

Curso 2010/11
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/36
I.S.B.N.: 978-84-15287-66-7

MARÍA INMACULADA BRITO GARCÍA

**Terpenoides bioactivos y acetogeninas
de algas e invertebrados marinos**

Directores

**JOSÉ DARIAS JEREZ
MERCEDES CUETO PRIETO
ANA R. DÍAZ MARRERO**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

A mis padres, por ser incondicionales.

A Fran, por estar a mi lado.

A toda mi Familia, a mis Amigas y Amigos,
a todos los que con su afecto me han hecho
mejor.

AGRADECIMIENTOS

A los directores de la Tesis, José Darías, Mercedes Cueto y Ana Raquel Díaz, por sus valiosas enseñanzas, orientación, perseverancia y apoyo en la solución de dificultades.

A Enrique Dorta, Manuel Lorenzo y Teresa Díaz, por tantas horas buenas que hemos pasado dentro y fuera del laboratorio, y por las experiencias compartidas.

A Almudena Corrales y en especial a nuestro querido Rafael Redondo, que siempre estará en nuestra memoria, por su cariño, su profesionalidad y buen hacer, lo que ha sido de una ayuda invaluable en el trabajo de cada día.

A mis actuales compañeras y compañero de grupo, por sus opiniones, cordialidad y simpatía.

Al personal de administración y servicios del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC, particularmente a los servicios de RMN, MS, Biblioteca y Almacén, porque gracias a su dedicación la nuestra se simplifica.

A Laila Moujir, Marina Semenova e Irene Cózar Castellano, y a sus grupos de investigación, por la realización de los ensayos de actividad biológica.

A Julio Afonso-Carrillo y Marta Sansón, por la clasificación taxonómica del alga.

A Oscar Fabelo y Catalina Ruiz-Pérez, por la realización de rayos X.

A las personas del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC, y del Departamento de Química Orgánica de La Universidad de La Laguna, que, con su ayuda han facilitado mi trabajo.

A los siguientes organismos por la financiación recibida: Ministerio de Educación y Ciencia (PPQ2002-02494, REN2002-10485-E/ANT, SAF2006-03004, BIO2007-61745, SAF2009-08039, SAF2010-16858), Gobierno de Canarias (PI2002/044, PIO422005/003, PUB2005/030) y Smithsonian Tropical Research Institute, por su apoyo en las expediciones científicas de muestreo y por la clasificación taxonómica del octocoral.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Ac	Acetilo
Ac₂O	Anhídrido acético
AcOH	Ácido acético
ccf	Cromatografía en capa fina
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CIPO	Cloroperoxidasa
BrPO	Bromoperoxidasa
COSY	Espectroscopía de correlación ¹ H- ¹ H
CSA	Agente solvatante quirral
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble doblete
ddd	Doble doble doblete
dddd	Doble doble doble doblete
DEPT	Incremento no distorsionado por transferencia de polarización
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMF	Dimetilformamida
EM	Espectro de masas
EMAR	Espectro de masas de alta resolución
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
Fase "lag"	Fase inicial de crecimiento bacteriano
Fase "log"	Fase exponencial de crecimiento bacteriano
φ_{int}	Diámetro interno de columna cromatográfica
h	Altura de columna cromatográfica
He-La	Línea celular de carcinoma humano de útero
Hep-2	Línea celular de carcinoma humano de laringe
IC₅₀	Concentración que inhibe el 50% del crecimiento
IE	Impacto electrónico
IR	Infrarrojo

J	Constante de acoplamiento
Hex	Hexano
HMBC	Coherencia heteronuclear a múltiple enlace ^1H - ^{13}C
HSQC	Coherencia cuántica simple heteronuclear con detección de protón ^1H - ^{13}C
Hz	Hertzios
m	Multiplete
Me	Metilo
MHz	Megahertzios
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio
NOE	Efecto Nuclear Overhauser
NOESY	Correlación homonuclear bidimensional NOE en sistemas de referencia rotante
q	Cuarteto
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ^1H	Resonancia magnética nuclear de protón
s	Singulete
(R)-TFAE	(R)-2,2,2-trifluoro-1-(9-antril)etanol
(S)-TFAE	(S)-2,2,2-trifluoro-1-(9-antril)etanol
t_r	Tiempo de retención
V-CIPO	Cloroperoxidasa dependiente de Vanadio
V-BrPO	Bromoperoxidasa dependiente de Vanadio
Vero	Línea celular de riñón de mono africano verde

ÍNDICE

ÍNDICE.	i
LISTA DE FIGURAS.	vii
LISTA DE TABLAS.	xvii
ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y AVANCE DE CONTENIDO.	1
1. INTRODUCCIÓN.	13
1.1. Halogenación Biológica.	16
1.1.1. Antecedentes.	16
1.1.2. Incorporación de halógenos en las moléculas.	19
1.1.3. Clases de enzimas de halogenación.	20
1.1.4. Haloperoxidasas.	21
1.2. Sesquiterpeneos de fuentes marinas con esqueleto chamigreno.	27
1.2.1. Grupo I. Esqueleto α -chamigreno.	30
1.2.1.1. Grupo IA. Sistemas con cloro-bromo, halovinilo, halohidrina, diol, époxido o carbonilo en C2-C3 del anillo B.	30
1.2.1.1.1. Grupo IA1. Productos con 1 carbono modificado en A.	30
1.2.1.1.2. Grupo IA2. Productos con 2 carbonos modificados en A.	32
1.2.1.1.3. Grupo IA3. Productos con 3 carbonos modificados en A.	32
1.2.1.1.4. Grupo IA4. Productos con 4 carbonos modificados en A.	33
1.2.1.1.5. Grupo IA5. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	34
1.2.1.1.6. Grupo IA6. Productos con 3 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	35
1.2.1.1.7. Grupo IA7. Productos con 4 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	36
1.2.1.2. Grupo IB. Sistemas con endo y/o exo olefinas en el anillo B.	38
1.2.1.2.1. Grupo IB1. Productos con 1 carbono modificado en A.	38
1.2.1.2.2. Grupo IB2. Productos con 2 carbonos modificados en A.	39

1.2.1.2.3. Grupo IB3. Productos con 3 carbonos modificados en A.	39
1.2.1.2.4. Grupo IB4. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	40
1.2.1.2.5. Grupo IB5. Productos con 3 carbonos modificados en A y 2 carbonos modificados en B.	40
1.2.1.2.6. Grupo IB6. Productos con 4 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	41
1.2.1.2.7. Grupo IB7. Productos con 4 carbonos modificados en A y 2 carbonos modificados en B.	41
1.2.1.3. Grupo IC. Esqueletos reagrupados.	42
1.2.1.4. Grupo ID. Esqueleto degradado.	44
1.2.2. Grupo II. Esqueleto β -chamigreno.	44
1.2.2.1. Grupo IIA. Sistemas con cloro-bromo, halovinilo, halohidrina, diol, époxido o carbonilo en C2-C3 del anillo B.	44
1.2.2.1.1. Grupo IIA1. Productos con 1 carbono modificado en A.	44
1.2.2.1.2. Grupo IIA2. Productos con 2 carbonos modificados en A.	45
1.2.2.1.3. Grupo IIA3. Productos con 3 carbonos modificados en A.	49
1.2.2.1.4. Grupo IIA4. Productos con 4 carbonos modificados en A.	49
1.2.2.1.5. Grupo IIA5. Productos con 1 carbono modificado en A y 1 carbono modificado en B.	50
1.2.2.1.6. Grupo IIA6. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	50
1.2.2.1.7. Grupo IIA7. Productos con 3 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	50
1.2.2.2. Grupo IIB. Sistemas con endo y/o exo olefinas en el anillo B.	51
1.2.2.2.1. Grupo IIB1. Productos con 1 carbono modificado en A.	51
1.2.2.2.2. Grupo IIB2. Productos con 2 carbonos modificado en A.	51
1.2.2.2.3. Grupo IIB3. Productos con 1 carbono modificado en A y 1 carbono modificado en B.	53

1.2.2.2.4. Grupo IIB4. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	54
1.2.2.3. Grupo IIC. Esqueleto reagrupado.	54
1.2.2.4. Grupo IID. Esqueleto degradado.	55
1.2.3. Clasificación de Chamigrenos de Origen Marino.	56
1.3. γ -Butirolactonas derivadas de ácidos grasos de cadena larga obtenidos de Octocorales Marinos.	71
2. PARTE TEÓRICA	77
2.1. Estudio químico del alga roja <i>Laurencia Majuscula</i> (Harvey) Lucas.	79
2.1.1. Caracterización de las Gomeronas A-C. Esqueleto gomerano.	84
2.1.2. Caracterización de 10-bromorhodolaureano.	89
2.1.3. Caracterización de las Gomerolactonas A-D. Nuevos tipos estructurales derivados de chamigreno.	91
2.1.3.1. Configuración absoluta de las Gomerolactonas A y B.	96
2.1.4. Caracterización de un nor- β -chamigreno L9.	102
2.1.5. Caracterización de derivados de α -chamigreno y con sistema enónico en el anillo A.	104
2.1.6. Caracterización del producto Ap-1.	114
2.2. Estudio químico del molusco <i>Aplysia dactylomela</i> .	115
2.2.1. Estudio químico del molusco <i>Aplysia dactylomela</i> de La Palma.	116
2.2.1.1. Caracterización de los compuestos con esqueleto chamigreno.	118
2.2.1.2. Caracterización de A3 y A4, compuestos con esqueleto bisaboleno.	122
2.2.1.3. Caracterización del compuesto con estructura reagrupada A5.	124
2.2.1.4. Caracterización del bisaboleno degradado A6.	127
2.2.1.5. Caracterización de un compuesto con esqueleto ciclobisaboleno.	129
2.2.2. Estudio químico del molusco <i>Aplysia dactylomela</i> de La Gomera.	132
2.2.2.1. Caracterización del compuesto aplysianotriol.	134

2.2.2.2. Caracterización del compuesto derivado de bisaboleno.	137
2.2.2.3. Caracterización de compuestos con estructuras químicas degradadas derivadas de bisaboleno.	141
2.3. Posible Biogénesis de algunos metabolitos de <i>Laurencia</i> y <i>Aplysia</i> .	147
2.3.1. Posible biogénesis de los esqueletos de Clase I, gomerano y rhodolaurano, y de los esqueletos de Clase II.	148
2.3.2. Posible biogénesis de productos degradados y de esqueleto irregular derivados de bisaboleno.	151
2.4. Actividad Biológica.	154
2.4.1. Ensayos de citotoxicidad.	154
2.4.2. Búsqueda de agentes estabilizadores y desestabilizadores de microtúbulos.	157
2.4.2. Estudio de regeneración de células beta-pancreáticas.	160
2.5. Estudio comparativo de los compuestos obtenidos de <i>Laurencia Majuscula</i> (Harvey) Lucas y <i>Aplysia dactylomela</i> .	162
2.6. Estudio químico del octocoral <i>Pterogorgia</i> sp.	167
2.6.1. Caracterización de los compuestos P1 y P2.	168
2.6.2. Caracterización de los compuestos P3 y P4.	171
2.6.3. Caracterización del compuesto P5.	173
2.6.4. Determinación de la configuración relativa de 3'-alquil-4'-hidroxi-5'-metil-2'(5'H)-dihidrofuranonas.	174
2.6.5. Determinación de la configuración absoluta de la unidad de butenolida.	176
2.7. Ruta Biogénica Propuesta para los compuestos aislados de <i>Pterogorgia</i> sp.	179
2.7.1. Ruta biogénica propuesta para los compuestos bisbutenolidos.	179
3. PARTE EXPERIMENTAL.	181
3.1. Técnicas experimentales generales.	183
3.1.1. Espectroscopía Infrarroja (IR).	183

3.1.2. Rotación Óptica ($[\alpha]_D^{25}$).	183
3.1.3. Espectrometría de Masas (EM).	183
3.1.4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	183
3.1.5. Punto de fusión.	183
3.2. Técnicas cromatográficas.	184
3.2.1. Cromatografía en Columna.	184
3.2.2. Cromatografía de Exclusión Molecular.	184
3.2.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).	184
3.2.4. Cromatografía en Capa Fina (ccf).	185
3.3. Estudio del alga roja <i>Laurencia Majuscula</i> (Harvey) Lucas.	186
3.3.1. Clasificación.	186
3.3.2. Recolección y extracción.	186
3.3.3. Estudio cromatográfico del extracto de <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	187
3.3.4. Datos experimentales obtenidos de los compuestos aislados de <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	193
3.4. Estudio del molusco <i>Aplysia dactylomela</i> .	206
3.4.1. Recolección, disección y extracción.	207
3.4.2. Estudio cromatográfico del extracto del manto de <i>Aplysia dactylomela</i> (La Palma).	207
3.4.3. Estudio cromatográfico del extracto del aparato digestivo de <i>Aplysia dactylomela</i> (La Palma).	209
3.4.4. Datos experimentales obtenidos de los compuestos aislados de <i>Aplysia dactylomela</i> (La Palma).	212
3.4.5. Estudio cromatográfico del extracto del manto de <i>Aplysia dactylomela</i> (La Gomera).	218
3.4.6. Estudio cromatográfico del extracto del aparato digestivo de <i>Aplysia dactylomela</i> (La Gomera).	219

3.4.7. Datos experimentales obtenidos de los compuestos aislados de <i>Aplysia dactylomela</i> (La Gomera).	224
3.5. Estudio de la Actividad Biológica de los compuestos aislados de <i>Laurencia Majuscula</i> (Harvey) Lucas y <i>Aplysia dactylomela</i> .	229
3.5.1. Determinación de la actividad citotóxica.	229
3.5.2. Determinación de agentes estabilizadores/desestabilizadores de microtúbulos. Agentes antimitóticos.	230
3.6. Estudio del octocoral <i>Pterogorgia</i> sp.	232
3.6.1. Recolección y extracción.	232
3.6.2. Estudio cromatográfico del extracto de <i>Pterogorgia</i> sp.	232
3.6.3. Datos experimentales obtenidos de los compuestos aislados de <i>Pterogorgia</i> sp.	234
4. CONCLUSIONES	239
5. APÉNDICE	243
5.1. Espectros de RMN de los metabolitos nuevos aislados de <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	245
5.2. Espectros de RMN de los metabolitos nuevos aislados de <i>Aplysia dactylomela</i> (La Palma).	277
5.3. Espectros de RMN de los metabolitos nuevos aislados de <i>Aplysia dactylomela</i> (La Gomera).	293
5.4. Espectros de RMN de los metabolitos nuevos aislados de <i>Pterogorgia</i> sp.	305

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1.1. Ciclación de olefinas terminales vía epoxidación y protonación.	16
Figura 1.1.1.2. Ciclación de olefinas terminales halogenación y protonación.	17
Figura 1.1.1.3. Primeros metabolitos bromados de <i>Aplysia kurodai</i> y <i>Laurencia okamurai</i> .	18
Figura 1.1.1.4. 3,5-diyodotirosina: primer producto halogenado obtenido de un organismo marino.	18
Figura 1.1.2.1. Vancomicina y desclorovancomicina. Influencia de los sustituyentes halogenados en la magnitud de la actividad antibacteriana.	19
Figura 1.1.4.1. Mecanismo de reacción de hemo-haloperoxidasas dependientes de hierro.	22
Figura 1.1.4.2. Conversión quimioenzimática in vitro de E-(+)-nerolidol en regioisómeros de synderol.	24
Figura 1.1.4.3. Mecanismo de reacción de haloperoxidasas dependientes de vanadio.	25
Figura 1.1.4.4. Estabilización de complejo de vanadato por puentes de hidrógeno.	26
Figura 1.2.3.1. Grupo IA1. Productos con 1 carbono modificado en A.	56
Figura 1.2.3.2. Grupo IA2. Productos con 2 carbonos modificados en A.	57
Figura 1.2.3.3. Grupo IA3. Productos con 3 carbonos modificados en A.	57
Figura 1.2.3.4. Grupo IA4. Productos con 4 carbonos modificados en A.	58
Figura 1.2.3.5. Grupo IA5. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	58
Figura 1.2.3.6. Grupo IA6. Productos con 3 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	59
Figura 1.2.3.7. Grupo IA7. Productos con 4 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	60
Figura 1.2.3.8. Grupo IB1. Productos con 1 carbono modificado en A.	61
Figura 1.2.3.9. Grupo IB2. Productos con 2 carbonos modificados en A.	61

Figura 1.2.3.10. Grupo IB3. Productos con 3 carbonos modificados en A.	61
Figura 1.2.3.11. Grupo IB4. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	62
Figura 1.2.3.12. Grupo IB5. Productos con 3 carbonos modificados en A y 2 carbonos modificados en B.	62
Figura 1.2.3.13. Grupo IB6. Productos con 4 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	62
Figura 1.2.3.14. Grupo IB7. Productos con 4 carbonos modificados en A y 2 carbonos modificados en B.	62
Figura 1.2.3.15. Grupo IC. Esqueletos reagrupados.	63
Figura 1.2.3.16. Grupo ID. Esqueleto degradado.	64
Figura 1.2.3.17. Grupo IIA1. Productos con 1 carbono modificado en A.	65
Figura 1.2.3.18. Grupo IIA2. Productos con 2 carbonos modificados en A.	66
Figura 1.2.3.19. Grupo IIA3. Productos con 3 carbonos modificados en A.	67
Figura 1.2.3.20. Grupo IIA4. Productos con 4 carbonos modificados en A.	67
Figura 1.2.3.21. Grupo IIA5. Productos con 1 carbono modificado en A y 1 carbono modificado en B.	67
Figura 1.2.3.22. Grupo IIA6. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	68
Figura 1.2.3.23. Grupo IIA7. Productos con 3 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	68
Figura 1.2.3.24. Grupo IIB1. Productos con 1 carbono modificado en A.	68
Figura 1.2.3.25. Grupo IIB2. Productos con 2 carbonos modificados en A.	69
Figura 1.2.3.26. Grupo IIB3. Productos con 1 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	69
Figura 1.2.3.27. Grupo IIB4. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.	70
Figura 1.2.3.28. Grupo IIC. Esqueleto reagrupado.	70
Figura 1.2.2.29. Grupo IID. Esqueleto degradado.	70

Figura 1.3.1. Ejemplos representativos de metabolitos γ -lactónicos de esponjas.	71
Figura 1.3.2. Ejemplos representativos de metabolitos γ -lactónicos de bacterias marinas.	72
Figura 1.3.3. Ejemplos representativos de metabolitos γ -lactónicos de plumas de mar.	72
Figura 1.3.4. Bis-butenolidos característicos del género <i>Pterogorgia</i> .	73
Figura 1.3.5. Bis-butenolidos naturales del género <i>Pterogorgia</i> derivados de la hidratación de ancepsenolido y homoancepsenolido.	74
Figura 1.3.6. Monobutenolidos de <i>P. anceps</i> , <i>Europlexaura flava</i> y <i>Plexaura flava</i> .	75
Figura 1.3.7. Monobutenolidos de corales blandos con cadena lateral insaturada poco común.	76
Figura 2.1.1. Derivados de α -chamigreno conocidos aislados de <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	81
Figura 2.1.2. Nor-chamigreno conocido aislado de <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	81
Figura 2.1.3. Derivados de β -chamigreno conocidos aislados de <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	82
Figura 2.1.4. Cuparano conocido aislado de <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	82
Figura 2.1.5. Metabolitos con esqueleto gomerano aislados de <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	83
Figura 2.1.6. Metabolito con esqueleto rhodolaurano aislado de <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	83
Figura 2.1.7. Gomerolactonas aisladas de <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	83
Figura 2.1.8. Chamigreno degradado aislado de <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	83
Figura 2.1.9. Chamigrenonas aisladas de <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	84

Figura 2.1.10. α -chamigreno polihalogenado aislado de <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	84
Figura 2.1.1.2. Estructura de mínima energía y efectos NOE significativos de L1 .	88
Figura 2.1.1.3. Estructuras de mínima energía de L2 y L3 y efectos NOE significativos de L2 .	89
Figura 2.1.2.1. Estructura de mínima energía para L4 .	91
Figura 2.1.3.1. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para L5 .	94
Figura 2.1.3.1.1. Modelo propuesto por Latypov <i>et al.</i> para los complejos diastereoméricos.	96
Figura 2.1.3.1.2. Fundamento básico del método descrito por Latypov <i>et al.</i>	97
Figura 2.1.3.1.3. Configuración absoluta de gomerolactonas A y B.	98
Figura 2.1.3.2. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para L8 .	101
Figura 2.1.3.3. Configuración absoluta de gomerolactonas C y D.	101
Figura 2.1.4.1. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para L9 .	103
Figura 2.1.5.1. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para L10 .	105
Figura 2.1.5.2. Transformación química de obtusol (81) en 7-b .	113
Figura 2.1.5.3. Estructuras de mínima energía de 6 y 7-b .	113
Figura 2.1.5.4. Estructuras de mínima energía y efectos NOE seleccionados para L16-A y L16-B .	114
Figura 2.2.1.1. Productos β -chamigrénicos conocidos aislados de <i>A. dactylomela</i> de La Palma.	116
Figura 2.2.1.2. Productos conocidos derivados de bisaboleno aislados de <i>A. dactylomela</i> de La Palma.	117
Figura 2.2.1.3. Nuevos metabolitos chamigrénicos aislados de <i>A. dactylomela</i> de La Palma.	117

Figura 2.2.1.4. Nuevos derivados de bisaboleno aislados de <i>A. dactylomela</i> de La Palma.	117
Figura 2.2.1.5. Derivados de bisaboleno y ciclobisaboleno aislados de <i>A. dactylomela</i> de La Palma.	118
Figura 2.2.1.1.1. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para Ap-1 .	120
Figura 2.2.1.3.1. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para el compuesto aplysiadactydiol (A5).	126
Figura 2.2.1.3.2. Reagrupamiento espontáneo de laucopiranoide C (179).	127
Figura 2.2.1.4.1. Estructuras de mínima energía y efectos NOE seleccionados para el compuesto furocaespitanolactol (A6) y (A6-a).	128
Figura 2.2.1.4.2. Reagrupamiento espontáneo de A6 en A6-a .	129
Figura 2.2.1.5.1. Efectos NOE seleccionados y estereoquímica relativa de A7 .	131
Figura 2.2.2.1. Productos conocidos derivados de chamigreno aislados de <i>Aplysia dactylomela</i> de La Gomera.	132
Figura 2.2.2.2. Producto conocido con esqueleto degradado aislado de <i>Aplysia dactylomela</i> de La Gomera.	133
Figura 2.2.2.3. Productos conocidos con esqueletos tipo bisaboleno aislados de <i>Aplysia dactylomela</i> de La Gomera.	133
Figura 2.2.2.4. Producto nuevo con esqueleto aplysiano aislado de <i>Aplysia dactylomela</i> de La Gomera.	133
Figura 2.2.2.5. Productos nuevos con esqueleto tipo chamigreno aislados de <i>Aplysia dactylomela</i> de La Gomera.	133
Figura 2.2.2.6. Producto nuevo con esqueleto tipo bisaboleno aislados de <i>Aplysia dactylomela</i> de La Gomera.	134
Figura 2.2.2.7. Producto nuevo con esqueleto reagrupado aislado de <i>Aplysia dactylomela</i> de La Gomera.	134
Figura 2.2.2.8. Productos nuevos con esqueleto degradado derivados de bisaboleno aislados de <i>Aplysia dactylomela</i> de La Gomera.	134
Figura 2.2.2.1.1. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para el compuesto aplysianotriol (A8).	137

Figura 2.2.2.2.1. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para A9 .	140
Figura 2.2.2.3.1. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para A10 .	142
Figura 2.2.2.3.2. Posibles estructuras para A11 .	143
Figura 2.2.2.3.3. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para A11 .	144
Figura 2.2.2.3.4. Posibles estructuras para A12 .	145
Figura 2.2.2.3.5. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para A12 .	146
Figura 2.3.1. Clase I y II de esqueletos marinos y terrestres.	148
Figura 2.3.1.1. Ruta biogénica de formación de 2-cloro- β -chamigreno.	149
Figura 2.3.1.2. Posible ruta biogénica de L1 , L2 , L3 y rhodolaureol (171).	150
Figura 2.3.1.3. Ruta biogénica para esqueletos de Clase II.	151
Figura 2.3.2.1. Ruta biogénica de A5 , furocaespitano (178) y furocaespitanolactol (A6).	152
Figura 2.4.1.1. Metabolitos de <i>A. dactylomela</i> con actividad proliferativa de células beta-pancreáticas.	161
Figura 2.6.1. Nuevos metabolitos aislados del octocoral <i>Pterogorgia</i> sp.	167
Figura 2.6.2. Metabolitos conocidos aislados del octocoral <i>Pterogorgia</i> sp.	168
Figura 2.6.1.1. Efectos NOE de P1 .	171
Figura 2.7.1.1. Biogénesis propuesta para los compuestos P1–P5 , 143 , 146 , 153 .	179
Figura 3.3.1. Esquema del estudio cromatográfico del alga roja <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	187
Figura 3.3.2. Esquema ampliado de los productos naturales obtenidos de <i>Laurencia majuscula</i> (Harvey) Lucas.	188
Figura 3.4.1. Esquema del estudio cromatográfico del manto de <i>Aplysia dactylomela</i> (La Palma).	208
Figura 3.4.2. Esquema del estudio cromatográfico del aparato digestivo de <i>Aplysia dactylomela</i> (La Palma).	210

Figura 3.4.3. Esquema del estudio cromatográfico del manto de <i>Aplysia dactylomela</i> (La Gomera).	218
Figura 3.4.4. Esquema del estudio cromatográfico del aparato digestivo de <i>Aplysia dactylomela</i> (La Gomera).	220
Figura 3.5.1.1. Esquema del ensayo.	230
Figura 3.5.2.1. Etapas del desarrollo embrionario del erizo de mar <i>Paracentrotus lividus</i> .	231
Figura 3.6.1. Esquema del estudio cromatográfico del octocoral <i>Pterogorgia</i> sp.	233
Figura 5.1.1. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Gomerona A, L1 (500 MHz, C_6D_6).	247
Figura 5.1.2. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Gomerona A, L1 (500 MHz, C_6D_6).	248
Figura 5.1.3. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Gomerona B, L2 (500 MHz, CDCl_3).	249
Figura 5.1.4. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Gomerona B, L2 (500 MHz, CDCl_3).	250
Figura 5.1.5. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Gomerona C, L3 (500 MHz, CDCl_3).	251
Figura 5.1.6. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Gomerona C, L3 (500 MHz, CDCl_3).	252
Figura 5.1.7. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de L4 (500 MHz, CDCl_3).	253
Figura 5.1.8. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de L4 (500 MHz, CDCl_3).	254
Figura 5.1.9. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Gomerolactona A, L5 (500 MHz, CDCl_3).	255
Figura 5.1.10. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Gomerolactona A, L5 (500 MHz, CDCl_3).	256
Figura 5.1.11. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Gomerolactona B, L6 (500 MHz, CDCl_3).	257
Figura 5.1.12. Espectros de RMN de HMBC de Gomerolactona B, L6 (500 MHz, CDCl_3).	258
Figura 5.1.13. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Gomerolactona C, L7 (500 MHz, CDCl_3).	259

Figura 5.1.14. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Gomerolactona C, L7 (500 MHz, CDCl ₃).	260
Figura 5.1.15. Espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de Gomerolactona D, L8 (500 MHz, CDCl ₃).	261
Figura 5.1.16. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Gomerolactona D, L8 (500 MHz, CDCl ₃).	262
Figura 5.1.17. Espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de L9 (500 MHz, CDCl ₃).	263
Figura 5.1.18. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de L9 (500 MHz, CDCl ₃).	264
Figura 5.1.19. Espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de L10 (500 MHz, CDCl ₃).	265
Figura 5.1.20. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de L10 (500 MHz, CDCl ₃).	266
Figura 5.1.21. Espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de L11 (500 MHz, CDCl ₃).	267
Figura 5.1.22. Espectros de RMN de HMBC de L11 (500 MHz, CDCl ₃).	268
Figura 5.1.23. Espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de L12 (500 MHz, CDCl ₃).	269
Figura 5.1.24. Espectros de de HMBC de L12 (500 MHz, CDCl ₃).	270
Figura 5.1.25. Espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de L13 (500 MHz, CDCl ₃).	271
Figura 5.1.26. Espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de L14 (500 MHz, CDCl ₃).	272
Figura 5.1.27. Espectros de RMN de de HMBC de L14 (500 MHz, CDCl ₃).	273
Figura 5.1.28. Espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de L15 (500 MHz, CDCl ₃).	274
Figura 5.1.29. Espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de L16 (500 MHz, C ₆ D ₆).	275
Figura 5.1.30. Espectros de RMN de HMBC y NOESY L16 (500 MHz, CDCl ₃).	276
Figura 5.2.1. Espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de Ap-1 (500 MHz, CDCl ₃).	279
Figura 5.2.2. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Ap-1 (500 MHz, CDCl ₃).	280
Figura 5.2.3. Espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de Acetildescloroelato, A1 (500 MHz, CDCl ₃).	281
Figura 5.2.4. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Acetildescloroelato, A1 (500 MHz, CDCl ₃).	282
Figura 5.2.5. Espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de Acetilelato, A2 (500 MHz, CDCl ₃).	283

Figura 5.2.6. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Desclorobromocaespitol, A3 (500 MHz, CDCl_3).	284
Figura 5.2.7. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Desclorobromocaespitol, A3 (500 MHz, CDCl_3).	285
Figura 5.2.8. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Desclorobromocaespitenona, A4 (500 MHz, CDCl_3).	286
Figura 5.2.9. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Aplysiadactydiol, A5 (500 MHz, CDCl_3).	287
Figura 5.2.10. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Aplysiadactydiol, A5 (500 MHz, CDCl_3).	288
Figura 5.2.11. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Furocaespitanolactol, A6 (500 MHz, CDCl_3).	289
Figura 5.2.12. Espectros de RMN de HMBC de Furocaespitanolactol, A6 (500 MHz, CDCl_3).	290
Figura 5.2.13. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de A7 (500 MHz, CDCl_3).	291
Figura 5.2.14. Espectros de RMN de HMBC de A7 (500 MHz, CDCl_3).	292
Figura 5.3.1. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Aplysianotriol, A8 (500 MHz, C_6D_6).	295
Figura 5.3.2. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Aplysianotriol, A8 (500 MHz, C_6D_6).	296
Figura 5.3.3. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de A9 (500 MHz, CDCl_3).	297
Figura 5.3.4. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de A9 (500 MHz, CDCl_3).	298
Figura 5.3.5. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de A10 (500 MHz, CDCl_3).	299
Figura 5.3.6. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de A10 (500 MHz, CDCl_3).	300
Figura 5.3.7. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de A11 (500 MHz, CDCl_3).	301
Figura 5.3.8. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de A11 (500 MHz, CDCl_3).	302
Figura 5.3.9. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de A12 (500 MHz, CDCl_3).	303
Figura 5.3.10. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de A12 (500 MHz, CDCl_3).	304
Figura 5.4.1. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de P1 (500 MHz, CDCl_3).	307
Figura 5.4.2. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de P1 (500 MHz, CDCl_3).	308

Figura 5.4.3. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de P2 (500 MHz, CDCl_3).	309
Figura 5.4.4. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de P2 (500 MHz, CDCl_3).	310
Figura 5.4.5. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de P3 (500 MHz, CDCl_3).	311
Figura 5.4.6. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de P3 (500 MHz, CDCl_3).	312
Figura 5.4.7. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de P4 (500 MHz, CDCl_3).	313
Figura 5.4.8. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de P4 (500 MHz, CDCl_3).	314
Figura 5.4.9. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de P5 (500 MHz, CDCl_3).	315
Figura 5.4.10. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de P5 (500 MHz, CDCl_3).	316

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1.3.1. Tipos de enzimas de halogenación.	20
Tabla 2.1.1.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC de los compuestos L1 y L2 y datos de RMN de ^1H y ^{13}C de L3 [500 MHz, δ ppm, (<i>J</i>) Hz, CDCl_3].	87
Tabla 2.1.2.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto L4 [500 MHz, δ ppm, (<i>J</i>) Hz, CDCl_3].	90
Tabla 2.1.3.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto L5 [500 MHz, δ ppm, (<i>J</i>) Hz, CDCl_3].	93
Tabla 2.1.3.2. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto L6 [500 MHz, δ ppm, (<i>J</i>) Hz, CDCl_3].	95
Tabla 2.1.3.1.1. $\Delta\delta_{\text{H-1}}$ del compuesto L5 con 6 equivalentes de (<i>R</i>)- y (<i>S</i>)-TFAE.	97
Tabla 2.1.3.1.2. $\Delta\delta_{\text{H-1}}$ del compuesto L6 con 6 equivalentes de (<i>R</i>)- y (<i>S</i>)-TFAE.	98
Tabla 2.1.3.3. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , de L5 y L6 y datos de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC del compuesto L7 [500 MHz, δ ppm, (<i>J</i>) Hz, CDCl_3].	99
Tabla 2.1.3.4. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C de L7 y datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto L8 [500 MHz, δ ppm, (<i>J</i>) Hz, CDCl_3].	100
Tabla 2.1.4.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto L9 [500 MHz, δ ppm, (<i>J</i>) Hz, CDCl_3].	103
Tabla 2.1.5.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto L10 [500 MHz, δ ppm, (<i>J</i>) Hz, CDCl_3].	104
Tabla 2.1.5.2. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto L11 [500 MHz, δ ppm, (<i>J</i>) Hz, CDCl_3].	106
Tabla 2.1.5.3. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC del compuesto L12 y datos de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto L13 [500 MHz, δ ppm, (<i>J</i>) Hz, CDCl_3].	107
Tabla 2.1.5.4. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC del compuesto L14 y de RMN de ^1H , ^{13}C del compuesto L15 [500 MHz, δ ppm, (<i>J</i>) Hz, CDCl_3].	109
Tabla 2.1.5.5. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto L16 [500 MHz, δ ppm, (<i>J</i>) Hz, CDCl_3].	111
Tabla 2.1.5.6. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de los compuestos L16 , 6 y 7-b .	112

Tabla 2.2.1.1.1. Datos de RMN de ¹ H, ¹³ C y HMBC del compuesto Ap-1 [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl ₃].	119
Tabla 2.2.1.1.2. Datos de RMN de ¹ H, ¹³ C y HMBC de acetildesclorelatol (A1) y datos de RMN de ¹ H y ¹³ C de acetilelatol (A2) [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl ₃].	121
Tabla 2.2.1.2.1. Datos de RMN de ¹ H, ¹³ C y HMBC de desclorobromocaespitol (A3) y datos de RMN de ¹ H y ¹³ C de desclorobromocaespitenona (A4) [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl ₃].	123
Tabla 2.2.1.3.1. Datos de RMN de ¹ H, ¹³ C y HMBC de aplysiadactydiol (A5) y datos de RMN de ¹³ C de A5-a [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl ₃].	125
Tabla 2.2.1.4.1. Datos de RMN de ¹ H, ¹³ C y HMBC de furocaespitanolactol (A6) y datos RMN de de ¹³ C del derivado A6-a [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl ₃].	128
Tabla 2.2.1.5.1. Datos de RMN de ¹ H, ¹³ C y HMBC del compuesto A7 [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl ₃].	130
Tabla 2.2.2.1.1. Datos de RMN de ¹ H, ¹³ C y HMBC de aplysianotriol (A8) [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, C ₆ D ₆].	136
Tabla 2.2.2.2.1. Datos de RMN de ¹ H, ¹³ C, COSY y HMBC del compuesto A9 [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl ₃].	138
Tabla 2.2.2.2.2. Datos de RMN de ¹ H y ¹³ C de A9 y de 8-acetilcaespitol (174) [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl ₃].	140
Tabla 2.2.2.3.1. Datos de RMN de ¹ H, ¹³ C y HMBC del compuesto A10 [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl ₃].	141
Tabla 2.2.2.3.2. Datos de RMN de ¹ H, ¹³ C, COSY y HMBC del compuesto A11 [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl ₃].	143
Tabla 2.2.2.3.3. Datos de RMN de ¹ H, ¹³ C, COSY y HMBC del compuesto A12 [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl ₃].	145
Tabla 2.4.1.1. Actividad citotóxica de sesquiterpenos frente a líneas celulares He-La, Hep-2 y Vero.	156
Tabla 2.4.2.1. Toxicidad de sesquiterpenos derivados de chamigreno evaluados en el desarrollo embrionario de <i>Paracentrotus lividus</i> .	159

Tabla 2.4.2.2. Toxicidad de sesquiterpenos derivados de bisaboleno evaluados en el desarrollo embrionario de <i>Paracentrotus lividus</i> .	160
Tabla 2.5.1. Comparativa de sesquiterpenos derivados de chamigreno aislados de los organismos.	163
Tabla 2.5.2. Comparativa de sesquiterpenos derivados de bisaboleno aislados de los organismos.	164
Tabla 2.6.1.1. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de P1 y de 143 [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].	169
Tabla 2.6.1.2. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de P1 y de P2 [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].	170
Tabla 2.6.2.1. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de P3 y de P4 [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].	172
Tabla 2.6.3.1. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de P5 [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].	173
Tabla 2.6.4.1. Datos de $\delta_{\text{C-4}'}$ y $\delta_{\text{C-5}'}$ (ppm) de las unidades butanolida.	175
Tabla 2.6.4.2. Disposición relativa de los sustituyentes sobre α -alquil- β -hidroxi- γ -metil- γ -lactonas. $\Delta(\delta_{\text{C-5}'} - \delta_{\text{C-4}'})$ [CDCl_3 , δ ppm].	176
Tabla 2.6.5.1. $\delta_{\text{H-5}}$ (ppm) de los compuestos P1 , P2 , P4 y 146 con 12 equivalentes de <i>R</i> - y <i>S</i> -TFAE a 240 K.	177

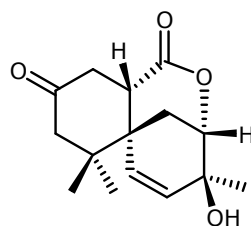
Antecedentes, Objetivos y Avance de Contenido



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Para la obtención de la Diplomatura en Estudios Avanzados (DEA), y dentro de un proyecto de investigación sobre organismos marinos de ambos lados del Istmo de Panamá, realizamos un estudio químico del alga roja *Laurencia obtusa* del Caribe. La *L. obtusa* es también una especie abundante en las Islas Canarias, y esta especie canaria fue estudiada hace algunos años por nuestro grupo de investigación, y por otros grupos nacionales y de otras partes del mundo.¹

Nuestro estudio de *L. obtusa* del Caribe nos permitió identificar un sesquiterpeno con un nuevo esqueleto carbonado,² y otros productos de interés³ entre los que se encuentra la chamigrenolactona.⁴ La chamigrenolactona tiene la particularidad de estar desprovista de sustituyentes halógenos, lo cual es excepcional en derivados chamigrénicos. Esta rareza, la ausencia de halógenos en la molécula, nos llamó la atención y, en cierta medida, altera el paradigma de que los derivados de chamigreno halogenados son marcadores quimio-taxonómicos de especies del género *Laurencia*. Pensamos que este hallazgo no podría ser exclusivo de *L. obtusa* del Caribe, y, puesto que, en la amplia investigación publicada sobre *L. obtusa* de Canarias, nunca se han descrito derivados chamigrénicos deshalogenados, nos propusimos estudiar otras especies de *Laurencia* distintas de la *L. obtusa*, y también moluscos herbívoros del género *Aplysia*.



Chamigrenolactona

Con esta finalidad, abordamos por primera vez el estudio químico de *Laurencia majuscula* y de aplysias de La Palma y de La Gomera, como una estrategia eficaz para el aislamiento de diversidad de sustancias sesquiterpénicas derivadas de chamigreno y con los objetivos de:

¹ J. W. Blunt, B. R. Copp, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep, *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, *28*, 196-268, y publicaciones anteriores de la serie.

² I. Brito, J. Darias, E. Dorta, M. Cueto, *Tetrahedron Letters*, **2002**, *43*, 2551-2553.

³ I. Brito, M. Cueto, A. R. Díaz-Marrero, J. Darias, A. San Martín, *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 946-948.

⁴ E. Dorta, A. R. Díaz-Marrero, M. Cueto, Luis D´Croza, J. L. Maté, J. Darias, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 7065-7068.

- Comprobar la posible biosíntesis de metabolitos chamigrénicos no halogenados procedentes de *Laurencia majuscula*, o de otras especies de *Laurencia* ingeridas por aplysias.
- Comparar los metabolitos *de novo* de *Laurencia majuscula* con los productos acumulados por estos herbívoros.
- Estudiar de forma independiente los extractos del manto y del aparato digestivo de las aplysias por su interés ecológico.
- Evaluar la actividad citotóxica de algunos metabolitos de ambos organismos. Evaluar las capacidades *ex novo* que exhiben las aplysias para detoxificar metabolitos adquiridos de su dieta.

Lo que en principio iba a ser un trabajo de investigación corto, para intentar resolver el primer punto de los objetivos, derivó a una investigación más amplia, con nuevos objetivos, debido a la notable riqueza metabólica encontrada en ambas especies.

También, dentro del proyecto de investigación antes mencionado, estudiamos una especie nueva de octocoral, procedente del Pacífico oriental de Panamá.

A continuación avanzamos un resumen del contenido de la Tesis Doctoral, para luego desarrollarlo con amplitud en los capítulos siguientes: Introducción, Parte Teórica y Parte Experimental.

AVANCE DE CONTENIDO

Se describe el estudio químico de tres especies marinas: un alga roja y dos invertebrados. El alga es *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas, uno de los invertebrados es el molusco *Aplysia dactylomela* y el otro es un octocoral del género *Pterogorgia*.

La exploración de los océanos ha originado el descubrimiento de nuevos productos de algas, invertebrados y microorganismos marinos. El estudio de algas rojas, particularmente de especies del género *Laurencia*, está íntimamente ligado a la evolución de la investigación en la química de organismos marinos, desde sus inicios hasta nuestros días. Esto es debido, principalmente, al rol que tuvo el estudio químico del género *Laurencia* en el descubrimiento de la incorporación de halógenos en la biosíntesis de sesquiterpenos, así como en la caracterización de moléculas polihalogenadas, sin precedentes en el medio ambiente terrestre.

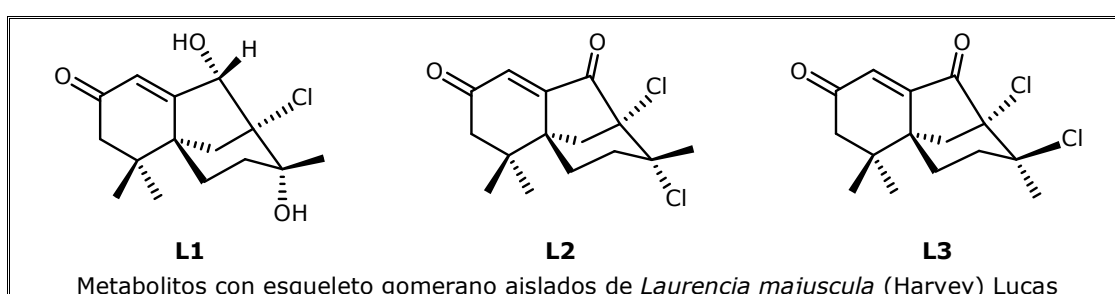
Nuestro Grupo de Investigación ha tenido un papel relevante en la investigación química de este género, y, por las razones antes mencionadas, abordamos por primera vez el estudio químico de *Laurencia majuscula*.

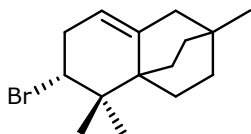
Del estudio químico de esta especie se obtuvo un número significativo de nuevos productos, y como la mayoría incorporan halógenos en sus estructuras químicas, en la Introducción de la Tesis hacemos referencia a las estrategias de halogenación que utiliza la Naturaleza para la biosíntesis de productos naturales halogenados. Incluimos un resumen de los tipos de enzimas de halogenación, haciendo hincapié en las haloperoxidasas de vanadio que, posiblemente, son las responsables de la mayoría de los procesos de halogenación biológica en algas marinas. La Introducción se complementa con una recopilación bibliográfica de productos con esqueleto chamigreno (α -chamigreno y β -chamigreno). Estos metabolitos son característicos de las algas rojas del género *Laurencia* y de los moluscos del género *Aplysia*.

Los estudios que hemos realizado con un octocoral del género *Pterogorgia*, supone una importante contribución a la química de bisbutanolidos. Para los sistemas dilactónicos presentes en los metabolitos aislados de *Pterogorgia* sp., proponemos una ruta biogénica que implica la oxidación de ácidos grasos de cadena larga (C16:0 y C18:0). Asimismo, se efectúa una recopilación bibliográfica de productos de octocorales con anillos γ -lactónicos derivados de ácidos grasos.

En la Parte Teórica se describen con detalle las nuevas sustancias obtenidas del estudio de cada especie, así como algunos ensayos de actividad biológica. El conjunto de productos caracterizados representa una gran diversidad estructural.

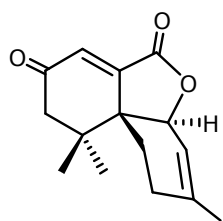
Del alga *L. majuscula* se describen nuevos productos que, en conjunto, responden a cuatro esqueletos: gomerano (esqueleto nuevo), rhodolaurano, chamigreno y esqueleto degradado derivado de chamigreno. Se representan en los recuadros siguientes:



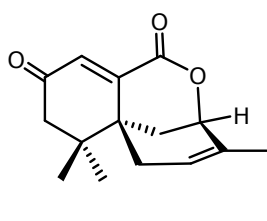


L4

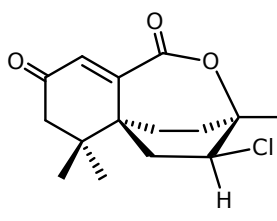
Metabolito representativo del esqueleto rhodolaurano aislado de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas



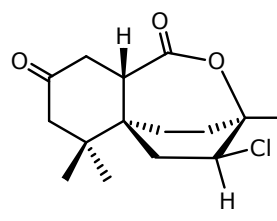
L5



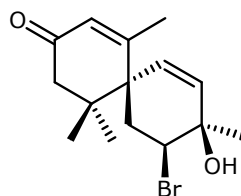
L6



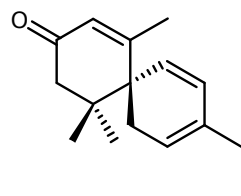
L7



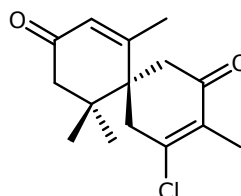
L8



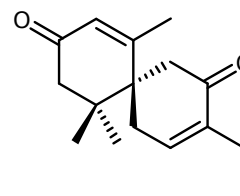
L10



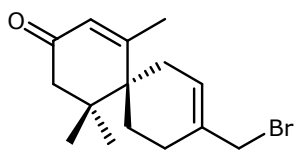
L11



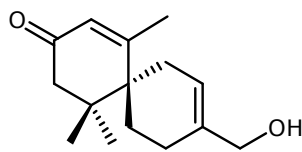
L12



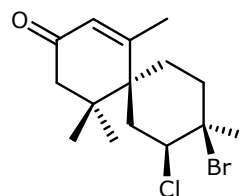
L13



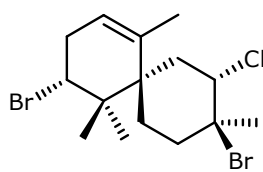
L14



L15

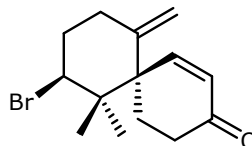


L16



Ap-1

Metabolitos derivados de α -chamigreno aislados de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas

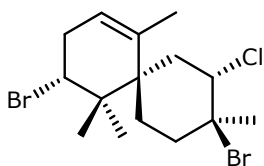


L9

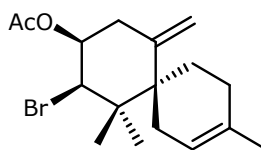
Nor-chamigreno aislado de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

Las aplysias son moluscos herbívoros que, con frecuencia, se alimentan de algas del género *Laurencia*, de las que adquieren muchos de sus metabolitos para almacenarlos en sus glándulas digestivas. Como el contenido químico de las glándulas digestivas varía, dependiendo del lugar de recolección, estudiamos especímenes de *Aplysia dactylomela* recolectadas por primera vez en las islas de la Palma y de la Gomera.

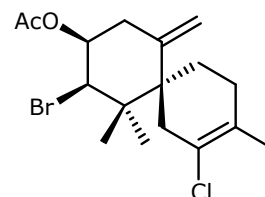
De *A. dactylomela*, recolectada en La Palma, se caracterizaron sesquiterpenos que derivan de los esqueletos siguientes: chamigreno, bisaboleno, ciclobisaboleno, y derivados reagrupados y degradados de bisaboleno. Se representan en los recuadros siguientes:



Ap-1

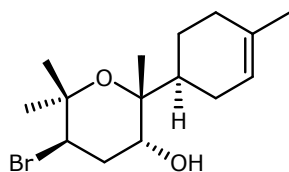


A1

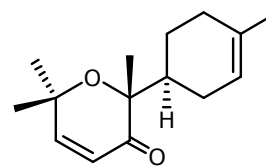


A2

Nuevos productos derivados de chamigreno aislados de *Aplysia dactylomela* (La Palma)

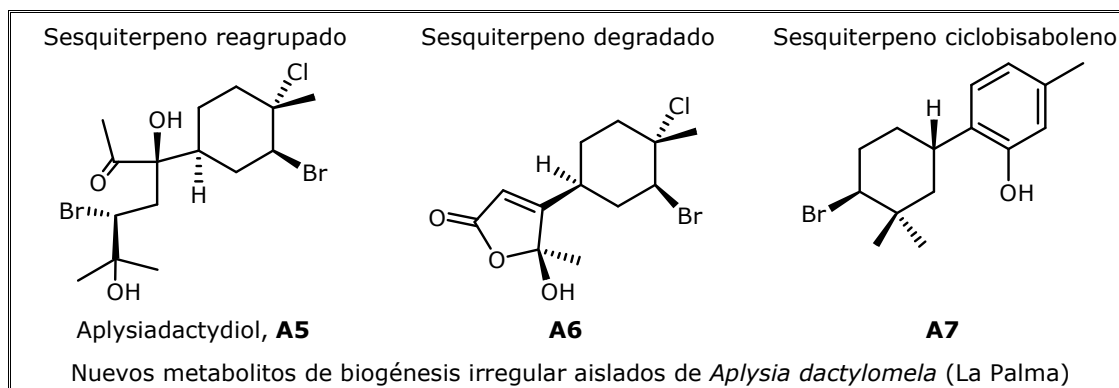


A3



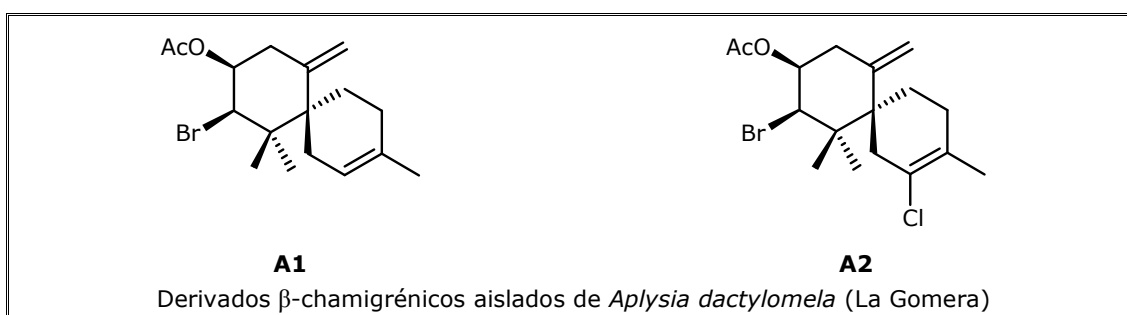
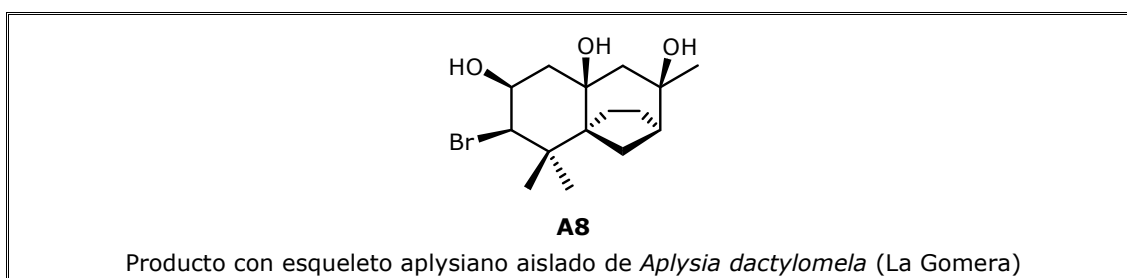
A4

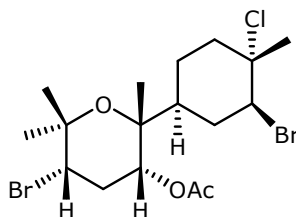
Nuevos productos derivados de bisaboleno aislados de *Aplysia dactylomela* (La Palma)



El descubrimiento en *A. dactylomela* de un sesquiterpeno de biogénesis irregular, el aplysiadactydiol (**A5**), nos ha permitido proponer una ruta biogénica unificada para metabolitos con esqueleto bisaboleno obtenidos de algas marinas.

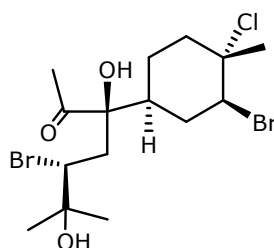
De la *Aplysia dactylomela* de La Gomera hemos caracterizado productos con los siguientes esqueletos: aplysiario, encontrado por primera vez en un organismo marino, chamigreno, bisaboleno y derivados irregulares de bisaboleno. Se representan en los recuadros siguientes:





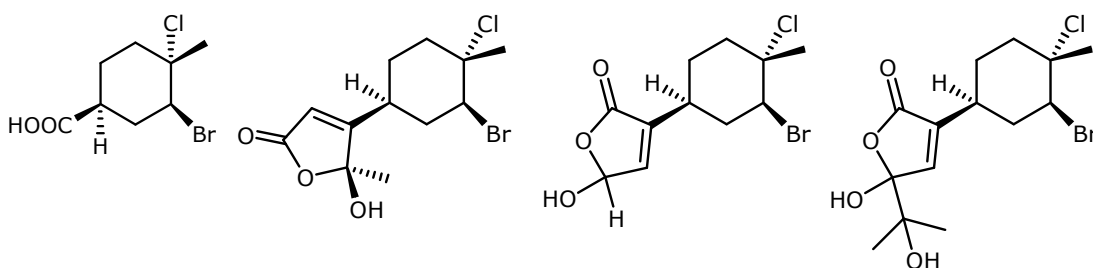
A9

Derivado regular de bisaboleno aislado de *Aplysia dactylomela* (La Gomera)



A5

Aplysyadactydiol, un sesquiterpeno irregular, derivado de bisaboleno y aislado de *Aplysia dactylomela* (La Gomera)



A10

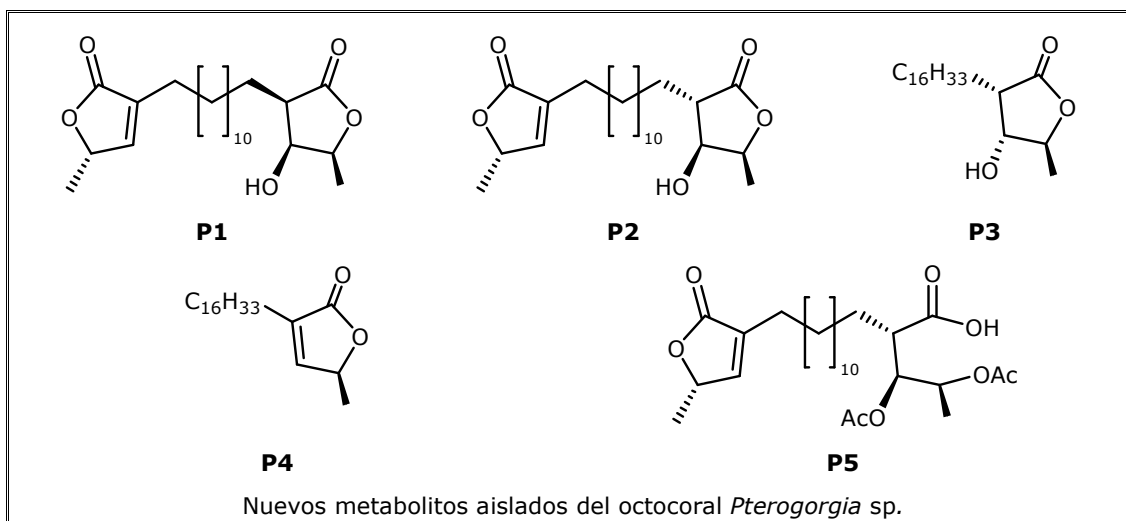
A6

A11

A12

Metabolitos degradados, derivados de bisaboleno y aislados de *Aplysia dactylomela* (La Gomera)

Otro invertebrado objeto de estudio fue el octocoral *Pterogorgia* sp., del que obtuvimos una serie de C-dilactonas diastereoisoméricas, representadas en el recuadro siguiente, junto con los productos conocidos hidroxiancepsenolido y homoancepsenolido.



La caracterización estructural de estos metabolitos lactónicos nos permitió establecer unas reglas empíricas, basadas en RMN de ^{13}C , para determinar la estereoquímica relativa de 3-alkil-4-hidroxi-5-metil-2(5H)-dihidrofuranonas, una unidad γ -lactona frecuente en muchos productos bioactivos naturales y sintéticos. Proponemos para los sistemas dilactónicos una ruta biogenética vía oxidación de ácidos grasos C16:0 y C18:0.

En la Parte Teórica se describe la configuración relativa de cada una de las estructuras representadas en los recuadros y, en algunos casos, la configuración absoluta.

Parte de los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- A. R. Díaz-Marrero, I. Brito, J. M. de la Rosa, L. D'Croze, O. Fabelo, C. Ruiz-Pérez, J. Darías, M. Cueto. "Novel Lactone Chamigrene-Derived Metabolites from *Laurencia majuscula*". **Eur. J. Org. Chem.**, **2009**, 1407-1411.
- A. R. Díaz-Marrero, I. Brito, J. M. de la Rosa, J. Darías, M. Cueto. "Gomerones A-C, halogenated sesquiterpenoids with a novel carbon skeleton from *Laurencia majuscula*". **Tetrahedron**, **2008**, 10821-10824.
- E. Dorta, A. R. Díaz-Marrero, I. Brito, M. Cueto, L. D'Croze, J. Darías. "The oxidation profile at C-18 of furanocembranolides provides a taxonomical marker for several genera of octocorals". **Tetrahedron**, **2007**, 9057-9062.

- M. Lorenzo, I. Brito, M. Cueto, L. D'Croze, J. Darias. "¹³C NMR-based empirical rules to determine the configuration of fatty acid butanolides. Novel γ -dilactones from *Pterogorgia* sp". **Org. Lett.**, **2006**, 5001-5004.
- I. Brito, T. Dias, A. R. Díaz-Marrero, J. Darias, M. Cueto. "Aplysiadiol from *Aplysia dactylomela* suggested a key intermediate for a unified biogenesis of regular and irregular marine algal bisabolene-type metabolites". **Tetrahedron**, **2006**, 9655-9660.
- T. Dias, I. Brito, L. Moujir, N. Paiz, J. Darias, M. Cueto. "Cytotoxic sesquiterpenes from *Aplysia dactylomela*". **J. Nat. Prod.**, **2005**, 68, 1677-1679.

La investigación que he desarrollado en el IPNA también ha dado lugar a la publicación de los siguientes artículos:

- A. R. Díaz-Marrero, I. Brito, M. Cueto, A. San-Martín, J. Darias. "Suberitane network, a taxonomical marker for Antarctic sponges of the genus *Suberites*? Novel sesterterpenes from *Suberites caminatus*". **Tetrahedron Lett.**, **2004**, 45, 4707-4710.
- A. R. Díaz-Marrero, I. Brito, E. Dorta, M. Cueto, A. San-Martín, J. Darias. "Caminatal, an aldehyde sesterterpene with a novel carbon skeleton from Antarctic sponges *Suberites caminatus*". **Tetrahedron Lett.**, **2003**, 44, 5939-5940.
- I. Brito, M. Cueto, A. R. Díaz-Marrero, J. Darias, A. San Martín. "Oxachamigrenes, New Halogenated Sesquiterpenes from *Laurencia obtusa*". **J. Nat. Prod.**, **2002**, 65, 946-948.
- I. Brito, J. Darias, E. Dorta, M. Cueto. "Bromocyclococanol, a Halogenated Sesquiterpene with a Novel Carbon Skeleton from the Red Alga *Laurencia obtusa*". **Tetrahedron Lett.**, **2002**, 43, 2551-2553.
- E. Dorta, M. Cueto, I. Brito, J. Darias. "New Terpenoids from the Brown Alga *Styopodium zonale*". **J. Nat. Prod.**, **2002**, 65, 1727-1730.

1. Introducción



La investigación química de la biota marina es relativamente reciente. Se puede decir que es a partir de la mitad de la década de los sesenta y principios de los setenta cuando comienza el estudio sistemático de la química de organismos marinos. Es decir, hace apenas 45 años, lo que contrasta con la investigación sobre la química de metabolitos secundarios de plantas terrestres, que tiene una larga tradición. Las sustancias químicas derivadas de animales, plantas y microbios se han utilizado para tratar enfermedades humanas desde los albores de la medicina. Los primeros datos escritos proceden de Mesopotamia, 2.600 AC, donde en texto cuneiforme sobre placas de arcilla se describen sustancias derivadas de plantas, como aceites derivados de especies de *Cedrus* (cedro) y *Cupressus sempervirens* (ciprés), derivados de *Glycyrrhiza glabra* (regaliz), *Commiphora* (mirra), y *Papaver somniferum* (jugo de adormidera), todos ellos actualmente en uso para el tratamiento de enfermedades como la tos y resfriados hasta infecciones parasitarias e inflamación.

La exploración de los océanos ha originado el descubrimiento de nuevos productos de algas, invertebrados y microorganismos marinos. Hay que señalar que el estudio de las algas rojas, particularmente de algunas especies, está íntimamente ligado a la evolución de la investigación en la química de organismos marinos, desde sus inicios hasta nuestros días.

Dada la abundancia de cloro y bromo en los océanos, no es sorprendente que la mayoría de los compuestos halogenados naturales sean de origen marino. La variedad estructural de los productos de origen marino, en relación con los terrestres, es una consecuencia de las diferencias bioquímicas de sus procesos biológicos, impuestas por las distintas condiciones medioambientales a las que están sometidos, como son: una mayor presión, mayor concentración de iones halógenos, menor intensidad lumínica, y temperatura que va desde los -2.5°C de los mares antárticos a temperaturas superiores a los 100°C , que se alcanzan en los fondos oceánicos donde fluyen materiales hidrotermales. Posiblemente, la característica que establece una mayor diferencia entre ambos medios, marino y terrestre, sea la gran concentración de iones halógeno que contiene el agua de mar, especialmente cloruros y bromuros.

1.1. HALOGENACIÓN BIOLÓGICA.

1.1.1. Antecedentes.

La naturaleza ha desarrollado varios mecanismos para activar la olefina terminal de terpenos lineales y facilitar la creación de nuevos enlaces C-X (X=heteroátomo, protón o halógeno). Por ejemplo, la ciclación del escualeno a esteroides y hopanoides se inicia por epoxidación o protonación de la olefina terminal, respectivamente, Figura 1.1.1.1.

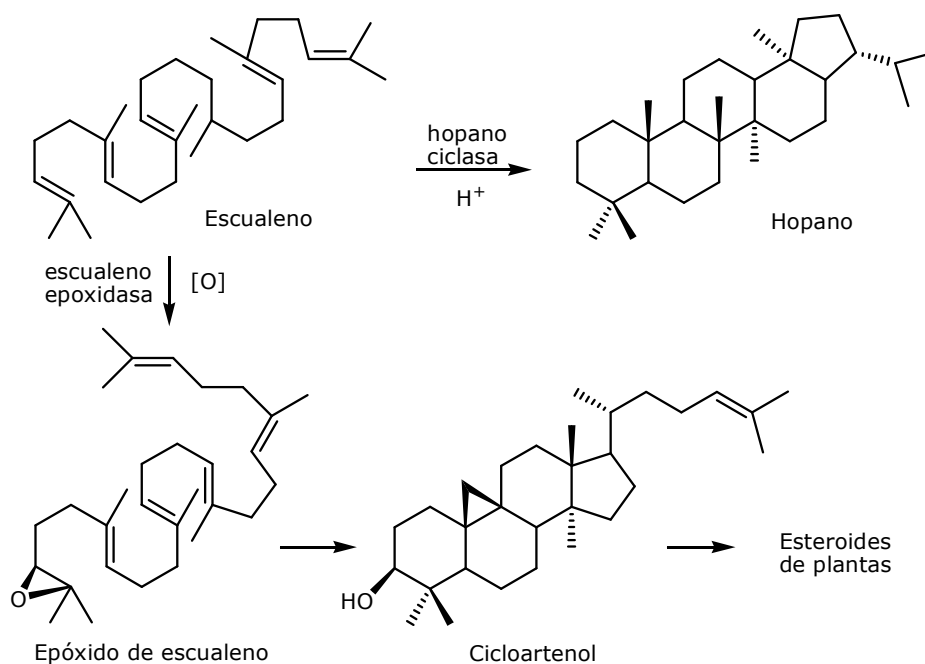


Figura 1.1.1.1. Ciclación de olefinas terminales vía epoxidación y protonación.

Aunque estas estrategias biosintéticas están muy generalizadas, en las macroalgas marinas opera, además, un tercer mecanismo de ciclación de terpenos, que implica la participación de iones bromonio en la inducción de la ciclación, Figura 1.1.1.2. Por ejemplo, en el medio ambiente terrestre, la ciclación del geraniol pirofosfato (GPP) inducida por ácido puede dar el derivado octodano A, una feromona sexual del gorgojo *Anthonomus grandis*. En cambio, si la ciclación la inicia el ion

bromonio (Br^+), como ocurre en el medio marino, puede obtenerse el octodeno, aislado del alga *Octhodes secundiramea*.⁵

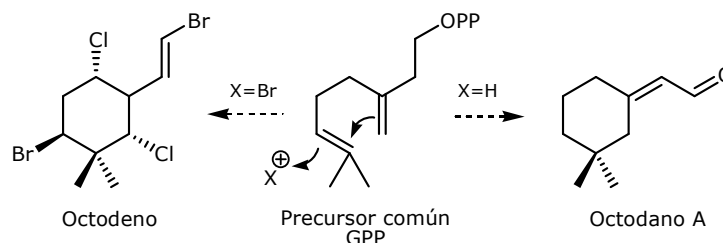


Figura 1.1.1.2. Ciclación de olefinas terminales vía halogenación y protonación.

A pesar de que en los océanos el cloro es más abundante que el bromo, las algas marinas incorporan más átomos de bromo que de cloro en sus metabolitos. El fitoplancton y las algas producen una gran diversidad de compuestos organohalogenados, y representan el 20-25% de todos los organohalogenados naturales conocidos. En este punto cabe destacar la importancia que tuvo el estudio de algas del género *Laurencia*, en el descubrimiento de la incorporación de halógeno en la biosíntesis de sesquiterpenos.

En 1969, del alga *Laurencia okamurai*⁶ se aislaron los primeros metabolitos bromados, los sesquiterpenos aplysina, desbromoaplysina, aplysinol, laurinterol y desbromolaurinterol. La incorporación de bromo en los productos llamó poderosamente la atención e indujo que, en la década de los setenta, un número de científicos de diversos países se interesasen por la química de organismos marinos. En rigor histórico, los productos aplysina, desbromoaplysina, aplysinol, se obtuvieron inicialmente del molusco herbívoro *Aplysia kurodai* en 1963,⁷ pero la *Aplysia* no los biosintetiza, sino que los obtiene y acumula del auténtico productor, el alga *L. kurodai*, la cual forma parte de su dieta, Figura 1.1.1.3.

⁵ W. Fenical, *Science*, **1982**, 215, 923-928.

⁶ T. Irie, M. Suzuhi, Y. Hayakawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1969**, 42, 843-844.

⁷ S. Yamamura, Y. Hirata, *Tetrahedron*, **1963**, 19, 1485-1496.

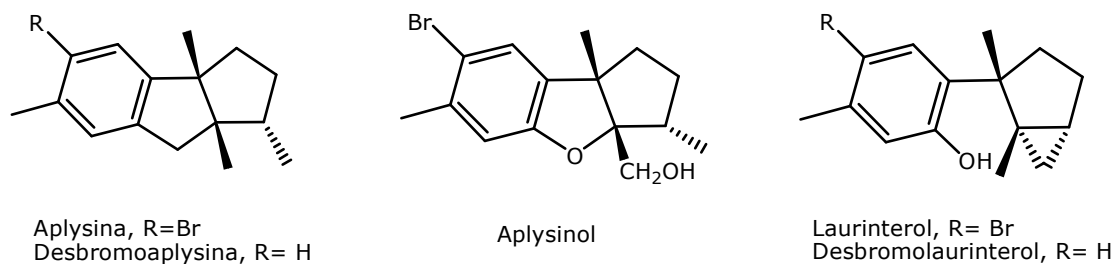


Figura 1.1.1.3. Primeros metabolitos bromados de *Aplysia kurodai* y *Laurencia okamurai*.

Desde esta época, los estudios de especies de algas del género *Laurencia*, y de algún que otro género, como *Plocamium* y, en menor medida, *Delisea* y *Asparagopsis*, están íntimamente ligados a la historia de los metabolitos secundarios polihalogenados de origen marino. Dentro de las algas de la familia Rhodomelaceae, las especies del género *Laurencia* ocupan un lugar destacado ya que producen el 85% del total de los metabolitos secundarios obtenidos de la familia, la mayoría halogenados.

Sin embargo, el primer metabolito cuyo análisis estructural demostró que contenía halógeno se obtuvo de un eucariota marino, el octocoral *Gorgonia cavolinii*, en 1896.⁸ Este compuesto se caracterizó como 3,5-diyodotirosina y fue encontrado posteriormente en las glándulas tiroideas de los mamíferos⁹ (Figura 1.1.1.4). La tirosina es un yoduro de arilo necesario para el control metabólico humano y la homeostasis.

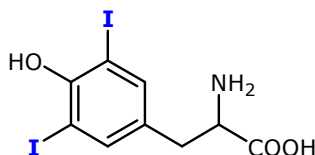


Figura 1.1.1.4. 3,5-diyodotirosina: primer producto halogenado obtenido de un organismo marino.

En la actualidad se conocen más de 5.000 productos naturales halogenados producidos por organismos vivos, y cada año se aísla un promedio de 200 nuevos productos que contienen halógenos. La cloración es la modificación predominante, seguida por la bromación. La yodación y fluoración son raras en la naturaleza.

⁸ (a) E. Drechsel, *Zeitschrift fur Biologie*, **1896**, 33, 85–107. (b) C. D. Murphy, C. D., *Appl. Microbiol.*, **2003**, 94, 539–548.

⁹ (a) G. L. Foster, *J. Biol. Chem.*, **1929**, 83, 345–346. (b) K. H. van Pe'e, C. Dong, S. Flecks, J. Naismith, E. P. Patallo, T. Wage, *Adv. Appl. Microbiol.*, **2006**, 59, 127–157.

1.1.2. Incorporación de halógenos en las moléculas.

La introducción de halógenos en moléculas complejas, utilizando métodos tradicionales de síntesis, es muy complicada, especialmente por la falta de especificidad y regioselectividad, además de que los halogenuros no son particularmente reactivos, a menos que sean activados mediante la intervención de enzimas. La naturaleza ha desarrollado una variedad de mecanismos enzimáticos, para la halogenación de sustratos específicos que cursan con regio- y estereoselectividad, por lo que la halogenación enzimática, a través de mecanismos de oxidación, es la ruta más común hacia estos metabolitos.¹⁰

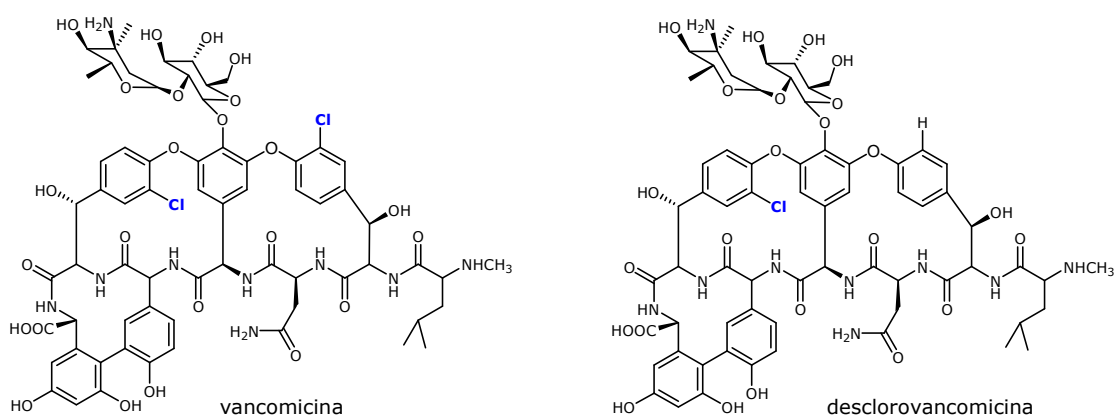


Figura 1.1.2.1. Vancomicina y desclorovancomicina. Influencia de los sustituyentes halogenados en la magnitud de la actividad antibacteriana.

Por esta razón, y porque la presencia de halógenos en muchos productos naturales influye en su actividad biológica (por ejemplo, cuando un átomo de cloro del antibiótico glicopeptídico vancomicina, se sustituye por el hidrógeno se pierde la conformación clínicamente activa y el resultado es la disminución de la actividad antibacteriana¹¹ hasta en un 70%), el descubrimiento de nuevos productos de origen

¹⁰ (a) X. Chen, K. H. van Pée, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **2008**, *40*, 183–193.

(b) H. Deng, D. O'Hagan, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2008**, *12*, 582–592.

(c) L. C. Blasiak, C. L. Drennan, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*, 147–155.

(d) C. Wagner, E. M. Omari, G. M. König, *J. Nat. Prod.*, **2009**, *72*, 540–553.

(e) C. S. Neumann, D. G. Fujimori, C. T. Walsh, *Chem. Biol.*, **2008**, *15*, 99–109.

(f) D. G. Fujimori, C. T. Walsh, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2007**, *11*, 553–560.

(g) J. Littlechild, E. G. Rodriguez, M. Isupov, *J. Inorg. Biochem.*, **2009**, *103*, 617–621.

(h) F. H. Vaillancourt, E. Yeh, D. A. Vosburg, S. Garneau-Tsodikova, C. T. Walsh, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 3364–3378.

(i) A. Butler, J. N. Carter-Franklin, *Nat. Prod. Rep.*, **2004**, *21*, 180–188.

¹¹ S. R. Nagarajan, *J. Antibiot.*, **1993**, *46*, 1181–1195.

marino, y la caracterización de los mecanismos de halogenación enzimática, se ha convertido en un área muy activa de investigación.

La caracterización estructural de enzimas de halogenación ha servido de base para entender el mecanismo de la especificidad y su química. En particular, la obtención reciente de imágenes cristalográficas de la arquitectura del sitio activo, y del sitio de unión de halogenuro, ha proporcionado información esencial sobre las claves de la catálisis enzimática.

1.1.3. Clases de enzimas de halogenación.

Las enzimas de halogenación se pueden dividir en tres grandes clases. La clase I, denominada haloperoxidasas, requiere peróxido de hidrógeno e incluye dos subclases: las hemo-haloperoxidasas dependientes de hierro, es decir, con porfirina que contiene hierro, y las haloperoxidasas dependientes de vanadio. La clase II, halogenasas, utiliza oxígeno molecular y también incluye dos subclases: las halogenasas dependientes de flavina, y las halogenasas no-hemo (no incluyen porfirina) dependientes de hierro. Por último, la clase III son las halogenasas nucleofílicas. En la Tabla 1.1.3.1 se muestran sus aspectos generales y el tipo de sustrato requiere cada clase de enzima.

Tabla 1.1.3.1. Tipos de enzimas de halogenación. Adaptada de referencia 10c.

CLASE	Enzima	Halógeno activo	Sustrato requerido	Cofactor y cosustratos
I	Hemo-haloperoxidasas dependientes de hierro	X ⁺	aromáticos y ricos en electrones	hemo, H ₂ O ₂
	Haloperoxidasas dependientes de vanadio	X ⁺	aromáticos y ricos en electrones	vanadato, H ₂ O ₂
II	Halogenasas dependientes de flavina	X ⁺	aromáticos y ricos en electrones	FADH ₂ , O ₂
	Halogenasas no-hemo dependientes de hierro	X [*]	alifáticos, inactivados	Fe(II), O ₂ , α-cetoglutarate
III	Halogenasas nucleofílicas	X	electrofílicos, buen grupo saliente, (AdoMet)	

En contraste con las haloperoxidasas, las reacciones de halogenación catalizadas por halogenasas transcurren con alta regioselectividad y especificidad de sustrato.¹²

Las dos primeras grandes clases halogenan productos naturales con centros de carbono ricos en electrones, y para ello la naturaleza utiliza un intermedio hipohalito (HOX) que es químicamente equivalente a una especie electrofílica "X⁺", especie reactiva deficiente en electrones que se obtiene por oxidación mediante dos electrones del haluro correspondiente. Por lo tanto, la catálisis ocurre a través de un mecanismo de sustitución electrofílica.

Ambas clases, haloperoxidasas y halogenasas, difieren en el tipo de oxidante. Mientras que la clase haloperoxidasas utiliza el peróxido de hidrógeno, la clase halogenasas utiliza oxígeno molecular. La clase haloperoxidasas puede oxidar los iones halogenuros Cl⁻, Br⁻, o I⁻, pero no F⁻. Tradicionalmente, la nomenclatura de las haloperoxidasas se ha basado en el halogenuro más electrofílico que, catalizado por la enzima, se oxida fácilmente por peróxido de hidrógeno. En consecuencia, las cloroperoxidasas (CIPO) oxidan el cloruro, bromuro y yoduro por el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), mientras que las yodoperoxidasas sólo oxidan el yoduro de esta manera. El peróxido de hidrógeno no tiene el potencial termodinámico necesario para oxidar el fluoruro, por lo que las enzimas que catalizan la fluoración no son peroxidadas.

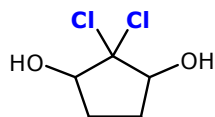
1.1.4. Haloperoxidasas.

Por su relación con esta Tesis, dentro de las distintas clases de enzimas de halogenación que figuran en la Tabla 1.1.3.1, nos centraremos en dos de ellas: las hemo-haloperoxidasas dependientes de hierro y las haloperoxidasas dependientes de vanadio. El estudio de las haloperoxidasas dependientes de hierro facilitó el descubrimiento de las segundas, esto es, las haloperoxidasas dependientes de vanadio, que catalizan la mayoría de los procesos de halogenación que ocurren en las algas rojas.

La primera enzima de halogenación que se caracterizó fue la cloroperoxidasa (CIPO). Se obtuvo del hongo *Caldariomyces fumago* y sirve de prototipo de hemo-haloperoxidasas. Esta proteína se aisló gracias a que se postuló que una enzima de

¹² K. H. van Pe'le, S. Unversucht, *Chemosphere*, **2003**, 52, 299–312.

halogenación debería ser la responsable de la biosíntesis de los átomos de cloro presentes en un metabolito del hongo, la caldariomicina.^{13,14}



Caldariomicina

El mecanismo de halogenación propuesto, inferido de la elucidación de la estructura tridimensional de esta enzima, supone que el peróxido se enlaza en la posición axial del complejo Fe(III)-porfirina. La eliminación de agua produce una especie Fe(IV)-oxo intermedia denominada compuesto I, que es interceptada por halogenuro para producir una especie hipohalito-Fe(III), compuesto II. El sustrato orgánico puede halogenarse directamente por la acción del compuesto II, o bien por el ácido hipohaloso liberado (ClOH), ya fuera del complejo-Fe.^{15,16}

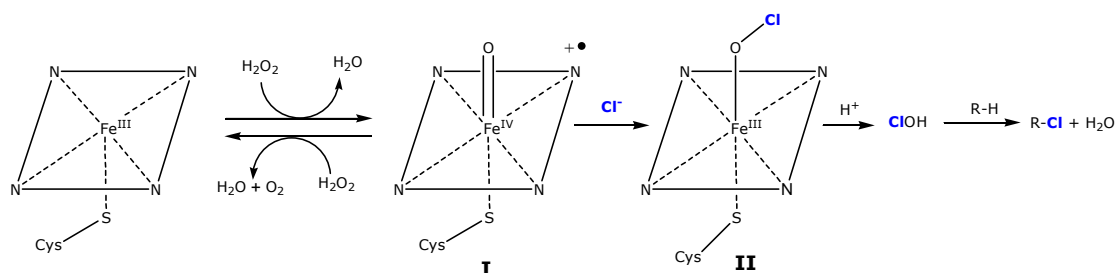


Figura 1.1.4.1. Mecanismo de reacción de hemo-haloperoxidasas dependientes de hierro.

Independientemente de qué especie exacta es la responsable de halogenación, hay consenso en que estas haloperoxidasas combinan la reducción de H₂O₂ y la oxidación de halogenuro para producir algún tipo de X⁺ electrofílico, que puede ser atacado por un sustrato rico en electrones.¹⁷ Estudios espectroscópicos y estructurales confirman que el ligando axial próximo al Fe-catalítico es tiolato, derivado de una cisteína. Por su estabilidad, y amplio comportamiento químico, esta proteína CIPO es importante en aplicaciones comerciales. La estequiometría de la reacción de

¹³ P. D. Shaw, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.*, **1959**, 234, 2565-2569.

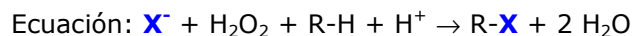
¹⁴ P. D. Shaw, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.*, **1961**, 236, 1626-1630.

¹⁵ H. A. Wagenknecht, W. D. Woggon, *Chem. Biol.*, **1997**, 4, 367-372.

¹⁶ P. G. Furtmuller, C. Obinger, Y. Hsuanyu, H. B. Dunford, *Eur. J. Biochem.*, **2000**, 267, 5858-5864.

¹⁷ D. R. Ramos, M. V. García, M. L. Canle, J. A. Santaballa, P. G. Furtmuller, C. Obinger, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2007**, 466, 221-233.

haloperoxidasas implica el consumo de un equivalente de H₂O₂ por producto halogenado producido, como se muestra en la siguiente ecuación.



Se han encontrado haloperoxidasas en prácticamente todas las clases de organismos marinos. Las algas Rhodophytas son las más ricas en actividad bromoperoxidasa y en contenido de lípidos halogenados. Las algas pardas son las más pobres en actividad haloperoxidasa.

Por otra parte, las haloperoxidasas de vanadio son enzimas no-hemo (sin porfirina). La presencia de vanadio como un componente esencial de haloperoxidasas, se descubrió en el alga roja *Ascophyllum nodosum* en 1984.¹⁸ Las haloperoxidasas dependientes de vanadio también catalizan la oxidación de halogenuros (excepto fluoruro) por peróxido de hidrógeno.

Dentro de las haloperoxidasas dependientes de vanadio están las cloroperoxidasas (V-ClPO) y las bromoperoxidasas (V-BrPO). Las V-ClPO se han aislado de hongos y de dos especies de bacterias, pero no de organismos marinos, mientras que las V-BrPO se encuentran principalmente en algas marinas verdes, rojas y pardas.

El vanadio, después del molibdeno, es el metal de transición más abundante en los océanos y el estado de oxidación V(V) es el más común en el agua de mar.¹⁹ Se han caracterizado V-BrPOs en las clases más importantes de algas marinas, y se cree que las haloperoxidasas dependientes de vanadio (V-BrPO) son las responsables de la inmensa mayoría de los procesos de halogenación que ocurren en productos naturales marinos. Su rol en la biosíntesis de sesquiterpenos cíclicos bromados de algas rojas, se estableció en 2004 por conversión quimioenzimática *in vitro* de (*E*)-(+)-nerolidol en los regioisómeros de synderol (α -, β - y γ -synderol), un sesquiterpeno natural,¹⁰ⁱ además de óxido de 3 β -bromo-8-epicarrapi, Figura 1.1.4.2. Estos productos han sido aislados de *L. obtusa*. El γ -synderol ha sido propuesto como intermedio en la biosíntesis de otros productos naturales bicíclicos. Este resultado establece por primera vez,²⁰ en 2004, el rol de la V-BrPO en la biosíntesis de sesquiterpenos cíclicos bromados de algas rojas marinas.

¹⁸ H. Vitler, *Phytochemistry*, **1984**, *23*, 1387–1390.

¹⁹ M. Jaclyn, J. M. Winter, S. Bradley, M. S. Moore, *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*, 18577–18581.

²⁰ J. N. Carter-Franklin, A. Butler, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 15060–15066.

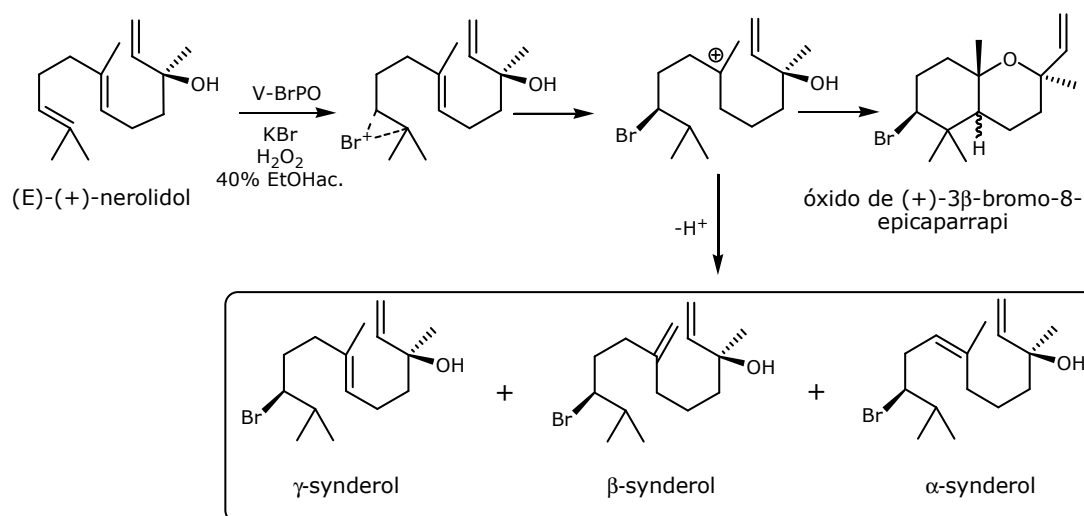


Figura 1.1.4.2. Conversión quimioenzimática *in vitro* de (E)-(+)-nerolidol en regioisómeros de synderol.

La enzima bromoperoxidasa de vanadio (V-BrPO), utilizada en esta transformación quimio-enzimática, se obtuvo de algas rojas de los géneros *Laurencia*, *Plocamium* y *Corallina*. La V-BrPO actúa catalizando la oxidación de ion bromuro por peróxido de hidrógeno generando un ion bromonio, o una especie equivalente, en el sitio activo de la enzima, que bromina una cara de la olefina terminal del nerolidol.

El cofactor redox (H₂O₂) de una haloperoxidasa dependiente de vanadio, se ancla en el sitio activo cuando el ion vanadato se une a un ligando de la proteína: el anillo imidazólico de un residuo de histidina, Figura 1.1.4.3. De modo análogo a las hemo-Fe haloperoxidasas, el peróxido de hidrógeno se enlaza al centro metálico de V y lo activa, mediante la formación de un intermedio metal-oxo de alta valencia, η-2-peroxo, para reaccionar con varios halogenuros y generar un hipohalito enlazado a vanadio (intermedio III), donde -OX es un (Br⁺) equivalente.^{10i,21} A diferencia de las hemo-Fe haloperoxidasas, el átomo de vanadio no parece activo en el proceso redox, sino que mantiene su estado de oxidación V(V) a lo largo del ciclo catalítico.

Al igual que con las enzimas hemo-dependientes, todavía hay un cierto desacuerdo sobre la naturaleza de la especie que halogena. No está claro si el intermedio V-OB_r, III, (en general V-OX) unido a la enzima es el agente oxidante activo, o lo es el ácido hipohaloso, liberado del centro metálico antes de que ocurra la halogenación. Algunas pruebas experimentales indican que estas enzimas pueden

²¹ J. Littlechild, E. Garcia-Rodriguez, A. Dalby, M. Isupov, *J. Mol. Recognit.*, **2002**, *15*, 291-296.

realizar ciertas reacciones con regioselectividad o enantioselectividad,²⁰ lo que apoya que la reacción ocurra con un equivalente X^+ atrapado en la enzima, mientras que en otros casos no se observa la selectividad.¹⁰ⁱ (La reacción con el synderol es un ejemplo de que el proceso ocurre con selectividad).

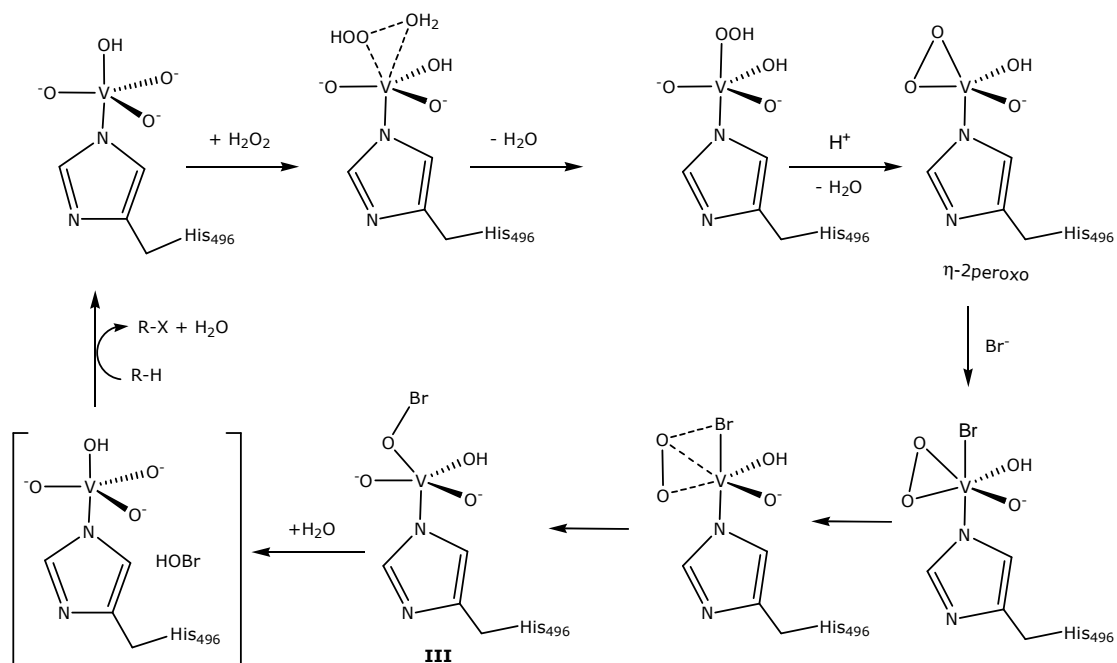


Figura 1.1.4.3. Mecanismo de reacción de haloperoxidasas dependientes de vanadio.

La primera haloperoxidasa de vanadio que se caracterizó por rayos X fue una cloroperoxidasa, y se obtuvo del hongo *Curvularia inaequalis*.²² Más recientemente, se completaron las estructuras de tres bromoperoxidasas homólogas de las algas *Ascophyllum nodosum*, *Corallina officinalis*, y *Corallina pilulifera*.^{10i,20} Los estudios estructurales de V-BrPO^{23,24} y V-ClPO²⁵ indican que hay diferencias sustanciales entre ellas, sin embargo, ambas enzimas poseen un centro activo característico muy similar, lo que apoya el mecanismo propuesto.

El vanadio está enlazado como ión vanadato (V), ligado al anillo de imidazol de un residuo de histidina conservada que ancla el cofactor vanadio en una coordinación

²² A. Messerschmidt, L. Prade, R. Wever, *Biol. Chem.*, **1997**, 378, 309–315.

²³ M. N. Isupov, A. R. Dalby, A. A. Brindley, Y. Izumi, T. Tanabe, G. N. Murshudov, J. A. Littlechild, *J. Mol. Biol.*, **2000**, 299, 1035–1049.

²⁴ M. Weyand, H. J. Hecht, M. Kie, M. F. Liaud, H. Vilter, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.*, **1999**, 293, 595–611.

²⁵ A. Messerschmidt, R. Wever, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 392–396.

trigonal bipiramidal, con los enlaces del metal coordinados a tres átomos de oxígeno no proteínicos localizados en el plano ecuatorial. En el sitio activo las cargas negativas son compensadas con los protones nitrogenados de residuos de aminoácidos, por una extensa red de puentes de hidrógeno, Figura 1.1.4.4.

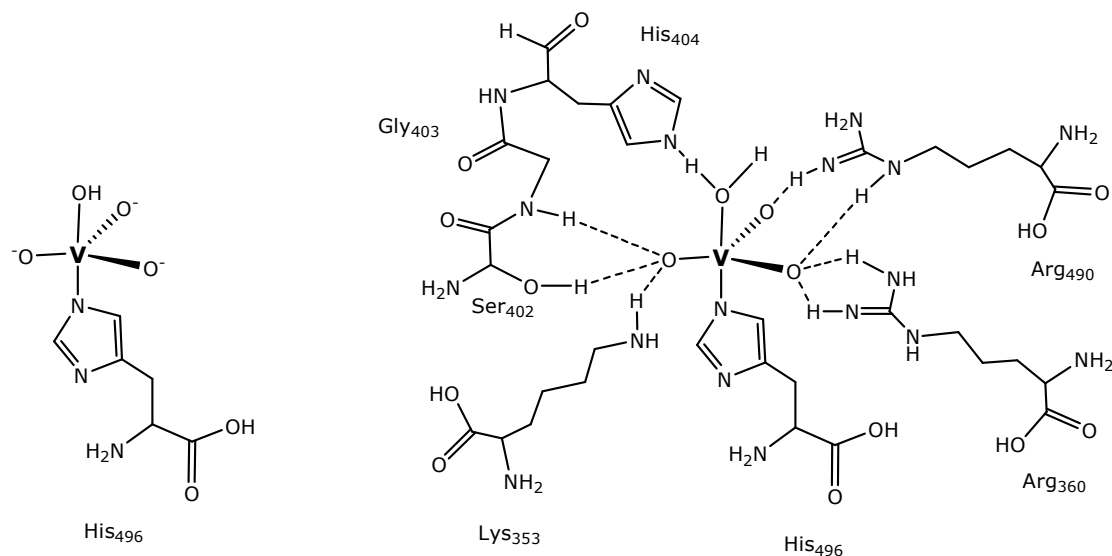


Figura 1.1.4.4. Estabilización de complejo de vanadato por puentes de hidrógeno.

La función de las haloperoxidasas marinas es la de intervenir en la biosíntesis de sustancias halogenadas naturales. Sin embargo, la V-CIPO de hongos no parece que intervengan en la halogenación de productos naturales; se supone que la función de esta enzima es la degradación de la pared celular de la planta huésped mediante la producción de ácido hipocloroso (ClOH) para permitir la penetración de la hifa del hongo.²⁶

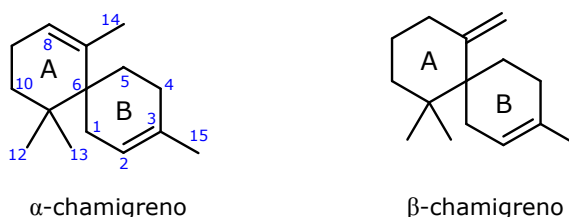
²⁶ R. Wever, W. Hemrika, in *Handbook of Metalloproteins* (A. Messerschmidt, R. Huber, K. Wieghardt, T. Poulos, eds), John Wiley & Sons Ltd., Chichester, United Kingdom, **2001**, pp. 1417–1428.

1.2. SESQUITERPENOS DE FUENTES MARINAS CON ESQUELETO CHAMIGRENO.

Las especies de las algas rojas del género *Laurencia* (Rhodomelaceae, Ceramiales) producen una gran variedad de metabolitos secundarios, tales como C-15 acetogeninas y sustancias terpénicas: sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos. Dentro de esta diversidad estructural, las sustancias sesquiterpénicas son las más comunes dentro del género, y en particular destacan, por la abundancia y variedad de los metabolitos, los sesquiterpenos halogenados con esqueleto chamigreno que, en algunas especies, pueden considerarse como un patrón quimiotaxonómico.

La función que desempeñan estos metabolitos halogenados en el alga no está clara, pero se cree que actúan como sustancias de defensa química contra herbívoros marinos. Muchos de ellos presentan propiedades farmacológicas diversas.

La mayoría de los metabolitos de especies del género *Laurencia* poseen esqueleto chamigreno, de α -chamigreno y β -chamigreno, con diferentes grados de oxidación en los carbonos de los anillos A y B. La característica más frecuente de los metabolitos chamigrénicos, es la presencia de un sistema cloro-bromo saturando el doble enlace del anillo B.



Desde el descubrimiento de los primeros sesquiterpenos halogenados de algas rojas, a finales de la década de los sesenta, el interés por este tipo de productos ha sido creciente y actualmente se siguen publicando metabolitos con nuevas características estructurales.

Hemos efectuado una recopilación bibliográfica de los productos con esqueleto chamigreno aislados de diferentes fuentes marinas. En esencia, proceden de algas rojas del género *Laurencia* y de moluscos del género *Aplysia*, depredadores de éstas. Dichos productos los hemos clasificado atendiendo al número de carbonos modificados* en el anillo A, con relación al anillo A de α - y de β -chamigreno. Sin

* El término modificado indica que sobre el carbono ha existido una adición, sustitución o eliminación.

embargo, para el anillo B, hemos considerado como carbonos modificados aquellos carbonos distintos de C-2 y C-3. Esto se justifica debido a que, la presencia de un sistema cloro-bromo en las posiciones C-2–C-3, o de funcionalidades derivadas de este sistema, tales como: halovinilo, halohidrina, diol, epóxido o carbonilo, es la característica más frecuente de los metabolitos chamigrénicos. Este criterio de clasificación, facilita la comparación estructural entre productos recién aislados y los que figuran en la literatura. En esta recopilación se indica las fuentes de los metabolitos, las características más significativas de sus estructuras químicas y el tipo de actividad biológica que exhiben. La discusión de los sesquiterpenos la realizaremos de acuerdo con la siguiente clasificación:

Grupo I. Esqueleto α -chamigreno.

Grupo IA. Sistemas con cloro-bromo, halovinilo, halohidrina, diol, epóxido o carbonilo en C2-C3 del anillo B.

- IA1. Productos con 1 carbono modificado en A.
- IA2. Productos con 2 carbonos modificados en A.
- IA3. Productos con 3 carbonos modificados en A.
- IA4. Productos con 4 carbonos modificados en A.
- IA5. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.
- IA6. Productos con 3 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.
- IA7. Productos con 4 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

Grupo IB. Sistemas con endo y/o exo olefinas en anillo B.

- IB1. Productos con 1 carbono modificado en A.
- IB2. Productos con 2 carbonos modificados en A.
- IB3. Productos con 3 carbonos modificados en A.
- IB4. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.
- IB5. Productos con 3 carbonos modificados en A y 2 carbonos modificados en B.
- IB6. Productos con 4 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.
- IB7. Productos con 4 carbonos modificados en A y 2 carbonos modificados en B.

Grupo IC. Esqueletos reagrupados.

Grupo ID. Esqueleto degradado.

Grupo II. Esqueleto β -chamigreno.

Grupo IIA. Sistemas con cloro-bromo, halovinilo, halohidrina, diol, epóxido o carbonilo en C2-C3 del anillo B.

- IIA1. Productos con 1 carbono modificado en A.
- IIA2. Productos con 2 carbonos modificados en A.
- IIA3. Productos con 3 carbonos modificados en A.
- IIA4. Productos con 4 carbonos modificados en A.
- IIA5. Productos con 1 carbono modificado en A y 1 carbono modificado en B.
- IIA6. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.
- IIA7. Productos con 3 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

Grupo IIB. Sistemas con endo y/o exo olefinas en el anillo B.

- IIB1. Productos con 1 carbono modificado en A.
- IIB2. Productos con 2 carbonos modificados en A.
- IIB3. Productos con 1 carbono modificado en A y 1 carbono modificado en B.
- IIB4. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

Grupo IIC. Esqueleto reagrupado.

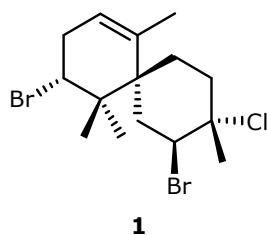
Grupo IID. Esqueleto degradado.

1.2.1. Grupo I. Esqueleto α -chamigreno.

1.2.1.1. Grupo IA. Sistemas con cloro-bromo, halovinilo, halohidrina, diol, époxido o carbonilo en C2-C3 del anillo B.

1.2.1.1.1. Grupo IA1. Productos con 1 carbono modificado en A.

El sesquiterpeno **1** se aisló por primera vez de *Laurencia* sp.,²⁷ recolectada en el Golfo de California, Méjico. Posteriormente se obtuvo de las siguientes especies: *L. pacífica* Kylin,²⁸ recolectada en California; *L. glandulifera* Kützing,²⁹ *L. okamurai*,³⁰ *L. nipponica*,³¹ *L. scoparia*,³² recolectadas en Jamaica; *L. glomerata* Kütz,³³ recolectada en Sudáfrica; *L. Flexilis* Setchell,³⁴ recolectada en Curimao (Filipinas); *L. nidifica*,³⁵ y *L. composita* Yamada,³⁶ recolectadas en la isla Tanegashima (Japón); *L. filiformis* y *Aplysia parvula*,³⁷ recolectadas en Tasmania (Australia); *Laurencia* sp. de Japón³⁸ y *L. composita* Yamada,³⁹ recolectada en la Isla Nanji (China). La configuración absoluta de **1** se determinó por difracción de rayos X.²⁹ Este producto presentó actividad citotóxica moderada en bioensayo con *Artemia salina*.³⁷



De *L. glandulifera* Kützing^{29,40} se obtuvo, junto con **1**, el glanduliferol (**2**), y los derivados **4** y **9**. La bromohidrina **3**, relativa al glanduliferol (**2**), se aisló de *L.*

²⁷ B. M. Howard, W. Fenical, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 21, 1687-1690.

²⁸ B. M. Howard, W. Fenical, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 29, 2519-2520.

²⁹ M. Suzuki, A. Furusaki, E. Kurosawa, *Tetrahedron*, **1979**, 35, 823-831.

³⁰ M. Ojika, Y. Shizuri, K. Yamada, *Phytochemistry*, **1982**, 21, 2410-2411.

³¹ A. Furusaki, C. Katayama, T. Matsumoto, M. Suzuki, T. Suzuki, H. Kikuchi, E. Kurosawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1982**, 55, 3398-3402.

³² D. J. Kennedy, I. A. Selby, R. H. Thomson, *Phytochemistry*, **1988**, 27, 1761-1766.

³³ J. F. Elsworth, R. H. Thomson, *J. Nat. Prod.*, **1989**, 52, 893-895.

³⁴ R. Nys, A. D. Wright, G.M. König, O. Sticher, P. M. Alino, *J. Nat. Prod.*, **1993**, 56, 877-883.

³⁵ J. Kimura, N. Kamada, Y. Tsujimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1999**, 72, 289-292.

³⁶ M. Masuda, S. Kawaguchi, T. Abe, T. Kawamoto, M. Suzuki, *Phycol. Res.*, **2002**, 50, 135-144.

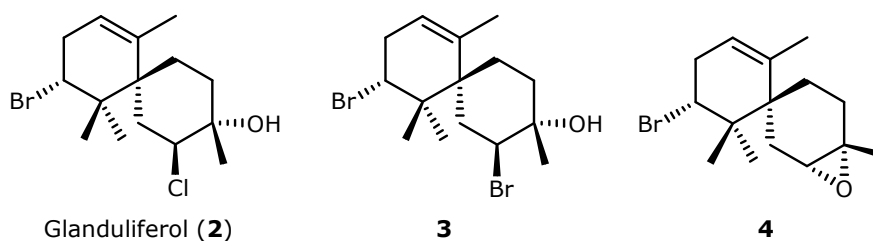
³⁷ J. Jongaramruong, A. J. Blackman, B. W. Skelton, A. H. White, *Aust. J. Chem.*, **2002**, 55, 275-280.

³⁸ M. Suzuki, T. Kawamoto, C. S. Vairappan, T. Ishii, T. Abe, M. Masuda, *Phytochemistry*, **2005**, 66, 2787-2793.

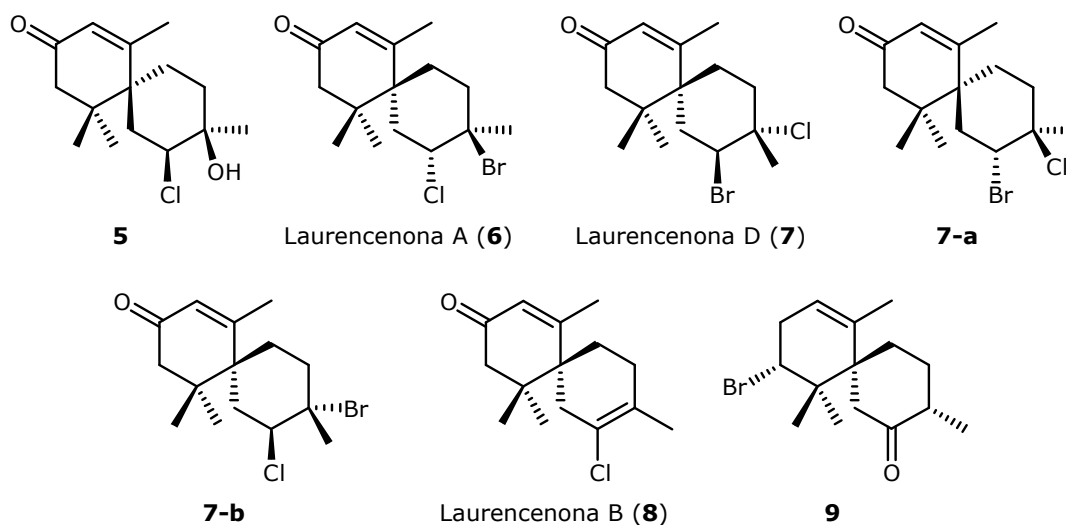
³⁹ N-Y. Ji, X-M. Li, K. Li, J. B. Gloer, B-G. Wang, *Biochem. Syst. Ecol.*, **2009**, 36, 938-941.

⁴⁰ M. Suzuki, E. Kurosawa, T. Irie, *Tetrahedron Lett.*, **1974**, 10, 821-824.

nipponica Yamada,⁴¹ recolectada en Sannai, Japón. La configuración absoluta de **2**, **4** y **9** se determinó por difracción de rayos X.²⁹ La configuración de **3** se confirmó por conversión a **4** usando KOH en metanol.⁴¹



De distintas recolecciones de *L. obtusa* de Jamaica se obtuvo una serie de derivados chamigrénicos: **5**,⁴² laurencenona A (**6**), laurencenona D (**7**) y laurencenona B (**8**).³² Todos ellos poseen en común una cetona α,β -insaturada en el anillo A y difieren en la regioquímica y tipos de heteroátomos que oxidan los carbonos C-2–C-3 del anillo B. Se realizaron estudios conformacionales de los productos **1**, **2**, **7** y de los derivados semisintéticos **7-a** y **7-b**, basados en el análisis de espectros de RMN de ¹H dependientes de la temperatura.⁴³



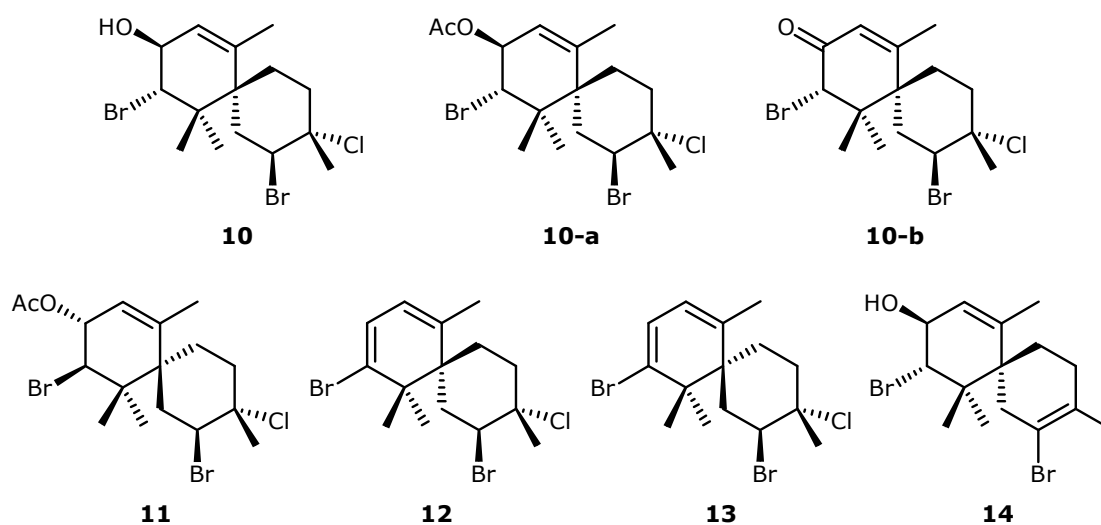
⁴¹ M. Suzuki, M. Segawa, T. Suzuki, E. Kurosawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, *56*, 3824-3826.

⁴² M. R. Brennan, K. L. Erickson, D. A. Minott, K. O. Pascoe, *Phytochemistry*, **1987**, *26*, 1053-1057.

⁴³ G. Guella, G. Chiasera, F. Pietra, *Helv. Chim. Acta.*, **1992**, *75*, 2012-2025.

1.2.1.1.2. Grupo IA2. Productos con 2 carbonos modificados en A.

El compuesto **10** se aisló por primera vez de *L. pacifica* Kylin,⁴⁴ recolectada cerca de Ensenada, Méjico. Posteriormente se encontró en *L. okamurai*,³⁰ *L. nipponica* Yamada,⁴⁵ *L. glomerata* Kütz,³³ *L. nidifica*³⁵ y *L. composita* Yamada.^{36,39} La estructura de **10** se determinó por análisis espectroscópico comparativo de sus derivados sintéticos **10-a** y **10-b**, y la configuración absoluta por datos de difracción de rayos X obtenidos de la cetona **10-b**.^{43,45} El acetato natural **11**, se obtuvo de *Aplysia dactylomela*.⁴⁶ De *L. okamurai* Yamada⁴⁷ recolectada en Qingdao, China, se obtuvieron los diastereoisómeros **12** y **13**, además de los productos **1** y **10**. El compuesto **14** se aisló de *L. saitoi* recolectada en la provincia Shandong en China.⁴⁸



1.2.1.1.3. Grupo IA3. Productos con 3 carbonos modificados en A.

De *L. obtusa* de Jamaica se aisló el chamigreno tricíclico **15**.⁴² El producto natural **16**, previamente conocido²⁷ como derivado sintético por oxidación de **1**, se obtuvo de *L. okamurai*,^{30,47} *L. nipponica*,³¹ *L. scoparia*,³² *L. nidifica*³⁵ y *L. composita*.³⁹ La estructura y configuración absoluta de **16** se confirmó por rayos X.³¹ La sustancia antimicrobiana **17**⁴⁹ se aisló de *Laurencia* sp.,²⁷ de *L. pinnatifida*⁴⁹ de Pakistán y de la

⁴⁴ W. Fenical, *Phytochemistry*, **1976**, *15*, 511-512.

⁴⁵ M. Suzuki, E. Kurosawa, A. Furusaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1988**, *61*, 3371-3373.

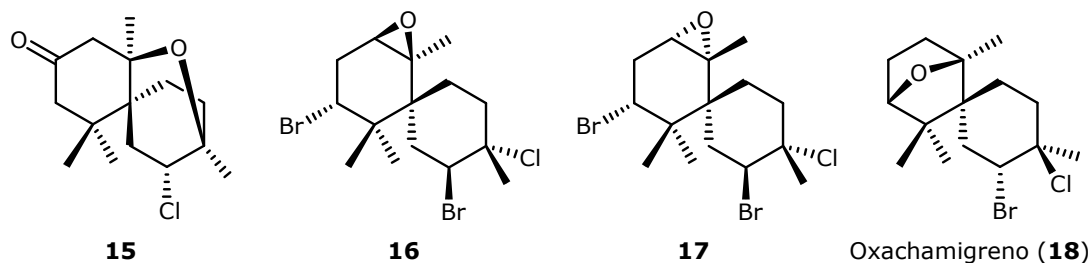
⁴⁶ J. Roviroso, L. Astudillo, M. E. Ramírez, A. San-Martín, *Bol. Soc. Chil. Quím.*, **1991**, *36*, 153-156.

⁴⁷ N-Y. Ji, X-M. Li, K. Li, Y. Zhang, B-G. Wang, *Biochem. Syst. Ecol.*, **2007**, *35*, 627-630.

⁴⁸ N-Y. Ji, X-M. Li, K. Li, B-G. Wang, *Helv. Chim. Acta.*, **2009**, *92*, 1873-1879.

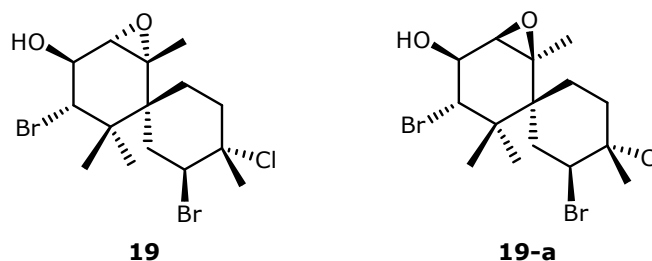
⁴⁹ S. Bano, M. S. Ali, V. U. Ahmad, *Planta Medica*, **1987**, 508-508.

especie sudafricana *L. glomerata* Kütz.³³ El oxachamigreno (**18**), pertenece a un nuevo tipo estructural oxacíclico de chamigreno. Fue aislado de *L. obtusa* recolectada en Cayo Coco, Cuba.³



1.2.1.1.4. Grupo IA4. Productos con 4 carbonos modificados en A.

De *L. glomerata* Kütz se obtuvo, además de **10**, su epoxi derivado **19**.³³ Intentos de obtener **19** por epoxidación de **10** condujo al epímero **19-a**. Posteriormente se ha aislado **19** de un extracto del aparato digestivo de *A. dactylomela*, recolectada en las costas sudafricanas.⁵⁰



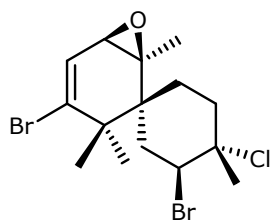
De una recolección de *A. californica* realizada en San Diego, California, se aisló el desoxipreapacifenol (**20**).⁵¹ Este producto se obtuvo también de *L. okamurai*,^{30,47} *L. nipponica*,⁵² *L. mariannensis*,⁵³ *L. nidifica*,³⁵ y *L. filiformis*.³⁷ Presenta propiedades como insecticida⁵² y actividad citotóxica moderada en bioensayo con *Artemia salina*.³⁷

⁵⁰ K. L. McPhail, M. T. Davies-Coleman, R. C. B. Copley, D. S. Eggleston, *J. Nat. Prod.*, **1999**, *62*, 1618-1623.

⁵¹ C. Ireland, M. O. Stallard, D. J. Faulkner, J. Finera, J. Clardy, *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 2461-2465.

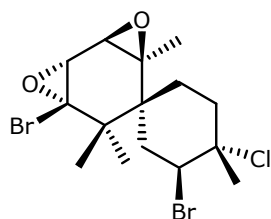
⁵² K. Watanabe, K. Umeda, M. Miyakado, *Agric. Biol. Chem.*, **1989**, *53*, 2513-2515.

⁵³ R. Nys, J. C. Coll, B. F. Bowden, *Aust. J. Chem.*, **1993**, *46*, 933-937.

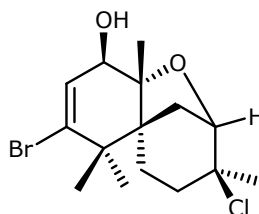


Desoxiprepacifenol (**20**)

El epóxido de deshidroxiprepacifenol (**21**), posee en su estructura un α -bromoepóxido inusual y se aisló de *L. nidifica*³⁵ y de *A. dactylomela*⁵⁴ recolectada en Brasil. De *L. saitoi* recolectada en la costa norte de Shandong en China se obtuvo **22**.⁴⁸



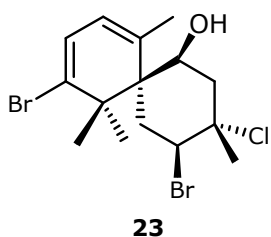
Epóxido de deshidroxiprepacifenol (**21**)



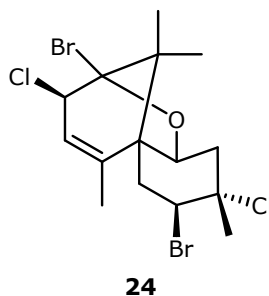
22

1.2.1.1.5. Grupo IA5. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

Las estructuras y configuración relativa del dieno **23**, y del metabolito tricíclico **24**, el primero obtenido de *L. nidifica*³⁵ y *L. composita* Yamada,³⁹ y el segundo de *A. californica*,⁵⁵ se determinaron por estudios espectroscópicos.



23



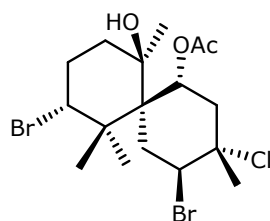
24

⁵⁴ C. R. Kaiser, L. F. Pitombo, A. C. Pinto, *Spectrosc. Lett.*, **1998**, 31, 573-585.

⁵⁵ M. O. Stallar, D. J. Faulkner, *Comp. Biochem. Physiol.*, **1974**, 49B, 25-35.

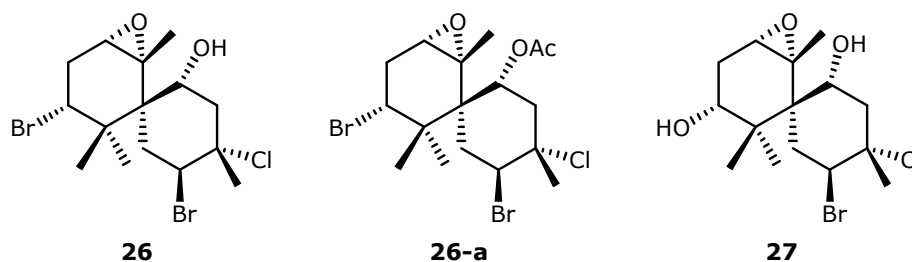
1.2.1.1.6. Grupo IA6. Productos con 3 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

Del alga roja *L. intricata* se caracterizó el acetoxiintrincatol (**25**).⁵⁶



Acetoxiintrincatol (**25**)

El producto **26** se obtuvo de *L. flagelligera*⁵⁷ y *L. scoparia*³². La estructura de **26** se determinó por análisis espectroscópico del derivado acetilado **26-a**.⁵⁷ La sustancia **26** es ictiotóxica frente a la especie tropical *Pomacentrus coeruleus*. Además de **26**, de *L. scoparia* también se aisló el epoxidiol **27**.³²



26

26-a

27

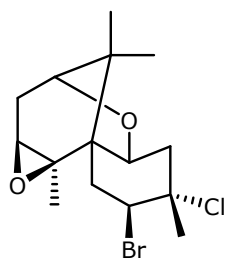
De *L. pinnatifida* Lamouroux se caracterizó el éter cíclico pinnatazano (**28**)⁵⁸ y la pinnatifidona (**29**).⁶⁰ Al producto **28**, obtenido de una variedad senegalesa de *L. intricata*,⁵⁹ se le asignó un nombre distinto: almadióxido. El producto 5-acetoxioxachamigreno (**30**) se obtuvo de *L. obtusa* recolectada en Cayo Coco, Cuba.³

⁵⁶ J. A. McMillan, I. C. Paul, R. H. White, L. P. Hager, *Tetrahedron Lett.*, **1974**, 23, 2039-2042.

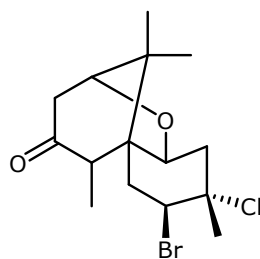
⁵⁷ M. L. Bittner, M. Silva, V. J. Paul, W. Fenical, *Phytochemistry*, **1985**, 24, 987-989.

⁵⁸ Atta-Ur-Rahman, V. U. Ahmad, S. Bano, S.A. Abbas, K. A. Alvi, M. S. Ali, H. S. M. Lu, J. Clardy, *Phytochemistry*, **1988**, 27, 3879-3880.

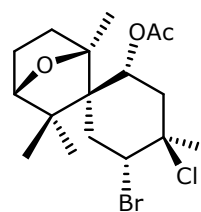
⁵⁹ M. Aknin, A. Ahond, A. Chiaroni, C. Poupat, C. Riche, J. M. Kornprobst, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 559-562.



Pinnatazano (**28**)



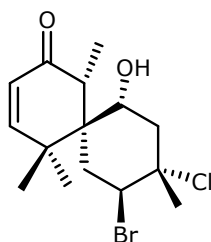
Pinnatifidona (**29**)



5-acetoxioxachamigreno (**30**)

1.2.1.1.7. Grupo IA7. Productos con 4 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

El extracto metanólico de *L. pinnatifida* de Pakistán mostró una actividad antibacteriana significativa. La cromatografía del extracto permitió aislar pinnatifinona (**31**) junto con **28**.^{60,61} Las estructuras de ambos compuestos se determinaron por estudios espectroscópicos.



Pinnatifinona (**31**)

El prepacifenol (**32**) se obtuvo de *L. filiformis*,⁶² recolectada en La Jolla, California y también se ha encontrado en *L. okamurai*,³⁰ *L. nidifica*,³⁵ *L. elata*,⁶³ *A. Californica*⁶⁴ y *L. nipponica* Yamada.⁶⁵ De *L. filiformis* recolectada en Tarooma, Tasmania, se aisló **33**.³⁷ El epóxido de prepacifenol (**34**) que, al igual que el deshidroderivado **21**, contiene un α -bromoepóxido, se ha aislado de *A. californica*,^{64,51} *L. okamurai*,³⁰ *L. nidifica*,³⁵ *L. composita* Yamada³⁶ y *A. dactylomela*⁵⁰

⁶⁰ S. Bano, M. S. Ali, V. U. Ahmad, *Z. Naturforsch.*, **1988**, *43*, 1347-1350.

⁶¹ V. U. Ahmad, M. S. Ali, *Phytochemistry*, **1991**, *30*, 4172-4174.

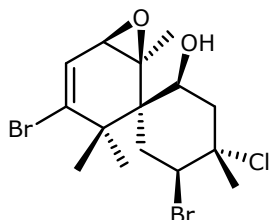
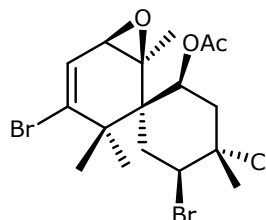
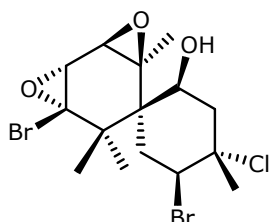
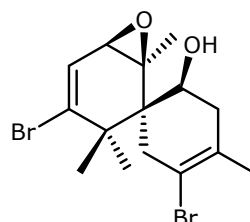
⁶² J. J. Sims, W. Fenical, R. M. Wing, P. Radlick, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 972-972.

⁶³ J. J. Sims, G. H. Y. Lin, R. M. Wing, *Tetrahedron Lett.*, **1974**, *39*, 3487-3490.

⁶⁴ D. J. Faulkner, M. O. Stallard, C. Ireland, *Tetrahedron Lett.*, **1974**, *40*, 3571-3574.

⁶⁵ K. Kurata, A. Furusaki, C. Katayama, H. Kikuchi, T. Suzuki, *Chem. Lett.*, **1981**, 773-776.

de Sudáfrica. Del estudio químico de un extracto activo de *L. majuscula* frente a *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* se obtuvo el deshidrocloroprepacifenol (**35**).⁶⁶

Prepacifenol (**32**)**(33)**Epóxido de prepacifenol (**34**)Deshidrocloroprepacifenol (**35**)

Fue el pacifenol (**36**), obtenido de *L. pacifica*,^{67,68} el producto natural en el que, por primera vez, se caracterizó el sistema cloro-bromo característico del anillo B de los derivados de chamigreno. Posteriormente se ha aislado de otras muchas especies de *Laurencia*: *L. nidifica*,^{35,69,70} *L. nipponica* Yamada,⁷¹ *L. majuscula*,⁷² *L. mariannensis*,⁵³ *L. composita* Yamada,³⁶ de *L. filiformis* y *A. parvula*,³⁷ de *A. dactylomela*⁷³ y de *A. californica*.⁶⁴ El pacifenol (**36**) puede ser un artefacto producido por la acción de la gel de sílice durante el proceso de purificación del prepacifenol (**32**). El producto es activo frente a *Staphylococcus aerus* y *Mycobacterium smegmatis*.⁶⁹ El pacifenol es citotóxico en el bioensayo con *Artemisa salina*.³⁷ La bromohidrina **37** se obtuvo de *L. nipponica* Yamada.⁷¹

⁶⁶ S. Caccamese, A. Compagnini, R. M. Toscano, F. Nicolo, G. Chapuis, *Tetrahedron*, **1987**, 43, 5393-5399.

⁶⁷ J. J. Sims, W. Fenical, R. M. Wing, P. Radlick, *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 3774-3775.

⁶⁸ S. J. Selover, P. Crews, *J. Org. Chem.*, **1980**, 45, 69-72.

⁶⁹ S. M. Waraszkiewicz, K. L. Erickson, *Tetrahedron Lett.*, **1974**, 23, 2003-2006.

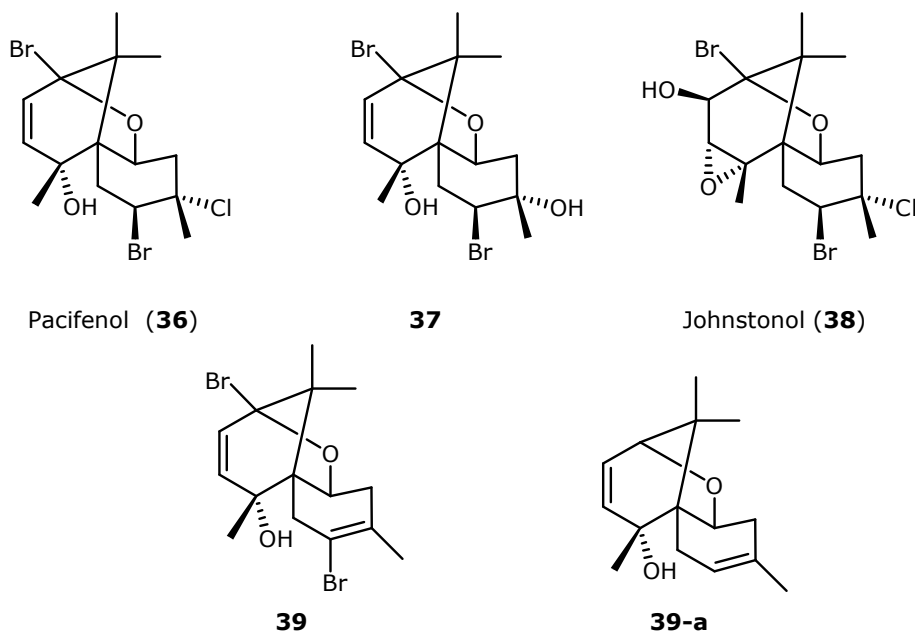
⁷⁰ S. M. Waraszkiewicz, K. L. Erickson, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 18, 1443-1444.

⁷¹ T. Suzuki, *Chem. Lett.*, **1980**, 541-542.

⁷² S. Caccamese, A. Compagnini, R. M. Toscano, *J. Nat. Prod.*, **1986**, 49, 173-174.

⁷³ C. R. Kaiser, L. F. Pitombo, A. C. Pinto, *Magn. Reson. Chem.*, **2001**, 39, 147-149.

Asimismo, el johnstonol (**38**), aislado de *L. johnstonii*,⁷⁴ *L. nidifica*,³⁵ *L. composita* Yamada,^{36,39} de *A. californica*,⁶⁴ y de *A. dactylomela*⁷³ puede ser un artefacto producido durante el proceso de aislamiento del epóxido de prepacifenol (**34**). El bromo vinil derivado **39** se obtuvo de *L. nipponica* Yamada.^{71,75} La deshalogenación reductiva de **39** produjo **39-a**.



1.2.1.2. Grupo IB. Sistemas con endo y/o exo olefinas en el anillo B.

1.2.1.2.1. Grupo IB1. Productos con 1 carbono modificado en A.

El 10-bromo- α -chamigreno (**40**) se aisló de *L. pacifica* Kylin,²⁸ *L. glandulifera* Kützing,²⁹ *L. rigida* J. Agardh⁷⁶ y de *L. mariannensis*.⁷⁷ La laurencenona C (**41**), y los vinil derivados relacionados **42** y **43**, se obtuvieron de *L. obtusa*³² y de *L. majuscula* Harvey,^{78,79,80} respectivamente.

⁷⁴ J. J. Sims, W. Fenical, R. M. Wing, P. Radlick, *Tetrahedron Lett.*, **1972**, *3*, 195-198.

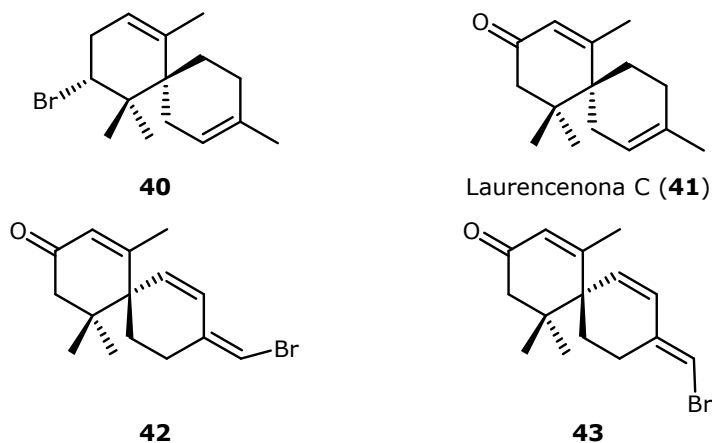
⁷⁵ K. Kurata, T. Suzuki, M. Suzuki, E. Kurosawa, A. Furusaki, K. Suehiro, T. Matsumoto, C. Katayama, *Chem. Lett.*, **1983**, 561-564.

⁷⁶ G. M. König, A. D. Wright, *J. Nat. Prod.*, **1997**, *60*, 967-970.

⁷⁷ N-Y. Ji, X-M. Li, K. Li, L-P Ding, J. B. Gloer, B-G. Wang, *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 1901-1905.

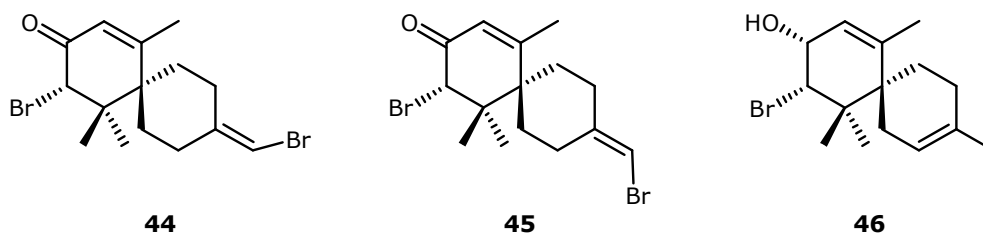
⁷⁸ M. Suzuki, E. Kurosawa, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *48*, 4805-4808.

⁷⁹ M. Suzuki, A. Furusaki, N. Hashiba, E. Kurosawa, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, *10*, 879-882.



1.2.1.2.2. Grupo IB2. Productos con 2 carbonos modificados en A.

De *A. dactylomela* recolectada en Puerto Rico se obtuvieron las sustancias citotóxicas, con actividad antitumoral, **44** y **45**.⁸¹ El compuesto **46**, que posee actividad alucida moderada, se obtuvo de *L. rigida*.⁷⁶



1.2.1.2.3. Grupo IB3. Productos con 3 carbonos modificados en A.

De *L. majuscula* recolectada en las Islas Xisha en el sur de China se aisló **47**.^{82,83} De *A. dactylomela* de Tenerife se obtuvieron los isómeros geométricos **48** y **49**.⁸⁴

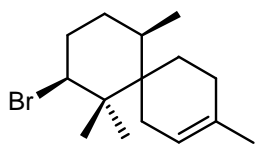
⁸⁰ M. Suzuki, E. Kurosawa, K. Kurata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1987**, *60*, 3795-3796.

⁸¹ F. J. Schmitz, D. P. Michaud, P. G. Schimdt, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 6415-6423.

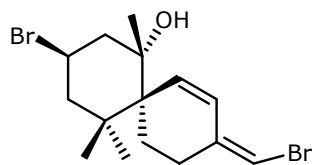
⁸² X. Xu, J. Lu, G. Yao, Y. Li, J. Su, L. Zeng, *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Haifa*, **2001**, *13*, 5-6.

⁸³ X. Xu, G. Yao, J. Lu, Y. Li, J. Chang, *Chem. Res. Chinese U.*, **2002**, *18*, 226-227.

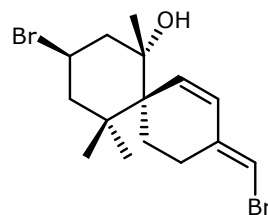
⁸⁴ A. G. González, J. D. Martín, M. Norte, R. Pérez, V. Weyler, A. Perales, J. Fayos, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 847-848.



47



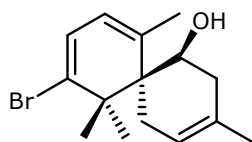
48



49

1.2.1.2.4. Grupo IB4. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

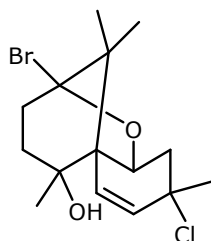
El trieno **50**, desprovisto del sistema cloro-bromo de **23**, se aisló del alga *L. nipponica* Yamada recolectada en Japón.⁸⁵



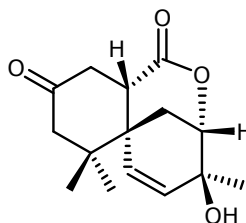
50

1.2.1.2.5. Grupo IB5. Productos con 3 carbonos modificados en A y 2 carbonos modificados en B.

De una recolección de *A. dactylomela* de la India se obtuvo **51**.⁸⁶ El producto llamado chamigrenolactona (**52**) se aisló de *L. obtusa* recolectada en Isla Grande (Panamá).⁴



51



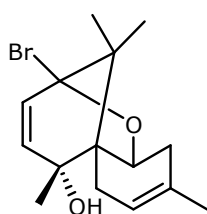
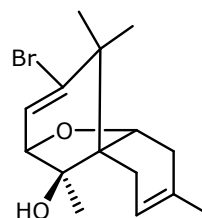
Chamigrenolactona (**52**)

⁸⁵ K. Kurata, T. Suzuki, M. Suzuki, E. Kurosawa, A. Furusaki, T. Marsumoto, *Chem. Lett.*, **1983**, 557-560.

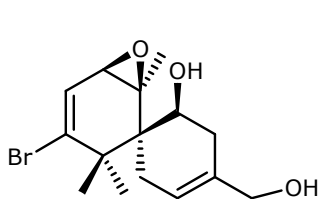
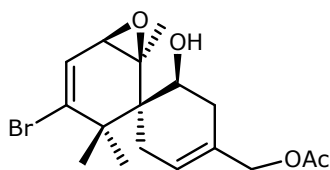
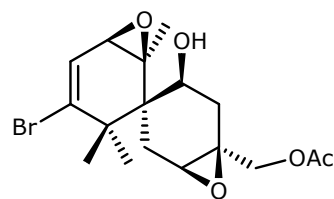
⁸⁶ C. B. Bao, C. Satyanarayana, D. V. Rao, *Recen. Rev. Biofouling Control*, **1994**, 259. (*Chem. Abstr.*, **1995**, 123, 251 787).

1.2.1.2.6. Grupo IB6. Productos con 4 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

El producto **53** se obtuvo de *L. nipponica* Yamada.^{71,75} De *L. claviformis* de la Isla de Pascua se caracterizó **54**.⁸⁷ La sustancia citotóxica **54** inhibe la división celular de los embriones del erizo *Tetrapygus niger*.⁸⁷

**53****54**

El producto **55** se aisló de *L. nipponica* Yamada.⁷⁵ La transformación del sesquiterpeno **55** en el acetato **55-a**, seguido de epoxidación condujo al derivado cristalino **55-b**. El estudio de difracción de rayos X de **55-b** permitió asignar la estructura y configuración absoluta del metabolito **55**.⁷⁵

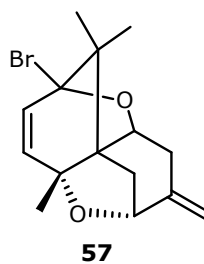
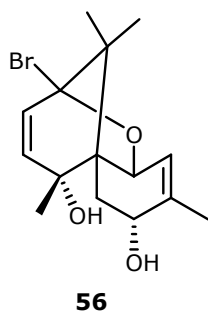
**55****55-a****55-b**

1.2.1.2.7. Grupo IB7. Productos con 4 carbonos modificados en A y 2 carbonos modificados en B.

De *L. nipponica* Yamada se obtuvieron **56** y **57**.^{65,88} La configuración absoluta de **56** se determinó por rayos X.⁶⁵

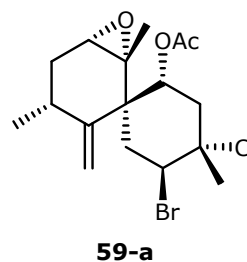
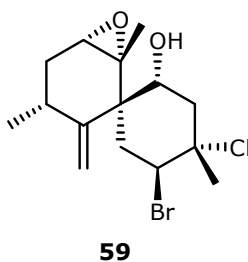
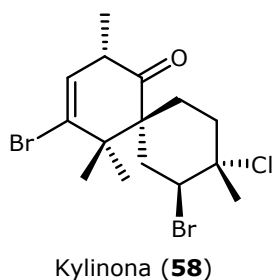
⁸⁷ J. Roviroso, H. Soto, M. Cueto, J. Darias, J. Herrera, A. San-Martín, *Phytochemistry*, **1999**, *50*, 745-748.

⁸⁸ H. Kikuchi, T. Suzuki, M. Suzuki, E. Kurosawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1985**, *58*, 2437-2438.

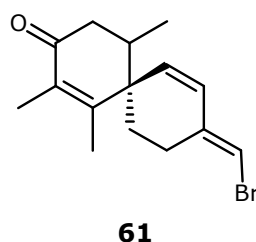
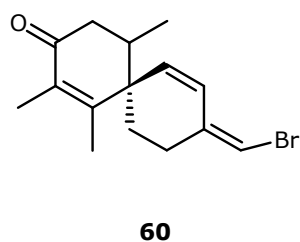


1.2.1.3. Grupo IC. Esqueletos reagrupados.

La kylinona (**58**), se obtuvo de *L. pacifica* Kylin de Monterey.⁶⁸ La sustancia **59**, aislada de *Laurencia* sp.⁵⁷ y de *L. scoparia*,³² es tóxica para la especie de pez tropical *Pomacentrus coeruleus*. La estructura se determinó en base a los datos espectroscópicos del derivado acetilado **59-a**.



De *A. dactylomela* se caracterizaron las cetonas insaturadas **60** y **61**.⁸⁹

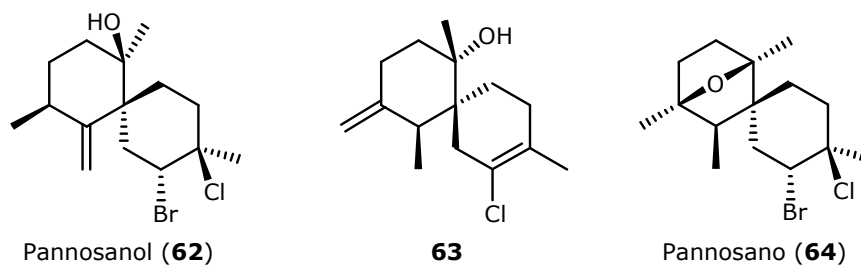


Los productos **62** y **64**, llamados pannosanol y pannosano respectivamente, se aislaron de la especie *L. pannosa* Zanardi, de Malasia.⁹⁰ Sus estructuras se caracterizaron por métodos espectroscópicos. El pannosanol (**62**) presentó actividad

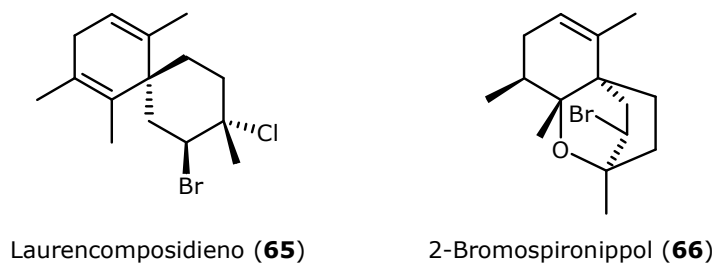
⁸⁹ R. Sakai, T. Higa, C. W. Jefford, G. Bernardinelli, *Helv. Chim. Acta.*, **1986**, 69, 91-105.

⁹⁰ M. Suzuki, M. Daitoh, C. S. Vairappan, T. Abe, M. Masuda, *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, 597-602.

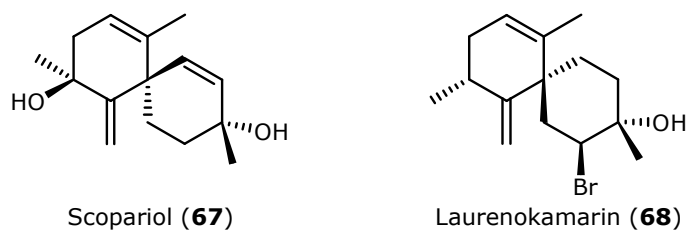
antibacteriana frente a *Chromobacterium violaceum*, *Proteus mirabilis* y *Vibro cholerae*, mientras que el pannosano (**64**) sólo fue activo frente a *Chromobacterium violaceum*. De una recolección de *A. dactylopera* en Madagascar se obtuvo **63**.⁹¹



De *L. composita* Yamada, recolectada en la provincia Zhenjiang, China, se obtuvo laurencomposidieno (**65**) y 2-bromospironippol (**66**).³⁹



De *L. scoparia* recolectada en Brasil se aisló scopariol (**67**)⁹² y de *L. okamurai* recolectada en China se obtuvo laurenokamarin (**68**).⁹³



En los productos **59-68** se ha producido un reagrupamiento 1,2 de uno de los metilos del *gem*-dimetilo característico del esqueleto chamigreno.

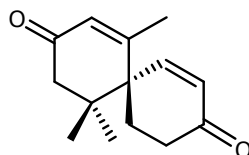
⁹¹ L. K. Shubina, S. N. Fedorov, A. I. Kalinovsky, A. S. Dmitrenok, J. O. Jin, M. G. Song, J. Y. Kwak, V. A. Stonik, *Russ. Chem. Bull.*, **2007**, *56*, 2109-2114.

⁹² D. Davyt, R. Fernandez, L. Suescun, A. W. Mombrú, J. Saldaña, L. Domínguez, J. Coll, M. T. Fujii, E. Manta, *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 1552-1555.

⁹³ Y. Liang, X. M. Li, C. M. Cui, C. S. Li, B. G. Wang, *Chin. Chem. Lett.*, **2009**, *20*, 190-192.

1.2.1.4. Grupo ID. Esqueleto degradado.

La majusculona (**69**) es un nor-chamigreno que ha perdido el metilo del anillo B. Se aisló de *L. majuscula* (Harvey).⁸⁰



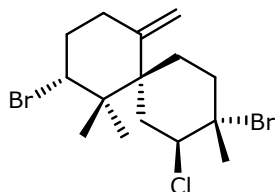
Majusculona (**69**)

1.2.2. Grupo II. Esqueleto β -chamigreno.

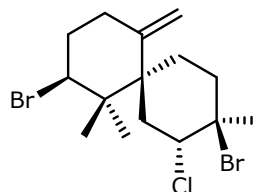
1.2.2.1. Grupo IIA. Sistemas con cloro-bromo, halovinilo, halohidrina, diol, epóxido o carbonilo en C2-C3 del anillo B.

1.2.2.1.1. Grupo IIA1. Productos con 1 carbono modificado en A.

El (+)-obtusano (**70**) se obtuvo de las algas *L. obtusa*^{94,95} y *L. mariannensis*⁷⁷ y el (-)-obtusano (**71**) de *L. nipponica* Yamada.⁹⁶ La estructura y configuración absoluta de **71** se estableció por rayos X.⁹⁶



(+)-Obtusano (**70**)



(-)-Obtusano (**71**)

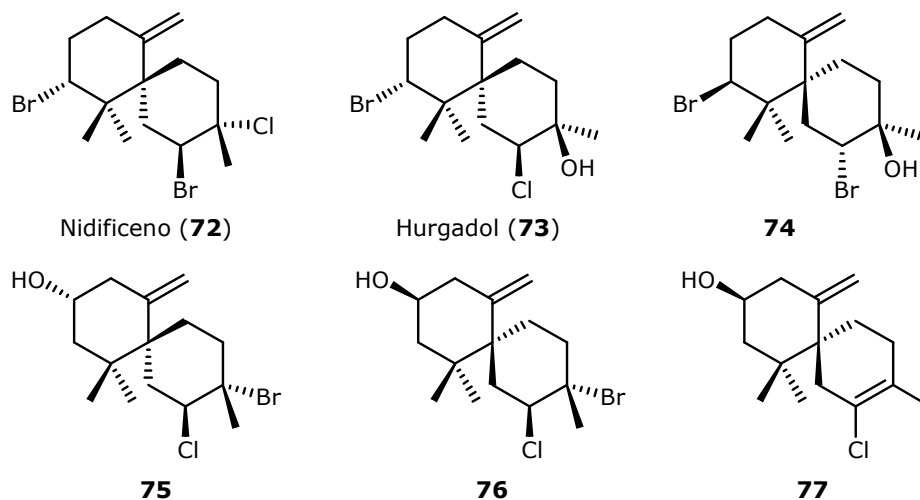
El nidificeno (**72**) exhibe actividad antivírica³⁵ y se ha encontrado en numerosas especies: *L. nidifica*,^{35,69,70} *L. okamura*,³⁰ *L. nipponica* Yamada⁴¹ y de *A. dactilomela*.⁵⁰ Las halohidrinas hurgadol (**73**) y **74** se aislaron de *L. obtusa*⁹⁵ del Mar Rojo y de *L.*

⁹⁴ A. G. González, J. D. Martín, V. S. Martín, M. Norte, *Tetrahedron Lett*, **1979**, 20, 2719-2722.

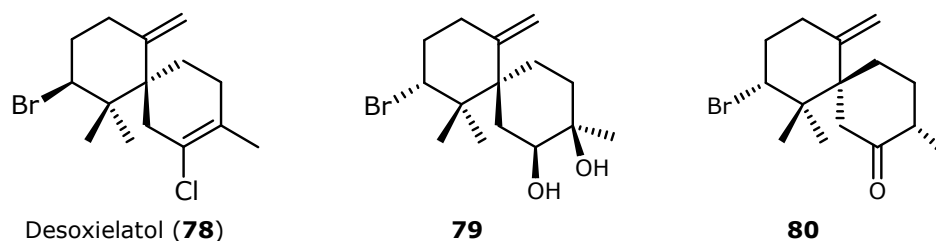
⁹⁵ S-E. N. Ayyad, A-A. M. Dawidar, H. W. Dias, R. A. Howie, J. Jakupovic, R. H. Thomson, *Phytochemistry*, **1990**, 29 (10), 3193-3196.

⁹⁶ A. Furusaki, T. Matsumoto, K. Kurata, T. Suzuki, M. Suzuki, E. Kurosawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, 56, 3501-3502.

flexilis Setchell⁹⁷ de Filipinas, respectivamente, mientras que de *L. obtusa* recolectada en las Islas Canarias se obtuvo la serie de productos **75**, **76** y **77**.^{98,99}



De *L. mariannensis* recolectada en las islas Hainan y en Weizhou (China) se obtuvo el desoxielatol (**78**).⁷⁷ El producto **79** se aisló de *A. dactylomela* recolectada en Madagascar, y presenta actividad citotóxica frente a líneas celulares de leucemia promielocítica HL-60 y monocítica THP-1.⁹¹ De *L. glandulifera* se obtuvo el producto **80**.⁴⁰



1.2.2.1.2. Grupo IIA2. Productos con 2 carbonos modificados en A.

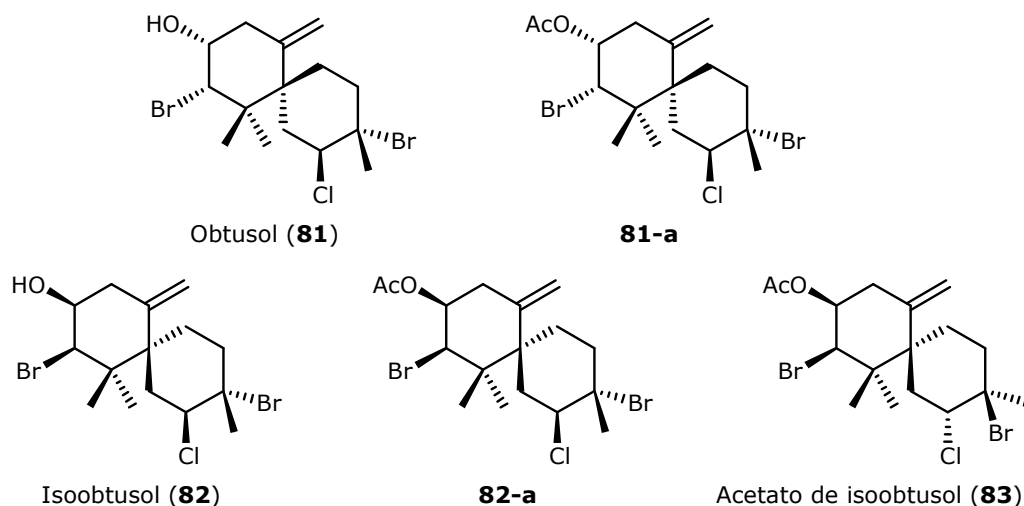
El obtusol e isoobtusol, aislados de *L. obtusa*^{98,100} recolectada en las Islas Canarias, se caracterizaron como **81** y **82**.⁹⁹ El isoobtusol (**82**) se encontró luego en *L.*

⁹⁷ R. de Nys, G. M. Köning, A. D. Wright, *Phytochemistry*, **1993**, *34*, 725-728.

⁹⁸ A. G. González, J. Darías, A. Díaz, J. D. Fourneron, J. D. Martín, C. Pérez, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, *35*, 3051-3054.

⁹⁹ A. G. González, J. D. Martín, V. S. Martín, M. Martínez-Ripoll, J. Fayos, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, *29*, 2717-2718.

*obtusa*³² de Jamaica. Los datos espectroscópicos de los acetatos **81-a**^{43,101} y **82-a** ayudaron a la caracterización estructural de los respectivos alcoholes.^{98,99} El acetato de isoobtusol (**83**) de *A. dactylomela*, de Puerto Rico, exhibe actividad citotóxica moderada.⁸¹



De *L. majuscula* se obtuvo **84** y su estructura se caracterizó por análisis espectroscópico del producto natural y del derivado acetilado **84-a**.¹⁰² Aún cuando **85** se describe por primera vez de la esponja *Spognia zimocca*, recolectada en Livorno, Italia, su procedencia real se supone que es de una especie del género *Laurencia* que coloniza dicha esponja.¹⁰³ La estructura del acetato de rogiolol (**85**) se obtuvo por análisis espectroscópico del producto natural y del derivado alcohólico **85-a**, (-)-rogiolol.^{43,101,104}

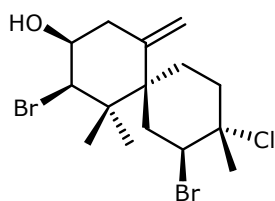
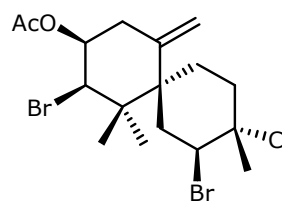
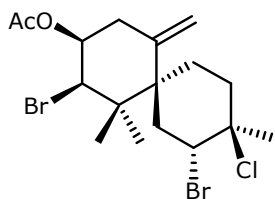
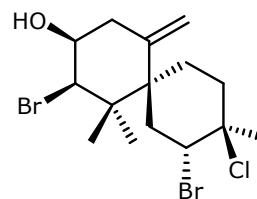
¹⁰⁰ J. D. Martín, P. Caballero, J. J. Fernández, M. Norte, R. Pérez, M. L. Rodríguez, *Phytochemistry*, **1989**, *28*, 3365-3367.

¹⁰¹ G. Guella, G. Chiasera, I. Mancini, F. Pietra, *Helv. Chim. Acta.*, **1991**, *74*, 774-782.

¹⁰² J. C. Coll, A. D. Wright, *Aust. J. Chem.*, **1989**, *42*, 1591-1603.

¹⁰³ G. Guella, I. Mancini, G. Chiasera, F. Pietra, *Helv. Chim. Acta.*, **1990**, *73*, 1612-1620.

¹⁰⁴ G. Guella, A. Oztunç, I. Manzini, F. Pietra, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 8261-8264.

**84****84-a**Acetato de rogiolol (**85**)(-)-Rogiolol (**85-a**)

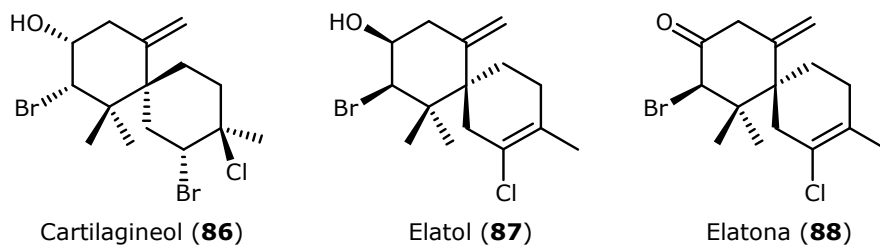
En 1997 se aísla un diastereoisómero del isoobtusol (**82**) que se nombra como *allo*-isoobtusol. Es activo a bajas concentraciones frente a distintas líneas celulares de cáncer, en particular la HT-29 (carcinoma de colon humano).¹⁰⁵ En el mismo año, Guella *et al.*¹⁰⁴ aíslan el mismo compuesto, al que renombran como cartilagineol y para el que proponen una nueva configuración. Posteriormente, este producto se obtuvo de una especie de *Laurencia* no identificada recolectada en Filipinas.¹⁰⁶ La estructura y configuración absoluta del producto natural cartilagineol se caracterizó finalmente como **86** mediante rayos X.¹⁰⁶

El sesquiterpeno **87**, elatol, se obtuvo de *L. elata*,⁶³ *L. obtusa*,^{32,37,98,100} *L. cartilaginea*,⁴⁴ *A. dactylomela*,⁸¹ *L. mariannensis*⁷⁷ y de *L. rigida*.⁷⁶ Presenta una citotoxicidad notable frente a células de carcinoma de colon humano HT-29.¹⁰⁵ Además, posee actividad antifúngica y alguicida moderada, así como una considerable actividad antiincrustante, inhibiendo el crecimiento de las larvas de *Balanu amphitrites* y del briozoo *Bugula neritina*.⁷⁶ El ceto derivado **88**, elatona, es un potente inhibidor de la división celular.¹⁰⁷

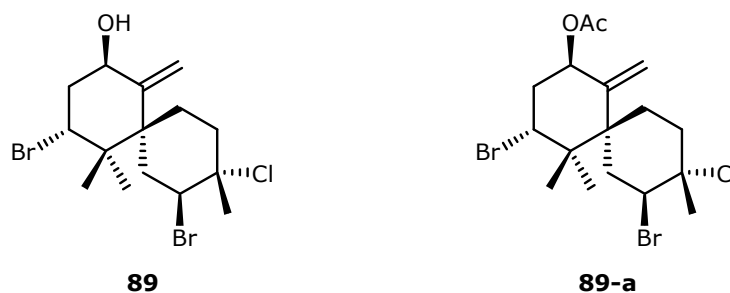
¹⁰⁵ E. G. Juagdan, R. Kalidindi, P. Scheuer, *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 521-528.

¹⁰⁶ M. E. Y. Francisco, M. M. Turnbull, K. L. Erickson, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 5289-5292.

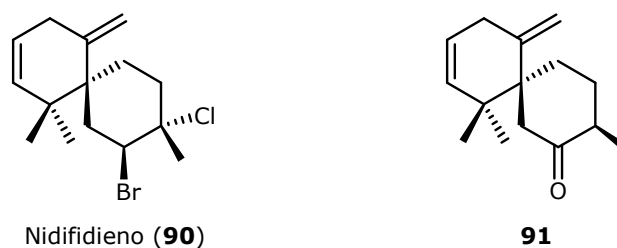
¹⁰⁷ S. J. White, R. S. Jacobs, *Mol. Pharm.*, **1981**, *21*, 614-620.



Del alga *L. nipponica* Yamada se obtuvo el producto **89**,³⁶ cuya estructura se determinó por análisis espectroscópico de su derivado acetilado **89-a**.

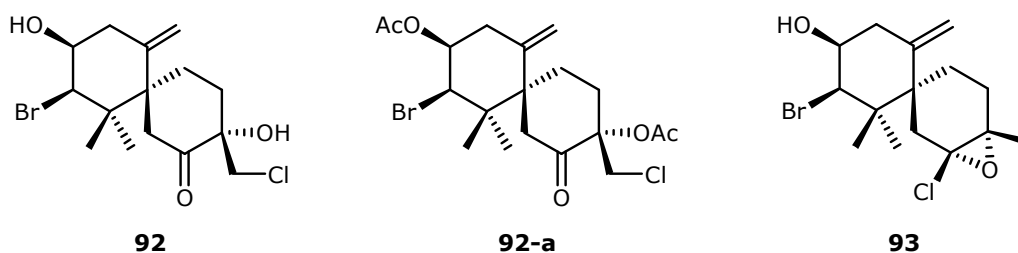


El nidifidieno (**90**) y el dieno **91** se aislaron de *L. nidifica*^{69,70} y de *L. flexilis* Setshell⁹⁷ respectivamente.



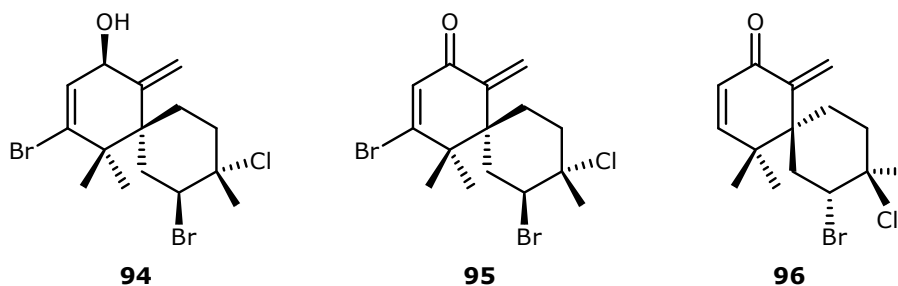
El producto **92** se aisló de *L. obtusa*.¹⁰⁸ Su estructura se determinó por análisis espectroscópico del derivado acetilado **92-a** y la configuración absoluta por estudios de difracción de rayos X de **92-a**.¹⁰⁸ De *L. mariannensis* recolectada en las Islas Hainan y en Weizhou (China) se obtuvo **93**.⁷⁷

¹⁰⁸ A. G. González, J. D. Martín, V. S. Martín, M. Norte, J. Fayos, M. Martínez-Ripoll, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 23, 2035-2036.



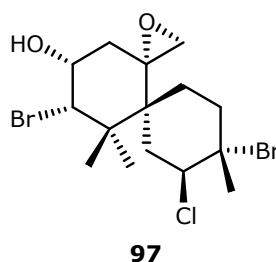
1.2.2.1.3. Grupo IIA3. Productos con 3 carbonos modificados en A.

El alcohol alílico **94** y la cetona correspondiente, **95**, se aislaron de *L. nipponica*.¹⁰⁹ La cetona insaturada **96**, previamente conocida por transformación oxidativa³⁶ de **89**, se obtuvo como producto natural de *A. dactylomela*.⁸⁹



1.2.2.1.4. Grupo IIA4. Productos con 4 carbonos modificados en A.

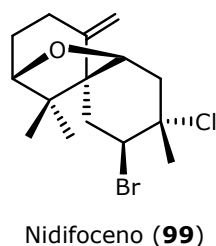
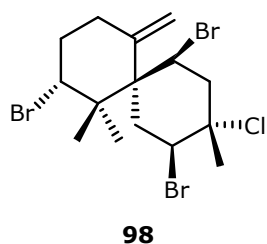
El epóxido exocíclico **97** se aisló de *L. obtusa*, recolectada en Gran Canaria. Su estructura se determinó por métodos espectroscópicos y se confirmó por difracción de rayos X.¹⁰⁰



¹⁰⁹ M. Suzuki, M. Segawa, T. Suzuki, E. Kurosawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1985**, *58*, 2435-2436.

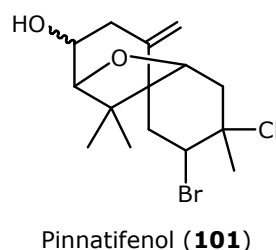
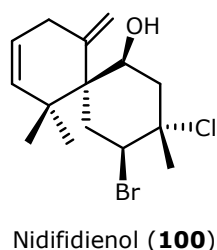
1.2.2.1.5. Grupo IIA5. Productos con 1 carbono modificado en A y 1 carbono modificado en B.

De *L. pinnatifida* recolectada en Pakistán se obtuvo el producto **98**.¹¹⁰ La estructura y configuración absoluta del nidifoceno (**99**), aislado del alga hawaiana *L. nidifica*, se determinó por difracción de rayos X.^{70,111}



1.2.2.1.6. Grupo IIA6. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

De *L. nidifica* de Hawai se obtuvo el nidifidienol (**100**).^{35,70,112} El compuesto **101**, pinnatifenol, que posee actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas, se aisló de *L. pinnatifida*.^{60,61}



1.2.2.1.7. Grupo IIA7. Productos con 3 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

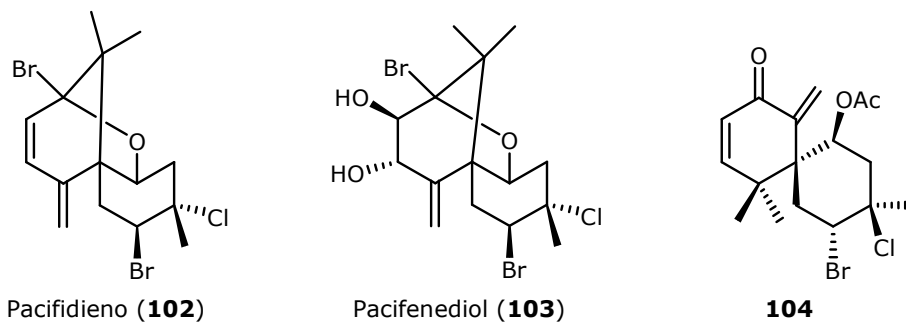
El pacifenol (**36**) en medio ácido dio lugar al dieno **102**,⁶⁸ llamado pacifidieno, posteriormente se encontró como producto natural en *L. pacifica*⁵⁵ y en *A. dactylomela*.⁷³ El compuesto relacionado **103**, pacifenediol, se obtuvo de *A.*

¹¹⁰ S. Bano, M. S. Ali, V. U. Ahmad, *Sci. Pharm.*, **1988**, *56*, 125-127.

¹¹¹ S. M. Waraszkiewicz, K. L. Erickson, J. Finer, J. Clardy, *Tetrahedron Lett.*, **1977**, *27*, 2311-2314.

¹¹² S. M. Waraszkiewicz, K. L. Erickson, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, *4*, 281-284.

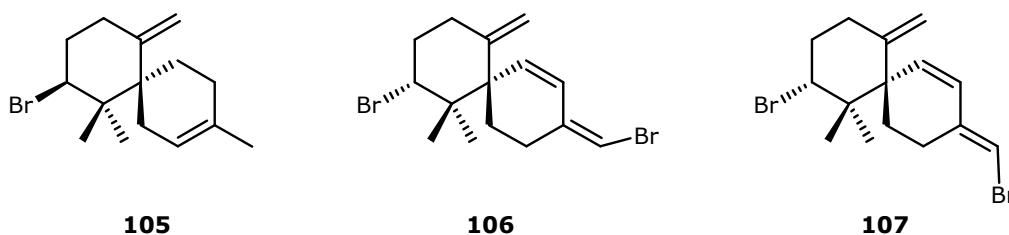
californica^{51,64} y de *A. dactylomela*,⁷³ mientras que **104** se obtuvo de *A. dactylomela*,⁸⁹ *L. majuscula*¹¹³ y de *L. mariannensis*,¹¹⁴ procedentes del mar Okinawa, Japón. La configuración absoluta de **104** se determinó por rayos X.⁸⁹



1.2.2.2. Grupo IIB. Sistemas con endo y/o exo olefinas en el anillo B.

1.2.2.2.1. Grupo IIB1. Productos con 1 carbono modificado en A.

El 10-bromo- β -chamigreno (**105**) se aisló de *L. rigida*⁷⁶ de Australia, y fue un producto seleccionado para describir las ventajas de la aplicación de gradiente de pulsos en la espectroscopía de RMN de productos naturales.⁷⁶ De *L. scoparia* recolectada en Brasil se aislaron los productos **106** y **107**.⁹²



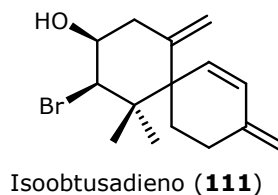
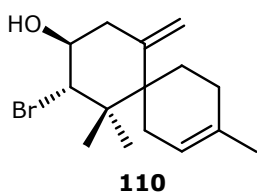
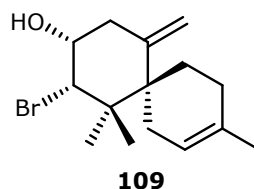
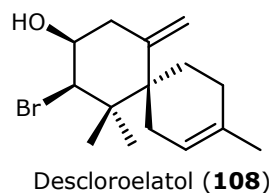
1.2.2.2.2. Grupo IIB2. Productos con 2 carbonos modificados en A.

El descloroelatol (**108**), con actividad biológica diversa como antibacteriano, antifúngico, algucida y como inhibidor del crecimiento de larvas de *Balanus amphitrite* y del briozoo *Bugula neritina*,^{76,114} se obtuvo de *L. obtusa*,³² *L. rigida*⁷⁶ y de *L. mariannensis*.⁷⁷ El enantiómero **109**, previamente obtenido por tratamiento reductivo⁹⁸ del obtusol (**81**), se aisló como producto natural de *L. majuscula*.¹¹⁴ De *L.*

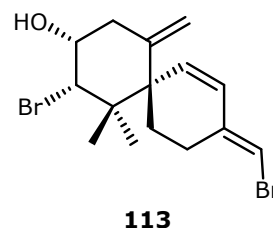
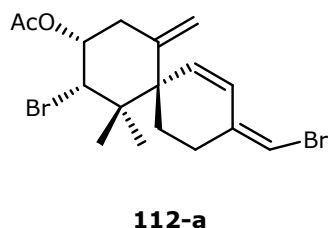
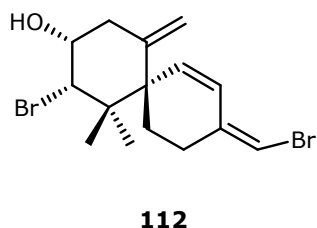
¹¹³ M. Masuda, T. Itoh, Y. Matsuo, M. Suzuki, *Phycological Res.*, **1997**, 45, 59-62.

¹¹⁴ C. S. Vairappan, M. Suzuki, T. Abe, M. Masuda, *Phytochemistry*, **2001**, 58, 517-523.

majuscula se aisló **110**,¹¹⁵ mientras que isoobtusadieno (**111**) se obtuvo de *L. obtusa*,¹¹⁶ de *L. cartilaginea*¹⁰⁵ y de *L. majuscula*,^{102,117} ésta última recolectada en Australia.



De *L. majuscula*^{78,114} (Japón) y de *Laurencia* sp.¹⁰⁵ (Filipinas), se obtuvo la bromohidrina **112**. Por el análisis espectroscópico de **112** y de su derivado acetilado **112-a** se determinó su estructura. De *A. dactylomela* de Puerto Rico se aisló, además de **112**, el producto **113**.⁸¹ Ambos presentan una actividad citotóxica moderada.⁸¹



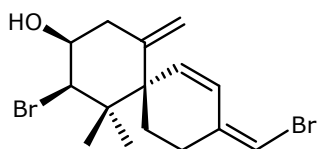
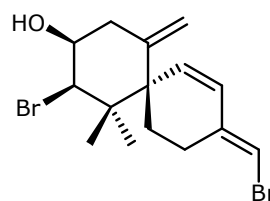
Los sesquiterpenos isoméricos **114** y **115**, aislados de *L. majuscula* Harvey^{102,117} recolectada en el noreste de Australia, así como **111**, presentan actividad citotóxica frente a líneas celulares de colon COLO 205, HT29 y KM12, de pulmón EK VX, de próstata PC3, de melanoma LOX IMVI y de ovarios IGROVI y OVCAR 5.¹¹⁷ Además, el producto **114**, aislado de *L. chondrioides*, recolectada en Gran Canaria y cultivada posteriormente, inhibieron el crecimiento de algunas bacterias patógenas.¹¹⁸

¹¹⁵ A. D. Wright, J. C. Coll, I. R. Price, *J. Nat. Prod.*, **1990**, *53*, 845-861.

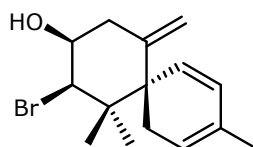
¹¹⁶ W. H. Gerwick, A. López, R. Dávila, R. Albors, *J. Nat. Prod.*, **1987**, *50*, 1131-1135.

¹¹⁷ M. A. Rashid, K. K. Gustafson, J. H. Cardellina II, M. R. Boyd, *Nat. Prod. Lett.*, **1995**, *6*, 255-259.

¹¹⁸ A. Bansemir, N. Just, M. Michalik, U. Lindequist, M. Lalk, *Chem. Biodiv.*, **2004**, *1*, 463-467.

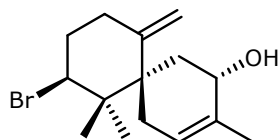
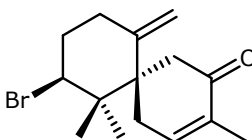
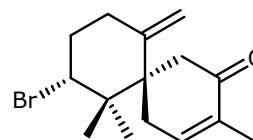
**114****115**

De *L. obtusa* del Caribe se caracterizó el obtusadieno, cuya estructura y configuración absoluta¹¹⁶ se representa en **116**.

Obtusadieno (**116**)

1.2.2.2.3. Grupo IIB3. Productos con 1 carbono modificado en A y 1 carbono modificado en B.

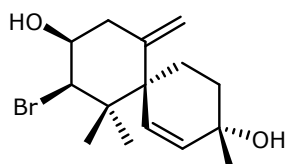
De *A. dactylomela* recolectada en Madagascar se obtuvieron los productos **117**, **118** y **119**.⁹¹ El producto dactylona, **119**, había sido aislado previamente de *A. dactylomela* y sometido a algunas transformaciones químicas para determinar su configuración absoluta.¹¹⁹

**117****118**Dactylona (**119**)

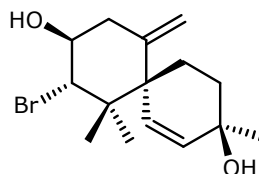
¹¹⁹ E. G. Lyakhova, S. N. Fedorov, L. K. Shubina, O. S. Radchenko, A. I. Kalinovsky, A. S. Dvitrenok, V. A. Stonik, *Russ. Chem. Bull.*, **2003**, 52, 1022-1026.

1.2.2.2.4. Grupo IIB4. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

Los isómeros rigidol (**120**) e isorigidol (**121**) se obtuvieron de *L. rigida*⁷⁶ y *L. scoparia*,¹²⁰ respectivamente.

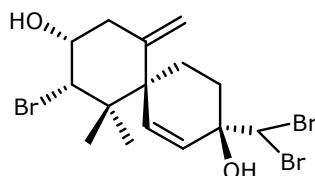


Rigidol (**120**)



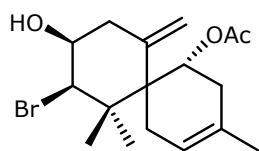
Isorigidol (**121**)

De *Laurencia* sp. recolectada en Filipinas, se aisló ma'iliohydrina (**122**). Posee actividad citotóxica frente a la línea celular de cáncer de mama NCI/ADR-RES.¹²¹

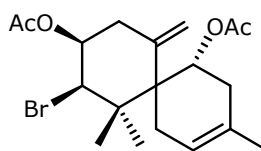


Ma'iliohydrina (**122**)

De *L. obtusa*, recolectada en Lanzarote se obtuvieron los productos **123** y **124**.¹⁰⁰



123



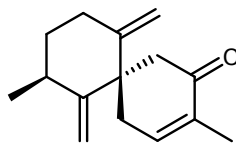
124

1.2.2.3. Grupo IIC. Esqueleto reagrupado.

La estructura del chamigreno reagrupado **125**, aislado de *Aplysia* sp., se caracterizó por análisis espectroscópico y transformaciones químicas. La configuración absoluta se determinó por estudios de dicroísmo circular.¹²²

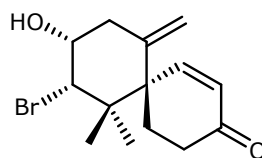
¹²⁰ L. Suescun, A. W. Mombru, R. A. Mariezcurrena, D. Davyt, R. Fernández, E. Manta, *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, **2001**, 57, 286-288.

¹²¹ M. E. Y. Francisco, K. L. Erickson, *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, 790-791.

**125**

1.2.2.4. Grupo IID. Esqueleto degradado.

El norsesquiterpeno ma'iliona (**126**), obtenido de *L. cartilaginea*, recolectada en Hawaii, exhibe actividad citotóxica a bajas concentraciones frente a la línea celular de carcinoma de colon humano HT-29.¹⁰⁵ La ma'iliona también se obtuvo de *Laurencia* sp., recolectada en Taytay, Filipinas.¹⁰⁶ La estructura y configuración relativa del producto se determinó por datos espectroscópicos.

Ma'iliona (**126**)

¹²² S. N. Fedorov, L. K. Shubina, A. I. Kalinovsky, E. G. Lyakhova, V. A. Stonik, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 1979-1982.

1.2.3. Clasificación de Chamigrenos de Origen Marino.

A continuación se relacionan los chamigrenos de origen marino descritos en la literatura. Estos productos se han agrupado de acuerdo a los criterios de clasificación que proponemos en esta Tesis. Se incluyen, para cada producto, las referencias bibliográficas correspondientes.

Grupo I. Esqueleto α -chamigreno.

Grupo IA. Sistemas con cloro-bromo, halovinilo, halohidrina, diol, epóxido o carbonilo en C2-C3 del anillo B.

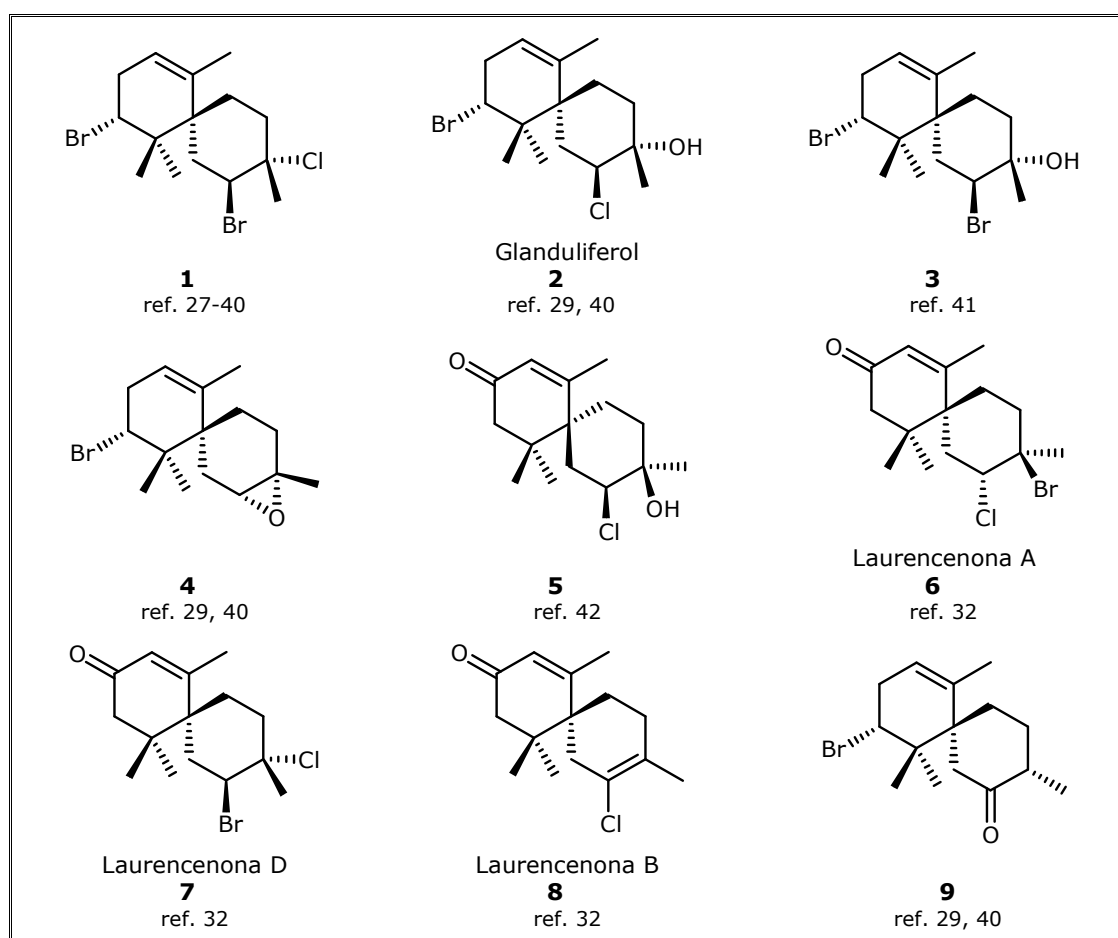


Figura 1.2.3.1. Grupo IA1. Productos con 1 carbono modificado en A.

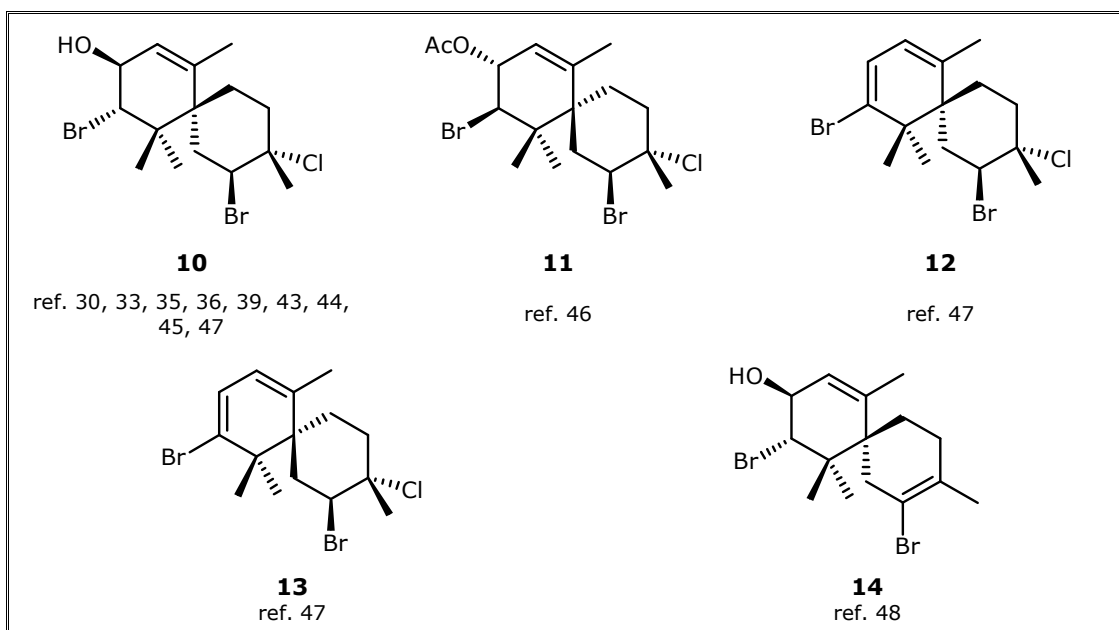


Figura 1.2.3.2. Grupo IA2. Productos con 2 carbonos modificados en A.

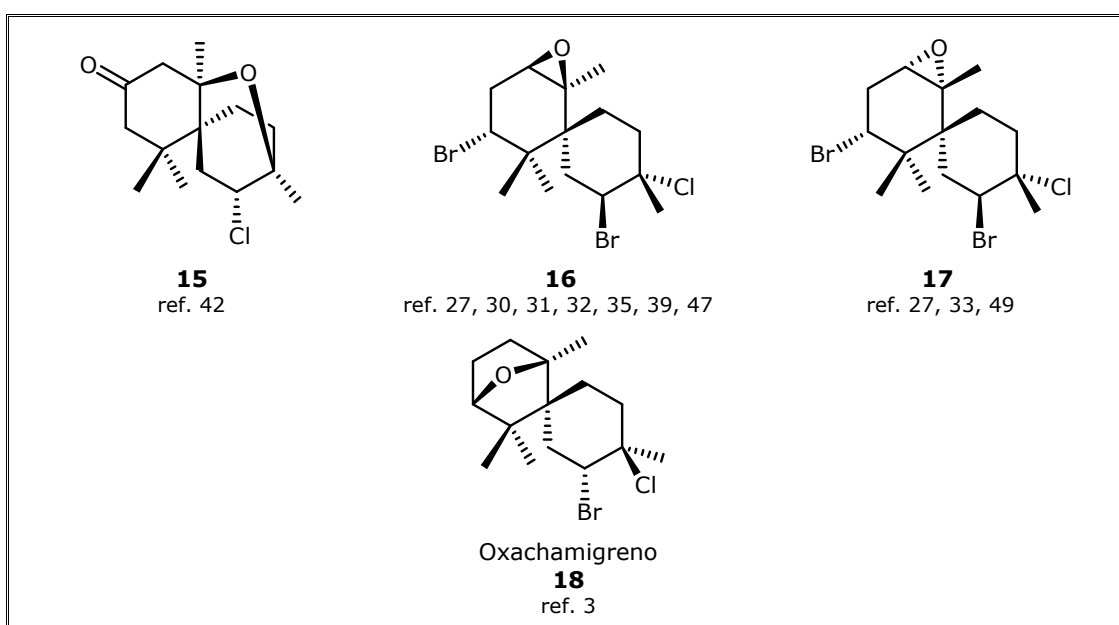


Figura 1.2.3.3. Grupo IA3. Productos con 3 carbonos modificados en A.

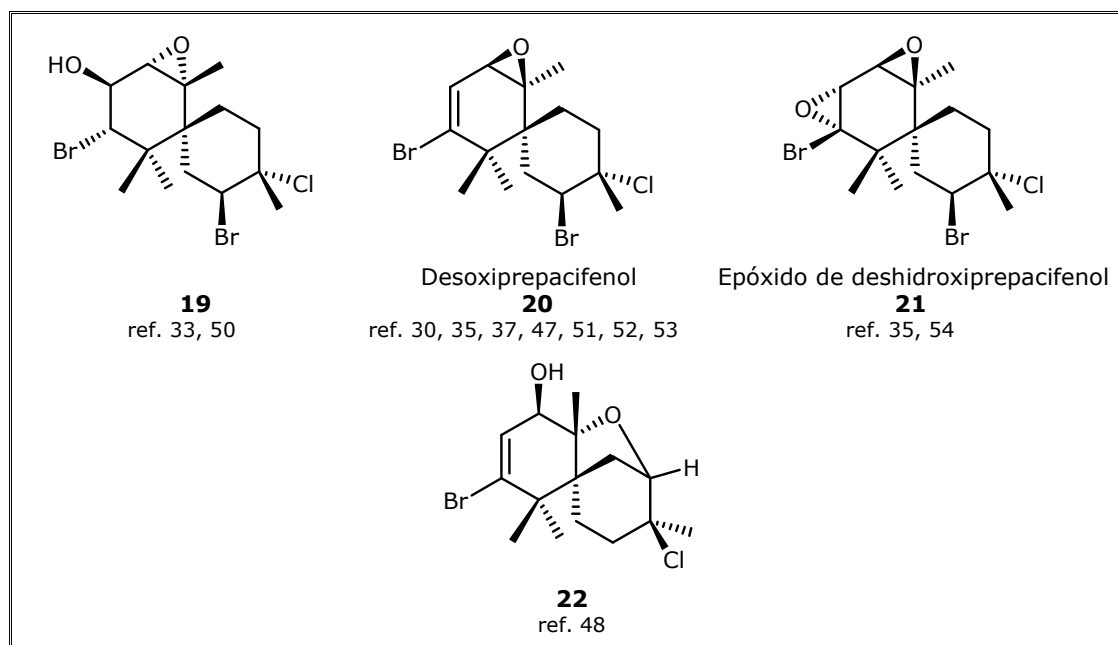


Figura 1.2.3.4. Grupo IA4. Productos con 4 carbonos modificados en A.

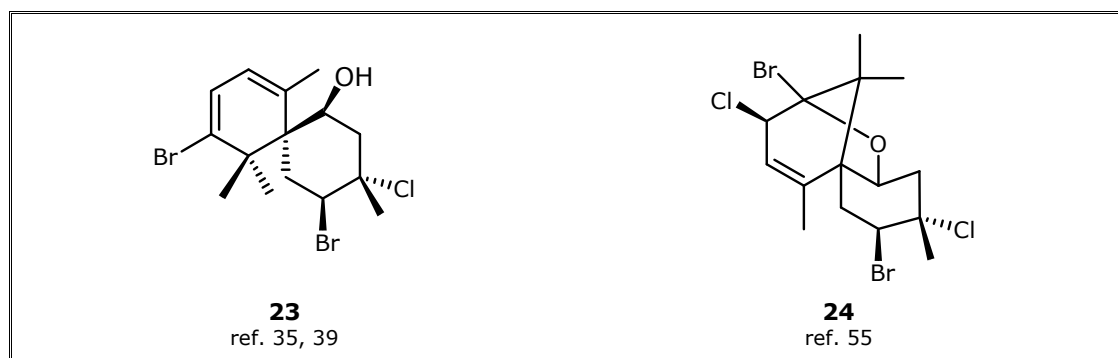


Figura 1.2.3.5. Grupo IA5. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

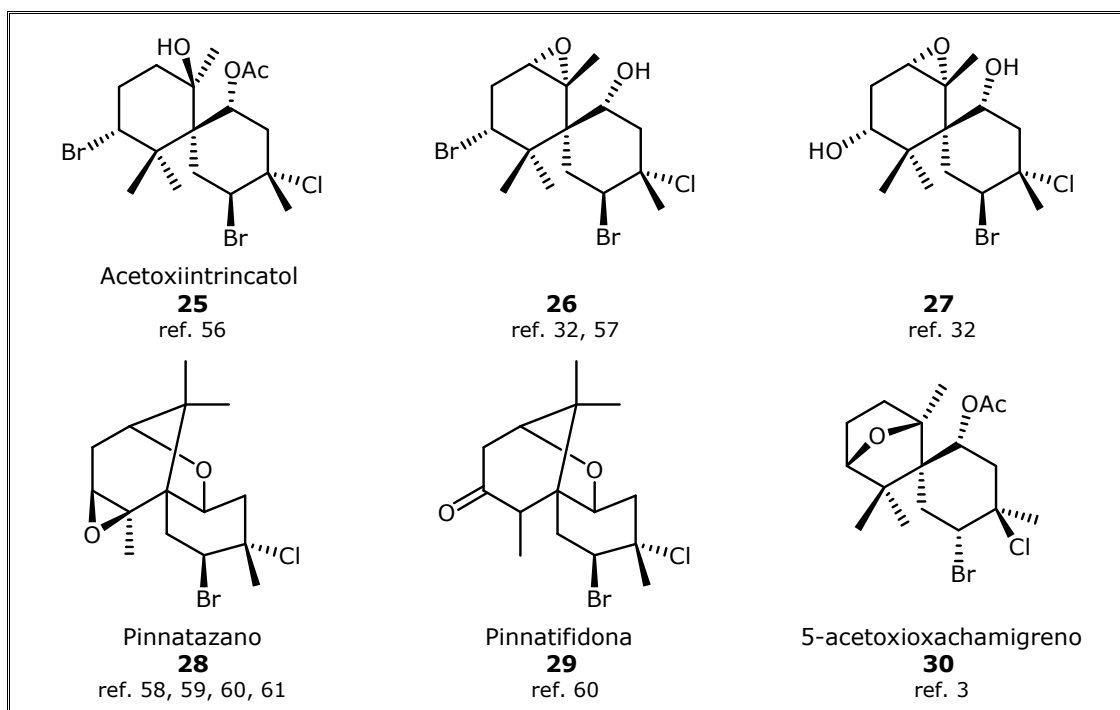


Figura 1.2.3.6. Grupo IA6. Productos con 3 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

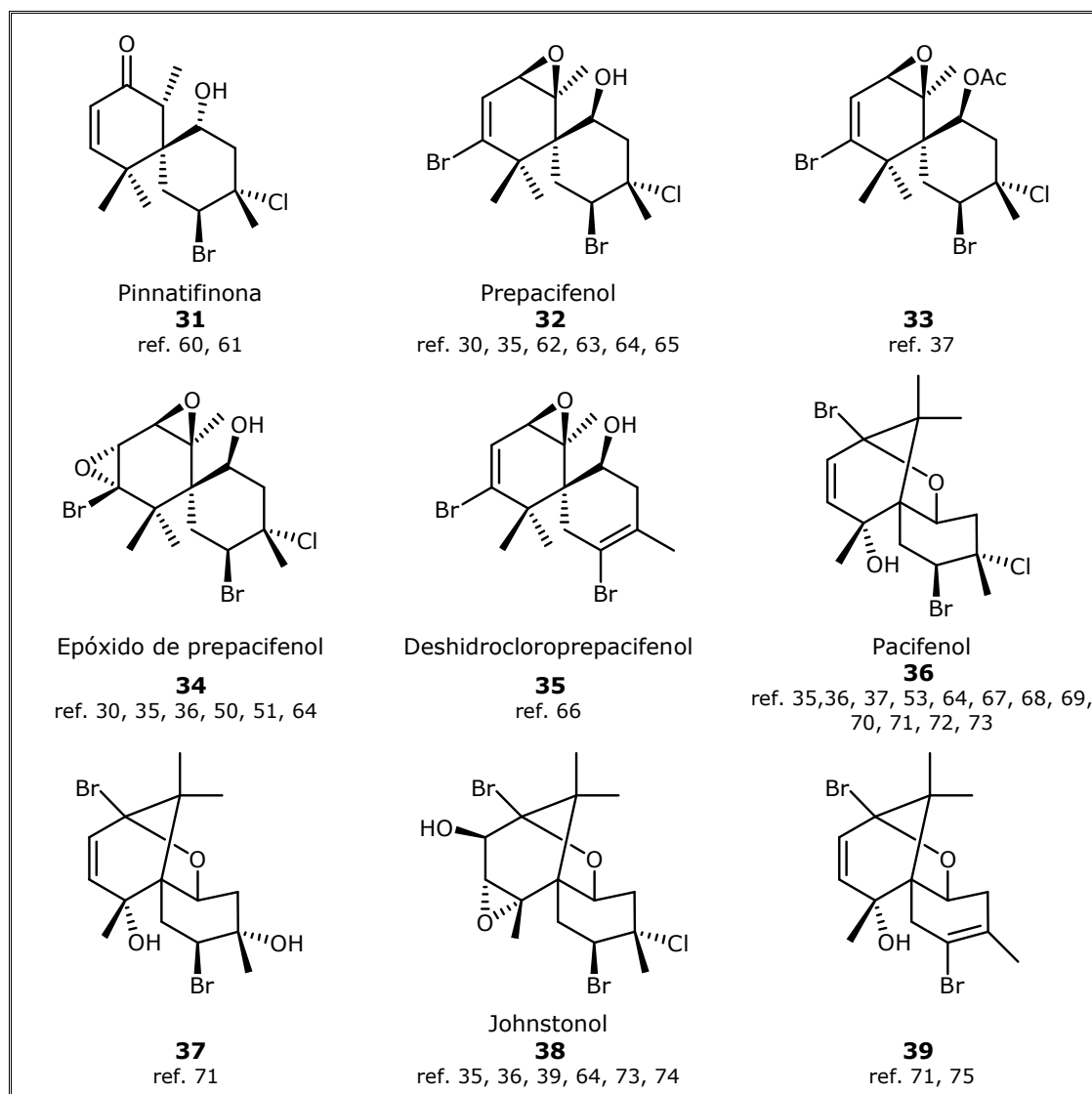
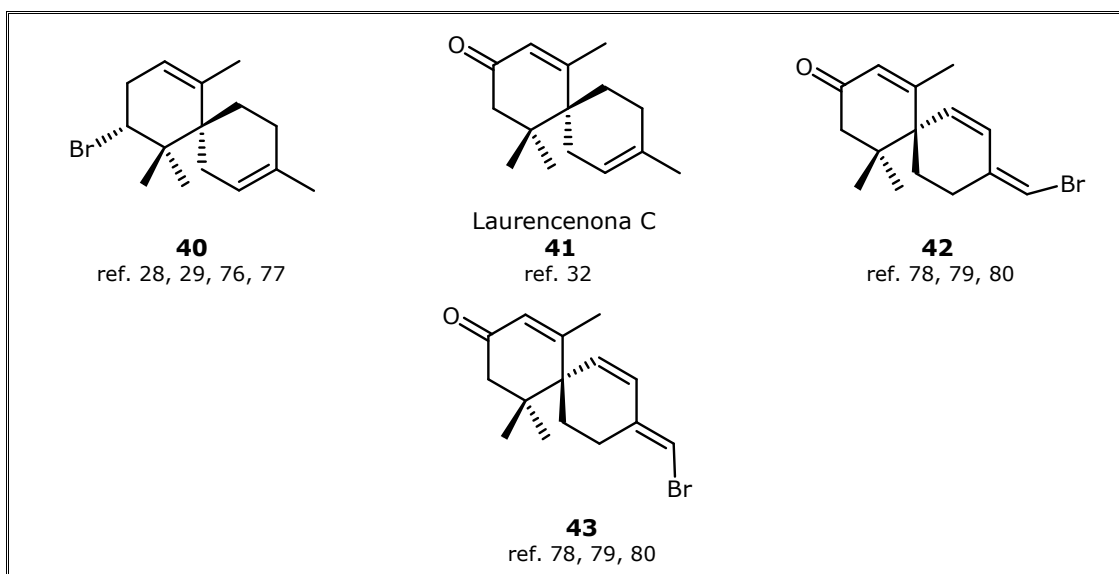
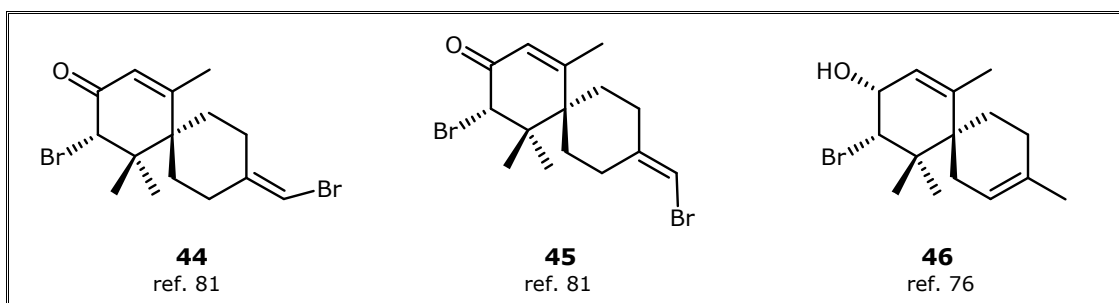
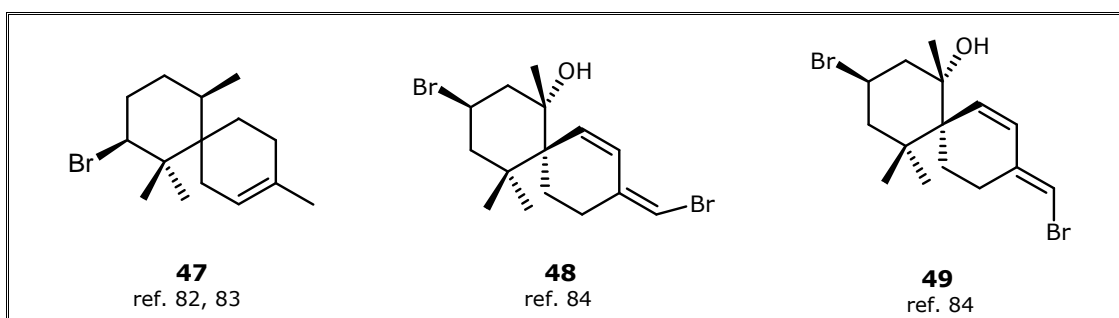


Figura 1.2.3.7. Grupo IA7. Productos con 4 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

Grupo IB. Sistemas con endo y/o exo olefinas en el anillo B.**Figura 1.2.3.8.** Grupo IB1. Productos con 1 carbono modificado en A.**Figura 1.2.3.9.** Grupo IB2. Productos con 2 carbonos modificados en A.**Figura 1.2.3.10.** Grupo IB3. Productos con 3 carbonos modificados en A.

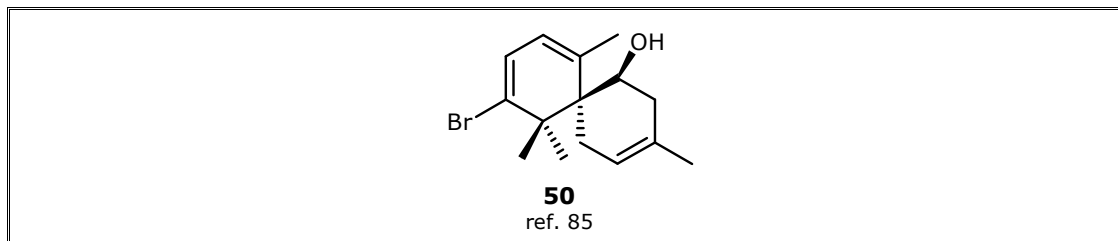


Figura 1.2.3.11. Grupo IB4. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

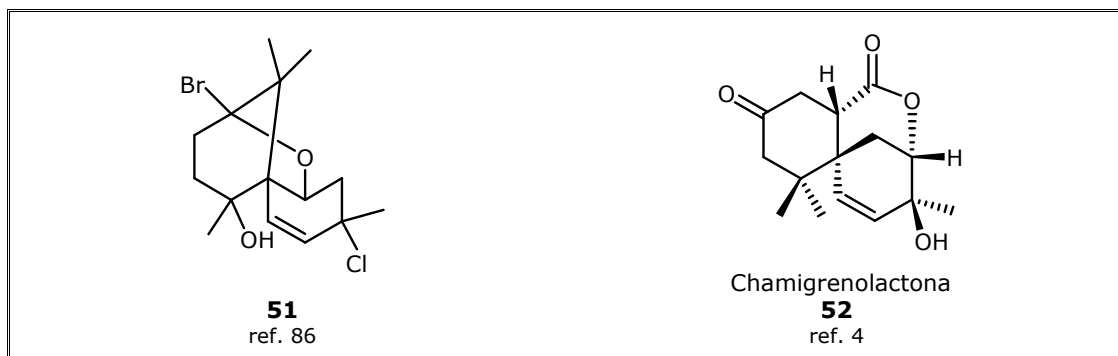


Figura 1.2.3.12. Grupo IB5. Productos con 3 carbonos modificados en A y 2 carbonos modificados en B.

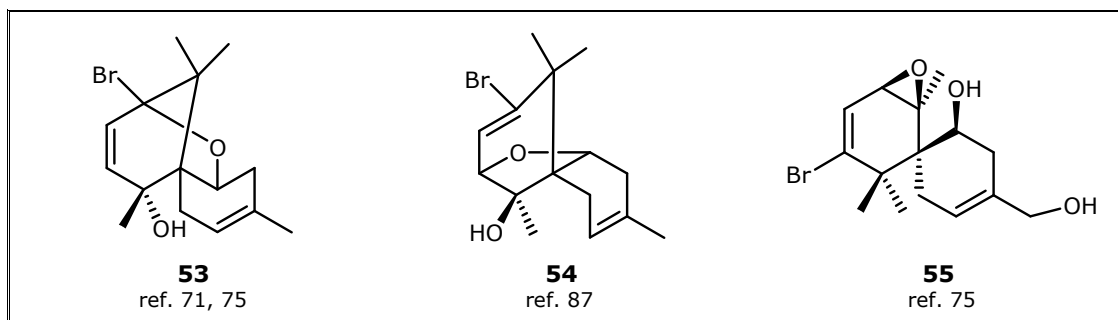


Figura 1.2.3.13. Grupo IB6. Productos con 4 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

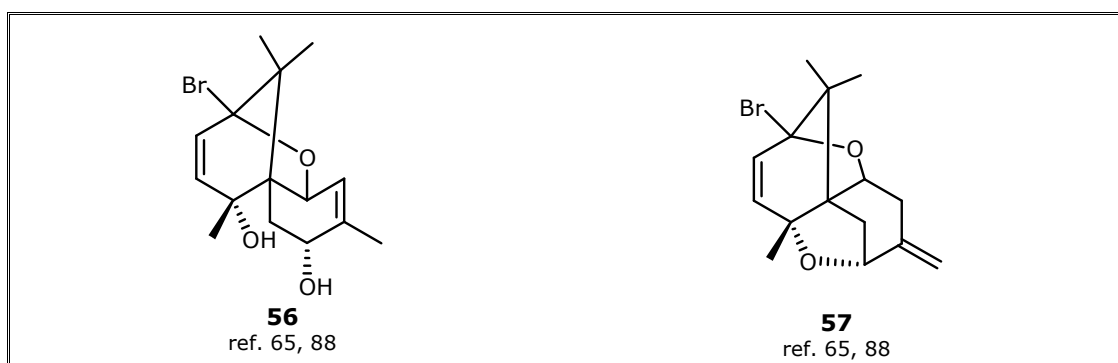


Figura 1.2.3.14. Grupo IB7. Productos con 4 carbonos modificados en A y 2 carbonos modificados en B.

Grupo IC. Esqueletos reagrupados.

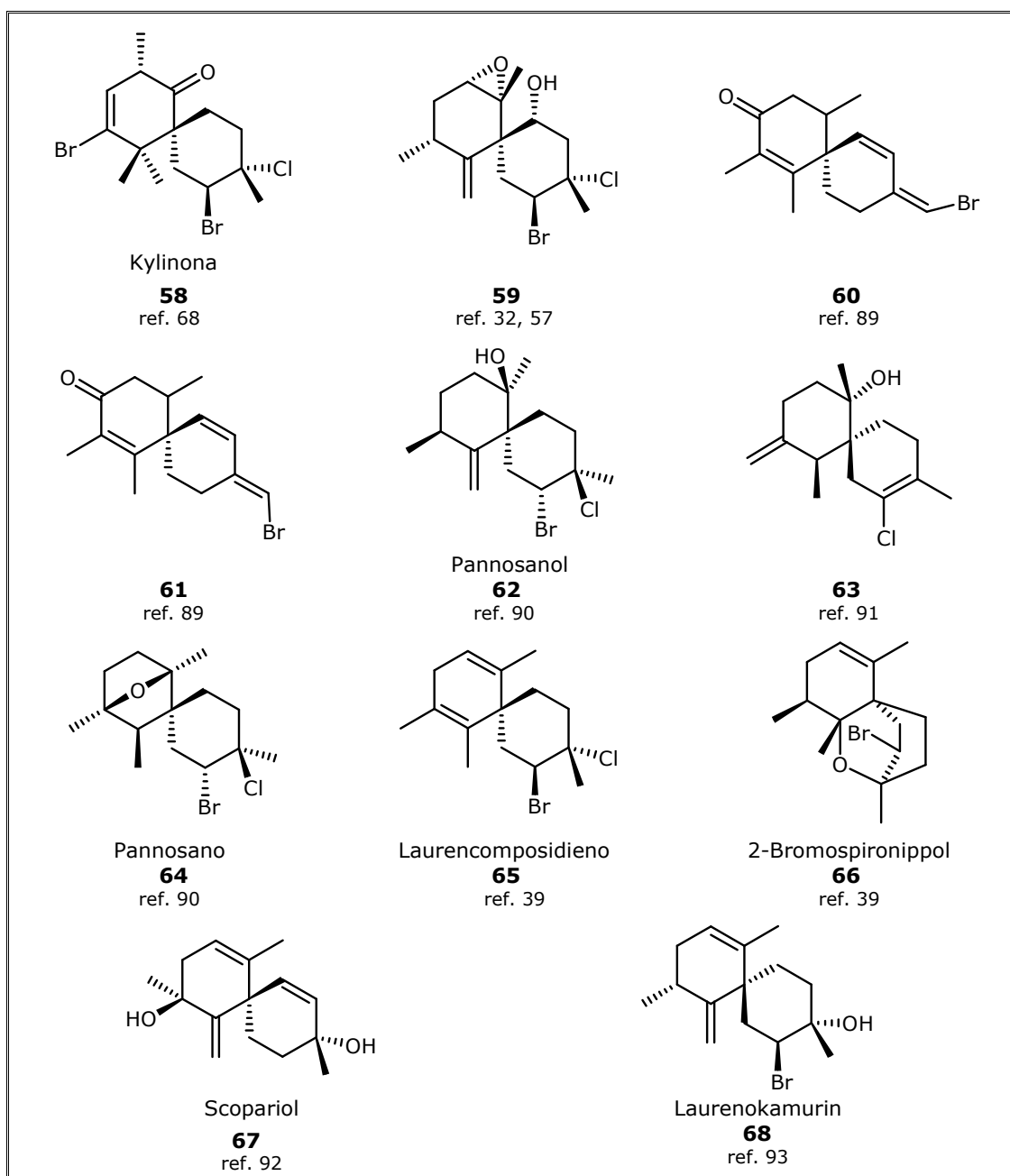


Figura 1.2.3.15. Grupo IC. Esqueletos reagrupados.

Grupo ID. Esqueleto degradado

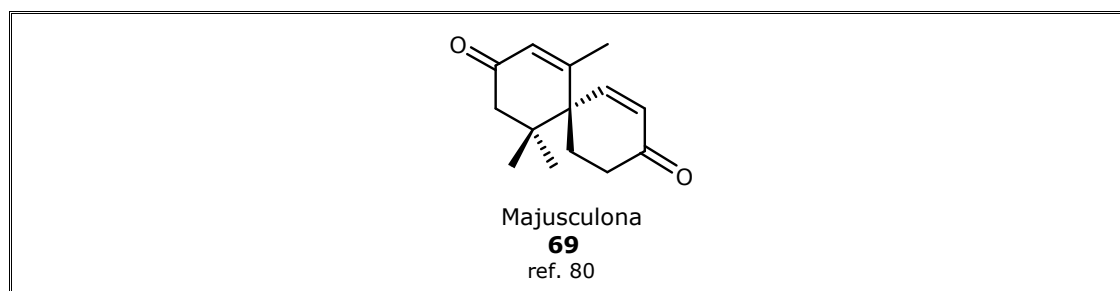
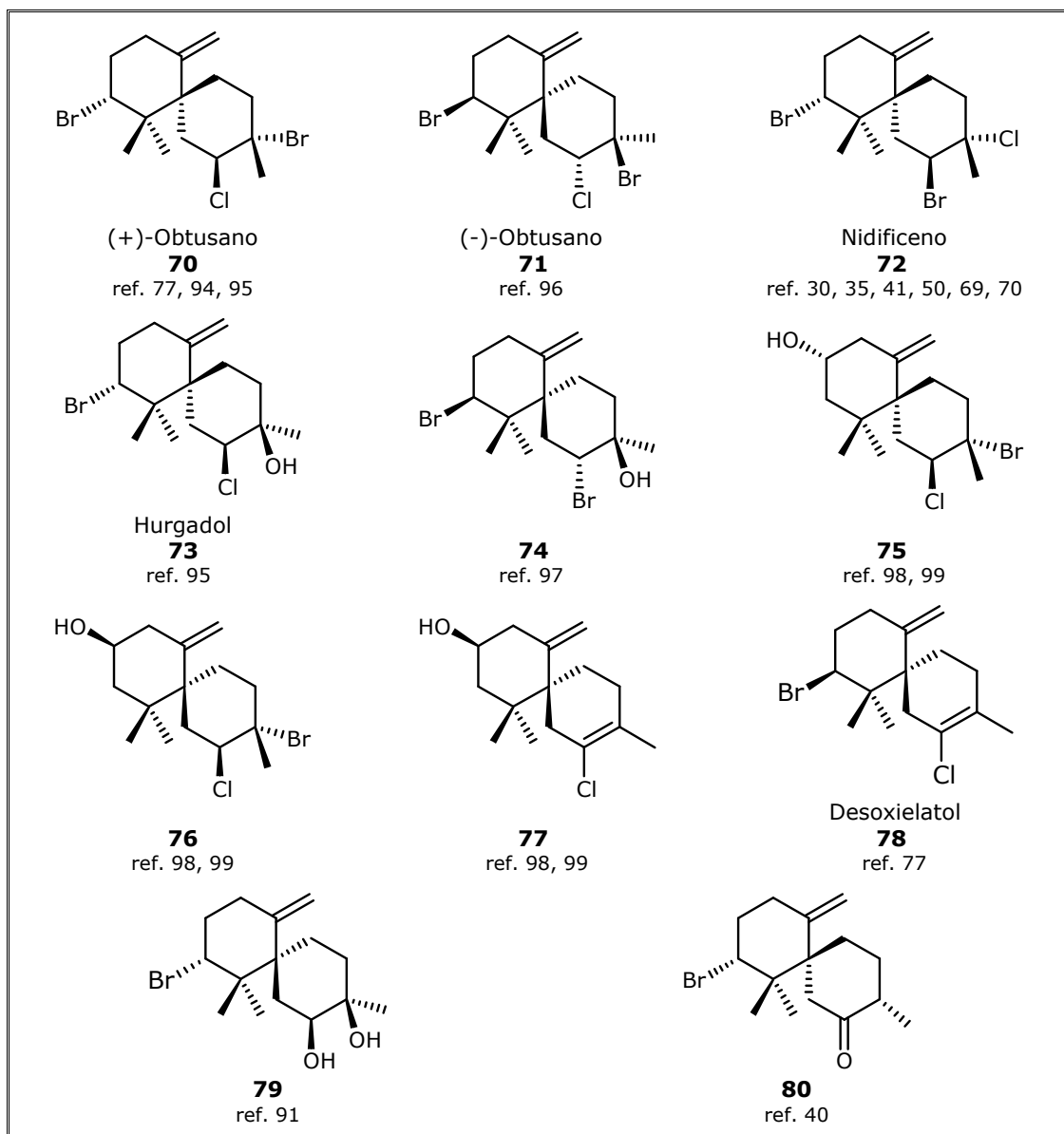


Figura 1.2.3.16. Grupo ID. Esqueleto degradado

Grupo II. Esqueleto β -chamigreno.**Grupo IIA. Sistemas con cloro-bromo, halovinilo, halohidrina, diol, epóxido o carbonilo en C2-C3 del anillo B.****Figura 1.2.3.17.** Grupo IIA1. Productos con 1 carbono modificado en A.

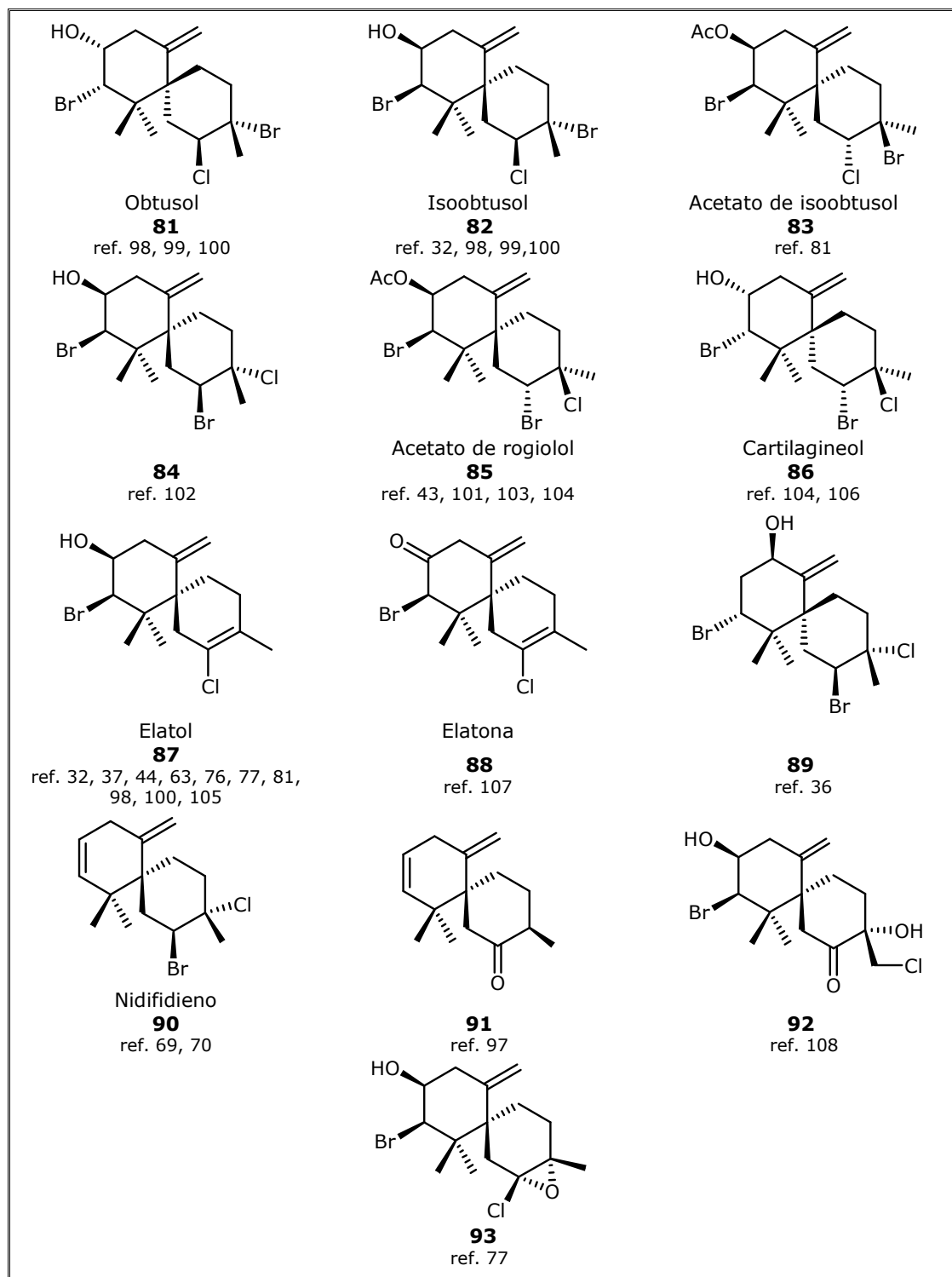


Figura 1.2.3.18. Grupo IIA2. Productos con 2 carbonos modificados en A.

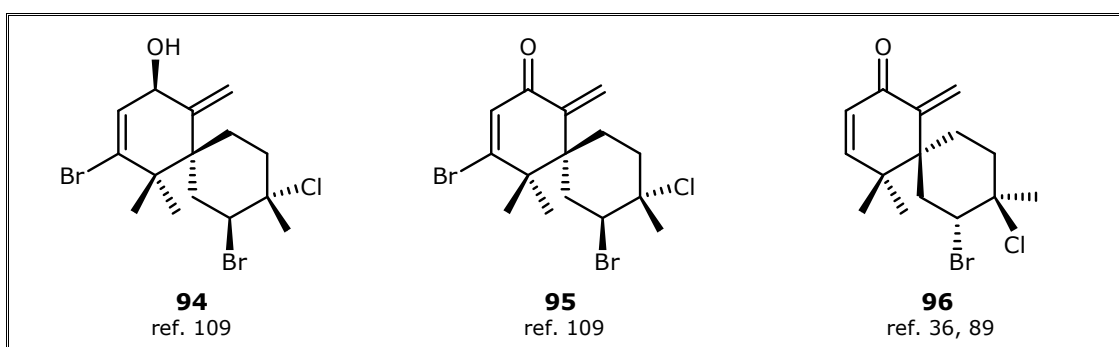


Figura 1.2.3.19. Grupo IIA3. Productos con 3 carbonos modificados en A.

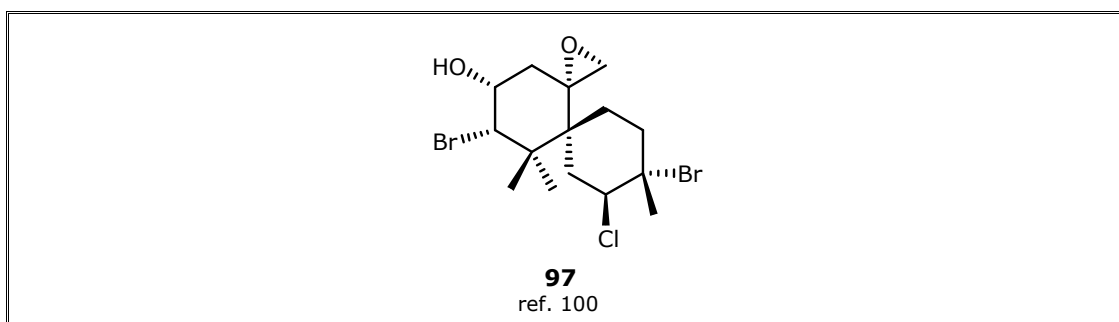


Figura 1.2.3.20. Grupo IIA4. Productos con 4 carbonos modificados en A.

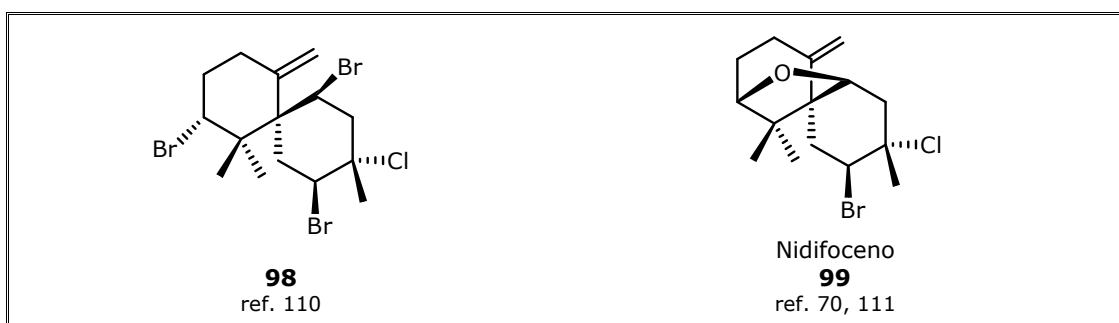


Figura 1.2.3.21. Grupo IIA5. Productos con 1 carbono modificado en A y 1 carbono modificado en B.

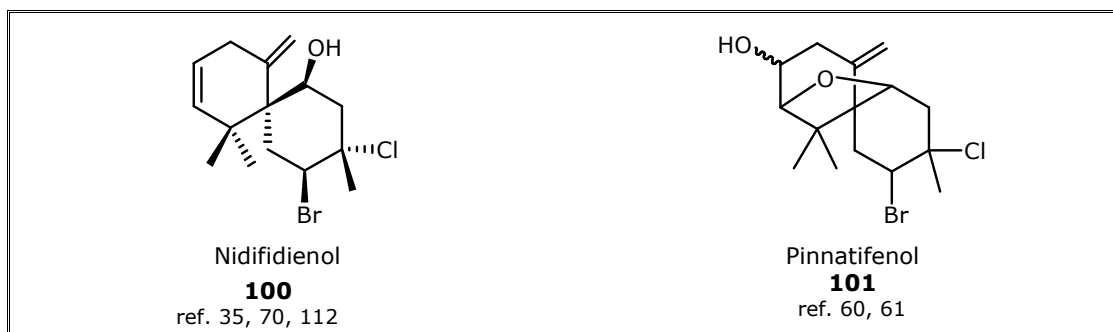


Figura 1.2.3.22. Grupo IIA6. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

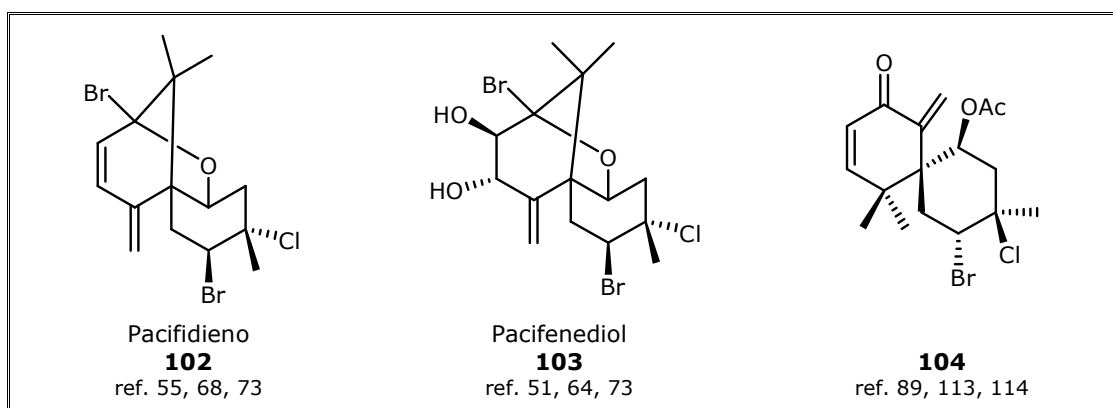


Figura 1.2.3.23. Grupo IIA7. Productos con 3 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

Grupo IIB. Sistemas con endo y/o exo olefinas en el anillo B.

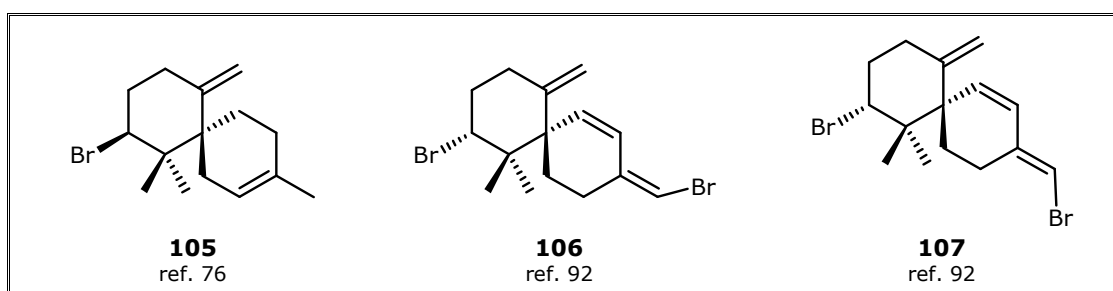


Figura 1.2.3.24. Grupo IIB1. Productos con 1 carbono modificado en A.

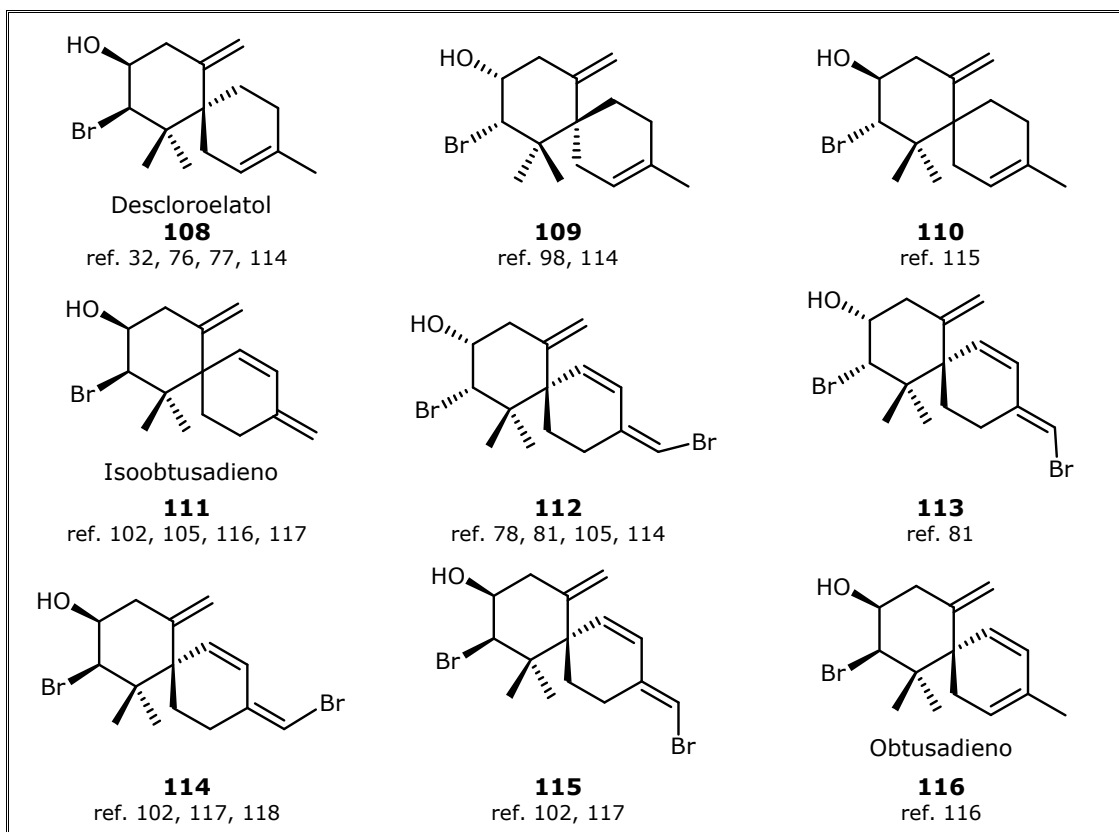


Figura 1.2.3.25. Grupo IIB2. Productos con 2 carbonos modificados en A.

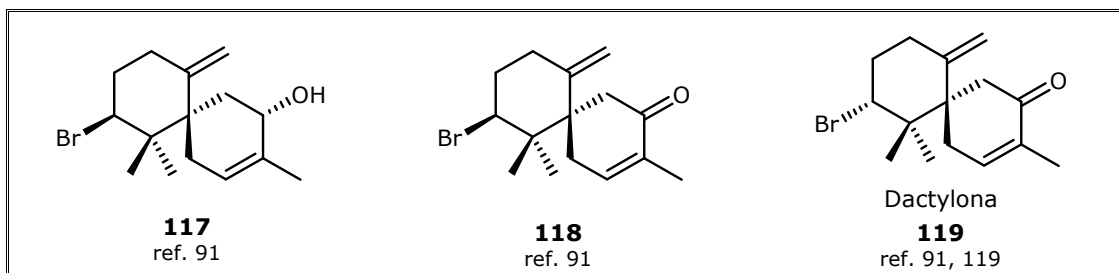


Figura 1.2.3.26. Grupo IIB3. Productos con 1 carbono modificado en A y 1 carbono modificado en B.

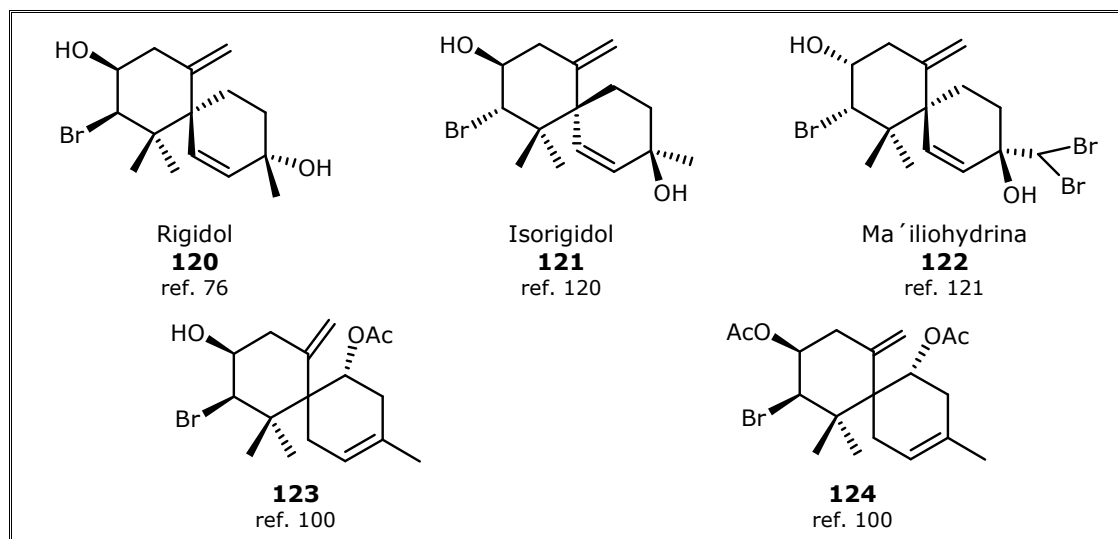


Figura 1.2.3.27. Grupo IIB4. Productos con 2 carbonos modificados en A y 1 carbono modificado en B.

Grupo IIC. Esqueleto reagrupado.

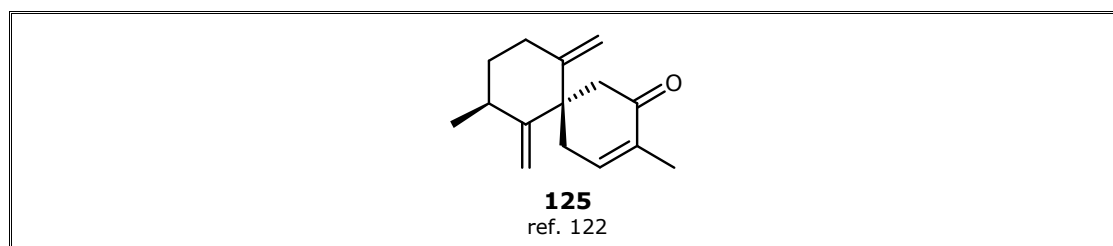


Figura 1.2.3.28. Grupo IIC. Esqueleto reagrupado.

Grupo IID. Esqueleto degradado

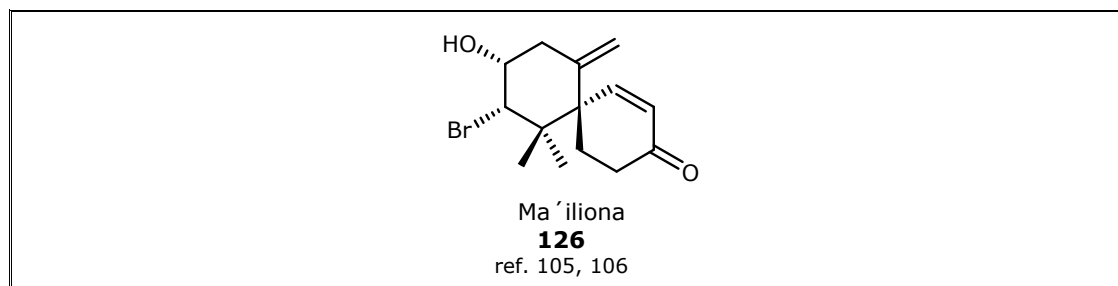


Figura 1.2.3.29. Grupo IID. Esqueleto degradado.

1.3. γ -BUTIROLACTONAS DERIVADAS DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA LARGA OBTENIDOS DE OCTOCORALES MARINOS.

Los butenolidos son una familia de lactonas α,β -insaturadas que, ocasionalmente, se encuentra en diversos organismos marinos, tales como: esponjas,¹²³ hongos,¹²⁴ bacterias,¹²⁵ gorgonias,^{126,127} plumas de mar¹²⁸ y corales blandos.¹²⁹ Sin embargo, son relativamente abundantes en ciertas especies de plantas

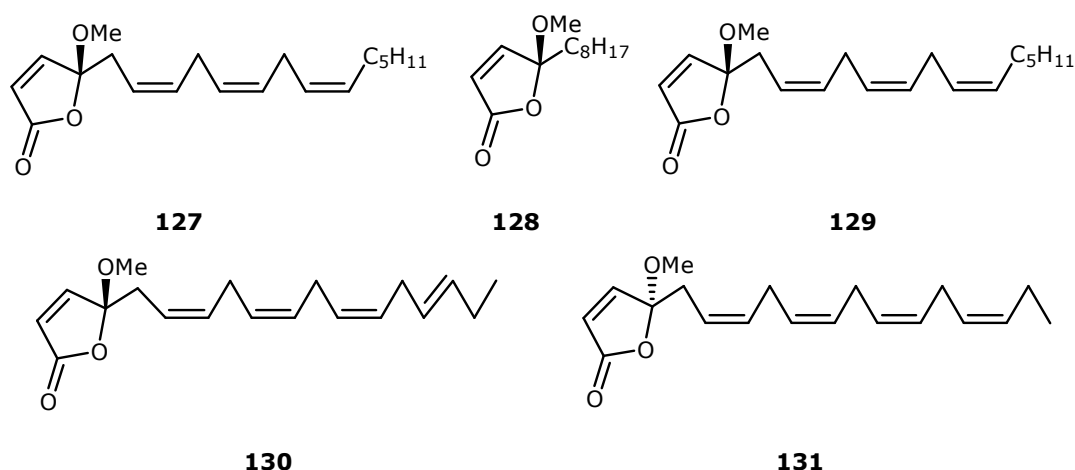


Figura 1.3.1. Ejemplos representativos de metabolitos γ -lactónicos de esponjas.

pertenecientes a la familia de las Annonaceae.¹³⁰ Sus análogos saturados actúan como sustancias de señalización en bacterias,¹³¹ aumentando la formación de esporas de

¹²³ F. S. D. Guzman, F. J. J. Schmitz, *J. Nat. Prod.*, **1990**, *53*, 926–931.

¹²⁴ (a) A. Evidente, L. J. Sparapano, *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 1720–1725. (b) C. J. Smith, D. Abbanat, S. V. Bernan, W. M. Maiese, M. Greenstein, J. Jompa, A. Tahir, C. M. Ireland, *J. Nat. Prod.*, **2000**, *63*, 142–145. (c) C. P. Pathirana, R. Dwight, P. R. Jensen, W. F. Fenical, A. Delgado, L. S. Brinen, J. Clardy, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 7001–7004.

¹²⁵ (a) V. J. R. V. Mukku, M. Speitling, H. Laatsch, E. J. Helmke, *J. Nat. Prod.*, **2000**, *63*, 1570–1572. (b) K. W. Cho, H. S. Lee, J. R. Rho, T. S. Kim, S. J. Mo, J. Shin, *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 664–667. (c) S. M. Pimentel-Elardo, S. Kozyska, T. S. Bugni, C. M. Ireland, H. Moll, U. Hentschel, *Mar. Drugs*, **2010**, *8*, 373–380.

¹²⁶ D. Braun, N. Pauli, U. Sequin, H. Zähler, *FEMS Microbiol. Lett.*, **1995**, *126*, 37–42.

¹²⁷ (a) Y. W. Guo, M. Gavagnin, E. Mollo, E. Trivelone, G. J. Cimino, *J. Nat. Prod.*, **1999**, *62*, 1194–96. (b) A. D. Rodriguez, C. J. Ramirez, *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 339–347. (c) F. J. Schmitz, K. W. Kraus, L. S. Ciereszko, D. H. Sifford, A. J. Weinheimer, *Tetrahedron Lett.*, **1966**, *1*, 97–104. (d) F. J. Schmitz, E. D. Lorange, L. S. Ciereszko, *J. Org. Chem.*, **1969**, *34*, 1989–1990. (e) F. J. Schmitz, E. D. Lorange, *J. Org. Chem.*, **1971**, *36*, 719–721.

¹²⁸ A. S. R. Anjaneyulu, C. V. S. Prakash, *Ind. J. Chem.*, **1994**, *33*, 55–58.

¹²⁹ T. Rezanka, V. M. Dembitsky, *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 8743–8749.

¹³⁰ F. Q. Alali, X.-X. Liu, J. L. McLaughlin, *J. Nat. Prod.*, **1999**, *62*, 504–540.

Streptomyces, o induciendo la producción de metabolitos.¹³² En las siguientes Figuras 1.3.1, 1.3.2, 1.3.3 se representan algunos ejemplos característicos de productos lactónicos aislados de esponjas, bacterias y plumas de mar.

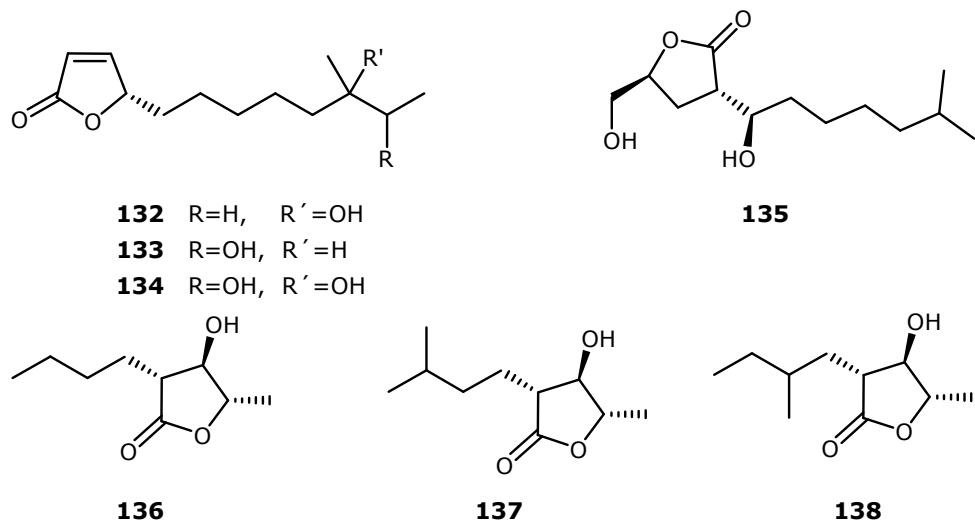


Figura 1.3.2. Ejemplos representativos de metabolitos γ -lactónicos de bacterias marinas.

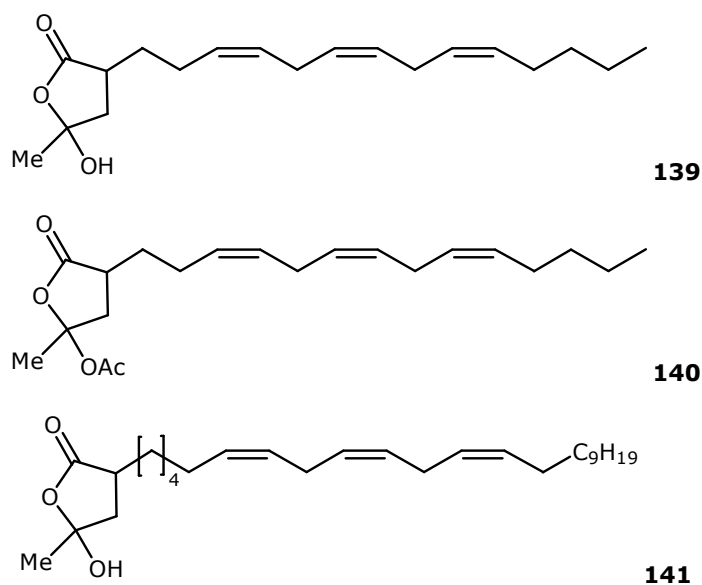


Figura 1.3.3. Ejemplos representativos de metabolitos γ -lactónicos de plumas de mar.

¹³¹ Y. Yamada, T. Nihira, In *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Sir D. Barton, K. Nakanishi, Ed.; Elsevier; Oxford, **1999**; Vol. 8, pp 377-413

¹³² S. Sakuda, S. Tanaka, K. Mizuno, O. Sukcharoen, T. Nihira, Y. Yamada, *J. Chem. Soc., Perkin I*, **1993**, 2309-2315.

Con motivo de nuestros estudios químicos de *Pterogorgia* sp., efectuamos una recopilación bibliográfica, que relacionamos a continuación, de los productos γ -lactónicos derivados de ácidos grasos obtenidos de octocorales. Los octocorales tienen la particularidad de biosintetizar una clase singular de bis-butenolidos derivados de ácidos grasos de cadena larga, por ejemplo, ancepsenolido (**142**) e hidroxiancepsenolido (**143**), Figura 1.3.4.

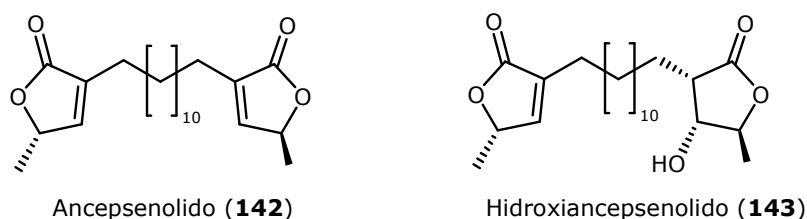


Figura 1.3.4. Bis-butenolidos característicos del género *Pterogorgia*.

Después de que en 1966 se obtuviera de la gorgonia *Pterogorgia anceps* el primer lípido bisbutenolido, el ancepsenolido (**142**),¹³³ y, posteriormente, el hidroxiancepsenolido¹³⁴ (**143**) de la misma especie, se han publicado muy pocos trabajos sobre la caracterización de nuevos productos γ -lactónicos de octocorales, a pesar de las importantes propiedades biológicas y biomédicas que exhiben.

La clase estructural bis-butenolido parece ser, hasta este momento, exclusiva de las especies *Pterogorgia anceps*,^{127a} *P. guadalupensis*¹³⁵ and *P. citrina*.¹³⁶ La mayoría de los metabolitos pertenecientes a esta clase son derivados hidroxilados o acetilados, resultantes de la hidratación de una de las unidades butenolida simétricas del ancepsenolido o del homoancepsenolido,^{127a} Figura 1.3.5.



¹³³ F. J. Schmitz, K. W. Kraus, L. S. Ciereszko, D. H. Sifford, A. J. Weinheimer, *Tetrahedron Lett.*, **1966**, 97-104.

¹³⁴ F. J. Schmitz, E. D. Lorange, L. S. Ciereszko, *J. Org. Chem.*, **1969**, 34, 1989-1990.

¹³⁵ F. J. Schmitz, E. D. Lorange, *J. Org. Chem.*, **1971**, 36, 719-721.

¹³⁶ A. Rodriguez, C. Ramirez, *J. Nat. Prod.*, **1994**, 57, 339-347.

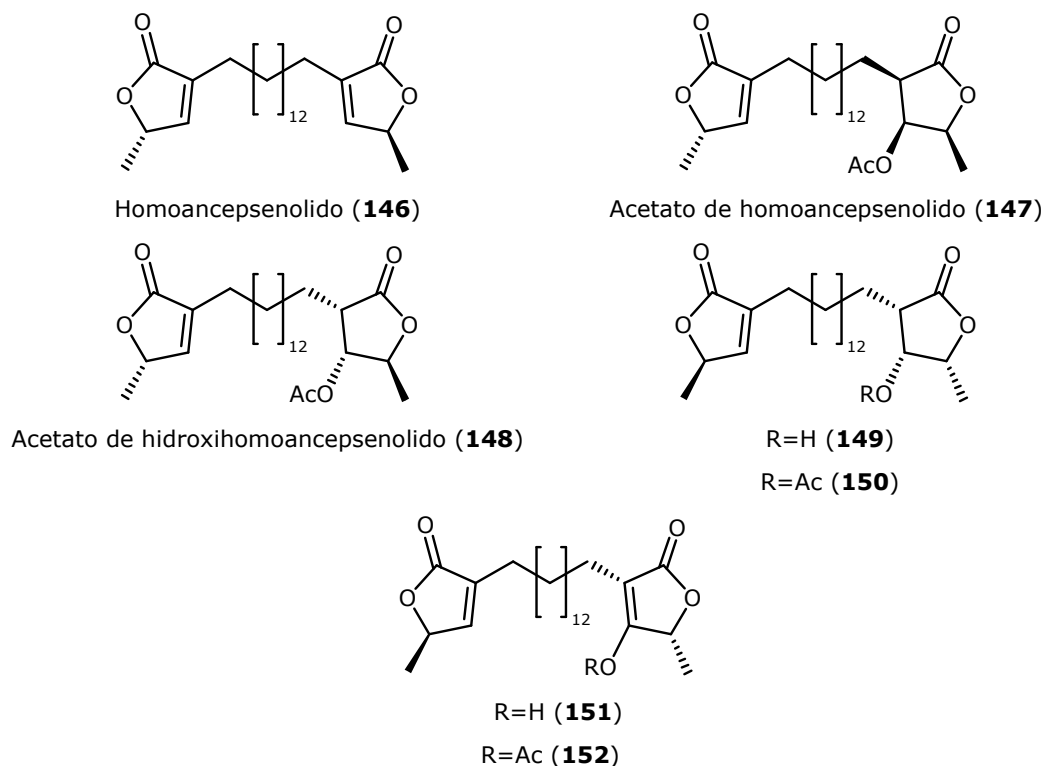
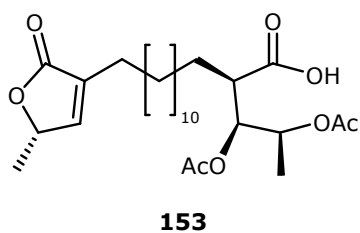


Figura 1.3.5. Bis-butenolidos naturales del género *Pterogorgia* derivados de la hidratación de ancepsenolido y homoancepsenolido.

También se han descrito derivados hidroxiácidos- γ -lactónicos.^{127e} Estos productos, por ejemplo **153**, son los probables precursores del segundo anillo lactónico de los bis-butanolidos.



Mientras que los monobutenolidos son relativamente abundantes en organismos terrestres, éstos son muy poco frecuentes en organismos marinos. Hasta este

momento sólo se han encontrado en *P. anceps*,^{127a} *Euplexaura flava*¹³⁷ y *Plexaura flava*,¹³⁸ Figura 1.3.6.

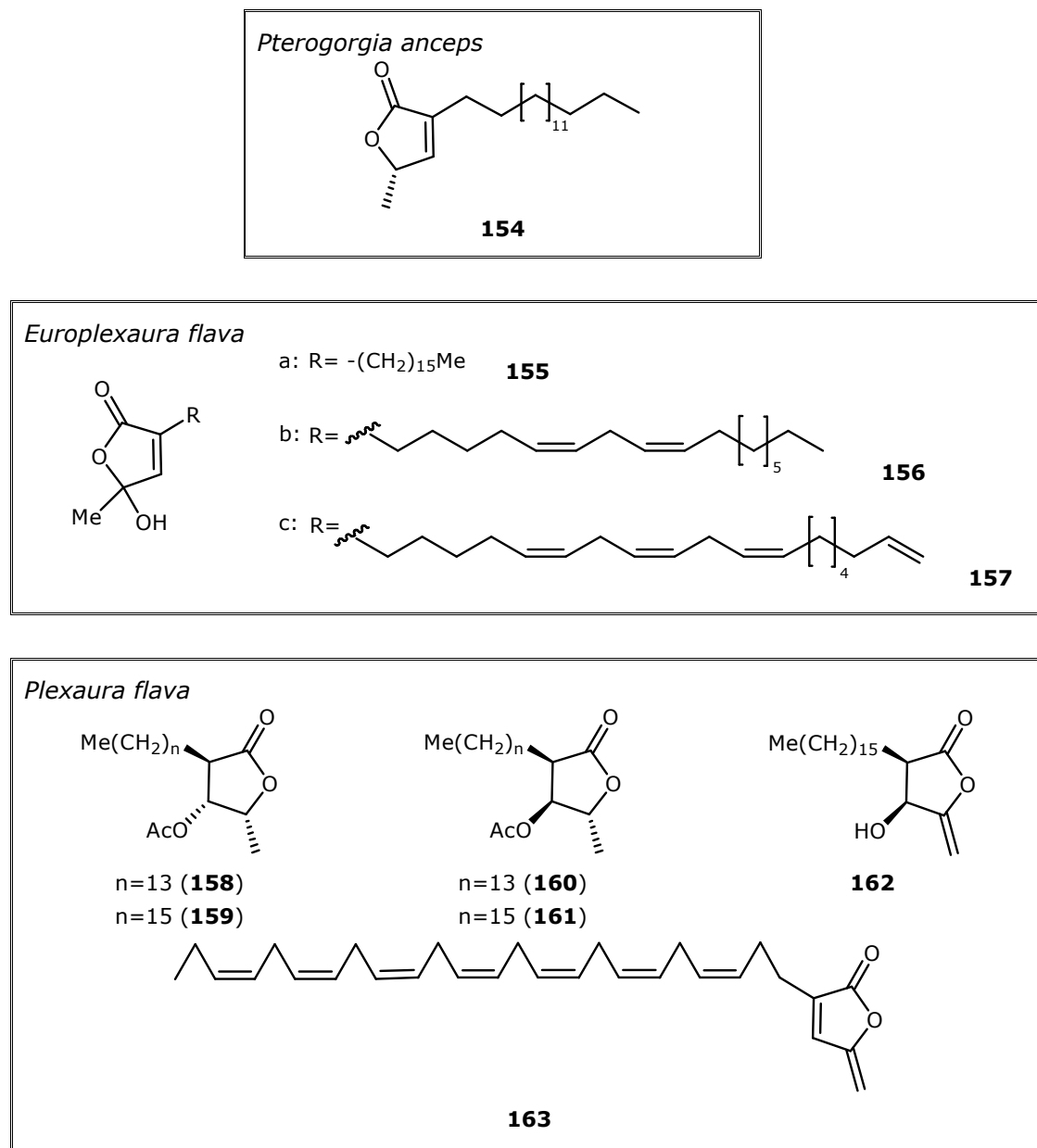


Figura 1.3.6. Monobutenolidos de *P. anceps*, *Europlexaura flava* y *Plexaura flava*.

¹³⁷ H. Kikuchi, Y. Tsukitani, H. Nakanishi, I. Shimizu, S. Saitoh, K. Iguchi, Y. Yamada, *Chem. Pharm. Bull.*, **1983**, 31, 1172-1176.

¹³⁸ B. N. Ravi, R. J. Wells, *Aust. J. Chem.*, **1982**, 35, 105-112.

De las especies *Sarcophyton trocheliophorum* y *Lythophyton arboreum*, del mar Rojo, se aislaron una serie de butanolidos y butenolidos con insaturaciones en la cadena lateral¹²⁸ poco habituales, Figura 1.3.7.

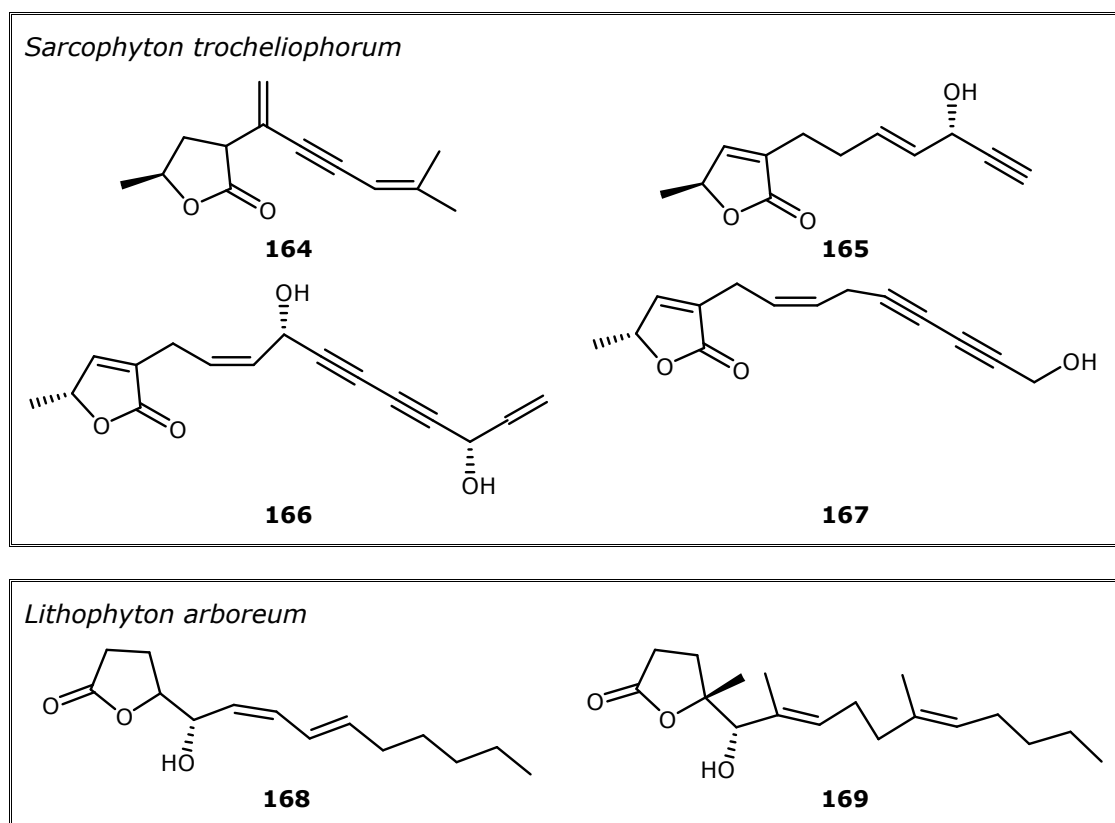


Figura 1.3.7. Monobutenolidos de corales blandos con cadena lateral insaturada poco común.

Los butenolidos que hemos relacionado, comparten una porción de γ -lactona α,β -insaturada, con varios modelos de sustitución y tienen propiedades antibióticas,^{127,130} antitumorales,^{127,130} inhibitoras de enzima,¹²⁷ y citotóxica.¹³⁰

Nuestros estudios de *Pterogorgia sp.*, suponen una importante contribución a la química de los bisbutanolidos derivados de ácidos grasos de cadena larga. Los resultados obtenidos se exponen en la parte teórica de esta Tesis.

2. Parte Teórica



2.1. ESTUDIO QUÍMICO DEL ALGA ROJA *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

El estudio de la química de los productos naturales revela que determinados compuestos sólo son producidos por ciertas especies. Estas sustancias se consideran marcadores químicos específicos. En el medio marino, los metabolitos secundarios halogenados con esqueleto chamigreno son característicos de algas rojas del género *Laurencia*, y aunque inicialmente se obtuvieron de moluscos herbívoros del género *Aplysia*, las especies de este género no los biosintetizan, sino que los obtienen y acumulan del auténtico productor, las algas del género *Laurencia* que forman parte de su dieta. El aislamiento de especies de *Laurencia* de más de 120 productos sesquiterpenos chamigrénicos halogenados, indica que este tipo de metabolitos constituye un marcador quimiotaxonómico del género. A pesar de la intensa investigación química a la que el género *Laurencia* ha sido sometido, con nuevos estudios químicos de especies de diferentes latitudes, dicho género aún continúa aportando metabolitos con nuevos esqueletos carbonados y una sorprendente diversidad estructural,^{1,2,3,139,140} que se puede interpretar como una respuesta adaptativa ecológica. Además, muchos de los productos obtenidos de *Laurencia* son biológicamente activos.^{92,141}

Al menos 40 especies de algas *Laurencia* producen metabolitos organohalogenados tales como C-15 acetogeninas y sustancias terpénicas: sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos. Sin duda, esta diversidad es consecuencia de una de sus principales características, la naturaleza halogenada de estas sustancias, que le permite sufrir fácilmente procesos intramoleculares que alteran sus estructuras.

El género *Laurencia* se encuentra distribuido en los mares tropicales y subtropicales de todo el mundo, y, en este trabajo, presentamos los resultados del estudio de la especie *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas (Rhodophyta, orden Ceremiales). Esta especie es muy rica en metabolitos secundarios, lo que nos ha permitido caracterizar diversidad de productos. Algunos de ellos exhiben nuevos esqueletos carbonados, otros aportan tipos estructurales nuevos dentro de un

¹³⁹ J. D. Martín, J. Darias in *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives* (Ed.: P. J. Schuer), Academia Press, New York, **1978**, vol. I, pp.125-174.

¹⁴⁰ L. R. Carvallo, M. T. Fujii, N. F. Roque, M. J. Kato, J. H. G. Lago, *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 2637-2640.

¹⁴¹ C. S. Vairappan, *Biolmol. Eng.*, **2003**, *20*, 255-259.

esqueleto conocido, y otros poseen esqueletos de biogénesis irregular o esqueletos degradados.

La *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas, fue recolectada en las costas de Valle Gran Rey en la isla de La Gomera. De esta alga hemos obtenido un elevado número de metabolitos, de los cuales 21 han sido descritos en la bibliografía: ocho sesquiterpenos derivados de α -chamigreno (Figura 2.1.1); un sesquiterpeno con esqueleto degradado (Figura 2.1.2); once sesquiterpenos derivados de β -chamigreno (Figura 2.1.3) y un sesquiterpeno derivado de cuparano (Figura 2.1.4). Los diecisiete nuevos metabolitos restantes poseen estructura y funcionalidad muy diversa. Estos incluyen: tres sesquiterpenos representativos de un nuevo esqueleto que denominamos gomerano¹⁴² (Figura 2.1.5); un sesquiterpeno con esqueleto rhodolaurano (Figura 2.1.6); doce sesquiterpenos derivados de α -chamigreno agrupados de la forma siguiente: cuatro incorporan un anillo lactónico de cinco, seis y siete miembros para producir los respectivos triciclo derivados, que conforman nuevos tipos estructurales¹⁴³ (Figura 2.1.7); siete tienen en común un sistema enónico en el anillo A (Figura 2.1.9); y un derivado polihalogenado **Ap-1** (Figura 2.1.10). Finalmente, un producto de biogénesis irregular (Figura 2.1.8) completa el conjunto de compuestos sesquiterpénicos aislados de la especie.

¹⁴² A-R. Díaz-Marrero, I. Brito, J. M. de la Rosa, J. Darías, M. Cueto, *Tetrahedron*, **2008**, 10821-10824.

¹⁴³ A-R. Díaz-Marrero, I. Brito, J. M. de la Rosa, L. D'Croze, O. Fabelo, C. Ruiz-Pérez, J. Darías, M. Cueto, *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 1407-1411.

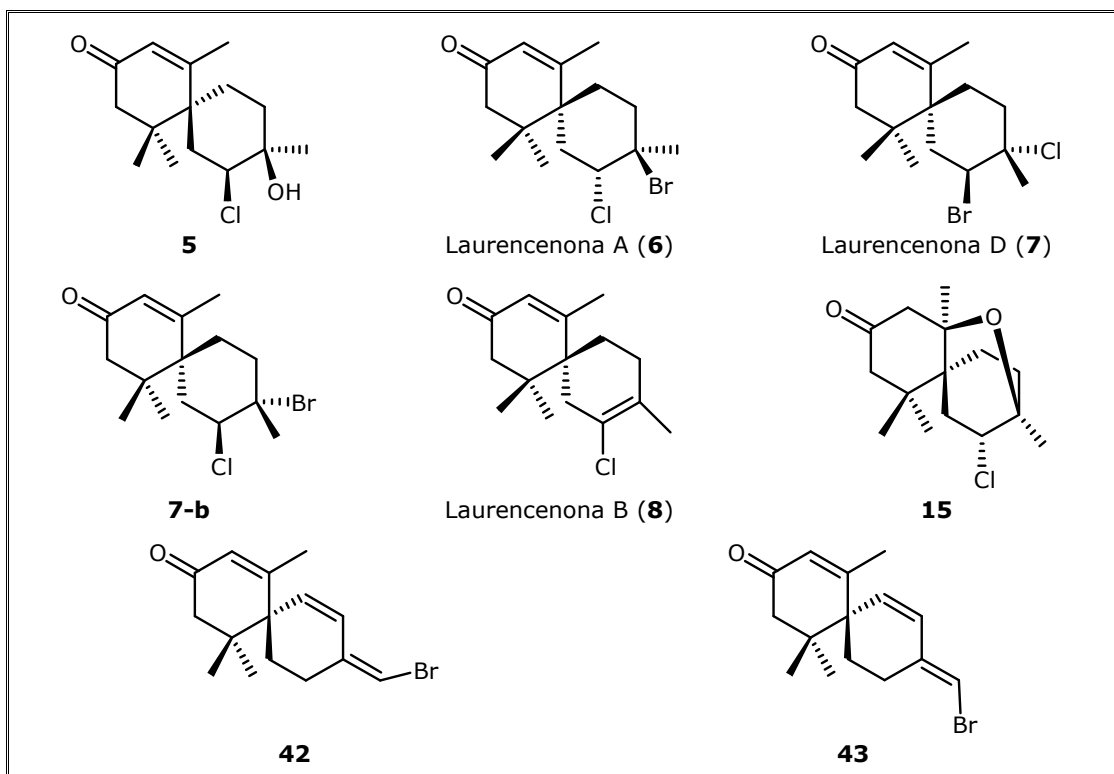


Figura 2.1.1. Derivados de α -chamigreno conocidos aislados de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

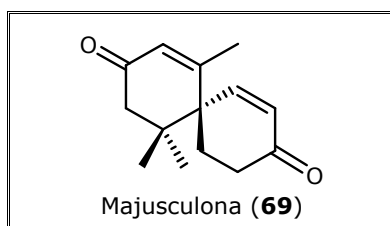


Figura 2.1.2. Nor-chamigreno conocido aislado de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

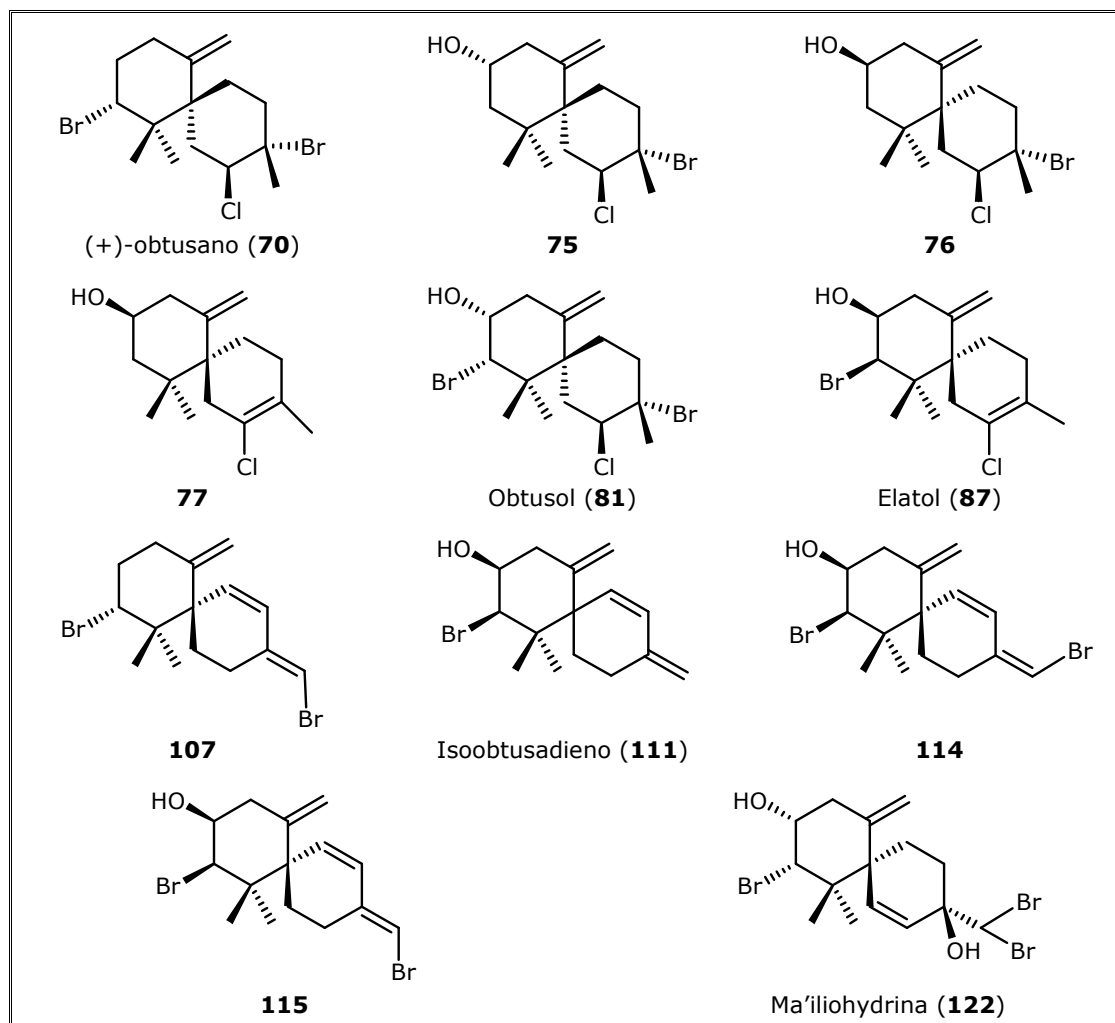


Figura 2.1.3. Derivados de β-chamigreno conocidos aislados de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

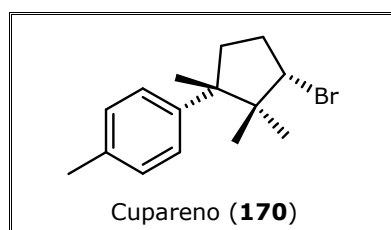


Figura 2.1.4. Cupareno conocido¹⁴⁴ aislado de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

¹⁴⁴ T. Suzuki, M. Suzuki, E. Kurosawa, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 35, 3058-3057

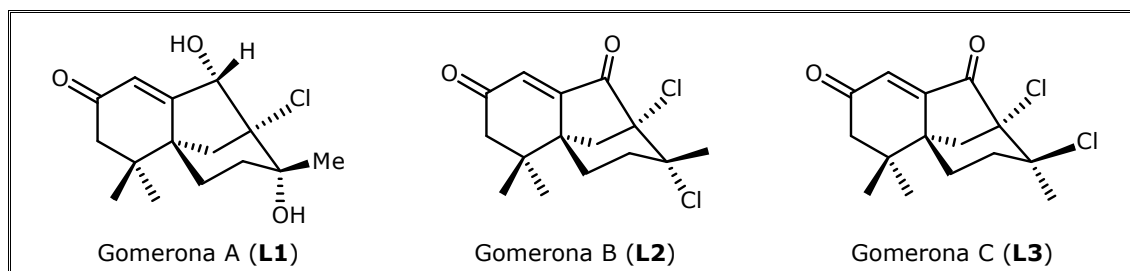


Figura 2.1.5. Metabolitos con esqueleto gomerano aislados de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

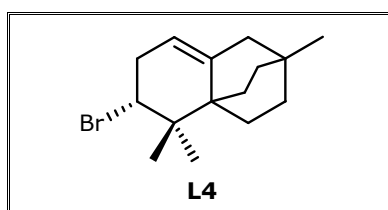


Figura 2.1.6. Metabolito con esqueleto rhodolaurano aislado de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

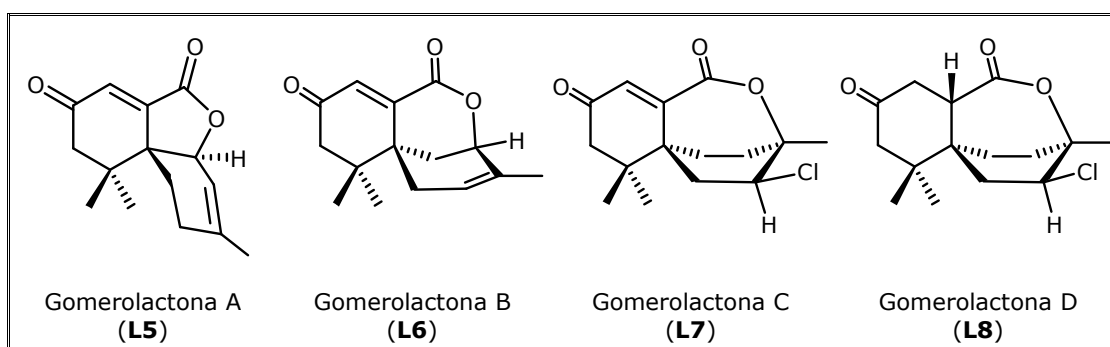


Figura 2.1.7. Gomerolactonas aisladas de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

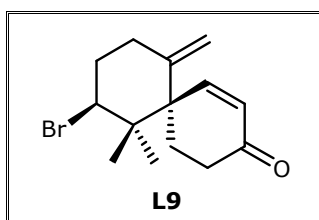


Figura 2.1.8. Chamigreno degradado aislado de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

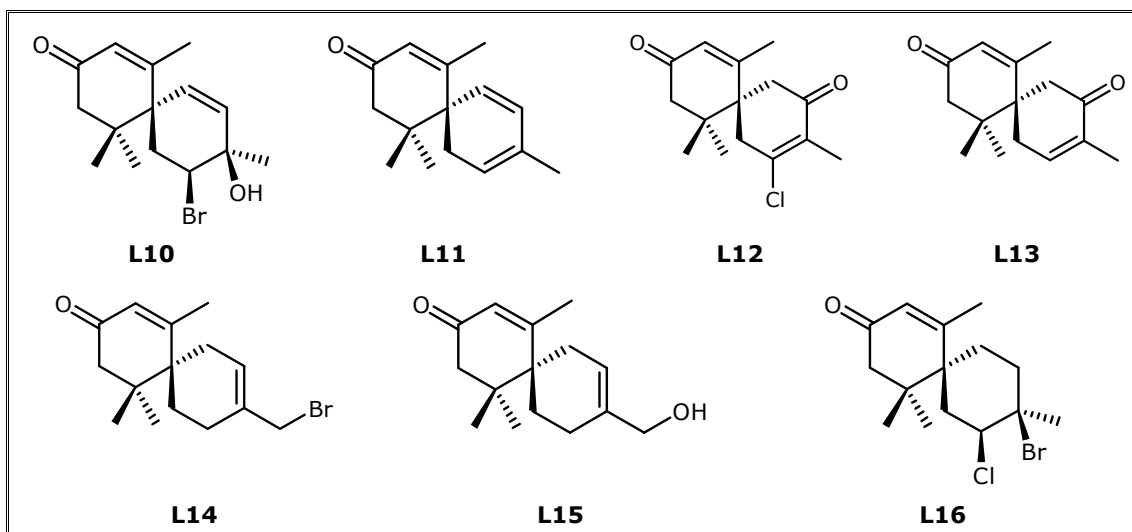


Figura 2.1.9. Chamigrenonas aisladas de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

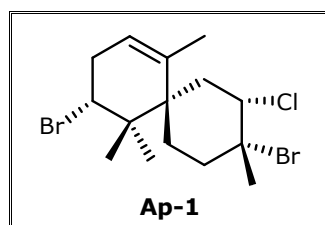
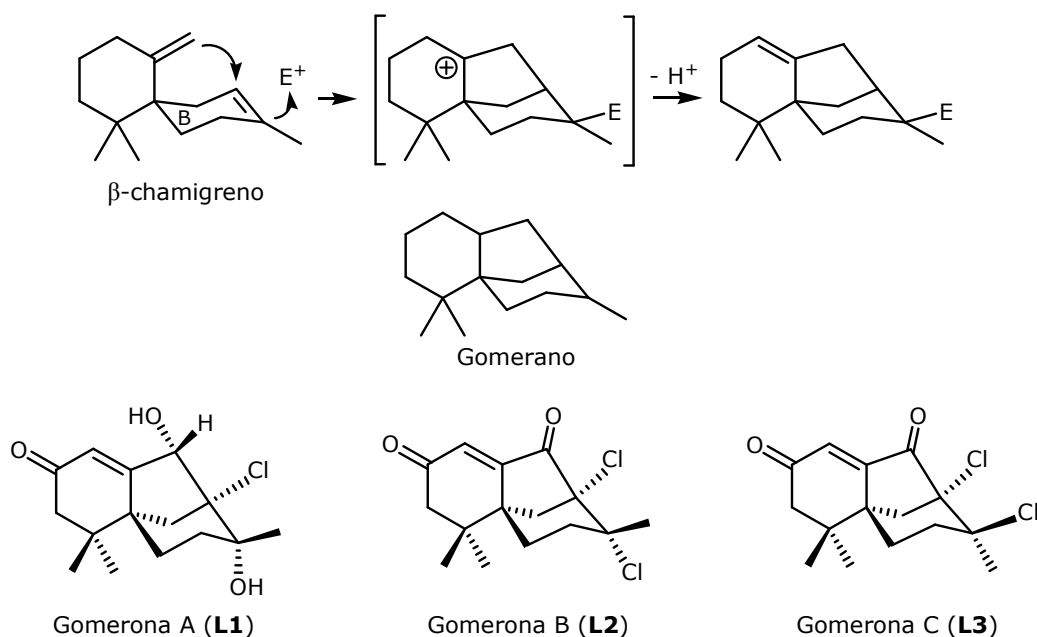


Figura 2.1.10. α -chamigreno polihalogenado aislado de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

A continuación describimos el análisis espectroscópico de cada producto, y la determinación de su estructura química y configuración relativa. En muchos casos se asigna la configuración absoluta. Hemos creído conveniente omitir el análisis estructural de los productos conocidos por razones de espacio y simplificación del texto.

2.1.1. Caracterización de las Gomeronas A-C. Esqueleto gomerano.

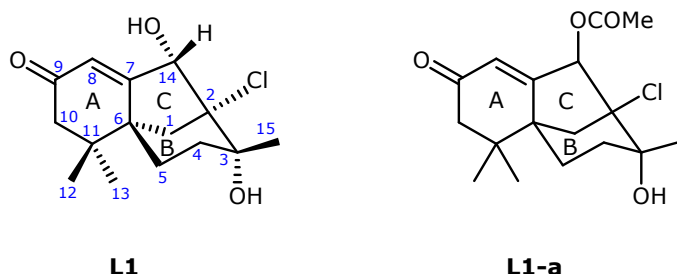
Los sesquiterpenos **L1**, **L2** y **L3** son representativos del esqueleto tricíclico gomerano. Se origina por la participación del doble enlace exocíclico de un β -chamigreno en una ciclación intramolecular electrofílica, inducida por la activación del doble enlace isoprénico del anillo B. Aspectos más detallados de su posible biogénesis se describe en el apartado 2.3. El nombre de los productos **L1**, **L2** y **L3** hace referencia a la isla donde el alga fue recolectada.



Estructura de gomerona A (L1). La gomerona A se aisló como un aceite incoloro. El espectro de masas muestra picos a m/z 284/286, con intensidades relativas para un átomo de cloro en una fórmula molecular $C_{15}H_{21}O_3Cl$ con cinco grados de insaturación: EMAR, $[M]^+$ m/z 284.118, (calculado para $C_{15}H_{21}O_3^{35}Cl$ 284.1179). En su espectro de IR aparecen bandas de absorción para un grupo carbonilo α,β -insaturado y para un grupo hidroxilo a 1658 y 3433 cm^{-1} , respectivamente. Los experimentos de RMN del compuesto **L1** realizados en benceno mejoró la resolución, con relación a los obtenidos en cloroformo deuterado, y evitó la superposición de algunas señales.

El espectro de RMN de ^{13}C indica la presencia de 15 átomos de carbono cuyas multiplicidades se determinaron mediante experimentos DEPT: tres metilos, cuatro metilenos, dos metinos (uno enlazado a heteroátomo y otro olefínico) y seis carbonos cuaternarios (dos enlazados heteroátomos, uno olefínico y una cetona). En el espectro de RMN de 1H (Tabla 2.1.1.1.) se observa una señal para un protón olefínico a δ 6.20, lo que sugiere la presencia de un sistema enónico trisustituido. Por lo tanto, los tres grados de insaturación restantes indican que la molécula debe ser tricíclica. El resto de señales que completan el espectro de RMN de 1H son: un protón geminal a heteroátomo a δ 3.69, ocho protones metileno entre δ 2.25 y δ 0.74, y tres grupos metilo a δ 0.55, δ 0.74 y δ 0.96. La presencia de un carbono cuaternario a δ 51.4, característico de un carbono spiro,⁴ sugiere que este producto podría ser un derivado de chamigreno. La ausencia de uno de los grupos metilo, de los cuatro que cabría

esperar para un esqueleto sesquiterpénico regular, indica que dicho metilo debe estar implicado en la formación del tercer anillo de la molécula. La presencia de un alcohol secundario en **L1** se comprobó mediante la formación del derivado monoacetilado **L1-a**.



El experimento bidimensional COSY indica un sistema de spin H₂-4–H₂-5. En el experimento de HMBC se observaron las correlaciones a tres enlaces de H₃-12 con el carbono C-13 y de H₃-13 con C-12, y las correlaciones a larga distancia de ambos metilos (H₃-12 y H₃-13) con C-10 y con los carbonos cuaternarios C-6 y C-11, lo que define un grupo *gem*-dimetilo. Además, la correlación de H-14 con C-6 y C-8 y la de H-8 con C-10 permite establecer el anillo A. Por otra parte, las correlaciones de H₃-15 con C-2, C-3 y C-4 sitúan al Me-15 en C-3, lo que unido a las correlaciones de H₂-5 con C-11 y a las de H₂-1 con C-2, C-3, C-5, C-7 aseguran el anillo B de la molécula y su unión al anillo A a través del carbono spiro C-6. El tercer anillo de la molécula se confirma por la correlación a larga distancia de H-14 con C-1 y C-2. Finalmente, la regioquímica del grupo hidroxilo terciario en C-3 queda definida por el desplazamiento químico de H₃-15 en δ 0.96, con lo que queda establecida la estructura plana de la molécula.

La configuración relativa del compuesto **L1** se asignó en base a experimentos NOESY, Figura 2.1.1.2.¹⁴⁵ La configuración de los carbonos C-3, C-6, C-14 se dedujo por el fuerte efecto NOE observado entre H-14 y H₃-15, lo que indica que el grupo metilo-15 es ecuatorial, que está en una disposición *syn* respecto de H-14 y que la configuración relativa de los centros quirales, alrededor del carbono spiro, es la indicada en la figura.

¹⁴⁵ PCModel (v. 9.2); Serena Software: Copyright 1988-2006.

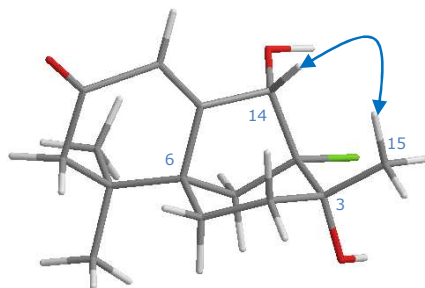
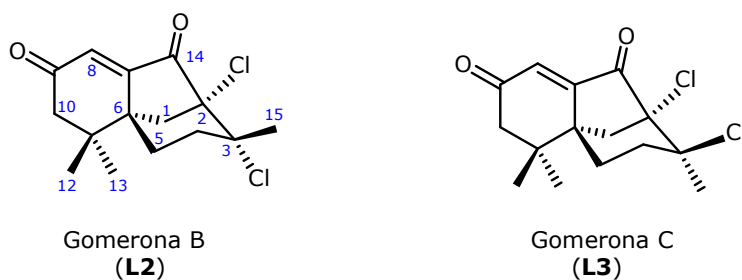


Figura 2.1.1.2. Estructura de mínima energía y efectos NOE significativos de **L1**.

Estructura de gomerona B (L2). La gomerona B se aisló como un aceite incoloro. Su espectro de masas de IE presenta picos a m/z 300/302/304 $[M]^+$, con intensidades relativas para dos átomos de cloro en una la fórmula molecular $C_{15}H_{18}O_2Cl_2$ con seis grados de insaturación: EMAR, $[M]^+$ m/z 302.0653, (calculado para $C_{15}H_{18}O_2^{35}Cl^{37}Cl$ 302.0654). En el espectro de IR aparecen señales en 1742 y 1682 cm^{-1} , correspondientes a dos grupos carbonilo α,β -insaturados.



En el espectro de RMN de ^{13}C se observaron señales para 15 átomos de carbono, cuyas multiplicidades, determinadas por experimentos DEPT, son las siguientes: tres metilos, cuatro metilenos, un metino olefínico y siete carbonos cuaternarios (dos carbonilos, uno olefínico y dos portadores de halógeno). Como los oxígenos son de naturaleza cetónica, la molécula debe ser tricíclica. El espectro de RMN de 1H exhibe señales a δ 6.57 ppm para un protón olefínico; para cuatro grupos metileno entre δ 1.72 y δ 2.96 ppm y para tres grupos metilo a δ 0.99, 1.14 y 1.90 ppm. Por comparación de los datos espectroscópicos de **L2** y **L1** (Tabla 2.1.1.1) se observa que el hidroxilo en C-14 de **L1** se encuentra oxidado a carbonilo en **L2**, como lo indica δ_{C-14} en 196.3 ppm. Como la molécula posee un único protón olefínico, los carbonos carbonílicos deben formar parte de un sistema dienónico. Los desplazamientos químicos de C-3 y H_3 -15, con relación a **L1**, indican que C-3 está sustituido por un átomo de cloro.

Estructura de gomerona C (L3). La gomerona C se aisló como un aceite incoloro y posee la misma fórmula molecular que **L2**, $C_{15}H_{18}O_2Cl_2$ (EMAR, $[M]^+$ m/z 302.0659, calculado para $C_{15}H_{18}O_2^{35}Cl^{37}Cl$ 302.0654). También el espectro de IR presenta bandas de absorción similares para carbonilos insaturados. Al comparar sus respectivos espectros de RMN de 1H y ^{13}C se observan desplazamientos químicos parecidos, exceptuando pequeñas diferencias en algunas señales del anillo B (Tabla 2.1.1.1). Las más significativas son las correspondientes al carbono y protones del grupo metilo-15, lo que sugiere que **L3** podría tener la misma estructura plana que **L2**. Los experimentos HMBC confirmaron las estructuras de ambos compuestos.

La configuración relativa de **L2** y **L3** se asignó mediante experimentos NOESY. La diferencia en el desplazamiento químico de H_3-15 de ambos productos ($\Delta\delta = 0.20$ ppm), se atribuye al efecto desapantallante que ejerce el grupo carbonilo de la ciclopentanona, lo que sugiere que el grupo metilo-15 de **L2** está en el área de influencia del grupo carbonilo. La disposición β de C-15 en **L2** quedó corroborada por el efecto NOE observado entre H_3-15 y $H-4\beta$ y $H-4\alpha$, Figura 2.1.1.3. Aunque los experimentos NOE no permiten establecer la configuración de C-3 en **L3**, los datos obtenidos de su espectro de masas y de la comparación de los desplazamientos químicos de 1H y ^{13}C indican que **L3** es el epímero en C-3 del compuesto **L2**.

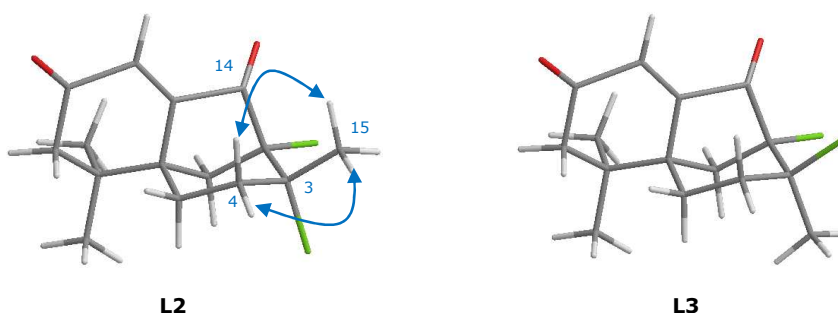
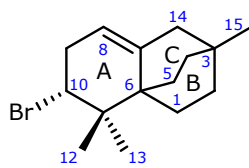


Figura 2.1.1.3. Estructuras de mínima energía de **L2** y **L3** y efectos NOE significativos de **L2**.

2.1.2. Caracterización de 10-bromorhodolaureano.

Estructura de 10-bromorhodolaureano (L4). El 10-bromorhodolaureano se aisló como un aceite incoloro. Su espectro de masas presenta dos picos a m/z 282/284 $[M]^+$, con intensidades relativas para un átomo de bromo en una fórmula molecular $C_{15}H_{23}Br$ con cuatro grados de insaturación: EMAR 284.0970, (calculado para $C_{15}H_{23}^{81}Br$ 284.0963).

**L4**

Su espectro de RMN de ^{13}C muestra señales para quince átomos de carbono, cuyas multiplicidades (DEPT) son las siguientes: tres metilos, seis metilenos, dos metinos (uno geminal a halógeno y otro olefínico) y cuatro carbonos cuaternarios. En el espectro RMN de ^1H se obseraron señales para: un protón geminal a bromo a δ 4.47 (dd, $J= 8.3, 8.3$ Hz), un protón olefínico δ 5.14 (s) y tres metilos angulares a δ 0.80 (s), δ 0.89 (s) y δ 0.95 (s) (Tabla 2.1.2.1).

Tabla 2.1.2.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto **L4** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].

#.	δ_{H}	δ_{C}	COSY	HMBC
1	1.57 m 1.51 m	25.9		C-2, C-6, C-7
2	1.35 m 1.45 m	32.7		C-1, C-3, C-4, C-15
3	---	29.6		
4	1.35 m 1.25 m	33.9		C-2, C-3, C-5, C-6, C-15
5	1.60 m 1.50 m	29.1		C-3, C-6, C-7
6	---	41.2		
7	---	141.9		
8	5.14 s	116.6	H ₂ -9	
9	2.50 m 2.50 m	35.0	H-10, H-8	C-8, C-10
10	4.47 dd (8.3, 8.3)	63.5	H ₂ -9	C-11, C-12, C-13
11	---	38.8		
12	0.95 s	23.4		C-6, C-10, C-11, C-13
13	0.89 s	17.5		C-6, C-10, C-11, C-12
14	1.83 d (15.5) 2.10 m	42.3		C-2, C-6, C-7, C-8
15	0.80 s	27.3		C-2, C-3, C-4, C-14

Los experimentos bidimensionales ^1H - ^1H COSY, HSQC y HMBC confirmaron la estructura de **L4**. Mediante el experimento COSY se definió el fragmento H-8–H-10. Las correlaciones HMBC de los protones de los metilos H₃-12, H₃-13 y de H₂-14 confirman el anillo A de la molécula, mientras que las correlaciones de H₃-15, y de H₂-1 y H₂-5 establecen el anillo B (Tabla 2.1.2.1). La formación del tercer anillo formado

por la unión C-3–C-14 se estableció en base a las correlaciones a larga distancia de H₃-15 con C-14 y de los de H₂-14 con C-2.

Por estudios de mecánica molecular se obtiene como conformación de mínima energía aquella en la que el anillo A adopta la forma de semisilla, con el bromo ecuatorial y el anillo B en una conformación bote. Las constantes de acoplamiento observadas para H-10 ($J = 8.3, 8.3$ Hz) están de acuerdo con dicha conformación.

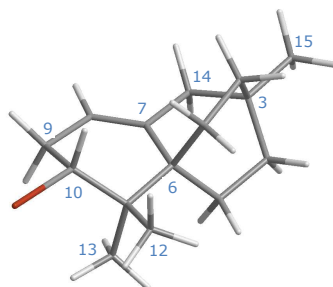
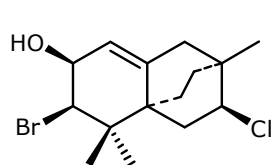
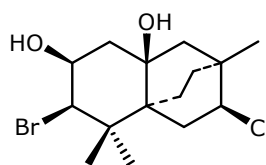


Figura 2.1.2.1. Estructura de mínima energía para **L4**.

El producto **L4**, como hemos indicado, posee un esqueleto carbonado tricíclico, que deriva de la participación del doble enlace exocíclico de un β -chamigreno en la formación de un nuevo enlace C-3–C-14. Hasta el momento se han encontrado en la naturaleza sólo dos compuestos con este esqueleto, el rhodolaureol (**171**) y rhodolauradiol (**172**), ambos aislados de un alga del género *Laurencia*.¹⁴⁶



Rhodolaureol (**171**)



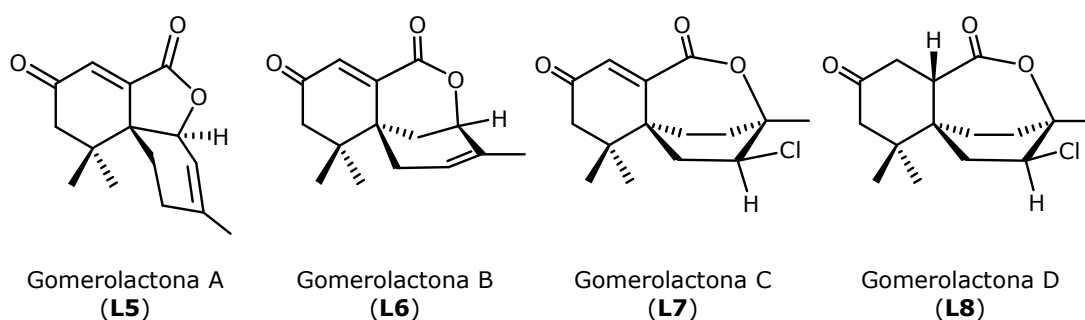
Rhodolauradiol (**172**)

2.1.3. Caracterización de las Gomerolactonas A-D. Nuevos tipos estructurales derivados de chamigreno.

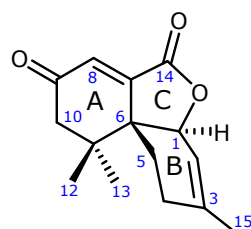
En este apartado describimos cuatro derivados polioxigenados de chamigreno, que contienen una unidad de lactona con anillos de cinco, seis y siete miembros. Estas

¹⁴⁶ A. G. González, J. D. Martín, V. S. Martín, R. Pérez, B. Tagle, J. Clardy, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1985**, 260-261.

lactonas representan los distintos tamaño de anillo lactónico que se pueden formar a lo largo del anillo B del esqueleto chamigreno. Las lactonas de 5, 6 y 7 miembros son representativas de nuevos tipos estructurales. Las gomerolactonas A y B, la chamigrenolactona obtenida de *L. obtusa* del Caribe,⁴ junto con los productos **L11**, **L13**, y **L15**, forman un grupo de metabolitos singulares, ya que son ejemplos de metabolitos chamigrénicos desprovistos de halógenos, lo que pone de manifiesto que este tipo estructural de metabolitos, con un alto grado de oxigenación, no es exclusivo de la *L. obtusa* del Caribe; también se encuentran en la *L. majuscula*. Por lo tanto, el paradigma de que los productos derivados de chamigreno, son marcadores taxonómicos, es igualmente válido, pero sería más preciso referirnos al esqueleto chamigreno como marcador taxonómico más que a sus derivados halogenados.



Estructura de gomerolactona A (L5). La gomerolactona A se aisló como un aceite incoloro. El espectro de masas de IE exhibe un pico a m/z 246 $[M]^+$ para una fórmula empírica $C_{15}H_{18}O_3$ con siete grados de insaturación: EMAR, $[M]^+$ m/z 246.1252 (calculado para $C_{15}H_{18}O_3$, 246.1256). En el espectro de IR aparecen señales para un grupo carbonilo α,β -insaturado (1680 cm^{-1}) y un carbonilo de un grupo éster (1757 cm^{-1}).



Gomerolactona A (L5)

En el espectro de RMN de ^{13}C se observan señales para quince átomos de carbono. La multiplicidad de los carbonos se determinó de los experimentos DEPT: tres metilos, tres metilenos, tres metinos (dos olefínicos) y 6 carbonos cuaternarios (dos carbonilos). El espectro de RMN de 1H mostró señales para: dos protones

olefínicos (δ 6.56 y δ 5.82 ppm); un protón geminal a oxígeno (δ 4.87 ppm); seis protones alifáticos entre δ 1.70 y δ 2.75 ppm y tres grupos metilo (δ 1.07, δ 1.14 y δ 1.82 ppm), Tabla 2.1.3.1.

De los datos espectroscópicos y de su fórmula molecular se deduce que **L5** es una molécula tricíclica. Como en el espectro de IR no se observan bandas de absorción para un ácido libre, dos de los oxígenos deben formar parte de un anillo de lactónico. Por lo tanto, el oxígeno restante debería formar parte de un sistema de enona trisustituida. Ambas funciones oxigenadas están de acuerdo con las absorciones observadas en IR. La ausencia de un grupo metilo, de los cuatro grupos metilo propios de un sesquiterpeno, sugiere que éste debe estar oxidado, formando parte del anillo lactónico.

Tabla 2.1.3.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto **L5** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].

#.	δ_{H}	δ_{C}	COSY	HMBC
1	4.87 d (5.1)	75.8	H-2	C-2, C-3, C-5, C-6, C-7
2	5.82 dd (1.5, 5.4)	116.9	H-1	
3	---	144.0		
4	α : 2.33 m β : 2.13 d (6.3)	28.8	H ₂ -5	C-2, C-3, C-6
5	1.70 m 2.10 m	24.7	H ₂ -4	C-3, C-4, C-11
6	---	45.9		
7	---	155.0		
8	6.56 s	126.3		C-6, C-14
9	---	198.1		
10	2.18 d (17.7) 2.75 d (17.7)	49.2		C-6, C-8, C-9, C-11, C-12, C-13
11	---	39.5		
12	1.14 s	25.6		C-6, C-10, C-11, C-13
13	1.07 s	25.6		C-6, C-10, C-11, C-12
14	---	168.1		
15	1.82 s	23.5		C-2, C-3, C-4

Todas las correlaciones directas C-H de **L5** se dedujeron de experimentos HSQC. El experimento bidimensional COSY mostró acoplamiento entre dos protones metino (H-1 y H-2) y dos grupos metileno (H₂-4-H₂-5). En el experimento HMBC las correlaciones mutuas H₃-12/C-13 y H₃-13/C-12, y de H₂-10 con C-12 y C-13 y con los carbonos cuaternarios C-6 y C-11, sitúan un grupo *gem*-dimetilo sobre C-11. La correlación de H-8 con C-6 y C-14, así como la de H₂-10 con C-6, C-8 y C-9 determinan el anillo A. Por otro lado, las correlaciones HMBC H₃-15/C-2, C-3 y C-4 sitúan el metilo-15 sobre C-3. La unión de ambos anillos carbocíclicos se produce a

través del átomo de carbono spiro C-6, y se dedujo por las correlaciones de H-1 con C-2, C-3, C-5, C-6 y C-7. La correlación a larga distancia de H-1 con C-7 determina el anillo de γ -lactona y confirma la estructura tricíclica de **L5**.

Por estudios de mecánica molecular se obtiene para **L5** la conformación de mínima energía representada en la Figura 2.1.3.1. Los NOEs observados entre H₃-12 (1.14 ppm) con los dos protones H₂-10 y con H-4 α (δ 2.33 ppm) están de acuerdo con las distancias interatómicas medidas, lo que sugiere que Me-12 es ecuatorial. Por otra parte el NOE observado entre H₃-13 (δ 1.07 ppm) y H-1 (δ 4.87 ppm) indica que los anillos A y B de la molécula adoptan una conformación semisilla. Por lo tanto, la configuración relativa de **L5** es la representada en la Figura 2.1.3.1.

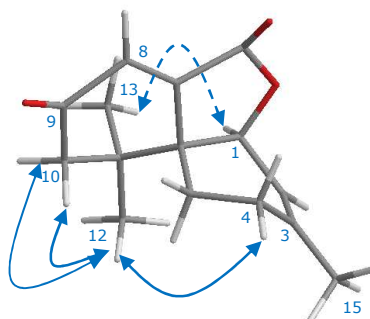
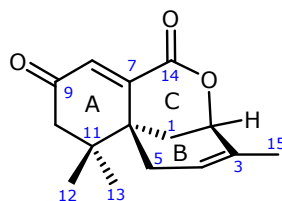


Figura 2.1.3.1. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para **L5**.

Estructura de gomerolactona B (L6). La gomerolactona B (**L6**) se aisló como un aceite incoloro. Su espectro de masas EMAR establece una fórmula molecular con siete grados de insaturación, C₁₅H₁₈O₃, [M]⁺ *m/z* 246.1268, (calculado para C₁₅H₁₈O₃, 246.1256). En el espectro de RMN de ¹³C se observan señales para quince átomos de carbono. La multiplicidad de los carbonos (DEPT) son las siguientes: tres grupos metilo, tres metilenos, tres metinos (dos olefínicos y uno geminal a heteroátomo) y seis carbonos cuaternarios. En el espectro de RMN de ¹H se observa dos señales de protones olefínicos a δ 6.98 (s) y a δ 5.59 (ddd, *J*= 1.8, 1.8, 5.4 Hz) y una señal a δ 4.66 (dd, *J*= 3.0, 3.0 Hz) para un hidrógeno geminal a oxígeno. El espectro de IR muestra bandas de absorción para un grupo éster y una cetona α,β -insaturada a 1717 y 1681 cm⁻¹, respectivamente.

Gomerolactona B (**L6**)

La gomerolactona B (**L6**) tiene la misma fórmula molecular y esqueleto carbonado que la gomerolactona A (**L5**). La diferencia entre ambos compuestos radica en la posición donde se produce el cierre del anillo lactónico. Las correlaciones de HMBC a larga distancia entre H-2 con C-4 y C-15 (Tabla 2.1.3.2) permiten asegurar que el compuesto **L6** posee una δ -lactona.

Tabla 2.1.3.2. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto **L6** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].

#.	δ_{H}	δ_{C}	COSY	HMBC
1	1.88 ddd (0.9, 2.7, 13.5) 2.28 ddd (1.8, 3.3, 13.5)	27.7		C-2, C-3, C-5, C-6, C-7
2	4.66 dd (3.0, 3.0)	74.7	H ₂ -1	C-3, C-4, C-6, C-14, C-15
3	---	134.2		
4	5.59 ddd (1.8, 1.8, 5.4)	124.2	H ₂ -5	C-2, C-5, C-6, C-15
5	2.17 dddd (1.8, 1.8, 5.4, 17.4) 2.74 ddd (2.7, 2.7, 17.4)	35.9		C-3, C-4, C-6, C-7
6	---	40.4		
7	---	150.2		
8	6.98 s	133.9		C-6, C-7, C-10, C-14
9	---	198.2		
10	2.68 d (18.3) 2.24 dd (1.2, 18.3)	48.9		C-6, C-8, C-9, C-11, C-12, C-13
11	---	39.1		
12	1.08 (s)	24.1		C-6, C-10, C-11, C-13
13	1.04 (s)	23.7		C-6, C-10, C-11, C-12
14	---	164.9		
15	1.84 (s)	20.6		C-2, C-3, C-4

2.1.3.1. Configuración absoluta de las Gomerolactonas A y B.

Las configuraciones absolutas de las gomerolactonas A (**L5**) y B (**L6**) se determinaron mediante la modificación de un método descrito por Latypov *et al.*,¹⁴⁷ para asignar la configuración absoluta de acetogeninas de Annonaceae. Nosotros hemos extendido su aplicación a la determinación de la configuración absoluta de butenolidas quirales contenidas en diversidad de productos, tales como: diterpenos^{148,149} y di- γ -lactonas derivados de ácidos grasos de cadena larga.¹⁵⁰

Esta técnica emplea un agente solvatante quiral, el 2,2,2-trifluoro-1-(9-antril)etanol, también conocido como reactivo de Pirkle, para formar complejos con las γ -metil butenolidas a baja temperatura y baja concentración, lo que permite aplicar el método a compuestos naturales.

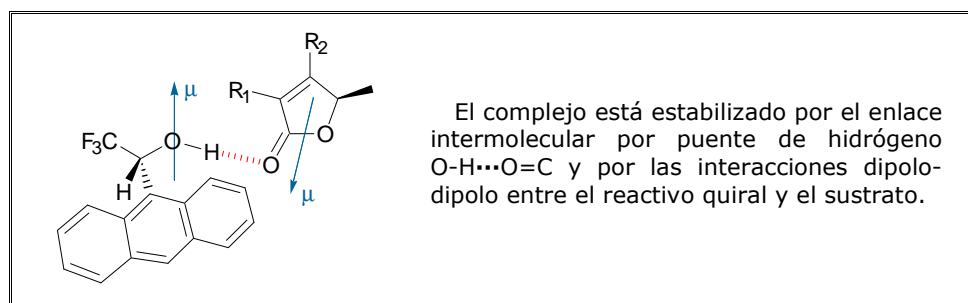


Figura 2.1.3.1.1. Modelo propuesto por Latypov *et al.*¹⁴⁷ para los complejos diastereoméricos.

De manera general, el agente solvatante quiral, que contiene un grupo fuertemente anisotrópico, forma complejos diastereoméricos con el producto e induce efectos apantallantes selectivos en los protones del sustrato. En el caso de las butenolidas, Latypov *et al.* proponen que el complejo está estabilizado por la formación de un puente de hidrógeno intermolecular entre el alcohol del agente quiral y el oxígeno del carbonilo de la lactona, y por las interacciones dipolo-dipolo entre el reactivo quiral y el sustrato (Figura 2.1.3.1.1). La orientación del sistema aromático es asimétrica con respecto del plano que contiene al anillo lactónico en los complejos (*R*)-y (*S*)-reactivo-sustrato diastereoméricos que se forman (Figura 2.1.3.1.2). Puesto que la configuración del agente quiral es conocida, es posible determinar la configuración absoluta del sustrato, por análisis del desplazamiento a campos altos/bajos en el espectro de RMN de ¹H de los sustituyentes situados en el centro quiral. La presencia

¹⁴⁷ S. Latypov, X. Franck, J. C. Jullian, R. Hocquemiller, B. Figadère, *Chem. Eur. J.*, **2002**, *8*, 5662-5666.

¹⁴⁸ A. R. Díaz-Marrero, E. Dorta, M. Cueto, A. San-Martín, J. Darias, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 1073-1078.

¹⁴⁹ E. Dorta, A. R. Díaz-Marrero, I. Brito, M. Cueto, L. D'Croze, J. Darias, *Tetrahedron*, **2007**, 9057-9062.

¹⁵⁰ M. Lorenzo, I. Brito, M. Cueto, J. Darias, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 5001-5004.

en la molécula de otros grupos básicos como hidroxilos o tetrahidrofuranos no interfiere en la solvatación del agente con la lactona.

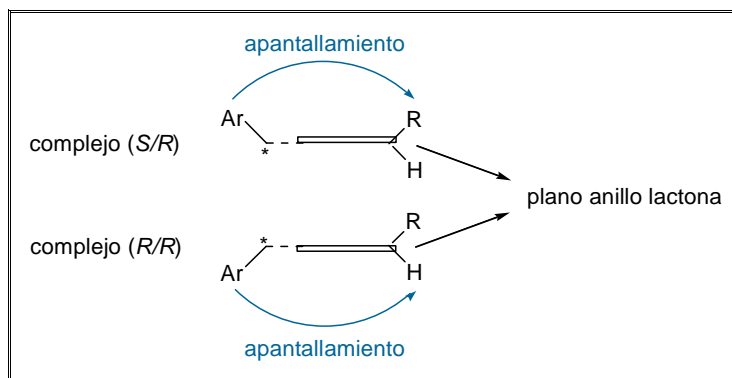


Figura 2.1.3.1.2. Fundamento básico del método descrito por Latypov *et al.*¹⁴⁷

Por primera vez aplicamos este método para determinar la configuración absoluta de derivados de chamigreno que poseen anillos γ - y δ -lactónicos. En este apartado analizamos los efectos de apantallamiento selectivo que produce la geometría del complejo sustrato-agente solvatante quiral, en los correspondientes protones H-1 y H-2 de los anillos lactónicos de los compuestos **L5** y **L6**.

Tabla 2.1.3.1.1. $\Delta\delta_{H-1}$ del compuesto **L5** con 6 equivalentes de (R)- y (S)-TFAE.

T [K]	$\delta_{H-1(R)}$	$\delta_{H-1(S)}$	$\Delta[\delta_{H-1(R)} - \delta_{H-1(S)}]$
293	4.84446	4.84067	0.00379
253	4.81546	4.80663	0.00883
240	4.81861	4.80915	0.00946

Se usaron los reactivos (R)- y (S)-2,2,2-trifluoro-1-(9-antril)etanol (TFAE) para formar complejos con la porción de γ -lactona α -alquenal sustituida de **L5**. Se puede predecir que la señal del protón H-1 para los solvatos (R,R) o (S,S) aparecerá a campos relativamente más altos que para los solvatos (R,S) o (S,R). Por tanto, si $\Delta[\delta_{H-1(R)} - \delta_{H-1(S)}]$ es positivo, la configuración absoluta en C-1 será (S). El análisis de los datos espectroscópicos de RMN de $\Delta\delta$ de H-1 de los dos complejos formados es positivo (Tabla 2.1.3.1.1), lo que permite establecer la configuración de C-1 como S. Por lo tanto, la configuración absoluta de la gomerolactona A (**L5**) es (1S, 6R) (Figura 2.1.3.1.3).

La configuración absoluta de la gomerolactona B (**L6**) se determinó utilizando los reactivos (R)-TFAE y (S)-TFAE, para formar los complejos con la unidad δ -lactona siguiendo el mismo procedimiento. El análisis de los datos espectroscópicos de RMN de $\Delta\delta$ de H-2 de los dos complejos (Tabla 2.1.3.1.2) asegura la configuración del centro

quiral C-2 como *R*. Por lo tanto, la configuración absoluta de la gomerolactona B (**L6**) es (2*R*, 6*R*) (Figura 2.1.3.1.3).

Tabla 2.1.3.1.2. $\Delta\delta_{H-1}$ del compuesto **L6** con 6 equivalentes de (*R*)- y (*S*)-TFAE.

T [K]	$\delta_{H-2(R)}$	$\delta_{H-2(S)}$	$\Delta[\delta_{H-2(R)} - \delta_{H-2(S)}]$
293	4.65219	4.65786	-0.00567
253	4.64210	4.65093	-0.00830
240	4.63391	4.64904	-0.01513

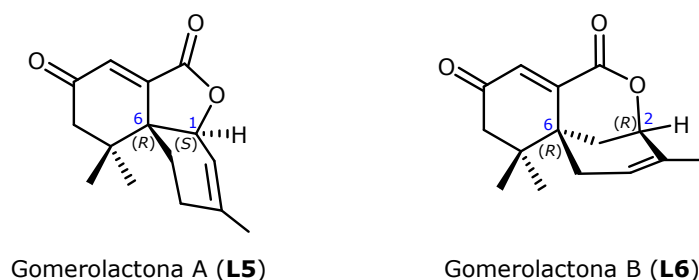
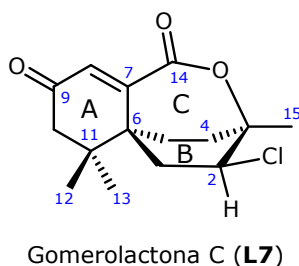


Figura 2.1.3.1.3. Configuración absoluta de gomerolactonas A y B.

Estructura de gomerolactona C (L7). La gomerolactona C (**L7**) se aisló como un aceite incoloro. Su espectro de masas de IE muestra picos a $[M]^+$ m/z 282/284, con intensidades relativas para un átomo de cloro en una fórmula molecular $C_{15}H_{19}O_3Cl$, $[M]^+$ (EMAR), con seis grados de insaturación. En el espectro de IR se observa absorciones para grupos carbonilo a 1676 y 1701 cm^{-1} .



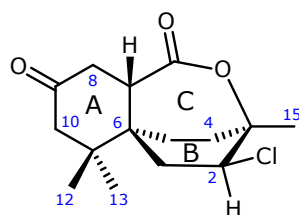
Los datos de RMN de **L7** son similares a los de **L5** y **L6**, con la diferencia de que la olefina trisustituida del anillo B de **L5** y **L6** está saturada en **L7**. El desplazamiento químico de H₃-15 a δ 1.54 ppm, típico de un grupo metilo sobre carbono enlazado a oxígeno, sugiere que en C-3 se produce el cierre de un anillo lactónico. El experimento HMBC permitió establecer la estructura plana de la molécula. El anillo A se confirmó por la correlación entre H₃-12 y H₃-13 con C-11, C-10 y C-6 y por las correlaciones H-8/C-10, C-7, C-6 y C-14. Por otra parte, las correlaciones de H₃-15 en combinación con las de H-4 y H-5, señaladas en la Tabla 2.1.3.3, definen el

anillo B de la molécula. Los desplazamientos químicos de C-2 (δ_C 61.1 ppm) y de H₃-15 (δ_H 1.54 ppm) indican que el sustituyente sobre C-2 debe ser el átomo de cloro, y que la lactona debe formarse entre C-7 y C-3, a través de C-14, lo que asegura un anillo lactónico de siete miembros en la estructura plana de **L7**.

Tabla 2.1.3.3. Datos de RMN de ¹H, ¹³C, de **L5** y **L6** y datos de RMN de ¹H, ¹³C y HMBC del compuesto **L7** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl₃].

#.	L5		L6		L7		
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	HMBC
1	4.87 d (5.1)	75.8	1.88 ddd (0.9, 2.7, 13.5) 2.28 ddd (1.8, 3.3, 13.5)	27.7	2.56 m 2.56 m	36.4	C-7, C-2, C-3
2	5.82 dd (1.5, 5.4)	116.9	4.66 dd (3.0, 3.0)	74.7	4.16 s	61.1	
3	---	144.0	---	134.2	---	81.2	
4	2.33 m 2.13 d (6.3)	28.8	5.59 ddd (1.8, 1.8, 5.4)	124.2	1.85 m 2.19 m	34.0	C-2, C-3
5	1.70 m 2.10 m	24.7	2.17 dddd (1.8, 1.8, 5.4, 17.4) 2.74 ddd (2.7, 2.7, 17.4)	35.9	1.85 m 1.85 m	25.6	C-3, C-7
6	---	45.9	---	40.4	---	42.5	
7	---	155.0	---	150.2	---	153.6	
8	6.56 s	126.3	6.98 s	133.9	6.80 s	133.5	C-6, C-7, C-10, C-14
9	---	198.1	---	198.2	---	197.7	
10	2.18 d (17.7) 2.75 d (17.7)	49.2	2.68 d (18.3) 2.24 dd (1.2, 18.3)	48.9	2.19 m 2.56 m	48.7	C-11
11	---	39.5	---	39.1	---	39.2	
12	1.14 s	25.6	1.08 (s)	24.1	1.02 s	23.7	C-6, C-10, C-11, C-13
13	1.07 s	25.6	1.04 (s)	23.7	0.96 s	23.0	C-6, C-10, C-11, C-12
14	---	168.1	---	164.9	---	167.1	
15	1.82 s	23.5	1.84 (s)	20.6	1.54 s	27.1	C-2, C-3, C-4

Estructura de gomerolactona D (L8). La gomerolactona D (**L8**) se aisló como un aceite incoloro. Su espectro de masas de IE muestra picos a [M]⁺ *m/z* 284/286, con intensidades relativas para un átomo de cloro en una fórmula empírica C₁₅H₂₁O₃Cl con cinco grados de insaturación: EMAR, [M]⁺ *m/z* 286.1137, (calculada para C₁₅H₂₁O₃³⁷Cl 286.1150). En el espectro de IR se observan bandas de absorción a 2961 y 1710 cm⁻¹.

Gomerolactona D (**L8**)

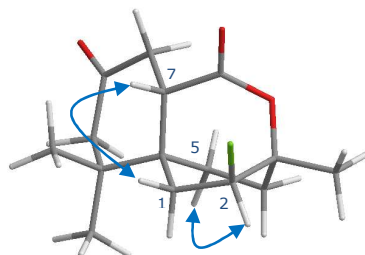
De la comparación de los datos espectroscópicos de **L7** y **L8**, y de sus espectros de masas, se deduce que el sistema dienónico de **L7** está saturado en **L8**, y que la gomerolactona D es el derivado hidrogenado de **L7**. Esto es coherente con las absorciones observadas en el espectro de IR y con las correlaciones HMBC de H-7 con C-9 y C-14 (Tabla 2.1.3.4).

Tabla 2.1.3.4. Datos de RMN de ¹H, ¹³C de **L7** y datos de RMN de ¹H, ¹³C, COSY y HMBC del compuesto **L8** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl₃].

#.	L7		L8			
	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C	COSY	HMBC
1	2.56 m 2.56 m	36.4	α: 2.61 dd (9.0, 14.5) β: 1.67 ddd (2.0, 9.0, 14.5)	38.5	H-2	C-2, C-3, C-5, C-6, C-7, C-11
2	4.16 s	61.1	4.11 dd (9.0, 9.0)	61.6	H ₂ -1	C-1, C-3, C-15
3	---	81.2	---	79.8		
4	1.85 m 2.19 m	34.0	2.10 m 2.10 m	34.1	H ₂ -5	C-2, C-3, C-5, C-6, C-15
5	1.85 m 1.85 m	25.6	α: 1.77 m β: 1.98 m	20.7		C-1, C-3, C-4, C-6, C-7, C-11
6	---	42.5	---	39.8		
7	---	153.6	3.15 ddd (1.1, 4.0, 14.3)	50.1	H ₂ -8	C-5, C-6, C-9, C-11, C-14
8	6.80 s	133.5	2.44 m 2.83 ddd (2.1, 4.0, 15.1)	41.5	H-7	C-6, C-7, C-9, C-10, C-14
9	---	197.7	---	206.1		
10	2.19 m 2.56 m	48.7	1.98 dd (2.4, 15.4) 2.41 m	51.7		C-6, C-8, C-9, C-11, C-12, C-13
11	---	39.2	---	39.3		
12	1.02 s	23.7	0.93 s	24.7		C-6, C-10, C-11, C-13
13	0.96 s	23.0	0.84 s	22.9		C-6, C-10, C-11, C-12
14	---	167.1	---	172.3		
15	1.54 s	27.1	1.41 s	27.2		C-2, C-3, C-4

La configuración relativa del compuesto **L8** se estableció por combinación de los experimentos NOESY, cálculos de mecánica molecular y el estudio de las constantes de acoplamiento. El efecto NOE observado entre H-7 con uno de los protones del metileno H₂-1, permitió identificar H-1β (δ 1.67 ppm) y establecer la

configuración relativa de C-6 y C-7. La configuración de C-2 se dedujo por el efecto NOE observado entre H-2 y H-5 α (δ 1.77 ppm). En la conformación de mínima energía calculada para **L8**, representada en la Figura 2.1.3.2., se aprecia la disposición pseudoaxial de H-2 en la conformación de bote-torcido del anillo B, lo que está de acuerdo con el NOE observado, así como con las constantes de acoplamiento teóricas de H-2 con H₂-1 ($J= 8.0$ Hz y $J= 8.0$ Hz), que son similares a la de los valores experimentales ($J= 9.0$ Hz y $J= 9.0$ Hz).

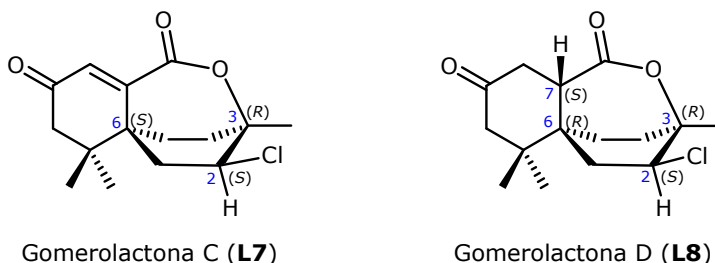


$J_{H-2} = 8.0, 8.0$ Hz (calculada)

$J_{H-2} = 9.0, 9.0$ Hz (observada)

Figura 2.1.3.2. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para **L8**.

La configuración relativa de **L7** no pudo determinarse por vía espectroscópica, debido a que la señal de RMN de H-2 es un singlete ancho. Conseguimos cristalizar los compuestos **L7** y **L8** y, por estudios de difracción de rayos X, asignar sus configuraciones absolutas como se representan en la Figura 2.1.3.3.

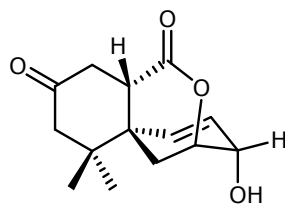


Gomerolactona C (**L7**)

Gomerolactona D (**L8**)

Figura 2.1.3.3. Configuración absoluta de gomerolactonas C y D.

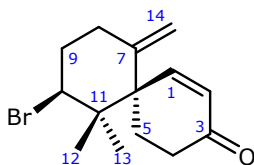
Las gomerolactonas A-D (**L5**, **L6**, **L7** y **L8**), junto con la chamigrenolactona (**52**),⁴ son los únicos metabolitos que poseen un esqueleto chamigreno oxidado en el carbono C-14. Puesto que los compuestos **L5**, **L6**, **L7** y **L8** se aislaron de especímenes de algas recolectadas en un área reducida, cabe esperar que provengan de un mismo precursor chamigrénico, con la configuración de C-6 inalterada. Las estructuras de estos metabolitos poseen un grado de oxidación y contenido de átomos de oxígeno muy poco frecuente, lo que podría reflejar una respuesta adaptativa ecológica.



Chamigrenolactona (**52**)

2.1.4. Caracterización de un nor- β -chamigreno **L9**.

Estructura de nor- β -chamigreno **L9.** El compuesto **L9** se aisló como un aceite incoloro. Su espectro de masas de IE mostró picos a m/z 282/284 $[M]^+$ con intensidades relativas para un átomo de bromo, en una fórmula molecular $C_{14}H_{19}OBr$ con cinco grados de insaturación. El espectro de IR exhibe una banda de absorción a 1680 cm^{-1} atribuible a una cetona α,β -insaturada.



L9

En su espectro de RMN de ^{13}C se observan señales para catorce átomos de carbono, y de los experimentos DEPT se deduce la presencia de dos metilos, cinco carbonos metilénicos (uno olefínico), tres metinos (dos sobre doble enlace y otro geminal a halógeno) y cuatro carbonos cuaternarios (uno olefínico y un carbonilo).

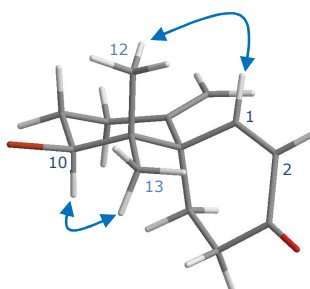
El espectro de RMN de 1H (Tabla 2.1.4.1) muestra señales para: cuatro protones olefínicos a δ 6.90 (dd, $J= 2.1, 10.6$ Hz), δ 6.10 (d, $J= 10.6$ Hz), δ 5.04 (s) y 4.69 (s); un protón geminal a halógeno a δ 4.53 (dd, $J= 4.8, 12.7$ Hz); protones metilenos entre δ 2.09 y δ 2.45 y grupos metilos angulares a δ 1.10 (s) y δ 1.19 (s).

El experimento 1H - 1H COSY indica dos sistemas de spin: H-1-H-2 y H₂-8-H₂-9-H-10. Mediante experimentos HSQC y HMBC se estableció la estructura plana de la molécula, que sitúa dos metilos sobre C-11, un bromo en C-10, un carbonilo en C-3 y dos dobles enlaces C-1-C-2 y C-7-C-14. Por lo tanto, **L9** posee estructura de β -nor-chamigreno, desprovista de un metilo isoprénico.

Tabla 2.1.4.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto **L9** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].

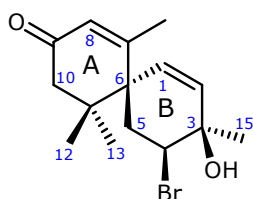
#.	δ_{H}	δ_{C}	COSY	HMBC
1	6.90 dd (2.1, 10.6)	153.2	H-2	C-3, C-5, C-7, C-11
2	6.10 d (10.6)	130.9	H-1	C-6
3	---	199.0		
4	2.31 m 2.20 m	34.0		
5	2.09 m 2.28 m	26.2		C-3, C-6
6	---	52.0		
7	---	144.8		
8	2.45 m 2.35 m	32.9	H ₂ -9	C-6, C-7, C-9, C-10, C-14
9	2.12 m 2.35 m	34.0	H ₂ -8, H-10	C-7, C-8, C-10
10	4.53 dd (4.8, 12.7)	62.1	H ₂ -9	C-12
11	---	42.3		
12	1.19 s	18.1		C-6, C-10, C-11, C-13
13	1.10 s	26.1		C-6, C-10, C-11, C-12
14	4.69 s 5.04 s	115.3		C-6, C-8

La configuración relativa de la molécula se determinó en base a estudios de mecánica molecular, constantes de acoplamiento y experimentos NOESY (se obtuvo como conformación de mínima energía la representada en la Figura 2.1.4.1). Las constantes de acoplamiento de H-10 ($J= 4.8, 12.7$ Hz) indican que H-10 es axial. La configuración relativa de C-6 y C-10 se estableció por los NOE observados entre H-10 y H₃-13 y entre H-1 y H₃-12.

**Figura 2.1.4.1.** Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para **L9**.

2.1.5. Caracterización de derivados de α -chamigreno con un sistema enónico en el anillo A.

Estructura de L10. El compuesto **L10** se aisló como un aceite incoloro. Su espectro de masas de IE muestra picos a m/z 313/315 $[M+1]^+$ con intensidades relativas para un átomo de bromo, en una fórmula molecular $C_{15}H_{22}O_2Br$ con cinco grados de insaturación: EMAR m/z $[M+1]^+$ 315.0768 (calculado para $C_{15}H_{22}O_2^{81}Br$, 315.0783). En su espectro de IR se observan dos bandas de absorción a 3464 y 1663 cm^{-1} para un grupo hidroxilo y una cetona α,β -insaturada, respectivamente.



L10

En el espectro de RMN de 1H se aprecian señales para: tres protones olefínicos a δ 6.04, 5.69 y 5.88 ppm, un protón geminal a heteroátomo a δ 4.45 ppm, cuatro protones metilénicos entre δ 2.10-2.63 ppm y protones para cuatro metilos a δ 1.03, 1.04, 1.46 y 1.90 ppm (Tabla 2.1.5.1.).

Tabla 2.1.5.1. Datos de RMN de 1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto **L10** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, $CDCl_3$].

#.	δ_H	δ_C	COSY	HMBC
1	5.69 d (10.5)	130.8	H-2	C-3, C-5, C-6
2	6.04 d (10.2)	133.7	H-1	C-3, C-4, C-6, C-15
3	---	66.9		
4	4.45 dd (4.5, 13.2)	61.4	H ₂ -5	C-5
5	α : 2.45 dd (4.5, 14.7) β : 2.38 d (13.5)	34.5	H-4	C-1, C-3, C-4, C-6, C-7, C-11
6	---	51.3		
7	---	164.2		
8	5.88 s	126.3		C-6, C-7, C-10, C-14
9	---	197.6		
10	α : 2.10 d (17.1) β : 2.63 d (17.1)	48.5		C-6, C-8, C-9, C-11, C-13
11	---	40.1		
12	1.04 s	26.8		C-6, C-10, C-11, C-13
13	1.03 s	25.1		C-6, C-10, C-11, C-12
14	1.90 s	21.7		C-6, C-7, C-8
15	1.46 s	29.5		C-2, C-3, C-4

En el espectro de RMN de ^{13}C , las señales a δ 197.6 ppm, δ 130.8 y 133.7 ppm, y δ 126.3 y 164.2 ppm sugieren que el compuesto posee un grupo carbonilo y dos dobles enlaces. Los experimentos DEPT indican las siguientes multiplicidades: cuatro carbonos de grupos metilos, dos metilenos, cuatro metinos y cinco carbonos cuaternarios.

El experimento COSY muestra dos sistemas de spin: H-1–H-2 y H-4–H-2-5. En el HMBC se observan correlaciones mutuas de H₃-12 y H₃-13 con C-11 y C-6, lo que combinado con las de H₂-10 y H₃-14, indicadas en la Tabla 2.1.5.1, aseguran el anillo A con una cetona α,β -insaturada. El anillo B, y la unión entre ambos anillos, se estableció por las correlaciones a larga distancia H₃-15/C-2, C-3 y C-4 y las correlaciones H₂-5/C-1, C-3, C-4, C-6, C-7 y C-11. Los desplazamientos químicos de H₃-15 (δ_{H} 1.46 ppm) y H-4 (δ_{H} 4.45 ppm) sitúa el grupo hidroxilo en C-3 y el bromo en C-4.

La configuración relativa de **L10** se determinó por estudios de mecánica molecular y experimentos NOESY. En la conformación de mínima energía, los anillos A y B adoptan forma semisilla, como se muestra en la Figura 2.1.5.1. El intenso efecto NOE de H-4 con H₃-12 y H₃-15 determina la configuración relativa de C-3, C-4 y C-6. El efecto NOE entre H₃-14 y H-5 β , y entre H-5 α y H-10 β , permitió asignar el desplazamiento químico de H-5 α y de H-5 β .

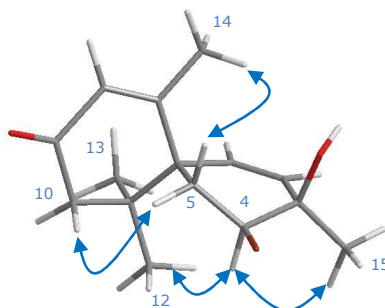
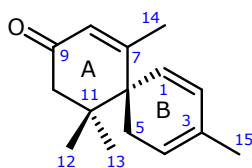


Figura 2.1.5.1. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para **L10**.

Estructura de L11. El producto **L11** se aisló como un aceite incoloro. Su fórmula molecular, $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}$ (m/z 216.1505, calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}$, 216.1514), indica que la molécula posee seis grados de insaturación. El espectro de IR muestra una señal para cetona conjugada (1668 cm^{-1}).

**L11**

En el espectro de RMN de ^{13}C se observan señales para 15 átomos de carbono, con las multiplicidades (DEPT) siguientes: $4\times\text{CH}_3$, $2\times\text{CH}_2$, $4\times\text{CH}$ (olefínicos) y 5 cuaternarios. En el espectro de RMN de ^1H exhibe señales para protones olefínicos: δ 5.36 (s), δ 5.46 (d, $J=9.8$ Hz), δ 5.72 (s) y δ 5.89 (d, $J=9.8$ Hz), Tabla 2.1.5.2.

Tabla 2.1.5.2. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto **L11** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].

#.	δ_{H}	δ_{C}	COSY	HMBC
1	5.46 d (9.8)	124.9	H-2	C-2, C-3, C-5, C-6, C-7, C-11
2	5.89 d (9.8)	128.4	H-1	C-3, C-4, C-6, C-15
3	---	128.1		
4	5.36 s	119.2	H ₂ -5	
5	2.28 m 2.54 m	27.7	H-4	C-3, C-4, C-6, C-7, C-11
6	---	45.5		
7	---	165.2		
8	5.72 s	124.4		C-10, C-14
9	---	197.5		
10	2.20 m 2.20 m	46.8		
11	---	39.9		
12	0.94 s	24.2		C-6, C-10, C-11, C-13
13	0.93 s	24.2		C-6, C-10, C-11, C-12
14	1.94 s	21.7		C-6, C-7, C-8
15	1.69 s	20.4		C-2, C-3, C-4

El experimento 2D-COSY indica dos sistemas de spin H-1–H-2 y H-4–H₂-5. La combinación de estos datos, junto con los de los experimentos HSQC y HMBC, permitió establecer la estructura plana de la molécula. Las correlaciones C-H fueron inferidas por experimentos HSQC. Las correlaciones HMBC H₃-15/C-2, C-3 y C-4 y las correlaciones H₂-5/C-3, C-4 y C-6, definen el anillo B de la molécula. Además de las correlaciones típicas para *gem*-dimetilo, Tabla 2.1.5.2, se observaron correlaciones de H-8 con C-10 y C-14 y las correlaciones de H-1 con C-7 y C-11. Esto permitió establecer el anillo A, la unión entre ambos anillos A y B, así como la posición de tres dobles enlaces entre C-1–C-2, C-3–C-4 y C-7–C-8, respectivamente.

Estructura de L12. El producto **L12** se aisló como un aceite incoloro. El espectro de masas exhibe picos a m/z 266/268, con intensidades relativas para un átomo de cloro en una fórmula molecular $C_{15}H_{19}O_2Cl$ con seis grados de insaturación: EMAR 268.1031, (calculado para $C_{15}H_{19}O_2^{37}Cl$ 268.1044). En el espectro de IR se observan absorciones para carbonilos conjugados a 1671, 1639 cm^{-1} .

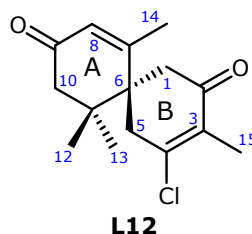


Tabla 2.1.5.3. Datos de RMN de 1H , ^{13}C y HMBC del compuesto **L12** y datos de RMN de 1H y ^{13}C del compuesto **L13** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, $CDCl_3$].

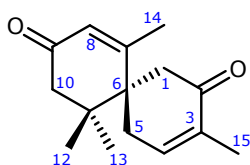
#.	L12			L13	
	δ_H	δ_C	HMBC	δ_H	δ_C
1	α : 2.69 d (15.9) β : 2.78 d (15.9)	42.1	C-2, C-5, C-6, C-7	α : 2.73 d (16.4) β : 2.60 d (16.4)	42.4
2	---	195.2		---	197.5
3	---	133.6		---	135.5
4	---	150.9		6.68 s	142.8
5	α : 3.14 d (19.0) β : 2.72 ddd (1.5, 1.5, 19.0)	39.4	C-1, C-3, C-4, C-6, C-7, C-11	α : 2.40 dddd (1.8, 1.8, 5.3, 19.9) β : 2.80 d (19.9)	33.5
6	---	47.1		---	48.2
7	---	164.0		---	166.3
8	5.86 d (1.3)	128.0	C-6, C-10, C-14	5.82 s	127.3
9	---	196.9		---	198.4
10	2.33 s 2.33 s	48.5	C-9, C-12, C-13	2.30 m 2.30 m	48.5
11	---	40.5		---	40.5
12	1.08 s	24.9	C-6, C-10, C-11, C-13	1.04 s	25.6
13	1.05 s	24.9	C-6, C-10, C-11, C-12	1.03 s	25.6
14	1.90 s	23.4	C-6, C-7, C-8	1.89 s	15.5
15	1.95 s	12.2	C-2, C-3, C-4	1.80 s	24.2

El espectro de RMN de ^{13}C muestra señales para 15 átomos de carbono, cuyas multiplicidades se determinaron por experimentos DEPT: cuatro grupos metilo (dos sobre doble enlace), tres metilenos, un carbono metínico (olefínico), dos carbonos carbonílicos y cinco carbonos cuaternarios (dos sp^3 y tres sp^2). El espectro de RMN de 1H exhibe las señales siguientes: un protón olefínico a δ 5.86 (d, $J= 1.3$ Hz); seis

protones metilenos entre δ 2.33 y δ 3.14; dos grupos metilos a δ 1.08 (s) y δ 1.05 (s) y dos grupos metilos sobre doble enlace a δ 1.90 (s) y δ 1.95 (s), Tabla 2.1.5.3.

En experimentos HMBC, las correlaciones de H₃-12 y H₃-13 entre sí y con C-6, C-10 y C-11; de H-8 con C-6, C-10 y C-14; y de H₃-14 con C-6, C-7 y C-8 definen el anillo A. El anillo B se establece por las correlaciones a dos y tres enlaces de H₂-1 con C-2, C-5, C-6 y C-7; de H₂-5 con C-1, C-3, C-4, C-6 y C-7; y de H₃-15 con C-2, C-3 y C-4. El desplazamiento químico de C-4 (δ_c 150.9 ppm) sitúa el átomo de cloro en dicho carbono. Estos datos conforman la estructura plana del producto como la representada en **L12**.

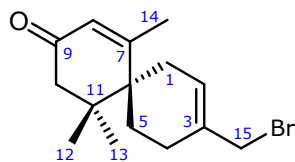
Estructura de L13. El compuesto **L13** se aisló como un aceite incoloro. Su espectro de masas indica una fórmula molecular C₁₅H₂₀O₂, (EMAR 232.1461, calculado para C₁₅H₂₀O₂ 232.1463). Su espectro de IR muestra dos bandas de absorción a 1671 y 1639 cm⁻¹ para cetonas α,β -insaturadas.



L13

El producto **L13** es el descloro derivado de **L12**. Sus datos de RMN de ¹H y ¹³C son similares, aunque hay diferencias en señales correspondientes a sustituyentes del anillo B, mayormente debidas a que el átomo de cloro en C-4 de **L12**, es un protón olefínico (δ 6.68 ppm) en el correspondiente carbono de **L13**, como lo ratifica el sistema de spin H-4-H₂-5 en el experimento COSY.

Estructura de L14. El compuesto **L14** se aisló como un aceite incoloro. El espectro de masas muestra picos a m/z 296/298 [M]⁺, con intensidades relativas para un átomo de bromo en una fórmula molecular C₁₅H₂₁OBr (EMAR 296.0785, calculado para C₁₅H₂₁O⁷⁹Br 296.0776). El espectro de IR muestra absorción para cetona α,β -insaturada (1663 cm⁻¹).



L14

En el espectro de RMN de ^{13}C se observaron señales para quince átomos de carbono con las multiplicidades (DEPT) siguientes: tres carbonos de grupos metilo, cinco metilenos (uno geminal a halógeno), dos metinos olefínicos y cinco carbonos cuaternarios. El espectro de RMN de ^1H exhibe señales para: dos protones olefínicos a δ 5.86 (s) y δ 5.98 (s); dos protones geminales a halógeno a δ 3.96 (m); protones metilénos entre δ 1.85 y δ 2.60 ppm y para tres grupos metilo a δ 0.94 (s), 1.01(s) y 1.94 (d, $J= 1.1$), Tabla 2.1.5.4.

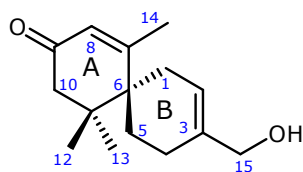
El experimento COSY distingue dos sistemas de spin: $\text{H}_2\text{-1-H-2}$ y $\text{H}_2\text{-4-H}_2\text{-5}$. Los experimentos HMBC establece las correlaciones siguientes: $\text{H}_3\text{-12}$ y $\text{H}_3\text{-13/C-6}$, C-10, C-11; $\text{H}_2\text{-10/C-8}$, C-9; $\text{H}_2\text{-1 /C-3}$, C-6; $\text{H}_2\text{-5/C-3}$, C-4, C-6; y $\text{H}_2\text{-15/C-2}$, C-3, C-4, lo que permitió asignar la estructura plana de **L14** como la de un derivado chamigrénico, en la que el metilo del anillo B es un bromometileno.

Tabla 2.1.5.4. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC del compuesto **L14** y de RMN de ^1H , ^{13}C del compuesto **L15** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].

#.	L14			L15	
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}
1	2.09 dd (4.3, 19.7) 2.25 m	28.3	C-2, C-3, C-5, C-6, C-7, C-11	2.14 m 2.29 m	27.8
2	5.98 s	128.3		5.80 s	123.3
3	---	134.5		---	137.6
4	2.09 m 2.18 m	24.4	C-2, C-3, C-5, C-6	1.95 m 2.18 m	23.9
5	1.85 m 1.90 m	30.3	C-1, C-3, C-4, C-6, C-7, C-11	1.86 m 1.93 m	30.4
6	---	43.5		---	43.9
7	---	169.2		---	169.7
8	5.86 s	127.2	C-6, C-10, C-14	5.85 s	127.1
9	---	198.3		---	198.5
10	2.08 m 2.60 d (17.3)	48.8	C-6, C-8, C-9, C-12, C-13	2.08 m 2.61 m	49.0
11	---	40.3		---	40.5
12	1.01 s	24.7	C-6, C-10, C-11, C-13	1.01 s	24.8
13	0.94 s	24.1	C-6, C-10, C-11, C-12	0.94 s	24.3
14	1.94 d (1.1)	23.9	C-6, C-7, C-8	1.95 d (1.5)	24.3
15	3.96 m	38.4	C-2, C-3, C-4	4.03 m	66.8

Estructura de L15. Del análisis de los datos espectroscópicos de ^1H y de ^{13}C de **L15** (Tabla 2.1.5.4.) y de su comparación con los de **L14** se deduce que **L15** es el hidroxí derivado en C-15 de **L14**. Esto se confirma por los datos de espectrometría de masas (m/z 234.1615, calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$, 234.1620), por la aparición de una

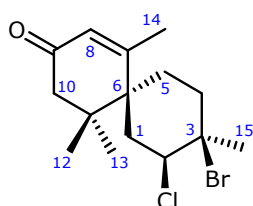
banda de absorción a 3410 cm^{-1} en el espectro de IR y por el desplazamiento químico de C-15 (δ 66.8 ppm), propio de un hidroximetileno. La estructura de **L15** se verificó por análisis de los experimentos bidimensionales COSY, HSQC y HMBC.



L15

Los productos **L11**, **L12**, **L13**, **L14** y **L15** poseen un único centro quiral C-6, y la configuración relativa de cada producto es la representada en la figura correspondiente.

Estructura de L16. El compuesto **L16** se aisló como un aceite incoloro. Su espectro de masas de IE exhibe picos a m/z 332/334/336 $[M]^+$, con intensidades para un átomo de cloro y un átomo de bromo en una fórmula molecular $C_{15}H_{22}OClBr$ (EMAR 336.0498, calculado para $C_{15}H_{22}O^{37}Cl^{81}Br$, 336.0493). En el espectro de IR se observa banda de absorción para cetona α,β -insaturada a 1669 cm^{-1} .



L16

En su espectro de RMN de 1H (Tabla 2.1.5.5) se observa señales para dos protones geminales a halógeno a δ 3.89 (dd, $J= 4.6, 12.2$ Hz, Integral: 0.69) y δ 4.23 (dd, $J= 4.6, 12.4$ Hz, Integral: 0.25). Del valor de las integrales de ambas señales, teniendo en cuenta que se trata de un producto puro, se deduce que cada una debe corresponder a un mismo protón cuyo desplazamiento químico refleja una mezcla de conformaciones, ya que la suma de sus integrales es aproximadamente uno. Este mismo desdoblamiento se aprecia a campos más altos en dos señales para metilos angulares geminales a halógeno a δ 1.92 (s) (Integral: 2.27) y otro a δ 1.72 (s) (Integral: 0.72) y en dos señales para metilo sobre doble enlace δ 2.11 (s) (Integral: 2.23) y δ 2.07 (s) (Integral: 0.75). Por lo tanto, este producto, en las condiciones del experimento de RMN de 1H , consiste en una mezcla de dos confórmeros estables, en

una proporción aproximada de 3:1. El resto de las señales de RMN de ^1H son: un protón olefínico a δ 5.84 ppm; dos metilos y protones metilénicos entre δ 1.84 y δ 2.31, Tabla 2.1.5.5.

Tabla 2.1.5.5. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto **L16** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].

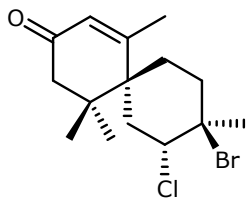
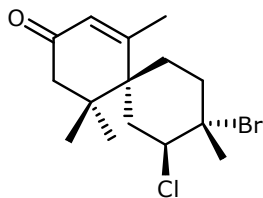
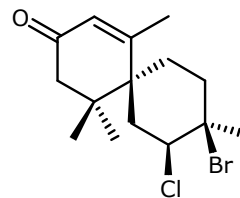
#.	δ_{H}	δ_{C}	COSY	HMBC
1	2.23 m 2.31 m	36.9 (35.6)*	H ₂ -2	C-2, C-6, C-11
2	3.89 dd (4.6, 12.2) 4.23 dd (4.6, 12.4)*	66.0 (65.5)*	H ₂ -1	C-3, C-4, C-15
3	---	71.9		
4	2.24 m 2.16 m	40.8 (39.7)*		C-2, C-3, C-6
5	1.84 m 2.00 m	25.3 (24.1)*		C-1, C-3, C-4, C-6, C-11
6	---	47.9		
7	---	166.9		
8	5.84 s	127.3		C-6, C-10, C-14
9	---	197.8		
10	2.34 m 2.34 m	50.0		C-6, C-8, C-9, C-11
11	---	40.4		
12	1.13 s	27.9		C-6, C-10, C-11, C-13
13	1.12 s	27.7		C-6, C-10, C-11, C-12
14	2.07 s (2.11 s)*	22.5		C-6, C-7, C-8
15	1.92 s (1.72 s)*	32.9 (31.3)*		C-2, C-3, C-4

*desplazamiento químico del segundo confórmero

Del análisis del espectro de RMN de ^{13}C y de los experimentos DEPT se observan señales para 20 átomos de carbono, con las multiplicidades siguientes: 4 carbonos de grupos metilos (uno de ellos desdoblado en dos señales), 4 metilenos (tres de ellos desdoblados en dos señales), 2 metinos (uno geminal a halógeno, desdoblado en dos señales y otro olefínico) y 5 carbonos cuaternarios (Tabla 2.1.5.5).

Los datos espectroscópicos del **L16** son similares a los de los compuestos laurencenona A (**6**)³² y (**7-b**),⁴³ también aislados en este estudio. El producto **7-b**, que proviene de una transformación química⁴³ (Figura 2.1.5.2), lo hemos obtenido por primera vez como producto natural. Los experimentos bidimensionales realizados: COSY, HSQC y HMBC confirman la estructura plana del compuesto **L16**, que coincide con la estructura plana de **6** y con la estructura plana de **7-b**, Tabla 2.1.5.6. El desplazamiento químico de C-2 de **L16** [confórmero **a**: δ_{C} 66.0 ppm; confórmero **b**: δ_{C}

65.5 ppm] indica que en esa posición se encuentra el cloro, por lo tanto, el bromo se sitúa en el carbono adyacente C-3, geminal al metilo-15.

Laurencenona A (**6**)**7-b****L16****Tabla 2.1.5.6.** Datos de RMN de ¹H y ¹³C de los compuestos **L16**, Laurencenona A (**6**) y **7-b**.

#.	L16		Laurencenona A (6)		7-b	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	2.23 m 2.31 m	36.9 (35.6)*	3.04 d (13.9) 2.02 m	41.7	2.15 m 2.00 m	35.9
2	3.89 dd (4.6, 12.2) 4.23 dd (4.6, 12.4)*	66.0 (65.5)*	4.57 dd (4.1, 4.1)	65.2	4.85 dd (5.1, 12.3) 4.49 dd (4.5, 11.7)*	68.9 (67.7)*
3	---	71.9	---	68.3	---	67.7
4	2.24 m 2.16 m	40.8 (39.7)*	2.20 m 2.20 m	36.4	2.44 m 2.44 m	41.7
5	1.84 m 2.00 m	25.3 (24.1)*	2.08 m 1.80 m	24.2	2.20 m 1.54 m	31.7
6	---	47.9	---	42.3	---	42.3
7	---	166.9	---	170.1	---	167.2
8	5.84 s	127.3	5.89 s	127.8	5.86 s	127.9
9	---	197.8	---	197.9	---	197.6
10	2.34 m 2.34 m	50.0	2.50 d (18.4) 2.08 m	48.9	2.50 m 2.02 m	48.7
11	---	40.4	---	42.3	---	42.3
12	1.13 s	27.9	1.00 s	24.1	0.94s (0.95 s)*	23.8
13	1.12 s	27.7	1.18 s	25.5	1.11 s	24.9
14	2.07 s (2.11 s)*	22.5	2.22 s	24.1	2.24 s (2.21 s)*	26.7
15	1.92 s (1.72 s)*	32.9 (31.3)*	1.97 s	31.4	1.83 s	23.8

*desplazamiento químico del segundo confórmero

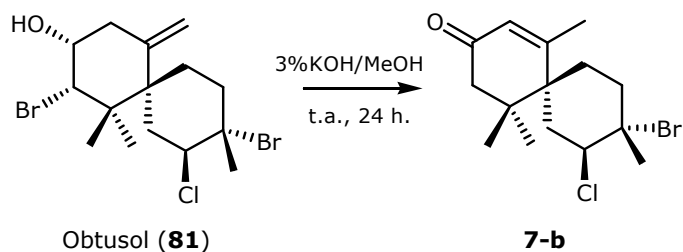


Figura 2.1.5.2. Transformación química de obtusol (**81**) en **7-b**.

En el producto **6**, las constantes de acoplamiento de H-2 (δ 4.57 ppm, $J = 4.1, 4.1$ Hz), Tabla 2.1.5.6, indican que el protón es ecuatorial. Asimismo, el desplazamiento químico del metilo-15, δ_c 31.4 ppm, establece que éste también es ecuatorial³² (Figura 2.1.5.2). Estos datos facilitaron la asignación de la configuración relativa de **L16** tal como se describe a continuación.

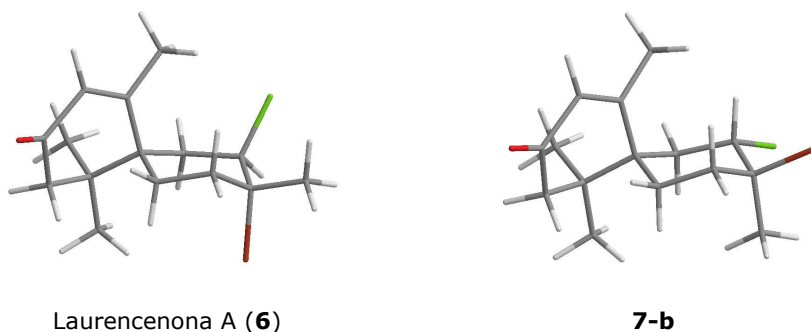


Figura 2.1.5.3. Estructuras de mínima energía de **6** y **7-b**.

Configuración relativa de L16. La configuración del carbono spiro C-6, y del sistema Cl-Br del anillo B, se determinó mediante análisis de: constantes de acoplamiento, experimentos NOESY y estudios de mecánica molecular. En el espectro de RMN de ^1H de **L16**, las constantes de acoplamiento de H-2 para cada conformero (conformero **a**: $J = 4.6, 12.2$ Hz; conformero **b**: $J = 4.6, 12.4$ Hz) indican que H-2 es axial en ambos. El desplazamiento químico de Me-15 de **L16** [δ_c 32.9 (31.3) ppm] es similar al correspondiente de **6** (δ_c 31.4 ppm), lo que sugiere que el Me-15 de **L16** es también ecuatorial. Por otra parte, los NOEs observados entre H-2 con H₃-12, H₃-13 y H₃-15 permiten establecer la configuración relativa de C-6. Los estudios de mecánica molecular indican que existen dos conformaciones de mínima energía compatibles con los NOEs observados. Ambos conformeros conservan la conformación silla del anillo B, mientras que en la conformación bote torcido del anillo A se producen los cambios siguientes: en el conformero **L16-A** el Me-12 β es axial, mientras que en **L16-B** el Me-12 β es ecuatorial y se sitúa en el plano del anillo. Las energías de ambas

conformaciones son similares: 33.455 y 33.637 Kcal/mol respectivamente, Figura 2.1.5.3.

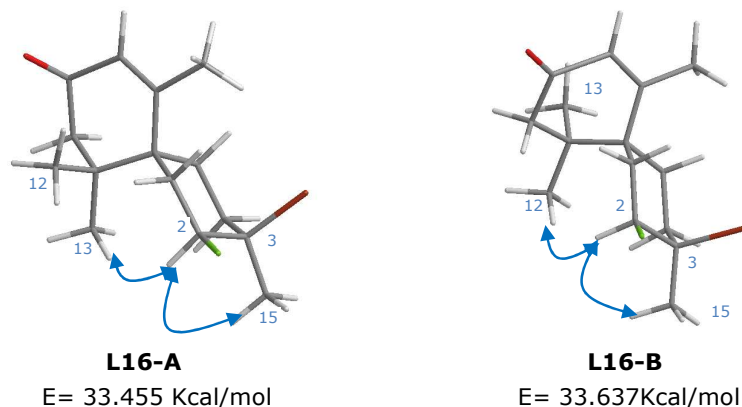
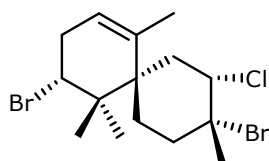


Figura 2.1.5.4. Estructuras de mínima energía y efectos NOE seleccionados para **L16-A** y **L16-B**.

El producto (**7-b**)⁴³ también coexiste en dos conforméromos de mínima energía, como se aprecia en los diferentes desplazamientos químicos de algunos de sus átomos (Tabla 2.1.5.6). Los desplazamientos químicos de H-2 (conformero **a**: δ 4.85 ppm, J = 5.1, 12.3 Hz; conformero **b**: 4.49 ppm, J = 4.5, 11.7 Hz), así como el desplazamiento químico del metilo-15 (δ_c 23.8 ppm) indican que ambos, protón y grupo metilo, son axiales, Figura 2.1.5.2, por lo que en **7-b** la disposición del sistema cloro-bromo es *anti* mientras que en **L16** es *syn*.

2.1.6. Caracterización del producto Ap-1.

Este producto se aisló también de *Aplysia dactylomela* de la Palma. La caracterización de su estructura se describe en el apartado 2.2.1.1.



Ap-1

2.2. ESTUDIO QUÍMICO DEL MOLUSCO *Aplysia dactylomela*.

Los moluscos del género *Aplysia* se utilizan como sistema modelo para estudios neurológicos¹⁵¹ y, entre los invertebrados marinos, han sido los más estudiados. La *Aplysia dactylomela* (Opisthobranchia: Anaspidea) se alimenta de algas, de las que adquiere y almacena muchos metabolitos en sus glándulas digestivas.⁵⁵ De estos moluscos se han aislado más de 80 metabolitos secundarios procedentes de su dieta. La función que desempeñan estos productos en el molusco es objeto de debate, por una parte se afirma que las aplysias los almacenan para usarlos como defensa química frente a posibles depredadores,⁵⁵ pero, por otra parte, se observa que la mayoría se acumulan en la glándula digestiva más que en el manto, tejido periférico, que sería el lugar adecuado para realizar esta función.^{152,153} Además, se ha observado que las aplysias son capaces de transformar los metabolitos que adquieren de su dieta en otros menos tóxicos.^{154,155}

Las algas rojas del género *Laurencia* son frecuentes en la alimentación de *Aplysia dactylomela*. Como ya hemos comentado, el género *Laurencia* se caracteriza por producir metabolitos halogenados, particularmente sesquiterpenos derivados de chamigreno y bisaboleno. Por su capacidad para almacenar compuestos procedentes de su dieta, y debido a nuestro interés en sustancias halogenadas, abordamos el estudio químico de *Aplysia dactylomela* de las Islas Canarias, como una estrategia eficaz para el aislamiento de sesquiterpenoides. Su estudio permite comparar los productos acumulados con los obtenidos de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas. Con esta finalidad estudiamos extractos de *Aplysia dactylomela* de distintas zonas geográficas: La Palma y La Gomera. Por su interés ecológico, se estudiaron de forma independiente los extractos del manto y del aparato digestivo.

En este epígrafe se describe la caracterización química de los sesquiterpenos aislados del género *Aplysia*. En el apartado 2.5. se resumen similitudes y diferencias entre metabolitos, en función del área de recolección de los especímenes, así como entre metabolitos de *Laurencia majuscula* y metabolitos de *Aplysia* obtenidos en una misma área de recolección.

¹⁵¹ T. J. Carew, E. R. Kandel, *J. Neurophysiol.*, **1977**, *40*, 692-707.

¹⁵² D. J. Faulkner, *In Ecological Roles of Marine Natural Products*; V. J. Paul, Ed; Comstock Publishing Associates: Ithaca, 1992; pp 120-129.

¹⁵³ S. C. Pennings, V. J. Paul, *Mar. Biol.*, **1993**, *117*, 535-576.

¹⁵⁴ M. O. Stallard, D. J. Faulkner, *Comp. Biochem. Physiol. B*, **1974**, *49*, 37-41.

¹⁵⁵ S. C. Pennings, A. M. Weiss, V. J. Paul, *Mar. Biol.*, **1996**, *126*, 735-743.

2.2.1. ESTUDIO QUÍMICO DEL MOLUSCO *Aplysia dactylomela* DE La Palma.

Del estudio químico de *A. dactylomela*, recolectada en la costa suroeste de La Palma (Islas Canarias), obtuvimos once productos conocidos derivados de β -chamigreno (Figura 2.2.1.1) y de bisaboleno (Figura 2.2.1.2), así como ocho nuevos sesquiterpenos que incluyen: tres derivados de chamigreno, (Figura 2.2.1.3), dos de bisaboleno, (Figura 2.2.1.4), uno de ciclobisaboleno, además de un derivado de bisaboleno con esqueleto irregular y un bisaboleno degradado (Figura 2.2.1.5).

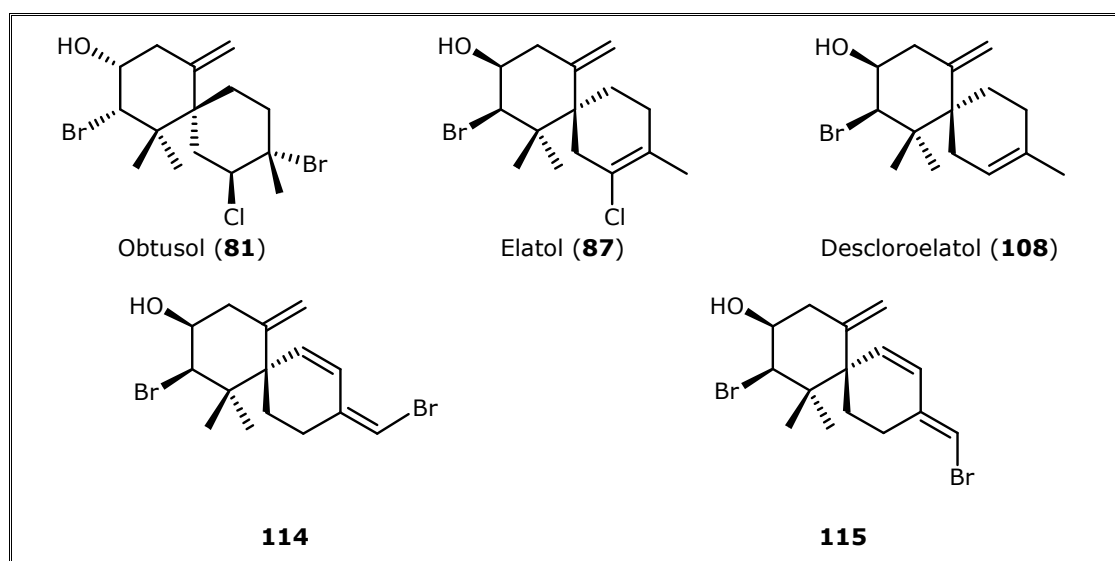


Figura 2.2.1.1. Productos β -chamigrénicos conocidos aislados de *A. dactylomela* de La Palma.

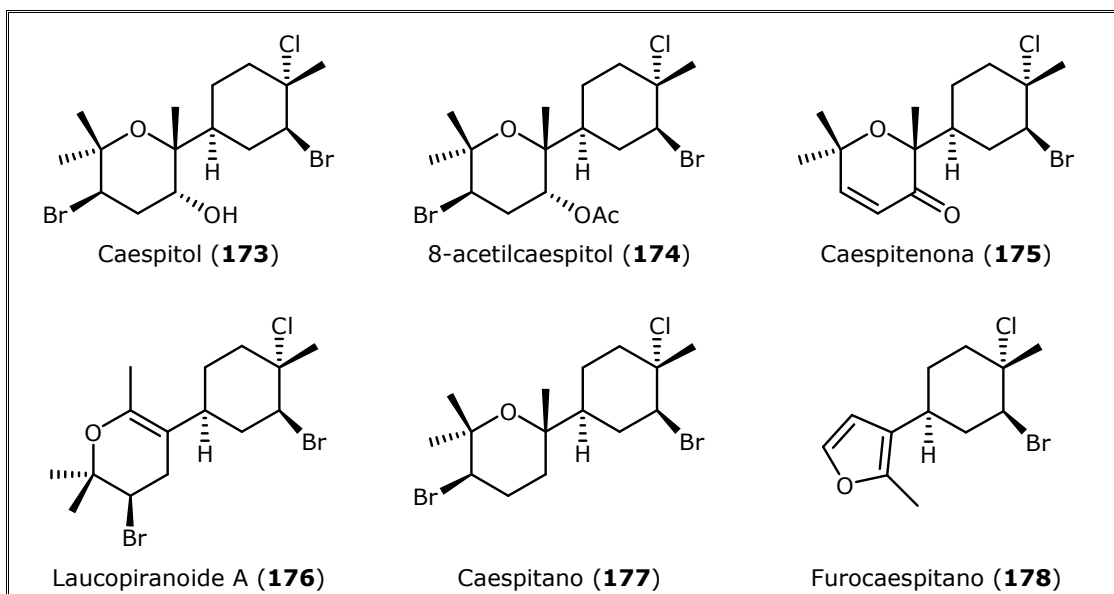


Figura 2.2.1.2. Productos conocidos derivados de bisaboleno aislados de *A. dactylomela* de La Palma.

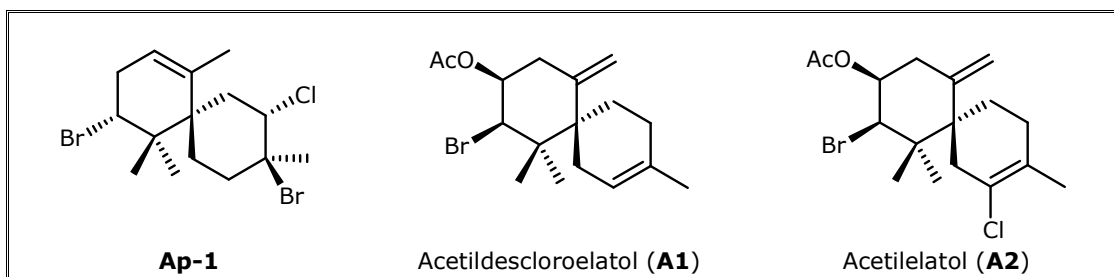


Figura 2.2.1.3. Nuevos metabolitos chamigránicos aislados de *A. dactylomela* de La Palma.

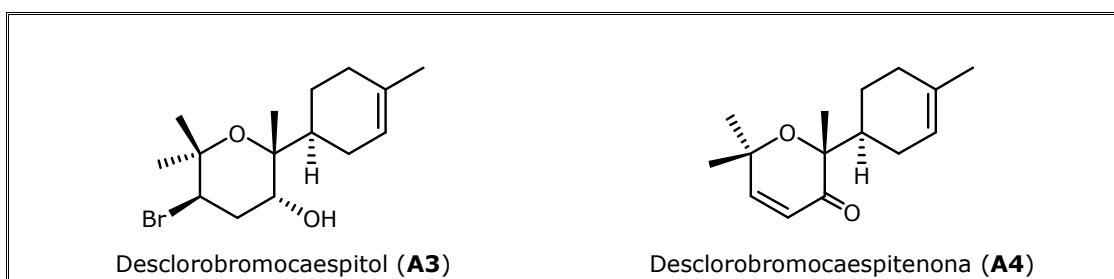


Figura 2.2.1.4. Nuevos derivados de bisaboleno aislados de *A. dactylomela* de La Palma.

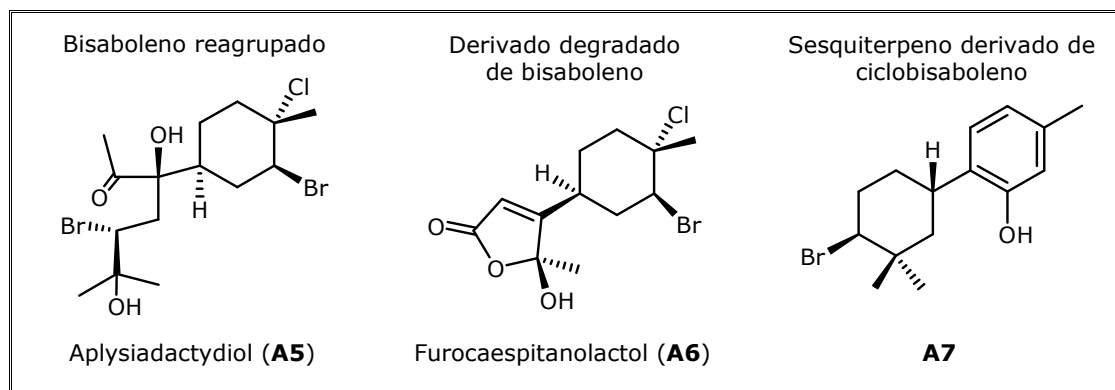
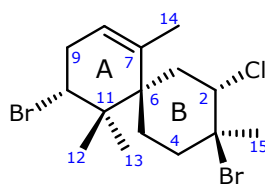


Figura 2.2.1.5. Derivados de bisaboleno y ciclobisaboleno aislados de *A. dactylomela* de La Palma.

2.2.1.1. Caracterización de los compuestos con esqueleto chamigreno.

Estructura de Ap-1. El compuesto **Ap-1** se aisló como un aceite incoloro. Su espectro de masas mostró picos a m/z 396/398/400/402, cuyas intensidades relativas sugieren la presencia de dos átomos de bromo y uno de cloro, en una fórmula empírica $C_{15}H_{23}ClBr_2 [M]^+$ (EMAR).



Ap-1

Los espectros de RMN de ^{13}C y DEPT de **Ap-1** (Tabla 2.2.1.1.1) muestran 15 átomos de carbono siguientes: cuatro grupos metilo, cuatro metilenos, tres metinos (uno olefínico) y cuatro carbonos cuaternarios (uno olefínico y otro unido a un heteroátomo). Se observaron señales de RMN de 1H para: un protón olefínico a δ 5.24 (m); dos protones geminales a heteroátomo [δ 4.88 (dd, $J= 6.4, 11.8$ Hz), 4.52 (dd, $J= 6.8, 10.8$ Hz)]; ocho protones metileno enentre δ 2.69 y δ 1.55; y cuatro grupos metilo [δ 1.94 (s), δ 1.84 (s), δ 1.20 (s), δ 0.94 (s)].

Los experimentos 1H - 1H COSY indican tres sistemas de spin: H_2 -1- H -2; H_2 -4- H_2 -5 y H -8- H -10. Los experimentos HSQC y HMBC permitieron confirmar estos fragmentos y establecer su conectividad. La correlación a tres enlaces de H_3 -12 y H_3 -13 con C-13 y C-12, respectivamente, y las correlaciones de ambos con C-10 y C-11, definen un grupo *gem*-dimetilo en C-11. La correlación de H_3 -14 con C-8 y las de H_3 -14, H_3 -12 y H_3 -13 con C-6 establecieron el anillo A, mientras que las correlaciones de H_3 -15/C-2, C-3, C-4 y H -2 y H_2 -5/C-6 definieron el anillo B y asegura una estructura

de tipo chamigreno para **Ap-1**. Los desplazamientos químicos de C-2 (δ 69.5), C-3 (δ 67.8) y C-10 (δ 60.9) permiten establecer la regioquímica de los halógenos de la forma siguiente: un átomo de bromo en C-3, un átomo de bromo en C-10, y un átomo de cloro en C-2.

Tabla 2.2.1.1.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC del compuesto **Ap-1** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].

#.	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
1	2.08 m 2.08 m	38.0	C-2, C-3, C-6, C-7
2	4.88 dd (6.4, 11.8)	69.5	C-3
3	---	67.8	
4	α : 2.41 dd (4.4, 4.4, 14.1) β : 2.55 m	42.3	C-3
5	α : 2.00m β : 1.55 m	31.7	C-3, C-6, C-7
6	---	47.3	
7	---	139.7	
8	5.24 m	123.0	
9	α : 2.69 m β : 2.55 m	36.3	
10	4.52 dd (6.8, 10.8)	60.9	C-12
11	---	43.0	
12	0.94 s	17.1	C-6, C-10, C-11, C-13
13	1.20 s	24.6	C-6, C-10, C-11, C-12
14	1.94 s	26.0	C-6, C-7, C-8
15	1.84 s	24.0	C-2, C-3, C-4

La configuración relativa de **Ap-1** se asignó en base a constantes de acoplamiento y experimentos NOESY, Figura 2.2.1.1.1. Las constantes de acoplamiento de H-2 ($J= 6.4, 11.8$ Hz) y H-10 ($J= 6.8, 10.8$ Hz) indican que ambos protones son axiales. Los NOEs observados entre H-2 y H_3 -14 y entre H-10 y H-5 β aseguran la configuración relativa de C-10, C-2, y la del carbono spiro C-6. Finalmente, los NOEs observados entre H-2 y H-4 β y entre H_3 -15 y H-4 α establecen que los átomos de cloro y bromo, sobre los carbonos C-2 y C-3, están en lados distintos del plano del anillo, con lo que se completa la configuración relativa, tal como está representada en la Figura 2.2.1.1.1

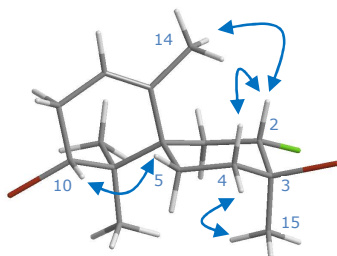
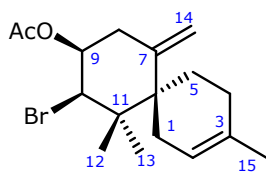


Figura 2.2.1.1.1. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para **Ap-1**.

Estructura del acetildescloroelatosol (A1). El acetildescloroelatosol (**A1**) se aisló como un aceite incoloro. Su EM mostró picos a m/z a 340/342, con intensidades relativas para un átomo de bromo en una fórmula empírica $C_{17}H_{25}O_2Br$ $[M]^+$ (EMAR). El espectro de IR muestra absorción para grupo carbonilo a 1743 cm^{-1} .



Acetildescloroelatosol (**A1**)

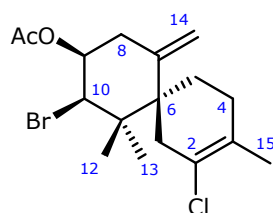
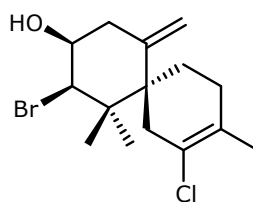
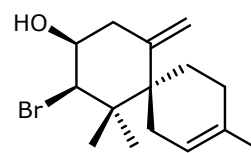
Los espectros de RMN de ^{13}C y los experimentos DEPT, Tabla 2.2.1.1.2, mostraron 17 señales correspondientes a: 4 metilos (un grupo acetato), 5 metilenos (uno olefínico), 3 metinos (uno geminal a acetato y uno olefínico) y cinco carbonos cuaternarios (un carbonilo y dos olefínicos). En el espectro de RMN de 1H se observan las señales siguientes: tres protones olefínicos a δ 5.28 (m), 4.95 (dd, $J= 1.6, 1.6$ Hz) y 4.76 (s); un protón geminal a acetato en δ 5.26 (ddd, $J= 3.2, 3.2, 3.2$ Hz); un protón geminal a bromo en δ 4.59 (d, $J= 3.3$ Hz); ocho protones metilenos en la franja δ 2.65- δ 1.61; y cuatro grupos metilo [δ 2.06 (s), 1.57 (s), 1.07 (s), 1.03 (s)]. De estos datos se deduce que el producto es un derivado de chamigreno. Los desplazamientos químicos de C-10, (δ_H 4.59 d, δ_C 64.0), y C-9, (δ_H 5.26 ddd, δ_C 74.0), indican que en estos carbonos está enlazado un átomo de bromo y un oxígeno de un grupo acetato, respectivamente.

Los experimentos COSY revelaron la presencia de tres sistemas de spin: H_2 -1-H-2; H_2 -4-H-5 y H_2 -8-H-10. Los datos de HMBC y HSQC permitieron confirmar estos fragmentos y establecer la conectividad entre ellos. Las correlaciones a tres enlaces de H_3 -12, H_3 -13 y H_2 -14 (Tabla 2.2.1.1.2) definen el anillo A, lo que combinado con las correlaciones de H_3 -15, permitió asegurar la estructura de **A1** como el derivado acetilado del descloroelatosol (**108**), también aislado en este estudio.

Tabla 2.2.1.1.2. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC de acetildescloroelato (**A1**) y datos de RMN de ^1H y ^{13}C de acetilelato (**A2**) [500 MHz, δ ppm, (*J*) Hz, CDCl_3].

#.	Acetildescloroelato (A1)			Acetilelato (A2)	
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}
1	α : 2.09 m β : 2.24 m	30.2	C-2, C-3, C-7	α : 2.35 m β : 2.61 m	38.6
2	5.28 m	119.4	C-4, C-6, C-15	---	124.1
3	---	132.7		---	128.1
4	α : 1.82 m β : 1.62 m	27.8		α : 1.97 m β : 1.79 m	29.4
5	α : 1.79 m β : 1.61 m	26.0		α : 1.80 m β : 1.63 m	25.6
6	---	46.9		---	49.0
7	---	141.0		---	140.6
8	α : 2.39 dd (2.8, 14.9) β : 2.65 dddd (1.5, 1.5, 3.1, 14.9)	36.7	C-6, C-7, C-9, C-10, C-14	α : 2.40 dd (2.8, 15.0) β : 2.57 m	36.8
9	5.26 ddd (3.2, 3.2, 3.2)	74.0	C-7	5.24 ddd (3.2, 3.2, 3.2)	73.7
10	4.59 d (3.3)	64.0	C-9, C-11, C-12, C-13	4.52 d (3.4)	63.0
11	---	43.5		---	43.4
12	1.03 s	20.1	C-6, C-10, C-11, C-13	1.05 s	20.1
13	1.07 s	24.3	C-6, C-10, C-11, C-12	1.09 s	24.2
14	a: 4.95 dd (1.6, 1.6) b: 4.76 s	115.7	C-6, C-7, C-8	a: 4.99 s b: 4.76 s	115.8
15	1.57 s	23.1	C-2, C-3, C-4	1.69 s	19.4
CH_3CO	---	170.2		---	170.1
CH_2CO	2.06 s	21.0		2.09 s	21.0

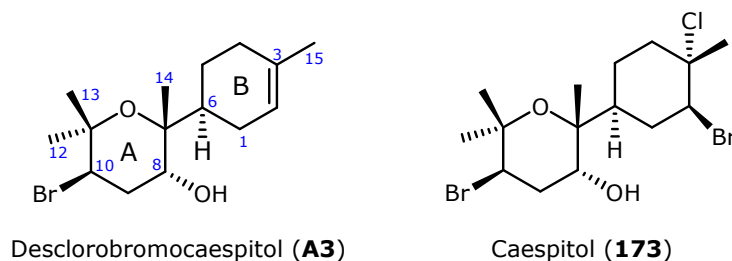
El acetildescloroelato (**A1**) y acetilelato (**A2**) tienen unos espectros de RMN de ^1H y ^{13}C similares. La diferencia esencial entre ambos productos radica en que el protón de la olefina *endo* de **A1** está sustituido por un átomo de cloro en **A2**. Esto lo ratifica el espectro EMAR del acetilelato (**A2**), así como la reacción de acetilación del elato (**87**) para producir un compuesto idéntico a **A2**.

Acetilelato (**A2**)Elato (**87**)Descloroelato (**108**)

La configuración absoluta de elatol (**87**) y descloroelatol (**108**) ha sido establecida para ambos productos como 6*R*, 9*S* y 10*R*, mediante estudios de difracción de rayos X.^{98,156} La rotación óptica del elatol (**87**) y del descloroelatol (**108**), aislados en este estudio, coincide con las establecidas en la literatura. Asumiendo que los productos **A1** y **A2**, han sido acetilados por *Aplysia dactylomela* a partir de elatol (**87**) y descloroelatol (**108**), la configuración absoluta de **A1** y **A2** es 6*R*, 9*S* y 10*R*.

2.2.1.2. Caracterización de **A3** y **A4**, compuestos con esqueleto bisaboleno.

Estructura de desclorobromocaespitol (A3**).** El compuesto se aisló como un sólido amorfo de color blanco. El espectro de masas muestra picos a *m/z* 316/318, con intensidades relativas para un átomo de bromo en una fórmula molecular, C₁₅H₂₅O₂Br, con tres grados de insaturación.



Los experimentos de RMN de ¹³C y DEPT confirman la presencia de quince átomos de carbono, con resonancias para: cuatro metilos, cuatro metilenos, cuatro metinos (uno olefínico y dos portando heteroátomo) y tres carbonos cuaternarios (uno olefínico). Se observaron las siguientes señales en RMN de ¹H: un protón olefínico a δ 5.32 (s); dos protones geminales a heteroátomo [δ 4.33 (dd, *J*= 4.1, 13.2 Hz), δ 3.52 (ddd, *J*= 3.6, 3.6, 6.2 Hz)]; un metino a δ 1.70 (s); ocho metilenos entre δ 2.03 y δ 1.19; cuatro grupos metilo [δ 1.62 (s), δ 1.40 (s), δ 1.32 (s), δ 1.13 (s)] y un protón a δ 1.84 (d, *J*= 6.4 Hz) intercambiable con D₂O. Puesto que la molécula tiene un doble enlace, ésta debe ser bicíclica.

¹⁵⁶ M. Wessels, G. M. König, A. D. Wright, *J. Nat. Prod.*, **2000**, *63*, 920-928.

Tabla 2.2.1.2.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC de desclorobromocaespitol (**A3**) y datos de RMN de ^1H y ^{13}C de desclorobromocaespitenona (**A4**) [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].

#.	Desclorobromocaespitol (A3)			A4	
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}
1	1.73 m 1.99 m	25.9	C-6	1.87 m 2.09 m	25.1
2	5.32 s	119.8	C-4, C-6, C-15	5.37 s	120.6
3	---	134.5		---	133.9
4	1.90 m 2.03 m	30.9		1.89 m 2.00 m	30.6
5	1.19 m 1.99 m	22.5		1.47 m 1.56 m	24.0
6	1.70 s	41.4		2.07 m	41.6
7	---	77.8		---	81.9
8	3.52 ddd (3.6, 3.6, 6.2)	71.4	C-10	---	199.9
9	α : 2.47 ddd (2.3, 13.6, 13.6) β : 2.26 ddd (4.1, 4.1, 13.9)	35.8	C-7, C-8, C-10, C-11	5.92 d (10.4)	122.8
10	4.33 dd (4.1, 13.2)	53.9	C-9, C-11, C-12, C-13	6.80 d (10.4)	154.7
11	---	75.3		---	71.2
12	1.32 s	31.2	C-10, C-11, C-13	1.36 s	30.0
13	1.40 s	24.3	C-10, C-11, C-12	1.41 s	29.7
14	1.13 s	19.2	C-6, C-7, C-8	1.30 s	23.4
15	1.62 s	23.4	C-2, C-3, C-4	1.62 s	23.4
OH	1.84 d (6.4)	---	C-7, C-8, C-9		

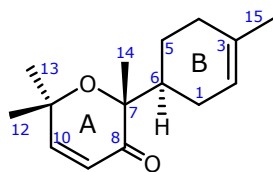
La información obtenida de los experimentos bidimensionales COSY, HSQC, HMBC y NOESY establece que **A3** contiene un anillo oxano que posee los mismos sustituyentes heteroátomos, regioquímica y configuración relativa que el anillo A del caespitol (**173**),¹⁵⁷ Tabla 2.2.1.2.1. Los dos grados de insaturación restantes corresponden a un doble enlace trisustituido y a un anillo de ciclohexano que lo contiene, lo que sugiere que **A3** no posee el sistema clorobromo característico del anillo B del caespitol (**173**). Por otro lado, se ha descrito que la deshalogenación del anillo B del caespitol (**173**) da lugar a un producto¹⁵⁷ cuya estructura plana coincide con la de **A3**. Sin embargo, los desplazamientos químicos de ^{13}C de este compuesto deshalogenado,¹⁵⁸ aunque son similares a los de **A3**, muestran diferencias en C-3 y C-15 ($\Delta\delta_{\text{C-3}} = 5.6$; $\Delta\delta_{\text{C-15}} = 10$ ppm). Si tenemos en cuenta que el anillo A de ambos compuestos, natural y sintético, son idénticos, y que no es probable que las diferencias se deban a un posible diastereómero en C-6, sospechamos que estos

¹⁵⁷ A. G. González, J. Darías, J. D. Martín, C. Pérez, *Tetrahedron Lett.*, **1974**, 1249-1250.

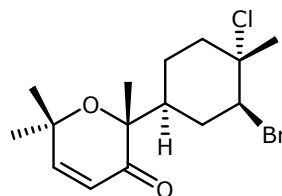
¹⁵⁸ A. G. González, J. D. Martín, V. S. Martín, M. Norte, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 2719-2722.

valores puedan ser erróneos o que no hayan sido asignados correctamente. Con el fin de corroborar este punto, el caespitol (**173**) fue deshalogenado por tratamiento con Zn/NaI en DMF a 115 °C, para obtener un producto idéntico a **A3**, lo que permitió asignar los datos espectroscópicos de **A3** de modo inequívoco, Tabla 2.2.1.2.1.

Estructura de desclorobromocaespitenona (A4). El compuesto se aisló como un aceite. Sus datos espectroscópicos junto con el pico del ión molecular a m/z 234.1665 [M]⁺ (EMAR) establece la fórmula molecular C₁₅H₂₂O₂ con cinco grados de insaturación. Los datos de RMN de ¹H y ¹³C son similares a los del compuesto conocido caespitenona (**175**),^{156,159} también aislado en este estudio. La principal diferencia radica en que **A4** no posee el sistema cloro-bromo característico del anillo B de la caespitenona, lo que está de acuerdo con el grado de insaturación deducido de la fórmula molecular. Por lo tanto, **A4** es el derivado deshalogenado de la caespitenona. Esto se demostró por oxidación y deshalogenación de **A3**, reacción de la que se obtuvo un producto cuyos espectros de RMN de ¹H y de ¹³C coinciden con los del producto natural **A4**.



Desclorobromocaespitenona (**A4**)



Caespitenona (**175**)

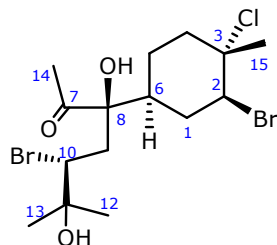
La rotación óptica del caespitol (**173**) aislado en este estudio, coincide con el citado en la literatura. Puesto que la configuración absoluta del caespitol es conocida,¹⁵⁹ su transformación en **A3** y **A4** permite asignar a **A3** la configuración absoluta 6*S*, 7*R*, 8*R*, 10*R*, y a **A4** la configuración absoluta 6*S*, 7*R*.

2.2.1.3. Caracterización del compuesto con estructura reagrupada **A5**.

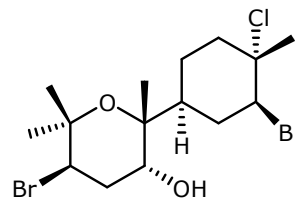
Estructura de aplysiadactydiol (A5). El compuesto **A5** es un aceite incoloro y sus datos espectroscópicos de RMN figuran en la Tabla 2.2.1.3.1. Su espectro de masas presenta picos a m/z 413/415/417/419, con intensidades relativas para un átomo de cloro y dos de bromo en una fórmula molecular C₁₄H₂₀O₂ClBr₂ [M-Me-H₂O]⁺

¹⁵⁹ M. Chang, J. T. Vázquez, K. Nakanishi, F. Cataldo, D. M. Estrada, J. Fernández, A. Gallardo, J. D. Martín, M. Norte, R. Pérez, M. L. Rodríguez, *Phytochemistry*, **1989**, 28, 1417-1424.

(EMAR). El espectro de IR muestra absorciones para grupos carbonilo e hidroxilo a 1722 y 3448 cm^{-1} , respectivamente.



Aplysiadactydiol (**A5**)



Caespitol (**173**)

Tabla 2.2.1.3.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC de aplysiadactydiol (**A5**) y datos de RMN de ^{13}C de **A5-a** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].

#.	Aplysiadactydiol (A5)			A5-a ¹⁵⁹
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{C}
1	1.80 m 1.98 m	35.7		35.7
2	4.27 dd (4.3, 12.8)	62.0	C-6	62.1
3	---	71.0		71.1
4	α : 2.06 m β : 2.45 ddd (3.4, 3.4, 13.7)	42.2	C-2, C-3, C-6	42.3
5	1.60 m 1.76 m	23.8		23.0
6	1.84 s	46.3		44.8
7	---	212.7		210.9
8	---	82.7		81.5
9	α : 2.55 dd (2.1, 15.6) β : 2.26 dd (9.5, 15.6)	39.4	C-8, C-10, C-11	35.5
10	3.67 dd (2.1, 9.5)	60.4	C-8, C-11	59.3
11	---	72.9		58.2
12	1.35 s	27.6	C-10, C-11, C-13	19.1
13	1.32 s	25.5	C-10, C-11, C-12	24.8
14	2.30 s	26.6	C-7	31.1
15	1.68 s	22.8	C-2, C-3, C-4	23.9
OH	3.85 s	---	C-6, C-7, C-8	

En los espectros de RMN de ^{13}C y experimentos DEPT, son significativas las siguientes resonancias: cuatro metilos, cuatro metilenos, tres metinos (dos portadores de bromo) y cuatro carbonos cuaternarios (uno de ellos una cetona). En el espectro de RMN de ^1H se aprecian señales para: dos protones geminales a halógeno a δ 3.67 (dd, $J= 2.1, 9.5$ Hz) y δ 4.27 (dd, $J= 4.3, 12.8$ Hz); ocho protones metileno entre δ 2.55 y

δ 1.60; un metino a 1.84 (s) y cuatro grupos metilo [δ 2.30 (s), δ 1.68 (s), δ 1.35 (s), δ 1.32 (s)]. Los datos de RMN y el grado de insaturación que indica la fórmula molecular, sugieren que **A5** debe poseer un esqueleto monocíclico.

La información obtenida de los experimentos COSY, HSQC y HMBC determina, sin ambigüedad, la presencia de un carbociclo de 6 miembros con sustituyentes halógenos que coinciden con los del anillo B del caespitol (**173**).¹⁵⁷ El resto de la molécula lo constituye una cadena carbonada muy funcionalizada. El grupo *gem*-dimetilo sobre el C-11 se deduce de las correlaciones HMBC mutuas de H₃-12 con C-13, de H₃-13 con C-12, y de H₃-12 y H₃-13 con C-10 y C-11. La correlación COSY de H-10 con el metileno H₂-9 sitúa la metil cetona carbinólica sobre C-8, estableciéndose así la estructura plana del sesquiterpeno irregular **A5**.

La constante de acoplamiento de H-2 ($J = 4.3, 12.8$ Hz), así como los desplazamientos químicos de C-2, C-3 y C-15 están de acuerdo con la regioquímica y con la configuración del sistema clorobromo vecinal en un anillo ciclohexánico, con una conformación silla análoga a la del caespitol (**173**), Tabla 2.2.1.3.1. El intenso efecto NOE existente entre H-2 y H-6 establece, de forma inequívoca, la disposición ecuatorial de la cadena lateral sobre el anillo, Figura 2.2.1.3.1.

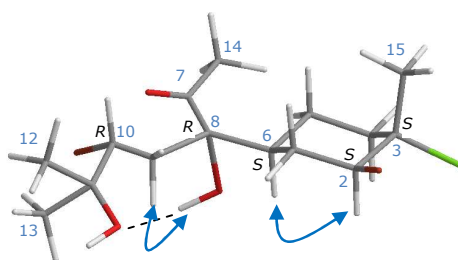


Figura 2.2.1.3.1. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para el compuesto aplysiadactydiol (**A5**).

La conformación de mínima energía de **A5**, deducida por cálculos de mecánica molecular, se muestra en la Figura 2.2.1.3.1. En este conformero se produce un enlace de hidrógeno intramolecular entre los grupos hidroxilo, lo que sitúa el protón del hidroxilo en C-8 y el protón *trans*-axial en C-9 a una distancia interatómica que justifica el NOE observado entre ellos. Por lo tanto, C-8 posee una configuración *R* que es compatible con el acoplamiento vecinal J^3 entre H₂-9/H-10 y con el efecto NOE observado. Además, este aspecto queda reforzado por comparación de los datos de RMN de **A5** con los respectivos del compuesto **A5-a**, obtenido por reagrupamiento espontáneo del laucopiranoide C (**179**), cuya configuración absoluta ha sido establecida por cristalografía de rayos X¹⁵⁹ (Figura 2.2.1.3.2). Mientras que los desplazamientos químicos de los carbonos del anillo de ciclohexano son casi idénticos

en ambos compuestos, se observan diferencias en los desplazamientos químicos de C-8 y de sus carbonos vecinos, debidas a la inversión de la configuración de este centro en **A5**. Los desplazamientos químicos de ^{13}C de **A5-a** figuran en la Tabla 2.2.1.3.1. La comparación de los datos espectroscópicos de **A5** y **A5-a** nos permite proponer para **A5** la configuración $2S, 3S, 6S, 8R, 10R$ representada en la Figura 2.2.1.3.1.

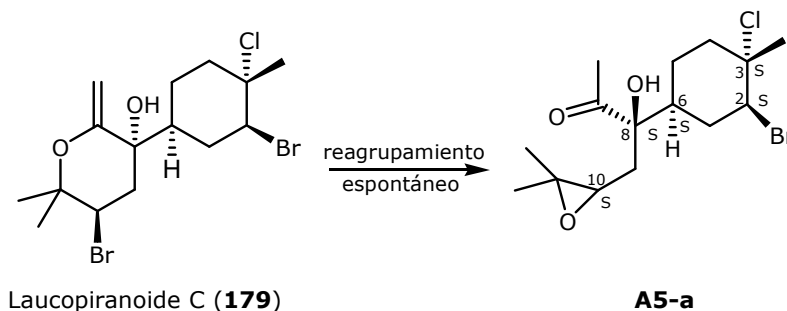
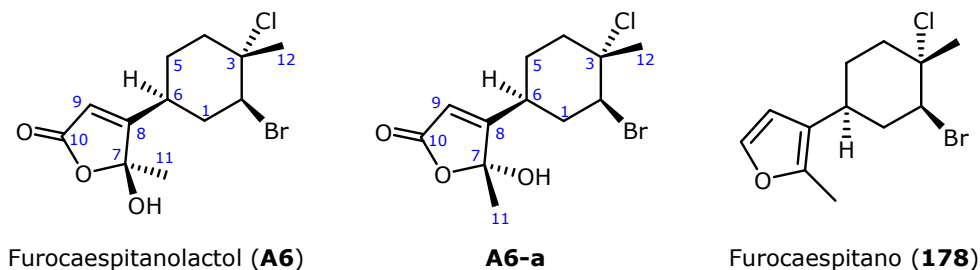


Figura 2.2.1.3.2. Reagrupamiento espontáneo de laucopiranoide C (**179**).

2.2.1.4. Caracterización del bisabolenol degradado **A6**.

Estructura de furocaespitanolactol (A6**).** El producto se aisló como un sólido blanco amorfo. Su espectro de masas de IE muestra picos a m/z 322/324/326, con intensidades relativas para un átomo de cloro y otro de bromo, correspondiente a la fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{ClBr}$ $[\text{M}]^+$ (EMAR).



Se ha descrito que la oxidación con ácido *m*-cloroperbenzoico del furocaespitano (**178**), un producto aislado previamente de *Laurencia caespitosa*,²⁷ condujo a una mezcla epimérica¹⁶⁰ en C-7 de las butenolidas **A6** y **A6-a**. En este estudio de *Laurencia majuscula*, los datos espectroscópicos de uno de los productos aislados coinciden con los de uno de los epímeros de la mezcla. A continuación describimos como logramos establecer la configuración de C-7 para cada epímero. En

¹⁶⁰ A. G. González, J. Darias, J. D. Martín, *Tetrahedron Lett.*, **1973**, 3625-3626.

la Figura 2.2.1.4.1 se muestran las estructuras de mínima energía calculadas para cada epímero.

Tabla 2.2.1.4.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC de furocaespitanolactol (**A6**) y datos RMN de de ^{13}C del derivado **A6-a** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].

#.	Furocaespitanolactol (A6)			A6-a
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{C}
1	2.00 m 2.00 m	39.8		39.7
2	4.38 dd (4.1, 12.4)	60.8	C-1, C-3, C-12	60.7
3	---	70.2		70.2
4	α : 2.16 ddd (3.9, 13.7, 13.7) β : 2.48 ddd (3.4, 3.4, 13.9)	42.2	C-3, C-5, C-6, C-12	41.9
5	1.50 m 1.50 m	28.8		28.6
6	2.53 dddd (3.2, 3.2, 12.0, 12.0)	36.9		36.8
7	---	106.8		106.8
8	---	170.4		170.4
9	5.80 s	116.4	C-6, C-7, C-8, C-10	116.3
10	---	172.6		172.6
11	1.71 s	24.1	C-7, C-10	23.9
12	1.75 s	24.1	C-2, C-3, C-4	23.9
OH	1.56 s	---		

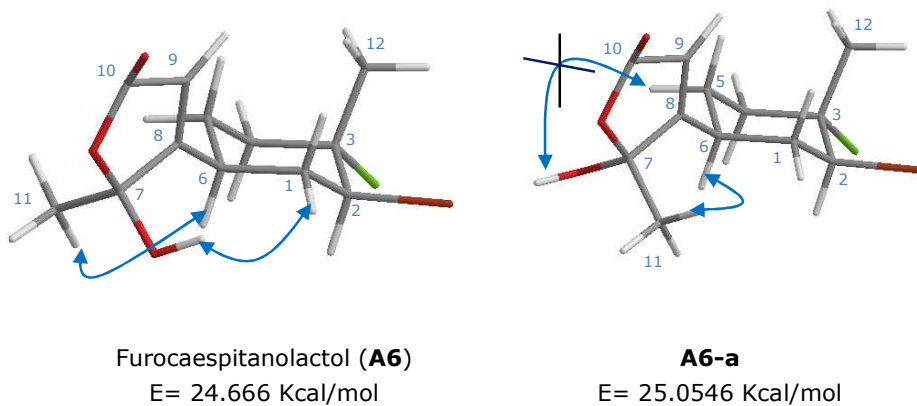


Figura 2.2.1.4.1. Estructuras de mínima energía y efectos NOE seleccionados para el compuesto furocaespitanolactol (**A6**) y (**A6-a**).

La disposición ortogonal de los anillos de lactona y de ciclohexano, coloca el grupo metilo de los carbinolos respectivos de cada epímero a una distancia similar de H-6, por lo que el efecto NOE que se observa entre el H₃-11 y H-6 no nos permite discriminar entre uno u otro epímero. La distancia interatómica entre el hidrógeno del grupo hidroxilo y el protón ecuatorial de H₂-1 de **A6**, calculada por el programa PC

Model,¹⁴⁵ es de 2.446 Å, mientras que para el epímero **A6-a** la distancia entre el hidrógeno del grupo hidroxilo y el H-5_{ec} es de 3.111 Å, lo que parece demasiado larga como para esperar un claro efecto NOE. Por tanto, el efecto NOE observado permitió determinar que el compuesto natural es el epímero que posee configuración *S* en C-7. Debido a que los centros quirales de **A6** son idénticos a los correspondientes del furocaespitano (**178**), la configuración de **A6** queda establecida como se indica en la Figura 2.2.1.4.1.

El furocaespitanolactol (**A6**) a temperatura ambiente isomeriza a **A6-a**, hasta que la mezcla alcanza un equilibrio 1:1, Figura 2.2.1.4.2, lo que nos permitió asignar los desplazamientos químicos RMN de ¹³C y de ¹H del producto natural **A6** y de **A6-a**, epímero en C-7 que se aísla por primera vez como producto natural.

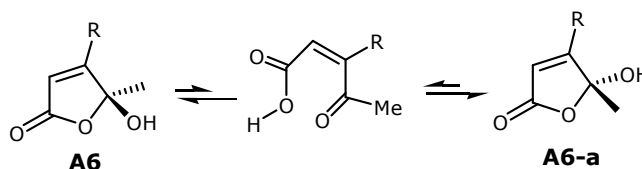
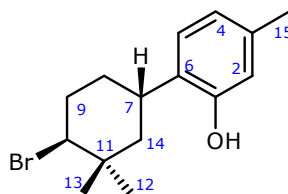


Figura 2.2.1.4.2. Reagrupamiento espontáneo de **A6** en **A6-a**.

2.2.1.5. Caracterización química de un compuesto con esqueleto ciclobisaboleno.

Estructura de A7. El compuesto **A7** se aisló como un aceite incoloro. Su espectro de masas de IE mostró picos a m/z 296/298, con intensidades relativas para un átomo de bromo en una fórmula molecular $C_{15}H_{21}OBr$ (EMAR, $[M]^+$ m/z 296.0774). Su espectro de IR muestra una banda de absorción a 3369 cm^{-1} para un grupo hidroxilo.



A7

El espectro de RMN de ¹³C exhibe señales para quince átomos de carbono, y los experimentos DEPT indicaron la presencia de tres metilos, tres metilenos, cinco metinos (tres olefínicos) y cuatro carbonos cuaternarios (tres olefínicos).

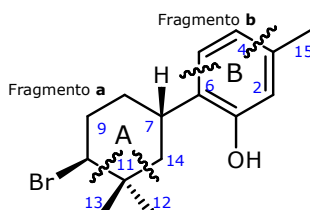
En el espectro de RMN de ¹H se observan señales para: tres protones aromáticos a δ 6.53 (s), δ 6.71 (d, $J = 7.8\text{ Hz}$) y δ 7.00 (d, $J = 7.8\text{ Hz}$); un protón

metino geminal a heteroátomo a δ 4.06 (dd, $J= 4.6, 12.2$ Hz); un protón intercambiable con D₂O; tres grupos metilo, uno de ellos sobre un anillo aromático a δ 2.25 (3H, s).

Tabla 2.2.1.5.1. Datos de RMN de ¹H, ¹³C y HMBC del compuesto **A7** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl₃].

#.	δ_H	δ_C	HMBC
1	---	153.0	
2	6.53 s	116.4	C-4, C-6, C-15
3	---	137.3	
4	6.71 d (7.8)	122.1	C-2, C-6, C-15
5	7.00 d (7.8)	126.9	C-1, C-3, C-7
6	---	129.1	
7	3.15 dddd (3.3, 3.3, 12.6, 12.6)	32.1	
8	1.51 m 1.85 m	34.3	
9	2.20 m 2.20 m	35.1	
10	4.06 dd (4.6, 12.2)	66.6	C-13
11	---	37.6	
12	1.08 s	32.1	C-10, C-11, C-13, C-14
13	1.17 s	20.8	C-10, C-11, C-12, C-14
14	1.50 m 1.80 m	46.9	C-11
15	2.25 s	21.1	C-2, C-3, C-4
OH	4.55 s	---	

Los experimentos COSY indican dos sistemas de spin: H-10–H₂-14 (fragmento **a**) y H-4–H-5 (fragmento **b**). Los experimentos de HSQC y HMBC confirman estos fragmentos y establecen su conectividad.



La correlación HMBC de los metilos Me-12 y Me-13 entre sí, confirma la presencia de un fragmento *gem*-dimetilo. La correlación de estos metilos con C-10 y C-14 permite unir el *gem*-dimetilo al sistema de spin que compone el fragmento **a** y establecer el anillo A. La correlación H₃-15/ C-3, C-2 y C-4 y las correlaciones de H-5 con C-1 y de H-4 con C-2 y C-6 definen el anillo aromático B. La unión de los dos anillos, a través del enlace C-6–C-7, se estableció por la correlación de H-5 con C-7. El

desplazamiento químico de C-1 (δ 153.0 ppm) indica que el grupo hidroxilo se encuentra sobre este carbono.

La configuración relativa de **A7**, Figura 2.2.1.5.1, se estableció por análisis de las constantes de acoplamiento y por experimentos NOESY. Las constantes de acoplamiento de H-7 ($J= 3.3, 3.3, 12.6, 12.6$ Hz) y las de H-10 ($J= 4.6, 12.2$ Hz) indican que ambos protones son axiales. Para que ésto sea posible en una conformación silla, el bromo y el anillo aromático deben ser ecuatoriales, y situados en distintos lados del plano del anillo, lo que está de acuerdo con los NOEs observados entre H-7 y H₃-12 y entre H-10 y H₃-13, Figura 2.2.1.5.1.

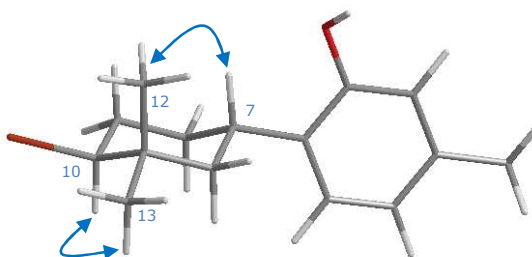
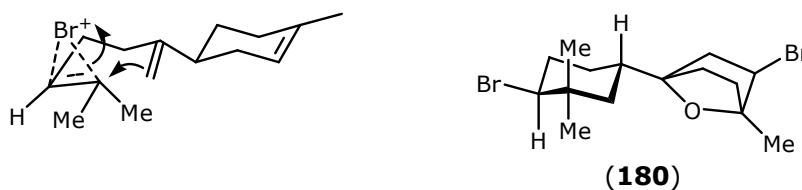


Figura 2.2.1.5.1. Efectos NOE seleccionados y estereoquímica relativa de **A7**.

A7 posee un esqueleto carbonado bicíclico, originado, probablemente, por la participación del doble enlace metilénico de un β -bisaboleno en la formación de un nuevo anillo, inducido por la apertura de un ion bromonio sobre la olefina terminal de la cadena lateral del bisaboleno. Hasta el momento sólo se ha encontrado en la naturaleza otro compuesto con este tipo de esqueleto, el sesquiterpeno dibromado (**180**) aislado de una *Laurencia obtusa*.^{161,162}



¹⁶¹ A. G. González, J. D. Martín, M. Norte, P. Rivera, J. Z. Ruano, *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 3443-3447.

¹⁶² A. G. González, J. D. Martín, M. Norte, R. Pérez, P. Rivera, J. Z. Ruano, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 4143-4146.

2.2.2. ESTUDIO QUÍMICO DEL MOLUSCO *Aplysia dactylomela* DE La Gomera.

De *Aplysia dactylomela* de la isla de La Gomera además, de siete productos chamigrenos (Figura 2.2.2.1), un nor-chamigreno (Figura 2.2.2.2) y seis derivados de bisaboleno conocidos (Figura 2.2.2.3), hemos caracterizado un producto representativo de esqueleto aplysiario, obtenido por primera vez en un organismo marino (Figura 2.2.2.4), dos nuevos derivados de chamigreno (Figura 2.2.2.5), también obtenidos de *Aplysia dactylomela* (La Palma), un derivado regular de bisaboleno (Figura 2.2.2.6), un derivado irregular de bisaboleno (Figura 2.2.2.7) y cuatro derivados degradados de bisaboleno (Figura 2.2.2.8), de los cuales el furocaespitanolactol (**A6**) y el aplysiadactydiol (**A5**) han sido descritos en el apartado 2.2.1. de *Aplysia dactylomela* (La Palma).

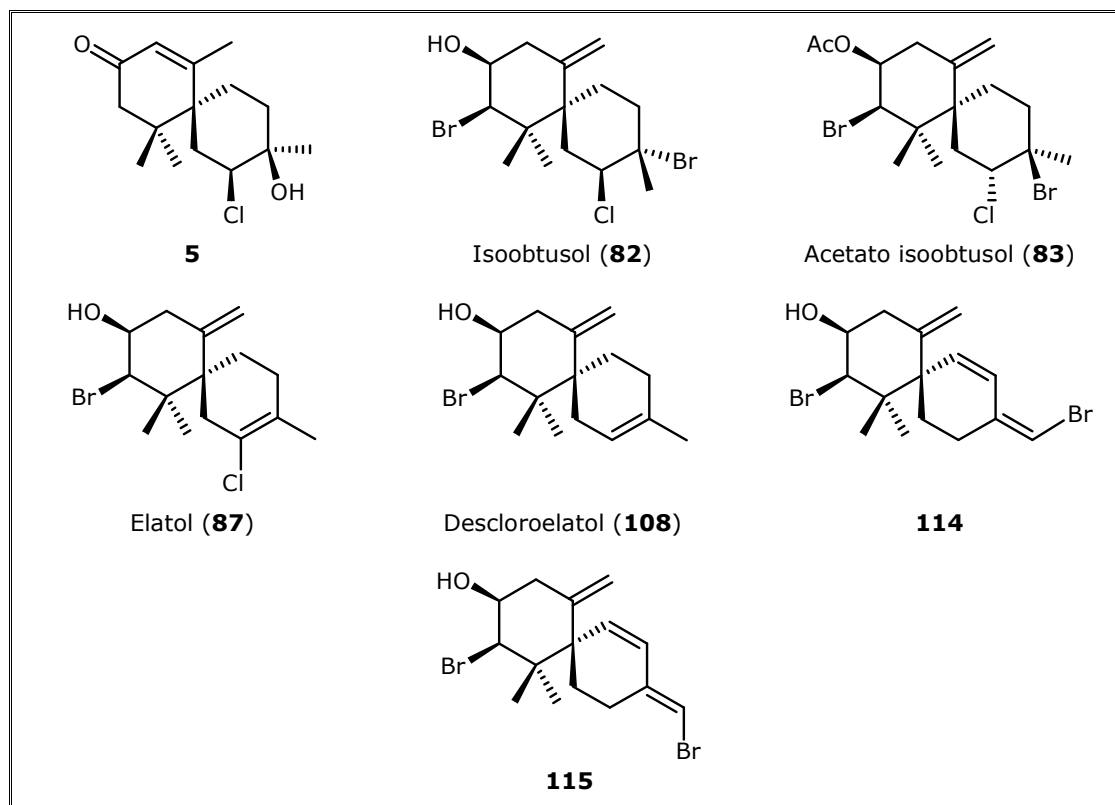


Figura 2.2.2.1. Productos conocidos con esqueletos tipo chamigreno aislados de *Aplysia dactylomela* de La Gomera.

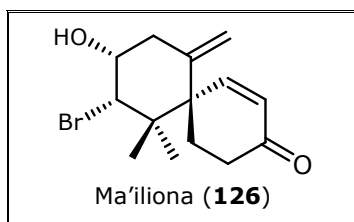


Figura 2.2.2.2. Producto conocido con esqueleto degradado aislado de *Aplysia dactylomela* de La Gomera.

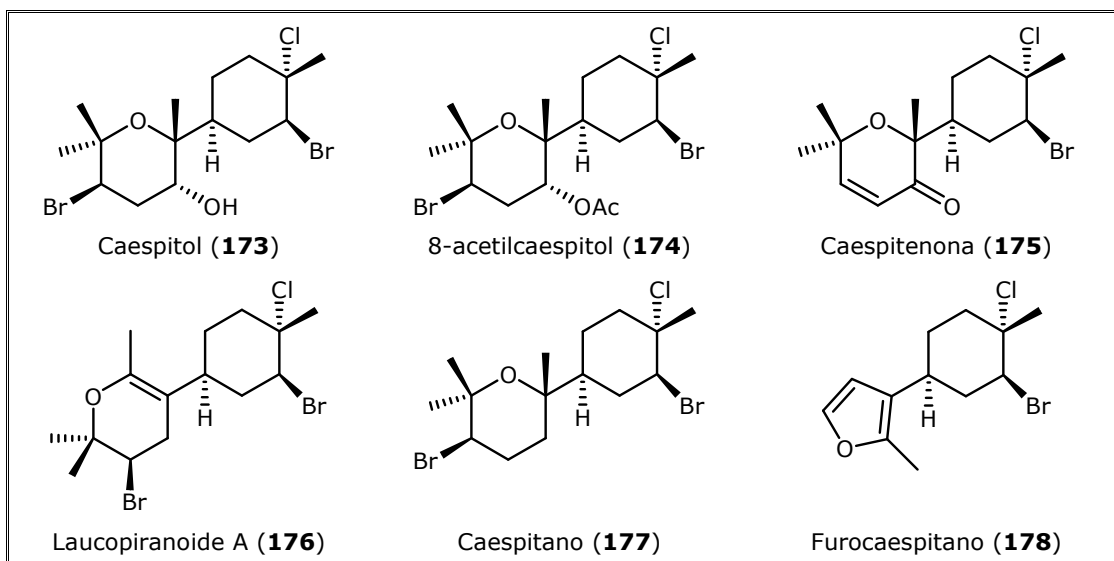


Figura 2.2.2.3. Productos conocidos con esqueletos tipo bisaboleno aislados de *Aplysia dactylomela* de La Gomera.

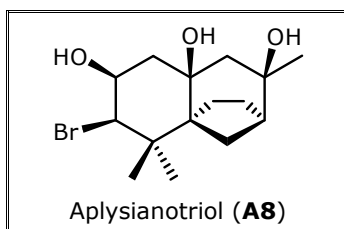


Figura 2.2.2.4. Producto nuevo con esqueleto aplysiario aislado de *Aplysia dactylomela* de La Gomera.



Figura 2.2.2.5. Productos nuevos con esqueleto tipo chamigreno aislados de *Aplysia dactylomela* de La Gomera.

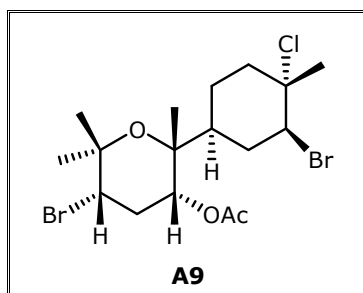


Figura 2.2.2.6. Producto nuevo con esqueleto tipo bisaboleno aislado de *Aplysia dactylomela* de La Gomera.

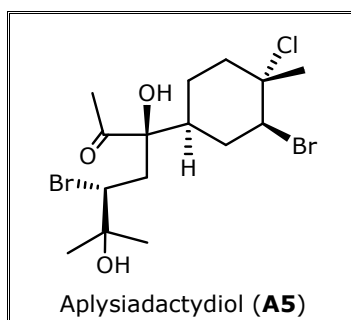


Figura 2.2.2.7. Producto nuevo con esqueleto reagrupado aislado de *Aplysia dactylomela* de La Gomera.

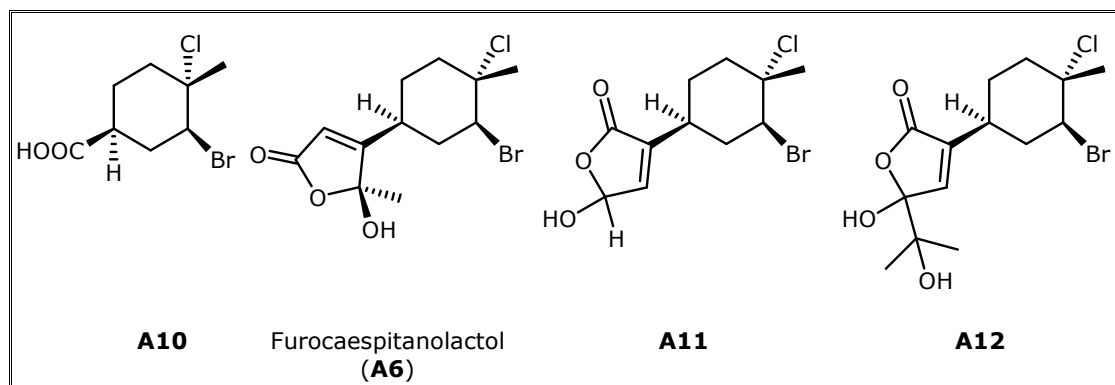
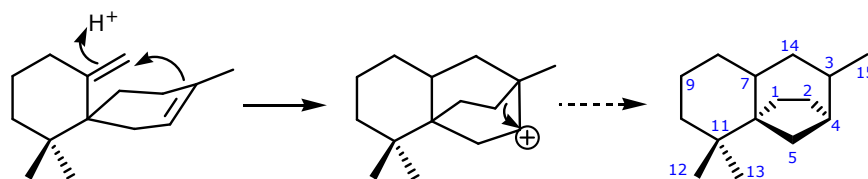


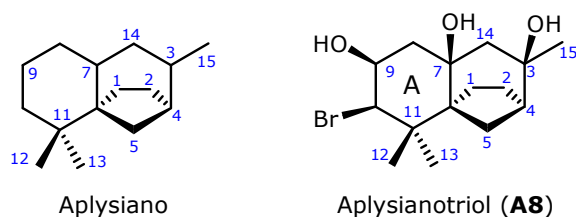
Figura 2.2.2.8. Productos nuevos con esqueleto degradado derivados de bisaboleno aislados de *Aplysia dactylomela* de La Gomera.

2.2.2.1. Caracterización del compuesto aplysianotriol.

Estructura de aplysianotriol (A8). El aplysianotriol (**A8**) posee una estructura tricíclica constituida por un biciclo [3.2.1]-octano fusionado a un anillo ciclohexano. El sistema tricíclico se origina a partir de un β -chamigreno por la formación de un nuevo enlace entre C-3 y C-14 seguido de contracción del anillo B.



El producto **A8** se aisló como un aceite incoloro. Su espectro de masas mostró picos a m/z 332/334 $[M]^+$ con intensidades relativas para un átomo de bromo en una fórmula molecular $C_{15}H_{25}O_3Br$ (EMAR, $[M]^+$ m/z 334.0978).



Los experimentos de RMN realizados en C_6D_6 de aplysianotriol (**A8**) evitan el solapamiento de las señales de los protones hidroxílicos. En el espectro de RMN de 1H , realizado en $CDCl_3$, las señales correspondientes se solapan. El espectro de RMN de ^{13}C , Tabla 2.2.2.1.1, muestra señales para quince átomos de carbono cuyas multiplicidades (DEPT) son las siguientes: tres grupos metilo, cinco grupos metileno, tres metinos (dos geminales a heteroátomo) y cuatro carbonos cuaternarios sp^3 (dos portadores de heteroátomo). En el espectro de RMN de 1H , Tabla 2.2.2.1.1, se observan señales para: dos protones geminales a heteroátomos a δ 3.72 (d, $J=2.7$ Hz) y δ 3.86 (m); tres protones intercambiables con D_2O , que indican la presencia de tres grupos hidroxilo; tres grupos metilo a δ 0.87 (s), δ 1.00 (s) y δ 1.43 (s) y once protones alifáticos entre δ 2.44 y δ 0.62.

De los datos espectroscópicos y de la fórmula molecular se deduce que la molécula es tricíclica, que posee tres grupos hidroxílicos y que un grupo metilo, de los cuatro esperados para un esqueleto sesquiterpénico, debe formar parte de un anillo.

Los experimentos 1H - 1H COSY permiten establecer con claridad dos sistemas de spin H_2 -1- H_2 -2- H -4 y H_2 -8- H -10. Otros sistemas de spin son inciertos debido al solapamiento de dos metilenos a δ 1.09 (m) y δ 1.36 (m). Los datos de HSQC y HMBC permitieron confirmar estos fragmentos y establecer la conectividad entre ellos. La correlación a tres enlaces de H_3 -12 y H_3 -13 con sus respectivos carbonos C-13 y C-12, y la correlación de ambos con C-10 y C-11 indican que dos grupos metilo se enlazan a C-11. Las correlaciones de H_2 -14 con C-8 y de H_3 -12, H_3 -13 y H_2 -14 con C-6 definen al anillo A. El carbono spiro C-6 se conecta con C-1 y C-5 por las correlaciones de C-7 con H_2 -1 [δ 0.62 (m)] y con H_2 -5 [δ 1.09 (m)] lo que, junto con las correlaciones H_3 -

15/C-3, C-4, C-14 y H-4/C-6, define las conectividades de los dos anillos de cinco y seis miembros restantes. La conectividad entre H-4 [δ 1.83 (m)] y H-2 [δ 1.36 (m)] la ratifica el experimento COSY. Finalmente, las correlaciones de las señales de los protones hidroxílicos a δ 3.02 (s); 4.34 (s) y 2.93 (d, 4.7) con C-3, C-7 y C-9, respectivamente, indican que el átomo de bromo está enlazado a C-10.

Tabla 2.2.2.1.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC de aplysianotriol (**A8**) [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, C_6D_6].

#.	δ_{H}	δ_{C}	HMBC
1	α : 0.62 m β : 1.36 m	27.7	C-5, C-6, C-7
2	1.09 m 1.36 m	27.4	
3	---	73.0	
4	1.83 m	46.9	C-6, C-14
5	endo: 2.44 d (10.2) exo: 1.09 m	31.1	C-1, C-7
6	---	54.6	
7	---	77.5	
8	α : 1.26 dd (3.5, 14.9) β : 1.66 dd (3.0, 14.9)	39.1	C-6, C-7, C-9
9	3.86 m	73.6	C-10
10	3.72 d (2.7)	71.6	C-11, C-12, C-13
11	---	40.6	
12	1.43 s	23.9	C-6, C-10, C-11, C-13
13	0.87 s	28.3	C-6, C-10, C-11, C-12
14	α : 0.94 d (14.4) β : 1.20 dd (1.9, 14.4)	46.2	C-3, C-4, C-6, C-7, C-8
15	1.00 s	27.4	C-3, C-14
3-OH	3.02 s	---	C-2, C-3, C-4
7-OH	4.34 s	---	C-7, C-8, C-14
9-OH	2.93 d (4.7)	---	C-8, C-9

La configuración relativa del aplysianotriol (**A8**) se asignó en base a los experimentos NOESY. Los claros NOEs observados entre H-10 y H-8 α , H-1 α y H₃-13 y entre H₃-12 con 9-OH y 7-OH fijan la configuración del anillo A e indican que los grupos hidroxilo en C-9 y C-7 están en el mismo plano de la molécula. Por otra parte, los NOEs observados entre H-5 α con H₃-12 y 3-OH establecen la configuración en C-3.

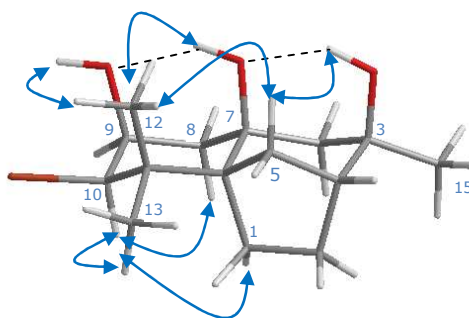
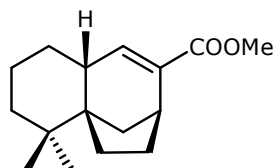


Figura 2.2.2.1.1. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para el compuesto aplysianotriol (**A8**).

Por estudios de mecánica molecular se obtuvo la estructura de mínima energía del aplysianotriol (**A8**), que muestra enlaces por puente de hidrógeno. Las distancias interatómicas medidas en el modelo satisfacen los NOEs observados experimentalmente, Figura 2.2.2.1.1.

Esta es la primera vez que, de fuentes marinas, se aísla un sesquiterpeno con este esqueleto. El éster metílico de omphalato (**181**), aislado de la planta terrestre *Omphalanthus filiformis*,¹⁶³ es el único precedente.

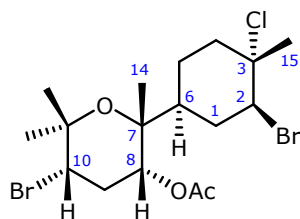


Éster metílico de omphalato (**181**)

2.2.2.2. Caracterización del compuesto derivado de bisaboleno.

Estructura de A9. El metabolito **A9** se aisló como un aceite incoloro. Su espectro de masas exhibe picos a m/z 473/475/477/479 $[M+1]^+$, con intensidades relativas para dos átomos de bromo y uno de cloro. El EMAR $[M+1]^+$ 477.0033 es coherente con la fórmula $[C_{17}H_{27}O_3ClBr_2+1]$. El espectro de IR da una señal a 1740 cm^{-1} para un grupo carbonilo.

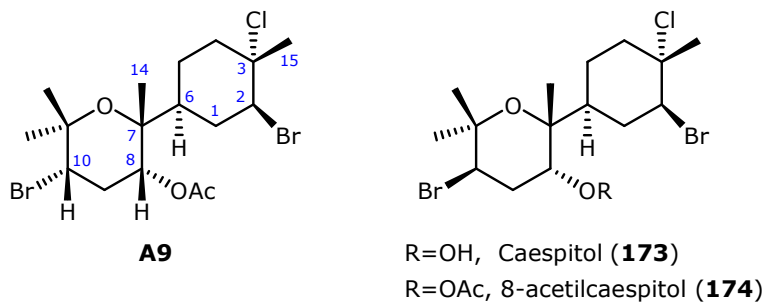
¹⁶³ M. Tori, K. Nakashima, Y. Asakawa, *Phytochemistry*, **1995**, *38*, 651-653.

**A9****Tabla 2.2.2.1.** Datos de RMN de ¹H, ¹³C, COSY y HMBC del compuesto **A9** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl₃].

#.	δ _H	δ _C	COSY	HMBC
1	α: 1.63 m β: 2.37 m	37.5		C-2, C-3, C-5, C-6, C-7
2	4.32 dd (4.3, 12.4)	63.2	H ₂ -1	C-3, C-15
3	---	71.4		
4	α: 2.05 m β: 2.43 ddd (3.2, 3.2, 13.4)	42.7		C-2, C-6
5	1.33 m 2.00 m	23.9		C-3, C-4
6	2.12 m	44.6		
7	---	75.4		
8	4.70 dd (4.2, 7.5)	73.5	H ₂ -9	C-10, CO
9	α: 2.39 m β: 2.52 ddd (4.4, 4.4, 14.6)	32.0		
10	4.08 dd (4.6, 8.8)	52.3	H ₂ -9	C-8, C-12
11	---	75.0		
12	1.35 s	30.2		C-7, C-10, C-11, C-13
13	1.43 s	27.0		C-7, C-10, C-11, C-12
14	1.12 s	22.4		C-6, C-7, C-8
15	1.69 s	24.2		C-2, C-3, C-4
CH ₃ COO	---	169.9		
CH ₃ COO	2.10 s	21.2		CO

El espectro RMN de ¹³C mostró 17 átomos de carbono con las asignaciones (DEPT) siguientes: cinco metilos (uno de un grupo acetilo), cuatro metilenos, cuatro metinos (dos geminales a halógeno y uno a oxígeno) y cuatro carbonos cuaternarios (un carbonilo). En el espectro de RMN de ¹H se observan señales para: dos protones geminales a halógeno, a δ 4.08 (dd, J= 4.6, 8.8 Hz) y δ 4.32 (dd, J= 4.3, 12.4 Hz); un protón geminal a oxígeno a δ 4.70 (dd, J= 4.2, 7.5 Hz); protones de CH₂ entre δ 1.63 y δ 2.52; tres metilos angulares a δ 1.12 (s), 1.35 (s) y 1.43 (s); un metilo geminal a halógeno a δ 1.69 (s) y un metilo de un grupo acetilo a δ 2.10 (s).

Los desplazamientos químicos de C-2 (δ 63.2 ppm) y C-3 (δ 71.4 ppm) indican que el átomo de bromo debe encontrarse en C-2 y el de cloro en C-3. Las constantes de acoplamiento de H-2 ($J= 4.3, 12.4$ Hz) junto con el desplazamiento químico de C-15 (δ 24.2 ppm) indican que **A9** posee un anillo carbocíclico con una sustitución y conformación de anillo idéntica a la del caespitol (**173**),^{157,164} en la que H-2 y Me-15 son axiales.

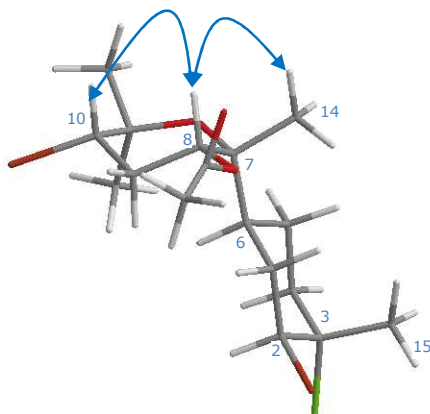


Los datos de RMN de ^1H y ^{13}C de **A9** son similares a los de 8-acetilcaespitol (**174**).^{157,164} La comparación de los datos de resonancia de protón, Tabla 2.2.2.2.2, muestra diferencias significativas en las constantes de acoplamiento de H-8 y H-10 de ambos productos. Los protones H-8 y H-10 en **A9** están en disposición *syn* axial en una conformación semisilla H-8 ($J=4.2, 7.5$ Hz) y H-10 ($J= 4.6, 8.8$ Hz), mientras que H-8 y H-10 en el 8-acetilcaespitol (**174**) están en disposición *anti* en una conformación silla, en la que H-8 ($J=2.4, 3.4$ Hz) es ecuatorial y H-10 axial ($J= 4.2, 12.9$ Hz). Por lo tanto, **A9** es un diastereoisómero del 8-acetilcaespitol (**174**). Los experimentos COSY, HSQC, HMBC y NOESY confirmaron la estructura y configuración relativa propuesta para **A9**. En la Figura 2.2.2.2.1 está representada la conformación de mínima energía calculada, y en ella se muestran los NOE significativos. Esta conformación está de acuerdo para los NOE y constantes de acoplamiento observados.

¹⁶⁴ K. H. Hollenbeak, F. J. Schmitz, M. B. Hossain, D. Van Der Helm, *Tetrahedron*, **1979**, *35*, 541-545.

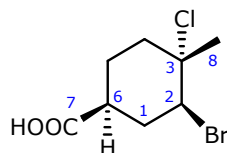
Tabla 2.2.2.2.2. Datos de RMN de ¹H y ¹³C de **A9** y de 8-acetilcaespitol (**174**) [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl₃].

#.	A9		8-acetilcaespitol (174)	
	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C
1	α: 1.63 m β: 2.37 m	37.5	1.59 m 1.82 m	36.3
2	4.32 dd (4.3, 12.4)	63.2	4.18 dd (3.9, 12.9)	62.7
3	---	71.4	---	71.5
4	α: 2.05 m β: 2.43 ddd (3.2, 3.2, 13.4)	42.7	2.00 ddd (3.4, 13.5, 13.5) 2.39 ddd (3.4, 3.4, 13.5)	42.9
5	1.33 m 2.00 m	23.9	1.21 m 1.88 m	23.9
6	2.12 m	44.6	1.81 m	46.2
7	---	75.4	---	75.9
8	4.70 dd (4.2, 7.5)	73.5	4.63 dd (2.4, 3.4)	72.9
9	α: 2.39 m β: 2.52 ddd (4.4, 4.4, 14.6)	32.0	2.28 ddd (4.2, 4.2, 14.8) 2.45 dd (2.4, 14.6)	32.8
10	4.08 dd (4.6, 8.8)	52.3	4.11 dd (4.2, 12.9)	52.5
11	---	75.0	---	75.6
12	1.35 s	30.2	1.32 s	30.9
13	1.43 s	27.0	1.38 s	22.8
14	1.12 s	22.4	1.18 s	20.1
15	1.69 s	24.2	1.65 s	24.1
CH ₃ COO	---	169.9	---	169.9
CH ₂ COO	2.10 s	21.2	2.14	21.1

**Figura 2.2.2.2.1.** Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para **A9**.

2.2.2.3. Caracterización de compuestos con estructuras químicas degradadas derivadas de bisaboleno.

Estructura de A10. El producto **A10** se aisló como un aceite incoloro. Su espectro de masas con picos a m/z 254/256/258 $[M]^+$, con intensidades relativas para un átomo de cloro y otro de bromo, que establece una fórmula molecular $C_8H_{12}O_2ClBr$ (EMAR 253.9709, calculado para $C_8H_{12}O_2^{35}Cl^{79}Br$, 253.9709). En el espectro de IR aparecen bandas de absorción para un grupo ácido en 3682 y 1710 cm^{-1} .



A10

El espectro de RMN de ^{13}C muestra señales para ocho átomos de carbono, con las multiplicidades (DEPT) siguientes: un metilo sobre carbono enlazado a halógeno, tres metilenos, dos grupos metino (uno geminal a halógeno) y dos carbonos cuaternarios (uno de ellos sp^3 y otro carboxílico).

En el espectro de RMN de 1H se observan resonancias para: un protón geminal a halógeno a δ 4.31 (dd, $J= 4.2, 11.7$ Hz); un metilo angular sobre carbono enlazado a halógeno a δ 1.72 (s) y seis protones entre δ 1.70 y δ 2.60.

Tabla 2.2.2.3.1. Datos de RMN de 1H , ^{13}C y HMBC del compuesto **A10** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, $CDCl_3$].

#.	δ_H	δ_C	COSY	HMBC
1	α : 2.60 dddd (1.8, 4.2, 4.2, 14.8) β : 2.15 ddd (12.2, 12.6, 12.6)	36.3	H-2, H-6	C-2, C-3, C-4, C-5, C-6
2	4.31 dd (4.2, 11.7)	60.2	H ₂ -1	C-1, C-3, C-4, C-6, C-8
3	---	70.6		
4	α : 2.44 ddd (4.0, 4.0, 13.9) β : 2.03 m	40.5	H ₂ -5	C-2, C-3, C-5, C-6, C-8
5	α : 1.70 m β : 1.98 m	25.1	H ₂ -4	
6	2.53 dddd (4.2, 4.2, 11.2, 11.2)	42.2	H ₂ -1	C-5, C-7
7	---	178.6		
8	1.72 s	25.0		C-2, C-3, C-4

El experimento 1H - 1H COSY indica un sistema de spin: H-2-H₂-1-H-6, H₂-4-H₂-5. Los experimentos HMBC sitúan un grupo carboxilo en C-6 y un metilo en C-3. Los desplazamientos químicos de C-2 (δ 60.2 ppm) y C-3 (δ 70.6 ppm) aseguran un cloro en C-3 y un bromo en C-2.

La configuración relativa se determinó en base a experimentos NOESY y a constantes de acoplamiento. Los valores J para H-2 y H-6 (Tabla 2.2.2.3.1) establecen que ambos protones son axiales, y los efectos NOE observados entre ellos aseguran la configuración de C-2 y C-6. El desplazamiento químico de C-8 indica que este metilo posee una configuración idéntica a la que posee el correspondiente metilo del anillo B del caespitol (**173**). Los NOEs observados de H₃-8 con H-1 β y H-4 β y de H-2 con H-1 α y H-4 α así lo confirman. Por lo tanto, **A10** es un derivado degradado del caespitol (**173**).¹⁵⁷

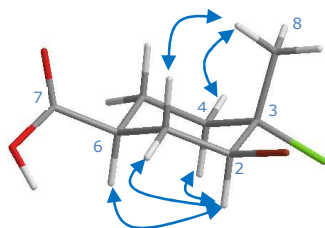
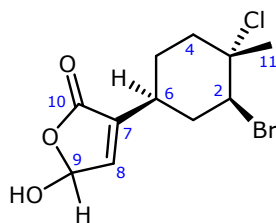


Figura 2.2.2.3.1. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para **A10**.

Estructura de A11. El producto **A11** se aisló como un aceite incoloro. En el espectro de IR aparecen señales a 3563, 1770 cm^{-1} correspondientes a un grupo hidroxilo y a un carbonilo. El espectro de masas muestra picos a m/z 308/310/312 consecuentes con la fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{ClBr}$ con cuatro grados de insaturación: $[\text{M}]^+$ (EMAR 309.9796, calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3^{35}\text{Cl}^{81}\text{Br}$ 309.9794).



A11

La combinación de datos de RMN de ^{13}C y experimentos DEPT indica que la molécula posee: un grupo metilo, tres metilenos, cuatro metinos y tres carbonos cuaternarios (un grupo carbonilo y otro olefínico). Las señales de RMN de ^1H son atribuibles a un protón olefínico [δ 6.84 ppm (s)], un protón geminal a grupo hidroxilo [δ 6.10 ppm (s)], un protón geminal a halógeno [δ 4.37 (dd, $J= 4.4, 12.4$ Hz)], un protón de grupo hidroxilo [δ 3.38 ppm (s)], seis protones de CH_2 [δ 1.50- δ 2.59 ppm] y un metilo angular a δ 1.72 ppm (s). La información obtenida de los experimentos de

RMN indica que la molécula posee un anillo sustituido idéntico al del anillo B del caespitol (**173**).

Los desplazamientos químicos de C-7 y C-8 (Tabla 2.2.2.3.2) son propios de carbonos olefínicos. Los desplazamientos químicos de C-10 (170.3 ppm) y C-9 (96.6 ppm), así como las correlaciones HMBC H-9/C-7 y C-10 indican que C-10 forma parte de un grupo éster de un lactol. La unión de los anillos carboxílico y lactónico se produce entre C-6-C-7, como se deduce de las correlaciones HMBC a dos y tres enlaces de los protones H₂-5 con C-6 y C-7 y del protón H-8 con el carbono C-6.

Tabla 2.2.2.3.2. Datos de RMN de ¹H, ¹³C, COSY y HMBC del compuesto **A11** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl₃].

#.	δ _H	δ _C	COSY	HMBC
1	α: 2.50 m β: 1.98 m	38.9	H-2, H-6	C-2, C-3, C-5, C-6, C-7
2	4.37 dd (4.4, 12.4)	61.0	H ₂ -1	C-1, C-3, C-11
3	---	70.5		
4	α: 2.14 ddd (4.0, 13.7, 13.7) β: 2.45 ddd (3.4, 3.4, 13.8)	42.0	H ₂ -5	C-2, C-3, C-5, C-6
5	α: 1.50 m β: 1.95 m	27.6	H ₂ -4, H-6	C-6, C-7
6	2.59 dddd (3.7, 3.7, 12.2, 12.2)	35.4	H ₂ -1, H ₂ -5	
7	---	139.7		
8	6.84 s	143.0	H-9	C-6, C-7, C-9, C-10
9	6.10 s	96.6	H-8	C-7, C-10
10	---	170.3		
11	1.72 s	24.1		C-2, C-3, C-4
OH	3.38 s			

Los datos despectroscópicos satisfacen las estructuras planas I y II. Sin embargo, el efecto NOE observado entre H-8 y H-9 discrimina a favor de I (**A11**).

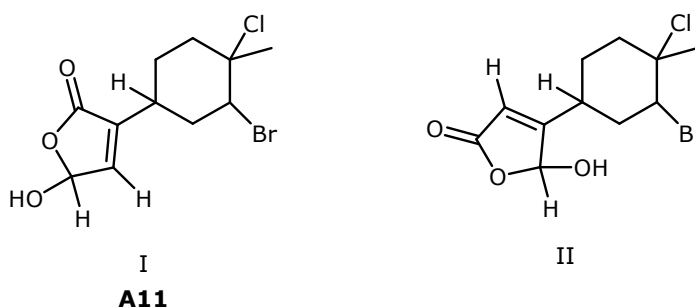


Figura 2.2.2.3.2. Posibles estructuras para **A11**.

La conformación de mínima energía calculada para **A11**, representada en la Figura 2.2.2.3.3, está de acuerdo con las constantes de acoplamiento y los NOEs observados. Sin embargo, estos datos no permiten establecer la configuración de C-9.

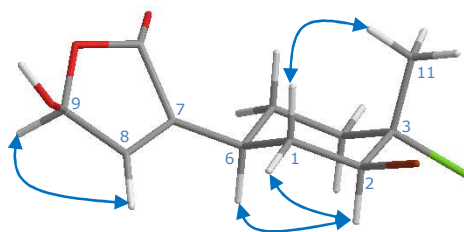
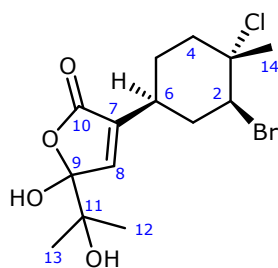


Figura 2.2.2.3.3. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para **A11**.

Estructura de A12. El producto se aisló como un aceite incoloro. El espectro de masas, con picos a m/z 366/368/370 $[M]^+$, satisface la fórmula molecular $C_{14}H_{20}O_4ClBr$, con cuatro grados de insaturación. El espectro de IR da señales para grupos hidroxilo (3054 cm^{-1}) y carbonilo (1769 cm^{-1}).



A12

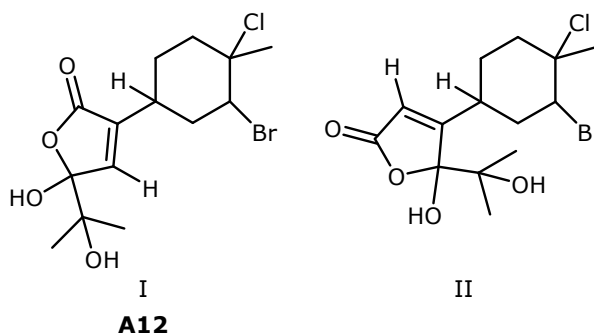
En el espectro de RMN de ^{13}C se observan señales para 14 átomos de carbono, cuyas multiplicidades, determinadas por experimentos DEPT, son: $3 \times CH_3$, $3 \times CH_2$, $3 \times CH$ (uno olefínico y otro con halógeno enlazado) y 5 cuaternarios (uno olefínico y un carbonilo). En el espectro de RMN de 1H destacan las siguientes señales: un protón olefínico en δ 6.80 ppm (dd, $J = 1.2, 5.1$ Hz), un protón geminal a halógeno en δ 4.38 ppm (dd, $J = 4.4, 12.4$ Hz), dos protones intercambiables con D_2O en δ 4.23 y en δ 4.27 ppm, seis protones metilénicos entre δ 1.50- δ 2.51 ppm y tres metilos angulares en δ 1.73 ppm (s), δ 1.30 ppm (s) y δ 1.24 ppm (s).

Tabla 2.2.2.3.3. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto **A12** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].

#.	δ_{H}	δ_{C}	COSY	HMBC
1	α : 2.51 m β : 1.95 m	39.0	H-2	C-2, C-6
2	4.38 dd (4.4, 12.4)	60.9	H ₂ -1	C-3
3	---	70.5		
4	α : 2.15 ddd (3.5, 3.5, 13.8) β : 2.48 ddd (3.3, 5.7, 13.9)	42.1	H ₂ -5	C-3, C-6
5	α : 2.00 m β : 1.50 m	27.7	H ₂ -4, H-6	C-3, C-4, C-6
6	2.60 m	35.7	H ₂ -1, H ₂ -5	
7	---	140.1		
8	6.80 dd (1.2, 5.1)	142.9		C-6, C-7, C-9, C-10
9	---	107.7		
10	---	170.4		
11	---	74.5		
12	1.24 s	24.2		C-9, C-11, C-13
13	1.30 d (3.9)	24.2		C-9, C-11, C-12
14	1.73 d (1.8)	24.2		C-2, C-3, C-4
9-OH	4.27 s			
11-OH	4.23 s			

La información obtenida de los experimentos de RMN indica que la molécula posee un anillo sustituido idéntico al anillo B del caespitol (**173**). La porción butenolida de la molécula se estableció por las correlaciones HMBC de H₃-12 y H₃-13 entre sí y con C-9 y C-11, y por las correlaciones del protón H-8 con los carbonos C-6, C-7, C-9 y C-10. Los desplazamientos químicos $\delta_{\text{C-9}}$ 107.7 ppm y $\delta_{\text{C-11}}$ 74.5 ppm sitúan grupos hidroxilo en las posiciones C-9 y C-11.

Los datos de RMN satisfacen las estructuras planas I y II. Sin embargo, el efecto NOE observado entre H-8 y H-13 discrimina a favor de I (**A12**), Figura 2.2.2.3.4.

**Figura 2.2.2.3.4.** Posibles estructuras para **A12**.

Los datos espectroscópicos no permitieron establecer la configuración absoluta de C-9.

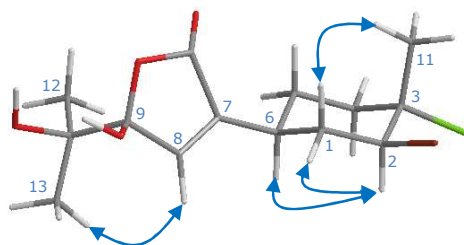


Figura 2.2.2.3.5. Estructura de mínima energía y efectos NOE seleccionados para **A12**.

2.3. POSIBLE BIOGÉNESIS DE ALGUNOS METABOLITOS DE *Laurencia* Y DE *Aplysia*.

El estudio de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas y de *Aplysia dactylomela*, recolectadas en La Palma y La Gomera, nos ha permitido aislar una gran variedad de sesquiterpenos, que incluyen productos derivados de chamigreno, de bisaboleno y otros productos derivados de nuevos esqueletos.

Revisando la literatura científica, durante la redacción de un manuscrito de productos de *Laurencia*, observamos algunos aspectos de interés en relación con plantas terrestres. Las algas del género *Laurencia*, las plantas terrestres inferiores Hepaticae de los géneros *Bazzania*, *Mannia*, *Myliia* y *Reboulia*, y las plantas superiores Cupressaceae de los géneros *Cupressus* y *Juniperus*, tienen en común la capacidad de biosintetizar sesquiterpenos policíclicos por ciclación interna de chamigreno. De este modo, de fuentes marinas se han identificado los esqueletos rhodolaurano,¹⁶⁵ aplydactano¹⁶⁶ y gomerano (Figura 2.3.1), mientras que de fuentes terrestres se han identificado los esqueletos myltaylano^{167a} y ciclomyltaylano^{167b,168} de Hepaticae, y los esqueletos junicedrano¹⁶⁹ y chamipinano¹⁷⁰ de Cupressaceae. Todos ellos tienen en común el esqueleto chamigreno como precursor.

A pesar de que el género *Laurencia* produce derivados α - y β -chamigreno, es interesante destacar que los tres tipos de esqueletos marinos, agrupados como Clase I en la Figura 2.3.1, proceden exclusivamente de la ciclación del metileno exocíclico de una estructura β -chamigreno y nunca de una estructura α -chamigreno. Por otro lado, los esqueletos de fuentes terrestres, agrupados como Clase II, provienen exclusivamente de un catión chamigrenilo,¹⁷¹ pero que, a diferencia de la Clase I, deja intacto el grupo metilo isoprénico central. Es decir, partiendo de un mismo esqueleto precursor, la ciclación sigue caminos distintos, como veremos más adelante.

¹⁶⁵ A. G. González, J. D. Martín, V. S. Martín, R. Pérez, B. Tagle, J. Clardy, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1985**, 260-261.

¹⁶⁶ S. N. Fedorov, O. S. Radchenko, L. K. Shubina, A. I. Kalinovsky, A. V. Gerasimenko, D. Y. Popov, V. A. Stonik, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 504-505.

¹⁶⁷ (a) D. Takota, A. Matsuo, J. Kuramoto, M. Nakayama, S. J. Hayashi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1985**, 482-483. (b) D. Takota, H. Tani, A. Matsuo, *J. Chem. Res., Synop.*, **1988**, 130-131

¹⁶⁸ Y. Asakawa, *Chemical constituents of the Bryophytes*. En *Progress in Chemistry of Organic Natural Products*; W. Herz, G. W. Kirby, R. E. Moore, W. Steglich, C. Tamm, Eds. Springer: Vienna, New York, NY, 1995; Vol. 65, pp 509-520.

¹⁶⁹ A. F. Barrero, E. Álvarez-Manzaneda, A. Lara, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 6347-6350.

¹⁷⁰ L. G. Cool, *Phytochemistry*, **2005**, *66*, 249-260.

¹⁷¹ A. Srikrishna, C. V. Yelamagad, P. P. Kumar, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1999**, 2877-2881.

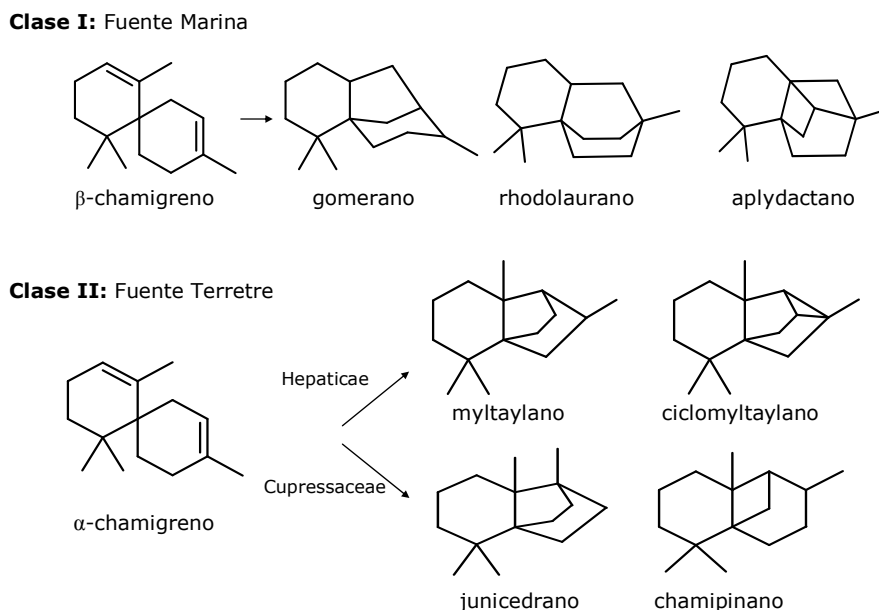


Figura 2.3.1. Clase I y II de esqueletos marinos y terrestres.

2.3.1. Posible biogénesis de los esqueletos de Clase I, gomerano y rhodolaurano, y de los esqueletos de Clase II.

Nuestra propuesta biogenética para los esqueletos gomerano y rhodolaurano se resume en la Figura 2.3.1. y se describe con detalle a continuación. Las sesquiterpeno-ciclasas son los catalizadores naturales más versátiles y comunes. Estas enzimas son responsables de la formación de más de 15 esqueletos carbonados diferentes en las algas rojas de la especie *Laurencia*.¹³⁹ Entre ellos, los chamigrenos son los más comunes con más de 120 metabolitos naturales. La mayoría de estos chamigrenos son derivados de α - y β -chamigrenos.⁴

Es bien conocido el mecanismo¹⁷² por el que algunas sesquiterpeno sintasas convierten el precursor acíclico farnesil difosfato (FPP) en (3*R*)-nerolidil difosfato para posteriormente ciclarlo al catión (*R*)-bisabolilo (**1***), que es el precursor de la mayoría de los sesquiterpenos, Figura 2.3.1.1. La halogenación de la olefina del anillo de (**1***),

¹⁷² (a) D. E. Cane, *Chem. Rev.*, **1990**, 90, 1089-1103. (b) D. E. Cane, *Acc. Chem. Rev.*, **1985**, 18, 220-226.

por acción de haloperoxidasas,¹⁷³ seguido de ciclación intramolecular C-11-C-7 de (**2***) y desplazamiento 1,4-hidruro produce el carbocatión dihalocuprenilo (**3***) que evoluciona a (**4***) por la migración del enlace C-11 hacia C-6 y pérdida de bromuro de hidrógeno. La desprotonación de (**4***) en C-14 da el 2-cloro-β-chamigreno (**5***) que es un intermedio que proponemos en la biogénesis de gomerano y rhodolaurano.

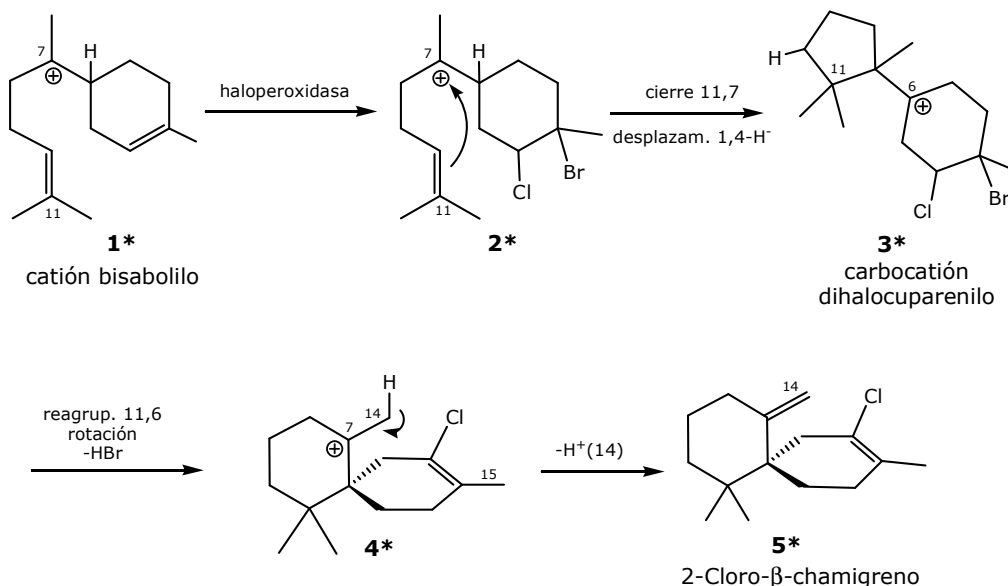


Figura 2.3.1.1. Ruta biogénica de formación de 2-cloro-β-chamigreno.

La biogénesis de los productos **L1**, **L2** y **L3**, representativos del esqueleto gomerano, y del producto rhodolauréol (**171**), representativo del esqueleto rhodolaurano, puede ocurrir vía el 2-cloro-β-chamigreno (**5***), un intermedio neutro que no se libera del centro activo de la enzima. La activación electrofílica de la olefina del anillo B de (**5***), Figura 2.3.1.2., induce a la participación del metileno exocíclico en la formación de nuevos anillos. Por la ruta **a**, se produce un enlace entre C-14 y C-2, lo que da lugar a la formación de un anillo de cinco eslabones y al esqueleto gomerano (**6***). Por la ruta **b**, se forma un anillo de seis eslabones, por establecimiento de un enlace entre C-14 y C-3, lo que origina un nuevo esqueleto rhodolaurano. Ambos son esqueletos marinos de Clase I.

¹⁷³ A. Butler, J. N. Carter-Franklin, *J. Nat. Prod. Rep.*, **2004**, *21*, 180-188.

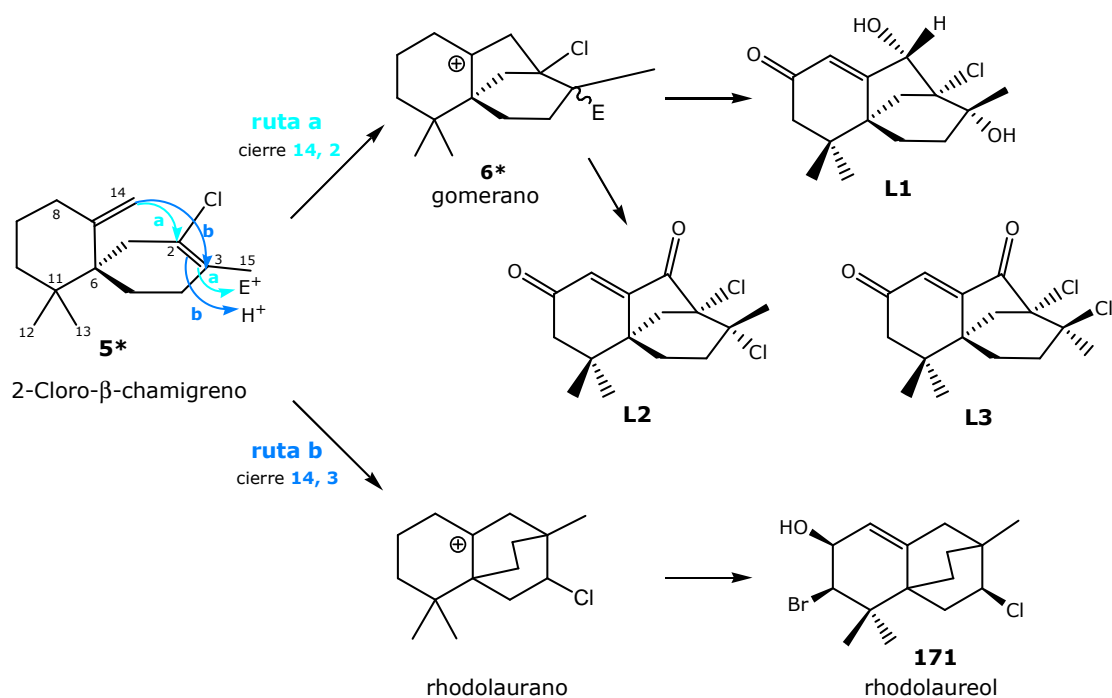


Figura 2.3.1.2. Posible ruta biogénica de **L1**, **L2**, **L3** y rhodolaureol (**171**).

La diversidad de esqueletos de Clase I y Clase II se originan por una vía química similar, pero la ciclación interna de (**5***) y (**7***) evoluciona en direcciones opuestas. El flujo de electrones en (**5***), representados por flechas en la Figura 2.3.1.2., sigue una dirección opuesta al flujo de electrones representados en (**7***), Figura 2.3.1.3. En ambos casos, el flujo de electrones está dirigido a favorecer la formación de un carbocatión terciario en C-7, desde el que se originan los esqueletos policíclicos marinos de la Clase I y los esqueletos policíclicos de la Clase II aislados de Cupressaceae y de Hepaticae, Figura 2.3.1.3.

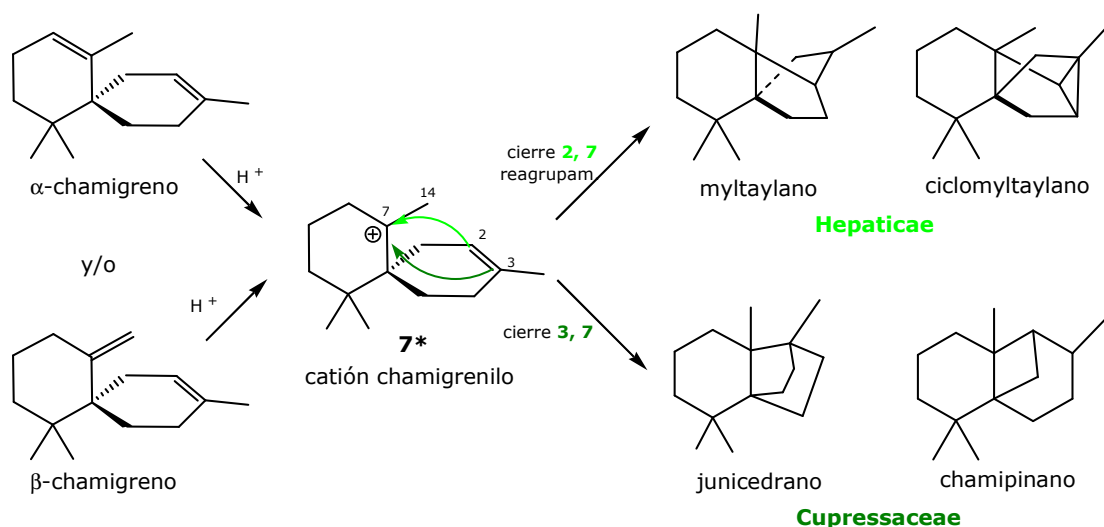


Figura 2.3.1.3. Ruta biogénica para esqueletos de Clase II.

Las características químicas de los metabolitos secundarios aislados de *Laurencia*, Hepaticae y Cupressaceae son muy similares. Es difícil saber la evolución de las plantas terrestres inferiores, debido especialmente a la ausencia de materiales fósiles de briofitas.¹⁶⁸ Sin embargo, teniendo en cuenta la hipótesis biogénica propuesta, y la disponibilidad creciente de secuencias genómicas completas de numerosas especies, se podrían resolver cuestiones sobre su evolución mediante el examen detallado de genes de rutas biosintéticas y su comparación con los de especies de plantas superiores mencionadas.

2.3.2. Posible biogénesis de productos degradados y de esqueleto irregular derivados de bisaboleno.

Como ya hemos comentado, el estudio de *Laurencia majuscula* y de *Aplysia dactylomela* ha proporcionado productos con esqueletos degradados y esqueletos reagrupados derivados de bisaboleno. Los criterios para proponer una ruta biogénica para estos productos pueden ser múltiples. Sin embargo, el aislamiento de *Aplysia dactylomela* del producto de biogénesis irregular aplysiadactydiol (**A5**), nos procuró la vía para discernir una biogénesis coherente para los productos de esqueletos reagrupados y degradados derivados de bisaboleno. La secuencia biogénica se representa en la Figura 2.3.2.1.

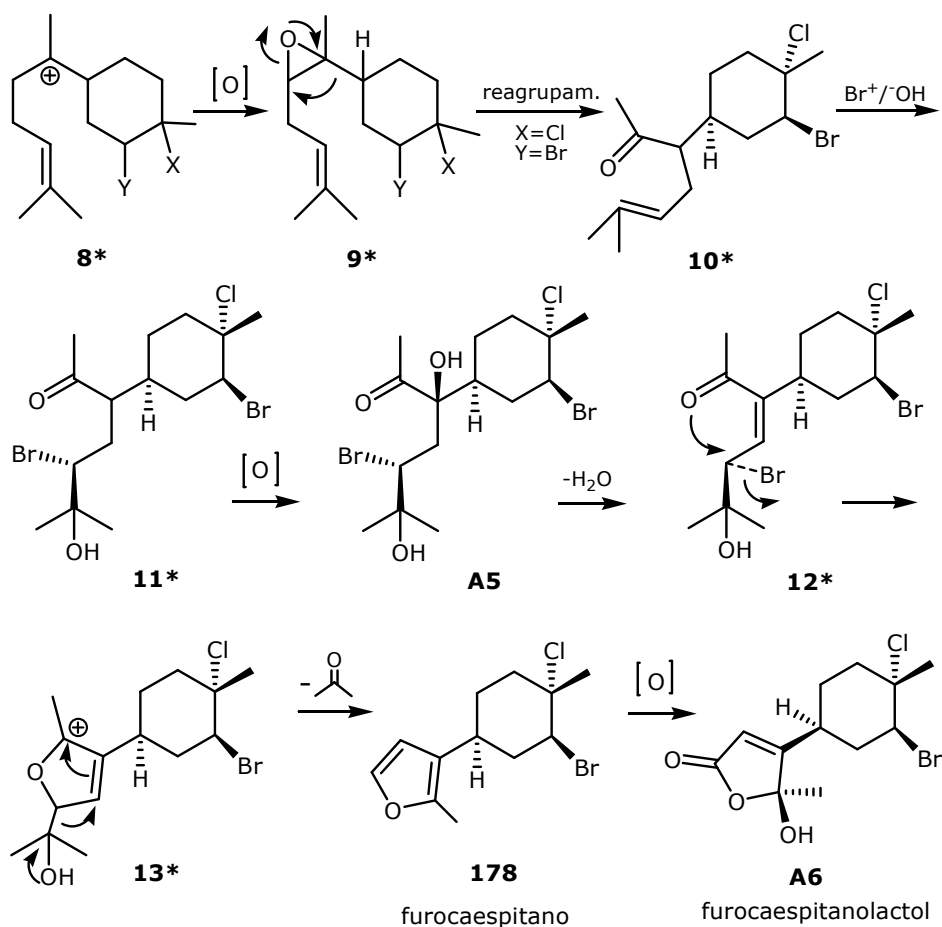
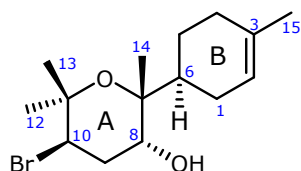
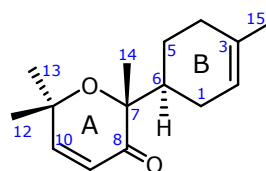


Figura 2.3.2.1. Ruta biogénica de **A5**, furocaespitano (**178**) y furocaespitanolactol (**A6**).

La estructura de **A5** sugirió que un epoxi-bisaboleno (**9***), derivado oxidado del catión bisabolilo (**8***), podría ser su precursor biogénico vía el producto de reagrupamiento (**10***). La oxidación de (**10***) daría lugar al esqueleto reagrupado del producto natural **A5**, a partir del cual se originaría furocaespitano (**178**) y furocaespitanolactol (**A6**), mediante la secuencia sintética indicada en la Figura 2.3.2.1. Por lo tanto, el epoxi-bisaboleno (**9***) parece ser el precursor clave de algunos metabolitos degradados y de biogénesis irregular de derivados de bisaboleno.

Hasta la fecha, todos los metabolitos derivados de bisaboleno, aislados de *Laurencia*, poseen un sistema cloro-bromo vecinal en su anillo carbocíclico. Sin embargo, el desclorobromocaespitol (**A3**) y la desclorobromocaespitenona (**A4**), encontrados por primera vez en *Aplysia dactylomela*, están desprovistos de este sistema de halógenos adyacentes, lo que sugiere que la *A. dactylomela* ha deshalogenado *de novo* a sus respectivos precursores caespitol (**173**) y caespitenona

(175). Suponemos que esta transformación química ha sido efectuada por el molusco para disminuir su toxicidad antes de almacenarlo en sus tejidos. Del mismo modo, el descloroelatol (**108**), encontrado de forma natural en *A. dactylomela*, es menos tóxico que su análogo clorado, elatol (**87**).¹⁷⁴ Esta capacidad biosintética de la *A. dactylomela*, de deshalogenar algunos metabolitos, complementa aquella en la que productos hidroxilados adquiridos de *Laurencia*, son acetilados por la *Aplysia* con el fin de destoxificarlos.¹⁷⁴

Desclorobromocaespitol (**A3**)Desclorobromocaespitenona (**A4**)

El producto **A6** contiene una unidad de butenolida. Esta unidad, que abunda en productos naturales producidos por organismos marinos y terrestres, independientemente de su origen isoprénico o policétido, posee funciones de inhibición enzimática.¹⁷⁵ Las plantas biosintetizan las lactonas para prevenir que sean ingeridas por depredadores y para evitar el asentamiento de las bacterias, mientras que algunos animales usan las lactonas para regular sus procesos biológicos.¹⁷⁵ Como la butenolida **A6** no se ha encontrado en algas, sugerimos que esta unidad ha sido sintetizada *de novo* por *A. dactylomela*, vía degradación de **A5**, Figura 2.3.2.1., como una habilidad añadida a la de acetilación y deshalogenación para mejorar su adaptación al medio.

¹⁷⁴ T. Dias, I. Brito, L. Moujir, N. Paiz, J. Darias, M. Cueto, *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68, 1677-1679.

¹⁷⁵ M. I. Konaklieva, B. J. Plotkin, *mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2005**, 5, 73-95.

2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Las algas rojas del género *Laurencia* producen metabolitos halogenados que interactúan con el ecosistema para prevenir posibles depredadores.^{176,177,178} Estas sustancias con frecuencia exhiben actividad antimicrobiana,^{141,179,180} antimalárica,¹⁸¹ insecticida,¹⁸² o citotóxica.¹⁸³

La variedad estructural de metabolitos que hemos obtenido del estudio químico de *L. majuscula* y *A. dactylomela*, nos ha impulsado a explorar su posible actividad biológica en los bioensayos siguientes:

- a. Citotoxicidad frente a tres líneas celulares: HeLa (carcinoma humano de útero), Hep-2 (carcinoma humano de laringe) y Vero (células de riñón de mono africano verde).
- b. Búsqueda de agentes estabilizadores y desestabilizadores de microtúbulos.
- c. Estudio de regeneración de células beta-pancreáticas.

2.4.1. Ensayos de citotoxicidad.

En este apartado describiremos la actividad biológica de seis metabolitos secundarios aislados en este estudio: elatol (**87**), caespitol (**173**), descloroelatol (**108**) y sus respectivos derivados acetilados, dos de los cuales han sido aislados por primera vez: acetilelatol (**A2**) y acetildescloroelatol (**A1**).

Los estudios de toxicidad del derivado hidroxilado y su acetato correspondiente, tuvo por finalidad comparar posibles diferencias en el grado de toxicidad entre ambos productos, datos que son de utilidad con relación a la posible destoxificación que practican las aplysias, con los productos procedentes de la dieta para almacenarlos en sus tejidos.

La citotoxicidad de cada par de metabolitos, alcohol/acetato, se evaluó frente a tres líneas celulares, dos tumorales: HeLa (carcinoma humano de útero) y Hep-2

¹⁷⁶ M. E. Hay, E. Duffy, W. Fenical, *Proceedings of the 6th international coral reef symposium*, **1988**, 3, 43-48.

¹⁷⁷ M.E. Hay, W. Fenical, K. Gustafson, *Chemical Ecology*, **1987**, 68, 1581-1591.

¹⁷⁸ I. Granado, P. Caballero, *Sci. Mar.*, **1995**, 59, 31-39.

¹⁷⁹ C.S. Vairappan, M. Suzuki, T. Abe, M. Masuda, *Phytochemistry*, **2001**, 58, 517-523.

¹⁸⁰ C. S.Vairappan, M. Suzuki, T. Ishii, T. Okino, T. Abe, M. Masuda, *Phytochemistry*, **2008**, 69, 2490-2494.

¹⁸¹ G. Topcu, Z. Aydogmus, S. Imre, A. C. Gören, J. M. Pezzuto, J. A. Clement, D. G. I. Kingston, *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66, 1505-1508.

¹⁸² D. Iliopoulou, C. Vagias, C. Harvala, V. Roussis, *Phytochemistry*, **2002**, 59, 111-116.

¹⁸³ C. Lhullier, M. Falkenberg, E. Ioannou, A. Quesada, P. Papazafiri, P. A. Horta, E. P. Schenkel, C. Vagias, V. Roussis, *J. Nat. Prod.*, **2010**, 73, 27-32.

(carcinoma humano de laringe) y otra no tumoral: Vero (células de riñón de mono africano verde). La preparación y uso de las placas de cultivo se describe con detalle en el procedimiento experimental, epígrafe 3.5.1. Cada producto se evaluó en un rango de concentraciones comprendido entre 20 µg/mL y 0.02 µg/mL, y se ensayaron frente a células no proliferantes y frente a células proliferantes.

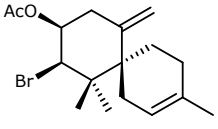
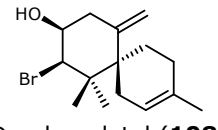
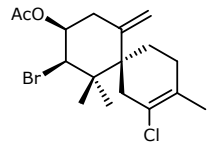
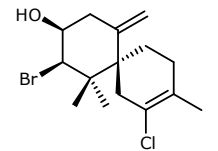
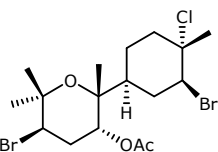
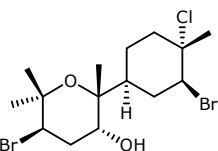
Los resultados de actividad citotóxica (Tabla 2.4.1.1) muestran que el elatol (**87**) es el compuesto más activo, en las condiciones de ensayo.

Es importante enfatizar que cuando las células han alcanzado la fase exponencial, la actividad del elatol (**87**) y del acetilelatol (**A2**) aumenta considerablemente sólo frente a HeLa (IC_{50} 1.3 y 13.7 µM, respectivamente). Por otro lado, el elatol presenta un comportamiento opuesto frente a células Vero.

El descloroelatol (**108**) y su acetilderivado (**A1**), son inactivos (IC_{50} >67 y >58 µM), lo que refleja la relevancia del átomo de cloro en la molécula para que exista actividad. El caespitol (**173**) es levemente activo. Los resultados demuestran que los acetilderivados son menos tóxicos que sus correspondientes alcoholes, lo que apoya la hipótesis de que las liebres de mar utilizan la acetilación como estrategia para almacenar metabolitos potencialmente tóxicos adquiridos a través de su dieta.

Los ensayos de citotoxicidad se efectuaron en colaboración con la Dra. Laila Moujir del Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna.

Tabla 2.4.1.1. Actividad citotóxica de sesquiterpenos frente a líneas celulares He-La, Hep-2 y Vero.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)					
	HeLa		Hep-2		Vero	
	Fase "lag"	Fase "log"	Fase "lag"	Fase "log"	Fase "lag"	Fase "log"
 Acetildescloroelatol (A1)	>58	>58	>58	>58	>58	>58
 Descloroelatol (108)	>67	>67	>67	>67	>67	>67
 Acetilelatol (A2)	50.3	13.7	28.0	22.4	>53	44.6
 Elatol (87)	4.1	1.3	2.4	2.0	2.3	25.0
 8-acetilcaespitol (174)	>42	>42	>42	>42	31.9	33.6
 Caespitol (173)	26.9	30.6	>46	>46	25.5	25.8
Actinomicina D ^a	0.011	0.01	0.191	0.006	0.071	0.001

^aActinomicina D, producto que actúa a nivel de la síntesis de ADN, se usó como control positivo.

2.4.2. Búsqueda de agentes estabilizadores y desestabilizadores de microtúbulos.

En este apartado describiremos la actividad biológica de 22 metabolitos secundarios aislados de los organismos estudiados.

La tubulina es una de las principales proteínas que componen los microtúbulos. Los microtúbulos son orgánulos estructurales que forman parte del citoesqueleto en todas las células nucleadas. Ensamblados a partir de subunidades proteicas, participan en la división, en el movimiento y en el mantenimiento de la morfología de la célula. Por este motivo, los microtúbulos se han convertido en importantes dianas para la terapia contra el cáncer. Diversos productos naturales se enlazan a la tubulina, o a los microtúbulos, en la transición metafase/anafase de la mitosis, actuando sobre el huso mitótico e inhibiendo la proliferación celular.¹⁸⁴ Los alcaloides de la Vinca: vinblastina, vincristina y vinorelbina, y los taxanos: paclitaxel y docetaxel, son productos naturales, o derivados del producto natural, de aplicación terapéutica en el tratamiento del cáncer. El éxito terapéutico del paclitaxel, desde 1986, ha validado la tubulina como una diana efectiva para la búsqueda de sustancias potencialmente anticancerosas. El paclitaxel, y otros taxanos, se diferencian de otros moduladores de la tubulina, por el sitio de interacción con la β -tubulina y por el efecto estabilizante de los microtúbulos. Los taxanos bloquean la despolimerización mientras que los alcaloides de la Vinca desestabilizan los microtúbulos y promueven la polimerización.¹⁸⁵

A pesar de su efectividad en el tratamiento de numerosos tumores, éstos compuestos no están exentos de efectos secundarios no deseables. Producen mielosupresión, son neurotóxicos, y muchos cánceres han desarrollado resistencia a estos fármacos. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevas sustancias químicas desestabilizadoras de los microtúbulos. Los organismos marinos han demostrado ser una potencial fuente de fármacos antimitóticos. Dolastatina-10, eleutherobina, laulimalida, sarcoditytinas A-D, discodermolida, y halichondrina B, son ejemplos de productos naturales aislados de invertebrados marinos que están actualmente en fase clínica como posibles fármacos antitumorales.¹⁸⁶

Con los productos caracterizados en esta Tesis se realizaron ensayos de actividad utilizando embriones del erizo de mar *Paracentrotus lividus* como diana para

¹⁸⁴ A. Jordan, J. A. Hadfield, N. J. Lawrence, A.T. McGowen, *Med. Res. Rev.*, **1998**, *18*, 259-296.

¹⁸⁵ E. Hamel, *Med. Res. Rev.*, **1996**, *16*, 207-231.

¹⁸⁶ T. F. Molinski, D. S. Dalisay, S. L. Lievens, J. P. Saludes, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2009**, *8*, 69-85.

el cribado¹⁸⁷ de sustancia desestabilizadoras de los microtúbulos. Aspectos como la facilidad de fertilización y cultivo, el rápido y sincronizado desarrollo del embrión, su transparencia óptica y una embriogénesis bien estudiada han contribuido a elegir este sistema. Además, es un ensayo que se caracteriza por ser rápido, versátil, reproducible y sencillo de realizar. Los análisis se efectuaron en Chemical Block Ltd., en Chipre, en colaboración con la Dra. Marina Semenova, perteneciente al Instituto de Biología del Desarrollo de la Academia Rusa de Ciencias. Los resultados obtenidos se resumen en las Tablas 2.4.2.1. y 2.4.2.2.

La mayoría de los compuestos evaluados no afectaron al desarrollo embrionario de *Paracentrotus lividus* con la excepción de elatol (**87**), obtusol (**81**) e isoobtusol (**82**) que mostraron una toxicidad moderada. Observando las estructuras de estos chamigrenos, y comparándolas con otros que no presentan actividad podemos deducir:

1. La presencia en el anillo A de un hidroxilo y un bromo en las posiciones 9 y 10 respectivamente y del doble enlace C-7-C-14 parece determinante en la actividad, mientras que el cambio en los sustituyentes en el anillo B no afecta a la actividad de los compuestos.
2. Por otra parte, es interesante destacar que ni el acetato de isoobtusol (**83**) ni el acetilelatol (**A2**) fueron activos. Este resultado concuerda con la hipótesis que la acetilación de estos compuestos reduce su toxicidad. Se ha propuesto que *Aplysia dactylomela* posee un mecanismo enzimático de acetilación de los productos que adquiere de su dieta. Estos resultados parecen apoyar esta hipótesis.^{154,155}

¹⁸⁷ M. N. Semenova, A. Kiselyov, V. V. Semenov, *BioTechniques*, **2006**, 40, 765-774.

Tabla 2.4.2.1. Toxicidad de sesquiterpenos derivados de chamigreno evaluados en el desarrollo embrionario de *Paracentrotus lividus*.

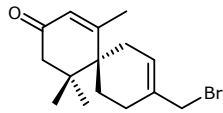
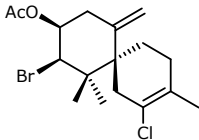
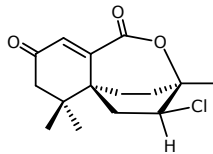
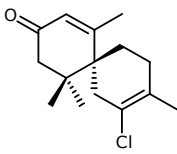
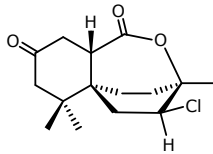
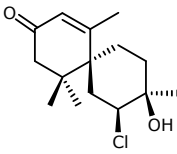
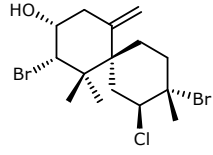
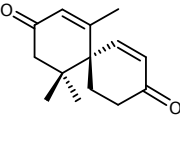
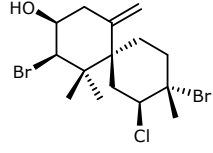
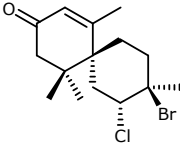
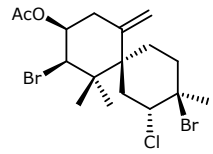
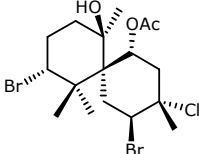
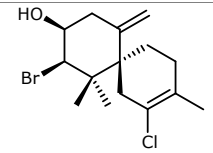
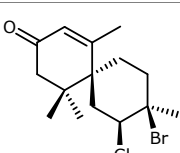
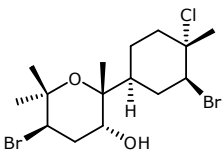
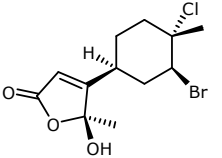
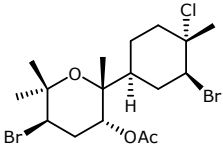
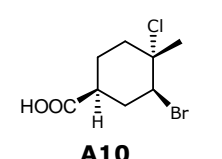
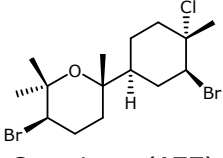
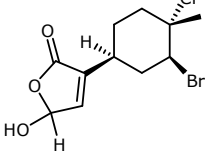
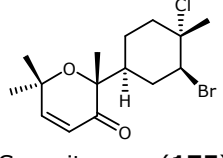
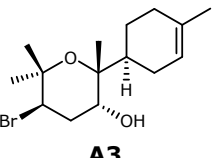
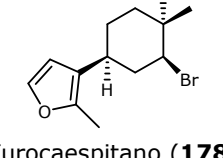
Compuesto	Concentración (μM)		Compuesto	Concentración (μM)	
	1 ^{er} T.	2 ^o T. ^a		1 ^{er} T.	2 ^o T. ^a
 L14	n/a	20	 Acetilelatol (A2)	n/a	n/a
 L7	n/a	n/a	 Laurencenona B (8)	n/a	n/a
 L8	n/a	n/a	 5	n/a	n/a
 Obtusol (81)	10	1	 Majusculona (69)	n/a	n/a
 Isoobtusol (82)	2	0.5	 Laurencenona A (6)	n/a	n/a
 Acetato de isoobtusol (83)	n/a	n/a	 Acetoxiintrinsicatol (25)	n/a	5
 Elatol (87)	1	0.1	 L16	n/a	n/a

Tabla 2.4.2.2. Toxicidad de sesquiterpenos derivados de bisaboleno evaluados en el desarrollo embrionario de *Paracentrotus lividus*.

Compuesto	Concentración (μM)		Compuesto	Concentración (μM)	
	1 ^{er} T.	2 ^o T. ^a		1 ^{er} T.	2 ^o T. ^a
 Caespitol (173)	<i>n/a</i>	5	 Furocaespitanolactol (A6)	<i>n/a</i>	<i>n/a</i>
 8-acetylcaespitol (174)	<i>n/a</i>	<i>n/a</i>	 A10	<i>n/a</i>	<i>n/a</i>
 Caespitano (177)	<i>n/a</i>	<i>n/a</i>	 A11	<i>n/a</i>	<i>n/a</i>
 Caespitenona (175)	<i>n/a</i>	5	 A3	<i>n/a</i>	<i>n/a</i>
 Furocaespitano (178)	<i>n/a</i>	<i>n/a</i>			

^aDespués de eclosionar; T: Tratamiento; *n/a*: sin actividad

2.4.3. Estudio de regeneración de células beta-pancreáticas.

Las células beta se encuentran en el páncreas y su función es la de sintetizar y segregar insulina. La diabetes mellitus se caracteriza por una pérdida funcional de la masa de células beta-pancreáticas. Una línea de investigación del grupo de la Dra. Irene Cózar Castellano, perteneciente a la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Puerta del Mar en Cádiz, es la regeneración de células beta-pancreáticas

mediante la inducción de su proliferación utilizando moléculas de pequeño tamaño, lo que podría ser útil para el tratamiento de la diabetes.

En colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Cózar Castellano, se analizó la actividad proliferativa de 22 sesquiterpenos de tipo chamigreno y bisabolenos aislados en esta Tesis Doctoral (los mismos empleados en la búsqueda de agentes estabilizadores y desestabilizadores de microtúbulos). Los productos naturales se ensayaron a concentraciones de 0.1, 1.0 y 10.0 μM .

Los productos naturales que han dado un resultado preliminar positivo de actividad proliferativa de células beta-pancreáticas son **A10** y **A11**. Puesto que los sustituyentes, regioquímica, configuración y anillo carbocíclico es la misma en los productos **A10**, **A11** y **A6**, y sólo **A10** y **A11** son activos, se deduce que la posición del grupo carbonilo, con relación al anillo carbocíclico, debe estar a uno (carbonilo del grupo ácido), o máximo dos enlaces (carbonilo del anillo butenolido), del carbono que lo enlaza al anillo. Esta observación puede ser de ayuda para el diseño de butenolidas favorecedoras de la proliferación de células beta-pancreáticas.

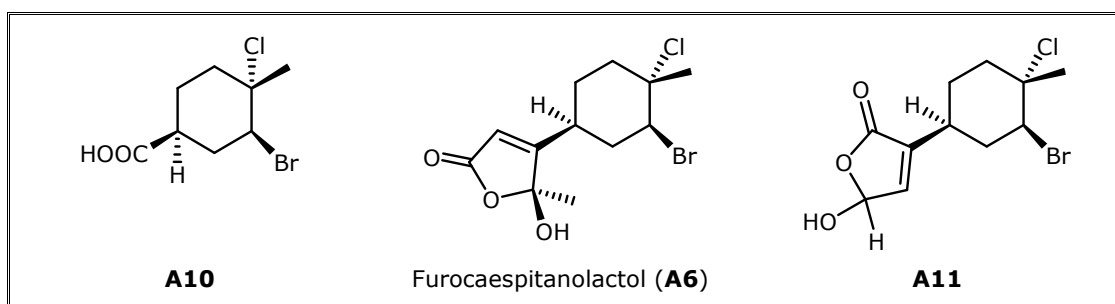


Figura 2.4.1.1. Metabolitos de *A. dactylomela* con actividad proliferativa de células beta-pancreáticas.

2.5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS DE *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas Y *Aplysia dactylomela*.

Los estudios químicos realizados hasta la fecha indican que los productos aislados de moluscos de género *Aplysia* proceden de su dieta, con las excepciones antes mencionadas. De la comparación del contenido metabólico de *L. majuscula* y de *A. dactylomela*, se observa que el alga biosintetiza productos derivados de chamigreno, mientras que los sesquiterpenos acumulados por las aplysias son mayoritariamente de tipo bisaboleno.

La *L. majuscula* y *A. dactylomela*, recolectadas para este estudio, coexisten en un nicho ecológico reducido, y las diferencias estructurales en el contenido de metabolitos de ambas especies sugiere que la *A. dactylomela*, recolectada en Valle Gran Rey (La Gomera), prefiere la ingesta de otras especies de *Laurencia*, ricas en metabolitos derivados de bisaboleno, más que la ingesta de *L. majuscula*. De hecho, parece que el molusco ha alcanzado un cierto grado de refinamiento metabólico, que le permite realizar, con los derivados de bisaboleno, procesos biosintéticos de deshalogenación y de degradación para producir metabolitos que no se encuentran en el alga ingerida. Esta especialización de *A. dactylomela* de Valle Gran Rey, por una dieta selectiva de especies de *Laurencia* rica en metabolitos bisabolénicos, para una posterior transformación en otras sustancias, generalmente menos tóxica, sugiere una mejora evolutiva en su capacidad de adaptación al medio.

Tabla 2.5.1. Comparativa de sesquiterpenos derivados de chamigreno aislados de los organismos:

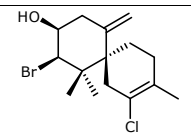
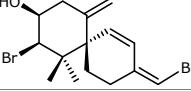
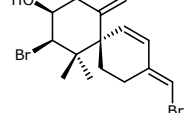
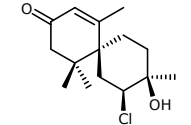
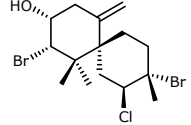
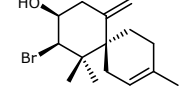
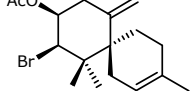
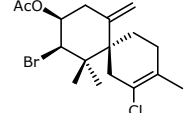
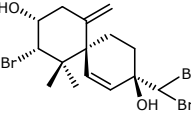
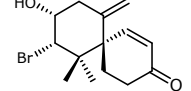
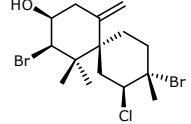
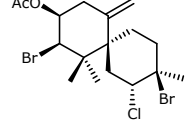
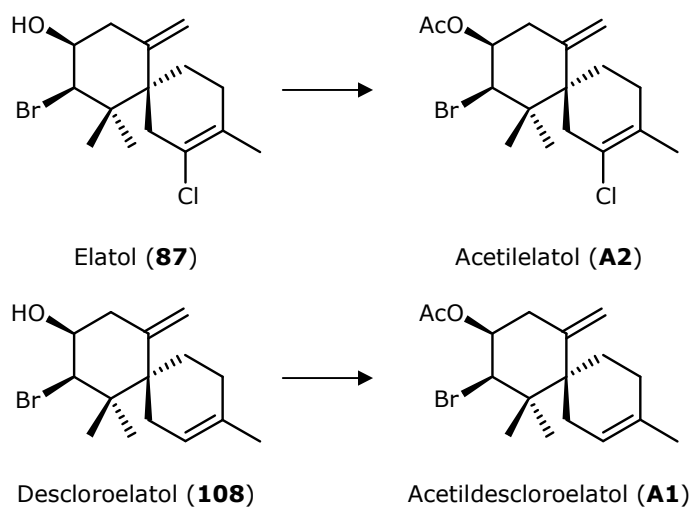
<i>L. majuscula</i> (Gomera)	<i>A. dactylomela</i> (Gomera)	<i>A. dactylomela</i> (Palma)	Estructura
Elatol (87)	Elatol (87)	Elatol (87)	
114	114	114	
115	115	115	
5	5	---	
Obtusol (81)	---	Obtusol (81)	
---	Descloroelatol (108)	Descloroelatol (108)	
---	Acetildescloroelatol (A1)	Acetildescloroelatol (A1)	
---	Acetilelatol (A2)	Acetilelatol (A2)	
Ma'iliohydrina (122)	---	---	
---	Ma'iliona (126)	---	
---	Isoobtusol (82)	---	
---	Acetato de isoobtusol (83)	---	

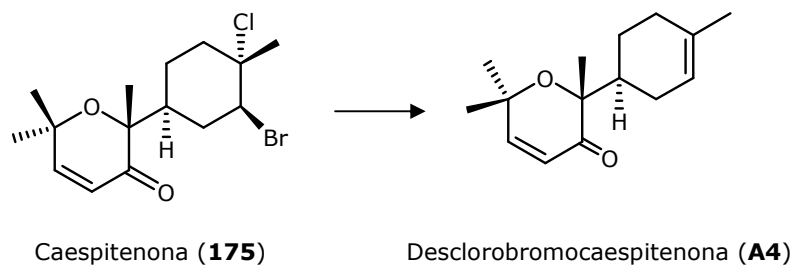
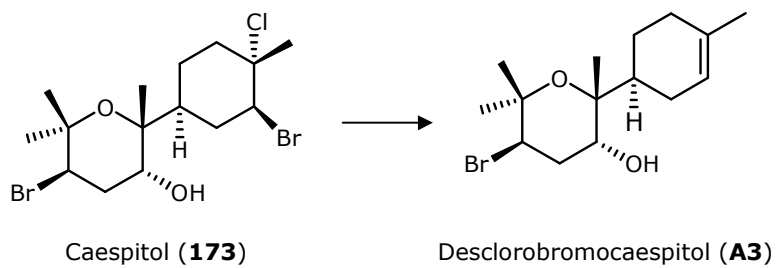
Tabla 2.5.1. Comparativa de sesquiterpenos derivados de bisaboleno aislados de los organismos:

<i>A. dactylomela</i> (Gomera)	<i>A. dactylomela</i> (Palma)	Estructura
Caespitol (173)	Caespitol (173)	
8-acetilcaespitol (174)	8-acetilcaespitol (174)	
Caespitenona (175)	Caespitenona (175)	
Laucapyrenoide A (176)	Laucapyrenoide A (176)	
Caespitano (177)	Caespitano (177)	
Furocaespitano (178)	Furocaespitano (178)	
Aplysiadactydiol (A5)	Aplysiadactydiol (A5)	
Furocaespitanolactol (A6)	Furocaespitanolactol (A6)	
---	Desclorobromocaespitol (A3)	
---	Desclorobromocaespitenona (A4)	

Los extractos obtenidos del aparato digestivo de *A. dactylomela* de La Gomera y de *A. dactylomela* de La Palma contienen, entre otros productos, elatol (**87**) y descloroelatol (**108**) y, por primera vez, se aíslan sus derivados acetilados, lo que sugiere que la *Aplysia* es la responsable de la acetilación del elatol (**87**) y descloroelatol (**108**). Los derivados acetilados exhiben unos índices de toxicidad menores que los compuestos hidroxilados, lo que ratifica que la acetilación es una estrategia de destoxificación para almacenar determinados metabolitos que proceden de la dieta.



Las transformaciones químicas que produce la *Aplysia* con los productos derivados de bisaboleno son más acusadas que con los productos derivados de chamigreno. Por ejemplo, parece más complejo, en relación con la acetilación, el proceso de deshalogenar el caespitol (**173**) y caespitenona (**175**), para convertirlos en desclorobromocaespitol (**A3**) y desclorobromocaespitenona (**A4**), respectivamente. Estos productos se obtuvieron tanto del manto como del aparato digestivo de especímenes de *A. dactylomela* de La Palma, por lo que suponemos que esta habilidad de la *Aplysia* para la deshalogenación tiene como finalidad disminuir la toxicidad de los productos para su posterior almacenamiento.



2.6. ESTUDIO QUÍMICO DEL OCTOCORAL *Pterogorgia* sp.

Los corales del género *Pterogorgia* (clase Anthozoa, orden Alcyonacea, familia Gorgoniidae y género *Pterogorgia*) son comunes en los arrecifes de coral del Caribe.¹⁸⁸ Son corales blandos que habitan en aguas poco profundas, pobres en nutrientes, entre -7 y -15 m. A pesar de que su tejido blando podría constituir una potencial fuente de alimento para posibles depredadores, se ven relativamente inalterados, por lo que se supone que estos invertebrados producen algunas sustancias con propiedades antialimentarias,¹⁸⁹ y sustancias de defensa química.

La búsqueda de productos naturales marinos de especies bentónicas a ambos lados del Istmo de Panamá,¹⁹⁰ nos ha conducido al estudio del octocoral del Caribe *Pterogorgia* sp. De su estudio químico hemos aislado cinco nuevas sustancias lipídicas **P1**, **P2**, **P3**, **P4** y **P5**, además de los productos conocidos hidroxiancepsenolido (**143**),¹³⁴ homoancepsenolido (**146**)¹³⁶ y (**153**).¹³⁵

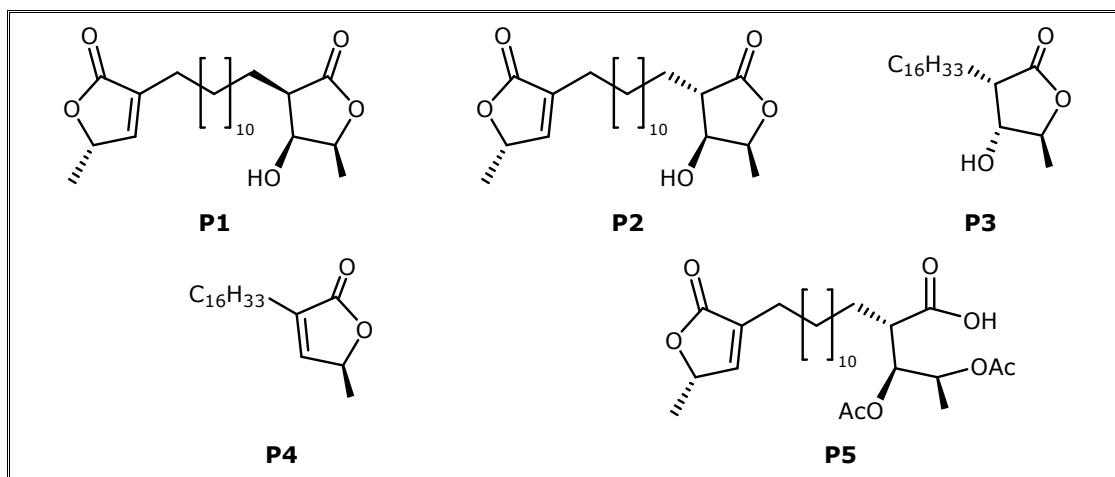


Figura 2.6.1. Nuevos metabolitos aislados del octocoral *Pterogorgia* sp.

¹⁸⁸ http://striweb.si.edu/bocas_database/

¹⁸⁹ J. R. Pawlik, W. Fenical, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **1992**, 87, 183-188.

¹⁹⁰ (a) E. Dorta, A. R. Díaz-Marrero, M. Cueto, L. D' Croz, J. L. Maté, J. Darias, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 2229-2232. (b) M. Cueto, L. D' Croz, J. L. Maté, A. San Martín, J. Darias, *Org. Lett.*, **2005**, 7, 415-418.

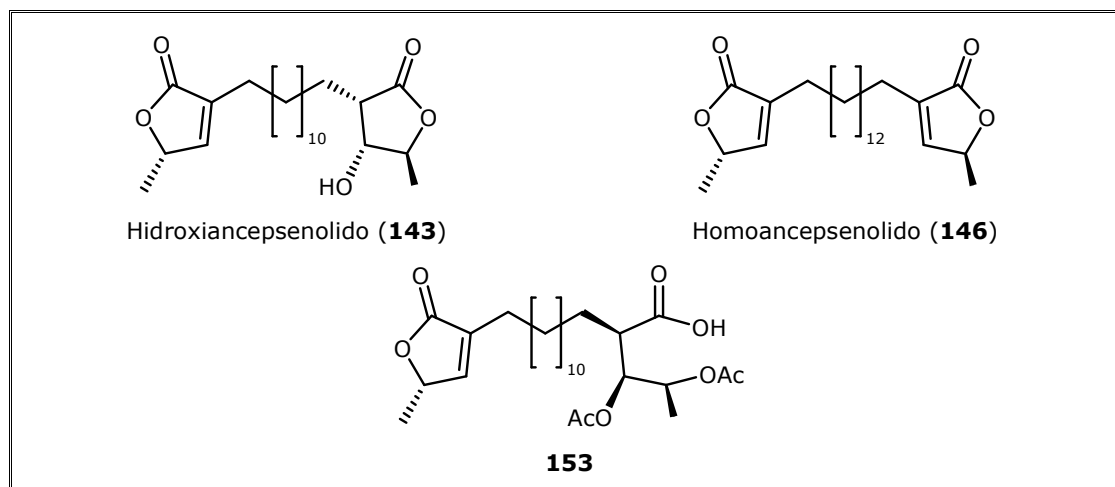
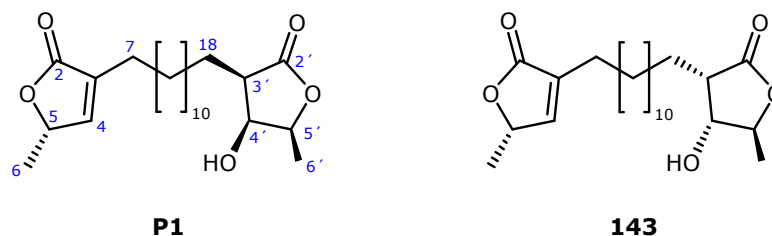


Figura 2.6.2. Metabolitos conocidos aislados del octocoral *Pterogorgia* sp.

En los siguientes apartados se describe la caracterización estructural de los nuevos metabolitos aislados en este estudio. También se detallan unas reglas empíricas basadas en espectroscopía de RMN de ^{13}C que nos han permitido determinar la estereoquímica relativa del anillo 3'-alquil-4'-hidroxi-5'-metil-2'(5'*H*)-dihidrofuranona, una γ -lactona presente en muchos productos naturales bioactivos aislados de organismos marinos,¹ de plantas sobre todo de la familia Annonaceae,¹³⁰ de hongos^{124c} y de bacterias.^{125b} La clave de este método radica en la comparación de los promedios de los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C y los valores δ de C-4' y C-5' de la unidad butanolida de los compuestos aislados de *Pterogorgia* sp.

2.6.1. Caracterización de los compuestos P1 y P2.

El 5*S*,3'*R*,4'*S*,5'*S*-hidroxiancepsenolido (**P1**) se aisló como un sólido blanco amorfo ópticamente activo $[\alpha]_D^{20}$ -24 (c 0.63, CHCl_3) con una masa de 380.2565 que corresponde con la fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_5$, indicando la presencia de cinco grados de insaturación.

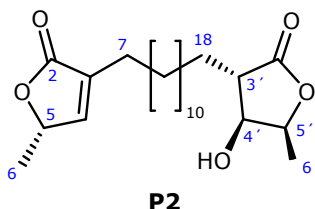


Los datos espectroscópicos de **P1** muestran similitudes con los del sistema bislactona del hidroxiancepsenolido (**143**).¹³⁴ Las resonancias de los fragmentos H-4–H-7 y C-2–C-7 en sus respectivos espectros de RMN de ¹H y ¹³C son coincidentes en ambos compuestos (Tabla 2.6.1.1). Los espectros de masas de **P1** y **143** mostraron el mismo ión molecular y el mismo patrón de fragmentación. Sin embargo, se observaron diferencias en los desplazamientos químicos de los carbonos (C-2'–C-6') y de protón (H-3'–H-6') de sus respectivas butanolidas, lo que indica que **P1** y **143** podrían ser diastereoisómeros.

Tabla 2.6.1.1. Datos de RMN de ¹H y ¹³C de **P1** y de **143** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl₃].

#.	P1		143	
	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C
1	---		---	---
2	---	174.1	---	174.1
3	---	134.4	---	134.3
4	6.99 (dd, 1.6, 3.1)	148.9	6.99 (dd, 1.5, 3.1)	149.0
5	4.99 (dddd, 1.7, 6.8, 6.8, 6.8)	77.4	4.99 (dddd, 1.7, 6.8, 6.8, 6.8)	77.5
6	1.39 (d, 6.8)	19.1	1.40 (d, 6.8)	19.2
7	2.22 (m) 2.22 (m)	25.1	2.25 (m) 2.25 (m)	25.1
8	1.51 (m) 1.51 (m)	27.3	1.54 (m) 1.54 (m)	27.4
17	1.25 (m) 1.25 (m)	27.5	1.42 (m) 1.42 (m)	27.6
18	1.79 (m) 1.65 (m)	23.3	1.79 (m) 1.67 (m)	23.3
1'	---	---	---	---
2'	---	177.4	---	176.7
3'	2.51 (dddd, 4.9, 4.9, 9.9, 9.9)	47.6	2.59 (ddd, 5.5, 5.5, 9.9)	43.7
4'	4.31 (dd, 3.2, 4.7)	71.2	4.19 (dd, 0.0, 5.5)	73.8
5'	4.43 (dddd, 3.2, 6.5, 6.5, 6.5)	78.7	4.51 (dddd, 0.0, 6.8, 6.8, 6.8)	82.1
6'	1.42 (d, 6.5)	13.7	1.34 (d, 6.8)	18.1

El 5*S*,3'*S*,4'*S*,5'*S*-hidroxiancepsenolido (**P2**) se aisló como un sólido blanco amorfo [α]_D²⁰ –22 (c 0.32, CHCl₃). Los datos de RMN junto al ión molecular observado en el EMAR *m/z* 380.2575 sugieren una fórmula molecular C₂₂H₃₆O₅ que indica la existencia de cinco grados de insaturación.



Los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C y los experimentos DEPT son consistentes con los de un ácido graso de cadena larga que posee un butenolido y una butanolida en sus extremos. De la similitud de sus datos espectroscópicos con los de **P1** y **143** (Tablas 2.6.1.1 y 2.6.1.2), y del patrón de fragmentación de su espectro de masas, se deduce que **P2** es diastereoisómero de **P1** y **143**.

Tabla 2.6.1.2. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de **P1** y de **P2** [500 MHz, δ ppm, (*J*) Hz, CDCl_3].

#.	P1		P2	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	---		---	---
2	---	174.1	---	174.0
3	---	134.4	---	134.3
4	6.99 (dd, 1.6, 3.1)	148.9	6.99 (dd, 1.5, 3.0)	148.9
5	4.99 (dddd, 1.7, 6.8, 6.8, 6.8)	77.4	4.99 (dddd, 1.6, 6.7, 6.7, 6.7)	77.4
6	1.39 (d, 6.8)	19.1	1.40 (d, 6.7)	19.2
7	2.22 (m) 2.22 (m)	25.1	2.26 (m) 2.26 (m)	25.2
8	1.51 (m) 1.51 (m)	27.3	1.57 (m) 1.57 (m)	27.2
17	1.25 (m)	27.5	1.57 (m) 1.57 (m)	28.4
18	1.79 (m) 1.65 (m)	23.3	1.79 (m) 1.57 (m)	27.4
1'	---	---	---	---
2'	---	177.4	---	177.5
3'	2.51 (dddd, 4.9, 4.9, 9.9, 9.9)	47.6	2.54 (ddd, 3.6, 6.2, 8.3)	49.1
4'	4.31 (dd, 3.2, 4.7)	71.2	4.21 (dd, 4.3, 4.3)	74.1
5'	4.43 (dddd, 3.2, 6.5, 6.5, 6.5)	78.7	4.62 (dddd, 4.6, 6.7, 6.7, 6.7)	78.1
6'	1.42 (d, 6.5)	13.7	1.40 (d, 6.7)	13.7

La porción de butanolida de **P1** y **P2** contiene tres centros estereogénicos contiguos, incorporados en el anillo 3'-alquil-4'-hidroxi-5'-metil-2'(5'H)-dihidrofuranona. La estereoquímica relativa de **P1** se estableció mediante experimentos NOESY. Los NOEs observados $\text{H}_3\text{-6}'/\text{H}_2\text{-18}$, $\text{H-4}'/\text{H-5}'$, $\text{H-3}'$ y $\text{H-3}'/\text{H-5}'$ establecen para **P1** una configuración en la que todos los sustituyentes de la unidad butenolida están en *cis*. Por otro lado, se ha comprobado que los datos espectroscópicos de **P1** son superponibles a los del producto resultante de la metanolisis del metabolito conocido **153**, también aislado en este estudio y de configuración relativa conocida,¹³⁵ y similares a los del metabolito **P1-a**,^{127a} un homólogo conocido de **P1**.

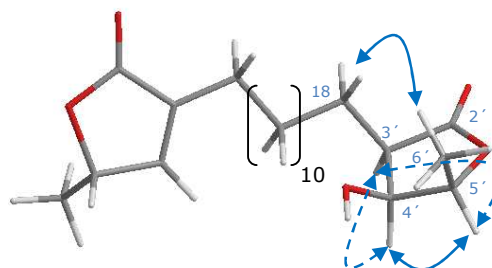
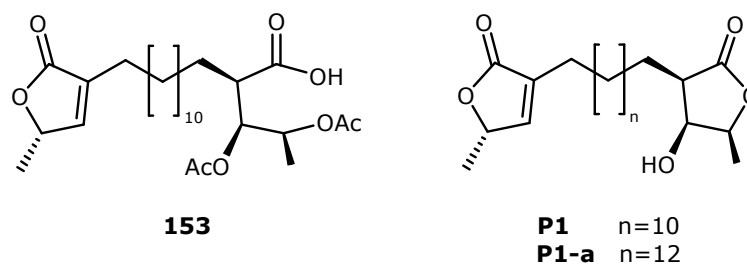
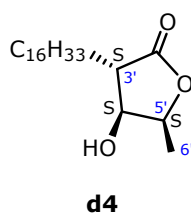


Figura 2.6.1.1. Efectos NOE de **P1**.

Como se describirá más adelante, la configuración de la porción butanolida de **P2** se dedujo por comparación de sus datos de RMN de ^{13}C con los del modelo sintético¹⁹¹ **d4** (Tabla 2.6.4.1), y se confirmó por los NOE observados entre H-3' y H₃-6'.

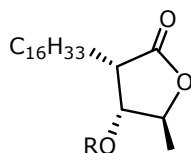


2.6.2. Caracterización de los compuestos **P3** y **P4**.

El compuesto **P3** se aisló como un sólido blanco con $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +7$ (c 0.88, CHCl_3). Los datos de RMN junto con el ión molecular observado a m/z 340.2983 (EMAR) sugieren una fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_3$, que indica dos grados de insaturación. Los datos espectroscópicos de RMN de ^{13}C y los experimentos DEPT pusieron de manifiesto la presencia de una unidad butanolida que posee una cadena lineal saturada de 16 átomos de carbono. La estructura de **P3** fue corroborada por transformación química.

¹⁹¹ R. M. Ortuño, J. Bigorra, J. Font, *Tetrahedron*, **1988**, 44, 5139-5144.

Su acetilación dio lugar a un compuesto cuyos datos espectroscópicos se ajustaban a los publicados para el acetato conocido **P3-a**.¹³⁸



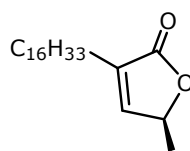
P3 R=H

P3-a R=Ac

Tabla 2.6.2.1. Datos de RMN de ¹H y ¹³C de **P3** y de **P4** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl₃].

#.	P3		P4	
	δ _H	δ _C	δ _H	δ _C
1				
2	---	177.4	---	173.9
3	2.59 (ddd, 5.4, 5.4, 10.6)	43.7	---	134.3
4	4.17 (dd, 0.0, 5.5)	73.8	6.97 (s)	148.9
5	4.50 (dddd, 0.0, 6.8, 6.8, 6.8)	82.5	4.95 (dddd, 1.6, 6.7, 6.7, 6.7)	76.8
6	1.33 (d, 6.8)	18.0	1.36 (d, 6.8)	19.2
7	1.79 (m) 1.69 (m)	23.3	2.24 (dd, 7.2, 7.2) 2.24 (dd, 7.2, 7.2)	25.2
8	1.45 (m) 1.45 (m)	27.6	1.51 (m) 1.51 (m)	27.5
20	1.29 (m) 1.29 (m)	31.9	1.29 (m) 1.29 (m)	31.9
21	1.25 (m) 1.25 (m)	22.6	1.25 (m) 1.25 (m)	22.6
22	0.87 (dd, 6.6, 6.6)	14.1	0.86 (dd, 6.8, 6.8)	14.1

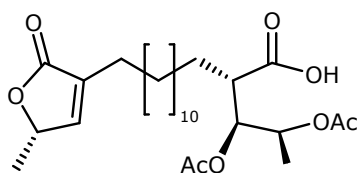
El producto **P4** se aisló como un sólido blanco amorfo [α]_D²⁰ +22 (c 1.1, CHCl₃). La fórmula molecular C₂₁H₃₈O₂, determinada por EMAR (*m/z* 322.2866), difiere de la de **P3** en 18 unidades de masa lo que indica, junto con sus datos espectroscópicos de RMN, que **P4** es la forma deshidratada de **P3**. Esto fue corroborado al comparar los datos espectroscópicos de **P4** con los publicados para el enantiómero de **P4**, [α]_D -11.9 (c 2.5, CHCl₃).^{127a}



P4

2.6.3. Caracterización del compuesto P5.

P5 se aisló como un sólido amorfo ópticamente activo. Sus datos de RMN son parecidos a los del compuesto **153**,¹³⁵ la forma abierta de la butanolida de la bislactona **P1**. La estructura y la configuración relativa de **P5** se confirmaron mediante la conversión via metanólisis de **P5** en **P2**.¹³⁵



P5

Tabla 2.6.3.1. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de **P5** [500 MHz, δ ppm, (*J*) Hz, CDCl_3].

#.	δ_{H}	δ_{C}
1		
2	---	175.6
3	---	134.4
4	6.98 (dd, 1.6, 3.1)	148.9
5	5.08 (m)	76.4
6	1.40 (d, 6.8)	19.2
7	2.27 m 2.27 m	25.2
8	1.53 m 1.53 m	28.4
18	1.51 m 1.61 m	28.4
1'		
2'	---	175.6
3'	2.72 (ddd, 3.8, 8.6, 9.8)	46.1
4'	5.19 (dd, 3.4, 8.5)	74.2
5'	5.10 (dddd, 3.5, 6.4, 6.4, 6.4)	69.4
6'	1.18 (d, 6.4)	16.3
4' <u>CO</u>	---	170.3
4' <u>COCH₃</u>	2.05 (s)*	20.9*
5' <u>CO</u>	---	170.3
5' <u>COCH₃</u>	2.10 (s)*	20.7*

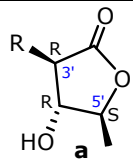
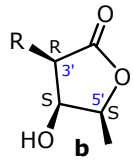
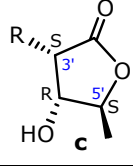
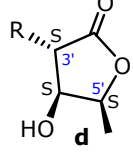
*Intercambiable.

2.6.4. Determinación de la configuración relativa de 3'-alquil-4'-hidroxi-5'-metil-2'(5'H)-dihidrofuranonas.

Los compuestos **P1**, **P2** y **143** representan tres de los cuatro posibles diastereoisómeros de la unidad 3'-alquil-4'-hidroxi-5'-metil-2'(5'H)-dihidrofuranona. El análisis de las constantes de acoplamiento de los protones de las lactonas en el espectro de RMN de ¹H no aporta información concluyente con relación a la estereoquímica relativa de los sustituyentes sobre el anillo. Con el fin de obtener más información al respecto, se decidió hacer un estudio comparativo de los datos espectroscópicos de RMN de ¹³C, de éstos y de otros compuestos naturales y sintéticos descritos en la literatura, con configuración conocida y con sustituciones equivalentes en el anillo.

La Tabla 2.6.4.1 recoge ejemplos de los cuatro diferentes diastereómeros, representados como **a-d**, donde se muestran los desplazamientos químicos de RMN de ¹³C de los carbonos C-4' y C-5' para cada una de las siguientes configuraciones relativas: **a**, 3'*R,4'*R,5'*S (entradas **a1-a6**); **b**, 3'*R,4'*S,5'*S (entradas **b1-b4**, **P1**); **c**, 3'*S,4'*R,5'*S (entradas **c1-c2**, **P3**, **143**); **d**, 3'*S,4'*S,5'*S (entradas **d1-d4**, **P2**). Se observa que una diferencia en los valores de los desplazamientos químicos entorno a 1 ppm ($\Delta\delta_{C-5'-C-4'} \sim 1$) indica una configuración relativa *trans*-vecinal de estas posiciones cuando la cadena lateral y el grupo metilo están en *cis* (son valores típicos $\delta_{C-4'} \sim 79.1$ y $\delta_{C-5'} \sim 80.0$), mientras que diferencias de alrededor de 7.7 ppm ($\delta_{C-4'} \sim 71.2$ y $\delta_{C-5'} \sim 79.1$) son propios de una estereoquímica todo-*cis*. Un incremento de 8.6 ppm ($\delta_{C-4'} \sim 73.8$ y $\delta_{C-5'} \sim 82.4$) establece que el resto alquílico y el grupo hidroxilo están en *cis* y diferencias de 4 ppm ($\delta_{C-4'} \sim 74.1$ y $\delta_{C-5'} \sim 78.1$) aseguran una configuración relativa *cis* de los grupos metilo e hidroxilo.

Tabla 2.6.4.1. Datos de $\delta_{C-4'}$ y $\delta_{C-5'}$ (ppm) de las unidades butanolida.

#.	R	$3'R,4'R,5'S$	$\delta_{C-4'}$	$\delta_{C-5'}$
a1	n -Bu ⁽¹⁹²⁾		79.1	79.9
a2	iso -Bu ^(125b)		78.9	80.1
a3	$C_6H_5(CH_2)_{13}$ ^(193,194a)		78.9	80.1
a4	$CH_3CH_2CH(CH_3)CH_2$ ^(125b)		79.8	79.9
a5	$C_{16}H_{33}$ ^(192a)		79.1	79.8
a6	$CH_2=CH(CH_2)_2CH=C(C\equiv C)_2(CH_2)_6$ ⁽¹⁹⁵⁾		78.7	80.1
#.	R	$3'R,4'S,5'S$	$\delta_{C-4'}$	$\delta_{C-5'}$
b1	n -Bu ⁽¹⁹⁶⁾		71.0	79.2
b2	$C_{14}H_{29}$ ^(194, 196)		71.1	78.8
b3	$C_6H_5(CH_2)_{13}$ ^(194a)		71.3	78.6
b4	$Me(CH_2)_7C\equiv(CH_2)_{10}$ ⁽¹⁹⁷⁾		71.2	79.0
1	Fragmento de P1		71.2	78.7
#.	R	$3'S,4'R,5'S$	$\delta_{C-4'}$	$\delta_{C-5'}$
c1	$Me(CH_2)_3C=C(CH_2)_6$ ⁽¹⁹⁸⁾		73.9	82.3
c2	$CH_2O_2C_6H_5-(CH_2)_9$ ⁽¹⁹⁸⁾		73.7	82.5
3	Fragmento de P3 ($C_{16}H_{33}$)		73.8	82.5
8	Fragmento de 143		73.8	82.1
#.	R	$3'S,4'S,5'S$	$\delta_{C-4'}$	$\delta_{C-5'}$
d1	$Me(CH_2)_3C=C(CH_2)_6$ ⁽¹⁹⁸⁾		74.1	78.1
d2	$CH_2O_2C_6H_5-(CH_2)_9$ ⁽¹⁹⁸⁾		74.1	78.0
d3	$CH_2O_2C_6H_5-(CH_2)_{11}$ ⁽¹⁹⁸⁾		74.1	78.0
d4	$C_{16}H_{33}$ ⁽¹⁹¹⁾		73.8	78.8
2	Fragmento de P2		74.1	78.1

Por tanto, el análisis de los desplazamientos químicos de ^{13}C de C-4' y de C-5' así como la diferencia relativa de los mismos, esquematizados en la Tabla 2.6.4.2, aporta información inequívoca para establecer la configuración relativa completa de una unidad α -alquil- β -hidroxi- γ -metil- γ -lactona. Los valores de δ para C-3' de los compuestos representados en los modelos **a-d** son: 48.6, 47.6, 43.7 y 49.2 ppm,

¹⁹² (a) M. P. Sibi, J. Lu, C. L. Talbacka, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 7848-7855. (b) R. M. Ortuño, D. Alonso, J. Cardellach, J. Font, *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 2191-2198.

¹⁹³ W. F. Tinto, P. K. Jagessar, P. Ketwaru, W. F. Reynolds, S. McLean, *J. Nat. Prod.*, **1991**, *54*, 972-977.

¹⁹⁴ (a) M. T. Pupo, P. C. Vieira, J. B. Fernández, M. G.-F. Da Silva, *Phytochemistry*, **1998**, *48*, 307-310. (b) S. Takahashi, N. Ogawa, N. Sakiri, T. Nakata, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 6540-6545.

¹⁹⁵ J. T. Etse, P. G. Waterman, *Phytochemistry*, **1986**, *25*, 1903-1905.

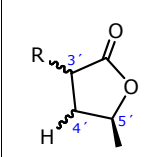
¹⁹⁶ K. Nishide, A. Aramata, T. Kamanaka, T. Inoue, M. Node, *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 8337-8346.

¹⁹⁷ M. H. Chaves, N. F. Roque, *Phytochemistry*, **1997**, *44*, 523-528.

¹⁹⁸ N. P. Lopes, D. H. S. Silva, M. S. Kato, M. Yoshida, *Phytochemistry*, **1998**, *49*, 1405-1410.

respectivamente. Estos desplazamientos químicos, excepto en el caso del grupo **c**, son demasiado parecidos para aplicar la regla. Se han publicado trabajos relacionados sobre butanolidas trisustituidas basados en el análisis de los desplazamientos químicos de ¹³C del grupo metilo en C-5¹⁹⁹ y del α-metileno¹⁹⁷ del resto alquilo de la cadena. De un estudio de lípidos que contienen butanolidas, se ha encontrado que la configuración de los anillos de butanolida de varias acetogeninas no se ajusta a nuestros criterios y debería corregirse como sigue: **a3**¹⁹³ (**b**→**a**). Por otro lado, la estereoquímica desconocida de saprathina **a6**¹⁹⁵ puede ser asignada como 3'*R,4'*R,5'*S. Además, la revisión estructural²⁰⁰ basada en un trabajo sintético de la configuración de lactonas de acetogeninas de anonáceas relacionadas, tales como itrabina y jeteina,²⁰¹ apoyan esta regla. Por consiguiente, estos resultados demuestran ser una herramienta útil para establecer la configuración relativa de α-alkil-β-hidroxi-γ-metil-γ-lactonas.

Tabla 2.6.4.2. Disposición relativa de los sustituyentes sobre α-alkil-β-hidroxi-γ-metil-γ-lactonas. Δδ_(C-5'-C-4') [CDCl₃, δ ppm].

	Δδ _(C-5'-C-4')	C-3'-C-4'	C-4'-C-5'	C-3'-C-5'	Configuración relativa
	1	<i>trans</i>	<i>trans</i>	<i>cis</i>	3'*R,4'*R,5'*S
4	<i>trans</i>	<i>cis</i>	<i>trans</i>	3'*S,4'*S,5'*S	
7.7	<i>cis</i>	<i>cis</i>	<i>cis</i>	3'*R,4'*S,5'*S	
8.6	<i>cis</i>	<i>trans</i>	<i>trans</i>	3'*S,4'*R,5'*S	

2.6.5. Determinación de la configuración absoluta de la unidad de butenolida.

Para determinar la configuración del anillo de butenolida hay que tener en cuenta que el único carbono quiral en el anillo (C-5) podría epimerizar en presencia de una base débil dando lugar a una mezcla de epímeros con datos espectroscópicos indistinguibles, en cuyo caso, no se podría conocer la configuración absoluta del fragmento butenolida.²⁰² La naturaleza cerosa de las acetogeninas lineales no permite realizar cristografía de rayos X directa, por tanto, su configuración absoluta no ha sido descrita. Debido a esto, se hace necesario el uso de una metodología que no suponga la alteración de la pureza enantiómerica de las dilactonas presentes de forma natural en *Pterogorgia* sp. Las limitaciones intrínsecas del método de Mosher hacen que la técnica no sea aplicable a la unidad butenolida,¹³⁶ sin embargo, un método

¹⁹⁹ C. H. Heathcock, S. D. Young, J.P. Hagen, M. C. Whitle, D. VanDerveer, *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*, 3846-3856.

²⁰⁰ E. Warmendam, I. Tranoy, B. Renoux, J. P.Gesson, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *39*, 8849-8852.

²⁰¹ D. Cortes, S. H. Myint, M. Leboeuf, A. Cave, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 6133-6134.

²⁰² P. Duret, B. Figadere, R. Hocquemiller, A. Cave, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 8077-8080.

basado en RMN que utiliza el reactivo de Pirkle a baja temperatura ha permitido determinar la configuración absoluta de butenolidas anonáceas²⁰³ y de diterpenos que contienen γ -butenolidos.²⁰⁴ Además, este método se puede aplicar para medir el exceso de diastereomérico (o enantiomérico) de los mismos compuestos que contengan la butenolida.²⁰³ Por esta razón, parece ser un método ideal para aplicarlo a nuestros compuestos.

El homoancepsenolido (**146**) y ancepsenolido (**142**) son compuestos ópticamente activos con simetría C_2 , lo que implica que los grupos metilo de sus respectivas unidades butenolida deben tener la misma configuración. Por tanto, cabe esperar que al aplicar este método, la geometría del complejo agente quirál-sustrato produzca un apantallamiento selectivo de los protones quirales del sustrato dependiendo de que su configuración sea R,R o S,S . De manera general, se puede predecir²⁰³ que la señal de H-5 de los complejos (S,S) o (R,R) aparecerá desplazada a campos más altos en comparación con la señal de H-5 para los complejos (R,S) o (S,R). Por lo tanto, si $\Delta(\delta_{H-5R}-\delta_{H-5S})$ es positivo la configuración absoluta del carbono quirál de la butenolida es (S). Como se describe en la parte experimental se utilizó (R)- y (S)-2,2,2-trifluoro-1-(9-antril)etanol (TFAE) para formar los complejos con las unidades de γ -metil- γ -lactona de **146**. El análisis de $\Delta\delta$ de H-5 de los dos complejos reactivo-sustrato R -(CSA)-**146** y S -(CSA)-**146**, tabulados en la Tabla 2.6.5.1, permitió establecer la estereoquímica absoluta de C-5 como S . Por ende, la configuración absoluta de **146**, hasta el momento desconocida, se pudo establecer como $5S,5'S$. El signo de la rotación óptica de **146** coincide con el dado para el (+)-ancepsenolido obtenido del éster (S)-láctico.²⁰⁵ Igualmente se aplicó este método para resolver la configuración absoluta de **P1**, **P2** y **P4** como $5S,3'R,4'S,5'S$; $5S,3'S,4'S,5'S$ y $5S$, respectivamente (Tabla 2.6.5.1).

Tabla 2.6.5.1. δ_{H-5} (ppm) de los compuestos **P1**, **P2**, **P4** y **146** con 12 equivalentes de R - y S -TFAE a 240 K.

Compuesto	δ_{H-5R}	δ_{H-5S}	$\Delta(\delta_{H-5R} - \delta_{H-5S})$
P1	4.89331	4.85119	+0.04212
P2	5.00807	4.97181	+0.03626
P4	4.98596	4.95324	+0.03272
146	4.87483	4.80521	+0.06962

²⁰³ S. Latypov, X. Franck, J.-C. Julian, R. Hocquemiller, B. Figadere, *Chem.-Eur. J.*, **2002**, *8*, 5662-5666.

²⁰⁴ A. R. Díaz-Marrero, E. Dorta, M. Cueto, A. San-Martín, J. Darias, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 1073-1078.

²⁰⁵ B. M. Trost, T. J. Müller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 4985-4986.

Se han descrito los dos enantiómeros de **P4**.^{127a,191} La rotación óptica publicada para el compuesto sintético se ajusta a la rotación óptica de nuestro compuesto (+26.7¹⁹¹, +22 en este trabajo). Por consiguiente, la síntesis de **P4** a partir del ácido (S)-láctico confirma la validez del modelo de Pirkle. Como la transformación de **P6**→**P1** y **P5**→**P2** vía metanolisis¹³⁵ ocurre sin isomerización de los centros estereogénicos vecinales de la cadena residual y del butenolido, se puede establecer que la configuración absoluta de los productos naturales **P5** y **153** es 5*S*,3'*R*,4'*S*,5'*S* y 5*S*,3'*S*,4'*S*,5'*S*, respectivamente, y está de acuerdo con sus correspondientes rotaciones ópticas.

Como resultado de este estudio también asignamos, sin ambigüedades, la configuración absoluta del ácido graso de cadena larga con simetría C₂, homoancepsenolido (**146**), de las dilactonas **P1** y **P2**, de sus correspondientes formas abiertas **153** y **P5**, así como del monobutenolido **P4**. Estos resultados son de gran relevancia porque hasta el momento las configuraciones absolutas dadas para algunas lactonas de acetogeninas de origen natural se habían establecido tomando como referencia el ancepsenolido²⁰⁶ y otras lactonas relacionadas obtenidas por métodos sintéticos^{174,207} mediante estrategias basadas en una secuencia de reacciones de aldolización, lactonización y deshidratación, donde no se aseguraba la pureza enantiomérica. Esto explica la publicación de configuraciones absolutas y valores de rotación óptica contradictorios para acetogeninas idénticas.^{136,202,208}

²⁰⁶ (a) T. Rezanka, V. M. Dembistky, *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 8743-8749. (b) K. Takeda, K. Sakurawi, H. Ishi, *Tetrahedron*, **1972**, *28*, 3757-3776.

²⁰⁷ Y. T. He, H. N. Yang, Z. J. Yao, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 8805-8810.

²⁰⁸ P. Vieira, M. Yoshida, O. R. Gottlieb, H. F. P. Filho, T. J. Nagen, R. B. Filhos, *Phytochemistry*, **1983**, *22*, 711-713.

2.7. RUTA BIOGÉNICA PROPUESTA PARA LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *Pterogorgia* sp.

2.7.1. Ruta biogénica propuesta para los compuestos bisbutenolidos.

Los ácidos palmítico (16:0) y esteárico (18:0) son los lípidos más abundantes en los tejidos coralinos.²⁰⁹ De acuerdo con modelos previos^{206b} que explican las posibles rutas biogénicas de oxidación de ácidos grasos, proponemos una biogénesis para los bisbutenolidos **P1–P5**, **143**, **146** y **153** que implica una catálisis enzimática en una cascada de oxidaciones que conduce a la formación de un ácido carboxílico a partir de un grupo metilo (Figura 2.7.1.1). La inserción de una unidad C₃, por ejemplo piruvil-CoA, en las posiciones activas del enolato del ácido α,ω-dioico podría bloquear la subsiguiente β-oxidación, como ocurre generalmente en el metabolismo de los ácidos grasos, para dar lugar a las dilactonas.²¹⁰

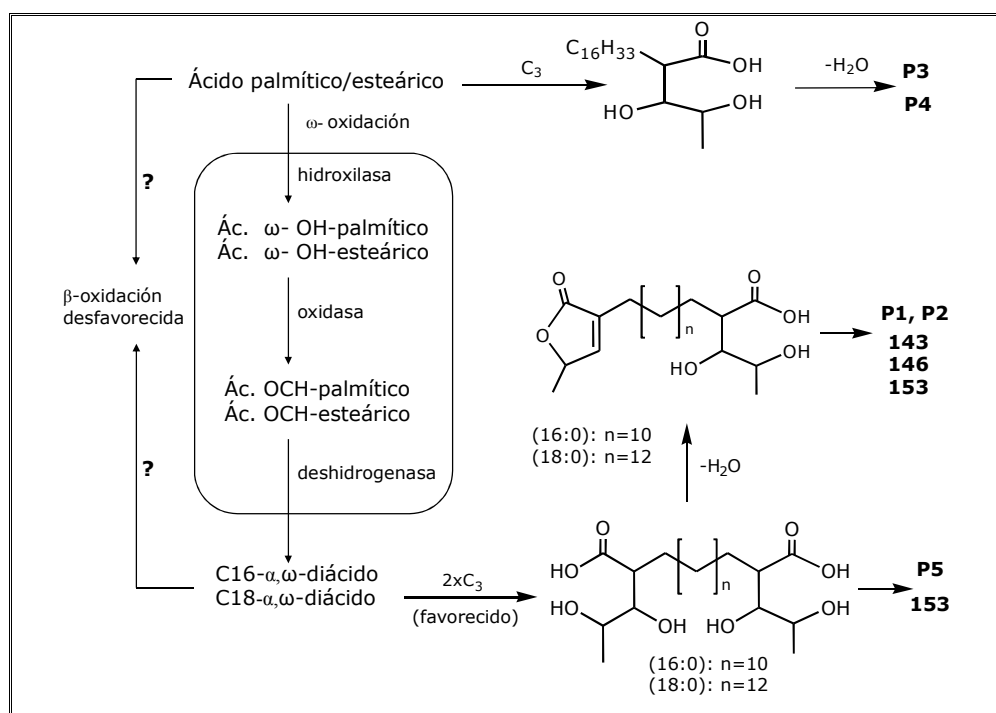


Figura 2.7.1.1. Biogénesis propuesta para los compuestos **P1–P5**, **143**, **146** y **153**.

²⁰⁹ H. Yamashiro, H. Oku, H. Higa, I. Chinen, K. Sakai, *Comp. Biochem. Physiol.*, **1999**, 122, 397-407.

²¹⁰ U. Scheller, T. Zimmer, D. Becher, F. Schauer, W. H. Schunck, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 32528-32534.

Los α,ω -diácidos son intermedios químicos versátiles para la preparación de sustancias de interés industrial y comercial. Se han desarrollado determinados procesos que emplean levaduras modificadas genéticamente para convertir ácidos grasos y *n*-alcanos en ácidos α,ω -dioicos.²¹¹ Hasta la fecha, los ácidos grasos naturales dilactónicos parecen ser exclusivos del género *Pterogorgia* (*P. anceps*,^{127a,134,135} *P. guadalupensis*¹³⁵ y *P. citrina*¹³⁶) mientras que otros taxones marinos poseen lípidos mono- γ -lactona.^{138,206,212}

La habilidad de las enzimas de *Pterogorgia* para oxidar y acumular ácidos grasos de cadena larga, se asemeja a los mecanismos que poseen ciertos microorganismos, genéticamente modificados, donde la β -oxidación ha sido bloqueada por genes que codifican la acil-coenzima A oxidasa. Por este motivo sería interesante el estudio los mecanismos por los cuales la ω -oxidación predomina sobre la β -oxidación en este octocoral, tanto a nivel genético²¹³ como molecular.

²¹¹ W. Eschenfeldt, Y. Zhang, H. Samaha, L. Stols, L. D. Eirich, C. R. Wilson, M. I. Donnelly, *App. Environ. Microbiol.*, **2003**, 5992-5999.

²¹² (a) H. Kikuchi, Y. Tsukitani, H. Nakasishi, I. Shimizu, S. Saitoh, K. Iguchi, Y. Yamada, *Chem. Pharm. Bull.*, **1983**, *31*, 1172-1176. (b) A. S. R. Anjaneyulu, C. V. S. Prakash, *Indian J. Chem.*, **1994**, *33*, 55-58.

²¹³ J. J. Stegeman, *Mar. Environ. Res.*, **2000**, *50*, 1-81.

Tabla 2.1.1.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC de los compuestos **L1** y **L2** y datos de RMN de ^1H y ^{13}C de **L3** [500 MHz, δ ppm, (J) Hz, CDCl_3].

#.	Gomerona A (L1) ^b			Gomerona B (L2)			Gomerona C (L3)	
	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{H}	δ_{C}
1	1.99 dd (2.8, 11.0) 2.25 dd (1.9, 11.0)	39.0	C-2, C-3, C-5, C-7, C-14	2.18 dd (3.1, 12.4) 2.96 d (12.4)	43.9	C-2, C-3, C-5, C-6, C-7, C-14	2.14 dd (3.0, 12.3) 2.95 d (12.3)	42.0
2	---	72.9		---	79.9 ^a		---	79.4 ^a
3	---	85.6		---	70.8 ^a		---	73.6 ^a
4	0.74 m 1.45 ddd (1.6, 5.1, 14.5)	34.5	C-2, C-3	1.72 ddd (4.9, 12.8, 15.9) 2.46 ddd (1.8, 4.9, 15.9)	40.2	C-2, C-3, C-6	1.70 ddd (5.4, 12.8, 12.8) 2.26 m	39.0
5	1.04 m 1.56 ddd (5.0, 12.3, 13.6)	28.9	C-1, C-4, C-11	1.98 dddd (2.4, 2.4, 4.9, 13.3) 2.31 ddd (4.9, 13.3, 13.3)	29.9		1.97 m 2.32 m	29.4
6	---	51.4		---	48.0		---	47.9
7	---	168.2		---	155.0		---	154.3
8	6.20 s	125.3	C-6, C-10, C-14	6.57 s	125.0	C-6, C-14	6.57 s	125.1
9	---	197.4		---	204.6		---	199.8
10	1.93 d (17.3) 2.21 d (17.3)	48.7	C-6, C-8, C-9, C-11, C-12	2.21 d (16.8) 2.67 d (16.8)	48.9	C-9, C-11, C-13	2.21 d (17.4) 2.67 d (17.4)	49.0
11	---	37.5		---	38.4		---	38.4
12	0.55 s	24.8	C-6, C-10, C-11, C-13	1.14 s	24.3	C-6, C-10, C-11, C-13	1.13 s	24.3
13	0.74 s	22.9	C-6, C-10, C-11, C-12	0.99 s	24.0	C-6, C-10, C-11, C-12	0.99 s	23.9
14	3.69 s	73.8	C-1, C-2, C-8, C-6	---	196.3		---	198.2
15	0.96 s	25.6	C-2, C-3, C-4	1.90 s	29.7	C-2, C-3, C-4	1.70 s	27.8
OH ₃	1.45 s							
OH ₁₄	1.83 d (2.5)							

^a Intercambiable

^b Datos en C_6D_6 . Para datos de ^1H y ^{13}C en CDCl_3 ver parte experimental (pág. 193).

3. Parte Experimental



3.1. TÉCNICAS EXPERIMENTALES GENERALES

3.1.1. Espectroscopía Infrarroja (IR).

Los espectros de infrarrojo se realizaron en los espectrofotómetros Perkin-Elmer modelo 1600/FTIR, Bruker IFS-55 y Avatar 360/FT-IR. Los productos se disolvieron en CH_3Cl o CH_2Cl_2 seco. Se aplicaron en forma de película sobre una célula de NaCl de 0.5 cm de espesor, o bien, en disolución en una celdilla de NaCl de 0.2 mm. Los valores de ν se expresan en cm^{-1} .

3.1.2. Rotación Óptica ($[\alpha]^{25}_D$).

La actividad óptica de los productos se determinó con el polarímetro Perkin-Elmer modelo 343 Plus. Las medidas se tomaron usando la línea D de lámpara de sodio a una temperatura de 25°C. Los productos se disolvieron en cloroformo o diclorometano anhidros. La longitud de la célula empleada para las medidas fue de 0.1 dm de longitud. La concentración está dada en g/100 ml de disolución.

3.1.3. Espectrometría de Masas (EM).

Los espectros de masas de baja y alta resolución fueron realizados en un espectrómetro Vg-Micromass modelo Zab 2F. La temperatura de la fuente fue de 220°C y la energía de ionización 70 eV.

3.1.4. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los espectros de RMN se realizaron en los espectrómetros Bruker Avance 400 (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C) y Bruker AMX 500 (500 MHz para ^1H y 125.7 MHz para ^{13}C).

Salvo que se indique lo contrario, se empleó cloroformo deuterado como disolvente y cloroformo como referencia interna. Los experimentos de correlación homo- y heteronuclear ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC y NOESY se realizaron en el espectrómetro Bruker AMX 500, con los programas suministrados por la firma Bruker.

Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en partes por millón (ppm), en relación al disolvente empleado como referencia interna, y las constantes de acoplamiento (J) en Hertzios (Hz).

3.1.5. Punto de fusión.

Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Kofler Mettler FP 80.

3.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.

3.2.1. Cromatografía en Columna.

- Cromatografía Flash. Se realizó siguiendo la metodología descrita por W. C. Still *et al.*²¹⁴
- Cromatografía húmeda de baja presión. La gel de sílice se suspende en el eluyente y se compacta con aire a presión. La muestra se puede aplicar disuelta o adsorbida sobre gel de sílice.
- Cromatografía húmeda a media presión. La gel de sílice se suspende en el eluyente y se compacta empleando una bomba peristáltica Fluid Metering Inc. modelo RP-SY. La muestra se puede aplicar disuelta o adsorbida sobre gel de sílice.

En la realización de columnas cromatográficas se emplearon, como fase estacionaria, dos tipos de gel de sílice: Silicagel 60 (0.063-0.200 mm) (Merck, art. 107734) y Silicagel 60 HF₂₅₄₊₃₆₆ (Merck, art. 107741). Como fase móvil se usó hexano y acetato de etilo (Merck y Quimidroga). Antes de su uso los disolventes fueron bidestilados.

3.2.2. Cromatografía de Exclusión Molecular.

Se empleó como fase estacionaria Sephadex LH-20 de Pharmacia Fine Chemicals (ref. 17-0090-01). El sistema de elución utilizado fue hexano:diclorometano:metanol en proporción 3:1:1.

3.2.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).

Para la cromatografía líquida de alta resolución se empleó el cromatógrafo Hewlett-Packard HP serie 1050 equipado con un detector UV de longitud de onda variable.

La columna utilizada fue Jaigel Sil-S-043-10, de 20 × 250 mm, empaquetada con gel de sílice de 10 μm, y el eluyente consistió en mezclas de hexano-acetato de etilo. El lavado de la columna se realizó con 2-propanol.

²¹⁴ W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 2923-2925.

Antes de su utilización, los disolventes fueron filtrados empleando membranas Durapore de 0.45 μm HV y desgasificados.

Las fracciones se tomaron de acuerdo a la evolución del cromatograma UV en tiempo real.

3.2.4. Cromatografía en Capa Fina (ccf).

El seguimiento de las separaciones cromatográficas en columna, así como de las reacciones químicas se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina. Se usaron cromatofolios (20 \times 20 cm) del gel de sílice Silicagel 60 F₂₅₄ con base de aluminio (Merck, art. 105554).

Para el revelado de la ccf se empleó:

- Oleum: pulverización con una disolución H₂SO₄:H₂O:AcOH (1:4:20) y posterior calentamiento.
- Detección por fluorescencia empleando una lámpara ultravioleta Vilbert Lourmat a una longitud de onda de 254 nm.

3.3. ESTUDIO DEL ALGA ROJA *LAURENCIA MAJUSCULA* (HARVEY) LUCAS.

Laurencia majuscula (Harvey) Lucas es un alga roja que pertenece a la división *Rhodophyta*, clase *Floridiophyceae*, orden *Ceremiales*, familia *Rhodomelaceae* y subfamilia *Laurencieae*. Las algas rojas del género *Laurencia* se encuentran frecuentemente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Su coloración es debida a un complejo pigmentario formado por clorofila, carotenos, ficoeritrina y ficocianina. Son organismos eucarióticos marinos, de consistencia cartilaginosa y su tamaño oscila entre 3 y 30 cm de longitud.

El alga *L. majuscula* (Harvey) Lucas posee talos erectos, ramificados de 5-7 cm, de color rosado a rojizo con algunas zonas verdosas en ápices y partes terminales. Se fija al sustrato por un disco basal (ramificación irregularmente alterna, a veces espiralada). Microscópicamente se caracteriza por poseer células corticales cuadrangulares y proyectadas hacia la superficie.



3.3.1. Clasificación.

El alga fue clasificada por los doctores Julio Afonso-Carrillo y Marta Sansón del Departamento de Botánica Marina de la Facultad de Biología de la Universidad de La Laguna. En el herbario del departamento se encuentra depositado un ejemplar con el número TFC Phyc 13091.

3.3.2. Recolección y extracción.

El alga fue recolectada mediante buceo con escafandra autónoma en Valle Gran Rey, La Gomera, a una profundidad de 2-5 m. Después de limpiarla, el alga se secó al aire, en la oscuridad y a temperatura ambiente. El alga seca (2 kg) se extrajo con

acetona a 25°C, con renovación frecuente del disolvente. Los extractos, una vez filtrados, se combinaron y se llevaron a sequedad en un rotavapor dando lugar a un residuo de color pardo oscuro de 89.8 g.

3.3.3. Estudio cromatográfico del extracto de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

El extracto crudo de *L. majuscula* (Harvey) Lucas se fraccionó mediante cromatografía Flash. Para ello se empleó una columna de 9.0 cm de diámetro interno que se compactó con gel de sílice (Merck, art. 107741) hasta una altura de 12.5 cm. Una vez colocado en la columna el extracto adsorbido en gel de sílice (Merck, art. 107734), este se eluyó con mezclas de polaridad creciente de hexano y acetato de etilo. El curso de la cromatografía se siguió por análisis de ccf, empleando oleum como revelador, y por RMN de ¹H, lo que permitió agrupar las fracciones como se indica en los esquemas siguientes:

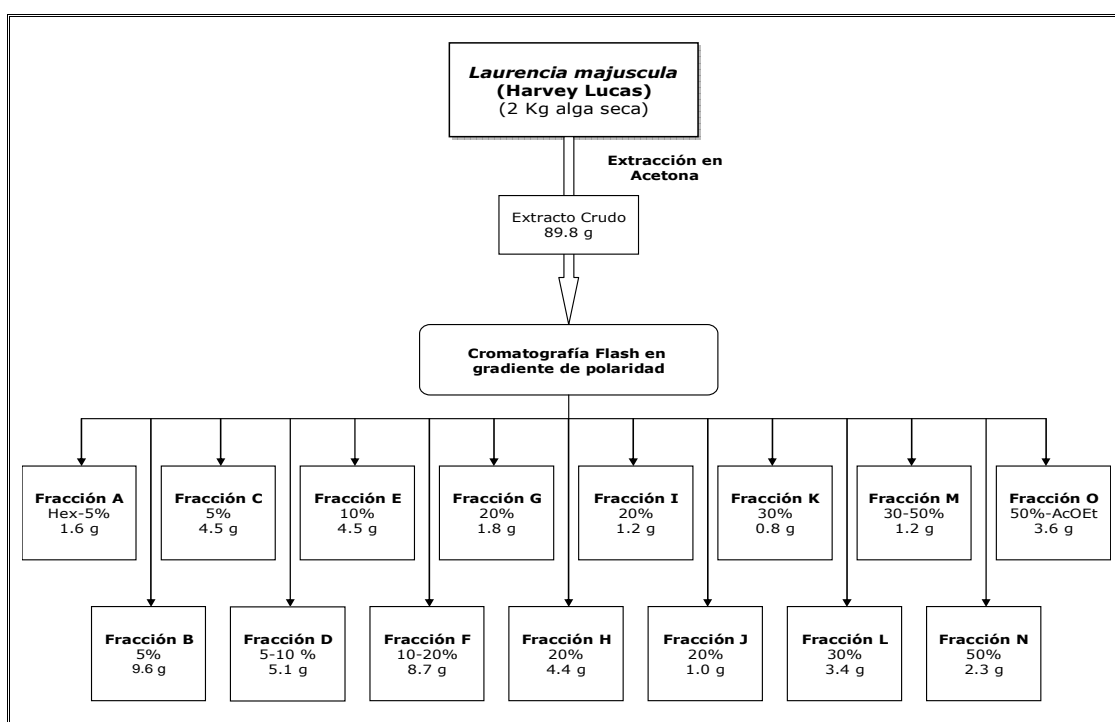


Figura 3.3.1. Esquema del estudio cromatográfico del alga roja *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

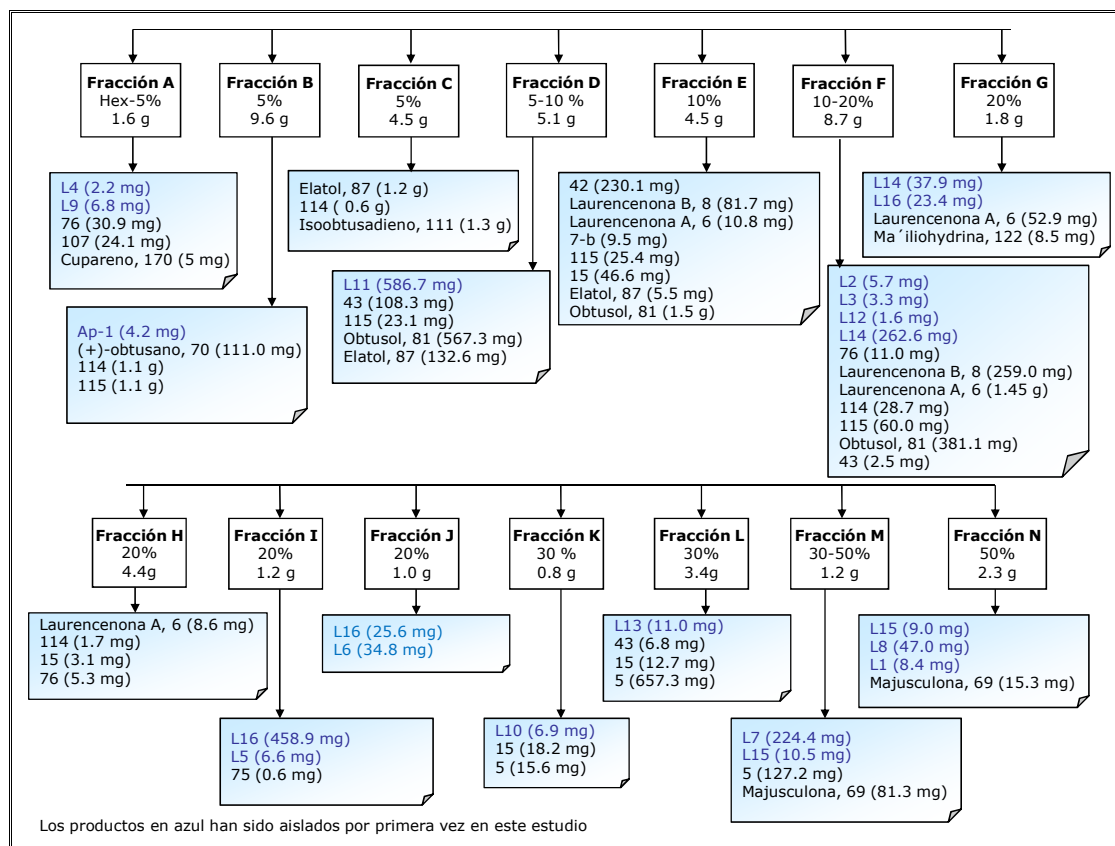


Figura 3.3.2. Esquema ampliado de los productos naturales obtenidos de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

Estudio de la fracción A (Hexano 100% y 5%, 1.58 g). Se realizó una columna de exclusión molecular sephadex LH-20 (ϕ_{int} = 5.0 cm y h_{gel} = 36.0 cm). Atendiendo a los resultados de ccf y de RMN de ¹H se obtuvieron las fracciones de interés:

A₁: 213.8 mg

A₂: 86.3 mg

El residuo de la porción **A₁** (213.8 mg) se cromatografió en una columna húmeda (ϕ_{int} = 3.0 cm y h_{gel} = 20.0 cm) eluida con hexano, para obtener los productos: **L4** (2.2 mg), **76**⁷⁷ (30.9 mg), **107**⁹² (24.1 mg), así como una fracción de 36.0 mg. De esta fracción se purificó el producto cupareno (**170**)¹⁴⁴ (5 mg), [CLAR (Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), 100% hexano, 3.5 mL/min, t_r = 20 min)].

De la fracción **A₂** se obtuvo **L9** (6.8 mg), por cromatografía líquida (ϕ_{int} = 3.0 cm y h_{gel} = 15.0 cm), eluida en hexano y hexano-acetato de etilo al 5%.

Estudio de la fracción B (5%, 9.62 g). Se fraccionó por cromatografía líquida de baja presión ($\phi_{\text{int}} = 6.5$ cm y $h_{\text{gel}} = 10.5$ cm). De la información obtenida por ccf y por los espectros de RMN de ^1H , el conjunto de las fracciones se agruparon en:

B₁: 139.2 mg

B₂: 110.0 mg

B₃: 2.20 g

El residuo **B₁** fue fraccionado en columna de sephadex ($\phi_{\text{int}} = 3.5$ cm y $h_{\text{gel}} = 32.0$ cm). Se obtuvo una fracción de interés de 27.7 mg, de la que se separó el producto **70**⁹⁴ (1.0 mg, $t_r = 28.5$ min) y el producto **Ap-1** (4.2 mg, $t_r = 34.0$ min) por CLAR, [(Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano-acetato de etilo al 5%, 3.5 mL/min, UV)].

De **B₂** se aisló (+)-obtusano (**70**),⁹⁴ mientras que del residuo **B₃** se obtuvo **114** y **115**.¹⁰² En ambos casos se aplicaron las condiciones cromatográficas antes indicadas.

Estudio de la fracción C (5%, 3.55 g). Los productos elatol (**87**)⁶³ (1.2 g); **114**¹⁰² (0.6 g) e isoobtusadieno (**111**)¹⁰² (1.3 g), se separaron de ácidos grasos de cadena larga, componentes mayoritarios de la mezcla, por cromatografía en sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}} = 5.0$ cm y $h_{\text{gel}} = 36.0$ cm).

Estudio de la fracción D (5-10%, 5.10 g). De esta fracción se aisló **L11** (586.7 mg), **43**⁷⁸ (108.3 mg), **115**¹⁰² (23.1 mg), elatol (**87**)⁶³ (132.6 mg) y obtusol (**81**)⁹⁸ (567.3 mg), por cromatografía de exclusión molecular [sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}} = 5.0$ cm y $h_{\text{gel}} = 36.0$ cm)].

Estudio de la fracción E (10%, 4.48 g). Esta fracción rindió: **42**⁷⁸ (230.1 mg), laurencenona B (**8**)³² (81.7 mg), laurencenona A (**6**)³² (10.8 mg), **7-b** (9.5 mg), **115**¹⁰² (25.4 mg), **15**⁴² (46.6 mg), elatol (**87**)⁶³ (5.5 mg) y obtusol (**81**)⁹⁸ (1.5 g). Los productos se obtuvieron después de varios procesos cromatográficos en columna húmeda de gel de sílice.

Estudio de la fracción F (10-20%, 8.67 g). La fracción, adsorbida en gel de sílice, se incorporó a la parte superior de una columna cromatográfica de gel de sílice ($\phi_{\text{int}} = 6.0$ cm y $h_{\text{gel}} = 13.0$ cm), que fue eluida con hexano/acetato de etilo con polaridad creciente (hexano, 5%, 10% y 100% de acetato de etilo). El análisis de las fracciones por ccf y RMN de ^1H , permitió agruparlas como sigue:

F₁: 511.7 mg

F₂: 2.34 g

F₃: 1.94 g

F₄: 923.2 mg

De **F₁** se aislaron: laurencenona B (**8**)³² (69.8 mg); **115**¹⁰² (60.0 mg) y obtusol (**81**)⁹⁸ (116.0 mg). La separación de estos productos se efectuó por cromatografía de exclusión molecular, ($\phi_{\text{int}}= 5.0$ cm y $h_{\text{gel}}= 36.0$ cm).

De **F₂** se obtuvo laurencenona B (**8**)³² (171.9 mg) y laurencenona A (**6**)³² (949.6 mg) y dos fracciones, **F₂₋₁** (121.7 mg) y **F₂₋₂** (91.1 mg), [sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}}= 5.0$ cm y $h_{\text{gel}}= 36.0$ cm)]. De **F₂₋₁** se aisló **43**⁷⁸ (2.5 mg), [columna de gel de sílice ($\phi_{\text{int}}= 3.5$ cm y $h_{\text{gel}}= 23.0$ cm), hexano/acetato de etilo 8.5:1.5]. De **F₂₋₂** se obtuvo obtusol (**81**)⁹⁸ (7.0 mg), [columna de gel de sílice ($\phi_{\text{int}}= 3.5$ cm y $h_{\text{gel}}= 18.0$ cm), eluida en hexano/acetato de etilo 9:1] y dos nuevas fracciones:

F₂₋₂₋₁: 39.4 mg

F₂₋₂₋₂: 5.5 mg

De **F₂₋₂₋₁** se separó **L2** (5.7 mg, $t_r= 88.5$ min) y **L3** (3.3 mg, $t_r= 92.0$ min), denominados gomerona B y C, respectivamente, [CLAR (Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano/acetato de etilo al 8% en AcOEt, 3.5 mL/min, UV].

De la fracción **F₂₋₂₋₂**, se obtuvo **L12**, [CLAR, Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano/acetato de etilo 6:4, 3.5 mL/min, UV, 1.6 mg, $t_r= 33.0$ min].

La fracción **F₃** es rica en: laurencenona B (**8**)³² (17.3 mg); laurencenona A (**6**)³² (508.9 mg); **114**¹⁰² (28.7 mg); obtusol (**81**)⁹⁸ (258.1 mg) y **L14** (262.6 mg), [columna de exclusión molecular, sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}}= 5.0$ cm y $h_{\text{gel}}= 36.0$ cm)].

De la fracción **F₄** se obtuvo 11.0 mg de **76**^{98,99} [columna de exclusión molecular, sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}}= 5.0$ cm y $h_{\text{gel}}= 36.0$ cm)], seguido de CLAR [Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano/EtOAc al 15%, $t_r= 16.6$ min, 3.5 mL/min, UV].

Estudio de la fracción G (20%, 1.82 g). El análisis por ccf y por RMN de ¹H, de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}}= 5.0$ cm y $h_{\text{gel}}= 36.0$ cm), permitió agruparlas en:

G₁: 396.5 mg

G₂: 293.0 mg

G₃: 80.1 mg

De **G₁** se obtuvo laurencenona A (**6**)³² (8.8 mg), **L14** (37.9 mg) y **L16** (23.4 mg), [columna de gel de sílice ($\phi_{\text{int}} = 3.5$ cm y $h_{\text{gel}} = 25.0$ cm), hexano/acetato de etilo 8:2].

De **G₂** se separó laurencenona A (**6**)³² [columna de gel de sílice ($\phi_{\text{int}} = 3.5$ cm y $h_{\text{gel}} = 20.0$ cm), eluida con hexano/acetato de etilo 8:2]. Laurencenona A se purificó por CLAR [Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano-acetato de etilo 8:2, 3.5 mL/min, UV, 44.1 mg, $t_r = 36.8$ min].

De **G₃** se obtuvo ma'iliohydrina (**122**),¹²¹ (8.5 mg, $t_r = 31.6$ min), utilizando el procedimiento cromatografico aplicado a **G₂**.

Estudio de la fracción H (20%, 4.41 g). Por análisis de ccf y de RMN de ¹H de las fracciones obtenidas de una columna de exclusión molecular, con relleno de sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}} = 5.0$ cm y $h_{\text{gel}} = 36.0$ cm), estas se agruparon en:

H₁: 91.7 mg

H₂: 131.5 mg

De **H₁** se obtuvo laurencenona A (**6**)³² (8.6 mg) y **76**^{98,99} (5.3 mg). [Columna de exclusión molecular con relleno de sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}} = 2.5$ cm y $h_{\text{gel}} = 32.0$ cm)].

De la fracción **H₂** se obtuvo 1.7 mg de **114**¹⁰² y 3.1 mg de **15**.⁴² [Columna húmeda de gel de sílice ($\phi_{\text{int}} = 3.5$ cm y $h_{\text{gel}} = 15.0$ cm), hexano 85%, acetato de etilo 15%].

Estudio de la fracción I (20%, 1.14 g). El residuo de 1.14 g se dividió en dos porciones, una de 546.6 mg y otra de 590.7 mg. Estas porciones se cromatografiaron en sendas columnas de sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}} = 3.2$ cm y $h_{\text{gel}} = 36.0$ cm) y, atendiendo a los análisis de ccf y de RMN de ¹H, el conjunto de las fracciones se agruparon en:

I₁: 449.6 mg

I₂: 131.6 mg

La fracción **I₁** es el nuevo producto **L16**, prácticamente en estado puro.

De **I₂** se obtuvo **L16** (9.3 mg) [cromatografía de exclusión molecular ($\phi_{\text{int}} = 5.0$ cm y $h_{\text{gel}} = 36.0$ cm)], y dos fracciones. De una de ellas (43.7 mg), se aisló gomerolactona A (**L5**) (6.6 mg), [CLAR, (Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano-acetato de etilo 8:2, 3.5 mL/min, UV, $t_r = 43.5$ min)]. De la segunda fracción (15.1 mg) se obtuvo **75**,^{98,99} [Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano-acetato de etilo al 20%, 3.5 mL/min, UV, 0.6 mg, $t_r = 3.4$ min].

Estudio de la fracción J (20%, 0.98 g). De la cromatografía de esta fracción, [exclusión molecular de sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}}= 5.0$ cm y $h_{\text{gel}}= 36.0$ cm)], se obtuvo un residuo de 701.3 mg, que rindió **L16** (25.6 mg) y una fracción de 68.7 mg, [columna húmeda de gel de sílice ($\phi_{\text{int}}= 3.5$ cm y $h_{\text{gel}}= 22.0$ cm) hexano-acetato de etilo 7:3]. De la CLAR de esta última fracción se aisló **L6** (34.8 mg), [Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano-acetato de etilo 8:2, 3.5 mL/min, UV, $t_r= 39.2$ min].

Estudio de la fracción K (20-30%, 0.84 g). Del residuo **K** se obtuvo una porción de interés **K₁** de 125.4 mg, [sephadex LH-20 de $\phi_{\text{int}}= 5.0$ cm y $h_{\text{gel}}= 36.0$ cm.] La porción **K₁** rindió **15⁴²** (18.2 mg), **5⁴²** (15.6 mg) y una fracción de 27.4 mg, [cromatografía líquida en columna ($\phi_{\text{int}}= 3.5$ cm y $h_{\text{gel}}= 15.0$ cm), hexano/acetato de etilo al 20% y al 25% en acetato de etilo]. De dicha fracción (27.4 mg) se aisló el nuevo producto **L10**, [CLAR, (Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano-acetato de etilo al 25%, 3.5 mL/min, UV, 6.9 mg, $t_r= 40.5$ min)].

Estudio de la fracción L (30%, 3.12 g). La porción **L** se fraccionó [cromatografía de exclusión molecular en sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}}= 5.0$ cm y $h_{\text{gel}}= 36.0$ cm)] en:

L₁: 243.7 mg

L₂: 657.3 mg

De **L₁** se obtuvieron **15⁴²** (12.7 mg), **43⁷⁸** (6.8 mg) y el nuevo producto **L13** (11.0 mg), [columna de gel de sílice ($\phi_{\text{int}}= 3.5$ cm y $h_{\text{gel}}= 18.0$ cm), hexano/acetato de etilo 7:3]; y de **L₂** el producto **5⁴²**.

Estudio de la fracción M (30-50%, 1.25 g). Por cromatografía en sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}}= 5.0$ cm y $h_{\text{gel}}= 36.0$ cm), **M** se subdividió en las siguientes fracciones:

M₁: 81.3 mg

M₂: 150.4 mg

M₃: 224.4 mg

La fracción **M₁** se compone mayoritariamente de majusculona (**69**),⁸⁰ mientras que la fracción **M₃** contiene, en esencia, el producto gomerolactona C, **L7**.

De **M₂** se aisló **5⁴²** (127.2 mg) y **L15** (10.5 mg) [columna en gel de sílice ($\phi_{\text{int}}= 3.0$ cm y $h_{\text{gel}}= 20.0$ cm), hexano/acetato de etilo 6.5:3.5].

Estudio de la fracción N (50%, 2.29 g). Por cromatografía de exclusión molecular [sephadex LH-20 de $\phi_{\text{int}}= 5.0$ cm y $h_{\text{gel}}= 36.0$ cm.], la fracción **N** se subdividió en:

N₁: 42.1 mg

N₂: 231.5 mg

N₃: 47.6 mg

De **N₁** se obtuvo 15.3 mg de majusculona (**69**),⁸⁰ [cromatografía en columna de gel de sílice ($\phi_{\text{int}} = 2.5$ cm y $h_{\text{gel}} = 18.0$ cm) hexano-acetato de etilo 6:4].

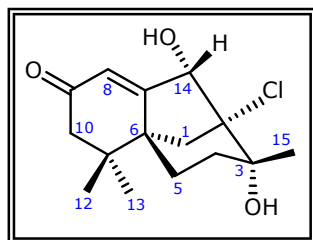
De la fracción **N₂** se aislaron los nuevos productos **L15** (9.0 mg) y **L8** (47.0 mg), éste último llamado gomerolactona D, [cromatografía en columna húmeda ($\phi_{\text{int}} = 3.0$ cm y $h_{\text{gel}} = 15.0$ cm), hexano-acetato de etilo 6:4].

De **N₃** se obtuvo gomerona A (**L1**) (8.4 mg), [cromatografía en columna de gel de sílice $\phi_{\text{int}} = 3.0$ cm y $h_{\text{gel}} = 15.0$ cm, hexano-acetato de etilo 6:4].

A continuación se relacionan los productos con nuevas estructuras químicas caracterizadas en este estudio, con detalle de sus respectivas constantes físicas, espectrometría de masas y datos espectroscópicos de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) y de RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃).

3.3.4. Datos experimentales obtenidos de los compuestos aislados de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas.

Gomerona A, L1



Aceite incoloro.

[α]²⁵_D -73.3 (c 0.30, CHCl₃).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 3433, 2965, 1658 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) m/z (%) 284/286 [M]⁺ (17, 8), 266/268 [M-H₂O]⁺ (16, 7), 256/258 [M-CO]⁺ (21, 8), 249 [M-Cl]⁺ (19), 238/240 [M-CO₂]⁺ (14, 9), 223/225 [M-CO₂-CH₃]⁺ (18, 5), 121 (100).

EMAR m/z [M]⁺ 286.1162 (calculado para C₁₅H₂₁O₃³⁷Cl, 286.1150), 284.1181 (calculado para C₁₅H₂₁O₃³⁵Cl, 284.1179), [M-H₂O]⁺ 268.1049 (calculado para C₁₅H₁₉O₂³⁷Cl, 268.1044), 266.1085 (calculado para C₁₅H₁₉O₂³⁵Cl, 266.1074), [M-Cl]⁺ 249.1495 (calculado para C₁₅H₂₁O₃, 249.1491), [M-CO₂]⁺ 240.1291 (calculado para C₁₄H₂₁O³⁵Cl, 240.1281).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 1.01 (3H, s, H-12), 1.03 (3H, s, H-13), 1.31 (1H, m, H-4), 1.35 (3H, s, H-15), 1.66 (1H, m, H-5), 1.89 (1H, m, H-4), 1.93 (1H, m, H-5), 2.07

(1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-10), 2.14 (1H, dd, $J = 2.5, 11.4$ Hz, H-1), 2.47 (1H, dd, $J = 1.95, 11.2$ Hz, H-1), 2.56 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-10), 4.29 (1H, s, H-14), 6.19 (1H, s, H-8).

RMN ¹H (500 MHz, C₆D₆) δ 0.55 (3H, s, H-12), 0.74 (3H, s, H-13), 0.74 (1H, m, H-4), 0.96 (3H, s, H-15), 1.04 (1H, m, H-5), 1.45 (1H, ddd, $J = 1.6, 5.1, 14.5$ Hz, H-4), 1.45 (OH-3), 1.56 (1H, ddd, $J = 5.0, 12.3, 13.6$ Hz, H-5), 1.83 (OH-14, d, $J = 2.5$ Hz), 1.93 (1H, d, $J = 17.3$ Hz, H-10), 1.99 (1H, dd, $J = 2.8, 11.0$ Hz, H-1), 2.21 (1H, d, $J = 17.3$ Hz, H-10), 2.25 (1H, dd, $J = 1.9, 11.0$ Hz, H-1), 3.69 (1H, s, H-14), 6.20 (1H, s, H-8).

RMN ¹³C (127.5 MHz, CDCl₃) δ 24.1 (CH₃, C-12), 25.2 (CH₃, C-13), 25.8 (CH₃, C-15), 28.9 (CH₂, C-5), 34.4 (CH₂, C-4), 37.6 (C, C-11), 38.8 (CH₂, C-1), 48.6 (CH₂, C-10), 51.5 (C, C-6), 73.4 (C, C-2), 73.7 (CH, C-14), 85.3 (C, C-3), 125.1 (CH, C-8), 168.9 (C, C-7), 199.0 (C, C-9).

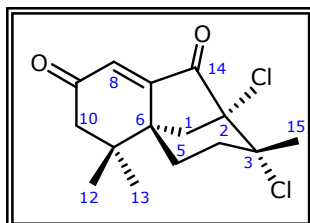
RMN ¹³C (125.7 MHz, C₆D₆) δ 22.9 (CH₃, C-13), 24.8 (CH₃, C-12), 25.6 (CH₃, C-15), 28.9 (CH₂, C-5), 34.5 (CH₂, C-4), 37.5 (C, C-11), 39.0 (CH₂, C-1), 48.7 (CH₂, C-10), 51.4 (C, C-6), 72.9 (C, C-2), 73.8 (CH, C-14), 85.6 (C, C-3), 125.3 (CH, C-8), 168.2 (C, C-7), 197.4 (C, C-9).

Acetilación de L1. En un balón de 2 ml de capacidad, con 1.4 mg de **L1**, se añadió 0.3 mL de C₅H₅N y 0.5 mL de Ac₂O. La mezcla se agitó a 25°C durante 24 h, luego se hidrolizó con HCl acuoso al 5% y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua destilada, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente para obtener 1.1 mg del derivado acetilado **L1-a**.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 1.00 (3H, s, H-13), 1.03 (3H, s, H-12), 1.42 (3H, s, H-15), 2.15 (3H, s, COCH₃), 3.64 (1H, s, OH), 5.66 (1H, s, H-14), 6.04 (1H, s, H-8).

RMN ¹³C (127.5 MHz, CDCl₃) δ 14.1 (OCOCH₃), 20.7 (CH₃, C-13), 24.1 (CH₃, C-12), 25.3 (CH₃, C-15), 28.9 (CH₂, C-5), 34.3 (CH₂, C-4), 37.8 (C, C-11), 40.2 (CH₂, C-1), 48.6 (CH₂, C-10), 51.5 (C, C-6), 73.3 (C, C-2), 77.2 (CH, C-14), 81.0 (C, C-3), 125.5 (CH, C-8), 167.2 (C, C-7), 169.8 (OCOCH₃), 198.5 (C, C-9).

Gomerona B, L2



Aceite incoloro.

$[\alpha]^{25}_D +49.1$ (c 0.29, CHCl₃).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 2968, 1742, 1682 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) m/z (%) 300/302/304 $[M]^+$ (3, 2, <1), 265/267 $[M-Cl]^+$ (100, 32), 247/249 $[M-H_2O-Cl]^+$ (6, 2), 229 $[M-HCl-Cl]^+$ (9).

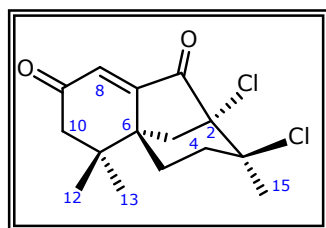
EMAR m/z $[M]^+$ 302.0653 (calculado para $C_{15}H_{18}O_2^{35}Cl^{37}Cl$, 302.0654), 300.0692 (calculado para $C_{15}H_{18}O_2^{35}Cl_2$, 300.0684), $[M-Cl]^+$ 267.0962 (calculado para $C_{15}H_{18}O_2^{37}Cl$, 267.0966), 265.0991 (calculado para $C_{15}H_{18}O_2^{35}Cl$, 265.0995), $[M-H_2O-Cl]^+$ 249.0853 (calculado para $C_{15}H_{16}O_2^{37}Cl$, 249.0860), 247.0892 (calculado para $C_{15}H_{16}O_2^{35}Cl$, 247.0890), $[M-HCl-Cl]^+$ 229.1238 (calculado para $C_{15}H_{17}O_2$, 229.1229).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 0.99 (3H, s, H-13), 1.14 (3H, s, H-12), 1.72 (1H, ddd, $J = 4.9, 12.8, 15.9$ Hz, H-4), 1.90 (3H, s, H-15), 1.98 (1H, dddd, $J = 2.4, 2.4, 4.9, 13.3$ Hz, H-5), 2.18 (1H, dd, $J = 3.1, 12.4$ Hz, H-1), 2.21 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-10), 2.31 (1H, ddd, $J = 4.9, 13.3, 13.3$ Hz, H-5), 2.46 (1H, ddd, $J = 1.8, 4.9, 15.9$ Hz, H-4), 2.67 (1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-10), 2.96 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-1), 6.57 (1H, s, H-8).

RMN ^{13}C (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 24.0 (CH_3 , C-13), 24.3 (CH_3 , C-12), 29.7 (CH_3 , C-15), 29.9 (CH_2 , C-5), 38.4 (C, C-11), 40.2 (CH_2 , C-4), 43.9 (CH_2 , C-1), 48.0 (C, C-6), 48.9 (CH_2 , C-10), 70.8* (C, C-3), 79.9* (C, C-2), 125.0 (CH, C-8), 155.0 (C, C-7), 196.3 (C, C-14), 204.6 (C, C-9).

*Intercambiables.

Gomerona C, L3



Aceite incoloro.

$[\alpha]_D^{25} +121.2$ (c 0.17, $CHCl_3$).

IR (disolución) ν_{max} 2966, 1746, 1687 cm^{-1} .

EM (IE, 70eV) m/z (%) 300/302/304 $[M]^+$ (23, 14, 3), 265/267 $[M-Cl]^+$ (100, 34), 229 $[M-HCl-Cl]^+$ (8).

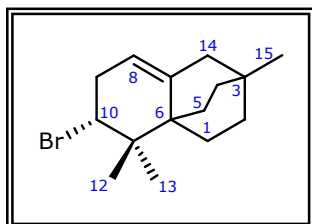
EMAR m/z $[M]^+$ 302.0659 (calculado para $C_{15}H_{18}O_2^{35}Cl^{37}Cl$, 302.0654), 300.0697 (calculado para $C_{15}H_{18}O_2^{35}Cl_2$, 300.0684), $[M-Cl]^+$ 267.0963 (calculado para $C_{15}H_{18}O_2^{37}Cl$, 267.0966), 265.0992 (calculado para $C_{15}H_{18}O_2^{35}Cl$, 265.0995), $[M-HCl-Cl]^+$ 229.1234 (calculado para $C_{15}H_{17}O_2$, 229.1229).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 0.99 (3H, s, H-13), 1.13 (3H, s, H-12), 1.70 (3H, ddd, $J = 5.4, 12.8, 12.8$ Hz, H-4), 1.70 (3H, s, H-15), 1.97 (1H, m, H-5), 2.14 (1H, dd, $J = 3.0, 12.3$ Hz, H-1), 2.21 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-10), 2.26 (1H, m, H-4), 2.32 (1H, m, H-5), 2.67 (1H, d, $J = 17.4$ Hz, H-10), 2.95 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-1), 6.57 (1H, s, H-8).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 23.9 (CH₃, C-13), 24.3 (CH₃, C-12), 27.8 (CH₃, C-15), 29.4 (CH₂, C-5), 38.4 (C, C-11), 39.0 (CH₂, C-4), 42.0 (CH₂, C-1), 47.9 (C, C-6), 49.0 (CH₂, C-10), 73.6* (C, C-3), 79.4* (C, C-2), 125.1 (CH, C-8), 154.3 (C, C-7), 198.2 (C, C-14), 199.8 (C, C-9).

*Intercambiables.

L4



Aceite incoloro.

[α]_D²⁵ +209.1 (c 0.11, CHCl₃).

IR (disolución) ν_{máx} 1673 cm⁻¹.

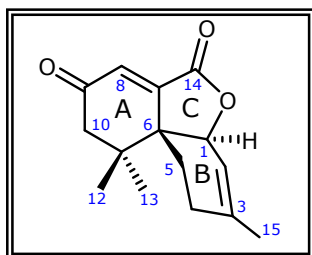
EM (IE, 70 eV) m/z (%) 282/284 [M]⁺ (45, 44), 253/255 [M-C₂H₅]⁺ (59, 56), 203 [C₁₅H₂₃] (100).

EMAR m/z [M]⁺ 284.0970 (calculado para C₁₅H₂₃⁸¹Br, 284.0963), 282.0988 (calculado para C₁₅H₂₃⁷⁹Br, 282.0983), 255.058 (calculado para C₁₃H₁₈⁸¹Br, 255.0571), 253.0595 (calculado para C₁₃H₁₈⁷⁹Br, 253.0592), 203.1808 (calculado para C₁₅H₂₃, 203.1800).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 0.80 (3H, s, H-15), 0.89 (3H, s, H-13), 0.95 (3H, s, H-12), 1.25 (1H, m, H-4), 1.35 (1H, m, H-2), 1.35 (1H, m, H-4), 1.45 (1H, m, H-2), 1.50 (1H, m, H-5), 1.51 (1H, m, H-1), 1.57 (1H, m, H-1), 1.60 (1H, m, H-5), 1.83 (1H, d, J = 15.5 Hz, H-14), 2.10 (1H, m, H-14), 2.50 (2H, m, H-9), 4.47 (1H, dd, J = 8.3, 8.3 Hz, H-10), 5.14 (1H, s, H-8).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 17.5 (CH₃, C-13), 23.4 (CH₃, C-12), 25.9 (CH₂, C-1), 27.3 (CH₃, C-15), 29.1 (CH₂, C-5), 29.6 (C, C-3), 32.7 (CH₂, C-2), 33.9 (CH₂, C-4), 35.0 (CH₂, C-9), 38.8 (C, C-11), 41.2 (C, C-6), 42.3 (CH₂, C-14), 63.5 (CH, C-10), 116.6 (CH, C-8), 141.9 (C, C-7).

Gomerolactona A, L5



Aceite incoloro.

[α]_D²⁵ +30.3 (c 0.33, CHCl₃).

IR (película) ν_{máx} 1757, 1680, 1452 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) m/z (%) 246 [M]⁺ (11), 218 [M-CO]⁺ (6), 202 [M-CO₂]⁺ (6), 162 (100).

EMAR m/z $[M]^+$ 246.1252 (calculado para $C_{15}H_{18}O_3$, 246.1256), $[M-CO]^+$ 218.1317 (calculado para $C_{14}H_{18}O_2$, 218.1307), $[M-CO_2]^+$ 202.1362 (calculado para $C_{14}H_{18}O$, 202.1358).

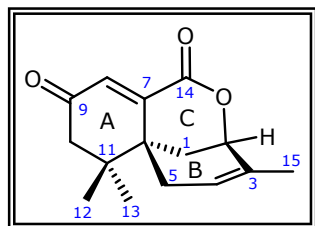
RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.07 (3H, s, H-13), 1.14 (3H, s, H-12), 1.70 (1H, m, H-5), 1.82 (3H, s, H-15), 2.10 (1H, m, H-5), 2.13 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-4), 2.18 (1H, d, $J = 17.7$ Hz, H-10), 2.33 (1H, m, H-4), 2.75 (1H, d, $J = 17.7$ Hz, H-10), 4.87 (1H, d, $J = 5.1$ Hz, H-1), 5.82 (1H, dd, $J = 1.5, 5.4$ Hz, H-2), 6.56 (1H, s, H-8).

RMN ^{13}C (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 23.5 (CH_3 , C-15), 24.7 (CH_2 , C-5), 25.6 (CH_3 , C-12), 25.6 (CH_3 , C-13), 28.8 (CH_2 , C-4), 39.5 (C, C-11), 45.9 (C, C-6), 49.2 (CH_2 , C-10), 75.8 (CH, C-1), 116.9 (CH, C-2), 126.3 (CH, C-8), 144.0 (C, C-3), 155.0 (C, C-7), 168.1 (C, C-14), 198.1 (C, C-9).

Preparación de los complejos 2,2,2-trifluoro-1-(9-antril)etanol de L5.

Para la realización de este experimento,¹⁴⁷ se prepararon dos tubos de RMN de 5 mm con 1.0 mg (4.06 μ mol) de L5 disuelto en 0.5 mL de $CDCl_3$, a los que se le agregaron 6 equivalentes de (*R*)- o (*S*)-2,2,2-trifluoro-1-(9-antril)etanol. Los espectros de RMN de 1H (500 MHz) fueron realizados a 20°C, -20°C y -33°C.

Gomerolactona B, L6



Aceite incoloro.

$[\alpha]^{25}_D +11.5$ (c 1.74, $CHCl_3$).

IR (disolución) $\nu_{m\acute{a}x}$ 1717, 1681, 1471 cm^{-1} .

EM (IE, 70eV) m/z (%) 246 $[M]^+$ (62), 218 $[M-CO]^+$ (8), 202 $[M-CO_2]^+$ (4), 192 $[C_{15}H_{12}]^+$ (57), 163 (100).

EMAR m/z $[M]^+$ 246.1268 (calculado para $C_{15}H_{18}O_3$, 246.1256), $[M-CO]^+$ 218.1299 (calculado para $C_{14}H_{18}O_2$, 218.1307), 192.0936 (calculado para $C_{15}H_{12}$, 192.0939).

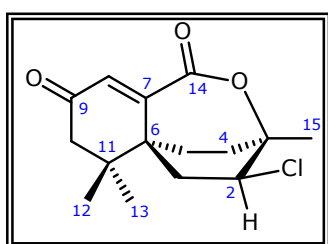
RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.04 (3H, s, H-13), 1.08 (3H, s, H-12), 1.84 (3H, s, H-15), 1.88 (1H, ddd, $J = 0.9, 2.7, 13.5$ Hz, H-1), 2.17 (1H, dddd, $J = 1.8, 1.8, 5.4, 17.4$ Hz, H-5), 2.24 (1H, dd, $J = 1.2, 18.3$ Hz, H-10), 2.28 (1H, ddd, $J = 1.8, 3.3, 13.5$ Hz, H-1), 2.68 (1H, d, $J = 18.3$ Hz, H-10), 2.74 (1H, ddd, $J = 2.7, 2.7, 17.4$ Hz, H-5), 4.66 (1H, dd, $J = 3.0, 3.0$ Hz, H-2), 5.59 (1H, ddd, $J = 1.8, 1.8, 5.4$ Hz, H-4), 6.98 (1H, s, H-8).

RMN ^{13}C (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 20.6 (CH_3 , C-15), 23.7 (CH_3 , C-13), 24.1 (CH_3 , C-12), 27.7 (CH_2 , C-1), 35.9 (CH_2 , C-5), 39.1 (C, C-11), 40.4 (C, C-6), 48.9 (CH_2 , C-

10), 74.7 (CH, C-2), 124.2 (CH, C-4), 133.9 (CH, C-8), 134.2 (C, C-3), 150.2 (C, C-7), 164.9 (C, C-14), 198.2 (C, C-9).

Preparación de los complejos 2,2,2-trifluoro-1-(9-antril)etanol de L6. El compuesto **L6** (1.0 mg) y CDCl₃ (0.5 mL) se colocaron en un tubo de RMN de 5 mm con (*R*)-2,2,2-trifluoro-1-(9-antril)etanol (6 equivalentes). Se siguió el mismo procedimiento experimental para la producción de los complejos correspondientes con (*S*)-2,2,2-trifluoro-1-(9-antril)etanol. Los espectros de RMN de ¹H se llevaron a cabo a 20°C, -20°C y -33°C.

Gomerolactona C, L7



Cristalino. Punto de fusión: 92.5°C.

$[\alpha]_D^{25}$ -13.9 (*c* 3.60, CHCl₃).

IR (película) ν_{\max} 1701, 1676, 1425 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) *m/z* (%) 282/284 [M]⁺ (20, 8), 247 [M-Cl]⁺ (8), 238/240 [M-CO₂]⁺ (24, 11), 203 [M-CO₂-Cl]⁺ (55), 183 (100).

EMAR *m/z* [M]⁺ 284.0986 (calculado para C₁₅H₁₉O₃³⁷Cl, 284.0993), 282.1030 (calculado para C₁₅H₁₉O₃³⁵Cl, 282.1023).

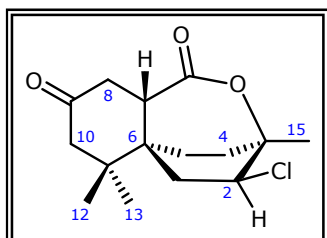
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 0.96 (3H, s, H-13), 1.02 (3H, s, H-12), 1.54 (3H, s, H-15), 1.85 (1H, m, H-4), 1.85 (2H, m, H-5), 2.19 (1H, m, H-4), 2.19 (1H, m, H-10), 2.56 (2H, m, H-1), 2.56 (1H, m, H-10), 4.16 (1H, s, H-2), 6.80 (1H, s, H-8).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 23.0 (CH₃, C-13), 23.7 (CH₃, C-12), 25.6 (CH₂, C-5), 27.1 (CH₃, C-15), 34.0 (CH₂, C-4), 36.4 (CH₂, C-1), 39.2 (C, C-11), 42.5 (C, C-6), 48.7 (CH₂, C-10), 61.1 (CH, C-2), 81.2 (C, C-3), 133.5 (CH, C-8), 153.6 (C, C-7), 167.1 (C, C-14), 197.7 (C, C-9).

Datos de Rayos X. Los datos de difracción de rayos X de un cristal único de **L7** se adquirieron a temperatura ambiente con un difractómetro CCD Kappa Nonius por medio de una radiación Mo-K_a monocromática de grafito ($\lambda = 0.71073$ Å). Los parámetros de red y la orientación de la matriz se determinaron por cálculos de mínimos cuadrados de las reflexiones obtenidas por una exploración θ - χ (método Dirac/Isq). La recolección de datos y la reducción de datos de **L7** fueron clasificados, integrados y puestos a escala por medio del programa EVALCCD. Todas las reflexiones independientes medidas se usaron en el análisis. La estructura de **L7** se resolvió por métodos directos usando el programa computacional SHELXS97. La configuración absoluta fue representada con SHELXS97. El factor Flack fue refinado sin restricciones

para permitir la completa convergencia de los datos, logrando un aumento en el refinamiento final de los valores de 0.00(8) para **L7**, valores que permitieron mostrar la forma del enantiómero como se ha representado en la figura anterior. Todos los átomos no hidrógenos fueron refinados anisótricamente por la técnica de mínimos-cuadrados matriz-llena en F^2 con el programa SHELXS97. Los átomos de hidrógeno en **L7** se situaron en las posiciones calculadas por el modelo. Los cálculos geométricos finales y las manipulaciones gráficas se llevaron a cabo con los programas PARST97 y PLATON. CCDC-692916 para **L7** contiene los datos cristalográficos complementarios. Estos datos se pueden obtener via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif del Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge.

Gomerolactona D, L8



Cristalino. Punto de fusión: 168.8°C

$[\alpha]^{25}_D +0.76$ (c 2.65, CHCl_3).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 2961, 1710 cm^{-1} .

EM (IE, 70eV) m/z (%) 284/286 $[\text{M}]^+$ (9, 3), 269/271 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ (5, 1), 266/268 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (4, 1), 249 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ (12), 231 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{Cl}]^+$ (10), 213 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}-\text{Cl}]^+$ (10), 205 $[\text{M}-\text{CO}_2-\text{Cl}]^+$ (36), 121 (100).

EMAR m/z $[\text{M}]^+$ 286.1137 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_3^{37}\text{Cl}$, 286.1150), 284.1180 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_3^{35}\text{Cl}$, 284.1179), $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ 269.0948 (calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_3^{35}\text{Cl}$, 269.0944), $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ 249.1500 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_3$, 249.1491), $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{Cl}]^+$ 231.1393 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_2$, 231.1385), $[\text{M}-\text{CO}_2-\text{Cl}]^+$ 205.1592 (calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}$, 205.1592).

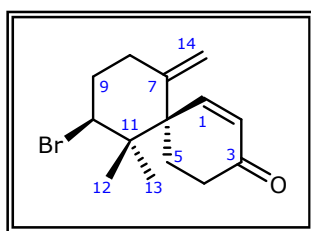
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 0.84 (3H, s, H-13), 0.93 (3H, s, H-12), 1.41 (3H, s, H-15), 1.67 (1H, ddd, $J = 2.0, 9.0, 14.5$ Hz, H-1), 1.77 (1H, m, H-5), 1.98 (1H, m, H-5), 1.98 (1H, dd, $J = 2.4, 15.4$ Hz, H-10), 2.10 (2H, m, H-4), 2.41 (1H, m, H-10), 2.44 (1H, m, H-8), 2.61 (1H, dd, $J = 9.0, 14.5$ Hz, H-1), 2.83 (1H, ddd, $J = 2.1, 4.0, 15.1$ Hz, H-8), 3.15 (1H, ddd, $J = 1.1, 4.0, 14.3$ Hz, H-7), 4.11 (1H, dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, H-2).

RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 20.7 (CH_2 , C-5), 22.9 (CH_3 , C-13), 24.7 (CH_3 , C-12), 27.2 (CH_3 , C-15), 34.1 (CH_2 , C-4), 38.5 (CH_2 , C-1), 39.3 (C, C-11), 39.8 (C, C-6), 41.5 (CH_2 , C-8), 50.1 (CH, C-7), 51.7 (CH_2 , C-10), 61.6 (CH, C-2), 79.8 (C, C-3), 172.3 (C, C-14), 206.1 (C, C-9).

Datos de Rayos X. Los datos de difracción de rayos X de un cristal único de **L8** se adquirieron a temperatura ambiente con un difractómetro CCD Kappa Nonius

por medio de una radiación Mo-K_a monocromática de grafito ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). Los parámetros de retícula y la orientación de la matriz se determinaron por cálculos de mínimos cuadrados de las reflexiones obtenidas por una exploración θ - χ (método Dirac/Isq). La recolección de datos y la reducción de datos de **L8** fueron clasificados, integrados y puestos a escala por medio del programa EVALCCD. Todas las reflexiones independientes medidas se usaron en el análisis. La estructura de **L8** se resolvió por métodos directos usando el programa computacional SHELXS97. La configuración absoluta fue representada con SHELXS97. El factor Flack fue refinado sin restricciones para permitir la completa convergencia de los datos, logrando un aumento en el refinamiento final de los valores de -0.06(8) para **L8**, valores que permitieron mostrar la forma del enantiómero como se ha representado en la figura anterior. Todos los átomos no hidrógenos se refinaron anisótricamente por la técnica de mínimos-cuadrados matriz-llena en F^2 con el programa SHELXS97. Los átomos de hidrógeno en **L8** se situaron en las posiciones calculadas por el modelo. Los cálculos geométricos finales y las manipulaciones gráficas se llevaron a cabo con los programas PARST97 y PLATON. CCDC-692917 para **L8** contiene los datos cristalográficos complementarios. Estos datos se pueden obtener via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif del Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge.

L9



Aceite incoloro.

$[\alpha]_D^{25} -20.6$ (c 0.34, CHCl₃).

IR (disolución) $\nu_{\text{máx}}$ 1680, 1454 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) m/z (%) 282/284 [M]⁺ (12, 7), 202 [M-HBr]⁺ (93), 69 [C₅H₉] (100).

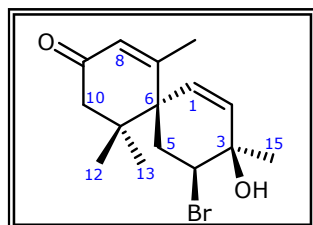
EMAR m/z [M]⁺ 284.0602 (calculado para C₁₄H₁₉O⁸¹Br, 284.0599), 282.0616 (calculado para C₁₄H₁₉O⁷⁹Br, 282.0619), 202.1355 (calculado para C₁₄H₁₈O, 202.1358).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 1.10 (3H, s, H-13), 1.19 (3H, s, H-12), 2.09 (1H, m, H-5), 2.12 (1H, m, H-9), 2.20 (1H, m, H-4), 2.28 (1H, m, H-5), 2.31 (1H, m, H-4), 2.35 (1H, m, H-8), 2.35 (1H, m, H-9), 2.45 (1H, m, H-8), 4.53 (1H, dd, $J = 4.8, 12.7$ Hz, H-10), 4.69 (1H, s, H-14), 5.04 (1H, s, H-14), 6.10 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-2), 6.90 (1H, dd, $J = 2.1, 10.6$ Hz, H-1).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 18.1 (CH₃, C-12), 26.1 (CH₃, C-13), 26.2 (CH₂, C-5), 32.9 (CH₂, C-8), 34.0 (CH₂, C-4), 34.0 (CH₂, C-9), 42.3 (C, C-11), 52.0 (C, C-6), 62.1

(CH, C-10), 115.3 (CH₂, C-14), 130.9 (CH, C-2), 144.8 (C, C-7), 153.2 (C, C-1), 199.0 (C, C-3).

L10



Aceite incoloro.

$[\alpha]^{25}_D +17.4$ (c 0.35, CHCl₃).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 3464, 1663, 1442 cm⁻¹.

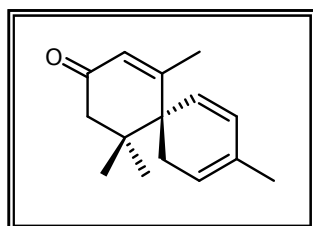
EM (IE, 70eV) m/z (%) 313/315 [M+1]⁺ (<1, <1), 312/314 [M]⁺ (<1, <1), 295/297 [M+1-H₂O]⁺ (<1, <1), 294/296 [M-H₂O]⁺ (<1, <1), 215/217 [M-H₂O-Br]⁺ (2, 1), 256 (98), 159 (100).

EMAR m/z [M+1]⁺ 315.0768 (calculado para C₁₅H₂₂O₂⁸¹Br, 315.0783), [M]⁺ 314.0704 (calculado para C₁₅H₂₁O₂⁸¹Br, 315.0783), 313.0816 (calculado para C₁₅H₂₂O₂⁷⁹Br, 313.0803), 294.0622 (calculado para C₁₅H₁₉O⁷⁹Br, 294.0619).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 1.03 (3H, s, H-13), 1.04 (3H, s, H-12), 1.46 (3H, s, H-15), 1.90 (3H, s, H-14), 2.10 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-10 α), 2.38 (1H, d, $J = 13.5$ Hz, H-5 β), 2.45 (1H, dd, $J = 4.5, 14.7$ Hz, H-5 α), 2.63 (1H, d, $J = 17.1$ Hz, H-10 β), 4.45 (1H, dd, $J = 4.5, 13.2$ Hz, H-4), 5.69 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-1), 5.88 (1H, s, H-8), 6.04 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-2).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 21.7 (CH₃, C-14), 25.1 (CH₃, C-13), 26.8 (CH₃, C-12), 29.5 (CH₃, C-15), 34.5 (CH₂, C-5), 40.1 (C, C-11), 48.5 (CH₂, C-10), 51.3 (C, C-6), 61.4 (CH, C-4), 66.9 (C, C-3), 126.3 (CH, C-8), 130.8 (CH, C-1), 133.7 (CH, C-2), 164.2 (C, C-7), 197.6 (C, C-9).

L11



Aceite incoloro.

$[\alpha]^{25}_D +2.0$ (c 1.49, CHCl₃).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 1668, 1425 cm⁻¹.

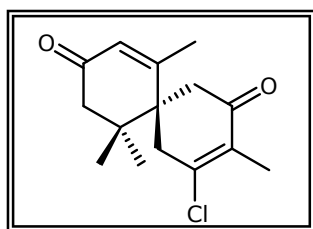
EM (IE, 70eV) m/z (%) 216 [M]⁺ (29), 201 [M-CH₃]⁺ (24), 173 [M-CH₃-C₂H₄]⁺ (25), 145 [C₁₀H₉O]⁺ (100).

EMAR m/z $[M]^+$ 216.1505 (calculado para $C_{15}H_{20}O$, 216.1514), 201.1275 (calculado para $C_{14}H_{17}O$, 201.1279), 173.0974 (calculado para $C_{12}H_{13}O$, 173.0966), 145.0655 (calculado para $C_{10}H_9O$, 145.0653).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 0.93 (3H, s, H-13), 0.94 (3H, s, H-12), 1.69 (3H, s, H-15), 1.94 (1H, s, H-14), 2.20 (2H, m, H-10), 2.28 (1H, m, H-5), 2.54 (1H, m, H-5), 5.36 (1H, s, H-4), 5.46 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-1), 5.72 (1H, s, H-8), 5.89 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-2).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 20.4 (CH₃, C-15), 21.7 (CH₃, C-14), 24.2 (CH₃, C-13), 24.2 (CH₃, C-12), 27.7 (CH₂, C-5), 39.9 (C, C-11), 45.5 (C, C-6), 46.8 (CH₂, C-10), 119.2 (CH, C-4), 124.4 (CH, C-8), 124.9 (CH, C-1), 128.1 (C, C-3), 128.4 (C, C-2), 165.2 (C, C-7), 197.5 (C, C-9).

L12



Aceite incoloro.

$[\alpha]_D^{25} +100$ (c 0.08, $CHCl_3$).

IR (disol.) ν_{max} 1671, 1639, 1467, 1442 cm^{-1}

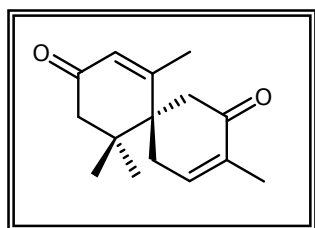
EM (IE, 70eV) m/z (%) 266/268 $[M]^+$ (13, 4), 210/212 $[M-C_2O_2]^+$ (78, 25), 175 $[C_{13}H_{19}]$ (34), 147 (100).

EMAR m/z $[M]^+$ 268.1031 (calculado para $C_{15}H_{19}O_2^{37}Cl$, 268.1044), 266.1076 (calculado para $C_{15}H_{19}O_2^{35}Cl$, 266.1074).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 1.05 (3H, s, H-13), 1.08 (3H, s, H-12), 1.90 (3H, s, H-14), 1.95 (3H, s, H-15), 2.33 (2H, s, H-10), 2.69 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-1 α), 2.72 (1H, ddd, $J = 1.5, 1.5, 19.0$ Hz, H-5 β), 2.78 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-1 β), 3.14 (1H, d, $J = 19.0$ Hz, H-5 α), 5.86 (1H, d, $J = 1.3$ Hz, H-8).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 12.2 (CH₃, C-15), 23.4 (CH₃, C-14), 24.9 (CH₃, C-12), 24.9 (CH₃, C-13), 39.4 (CH₂, C-5), 40.5 (C, C-11), 42.1 (CH₂, C-1), 47.1 (C, C-6), 48.5 (CH₂, C-10), 128.0 (CH, C-8), 133.6 (C, C-3), 150.9 (C, C-4), 164.0 (C, C-7), 195.2 (C, C-2), 196.9 (C, C-9).

L13



Aceite incoloro.

$[\alpha]^{25}_D +23.6$ (c 0.55, CHCl_3).

IR (disol.) $\nu_{\text{máx}}$ 1713, 1666, 1470, 1445 cm^{-1}

EM (IE, 70eV) m/z (%) 232 $[\text{M}]^+$ (25), 176

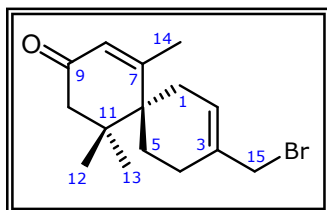
$[\text{C}_{13}\text{H}_{20}]^+$ (58), 82 (100).

EMAR m/z $[\text{M}]^+$ 232.1461 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$, 232.1463).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 1.03 (3H, s, H-13), 1.04 (3H, s, H-12), 1.80 (3H, s, H-15), 1.89 (3H, s, H-14), 2.30 (2H, m, H-10), 2.40 (1H, dddd, $J = 1.8, 1.8, 5.3, 19.9$ Hz, H-5 α), 2.60 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-1 β), 2.73 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-1 α), 2.80 (1H, d, $J = 19.9$ Hz, H-5 β), 5.82 (1H, s, H-8), 6.68 (1H, s, H-4).

RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 15.5 (CH_3 , C-14), 24.2 (CH_3 , C-15), 25.6 (CH_3 , C-12), 25.6 (CH_3 , C-13), 33.5 (CH_2 , C-5), 40.5 (C, C-11), 42.4 (CH_2 , C-1), 48.2 (C, C-6), 48.5 (CH_2 , C-10), 127.3 (CH, C-8), 135.5 (C, C-3), 142.8 (CH, C-4), 166.3 (C, C-7), 197.5 (C, C-2), 198.4 (C, C-9).

L14



Aceite incoloro.

$[\alpha]^{25}_D +26.4$ (c 1.90, CHCl_3).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 1663, 1430 cm^{-1} .

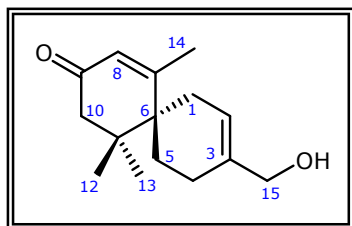
EM (IE, 70eV) m/z (%) 296/298 $[\text{M}]^+$ (19, 18), 278/280 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (68, 16), 217 $[\text{M}-\text{Br}]^+$ (64), 199 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{Br}]^+$ (6), 161 (100).

EMAR m/z $[\text{M}]^+$ 296.0785 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}^{79}\text{Br}$, 296.0776), 278.0673 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}^{79}\text{Br}$, 278.0670), 217.1599 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}$, 217.1592), 199.1487 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}$, 199.1487).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 0.94 (3H, s, H-13), 1.01 (3H, s, H-12), 1.85 (1H, m, H-5), 1.90 (1H, m, H-5), 1.94 (3H, d, $J = 1.1$ Hz, H-14), 2.08 (1H, m, H-10), 2.09 (1H, dd, $J = 4.3, 19.7$ Hz, H-1), 2.09 (1H, m, H-4), 2.18 (1H, m, H-4), 2.25 (1H, m, H-1), 2.60 (1H, d, $J = 17.3$ Hz, H-10), 3.96 (2H, m, H-15), 5.86 (1H, s, H-8), 5.98 (1H, s, H-2).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 23.9 (CH₃, C-14), 24.1 (CH₃, C-13), 24.4 (CH₂, C-4), 24.7 (CH₃, C-12), 28.3 (CH₂, C-1), 30.3 (CH₂, C-5), 38.4 (CH₂, C-15), 40.3 (C, C-11), 43.5 (C, C-6), 48.8 (CH₂, C-10), 127.2 (CH, C-8), 128.3 (CH, C-2), 134.5 (C, C-3), 169.2 (C, C-7), 198.3 (C, C-9).

L15



Aceite incoloro.

[α]²⁵_D +17.8 (c 0.45, CHCl₃).

IR (película) ν_{máx} 3410, 1649 cm⁻¹.

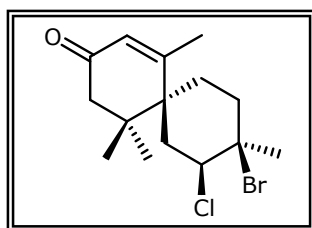
EM (IE, 70eV) *m/z* (%) 234 [M]⁺ (11), 216 [M-H₂O]⁺ (5), 151 [C₁₁H₁₉] (100), 147 [C₁₁H₁₅] (88).

EMAR *m/z* [M]⁺ 234.1615 (calculado para C₁₅H₂₂O₂, 234.1620), 216.1523 (calculado para C₁₅H₂₀O, 216.1514).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 0.94 (3H, s, H-13), 1.01 (3H, s, H-12), 1.86 (1H, m, H-5), 1.93 (1H, m, H-5), 1.95 (1H, m, H-4), 1.95 (3H, d, *J* = 1.5 Hz, H-14), 2.08 (1H, m, H-10), 2.14 (1H, m, H-1), 2.18 (1H, m, H-4), 2.29 (1H, m, H-1), 2.61 (1H, m, H-10), 4.03 (1H, m, H-15), 5.80 (1H, s, H-2), 5.85 (1H, s, H-8).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 23.9 (CH₂, C-4), 24.3 (CH₃, C-13), 24.3 (CH₃, C-14), 24.8 (CH₃, C-12), 27.8 (CH₂, C-1), 30.4 (CH₂, C-5), 40.5 (C, C-11), 43.9 (C, C-6), 49.0 (CH₂, C-10), 66.8 (CH₂, C-15), 123.3 (CH, C-2), 127.1 (CH, C-8), 137.6 (C, C-3), 169.7 (C, C-7), 198.5 (C, C-9).

L16



Aceite incoloro.

[α]²⁵_D -100.9 (c 1.07, CHCl₃).

IR (película) ν_{máx} 1669, 1445 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) *m/z* (%) 332/334/336 [M]⁺ (35, 48, 11), 280/282 [M-H₂O-HCl]⁺ (16, 3), 235/237 [M-H₂O-Br]⁺ (1, <1), 234/236 [M-H₂O-HBr]⁺ (18, 1), 199 [C₁₅H₁₉]⁺ (32), 197 (100).

EMAR *m/z* [M]⁺ 336.0498 (calculado para C₁₅H₂₂O³⁷Cl⁸¹Br, 336.0493), 334.0527 (calculado para C₁₅H₂₂O³⁵Cl⁸¹Br, 334.0522), 332.0537 (calculado para C₁₅H₂₂O³⁵Cl⁷⁹Br, 332.0543), 280.0659 (calculado para C₁₅H₁₉⁸¹Br, 280.0650), 235.1255 (calculado para

$C_{15}H_{20}^{35}Cl$, 235.1254), 234.1175 (calculado para $C_{15}H_{19}^{35}Cl$, 234.1175), 199.1490 (calculado para $C_{15}H_{19}$, 199.1487).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.12 (3H, s, H-13), 1.13 (3H, s, H-12), 1.84 (1H, m, H-5), 1.92 (1.72)* (3H, s, H-15), 2.00 (1H, m, H-5), 2.07 (2.11)* (3H, s, H-14), 2.16 (1H, m, H-4), 2.23 (1H, m, H-1), 2.24 (1H, m, H-4), 2.31 (1H, m, H-1), 2.34 (2H, m, H-10), 3.89 (1H, dd, $J = 4.6, 12.2$ Hz, H-2), 4.23* (1H, dd, $J = 4.6, 12.4$ Hz, H-2), 5.84 (1H, s, H-8).

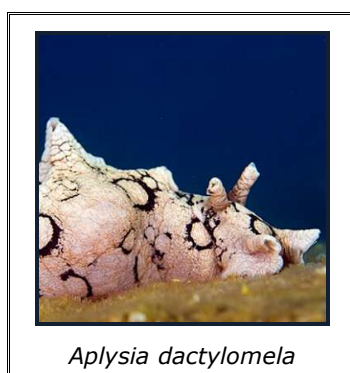
RMN ^{13}C (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 22.5 (CH_3 , C-14), 25.3 (24.1)* (CH_2 , C-5), 27.7 (CH_3 , C-13), 27.9 (CH_3 , C-12), 32.9 (31.3)* (CH_3 , C-15), 36.9 (35.6)* (CH_2 , C-1), 40.4 (C, C-11), 40.8 (39.7)* (CH_2 , C-4), 47.9 (C, C-6), 50.0 (CH_2 , C-10), 66.0 (65.5)* (CH_2 , C-2), 71.9 (C, C-3), 127.3 (CH, C-8), 166.9 (C, C-7), 197.8 (C, C-9).

El producto **Ap-1** se describe en la sección 3.4.4. de esta Tesis.

3.4. ESTUDIO DEL MOLUSCO *Aplysia dactylomela*.

El molusco *Aplysia dactylomela* pertenece a la clase de los Gastrópodos, subclase Opisthobranchia, orden Anaspidea, familia Aplysiidae, género *Aplysia*.

Los gastrópodos comprenden alrededor de 1.650 géneros repartidos en tres subclases: prosobranchia, pulmonata y opisthobranchia. La clase opisthobranchia son esencialmente marinos, y se caracterizan por tener la cavidad paleal y la mayor parte de las vísceras en el lado derecho del cuerpo. En el orden Anaspidea, que incluye al género *Aplysia*, se encuentran los mayores opisthobranchios conocidos, alcanzando hasta 40 cm de longitud.

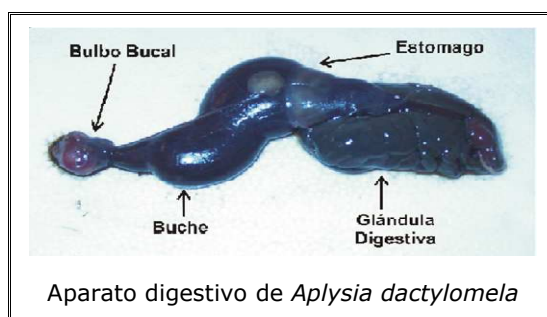


Los moluscos del género *Aplysia*, también llamados "liebres de mar", se encuentran en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo. Pueden alcanzar un tamaño de hasta 16 cm y un peso de 300 g. Son frecuentes en las zonas intermareales y en aguas poco profundas, donde existe una gran densidad de algas de las que se alimentan. Presentan cavidad paleal, branquia y el borde posterior del manto está enrollado para formar un sifón exhalante. No poseen defensa externa, sólo tienen una pequeña concha oculta en el manto por lo que, su cuerpo blando, queda expuesto a posibles depredadores. Por ello, han desarrollado otros mecanismos de defensa, como la secreción de un fluido de color púrpura que lanzan cuando se les toca o molesta. Si sufre ataques severos, la aplysia excreta un fluido blanco lechoso desde la glándula opalina, situada en la parte anterior de la cavidad paleal, llegando a provocar parálisis muscular e incluso la muerte de diversos organismos. Sin embargo, la glándula digestiva es la parte más tóxica de las aplysias y, por lo tanto, la de mayor interés para su estudio desde la perspectiva de los productos naturales.

3.4.1. Recolección, disección y extracción.

Las aplysias se recolectaron en la costa suroeste de la isla de La Palma y en Valle Gran Rey, isla de La Gomera, entre 1.5 y 3 m de profundidad. Cada molusco se diseccionó según el procedimiento que se describe a continuación:

El espécimen se fija con alfileres para tensar la piel y con un bisturí se realiza un corte longitudinal de la piel que comienza con una incisión detrás del tentáculo posterior derecho y continúa hasta el ano. Una vez abierta la aplysia, se separa el aparato digestivo del resto del cuerpo, mediante cortes a la altura de la boca, del ano, y otros tejidos circundantes. De esta manera se obtiene el aparato digestivo y el manto de forma independiente. En la fotografía se observa un aparato digestivo en el que se distinguen los siguientes órganos: boca, buche, estómago y glándula digestiva.



Se prepararon, de forma independiente y a temperatura ambiente, extractos acetónicos del aparato digestivo y del manto de 28 aplysias de La Palma. El disolvente se renovó periódicamente hasta agotar la extracción. Los extractos combinados de cada una de las partes se filtraron y concentraron en un rotavapor. Se obtuvieron dos residuos de color verde oscuro: 31.0 g procedente del aparato digestivo y 19.8 g del manto.

Por el mismo procedimiento se obtuvo un extracto de 121.0 g del aparato digestivo, y un extracto del manto de 495.3 g, de 41 aplysias recolectadas en La Gomera.

3.4.2. Estudio cromatográfico del extracto del manto de *Aplysia dactylomela* (La Palma).

El extracto del manto (19.8 g), por partición en $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ y $\text{EtOAc}:\text{H}_2\text{O}$, se fraccionó en:

Ap-M-D, 2.4 g, fracción de diclorometano.

Ap-M-Ac, 137.0 mg, fracción de acetato de etilo.

El residuo de diclorometano Ap-M-D, 2.4 g, se fraccionó por cromatografía de exclusión molecular [Sephadex LH-20, columna de 5.0 cm de diámetro interno y 60.0 cm de alto] y el seguimiento de la separación se realizó por ccf y por RMN de ¹H. Las fracciones de interés están representadas en el siguiente esquema:

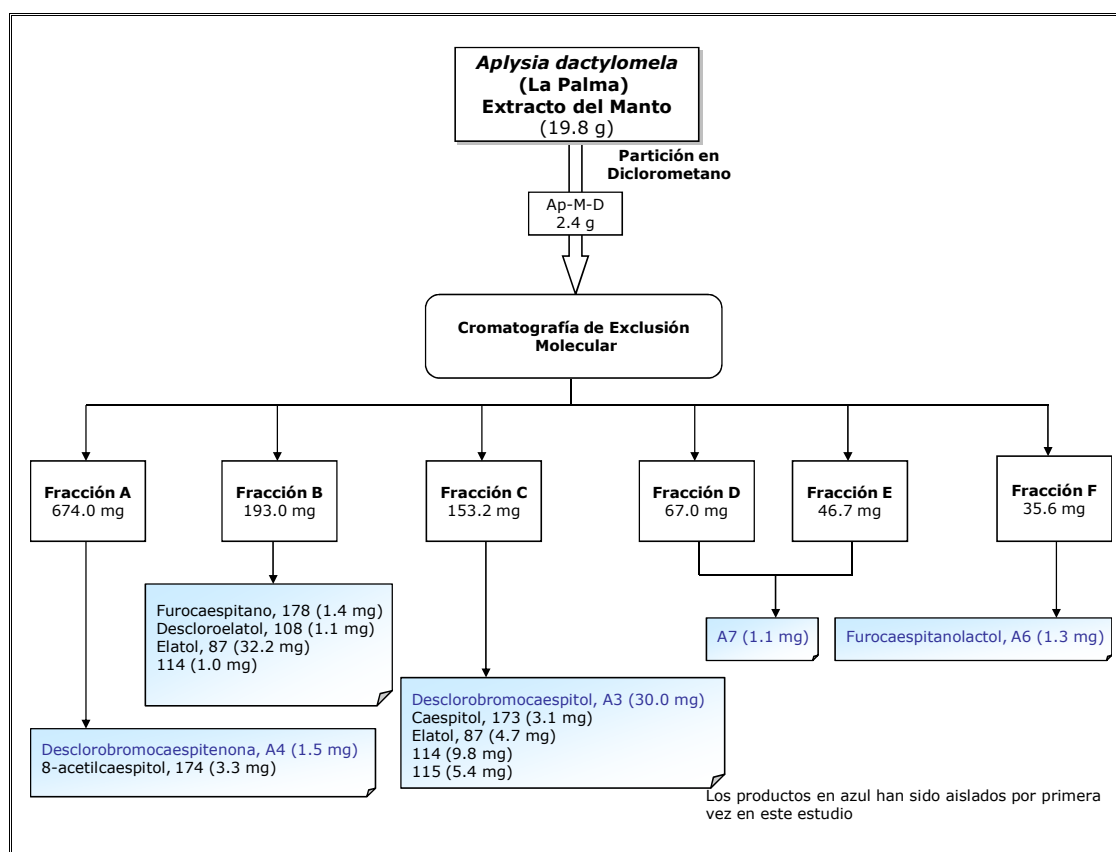


Figura 3.4.1. Esquema del estudio cromatográfico del manto de *Aplysia dactylomela* (La Palma).

Estudio de la fracción A (674.0 mg). De su cromatografía resultaron de interés las fracciones reagrupadas en **A₁**, (30.0 mg), [columna de gel de sílice, ϕ_{int} = 5.0 cm y h_{gel} = 12.0 cm, hexano/acetato de etilo con polaridad creciente]. De **A₁** se aisló 8-acetilcaespitol (**174**)¹⁵⁶ (3.3 mg, t_r = 25.6 min) y un nuevo producto, desclorobromocaespitenona (**A4**) (1.5 mg, t_r = 24.2 min), utilizando CLAR [Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), 2% hexano-acetato de etilo, 3.5 mL/min, UV].

Estudio de la fracción B (193.0 mg). De esta fracción se obtuvieron los productos furocaespitano (**174**)¹⁶⁰ (1.4 mg), elatol (**87**)⁶³ (32.2 mg), **114**¹⁰² (1.0 mg)

y descloroelatos (**108**)⁹⁸ (1.1 mg), [cromatografía líquida en columna ($\phi_{\text{int}} = 2.5$ cm y $h_{\text{gel}} = 20.0$ cm), hexano/acetato de etilo, 95:5].

Estudio de la fracción C (153.2 mg). Esta fracción rindió caespitol (**173**)¹⁵⁷ (3.1 mg), **114**¹⁰² (9.8 mg), **115**¹⁰² (5.4 mg), elatos (**87**)⁶³ (4.7 mg) y un nuevo producto desclorobromocaespitol (**A3**) (30.0 mg), [cromatografía en columna húmeda de gel de sílice ($\phi_{\text{int}} = 2.5$ cm, $h_{\text{gel}} = 20.0$), hexano/acetato de etilo, 90:10].

Estudio de las fracciones D (67mg) y E (46.7mg). Se cromatografiaron de forma independiente, y en las mismas condiciones: [cromatografía líquida a baja presión, ($\phi_{\text{int}} = 2.0$ cm, $h_{\text{gel}} = 12.0$ cm), hexano-acetato de etilo 9:1]. De la cromatografía se obtuvieron unas fracciones **D₁** y **E₁**, respectivamente, que dieron espectros de RMN de ¹H similares, por lo que se mezclaron se para obtener 2.0 mg de **D₁ + E₁**. De la mezcla **D₁ + E₁** se obtuvo el producto **A7** por CLAR [Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), 10% hexano-EtOAc, 3.5 mL/min, UV, 1.1 mg, $t_r = 28.6$ min].

Estudio de la Fracción F (35.6 mg). De su cromatografía se seleccionó la porción **F₁** (4.5 mg), [cromatografía líquida en columna de gel de sílice ($\phi_{\text{int}} = 1.0$ cm, $h_{\text{gel}} = 6.0$ cm), hexano y acetato de etilo con polaridad creciente]. De **F₁** se aisló un nuevo compuesto (**A6**, 1.3 mg), que denominamos furocaespitanolactol, [CLAR (Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano-EtOAc al 50%, 3.5 mL/min, $t_r = 24.8$ min, UV)].

3.4.3. Estudio cromatográfico del extracto del aparato digestivo de *Aplysia dactylomela* (La Palma).

El extracto del aparato digestivo (31.0 g) se sometió a partición con CH₂Cl₂:H₂O y EtOAc:H₂O, dando lugar a:

Ap-AD-D, 7.5 g, fracción de diclorometano.

Ap-AD-Ac, 58.0 mg, fracción de acetato de etilo.

La fracción Ap-AD-D se dividió en cuatro porciones y, de forma independiente, fueron cromatografiadas utilizando columna de exclusión molecular [sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}} = 3.0$ cm y $h_{\text{gel}} = 50.0$ cm)]. El conjunto de las fracciones se combinaron y concentraron en las seis fracciones que se indican en la Figura 3.4.2.

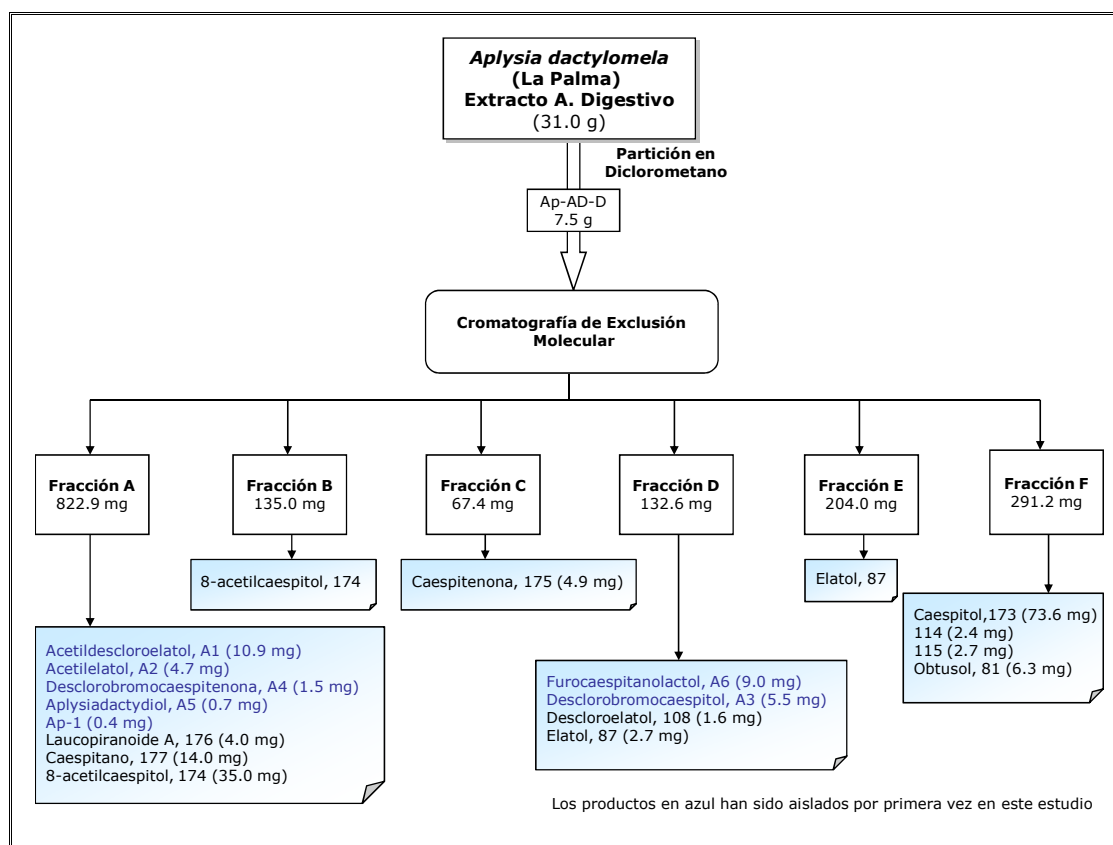


Figura 3.4.2. Esquema del estudio cromatográfico del aparato digestivo de *Aplysia dactylomela* (La Palma).

Estudio de la fracción A (822.9 mg). La porción **A**, consiste en una mezcla compleja de productos que por cromatografía en columna de gel de sílice [$(\phi_{int} = 3.0$ cm y $h_{gel} = 50.0$ cm), eluida con polaridad creciente de hexano y acetato de etilo], se resolvió en tres fracciones de interés:

A₁: 2.1 mg (hexano).

A₂: 64.5 mg (5% hexano-acetato de etilo).

A₃: 6.1 mg (30% hexano-acetato de etilo).

De la fracción **A₁** se obtuvo, **Ap-1** (0.4 mg), [CLAR (Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), 2% hexano-EtOAc, 3.5 mL/min, UV, $t_r = 24.4$ min)].

De la cromatografía de **A₂** se aislaron: laucapiranoide A (**176**)¹⁵⁹ (4.0 mg, $t_r = 22.5$ min); caespitano (**173**)^{156,159} (14.0 mg, $t_r = 23.9$ min); 8-acetilcaespitol (**174**)¹⁵⁶ (35.0 mg, $t_r = 34.0$ min); acetildescloroelato (**A1**) (10.9 mg, $t_r = 31.0$ min); acetilelato (**A2**) (4.7 mg, $t_r = 47.4$ min) y desclorobromocaespitenona (**A4**) (1.5 mg,

$t_r = 38.4$ min), [CLAR, Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), 5% hexano-EtOAc, 3.5 mL/min, UV].

La fracción **A₃** (6.1 mg) contenía sustancias insolubles, por lo que se filtró en una pipeta pasteur ($\phi_{int} = 0.5$ cm y $h_{gel} = 4.0$ cm) conteniendo gel de sílice y utilizando diclorometano como eluyente. Del filtrado se obtuvo un residuo de 3.9 mg, que se purificó hasta obtener aplysidactydiol (**A5**) (0.7 mg), [CLAR (Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), 3.5 mL/min, hexano-EtOAc, 6:4, UV, $t_r = 35.2$ min)].

Estudio de la fracción B (135.0 mg). La fracción **B** se compone principalmente del conocido producto 8-acetilcaespitol (**174**).¹⁵⁶

Estudio de la fracción C (67.4 mg). Se obtuvo 4.9 mg de caespitenona (**175**),^{156,159} [columna de gel de sílice ($\phi_{int} = 2$ cm y $h_{gel} = 11.0$ cm), hexano/EtOAc, 9:1].

Estudio de la fracción D (132.6 mg). Los productos obtenidos de esta fracción fueron: descloroelatol (**108**)⁹⁸ (1.6 mg); desclorobromocaespitol (**A3**) (5.5 mg); elatol (**87**)⁶³ (2.7 mg) y furocaespitanolactol (**A6**) (9.0 mg), [cromatografía líquida en columna de gel de sílice ($\phi_{int} = 2.0$ cm y $h_{gel} = 11.0$ cm), hexano/EtOAc, 9:1].

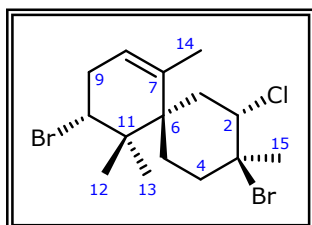
Estudio de la fracción E (204.0 mg). Constituida mayoritariamente de elatol (**87**).⁶³

Estudio de la fracción F (291.2 mg). Se aislaron los productos: caespitol (**173**)¹⁵⁷ (73.6 mg); **114**¹⁰² (2.4 mg); **115**¹⁰² (2.7 mg) y obtusol (**81**)⁹⁸ (6.3 mg), [columna húmeda de gel de sílice ($\phi_{int} = 3.0$ cm y $h_{gel} = 18.0$ cm), hexano/acetato de etilo 9:1].

A continuación se relacionan los productos con nuevas estructuras químicas caracterizadas en este estudio, con detalle de sus respectivas constantes físicas, espectrometría de masas y datos espectroscópicos de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) y de RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃).

3.4.4. Datos experimentales obtenidos de los compuestos aislados de *Aplysia dactylomela* (La Palma).

Ap-1



Aceite incoloro.

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} -210.2$ (c 0.03, CHCl₃).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 1663, 1430 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) m/z (%) 396/398/400/402

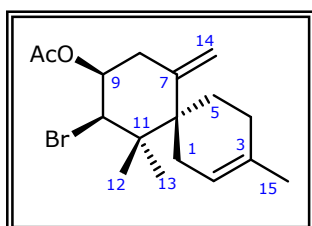
[M]⁺ (<1, <1, <1, <1), 361/363/365 [M-Cl]⁺ (<1, <1, <1), 317/318/321 [M-Br]⁺ (43, 58 14), 145 (100).

EMAR m/z [M]⁺ 395.9818 (calculado para C₁₅H₂₃³⁵Cl⁷⁹Br₂, 395.9855), [M-Br]⁺ 317.0660 (calculado para C₁₅H₂₃³⁵Cl⁷⁹Br, 317.0672).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 0.94 (3H, s, H-12), 1.20 (3H, s, H-13), 1.55 (1H, m, H-5 β), 1.84 (1H, s, H-15), 1.94 (1H, s, H-14), 2.00 (1H, m, H-5 α), 2.08 (2H, m, H-1), 2.41 (1H, dd, $J = 4.4, 4.4, 14.1$ Hz, H-4 α), 2.55 (1H, m, H-4 β), 2.55 (1H, m, H-9 β), 2.69 (1H, m, H-9 α), 4.52 (1H, dd, $J = 6.8, 10.8$ Hz, H-10), 4.88 (1H, dd, $J = 6.4, 11.8$ Hz, H-2), 5.24 (1H, m, H-8).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 17.1 (CH₃, C-12), 24.0 (CH₃, C-15), 24.6 (CH₃, C-13), 26.0 (CH₃, C-14), 31.7 (CH₂, C-5), 36.3 (CH₂, C-9), 38.0 (CH₂, C-1), 42.3 (CH₂, C-4), 43.0 (C, C-11), 47.3 (C, C-6), 60.9 (CH, C-10), 67.8 (C, C-3), 69.5 (CH, C-2), 123.0 (CH, C-8), 139.7 (C, C-7).

Acetildescloroelatol, A1



Aceite incoloro.

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} +53.0$ (c 0.30, CHCl₃).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 1743 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) m/z (%) 340/342 [M]⁺ (1, 1),

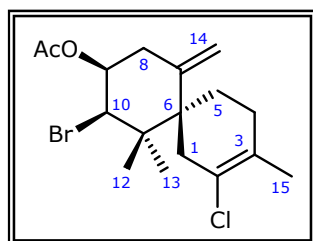
201 [M-HOAc-Br]⁺ (100).

EMAR m/z [M]⁺ 342.0977 (calculado para C₁₇H₂₅O₂⁷⁹Br, 342.1017), 340.1044 (calculado para C₁₇H₂₅O₂⁷⁹Br, 340.1037), [M-HOAc-Br]⁺ 201.1640 (calculado para C₁₅H₂₁, 201.1643).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 1.03 (3H, s, H-12), 1.07 (3H, s, H-13), 1.57 (3H, s, H-15), 1.61 (1H, m, H-5 β), 1.62 (1H, m, H-4 β), 1.79 (1H, m, H-5 α), 1.82 (1H, m, H-4 α), 2.06 (3H, s, CH_3CO), 2.09 (1H, m, H-1 α), 2.24 (1H, m, H-1 β), 2.39 (1H, dd, $J = 2.8, 14.9$ Hz, H-8 α), 2.65 (1H, dddd, $J = 1.5, 1.5, 3.1, 14.9$ Hz, H-8 β), 4.59 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, H-10), 4.76 (1H, s, H₂-14b), 4.95 (1H, dd, $J = 1.6, 1.6$ Hz, H₂-14a), 5.26 (1H, ddd, $J = 3.2, 3.2, 3.2$ Hz, H-9), 5.28 (1H, m, H-2).

RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 20.1 (CH_3 , C-12), 21.0 (CH_3 , CH_3CO), 23.1 (CH_3 , C-15), 24.3 (CH_3 , C-13), 26.0 (CH_2 , C-5), 27.8 (CH_2 , C-4), 30.2 (CH_2 , C-1), 36.7 (CH_2 , C-8), 43.5 (C, C-11), 46.9 (C, C-6), 64.0 (CH, C-10), 74.0 (CH, C-9), 115.7 (CH_2 , C-14), 119.4 (CH, C-2), 132.7 (C, C-3), 141.0 (C, C-7), 170.2 (C, CH_3CO).

Acetilelatol, A2



Aceite incoloro.

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} +173.0$ (c 0.09, CHCl_3).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 1740 cm^{-1} .

EM (IE, 70eV) m/z (%) 374/376/378 $[\text{M}]^+$ (<1, <1, <1), 235/237 $[\text{M}-\text{HOAc}-\text{Br}]^+$ (100, 34), 199 $[\text{M}-\text{HOAc}-\text{HBr}-\text{Cl}]^+$ (49).

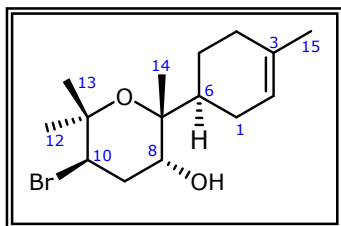
EMAR m/z $[\text{M}]^+$ 376.0696 (calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_2^{81}\text{Br}^{35}\text{Cl}$, 376.0627).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 1.05 (3H, s, H-12), 1.09 (3H, s, H-13), 1.63 (1H, m, H-5 β), 1.69 (3H, s, H-15), 1.79 (1H, m, H-4 β), 1.80 (1H, m, H-5 α), 1.97 (1H, m, H-4 α), 2.09 (3H, s, CH_3CO), 2.35 (1H, m, H-1 α), 2.40 (1H, dd, $J = 2.8, 15.0$ Hz, H-8 α), 2.57 (1H, m, H-8 β), 2.61 (1H, m, H-1 β), 4.52 (1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-10), 4.76 (1H, s, H₂-14b), 4.99 (1H, s, H₂-14a), 5.24 (1H, ddd, $J = 3.2, 3.2, 3.2$ Hz, H-9).

RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 19.4 (CH_3 , C-15), 20.1 (CH_3 , C-12), 21.0 (CH_3 , CH_3CO), 24.2 (CH_3 , C-13), 25.6 (CH_2 , C-5), 29.4 (CH_2 , C-4), 36.8 (CH_2 , C-8), 38.6 (CH_2 , C-1), 43.4 (C, C-11), 49.0 (C, C-6), 63.0 (CH, C-10), 73.7 (CH, C-9), 115.8 (CH_2 , C-14), 124.1 (C, C-2), 128.1 (C, C-3), 140.6 (C, C-7), 170.1 (C, CH_3CO).

Acetilación del Elatol (87). En un balón de 2 mL de capacidad se añadió 0.3 mL de $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ y 1 mL de Ac_2O , a 4.7 mg de elatol (**87**). Después de agitación a temperatura ambiente durante 5 h, la mezcla de reacción se hidrolizó con HCl acuoso al 5%, y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica, después de lavada con agua destilada y secada sobre Na_2SO_4 anhidro, se concentró para obtener 1.3 mg de acetilelatol **A2**.

Desclorobromocaespitol, A3



Sólido blanco amorfo.

$[\alpha]_D^{25}$ -1.72 (c 1.74, CHCl₃).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 3384 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) m/z (%) 316/318 [M]⁺ (<1, <1), 298/300 [M-H₂O]⁺ (2, 2), 236 [M-HBr]⁺ (8), 223 (28), 139 (100).

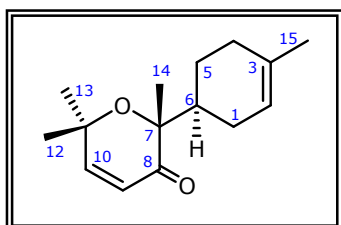
EMAR m/z [M]⁺ 316.1050 (calculado para C₁₅H₂₅O₂⁷⁹Br, 316.1037), [M-H₂O]⁺ 298.0900 (calculado para C₁₅H₂₃O⁷⁹Br, 298.0932), [M-HBr]⁺ 236.1751 (calculado para C₁₅H₂₄O₂, 236.1776).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 1.13 (3H, s, H-14), 1.19 (1H, m, H-5), 1.32 (3H, s, H-12), 1.40 (3H, s, H-13), 1.62 (3H, s, H-15), 1.70 (1H, s, H-6), 1.73 (1H, m, H-1), 1.84 (OH, d, $J = 6.4$ Hz), 1.90 (1H, m, H-4), 1.99 (1H, m, H-1), 1.99 (1H, m, H-5), 2.03 (1H, m, H-4), 2.26 (1H, ddd, $J = 4.1, 4.1, 13.9$ Hz, H-9 β), 2.47 (1H, ddd, $J = 2.3, 13.6, 13.6$ Hz, H-9 α), 3.52 (1H, ddd, $J = 3.6, 3.6, 6.2$ Hz, H-8), 4.33 (1H, dd, $J = 4.1, 13.2$ Hz, H-10), 5.32 (1H, s, H-2).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 19.2 (CH₃, C-14), 22.5 (CH₂, C-5), 23.4 (CH₃, C-15), 24.3 (CH₃, C-13), 25.9 (CH₂, C-1), 30.9 (CH₂, C-4), 31.2 (CH₃, C-12), 35.8 (CH₂, C-9), 41.4 (CH, C-6), 53.9 (CH, C-10), 71.4 (CH, C-8), 75.3 (C, C-11), 77.8 (C, C-7), 119.8 (CH, C-2), 134.5 (C, C-3).

Deshalogenación del caespitol (173). En un balón de 5 mL de capacidad se disolvió caespitol (20.0 mg) en DMF (1.5 ml). A la mezcla se añadió exceso de NaI/Zn y se agitó a 115°C. Después de 2 horas, la reacción se hidrolizó, se extrajo con acetato de etilo y se secó con sulfato sódico anhidro. Por concentración de la fase orgánica se obtuvo un residuo del que se aisló 7.9 mg de desclorobromocaespitol (**A3**), previa cromatografía de gel de sílice en una pipeta pasteur ($\phi_{\text{int}} = 0.5$ cm y $h_{\text{gel}} = 5.0$ cm, 5% hexano-acetato de etilo).

Desclorobromocaespitenona, A4



Aceite incoloro.

$[\alpha]_D^{25}$ +320 (c 0.01, CHCl₃).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 1738 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) m/z (%) 234 [M]⁺ (<1),

219 [M-CH₃]⁺ (1), 140 (94), 125 (61), 96 (100).

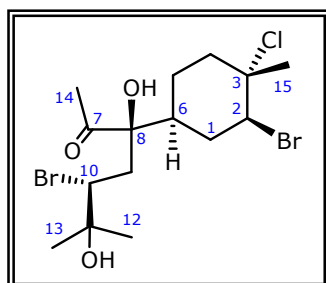
EMAR *m/z* [M]⁺ 234.1665 (calculado para C₁₅H₂₂O₂, 234.1619), [M-CH₃]⁺ 219.1412 (calculado para C₁₄H₁₉O₂, 219.1385).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 1.30 (3H, s, H-14), 1.36 (3H, s, H-12), 1.41 (3H, s, H-13), 1.47 (1H, m, H-5), 1.56 (1H, m, H-5), 1.62 (3H, s, H-15), 1.87 (1H, m, H-1), 1.89 (1H, m, H-4), 2.00 (1H, m, H-4), 2.07 (1H, m, H-6), 2.09 (1H, m, H-1), 5.37 (1H, s, H-2), 5.92 (1H, d, *J* = 10.4 Hz, H-9), 6.80 (1H, d, *J* = 10.4 Hz, H-10).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 23.4 (CH₃, C-14), 23.4 (CH₃, C-15), 24.0 (CH₂, C-5), 25.1 (CH₂, C-1), 29.7 (CH₃, C-13), 30.0 (CH₃, C-12), 30.6 (CH₂, C-4), 41.6 (CH, C-6), 71.2 (C, C-11), 81.9 (C, C-7), 120.6 (CH, C-2), 122.8 (CH, C-9), 133.9 (C, C-3), 154.7 (CH, C-10), 199.9 (C, C-8).

Oxidación de desclorobromocaespitol (A3). A una disolución de 12.4 mg de desclorobromocaespitol (**A3**) en acetona se añadió, gota a gota, con agitación, reactivo de Jones (CrO₃/H₂SO₄/H₂O). Después de 1.5 horas a 25°C, la mezcla de reacción se hidrolizó y se extrajo con EtOAc. Una vez secada la fase orgánica sobre Na₂SO₄ anhidro, y evaporado el disolvente, se obtuvo 8.3 mg de desclorobromocaespitenona (**A4**).

Aplysiadactydiol, A5



Aceite incoloro.

[α]_D²⁵ +492 (c 0.05, CHCl₃)

IR (película) *v*_{máx} 3448, 1722 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) *m/z* (%) 413/415/417/419

[M-H₂O-CH₃]⁺ (<1, <1, <1, <1), 403/405/407/409 [M-CH₃CO]⁺ (<1, <1, <1, <1), 385/384/389/394 [M-CH₃CO-H₂O]⁺ (36, 87, 62, 11), 237/239/241 [C₁₅H₂₁OBrCl]⁺ (30, 39, 3), 209/211/213 [C₇H₁₁BrCl]⁺ (9, 12, 3), 173/175 [C₇H₁₀Br]⁺ (13, 13).

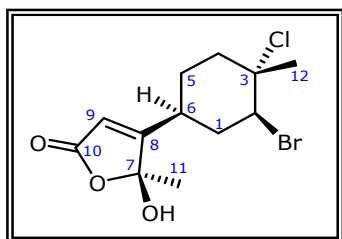
EMAR *m/z* [M-CH₃-H₂O]⁺ 412.9480 (calculado para C₁₄H₂₀O₂⁷⁹Br₂³⁵Cl, 412.9548), [M-CH₃CO]⁺ 402.9596 (calculado para C₁₃H₂₂O₂⁷⁹Br₂³⁵Cl, 402.9675), [M-CH₃CO-H₂O]⁺ 384.9512 (calculado para C₁₃H₂₀O⁷⁹Br₂³⁵Cl, 384.9569).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 1.32 (3H, s, H-13), 1.35 (3H, s, H-12), 1.60 (1H, m, H-5), 1.68 (3H, s, H-15), 1.76 (1H, m, H-5), 1.80 (1H, m, H-1), 1.84 (1H, s, H-6), 1.98 (1H, m, H-1), 2.06 (1H, m, H-4_α), 2.26 (1H, dd, *J* = 9.5, 15.6 Hz, H-9_β), 2.30 (3H, s,

H-14), 2.45 (1H, ddd, $J = 3.4, 3.4, 13.7$ Hz, H-4 β), 2.55 (1H, dd, $J = 2.1, 15.6$ Hz, H-9 α), 3.67 (1H, dd, $J = 2.1, 9.5$ Hz, H-10), 3.85 (OH, s), 4.27 (1H, dd, $J = 4.3, 12.8$ Hz, H-2).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 22.8 (CH₃, C-15), 23.8 (CH₂, C-5), 25.5 (CH₃, C-13), 26.6 (CH₃, C-14), 27.6 (CH₃, C-12), 35.7 (C, C-1), 39.4 (CH₂, C-9), 42.2 (CH₂, C-4), 46.3 (C, C-6), 60.4 (CH, C-10), 62.0 (CH, C-2), 71.0 (C, C-3), 72.9 (C, C-11), 82.7 (C, C-8), 212.7 (C, C-7).

Furocaespitanolactol, A6



Sólido blanco amorfo.

[α]²⁵_D +55.1 (c 0.25, CHCl₃).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 3352, 1751 cm⁻¹.

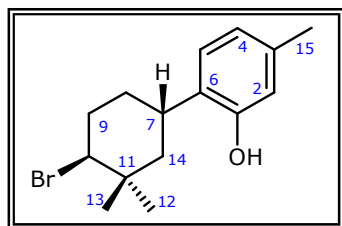
EM (IE, 70eV) m/z (%) 322/324/326 [M]⁺ (<1, <1, <1), 307/309/311 [M-CH₃]⁺ (25, 33, 9), 243/245 [M-Br]⁺ (20, 6), 225/227 [M-H₂O-Br]⁺ (77, 26), 207 [M-Cl-HBr]⁺ (100).

EMAR m/z [M]⁺ 321.9934 (calculado para C₁₂H₁₆O₃⁷⁹Br³⁵Cl, 321.9971), [M-CH₃]⁺ 306.9639 (calculado para C₁₁H₁₃O₃⁷⁹Br³⁵Cl, 306.9736), [M-Br]⁺ 243.0723 (calculado para C₁₄H₂₀O₂⁷⁹Br³⁵Cl, 243.1643), [M-H₂O-Br]⁺ 225.0682 (calculado para C₁₂H₁₅O₃, 207.1021).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 1.50 (2H, m, H-5), 1.56 (OH, s), 1.71 (3H, s, H-11), 1.75 (3H, s, H-12), 2.00 (2H, m, H-1), 2.16 (1H, ddd, $J = 3.9, 13.7, 13.7$ Hz, H-4 α), 2.48 (1H, ddd, $J = 3.4, 3.4, 13.9$ Hz, H-4 β), 2.53 (1H, dddd, $J = 3.2, 3.2, 12.0, 12.0$ Hz, H-6), 4.38 (1H, dd, $J = 4.1, 12.4$ Hz, H-2), 5.80 (1H, s, H-9).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 24.1 (CH₃, C-11), 24.1 (CH₃, C-12), 28.8 (CH₂, C-5), 36.9 (CH, C-6), 39.8 (CH₂, C-1), 42.2 (CH₂, C-4), 60.8 (CH, C-2), 70.2 (C, C-3), 106.8 (C, C-7), 116.4 (C, C-8), 170.4 (CH, C-9), 172.6 (C, C-10).

A7



Aceite incoloro.

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} +400$ (c 0.02, CHCl_3).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 3369 cm^{-1} .

EM (IE, 70eV) m/z (%) 296/298 $[\text{M}]^+$ (10, 10), 216 $[\text{M}-\text{HBr}]^+$ (29), 173 (100).

EMAR m/z $[\text{M}]^+$ 298.0759 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}^{81}\text{Br}$, 298.0755), 296.0774 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}^{79}\text{Br}$, 296.0775), $[\text{M}-\text{HBr}]^+$ 216.1494 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}$, 216.1514).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 1.08 (3H, s, H-12), 1.17 (3H, s, H-13), 1.50 (1H, m, H-14), 1.51 (1H, m, H-8), 1.80 (1H, m, H-14), 1.85 (1H, m, H-8), 2.20 (2H, m, H-9), 2.25 (3H, s, H-15), 3.15 (1H, dddd, $J = 3.3, 3.3, 12.6, 12.6$ Hz, H-7), 4.06 (1H, dd, $J = 4.6, 12.2$ Hz, H-10), 4.55 (OH, s), 6.53 (1H, s, H-2), 6.71 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4), 7.00 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5).

RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 20.8 (CH_3 , C-13), 21.1 (CH_3 , C-15), 32.1 (CH_3 , C-12), 32.1 (CH, C-7), 34.3 (CH_2 , C-8), 35.1 (CH_2 , C-9), 37.6 (C, C-11), 46.9 (CH_2 , C-14), 66.6 (CH, C-10), 116.4 (CH, C-2), 122.1 (CH, C-4), 126.9 (CH, C-5), 129.1 (C, C-6), 137.3 (C, C-3), 153.0 (C, C-1).

3.4.5. Estudio cromatográfico del extracto del manto de *Aplysia dactylomela* (La Gomera).

El extracto del manto (495.3 g), se sometió a partición sucesiva en CH₂Cl₂:H₂O y EtOAc:H₂O, para dar:

Ag-M-D, 6.3 g, fracción de diclorometano.

Ag-M-Ac, 79.0 mg, fracción de acetato de etilo.

El residuo Ag-M-D, 6.3 g, se fraccionó por cromatografía de exclusión molecular en sephadex LH-20 (ϕ_{int} = 5.0 cm y h_{gel} = 60.0 cm). La información obtenida por ccf y por RMN de ¹H permitió agrupar el conjunto de las fracciones como se indica en la Figura 3.4.3.

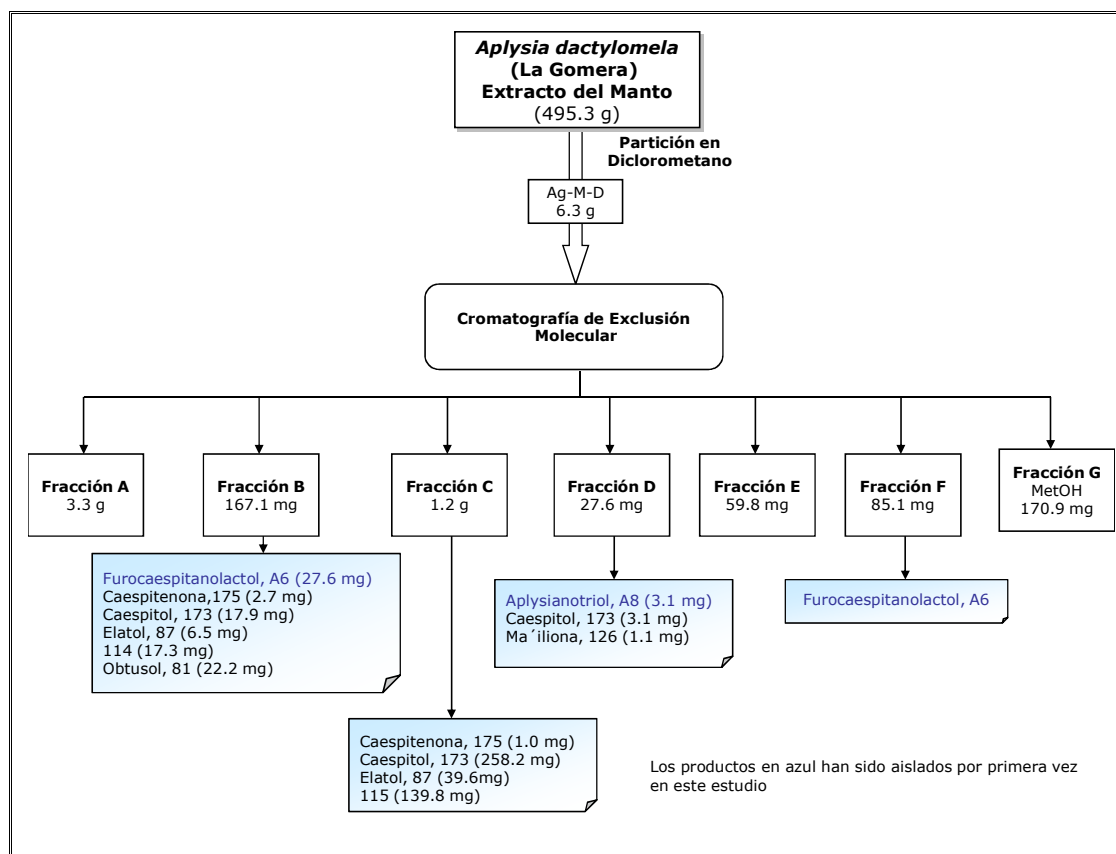


Figura 3.4.3. Esquema del estudio cromatográfico del manto de *Aplysia dactylomela* (La Gomera).

Estudio de la fracción B (167.1 mg). De esta fracción se aisló: caespitenona (**175**)^{156,159} (2.7 mg), caespitol (**173**)¹⁵⁷ (17.9 mg), elatol (**87**)⁶³ (6.5 mg), **114**¹⁰² (17.3 mg), obtusol (**81**)⁹⁸ (22.2 mg) y furocaespitanolactol (**A6**) (27.6 mg). La separación de los productos se efectuó por cromatografía de exclusión molecular en sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}} = 5.0$ cm y $h_{\text{gel}} = 60.0$ cm).

Estudio de la fracción C (1.2 g). La fracción C dio cuatro productos: caespitenona (**175**)^{156,159} (1.0 mg), elatol (**87**)⁶³ (39.6 mg), **114**¹⁰² (139.8 mg) y caespitol (**173**)¹⁵⁷ (258.2 mg). Para su separación se utilizó cromatografía de exclusión molecular en sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}} = 5.0$ cm y $h_{\text{gel}} = 36.0$ cm).

Estudio de la fracción D (27.6 mg). Se identificaron los productos caespitol (**173**)¹⁵⁷ (3.1 mg, $t_r = 17.2$ min), ma'íliona (**126**)¹⁰⁵ (1.1 mg, $t_r = 31.0$ min) y aplysianotriol (**A8**) (3.1 mg, $t_r = 37.0$ min), después de purificación por CLAR, [Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), flujo 3.5 mL/min, condiciones isocráticas (50% hexano-acetato de etilo)].

Estudio de la fracción F (85.1 mg). Esta fracción se compone mayoritariamente de furanocaespitanolactol (**A6**), aislado en nuestro estudio previo de *Aplysia dactylomela* (La Palma).

3.4.6. Estudio cromatográfico del extracto del aparato digestivo de *Aplysia dactylomela* (La Gomera).

La partición del extracto (121.0 g) con de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ y luego con $\text{EtOAc}:\text{H}_2\text{O}$ dio dos fracciones orgánicas:

Ag-AD-D, 19.3 g, fracción de diclorometano.

Ag-AD-Ac, 69.8 mg, fracción de acetato de etilo.

El residuo Ag-AD-D se fraccionó por cromatografía Flash. Se utilizó una columna de 6.5 cm de diámetro interno, compactada con gel de sílice hasta una altura de 22.0 cm. Se aplicó la muestra adsorbida en gel de sílice y se eluyó con mezclas de polaridad creciente de hexano y acetato de etilo. El fraccionamiento se siguió por ccf, empleando oleum como revelador, y por RMN de ¹H, lo que permitió obtener 10 fracciones, indicadas en el esquema siguiente:

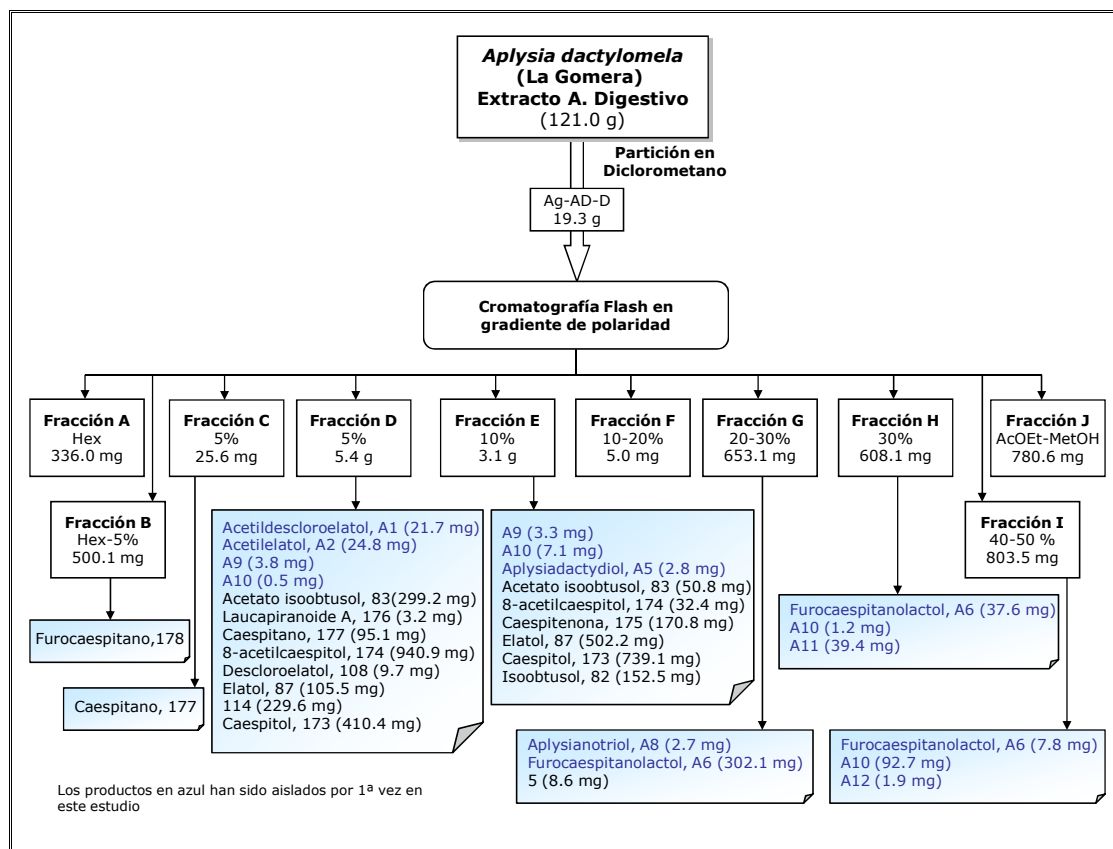


Figura 3.4.4. Esquema del estudio cromatográfico del aparato digestivo de *Aplysia dactylomela* (La Gomera).

Estudio de la fracción B (Hex-5%, 822.9 mg). Esta fracción contenía como producto principal el furocaespitano (**178**).¹⁶⁰

Estudio de la fracción C (5%, 25.6 mg). Constituida mayoritariamente por caespitano (**177**).¹⁵⁷

Estudio de la fracción D (5%, 5.4 g). El fraccionamiento del residuo **D** se realizó con una columna de sephadex LH-20 de 5.0 cm de diámetro y 36.0 cm de altura. Se obtuvieron las siguientes fracciones:

D₁: 431.8 mg

D₂: 681.2 mg

D₃: 272.0 mg

D₄: 842.3 mg

D₅: 557.0 mg

D₆: 394.7 mg

D₇: 9.7 mg

D₈: 105.5 mg

D₉: 229.6 mg

D₁₀: 410.4 mg

D₁₁: 6.6 mg

De **D₁** se aisló acetato de isoobtusol (**83**)⁸¹ (27.2 mg).

De **D₂** se aislaron los siguientes productos: laucapiranoide A (**176**)¹⁵⁹ (3.2 mg); caespitano (**177**)^{156,159} (17.8 mg); acetildescloroelato (**A1**) (14.7 mg) y acetilelato (**A2**) (5.0 mg). Dichos productos fueron separados por cromatografía líquida de gel de sílice (ϕ_{int} = 3.0 cm y h_{gel} = 29.5 cm, 5% acetato de etilo-hexano).

La fracción **D₃** estaba formada por acetato de isoobtusol (**83**).⁸¹

D₄ se compone de: caespitano (**177**)^{156,159} (77.3 mg), 8-acetilcaespitol (**174**)¹⁵⁶ (452.6 mg) y acetilelato (**A2**) (4.9 mg), [columna húmeda de gel de sílice (ϕ_{int} = 3.0 cm y h_{gel} = 24.0 cm), hexano-acetato de etilo al 5%].

De la fracción **D₅**, utilizando las condiciones de cromatografía antes indicada, se obtuvieron 7.0 mg de acetildescloroelato (**A1**), 93.6 mg de 8-acetilcaespitol (**174**),¹⁵⁶ 14.9 mg de acetilelato (**A2**) y 3.8 mg de **A9**.

D₆ es, mayoritariamente, 8-acetilcaespitol (**174**).¹⁵⁶

Cada una de las fracciones **D₇-D₁₀** contiene un producto mayoritario, con un grado de pureza suficiente para identificarlo como sigue:

D₇: descloroelato (**108**).⁹⁸

D₈: elato (**87**).⁹³

D₉: producto **114**.¹⁰²

D₁₀: caespitol (**173**).¹⁵⁷

D₁₁: se aisló 0.5 mg del producto **A10**, [CLAR (Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano-EtOAc 7:3, 3.5 mL/min, t_r = 32.6 min, UV)].

Estudio de la fracción E (10%, 3.1 g). Por cromatografía de exclusión molecular [sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}}= 5.0$ cm y $h_{\text{gel}}= 36.0$ cm)], y en base a los análisis de ccf y de RMN de ^1H , el residuo **E** se fraccionó como sigue:

E₁: 223.9 mg

E₂: 99.1 mg

E₃: 65.3 mg

E₄: 91.7 mg

E₅: 130.4 mg

E₆: 407.0 mg

E₇: 594.2 mg

E₈: 731.5 mg

E₉: 11.7 mg

E₁₀: 7.1 mg

De **E₁** se aisló 50.8 mg de acetato de isoobtusol (**83**),⁸¹ [columna húmeda de gel de sílice ($\phi_{\text{int}}= 3.0$ cm y $h_{\text{gel}}= 21.0$ cm), hexano/acetato de etilo, 8:2].

E₂ rindió 8-acetilcaespitol (**174**)¹⁵⁶ (10.7 mg), [columna húmeda de gel de sílice ($\phi_{\text{int}}= 2.5$ cm y $h_{\text{gel}}= 15.8$ cm), hexano/acetato de etilo, 8:2].

De **E₃** se obtuvo 8-acetilcaespitol (**174**)¹⁵⁶ (15.5 mg) y caespitenona (**175**)^{156,159} (4.7 mg), [columna húmeda de gel de sílice ($\phi_{\text{int}}= 2.5$ cm y $h_{\text{gel}}= 18$ cm), hexano/acetato de etilo, 8:2].

De **E₄** se separó 6.2 mg de 8-acetilcaespitol (**174**),¹⁵⁶ 35.7 mg de caespitenona (**175**)^{156,159} y 3.3 mg de **A9**, [columna húmeda de gel de sílice ($\phi_{\text{int}}= 2.5$ cm y $h_{\text{gel}}= 20$ cm), hexano/acetato de etilo, 8:2].

La fracción **E₅** corresponde a caespitenona (**175**).^{156,159}

La fracción **E₆** contenía elatol (**87**)⁶³ como producto mayoritario.

De **E₇** se aislaron: caespitol (**173**)¹⁰² (6.6 mg), elatol (**87**)⁶³ (95.2 mg) e isoobtusol (**82**)⁹⁸ (152.5 mg), [columna húmeda de gel de sílice ($\phi_{\text{int}}= 4.0$ cm y $h_{\text{gel}}= 21.5$ cm), hexano/acetato de etilo, 8:2].

E₈ se compone básicamente de caespitol (**173**).¹⁰²

De **E₉** se obtuvo 1 mg ($t_r = 17.3$ min) de caespitol (**173**)¹⁰² y 2.8 mg ($t_r = 36.5$ min) de aplysiadactydiol (**A5**), [CLAR (Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), 3.5 mL/min, hexano/acetato de etilo 7:3, UV)].

De la fracción **E₁₀** se aisló el producto **A10**.

Estudio de la fracción G (20-30%, 653.2 mg). De la fracción G, por cromatografía de exclusión molecular [sephadex LH-20 ($\phi_{int} = 5.0$ cm y $h_{gel} = 36.0$ cm)] se obtuvo:

G₁: 8.6 mg

G₂: 41.5 mg

G₃: 302.1 mg

La fracción **G₁** estaba constituida principalmente por el producto **5**.⁴²

G₂ se fraccionó en una pequeña columna de gel de sílice ($\phi_{int} = 0.5$ cm y $h_{gel} = 4.0$ cm) eluida con acetato de etilo, de la que se obtuvo 22.9 mg de un residuo que, purificado por CLAR, [Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano:acetato de etilo 1:1, 3.5 mL/min], dio aplysianotriol (**A8**) (2.7 mg, $t_r = 36.1$ min).

En **G₃** el producto mayoritario fue furocaepsitanolactol (**A6**).

Estudio de la fracción H (30%, 608.1 mg). El residuo **H** se cromatografió [sephadex LH-20 ($\phi_{int} = 5.0$ cm y $h_{gel} = 36.0$ cm)], para dar las siguientes fracciones de interés:

H₁: 11.5 mg

H₂: 37.6 mg

H₃: 39.4 mg

H₁ se filtró en una pipeta pasteur de 0.5 cm de diámetro, compactada con gel de sílice hasta 3.0 cm. El filtrado dio un residuo de 9.6 mg, que se purificó por CLAR para dar 1.2 mg de **A10**, [Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano/AcOEt 1:1, 3.5 mL/min, UV, $t_r = 23.0$ min].

En **H₂** el producto principal fue furocaepsitanolactol (**A6**) y en **H₃** el producto nuevo **A11**.

Estudio de la fracción I (40-50%, 803.5 mg). Por cromatografía de exclusión molecular [sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}} = 5.0$ cm y $h_{\text{gel}} = 36.0$ cm)], y en base a los análisis de ccf y de RMN de ^1H , el residuo **I** se fraccionó como sigue:

I₁: 92.7 mg

I₂: 7.8 mg

I₃: 12.5 mg

La fracción **I₁** estaba constituida mayoritariamente por **A10**.

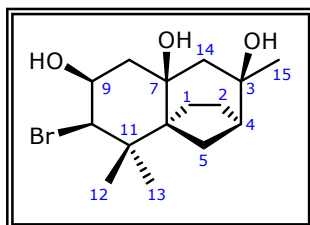
I₂ es furocaespitanolactol (**A6**).

De **I₃** se obtuvo **A12** (1.9 mg), [CLAR (Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), 3.5 mL/min, hexano-acetato de etilo, 1:1, isocrático, $t_r = 38.6$ min, UV)].

A continuación se relacionan los productos con nuevas estructuras químicas caracterizadas en este estudio, con detalle de sus respectivas constantes físicas, espectrometría de masas y datos espectroscópicos de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) y de RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3).

3.4.7. Datos experimentales obtenidos de los compuestos aislados de *Aplysia dactylomela* (La Gomera).

Aplysianotriol, **A8**



Aceite incoloro.

$[\alpha]_D^{25} -22.2$ (c 0.14, CHCl_3).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 3688, 3680, 3504 cm^{-1} .

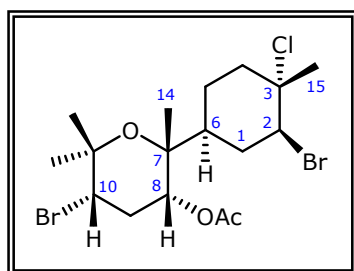
EM (IE, 70eV) m/z (%) 332/334 $[\text{M}]^+$ (1, 1), 314/316 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (6, 6), 204/205 (87, 85), 129 (100).

EMAR m/z $[\text{M}]^+$ 316.1050 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}_2^{79}\text{Br}$, 316.1037), $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 298.0900 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}^{79}\text{Br}$, 298.0932), $[\text{M}-\text{HBr}]^+$ 236.1751 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$, 236.1776).

RMN ^1H (500 MHz, C_6D_6) δ 0.62 (H, m, H-1 α), 0.87 (3H, s, H-13), 0.94 (1H, d, $J = 14.4$ Hz, H-14 α), 1.00 (3H, s, H-15), 1.09 (1H, m, H-2), 1.09 (1H, m, H-5), 1.20 (1H, dd, $J = 1.9, 14.4$ Hz, H-14 β), 1.26 (1H, dd, $J = 3.5, 14.9$ Hz, H-8 α), 1.36 (1H, m, H-1 β), 1.36 (1H, m, H-2), 1.43 (3H, s, H-12), 1.66 (1H, dd, $J = 3.0, 14.9$ Hz, H-8 β),

1.83 (1H, m, H-4), 2.44 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-5), 2.93 (OH-9, d, $J = 4.7$ Hz), 3.02 (OH-3, s), 3.72 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-10), 3.86 (1H, m, H-9), 4.34 (OH-7, s).

RMN ^{13}C (125.7 MHz, C_6D_6) δ 23.9 (CH₃, C-12), 27.4 (CH₂, C-2), 27.4 (CH₃, C-15), 27.7 (CH₂, C-1), 28.3 (CH₃, C-13), 31.1 (CH₂, C-5), 39.1 (CH₂, C-8), 40.6 (C, C-11), 46.2 (CH₂, C-14), 46.9 (CH, C-4), 54.6 (C, C-6), 71.6 (CH, C-10), 73.0 (C, C-3), 73.6 (CH, C-9), 77.5 (C, C-7).

A9

Aceite incoloro.

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} +85.7$ (c 0.07, CHCl_3).

IR (disolución) $\nu_{\text{máx}}$ 3054, 1740 cm^{-1}

EM (IE, 70eV) m/z (%) 473/475/477/479

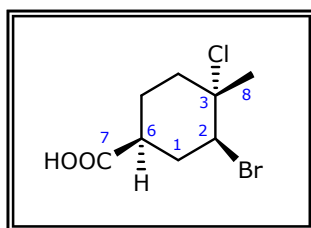
$[\text{M}+1]^+$ (7, 14, 10, 3), 429/431/433/435 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$ (8, 15, 12, 3), 413/415/417/419 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$ (23, 52, 42, 7), 173 (100).

EMAR m/z $[\text{M}+1]^+$ 477.0033 (calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3^{37}\text{Cl}^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}$, 477.0044, calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3^{35}\text{Cl}^{81}\text{Br}_2$, 477.0053), 475.0063 (calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3^{37}\text{Cl}^{79}\text{Br}_2$, 475.0064, calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3^{35}\text{Cl}^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}$, 475.0073), $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$ 432.9787 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2^{35}\text{Cl}^{81}\text{Br}_2$, 432.9791, calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2^{37}\text{Cl}^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}$, 432.9782), 430.9823 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2^{35}\text{Cl}^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}$, 430.9811), 428.9853 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2^{35}\text{Cl}^{79}\text{Br}_2$, 428.9832), $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$ 416.9843 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}^{35}\text{Cl}^{81}\text{Br}_2$, 416.9841, calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}^{37}\text{Cl}^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}$, 416.9832), 414.9853 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}^{35}\text{Cl}^{79}\text{Br}_2$, 414.9853, calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}^{35}\text{Cl}^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}$, 414.9862), 412.9863 (calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}^{35}\text{Cl}^{79}\text{Br}_2$, 412.9882).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 1.12 (3H, s, H-14), 1.33 (1H, m, H-5), 1.35 (3H, s, H-12), 1.43 (3H, s, H-13), 1.63 (1H, m, H-1 α), 1.69 (3H, s, H-15), 2.00 (1H, m, H-5), 2.05 (1H, m, H-4 α), 2.10 (3H, s, CH_3COO), 2.12 (1H, m, H-6), 2.37 (1H, m, H-1 β), 2.39 (1H, m, H-9 α), 2.43 (1H, ddd, $J = 3.2, 3.2, 13.4$ Hz, H-4 β), 2.52 (1H, ddd, $J = 4.4, 4.4, 14.6$ Hz, H-9 β), 4.08 (1H, dd, $J = 4.6, 8.8$ Hz, H-10), 4.32 (1H, dd, $J = 4.3, 12.4$ Hz, H-2), 4.70 (1H, dd, $J = 4.2, 7.5$ Hz, H-8).

RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 21.2 (CH_3COO), 22.4 (CH₃, C-14), 23.9 (CH₂, C-5), 24.2 (CH₃, C-15), 27.0 (CH₃, C-13), 30.2 (CH₃, C-12), 32.0 (CH₂, C-9), 37.5 (CH₂, C-1), 42.7 (CH₂, C-4), 44.6 (CH, C-6), 52.3 (CH, C-10), 63.2 (CH, C-2), 71.4 (C, C-3), 73.5 (CH, C-8), 75.0 (C, C-11), 75.4 (C, C-7), 169.9 (CH_3COO).

A10



Aceite incoloro.

$[\alpha]^{25}_D +36.7$ (c 0.55, CHCl₃).

IR (disolución) $\nu_{\text{máx}}$ 3682, 3599, 3489, 2955, 1710 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) m/z (%) 254/256/258 [M]⁺ (17, 20, 8), 219/221 [M-HBr]⁺ (38, 37), 139 (100), 93 (100).

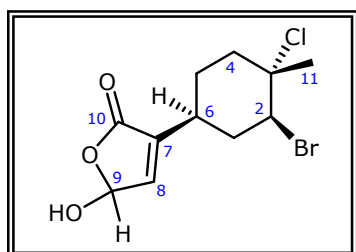
EMAR m/z [M]⁺ 257.9665 (calculado para C₈H₁₂O₂³⁷Cl⁸¹Br, 257.9659), 255.9675 (calculado para C₈H₁₂O₂³⁷Cl⁷⁹Br, 255.9680), 253.9709 (calculado para C₈H₁₂O₂³⁵Cl⁷⁹Br, 253.9709), [M-Cl]⁺ 220.9994 (calculado para C₈H₁₂O₂⁸¹Br, 221.0000), 219.0011 (calculado para C₈H₁₂O₂⁷⁹Br, 219.0021).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 1.70 (1H, m, H-5 α), 1.72 (3H, s, H-8), 1.98 (1H, m, H-5 β), 2.03 (1H, m, H-4 β), 2.15 (1H, ddd, $J = 12.2, 12.6, 12.6$ Hz, H-1 β), 2.44 (1H, ddd, $J = 4.0, 4.0, 13.9$ Hz, H-4 α), 2.53 (1H, dddd, $J = 4.2, 4.2, 11.2, 11.2$ Hz, H-6), 2.60 (1H, dddd, $J = 1.8, 4.2, 4.2, 14.8$ Hz, H-1 α), 4.31 (1H, dd, $J = 4.2, 11.7$ Hz, H-2).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 25.0 (CH₃, C-8), 25.1 (CH₂, C-5), 36.3 (CH₂, C-1), 40.5 (CH₂, C-4), 42.2 (CH, C-6), 60.2 (CH, C-2), 70.6 (C, C-3), 178.6 (C, C-7).

Esterificación de A10. En un balón de 5 mL de capacidad se disolvió 10.9 mg de **A10** en 2 mL de metanol. A la mezcla se le añadió 0.2 ml de ácido clorhídrico y se calentó a 110°C durante 6 horas. Después de enfriar, a la mezcla se añadió agua destilada se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó con CaCl₂ y, una vez eliminado el disolvente, se obtuvo un residuo de 9.8 mg del derivado metil ester del ácido **A10**.

A11



Aceite incoloro.

$[\alpha]^{25}_D +18.1$ (c 0.99, CHCl₃).

IR (disolución) $\nu_{\text{máx}}$ 3563, 2946, 2866, 1770, 1710 cm⁻¹.

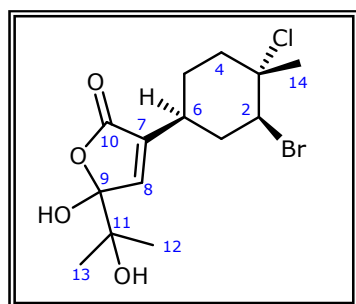
EM (IE, 70eV) m/z (%) 308/310/312 $[M]^+$ (1, 2, <1), 290/292/294 $[M-H_2O]^+$ (3, 4, 1), 255/257 $[M-H_2O-Cl]^+$ (5, 4), 229/231 $[M-Br]^+$ (15, 5), 211/213 $[M-H_2O-Br]^+$ (14, 4), 193 $[M-HBr-Cl]^+$ (100), 175 $[C_{11}H_{11}O_2]^+$ (91).

EMAR m/z $[M]^+$ 309.9796 (calculado para $C_{11}H_{14}O_3^{35}Cl^{81}Br$, 309.9794, calculado para $C_{11}H_{14}O_3^{35}Cl^{79}Br$, 309.9785), $[M-H_2O]^+$ 293.9659 (calculado para $C_{11}H_{12}O_2^{37}Cl^{81}Br$, 293.9659), 291.9688 (calculado para $C_{11}H_{12}O_2^{35}Cl^{81}Br$, 291.9689, calculado para $C_{11}H_{12}O_2^{37}Cl^{79}Br$, 291.9680), 289.9703 (calculado para $C_{11}H_{12}O_2^{35}Cl^{79}Br$, 289.9709), $[M-HBr-Cl]^+$ 193.0863 (calculado para $C_{11}H_{13}O_3$, 193.0865), 175.0752 (calculado para $C_{11}H_{11}O_2$, 175.0759).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.50 (1H, m, H-5 α), 1.72 (3H, s, H-11), 1.95 (1H, m, H-5 β), 1.98 (1H, m, H-1 β), 2.14 (1H, ddd, $J = 4.0, 13.7, 13.7$ Hz, H-4 α), 2.45 (1H, ddd, $J = 3.4, 3.4, 13.8$ Hz, H-4 β), 2.50 (1H, m, H-1 α), 2.59 (1H, dddd, $J = 3.7, 3.7, 12.2, 12.2$ Hz, H-6), 3.38 (s, OH-9), 4.37 (1H, dd, $J = 4.4, 12.4$ Hz, H-2), 6.10 (1H, s, H-9), 6.84 (1H, s, H-8).

RMN ^{13}C (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 24.1 (CH₃, C-11), 27.6 (CH₂, C-5), 35.4 (CH, C-6), 38.9 (CH₂, C-1), 42.0 (CH₂, C-4), 61.0 (CH, C-2), 70.5 (C, C-3), 96.6 (CH, C-9), 139.7 (C, C-7), 143.0 (CH, C-8), 170.3 (C, C-10).

A12



Aceite incoloro.

$[\alpha]_D^{25}$ -63.2 (c 0.10, $CHCl_3$).

IR (disolución) $\nu_{m\acute{a}x}$ 3054, 2985, 2925, 2852, 1769, 1605 cm^{-1} .

EM (IE, 70eV) m/z (%) 366/368/370 $[M]^+$ (1, 3, <1), 348/350/352 $[M-H_2O]^+$ (12, 15, 6), 290/292/294 $[M-C_3H_6O-H_2O]^+$ (28, 36, 10), 183/185 $[C_{10}H_{12}OCl]^+$ (74, 24), 59 (100).

EMAR m/z $[M-C_3H_6O-H_2O]^+$ 293.9658 (calculado para $C_{11}H_{12}O_2^{37}Cl^{81}Br$, 293.9659), 291.9689 (calculado para $C_{11}H_{12}O_2^{35}Cl^{81}Br$, 291.9689), 289.9707 (calculado para $C_{11}H_{12}O_2^{35}Cl^{79}Br$, 289.9709).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.24 (3H, s, H-12), 1.30 (3H, d, $J = 3.9$ Hz, H-13), 1.50 (1H, m, H-5 β), 1.73 (3H, d, $J = 1.8$ Hz, H-14), 1.95 (1H, m, H-1 β), 2.00 (1H, m, H-5 α), 2.15 (1H, ddd, $J = 3.5, 3.5, 13.8$ Hz, H-4 α), 2.48 (1H, ddd, $J = 3.3, 5.7, 13.9$ Hz,

H-4 β), 2.51 (1H, m, H-1 α), 2.60 (1H, m, H-6), 4.23 (s, OH-9), 4.27 (s, OH-11), 4.38 (1H, dd, $J = 4.4, 12.4$ Hz, H-2), 6.80 (1H, dd, $J = 1.2, 5.1$ Hz, H-8).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 24.2 (CH₃, C-12), 24.2 (CH₃, C-13), 24.2 (CH₃, C-14), 27.7 (CH₂, C-5), 35.7 (CH, C-6), 39.0 (CH₂, C-1), 42.1 (CH₂, C-4), 60.9 (CH, C-2), 70.5 (C, C-3), 74.5 (C, C-11), 107.7 (C, C-9), 140.1 (C, C-7), 142.9 (CH, C-8), 170.4 (C, C-10).

3.5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *LAURENCIA MAJUSCULA* (HARVEY) LUCAS Y DE *APLYSIA DACTYLOMELA*.

3.5.1. Determinación de la actividad citotóxica.

La actividad citotóxica se determinó usando el método colorimétrico de Mossman.²¹⁵ Este ensayo tiene como principal ventaja la velocidad con que las muestras pueden ser procesadas, ya que el sustrato no interfiere con la medición del producto y la lectura puede ser hecha sin necesidad de lavar. Los resultados son detectados visualmente, lo que puede ser muy útil si se precisan resultados cualitativos rápidos.

Los ensayos se realizaron empleando líneas celulares de carcinoma epitelial de cuello de útero humano (células HeLa), de carcinoma de laringe humano (Hep-2) y de riñón de mono africano Verde (Vero). Las células fueron cultivadas en medio mínimo de Eagle (MEM) modificado por Dubelco (DMEM) suplementado con una mezcla de antimicóticos, antibióticos (estreptomicina-penicilina) y con glutamina 4 mM y suero fetal al 5%.

En placas de cultivo de 96 pocillos las células (2×10^4 células/pocillo) fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, con humedad relativa de 98%, junto con los productos a ensayar predisueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), a una concentración inicial de 20 µg/ml y diluciones sucesivas hasta 0,02 µg/ml. La concentración final de DMSO empleada fue siempre menor que el 1%.

Se testaron los productos empleando células no proliferantes y proliferantes. Estas últimas son colocadas 24 h antes de manera que, en el momento del ensayo, las células ya están fijadas a la placa y en proceso de división.

Tras 48 horas de incubación, se añadió MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio) predisuelto en tampón fosfato salino. El MTT es un sustrato incoloro que, en presencia de la enzima succinato deshidrogenasa, se transforma en un producto coloreado llamado formazán (Figura 3.5.1.1.). La cantidad de formazán generada es relativamente constante, y proporcional a la enzima presente en la célula, lo que nos da información sobre el número aproximado de células vivas existentes en el medio. Después de 4 horas de incubación, se succionó el medio y se añadió DMSO

²¹⁵ T. Mossman, *Journal of Immunological Methods*, **1983**, 65, 55-63.

para disolver los cristales de formazán producidos por las células vivas. La densidad óptica del color desarrollado se leyó en un espectrofotómetro ELISA a una longitud de onda de 550 nm y los resultados fueron expresados como IC₅₀ en µg/ml.

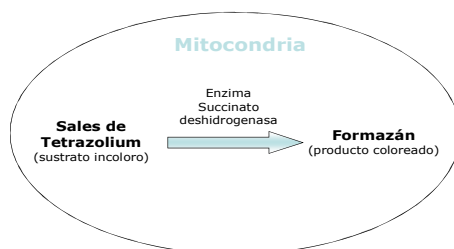


Figura 3.5.1.1. Esquema del ensayo.

Para la obtención de las curvas dosis-respuesta se calculó el porcentaje de supervivencia (%T/C), que resultó de dividir la absorbancia media de las células testadas (T) por la absorbancia media de las células control (C) y multiplicando por 100. A partir de las curvas dosis-respuesta se determinó la concentración que inhibía el crecimiento celular al 50%, para cada línea celular y para cada tipo de ensayo.

Los resultados obtenidos en estudios anteriores demuestran que la absorbancia es directamente proporcional al número de células. Esta linealidad se extiende en todo el rango testado desde 50.000 a 200 células por pocillo. Estos resultados indican que el ensayo es capaz de detectar números pequeños de células vivas.

3.5.2. Determinación de agentes estabilizadores/desestabilizadores de microtúbulos. Agentes antimitóticos.

Los erizos de mar adultos de *Paracentrotus lividus* se recolectaron en la costa del Mar Mediterráneo de Chipre y se mantuvieron en un tanque con agua de mar y aireación. Los gametos se obtuvieron por inyección de 0.5 a 1.0 mL de KCl 0.5 M. Los huevos se lavaron con agua de mar, previamente filtrada, y se fertilizaron por adición de unas gotas de una dilución de esperma. Los embriones se cultivaron a temperatura ambiente en agua de mar filtrada con agitación suave (60 rpm) usando una espátula plástica hasta la fase pluteus media. El seguimiento de las distintas etapas embrionarias se realizó por observación al microscopio óptico Biolam LOMO (LOMO PLC, St. Petersburg, Russia).

Los productos evaluados fueron aislados de *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas y de *Aplysia dactylomela* (La Gomera y La Palma). Las disoluciones stock se prepararon del siguiente modo: 2.5 mM de obtusol (**81**), isoobtusol (**82**), caespitol

(**173**), 8-acetilcaespitol (**174**) y caespitano (**177**) en EtOH 95%; 10 mM de **L7**, **L8**, majusculona (**69**), furocaespitanolactol (**A6**), **L14**, desclorobromocaespitol (**A3**), **A10** y furanocaespitano (**178**) en EtOH 95%; y 10 mM de elatol (**87**), **A11**, acetato de isoobtusol (**83**), acetilelatol (**A2**), laurencenona B (**8**), **5**, laurencenona B (**6**), **L16**, acetoxiintrinsicatol (**25**) y caespitenona (**175**) en DMSO.

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 6 pocillos donde se añadió un volumen de 5 mL de la suspensión de embriones (concentración aproximada de 3000 embriones/mL) y se incubaron en presencia de los productos. La influencia de los compuestos se evaluó en las siguientes etapas embrionarias: huevos fertilizados, blástula temprana, blástula eclosionada, gástrula, y pluteus temprana. La adición de los compuestos se efectuó: a) tras la fertilización de los huevos (1^{er} tratamiento) y b) compuestos tras la eclosión de la blástula (2^o tratamiento). Los efectos se cuantificaron como el promedio de la mínima concentración causante de alteración en la división y de muerte de los embriones antes de la eclosión o de la interrupción de la mitosis.

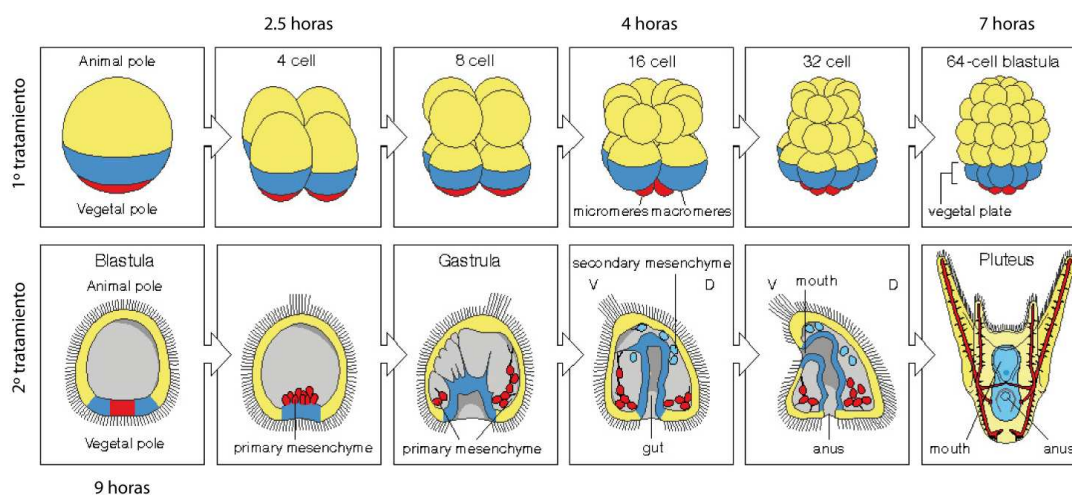
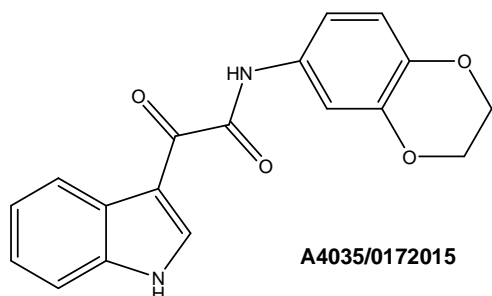


Figura 3.5.2.1. Etapas del desarrollo embrionario del erizo de mar *Paracentrotus lividus*.



Como control negativo se utilizó la suspensión de embriones sin tratar. Como control positivo se utilizó el compuesto sintético **A4035/0172015** (Chemical Block ID number). **A4035/0172015** causa alteración en la división a 2 nM e interrupción de la división a 5 nM.¹⁸⁷

3.6. ESTUDIO DEL OCTOCORAL *Pterogorgia* sp.

El octocoral *Pterogorgia* sp. pertenece a la clase Anthozoa, orden Alcyonacea, familia Gorgoniidae y género *Pterogorgia*. Son corales blandos, ramificados, y sus ramas suelen ser planas y anchas, con pólipos que se extienden a lo largo de los bordes. Su clasificación taxonómica suele ser compleja y laboriosa.¹⁸⁹



3.6.1. Recolección y extracción.

El octocoral *Pterogorgia* sp., se recolectó por buceo con escafandra autónoma en Cayo Tigre, Panamá, a 10 m de profundidad. Una vez seco y molido se obtuvo 2.5 kg, que fueron macerados en acetona a temperatura ambiente. El disolvente se renovó periódicamente, y los extractos resultantes, una vez reunidos y filtrados, se concentraron hasta obtener un residuo de 83.0 g de color verde oscuro.

3.6.2. Estudio cromatográfico del extracto de *Pterogorgia* sp.

El extracto crudo de *Pterogorgia* sp. se fraccionó mediante partición sucesiva en Hexano:H₂O, CH₂Cl₂:H₂O y EtOAc:H₂O. Se separaron tres fracciones orgánicas:

P-H, 16.4 g, fracción de hexano.

P-D, 61.2 g, fracción de diclorometano.

P-Ac, 5.7 g, fracción de acetato de etilo.

En base a sus espectros de RMN de ¹H, las fracciones de diclorometano y acetato de etilo (66.9 g) se combinaron y se purificaron por cromatografía Flash, en una columna de 9.5 cm de diámetro interno, compactada con gel de sílice (Merck, art. 107741) hasta una altura de 19 cm. El extracto se aplicó adsorbido en gel de sílice (Merck, art. 107734), y se eluyó con mezclas de hexano y acetato de etilo con polaridad creciente. El seguimiento de la separación se realizó tanto ccf, empleando

oleum como revelador, como por RMN de ^1H , lo que permitió agrupar el conjunto de las fracciones como se indica en el esquema siguiente:

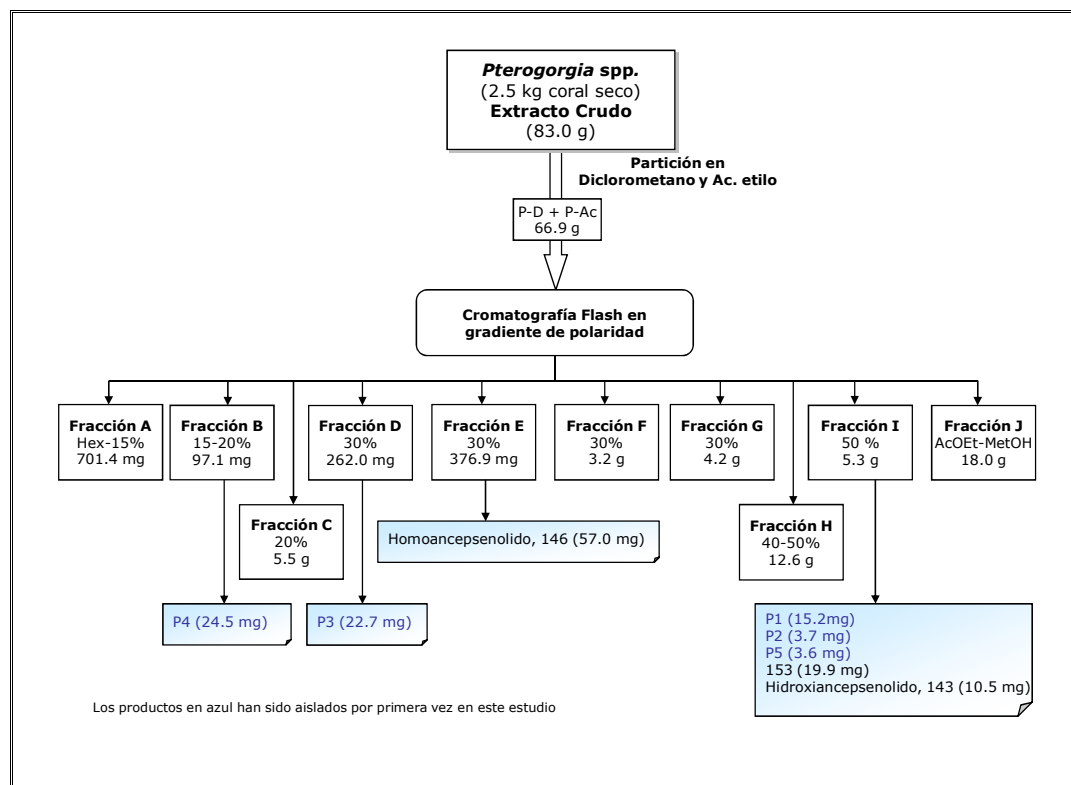


Figura 3.6.1. Esquema del estudio cromatográfico del octocoral *Pterogorgia sp.*

Estudio de la fracción B (15-20%, 97.1 mg). El residuo **B**, por cromatografía de exclusión molecular [sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}}= 2.5$ cm y $h_{\text{gel}}= 30.0$ cm)], dio una fracción que fue purificada por CLAR [Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano-acetato de etilo al 15%, 3.5 mL/min, UV], para obtener el nuevo producto **P4** (24.5 mg, $t_r= 28.9$ min).

Estudio de la fracción D (30%, 262.0 mg). El residuo **D**, por cromatografía de exclusión molecular [sephadex LH-20 ($\phi_{\text{int}}= 2.5$ cm y $h_{\text{gel}}= 30.0$ cm)], dio una fracción que fue purificada por CLAR [Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano-acetato de etilo al 25%, 3.5 mL/min, UV, $t_r= 36.4$ min], para obtener 22.7 mg del nuevo producto **P3**.

Estudio de la fracción E (30%, 376.9 mg). Se obtuvo el producto homoancepsenólido (**146**),¹³⁶ por cromatografía de exclusión molecular [sephadex LH-

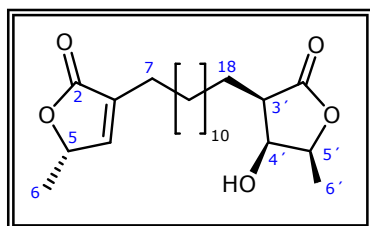
20 ($\phi_{\text{int}} = 2.5$ cm y $h_{\text{gel}} = 30.0$ cm)], seguido de CLAR [Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano/acetato de etilo al 25%, 3.5 mL/min, UV, 57.0 mg, $t_r = 31.5$ min].

Estudio de la fracción I (50%, 5.3 g). La mezcla **I** se fraccionó por cromatografía de exclusión molecular [sephadex LH-20 en una columna de $\phi_{\text{int}} = 5.0$ cm y $h_{\text{gel}} = 60.0$ cm], para obtener un residuo de 246.0 mg que se purificó por CLAR, lo que permitió aislar los productos siguientes: **153**¹³⁵ (19.9 mg, $t_r = 30.7$ min); hidroxiancepsenolido (**143**)¹³⁴ (10.5 mg, $t_r = 48.6$ min); **P1** (15.2 mg, $t_r = 37.2$ min); **P2** (3.7 mg, $t_r = 41.5$ min) y **P5** (3.6 mg, $t_r = 26.3$ min), [Jaigel Sil-S-043-10 (20 × 250 mm), hexano-acetato de etilo 6:4, 3.5 mL/min, UV].

A continuación se relacionan los productos con nuevas estructuras químicas caracterizadas en este estudio, con detalle de sus respectivas constantes físicas, espectrometría de masas y datos espectroscópicos de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) y de RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃).

3.6.3. Datos experimentales obtenidos de los compuestos aislados de *Pterogorgia sp.*

P1



Sólido blanco amorfo.

$[\alpha]_D^{20} -24$ (c 0.63, CHCl₃).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 3373, 1766, 1729 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) m/z (%) 380 [M]⁺ (11), 362 [M-H₂O]⁺ (5), 265 [M-C₅H₇O₃]⁺ (61).

EMAR m/z [M]⁺ 380.2565 (calculado para C₂₂H₃₆O₅, 380.2563), [M-H₂O]⁺ 362.2440 (calculado para C₂₂H₃₄O₄, 362.2457), [M-C₅H₇O₃]⁺ 265.2169 (calculado para C₁₇H₂₉O₂, 265.2168).

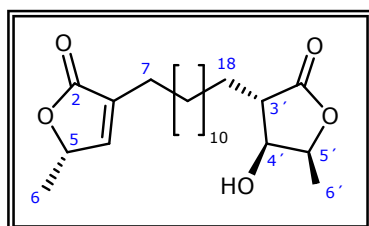
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 1.25 (2H, m, H-17), 1.39 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-6), 1.42 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-6'), 1.51 (2H, m, H-8), 1.65 (1H, m, H-18), 1.79 (1H, m, H-18), 2.22 (2H, m, H-7), 2.51 (1H, dddd, $J = 4.9, 4.9, 9.9, 9.9$ Hz, H-3'), 4.31 (1H, dd, $J = 3.2, 4.7$ Hz, H-4'), 4.43 (1H, dddd, $J = 3.2, 6.5, 6.5, 6.5$ Hz, H-5'), 4.99 (1H, dddd, $J = 1.7, 6.8, 6.8, 6.8$ Hz, H-5), 6.99 (1H, dd, $J = 1.6, 3.1$ Hz, H-4).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 13.7 (CH₃, C-6'), 19.1 (CH₃, C-6), 23.3 (CH₂, C-18), 25.1 (CH₂, C-7), 27.3 (CH₂, C-8), 27.5 (CH₂, C-17), 47.6 (CH, C-3'), 71.2 (CH, C-4'),

77.4 (CH, C-5), 78.7 (CH, C-5'), 134.4 (C, C-3), 148.9 (CH, C-4), 174.1 (C, C-2), 177.4 (C, C-2').

Conversión de 153 en P1. En un balón de 5 mL de capacidad se disolvió 19.4 mg del producto **153** en 3.0 mL de CH₃OH. A la mezcla se le añadió unas gotas de HCl concentrado, se mantuvo 8 horas a reflujo y luego a temperatura ambiente durante 5 días. La mezcla de reacción se diluyó con agua destilada y se extrajo con éter etílico. La fase orgánica se lavó con una disolución saturada de bicarbonato sódico, se secó con sulfato sódico anhidro y una vez evaporado el disolvente se obtuvo 16.1 mg de la lactona **P1**.

Transformación de P1 en ancepsenolido (142). Al producto **P1** (5.4 mg), en un balón de 2 mL, se añadió piridina (0.5 mL) y POCl₃ (10 µL). La mezcla, después de 12 h de agitación a 25°C, se diluyó con agua y se extrajo con éter etílico. La fase orgánica se lavó con ácido clorhídrico diluido, agua desilada y se secó (MgSO₄). Una vez evaporado el disolvente, el residuo obtenido se purificó en columna de gel de sílice para obtener ancepsenolido (**142**) (3.8 mg).

P2

Sólido blanco amorfo.

$[\alpha]_D^{25} -22$ (c 0.32, CHCl₃).

IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ 3419, 1734 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) m/z (%) 380 [M]⁺ (20), 362 [M-H₂O]⁺ (98), 265 [M-C₅H₇O₃]⁺ (100).

EMAR m/z [M]⁺ 380.2575 (calculado para C₂₂H₃₆O₅, 380.2563), [M-H₂O]⁺ 362.2469 (calculado para C₂₂H₃₄O₄, 362.2457), [M-C₅H₇O₃]⁺ 265.2175 (calculado para C₁₇H₂₉O₂, 265.2168).

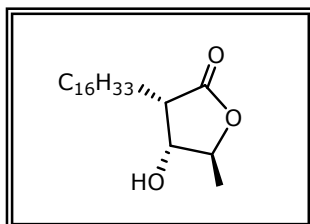
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 1.40 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-6), 1.40 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-6'), 1.57 (2H, m, H-8), 1.57 (2H, m, H-17), 1.57 (1H, m, H-18), 1.79 (1H, m, H-18), 2.26 (2H, m, H-7), 2.54 (1H, ddd, $J = 3.6, 6.2, 8.3$ Hz, H-3'), 4.21 (1H, dd, $J = 4.3, 4.3$ Hz, H-4'), 4.62 (1H, dddd, $J = 4.6, 6.7, 6.7, 6.7$ Hz, H-5'), 4.99 (1H, dddd, $J = 1.6, 6.7, 6.7, 6.7$ Hz, H-5), 6.99 (1H, dd, $J = 1.5, 3.0$ Hz, H-4).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 13.7 (CH₃, C-6'), 19.2 (CH₃, C-6), 25.2 (CH₂, C-7), 27.2 (CH₂, C-8), 27.4 (CH₂, C-18), 28.4 (CH₂, C-17), 49.1 (CH, C-3'), 74.1 (CH, C-

4'), 77.4 (CH, C-5), 78.1 (CH, C-5'), 134.3 (C, C-3), 148.9 (CH, C-4), 174.0 (C, C-2), 177.5 (C, C-2').

Transformación de P2 en ancespenolido (142). Siguiendo el mismo proceso descrito para **P1**, 11.8 mg de **P2** se transformaron en 11.0 mg del producto deshidratado (**143**).

P3



Sólido blanco amorfo.

$[\alpha]_D^{20} +7$ (c 0.88, CHCl₃).

IR (película) ν_{\max} 3420, 1732 cm⁻¹.

EM (IE, 70eV) m/z (%) 340 [M]⁺ (2), 323

[M-OH]⁺ (<1), 312 [M-CO]⁺ (5).

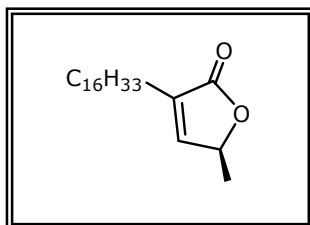
EMAR m/z [M]⁺ 340.2983 (calculado para C₂₁H₄₀O₃, 340.2977).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 0.87 (3H, dd, $J = 6.6, 6.6$ Hz, H-22), 1.25 (2H, m, H-21), 1.29 (2H, m, H-20), 1.33 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-6), 1.45 (2H, m, H-8), 1.69 (1H, m, H-7), 1.79 (1H, m, H-7), 2.59 (1H, ddd, $J = 5.4, 5.4, 10.6$ Hz, H-4), 4.17 (1H, dd, $J = 0.0, 5.5$ Hz, H-4), 4.50 (1H, dddd, $J = 0.0, 6.8, 6.8, 6.8$ Hz, H-5).

RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 14.1 (CH₃, C-22), 18.0 (CH₃, C-6), 22.6 (CH₂, C-21), 23.3 (CH₂, C-7), 27.6 (CH₂, C-8), 31.9 (CH₂, C-20), 43.7 (CH, C-3), 73.8 (CH, C-4), 82.5 (CH, C-5), 177.4 (C, C-2).

Acetilación de P3. En un balón de 2 mL de capacidad, que contiene 4.9 mg de **P3**, se añadió 1.0 mL de C₅H₅N y 0.2 mL AC₂O. Después de 16 h a 25°C, la mezcla de reacción se hidrolizó y se extrajo con con EtOAc. La fase orgánica, después de lavada con HCl al 5% y agua destilada se secó (Na₂SO₄), para obtener, previa evaporación del disolvente, 5.5 mg de **P3-a**.

P4



Sólido blanco amorfo.

$[\alpha]_D^{20} +22$ (c 1.1, CHCl₃).

IR (disolución) ν_{\max} 1743 cm⁻¹.

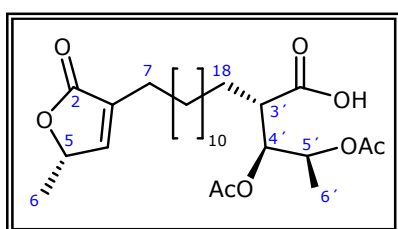
EM (IE, 70eV) m/z (%) 322 [M]⁺ (25), 294

(100).

EMAR m/z $[M]^+$ 322.2866 (calculado para $C_{21}H_{38}O_2$, 322.2872).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 0.86 (3H, dd, $J = 6.8, 6.8$ Hz, H-22), 1.25 (2H, m, H-21), 1.29 (2H, m, H-20), 1.36 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-6), 1.51 (2H, m, H-8), 2.24 (2H, dd, $J = 7.2, 7.2$ Hz, H-7), 4.95 (1H, dddd, $J = 1.6, 6.7, 6.7, 6.7$ Hz, H-5), 6.97 (1H, s, H-4).

RMN ^{13}C (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 14.1 (CH_3 , C-22), 19.2 (CH_3 , C-6), 22.6 (CH_2 , C-21), 25.2 (CH_2 , C-7), 27.5 (CH_2 , C-8), 31.9 (CH_2 , C-20), 76.8 (CH, C-5), 134.3 (CH, C-3), 148.9 (CH, C-4), 173.9 (C, C-2).

P5

Sólido blanco amorfo.

$[\alpha]_D^{20}$ -128 (c 0.18, $CHCl_3$).

IR (disolución) ν_{max} 1743 cm^{-1} .

EM (IE, 70eV) m/z (%) 482 $[M]^+$ (<1), 422 $[M-AcOH]^+$ (48), 404 $[M-AcOH-H_2O]^+$ (49), 362 $[M-2AcOH]^+$ (60), 335 (100).

EMAR m/z $[M]^+$ 482.2870 (calculado para $C_{26}H_{42}O_8$, 482.2880), $[M-AcOH]^+$ 422.2652 (calculado para $C_{24}H_{38}O_6$, 422.2668), $[M-AcOH-H_2O]^+$ 404.2581 (calculado para $C_{24}H_{36}O_5$, 404.2563), $[M-2AcOH]^+$ 362.2455 (calculado para $C_{22}H_{34}O_4$, 362.2457).

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.18 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-6'), 1.40 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-6), 1.51 (1H, m, H-18), 1.53 (2H, m, H-8), 1.61 (1H, m, H-18), 2.05* (3H, s, 4'- $OCOCH_3$), 2.10* (3H, s, 5'- $OCOCH_3$), 2.27 (2H, m, H-7), 2.72 (1H, ddd, $J = 3.8, 8.6, 9.8$ Hz, H-3'), 5.08 (1H, m, H-5), 5.10 (1H, dddd, $J = 3.5, 6.4, 6.4, 6.4$ Hz, H-5'), 5.19 (1H, dd, $J = 3.4, 8.5$ Hz, H-4'), 6.98 (1H, dd, $J = 1.6, 3.1$ Hz, H-4).

RMN ^{13}C (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 16.3 (CH_3 , C-6'), 19.2 (CH_3 , C-6), 20.7* (5'- $OCOCH_3$), 20.9* (4'- $OCOCH_3$), 25.2 (CH_2 , C-7), 28.4 (CH_2 , C-8), 28.4 (CH_2 , C-18), 46.1 (CH_2 , C-3'), 69.4 (CH, C-5'), 74.2 (CH, C-4'), 76.4 (CH, C-5), 134.4 (C, C-3), 148.9 (CH, C-4), 170.3 (4'- $OCOCH_3$), 170.3 (5'- $OCOCH_3$), 175.6 (C, C-2), 175.6 (C, C-2').

*Intercambiables.

Conversión de P5 en P2. En un matraz de 5 mL de capacidad, que contiene 3.2 mg de **P5** disuelto en 3.0 mL de metanol, se añadió unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. Después de 8 h a reflujo y 12 h a 25°C, la mezcla se diluyó con agua destilada y se extrajo con éter etílico. La fase orgánica se lavó con agua

destilada y se secó (MgSO₄). Una vez evaporado el disolvente, el residuo obtenido se purificó en columna de gel de sílice para obtener 2.1 mg de **P2**.

Transformación de hidroxiancepsenolido (143) en ancepsenolido (142). A 3.8 mg de **143** se añadió POCl₃ (10 µL) y piridina (0.5 mL) a temperatura ambiente. La mezcla se mantuvo en agitación durante 12 horas. Finalizada la reacción, y siguiendo el procedimiento de extracción y purificación antes indicado, se obtuvo 3.5 mg de **142**.

Preparación de los complejos 2,2,2-trifluoro-1-(9-antril)etanol de P1.¹⁴⁷ Se prepararon dos tubos de RMN de 5 mm con 1.0 mg de **P1** disuelto en 0.5 mL de CDCl₃, a los que se le agregaron cantidades crecientes (6 y 12 equivalentes de (*R*)- o (*S*)-2,2,2-trifluoro-1-(9-antril)etanol. Se tomaron espectros de RMN de ¹H (500 MHz) a 26°C, -20°C y -33°C.

Preparación de los complejos 2,2,2-trifluoro-1-(9-antril)etanol de P2, P4 y homoancepsenolido (146). Se siguió el procedimiento experimental antes descrito.

4. Conclusiones



1. Se describe el estudio químico de tres especies marinas: un alga roja y dos invertebrados. Del conjunto de las tres especies se caracterizaron 68 productos de los cuales 34 son nuevos metabolitos secundarios.
2. Como la mayoría son halogenados, en la Introducción describimos las estrategias de halogenación que utiliza la Naturaleza, así como una recopilación bibliográfica de productos derivados de chamigreno, y de metabolitos γ -lactónicos derivados de ácidos grasos aislados de octocorales.
3. Los productos nuevos caracterizados de *L. majuscula* derivan de cuatro esqueletos: gomerano, rhodolaurano, α -chamigreno y esqueleto degradado derivado de chamigreno. Los productos nuevos caracterizados *A. dactylomela* derivan de seis esqueletos: aplysiano, α - y β -chamigreno, bisaboleno, ciclobisaboleno, esqueleto irregular derivado de bisaboleno y esqueleto degradado derivado de bisaboleno.
4. Las algas del género *Laurencia*, y determinados géneros de plantas terrestres, tienen en común la capacidad de biosintetizar sesquiterpenos policíclicos por ciclación interna de chamigreno. Sin embargo, dicho proceso transcurre por mecanismos de reacción diferenciados, por lo que hemos propuesto una ruta biogenética que establece la Clase I, para englobar los productos de origen marino, y la Clase II para los de origen terrestre.
5. La caracterización de aplysiadactydiol (**A5**), producto de biogénesis irregular de *Aplysia dactylomela*, nos facilitó la vía para proponer una biogénesis coherente para los productos de esqueletos reagrupados y degradados derivados de bisaboleno.
6. La caracterización estructural de C-dilactonas diastereoisoméricas, obtenidas de *Pterogorgia* sp., nos permitió establecer reglas empíricas, basadas en RMN de ^{13}C , para determinar la estereoquímica relativa de 3-alkuil-4-hidroxi-5-metil-2 (5H)-dihidrofuranonas, una unidad γ -lactona presente en muchos productos naturales y sintéticos bioactivos. Proponemos una ruta biogenética para los sistema dilactónicos vía oxidación de ácidos grasos de cadena larga (C16:0 y C18:0).

7. Hemos extendido el método de Latypov, diseñado para asignar la configuración absoluta de acetogeninas de Annonaceae, para aplicarlo a la determinación de la configuración absoluta de butenolidas quirales, contenidas en diversidad de productos naturales, tales como: sesquiterpenos, diterpenos y di- γ -lactonas derivados de ácidos grasos de cadena larga.

8. Las gomerolactonas, la chamigrenolactona y un reducido número de derivados chamigrénicos, se caracterizan por ser los únicos ejemplos de metabolitos chamigrénicos desprovistos de halógenos, por lo que sería más preciso establecer el esqueleto chamigreno como marcador taxonómico de *Laurencia*, más que sus derivados halogenados.

9. La diversidad estructural de metabolitos de *L. majuscula* y *A. dactylomela*, nos ha impulsado a explorar su posible actividad biológica en los bioensayos siguientes:
 - Citotoxicidad frente a tres líneas celulares: He-La (carcinoma humano de útero), Hep-2 (carcinoma humano de laringe) y Vero (células de riñón de mono africano verde).
 - Búsqueda de agentes estabilizadores y desestabilizadores de microtúbulos.
 - Estudio de regeneración de células beta-pancreáticas.

10. Los estudios de toxicidad apoyan la hipótesis de que las liebres de mar utilizan la acetilación, la deshalogenación y la degradación de determinados productos, como una estrategia de destoxificación para almacenar determinados metabolitos que proceden de la dieta, lo que sugiere una mejora evolutiva en su capacidad de adaptación al medio.

5. Apéndice



**5.1. Espectros de RMN de los metabolitos
aislados de *Laurencia majuscula*
(Harvey) Lucas**

Figura 5.1.1. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Gomerona A, **L1** (500 MHz, C_6D_6).

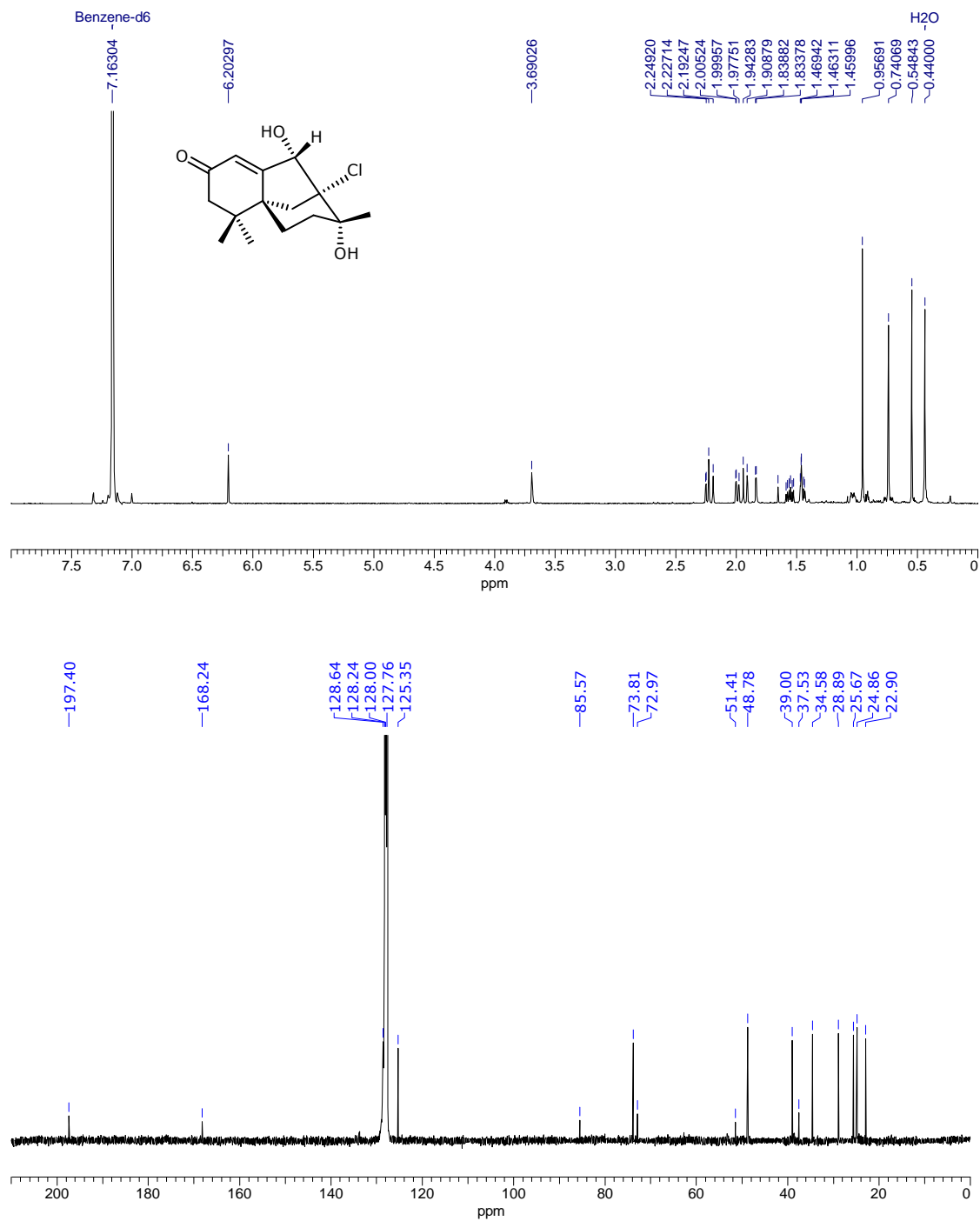


Figura 5.1.2. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Gomerona A, **L1** (500 MHz, C₆D₆).

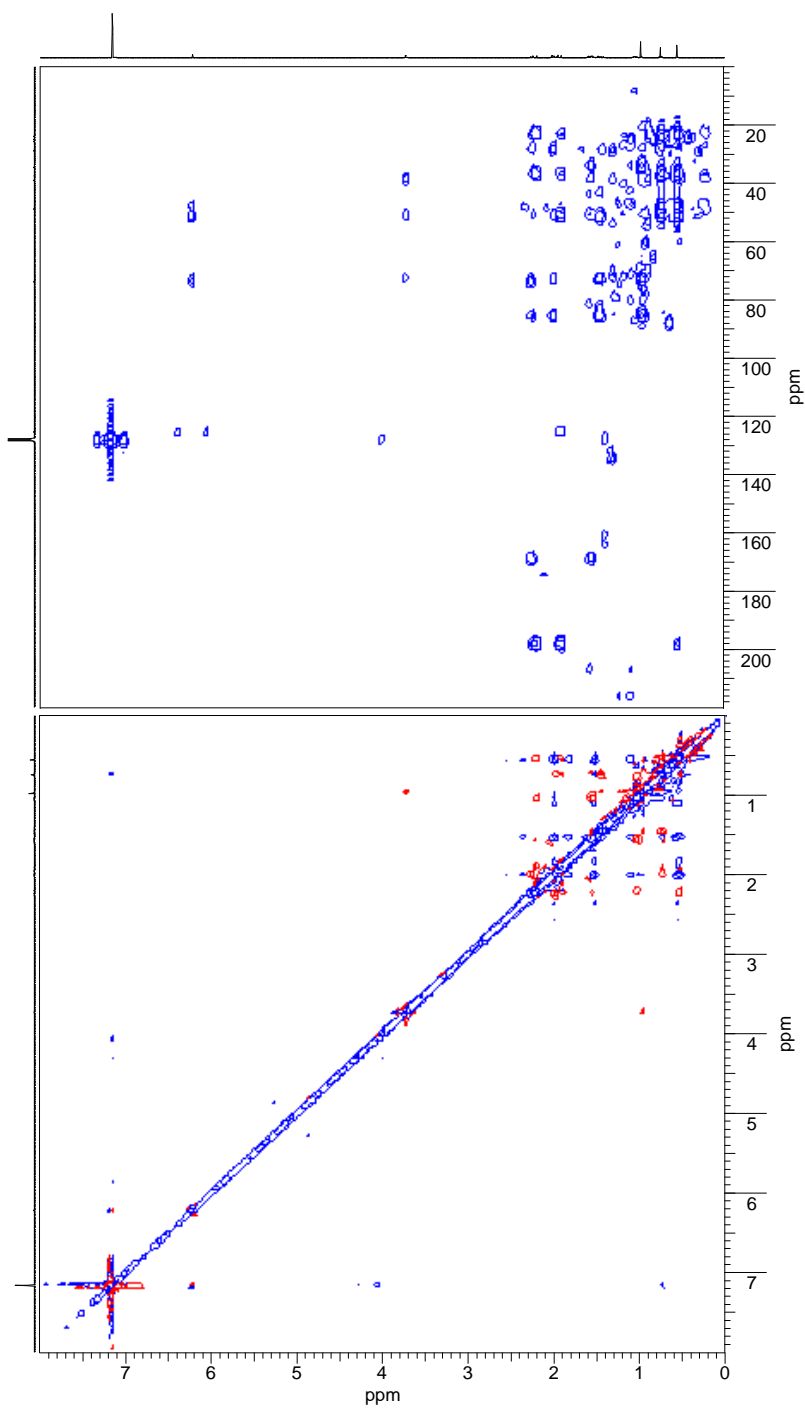


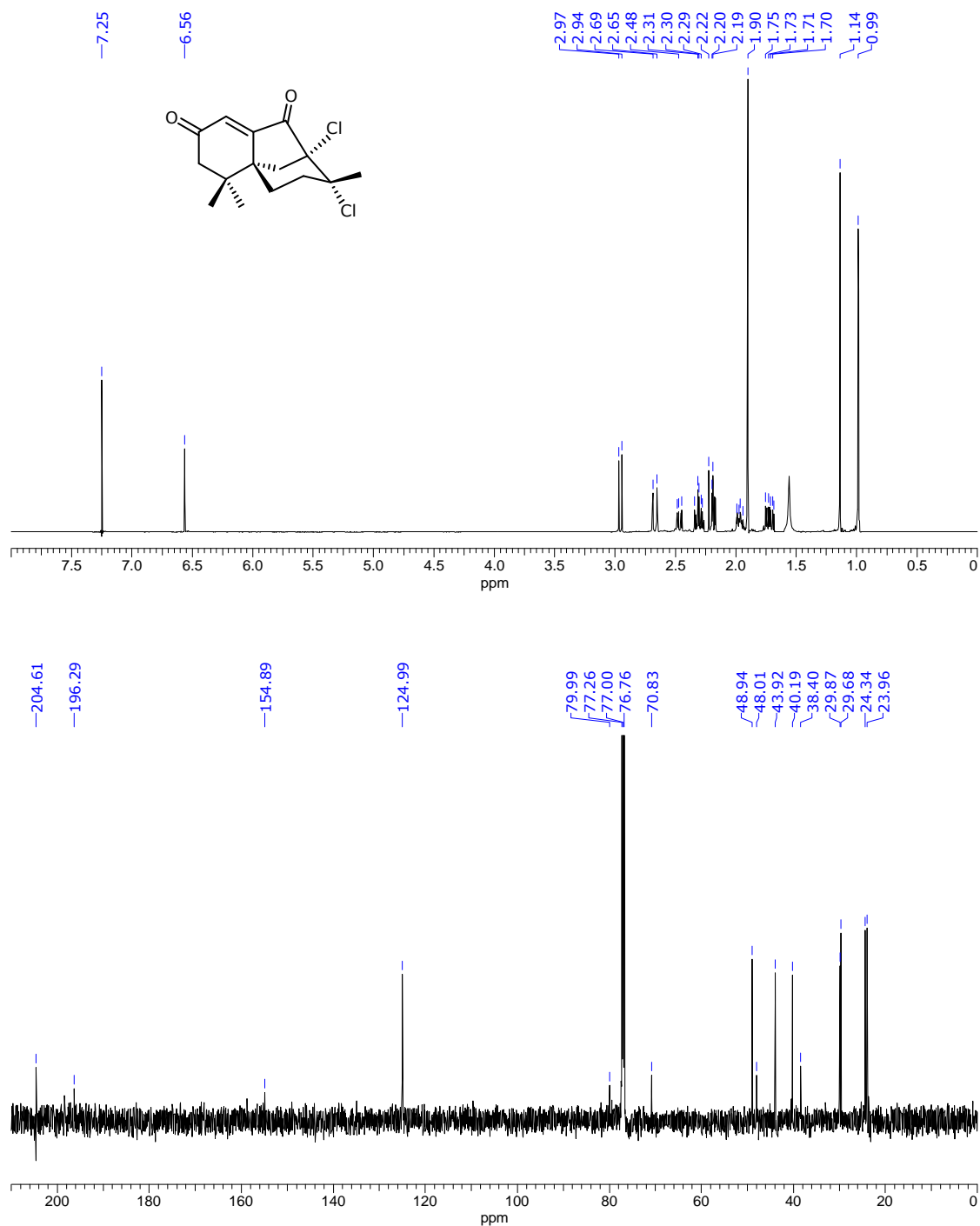
Figura 5.1.3. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Gomerona B, **L2** (500 MHz, CDCl_3).

Figura 5.1.4. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Gomerona B, **L2** (500 MHz, CDCl₃).

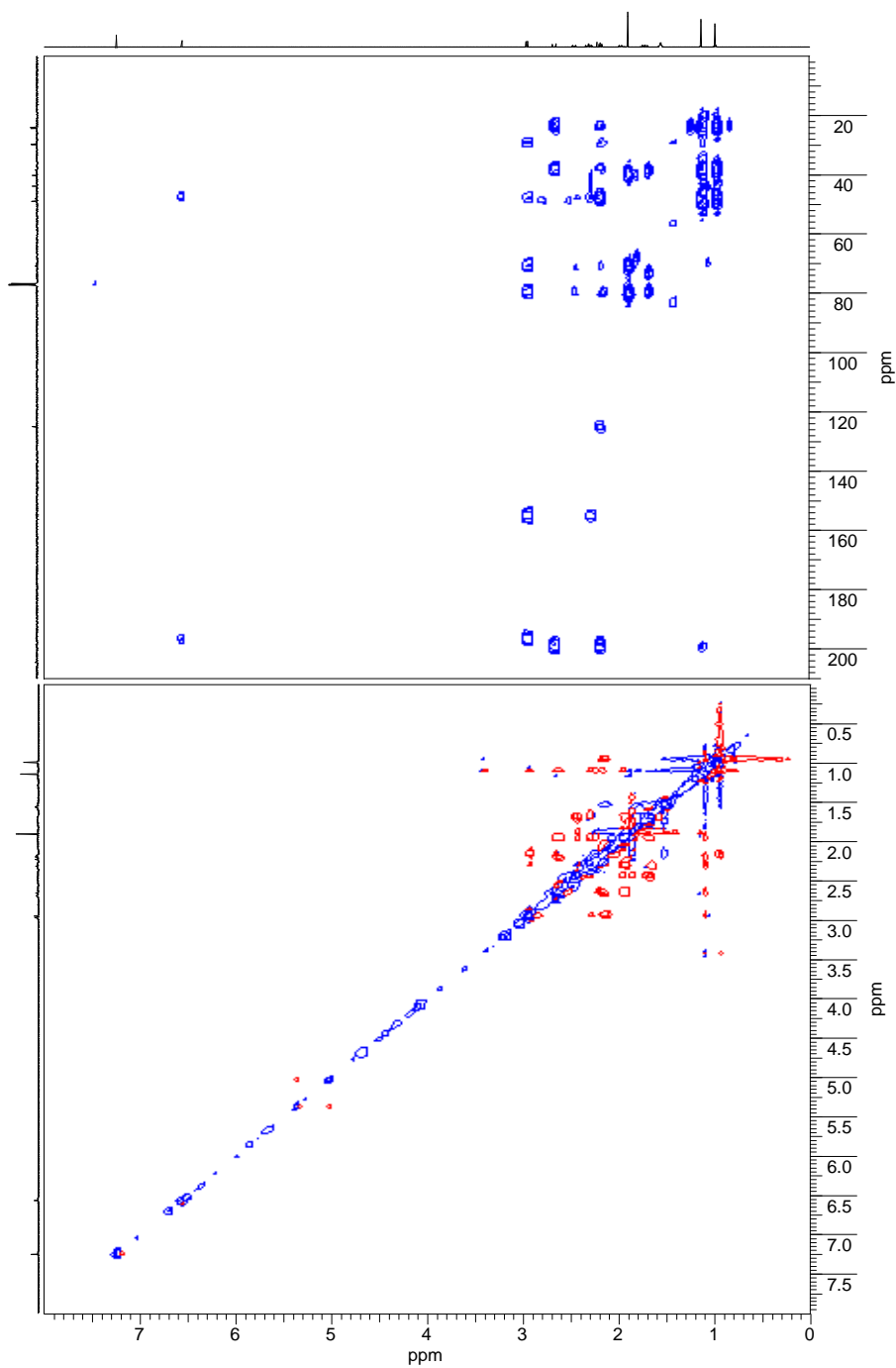


Figura 5.1.5. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Gomerona C, **L3** (500 MHz, CDCl_3).

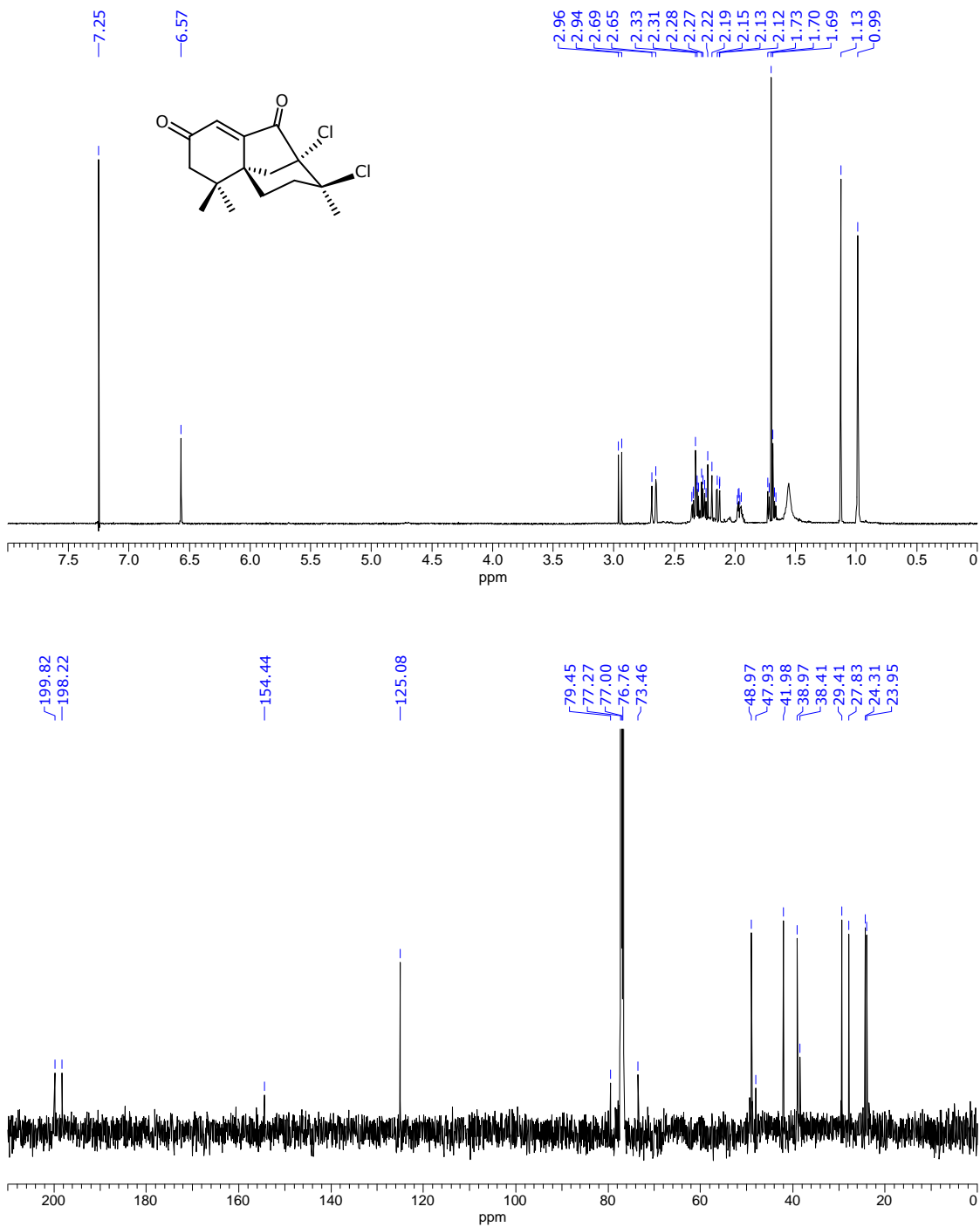


Figura 5.1.6. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Gomerona C, **L3** (500 MHz, CDCl₃).

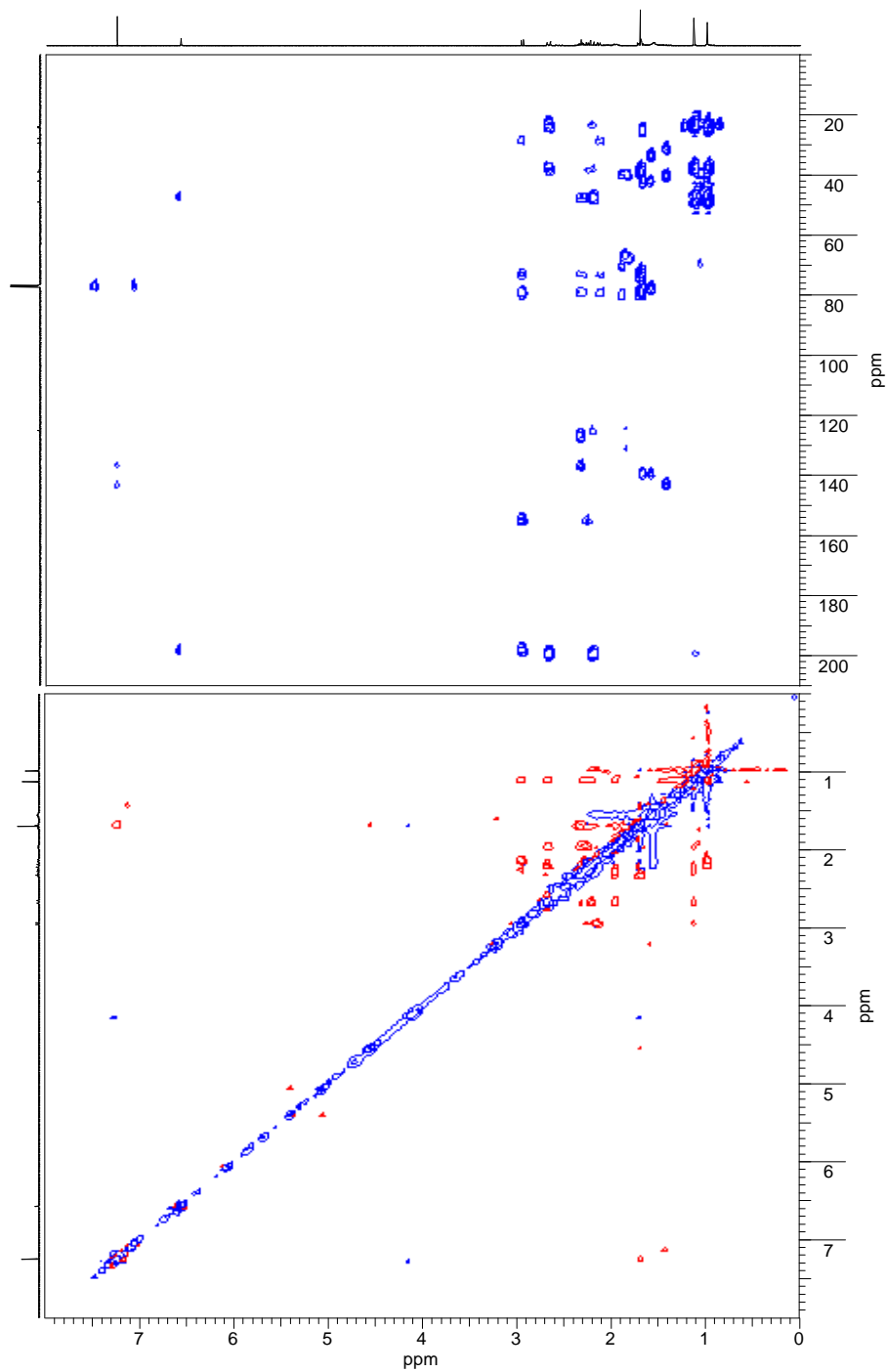


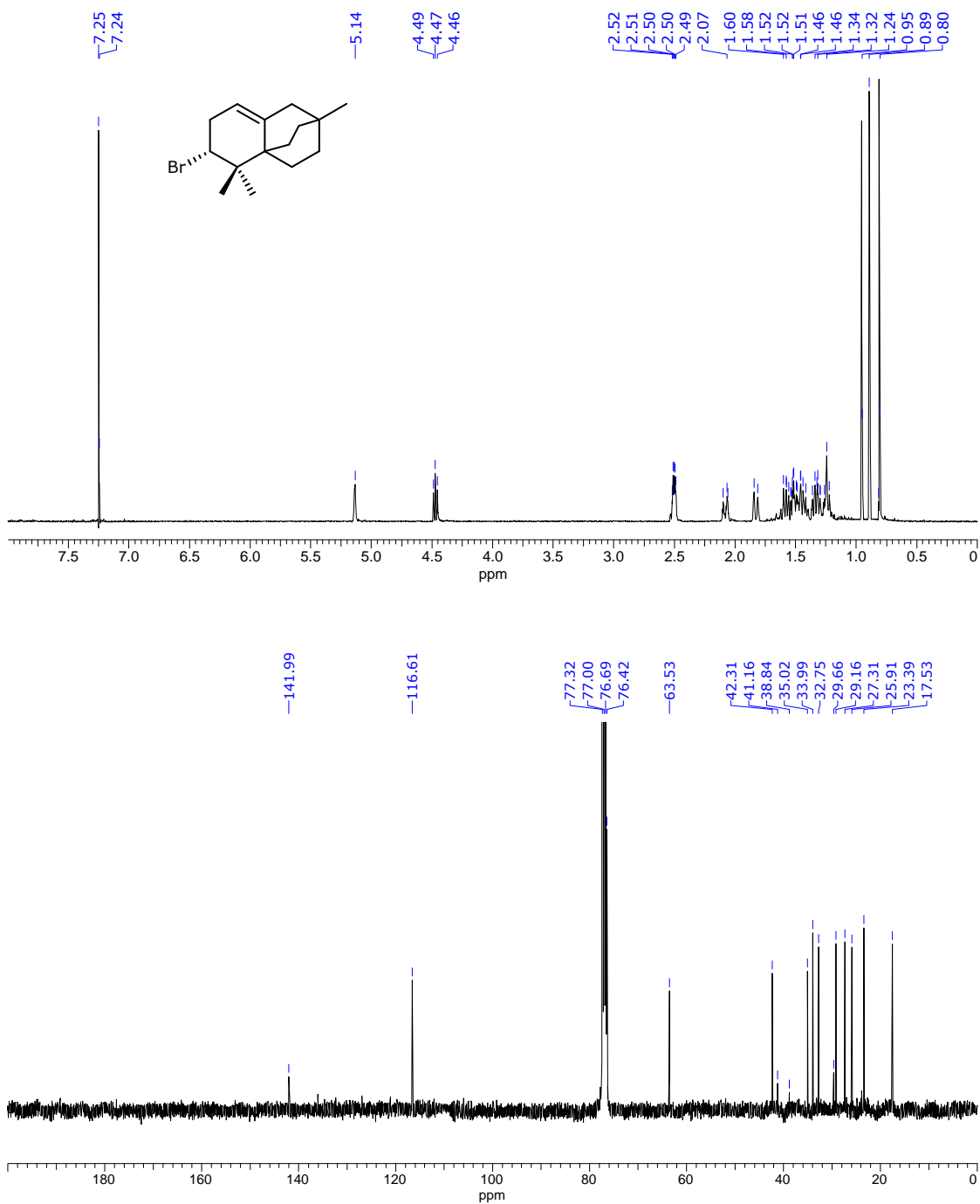
Figura 5.1.7. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **L4** (500 MHz, CDCl_3).

Figura 5.1.8. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de **L4** (500 MHz, CDCl₃).

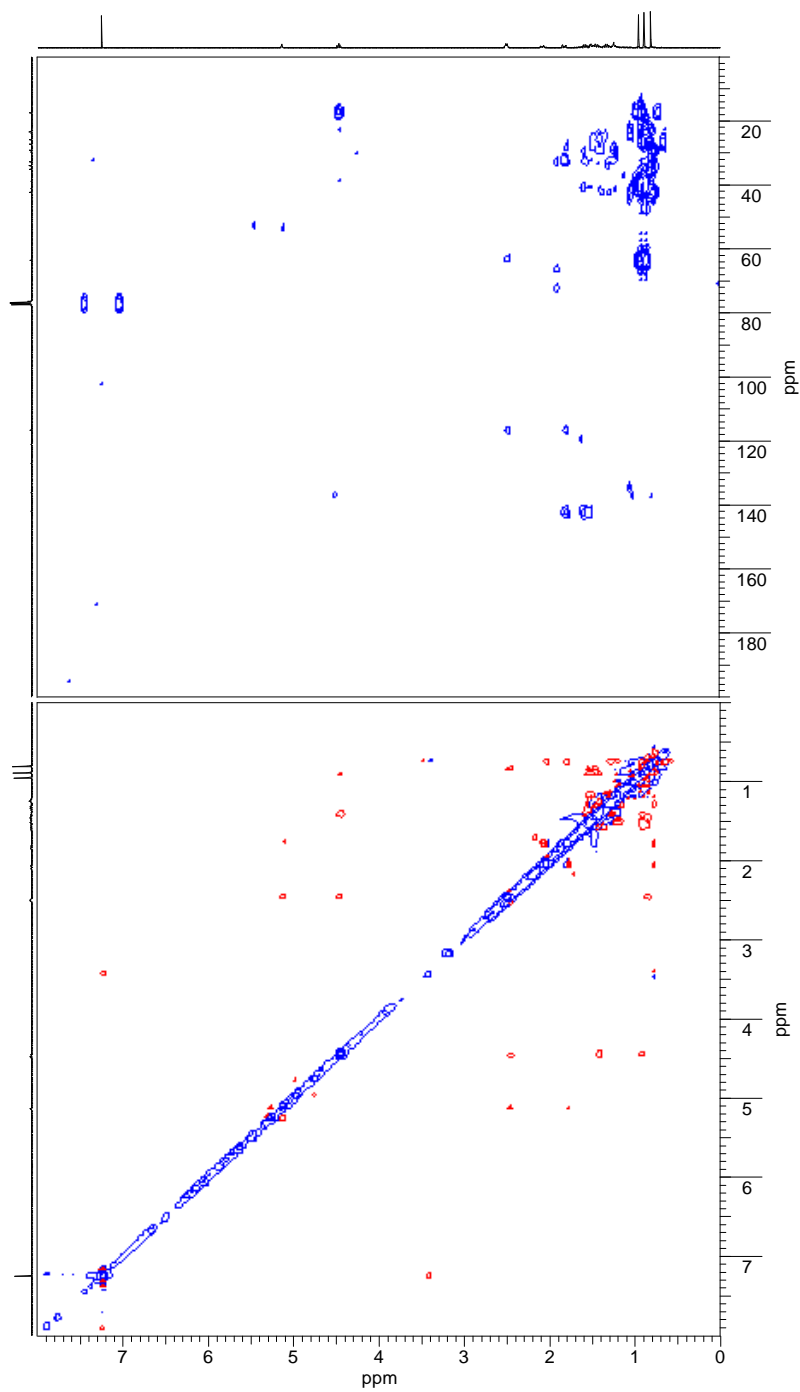


Figura 5.1.9. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Gomerolactona A, **L5** (500 MHz, CDCl_3).

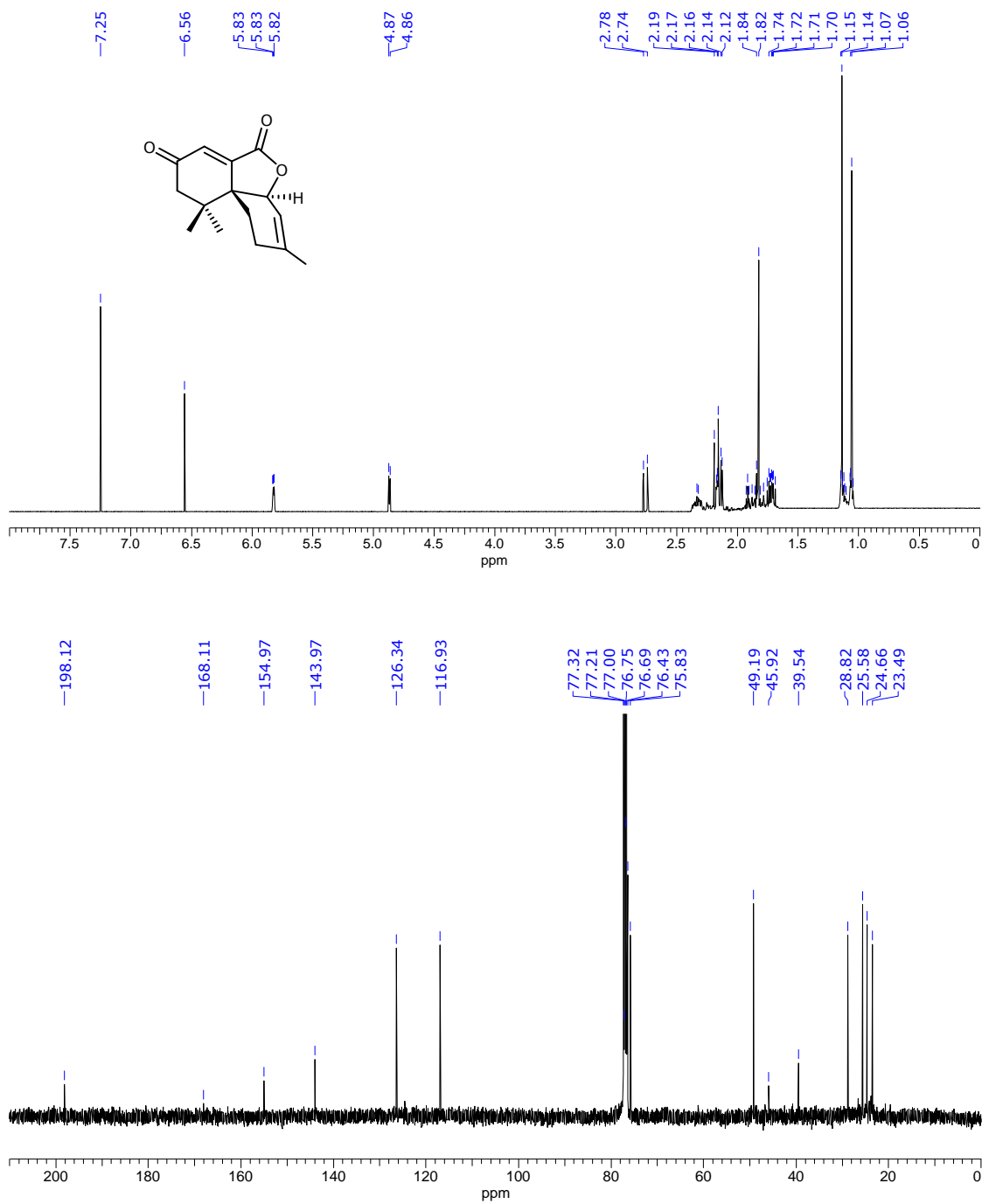


Figura 5.1.10. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Gomerolactona A, **L5** (500 MHz, CDCl₃).

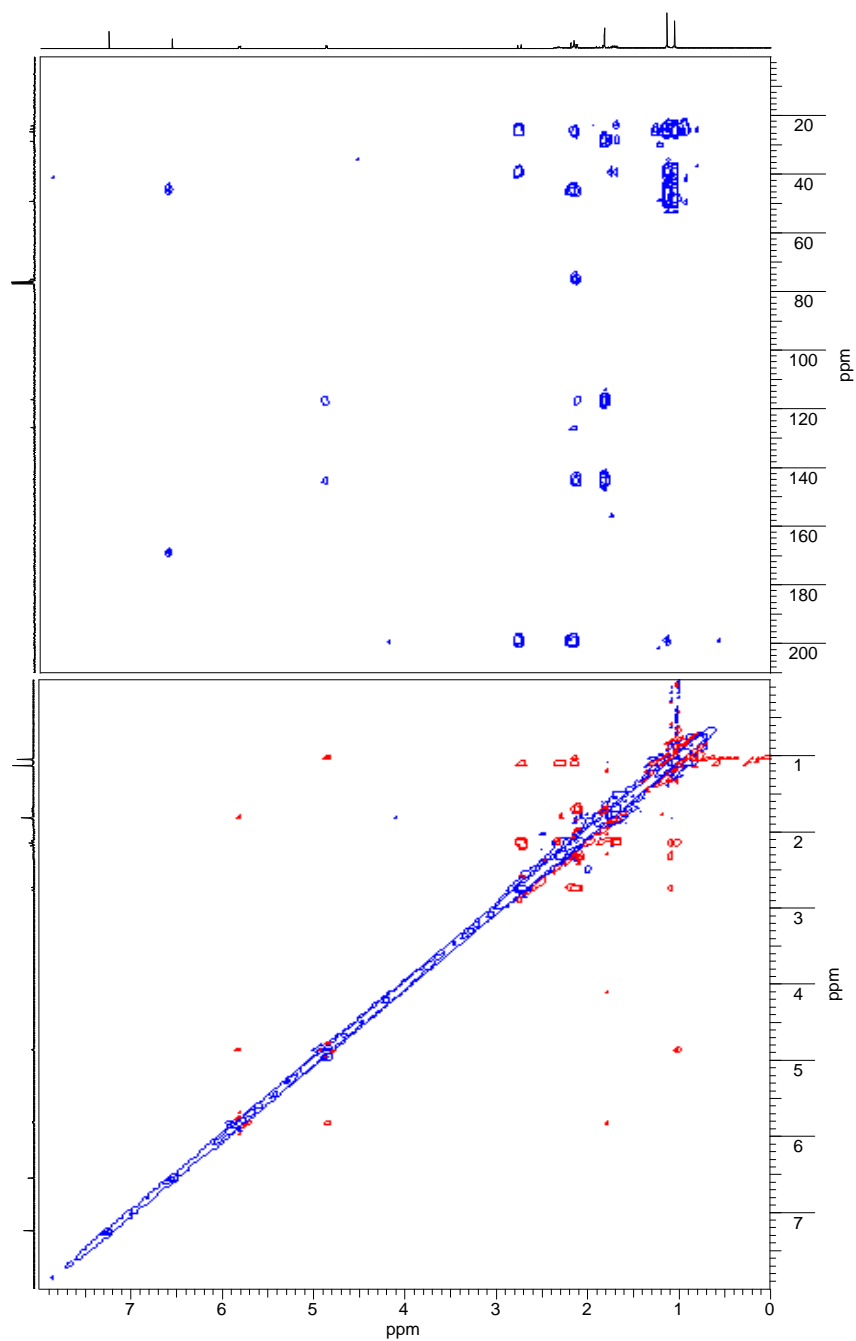


Figura 5.1.11. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Gomerolactona B, **L6** (500 MHz, CDCl_3).

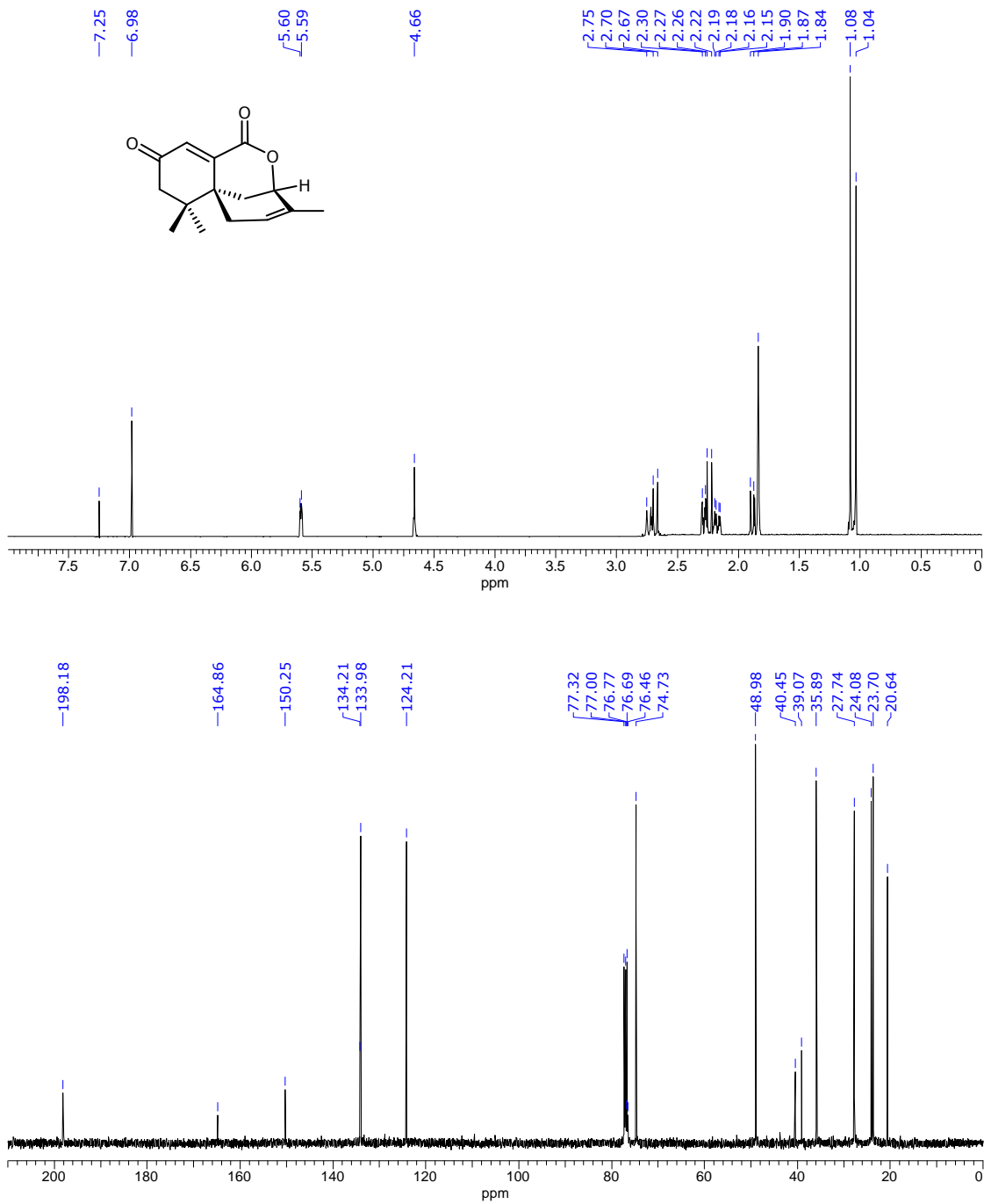


Figura 5.1.12. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Gomerolactona B, **L6** (500 MHz, CDCl₃).

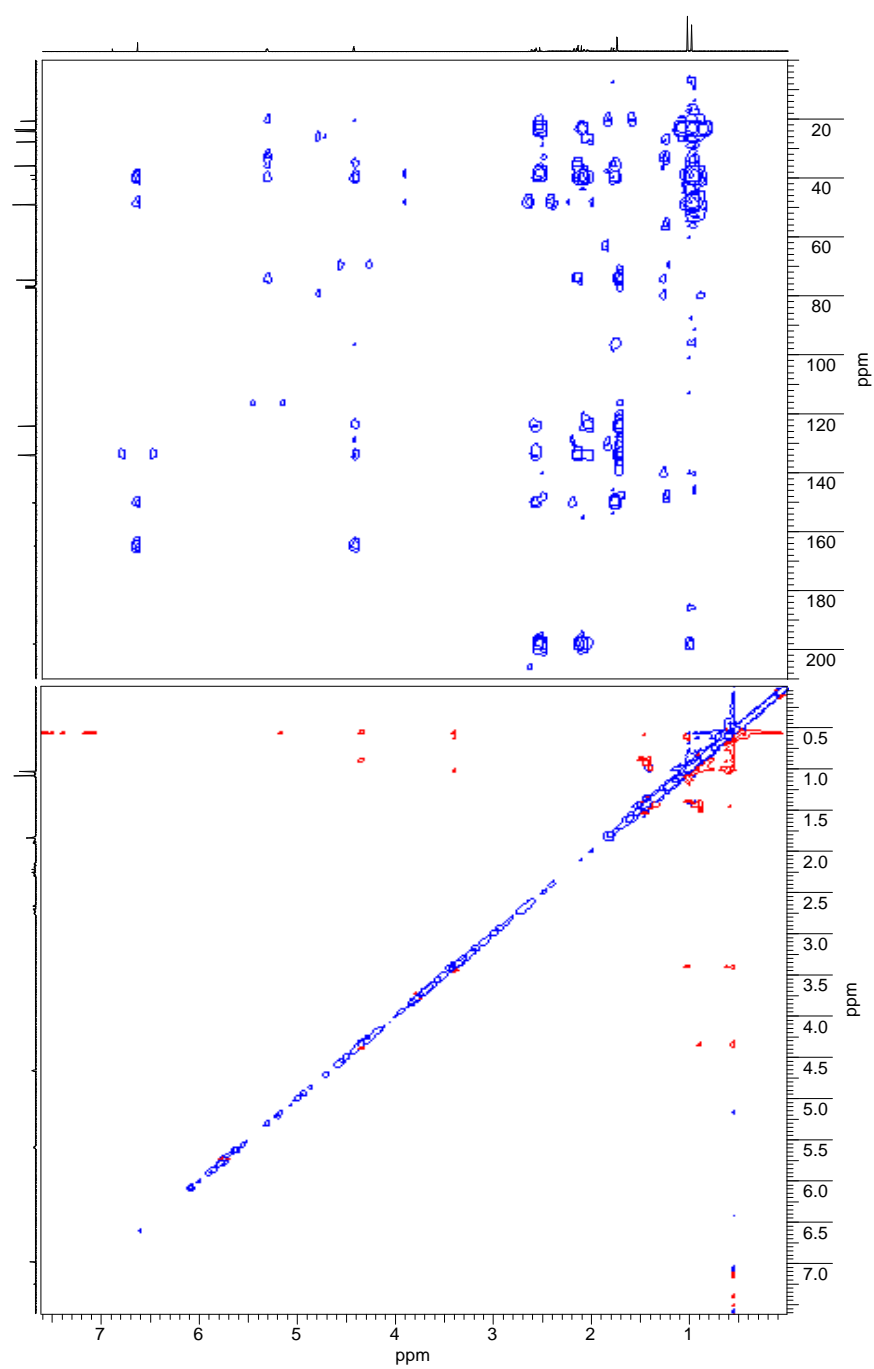


Figura 5.1.13. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Gomerolactona C, **L7** (500 MHz, CDCl_3).

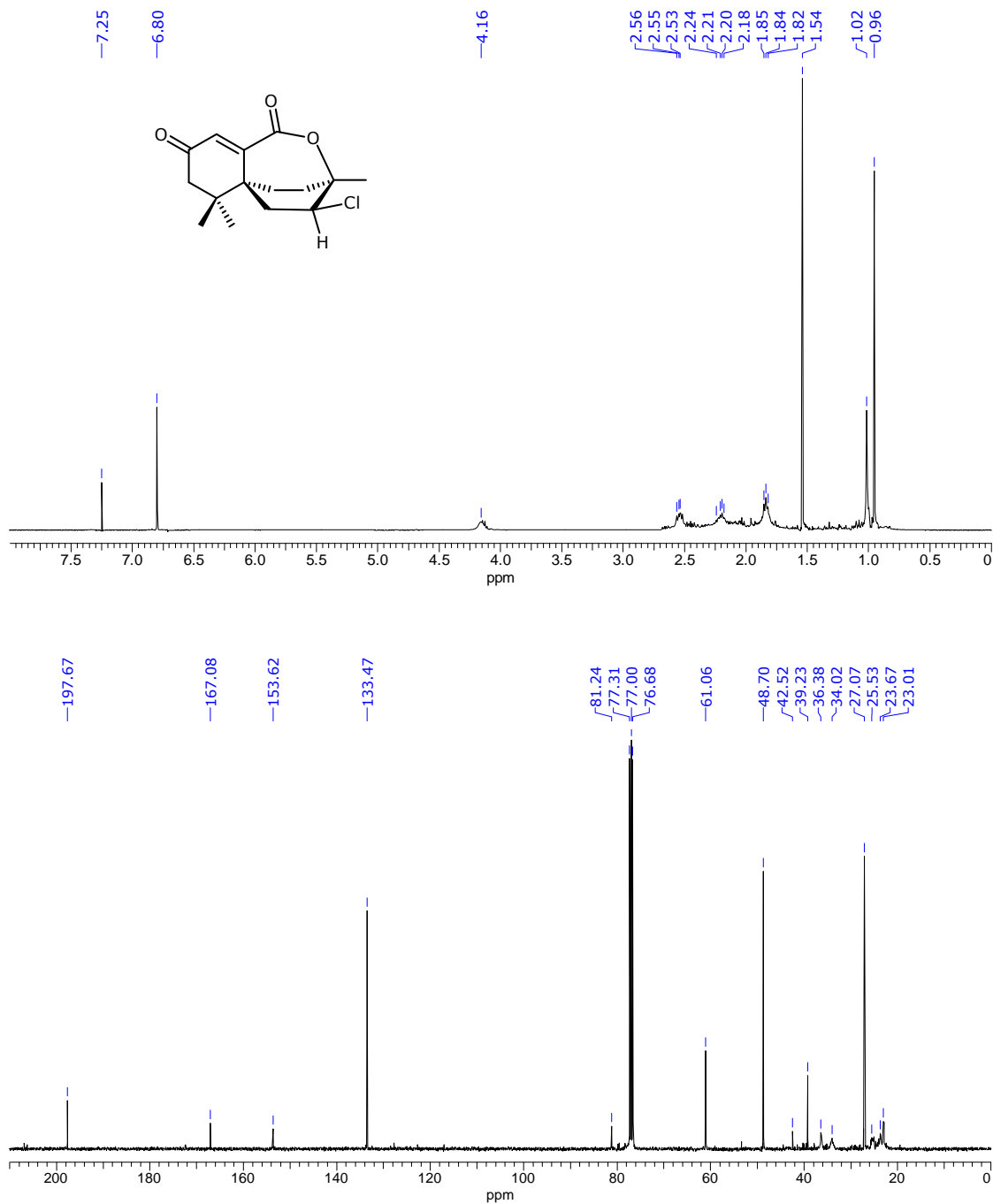


Figura 5.1.14. Espectros de RMN de HMBC y NOESY Gomerolactona C, **L7** (500 MHz, CDCl₃).

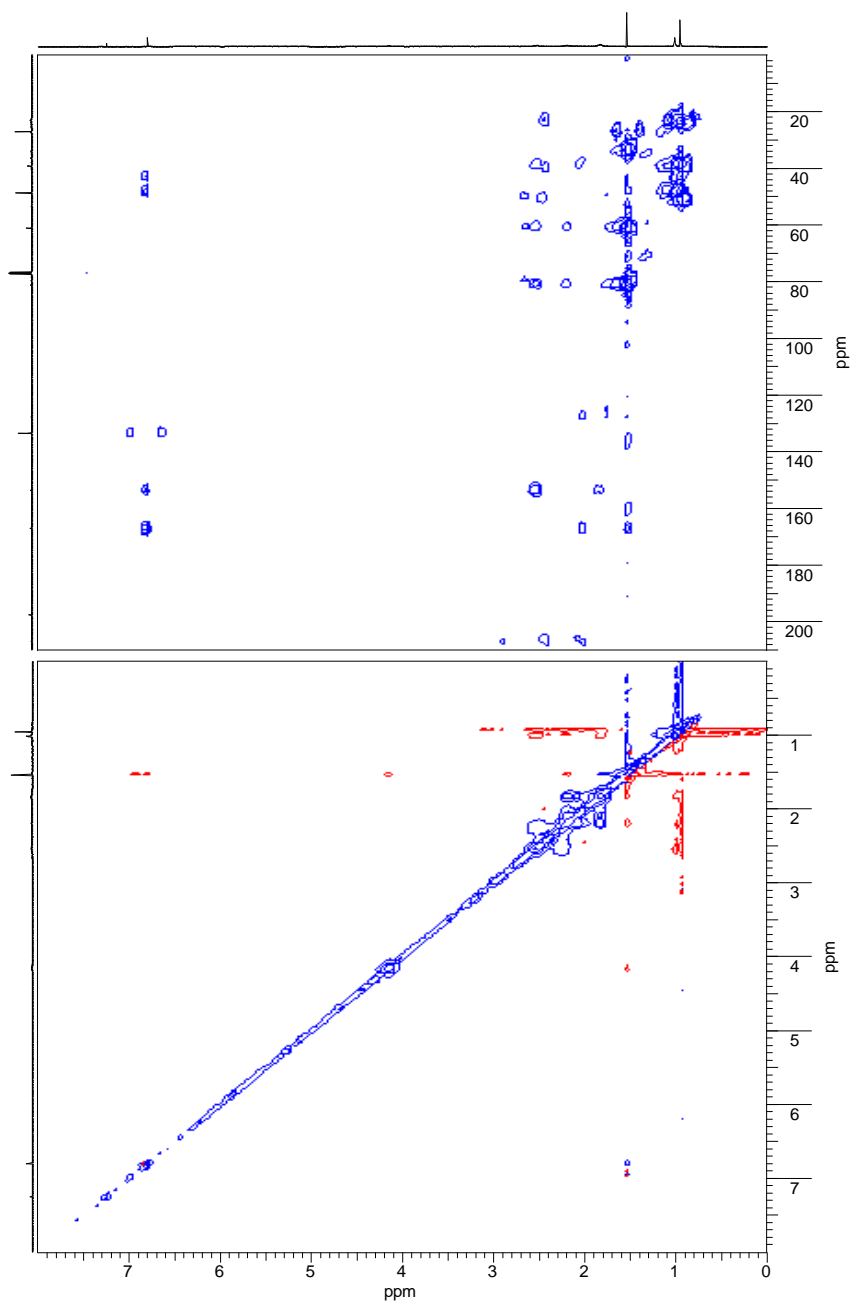


Figura 5.1.15. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Gomerolactona D, **L8** (500 MHz, CDCl_3).

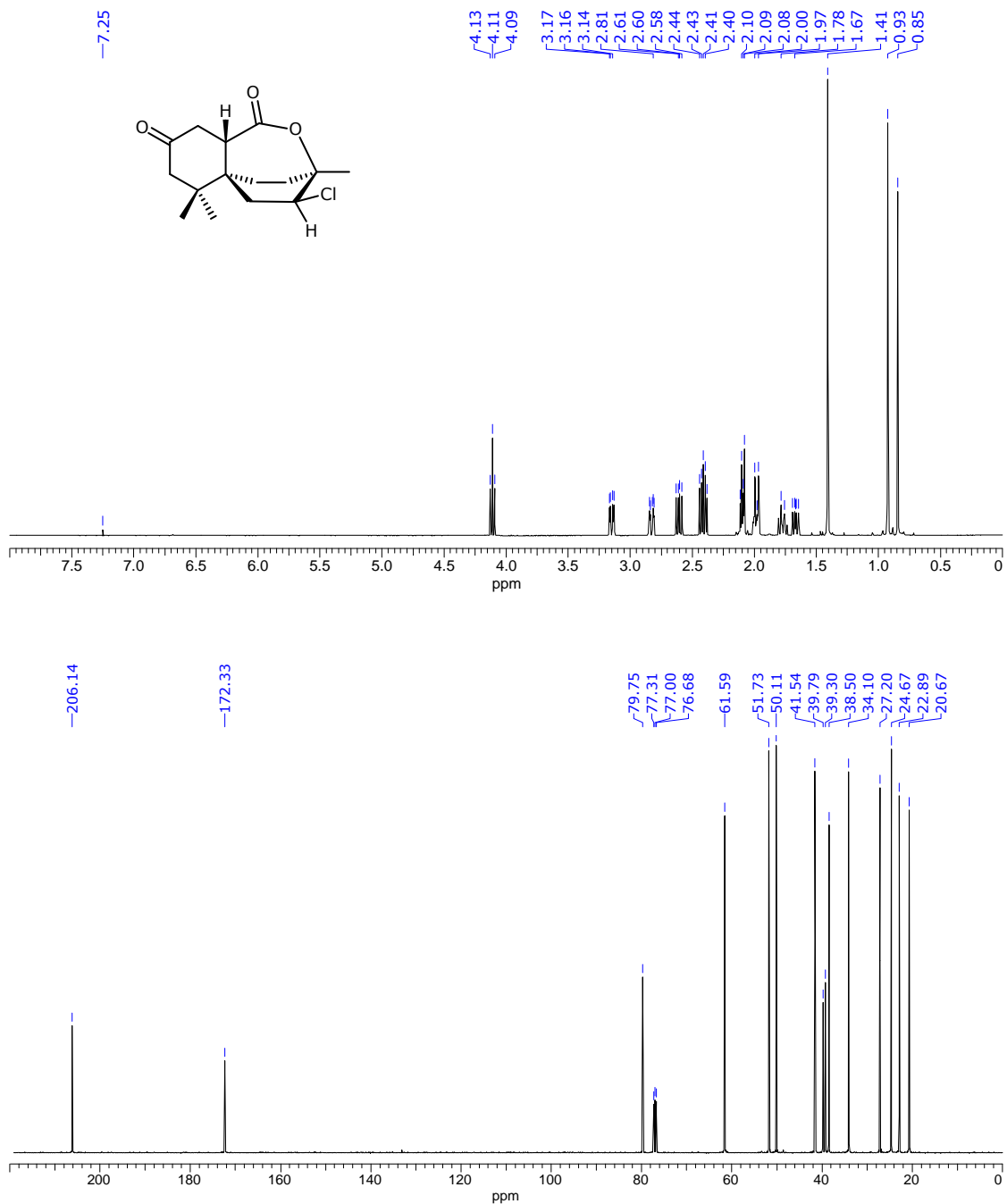


Figura 5.1.16. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Gomerolactona D, **L8** (500 MHz, CDCl₃).

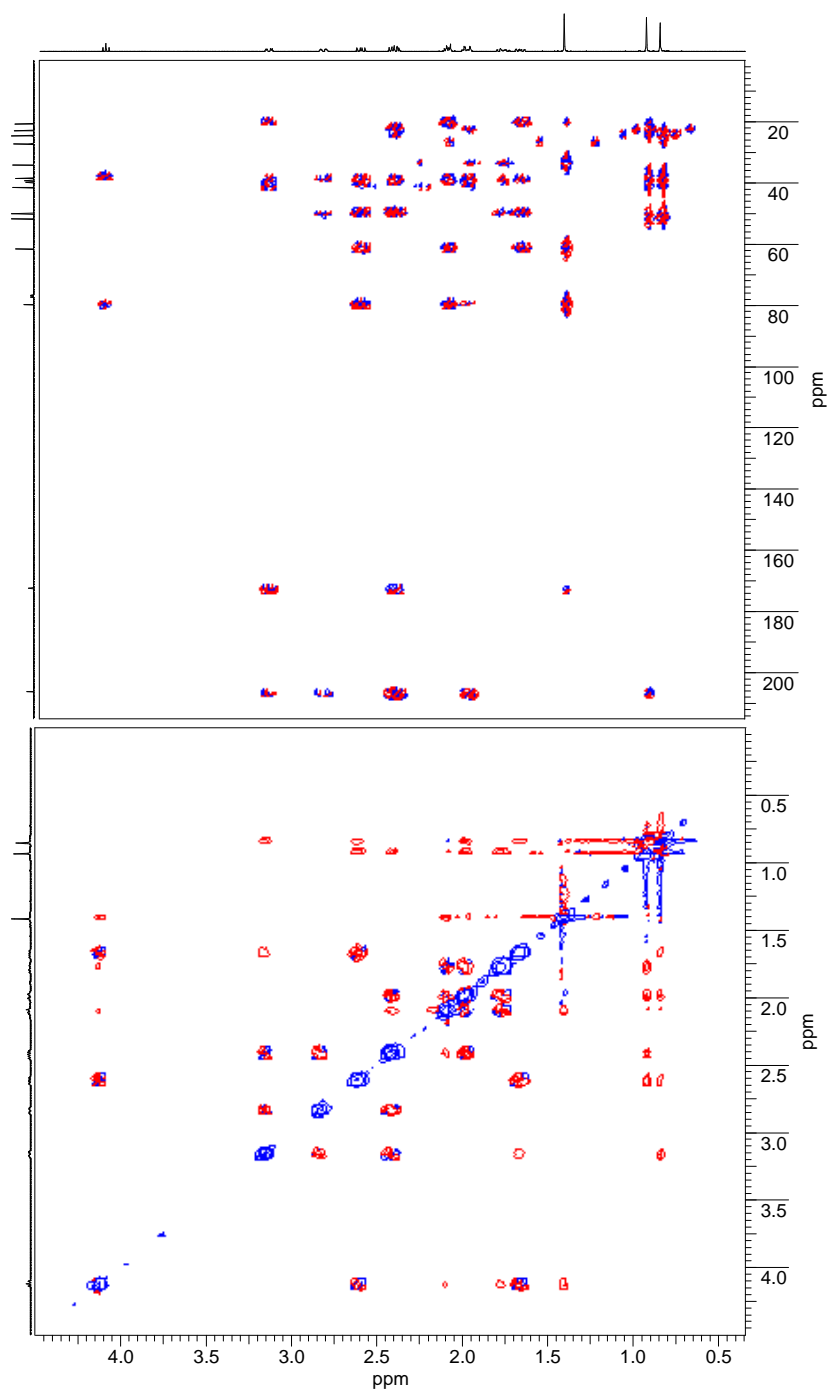


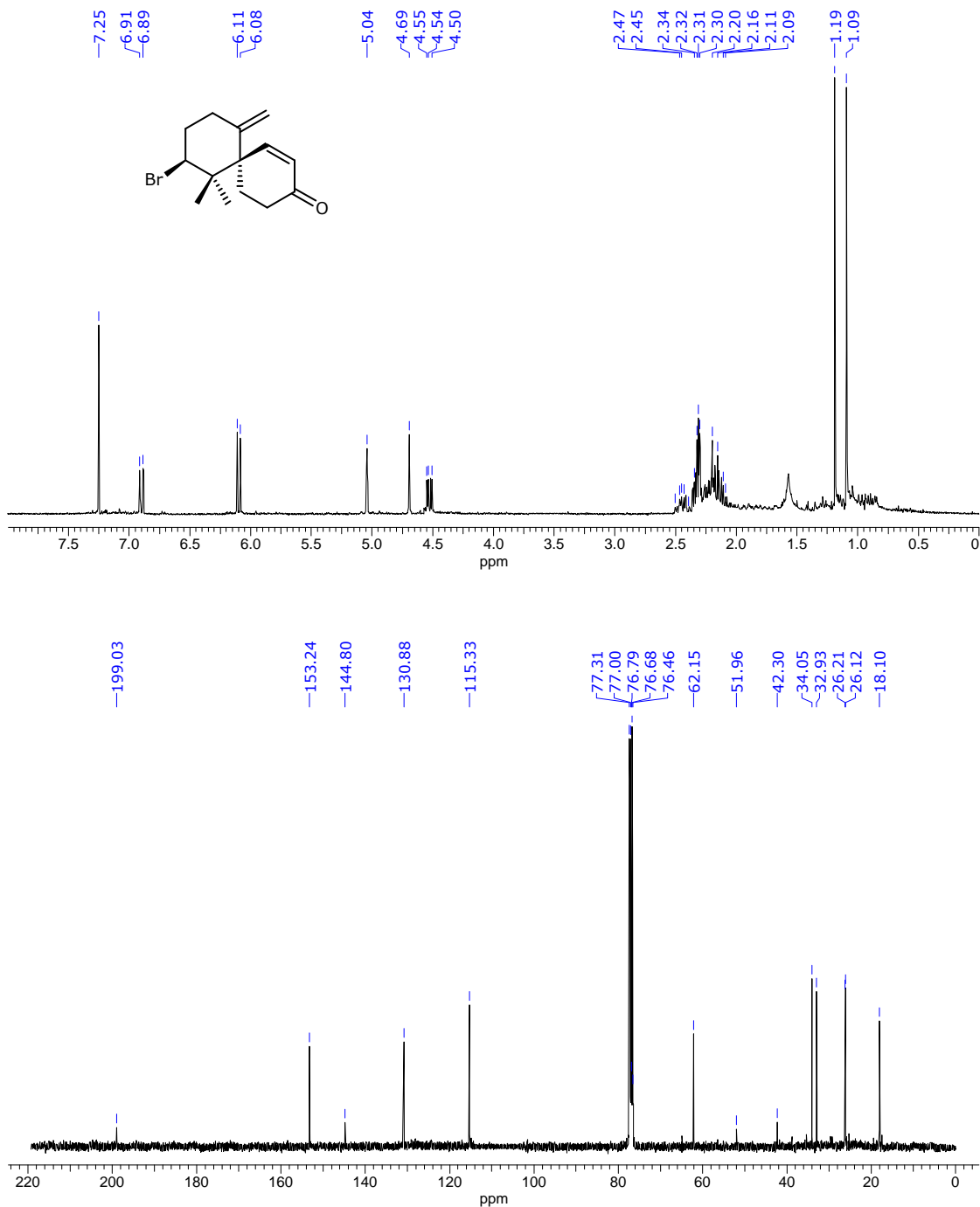
Figura 5.1.17. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **L9** (500 MHz, CDCl_3).

Figura 5.1.18. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de **L9** (500 MHz, CDCl₃).

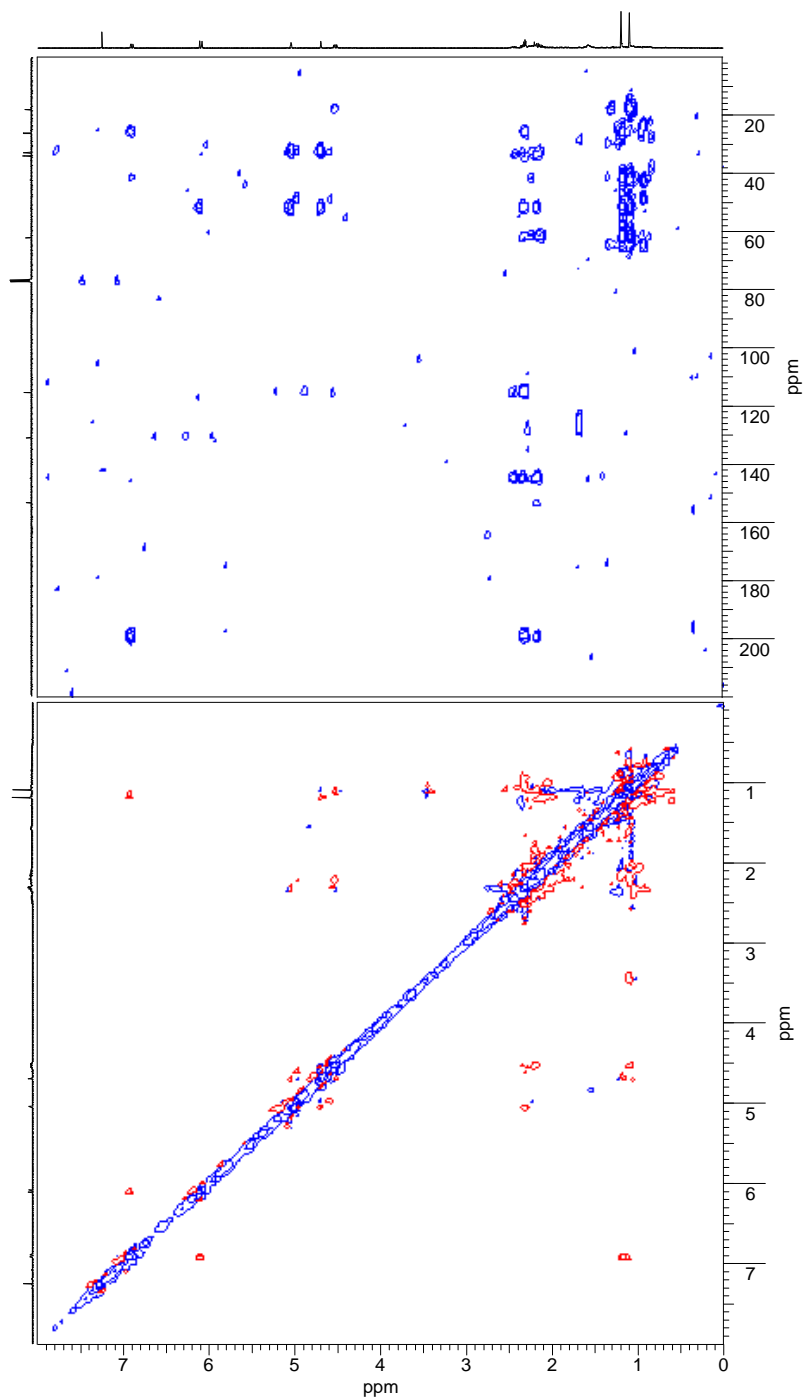


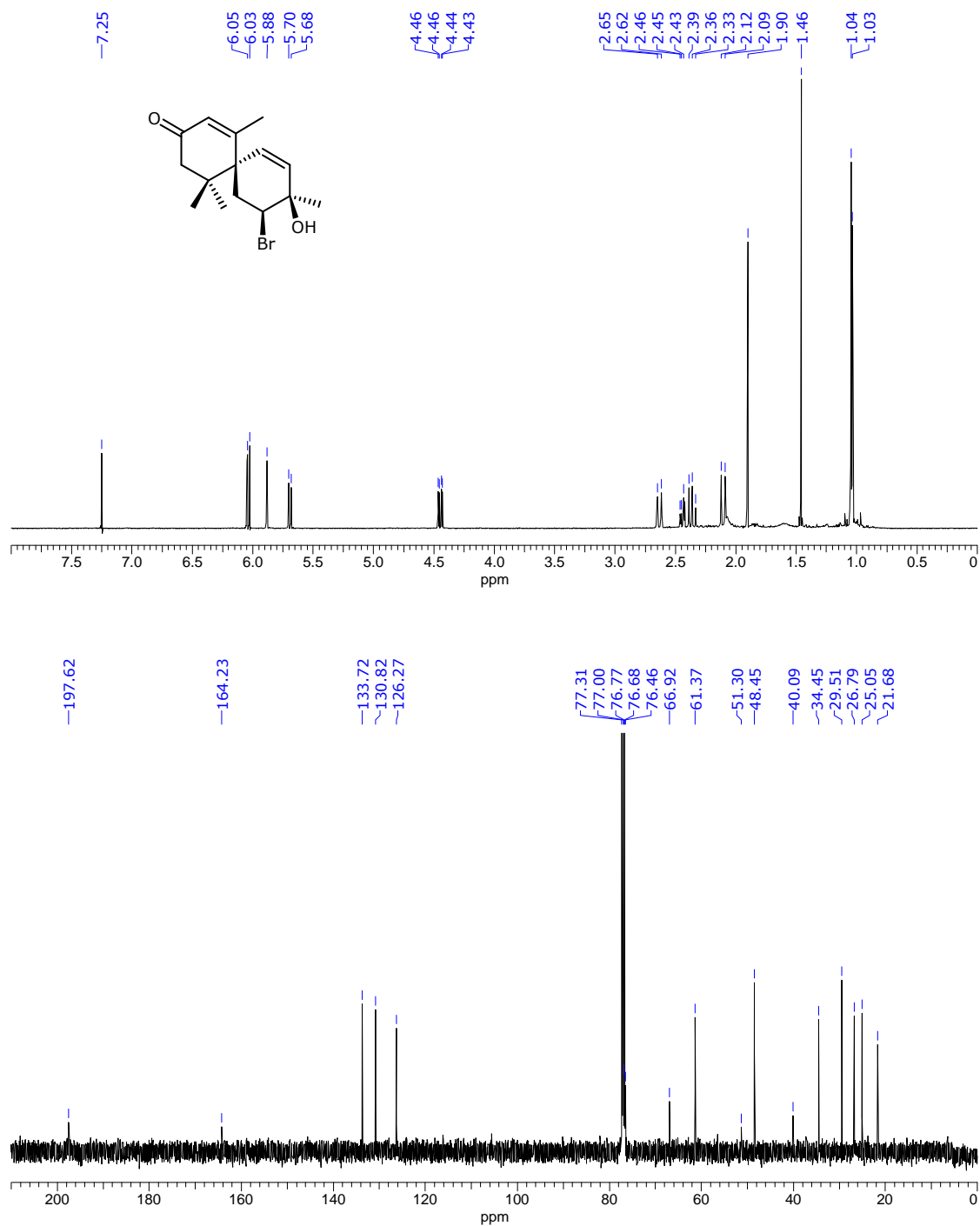
Figura 5.1.19. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **L10** (500 MHz, CDCl_3).

Figura 5.1.20. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de **L10** (500 MHz, CDCl₃).

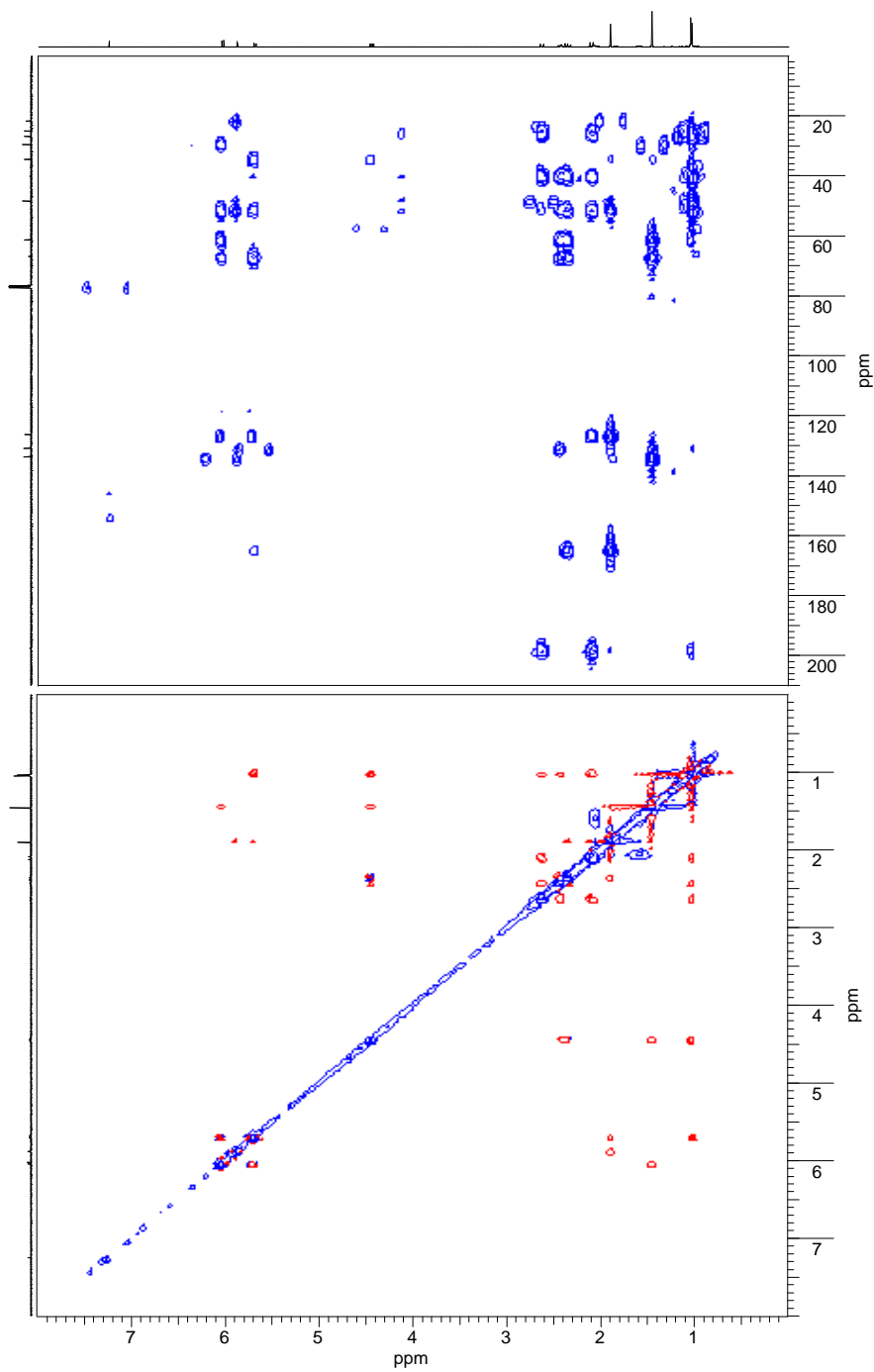


Figura 5.1.21. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **L11** (500 MHz, CDCl_3).

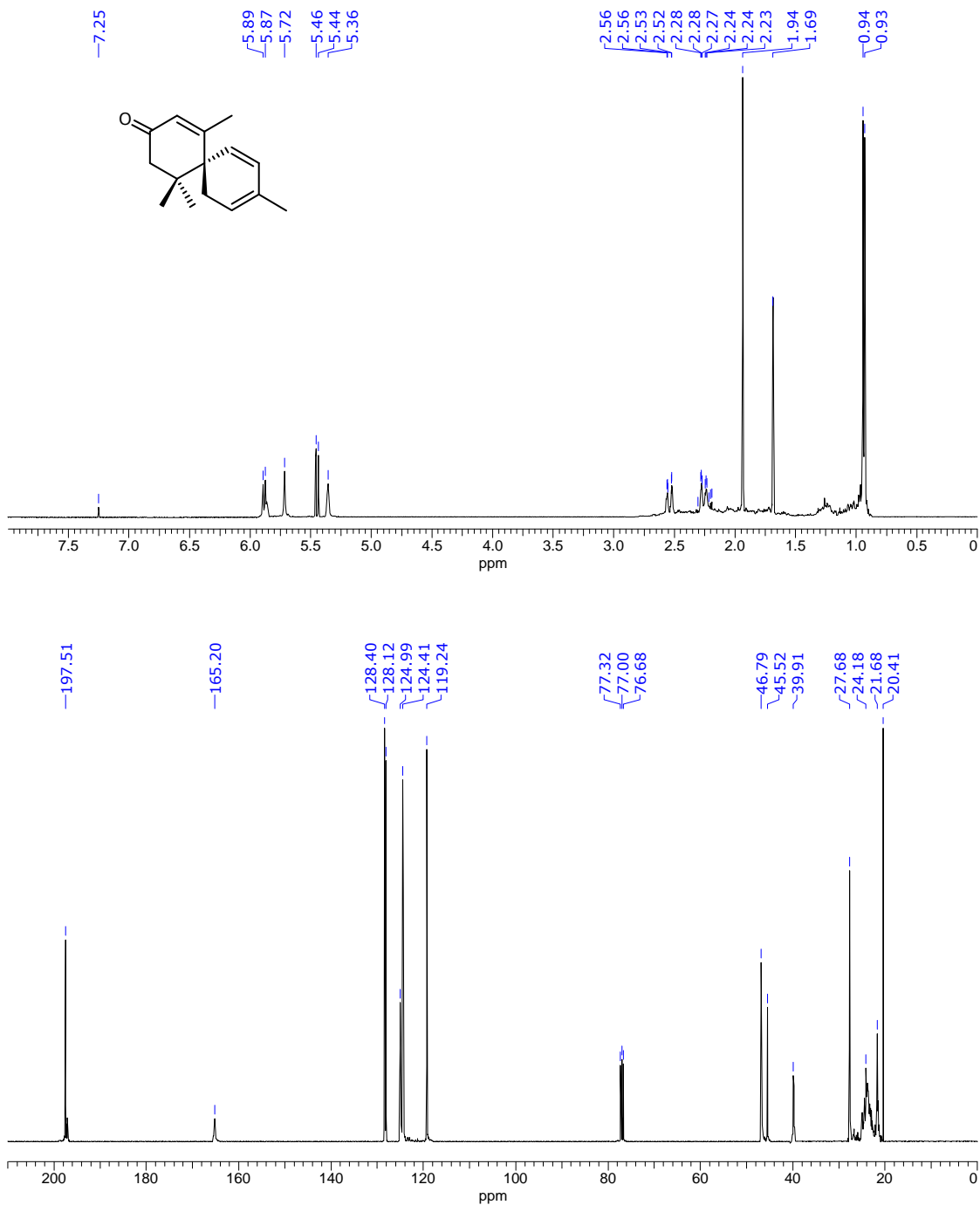


Figura 5.1.22. Espectros de RMN de HMBC de **L11** (500 MHz, CDCl₃).

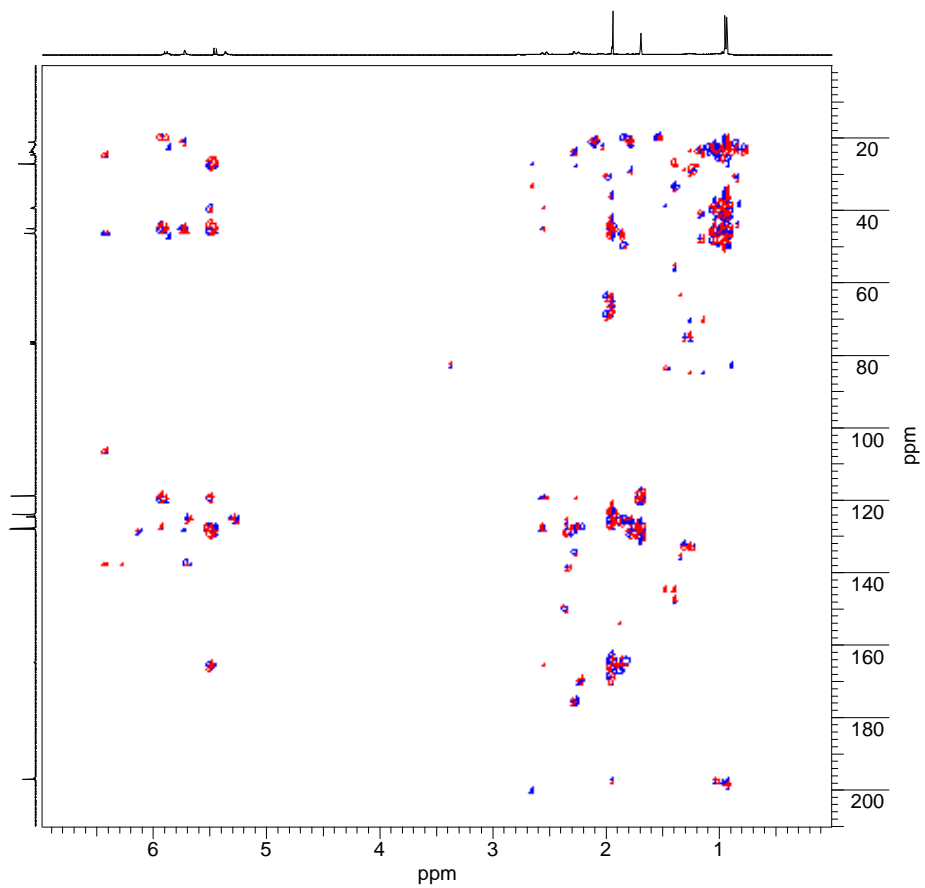


Figura 5.1.23. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **L12** (500 MHz, CDCl_3).

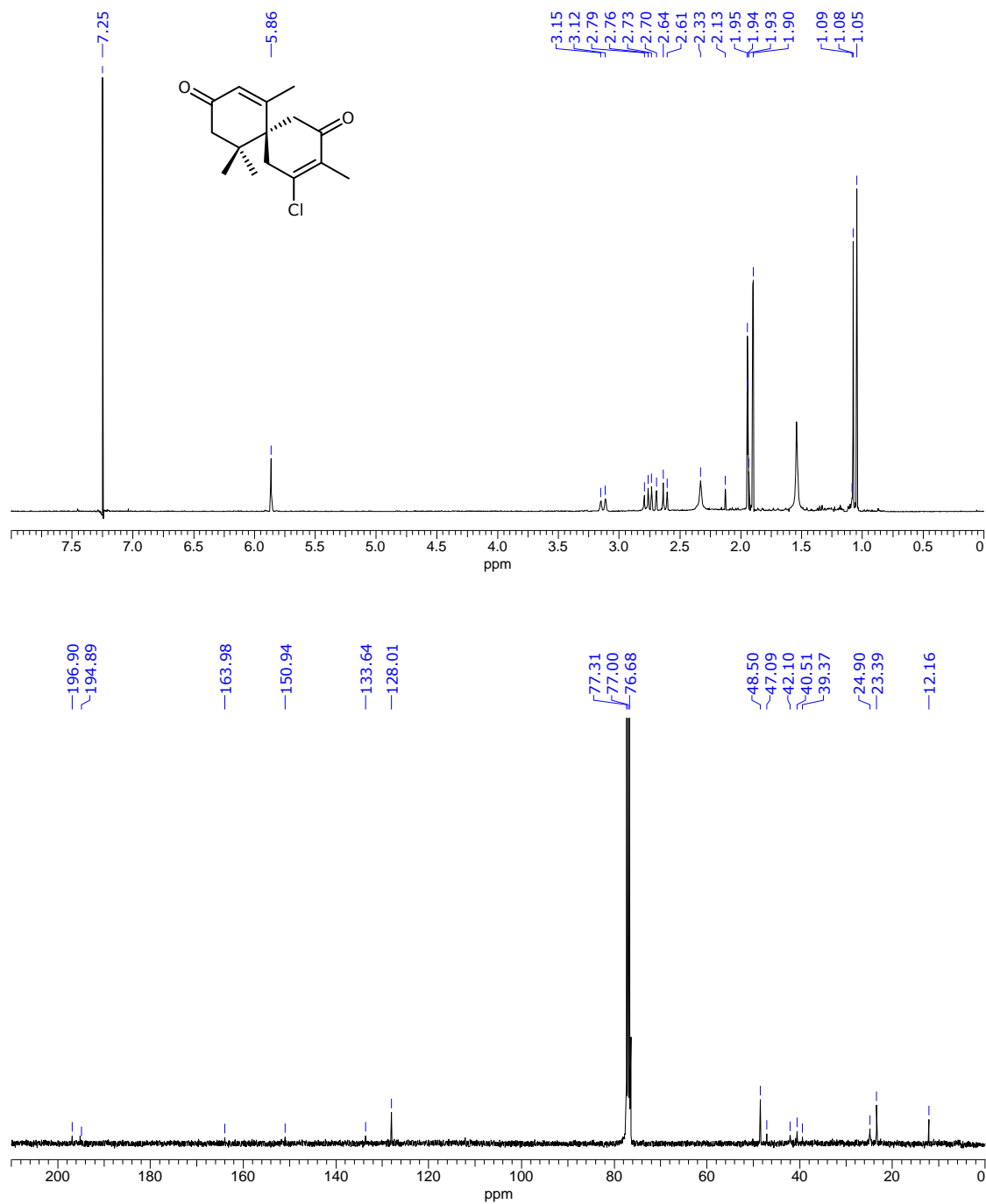


Figura 5.1.24. Espectros de RMN de HMBC de **L12** (500 MHz, CDCl₃).

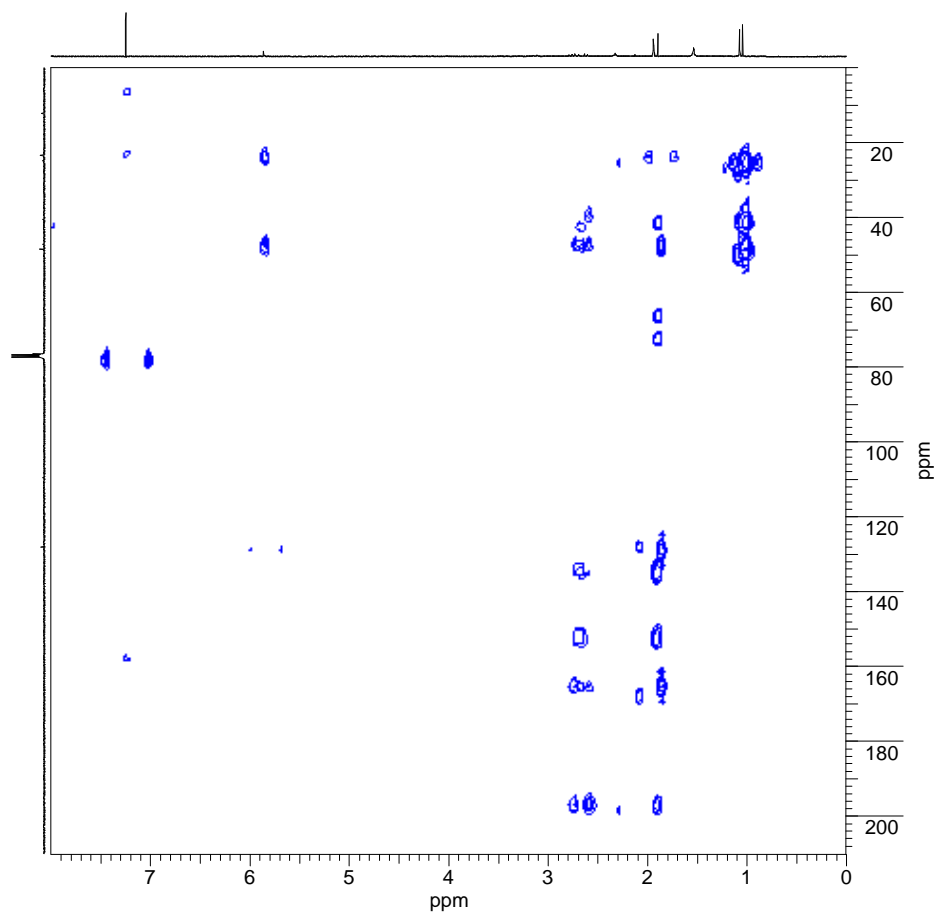


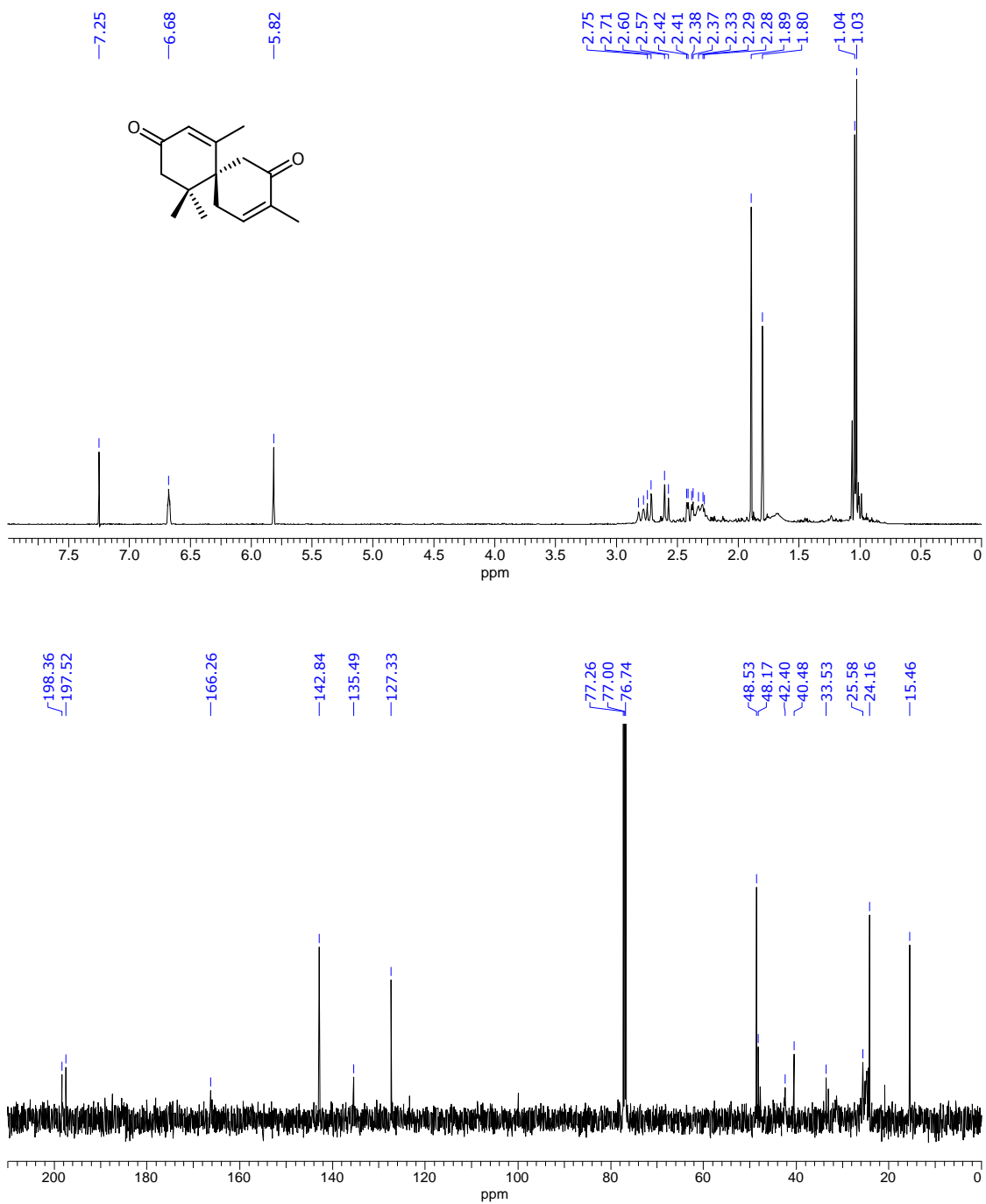
Figura 5.1.25. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **L13** (500 MHz, CDCl_3).

Figura 5.1.26. Espectros de RMN de ¹H y ¹³C de **L14** (500 MHz, CDCl₃).

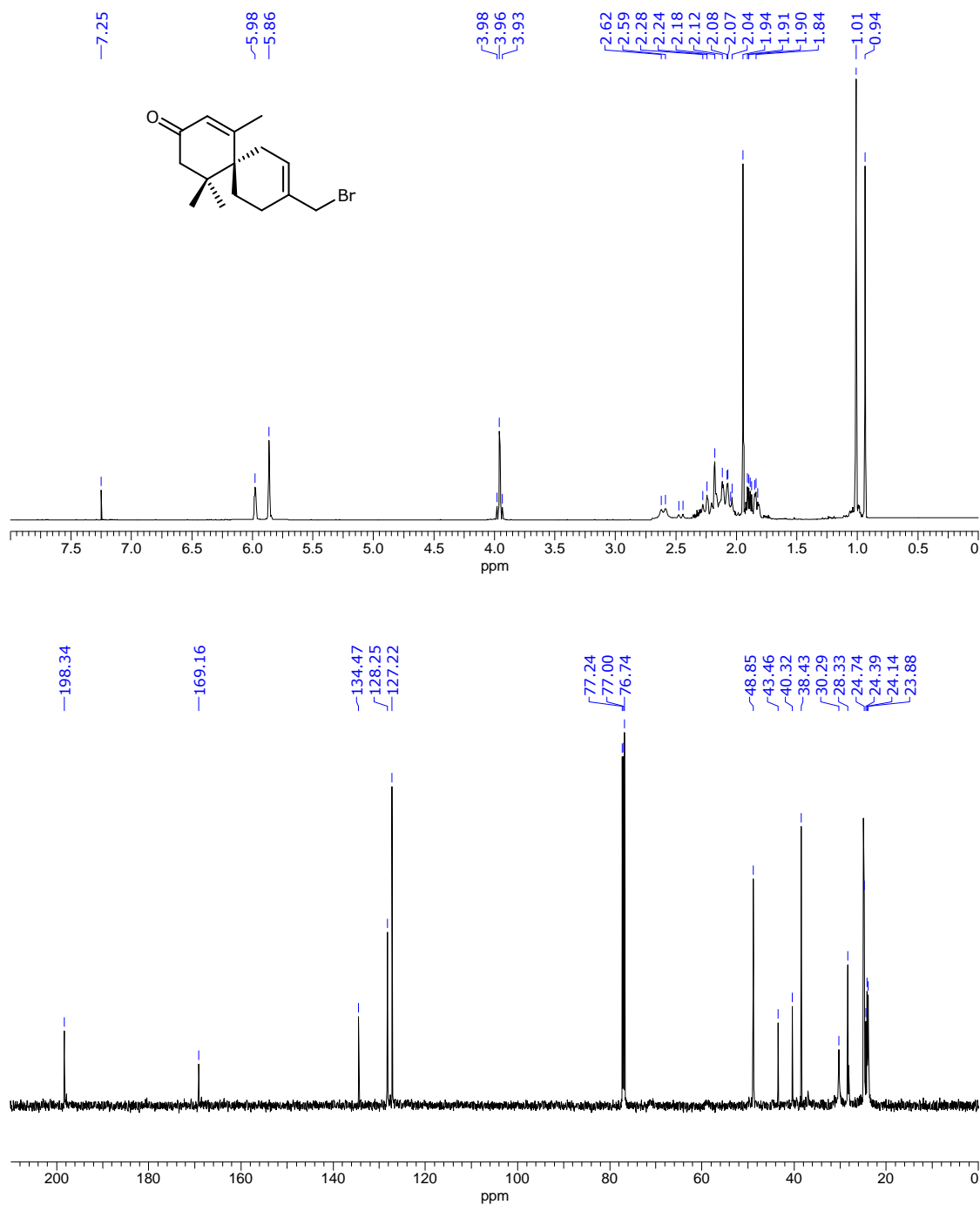


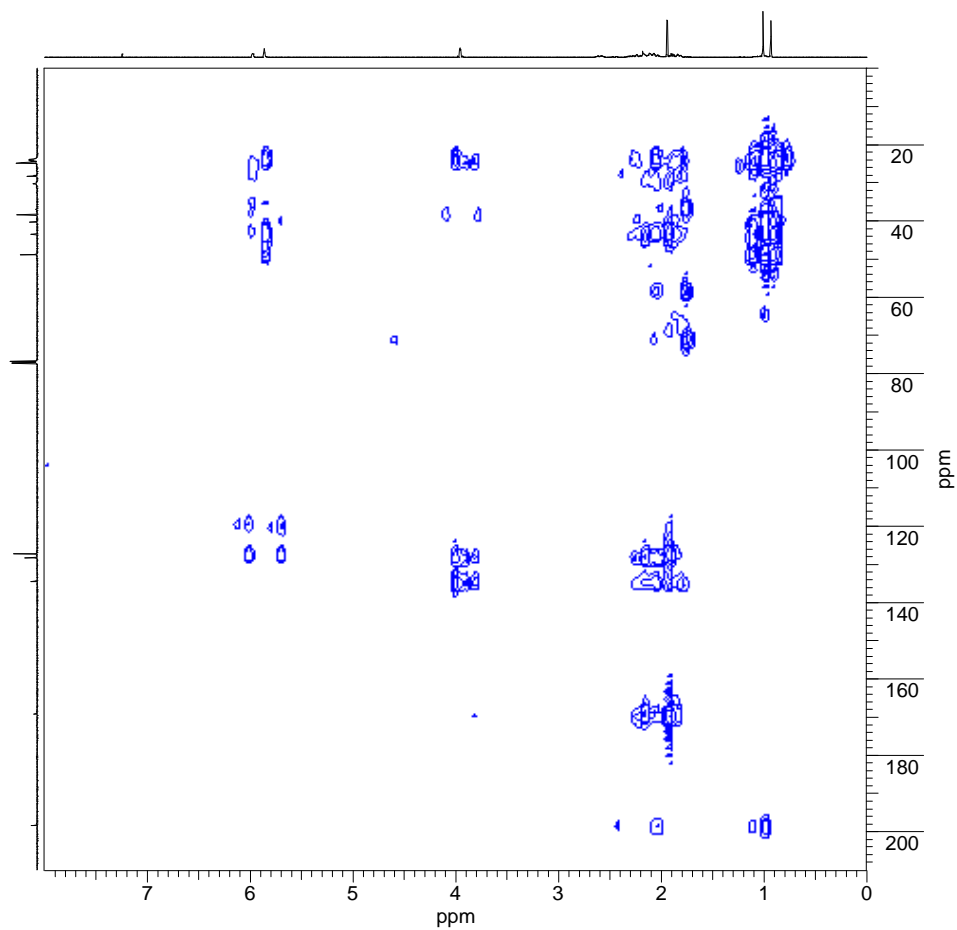
Figura 5.1.27. Espectros de RMN de HMBC de **L14** (500 MHz, CDCl_3).

Figura 5.1.28. Espectros de RMN de ¹H y ¹³C de **L15** (500 MHz, CDCl₃).

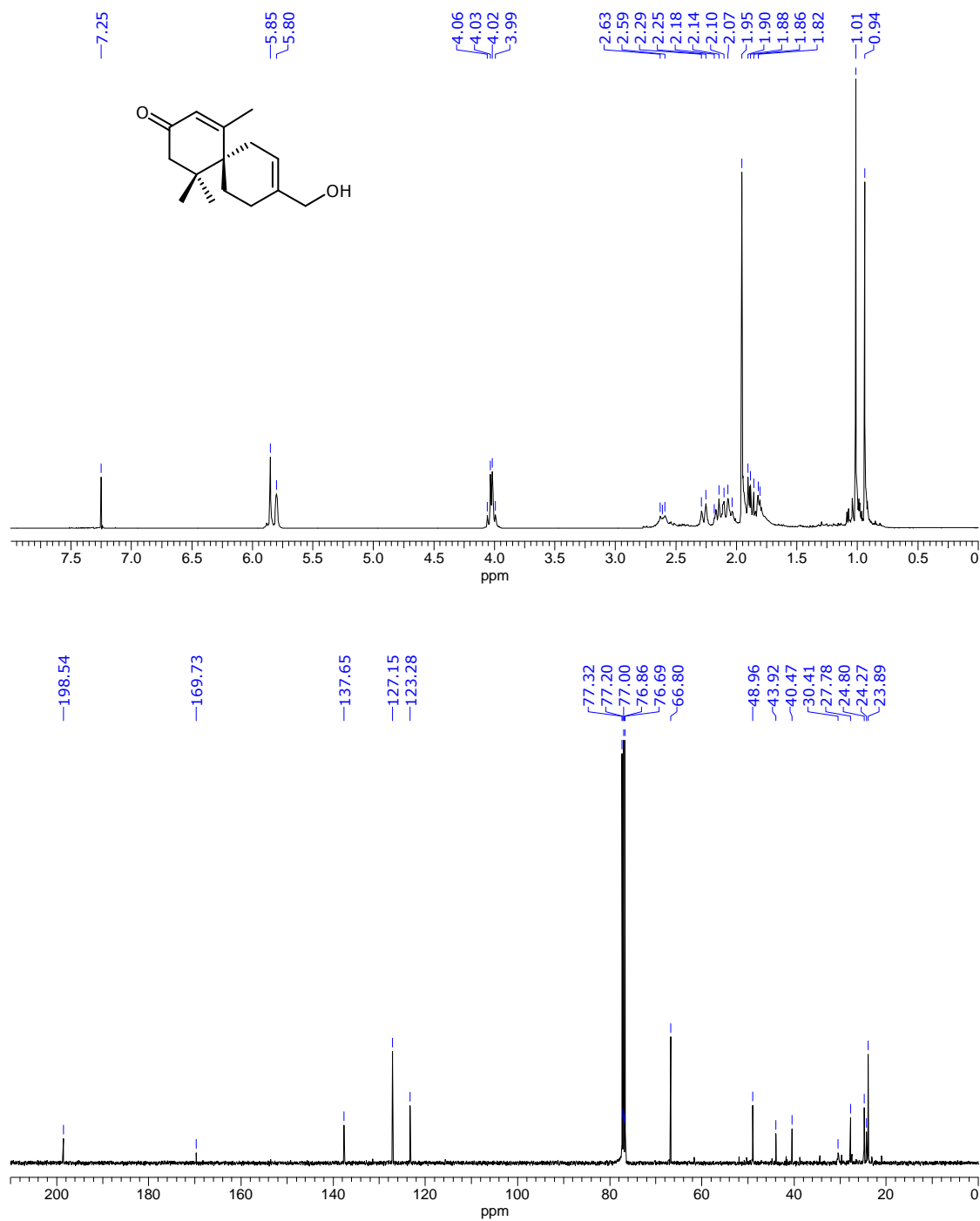


Figura 5.1.29. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **L16** (500 MHz, CDCl_3).

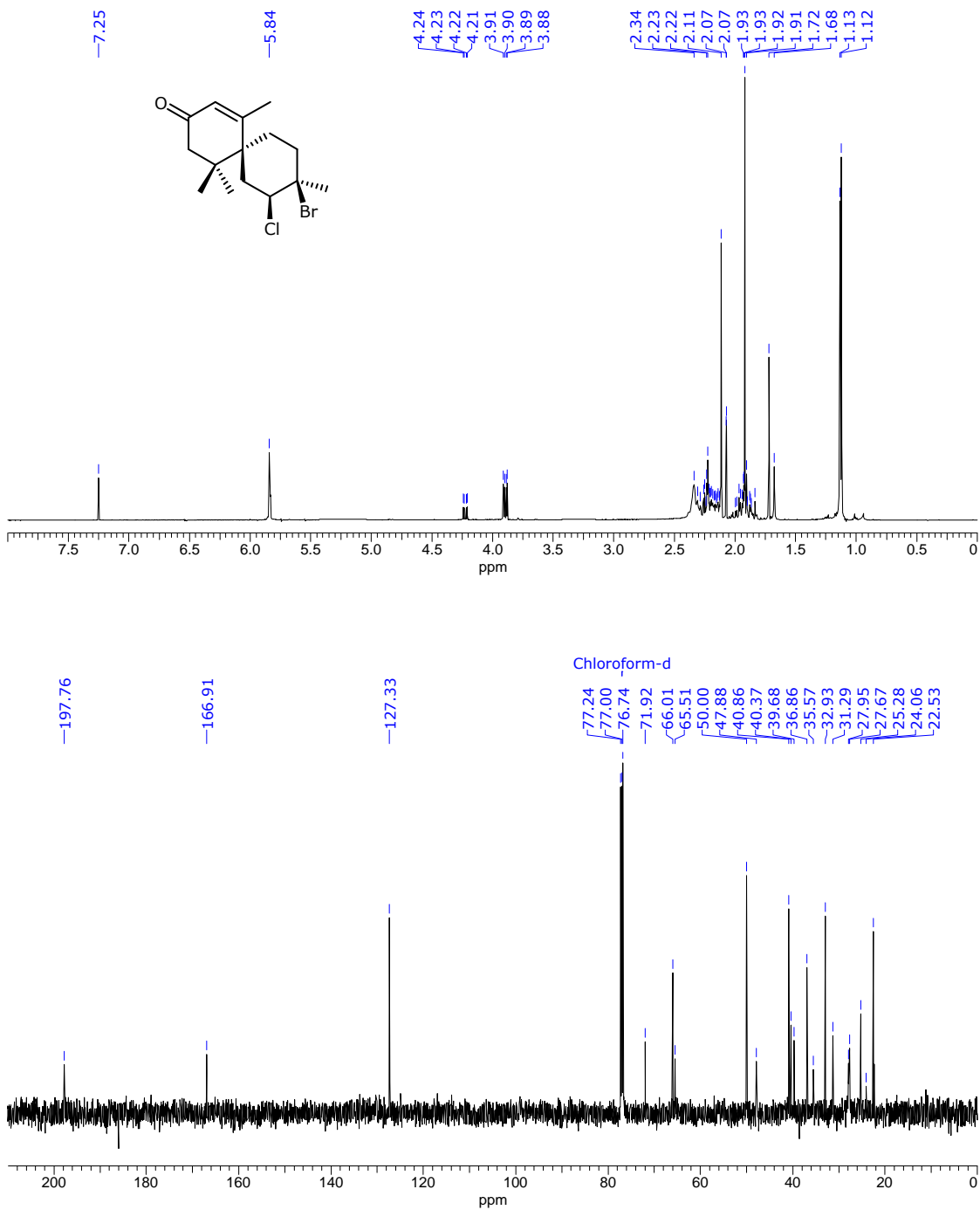
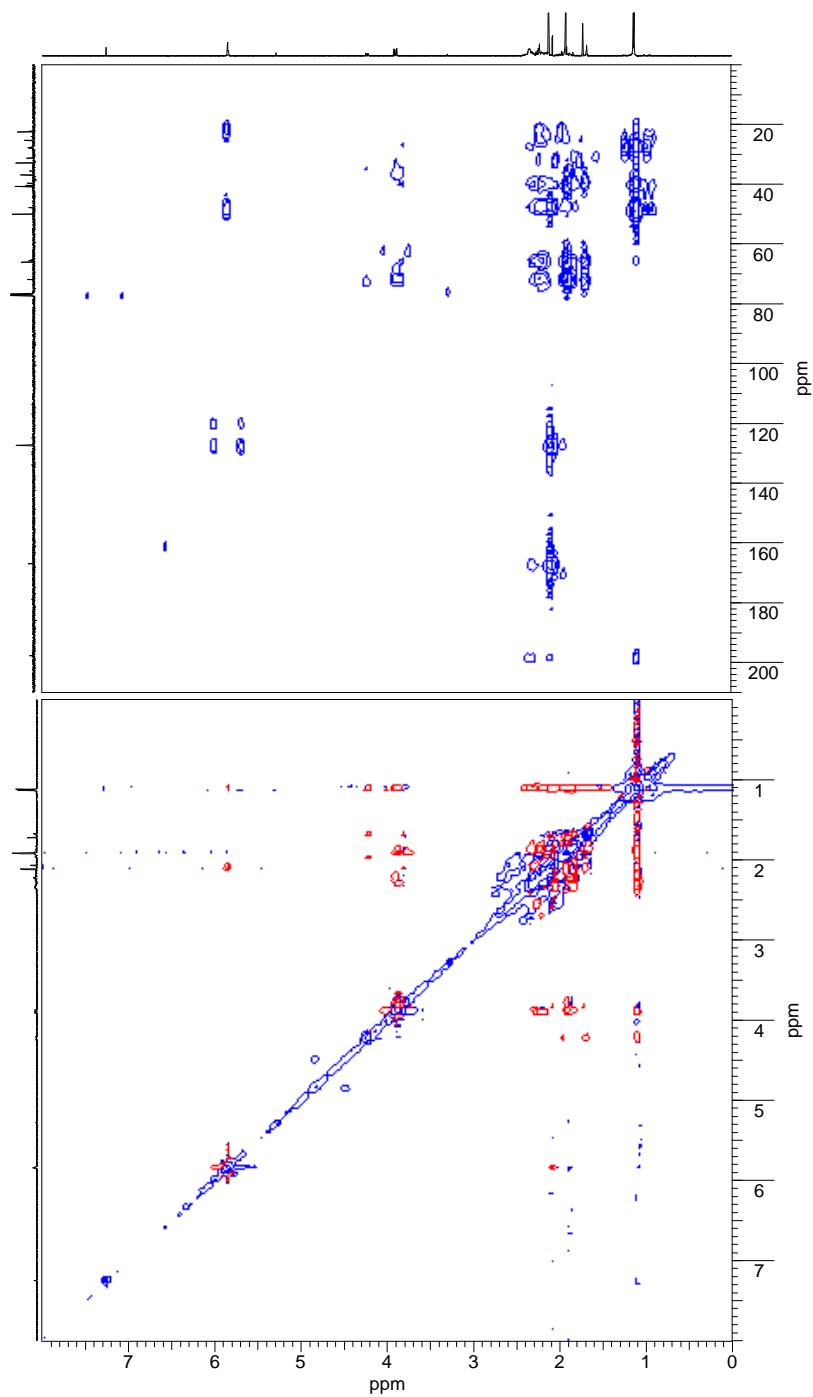


Figura 5.1.30. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de **L16** (500 MHz, CDCl₃).



**5.2. Espectros de RMN de los metabolitos
aislados de *Aplysia dactylomela*
(La Palma)**

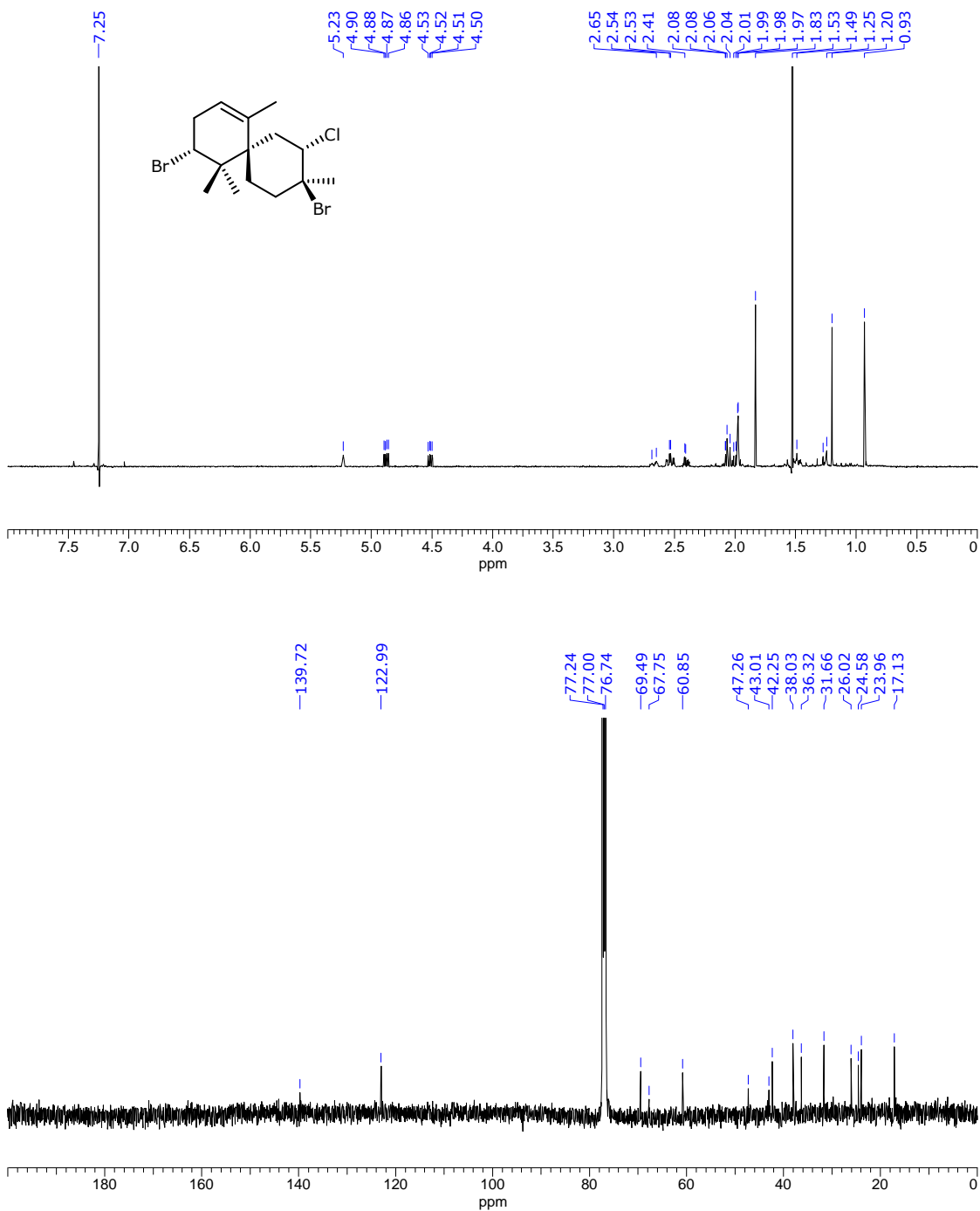
Figura 5.2.1. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **Ap-1** (500 MHz, CDCl_3).

Figura 5.2.2. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de **Ap-1** (500 MHz, CDCl₃).

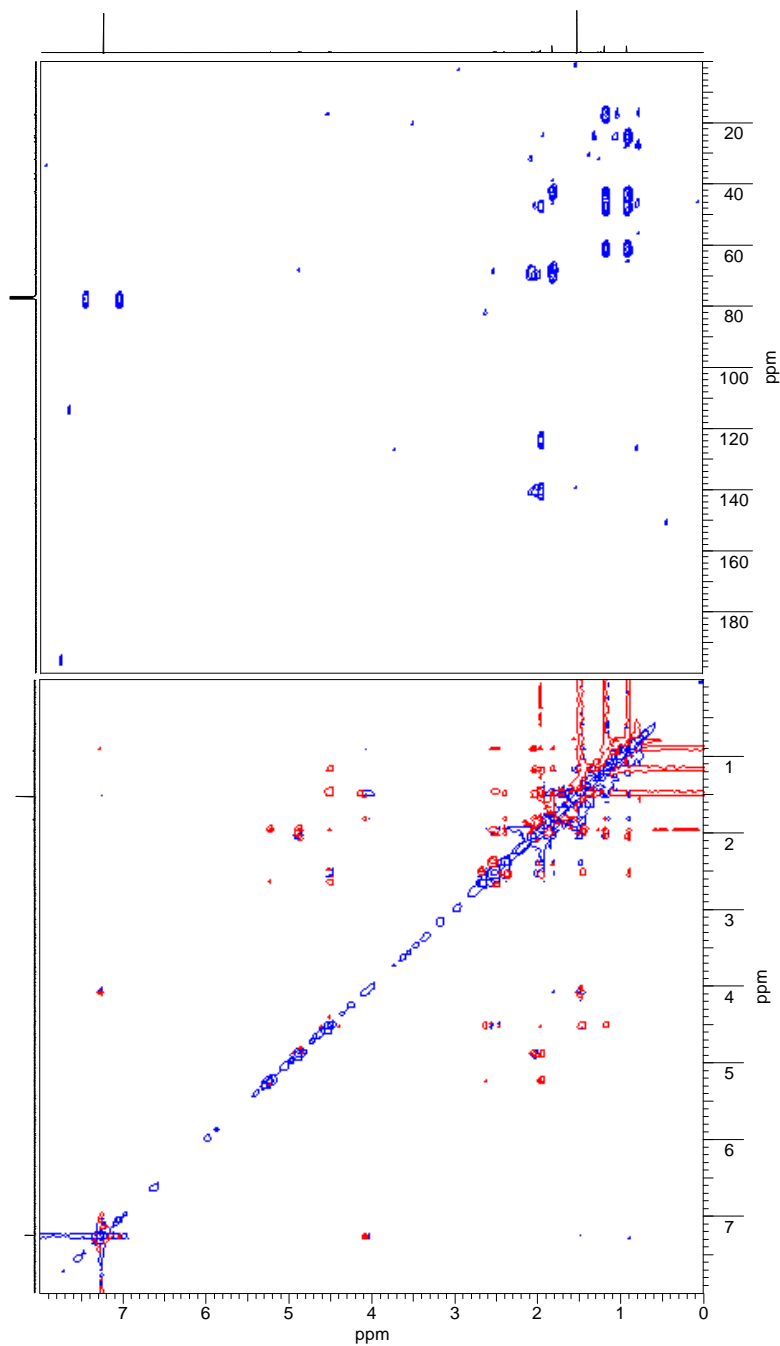


Figura 5.2.3. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Acetildesclorelato, **A1** (500 MHz, CDCl_3).

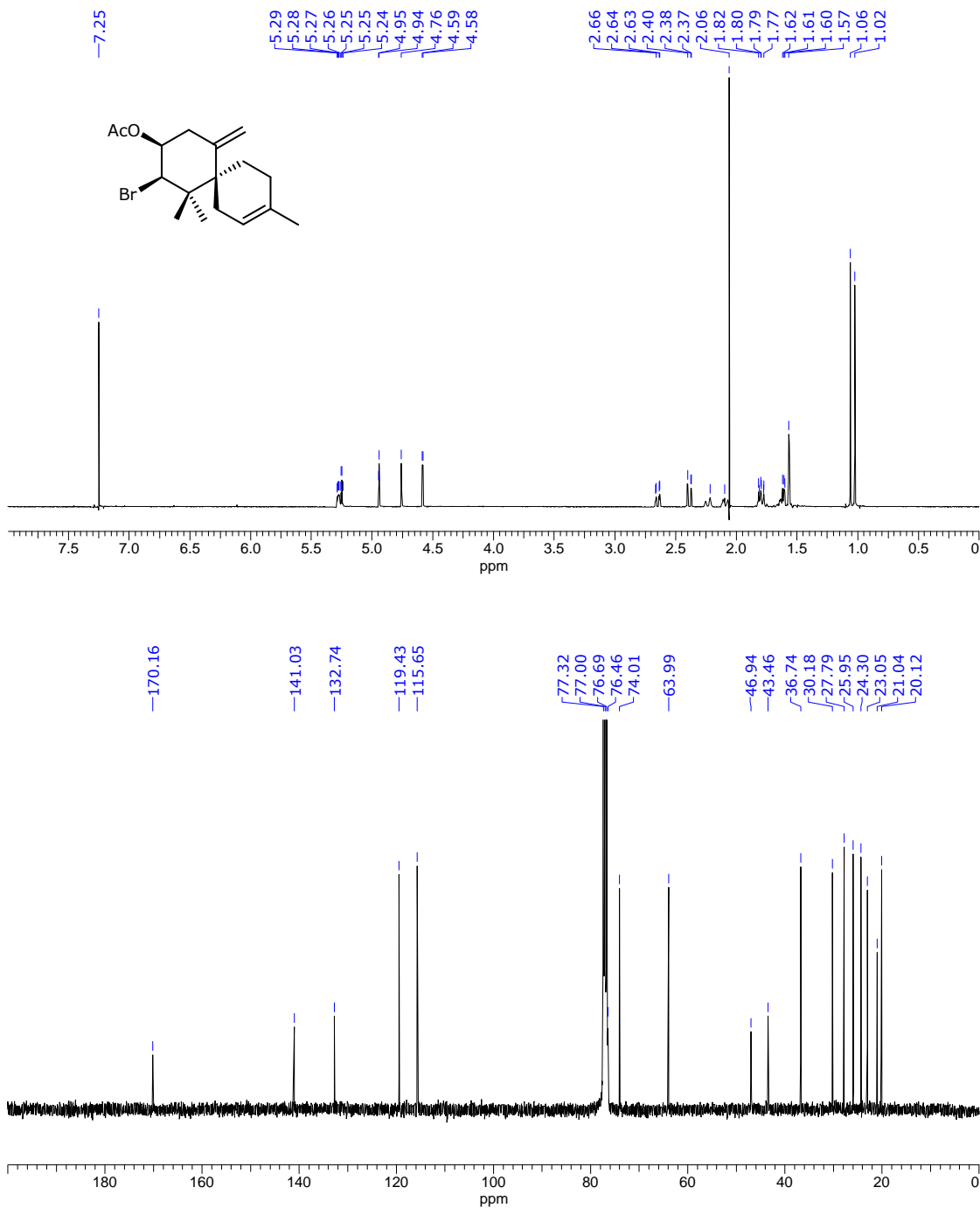


Figura 5.2.4. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Acetildesclororelatol, **A1** (500 MHz, CDCl₃).

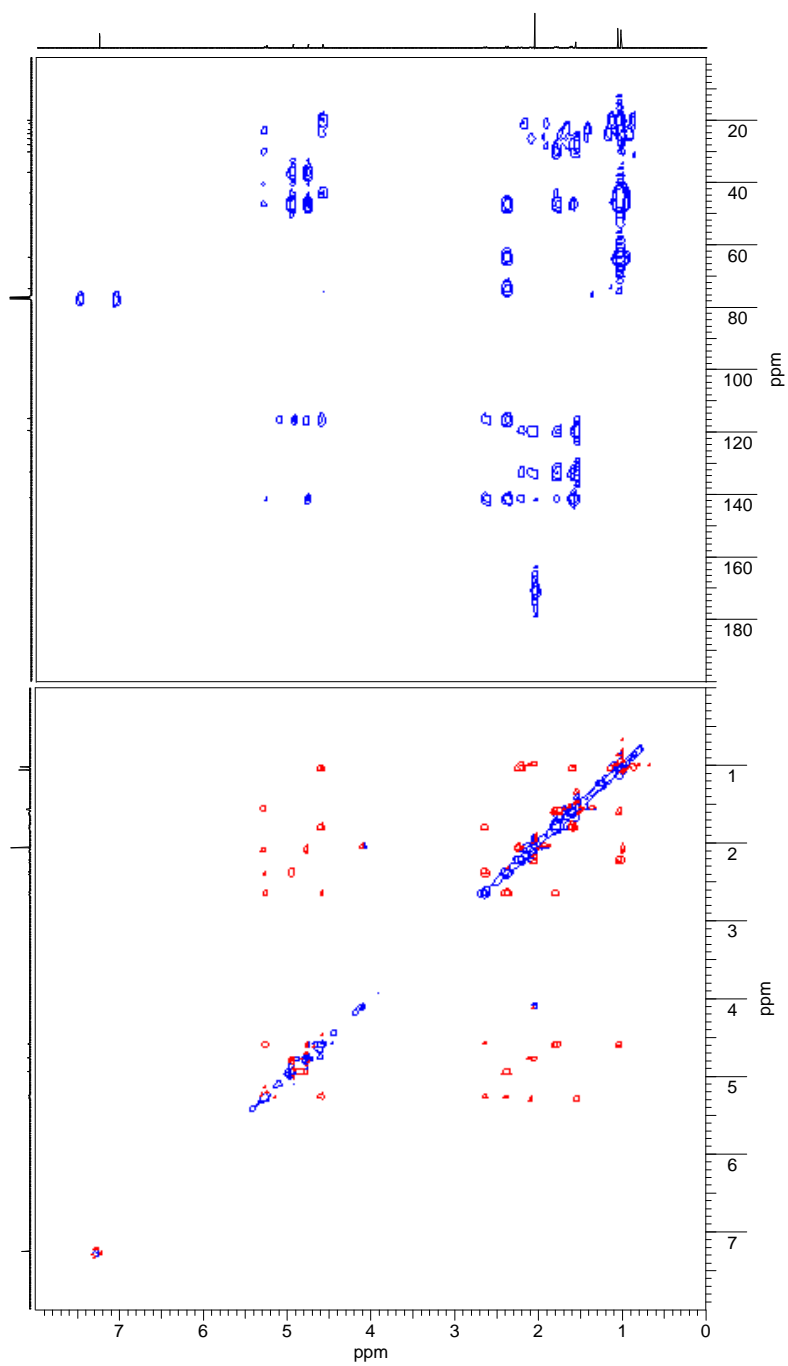


Figura 5.2.5. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Acetilelatol, **A2** (500 MHz, CDCl_3).

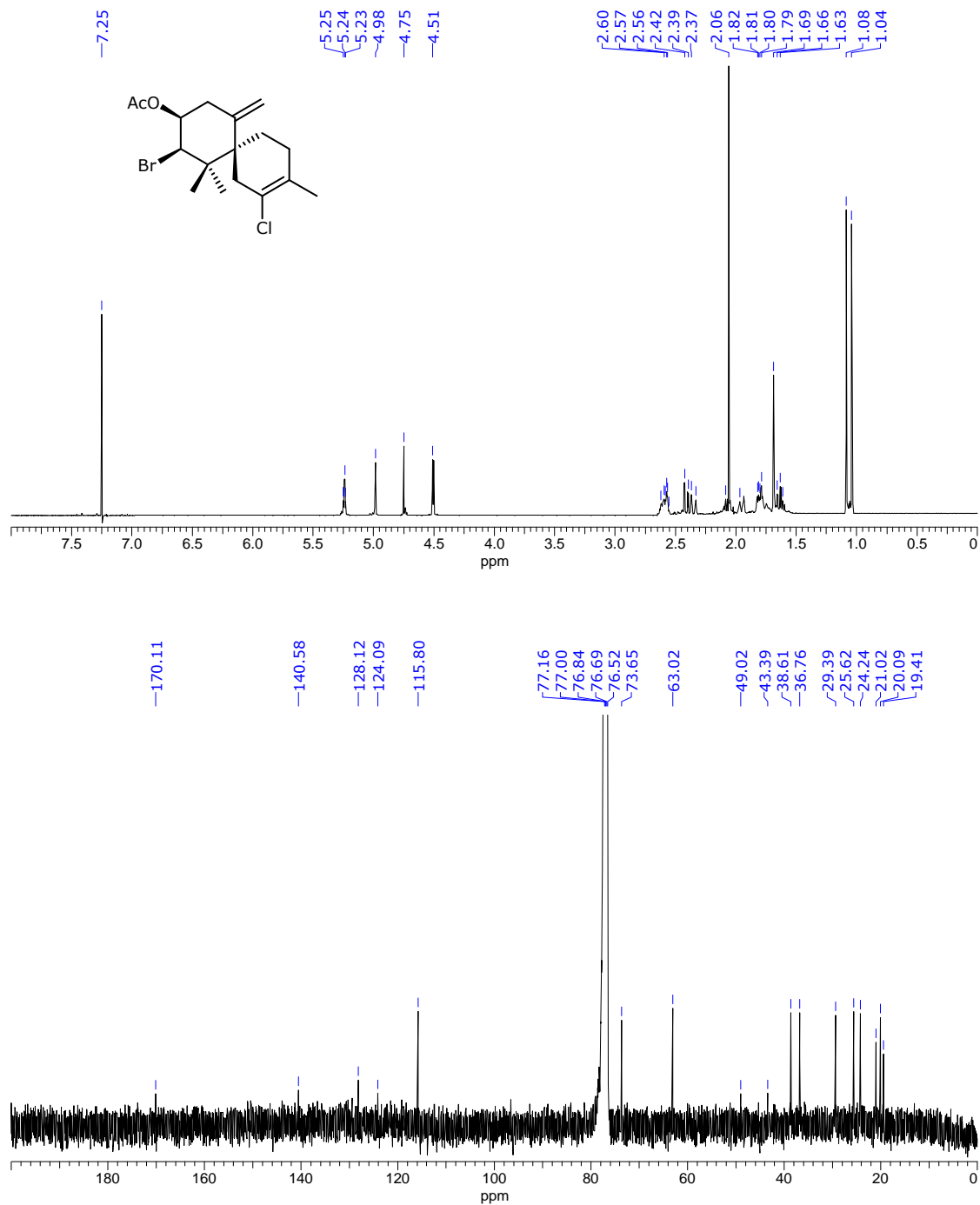


Figura 5.2.6. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Desclorobromocaespitol, **A3** (500 MHz, CDCl_3).

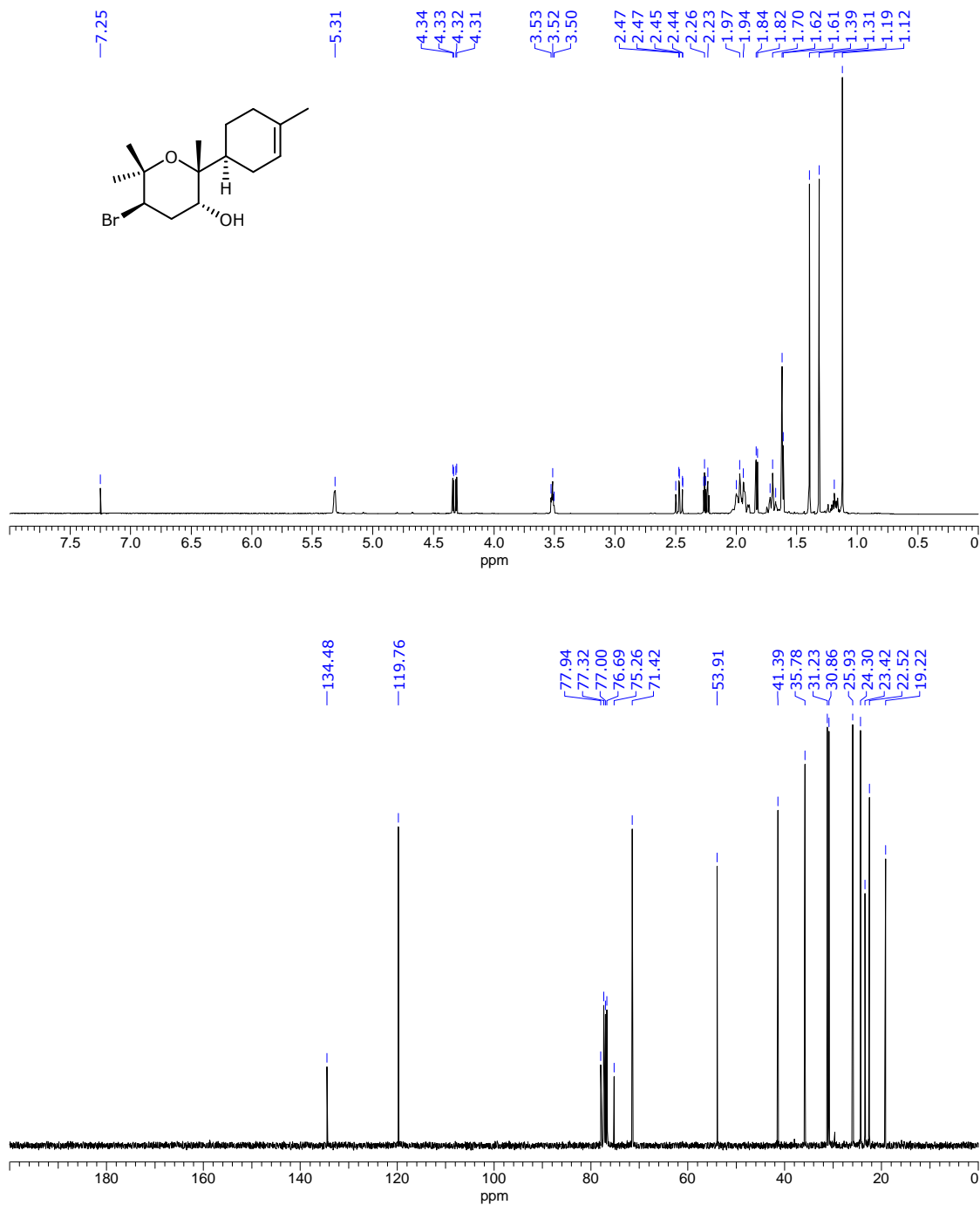


Figura 5.2.7. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Desclorobromocaespitol, **A3** (500 MHz, CDCl_3).

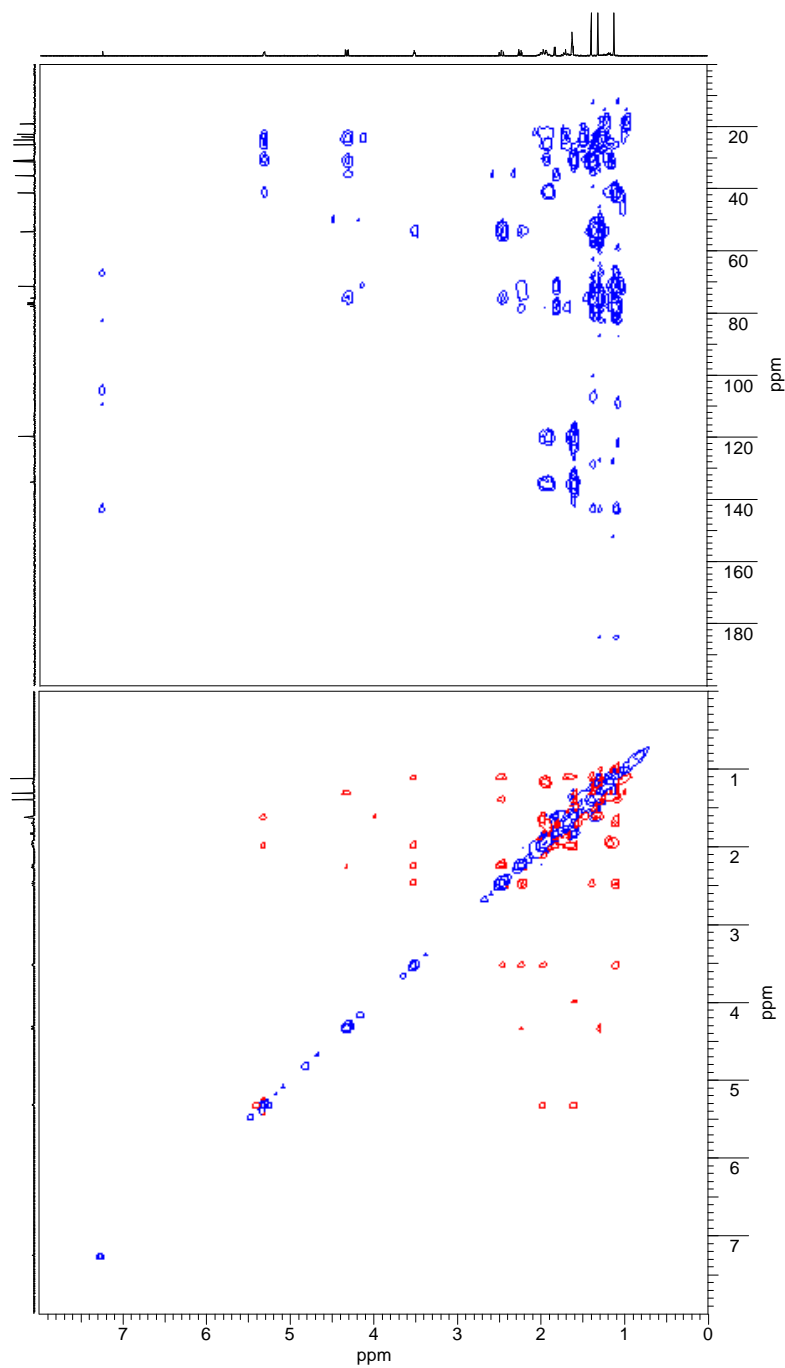


Figura 5.2.8. Espectros de RMN de ¹H y ¹³C de Desclorobromocaespitenona, **A4** (500 MHz, CDCl₃).

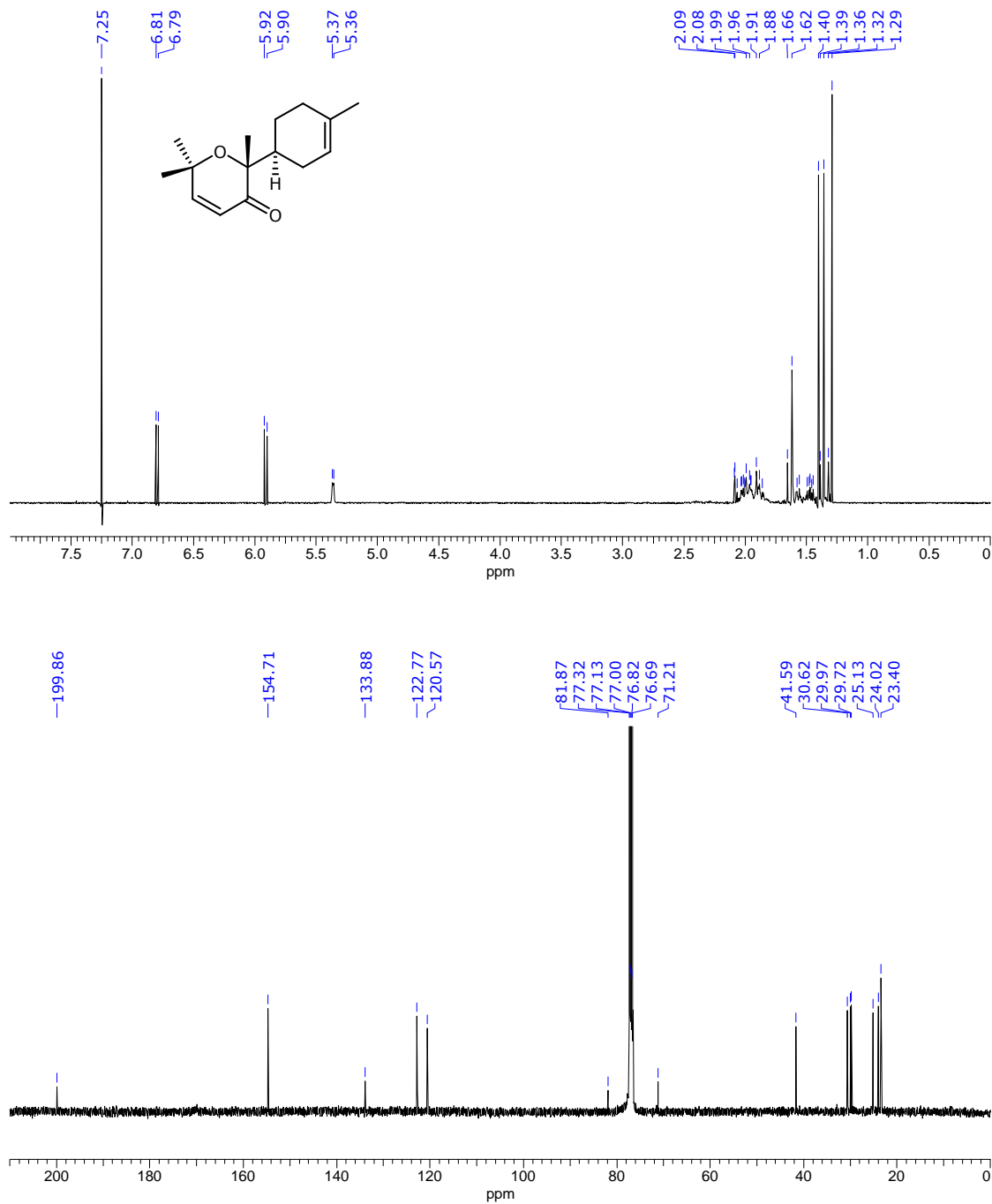


Figura 5.2.9. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Aplysiadactydiol, **A5** (500 MHz, CDCl_3)

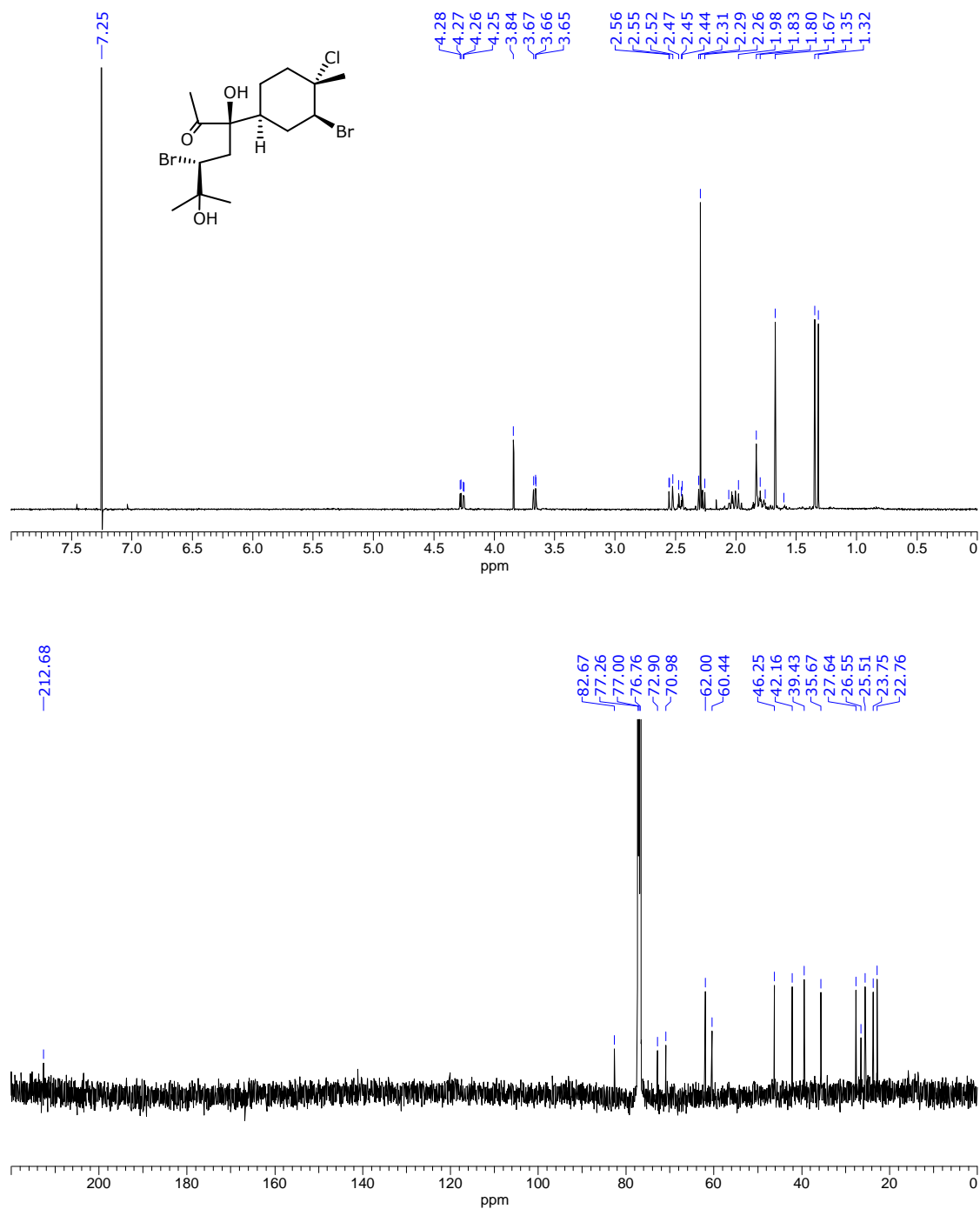


Figura 5.2.10. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Aplysiadactydiol, **A5** (500 MHz, CDCl₃).

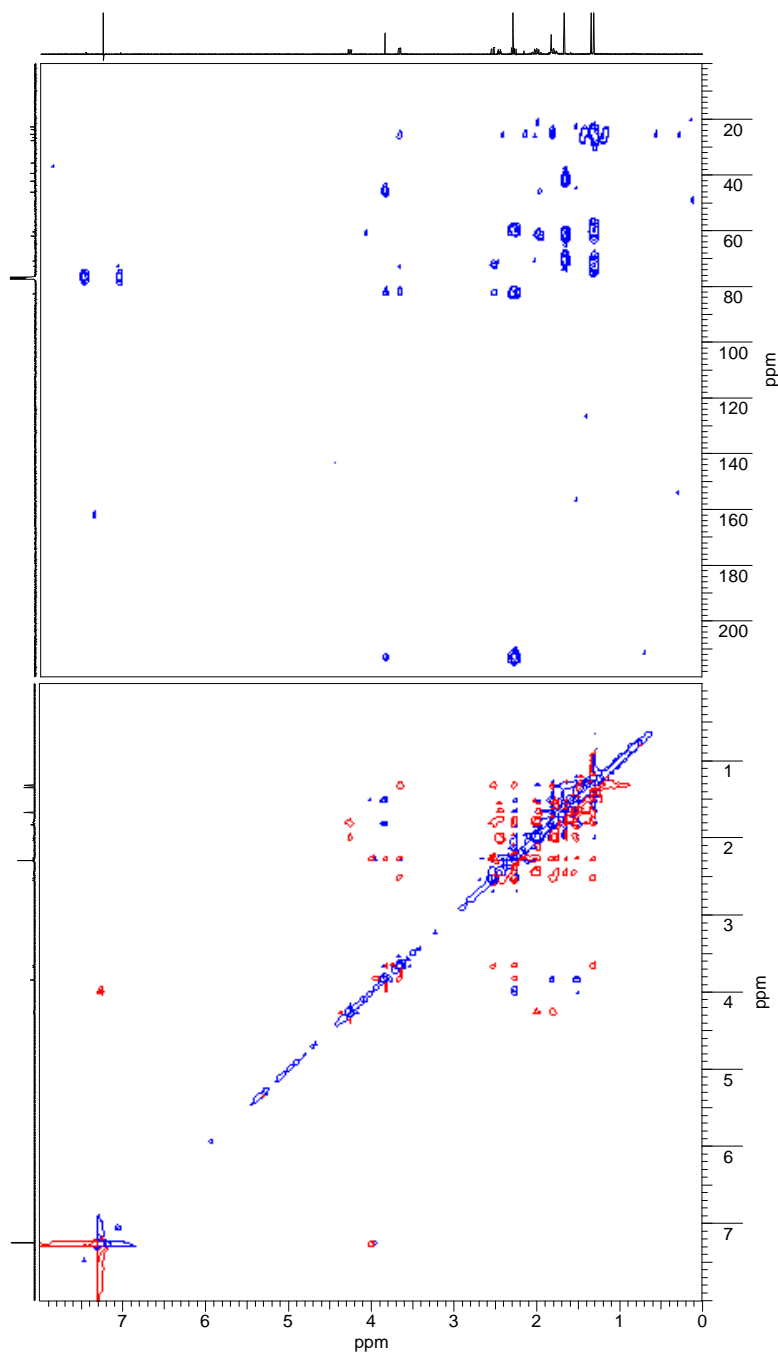


Figura 5.2.11. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Furocaespitanolactol, **A6** (500 MHz, CDCl_3).

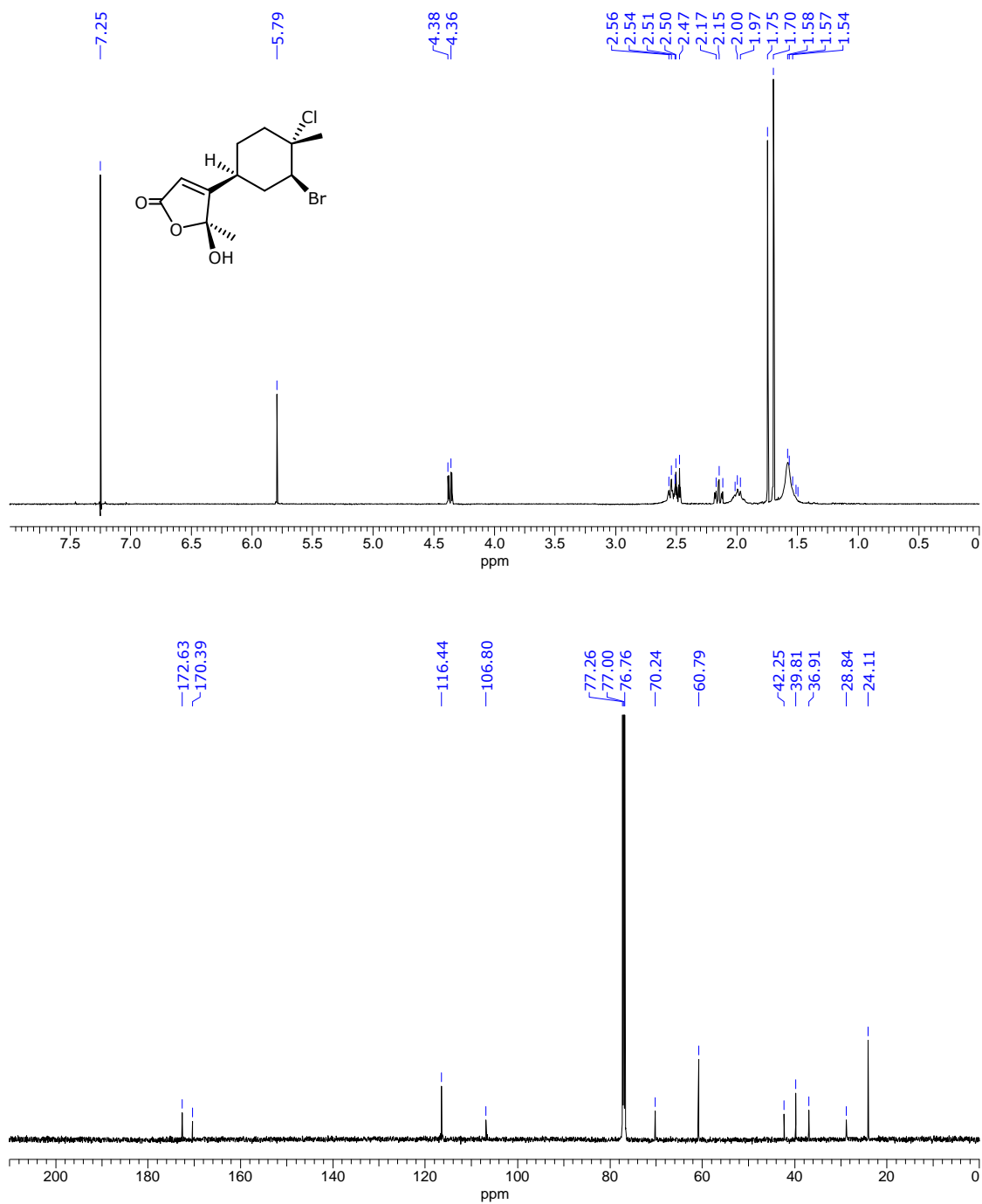


Figura 5.2.12. Espectros de RMN de HMBC de Furocaespitanolactol, **A6** (500 MHz, CDCl₃).

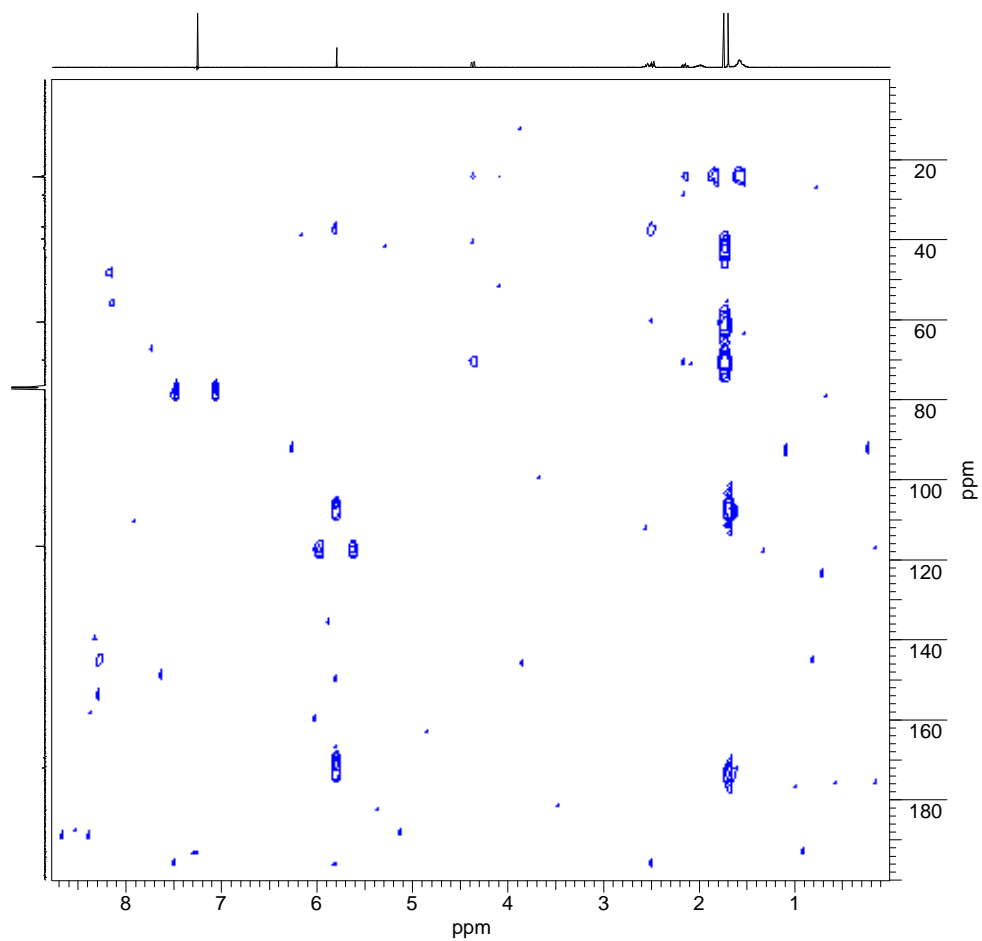


Figura 5.2.13. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **A7** (500 MHz, CDCl_3).

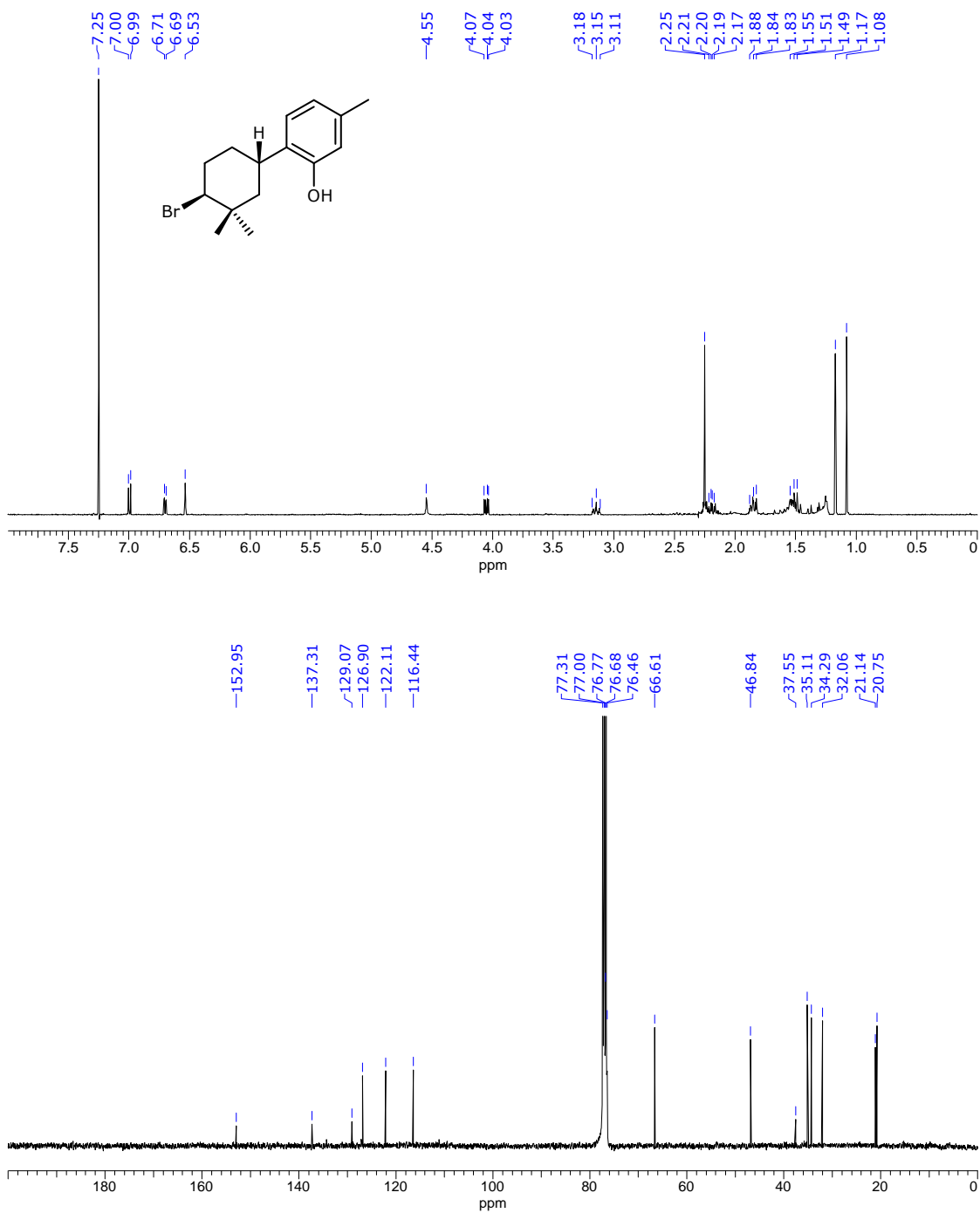
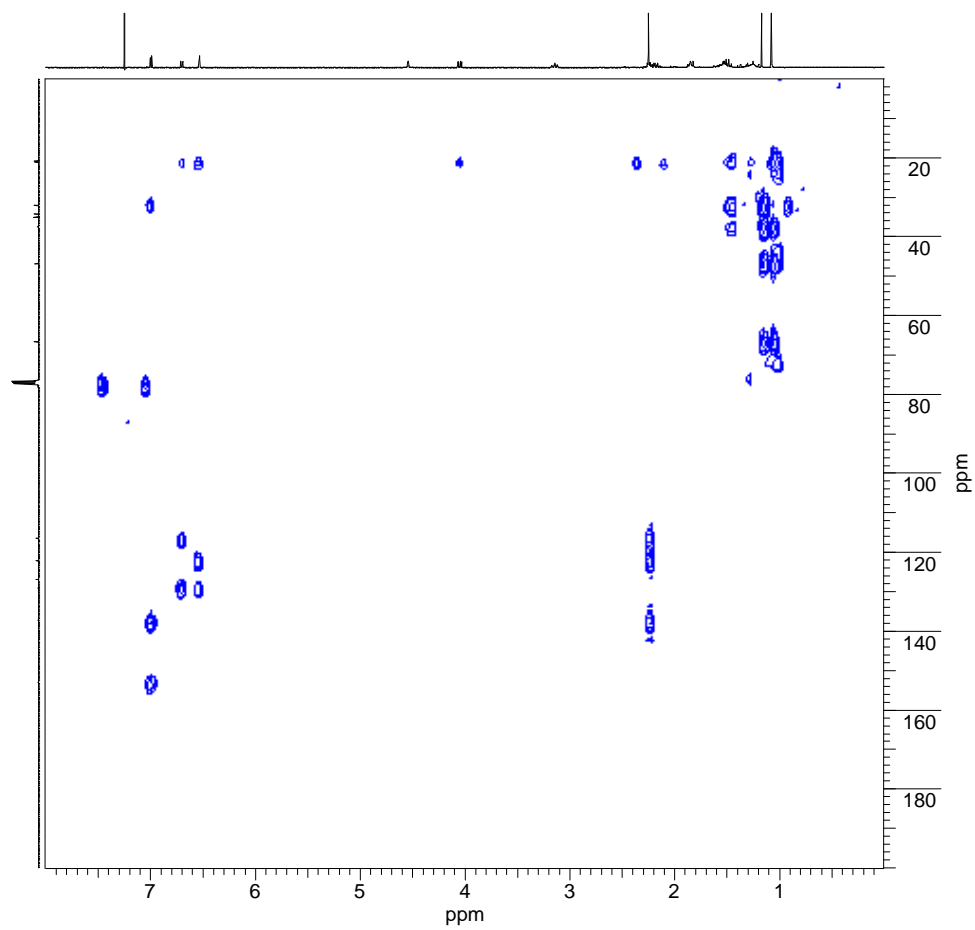


Figura 5.2.14. Espectros de RMN de HMBC de **A7** (500 MHz, CDCl₃).



**5.3. Espectros de RMN de los metabolitos
aislados de *Aplysia dactylomela*
(La Gomera)**

Figura 5.3.1. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de Aplysianotriol, **A8** (500 MHz, C_6D_6).

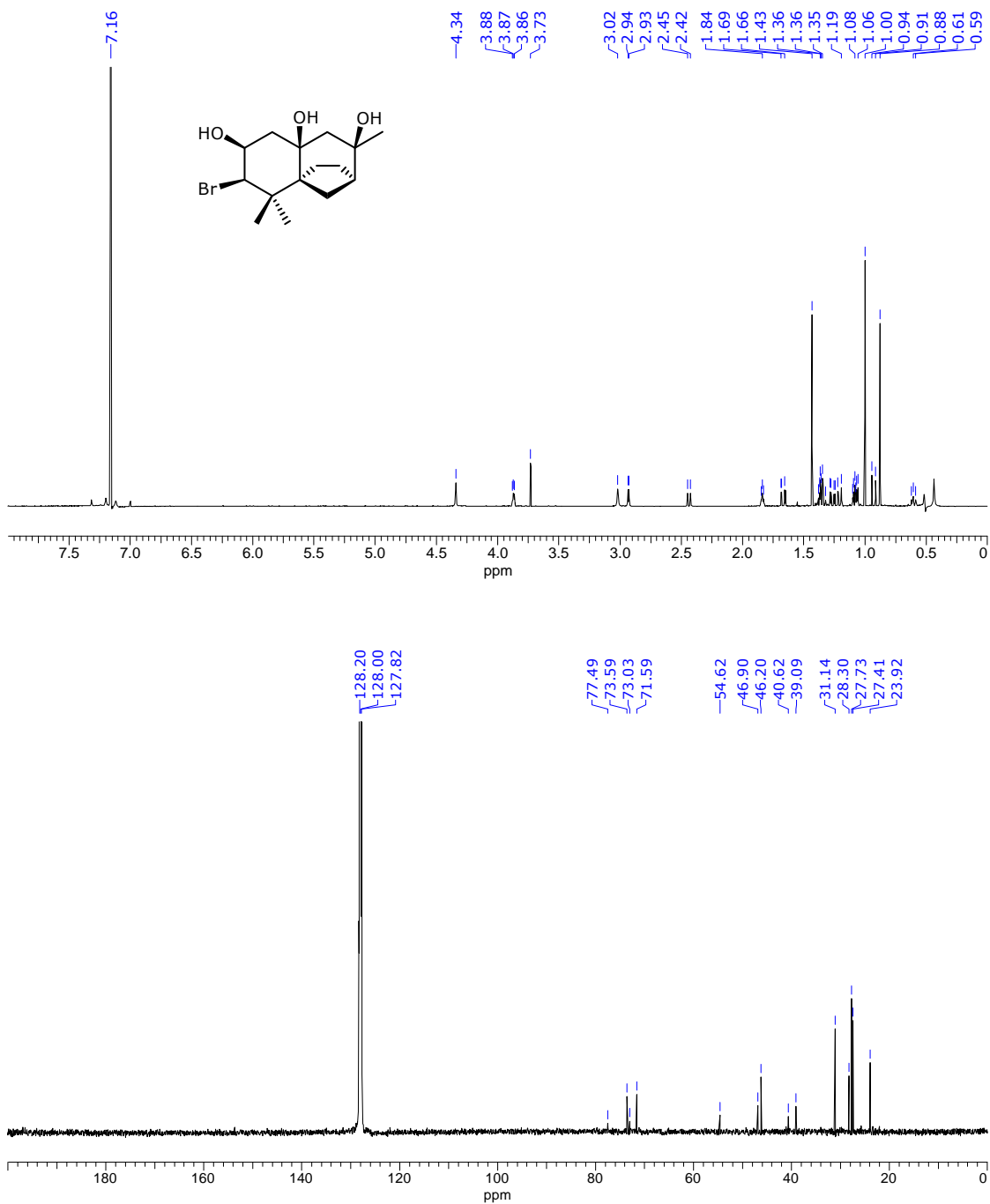


Figura 5.3.2. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de Aplysianotriol, **A8** (500 MHz, C₆D₆).

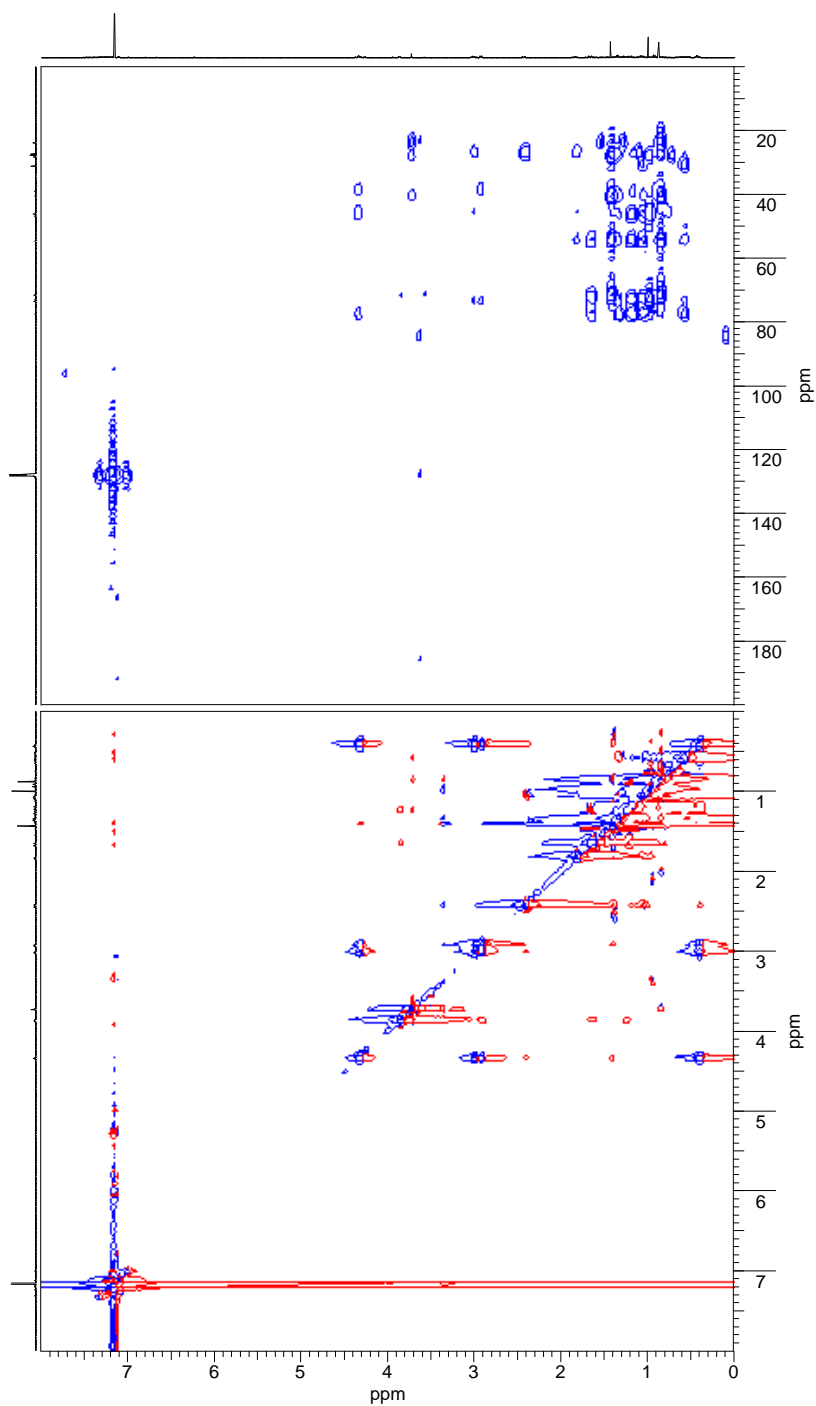


Figura 5.3.3. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **A9** (500 MHz, CDCl_3).

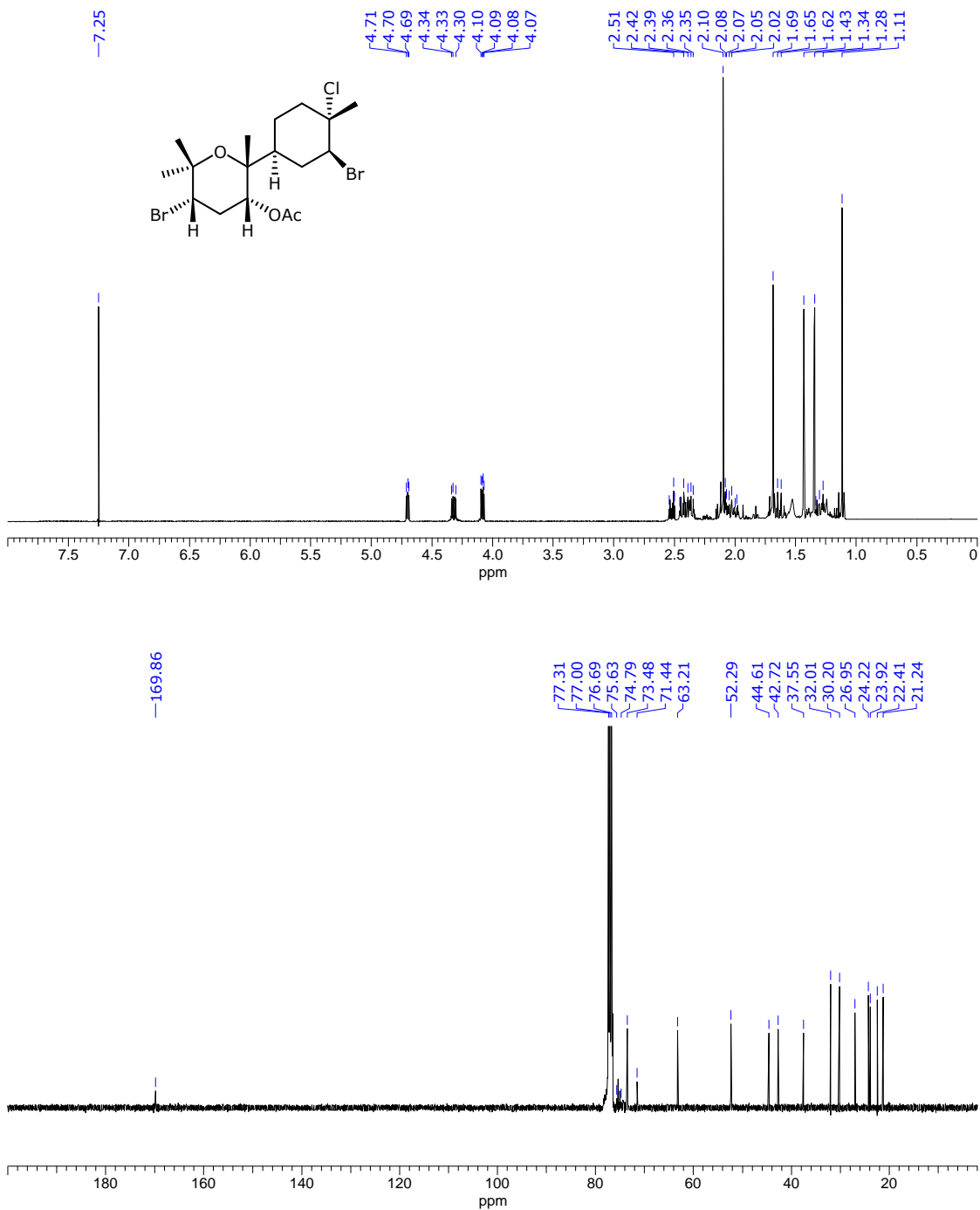


Figura 5.3.4. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de **A9** (500 MHz, CDCl₃).

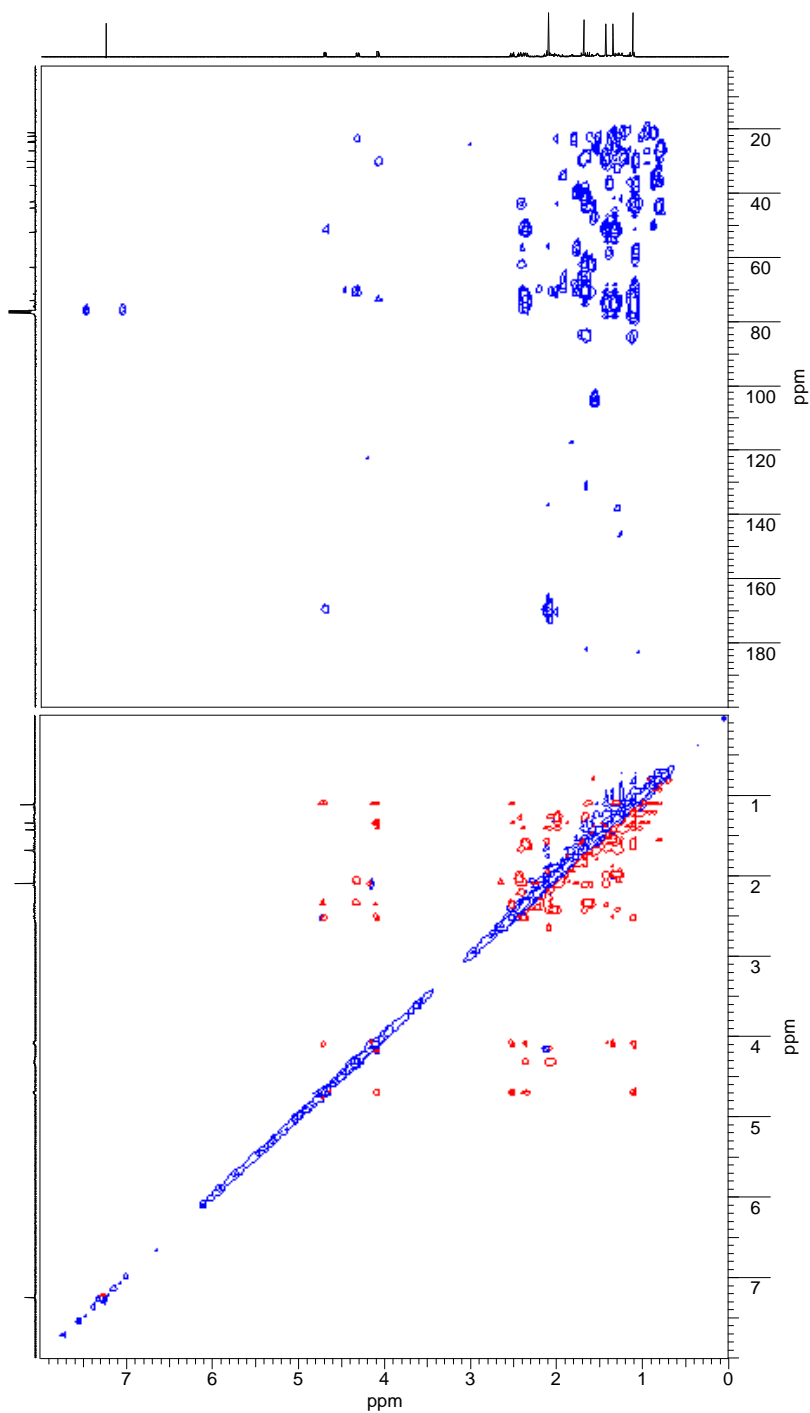


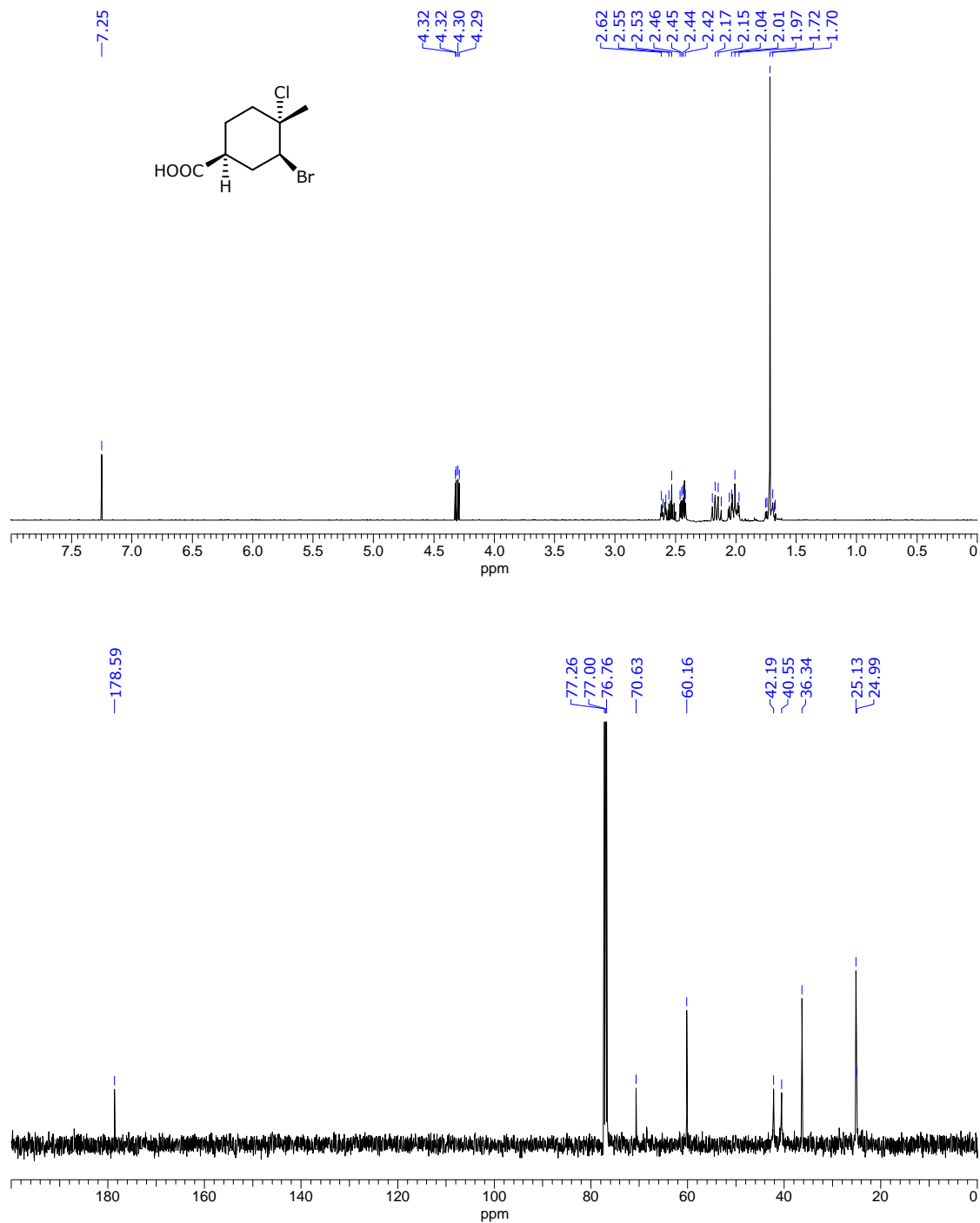
Figura 5.3.5. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **A10** (500 MHz, CDCl_3).

Figura 5.3.6. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de **A10** (500 MHz, CDCl₃).

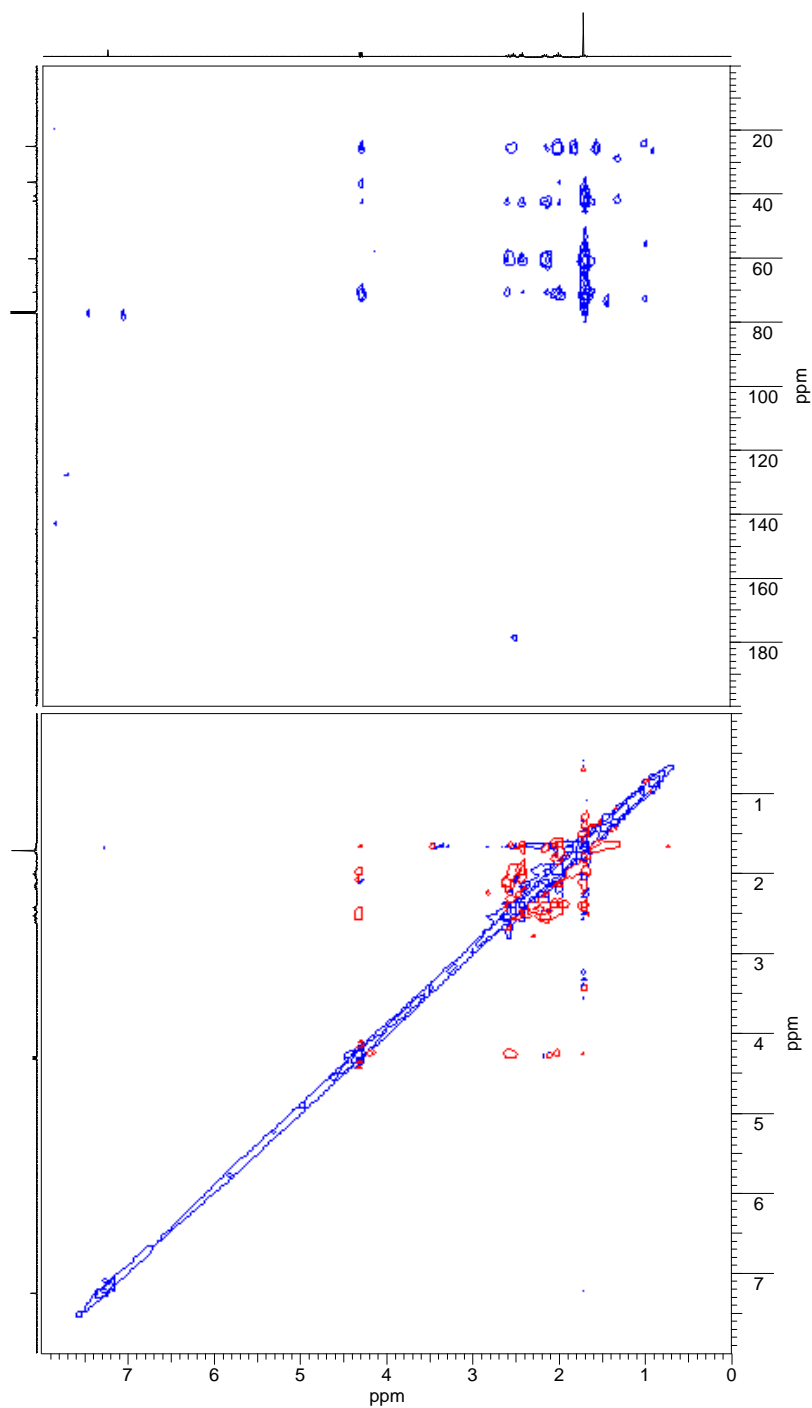


Figura 5.3.7. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **A11** (500 MHz, CDCl_3).

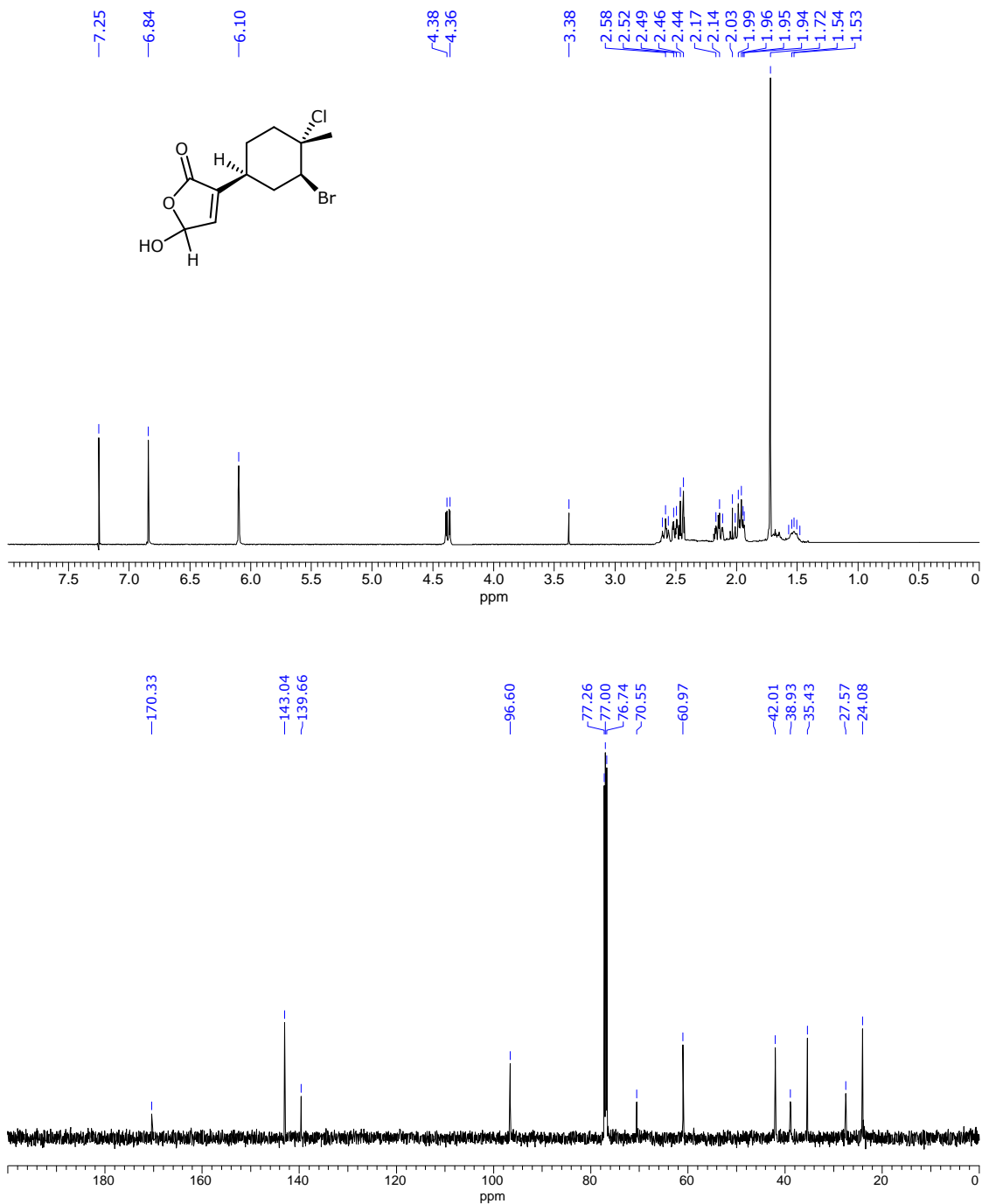


Figura 5.3.8. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de **A11** (500 MHz, CDCl₃).

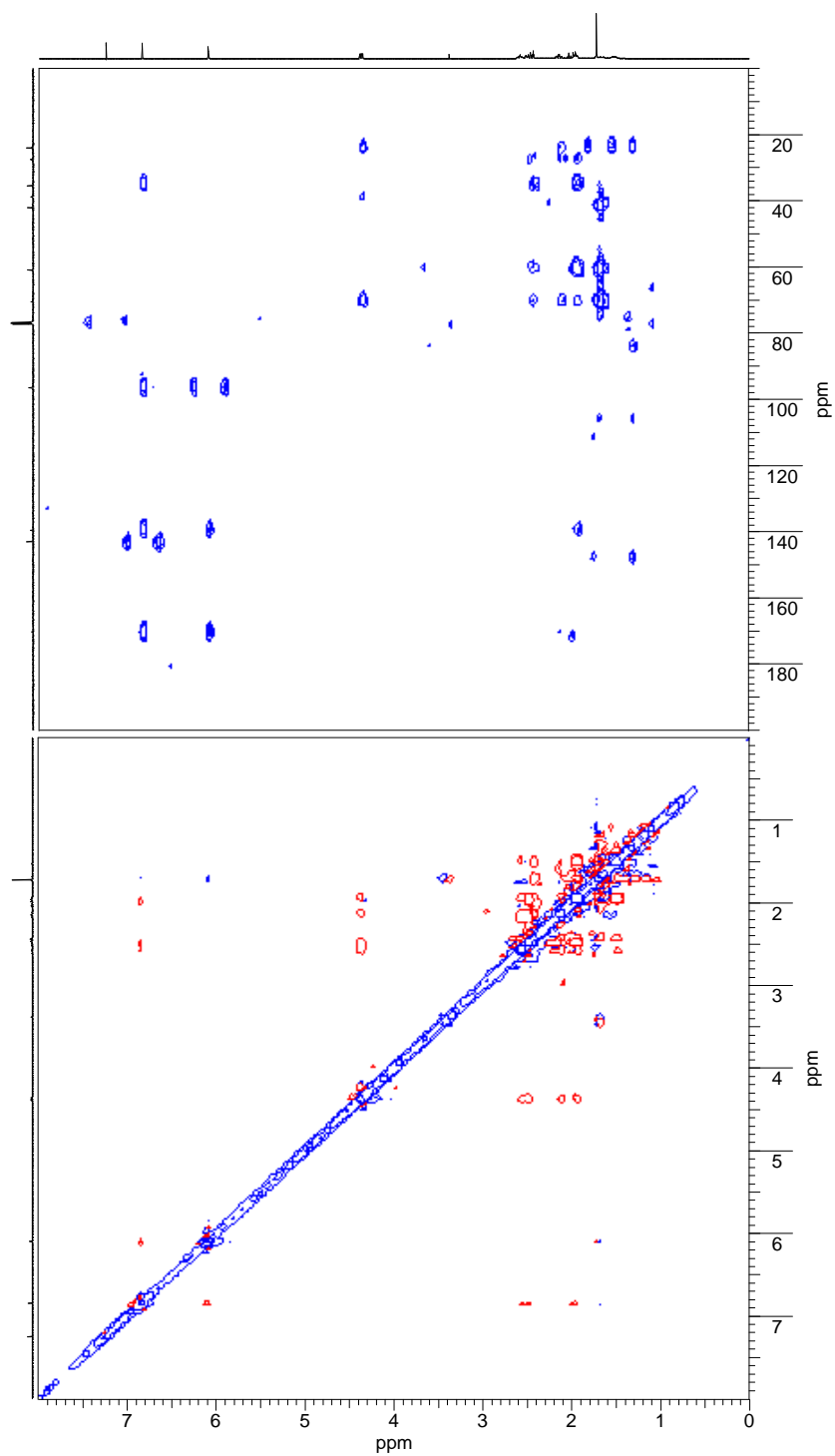


Figura 5.3.9. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **A12** (500 MHz, CDCl_3).

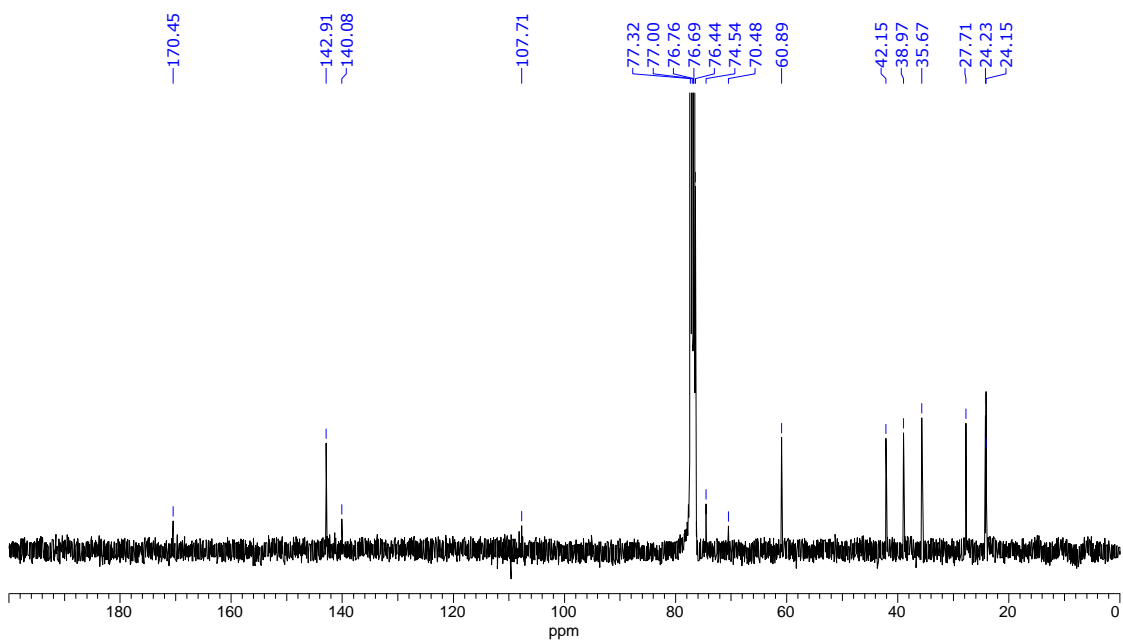
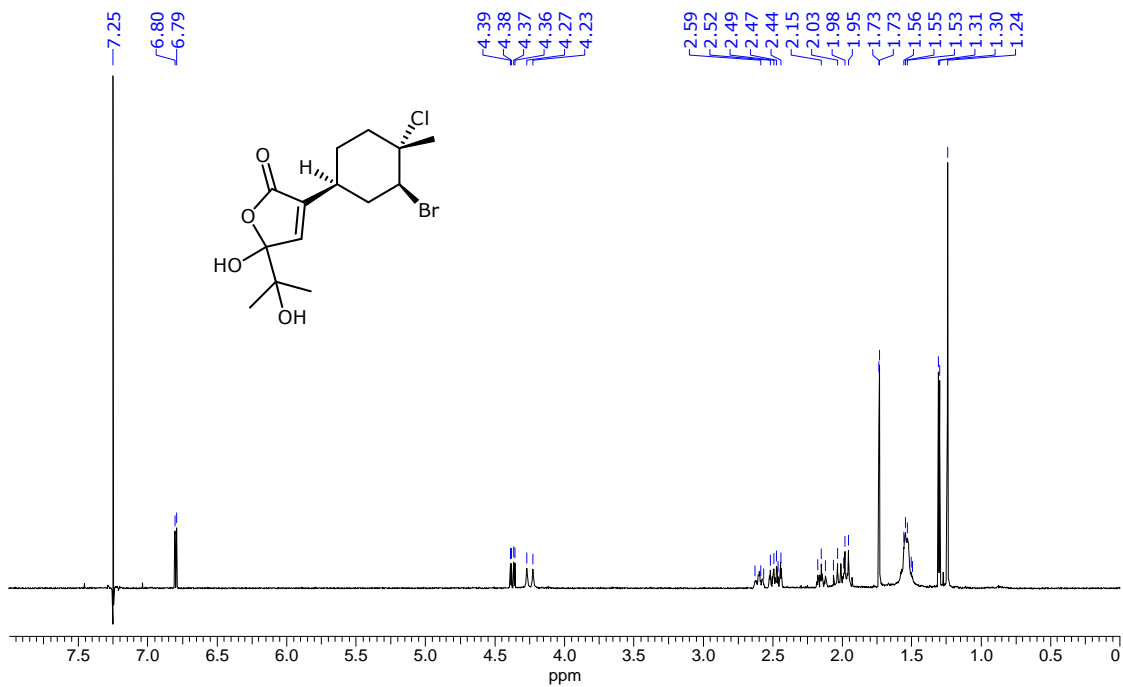
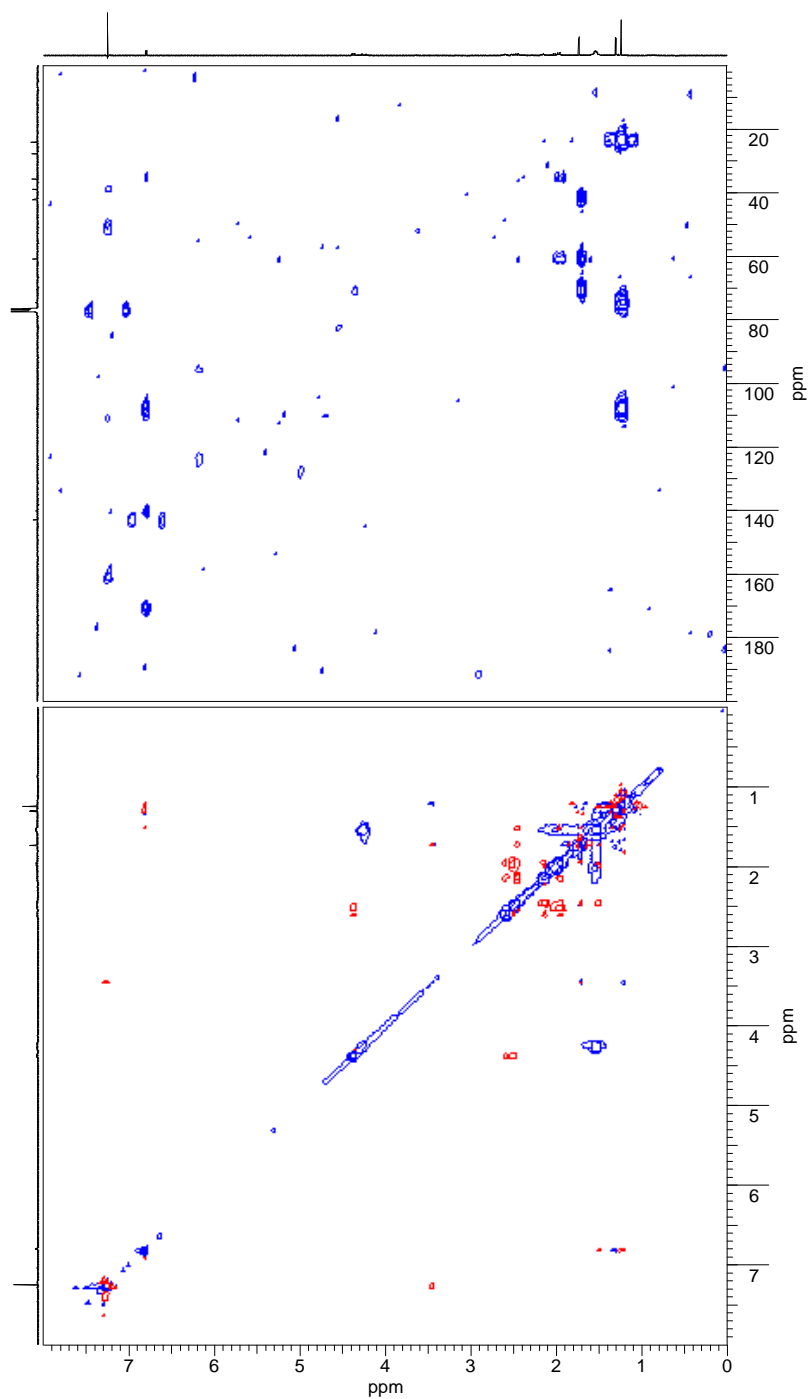


Figura 5.3.10. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de **A12** (500 MHz, CDCl₃).



5.4. Espectros de RMN de los metabolitos aislados de *Pterogorgia* sp.

Figura 5.4.1. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **P1** (500 MHz, CDCl_3).

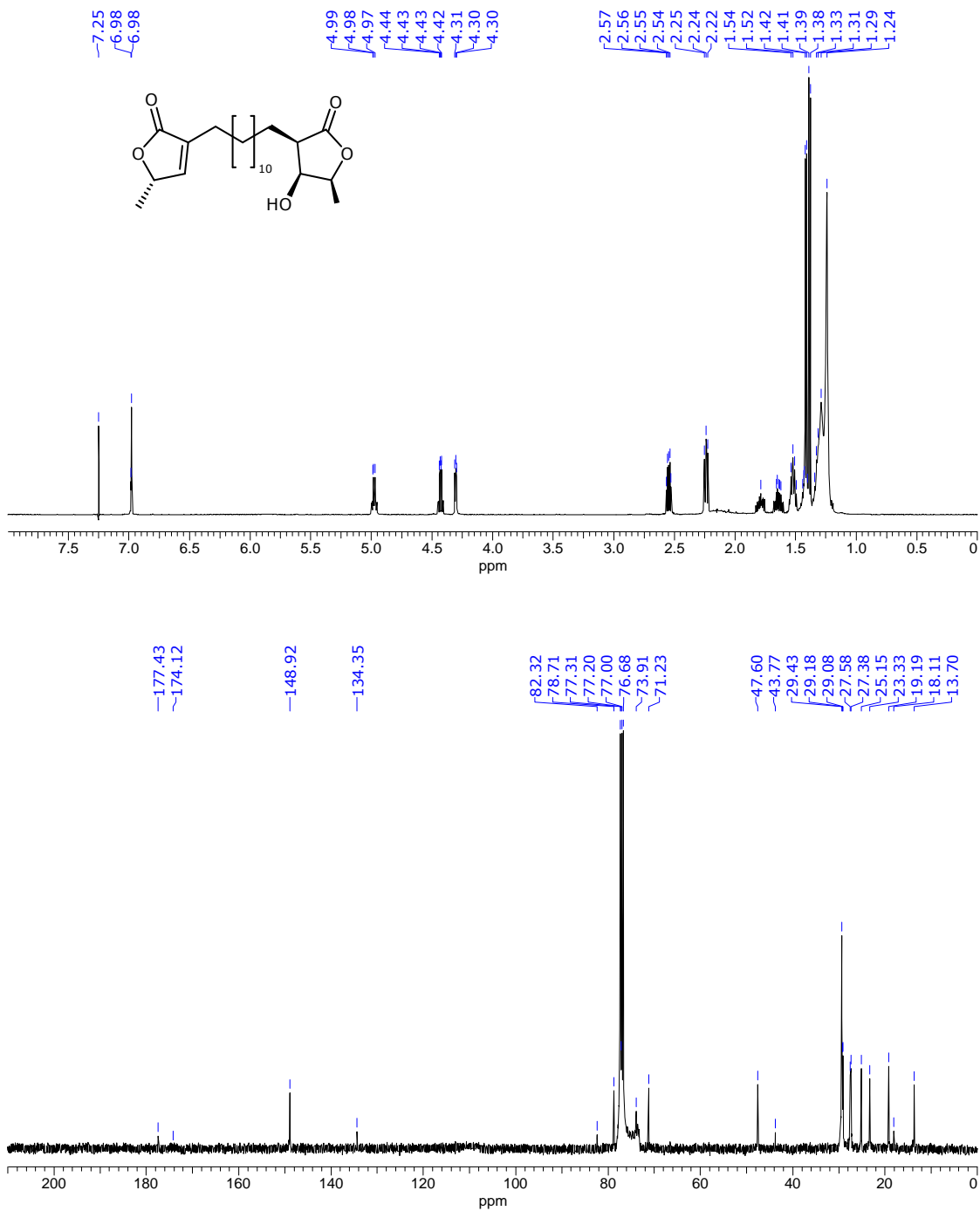


Figura 5.4.2. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de **P1** (500 MHz, CDCl₃).

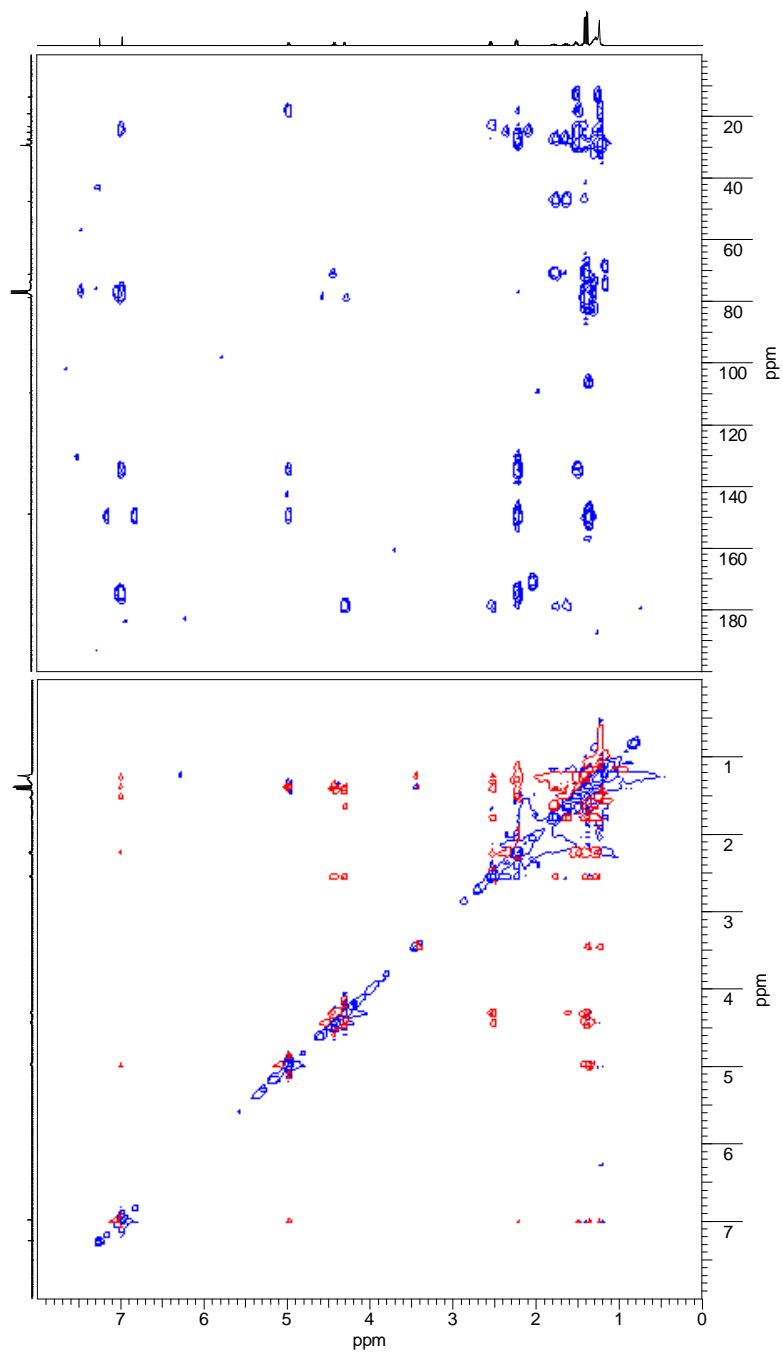


Figura 5.4.3. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **P2** (500 MHz, CDCl_3).

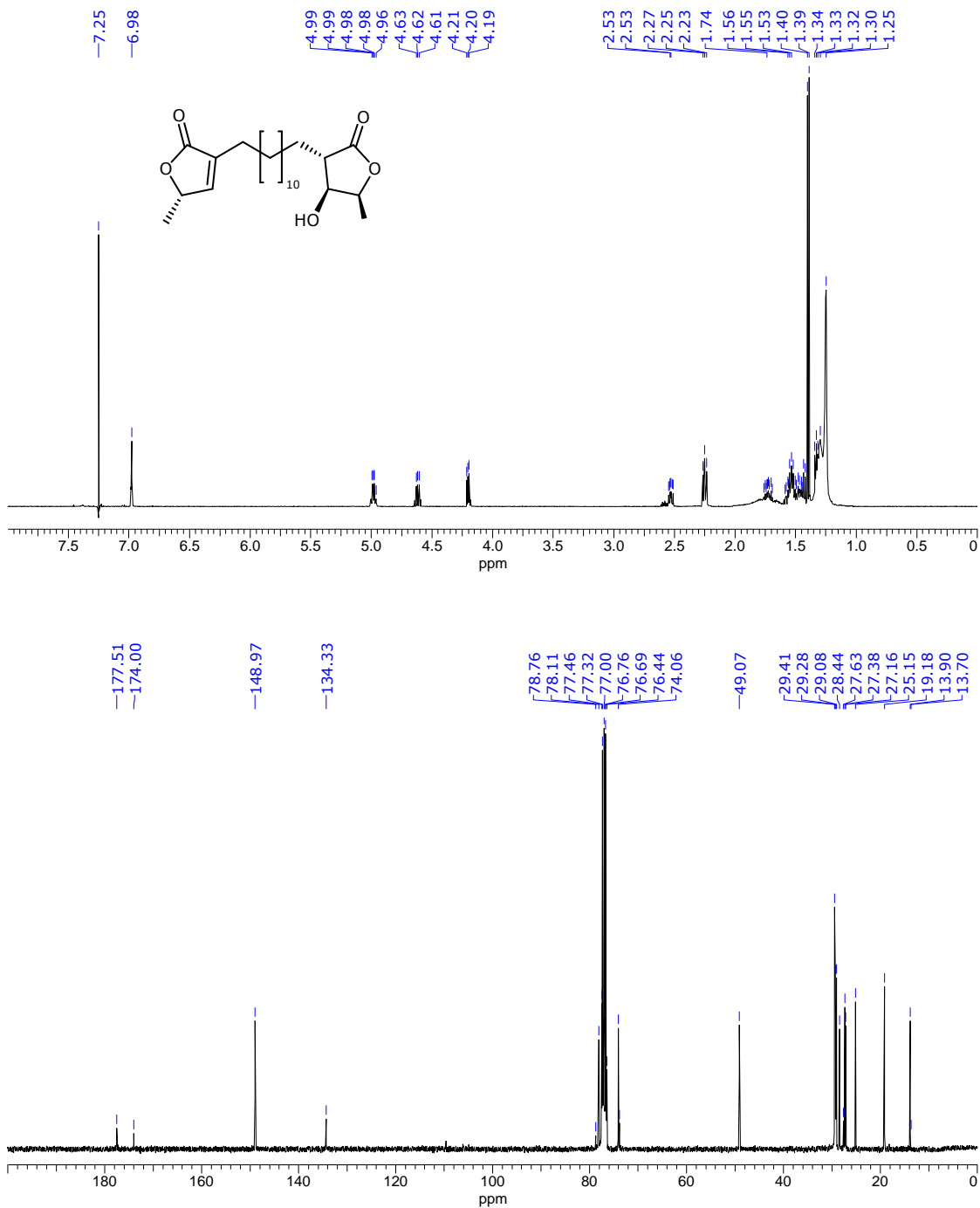


Figura 5.4.4. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de **P2** (500 MHz, CDCl₃).

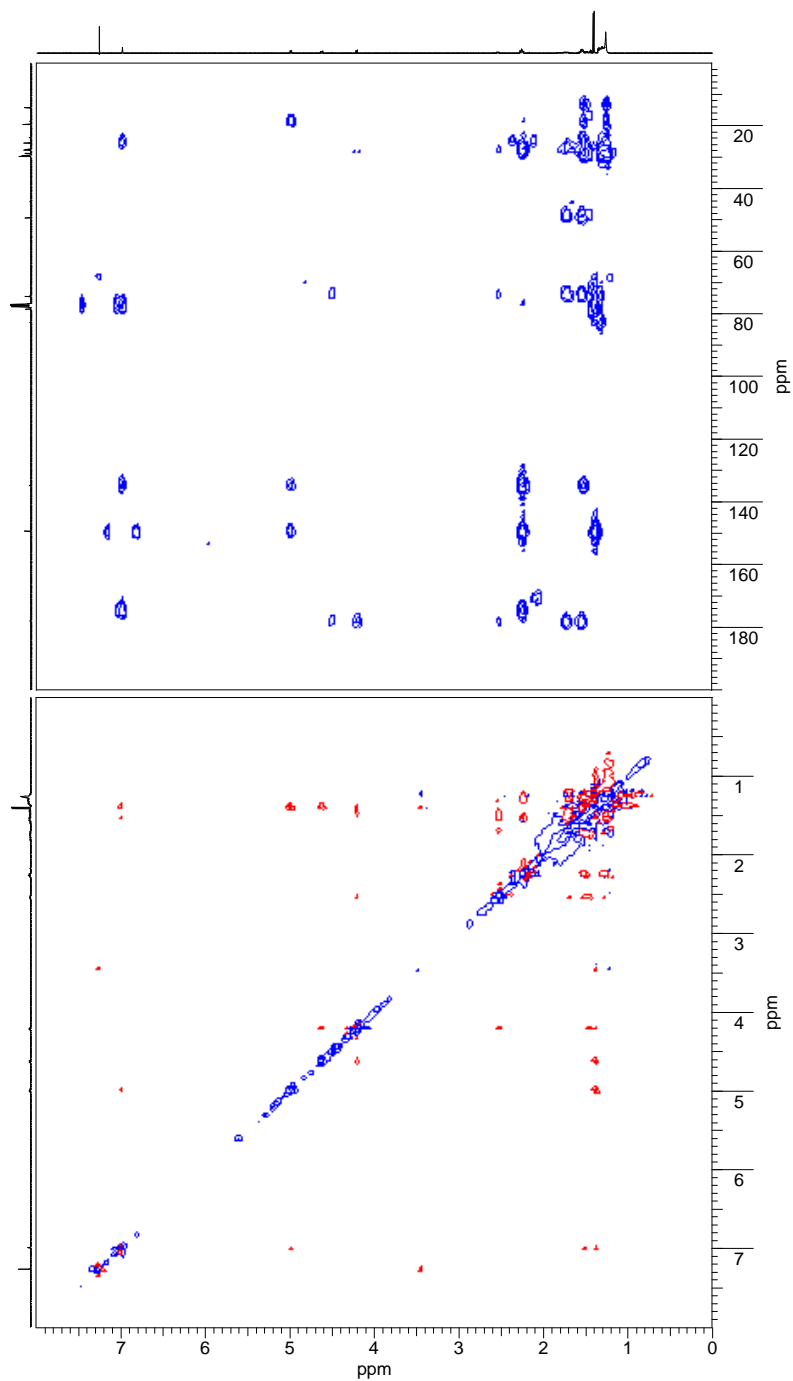


Figura 5.4.5. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **P3** (500 MHz, CDCl_3).

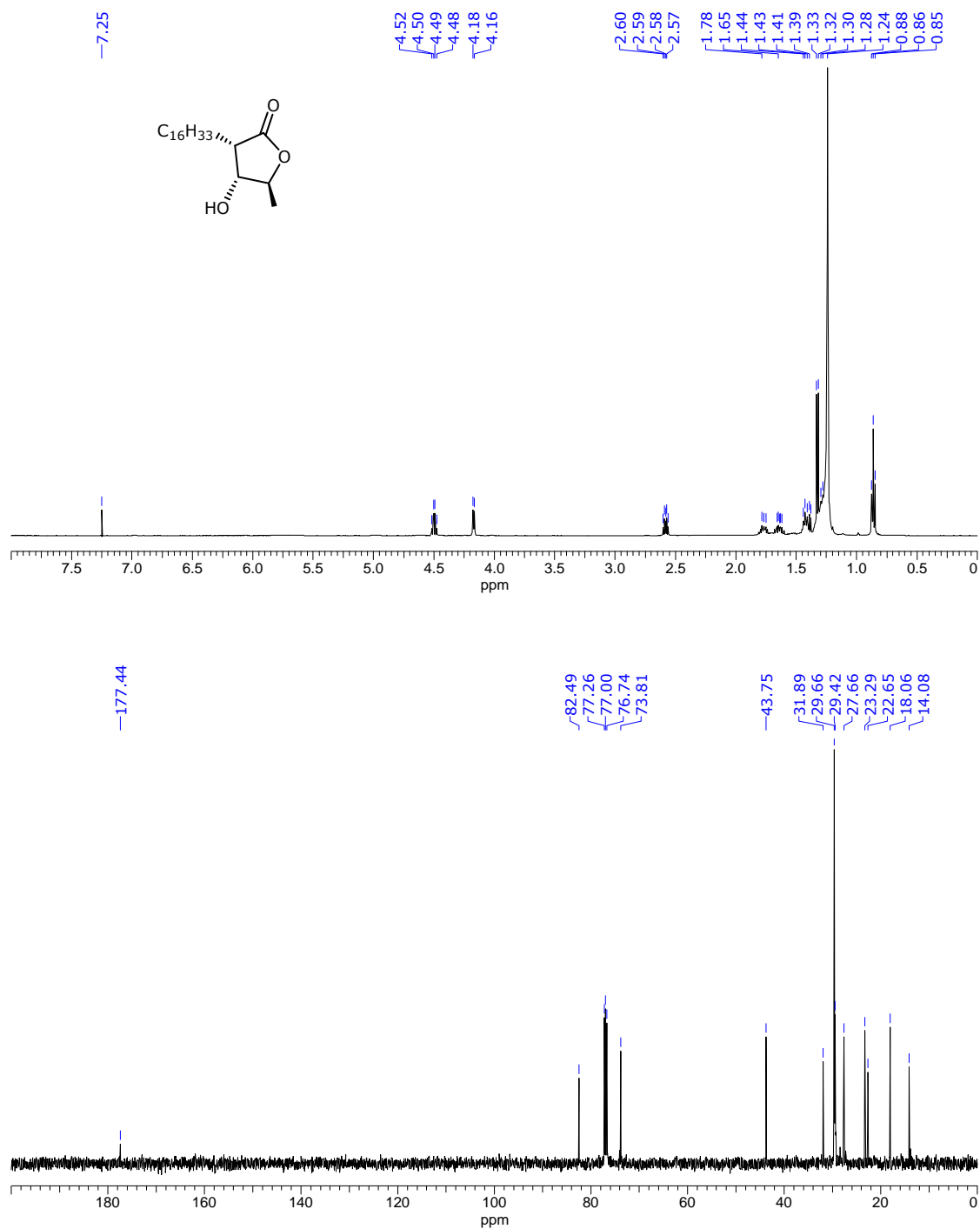


Figura 5.4.6. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de **P3** (500 MHz, CDCl₃).

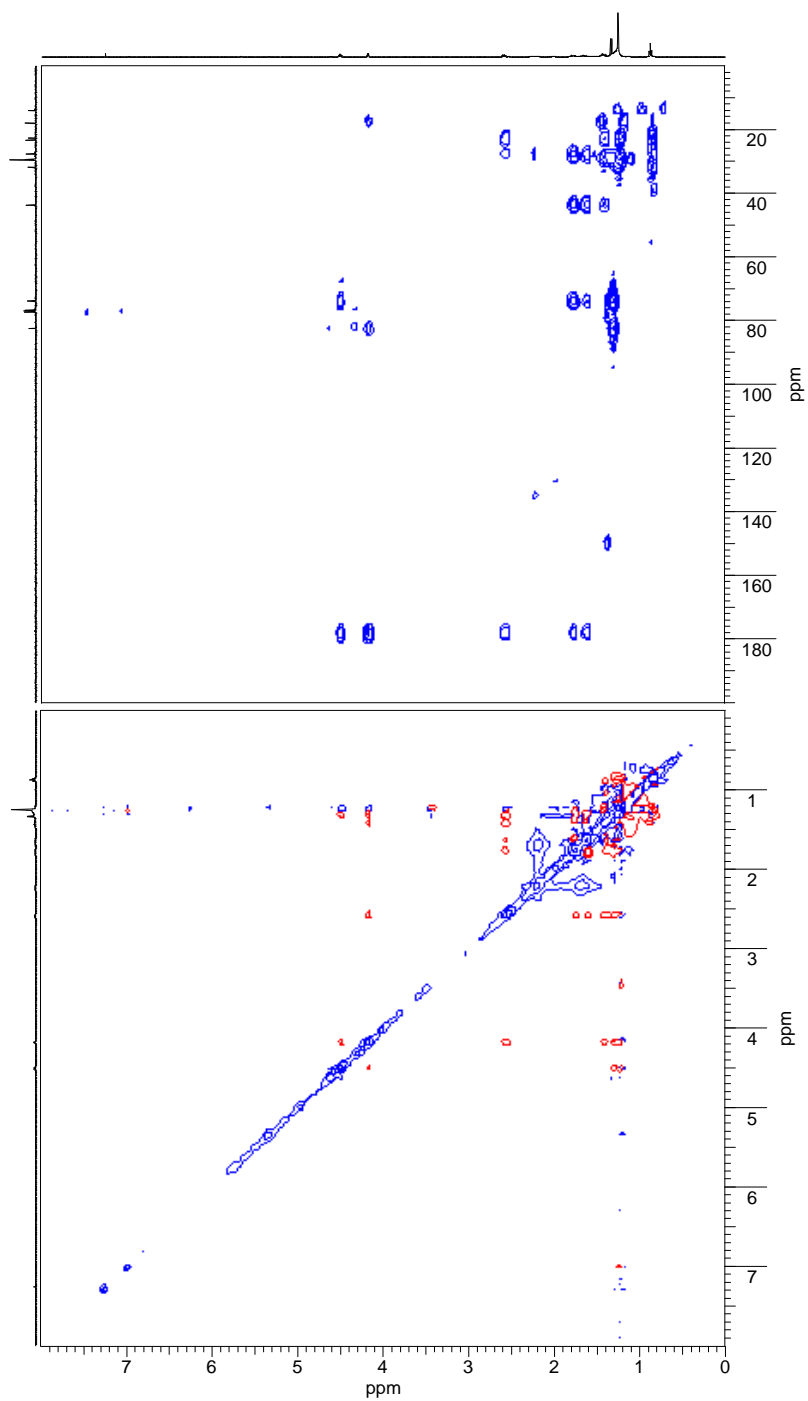


Figura 5.4.7. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **P4** (500 MHz, CDCl_3).

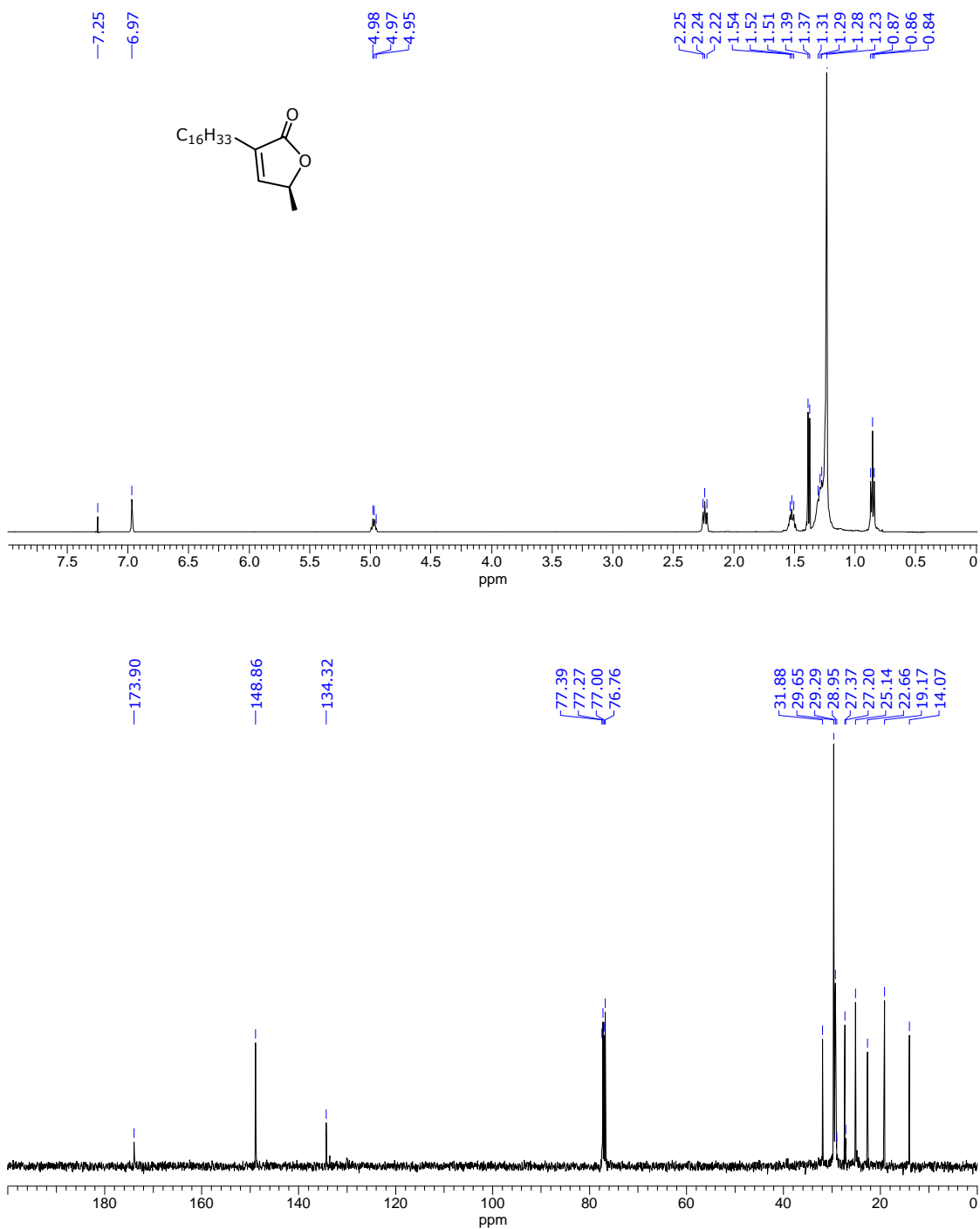


Figura 5.4.8. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de **P4** (500 MHz, CDCl₃).

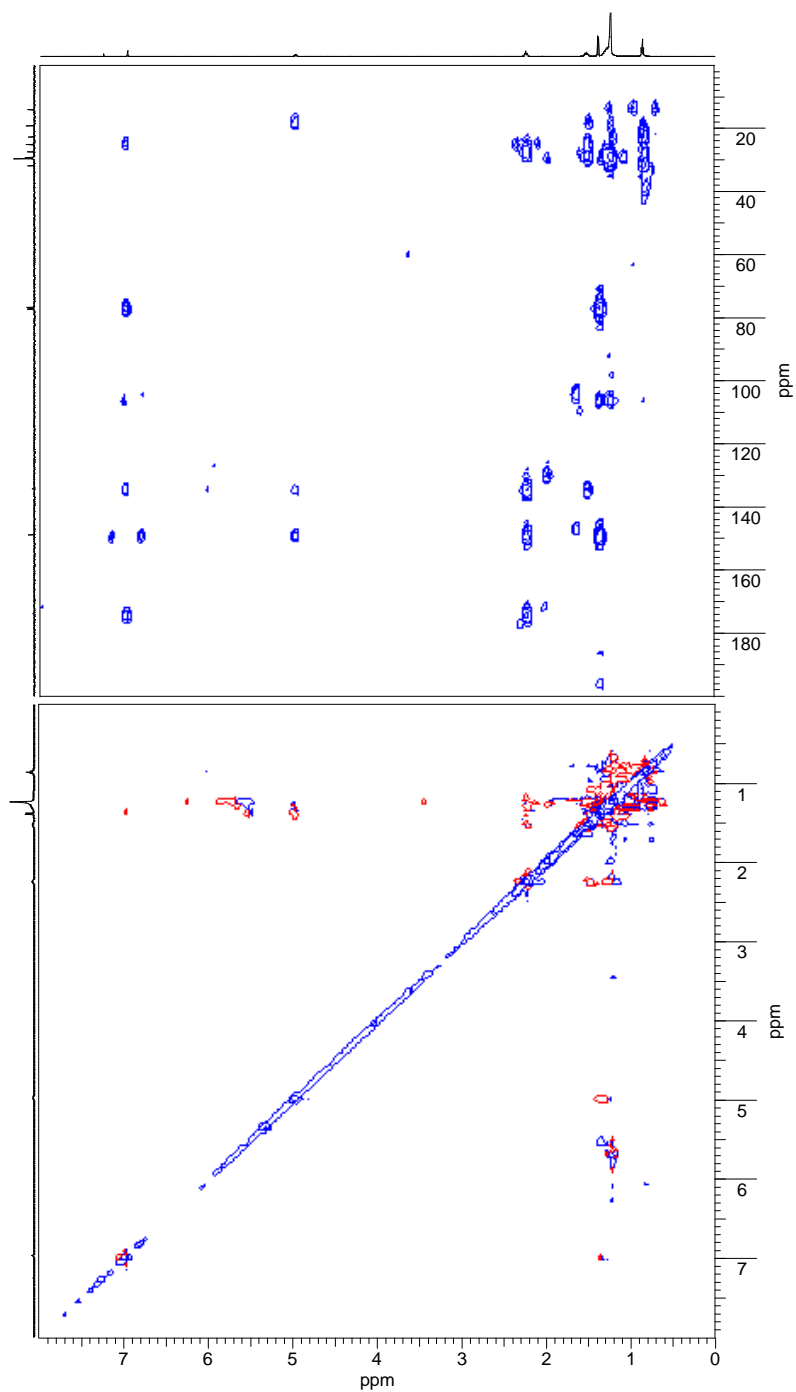


Figura 5.4.9. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **P5** (500 MHz, CDCl_3).

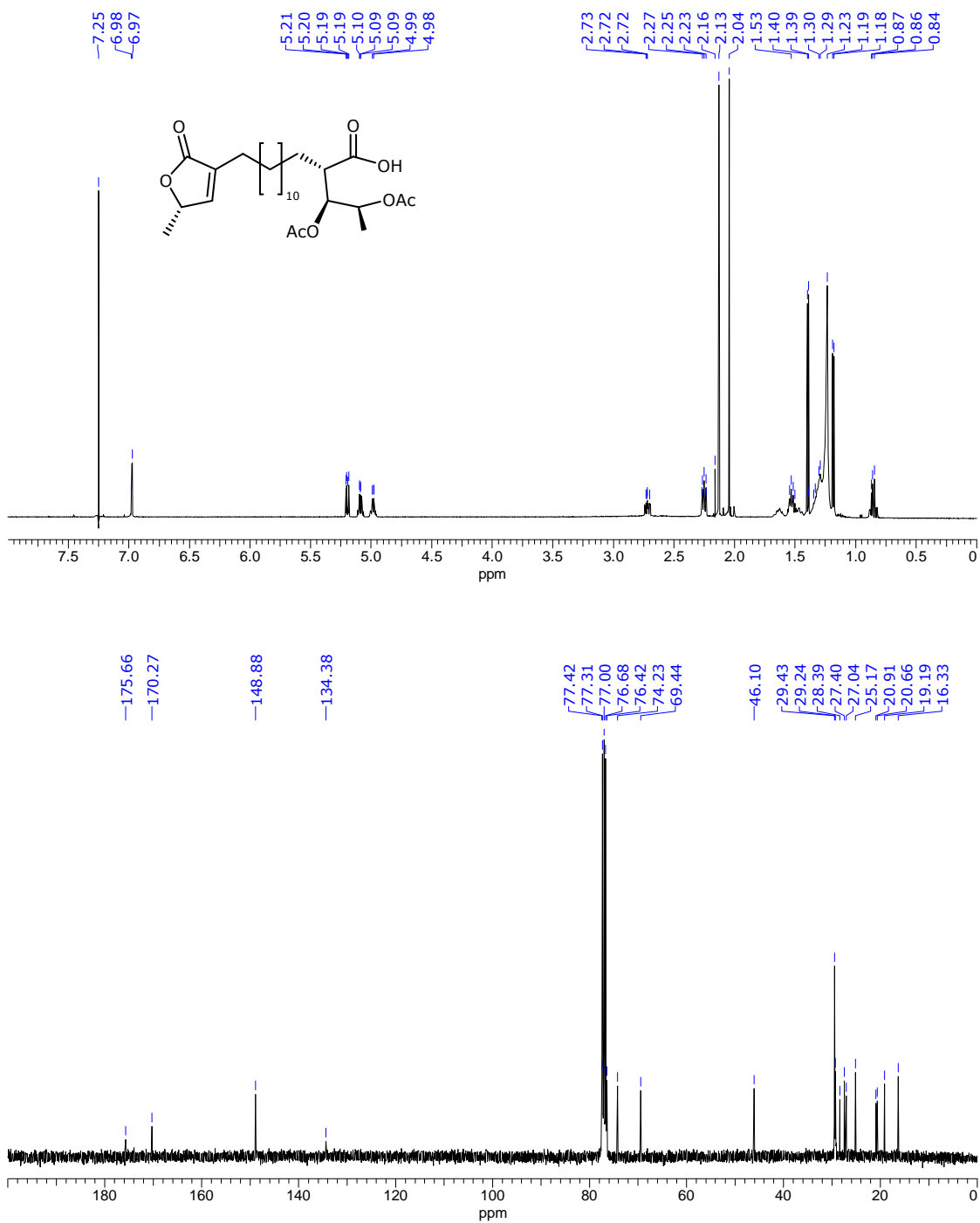


Figura 5.4.10. Espectros de RMN de HMBC y NOESY de **P5** (500 MHz, CDCl₃).

