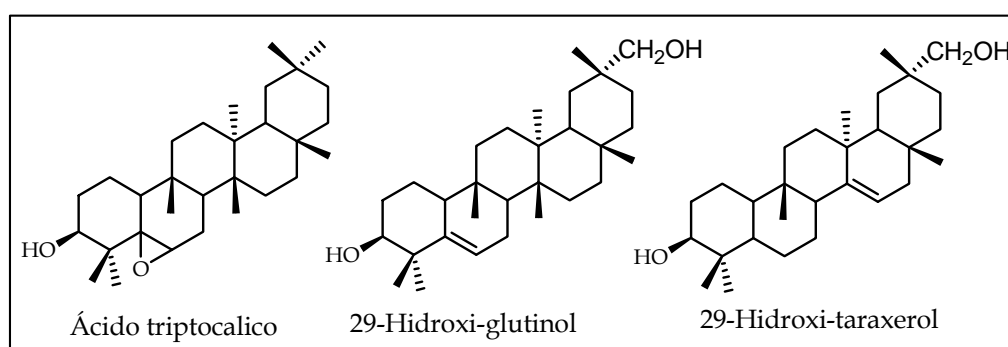


Figura 4.1.6. Ejemplo de triterpenos con esqueleto de taraxerano y glutinano.

4.1.1.1.4. Triterpenos de la serie del friedelano

Los triterpenos con esqueleto de **friedelano** son abundantes en la familia Celastraceae, existiendo numerosos ejemplos de este tipo de triterpenos (figura 4.1.7) que han mostrado una actividad citostática significativa *in vivo* frente a diversos tipos de células cancerígenas. Así, el **ácido polpunónico**, aislado de *Orthosphenia mexicana*, presentó citotoxicidad frente a células A-549 (células de carcinoma de pulmón) con una DE₅₀ de 0,21 µg/ml²¹ y su administración (100 mg/kg) disminuye el índice de lesión ulcerosa (ILU) en un 55,3%²². El **ácido salaspérmico**, aislado del extracto de la corteza de raíz de *Tripterygium wilfordii*,

¹⁸ Nakano, K.; Oose, Y.; Takaishi, Y. *Phytochemistry*. **1997**, *46*, 1179-1182.

¹⁹ Aguilar-González, A. R.; Mena-Rejón, G. J.; Padilla-Montaño, N.; Toscano, A.; Quijano, L. *Chem. Scien.* **2005**, *5*, 577-584.

²⁰ Tantray, M. A.; Shawl, A. S.; Arora, B. S.; Purinima, B.; Ahmad, K.; Khuroo, M. A. *Chem. Nat. Prod.* **2009**, *45*, 377-380.

²¹ Nozaki, H.; Matsuura, Y.; Hirono, S.; Kasai, R.; Chang, J. J.; Lee, K. H. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1039-1041.

²² Andrade, S. F.; Antonioli, D.; Comunello, E.; Cardoso, L. G. V.; Carvalho, J. C. T.; Bastos, J. K. *Z. Naturforsch.(C)*. **2006**, *61*, 329-333.

mostró una importante actividad antiviral frente al VIH^{23,24}. La serie de friedelanos con una función hemiacetalica entre el C-24 y el C-3 se han descrito en especies de la familia Celastraceae. Este tipo de compuestos, como el **ácido salaspérmico** y el **ácido orthosphenico** han sido propuestos como posibles intermedios en la biosíntesis de las quinonas triterpénicas²⁵.

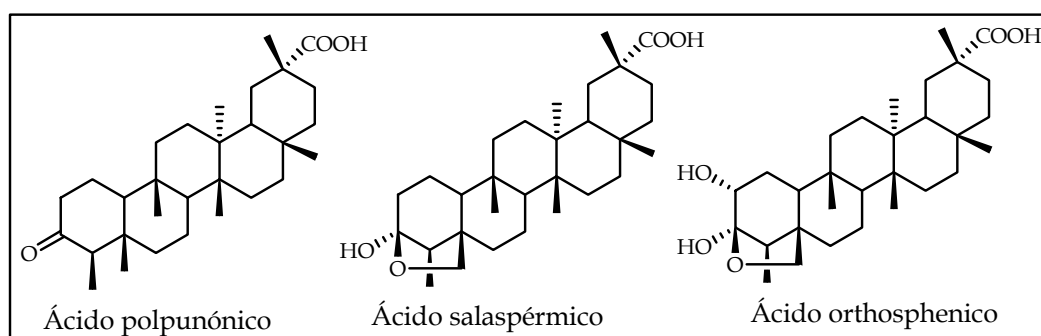


Figura 4.1.7. Friedelanos aislados de celastráceas.

Recientemente, se ha determinado la actividad antiulcerosa del 3,15-dioxo-21 α -hidroxi-friedelano (figura 4.1.8), aislado de *Maytenus robusta*, comparable a la del omeprazol²⁶.

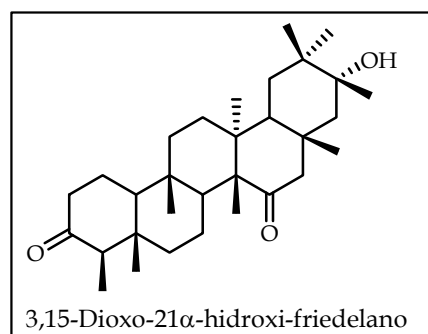


Figura 4.1.8. Friedelano con actividad antiulcerosa.

Lotina-Hennsen y *col*²⁷ describen la actividad inhibitoria del proceso fotosintético del **ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico** (figura 4.1.9), que presentó una CI₅₀ de 148 μ M, inhibiendo el transporte de electrones y la síntesis de ATP en cloroplastos de

²³ Chen, K.; Shi, Q.; Kashiwada, Y.; Zhang, D. C.; Hu, C. Q.; Jin, J. Q.; Nozaki, H.; Kllkuskie, R. E.; Tramontano, E.; Chen, Y. C.; McPhail, D. R.; McPhail, A. T.; Lee, K. H. *J. Nat. Prod.* **1992**, 55, 340-346.

²⁴ Lee, N. H.; Ho, J. W. *Anti-infective Agents in Medicinal Chemistry.* **2008**, 7,97-100.

²⁵ Tezuka, Y.; Kikuchi, T.; Dhanabalasingham, B.; Gunatilaka, A. A. L. *Nat. Prod. Lett.* **1993**, 3, 273-275.

²⁶ Andrade, S. F.; Comunello, E.; Noldin, V. F.; Monache, F. D.; Filho, V. C.; Niero, R. *Arch. Pharm. Res.* **2008**, 31, 41-46.

²⁷ Ribeiro de Souza e Silva, S.; Silva, G. D. de F.; Barbosa, L. C. de A.; Duarte, L. P.; King-Diaz, B.; Archundia-Camacho, F.; Lotina-Hennsen, B. *Pest. Biochem. Phys.* **2007**, 87, 109-114.

espinacas, comportándose así como un inhibidor de la reacción de Hill, resultando promotor cabeza de serie para el desarrollo de "herbicidas ecológicos"²⁸.

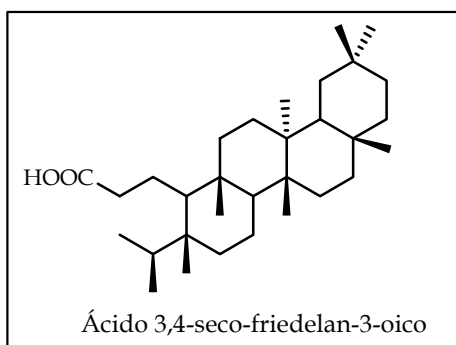


Figura 4.1.9. Friedelano con actividad inhibidora del proceso fotosintético.

4.1.1.1.5. Triterpenos de las series del oleano y ursano

Los triterpenos de la serie del **oleano** y **ursano**, poseen un perfil farmacológico similar al de los retinoides y esteroides, destacando su actividad antiinflamatoria, hepatoprotectora y supresora de la promoción de tumores²⁹.

En el 2005 se descubrió que los **ácidos oleanólico, maslínico** y **3 β ,19 α ,23-trihidroxiurs-12-en-28-oico**, presentan actividad antiinflamatoria comparable a la indometacina³⁰. Además, los **ácidos oleanólico, ursólico** y **euscáfico** (figura 4.1.10), son capaces de inhibir la activación del virus Epstein-Barr y a bajas concentraciones, inhiben la formación de tumores en ensayos *in vivo*, presentando, por tanto, propiedades quimiopreventivas³¹. Así mismo, se ha descrito la capacidad de los **ácidos 3 β ,13 β -dihidrours-11-en-28-oico** y **3 β ,27-dihidroxi-12-oleanen-28-oico** para inhibir el crecimiento de células tumorales de pulmón (VA-13)³².

Cabe destacar que el **ácido ursólico**, un triterpeno habitual en las especies de celastráceas, presenta actividad antiinflamatoria³³ y, además, ha mostrado ser efectivo en el tratamiento de la artritis, la diabetes, úlceras y la arteriosclerosis. La citotoxicidad de este producto y varios ésteres derivados fue ensayada por Lee y

²⁸ Morales-Flores, F.; Aguilar, M. I.; King-Díaz, B.; Santiago-Gómez, J.; Lotina-Hennsen, B. *Photosyn. Res.* **2007**, *91*, 71.

²⁹ Liu, J. J. *Ethnopharm.* **2005**, *100*, 92-94.

³⁰ Sosa, S.; Altiniera, G.; Politib, M. Bracab, A.; Morellib, I.; Della Loggia, R. *Phytomedicine.* **2005**, *12*, 271-277.

³¹ Banno, N. Akihisa, T.; Tokuda, H.; Yasukawa, K.; Taguchi, Y.; Akazawa, H.; Ukiya, M.; Kimura, Y.; Suzuki, T.; Nishino, H. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1995-1999.

³² Fu, L.; Zhang, S.; Li, N.; Wang, J.; Zhao, M.; Sakai, J.; Hasegawa, T.; Mitsui, T.; Katoka, T.; Oka, S.; Kiuchi, M.; Hirose, K.; Ando, M. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 198-206.

³³ Ikeda, Y.; Murakami, A.; Ohigashi, H. *Molec. Nutrition Food Res.* **2008**, *52*, 26-42.

col.³⁴ frente a varias líneas celulares de cánceres humanos. Este ácido mostró actividad frente al crecimiento celular de las leucemias linfocíticas P-388 y L-1210 y frente al carcinoma A-549, así como citotoxicidad frente a células tumorales de colon (HCT-8), mama (MCF-7)¹², vejiga (253JB-V) y páncreas (Panc-1, Panc-28)³⁵.

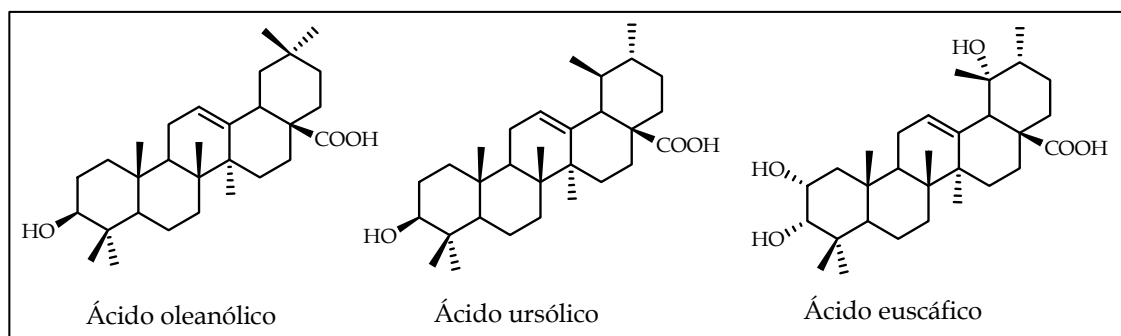


Figura 4.1.10. Triterpenos con esqueleto de oleano y ursano aislados de celastráceas.

4.1.1.1.6. Triterpenos de la serie del lupano

El interés por los triterpenos con esqueleto de lupano se debe, fundamentalmente, a la amplia gama de actividades biológicas descritas en los últimos años, entre las que destacan la actividad citotóxica, anti-VIH, así como para el tratamiento de la diabetes^{36,37,38,39}.

Cabe destacar la **betulina**, que se obtiene en grandes cantidades y de forma fácil y económica de las hojas y corteza del abedul (*Betula pendula*). La importancia de este compuesto radica en que mediante transformaciones químicas sencillas da lugar al **ácido betulínico**, compuesto que presenta una extraordinaria actividad biológica. Así, además de actividad anti-VIH, ha mostrado actividad citotóxica frente al melanoma humano por inducción de apoptosis, actividad leishmanicida frente a *Leishmania amazonensis* y actividad antiparasitaria frente a los estadios asexuales eritrocíticos de *Plasmodium*

³⁴ Lee, K. H.; Lin, Y. M.; Wu, T. S.; Zhang, D. C.; Yamagishi, T.; Hayashi, T.; Hall, I. H.; Chang, J. J.; Wu, R. Y.; Yang, T. H. *Planta Med.* **1988**, *54*, 308-311.

³⁵ Chadalapaka, G.; Jotooru, I.; McAlees, T.; Stefanac, T.; Safe, Stephen. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2633-2639.

³⁶ Setzer, W. N.; Setzer, M. C. *Mini. Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 540-556.

³⁷ Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 394-411.

³⁸ Tolstikova, T. G.; Sorokina, I. V.; Tolstikov, A. G.; Flekhter, O. B. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2006**, *32* (1), 37-49.

³⁹ Zhu, P.; Bi, Y.; Xu, J.; Li, Z.; Liu, J.; Zhang, L.; Ye, W.; Wu, X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6966-6969.

*falciiparum*⁴⁰. Se han realizado ensayos *in vivo* que han mostrado que la administración del ácido betulínico disminuye sustancialmente los tumores de piel inducidos por el TPA (13-acetato-12-O-tetradecanoil-forbol) en ratones⁴¹. Además, el ácido betulínico es altamente específico, presentando una potente actividad frente a diversas líneas celulares cancerígenas, no siendo afectadas las células normales, indicando una amplia ventana terapéutica^{42,43}.

Cabe destacar a los **derivados del ácido betulínico** como potenciales agentes antivirales. Así, esterificación en el C-3 del ácido betulínico condujo al descubrimiento de Bevirimat (DSB, PA-457, ácido 3',3'-dimetilsuccinilbetulínico)⁴⁴, el cual es un inhibidor de la maduración del VIH-1 (figura 4.1.11). El Bevirimat está actualmente en fase clínica II y fue lanzado por la farmacéutica Panacos^{45,46}.

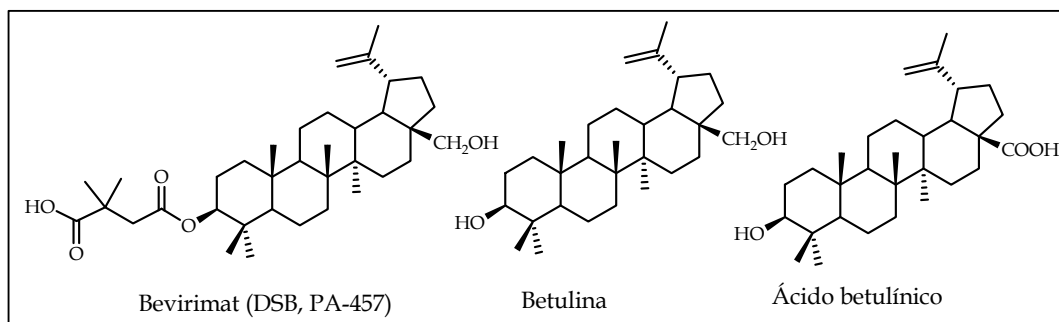


Figura 4.1.11. Lupanos con actividad anti-VIH. (Beverimat: compuesto en fase clínica).

Recientemente, dos nuevos derivados 3,28-disustituídos del ácido betulínico (figura 4.1.12) presentaron actividad anti-VIH, ligeramente mayor que el Bevirimat, siendo por tanto considerados como excelentes candidatos a estudios clínicos⁴⁷.

⁴⁰ Bringmann, G.; Saeb, W.; Assi, L. A.; François, G.; Narayanan, A. S. S.; Peters, K.; Peters, E.M. *Planta Med.* **1997**, *63*, 255-257.

⁴¹ Jasukawa, K.; Takido, M.; Matsumoto, T.; Takeuchi, M.; Nakagawa, S. *Oncology.* **1991**, *48*, 72-76.

⁴² Fulda, S. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 140-148.

⁴³ Fulda, S.; Kroemer, G. *Drug Discov. Today.* **2009**, *14*, 885-890.

⁴⁴ Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentino, L. M.; Chen, C. H.; Garrett, P. E.; Lee, K. H. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1016-1017.

⁴⁵ Martín, D. E.; Blum, R.; Wilton, J.; Doto, J.; Galbraith, H.; Burgess, G. L.; Smith, P. C.; Ballow, C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3063-3066.

⁴⁶ Smith, P. F.; Ogundele, A.; Forrest, A.; Wilton, J.; Slazwedel, K.; Doto, J.; Allaway, G. P.; Martín, D. E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3574-3581.

⁴⁷ Qian, K.; Yu, D.; Chen, C. H.; Huang, L.; Morris-Natscheke, S. L.; Nitz, T. J.; Salzwedel, K.; Reddick, M.; Allaway, G. P.; Lee, K. H. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3248-3258.

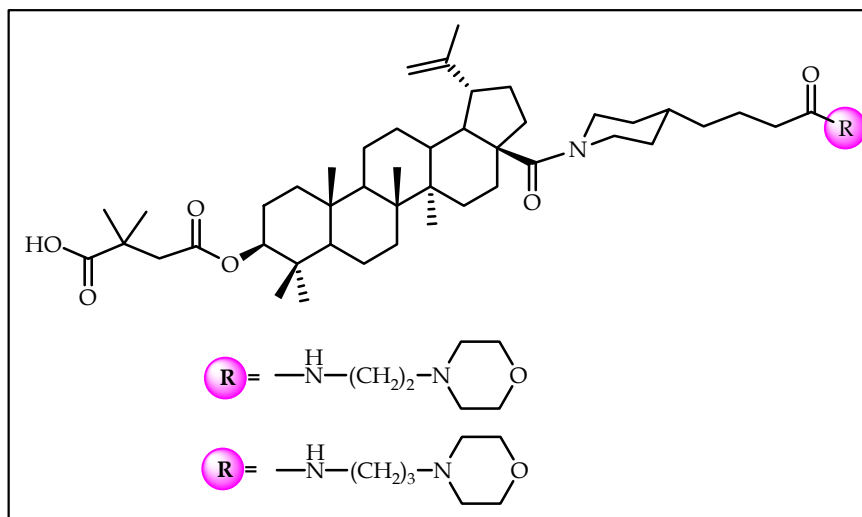


Figura 4.1.12. Derivados 3,28-disustituídos del ácido betulínico con actividad anti-VIH.

En nuestro grupo de investigación se evaluó el potencial antiinflamatorio de una serie de lupanos, aislados de *M. cuzcoina* y *M. chiapiensis*. Se determinó la producción de NO (óxido nítrico) y la prostaglandina E₂ (PGE₂) en macrófagos de ratón (RAW 264.7). Los resultados mostraron que algunos de estos triterpenos inhiben la generación tanto de NO como de la PGE₂, con valores de CI₅₀ en un rango micromolar⁴⁸. Así mismo, se evaluó la actividad citotóxica frente a las líneas celulares HeLa (carcinoma epitelial de cuello de útero humano), Hep-2 (carcinoma de laringe humano) y Vero (riñón de mono verde africano), de un grupo de triterpenos de la serie del lupano aislados de las especies anteriormente citadas. Los compuestos 28,30-dihidroxi-3-oxolup-20(29)-eno y ácido 3-*epi*-betulínico mostraron moderada actividad frente a las células HeLa (CI₅₀ 2,1 y 4,0 µg/ml, respectivamente)⁴⁹.

⁴⁸ Reyes, C. P.; Núñez, M. J.; Jiménez, I. A.; Busserolles, J.; Alcaráz, M. J.; Bazzocchi, I. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1573-1579.

⁴⁹ Núñez, M. J.; Reyes, C. P.; Jiménez, I. A.; Moujir, L.; Bazzocchi, I. L. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1018-1021.

4.1.2 Resultados y discusión

El estudio fitoquímico de la fracción de diclorometano de las **hojas** de *M. jelskii*, después de repetidas cromatografías, según se detalla en la parte experimental de esta Memoria, nos permitió el aislamiento de **11** triterpenos, diez de los cuales habían sido descritos previamente en la bibliografía química y fueron identificados, basándonos en sus datos físicos y espectroscópicos y comparación con los datos existentes en la bibliografía química. Estos metabolitos fueron identificados como: ácido 3,4-seco-28-hidroxifriedelan-3-oico⁵⁰ (**F-2**), ácido polpunónico⁵¹ (**F-5**), canophyllo⁵² (**F-12**), ácido 3 α -hidroxi-*D:A*-friedoolean-28-oico⁵³ (**F-13**), betulina⁵⁴ (**L-1**), 3 β ,30-dihidroxi-lup-20(29)-eno⁵⁵ (**L-2**), nepeticina⁵⁶ (**L-3**), epiglochidiol⁵⁷ (**L-4**), nivadiol⁵⁸ (**O-2**) y β -sitosterol⁵⁹ (**E-1**). El compuesto denominado **O-1** resultó nuevo en la bibliografía química y su elucidación estructural se describe a continuación.

Por otro lado, tras sucesivas cromatografías del extracto en *n*-hexano-éter dietílico (1:1) de la corteza de la **raíz** de la misma planta, se aislaron **18** triterpenos, dos de los cuales resultaron ser nuevos en la bibliografía química y a los que hemos denominado **F-1** y **U-1**. Los compuestos descritos anteriormente en la literatura fueron identificados como: barudiona⁶⁰ (**F-3**), epibarudiona⁶⁰ (**F-4**), 3-oxo-*D:A*-friedoolean-29-al⁵² (**F-6**), 29-hidroxifriedelina⁵² (**F-7**), ácido 3-oxo-*D:A*-friedoolean-30-oico⁵² (**F-8**), 3-oxo-*D:A*-friedoolean-30-al⁵² (**F-9**), friedelina⁵² (**F-10**), 3-oxo-*D:A*-friedoolean-28-al (octandronal)⁵² (**F-11**), cangoronina (**F-14**)⁶¹, baruol⁵ (**B-1**),

⁵⁰ Vieira, Filho, S. A.; Duarte, L. P.; Silva, G. D. F.; Lula, I. S.; dos Santos, M. H. *Mag. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 746-748.

⁵¹ Ramiah, P. A.; Devi, P. U.; Frolow, F.; Lavie, D. *Phytochemistry*. **1984**, *23*, 2251-2255.

⁵² Betancor, C.; Freire, R.; González, A. G.; Salazar, J. A.; Pascard, C.; Prange, T. *Phytochemistry*. **1980**, *19*, 1989-1993.

⁵³ Betancor, C.; Freire, R.; González, A. G.; Salazar, J. A.; Pascard, C.; Prange, T. *Phytochemistry*. **1989**, *1980*.

⁵⁴ Cholichin, M.; Yamasaki, K.; Kasai, R.; Tanaka, O. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 1006-1008.

⁵⁵ Hui, W.; Li, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*. **1977**, *8*, 1972-1999.

⁵⁶ Ahmad, V. U.; Bano, S.; Voelter, W.; Fuchs, W. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1715-1718.

⁵⁷ Hui, W. H.; Lee, W.K.; Cham, C. K. *Phytochemistry*. **1970**, *9*, 1099-1102.

⁵⁸ González, A. G.; Fraga, B. M.; González, P. Hernández, M. G.; Ravelo, A. G. *Phytochemistry*. **1981**, *20*, 1919-1921.

⁵⁹ Rathmann, D. M.; Morrow, L. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 5647-5650.

⁶⁰ Mena-Rejón, G. Búsqueda de moléculas bioactivas en especies de la flora de la península de Yucatán, México. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, 2006.

⁶¹ Morota, T.; Yang, C. X.; Sasaki, H.; Qin, W.; Sugama, K.; Miao, K.; Yoshino, T.; Xu, L. H.; Maruno, M.; Yang, B. *Phytochemistry*. **1995**, *39*, 1153-1157.

palmitato de β -amirina⁶² (**O-3**), ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-30-oico⁶³ (**O-4**), ácido *D*:*B*-friedoolean-5-en-29-oico⁶⁴ (**G-1**), ácido polpunónico⁵¹ (**F-5**), canophyllo⁵² (**F-12**) y β -sitosterol⁵⁹ (**E-1**).

Todos los triterpenos aislados son pentacíclicos, excepto el triterpeno tetracíclico baruol, que presenta un esqueleto de *D*:*B*-friedobaccharano, resultando ésta la tercera vez que se aísla de una especie de Celastraceae.

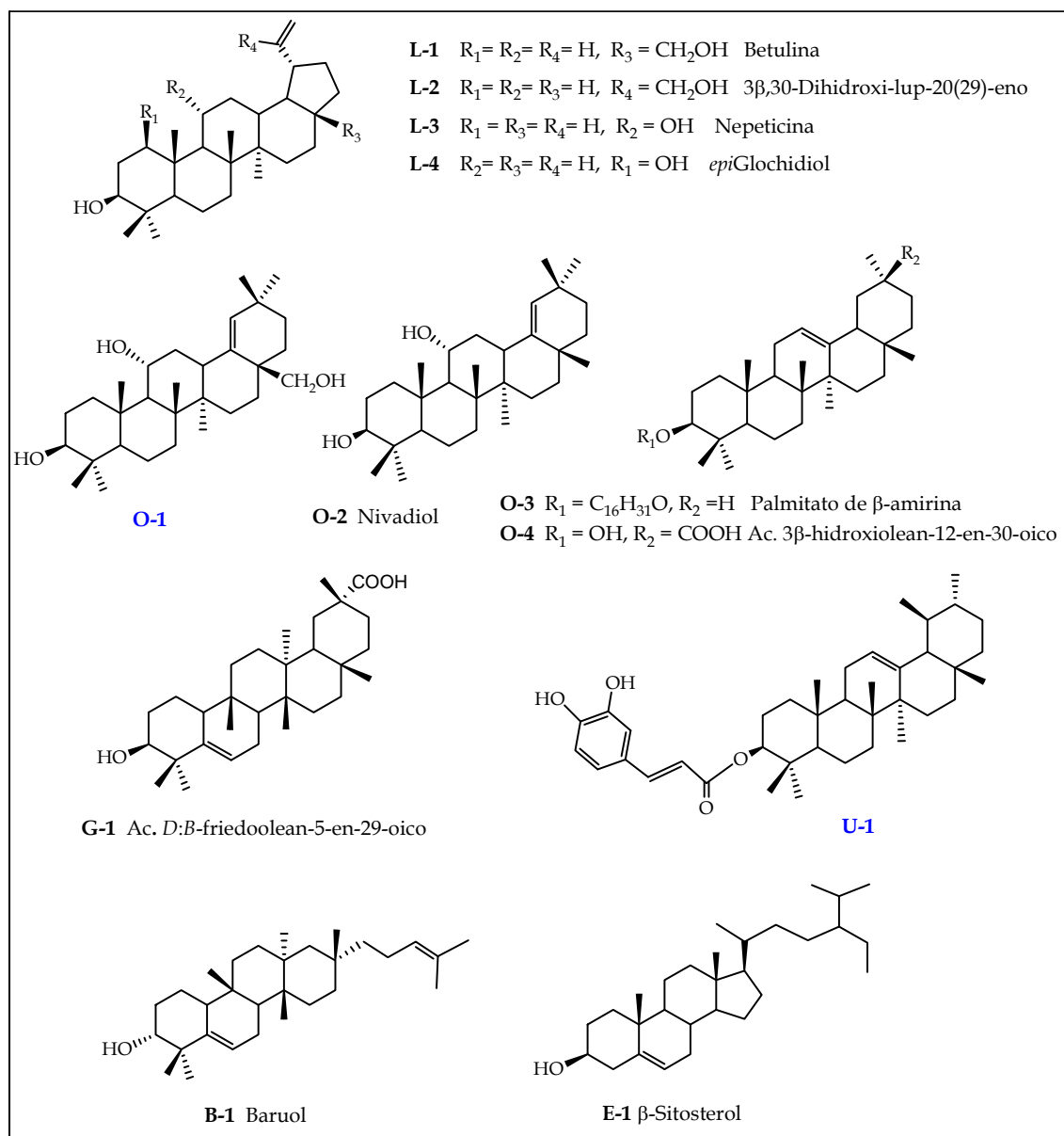


Figura 4.1.13. Esteroles y triterpenos con esqueleto de lupano, oleano, glutinano, ursano y baccharano aislados de la raíz y las hojas de *M. jelskii*. En azul los compuestos que resultaron nuevos en la bibliografía química.

⁶² Weissmann, G.; Sandermann, W. *Phytochemistry*. **1968**, 7, 467-469.

⁶³ Corey, E. J.; Cantrall, E. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80,499-500.

⁶⁴ Morota, T.; Yang, C. X.; Sasaki, H.; Qin, W. Z.; Sugama, K.; Miao, K. L.; Yoshino, T.; Xu, L. H.; Maruno, M.; Yang, B. H. *Phytochemistry*. **1995**, 39 (5), 1153-1157.

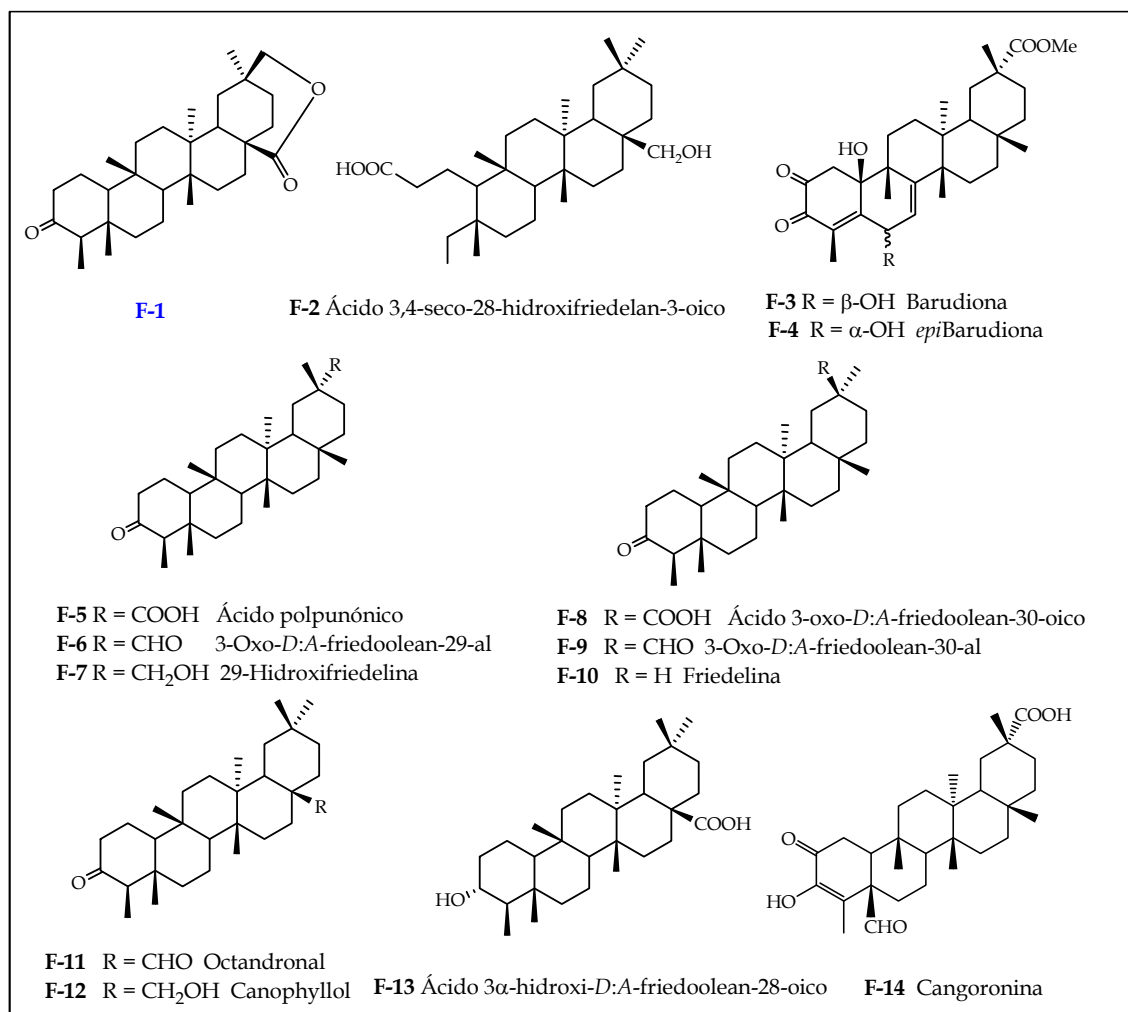


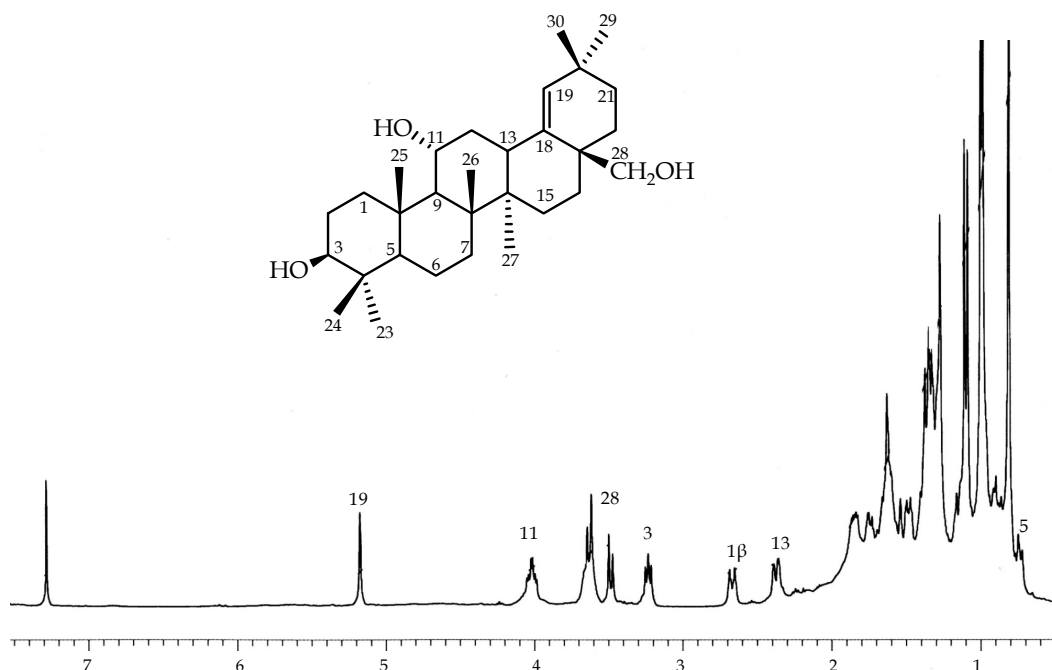
Figura 4.1.14. Triterpenos con esqueleto de friedelano aislados de las hojas y las raíces de *M. jelskii*. En azul el compuesto que resultó nuevo en la bibliografía química.

A continuación pasamos a discutir la elucidación estructural de los triterpenos que resultaron nuevos en la bibliografía química y que denominamos O-1, F-1 y U-1.

Triterpeno O-1

El compuesto **O-1**, aislado como un sólido amorfo incoloro, mostró en su espectro de IR una banda ancha de absorción a 3403 cm^{-1} , característica de grupo hidroxilo. Su fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3$ fue determinada por espectrometría de masas de alta resolución y RMN de ^{13}C (tabla 4.1.1).

En su espectro de RMN de ^1H se observaron señales correspondientes a siete metilos como singuletes a 0,81 (6H), 0,98, 0,99, 1,00, 1,09 y 1,11 δ_{H} , señales asignables a dos protones metínicos unidos a oxígeno a 3,23 δ (1H, t, $J = 7,9\text{ Hz}$) y a 4,00 δ (1H, dt, $J = 4,8, 10,8\text{ Hz}$), así como a un metileno unido a oxígeno a 3,48, 3,63 δ (2H, d_{AB} , $J = 10,8\text{ Hz}$). Así mismo, se observó una señal característica de un protón vinílico a 5,18 δ (s).

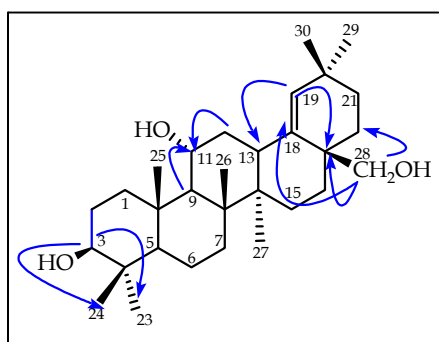


Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto **O-1**

El espectro de RMN de ^{13}C reveló la presencia de 30 átomos de carbono en la molécula y de acuerdo con los experimentos DEPT 90° y 135° , fueron identificados como siete metilos, diez metilenos (uno de ellos unido a oxígeno), seis metinos (incluyendo dos oximetínicos y uno olefínico) y siete carbonos cuaternarios (uno olefínico). Estos datos están de acuerdo con una estructura de triterpeno pentacíclico de la serie de Δ^{18} -oleano¹ para el producto **O-1** y cuya estructura, 3β -

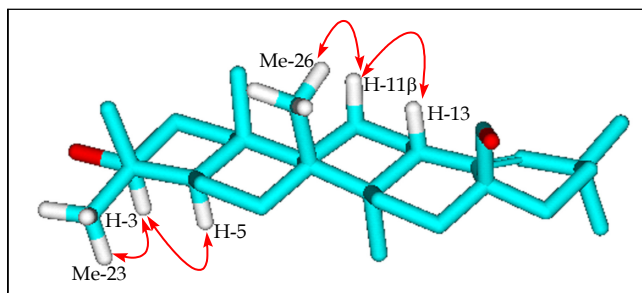
11 α -28-trihidroxi-olean-18-eno, fue establecida mediante estudios 2D de RMN, tal como mostramos a continuación.

El análisis del experimento HSQC permitió correlacionar cada carbono con sus protones, destacando las correlaciones de los protones metínicos a 3,23 y 4,00 y el metileno a 3,48 y 3,63 δ con los carbonos a 78,5, 70,9 y 65,4 δ_C , respectivamente. En el experimento HMBC se observó correlación entre la señal a 3,23 δ_H y los carbonos C-24 (15,5 δ_C) y C-23 (28,2 δ_C); correlación de la señal a 4,00 δ_C con los carbonos C-9 (56,3 δ_C) y C-12 (38,3 δ_C), así como correlación entre el protón a 3,63 δ_H y los carbonos a 31,1 δ_C (C-22), 39,0 δ_C (C-17) y 137,5 δ_C (C-18). Además, se observó correlación entre la señal a 5,18 δ_H y los carbonos C-17 (39,0 δ_C) y C-13 (37,7 δ_C). Estas correlaciones permitieron situar a los grupos hidroxilos secundarios sobre los carbonos C-3 y C-11, el grupo hidroxilo primario sobre el carbono C-28 y el doble enlace entre C-18-C-19 del esqueleto carbonado.

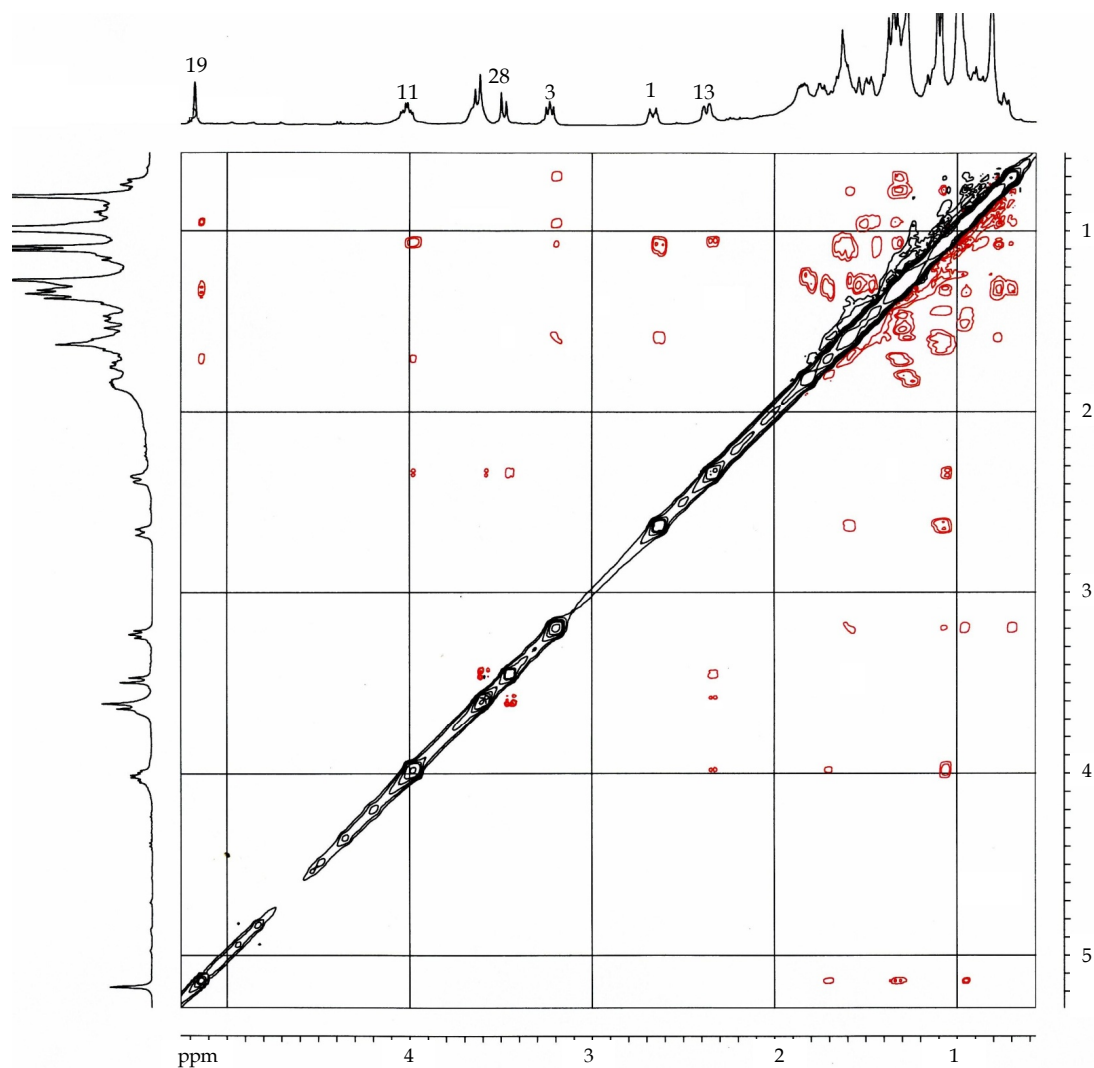


Correlaciones más significativas observadas en el experimento HMBC del compuesto **O-1**

La estereoquímica relativa de los hidroxilos secundarios en la molécula, se estableció mediante un estudio de las constantes de acoplamiento y se confirmó mediante un experimento ROESY. Así, correlación de H-3 (3,23 δ) con H-5 (0,73 δ) y el Me-23 (1,00 δ) y correlación de H-11 (4,00 δ) con el Me-26 (1,09 δ) y H-13 (2,37 δ), nos permitió establecer la estereoquímica relativa de los grupos hidroxilos sobre C-3 y C-11 como β y α , respectivamente.



Efectos ROE más significativos observados en el experimento ROESY de **O-1**



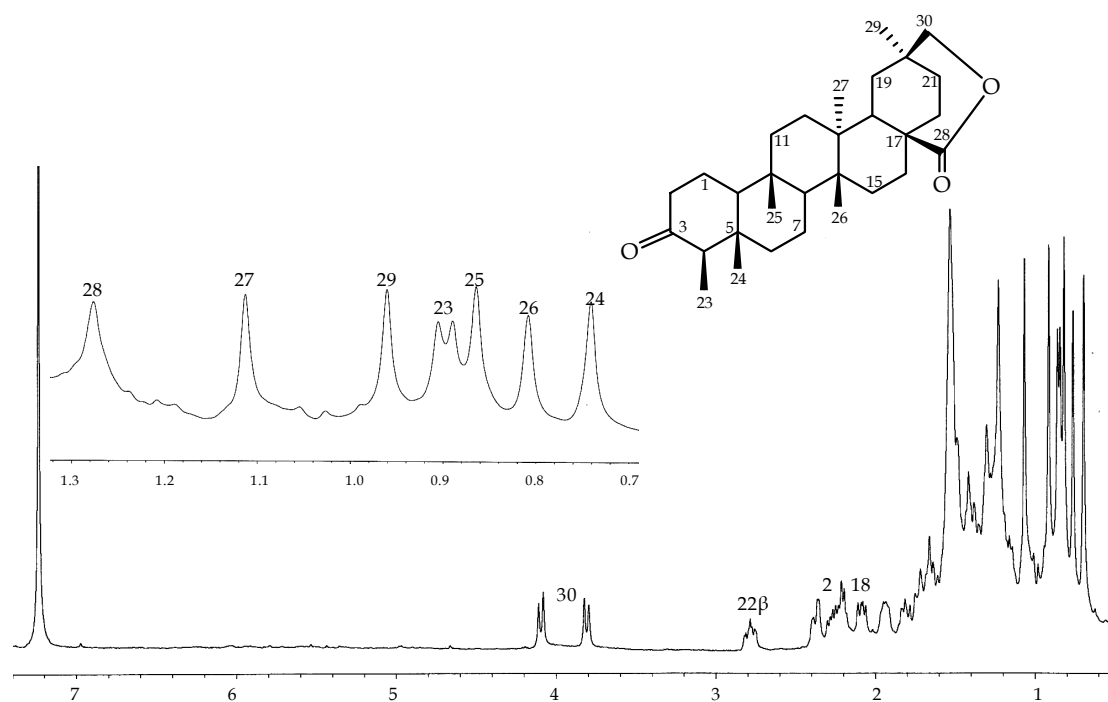
Ampliación del experimento ROESY del compuesto **O-1**

Triterpeno F-1

El compuesto que hemos denominado **F-1**, aislado como un sólido amorfo, presentó en su espectro de masas de baja resolución un ión molecular a 454 m/z y una fórmula molecular de $C_{30}H_{46}O_3$, basada en su espectro de masas de alta resolución. En su espectro de IR se observa como señal más característica la presencia de grupo carbonilo (1714 cm^{-1}).

En su espectro de RMN de ^1H se observaron cinco singuletes (0,74, 0,81, 0,87, 0,96, 1,11 δ) que por su intensidad y desplazamiento se atribuyen a un número igual de metilos. Así mismo, se observó un metilo como doblete a 0,90 δ (3H, d, $J = 6,2\text{ Hz}$) y un metileno unido a oxígeno a 3,86 y 4,14 δ (2H, d_{AB} , $J = 11,5\text{ Hz}$). Su espectro de RMN de ^{13}C mostró señales para 30 carbonos, lo que junto con los experimentos DEPT 90° y 135° corroboró la existencia de seis metilos, doce metilenos, cuatro metinos y ocho carbono cuaternarios, destacando la presencia de las señales correspondientes a un carbono carbonílico a 213,0 δ_C , un carbono carboxílico a 177,0 δ_C , un carbono metilénico unido a oxígeno a 79,7 δ_C y un carbono primario a 6,6 δ_C .

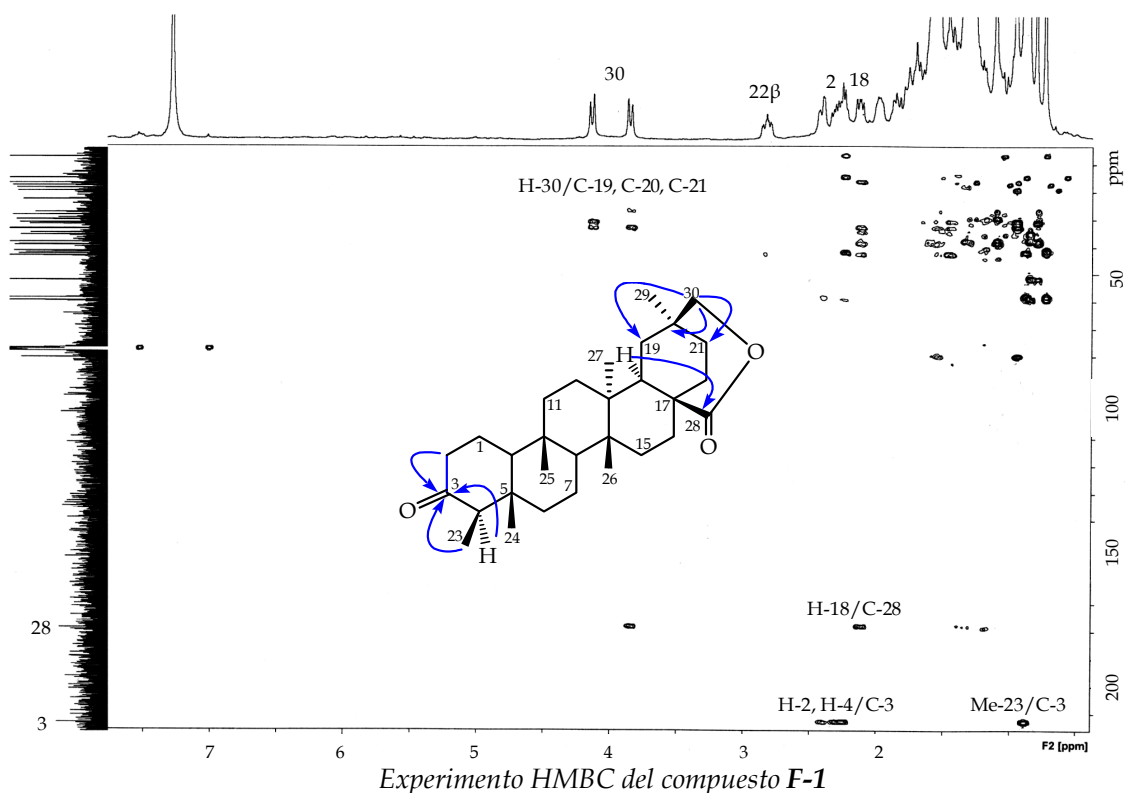
Estos datos (tabla 4.1.1) están de acuerdo con una estructura de triterpeno pentacíclico de la serie del friedelano para el compuesto **F-1**.



Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto **F-1**

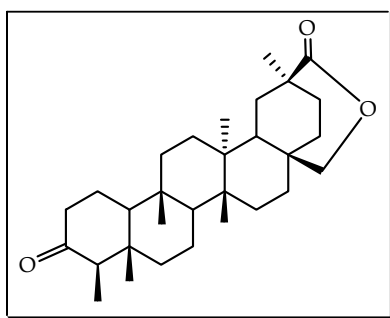
Por otra parte, aunque las señales a 3,86 y 4,14 δ_H corresponden a un grupo CH_2OH , ésta funcionalización fue descartada, ya que el desplazamiento de su correspondiente carbono a 79,7 δ_C es aproximadamente 10 veces mayor que el característico de un grupo CH_2OH . Estos datos y la presencia de la señal de carbono para un ácido carboxílico a 177,0 δ_C , sugieren que el compuesto **F-1** presenta una lactona.

La posición de los grupos funcionales en la molécula se determinó mediante un experimento HMBC, en el que se observó correlación de la señal a 3,86, 4,14 δ_H con los carbonos a 31,0 δ_C (C-21), 32,8 δ_C (C-20) y 34,1 δ_C (C-19), así como correlación entre el metino a 2,13 δ_H (H-18) y el carbono carboxílico a 177,0 δ_C . Así mismo, se observó correlación entre la señales a 0,90 δ_H (Me-23), 2,26 δ_H (H-4) y 2,31, 2,42 δ_H (H-2) con el carbono carbonílico a 213,0 δ_C . Estas correlaciones nos permitieron situar al grupo carbonilo sobre C-3 y la lactona entre los carbonos C-28,C-30 del esqueleto de triterpeno.



Revisada la bibliografía química, encontramos descrito un compuesto (maytenfolona⁶⁵) relacionado con el producto **F-1**, cuya diferencia estructural radica en la disposición de la lactona sobre el esqueleto de friedelano. Así, maytenfolona presenta la lactona entre los carbonos C-30, C-28, mientras que en nuestro producto se encuentra situada entre los carbonos C-28, C-30.

Estos datos nos permiten establecer la estructura de **F-1** como 3-oxo-*D:A*-friedoolean-28,30-olida, para el cual proponemos el nombre de **jelskolida**.



Estructura de maytenfolona

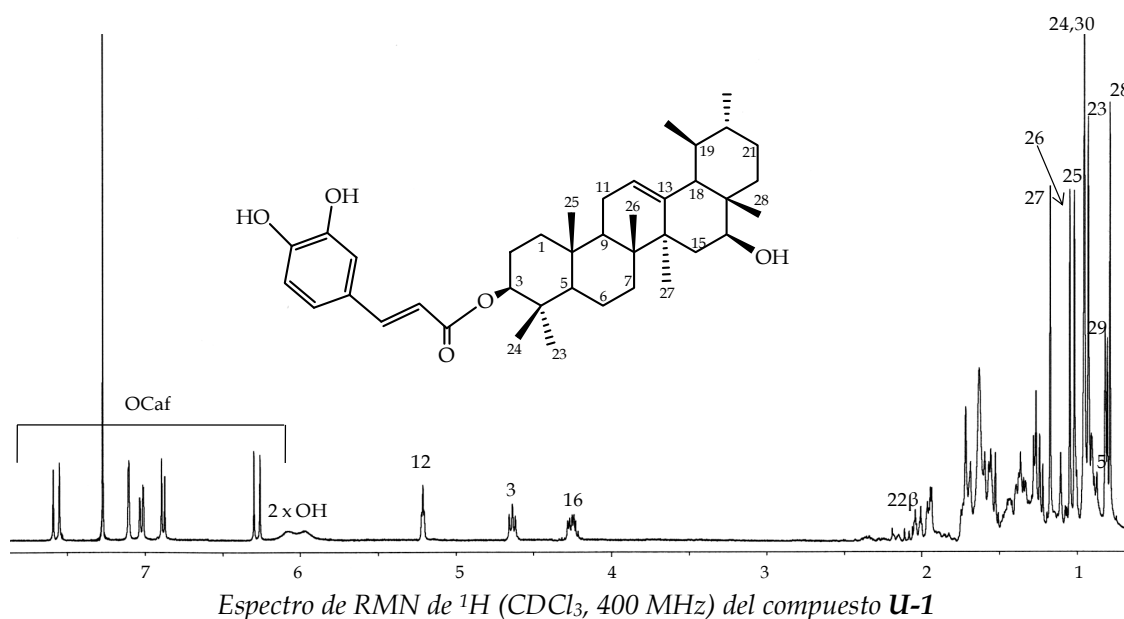
Triterpeno U-1

El compuesto que hemos denominado **U-1**, presentó una fórmula molecular $C_{39}H_{56}O_5$, determinada por espectrometría de masas de alta resolución. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción correspondientes a grupo hidroxilo (3368 cm^{-1}), éster α,β -insaturado (1676 cm^{-1}) y anillo aromático (758 cm^{-1}).

El espectro de RMN de ^1H (tabla 4.1.1) indicó la presencia de ocho metilos ($0,81\text{-}1,19\ \delta_{\text{H}}$), señales asignables a dos protones metínicos unidos a oxígeno a $4,27\ \delta_{\text{H}}$ y $4,66\ \delta_{\text{H}}$, y una señal correspondiente a un protón vinílico a $5,23\ \delta_{\text{H}}$ (1H , t, $J = 3,9\text{ Hz}$). Además, se observaron señales asignables a un doble enlace *trans* ($J = 15,7\text{ Hz}$) a $6,30$ y $7,58\ \delta_{\text{H}}$ y un sistema ABC de anillo aromático a $6,90\ \delta_{\text{H}}$ (1H , d, $J = 8,3\text{ Hz}$), $7,04\ \delta_{\text{H}}$ (1H , dd, $J = 1,6, 8,3\text{ Hz}$) y $7,12\ \delta_{\text{H}}$ (1H , d, $J = 1,6\text{ Hz}$) con acoplamientos *orto*, *orto/meta* y *meta*, respectivamente, señales características de un éster derivado del ácido caféico. Esto se corroboró en su espectro de RMN de ^{13}C (tabla 4.1.1), donde se observaron señales correspondientes a un cafeato [$114,4$ (d), $115,5$ (d), $116,3$ (d), $122,3$ (d), $127,7$ (s), $143,8$ (s), $144,5$ (d), $146,2$ (s), $167,5$ (s) δ_{C}], dos carbonos vinílicos

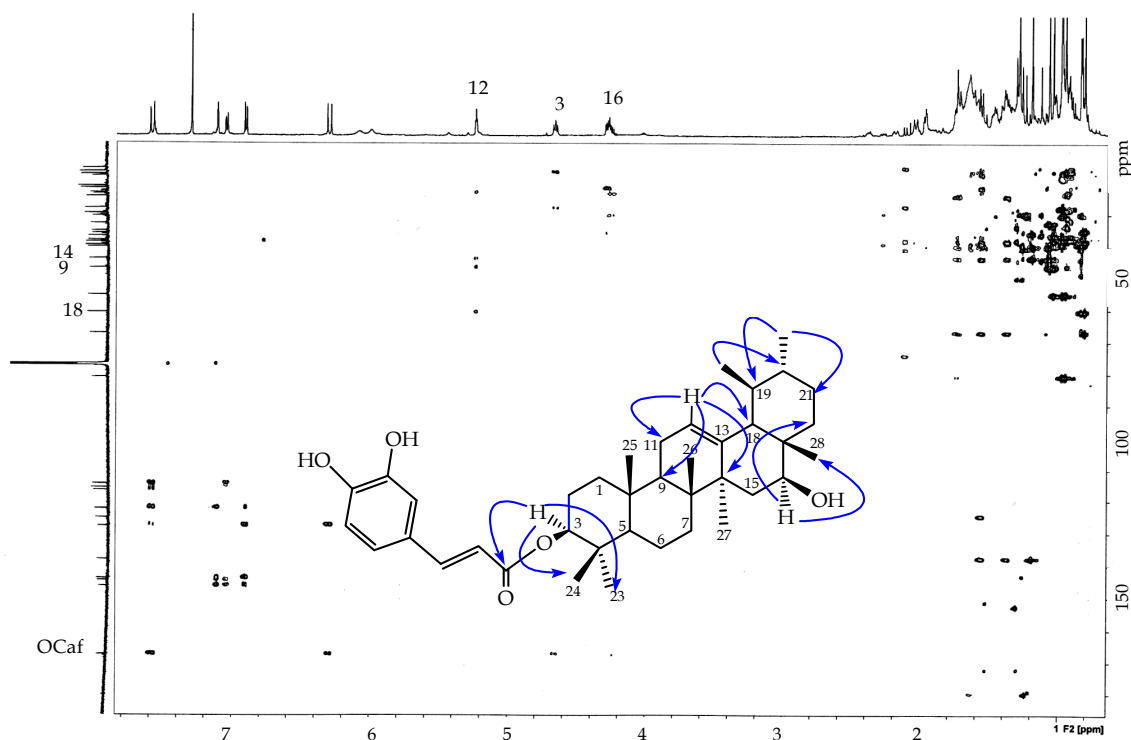
⁶⁵ Kuo, Y. H.; Ou, J. C. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58* (7), 1103-1108.

a 125,1 δ_C y 138,0 δ_C , así como dos señales de carbonos metínicos unidos a oxígeno a 67,2 δ_C y a 81,0 δ_C .

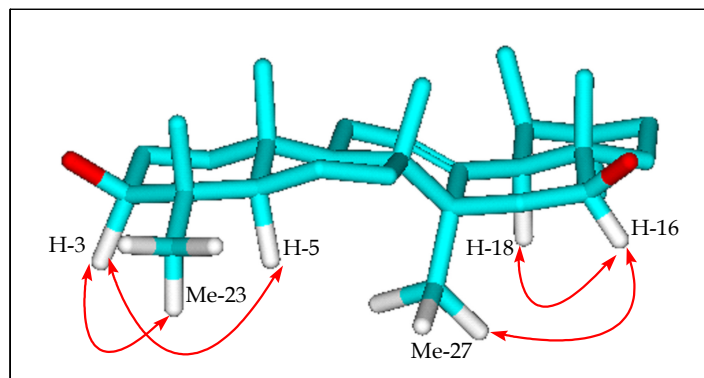


Por otra parte, la presencia en el experimento DEPT 90° de dos carbonos metínicos a 39,5 δ y 39,6 δ , asignables a los carbonos C-19 y C-20, junto con la correlación observada en un experimento COSY entre los protones a 1,37 y 0,96 δ_H (H-19 y H-20, respectivamente) y los metilos a 0,98 y 0,83 δ_H , respectivamente, confirmaron que el triterpeno **U-1** corresponde a la serie del ursano. Así mismo, en el experimento HMBC se observó correlación entre el metilo a 0,83 δ_H (Me-29) y las señales a 30,5 δ_C (C-21) y 39,5 δ_C (C-19) y correlación entre el metilo a 0,98 δ_H (Me-30) y el carbono a 39,6 δ_C (C-20).

La localización de los demás grupos funcionales en la molécula fue determinada mediante un experimento heteronuclear HMBC. Así, la posición del éster aromático sobre el carbono C-3 fue establecida al observarse correlación entre el protón a 4,66 δ_H (H-3) y las señales a 167,5 δ_C (C=O), 28,2 δ_C (C-23) y 16,9 δ_C (C-24). Además, correlación entre el protón a 5,23 δ_H (H-12) y los carbonos a 60,7 δ_C (C-18), 46,9 δ_C (C-9), 44,1 δ_C (C-14) y 23,4 δ_C (C-11), situaron el doble enlace sobre los carbonos C-12, C-13, mientras que la correlación entre el protón a 4,27 δ_H (H-16) y las señales a 22,0 δ_C (C-28) y 35,2 δ_C (C-22) indicaron que el grupo hidroxilo secundario se encuentra sobre el carbono C-16.

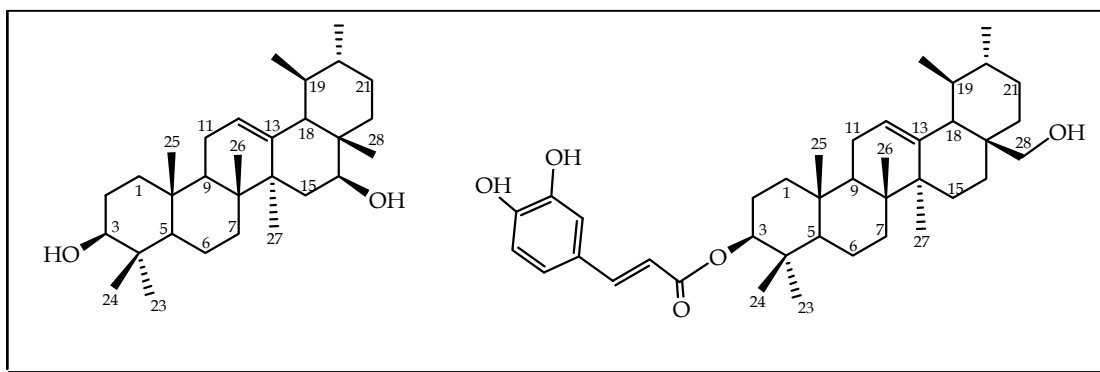
Experimento HMBC del compuesto **U-1**

La estereoquímica relativa del éster en C-3 se estableció basándose en consideraciones biogénicas, el análisis de las constantes de acoplamiento y confirmada mediante un experimento ROESY. Así, se observó efecto ROE de H-3 ($4,66 \delta_H$) con el Me-23 ($0,95$) y H-5 ($0,91 \delta_H$), determinándose la estereoquímica como β para el éster en C-3. Así mismo, la estereoquímica β del alcohol secundario se estableció al observarse correlación de H-16 con el Me-27 ($1,19 \delta_H$) y H-18 ($1,56 \delta_H$).

Efectos ROE observados en el experimento ROESY de **U-1**

Revisando la bibliografía encontramos un compuesto relacionado con **U-1**, pero que no presenta un grupo éster sobre C-3⁶⁶ (ursan-12-en-3 β ,16 β -diol). Cabe destacar que este compuesto ha sido aislado, recientemente, de la corteza de raíz de *M. jelskii* en nuestro grupo de investigación, lo que sugiere que sería el precursor del compuesto **U-1**.

Así mismo, en la bibliografía química se describe un compuesto que presenta el mismo éster sobre el carbono C-3 que **U-1**, pero con un alcohol primario sobre C-28 en lugar del alcohol sobre C-16 (cafeato de uvaol)⁶⁷.



Estructura de ursan-12-en-3 β ,16 β -diol (izquierda) y cafeato de uvaol (derecha)

⁶⁶ Kasprzyk, Z.; Pyrek, J. *Phytochemistry*. **1968**, *7*, 1631-1639.

⁶⁷ Ohsaki, A.; Imai, Y.; Naruse, M.; Ayabe, S.; Komiyama, K.; Takashima, J. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 469-471.

Tabla 4.1.1. Datos de RMN de $^1\text{H}^a$ (400 MHz) y $^{13}\text{C}^b$ (100 MHz) de los triterpenos F-1, O-1 y U-1

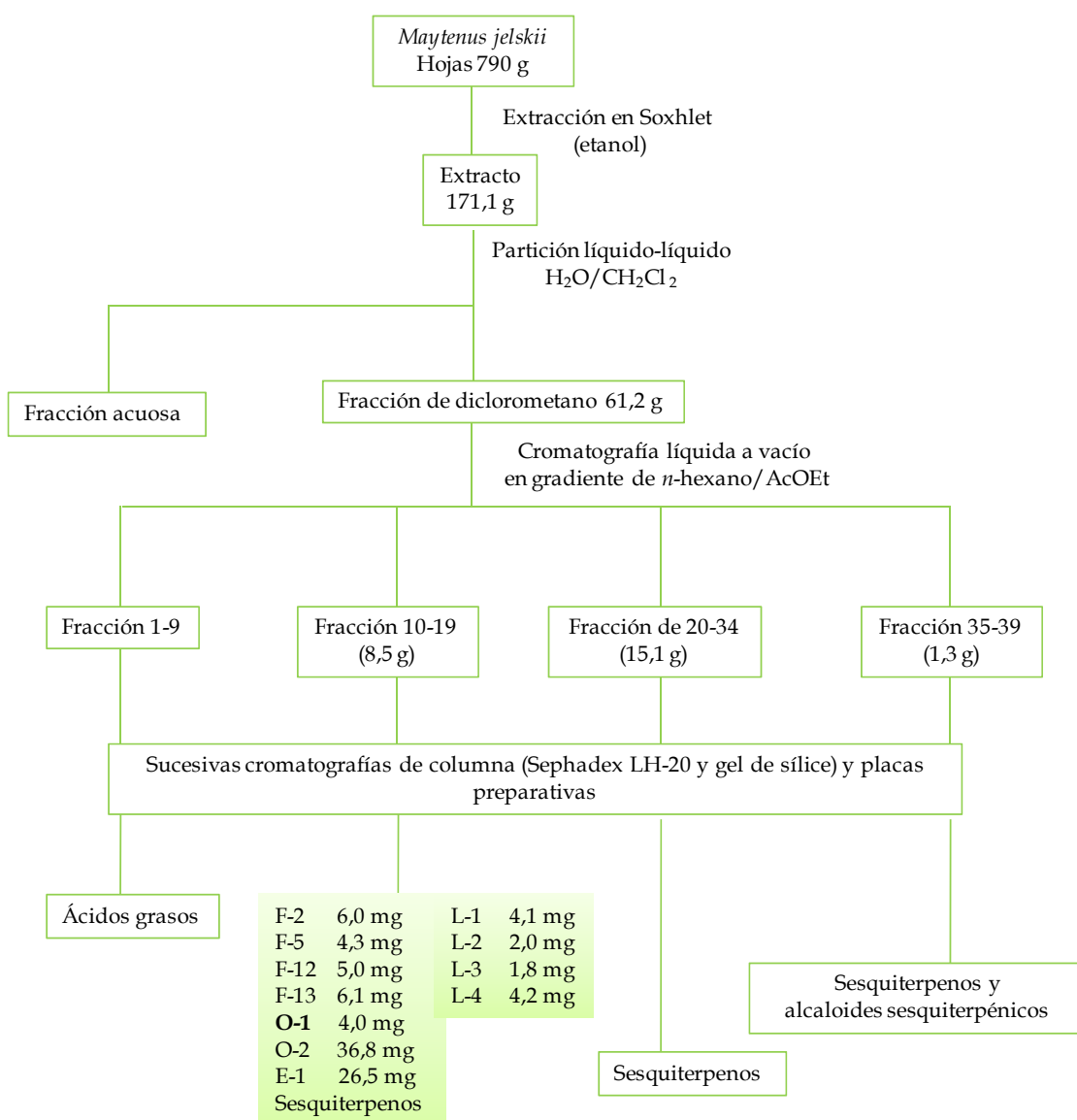
| Posición | O-1 | | F-1 | | U-1 | |
|----------|--------------------------------------|---------------------|--------------------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} |
| 1 | 1,14 m* 2,67 d (13,7) | 41,3 t | 1,65, 1,96 | 27,6 t | 1,15, 1,72 | 38,6 t |
| 2 | 1,60 | 27,6 t | 2,31, 2,42 | 41,2 t | 1,74 | 23,7 t |
| 3 | 3,23 t (7,9) | 78,5 d | - | 213,0 s | 4,66 t (8,4) | 81,0 d |
| 4 | - | 39,5 s | 2,26 | 57,9 d | - | 38,0 s |
| 5 | 0,73 | 55,7 d | - | 41,7 s | 0,91 m | 55,3 d |
| 6 | 1,31, 1,51 | 17,9 t | 1,27, 1,78 | 40,7 t | 1,46, 1,60 | 18,2 t |
| 7 | 1,29*, 1,44 | 35,5 t | 1,34, 1,46 | 17,8 t | 1,40, 1,61 | 32,8 t |
| 8 | - | 42,8 s* | 1,35* | 51,5 d | - | 40,1 s |
| 9 | 1,35 | 56,3 d | - | 37,4 s | 1,56* | 46,9 d |
| 10 | - | 39,4 s | 1,54* | 59,0 d | - | 36,8 s |
| 11 | 4,00 dt (4,8, 10,8) | 70,9 d | 1,30, 1,54* | 34,8 t | 1,97 | 23,4 t |
| 12 | 1,32, 1,71 | 38,3 t | 1,52, 1,71 | 30,4 t | 5,23 t (3,9) | 125,1 d |
| 13 | 2,37 d _a (11,6) | 37,7 d | - | 37,5 s | - | 138,0 s |
| 14 | - | 42,8 s* | - | 38,4 s | - | 44,1 s |
| 15 | 1,14* | 27,3 t | 1,45, 1,55 | 32,6 t | 1,37*, 1,73 | 35,9 t |
| 16 | 1,27, 1,84 | 31,5 t | 1,32, 1,43 | 29,3 t | 4,27 dd (4,9, 11,2) | 67,2 d |
| 17 | - | 39,0 s | - | 42,4 s | - | 38,5 s |
| 18 | - | 137,5 s | 2,13 d (8,1, 12,1) | 38,5 d | 1,56* | 60,7 d |
| 19 | 5,18 s | 134,5 d | 1,69, 1,87 | 34,1 t | 1,37* | 39,5 d |
| 20 | - | 32,2 s | - | 32,8 s | 0,96 | 39,6 d |
| 21 | 1,29*, 1,45 | 33,2 t | 1,26, 1,59 | 31,0 t | 1,47, 1,63 | 30,5 t |
| 22 | 1,57 | 31,1 t | 1,35*, 2,81 | 22,0 t | 1,09, 2,05 dt (2,7,14,0) | 35,2 t |
| 23 | 1,00 s | 28,2 c | 0,90 d (6,2) | 6,6 c | 0,95 s | 28,2 c |
| 24 | 0,81 s* | 15,5 c | 0,74 s | 14,3 c | 0,98 s* | 16,9 c* |
| 25 | 1,11 s | 16,8 c | 0,87 s | 17,0 c | 1,04 s | 15,8 c |
| 26 | 1,09 s | 17,4 c | 0,81 s | 19,0 c | 1,07 s | 16,9 c* |
| 27 | 0,81 s* | 14,4 c | 1,11 s | 16,1 c | 1,19 s | 24,5 c |
| 28 | 3,48, 3,63 d _{AB} (10,8) | 65,4 t | - | 177,0 s | 0,81 s | 22,0 c |
| 29 | 0,99 s | 29,7 c | 0,96 | 26,7 c | 0,83 d (6,3) | 17,7 c |
| 30 | 0,98 s | 30,5 c | 3,86, 4,14 d _{AB} (11,5) | 79,7 t | 0,98* | 21,4 c |

^a δ , CDCl_3 . J en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC. En el caso que no se indica multiplicidad son multipletes o señales solapadas. ^b Datos basados en experimentos DEPTs y HMBC. *Señales solapadas.

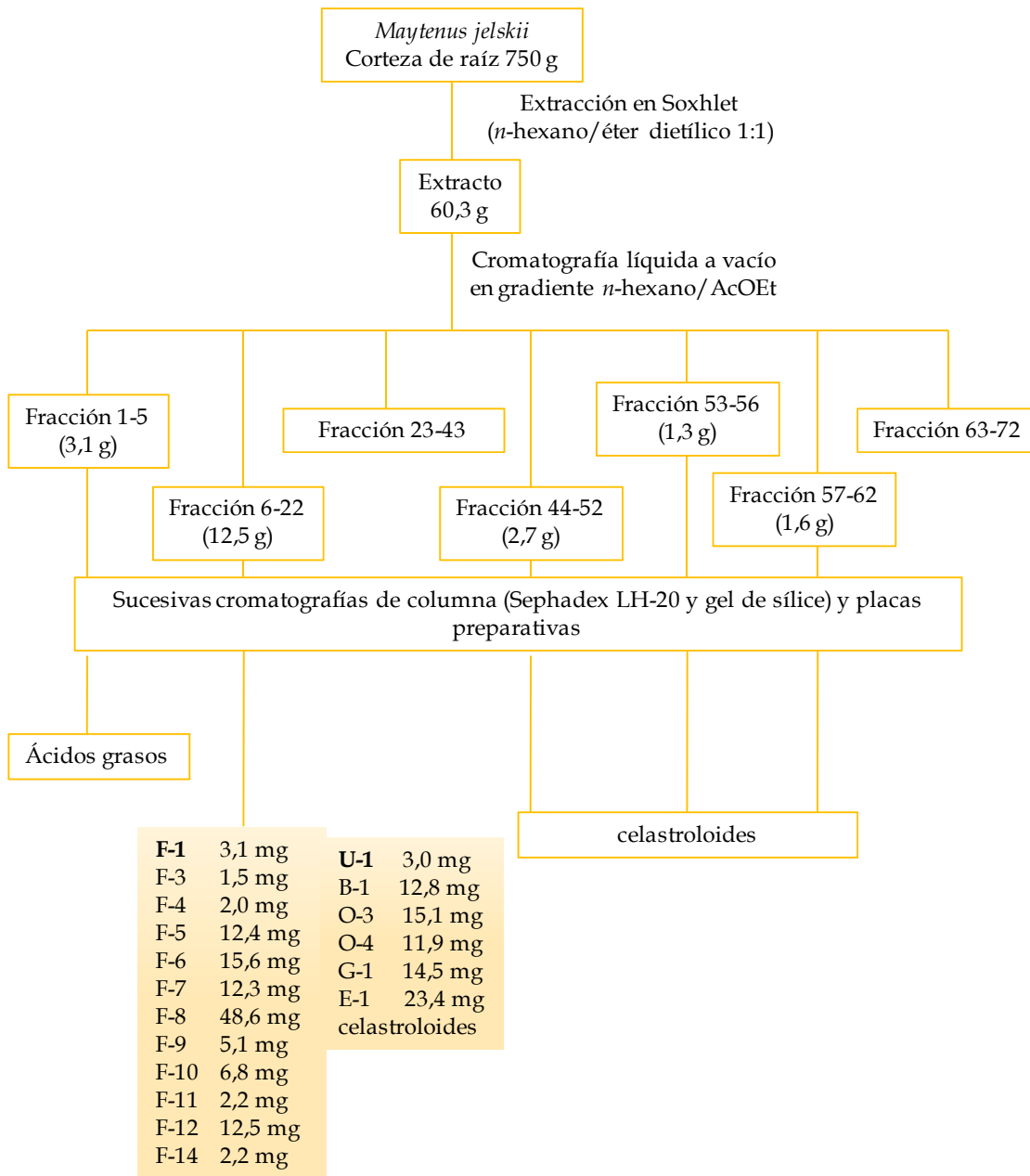
4.1.3. Parte experimental

4.1.3.1. Separación cromatográfica de los triterpenos aislados de las hojas y raíces de *M. jelskii*

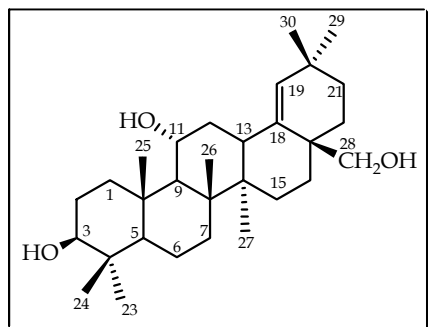
En la separación cromatográfica realizada a la fracción de diclorometano de las hojas de *M. jelskii* y al extracto de *n*-hexano-éter dietílico (1:1) de la corteza de raíz de la misma especie, se aislaron 25 triterpenos y un esteroide. A continuación se presentan los esquemas de separación tanto de hojas (esquema 4.1.1) como de raíces (esquema 4.1.2), llevados a cabo para la obtención de dichos compuestos.



Esquema 4.1.1. Separación cromatográfica de los triterpenos aislados de la fracción de diclorometano de las hojas de *Maytenus jelskii*.



Esquema 4.1.2. Separación cromatográfica de los triterpenos aislados del extracto *n*-hexano-éter dietílico (1:1) de la corteza de raíz de *Maytenus jelskii*.

4.1.3.2. Datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos de los nuevos triterpenos**Triterpeno O-1****3β,11α,28-Trihidroxi-olean-18-eno
(28-hidroxi-nivadiol)**

Descripción: sólido amorfo (4,0 mg)

 $[\alpha]_D^{20}$ - 5,15 (c 1,6, CHCl₃).IR ν_{\max} 3403, 2931, 2864, 1460, 1382, 1264, 1036, 1008, 758 cm⁻¹.

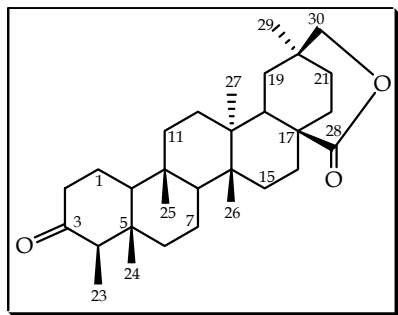
RMN ¹H (δ, CDCl₃) 0,73 (1H, m, H-5); 0,81 (6H, s, Me-24, Me-27); 0,98 (3H, s, Me-30); 0,99 (3H, s, Me-29); 1,00 (3H, s, Me-23); 1,09 (3H, s, Me-26); 1,11 (3H, s, Me-25); 1,14 (3H, m, H-15, H-1α); 1,27, 1,84 (2H, m, H-16); 1,29, 1,44 (2H, m, H-7); 1,29, 1,45 (2H, m, H-21); 1,31, 1,51 (2H, m, H-6); 1,32, 1,71 (2H, m, H-12); 1,35 (1H, m, H-9); 1,57 (2H, m, H-22); 1,60 (2H, m, H-2); 2,37 (1H, da, J = 11,6 Hz, H-13); 2,67 (1H, d, J = 13,7 Hz, H-1β); 3,23 (1H, t, J = 7,9 Hz, H-3); 3,48, 3,63 (2H, d_{AB}, J = 10,8 Hz, H-28); 4,00 (1H, dt, J = 4,8, 10,8 Hz, H-11); 5,18 (1H, s, H-19).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 14,4 (c, C-27); 15,5 (c, C-24); 16,8 (c, C-25); 17,4 (c, C-26); 17,9 (t, C-6); 27,3 (t, C-15); 27,6 (t, C-2); 28,2 (c, C-23); 29,7 (c, C-29); 30,5 (c, C-30); 31,1 (t, C-22); 31,5 (t, C-16); 32,2 (s, C-20); 33,2 (t, C-21); 35,5 (t, C-7); 37,7 (d, C-13); 38,3 (t, C-12); 39,0 (s, C-17); 39,4 (s, C-10); 39,5 (s, C-4); 41,3 (t, C-1); 42,8 (2 x s, C-8, C-14); 55,7 (d, C-5); 56,3 (d, C-9); 65,4 (t, C-28); 70,9 (d, C-11); 78,5 (d, C-3); 134,5 (d, C-19); 137,5 (s, C-18).

EM *m/z* (%) 440 [M⁺-H₂O] (12), 427 (100), 409 (45), 404 (27), 389 (16), 361 (7), 335 (4), 253 (12), 201 (42), 189 (52), 175 (64).

EMAR *m/z* Calculado para C₃₀H₄₈O₂ [M⁺-H₂O], 440,3654; observado, 440,3652.

Triterpeno F-1



3-Oxo-D:A-friedoolean-28,30-olida (jelskolida)

Descripción: sólido amorfo (3,1 mg)

$[\alpha]_D^{20}$ - 15,3 (c 0,2, CHCl₃).

IR ν_{\max} 2928, 2868, 1714, 1462, 1385, 1188, 1150, 1069, 755 cm⁻¹.

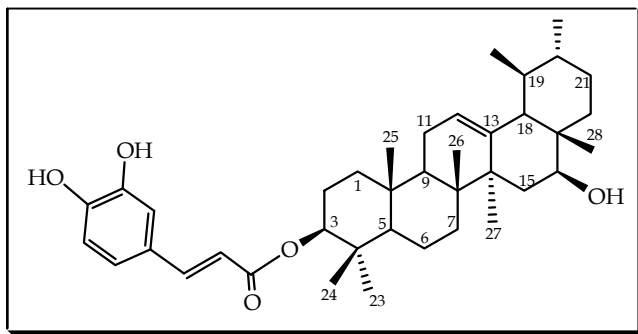
RMN ¹H (δ, CDCl₃) 0,74 (3H, s, Me-24); 0,81 (3H, s, Me-26); 0,87 (3H, s, Me-25); 0,90 (3H, d, J = 6,2 Hz, Me-23); 0,96 (3H, s, Me-29); 1,11 (3H, s, Me-27); 1,26, 1,59 (2H, m, H-21); 1,27, 1,78 (2H, m, H-6); 1,30, 1,54, (2H, m, H-11); 1,32, 1,43 (2H, m, H-16); 1,34, 1,46 (2H, m, H-7); 1,35, 2,81 (2H, m, H-22); 1,35 (1H, m, H-8); 1,45, 1,55 (2H, m, H-15); 1,52, 1,71 (2H, m, H-12); 1,54 (1H, m, H-10); 1,65, 1,96 (2H, m, H-1); 1,69, 1,87 (2H, m, H-19); 2,13 (1H, dd, J = 8,1, 12,1 Hz, H-18); 2,26 (1H, m, H-4); 2,31, 2,42 (2H, m, H-2); 3,86, 4,14 (2H, d_{AB}, J = 11,5 Hz, H-30).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 6,6 (c, C-23); 14,3 (c, C-24); 16,1 (c, C-27); 17,0 (c, C-25); 17,8 (t, C-7), 19,0 (c, C-26); 22,0 (t, C-22); 26,7 (c, C-29); 27,6 (t, C-1); 29,3 (t, C-16); 30,4 (t, C-12); 31,0 (t, C-21); 32,6 (t, C-15); 32,8 (s, C-20); 34,1 (t, C-19); 34,8 (t, C-11); 37,4 (s, C-9); 37,5 (s, C-13); 38,4 (s, C-14); 38,5 (d, C-18); 40,7 (t, C-6); 41,2 (t, C-2); 41,7 (s, C-5); 42,4 (s, C-17); 51,5 (d, C-8); 57,9 (d, C-4); 59,0 (d, C-10); 79,7 (t, C-30); 177,0 (s, C-28); 213,0 (s, C-3).

EM m/z (%) 454 [M⁺] (100), 439 (36), 395 (13), 369 (54), 355 (10), 301 (46), 259 (29), 233 (21), 207 (58), 121 (91), 95 (90).

EMAR m/z Calculado para C₃₀H₄₆O₃ [M⁺], 454,3447; observado, 454,3420.

Triterpeno U-1

**3β-caffeato-ursan-12-eno**

Descripción: sólido amorfo
(3,0 mg)

$[\alpha]_D^{20}$ +21,1 (c 0,5, CHCl₃).

IR ν_{\max} 3368, 2945, 2864, 1676, 1520, 1460, 1264, 1197, 1186, 1036, 758 cm⁻¹.

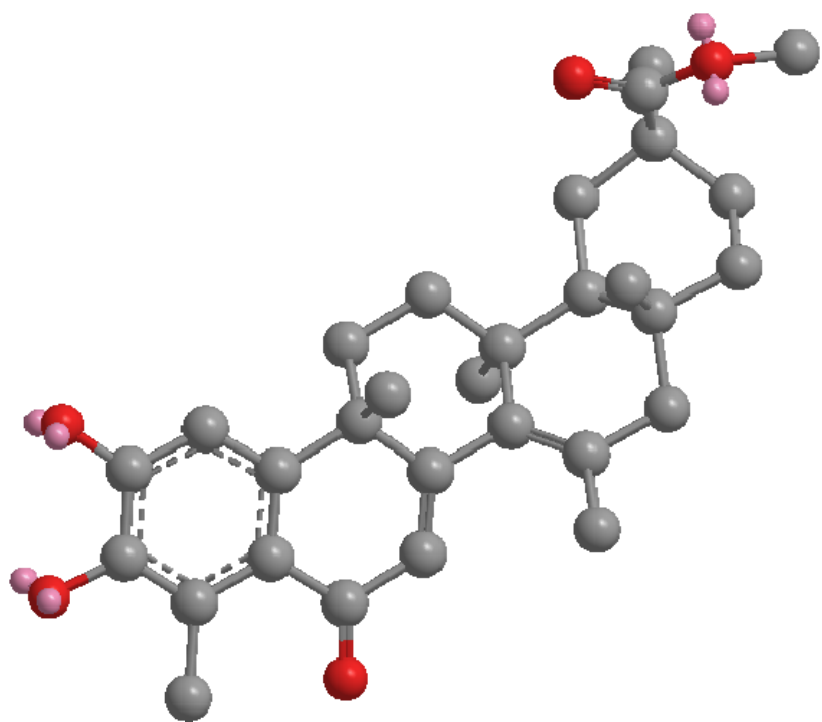
UV (EtOH)
 λ_{\max} (log ϵ) 333 (4,2), 302 (4,0), 251 (3,9), 218 (4,2) nm.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 0,81 (3H, s, Me-28); 0,83 (3H, d, J = 6,3 Hz, Me-29); 0,91 (1H, m, H-5); 0,95 (3H, s, Me-23); 0,96 (1H, m, H-20); 0,98 (6H, s, Me-24, Me-30); 1,04 (3H, s, Me-25); 1,07 (3H, s, Me-26); 1,09, 2,05 (2H, m, H-22); 1,15, 1,72 (2H, m, H-1); 1,19 (3H, s, Me-27); 1,37 (2H, m, H-19, H-15); 1,40, 1,61 (2H, m, H-7); 1,46, 1,60 (2H, m, H-6); 1,47, 1,63 (2H, m, H-21); 1,56 (2H, m, H-9, H-18); 1,73 (1H, m, H-15); 1,74 (2H, m, H-2); 1,97 (2H, m, H-11); 4,27 (1H, dd, J = 4,9, 11,2 Hz, H-16); 4,66 (1H, t, J = 8,4 Hz, H-3); 5,23 (1H, t, J = 3,9 Hz, H-12); OCaf [6,30 (1H, d, J = 15,7 Hz), 6,90 (1H, d, J = 8,3 Hz), 7,04 (1H, dd, J = 1,6, 8,3 Hz), 7,12 (1H, d, J = 1,6 Hz), 7,58 (1H, d, J = 15,7 Hz)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 15,8 (c, C-25); 16,9 (2 x c, C-24, C-26); 17,7 (c, C-29); 18,2 (t, C-6); 21,4 (c, C-30); 22,0 (c, C-28); 23,4 (t, C-11); 23,7 (t, C-2); 24,5 (c, C-27); 28,2 (c, C-23); 30,5 (t, C-21); 32,8 (t, C-7); 35,2 (t, C-22); 35,9 (t, C-15); 36,8 (s, C-10); 38,0 (s, C-4); 38,5 (s, C-17); 38,6 (t, C-1); 39,5 (d, C-19); 39,6 (d, C-20); 40,1 (s, C-8); 44,1 (s, C-14); 46,9 (d, C-9); 55,3 (d, C-5); 60,7 (d, C-18); 67,2 (d, C-16); 81,0 (d, C-3); 125,1 (d, C-12); 138,0 (s, C-13); Ocín [114,4 (d), 115,5 (d), 116,3 (d), 122,3 (d), 127,7 (s), 143,8 (s), 144,5 (d), 146,2 (s), 167,5 (s)].

EM m/z (%) 604 [M⁺] (12), 586 (28), 498 (100), 480 (45), 424 (27), 391 (16), 271 (7), 234 (12), 163 (52).

EMAR m/z Calculado para C₃₉H₅₆O₅ [M⁺], 604,4128; observado, 604,4119.



4.2. Celastroloides

4.2.1 Introducción

Los **celastroides** son un grupo de metabolitos que incluyen a las **nor-triterpenometilénquinonas** y que se encuentran exclusivamente en las raíces de las especies de la familia Celastraceae, considerándose, por tanto, marcadores quimiotaxonómicos de ésta. El término celastroides fue acuñado por Brüning y Wagner¹, siendo utilizado posteriormente² para nombrar también a los derivados fenólicos, los dímeros y los trímeros de estos metabolitos. La complejidad estructural, el alto grado de funcionalización y las actividades biológicas que presentan ha provocado el interés por este tipo de compuestos. Así, aún cuando los primeros compuestos de este tipo en ser descritos fueron pristimerina y celastrol³ (figura 4.2.1), aislados de *Pristimera indica* y *T. wilfordii*, respectivamente, actualmente se continúa la investigación sobre sus propiedades citotóxicas^{4,5}.

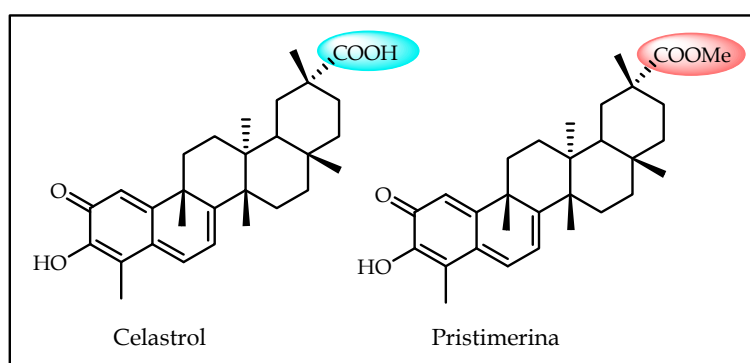


Figura 4.2.1. Primeros celastroides descritos en la literatura química.

¹ Brüning, R.; Wagner, H. *Phytochemistry*. **1978**, *17*, 1821.

² Gunatilaka, A.A.L. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer-Verlag: Nueva York, **67**, **1996**.

³ Gisvold, O. J. *Amer. Pharm. Assoc.* **1939**, *28*, 440-443.

⁴ Marcal da Costa, P.; Ferreira, P. M. P. Bolzani, V. ; Furlan, M.; Macedo dos Santos, V.; Corsino, J. Odorico, M. Costa-Lotufo, L.; Montenegro, R. C.; Pessoa, C. *Toxicol. in vitro*. **2008**, *22*, 854-863.

⁵ Pang, X.; Yi, Z.; Zhang, J.; Lu, B.; Sung, B.; Qu, W.; Aggarwal, B. B.; Liu, M. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1951-1959.

El esqueleto básico de las **nor-triterpenometilénquinonas** es el núcleo 24-nor-*D:A*-friedoleano con el sistema metilenquinónico en los anillos A/B y con funciones oxigenadas en los carbonos C2 y C3 (figura 4.2.2). Los **nor-triterpenometilénfenoles** presentan el mismo núcleo 24-nor-*D:A*-friedoleano, pero aromatizado en el anillo A e igualmente con funciones oxigenadas en los carbonos C2 y C3. Oxidaciones adicionales en ambos esqueletos dan lugar a los diferentes compuestos aislados⁶.

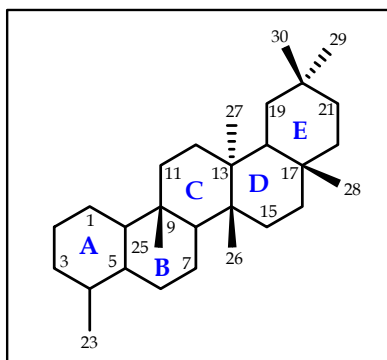


Figura 4.2.2 Estructura del núcleo 24-nor-*D:A*-friedoleano.

La **biosíntesis** de este tipo de compuestos fue propuesta por Kutney y col.⁷ en 1981 (figura 4.2.3), en la cual se propone que el C-29 de la friedelina se oxida a un grupo ácido y el C-24 a un alcohol, dando lugar a los productos intermedios, ácido salaspérmico, ácido orthosphénico y 6 β -hidroxiorthosphénico. A partir de este último, por apertura oxidativa del agrupamiento hemicétalico, se forma un compuesto con un grupo ácido en C-24, cuya descarboxilación y posterior aromatización da lugar a los triterpenofenoles, mientras que la deshidratación en C-6 da lugar al sistema quinónico, característico de las quinonas triterpénicas como el celastrol.

⁶ Rodríguez, F. M. *Estudio fitoquímico de especies de la familia Celastraceae (flora panameña): Maytenus blepharodes, Crossopetalum lobatum*. 2000, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.

⁷ Kutney, J. P.; Beale, M. H.; Salisbury, P. J.; Stuart, K. L.; Worth, B. R.; Townsley, P. M.; Chalmers, W. T.; Nilsson, K.; Jacoli, G. G. *Phytochemistry*. 1981, 20, 653-657.

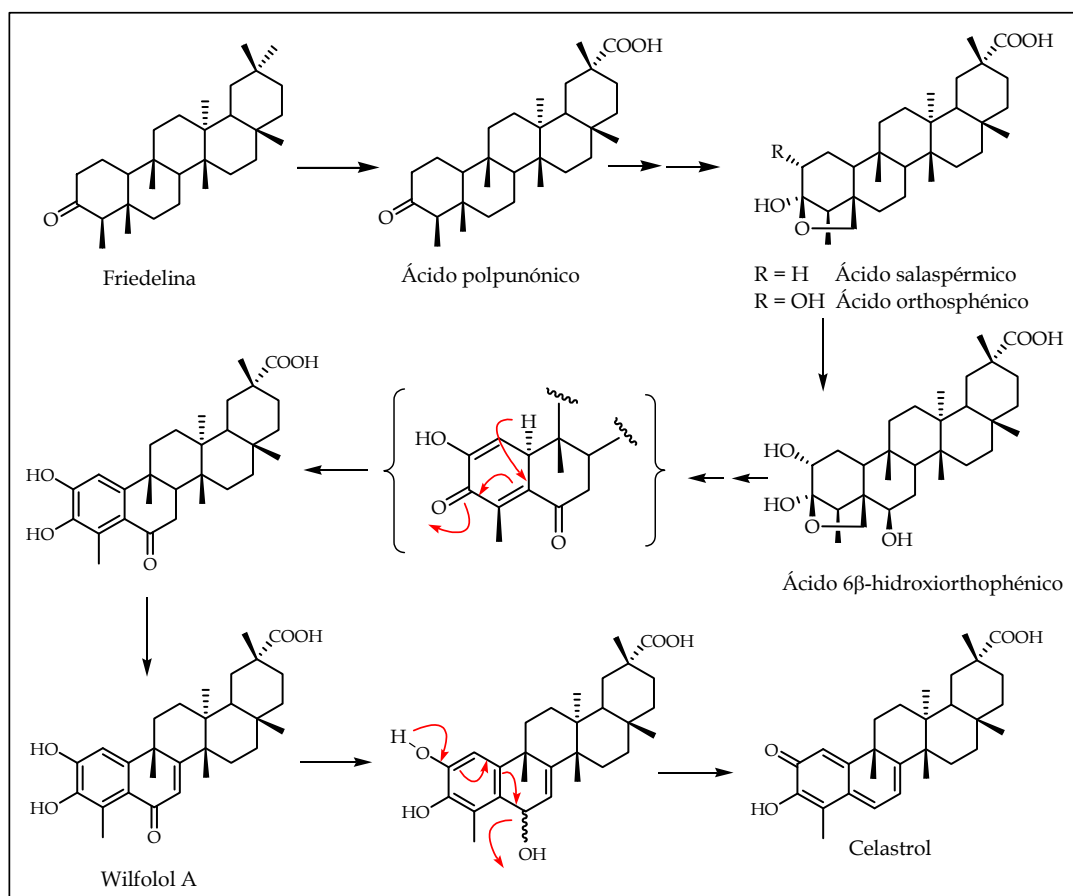


Figura 4.2.3. Propuesta biogénica de las nor-triterpenometilénquinonas.

Los **dímeros triterpénicos** están constituidos por dos unidades de pristimerina, tingena, netzahualcoyona y/o sus congéneres, que presentan una subunidad en forma quinónica y la otra en forma aromática, unidas por un puente diéter en disposición *cis* entre los anillos A de ambas subunidades o bien entre el anillo A de la unidad aromática y el anillo B de la quinónica.

Este grupo de metabolitos es menos extenso que los dos anteriores y hasta el año 2000 se habían aislado de siete especies (*Maytenus ilicifolia*, *M. chuchuhuasca*, *M. umbellata*, *M. magellanica*, *M. scutioides*, *M. blepharodes* y *Rzedowskia tolantonguensis*) sólo 33 dímeros⁶, mientras que en el periodo 2001-2004 se describieron 31 dímeros nuevos, aislados de *M. blepharodes*⁸, *M. magellanica* y *M. chuchuhuasca*^{9,10,11,12}.

⁸ González, A. G.; Kennedy, M. L. Rodríguez, F. M.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Moujir, L. *Tetrahedron*. **2001**, 57, 1283-1287.

⁹ Shirota, O. Sekita, S.; Satake, M.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 1148-1150.

¹⁰ Shirota, O.; Sekita, S.; Satake, M.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. *Helv. Chim. Acta.* **2004**, 87, 1536-1544.

¹¹ Shirota, O.; Sekita, S.; Satake, M.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 739-746.

¹² Shirota, O.; Sekita, S.; Satake, M.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. *Chem. Biodiv.* **2004**, 1, 1296-1307.

La biosíntesis de estos dímeros triterpénicos ha sido postulada por Itokawa y col.¹³, y está basada en reacciones Diels-Alder, paso clave en diversas conversiones biosintéticas¹⁴. Ello sugiere que una triterpenometilénquinona como la pristimerina puede estar en equilibrio tautomérico con la forma *ortoquinona*, la 2,3-dicetona correspondiente y que ambos podrían reaccionar para dar el correspondiente dímero de triterpeno.

Esta propuesta biosintética ha sido comprobada en nuestro laboratorio mediante reacción de 4 α -hidroxipristimerina (una *ortoquinona*), obtenida por tratamiento de la pristimerina con dimetildioxano (DMDO), y la pristimerina. El producto de reacción fue un dímero¹⁵ no descrito anteriormente en la literatura química (figura 4.2.4).

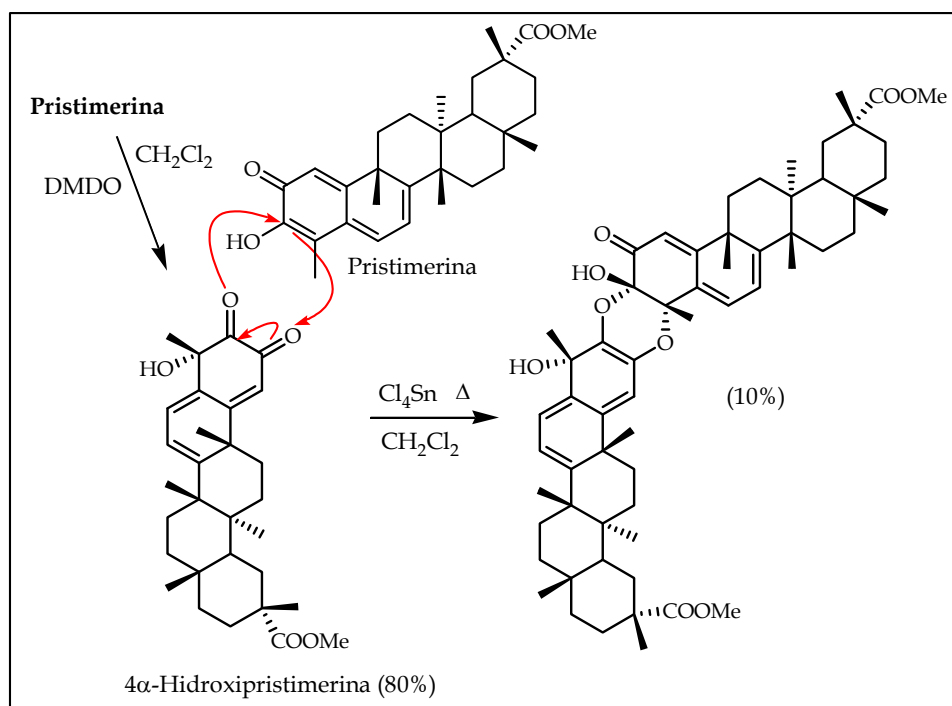


Figura 4.2.4. Esquema de reacción para la obtención de un dímero triterpénico característico de celastráceas.

Además, según la orientación espacial que adopte la metilénquinona (dienófilo) frente a la *ortoquinona* (dieno) se pueden obtener cuatro posibles isómeros de cada dímero. El ataque de la *ortoquinona* puede ocurrir por la cara *si-si* o por la cara *re-re* del doble enlace de la metilénquinona. Esto da lugar a dos estereoisómeros α y β . Los regioisómeros resultantes de la reacción entre los anillos

¹³ Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. *Tetrahedron*. **1995**, 51, 1107-1120.

¹⁴ Laschat, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 289-291.

¹⁵ González, A. G.; Alvarenga, N. L.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Mujir, L. M. *Tetrahedron*. **1996**, 52, 9597-9608.

A de una metilénquinona y una *orto*quinona (dímeros A-A) pueden presentar una unión [3-O-3', 4-O-2'] (regioisómero A) o una unión [3-O-2', 4-O-3'] (regioisómero B) (figura 4.2.5).

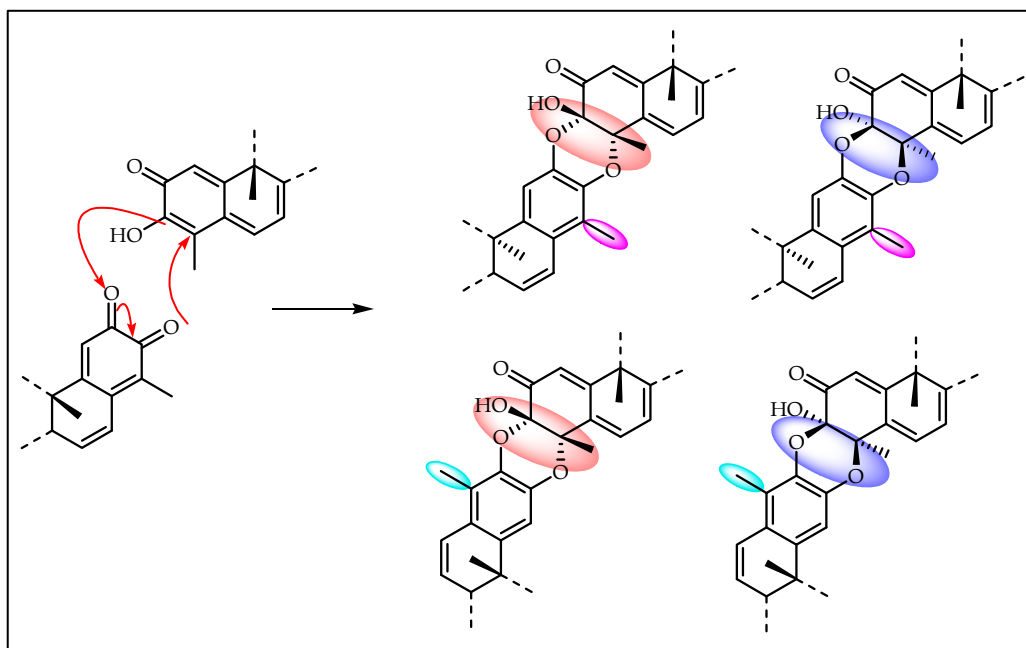


Figura 4.2.5. Posibles regio y estereoisómeros de los dímeros triterpénicos con unión A-A.

Los regioisómeros resultantes de la reacción entre el doble enlace C-6-C-7 del anillo B de un fenol y la dicetona del anillo A de una *orto*quinona (dímeros B-A) pueden presentar una unión [6-O-3', 7-O-2'] (regioisómero) o [6-O-2', 7-O-3'] (regioisómero *iso*) (figura 4.2.6).

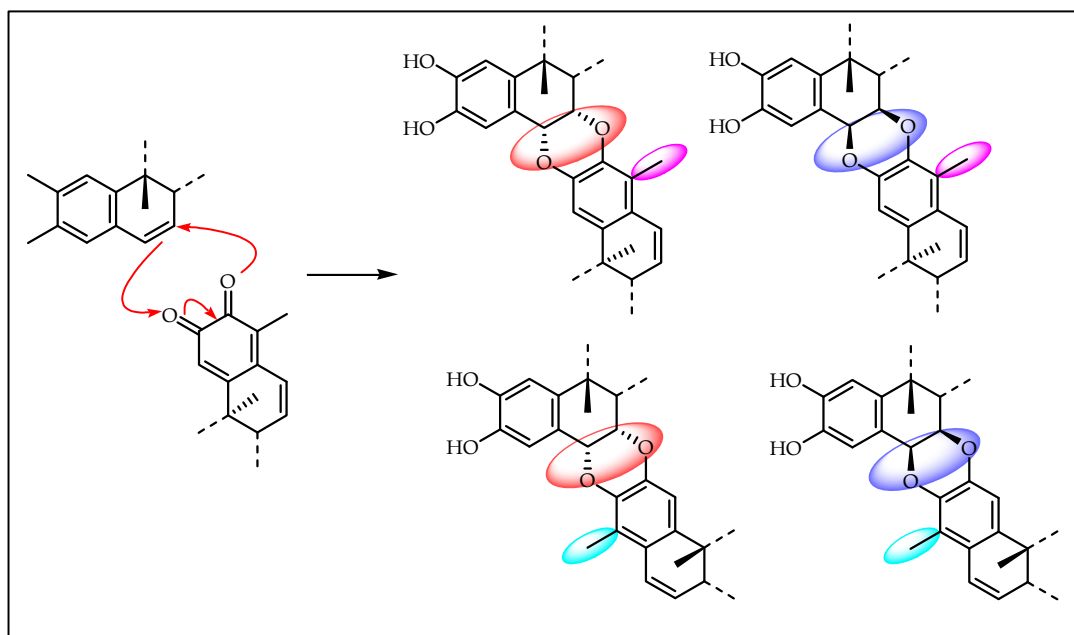


Figura 4.2.6. Posibles regio y estereoisómeros de los dímeros con unión B-A.

Por otra parte, en nuestro grupo de trabajo, se han aislado los dos únicos ejemplos de trímeros triterpénicos¹⁶, basados en unidades de pristimerina, que implican dos unidades en forma aromática y una en forma quinónica, unidas a través de los anillos A-A, B-A. Su biosíntesis podría tener lugar mediante una reacción de un triterpeno dimérico con un doble enlace en posición C6'-C7', como el escutionina α A¹⁵, aislado de *Maytenus scutioides* y la ortoquinona de una triterpenoquinona como la pristimerina (figura 4.2.7).

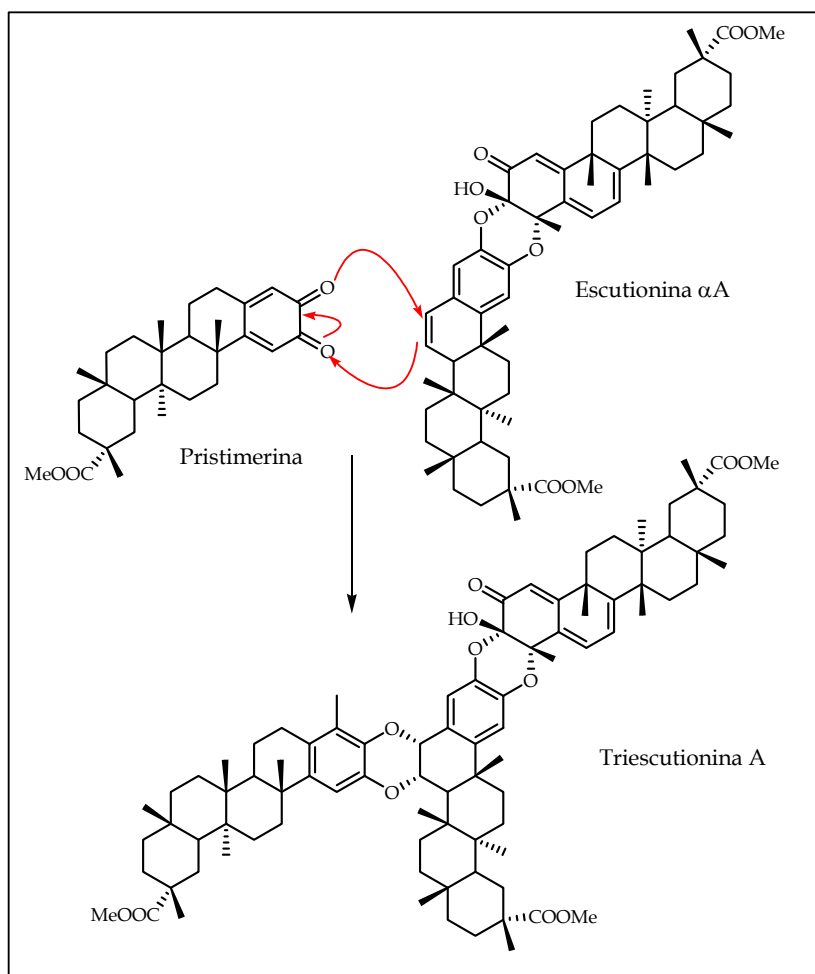


Figura 4.2.7. Propuesta de biosíntesis para los trímeros triterpénicos.

En el 2005 se describió el aislamiento de los primeros **aductos hetero-Diels-Alder** de triterpenoquinonas y sesquiterpenos de la corteza de la raíz de *Cheiloclinium hippocratoides*¹⁷, siendo la unidad enlazada al triterpeno un sesquiterpeno de la serie del guayano (figura 4.2.8).

¹⁶ González, A. G.; Alvarenga, N. L.; Bazzocchi, I. L.; Ravelo, A. G.; Moujir, L. J. *Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1185-1187.

¹⁷ Mesa-Siverio, D.; Chávez, H.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G. *Tetrahedron.* **2005**, *61*, 429-436.

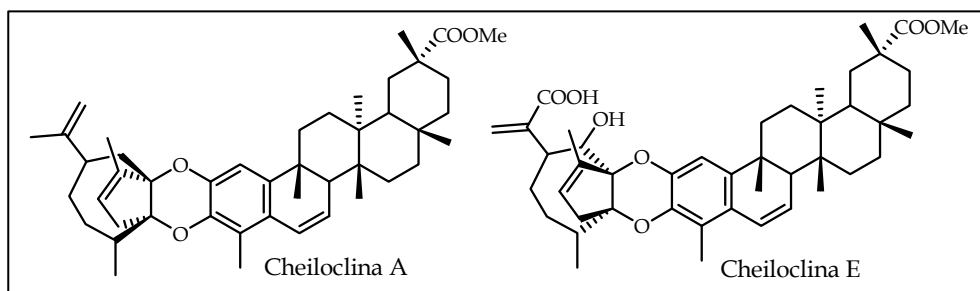


Figura 4.2.8. Aductos hetero Diels-Alder aislados de *Cheiloclinium hippocratioides*.

Respecto a la biosíntesis de este tipo de compuestos, los autores proponen que el anillo 1,4-dioxano se forma igual que los dímeros triterpénicos, a través de una reacción hetero Diels-Alder entre la unidad triterpénica, pristimerina en su forma tautomérica de ortoquinona y el doble enlace tetrasustituido del sesquiterpeno, tal y como se muestra en la figura 4.2.9.

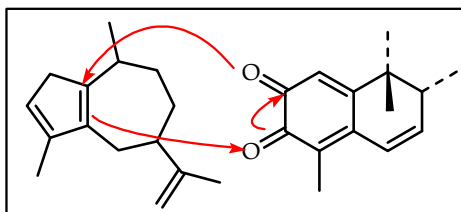


Figura 4.2.9. Propuesta biogénica de los aductos hetero-Diels-Alder.

En cuanto a la regiosustitución, podemos encontrarnos con dos posibles orientaciones: el metilo-23 del triterpeno y el isopropilideno del sesquiterpeno en el mismo o en lados opuestos y la estereoquímica depende del ataque del sesquiterpeno por la cara α o por la cara β del triterpeno (figura 4.2.10).

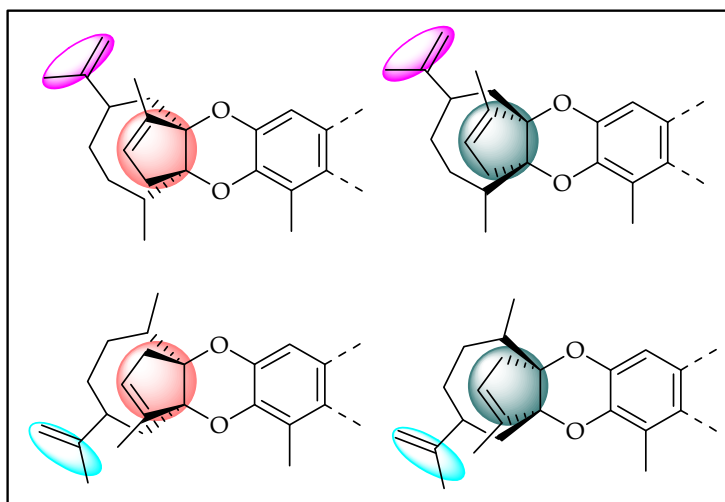


Figura 4.2.10. Posibles regio y estereoisómeros de los aductos hetero Diels-Alder.

4.2.1.1. Actividades biológicas de celastroloides

4.2.1.1.1 Actividad insecticida

Estudios realizados de la actividad insecticida y disuasoria de la alimentación de triterpenometilénquinonas, mostraron que un derivado de la tingenona, la **20 α -hidroxi-tingenona**, era capaz de inhibir el crecimiento de la larva de *Cydia pomonella* (Lepidoptera), a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$, causando la mortalidad del 100% de la población al cabo de 5 días¹⁸. Otro estudio¹⁹ puso de manifiesto la capacidad insecticida de la **pristimerina**, mostrando su efecto disuasorio de la alimentación y provocando la mortalidad de *Sitophilus zeamans*, presentando mejores resultados que la rotenona, usada como control positivo (figura 4.2.11).

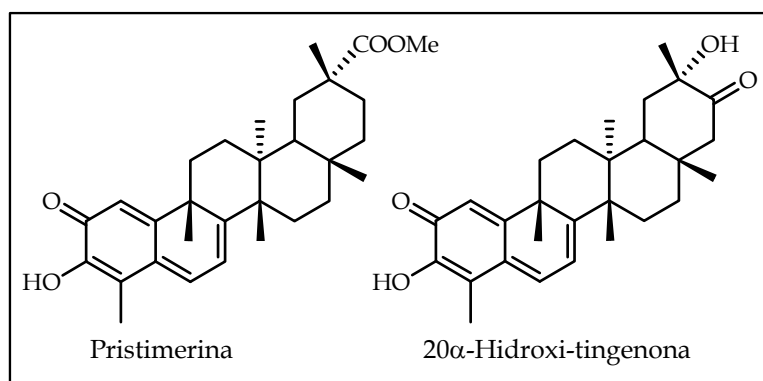


Figura 4.2.11. *nor*-Triterpenometilénquinonas con actividad insecticida.

4.2.1.1.2. Actividad antioxidante

Los antioxidantes presentes en las hojas y semillas de muchas especies vegetales poseen la capacidad de reducir el daño oxidativo asociado a muchas patologías, entre las cuales se encuentran el cáncer, la arterioesclerosis, artritis y enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas e inmunes. Así pues, los antioxidantes son muy útiles en la prevención de estas enfermedades, ya que pueden actuar secuestrando los radicales libres, formando complejos de metales prooxidantes o agentes reductores, evitando la formación de especies tóxicas del

¹⁸ Avila, J.; Teixidó, A.; Velázquez, C. Alvarenga, N.; Ferro, E.; Canela, R. *J. Agric. Food. Chem.* **2000**, *48*, 88-92.

¹⁹ Reyes-Chilpa, R.; Jiménez-Estrada, M.; Critobal-Telésforo, E.; Torres-Colin, L.; Villavicencio, M. A.; Pérez-Escandón, B. E.; Mercado-González, R. *Economy Botany.* **2002**, *57*, 54-64.

oxígeno²⁰. No obstante, ante la sospecha de que los antioxidantes sintéticos podrían ser potenciales carcinogénicos, en los últimos años se ha incrementado el interés por los antioxidantes de origen natural²¹.

En la búsqueda de antioxidantes naturales, usando el radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidracilo (DPPH), se ha evaluado la actividad de varias quinonas, entre las que se encuentran el netzahualcoyeno, netzhualcoyonol y netzahualcoyondiol²². Estos estudios mostraron que el **netzahualcoyeno** (figura 4.2.12), a la concentración de 50 μM , fue capaz de reducir en más de un 50% el DPPH²³.

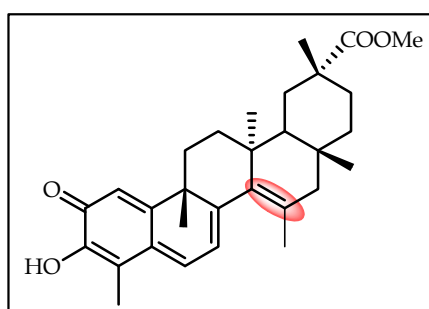


Figura 4.2.12. Estructura del netzahualcoyeno.

4.2.1.1.3. Actividad antimicrobiana

En general, las quinonas presentan un espectro de actividad medio, ya que son activas sólo frente a bacterias Gram-positivas^{24,25}. Además, se ha probado que el grado de actividad antibacteriana de este tipo de compuestos aumenta con el grado de oxidación de la molécula²⁶. Así, la **netzahualcoyona** con una CMI (concentración mínima inhibitoria) de 1,5-1,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ frente a *Staphylococcus aureus*, resultó más activa que otras quinonas de su misma serie, pero menos funcionalizadas. Ello permitió establecer que la presencia de una cetona y un alcohol secundario en el anillo E son indispensables para dicha actividad²⁷.

²⁰ Andlauer, W.; Fürst, P. *Cereal Foods World*. **1998**, 43, 356-359.

²¹ Jayaprakasha, G. K.; Selvi, T.; Sakariah, K. K. *Food Research International*. **2003**, 36, 117-122.

²² Jeller, A. H. Silva, D. H. S.; Liao, L. M.; Bolzani, V. S.; Furlan, M. *Phytochemistry*. **2004**, 65, 1977-1982.

²³ Carvalho, P. R.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Furlan, M. *Chem. Biodiv.* **2005**, 2, 367-372.

²⁴ Moujir, L.; Gutiérrez-Navarro, A.; González, A. G.; Ravelo, A. G.; Luis, J. G. *Biochemical Systematics and Ecology*. **1990**, 18, 25-28.

²⁵ Moujir, L.; Gutiérrez-Navarro, A.; González, A. G.; Ravelo, A. G.; Luis, J. G. *Biomedical Letters*. **1991**, 46, 7-15.

²⁶ Muñoz, O.; Penaloza, A.; González, A. G.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, Alveranga, N. L. *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier Science: The Netherland, **1996**, 18, 739-784.

²⁷ González, A. G.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez, J.; González, C. M.; Luis, J. G.; Ferro, E. A.; Gutiérrez, A.; Moujir, L.; Las Heras, F. G. *Il Farmaco*. **1988**, 43, 501-505.

Los 6-oxo-fenoles triterpénicos, **zeylasteral** y **demetilzeylasteral**, presentaron una actividad antibacteriana significativa, resultando más activos en la fase de crecimiento exponencial del microorganismo, disminuyendo la formación de colonias de *Bacillus subtilis* en un 10^{-3} ufc. Estudios realizados con estos triterpenofenoles indicaron que su mecanismo de acción radica en la inhibición de la síntesis de la pared celular o de la membrana plasmática²⁸. En otro trabajo, realizado por nuestro grupo de investigación, demostramos que el **pristimerol**²⁹ fue activo frente a bacterias Gram-positivas, incluyendo *Enterococcus faecalis*, bacteria multirresistente. Además, cabe destacar que la actividad antimicrobiana del **celastrol**, **6-deoxo-blepharodol** y triterpenofenoles relacionados, así como el estudio de sus mecanismos de acción han sido objeto de dos tesis doctorales en nuestro grupo de trabajo^{30,31}. Por otra parte, **isoiguesterina** y **20-*epi*-isoiguesterol** presentaron actividad frente a *S. aureus* (CI₅₀ de 0,85 y 0,7 µg/ml, respectivamente) y *Mycobacterium intracellulare* (CI₅₀ de 4,5 y 15 µg/ml, respectivamente)³² (figura 4.2.13).

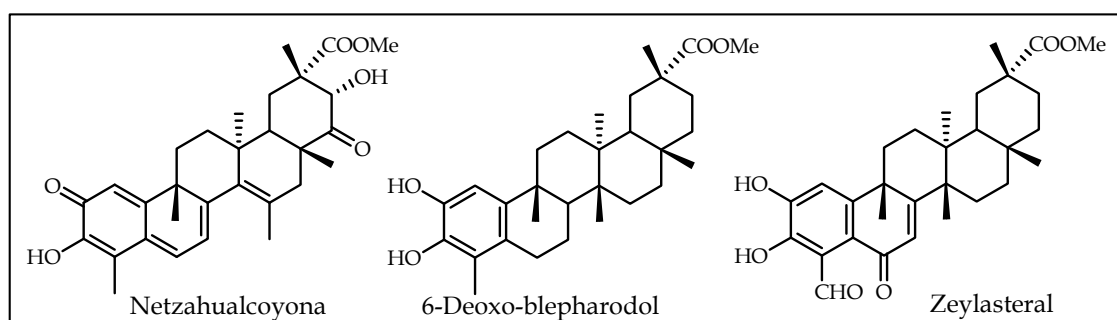


Figura 4.2.13. Ejemplos de celastroloides con actividad antibacteriana.

Diversas especies de la familia Celastraceae se han descrito por su actividad antiparasitaria. Así, una serie de nor-triterpenometilénquinonas aisladas de *Salacia kraussii*, se evaluaron por su actividad antiparasitaria *in vitro* frente a *Plasmodium*

²⁸ De León, L.; Beltrán, B.; Moujir, L. *Planta Med.* **2005**, *71*, 313-319.

²⁹ Rodríguez, F. M.; López, M. R.; Jiménez, I. A.; Moujir, L.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L. *Tetrahedron.* **2005**, *61*, 2513-2519.

³⁰ Padilla-Montaño, N. *Mecanismo de Acción de Triterpenoquinonas de Celastráceas.* **2009**, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.

³¹ Rodríguez López, M. *Triterpenofenoles de Celastráceas. Actividad antimicrobiana y mecanismo de acción.* **2010**, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.

³² Thiem, D. A.; Sneden, A. T.; Khan, S. I.; Tekwani, B. L. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 251-254.

falciparum, resultando **17-metoxicarbonil-28-nor-isoiguesterina** e **isoiguesterol** tres veces más activos que la cloroquina frente a la cepa multirresistente K1^{33,34}.

Por otra parte, se ha evaluado la actividad de la **isoiguesterina** y **20-epi-isoiguesterol** frente a *Leishmania donovani*, resultando ser más activas que la anfotericina B, usado actualmente en el tratamiento de esta parasitosis³² (figura 4.2.14).

Además, se han evaluado **pristimerina** y **tingenona** frente a *Giardia intestinalis*, que es un protozoo causante de la infección intestinal conocida como giardiasis. De los compuestos ensayados, la pristimerina fue 10 veces más potente (CI₅₀ de 0,11 µM) que el metronidazol, fármaco utilizado en el tratamiento de la giardiasis, mientras que la tingenona mostró valores similares al fármaco³⁵.

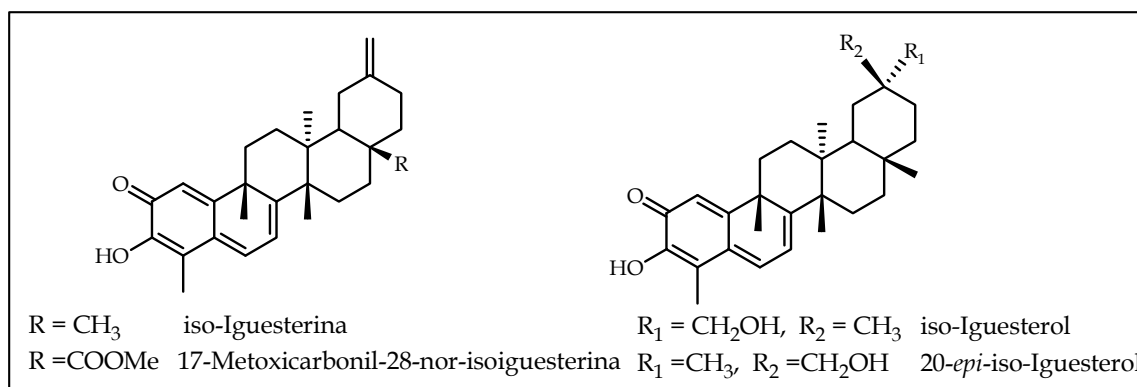


Figura 4.2.14. Celastroloides con actividad antiparasitaria.

4.2.1.1.4. Actividad anticancerígena

Son numerosos los estudios llevados a cabo para probar el potencial anticancerígeno de las triterpenometilénquinonas³⁶. Los nor-triterpenometilénfenoles con un grupo aldehído sobre C23 y un grupo carbonilo en C6 resultan los más activos, destacando, **22β-hidroxi-6,23-dioxotingenol**, aislado de *Maytenus amazonica*, con una CI₅₀ de 0,25 µg/ml, frente a las líneas celulares P-388 (linfoma de ratón) y A-459 (carcinoma humano de pulmón) y el **acetato de macrocarpin A**, derivado de un metabolito aislado de *Maytenus macrocarpa*, con

³³ Figueiredo, J. N.; Rätz, B.; Séquin, U. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 718-723.

³⁴ Kirandeep, K.; Meenakshi, J.; Tarandeep, K.; Rahul, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3229-3256.

³⁵ Mena-Rejón, G.; Pérez-Espadas, A.; Moo-Puc, R.; Cedillo-Rivera, R.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez-Díaz, I. A.; Quijano, L. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 863-865.

³⁶ Alveranga, N.; Ferro, E. A. *Studies in Natural Products Chemistry, Bioactive Natural Products (part K)*, Elsevier Science: The Netherlands **2005**, *30*, 635-702.

una CI_{50} de 0,25 frente a las cuatro líneas ensayadas, P-388, A-459, HT-29 (carcinoma humano de colon) y MEL-28 (melanoma humano).

Se ha evaluado también, la actividad inhibidora de la topoisomerasa II de una serie de celastroloides, resultando **demetilzeylasterona** el más activo, con un valor de CI_{50} de 17,6 μM ³⁷. Este metabolito resultó, así mismo, citotóxico frente a la línea celular MCF-7 (cáncer de mama), con una CI_{50} de 12,5 μM .

Ensayos *in vitro* frente a líneas celulares de leucemia (HL-60) tratadas con **celastrol**, mostraron un patrón de fragmentación del ADN, característico de las células que han sufrido apoptosis, además de inhibir la topoisomerasa II³⁸.

Recientemente, Morita y col.³⁹ describieron la actividad antimitótica de la **tingenona**, **22 β -hidroxi-tingenona**, **pristimerina** y **celastrol**, que inhiben la polimerización de la tubulina en la replicación celular.

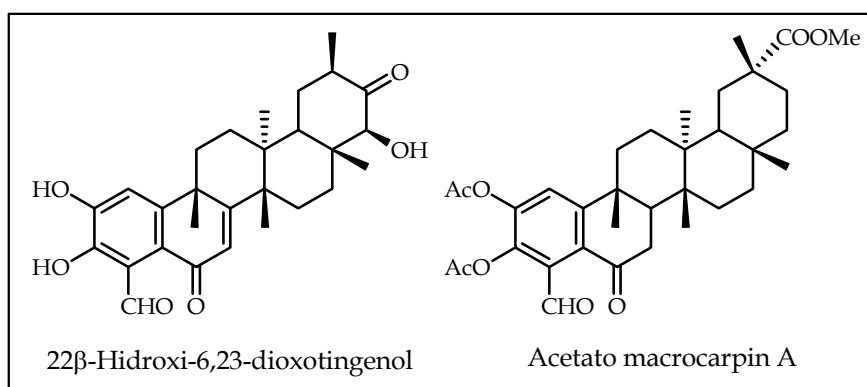


Figura 4.2.15. Celastroloides con actividad anticancerígena.

Además, existen estudios teóricos que demuestran la correlación entre la actividad citotóxica y los efectos electrónicos relacionados con la adición nucleofílica sobre C-6 en los celastroloides⁴⁰.

4.2.1.1.5. Actividad antiinflamatoria

Un estudio realizado con el **celastrol** mostró la capacidad que tiene, en células de macrófago estimuladas con un lipopolisacárido, para inhibir la activación del

³⁷ Furbacher, T. R.; Gunatilaka, L. J. *Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1294-1296.

³⁸ Nagase, M.; Oto, J.; Sugiyama, S.; Yube, K.; Takaishi, Y.; Sakato, N. *Bios. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 1883-1887.

³⁹ Morita, H.; Hirasawa, Y.; Muto, A.; Yoshida, T.; Sekita, S.; Shirota, O. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1050-1052.

⁴⁰ Setzar, W. N. *J. Mol. Model.* **2009**, *15*, 197-201.

factor nuclear κ B (NF- κ B)^{41,42}, factor que regula la expresión de numerosos genes⁴³, particularmente aquellos relacionados con la respuesta inmune, inflamatoria y antiapoptótica⁴⁴.

También se ha evaluado la actividad antiinflamatoria *in vivo* de la **pristimerina** y la **tingenona**, que inhiben la producción de IL-1 β (interleucinas), relacionadas con la enfermedad de Crohn, en monocitos humanos, con una CI₅₀ de 40,6 y 58 nM, respectivamente⁴⁵.

4.2.1.1.6. Actividad antiviral

La actividad antiviral del **celastrol** se corroboró, ya que fue efectivo en la inhibición del virus de la hepatitis C (CI₅₀ de 36,4 μ M), actuando específicamente a nivel de la enzima NS5B, una ARN polimerasa-ARN dependiente (HCV-RdRp). En este mismo estudio, un **derivado del celastrol**, con agrupamiento fenólico en el anillo A, presentó una CI₅₀ de 24,6 μ M⁴⁶ (figura 4.2.16).

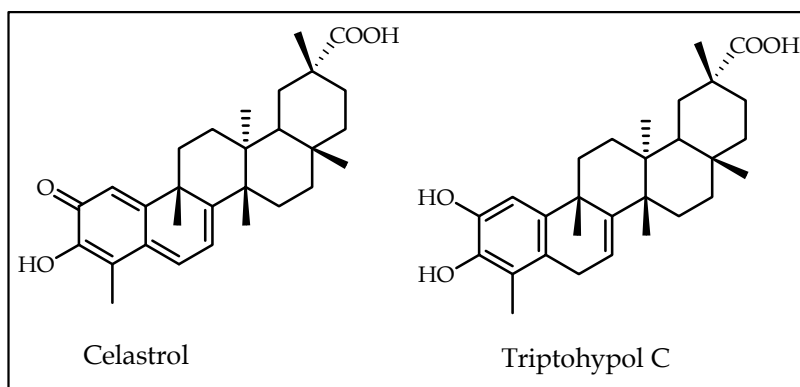


Figura 4.2.16. Celastroloides con actividad antiviral.

⁴¹ Jin, H. Z.; Hwang, B. Y.; Kim, H. S.; Lee, J. H.; Kim, Y. H.; Lee, J. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 89-91.

⁴² Kim, D. H.; Shin, E. K.; Kim, Y. H.; Lee, B. W.; Jun, J. G.; Park, J. H. Y.; Kim, J. K. *Eur. J. Clin. Invest.* **2009**, *39*, 819-827.

⁴³ Baldwin, A. S. *J. Clin. Invest.* **2001**, *107*, 3-6.

⁴⁴ Ghosh, S.; May, M. J.; Kopp, E. B. *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 225-260.

⁴⁵ Calixto, J. B.; Campos, M. M.; Otuki, M. F.; Santos, A. R. S. *Planta Med.* **2004**, *70*, 93-103.

⁴⁶ Jo, M.; Nakamura, N.; Kakiuchi, N.; Komatsu, K.; Qui, M. H.; Shimimotohno, K.; Simimotohno, K.; Hattori, M. *J. Nat. Med.* **2006**, *60*, 217-224.

4.2.2. Resultados y discusión

Del estudio fitoquímico de la corteza de raíz de *Maytenus jelskii* aislamos **29** celastroloides (figuras 4.2.17, 4.2.18 y 4.2.19), distribuidos en:

➤ **Dos triterpenometilénquinonas (Q-1 y Q-2)**, que fueron identificadas como: pristimerina⁴⁷ (Q-1) y tingenona⁴⁸ (Q-2).

➤ **Siete triterpenometilénfenoles (Fe-1 a Fe-7)**, seis de los cuales habían sido descritos con anterioridad en la bibliografía química y se identificaron como: 6-oxopristimerol⁴⁹ (Fe-2), 7-hidroxi-6-oxopristimerol⁵⁰ (Fe-3), 23-nor-6-oxopristimerol⁵¹ (Fe-4), blepharotriol²⁹ (Fe-5), 6 β -(2-oxo-propil)-pristimerol⁵² (Fe-6) y blepharodol²⁹ (Fe-7). El compuesto que resultó nuevo en la literatura lo hemos denominado Fe-1.

➤ **Diecisiete dímeros triterpénicos (DT-1 a DT-17)**, de los cuales dos resultaron nuevos en la bibliografía química (DT-1 y DT-2) y el resto fueron identificados como: escutidina α A¹⁵ (DT-3), 7,8-dihidroisoxuxuarina E α ⁵³ (DT-4), 7 α -hidroxi-7,8-dihidroisoxuxuarina E α ¹¹ (DT-5) isoxuxuarina A α ⁵⁴ (DT-6), 7,8-dihidroisoxuxuarina A α ¹¹ (DT-7), escutionina α A¹⁶ (DT-8), 7,8-dihidroescutionina α A¹⁵ (DT-9), escutionina β B⁶ (DT-10), 6',7'-dihidrocangorosin A⁶ (DT-11), escutionina α B⁸ (DT-12), 6',7'-dihidroescutionina α B⁸ (DT-13), 6 β -hidroxi-6',7'-dihidroescutionina α B⁵⁵ (DT-14), xuxuarina E β ⁵⁴ (DT-15), xuxuarina E α ⁵⁶ (DT-16) y 7,8-dihidroescutionina β B¹⁵(DT-17).

➤ **Tres trímeros triterpénicos (TT-1 a TT-3)**, dos de los cuales están descritos en la bibliografía como: triescutionina A¹⁶ (TT-2) y triescutionina B¹⁶ (TT-3).

⁴⁷ Johnson, A.; Jubi, P.; King, T.; Tam, S. *J. Chem. Soc.* **1963**, 2884.

⁴⁸ Monache, R.; Marini-Bettolo, G.; Gonçalves de Lima, O.; D'Albuquerque, I.; Barros Coelho, J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1973**, 1, 2725.

⁴⁹ Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 1675-1681.

⁵⁰ Ankli, A.; Heilmann, J.; Heinrich, M.; Sticher, O. *Phytochemistry*. **2000**, 54, 531-537.

⁵¹ Gamhlat, C. A.; Gunatilaka, A. A. Leslie. *Phytochemistry*. **1988**, 27, 3221-3224.

⁵² Pérez-Reyes, C. *Maytenus cuzcoina: Fuente de metabolitos secundarios bioactivos. Estudios de relación estructura-actividad*. **2006**, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.

⁵³ Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, 46, 102-106.

⁵⁴ Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Otokawa, H. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 1100-1104.

⁵⁵ Torres-Romero, D. *Metabolitos secundarios bioactivos aislados de *Celastrus vulcanicola* y *Cassine xylocarpa* (Celastraceae)*. **2008**, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.

⁵⁶ González, A. G.; Rodríguez, F. M.; Bazzocchi, I. L.; Ravelo, A. G. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 48-51.

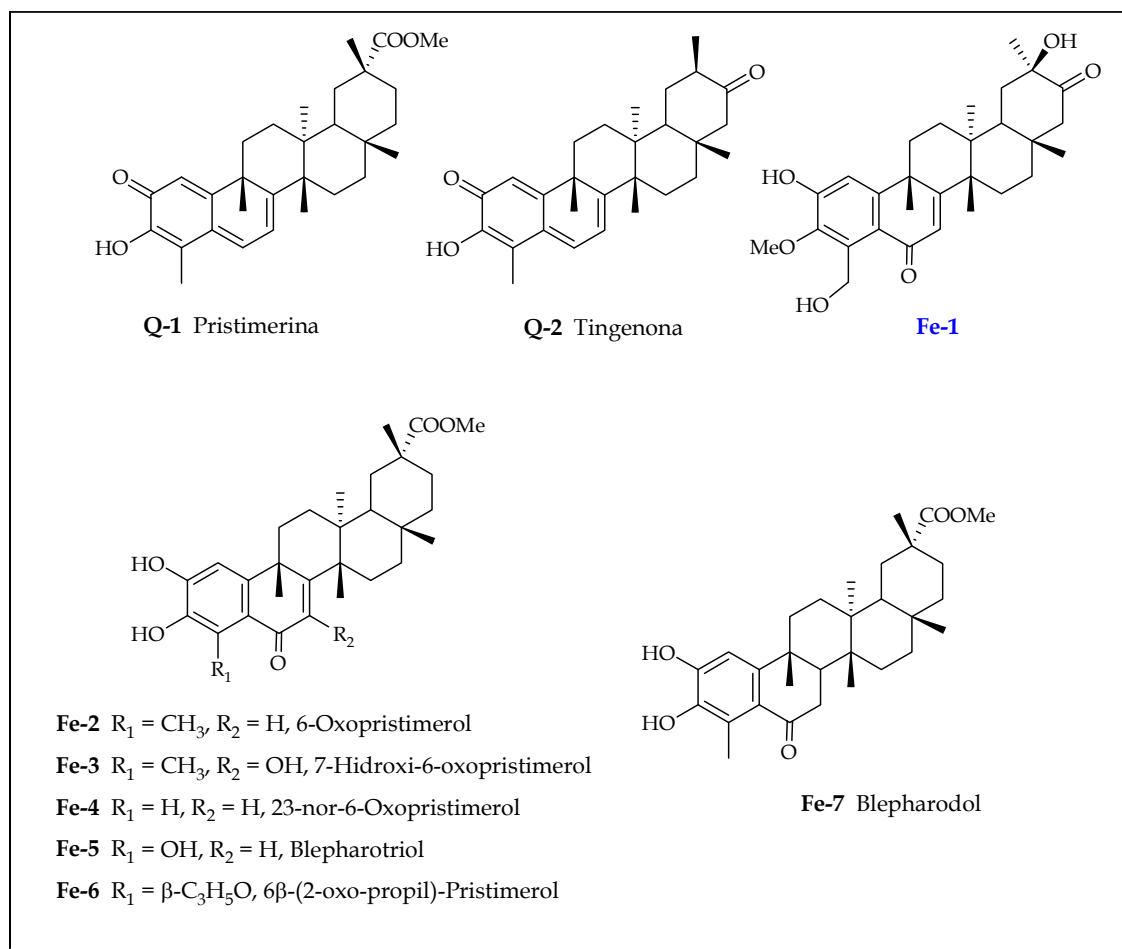


Figura 4.2.17. *nor*-Triterpenometilénquinonas y fenoles aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus jelskii*. En azul se señala el compuesto que resultó nuevo en la bibliografía química.

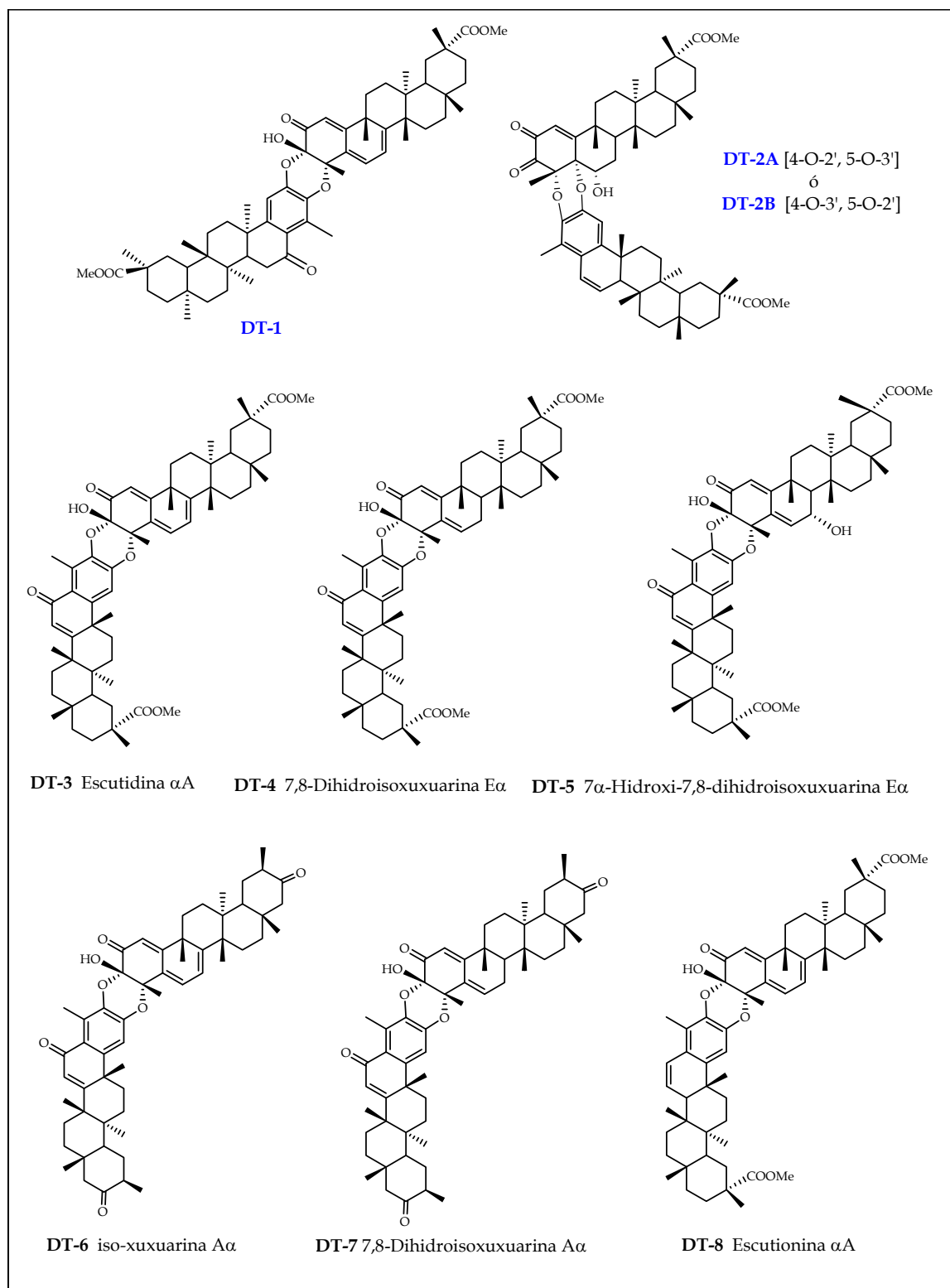


Figura 4.2.18. Dímeros triterpénicos aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus jelskii*. En azul los compuestos que resultaron nuevos en la bibliografía química.

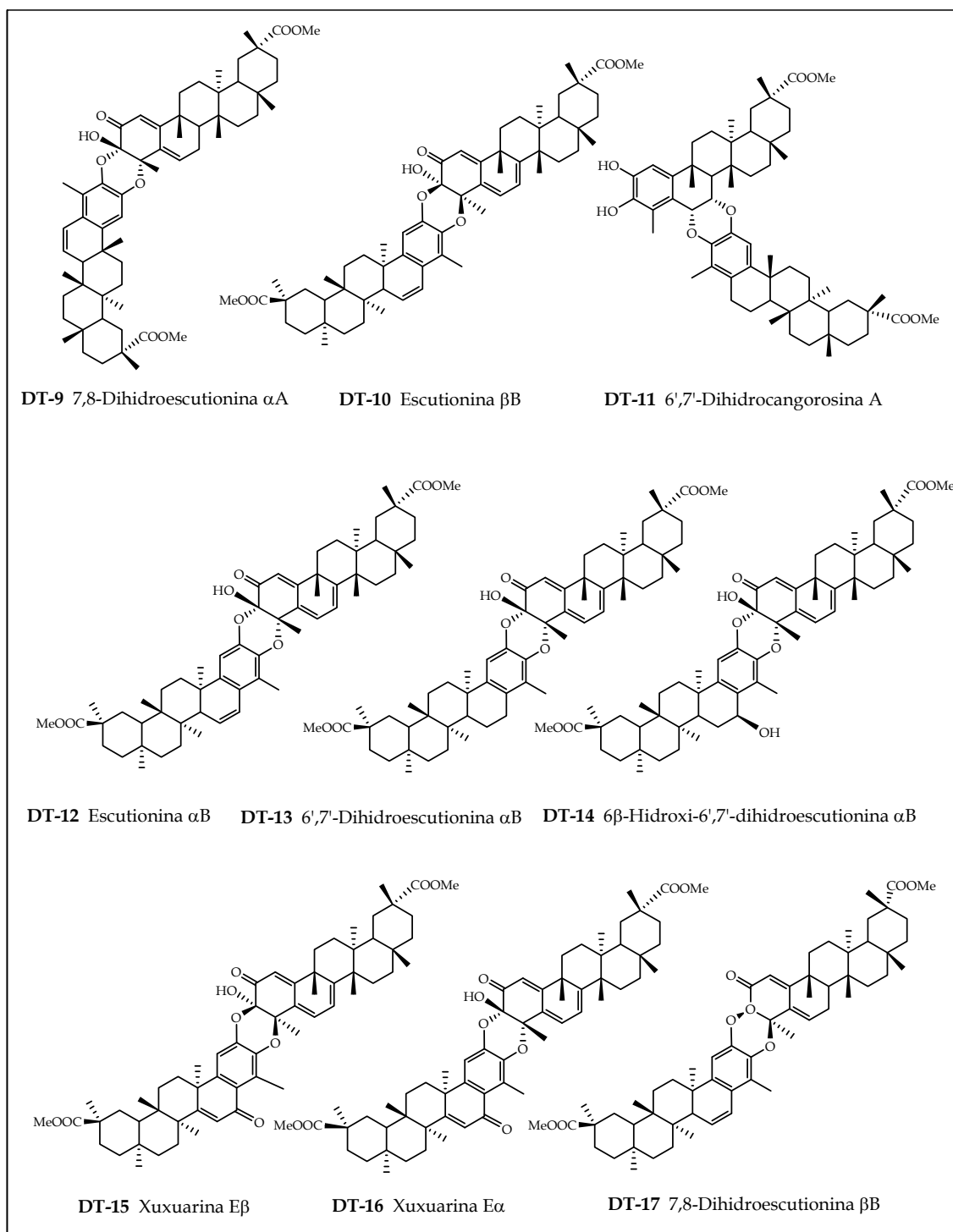


Figura 4.2.18. (continuación).

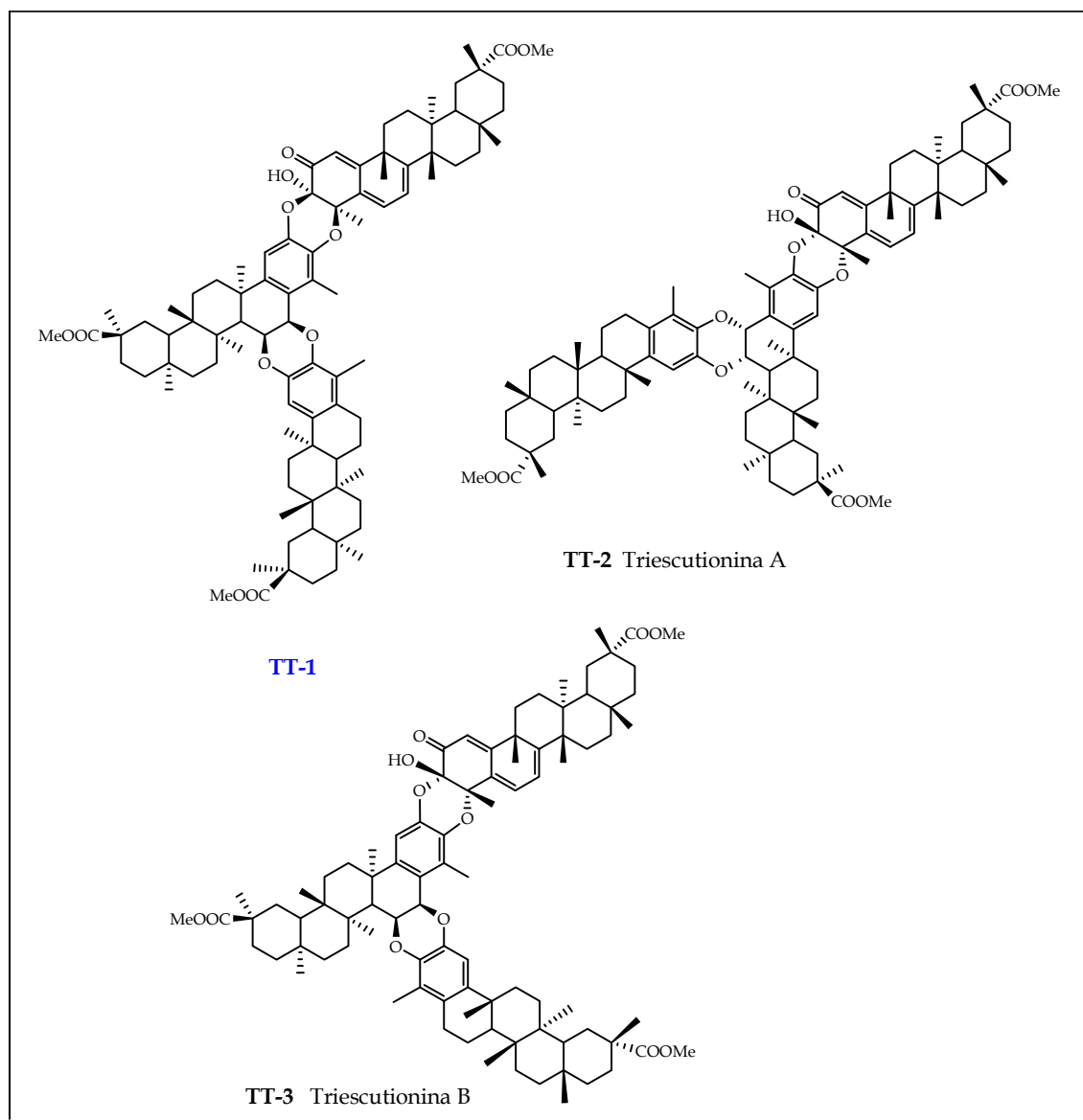


Figura 4.2.19. Trímeros triterpénicos aislados de la corteza de la raíz de *M. jelskii*. En azul el compuesto que resultó nuevo en la literatura química.

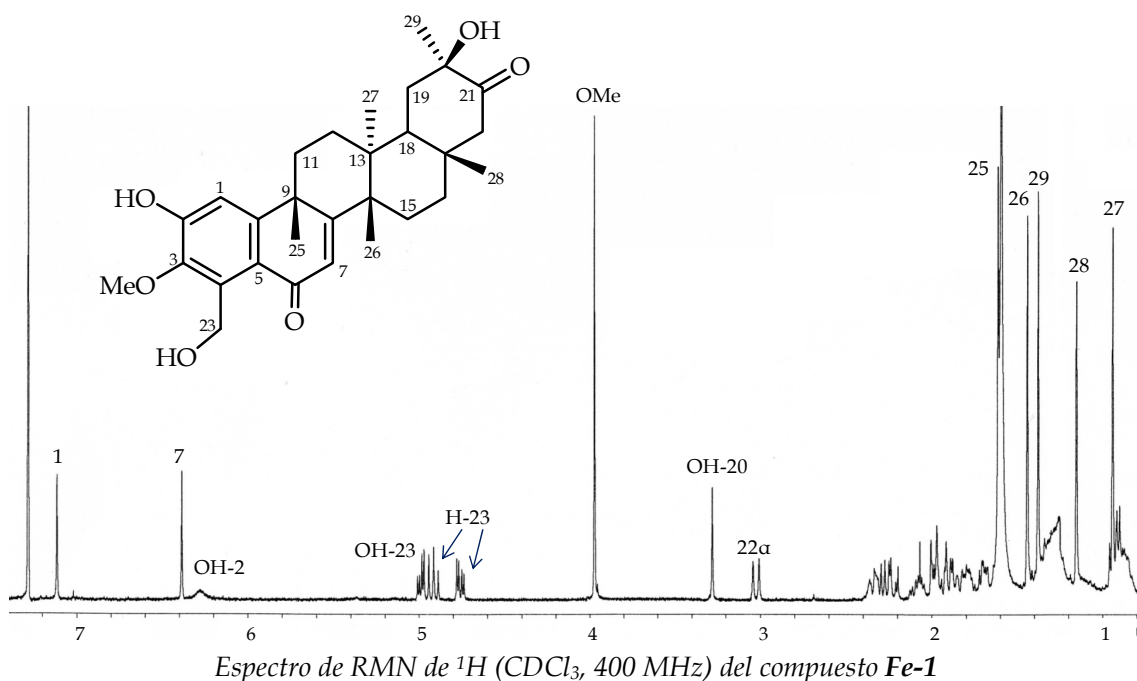
La elucidación estructural de los metabolitos, anteriormente descritos, se realizó mediante el uso de técnicas espectroscópicas y espectrométricas, así como por comparación con los datos existentes en la bibliografía química. Por otro lado, las estructuras de los nuevos metabolitos se determinó mediante técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C y experimentos 2D, tanto homo como heteronucleares, infrarrojo (IR), ultravioleta (UV) y espectrometría de masas (EM). La determinación de la configuración absoluta, en los casos que fue posible, se realizó mediante el estudio de las curvas de dicroísmo circular (DC).

A continuación pasamos a discutir la elucidación estructural de los nuevos celastroloides (**Fe-1**, **DT-1**, **DT-2** y **TT-1**) aislados de las raíces de *M. jelskii*.

Celastrolide Fe-1

El producto que hemos denominado **Fe-1** presentó la fórmula molecular $C_{29}H_{38}O_6$, calculada por espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). En su espectro de IR se observaron bandas de absorción correspondientes a grupo hidroxilo (3468 cm^{-1}), cetona (1729 cm^{-1}) y carbonilo α,β -insaturado (1641 cm^{-1}).

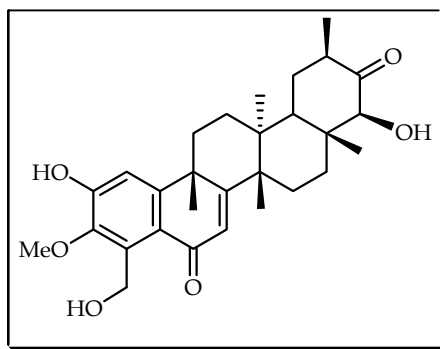
Su espectro de RMN de ^1H mostró señales correspondientes a cinco metilos a $0,94, 1,15, 1,38, 1,44$ y $1,61\ \delta_{\text{H}}$ como singuletes, señales correspondientes a un grupo metoxilo a $3,97\ \delta_{\text{H}}$ y una señal de metileno unido a oxígeno a $4,76\ \delta_{\text{H}}$ (1H, dd, $J = 4,8, 11,8\text{ Hz}$) y $4,91\ \delta_{\text{H}}$ (1H, t, $J = 11,8\text{ Hz}$). Además, se observaron señales para un protón olefínico a $6,39\ \delta_{\text{H}}$ (1H, s) y un protón aromático a $7,12$ (1H, s). Así mismo, se observaron señales intercambiables con agua deuterada a $3,28\ \delta_{\text{H}}$ (s), $4,99\ \delta_{\text{H}}$ (1H, dd, $J = 5,0, 11,9\text{ Hz}$) y $6,28\ \delta_{\text{H}}$ (sa).



En su espectro de RMN de ^{13}C se observaron señales de veintinueve átomos de carbono, lo que junto con los experimentos DEPT 90° y 135° corroboró la existencia de seis metilos, siete metilenos, tres metinos y trece carbonos cuaternarios, siendo significativa la presencia de señales características de un carbonilo α,β -insaturado a $186,7\ \delta_{\text{C}}$, un carbonilo alifático a $215,1\ \delta_{\text{C}}$ (s), ocho carbonos olefínicos, seis de ellos aromáticos a $111,1$ (d), $123,5$ (s), $134,7$ (s), $144,6$ (s),

155,4 (s) y 153,0 (s) δ_C , y dos carbonos vinílicos a 125,5 (d) y 173,6 (s) δ_C . Además, se observaron señales para tres carbonos unidos a oxígeno a 57,1 δ_C (t), 63,7 δ_C (c, OMe) y 73,7 δ_C (s).

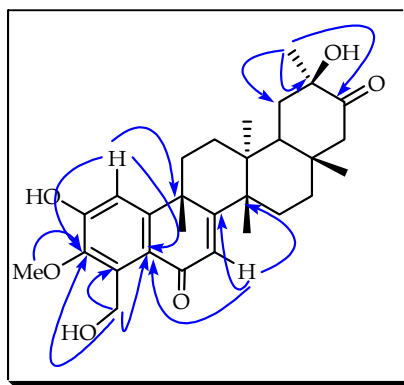
Los datos anteriores están de acuerdo con una estructura de nor-triterpenofenol derivado de la tingenona para **Fe-1** y relacionado con un producto descrito en la bibliografía, 3-O-metil-22 β ,23-dihidroxi-6-oxo-tingenol⁴⁹.



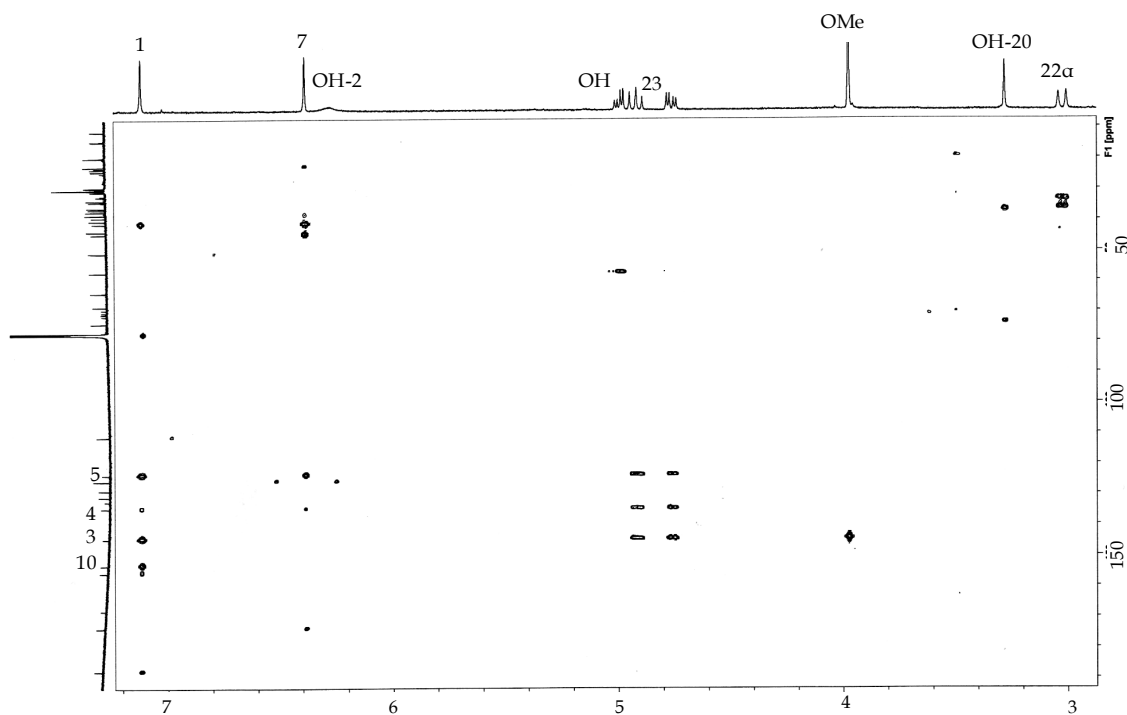
Estructura del compuesto 3-O-metil-22 β ,23-dihidroxi-6-oxo-tingenol.

La diferencia en sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C es la desaparición de la señal como doblete correspondiente al Me-30 en el 3-O-metil- 22 β ,23-dihidroxi-6-oxo-tingenol y la aparición de un singulete que integra para tres protones a 1,38 δ_H . Además, se observó un carbono terciario unido a oxígeno a 73,7 δ_C (C-20) y la aparición de otro metileno en la molécula a 1,99 y 3,02 δ_H asignables a los protones H-22, lo que sugiere que **Fe-1** posee un alcohol terciario en C-20 y su estructura correspondería a 3-O-metil-20,23-dihidroxi-6-oxo-tingenol.

El estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HMBC y HSQC), nos permitió confirmar de forma inequívoca la posición de cada uno de los grupos funcionales presentes en la molécula. Así, en el experimento HMBC podemos destacar las correlaciones observadas entre la señal como singulete a 1,38 δ_H (Me-29) con los carbonos C-19 (36,7 δ_C), C-20 (73,7 δ_C) y C-21 (215,1 δ_C), permitiendo confirmar la presencia del grupo hidroxilo sobre C-20. Además, se observó correlación a dos y tres enlaces de los protones metilénicos a 4,76 y 4,91 δ_H (H-23) con los carbonos aromáticos C-3 (144,6), C-4 (134,7 δ_C) y C-5 (123,5 δ_C), así como correlación de los protones correspondientes al grupo metoxilo a 3,97 δ_H con el carbono a 144,6 δ_C (C-3).

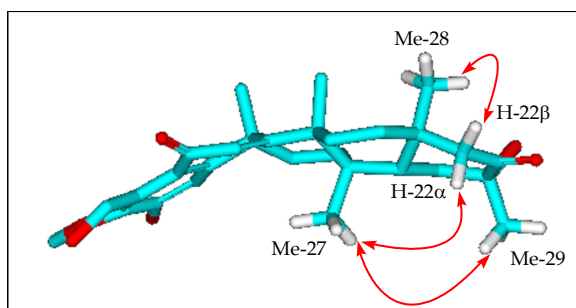


Correlaciones observadas en el experimento HMBC del compuesto **Fe-1**



Ampliación del experimento HMBC del compuesto **Fe-1**

La estereoquímica relativa del alcohol sobre C-20 se estableció como β al observarse, en un experimento ROESY, efecto ROE entre el Me-29 y el Me-27 α . Así, quedó establecida la estructura del producto **Fe-1** como 3-O-metil-20 β ,23-dihidroxi-6-oxotingenol.



Efectos ROE observados en el experimento ROESY de **Fe-1**

Tabla 4.2.1. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C del celastroloide Fe-1.

| Posición | Celastroloide Fe-1 | |
|----------|--------------------------------------|--------------------------------|
| | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ |
| 1 | 7,12 s | 111,1 d |
| 2 | - | 153,0 s |
| 3 | - | 144,6 s |
| 4 | - | 134,7 s |
| 5 | - | 123,5 s |
| 6 | - | 186,7 s |
| 7 | 6,39 s | 125,5 d |
| 8 | - | 173,6 s |
| 9 | - | 40,8 s |
| 10 | - | 155,4 s |
| 11 | 2,09 m, 2,35 m | 33,8 t |
| 12 | 1,82 m, 1,90 m | 30,0 t |
| 13 | - | 44,2 s |
| 14 | - | 39,8 s |
| 15 | 1,80 m, 1,91 m | 29,2 t |
| 16 | 1,70 m, 1,97 m | 35,5 t |
| 17 | - | 36,0 s |
| 18 | 1,98 m | 43,3 d |
| 19 | 2,25 d (16,5) 2,30 dd (8,2, 16,5) | 36,7 t |
| 20 | - | 73,7 s |
| 21 | - | 215,1 s |
| 22 | 1,99 d (14,1) 3,02 d (14,1) | 50,4 t |
| 23 | 4,76 dd (4,8, 11,8) 4,91 t (11,8) | 57,1 t |
| 24 | - | - |
| 25 | 1,61 s | 37,8 c |
| 26 | 1,44 s | 22,3 c |
| 27 | 0,94 s | 19,4 c |
| 28 | 1,15 s | 33,1 c |
| 29 | 1,38 s | 29,0 c |
| OMe | 3,97 s | 63,7 c |
| OH-2 | 6,28 sa | - |
| OH-23 | 4,99 dd (4,8, 11,9) | - |
| OH-20 | 3,28 sa | - |

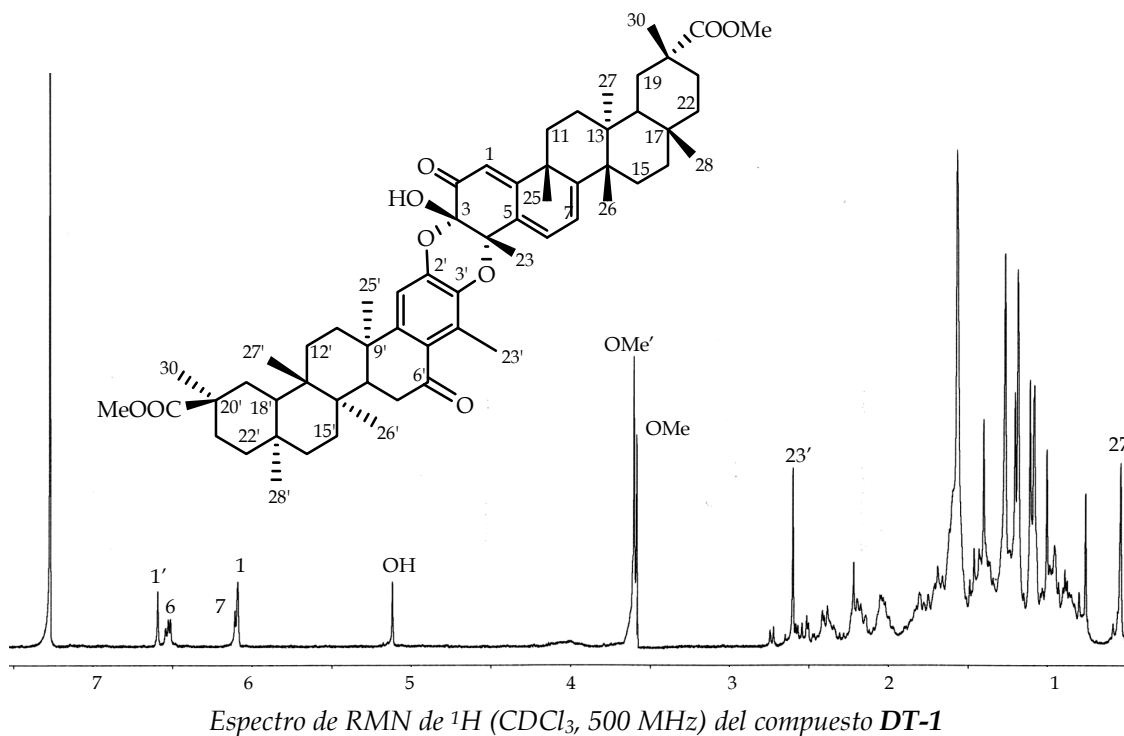
^a δ , CDCl_3 , 400 MHz. J en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC.

^b δ , CDCl_3 , 100 MHz. Datos basados en experimentos DEPTs y HMBC.

Celastroloide DT-1

El metabolito que hemos denominado **DT-1** fue aislado como un sólido amorfo de color amarillo pálido con un $[\alpha]_D^{20} - 134,5$ (c 0,3, CHCl_3). El espectro de masas (Electrospray, ESI) presentó un ion molecular $[\text{M}^+ + \text{Na}]$ a 967 m/z , lo que está de acuerdo con una fórmula molecular $\text{C}_{60}\text{H}_{80}\text{O}_9\text{Na}$.

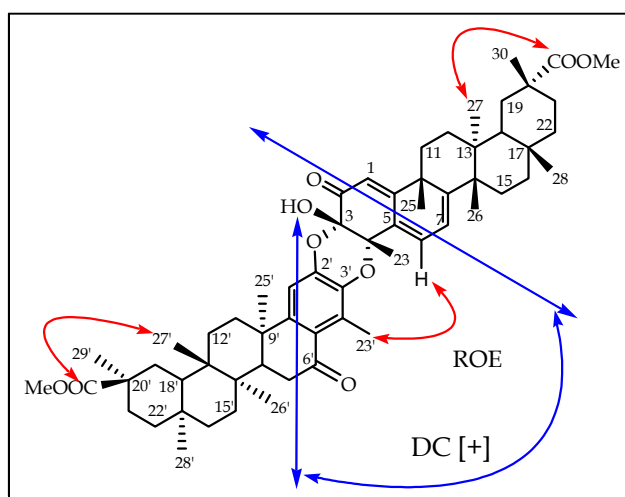
En su espectro de RMN de ^1H (tabla 4.2.2) se observó un singlete a 6,59 δ , asignable a un protón aromático, además, se observaron tres protones vinílicos a 6,09 δ (1H, s), 6,10 δ (1H, d, $J = 7,1$ Hz), 6,52 δ (1H, d, $J = 7,1$ Hz) característicos de un sistema triterpenoquinónico. Así mismo, se observaron señales correspondientes a once metilos (0,54, 0,76, 1,00, 1,08 (6H), 1,11, 1,18 (6H), 1,20, 1,40 y 1,57 δ) y un metilo sobre anillo aromático a 2,60 δ y señales características de grupos metoxilos como singletes a 3,58 y 3,60 δ . Estos datos y el análisis de su espectro de RMN de ^{13}C (tabla 4.2.2) y experimentos DEPT, que presentó señales correspondientes a 60 carbonos, sugieren que **DT-1** es un dímero triterpénico, característico en especies de celastráceas⁸, formado por una subunidad quinónica tipo pristimerina y otra fenólica tipo 7,8-dihidro-6-oxopristimerol.



El análisis de los experimentos COSY, HSQC y HMBC permitió la asignación de las señales de ^1H y ^{13}C , incluyendo las correspondientes a los carbonos C-3 (91,0 δ_{C}) y C-4 (76,9 δ_{C}) que forman parte del puente 3-hidroxi-4-metil-3,4-dioxo de la unidad quinónica, característico de dímeros triterpénicos con unión A-A⁸.

La regiosustitución de ambas subunidades se determinó mediante un experimento ROESY, en el cual se observó efecto ROE entre el protón H-6 (6,52 δ) y el Me-23' (2,60 δ), lo que indicó una unión [3-O-2', 4-O-3'] entre ambas unidades triterpénicas.

La configuración absoluta se determinó mediante dicroísmo circular, que mostró una curva bisignada tipo Davidoff, con un primer efecto Cotton positivo a 315,6 nm ($\Delta\epsilon = +6,0$) y un segundo efecto negativo a 253,8 nm ($\Delta\epsilon = -21,6$), que corresponde a la interacción de la enona y el sistema aromático, lo que está de acuerdo con una configuración absoluta 3S,4S.



Efectos ROE observados en un experimento ROESY (**rojo**) y dicroísmo circular (**azul**) de DT-1

Comparación del compuesto DT-1 con el descrito previamente en la bibliografía química, xuxuarina E α ⁵⁶, que también aislamos de *M. jelskii* (DT-16), cuya única diferencia es la presencia del doble enlace en las posiciones C-7'-C-8', nos sugirió nombrar al compuesto DT-1 como 7',8'-dihidro-xuxuarina E α .

Tabla 4.2.2. Datos de RMN ^1H , RMN ^{13}C y correlaciones HMBC ($^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$) de DT-1.

| posición | unidad quinónica | | | unidad fenólica | | |
|----------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ | HMBC | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ | HMBC |
| 1 | 6,09 s | 114,7 d | 3, 5 | 6,59 s | 109,1 d | 2', 3 ^c , 5' |
| 2 | | 189,6 s | | | 145,4 s | |
| 3 | 5,12 s (OH) | 91,0 s | 3 ^c , 4 | | 137,3 s | |
| 4 | | 76,9 s | | | 129,5 s | |
| 5 | | 132,0 s | | | 125,3 s | |
| 6 | 6,52 d (7,1) | 128,8 d | 4, 10 | | 200,5 s | |
| 7 | 6,10 d (7,1) | 117,2 d | | 2,54 m | 37,6 t | 5', 9', 14' |
| 8 | | 164,4 s | | 2,22 m | 42,2 d | |
| 9 | | 43,9 s | | | 37,1 s | |
| 10 | | 173,2 s | | | 152,6 s | |
| 11 | | 32,7 t | | 1,8 | 33,1 t | |
| 12 | | 29,8 t | | | 29,9 t | |
| 13 | | 38,6 s | | | 39,4 s | |
| 14 | | 44,2* s | | | 38,8 s | |
| 15 | | 28,4 t | | | 28,6 t | |
| 16 | | 36,4* t | | | 36,2 t | |
| 17 | | 30,5* s | | | 30,3 s | |
| 18 | | 44,2* d | | | 44,6 d | |
| 19 | | 30,8 t | | | 30,5* t | |
| 20 | | 40,4 s | | | 40,6 s | |
| 21 | | 29,7* t | | | 29,7* t | |
| 22 | | 34,7 t | | | 36,4* t | |
| 23 | 1,57 s | 24,6 c | 3, 4 ^c , 5 | 2,60 s | 13,4 c | 3', 4' ^c , 5' |
| 25 | 1,40 s | 39,2 c | 8, 9 ^c , 11 | 1,11 s | 25,6 c | 8', 9' ^c , 10', 11' |
| 26 | 1,20 s | 22,4 c | 8, 14 ^c | 1,00 s | 15,4 c | 8', 13', 14' ^c , 15' |
| 27 | 0,54 s | 18,3 c | | 0,76 s | 16,9 c | 13' ^c , 14' |
| 28 | 1,08* s | 31,5 c | | 1,08* s | 31,7 c | |
| 29 | | 178,9 s | | | 179,4 s | |
| 30 | 1,18* s | 32,8 c | 29 | 1,18* s | 32,3 c | 29' |
| OMe | 3,58 s | 51,7 c | | 3,60 s | 51,6 c | |

^a δ , CDCl_3 , 500 MHz, valores de J en Hz entre paréntesis. Datos basados en experimentos COSY y HSQC, ^b δ , CDCl_3 , 125 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

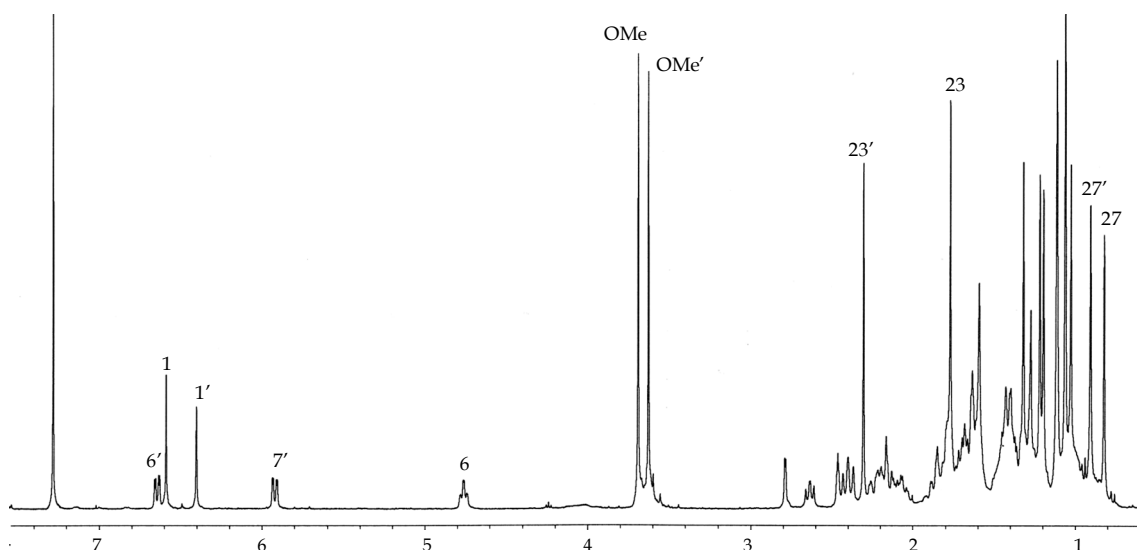
^c acoplamiento a dos enlaces.

*Señales solapadas.

Celastroloide DT-2

El producto que hemos denominado **DT-2**, se aisló como un sólido amorfo de color amarillo pálido, que mostró una fórmula molecular de $C_{60}H_{82}O_9$, según su espectro de masas de alta resolución (ESI).

Su espectro de RMN de 1H (tabla 4.2.3) mostró señales para once metilos (0,83, 0,91, 1,03, 1,07 (6H), 1,12 (6H), 1,20, 1,22, 1,32 y 1,77 δ), un metilo sobre anillo aromático (2,31 δ) y dos grupos metoxilos (3,60 y 3,66 δ). Se observaron, además, señales de un protón fenólico a 6,40 δ como singulete, un protón geminal a un grupo hidroxilo a 4,76 δ (1H, dt, $J = 2,4, 8,4$ Hz) y tres protones vinílicos a 6,59 δ (1H, s), 5,92 δ (1H, dd $J = 2,6, 9,8$ Hz) y 6,64 δ (1H, dd, $J = 2,8, 9,8$ Hz).

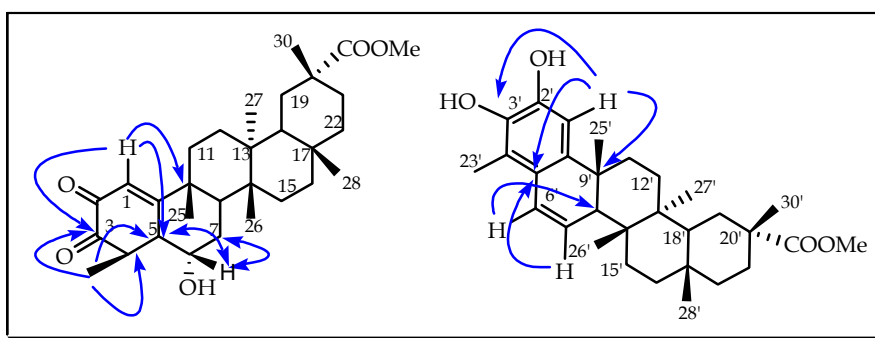


Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 600 MHz) del compuesto **DT-2**

En su espectro de RMN de ^{13}C (tabla 4.2.3) se observaron, como señales más significativas, tres carbonos unidos a oxígeno, dos de ellos como singuletes a 84,9 y 79,2 δ y uno como doblete a 68,1 δ . Además, se observó la presencia de señales correspondientes a dos cetonas a 182,4 δ y 191,0 δ y dos carbonos carboxilos a 179,0 δ_C .

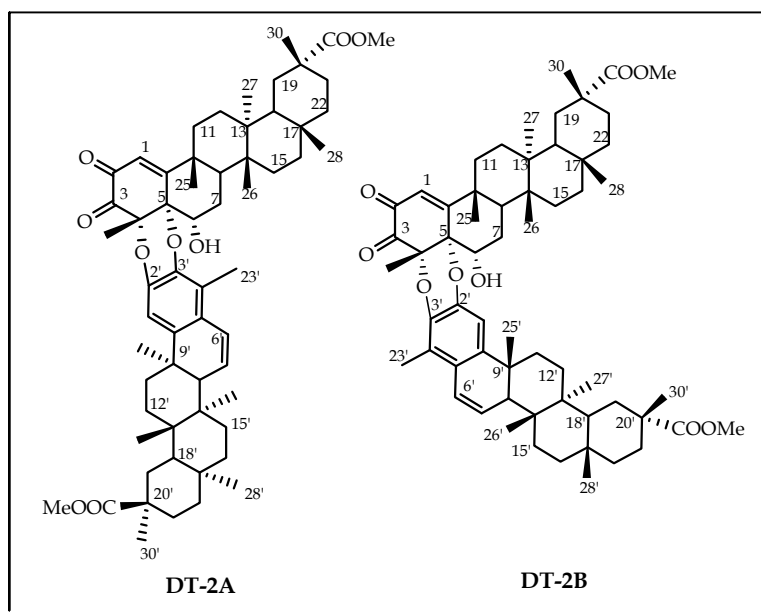
Estos datos y un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales de RMN (DEPT, COSY, HSQC y HMBC), indicaron que se trata de un dímero triterpénico formado por una unidad fenólica derivada del isopristimerol y una unidad de *ortoquinona* basada en una estructura de 7,7-dihidro-6 α -hidroxipristimerol. Así, en el experimento HMBC observamos correlación entre el protón a 6,59 δ_H (s, H-1) y el carbono cuaternario unido a oxígeno C-5 (79,2 δ_C), el carbono

carbonílico a 191,0 δ_C (s, C-3) y el carbono a 39,7 δ_C (s, C-9); correlación del Me-23 (1,77 δ_H) y los carbonos C-3 (191,0 δ_C), C-4 (84,9 δ_C) y C-5 (79,2 δ_C), así como correlación del protón a 4,76 δ_H (H-6) con los carbonos C-5 y C-7 (27,1 δ_C), lo que nos permitió determinar la regiosustitución sobre los anillos A y B de la unidad de *ortoquinona*. Por otra parte, las correlaciones a larga distancia observadas entre las señales a 6,40 δ_H (H-1'), 6,64 δ_H (H-6') y 5,92 δ_H (H-7'), nos confirmaron la presencia del sistema fenólico conjugado de los anillos A y B de la otra subunidad triterpénica.



Correlaciones 1H - ^{13}C observadas en el HMBC del compuesto **DT-2**

El experimento ROESY nos permitió determinar la estereoquímica relativa del alcohol en el C-6 como α , al observarse efecto ROE entre el protón H-6 y el Me-23, que a su vez presentó efecto ROE con el Me-25 β . Sin embargo, este experimento no nos permitió determinar la regiosustitución de la molécula como [4-O-3', 5-O-2'] ó [4-O-2', 5-O-3'], puesto que no fue posible observar ningún efecto ROE entre protones de ambas subunidades. Decidimos entonces realizar un experimento ROESY selectivo de los protones H-1', H-6, Me-23 y Me-23', pero tampoco observamos ninguna correlación. En un intento de determinar la configuración absoluta de **DT-2**, realizamos el estudio de la curva de dicroísmo circular, que sin embargo tampoco resultó concluyente. Por tanto, tenemos que el compuesto **DT-2** podría corresponder a los dos posibles regioisómeros anteriormente citados (**DT-2A** o **DT-2B**).



Posibles estructuras del compuesto DT-2

Cabe destacar que esta es la primera vez que se aísla un dímero triterpénico con este tipo de unión y para el cual proponemos el nombre de **jelskina**.

Tabla 4.2.3. Datos de RMN ^1H , RMN ^{13}C y correlaciones HMBC de DT-2.

| posición | unidad ortoquinónica | | | unidad fenólica | | |
|----------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ | HMBC | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ | HMBC |
| 1 | 6,59 s | 127,7 d | 3, 5, 9 | 6,40 s | 106,9 d | 3', 5', 9', 10' |
| 2 | | 182,4 s | | | 142,8 s | |
| 3 | | 191,0 s | | | 136,8 s | |
| 4 | | 84,9 s | | | 122,5 s | |
| 5 | | 79,2 s | | | 125,6 s | |
| 6 | 4,76 dt (2,4, 8,4) | 68,1 d | 5 ^c , 7 ^c | 6,64 dd (2,8, 9,8) | 123,9 d | 8', 10' |
| 7 | | 27,1 t | | 5,92 dd (2,6, 9,8) | 129,5 d | 5', 9' |
| 8 | | 36,9 d | | | 45,2 d | |
| 9 | | 39,7 s | | | 37,3 s | |
| 10 | | 175,3 s | | | 144,3 s | |
| 11 | | 35,1 t | | | 31,2 t | |
| 12 | | 29,8 t | | | 29,7 t | |
| 13 | | 38,7 s | | | 38,9* s | |
| 14 | | 38,9* s | | | 40,3 s | |
| 15 | | 28,4 t | | | 28,1 t | |
| 16 | | 35,9 t | | | 36,4 t | |
| 17 | | 30,3* s | | | 30,3* s | |
| 18 | | 44,5 d | | | 44,8 d | |
| 19 | | 30,5* t | | | 30,5* t | |
| 20 | | 40,5* s | | | 40,5* s | |
| 21 | | 30,1 t | | | 30,0 t | |
| 22 | | 36,0* t | | | 36,0* t | |
| 23 | 1,77 s | 20,6 c | 3, 4 ^c , 5 | 2,31 s | 11,0 c | 3', 4' ^c , 5' |
| 25 | 1,32 s | 26,3 c | 8, 9 ^c , 11 | 1,03 s | 22,2 c | 8', 9' ^c , 10', 11' |
| 26 | 1,07* s | 14,9 c | 13 ^c , 14, 15 | 1,07* s | 16,8 c | 8', 13', 14' ^c , 15' |
| 27 | 0,83 s | 17,3 c | 13, 14 ^c | 0,91 s | 16,9 c | 13' ^c , 14' |
| 28 | 1,12* s | 31,7 c | | 1,12* s | 31,8 c | |
| 29 | | 179,0* s | | | 179,0* s | |
| 30 | 1,20 s | 32,2 c | 29 | 1,22 s | 32,4 c | 29' |
| OMe | 3,60 s | 51,6 c | | 3,66 s | 51,7 c | |

^a δ , CDCl_3 , 600 MHz, valores de J en Hz entre paréntesis. Datos basados en experimentos COSY y HSQC. ^b δ , CDCl_3 , 150 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

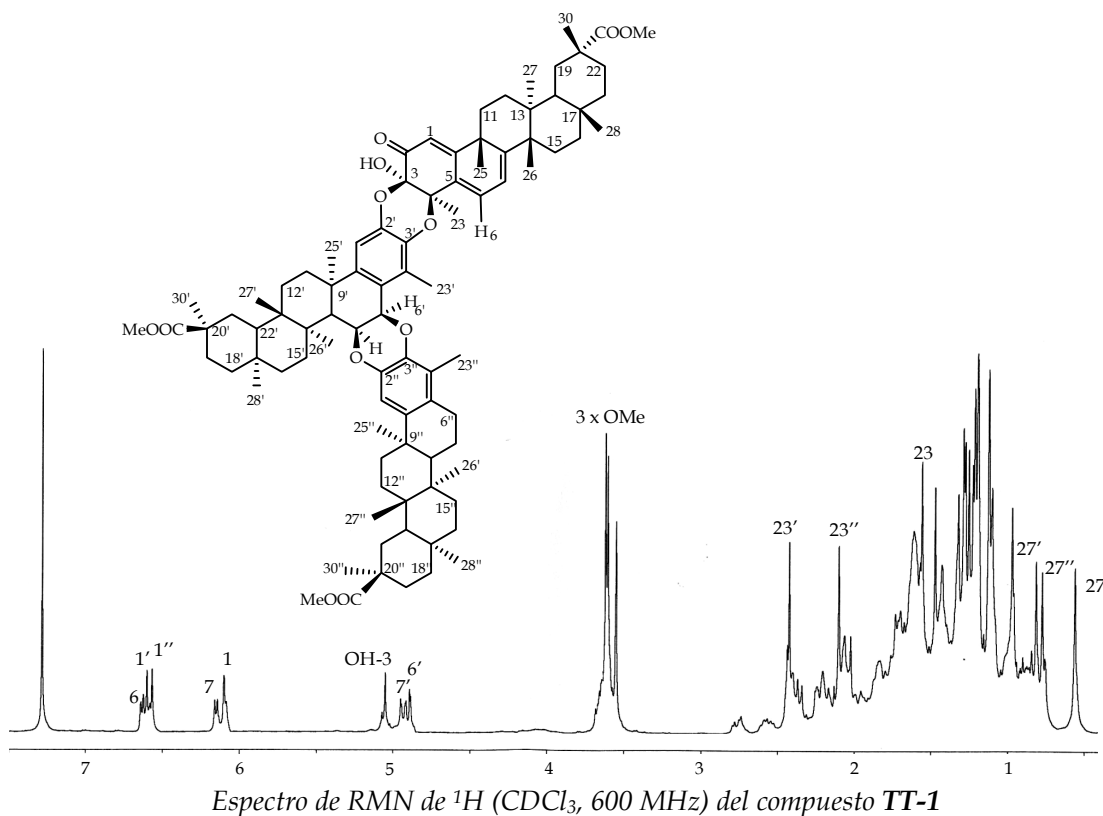
^c acoplamiento a dos enlaces.

*Señales solapadas.

Celastroloide TT-1

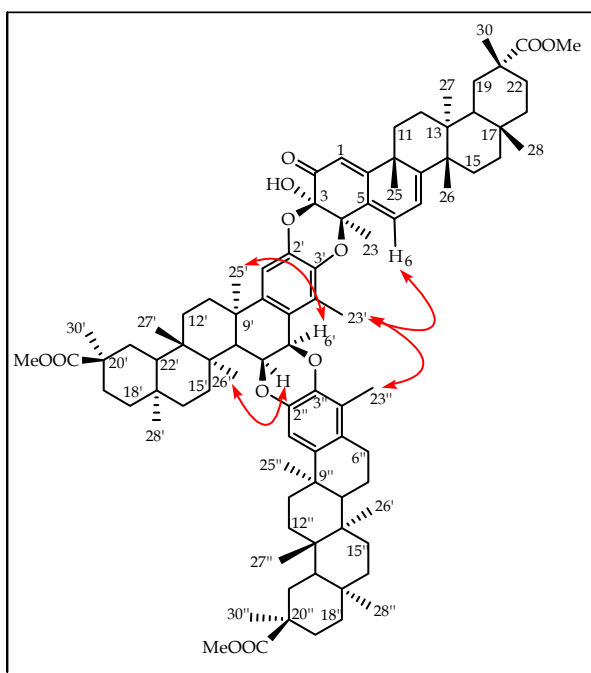
El compuesto **TT-1**, aislado como un sólido amorfo, presentó en su espectro de masas (ESI) un ión molecular a 1417 m/z correspondiente a una fórmula molecular de $C_{90}H_{122}O_{12}Na$, lo que se confirmó en su espectro de RMN de ^{13}C , que mostró señales para 90 átomos de carbono.

En su espectro de RMN de 1H destaca la presencia de señales para 18 metilos, dos de ellos sobre anillo aromático a 2,10 y 2,42 δ_H y señales correspondientes a tres grupos metoxilos a 3,55, 3,60 y 3,62 δ_H . Además, se observaron señales para protones geminales a átomos de oxígeno a 4,89 δ (d, $J = 2,8$ Hz) y 4,93 δ (dd, $J = 2,8, 11,6$ Hz), señales correspondientes a los protones de un sistema metilénquinónico a 6,15 δ (d, $J = 7,1$ Hz), 6,63 (dd, $J = 1,1, 7,1$ Hz) y 6,10 δ (d, $J = 1,1$ Hz) y señales para dos protones fenólicos como singuletes a 6,57 δ y 6,60 δ . En su espectro de RMN de ^{13}C se observó la presencia de cuatro átomos de carbono unidos a oxígeno, dos de ellos cuaternarios a 76,8 δ_C y 90,4 δ_C (este último característico de un carbono hemiacetalico) y los otros dos carbonos metínicos a 71,3 δ_C y 73,5 δ_C . El conjunto de estos datos nos sugirió que nos encontrábamos en presencia de un trímero triterpénico formado por tres subunidades derivadas de la pristimerina para el producto **TT-1**.



La característica metilénquinónica de una de las subunidades y fenólica de las otras dos fue determinada por medio de experimentos de correlación heteronuclear (HMBC y HSQC). Así, se observó correlación a tres enlaces entre la señal del protón a 6,10 δ_H (s, H-1) y las señales de los carbonos a 131,7 δ_C (s, C-5), 90,4 δ_C (s, C-3) y 44,1 δ_C (d, C-9), correlación entre el metilo a 1,56 δ_H (s, Me-23) y las señales a 131,7 δ_C (s, C-5), 90,4 δ_C (s, C-3) y 76,8 δ_C (s, C-4) y correlación del protón a 5,05 δ_H (s, OH-3) con señales a 76,8 δ_C (s, C-4), 90,4 δ_C (s, C-3) y a 189,7 δ_C (s, C-2). El experimento HMBC también nos permitió asignar de forma inequívoca los carbonos C-6' y C-7', al observarse correlación entre el protón a 4,89 δ_H (d, $J = 2,8$ Hz, H-6') y los carbonos a 44,6 δ_C (d, C-8'), 126,3 δ_C (s, C-4') y 143,9 δ_C (s, C-10'), así como correlación del protón a 4,93 δ_H (dd, $J = 2,8, 11,6$ Hz, H-7') con las señales a 140,7 δ_C (s, C-2''), 123,7 δ_C (s, C-5') y 40,3 δ_C (s, C-9').

La regiosustitución fue determinada mediante un experimento ROESY, observándose efectos ROE del Me-23' con H-6 y el Me-23''. Así mismo se determinó la estereoquímica relativa de la unión B-A, al observarse correlación de los protones H-6' y H-7' con los metilos Me-25' y Me-26', respectivamente. La estereoquímica relativa de la unión entre la unidad metilénquinónica y la fenólica, la hemos considerado como β , al no observarse el efecto ROE característico entre el Me-23 y el Me-25 en los casos en los que la unión entre ambas subunidades es α .



Correlaciones espaciales observadas en el experimento ROESY del compuesto TT-1

Cabe destacar que en la bibliografía química sólo existen dos ejemplos de trímeros triterpénicos (triescutionina A y triescutionina B), aislados de *Maytenus escutioides*¹⁶, por lo que el compuesto **TT-1**, al que hemos denominado **triescutionina C**, constituye el tercer ejemplo de este tipo de metabolitos en la bibliografía química.

Tabla 4.2.4. Datos de RMN ^1H y RMN ^{13}C de TT-1.

| posición | Unidad quinónica | | Unidad fenólica' | | Unidad fenólica'' | |
|----------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ | $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ | $\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ |
| 1 | 6,10 d (1,1) | 114,4 d | 6,60 s | 110,3 d | 6,57 s | 109,2 d |
| 2 | | 189,7 s | | 142,9 s | | 140,1 s |
| 3 | | 90,4 s | | 137,2 s | | 138,6 s |
| 4 | | 76,8 s | | 126,3 s | | 123,2 s |
| 5 | | 131,7 s | | 123,7 s | | 125,2 s |
| 6 | 6,63 dd (1,1, 7,1) | 128,6 d | 4,89 d (2,8) | 71,3 d | | 28,4 t |
| 7 | 6,15 d (7,1) | 117,1 d | 4,93 dd (2,8, 11,6) | 73,5 d | 1,70 1,82 | 18,2 t |
| 8 | | 163,7 s | 2,35 d (11,6) | 44,6 d | 1,60 * | 43,3 d |
| 9 | | 44,1 s | | 40,3 s | | 36,8 s |
| 10 | | 173,3 s | | 143,9 s | | 144,9 s |
| 11 | | 34,2 t ^c | | 34,5 t | | 34,0 t |
| 12 | | 30,0 t ^c | | 30,0 t | | 30,1 t |
| 13 | | 38,8 s | | 38,7 s | | 38,5 s |
| 14 | | 44,2 s | | 40,0 s | | 39,7 s |
| 15 | | 29,5 t ^c | | 29,5 t | | 29,6 t |
| 16 | | 36,0 t ^c | | 36,2 t | | 36,3 t |
| 17 | | 30,4 s ^c | | 30,5 s | | 30,5 s |
| 18 | | 44,0 d | | 43,7 d | | 43,6 d |
| 19 | | 30,3 t ^c | | 30,3 t | | 30,2 t |
| 20 | | 40,3 s ^c | | 40,3 s | | 40,2 s |
| 21 | | 28,8 t ^c | | 28,8 t | | 28,9 t |
| 22 | | 35,9 t | | 36,6 t | | 36,6 t |
| 23 | 1,56 s | 24,4 c | 2,42 s | 10,6 c | 2,10 s | 10,8 c |
| 25 | 1,47 s | 39,3 c | 1,29 s | 27,8 c | 1,23 s | 27,1 c |
| 26 | 1,25 s | 22,2 c | 1,32 s | 17,3 c | 0,97 s | 15,8 c |
| 27 | 0,56 s | 17,9 c | 0,81 s | 17,0 c | 0,78 s | 18,2 c |
| 28 | 1,10 s | 31,3 c | 1,12s* | 31,6 c | 1,12 s* | 31,6 c |
| 29 | | 179,2 s ^c | | 179,0 s | | 178,6 s |
| 30 | 1,20* s | 31,7 c | 1,20* s | 32,5 c | 1,21 s | 32,5 c |
| OMe | 3,62 s | 51,1 c ^c | 3,60 s | 51,4 c | 3,55 s | 51,2 c |

^a δ , CDCl_3 , 600 MHz, valores de J en Hz entre paréntesis. Datos basados en experimentos COSY y HSQC, en el caso que no se indica multiplicidad, son señales solapadas.

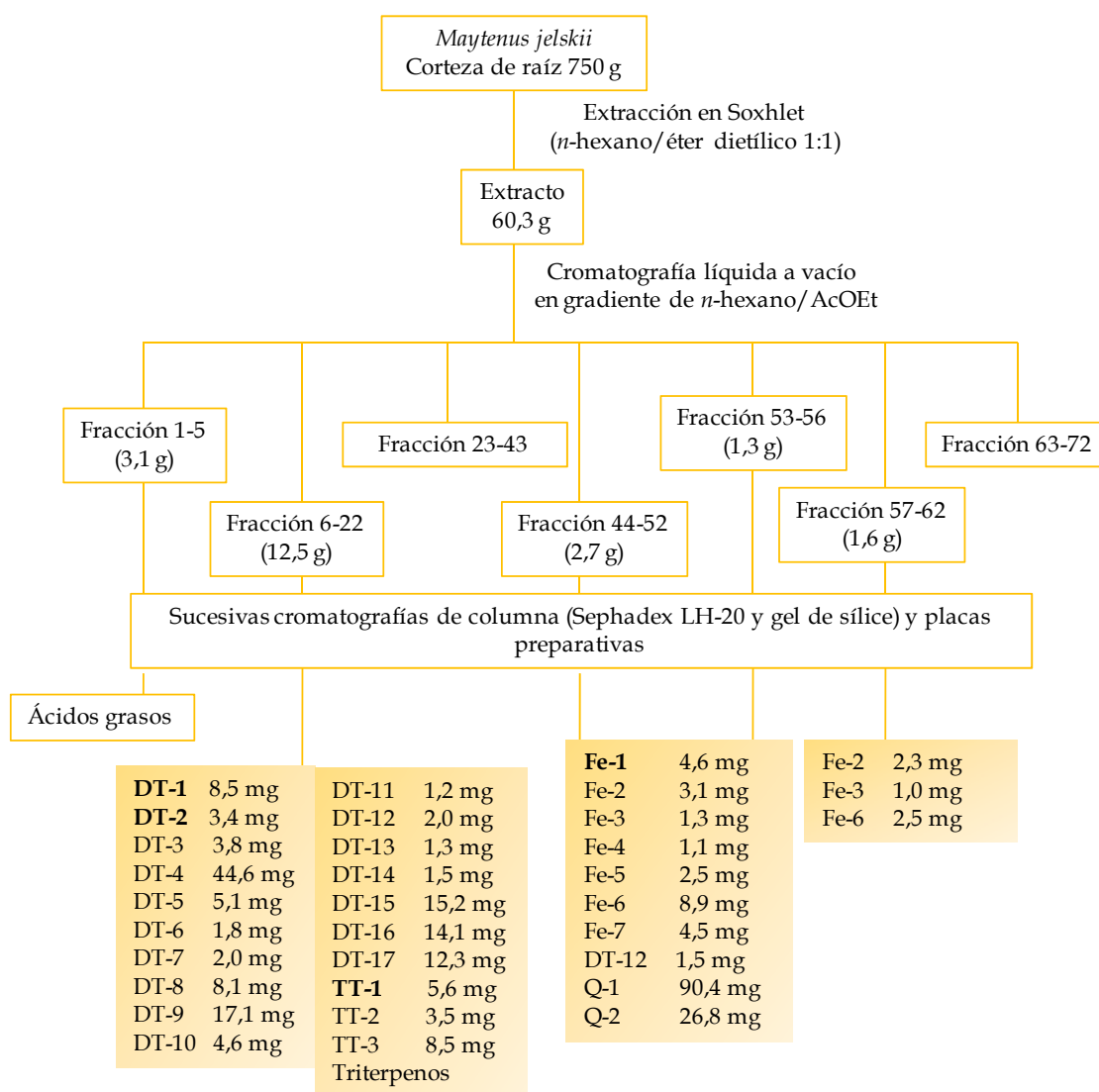
^b δ , CDCl_3 , 150 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

^cvalores intercambiables entre los carbonos de la misma posición de las tres unidades triterpénicas.

4.2.3. Parte experimental

4.2.3.1. Separación cromatográfica de los celastroloides aislados de la corteza de raíces de *M. jelskii*

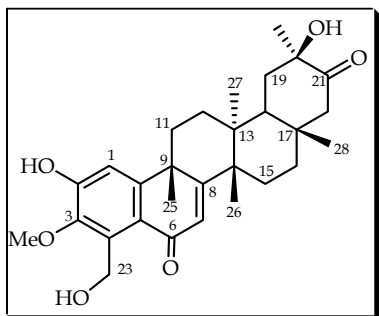
En la separación cromatográfica realizada al extracto de *n*-hexano-éter dietílico (1:1) de la corteza de raíz de *M. jelskii*, se aislaron 29 celastroloides (esquema 4.2.1).



Esquema 4.2.1. Separación cromatográfica de los celastroloides aislados del extracto de n-hexano-éter dietílico (1:1) de la corteza de la raíz de Maytenus jelskii.

4.2.3.2. Datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos de los nuevos celastroloides

Celastroloide Fe-1



3-O-metil-20β,23-dihidroxi-6-oxotingenol

Descripción: sólido amorfo de color amarillo (4,6 mg)

$[\alpha]_D^{20}$ + 24,8° (c 3,3, CHCl₃).

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 308 (3,4), 203 (3,3) nm.

IR ν_{max} 3468, 2923, 2853, 1729, 1641, 1578, 1459, 1378, 1294, 1220, 1123, 1027, 1003, 772 cm⁻¹.

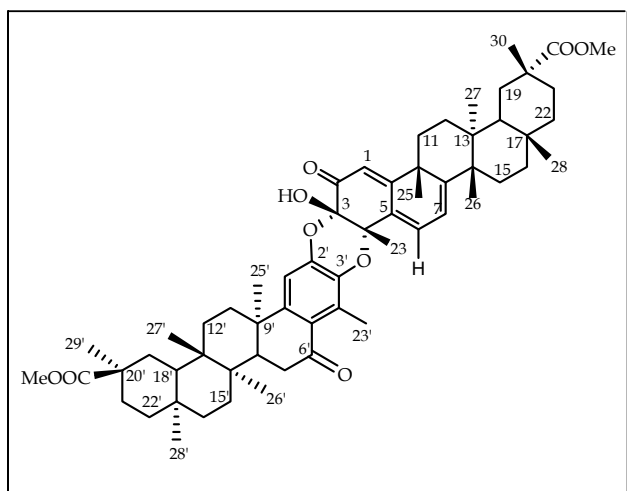
RMN ¹H (δ, CDCl₃) 0,94 (3H, s, Me-27); 1,15 (3H, s, Me-28); 1,38 (3H, s, Me-29); 1,44 (3H, s, Me-26); 1,61 (3H, s, Me-25); 1,70 (1H, m, H-16); 1,80 (1H, m, H-15); 1,82 (1H, m, H-12); 1,90 (1H, m, H-12); 1,91 (1H, m, H-15); 1,97 (1H, m, H-16); 1,98 (1H, m, H-18); 1,99 (1H, d, J = 14,1 Hz, H-22β); 2,09 (1H, m, H-11); 2,25 (1H, d, J = 16,5 Hz, H-19); 2,30 (1H, dd, J = 8,2, 16,5 Hz, H-19); 2,35 (1H, m, H-11); 2,51 (1H, m, H-20); 3,02 (1H, d, J = 14,1 Hz, H-22α); 3,28 (1H, s, OH-20); 3,97 (3H, s, OMe-3); 4,76 (1H, dd, J = 4,8, 11,8 Hz, H-23); 4,91 (1H, t, J = 11,8 Hz, H-23); 4,99 (1H, dd, J = 5,0, 11,9 Hz, OH-23); 6,28 (1H, sa, OH-2); 6,39 (1H, s, H-7); 7,12 (1H, s, H-1).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 19,4 (c, Me-27); 22,3 (c, Me-26); 29,0 (c, Me-29); 29,2 (t, C-15); 30,0 (t, C-12); 33,1 (c, Me-28); 33,8 (t, C-11); 35,5 (t, C-16); 36,0 (s, C-17); 36,7 (t, C-19); 37,8 (c, Me-25); 39,8 (s, C-14); 40,8 (s, C-9); 43,3 (d, C-18); 44,2 (s, C-13); 50,4 (t, C-22); 57,1 (t, C-23); 63,7 (c, OMe-3); 73,7 (s, C-20); 111,1 (d, C-1); 123,5 (s, C-5); 125,5 (d, C-7); 134,7 (s, C-4); 144,6 (s, C-3); 153,0 (s, C-2); 155,4 (s, C-10); 173,6 (s, C-8); 186,7 (s, C-6); 215,1 (s, C-21).

EM m/z (%) 482 [M⁺] (50), 467 (100), 461 (25), 401 (12), 361 (16), 309 (14), 245 (11), 232 (12), 71 (14), 57 (19).

EMAR m/z Calculado para C₂₉H₃₈O₆ [M⁺], 482,2668; observado, 482,2644.

Celastroloide DT-1

**7',8'-dihidro-xuxuarina E α**

Descripción: sólido amorfo de color amarillo (8,5 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ - 134,5 (c 0,3, CHCl₃).

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 280 (3,1), 268 (3,1) nm.

DC λ_{\max} (log ϵ) nm 315,6 ($\Delta\epsilon = +6,0$), 283,2 ($\Delta\epsilon = 0$), 253,8 ($\Delta\epsilon = -21,6$)

IR ν_{\max} 3435, 2926, 2869, 1729, 1670, 1592, 1461, 1304, 1150, 1001, 757 cm⁻¹.

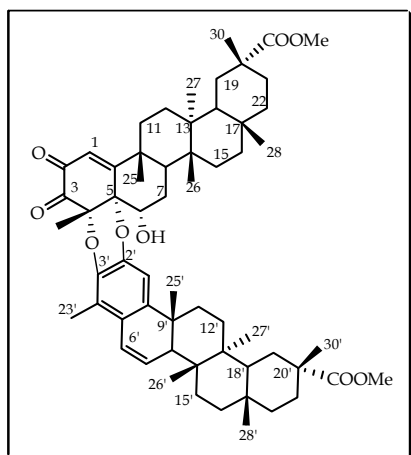
RMN ¹H (δ, CDCl₃) 0,54 (3H, s, Me-27); 0,76 (3H, s, Me-27'); 0,95 (1H, m, H-22'β); 0,98, 2,05 (2H, m, H-22); 1,00 (3H, s, Me-26'); 1,08 (6H, s, Me-28, Me-28'), 1,11 (3H, s, Me-25'); 1,18 (6H, s, Me-30, Me-30'); 1,20 (3H, s, Me-26); 1,39, 1,72 (2H, m, H-16'); 1,40 (3H, s, Me-25); 1,55 (1H, m, H-18); 1,57 (3H, s, Me-23); 1,61 (1H, m, H-18'); 1,63 (2H, m, H-21); 1,66 (1H, m, H-19'β); 1,78, 2,05 (2H, m, H-11); 1,81 (2H, m, H-11'); 2,02 (1H, m, H-22'α); 2,22 (1H, m, H-8'); 2,39 (1H, m, H-19'α); 2,54 (1H, m, H-7'); 2,60 (3H, s, Me-23'); 3,58 (3H, s, OMe); 3,60 (3H, s, OMe'); 5,12 (1H, s, OH-3); 6,09 (1H, s, H-1); 6,10 (1H, d, J = 7,1 Hz, H-7); 6,52 (1H, d, J = 7,1 Hz, H-6); 6,59 (1H, s, H-1').

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 13,4 (c, C-23'); 15,4 (c, C-26'); 16,9 (c, C-27'); 18,3 (c, C-27); 22,4 (c, C-26); 24,6 (c, C-23); 25,6 (c, C-25'); 28,4 (t, C-15); 28,6 (t, C-15'); 29,7 (2 x t, C-21, C-21'); 29,8 (t, C-12); 29,9 (t, C-12'); 30,3 (s, C-17'); 30,5 (s, t, C-17, C-19'); 30,8 (t, C-19); 31,5 (c, C-28); 31,7 (c, C-28'); 32,3 (c, C-30'); 32,7 (t, C-11); 32,8 (c, C-30); 33,1 (t, C-11'); 34,7 (t, C-22); 36,2 (t, C-16'); 36,4 (2 x t, C-16, C-22'); 37,1 (s, C-9'); 37,6 (t, C-7'); 38,6 (s, C-13); 38,8 (s, C-14'); 39,2 (c, C-25); 39,4 (s, C-13'); 40,4 (s, C-20); 40,6 (s, C-20'); 42,2 (d, C-8'); 43,9 (s, C-9); 44,2 (s, d, C-14, C-18); 44,6 (d, C-18'); 51,6 (c, OMe'); 51,7 (c, OMe); 76,9 (s, C-4); 91,0 (s, C-3); 109,1 (d, C-1'); 114,7 (d, C-1); 117,2 (d, C-7); 125,3 (s, C-5'); 128,8 (d, C-6); 129,5 (s, C-4'); 132,0 (s, C-5); 137,3 (s, C-3'); 145,4 (s, C-2'); 152,6 (s, C-10'); 164,4 (s, C-8); 173,2 (s, C-10); 178,9 (s, C-29); 179,4 (s, C-29'); 189,6 (s, C-2); 200,5 (s, C-6').

ESIMS m/z (%) 967 [M⁺+Na] (100)

AR-ESI/MS m/z Calculado para C₆₀H₈₀O₉Na [M⁺+Na], 967,5724; observado, 967,5699.

Celastroloide DT-2A [4-O-2', 5-O-3'] ó DT2B [4-O-3', 5-O-2']



Jelskina

Descripción: sólido amorfo de color amarillo (3,4 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ - 34,5 (*c* 0,9, CHCl₃).

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 273 (3,9), 252 (3,8), 230 (4,1) nm.

IR ν_{max} 3493, 2945, 2874, 1731, 1688, 1467, 1319, 1219, 1149, 1074, 760 cm⁻¹.

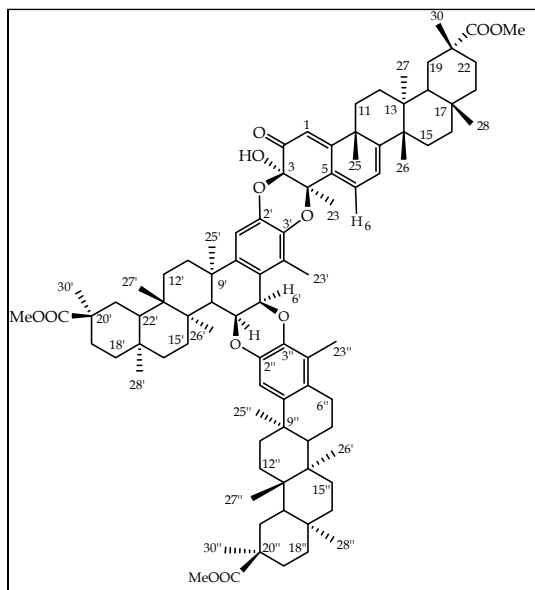
RMN ¹H (δ, CDCl₃) 0,83 (3H, s, Me-27); 0,91 (3H, s, Me-27'); 1,00, 2,06 (2H, m, H-16); 1,03 (3H, s, Me-25'); 1,07 (6H, s, Me-26, Me-26'); 1,12 (6H, s, Me-28, Me-28'); 1,20 (3H, s, Me-30); 1,22 (3H, s, Me-30'); 1,32 (3H, s, Me-25); 1,41, 1,76 (4H, m, H-22, H-22'); 1,40 (2H, m, H-15'); 1,43 (2H, m, H-15); 1,44 (2H, m, H-12'); 1,58, 2,42 (2H, m, H-19'); 1,59 (1H, m, H-18); 1,63, 2,39 (3H, m, H-19, H-18'); 1,64 (2H, m, H-12); 1,77 (3H, s, Me-23); 1,78 (2H, m, H-11); 1,84 (2H, m, H-11'); 2,04 (2H, m, H-16'); 2,16 (2H, m, H-7); 2,20 (4H, m, H-21, H-21'); 2,31 (3H, s, Me-23'); 2,46 (1H, m, H-8'); 2,63 (1H, dd, *J* = 8,4, 11,1 Hz, H-8); 2,79 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, OH-6); 3,60 (3H, s, OMe'); 3,66 (3H, s, OMe); 4,76 (1H, dt, *J* = 2,4, 8,4 Hz, H-6); 5,92 (1H, dd, *J* = 2,6, 9,8 Hz, H-7'); 6,40 (1H, s, H-1'); 6,59 (1H, s, H-1); 6,64 (1H, dd, *J* = 2,8, 9,8 Hz, H-6').

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 11,0 (*c*, C-23'); 14,9 (*c*, C-26); 16,8 (*c*, C-26'); 16,9 (*c*, C-27'); 17,3 (*c*, C-27); 20,6 (*c*, C-23); 22,2 (*c*, C-25'); 26,3 (*c*, C-25); 27,1 (*t*, C-7); 28,1 (*t*, C-15'); 28,4 (*t*, C-15); 29,7 (*t*, C-12'); 29,8 (*t*, C-12); 30,0 (*t*, C-21'); 30,1 (*t*, C-21); 30,3 (2 x *s*, C-17, C-17'); 30,5 (2 x *t*, C-19, C-19'); 31,2 (*t*, C-11); 31,7 (*c*, C-28); 32,2 (*c*, C-30); 32,4 (*c*, C-30'); 35,1 (*t*, C-11); 35,9 (*t*, C-16); 36,0 (2 x *t*, C-22, C-22'); 36,4 (*t*, C-16'); 36,9 (*d*, C-8); 37,3 (*s*, C-9'); 38,7 (*s*, C-13); 38,9 (2 x *s*, C-13', C-14); 39,7 (*s*, C-9); 40,3 (*s*, C-14'); 40,5 (2 x *s*, C-20, C-20'); 44,5 (*d*, C-18); 44,8 (*d*, C-18'); 45,2 (*d*, C-8'); 51,6 (*c*, OMe); 51,7 (*c*, OMe'); 68,1 (*d*, C-6); 79,2 (*s*, C-5); 84,9 (*s*, C-4); 106,9 (*d*, C-1'); 122,5 (*s*, C-4'); 123,9 (*d*, C-6'); 125,6 (*s*, C-5') 127,7 (*d*, C-1); 129,5 (*d*, C-7'); 136,8 (*s*, C-3'); 142,8 (*s*, C-2'); 144,3 (*s*, C-10'); 175,3 (*s*, C-10); 179,0 (2 x *s*, C-29, C-29'); 182,4 (*s*, C-2); 191,0 (*s*, C-3).

ESIMS *m/z* (%) 969 [M⁺+Na] (100).

AR-ESI/MS *m/z* Calculado para C₆₀H₈₂O₉Na [M⁺+Na], 969,5857; observado, 969,5846.

Celastroloides TT-1



Triescutionina C

Descripción: sólido amorfo de color amarillo (6,2 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ - 146,2 (*c* 0,3, CHCl₃).

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 384 (4,0), 286 (4,1), 256 (3,9) nm.

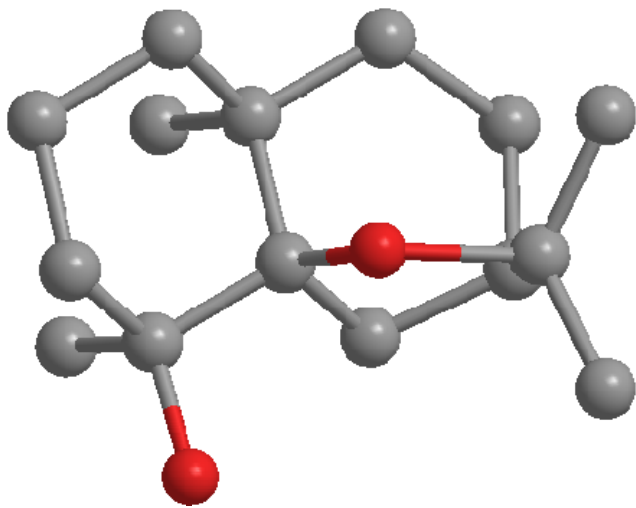
IR ν_{\max} : 3458, 2945, 1730, 1666, 1470, 1378, 1217, 1148, 1084, 793 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 0,56 (3H, s, Me-27); 0,78 (3H, s, Me-27''); 0,81 (3H, s, Me-27'); 0,97 (3H, s, Me-26''); 1,10 (3H, s, Me-28); 1,12 (6H, s, Me-28', Me-28''); 1,20 (6H, s, Me-29, Me-29'); 1,21 (3H, s, Me-29''); 1,23 (3H, s, Me-25''); 1,25 (3H, s, Me-26); 1,29 (3H, s, Me-25'); 1,32 (3H, s, Me-26'); 1,47 (3H, s, Me-25); 1,52, 2,39 (2H, m); 1,56 (3H, s, Me-23); 1,57 (1H, m, H-18); 1,60 (2H, m, H-8'', H-18'); 1,61, 2,39 (2H, m); 1,70, 2,44 (2H, m); 1,73 (1H, m, H-18''); 2,10 (3H, s, Me-23''); 2,35 (1H, d, *J* = 11,6 Hz, H-8'); 2,42 (3H, s, Me-23'); 3,55 (3H, s, OMe); 3,60 (3H, s, OMe); 3,62 (3H, s, OMe); 4,89 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H-6'); 4,93 (1H, dd, *J* = 2,8, 11,6 Hz, H-7'); 5,05 (1H, s, OH-3); 6,10 (1H, d, *J* = 1,1 Hz, H-1); 6,15 (1H, d, *J* = 7,1 Hz, H-7); 6,57 (1H, s, H-1''); 6,60 (1H, s, H-1'); 6,63 (1H, dd, *J* = 1,1, 7,1 Hz, H-6).

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 10,6 (c, C-23'); 10,8 (c, C-23''); 15,8 (c, C-26''); 17,0 (c, C-27'); 17,9 (c, C-27); 18,2 (t, c, C-7'', C-27''); 22,2 (c, C-26); 24,4 (c, C-23); 27,1 (c, C-25''); 27,8 (c, C-25'); 28,4 (t, C-6''); 28,8 (2 x t); 28,9 (t); 29,5 (2 x t); 29,6 (t); 30,0 (2 x t); 30,1 (t); 30,3 (3 x t, C-19, C-19', C-19''); 30,4 (s, C-17); 30,5 (2 x s); 31,3 (c, C-28); 31,6 (2 x c, C-28, C-28'); 31,7 (c, C-30); 32,5 (c, C-30', C-30''); 34,0 (t); 34,2 (t, C-11); 34,5 (1 x t); 35,9 (t, C-22); 36,0 (1 x t); 36,2 (1 x t); 36,3 (t); 36,6 (2 x t); 36,8 (s, C-9''); 38,7 (s); 38,5 (s); 38,8 (s, C-13); 39,3 (c, C-25); 39,7 (s); 40,0 (s); 40,2 (t, C-20''); 40,3 (3 x s, C-20, C-20', C-9'); 43,3 (d, C-8''); 43,6 (d, C-18''); 44,0 (d, C-18); 44,1 (s, C-9); 44,2 (s, C-14); 44,6 (d, C-8'); 51,1 (c, OMe); 51,2 (c, OMe); 51,4 (c, OMe); 71,3 (d, C-6'); 73,5 (d, C-7'); 76,8 (s, C-4); 90,4 (s, C-3); 109,2 (d, C-1''); 110,3 (d, C-1'); 114,4 (d, C-1); 117,1 (d, C-7); 123,7 (s, C-5'); 123,2 (s, C-5'); 125,2 (s, C-5''); 126,3 (s, C-4'); 128,6 (d, C-6); 131,7 (s, C-5); 137,2 (s, C-3'); 138,6 (s, C-3''); 140,1 (s, C-2''); 142,9 (s, C-2'); 143,9 (s, C-10'); 144,9 (s, C-10''); 163,7 (s, C-8); 173,3 (s, C-10); 178,6 (s, 1 x C); 179,0 (s, 1 x C); 179,2 (s, C-29''); 189,7 (s, C-2).

ESIMS *m/z* (%) 1417 [M⁺+Na] (100).

AR-ESI/MS *m/z* Calculado para C₉₀H₁₂₂O₁₂Na [M⁺+Na], 1417,8834; observado, 1417,8828.



*4.3. Sesquiterpenos
dihidro-β-agarofuranos*

4.3.1. Introducción

Los agarofuranos son sesquiterpenos tricíclicos de la familia del eudesmano (figura 4.3.1), que provienen del catión *E,E*-farnesilo, pasando por el catión germacrilo como intermedio en la biogénesis (figura 4.3.3). Así, el esqueleto base de los sesquiterpenos agarofuranos, es un sistema decalínico con unión *trans* y un anillo tetrahidrofuraníco, entre los carbonos 5 y 7, en posición β con respecto al plano del sistema decalínico.

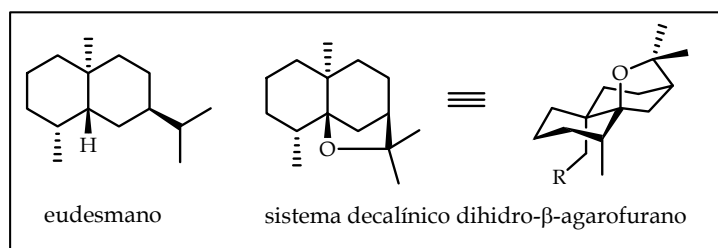


Figura 4.3.1. Esqueletos de eudesmano y dihidro- β -agarofurano.

En 1962 Jain y *col.* aíslan de la madera de *Aquilaria agallocha* Roxb. (Thymelaceae), el α -agarofurano, el β -agarofurano y el dihidro- β -agarofurano, primeros agarofuranos descritos en la literatura (figura 4.3.2).

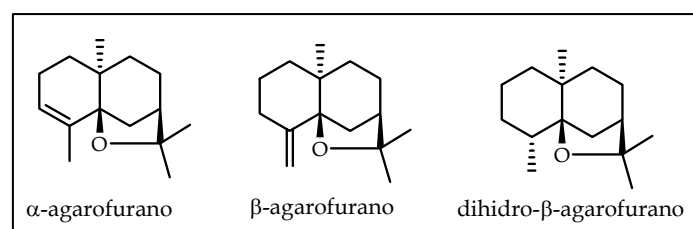


Figura 4.3.2. Primeros agarofuranos descritos aislados de *Aquilaria agallocha* (Timelaceae).

Sus estructuras fueron determinadas un año más tarde por Maheshwari¹, mediante estudios espectroscópicos (IR y RMN) y transformaciones químicas. Posteriormente, en 1967, Barrett y Büchi² determinan la conformación de la unión de los dos anillos como *trans* y una disposición β del sustituyente tetrahidrofuránico. Estudios de Rayos X y conformacionales realizados a estos sesquiterpenos han demostrado que, con pequeñas variaciones, los anillos A-B con unión *trans* forman un sistema decalínico *silla-silla*, ligeramente distorsionado por la presencia del enlace 1,3-diaxial del anillo tetrahidrofuránico, prácticamente perpendicular al plano formado por los carbonos 5, 7, 8 y 10.

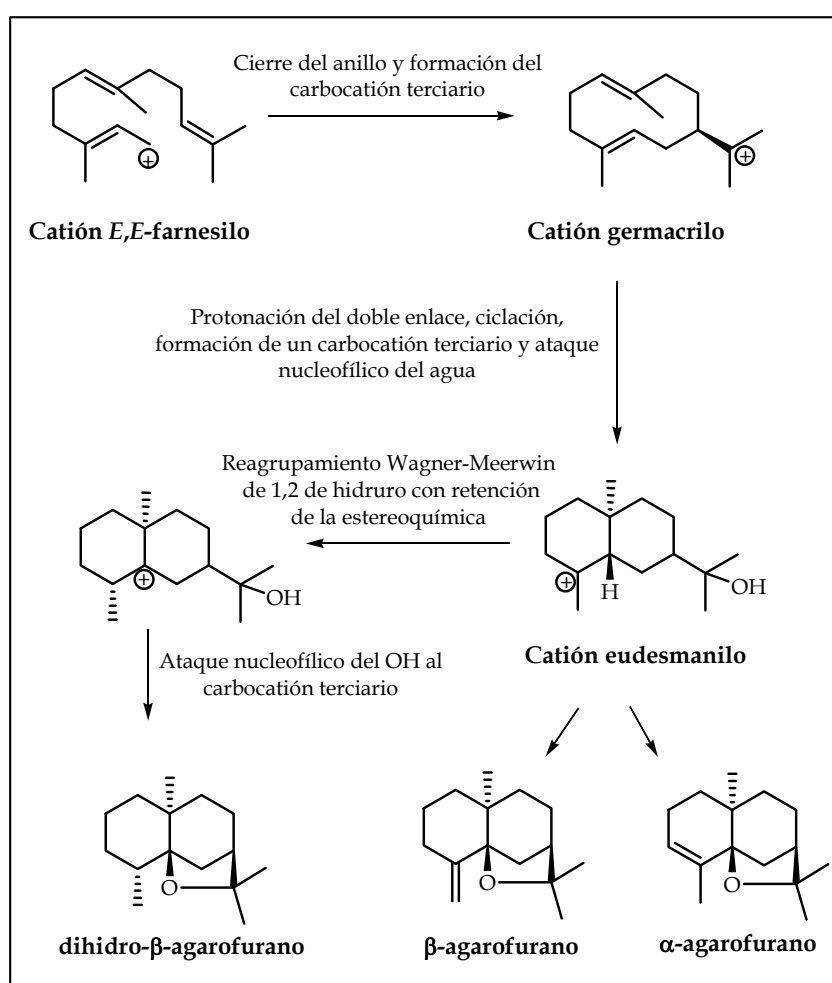


Figura 4.3.3. Biogénesis de los sesquiterpenos agarofuránicos.

Estos sesquiterpenos están ampliamente distribuidos en las especies de las celastráceas, siendo considerados indicadores quimiotaxonómicos de esta familia^{3,4}.

¹ Maheshwari, M. L.; Jain, T. C.; Bates, R. B.; Bhattacharyya, S. C. *Tetrahedron*. **1963**, *19*, 1079-1090.

² Barrett, H. C.; Büchi, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5665-5667.

³ Brüning, R.; Wagner, H. *Phytochemistry*, **1978**, *17*, 1821-1854.

⁴ Gao, J. M.; Wu, W. J.; Zhag, J. W.; Konishi, Y. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1153-1189.

Entre los años 1990 y 2007, se han aislado 462 nuevos sesquiterpenos de este tipo, siendo las fuentes de este tipo de metabolitos, 64 especies de celastráceas, 3 especies de la familia Hippocrateaceae y una de Lamiaceae⁴.

Los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos se encuentran, generalmente, en forma de **poliésteres**, esterificados por una gran variedad de ácidos alifáticos, olefínicos, aromáticos o heterocíclicos, tales como acético, metilbutírico, benzoico, *t*-cinámico, 2 y 3-furanoico y nicotínico y con menos frecuencia se han encontrado los ácidos isobutírico⁵, epoxicinámico^{6,7}, hexanoico⁸, *N*-metil-2-piridin-5-carboxílico⁹, ácido trimetoxigálico, tíglico y angélico¹⁰ (figura 4.3.4).

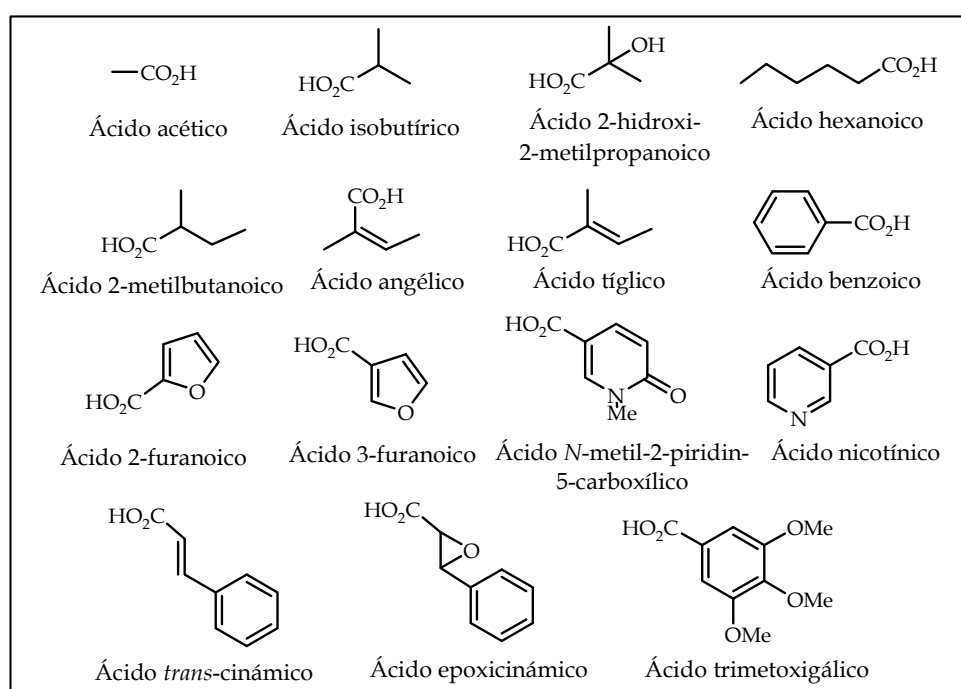


Figura 4.3.4. Ácidos carboxílicos que esterifican a los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos.

Los sesquiterpenos con esqueleto de agarofurano que se han aislado, se han agrupado en función de su esqueleto polihidroílico base (número, posición y estereoquímica de los sustituyentes), con el objeto de simplificar su estudio. Así, nos encontramos con más de cincuenta series de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos (figura 4.3.5), con esqueletos que van desde los más simples como

⁵ Maotian, W.; Hailin, Q.; Man, K.; Yanzi, L. *Phytochemistry*. **1991**, 30, 3931-3933.

⁶ Jiménez, M., García, E., Garcina, L., Lira-rocha, A. *Phytochemistry*. **1988**, 27, 2213-2217.

⁷ Tu, Y. Q.; Wang, D.Z.; Zhang, H. J.; Zhou, L. *Phytochemistry*. **1991**, 30, 271-273.

⁸ Takaishi, Y.; Tokura, K.; Tamai, S.; Ujita, K.; Nakamo, K.; Tomimatsu, T. *Phytochemistry*. **1991**, 30, 1561-1564.

⁹ Mata, R.; Calzada, F. J. *Nat. Prod.* **1990**, 53, 1212-1219.

¹⁰ González, A. G.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 1178-1182.

es el caso del **boariol**¹¹, que posee dos grupos hidroxilo, hasta los más complejos con nueve grupos hidroxilos en la serie del **euoniminol e isoeuoniminol**¹².

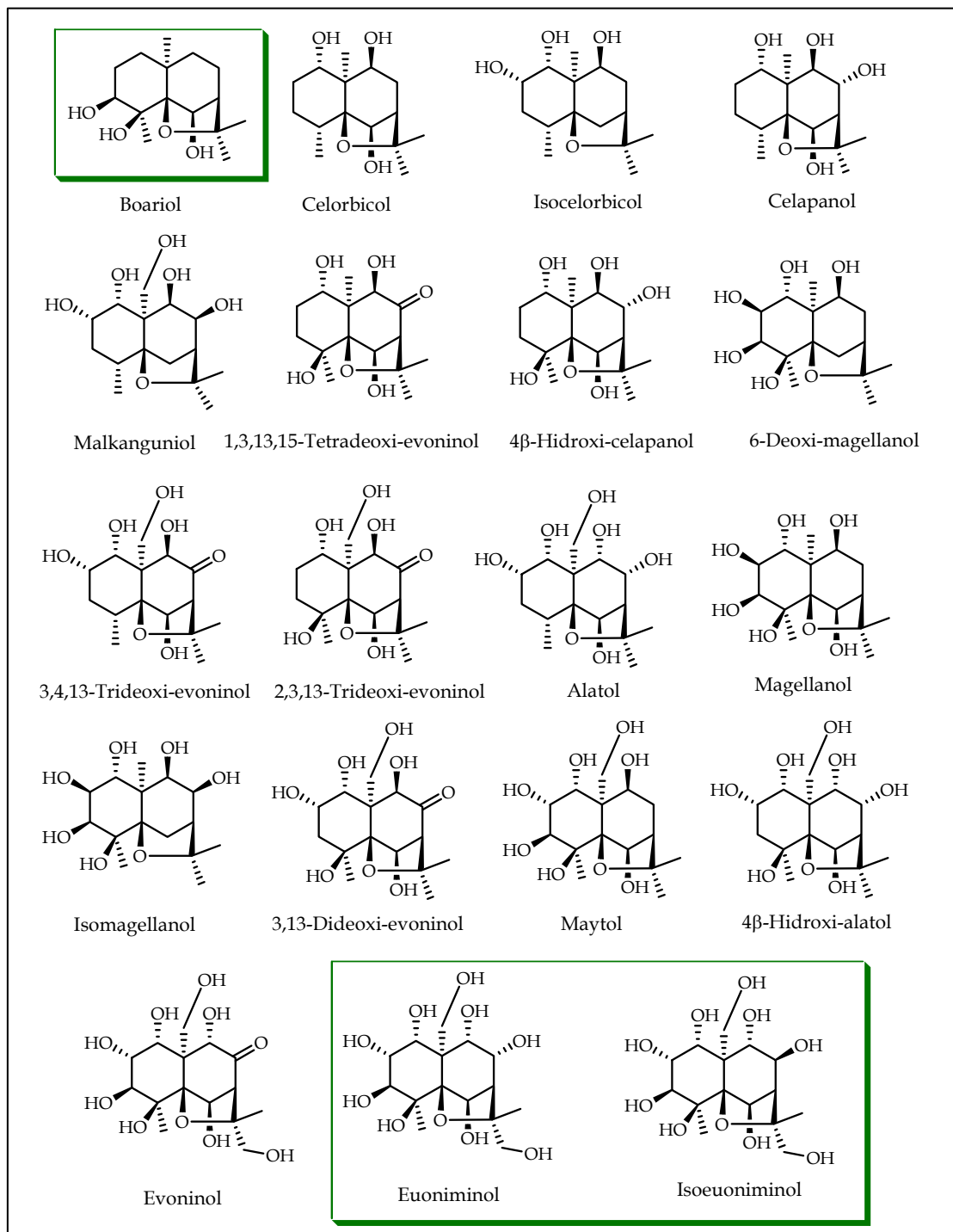


Figura 4.3.5. Algunos esqueletos polihidroxílicos base de sesquiterpenos agarofuranos.

¹¹ González, A. G.; Muñoz, O. M.; Ravelo, A. G.; Crespo, A.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez, I. A.; Solans, X.; Ruiz-Pérez, C.; Rodríguez-Romero, V. *Tetrahedron Let.* **1992**, 33 (14), 1921-1924.

¹² Shizuri, Y.; Wada, K.; Sugiura, K.; Hirata, Y. *Tetrahedron.* **1973**, 29, 1773-1794.

La presencia de alcaloides en especies de la familia Celastraceae se conoce desde hace más de 50 años¹³. La primera publicación sobre la presencia de alcaloides en esta familia data de 1934¹⁴ y desde entonces numerosos investigadores han llevado a cabo el aislamiento y estudio estructural de los componentes de especies de esta familia. Este tipo de alcaloides sesquiterpénicos son indicadores quimiotaxonómicos de esta familia y presentan una macrolactona, procedente de un ácido dicarboxílico piridínico (figura 4.3.7), que forman un puente entre las posiciones 3 β y 12 del esqueleto sesquiterpenoide tipo evoninol, euniminol o isoeuniminol, que se encuentran esterificados generalmente con ácido acético y benzoico, así como por complejos ácidos alifáticos y heterocíclicos¹⁵.

Algunos ejemplos de este tipo de alcaloides son la alatusinina¹⁶ y la orthosphenina¹⁷ (figura 4.3.6).

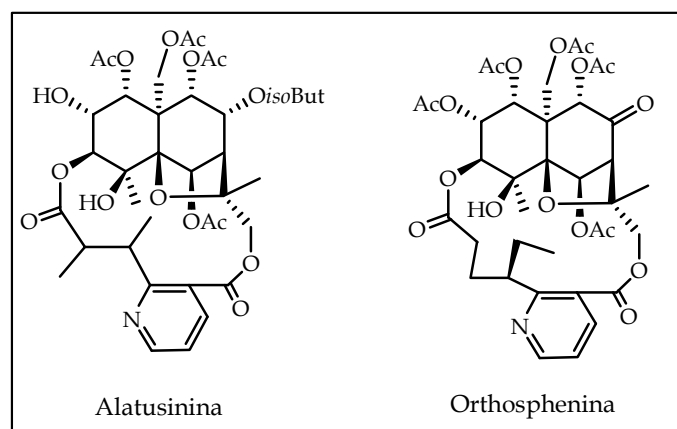


Figura 4.3.6. Alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos.

¹³ Smith, R. M. *The Alkaloids*, Academic Press, Ed.; R. H. F. 1997, Manske, London.

¹⁴ Orechoff, A. *Arch. Pharm.* 1934, 272, 673-675.

¹⁵ Spivey, A.; Weston, M.; Woodhead, S. *Chem. Soc. Rev.* 2002, 31, 43-59.

¹⁶ Ishiwata, H.; Shizuri, Y.; Yamada, K. *Phytochemistry*. 1983, 22 (12), 2839-2841.

¹⁷ González, A. G.; San Andrés, L.; Ravelo, A. G.; Jiménez, I. A.; Domínguez, X. A. *J. Nat. Prod.* 1989, 52, 1338-1341.

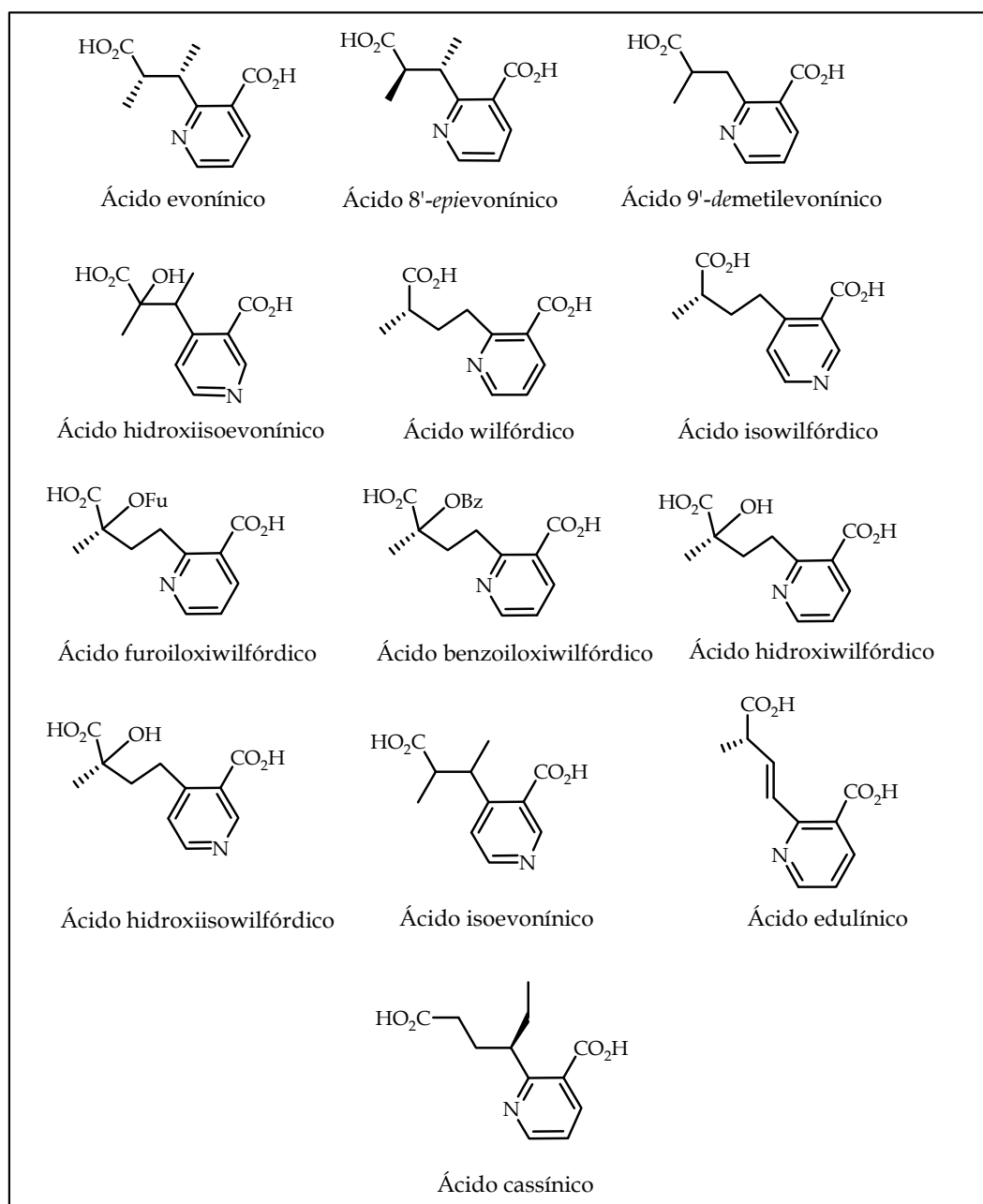


Figura 4.3.7. Ácidos carboxílicos que esterifican a los alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos.

4.3.1.1. Actividades biológicas de los sesquiterpenos y alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos dihidro- β -agarofuránicos.

Los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos y alcaloides sesquiterpénicos presentan un amplio espectro de actividades biológicas⁴, entre las cuales se encuentran, la actividad inhibidora del proceso fotosintético, antialimentaria e insecticida, antituberculosa, antiviral, inmunosupresora, inhibidora de la activación

del virus Epstein-Barr, citotóxica, antiinflamatoria, relajante intestinal y actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos.

4.3.1.1.1. Actividad antialimentaria e insecticida

Los efectos negativos de los insectos sobre las plantas cultivadas y productos almacenados son muy importantes y en este sentido constituyen uno de los azotes de la humanidad. Dentro del amplio abanico de posibilidades en la lucha contra las plagas se encuentran los antialimentarios que constituyen un grupo de sustancias que inhiben la alimentación de los insectos. Estos inhibidores de la alimentación junto con reguladores del desarrollo de los insectos, feromonas, atrayentes y repelentes, se han descrito como insecticidas de acción indirecta. Además, los insecticidas naturales presentan la ventaja de que los insectos tienen dificultad en adaptarse a ellos y no están sometidos a la misma presión selectiva como en el caso de los insecticidas convencionales.

Durante siglos, especies de celastráceas han sido utilizadas en la agricultura tradicional china para proteger los cultivos contra el ataque de los insectos. Así, son conocidas las propiedades insecticidas de *Celastrus angulatus* Maxim. y *Tripterygium wilfordii* Hook¹⁸, cuyas partes aéreas molidas y mezcladas con agua, se añaden sobre las plantas para protegerlas de diversas plagas.

Acree¹⁹, Swingle^{18,18} y Beroza^{20,21,22} aislaron wilfordina, wilforina, wilforgina y wilfortrina, como responsables de la actividad insecticida de *Tripterygium wilfordii*. Wilfordina y wilforina resultaron ser altamente tóxicos frente a la larva europea *Pyrausta nubilalis* “taladro del maíz”²³ y la wilforina fue efectivo como antialimentaria frente a la larva *Pieris rapae* y la conocida “langosta migratoria africana”, *Locusta migratoria*, resultando más potente para estas plagas que la azadiractina, aislada del árbol del Neem (*Azadirachta indica* Bark, Meliaceae), el más notable antialimentario natural conocido.

¹⁸ Swingle, W. T.; Haller, H. L.; Siegler, E. H.; Swingle, M. C. *Science*. **1941**, 93, 60-61.

¹⁹ Acree, F. Jr.; Haller, H. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 1608-1611.

²⁰ Beroza, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 3656-3659.

²¹ Beroza, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 1585-1584.

²² Beroza, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 2136-2134.

²³ Beroza, M. J.; Bottger, G. T. *J. Econom. Entomol.* **1954**, 47, 184.

Se han evaluado como insecticidas numerosos alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos, metabolitos responsables de la actividad insecticida de celastráceas^{24,25}, presentando actividad comparable con la azadiractina (figura 4.3.8).

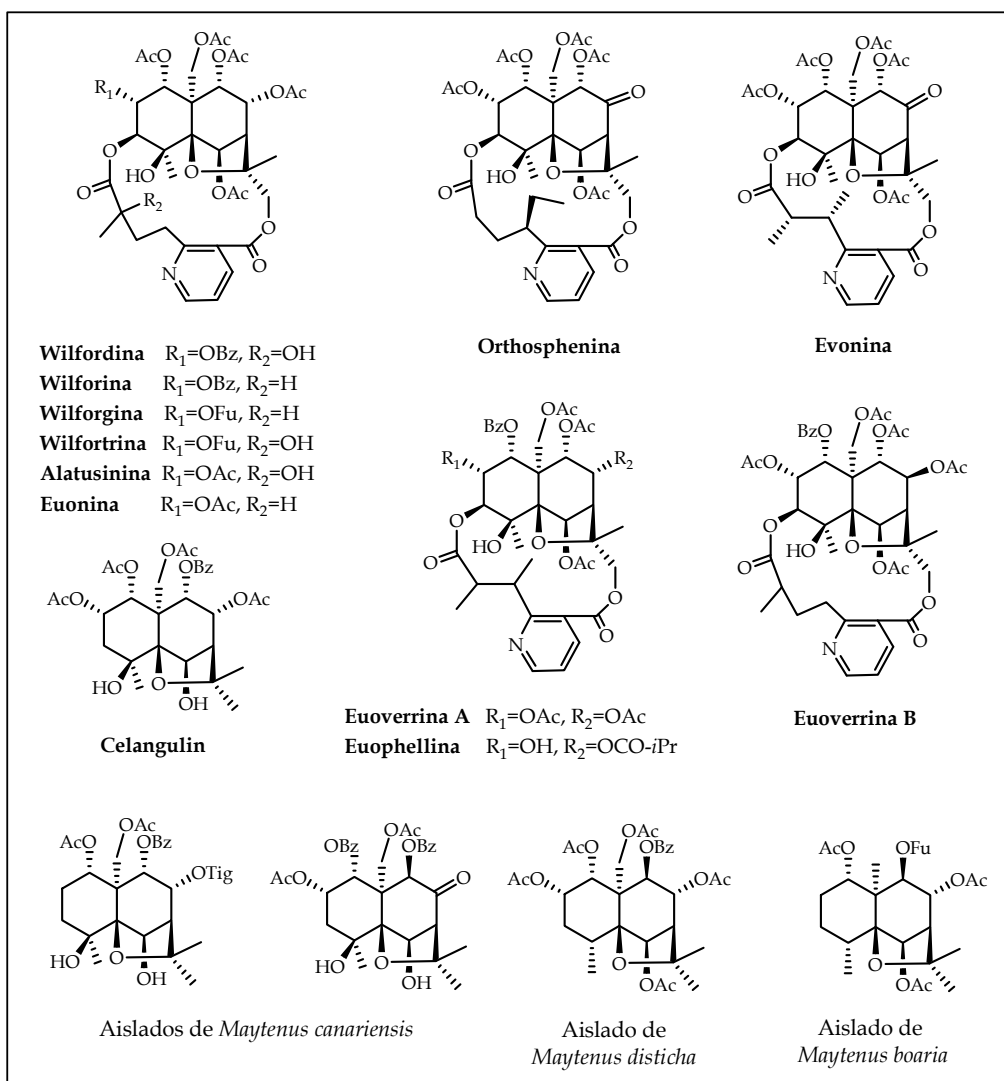


Figura 4.3.8. Ejemplos de sesquiterpenos y alcaloides sesquiterpénicos con actividad antialimentaria e insecticida.

4.3.1.1.2. Actividad inhibidora del proceso fotosintético

Un número considerable de metabolitos secundarios que son liberados por las plantas, están involucrados en la interacción con otros organismos, desempeñando una gran variedad de funciones ecológicas, tales como: alelopática, disuasoria de herbívoros, atrayente de polinizadores o protectora de radiaciones

²⁴ Hohmann, J.; Nagy, G.; Dini, Z.; Günther, G.; Pelczer, Y.; Jerkouich, G.; Varjas, L. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1192-1199.

²⁵ Ichinobe, Y.; Fujimoto, Y.; Takaii, S., *Jnp. Kokai Tokkyo Koho.* **2000**, *9*.

UV. Estos fenómenos han sido agrupados bajo el amplio espectro que cubre la Química ecológica, disciplina que se ha desarrollado extraordinariamente en los últimos 20 años.

Se ha demostrado que muchos de estos metabolitos pueden inhibir el desarrollo de insectos, nemátodos e incluso hongos. Así mismo, pueden proteger a la planta frente a bacterias, como es el caso de algunos flavonoides. Los metabolitos de naturaleza fenólica, especialmente los taninos, protegen a la planta de herbívoros, al dificultar su digestión. A estas sustancias se les conoce como aleloquímicos y el fenómeno se designa **aleloquimia**, o **alelopatía** cuando se establece entre individuos vegetales.

El proceso de la fotosíntesis es la diana de un amplio rango de aleloquímicos y así la inhibición de dicho proceso por productos naturales, particularmente de plantas alelopáticas, son una buena estrategia para el descubrimiento de herbicidas naturales²⁶.

En este sentido, Céspedes y col.²⁷ investigaron el modo de acción de dos sesquiterpenos β -agarofuranos, aislados de *Maytenus disticha* y *Maytenus boaria* (figura 4.3.9), como inhibidores del crecimiento vegetal, mediante la interferencia del proceso fotosintético en cloroplastos aislados de espinaca. La fotofosforilación y el transporte de electrones fue inhibida de una manera dependiente de la concentración de los sesquiterpenos.

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha evaluado la actividad inhibidora del proceso fotosintético de tres sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos, aislados de *Celastrus vulcanicola*, en colaboración con los Drs. Blas Lotina y Beatriz King Díaz, en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Dos de estos compuestos resultaron potentes inhibidores tanto de la síntesis de ATP como del flujo de electrones en cloroplastos de espinaca a 50 μ M²⁸.

²⁶ Hoagland, R. E.; Williams, R. D. *Allelopathy*. **2004**, 315-351.

²⁷ Céspedes, C.; Achnine, L.; Alarcón, J.; Becerra J.; Lotina-Hennsen, B. Z. *Naturforsch.* **2000**, 55c, 631-637.

²⁸ Torres-Romero, D.; King-Díaz, B.; Jiménez, I. A.; Lotina-Hennsen.; Bazzocchi, I. L. *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 1331-1335.

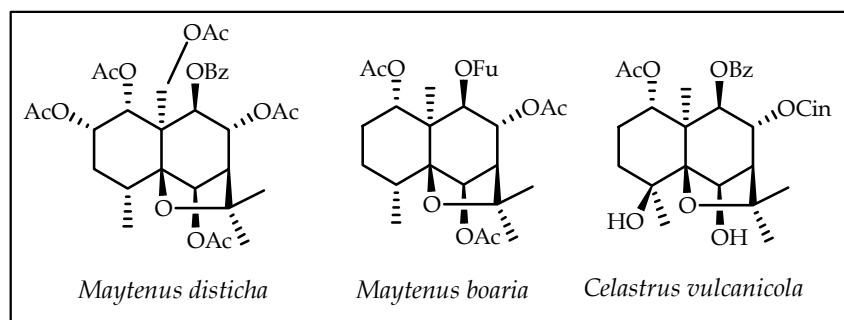


Figura 4.3.9. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos con actividad inhibidora del proceso fotosintético.

4.3.1.1.3. Actividad antituberculosa

La tuberculosis (TB) se define como una enfermedad infecto-contagiosa causada por diversas especies del género *Mycobacterium*. La TB es posiblemente la enfermedad infecciosa más prevalente en el mundo. Es la principal causa de mortalidad por enfermedades infecciosas en adultos y aproximadamente la tercera parte de la población está infectada con el bacilo de la tuberculosis.

Se han descrito sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos que presentan una potente actividad antituberculosa (figura 4.3.10). Así, por ejemplo, existen dos estudios de dicha actividad en sesquiterpenos aislados de los tallos de *Microtropis fokiensis*. En ambos estudios *in vitro*, los compuestos fueron evaluados frente a la cepa *Micobacterium tuberculosis* 90-221387, presentando el sesquiterpeno 8-acetoximutagenina un valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 10,0 $\mu\text{g/ml}$, actividad comparable a la del control positivo, etambutol (CMI 6,3 $\mu\text{g/ml}$)²⁹. Además, los compuestos **A-D** presentaron una potente actividad antituberculosa con CMIs $\leq 26,0$ $\mu\text{g/ml}$, en un ensayo usando como control positivo el etambutol (CMI 30,6 $\mu\text{g/ml}$)³⁰.

Estudios recientes de *Microtropis japonica* revelan la actividad antituberculosa del sesquiterpeno 15-acetoxiorbiculín G, con una CMI de 39,6 μM ³¹.

²⁹ Tsung-Hsien, C.; Ih-Sheng C.; Ping-Jyun, S.; Chien-Fang, P.; Po-Chuen S.; Jih-Jung, C. *Chem. Biodiver.* **2007**, *4*, 1594-1600.

³⁰ Jih-Jung, C.; Tsung-Hsien, C.; Chien-Fang, P.; Ih-Sheng C.; Sheng-Zehn, Y. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 202-205.

³¹ Jih-Jung, C.; Chang-Syun Y.; Chien-Gang, P.; Ih-Sheng, C.; Chang-Ling, M. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1016-1021.

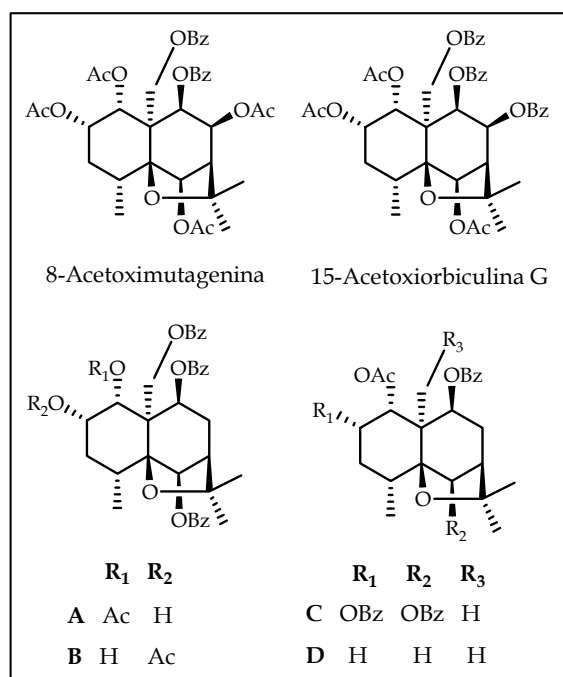


Figura 4.3.10. Sesquiterpenos aislados de *Microtropis fokiensis* y *Microtropis japonica* con actividad antituberculosa.

En nuestro grupo se han evaluado 25 sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de *Celastrus vulcanicola* frente a la cepa sensible de *Micobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 (American Type Cultures Collection, Rockville, Md.) y la cepa resistente MDR (aislada en clínica, cepa 02 TB DM039EP097). Ninguno de estos compuestos mostró actividad frente a la cepa MT H37Rv, presentando una CMI > 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Sin embargo, siete de los compuestos presentaron moderada actividad frente a la cepa MT (MDR), con valores de CMI en un rango de 6,2-12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, resultando más activos que la rifampicina (CMI > 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$), usada como control positivo³².

4.3.1.1.4. Actividad antiviral

Las infecciones virales en humanos y animales, por lo general, dan como resultado una respuesta inmune del organismo invadido, y a menudo enfermedades o incluso la muerte. Entre los padecimientos se incluyen el resfriado común, la gripe, la varicela, la hepatitis B, la fiebre amarilla, el SIDA, etc.

³² Torres-Romero, D. *Metabolitos Secundarios Bioactivos de Celastrus Vulcanicola*. 2008, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.

La actividad de trece sesquiterpenos aislados de *T. wilfordii* fue evaluada frente a los virus: herpes simplex 1 (HSV-1), virus de la influenza A, citomegalovirus y el virus de la rubéola³³. De los compuestos evaluados sólo triptofordin C-2 mostró actividad frente al herpes simplex 1, aumentado su efecto antiviral cuando se combinó con aciclovir, usado actualmente en clínica.

Diversos alcaloides sesquiterpénicos aislados de *Trypterygium hypoglaucum*, fueron ensayados por su actividad anti-VIH. Los resultados obtenidos indicaron que este tipo de compuestos son potenciales agentes terapéuticos. Así, triptonina A inhibe la replicación del VIH en linfocitos H9 con valores de concentración efectiva al 50% (CE₅₀) de 2,54 µg/ml e inhibe el crecimiento celular (H9) a una CI₅₀ > 100 µg/ml, representando un índice terapéutico (IT) de 39,4.

Por otro lado, triptonina B e hypoglaunina B, mostraron una potente actividad anti-VIH, presentando CE₅₀ de 0,10 µg/ml y 0,13 µg/ml, respectivamente y un valor de IT > 1000, lo que es poco frecuente en un compuesto bioactivo aislado de fuentes naturales^{34,35} (figura 4.3.11).

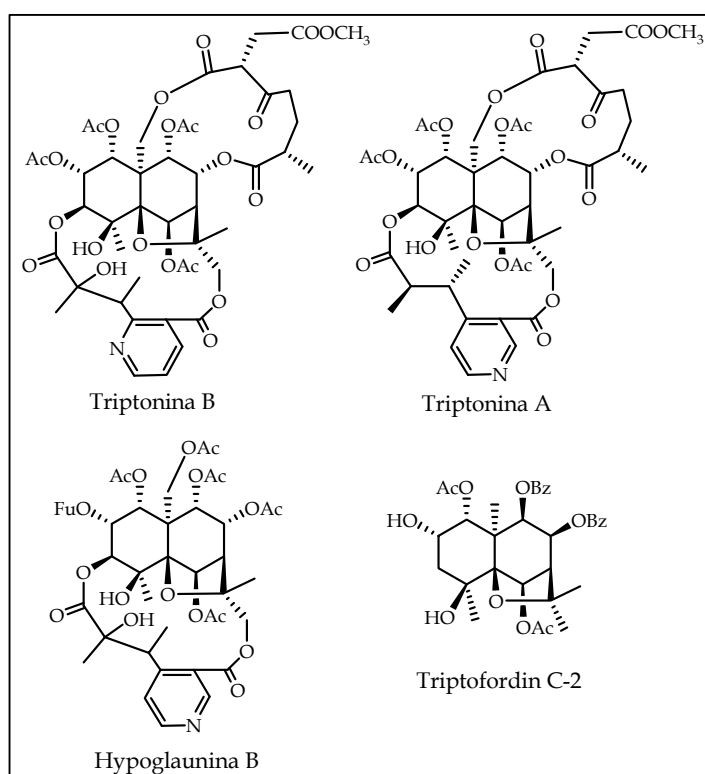


Figura 4.3.11. Alcaloides y sesquiterpenos dihidro-β-agarofuranos con actividad antiviral.

³³ Hayashi, K; Toshimitsu, U.; Ujita, K.; Takaishi, Y. *J. Antimicrob. Chemoth.* **1996**, 37, 759-764.

³⁴ Duan, H.; Takaishi, Y.; Bando, M.; Kido, M.; Imakura, Y.; Lee, K. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2969-2972.

³⁵ Duan, H.; Takaishi, Y.; Bando, M.; Kido, M.; Imakura, Y.; Lee, K. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 357-361.

4.3.1.1.5. Actividad citotóxica

El cáncer engloba a un grupo complejo y heterogéneo de patologías, 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 diferenciados³⁶.

La **quimioterapia** se basa fundamentalmente en el uso de fármacos con actividad antiproliferativa, siendo los compuestos más utilizados hoy día los que pertenecen al grupo de los **citotóxicos**.

Existen numerosos estudios de la actividad citotóxica de sesquiterpenos y alcaloides sesquiterpénicos agarofuránicos. Así, de las hojas y corteza de *Maytenus emarginata* se aislaron emarginatina A y emarginatina B, que presentaron actividad citotóxica *in vitro* frente a un cultivo de células KB (carcinoma de nasoraginge)³⁷, siendo la primera vez que se observa actividad citotóxica en este tipo de compuestos.

Posteriores investigaciones de la planta condujeron al aislamiento de emarginatinas C-G y emarginatinina^{38,39}, que se evaluaron frente a una batería de líneas celulares cancerígenas. Los resultados mostraron que el compuesto más activo fué emarginatina F, mientras que emarginatina G resultó inactivo. Posteriormente, se ensayó emarginatina E⁴⁰ sobre cuatro líneas celulares: carcinoma de nasofaringe (KB), colon (COLO-205), hígado (Hepa-3B) y cervix (HeLa), resultando activo frente a células KB (DE₅₀ = 1,7 µg/ml) y COLO-205 (DE₅₀ = 4,1 µg/ml) (figura 4.3.12).

Otros alcaloides sesquiterpénicos con actividad citotóxica son 4-hidroxi-7-epichuchuhuanina EV, aislado de *Peritassa campestris* Cambess⁴¹ y mayteina y 6-benzoil-6-deacetilmayteina, aislados de *Maytenus krukovii*⁴², entre otros.

³⁶ Evan, G. I.; Vousden, K. H. *Nature*. **2001**, *411*, 342-344.

³⁷ Kuo, Y.; Chen, C.; Kuo, M. Y. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 422-424.

³⁸ Kuo, Y.; Chen, C.; King, M.; Wu, T.; Lee, K. *Phytochemistry*. **1994**, *35*, 803-807.

³⁹ Kuo, Y.; King, M.; Chen, G.; Chen, H.; Chen, C.; Chen, L.; Lee, K. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 263-269.

⁴⁰ Huang, H. C.; Shen, C. C.; Chen, C. F.; Wu, Y. C.; Kuo, Y. H. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1079-1080.

⁴¹ Lião, L. M.; Vieira, P. C.; Rodrigues-Filho, E.; Fernandes, J. B.; Fernandes da Silva, M. F. G. *Phytochemistry*. **2001**, *58*, 1205-1207.

⁴² Sekar, K. V. S.; Sneden, A. T.; Flores, F. A. *Planta Med.* **1995**, *61*, 390.

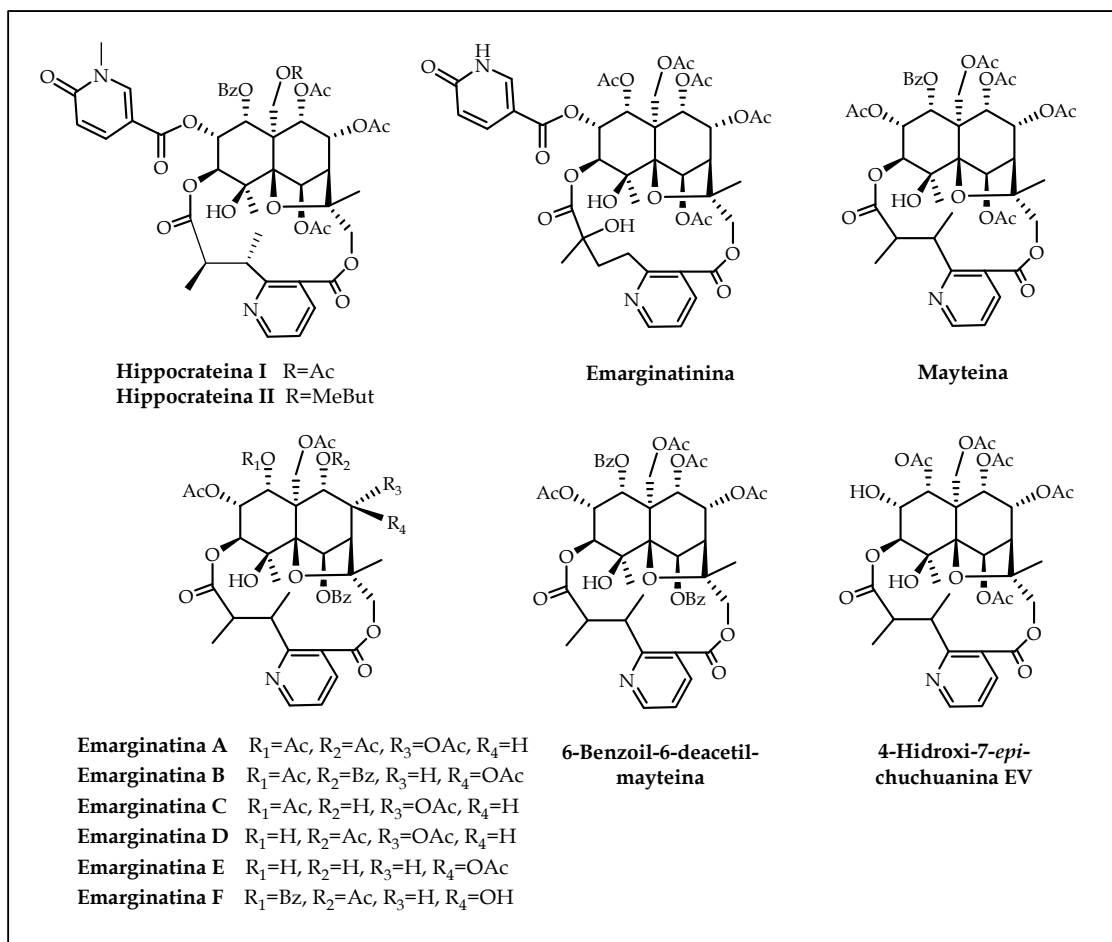


Figura 4.3.12. Alcaloides sesquiterpénicos con actividad citotóxica.

Existen también numerosos sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos con actividad citotóxica⁴ (figura 4.3.13). Así, por ejemplo, sesquiterpenos aislados de *Euonymus nanoides* mostraron actividad inhibitoria *in vitro* frente a tres líneas celulares humanas, A-549 (carcinoma de pulmón), HL-60 y BEL-7402 (carcinoma de hígado) y también una célula tumoral de ratón P-388⁴³. Recientemente, se han publicado estudios de la actividad citotóxica de sesquiterpenos aislados de *Celastrus orbiculatus*⁴⁴ frente a la línea celular HL-60, mostrando una CI₅₀ entre 1,9-8,3 μ M.

⁴³ Liu, Z. L.; Jia, Z. J. Tian, X. Wang, H. *Planta Med.* **2004**, *70*, 353.

⁴⁴ Zhu, Y.; Miao, Z. Ding, J.; Zhao, W. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1005-1010.

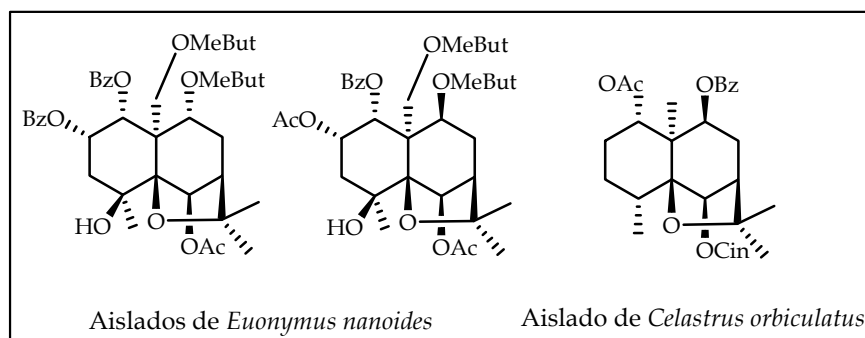


Figura 4.3.13. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos con actividad citotóxica.

4.3.1.1.6. Actividad inmunosupresora

Los inmunomoduladores son fármacos que modifican directamente una función inmune específica o tienen un efecto neto positivo o negativo sobre la actividad del sistema inmune. Los trastornos por inmunodeficiencia son aquellos en los cuales se presenta disminución o ausencia de la respuesta inmune (VIH, enfermedad de Bruton, síndrome de Job, etc.) y las enfermedades autoinmunes son las causadas por las respuestas inmunes contra los propios tejidos del cuerpo (artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, fibrosis pulmonar idiopática, soriasis, enfermedad de Crohn, etc.).

El extracto T_{II} derivado de las raíces de *T. wilfordii*, ha sido usado en clínica para el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes^{45,46} en China. Se han obtenido de este extracto los compuestos ebenifolina E-11 y cangorinina E-1, que presentaron un efecto inhibitor sobre la producción de citoquinas en células humanas mononucleares periféricas de lipopolisacáridos, al compararlos con la prednisolona⁴⁷, inmunomodulador utilizado actualmente en clínica.

Por otra parte, los alcaloides wilfortrina y wilforina, aislados de esta misma especie, inhibieron la respuesta inmune humoral en animales de laboratorio. Wilforina fue efectiva en el tratamiento de artritis reumatoide, siendo la toxicidad intraperitoneal, dosis letal 50% (DL₅₀) de 418 mg/kg en ratones⁴⁸. Wilforina, es un

⁴⁵ Wang, X. W.; Xie, H. *Drugs Future*. **1999**, 24, 991.

⁴⁶ Tao, X.; Lipski, P. E. *Rheum. Disc. N. Amer.* **2000**, 26, 29.

⁴⁷ Duan, H.; Takaiishi, Y.; Momota, H.; Ohmota, Y.; Taki, T.; Jia, Y.; Li, D. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 582-587.

⁴⁸ Xia, Z.; Chen, J. *Zhongguo Yaoxue*. **1990**, 25, 266-267.

inmunesupresor usado en el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática y su eficacia terapéutica, basada en la observación patológica, fue evidente aunque no fue tan efectiva como la hidrocortisona. Una terapia combinada de wilforina e hidrocortisona mostró mejores resultados terapéuticos⁴⁹. Por otra parte, wilforidina, mostró un efecto inmunofarmacológico sobre pacientes afectados con lupus eritematoso sistémico (LES)⁵⁰ (figura 4.3.14).

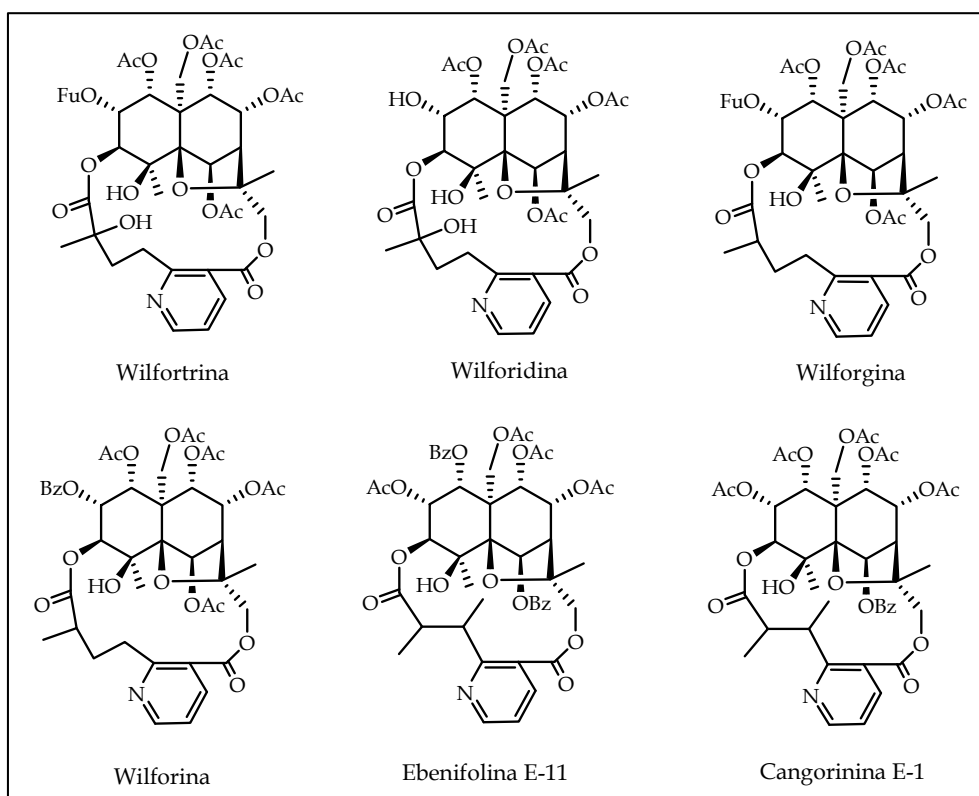


Figura 4.3.14. Alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos con actividad inmunosupresora.

4.3.1.1.7. Actividad antiinflamatoria

La inflamación es un proceso fisiopatológico complejo, caracterizado por el enrojecimiento, aumento de temperatura, hinchazón y disminución de la función de los órganos. Se trata de una respuesta del organismo frente a una infección, a un agente químico/físico, o frente a la lesión de un tejido, que proporciona una señal de alarma que dispara las respuestas inmunitarias específicas. La respuesta inflamatoria surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado⁵¹. La respuesta inflamatoria está mediada

⁴⁹ Dai, L.; Hou, J.; Cai, H.; Wang, W. *Jiangsu Yiyao*, **1998**, *24*, 28-30.

⁵⁰ Yu, H.; Qin, W.; Wu, H. *Zhongguo Mianyixue*, **1999**, *15*, 27-31.

⁵¹ Flores, J. *Farmacología Humana*. **2003**, Masson, Barcelona.

por una gran cantidad de señales moleculares producidas por neutrófilos, monocitos/macrófagos, células de la matriz, plaquetas y linfocitos, como consecuencia de la activación de una cascada de señales.

Se han evaluado numerosos sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos como antiinflamatorios. Cabe destacar tres compuestos aislados de *Celastrus orbiculatus*⁵² que fueron evaluados como inhibidores de la activación del factor NF- κ B. Estos compuestos mostraron una actividad moderada, tanto en la inhibición de NF- κ B como en la producción de NO, al compararlos con aminoguanidina, un inhibidor de iNOS (óxido nítrico sintetasa).

En 2004, Arciniegas y col⁵³. aíslan de las raíces de *Mortonia greggii* dos sesquiterpenos, mostrando moderados efectos antiinflamatorios como inhibidores de NO.

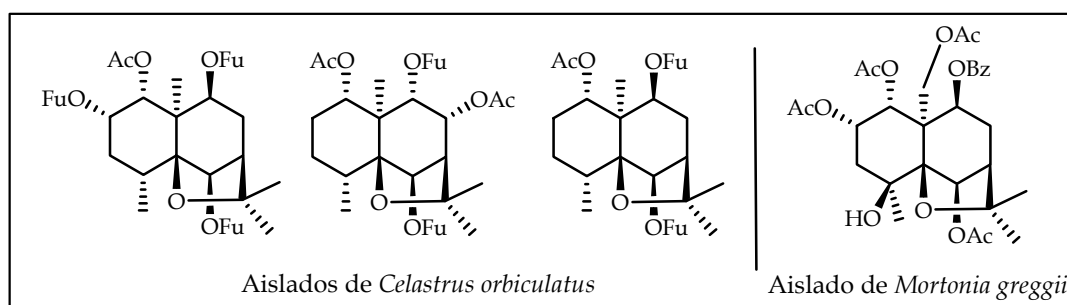


Figura 4.3.15. Sesquiterpenos con actividad antiinflamatoria.

4.3.1.1.8. Actividad relajante intestinal

Más de la mitad de las consultas gastrointestinales están relacionadas de alguna manera con “trastornos funcionales”. Estos representan una combinación de síntomas digestivos crónicos o recurrentes que no pueden explicarse por anomalías estructurales o bioquímicas. Así, los trastornos funcionales del tubo digestivo representan el 35-40% de las consultas médicas en España. Un trastorno funcional gastrointestinal da lugar a un desequilibrio en la absorción y la eliminación, con consecuencias graves y en el caso extremo mortales.

En este sentido, diversas especies de la familia Celastraceae son utilizadas como remedio tradicional para los desórdenes gastrointestinales, destacando el uso

⁵² Jin, H. Z.; Hwang, B. H.; Kim, H. S.; Lee, J. H.; Kim, Y. H.; Lee, J. H. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 89-91.

⁵³ Arciniegas, A.; Apan, M. T. R.; Perez-Catorena, A. L. Vivar, A. R. *Z. Naturforsch, Teil C*, **2004**, *59*, 237.

en la medicina Ayurvédica de *Celastrus paniculatus*⁵⁴, especie de la cual se ha descrito la aplicación de extractos para combatir los espasmos intestinales⁵⁵. De esta especie, F. Borrelli y col.⁵⁶ aislaron los únicos ejemplos hasta el momento, de sesquiterpenos con actividad relajante intestinal (figura 4.3.16).

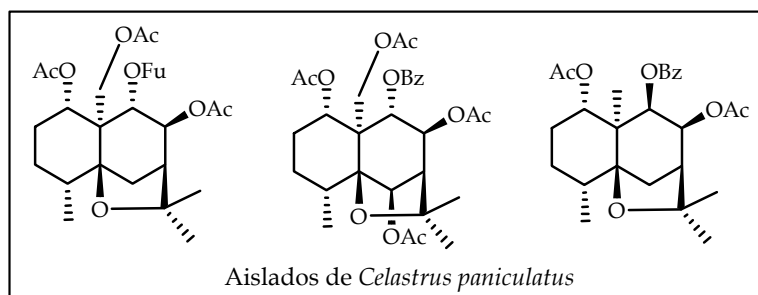


Figura 4.3.16. Sesquiterpenos con actividad relajante intestinal.

4.3.1.1.9. Actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos

Uno de los principales problemas en el tratamiento del cáncer es la resistencia a la quimioterapia desarrollada por los organismos infecciosos y por las células tumorales. El fenómeno de la resistencia impide el éxito del tratamiento farmacológico de numerosas enfermedades, habiéndose identificado cepas resistentes a fármacos en casi todos los agentes infecciosos estudiados, desde virus a parásitos⁵⁷. La ineficacia en el tratamiento de muchos cánceres también suele ir asociado a problemas de resistencia a la quimioterapia, siendo de especial importancia el fenómeno de la multirresistencia a fármacos (MDR).

Recientemente, se ha publicado la actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos frente a una línea de *Leishmania tropica* resistente a la daunomicina⁵⁸ de dos nuevos sesquiterpenos aislados de *Maytenus apurimacensis* (figura 4.3.17), los cuales presentaron esqueletos polihidroxílicos base nuevos en la literatura química (15-deoxialatol y 4,15-dideoxialatol).

⁵⁴ Kapoor, L. D. *Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants*, 2000, CRC Press, Boca Raton.

⁵⁵ Borrelli, F.; Borbone, N.; Capasso, R.; Montesano, D.; De Marino, S.; Aviello, G.; Masone, S.; Izzo, A. *Journal of ethnopharmacology*. 2009, 122 (3), 434-434.

⁵⁶ Borrelli, F.; Borbone, N.; Capasso, R.; Montesano, D.; Izzo, A. A.; De Marino, S.; Capasso, F.; Ferrara, L.; Longo, R.; Zollo, F. *Planta Med.* 2004, 70, 652-654.

⁵⁷ Teodori, E.; Dei, S.; Scapechi, S.; Cualtieri, F. *Il Farmaco*. 2002, 57, 385-415.

⁵⁸ Delgado-Méndez, P.; Herrera, N.; Chavez, H.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Cortés, F.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 1425-1430.

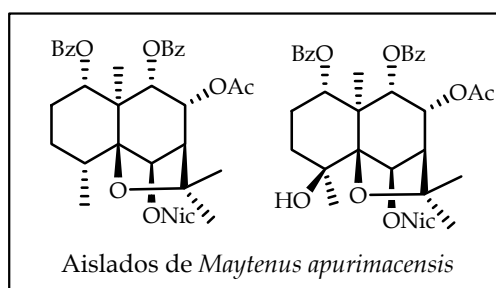


Figura 4.3.17. Revertidores de la multirresistencia a fármacos.

En nuestro grupo de trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos *in vitro* de un gran número de sesquiterpenos (figura 4.3.18). Así, se ha determinado el efecto revertidor de sesquiterpenos sobre el crecimiento de una línea de *Leishmania tropica* resistente a daunomicina (DNM) y los resultados obtenidos mostraron que dicha actividad depende del esqueleto polihidroxílico base y del número, tipo y posición de los ésteres en la molécula^{59,60}.

Por otra parte, los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos son considerados excelentes revertidores de la multirresistencia a fármacos en líneas celulares humanas^{61,62,63}, llevándose a cabo estudios del mecanismo molecular de estos sesquiterpenos como inhibidores específicos no transportados de la Pgp⁶⁴.

⁵⁹ Cortés-Selva, F.; Campillo, M.; P. Reyes, C.; Jiménez, I. A.; Castanys, S.; Bazzocchi, I. L.; Pardo, L.; Gamarro, F.; Ravelo, A. G. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 576-587.

⁶⁰ Pérez-Victoria, J. M.; Pérez-Victoria, F. J.; Parodi-Talice, A.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2468-2474.

⁶¹ Muñoz-Martínez, F.; Lu, P.; Cortés-Selva, F.; Pérez-Victoria, J.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Sharom F.; Gamarro, F.; Castanys, S. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7130-7134.

⁶² Reyes, C. P.; Muñoz-Martínez, F.; Torrecillas, I. R.; Mendoza, C. R.; Gamarro, F.; Bazzocchi, I. L.; Nuñez, M. J.; Pardo, L.; Castanys, S.; Campillo, M.; Jiménez, I. A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4080-4817.

⁶³ Torres-Romero, D.; Muñoz-Martínez, F.; Jiménez, I. A.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Bazzocchi, I. L. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 5166-5172.

⁶⁴ Muñoz-Martínez, F.; Reyes, C. P.; Pérez-Lomas, A.; Jiménez, I. A.; Gamarro, F.; Castanys, S. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2006**, *1758*, 98-110.

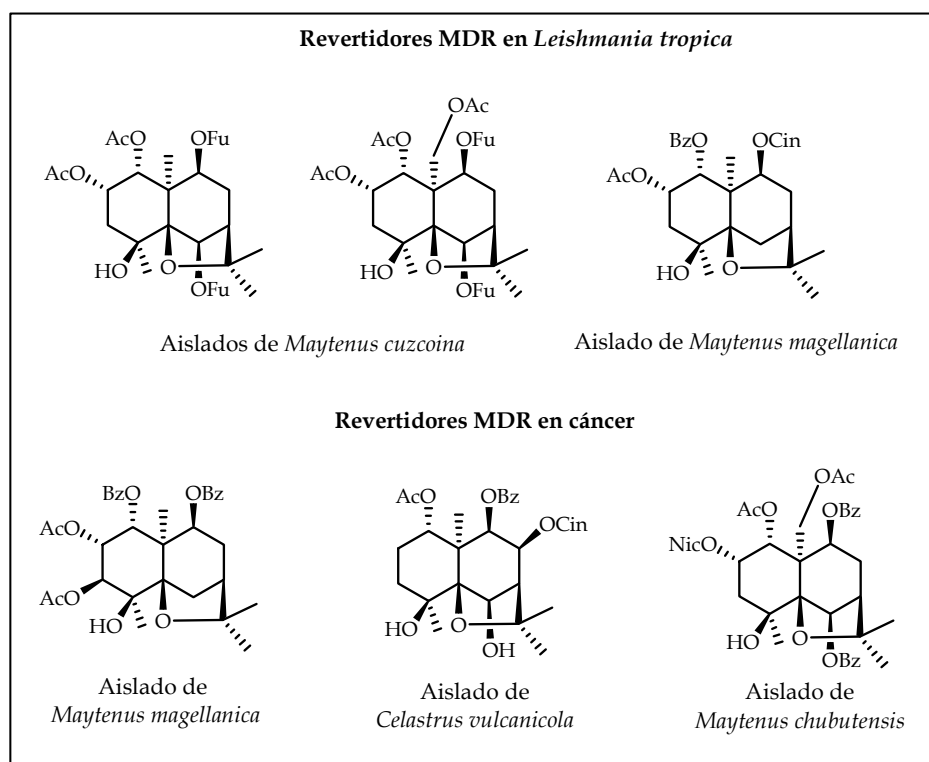


Figura 4.3.18. Sesquiterpenos con actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos.

4.3.1.1.10. Actividad inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr

La inhibición de tumores en su etapa de promoción es una de las estrategias más prometedoras en la quimioprevención del cáncer (capítulo 5.2). En los últimos años, se han publicado estudios sobre la actividad inhibidora de la inducción de tumores de numerosos productos naturales⁶⁵, incluyendo flavonoides⁶⁶, triterpenoides⁶⁷ y quinonas⁶⁸. Takaishi y *col.*⁶⁹ ensayaron, por primera vez, sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos, aislados de *T. wilfordii*, obteniendo excelentes resultados como inhibidores de la activación de los antígenos tempranos del virus Epstein-Barr, inducido por el 13-acetato-12-*O*-tetra-decanoilforbol (TPA), lo que se vincula a una actividad quimiopreventiva.

⁶⁵ Akihisa, T.; Yusakawa, K.; Tokuda, H. *Studies in Natural Products Chemistry. Atta-ur-Rahman. Bioactive Natural Products (Part J)*, **2003**, 29, 73.

⁶⁶ Konoshima, T.; Tabasaki, M.; Kozuka, M.; Inada, A.; Nekanishi, T.; Tokuda, H.; Matsumoto, T. *Shoyakugaku Sassi*. **1989**, 43, 135-141.

⁶⁷ Diablo, B.; Vanhaelen, M.; Vanhaelen-Fastré, R.; Konoshima, T.; Kozuka, M.; Tokuda, H. *S. J. Nat. Prod.* **1989**, 52, 879-881.

⁶⁸ Konoshima, T.; Kozuka, M.; Koyama, J.; Okatani, T.; Tagahara, K.; Tokuda, H. *J. Nat. Prod.* **1989**, 52, 987-995.

⁶⁹ Takaishi, Y.; Ujita, K.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Iwashima, A.; Fujita, T. *Cancer Lett.* **1992**, 65, 19.

Nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo estudios en colaboración con el Profesor H. Tokuda de Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto (Japón), de la relación estructura-actividad de una serie de sesquiterpenos aislados de *Maytenus cuzcoina* Loesener⁷⁰ y *Crosopetalum tonduzii* (Loes.) Lund^{71,72}. La actividad inhibidora de algunos de estos compuestos resultó mayor que la de glicirricina y el ácido retinoico⁷³, conocidos inhibidores de la activación tumoral. Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que nos encontramos ante un nuevo tipo de compuestos realmente prometedores como agentes quimiopreventivos (figura 4.3.19).

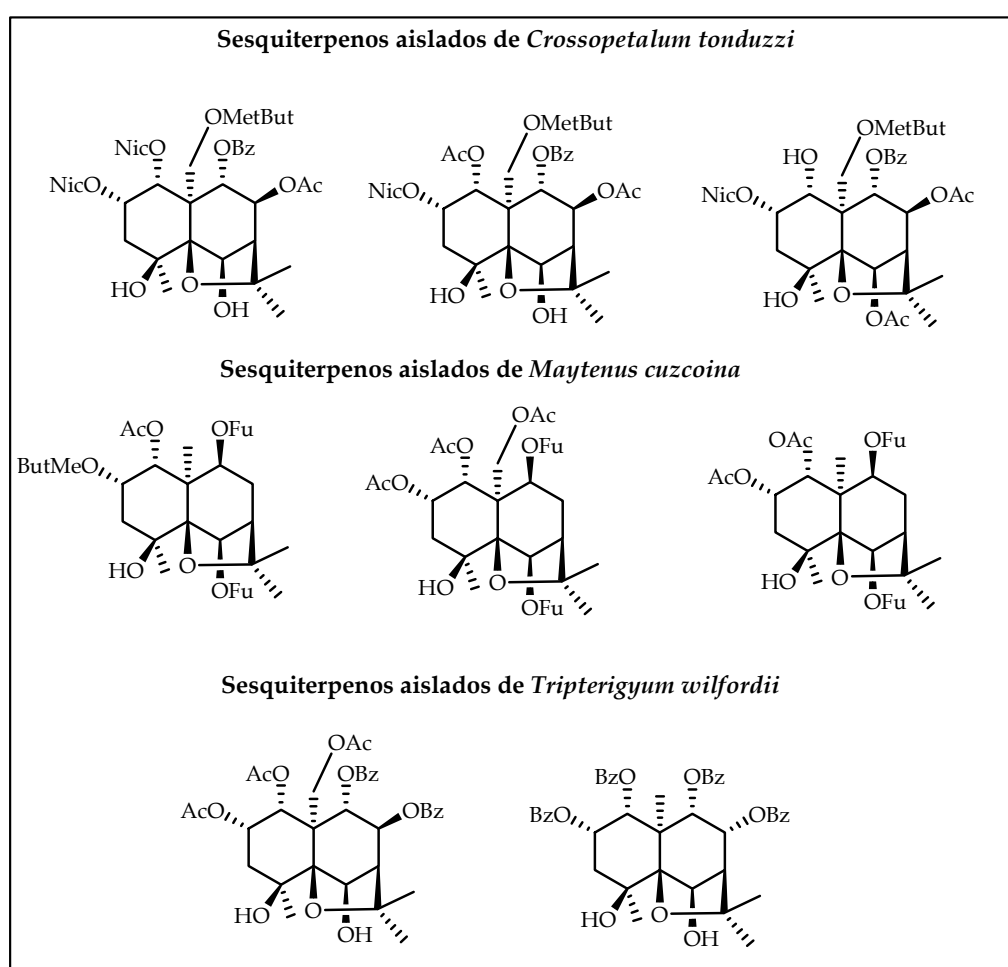


Figura 4.3.19. Sesquiterpenos inhibidores de la activación del virus Epstein-Barr.

⁷⁰ González, A. G.; Tincusi, B. M.; Bazzocchi, I. L.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Konoshima, T.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1773-1774.

⁷¹ Jiménez, I. A.; Bazzocchi, I. L.; Núñez, M. J.; Mukainaka, T.; Tokuda, H.; Ravelo, A. G. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1047-1050.

⁷² Mendoza, C.; Jiménez, I. A.; Tokuda, H.; Kushida, H.; Bazzocchi, I. L. *Chem. Biodivers.* **2005**, *2*, 286-294.

⁷³ O'Brian, C. A.; Word, N. E.; Vogel, V. G. *Cancer Lett.* **1990**, *49*, 9-12.

4.3.1.2. Aproximaciones a la síntesis de los sesquiterpenos agarofuránicos

En los últimos años ha aumentado el interés por los sesquiterpenos agarofuránicos, debido, fundamentalmente, al descubrimiento de numerosas actividades biológicas. Este interés ha llevado a determinar sus mecanismos de acción, establecer relaciones estructura-actividad y realizar su síntesis, como alternativa al aislamiento de fuentes naturales.

En la actualidad existen en la literatura química diversas aportaciones a la síntesis de estos compuestos. Así, la aportación más significativa es la desarrollada por White y col.⁷⁴ (figura 4.3.20), quienes llevaron a cabo la síntesis total de (±)-euoniminol y (±)-3,4-dideoximaytol, usando una estrategia basada en una ciclación en cascada que conduce al esqueleto de dihidroagarofurano, característico de estos compuestos.

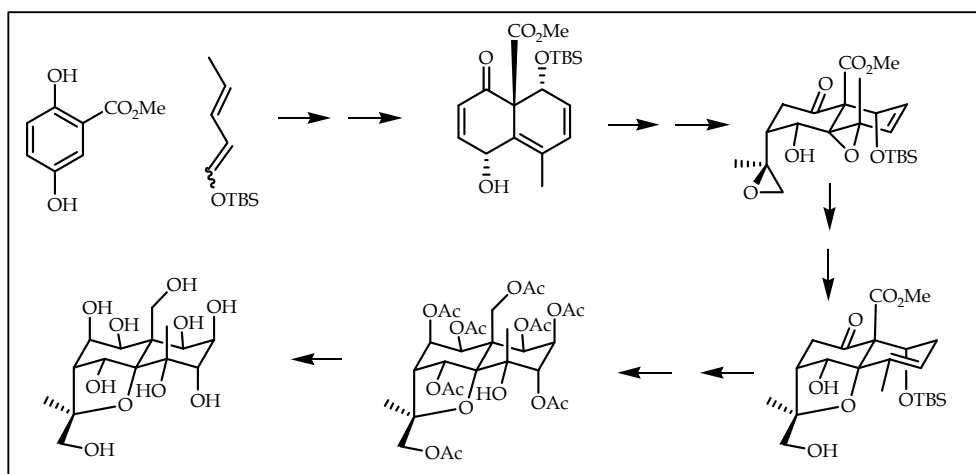


Figura 4.3.20. Aproximación sintética de sesquiterpenos de White y col.

En 1999, Charles Descoins Jr. y col.⁷⁵ desarrollaron una nueva estrategia para la síntesis de decalinas polihidroxiladas, cuya posterior funcionalización conduciría a los agarofuranos polihidroxilados. En esta aproximación la introducción del anillo de tetrahidrofurano se realiza en los últimos pasos de la síntesis, lo que supone un rápido acceso a intermedios útiles en la síntesis de los dihidro-β-agarofuranos polihidroxilados⁷⁶ (figura 4.3.21).

⁷⁴ White, J. D.; Shin, H.; Kim, T. S.; Cutshall, N. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2404-2419.

⁷⁵ Descoins, C. Jr.; Thamh, G. V.; Boyer, F. D.; Ducrot, P. H.; Descoin, C.; Lallemand, J. Y. *Synlett.* **1999**, *2*, 240-242.

⁷⁶ Descoins, C. Mecanismo de acción y síntesis de sustancias con actividad antiapetente de posible uso en la protección de cultivos, *Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna*, **1999**.

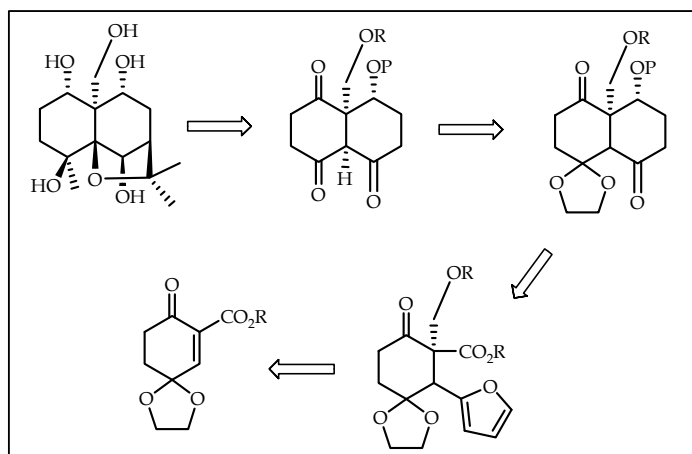


Figura 4.3.21. Esquema retrosintético de la síntesis de agarofuranos polihidroxilados (Descoins Jr. y col.).

Mehta y col.⁷⁷ desarrollan una aproximación sintética enantioespecífica de eudesmanos, partiendo de carvona y a través de una reacción de metátesis de cierre de anillo como paso clave para, posteriormente, llegar hasta el esqueleto de agarofurano polifuncionalizado. Floreancig y col.⁷⁸ han desarrollado una nueva estrategia para la síntesis estereoselectiva de dihidro- β -agarofuranos a partir de carvona (figura 4.3.22), siendo las etapas determinantes la formación del anillo decalínico mediante reacción de metátesis del correspondiente dieno, formación del anillo tetrahidrofuránico y finalmente, reducción diastereoselectiva.

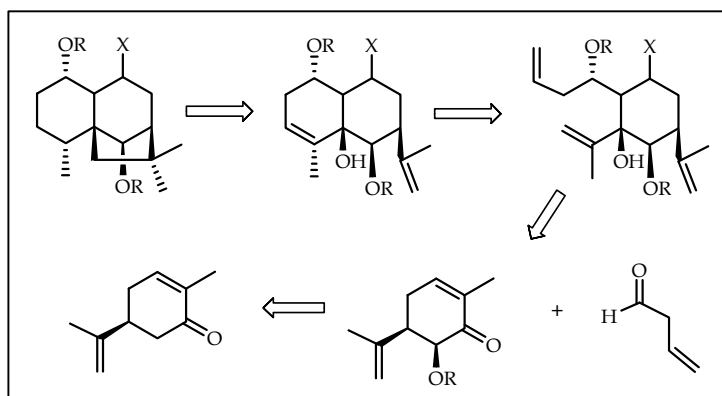


Figura 4.3.22. Esquema retrosintético de la síntesis de agarofuranos polihidroxilados (Floreancig y col.).

Helliwell y col.⁷⁹ propusieron una aproximación a la síntesis de precursores de agarofuranos polihidroxilados a partir de una reacción de Diels-Alder entre 1,4-benzoquinonas activadas y 1,3-butadienos oxigenados, que conducen a la síntesis

⁷⁷ Mehta, G.; Kumaran, S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 7055-7059.

⁷⁸ Christopher, A. L.; Floreancig, P. E. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7193-7194.

⁷⁹ Helliwell, M.; Thomas, E.; Whitehouse, D. *Synthesis.* **2005**, *19*, 3235-3234.

de biciclo decanos, precursores de dihidroagarofuranos polihidroxiados (figura 4.3.23.). Este trabajo aporta la síntesis con un nuevo reagrupamiento de un aducto Diels-Alder, así como procedimientos que evitan otros reagrupamientos y permiten acceder a derivados con esqueleto decalínico, útiles en la síntesis de agarofuranos.

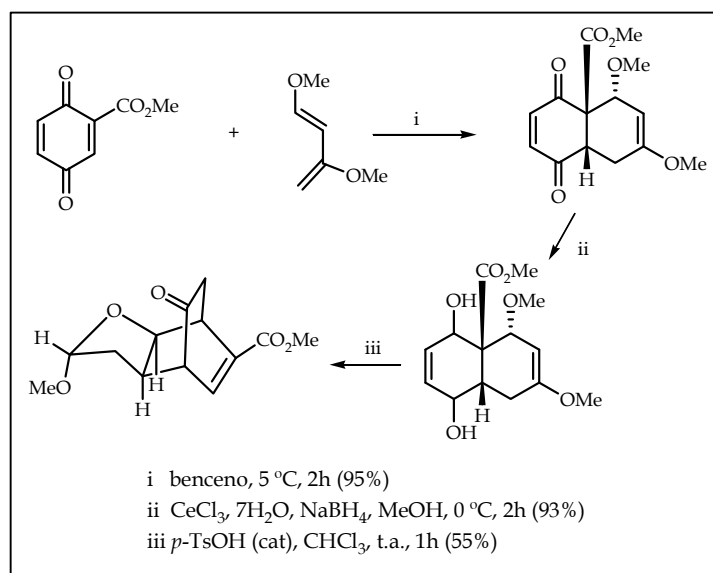


Figura 4.3.23. Aproximación Diels-Alder de precursores de dihidroagarofuranos de Helliwell y col.

Más recientemente, Siwicka y col⁸⁰. han desarrollado una síntesis total del esqueleto de dihidro-β-agarofurano, obteniendo una batería de derivados poliesterificados del compuesto **1** (figura 4.3.24). La estrategia consta de una reacción aldólica Mukaiyama de tetrahidronaftalenos con acetona, una epoxidación, reducción de la cetona y ciclación catalizada por ácidos.

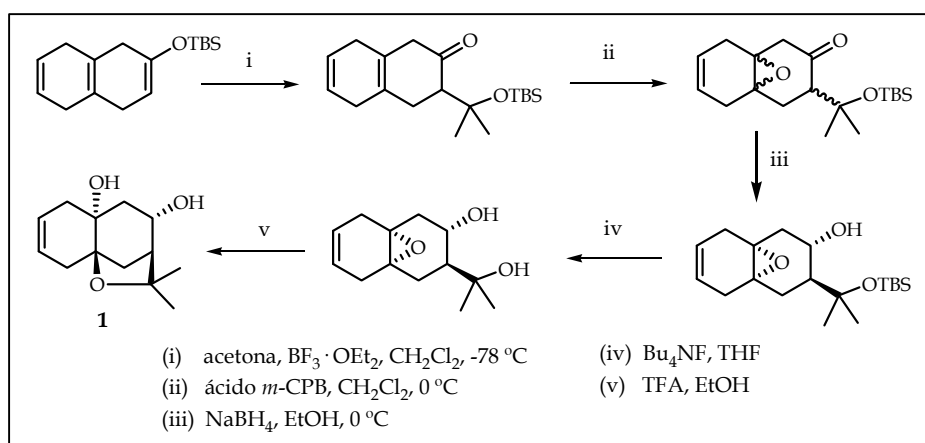


Figura 4.3.24. Aproximación sintética de dihidro-β-agarofuranos (Siwicka y col.).

⁸⁰ Siwicka, A.; Cuperly, D.; Tedeschi, L.; Vézouët, R. L.; White, A. J. P. Barrett, A. G. M. *Tetrahedron*. **2007**, *63*, 5903-5917.

*4.3.2. Sesquiterpenos
aislados de las hojas de
M. jelskii*

4.3.2. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de las hojas de *M. jelskii*

4.3.2.1. Resultados y discusión

Sesquiterpenos agarofuránicos

Tras repetidas cromatografías del extracto diclorometánico de las hojas de *M. jelskii*, aislamos **veinticinco sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano** que hemos denominado de **S-1 a S-25**, diecisiete de los cuales resultaron ser nuevos en la bibliografía química y que describiremos a continuación.

Las estructuras de los nuevos metabolitos aislados fueron elucidadas mediante técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C , incluyendo experimentos homo (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), IR, UV y espectrometría de masas. Por otra parte, las estructuras de los compuestos conocidos fueron caracterizadas basándonos en sus datos físicos y espectroscópicos y comparación de los mismos con los existentes en la bibliografía química. Así, los compuestos **S-8, S-10, S-11, S-13, S-14, S-16, S-23 y S-25**, resultaron ser coincidentes con los descritos en la bibliografía, (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-2-6-diacetoxi-1-benzoiloxi-9-*t*-cinamoiloxi-3,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano¹, (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-2,3,6-triacetoxi-1-benzoiloxi-9-*t*-cinamoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano¹, (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-2,6-diacetoxi-1-benzoiloxi-9-*t*-cinamoiloxi-3-nicotinoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -garofurano², (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,

¹ González, A. G.; Jiménez, I. A.; Bazzocchi, I. L.; Ravelo, A. G. *Phytochemistry*, **1994**, *35*, 187-189.

² Kennedy, M. L.; Cortés-Selva, F.; Pérez-Victoria, J. M.; Jiménez, I. A.; González, A. G.; Muñoz, O. M.; Gamarro, F.; Castanys, S.; Ravelo, A. G. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (26), 4668-4676.

9S,10R)-2,6-diacetoxi-1,9-dibenzoiloxi-3,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano³, (1R,2S,3S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-2,6-diacetoxi-1,9-dibenzoiloxi-3-nicotinoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano², (1R,2S,3S,4S,5R,7S,9R,10R)-2,3,8-triacetoxi-1,9-dibenzoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano⁴, (1R,2R,3R,4R,5S,6R,7R,9S,10R)-2,6-diacetoxi-1,9-dibenzoiloxi-3-hidroxi-dihidro- β -agarofurano¹ y (1R,2R,3R,4R,5S,7R,9S,10R)-2-acetoxi-1-benzoiloxi-9-*t*-cinamoiloxi-3-hidroxi-dihidro- β -agarofurano⁵, respectivamente. Cabe destacar que es la primera vez que se aísla el compuesto **S-10** como producto natural, por lo que sus datos físicos y espectroscópicos los incluiremos en la parte experimental de este capítulo.

Los sesquiterpenos aislados se agruparon en series, para facilitar su estudio, de acuerdo a la similitud de sus sistemas polihidroxílicos básicos (figura 4.3.25). Teniendo en cuenta esta consideración los productos que hemos denominado **S-7** a **S-14** poseen un esqueleto polihidroxílico base de magellanol³; las estructuras de **S-15** y **S-16** corresponden a la serie del isomagellanol⁴, los compuestos **S-17** a **S-20** presentan un esqueleto polihidroxílico base de 6-deoximagellanol³, los compuestos **S-21** a **S-24** corresponden a la serie del 4-deoximagellanol⁴ y el compuesto **S-25** presenta un esqueleto polihidroxílico base de 4,6-dideoximagellanol². Cabe destacar que los esqueletos polihidroxílicos base de los compuestos que hemos denominado **S-1** y **S-2** y los compuestos de **S-3** a **S-5** resultaron ser nuevos en la bibliografía química y para los cuales proponemos los nombres de 8-hidroximagellanol y 4-deoxi-8-hidroxi-magellanol, respectivamente. Así mismo, el compuesto **S-6** presentó también un esqueleto nuevo en la bibliografía química y al cual hemos denominado jelskol.

A continuación se presenta un esquema de los sesquiterpenos aislados, agrupados en series según sus esqueletos polihidroxílicos base.

³ González, A. G.; Núñez, M. P.; Ravelo, A. G.; Sazatornil, J. G.; Vázquez, J. T.; Bazzocchi, I. L.; Morales, E.; Muñoz, O. M. J. *Chem. Soc. Perkin Trans 1*. **1992**, *11*, 1437-1441.

⁴ González A. G.; Núñez, M. P.; Bazzocchi, I. L.; Ravelo, A. G.; Jiménez, I. A. *Nat. Prod. Let.* **1993**, *2*, 163-170.

⁵ Muñoz-Martínez, F.; Mendoza, C. R.; Bazzocchi, I. L.; Castany, S.; Jiménez, I. A.; Gamarro, F. J. *Med. Chem.* **2005**, *48*, 4266-4275

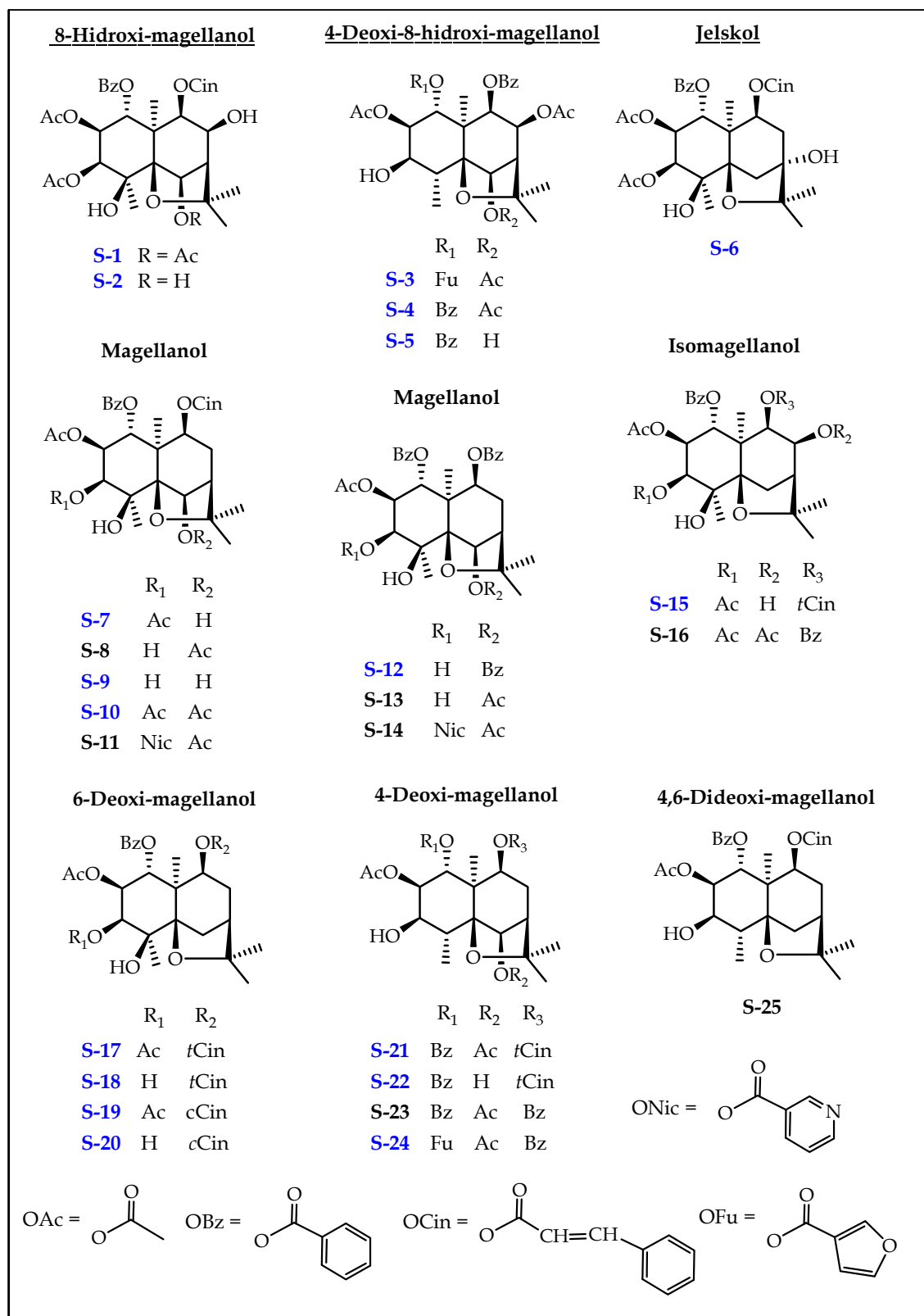
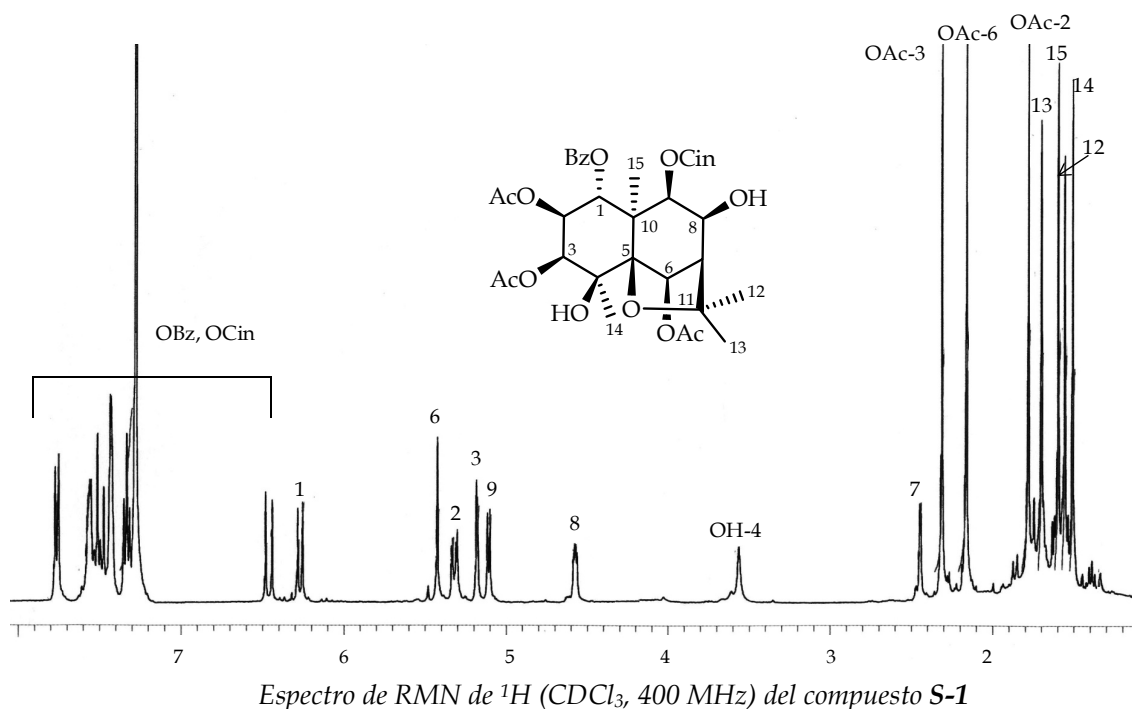


Figura 4.3.25. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de las *hojas* de *Maytenus jelskii*. En azul los sesquiterpenos que resultaron ser nuevos en la bibliografía química. Se subrayan los esqueletos nuevos en la bibliografía.

A continuación pasamos a discutir la elucidación estructural de los nuevos metabolitos aislados de las hojas de *Maytenus jelskii*.

Sesquiterpeno S-1

Al compuesto que hemos denominado **S-1**, le hemos asignado la fórmula molecular $C_{37}H_{42}O_{13}$, basándonos en sus datos de masas de alta resolución y Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C . En su espectro de infrarrojo se observaron bandas correspondientes a grupo hidroxilo a 3526 cm^{-1} y a grupo éster a 1737 cm^{-1} y su espectro de masas muestra fragmentos correspondientes a pérdidas de metilo [$M^+ - 15$, 679 m/z , CH_3], agua [$M^+ - 15 - 18$, 661 m/z , CH_3 , H_2O], ácido acético [$M^+ - 15 - 60$, 619 m/z , CH_3 , CH_3COOH], ácido benzoico [$M^+ - 15 - 122$, 557 m/z , CH_3 , $C_7H_6O_2$, 105 m/z , $C_7H_5O^+$] y ácido cinámico [$M^+ - 15 - 148$, 531 m/z , $CH_3 - C_8H_7O_2H$, 131 m/z , $C_8H_6CO^+$]. En su espectro de RMN de 1H se observó la presencia de tres singuletes a 1,77, 2,15 y 2,30 δ que integran para tres protones cada uno, correspondiendo a tres grupos acetato, así como señales que integran para once protones entre 7,29 y 7,75 δ y un doblete centrado a 6,44 δ (d , $J = 15,9\text{ Hz}$), cuya forma y desplazamiento indican la presencia en la molécula de un grupo *trans*-cinamato y un grupo benzoato. La presencia de estos ésteres fue confirmada mediante RMN de ^{13}C .

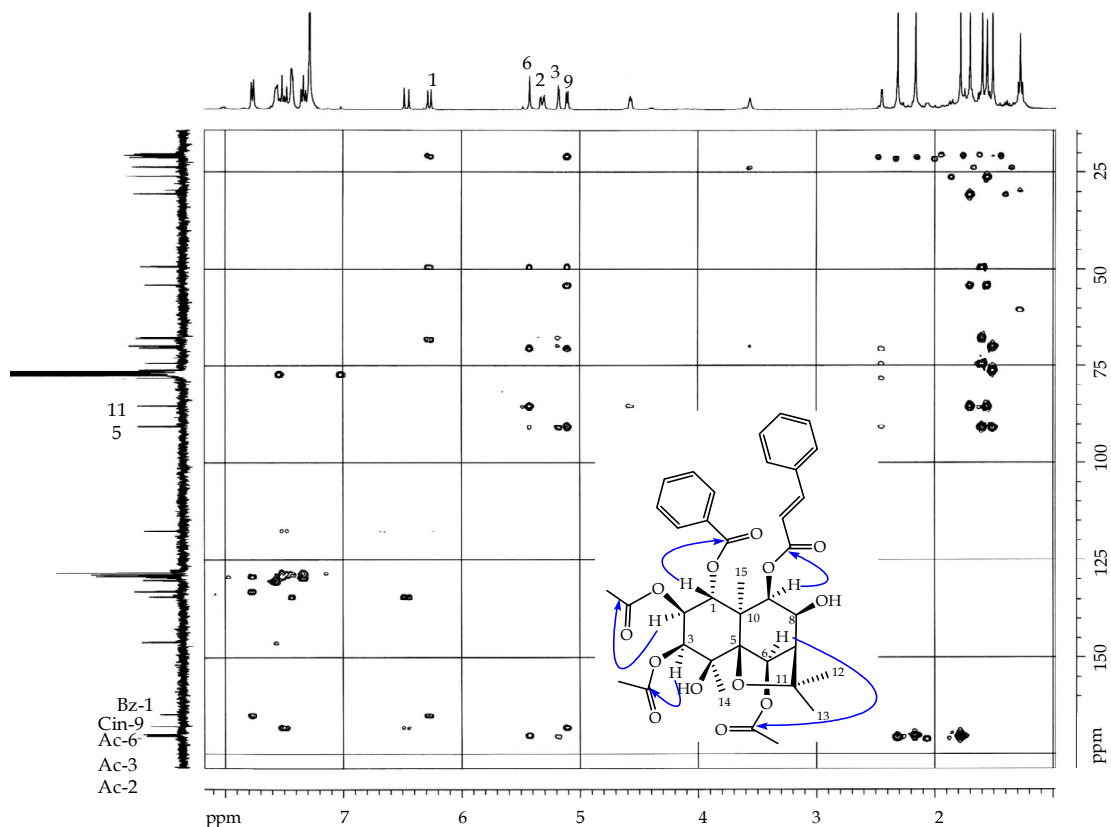


En su espectro de RMN de ^1H (tabla 4.3.1) se observó, así mismo, la presencia de dos sistemas, el primero de ellos un sistema ABM formado por un doblete a 5,16 δ ($J = 3,0$ Hz), un doble doblete a 5,29 δ ($J = 3,0, 11,3$ Hz) y un doblete a 6,25 δ (d, $J = 11,3$ Hz), que integran para un protón cada uno; el segundo sistema AMX presentó señales a 5,09 δ (d, $J = 6,0$ Hz), un doble doblete a 4,55 δ ($J = 2,8, 6,0$ Hz) y un doblete a 2,43 δ ($J = 2,8$ Hz). Además, se observó un singulete a 5,40 δ , así como señales correspondientes a un metilo terciario como singulete a 1,49 δ , situado sobre un carbono tetrasustituído a 69,8 δ_{C} y tres metilos angulares como singuletes a 1,54, 1,58 y 1,68 δ , datos que fueron confirmados en su espectro de RMN de ^{13}C (tabla 4.3.2).

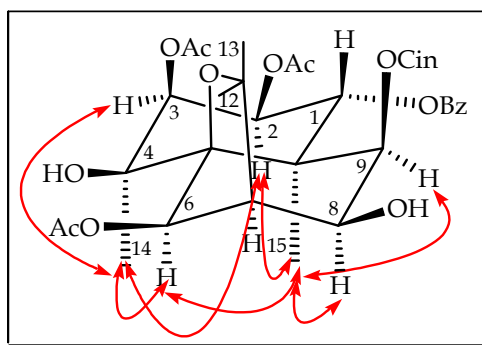
El conjunto de estos datos está de acuerdo con que el compuesto que hemos denominado **S-1** es un sesquiterpeno poliesterificado que posee un grupo benzoato, un grupo *trans*-cinamato, tres grupos acetatos y dos grupos hidroxilo, uno secundario y el otro terciario, en las posiciones 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 9.

Al objeto de determinar la regiosustitución del compuesto se realizó un experimento HMBC donde se observaron correlaciones a tres enlaces entre las señales a 5,29 δ_{H} (H-2), 5,16 δ_{H} (H-3) y 5,40 δ_{H} (H-6) con los carbonos carboxílicos de los grupos acetato a 170,3 δ_{C} , 170,1 δ_{C} y 169,9 δ_{C} , respectivamente. Así mismo, se observó correlación de la señal a 5,09 δ_{H} (H-9) con el carbono carboxílico del grupo cinamato a 167,9 δ_{C} y correlación de la señal a 6,25 δ_{H} (H-1) con el carbono carboxílico del grupo benzoato (164,7 δ_{C}). Además, el experimento HMBC nos permitió determinar la posición del alcohol secundario sobre C-8 y el terciario sobre C-4, al presentar correlación de la señal a 4,55 δ_{H} con el C-11 (85,2 δ_{C}) y correlación de la señal a 3,55 δ_{H} (OH-4) con C-4 (69,8 δ_{C}) y el Me-14 (23,6 δ_{C}).

La configuración relativa fue establecida mediante el estudio de las constantes de acoplamiento en su espectro de RMN de ^1H . Así, el análisis de $J_{1,2}$, $J_{2,3}$, y $J_{8,9}$ indican una disposición *cis* entre H-2 y H-3 y entre H-8 y H-9 y una disposición *trans* entre H-1 y H-2, lo que fue confirmado mediante un experimento ROESY, donde se observó efecto ROE del Me-15 con H-2, H-6, H-8, H-9 y Me-14, así como efecto ROE del Me-14 con H-2, H-3 y H-6.



Experimento HMBC del compuesto S-1

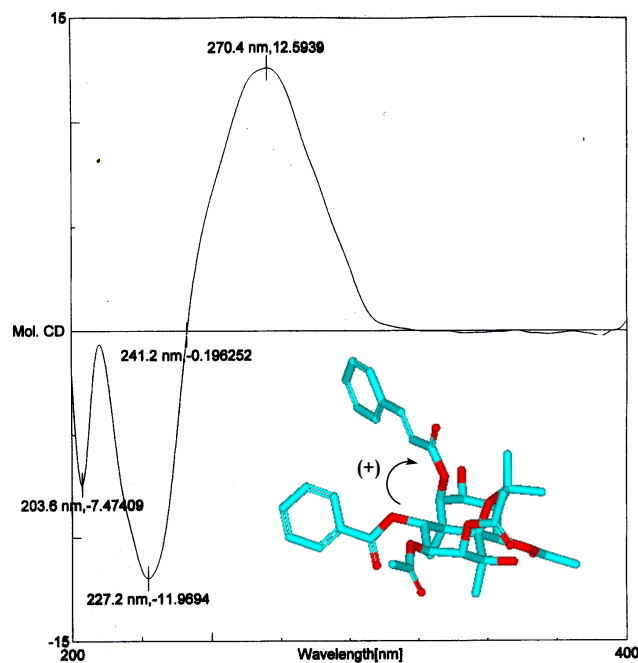


Correlaciones observadas en el experimento ROESY del compuesto S-1

La determinación de la configuración absoluta de **S-1** se realizó basándose en el estudio de la curva de dicroísmo circular, la cual presentó un primer efecto Cotton positivo a 270,4 nm ($\Delta\epsilon = +12,6$) y un segundo efecto Cotton negativo a 227,2 nm ($\Delta\epsilon = -11,9$), debido a los cromóforos benzoato y cinamato. La aplicación del método de la quiralidad del benzoato^{6,7} nos permitió determinar la

⁶ Harada, N.; Nakanishi, K. *Circular Dichroism Spectroscopy Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*, University Science Books, Mill Valley, CA, 1983.

configuración absoluta del compuesto **S-1** como (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*R*)-2,3,6-triacetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-4,8-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano.



Curva de dicroísmo circular del compuesto **S-1**

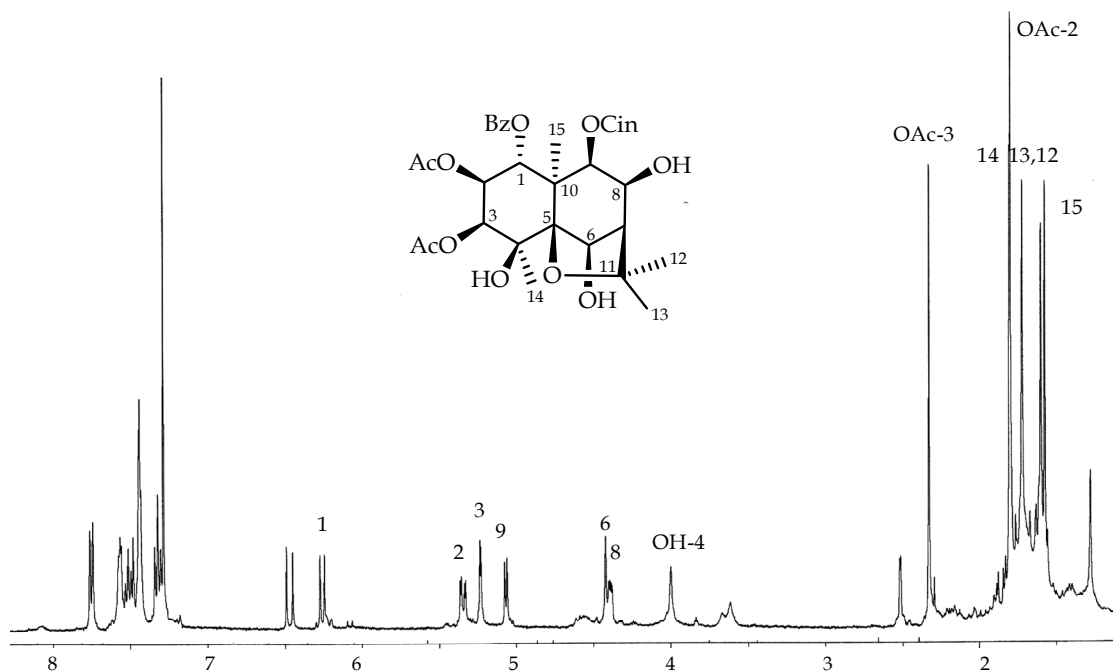
Sesquiterpeno **S-2**

El producto **S-2** presentó una fórmula molecular $C_{35}H_{40}O_{12}$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución y RMN de ^{13}C y el estudio de sus datos físicos y espectroscópicos mostró que estaba relacionado con **S-1**. Así, la principal diferencia en su espectro de RMN de 1H (tabla 4.3.1), con respecto a **S-1**, es la desaparición de la señal correspondiente al grupo acetato y el desplazamiento de la señal asignada a H-6 ($5,40 \delta_H$ en **S-1**, $4,42 \delta_H$ en **S-2**) a campos más altos, lo que por otra parte se confirmó en su espectro de RMN de ^{13}C (tabla 4.3.2).

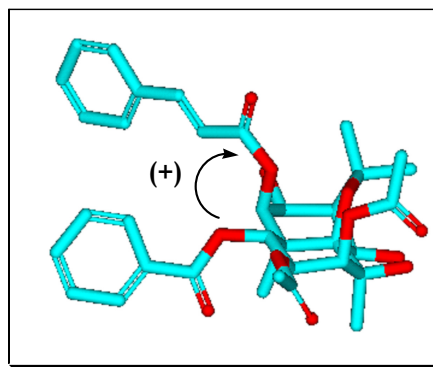
El estudio de experimentos mono y bidimensionales nos permitió establecer la estructura del compuesto **S-2**. Así mismo, a partir de estudios de dicroísmo circular pudimos establecer su configuración absoluta. Así, la curva de DC presentó un primer efecto Cotton positivo a 269,2 nm ($\Delta\epsilon = +14,5$) y un segundo

⁷ Torres-Romero, D.; King-Díaz, B.; Jiménez, I. A.; Lotina-Hennsen, B.; Bazzocchi, I. L. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1331-1335.

efecto Cotton negativo a 226,0 nm ($\Delta\epsilon = -13,6$), permitiendo establecer su configuración absoluta como (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*R*)-2,3-diacetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-4,6,8-trihidroxi-dihidro- β -agarofurano.



Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto S-2



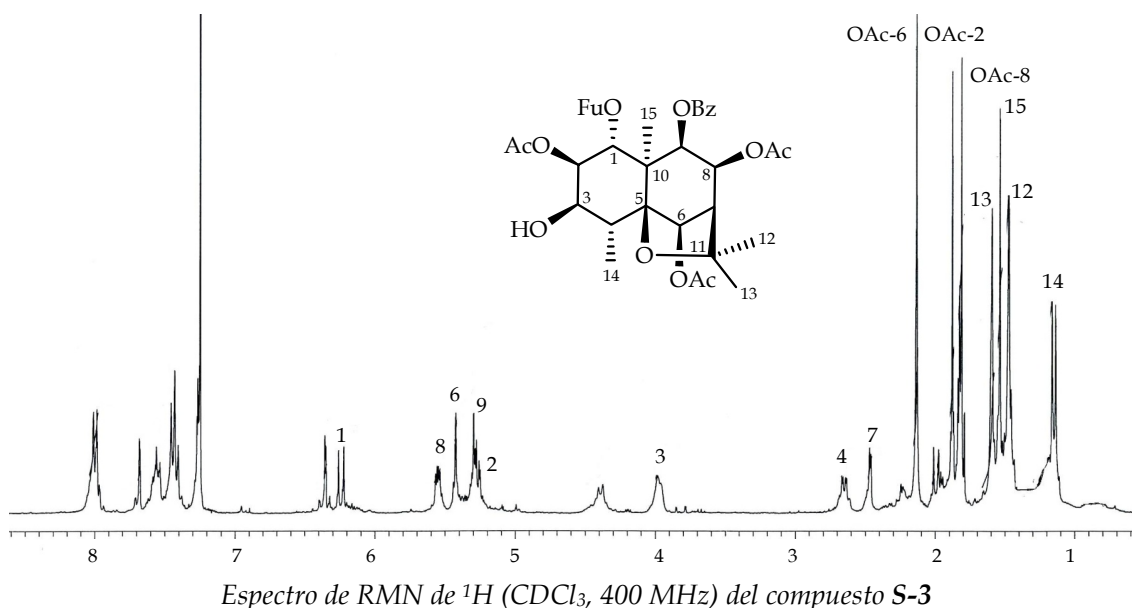
Dicroísmo circular para el compuesto S-2

Sesquiterpeno S-3

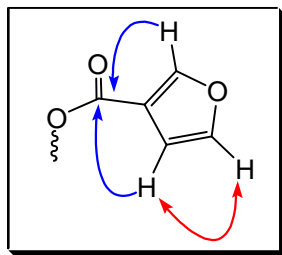
La estructura del compuesto S-3 fue establecida mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, tal como se muestra a continuación. Su fórmula molecular $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{O}_{13}$ fue fijada basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución y RMN de ^{13}C . Su espectro de RMN de ^1H (tabla 4.3.1) presentó señales asignables a tres grupo acetato, un grupo benzoato y un grupo furoato, señales correspondientes a cinco protones geminales a grupos ésteres

secundarios ($5,32 \delta_{\text{H}}$, dd, $J = 2,7, 11,1$ Hz; $5,33 \delta_{\text{H}}$, d, $J = 6,2$ Hz; $5,45 \delta_{\text{H}}$, s; $5,58 \delta_{\text{H}}$, dd, $J = 2,6, 6,2$ Hz y $6,27 \delta_{\text{H}}$, d, $J = 11,1$ Hz) y un protón geminal a un alcohol secundario ($3,99 \delta_{\text{H}}$), datos que fueron confirmados en su espectro de RMN de ^{13}C (tabla 4.3.2).

El conjunto de estos datos mostró que el producto **S-3** estaba relacionado con el producto que denominamos **S-1**, siendo las principales diferencias en sus espectros de RMN de ^1H la ausencia de la señal correspondiente al alcohol terciario sobre C-4 a $3,55 \delta_{\text{H}}$, observándose de este modo la señal asignada al metilo Me-14 como un doblete a $1,19 \delta$ ($J = 7,6$ Hz) y el protón metínico H-4 a $2,67 \delta$ como multiplete. Además, se observaron señales características de un grupo furoato ($6,38 \delta_{\text{H}}$, $109,2 \delta_{\text{C}}$; $7,29 \delta_{\text{H}}$, $143,3 \delta_{\text{C}}$; $7,70 \delta_{\text{H}}$, $147,3 \delta_{\text{C}}$; $118,3 \delta_{\text{C}}$; $160,4 \delta_{\text{C}}$) en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del producto **S-3** y la desaparición de las señales correspondientes al grupo *trans*-cinamato presente en el compuesto **S-1**.



Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares, ROESY y COSY y el análisis del experimento HMBC nos permitió establecer la posición y estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre la molécula. Así, se determinó la estructura del grupo furoato como 3-furoato, al observarse, en el experimento HMBC, correlación de los protones a $6,38 \delta_{\text{H}}$ y $7,70 \delta_{\text{H}}$ con el carbono carboxílico del grupo furoato a $160,4 \delta_{\text{C}}$. Además, en el experimento ROESY se observó efecto ROE entre los protones aromáticos $6,38 \delta_{\text{H}}$ y $7,29 \delta_{\text{H}}$.



Correlaciones observadas en el experimento HMBC (azul)
y efecto ROE (rojo) del grupo 3-furoato

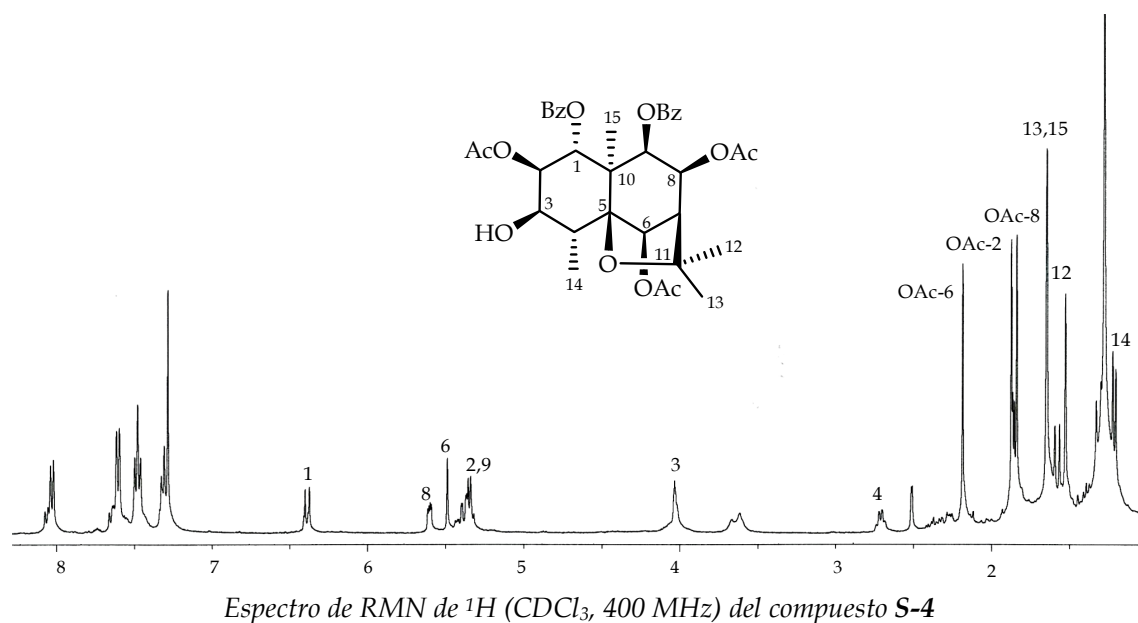
La configuración absoluta de la molécula no se pudo determinar por dicroísmo circular, puesto que el grupo furoato no es un cromóforo adecuado para su estudio mediante esta técnica. Sin embargo, basándonos en consideraciones biogénicas, asignamos la configuración absoluta de **S-3** como: (1*R*,2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*R*)-2,6,8-triacetoxi-9-benzoiloxi-1-(3-furoiloxi)-3-hidroxi-dihidro- β -agarofurano. Este compuesto presenta el mismo esqueleto polihidroxílico base que el compuesto que denominamos **S-4** y cuya configuración absoluta fue determinada mediante dicroísmo circular, como pasaremos a describir.

Sesquiterpeno **S-4**

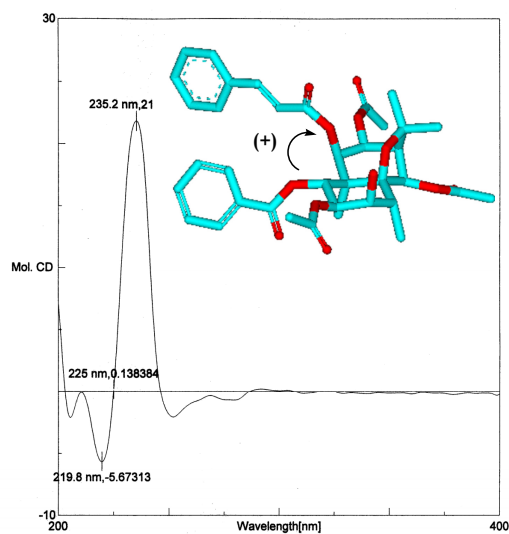
El compuesto **S-4** fue aislado como un sólido amorfo. Su fórmula molecular $C_{35}H_{40}O_{12}$, fue establecida basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución y resonancia magnética nuclear de ^{13}C . En su espectro de IR se observaron bandas para grupo éster (1738 cm^{-1}) y para grupo hidroxilo (3477 cm^{-1}). En el espectro de masas se observaron fragmentos correspondientes a la pérdida de ácido acético [$M^+-15-60$, 577 m/z , CH_3 , CH_3CO_2H] y ácido benzoico [$M^+-15-122$, 515 m/z , CH_3 , $C_6H_5CO_2H$, 105 m/z , $C_7H_5O^+$] lo que fue confirmado por RMN de 1H y ^{13}C (tablas 4.3.1 y 4.3.2).

De este modo, en su espectro de RMN de 1H (tabla 4.3.1) se observaron señales para diez protones aromáticos entre 7,30 y 8,03 δ , asignables a dos grupos benzoato y la presencia de tres singuletes que integran para tres protones cada uno a 1,86, 1,88 y 2,19 δ_H , que confirman la presencia de tres grupos acetato en la molécula. El estudio de las constantes de acoplamiento y experimentos de doble resonancia homonuclear COSY y ROESY, nos permitieron determinar las

posiciones de sustitución y estereoquímica como 1α , 2β , 3β , 6β , 8β y 9β . Las características de regiosustitución fueron establecidas mediante un experimento HMBC, el cual nos permitió situar los grupos benzoatos sobre C-1 y C-9 y los grupos acetato sobre C-2, C-6 y C-8, mientras que el grupo hidroxilo se situó sobre C-3.



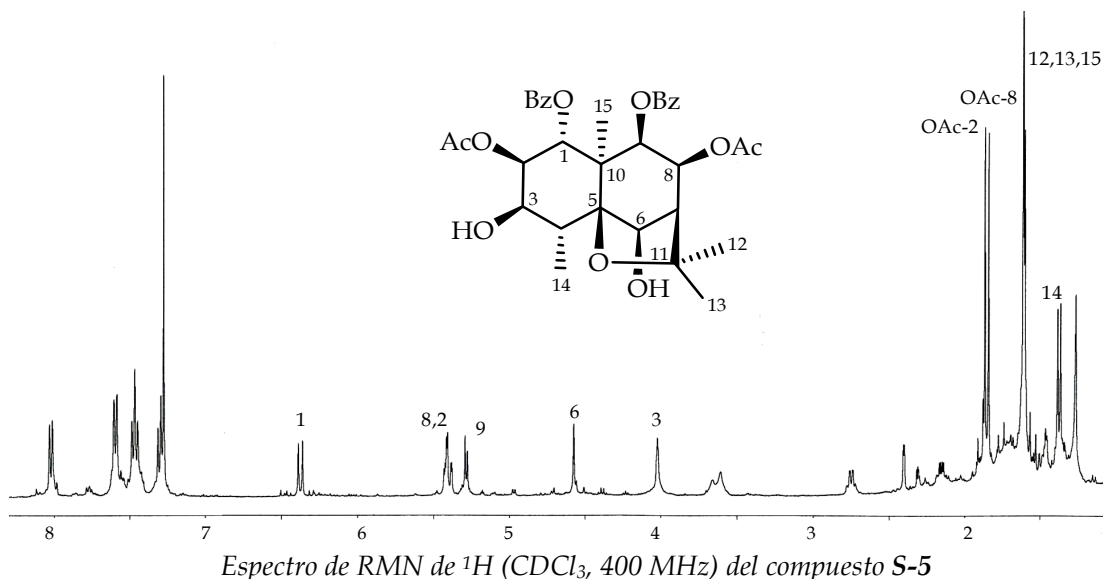
La configuración absoluta de **S-4** se determinó mediante estudios de dicroísmo circular (DC). Su espectro presentó una curva bisignada con un primer efecto Cotton positivo a 235,2 nm ($\Delta\epsilon = +21,8$) y un segundo efecto Cotton negativo a 219,8 nm ($\Delta\epsilon = -5,7$), quedando establecida la estructura del producto **S-4** como (1*R*,2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*R*)-2,6,8-triacetoxi-1,9-dibenzoiloxi-3-hidroxi-dihidro- β -agarofurano.



Curva de dicroísmo circular de **S-4**

Sesquiterpeno S-5

El estudio de los datos espectroscópicos (tablas 4.3.1 y 4.3.2) y espectrométricos del compuesto **S-5** indicó que se trataba de un sesquiterpeno poliesterificado relacionado con **S-4**, siendo la principal diferencia en sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , la ausencia de las señales correspondientes a un grupo acetato, la presencia de un grupo hidroxilo secundario adicional y el desplazamiento de la señal asignada a H-6 (5,49 δ , en **S-4**, 4,56 δ , en **S-5**). Estos datos nos indicaron la presencia de un grupo hidroxilo sobre C-6, lo que además estaba de acuerdo con su fórmula molecular $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{O}_{11}$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución.



Un estudio de los experimentos bidimensionales homo (COSY y ROESY) y heteronucleares (HMBC y HSQC) nos permitió establecer de forma inequívoca la estructura del compuesto **S-5**. La configuración absoluta de este compuesto se estableció como (1*R*,2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*,7*S*,8*S*,9*R*,10*R*)-2,8-diacetoxi-1,9-dibenzoiloxi-3,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano, basándonos en consideraciones biogénicas, dado que **S-5** proviene de la acetilación del compuesto **S-4**, cuya configuración absoluta fue determinada mediante estudios de dicroísmo circular.

Tabla 4.3.1. Datos^a de RMN de ¹H de los sesquiterpenos S-1 a S-5.

| Posición | S-1 | S-2 | S-3 | S-4 | S-5 |
|----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| H-1 | 6,25 d (11,3) | 6,26 d (11,2) | 6,27 d (11,1) | 6,39 d (11,1) | 6,35 d (11,0) |
| H-2 | 5,29 dd (3,0, 11,3) | 5,34 dd (3,2, 11,2) | 5,32 dd (2,7, 11,1) | 5,41 dd (2,3, 11,1) | 5,39 dd (2,6, 11,0) |
| H-3 | 5,16 d (3,0) | 5,23 d (3,2) | 3,99 sa | 4,03 d (2,3) | 4,00 sa |
| H-4 | - | - | 2,67 c (7,6) | 2,73 c (7,5) | 2,73 c (7,6) |
| H-6 | 5,40 s | 4,42 s | 5,45 s | 5,49 s | 4,56 s |
| H-7 | 2,43 d (2,8) | 2,51 d (2,5) | 2,49 d (2,6) | 2,51 d (2,7) | 2,38 d (2,7) |
| H-8 | 4,55 dd (2,8, 6,0) | 4,39 dd (2,5, 6,2) | 5,58 dd (2,6, 6,2) | 5,60 dd (2,7, 6,2) | 5,40 dd (2,7, 6,3) |
| H-9 | 5,09 d (6,0) | 5,07 d (6,2) | 5,33 d (6,2) | 5,36 d (6,2) | 5,26 d (6,3) |
| Me-12 | 1,54 s | 1,60 s | 1,51 s | 1,53 s | 1,60 s* |
| Me-13 | 1,68 s | 1,72 s | 1,62 s | 1,65 s* | 1,60 s* |
| Me-14 | 1,49 s | 1,80 s | 1,19 d (7,6) | 1,21 d (7,5) | 1,36 d (7,6) |
| Me-15 | 1,58 s | 1,57 s | 1,57 s | 1,65 s* | 1,59 s |
| OAc-2 | 1,77 s | 1,79 s | 1,90 s | 1,88 s | 1,85 s |
| OAc-3 | 2,30 s | 2,33 s | - | - | - |
| OAc-6 | 2,15 s | - | 2,16 s | 2,19 s | - |
| OAc-8 | - | - | 1,82 s | 1,86 s | 1,83 s |

^a δ , CDCl₃, 400 MHz, J en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC.

* Señales solapadas.

Tabla 4.3.2. Datos^a de RMN de ¹³C de los sesquiterpenos S-1 a S-5.

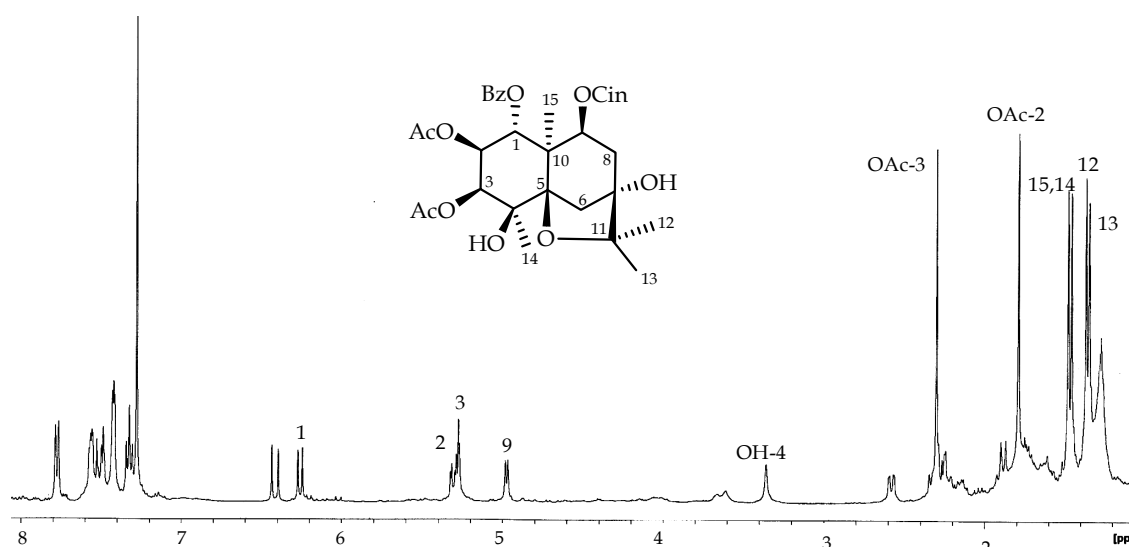
| Posición | S-1 | S-2 | S-3 | S-4 | S-5 |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| C-1 | 67,5 d | 67,6 d | 67,7 d | 68,0 d | 68,0 d |
| C-2 | 67,9 d | 67,9 d | 70,6 d | 70,7 d | 70,8 d |
| C-3 | 75,9 d | 74,8 d | 72,9 d | 73,0 d | 73,2 d |
| C-4 | 69,8 s | 71,2 s | 40,8 d | 40,9 d | 40,6 d |
| C-5 | 90,5 s | 90,6 s | 90,7 s | 90,7 s | 92,1 s |
| C-6 | 77,9 d | 78,5 d | 77,0 d | 76,7 d | 76,1 d |
| C-7 | 53,9 d | 55,0 d | 52,3 d | 51,1 d | 54,1 d |
| C-8 | 70,2 d | 70,7 d | 68,3 d | 68,3 d | 68,7 d |
| C-9 | 74,2 d | 74,4 d | 71,7 d | 71,3 d | 72,0 d |
| C-10 | 49,4 s | 48,4 s | 51,0 s | 52,3 s | 50,9 s |
| C-11 | 85,2 s | 85,2 s | 85,5 s | 85,6 s | 85,5 s |
| C-12 | 30,4 c | 30,9 c | 30,8 c | 30,9 c | 30,9 c |
| C-13 | 26,0 c | 26,7 c | 26,4 c | 26,5 c | 26,6 c |
| C-14 | 23,6 c | 23,9 c | 15,6 c | 15,7 c | 16,3 c |
| C-15 | 20,5 c | 20,7 c | 19,6 c | 19,6 c | 19,8 c |
| OAc-2 | 170,3 s | 170,3 s | 170,6 s | 170,6 s | 170,6 s |
| OAc-3 | 170,1 s | 170,1 s | - | - | - |
| OAc-6 | 169,9 s | - | 169,2 s | 169,2 s | - |
| OAc-8 | - | - | 168,8 s | 168,8 s | 169,2 s |

^a δ , CDCl₃, 100 MHz, Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

Sesquiterpeno S-6

El compuesto **S-6** fue aislado como un sólido amorfo y en su espectro de masas mostró un ión molecular a 636 m/z , que se corresponde con la fórmula molecular $C_{35}H_{40}O_{11}$, de acuerdo a sus datos de RMN de ^{13}C y espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). En su espectro de IR se observaron bandas de absorción características de grupo hidroxilo (3502 cm^{-1}) y grupo carboxilo (1735 cm^{-1}). El espectro de masas de baja resolución (EM) presentó fragmentos correspondientes a la pérdida de metilo [M^+-15 , 621 m/z , CH_3], grupo acetato y benzoato ($M^+-15-42-105$, 474 m/z , CH_3 , C_2H_2O , $C_7H_5O^+$) y un grupo cinamato ($M^+-15-148$, 473 m/z , CH_3 , $C_9H_8O_2$, 131 m/z , $C_9H_7O^+$).

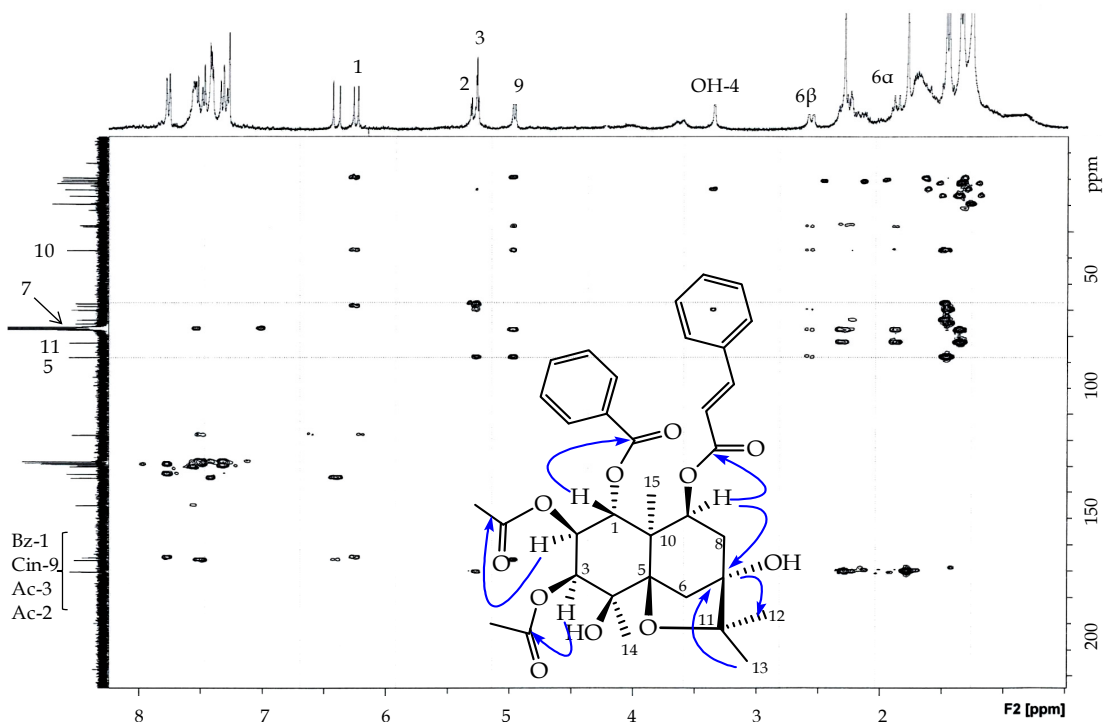
En su espectro de RMN 1H (tabla 4.3.3) fueron observadas señales para un sistema ABM (5,27 δ , d, $J = 3,0$ Hz; 5,31 δ , dd, $J = 3,0, 11,1$ Hz y 6,26 δ , d, $J = 11,1$ Hz), asignadas a los protones H-3, H-2 y H-1, respectivamente; señales correspondientes a un protón metínico a 4,98 δ (d, $J = 6,3$ Hz) y a dos grupos metilénicos asignados a H-6 (1,89, 2,58 δ) y H-8 (2,27 δ). Además, se observaron en sus espectros de RMN 1H y ^{13}C , señales correspondientes a cuatro metilos angulares a 1,35 δ_H , 1,37 δ_H , 1,46 δ_H y 1,48 δ_H . Así mismo, se observaron en su espectro de RMN ^{13}C cinco carbonos cuaternarios, además de los carbonos carboxílicos, a 47,1, 69,9, 77,6, 82,5 y 88,1 δ_C , cuatro de los cuales están unidos a oxígeno. Estos datos indican que **S-6** es un sesquiterpeno con esqueleto de dihidro- β -agarofurano hexasustituido.



Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) del compuesto **S-6**

En el espectro de RMN ^{13}C se observó la desaparición del metino C-7 en la zona de alifáticos, observado en los compuestos anteriormente descritos y la presencia de un carbono cuaternario adicional en la zona de carbonos unidos a oxígeno a 77,6 δ_{C} . Por otra parte, la asignación de esta carbono se confirmó mediante las correlaciones observadas en un experimento HMBC de los metilos Me-12 (1,37 δ_{H}) y Me-13 (1,35 δ_{H}) y H-9 (4,98 δ_{H}) con dicho carbono. Estos datos, junto con la fórmula molecular, determinada por EMAR, indican la presencia de un grupo hidroxilo terciario sobre el carbono C-7. Cabe destacar que este es el primer ejemplo de sesquiterpeno dihidro- β -agarofurano con un sustituyente sobre dicho carbono.

Además, en el experimento HMBC se observó correlación de la señal a 6,26 δ_{H} (H-1) y el carboxilo del grupo benzoato (164,8 δ_{C}), correlación de la señal a 5,27 δ_{H} (H-3) con el carboxilo de un grupo acetato (170,3 δ_{C}) y de la señal a 4,98 δ_{H} (H-9) con el carboxilo del grupo cinamato (165,8 δ_{C}), situando al otro grupo acetato (170,1 δ_{C}) sobre el C-2.

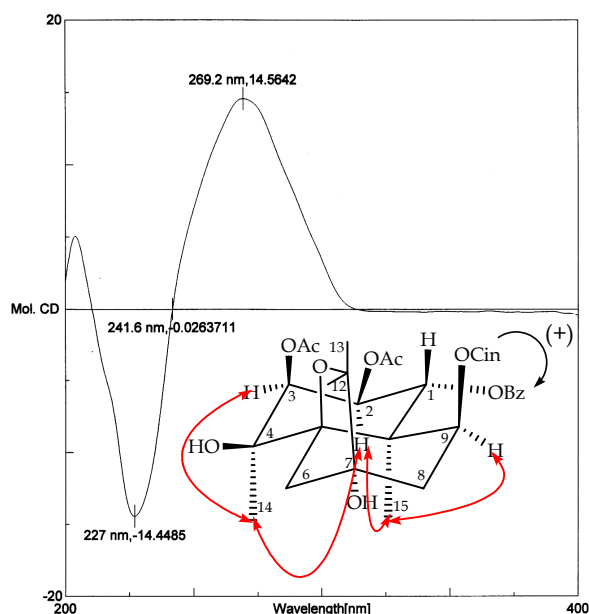


Correlaciones ^1H - ^{13}C a tres enlaces (HMBC) del compuesto S-6

La estereoquímica relativa de S-6 se determinó mediante un cuidadoso estudio de las constantes de acoplamiento, un experimento COSY y confirmada

mediante un experimento ROESY, donde se observó efecto ROE entre el el Me-15 ($1,48 \delta_H$) y los protones H-2 ($5,31 \delta_H$), H-3 ($5,27 \delta_H$), H-9 ($4,98$) y H-6 α ($1,89 \delta_H$). Por otra parte, la estereoquímica relativa del alcohol terciario sobre C-7 se consideró como α , dada la estereoquímica β del anillo agarofuránico en este tipo de compuestos.

La configuración absoluta se determinó usando el método de excitón quiralidad. En su curva de DC se observó un primer efecto Cotton positivo a 269,2 nm ($\Delta\epsilon = +14,5$) y un segundo efecto Cotton negativo a 227,0 nm ($\Delta\epsilon = -14,4$), permitiendo establecer la configuración absoluta de **S-6** como (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-2,3-diacetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-4,7-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano.



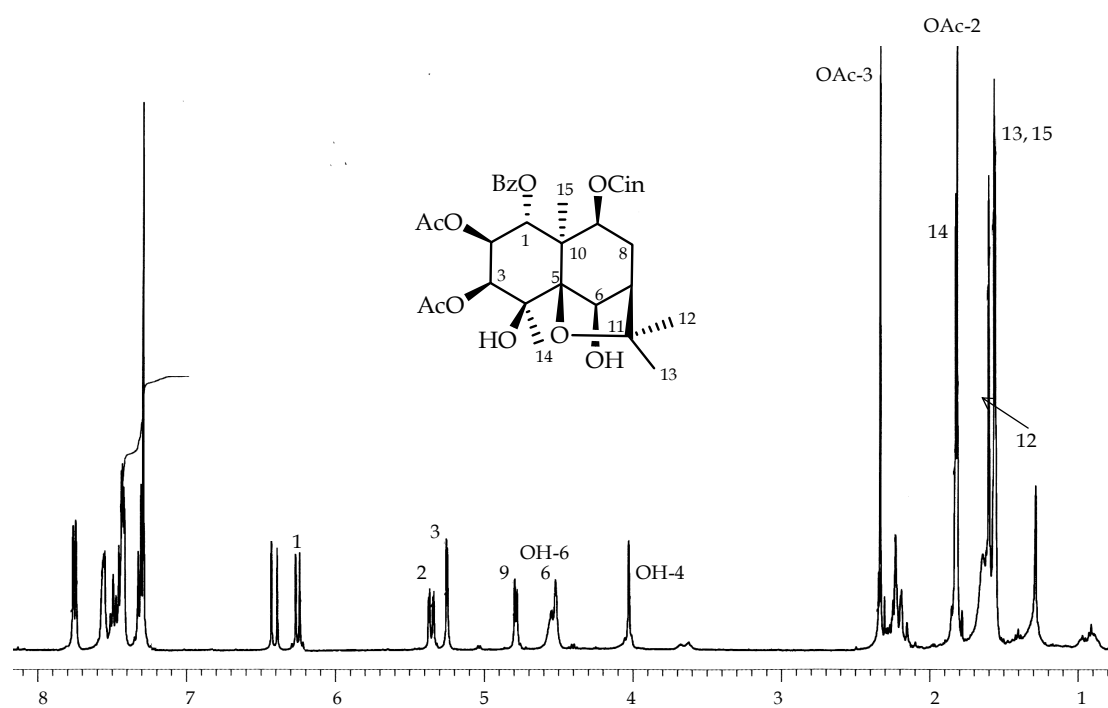
Curva de dicroísmo circular y efectos ROE observados en el experimento ROESY del compuesto **S-6**

Sesquiterpeno **S-7**

El compuesto que hemos denominado **S-7** presentó una fórmula molecular de $C_{35}H_{40}O_{11}$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción a 3501, 1749 y 1733 cm^{-1} , que indican la presencia de grupo hidroxilo y carboxilo. El espectro de masas presentó fragmentos correspondientes a la pérdida de metilo ($M^+ - 15$, 621 m/z , CH_3), ácido

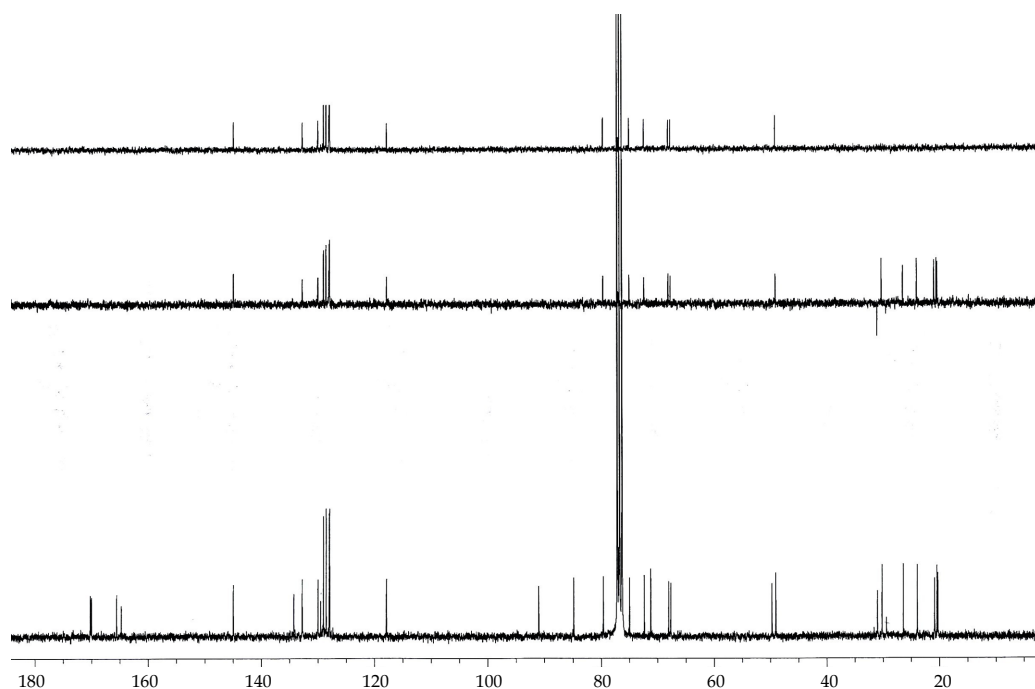
acético ($M^+ - 60$, $561 m/z$, $C_2H_4O_2$), ácido cinámico ($M^+ - 148$, $488 m/z$, $C_8H_7CO_2H$, $131 m/z$, $C_8H_6CO^+$) y ácido benzoico ($M^+ - 15 - 18 - 122$, $481 m/z$, $C_7H_6O_2$, $105 m/z$, $C_7H_5O^+$).

Los grupos ésteres fueron confirmados mediante RMN de 1H y ^{13}C (tablas 4.3.3 y 4.3.4). Así, en su espectro de RMN 1H se observó la presencia de dos singuletes que integran para tres protones cada uno a $1,81$ y $2,32 \delta$, correspondientes a dos metilos de grupos acetato y la presencia de señales complejas entre $7,29$ y $7,74 \delta$ que integran para once protones y de un protón a $6,40 \delta$ como doblete ($J = 16,0$ Hz), que indican la presencia de un grupo benzoato y un grupo *trans*-cinamato en la molécula.



Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) del compuesto S-7

Estos datos se corroboran en su espectro de RMN ^{13}C , donde se observaron señales para dos cuartetos a $20,3$ y $20,9 \delta$ y dos carbonos carboxílicos a $170,1$ y $170,3 \delta$, correspondientes a dos grupos acetatos, así como señales correspondientes a catorce carbonos entre $117,9$ y $145,0 \delta$ y dos carbonos carboxílicos a $164,8$ y $165,6 \delta$, asignables a los grupos benzoato y cinamato, respectivamente.



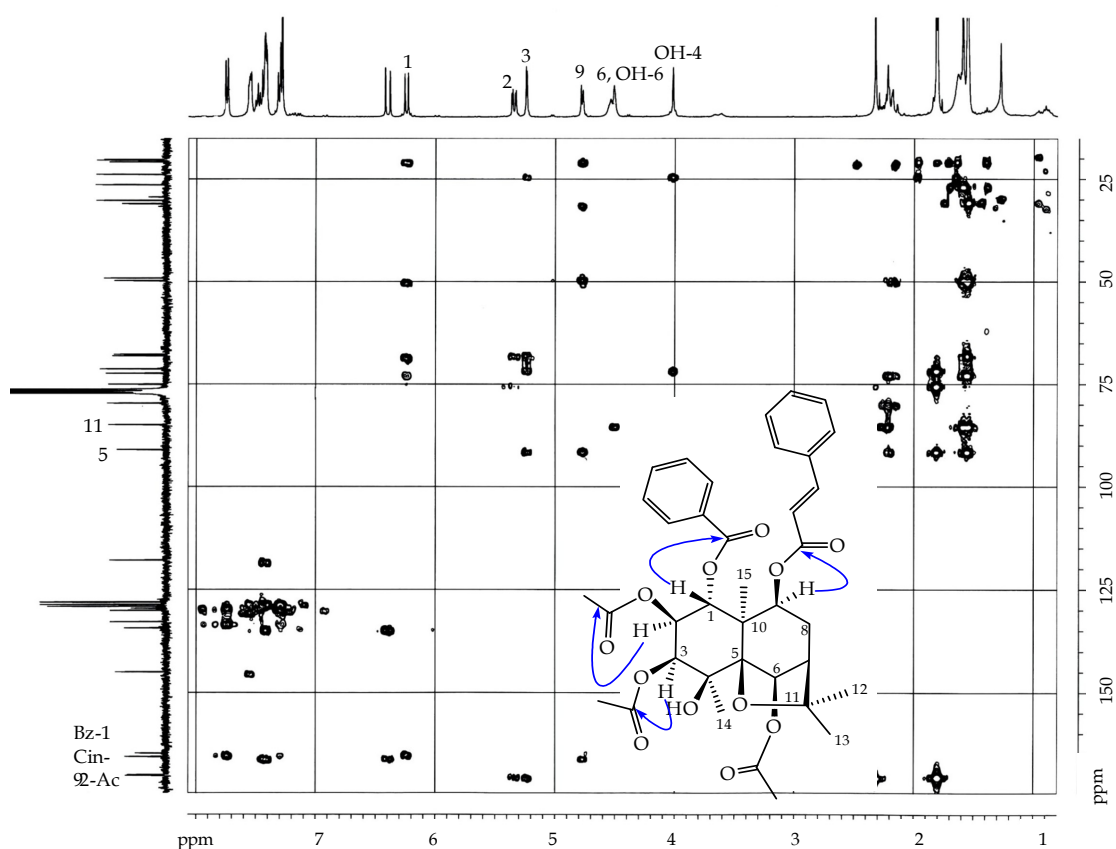
Espectro de RMN de ^{13}C y experimentos DEPTs (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto S-7

Un cuidadoso estudio del espectro de RMN de ^1H (tabla 4.3.3) 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. Así, en su espectro de RMN de ^1H se observaron señales correspondientes a cinco protones metínicos, tres de los cuales forman un sistema ABM que presenta señales a 5,24 δ (d, $J = 3,1$ Hz), 5,34 δ (dd, $J = 3,1, 11,3$ Hz) y 6,24 δ (d, $J = 11,3$ Hz) que integran para un protón cada uno y que fueron asignadas a los protones H-3, H-2 y H-1, respectivamente y dos protones con señales a 4,78 δ (d, $J = 6,4$ Hz) y 4,51 δ (s), asignados a H-9 y H-6. Además, se observó en el espectro de RMN de ^1H una señal a 2,20 δ que integra para tres protones, correspondientes a un protón metínico (H-7) y un metileno (H-8), lo que fue confirmado en los experimentos DEPTs y HSQC (49,1 y 31,0 δ_{C} , respectivamente) y una señal a 3,99 δ_{H} que integra para un protón y es intercambiable con D_2O , lo que indica la presencia en la molécula de un grupo hidroxilo terciario.

En los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se observaron así mismo señales correspondientes a cuatro metilos a 1,55, 1,56, 1,60 y 1,82 δ_{H} como singuletes (Me-13, Me-15, Me-12 y Me-14), así como cuatro carbonos cuaternarios a 49,8 δ_{C} (C-10), 71,3 δ_{C} (C-4), 84,9 δ_{C} (C-11) y 91,0 δ_{C} (C-5). Los datos anteriores nos indican que el

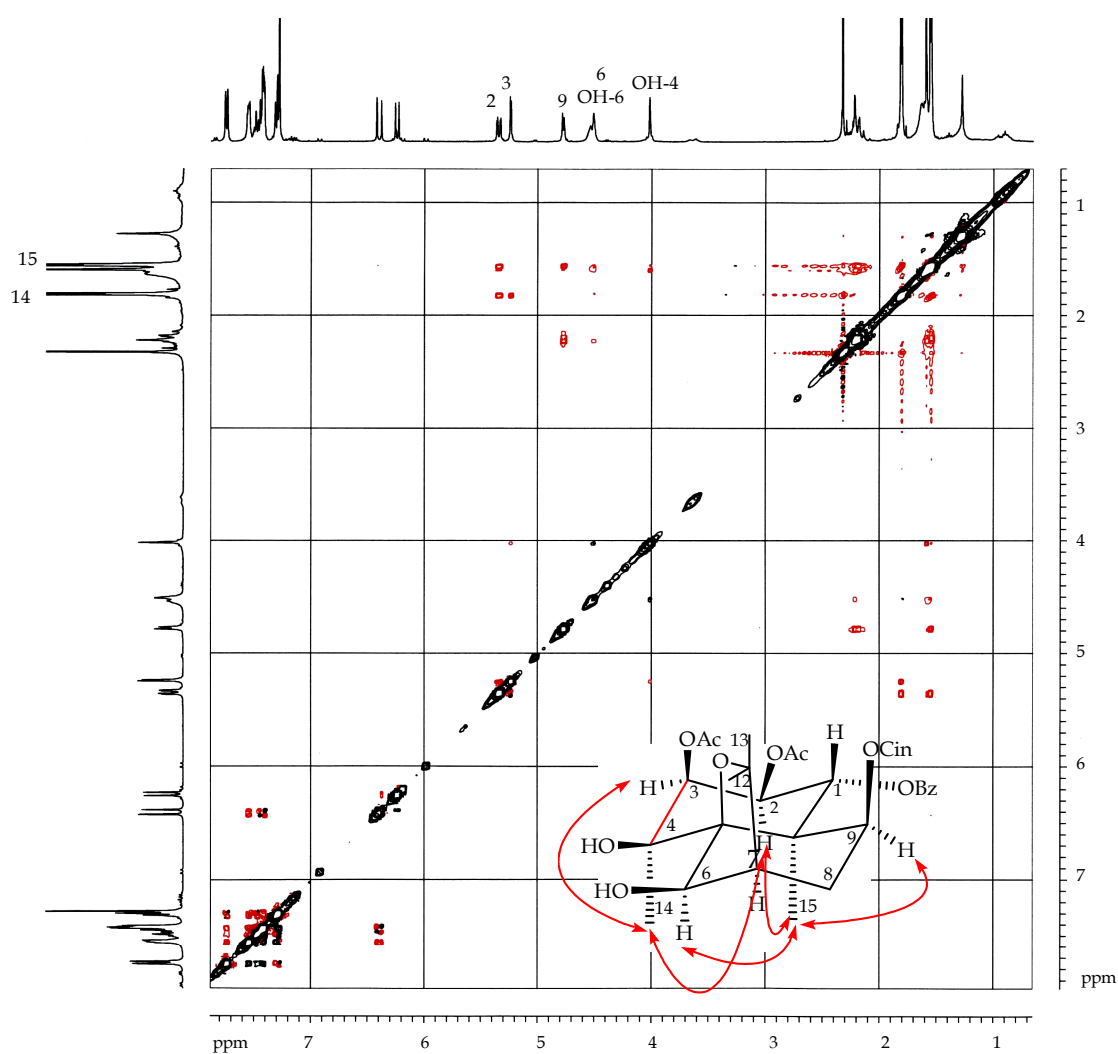
producto **S-7** es un sesquiterpeno poliesterificado hexasustituido, con un esqueleto de dihidro- β -agarofurano.

La regiosustitución en la molécula se determinó mediante los datos del espectro de RMN de ^1H , donde se observó el desplazamiento de algunos protones aromáticos a campos más altos de lo habitual, entre 7,29 y 7,74 δ_{H} . Este desplazamiento puede ser debido a la disposición relativa de los dos anillos aromáticos, que deben encontrarse situados sobre C-1 y C-9 ya que las corrientes de anillo generadas por ambos grupos provoca un efecto de apantallamiento en los protones del otro. Estos datos fueron confirmados mediante un experimento HMBC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*), donde se observó que las señales de los carbonos carboxílicos del benzoato y del cinamato a 164,8 y 165,6 δ_{C} fueron correlacionadas con las señales a 6,24 y 4,78 δ_{H} , correspondientes a H-1 y H-9, respectivamente. Así mismo, las señales de los grupos acetato a 170,1 y 170,3 δ_{C} , mostraron correlación a tres enlaces con las señales a 5,34 y 5,24 δ_{H} , correspondientes a los protones H-2 y H-3, respectivamente.

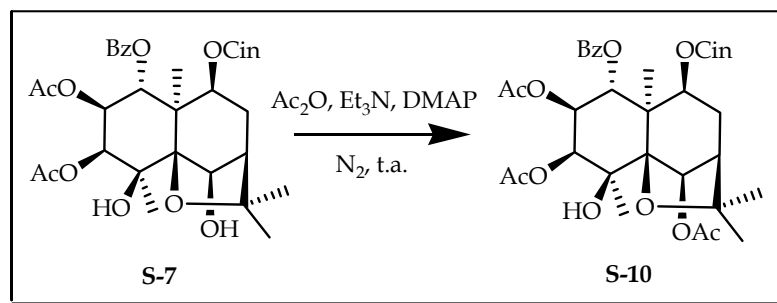


Correlaciones ^1H - ^{13}C a tres enlaces (HMBC) observadas para **S-7**

La estereoquímica relativa de los sustituyentes en el sistema decalínico de la molécula se determinó mediante un estudio de las constantes de acoplamiento que nos indicó una relación *trans* para el sistema H-1, H-2 y *cis* para el sistema H-2, H-3 ($J_{1,2} = 11,3$ Hz, y $J_{2,3} = 3,1$ Hz), lo que fue confirmado mediante los experimentos bidimensionales homonucleares, COSY y ROESY (*Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy*). En este último se observaron efectos ROE del Me-15 (1,56 δ) con H-2 (5,34 δ), H-6 (4,51 δ) y H-9 (4,78 δ), así como correlación entre el Me-14 (1,82 δ) con H-2 (5,34 δ) y H-3 (5,24 δ), lo que nos permitió establecer la estereoquímica relativa del compuesto como 1 α , 2 β , 3 β , 4 β , 6 β y 9 β .



Correlación química de **S-7** con **S-10**,⁸ compuesto descrito anteriormente en la bibliografía química y cuya configuración absoluta había sido determinada mediante estudios de dicroísmo circular,⁹ permitió confirmar la estructura y establecer la configuración absoluta del producto **S-7**. Así, acetilación de **S-7** en las condiciones habituales, dio un único compuesto cuyos datos físicos y espectroscópicos fueron idénticos a los del sesquiterpeno **S-10**. Esta correlación química nos permitió establecer la configuración absoluta de **S-7** como (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-2,3-diacetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-4,6-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano.



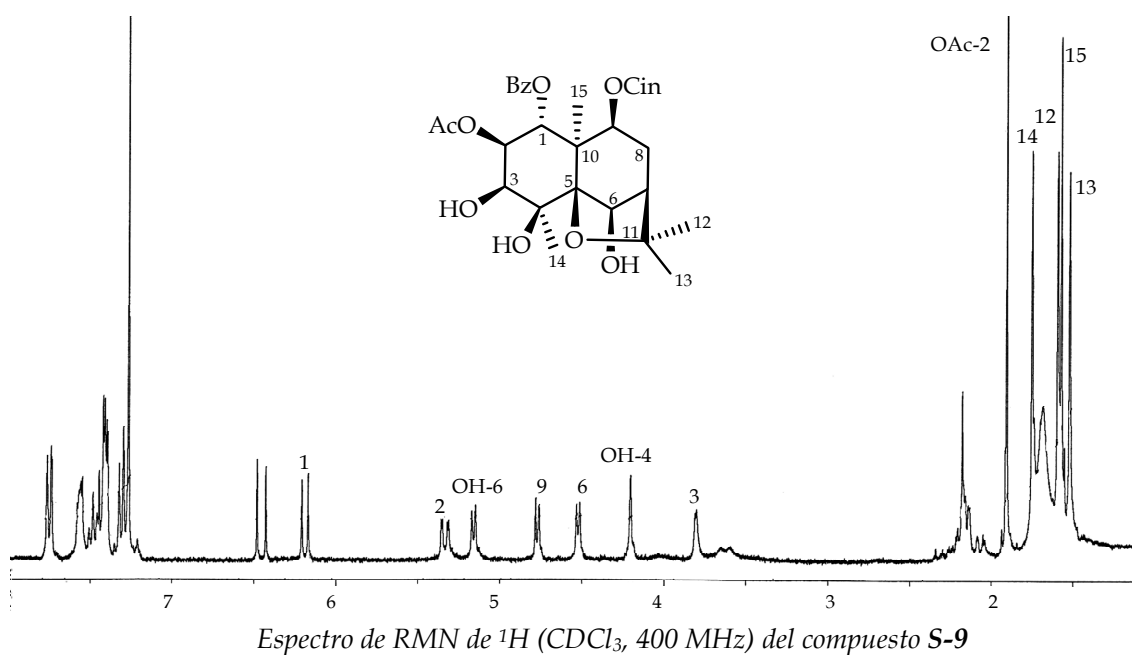
Correlación química de **S-7** con **S-10**

Sesquiterpeno **S-9**

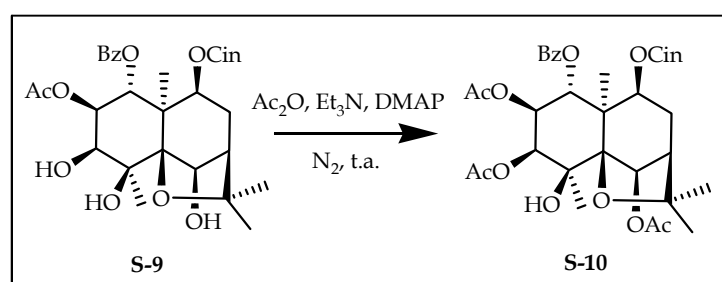
Al compuesto denominado **S-9** le hemos asignado una fórmula molecular $C_{33}H_{38}O_{10}$, basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución. Sus datos de RMN de 1H y ^{13}C (tablas 4.3.3 y 4.3.4) y experimentos bidimensionales, tanto homo como heteronucleares, mostraron que el producto **S-9** se trataba de un sesquiterpeno dihidro-β-agarofurano hexasustituido, relacionado con el anteriormente descrito **S-7**. Así, la principal diferencia en sus espectros de RMN de 1H fue la ausencia de la señal correspondiente a un grupo acetato y el desplazamiento y multiplicidad de la señal correspondiente a H-3 (5,24 d, $J = 3,1$ Hz, en **S-7**, 3,79 d, $J = 2,3$ Hz, en **S-9**), indicando que **S-9** presenta un grupo hidroxilo en C-3 en lugar de un grupo acetato como ocurre en **S-7**.

⁸ González, A. G.; Jiménez, I. A.; Bazzocchi, I. L.; Ravelo, A. G. *Phytochemistry*, **1994**, 35, 187.

⁹ Harada, N.; Nakanishi, K. *Circular Dichroism Spectroscopy Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*. University Science Books, Mill Valley CA, **1983**.



El compuesto **S-9**, al igual que **S-7**, fue correlacionado químicamente con **S-10**. Así, acetilación en condiciones habituales de **S-9** rindió un compuesto cuyos datos espectroscópicos fueron idénticos a los de **S-10**. Ello nos permitió confirmar la estructura y establecer la configuración absoluta de **S-9** como (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-2-acetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-3,4,6-trihidroxi-dihidro- β -agarofurano.

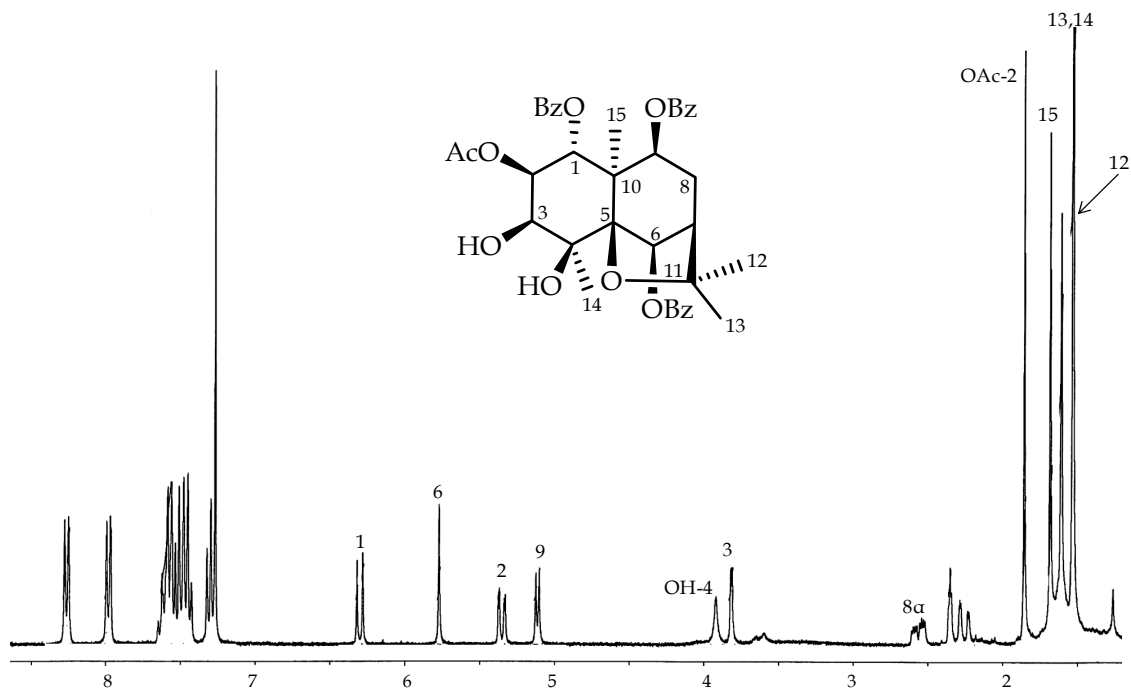


Correlación química de **S-9** con **S-10**

Sesquiterpeno **S-12**

Este compuesto se aisló como un sólido amorfo y presentó una fórmula molecular de $\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{O}_{11}$, basada en espectrometría de masas de alta resolución y datos de RMN de ^{13}C . El estudio de sus datos espectroscópicos (tablas 4.3.3 y 4.3.4) nos indicó la existencia en la molécula de un grupo acetato (1,89 δ_{H} , 170,5 δ_{C}), tres grupos benzoatos (7,28-8,25 δ_{H} , 164,6, 165,3 y 166,1 δ_{C}), un alcohol secundario (3,92

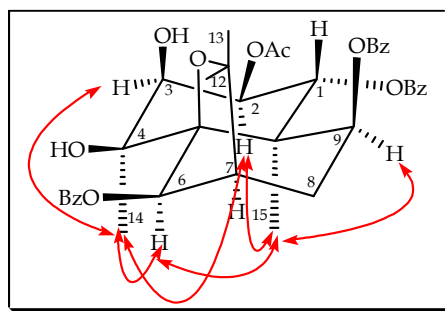
δ_H , 71,4 δ_C) y otro terciario, sobre un esqueleto sesquiterpénico de dihidro- β -agarofurano, en las posiciones 1, 2, 3, 4, 6 y 9.



Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) del compuesto S-12

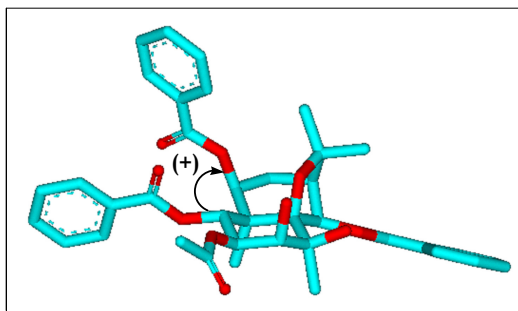
Un experimento HMBC nos permitió establecer las características de regiosustitución en la molécula, situando los grupos benzoatos sobre C-1, C-6 y C-9, el grupo acetato sobre C-2 y el alcohol secundario sobre C-3.

Un experimento ROESY, en el que se observaron efectos ROE de los protones del Me-15 (1,67 δ) con H-2 (5,34 δ), H-6 (5,76 δ) y H-9 (5,11 δ) y correlación de la señal del Me-14 (1,53 δ) con H-2 (5,34 δ), H-3 (3,81 δ), H-6 (5,76 δ) y Me-15 (1,67 δ), nos permitió establecer la configuración relativa de este compuesto, quedando así establecida su estructura como 2 β -acetoxi-1 α ,6 β ,9 β -tribenzoiloxi-3 β ,4 β -dihidroxi-dihidro- β -agarofurano.



Efectos ROE observados en el experimento ROESY de S-12

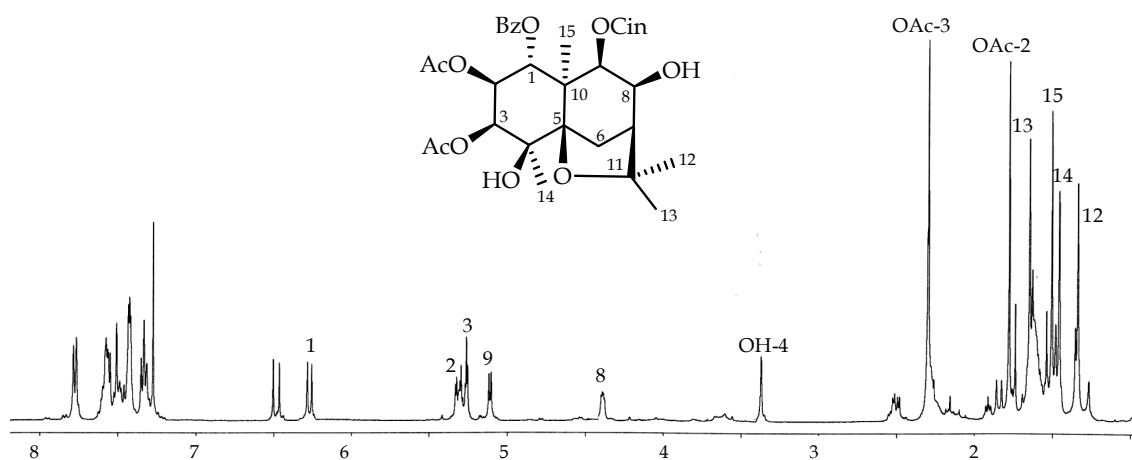
El espectro de dicroísmo circular mostró una curva bisignada con un primer efecto Cotton positivo a 237,0 nm ($\Delta\epsilon = +18,2$) y un segundo efecto Cotton negativo a 219,8 nm ($\Delta\epsilon = -5,1$), determinándose así la configuración absoluta del compuesto **S-12** como (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-2-acetoxi-1,6,9-tribenzoiloxi-3,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano.



Dicroísmo circular del compuesto **S-12**

Sesquiterpeno **S-15**

El estudio de los datos espectroscópicos (tablas 4.3.3 y 4.3.4) y espectrométricos ($C_{35}H_{40}O_{11}$) del compuesto que hemos denominado **S-15**, nos indicó que se trataba de un sesquiterpeno poliesterificado con dos grupos acetato (1,79 δ_H , 170,1 δ_C ; 2,30 δ_H , 170,3 δ_C), un grupo benzoato, un grupo cinamato (7,33-7,78 δ_H , 164,8 δ_C , 168,3 δ_C) y un alcohol secundario (4,45 δ_H , 71,2 δ_C) y otro terciario (69,5 δ_C) sobre un esqueleto sesquiterpénico de dihidro- β -agarofurano, funcionalizado en las posiciones 1, 2, 3, 4, 8 y 9.

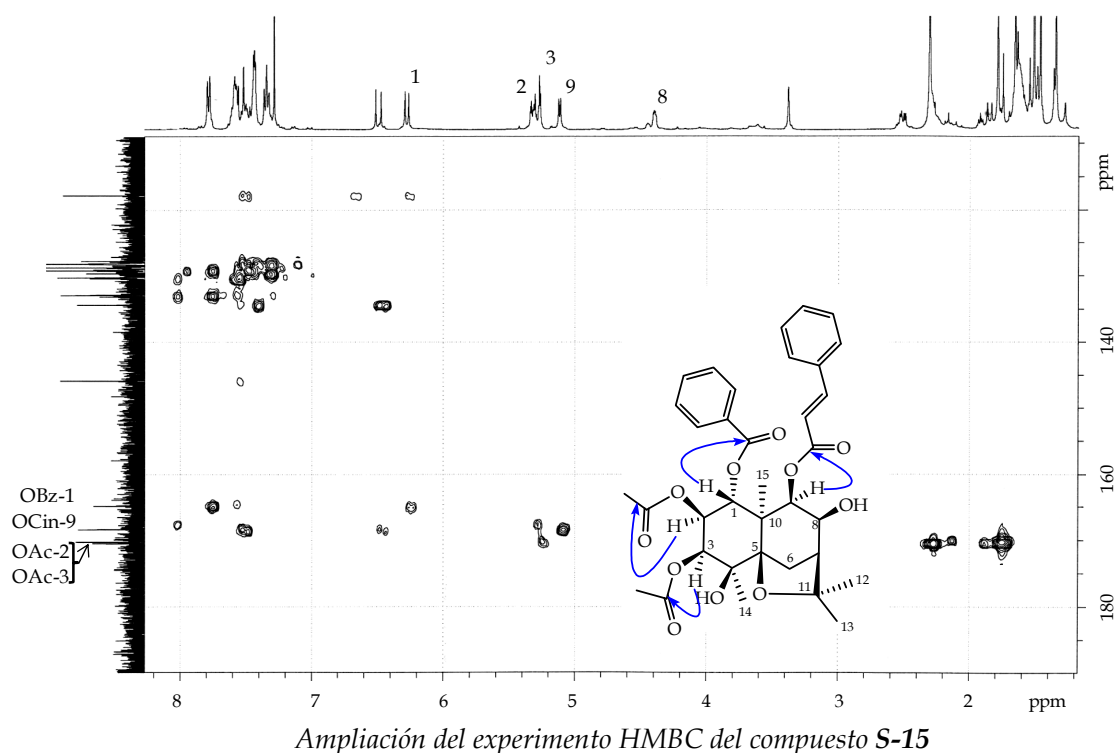


Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) del compuesto **S-15**

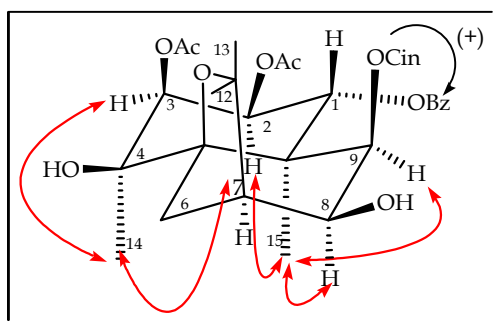
Este compuesto está muy relacionado con **S-1**, presentando como principal diferencia en sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , la desaparición de la señal correspondiente al grupo acetato sobre C-6 ($2,15 \delta_{\text{H}}$, $21,2 \delta_{\text{C}}$, $169,9 \delta_{\text{C}}$) y del protón geminal a dicho carbono ($5,40 \delta_{\text{H}}$ para **S-1**) y la presencia de un metileno adicional ($1,85$ y $2,51 \delta_{\text{H}}$, $32,5 \delta_{\text{C}}$) en **S-15**.

Al objeto de confirmar las características de regiosustitución, se realizó un experimento HMBC, situando el grupo benzoato sobre C-1, el grupo cinamato sobre C-9, los grupos acetatos sobre C-2 y C-3 y el alcohol secundario sobre C-6.

La estereoquímica relativa se determinó mediante un cuidadoso estudio de las constantes de acoplamiento y fue confirmada mediante un experimento ROESY, donde se observaron efectos ROE de los protones del Me-15 ($1,51 \delta$) con H-2 ($5,31 \delta$) y H-9 ($5,12 \delta$) y correlación de la señal del Me-14 ($1,47 \delta$) con H-2 ($5,31 \delta$), H-3 ($5,27 \delta$) y Me-15 ($1,51 \delta$), lo que nos permitió establecer la configuración relativa de este compuesto y determinar su estructura como 1α -benzoiloxi- 9β -*trans*-cinamoiloxi- $2\beta,3\beta$ -diacetoxi- $4\beta,8\beta$ -dihidroxi-dihidro- β -agarofurano.



La configuración absoluta se estableció basándonos en la curva de dicroísmo circular (DC), la cual presentó un primer efecto Cotton positivo a 269,8 nm ($\Delta\epsilon = +15,1$) y un segundo efecto Cotton negativo a 224,4 nm ($\Delta\epsilon = -12,1$), debido a la interacción de los cromóforos benzoato y cinamato. La aplicación del método de la quiralidad del benzoato nos permitió determinar la configuración absoluta de **S-15** como (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,7*S*,8*S*,9*R*,10*R*)-2,3-diacetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-4,8-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano.



Efectos ROE y dicroísmo circular de **S-15**

Tabla 4.3.3. Datos^a de RMN de ¹H de los sesquiterpenos S-6 a S-15.

| Posición | S-6 | S-7 | S-9 | S-12 | S-15 |
|-------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---|------------------------|
| H-1 | 6,26 d (11,1) | 6,24 d (11,3) | 6,18 d (11,4) | 6,29 d (11,3) | 6,28 d (11,2) |
| H-2 | 5,31 dd (3,0, 11,1) | 5,34 dd (3,1, 11,3) | 5,33 dd (2,3, 11,4) | 5,34 dd (2,6, 11,3) | 5,31 dd (3,1, 11,2) |
| H-3 | 5,27 d (3,0) | 5,24 d (3,1) | 3,79 d (2,3) | 3,81 d (2,6) | 5,27 d (3,1) |
| H-6α | 1,89 da (11,4) | 4,51 s | 4,51 d (5,5) | 5,76 s | 1,85 d (12,8) |
| H-6β | 2,58 dd (2,2, 11,4) | - | - | - | 2,51 dd (5,0, 12,8) |
| H-7 | - | 2,20 m* | 2,19 m* | 2,34 t (2,5) | 2,27 m |
| H-8 | 2,27 m | 2,20 m * | 2,19 m* | α , 2,55 ddd (2,5, 6,5, 16,1) β , 2,25 dd (2,5, 16,1) | α , 4,45 m |
| H-9 | 4,98 d (6,3) | 4,78 d (6,4) | 4,76 d (6,4) | 5,11 d (6,5) | 5,12 d (5,8) |
| Me-12 | 1,37 s | 1,60 s | 1,61 s | 1,60 s | 1,35 s |
| Me-13 | 1,35 s | 1,55 s | 1,54 s | 1,53 s* | 1,66 s |
| Me-14 | 1,46 s | 1,82 s | 1,77 s | 1,53 s* | 1,47 s |
| Me-15 | 1,48 s | 1,56 s | 1,59 s | 1,67 s | 1,51 s |
| OAc-2 | 1,80 s | 1,81 s | 1,91 s | 1,89 s | 1,79 s |
| OAc-3 | 2,30 s | 2,32 s | - | - | 2,30 s |

^a δ , CDCl₃, 400 MHz, J en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC.

* Señales solapadas.

Tabla 4.3.4. Datos^a de RMN de ¹³C de los sesquiterpenos S-6 a S-15.

| Posición | S-6 | S-7 | S-9 | S-12 | S-15 |
|----------|---------|---------|----------|---------|---------|
| C-1 | 67,5 d | 67,7 d | 67,8 d | 67,7 d | 67,7 d |
| C-2 | 68,4 d | 68,1 d | 70,2 d | 70,3 d | 68,4 d |
| C-3 | 75,1 d | 75,0 d | 76,8 d | 77,9 d | 75,1 d |
| C-4 | 69,9 s | 71,3 s | 72,7 s * | 71,4 s | 69,5 s |
| C-5 | 88,1 s | 91,0 s | 92,7 s | 92,5 s | 88,9 s |
| C-6 | 37,6 t | 79,7 d | 80,0 d | 80,7 d | 32,5 t |
| C-7 | 77,6 s | 49,1 d | 48,9 d | 48,1 d | 47,9 d |
| C-8 | 38,1 t | 31,0 t | 31,4 t | 31,6 t | 71,2 d |
| C-9 | 73,7 d | 72,4 d | 72,7 d * | 72,9 d | 74,8 d |
| C-10 | 47,1 s | 49,8 s | 50,4 s | 51,7 s | 48,2 s |
| C-11 | 82,5 s | 84,9 s | 86,4 s | 86,3 s | 84,0 s |
| C-12 | 21,6 c | 30,2 c | 29,8 c | 30,0 c | 31,0 c |
| C-13 | 26,4 c | 26,4 c | 26,3 c | 25,9 c | 24,7 c |
| C-14 | 24,0 c | 24,0 c | 23,7 c | 24,0 c | 23,9 c |
| C-15 | 19,5 c | 20,4 c | 20,8 c | 20,8 c | 20,0 c |
| OAc-2 | 170,1 s | 170,1 s | 170,2 s | 170,5 s | 170,1 s |
| OAc-3 | 170,3 s | 170,3 s | - | - | 170,3 s |

^a δ , CDCl₃, 100 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

* Señales solapadas.

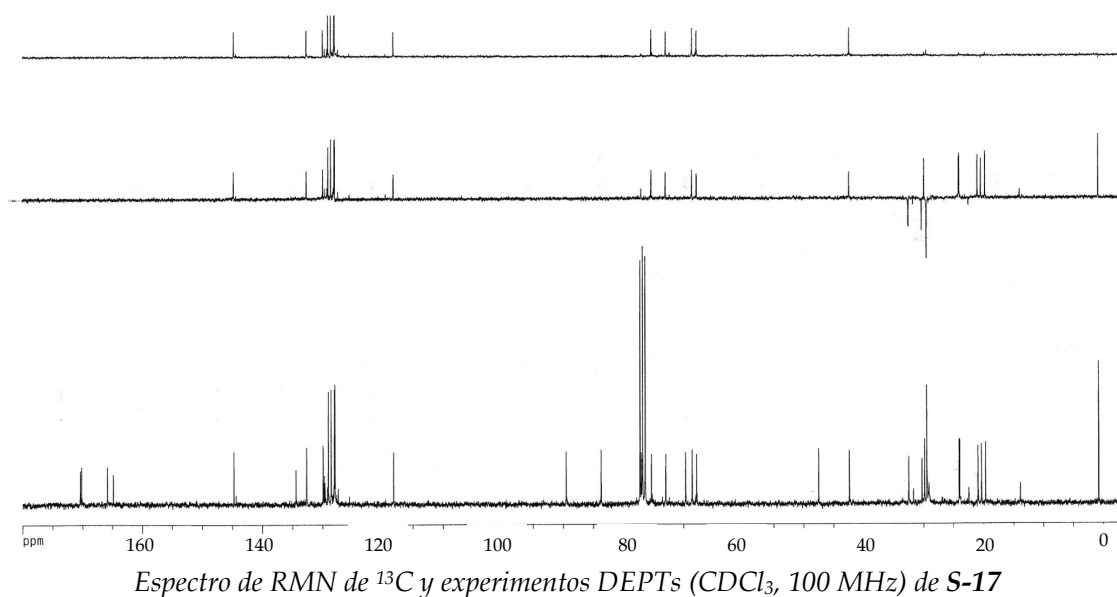
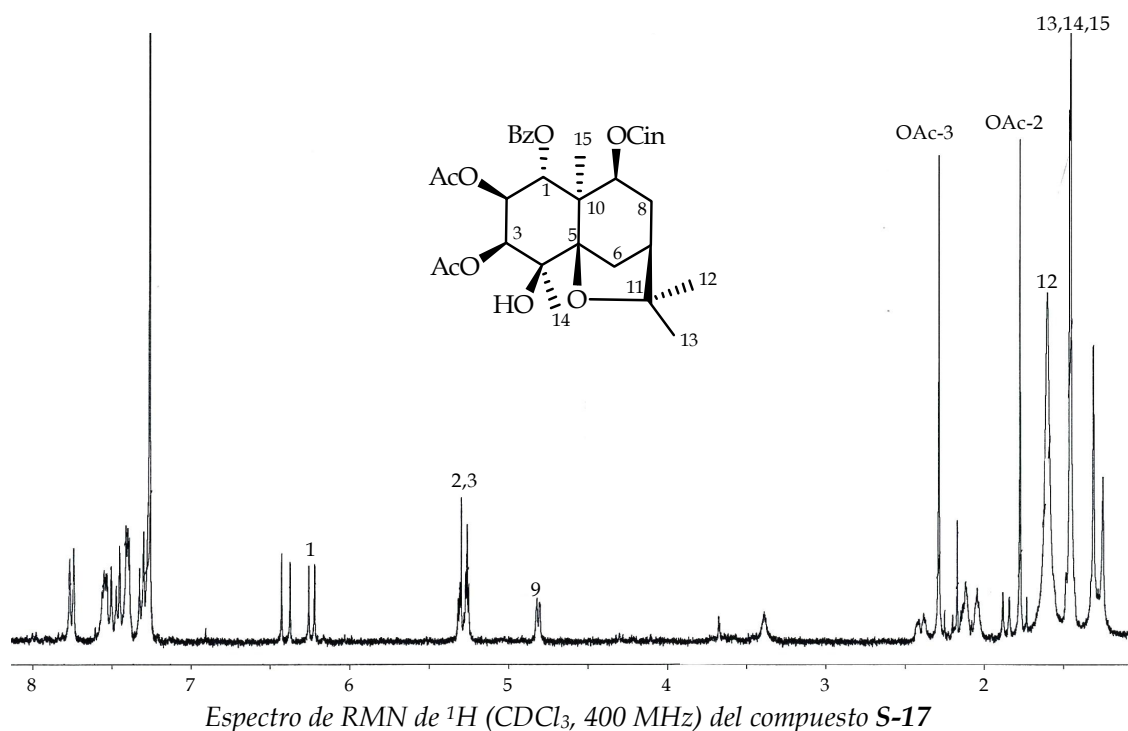
Sesquiterpeno S-17

El compuesto **S-17** se obtuvo como un sólido amorfo que posee una fórmula molecular $C_{35}H_{40}O_{10}$, según indica su espectro de masas de alta resolución (EMAR). El espectro de IR mostró bandas de absorción para grupos hidroxilo (3524 cm^{-1}) y grupos éster ($1731, 1746\text{ cm}^{-1}$).

El espectro de masas de baja resolución (EM) presentó fragmentos correspondientes a la pérdida de metilo (M^+-15 , m/z 605, CH_3), grupo acetato y benzoato ($M^+-15-42-105$, 458 m/z , $CH_3\ C_2H_2O$, $C_7H_5O^+$) y un grupo cinamato ($M^+-15-148$, 457 m/z , CH_3 , $C_9H_8O_2$, 131 m/z , $C_9H_7O^+$).

Cuando **S-17** fue tratado con anhídrido acético y piridina a temperatura ambiente, el compuesto permaneció inalterado; este dato unido al anteriormente expuesto de la presencia de un grupo hidroxilo en su espectro de IR y de un singulete a $3,89\ \delta$ en su espectro de RMN 1H , que integra para un protón y que es intercambiable con D_2O , nos confirma la presencia en la molécula de un grupo hidroxilo terciario. En su espectro de RMN 1H (tabla 4.3.5) fueron también observadas señales para un sistema ABM ($5,26\ \delta$, d, $J = 2,8\text{ Hz}$, $5,29\ \delta$, dd, $J = 2,8, 11,0\text{ Hz}$ y $6,24\ \delta$, d, $J = 11,0\text{ Hz}$), asignadas a los protones H-3, H-2 y H-1, respectivamente; señales correspondientes a dos protones metínicos a $2,04\ \delta$ (m, H-7) y $4,82\ \delta$ (d, $J = 5,0\text{ Hz}$, H-9), además de dos grupos metilenos asignados a H-6 ($1,86\ \delta$ y $2,40\ \delta$) y H-8 ($2,12\ \delta$). Además, se observaron en sus espectros de RMN 1H y ^{13}C (tablas 4.3.5 y 4.3.6), señales correspondientes a cuatro metilos angulares a $1,46\ \delta_H$ (Me-13, Me-14 y Me-15) y $1,31\ \delta_H$ (Me-12) y tres carbonos cuaternarios a $47,5, 83,7$ y $89,5\ \delta_C$. Estos datos indican que **S-17** es un sesquiterpeno con esqueleto de dihidro- β -agarofurano pentasustituido.

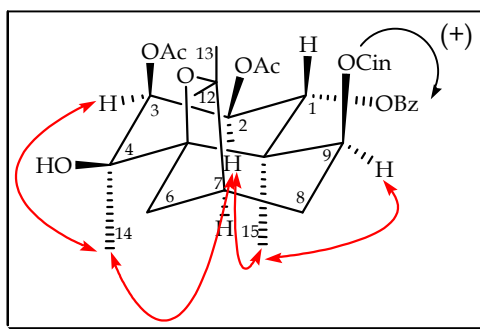
En el experimento HMBC se observó correlación de la señal a $6,24\ \delta_H$ (H-1) y el carboxilo del grupo benzoato ($164,9\ \delta_C$), correlación de la señal a $5,26\ \delta_H$ (H-3) con el carboxilo de un grupo acetato ($170,4\ \delta_C$) y de la señal a $4,82\ \delta_H$ (H-9) con el carboxilo del grupo cinamato ($165,9\ \delta_C$), situando el otro grupo acetato ($170,2\ \delta_C$) sobre el C-2, la única posición esterificada restante en la molécula.



La estereoquímica relativa se determinó mediante un cuidadoso estudio de las constantes de acoplamiento, un experimento COSY y fue confirmada mediante un experimento ROESY.

La configuración absoluta de **S-17** se determinó mediante estudios de dicroísmo circular, como en los casos anteriores, dando lugar a una curva con un primer efecto Cotton positivo a 269,8 nm ($\Delta\epsilon = +16,8$) y un segundo efecto Cotton

negativo a 227,4 nm ($\Delta\epsilon = -15,2$), resultado de la interacción de los cromóforos cinamato y benzoato. La aplicación del método de la quiralidad del benzoato nos permitió determinar la configuración absoluta del producto **S-17** como (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-2,3-diacetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano.



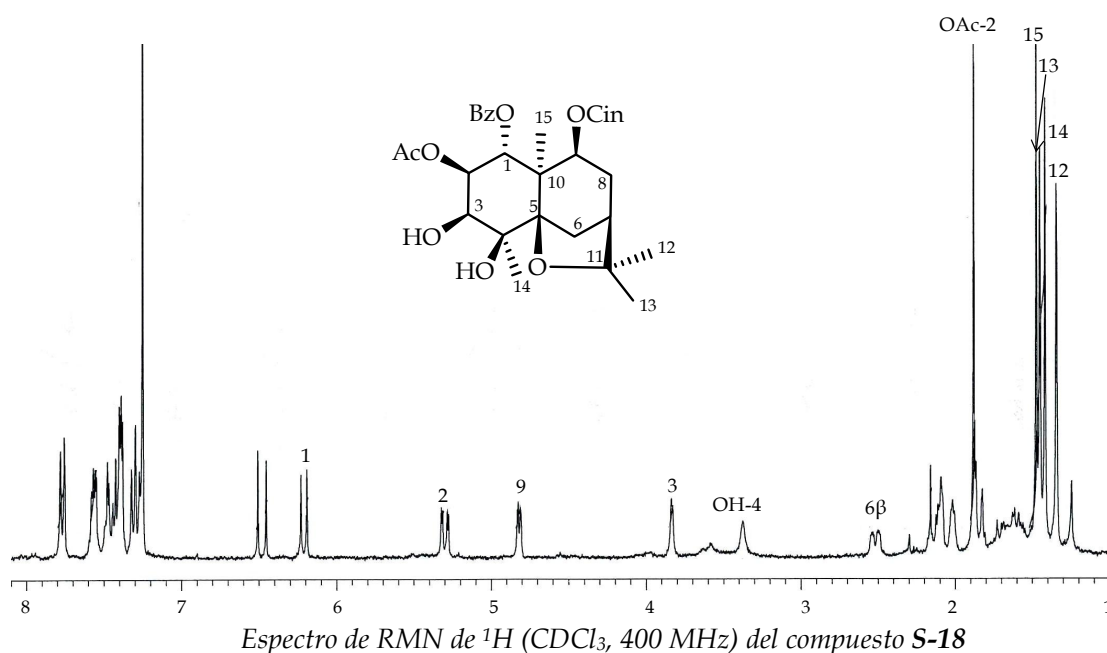
Efectos ROE y dicroísmo circular de **S-17**

Sesquiterpeno **S-18**

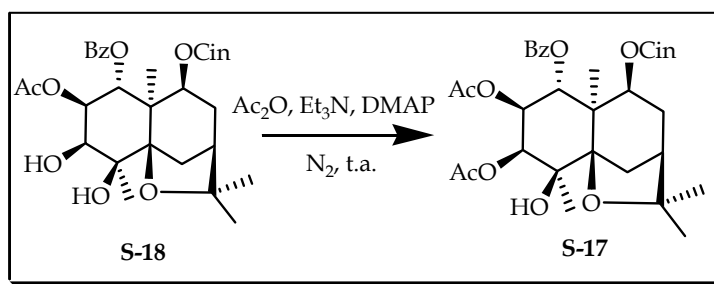
En su espectro de IR presentó bandas de absorción características de grupo hidroxilo (3474 cm^{-1}) y grupo carboxilo ($1733, 1740\text{ cm}^{-1}$) y en su espectro de masas se observaron fragmentos que indicaban la presencia de grupos metilo e hidroxilo ($M^+-15-18, 545\text{ m/z}, \text{CH}_3, \text{H}_2\text{O}$), grupo acetato ($M^+-15-60, 503\text{ m/z}, \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), benzoato ($M^+-122, 456\text{ m/z}, \text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$) y cinamato ($M^+-148, 430\text{ m/z}, \text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$).

La presencia de estos grupos ésteres en la molécula se confirmó por la existencia en su espectro de RMN ^1H (tabla 4.3.5) de un singulete a $1,88\ \delta$, correspondiente a un metilo de grupo acetato; señales que integran para once protones entre $7,31$ y $7,78\ \delta$ y un doblete centrado a $6,49\ \delta$ ($J = 16,0\text{ Hz}$), asignadas a un grupo *trans*-cinamato y un grupo benzoato.

La estructura propuesta para **S-18** se confirmó mediante experimentos de RMN 2D. Así, la estereoquímica $1\alpha, 2\beta, 3\beta$ y 9β , se determinó mediante el uso de experimentos bidimensionales, COSY y ROESY, mientras que el estudio de un experimento HMBC nos permitió establecer la regiosustitución en la molécula.



La configuración absoluta del compuesto **S-18** fue determinada mediante correlación química con **S-17**, cuya configuración absoluta determinamos mediante dicroísmo circular. Así, acetilación de **S-18** en las condiciones habituales rindió un producto cuyos datos espectroscópicos resultaron ser idénticos a los de **S-17**. Dicha correlación química nos permitió confirmar la estructura y establecer la configuración absoluta de **S-18** como (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-2-acetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-3,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano.

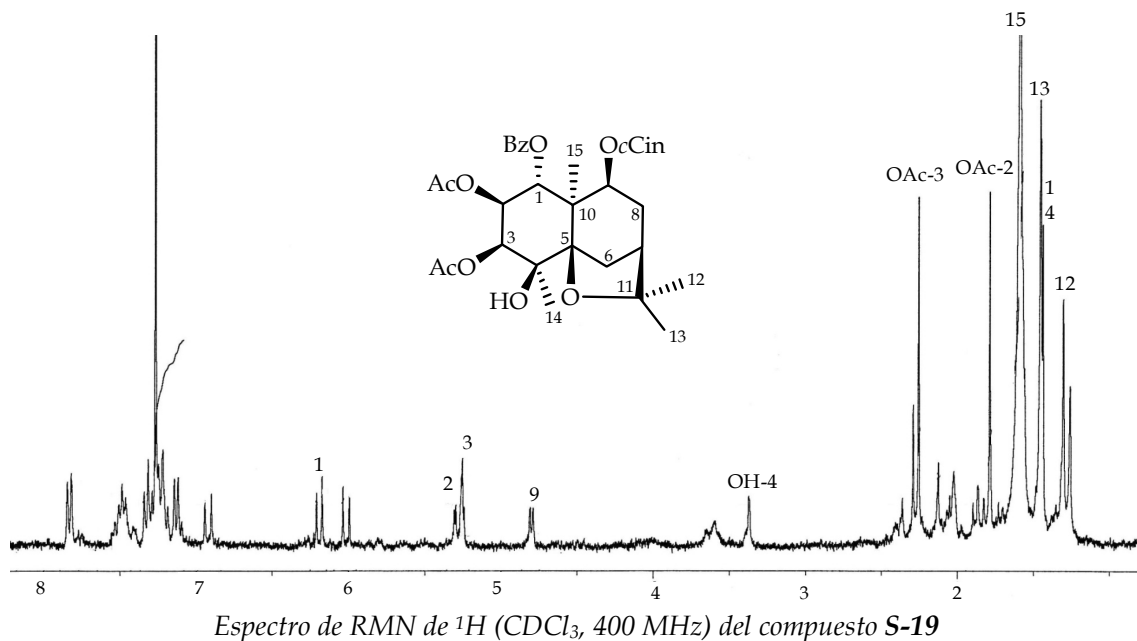


Correlación química de **S-18** con **S-17**

Sesquiterpeno **S-19**

El producto **S-19** presentó una fórmula molecular, $\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{O}_{10}$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución. Sus espectros de RMN ^1H y ^{13}C (tablas 4.3.5 y 4.3.6) presentaron señales características para un sesquiterpeno

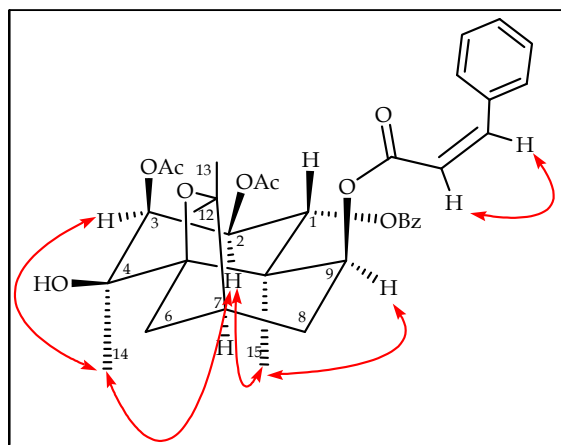
poliesterificado que presentaba dos grupos acetato, un grupo benzoato, un cinamato y un alcohol terciario en su estructura.



Estos datos nos indicaron que el producto **S-19** se encontraba relacionado con **S-17**, siendo la única diferencia estructural la estereoquímica del grupo cinamato sobre C-9, tal y como se observa en la variación de los desplazamientos y constantes de acoplamiento de los protones del sistema cinámico ($6,03 \delta_{\text{H}}$, d, $6,92 \delta_{\text{H}}$, d, $J = 12,5 \text{ Hz}$) en su espectro de RMN ^1H . Estos datos están de acuerdo con un sistema *cis* cinamato en **S-19**, a diferencia de las señales observadas en el espectro de RMN de ^1H de **S-17** ($6,40 \delta$, $J = 16,0 \text{ Hz}$ y $7,48 \delta$, señal solapada).

Un experimento ROESY nos permitió confirmar la configuración relativa del grupo cinamato, al observarse efecto ROE entre los protones vinílicos del éster cinámico, lo que sólo es posible si existe una estereoquímica *cis* del doble enlace.

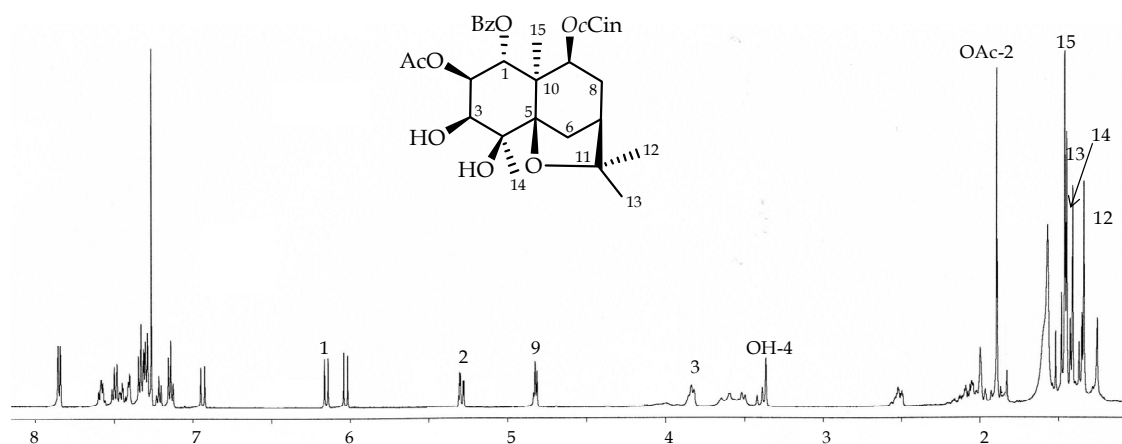
Un experimento heteronuclear HMBC nos permitió fijar la disposición de los sustituyentes sobre el esqueleto sesquiterpénico, quedando así fijada la estructura del compuesto **S-19** como $2\beta,3\beta$ -diacetoxi- 1α -benzoiloxi- 9β -*cis*-cinamoiloxi- 4β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano.

Efectos ROE observados en el experimento ROESY del compuesto **S-19**

Dado que la única diferencia estructural entre **S-19** y **S-17** es la estereoquímica relativa del grupo cinamato situado sobre C-9 y que la configuración absoluta de **S-17** fue determinada mediante DC, proponemos la estructura de **S-19** como (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-2,3-diacetoxi-1-benzoiloxi-9-*cis*-cinamoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano, basándonos en consideraciones biogenéticas.

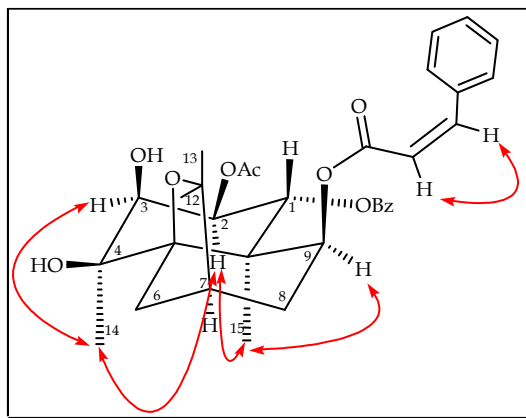
Sesquiterpeno **S-20**

La estructura del producto que hemos denominado **S-20** fue establecida mediante el estudio de sus datos espectroscópicos (tablas 4.3.5 y 4.3.6), los cuales nos indicaron que se trataba de un poliéster sesquiterpénico con esqueleto de dihidro- β -agarofurano, que posee un grupo benzoato, un grupo *cis*-cinamato, un grupo acetato, un alcohol secundario y uno terciario.

Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto **S-20**

Las posiciones de sustitución fueron determinadas basándonos en el estudio de las constantes de acoplamiento y experimentos de doble resonancia homonucleares (COSY, ROESY), mientras que la regiosustitución fue establecida mediante un experimento HMBC.

El estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **S-20** y **S-18** mostró que ambos productos estaban relacionados, siendo la única diferencia estructural la presencia en el compuesto **S-20** de un grupo *cis*-cinamato en lugar de un grupo *trans*-cinamato sobre C-9. Esto fue confirmado mediante el estudio de la constante de acoplamiento de los protones vinílicos del grupo cinamato y un experimento ROESY, donde se observó efecto ROE entre ambos protones.



Efectos ROE observados en el experimento ROESY del compuesto **S-20**

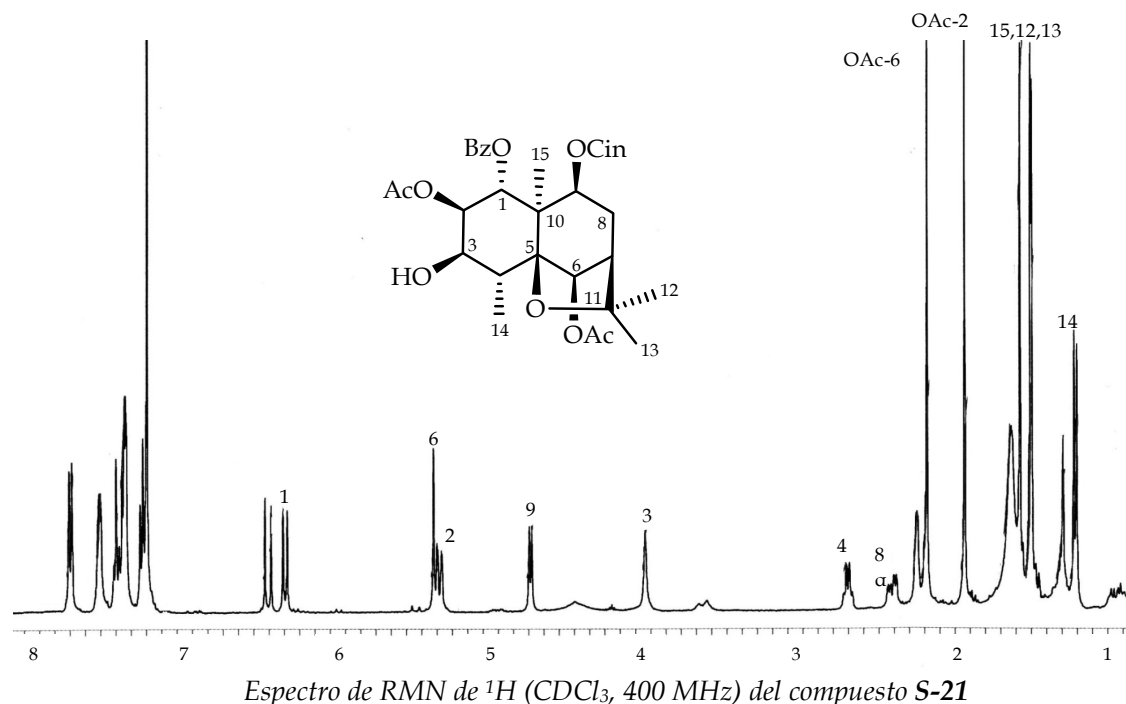
La configuración absoluta de **S-20** se estableció basándonos en consideraciones biogénicas como: (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-2-acetoxi-1-benzoiloxi-9-*cis*-cinamoiloxi-3,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano.

Sesquiterpeno **S-21**

En el espectro de infrarrojo del compuesto **S-21** se observaron bandas de absorción correspondientes a grupo hidroxilo a 3480 cm^{-1} y a grupos carboxilos a 1741 y 1734 cm^{-1} . En su espectro de masas de baja resolución se observaron fragmentos correspondientes a pérdidas de metilo, agua, ácido acético, benzoico y cinámico.

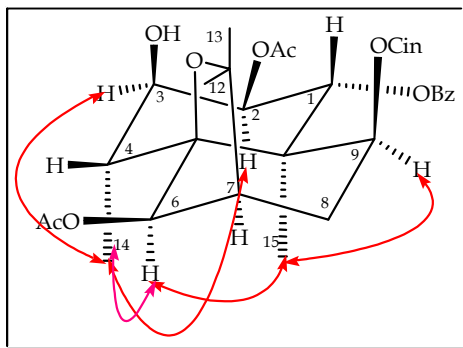
En su espectro de RMN de ^1H (tabla 4.3.5) se observó la presencia de dos singuletes a 1,90 y 2,15 δ que integran para tres protones cada uno, correspondientes a dos grupos acetato, así como señales que integran para once protones entre 7,29 y 7,76 δ y un doblete centrado a 6,47 δ (d, $J = 16,0$ Hz) cuya forma y desplazamiento indican la presencia en la molécula de un grupo *trans*-cinamato y un grupo benzoato. La presencia de estos ésteres fue confirmada mediante RMN de ^{13}C (tabla 4.3.6).

En su espectro de RMN de ^1H se observaron, además, señales atribuibles a protones geminales a cuatro grupos ésteres secundarios a 6,36 δ (d, $J = 11,1$ Hz), 5,40 δ (s), 5,35 δ (dd, $J = 2,8, 11,1$ Hz) y 4,77 δ (d, $J = 6,8$ Hz), asignables a los protones H-1, H-6, H-2 y H-9, respectivamente. Así mismo, se observaron señales a 4,02 δ (sa, H-3), correspondiente a un protón geminal a un alcohol secundario, dos protones metínicos a 2,68 δ (m, H-4) y 2,22 δ (señal solapada, H-7), un sistema metilénico con señales a 2,37 y 2,22 δ (2H, m, H-8) y cuatro metilos a 1,19 δ (d, $J = 7,6$ Hz, Me-14), 1,45 δ (s, Me-13), 1,46 δ (s, Me-12) y 1,56 (s, Me-15) δ . Estos datos fueron confirmados mediante RMN de ^{13}C (tabla 4.3.6).



La estereoquímica relativa 1α , 2β , 3β , 6β y 9β , fue fijada mediante el estudio de las constantes de acoplamiento y un experimento bidimensional (COSY) y confirmada mediante un experimento ROESY, en el cual se observó efecto ROE del

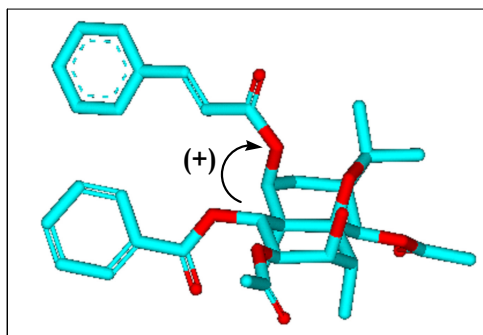
metilo Me-14 (1,19 δ) con H-2 (5,35 δ), H-3 (4,02 δ) y H-6 (5,40 δ) y correlación del Me-15 (1,56 δ) con H-6 y H-9 (4,77 δ), lo que nos permitieron establecer de forma inequívoca la configuración relativa propuesta.



Efectos ROE observados en el experimento ROESY del compuesto **S-21**

Estos datos indicaron que **S-21** es un sesquiterpeno esterificado con un grupo benzoato, un grupo cinamato y dos grupos acetatos. Un experimento HMBC nos permitió localizar las posiciones de los distintos sustituyentes sobre el esqueleto sesquiterpénico, quedando fijada su estructura como: 2 β ,6 β -diacetoxi-1 α -benzoiloxi-9 β -*trans*-cinamoiloxi-3 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano.

La configuración absoluta de **S-21** fue determinada mediante estudios de dicroísmo circular (DC), observándose una curva con un primer efecto Cotton positivo a 270,0 nm ($\Delta\epsilon = +17,6$) y un segundo efecto Cotton negativo a 227,6 nm ($\Delta\epsilon = -16,1$), permitiendo establecer la configuración absoluta de **S-21** como (1*R*,2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-2,6-diacetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-3-hidroxi-dihidro- β -agarofurano.



Dicroísmo circular del compuesto **S-21**

Tabla 4.3.5. Datos^a de RMN de ¹H de los sesquiterpenos S-17 a S-21.

| Posición | S-17 | S-18 | S-19 | S-20 | S-21 |
|--------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--|
| H-1 | 6,24 d (11,0) | 6,22 d (11,3) | 6,19 d (10,9) | 6,17 d (11,2) | 6,36 d (11,1) |
| H-2 | 5,29 dd (2,8, 11,0) | 5,31 dd (2,8, 11,3) | 5,27 dd (3,2, 10,9) | 5,31 dd (2,8, 11,2) | 5,35 dd (2,8, 11,1) |
| H-3 | 5,26 d (2,8) | 3,84 dd (2,8, 11,0) | 5,25 d (3,2) | 3,85 dd (2,8, 10,9) | 4,02 sa |
| H-4 | - | - | - | - | 2,68 c (7,6) |
| H-6 α | 1,86 d (12,2) | 1,85 d (12,9) | 1,86 m | 1,86 d (12,2) | 5,40 s |
| H-6 β | 2,40 dd (3,8, 12,2) | 2,52 m | 2,40 m | 2,53 m | - |
| H-7 | 2,04 m | 2,03 m | 2,04 m | 2,02 m | 2,22 m* |
| H-8 | 2,12 m | 2,12 m | 2,14 m | 2,09 m | α , 2,37 ddd (2,9, 6,8, 16,0) β , 2,22 m* |
| H-9 | 4,82 d (5,0) | 4,82 d (5,2) | 4,79 d (5,1) | 4,84 d (5,4) | 4,77 d (6,8) |
| Me-12 | 1,31 s | 1,35 s | 1,31 s | 1,36 s | 1,46 s |
| Me-13 | 1,46 s* | 1,46 s | 1,47 s | 1,47 s | 1,45 s |
| Me-14 | 1,46 s* | 1,42 s | 1,46 s | 1,43 s | 1,19 d (7,6) |
| Me-15 | 1,46 s* | 1,48 s | 1,50 s | 1,48 s | 1,56 s |
| OAc-2 | 1,77 s | 1,88 s | 1,78 s | 1,92 s | 1,90 s |
| OAc-3 | 2,28 s | - | 2,25 s | - | - |
| OAc-6 | - | - | - | - | 2,15 s |

^a δ , CDCl₃, 400 MHz, J en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC.

* Señales solapadas.

Tabla 4.3.6. Datos^a de RMN de ¹³C de los sesquiterpenos S-17 a S-21.

| Posición | S-17 | S-18 | S-19 | S-20 | S-21 |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| C-1 | 67,8 d | 68,1 d | 68,1 d | 68,3 d | 68,5 d |
| C-2 | 68,6 d | 70,7 d | 68,7 d | 70,7 d | 71,8 d |
| C-3 | 75,3 d | 77,0 d | 75,6 d | 77,2 d | 73,0 d |
| C-4 | 69,7 s | 70,9 s | 69,9 s | 70,8 s | 41,0 d |
| C-5 | 89,5 s | 92,0 s | 89,7 s | 92,1 s | 90,8 s |
| C-6 | 32,5 t | 32,1 t | 32,9 t | 32,1 t | 79,3 d |
| C-7 | 42,4 d | 42,2 d | 42,6 d | 42,2 d | 47,4 d |
| C-8 | 30,3 t | 31,0 t | 30,7 t | 30,9 t | 31,5 t |
| C-9 | 73,0 d | 73,5 d | 72,5 d | 72,9 d | 72,5 d |
| C-10 | 47,5 s | 48,1 s | 47,9 s | 48,1 s | 52,6 s |
| C-11 | 83,7 s | 85,3 s | 84,2 s | 85,4 s | 85,0 s |
| C-12 | 29,8 c | 29,8 c | 29,8 c | 29,8 c | 30,2 c |
| C-13 | 24,0 c* | 24,2 c | 24,2 c | 24,1 c | 25,7 c |
| C-14 | 24,0 c* | 23,8 c | 24,6 c | 23,8 c | 15,8 c |
| C-15 | 19,7 c | 20,2 c | 19,7 c | 20,2 c | 19,6 c |
| OAc-2 | 170,2 s | 170,6 s | 170,6 s | 170,6 s | 170,6 s |
| OAc-3 | 170,4 s | - | 171,0 s | - | - |
| OAc-6 | - | - | - | - | 169,7 s |

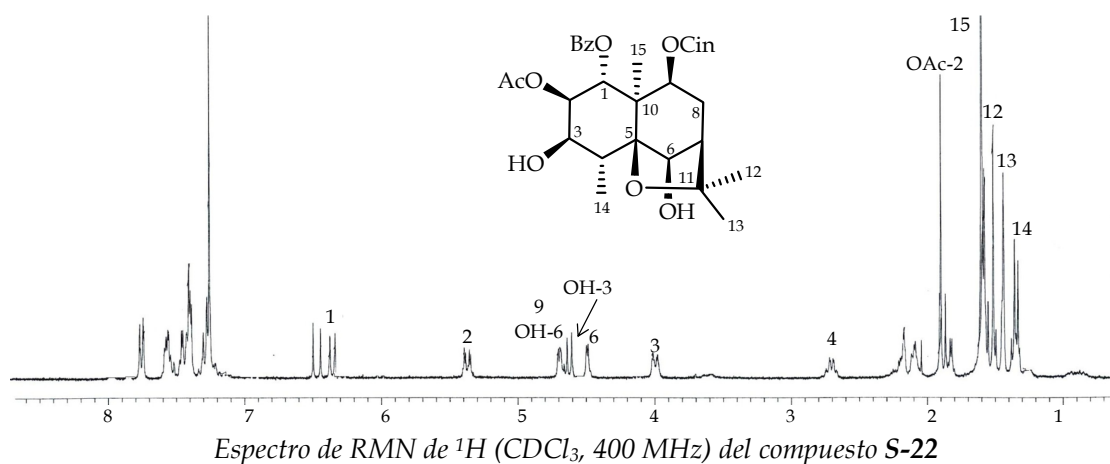
^a δ , CDCl₃, 100 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

* Señales solapadas.

Sesquiterpeno S-22

El compuesto que hemos denominado **S-22** presentó una fórmula molecular de $C_{33}H_{38}O_9$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución y datos de RMN de ^{13}C , indicando que se trataba de un isómero del compuesto **S-18**.

Un cuidadoso estudio de los datos espectroscópicos de RMN de 1H y ^{13}C (tablas 4.3.7), así como experimentos bidimensionales, nos indicaron que el compuesto **S-22** se encuentra sustituido en las posiciones 1, 2, 3, 6 y 9 del esqueleto sesquiterpénico. Así, las principales diferencias en su espectro de RMN de 1H con el de **S-18** fue la presencia de un metilo doblete a $1,37 \delta$ (d, $J = 7,7$ Hz) acoplado con un metino a $2,70 \delta$ (m) y de un protón geminal a un grupo hidroxilo secundario adicional a $4,49 \delta$ (d, $J = 3,5$ Hz), así como la desaparición de las señales asignadas al OH-4 ($3,38$, s) y al metileno correspondiente a los protones H-6 ($1,85 \delta$, d, $J = 12,9$ Hz y $2,52 \delta$, m).



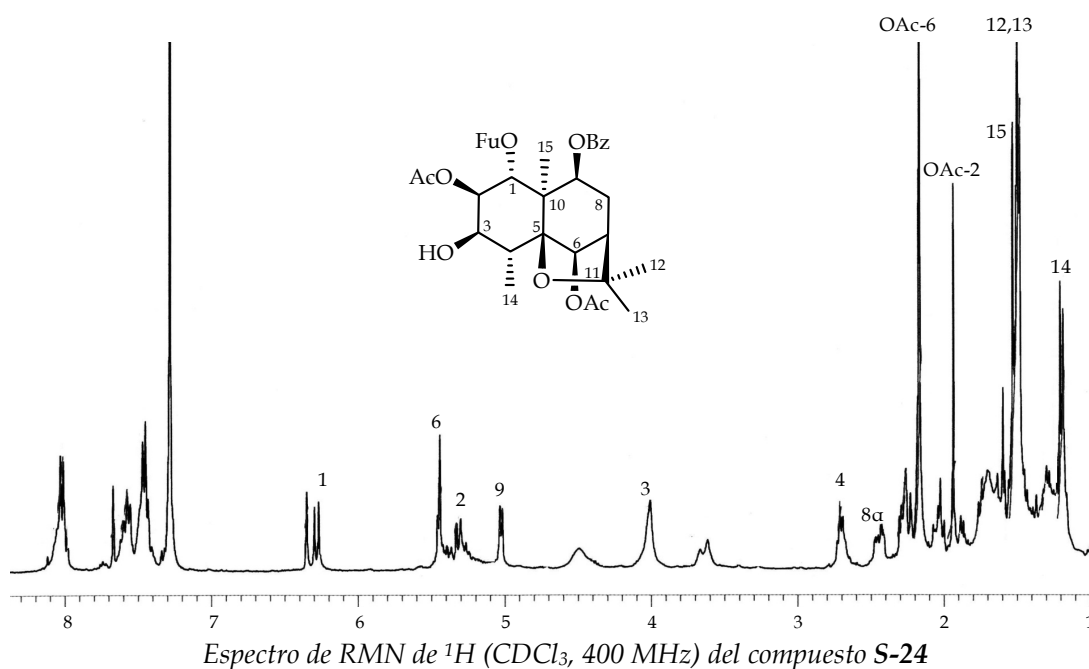
El experimento HMBC nos confirmó las características de regiosustitución en la molécula. Así, se observaron correlaciones del metilo a $1,37 \delta_H$ (Me-14) con los C-3 ($73,1 \delta_C$) y C-5 ($90,3 \delta_C$) y del protón geminal al grupo hidroxilo a $4,49 \delta_H$ (H-6) con los C-5 ($90,3 \delta_C$) y C-11 ($85,0 \delta_C$). Además, se observaron conectividades de las señales a $6,36 \delta_H$ (H-1) con el carboxilo del grupo benzoato ($164,7 \delta_C$), correlación de la señal a $5,38 \delta_H$ (H-2) con el carboxilo del grupo acetato ($170,8 \delta_C$) y de la señal a $4,70 \delta_H$ (H-9) con el carboxilo del grupo *trans*-cinamato ($165,9 \delta_C$).

La estereoquímica relativa del compuesto se determinó mediante el estudio de las constantes de acoplamiento y se confirmó por los efectos ROE observados en un experimento ROESY. En este caso podemos establecer la configuración absoluta de **S-22** como (1*R*,2*R*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-2-acetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-3,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano, ya que este compuesto presenta el mismo esqueleto polihidroilico base que **S-21**, cuya configuración absoluta fue determinada mediante dicroísmo circular.

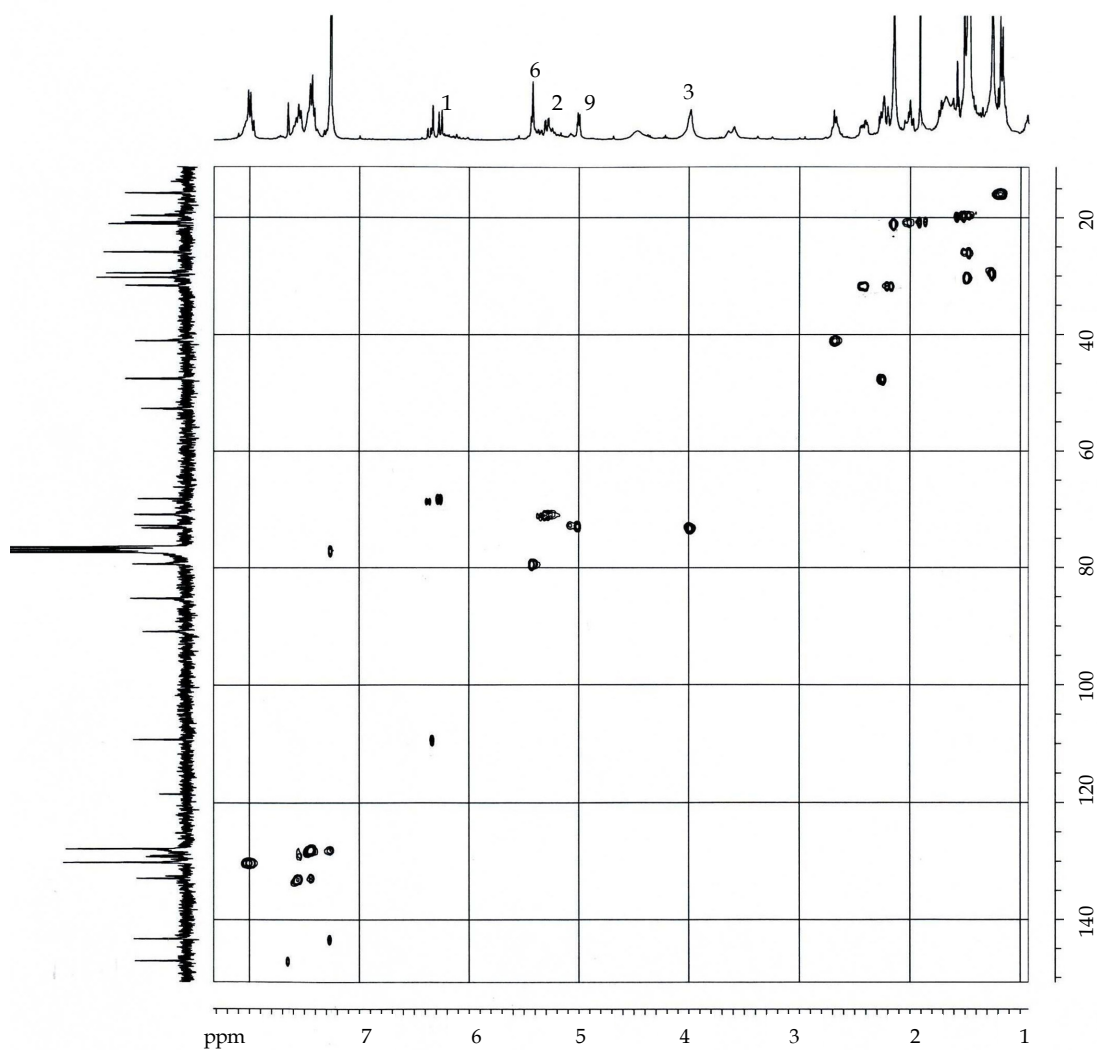
Sesquiterpeno S-24

La estructura del compuesto que hemos denominado **S-24** fue establecida mediante sus datos espectroscópicos, tal como se muestra a continuación. Su fórmula molecular $C_{31}H_{36}O_{11}$, fue fijada basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución y RMN de ^{13}C .

Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **S-24** (tablas 4.3.7) y **S-21** mostró que ambos productos estaban relacionados, siendo la principal diferencia la presencia de señales asignables a un grupo furoato [7,65 δ_H (1H, s), 7,43 δ_H (1H, m solapado), 6,33 δ_H (1H, s), (160,4 s, 147,1 d, 143,2 d, 118,5 s y 109,0 d δ_C)] y la desaparición de las señales correspondientes a un grupo *trans*-cinamato presente en **S-21**.



Un cuidadoso estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares, ROESY y COSY y el análisis del experimento HMBC y HSQC nos permitió establecer la posición y estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre la molécula como: 1α , 2β , 3β , 6β y 9β , quedando así establecida la estructura de 9β -benzoiloxi- $2\beta,6\beta$ -diacetoxi- 1α -(3-furoiloxi)- 3β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano para el compuesto **S-24**.



Experimento HSQC del compuesto **S-24**

Igual que en el caso del compuesto anterior, la configuración absoluta de **S-24** fue establecida en base a consideraciones biogenéticas, puesto que presenta el mismo esqueleto polihidroxílico base que **S-21**, cuya configuración absoluta fue determinada mediante dicroísmo circular.

Tabla 4.3.7. Datos de RMN de $^1\text{H}^a$ y $^{13}\text{C}^b$ de los sesquiterpenos S-22 y S-24.

| Posición | S-22 | | S-24 | |
|----------|------------------------|---------------------|--|---------------------|
| | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} |
| 1 | 6,36 d (11,2) | 68,8 d | 6,26 d (11,0) | 68,1 d |
| 2 | 5,38 dd (3,0, 11,2) | 71,3 d | 5,29 dd (2,7,11,0) | 70,8 d |
| 3 | 3,99 dd (3,0, 9,8) | 73,1 d | 3,99 sa | 73,1 d |
| 4 | 2,70 c (7,7) | 40,5 d | 2,68 c (7,6) | 41,0 d |
| 5 | - | 90,3 s | - | 90,8 s |
| 6 | 4,49 d (3,5) | 77,7 d | 5,42 s | 79,3 d |
| 7 | 2,08 m | 48,5 d | 2,28* | 47,5 d |
| 8 | 2,19 m | 31,8 t | β , 2,28* α , 2,39 ddd (3,0, 6,5, 16,0) | 31,6 t |
| 9 | 4,70 d (5,9) | 72,8 d | 5,00 d (6,5) | 72,7 d |
| 10 | - | 52,4 s | - | 52,6 s |
| 11 | - | 85,0 s | - | 85,2 s |
| 12 | 1,50 s | 30,4 c | 1,48 s | 30,2 c |
| 13 | 1,44 s | 26,0 c | 1,46 s | 25,9 c |
| 14 | 1,37 d (7,7) | 16,3 c | 1,17 d (7,6) | 15,8 c |
| 15 | 1,58 s | 19,5 c | 1,51 s | 19,7 c |
| OAc-2 | 1,91 s | 170,8 s | 1,91 s | 170,7 s |
| OAc-6 | - | - | 2,15 s | 169,7 s |

^a δ , CDCl_3 , 400 MHz. J en paréntesis en Hz. ^b δ , CDCl_3 , 100 MHz.

Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC. * Señales solapadas.

Alcaloides sesquiterpénicos

Tras repetidas cromatografías del extracto diclorometánico de las hojas de *M. jelskii* se aislaron, además de los veinticinco sesquiterpenos anteriormente descritos, cinco alcaloides sesquiterpénicos macrociclos, con esqueleto de dihidro- β -agarofurano, que hemos denominado **SM-1** a **SM-5**, uno de los cuales resultó nuevo en la literatura química.

La estructura del nuevo metabolito aislado fue elucidada mediante técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C , incluyendo experimento homo (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), IR, UV y espectrometría de masas. 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, los compuestos **SM-2**, **SM-3**, **SM-4** y **SM-5** resultaron ser coincidentes con los descritos en la bibliografía como paniculatina A^{10} , euonimina 11 , alatusinina 12 y alatamina 11 , respectivamente.

Los alcaloides sesquiterpénicos aislados se agruparon en dos series de acuerdo al diácido piridínico que esterifica las posiciones C-3 y C-12 del esqueleto sesquiterpénico. Así, los productos que hemos denominado **SM-1** a **SM-3** se caracterizan por estar incluidos en la serie del ácido evónico y los compuestos **SM-4** y **SM-5** en la serie del ácido hidroxiwilfórdico.

A continuación se presenta un esquema de los sesquiterpenos macrocíclicos aislados y se discute la elucidación estructural del compuesto que resultó nuevo en la bibliografía química **SM-1**.

¹⁰ Lu, Y.; Yang, S.; Zou, Z.; Luo, X.; Chen, H.; Xu, L. *Heterocycles*. **2006**, 68 (6), 1241-1247.

¹¹ Kimio, S.; Yoshikazu, S.; Hiroshi, W.; Kiyoyuki, Y.; Yoshimasa, H. *Tetrahedron Lett.* **1971**, 29, 2733-2736.

¹² Ishiwata, H.; Shizuri, Y.; Yamada, K. *Phytochemistry*, **1983**, 22 (12), 2839-2841.

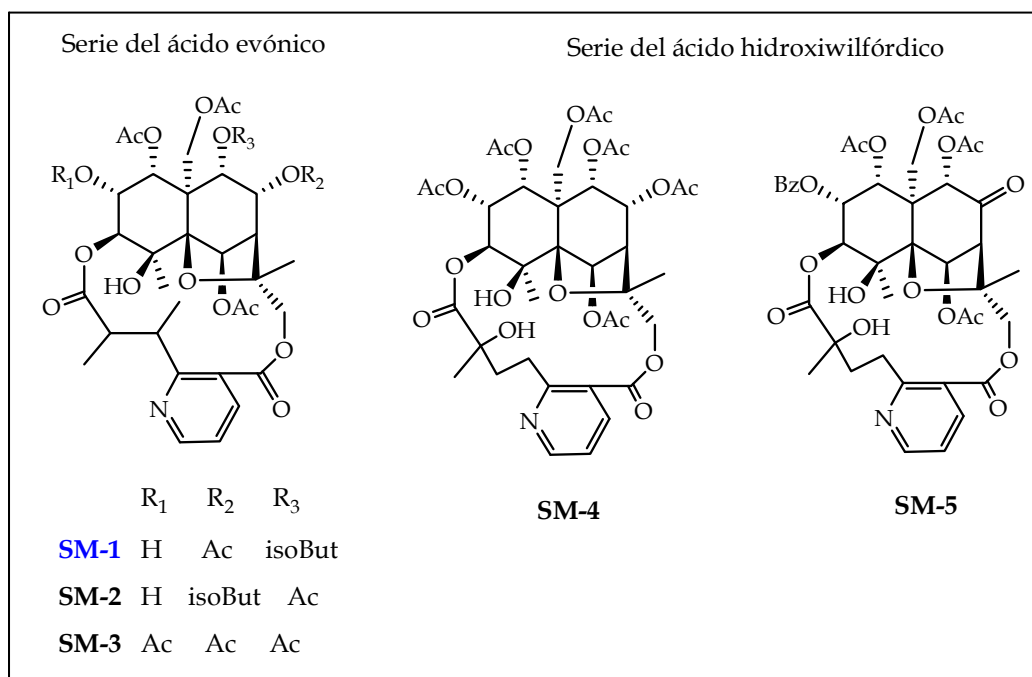
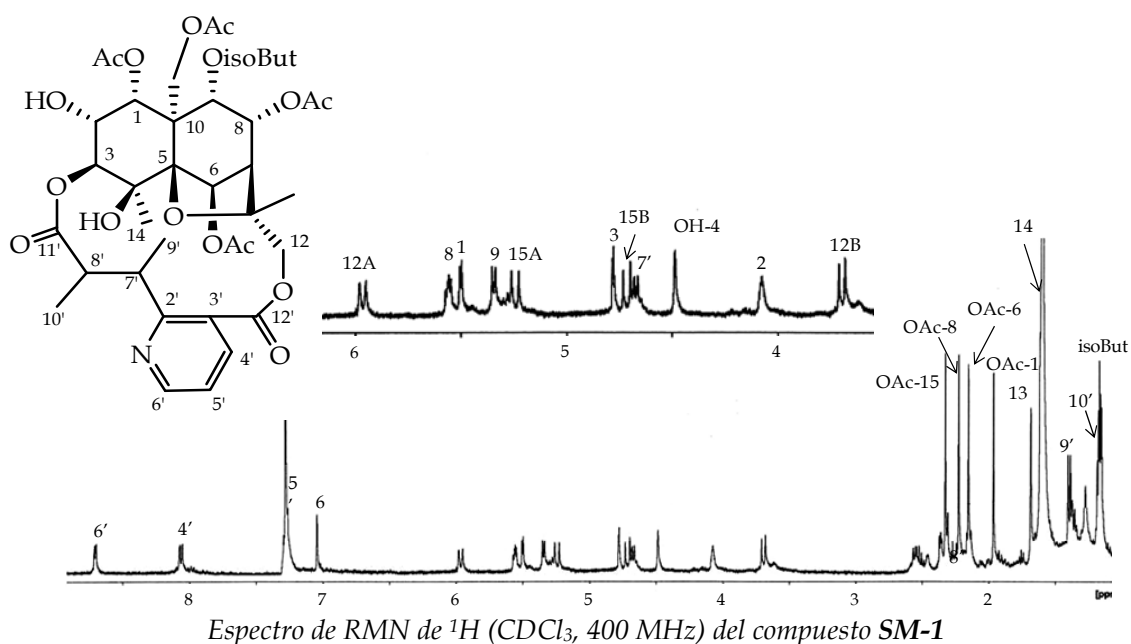


Figura 4.3.26. Sesquiterpenos macrocíclicos dihidro- β -agarofuranos aislados de las hojas de *M. jelskii*. En azul se muestra el compuesto nuevo en la bibliografía química.

Sesquiterpeno macrocíclico SM-1

Este producto presentó una fórmula molecular de $C_{38}H_{49}NO_{17}$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución (ESI). En su espectro de IR se observaron bandas de absorción para grupos hidroxilo y éster (3494 y 1745 cm^{-1} , respectivamente).

Su espectro de RMN de 1H (tabla 4.3.8), presentó señales características de cuatro grupos acetato ($1,94$, $2,13$, $2,20$ y $2,29$ δ_H), un grupo isobutirato con señales a $1,16$ ($3H$, d, $J = 6,8$ Hz), $1,17$ ($3H$, d, $J = 6,9$ Hz) y $2,54$ ($1H$, m). Además, se observaron señales para siete protones metínicos a $2,35$ (s), $4,10$ (sa), $4,76$ (d, $J = 2,6$ Hz), $5,32$ (d, $J = 6,9$ Hz), $5,48$ (d, $J = 3,6$ Hz), $5,54$ (m) y $7,0$ (s) y dos grupos metilénicos a $3,67$ y $5,94$ ($2H$, d_{AX} , $J = 11,0$ Hz) y a $4,69$, $5,22$ ($2H$, d_{AB} , $J = 13,9$ Hz). La presencia de un ácido evónico se determinó por las señales en el espectro de RMN de 1H de tres protones aromáticos, correspondientes a una unidad de piridina 2,3-disustituída a $7,25$ δ_H ($1H$, m, H-5'), $8,04$ δ_H ($1H$, dd, $J = 1,8, 7,8$ Hz, H-4') y $8,69$ δ_H ($1H$, dd, $J = 1,8, 4,4$ Hz, H-6'), dos protones metínicos a $2,52$ δ_H (m, H-8') y $4,66$ δ_H (m, H-7') y dos metilos dobles a $1,18$ δ_H (d, $J = 6,8$ Hz, Me-10') y $1,38$ δ_H (d, $J = 6,9$ Hz, Me-9').



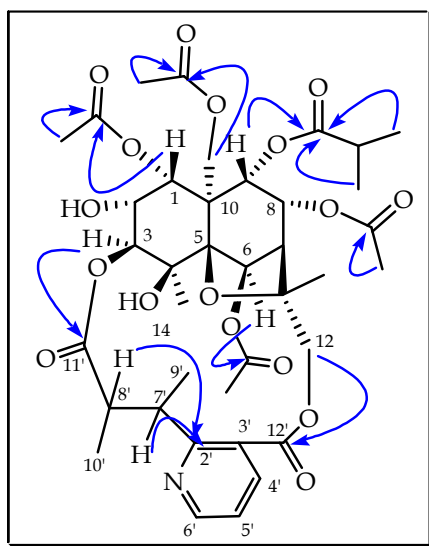
Estos datos fueron corroborados en su espectro de RMN de ^{13}C , en el cual además de cinco carbonos aromáticos de una unidad piridínica 2,3-disustituida a 120,9 δ_{C} (d, C-5'), 125,2 δ_{C} (s, C-3'), 137,9 δ_{C} (d, C-4'), 151,6 δ_{C} (d, C-6') y 164,5 δ_{C} (s, C-2'), se observaron dos carbonos metínicos a 36,3 δ_{C} (C-7') y 44,8 δ_{C} (C-8') y dos carbonos metílicos a 9,0 δ_{C} (C-10') y 11,7 δ_{C} (C-9').

Estos datos indican que el compuesto **SM-1** es un alcaloide sesquiterpénico macrocíclico con esqueleto de dihidro- β -agarofurano, que presenta cuatro grupos acetato, un isobutirato, un alcohol secundario y un diácido del tipo evónico.

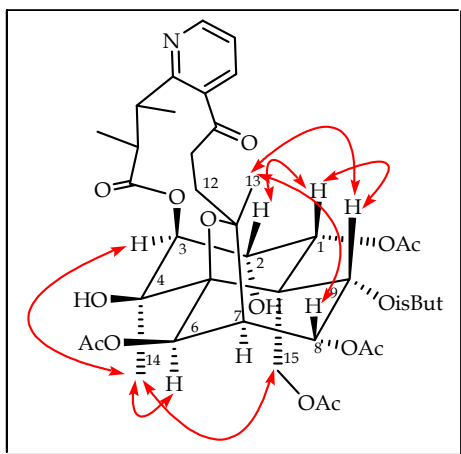
La regiosustitución de los grupos ésteres sobre el esqueleto base fue resuelta por medio de un experimento HMBC. Los cuatro carbonos carboxílicos de los grupo acetato a 168,9, 169,6 (2 x s) y 169,7 δ_{C} , se correlacionaron con sus metilos singuletes a 1,94, 2,13, 2,20 y 2,29 δ_{H} , respectivamente. Estos grupos acetato se situaron sobre C-1, C-6, C-8 y C-15 por las correlaciones observadas entre las señales de sus carboxilos y las señales de sus protones geminales a 5,48 δ_{H} (H-1), 7,0 δ_{H} (H-6), 5,54 (H-8) y 4,69, 5,22 δ_{H} (H-15A y H-15B). La señal a 174,0 δ_{C} fue asignada al carbono carboxílico del grupo isobutirato, basándonos en la correlación de este carbono con las señales de los metilos a 1,16 δ_{H} (d, $J = 6,8$ Hz) y 1,17 δ_{H} (d, $J = 6,9$ Hz) y del protón metínico a 2,54 δ_{H} (m). Dicho grupo se situó sobre C-9 por correlación del carboxilo del grupo isobutirato y la señal del protón a 5,32 δ_{H} (H-9). La señal a 164,5 δ_{C} fue asignada a C-2', basándonos en su correlación con los

protones a 4,66 δ_H (H-7') y 2,52 δ_H (H-8'). Así mismo, la correlación entre las señales del carbono a 173,9 δ_C (C-11') y 167,6 δ_C (C-12') con las señales de los protones a 4,76 δ_H (H-3) y 3,67, 5,94 δ_H (H-12A y H-12B), respectivamente, confirmaron la unión del agrupamiento evónico al esqueleto sesquiterpénico entre los carbonos C-3 y C-12.

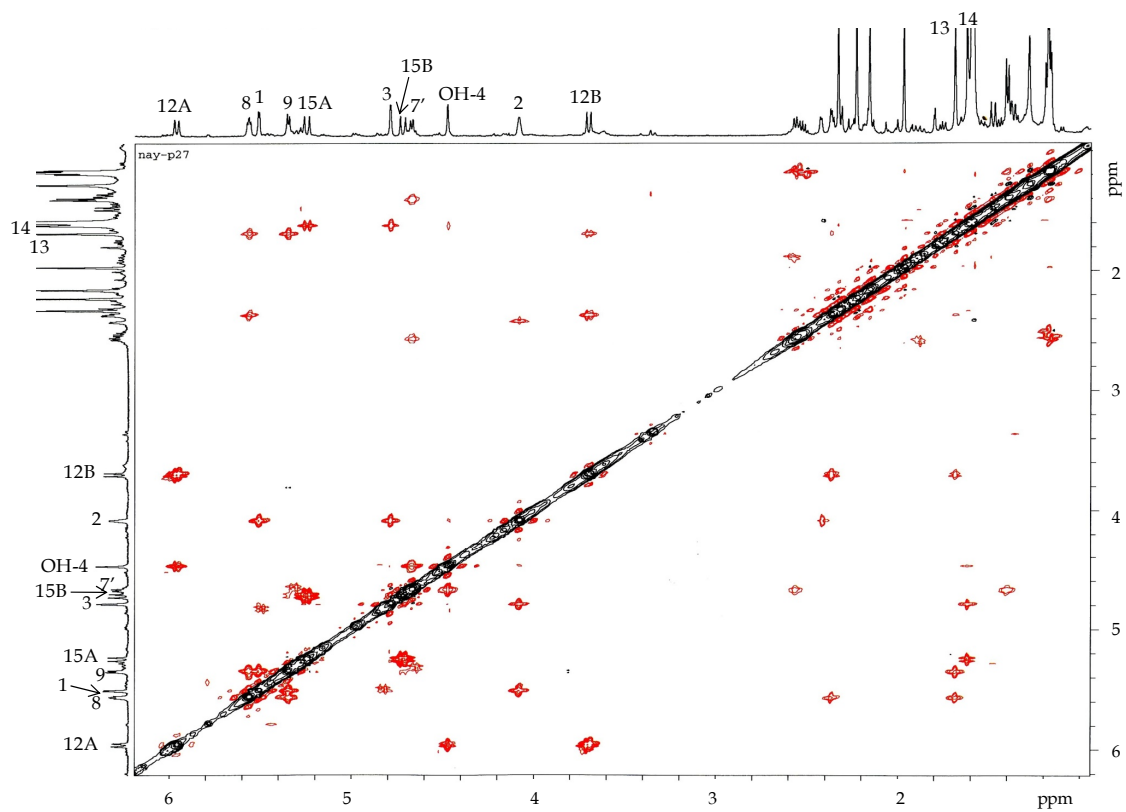
Un cuidadoso estudio de las constantes de acoplamiento y un experimento ROESY, en el que se observaron efectos ROE de H-1 con H-2 y H-9, correlación del Me-13 con H-8 y H-9, así como conectividad del Me-14 con H-3, H-6 y H-15, permitieron determinar la disposición relativa de los grupos ésteres en la molécula como 1 α , 2 α , 6 β , 8 α , 9 α y 15 α . Estos datos y comparación con los publicados para el producto **SM-2**¹⁰ (paniculatina A), nos permitieron establecer la estructura de **SM-1**, que hemos denominado paniculatina C.



Correlaciones observadas en el experimento HMBC del compuesto **SM-1**



Efectos ROE más relevantes observados en el experimento ROESY de SM-1



Ampliación del experimento ROESY de SM-1

Tabla 4.3.8. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de SM-1.

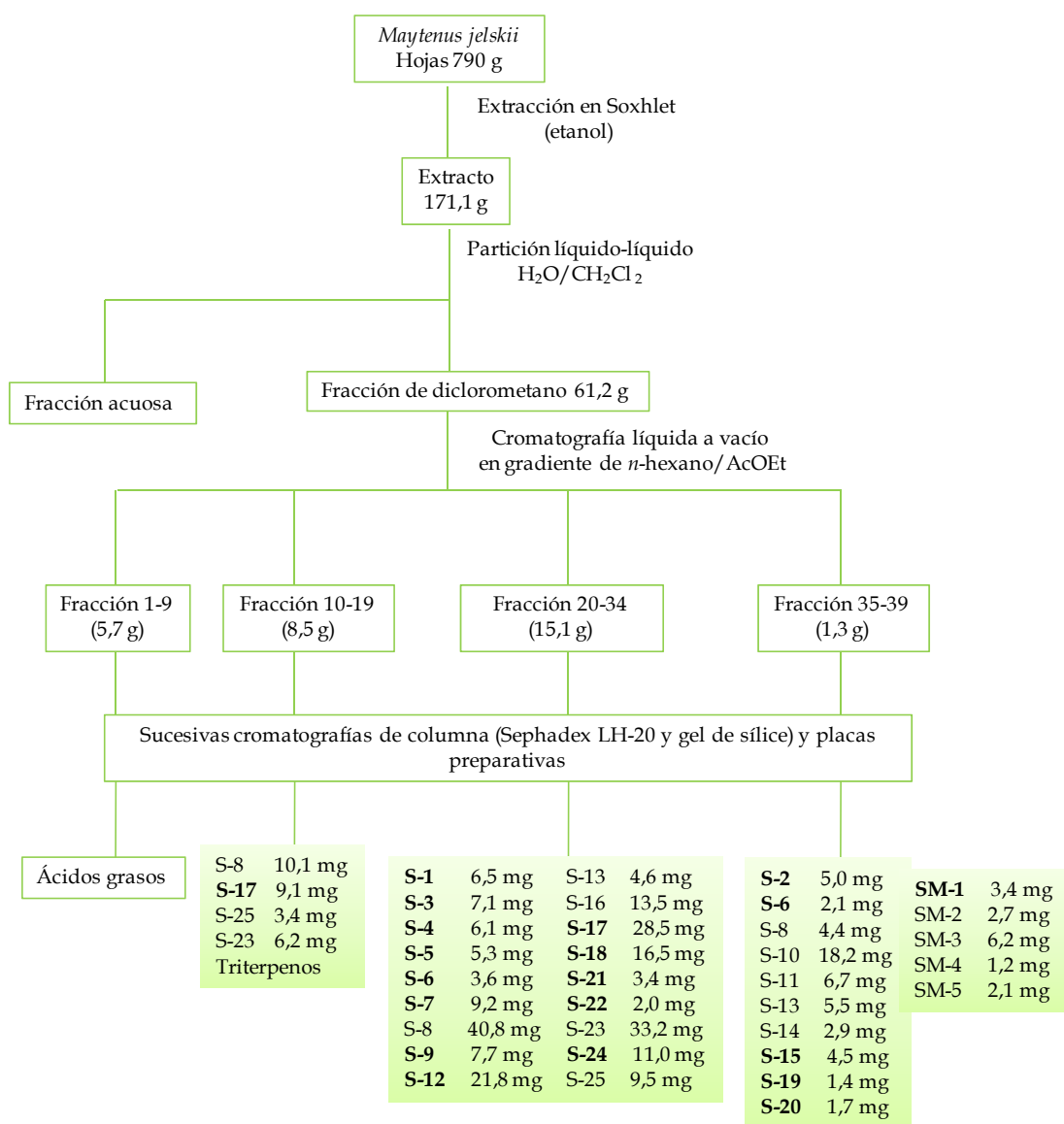
| SM-1 | | |
|----------|--|-----------------------|
| Posición | δ_{H}^a | δ_{C}^b |
| 1 | 5,48 d (3,6) | 75,2 d |
| 2 | 4,10 sa | 69,7 d |
| 3 | 4,76 d (2,6) | 77,9 d |
| 4 | - | 70,3 s |
| 5 | - | 94,1 s |
| 6 | 7,0 s | 73,9 d |
| 7 | 2,35 m | 50,1 d |
| 8 | 5,54 m | 68,8 d |
| 9 | 5,32 d (6,9) | 70,8 d |
| 10 | - | 52,6 s |
| 11 | - | 83,4 s |
| 12 | 3,67 d (11,0) 5,94 d (11,0) | 69,8 t |
| 13 | 1,66 s | 18,3 c |
| 14 | 1,59 s | 23,0 c |
| 15 | 4,69 d _{AM} (13,9) 5,22 d _{AM} (13,9) | 60,3 t |
| 2' | - | 164,5 s |
| 3' | - | 125,2 s |
| 4' | 8,04 dd (1,8, 7,8) | 137,9 d |
| 5' | 7,24 m | 120,9 d |
| 6' | 8,69 dd (1,8, 4,4) | 151,6 d |
| 7' | 4,66 m | 36,3 d |
| 8' | 2,52 m | 44,8 d |
| 9' | 1,38 d (6,9) | 11,7 c |
| 10' | 1,18 d (6,8) | 9,0 c |
| 11' | - | 173,9 s |
| 12' | - | 167,6 s |

^a δ , CDCl_3 , 400 MHz, J en paréntesis en Hz. ^b δ , CDCl_3 , 100 MHz.
Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

4.3.2.2. Parte experimental

4.3.2.2.1. Separación cromatográfica de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de las hojas de *M. jelskii*

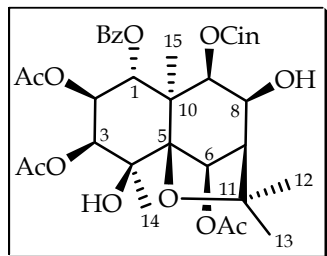
En la separación cromatográfica realizada a la fracción de diclorometano de las hojas de *M. jelskii*, se aislaron 25 sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos y 5 alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos (esquema 4.3.1).



Esquema 4.3.1. Separación cromatográfica de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos y alcaloides sesquiterpénicos aislados de las hojas de *M. jelskii*.

4.3.2.2.2. Datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos de los nuevos sesquiterpenos aislados de las hojas de *M. jelskii*

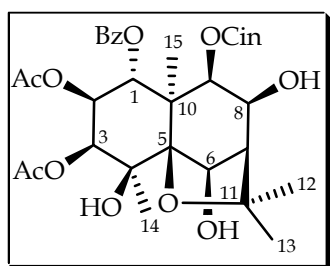
Sesquiterpeno S-1



(1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*R*)-2,3,6-Triacetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-4,8-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (6,5 mg).

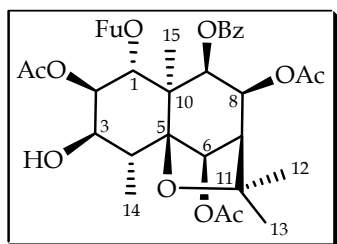
| | |
|---|--|
| [α] _D ²⁰ | +132,8 (c 0,6, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) | 274 (4,2), 216 (3,9) nm. |
| DC λ_{\max} (EtOH) nm | 270,4 ($\Delta\epsilon = +12,6$), 227,2 ($\Delta\epsilon = -11,9$). |
| IR ν_{\max} | 3526, 2960, 2926, 1737, 1638, 1163, 1110, 1028, 758, 712 cm ⁻¹ . |
| RMN ¹ H (δ , CDCl ₃) | 1,49 (3H, s, Me-14); 1,54 (3H, s, Me-12); 1,58 (3H, s, Me-15); 1,68 (3H, s, Me-13); 1,77 (3H, s, OAc-2); 2,15 (3H, s, OAc-6); 2,30 (3H, s, OAc-3); 2,43 (1H, d, $J = 2,8$ Hz, H-7); 3,55 (1H, s, OH-4); 4,55 (1H, dd, $J = 2,8, 6,0$ Hz, H-8); 5,09 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-9); 5,16 (1H, d, $J = 3,0$ Hz, H-3); 5,29 (1H, dd, $J = 3,0, 11,3$ Hz, H-2); 5,40 (1H, s, H-6); 6,25 (1H, d, $J = 11,3$ Hz, H-1); OBz, OCin [6,44 (1H, d, $J = 15,9$ Hz), 7,29 (2H, m), 7,42 (3H, m), 7,48 (2H, m), 7,53 (2H, m), 7,75 (2H, d, $J = 7,1$ Hz)]. |
| RMN ¹³ C (δ , CDCl ₃) | 20,5 (c, Me-15); 21,2 (c, OAc-6); 23,6 (c, Me-14); 26,0 (c, Me-13); 30,4 (c, Me-12); 49,4 (s, C-10); 53,9 (d, C-7); 67,5 (d, C-1); 67,9 (d, C-2); 69,8 (s, C-4); 70,2 (d, C-8); 74,2 (d, C-9); 75,9 (d, C-3); 77,9 (d, C-6); 85,2 (s, C-11); 90,5 (s, C-5); OBz, OCin [117,5 (d), 128,1 (4 x d), 128,6 (2 x d), 129,1 (2 x d), 129,4 (s), 130,2 (d), 132,9 (d), 134,2 (s), 145,9 (d, OCin), 164,7 (s, OBz-1), 167,9 (s, OCin-9)]; OAc [(20,3 c, 170,3 s, OAc-2), (20,8 c, 170,1 s, OAc-3), (21,2 c, 169,9 s, OAc-6)]. |
| EM m/z (%) | 679 [M ⁺ -CH ₃] (8), 661 (7), 634 (2), 619 (1), 557 (1), 531 (14), 504 (2), 429 (1), 321 (2), 253 (2), 165 (3), 131 (100), 105 (68). |
| EMAR m/z | Calculado para C ₃₆ H ₃₉ O ₁₃ [M ⁺ -CH ₃], 679,2391; observado, 679,2381. |

Sesquiterpeno S-2

(1R,2S,3S,4S,5S,6R,7R,8S,9R,10R)-2,3-Diacetoxi-1-benzoiloxi-9-trans-cinamoiloxi-4,6,8-trihidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (5,0 mg).

- [α]_D²⁰** + 63,5 (c 0,4, CHCl₃).
- UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)** 216 (4,5), 274 (4,2) nm.
- DC λ_{\max} (EtOH) nm** 269,2 ($\Delta\epsilon = +14,5$), 226,0 ($\Delta\epsilon = -13,6$).
- IR ν_{\max}** 3470, 2957, 2925, 1736, 1276, 1241, 1163, 1111, 1026, 758, 712 cm⁻¹.
- RMN ¹H (δ , CDCl₃)** 1,57 (3H, s, Me-15); 1,60 (3H, s, Me-12); 1,72 (3H, s, Me-13); 1,79 (3H, s, OAc-2); 1,80 (3H, s, Me-14); 2,33 (3H, s, OAc-3); 2,51 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-7); 4,00 (1H, s, OH-4); 4,39 (1H, dd, $J = 2,5, 6,2$ Hz, H-8); 4,42 (1H, s, H-6); 5,07 (1H, d, $J = 6,2$ Hz, H-9); 5,23 (1H, d, $J = 3,2$ Hz, H-3); 5,34 (1H, dd, $J = 3,2, 11,2$ Hz, H-2); 6,26 (1H, d, $J = 11,2$ Hz, H-1); OBz, OCin [6,47 (1H, d, $J = 15,9$ Hz); 7,32 (3H, m), 7,44 (2H, m), 7,50 (2H, m), 7,56 (2H, m), 7,75 (2H, d, $J = 7,4$ Hz)].
- RMN ¹³C (δ , CDCl₃)** 20,7 (c, C-15); 23,9 (c, C-14); 26,7 (c, C-13); 30,9 (c, C-12); 48,4 (s, C-10); 55,0 (d, C-7); 67,6 (d, C-1); 67,9 (d, C-2); 70,7 (d, C-8); 71,2 (s, C-4); 74,4 (d, C-9); 74,8 (d, C-3); 78,5 (d, C-6); 85,2 (s, C-11); 90,6 (s, C-5); OBz, OCin [117,4 (d), 128,1 (4 x d), 128,6 (2 x d), 129,1 (2 x d), 129,3 (s), 130,3 (s), 132,9 (d), 134,1 (d), 145,9 (d), 164,7 (s, OBz-1), 168,0 (s, OCin-9)]; OAc [(20,3 c, 170,3 s, OAc-2), (20,9 c, 170,1 s, OAc-3)].
- EM m/z (%)** 637 [$M^+ - CH_3$] (10), 619 (28), 611 (3), 577 (2), 489 (6), 321 (1), 279 (1), 131 (100), 105 (68).
- EMAR m/z** Calculado para C₃₄H₃₇O₁₂ [$M^+ - CH_3$], 637,2285; observado, 637,2281.

Sesquiterpeno S-3

(1R,2R,3R,4R,5S,6R,7R,8S,9R,10R)-2,6,8-Triacetoxi-9-benzoiloxi-1-(3-furoiloxi)-3-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (7,1 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ +13,1 (c 5,2, CHCl₃).

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 274,8 (3,5), 202 (4,3) nm.

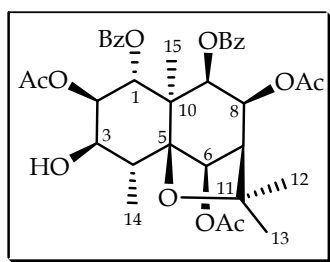
IR ν_{\max} 3481, 2930, 2857, 1749, 1718, 1277, 1180, 1098, 1045, 759, 714 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,19 (3H, d, J = 7,6 Hz, Me-14); 1,51 (3H, s, Me-12); 1,57 (3H, s, Me-15); 1,62 (3H, s, Me-13); 1,82 (3H, s, OAc-8); 1,90 (3H, s, OAc-2); 2,16 (3H, s, OAc-6); 2,49 (1H, d, J = 2,6 Hz, H-7); 2,67 (1H, c, J = 7,6 Hz, H-4); 3,99 (1H, sa, H-3); 5,32 (1H, dd, J = 2,7, 11,1 Hz, H-2); 5,33 (1H, d, J = 6,2 Hz, H-9); 5,45 (1H, s, H-6); 5,58 (1H, dd, J = 2,6, 6,2 Hz, H-8); 6,27 (1H, d, J = 11,1 Hz, H-1); OFu [6,38 (1H, s), 7,29 (1H, s), 7,70 (1H, s)]; OBz [7,46 (2H, m), 7,59 (1H, m), 8,02 (2H, d, J = 7,6 Hz)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 15,6 (c, Me-14); 19,6 (c, Me-15); 26,4 (c, Me-13); 30,8 (c, Me-12); 40,8 (d, C-4); 51,0 (s, C-10); 52,3 (d, C-7); 67,7 (d, C-1); 68,3 (d, C-8); 70,6 (d, C-2); 71,7 (d, C-9); 72,9 (d, C-3); 77,0 (d, C-6); 85,5 (s, C-11); 90,7 (s, C-5); OFu [109,2 (d), 118,3 (s), 143,3 (d), 147,3 (d), 160,4 (s, OFu-1)]; OBz [127,9 (2 x d), 129,0 (s), 130,1 (2 x d), 132,9 (d), 165,4 (s, OBz-9)]; OAc [(20,3 c, 168,8 s, OAc-8), (20,6 c, 170,6 s, OAc-2), (20,9 c, 169,2 s, OAc-6)].

EM *m/z* (%) 627 [M⁺ - CH₃] (4), 515 (15), 231 (3), 189 (7), 105 (100), 95 (11).

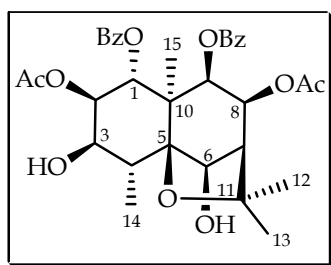
EMAR *m/z* Calculado para C₃₂H₃₅O₁₃ [M⁺ - CH₃], 627,2078; observado, 627,2089.

Sesquiterpeno S-4

(1R,2R,3R,4R,5S,6R,7R,8S,9R,10R)-2,6,8-Triacetoxi-1,9-dibenzoiloxi-3-hidroxi-dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (6,1 mg).

| | |
|---|--|
| $[\alpha]_D^{20}$ | + 31,8 (c 1,0, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) | 230 (4,4) nm. |
| DC λ_{\max} (EtOH) nm | 235,2 ($\Delta\epsilon = +21,8$), 219,8 ($\Delta\epsilon = -5,7$) |
| IR ν_{\max} | 3477, 3016, 2928, 1738, 1369, 1278, 1235, 1106, 1026, 756, 711 cm ⁻¹ . |
| RMN ¹ H (δ , CDCl ₃) | 1,21 (3H, d, $J = 7,5$ Hz, Me-14); 1,53 (3H, s, Me-12); 1,65 (6H, s, Me-13, Me-15); 1,86 (3H, s, OAc-8); 1,88 (3H, s, OAc-2); 2,19 (3H, s, OAc-6); 2,51 (1H, d, $J = 2,7$ Hz, H-7); 2,73 (1H, c, $J = 7,5$ Hz, H-4); 4,03 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, H-3); 5,36 (1H, d, $J = 6,2$ Hz, H-9); 5,41 (1H, dd, $J = 2,3, 11,1$ Hz, H-2); 5,49 (1H, s, H-6); 5,60 (1H, dd, $J = 2,7, 6,2$ Hz, H-8); 6,39 (1H, d, $J = 11,1$ Hz, H-1); 2 x OBz [7,30 (3H, m), 7,48 (3H, m), 7,60 (2H, d, $J = 7,3$ Hz), 8,03 (2H, d, $J = 7,8$ Hz)]. |
| RMN ¹³ C (δ , CDCl ₃) | 15,7 (c, Me-14); 19,6 (c, Me-15); 26,5 (c, Me-13); 30,9 (c, Me-12); 40,9 (d, C-4); 51,1 (d, C-7); 52,3 (s, C-10); 68,0 (d, C-1); 68,3 (d, C-8); 70,7 (d, C-2); 71,3 (d, C-9); 73,0 (d, C-3); 76,7 (d, C-6); 85,6 (s, C-11); 90,7 (s, C-5); 2 x OBz [127,8 (2 x d), 127,9 (2 x d), 129,0 (s), 129,1 (2 x d), 129,4 (s), 130,2 (2 x d), 132,6 (d), 132,9 (d), 163,9 (s, OBz-1), 165,3 (s, OBz-9)]; OAc [(20,3 c, 168,8 (s, OAc-8), (20,6 c, 170,6 s, OAc-2), (20,9 c, 169,2 s, OAc-6)]. |
| EM m/z (%) | 637 [M ⁺ -CH ₃] (4), 577 (2), 515 (2), 473 (2), 428 (1), 351 (1), 289 (1), 247 (1), 195 (3), 153 (5), 105 (100). |
| EMAR m/z | Calculado para C ₃₄ H ₃₇ O ₁₂ [M ⁺ -CH ₃], 637,2285; observado, 637,2267. |

Sesquiterpeno S-5

(1R,2R,3R,4R,5S,6R,7S,8S,9R,10R)-2,8-Diacetoxi-1,9-dibenzoiloxi-3,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (5,3 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 48,9 (*c* 0,6, CHCl₃).

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 230 (4,5) nm.

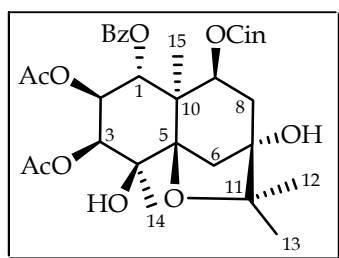
IR ν_{\max} 3463, 2957, 2928, 1734, 1640, 1369, 1280, 1242, 1112, 757, 711 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ , CDCl₃) 1,36 (3H, d, *J* = 7,6 Hz, Me-14); 1,59 (3H, s, Me-15); 1,60 (6H, s, Me-12, M-13); 1,83 (3H, s, OAc-8); 1,85 (3H, s, OAc-2); 2,38 (1H, d, *J* = 2,7 Hz, H-7); 2,73 (1H, c, *J* = 7,6 Hz, H-4); 4,00 (1H, sa, H-3); 4,56 (1H, s, H-6); 5,26 (1H, d, *J* = 6,3 Hz, H-9); 5,39 (1H, dd, *J* = 2,6, 11,0 Hz, H-2); 5,40 (1H, dd, *J* = 2,7, 6,3 Hz, H-8); 6,35 (1H, d, *J* = 11,0 Hz, H-1); 2 x OBz [7,30 (3H, m), 7,45 (3H, m), 7,57 (2H, d, *J* = 8,1 Hz), 8,01 (2H, d, *J* = 7,9 Hz)].

RMN ¹³C (δ , CDCl₃) 16,3 (c, C-14); 19,8 (c, C-15); 26,6 (c, C-13); 30,9 (c, C-12); 40,6 (d, C-4); 50,9 (s, C-10); 54,1 (d, C-7); 68,0 (d, C-1); 68,7 (d, C-8); 70,8 (d, C-2); 72,0 (d, C-9); 73,2 (d, C-3); 76,1 (d, C-6); 85,5 (s, C-11); 92,1 (s, C-5); 2 x OBz [127,8 (2 x d), 127,9 (2 x d), 129,0 (2 x d), 129,2 (s), 129,6 (s), 130,2 (2 x d), 132,5 (d), 132,8 (d), 164,3 (s, OBz-1), 165,6 (s, OBz-9)]; OAc [20,7 c, 169,2 s, OAc-8), (21,0 c, 170,6 s, OAc-2)].

EM *m/z* (%) 610 [M⁺] (1), 595 (7), 578 (2), 535 (2), 473 (2), 428 (2), 413 (2), 291 (1), 247 (2), 105 (100).

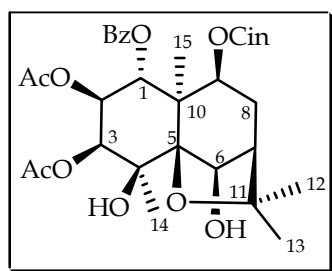
EMAR *m/z* Calculado para C₃₃H₃₈O₁₁ [M⁺], 610,2414; observado, 610,2422.

Sesquiterpeno S-6

(1R,2S,3S,4S,5R,7R,9S,10R)-2,3-Diacetoxy-1-benzoiloxi-9-trans-cinamoiloxi-4,7-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (5,7 mg).

- [α]_D²⁰** + 91,4 (c 0,4, CHCl₃).
- UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)** 274 (4,3), 223 (4,2) nm.
- DC λ_{\max} (EtOH) nm** 269,2 ($\Delta\epsilon = +14,5$), 227,0 ($\Delta\epsilon = -14,4$).
- IR ν_{\max}** 3502, 2924, 2854, 1735, 1276, 1243, 1164, 1096, 758, 713 cm⁻¹.
- RMN ¹H** 1,35 (3H, s, Me-13); 1,37 (3H, s, Me-12); 1,46 (3H, s, Me-14); 1,48 (3H, s, Me-15); 1,80 (3H, s, OAc-2); 1,89 (1H, da, $J = 11,4$ Hz, H-6 α); 2,27 (2H, m, H-8); 2,30 (3H, s, OAc-3); 2,58 (1H, dd, $J = 2,2, 11,4$ Hz, H-6 β); 3,33 (1H, s, OH-4); 4,98 (1H, d, $J = 6,3$ Hz, H-9); 5,27 (1H, d, $J = 3,0$ Hz, H-3); 5,31 (1H, dd, $J = 3,0, 11,1$ Hz, H-2); 6,26 (1H, d, $J = 11,1$ Hz, H-1); OBz, OCin [6,41 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), 7,33 (2H, m), 7,42 (3H, m), 7,50 (2H, m), 7,56 (2H, m), 7,85 (2H, d, $J = 7,7$ Hz)].
- RMN ¹³C** 19,5 (c, C-15), 21,6 (c, C-12); 24,0 (c, C-14); 26,4 (c, C-13); 37,6 (t, C-6); 38,1 (t, C-8); 47,1 (s, C-10); 67,5 (d, C-1); 68,4 (d, C-2); 69,9 (s, C-4); 73,7 (d, C-9); 75,1 (d, C-3); 77,6 (s, C-7); 82,5 (s, C-11); 88,1 (s, C-5); OBz, OCin [117,9 (d), 128,0 (2 x d), 128,1 (2 x d), 128,6 (2 x d), 129,1 (2 x d), 129,6 (s), 130,0 (d), 132,8 (d), 134,3 (s), 145,1 (d, OCin), 164,8 (s, OBz-1), 165,8 (s, OCin-9)]; OAc [(20,3 c, 170,1 s, OAc-2), (20,9 c, 170,3 s, OAc-3)].
- EM m/z (%)** 636 [M⁺] (1), 621 (14), 594 (1), 576 (1), 474 (1), 473 (8), 412 (2), 369 (2), 310 (4), 248 (2), 230 (8), 206 (12), 131 (82), 105 (100).
- EMAR m/z** Calculado para C₃₅H₄₀O₁₁ [M⁺], 636,2571; observado, 636,2585.

Sesquiterpeno S-7

(1R,2S,3S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-2,3-Diacetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-4,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (9,2 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 111,5 (*c* 0,9, CHCl₃).

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 280 (4,3), 224 (4,4) nm.

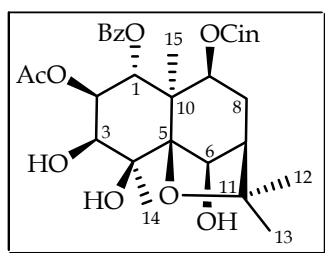
IR ν_{\max} 3501, 3474, 2963, 2931, 1749, 1733, 1716, 1260, 1114, 759, 715 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ , CDCl₃) 1,55 (3H, s, Me-13); 1,56 (3H, s, Me-15); 1,60 (3H, s, Me-12); 1,81 (3H, s, OAc-2); 1,82 (3H, s, Me-14); 2,20 (3H, m, H-7, H-8); 2,32 (3H, s, OAc-3); 3,99 (1H, sa, OH-4); 4,51 (1H, s, H-6); 4,54 (1H, sa, OH-6); 4,78 (1H, d, *J* = 6,4 Hz, H-9); 5,24 (1H, d, *J* = 3,1 Hz, H-3); 5,34 (1H, dd, *J* = 3,1, 11,3 Hz, H-2); 6,24 (1H, d, *J* = 11,3 Hz, H-1); OBz, OCin [6,40 (1H, d, *J* = 16,0 Hz), 7,29 (2H, m), 7,55 (2H, m), 7,45 (5H, m), 7,74 (2H, d, *J* = 7,2 Hz)].

RMN ¹³C (δ , CDCl₃) 20,4 (c, C-15); 24,0 (c, C-14); 26,4 (c, C-13); 30,2 (c, C-12); 31,0 (t, C-8); 49,1 (d, C-7); 49,8 (s, C-10); 67,7 (d, C-1); 68,1 (d, C-2); 71,3 (s, C-4); 72,4 (d, C-9); 75,0 (d, C-3); 79,7 (d, C-6); 84,9 (s, C-11); 91,0 (s, C-5); OBz, OCin [117,9 (d), 128,0 (2 x d), 128,1 (2 x d), 128,6 (2 x d), 128,8 (s), 129,1 (2 x d), 129,5 (s), 130,0 (d), 132,8 (d), 134,3 (s), 145,0 (d, OCin-9), 164,8 (s, OBz-1), 165,6 (s, OCin-9)]; OAc [(20,3 c, 170,1 s, OAc-2), (20,9 c, 170,3 s, OAc-3)].

EM *m/z* (%) 636 [M⁺] (1), 621 (3), 603 (19), 561 (2), 488 (2), 481 (1), 473 (7), 428 (1), 356 (2), 306 (1), 264 (3), 131, (100), 105 (81).

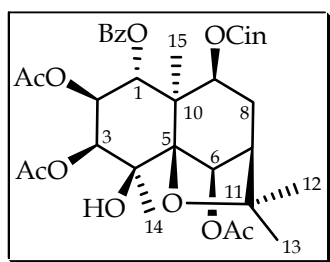
EMAR *m/z* Calculado para C₃₅H₄₀O₁₁ [M⁺], 636,2571; observado, 636,2597.

Sesquiterpeno S-9

(1R,2S,3S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-2-Acetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-3,4,6-trihidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (7,7 mg).

- [α]_D²⁰** + 95,8 (c 0,6, CHCl₃).
- UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)** 223 (4,6), 279 (4,5) nm.
- IR ν_{\max}** 3447, 2956, 2925, 1733, 1637, 1273, 1163, 1111, 756, 713 cm⁻¹.
- RMN ¹H** 1,54 (3H, s, Me-13); 1,59 (1H, s, Me-15); 1,61 (3H, s, Me-12); 1,77 (3H, s, Me-14); 1,91 (3H, s, OAc-2); 2,19 (3H, m, H-7, H-8); 3,79 (1H, d, *J* = 2,3 Hz, H-3); 4,20 (1H, s, OH-4); 4,51 (1H, d, *J* = 5,5 Hz, H-6); 4,76 (1H, d, *J* = 6,4 Hz, H-9); 5,15 (1H, d, *J* = 5,5 Hz, OH-6); 5,33 (1H, dd, *J* = 2,3, 11,4 Hz, H-2); 6,18 (1H, d, *J* = 11,4 Hz, H-1); OBz, OCin [6,45 (1H, d, *J* = 16,0 Hz), 7,30 (2H, m), 7,41 (5H, m), 7,54 (2H, m), 7,75 (2H, d, *J* = 7,1 Hz)].
- RMN ¹³C** 20,8 (c, C-15); 23,7 (c, C-14); 26,3 (c, C-13); 29,8 (c, C-12); 31,4 (t, C-8); 48,9 (d, C-7); 50,4 (s, C-10); 67,8 (d, C-1); 70,2 (d, C-2); 72,7 (s, d; C-4, C-9); 76,8 (d, C-3); 80,0 (d, C-6); 86,4 (s, C-11); 92,7 (s, C-5); OBz, OCin [118,0 (d), 127,5 (4 x d), 128,0 (2 x d), 128,6 (2 x d), 129,5 (s), 130,1 (d), 132,9 (d), 134,3 (s), 144,9 (d, OCin), 164,7 (s, OBz-1), 165,6 (s, OCin-9)]; OAc [20,5 c, 170,2 s, OAc-2)].
- EM *m/z* (%)** 594 [M⁺] (1), 561 (5), 534 (1), 519 (1), 428 (2), 412 (3), 314 (5), 264 (3), 131 (100), 105 (66).
- EMAR *m/z*** Calculado para C₃₃H₃₈O₁₀ [M⁺] 594,2465; observado, 594,2458.

Sesquiterpeno S-10

(1R,2S,3S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-2,3,6-Triacetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (18,2 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 131,7 (c 0,6, CHCl₃).

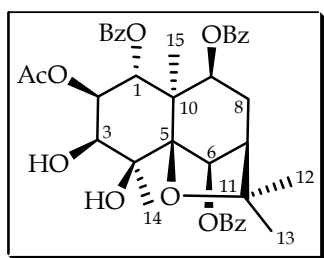
IR ν_{\max} 3499, 1739, 1652, 1350, 1262, 1219, 1095, 710 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,51 (6H, s, Me-12, Me-14); 1,56 (3H, s, Me-14); 1,58 (3H, s, Me-15); 1,78 (3H, s, OAc-2); 2,15 (3H, s, OAc-6); 2,31 (3H, s, OAc-3); 2,37 (2H, m, H-8); 3,57 (1H, s, OH-4); 4,81 (1H, d, J = 6,3 Hz, H-9); 5,18 (1H, d, J = 3,0 Hz, H-3); 5,30 (1H, dd, J = 11,3, 3,0 Hz, H-2); 5,52 (1H, s, H-6); 6,25 (1H, d, J = 11,3 Hz, H-1); OBz, OCin [6,38 (1H, d, J = 16,0 Hz), 7,27-7,57 (8H, m), 7,43 (1H, d, J = 16,0 Hz), 7,75 (2H, m)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 21,1 (c, Me-15); 24,0 (c, Me-14); 26,0 (c, Me-13); 29,8 (c, Me-12); 31,2 (t, C-8); 48,3 (d, C-7); 51,1 (s, C-10); 67,8 (d, C-1); 68,3 (d, C-2); 70,1 (s, C-4); 72,4 (d, C-9); 77,2 (d, C-3); 78,8 (d, C-6); 85,0 (s, C-11); 91,1 (s, C-5); OBz, OCin [118,4 (d), 128,2 (2 x d), 128,3 (2 x d), 128,6 (2 x d), 129,2 (2 x d), 129,6 (s), 130,0 (d), 132,8 (d), 134,3 (s), 145,3 (d), 165,0 (OBz-1), 165,9 (OCin-9)]; OAc [20,5 c, 21,1 c, 21,1 c, 170,3 s, OAc-2, OAc-3, OAc-6)].

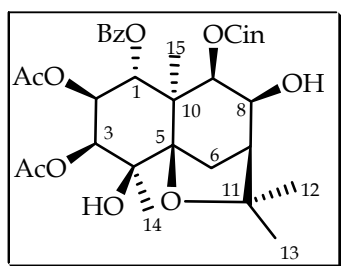
EM m/z (%) 678 [M⁺] (1), 663 (4), 636 (2), 618 (7), 576 (12), 558 (22), 530 (3), 515 (38), 488 (4), 470 (4), 428 (12), 410 (6), 361 (7), 323 (9), 264 (12), 246 (12), 209 (20), 149 (14), 131 (100), 105 (100), 43 (49).

EMAR m/z Calculado para C₃₇H₄₂O₁₂ [M⁺], 678,2609; observado, 678,2622.

Sesquiterpeno S-12**(1R,2S,3S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-2-Acetoxy-1,6,9-tribenzoiloxi-3,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano**

Descripción: sólido amorfo (21,8 mg).

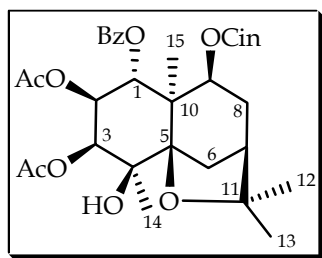
- [α]_D²⁰** + 57,0 (*c* 2,2, CHCl₃).
- UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)** 230 (4,5) nm.
- DC λ_{\max} (EtOH) nm** 237,0 ($\Delta\epsilon = +18,2$), 219,8 ($\Delta\epsilon = -5,1$).
- IR ν_{\max}** 3526, 2926, 2855, 1732, 1715, 1277, 1111, 1025, 757, 710 cm⁻¹.
- RMN ¹H** 1,53 (6H, s, Me-13, Me-14); 1,60 (3H, s, Me-12); 1,67 (3H, s, Me-15);
(δ , CDCl₃) 1,89 (3H, s, OAc-2); 2,25 (1H, dd, *J* = 2,5, 16,1 Hz, H-8 β); 2,34 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, H-7); 2,55 (1H, ddd, *J* = 2,5, 6,5, 16,1 Hz, H-8 α); 3,81 (1H, d, *J* = 2,6 Hz, H-3); 3,92 (1H, s, OH-4); 5,11 (1H, d, *J* = 6,5 Hz, H-9); 5,34 (1H, dd, *J* = 2,6, 11,3 Hz, H-2); 5,76 (1H, s, H-6); 6,29 (1H, d, *J* = 11,3 Hz, H-1); 3 x OBz [7,28 (2H, m), 7,44 (5H, m), 7,55 (4H, m), 7,96 (2H, *J* = 7,2 Hz), 8,25 (2H, d, *J* = 7,1 Hz)].
- RMN ¹³C** 20,8 (c, Me-15); 24,0 (c, Me-14); 25,9 (c, Me-13); 30,0 (c, C-12); 31,6 (t, C-8); 48,1 (d, C-7); 51,7 (s, C-10); 67,7 (d, C-1); 70,3 (d, C-2); 71,4 (s, C-4); 72,9 (d, C-9); 77,9 (d, C-3); 80,7 (d, C-6); 86,3 (s, C-11); 92,5 (s, C-5); 3 x OBz [128,0 (2 x d), 128,2 (2 x d), 128,7 (2 x d), 129,2 (2 x d), 129,4 (s), 129,5 (s), 129,6 (s), 130,2 (2 x d), 130,3 (2 x d), 132,9 (d), 133,1 (d), 133,5 (d), 164,6 (s, OBz-1), 165,3 (s, OBz-9), 166,1 (s, OBz-6)]; OAc (23,9 c, 170,5 s, OAc-2).
- EM *m/z* (%)** 657 [M⁺-CH₃] (1), 639 (2), 612 (2), 532 (1), 490 (2), 264 (1), 105 (100).
- EMAR *m/z*** Calculado para C₃₇H₃₇O₁₁ [M⁺-CH₃], 657,2336; observado, 657,2321.

Sesquiterpeno S-15

(1R,2S,3S,4S,5R,7S,8S,9R,10R)-2,3-Tiacetoxi-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-4,8-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (4,5 mg).

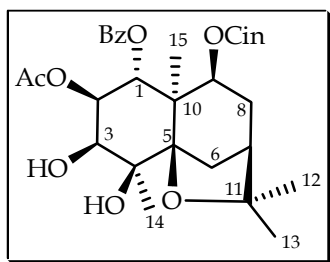
- [α]_D²⁰** + 116,1 (*c* 0,4, CHCl₃).
- UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)** 274 (4,4), 223 (4,2) nm.
- DC λ_{\max} (EtOH) nm** 269,8 ($\Delta\epsilon = +15,1$), 224,4 ($\Delta\epsilon = -12,1$).
- IR ν_{\max}** 3521, 2961, 2928, 1737, 1278, 1244, 1026, 757, 711 cm⁻¹.
- RMN ¹H (δ , CDCl₃)** 1,35 (3H, s, Me-12); 1,47 (3H, s, Me-14); 1,51 (3H, s, Me-15); 1,66 (3H, s, Me-13); 1,79 (3H, s, OAc-2); 1,85 (1H, d, *J* = 12,8 Hz, H-6 α); 2,27 (1H, m, H-7); 2,30 (3H, s, OAc-3); 2,51 (1H, dd, *J* = 5,0, 12,8 Hz, H-6 β); 3,36 (1H, s, OH-4); 4,45 (1H, m, H-8); 5,12 (1H, d, *J* = 5,8 Hz, H-9); 5,27 (1H, d, *J* = 3,1 Hz, H-3); 5,31 (1H, dd, *J* = 3,1, 11,2 Hz, H-2); 6,28 (1H, d, *J* = 11,2 Hz, H-1); OBz, OCin [6,49 (1H, d, *J* = 16,0 Hz), 7,33 (2H, m), 7,43 (3H, m), 7,52 (2H, m), 7,60 (2H, m), 7,78 (2H, d, *J* = 7,2 Hz)].
- RMN ¹³C (δ , CDCl₃)** 20,0 (*c*, C-15); 23,9 (*c*, C-14); 24,7 (*c*, C-13); 31,0 (*c*, C-12); 32,5 (*t*, C-6); 47,9 (*d*, C-7); 48,2 (*s*, C-10); 67,7 (*d*, C-1); 68,4 (*d*, C-2); 69,5 (*s*, C-4); 71,2 (*d*, C-8); 74,8 (*d*, C-9); 75,1 (*d*, C-3); 84,0 (*s*, C-11); 88,9 (*s*, C-5); OBz, OCin [117,7 (*d*), 127,7 (*s*), 128,0 (4 x *d*), 128,6 (2 x *d*), 129,1 (2 x *d*), 130,1 (*d*), 133,0 (*d*), 134,3 (*s*), 145,7 (*d*), 164,8 (*s*, OBz-1), 168,3 (*s*, OCin-9)]; OAc [(20,3 *c*, 170,1 *s*, OAc-2), (20,9 *c*, 170,3 *s*, OAc-3)].
- EM *m/z* (%)** 621 [M⁺-CH₃] (14), 595 (13), 577 (2), 473 (17), 413 (1), 249 (2), 195 (12), 131 (91), 105 (100).
- EMAR *m/z*** Calculado para C₃₄H₃₇O₁₁ [M⁺-CH₃], 621,2336; observado, 621,2307.

Sesquiterpeno S-17

(1R,2S,3S,4S,5R,7R,9S,10R)-2,3-Diacetoxi-1-benzoiloxi-9-trans-cinamoiloxi-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (37,6 mg).

- [α]_D²⁰** + 42,4 (c 3,7, CHCl₃).
- UV (EtOH) λ_{max} (log ε)** 274 (4,2), 223 (4,3) nm.
- DC λ_{max} (EtOH) nm** 269,8 (Δε = +16,8), 227,4 (Δε = -15,2).
- IR ν_{max}** 3524, 2960, 2926, 1746, 1731, 1714, 1636, 1140, 1024, 756, 712 cm⁻¹.
- RMN ¹H (δ, CDCl₃)** 1,31 (3H, s, Me-12); 1,46 (9H, s, Me-13, Me-14, Me-15); 1,77 (3H, s, OAc-2); 1,86 (1H, d, J = 12,2 Hz, H-6α); 2,04 (1H, m, H-7); 2,12 (2H, m, H-8); 2,28 (3H, s, OAc-3); 2,40 (1H, dd, J = 3,8, 12,2 Hz, H-6β); 3,39 (1H, s, OH-4); 4,82 (1H, d, J = 5,0 Hz, H-9); 5,26 (1H, d, J = 2,8 Hz, H-3); 5,29 (1H, dd, J = 2,8, 11,0 Hz, H-2); 6,24 (1H, d, J = 11,0 Hz, H-1); OBz, OCin [6,40 (1H, d, J = 16,0 Hz), 7,30 (2H, m), 7,43 (4H, m), 7,48 (3H, m), 7,75 (2H, d, J = 7,1 Hz)].
- RMN ¹³C (δ, CDCl₃)** 19,7 (c, Me-15); 24,0 (c, Me-13, Me-14); 29,8 (c, Me-12); 30,3 (t, C-8); 32,5 (t, C-6); 42,4 (d, C-7); 47,5 (s, C-10); 67,8 (d, C-1); 68,6 (d, C-2); 69,7 (s, C-4); 73,0 (d, C-9); 75,3 (d, C-3); 83,7 (s, C-11); 89,5 (s, C-5); OBz, OCin [118,2 (d), 127,9 (2 x d), 128,0 (2 x d), 128,6 (2 x d), 129,1 (2 x d), 129,7 (s), 129,9 (d), 132,7 (d), 134,4 (s), 144,5 (d), 164,9 (s, OBz-1), 165,9 (s, OCin-9)]; OAc [(20,3 c, 170,4 (s, OAc-3), (20,9 c, 170,2 s, OAc-2)].
- EM m/z (%)** 620 [M⁺] (3), 605 (14), 579 (1), 489 (1), 458 (5), 397 (4), 248 (11), 131 (100), 105 (89).
- EMAR m/z** Calculado para C₃₅H₄₀O₁₀ [M⁺], 620,2621; observado, 620,2639.

Sesquiterpeno S-18

(1R,2S,3S,4S,5R,7R,9S,10R)-2-Acetoxy-1-benzoiloxi-9-trans-cinamoiloxi-3,4-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (16,5 mg).

[α]_D²⁰ + 112,7 (c 1,6, CHCl₃).

UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 278 (4,8), 223 (4,9) nm.

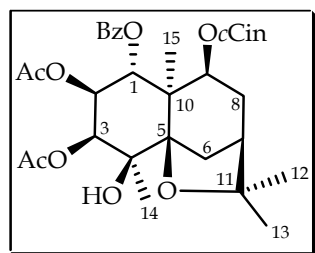
IR ν_{max} 3474, 2931, 1740, 1733, 1716, 1639, 1277, 1241, 1169, 757, 714 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,35 (3H, s, Me-12); 1,42 (3H, s, Me-14); 1,46 (3H, s, Me-13); 1,48 (3H, s, Me-15); 1,85 (1H, d, J = 12,9 Hz, H-6α); 1,88 (3H, s, OAc-2); 2,03 (1H, m, H-7); 2,12 (2H, m, H-8); 2,52 (1H, m, H-6β); 3,38 (1H, s, OH-4); 3,55 (1H, d, J = 11,0 Hz, OH-3); 3,84 (1H, d, J = 2,8, 11,0 Hz, H-3); 4,82 (1H, d, J = 5,2 Hz, H-9); 5,31 (1H, dd, J = 2,8, 11,3 Hz, H-2); 6,22 (1H, d, J = 11,3 Hz, H-1); OBz, OCin [6,49 (1H, d, J = 16,0 Hz), 7,31 (2H, m), 7,45 (5H, m), 7,58 (2H, m), 7,78 (2H, d, J = 7,2 Hz)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 20,2 (c, C-15); 23,8 (c, C-14); 24,2 (c, C-13); 29,8 (c, C-12); 31,0 (t, C-8); 32,1 (t, C-6); 42,2 (d, C-7); 48,1 (s, C-10); 68,1 (d, C-1); 70,7 (d, C-2); 70,9 (s, C-4); 71,0 (d, C-9); 77,0 (d, C-3); 85,3 (s, C-11); 92,0 (s, C-5); OBz, OCin [118,6 (d), 127,7 (4 x d), 128,8 (2 x d), 129,3 (2 x d), 129,8 (s), 130,2 (d), 132,9 (d), 134,6 (s), 144,8 (d), 165,0 (s, OBz-1), 166,1 (s, OCin-9)]; OAc (20,8 c, 170,6 s, OAc-2).

EM m/z (%) 578 [M⁺] (22), 563 (4), 545 (4), 503 (1), 456 (1), 430 (4), 396 (2), 265 (4), 248 (6), 131 (100), 105 (97).

EMAR m/z Calculado para C₃₃H₃₈O₉ [M⁺], 578,2516; observado, 578,2539.

Sesquiterpeno S-19

(1R,2S,3S,4S,5R,7R,9S,10R)-2,3-Diacetoxi-1-benzoiloxi-9-*cis*-cinamoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (1,4 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 20,4 (c 0,2, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 224 (3,4), 275 (3,1) nm.

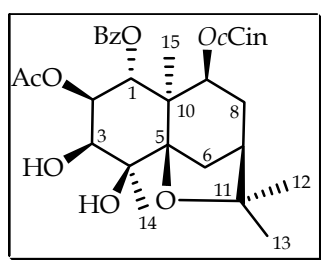
IR ν_{\max} 3521, 2928, 2857, 1735, 1279, 1166, 761, 715 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,31 (3H, s, Me-12); 1,46 (3H, s, Me-14); 1,47 (3H, s, Me-13); 1,50 (3H, s, Me-15); 1,78 (3H, s, OAc-2); 1,86 (1H, m, H-6 α); 2,04 (1H, m, H-7); 2,14 (2H, m, H-8); 2,25 (3H, s, OAc-3); 2,40 (1H, m, H-6 β); 3,39 (s, OH-4); 4,79 (1H, d, *J* = 5,1 Hz, H-9); 5,25 (1H, d, *J* = 3,2 Hz, H-3); 5,27 (1H, dd, *J* = 3,2, 10,9 Hz, H-2); 6,19 (1H, d, *J* = 10,9 Hz, H-1); OBz, OCin [6,03 (1H, d, *J* = 12,5 Hz, OcCin), 6,92 (1H, d, *J* = 12,5 Hz, OcCin), 7,13 (2H, d, *J* = 7,7 Hz), 7,31 (4H, m), 7,48 (2H, m), 7,83 (2H, d, *J* = 7,7 Hz)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 19,7 (c, C-15); 24,2 (c, C-13); 24,6 (c, C-14); 29,8 (c, C-12); 30,7 (t, C-8); 32,9 (t, C-6); 42,6 (d, C-7); 47,9 (s, C-10); 68,1 (d, C-1); 68,7 (d, C-2); 69,9 (s, C-4); 72,5 (d, C-9); 75,6 (d, C-3); 84,2 (s, C-11); 89,7 (s, C-5); OBz, OCin [119,9 (d), 128,1 (2 x d), 128,9 (2 x d), 129,8 (2 x d), 130,3 (2 x d), 131,5 (s), 131,9 (d), 133,1 (d), 134,7 (s), 144,8 (d), 164,7 (s, OcCin-9), 165,4 (OBz-1)]; OAc [(20,7 c, 170,6 s, OAc-2), (21,4 c, 171,0 s, OAc-3)].

EM *m/z* (%) 620 [M⁺] (4), 605 (11), 515 (1), 470 (4), 457 (27), 454 (5), 396 (7), 370 (1), 307 (3), 265 (4), 248 (13), 173 (4), 131 (93), 105 (100).

EMAR *m/z* Calculado para C₃₅H₄₀O₁₀ [M⁺], 620,2625; observado, 620,2621.

Sesquiterpeno S-20

(1R,2S,3S,4S,5R,7R,9S,10R)-2-Acetoxy-1-benzoiloxi-9-cis-cinamoiloxi-3,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (1,7 mg).

[α]_D²⁰ + 20,0 (c 0,1, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 224 (4,0), 275 (3,7) nm.

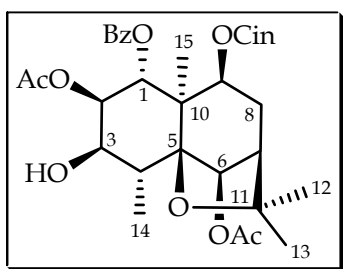
IR ν_{\max} 3515, 2927, 2857, 1732, 1278, 1165, 765, 715 cm⁻¹.

RMN ¹H 1,36 (3H, s, Me-12); 1,43 (3H, s, Me-14); 1,47 (3H, s, Me-13); 1,48 (3H, s, Me-15); 1,86 (1H, d, *J* = 12,2 Hz, H-6 α); 1,92 (3H, s, OAc-2); 2,02 (1H, m, H-7); 2,09 (2H, m, H-8); 2,53 (1H, m, H-6 β); 3,38 (1H, s, OH-4); 3,53 (1H, d, *J* = 10,9 Hz, OH-3); 3,85 (1H, dd, *J* = 2,8, 10,9 Hz, H-3); 4,84 (1H, d, *J* = 5,4 Hz, H-9); 5,31 (1H, dd, *J* = 2,8, 11,2 Hz, H-2); 6,17 (1H, d, *J* = 11,2 Hz, H-1); OBz, OCin [6,05 (1H, d, *J* = 12,6 Hz, OcCin); 6,96 (1H, d, *J* = 12,6 Hz, OcCin); 7,16 (2H, d, *J* = 7,7 Hz); 7,33 (4H, m); 7,50 (2H, m); 7,87 (2H, d, *J* = 8,3 Hz)].

RMN ¹³C 20,2 (c, C-15); 23,8 (c, C-14); 24,1 (c, C-13); 29,8 (c, C-12); 30,9 (t, C-8); 32,1 (t, C-6); 42,2 (d, C-7); 48,1 (s, C-10); 68,3 (d, C-1); 70,7 (d, C-2); 70,8 (s, C-4); 72,9 (d, C-9); 77,2 (d, C-3); 85,4 (s, C-11); 92,1 (s, C-5); OBz, OCin [119,6 (d), 127,7 (2 x d), 128,4 (2 x d), 128,9 (d), 129,5 (2 x d), 129,9 (2 x d), 130,2 (s), 133,0 (d), 134,5 (s), 144,9 (d), 164,3 (OcCin-9), 164,9 (OBz-1)]; OAc (20,9 c, 170,6 s, OAc-2).

EM *m/z* (%) 578 [M⁺] (15), 552 (10), 545 (4), 430 (6), 370 (2), 322 (6), 279 (2), 248 (7), 149 (25), 105 (100), 57 (27).

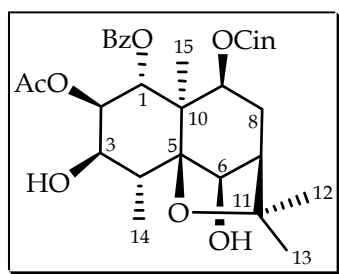
EMAR *m/z* Calculado para C₃₃H₃₈O₉ [M⁺], 578,2516; observado, 578,2498.

Sesquiterpeno S-21

(1R,2R,3R,4R,5S,6R,7R,9S,10R)-2,6-Diacetoxi-1-benzoiloxi-9-trans-cinamoiloxi-3-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (3,4 mg).

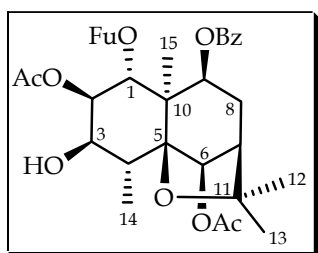
| | |
|--|---|
| [α]_D²⁰ | + 62,6 (c 0,3, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) | 277 (4,2), 223 (4,3) nm. |
| DC λ_{\max} (EtOH) nm | 270,0 ($\Delta\epsilon = +17,6$), 227,6 ($\Delta\epsilon = -16,1$). |
| IR ν_{\max} | 3480, 2928, 1741, 1716, 1662, 1273, 1246, 1167, 1140, 759, 715 cm ⁻¹ . |
| RMN ¹H (δ , CDCl ₃) | 1,19 (3H, d, $J = 7,6$ Hz, Me-14); 1,45 (3H, s, Me-13); 1,46 (3H, s, Me-12); 1,56 (3H, s, Me-15); 1,90 (3H, s, OAc-2); 2,15 (3H, s, OAc-6); 2,22 (2H, m, H-7, H-8 β); 2,37 (1H, dd, $J = 2,9, 6,8$ Hz, H-8 α); 2,68 (1H, c, $J = 7,6$ Hz, H-4); 4,02 (1H, sa, H-3); 4,77 (1H, d, $J = 6,8$ Hz, H-9); 5,35 (1H, dd, $J = 2,8, 11,1$ Hz, H-2); 5,40 (1H, s, H-6); 6,36 (1H, d, $J = 11,1$ Hz, H-1); OBz, OCin [6,47 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), 7,29 (2H, m), 7,39 (5H, m), 7,59 (2H, m), 7,76 (2H, d, $J = 7,5$ Hz)]. |
| RMN ¹³C (δ , CDCl ₃) | 15,8 (c, Me-14); 19,6 (c, Me-15); 25,7 (c, Me-13); 30,2 (c, Me-12); 31,5 (t, C-8); 41,0 (d, C-4); 47,4 (d, C-7); 52,6 (s, C-10); 68,5 (d, C-1); 71,8 (d, C-2); 72,5 (d, C-9); 73,0 (d, C-3); 79,3 (d, C-6); 85,0 (s, C-11); 90,8 (s, C-5); OBz, OCin [118,2 (d), 128,0 (2 x d), 128,1 (2 x d), 128,6 (2 x d), 129,1 (2 x d), 129,7 (s), 130,0 (d), 132,6 (d), 134,4 (s), 148,8 (d), 164,6 (s, OBz-1), 165,7 (s, OCin-9)]; OAc [(20,7 c, 170,6 s, OAc-2), (21,1 c, 169,7 (s, OAc-6)]. |
| EM m/z (%) | 620 [M ⁺] (1), 605 (15), 578 (43), 560 (1), 545 (5), 483 (1), 458 (1), 430 (7), 231 (3), 220 (5), 131 (100), 105 (91). |
| EMAR m/z | Calculado para C ₃₅ H ₄₀ O ₁₀ [M ⁺] 620,2621; observado, 620,2604. |

Sesquiterpeno S-22

(1R,2R,3R,4R,5S,6R,7R,9S,10R)-2-Acetoxy-1-benzoiloxi-9-*trans*-cinamoiloxi-3,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (2,0 mg).

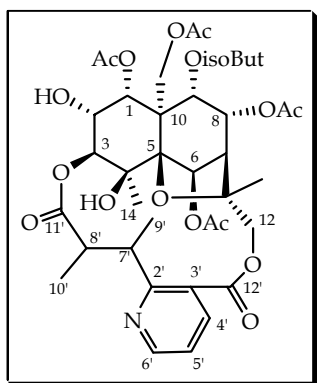
- $[\alpha]_D^{20}$** + 115 (c 0,2, CHCl₃).
- UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)** 279 (3,9), 223 (4,2) nm.
- IR ν_{\max}** 3436, 2963, 2927, 1732, 1637, 1265, 1109, 801, 759, 711 cm⁻¹.
- RMN ¹H (δ , CDCl₃)** 1,37 (3H, d, $J = 7,7$ Hz, Me-14); 1,44 (3H, s, Me-13); 1,50 (3H, s, Me-12); 1,58 (3H, s, Me-15); 1,91 (3H, s, OAc-2); 2,08 (1H, m H-7); 2,19 (2H, m H-8); 2,70 (1H, c, $J = 7,7$ Hz, H-4); 3,99 (1H, dd, $J = 3,0, 9,8$ Hz, H-3); 4,49 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-6); 4,62 (1H, d, $J = 9,8$ Hz, OH-3); 4,68 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, OH-6); 4,70 (1H, d, $J = 5,9$ Hz, H-9); 5,38 (1H, dd, $J = 3,0, 11,2$ Hz, H-2); 6,36 (1H, d, $J = 11,2$ Hz, H-1); OBz, OCin [6,47 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), 7,30 (2H, m), 7,43 (3H, m), 7,46 (2H, m), 7,56 (2H, m), 7,76 (2H, d, $J = 7,1$ Hz)].
- RMN ¹³C (δ , CDCl₃)** 16,3 (c, Me-14); 19,5 (c, Me-15); 26,0 (c, Me-13); 30,4 (c, Me-12); 31,8 (t, C-8); 40,5 (d, C-4); 48,5 (d, C-7); 52,4 (s, C-10); 68,8 (d, C-1); 71,3 (d, C-2); 72,8 (d, C-9); 73,1 (d, C-3); 77,7 (d, C-6); 85,0 (s, C-11); 90,3 (s, C-5); OBz, OCin [118,2 (d), 128,1 (2 x d), 128,5 (2 x d), 129,1 (2 x d), 129,8 (2 x d), 129,9 (s), 132,4 (2 x d), 134,4 (s), 147,7 (d), 164,7 (s, OBz-1), 165,9 (s, OCin-9)]; OAc (20,7 c, 170,8 s, OAc-2).
- EM m/z (%)** 578 [M⁺] (12), 563 (2), 545 (1), 430 (1), 396 (1), 248 (2), 131 (100), 105 (97).
- EMAR m/z** Calculado para C₃₃H₃₈O₉ [M⁺], 578,2123; observado, 578,2109.

Sesquiterpeno S-24

(1R,2R,3R,4R,5S,6R,7R,9S,10R)-2,6-Diacetoxi-9-benzoiloxi-1-(3-furoiloxi)- 3-hidroxi-dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (11,0 mg).

- [α]_D²⁰** +36,3 (c 11,0, CHCl₃).
- UV (EtOH) λ_{max} (log ε)** 274 (3,6), 202 (4,3) nm.
- IR ν_{max}** 3480, 2928, 2856, 1743, 1718, 1245, 1234, 1099, 759, 715 cm⁻¹.
- RMN ¹H (δ, CDCl₃)** 1,17 (3H, d, J = 7,6 Hz, Me-14); 1,46 (3H, s, Me-13); 1,48 (3H, s, Me-12); 1,51 (3H, s, Me-15); 1,91 (3H, s, OAc-2); 2,15 (3H, s, OAc-6); 2,28 (2H, m, H-7, H-8β); 2,39 (1H, ddd, J = 3,0, 6,5, 16,0 Hz, H-8α); 2,68 (1H, c, J = 7,6 Hz, H-4); 3,99 (1H, sa, H-3); 5,00 (1H, d, J = 6,5 Hz, H-9); 5,29 (1H, dd, J = 2,7, 11,0 Hz, H-2); 5,42 (1H, s, H-6); 6,26 (1H, d, J = 11,0 Hz, H-1); OFu, OBz [6,33 (1H, s), 7,43 (3H, m), 7,54 (1H, m), 7,65 (1H, s)]; 8,00 (2H, d, J = 7,8 Hz).
- RMN ¹³C (δ, CDCl₃)** 15,8 (c, Me-14); 19,7 (c, Me-15); 25,9 (c, Me-13); 30,2 (c, Me-12); 31,6 (t, C-8); 41,0 (d, C-4); 47,5 (d, C-7); 52,6 (s, C-10); 68,1 (d, C-1); 70,8 (d, C-2); 72,7 (d, C-9); 73,1 (d, C-3); 79,3 (d, C-6); 85,2 (s, C-11); 90,8 (s, C-5); OFu [109 (d), 118,5 (s), 143,2 (d), 147,1 (d), 160,4 (s, OFu-1)]; OBz [127,8 (2 x d), 128,6 (s), 130,1 (2 x d), 132,9 (d), 165,2 (s, OBz-9)]; OAc [(20,7 c, 170,7 s, OAc-2), (21,1 c, 169,7 (s, OAc-6)].
- EM m/z (%)** 569 [M⁺-CH₃] (1), 542 (17), 515 (2), 457 (1), 406 (2), 248 (4), 105 (100), 95 (33).
- EMAR m/z** Calculado para C₃₀H₃₃O₁₁ [M⁺-CH₃], 569,2023; observado, 569,2009.

Sesquiterpeno macrocíclico SM-1**Paniculatina C**

Descripción: sólido amorfo (3,4 mg).

 $[\alpha]_D^{20}$ +11,5 (c 0,3, CHCl₃).UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 270 (2,7), 223 (3,4) nm.IR ν_{\max} 3494, 2929, 2858, 1745, 1374, 1237, 1123, 1102, 761, 715 cm⁻¹.

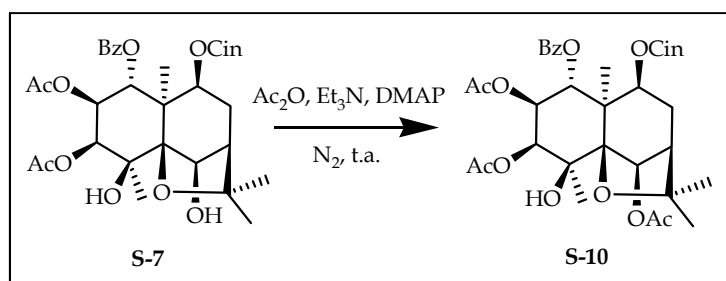
RMN ¹H 1,18 (3H, d, *J* = 6,8 Hz, Me-10'); 1,38 (3H, d, *J* = 6,9 Hz, Me-9'); 1,59 (3H, s, Me-14); 1,66 (3H, s, Me-13); 1,94 (3H, s, OAc-1); 2,13 (3H, s, OAc-6); 2,20 (3H, s, OAc-8); 2,29 (3H, s, OAc-15); 2,35 (1H, m, H-7); 2,52 (1H, m, H-8'); 3,67 (1H, d, *J* = 11,0 Hz, H-12A); 4,10 (1H, sa, H-2); 4,47 (1H, s, OH-4); 4,66 (1H, m, H-7'); 4,69, 5,22 (2H, d_{AM}, *J* = 13,9 Hz, H-15); 4,76 (1H, d, *J* = 2,6 Hz, H-3); 5,32 (1H, d, *J* = 6,9 Hz, H-9); 5,48 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H-1); 5,54 (1H, m, H-8); 5,94 (1H, d, *J* = 11,0 Hz, H-12B); 7,0 (1H, s, H-6); 7,24 (1H, m, H-5'); 8,04 (1H, dd, *J* = 1,8, 7,8 Hz, H-4'); 8,69 (1H, dd, *J* = 1,8, 4,4 Hz, H-6'); OisoBut [1,16 (3H, d, *J* = 6,8 Hz), 1,17 (3H, d, *J* = 6,9 Hz), 2,54 (1H, m)].

RMN ¹³C 9,0 (c, C-10'); 11,7 (c, C-9'); 18,3 (c, C-13); 23,0 (c, C-14); 36,3 (d, C-7'); 44,8 (d, C-8'); 50,1 (d, C-7); 52,6 (s, C-10); 60,3 (t, C-15); 68,8 (d, C-8); 69,7 (d, C-2); 69,8 (t, C-12); 70,3 (s, C-4); 70,8 (d, C-9); 73,9 (d, C-6); 75,2 (d, C-1); 77,9 (d, C-3); 83,4 (s, C-11); 94,1 (s, C-5); 120,9 (d, C-5'); 125,2 (s, C-3'); 137,9 (d, C-4'); 151,6 (d, C-6'); 164,5 (s, C-2'); 167,6 (s, C-12'); 173,9 (s, C-11'); OAc [(20,5 c, 168,9 s, OAc-1), (20,6 c, 20,8 c, 169,6 s, OAc-6, OAc-8), (21,2 c, 169,7 s, OAc-15)]; OisoBut [18,6 (2 x c), 33,6 (d), 174,0 (s)].

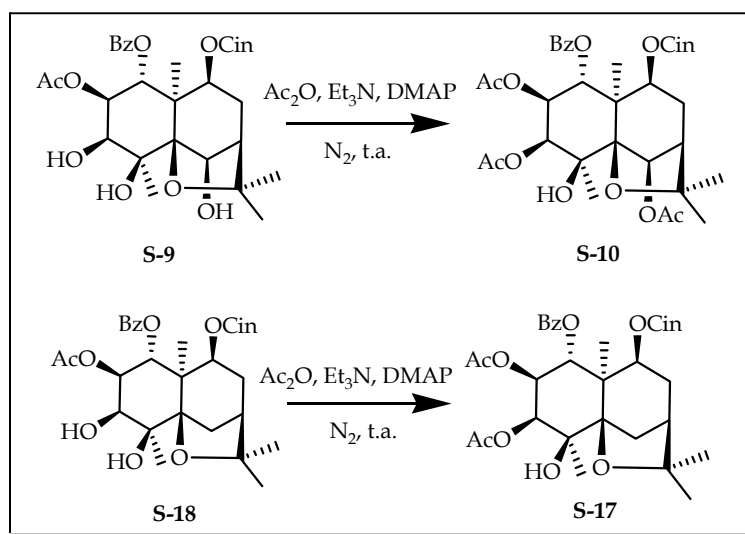
ESIMS *m/z* (%) 814 [M⁺⁺Na] (100)**AR-ESI/MS *m/z*** Calculado para C₃₈H₄₉NO₁₇Na [M⁺⁺Na], 814,2898; observado, 814,2896.

Reacciones de correlación química de los sesquiterpenos**Acetilación de S-7**

A una disolución de 4,0 mg de **S-7** (0,006 mmoles), 0,1 ml de trietilamina (1,08 mmoles, 108 eq) y 3 ml de CH₂Cl₂ seco, se le añadió 0,2 ml de anhídrido acético (0,42 mmoles, 42 eq) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina. La reacción se llevó a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno y se agitó durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo, se concentró a vacío y el residuo fue purificado por cromatografía en placa de gel de sílice de capa fina *n*-hexano:AcOEt, 6:4. Se obtuvieron así 3,6 mg de **S-10** (R= 88%) como un sólido amorfo.

**Acetilación de S-9 y S-18**

Siguiendo el procedimiento general descrito para la acetilación de **S-7**, se acetilaron 3,8 mg de **S-9** (0,007 mmoles), obteniéndose 3,5 mg de **S-10** (R = 74%), como un sólido amorfo. De igual forma, se acetilaron 4,5 mg de **S-18** (0,008 mmoles) para dar lugar a 4,5 mg del compuesto **S-17** (R = 95 %).



*4.3.3. Sesquiterpenos
aislados de los frutos de
M. jelskii*

4.3.3. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de los frutos de *M. jelskii*

4.3.3.1. Resultados y discusión

El estudio fitoquímico de los frutos de *Maytenus jelskii* permitió el aislamiento de **24 sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano** que hemos denominado de **S-26 a S-49**. Las estructuras de estos metabolitos fueron determinadas mediante el estudio de sus datos físicos y espectroscópicos, resultando veinte de ellos nuevos en la bibliografía química. Los compuestos **S-32, S-33, S-35 y S-49** resultaron ser coincidentes con los descritos en la literatura química: $1\alpha,2\alpha,15$ -triacetoxi- $6\beta,9\beta$ -dibenzoiloxi- 4β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano¹, $1\alpha,2\alpha,6\beta,15$ -tetraacetoxi- 9β -benzoiloxi- 4β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano², $1\alpha,2\alpha,15$ -triacetoxi- $6\beta,9\beta$ -di-(3-furoiloxi)- 4β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano¹ y (1S,4S,5R,7R,9S,10S)- $1,9$ -dibenzoiloxi- 4 -hidroxi-dihidro- β -agarofurano³, respectivamente.

Los sesquiterpenos aislados se agruparon en series de la misma forma que los aislados de las hojas, a fin de facilitar su estudio, según sus esqueletos polihidroxílicos base. Así, los compuestos **S-26 a S-35** poseen un esqueleto de 3-deoximaytol⁴, los compuestos de **S-36 a S-38** presentan un esqueleto de $2\alpha,4\beta$ -dihidroxicelorbicol⁵, **S-40** presenta un esqueleto de 6-deoximagellanol⁶, los compuestos **S-41 y S-42** poseen un esqueleto de 4,6-dideoximagellanol⁷, los

¹ González, A. G.; Tincusi, B. M.; Bazzocchi, I. L.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Konoshima, T.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8* (7), 1773-1778.

² Hohmann, J.; Dini, Z.; Pelczar, I.; Jerkovich, G. *Phytochemistry.* **1994**, *35* (5), 1267-1270.

³ González A. G.; Núñez, M. P.; Bazzocchi, I. L.; Ravelo, A. G.; Jiménez, I. A. *Nat. Prod. Let.* **1993**, *2*, 163-170.

⁴ Kupchan, S. M.; Smith, R. M. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 115-118.

⁵ Smith, C. R.; Millar, R. W.; Weisleder, D.; Rohwedder, W. K.; Eickman, N.; Clardy, J. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3264-3269.

⁶ González, A. G.; Núñez, M. P.; Ravelo, A. G.; Sazatornil, J. G.; Vázquez, J. T.; Bazzocchi, I. L.; Morales, E.; Muñoz, O. M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1992**, *11*, 1437-1441.

⁷ Muñoz-Martínez, F.; Mendoza, C. R.; Bazzocchi, I. L.; Castanys, S.; Jiménez, I. A.; Gamarro, F. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4266-4275.

productos de **S-43** a **S-45** presentan un esqueleto de 3,6-dideoxi-magellanol⁸ y **S-48** y **S-49** pertenecen al 4 β -hidroxi-6-deoxicelorbicol³. Cabe destacar que los productos **S-39** y **S-46**, **S-47**, poseen un esqueleto no descrito anteriormente en la bibliografía, que denominamos 3-deoxi-isomagellanol y 2-*epi*-isocelorbicol, respectivamente.

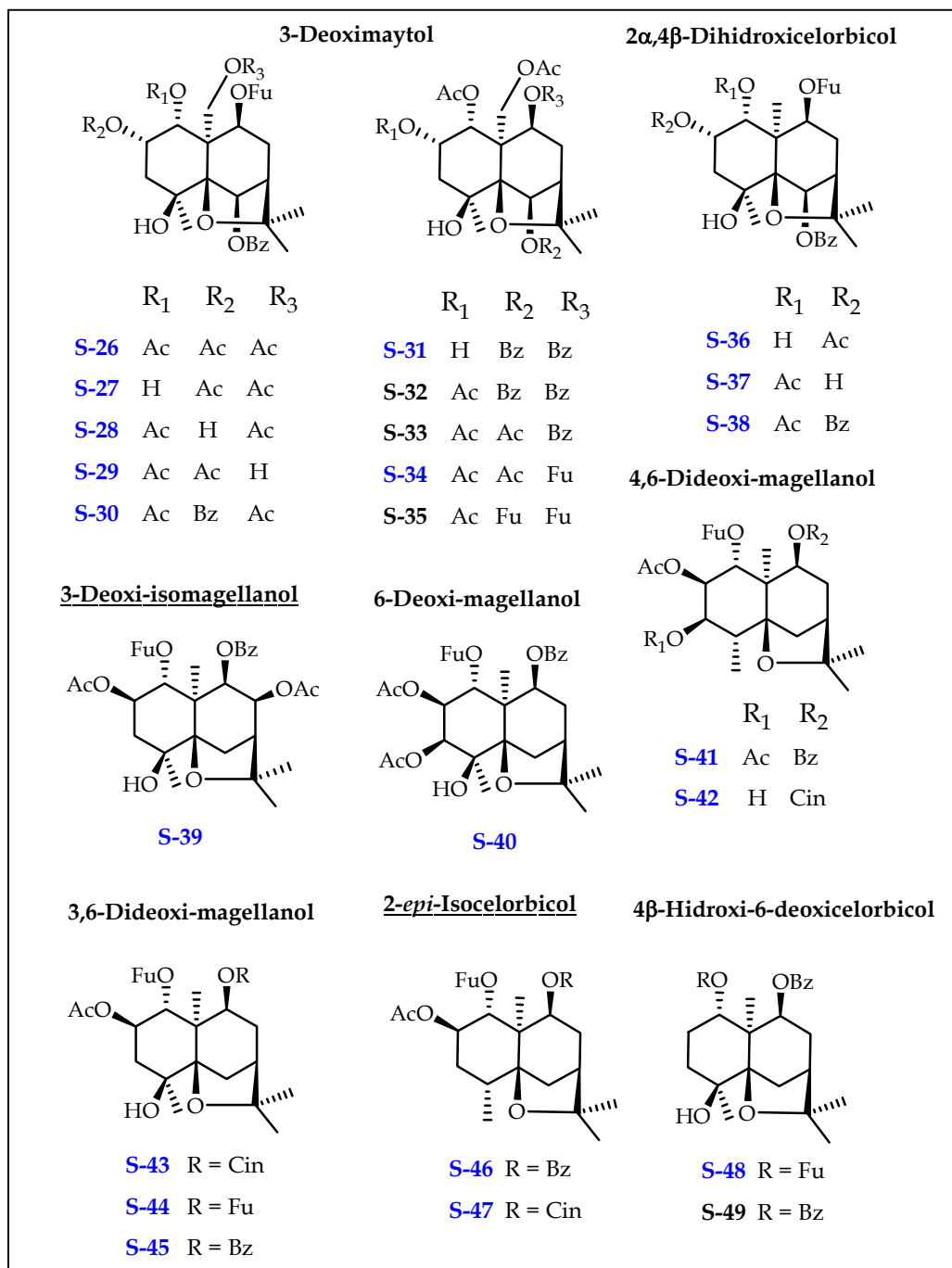


Figura 4.3.27. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de los frutos de *Maytenus jelskii*. En azul los compuestos que resultaron nuevos en la bibliografía química. Se subrayan los esqueletos nuevos.

⁸ Kennedy, M. L.; Cortés-Selva, F.; Pérez-Victoria, J. M.; Jiménez, I. A.; González, A. G.; Muñoz, O. M.; Gamarro, F.; Castany, S.; Ravelo, A. G. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (26), 4668-4676.

Además de los compuestos descritos anteriormente, de los frutos se aislaron **seis sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos** que presentaron en su esqueleto un grupo éster diferente a los que se han identificado hasta ahora en la bibliografía química para este tipo de compuestos (figura 4.3.28):

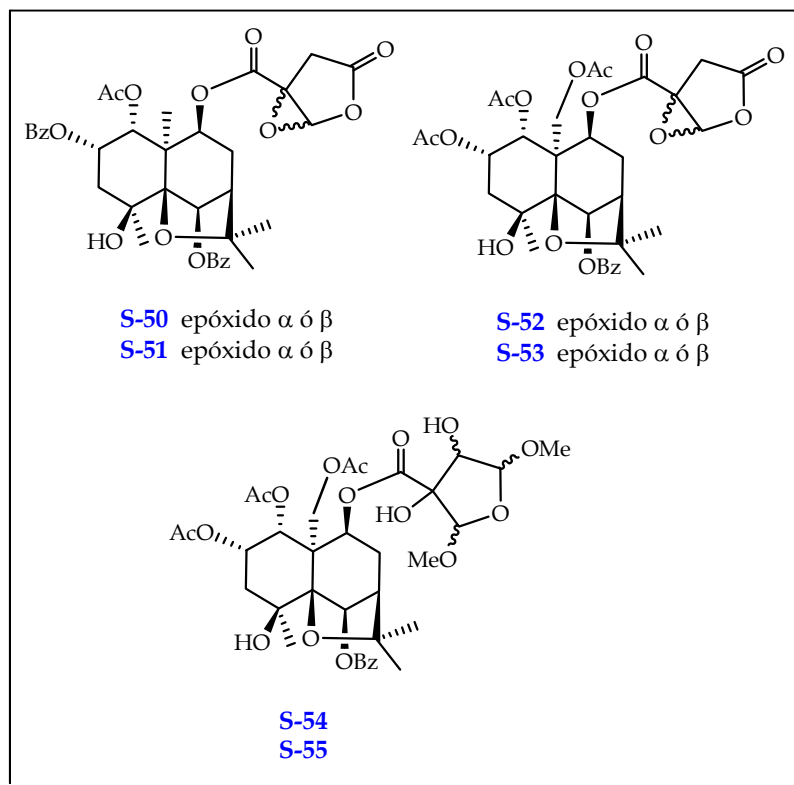


Figura 4.3.28. Sesquiterpenos nuevos en la bibliografía química que presentan un éster no descritos anteriormente.

A continuación pasamos a discutir la elucidación estructural de los nuevos sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos. Para simplificar y agilizar la discusión, realizaremos el estudio por grupos, en función de sus esqueletos polihidroxílicos base.

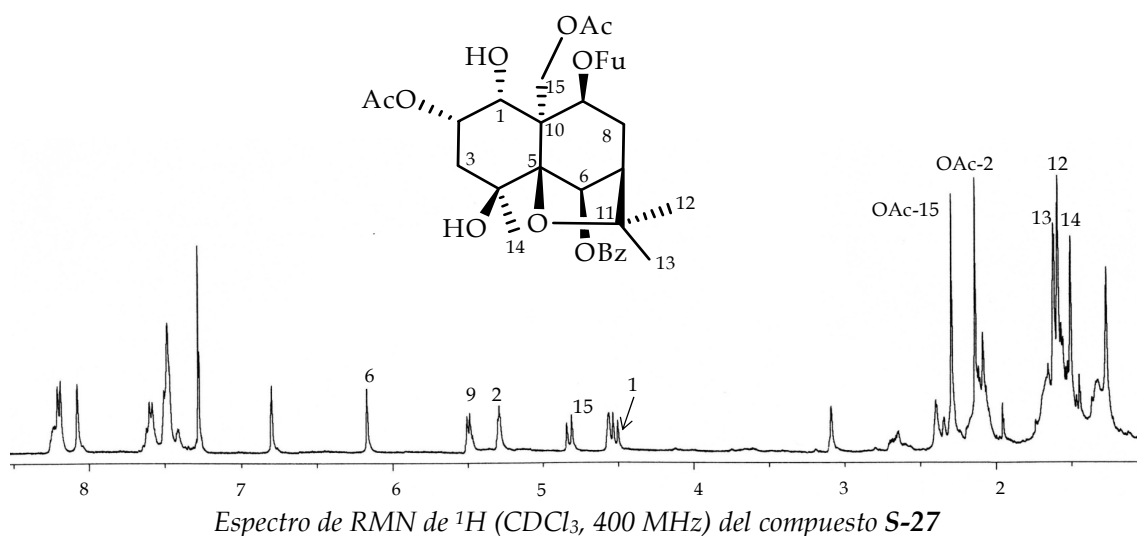
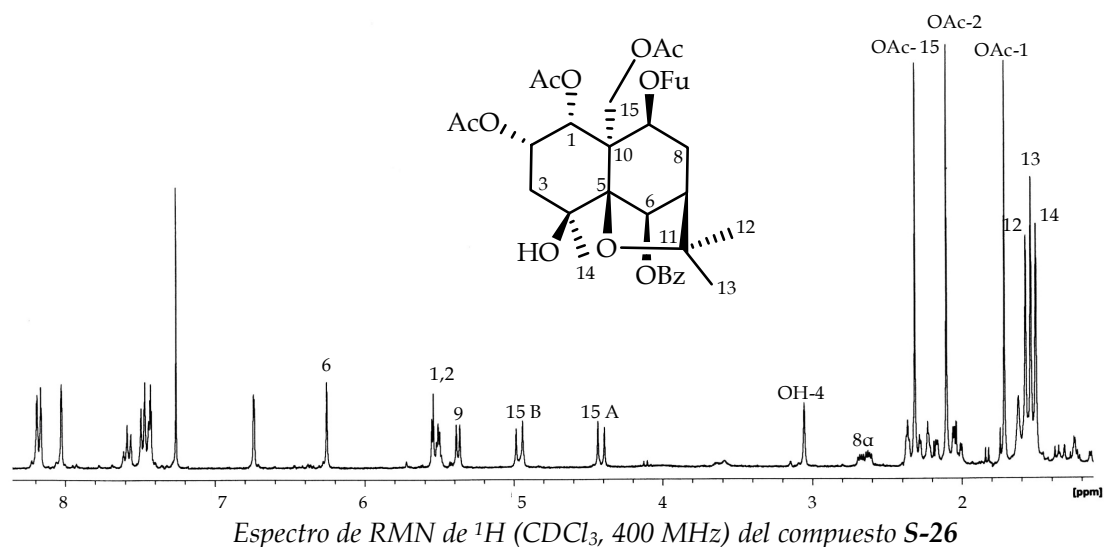
Sesquiterpenos de S-26 a S-30

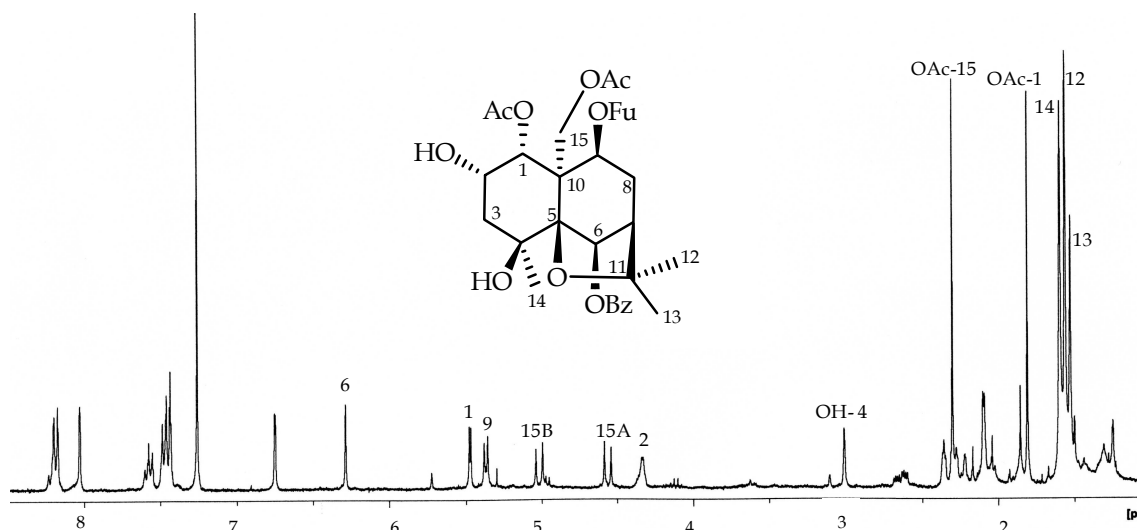
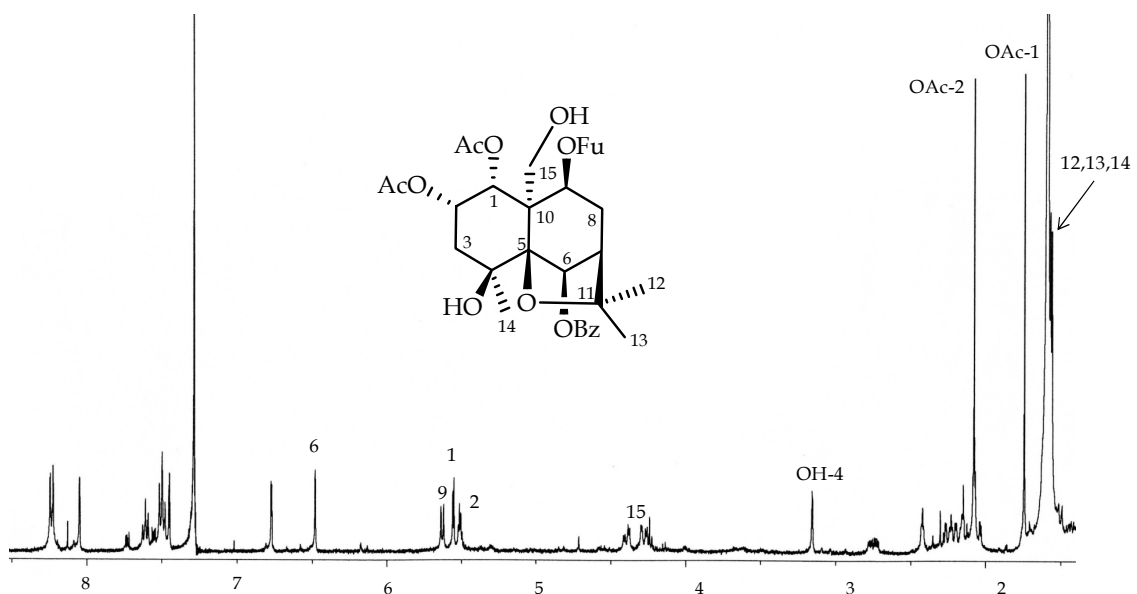
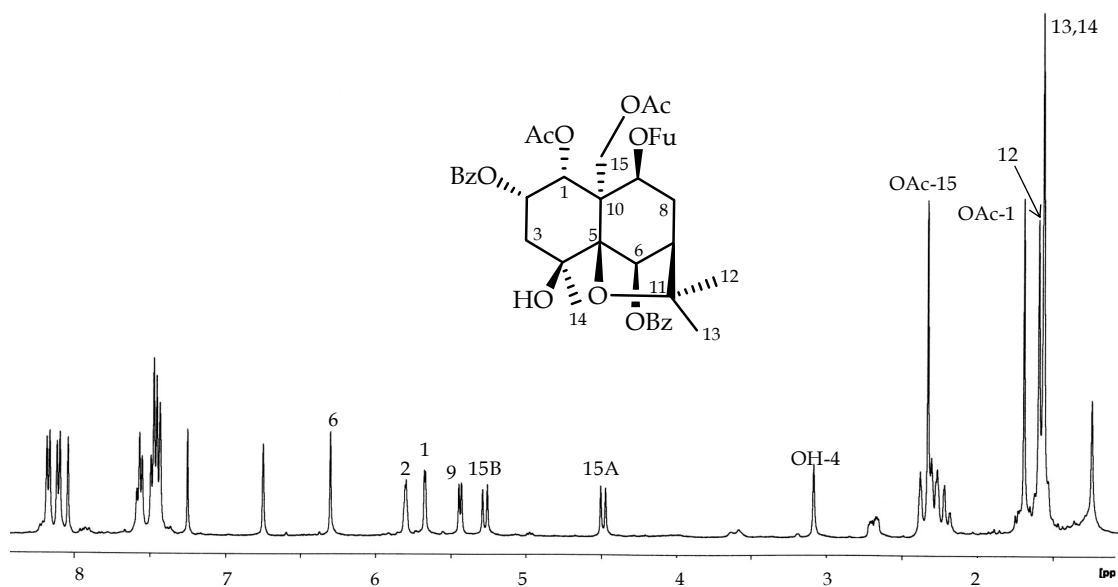
Las estructuras de los compuestos **S-26 a S-30** fueron determinadas mediante técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C (tablas 4.3.9 y 4.3.10), incluyendo experimentos homo (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), IR, UV y espectrometría de masas.

Así, los compuestos **S-26** y **S-30** presentaron una fórmula molecular de $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{O}_{13}$ y $\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{O}_{13}$, respectivamente, mientras que los compuestos de **S-27 a S-**

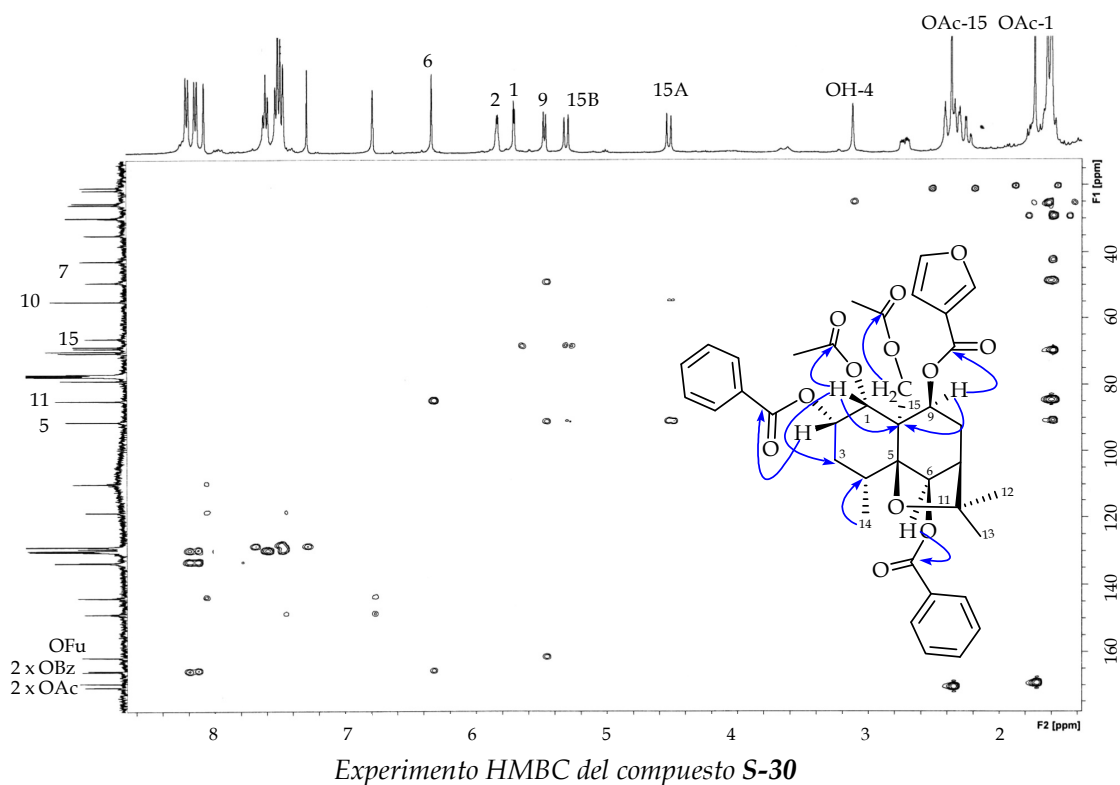
29, que resultaron ser isómeros, presentaron una fórmula molecular de $C_{31}H_{36}O_{12}$. Las fórmulas moleculares fueron determinadas, en todos los casos, por espectrometría de masas de alta resolución y RMN de ^{13}C . En los espectros IR de los compuestos **S-26** a **S-30** se observaron bandas de absorción correspondientes a grupos hidroxilos (entorno a 3500 cm^{-1}) y grupos éster (entorno a 1730 cm^{-1}).

En sus espectros de RMN de 1H se observaron señales asignables a un grupo furoato en cada uno de los productos, así como dos grupos benzoatos en **S-30** y uno en el resto de los compuestos. Además, se observaron señales correspondientes a grupos acetatos (tres en **S-26** y dos en los demás compuestos) y un alcohol terciario. Estos datos y los espectros de RMN de ^{13}C nos indicaron que se trataba de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos hexasustituidos en las posiciones 1, 2, 4, 6, 9 y 15.



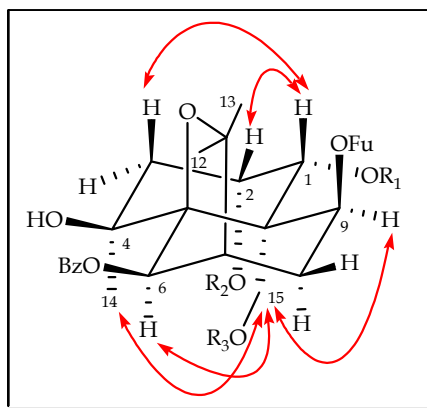
Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) del compuesto S-28Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) del compuesto S-29Espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) del compuesto S-30

Un experimento HMBC nos permitió establecer las características de regiosustitución en las moléculas. A modo de ejemplo, en la figura que mostramos a continuación, se señalan las principales correlaciones observadas en el experimento HMBC del compuesto **S-30**. Así, las señales de los carbonos carboxílicos de los grupos acetato a 169,5 y 170,7 δ_C , muestran correlación a tres enlaces con las señales a 5,70 y 4,52, 5,31 δ_H , señales asignables a los protones H-1 y H-15, respectivamente. Así mismo, las señales de los carbonos carboxílicos de los grupos benzoatos (165,7 y 166,0 δ_C) y del furoato (161,7 δ_C), fueron correlacionadas con las señales a 6,33, 5,83 y 5,47 δ_H , asignadas a H-6, H-2 y H-9, respectivamente. Además, se observaron otras correlaciones a tres enlaces, como se refleja en la figura. Estos datos permitieron establecer la estructura de **S-30** como 1 α ,15-diacetoxi-2 α ,6 β -dibenzoiloxi-9 β -furoiloxi-4 β -dihidroxi-dihidro- β -agarofurano.



La estereoquímica relativa de los sustituyentes en el sistema decalínico en las moléculas de **S-26** a **S-30** se determinó mediante un estudio de las constantes de acoplamiento, que nos indicó una relación *cis* para el sistema H-1, H-2 ($J_{1,2} = 3,2$ Hz para **S-26**, $J_{1,2} = 3,3$ Hz para **S-27** y **S-29**, $J_{1,2} = 3,1$ Hz para **S-28** y $J_{1,2} = 3,5$ Hz para **S-30**), lo que fue confirmado mediante los experimentos bidimensionales homonucleares, COSY y ROESY. Así, en este último se observaron efectos ROE de

la señal asignada a H-15 con H-6, H-9 y Me-14, así como correlación de H-1 con H-2 y H-3 β , lo que nos permitió establecer la estereoquímica relativa de los compuestos como 1 α , 2 α , 4 β , 6 β , 9 β y 15 α . A continuación presentamos una figura donde se indican los efectos ROE observados en el experimento ROESY de los compuestos **S-26** a **S-30**.

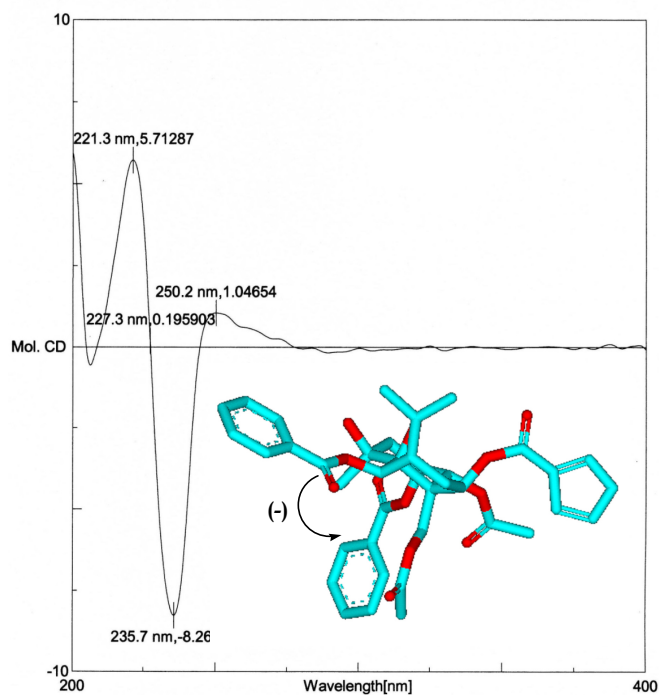


*Efectos ROE más significativos observados en los experimentos ROESY de los compuestos **S-26** a **S-30***

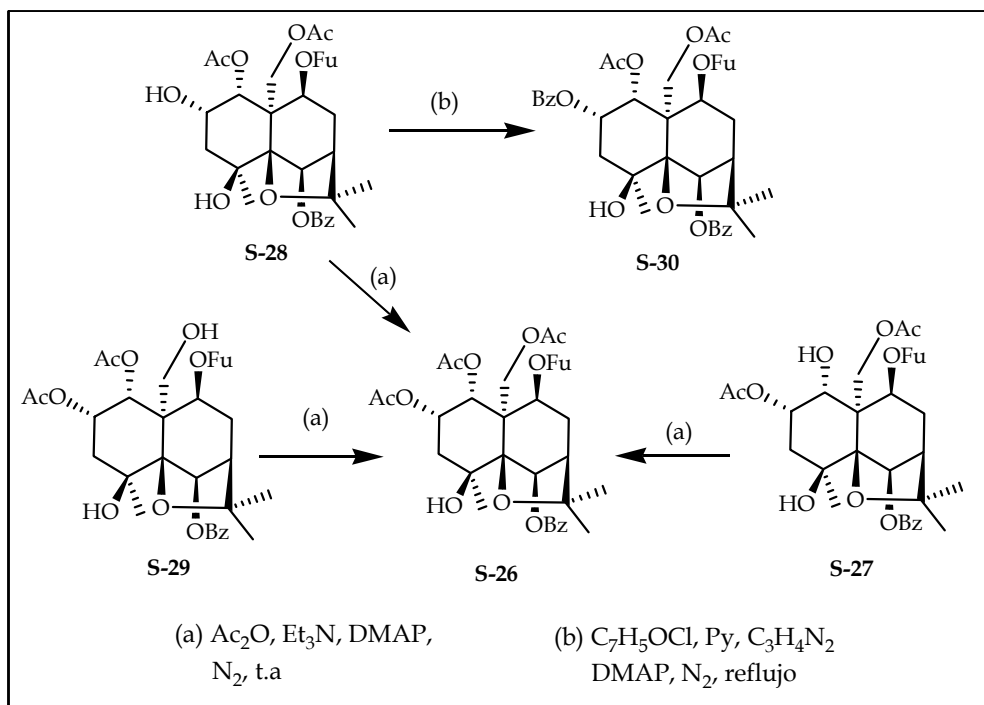
La configuración absoluta de los compuestos fue determinada mediante estudios de dicroísmo circular y correlaciones químicas. Así, la curva de dicroísmo circular del compuesto **S-30** presentó un primer efecto Cotton negativo a 235,7 nm ($\Delta\epsilon = -8,3$) y un segundo efecto Cotton positivo a 221,3 nm ($\Delta\epsilon = +5,7$), debido al acoplamiento de los dos grupos benzoatos. La aplicación del método del dibenzoato nos permitió determinar la configuración absoluta del compuesto **S-30** (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,15-diacetoxi-2,6-dibenzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano.

La configuración absoluta del resto de los compuestos incluidos en este grupo fue determinada por correlaciones químicas. Así, benzoilación del compuesto **S-28** rindió un compuesto cuyos datos físicos y espectroscópicos coincidieron con los de **S-30**. Por otro lado, acetilación, en las condiciones habituales con anhídrido acético y trietilamina, de los compuestos **S-27** a **S-29** dio lugar a un mismo compuesto **S-26**, permitiendo establecer la configuración absoluta de los diferentes compuestos como: (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2,15-triacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano (**S-26**), (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*S*)-2,15-diacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-1,4-dihidroxi-dihidro- β -

agarofurano (S-27), (1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,15-diacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-2,4-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano (S-28) y (1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,2-diacetoxi-6-benzoiloxi 9-(3-furoiloxi)-4,15-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano (S-29).



Curva de dicroísmo circular del compuesto S-30



Correlaciones químicas entre los compuestos de S-26 a S-30

Tabla 4.3.9. Datos^a de RMN de ¹H de los sesquiterpenos S-26 a S-30

| Posición | S-26 | S-27 | S-28 | S-29 | S-30 |
|----------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| H-1 | 5,54 d (3,2) | 4,58 t (3,3) | 5,47 d (3,1) | 5,56 d (3,3) | 5,70 d (3,5) |
| H-2 | 5,50 m | 5,30 dd (3,3, 6,7) | 4,33 m | 5,52 m | 5,83 d _a (3,5) |
| H-6 | 6,25 s | 6,17 s | 6,29 s | 6,49 s | 6,33 s |
| H-7 | 2,36 m | 2,41 t (4,2) | 2,34 t (3,6) | 2,43 t (3,6) | 2,41 t (3,5) |
| H-9 | 5,37 d (7,0) | 5,50 d (7,3) | 5,37 d (6,8) | 5,63 d (6,8) | 5,47 d (7,0) |
| Me-12 | 1,57 s | 1,60 s | 1,56 s | 1,60 s | 1,63 s |
| Me-13 | 1,54 s | 1,63 s | 1,53 s | 1,56 s | 1,60 s* |
| Me-14 | 1,50 s | 1,52 s | 1,60 s | 1,57 s | 1,60 s* |
| H-15 | 4,41, 4,96 d _{AM} (13,0) | 4,53, 4,83 d _{AB} (12,8) | 4,56, 5,02 d _{AB} (13,1) | 4,29, 4,40 d _{AB} (12,9) | 4,52, 5,31 d _{AM} (12,8) |
| OAc-1 | 1,71 s | - | 1,80 s | 1,74 s | 1,73 s |
| OAc-2 | 2,10 s | 2,15 s | - | 2,07 s | - |
| OAc-15 | 2,31 s | 2,31 s | 2,30 s | - | 2,36 s |

^a δ, CDCl₃, 400 MHz, J en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC.

* Señales solapadas.

Tabla 4.3.10. Datos^a de RMN de ¹³C de los sesquiterpenos S-26 a S-30.

| Posición | S-26 | S-27 | S-28 | S-29 | S-30 |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| C-1 | 70,0 d | 68,8 d | 73,2 d | 70,8 d | 70,2 d |
| C-2 | 68,3 d | 72,2 d | 67,3 d | 68,6 d | 68,8 d |
| C-3 | 42,4 t | 42,5 t | 44,2 t | 42,5 t | 42,4 t |
| C-4 | 70,5 s | 69,9 s | 70,0 s | 70,0 s | 69,8 s |
| C-5 | 91,2 s | 91,0 s | 91,4 s | 91,4 s | 91,1 s |
| C-6 | 78,8 d | 78,9 d | 78,8 d | 79,3 d | 78,6 d |
| C-7 | 49,2 d | 49,1 d | 49,0 d | 49,1 d | 49,2 d |
| C-8 | 34,8 t | 34,2 t | 34,7 t | 34,4 t | 35,6 t |
| C-9 | 68,5 d | 68,1 d | 68,8 d | 68,3 d | 68,4 d |
| C-10 | 54,9 s | 56,1 s | 55,0 s | 56,3 s | 54,8 s |
| C-11 | 84,8 s | 84,5 s | 84,3 s | 84,4 s | 84,7 s |
| C-12 | 29,6 c | 29,5 c | 29,5 c | 29,6 c | 29,4 c |
| C-13 | 25,7 c | 25,7 c | 25,6 c | 25,7 c | 25,5 c |
| C-14 | 24,9 c | 24,9 c | 25,0 c | 25,0 c | 25,2 c |
| C-15 | 65,6 t | 65,0 t | 65,9 t | 63,0 t | 66,0 t |
| OAc-1 | 169,6 s | - | 169,9 s | 169,4 s | 169,5 s |
| OA-2 | 169,8 s | 171,5 s | - | 169,6 s | - |
| OAc-15 | 170,7 s | 170,5 s | 170,6 s | - | 170,7 s |

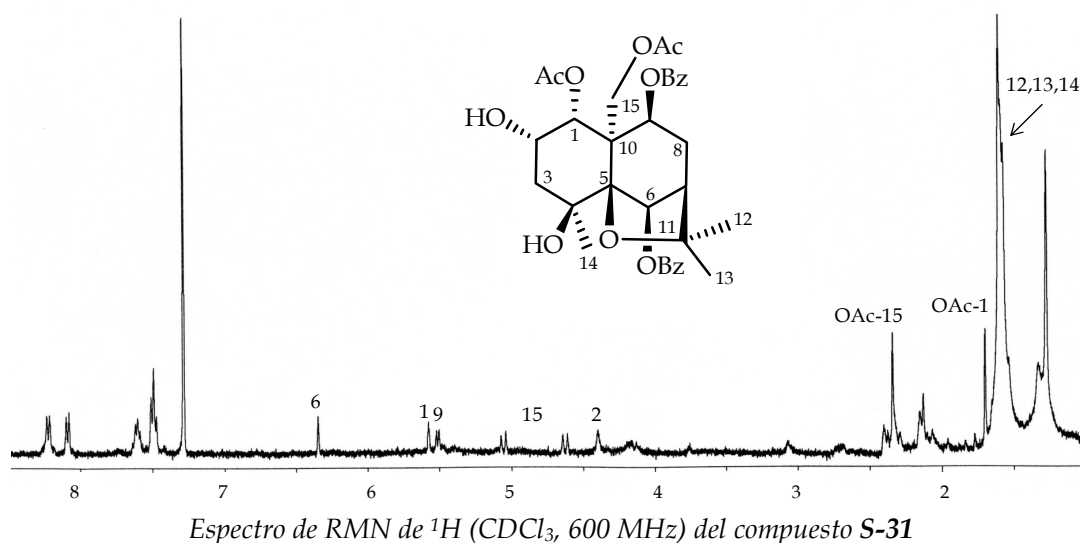
^a δ , CDCl₃, 100 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

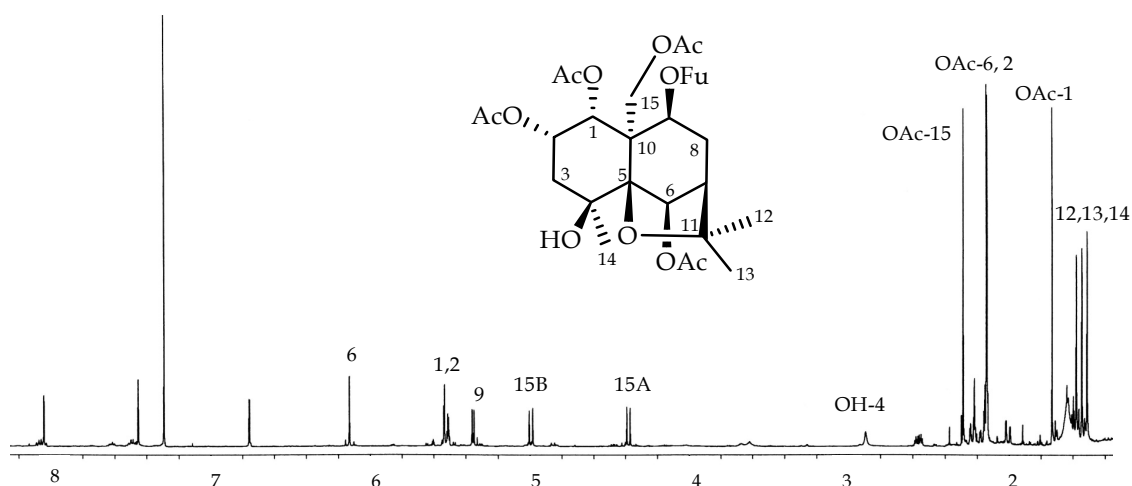
Sesquiterpenos S-31 y S-34

Los compuestos **S-31** y **S-34** se aislaron como sólidos amorfos de fórmula molecular $C_{33}H_{38}O_{11}$ y $C_{28}H_{36}O_{13}$, respectivamente. Sus datos físicos y espectroscópicos, incluyendo estudios de RMN de 1H y ^{13}C y experimentos bidimensionales, tanto homonucleares como heteronucleares, indicaron que corresponden a sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano. Ambos compuestos presentaron esqueleto de 3-deoxi-maytol, como en el caso del grupo anteriormente descrito.

En los espectros de RMN de 1H y de ^{13}C (tablas 4.3.11 y 4.3.12) del compuesto **S-31** se observaron señales correspondientes a dos grupos benzoatos, dos grupos acetato, un grupo hidroxilo secundario y otro terciario. Así mismo, en los espectros de RMN de 1H y ^{13}C del sesquiterpeno **S-34** se observaron señales asignables a cuatro grupos acetato, un grupo furoato y un alcohol terciario.

El estudio del experimento HMBC nos permitió establecer la posición de cada uno de grupos ésteres en las moléculas de forma inequívoca. Por otra parte, la estereoquímica relativa de los sustituyentes se determinó mediante un experimento ROESY, observándose efectos ROE de la señal asignada a H-15 con H-6, H-9, H-8 α y Me-14, así como correlación de H-1 con H-2 y H-3 β , lo que nos permitió establecer la misma estereoquímica relativa que en el caso del grupo anterior como 1 α , 2 α , 4 β , 6 β , 9 β y 15 α .

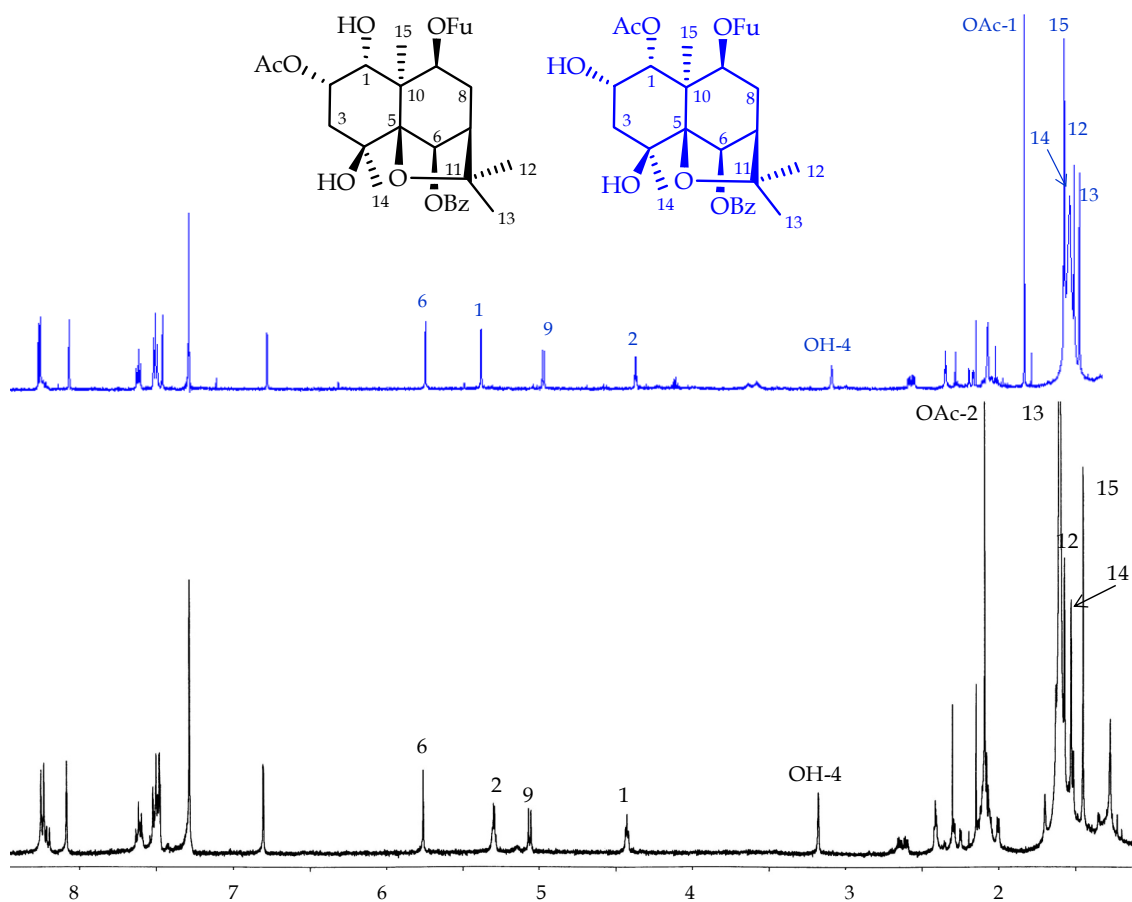


Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) del compuesto **S-34**

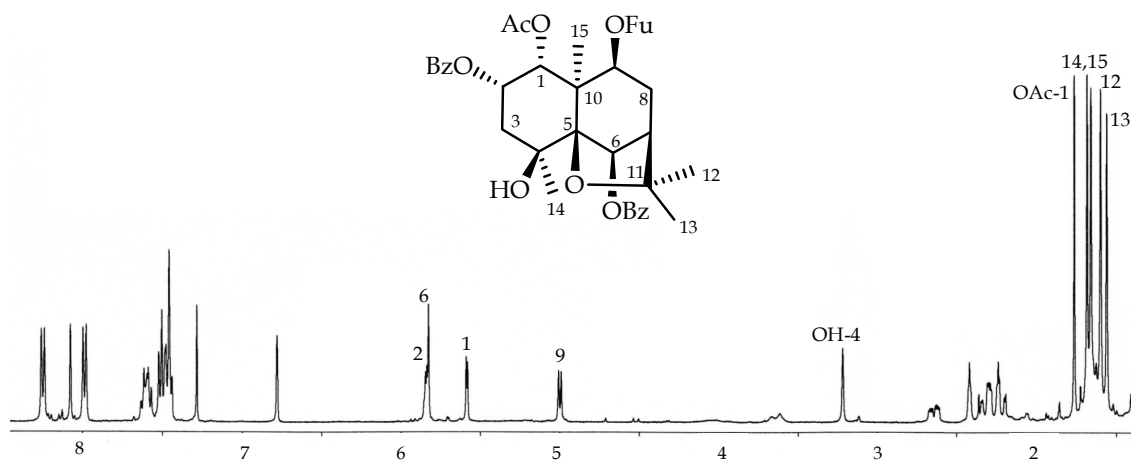
La configuración absoluta de **S-31** y **S-34** se estableció en base a consideraciones biogenéticas, dado que estos compuestos poseen el mismo esqueleto polihidroílico base que el grupo anterior (**S-26-S-31**) de configuración absoluta conocida por dicroísmo circular y correlaciones químicas, quedando así establecida la estructura de **S-31** y **S-34** como (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,15-diacetoxi-6,9-dibenzoiloxi-2,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano y (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2,6,15-tetraacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano, respectivamente.

Sesquiterpenos de **S-36** a **S-38**

Los compuestos denominados **S-36**, **S-37** y **S-38** presentaron como principal diferencia en sus espectros de RMN de ^1H con el grupo anterior de sesquiterpenos, la ausencia de las señales correspondientes al metileno situado en C-15 y la presencia adicional de un metilo como singulete. Además, se observaron señales asignables a un grupo acetato, un grupo furoato y un alcohol terciario en todos los compuestos, así como señales correspondientes a grupos benzoatos (uno en **S-36** y **S-37** y dos en **S-38**) y un alcohol secundario en el caso de **S-36** y **S-37**, compuestos que resultaron ser regioisómeros. Estos datos se confirmaron en sus espectros de RMN de ^{13}C y experimentos DEPTs.



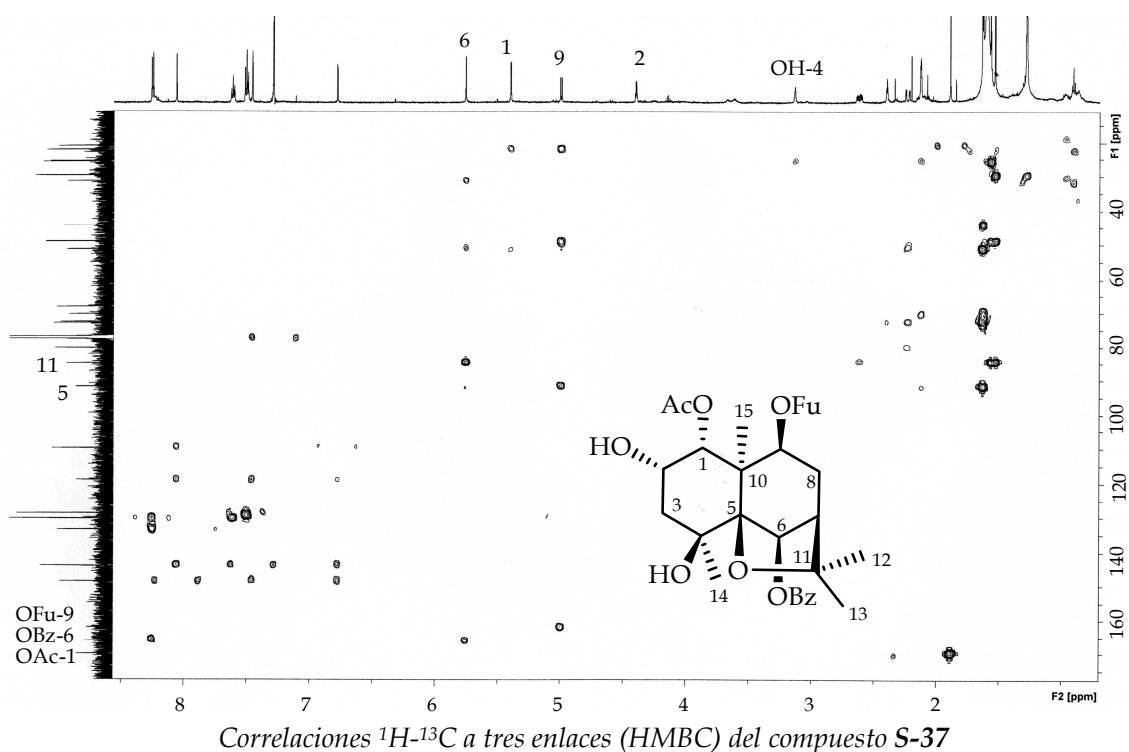
Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de los compuestos **S-36** y **S-37**



Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto **S-38**

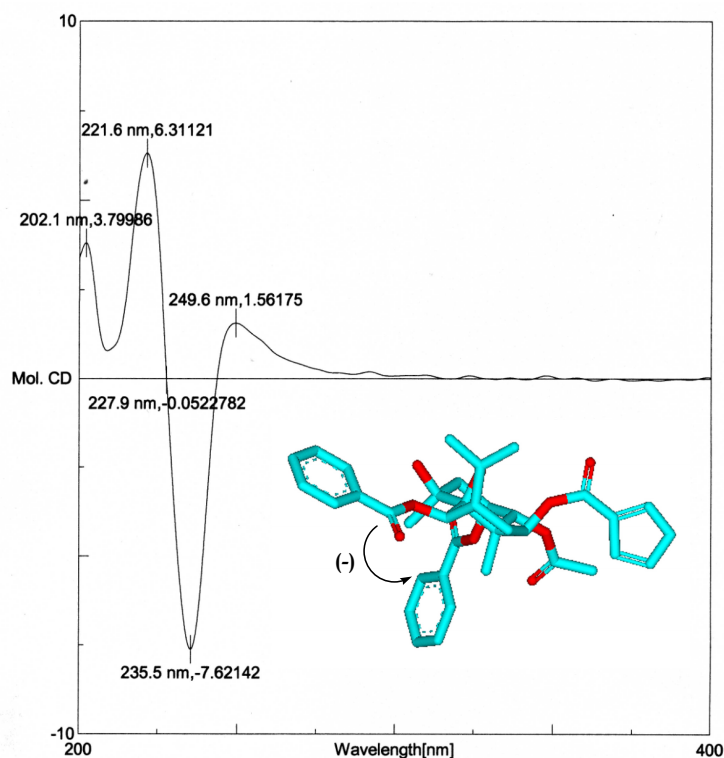
La regiosustitución de los diferentes grupos en el sistema decalínico fue determinada mediante un experimento HMBC. A modo de ejemplo, las correlaciones más significativas observadas en el experimento HMBC del compuesto **S-37** fueron las siguientes: correlación a tres enlaces entre el protón H-1

(5,40 δ_H , d, $J = 3,4$ Hz) y el carbono carboxílico del grupo acetato a 170,0 δ_C , correlación entre H-6 (5,76 δ_H , 1H, s) y el carbono carboxílico del grupo benzoato a 166,0 δ_C y correlación entre H-9 (5,00 δ_H , d, $J = 6,6$ Hz) y el carbono carboxílico del grupo furoato a 162,2 δ_C . Así mismo, se observaron correlaciones entre el protón H-6 (5,76 δ_H) y el protón H-8 (2,62 δ_H , ddd, $J = 3,4, 6,9, 16,3$ Hz) con el carbono C-11 (84,5 δ_C) y correlación entre H-9 (5,00 δ_H) y el C-5 (91,6 δ_C), entre otras.



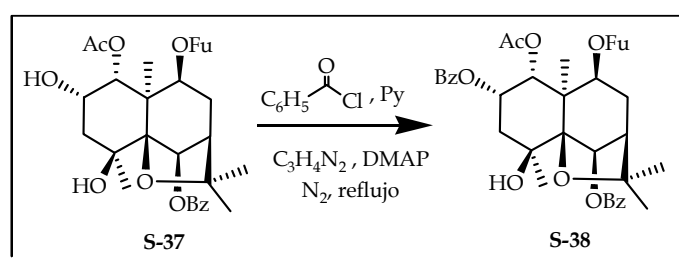
La estereoquímica relativa de las moléculas se determinó mediante un experimento ROESY, donde se observaron como principales correlaciones espaciales las de H-1 con H-2, correlaciones del Me-14 con H-6 y el Me-15 y efecto ROE de H-9 con el Me-15.

La configuración absoluta de **S-38**, (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-acetoxi-2,6-dibenzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano, fue establecida a partir del estudio de la curva de dicroísmo circular, que presentó un primer efecto Cotton negativo a 235,5 nm ($\Delta\epsilon = -7,6$) y un segundo efecto Cotton positivo a 221,6 ($\Delta\epsilon = +6,3$), debido al acoplamiento de los dos grupos benzoato, situados sobre C-2 α y C-6 β , disposición que resultó adecuada para dicho estudio.



Curva de dicroísmo circular del compuesto S-38

Una vez conocida la configuración absoluta de **S-38**, la correlación química con el compuesto **S-37**, permitió establecer la estructura y configuración absoluta del este último como (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2-diacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4,15-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano.



Correlación química de S-37 con S-38

La configuración absoluta del compuesto **S-36**, (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*S*)-2-acetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-1,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano, fue asumida basándonos en consideraciones biogénicas, ya que **S-37** y **S-38** de configuración absoluta establecida, presentan el mismo esqueleto polihidroxílico base, 2 α ,4 β -dihidroxi-celorbicol⁵.

Tabla 4.3.11. Datos^a de RMN de ¹H de los sesquiterpenos S-31, S-34 y S-36- S-38.

| Posición | S-31 | S-34 | S-36 | S-37 | S-38 |
|----------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| H-1 | 5,55 d (3,1) | 5,54 d (3,3) | 4,43 d (3,5) | 5,40 d (3,4) | 5,58 d (3,4) |
| H-2 | 4,40 m | 5,51 dd (3,3, 6,6) | 5,30 dd (3,5, 7,0) | 4,40 dd (3,4, 7,0) | 5,84 da (3,4) |
| H-6 | 6,32 s | 6,14 s | 5,76 s | 5,76 s | 5,83 s |
| H-7 | 2,41 t (4,4) | 2,22 t (4,7) | 2,42 t (3,5) | 2,41 t (3,4) | 2,42 t (3,2) |
| H-9 | 5,52 d (7,2) | 5,35 d (7,2) | 5,07 d (6,4) | 5,00 d (6,6) | 5,00 d (6,8) |
| Me-12 | 1,62 s | 1,58 s | 1,58 s | 1,57 s | 1,60 s |
| Me-13 | 1,58 s | 1,54 s | 1,61 s | 1,54 s | 1,56 s |
| Me-14 | 1,61 s | 1,52 s | 1,54 s | 1,63 s | 1,66 s |
| H-15 | 4,63, 5,06 d _{AB} (13,1) | 4,38, 4,99 d _{AM} (12,9) | 1,46 s | 1,64 s | 1,69 s |
| OAc-1 | 1,71 s | 1,73 s | - | 1,89 s | 1,76 s |
| OAc-2 | - | 2,13 s | 2,10 s | - | - |
| OAc-6 | - | 2,14 s | - | - | - |
| OAc-15 | 2,35 s | 2,29 s | - | - | - |

^a δ , CDCl₃, 400 y 600 MHz, J en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC.

Tabla 4.3.12. Datos^a de RMN de ¹³C de los sesquiterpenos S-31, S-34, S-36-S-38.

| Posición | S-31 | S-34 | S-36 | S-37 | S-38 |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| C-1 | 73,4 d | 70,3 d | 68,2 d | 72,7 d | 70,1 d |
| C-2 | 67,4 d | 68,1 d | 72,8 d | 68,1 d | 69,4 d |
| C-3 | 44,3 t | 41,9 t | 42,5 t | 44,1 t | 42,5 t |
| C-4 | 70,1 s | 69,7 s | 70,1 s | 70,1 s | 70,0 s |
| C-5 | 91,5 s | 91,0 s | 91,4 s | 91,6 s | 91,3 s |
| C-6 | 78,8 d | 78,1 d | 80,3 d | 80,0 d | 80,0 d |
| C-7 | 49,1 d | 49,1 d | 49,1 d | 49,4 d | 49,0 d |
| C-8 | 34,7 t | 34,7 t | 31,2 t | 31,2 t | 31,3 t |
| C-9 | 69,4 d | 68,4 d | 72,1 d | 72,6 d | 72,1 d |
| C-10 | 55,2 s | 54,8 s | 52,7 s | 51,1 s | 51,1 s |
| C-11 | 84,5 s | 84,5 s | 84,6 s | 84,5 s | 84,8 s |
| C-12 | 29,5 c | 29,4 c | 29,7 c | 29,7 c | 29,7 c |
| C-13 | 25,8 c | 25,6 c | 25,8 c | 25,8 c | 25,7 c |
| C-14 | 25,1 c | 25,1 c | 25,2 c | 25,5 c | 25,4 c |
| C-15 | 66,0 t | 65,5 t | 20,0 c | 22,0 c | 21,8 c |
| OAc-1 | 169,7 s | 169,5 s | - | 170,0 s | 169,8 s |
| OAc-2 | - | 169,7 s | 171,5 s | - | - |
| OAc-6 | - | 170,3 s | - | - | - |
| OAc-15 | 170,6 s | 170,6 s | - | - | - |

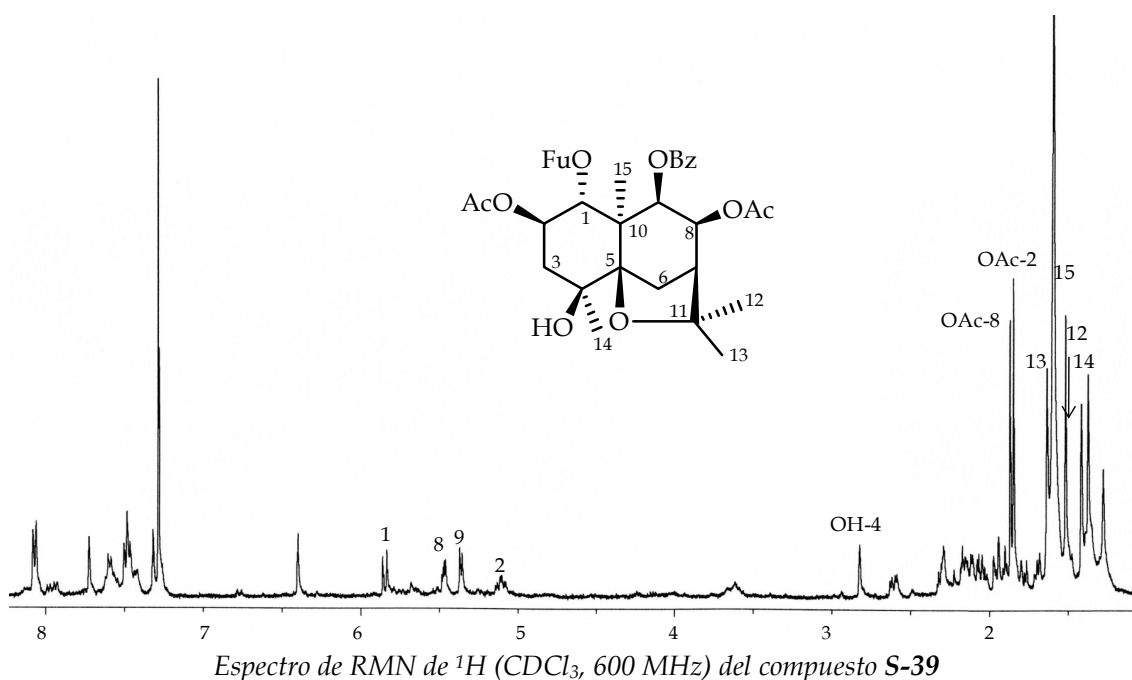
^a δ , CDCl₃, 100 y 150 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

Sesquiterpeno S-39

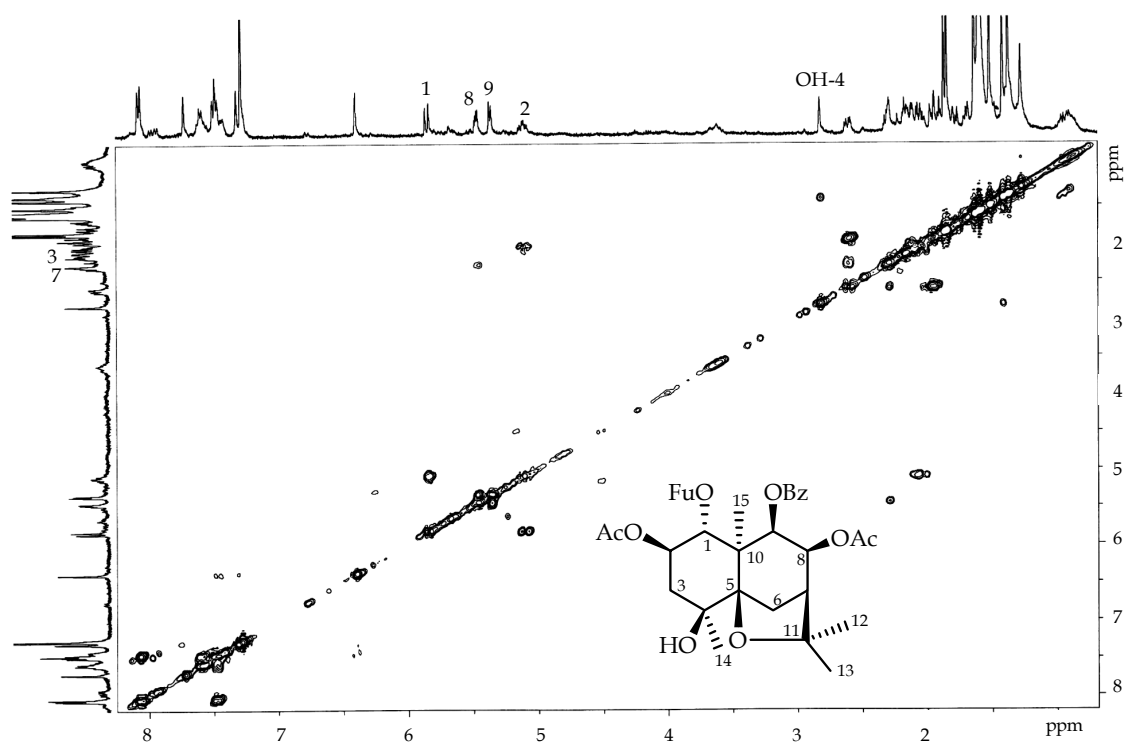
El compuesto que denominamos **S-39** presentó una fórmula molecular de $C_{31}H_{36}O_{11}$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución y datos de RMN de ^{13}C . En su espectro de IR se observaron bandas de absorción a 3532 y 1741 cm^{-1} , que indicaron la presencia de grupos hidroxilo y carboxilo.

En su espectro de RMN 1H (tabla 4.3.13) se observó la presencia de dos singuletes, que integran para tres protones cada uno, a $1,85$ y $1,87\ \delta$, asignados a dos metilos de grupos acetato, señales correspondientes a un grupo benzoato [$7,48\ \delta$ (2H, m), $7,60\ \delta$ (1H, m), $8,07\ \delta$ (2H, d, $J = 7,1\text{ Hz}$)] y señales asignables a un grupo furoato [$6,40\ \delta$ (1H, d, $J = 1,8\text{ Hz}$), $7,32\ \delta$ (1H, t, $J = 1,8\text{ Hz}$), $7,72\ \delta$ (1H, d, $J = 1,8\text{ Hz}$)] en la molécula.

Estos datos se corroboran en su espectro de RMN ^{13}C (tabla 4.3.14), donde se observaron señales de dos carbonos metílicos a $20,8$ y $20,9\ \delta$ y dos carbonos carboxílicos a $170,4$ y $169,3\ \delta$, correspondientes a dos grupos acetatos, así como señales correspondientes a carbonos de un grupo benzoato [$128,0\ \delta$ (2 x d), $129,7$ (s), $130,3$ (2 x d), $133,0\ \delta$ (d), $165,8\ \delta$ (s)] y un grupo furoato [$109,5\ \delta$ (d), $118,6\ \delta$ (s), $143,5\ \delta$ (d), $147,5\ \delta$ (d), $161,1\ \delta$ (s)].



Un cuidadoso estudio del espectro de RMN de ^1H y de los experimentos bidimensionales ^1H - ^1H (COSY) y ^1H - ^{13}C (HSQC) nos permitió la asignación de las señales correspondientes a los protones existentes en la molécula. Así, en su espectro de RMN de ^1H se observaron, además de las señales antes citadas, señales correspondientes a cuatro protones metínicos unidos a oxígeno a 5,11 δ (1H, dt, $J = 4,6, 10,6$ Hz), 5,36 (1H, d, $J = 6,2$ Hz), 5,47 δ (1H, dd, $J = 3,3, 6,2$ Hz) y 5,85 δ (1H, d, $J = 10,6$ Hz, H-1), señales de un metino a 2,29 δ y dos metilenos [1,95 δ (1H, d, $J = 12,8$ Hz) y 2,61 δ (1H, dd, $J = 5,1, 12,8$ Hz,)] y [2,09 δ (2H, m)].



Experimento COSY del compuesto S-39

En los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (tablas 4.3.13 y 4.3.14) se observaron así mismo, señales correspondientes a cuatro metilos a 1,37, 1,42, 1,52 y 1,64 δ_{H} como singuletes, así como cuatro carbonos cuaternarios a 48,8 δ_{C} (C-10), 70,4 δ_{C} (C-4), 82,2 δ_{C} (C-11) y 89,5 δ_{C} (C-5). Los datos anteriores indicaron que el producto S-39 es un sesquiterpeno poliesterificado pentasustituido, con un esqueleto de dihidro- β -agarofurano.

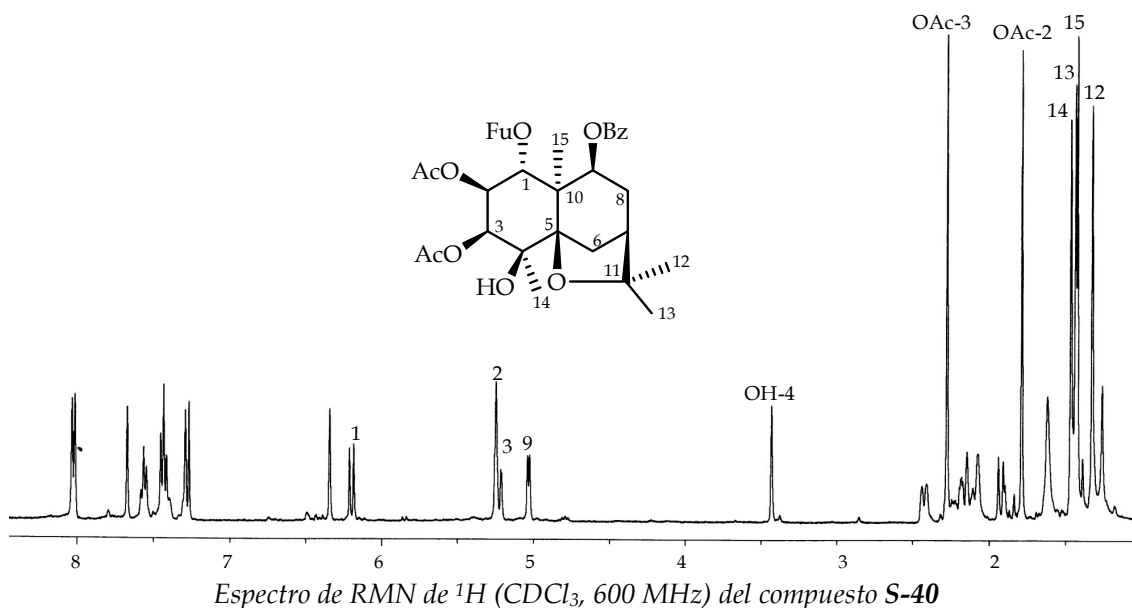
La regiosustitución de los diferentes grupos funcionales en la molécula se determinó mediante un experimento HMBC, donde se observó que las señales de los carbonos carboxílicos de los grupos benzoato y furoato a 165,8 y 161,1 δ_{C} fueron

correlacionadas con las señales a 5,36 y 5,85 δ_H , correspondientes a H-9 y H-1, respectivamente. Así mismo, las señales de los carbonos carboxílicos de los grupos acetato a 169,3 y 170,4 δ_C , mostraron correlación a tres enlaces con las señales a 5,11 y 5,47 δ_H , señales correspondientes a los protones H-2 y H-8, respectivamente.

La estereoquímica relativa de la molécula se determinó mediante un experimento ROESY, donde se observó correlación de la señal asignada al Me-15 (1,52 δ_H) con H-2 (5,11 δ_H), H-8 (5,47 δ_H) y H-9 (5,36 δ_H). Estos datos permitieron establecer la estructura de **S-39** como 2 β ,8 β -diacetoxi-9 β -benzoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano.

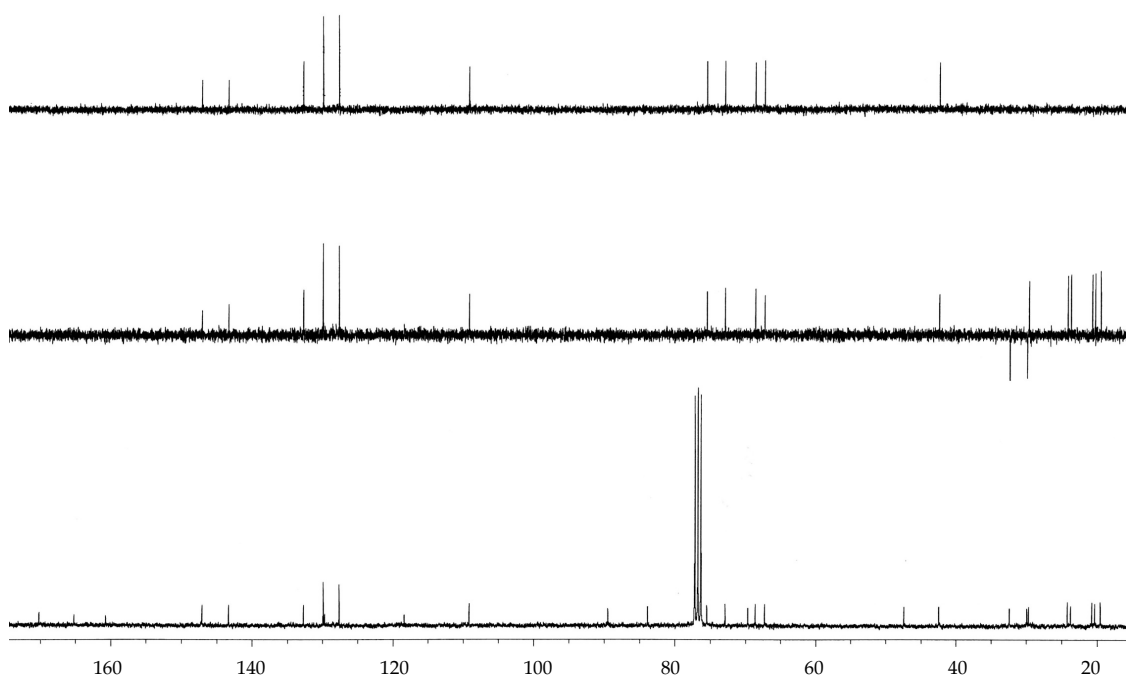
Sesquiterpeno S-40

El metabolito que denominamos **S-40** presentó la misma fórmula molecular que **S-39**, $C_{31}H_{36}O_{11}$, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución y el estudio de sus datos de RMN de 1H y ^{13}C y experimentos bidimensionales nos indicó que se trata de un regioisómero de **S-39**.

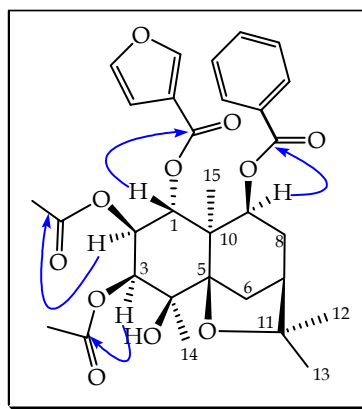


En un experimento HMBC se observó correlación de las señales asignadas a los protones H-2 (5,19) y H-3 (5,24 δ_H) con los carbonos carboxílicos de los grupos acetato a 170,1 δ_C y 170,2 δ_C , respectivamente. Además, se observó correlación de los protones H-1 (6,18 δ_H) y H-9 (5,02 δ_H) con los carbonos carboxílicos a 160,8 δ_C y 165,5 δ_C , correspondientes a los grupos furoato y benzoato, respectivamente. Estos datos indicaron que **S-40** presentó como única diferencia con **S-39**, la localización

de un grupo acetato en C-3 en lugar de en C-8. La estructura de **S-40** se estableció así como 2 β ,3 β -diacetoxi-9 β -benzoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano.



Espectro de RMN de ^{13}C y experimentos DEPTs (CDCl_3 , 150 MHz) de **S-40**



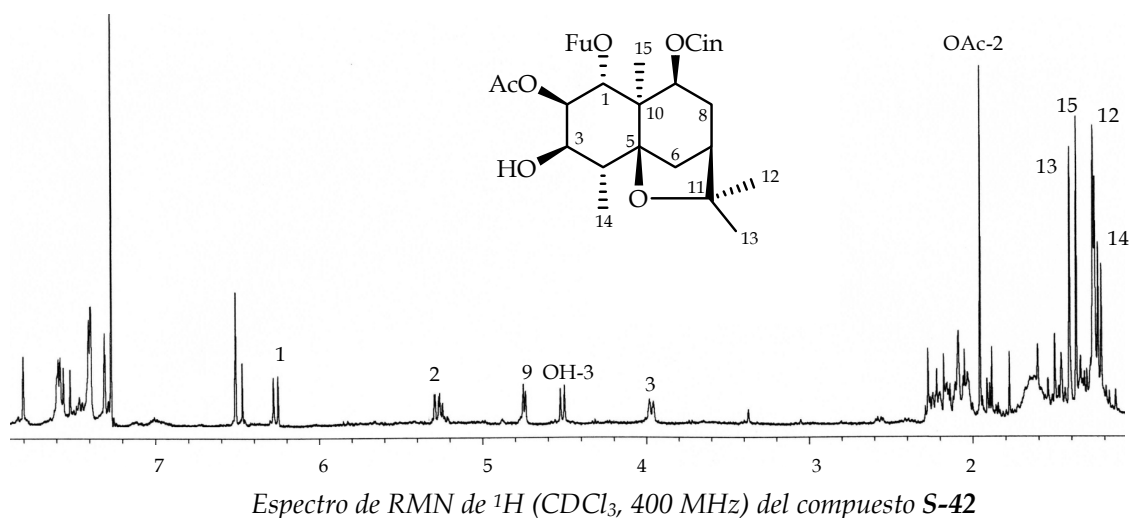
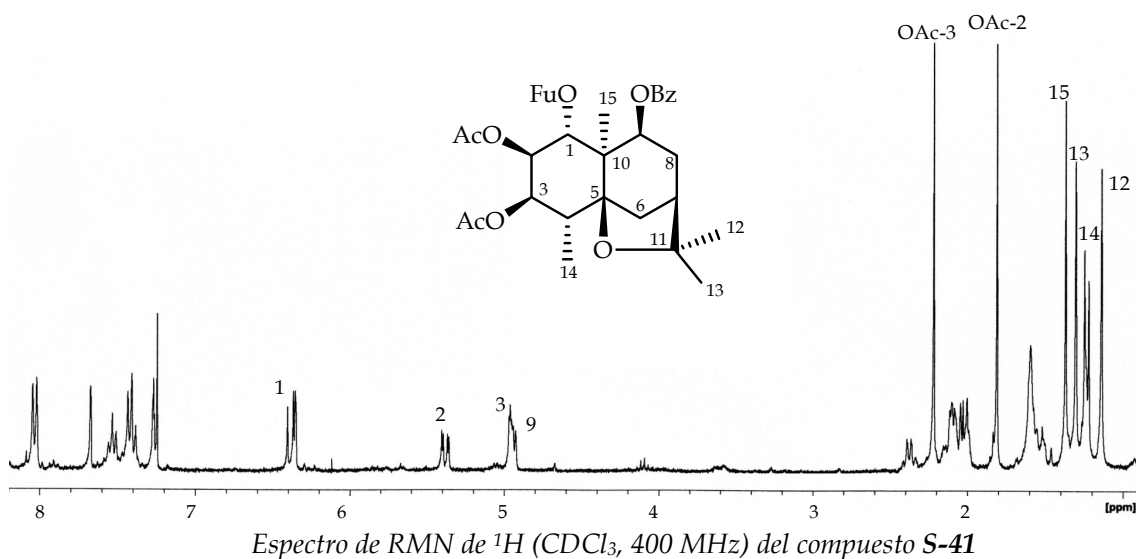
Correlaciones más significativas observadas en el experimento HMBC de **S-40**

Sesquiterpenos **S-41** y **S-42**

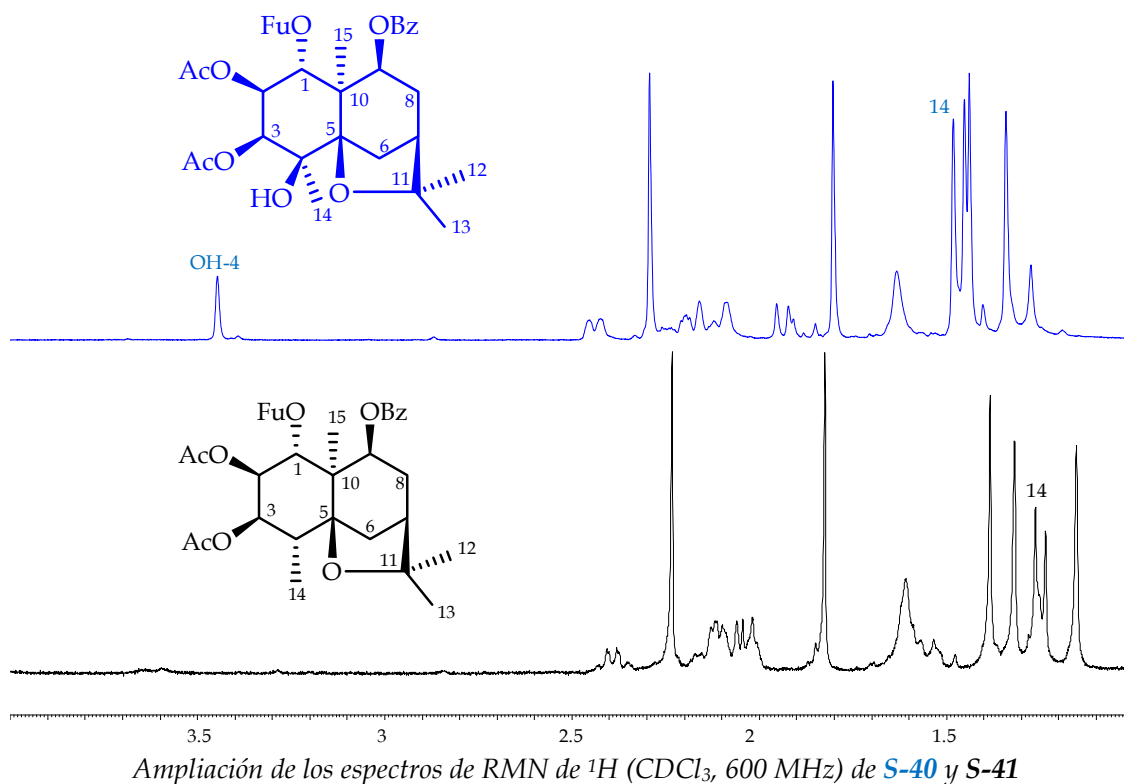
A los compuestos **S-41** y **S-42** se les asignó la estructura de 2 β ,3 β -diacetoxi-9 β -benzoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-dihidro- β -agarofurano y 2 β -acetoxi-9 β -*trans*-cinamoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-3 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano, respectivamente.

Ambos compuestos presentaron señales en sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (tablas 4.3.13 y 4.3.14), asignables a un grupo furoato y grupos acetato (dos en el

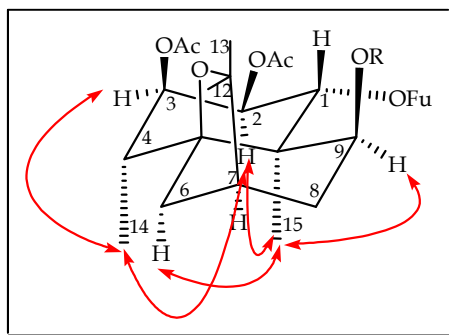
compuesto **S-41** y uno en **S-42**). Además, se observaron señales para cinco protones y seis carbonos aromáticos (7,45-8,07 δ_H , 127,7-132,5, 165,4 δ), características de un grupo benzoato en los espectros del compuesto **S-41**. Por otro lado se observaron señales de protones y carbonos correspondientes a un grupo cinamato (6,50-7,60 δ_H , 118,8-144,6, 166,3 δ_C) y un alcohol secundario a 3,98 δ_H y 73,7 δ_C en el compuesto **S-42**. Estos datos están de acuerdo con las fórmulas moleculares determinadas por espectrometría de masas de alta resolución de $C_{31}H_{36}O_{10}$ y $C_{31}H_{36}O_9$ para **S-41** y **S-42**, respectivamente.



Estos datos nos indicaron que el compuesto **S-41** está relacionado con **S-40**, compuesto que describimos anteriormente, observándose como principal diferencia en su espectro de RMN de 1H la ausencia de la señal correspondiente al grupo hidroxilo terciario en C-4 presente en el compuesto **S-41**, además de la presencia de un doblete asignado al Me-14 (1,27, d, $J = 8,1$ Hz).



Los experimentos HMBC de los compuestos **S-41** y **S-42** nos permitieron asignar de forma inequívoca la posición de los distintos ésteres en las moléculas. La estereoquímica relativa de 1α , 2β , 3β , 9β fue establecida por medio de las constantes de acoplamiento y un experimento ROESY, igual que en los casos anteriores.



Efectos ROE más significativos observados en el experimento ROESY de **S-41** y **S-42**

Tabla 4.3.13. Datos^a de RMN de ¹H de los sesquiterpenos S-39 a S-42.

| Posición | S-39 | S-40 | S-41 | S-42 |
|----------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| H-1 | 5,85 d (10,6) | 6,18 d (10,8) | 6,42 d (11,1) | 6,28 d (11,2) |
| H-2 | 5,11 dt (4,6, 10,6) | 5,19 dd (2,8, 10,8) | 5,42 dd (3,0, 11,1) | 5,29 dd (2,9, 11,2) |
| H-3 | 2,09 | 5,24 d (2,8) | 5,00 d (3,0) | 3,98 dd (2,9, 9,9) |
| H-4 | - | - | 2,41 c (8,1) | 2,27 m |
| H-7 | 2,29 m | 2,09 m | 2,04 m | 2,07 m |
| H-8 | 5,47 dd (3,3, 6,2) | 2,18 m | 2,13 m | 2,13 m |
| H-9 | 5,36 d (6,2) | 5,02 d (5,8) | 4,98 d (5,3) | 4,76 d (5,6) |
| Me-12 | 1,37 s | 1,31 s | 1,18 s | 1,29 s |
| Me-13 | 1,64 s | 1,43 s | 1,34 s | 1,43 s |
| Me-14 | 1,42 s | 1,45 s | 1,27 d (8,1) | 1,24 d (8,1) |
| Me-15 | 1,52 s | 1,42 s | 1,41 s | 1,39 s |
| OAc-2 | 1,87 s | 1,77 s | 1,85 s | - |
| OAc-3 | - | 2,26 s | 2,26 s | 1,97 s |
| OAc-8 | 1,85 s | - | - | - |

^a δ , CDCl₃, 400 y 600 MHz, J en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC.

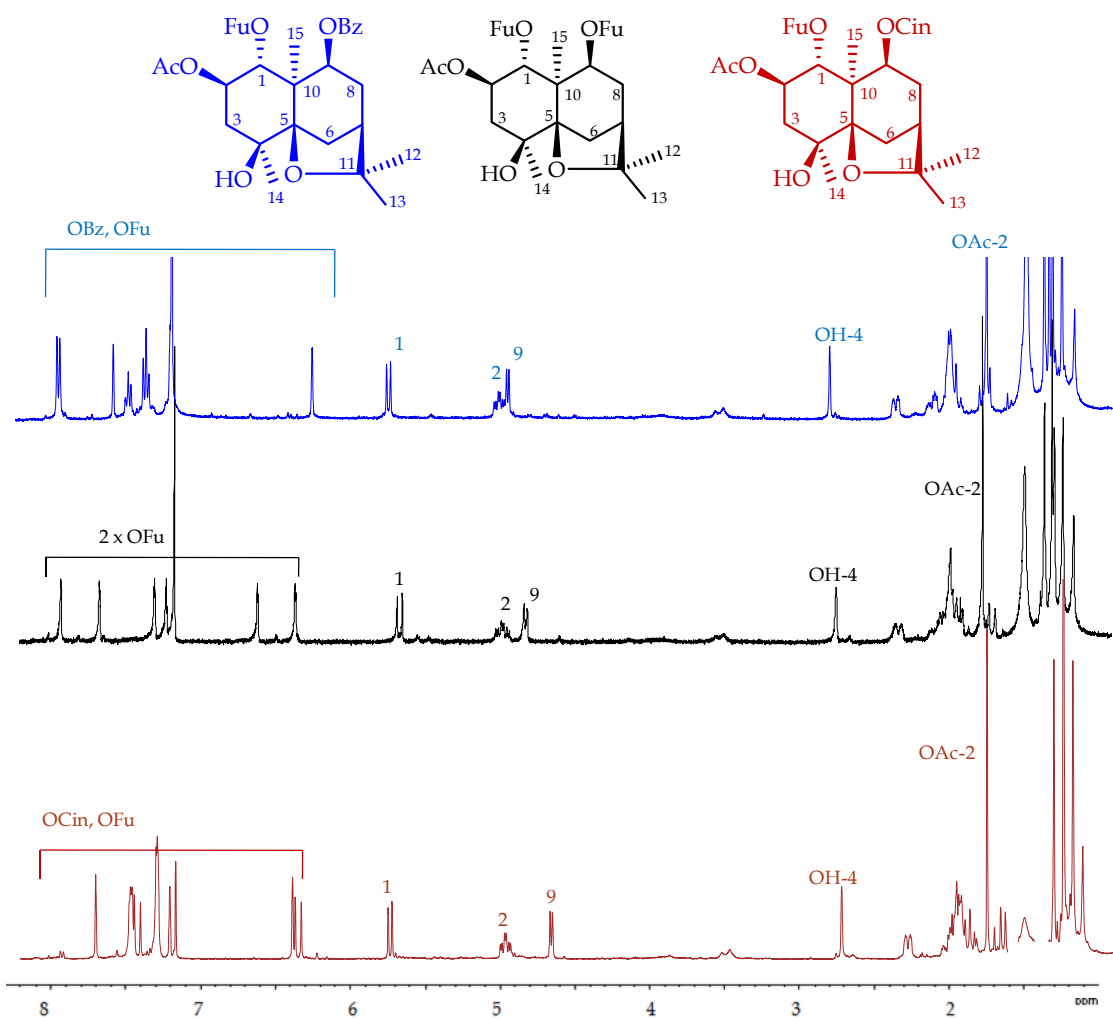
Tabla 4.3.14. Datos^a de RMN de ¹³C de los sesquiterpenos S-39 a S-42.

| Posición | S-39 | S-40 | S-41 | S-42 |
|----------|---------|---------|---------|---------|
| C-1 | 72,0 d | 67,3 d | 68,4 d | 68,4 d |
| C-2 | 69,0 d | 68,6 d | 67,9 d | 71,3 d |
| C-3 | 42,5 t | 75,5 d | 75,0 d | 73,7 d |
| C-4 | 70,4 s | 69,7 s | 43,4 d | 47,2 d |
| C-5 | 89,5 s | 89,5 s | 85,8 s | 88,8 s |
| C-6 | 31,4 t | 32,5 t | 36,2 t | 36,7 t |
| C-7 | 48,2 d | 42,5 d | 42,6 d | 42,3 d |
| C-8 | 69,9 d | 30,0 t | 30,3 t | 31,2 t |
| C-9 | 72,2 d | 72,9 d | 73,3 d | 73,4 d |
| C-10 | 48,8 s | 47,4 s | 49,4 s | 49,9 s |
| C-11 | 82,2 s | 83,9 s | 82,3 s | 84,5 s |
| C-12 | 30,9 c | 29,7 c | 30,0 c | 30,1 c |
| C-13 | 25,2 c | 24,2 c | 24,2 c | 24,1 c |
| C-14 | 24,8 c | 23,7 c | 15,9 c | 16,2 c |
| C-15 | 20,0 c | 19,6 c | 18,9 c | 19,2 c |
| OAc-2 | 169,3 s | 170,1 s | 170,4 s | 170,9 s |
| OAc-3 | - | 170,2 s | 171,0 s | - |
| OAc-8 | 170,4 s | - | - | - |

^a δ , CDCl₃, 100 y 150 MHz Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

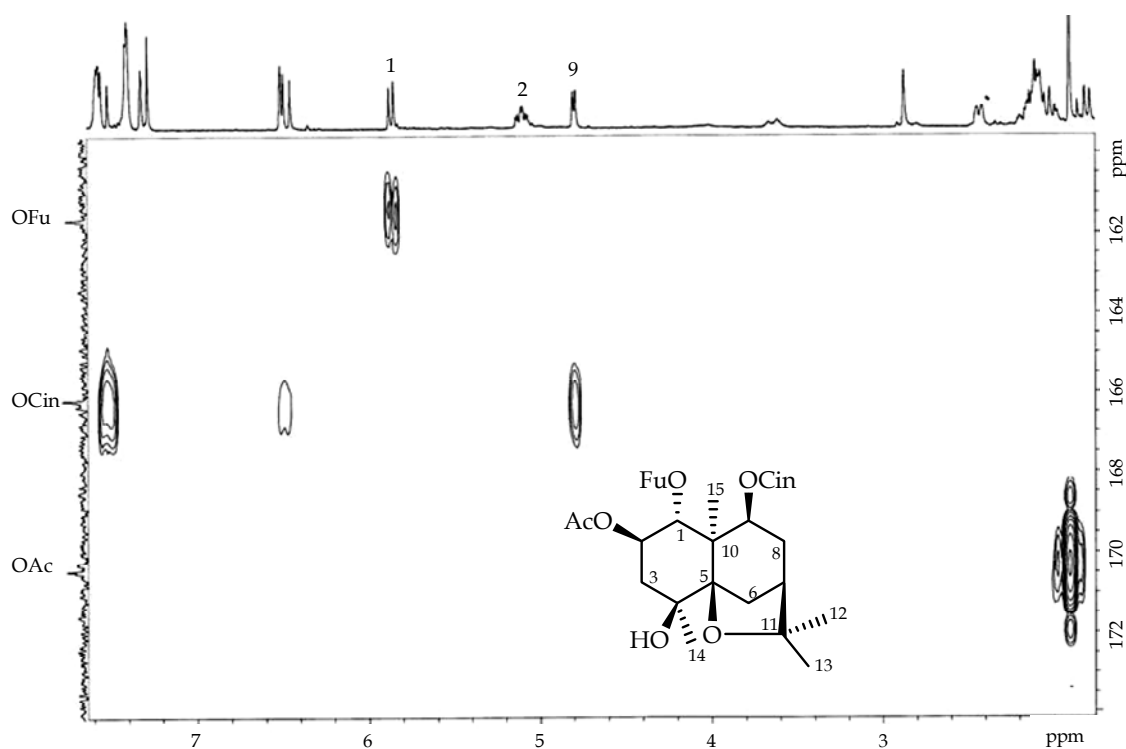
Sesquiterpenos de S-43 a S-45

El estudio de los datos espectroscópicos de **S-43**, **S-44** y **S-45** nos permitió determinar sus estructuras, indicando que poseen el mismo esqueleto polihidroxílico base. En sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (tablas 4.3.15 y 4.3.16) se observaron señales asignadas a un grupo acetato, un grupo furoato y un alcohol terciario, en los tres compuestos, siendo la única diferencia estructural el sustituyente situado sobre C-9. Así, el compuesto **S-43** presentó señales características de un grupo cinamato, el compuesto **S-44** presentó señales para un grupo furoato y el **S-45** para un grupo benzoato, lo que por otra parte está de acuerdo con su fórmulas moleculares, $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{O}_9$, $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{10}$ y $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_9$, determinadas por EMAR.



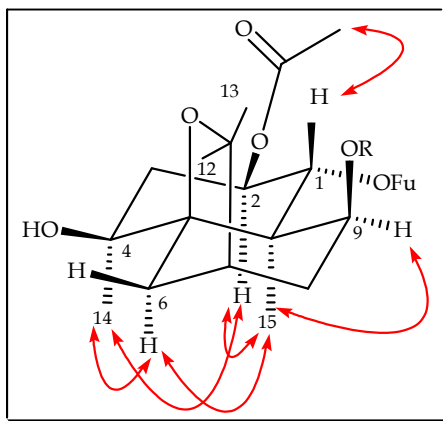
Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz ó 400 MHz) de los compuestos **S-43**, **S-44** y **S-45**.

Un experimento HMBC nos permitió determinar la regiosustitución de los diferentes grupos funcionales en el sistema decalínico. Así, se observó correlación entre H-1 ($5,83 \delta_H$ en **S-43**, $5,75 \delta_H$ en **S-44** y $5,84 \delta_H$ en **S-45**) y los carboxilos de los grupos furoatos ($161,6 \delta_C$ en **S-43**, $161,7 \delta_C$ en **S-44** y $161,1 \delta_C$ en **S-45**) y correlación entre protón H-9 ($4,76 \delta_H$ en **S-43**, $4,91 \delta_H$ en **S-44** y $5,05 \delta_H$ en **S-45**) y los carboxilos del grupo cinamato ($166,2 \delta_C$), furoato ($162,4 \delta_C$) y benzoato ($165,6 \delta_C$), respectivamente. El grupo acetato se situó sobre la única posición esterificada restante sobre la molécula, H-2.



Amplificación del experimento HMBC del compuesto **S-43**

La estereoquímica relativa fue determinada mediante un estudio de las constantes de acoplamiento que nos indicó una relación *trans* para el sistema H-1, H-2 ($J_{1,2} = 10,6$ Hz para **S-43**, $J_{1,2} = 10,3$ Hz para **S-44** y $J_{1,2} = 10,5$ Hz para **S-45**). Esto fue confirmado mediante un experimento ROESY, donde se observó efectos ROE del Me-15 con H-2, H-6 α , H-9 y Me-14, así como correlación de H-1 con el metilo del acetato en posición 2. Estos datos nos permitieron establecer las estructuras de **S-43**, **S-44** y **S-45** como 2 β -acetoxi-9 β -*trans*-cinamoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-4 β -hidroxidi-hidro- β -agarofurano, 2 β -acetoxi-1 α ,9 β -di-(3-furoiloxi)-4 β -hidroxidi-hidro- β -agarofurano y 2 β -acetoxi-9 β -benzoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-4 β -hidroxidi-hidro- β -agarofurano.



Efectos ROE observados en los experimentos ROESY de los compuestos S-43 a S-45

Tabla 4.3.15. Datos^a de RMN de ¹H de los sesquiterpenos S-43 a S-45.

| Posición | S-43 | S-44 | S-45 |
|----------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| H-1 | 5,83 d (10,6) | 5,75 d (10,3) | 5,84 d (10,5) |
| H-2 | 5,9 dt (4,7, 10,6) | 5,06 dt (4,1, 10,3) | 5,11 dt (4,8, 10,5) |
| H-3 | 2,09 m | 2,08 m | 2,08 m |
| H-6 | α, 1,80 d (12,5) β, 2,43 da (12,5) | α, 1,81 d (12,4) β, 2,43 da (12,4) | α, 1,84 d (12,4) β, 2,47 da (12,4) |
| H-7 | 2,09 * | 2,03 m | 2,09 m* |
| H-8 | 2,14 m | 2,12 m | 2,09 m* |
| H-9 | 4,76 d (5,0) | 4,91 d (6,8) | 5,05 d (6,5) |
| Me-12 | 1,33 s | 1,33 s | 1,36 s |
| Me-13 | 1,45 s | 1,45 s | 1,48 s |
| Me-14 | 1,39 s* | 1,39 s | 1,42 s |
| H-15 | 1,39 s* | 1,40 s | 1,45 s |
| OAc-2 | 1,89 s | 1,86 s | 1,86 s |

^a δ, CDCl₃, 300 ó 400 MHz, J en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC. * Señales solapadas.

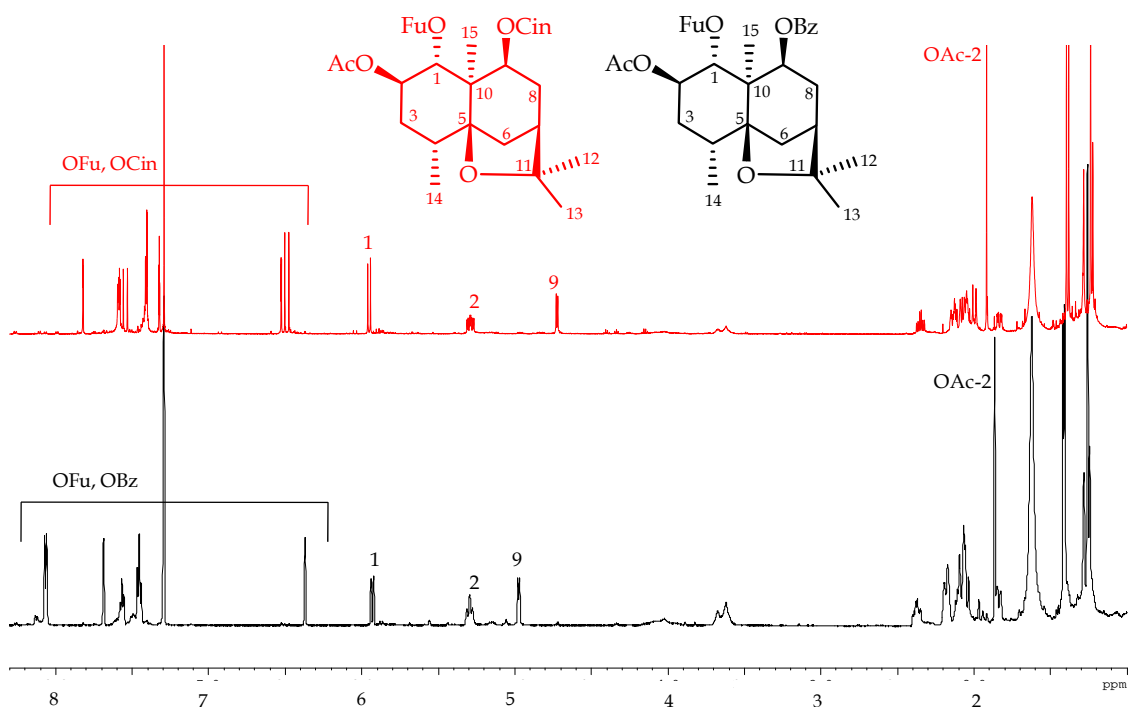
Tabla 4.3.16. Datos^a de RMN de ¹³C de los sesquiterpenos S-43 a S-45.

| Posición | S-43 | S-44 | S-45 |
|----------|---------|---------|---------|
| C-1 | 72,5 d | 72,3 d | 72,6 d |
| C-2 | 69,2 d | 68,9 d | 69,1 d |
| C-3 | 42,6 t | 42,4 t | 42,7 t |
| C-4 | 70,5 s | 70,3 s | 70,6 s |
| C-5 | 89,9 s | 89,7 s | 90,0 s |
| C-6 | 31,5 t | 31,4 t | 31,6 t |
| C-7 | 43,4 d | 43,2 d | 43,4 d |
| C-8 | 31,0 t | 30,8 t | 31,0 t |
| C-9 | 73,4 d | 72,9 d | 73,6 d |
| C-10 | 48,2 s | 47,9 s | 48,3 s |
| C-11 | 83,9 s | 83,7 s | 84,1 s |
| C-12 | 30,1 c | 29,8 c | 30,0 c |
| C-13 | 24,2 c | 24,1 c | 24,4 c |
| C-14 | 24,9 c | 24,7 c | 25,0 c |
| C-15 | 19,8 c | 19,7 c | 20,0 c |
| OAc-2 | 170,4 s | 170,5 s | 170,5 s |

^a δ , CDCl₃, 75 ó 100 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

Sesquiterpenos S-46 y S-47

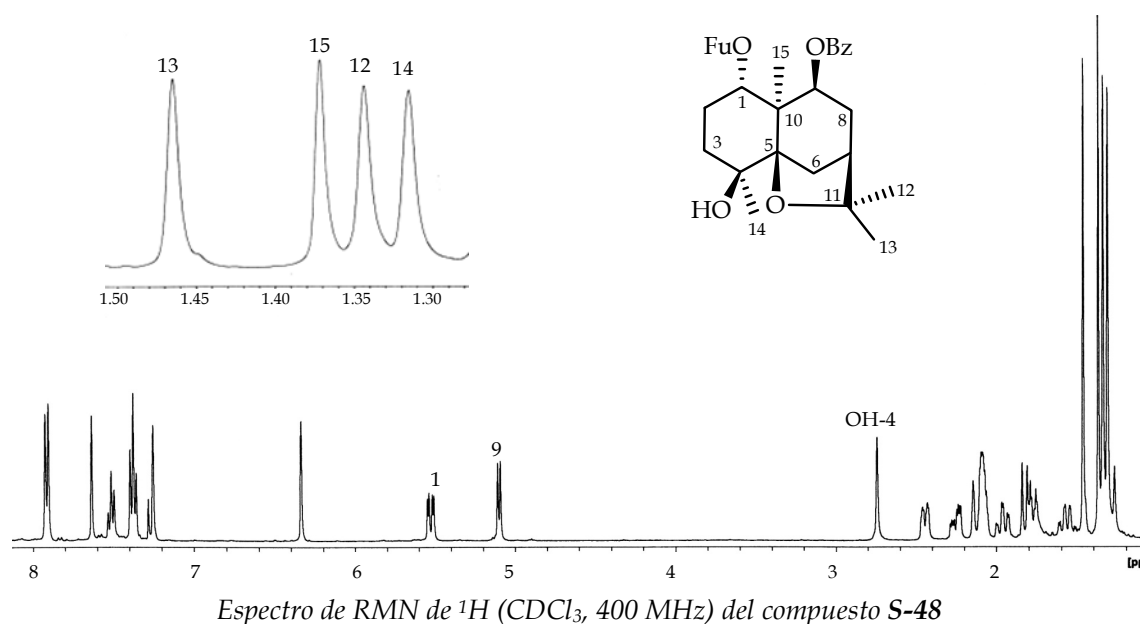
Los compuestos **S-46** y **S-47** presentaron una fórmula molecular de $C_{29}H_{34}O_8$ y $C_{31}H_{36}O_8$, respectivamente, determinada por espectrometría de masas de alta resolución. Ambos compuestos presentaron señales en su espectro de RMN de ^{13}C (tabla 4.3.18) correspondientes a un grupo acetato (21,1, 170,9 δ_C en **S-46** y 21,1, 172,1 δ_C , en **S-47**) y un grupo furoato [109,5 δ_C (d), 119,1 δ_C (s), 143,4 δ_C (d), 147,2 (d), 161,2 δ_C (s) en **S-46**] y [109,6 δ_C (d), 119,3 δ_C (s), 143,4 δ_C (d), 147,3 δ_C (d), 161,7 δ_C (s) en **S-47**]. La principal diferencia entre ambos compuestos es la presencia de señales correspondientes a un grupo benzoato en **S-46** [127,9 δ_C (2 x d), 130,0 δ_C (s), 130,3 δ_C (2 x d), 132,8 δ_C (d), 165,8 δ_C (s)] y señales características de un grupo cinamato [119,0 δ_C (d), 128,1 δ_C (2 x d), 128,7 δ_C (2 x d), 130,0 δ_C (d), 134,8 δ_C (s), 144,3 δ_C (d), 166,4 δ_C (s)] en **S-47**, lo que está de acuerdo con las señales observadas en sus espectros de RMN de 1H (tabla 4.3.17). Además, cabe destacar la presencia de un metilo doblete en ambos casos (1,25 δ_H , d, $J = 8,6$ Hz en **S-46** y 1,23 δ_H , d, $J = 8,8$ Hz en **S-47**) indicando que no existe grupo hidroxilo en posición C-4 de ambos compuestos. Estos datos indican que **S-46** y **S-47** corresponden a sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos trisustituídos en las posiciones 1, 2 y 9 del esqueleto carbonado.

Espectros de RMN de 1H ($CDCl_3$, 600 MHz) de los compuestos **S-46** y **S-47**

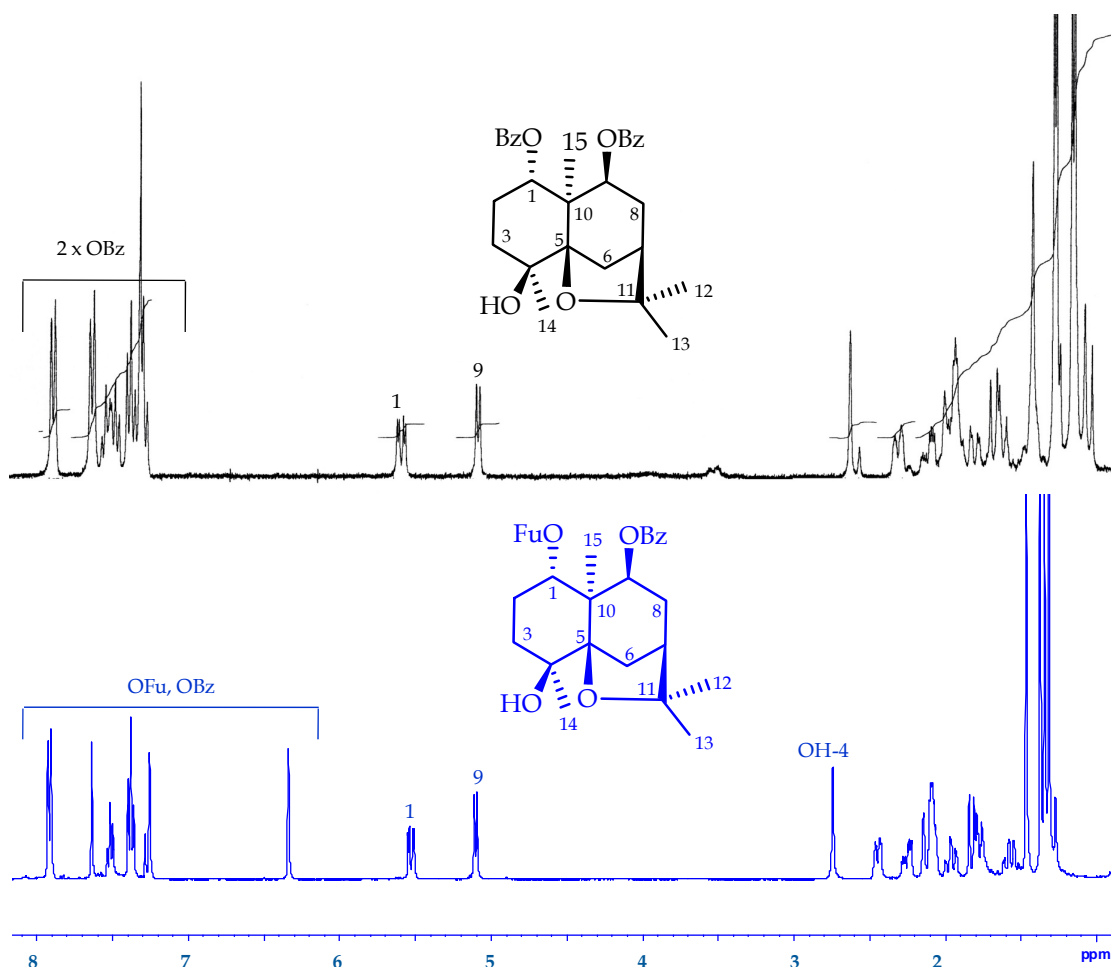
La regiosustitución y la estereoquímica de los diferentes grupos sobre la molécula fueron determinadas mediante experimentos HMBC y ROESY, respectivamente, quedando establecidas las estructuras de **S-46** y **S-47** como 2 β -acetoxi-9 β -benzoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-dihidro- β -agarofurano y 2 β -acetoxi-9 β -*trans*-cinamoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-dihidro- β -agarofurano, respectivamente.

Sesquiterpeno S-48

El producto **S-48** presentó una fórmula molecular de C₂₇H₃₂O₇, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). El estudio de sus espectros de IR, UV, RMN de ¹H y ¹³C (tablas 4.3.17 y 4.3.18) y experimentos 2D, nos indicó que se trataba de un sesquiterpeno con esqueleto de dihidro- β -agarofurano, con un grupo furoato, un benzoato y un alcohol terciario.



Un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de **S-48** con el compuesto ya existente en la bibliografía **S-49**³, mostró que ambos productos estaban relacionados, siendo la principal diferencia en sus espectros de RMN de ¹H y ¹³C, la sustitución de las señales de un grupo benzoato presente en **S-49** por señales características de un grupo furoato en **S-48**.



Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de los compuestos **S-48** y **S-49**

Un experimento HMBC nos permitió asignar de forma inequívoca la posición de los distintos ésteres en la molécula. Así, el grupo furoato fue localizado sobre C-1 y el benzoato sobre C-9, al observarse correlación de las señales a $5,53 \delta_{\text{H}}$ (H-1) y $5,10 \delta_{\text{H}}$ (H-9) con los carbonos carboxílicos de los grupos furoato ($162,1 \delta_{\text{C}}$) y benzoato ($165,6 \delta_{\text{C}}$), respectivamente. La estereoquímica relativa fue establecida por medio de un experimento ROESY, en el que se observó efecto ROE de H-9 con Me-14, Me-15 y H-8 α , además de correlación de H-1 con H-2 β y H-3 β . Estos datos nos permitieron determinar la estructura de **S-48** como 9 β -benzoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano.

La configuración absoluta del compuesto **S-48**, (1*S*,4*S*,5*R*,7*R*,9*S*,10*S*), fue establecida en base a consideraciones biogénicas, puesto que presenta el mismo esqueleto polihidroxílico base que el compuesto **S-49**³ de configuración absoluta conocida por dicroísmo circular.

Tabla 4.3.17. Datos^a de RMN de ¹H de los sesquiterpenos S-46 a S-48.

| Posición | S-46 | S-47 | S-48 |
|----------|-------------------------|--------------------------------|--|
| H-1 | 5,93 d (10,2) | 5,95 d (10,6) | 5,53 dd (3,5, 11,9) |
| H-2 | 5,29 dt (4,7, 10,2) | 5,29 ddd (4,5, 10,6, 12,4) | α, 1,56 da (11,9) β, 2,09 m |
| H-3α | 1,84 da (12,8) | 1,83 ddd (1,5, 4,5, 12,4) | 1,77 dt (3,4, 13,4) |
| H-3β | 2,37 dt (4,7, 12,8) | 2,35 dt (6,2, 12,4) | 1,94 dt (3,8, 13,4) |
| H-4 | 2,10 m | 2,06 m | - |
| H-6 | α, 2,05 m β, 2,18 m* | α, 1,99 da (12,5) β, 2,14 m | α, 1,82 d (12,3) β, 2,44 d (12,3) |
| H-7 | 2,06 m | 2,04 m | 2,10 m |
| H-8 | α, 2,18 m* β, 2,08 m | 2,09 m | α, 2,25 ddd (3,4, 6,6, 16,0) β, 2,12 da (16,0) |
| H-9 | 4,97 d (6,4) | 4,72 d (6,3) | 5,10 d (6,6) |
| Me-12 | 1,26 s | 1,25 s | 1,35 s |
| Me-13 | 1,41 s | 1,40 s | 1,47 s |
| Me-14 | 1,25 d (7,6) | 1,23 d (7,8) | 1,31 s |
| H-15 | 1,42 s | 1,38 s | 1,37 s |
| OAc-2 | 1,87 s | 1,88 s | - |

^a δ, CDCl₃, 400 y 600 MHz, J en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC. * Señales solapadas.

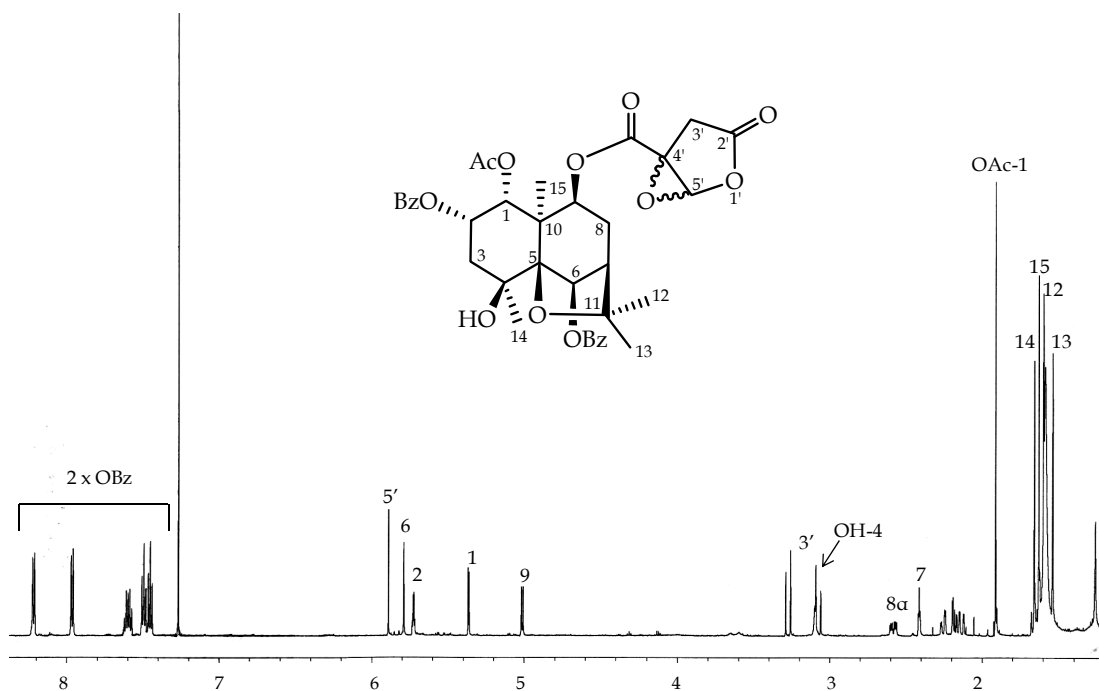
Tabla 4.3.18. Datos^a de RMN de ¹³C de los sesquiterpenos S-46 a S-48

| Posición | S-46 | S-47 | S-48 |
|----------|---------|---------|--------|
| C-1 | 73,4 d | 73,4 d | 73,2 d |
| C-2 | 69,3 d | 69,4 d | 23,8 t |
| C-3 | 33,1 t | 33,0 t | 37,0 t |
| C-4 | 40,7 d | 40,6 d | 70,3 s |
| C-5 | 86,9 s | 86,8 s | 90,6 s |
| C-6 | 36,3 t | 36,2 t | 31,6 t |
| C-7 | 43,9 d | 43,7 d | 43,5 d |
| C-8 | 31,4 t | 31,2 t | 31,2 t |
| C-9 | 74,0 d | 73,8 d | 74,0 d |
| C-10 | 49,6 s | 49,5 s | 48,1 s |
| C-11 | 82,6 s | 82,4 s | 83,5 s |
| C-12 | 30,2 c | 30,2 c | 30,0 c |
| C-13 | 24,4 c | 24,2 c | 24,4 c |
| C-14 | 18,5 c | 18,4 c | 24,1 c |
| C-15 | 19,3 c | 19,1 c | 19,3 c |
| OAc-2 | 170,9 s | 172,1 s | - |

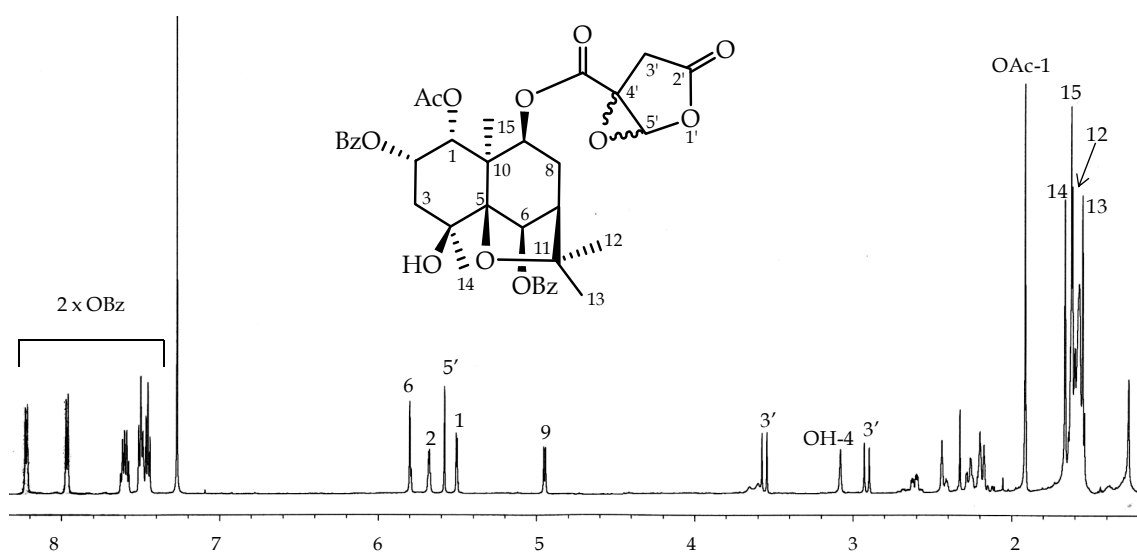
^a δ , CDCl₃, 100 y 150 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

Sesquiterpenos S-50 y S-51

Las estructuras de los compuestos **S-50** y **S-51** fueron determinadas mediante técnicas espectroscópicas y espectrometría de masas. Así, ambos compuestos presentaron la misma fórmula molecular de $C_{36}H_{38}O_{13}$ determinada mediante espectrometría de masas (ESI) y datos de RMN de 1H y ^{13}C . En sus espectros de IR se observaron bandas de absorción características de grupo hidroxilo y grupos carboxilo.



Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 600 MHz) del compuesto **S-50**

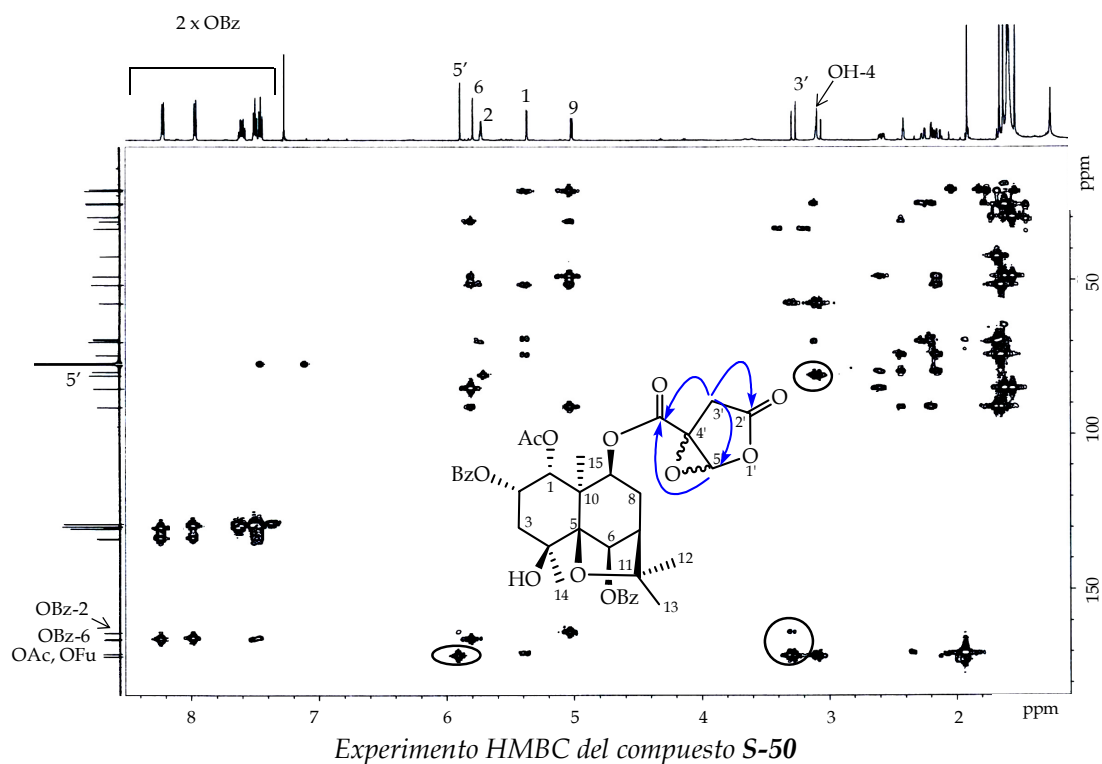


Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 600 MHz) del compuesto **S-51**

El análisis de sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (tablas 4.3.19 y 4.3.20) y experimentos bidimensionales indicaron que los compuestos **S-50** y **S-51** eran sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos poliesterificados en las posiciones 1α , 2α , 6β y 9β y que poseen dos grupos benzoatos, un grupo acetato y un alcohol terciario. Además, se observaron señales correspondientes a un éster que no habíamos identificado en los compuestos anteriores. Así, en el espectro de RMN de ^1H de ambos compuestos, se observaron señales correspondientes a un metileno [$3,07, 3,27 \delta_{\text{H}}$ (2H, d_{AB} , $J = 19,4$ Hz) en **S-50** y $2,92, 3,56 \delta_{\text{H}}$ (2H, d_{AM} , $J = 18,9$ Hz) en **S-51**] y un protón metínico [$5,89 \delta_{\text{H}}$ (1H, s) en **S-50** y $5,58 \delta_{\text{H}}$ (1H, s) en **S-51**]. Así mismo, en su espectro de RMN de ^{13}C se observaron señales para un metileno alifático, dos carbonos unidos a oxígeno y dos carbonos carboxílicos [($33,5$ (t), $57,5$ (s), $81,0$ (d), $163,8$ (s), $171,5$ (s) δ_{C} en **S-50** y $33,6$ (t), $57,6$ (s), $80,8$ (d), $163,6$ (s), $171,6$ (s) δ_{C} en **S-51**].

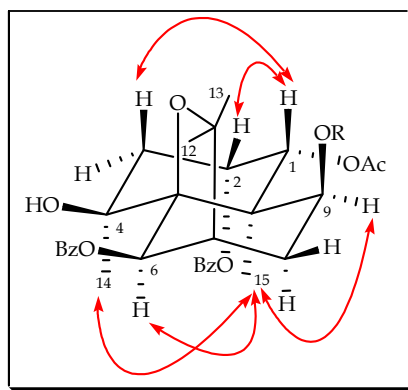
La estructura del nuevo éster fue establecida de forma inequívoca mediante experimentos bidimensionales. Así, en el experimento HSQC se asignaron las señales correspondientes al metileno y metino y en el HMBC se observó correlación entre las señales del protón metínico a $5,89 \delta_{\text{H}}$ en **S-50** y $5,58 \delta_{\text{H}}$ en **S-51**, con los carbonos a $171,5 \delta_{\text{C}}$ (s) y $171,6 \delta_{\text{C}}$ (s), respectivamente. Así mismo, se observó correlación entre el metileno a $3,07, 3,27 \delta_{\text{H}}$ en **S-50** y $2,92, 3,56 \delta_{\text{H}}$ en **S-51** y los carbonos a $81,0$ (d), $163,8$ (s) y $171,5$ (s) δ_{C} en **S-50** y $80,8$ (d), $163,6$ (s) y $171,6$ (s) δ_{C} en **S-51**. Estos datos están de acuerdo con una estructura de 4,5-epoxi-2-oxo-4-tetrahidrofuroato.

Por otra parte, en ambos compuestos, se observó correlación a tres enlaces entre el protón H-1 con el carbono carboxílico del grupo acetato y correlación de los protones H-6 y H-2 con los carbonos carboxílicos correspondientes a los grupos benzoatos. Además, se observó correlación entre el protón H-9 con el carbono carboxílico del grupo éster descrito anteriormente en la molécula. Estos datos nos permitieron establecer la regiosustitución de los diferentes ésteres en el esqueleto base de los sesquiterpenos **S-50** y **S-51**.



La esteoquímica relativa de las moléculas fue determinada mediante un estudio de las constantes de acoplamiento y corroborada mediante un experimento ROESY. Así, se observaron efectos ROE de los protones H-1 con H-2 y H-3 β , del Me-15 con H-6 y de H-9 con Me-14.

Los datos espectroscópicos y espectrométricos de **S-50** y **S-51**, nos sugieren las mismas características de regiosustitución y esteoquímica relativa de los sustituyentes sobre el esqueleto polihidroxiílico base del sesquiterpeno, por lo que la única diferencia posible entre ambos compuestos es la esteoquímica del epóxido del grupo éster en C-9, esteoquímica que hasta el momento no hemos podido determinar mediante las técnicas de RMN de 2D habitualmente usadas.



Efectos ROE observados en el experimento ROESY de los compuestos **S-50** y **S-51**.

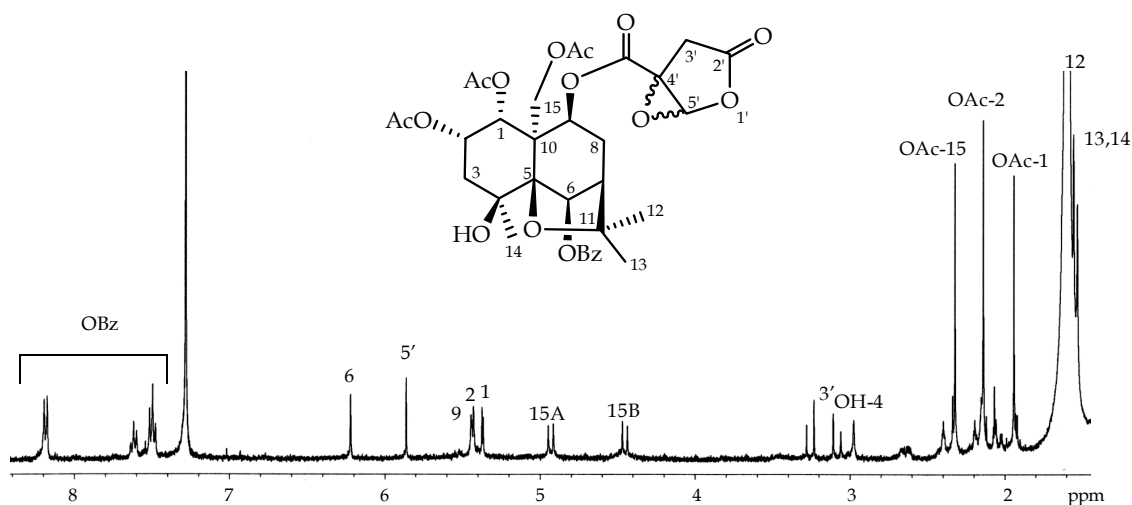
Estos compuestos están íntimamente relacionados con **S-38**, compuesto descrito con anterioridad, con la única diferencia del éster en C-9. Así, mientras **S-38** presentaba un grupo furoato sobre C-9, los productos **S-50** y **S-51** presentan un grupo 4,5-epoxi-2-oxo-4-tetrahydrofuroato.

La configuración absoluta del esqueleto polihidroxílico base de los compuestos **S-50** y **S-51** fue establecida en base a consideraciones biogénicas, ya que ambos presentan el mismo esqueleto que el compuesto anteriormente descrito, **S-38**, y cuya configuración absoluta determinamos por dicroísmo circular. Así, los compuestos **S-50** y **S-51** corresponden a una estructura de (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-acetoxi-2,6-dibenzoiloxi-9-(4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahydrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano.

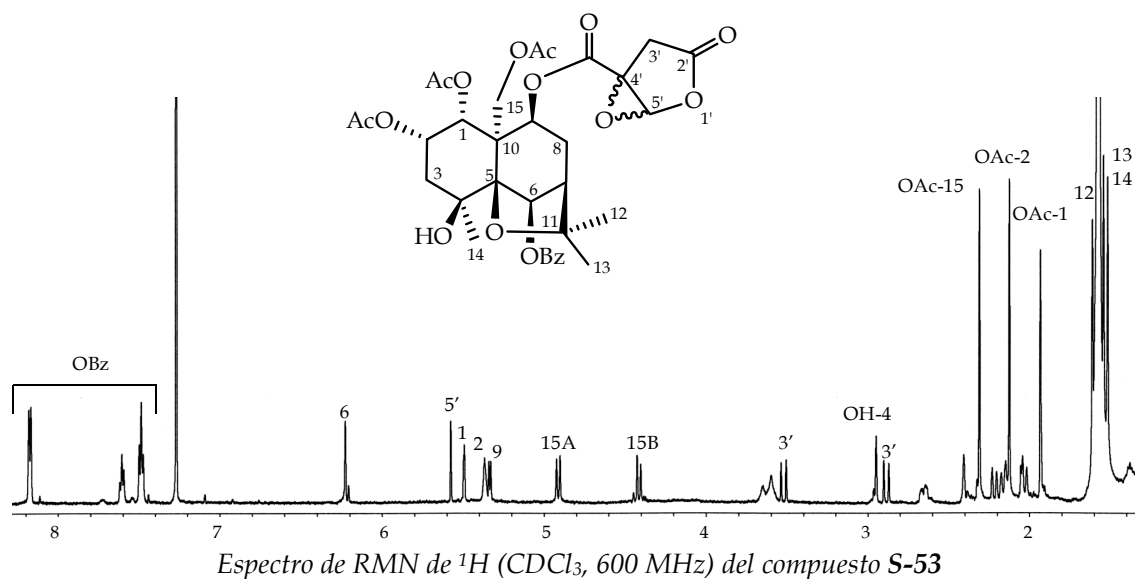
Sesquiterpenos **S-52** y **S-53**

Los compuestos **S-52** y **S-53**, que fueron aislados como sólidos amorfos, presentaron la misma fórmula molecular de $C_{33}H_{38}O_{15}$, determinada mediante espectrometría de masas (ESI) y datos de RMN de ^{13}C .

Un estudio detallado de los espectros de RMN de 1H y ^{13}C (tablas 4.3.19 y 4.3.20) y experimentos bidimensionales homo- y heteronucleares nos permitió determinar las estructuras de estos compuestos como sesquiterpenos dihidro- β -agarofurano con tres grupos acetatos, un grupo benzoato, un alcohol terciario y un éster 4,5-epoxi-2-oxo-4-tetrahydrofuroato, este último igual al descrito en los compuestos **S-50** y **S-51**.



Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 500 MHz) del compuesto **S-52**



Los experimentos HMBC y ROESY de estos compuestos nos permitieron determinar la regiosustitución y estereoquímica relativa de los sustituyentes en la molécula, respectivamente. Así, en ambos compuestos se localizaron los tres acetatos en las posiciones 1, 2 y 15, un benzoato en posición 6 y el éster derivado del furoato en posición 9.

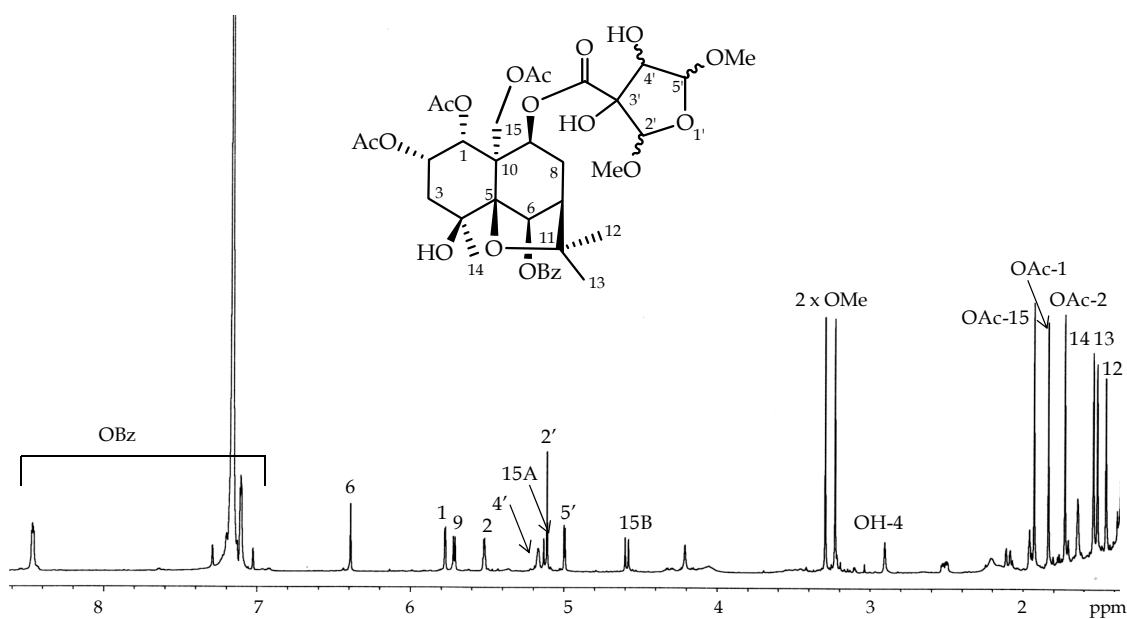
Por otro lado, la estereoquímica relativa fue establecida como: 1α , 2α , 4β , 6β , 9β y 15α . Además, ambos compuestos presentan la misma estructura y estereoquímica del esqueleto sesquiterpénico, observándose como única posible diferencia la estereoquímica del grupo epóxido del éster derivado del grupo furoato, igual que en el caso anterior. Estos compuestos están relacionados con **S-26**, compuesto descrito anteriormente, con la única diferencia del éster en C-9. Así, mientras **S-26** presentaba un grupo furoato en esa posición, los compuestos **S-52** y **S-53** presentan un éster 4,5-epoxi-2-oxo-4-tetrahydrofuroato.

La configuración absoluta del esqueleto polihidroxiílico base de estos compuestos fue establecida en base a consideraciones biogénicas, ya que ambos presentan el mismo esqueleto que el compuesto **S-26**, de configuración absoluta establecida mediante correlación química. Así, los compuestos **S-52** y **S-53** corresponden a una estructura de $(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)$ -1,2,15-triacetoxi-6-benzoiloxi-9-(4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahydrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano.

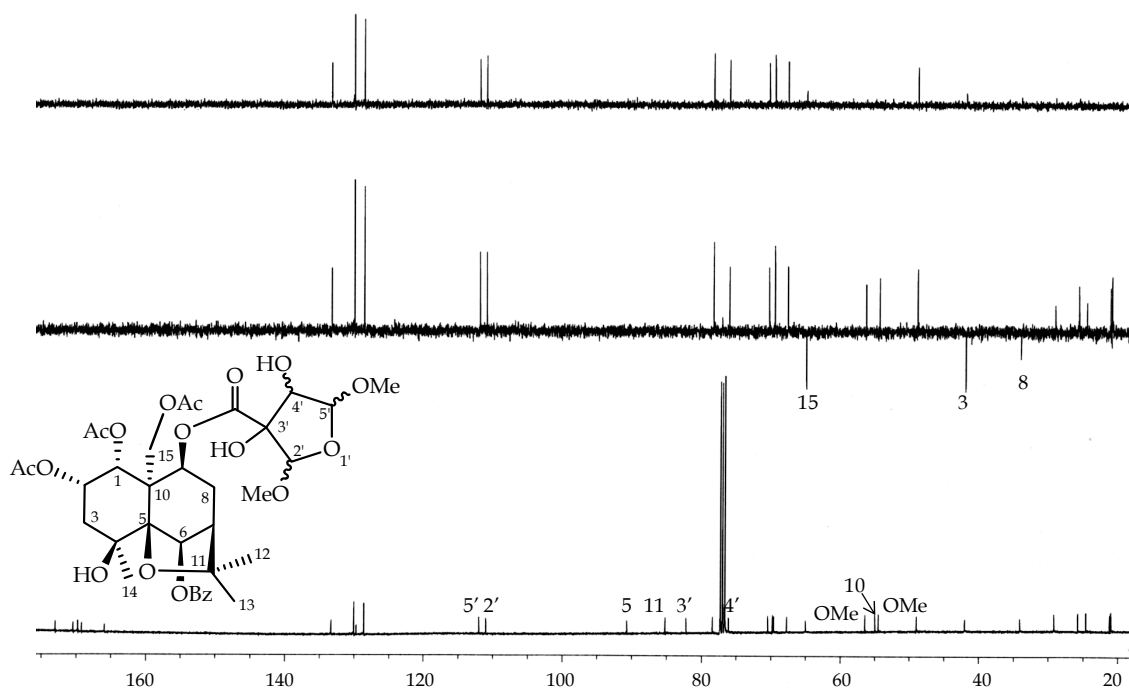
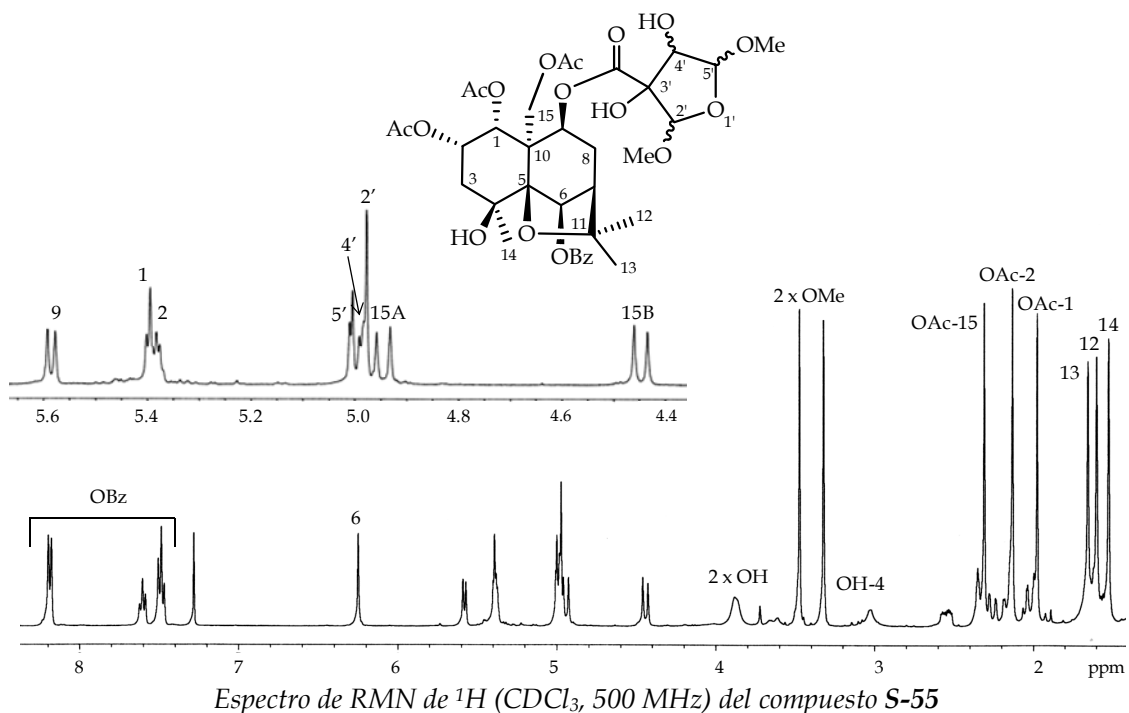
Sesquiterpenos S-54 y S-55

El análisis de los datos espectroscópicos de los compuestos **S-54** y **S-55** nos permitió establecer sus estructuras. Así, su fórmula molecular $C_{35}H_{46}O_{17}$, se determinó mediante sus datos de espectrometría de masas (ESI) y resonancia magnética nuclear de 1H y ^{13}C (tablas 4.3.19 y 4.3.20). El estudio de los datos de RMN de 1H y ^{13}C , nos indicó la presencia de tres grupos acetatos, un grupo benzoato, un alcohol terciario y un éster derivado del grupo furoato en un esqueleto de sesquiterpeno dihidro- β -agarofurano.

La estructura de este nuevo éster la establecimos basándonos en los datos de RMN de 1H y ^{13}C . Así, en el espectro de RMN de 1H se observaron señales correspondientes a dos grupos metoxilos y tres protones metínicos [(3,23 (3H, s), 3,29 (3H, s), 5,00 (1H, d, $J = 3,6$ Hz), 5,11 (1H, s), 5,17 (1H, sa)] en **S-54** y [(3,33 (3H, s), 3,48 (3H, s), 3,87 (1H, s, OH), 3,89 (1H, s, OH), 4,97 (1H, s), 4,98 (1H, d, $J = 3,1$ Hz), 5,00 (1H, d, $J = 3,1$ Hz)] en **S-55**. Estos datos fueron confirmados mediante un experimento de RMN de ^{13}C , que presentó señales para dos metoxilos, un carbono secundario y otro terciario unidos a oxígeno, dos carbonos cetálicos y un carbono carboxílico [(54,5 (c), 56,1 (c), 77,1 (d), 83,6 (s), 107,4 (d), 110,2 (d), 167,4 (s) en **S-54**, y (54,5 (c), 56,5 (c), 75,9 (d), 82,4 (s), 111,0 (d), 112,0 (d), 173,0 (s) en **S-55**]. Estos datos nos permitieron establecer la estructura de este nuevo éster como 3',4'-dihidroxi-2',5'-dimetoxi-3'-tetrahidrofuroiloxi.

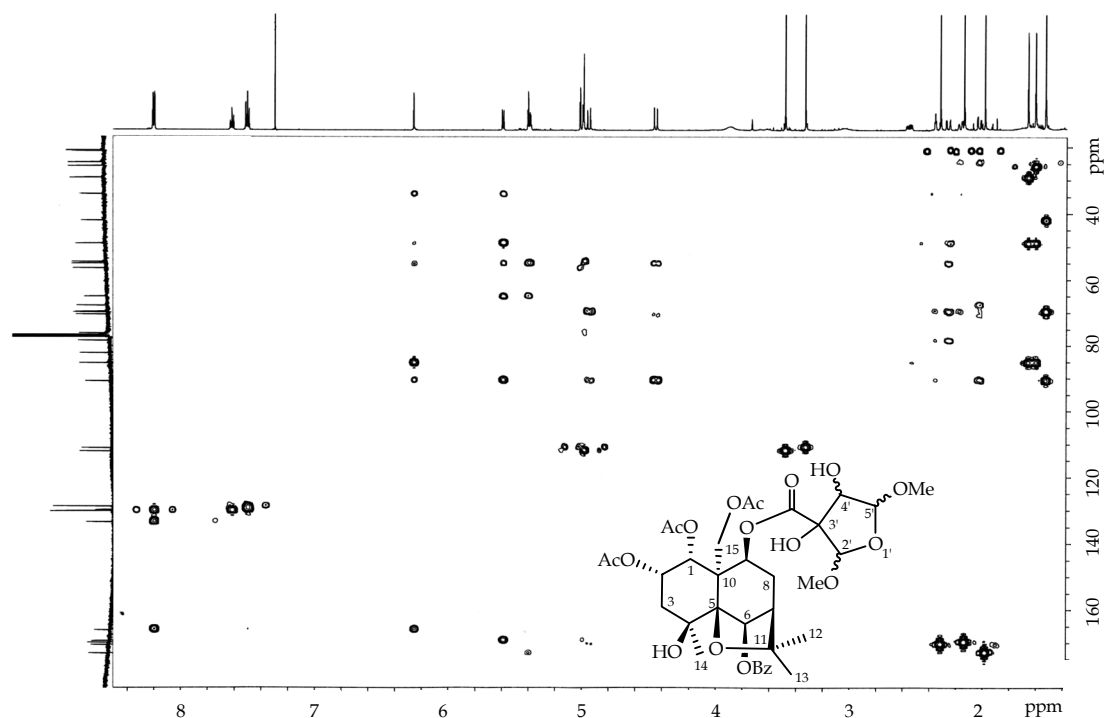


Espectro de RMN de 1H (C_6D_6 , 600 MHz) del compuesto **S-54**



Los experimentos HMBC de ambos compuestos nos permitió situar a los diferentes grupos en las moléculas. Así, se observó correlación entre H-1, H-2 y H-15 con los carboxilos de los grupos acetato. Además, se observó correlación de los protones H-6 y H-9 con los carboxilos de un grupo benzoato y un grupo 3',4'-dihidroxi-2',5'-dimetoxi-3'-tetrahidrofuroiloxi, respectivamente. Así mismo, se

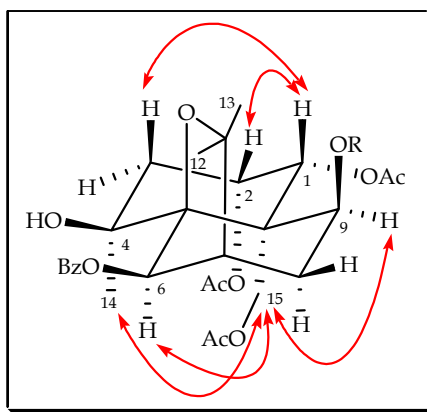
confirmó la estructura de este nuevo éster al observarse correlación de los grupos metoxilos con los carbonos cetálicos (C-2' y C-5') y correlación del protón geminal al grupo hidroxilo (H-4') con los carbonos cetálicos, con el carbono cuaternario unido a oxígeno (C-3') y el carbono carboxílico.



Experimento HMBC del compuesto S-55

Los experimentos ROESY de S-54 y S-55 nos permitieron determinar la estereoquímica relativa de los diferentes ésteres en las moléculas. Así, correlación de los protones H-1 con H-2, de H-6 con Me-14 y Me-15 y correlación entre H-9 y Me-15 nos permitió establecer la estereoquímica relativa de ambos compuestos como 1 α , 2 α , 4 β , 6 β , 9 β y 15 α .

Estos datos nos indicaron que presentaban las mismas características de regiosustitución y estereoquímica, sugiriendo que la única diferencia entre ambos compuestos radica en la estereoquímica de los sustituyentes del éster situado sobre C-9. Sin embargo, no fue posible determinar dicha estereoquímica usando las técnicas habituales de RMN de 2D. Por tanto, decidimos realizar estudios de constantes de acoplamiento ^1H - ^{13}C , usando los experimentos bidimensionales J -HMBC y HSQC-HECADE, no resultando tampoco concluyentes los valores de las constantes para la determinación de la estereoquímica.



Correlaciones más significativas observadas en el experimento ROESY de S-54 y S-55

Estos datos nos permitieron establecer la estructura de **S-54** y **S-55** como (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2,15-triacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3',4'-dihidroxi-2',5'-dimetoxi-3'-tetrahidrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano.

Cabe destacar que es la primera vez que se describen los ésteres 4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahidrofuroiloxi y 3',4'-dihidroxi-2',5'-dimetoxi-3'-tetrahidrofuroiloxi, en un metabolito con esqueleto de sesquiterpeno agarofuránico.

Tabla 4.3.19. Datos^a de RMN de ¹H de los sesquiterpenos S-50 a S-55.

| Posición | S-50 | S-51 | S-52 | S-53 | S-54 ^b | S-55 |
|----------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| H-1 | 5,37 d (3,4) | 5,50 d (3,2) | 5,36 sa | 5,49 s | 5,77 d (3,4) | 5,40 d (3,6) |
| H-2 | 5,73 dd (3,4, 7,0) | 5,68 dt (3,2, 6,7) | 5,42 d (3,4) | 5,37 m | 5,52 dd (3,4, 5,7) | 5,38 dd (3,6, 6,7) |
| H-6 | 5,79 s | 5,80 s | 6,21 s | 6,23 s | 6,39 s | 6,25 s |
| H-7 | 2,41 t (3,1) | 2,44 t (3,3) | 2,31 t (3,6) | 2,41 t (3,1) | 1,96 sa | 2,35 t (3,8) |
| H-9 | 5,02 d (6,6) | 4,95 d (6,6) | 5,44 sa | 5,34 d (6,7) | 5,71 d (7,0) | 5,59 d (6,1) |
| Me-12 | 1,60 s | 1,62 s | 1,60 s | 1,61 s | 1,46 s | 1,60 s |
| Me-13 | 1,54 s | 1,55 s | 1,54 s | 1,54 s | 1,51 s | 1,66 |
| Me-14 | 1,66 s | 1,67 s | 1,53 s | 1,52 s | 1,54 s | 1,53 s |
| H-15 | 1,63 s | 1,63 s | 4,43,4,91 d _{AB} (13,0) | 4,41, 4,91 d _{AB} (13,4) | 4,59, 5,12 d _{AB} (13,1) | 4,45, 4,95 d _{AB} (12,9) |
| OAc-1 | 1,90 s | 1,91 s | 1,94 s | 1,94 s | 1,83 s | 1,98 s |
| OAc-2 | - | - | 2,14 s | 2,13 s | 1,72 s | 2,14 s |
| OAc-15 | - | - | 2,32 s | 2,31 s | 1,92 s | 2,31 s |

^a δ , CDCl₃, 500 y 600 MHz, J en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC.

^b Datos en C₆D₆.

Tabla 4.3.20. Datos^a de RMN de ¹³C de los sesquiterpenos S-50 a S-55.

| Posición | S-50 | S-51 | S-52 | S-53 | S-54 ^b | S-55 |
|----------|---------|---------|---------|---------|-------------------|---------|
| C-1 | 69,4 d | 69,3 d | 67,8 d | 69,9 d | 70,4 d | 70,5 d |
| C-2 | 69,0 d | 69,1 d | 70,8 d | 67,9 d | 67,9 d | 67,8 d |
| C-3 | 42,3 t | 42,4 t | 42,1 t | 42,1 t | 41,7 t | 42,1 t |
| C-4 | 69,9 s | 69,9 s | 69,8 s | 69,8 s | 69,7 s | 69,8 s |
| C-5 | 91,2 s | 91,2 s | 90,9 s | 90,9 s | 91,1 s | 90,7 s |
| C-6 | 79,6 d | 79,6 d | 78,2 d | 78,2 d | 78,3 d | 78,4 d |
| C-7 | 48,8 d | 48,7 d | 48,8 d | 48,8 d | 49,1 d | 49,0 d |
| C-8 | 31,2 t | 31,1 t | 34,4 t | 34,4 t | 34,5 t | 34,2 t |
| C-9 | 74,3 d | 74,7 d | 69,7 d | 71,2 d | 68,7 d | 69,6 d |
| C-10 | 51,5 s | 51,5 s | 55,2 s | 55,1 s | 55,2 s | 55,0 s |
| C-11 | 85,1 s | 85,0 s | 84,9 s | 84,8 s | 84,4 s | 85,0 s |
| C-12 | 29,7 c | 29,6 c | 29,4 c | 29,4 c | 29,1 c | 29,2 c |
| C-13 | 25,7 c | 25,9 c | 25,6 c | 25,7 c | 25,1 c | 25,8 c |
| C-14 | 25,3 c | 25,3 c | 24,7 c | 24,7 c | 24,4 c | 24,7 c |
| C-15 | 21,5 c | 21,4 c | 64,9 t | 64,9 t | 64,8 t | 65,1 t |
| OAc-1 | 170,6 s | 170,4 s | 170,2 s | 169,8 s | 172,5 s | 170,4 s |
| OAc-2 | - | - | 169,7 s | 169,7 s | 169,0 s | 169,2 s |
| OAc-15 | - | - | 170,4 s | 170,4 s | 169,6 s | 169,8 s |

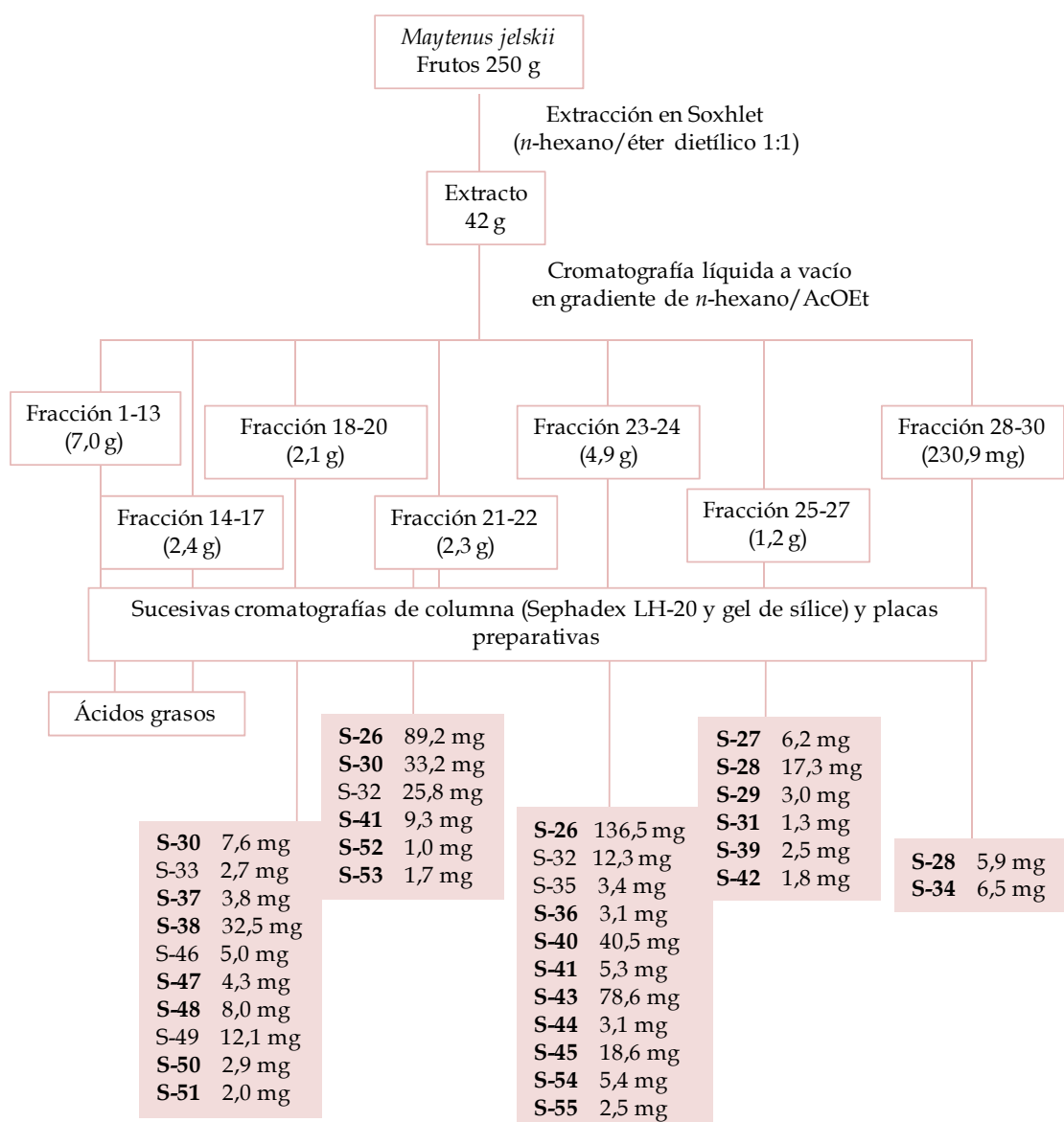
^a δ , CDCl₃, 125 y 150 MHz Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

^b Datos en C₆D₆.

4.3.3.2. Parte experimental

4.3.3.2.1. Separación cromatográfica de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de los frutos de *M. jelskii*

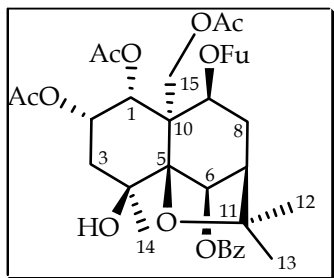
La separación cromatográfica del extracto de *n*-hexano-éter dietílico (1:1) de los frutos de *M. jelskii* permitió el aislamiento de 30 sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos (esquema 4.3.2), que agrupamos para su estudio en función de su esqueleto polihidroxílico base.



*Esquema 4.3.2. Separación cromatográfica de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de los frutos de *Maytenus jelskii*.*

4.3.3.2.2. Datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos de los nuevos sesquiterpenos aislados de los frutos de *M. jelskii*

Sesquiterpeno S-26



(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,2,15-Triacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (225,7 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 40,5 (c 1,1, CHCl₃).

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 231 (3,9), 213 (3,7) nm.

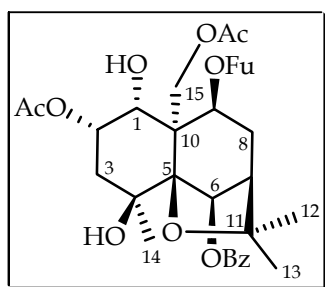
IR ν_{\max} 3548, 2956, 2932, 1747, 1723, 1575, 1278, 1242, 1155, 758, 715 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,50 (3H, s, Me-14); 1,54 (3H, s, Me-13); 1,57 (3H, s, Me-12); 1,71 (3H, s, OAc-1); 2,04 (1H, d, J = 15,0 Hz, H-3 α); 2,10 (3H, s, OAc-2); 2,21 (2H, d_a, J = 15,0 Hz, H-3 β); 2,27 (1H, d_a, J = 15,8 Hz, H-8 β); 2,31 (3H, s, OAc-15); 2,36 (1H, m, H-7); 2,67 (1H, ddd, J = 3,5, 7,0, 15,8 Hz, H-8 α); 3,05 (1H, s, OH-4); 4,41, 4,96 (2H, d_{AM}, J = 13,0 Hz, H-15); 5,37 (1H, d, J = 7,0 Hz, H-9); 5,50 (1H, m, H-2); 5,54 (1H, d, J = 3,2, Hz, H-1); 6,25 (1H, s, H-6); OFu, OBz [6,74 (1H, d, J = 0,7 Hz), 7,46 (3H, m), 7,57 (1H, m), 8,02 (1H, d, J = 0,7 Hz, OFu), 8,18 (2H, d, J = 8,1 Hz, OBz)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 24,9 (c, C-14); 25,7 (c, C-13); 29,6 (c, C-12); 34,8 (t, C-8); 42,4 (t, C-3); 49,2 (d, C-7); 54,9 (s, C-10); 65,6 (t, C-15); 68,3 (d, C-2); 68,5 (d, C-9); 70,0 (d, C-1); 70,5 (s, C-4); 78,8 (d, C-6); 84,8 (s, C-11); 91,2 (s, C-5); OFu [109,9 (d), 118,6 (s), 144,0 (d), 148,9 (d), 161,9 (s, OFu-9)]; OBz [128,8 (2 x d), 129,9 (s), 130,2 (2 x d), 133,5 (d), 166,1 (s, OBz-6)]; OAc [(20,6 c, 169,6 s, OAc-1), (21,3 c, 169,8 s, OAc-2), (21,5 c, 170,7 s, OAc-15)].

EM m/z (%) 627 [M⁺-CH₃] (3), 582 (1), 515 (1), 460 (22), 418 (1), 348 (1), 275 (7), 192 (7), 105 (100), 95 (31).

EMAR m/z Calculado para C₃₂H₃₅O₁₃ [M⁺-CH₃], 627,2078; observado, 627,2087.

Sesquiterpeno S-27

(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10S)-2,15-Diacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-1,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (6,2 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 16,1 (*c* 0,3, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 231 (4,0), 214 (3,2) nm.

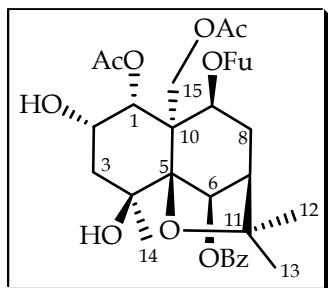
IR ν_{\max} 3621, 2927, 2855, 1717, 1278, 1252, 1152, 1112, 1024, 761, 714 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ , CDCl₃) 1,52 (3H, s, Me-14); 1,60 (3H, s, Me-12); 1,63 (3H, s, Me-13); 2,10 (2H, m, H-3); 2,15 (3H, s, OAc-2); 2,31 (3H, s, OAc-15); 2,32 (1H, m, H-8 β); 2,41 (1H, t, *J* = 4,2 Hz, H-7); 2,69 (1H, ddd, *J* = 4,2, 7,3, 16,1 Hz, H-8 α); 3,09 (1H, s, OH-4); 4,53, 4,83 (2H, d_{AB}, *J* = 12,8 Hz, H-15); 4,58 (1H, t, *J* = 3,3 Hz, H-1); 5,30 (1H, dd, *J* = 3,3, 6,7 Hz, H-2); 5,50 (1H, d, *J* = 7,3 Hz, H-9); 6,17 (1H, s, H-6); OFu, OBz [6,80 (1H, s), 7,50 (3H, m), 7,61 (1H, m), 8,08 (1H, s), 8,21 (2H, d, *J* = 8,0 Hz)].

RMN ¹³C (δ , CDCl₃) 24,9 (c, C-14); 25,7 (c, C-13); 29,5 (c, C-12); 34,2 (t, C-8); 42,5 (t, C-3); 49,1 (d, C-7); 56,1 (s, C-10); 65,0 (t, C-15); 68,1 (d, C-9); 68,8 (d, C-1); 69,9 (s, C-4); 72,2 (d, C-2); 78,9 (d, C-6); 84,5 (s, C-11); 91,0 (s, C-5); OFu [109,7 (d), 119,7 (s), 144,0 (d), 147,6 (d), 161,7 (OFu-9)]; OBz [128,6 (2 x d), 129,8 (s), 130,1 (2 x d), 133,3 (d), 165,9 (s, OBz-6)]; OAc [(21,2 c, 171,5 s, OAc-2), (21,3 c, 170,5 s, OAc-15)].

EM *m/z* (%) 585 [M⁺-CH₃] (10), 567 (12), 527 (9), 473 (1), 462 (2), 418 (4), 340 (2), 329 (1), 105 (100).

EMAR *m/z* Calculado para C₃₀H₃₃O₁₂ [M⁺-CH₃], 585,1972; observado, 585,1974.

Sesquiterpeno S-28

(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,15-Diacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-2,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (23,2 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 31,3 (c 0,4, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{max} (log ϵ) 230 (3,3), 218 (3,1) nm.

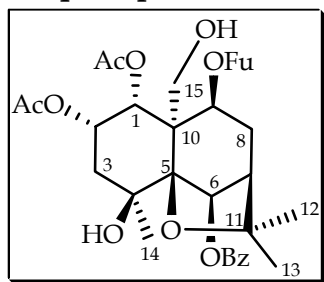
IR ν_{max} 3516, 2926, 2853, 1717, 1278, 1234, 1141, 762, 713 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ , CDCl₃) 1,53 (3H, s, Me-13); 1,56 (3H, s, Me-12); 1,60 (3H, s, Me-14); 1,80 (3H, s, OAc-1); 2,10 (2H, da, $J = 3,1$ Hz, H-3); 2,25 (1H, da, $J = 15,9$ Hz, H-8 β); 2,30 (3H, s, OAc-15); 2,34 (1H, t, $J = 3,6$ Hz, H-7); 2,65 (1H, ddd, $J = 3,6, 6,8, 15,9$ Hz, H-8 α); 3,01 (1H, s, OH-4); 4,33 (1H, m, H-2); 4,56, 5,02 (2H, d_{AB}, $J = 13,1$ Hz, H-15); 5,37 (1H, d, $J = 6,8$ Hz, H-9); 5,47 (1H, d, $J = 3,1$ Hz, H-1); 6,29 (1H, s, H-6); OBz, OFu [6,75 (1H, d, $J = 1,7$ Hz), 7,46 (3H, m), 7,58 (1H, m), 8,03 (1H, d, $J = 1,7$ Hz), 8,19 (2H, d, $J = 7,0$ Hz)].

RMN ¹³C (δ , CDCl₃) 25,0 (c, C-14); 25,6 (c, C-13); 29,5 (c, C-12); 34,7 (t, C-8); 44,2 (t, C-3); 49,0 (d, C-7); 55,0 (s, C-10); 65,9 (t, C-15); 67,3 (d, C-2); 68,8 (d, C-9); 70,0 (s, C-4); 73,2 (d, C-1); 78,8 (d, C-6); 84,3 (s, C-11); 91,4 (s, C-5); OFu [109,8 (d), 118,6 (s), 143,8 (d), 148,7 (d), 161,8 (s, OFu-9)]; OBz [128,6 (2 x d), 129,9 (s), 130,1 (2 x d), 133,3 (d), 166,6 (s, OBz-6)]; OAc [20,8 c, 169,9 s, OAc-1), (21,3 c, 170,6 s, OAc-15)].

ESIMS m/z (%) 623 [M⁺+Na] (100)

HR-ESI/MS m/z Calculado para C₃₁H₃₆O₁₂Na [M⁺+Na], 623,2104; observado, 623,2098.

Sesquiterpeno S-29

(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,2-Diacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4,15-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (3,0 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 7,8 (c 0,2, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{max} (log ϵ) 231 (4,2), 215 (3,9) nm.

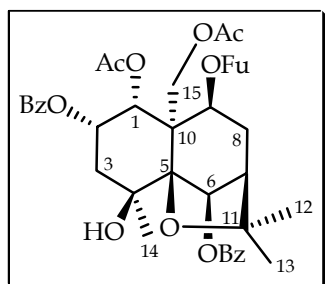
IR ν_{max} 3525, 2924, 2854, 1743, 1720, 1251, 1135, 1025, 761, 715 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ , CDCl₃) 1,56 (3H, s, Me-13); 1,57 (3H, s, Me-14); 1,60 (3H, s, Me-12); 1,74 (3H, s, OAc-1); 2,06 (1H, m, H-3); 2,07 (3H, s, OAc-2); 2,21 (1H, m, H-3); 2,25 (1H, da, $J = 17,0$ Hz, H-8 β); 2,43 (1H, t, $J = 3,6$ Hz, H-7); 2,76 (1H, ddd, $J = 3,6, 6,8, 17,0$ Hz, H-8 α); 3,17 (1H, s, OH-4); 4,29, 4,40 (2H, d_{AB}, $J = 12,9$ Hz, H-15); 5,52 (1H, m, H-2); 5,56 (1H, d, $J = 3,3$ Hz, H-1); 5,63 (1H, d, $J = 6,8$ Hz, H-9); 6,49 (1H, s, H-6); OFu [6,78 (1H, s), 7,46 (1H, s), 8,06 (1H, s)]; OBz [7,51 (2H, m), 7,62 (1H, m), 8,24 (2H, d, $J = 7,7$ Hz)].

RMN ¹³C (δ , CDCl₃) 25,0 (c, C-14); 25,7 (c, C-13); 29,6 (c, C-12); 34,4 (t, C-8); 42,5 (t, C-3); 49,1 (d, C-7); 56,3 (s, C-10); 63,0 (t, C-15); 68,3 (d, C-9); 68,6 (d, C-2); 70,0 (s, C-4); 70,8 (d, C-1); 79,3 (d, C-6); 84,4 (s, C-11); 91,4 (s, C-5); OFu [109,8 (d), 118,7 (s), 143,8 (d), 148,7 (d), 161,9 (s, OFu-9)]; OBz [128,7 (2 x d), 130,0 (s), 130,1 (2 x d), 133,3 (d), 166,1 (s, OBz-6)]; OAc [(20,5 c, 169,4 s, OAc-1), (21,3 c, 169,6 s, OAc-2)].

EM m/z (%) 585 [M⁺-CH₃] (2), 533 (1), 473 (1), 460 (1), 418 (2), 359 (1), 306 (1), 246 (5), 105 (100), 95 (33).

EMAR m/z Calculado para C₃₀H₃₃O₁₂ [M⁺-CH₃], 585,1972; observado, 585,1996.

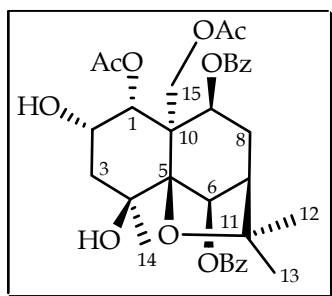
Sesquiterpeno S-30

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,15-Diacetoxi-2,6-dibenzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (40,8 mg).

- [α]_D²⁰** + 55,3 (*c* 1,0, CHCl₃).
- UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ)** 230 (4,0), 213 (3,8) nm.
- DC λ_{\max} (EtOH) nm** 235,7 ($\Delta\epsilon = -8,3$), 221,3 ($\Delta\epsilon = +5,7$).
- IR ν_{\max}** 3547, 2928, 1746, 1720, 1273, 1223, 1108, 1023, 759, 713 cm⁻¹.
- RMN ¹H** 1,60 (6H, s, Me-13, Me-14); 1,63 (3H, s, Me-12); 1,73 (3H, s, OAc-1);
(δ , CDCl₃) 2,27 (2H, m, H-3); 2,32 (1H, m, H-8 β); 2,36 (3H, s, OAc-15); 2,41 (1H, t, *J* = 3,5 Hz, H-7); 2,72 (2H, ddd, *J* = 3,5, 7,0, 15,9 Hz, H-8 α); 3,12 (1H, s, OH-4); 4,52, 5,31 (2H, d_{AM}, *J* = 12,8 Hz, H-15); 5,47 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, H-9); 5,70 (1H, d, *J* = 3,5 Hz, H-1); 5,83 (1H, d_a, *J* = 3,5 Hz, H-2); 6,33 (1H, s, H-6); OFu, OBz [6,78 (1H, s), 7,50 (5H, m), 7,60 (2H, m), 8,07 (1H, s), 8,14 (2H, d, *J* = 7,9 Hz), 8,19 (2H, d, *J* = 7,9 Hz)].
- RMN ¹³C** 25,2 (*c*, C-14); 25,5 (*c*, C-13); 29,4 (*c*, C-12); 35,6 (*t*, C-8); 42,4 (*t*, C-3);
(δ , CDCl₃) 49,2 (*d*, C-7); 54,8 (*s*, C-10); 66,0 (*t*, C-15); 68,4 (*d*, C-9); 68,8 (*d*, C-2); 69,8 (*s*, C-4); 70,2 (*d*, C-1); 78,6 (*d*, C-6); 84,7 (*s*, C-11); 91,1 (*s*, C-5); OFu [110,1 (*d*), 118,5 (*s*), 143,8 (*d*), 148,6 (*d*), 161,7 (*s*, OFu-9)]; OBz [128,6 (2 x *d*), 128,7 (2 x *d*), 129,3 (*s*), 129,7 (*s*), 129,8 (*d*), 129,9 (*d*), 130,0 (*d*), 130,2 (*d*), 133,4 (*d*), 133,5 (*d*), 165,7 (*s*, OBz-6), 166,0 (*s*, OBz-2)]; OAc [(20,1 *c*, 169,5 *s*, OAc-1), (20,5 *c*, 170,7 *s*, OAc-15)].
- EM *m/z* (%)** 689 [M⁺-CH₃] (1), 582 (1), 460 (22), 348 (1), 275 (7), 192 (7), 105 (100).
- EMAR *m/z*** Calculado para C₃₇H₃₇O₁₃ [M⁺-CH₃], 689,2241; observado, 689,2234.

Sesquiterpeno S-31

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

Descripción: sólido amorfo (1,3 mg).

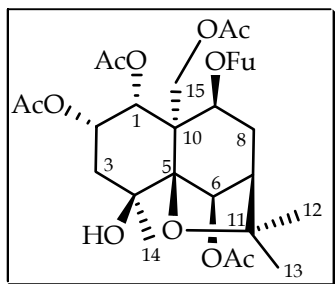
[α]_D²⁰ + 32,7 (c 0,1, CHCl₃).UV(EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 231 (4,1) nm.IR ν_{\max} 3521, 2924, 2854, 1746, 1717, 1276, 1107, 1024, 772, 714 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,58 (3H, s, Me-13); 1,61 (3H, s, Me-14); 1,62 (3H, s, Me-12); 1,71 (3H, s, OAc-1); 2,17 (2H, m, H-3); 2,34 (1H, m, H-8 β); 2,35 (3H, s, OAc-15); 2,41 (1H, t, *J* = 4,4 Hz, H-7); 2,72 (1H, ddd, *J* = 4,4, 7,2, 16,1 Hz, H-8 α); 3,08 (1H, s, OH-4); 4,40 (1H, m, H-2); 4,63, 5,06 (2H, d_{AB}, *J* = 13,1 Hz, H-15); 5,52 (1H, d, *J* = 7,2 Hz, H-9); 5,55 (1H, d, *J* = 3,1 Hz, H-1); 6,32 (1H, s, H-6); 2 x OBz [7,50 (4H, m), 7,62 (2H, m), 8,10 (2H, d, *J* = 7,4 Hz), 8,23 (2H, d, *J* = 7,6 Hz)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 25,1 (c, C-14); 25,8 (c, C-13); 29,5 (c, C-12); 34,7 (t, C-8); 44,3 (t, C-3); 49,1 (d, C-7); 55,2 (s, C-10); 66,0 (t, C-15); 67,4 (d, C-2); 69,4 (d, C-9); 70,1 (s, C-4); 73,4 (d, C-1); 78,8 (d, C-6); 84,5 (s, C-11); 91,5 (s, C-5); 2 x OBz [128,4 (2 x d), 128,7 (2 x d), 129,1 (s), 129,9 (s), 130,1 (2 x d), 130,2 (2 x d), 133,4 (d), 133,6 (d), 165,3 (s, OBz-9), 166,0 (s, OBz-6)]; OAc [(20,7 c, 169,7 s, OAc-1), (21,4 c, 170,6 s, OAc-15)].

ESIMS *m/z* (%) 633 [M⁺+Na] (100).HR-ESI/MS *m/z* Calculado para C₃₃H₃₈O₁₁Na [M⁺+Na], 633,2312; observado, 633,2322.

Sesquiterpeno S-34



(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,2,6,15-Tetraacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (6,5 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 18,6 (c 0,6, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{max} (log ϵ) 226 (2,9), 219 (3,8) nm.

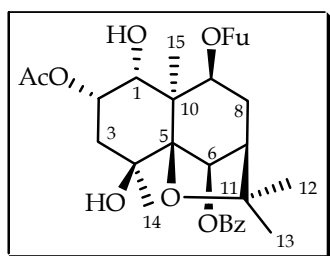
IR ν_{max} 3541, 2927, 2854, 1746, 1368, 1232, 1154, 1029, 760 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,52 (3H, s, Me-14); 1,54 (3H, s, Me-13); 1,58 (3H, s, Me-12); 1,73 (3H, s, OAc-1); 2,06 (1H, dd, *J* = 3,3, 15,4 Hz, H-3α); 2,13 (3H, s, OAc-2); 2,14 (3H, s, OAc-6); 2,16 (1H, m, H-3β); 2,21 (1H, dd, *J* = 4,7, 16,9 Hz, H-8β); 2,22 (1H, t, *J* = 4,7 Hz, H-7); 2,29 (3H, s, OAc-15); 2,56 (1H, ddd, *J* = 4,7, 7,2, 16,9 Hz, H-8α); 2,87 (1H, s, OH-4); 4,38, 4,99 (2H, d_{AM}, *J* = 12,9 Hz, H-15); 5,35 (1H, d, *J* = 7,2 Hz, H-9); 5,51 (1H, dd, *J* = 3,3, 6,6 Hz, H-2); 5,54 (1H, d, *J* = 3,3 Hz, H-1); 6,14 (1H, s, H-6); OFu [6,76 (1H, d, *J* = 1,6 Hz), 7,45 (1H, d, *J* = 1,6 Hz), 8,04 (1H, s)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 25,1 (c, C-14); 25,6 (c, C-13); 29,4 (c, C-12); 34,7 (t, C-8); 41,9 (t, C-3); 49,1 (d, C-7); 54,8 (s, C-10); 65,5 (t, C-15); 68,1 (d, C-2); 68,4 (d, C-9); 69,7 (s, C-4); 70,3 (d, C-1); 78,1 (d, C-6); 84,5 (s, C-11); 91,0 (s, C-5); OFu [109,7 (d), 118,5 (s), 143,9 (d), 148,8 (d), 161,7 (s, OFu-9)]; OAc [(20,5 c, 169,5 s, OAc-1), (21,1 c, 169,7 s, OAc-2), (21,3 c, 170,6 s, OAc-15), (21,6 c, 170,3 s, OAc-6)].

EM *m/z* (%) 565 [M⁺-CH₃] (2), 520 (8), 460 (12), 453 (2), 351 (7), 291 (7), 228 (18), 192 (27), 95 (6).

EMAR *m/z* Calculado para C₂₇H₃₃O₁₃ [M⁺-CH₃], 565,1921; observado, 565,1971.

Sesquiterpeno S-36

(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10S)-2-Acetoxy-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-1,4-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (3,1 mg).

[α]_D²⁰ + 6,3 (c 0,2, CHCl₃).

UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 228 (3,6), 219 (3,9) nm.

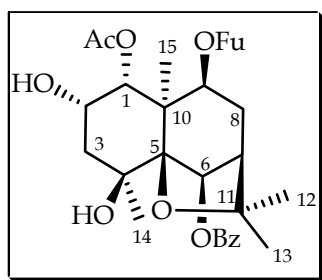
IR ν_{max} 3487, 2925, 2854, 1720, 1254, 1114, 1025, 971, 714 cm⁻¹.

RMN ¹H 1,46 (3H, s, Me-15); 1,54 (1H, s, Me-14); 1,58 (3H, s, Me-12); 1,61 (3H, s, Me-13); 2,09 (2H, m, H-3); 2,10 (3H, s, OAc-2); 2,28 (1H, dd, *J* = 3,5, 16,5 Hz, H-8β); 2,42 (1H, t, *J* = 3,5 Hz, H-7); 2,63 (1H, ddd, *J* = 3,5, 6,4, 16,5 Hz, H-8α); 3,20 (1H, s, OH-4); 4,43 (1H, d, *J* = 3,5 Hz, H-1); 5,07 (1H, d, *J* = 6,4 Hz, H-9); 5,30 (1H, dd, *J* = 3,5, 7,0 Hz, H-2); 5,76 (1H, s, H-6); 6,80 (1H, d, *J* = 1,7 Hz, OFu); OFu, OBz [7,40 (3H, m), 7,51 (1H, m), 8,09 (1H, d, *J* = 1,7 Hz), 8,25 (2H, d, *J* = 7,2 Hz)].

RMN ¹³C 20,0 (c, C-15); 25,2 (c, C-14); 25,8 (c, C-13); 29,7 (c, C-12); 31,2 (t, C-8); 42,5 (t, C-3); 49,1 (d, C-7); 52,7 (s, C-10); 68,2 (d, C-1); 70,1 (s, C-4); 72,1 (d, C-9); 72,8 (d, C-2); 80,3 (d, C-6); 84,6 (s, C-11); 91,4 (s, C-5); OFu [109,9 (d), 119,7 (s), 144,0 (d), 147,7 (d), 162,0 (s, OFu-9)]; OBz [128,7 (2 x d), 129,8 (s), 130,1 (2 x d), 133,4 (d), 166,1 (s, OBz-6)]; OAc (21,3 c, 171,5 s, OAc-2).

EM *m/z* (%) 527 [M⁺-CH₃] (8), 482 (1), 433 (1), 402 (2), 370 (1), 248 (1), 189 (3), 105 (100), 95 (20).

EMAR *m/z* Calculado para C₂₈H₃₁O₁₀ [M⁺-CH₃], 527,1917; observado, 527,1875.

Sesquiterpeno S-37

(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,2-Diacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-2,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (3,8 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 2,7 (c 0,1, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{\max} log ϵ ⁰ 228 (3,9), 213 (4,0) nm.

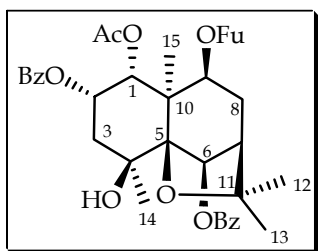
IR ν_{\max} 3479, 2935, 2848, 1719, 1252, 1114, 1025, 970, 714 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ , CDCl₃) 1,54 (3H, s, Me-13); 1,57 (3H, s, Me-12); 1,63 (3H, s, Me-14); 1,64 (3H, s, Me-15); 1,89 (3H, s, OAc-1); 2,13 (2H, m, H-3); 2,23 (1H, dd, *J* = 3,4, 16,3 Hz, H-8 β); 2,41 (1H, t, *J* = 3,4, H-7); 2,62 (1H, ddd, *J* = 3,4, 6,6, 16,3 Hz, H-8 α); 3,14 (1H, s, OH-4); 4,40 (1H, dd, *J* = 3,4, 7,0 Hz, H-2); 5,00 (1H, d, *J* = 6,6 Hz, H-9); 5,40 (1H, d, *J* = 3,4 Hz, H-1); 5,76 (1H, s, H-6); OFu [6,78 (1H, s), 7,46 (1H, s), 8,06 (1H, s)]; OBz [7,51 (2H, m), 7,62 (1H, m), 8,24 (2H, d, *J* = 7,6 Hz)].

RMN ¹³C (δ , CDCl₃) 22,0 (c, C-15); 25,5 (c, C-14); 25,8 (c, C-13); 29,7 (c, C-12); 31,2 (t, C-8); 44,1 (t, C-3); 49,4 (d, C-7); 51,1 (s, C-10); 68,1 (d, C-2); 70,1 (s, C-4); 72,6 (d, C-9); 72,7 (d, C-1); 80,0 (d, C-6); 84,5 (s, C-11); 91,6 (s, C-5); OFu [109,8 (d), 119,0 (s), 143,8 (d), 148,6 (d), 162,2 (s, OFu-9)]; OBz [128,5 (2 x d), 129,8 (s), 130,1 (2 x d), 133,5 (d), 166,0 (s, OBz-6)]; OAc (20,9 c, 170,0 s, OAc-1).

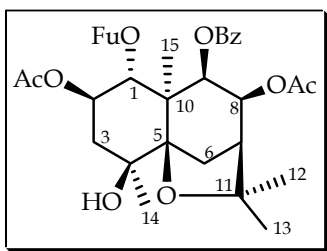
EM *m/z* (%) 527 [M⁺-CH₃] (1), 482 (1), 433 (1), 402 (2), 370 (1), 308 (2), 248 (3), 189 (3), 105 (100), 95 (13).

EMAR *m/z* Calculado para C₂₈H₃₁O₁₀ [M⁺-CH₃], 527,1917; observado, 527,1873.

Sesquiterpeno S-38**(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1-Acetoxi-2,6-dibenzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano**

Descripción: sólido amorfo (32,5 mg).

| | |
|---|---|
| [α]_D²⁰ | + 49,5 (c 0,4, CHCl ₃). |
| UV(EtOH) λ_{max} (log ε) | 229 (3,4) nm. |
| DC λ_{max} (EtOH) nm | 235,5 (Δε = -7,6), 221,6 (Δε = +6,3). |
| IR ν_{max} | 3546, 2955, 2927, 1719, 1275, 1110, 1024, 759, 713 cm ⁻¹ . |
| RMN ¹H (δ, CDCl₃) | 1,56 (3H, s, Me-13); 1,60 (3H, s, Me-12); 1,66 (3H, s, Me-14); 1,69 (3H, s, Me-15); 1,76 (3H, s, OAc-1); 2,22 (1H, dd, J = 3,2, 15,2 Hz, H-3α); 2,27 (1H, m, H-8β); 2,32 (1H, d, J = 15,2 Hz, H-3β); 2,42 (1H, t, J = 3,2, H-7); 2,64 (1H, ddd, J = 3,2, 6,8, 16,5 Hz, H-8α); 3,22 (1H, s, OH-4); 5,00 (1H, d, J = 6,8 Hz, H-9); 5,58 (1H, d, J = 3,4 Hz, H-1); 5,83 (1H, s, H-6); 5,84 (1H, da, J = 3,4 Hz, H-2); OFu, 2 x OBz [7,28 (1H, d, J = 0,7 Hz), 7,47 (3H, m), 7,50 (2H, m), 7,60 (2H, m), 7,99 (2H, d, J = 8,0 Hz), 8,10 (1H, s), 8,25 (2H, d, J = 8,0 Hz)]. |
| RMN ¹³C (δ, CDCl₃) | 21,8 (c, C-15); 25,4 (c, C-14); 25,7 (c, C-13); 29,7 (c, C-12); 31,3 (t, C-8); 42,5 (t, C-3); 49,0 (d, C-7); 51,1 (s, C-10); 69,4 (d, C-2); 70,0 (s, C-4); 70,1 (d, C-1); 72,1 (d, C-9); 80,0 (d, C-6); 84,8 (s, C-11); 91,3 (s, C-5); OFu [109,8 (d), 118,7 (s), 143,8 (d), 148,6 (d), 161,9 (s, OFu-9)]; 2 x OBz [128,6 (2 x d), 128,7 (2 x d), 129,5 (2 x d), 129,7 (s), 129,9 (s), 130,2 (2 x d), 133,4 (d), 133,2 (d), 165,8 (s, OBz-2), 166,1 (s, OBz-6)]; OAc (20,5 c, 169,8 s, OAc-1). |
| EM m/z (%) | 631 [M ⁺ -CH ₃] (1), 613 (1), 519 (2), 402 (12), 290 (6), 230 (5), 105 (100), 95 (23). |
| EMAR m/z | Calculado para C ₃₅ H ₃₅ O ₁₁ [M ⁺ -CH ₃], 631,2179; observado, 631,2168. |

Sesquiterpeno S-39

2β,8β-Diacetoxi-9β-benzoiloxi-1α-(3-furoiloxi)-4β-hidroxi-dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (2,5 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 19,0 (c 0,3, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 230 (3,7), 214 (3,9) nm.

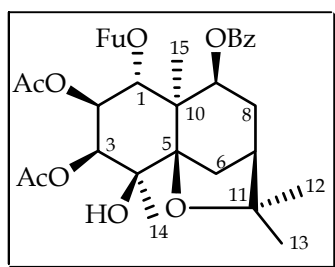
IR ν_{\max} 3532, 2926, 2855, 1741, 1275, 1240, 1032, 757, 712 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,37 (3H, s, Me-12); 1,42 (3H, s, Me-14); 1,52 (3H, s, Me-15); 1,64 (3H, s, Me-13); 1,85 (3H, s, OAc-8); 1,87 (3H, s, OAc-2); 1,95 (1H, d, J = 12,8 Hz, H-6α); 2,09 (2H, m, H-3); 2,29 (1H, m, H-7); 2,61 (1H, dd, J = 5,1, 12,8 Hz, H-6β); 2,82 (1H, s, OH-4); 5,11 (1H, dt, J = 4,6, 10,6 Hz, H-2); 5,36 (1H, d, J = 6,2 Hz, H-9); 5,47 (1H, dd, J = 3,3, 6,2 Hz, H-8); 5,85 (1H, d, J = 10,6 Hz, H-1); OFu [6,40 (1H, d, J = 1,8 Hz), 7,32 (1H, t, J = 1,8 Hz), 7,72 (1H, d, J = 1,8 Hz)]; OBz [7,48 (2H, m), 7,60 (1H, m), 8,07 (2H, d, J = 7,1 Hz)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 20,0 (c, C-15); 24,8 (c, C-14); 25,2 (c, C-13); 30,9 (c, C-12); 31,4 (t, C-6); 42,5 (t, C-3); 48,2 (d, C-7); 48,8 (s, C-10); 69,0 (d, C-2); 69,9 (d, C-8); 70,4 (s, C-4); 72,0 (d, C-1); 72,2 (d, C-9); 82,2 (s, C-11); 89,5 (s, C-5); OFu [109,5 (d), 118,6 (s), 143,5 (d), 147,5 (d), 161,1 (s, OFu-1)]; OBz [128,0 (2 x d), 129,7 (s), 130,3 (2 x d), 133,0 (d), 165,8 (s, OBz-9)]; OAc [(20,8 c, 170,4 s, OAc-8), (20,9 c, 169,3 s, OAc-2)].

EM m/z (%) 569 [M⁺-CH₃] (11), 551 (6), 524 (1), 463 (1), 447 (16), 279 (6), 149 (37), 105 (100), 95 (43).

EMAR m/z Calculado para C₃₀H₃₃O₁₁ [M⁺-CH₃], 569,2023; observado, 569,2024.

Sesquiterpeno S-40**2β,3β-Diacetoxi-9β-benzoiloxi-1α-(3-furoiloxi)-4β-hidroxi-dihidro-β-agarofurano**

Descripción: sólido amorfo (40,5 mg).

[α]_D²⁰ + 71,6 (c 0,4, CHCl₃).UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 231 (3,9) nm.IR ν_{max} 3524, 2927, 1745, 1714, 1305, 1245, 1137, 1011, 757, 714 cm⁻¹.

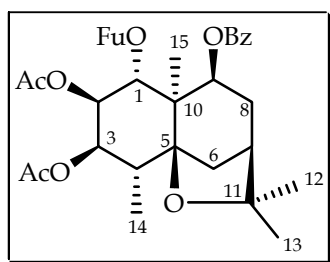
RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,31 (3H, s, Me-12); 1,42 (3H, s, Me-15); 1,43 (3H, s, Me-13); 1,45 (3H, s, Me-14); 1,77 (3H, s, OAc-2); 1,94 (1H, d_{AB}, J = 12,4 Hz, H-6α); 2,09 (1H, m, H-7); 2,18 (2H, m, H-8); 2,26 (3H, s, OAc-3); 2,44 (1H, dd_{AB}, J = 3,3, 12,4 Hz, H-6β); 3,43 (1H, s, OH-4); 5,02 (1H, d, J = 5,8 Hz, H-9); 5,19 (1H, dd, J = 2,8, 10,8 Hz, H-2); 5,24 (1H, d, J = 2,8 Hz, H-3); 6,18 (1H, d, J = 10,8 Hz, H-1); OFu [6,33 (1H, d, J = 1,9 Hz); 7,66 (1H, t, J = 1,9 Hz), 7,31 (1H, d, J = 1,9 Hz)]; OBz [7,45 (2H, m)], 7,58 (1H, m), 8,01 (2H, d, J = 7,7 Hz)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 19,6 (c, C-15); 23,7 (c, C-14); 24,2 (c, C-13); 29,7 (c, C-12); 30,0 (t, C-8); 32,5 (t, C-6); 42,5 (d, C-7); 47,4 (s, C-10); 67,3 (d, C-1); 68,6 (d, C-2); 69,7 (s, C-4); 72,9 (d, C-9); 75,5 (d, C-3); 83,9 (s, C-11); 89,5 (s, C-5); OFu [109,2 (d), 118,7 (s), 143,3 (d), 147,1 (d), 160,8 (s, OFu-1)]; OBz [127,7 (2 x d), 129,7 (s), 129,9 (2 x d), 132,7 (d), 165,2 (s, OBz-9)]; OAc [(20,4 c, 170,1 s, OAc-2), (20,8 c, 170,2 s, OAc-3)].

EM m/z (%) 584 [M⁺] (4), 569 (28), 524 (1), 447 (18), 430 (4), 370 (10), 248 (18), 105 (100), 95 (94).

EMAR m/z Calculado para C₃₁H₃₆O₁₁ [M⁺], 584,2258; observado, 584,2266.

Sesquiterpeno S-41



2β,3β-Diacetoxy-9β-benzoiloxi-1α-(3-furoiloxi)- dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (14,6 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 18,1 (*c* 0,3, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{max} (log ϵ) 230 (4,1) nm.

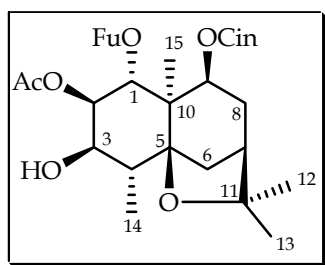
IR ν_{max} 2926, 2854, 1738, 1277, 1238, 1150, 1010, 757, 714 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,18 (3H, s, Me-12); 1,27 (3H, d, *J* = 8,1 Hz, Me-14); 1,34 (3H, s, Me-13); 1,41 (3H, s, Me-15); 1,85 (3H, s, OAc-2); 2,04 (1H, m, H-7); 2,06 (1H, m, H-6β); 2,13 (2H, m, H-8); 2,17 (1H, m, H-6α); 2,26 (3H, s, OAc-3); 2,41 (1H, c, *J* = 8,1 Hz, H-4); 4,98 (1H, d, *J* = 5,3 Hz, H-9); 5,00 (1H, d, *J* = 3,0 Hz, H-3); 5,42 (1H, dd, *J* = 3,0, 11,1 Hz, H-2); 6,42 (1H, d, *J* = 11,1 Hz, H-1); OFu [6,39 (1H, d, *J* = 1,7 Hz), 7,31 (1H, t, *J* = 1,7 Hz), 7,71 (1H, d, *J* = 1,7 Hz)]; OBz [7,45 (2H, m), 7,57 (1H, m), 8,07 (2H, d, *J* = 7,7 Hz)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 15,9 (c, C-14); 18,9 (c, C-15); 24,2 (c, C-13); 30,0 (c, C-12); 30,3 (t, C-8); 36,2 (t, C-6); 42,6 (d, C-7); 43,4 (d, C-4); 49,4 (s, C-10); 67,9 (d, C-2); 68,4 (d, C-1); 73,3 (d, C-9); 75,0 (d, C-3); 82,3 (s, C-11); 85,8 (s, C-5); OFu [109,3 (d), 118,6 (s), 143,3 (d), 147,1 (d), 160,8 (s, OFu-1)]; OBz [127,7 (2 x d), 130,0 (2 x d, s), 132,5 (d), 165,4 (s, OBz-9)]; OAc [(20,6 c, 170,4 s, OAc-2), (21,2 c, 171,0 s, OAc-3)].

EM *m/z* (%) 568 [M⁺] (44), 553 (2), 446 (6), 354 (3), 311 (5), 232 (9), 157 (8), 105 (100), 95 (69).

EMAR *m/z* Calculado para C₃₁H₃₆O₁₀ [M⁺], 568,2308; observado, 568,2306.

Sesquiterpeno S-42**2β-Acetoxy-9β-*trans*-cinamoiloxi-1α-(3-furoiloxi)-3β-hidroxi-dihidro-β-agarofurano**

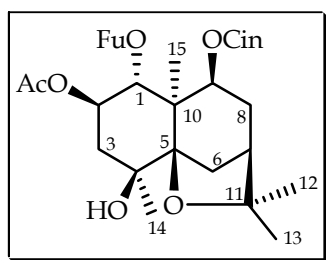
Descripción: sólido amorfo (1,8 mg).

[α]_D²⁰ + 74,8 (c 0,2, CHCl₃).UV(EtOH)λ_{max} (log ε) 274 (3,9), 220 (3,1), 216 (3,9) nm.IR ν_{max} 3470, 2924, 2853, 1738, 1241, 1165, 1007, 758, 712 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,24 (3H, d, *J* = 8,1 Hz, Me-14); 1,29 (3H, s, Me-12); 1,39 (3H, s, Me-15); 1,43 (3H, s, Me-13); 1,97 (3H, s, OAc-2); 2,07 (1H, m, H-7); 2,09 (1H, m, H-6β); 2,13 (2H, m, H-8); 2,21 (1H, m, H-6α); 2,27 (1H, m, H-4); 3,98 (1H, dd, *J* = 2,9, 9,9 Hz, H-3); 4,52 (1H, d, *J* = 9,9 Hz, OH-3); 4,76 (1H, d, *J* = 5,6 Hz, H-9); 5,29 (1H, dd, *J* = 2,9, 11,2 Hz, H-2); 6,28 (1H, d, *J* = 11,2 Hz, H-1); OFu [6,53 (1H, d, *J* = 1,8 Hz), 7,32 (1H, t, *J* = 1,8 Hz), 7,82 (1H, d, *J* = 1,8 Hz)]; OCin [6,50 (1H, d, *J* = 16,8 Hz), 7,41 (3H, m), 7,55 (1H, d, *J* = 16,8 Hz), 7,60 (2H, m)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 16,2 (c, C-14); 19,2 (c, C-15); 24,1 (c, C-13); 30,1 (c, C-12); 31,2 (t, C-8); 36,7 (t, C-6); 42,3 (d, C-7); 47,2 (d, C-4); 49,9 (s, C-10); 68,4 (d, C-1); 71,3 (d, C-2); 73,4 (d, C-9); 73,7 (d, C-3); 84,5 (s, C-11); 88,8 (s, C-5); OFu [109,6 (d), 119,1 (s), 143,5 (d), 147,3 (d), 161,2 (s, OFu-1)]; OCin [118,8 (d), 128,3 (2 x d), 128,8 (2 x d), 130,1 (d), 134,7 (s), 144,6 (d), 166,3 (s, OCin-9)]; OAc (21,0 c, 170,9 s, OAc-2).

EM *m/z* (%) 552 [M⁺] (24), 533 (2), 440 (4), 398 (6), 250 (1), 131 (100), 95 (50).EMAR *m/z* Calculado para C₃₁H₃₆O₉ [M⁺], 552,22359; observado, 552,2372.

Sesquiterpeno S-43

2β-Acetoxy-9β-*trans*-cinamoiloxi-1α-(3-furoiloxi)-4β-hidroxi-dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (78,6 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 124,7 (c 0,6, CHCl₃).

UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 276 (4,1), 222 (4,0), 217 (4,0) nm.

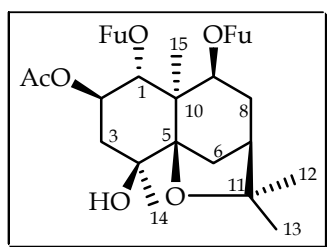
IR ν_{\max} 3536, 2931, 1740, 1310, 1241, 1166, 1009, 757, 713 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,33 (3H, s, Me-12); 1,39 (6H, s, Me-14, Me-15); 1,45 (3H, s, Me-13); 1,80 (1H, d, *J* = 12,5 Hz, H-6α); 1,89 (3H, s, OAc-2); 2,09 (3H, m, H-3, H-7); 2,14 (2H, m, H-8); 2,43 (1H, da, *J* = 12,5 Hz, H-6β); 2,86 (1H, s, OH-4); 4,76 (1H, d, *J* = 5,0 Hz, H-9); 5,09 (1H, dt, *J* = 4,7, 10,6 Hz, H-2); 5,83 (1H, d, *J* = 10,6 Hz, H-1); OFu [6,49 (1H, d, *J* = 1,6 Hz), 7,30 (1H, t, *J* = 1,6 Hz), 7,80 (1H, d, *J* = 1,6 Hz)]; OCin [6,44 (1H, d, *J* = 16,0 Hz), 7,40 (3H, m), 7,52 (1H, d, *J* = 16,0 Hz), 7,56 (2H, m)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 19,8 (c, C-15); 24,2 (c, C-13); 24,9 (c, C-14); 30,1 (c, C-12); 31,0 (t, C-8); 31,5 (t, C-6); 42,6 (t, C-3); 43,4 (d, C-7); 48,2 (s, C-10); 69,2 (d, C-2); 70,5 (s, C-4); 72,5 (d, C-1); 73,4 (d, C-9); 83,9 (s, C-11); 89,9 (s, C-5); OFu [109,6 (d), 119,1 (s), 143,6 (d), 147,4 (d), 161,6 (s, OFu-1)]; OCin [118,7 (d), 128,2 (2 x d), 128,8 (2 x d), 130,1 (d), 134,6 (s), 144,6 (d), 166,2 (s, OCin-9)]; OAc (20,9 c, 170,4 s, OAc-2).

EM *m/z* (%) 552 [M⁺] (19), 537 (5), 421 (2), 389 (23), 362 (6), 249 (7), 232 (6), 131 (100), 95 (67).

EMAR *m/z* Calculado para C₃₁H₃₆O₉ [M⁺], 552,2359; observado, 552,2380.

Sesquiterpeno S-44**2β-Acetoxy-1α,9β-di-(3-furoiloxi)-4β-hidroxi-dihidro-β-agarofurano**

Descripción: sólido amorfo (3,1 mg).

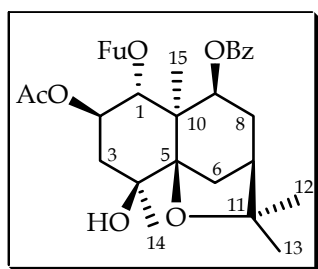
[α]_D²⁰ + 45,5 (c 0,2, CHCl₃).UV (EtOH) λ_{max} (log ε) 274 (4,4), 223 (4,2) nm.IR ν_{max} 3517, 2925, 2853, 1738, 1311, 1241, 1160, 1008, 874, 758 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,33 (3H, s, Me-12); 1,39 (3H, s, Me-14); 1,40 (3H, s, Me-15); 1,45 (3H, s, Me-13); 1,81 (1H, d, J = 12,4, H-6α); 1,86 (3H, s, OAc-2); 2,03 (1H, m, H-7); 2,08 (2H, m, H-3); 2,12 (2H, m, H-8); 2,43 (1H, da, J = 12,4 Hz, H-6β); 2,84 (1H, s, OH-4); 4,91 (1H, d, J = 6,8 Hz, H-9); 5,06 (1H, dt, J = 4,1, 10,3 Hz, H-2); 5,75 (1H, d, J = 10,3 Hz, H-1); OFu [6,45 (1H, s), 6,70 (1H, s), 7,31 (1H, s), 7,39 (1H, s), 7,76 (1H, s), 8,02 (1H, s)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 19,7 (c, C-15); 24,1 (c, C-13); 24,7 (c, C-14); 29,8 (c, C-12); 30,8 (t, C-8); 31,4 (t, C-6); 42,4 (t, C-3); 43,2 (d, C-7); 47,9 (s, C-10); 68,9 (d, C-2); 70,3 (s, C-4); 72,3 (d, C-1); 72,9 (d, C-9); 83,7 (s, C-11); 89,7 (s, C-5); OFu [109,3 (d), 109,8 (d), 118,7 (s), 118,9 (s), 143,0 (d), 143,3 (d), 147,1 (d), 148,5 (d), 161,7 (s, OFu-1), 162,4 (s, OFu-9)]; OAc (20,7 c, 170,5 s, OAc-2).

EM m/z (%) 516 [M⁺] (14), 501 (10), 474 (1), 456 (2), 389 (3), 362 (5), 250 (4), 95 (100).

EMAR m/z Calculado para C₂₇H₃₂O₁₀ [M⁺], 516,1995; observado, 516,1978.

Sesquiterpeno S-45

2β-Acetoxy-9β-benzoiloxi-1α-(3-furoiloxi)-4β-hidroxi-dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (18,6 mg).

[α]_D²⁰ + 65,1 (c 0,6, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{max} (log ε) 231 (3,8) nm.

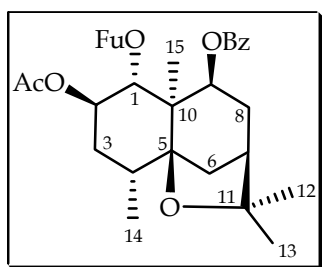
IR ν_{max} 3539, 2929, 2855, 1740, 1714, 1277, 1241, 1156, 1012, 757, 714 cm⁻¹.

RMN ¹H 1,36 (3H, s, Me-12); 1,42 (3H, s, Me-14); 1,45 (3H, s, Me-15); 1,48 (3H, s, Me-13); 1,84 (1H, d, J = 12,4 Hz, H-6α); 1,86 (3H, s, OAc-2); 2,08 (2H, m, H-3); 2,09 (3H, m, H-7, H-8); 2,23 (1H, m, H-8α); 2,47 (1H, d_a, J = 12,4 Hz, H-6β); 2,91 (1H, s, OH-4); 5,05 (1H, d, J = 6,5 Hz, H-9); 5,11 (1H, dt, J = 4,8, 10,5 Hz, H-2); 5,84 (1H, d, J = 10,5 Hz, H-1); OFu [6,35 (1H, s), 7,30 (1H, s), 7,67 (1H, s)]; OBz [7,46 (2H, m), 7,57 (1H, m), 8,04 (2H, d, J = 7,5 Hz)].

RMN ¹³C 20,0 (c, C-15); 24,4 (c, C-13); 25,0 (c, C-14); 30,0 (c, C-12); 31,0 (t, C-8); 31,6 (t, C-6); 42,7 (t, C-3); 43,6 (d, C-7); 48,3 (s, C-10); 69,1 (d, C-2); 70,6 (s, C-4); 72,6 (d, C-1); 73,6 (d, C-9); 84,1 (s, C-11); 90,0 (s, C-5); OFu [109,4 (d), 118,8 (s), 143,4 (d), 147,3 (d), 161,1 (s, OFu-1)]; OBz [127,9 (2 x d), 129,8 (s), 130,2 (2 x d), 132,9 (d), 165,6 (s, OBz-9)]; OAc (20,9 c, 170,5 s, OAc-2).

EM m/z (%) 526 [M⁺] (6), 510 (10), 465 (1), 388 (7), 362 (6), 329 (3), 232 (8), 105 (99), 95 (100).

EMAR m/z Calculado para C₂₉H₃₄O₉ [M⁺], 526,2203; observado, 526,2185.

Sesquiterpeno S-46**2β-Acetoxy-9β-benzoiloxi-1α-(3-furoiloxi)-dihidro-β-agarofurano**

Descripción: sólido amorfo (5,0 mg).

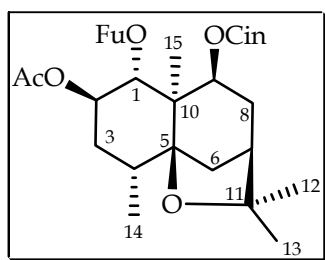
 $[\alpha]_D^{20}$ + 81,5 (c 0,2, CHCl₃).UV(EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 230 (3,8) nm.IR ν_{\max} 2926, 2854, 1737, 1711, 1304, 1278, 1244, 1143, 1014, 757, 714 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,25 (3H, d, J = 7,6 Hz, Me-14); 1,26 (3H, s, Me-12); 1,41 (3H, s, Me-13); 1,42 (3H, s, Me-15); 1,84 (1H, d, J = 12,8 Hz, H-3α); 1,87 (3H, s, OAc-2); 2,05 (1H, m, H-6α); 2,06 (1H, m, H-7); 2,08 (1H, m, H-8β); 2,10 (1H, m, H-4); 2,18 (2H, m, H-6β, H-8α); 2,37 (1H, dt, J = 4,7, 12,8 Hz, H-3β); 4,97 (1H, d, J = 6,4 Hz, H-9); 5,29 (1H, dt, J = 4,7, 10,2 Hz, H-2); 5,93 (1H, d, J = 10,2 Hz, H-1); OFu, OBz [6,37 (1H, s), 7,45 (3H, m), 7,57 (1H, m), 7,70 (1H, s), 8,06 (2H, d, J = 7,7 Hz)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 18,5 (c, C-14); 19,3 (c, C-15); 24,4 (c, C-13); 30,2 (c, C-12); 31,4 (t, C-8); 33,1 (t, C-3); 36,3 (t, C-6); 40,7 (d, C-4); 43,9 (d, C-7); 49,6 (s, C-10); 69,3 (d, C-2); 73,4 (d, C-1); 74,0 (d, C-9); 82,6 (s, C-11); 86,9 (s, C-5); OFu [109,5 (d), 119,1 (s), 143,4 (d), 147,2 (d), 161,2 (s, OFu-1)]; OBz [127,9 (2 x d), 130,0 (s), 130,3 (2 x d), 132,8 (d), 165,8 (s, OBz-9)]; OAc (21,1 c, 170,9 s, OAc-2).

EM m/z (%) 510 [M⁺] (55), 495 (1), 450 (1), 388 (9), 346 (3), 277 (5), 234 (10), 105 (100), 95 (85).

EMAR m/z Calculado para C₂₉H₃₄O₈ [M⁺], 510,2254; observado, 510,2248.

Sesquiterpeno S-47**2β-Acetoxy-9β-trans-cinamoiloxi-1α-(3-furoiloxi)-
dihidro-β-agarofurano**

Descripción: sólido amorfo (4,3 mg).

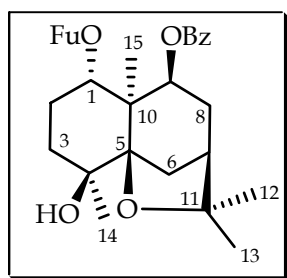
[α]_D²⁰ + 122,9 (c 0,2, CHCl₃).UV(EtOH) λ_{max} (log ε) 274 (3,8), 220 (3,8), 217 (4,1) nm.IR ν_{max} 2925, 2854, 1737, 1309, 1243, 1169, 1142, 1016, 759, 713 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,23 (3H, d, J = 7,8 Hz, Me-14); 1,25 (3H, s, Me-12); 1,38 (3H, s, Me-15); 1,40 (3H, s, Me-13); 1,83 (1H, ddd, J = 1,5, 4,5, 12,4 Hz, H-3α); 1,88 (3H, s, OAc-2); 1,99 (1H, d_a, J = 12,5 Hz, H-6α); 2,04 (1H, m, H-7); 2,06 (1H, m, H-4); 2,09 (2H, m, H-8); 2,14 (1H, m, H-6β); 2,35 (1H, dt, J = 6,2, 12,4 Hz, H-3β); 4,72 (1H, d, J = 6,3 Hz, H-9); 5,29 (1H, ddd, J = 4,5, 10,6, 12,4 Hz, H-2); 5,95 (1H, d, J = 10,6 Hz, H-1); OFu, OCin [6,49 (1H, d, J = 16,1 Hz), 6,53 (1H, dd, J = 0,7, 1,8 Hz), 7,32 (1H, m), 7,41 (2H, m), 7,54 (1H, d, J = 16,1 Hz), 7,59 (3H, m), 7,82 (1H, dd, J = 0,7, 1,8 Hz)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 18,4 (c, C-14); 19,1 (c, C-15); 24,2 (c, C-13); 30,2 (c, C-12); 31,2 (t, C-8); 33,0 (t, C-3); 36,2 (t, C-6); 40,6 (d, C-4); 43,7 (d, C-7); 49,5 (s, C-10); 69,4 (d, C-2); 73,4 (d, C-1); 73,8 (d, C-9); 82,4 (s, C-11); 86,8 (s, C-5); OFu [109,6 (d), 119,3 (s), 143,4 (d), 147,3 (d), 161,7 (s, OFu-1)]; OCin [119,0 (d), 128,1 (2 x d), 128,7 (2 x d), 130,0 (d), 134,8 (s), 144,3 (d), 166,4 (s, OCin-9)]; OAc (21,1 c, 172,1 s, OAc-2).

EM m/z (%) 536 [M⁺] (25), 510 (1), 448 (1), 405 (11), 388 (7), 346 (2), 310 (2), 270 (9), 233 (16), 131 (93), 95 (100).

EMAR m/z Calculado para C₃₁H₃₆O₈ [M⁺], 536,2410; observado, 536,2431.

Sesquiterpeno S-48**(1S,4S,5R,7R,9S,10S)-9-Benzoiloxi-1-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano**

Descripción: sólido amorfo (8,0 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 69,7 (c 0,6, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 230 (3,9) nm.

IR ν_{\max} 3543, 2930, 1720, 1307, 1278, 1160, 1092, 970, 760, 713 cm⁻¹.

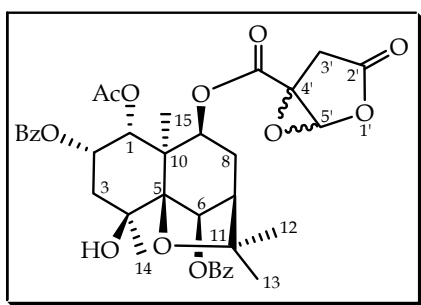
RMN ¹H (δ, CDCl₃) 1,31 (3H, s, Me-14); 1,35 (3H, s, Me-12); 1,37 (3H, s, Me-15); 1,47 (3H, s, Me-13); 1,56 (1H, d_a, J = 11,9 Hz, H-2 α); 1,77 (1H, dt, J = 3,4, 13,4 Hz, H-3 α); 1,82 (1H, d, J = 12,3 Hz, H-6 α); 1,94 (1H, dt, J = 3,8, 13,4 Hz, H-3 β); 2,09 (1H, m, H-2 β); 2,10 (1H, m, H-7); 2,12 (1H, da, J = 16,0 Hz, H-8 β); 2,25 (1H, ddd, J = 3,4, 6,6, 16,0 Hz, H-8 α); 2,44 (1H, da, J = 12,3 Hz, H-6 β); 2,74 (1H, s, OH-4); 5,10 (1H, d, J = 6,6 Hz, H-9); 5,53 (1H, dd, J = 3,5, 11,9 Hz, H-1); OFu [6,34 (1H, s), 7,25 (1H, s), 7,63 (1H, s)]; OBz [7,38 (2H, m), 7,51 (1H, m), 7,91 (2H, d, J = 7,7 Hz)].

RMN ¹³C (δ, CDCl₃) 19,3 (c, C-15); 23,8 (t, C-2); 24,1 (c, C-14); 24,4 (c, C-13); 30,0 (c, C-12); 31,2 (t, C-8); 31,6 (t, C-6); 37,0 (t, C-3); 43,5 (d, C-7); 48,1 (s, C-10); 70,3 (s, C-4); 73,2 (d, C-1); 74,0 (d, C-9); 83,5 (s, C-11); 90,6 (s, C-5); OFu [109,4 (d), 119,2 (s), 143,2 (d), 147,1 (d), 162,1 (s, OFu-1)]; OBz [128,0 (2 x d), 129,7 (s), 129,8 (2 x d), 132,8 (d), 165,6 (s, OBz-9)].

EM m/z (%) 468 [M⁺] (5), 453 (27), 356 (10), 346 (9), 234 (14), 105 (100), 95 (58).

EMAR m/z Calculado para C₂₇H₃₂O₇ [M⁺], 468,2148; observado, 468,2129.

Sesquiterpeno S-50

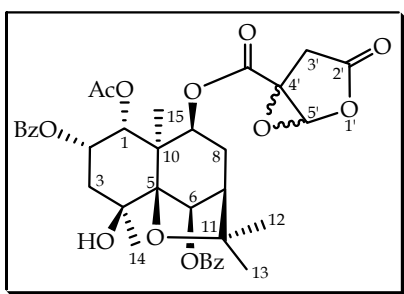


(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-Acetoxy-2,6-dibenzoiloxi-9-(4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahydrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (2,9 mg).

| | |
|---|---|
| $[\alpha]_D^{20}$ | + 7,2 (c 0,3, CHCl ₃). |
| UV(EtOH) λ_{\max} (log ϵ) | 231 (3,9) nm. |
| IR ν_{\max} | 3542, 2924, 2854, 1816, 1722, 1274, 1110, 1025, 759, 713 cm ⁻¹ . |
| RMN ¹ H (δ , CDCl ₃) | 1,54 (3H, s, Me-13); 1,60 (3H, s, Me-12); 1,63 (3H, s, Me-15); 1,66 (3H, s, Me-14); 1,90 (3H, s, OAc-1); 2,14 (1H, dd, $J = 3,1, 16,6$ Hz, H-8 β); 2,18 (1H, d, $J = 3,8$ Hz, H-3 α); 2,25 (1H, d, $J = 3,3$ Hz, H-3 β); 2,41 (1H, t, $J = 3,1$ Hz, H-7); 2,58 (1H, ddd, $J = 3,1, 6,6, 16,6$ Hz, H-8 α); 3,10 (1H, s, OH-4); 5,02 (1H, d, $J = 6,6$ Hz, H-9); 5,37 (1H, d, $J = 3,4$ Hz, H-1); 5,73 (1H, dd, $J = 3,4, 7,0$ Hz, H-2); 5,79 (1H, s, H-6); 2 x OBz [7,45 (2H, t, $J = 7,7$ Hz), 7,50 (2H, t, $J = 7,9$ Hz), 7,60 (2H, m), 7,96 (2H, d, $J = 8,2$ Hz), 8,21 (2H, d, $J = 7,9$ Hz)]; 4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahidro(3-furoiloxi) [3,07, 3,27 (2H, d _{AB} , $J = 19,4$ Hz), 5,89 (1H, s)]. |
| RMN ¹³ C (δ , CDCl ₃) | 21,5 (c, C-15); 25,3 (c, C-14); 25,7 (c, C-13); 29,7 (c, C-12); 31,2 (t, C-8); 42,3 (t, C-3); 48,8 (d, C-7); 51,5 (s, C-10); 69,0 (d, C-2); 69,4 (d, C-1); 69,9 (s, C-4); 74,3 (d, C-9); 79,6 (d, C-6); 85,1 (s, C-11); 91,2 (s, C-5); 2 x OBz [128,7 (2 x d), 128,8 (2 x d), 129,5 (2 x d), 129,6 (s), 129,7 (s), 130,2 (2 x d), 133,4 (d), 133,6 (d), 165,8 (s, OBz-2), 166,1 (s, OBz-6)]; 4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahidro(3-furoiloxi) [33,5 (t), 57,5 (s), 81,0 (d), 163,8 (s), 171,5 (s)]; OAc (20,9 c, 170,6 s, OAc-1). |
| ESI m/z (%) | 701 [M ⁺ +Na] (100). |
| HR-ESI/MS m/z | Calculado para C ₃₆ H ₃₈ O ₁₃ Na [M ⁺ +Na], 701,2223; observado, 701,2213. |

Sesquiterpeno S-51



(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1-Acetoxy-2,6-dibenzoiloxi-9-(4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahydrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (2,0 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 26,1 (c 0,2, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 231 (4,1) nm.

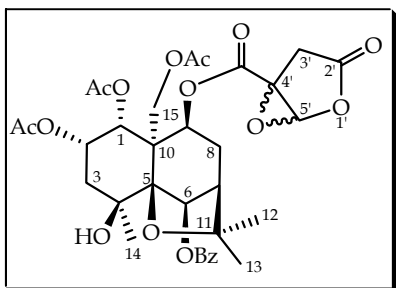
IR ν_{\max} 3542, 2925, 2854, 1814, 1722, 1271, 1110, 1024, 759, 713 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ , CDCl₃) 1,55 (3H, s, Me-12); 1,62 (3H, s, Me-13); 1,63 (3H, s, Me-15); 1,67 (3H, s, Me-14); 1,91 (3H, s, OAc-1); 2,19 (1H, da, J = 15,2 Hz, H-3 α); 2,27 (1H, dd, J = 3,2, 15,2 Hz, H-3 β); 2,44 (1H, t, J = 3,3 Hz, H-7); 2,61 (1H, ddd, J = 3,3, 6,6, 16,7 Hz, H-8 α); 3,07 (1H, s, OH-4); 4,95 (1H, d, J = 6,6 Hz, H-9); 5,50 (1H, d, J = 3,2 Hz, H-1); 5,68 (1H, dd, J = 3,2, 6,7 Hz, H-2); 5,80 (1H, s, H-6); 2 x OBz [7,45 (2H, t, J = 7,8 Hz), 7,50 (2H, t, J = 7,7 Hz), 7,61 (2H, m), 7,98 (2H, d, J = 7,7 Hz), 8,22 (2H, d, J = 7,8 Hz)]; 4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahydro(3-furoiloxi) [2,92, 3,56 (2H, d_{AM}, J = 18,9 Hz), 5,58 (1H, s)].

RMN ¹³C (δ , CDCl₃) 21,4 (c, C-15); 25,3 (c, C-14); 25,9 (c, C-13); 29,6 (c, C-12); 31,1 (t, C-8); 42,4 (t, C-3); 48,7 (d, C-7); 51,5 (s, C-10); 69,1 (d, C-2); 69,3 (d, C-1); 69,9 (s, C-4); 74,7 (d, C-9); 79,6 (d, C-6); 85,0 (s, C-11); 91,2 (s, C-5); 2 x OBz [128,7 (2 x d), 128,8 (2 x d), 129,5 (2 x d), 129,6 (s), 129,7 (s), 130,2 (2 x d), 133,4 (d), 133,6 (d), 165,9 (s, OBz-2), 166,2 (s, OBz-6)]; 4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahydro(3-furoiloxi) [33,6 (t), 57,6 (s), 80,8 (d), 163,6 (s), 171,6 (s)]; OAc (21,0 c, 170,4 s, OAc-1).

ESI m/z (%) 701 [M⁺+Na] (100).

HR-ESI/MS m/z Calculado para C₃₆H₃₈O₁₃Na [M⁺+Na], 701,2223; observado, 701,2218.

Sesquiterpeno S-52

(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,2,15-Triacetoxi-6-benzoiloxi-9-(4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahidrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (1,0 mg).

$[\alpha]_D^{20}$

+ 9,0 (c 0,1, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{max} (log ϵ)

230 (3,9) nm.

IR ν_{max}

3514, 2923, 2853, 1816, 1744, 1251, 1153, 1113, 1040, 770, 715 cm⁻¹.

RMN ¹H
(δ , CDCl₃)

1,53 (3H, s, Me-13); 1,54 (3H, s, Me-14); 1,60 (3H, s, Me-12); 1,94 (3H, s, OAc-1); 2,05 (1H, m, H-3 α); 2,14 (3H, s, OAc-2); 2,17 (1H, m, H-3 β); 2,18 (1H, m, H-8 β); 2,31 (1H, t, J = 3,6 Hz, H-7); 2,32 (3H, s, OAc-15); 2,63 (1H, ddd, J = 3,6, 6,8, 16,1 Hz, H-8 α); 2,97 (1H, s, OH-4); 4,43, 4,91 (2H, d_{AB}, J = 13,0 Hz, H-15); 5,36 (1H, sa, H-1); 5,42 (1H, d, J = 3,4 Hz, H-2); 5,44 (1H, sa, H-9); 6,21 (1H, s, H-6); OBz [7,48 (2H, m), 7,60 (1H, m), 8,17 (2H, d, J = 7,7 Hz)]; 4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahidro(3-furoiloxi) [3,07, 3,24 (2H, d_{AB}, J = 19,2 Hz), 5,85 (1H, s)].

RMN ¹³C
(δ , CDCl₃)

24,7 (c, C-14); 25,6 (c, C-13); 29,4 (c, C-12); 34,4 (t, C-8); 42,1 (t, C-3); 48,8 (d, C-7); 55,2 (s, C-10); 64,9 (t, C-15); 67,8 (d, C-1); 69,7 (d, C-9); 69,8 (s, C-4); 70,8 (d, C-2); 78,2 (d, C-6); 84,9 (s, C-11); 90,9 (s, C-5); OBz [128,7 (2 x d), 129,6 (s), 130,1 (2 x d), 133,6 (d), 166,0 (s, OBz-6)]; 4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahidro(3-furoiloxi) [33,4 (t), 57,4 (s), 81,0 (d), 163,6 (s), 171,3 (s)]; OAc [(20,8 c, 170,2 s, OAc-1), (21,1 c, 169,7 (s, OAc-2), (21,3 c, 170,4 s, OAc-15)].

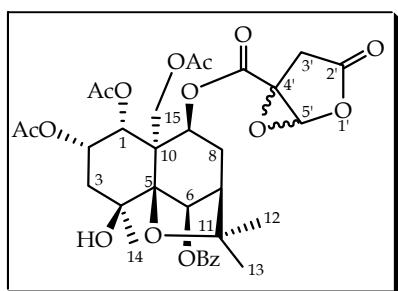
ESI m/z (%)

697 [M⁺+Na] (100).

HR-ESI/MS m/z

Calculado para C₃₃H₃₈O₁₅Na [M⁺+Na], 697,2108; observado, 697,2120.

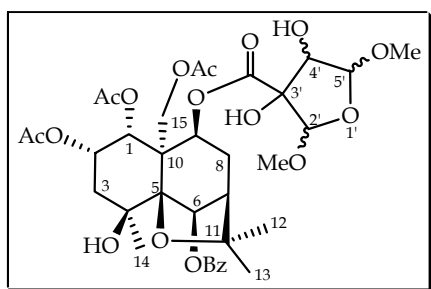
Sesquiterpeno S-53



(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,2,15-Triacetoxi-6-benzoiloxi-9-(4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahydrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano

Descripción: sólido amorfo (1,7 mg).

| | |
|---|--|
| $[\alpha]_D^{20}$ | + 5,9 (c 0,2, CHCl ₃). |
| UV(EtOH) λ_{\max} (log ϵ) | 230 (3,8) nm. |
| IR ν_{\max} | 3515, 2923, 2853, 1817, 1746, 1252, 1113, 1040, 768, 714 cm ⁻¹ . |
| RMN ¹ H (δ , CDCl ₃) | 1,52 (3H, s, Me-14); 1,54 (3H, s, Me-13); 1,61 (3H, s, Me-12); 1,94 (3H, s, OAc-1); 2,03 (1H, d, J = 15,2 Hz, H-3 α); 2,13 (3H, s, OAc-2); 2,16 (1H, d _a , J = 15,2 Hz, H-3 β); 2,23 (1H, m, H-8 β); 2,31 (3H, s, OAc-15); 2,41 (1H, t, J = 3,1 Hz, H-7); 2,66 (1H, ddd, J = 3,1, 6,7, 16,7 Hz, H-8 α); 2,95 (1H, s, OH-4); 4,41, 4,91 (2H, d _{AB} , J = 13,4 Hz, H-15); 5,34 (1H, d, J = 6,7 Hz, H-9); 5,37 (1H, m, H-2); 5,49 (1H, m, H-1); 6,23 (1H, s, H-6); OBz [7,49 (2H, m), 7,61 (1H, m), 8,18 (2H, d, J = 7,5 Hz)]; 4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahidro(3-furoiloxi) [2,88, 3,52 (2H, d _{AM} , J = 18,5 Hz), 5,58 (1H, s)]. |
| RMN ¹³ C (δ , CDCl ₃) | 24,7 (c, C-14); 25,7 (c, C-13); 29,4 (c, C-12); 34,4 (t, C-8); 42,1 (t, C-3); 48,8 (d, C-7); 55,1 (s, C-10); 64,9 (t, C-15); 67,9 (d, C-2); 69,9 (d, C-1); 69,8 (s, C-4); 71,2 (d, C-9); 78,2 (d, C-6); 84,8 (s, C-11); 90,9 (s, C-5); OBz [128,7 (2 x d), 129,6 (s), 130,1 (2 x d), 133,5 (d), 165,9 (s, OBz-6)]; 4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahidro(3-furoiloxi) [33,5 (t), 57,5 (s), 80,6 (d), 163,4 (s), 171,3 (s)]; OAc [(20,9 c, 169,8 s, OAc-1), (21,1 c, 169,7 s, OAc-2), (21,3 c, 170,4 s, OAc-15)]. |
| ESI m/z (%) | 697 [M ⁺ +Na] (100). |
| HR-ESI/MS m/z | Calculado para C ₃₃ H ₃₈ O ₁₅ Na [M ⁺ +Na], 697,2108; observado, 697,2103. |

Sesquiterpeno S-54

(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,2,15-Triacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3',4'-dihidroxi-2',5'-dimetoxi-3'-tetrahidrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (5,4 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 16,5 (*c* 0,5, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{\max} (log ϵ) 231 (4,0) nm.

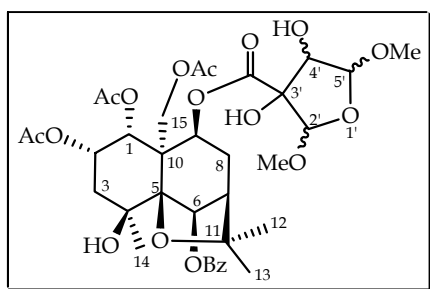
IR ν_{\max} 3498, 2929, 2856, 1744, 1248, 1154, 1114, 992, 758, 716 cm⁻¹.

RMN ¹H (δ , C₆D₆) 1,46 (3H, s, Me-12); 1,51 (3H, s, Me-13); 1,54 (3H, s, Me-14); 1,64 (2H, m, H-3); 1,72 (3H, s, OAc-2); 1,83 (3H, s, OAc-1); 1,92 (3H, s, OAc-15); 1,96 (1H, sa, H-7); 2,10 (1H, dd, *J* = 2,6, 15,7 Hz, H-8 β); 2,51 (1H, ddd, *J* = 3,7, 7,0, 15,7 Hz, H-8 α); 3,08 (1H, s, OH-4); 4,59, 5,12 (2H, d_{AB}, *J* = 13,1 Hz, H-15); 5,52 (1H, dd, *J* = 3,4, 5,7 Hz, H-2); 5,71 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, H-9); 5,77 (1H, d, *J* = 3,4 Hz, H-1); 6,39 (1H, s, H-6); OBz [7,11 (3H, m), 8,47 (2H, m)]; 3',4'-dihidroxi-2',5'-dimetoxi-3'-tetrahidro(3-furoiloxi) [3,23 (3H, s), 3,29 (3H, s), 5,00 (1H, d, *J* = 3,6 Hz), 5,11 (2H, s), 5,17 (1H, sa)].

RMN ¹³C (δ , C₆D₆) 24,4 (c, C-14); 25,1 (c, C-13); 29,1 (c, C-12); 34,5 (t, C-8); 41,7 (t, C-3); 49,1 (d, C-7); 55,2 (s, C-10); 64,8 (t, C-15); 67,9 (d, C-2); 68,7 (d, C-9); 69,7 (s, C-4); 70,4 (d, C-1); 78,3 (d, C-6); 84,4 (s, C-11); 91,1 (s, C-5); OBz [128,6 (2 x d), 130,2 (2 x d), 130,3 (s), 133,1 (d), 165,7 (s, OBz-6)]; 3',4'-dihidroxi-2',5'-dimetoxi-3'-tetrahidro(3-furoiloxi) [54,5 (c); 56,1 (c), 77,1 (d); 83,6 (s), 107,4 (d), 110,2 (d), 167,4 (s)]; OAc [(20,2 c, 169,0 s, OAc-2), (20,3 c, 169,6 s, OAc-15), (20,8 c, 172,5 s, OAc-1)].

ESI *m/z* (%) 761 [M⁺⁺Na] (100).

HR-ESI/MS *m/z* Calculado para C₃₅H₄₆O₁₇Na [M⁺⁺Na], 761,2633; observado, 761,2648.

Sesquiterpeno S-55

(1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,2,15-Triacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3',4'-dihidroxi-2',5'-dimetoxi-3'-tetrahidrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano

Descripción: sólido amorfo (2,5 mg).

$[\alpha]_D^{20}$

+ 4,8 (c 1,3, CHCl₃).

UV(EtOH) λ_{max} (log ϵ)

231 (4,4) nm.

IR ν_{max}

3496, 2929, 2856, 1743, 1249, 1152, 1113, 990, 756, 714 cm⁻¹.

RMN ¹H

(δ , CDCl₃)

1,53 (3H, s, Me-14); 1,60 (3H, s, Me-12); 1,66 (3H, s, Me-13); 1,98 (3H, s, OAc-1); 2,02 (1H, dd, $J = 6,7, 15,1$ Hz, H-3 α); 2,14 (3H, s, OAc-2); 2,17 (1H, dd, $J = 3,6, 15,1$ Hz, H-3 β); 2,26 (1H, dd, $J = 2,3, 15,9$ Hz, H-8 β); 2,31 (3H, s, OAc-15); 2,35 (1H, t, $J = 3,8$ Hz, H-7); 2,55 (1H, ddd, $J = 3,8, 6,1, 15,9$ Hz, H-8 α); 3,02 (1H, s, OH-4); 4,45, 4,95 (2H, d_{AB}, $J = 12,9$ Hz, H-15); 5,38 (1H, dd, $J = 3,6, 6,7$ Hz, H-2); 5,40 (1H, d, $J = 3,6$ Hz, H-1); 5,59 (1H, d, $J = 6,1$ Hz, H-9); 6,25 (1H, s, H-6); OBz [7,49 (2H, m), 7,61 (1H, m), 8,19 (2H, d, $J = 7,2$ Hz)]; 3',4'-dihidroxi-2',5'-dimetoxi-3'-tetrahidro(3-furoiloxi) [3,33 (3H, s), 3,48 (3H, s), 3,88 (2H, s, 2 x OH), 4,97 (1H, s), 4,98 (1H, d, $J = 3,1$ Hz), 5,00 (1H, d, $J = 3,1$ Hz)].

RMN ¹³C

(δ , CDCl₃)

24,7 (c, C-14); 25,8 (c, C-13); 29,2 (c, C-12); 34,2 (t, C-8); 42,1 (t, C-3); 49,0 (d, C-7); 55,0 (s, C-10); 65,1 (t, C-15); 67,8 (d, C-2); 69,6 (d, C-9); 69,8 (s, C-4); 70,5 (d, C-1); 78,4 (d, C-6); 85,0 (s, C-11); 90,7 (s, C-5); OBz [128,6 (2 x d), 129,7 (s), 130,1 (2 x d), 133,3 (d), 165,9 (s, OBz-6)]; 3',4'-dihidroxi-2',5'-dimetoxi-3'-tetrahidro(3-furoiloxi) [54,5 (c), 56,5 (c), 75,9 (d), 82,4 (s), 111,0 (d), 112,0 (d), 173,0 (s)]; OAc [(21,0 c, 169,2 (s, OAc-2), (21,1 c, 170,4 s, OAc-1), (21,3 c, 169,8 s, OAc-15)].

ESI m/z (%)

761 [M⁺+Na] (100).

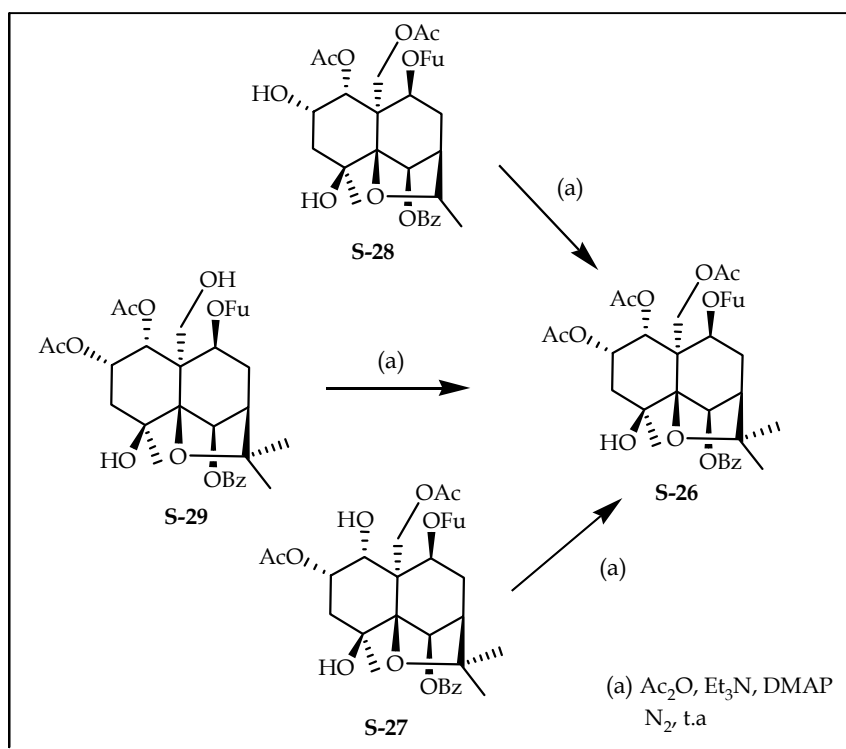
HR-ESI/MS m/z

Calculado para C₃₅H₄₆O₁₇Na [M⁺+Na], 761,2633; observado, 761,2635.

Reacciones de correlación química

Acetilación de S-27, S-28 y S-29

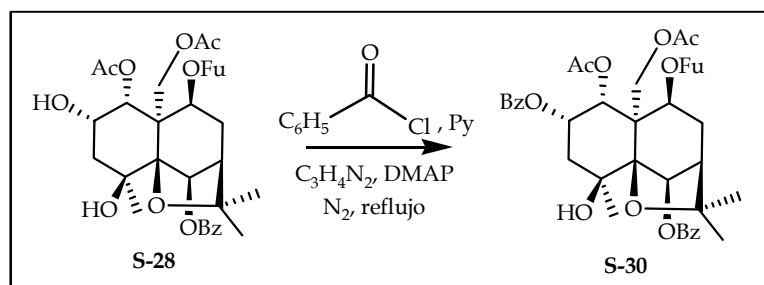
Siguiendo el procedimiento general descrito en las reacciones de acetilación de los sesquiterpenos aislados de las hojas, se acetilaron los compuestos **S-27** (3,5 mg, 0,006 mmoles), **S-28** (4,5 mg, 0,008 mmoles) y **S-29** (2,7 mg, 0,005 mmoles), dando lugar a 3,5 mg (R =90%), 4,0 mg (R = 78%) y 2,6 mg (R = 81%), respectivamente, de un compuesto cuyos datos físicos y espectroscópicos fueron coincidentes con los de **S-26**.



Benzoilación de S-28

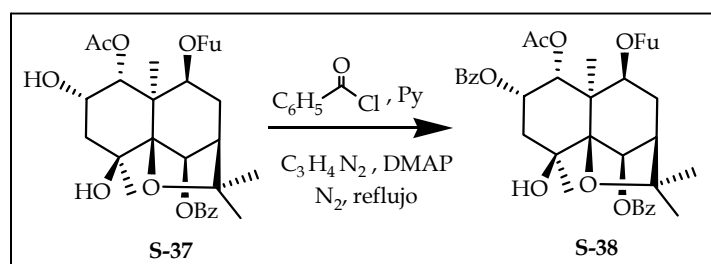
A una disolución de 4,5 mg de **S-28** (0,008 mmoles) en 0,3 ml de piridina seca (3,09 mmoles, 309 eq), se le añadió una cantidad catalítica de DMAP (dimetilaminopiridina) e imidazol ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$) y 0,1 ml de cloruro de benzoilo (1,10 mmoles, 110 eq). La mezcla se agitó durante 16 horas a reflujo, bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se adicionó 1 ml de etanol, agitando la mezcla durante 30 minutos y se llevó a sequedad a presión reducida. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía preparativa de gel de sílice usando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$ (8/2) como eluyente. Se disolvió el producto en 3,0 ml de éter dietílico,

adicionándole 64 mg de fluoruro potásico (1,1 mmoles, 110 eq), agitándolo durante 1 hora a temperatura ambiente, para posteriormente filtrar, obteniéndose 4,3 mg de un producto cuyos datos físicos y espectroscópicos fueron coincidentes con los de **S-30** (R = 76%).



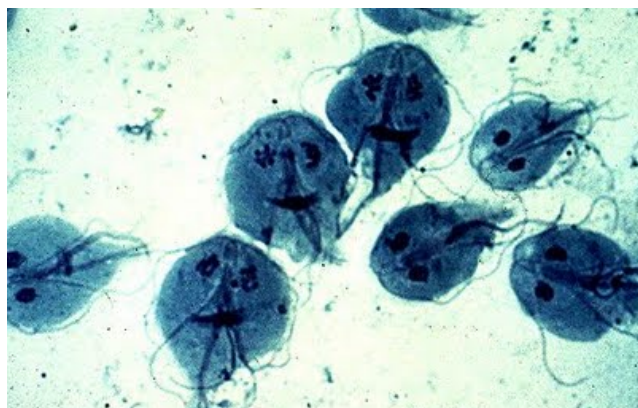
Benzoilación de S-37

Siguiendo el mismo procedimiento que para la benzoilación de **S-28**, se trataron 2,8 mg de **S-37** (0,005 mmoles), obteniéndose 2,5 mg (R = 77%) de un sólido amorfo, cuyos datos físicos y espectroscópicos fueron coincidentes con los del compuesto **S-38**.





5. Actividades biológicas



*5.1. Actividad antiparasitaria
frente a G. intestinalis*

5.1.1. Introducción

5.1.1.1. Giardiasis

La **giardiasis** es una enfermedad parasitaria de gran importancia epidemiológica y clínica por su alta prevalencia y patogenicidad, fundamentalmente entre la población infantil. Esta enfermedad es ocasionada por *Giardia intestinalis* (*Giardia lamblia*), un parásito microscópico unicelular que vive en el intestino de las personas y los animales y se transmite en las heces de una persona o animal infectado. Este parásito está protegido por una cobertura exterior que le permite sobrevivir en el medio ambiente por largos periodos de tiempo.

Como otras especies de este género, el **ciclo biológico** de *G. lamblia* (figura 5.1.2) incluye dos fases o estadios: el trofozoíto (forma vegetativa) cuyo hábitat es el intestino delgado, siendo responsable de las manifestaciones clínicas, y el quiste (forma de resistencia e infecciosa) responsable de la transmisión del parásito (figura 5.1.1).

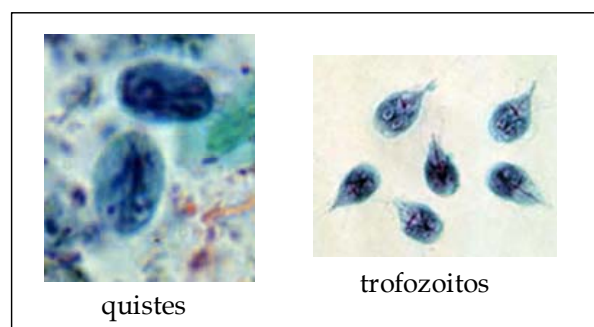


Figura 5.1.1. Imagen de los dos estadios de *Giardia intestinalis*.

Los trofozoítos se dividen en el intestino delgado mediante un proceso de fisión binaria, que incluye la división nuclear en primer lugar, seguida del aparato neuromotor y del disco ventral, y la separación posterior del citoplasma, obteniéndose dos trofozoítos hijos. El siguiente paso es el enquistamiento de los trofozoítos, una vez se dirigen hacia el colon. Los quistes expulsados junto a las heces son infectantes. Cuando dichos quistes son ingeridos por un nuevo hospedador, llegan al duodeno, donde se disuelve la pared quística, dando así lugar a un individuo tetranucleado que se divide en dos trofozoítos binucleados que se anclan al epitelio intestinal, cerrando así su ciclo vital.

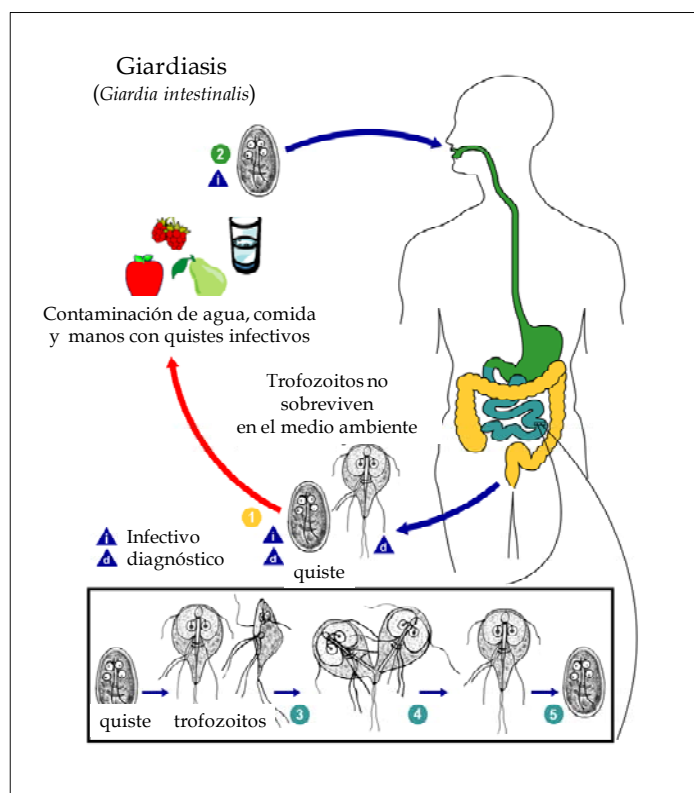


Figura 5.1.2. Ciclo vital de *Giardia intestinalis*.

5.1.1.2. Epidemiología

La infección por *G. lamblia* es cosmopolita y se puede desarrollar tanto de forma endémica (afectando fundamentalmente a la población infantil, con frecuentes reinfecciones) o de forma epidémica (brotes que afectan a comunidades cerradas o viajeros que visitan zonas endémicas). Entre un 2%-3% de todas las diarreas del viajero están causadas por *Giardia*. La infección se adquiere por la ingestión de quistes o, más raramente, por trofozoítos, procedentes de la materia fecal. La transmisión es fundamentalmente fecal-oral directa, por contacto con

personas o animales infectados con quistes. La transmisión fecal-oral indirecta, por el consumo de aguas o alimentos contaminados con quistes, suele ser el origen de brotes epidémicos. *Giardia* también se transmite por vía sexual, sobre todo entre la población homosexual.

La Organización mundial de la salud ha estimado que 280 millones de personas son infectadas cada año¹. La prevalencia de infección varía del 2%-7% en países industrializados hasta más del 50% en países en vías de desarrollo en Asia, África y América Latina².

5.1.1.3. Sintomatología

En la mayor parte de los pacientes infectados por *G. lamblia* la parasitación es asintomática. Se estima que alrededor de un 60% de las giardiasis cursan de esta manera, aunque esta cifra puede modificarse dependiendo del grupo de población geográfica estudiada.

El periodo de incubación de la giardiasis sintomática oscila entre 3 y 45 días. La infección puede evolucionar de forma aguda, subaguda o crónica. Aunque la giardiasis suele resolverse de forma espontánea, en otras ocasiones la parasitación puede durar semanas o meses en ausencia de tratamiento. Además, las formas agudas pueden evolucionar, en un número limitado de casos, a infección crónica, con mayor frecuencia entre la población infantil. La sintomatología gastrointestinal es la más frecuente y comprende un amplio espectro de manifestaciones clínicas: enteritis aguda, diarrea crónica, mala absorción con esteatorrea y pérdida de peso^{3,4}. Las manifestaciones extraintestinales que con más frecuencia se han asociado a la giardiasis son erupción maculopapular, urticaria, aftas, poliartritis, colangitis, asma bronquial, iridociclitis, retinitis, etc. En las formas de giardiasis crónica los síntomas predominantes son el malestar abdominal acompañado de

¹ Upcroft, P.; Upcroft, J. A. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, *14*, 150-164.

² Odoi, A.; Martin, S. W.; Michel, P.; Holt, J.; Middleton, D.; Wilson, J. *Epidemiol. Infect.* **2004**, *132*, 967-975.1.

³ Ranjan, F.; Sujatha, F.; Leong, A. *Tropical Infectious Diseases; Epidemiology, Investigation, Diagnosis and Management*, 1ª ed., Greenwich Medical Media Limited: London, **2001**.

⁴ Ponce-Macotela, M.; Gómez-Garduño, J.; González-Maciél, A.; Reynoso-Robles, R.; Anislado- Tolentino, V.; Martínez-Gordillo, M. *Rev. Invest. Clin.* **2001**, *53*, 41-45.1.

dolor epigástrico difuso. La diarrea puede persistir o alternar con estreñimiento y puede acompañarse de pérdida de peso⁵.

5.1.1.4. Tratamiento

El tratamiento de este tipo de parasitosis se basa en la administración de metronidazol, tinidazol, quinacrina, furazolidona, albendazol y/o nitazoxanida (figura 5.1.3).

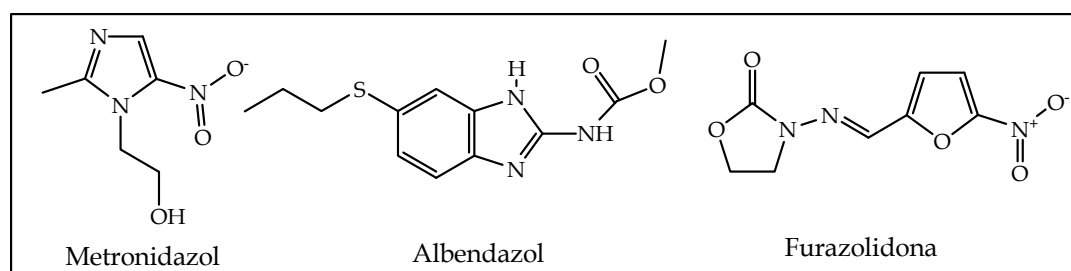


Figura 5.1.3. Compuestos antiparasitarios usados en el tratamiento de la giardiasis.

Sin embargo, la mayoría de estos antiparasitarios presentan efectos secundarios, como náuseas, sabor metálico, coloración amarillenta de la piel e incremento de las enzimas hepáticas (albendazol)^{3,6}. Así, el metronidazol, el medicamento más recetado para tratar la giardiasis, es citotóxico⁷ y además, no ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para su uso pediátrico, sino sólo se prescribe para amebiasis⁸. La furazolidona posee potencial mutagénico en bacterias y además induce tumores de mama en ratas, mientras que los benzimidazoles presentan teratogenicidad⁹. A estos efectos secundarios, hemos de añadir la aparición de resistencia del parásito a estos fármacos¹⁰, lo que hace evidente la necesidad de agentes antiparasitarios frente a esta enfermedad más seguros y efectivos.

En lo que a la búsqueda de nuevos agentes con actividad antiparasitaria se refiere, gran parte de los esfuerzos se han dirigido hacia los productos naturales,

⁵ Wolfe, M. S. *Clin. Microbiol. Rev.* **1992**, 5, 97-105.1.

⁶ Ortega, Y.; Adam, R. *Clin. Infect. Dis.* **1997**, 25, 545-550.

⁷ López Nigro, M. M.; Palermo, A. M.; Mudry, M. D.; Carballo, M. A. *Toxicol. In Vitro.* **2003**, 17, 35-40.

⁸ Fisher, R.; Boyce, T. *Moffet's Pediatric Infectious Diseases; A Problem-Oriented Approach*, 4^a ed.; Lippincott Williams & Wilkins: USA, **2005**, p 441.

⁹ Liu, L. X.; Weller, P. F. *N. Engl. J. Med.* **1996**, 334, 1178-1184.

¹⁰ Lemée, V.; Zaharia, I.; Nevez, G.; Rabodonirina, M.; Brasseur, P.; Ballet, J. J.; FAvenec, L. J. *Antimicrob. Chemother.* **2000**, 46, 819-821.

enfocándose principalmente a la evaluación de plantas con aplicaciones etnomédicas para el tratamiento de las diarreas. A través de estudios biodirigidos se ha logrado el aislamiento de compuestos antiparasitarios para tratar la giardiasis derivados de la ruta fenilpropanoide (figura 5.1.4).

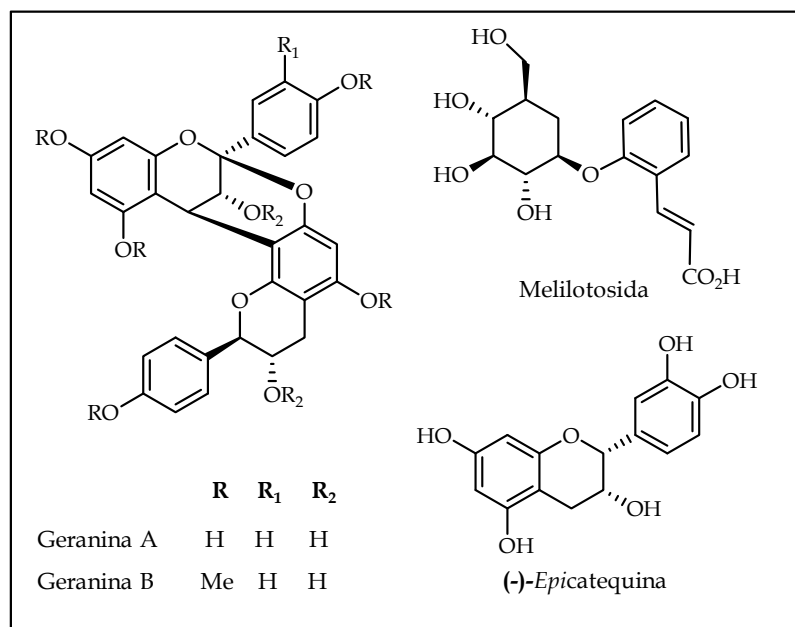


Figura 5.1.4. Compuestos de origen natural con actividad antiparasitaria frente a *Giardia*.

Así, de *Geranium niveum*, se obtuvieron dos nuevas proantocianidinas, geraninas A y B, que fueron activas frente a *G. intestinalis* con una CI_{50} de 2,4 y 6,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente¹¹. Así mismo, de la parte aérea de *Rubus coriifolius* se aisló (-)-epicatequina, compuesto que presentó una CI_{50} de 1,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ¹² y melilotosida, aislada de la parte aérea de *Teloxys graveolens*, que exhibió una CI_{50} de 16,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ¹³ frente a los trofozoítos de *G. intestinalis*.

Recientemente, se han realizado ensayos *in vivo*¹⁴ de flavonoides aislados de varias especies (*Geranium mexicanum*, *Cuphea pinetorum*, *Helianthemum glomeratum*, *Rubus coriifolius*), siendo el flavonoide (-)-epicatequina el que resultó más activo, incluso más que el metronidazol, usado como control positivo.

En lo que se refiere a la familia Celastraceae, se han evaluado algunos compuestos como antiparasitarios frente a *G. intestinalis* desde triterpenos y

¹¹ Calzada, F.; Cerda-García, C. M.; Meckes, M.; Cedillo-Rivera, R.; Bye, R.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 705-709.

¹² Alanis, A.; Calzada, F.; Cedillo-Rivera, R.; Meckes, M. *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 681-682.

¹³ Calzada, F.; Velázquez, C.; Cedillo-Rivera, R.; Esquivel, B. *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 731-732.

¹⁴ Barbosa, E.; Calzada, F.; Campos, R. *Journal of Ethnopharmacology.* **2007**, *109*, 552-554.

triterpenometilénquinonas hasta dímeros triterpénicos, siendo éstos los primeros ejemplos de este tipo de compuestos evaluados frente a este parásito^{15,16}. Entre los compuestos más activos cabe destacar la pristimerina que presenta una CI_{50} de 0,11 μ M y un dímero triterpénico (xuxuarina E β) con una CI_{50} de 11,3 μ M (figura 5.1.5).

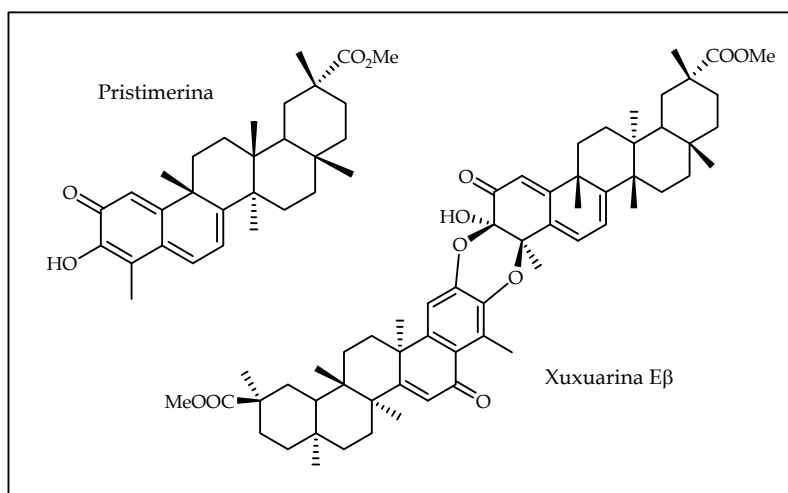


Figura 5.1.5. Compuestos aislados de celastráceas con actividad antiparasitaria frente a *Giardia*.

La actividad de la pristimerina es notable, pues resultó 10 veces más potente que el metronidazol (1,23 μ M), usado como control positivo y fármaco de elección para el tratamiento de la giardiasis.

Con estos antecedentes, en la búsqueda de agentes antiparasitarios, hemos decidido evaluar los dímeros triterpénicos, aislados de *M. jelskii* y otras especies de celastráceas, por su actividad frente a *Giardia intestinalis*.

5.1.2. Resultados y discusión

Se evaluaron los dímeros y trímeros triterpénicos que aislamos de *Maytenus jelskii* (código DT o TT) y de otras especies de celastráceas (*M. cuzcoína*, *M. blepharodes* y *M. scutioides*), resultado de trabajos previos en nuestro grupo de investigación (figura 5.1.6). Se ensayaron 17 dímeros y 2 trímeros triterpénicos. Todos los dímeros presentan uniones A-A, excepto dos de ellos que poseen unión B-A (DT-11 y cangorosina A) y además, dos de los dímeros presentan unidades monoméricas derivadas de la tingenona, mientras que el resto pertenecen a la

¹⁵ Mena-Rejón, G. J.; Pérez-Espadas, A. R.; Moo-Puc, R. E.; Cedillo-Rivera, R.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez-Díaz, I. A.; Quijano, L. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 863-865.1.

¹⁶ Mena-Rejón, G. J.; Cedillo-Rivera, R.; Quijano, L. *Phytochemistry*. **2008**, *69*, 1057-1064.

pristimerina. En general, se evaluaron dímeros con diferente regiosustitución [(3-O-3', 4-O-2') ó (3-O-2', 4-O-3')] y esteroquímica entre las dos unidades monoméricas (α ó β).

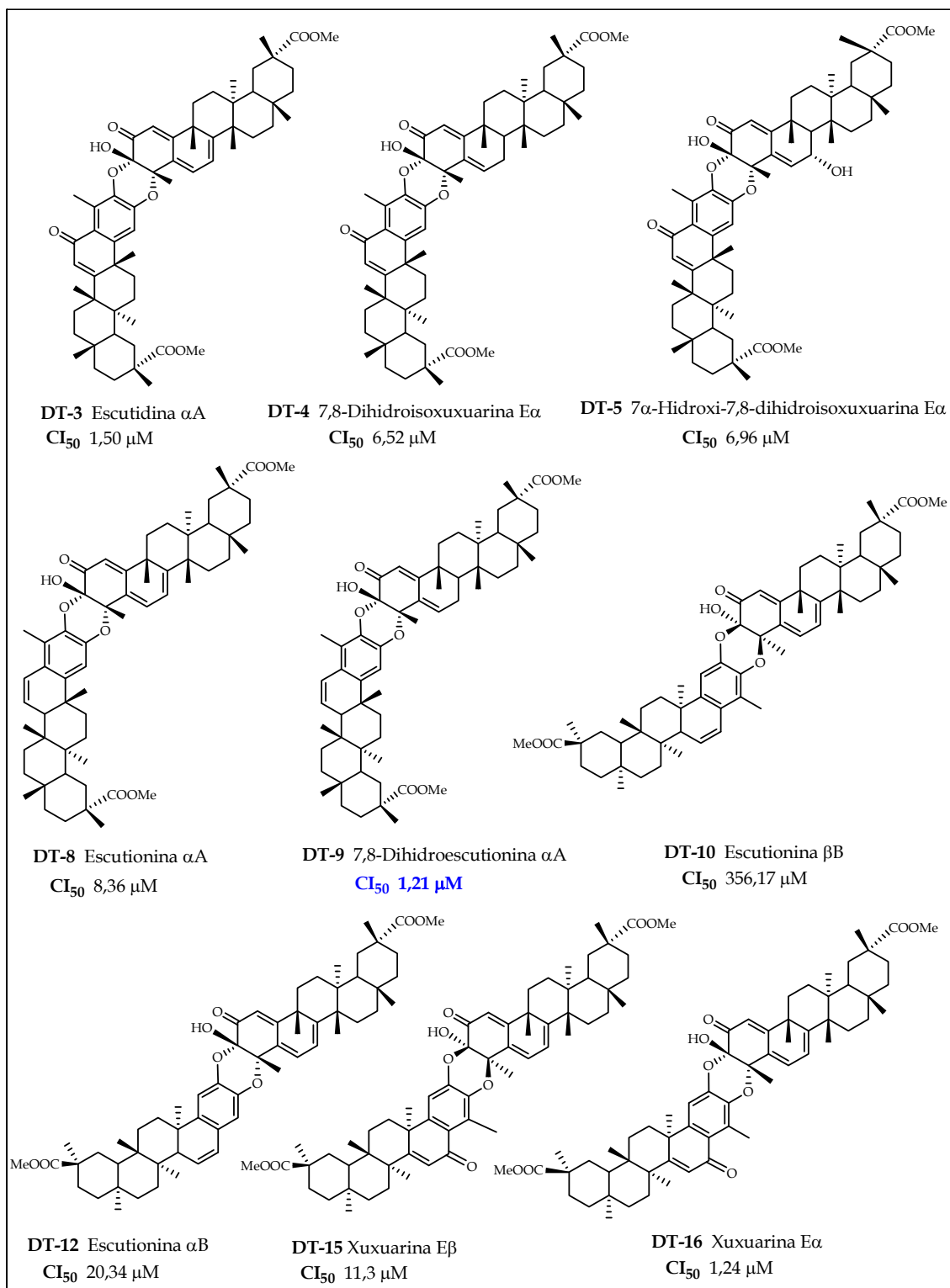


Figura 5.1.6. Dímeros y trímeros evaluados frente a *Giardia intestinalis*.

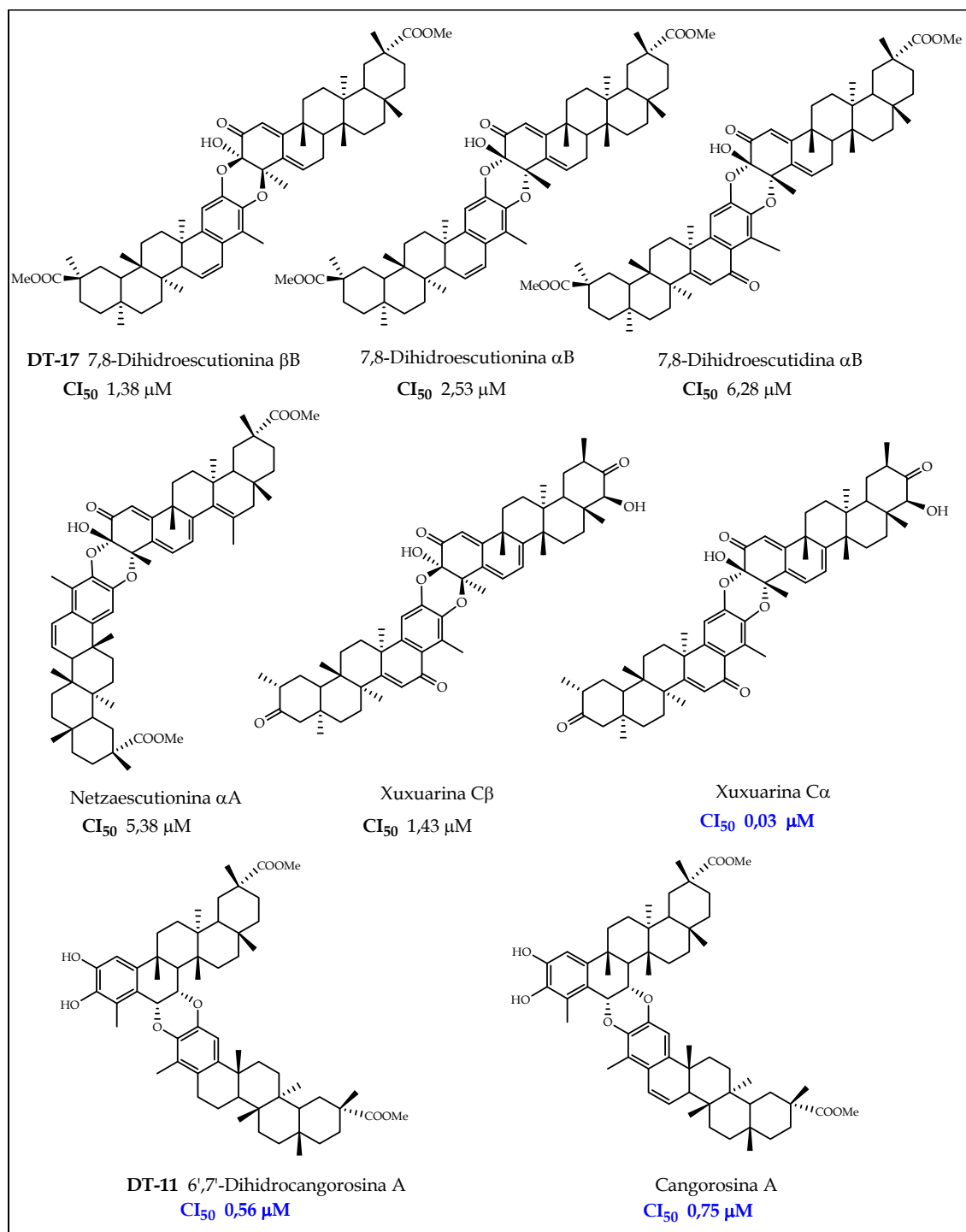


Figura 5.1.6. (continuación).

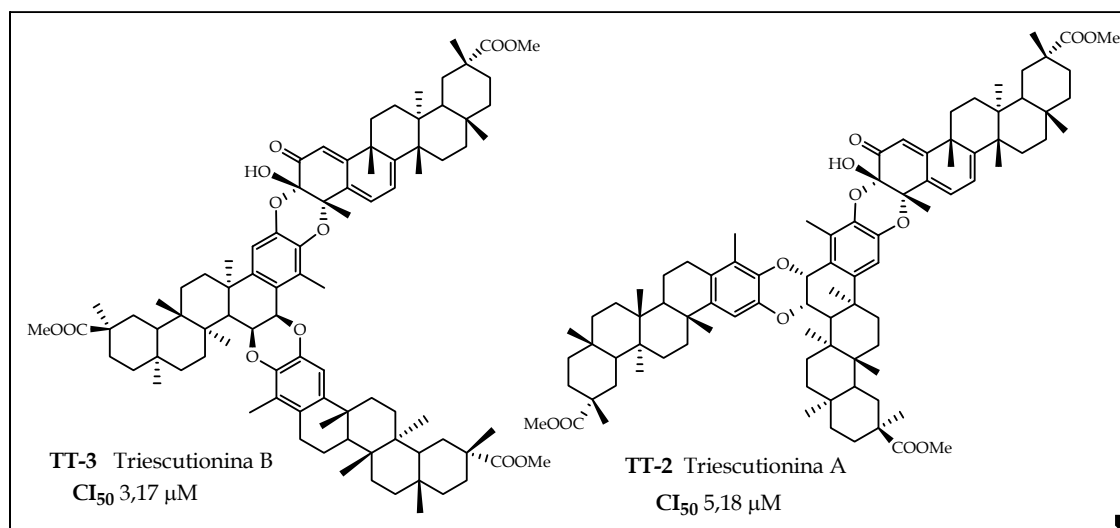


Figura 5.1.6. (continuación).

La determinación de la actividad antiparasitaria frente a *G. intestinalis in vitro* fue realizada por el grupo del Dr. Gonzalo Mena Rejón en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, México y la metodología empleada está recogida en diversas publicaciones^{15,16}.

Se utilizó para los ensayos trofozoítos de *Giardia intestinalis* (cepa IMSS:0989:1), aislada de un paciente con giardiasis sintomática¹⁷ en fase logarítmica de crecimiento. Como control negativo, se incubaron trofozoítos (forma vegetativa de *Giardia lamblia*) sólo con dimetilsulfóxido (DMSO) y como control positivo se empleó metronidazol. Los valores de actividad se expresan en CI₅₀, que es la concentración a la que se inhibe el 50% del crecimiento de trofozoítos y los intervalos de confianza (IC) fueron del 95%.

Los resultados obtenidos (tabla 5.1.1) indican que cuatro de los compuestos ensayados (**DT-9**, **DT-11**, **cangorosina A** y **xuxuarina Cα**) presentan una potente actividad, con valores de CI₅₀ entre 0,03-1,21 μM. Cabe destacar la actividad de **xuxuarina Cα** (CI₅₀ = 0,03 μM) que es 40 veces más activa que el metronidazol (CI₅₀ = 1,23 μM), utilizado como control positivo, constituyendo ésta un potencial antiparasitario frente a *Giardia*. Además, cuatro de los compuestos ensayados (**DT-3**, **DT-16**, **DT-17** y **xuxuarina Cβ**) presentaron valores de CI₅₀ similares al del control.

¹⁷ Cedillo-Rivera, R.; Darby, J. M.; Enciso-Moreno, J. A.; Ortega-Pierres, G.; Ey, P. L. *Parasitol. Res.* **2003**, *90*, 119-123.

Tabla 5.1.1. Actividad^a frente a *Giardia intestinalis* de dímeros y trímeros aislados de especies de celastráceas expresada como CI₅₀ en μM .

| Compuesto | CI ₅₀ |
|---|------------------|
| escutidina αA (DT-3) | 1,50 |
| 7,8-dihidroisoxuxuarina E α (DT-4) | 6,52 |
| 7 α -hidroxi-7,8-dihidroisoxuxuarina E α (DT-5) | 6,96 |
| escutionina αA (DT-8) | 8,36 |
| 7,8-dihidroescutionina αA (DT-9) | 1,21 |
| escutionina βB (DT-10) | 356,17 |
| escutionina αB (DT-12) | 20,34 |
| xuxuarina E β (DT-15) | 11,3 |
| xuxuarina E α (DT-16) | 1,24 |
| 7,8-dihidroescutionina βB (DT-17) | 1,38 |
| 7,8-dihidroescutionina αB | 2,53 |
| 7,8-dihidroescutidina αB | 6,28 |
| netzaescutionina αA | 5,38 |
| xuxuarina C β | 1,43 |
| xuxuarina C α | 0,03 |
| 6',7'-dihidrocangorosina A (DT-11) | 0,56 |
| cangorosina A | 0,75 |
| triescutionina A (TT-2) | 5,18 |
| triescutionina B (TT-3) | 3,17 |
| metronidazol | 1,23 |

^a Intervalo de confianza 95%. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Un análisis preliminar de la relación estructura-actividad de los dímeros y trímeros evaluados nos permitió obtener las siguientes conclusiones:

1. El compuesto más activo (**xuxarina C α**) presenta un esqueleto de dímero triterpénico, cuyas unidades monoméricas están unidas a través de los anillos A y estereoquímica α entre ambas subunidades derivadas de la **serie de la tingenona**. Cabe reseñar en este punto, que la **22-hidroxitingenona**, unidad quinónica de la que proviene este compuesto, ha sido ensayada frente a *G. intestinalis*, presentando una potente actividad (CI₅₀ de 0,74 μM), pero algo inferior al correspondiente compuesto dimérico.

2. La estereoquímica de los dímeros con unión A-A parece importante para la actividad, tal como se observa al comparar los compuestos **xuxarina C α** (CI₅₀ 0,03

μM) *versus* **xuxuarina C β** (CI₅₀ 1,43 μM); **DT-16** (CI₅₀ 1,24 μM) *versus* **DT-15** (CI₅₀ 11,3 μM) y **DT-12** (CI₅₀ 20,34 μM) *versus* **DT-10** (CI₅₀ 356,17 μM), siendo más activo el dímero con unión α entre las dos subunidades monoméricas.

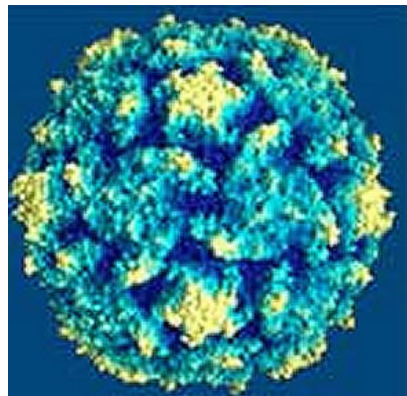
3. Los dos únicos dímeros con **unión entre los anillos B-A** (**DT-11** y **cangorosina A**) fueron los compuestos más activos, a excepción de la xuxuarina C β .

4. El sistema cetona α,β -insaturado en la unidad de fenol potencia la actividad para aquellos dímeros con sistema quinónico extendido a los carbonos C-7-C-8 de la unidad quinónica: **DT-3** *versus* **DT-8** y **DT-15** *versus* **DT-10**. Sin embargo, los 7,8-dihidro derivados en el anillo A, presentan mayor actividad cuando poseen el sistema insaturado C-6',C-7' en el anillo B en lugar de la cetona α,β -insaturada: **DT-4** *versus* **DT-9** y **7,8-dihidroescutidina αB** *versus* **7,8-dihidroescutionina αB** .

5. La regiosustitución no parece afectar a los valores de actividad, tal como se observa al comparar **DT-9** *versus* **7,8-dihidroescutionina αB** , **DT-3** *versus* **DT-16** y **DT-4** *versus* **7,8-dihidroescutidina αB** .

6. Los trímeros triterpénicos (**TT-2** y **TT-3**) presentan una actividad moderada, pero superior a sus correspondientes precursores diméricos (**DT-8** y **DT-12**, respectivamente).

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que nos encontramos frente a un grupo de metabolitos realmente prometedores para el tratamiento de la giardiasis y que las especies de celastráceas son la única fuente de los mismos, puesto que son indicadores quimiotaxonómicos de dicha familia. En el futuro, se llevarán a cabo estudios con un mayor número de compuestos, para poder realizar un análisis más detallado de la relación estructura-actividad (SAR).



*5.2. Quimioprevención:
virus Epstein-Barr*

5.2.1 Introducción

5.2.1.1. Cáncer

El cáncer constituye la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados, en los que una de cada cuatro personas fallece debido a esta enfermedad. 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.

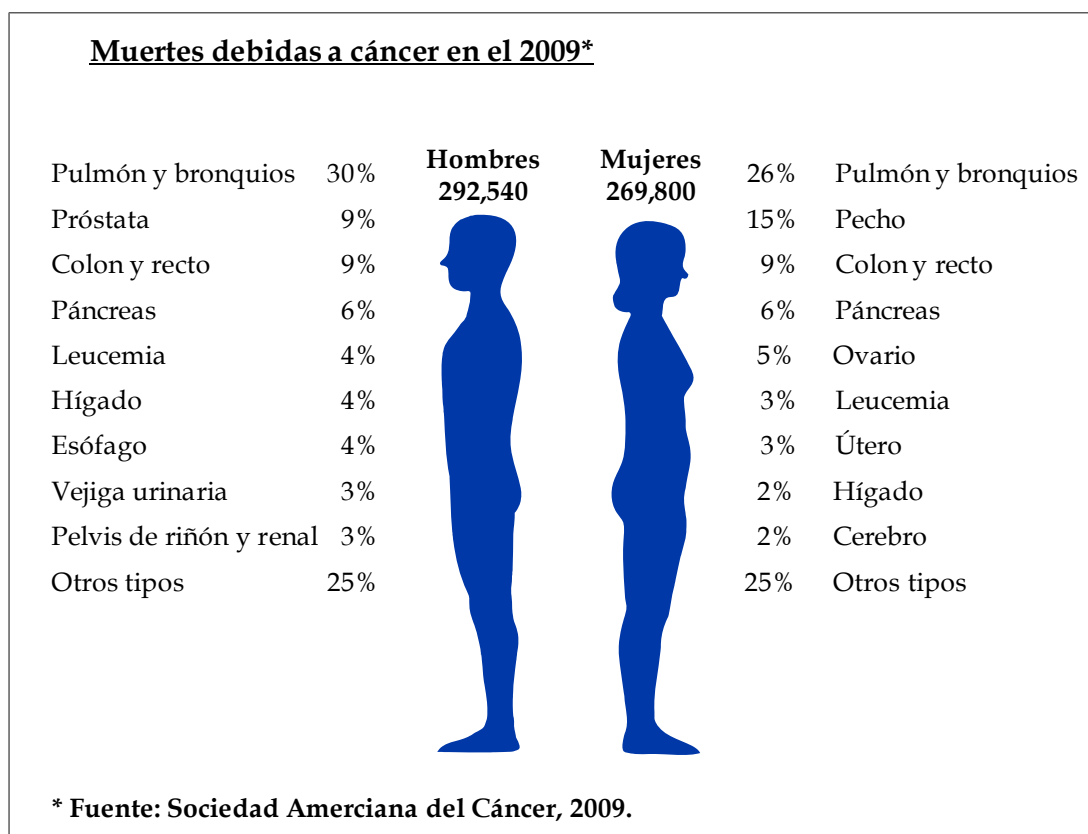
La Sociedad Americana del Cáncer¹ tiene como principal objetivo hasta el 2015, la prevención y detección precóz del cáncer, dedicando grandes esfuerzos en campañas de sensibilización contra el tabaquismo, obesidad, mal nutrición e inactividad física. Es decir, en sensibilizar a la población de los posibles factores de riesgo². Según datos de esta institución, al menos el 50% de las muertes por cáncer causados por el tabaco y el consumo excesivo de alcohol, podrían prevenirse por completo.

En el siguiente esquema se presentan las muertes ocurridas en el año 2009³, debido a diferentes tipos de cáncer:

¹ http://www.cancer.org/docroot/ESP/esp_0.asp

² http://www.cancer.org/docroot/ESP/content/ESP_1_1X_Prevenccion_y_factores_de_riesgo_general.asp?

³ <http://www.cancer.org/downloads/STT/500809web.pdf>



Entre las estrategias existentes para la prevención del cáncer, podemos destacar la **quimioprevención**, la cual implica la utilización de determinados agentes químicos, naturales o sintéticos, capaces de corregir, suprimir o impedir la carcinogénesis evitando el desarrollo de una neoplasia maligna invasora⁴. Este mecanismo se presenta como una solución prometedora, siendo de particular interés la inhibición de promotores de procesos carcinogénicos.

El proceso químico de la carcinogénesis está sustancialmente dividido en tres etapas (figura 5.2.1): iniciación, promoción y progresión⁵. La etapa de **iniciación** ocurre a nivel del genoma. Existen tres procesos fundamentales en la célula: metabolismo, reparación del ADN y proliferación celular. La alteración de cualquiera de estos tres procesos puede iniciar el proceso de la carcinogénesis. El compuesto químico implicado en este proceso se le denomina agente iniciador o carcinógeno incompleto y es aquel que sólo es capaz de iniciar a las células. La segunda etapa, la **promoción**, representa la etapa de crecimiento tisular con la

⁴ William, N.; William, Jr.; Heymach, J. V.; Kim, E. S.; Lippman, S. M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 213-225.

⁵ Pitot, H. C.; Dragan, Y. P. *FASEB J.* **1991**, *5*, 2280-2286.

formación del tumor. Participan factores de crecimiento y receptores, así como la angiogénesis y degradación de las matrices celulares. La tercera etapa, **progresión**, se caracteriza por ser irreversible e implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia, por parte de la célula tumoral maligna. Esa capacidad está codificada también en los genes de la misma con modificaciones estructurales y funcionales.

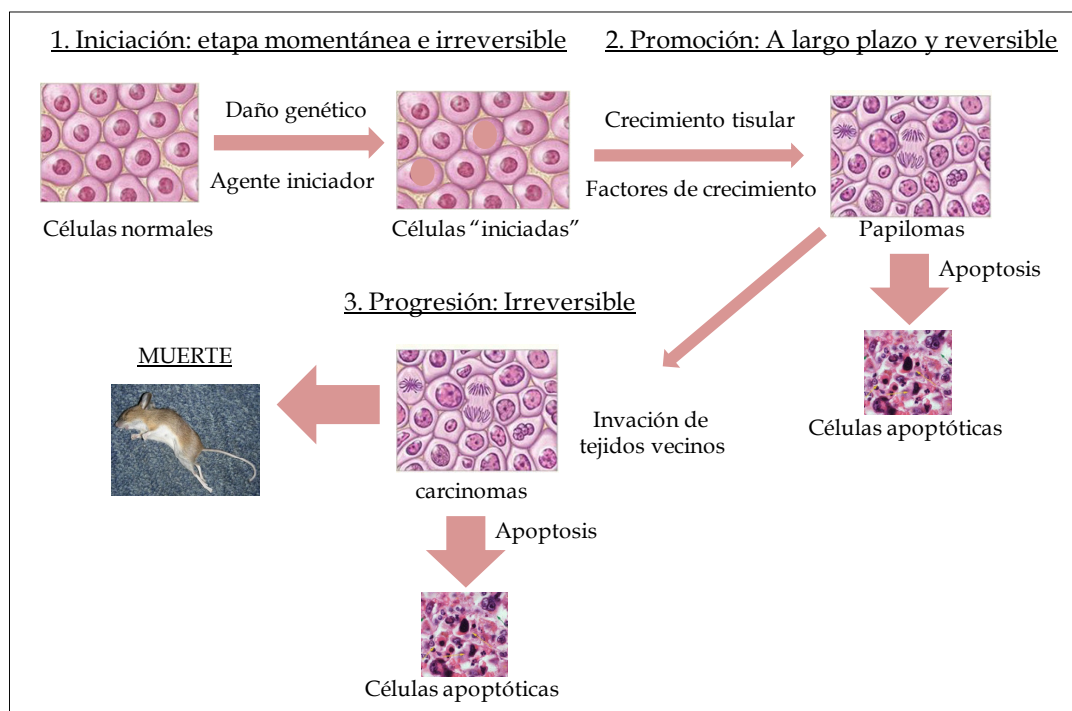


Figura 5.2.1. Proceso químico de la carcinogénesis.

De estas tres etapas, la de promoción es la más larga y la que podría ser reversible, al menos en los primeros estadios. Por lo tanto, la inhibición de tumores en la etapa de promoción es una de las estrategias más prometedoras en la quimioprevención del cáncer⁶.

5.2.1.2. Virus y Cáncer

Ciertas **infecciones virales** se han asociado con algunos tipos de cánceres (tabla 5.2.2), siendo algunos de ellos cánceres muy comunes en la población⁷. Se ha establecido que el 15% de los cánceres humanos a nivel mundial tienen una etiología viral. Entre los virus capaces de producir cáncer se encuentran, el **virus Epstein Barr**, el virus del papiloma humano, el virus de la hepatitis B y el herpes

⁶ Murakani, A.; Ohigahsi, H.; Koshimizu, K. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 1-8.

⁷ Liao, J. B. *Yale Journal of Biology and Medicine.* **2006**, *79*, 115-122.

humano 8, que son virus ADN, así como el virus de la hepatitis C y el HTLV-1 que son virus de ARN.

Los virus pueden inducir cáncer por dos tipos de mecanismos:

1. El mecanismo directo, que implica la integración total o parcial de un genoma viral en el ADN de una célula, que actuaría como verdadero “oncogén” en alguna etapa del proceso oncogénico.

2. El mecanismo indirecto, propone la participación viral en la promoción o estabilización del crecimiento celular en una población previamente transformada o alterada genéticamente.

Tabla 5.2.1. Principales virus identificados como agentes carcinogénicos.

| Virus | Cáncer | Factores de riesgo |
|------------------------|--|---|
| Hepatitis B | Carcinoma hepatocelular | Aflatoxina, alcohol, tabaco |
| Epstein-Barr | Linfoma de Burkitt Carcinoma nasofaríngeo | Malaria, nitrosaminas |
| Herpes Humano 8 | Sarcoma de Kaposi | |
| Papilomavirus: | | Tabaco |
| HPV 16 y 18 | Cáncer cervicouterino | Alteración genética |
| HPV 5, 8 y 17 | Cáncer de piel | Excesiva exposición a la luz solar |
| Retrovirus: | | |
| HTLV-I | Leucemia células T, linfoma | |
| HTLV-II | Leucemia células pilosas | |

5.2.1.3. Virus Epstein Barr

El virus Epstein-Barr (VEB) es un virus ADN de la familia *Herpesviridae* y se incluye en la subfamilia de γ -*Herpesvirus* por su capacidad de transformar y crecer en células linfoides⁸. Como todos los de su familia⁹, es un virus grande, encapsulado y con una doble cadena de ADN. Mide 150 nm. Su cápside es icosaédrica con 162 capsómeros y todo el virus está envuelto por una cubierta con

⁸ Mitchell, J. R.; Anderson, G. R.; Bowles, C. A.; Hinz, R. W. *Lancet*. 1967, 1, 702-703.

⁹ Miller, S.; Lipman M. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*.1973, 70, 190-192.

glicoproteínas. El espacio que existe entre la cubierta y la cápside, tegumento, está lleno de proteínas y enzimas de origen viral (figura 5.2.2).

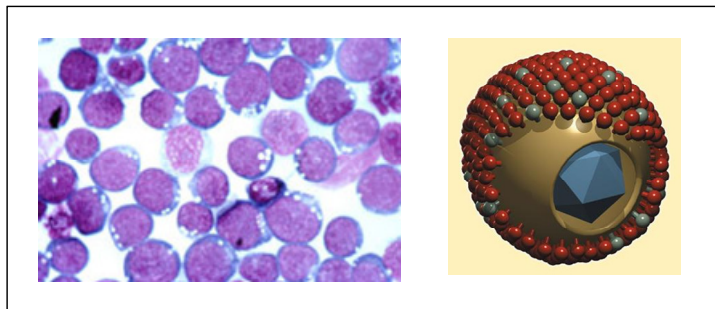


Figura 5.2.2. Imagen del virus Epstein-Barr. A la derecha un dibujo en el que se observa la cubierta lipoproteica del virus y la nucleocápsida en su interior.

El VEB es el agente etiológico del cuadro clásico de mononucleosis infecciosa y se asocia con el desarrollo de una amplia variedad de neoplasias linfoides epiteliales y de músculo liso.

Fue descubierto hace mas de 30 años en líneas celulares de un tumor agresivo prevalente en niños africanos, conocido como linfoma de Burkitt¹⁰. Desde entonces, el virus ha sido ampliamente considerado como agente etiológico de enfermedades linfoproliferativas como los linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, linfomas post-transplante, linfomas asociados al síndrome de inmunodeficiencia adquirida-SIDA, carcinoma nasofaríngeo y, más recientemente, cáncer de mama. Desde su descubrimiento se han sucedido notables progresos en el conocimiento de la estructura, organización genética y funcionamiento biológico del virus Epstein-Barr¹¹. La demostración de la existencia de antígenos virales específicos en las células de estos linfomas y en aquellas transformadas por VEB, apoyan también el postulado de que el VEB sería el agente etiológico más importante (tabla 5.2.2).

¹⁰ Epstein, M. A.; Achong, B. G.; Barr Y. M. *Lancet*. **1964**, 1, 702-703.

¹¹ Young, L. S.; Rickinson, A. B. *Nature Rev. Cancer*. **2004**, 4, 757-768.

Tabla 5.2.2. Cánceres asociados con el virus Espein-Barr.

| Cáncer | Subtipo | % positivo VEB |
|--|------------------------------|----------------|
| Pacientes Inmunocompetentes | | |
| Linfoma de Burkitt | Endémico | > 95 |
| | Esporádico | 15-30 |
| Linfoma nasal | | 95 |
| Linfoadenopatía | Angioimmunoblástico | - |
| Linfoma de Hodgkin | | ≈ 40 |
| Carcinoma nasofaríngeo | No diferenciado | > 95 |
| Carcinoma gástrico | Parecido a un linfopitelioma | * |
| Pacientes Inmunodeprimidos | | |
| Desórdenes linfoproliferativos post-transplante | | > 90 |
| Linfomas asociados al VIH | Burkitt | 20-30 |
| | Hodgkin | > 95 |
| | Inmunoblástico | > 95 |
| Leiomiocarcinoma | | * |

(-) no se conoce. (*) no está claro.

5.2.1.3.1. Ciclo vital del Virus Epstein Barr

Durante la fase aguda, el virus expresa unos 90 antígenos, mientras que en la fase latente sólo son expresados seis antígenos nucleares y tres antígenos de membrana¹². Entre los productos de latencia del VEB destaca la LMP-1 (proteína de membrana expresada durante las infecciones latentes), por su papel individual en la transformación celular, lo que se ha demostrado *in vitro* e *in vivo*^{13,14,15}, sin embargo, los mecanismos específicos por los que la LMP-1 induce la transformación oncogénica celular no se han aclarado.

¹² Miller G. *Prog Med Virol.* **1975**; 20, 84-112.

¹³ Kaye, K.; Izumi K. M.; Kieff E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1993**, 90 (19), 9150-9154.

¹⁴ Faraheus, R.; Rymo, R.; Rhim J. S.; Klein G. *Nature.* **1990**, 345, 447-449.

¹⁵ Wilson, J. B. Winberg, W.; Johnson, R.; Yuspa, S.; Levine, A. *J. Cell.* **1990**, 61, 1315-1325.2.

Por otro lado, una vez que se produce la infección celular comienza la producción de proteínas virales. Estas proteínas incluyen, además de las anteriormente citadas los antígenos tempranos, que representan el primer signo de que la célula entra en estado lítico.

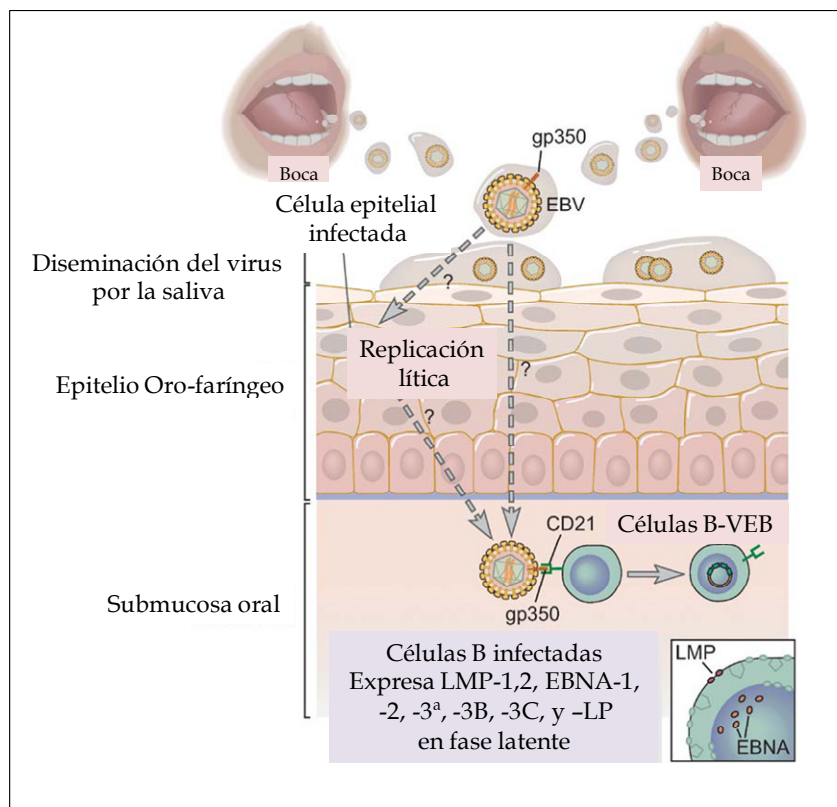


Figura 5.2.3. Ciclo de vida del virus Epstein-Barr.

5.2.1.3.2. Epidemiología

El virus Epstein-Barr fue el primer virus humano que se implicó en la carcinogénesis. Su huésped natural es el hombre y está ampliamente distribuido por todo el mundo, estimándose que hasta el 95% de los adultos entre 35 y 40 años han sido infectados¹⁶. Los niños se hacen susceptibles tan pronto como desaparece la protección de anticuerpos maternos. El virus es transmitido mediante saliva infectada, a menudo a partir de adultos asintomáticos y suele ocurrir cuando se besan. Con contactos menos íntimos, el contagio es menor. En algún caso se ha producido la transmisión del virus en casos de transfusiones y trasplantes de médula. Los estudios epidemiológicos indican que más del 90% de individuos asintomáticos seropositivos son portadores del virus en sus secreciones orales y se

¹⁶ Kutok, J. L.; Wang, F. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2006**, *1*, 375-404.

ha demostrado que en los países poco desarrollados la infección asintomática en los primeros años de la vida es lo más frecuente mientras que, por el contrario, en los países con mayor nivel de vida muchos individuos escapan de la infección primaria hasta la adolescencia. Cuando la primoinfección se retrasa el virus tiene tendencia a producir síntomas.

5.2.1.3.3. Patogénesis

El virus es transmitido mediante saliva infectada y alcanza las células epiteliales de la orofaringe, donde se replica con producción de viriones y lisis celular. Las células B son infectadas en su paso por la orofaringe o el epitelio del espacio postnasal. El virus utiliza para contactar con la célula una de las proteínas de su envoltura, gp350, que se une al receptor celular CD21. La mayoría de los anticuerpos producidos durante la infección están dirigidos hacia esta proteína y han existido ya intentos por desarrollar con ella una vacuna frente a esta infección.

Con la producción de los nuevos viriones se infectan células contiguas susceptibles y en estas células el VEB es capaz de establecer infección latente¹⁷. Esta estrategia le permite eludir la respuesta inmune y mantener su genoma indefinidamente, protegido en el núcleo de las células diana¹⁸.

El VEB ha hecho frente a los factores limitantes de su persistencia mediante el desarrollo de un abanico de genes que se expresan durante la etapa de latencia y aseguran la proliferación e inmortalización de los linfocitos infectados¹⁹. El sistema inmune humano mantiene a su vez el equilibrio, evitando una expansión sin control de las células infectadas por el virus, eliminando así la mayoría de las células que expresan antígenos de latencia del VEB y sólo un pequeño grupo de células con una expresión más restringida es capaz de persistir²⁰.

Cuando actúan otros factores, que bien ofrecen una ventaja proliferativa adicional a las células infectadas por el VEB, o debilitan la respuesta inmune frente a aquellas, este equilibrio se rompe, pudiendo originar neoplasias.

¹⁷ Sixbey, J. W.; Lemon, S. M.; Pagano J. S. *Lancet*. **1986**, 2, 122-124.

¹⁸ Robertson, E. S. *Epstein-Barr Virus*; Caister Academic Press, Norfolk: Inglaterra, **2005**.

¹⁹ Menezes, J.; Jondal, M.; Leibold, W.; Dorval, G. *Infect. Immuno*. **1976**, 13, 303-310.

²⁰ Robinson, J.; Smith, D. *Virology*. **1981**, 109, 336-345.

Uno de los aspectos más importantes del VEB en el desarrollo de algunas neoplasias es que después de la infección primaria, el virus no es erradicado completamente del organismo, permaneciendo presente en una pequeña población de linfocitos B en una situación de relativa inactividad, conocida como infección latente²¹.

Con la aparición del SIDA, el desarrollo de los trasplantes, tanto de órganos sólidos como de médula ósea y de alternativas terapéuticas para un creciente número de enfermedades que exigen inmunosupresión farmacológica agresiva, la incidencia de neoplasias relacionadas con el VEB ha aumentado²², tal como se presenta en la tabla 5.2.2.

5.2.1.3.4. Agentes quimiopreventivos: inhibición de la activación del VEB

La inhibición de tumores en su etapa de promoción es una de las estrategias más prometedoras en la quimioprevención del cáncer y en la bibliografía existen numerosos bioensayos para la búsqueda de agentes quimiopreventivos²³. En la búsqueda de inhibidores de la promoción de tumores, la metodología *in vitro* que se utiliza con más frecuencia, es la inhibición de la producción de antígenos tempranos (AT) por el virus Epstein-Barr cuando entra en ciclo lítico. La relación entre la actividad inhibidora de la activación del VEB y la actividad inhibidora de la promoción de tumores, está bien establecida y se ha estudiado en modelos animales²⁴. Así, el ensayo de inhibición de AT por el VEB en células Raji (línea celular de linfoma de Burkitt humano), activado por el promotor 13-acetato-12-O-tetradecanoil-forbol (TPA), es un método efectivo en la identificación de agentes quimiopreventivos.

En los últimos años se han publicado estudios sobre la actividad inhibidora de numerosos productos naturales como inhibidores de la activación del virus Epstein Barr, mediada por TPA en células Raji^{22,25}, destacando los terpenoides, tanto monoterpenos, como sesquiterpenos y diterpenos. La actividad de algunos

²¹ Thorley-Lawson, D. A. J. *Allergy Clin. Immunol.* **2005**, *116* (2), 251-261.

²² Dolcetti, R.; Guidoboni, M.; Gloghini, A.; Carbone, A. *Curr. Cancer Ther. Rev.* **2005**, *1*, 27-44.

²³ Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Tokuda, H. *Studies in Natural Product.*, Atta-ur-Raham, Elsevier Science B. V., Amsterdam, **2003**, *29*, 73-126.

²⁴ Saito, Y.; Takizawa, H.; Konishi, S.; Yoshida, D.; Mizusaki, S. *Carcinogenesis.* **1985**, *6*, 1189-1194.

²⁵ Francy-Guilford, J.; Pezzuto, J. M. *Planta Med.* **2008**, *74*, 1644-1650.

de estos compuestos resultó aún mayor que la del β -caroteno, un precursor de la vitamina A, que ha sido ampliamente estudiado en la quimioprevención del cáncer, y es usado como control en este tipo de ensayos.

Entre los metabolitos activos podemos destacar los que se presentan en la figura 5.2.4. Así, entre los sesquiterpenos cabe citar aquellos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano^{26,27,28}, siendo los sesquiterpenos aislados de *Maytenus cuzcoina*²⁹, **S2**, **S3**, **S4**, **S7** y **S8**, los más activos, con valores de % de inhibición de 23%-27% a la concentración de 100 moles/TPA, superiores a los del β -caroteno, utilizado como referencia (18% de inhibición), trabajos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación.

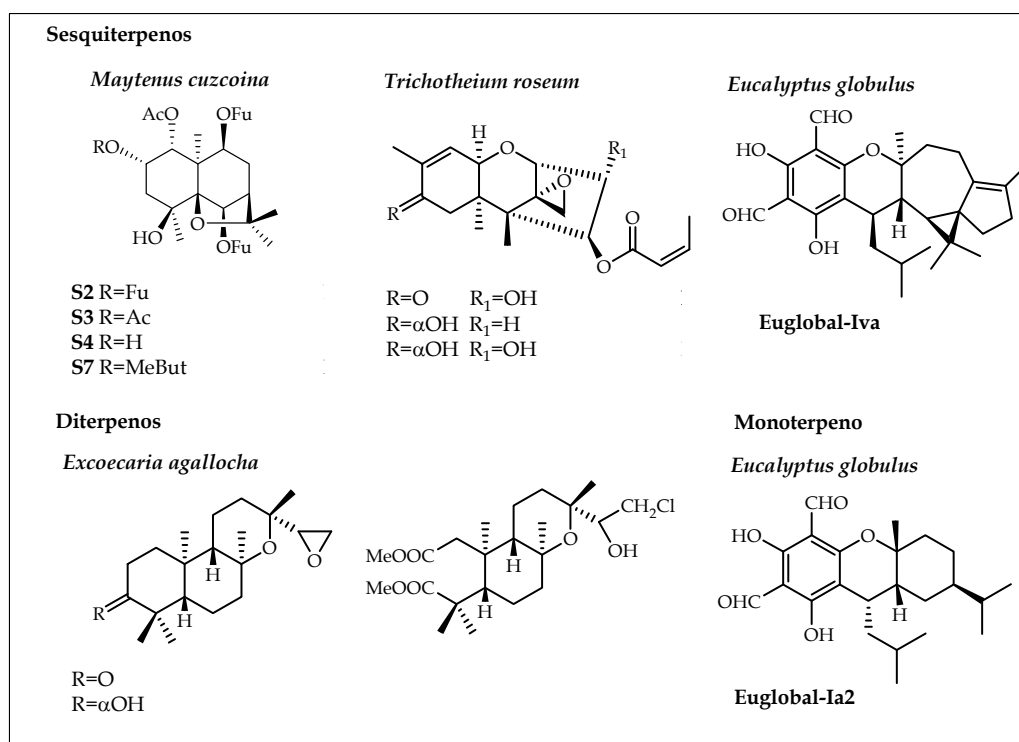


Figura 5.2.4. Metabolitos secundarios inhibidores de la activación del virus Epstein Barr.

Además, los sesquiterpenos trichothecinol A-C²³, aislados del hongo *Trichothecium roseum*, presentan una excelente actividad con valores de 100% de inhibición, incluso a la concentración de 10 moles/TPA. Así mismo, sesquiterpenos con esqueleto de acilfloroglucinol, aislados de diferentes especies

²⁶ Gao, J. M.; Wu, W. J. Zhang, J. W. Konishi, Y. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1153-1189.

²⁷ Mendoza, C.; Jiménez, I. A.; Tokuda, H.; Kushida, H.; Bazzocchi, I. L. *Chem. Biodivers.*, **2005**, *2*, 286-294.

²⁸ Perestelo, N. R.; Jiménez, I. A.; Tokuda, H.; Hirotaka, H.; Bazzocchi, I. L. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 127-132.

²⁹ González, A. G.; Tincusi, B. M.; Bazzocchi, I. L.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Konoshima, T.; Jimenez, I. A.; Ravelo, A. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1773-1778.

del género *Eucalyptus*, presentaron potente actividad. Existen también descritos en la literatura, numerosos diterpenos con una potente actividad inhibidora de la activación del VEB, destacando los diterpenos aislados de la resina de una *Euphorbiaceae*, *Excoecaria agallocha*²³.

Con estos antecedentes, decidimos evaluar los sesquiterpenos aislados de las hojas y frutos de *M. jelskii*, como potenciales agentes quimiopreventivos.

5.2.2. Resultados y discusión

Los ensayos de la actividad inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr fueron realizados por el Dr. Harukuni Tokuda, del Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japón. La metodología empleada por el grupo del Dr. Tokuda está recogida en diversas publicaciones^{27,30} y la explicaremos brevemente a continuación.

Las células Raji (células derivadas de linfoma de Burkitt), se cultivan en medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal. La inhibición de los antígenos tempranos del virus Epstein-Barr (AT-VEB) se ensaya de acuerdo con el método descrito por Takasaki³¹. Así, 10⁶ células Raji se incuban durante 48 horas a 37 °C en 1 ml de medio que contiene ácido *n*-butírico (4 mmol), TPA (13-acetato-12-*O*-tetradecanoilforbol, 32 pmol = 20 ng en DMSO) como inductor y diferentes concentraciones de los productos a ensayar disueltos en DMSO. Posteriormente, se añade suero positivo de AT-VEB, determinándose el número de células por inmunofluorescencia indirecta³².

El porcentaje de inducción de los antígenos tempranos de los compuestos se expresa como la relación entre los AT en las células control (100%), que contienen ácido *n*-butírico y TPA (13-acetato-13-*O*-tetra-decanoilforbol) que actúa como inductor, y los AT existentes en las células tratadas con los productos a diferentes concentraciones (1000, 500, 100 y 10 moles/TPA). Como control se usó β -caroteno, precursor de la vitamina A.

³⁰ Jiménez, I. A.; Bazzocchi, I. L.; Núñez, M. J.; Mukainaka, T.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Konoshima, T.; Ravelo, A. G. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1047-1050.

³¹ Takasaki, M.; Konoshima, T.; Yasuda, Y.; Hamano, T.; Tokuda, H. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 776-780.

³² Murakami, A.; Ohigashi, H.; Ad. Koshimizu, K. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 1-8.

Se realizó la evaluación de veintinueve sesquiterpenos dihidro- β -agarofurano, veintiuno aislados de las hojas de *Maytenus jelskii*, **S-1** a **S-18** y de **S-21** a **S-23**, así como ocho sesquiterpenos aislados de los frutos de la misma planta, **S-26**, **S-30**, **S-38**, **S-40**, **S-41**, **S-43**, **S-45** y **S-48**.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5.2.3 y dado que las estructuras de estos compuestos ya están contempladas en la parte de resultados y discusión del estudio fitoquímico y se volverán a incluir en el capítulo de diseño de fármacos (capítulo 6), en este caso resaltaremos únicamente las estructuras de los compuestos que presentaron mayor actividad que el control (β -caroteno) a la concentración de 100 moles/TPA (figura 5.2.5).

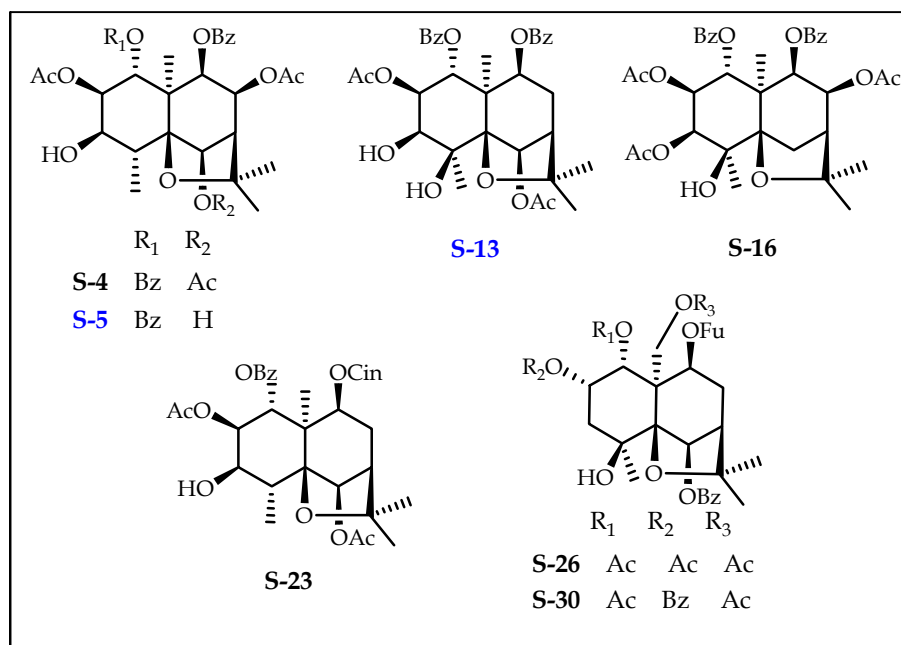


Figura 5.2.5. Metabolitos evaluados como inhibidores de la producción de antígenos tempranos del VEB. En azul se indican los compuestos más potentes.

Entre los sesquiterpenos evaluados, siete de ellos (**S-4**, **S-5**, **S-13**, **S-16**, **S-23**, **S-26** y **S-30**) con porcentajes de inhibición entre 17,8-23,7%, resultaron más activos que el β -caroteno (17,3% de inhibición a la concentración de 100 moles/TPA), usado como control positivo. Los compuestos **S-5** y **S-13** resultaron activos incluso a la concentración de 10 moles/TPA, concentración más baja ensayada, presentando entorno a un 2% de inhibición de la activación de AT-VEB, mientras que el control resultó inactivo a esa concentración. Cabe destacar que los

compuestos presentaron una baja citotoxicidad frente a las células Raji, siendo la viabilidad de éstas mayor del 60%, incluso a la concentración más alta evaluada.

Tabla 5.2.3. Porcentaje de activación de antígenos tempranos del VEB inducida por el TPA en presencia de los metabolitos ensayados respecto a un control positivo^a.

| Sesquiterpeno | Concentración (moles/TPA) ^b | | | |
|-------------------------------|--|------|------|------|
| | 1000 | 500 | 100 | 10 |
| S-1 | 7,9 (60) ^c | 37,2 | 88,6 | - |
| S-2 | 4,9 | 34,0 | 85,0 | - |
| S-3 | 11,5 | 53,4 | 87,0 | - |
| S-4 | 2,4 | 33,2 | 79,5 | - |
| S-5 | 0 | 30,1 | 76,3 | 97,8 |
| S-6 | 8,9 | 37,9 | 87,7 | - |
| S-7 | 10,1 | 51,3 | 85,2 | - |
| S-8 | 9,3 | 50,1 | 84,3 | - |
| S-9 | 5,3 | 35,2 | 85,2 | - |
| S-10 | 8,9 | 39,6 | 87,4 | - |
| S-11 | 14,6 | 48,1 | 89,3 | - |
| S-12 | 13,7 | 54,2 | 87,1 | - |
| S-13 | 0 | 33,2 | 77,5 | 98,6 |
| S-14 | 7,5 | 36,6 | 87,6 | - |
| S-15 | 8,7 | 37,2 | 87,0 | - |
| S-16 | 7,1 | 45,2 | 79,3 | - |
| S-17 | 11,8 | 53,2 | 86,3 | - |
| S-18 | 10,9 | 52,0 | 86,2 | - |
| S-21 | 10,3 | 39,2 | 86,2 | - |
| S-22 | 9,2 | 38,9 | 86,0 | - |
| S-23 | 9,3 | 46,8 | 81,0 | - |
| S-26 | 12,0 | 52,3 | 81,9 | - |
| S-30 | 14,3 | 54,0 | 82,2 | - |
| S-38 | 15,5 | 55,7 | 83,9 | - |
| S-40 | 14,3 | 54,2 | 83,9 | - |
| S-41 | 16,2 | 56,2 | 85,2 | - |
| S-43 | 15,1 | 55,3 | 84,6 | - |
| S-45 | 15,6 | 55,8 | 84,3 | - |
| S-48 | 15,9 | 56,0 | 85,2 | - |
| β-caroteno^d | 9,1 | 34,3 | 82,7 | - |

^aLos valores representan el % de inducción de antígenos tempranos del VEB con respecto al control positivo 100% (n=3). ^b Relación en moles del metabolito con respecto a la concentración de TPA (32 pmol= 20 ng/mol): 1000= 32 nmol del metabolito, 500= 16 nmol, 100= 3,2 nmol y 10= 0,32 nmol. ^c porcentaje de viabilidad de las células Raji en todos los productos. ^d Control positivo.

Estos resultados nos motivaron a evaluar la actividad *in vivo* de uno de los compuestos más activos (**S-13**), del cual poseíamos cantidad suficiente para realizar el ensayo. Además, con el fin de establecer si existía una buena correlación entre las actividades *in vitro* e *in vivo*, se estudió también la actividad *in vivo* de uno de los compuestos menos activos (**S-11**).

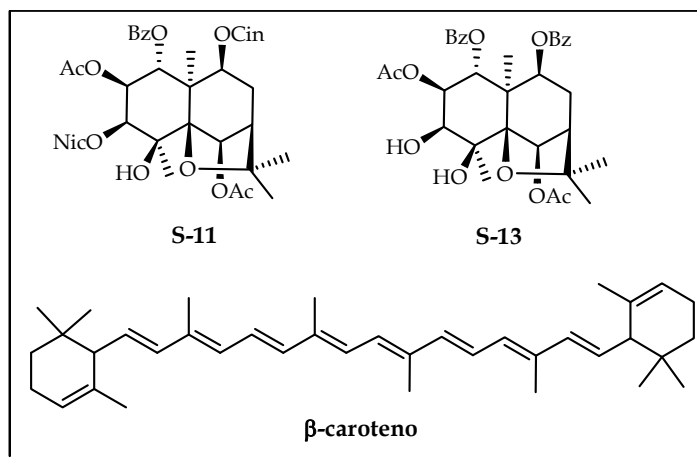


Figura 5.2.6. Compuestos ensayados como inhibidores de carcinogénesis en un modelo *in vivo* y estructura del β-caroteno.

La actividad *in vivo* se llevó a cabo usando un bioensayo de inhibición de la carcinogénesis en ratones desarrollada en dos fases. Estos ensayos se realizan de acuerdo con la metodología descrita por Iwamoto³³. Para este ensayo se usan ratones hembra de aproximadamente 30 gramos, que se tratan tópicamente con 0,1 ml del iniciador de carcinogénesis, el DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno, 100 μg, 390 nmol). Al cabo de una semana, se aplica dos veces por semana 0,1 ml de TPA (1 μg, 1,7 nmol) sobre la piel, para inducir la formación de papilomas. Una hora antes de someter a los ratones a la inducción de papilomas, se tratan con 0,1 ml de los compuestos a evaluar (85 nmol) disueltos en acetona. La incidencia de papilomas se examina semanalmente durante un periodo de 20 semanas.

Los resultados de estos ensayos se muestran en la tabla 5.2.4 y en las gráficas obtenidas con dichos resultados (figuras 5.2.7 y 5.2.8).

³³ Tanaka, R.; Ohtsu, H.; Iwamoto, M.; Toshifumi, M.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Matsunaga, S.; Yoshitake, A. *Cancer Lett.* **2000**, *161*, 165-170.

Tabla 5.2.4. Efecto inhibitor de los sesquiterpenos **S-11** y **S-13** sobre la carcinogénesis en ratones (sistema DMBA-TPA).

| Control positivo | | | | | | |
|------------------|----------------------|----------|---------------------|----------|---------------------|----------|
| Semana | DMBA (390 nmol) + | | S-11 (85 nmol) + | | S-13 (85 nmol) + | |
| | TPA (1,7 nmol) | | TPA (1,7 nmol) | | TPA (1,7 nmol) | |
| | Papilomas (P) (%) | P./ratón | Papilomas (%) | P./ratón | Papilomas (%) | P./ratón |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 6,6 | 0,3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 20,0 | 0,9 | 13,3 | 0,7 | 0 | 0 |
| 8 | 46,6 | 1,9 | 33,3 | 1,7 | 6,6 | 0,5 |
| 9 | 73,3 | 2,5 | 46,6 | 2,3 | 13,3 | 0,9 |
| 10 | 100 | 3,7 | 60 | 3,3 | 20 | 1,2 |
| 11 | 100 | 4,2 | 66,6 | 3,9 | 26,6 | 1,5 |
| 12 | 100 | 5,5 | 73,3 | 4,8 | 33,3 | 1,8 |
| 13 | 100 | 6,4 | 80 | 5,6 | 40 | 2 |
| 14 | 100 | 6,9 | 80 | 5,9 | 46,6 | 2,2 |
| 15 | 100 | 7,0 | 86,6 | 6,2 | 53,3 | 2,4 |
| 16 | 100 | 7,3 | 93,5 | 6,6 | 66,6 | 2,6 |
| 17 | 100 | 7,6 | 100 | 6,9 | 73,3 | 2,9 |
| 18 | 100 | 8,1 | 100 | 7,2 | 73,3 | 3,3 |
| 19 | 100 | 8,4 | 100 | 7,5 | 80 | 3,7 |
| 20 | 100 | 8,6 | 100 | 7,9 | 86,6 | 3,9 |

Como se observa en la tabla 5.2.4 y en la figura 5.2.7, el porcentaje de papilomas en el grupo control aumenta rápidamente a partir de la sexta semana y alcanza el máximo (100%) en la décima semana, a partir de la cual se mantiene constante. El tratamiento con **S-11** o **S-13**, junto con el iniciador y el promotor, redujo a las 10 semanas de tratamiento, el porcentaje de papilomas hasta un 40% (60% de papilomas) o 80% (20% de papilomas), respectivamente, a partir de la cual aumenta hasta alcanzar a las 20 semanas, el 100% ó 86,6% de formación, respectivamente.

Por otra parte, como se observa en la figura 5.2.8, el número de papilomas por ratón aumentó rápidamente en el grupo control a partir de la sexta semana de tratamiento y alcanza 9,3 papilomas/ratón a las 20 semanas. En el grupo de ratones

tratados con **S-13**, se redujo más de la mitad el número de papilomas en el periodo de 20 semanas, alcanzando 3,9 papilomas/ratón al final del ensayo. El tratamiento con **S-11** redujo de manera leve el número de papilomas hasta los 7,9 papilomas/ratón a la semana 20.

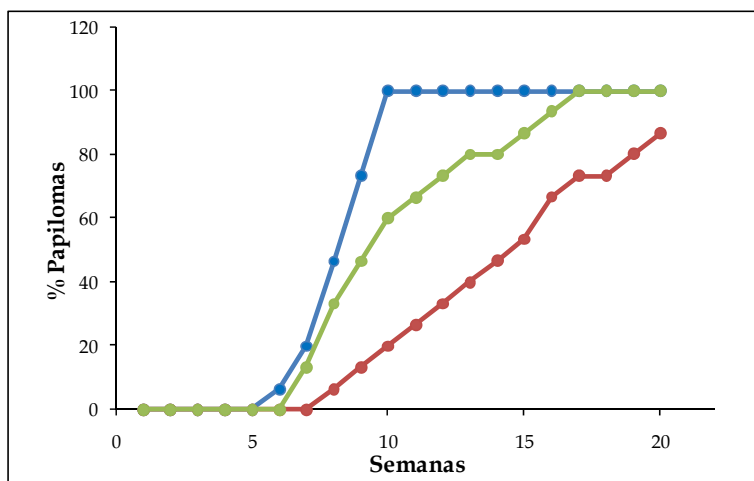


Figura 5.2.7. Inhibición de la promoción de tumores inducidos por TPA por aplicación múltiple de **S-11** y **S-13**. La carcinogénesis se inició con DMBA (390 nmol) y se promovió con 1,7 nmol de TPA. ● Porcentaje de papilomas en el control (TPA). ● Porcentaje de papilomas en el ensayo TPA + 85 nmol de **S-11**. ● Porcentaje de papilomas en el ensayo TPA + 85 nmol de **S-13**.

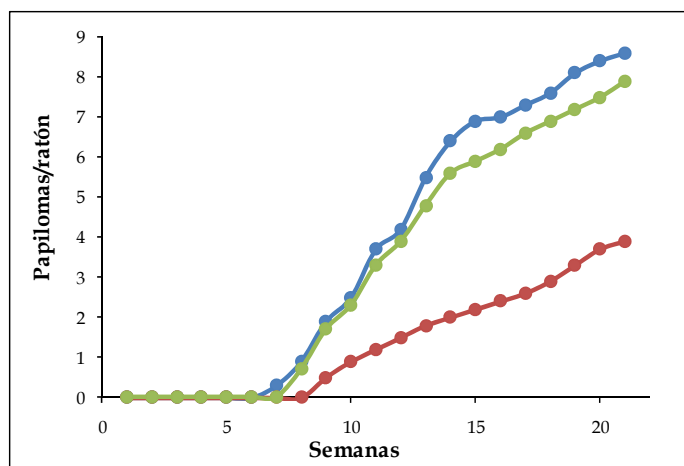
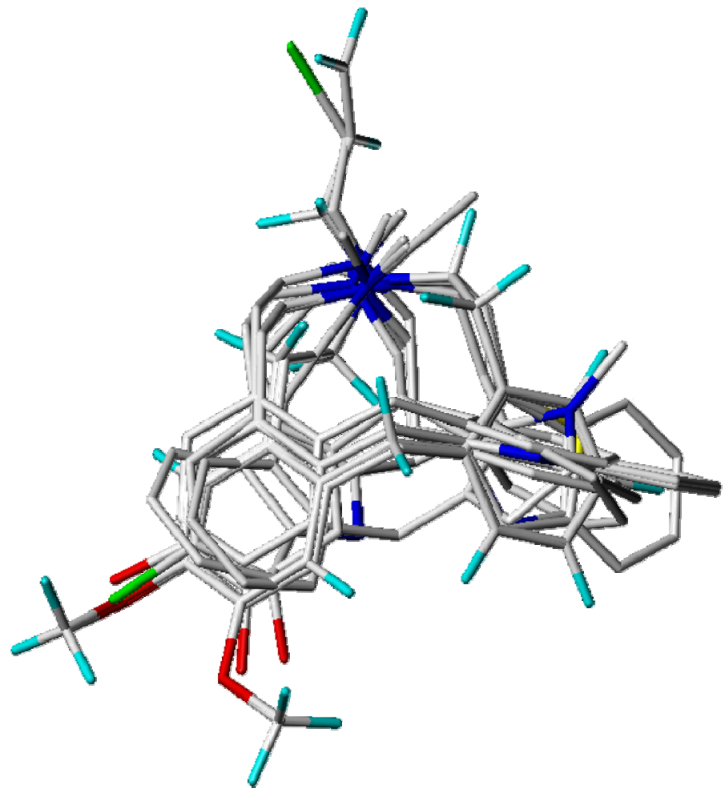


Figura 5.2.8. Inhibición de la promoción de tumores inducido por TPA por el **S-11** y el **S-13**. La carcinogénesis se inició con DMBA (390 nmol) y se promovió con 1,7 nmol de TPA. Número de papilomas por ratón: ● Control (TPA) ● TPA + 85 nmol de **S-11** ● TPA + 85 nmol de **S-13**.

Los resultados obtenidos muestran que este tipo de compuestos son realmente prometedores como inhibidores de la carcinogénesis y por lo tanto las especies de celastráceas son una fuente importante de estos agentes quimiopreventivos.



6. Diseño de fármacos asistido por ordenador

6. Diseño de fármacos asistido por ordenador

El diseño y desarrollo de un fármaco es un proceso largo y costoso, ya que 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 tres de cada 10 nuevos fármacos 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 fármaco, sólo tres se comercializan. Por tal motivo, el diseño racional de fármacos constituye una herramienta casi indispensable en el desarrollo actual de nuevos fármacos, contribuyendo a un aumento de las posibilidades de éxito y a una reducción de los costos¹. Dentro del diseño racional de fármacos, una de las estrategias más utilizadas es el uso de técnicas informáticas. Así, el desarrollo de la química computacional ha permitido el avance de diversas técnicas utilizadas en el diseño racional de fármacos asistido por ordenador² (CADD, *Computer-Assisted Drug Design*). Estas técnicas permiten tanto visualizar como almacenar datos biológicos y estructurales, que se pueden procesar generando un modelo que nos aporta una mayor comprensión de la interacción ligando-receptor, además de predecir nuevas moléculas con potencial actividad farmacológica.

La búsqueda de los aspectos estructurales indispensables en una serie de moléculas para lograr la unión al receptor y expresar una actividad farmacológica se conoce como **búsqueda del farmacóforo**, que no es más que el conjunto de

¹ Richon, A. B. *Drug Discov. Today*. 2008, 13, 665-669.

² Kourounakis, P. N. Epilogue-closing remarks: trends in and future of medicinal chemistry. En *Advanced drug design and development: a medicinal chemistry approach*, Kourounakis, P. N; Rekka, E. A., Eds.; Ellis Horwood, 2005, 135-136.

grupos químicos, unidos entre sí o no, que todas las moléculas activas sobre un mismo receptor tienen en común, y que son esenciales para el reconocimiento por el mismo. En la actualidad existen dos vías fundamentales de obtener el farmacóforo³.

- **Métodos directos (Docking)**⁴ (figura 6.1), son los empleados cuando se dispone de la estructura tridimensional de la diana terapéutica (receptor). La posibilidad de diseñar fármacos partiendo de la estructura tridimensional de la diana terapéutica, aparece con la resolución de las primeras estructuras de proteínas, la hemoglobina y la mioglobina^{5,6}, por Max Perutz y John Kendrew, hecho que les valió el premio Nobel de química en 1962. Actualmente, existen bancos de datos de estructuras tridimensionales de proteínas procedentes de cristalografía de Rayos X y Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Así, la mayor base de datos de macromoléculas la constituye el banco de datos de proteínas (PDB, *protein data bank*) de Brookhaven que cuenta en la actualidad con varios miles de estructuras de proteínas y cientos de estructuras de ácidos nucleicos (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Además, se conoce la estructura tridimensional de muchos complejos proteína-ligando (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>), de forma que el sitio y modo de unión sirven como un excelente punto de partida para el diseño de nuevos fármacos. Por tanto, en los métodos directos, el diseño de nuevos ligandos se basa en la estructura de los mismos y su interacción con el sitio activo de la diana. Es decir, estos métodos nos permiten explorar y evaluar los posibles modos de interacción de nuevos ligandos con una proteína, determinándose los residuos implicados en dicha unión⁷.

³ Jorgensen, W. L. *Science*. **2004**, 303, 1813-1818.

⁴ Morris, G. M.; Lim-Wilby, M. *Methods in Molecular Biology*. **2008**, 443, 365-382.

⁵ Perutz M. F. *Brookhaven Symp Biol*. **1960**, 13, 165-183.

⁶ Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H.; Phillips, D. C. *Nature*, **1958**, 181, 662-666.

⁷ Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. *Nature Rev. Drug Discov*. **2004**, 3, 935-949.

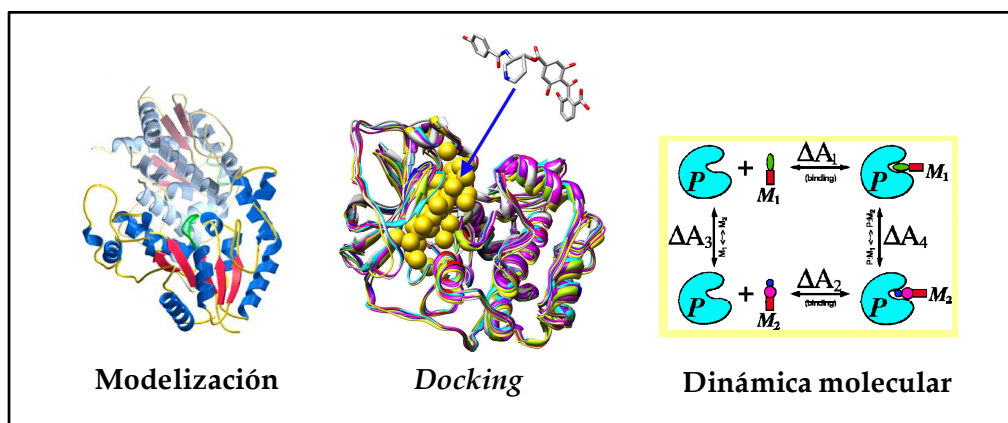


Figura 6.1. Métodos computacionales directos empleados en el diseño de nuevos fármacos.

- **Métodos indirectos** (figura 6.2), se utilizan cuando se desconoce la estructura del receptor que constituye la diana y se basan en la búsqueda de secuencias en la estructura química de múltiples ligandos que se unan a un mismo receptor, permitiendo diseñar moléculas más potentes para dicho receptor⁸.

Estos métodos permiten relacionar las variaciones estructurales en una serie de ligandos con variaciones en la actividad de manera cuantitativa, a través de las llamadas ecuaciones de relación estructura-actividad o QSAR (*Quantitative structure-activity relationships*)⁹.

En los últimos años se han desarrollado nuevos y más potentes métodos que estudian la relación estructura-actividad, utilizando descriptores moleculares que tienen en cuenta la estructura tridimensional del ligando, denominados estudios 3D-QSAR (*Three Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship*)¹⁰, estudios cuantitativos en tres dimensiones de la relación estructura-actividad. Además, existen los estudios 4D-QSAR que incorporan el libre alineamiento y conformación de los ligandos¹¹, 5D-QSAR, que considera tanto la flexibilidad del ligando como

⁸ Liljefors, T.; Pettersson, I. *Computer-aided development of three dimensional pharmacophore models*. P. Drogsgaard-Larsen TLaUM, editor. A Textbook of Drug Design and Development. **1996**.

⁹ Hansch, C. M.; R. M.; Fujita, T.; Maloney, P. P.; Geiger, F.; Streich, M. J. *Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2817-2824.

¹⁰ Green, S. M.; Marshall, G. R. *Trends Pharm. Sci.* **1995**, *16*, 285-291.

¹¹ Hopfinger, A. J.; Wang, S.; Tokarski, J. S.; Baiqiang, J.; Albuquerque, M.; Prakash, J. M.; Duraiswami, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10509-10524.

del receptor¹² y 6D-QSAR, en los cuales podemos considerar simultáneamente diferentes modelos de solvatación¹³.

Recientemente, se han desarrollado tres nuevos métodos de QSAR¹⁴.

1. FB-QSAR (*fragmente-based two dimensional QSAR*), en el cual se consideran las propiedades fisicoquímicas de los fragmentos en los cuales se han dividido los ligandos.

2. MF-3D-QSAR (*multiple field three dimensional QSAR*), en el cual se integran potenciales termodinámicos y no termodinámicos.

3. AABPP (*amino acid-based peptide or protein prediction*), en el cual las técnicas QSAR se aplican para la predicción de la actividad de péptidos y proteínas.

Para la mayoría de los fármacos se desconoce la estructura tridimensional de sus receptores, por lo que la elaboración de un modelo hipotético del farmacóforo, a partir de una serie de compuestos que interactúan con un mismo receptor con diferentes afinidades, es esencial para la comprensión de la interacción ligando-receptor a nivel molecular. Si se establecen relaciones geométricas entre los diferentes grupos farmacofóricos, tenemos un farmacóforo tridimensional, y con ello una imagen gráfica del sitio de unión del receptor, ya que el farmacóforo hace referencia a las zonas del receptor que interactúan con él.

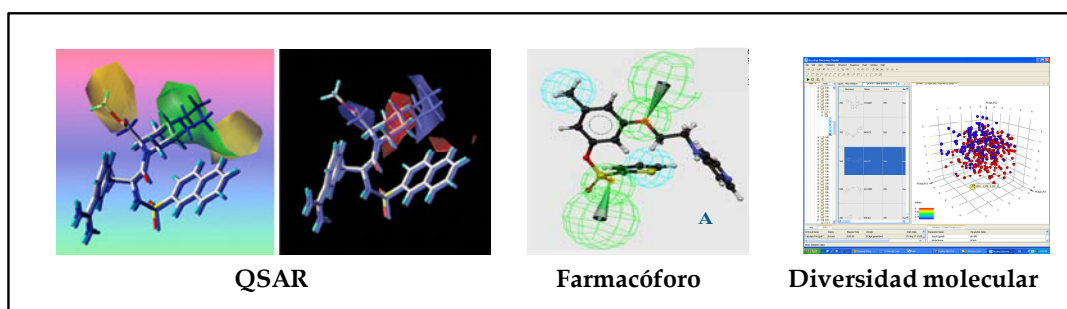


Figura 6.2. Métodos computacionales indirectos empleados en el diseño de nuevos fármacos.

¹² Vendani, A.; Dobler, M. J. *Med. Chem.* **2002**, *45*, 2139-2149.

¹³ Vendani, A.; Dobler, M.; Lill, M. A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3700-3703.

¹⁴ Du, Q. S.; Huang, R. B.; Chou, K. C. *Current Protein and Peptide Sci.* **2008**, *9*, 248-259.

6.1. Estudios QSAR

6.1.1 Introducción

Estos métodos están basados en el empleo de técnicas de correlación entre la estructura química y la actividad biológica¹⁵. En este tipo de técnicas, la actividad biológica es interpretada como función de diferentes aspectos de la estructura química, y por lo tanto dependiente de ésta.

La actividad biológica del compuesto, producto de su interacción con el receptor, es una función de las características estructurales de la molécula:

$$\ln(A) = f(X_h) + f(X_e) + f(X_s) + \text{cte}$$

Donde A es la actividad y $f(X_h)$, $f(X_e)$, $f(X_s)$ son funciones de índices o parámetros hidrofóbicos, electrónicos o estéricos, respectivamente. Así, la actividad biológica es función de la estructura de la molécula y la estructura de la molécula implica ciertas propiedades globales (hidrofobicidad, refractividad molar o solubilidad) y propiedades locales (la distribución de la hidrofobicidad, carga, volumen), en determinadas posiciones de la molécula. Estas propiedades globales y locales pueden ser cuantificadas mediante ciertos parámetros y siempre existe una función que relaciona los cambios de actividad biológica con los cambios en las propiedades globales y locales, aunque puede ser que no sea sencilla ni evidente.

El método QSAR tradicional incluye el tratamiento estadístico de los datos mediante métodos multivariantes, que incluye análisis de regresión, mínimos cuadrados parciales, entre otros. En ellos se valora la actividad biológica como variable dependiente del conjunto de descriptores moleculares que constituyen las variables independientes. Como resultado se obtienen modelos que describen la actividad biológica como una determinada función matemática de los descriptores moleculares, bien sean estructurales, químico-físicos o ambos.

El método estadístico más utilizado dentro del QSAR tradicional es el análisis de regresión lineal múltiple, en el que se obtiene un modelo en forma de ecuación

¹⁵ Selassie, C. D. *History of Quantitative structure activity relationships*, Burger's medicinal chemistry and drug discovery, Eds. Donald, J. A. Wiley, 6º ed. 2003, 1-48.

de una recta, que describe la dependencia de la actividad (A) del conjunto de descriptores (X_i), así como la magnitud de las contribuciones de cada uno de ellos.

$$A = f(X_i) + \text{cte}$$

El modelo así obtenido ha de ser analizado en función de su calidad estadística, para poder evaluar su capacidad de predicción. Cuanta mayor calidad estadística tenga el modelo, más confiables y exactas serán las predicciones a realizar.

Otro método estadístico es el de mínimos cuadrados parciales, que nos permite extraer, igualmente, las variables que describen la varianza del conjunto de datos, los cuales se someten después a una validación cruzada. En este caso, se obtiene una expresión lineal que consiste en un conjunto mínimo de puntos necesarios para distinguir los compuestos sometidos a examen de acuerdo a las actividades determinadas experimentalmente.

Los descriptores utilizados pueden ser de tres tipos:

- Descriptores basados en propiedades químico-físicas: son aquellos que derivan de la determinación experimental de una determinada propiedad químico-física de la molécula en estudio y pueden reflejar la interacción de dicha molécula con el receptor. Entre los más empleados se encuentran el log P, la refractividad molar, la constante de ionización y el momento dipolar.
- Descriptores mecánico-cuánticos: son aquellos que permiten describir las características electrónicas y energéticas de las moléculas. Entre los más utilizados se encuentran las cargas atómicas y la energía de los orbitales HOMO y LUMO¹⁶.
- Descriptores topológicos y topográficos: que describen las posiciones y las interconexiones entre los átomos de una molécula dada. De esta forma se logra caracterizar estructuralmente los compuestos.

La calidad estadística de un modelo se evalúa por diferentes métodos. Los más aceptados son el coeficiente de regresión (r), el coeficiente de Fisher (F) y la

¹⁶ Gasteiger, J. *Chemoinformatics*. Eds. VCH-Wiley, 2003.

desviación estándar (**S**)¹⁷. El valor de F correlaciona la varianza explicada (r^2) por el número de grados de libertad, con la varianza no explicada ($1-r^2$) por el número de variables del modelo. Cuanto más alto es el porcentaje de varianza explicada por el modelo, mayor será el valor de F. La desviación estándar S es una media de cuanto se alejan los valores predichos por el modelo de la línea. La tendencia a cero de este valor supondría mayor calidad de la predicción.

Otro punto importante es validar la capacidad predictiva del modelo. Esto se realiza mediante el método de validación cruzada con el procedimiento *Leave One Out* (dejar uno fuera) que proporciona un coeficiente de correlación de validación cruzada (q^2), considerando un valor superior a 0,5, un resultado satisfactorio¹⁶.

6.1.2. Resultados y discusión

Se llevó a cabo un estudio QSAR, utilizando la metodología anteriormente explicada, de los dímeros triterpénicos evaluados como antiparasitarios frente a *Giardia intestinalis* (figura 6.3) y cuyos datos de actividad se presentaron el capítulo 5.1. de esta Memoria.

Los estudios QSAR fueron realizados por el grupo del Dr. Gonzalo Mena Rejón en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, México.

Los programas utilizados en dicho estudio fueron:

1. **ACD LABS**-Advanced Chemistry Development.
2. **Spartan 06** Wavefunction, Inc, Irvine, CA.
3. Talete srl, **DRAGON** for Windows (Software for Molecular Descriptor Calculations). Version 5.5-2007- <http://www.talete.mi.it/>.
4. **SYSTAT** Software, Inc for Windows. Version 12.02.00-2007- <http://www.systat.com>.

¹⁷ Jaworska, D.; Nikolova, N. *Review of methods for assessing the applicability domains of QSARs and QSARS*. JRC Contract ECVA. 2005,1-23.

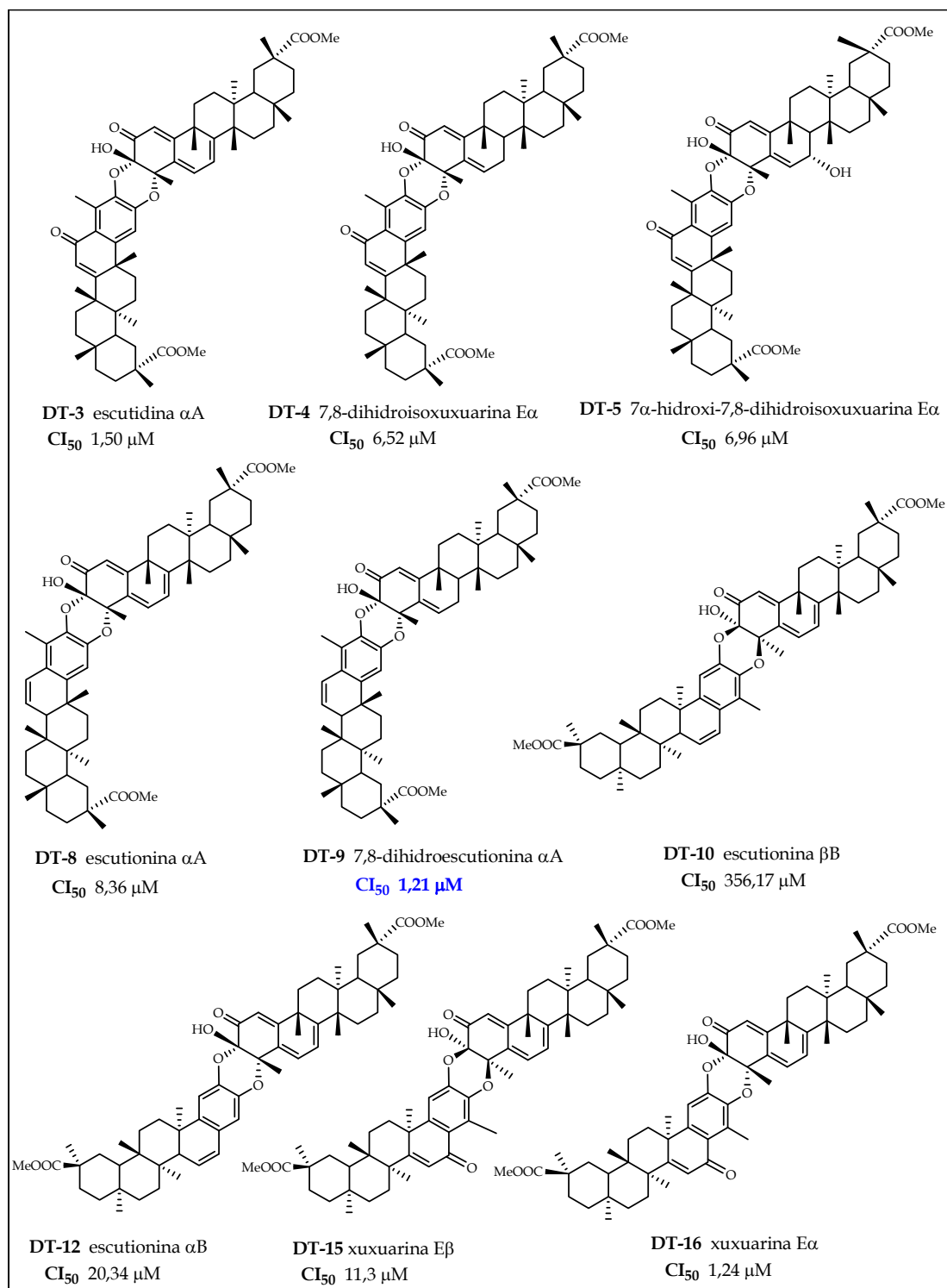


Figura 6.3. Dímeros incluidos en el estudio QSAR.

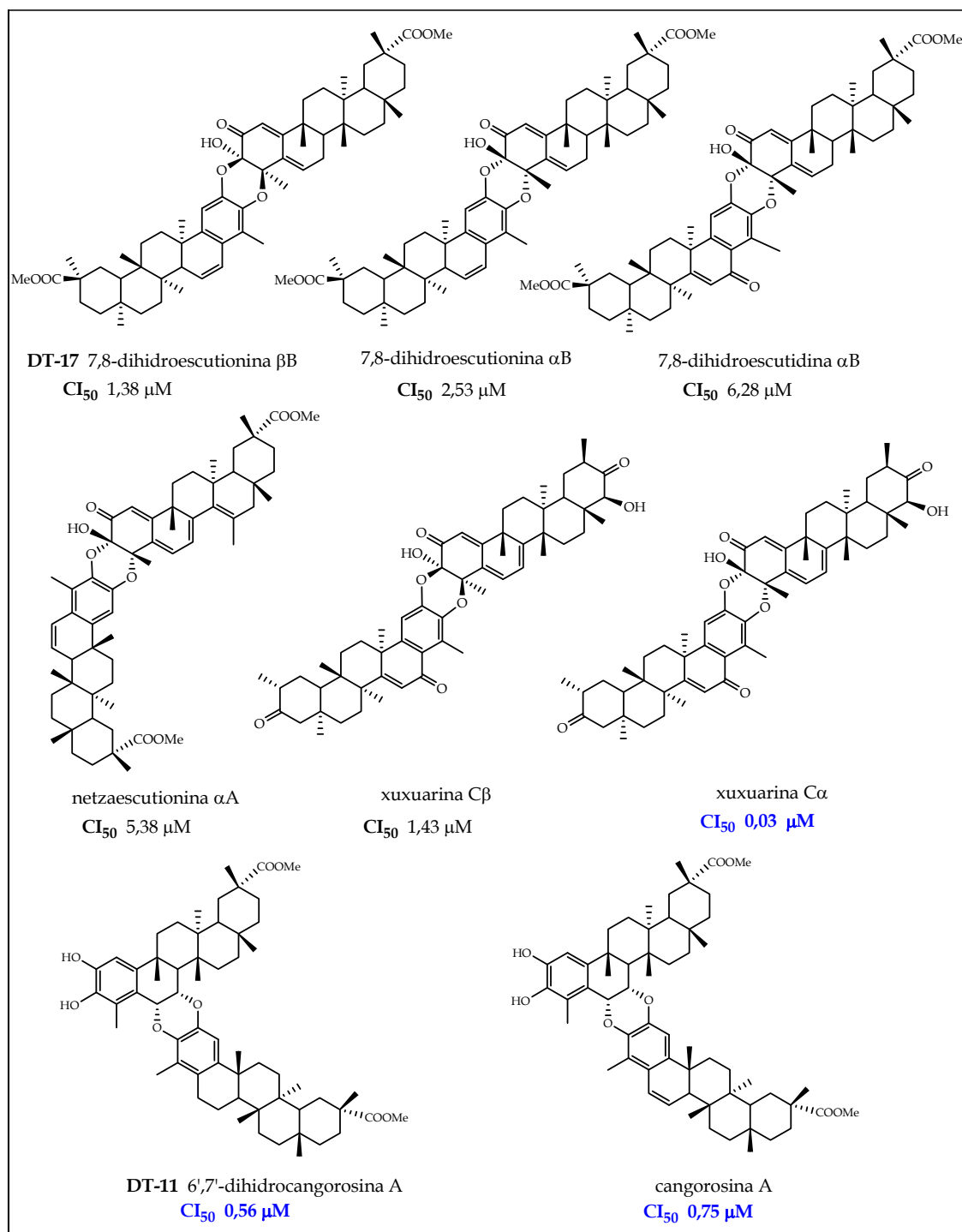


Figura 6.3. (continuación).

En este estudio QSAR los descriptores fueron calculados a partir de las geometrías optimizadas de las moléculas bioactivas. La optimización geométrica se realizó usando la teoría funcional de la densidad con una base 6-31G* y con el potencial híbrido B3LYP para el potencial de intercambio y correlación. La correlación entre los descriptores y la actividad biológica se determinó haciendo uso del método de regresión lineal múltiple.

Los descriptores tridimensionales, RDF145M (Función de Distribución Radial - 14,5 / ponderado con masas atómicas), AU (índice de tamaño total sin ponderar) y H7M (Autocorrelación H de intervalo 7 / ponderado con masas atómicas) fueron los que mejor correlacionaron con la actividad biológica. Se obtuvo así un modelo con un alto valor estadístico, cuyos parámetros fueron:

$$r^2 \text{ (coeficiente de correlación múltiple)} = 0,865$$

$$r^2_{\text{adj}} \text{ (coeficiente de correlación múltiple al cuadrado)} = 0,834$$

$$S \text{ (estimación del error estándar)} = 0,345$$

$$F \text{ (coeficiente de Fisher)} = 28,961$$

La capacidad de predicción se valoró usando la metodología de la validación cruzada ($q^2 = 0,760$), concluyéndose que el modelo obtenido puede ser usado para la predicción de la actividad frente a *Giardia* de moléculas similares.

El descriptor RDF145M sugiere una relación lineal entre la actividad antiparasitaria frente a *Giardia* y la distribución 3D de la masa molecular, calculada a un radio de 14.5 Å del centro geométrico de cada molécula. Los descriptores del grupo WHIM se basan en el cálculo de los ejes principales de inercia de la molécula, en este caso, el descriptor AU contiene información del tamaño total del compuesto. Los descriptores GETAWAY están basados en el cálculo de la matriz de influencia molecular relacionados en este caso (H7M) con la masa atómica.

Tabla 6.1. Logaritmo de la actividad biológica experimental y calculada de los compuestos en estudio.

| Compuesto | Log (1/C _{exp}) | Log (1/C _{cal}) |
|--|---------------------------|---------------------------|
| escutidina αA (DT-3) | 5,82 | 5,72 |
| 7,8-dihidroisoxuxuarina Eα (DT-4) | 5,19 | 5,06 |
| 7α-hidroxi-7,8-dihidroisoxuxuarina Eα (DT-5) | 5,16 | 5,69 |
| escutionina αA (DT-8) | 5,07 | 4,93 |
| 7,8-dihidroescutionina αA (DT-9) | 5,92 | 6,21 |
| escutionina βB (DT-10) | 3,45 | 3,97 |
| escutionina αB (DT-12) | 4,69 | 4,68 |
| xuxuarina Eβ (DT-15) | 4,94 | 4,52 |
| xuxuarina Eα (DT-16) | 5,90 | 5,75 |
| 7,8-dihidroescutionina βB (DT-17) | 5,86 | 5,29 |
| 7,8-dihidroescutionina αB | 5,60 | 5,70 |
| 7,8-dihidroescutidina αB | 5,20 | 5,27 |
| netzaescutionina αA | 5,27 | 5,30 |
| xuxuarina Cβ | 5,84 | 6,30 |
| xuxuarina Cα | 7,52 | 7,29 |
| 6',7'-dihidrocangorosina A (DT-11) | 6,25 | 6,06 |
| cangorosina A | 6,12 | 6,24 |

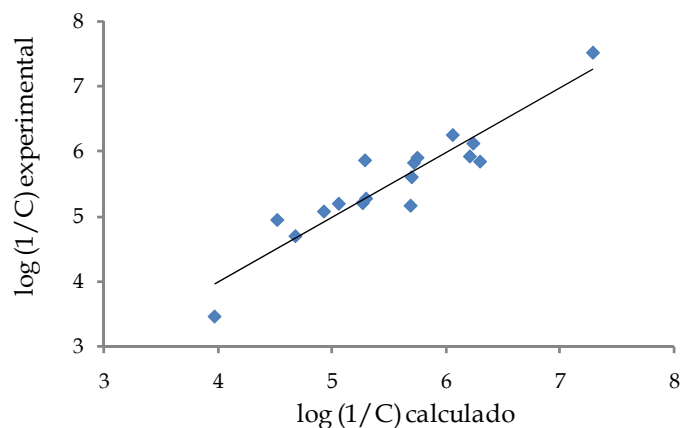


Figura 6.4. Representación de los valores del $\log(1/C)$ experimentales y los calculados por el modelo.

La ecuación obtenida es:

$$\log(1/C) = 0,146 \times (\text{RDF145M}) - 0,012 \times (\text{AU}) - 6,127 \times (\text{H7M}) + 12,463$$

Los resultados obtenidos, nos indican que el estudio QSAR bidimensional realizado posee una alta calidad estadística y que la inclusión de descriptores 3D proporciona información tridimensional sin necesidad de realizar un estudio 3D-QSAR, el cual computacionalmente es más costoso. Por lo tanto, podemos considerarlo como un estudio previo al 3D-QSAR con alto valor predictivo.

Esta metodología permite efectuar una evaluación teórica de la actividad biológica de moléculas previa a su síntesis o aislamiento, utilizando los descriptores RDF145M, H7M y AU sin ponderación, ya que éstos incluyen información de la geometría molecular y la distribución atómica.

Así, podemos concluir que el incremento del valor del descriptor RDF145M, que se encuentra ponderado con las masas atómicas de las moléculas investigadas, es directamente proporcional al aumento de la actividad antiparasitaria frente a *Giardia*, lo que permite establecer que un incremento en el número de átomos provocará un aumento proporcional de la actividad mencionada.

Además, considerando que el descriptor AU tiene en cuenta la contribución cuadrática al tamaño molecular y que la relación entre los valores de este descriptor y la actividad es inversamente proporcional, se concluye que una disminución en el volumen de los dímeros aumentaría la actividad investigada.

Por último, la disminución del valor del descriptor H7M, perteneciente al grupo de descriptores GETAWAY, disminuye la actividad de los dímeros frente a

Giardia y ya que representa la autocorrelación 3D que existe entre las masas atómicas presentes en la molécula, puede relacionarse con el volumen de la molécula tal y como ocurre en el caso del descriptor AU.

6.2. Estudios 3D-QSAR

6.2.1. Introducción

Los métodos 3D-QSAR utilizan descriptores espaciales y técnicas de análisis multivariante *Partial Least Squares* (PLS). Se utilizan los descriptores de campo molecular, basados en describir las interacciones receptor-ligando a través de potenciales de interacción molecular (*Molecular Interaction Potential*, MIP).

Un paso crítico en estos métodos 3D-QSAR es el alineamiento de las moléculas teniendo en cuenta los grupos responsables de una interacción común con el receptor, es decir, los ligandos deben estar adecuadamente superpuestos en el seno de la red de puntos en los que se calcularán los potenciales de interacción.

Los métodos más usados son el CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*)¹⁸, el CoMSIA (*Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*)¹⁹ y el método GRID/GOLPE, que se diferencian principalmente en los MIP que derivan. CoMFA utiliza un MIP estérico y otro electrostático, el CoMSIA emplea además de éstos, los factores hidrofóbicos y descriptores de grupos aceptores y dadores en el receptor, y en el GRID/GOLPE²⁰ se realiza una serie de pre-tratamientos de los valores de los potenciales de interacción molecular.

Por otro lado, se han desarrollado métodos que presentan módulos para la obtención del farmacóforo que no requieren el alineamiento de las moléculas en el espacio. Uno de estos programas es el Discovery Studio 2.1, que describiremos con detalle a continuación, ya que ha sido el usado en nuestros estudios 3D-QSAR.

Todo esto hace que, hoy en día, los estudios 3D-QSAR estén muy extendidos en la investigación farmacéutica. El concepto de farmacóforo ha demostrado ser extremadamente eficaz, no sólo en el estudio de las relaciones estructura-actividad,

¹⁸ Cramer, R. D.; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5959-5967.

¹⁹ Klebe, G.; Abraham, U.; Mietzner, T. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4130-4146.

²⁰ Baroni, M.; Constantino, G.; Cruciale, G.; Riganelli, D.; Valigi, R.; Clementi, S. *Quan. Struct-Act. Relat.* **1993**, *12*, 9-20.

sino también en el desarrollo de herramientas tridimensionales, apropiadas para la búsqueda eficaz de nuevos ligandos y por consiguiente de nuevos compuestos bioactivos²¹.

6.2.1.1. Discovery Studio 2.1

Existen varios programas que **no requieren la alineación de las moléculas en el espacio**, lo que supone una gran ventaja y además, consideran la flexibilidad de los ligandos a la hora de construir el farmacóforo (es decir, consideran las conformaciones posibles de cada uno de los ligandos). Entre estos programas se encuentran GASP, DISCO y Catalyst, que actualmente forma parte de la versión actualizada Discovery Studio 2.1²², y presentan además la ventaja de incorporar un buscador rápido en bases de datos tridimensionales.

Dentro del **Discovery Studio 2.1** existen dos módulos usados para la determinación del farmacóforo, el módulo *Hip Hop* y el *Hypogen*, extensamente utilizados en el descubrimiento de fármacos^{23,24,25} y en toxicología²⁶.

El modo *Hip Hop* genera el farmacóforo sólo con compuestos activos, no considera los valores de actividad y se basa en la similitud estructural existente entre todos ellos (método cualitativo). Por otra parte, se encuentra el modo *Hypogen*, que utiliza los datos de actividad y considera tanto los compuestos activos como los inactivos, identificando, así, las hipótesis que sirvan para los compuestos activos, pero no para los inactivos (método cuantitativo). Es decir, las hipótesis de farmacóforo obtenidas en el programa se basan en características estructurales comunes en los compuestos activos y que no tienen los compuestos inactivos.

Entre las características que puede utilizar el programa Discovery Studio 2.1 se encuentran los siguientes:

- HBA: *hydrogen bond acceptor* (grupos aceptores)

²¹ Güner, O. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, 2, 1321-1332.

²² <http://accelrys.com/events/webinars/discovery-studio-21/>

²³ Greenidge, P. A.; Weiser, J. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2001**, 1, 79-87.

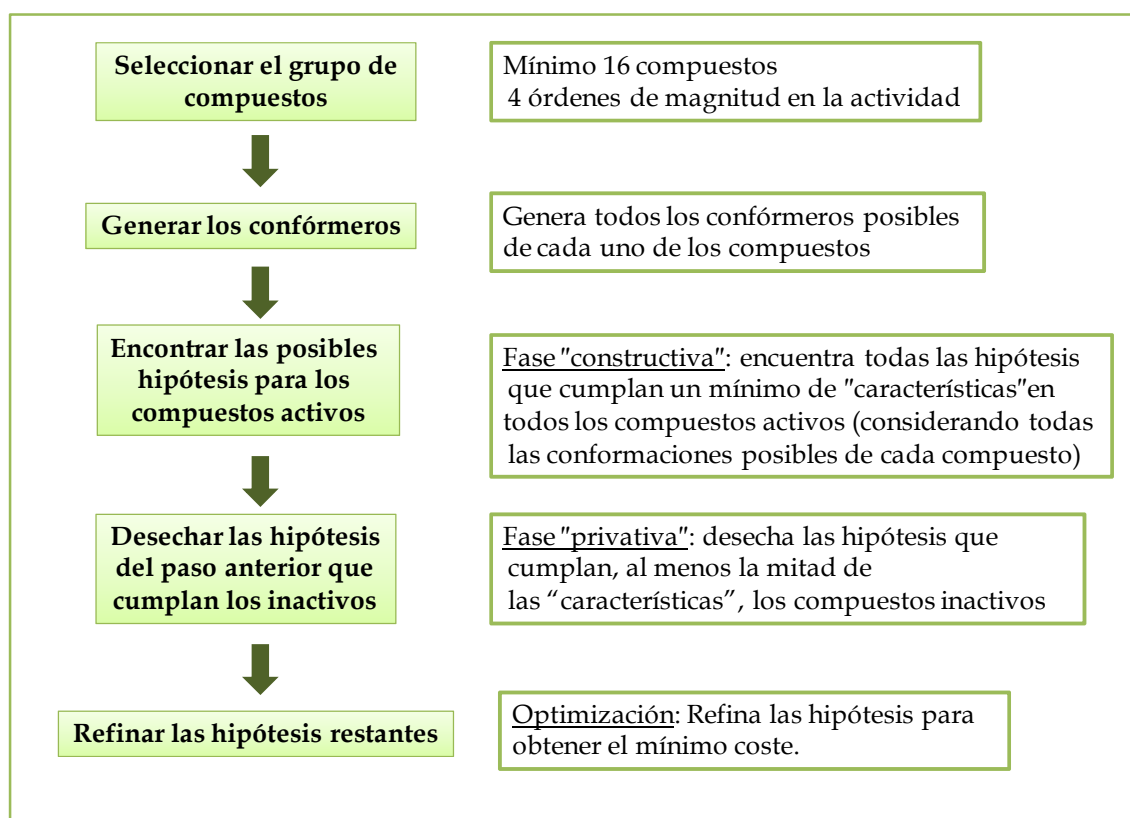
²⁴ Wan, H. Y.; Cao, Z. X.; Li, L. L.; Jiang, P. D.; Zhao, Y. L. Luo, S. D. Yang, L.; Wei, Y. Q.; Yang, S. Y. *Bioorg. Med. Chem. Letter.* **2008**, 18, 4972-4977

²⁵ Pérez-Sacau, E.; Díaz-Peñate, R. G.; Estevez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; García-Castellano, J. M.; Pardo, L.; Campillo, M. J. *Med. Chem.* **2009**, 50, 696-706.

²⁶ Garg, D.; Gandhi, T.; Mohan, C. G. *J. Mol. Graph. Mod.* **2008**, 26, 966-976.

- HBD: *hydrogen bond donor* (grupos dadores)
- HYD: *hydrophobic* (grupos hidrofóbicos)
- HY-ALI: *hydrophobic aliphatic* (grupos alifáticos hidrofóbicos)
- HY-AR: *hydrophobic aromatic* (grupos aromáticos hidrofóbicos)
- RA: *ring aromatic* (anillos aromáticos)
- Volúmenes de exclusion (zonas de exclusión de la molécula)

En el esquema 6.1 se presentan los pasos que realiza el programa (modo *Hypogen*) para la obtención del farmacóforo²⁷.



Esquema 6.1. Metodología *Hypogen*.

El módulo *Hypogen* selecciona en el proceso de **optimización** las mejores hipótesis en función del análisis de sus costes²⁶. En primer lugar, realiza el cálculo de dos costes teóricos (en unidades de *bits*) que reflejan el éxito potencial de la hipótesis de farmacóforo. El primer cálculo teórico es el del coste fijo, que representa el coste del modelo más simple y el ideal. El segundo cálculo es el coste nulo, que representa el coste más alto de una hipótesis que estima como valores de

²⁷ Chopra, M.; Gupta, R.; Gupta, S.; Saluja, D. *J. Mol. Model.* **2008**, *14*, 1087-1099.

actividad el promedio de los datos reales. Los costes se calculan teniendo en cuenta la suma de tres factores: el peso, el error y la configuración. El peso representa lo que contribuye cada característica al modelo, el error es una medida de cuanto se alejan los valores estimados por el modelo de la línea de regresión, por tanto depende de la diferencia entre la actividad real y la estimada por la hipótesis y la configuración (entropía) depende de la complejidad del espacio conformacional de las hipótesis del farmacóforo.

Una vez finalizada la optimización, el programa nos proporciona un número determinado de hipótesis con la siguiente información:

- Coste nulo y coste fijo
- Coste total: que es el coste de la hipótesis resultante
- RMS: desviación del logaritmo actividad estimada del logaritmo actividad real (error cuadrático medio)
- Correlación (r): coeficiente de regresión
- Configuración: entropía

Para que exista una alta probabilidad de que la hipótesis represente los datos reales, se deben cumplir los siguientes requisitos:

1. coste nulo-coste fijo > 60 bits (probabilidad de 90% de encontrar modelos predictivos).
2. El coste total debe estar más próximo al coste fijo que al coste nulo.
3. RMS: valor próximo a 0.
4. Coeficiente de regresión: valor próximo a 1.
5. Configuración < 18

6.2.2. Resultados y discusión

La elaboración de los modelos 3D-QSAR se realizó durante una estancia que llevé a cabo en el grupo de investigación dirigido por los Drs. Mercedes Campillo y Leonardo Pardo, en el laboratorio de Química Computacional, Unidad de Bioestadística de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Como resultado de trabajos anteriores en nuestro grupo de investigación y del llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, disponemos de una **amplia quimioteca de**

sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos evaluados como inhibidores de la activación del VEB, que, como hemos mencionado en el capítulo 5.1 de esta Memoria, es un virus oncogénico, causante de numerosas neoplasias y que es considerado el agente etiológico de la mononucleosis infecciosa. Dada la gran cantidad de sesquiterpenos ensayados, nos pareció de interés elaborar **un modelo de farmacóforo** mediante **estudios 3D-QSAR**, que nos proporcionara información sobre las características estructurales que deben presentar este tipo de metabolitos para la expresión de su actividad, además de permitirnos predecir la actividad de un nuevo sesquiterpeno de origen natural, derivado o sintético.

Los metabolitos incluidos en estos estudios de relación estructura-actividad SAR y 3D-QSAR, fueron obtenidos del estudio fitoquímico de *Maytenus jelskii* (S-1-S-18, S-21-S-23, S-25, S-26, S-30, S-38, S-40, S-41, S-43, S-45, S-48), resultado del trabajo de esta Tesis Doctoral y sesquiterpenos aislados de otras especies de celastráceas: *Crossopetalum tonduzii* (68, 91, 98-120), *Maytenus magellanica* (2, 11, 14, 16, 17, 21, 43, 44, 55, 57, 58, 62, 64, 65), *Maytenus cuzcoina* (10, 22-27, 29-37, 69, 70 y 77), *Celastrus vulcanicola* (40 y 41), *Zinowiewia costaricensis* (5-8, 39, 66, 67, 72, 83-90, 93, 94 y 121), *Maytenus canariensis* (38, 74-76, 78-82, 92 y 95) y *Rzedowskia tolantonguensis* (42).

A fin de simplificar el estudio de la relación estructura-actividad tanto SAR como 3D-QSAR, hemos agrupado los sesquiterpenos objeto de este trabajo basándonos en sus esqueletos polihidroxílicos base y teniendo en cuenta el número de sustituyentes en dicho esqueleto. A continuación se muestran las estructuras y actividades correspondientes a cada grupo de compuestos (tablas 6.2-6.7). La actividad se expresa en % de inducción de antígenos tempranos del VEB a diferentes concentraciones.

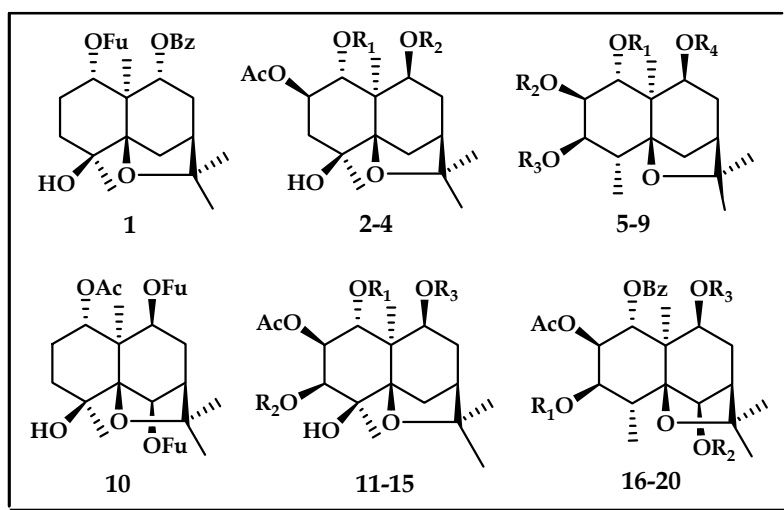


Tabla 6.2. Porcentaje de activación de antígenos tempranos del VEB inducida por el TPA en presencia de los compuestos ensayados respecto a un control positivo^a.

| Sesquiterpeno | Sustituyentes | | | | Concentración (moles/TPA) ^b | | | |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|-------------|-------------|----|
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | 1000 | 500 | 100 | 10 |
| 1 (S-48) | | | | | 15,9 | 56,0 | 85,2 | - |
| 2 | Bz | Cin | | | 15,7 | 39,4 | 83,5 | - |
| 3 (S-43) | Fu | Cin | | | 15,1 | 55,3 | 84,6 | - |
| 4 (S-45) | Fu | Bz | | | 15,6 | 55,8 | 84,3 | - |
| 5 | Bz | Ac | Ac | Cin | 16,3 | 53,2 | 86,3 | - |
| 6 | Bz | H | Ac | Cin | 16,9 | 54,8 | 87,6 | - |
| 7 (S-25) | Bz | Ac | H | Cin | 17,1 | 54,3 | 89,0 | - |
| 8 | Bz | H | H | Cin | 17,1 | 56,6 | 82,7 | - |
| 9 (S-41) | Fu | Ac | Ac | Bz | 16,2 | 56,2 | 85,2 | - |
| 10 | | | | | 10,5 | 40,2 | 84,6 | - |
| 11 | Bz | Ac | Bz | | 11,2 | 33,1 | 80,5 | - |
| 12 (S-17) | Bz | Ac | Cin | | 11,8 | 53,2 | 86,3 | - |
| 13 (S-18) | Bz | H | Cin | | 10,9 | 52,0 | 86,2 | - |
| 14 | Cin | Nic | Bz | | 19,9 | 42,7 | 86,8 | - |
| 15 (S-40) | Fu | Ac | Bz | | 14,3 | 54,2 | 83,9 | - |
| 16 | Ac | Ac | Bz | | 15,3 | 38,0 | 84,6 | - |
| 17 | Bz | Ac | Bz | | 20,3 | 41,5 | 87,0 | - |
| 18 (S-23) | H | Ac | Bz | | 9,3 | 46,8 | 81,0 | - |
| 19 (S-21) | H | Ac | Cin | | 10,3 | 39,2 | 86,2 | - |
| 20 (S-22) | H | H | Cin | | 9,2 | 38,9 | 86,0 | - |
| β-caroteno | | | | | 9,1 | 34,3 | 82,7 | - |

^aLos valores representan el % de inducción de antígenos tempranos del VEB con respecto al control positivo 100% (n=3).^b Relación en moles del compuesto con respecto a la concentración de TPA (32 pmol= 20 ng/mol): 1000= 32 nmol del compuesto, 500= 16 nmol, 100= 3,2 nmol y 10= 0,32 nmol.

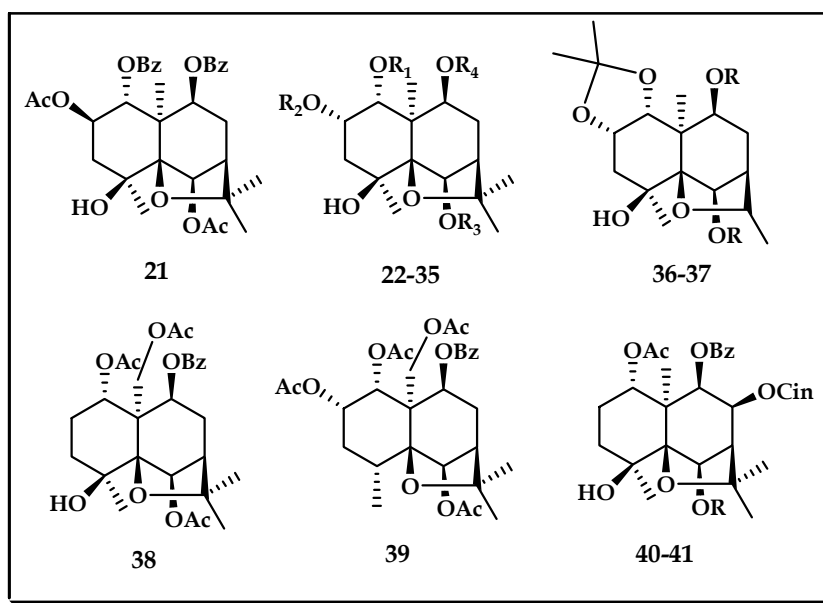


Tabla 6.3. Porcentaje de activación de antígenos tempranos del VEB inducida por el TPA en presencia de los compuestos ensayados respecto a un control positivo^a.

| Sesquiterpeno | Sustituyentes | | | | | Concentración (moles/TPA) ^b | | | |
|-------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|------|-------------|------|
| | R | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | 1000 | 500 | 100 | 10 |
| 21 | | | | | | 12,5 | 36,6 | 81,4 | - |
| 22 | | Ac | Fu | Fu | Fu | 0 | 30,2 | 76,9 | 94,6 |
| 23 | | Ac | MeBut | Fu | Fu | 0 | 32,7 | 78,0 | 96,2 |
| 24 | | Ac | Bz | Fu | Fu | 11,7 | 42,9 | 87,1 | - |
| 25 | | Ac | Ac | Fu | Fu | 0 | 27,4 | 74,8 | 93,0 |
| 26 | | Ac | Pr | Fu | Fu | 6,3 | 34,9 | 77,9 | - |
| 27 | | Ac | H | Fu | Fu | 0 | 28,5 | 76,7 | 95,8 |
| 28 (S-38) | | Ac | Bz | Bz | Fu | 15,5 | 55,7 | 83,9 | - |
| 29 | | Ac | Ac | TMeOBz | Fu | 15,3 | 61,7 | 87,6 | - |
| 30 | | Ac | Ac | Ac | Ac | 0 | 25,0 | 71,6 | 90,5 |
| 31 | | Ac | Fu | H | Fu | 13,9 | 59,8 | 85,1 | - |
| 32 | | Ac | Ac | Ac | H | 0 | 24,1 | 71,1 | 90,3 |
| 33 | | H | Ac | Ac | Ac | 0 | 25,7 | 72,4 | 91,7 |
| 34 | | H | Ac | Fu | Fu | 15,2 | 54,6 | 87,8 | - |
| 35 | | H | H | H | H | 1,2 | 27,3 | 74,0 | 94,5 |
| 36 | Ac | | | | | 5,0 | 37,0 | 73,5 | 95,2 |
| 37 | H | | | | | 5,9 | 39,2 | 74,6 | 97,6 |
| 38 | | | | | | 4,6 | 38,7 | 77,9 | 97,2 |
| 39 | | | | | | 0 | 33,6 | 78,5 | 97,2 |
| 40 | Ac | | | | | 14,9 | 53,6 | 87,1 | - |
| 41 | H | | | | | 13,1 | 51,1 | 85,2 | - |
| β-caroteno | | | | | | 9,1 | 34,3 | 82,7 | - |

^aLos valores representan el % de inducción de antígenos tempranos del VEB con respecto al control positivo 100% (n=3).^b Relación en moles del compuesto con respecto a la concentración de TPA (32 pmol= 20 ng/mol): 1000= 32 nmol del compuesto, 500= 16 nmol, 100= 3,2 nmol y 10= 0,32 nmol.

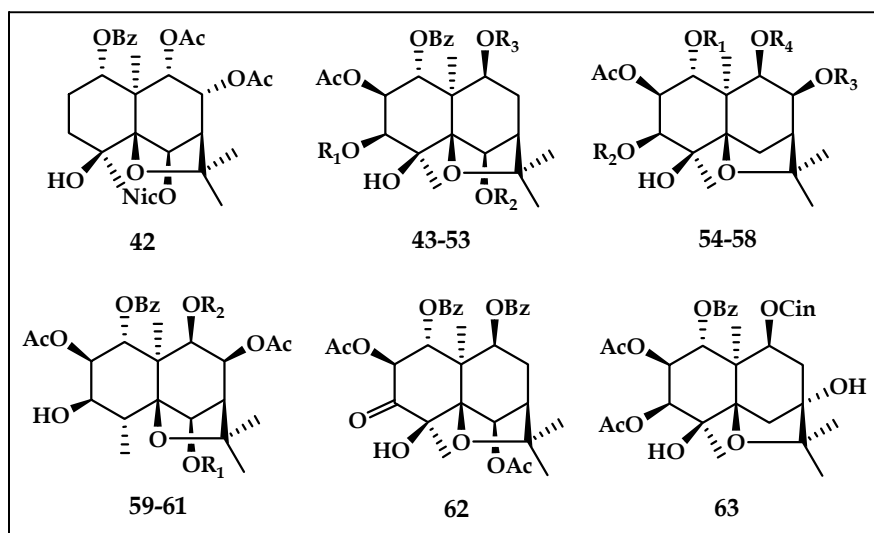


Tabla 6.4. Porcentaje de activación de antígenos tempranos del VEB inducida por el TPA en presencia de los compuestos ensayados respecto a un control positivo^a.

| Sesquiterpeno | Sustituyentes | | | | Concentración (moles/TPA) ^b | | | |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|------|-------------|------|
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | 1000 | 500 | 100 | 10 |
| 42 | | | | | 12,5 | 60,1 | 86,3 | - |
| 43 | Ac | Bz | Bz | | 15,7 | 39,0 | 83,1 | - |
| 44 | Ac | Ac | Bz | | 7,9 | 26,0 | 75,2 | 94,8 |
| 45 (S-10) | Ac | Ac | Cin | | 8,9 | 39,6 | 87,4 | - |
| 46 (S-7) | Ac | H | Cin | | 10,1 | 51,3 | 85,2 | - |
| 47 | Bz | Ac | Bz | | 16,5 | 39,4 | 85,2 | - |
| 48 (S-14) | Nic | Ac | Bz | | 7,5 | 36,6 | 87,6 | - |
| 49 (S-11) | Nic | Ac | Cin | | 14,6 | 48,1 | 89,3 | - |
| 50 (S-8) | H | Ac | Cin | | 9,3 | 50,1 | 84,3 | - |
| 51 (S-12) | H | Bz | Bz | | 13,7 | 54,2 | 87,1 | - |
| 52 (S-13) | H | Ac | Bz | | 0 | 33,2 | 77,5 | 98,6 |
| 53 (S-9) | H | H | Cin | | 5,3 | 35,2 | 85,2 | - |
| 54 (S-16) | Bz | Ac | Ac | Bz | 7,1 | 45,2 | 79,3 | - |
| 55 | Bz | Ac | Bz | Bz | 9,6 | 29,8 | 78,3 | - |
| 56 (S-15) | Bz | Ac | H | Cin | 8,7 | 37,2 | 87,0 | - |
| 57 | Nic | Ac | Bz | Bz | 11,1 | 31,7 | 79,0 | - |
| 58 | Nic | Bz | Ac | Bz | 13,6 | 38,4 | 84,1 | - |
| 59 (S-3) | Ac | Fu | | | 11,5 | 53,4 | 87,0 | - |
| 60 (S-4) | Ac | Cin | | | 2,4 | 33,2 | 79,5 | - |
| 61 (S-5) | H | Bz | | | 0 | 30,1 | 76,3 | 97,8 |
| 62 | | | | | 10,1 | 29,5 | 77,9 | - |
| 63 (S-6) | | | | | 8,9 | 37,9 | 87,7 | - |
| β-caroteno | | | | | 9,1 | 34,3 | 82,7 | - |

^aLos valores representan el % de inducción de antígenos tempranos del VEB con respecto al control positivo 100% (n=3).^b Relación en moles del compuesto con respecto a la concentración de TPA (32 pmol= 20 ng/mol): 1000= 32 nmol del compuesto, 500= 16 nmol, 100= 3,2 nmol y 10= 0,32 nmol.

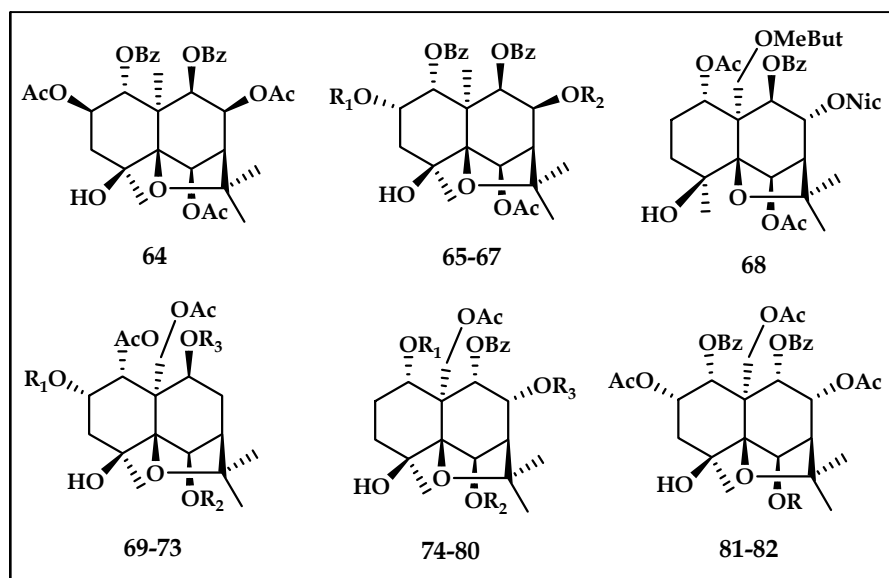


Tabla 6.5. Porcentaje de activación de antígenos tempranos del VEB inducida por el TPA en presencia de los compuestos ensayados respecto a un control positivo^a.

| Sesquiterpeno | Sustituyentes | | | Concentración (moles/TPA) ^b | | | |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|--|-------------|-------------|-------------|
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | 1000 | 500 | 100 | 10 |
| 64 | | | | 0 | 25,5 | 73,0 | 91,5 |
| 65 | Bz | Ac | | 17,4 | 40,3 | 84,5 | - |
| 66 | Bz | H | | 14,3 | 52,3 | 86,4 | - |
| 67 | Ac | Bz | | 10,4 | 48,0 | 82,1 | - |
| 68 | | | | 0 | 26,8 | 86,0 | - |
| 69 | Ac | Fu | Fu | 0 | 25,9 | 72,0 | 91,0 |
| 70 | Ac | Bz | Bz | 12,6 | 48,0 | 86,9 | - |
| 71 (S-26) | Ac | Bz | Fu | 12,0 | 52,3 | 81,9 | - |
| 72 | Ac | Ac | Bz | 0 | 31,1 | 75,4 | 95,1 |
| 73 (S-30) | Bz | Bz | Fu | 14,3 | 54,0 | 82,2 | - |
| 74 | Ac | Ac | Ac | 0 | 31,4 | 74,9 | 92,7 |
| 75 | Ac | Ac | Bz | 4,3 | 34,6 | 78,9 | - |
| 76 | Ac | Ac | MeBut | 0 | 27,3 | 72,8 | 93,5 |
| 77 | Ac | TMeOBz | MeBut | 3,6 | 29,7 | 75,1 | 96,8 |
| 78 | Bz | Ac | Ac | 0 | 32,8 | 75,6 | 93,7 |
| 79 | Bz | Ac | Bz | 7,2 | 47,1 | 79,2 | - |
| 80 | Bz | Ac | MeBut | 0 | 29,6 | 74,9 | 95,6 |
| 81 | Ac | | | 0 | 25,4 | 70,0 | 90,1 |
| 82 | H | | | 0 | 24,1 | 69,2 | 89,1 |
| β-caroteno | | | | 9,1 | 34,3 | 82,7 | - |

^aLos valores 8 representan el % de inducción de antígenos tempranos del VEB con respecto al control positivo 100% (n=3).^b Relación en moles del compuesto con respecto a la concentración de TPA (32 pmol= 20 ng/mol): 1000= 32 nmol del compuesto, 500= 16 nmol, 100= 3,2 nmol y 10= 0,32 nmol.

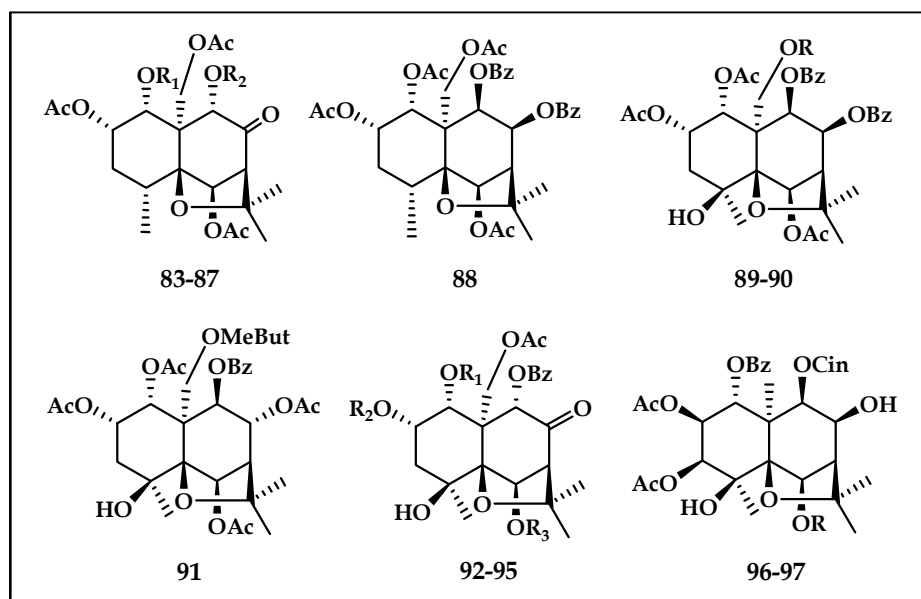


Tabla 6.6. Porcentaje de activación de antígenos tempranos del VEB inducida por el TPA en presencia de los compuesto ensayados respecto a un control positivo^a.

| Sesquiterpeno | Sustituyentes | | | | Concentración (moles/TPA) ^b | | | |
|-------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|--|-------------|-------------|----------|
| | R | R ₁ | R ₂ | R ₃ | 1000 | 500 | 100 | 10 |
| 83 | | Ac | Ac | | 3,1 | 31,7 | 72,0 | 94,8 |
| 84 | | Ac | Bz | | 9,7 | 52,1 | 82,6 | - |
| 85 | | Bz | Ac | | 4,3 | 38,0 | 73,9 | 96,7 |
| 86 | | Bz | Bz | | 13,3 | 53,3 | 86,7 | - |
| 87 | | H | Bz | | 8,5 | 50,3 | 81,1 | - |
| 88 | | | | | 0 | 29,9 | 73,9 | 93,5 |
| 89 | Ac | | | | 0 | 27,1 | 72,6 | 92,1 |
| 90 | H | | | | 3,1 | 26,5 | 71,4 | 91,0 |
| 91 | | | | | 0 | 23,9 | 81,3 | - |
| 92 | | Bz | Ac | Ac | 10,0 | 49,2 | 80,0 | 98,4 |
| 93 | | Bz | Bz | Ac | 12,5 | 54,3 | 83,5 | - |
| 94 | | Bz | Ac | H | 11,2 | 53,2 | 81,6 | - |
| 95 | | Ac | Ac | Ac | 9,0 | 46,3 | 78,0 | 96,1 |
| 96 (S-1) | Ac | | | | 7,9 | 37,2 | 88,6 | - |
| 97 (S-2) | H | | | | 4,9 | 34,0 | 85,0 | - |
| β-caroteno | | | | | 9,1 | 34,3 | 82,7 | - |

^aLos valores representan el % de inducción de antígenos tempranos del VEB con respecto al control positivo 100% (n=3).^b Relación en moles del compuesto con respecto a la concentración de TPA (32 pmol= 20 ng/mol); 1000= 32 nmol del compuesto, 500= 16 nmol, 100= 3,2 nmol y 10= 0,32 nmol.

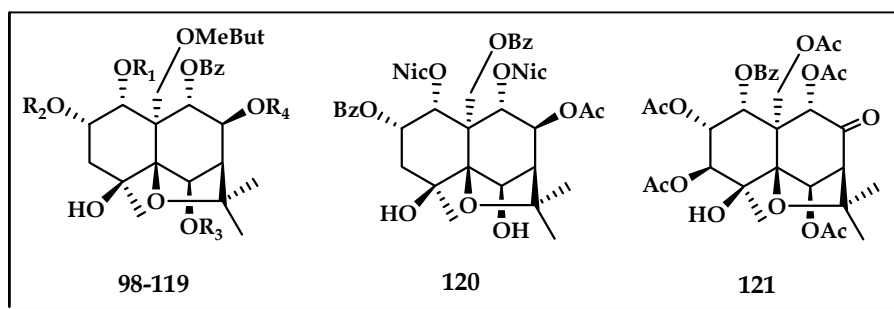


Tabla 6.7. Porcentaje de activación de antígenos tempranos del VEB inducida por el TPA en presencia de los compuestos ensayados respecto a un control positivo^a.

| Sesquiterpeno | Sustituyentes | | | | Concentración (moles/TPA) ^b | | | |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|-------------|-------------|------|
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | 1000 | 500 | 100 | 10 |
| 98 | Ac | Ac | Ac | Ac | 0 | 22,0 | 79,2 | 96,7 |
| 99 | Ac | Bz | Ac | Ac | 4,6 | 33,8 | 75,9 | 96,0 |
| 100 | Ac | Ac | Ac | MeBut | 10,1 | 45,9 | 84,0 | - |
| 101 | Ac | Bz | Bz | MeBut | 17,5 | 51,6 | 88,5 | - |
| 102 | Ac | H | Ac | Ac | 0 | 31,2 | 73,7 | 90,5 |
| 103 | Ac | Ac | H | Ac | 0 | 21,8 | 77,4 | 94,1 |
| 104 | Ac | Ac | H | MeBut | 0 | 25,4 | 85,0 | - |
| 105 | Ac | Nic | H | Ac | 7,0 | 34,2 | 82,3 | - |
| 106 | Ac | H | Bz | MeBut | 15,3 | 50,1 | 87,9 | - |
| 107 | Ac | Ac | H | H | 0 | 32,7 | 74,0 | 90,1 |
| 108 | Ac | H | H | MeBut | 0 | 18,4 | 76,0 | 93,7 |
| 109 | Bz | Ac | Ac | Ac | 10,4 | 46,2 | 85,6 | - |
| 110 | Bz | Bz | Ac | Ac | 14,7 | 49,9 | 87,0 | - |
| 111 | Bz | H | Ac | Ac | 0 | 25,3 | 82,4 | - |
| 112 | Bz | Nic | H | Ac | 7,2 | 33,4 | 87,1 | - |
| 113 | Bz | H | H | Ac | 0 | 21,0 | 79,5 | 95,0 |
| 114 | Nic | Ac | H | Ac | 5,6 | 31,4 | 83,2 | - |
| 115 | Nic | H | Ac | Ac | 8,1 | 35,7 | 84,1 | - |
| 116 | Nic | Nic | H | Ac | 10,2 | 33,3 | 82,1 | - |
| 117 | Nic | H | H | Ac | 2,4 | 28,8 | 81,5 | - |
| 118 | Nic | H | H | MeBut | 5,1 | 30,9 | 85,6 | - |
| 119 | H | Nic | Ac | Ac | 0 | 25,0 | 80,3 | - |
| 120 | | | | | 12,6 | 38,0 | 86,9 | - |
| 121 | | | | | 10,3 | 51,7 | 80,3 | - |
| β-caroteno | | | | | 9,1 | 34,3 | 82,7 | - |

^aLos valores representan el % de inducción de antígenos tempranos del VEB con respecto al control positivo 100% (n=3).^b Relación en moles del compuesto con respecto a la concentración de TPA (32 pmol= 20 ng/mol): 1000= 32 nmol del compuesto, 500= 16 nmol, 100= 3,2 nmol y 10= 0,32 nmol.

6.2.2.1. Estudios SAR

El análisis SAR lo hemos llevado a cabo considerando tres grandes grupos: los compuestos que presentan una actividad inferior al β -caroteno, que es el control positivo en este tipo de ensayos, los que poseen una actividad similar y aquellos que resultaron más activos que dicho control. Cabe destacar que **39** de estos compuestos poseen una **actividad superior al β -caroteno**, incluso a la **concentración más baja ensayada**, según se refleja en las tablas (6.2-6.7). Por otra parte, para dicho estudio nos hemos centrado en los resultados obtenidos en una única concentración, seleccionando la de 100 moles/TPA, dado que en esta concentración existe un mayor rango en la actividad inhibitoria.

Un cuidadoso estudio de los resultados obtenidos nos ha permitido establecer algunas correlaciones entre las estructuras de los compuestos ensayados y su actividad. A continuación resumimos las conclusiones obtenidas en el estudio SAR:

- Los mejores sustituyentes en este tipo de compuestos son los grupos acetatos y los grupos hidroxilos. El intercambio entre ellos no influye en general en la actividad, tal como se observa al comparar: **25 versus 27**; **30 versus 32 y 33**; **43 versus 51**; **45 versus 46 y 50**.
- La comparación entre los compuestos **25 y 44** con **24 y 47**, respectivamente, nos permite concluir que el grupo acetato es mejor sustituyente que el grupo benzoato. De igual modo, se observa que el hidroxilo es mejor grupo que el benzoato (**18 vs 17 y 108 vs 106**), para la expresión de la actividad.
- En general, la presencia de un grupo nicotinato afecta negativamente en la actividad frente a un grupo acetato. Este efecto se puede observar al comparar los compuestos **48 (ONic)** con **44 (OAc)**, **105 (ONic)** con **103 (OAc)**, **114 (ONic)** vs **103 (OAc)** o el compuesto **118 (ONic)** con **108 (OAc)**. Por otro lado, la comparación de los compuestos **48 (ONic)** vs **52 (OH)** y **112 (Nic)** vs **113 (OH)**, muestra la preferencia de un grupo hidroxilo frente a un nicotinato.
- Al comparar los compuestos **11, 18, 44 y 52** con **12, 19, 45 y 50**, respectivamente, podemos deducir que el grupo cinamato influye negativamente en la actividad frente a un grupo benzoato.

- Un éster tipo furoato tiene similar efecto en la actividad inhibitoria que el grupo acetato y/o hidroxilo, en la mayoría de los casos: **22 versus 25, 27; 69 vs 70, 71**. Por tanto, podemos deducir que el furoato, al igual que los grupos acetato e hidroxilo, es mejor sustituyente que el benzoato: **22 versus 24**.

- Los resultados muestran que los ésteres aromáticos (OBz, OCin y ONi), influyen negativamente en la actividad, al compararlos con ésteres alifáticos o grupos hidroxilos, a excepción del grupo furoato que presenta un efecto similar al de un hidroxilo o un acetato.

- Entre los grupos aromáticos, el mejor es el benzoato y en algunos casos, dependiendo de su localización en la molécula, puede que no disminuya radicalmente la actividad. Así, los compuestos que posean tres grupos benzoatos en las posiciones 1, 8 y 9 del esqueleto base del sesquiterpeno, independientemente de su estereoquímica, tienen una actividad moderada (**55 y 79**).

- Por otra parte, la presencia de un grupo benzoato en 6β influye negativamente en la actividad. Así, los compuestos **51 (S-12)** y **70**, que presenta dos o tres benzoatos, uno de ellos en la posición C-6, presentan una actividad inferior al β -caroteno e inferior a los compuestos con un grupo acetato en esta posición, lo que se pone de manifiesto al compararlos con **52 y 72**, respectivamente.

- De igual modo, la presencia de un grupo benzoato en posición 2 influye negativamente en la actividad: **24, 93 y 110 versus 25, 92 y 109**, respectivamente.

- Los resultados también muestran la influencia de la regiosustitución sobre el esqueleto, especialmente sobre las posiciones 1, 2 o 6. Así, por ejemplo, comparando los compuestos **27 y 34** se observa la preferencia de un grupo OH en la posición 2 en lugar de 1. La comparación entre **27 y 31** nos permite deducir la preferencia de un furoato en C-6 más que en C-2 (importancia de un éster en 6).

6.2.2.2. Estudios 3D-QSAR

6.2.2.2.1. Modelo 3D-QSAR de sesquiterpenos como agentes quimiopreventivos

Se llevó a cabo un estudio 3D-QSAR de los 121 sesquiterpenos como inhibidores de la activación del virus Epstein-Barr (tablas 6.2-6.7). Para ello, aplicando la metodología descrita anteriormente, se usó el módulo *Hypogen* del programa Discovery Studio 2.1. El cálculo nos proporcionó diez hipótesis de farmacóforo, siendo la primera (**Hipo 1**) la que mejores valores teóricos y experimentales presentaba:

Costes teóricos: nulo = 200, fijo = 4

Coste total (coste de la hipótesis): 99

r = 0,81, **Configuración** = 15, **RMS** = 1,13

Características farmacofóricas de la hipótesis: 3 grupos aceptores (A), 1 grupo hidrofóbico (H) y 34 volúmenes de exclusión (VE) (figura 6.5)

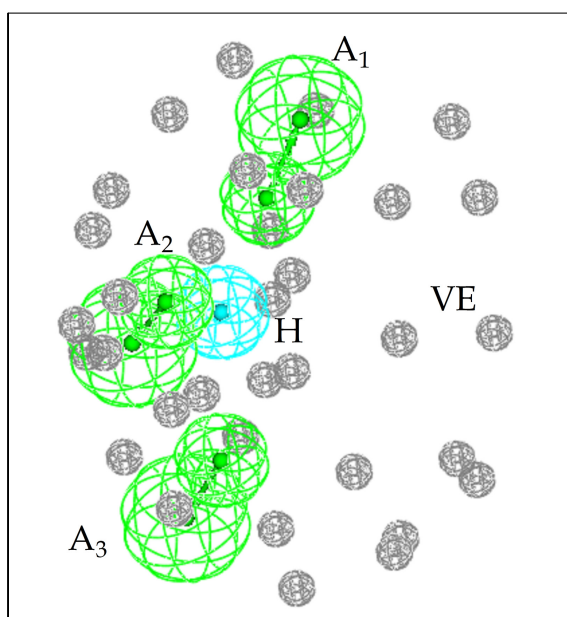


Figura 6.5. Elementos estructurales del ligando claves en la inhibición de la activación del virus Epstein-Barr, obtenidos mediante un análisis 3D-QSAR de generación del farmacóforo con el módulo *Hypogen* del programa Discovery Studio 2.1.

Esferas verdes grandes: zonas del receptor que interaccionan con grupos aceptores de puentes de hidrógeno del ligando.

Esferas verdes pequeñas: grupos aceptores del compuesto que se unen al receptor.

Esfera azul: región del receptor que interacciona con grupos hidrofóbicos del ligando.

Esferas grises: volúmenes de exclusión.

Los resultados indican que existe un 90% de probabilidad de que el modelo obtenido sea un modelo predictivo, puesto que la diferencia entre el coste nulo y el fijo es superior a 60 *bits*. Además, presenta un valor de configuración y error bajo y un valor del coeficiente de correlación **r** relativamente alto.

La actividad inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr (expresada en % de activación) experimental comparada con la calculada se representa en la figura 6.6, observándose, que a pesar de que algunos puntos se alejan de la diagonal, existe una tendencia lineal de todos los datos.

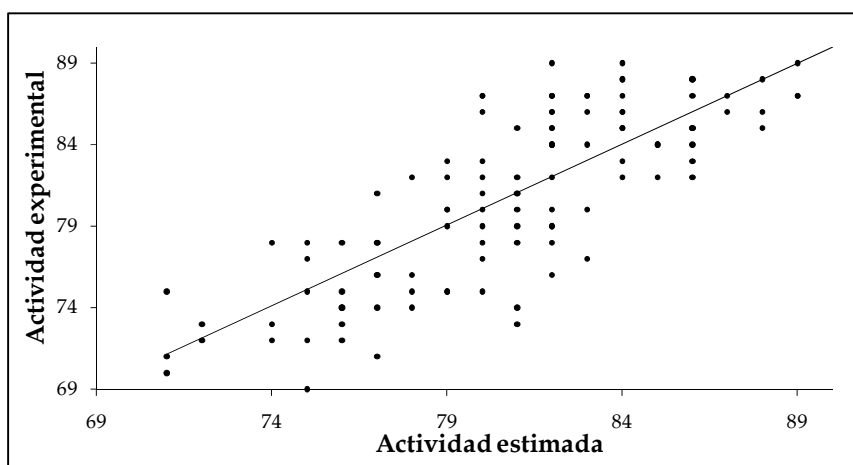


Figura 6.6. Representación de los valores de actividad experimental frente a lo que predice el modelo utilizando la metodología Hypogen.

A continuación presentamos los valores de actividad experimentales y los calculados por la Hipo 1, además de los valores de *fit* para cada compuesto. El valor de *fit* indica lo que se ajusta cada compuesto al modelo calculado. Así, cuanto mejor se ajuste un compuesto al modelo, su valor de *fit* será más próximo al *fit* máximo que proporciona el cálculo.

Tabla 6.8. Porcentaje de activación experimental y calculado por el modelo, de antígenos tempranos del VEB inducido por el TPA en presencia de los sesquiterpenos ensayados respecto a un control positivo^a y valores de "fit" para cada uno de los compuestos.

| Sesquiterpenos | Exp ^b | Calc ^c | <i>fit</i> [*] |
|----------------|------------------|-------------------|-------------------------|
| 1 (S-48) | 85,2 | 83,5 | 0,038 |
| 2 | 83,5 | 81,7 | 0,048 |
| 3 (S-43) | 84,6 | 81,6 | 0,049 |
| 4 (S-45) | 84,3 | 82,0 | 0,046 |
| 5 | 86,3 | 82,7 | 0,043 |
| 6 | 87,6 | 85,5 | 0,028 |
| 7 (S-25) | 89,0 | 81,6 | 0,048 |
| 8 | 82,7 | 80,2 | 0,056 |
| 9 (S-41) | 85,2 | 83,4 | 0,039 |
| 10 | 84,6 | - | - |
| 11 | 80,5 | 82,3 | 0,045 |
| 12 (S-17) | 86,3 | 87,6 | 0,017 |
| 13 (S-18) | 86,2 | 83,4 | 0,039 |
| 14 | 86,8 | 88,9 | 0,011 |

| | | | |
|-----------|------|------|-------|
| 15 (S-40) | 83,9 | 82,6 | 0,043 |
| 16 | 84,6 | 81,5 | 0,049 |
| 17 | 87,0 | 85,9 | 0,026 |
| 18 (S-23) | 81,0 | 80,4 | 0,055 |
| 19 (S-21) | 86,2 | 83,8 | 0,037 |
| 20 (S-22) | 86,0 | 82,1 | 0,046 |
| 21 | 81,4 | 80,2 | 0,056 |
| 22 | 76,9 | 80,6 | 0,053 |
| 23 | 78,0 | 80,0 | 0,064 |
| 24 | 87,1 | 82,8 | 0,042 |
| 25 | 74,8 | 80,0 | 0,057 |
| 26 | 77,9 | 76,8 | 0,075 |
| 27 | 76,7 | 74,6 | 0,087 |
| 28 (S-38) | 83,9 | 84,8 | 0,032 |
| 29 | 87,6 | 84,7 | 0,032 |
| 30 | 71,6 | 71,6 | 0,105 |
| 31 | 85,1 | - | - |
| 32 | 71,1 | 71,3 | 0,107 |
| 33 | 72,4 | 74,7 | 0,086 |
| 34 | 87,8 | 81,0 | 0,060 |
| 35 | 74,0 | 76,0 | 0,079 |
| 36 | 73,5 | 71,5 | 0,106 |
| 37 | 74,6 | 75,6 | 0,081 |
| 38 | 77,9 | 75,2 | 0,084 |
| 39 | 78,5 | 76,0 | 0,079 |
| 40 | 87,1 | 79,5 | 0,060 |
| 41 | 85,2 | 80,4 | 0,055 |
| 42 | 86,3 | 79,5 | 0,060 |
| 43 | 83,1 | 86,0 | 0,025 |
| 44 | 75,2 | 78,4 | 0,066 |
| 45 (S-10) | 87,4 | 83,2 | 0,040 |
| 46 (S-7) | 85,2 | 85,0 | 0,031 |
| 47 | 85,2 | 84,3 | 0,034 |
| 48 (S-14) | 87,6 | 86,0 | 0,038 |
| 49 (S-11) | 89,3 | 89,2 | 0,01 |
| 50 (S-8) | 84,3 | 83,0 | 0,041 |
| 51 (S-12) | 87,1 | 87,4 | 0,018 |
| 52 (S-13) | 77,5 | 73,7 | 0,092 |
| 53 (S-9) | 85,2 | 86,0 | 0,025 |
| 54 (S-16) | 79,3 | 82,3 | 0,044 |
| 55 | 78,3 | 82,3 | 0,045 |
| 56 (S-15) | 87,0 | 80,0 | 0,057 |
| 57 | 79,0 | 82,4 | 0,044 |
| 58 | 84,1 | 85,5 | 0,028 |
| 59 | 87,0 | - | - |
| 60 (S-5) | 76,3 | 78,2 | 0,067 |
| 61 (S-4) | 79,5 | 83,1 | 0,040 |
| 62 | 77,9 | 81,1 | 0,051 |
| 63 (S-6) | 87,7 | 83,5 | 0,038 |
| 64 | 73,0 | 81,2 | 0,051 |
| 65 | 84,5 | 85,5 | 0,028 |

| | | | |
|-----------|------|------|-------|
| 66 | 86,4 | 83,4 | 0,039 |
| 67 | 82,1 | 86,0 | 0,025 |
| 68 | 86,0 | - | - |
| 69 | 72,0 | 73,2 | 0,095 |
| 70 | 86,9 | 81,6 | 0,049 |
| 71 (S-26) | 81,9 | 78,3 | 0,066 |
| 72 | 75,4 | 77,9 | 0,068 |
| 73 (S-30) | 82,2 | 81,8 | 0,047 |
| 74 | 74,9 | 70,4 | 0,112 |
| 75 | 78,9 | 79,8 | 0,058 |
| 76 | 72,8 | 76,7 | 0,069 |
| 77 | 75,1 | 78,3 | 0,066 |
| 78 | 75,6 | 76,9 | 0,074 |
| 79 | 79,2 | 78,7 | 0,064 |
| 80 | 74,9 | 74,7 | 0,087 |
| 81 | 70,0 | 70,7 | 0,110 |
| 82 | 69,2 | 74,3 | 0,089 |
| 83 | 72,0 | 75,7 | 0,081 |
| 84 | 82,6 | 78,8 | 0,063 |
| 85 | 73,9 | 76,0 | 0,079 |
| 86 | 86,7 | 83,0 | 0,041 |
| 87 | 81,1 | 76,3 | 0,077 |
| 88 | 73,9 | 77,5 | 0,077 |
| 89 | 72,6 | 73,7 | 0,092 |
| 90 | 71,4 | 76,6 | 0,076 |
| 91 | 81,3 | 80,7 | 0,053 |
| 92 | 80,0 | 80,4 | 0,055 |
| 93 | 83,5 | 82,3 | 0,044 |
| 94 | 81,6 | 77,9 | 0,069 |
| 95 | 78,0 | 76,5 | 0,076 |
| 96 (S-1) | 88,6 | 83,7 | 0,037 |
| 97 (S-2) | 85,0 | 88,3 | 0,014 |
| 98 | 79,2 | 81,6 | 0,049 |
| 99 | 75,9 | 76,4 | 0,077 |
| 100 | 84,0 | - | - |
| 101 | 88,5 | 91,0 | 0,00 |
| 102 | 73,7 | 76,6 | 0,076 |
| 103 | 77,4 | 82,9 | 0,047 |
| 104 | 85,0 | 85,9 | 0,026 |
| 105 | 82,3 | 84,2 | 0,035 |
| 106 | 87,9 | 87,0 | 0,021 |
| 107 | 74,0 | 80,4 | 0,055 |
| 108 | 76,0 | 77,3 | 0,072 |
| 109 | 85,6 | 86,6 | 0,023 |
| 110 | 87,0 | 88,4 | 0,013 |
| 111 | 82,4 | 80,5 | 0,054 |
| 112 | 87,1 | 81,6 | 0,058 |
| 113 | 79,5 | 81,4 | 0,049 |
| 114 | 83,2 | 84,1 | 0,035 |
| 115 | 84,1 | 85,1 | 0,030 |
| 116 | 82,1 | 84,0 | 0,031 |

| | | | |
|------------|------|------|-------|
| 117 | 81,5 | 79,6 | 0,059 |
| 118 | 85,6 | 82,1 | 0,046 |
| 119 | 80,3 | 80,0 | 0,057 |
| 120 | 86,9 | 81,7 | 0,048 |
| 121 | 80,3 | 78,3 | 0,066 |

^aLos valores representan el % de inducción de antígenos tempranos del VEB con respecto al control positivo 100% ($n=3$).^b Actividad experimental empleando una relación en moles del metabolito con respecto a la concentración de TPA ($32 \mu\text{mol} = 20 \text{ ng/mol}$): $100 = 3,2 \text{ nmol}$.^c Actividad calculada por el modelo. (-) metabolitos no incluidos en el modelo.* Máximo valor de fit posible, 0,119.

Al hacer el mapeo de todos los compuestos utilizados para generar el modelo, obtenemos un valor de *fit* máximo posible de 0,119, de tal forma que un valor próximo a éste, indicaría un mayor ajuste de un determinado compuesto al modelo. Cabe destacar que no todos los sesquiterpenos se unen al receptor a través de las mismas posiciones. Así, para el compuesto más activo (**82**) el modelo calcula una *fit* de 0,112 y se une al receptor por los cuatro puntos de interacción que constituyen el farmacóforo a través de las posiciones 1, 4, 6 y 11 del esqueleto carbonado. Sin embargo, el compuesto menos activo (**49**) no es capaz de unirse al receptor a través de todos los puntos, sino mediante dos aceptores y a través de las posiciones 2 y 6. Además, no es capaz de aproximarse de forma adecuada para ajustarse correctamente a los grupos aceptores del receptor, presentando un valor de *fit* de 0,01.

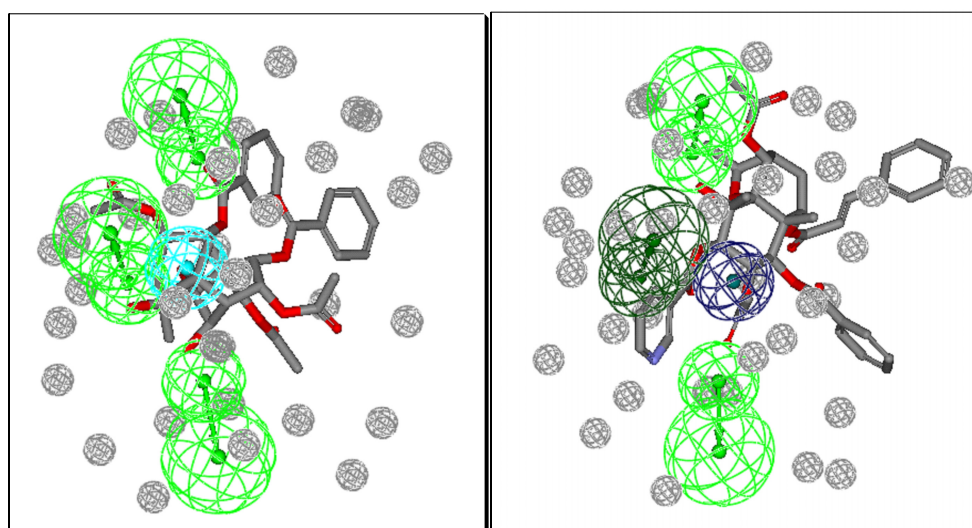


Figura 6.7. Mapeo del compuesto **82** (izquierda) y **49** (S-11) (derecha) en el modelo.

- grupos aceptores del modelo que se ajustan al sesquiterpeno
- grupos aceptores del modelo que no se ajustan al sesquiterpeno
- grupos hidrofóbicos del modelo que se ajustan al sesquiterpeno
- grupos hidrofóbicos del modelo que no se ajustan al sesquiterpeno

Validación de la hipótesis:

Para evaluar la relevancia estadística de la hipótesis hemos utilizado el ***Test de validación de Fisher***²⁸. El propósito de esta técnica es randomizar los datos de actividad asociados con el grupo de compuestos, y el grupo randomizado se usa para generar las hipótesis, considerando los mismos parámetros usados para generar la hipótesis que pretendemos validar. Si los valores de los costes y de **r** de estas hipótesis calculadas son menores o mayores, respectivamente, que los de la hipótesis que tratamos de validar, entonces se concluye que ésta fue obtenida al azar, en cuyo caso la hipótesis se descarta.

El significado estadístico de la hipótesis obtenida viene dado por la ecuación siguiente:

$$[1 - (1 - x)/y] \cdot 100 \quad x = \text{n}^\circ \text{ de hipótesis que tienen un coste total menor que la hipótesis original}$$

$$y = \text{hipótesis original} + \text{el n}^\circ \text{ de hipótesis arbitrarias}$$

Realizamos el test con 19 cálculos, obteniendo un nivel de confianza del 95%, ya que el coste total y el valor de **r** de todas las hipótesis randomizadas han sido en todo los casos superior e inferior, respectivamente, al de la Hipo 1 (figuras 6.8 y 6.9), indicando que dicho modelo es válido.

Así, en las figuras 6.8 y 6.9 observamos que ninguna de las 19 hipótesis "random" presentaron valores de los costes inferiores ni valores de **r** superiores al de la Hipo 1. Estos datos indican que hay un 95% de probabilidad de que la Hipo 1 correlacione correctamente los datos de actividad con la estructura.

Estos datos nos permiten concluir que el modelo 3D-QSAR obtenido es válido para sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos como agentes quimiopreventivos.

²⁸ Fischer, R. The Principle of Experimentation, Illustrated by a Psycho-Physical Experiment. In *The Design of Experiments*, 8 th ed. Hafner Publishing Co. New York, 1966, Chapt. II.

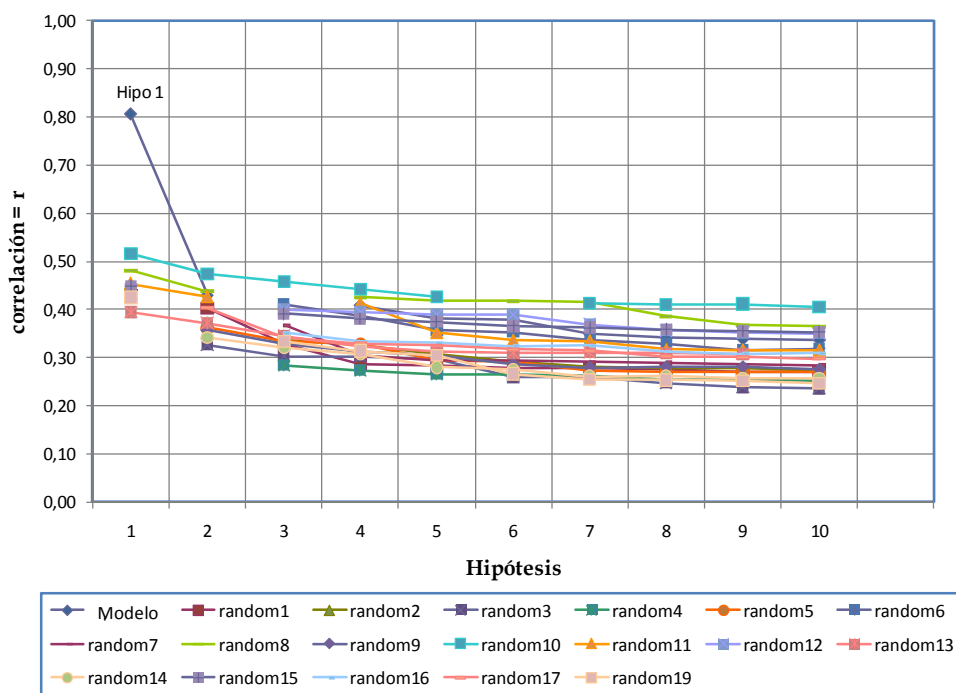


Figura 6.8. Representación de los valores de r de nuestras hipótesis y cada una de las hipótesis del ensayo

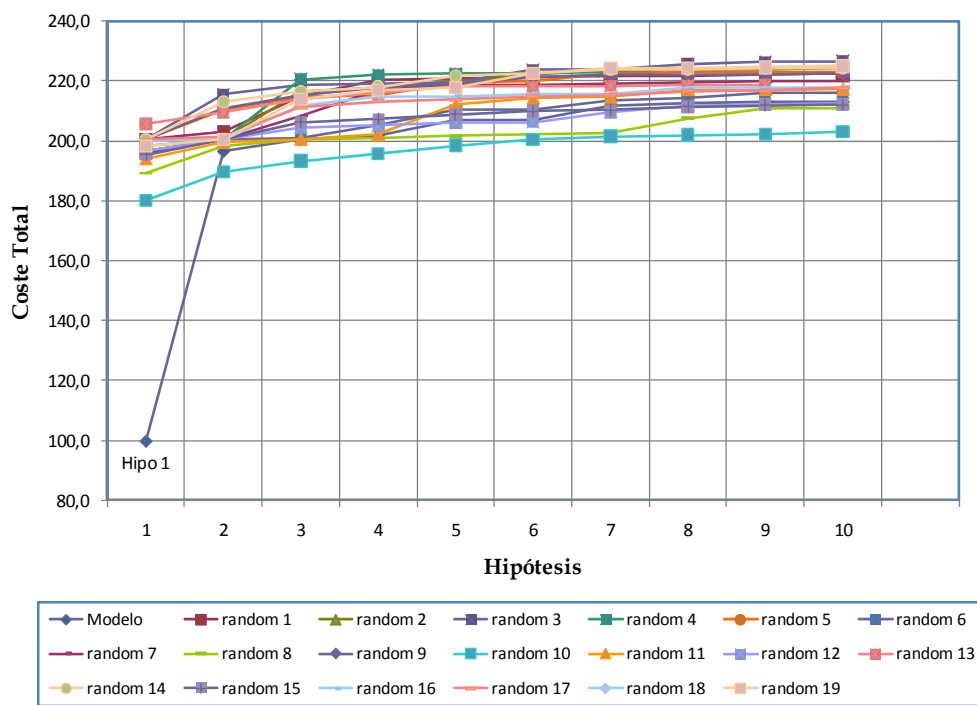


Figura 6.9. Representación de los valores de los costes de nuestras hipótesis y de cada una de las hipótesis del ensayo

Por tanto, el análisis del modelo 3D-QSAR obtenido haciendo uso del módulo *Hypogen* del programa *Discovery Studio 2.1*, nos permite extraer las siguientes conclusiones:

1. El sesquiterpeno ideal como inhibidor de la activación del VEB debe presentar como características estructurales indispensables tres grupos aceptores de hidrógeno y un grupo hidrofóbico.

2. Los compuestos más potentes como inhibidores de este virus interactúan con el receptor a través de los sustituyentes sobre los carbonos 1 ó 2, 4, 6 y 11 del esqueleto sesquiterpénico. Las posiciones 1 ó 2, 4 y 6 requerirán un grupo aceptor y el grupo hidrofóbico debe estar sobre C-11.

3. La regiosustitución afecta de forma significativa cuando participan las posiciones 1 y 2. Esto se pone de manifiesto en el siguiente ejemplo: **27** (OAc-1, OH-2) *vs* **34** (OAc-2, OH-1). Así, el compuesto más activo, **27**, es capaz de ajustarse al modelo a través de los sustituyentes sobre los carbonos 4, 6 y 11 del esqueleto sesquiterpénico; sin embargo, el compuesto **34** sólo es capaz de interactuar con el receptor a través de las posiciones 4 y 11 (figura 6.10).

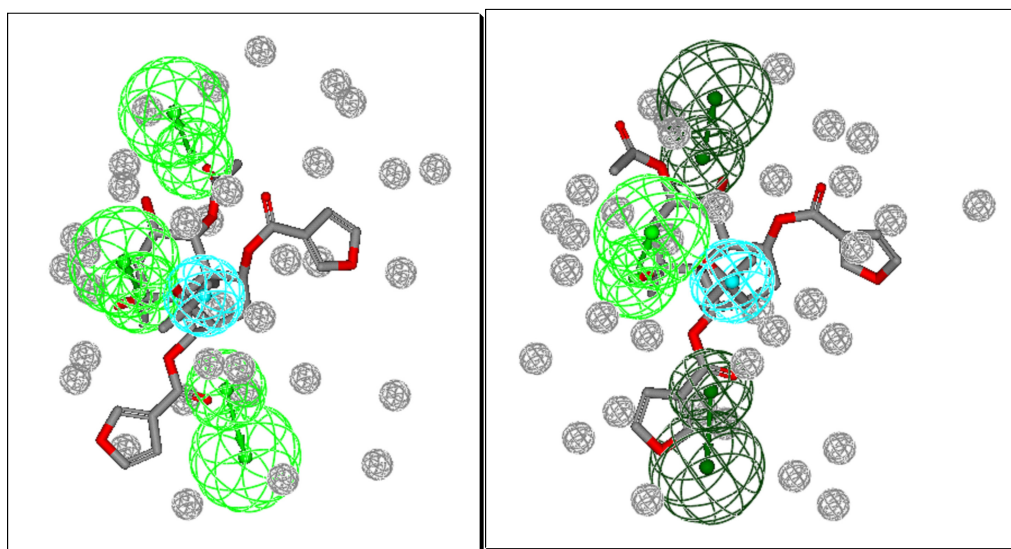


Figura 6.10. Mapeo del compuesto **27** (izquierda) y **34** (derecha) en el modelo.

4. La presencia de tres grupos benzoatos en las posiciones 1, 2 y 9 ó 1, 6 y 9 influye negativamente en la actividad puesto que impide que el receptor se aproxime a la posición requerida 1 ó 6 y deba buscar otros puntos de interacción donde el efecto estérico no sea tan significativo, como ocurre en los siguientes sesquiterpenos (**65**, **66**, **93**, **109**, **43**, **51**). Esto no ocurre cuando los grupos benzoato se localizan en las posiciones 1, 8 y 9 (**55**, **67** y **79**). Por tanto, podemos concluir que las posiciones 2 y 6 no “admiten” un grupo benzoato cuando hay otros dos en posiciones 1 y 9.

6.2.2.2. Modelo 3D-QSAR de agentes quimiopreventivos descritos en la bibliografía química

Los resultados obtenidos en el estudio 3D-QSAR de los sesquiterpenos agarofuránicos, nos permitió obtener un modelo de farmacóforo válido para dichos compuestos, con un alto valor estadístico. Por ello, decidimos realizar una revisión bibliográfica de compuestos descritos como agentes quimiopreventivos y realizar un modelo 3D-QSAR con dicho compuestos, con el fin de comparar ambos modelos.

Así, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de productos naturales y derivados semisintéticos, diferentes estructuralmente a los sesquiterpenos y descritos como inhibidores de la activación del virus Epstein-Barr, búsqueda que dio como resultado un grupo de 58 compuestos con una amplia variedad de características estructurales, resultando así idóneo para el estudio que nos proponemos (C1-C7²⁹, C8³⁰, C9-C14³¹, C15-C23³², C24-C41³³, C42³⁴, C43-C46³⁵, C47-C48³⁶, C49-C50³⁷, C51³⁸, C52³⁹, C53-C56⁴⁰, C57-C58⁴¹) (figura 6.11).

²⁹ Takasaki, M.; Konoshima, T.; Yasuda, I.; Hamano, T.; Tokuda, H. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 776-780.

³⁰ Tamura, S.; Fukamiya, N.; Okano, M.; Tokuda, H.; Aoi, W.; Mukainaka, T.; Nishino, H.; Tagahara, K.; Koike, K. *Cancer Lett.* **2002**, *185*, 47-51.

³¹ Akihisa, T.; Hamasaki, Y.; Tokuda, H.; Ukiya, M.; Kimura, Y.; Nishino, H. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 407-410.

³² Uesato, S.; Taniuchi, K.; Kumagai, A.; Nagaoka, Y.; Seto, R.; Hara, Y.; Tokuda, H.; Nishino, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 1448-1450.

³³ Itoigawa, M.; Ito, C.; Wu, T. S.; Enjo, F.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Furukawa, H. *Cancer Lett.* **2003**, *193*, 133-138.

³⁴ Itoigawa, M.; Ito, C.; Ju, M.; Nobukuni, T.; Ichiishi, E.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Furukawa, H. *Cancer Lett.* **2002**, *176*, 25-29.

³⁵ Akihisa, T.; Tokuda, H.; Ukiya, M.; Iizuka, M.; Schneider, S.; Ogasawara, K.; Mukainaka, T.; Iwatsuki, K.; Susuki, T.; Nishino, H. *Cancer Lett.* **2003**, *201*, 133-137.

³⁶ Minami, T.; Wada, S. I.; Tokuda, H.; Tanabe, G.; Muraoka, O.; Tanaka, R. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1921-1923.

³⁷ Itoigawa, M.; Ito, C.; Tokuda, H.; Enjo, F.; Nishino, H.; Furukawa, H. *Cancer Lett.* **2004**, *214*, 165-169.

³⁸ Colombo, D.; Franchini, L.; Toma, L.; Ronchetti, F.; Nakabe, N.; Konoshima, T.; Nishino, H.; Tokuda, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 69-74.

³⁹ Tanaka, R.; Shanmugasundaram, K.; Tamaguchi, C.; Ishikawa, Y.; Tokuda, H.; Nishide, K.; Node, M. *Cancer Lett.* **2004**, *214*, 149-156.

⁴⁰ Diallo, B.; Vanhaelen, M.; Fastre, V. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 879-881.

⁴¹ Ishida, J.; Kozuka, M.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Nagumo, S.; Lee, K. H.; Nagai, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *10*, 3361-3365.

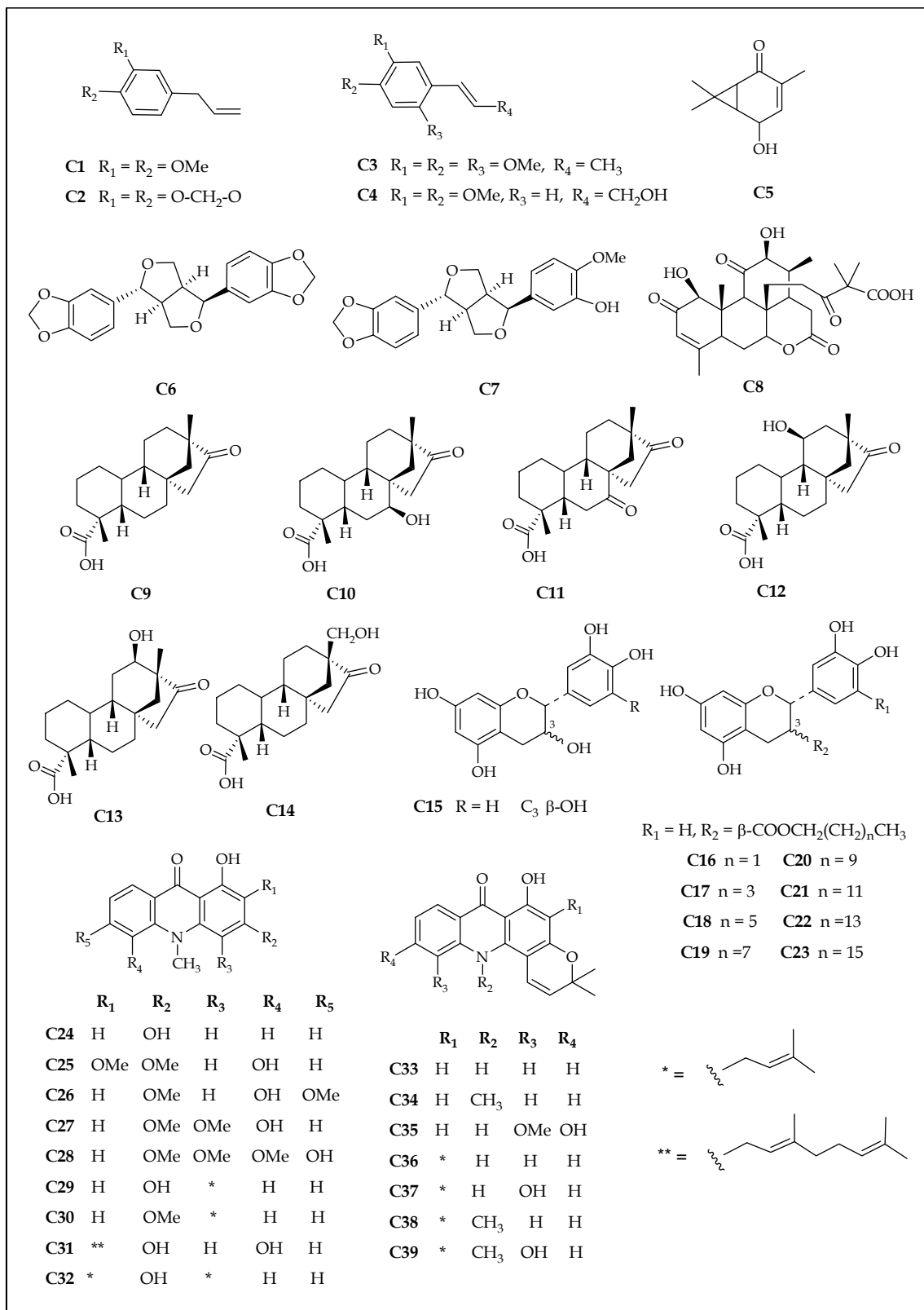


Figura 6.11. Estructuras de los compuestos de la bibliografía descritos como inhibidores de la activación del virus Epstein-Barr.

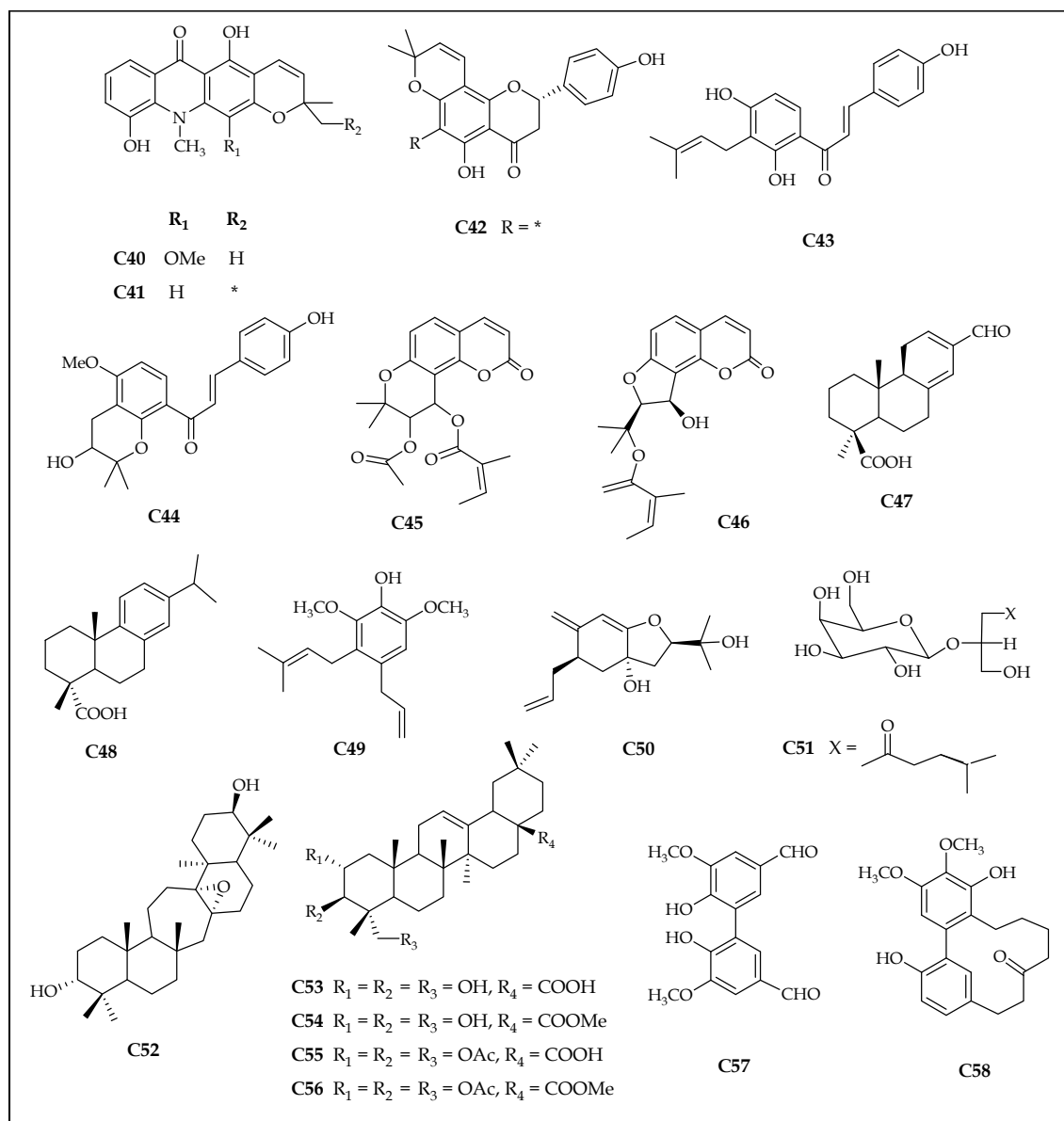


Figura 6.11. (continuación).

Tabla 6.9. Porcentaje de activación de antígenos tempranos del VEB inducida por el TPA en presencia de los compuestos evaluados respecto a un control positivo^a.

| Compuesto | Concentración (moles/TPA) ^b | | | |
|-----------|--|------|-------------|------|
| | 1000 | 500 | 100 | 10 |
| C1 | 0,0 | 62,9 | 89,4 | 100 |
| C2 | 0,0 | 50,4 | 84,6 | 100 |
| C3 | 24,7 | 80,1 | 100 | 100 |
| C4 | 0,0 | 26,7 | 90,1 | 100 |
| C5 | 18,4 | 44,2 | 87,3 | 100 |
| C6 | 0,0 | 29,8 | 66,7 | 92,4 |
| C7 | 0,0 | 21,5 | 62,3 | 100 |

| | | | | |
|-----|------|------|------|------|
| C8 | 5,9 | 35,7 | 70,6 | 92,9 |
| C9 | 12,3 | 46,7 | 80,0 | 98,8 |
| C10 | 6,9 | 41,7 | 76,3 | 94,6 |
| C11 | 7,4 | 35,1 | 72,3 | 94,5 |
| C12 | 4,0 | 39,8 | 74,1 | 91,0 |
| C13 | 5,7 | 40,0 | 75,1 | 93,2 |
| C14 | 8,2 | 42,6 | 77,0 | 95,7 |
| C15 | 21,6 | 46,2 | 75,9 | 100 |
| C16 | 19,3 | 44,0 | 73,4 | 94,4 |
| C17 | 12,9 | 41,8 | 71,8 | 94,9 |
| C18 | 8,8 | 39,5 | 69,7 | 91,9 |
| C19 | 10,7 | 41,9 | 71,2 | 93,6 |
| C20 | 16,4 | 46,9 | 75,7 | 100 |
| C21 | 19,8 | 46,0 | 78,1 | 100 |
| C22 | 22,6 | 47,3 | 77,1 | 100 |
| C23 | 25,1 | 49,6 | 81,4 | 100 |
| C24 | 11,3 | 36,6 | 78,2 | 100 |
| C25 | 0,0 | 37,4 | 72,7 | 93,1 |
| C26 | 9,3 | 33,6 | 71,2 | 100 |
| C27 | 8,0 | 27,6 | 69,3 | 100 |
| C28 | 7,6 | 35,2 | 77,2 | 100 |
| C29 | 3,2 | 24,8 | 67,3 | 93,6 |
| C30 | 3,2 | 24,2 | 66,6 | 96,4 |
| C31 | 9,3 | 36,9 | 78,3 | 100 |
| C32 | 0,0 | 23,1 | 65,5 | 92,0 |
| C33 | 6,7 | 40,3 | 73,2 | 95,8 |
| C34 | 8,9 | 47,2 | 77,3 | 96,0 |
| C35 | 6,7 | 33,2 | 75,3 | 100 |
| C36 | 2,9 | 23,9 | 66,4 | 90,5 |
| C37 | 4,9 | 25,4 | 65,7 | 100 |
| C38 | 6,9 | 28,2 | 69,4 | 100 |
| C39 | 6,6 | 26,1 | 68,7 | 100 |
| C40 | 10,7 | 35,5 | 70,1 | 100 |
| C41 | 9,0 | 35,4 | 71,7 | 100 |
| C42 | 0,0 | 32,2 | 69,4 | 89,8 |
| C43 | 0,0 | 16,3 | 63,0 | 88,4 |
| C44 | 5,3 | 32,4 | 71,5 | 95,0 |
| C45 | 4,3 | 41,0 | 72,4 | 93,2 |
| C46 | 3,5 | 40,3 | 71,7 | 93,0 |
| C47 | 0,0 | 31,4 | 68,5 | 91,4 |
| C48 | 2,9 | 32,7 | 69,8 | 97,9 |
| C49 | 0,0 | 22,2 | 61,1 | 79,7 |
| C50 | 3,0 | 27,9 | 67,8 | 91,7 |
| C51 | 0,0 | 8,9 | 25,2 | 65,0 |
| C52 | 0,0 | 21,3 | 68,4 | 82,7 |
| C53 | 18,5 | 38,4 | 85,9 | 100 |

| | | | | |
|------------------------------------|------------|-------------|-------------|------------|
| C54 | 11,4 | 47,1 | 79,4 | 100 |
| C55 | 0,0 | 0,0 | 34,3 | 42,7 |
| C56 | 0,0 | 0,0 | 26,6 | 45,1 |
| C57 | 9,5 | 43,2 | 72,4 | 100 |
| C58 | 5,7 | 33,7 | 75,9 | 100 |
| β-caroteno | 9,1 | 34,3 | 82,7 | 100 |

^aLos valores representan el % de inducción de antígenos tempranos del VEB con respecto al control positivo 100% (n=3).^b Relación en moles del compuesto con respecto a la concentración de TPA (32 pmol= 20 ng/mol): 1000= 32 nmol del compuesto, 500= 16 nmol, 100= 3,2 nmol y 10= 0,32 nmol.

Con esta quimioteca de compuestos hemos realizado un estudio 3D-QSAR, siguiendo la misma metodología usada con los sesquiterpenos agarofuránicos aislados de *M. jelskii* y otras celastráceas, utilizando el modulo *Hypogen* del programa Discovery Studio 2.1.

El cálculo llevado a cabo nos permitió obtener un modelo, que hemos denominado **Hipo 2** (figura 6.12), con un alto valor estadístico y cuyos valores teóricos y experimentales son los siguientes:

Costes teóricos: nulo = 217, fijo = 70

Coste total (coste de la hipótesis): 108

r = 0,92, **Configuración** = 18, **RMS** = 0,96

Las características farmacofóricas de la hipótesis generada incluyen: 3 grupos aceptores (A), 1 grupo hidrofóbico (H) y 12 volúmenes de exclusión (VE).

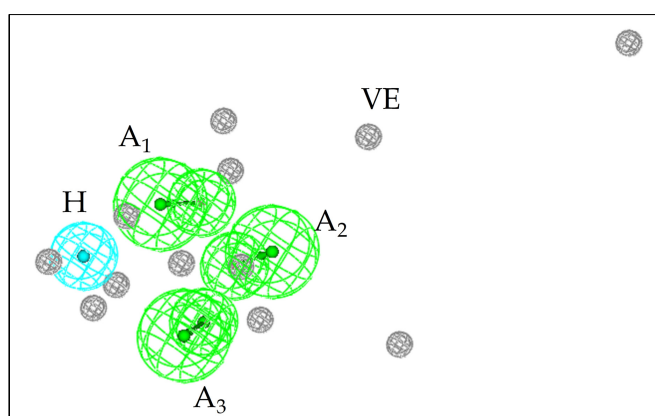


Figura 6.12. Elementos estructurales del ligando que son claves en la inhibición de la activación del virus Epstein-Barr, obtenidos mediante un análisis 3D-QSAR de generación del farmacóforo.

Este modelo presenta un elevado valor de **r** (coeficiente de regresión), lo que indicaría una buena correlación entre los datos experimentales y calculados por el

modelo. Además, presenta una diferencia entre los costes nulo y fijo superior a 60 bits, indicando un 90% de probabilidad de que el modelo sea predictivo.

Los valores de actividad en % obtenidos experimentalmente, así como los calculados por el modelo **Hipo 2** se representan en la figura 6.13 y están recogidos en la tabla 6.10.

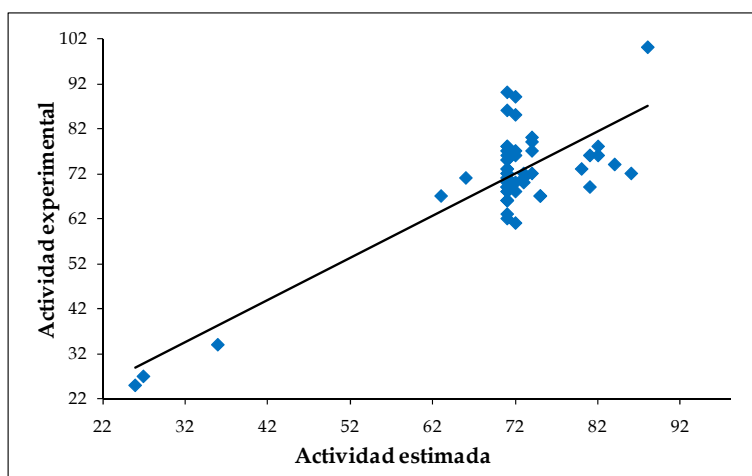


Figura 6.13. Representación de los valores de actividad experimental frente a la que predice el modelo, utilizando la metodología Hypogen.

Tabla 6.10. Porcentaje de activación de AT-VEB inducida por el TPA de los compuestos ensayados respecto a un control positivo (experimental y calculada)^a.

| Compuestos | Exp ^b | Calc ^c |
|------------|------------------|-------------------|
| C1 | 89,4 | 71,8 |
| C2 | 84,6 | 72,1 |
| C3 | 100 | 88,6 |
| C4 | 90,1 | 70,8 |
| C5 | 87,3 | - |
| C6 | 66,7 | 62,8 |
| C7 | 62,3 | 70,9 |
| C8 | 70,6 | 70,9 |
| C9 | 80,0 | 74,3 |
| C10 | 76,3 | 81,7 |
| C11 | 72,3 | 86,1 |
| C12 | 74,1 | 83,9 |
| C13 | 75,1 | 71,5 |
| C14 | 77,0 | 71,9 |
| C15 | 75,9 | 81,7 |
| C16 | 73,4 | 70,9 |
| C17 | 71,8 | 71,1 |

| | | |
|-----|------|------|
| C18 | 69,7 | 70,9 |
| C19 | 71,2 | 65,9 |
| C20 | 75,7 | 71,5 |
| C21 | 78,1 | 70,8 |
| C22 | 77,1 | 70,8 |
| C23 | 81,4 | - |
| C24 | 78,2 | 82,6 |
| C25 | 72,7 | 80,0 |
| C26 | 71,2 | 73,7 |
| C27 | 69,3 | 81,4 |
| C28 | 77,2 | 74,4 |
| C29 | 67,3 | 74,8 |
| C30 | 66,6 | 75,2 |
| C31 | 78,3 | 70,8 |
| C32 | 65,5 | 71,2 |
| C33 | 73,2 | 71,5 |
| C34 | 77,3 | 71,6 |
| C35 | 75,3 | 70,9 |
| C36 | 66,4 | 71,4 |
| C37 | 65,7 | 70,9 |
| C38 | 69,4 | 71,5 |
| C39 | 68,7 | 71,3 |
| C40 | 70,1 | 73,3 |
| C41 | 71,7 | 73,0 |
| C42 | 69,4 | 70,9 |
| C43 | 63,0 | 71,1 |
| C44 | 71,5 | 70,9 |
| C45 | 72,4 | - |
| C46 | 71,7 | 71,0 |
| C47 | 68,5 | 71,9 |
| C48 | 69,8 | 73,0 |
| C49 | 61,1 | 72,5 |
| C50 | 67,8 | 70,9 |
| C51 | 25,2 | 26,0 |
| C52 | 68,4 | 71,0 |
| C53 | 85,9 | 71,1 |
| C54 | 79,4 | 74,6 |
| C55 | 34,3 | 36,0 |
| C56 | 26,6 | 27,2 |
| C57 | 72,4 | 74,1 |
| C58 | 75,9 | 71,8 |

^aLos valores representan el % de inducción de antígenos tempranos del VEB con respecto al control positivo 100% (n=3). ^b Actividad experimental empleando una relación en moles del compuesto con respecto a la concentración de TPA (32 pmol= 20 ng/mol): 100= 3,2 nmol. ^c Actividad calculada por el modelo.(-) compuestos no incluidos en el estudio 3D-QSAR.

Se determinó el ajuste de los 58 compuestos al modelo obtenido, es decir, se llevó a cabo el mapeo de los mismos. El compuesto con mayor % de inhibición (**C51**) se ajusta al modelo **Hipo 2** (figura 6.14) a través de las cuatro características farmacofóricas del mismo, mientras que el compuesto menos activo (**C3**) sólo es capaz de unirse a través de dos de las características farmacofóricas del modelo (un grupo aceptor y un hidrofóbico).

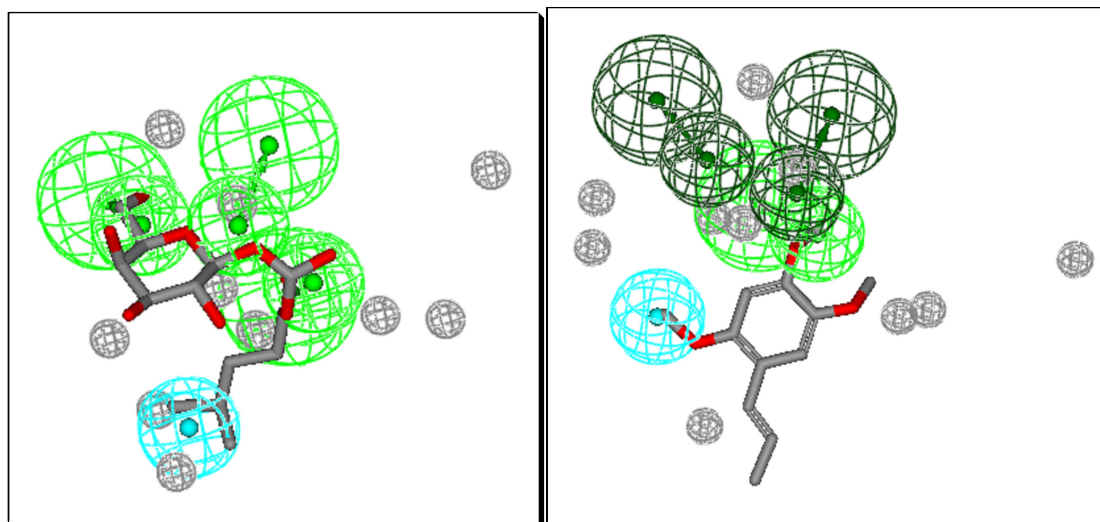


Figura 6.14. Mapeo del compuesto C51 (izquierda) y C3 (derecha) en el modelo Hipo 2.

Con esta información podemos concluir que el modelo obtenido permitiría predecir con una alta probabilidad, la actividad inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr de cualquier compuesto. Así, un compuesto presentaría actividad, siempre y cuando posea las características estructurales requeridas para la expresión de dicha actividad según predice el modelo.

Validación de la hipótesis:

Para evaluar la relevancia estadística de la hipótesis obtenida (**Hipo 2**) hemos utilizado la misma metodología que empleamos para la validación del modelo de los sesquiterpenos: **Test de validación de Fisher**. Al validar la Hipo 2, realizamos el test con 19 cálculos y dos de ellos proporcionaron hipótesis con un coste total menor al de la hipótesis inicial, obteniendo un nivel de confianza del 85% (figura 6.16). Por otro lado, como se muestra en la figura 6.15, ninguna de las hipótesis randomizadas posee un valor de r (correlación) mayor al de la Hipo 2. Estos datos indican que la hipótesis Hipo 2 es válida y que existe un 85% de probabilidad de

de que correlacione correctamente los datos de actividad con la estructura. Cabe destacar que las diez hipótesis proporcionadas por el módulo *Hypogen* poseen un 85% de confianza, indicando que los modelos no son creados al azar y que poseen una alta significancia estadística.

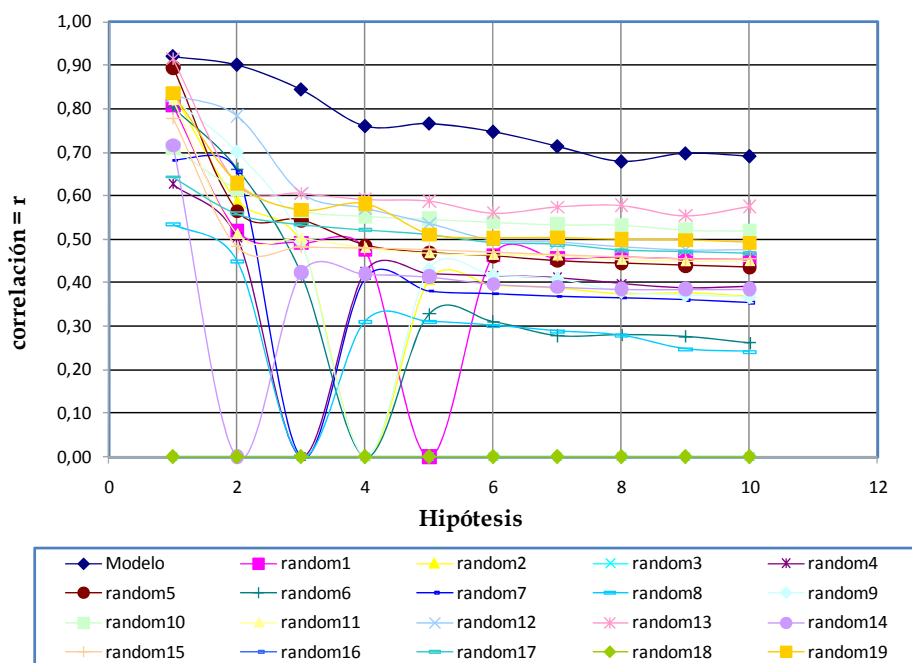


Figura 6.15. Representación de los valores de *r* de nuestras hipótesis y de cada una de las hipótesis del ensayo

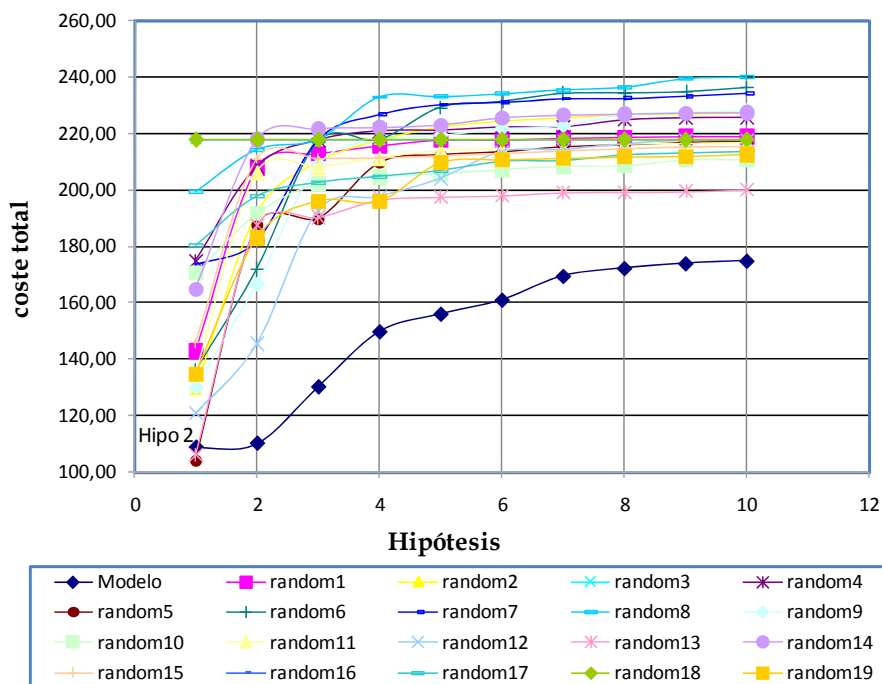


Figura 6.16. Representación de los valores del *coste total* de nuestras hipótesis y de cada una de las hipótesis del ensayo

6.2.2.2.3. Comparación de los modelos 3D-QSAR obtenidos con los sesquiterpenos y los compuestos de la bibliografía

Se llevó a cabo la comparación de los modelos 3D-QSAR obtenidos con los sesquiterpenos (**Hipo 1**) y con los compuestos de la bibliografía (**Hipo 2**), utilizando el módulo de comparación de farmacóforos del programa Discovery Studio 2.1. Los resultados obtenidos, indican que, a pesar de presentar disposiciones espaciales de las características farmacofóricas diferentes, existe una correlación entre ambos modelos, presentando tres de estas características coincidencia en posición y orientación.

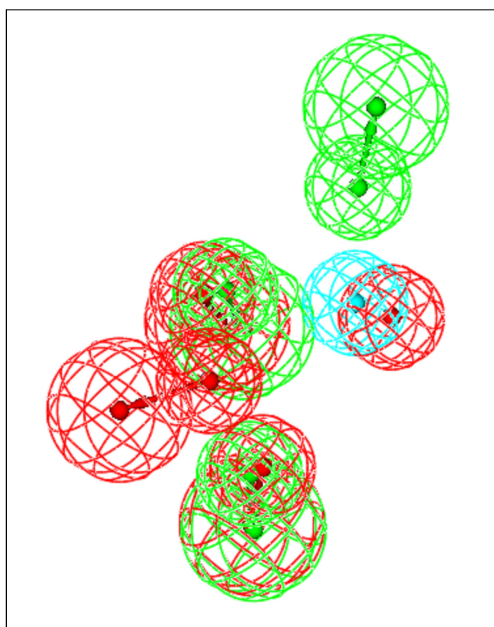


Figura 6.17. Comparación de Hipo 1 (verde y azul) con Hipo 2 (rojo).

Por lo tanto, el programa es capaz de encontrar, para los compuestos de la bibliografía, distancias entre dos de los grupos aceptores y el grupo hidrofóbico del modelo similares a las obtenidas en el modelo de los sesquiterpenos, existiendo, por tanto, una concordancia entre los resultados obtenidos entre ambos modelos.

Además, el mapeo de los compuestos de la bibliografía en el modelo obtenido para los sesquiterpenos (**Hipo 1**) nos indica que 40 de los 58 compuestos son capaces de ajustarse a éste. Por otra parte, en el mapeo de los sesquiterpenos en el modelo obtenido para los compuestos de la bibliografía (**Hipo 2**) encontramos que 113 de los 121 sesquiterpenos son capaces de ajustarse al mismo (figura 6.18).

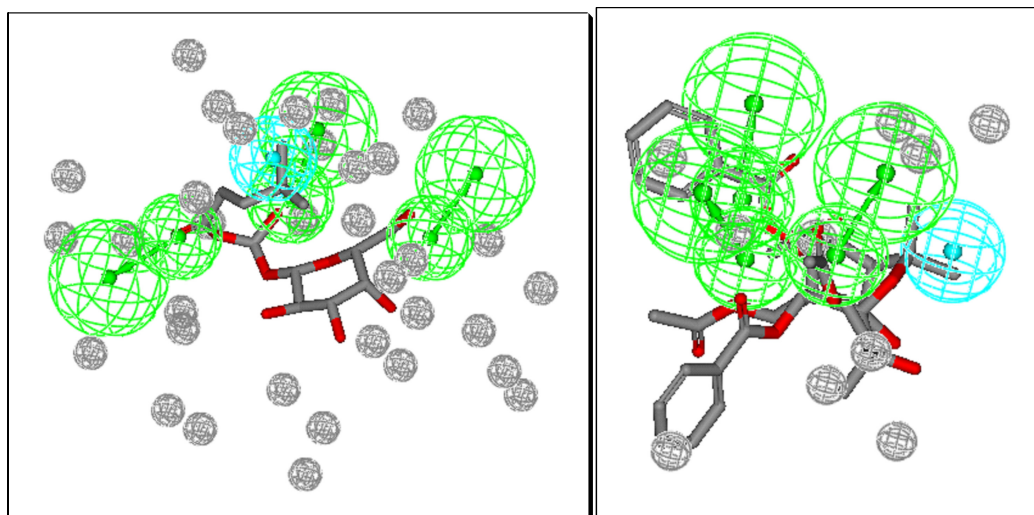


Figura 6.18. Mapeo del compuesto C51 en Hipo 1 (izquierda) y de 82 en Hipo 2 (derecha).

Estos datos nos indican que el modelo específico para los sesquiterpenos y que discriminaría entre unos compuestos y otros, sería, evidentemente, el modelo obtenido **Hipo 1**. Sin embargo, el modelo **Hipo 2**, obtenido con los compuestos de la bibliografía podría considerarse como un farmacóforo general para cualquier tipo de compuesto, ya que, incluso, los sesquiterpenos son capaces de ajustarse a éste.



7. Técnicas experimentales

7. Técnicas experimentales

7.1. Técnicas espectroscópicas y espectrométricas

7.1.1 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 con 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 HSQC editado, HSQC-HECADE,⁴ HMBC, J -HMBC⁵ y ROESY⁶ 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.

7.1.2. 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

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 Kozminski, W.; Nanz, D. *J. Magn. Reson.* **2000**, *142*, 294-299.

⁵ Meissner, A.; Sorensen, O. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 49-52.

⁶ Bax, A.; Davis, D. G. *J. Magn. Reson.* **1985**, *63*, 207.

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.

7.1.3 Espectroscopia 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} .

7.1.4. Espectroscopia 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.

7.1.5. 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.

7.1.6. Espectrometría de masas de baja resolución (EM)

Los espectros de masas de baja resolución se llevaron a cabo en un espectrómetro VG Micromass ZAB-2F. Los métodos de ionización empleados son impacto electrónico (IE) empleando potenciales de ionización de 70 eV, bombardeo con átomos rápidos (FAB) y electrospray (ESI).

7.1.7. 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.

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 elución 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 Å, 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 elución diferentes mezclas de disolventes. La detección de los productos sobre las placas se realiza de la misma forma que en los apartados anteriores.

7.2.4. Cromatografía en columna (CC)

En la realización de columnas cromatográficas se emplea gel de sílice de capa fina de 0,015–0,063 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, o con una bomba de media presión. La muestra se puede aplicar disuelta o adsorbida en gel de sílice de 0,063–0,200 nm de diámetro.

7.2.5. Cromatografía de exclusión molecular (CEM)

Se usa como soporte Sephadex LH-20, suministrada por la empresa Sigma, que requiere una previa estabilización del polímero en suspensión con metanol (4,1 ml/g) durante, al menos, doce horas. A continuación, se vierte en la columna y se deja reposar durante una hora, aproximadamente. Esta columna se estabiliza posteriormente en la disolución que se va a usar como eluyente, para lo cual se eluye tres veces la cantidad correspondiente al volumen muerto. El eluyente que generalmente 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.

7.3. Programas informáticos

Para la elaboración del modelo 3D-QSAR se empleó el programa Discovery Studio 2.1, usando los módulos *Hip Hop* y *Hypogen* en el protocolo de obtención del farmacóforo y para los cálculos QSAR se utilizaron los programas **Spartan 06** Wavefunction, Inc, Irvine, CA, Talete srl, **DRAGON** for Windows (Software for Molecular Descriptor Calculations) Version 5.5-2007- <http://www.taletemi.it/>. **SYSTAT** Software, Inc for Windows. Version 12.02.00-2007- <http://www.systat.com>. Para los cálculos de mecánica molecular se utilizó el PC Model 6,⁷ 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 Topspin 2.0 y en la representación de las moléculas el ChemDraw Ultra 7,0.

⁷ PC Model from Serena Software, P. O. Box. 3076, Bloomington, IN 47402-3077.



8. Conclusiones

8. Conclusiones

*El trabajo de investigación llevado a cabo durante la realización de esta Tesis Doctoral incluye el estudio fitoquímico de *Maytenus jelskii* Zahlbruchner (hojas, corteza de raíz y frutos), así como la evaluación biológica de los metabolitos aislados. De dicha investigación podemos extraer las siguientes conclusiones:*

1. Se aísla y determina la estructura de **26 triterpenos con diferentes esqueletos**: friedelano, lupano, oleano, ursano y baccharano, **tres de los cuales resultaron nuevos** en la bibliografía química: 3-oxo-*D:A*-friedoolean-28,30-olida, 3 β ,11 α ,28-trihidroxi-olean-18-eno y 3 β -cafeato-ursan-12-eno.
1. Se aíslan **29 celastroloides** con esqueleto de nor-triterpenometilénquinona, nor-triterpenofenol, dímeros y trímeros triterpénicos, **cuatro de los cuales resultaron nuevos en la bibliografía química**: 3-*O*-metil-20 β ,23-dihidroxi-6-oxotingenol, 7',8'-dihidro-xuxuarina E α , jelskina y triescutionina C. Jelskina representa el primer ejemplo en la bibliografía química de dímero triterpénico con unión a través de C-4 y C-5 de la subunidad quinónica. Por otra parte, triescutionina C constituye el tercer ejemplo de trímero triterpénico en la bibliografía química.
2. Se evalúa la **actividad antiparasitaria frente a *Giardia intestinalis*** de 17 dímeros y 2 trímeros triterpénicos, aislados de *M. jelskii* y otras especies de celastráceas, resultando cuatro ellos más activos (CI₅₀ 0,03-1,21 μ M) que el metronidazol, fármaco de elección para el tratamiento de la giardiasis, destacando **xuxuarina C α** que resultó 40 veces más potente (CI₅₀ = 0,03 μ M) que el control.
3. El **modelo QSAR** obtenido con **17 dímeros triterpénicos** como **agentes antiparasitarios para el tratamiento de la giardiasis** mostró un alto valor estadístico y explica satisfactoriamente los requisitos necesarios para la expresión de la actividad de estos compuestos.
4. Se aíslan **5 alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos**, siendo uno de ellos (**paniculatina C**) nuevo en la bibliografía química.
5. Se aíslan **55 sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano**, de los cuales **43 resultaron nuevos en la bibliografía química**. Seis de estos

sesquiterpenos presentan en su estructura un éster no descrito anteriormente en este tipo de compuestos: (**3',4'-dihidroxi-2',5'-dimetoxi-3'-tetrahidrofuroato** y **4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahidrofuroato**). Entre los sesquiterpenos aislados se describen cinco nuevos esqueletos polihidroxílicos base: **3-deoxi-isomagellanol**, **2-epi-isocelorbicol**, **8-hidroxi-magellanol**, **4-deoxi-8-hidroxi-magellanol** y **jelskol**. La configuración absoluta de los compuestos se estableció mediante dicroísmo circular, correlaciones químicas o consideraciones biogénicas.

6. Se evalúan **29 sesquiterpenos** como **potenciales agentes quimiopreventivos** (inhibidores de la activación de los antígenos tempranos del virus Epstein-Barr) *in vitro*, **5** de los cuales mostraron actividad superior al β -caroteno, usado como control positivo. Así mismo, se evaluó la actividad *in vivo* en un **modelo de carcinogénesis** inducida en ratones de 2 de estos compuestos y los resultados mostraron que ambos compuestos reducen la formación de papilomas.
7. Se realizan estudios **SAR** (relación estructura-actividad) y **3D-QSAR** (relación estructura-actividad cuantitativa) de **121 sesquiterpenos** aislados de especies de celastráceas, como inhibidores de la activación del virus Epstein-Barr. Los resultados del estudio 3D-QSAR indican que el sesquiterpeno ideal debe presentar tres grupos aceptores de hidrógeno y un grupo hidrofóbico. El modelo obtenido posee un alto valor estadístico y explica las características estructurales que modulan la actividad. Así mismo, el modelo 3D-QSAR generado a partir de 58 compuestos seleccionados de la bibliografía, proporcionó un modelo general de inhibidor de la activación del virus Epstein-Barr.
8. Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación nos permiten concluir que los dímeros triterpénicos y los sesquiterpenos agarofuránicos son potenciales agentes antiparasitarios y quimiopreventivos, respectivamente, y que las especies de celastráceas son una excelente fuente de estos potenciales agentes terapéuticos.
9. Los estudios QSAR y 3D-QSAR llevados a cabo permitirán en el futuro el diseño racional de agentes terapéuticos (antiparasitarios e inhibidores de la activación del virus Epstein-Barr), más potentes y selectivos.



9. Anaxos

9.1. Índice de productos nuevos en la bibliografía química

| Siglas | Producto | Elucid. Estruct. | Parte Exp. |
|--------|--|---------------------|---------------|
| O-1 | 3 β ,11 α ,28-Trihidroxi-olean-18-eno (28-hidroxi-nivadiol) | 52 | 65 |
| F-1 | 3-Oxo-D:A-friedoolean-28,30-olida (jelskolida) | 55 | 66 |
| U-1 | 3 β -Cafeato-ursan-12-en (cafeato de α -amirina) | 57 | 67 |
| Fe-1 | 3-O-Metil-20 β ,23-dihidroxi-6-oxotingenol | 90 | 106 |
| DT-1 | 7',8'-dihidro-xuxuarina E α | 94 | 107 |
| DT-2 | Jelskina | 97 | 108 |
| TT-1 | Triescutionina C | 101 | 109 |
| S-1 | (1R,2S,3S,4S,5S,6R,7R, 8S,9R,10R)-2,3,6-Triacetoxi-1-benzoiloxi-9- <i>t</i> -cinamoiloxi-4,8-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 142 | 190 |
| S-2 | (1R,2S,3S,4S,5S,6R,7R,8S,9R,10R)-2,3-Diacetoxi-1-benzoiloxi-9- <i>t</i> -cinamoiloxi-4,6,8-trihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 145 | 191 |
| S-3 | (1R,2R,3R,4R,5S,6R,7R,8S,9R,10R)-2,6,8-Triacetoxi-9-benzoiloxi-1-(3-furoiloxi)-3-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 146 | 192 |
| S-4 | (1R,2R,3R,4R,5S,6R,7R,8S,9R,10R)-2,6,8-Triacetoxi-1,9-dibenzoiloxi-3-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 148 | 193 |
| S-5 | (1R,2R,3R,4R,5S,6R,7S,8S,9R,10R)-2,8-Diacetoxi-1,9-dibenzoiloxi-3,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 150 | 194 |
| S-6 | (1R,2S,3S,4S,5R,7R,9S,10R)-2,3,Diacetoxi-1-benzoiloxi-9- <i>t</i> -cinamoiloxi-4,7-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 153 | 195 |
| S-7 | (1R,2S,3S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-2,3-Diacetoxi-1-benzoiloxi-9- <i>t</i> -cinamoiloxi-4,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 155 | 196 |
| S-9 | (1R,2S,3S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-2-Acetoxi-1-benzoiloxi-9- <i>t</i> -cinamoiloxi-3,4,6-trihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 160 | 197 |
| S-12 | (1R,2S,3S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-2-Acetoxi-1,6,9-tribenzoiloxi-3,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 161 | 199 |

| | | | |
|-------------|---|-----|-----|
| S-15 | (1R,2S,3S,4S,5R,7S,8S,9R,10R)-2,3-Tiacetoxi-1-benzoiloxi-9- <i>t</i> -cinamoiloxi-4,8-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 163 | 200 |
| S-17 | (1R,2S,3S,4S,5R,7R,9S,10R)-2,3-Diacetoxi-1-benzoiloxi-9- <i>t</i> -cinamoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 168 | 201 |
| S-18 | (1R,2S,3S,4S,5R,7R,9S,10R)-2-Acetoxi-1-benzoiloxi-9- <i>t</i> -cinamoiloxi-3,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 170 | 202 |
| S-19 | (1R,2S,3S,4S,5R,7R,9S,10R)-2,3-Diacetoxi-1-benzoiloxi-9- <i>cis</i> -cinamoiloxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 171 | 203 |
| S-20 | (1R,2S,3S,4S,5R,7R,9S,10R)-2-Acetoxi-1-benzoiloxi-9- <i>cis</i> -cinamoiloxi-3,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 173 | 204 |
| S-21 | (1R,2R,3R,4R,5S,6R,7R,9S,10R)-2,6-Diacetoxi-1-benzoiloxi-9- <i>t</i> -cinamoiloxi-3-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 174 | 205 |
| S-22 | (1R,2R,3R,4R,5S,6R,7R,9S,10R)-2-Acetoxi-1-benzoiloxi-9- <i>t</i> -cinamoiloxi-3,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 179 | 206 |
| S-24 | (1R,2R,3R,4R,5S,6R,7R,9S,10R)-2,6-Diacetoxi-9 β -benzoiloxi-1-(3-furoiloxi)-3-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 180 | 207 |
| SM-1 | Paniculatina C | 184 | 208 |
| S-26 | (1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,2,15-Triacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 215 | 260 |
| S-27 | (1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10S)-2,15-Diacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-1,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 215 | 261 |
| S-28 | (1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,15-Diacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-2,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 215 | 262 |
| S-29 | (1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,2-Diacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4,15-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 215 | 263 |
| S-30 | (1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,15-Diacetoxi-2,6-dibenzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 215 | 264 |
| S-31 | (1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,15-Diacetoxi-6,9-dibenzoiloxi-2,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 223 | 265 |

| | | | |
|-------------|---|-----|-----|
| S-34 | (1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,2,6,15-Tetraacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 223 | 266 |
| S-36 | (1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10S)-2-Acetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-1,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 224 | 267 |
| S-37 | (1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1,2-Diacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-2,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano | 224 | 268 |
| S-38 | (1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1-Acetoxi-2,6-dibenzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 224 | 269 |
| S-39 | 2 β ,8 β -Diacetoxi-9 β -benzoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 230 | 270 |
| S-40 | 2 β ,3 β -Diacetoxi-9 β -benzoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 232 | 271 |
| S-41 | 2 β ,3 β -Diacetoxi-9 β -benzoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-dihidro- β -agarofurano | 233 | 272 |
| S-42 | 2 β -Acetoxi-9 β - <i>t</i> -cinamoiloxi-1-(3-furoiloxi)-3-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 233 | 273 |
| S-43 | 2 β -Acetoxi-9 β - <i>t</i> -cinamoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 238 | 274 |
| S-44 | 2 β -Acetoxi-1 α ,9 β -di-(3-furoiloxi)-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 238 | 275 |
| S-45 | 2 β -Acetoxi-9 β -benzoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 238 | 276 |
| S-46 | 2 β -Acetoxi-9 β -benzoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-dihidro- β -agarofurano | 242 | 277 |
| S-47 | 2 β -Acetoxi-9 β - <i>t</i> -cinamoiloxi-1 α -(3-furoiloxi)-dihidro- β -agarofurano | 242 | 278 |
| S-48 | (1S,4S,5R,7R,9S,10S)-9-Benzoiloxi-1-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 243 | 279 |
| S-50 | (1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1-Acetoxi-2,6-dibenzoiloxi-9-(4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahidrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 247 | 280 |
| S-51 | (1R,2S,4S,5S,6R,7R,9S,10R)-1-Acetoxi-2,6-dibenzoiloxi-9-(4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahidrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 247 | 281 |

| | | | |
|-------------|---|-----|-----|
| S-52 | (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2,15-Triacetoxi-6-benzoiloxi-9-(4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahidrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 250 | 282 |
| S-53 | (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2,15-Triacetoxi-6-benzoiloxi-9-(4',5'-epoxi-2'-oxo-4'-tetrahidrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 250 | 283 |
| S-54 | (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2,15-Triacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3',4'-dihidroxi-2',5'-dimetoxi-3'-tetrahidrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 252 | 284 |
| S-55 | (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2,15-Triacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3',4'-dihidroxi-2',5'-dimetoxi-3'-tetrahidrofuroiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano | 252 | 285 |

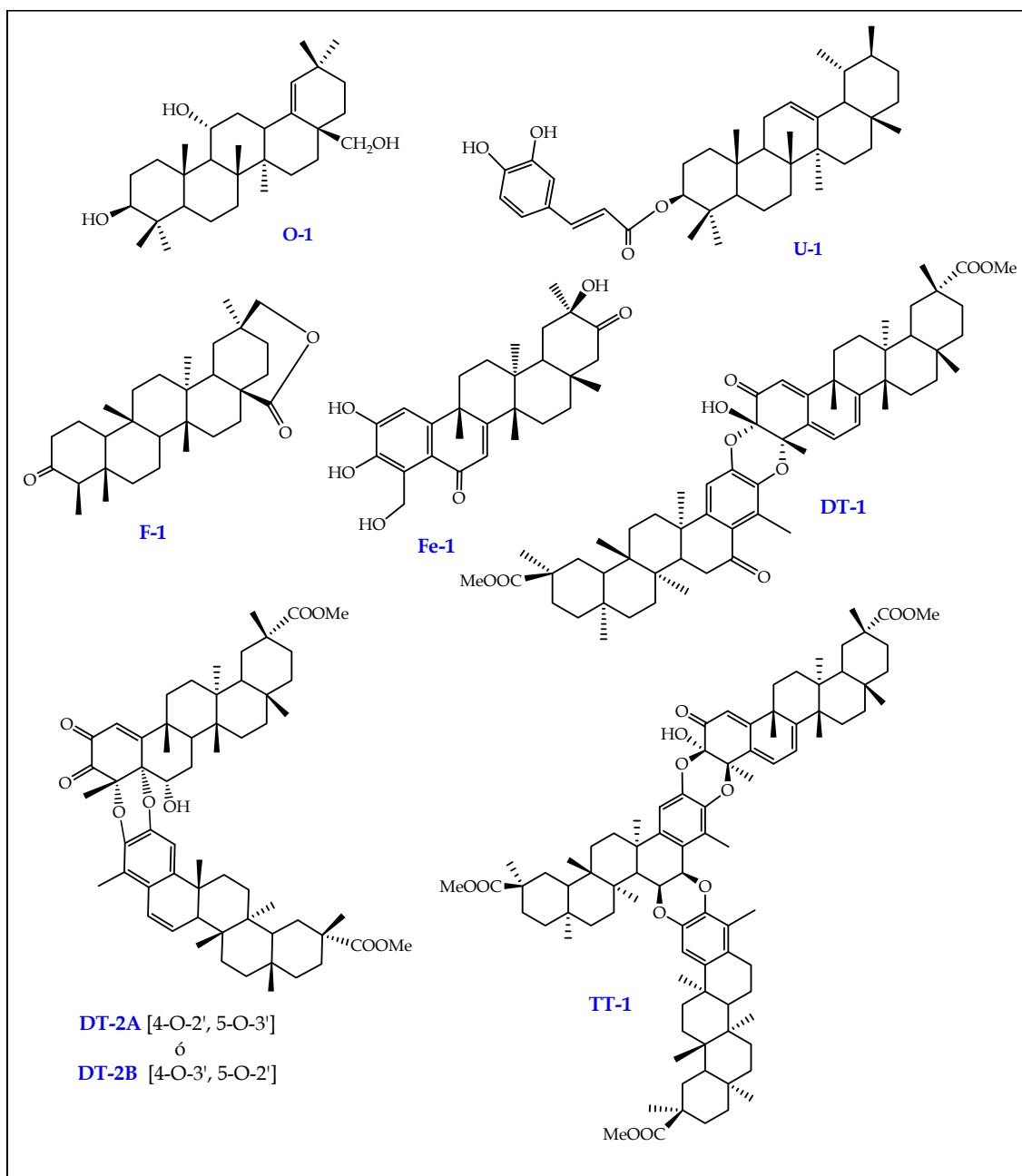


Figura 9.1.1. Metabolitos aislados de *M. jelskii* nuevos en la bibliografía química.

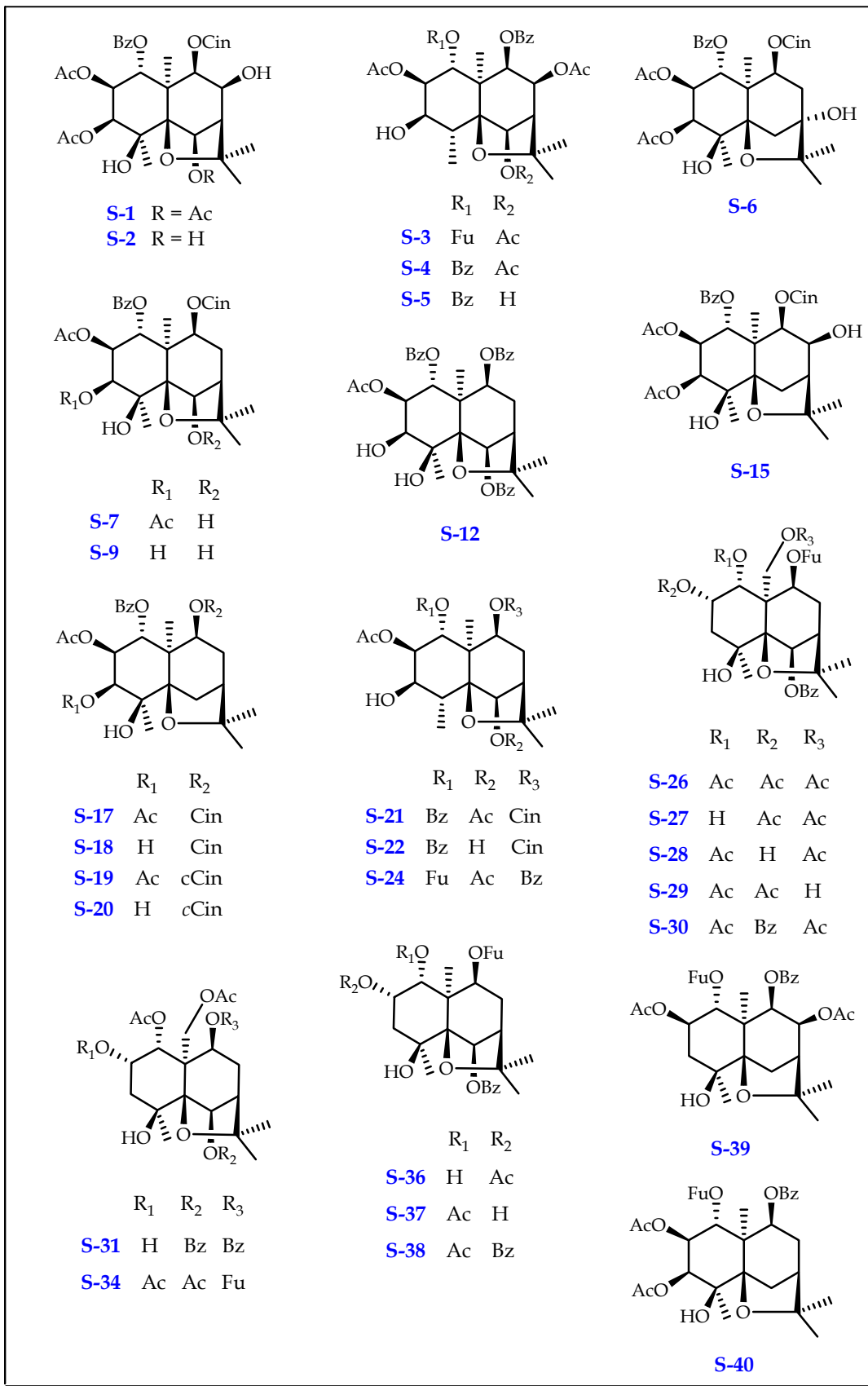


Figura 9.1.1. Continuación.

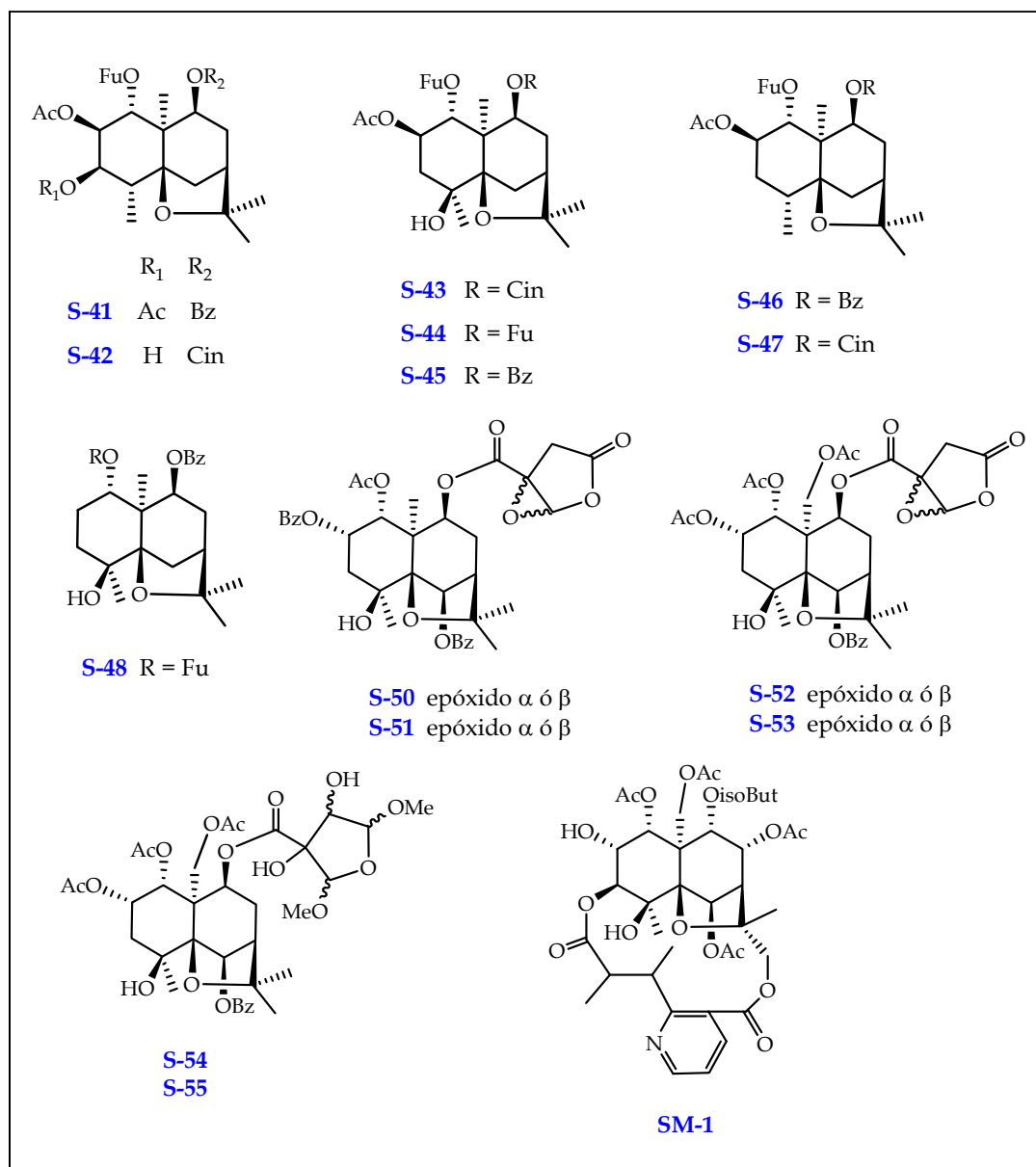


Figura 9.1.1. Continuación.