



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Síntesis química y enzimática de biofenoles lipófilos del
olivo con actividad antiinflamatoria. Optimización de la
reacción de Krapcho**

Alejandro González Benjumea
Sevilla, Junio de 2017



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Síntesis química y enzimática de biofenoles lipófilos del
olivo con actividad antiinflamatoria. Optimización de la
reacción de Krapcho**

Memoria presentada por el
Licenciado Alejandro González
Benjumea para optar al grado de
Doctor en Química

Alejandro González Benjumea
Sevilla, Junio de 2017



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Vº Bº de los directores de la Tesis

Fdo. Dr. José M^a Fernández-
Bolaños Guzmán
Catedrático del Departamento
de Química Orgánica de la
Universidad de Sevilla

Fdo. Dra. Inés Maya Castilla
Catedrática de Escuela
Universitaria del Departamento
de Química Orgánica de la
Universidad de Sevilla

ÍNDICE

ÍNDICE

Abreviaturas y acrónimos	5
Resumen/Summary	13
Relación de compuestos	21
1. Introducción general	27
1.1. Compuestos fenólicos	29
1.2. Hidroxitirosol. Procedencia, aislamiento y propiedades biológicas	31
1.3. 3,4-dihidroxifenilglicol. Procedencia, aislamiento y propiedades biológicas	42
1.4. Oleuropeína. Procedencia, aislamiento y propiedades biológicas	47
1.5. Lipofilia y farmacocinética de compuestos fenólicos	55
1.6. Biocatálisis en Síntesis Orgánica mediante el uso de lipasas	61
2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol	70
2.1. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol	72
2.2. Síntesis de derivados lipófilos de glicoles procedentes del olivo	81
2.2.1. Síntesis de derivados lipófilos del 3,4-dihidroxifenilglicol	82
2.2.2. Síntesis de derivados lipófilos del 2,3-dihidroxi-propil hidroxitirosil éter	85
3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos	93
3.1. Procedencia y descripción general de las lipasas	96

3.2. Reacciones de acetilación de polifenoles procedentes del olivo	97
3.3. Reacciones de acetilación en carbohidratos	107
3.4. Reacciones de desacilación en polifenoles procedentes del olivo	108
3.5. Reacciones de desacilación en carbohidratos	118
3.6. Reacciones de acilación y/o desacilación en oleuropeína y derivados	125
3.7. Reacciones de acilación/desacilación con lipasas nativas puras	132
4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización	137
4.1. Introducción	139
4.2. Reacción de desmetoxycarbonilación de Krapcho sobre compuestos fenólicos del olivo	149
4.2.1. Reacción de Krapcho sobre la oleuropeína	149
4.2.2. Reacción de Krapcho sobre otros fenoles de interés biológico	158
4.3. Derivatización de los secoiridoides dialdehídicos	166
4.3.1. Reacciones de reducción de los grupos aldehído	166
4.3.2. Reacciones de acetalación	170
5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra	173
5.1. Introducción	175
5.1.1. Composición del aceite de oliva virgen extra	176
5.1.2. Extracción, separación y cuantificación de la fracción fenólica del aceite de oliva	184

5.2. Elección de la fase extractante	190
5.3. Método de análisis de los secoiridoides del aceite de oliva mediante Resonancia Magnética Nuclear de protones	192
5.4. Cuantificación de secoiridoides de aceites de oliva	193
5.5. Aislamiento de los compuestos secoiridoides de la fracción fenólica del aceite de oliva	202
6. Propiedades biológicas	206
6.1. Actividad antirradicalaria <i>in vitro</i> . Ensayo del DPPH	208
6.2. Actividad antiproliferativa en células cancerígenas de los derivados lipófilos secoiridoides	214
6.3. Modulación de la respuesta inflamatoria en macrófagos peritoneales por parte de polifenoles lipófilos	219
6.4. Efecto de la suplementación en la dieta con HTAc en la colitis aguda	224
6.5. Efectos de la dieta suplementada con HTAc en la artritis reumatoide	229
6.6. Modulación de la respuesta inflamatoria de fibroblastos humanos del líquido sinovial	233
6.7. Modulación de la respuesta inflamatoria de macrófagos peritoneales por parte de la oleuropeína y sus derivados acetilados	237
6.8. Efectos de la dieta suplementada con HT y HTAc en el lupus eritematoso sistémico	243
7. Conclusiones	249
8. Parte experimental	259
8.1. Métodos generales	261
8.2. Nuevas investigaciones	266
8.2.1. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol	268

Índice

8.2.2. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos	304
8.2.3. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización	340

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A549	Células tumorales de cancer de pulmón
Ac	Acetilo
ac	Acuoso
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN circular
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AMP	Adenosina monofosfato
AOVE	Aceite de oliva virgen extra
Asp	Aspártico
ATP	Adenosina trifosfato
BALB/c	Cepa de ratones albinos
BCL	<i>Pseudomonas cepacia</i>
BCPAP	Células de tiroides humano
Caco-2	Células de adenocarcinoma de colon
CALB	Lipasa B de <i>Candida Antarctica</i>
CE	Electroforesis capilar
CIA	Artritis inducida por colágeno
cm	Centímetros
CoA	Coenzima A
COI	Consejo Oleícola Internacional
COX-2	Ciclooxigenasa-2
cuant.	Cuantitativo
DAD	Diode array detector
DAI	Índice de actividad de la enfermedad
DHPG	3,4-Dihidroxifenilglicol
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMBA	7,12-Dimetilbenzantraceno
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOA	Aglicón deshidratado del oleurósido
DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
DSS	Dextrán sulfato sódico
E/S	Relación enzima/sustrato
E1 _{cb}	Eliminación unimolecular por base conjugada

Abreviaturas y acrónimos

EC ₅₀	Concentración efectiva máxima al 50%
EM	Espectrometría de masas
equiv	Equivalente
FDA	Food and Drug Administration
FID	Detector de ionización de llama
g	Gramo
GI ₅₀	Inhibición de la proliferación celular al 50%
Glu	Ácido Glutámico
gp41	Glicoproteína transmembrana
h	Horas
HBL-100	Células tumorales de cáncer de mama
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HeLa	Células tumorales de cáncer cérvico-uterino
HepG2	Células hepáticas humanas
His	Histidina
HL60	Células de leucemia promielocítica
HMPA	Hexametilfosforamida
HO-1	Homooxigenasa-1
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HRCI	Ionización química de alta resolución
HRESI	Ionización por electrospray de alta resolución
HRLSI	Ion líquido secundario de alta resolución
HT	Hidroxitirosol
HT29	Células de adenocarcinoma de colon
IC ₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
ICAM-1	Moléculas de adhesión intercelular
IL-17	Interleuquina-17
IL-1 β	Interleuquina-1 β
IL-6	Interleuquina-6
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IR	Infrarrojo
IT	Analizador de masas de trampa iónica
JNK	Quinasa c-Jun <i>N</i> -terminal (familia MAPK)
kg	Kilogramo
kJ	KiloJulios

LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LES	Lupus eritematoso sistémico
LiHMDS	bis-Trimetilsilil amiduro de litio
LLE	Extracción líquido-líquido
LPS	Lipopolisacáridos
M	Molaridad
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MAO	Monoamino oxidasa
MAPKs	Proteínas MAP quinasas
MCF10A	Células mamarias epiteliales
MCF-7	Células de adenocarcinoma de mama
MDA	Células de cáncer de mama
mg	Miligramos
MHz	Megahertzios
min	Minutos
ml	Mililitros
mmol	Milimol
MMP-9	Metaloproteinasa-9
m-PGEs1	Prostaglandina E sintasa-1 microsomal
MPO	Mieloperoxidasa
N	Normalidad
NF-κB	Factor nuclear de transcripción κB
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2
°C	Grados centígrados
p38	Proteína de la familia de las MAP quinasas
PBO	Butóxido de piperonilo
PGE2	Prostaglandina E2
Ph	Fenilo
ppm	Partes por millón
Py	Piridina
RAW264	Células macrófagos de ratón
<i>R_F</i>	Factor de retención

Abreviaturas y acrónimos

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNS	Especies Reactivas del Nitrógeno
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
Rto	Rendimiento
Ser	Serina
S _N 2	Sustitución Nucleófila bimolecular
SPE	Extracción en fase sólida
SW-1573	Células tumorales de cáncer de pulmón
SW982	Células de fibroblastos humanos
t	Tiempo
t.a.	Temperatura ambiente
T-47D	Células tumorales de cáncer de mama
TCP-1	Células tumorales de cáncer de tiroides
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TIMP	Inhibidor de metaloproteinasas
TLC	Cromatografía en capa fina
TLL	<i>Thermomyces lanuginosus</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
TOF	Analizador de masas de tiempo de vuelo
UDP	Uridina difosfato
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
Vis	Visible
WiDr	Células tumorales de adenocarcinoma de colon
δ	Desplazamiento químico
μ M	Micromolar
v	Número de onda
[M] ⁺	Ion molecular
[α]	Rotación específica
¹³ C-RMN	RMN de carbono 13
¹ H-RMN	RMN de protones

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se ha realizado la síntesis de una serie de compuestos lipófilos, a partir de biofenoles contenidos tanto en la hoja de olivo como en el aceite de oliva virgen extra (AOVE), bajo la hipótesis general de que un aumento del carácter lipófilo tiene como consecuencia una mejora en la actividad biológica del compuesto, ya que en sistemas biológicos reales se producen procesos de absorción a través de membranas celulares de naturaleza lipófila. El cumplimiento de esta hipótesis nos llevaría a la conclusión de que una mayor lipofilia de un biofenol implica una mejor biodisponibilidad y una mayor eficiencia a la hora de ejercer la acción terapéutica. Concretamente, las transformaciones descritas en esta Tesis Doctoral encaminadas a tal fin se han llevado a cabo mediante procedimientos químicos o enzimáticos, o bien mediante una combinación de ambos.

En primer lugar, se ha puesto a punto un nuevo método de síntesis del fenol 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG), compuesto natural minoritario contenido en el AOVE, a partir de cloruro de fenacilo en 3 pasos y con un rendimiento global del 38% mediante de una ruta sintética sencilla y fácilmente escalable.

En segundo lugar, la síntesis de las dos nuevas familias de derivados lipófilos **10-14** y **23-27**, se ha realizado mediante esterificación con ácidos carboxílicos de 2 a 16 átomos de carbono a partir de los catecoles *O*-bencil protegidos **4** y **17**, derivados DHPG y de HT, respectivamente.

En tercer lugar, se ha establecido la utilidad sintética de nuevos extractos enzimáticos procedentes de microorganismos con marcada

actividad en reacciones de transesterificación en compuestos fenólicos y carbohidratos modelo, concluyendo que los mejores resultados se obtienen por la vía de la desacilación, que resulta ser muy selectiva. Gracias a ello, se ha logrado la síntesis de HTAc **29** a partir del derivado triacetilado de HT **142**, y de una nueva familia de compuestos lipófilos del DHPG **30-39** a partir del derivado tetraacetilado **2**. Esta familia se caracteriza por exhibir el grupo catecol desprotegido y por la sustitución en posición bencílica de un grupo acetoxi por un grupo alcoxi que proviene del alcohol utilizado como disolvente en la etapa de desacilación. Adicionalmente, en la desacilación de disacáridos peracetilados como la trehalosa y la sacarosa, se ha observado una preferencia por la desacilación selectiva de uno de los monosacáridos dejando el segundo inalterado, permitiendo así la desimetrización de la trehalosa y el acceso a nuevos derivados como el penta-*O*-acetilado **42** y el tetra-*O*-acetilado **43** en solo dos pasos: peracilación seguido de desacilación regioselectiva. Finalmente, la desacilación selectiva del ligstrósido y la oleuropeína peracetilados **147** y **148** con estos extractos enzimáticos ha permitido la síntesis regioselectiva de los compuestos **49** y **50**, acetilados únicamente en el anillo de glucosa. Utilizando una lipasa comercial (*Thermomyces lanuginosus*) ha sido posible la acilación regioselectiva de la posición 6 de la glucosa de la oleuropeína con acilos de 2, 4, y 8 carbonos con rendimientos aceptables (56–74%).

En cuarto lugar, algunos de los derivados sintetizados han sido ensayados en diferentes modelos de inflamación. De este modo, el glicol **3** y el HTAc **29** han demostrado ser eficientes moduladores de la respuesta inflamatoria de macrófagos peritoneales estimulados con LPS, consiguiendo modular el nivel de nitritos y la expresión de enzimas proinflamatorias en la célula. Más aún, el derivado **29**, ha demostrado

ser un excelente agente terapéutico en enfermedades de índole inflamatoria como la colitis ulcerosa, la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico, combatiendo la inflamación y corrigiendo el nivel de estrés oxidativo asociado a estas patologías.

Siguiendo esta tendencia, estudios preliminares con macrófagos peritoneales señalan que los derivados lipófilos de la oleuropeína tienen un efecto similar al alcanzado por el HTAc **29**. Tanto el peracetilado de la oleuropeína **148**, como los derivados parcialmente acilados obtenidos enzimáticamente, el tetraacetilado **50** y el monoacetilado **46**, son mejores que la oleuropeína, en cuanto a la modulación de la respuesta inflamatoria y el nivel de estrés oxidativo de macrófagos peritoneales.

En quinto lugar, se ha optimizado la reacción de desmetoxicarbonilación de Krapcho aplicada a la oleuropeína para obtener con rendimiento aceptable la oleaceína acetilada o aceoleína **51** junto con el aglicón del oleurosido deshidratado (DOA) acetilado **52**, mediante calentamiento a 150 °C en DMSO seguido de acetilación y sin purificación previa. Esta misma estrategia biomimética ha podido ser implantada en extractos fenólicos del aceite de oliva conteniendo los aglicones monoaldehídicos de ligstrósido y oleuropeína **65** y **66**, así como con los mismos aglicones purificados por separado, lo que permite no solo un nuevo acceso a oleocantal y oleaceína, sino también la posibilidad de enriquecer extractos fenólicos fáciles de obtener de AOVes en oleocantal y oleaceína, dos compuestos de alto valor añadido y con aplicación en la industria Farmacéutica y de la Alimentación.

Se han explorado diferentes vías de estabilización de la oleaceína con el objetivo de posibilitar su purificación cromatográfica,

obteniéndose de esta manera el ya citado derivado acetilado de la oleaceína **51** y también los compuestos derivados de las reducciones regioselectivas **59** y **60**, además de los monoacetales **61–64**.

Los compuestos acetilados **51** y **52** que resultan de la reacción de Krapcho sobre la oleuropeína y posterior acetilación han sido ensayados, junto con los derivados lipófilos de ligstrósido **49** y **147**, y de oleuropeína **50-52** y **148** como agentes antiproliferativos frente a diversas líneas celulares de tumores sólidos humanos. Los resultados muestran una progresiva mejora de los datos de inhibición de crecimiento celular conforme aumenta la lipofilia de los glucósidos secoiridoideos. Además, tanto **51** como **52** presentan mejores resultados que el HT peracetilado en todas las líneas celulares ensayadas. En los compuestos con mejores actividades, se observa una mayor selectividad hacia las células de cáncer cérvico-uterino (HeLa) con GI_{50} de $(8.6 \pm 4.4) \mu\text{M}$, $(23 \pm 4.3) \mu\text{M}$ y $(15 \pm 3.2) \mu\text{M}$ para **148**, **51** y **52** respectivamente.

Finalmente, se ha propuesto un método de cuantificación mediante $^1\text{H-RMN}$ de los derivados aldehídicos de naturaleza secoiridoide presentes en la fracción fenólica de AOVes, con el que se consigue la cuantificación de oleaceína **53**, oleocantal **57** y los aglicones monoaldehídicos de ligstrósido **65** y oleuropeína **66** mediante la integración de las señales de los protones aldehídicos por encima de 9.0 ppm.

SUMMARY

In this PhD Thesis it is described the synthesis of a series of lipophilic compounds, from biophenols contained in both olive leaf and extra virgin olive oil (EVOO), under the general hypothesis that an increase in the lipophilic character results in an improvement in the biological activity of the compound, as in real biological systems absorption processes take place through lipophilic cell membranes. The fulfillment of this hypothesis would lead us to the conclusion that a greater lipophilicity of a biophenol leads to a better bioavailability and to a greater efficiency in the exercise of the therapeutic action. Specifically, the transformations described in this PhD Thesis aimed at this purpose have been carried out by chemical or enzymatic procedures, or by a combination of both methodologies.

First, a novel method for the synthesis of phenol 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG), a natural compound contained in EVOO, has been developed from phenacyl chloride in 3 steps and with an overall yield of 38% through a simple and easily scalable synthetic route.

Second, the synthesis of two new families of lipophilic derivatives **10–14** and **23–27** was performed by esterification with carboxylic acids of 2 to 16 carbon atoms from *O*-benzyl protected catechols **4** and **17**, derived from of DHPG **3** and HT **67**, respectively.

Third, it has been established the synthetic utility of new enzymatic extracts from microorganisms with marked activity in transesterification reactions on model phenols and carbohydrates compounds, concluding that the best results are obtained for deacylation

reactions, which turns out to be very selective. As a result, the synthesis of HTAc **29** has been achieved from the triacetylated derivative of HT **142**, and also a novel family of lipophilic compounds of DHPG **30-39** was obtained from peracetyl DHPG **2**. This family is characterized by displaying the deprotected catechol group and by the substitution in benzylic position of an acetoxy group by an alkoxy group derived from the alcohol used as solvent in the deacylation step. Additionally, in the deacylation of peracetylated disaccharides such as trehalose and sucrose, a preference has been observed for the selective deacylation of one of the monosaccharides leaving the second unchanged, allowing the desymmetrization of trehalose and the access to new derivatives such as the penta-*O*-acetylated **42** and tetra-*O*-acetylated **43** in just two steps: peracylation followed by regioselective deacylation. Finally, selective deacylation of the peracetylated ligstroside **147** and oleuropein **148** with these enzyme extracts has allowed the regioselective synthesis of compounds **49** and **50**, acetylated only in the glucose ring. The regioselective acylation with acceptable yield (56–74%) of the *O*-6 position of the glucose moiety of oleuropein with acyl groups of 2, 4 and 8 carbons was achieved by using *Thermomyces lanuginosus*, a commercial lipase.

Forth, some of the synthesized derivatives have been tested in different models of inflammation. Thus, glycol **3** and HTAc **29** have been shown to be efficient modulators of the inflammatory response of LPS-stimulated peritoneal macrophages, modulating the level of nitrites and the expression of proinflammatory enzymes into the cell. Moreover, derivative **29** has been shown to be an excellent therapeutic agent in

inflammatory diseases such as ulcerative colitis, rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus, combating inflammation and efficiently correcting the level of oxidative stress associated to these pathologies.

Following this trend, preliminary studies with peritoneal macrophages indicate that the lipophilic derivatives of oleuropein have a similar effect to that observed for the HTAc **29**. Both the peracetylated oleuropein **148** and the partially acylated derivatives obtained enzymatically, the tetraacetylated **50** and the monoacetylated **46**, are better than the oleuropein, in terms of the modulation of the inflammatory response and the level of oxidative stress of peritoneal macrophages.

Fifth, the Krapcho demethoxycarbonylation reaction applied to the oleuropein has been optimized to obtain, with acceptable yield, the acetylated oleacein or aceolein **51**, together with the acetylated dehydrated oleuroside aglycone (DOA) **52**, by heating at 150 °C in DMSO followed by acetylation, without prior purification. The same biomimetic strategy has been applied to phenolic extracts of olive oil containing the monoaldehyde aglycones of ligstroside and oleuropein **65** and **66**, as well as to the same aglycones previously separated and purified. This methodology allows not only a new access to oleocantal and oleacein, but also the possibility of enriching phenolic extracts, easy to obtain from EVOOs, in oleocantal and oleacein, two important highly active biophenols with application in the Pharmaceutical and Food industries.

Different synthetic routes for stabilizing oleacein **53** have also been explored in order to enable their chromatographic purification, obtaining the aforementioned acetylated derivative **51** and the

compounds derived from regioselective reductions **59** and **60**, besides to monoacetals of oleacein and oleocanthal **61–64**.

Compounds **51** and **52** resulting from the Krapcho reaction on oleuropein followed by acetylation have been tested, together with the lipophilic derivatives of ligstroside **49** and **147** and oleuropein **50-52** and **148** as antiproliferative agents against various human solid tumor cell lines. The results show a progressive improvement of the cellular growth inhibition data as the lipophilicity of the secoiridoid glycosides increases. In addition, both **51** and **52** present better results than the peracetylated HT **142** in all cell lines tested. The compounds with better activity show a higher selectivity to cells of cervix-uterine cancer (HeLa) with GI_{50} (8.6 ± 4.4) μM , (23 ± 4.3) μM and (15 ± 3.2) μM for **148**, **51** and **52** respectively.

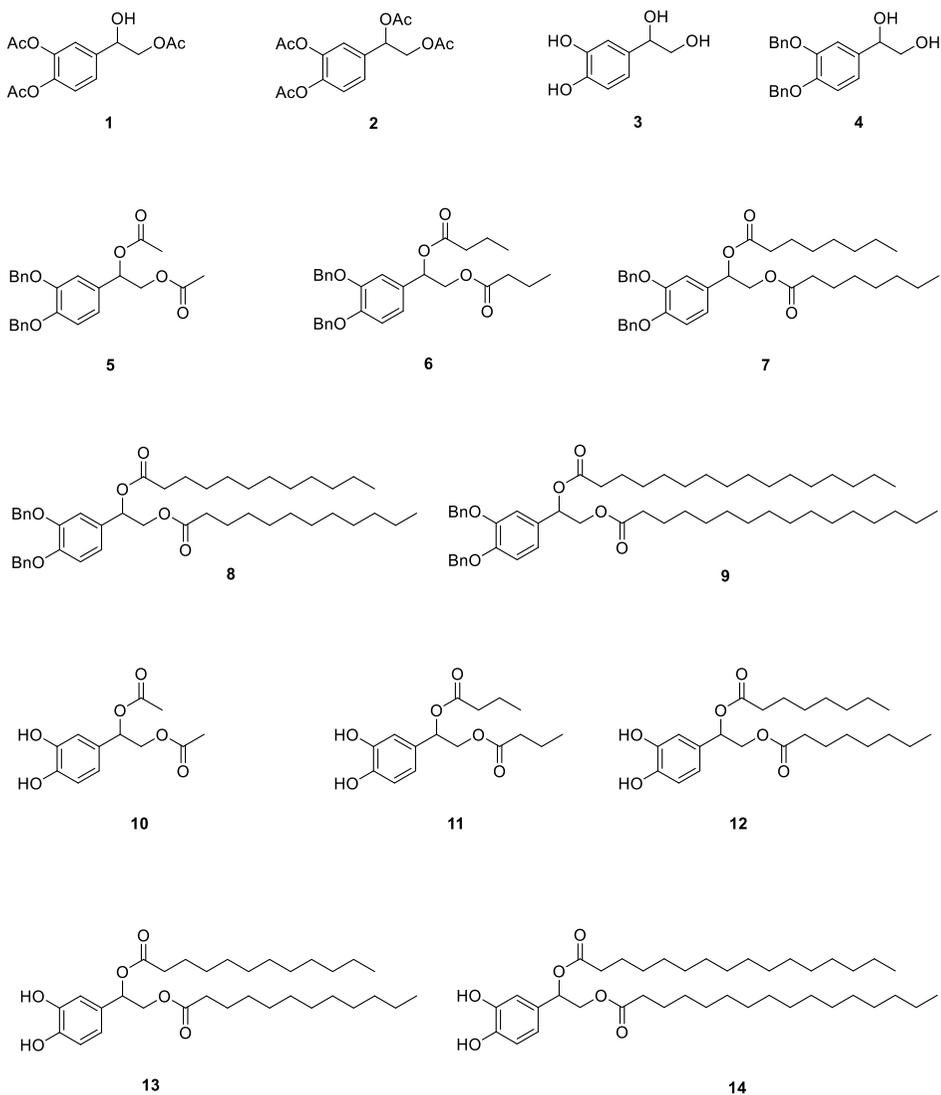
Finally, a method of quantification by $^1\text{H-NMR}$ of the aldehyde secoiridoid derivatives present in the phenolic fraction of the EVOOs has been proposed, allowing quantification of oleacein **53**, oleocanthal **57**, and monoaldehyde aglycones of ligstroside **65** and oleuropein **66** by integration of the signal corresponding to aldehyde protons above 9.0 ppm.

RELACIÓN DE COMPUESTOS

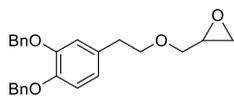
Relación de compuestos descritos en los distintos capítulos de esta tesis.

1. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo.

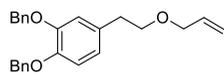
Nueva síntesis de 3,4-dihidroxiifenilglicol



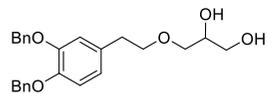
Relación de compuestos



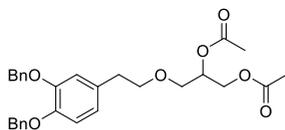
15



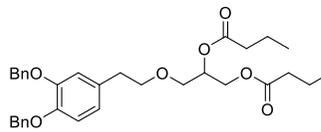
16



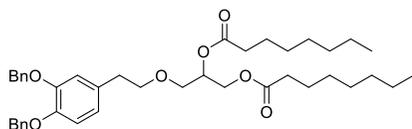
17



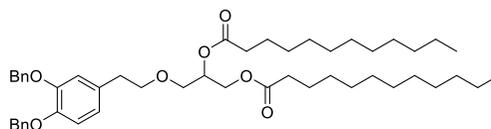
18



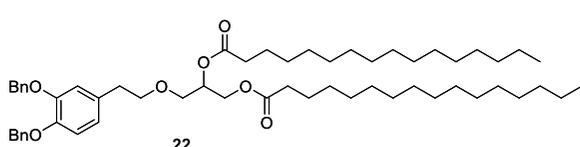
19



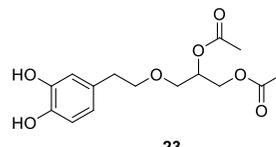
20



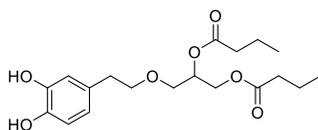
21



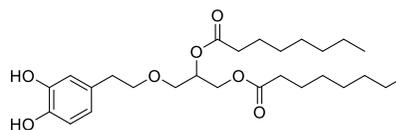
22



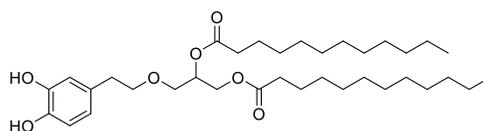
23



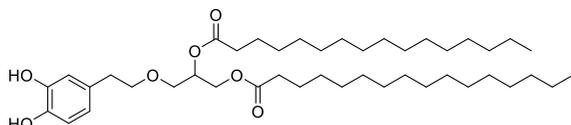
24



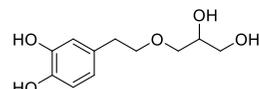
25



26

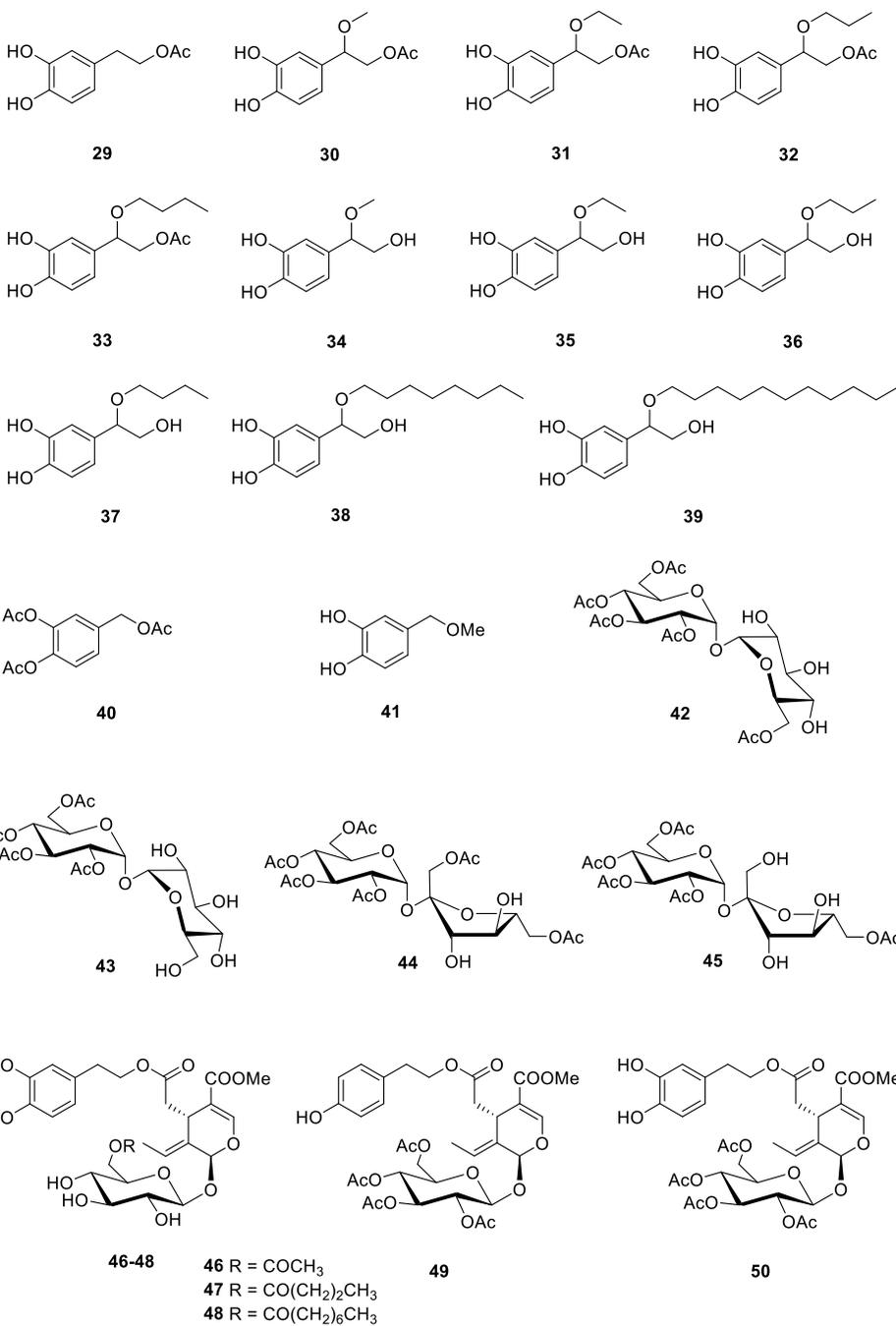


27

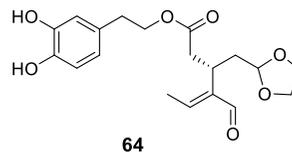
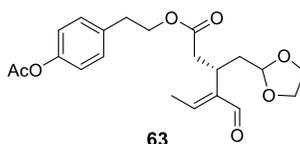
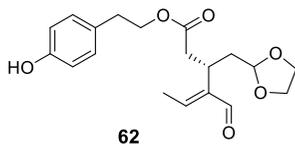
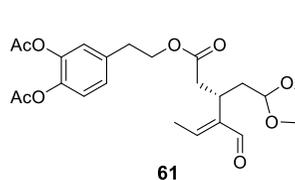
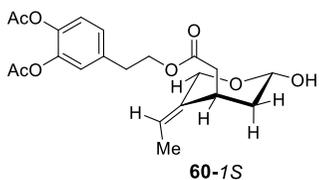
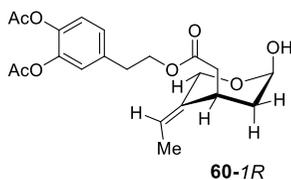
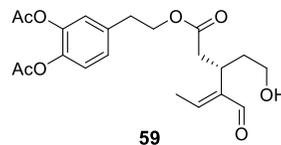
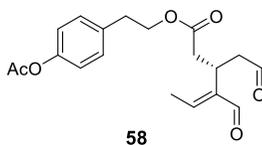
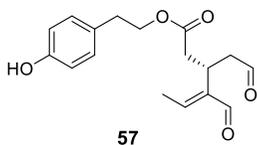
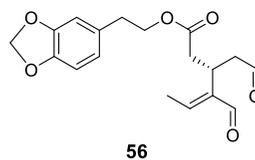
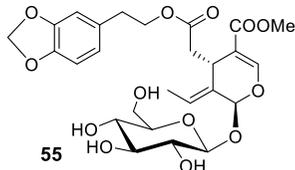
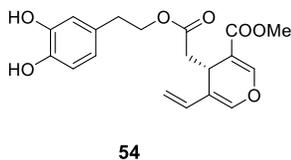
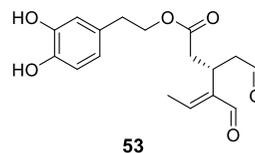
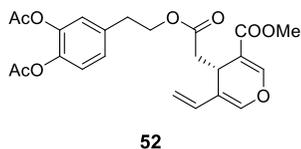
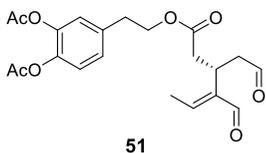


28

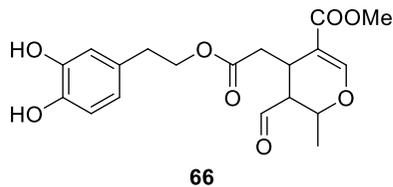
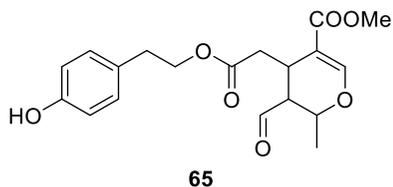
2. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos



3. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización



4. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra



1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Esta Tesis Doctoral se encuadra en la búsqueda de compuestos bioactivos de origen natural, sintético o semisintético, y que ha sido financiada por los proyectos: “Optimización del aislamiento de polifenoles de la aceituna. Complejación con ciclodextrinas, derivatización y evaluación como agentes antioxidantes” *P08-AGR-03751* y “Extremozimas lipolíticas como catalizadores regioselectivos útiles en la síntesis de carbohidratos y polifenoles lipófilos” *P11-CVI-7427*, ambos subvencionados por la Junta de Andalucía, y “Moléculas y macromoléculas con actividad multidiana frente a enfermedades degenerativas” *CTQ2016-78703-P*, subvencionado por el MEC.

1.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son una amplia familia de metabolitos secundarios procedentes del reino vegetal. No son considerados como alimentos esenciales para los humanos, pero su ingesta a través de fuentes naturales como la fruta, la verdura, el vino, el té, el cacao o el aceite de oliva, tiene un impacto positivo para la salud. De hecho, existen numerosos estudios que lo asocian, por ejemplo, a la mejora de la función cardiovascular, disminuyendo en un 46% el riesgo de padecer estos trastornos tal y como se confirma en el prestigioso informe PREDIMED.¹ Otros investigadores han reportado que una dieta rica en

¹ Tresserra-Rimbau, A; Rimm, EB; Medina-Remón, A; Martínez-González, MA; de la Torre, R; Corella, D; Salas-Salvadó, J; Gómez-Gracia, E; Lapetra, J; Arós, F; Fiol, M; Ros, E; Serra-Majem, L; Pintó, X; Saez, GT; Basora, J; Sorlí, JV; Martínez, JA;

1. Introducción general

compuestos fenólicos está asociada a un mejor funcionamiento del tejido endotelial y a la inhibición de la agregación plaquetaria² con la consiguiente disminución de problemas coronarios serios. También su ingesta prolongada está relacionada con un menor riesgo de padecimiento de enfermedades crónicas como la diabetes tipo II,³ enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer⁴ y el cáncer,⁵ además de combatir procesos inflamatorios⁶ y otros síntomas propios de la tercera edad.

Tradicionalmente su actividad biológica se ha relacionado con su capacidad antioxidante, la cual está íntimamente ligada a la estructura de la molécula, siendo el número de grupos hidroxilos fenólicos y el número de fragmentos catecol los factores más importantes.⁷ Además se ha demostrado que existe una perfecta correlación entre el estrés oxidativo y las enfermedades anteriormente comentadas por lo que parece lógico pensar que sus efectos beneficiosos no sólo pueden deberse a mecanismos específicos como por ejemplo, su interacción con ciertas

Vinyoles, E; Ruiz-Gutiérrez, V; Estruch, R; Lamuela-Raventós, RM. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2014**, *24*, 639–647.

² Vita, JA. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 292S–297S.

³ Xiao, JB; Hogger P. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 23–38.

⁴ Rodríguez-Mateos, A; Vauzour, D; Krueger, CG; Shanmuganayagam, D; Reed, J; Calani, L; Mena, P; Del Río, D; Crozier, A. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 1803–1853.

⁵ Vauzour, D; Rodríguez-Mateos, A; Corona, G; Oruna-Concha, MJ; Spencer, JPE. *Nutrients* **2010**, *2*, 1106–1131.

⁶ Pounis, G; Bonaccio, M; di Castelnuovo, A; Costanzo, S; de Curtis, A; Persichillo, M; Sieri, S; Donati, MB; Cerletti, C; de Gaetano, G; Iacoviello, L. *J. Thromb. Haemost.* **2016**, *115*, 344–352.

⁷ Fraga, CG; Galleano, M; Verstraeten, SV; Oteiza, PI. *Mol. Aspects Med.* **2010**, *31*, 435–445.

enzimas, receptores o factores de transcripción de genes, sino también a otros inespecíficos como es la simple destrucción de radicales libres que funcionan como agentes oxidantes en los organismos.

Más aún, la función antioxidante de estos compuestos también se debe a que los compuestos fenólicos en general y especialmente los que exhiben el grupo catecol, son buenos agentes quelatantes de iones metálicos como el Fe^{3+} y el Cu^{2+} que a su vez actúan como catalizadores en la formación de radicales libres durante los procesos de oxidación.^{8,9}

1.2. Hidroxitirosol. Procedencia, aislamiento y propiedades biológicas

Como ocurre en general con todos los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen extra (AOVE), el contenido de hidroxitirosol **67** (Figura 1) es muy bajo. En España, los métodos actuales de extracción de aceite de oliva en dos fases (aceite y alperujo) fueron desarrollados y adoptados en la década de los noventa,¹⁰ con el objetivo de eliminar la producción de ingentes cantidades de alpechín, (subproducto de la producción del aceite de oliva y muy contaminante). Este procedimiento permite la generación de aceite de oliva con un contenido mayor en biofenoles comparado con el procedimiento previo de tres fases (aceite, alpechín y orujo). Tanto el alpechín, líquido, como

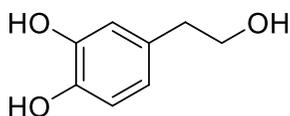
⁸ Halliwell, B; Gutteridge, JMC. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 1–85.

⁹ Halliwell, B; Aeschbach, R; Lölliger, J; Aruoma, OI. *Food Chem. Toxicol.* **1995**, *33*, 601–617.

¹⁰ Alba Mendoza, J; Hidalgo Casado, F; Ruiz Gómez, M^aA.; Martínez Román, F; Moyano Pérez, MJ; Cert Ventulá, A; Pérez Camino, MC; Ruiz Méndez, MV. *Grasas y Aceites* **1996**, *47*, 163–181.

1. Introducción general

el alperujo, de naturaleza semisólida, contienen gran cantidad de fenoles y constituyen una fuente importante de compuestos bioactivos.



67

Figura 1. Estructura del hidroxitirosol

El sistema tradicional de extracción de aceite de oliva constaba de tres procesos bien diferenciados que eran la molienda, donde se trituraban las aceitunas hasta obtener una pasta; el prensado, que consistía en la separación de un líquido (aceite y agua) y un sólido llamado orujo que conformaba el resto del fruto; y, por último, la decantación, donde se separaba el aceite del agua contenida de forma natural en las olivas. El gran problema era que para conseguir una verdadera separación de fases era necesario añadir más agua, con lo que el volumen de residuo aumentaba considerablemente. Una vez separadas las fases se obtenía el aceite por un lado y las aguas que recibían el nombre de alpechín.

El proceso de prensado en prensa hidráulica se sustituyó a mitad del siglo XX por un sistema de batido seguido de centrifugación. Las batidoras pueden incluir un sistema de calefacción por agua caliente. Lo ideal es trabajar entre los 25 y los 30 °C, siendo aquella que no sobrepasa los 27 °C la que se conoce como extracción en frío.

Con el nuevo sistema, se consiguió automatizar el proceso al que se sumaba la capacidad de convertirlo en un sistema en continuo mucho más eficiente, ya que el antiguo prensado obligaba a un proceso de tipo

discontinuo. Dentro de la centrifugación se distinguen dos sistemas: el continuo de tres fases que se desarrolla primero y el continuo de dos fases que se desarrolla en los años noventa.

En el sistema continuo de tres fases se disponen dos salidas para líquidos y una tercera para sólidos. Por cada una salen separadas la fase menos densa (aceite), una fase intermedia (alpechín) y la fase más densa (orujo); siendo necesario adicionar un volumen apreciable de agua entre 30 y 35 °C. Por el contrario, en el sistema continuo de dos fases, y que no necesita adición de agua, se disponen dos salidas, una para el aceite, la menos densa, y otra para la mezcla de alpechín y orujo denominada alperujo.

El alperujo, por tanto, es una pasta densa muy húmeda que contiene en torno al 98% de los compuestos fenólicos originales de la oliva, mientras que el 2% restante se encuentra en el aceite de oliva; por el contrario, en el sistema de tres fases tan sólo el 1% de los polifenoles pasa al aceite.¹¹

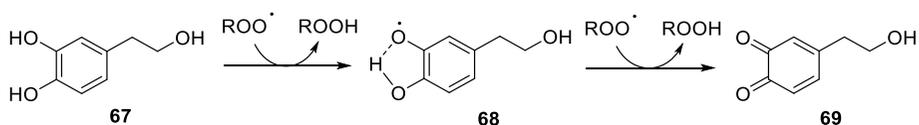
Entre los compuestos fenólicos más abundantes en el alperujo encontramos al hidroxitirosol **67** y al 3,4-dihidroxifenilglicol **3**, por lo que su aislamiento a partir de este abundante subproducto puede dar acceso a grandes cantidades de los mismos. El grupo de investigación dirigido por el Dr. Juan Fernández-Bolaños del Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla) ha desarrollado distintos procedimientos para lograr recuperar estos

¹¹ Fernández-Bolaños, J; Rodríguez, G; Rodríguez, R; Heredia, A; Guillén, R; Jiménez, A. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6804–6811.

1. Introducción general

compuestos con un alto grado de pureza^{12,13} consistente en un pretratamiento hidrotermal del alperujo conocido como explosión al vapor (*steam explosion*), con lo que se consigue maximizar el contenido de hidroxitirosol recuperable. Posteriormente, se ha conseguido escalar el proceso de aislamiento y purificación a escala semiindustrial¹⁴ la cual consiste esencialmente en el empleo de un sistema de dos columnas, una primera con un relleno de resina intercambiadora aniónica (consiguiendo HT con una pureza del 50%), y una segunda con un relleno neutro y polar como son las resinas XAD. Esta doble purificación cromatográfica del alperujo tratado al vapor permite acceder a hidroxitirosol en grandes cantidades con una pureza del 99.6%.

El hidroxitirosol es uno de los compuestos fenólicos del olivo con mayor actividad antirradicalaria de entre todos los existentes en las aceitunas. Esta actividad se puede atribuir a la capacidad del fragmento catecol para donar átomos de hidrógeno a través de la formación de un radical fenoxílico **68** y posterior evolución hasta la *o*-quinona **69** (Esquema 1).



Esquema 1. Mecanismo de eliminación de radicales alquilperoxilos por el fragmento catecol

¹² Fernández-Bolaños, J, Felizón, B, Brenes, M, Guillén, R; Heredia, A. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **1998**, 75, 1643-1649.

¹³ Felizón, B; Fernández-Bolaños, J; Heredia, A; Guillén, A. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, 77, 15-22.

¹⁴ Fernández-Bolaños, J; Heredia, A; Rodríguez, G; Rodríguez, R; Guillén, R; Jiménez, A. PCT **2002**, WO 02/0645537 A1.

Esta habilidad de capturar radicales libres, confiere al HT la capacidad de detener las reacciones de oxidación en cadena y así prevenir la peroxidación lipídica de lipoproteínas de baja densidad (LDL)¹⁵ dotándole una función cardioprotectora, ya que el LDL-colesterol oxidado u oxicolesterol es especialmente susceptible a fijarse en las arterias y formar los ateromas. Además, el HT ha demostrado ser efectivo como antiagregante plaquetario¹⁶ y en la inhibición de la producción de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotirenos) inducida por colágeno.¹⁷ Así mismo, un estudio *in vivo* con conejos hiperlipidémicos realizado por González-Santiago *et al.*¹⁸ demostró que el tratamiento con HT disminuye el desarrollo de la aterosclerosis. También se ha demostrado que tanto el HT, como otros fenoles del aceite de oliva ayudan a corregir defectos del tejido endotelial, como la producida por fenómenos de adhesión celular de monocitos. De esta forma, el HT y otros compuestos de similar naturaleza, además de corregir esta disfunción también disminuyen la expresión de ciertas proteínas inductoras de la adhesión intercelular

¹⁵ Aruoma, OI; Deiana, M; Jenner, A; Halliwell, B; Kaur, H; Banni, S; Corongiu, FP; Dessì, MA; Aeschbach, R. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5181–5187.

¹⁶ Dell'Agli, M; Maschi, O; Galli, GV; Fagnani, R; Dal Cero, E; Caruso, D; Bosisio, E. *Br. J. Nutr.* **2008**, *99*, 945–951.

¹⁷ Petroni, A; Blasevich, M; Salami, M; Papini, N; Montedoro, GF; Galli, C. *Thromb. Res.* **1995**, *78*, 151-160.

¹⁸ González-Santiago, M; Martín-Bautista, E; Carrero, JJ; Fonollá, J; Baró, L; Bartolomé, MV; Gil-Loyzaga, P; Lopez- Huertas, E. *Atherosclerosis* **2006**, *188*, 35–42.

1. Introducción general

llamadas ICAM-1¹⁹ y establecen una asociación sinérgica con fenoles monohidroxilados potenciando su actividad.

Se sabe que el cáncer en general puede ser causado por alteraciones genéticas debidas a sustancias genotóxicas que intervienen en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).²⁰ El HT ha demostrado ser un eficaz agente protector del daño causado al ADN por estrés oxidativo a concentraciones del orden de 1 mM, tal y como ha reportado el grupo del Dr. Fabiani²¹ en células mononucleares de sangre periférica humanas y en células de leucemia promielocítica (HL60). En este sentido, Warletta *et al.* han demostrado que esta protección frente al daño oxidativo también se extiende al ADN nuclear en células mamarias epiteliales (MCF10A).²²

Adicionalmente a la acción preventiva, la capacidad antitumoral para distintos tipos de cáncer está bien documentada. Por ejemplo, en un estudio *in vitro* con células HL60 realizado por della Ragione *et al.*, se demostró que el HT bloqueaba el ciclo celular de estas células, reducía su crecimiento y proliferación e inducía su muerte por apoptosis²³ en concentraciones entre 50–100 μ M. Estos datos fueron confirmados y complementados posteriormente en el año 2002 por Morozzi y

¹⁹ Manna, C; Napoli, D; Cacciapuoti, G; Porcelli, M; Zappia, V. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3478–3482.

²⁰ Halliwell, B. *Biochem. J.* **2007**, *401*, 1–11.

²¹ Fabiani, R; Rosignoli, P; de Bartolomeo, A; Fuccelli, R; Servili, M; Montedoro, GF; Morozzi, G. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 1411–1416.

²² Warletta, F; Quesada, CS; Campos, M; Allouche, Y; Beltrán, G; Gaforio, JJ. *Nutrients* **2011**, *3*, 839–857.

²³ Ragione, FD; Cucciolla, V; Borriello, A; Pietra, VD; Pontoni, G; Racioppi, L; Manna, C; Galletti, P; Zappia, V. *Biochem Biophys Res Commun.* **2000**, *278*, 733–739.

colaboradores, determinando mediante análisis por citometría de flujo que el arresto del ciclo celular observado por Ragine se producía en la fase G1,²⁴ debido probablemente a la inhibición por parte del HT de determinadas quinasas responsables del ciclo celular.

Un tipo de cáncer con poca incidencia en las regiones en donde se produce un gran consumo de aceite de oliva es el cáncer colorrectal. Esto puede deberse a que existe la evidencia de que el HT inhibe el crecimiento e induce la apoptosis en células tipo HT29 (adenocarcinoma de colon) mediante la modulación del estrés oxidativo producido en el retículo endoplasmático. Otros estudios apuntan que la inhibición de la enzima inflamatoria ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la inhibición de la fosforilación de la proteína p38/CREB ejerce un excelente efecto antiproliferativo en células Caco-2 (adenocarcinoma de colon).²⁵

En la misma línea que con el cáncer colorrectal, el número de casos diagnosticados de cáncer de mama en la región del Mediterráneo es mucho menor que en otros países occidentales.²⁶ El primer estudio de antiproliferación del cáncer de mama debido al HT y otros polifenoles fue el realizado por Goulas *et al.*,²⁷ donde se llegó a la conclusión que el bloqueo de las células MCF-7 (adenocarcinoma de mama) se debía a un arresto del desarrollo celular en las fases G0/G1 del ciclo. Posteriores análisis del tratamiento con HT de estas células reveló que se producía

²⁴ Fabiani, R; de Bartolomeo, A; Rosignoli, P; Servili, M; Montedoro, GF; Morozzi, G. *Eur. J. Cancer Prev.* **2002**, *11*, 351–358.

²⁵ Corona, G; Deiana, M; Incani, A; Vauzour, D; Assunta Dessì, M; Spencer, JPE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *362*, 606–611.

²⁶ Ia Vecchia, C. *Public Health Nutr.* **2004**, *7*, 965–968.

²⁷ Goulas, V.; Exarchou, V.; Troganis, A. N.; Psomiadou, E.; Fotsis, T.; Briasoulis, E.; Gerothanassis, I. P. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 600–608.

1. Introducción general

muerte celular por apoptosis vía inhibición de la *cis/trans* peptidil-prolil isomerasa.²⁸ En un modelo *in vivo* de cáncer de mama en ratas inducido por dimetilbenzoantraceno (DMBA), Granados-Principal *et al.*²⁹ demostraron mediante chips de ADNc (ADN circular), que el HT inhibía el crecimiento de tumores mamarios ya que incidía en las vías de señalización y expresión de algunos genes implicados en el desarrollo del cáncer.

Los estrógenos ejercen un papel importante en el desarrollo y crecimiento, en procesos dependientes del retículo endoplasmático, de células de cáncer de mama.³⁰ Parece ser que el HT y la oleuropeína ejercerían un efecto antiproliferativo indirecto debido a que son capaces de interferir en las funciones de señalización de los estrógenos.³¹

La medicina tradicional ha tratado la diabetes con hojas de olivo desde hace muchos años. Tanto es así que el tratamiento durante 12 semanas de hombres con sobrepeso de mediana edad con extractos de hoja de olivo, que contienen básicamente oleuropeína y HT en proporción 5:1 en peso, consigue corregir la secreción de insulina en el organismo debido a una mejor actividad de las células β del páncreas.³²

²⁸ Bouallagui, Z; Han, J; Isoda, H; Sayadi, S. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 179–184.

²⁹ Granados-Principal, S; Quiles, JL; Ramírez-Tortosa, C; Camacho-Corencia, P; Sánchez-Rovira, P; Vera-Ramírez, L; Ramírez-Tortosa, MC. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, S117–S126.

³⁰ Yager, JD; Davidson, NE. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *354*, 270–282.

³¹ Sirianni, R; Chimento, A; de Luca, A; Casaburi, I; Rizza, P; Onofrio, A; Iacopetta, D; Puoci, F; Andò, S; Maggiolini, M; Pezzi, V. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 833–840.

³² de Bock, M; Derraik, JGB; Brennan, CM; Biggs, JB; Morgan, PE; Hodgkinson, SC; Hofman, PL; Cutfield, WS. *PLoS One* **2013**, *8*, 3e57622.

Una explicación para este hecho podría ser que la disminución del estrés oxidativo como consecuencia de la ingesta de antioxidantes minimiza la resistencia a la insulina, un impacto negativo de los radicales libres. Es por ello que determinadas dietas ricas en antioxidantes pueden ayudar a prevenir esta enfermedad. Esta hipótesis fue ensayada en un estudio *in vivo* con ratas diabéticas,³³ observando que tras tres meses de dieta enriquecida con HT, la actividad de enzimas intestinales como la lactasa, la maltasa, la sacarasa y la lipasa descendían mientras que la de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa aumentaban. Además, se observó en las ratas una mejora en el perfil lipídico dado que disminuía el colesterol-LDL y aumentaba el HDL, lo que sugiere que el HT podría ser un buen agente terapéutico como antidiabético e hipocolesterolémico.

Como se ha comentado, el estrés oxidativo está implicado en el origen de muchas enfermedades y su acción sostenida durante largos periodos induce la activación de citoquinas proinflamatorias que son clave en numerosas enfermedades autoinmunes. Se ha demostrado que el HT y la oleuropeína consiguen modular algunas enfermedades crónicas como la diabetes tipo II, la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal.³⁴

Una elevada concentración de ROS y RNS (Especies reactivas de Nitrógeno) puede implicar un daño para los tejidos y la función cerebral. En este sentido, extractos de HT han demostrado disminuir la

³³ Hamden, K; Allouche, N; Jouadi, B; El-Fazaa, S; Gharbi, N; Carreau, S; Damak, M; Elfeki, A. *Food Sci. Biotechnol.* **2010**, *19*, 439–447.

³⁴ Kawaguchi, K; Matsumoto, T; Kumazawa, Y. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 1767–1779.

1. Introducción general

citotoxicidad asociada a óxido nítrico (NO) en un estudio *in vitro* realizado con células cerebrales de murinos.³⁵ El efecto neuroprotector del HT se ha estudiado en un modelo *ex vivo* de hipoxia-reoxigenación en cerebro de rata y midiéndose la actividad de la lactato deshidrogenasa para cuantificar la muerte celular. Según el estudio, el HT evita la pérdida de la lactato deshidrogenasa hacia los fluidos extracelulares, lo que da una posible evidencia de su actividad como agente neuroprotector.³⁶

Gracias a la acción moduladora de la actividad de ciertas enzimas ejercida por el HT, se ha valorado su actividad *in vitro* en plaquetas, leucocitos y macrófagos. Así mismo, se ha podido determinar que el HT actúa como inhibidor de las araquidonato lipoxigenasas, pertenecientes a la familia de las enzimas proinflamatorias, como la 12-lipoxigenasa y la 5-lipoxigenasa con IC₅₀ de 4.2 µM y 13 µM, respectivamente.³⁷ Estas dos enzimas participan en la biosíntesis de algunos biorreguladores y su mal funcionamiento está asociado a enfermedades como la alergia, la aterosclerosis y el cáncer.^{38,39}

Por último, cabe destacar que el HT y la oleuropeína son las dos primeras moléculas de tipo fenólico que han demostrado tener actividad antiviral frente al VIH. Su actividad parece centrarse en las fases de la infección y replicación del virus con valores de EC₅₀ del rango

³⁵ Schaffer, S; Podstawa, M; Visioli, F; Bogani, P; Muller, WE; Eckert, GP. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5043–5049.

³⁶ González-Correa, JA; Navas, M. D; Lopez-Villodres, JA; Trujillo, M; Espartero, JL; de La Cruz, JP. *Neurosci. Lett.* **2008**, *446*, 143–146.

³⁷ Kohyama, N; Nagata, T; Fujimoto, S; Sekiya, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 347–350.

³⁸ Spector, AA; Gordon, JA; Moore, A. *Prog. Lipid Res.* **1988**, *27*, 271–323.

³⁹ Tang, DG; Honn, KV. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1994**, *744*, 199–215.

nanomolar que corresponden a 68 y 73 nM (HT y oleuropeína) para la inhibición de la producción de los antígenos p24 (relacionados con la infección) y 61 y 55 nM (HT y oleuropeína) para la inhibición de la formación de sincitios (células gigantes multinucleadas), que corresponde al periodo posterior cuando el virus ya ha infectado a una célula huésped.⁴⁰ Por medio de simulaciones, se ha determinado que la inhibición de algunas proteínas responsables de la infección por parte del HT y la oleuropeína se darían a través de la formación enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals entre los compuestos fenólicos y los sitios activos de las proteínas. Ambos compuestos encajarían perfectamente en el sitio activo de la proteína transmembrana gp41, que es clave para la fusión del virus con el huésped (Figura 2); y también en el sitio activo de la enzima integrasa que cataliza la fusión del material genético vírico en el ADN del huésped⁴¹ (Figura 2).

⁴⁰ Lee-Huang, S; Huang, PL; Zhang, D; Lee, JW; Bao, J; Sun, Y; Chang, YT; Zhang, J; Huang, PL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 354, 872–878.

⁴¹ Lee-Huang, S; Huang, PL; Zhang, D; Lee, JW; Bao, J; Sun, Y; Chang, YT; Zhang, J; Huang, PL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 354, 879–884.

1. Introducción general

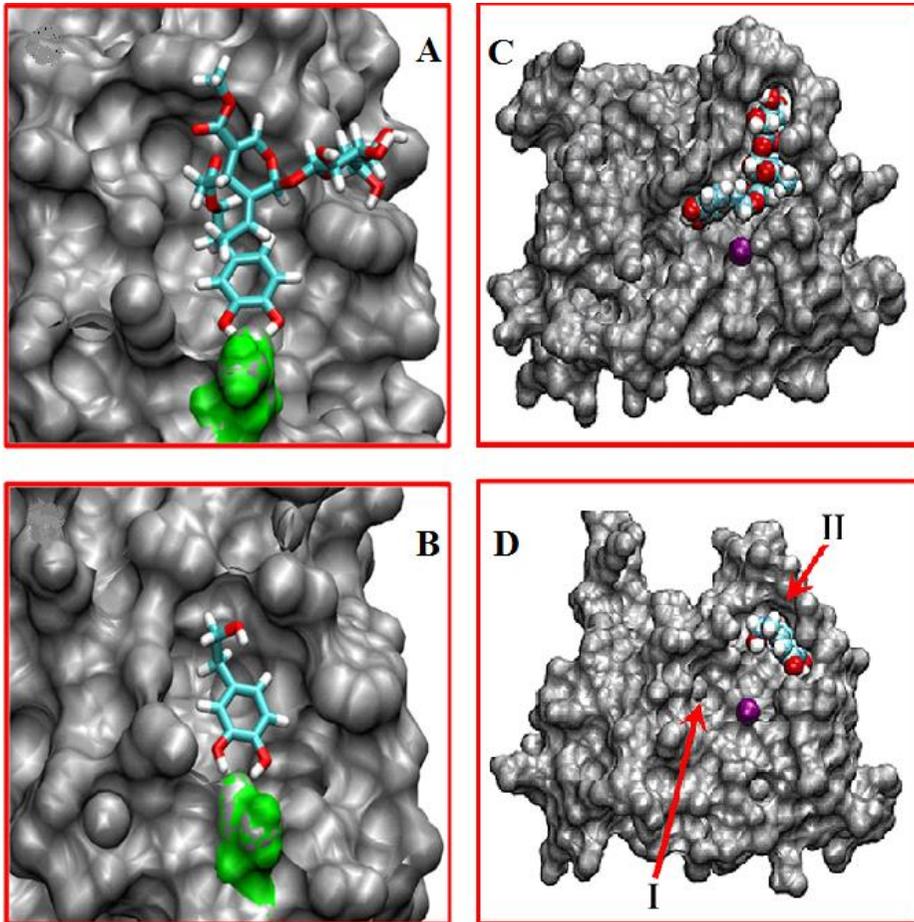


Figura 2. Modelización de la interacción de los fenoles del olivo con los sitios activos de dos proteínas implicadas en la infección del VIH en células sanas. Las imágenes A y B corresponden a la modelización de oleuropeína y HT respectivamente con la proteína gp41. Las imágenes C y D corresponden a la modelización de oleuropeína y HT respectivamente con la integrasa.

1.3. 3,4-Dihidroxifenilglicol. Procedencia, aislamiento y propiedades biológicas

El 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) **3** es un compuesto fenólico de estructura muy similar al hidroxitirosol, pero con un grupo hidroxilo adicional en posición bencílica (Figura 3).

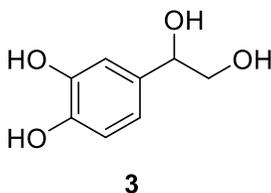


Figura 3. Estructura del DHPG

El DHPG es un componente natural de la aceituna,⁴² aunque se descubrió por primera vez en las aguas de vegetación de las mismas.⁴³ Se ha detectado en pequeñas cantidades en el aceite de oliva,⁴⁴ encontrándose en mayor proporción en el alperujo.⁴⁵ En la aceituna se encuentra fundamentalmente en forma del glicósido β -hidroxiacteósido **70a**. En extractos vegetales del género *Orobache*,⁴⁶ (Figura 4) muy utilizados por la medicina tradicional oriental (china, japonesa y coreana) debido a sus propiedades antiproliferativas, antiinflamatorias y neuroprotectoras,⁴⁷ se encuentra en forma del compuesto orobanchósido **70b**. Es por ello, que resulta de interés no sólo el desarrollo de métodos de aislamiento y purificación del DHPG, sino también de sus derivados.

⁴² Rodríguez, G; Lama, A; Jaramillo, S; Fuentes-Alventosa, JM; Guillen, R; Jiménez-Araujo, A; Rodríguez-Arcos, R; Fernández-Bolaños, J. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6298–6304.

⁴³ Bianchi, G; Pozzi, N. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1335–1337.

⁴⁴ Medina, E; de Castro, A; Romero, C; Brenes, M. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4954–4961.

⁴⁵ Rodríguez, G; Lama, A; Trujillo, M; Espartero, JL; Fernández-Bolaños, J. *LWT - Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 483–490.

⁴⁶ Pieretti, S; di Giannuario, A; Capasso, A; Nicoletti, M. *Phytother. Res.* **1992**, *6*, 89–93.

⁴⁷ Nishibe, S. *J. Pharm. Soc. Japan* **2002**, *122*, 363–379.

1. Introducción general

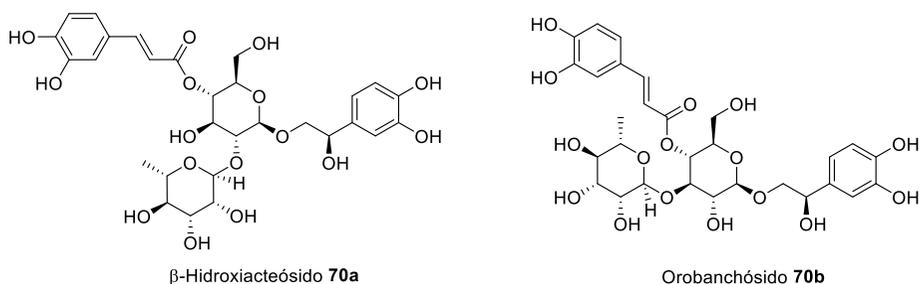


Figura 4.

También debemos indicar que el DHPG se detecta en el cuerpo humano, debido a que es el principal metabolito de la noradrenalina (Figura 5). Una de las primeras evidencias de esto fue descrita por Dingemans y colaboradores,⁴⁸ que reportaron que la inhibición de la enzima monoamino oxidasa (MAO-A) que cataliza la oxidación de la noradrenalina al aldehído de la noradrenalina, tenía como consecuencia una fuerte disminución de la concentración de DHPG en suero humano. El aldehído de la noradrenalina a su vez se reduce a DHPG por intervención de la enzima aldehído reductasa.

⁴⁸ Dingemans, J; Korn, A; Pfenner, JP; Guntert, TW. *Psychopharmacology (Berl)*. **1992**, *106*, S46–S48.

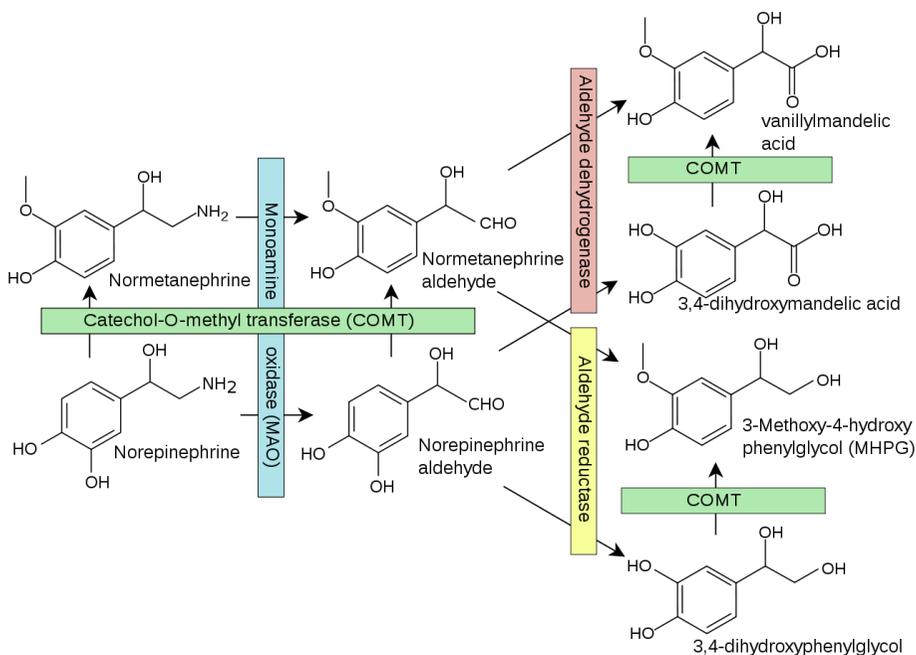


Figura 5. Mecanismo de degradación de la noradrenalina⁴⁹

Actualmente, existe un único procedimiento de obtención de DHPG a escala de planta piloto que ha sido desarrollado por el grupo del Dr. Juan Fernández-Bolaños⁵⁰ a partir de alperujo diluido en agua. Éste consiste en la utilización 3 ó 4 columnas cromatográficas de distinta naturaleza dependiendo de la pureza que se desee. El alperujo pretratado se somete a una primera purificación en columna con una resina iónica fuerte que se eluye con agua, consiguiéndose DHPG con una pureza entre el 5-20%. Posteriormente, esta fracción es purificada con una

⁴⁹ Flower, R; Rang, HP; Dale, MM; Ritter, JM. *Rang & Dale's Pharmacology*, Elsevier, 8ª edición, 2007, ISBN: 0-443-06911-5.

⁵⁰ Fernandez-Bolaños, J; Guillén-Bejarano, R; Jiménez-Araujo, A; Rodríguez-Arcos, R; Rodríguez-Gutiérrez, G. Method for purifying 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG) from plant products. PCT 2010 WO 2010/070168 A1.

1. Introducción general

segunda columna de naturaleza neutra y polar (XAD). La elución con agua provee de un DHPG de pureza 20-40%. Es necesario el uso de una tercera columna compuesta por una resina iónica débil para alcanzar una pureza del 80-95%. Por último, la utilización de una cuarta columna igual a la anterior permite la obtención de una disolución de gran pureza (95-100%). En total, y teniendo en cuenta las 4 columnas, el método permite obtener 10 g de DHPG de alta pureza a partir de 250 kg de alperujo.

Aun así, la actividad biológica del DHPG ha sido poco estudiada. Es un antioxidante muy potente, con una actividad incluso superior a la del HT y entre 2-3 veces superior a la del ácido ascórbico en agua y de actividad similar a la vitamina E en medios lipídicos.⁵¹ Es por ello que en principio, se le pueden atribuir similares capacidades terapéuticas a las del HT que deriven de su potencial como atrapador de radicales libres y de agente protector frente al daño oxidativo. Un ejemplo de ello es el que representa un reciente estudio *in vivo* realizado en ratas con deficiencia de vitamina E con extractos de alperujo.⁵² El análisis proteómico de sangre y tejidos demostró que el HT y el DHPG lograban disminuir la actividad de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial y la hepática, además de aumentar la actividad de la superóxido dismutasa, todo ello a pesar de que la actividad antioxidante *in vivo* era moderada. Esto sugiere un mecanismo de interacción entre los compuestos fenólicos y las enzimas u otras moléculas que las activen, lo que puede

⁵¹ Rodríguez, G; Rodríguez, R; Fernández-Bolaños, J; Guillén, R; Jiménez, A. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *224*, 733–741.

⁵² Rodríguez-Gutiérrez, G; Duthie, GG; Wood, S; Morrice, P; Nicol, F; Reid, M; Cantlay, LL; Kelder, T; Horgan, GW; Fernández-Bolaños, J; de Roos, B. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 1137–1147.

representar un nuevo punto de vista en la forma de entender su actividad biológica más allá del simple hecho de que sean antioxidantes.

1.4. Oleuropeína. Procedencia, aislamiento y propiedades biológicas

La oleuropeína **71** es un glucósido secoiridoide que se esterifica con una unidad de hidroxitirosol, responsable del sabor amargo de las olivas no procesadas⁵³ y que constituye el componente fenólico mayoritario de las hojas de olivo, el hueso, el mesocarpio (o pulpa) y la piel de las aceitunas (Figura 6). El término secoiridoide alude al fragmento monoterpénico que en la oleuropeína se une al HT y a la glucosa.

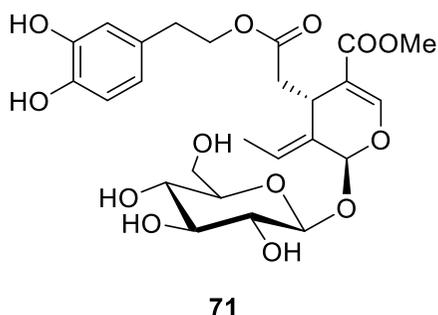


Figura 6. Estructura de la oleuropeína

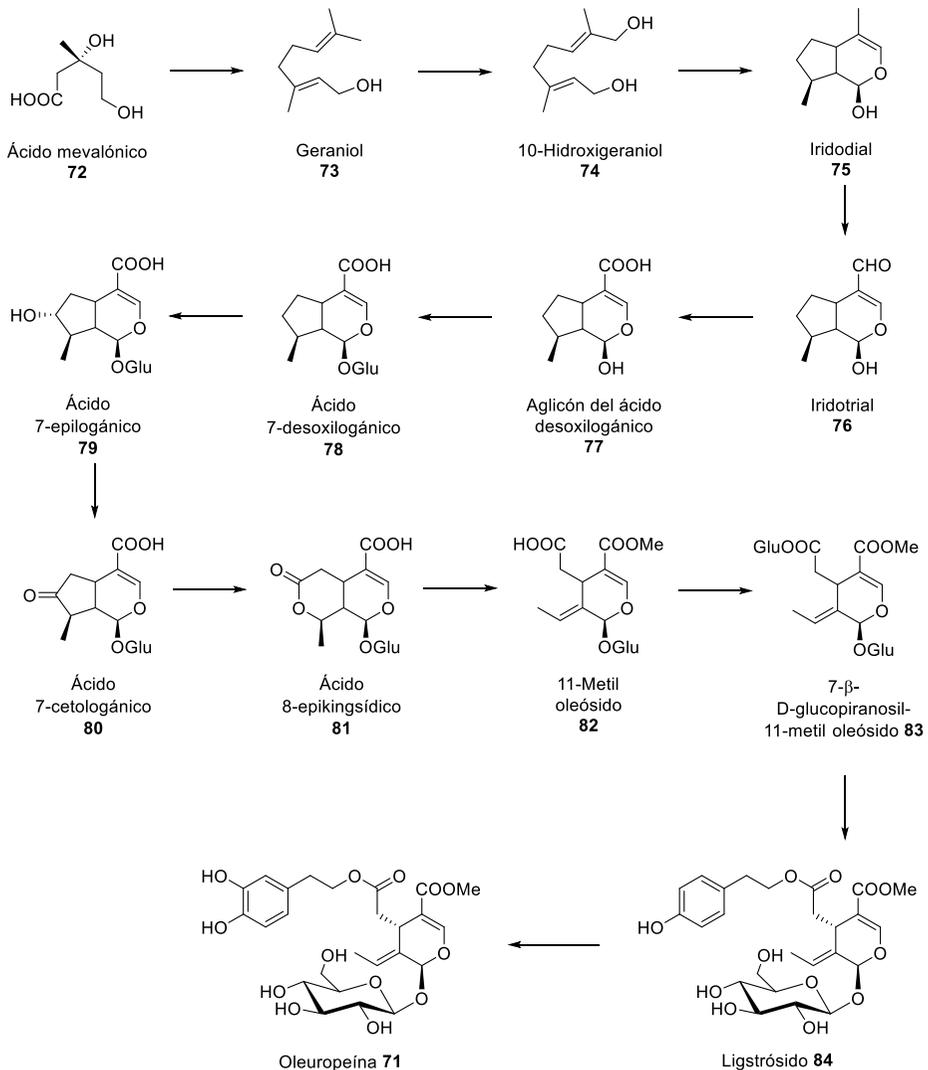
Su biosíntesis en plantas de la familia *Oleaceae* parece encontrarse dentro de la ruta del ácido mevalónico, que culmina en la formación de oleósidos (Esquema 2).⁵⁴ Así, a partir del ácido mevalónico

⁵³ Shasha, B; Leibowitz, J. *J. Org. Chem.* **1960**, 26, 1948–1954.

⁵⁴ Alagna, F; Geu-Flores, F; Kries, H; Panara, F; Baldoni, L; O'Connor, SE; Osbourn, A. *J. Biol. Chem.* **2016**, 291, 5542–5554.

1. Introducción general

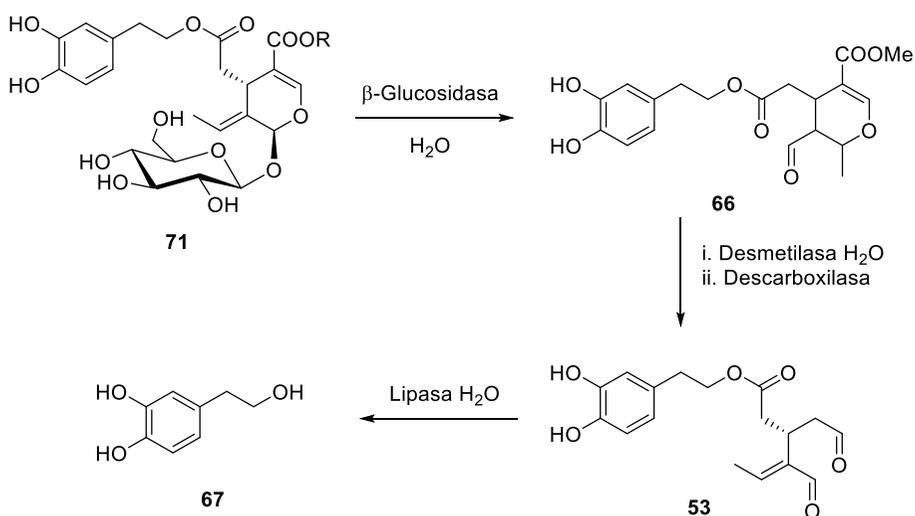
72 se llega al iridotrial **76**, que se considera precursor de distintos tipos de loganinas. Finalmente, su oxidación y rotura de la estructura iridoide bicíclica da lugar a los ésteres de oleósido **82** y **83** que pueden incorporar tirosol para dar ligstrósido **84** el cual, tras oxidación del anillo aromático, produce oleuropeína (Esquema 2).



Esquema 2. Biosíntesis de la oleuropeína en plantas de la familia *Oleaceae*

La oleuropeína se considera precursor de otras biomoléculas presentes en el aceite de oliva y el alperujo como la oleaceína **53**, el aglicón de la oleuropeína **66** y el hidroxitirosol **67**. La acción de enzimas propias de la planta como β -glucosidasas, desmetilasas, descarboxilasas y lipasas que actúan durante la molturación y el batido del fruto, son los responsables del origen del aglicón monoaldehídico de la oleuropeína **66**, el dialdehído oleaceína **53** y el alcohol fenólico hidroxitirosol **67** (Esquema 3).

El aislamiento y la determinación de la estructura de la oleuropeína tuvo lugar por vez primera en 1959 por Shasha y Lebowitz⁵⁵ a partir de extractos de la aceituna, lo que supuso el punto de partida para el estudio de su bioactividad.



Esquema 3. Formación de los polifenoles más abundantes del aceite de oliva y el alperujo a partir de la oleuropeína

⁵⁵ Shasha, B; Lebowitz, J. *Nature* **1959**, *184*, 2019–2020.

1. Introducción general

En cuanto a su obtención, lo más conveniente resulta ser su extracción con disolventes a partir de las hojas de olivo secas y trituradas. Dichas extracciones suelen hacerse con agua a 70 °C⁵⁶ o con soluciones hidroalcohólicas como la mezcla de agua-EtOH 30:70 (v/v).⁵⁷

Debido al grupo catecol, la oleuropeína posee actividad antioxidante. Posee buenos valores *in vitro* en ensayos de DPPH, del orden de los que presentan las vitaminas C y E,⁵⁸ lo que le confiere la capacidad de paliar la oxidación de LDL-colesterol promovida por Cu²⁺, restaurando de esta manera los niveles de vitamina E y disminuyendo en células la cantidad de malondialdehído y otras sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.⁵⁹ Estos datos fueron confirmados en un estudio *in vivo* con conejos, ya que los individuos que fueron alimentados con oleuropeína ofrecían mayor resistencia a la oxidación de LDL en el plasma sanguíneo que aquellos que fueron alimentados con aceite de oliva, presentando un mejor perfil lipídico general.⁶⁰ También tiene la propiedad de neutralizar especies reactivas del nitrógeno como el NO, tanto *in vitro* como *ex vivo*, aunque en determinados modelos experimentales se ha detectado una mayor expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en células.⁶¹

⁵⁶ Romani, A; Mulas, S; Heimler, D. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, 243, 429–435.

⁵⁷ Stamatopoulos, K; Chatzilazarou, A; Katsoyannos, E. *Foods* **2013**, 3, 66–81.

⁵⁸ Visioli, F; Bellomo, G; Galli, C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 247, 60–64.

⁵⁹ Visioli, F; Galli, C. *Life Sci.* **1994**, 55, 1965–1971.

⁶⁰ Coni, E; Di Benedetto, R; Di Pasquale, M; Masella, R; Modesti, D; Mattei, R; Carlini, EA. *Lipids* **2000**, 35, 45–54.

⁶¹ De la Puerta, R; Domínguez, MEM; Ruíz-Gutierrez, V; Flavill, JA; Hoult, JRS. *Life Sci.* **2001**, 69, 1213–1222.

Como se comentó con anterioridad, el HT y la oleuropeína tienen actividad antiinflamatoria, como se deduce por ejemplo, de su capacidad de inhibir la enzima proinflamatoria 5-lipooxigenasa en leucocitos con un EC₅₀ de 80 µM, menor que el del HT (15 µM) pero mejor que el ácido cafeico y el tirosol (200 y 500 µM, respectivamente). Hay que destacar que estos compuestos no presentan toxicidad a las dosis ensayadas.⁶²

En la respuesta inflamatoria intervienen multitud de variables como las citoquinas TNF-α (factor de necrosis tumoral) y la IL-1β (interleuquina-1β); y las enzimas inflamatorias iNOS y la COX-2. Todas estas variables están relacionadas entre sí de modo que la producción de citoquinas, que suele ocurrir justo después de producirse el daño, tiene como consecuencia la activación o la sobreexpresión de la iNOS y COX-2, aumentando el estrés oxidativo y empeorando los síntomas como la propia inflamación o la fiebre.

Un ejemplo de la modulación por parte de la oleuropeína de las citoquinas TNF-α e IL-1β, se encuentra en el estudio *in vivo* con 70 conejos a los que se les indujo una fuerte sepsis estimulada por *Pseudomonas aeruginosa*. De esta forma, el tratamiento con oleuropeína permitió la supervivencia de los individuos por medio de la inhibición de la biosíntesis de estas citoquinas.⁶³ Resultados análogos fueron reportados por Khalatbary *et al.* en otro estudio *in vivo* con ratas,⁶⁴ por

⁶² De la Puerta, R; Gutierrez, VR; Hoult, JRS. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 445–449.

⁶³ Giamarellos-Bourboulis, E. J; Geladopoulos, T; Chrisofos, M; Koutoukas, P; Vassiliadis, J; Alexandrou, I; Tsaganos, T; Sabracos, L; Karagianni, V; Pelekanou, E; Tzepi, I; Kranidioti, H; Koussoulas, V; Giamarellou, H. *Shock* **2006**, *26*, 410–416.

⁶⁴ Khalatbary, AR; Zarrinjoei, GR. *Iran. Red Crescent Med. J.* **2012**, *14*, 229–234.

1. Introducción general

Miles *et al.* en monocitos humanos⁶⁵ y más recientemente por Giner *et al.* en un modelo de colitis crónica en ratones.⁶⁶

Por otro lado, la oleuropeína muestra otros efectos beneficiosos relacionados con los trastornos cardiovasculares como actividad vasodilatadora, de antiagregación plaquetaria⁶⁷ o antiisquémica.⁶⁸ Algunos estudios *in vivo* con ratas con hipertensión demuestran que el extracto de hojas de olivo rico en oleuropeína provoca una disminución palpable en la tensión arterial y la presión cardíaca.⁶⁹ Más interesante resulta un ensayo clínico con 40 parejas de gemelos monocigóticos hipertensos, donde se ha demostrado que la ingestión de 1 g/día de extracto de hojas de olivo durante 8 semanas disminuye la presión sistólica desde 137 ± 10 a 126 ± 6 , experimentando adicionalmente una bajada en los niveles de colesterol.⁷⁰

De manera similar a lo comentado sobre la actividad biológica del hidroxitirosol, la oleuropeína ha demostrado tener efectos

⁶⁵ Miles, EA; Zoubouli, P; Calder, PC. *Nutrition* **2005**, *21*, 389–394.

⁶⁶ Giner, E; Recio, MC; Ríos, JL; Giner, RM. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1113–1120.

⁶⁷ Singh, I; Mok, M; Christensen, AM; Turner, AH; Hawley, JA. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2008**, *18*, 127–132.

⁶⁸ Andreadou, I; Iliodromitis, EK; Mikros, E; Constantinou, M; Agalias, A; Magiatis, P; Skaltsounis, AL; Kamber, E; Tsantili-Kakoulidou, A; Kremastinos, DT. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2213–2219.

⁶⁹ Osim, EE, Mbajjorgu, EF, Mukarati, G, Vaz, RF, Makufa, B, Munjeri, O, Musabayane, CT. *Cent. Afr. J. Med.* **1999**, *45*, 269–274.

⁷⁰ Perrinaquet-Mocchetti, T; Busahn, A; Schmidlin, C; Schmidt, A; Bradl, B; Aydogan, C. *Phyther. Res.* **2008**, *22*, 1239–1242.

antiproliferativos^{31,71,72} y proapoptóticos⁷³ sobre diferentes líneas celulares de cáncer. Por ejemplo, existen evidencias de la inhibición del crecimiento y la metástasis del cáncer de mama humano (células MCF-7) xenotransplantadas en ratones hembra ovariectomizadas.⁷⁴ Más evidencias fueron encontradas en este mismo sentido en células MDA de cáncer de mama, revelando que el efecto antimetástasis se debe a una estimulación de la expresión de genes que codifican inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs) que facilitan la invasión, y a la supresión de los genes que codifican dichas metaloproteinasas.⁷⁵

La oleuropeína no solo es un agente anticancerígeno al combatir el desarrollo del cáncer o la metástasis, sino también por su función contra procesos de angiogénesis necesarios para el crecimiento de nuevos tumores. En este sentido, Scoditti *et al.*⁷⁶ demostraron en un estudio *in vitro* con células endoteliales, que la oleuropeína y el HT impiden la formación y migración de los vasos angioblásticos vía inhibición de la metaloproteinasa MMP-9 y la enzima proinflamatoria COX-2.

⁷¹ Mao, W; Shi, H; Chen, X; Yin, Y; Yang, T; Ge, M; Luo, M; Chen, D; Qian, X. *Lat. Am. J. Pharm.* **2012**, *31*, 1217–1221.

⁷² Acquaviva, R; di Giacomo, C; Sorrenti, V; Galvano, F; Santangelo, R; Cardile, V; Gangia, S; D’Orazio, N; Abraham, NG; Vanella, L. *Int. J. Oncol.* **2012**, *41*, 31–38.

⁷³ Han, J; Talorete, TPN; Yamada, P; Isoda, H. *Cytotechnology* **2009**, *59*, 45–53.

⁷⁴ Sepporta, MV; Fuccelli, R; Rosignoli, P; Ricci, G; Servili, M; Morozzi, G; Fabiani, R. *J. Funct. Foods* **2014**, *8*, 269–273.

⁷⁵ Hassan, ZK; Elamin, MH; Daghestani, MH; Omer, SA; Al-Olayan, EM; Elobeid, MA; Virk, P; Mohammed, OB. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **2012**, *13*, 4555–4559.

⁷⁶ Scoditti, E; Calabriso, N; Massaro, M; Pellegrino, M; Storelli, C; Martines, G; De Caterina, R; Carluccio, MA. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *527*, 81–89.

1. Introducción general

También la oleuropeína ha demostrado ejercer efectos terapéuticos en el hígado. Así mismo, en ratones BALB/c (cepa de ratones albinos desarrollada por H. Bragg en 1913) con daño hepático estimulado con CCl₄, el tratamiento con oleuropeína suministrado intraperitonealmente promovió un efecto regenerador en el hígado gracias a una disminución generalizada del estrés oxidativo y a la inactivación del factor TNF- α y la enzima COX-2.⁷⁷ Dentro del grupo de las enfermedades hepáticas, la esteatosis (o hígado graso) es considerada como una de las más dañinas, sobre todo la no alcohólica, ya que puede evolucionar a fibrosis hepática.⁷⁸ Está comprobado que la suplementación con oleuropeína mitiga la esteatosis en ratones inducida por una dieta rica en grasas.⁷⁹ Además, en otro estudio también en ratones, Kim y colaboradores⁸⁰ probaron que la dieta suplementada con oleuropeína impedía la evolución de la esteatohepatitis no alcohólica a fibrosis hepática.

Algunas enfermedades neurodegenerativas ocurren tras una pérdida progresiva de la función y la estructura neuronal. El estrés oxidativo y el correspondiente daño en el ADN mitocondrial de estas células son dos factores importantes a tener en cuenta a la hora de prevenir este tipo de enfermedades.⁸¹ Así por ejemplo, la principal patología del Parkinson resulta ser la degeneración y muerte de las

⁷⁷ Domitrović, R; Jakovac, H; Marchesi, VV; Šain, I; Romić, Ž; Rahelić, D. *Pharmacol. Res.* **2012**, *65*, 451–464.

⁷⁸ Angulo, P. *New Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 1221–1231.

⁷⁹ Park, S; Choi, Y; Um, SJ; Yoon, SK; Park, T. *J. Hepatol.* **2011**, *54*, 984–993.

⁸⁰ Kim, SW; Hur, W; Li, TZ; Lee, YK; Choi, JE; Hong, SW; Lyoo, KS; You, CR; Jung, ES; Jung, CK; Park, T; Um, SJ; Yoon, SK. *Exp. Mol. Med.* **2014**, *46*, e92.

⁸¹ Lin, MT; Beal, MF. *Nature* **2006**, *443*, 787–795.

neuronas que se encuentran en la sustancia negra del cerebro medio (*se denomina sustancia negra por el pigmento oscuro de melanina que generan las neuronas en dicha zona*). Sin embargo, en un estudio *in vivo* en ratas envejecidas, la administración intraperitoneal de oleuropeína, condujo a una disminución de la oxidación lipídica de las neuronas, así como a una mayor supervivencia.⁸²

Aunque aún se desconoce la causa o etiología del Alzheimer, esta patología se caracteriza por la formación de placas β -amiloides en el tejido cerebral y la aparición de ovillos fibrilares de proteínas- τ en el interior de las neuronas. Se ha descrito la formación de un complejo entre la oleuropeína y el péptido β -amiloide 1-40 o su forma oxidada, mediante interacciones no covalentes,⁸³ lo que podría derivar en una nueva vía de investigación del tratamiento de la amiloidosis.

1.5. Lipofilia y farmacocinética de compuestos fenólicos

La bondad de los compuestos fenólicos respecto a sus propiedades beneficiosas para la salud ha quedado avalada por la gran cantidad de estudios epidemiológicos y científicos publicados. Sin embargo, a menudo existe una cierta desviación entre los resultados encontrados *in vitro* o *ex vivo*, y los obtenidos en los modelos *in vivo*. Esta discrepancia, que hace que a veces parezca que los polifenoles presenten de cierta pérdida de efectividad en su acción terapéutica, tiene que ver con su metabolismo en un organismo complejo (animal,

⁸² Sarbishegi, M; Mehraein, F; Soleimani, M. *Iran. Biomed. J.* **2014**, *18*, 16–22.

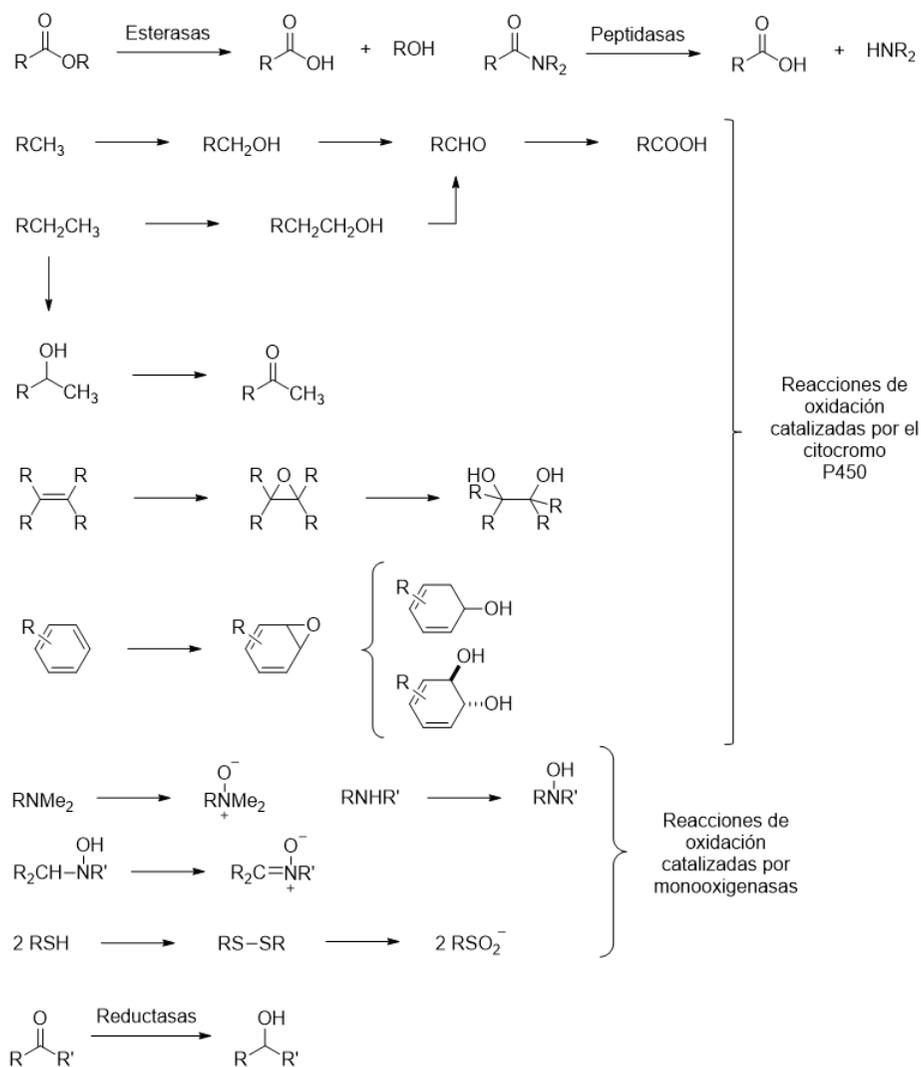
⁸³ Bazoti, FN; Bergquist, J; Markides, KE; Tsarbopoulos, A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 568–575.

1. Introducción general

incluyendo humanos) en comparación con su acción sobre otro mucho más simple (célula).

En general, para facilitar la excreción de cualquier molécula extraña, los seres vivos tendemos a aumentar la polaridad del compuesto. Con esto se consigue minimizar la absorción de las moléculas por parte de los tejidos y órganos de modo que la mayor parte del tiempo quedan disueltos en la sangre, y posteriormente se elimina por la orina. Las vías metabólicas encaminadas a esto son, la ruptura de ésteres por parte de esterasas, la oxidación de cadenas alifáticas, alquenos y anillos aromáticos por parte del citocromo P450, la oxidación de heteroátomos como N y S en las que intervienen monooxigenasas, y la reducción de carbonilos, dobles enlaces C-C, entre otras, catalizada por reductasas (y en algunos casos, por el citocromo P450) y que conforman la fase I de la excreción de fármacos (Esquema 4).⁸⁴

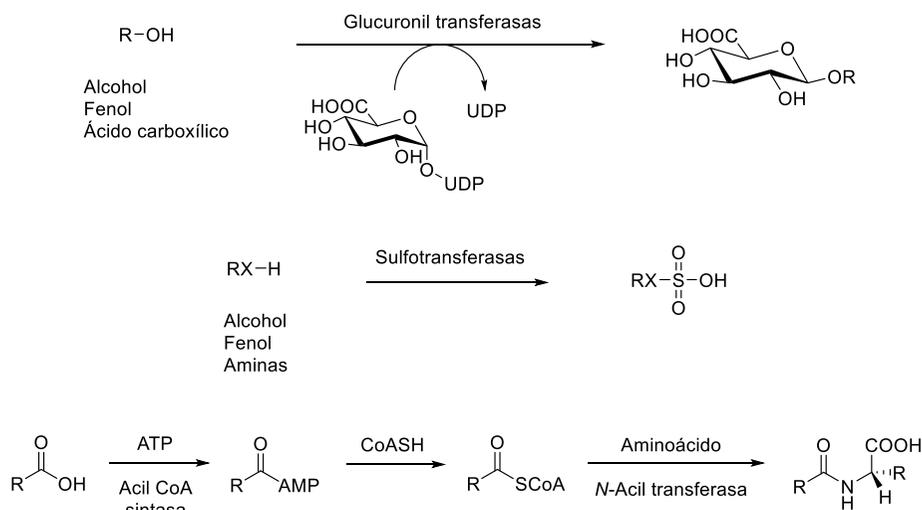
⁸⁴ Graham L, P. En *Pharmacokinetics and related topics. An Introduction to Medicinal Chemistry*, 5ª Edición; Oxford, 2013.



Esquema 4. Reacciones típicas del metabolismo de excreción de fármacos

La fase II comprende las reacciones de conjugación (sulfonación, glucuronidación y acilación) de los metabolitos procedentes de la primera fase con sulfato, ácido glucurónico y aminoácidos entre otros. Estas reacciones catalizadas por distintas transferasas, vuelven a los metabolitos mucho más polares y los inactivan por completo (Esquema 5).⁸⁴

1. Introducción general



Esquema 5. Reacciones de conjugación del metabolismo de excreción de fármacos

La rápida eliminación de estas moléculas por la orina impide desplegar parte del potencial terapéutico de los fármacos. Como ejemplo, se ha determinado que la cantidad máxima de HT en sangre es alcanzada tan sólo tras 5-10 minutos después de su ingestión vía oral, a partir del cual sufre una rápida disminución⁸⁵ como demuestra su vida media de eliminación de 2.4 h.⁸⁶

Es por ello que la modificación de la estructura de los compuestos fenólicos para convertirse en derivados más lipófilos puede suponer una interesante estrategia para solventar el problema, ya que suelen mantener las propiedades del compuesto original, y mejoran su biodisponibilidad. Su mayor lipofilia les confiere una mayor resistencia a la degradación

⁸⁵ D'Angelo, S; Manna, C; Migliardi, V; Mazzoni, O; Morrica, P; Capasso, G; Pontoni, G; Galletti, P; Zappia, V. *Drug Metab. Dispos.* **2001**, *29*, 1492–1498.

⁸⁶ Miró-Casas, E; Covas, MI; Farre, M; Fitó, M; Ortuño, J; Weinbrenner, T; Roset, P; De la Torre, R. *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 945–952.

metabólica y también los hacen más aptos para incorporarlos a alimentos de carácter lipídico, como aceites, margarinas y otros alimentos procesados ya que adquieren mayor solubilidad en la matriz en la que se incluyen además de ofrecer mejor efecto estabilizante.⁸⁷ Un ejemplo de ello son los derivados parcialmente acilados de la epigalocatequina-3-galato, que exhiben mejores valores de inhibición de la peroxidación lipídica en matrices lipídicas, y una mejor afinidad por las membranas celulares en comparación con el compuesto no acilado, lo que le permite una mejor absorción celular⁸⁸ (Figura 7).

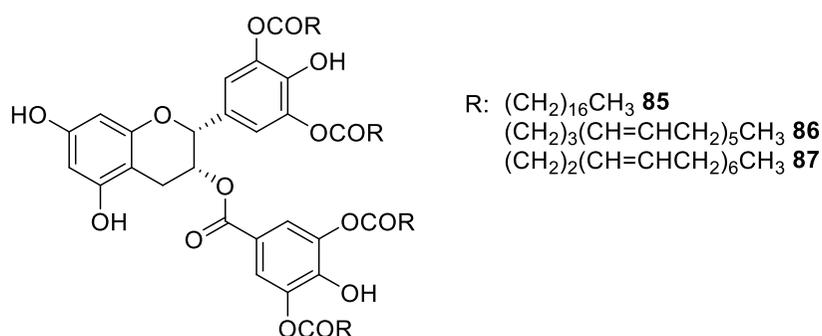


Figura 7. Estructuras de derivados lipófilos de epigalocatequina-3-galato

Un efecto parecido también se ha documentado para los ésteres de distinta longitud de cadena del hidroxitirosol.⁸⁹ De hecho, en muchas ocasiones se puede asociar un aumento en la lipofilia con una mejora en la biodisponibilidad, lo que tiene una consecuencia directa en la mejora

⁸⁷ Gupta, A; Kagliwal, LD; Singhal, RS. En *Biotransformation of Polyphenols for Improved Bioavailability and Processing Stability*. *Advances in Food and Nutrition Research*, **2013** Elsevier Vol. 69, pp 183–217.

⁸⁸ Zhong, Y; Shahidi, F. *Food Chem.* **2012**, *131*, 22–30.

⁸⁹ Medina, I; Lois, S; Alcantara, D; Lucas, R; Morales, JC. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9773–9779.

1. Introducción general

de sus propiedades biológicas como se ha comprobado en los éteres derivados del HT **88-95** (Figura 8).⁹⁰

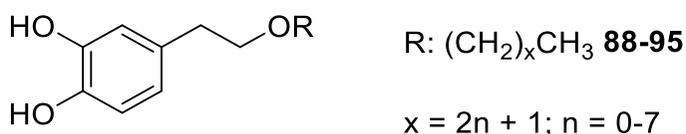


Figura 8. Alquil éteres del hidroxitirosol

En un estudio con muestras de sangre humana a los que se le indujo una fuerte coagulación, se comprobó el efecto antiagregante de los éteres del HT. Este efecto está producido por la inhibición de la producción de tromboxanos B₂, de prostaglandinas E₂ y de IL-1β, así como la inhibición de las enzimas proinflamatorias COX-2 e iNOS.⁹¹

Otros estudios demuestran una mejor actividad neuroprotectora y anticancerígena en comparación con el HT; concretamente, en un modelo *in vivo* de hipoxia-reoxigenación en ratas Wistar macho a los que se suministraron los diferentes compuestos a razón de 20 mg/kg/día durante 7 días, la administración de los éteres del HT consiguió reducir la muerte de neuronas cerebrales. La oxidación lipídica fue inhibida y la concentración de nitritos fue reducida gracias a estos éteres, lo que tuvo como consecuencia una menor producción de interleuquinas y el consecuente efecto citoprotector.⁹² Finalmente, estos éteres han sido

⁹⁰ Calderón-Montaño, JM; Madrona, A; Burgos-Morón, E; Orta, ML; Mateos, S; Espartero, JL; López-Lázaro, M. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 5046–5053.

⁹¹ Reyes, JJ; De La Cruz, JP; Muñoz-Marin, J; Guerrero, A; Lopez-Villodres, JA; Madrona, A; Espartero, JL; Gonzalez-Correa, JA. *Eur. J. Nutr.* **2013**, *52*, 591–599.

⁹² Muñoz-Marín, J; De La Cruz, JP; Guerrero, A; López-Leiva, I; López-Villodres, JA; Reyes, JJ; Espartero, JL; Madrona, A; Labajos, MT; González-Correa, JA. *J. Agric.*

ensayados como agentes citotóxicos sobre células A549 de cáncer de pulmón y en células MCF-7 de cáncer de mama, detectándose una selectividad hacia las células malignas. La combinación de una mejor inhibición de la glicolisis en las células cancerígenas, la disminución del estrés oxidativo y su efecto protector en el material genético unido a su mejor disponibilidad, parecen ser los responsables de la actividad anticancerígena de los éteres del HT (Figura 8).⁹⁰

1.6. Biocatálisis en Síntesis Orgánica mediante el uso de lipasas

Para llegar a ciertos compuestos químicos de alto valor añadido que formen parte de fármacos, alimentos, productos agroquímicos o cosméticos, es necesario en muchas ocasiones llevar a cabo una serie de transformaciones altamente regio, quimio y/o estereoselectivas.⁹³ Para ello, es habitual recurrir a largas y tediosas rutas sintéticas basadas en la protección y desprotección selectiva de ciertos grupos funcionales,⁹⁴ que suponen un gran número de etapas de síntesis, el uso de catalizadores⁹⁵ y/o reactivos^{96,97} que pueden ser caros y tóxicos.

En este contexto, la biocatálisis se convierte en una alternativa útil respecto de los métodos clásicos de Síntesis Química. Tradicionalmente, los microorganismos han sido usados como parte de

Food Chem. **2012**, *60*, 7659–7664.

⁹³ Bastian, AA; Marcozzi, A; Herrmann, A. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 789–793.

⁹⁴ Wong, CH; Zimmerman, SC. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1679–1695.

⁹⁵ Denmark, SE; Ambrosi, A. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 982–994.

⁹⁶ Yoshida, H. *ACS Catal.* **2016**, *6*, 1799–1811.

⁹⁷ Bernini, R; Mincione, E; Barontini, M; Crisante, F. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8897–8904.

1. Introducción general

la elaboración de productos comerciales aprovechando sus capacidades biológicas innatas (como por ejemplo, la fermentación con levadura se caracteriza por su alta selectividad en condiciones suaves y su bajo coste⁹⁸), seguida o no de modificaciones químicas, con el objetivo de mejorar aspectos como la actividad, la solubilidad, la absorción o la estabilidad del producto. Es por ello que en los últimos años, la biocatálisis ha experimentado un intenso desarrollo para proveer nuevos microorganismos, tanto aislados de la naturaleza, como modificados genéticamente, que generen enzimas que sean capaces de: (a) tolerar otros disolventes distintos del agua; (b) puedan permanecer soportados en distintos materiales que permitan una mayor actividad, condiciones más extremas y capacidad de reutilización; todo ello para satisfacer las necesidades de la Química Sintética y facilitar su utilización como alternativa viable.⁹⁹

Así, el uso de lipasas para dar lugar a compuestos fenólicos lipófilos puede conllevar un ahorro tanto en el número de etapas sintéticas como en lo económico, así como facilitar el uso de reactivos “verdes”. De hecho, un buen número de publicaciones de síntesis orgánica tienen que ver con el uso de lipasas, y en menor medida esterasas, sobre compuestos fenólicos para aumentar su lipofilia. Sin embargo, su uso no se encuentra tan extendido en el campo de los carbohidratos, aunque los productos de una derivatización selectiva pueden ser de gran interés debido al número de aplicaciones de estos nuevos derivados. Es bien conocido que los carbohidratos son

⁹⁸ Wohlgemuth, R; Plazl, I; Žnidaršič-Plazl, P; Gernaey, KV; Woodley, JM. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 302–314.

⁹⁹ Gupta, A; Khare, SK. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2009**, *29*, 44–54.

biomoléculas que intervienen en una amplísima variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Por ejemplo, están involucrados en procesos de señalización celular,¹⁰⁰ infección¹⁰¹ o metástasis celular,¹⁰² y poseen una importante capacidad terapéutica ya que actúan como glicomiméticos contra enfermedades metabólicas,¹⁰³ como antivirales,¹⁰⁴ anticancerígenos¹⁰⁵ o formando parte de vacunas.¹⁰⁶

Las lipasas (o triacilglicerol hidrolasas, EC 3.1.1.3) son un tipo particular de serina hidrolasas que, en principio, catalizan la hidrólisis de grasas a ácidos grasos y glicerol en la interfase entre la fase lipídica y la acuosa. Sin embargo, dependiendo de las condiciones de reacción y los reactivos que pongamos en juego, son capaces de realizar otros procesos de utilidad en síntesis como hidrólisis de ésteres, esterificaciones, transesterificaciones y transesterificaciones (Esquema 6).¹⁰⁷

¹⁰⁰ Mesnage, S; Dellarole, M; Baxter, NJ; Rouget, JB; Dimitrov, JD; Wang, N; Fujimoto, Y; Hounslow, AM; Lacroix-Desmazes, S; Fukase, K; Foster, SJ; Williamson, MP. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4269.

¹⁰¹ Craig-Barnes, HA; Doumouras, BS; Palaniyar, N. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 13461–13470.

¹⁰² Van Slambrouck, S; Groux-Degroote, S; Krzewinski-Recchi, MA; Cazet, A; Delannoy, P; Steelant, WFA. *Biosci. Rep.* **2014**, *34*, art:e00138, 546–557.

¹⁰³ López, Ó; Merino-Montiel, P; Martos-Delgado, S; González-Benjumea, A. En *Carbohydrate Chemistry. Chemical and Biological Chemistry*, **2012** RSC Vol. 38, pp. 215–262.

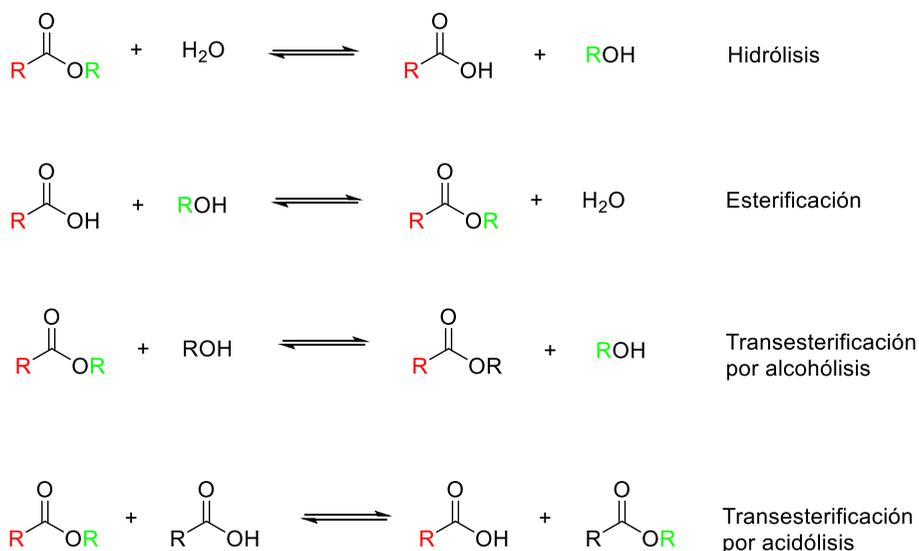
¹⁰⁴ Wang, H; Huang, W; Orwenyo, J; Banerjee, A; Vasta, GR; Wang, LX. *Bioorganic Med. Chem.* **2013**, *21*, 2037–2044.

¹⁰⁵ Pastuch-Gawolek, G; Malarz, K; Mrozek-Wilczkiewicz, A; Musiol, M; Serda, M; Czaplinska, B; Musiol, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *112*, 130–144.

¹⁰⁶ Jones, LH. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 952–960.

¹⁰⁷ Priji, P; Sajith, S; Faisal, PA; Benjamin, S. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **2016**,

1. Introducción general



Esquema 6. Reacciones catalizadas por lipasas

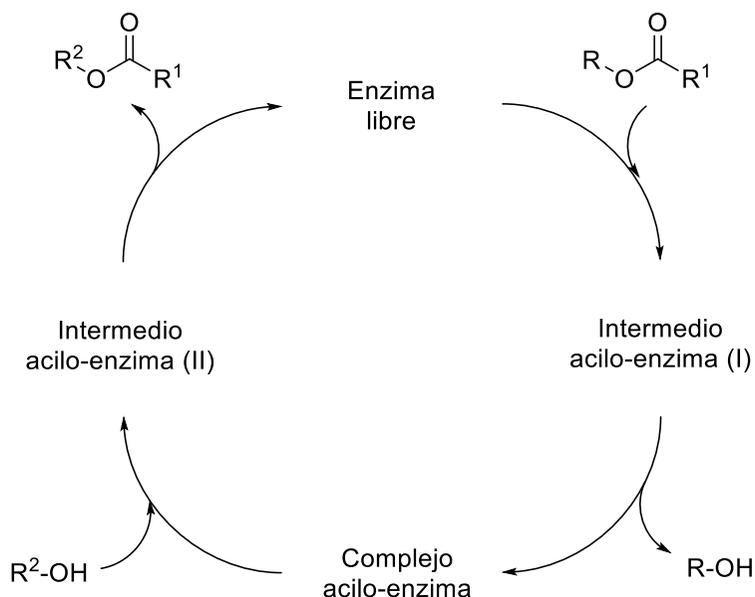
Debido a su versatilidad, las lipasas gozan de un gran número de aplicaciones en diferentes sectores de la industria, como la Farmacéutica, la Alimentaria y la industria de la Detergencia.¹⁰⁸ Su mecanismo de acción es igual al de las serina proteasas, por lo que en su sitio activo podemos encontrar la tríada de aminoácidos Ser-His-Asp/Glu responsable de la catálisis. En el caso de las lipasas, su regioselectividad puede ser explicada en base a dos factores: (a) el tamaño del sitio activo y (b) la naturaleza de la región hidrofóbica adyacente al sitio activo (serina) determinada por la posición de otros aminoácidos hidrofílicos que estabilizan al intermedio tetraédrico.¹⁰⁹ El ciclo catalítico general implica la activación de un acilo por parte de la serina y la formación de

6, 799–807.

¹⁰⁸ Villeneuve, P. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 515–536.

¹⁰⁹ Anderson, EM; Larsson, KM; Kirk, O. *Biocatal. Biotransformation* **1998**, *16*, 181–204.

un complejo acilo-enzima. En este punto, la intervención de agua o alcohol, conduce a la formación del producto final y a la regeneración de la enzima (Esquema 7).



Esquema 7. Mecanismo catalítico general de las lipasas

En el campo de la Síntesis Orgánica, la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) es con gran diferencia la más utilizada tanto sobre compuestos fenólicos como sobre otro tipo de sustratos debido a su elevada resistencia a la desnaturalización térmica.^{110,111,112} Es por ello que esta lipasa es utilizada para la síntesis de ésteres grasos de la vitamina

¹¹⁰ Ardhaoui, M; Falcimaigne, A; Ognier, S; Engasser, JM; Moussou, P; Pauly, G; Ghoul, MJ. *Biotechnol.* **2004**, *110*, 265–271.

¹¹¹ Kontogianni, A; Skouridou, V; Sereti, V; Stamatis, H; Kolisis, FN. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2003**, *21*, 59–62.

¹¹² Stevenson, DE; Wibisono, R; Jensen, DJ; Stanley, RA; Cooney, JM. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 1236–1241.

1. Introducción general

C para su uso en alimentos^{113,114} o para hacer lipofílicos algunos monosacáridos, como el ácido glucurónico,^{115,116} la glucosa¹¹⁷ y la fructosa.¹¹⁸ La acilación de aminoácidos para llegar a “lipoaminoácidos” está cobrando cierto interés para la industria cosmética¹¹⁹ debida a su acción antibacteriana, aunque su producción mediante métodos enzimáticos es complicado debido a la escasa solubilidad de los sustratos en disolventes orgánicos. Los rendimientos difícilmente superan el 20% con independencia del sustrato y la lipasa utilizada, aunque se han alcanzado algunos éxitos con CALB, como en la síntesis de homólogos de la *N*-lauroil- β -alanina.¹²⁰

El uso más común de las lipasas es la acilación de compuestos fenólicos, debido a las propiedades biológicas de estos y su vasta heterogeneidad, presentándose en forma glicosilada o libre. En bibliografía existe un gran número de trabajos, como por ejemplo la esterificación de: ácidos fenólicos procedentes del té con alcoholes

¹¹³ Stamatis, H; Sereti, V; Kolisis, FN. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 1505–1510.

¹¹⁴ Adamczak, M; Bornscheuer, UT; Bednarski, W. *Process Biochem.* **2005**, *40*, 3177–3180.

¹¹⁵ Villeneuve, P; Hills, G; Bachain, P; Pina, M; Caro, Y; Baréa, B; Guyot, B; Grüning, B; Graille, J. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104*, 394–401.

¹¹⁶ Otto, RT; Bornscheuer, UT; Scheib, H; Pleiss, J; Syldatk, C; Schmid, RD. *Biotechnol. Lett.* **1998**, *20*, 1091–1094.

¹¹⁷ Ganske, F; Bornscheuer, UT. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2005**, *36*, 40–42.

¹¹⁸ Sakaki, K; Aoyama, A; Nakane, T; Ikegami, T; Negishi, H; Watanabe, K; Yanagishita, H. *Desalination* **2006**, *193*, 260–266.

¹¹⁹ Mhaskar, SY; Lakshminarayana, G; Saisree, L. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1993**, *70*, 23–27.

¹²⁰ Izumi, T; Yagimuma, Y; Haga, M. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, *74*, 875–878.

grasos,¹²¹ acilación de alcoholes fenólicos como el HT^{122,123} y de flavonoides glicosilados como la rutina **104**¹²⁴ y la naringina **108**^{125,126} catalizada preferentemente por CALB con altas regioselectividades (Esquema 8 y 9).

¹²¹ Guyot, B; Bosquette, B; Pina, M; Graille, J. *Biotechnol. Lett.* **1997**, *19*, 529–532; Guyot, B; Gueule, D; Pina, M; Farines, V; Farines, M. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, *102*, 93–96.

¹²² Buisman, GJH; Van Helteren, CTW; Kramer, GFH; Veldsink, JW; Derksen, JTP; Cuperus, FP. *Biotechnol. Lett.* **1998**, *20*, 131–136.

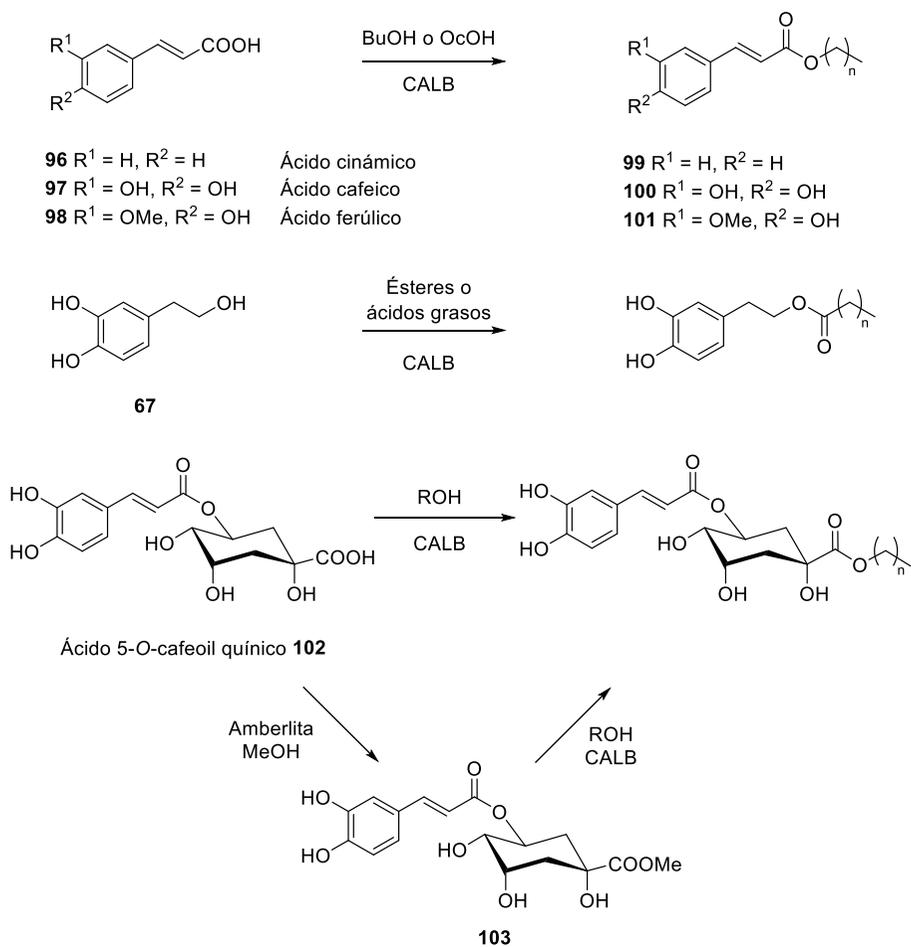
¹²³ Bouallagui, Z; Bouaziz, M; Lassoued, S; Engasser, JM; Ghoul, M; Sayadi, S. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *163*, 592–599.

¹²⁴ Xiao, YM; Wu, Q; Wu, WB; Zhang, QY; Lin, X. F. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 1591–1595.

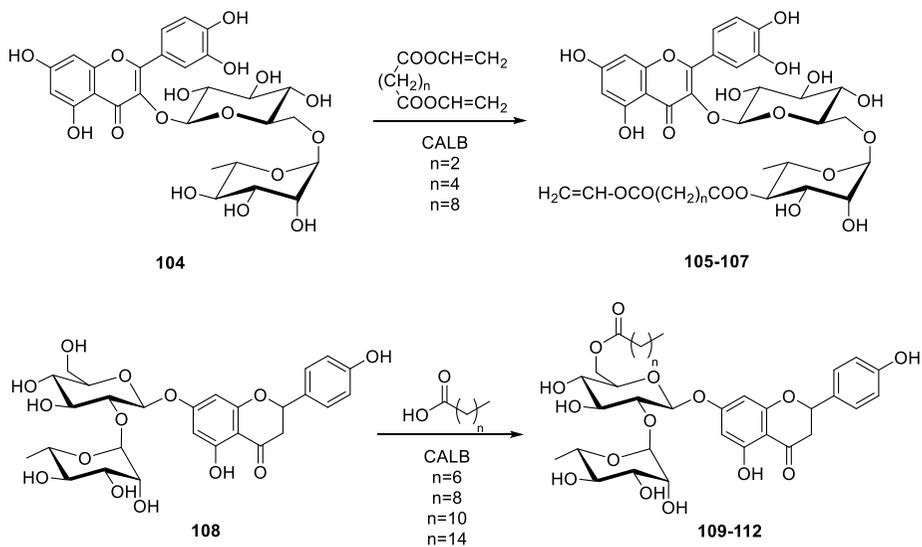
¹²⁵ Kontogianni, A; Skouridou, V; Sereti, V; Stamatis, H; Kolisis, FN. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2001**, *103*, 655–660.

¹²⁶ Gayot, S; Santarelli, X; Coulon, D. *J. Biotechnol.* **2003**, *101*, 29–36.

1. Introducción general



Esquema 8. Síntesis de ácidos y alcoholes fenólicos lipófilos catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB)



Esquema 9. Síntesis de flavonoides lipófilos catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB)

**2. SÍNTESIS DE DIACIL DERIVADOS DE
GLICOLES PROCEDENTES DEL
OLIVO. NUEVA SÍNTESIS DE 3,4-
DIHIDROXIFENILGLICOL**

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

2. SÍNTESIS DE DIACIL DERIVADOS DE GLICOLES PROCEDENTES DEL OLIVO. NUEVA SÍNTESIS DE 3,4-DIHIDROXIFENILGLICOL

En este capítulo se detalla la síntesis química de dos nuevas familias de diésteres de catecoles procedentes del olivo, una a partir del 3,4-dihidroxifenilglicol y una segunda a partir del hidroxitirosol. Así mismo, en este mismo capítulo se describe una nueva síntesis del 3,4-dihidroxifenilglicol.

2.1. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

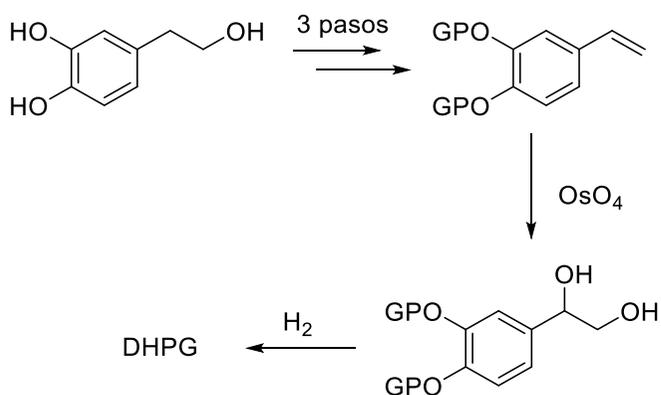
El 3,4-dihidroxifenilglicol **3** es un compuesto fenólico del olivo que se puede aislar del alperujo al igual que el HT aunque en menor proporción.^{127,45} Dicho compuesto posee una mayor capacidad antioxidante que el HT⁴⁵ sin embargo, su potencial actividad biológica aún está por explorar, posiblemente debido a su elevado coste (191.0 €/25 mg en Sigma-Aldrich) y a la inexistencia de una ruta de síntesis fácil y viable.

En este grupo de investigación se desarrolló una primera ruta de síntesis química del DHPG a partir de HT en cinco etapas mediante protección de los hidroxilos fenólicos, halogenación de la cadena lateral seguida de deshidrohalogenación y dihidroxilación con OsO₄ del vinil

¹²⁷ Fernández-Bolaños, J; Guillén-Bejarano, R; Jiménez-Araujo, A; Rodríguez-Arcos, R; Rodríguez-Gutiérrez, G. PCT Int. Appl. **2010**, WO 2010070168 A1 20100624.

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

catecol y posterior desprotección (Esquema 10).¹²⁸ Dicha ruta, aunque da acceso al producto deseado, tiene como principal inconveniente el alto precio de la materia prima (738.0 €/100 mg en Sigma-Aldrich).



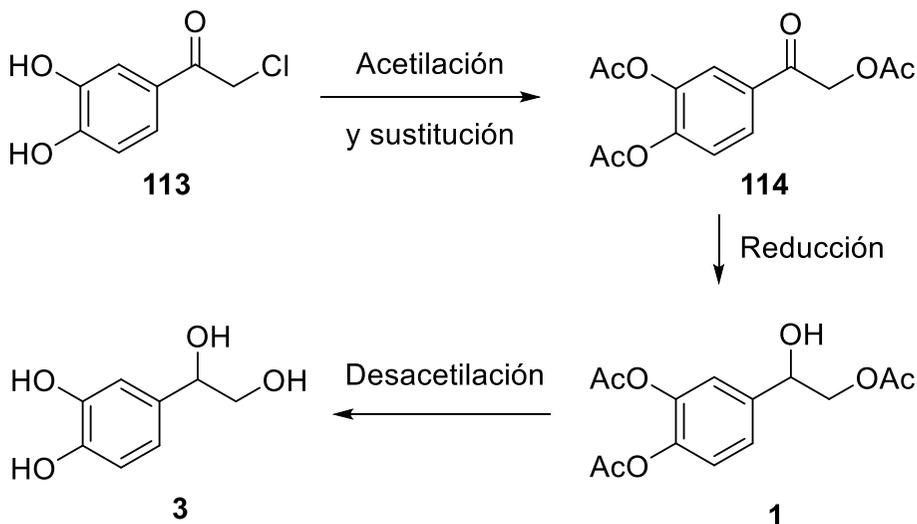
Esquema 1. Síntesis de DHPG a partir de HT

En esta tesis doctoral, hemos desarrollado una nueva metodología sintética para obtener DHPG a partir del cloruro de 3,4-dihidroxifenacilo **113**, menos costoso (87.3 €/25 g en Sigma-Aldrich) y con menor número de pasos que en la ruta anterior. La etapa clave es la reducción del grupo

¹²⁸ López-García, MA. Tesis Doctoral: “Tio y aza derivados del hidroxitirosol. Síntesis y actividad biológica.” Mayo 2011.

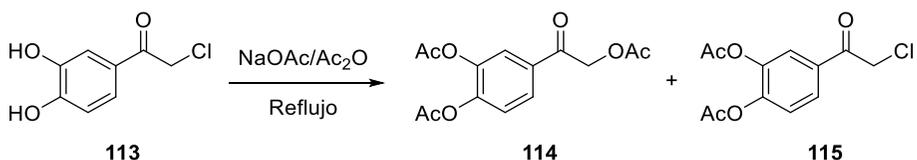
2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

carbonilo en posición bencílica del derivado **114** (Esquema 11).



Esquema 2. Propuesta de esquema de síntesis de DHPG a partir del cloruro de 3,4-dihidroxifenacilo

La síntesis del compuesto **114** partiendo del citado cloruro de fenacilo (Esquema 12) se llevó a cabo mediante una modificación del método descrito por Tozuka *et al.*¹²⁹ añadiendo 2 equiv de NaOAc en Ac₂O a reflujo durante 6 h. El proceso implica una acetilación de los hidroxilos fenólicos y una reacción S_N2 en la que el cloro se desplaza por acetato.



¹²⁹ Tozuka, H; Michikazu, O; Hisayoshi, K; Takahashi, K. *J. Wood Sci.* **2005**, *51*, 48–59.

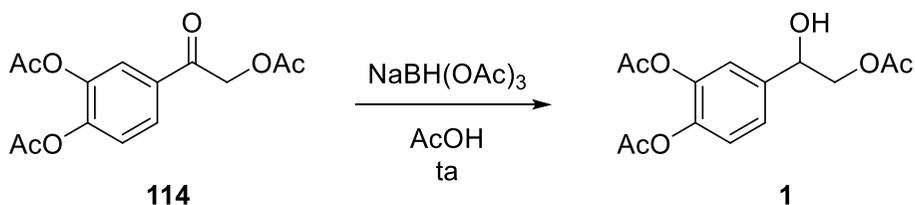
Tras separación cromatográfica del cloro derivado **115** intermedio, se obtiene el producto deseado **114**, con un rendimiento del 88%. El compuesto es fácilmente identificable por ^1H -RMN debido a un claro desapantallamiento, por encima de 7 ppm, de los protones del anillo aromático con respecto al material de partida; y por las señales de los grupos acetilos en torno a 2.2 y 2.3 ppm para los acetilos de la cadena alifática y los aromáticos, respectivamente.

La reacción de reducción entrañó más complicaciones de lo inicialmente esperado. En una primera aproximación, se intentó la reducción con distintos hidruros como NaBH_4 y $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$. El NaBH_4 resultó ser un reductor demasiado enérgico pues en todos los ensayos se detectaban, mediante cromatografía en capa fina, mezclas muy complejas de compuestos, incluso usando disolventes apróticos como el THF, variando las proporciones de reductor y su secuencia de adición. Estas mezclas pueden deberse a la conocida facilidad de los catecoles a sufrir reacciones de autooxidación hasta quinonas al pH básico generado durante la reacción.¹³⁰

Sin embargo, el uso de un reductor más suave y compatible con el medio ácido como es el $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ en AcOH glacial, permitió la reducción del carbonilo. El mejor rendimiento se obtuvo a temperatura ambiente usando tres porciones del reductor en intervalos de 10 minutos (Esquema 13).

¹³⁰ Schweigert, N; Zehnder, AJB; Eggen, R. *Environ. Microbiol.* **2001**, *3*, 81–91.

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol



Esquema 4. Reducción del carbonilo en ácido acético glacial

La reacción finaliza al cabo de 30 minutos obteniéndose el producto con un rendimiento del 55%. La estructura del compuesto se confirma en el espectro de masas, pero sobre todo por la aparición en ^1H -RMN de un doblete a 4.95 ppm que corresponde al nuevo H-1 (Figura 9). Las señales a 2.29, 2.28 y 2.10 permiten comprobar que no ha habido desacetilación en el transcurso de la reacción.

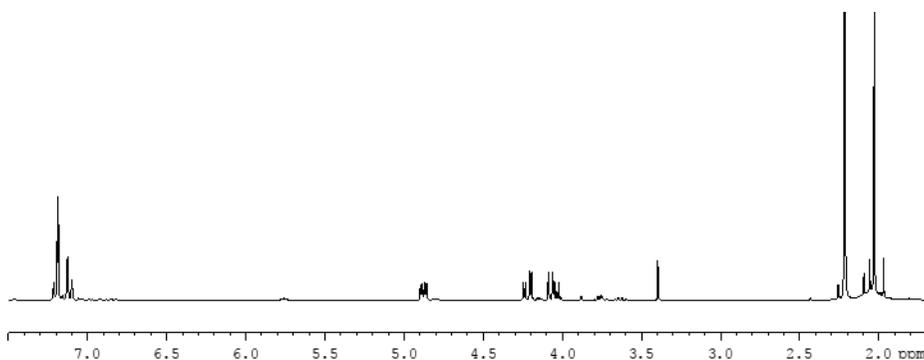


Figura 1. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) de **1** en CDCl_3

Con objeto de mejorar el rendimiento de la reacción, se intentó la reducción añadiendo los 3 equiv de NaBH(OAc)_3 desde el principio y disminuyendo la temperatura a 0 °C. Para evitar la congelación del AcOH se diluyó con THF, encontrando que la mezcla de AcOH/THF 4:1 permanecía líquida a dicha temperatura de reacción. Sin embargo, el rendimiento bajó en torno al 40% en estas nuevas condiciones debido a

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

la formación de un subproducto. Se intentó la reducción en las mismas condiciones, pero añadiendo 1 equiv de CeCl_3 , según un procedimiento análogo al descrito por Luche¹³¹ para la reducción de carbonilos conjugados a alcoholes.

Bajo estas nuevas condiciones, el crudo de reacción mostró la presencia de **1** y de un segundo producto al término de la reacción (15 min). La separación cromatográfica y los espectros de ^1H -RMN permitieron deducir que la estructura de este nuevo compuesto **116**, debía tener 4 grupos acetilo correspondientes a los 4 singuletes a 2.31-2.20 ppm, y que sorprendentemente, la molécula debería poseer un doble enlace puesto que sólo se observaba una única señal no aromática a 7.7 ppm correspondiente a un protón (Figura 10). Nótese que el conjunto de los carbonos C-1 y C-2 de este compuesto, tienen el mismo estado de oxidación que el compuesto **114**. Podemos suponer que **116** se ha formado por enolización de la cadena lateral de **114** seguido de una reacción de acetilación del hidroxilo enólico. Este compuesto no ha sido previamente descrito.

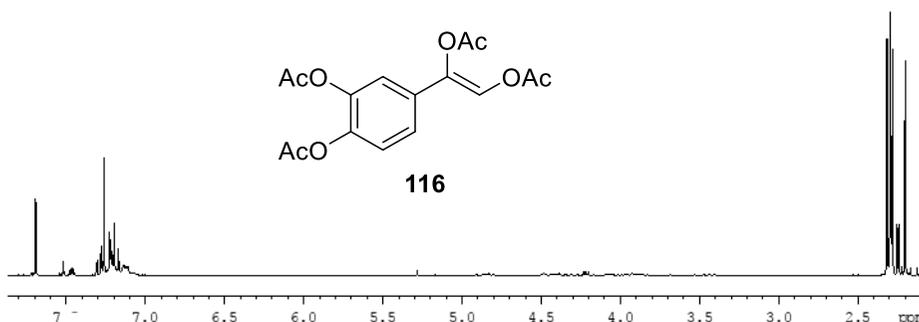
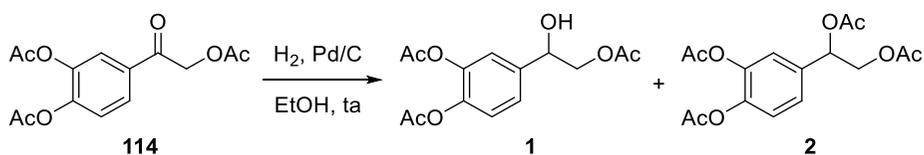


Figura 2. Espectro ^1H -RMN (300 MHz) **114** en CDCl_3

¹³¹ Luche, J.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2226–2227.

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

Cambiando de estrategia con el objetivo de maximizar el rendimiento, se optó por ensayar un método alternativo al empleo de hidruros. Se llevó a cabo la hidrogenación catalítica a presión atmosférica descrita por Jakobsen *et al.*,¹³² en la reducción de cetonas en posición bencílica usando Pd sobre carbón como catalizador. La reacción fue llevada a cabo a presión atmosférica y a temperatura ambiente hasta desaparición completa del compuesto de partida **114**. Inesperadamente, el espectro de protones del crudo de reacción mostró dos compuestos de igual naturaleza, pero con diferente grado de acetilación (Esquema 14).



Esquema 5. Reducción del grupo carbonilo de **114** mediante hidrogenación catalítica

La separación cromatográfica de ambos compuestos permitió confirmar la estructura de los productos de la reacción. Así, en el ¹H-RMN de **2** el protón H-1 se encuentra bastante más desapantallado que el correspondiente H-1 de **1** (6.01 frente a 4.95 ppm). La formación del compuesto **2** durante la reducción puede ser debido a migraciones intermoleculares de grupos acetilos sobre hidroxilos aromáticos. Además, se comprobó que pequeñas adiciones de Ac₂O a la mezcla de reacción repercutían en un aumento de la proporción del derivado tetraacetilado. Finalmente, con la adición de un equiv de Ac₂O y 0.15 equiv de Pd/C, e hidrogenando a presión atmosférica durante 6 h se

¹³² Jakobsen, P; Treppendahl, S; Andersen, PH; Klysner, R; Geisler, A; Teuber, L. *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 1962–1964.

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

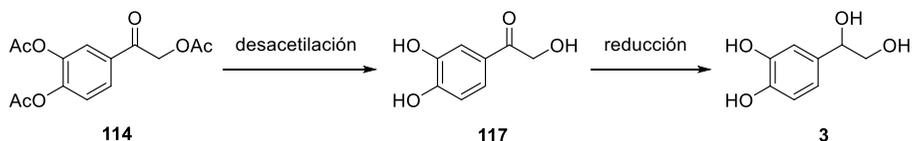
consiguió un rendimiento global del 78%, obteniéndose **1** con un 46% y **2** con un 32%.

La posibilidad de realizar la etapa de reducción mediante hidrogenación catalítica brinda una serie de ventajas: (1) es una reacción sencilla de llevar a cabo, se produce en condiciones suaves y no conlleva un cambio del pH del medio; (2) es fácilmente escalable habiéndose podido reproducir los resultados incluso en escala de gramos; (3) la aparición de dos productos **1** y **2**, no añade ninguna problemática adicional pues, en principio, es posible realizar la desacetilación sobre la mezcla sin purificación previa.

Para la desacetilación, última etapa en la ruta propuesta, se consideraron dos posibilidades: realizarla en medio básico o en medio ácido. Aunque ya se ha comentado la especial labilidad de estos compuestos en medio básico, decidimos comenzar los ensayos de desacetilación usando tres tipos de carbonatos: Cs_2CO_3 , K_2CO_3 y Na_2CO_3 , usando MeOH como disolvente. Todos los intentos resultaron ser infructuosos incluso con diferentes equivalentes de base o la adición de ascorbato sódico para minimizar los problemas de oxidación. En general, los problemas observados fueron, o bien la generación de complicadas mezclas de productos, o bien la aparición de precipitados, originados posiblemente por oxidación y/o procesos de oligomerización.

Antes de explorar la vía de la desacetilación de **1** y **2** en medio ácido, se planteó la posibilidad de intercambiar el orden de las etapas de reducción y desacetilación en la ruta general, de modo que primero se desacetilara el compuesto **114** y posteriormente se redujera hasta **3** por hidrogenación catalítica (Esquema 15).

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol



Esquema 6. Propuesta de síntesis del DHPG **3** mediante desacetilación de **114** seguida de reducción

La reacción de desacetilación para dar **117** se realizó sin problemas con rendimiento del 80% siguiendo un procedimiento descrito en bibliografía¹²⁹ consistente en una metanolisis con HCl a 50 °C durante una noche. Sin embargo, los intentos por reducir el grupo carbonilo de cetona, tanto con reductores tipo hidruro como por hidrogenación catalítica, resultaron ser fallidos por degradación del compuesto en el primer caso y por poca reactividad en el segundo.

Este hecho pudo deberse a que el carbonilo de **117** no es lo suficientemente electrófilo como para aceptar un hidruro, como puede deducirse de la contribución de la forma resonante indicada en la Figura 11, donde se observa la existencia de un efecto “push-pull” que estabiliza de forma especial a la molécula, y reduce la contribución de la forma con separación de carga C^+-O^- .

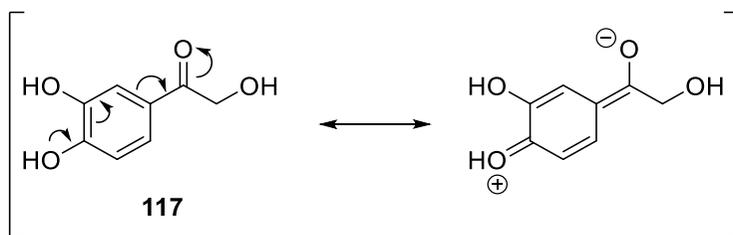


Figura 3.

Como otra alternativa a ensayar, se retomó la ruta inicial de desprotección de la mezcla de compuestos **1** y **2**, logrando realizar con

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

éxito la desacetilación mediante hidrólisis con H_2SO_4 2N durante una noche a temperatura ambiente. La purificación cromatográfica previa neutralización con NaHCO_3 condujo finalmente al compuesto deseado **3** con un rendimiento del 55%. Los espectros de RMN y masas comparados con los de la bibliografía confirmaron la desacetilación completa y la obtención del producto final (Figura 12).

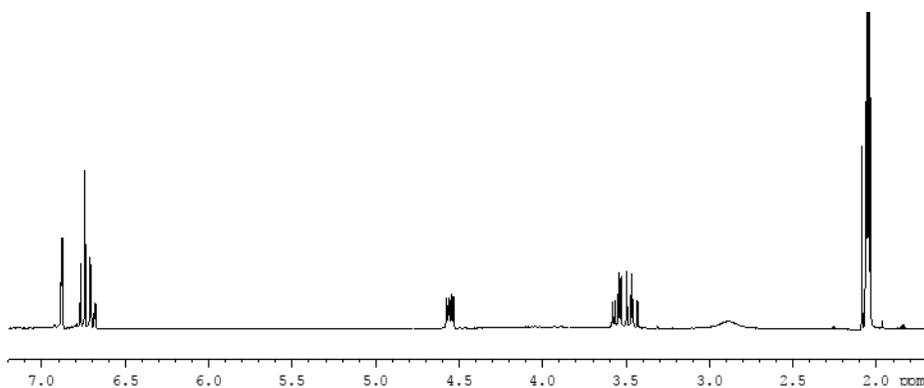


Figura 4. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) del DHPG **3** en $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

Como conclusión, mediante esta nueva aproximación sintética hemos conseguido una mejora notable en la síntesis del DHPG en tres aspectos fundamentales, ya que se ha acortado el número total de pasos de 5 a 3 pasos, se ha mejorado el rendimiento global hasta un 38%, y se ha establecido una ruta sintética, en general, mucho más ventajosa desde el punto de vista económico.

2.2. Síntesis de derivados lipófilos de glicoles procedentes del olivo

Es bien sabido que los polifenoles del olivo, y más concretamente, aquellos que se encuentran en el aceite de oliva virgen extra, poseen un número considerable de propiedades farmacológicas

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

beneficiosas, como son por ejemplo la actividad anticancerígena¹³³ y la antiinflamatoria.¹³⁴ Sin embargo, su carácter hidrófilo inherente puede ser un inconveniente en organismos vivos debido a un balance hidrófilo-lipófilo inadecuado que dificulta el ejercicio de su papel terapéutico al no atravesar fácilmente las membranas celulares impidiendo su absorción.

Es por ello que nos planteamos la síntesis de derivados de reconocida importancia biológica, pero con una lipofilia mayor con objeto de mejorar sus propiedades farmacocinéticas y su biodisponibilidad.

2.2.1. Síntesis de derivados lipófilos del 3,4-dihidroxifenilglicol

La manera más sencilla de aumentar la lipofilia de una molécula con grupos hidroxilos es mediante su transformación en ésteres. Debido a que la actividad antioxidante de estos compuestos, origen en muchos casos de su actividad biológica, la ejerce el grupo catecol, nos planteamos sólo la esterificación de los hidroxilos en la cadena lateral para obtener ésteres de distinto número de carbonos.

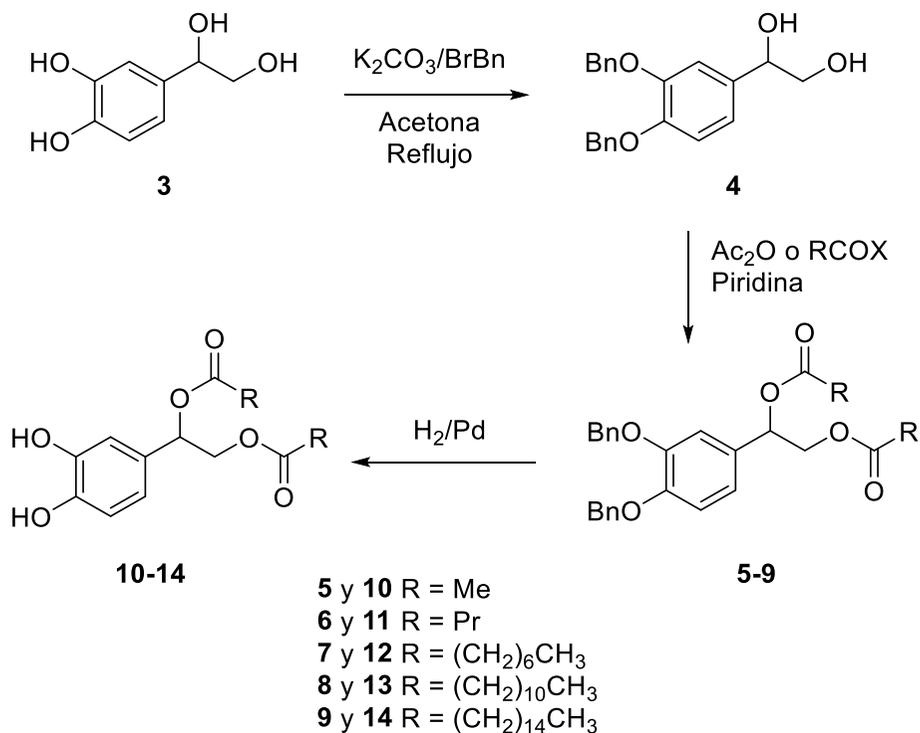
La síntesis de este tipo de derivados resulta muy sencilla desde el punto de vista teórico ya que únicamente es necesaria una etapa de protección/desprotección del catecol y otra de funcionalización (Esquema 16). Como grupo protector del catecol, encontramos que la

¹³³ Cárdeno, A; Sánchez-Hidalgo, M; Alarcón-de-la-Lastra, C. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 4758–4776.

¹³⁴ Parkinson, L; Keast, R. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 12323–12334.

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

bencilación resultaba más satisfactoria que la protección con el grupo *o*-xileno que había utilizado previamente nuestro grupo de investigación.



Esquema 7. Síntesis de los derivados lipófilos de 3,4-dihidroxifenilglicol **10-14**¹³⁵

La protección del grupo catecol por bencilación se ha llevado a cabo¹³⁶ mediante adición de 1.3 equiv de BrBn en acetona a reflujo,

¹³⁵ Aparicio-Soto, M; Sánchez-Fidalgo, S; González-Benjumea, A; Maya, I; Fernández-Bolaños, JG; Alarcón-de-la-Lastra, C. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 838–846.

¹³⁶ Madrona, A; Pereira-Caro, G; Mateos, R; Rodríguez, G; Trujillo, M; Fernández-Bolaños, J; Espartero, J. *Molecules* **2009**, *14*, 1762–1772.

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

usando como base 2 equiv de K_2CO_3 , lo que proporciona el producto dibencilado **4** con un buen rendimiento, 81%.

Se procedió entonces a la esterificación de **4** de manera convencional en piridina y usando Ac_2O o los correspondientes cloruros de ácido (cloruro de butanoilo, octanoilo, dodecanoilo, hexadecanoilo) como fuente de acilo. Esto permitió el acceso a los compuestos **5-9** con excelentes rendimientos que fueron desde el 95% hasta cuantitativos; observándose en 1H -RMN un claro desapantallamiento para los protones H-1 y H-2 en torno a 5.9 y 4.2 ppm, que permiten confirmar rápidamente la formación de los ésteres (Figura 13).

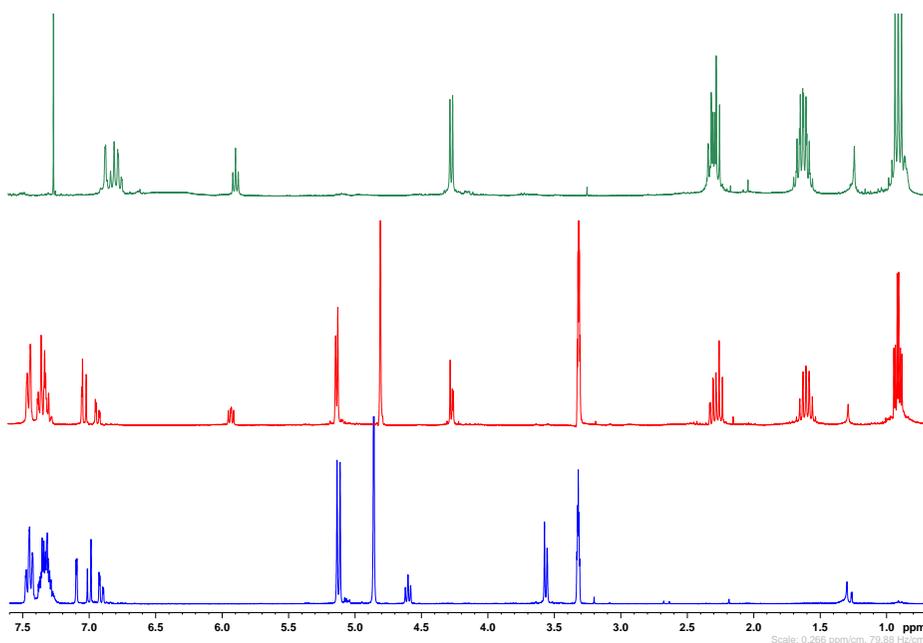


Figura 5. Espectros comparativos de 1H -RMN (300 MHz). **4** (abajo), **6** (central) y **11** (arriba)

La desprotección de los bencilos finalmente se llevó a cabo mediante hidrogenación catalítica a presión atmosférica y temperatura

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

ambiente usando Pd/C al 10% como catalizador con tiempos de reacción entre 2-15 h, obteniéndose **10-14** con rendimientos entre excelentes y aceptables (93-57%). Se comprobó que, a medida que los ésteres eran de cadena más larga, se necesitaba más cantidad de catalizador para la hidrogenación (6.5%-65% mol).

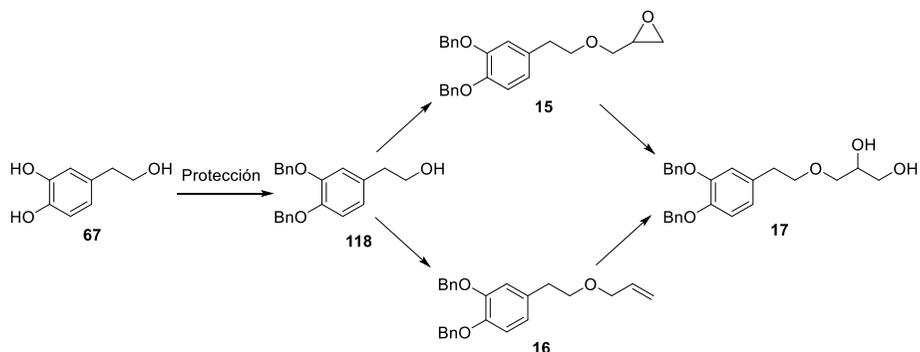
De esta forma hemos descrito el acceso a una nueva familia de derivados lipófilos del 3,4-dihidroxifenilglicol que hace uso de reacciones clásicas que además, son fáciles de realizar y escalar.

2.2.2. Síntesis de derivados lipófilos del 2,3-dihidroxi-propil hidroxitirosil éter

Nos propusimos la síntesis de análogos a los derivados lipófilos **10-14**, en los que el fragmento de glicol diacilado no estuviera unido directamente al fragmento de catecol, sino enlazado al HT mediante una función éter. En primer lugar, abordamos la síntesis del 2,3-dihidroxi-propil hidroxitirosil éter que tuviera protegido los hidroxilos fenólicos **17** para posteriormente diacilar el fragmento de glicol seguido de la desprotección del catecol.

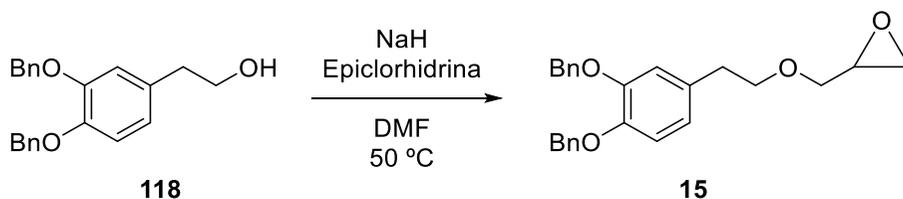
Para ello, se ensayaron dos posibles rutas de síntesis: la primera implica la formación del glicidil éter **15** seguido de la apertura del anillo de oxirano y la segunda la formación del alil éter **16** seguido de dihidroxilación (Esquema 17).

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol



Esquema 8. Síntesis del 2,3-dihidroxilpropil hidroxitirosil éter protegido en el catecol **17**

Para la protección del HT, se procedió a la bencilación según está descrito en bibliografía,¹³⁶ obteniéndose el HT di-*O*-bencilado **118** con buen rendimiento (80%). La formación del glicidil éter **15** a partir de hidroxitirosol bencilado se consiguió por sustitución nucleófila con exceso de epiclorhidrina (15 equiv) y exceso de NaH (30 equiv) en DMF seca a 50 °C obteniéndose **15** con un rendimiento del 60% (Esquema 18). La estructura de la molécula fue confirmada por EM y ¹H-RMN donde se observan los dos dobles dobletes típicos, a 3.71 y 3.36 ppm, de los epóxidos monosustituidos (Figura 14).



Esquema 9. Síntesis del glicidil éter del HT protegido

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

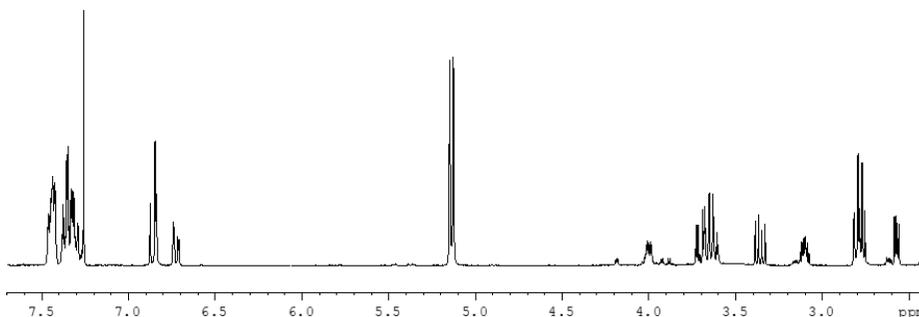
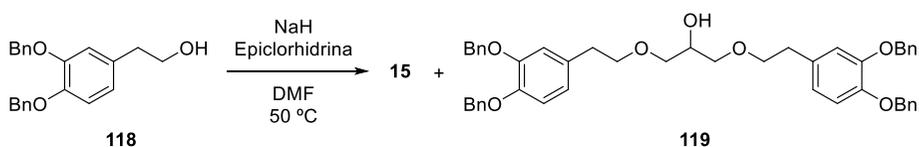


Figura 6. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) del glicil éter **15** en CDCl_3

Repetidos intentos por optimizar la reacción empleando menores cantidades de epiclorhidrina y base resultaron infructuosos obteniendo rendimientos de reacción mucho menores. Así mismo, cuando en la reacción se emplea un exceso de tan solo 3 equiv de epiclorhidrina y base, se forma además del glicidil éter **15**, un diéter simétrico **119** (Esquema 19), cuya estructura pudo determinarse con facilidad por ^1H -RMN, debido a la aparición de un multiplete para 1 protón a 4.04 ppm y a un doblete ancho a 3.70 ppm para 4 protones, que corresponden al fragmento de glicerol del nuevo compuesto. En estas condiciones, se consiguió obtener el compuesto **15** con un 32% de rendimiento y el **119** con un 27%.



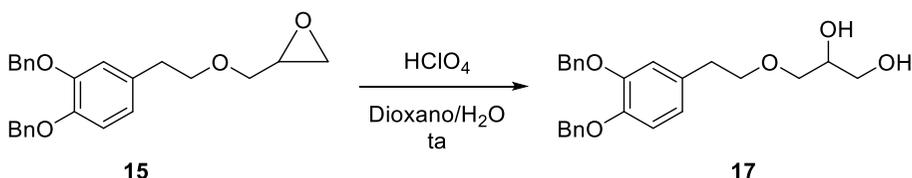
Esquema 10. Formación del glicidil éter **15** junto con el diéter simétrico del glicerol **119**

Este resultado está relacionado con el menor exceso de epiclorhidrina cuando se genera *in situ* el alcóxido derivado de **118**. El

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

glicidil éter es mayoritario cuando el alcóxido se encuentra con un gran exceso de epiclorhidrina, y se consume antes de que ataque al fragmento de oxirano de **15**. Por el contrario, si el exceso no es suficiente, el alcóxido remanente puede atacar al anillo de oxirano del glicidil éter **15** formado, dando como resultado el diéter **119**.

Una vez optimizada la formación del glicidil éter se procedió a la apertura del oxirano catalizada por ácido para obtener el diol **17** correspondiente. Dicha síntesis fue realizada de manera exitosa (69%) empleando una metodología similar a la utilizada por Row *et al.*¹³⁷ (Esquema 20) y que consiste en la adición de HClO₄ en dioxano/agua 2:1 (v/v) a temperatura ambiente durante 24 h.

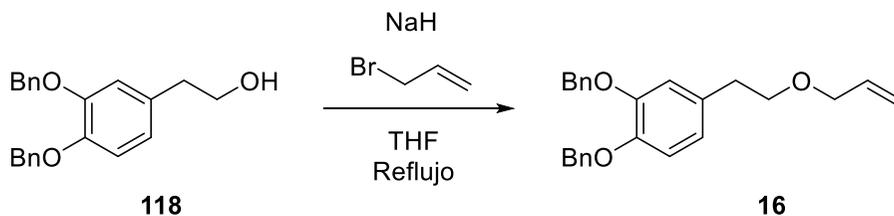


Esquema 11. Síntesis de 2,3-dihidroxilpropil hidroxitirosil éter **17** mediante apertura de epóxido

Por otro lado, se procedió a explorar una segunda vía con objeto de determinar la ruta más ventajosa. La síntesis del *O*-alil derivado **16** a partir del di-*O*-bencil hidroxitirosol **118** se realizó de manera eficaz por tratamiento de **118** con bromuro de alilo en THF a reflujo en presencia de hidruro de sodio (Esquema 21), tal y como se confirmó mediante EM y RMN. En el ¹H-RMN de **16** se observa el complejo sistema de spin correspondiente a la presencia del grupo alilo (Figura 15).

¹³⁷ Row, EC; Brown, SA; Stachulski, AV; Lennard, M. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1604–1610.

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol



Esquema 12. Síntesis alil hidroxitirosil éter protegido en el catecol **16**

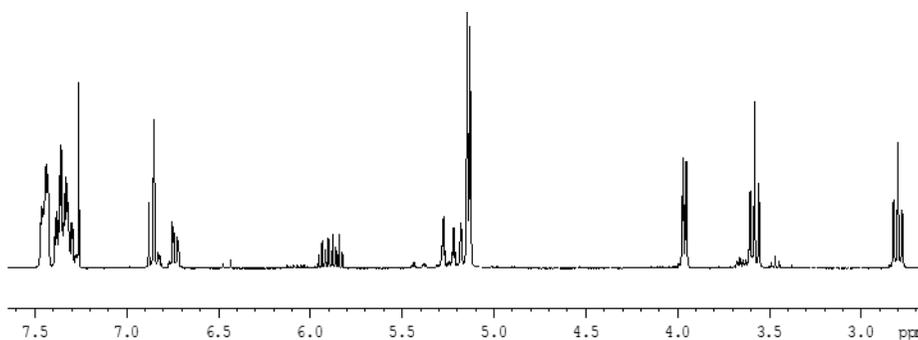
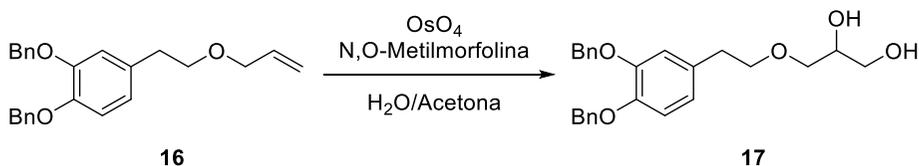


Figura 7. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) del alil éter **16** en CDCl_3

La conversión del compuesto **16** en el glicol **17** (Esquema 22) fue llevada a cabo mediante dihidroxilación de Upjohn, siguiendo el método desarrollado por Van Rheenen *et al.*¹³⁸

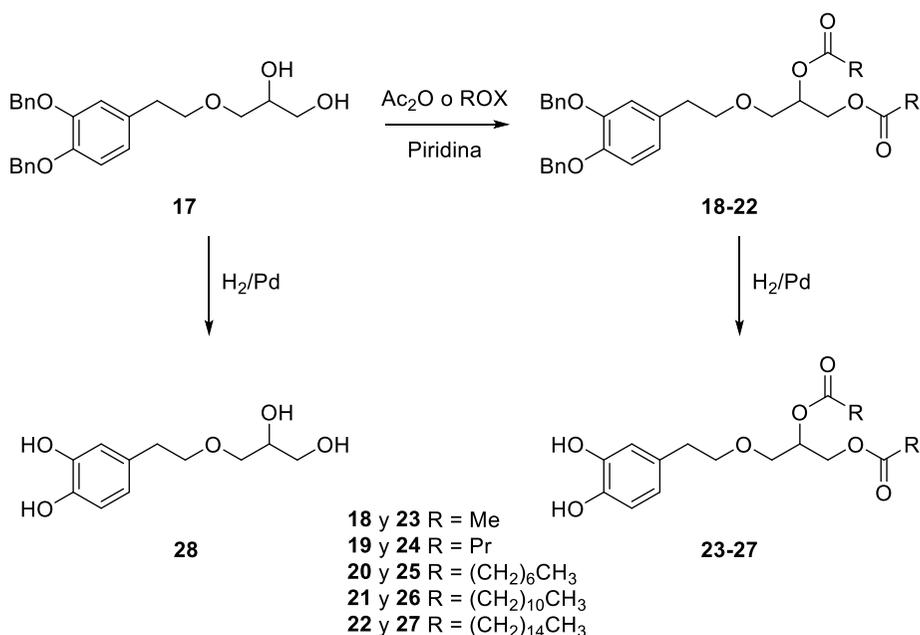


Esquema 13. Síntesis 2,3-dihidroxilpropil hidroxitirosil éter protegido en el catecol **17** mediante dihidroxilación del grupo vinilo

¹³⁸ Van Rheenen, V; Kelly, RC; Cha DY. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 1973–1976.

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

La reacción transcurrió en 5 h a temperatura ambiente con un rendimiento del 75%, quedando así patente la conveniencia de la vía de la dihidroxilación como mejor ruta para llegar al diol. La acilación convencional (con anhídrido acético o con cloruro de butanoilo, octanoilo, dodecanoilo y hexadecanoilo) nos proporcionó los derivados diacilados y bencilados **18-22** y la posterior eliminación de los grupos bencilos por hidrogenólisis (Esquema 23), condujo a la formación de los correspondientes nuevos derivados lipófilos de HT **23-27**.



Esquema 14. Síntesis de los nuevos derivados lipófilos de HT

Los rendimientos obtenidos en las reacciones de acilación de **17** fueron entre buenos y excelentes (de 80% a cuant.), confirmándose sus estructuras mediante EM y RMN, siendo de nuevo característico en ¹H-RMN el desapantallamiento de los protones del fragmento de glicerol desde 3.6-3.4 ppm a 5.2-4.1 ppm. En cuanto a las hidrogenólisis, dichas reacciones se realizaron eficazmente a temperatura ambiente y presión

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

atmosférica en 12 h obteniéndose los compuestos **23-27** con rendimientos entre 81% y cuant. (Figura 16). Podemos añadir que, siguiendo una metodología análoga a la usada para los derivados del 3,4-dihidroxifenilglicol **3**, hemos preparado una segunda y novedosa familia de diésteres lipófilos de HT.

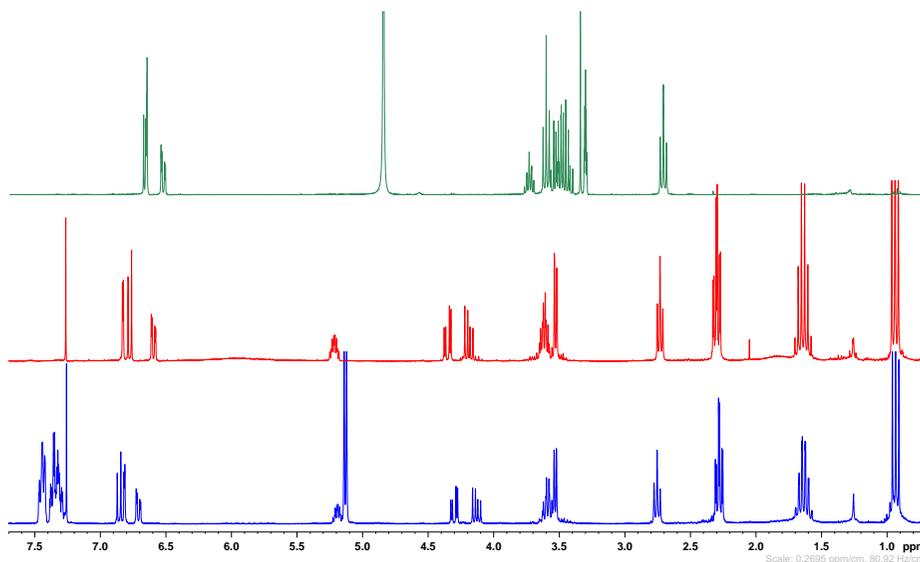


Figura 8. Espectros comparativos de ^1H -RMN (300 MHz) en CDCl_3 . **19** (abajo), **24** (central) y **28** (arriba)

Cabe destacar que los compuestos **23-27** poseen una estrecha analogía estructural con los derivados de diacilgliceroles que forman parte de los lípidos de las membranas celulares, lo cual puede hacer que contribuyan especialmente a su protección y a facilitar procesos de transporte hacia el interior de las células.

Además, si la hidrogenólisis se realiza sobre el 2,3-dihidroxipropil derivado **5**, se obtiene con buen rendimiento (92%) el 2,3-dihidroxilpropil hidroxitirosil éter **28**. Este compuesto puede ser considerado un derivado dihidroxilado del propil hidroxitirosil éter el

2. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

cual ha mostrado un excelente efecto protector en células hepáticas humanas HepG2 frente al estrés oxidativo inducido por *tert*-butil hidroperóxido.¹³⁹ Debido a esto, sería de gran interés comparar la actividad biológica de **28** con su análogo propil hidroxitirosil éter con objeto de analizar la influencia de los dos hidroxilos y el correspondiente aumento de la hidrofilia en sus propiedades.

¹³⁹ Pereira-Caro, G; Sarriá, B; Madrona, A; Espartero, JL; Goya, L; Bravo, L; Mateos, R. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5964–5976.

**3. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE
DERIVADOS LIPÓFILOS DE
COMPUESTOS FENÓLICOS Y
CARBOHIDRATOS**

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

3. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE DERIVADOS LIPÓFILOS DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y CARBOHIDRATOS

El presente capítulo se ha realizado en colaboración con el grupo de investigación de la Profesora Encarnación Mellado, del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, en el marco del proyecto de investigación “Extremozimas Lipolíticas como Catalizadores Regioselectivos útiles en la Síntesis de Carbohidratos y Polifenoles Lipófilos” (P11-CVI-7427), concedido por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresas de la Junta de Andalucía.

Nuestro objetivo era el aislamiento y caracterización de extractos enzimáticos con capacidad lipolítica procedentes de microorganismos, concretamente bacterias, que producen enzimas de tipo lipasas y/o esterases excretándolas hacia el exterior de la célula (exoenzimas) para obtener una fuente de lípidos.¹⁴⁰

Con dichos extractos, se pretendió estudiar su viabilidad como catalizadores en reacciones de síntesis orgánica para así tener acceso a nuevos compuestos con potencial actividad biológica. En una segunda etapa, una vez detectados los mejores extractos enzimáticos, se procedería, en el grupo de la Prof. Mellado, al aislamiento de la secuencia de aminoácidos para su posterior traducción inversa, clonación del gen en *E. coli* y purificación de las proteínas recombinantes producidas. Esto daría acceso a enzimas puras, lo que podría derivar en

¹⁴⁰ Macrae, A. R. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1983**, *60*, 291–294.

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

posibles mejoras en el rendimiento de las reacciones, así como la posibilidad de determinar la verdadera actividad enzimática para un determinado sustrato.

3.1. Procedencia y descripción general de las lipasas

Todos los extractos enzimáticos usados en esta tesis proceden de microorganismos recogidos de diferentes industrias del campo de la alimentación, y siempre relacionados con ambientes grasos como por ejemplo, almazaras de aceite, conserveras de pescado o secado y curado de jamón.

Se cultivaron los microorganismos que contenían cada una de las muestras recogidas para someterlas luego a diferentes *screenings* o cribado que permitieron evaluar su actividad lipolítica.^{141,142,143} Una vez se identificaron los mejores candidatos, se recogían los sobrenadantes conteniendo las enzimas y se purificaban mediante diálisis. Finalmente, los extractos dializados se liofilizaban resultando en un polvo fino y blanco, fácilmente manipulable y apto para su pesada y uso en reacciones químicas.

Los extractos enzimáticos nativos, así como las lipasas comerciales utilizadas en esta Tesis doctoral fueron las siguientes:

¹⁴¹ Teng, Y; Xu, Y. *Anal. Biochem.* **2007**, 363, 297–299.

¹⁴² Escobar-Niño, A; Luna, C; Luna, D; Marcos, AT; Cánovas, D; Mellado, E. *PLoS One* **2014**, 9e104063.

¹⁴³ Sánchez-Barrionuevo, L; González-Benjumea, A; Escobar-Niño, A; García, MT; López, O; Maya, I; Fernández-Bolaños, JG; Cánovas, D; Mellado, E. *PLoS One* **2016**, 11e0166561.

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

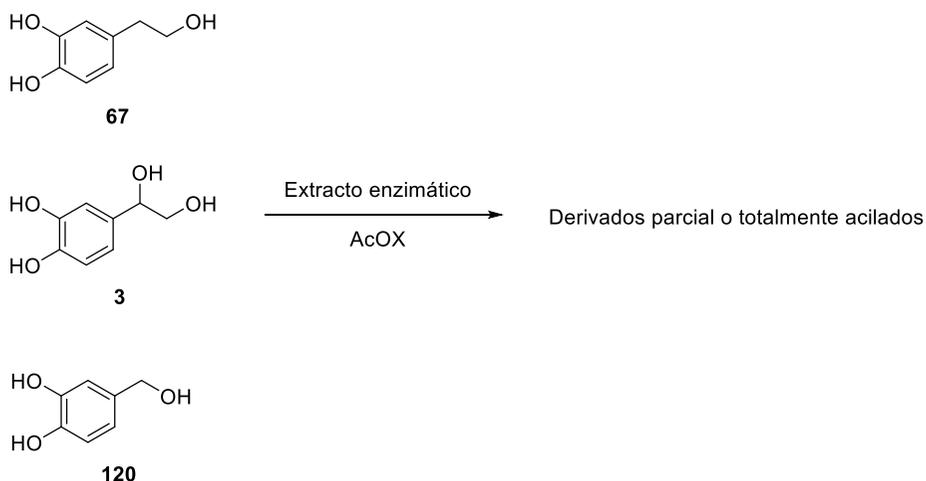
Abreviatura	Microorganismo	Procedencia
HR21-6	<i>Bacillus pumilus</i>	Nativa
1B89	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Nativa
2B122	<i>Terribacillus goriensis</i>	Nativa
2B120	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Nativa
CALB	<i>Candida antarctica</i>	Sigma-Aldrich
BCL	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Sigma-Aldrich
TLL	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Sigma-Aldrich

Tabla 1. Enzimas utilizadas en reacciones de acilación/desacilación

3.2. Reacciones de acetilación de polifenoles procedentes del olivo

Las primeras reacciones planteadas fueron las de transesterificación de grupos acetilo procedentes del acetato de isopropenilo a polifenoles con potencial y/o reconocida actividad biológica tomando como modelo tres compuestos fenólicos del olivo: hidroxitirosol, 3,4-dihidroxifenilglicol y alcohol protocatecuico (Esquema 24).

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos



Esquema 1. Reacciones enzimáticas de *O*-acilación

Estas reacciones de acilación nos permitirían determinar la regioselectividad de las lipasas nativas en este tipo de sustratos.

Para comenzar, se optó por optimizar las condiciones para el caso de la acetilación del hidroxitirosol. Las condiciones de reacción fueron similares a las utilizadas por Torres de Pinedo *et al.*,¹⁴⁴ pero en lugar de usar como agente acilante y disolvente el acetato de etilo, decidimos usar acetato de isopropenilo ya que, tras la transesterificación, dicho reactivo libera al medio acetona y no un alcohol, lo que provoca un desplazamiento del equilibrio hacia los productos.

Las primeras reacciones, usando una relación extracto/sustrato 1:1 en peso, mostraban una conversión global pobre tras 24 h de reacción. Aun así, no se apreciaba una mezcla de productos compleja. Decidimos añadir Celita® (tierra de diatomeas o kieselguhr) con la

¹⁴⁴ Torres de Pinedo, A; Peñalver, P; Rondón, D; Morales, JC. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7654–7660.

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

esperanza de que realizara una función de soporte para las lipasas que aumentara su actividad, tal y como han reportado otros autores.¹⁴⁵ El resultado observado, usando una relación extracto/sustrato/Celita 1:1:1 en peso, es que se producía una mayor evolución de la reacción disminuyendo la cantidad de reactivo de partida, pero con una distribución de productos muy similar a la que se producía en ausencia de Celita.

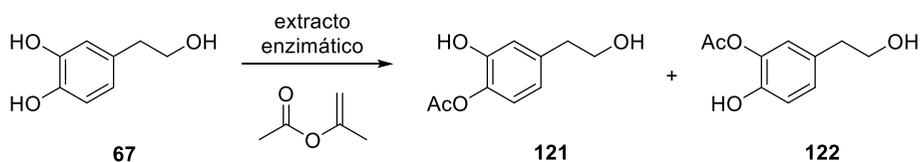
Este hecho puede deberse a que entre la enzima y la Celita existan una serie de interacciones no covalentes que provoquen la adopción de una conformación más adecuada de la proteína, junto con un posible aumento del área interfacial sustrato/lipasa.¹⁴⁶

En general, mediante TLC se podían distinguir una fracción mayoritaria más polar, el acetato de hidroxitirosilo **29** y a un número indeterminado de compuestos más apolares y minoritarios. La purificación cromatográfica en AcOEt-ciclohexano de uno de los ensayos permitió el aislamiento de la fracción mayoritaria, cuyo análisis por RMN de protón y carbono nos llevó a la conclusión de que se obtenían los dos regioisómeros acetilados en el catecol (Esquema 25) en relación 2:1 (**121:122**).

¹⁴⁵ Bastida, A; Sabuquillo, P; Armisen, P; Fernández-Lafuente, R; Huguet, J; Guisán, JM. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *58*, 486–493.

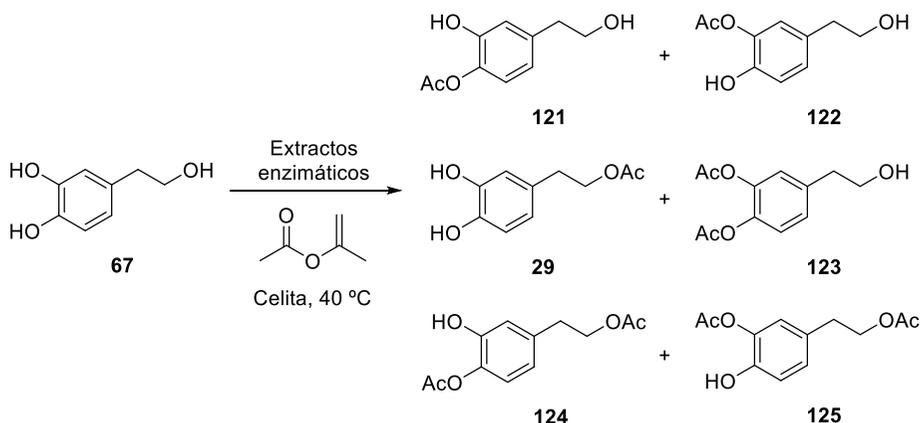
¹⁴⁶ Adlercreutz, P. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6406–6436.

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos



Esquema 2. Productos mayoritarios de la reacción de acetilación catalizada por extractos enzimáticos

La acilación del HT con acetato de isoprenilo catalizada por los distintos extractos de lipasas fueron cuantificados mediante el análisis por $^1\text{H-RMN}$ de las distintas mezclas de reacción tras 24 h (Esquema 26 y Figura 17).



Esquema 3. *O*-Acetilación de HT **67** catalizada por extractos enzimáticos^{143,147}

¹⁴⁷ Escobar-Niño, A; Sánchez-Barrionuevo, L; Cánovas, D; Mellado, E; González-Benjumea, A; López, Ó; Maya, I; Fernández-Bolaños, JG. Bacterial strains and the uses thereof in acylation and/or deacylation reactions. WO2015169980 A1, 2015.

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

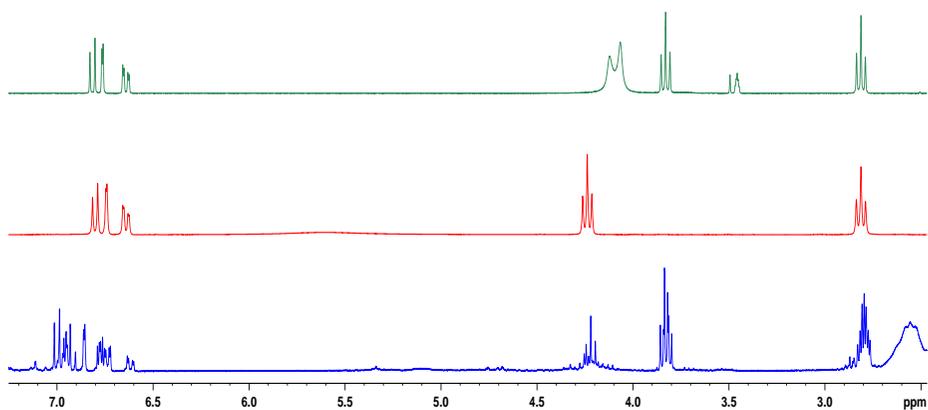


Figura 1. Espectros comparativos de ^1H -RMN (300 MHz) de la acetilación catalizada por extractos enzimáticos. HT **66** (arriba), HTAc **29** (central) y crudo de reacción (abajo)^{143,147}

Teniendo como referencia los espectros y por separado de **67**, **121** + **122** y **29**, se identificaron las señales de **124** y **125** pudiendo de esta manera realizar la cuantificación de las distintas reacciones de acilación tal y como se muestra en la Tabla 2.

Compuesto	2B122	1B89	2B120	HR21-6	CALB
67	8%	12%	6%	4%	-
121	36%	34%	44%	38%	-
122	20%	16%	23%	21%	-
29	19%	21%	11%	18%	100%
123	2%	2%	3%	3%	-
124	10%	9%	5%	9%	-
125	5%	6%	8%	7%	-

Tabla 2. Conversión medida por ^1H -RMN de la *O*-acetilación catalizada por extractos enzimáticos^{143,147}

De los datos recogidos de la tabla 2 podemos deducir que:

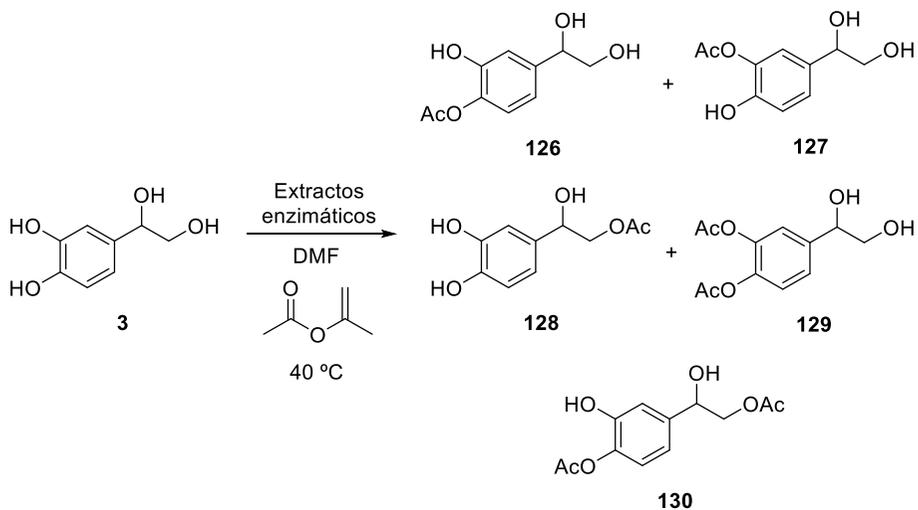
3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

1. El uso de la Celita es conveniente para esta reacción debido a que el grado de conversión del HT es elevado, situándose entre el 88% para el *Enterobacter* y el 96% para el *Bacillus*.
2. El grado de regioselectividad es bajo.
3. Los productos mayoritarios son los derivados monoacetilados **121**, **122** y **29**.
4. De los derivados monoacetilados, los mayoritarios son los regioisómeros acetilados en el catecol **121** y **122**, que suman rendimientos entre el 50% obtenido con *Enterobacter* y el 67% con *Pseudomonas*.
5. Parece existir cierta preferencia por la acetilación en la posición *para* del anillo aromático, ya que es el producto mayoritario en casi todos los casos, tanto en los mono como en los diacetilados.

Para las *O*-acetilaciones del 3,4-dihidroxifenilglicol **3**, nos vimos obligados a usar DMF para solubilizar el reactivo de partida ya que el acetato de isopropenilo no era lo suficientemente polar. De hecho, usando exactamente las mismas condiciones de reacción empleadas para el HT, apenas se observó reacción.

La DMF conseguía disolver incluso el extracto enzimático, por lo que también se prescindió de la Celita. Los primeros resultados mostraron una distribución de productos análoga a la obtenida con HT, con la salvedad de que el grado de conversión no era tan elevado. Los crudos de reacción se analizaron por RMN tras 24 h de reacción, obteniéndose así los siguientes resultados (Esquema 27, Figura 18 y Tabla 3).

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos



Esquema 4. *O*-Acetilación de DHPG **3** catalizada por extractos enzimáticos^{143,147}

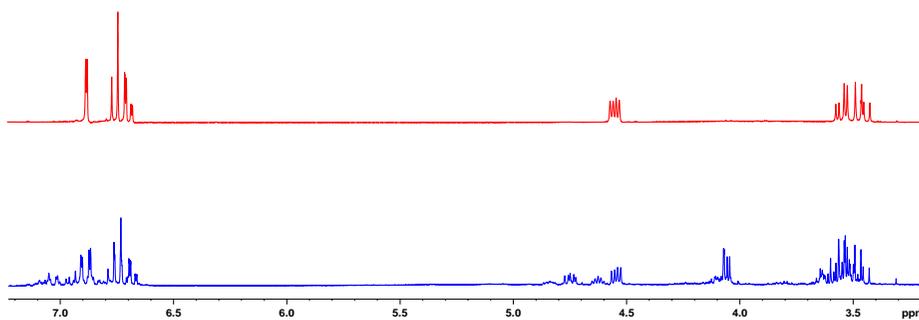


Figura 2. Espectros comparativos de ¹H-RMN (300 MHz) de la acetilación catalizada por extractos enzimáticos. DHPG **3** (arriba) y crudo de reacción (abajo)^{143,147}

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

Compuesto	2B122	1B89	2B120	HR21-6	CALB
3	39%	30%	32%	34%	47%
126	17%	16%	14%	12%	10%
127	16%	16%	13%	11%	10%
128	15%	18%	22%	23%	20%
129	7%	11%	10%	11%	7%
130	7%	9%	9%	9%	6%

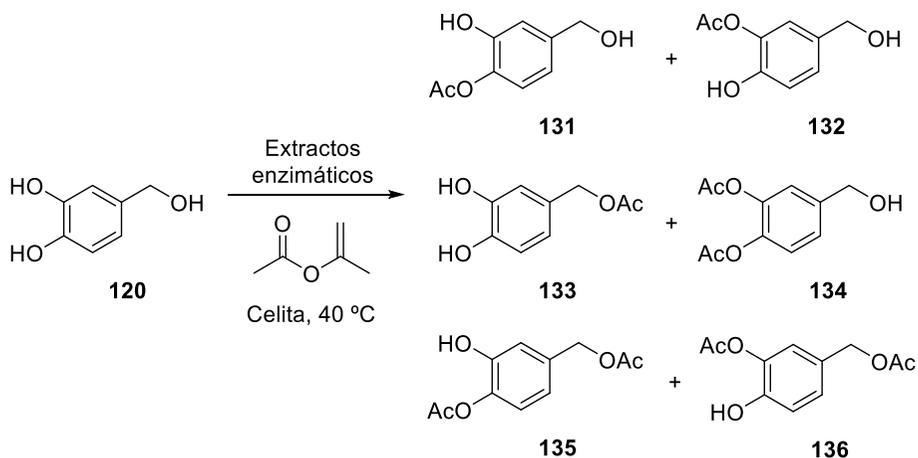
Tabla 3. Conversión medida por $^1\text{H-RMN}$ de la *O*-acetilación catalizada por extractos enzimáticos^{143,147}

Con estos datos podríamos afirmar que:

1. El DHPG es peor sustrato que el HT, dado que el grado de conversión es sensiblemente menor, situándose entre un 61% para el *Terribacillus* y un 70% para el *Enterobacter*.
2. Al igual que con el HT, la regioselectividad es pequeña, siendo los derivados monoacetilados, los mayoritarios.
3. La suma de los regioisómeros monoacetilados en el catecol **126** y **127**, sigue siendo la fracción mayoritaria seguida del monoacetilado en la cadena alifática, siguiendo una tendencia análoga al HT.
4. No se detectan compuestos que presenten el grupo acetilo sobre el hidroxilo benílico.

Finalmente, las reacciones con el alcohol protocatecuico **120** pudieron realizarse según las condiciones utilizadas para el HT al no existir problemas de solubilidad del sustrato en el agente acilante. Al igual que en los casos anteriores, se pudo determinar mediante $^1\text{H-RMN}$ la proporción en la que se forman los distintos derivados parcialmente acetilados (Esquema 28, Figura 19, Tabla 4).

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos



Esquema 5. *O*-Acetilación del alcohol protocatecuico **120** catalizada por extractos enzimáticos^{143,147}

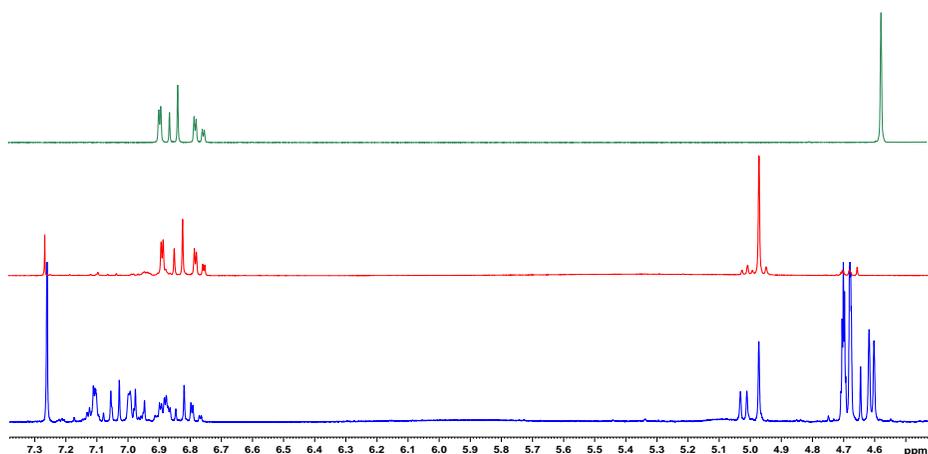


Figura 3. Espectros comparativos de ¹H-RMN (300 MHz) de la acetilación catalizada por extractos enzimáticos. Alcohol protocatecuico **120** (arriba), alcohol protocatecuico monoacetilado **133** (central) y crudo de reacción (abajo)^{143,147}

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

Compuesto	2B122	1B89	2B120	HR21-6	CALB
120	22%	12%	10%	10%	-
131	22%	24%	35%	27%	5%
132	19%	20%	29%	23%	-
133	20%	24%	13%	21%	82%
134	3%	1%	2%	1%	-
135	7%	10%	6%	9%	9%
136	7%	9%	5%	9%	-

Tabla 4. Conversión medida por $^1\text{H-RMN}$ de la *O*-acetilación catalizada por extractos enzimáticos ^{143,147}

De los valores mostrados en la Tabla 4 se deduce que:

1. El grado de conversión se sitúa en una posición intermedia entre los obtenidos para el HT y el DHPG, con valores entre el 78% para el extracto procedente del *Terribacillus* y el 90% para los extractos de la *Pseudomonas* y el *Bacillus*.
2. En relación a la regioselectividad, se observa de nuevo que los productos mayoritarios son los monoacetilados en el anillo aromático **131** y **132**.

Como resumen, las lipasas bacterianas estudiadas parecen tener una moderada preferencia por la acilación en el anillo aromático. Esta regioselectividad contrasta con la que presentó la CALB sobre el HT y el alcohol protocatecuico, con la que se consigue acetilar preferentemente el hidroxilo alifático. Curiosamente, esta lipasa no resultó ser eficaz en la acetilación del DHPG.

3.3. Reacciones de acetilación en carbohidratos

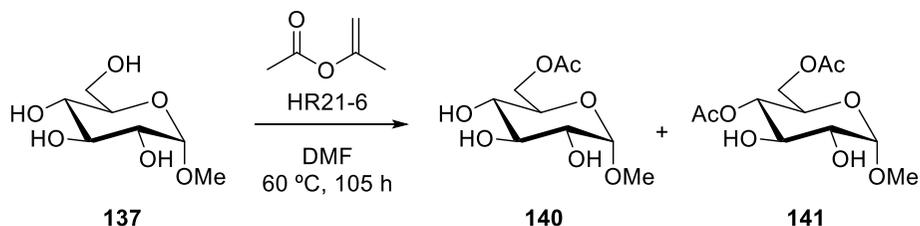
De manera similar a lo realizado sobre compuestos fenólicos, primeramente se exploró la actividad catalítica de los extractos lipolíticos suministrados por el grupo de la Prof. Mellado en la *O*-acetilación en mono y disacáridos para así obtener información de la regioselectividad de dichas reacciones quimioenzimáticas. Para ello, se seleccionaron como modelo tres carbohidratos no reductores totalmente desprotegidos: la metil α -D-glucopiranosido **137**, la α,α -trehalosa **138** y la sacarosa **139**.

De manera similar a lo realizado para la acetilación del DHPG **3**, se usó DMF como disolvente debido a problemas de solubilidad con el agente acilante y acetato de isopropenilo como dicho agente acilante.

Para los dos disacáridos **138** y **139**, incluso con tiempos de reacción largos (200 h) y temperaturas relativamente altas para este tipo de reacciones (60 °C); no sólo se observó un bajo grado de conversión, sino también una baja regioselectividad que se traducía en una mezcla compleja de productos.

Únicamente con el glucopiranosido **137** se obtuvo un éxito moderado ya que, aunque el grado de conversión de la *O*-acetilación no era elevada tras 100 h a 60 °C, la regioselectividad sí fue aceptable cuando se empleó el extracto procedente de *Bacillus pumilus* (Esquema 29), observándose sólo la formación del monoderivado acetilado en *O*-6 **140** y el diacetilado en *O*-4 y *O*-6 **141** en relación 1:2.8, tal y como se dedujo del espectro de $^1\text{H-RMN}$ del crudo de reacción (Figura 20).

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos



Esquema 6. *O*-Acetilación del metil α -D-glucopiranosido **137** catalizada por el extracto enzimático procedente de *Bacillus pumilus*¹⁴⁷

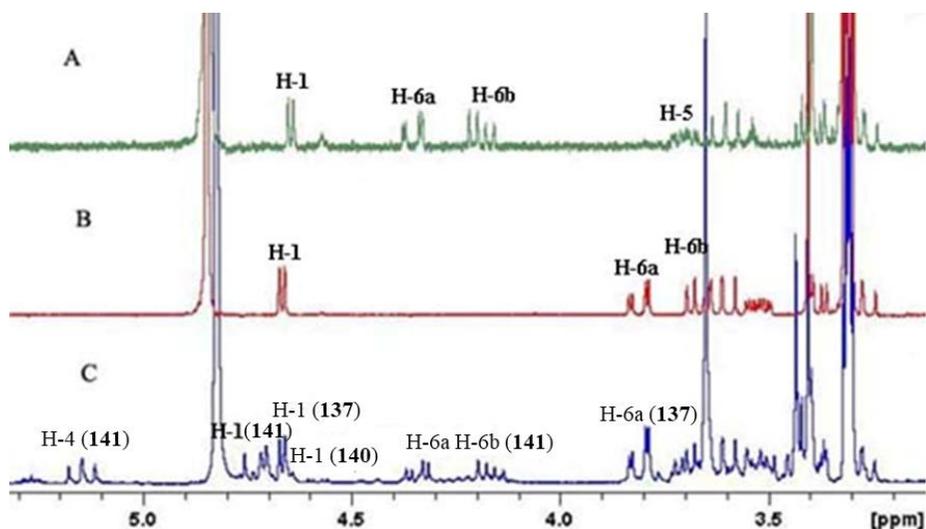


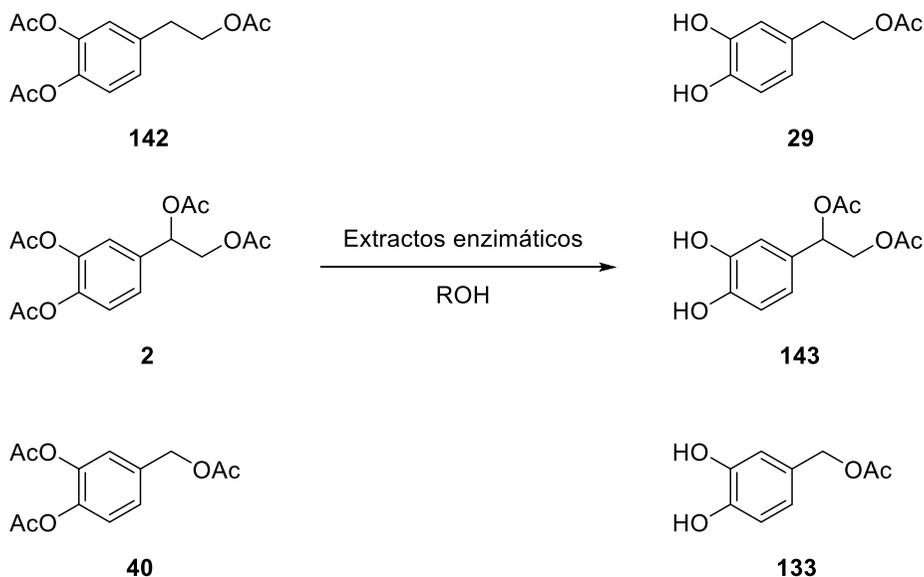
Figura 4. Espectro parcial comparativo de ^1H -RMN (500 MHz) de la acetilación del metil α -D-glucopiranosido **137**. Compuesto **140** (A), compuesto **137** (B), crudo de reacción (C)

3.4. Reacciones de desacetilación en polifenoles procedentes del olivo

Explorada la vía de la acetilación con las lipasas nativas y concluyendo que su baja regioselectividad dificultaba el aislamiento de derivados parcialmente acetilados, nos propusimos analizar la eficacia de dichas lipasas en reacciones de *O*-desacetilación, en presencia de metanol, de los derivados peracetilados **142**, **2** y **40**, derivados de HT, DHPG y alcohol protocatecuico, respectivamente. Como las reacciones

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

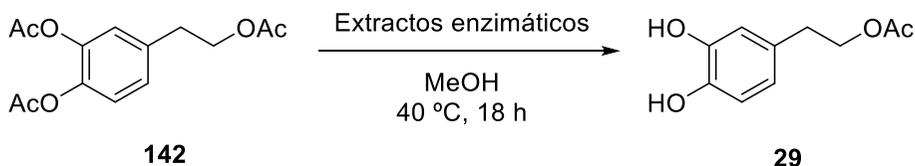
de acetilación habían ocurrido preferentemente sobre los hidroxilos del fragmento de catecol, cabía pensar que la desacetilación también se diera en mayor medida en dichas posiciones, de tal forma que los productos acetilados en la cadena lateral **29**, **143** y **133** fueran los mayoritarios (Esquema 30).



Esquema 7. Productos esperados de la *O*-desacetilación quimioselectiva sobre los derivados peracetilados

De hecho, la reacción de *O*-desacetilación del HT peracetilado **142** demostró ser totalmente quimioselectiva para los acetilos aromáticos, obteniéndose como se había previsto, el correspondiente derivado monoacetilado **29** con excelentes rendimientos (90% a cuantitativo) para los extractos de todas las cepas (Esquema 31), lo que permite utilizar ese procedimiento con fines preparativos.

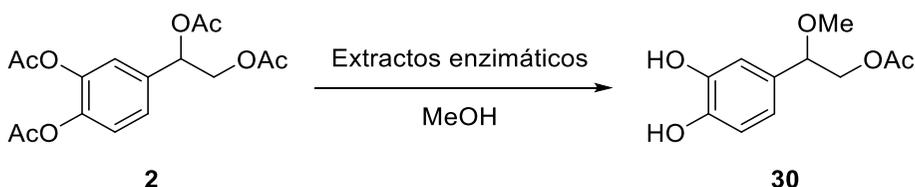
3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos



Esquema 8. *O*-Desacetilación regioselectiva del HT peracetilado **142** catalizada por extractos enzimáticos^{143,147}

Sin embargo, la desacetilación del compuesto **2** empleando MeOH condujo a un derivado inesperado. En las primeras reacciones, durante la monitorización mediante TLC, se observó tras un periodo de reacción de 24 h, no sólo un producto de reacción sensiblemente más polar, sino que también quedaba sin reaccionar gran cantidad de producto de partida. No obstante, si la reacción de metanólisis se llevaba a cabo en presencia de gel de sílice, se observaba la casi desaparición del producto de partida y la formación de un único producto.

Tras analizar dicho producto por RMN y masas, se dedujo que la estructura del compuesto no era la del diacetilado **143** esperado, sino la de **30**, formado por la sustitución en la posición benéfica del grupo acetoxi por el grupo metoxi junto con la metanólisis de los dos acetatos del anillo aromático (Esquema 32).



Esquema 9. *O*-Desacetilación regioselectiva del DHPG peracetilado **2** catalizada por extractos enzimáticos

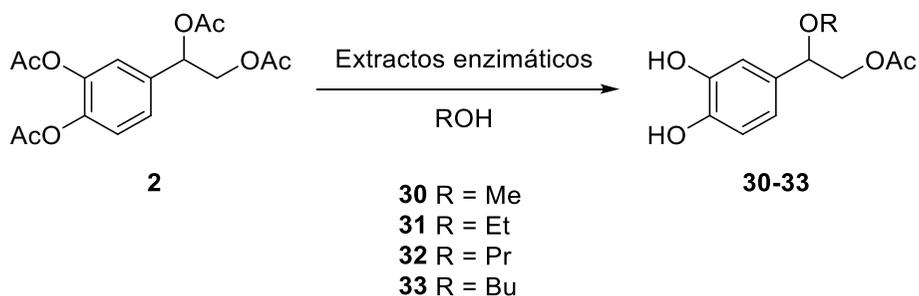
3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

Adicionalmente, se comprobó que el calentamiento a reflujo del peracetilado **2** en metanol conteniendo gel de sílice, no promueve reacción alguna, por lo que se concluye que ésta no induce *per se* el proceso, aunque sí aumenta considerablemente la actividad catalítica de los extractos enzimáticos empleados. De hecho, si las reacciones se realizaban en presencia de una cantidad de gel de sílice en peso el doble de la cantidad de sustrato **2**, se llegaba a una conversión completa en favor de **30**, el cual pudo ser aislado del medio de reacción con rendimientos del 90% después de usar el extracto de *Terribacillus* y del 72% con el extracto de *Bacillus*. Este aumento en el grado de conversión de la reacción está en concordancia con los resultados obtenidos por Bellot *et al.* en reacciones de transesterificación mediadas por lipasas cuando se emplean sustratos adsorbidos en gel de sílice,¹⁴⁸ pudiendo ser explicado debido al papel ejercido por la sílica como reservorio de intermedios de reacción polares.

Esta reacción pudo ser extendida a otros alcoholes alifáticos, siendo necesarios mayores tiempos de reacción y mayores cantidades de extracto enzimático a medida que el alcohol aumentaba en número de carbonos. Los intentos de reacción con alcoholes secundarios fueron infructuosos (Esquema 33, Tabla 5).

¹⁴⁸ Bellot, JC; Choisnard, L; Castillo, E; Marty, A. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, 28, 362–369.

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos



Esquema 10. Reacciones quimioenzimáticas sobre **2** catalizada por extractos enzimáticos^{143,147}

Compuesto	2B122 (<i>Terribacillus</i>)			HR21-6 (<i>Bacillus</i>)		
	E/S	t (h)	Rto (%)	E/S	t (h)	Rto (%)
30	2:1	72	90	1:1	48	79
31	2:1	98	52	1:1	24	55
32	2:1	168	40	1:1	48	57
33	2:1	168	44	1:1	48	61

Tabla 5. Condiciones de reacción y rendimientos de productos aislados en la *O*-desacetilación de **2**. Todas las reacciones se hicieron en presencia de sílica gel en relación 2:1 (p/p) respecto del sustrato **2**^{143,147}

Las estructuras fueron confirmadas por EM y RMN siendo características en los espectros de protones, las señales correspondientes a la cadena lateral entre 4.0 y 4.5 ppm, junto con las señales del grupo alcoxilo (Figura 21).

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

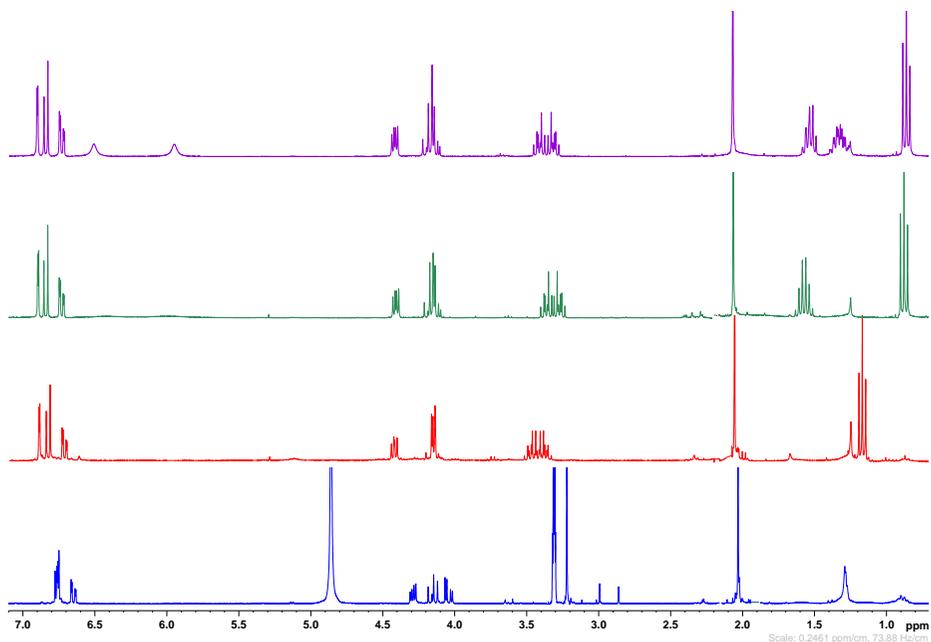


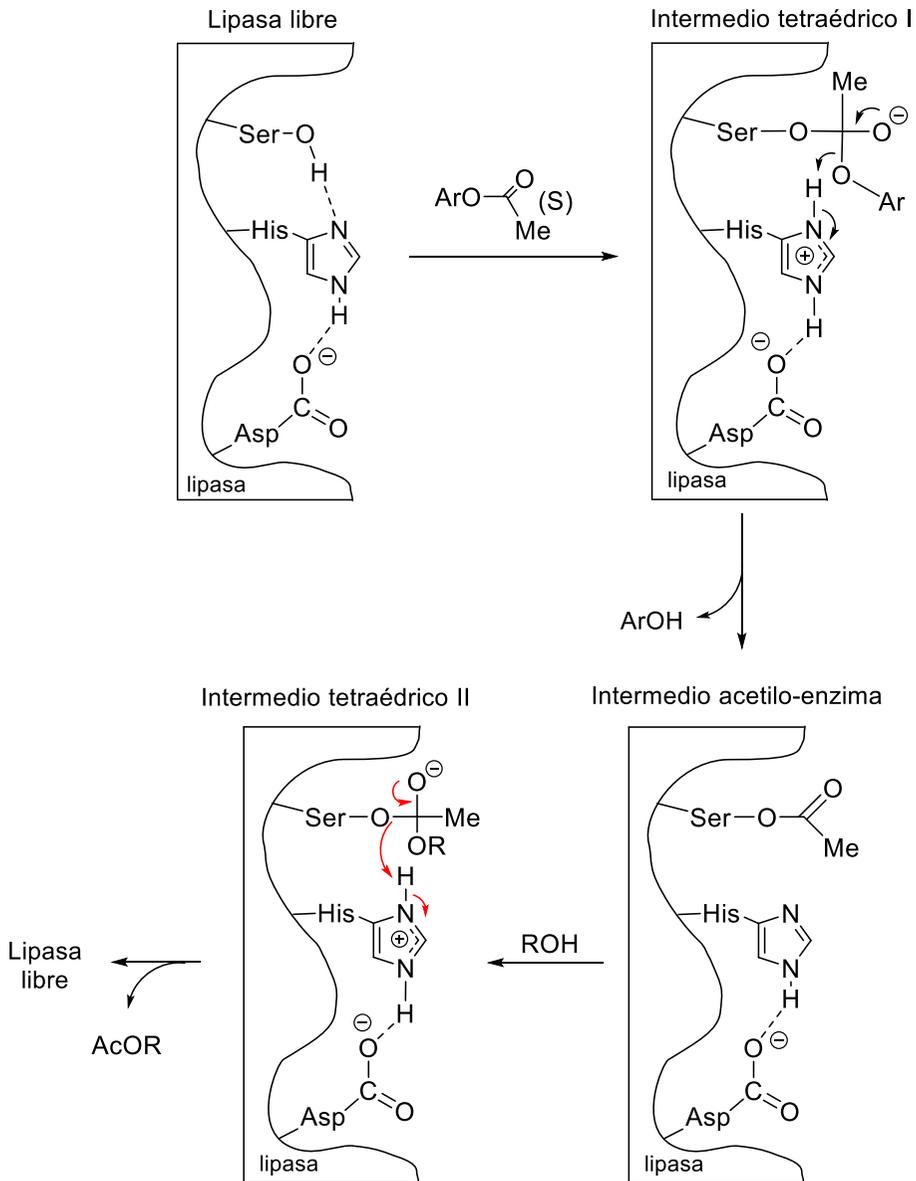
Figura 5. Espectros comparativos de ^1H -RMN (300 MHz) de la *O*-desacetilación de **2**. En orden ascendente: **30-33**

Por tanto, tras la reacción enzimática, no sólo se produce desacetilación quimioselectiva de los acetilos aromáticos respetando el acetilo sobre el extremo de la cadena lateral, sino también la sustitución de un grupo acetoxi en posición bencílica por un grupo alcoxilo. En primer lugar, el proceso de transesterificación debe transcurrir a través de un mecanismo generalmente aceptado que incluye la participación de una tríada de residuos de Ser-His-Asp,¹⁴⁹ donde el grupo $-\text{OH}$ de la serina (Esquema 34) actúa como nucleófilo atacando al grupo carbonilo del acetilo aromático para llegar al intermedio tetraédrico (I). El acetilo queda sobre el $-\text{OH}$ de la serina (intermedio acetilo-enzima) y se libera la molécula desacetilada ArOH con ayuda de su protonación por el residuo de histidina (Esquema 34).¹⁴³ A través del intermedio tetraédrico

¹⁴⁹ Kobayashi, S. *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2010**, *86*, 338–365.

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

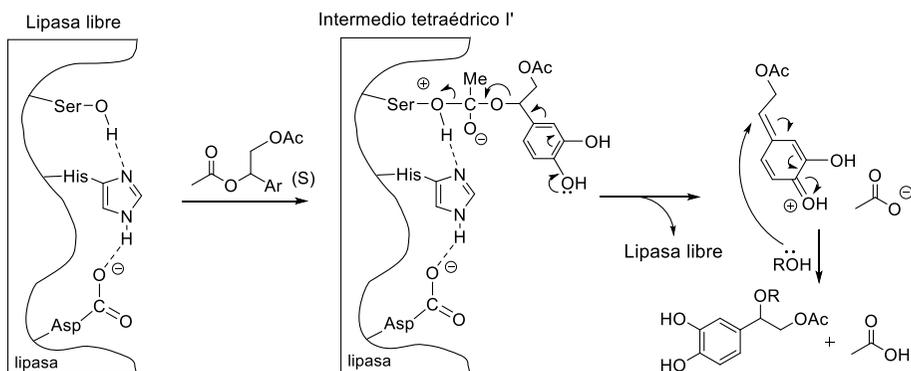
II se explica la regeneración de la enzima y la acetilación del alcohol en la transesterificación.



Esquema 11. Mecanismo de *O*-desacetilación catalizada por lipasas

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

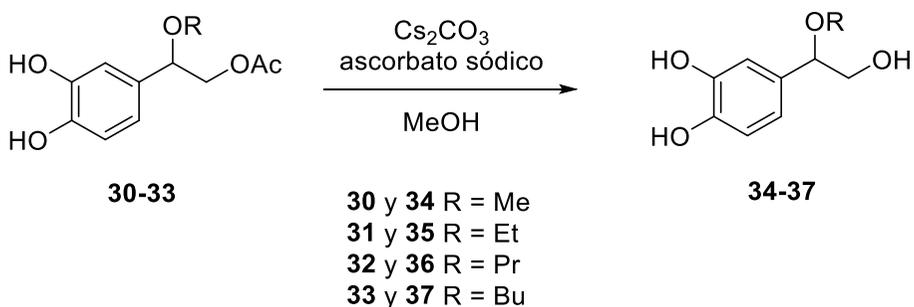
Por otro lado, una posible explicación para el proceso de alcoholólisis pueda partir de un intermedio tetraédrico análogo a (I), pero considerando el grupo acetilo en posición bencílica (Esquema 35). Dicho intermedio tetraédrico (I'), generado a partir de un ataque nucleófilo del residuo de la serina al carbonilo en posición bencílica, que podría evolucionar hacia la expulsión de un grupo acetoxi (AcO^-) como consecuencia del efecto electrón donante del hidroxilo fenólico en posición *para*. En consecuencia, se formaría un intermedio catiónico oxocarbenio muy polar que puede adicionar una molécula de alcohol obteniéndose el producto de sustitución.¹⁴³



Esquema 12. Mecanismo propuesto de formación del éter en posición bencílica, catalizada por lipasas

Debido a que la desacetilación del grupo acetilo en el extremo de la cadena alifática no fue posible con ninguna de las lipasas ensayadas, llevamos a cabo dicha reacción con Cs_2CO_3 en MeOH y en presencia de 1 equiv de ascorbato sódico con objeto de minimizar la degradación por oxidación durante la desacilación básica (Esquema 36).

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos



Esquema 13. Desacetilación química de los éteres de DHPG

Si bien los rendimientos fueron de discretos a moderados (31%-65%), esta vía nos dio acceso a los éteres de DHPG **34-37** totalmente desacetilados. Las estructuras de los compuestos fueron determinadas mediante RMN y EM observándose la ausencia de grupos acetilos con el consiguiente apantallamiento de los protones H-2 hasta 3.65 ppm (Figura 22).

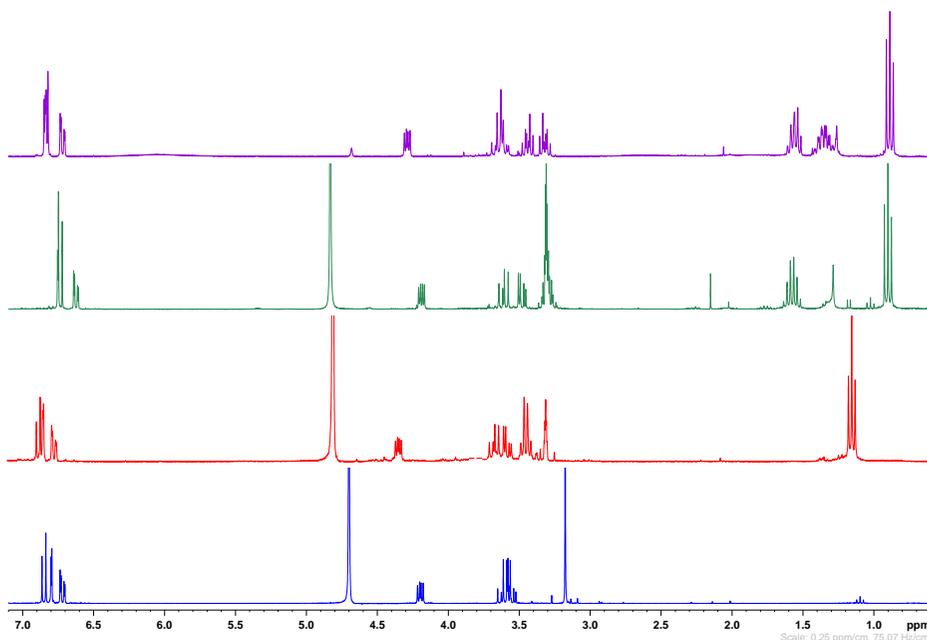
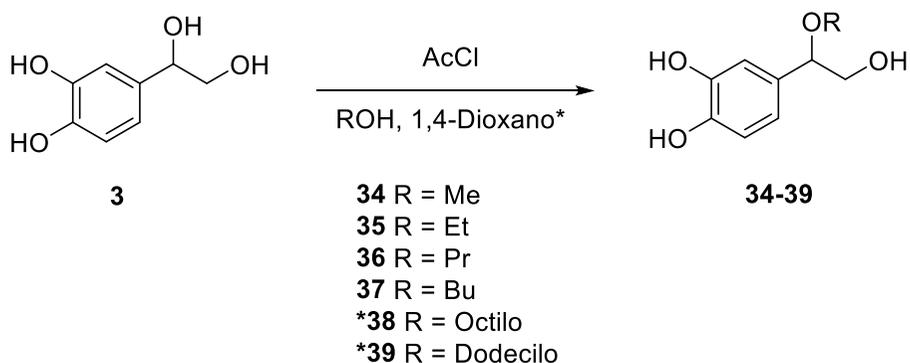


Figura 6. Espectros comparativos de ^1H -RMN (300 MHz) de la desacetilación de los éteres de DHPG. En orden ascendente: **34-37**

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

Paralelamente, se analizó la posibilidad de realizar directamente la síntesis química de los distintos éteres **34-37** a partir de DHPG usando alcoholes alifáticos y catálisis ácida. Así mismo, la protonación del DHPG promovida por medios alcohólicos acidulados a pH 0-0.5, condujo a la síntesis de los éteres **34-37** de forma limpia, en cortos tiempos de reacción (30-45 minutos) y a temperatura ambiente con rendimientos del 90% a cuant. Para evitar problemas derivados de la presencia de agua en el medio, decidimos generar *in situ* el ácido mediante la adición de una cantidad controlada de AcCl sobre una disolución alcohólica de DHPG. No obstante, la síntesis de análogos de cadena grasa empleando octanol y dodecanol, se tuvo que modificar, ya que estos dos alcoholes no son volátiles. De este modo, además de AcCl se utilizó 1,4-dioxano como disolvente y tamiz molecular de 3Å activado para asegurar la ausencia de humedad, junto con 8-10 equiv del alcohol correspondiente. Ello proporcionó ambos productos, aunque con tiempos de reacción sensiblemente mayores (Esquema 37).

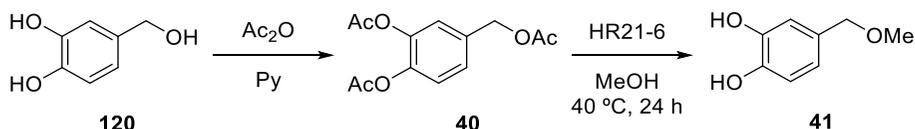


Esquema 14. Síntesis química de los éteres de DHPG

Retomando las reacciones de desacetilación catalizadas por lipasas, la alcoholólisis de los acetilos fenólicos junto con la sustitución de

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

un grupo acetoxi en posición bencílica por un grupo metoxi también se repitió en el tratamiento del alcohol protocatecuico peracetilado **40** con MeOH en presencia de extracto de lipasas. Sin embargo, los intentos por conseguir la sustitución con otros alcoholes fueron infructuosos obteniéndose mezclas complejas (Esquema 38).



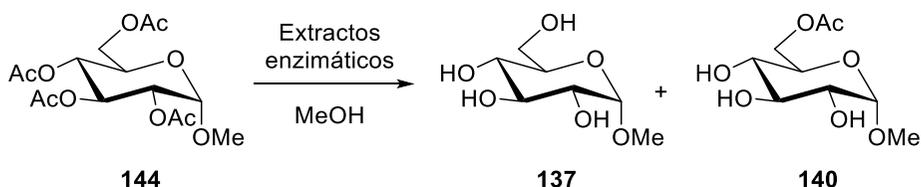
Esquema 15. *O*-Desacetilación regioselectiva del alcohol protocatecuico peracetilado **40** catalizada por lipasas de *Bacillus pumilus*^{143,147}

3.5. Reacciones de desacilación en carbohidratos

Habida cuenta de los discretos resultados obtenidos en la acilación de los compuestos fenólicos y los azúcares (apartados 3.2 y 3.3), que contrastan con los éxitos cosechados en la desacilación de polifenoles, decidimos ensayar también las desacilaciones con los derivados peracetilados de los carbohidratos seleccionados en el apartado 3.3.

En el caso de metil α -D-glucopiranosido peracetilado **144**, la desacilación regioselectiva se llevó a cabo a temperatura ambiente en MeOH y con una relación enzima/sustrato 1:2 (p/p) (Esquema 39).

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos



Esquema 16. *O*-Desacetilación regioselectiva de α -D-glucopiranosido peracetilado **144** catalizada por extractos enzimáticos¹⁴⁷

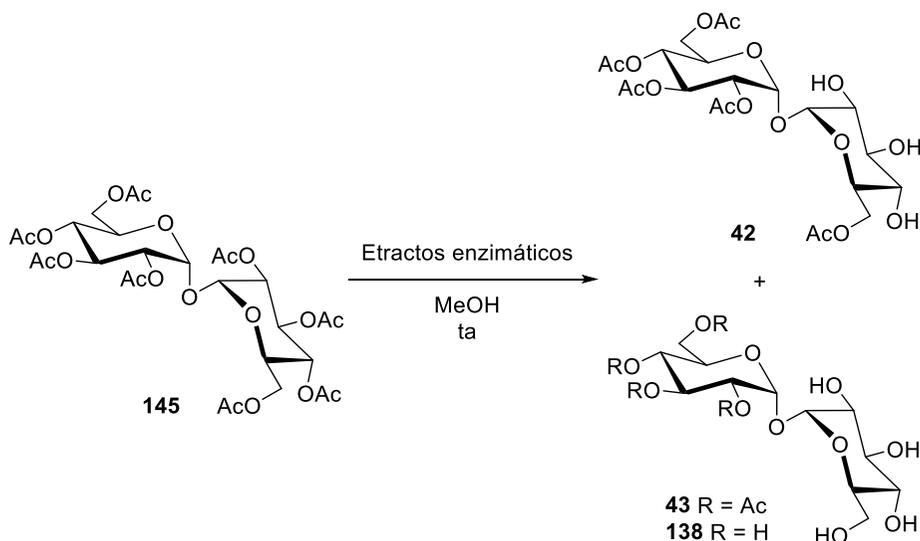
Con el extracto 2B122 procedente de *Terribacillus* tan sólo se alcanzó un grado de conversión del 28% (medido por ¹H-RMN) tras 12 h de reacción, aunque la regioselectividad observada fue alta dado que sólo se formó el derivado monoacetilado en *O*-6 **140** (Tabla 6). Mejores conversiones se observaron con los extractos de 1B89 (*Enterobacter*) y HR21-6 (*Bacillus*), donde se alcanzó un 84% y un 86% respectivamente tras sólo 6 h. En ambos casos, la regioselectividad observada también fue alta siendo de nuevo los productos formados el monoacetilado **140** y el compuesto de partida **137** (Tabla 6). A efectos comparativos, las lipasas comerciales CALB y BCL fueron usadas en las mismas condiciones sin que se detectara reacción alguna incluso tras largos periodos de reacción.

Lipasa/Microorganismo	Conversión (% , ¹ H-RMN)			t (h)
	144	137	140	
2B122 (<i>Terribacillus</i>)	72	0	28	12
2B89 (<i>Enterobacter</i>)	16	64	20	6
HR21-6 (<i>Bacillus</i>)	14	65	21	6
CALB (<i>C. antarctica</i>)	100	0	0	22
BCL (<i>P. cepacea</i>)	100	0	0	22

Tabla 6. Composición del crudo de reacción en la *O*-desacetilación de **144** catalizada por extractos enzimáticos¹⁴⁷

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

Para la desacetilación regioselectiva de la trehalosa peracetilada **145**, se usaron las mismas condiciones de reacción (Esquema 40).



Esquema 17. *O*-Desacetilación regioselectiva de la trehalosa peracetilada **145** catalizada por extractos enzimáticos¹⁴⁷

Los extractos enzimáticos ensayados (2B122, 1B89 y HR21-6) alcanzaron altos grados de conversión, entre el 71 y el 84%, en tiempos de reacción relativamente cortos (Tabla 7). También en todos los extractos se observó una especial e interesante regioselectividad dado que las lipasas desacetilaron únicamente uno de los anillos de glucosa total o parcialmente, dejando el segundo completamente acetilado, lo permite la eficaz desimetrización catalizada por lipasas de la α,α -trehalosa en un solo paso. Esto nos proporcionó dos productos mayoritarios y no descritos hasta la fecha, el 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetil- α,α -trehalosa **42** y el 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α,α -trehalosa **43**. Nuevamente, no hubo reacción utilizando lipasas comerciales.

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

Lipasa/Microorganismo	Conversión (% $^1\text{H-RMN}$)				t (h)
	145	42	43	138	
2B122 (<i>Terribacillus</i>)	11	34	38	17	12
2B89 (<i>Enterobacter</i>)	6	26	39	29	7
HR21-6 (<i>Bacillus</i>)	9	35	40	16	7
CALB (<i>C. antarctica</i>)	100	0	0	0	22
BCL (<i>P. cepacea</i>)	100	0	0	0	22

Tabla 7. Composición del crudo de reacción en la *O*-desacetilación de **145** catalizada por extractos enzimáticos¹⁴⁷

Debido a que los compuestos **42** y **43** no habían sido previamente descritos, se realizó una purificación cromatográfica a partir del crudo obtenido con el extracto HR21-6 (*Bacillus pumilus*) con el objetivo de cuantificar los productos y caracterizarlos mediante RMN y EM, obteniéndose ambos compuestos con un rendimiento del 29% y 49% respectivamente (Figura 23).

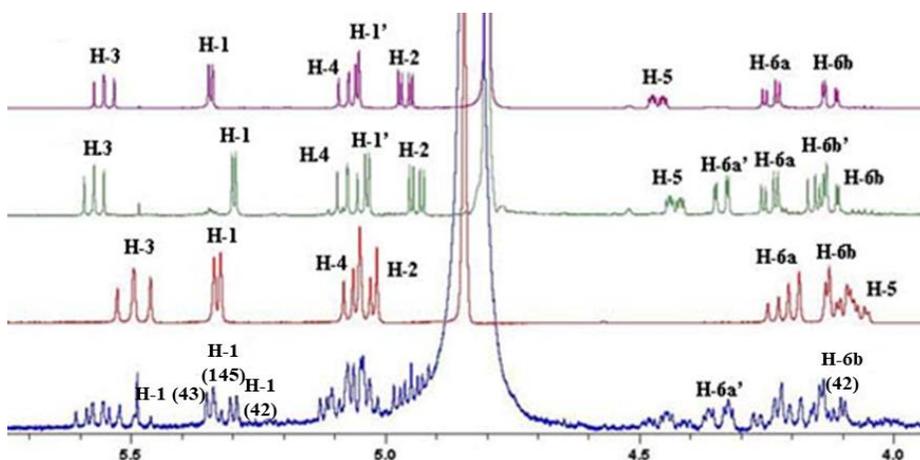


Figura 7. Espectros parciales comparativos de $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz) de la desacetilación de la trehalosa peracetilada **145**. En orden ascendente: crudo, **145**, **42** y **43**

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

La desimetrización de la trehalosa es un proceso complejo desde el punto de vista químico ya que es un compuesto con simetría C_2 con 8 hidroxilos químicamente similares. Una posible alternativa usando procedimientos químicos es la formación de un enlace α,α -1,1-glucosídico entre dos unidades de glucosa previamente derivatizadas de distinta manera.

Ciertos derivados de trehalosa con diferentes sustituyentes en ambos anillos de glucosa son objeto de interés en el campo de la Química Medicinal,¹⁵⁰ ya que son el punto de partida para llegar a sulfolípidos *O*-acilados que guardan similitud con algunos metabolitos encontrados en la pared celular de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la tuberculosis. Los sulfolípidos de trehalosa naturales juegan un papel importante en la inmunopatogénesis de la infección ya que permiten la adhesión y penetración de la bacteria en el interior de los macrófagos y permiten su supervivencia al inhibir o interferir en la respuesta inmune.¹⁵¹ Por esta razón se ha postulado que derivados parcialmente acilados de la trehalosa puedan modular la infección¹⁵² y ahí radica el interés por esta nueva metodología, como eficaz vía de acceso a compuestos cabeza de serie en nuevos potenciales tratamientos.

Finalmente, la desacetilación regioselectiva de la sacarosa peracetilada **146** se llevó a cabo con los tres extractos lipolíticos (*Terribacillus* 2B122, *Enterobacter* 2B89 y *Bacillus* HR21-6) empleados sobre la trehalosa y en las mismas condiciones de reacción,

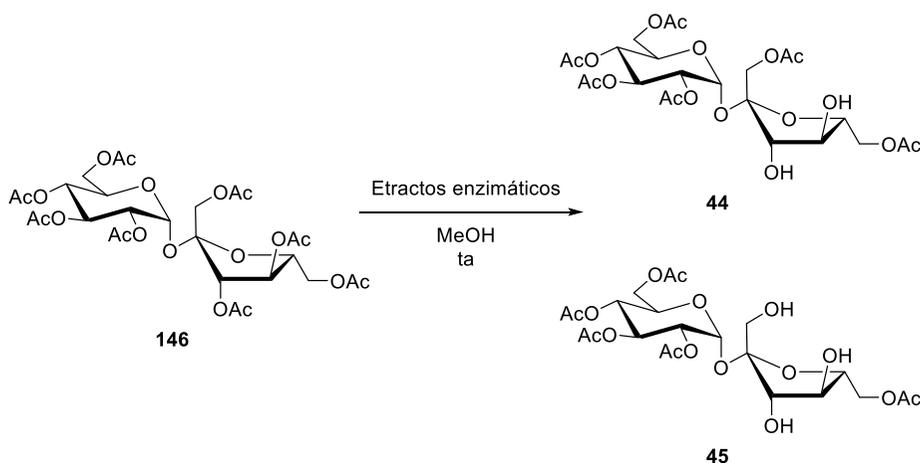
¹⁵⁰ Wu, CH.; Wang, CC. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 5558–5562.

¹⁵¹ Schorey, JS; Carroll, MC; Brown, EJ. *Science* **1997**, *277*, 1091–1093.

¹⁵² Gilleron, M; Stenger, S; Mazorra, Z; Wittke, F; Mariotti, S; Böhmer, G; Prandi, J; Mori, L; Puzo, G; De Libero, G. *J. Exp. Med.* **2004**, *199*, 649–659.

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

consiguiéndose nuevamente altos grados de conversión (del 82 al 90%). La regioselectividad en todos los casos recordó a la ya comentada para la trehalosa peracetilada ya que los dos compuestos obtenidos, la 2,3,4,6,1',6'-hexa-*O*-acetilsacarosa **44** y la 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetilsacarosa **45** corresponden a la desacetilación únicamente del anillo de fructosa, dejando inalterado el anillo de glucosa (Esquema 41, Tabla 8).



Esquema 18. *O*-Desacetilación regioselectiva de la sacarosa peracetilada **146** catalizada por extractos enzimáticos¹⁴⁷

Lipasa/Microorganismo	Conversión (% , ¹ H-RMN)			t (h)
	146	44	45	
2B122 (<i>Terribacillus</i>)	10	38	52	4
2B89 (<i>Enterobacter</i>)	18	43	39	7.5
HR21-6 (<i>Bacillus</i>)	14	44	42	8.5
CALB (<i>C. antarctica</i>)	100	0	0	10
BCL (<i>P. cepacea</i>)	100	0	0	10

Tabla 8. Composición del crudo de reacción en la *O*-desacetilación de **146** catalizada por extractos enzimáticos¹⁴⁷

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

Estos resultados vendrían a complementar a los publicados por Ong *et al.*¹⁵³ sobre la desacetilación regioselectiva de la sacarosa peracetilada **146** mediante catálisis enzimática con lipasa de *Candida cylindracea* obteniendo derivados parcialmente acetilados, en los que la desacetilación solo ocurre en la unidad de glucosa, es decir con una regioselectividad totalmente distinta a la observada con nuestros extractos. Por otro lado, en la bibliografía existen procedimientos químicos de síntesis para los compuestos **44** y **45** vía desacetilación sin embargo, la separación es tediosa y los rendimientos bajos ya que se forman mezclas complejas.¹⁵⁴

Tal y como se procedió para los derivados parcialmente acetilados de la trehalosa, los análogos **44** y **45** fueron purificados a partir del crudo obtenido del extracto HR21-6 (*Bacillus pumilus*) con un 26% y 27% de rendimiento respectivamente. Tal y como se indica en la Tabla 8, con las lipasas comerciales los resultados fueron negativos.

Los resultados encontrados para la desacetilación regioselectiva de la trehalosa y la sacarosa peracetiladas con los extractos de lipasas sugieren que una vez que una de las unidades del disacárido empieza a ser desacetilada, interacciona de manera más favorable con los aminoácidos del sitio activo hasta que es desacetilado total o casi totalmente, mientras que la unidad acetilada es respetada.

¹⁵³ Ong, GT; Chang, KY; Wu, SH; Wang, KT. *Carbohydr. Res.* **1993**, *241*, 327–333.

¹⁵⁴ Haines, AH; Konowicz, PA; Jones, HF. *Carbohydr. Res.* **1990**, *205*, 406–409; Čapek, C; Vydra, T; Sedmera, P. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1988**, *53*, 1317–1331.

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

3.6. Reacciones de acilación y/o desacilación en oleuropeína y derivados

Teniendo en cuenta todos los resultados que hemos obtenido en las reacciones de acetilación y desacetilación, en compuestos fenólicos por una parte y en carbohidratos por otra, decidimos ensayar sobre un nuevo sustrato, la oleuropeína **71** (Figura 24), una molécula que contiene en su estructura tanto el fragmento de catecol como la unidad de carbohidrato.

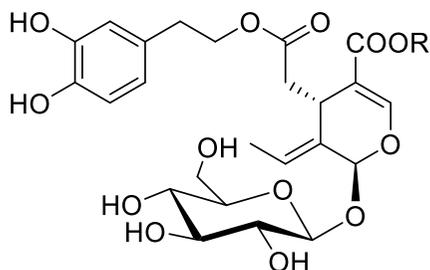


Figura 8. Estructura de la oleuropeína

Debido a que las acilaciones con las lipasas nativas no fueron altamente regioselectivas como demostraron los primeros ensayos, se descartó dicha vía en favor del uso de lipasas comerciales. En la bibliografía existen numerosos ejemplos de acilaciones de glicósidos, fundamentalmente glucosa y galactosa, empleando grupos acilo de diferente longitud de cadena. La lipasa más empleada es la procedente de *Candida antarctica*,¹⁵⁵ aunque también se han reportado resultados positivos empleando lipasas como la de *Candida rugosa* y esterases como la acetil esterasa de *Trichoderma reesei*. La regioselectividad suele

¹⁵⁵ Davis, RA; Fettinger, JC; GH, J. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 8447–8452.

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

ser buena en la mayoría de los casos detectándose una tendencia general a la acilación en el hidroxilo en C-6 cuando se emplean lipasas^{155,156} y en el hidroxilo en C-3 cuando se emplean esterasas.¹⁵⁷

Desde el punto de vista farmacológico, nuestra estrategia es la de aumentar la biodisponibilidad de compuestos bioactivos a través de un aumento en su lipofilia, pero si también tenemos en cuenta la farmacocinética, es más conveniente acilar en la posición 6 del azúcar. Modificar esta parte de la molécula puede entorpecer los mecanismos naturales de metabolización y excreción favoreciendo su acumulación en el organismo y por tanto, su biodisponibilidad.¹⁵⁸

A la hora de escoger la lipasa adecuada nos decantamos por la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* TLL ya que según los antecedentes, nos proporcionaría la regioselectividad adecuada, resultaba una lipasa más económica que la CALB y además era capaz de actuar en disolventes orgánicos más verdes como los alcoholes o al acetato de etilo.¹⁵⁹

De hecho, todas las acilaciones catalizadas por la lipasa TLL soportada en Immobead 150 (un soporte hidrofóbico para la inmovilización de lipasas) fueron totalmente regioselectivas

¹⁵⁶ Kim, MJ; Choi, MY; Lee, JK; Ahn, Y. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2003**, *26*, 115–118.

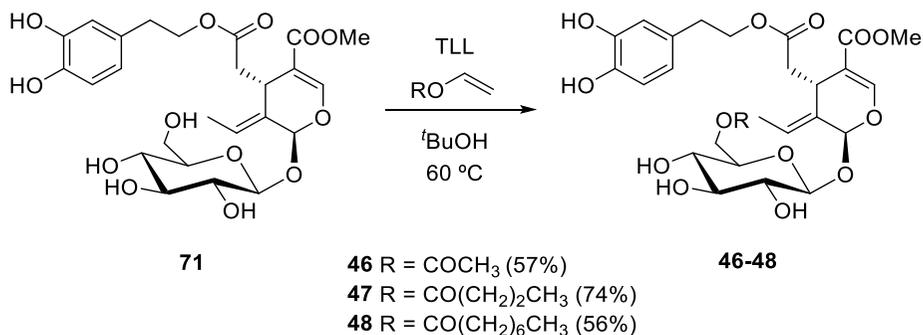
¹⁵⁷ Biely, P; Czigárová, M; Wong, KKY; Fernyhough, A. *Biotechnol. Lett.* **2014**, *36*, 2249–2255.

¹⁵⁸ Pérez, JA.; Hernández, JM; Trujillo, JM; López, H. En *Studies in Natural Products Chemistry*; 2005; Vol. 32, pp 303–363.

¹⁵⁹ Larrosa, M; Tomé-Carneiro, J; Yáñez-Gascón, MJ; Alcántara, D; Selma, MV; Beltrán, D; García-Conesa, MT; Urbán, C; Lucas, R; Tomás-Barberán, F; Morales, JC; Espín, JC. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7365–7376.

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

obteniéndose los correspondientes 6''-*O*-acil oleuropeínas de acetilo **46**, butanoilo **47** y octanoilo **48**. En todas las reacciones se usaron como agentes acilantes los correspondientes ésteres de vinilo en un exceso de 20 equiv, calentando a 60 °C en *t*BuOH (Esquema 42).



Esquema 19. *O*-Acilación regioselectiva de la oleuropeína **71** catalizada por la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL)

Las estructuras fueron confirmadas por EM y RMN, especialmente por el desapantallamiento en torno a 4.4 y 4.2 ppm observado en ¹H-RMN para los H-6'' del azúcar como consecuencia de la acilación (Figura 25).

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

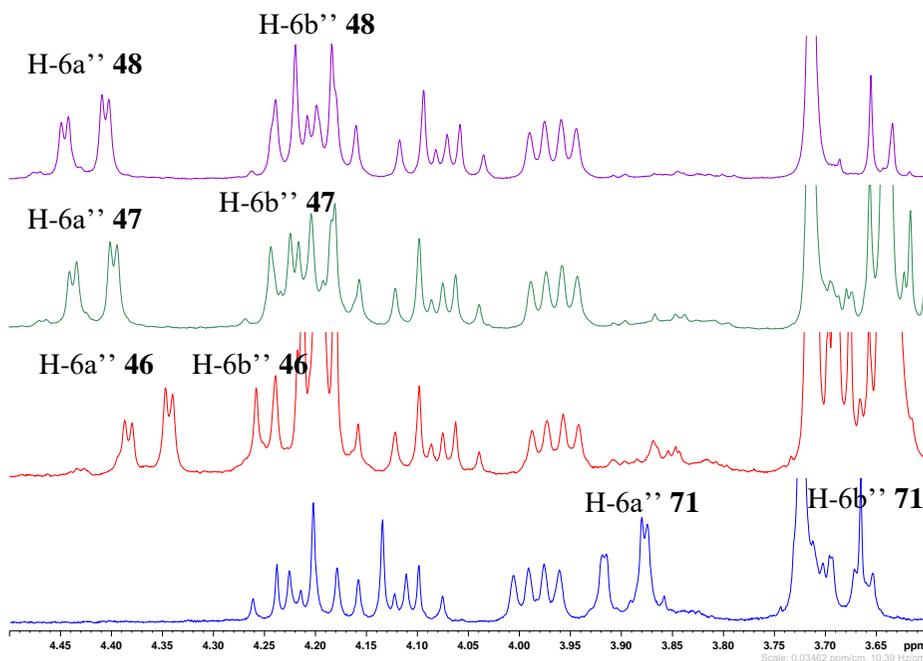


Figura 9. Espectro parcial comparativo (300 MHz) de la acilación regioselectiva de la oleuropeína catalizada por TLL. En orden ascendente, **71, 46-48**

Algunos autores describen^{156,160} que existe un aumento significativo de la actividad de muchas lipasas utilizando como disolvente líquidos iónicos como Bmim-PF₆ (hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio), por lo que analizamos el papel de dicho disolvente inicialmente en la monoacilación regioselectiva de la oleuropeína **71**. Sin embargo, la mejora en el rendimiento de tan sólo 5 puntos porcentuales (63% para la acilación), y el hecho de estar obligados a emplear grandes volúmenes de ^tBuOH para extraer el producto tras la finalización de la reacción junto con la posterior

¹⁶⁰ Ganske, F; Bornscheuer, UT. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3097–3098.

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

purificación cromatográfica para retirar los restos del líquido iónico, desaconsejan el uso de este disolvente.

Respecto a las reacciones de desacetilación, dos sustratos fueron objeto de estudio con las lipasas nativas, el ligstrósido y la oleuropeína peracetilados **147** y **148** (Figura 26). No sólo el ligstrósido **147** es un sustrato interesante en el sentido de que, análogamente a la oleuropeína peracetilada, conforma un reto sintético para las lipasas debido a que existe en una misma molécula 4 tipos de ésteres distintos; sino que están descritas muy pocas transformaciones químicas para dicho compuesto probablemente debido a su escasa disponibilidad.

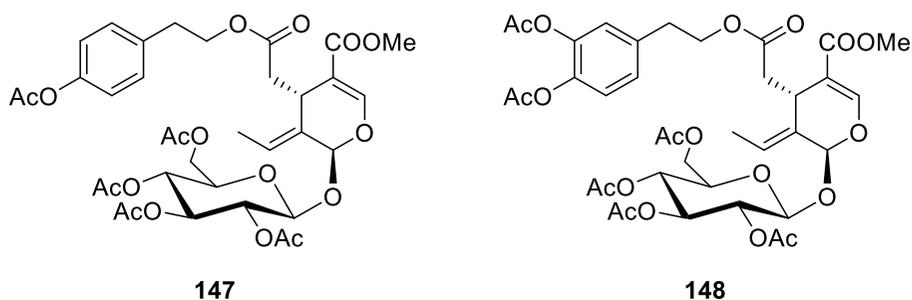


Figura 10. Estructuras del ligstrósido y la oleuropeína peracetilados **147** y **148**

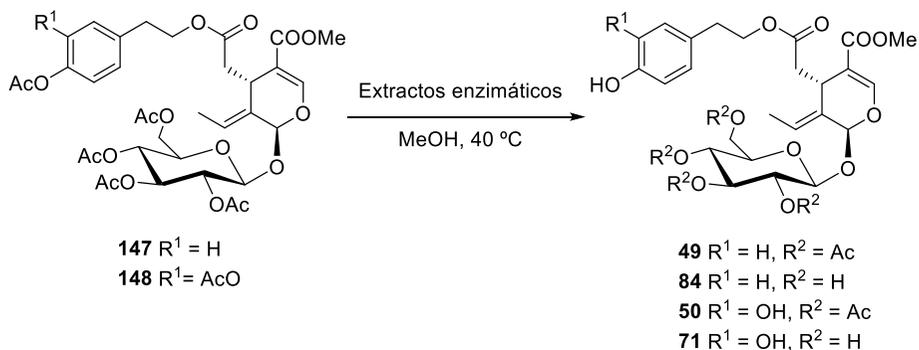
En nuestro grupo de investigación, la fuente de oleuropeína son las hojas de olivo, variedad picual. Su aislamiento se realizaba mediante secado de las mismas y extracción con H₂O-EtOH siguiendo un procedimiento descrito por Stamatopoulos *et al.*^{¡Error! Marcador no definido.} que da como resultado un polvo rico en oleuropeína acompañado de pequeñas cantidades de ligstrósido. Debido a la parecida movilidad cromatográfica en gel de sílice de ambos compuestos, su separación se abordó mediante acetilación previa en Ac₂O/Py seguida de cromatografía en ciclohexano-AcOEt de los correspondientes derivados

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

peracetilados. Esta estrategia nos proporcionó el acceso a ambos sustratos puros para el posterior estudio de las desacetilaciones con las lipasas nativas.

En primer lugar, la desacetilación del ligstrósido y la oleuropeína peracetiladas **147** y **148** se realizó con las lipasas 2B120 (*Pseudomonas*) y HR21-6 (*Bacillus*) calentando a 40 °C en MeOH (Esquema 43), siendo la reacción sensible respecto al tiempo y sobre todo de la cantidad de extracto empleado. La reacción de desacetilación en presencia de HR21-6 era más difícil de controlar ya que se conseguía un alto grado de desacetilación en un tiempo relativamente corto y con poca selectividad. En consecuencia, en pocas horas se detectaba una alta proporción de derivados completamente desprotegidos **84** ó **71**, junto a una pequeña proporción de los derivados tetraacetilados en la unidad de glucosa **49** ó **50**, y de los compuestos peracetilados de partida **147** ó **148**. Los mejores resultados se obtuvieron con el empleo del extracto procedente de la *Pseudomonas* ya que permitió la desacetilación regioselectiva de ambos compuestos, obteniéndose en los dos casos los derivados acetilados en el anillo de azúcar **49** ó **50** con rendimientos moderados (35 y 51%, respectivamente) (Tabla 9). Con la lipasa 2B122 procedente del *Terribacillus* también se pudo obtener la oleuropeína tetraacetilada aunque el rendimiento disminuyó hasta el 22%.

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos



Esquema 20. *O*-Desacetilación regioselectiva de **147** y **148** catalizada por extractos enzimáticos

Lipasa	Rendimiento (%)		t (h)	Rendimiento (%)		t (h)
	49	84		50	71	
2B120	35	0	20	51	0	20
2B122	-	-	-	22	16	12
HR21-6	0 ^a	56 ^a	20	(0) ^b	(53) ^b	14

Tabla 9. Rendimientos de compuestos aislados tras la *O*-desacetilación de **147** y **148** catalizada por extractos enzimáticos. Rendimientos obtenidos usando una relación extracto/sustrato (p/p): ^a1:1. ^b1:2

Las estructuras de los compuestos **49** y **50** fueron resueltas mediante espectroscopia de masas y RMN mono y bidimensional (Figura 27).

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

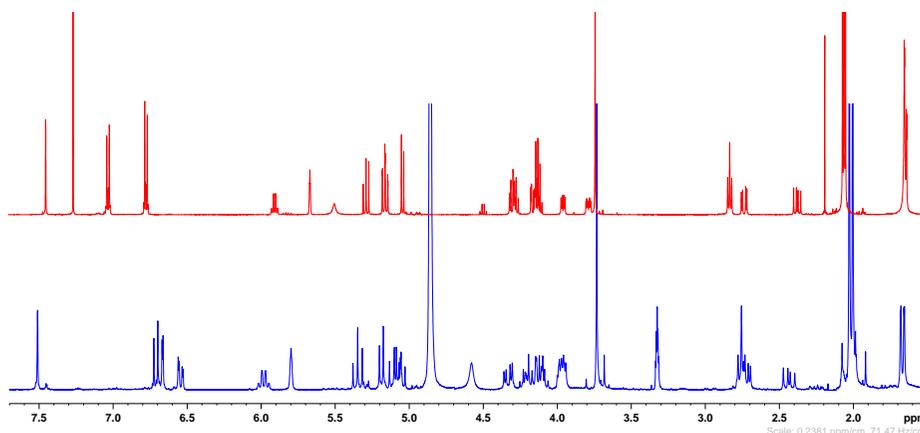


Figura 11. Espectros comparativos de ^1H -RMN (300 MHz) de **49** (arriba) y **50** (abajo)

Mediante el empleo de las distintas lipasas hemos conseguido el acceso a una batería de derivados del ligstrósido y la oleuropeína acilados en distinto grado. Dichos compuestos, junto con los compuestos desprotegidos de partida **84** y **71** y sus derivados peracetilados **147** y **148**, nos permiten modular su lipofilia en la búsqueda de cambios beneficiosos en sus propiedades biológicas al mejorar su balance hidrófilo-lipófilo, que favorezca su entrada en células a través de las membranas plasmáticas que son de naturaleza lipídica.

3.7. Reacciones de acilación/desacilación con lipasas nativas puras

Hasta ahora, hay que destacar que todas las reacciones con las lipasas nativas de este capítulo, han sido realizadas con un extracto crudo de enzimas, separadas de las bacterias por centrifugación, dializadas y liofilizadas. Es un método simple y barato que permite ser escalado y que suministra mezclas de enzimas y otras proteínas, excretadas por las bacterias al medio de cultivo. Como hemos demostrado, estos extractos

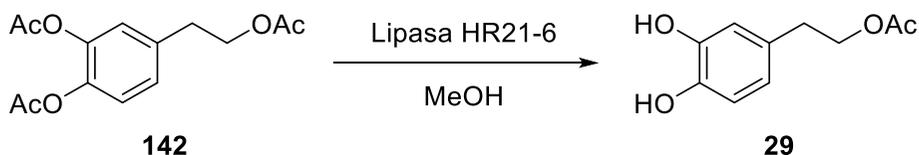
3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

enzimáticos son capaces de catalizar reacciones quimioenzimáticas que nos permiten sintetizar nuevas familias de compuestos fenólicos antioxidantes y con un potencial bioactivo aún por explorar.

El siguiente paso en esta investigación, ha sido aislar la enzima o enzimas responsables de las transformaciones observadas, y purificarlas para poder analizar los posibles cambios en reactividad y regio y quimioselectividad al usar las enzimas puras. Gracias a la colaboración con el grupo de investigación de la profesora Mellado, hemos tenido acceso hasta ahora, a una enzima pura procedente del extracto HR21-6 de *Bacillus pumilus*.

Debido a los buenos resultados obtenidos en desacetilaciones, comenzamos utilizando los tres compuestos fenólicos peracetilados manejados hasta ahora: HT peracetilado **142**, 3,4-dihidroxifenilglicol peracetilado **2** y oleuropeína peracetilada **148**, a dos temperaturas, 37 y 60 °C y en 24 h.

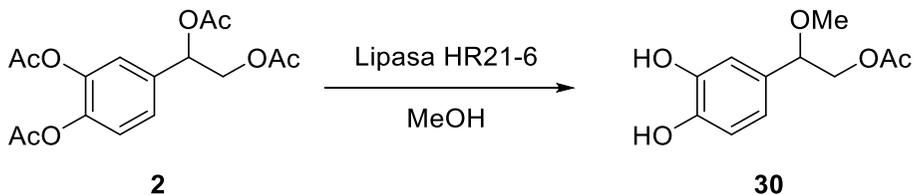
La reacción con **142** fue de nuevo completamente regioselectiva hacia la desacetilación de los ésteres del anillo aromático dando como único producto, el monoacetilado esperado **29** (Esquema 44); sin embargo en vez de utilizar una relación sustrato/extracto enzimático 1:1 (p/p) hemos utilizado con éxito la relación 1500:1 sustrato/enzima purificada, lo que confirma la alta actividad de la lipasa aislada.



Esquema 21. *O*-Desacetilación regioselectiva de **142** catalizada por la lipasa HR21-6

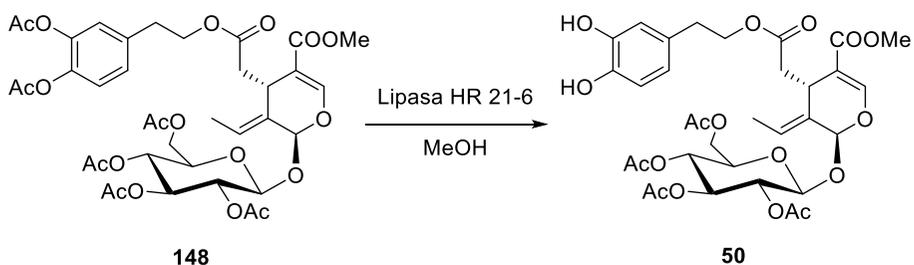
3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

La reacción con el DHPG peracetilado en MeOH, también dio como resultado el éter metílico esperado **30** sin embargo, todos los intentos por reproducir la reacción con EtOH y el resto de los alcoholes fueron infructuosos, alcanzándose rendimientos anormalmente bajos (Esquema 45).



Esquema 22. *O*-Desacetilación regioselectiva de **2** catalizada por la lipasa HR21-6

Por último, nos encontramos con un resultado inesperado en la desacetilación de **148** ya que, al contrario que sucedía con el extracto original, con la enzima pura la quimioselectividad de la reacción fue total, detectándose un único producto que resultó ser el tetraacetilado **50** (Esquema 46), lo que indica que la enzima purificada solo cataliza la desacetilación de los acetilos sobre el fragmento de catecol.



Esquema 23. *O*-Desacetilación quimioselectiva de **148** catalizada por la lipasa HR21-

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

A continuación, se presentan los datos de rendimientos alcanzados por la lipasa pura (Tabla 10).

Compuesto formado	Sustrato/Enzima (p/p)	Conversión (% ¹ H-RMN)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
29	1500/1	82	60	20
		49	37	
30	2000/1	81	60	24
		19	37	
50	5000/1	65	60	20
	2500/1	36	37	

Tabla 10. Datos relativos a la *O*-desacetilación regioselectiva catalizada por la lipasa HR21-6

Con respecto a los datos recogidos en la Tabla 10, una primera observación es que la conversión obtenida depende enormemente de la temperatura ya que en todos los casos hubo una mejora notable al calentar a 60 °C. Así mismo, se puede observar que con la enzima pura, ya no es necesario emplear las grandes cantidades de extracto de los primeros ensayos, sino que ahora nos movemos en un rango en peso entre 1500-5000 veces menor comparado con el peso de sustrato, es decir una cantidad catalítica. Esto puede darnos una idea de la cantidad de lipasa activa que había en el extracto original.

Hemos observado que dicha lipasa pura parece ser muy activa transesterificando en un medio metanólico, pero no en otros alcoholes ya que en el caso de la desacetilación de **2**, las conversiones obtenidas en EtOH eran muy pequeñas, incluso con mayores cantidades de lipasa y tiempos de reacción. Por otra parte, ahora la desacetilación de **148** sí fue totalmente quimioselectiva hacia la formación de **50**, no llegando a

3. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de compuestos fenólicos y carbohidratos

detectarse en el medio de reacción el compuesto totalmente desacetilado

71.

Estos resultados nos indican que la lipasa purificada que actualmente disponemos, se correspondería con una de las lipasas que debe contener el extracto original, pudiendo ser las restantes las responsables de las transformaciones que no se han detectados en estos últimos ensayos.

**4. TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE
FENOLES SECOIRIDOIDES
PROCEDENTES DEL OLIVO.
ESTRATEGIAS PARA SU
ESTABILIZACIÓN**

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

En el presente capítulo se detallan la síntesis de compuestos secoiridoides del AOVE mediante la reacción de Krapcho y a partir de compuestos fenólicos procedentes del olivo, ya sea del aceite o de la hoja. Adicionalmente se detallarán algunas estrategias para la estabilización de estos compuestos mediante protección o derivatización de ciertos grupos funcionales.

4.1. Introducción

En el aceite de oliva virgen extra (AOVE), aunque los compuestos fenólicos constituyen la fracción minoritaria, su composición es extremadamente compleja^{161,162} y dependiente de una gran variedad de factores agronómicos y técnicos como la variedad del olivo,¹⁶³ el grado de maduración del fruto,¹⁶⁴ las condiciones climáticas e incluso la propia producción del aceite en las almazaras.¹⁶⁵ No obstante son los responsables de una innumerable variedad de efectos

¹⁶¹ Christophoridou, S; Dais, P; Tseng, LH; Spraul, M. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4667–4679.

¹⁶² Christophoridou, S.; Dais, P. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *633*, 283–292.

¹⁶³ Vinha, AF; Ferreres, F; Silva, BM; Valentao, P; Gonçaves, A; Pereria, JA; Oliveira, MB; Seabra, RM; Andrade, PB. *Food Chem.* **2005**, *89*, 561–568.

¹⁶⁴ Kalua, CM; Allen, MS; Bedgood, DR; Bishop, AG; Prenzler, PD. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8054–8062.

¹⁶⁵ de Torres, A; Espínola, F; Moya, M; Castro, E. *Eur. Food Res. Technol.* **2016**, *242*, 1709–1718.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

beneficiosos para la salud ya que son antioxidantes^{166,167} reconocidos, actúan como antiinflamatorios,¹⁶⁸ disminuyen los niveles de LDL oxidada^{169,170} y ejercen un papel cardioprotector.¹⁷¹

Dentro de esta fracción destacan los fenoles secoiridoides como los mayoritarios con gran diferencia respecto del resto, siendo el oleocantal **57**, la oleaceína **53**¹⁷² y sus respectivos aglicones en su forma aldehídica **65** y **66**, los más característicos y abundantes¹⁷³ (Figura 28).

¹⁶⁶ Dimitrios, B. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 505–512.

¹⁶⁷ Bendini, A; Cerretani, L; Carrasco-Pancorbo, A; Gómez-Caravaca, AM; Segura-Carretero, A; Fernández-Gutiérrez, A; Lercker, G. *Molecules* **2007**, *12*, 1679–1719.

¹⁶⁸ Cicerale, S; Lucas, L; Keast, R. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 458–479.

¹⁶⁹ Gimeno, E; de-la-Torre-Carbot, K; Lamuela-Raventos, RM; Castellote, AI; Fitó, M; de-la-Torre, R; Covas, MI; López-Sabater, MC. *Br. J. Nutr.* **2007**, *98*, 1243–1250.

¹⁷⁰ Marrugat, J; Covas, MI; Fitó, M; Schroeder, H; Miró-Casas, E; Gimeno, E; López-Sabater, MC; de-la-Torre, R; Farre, M. *Eur. J. Nutr.* **2004**, *43*, 140–147.

¹⁷¹ Pedret, A; Catalán, Ú; Fernández-Castillejo, S; Farràs, M; Valls, RM; Rubió, L; Canela, N; Aragonés, G; Romeu, M; Castañer, O; de-la-Torre, R; Covas, MI; Fitó, M; Motilva, MJ; Solà, R. *PLoS One* **2015**, 10e01291160.

¹⁷² Montedoro, G; Servili, M; Baldioli, M; Selvaggini, R; Miniati, E; Macchionii, A. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2228–2234.

¹⁷³ Diamantakos, P; Velkou, A; Killday, KB; Gimisis, T; Meliou, E; Magiatis, P. et al. *Olivae* **2015**, *122*, 23–33.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

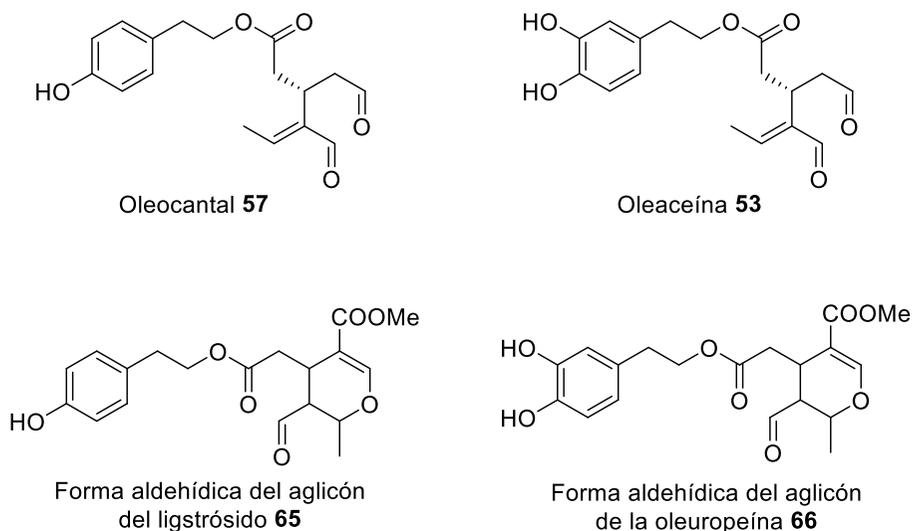


Figura 1. Estructuras de los fenoles secoiridoides más importantes en los AOVEs

El oleocantal es un compuesto dialdehídico que, junto con la oleaceína, fueron los dos primeros secoiridoides descubiertos en el aceite de oliva por Montodoro en 1993.¹⁷² Se le atribuyen numerosas propiedades biológicas entre las que destaca su actividad antiinflamatoria,^{¡Error! Marcador no definido.} antiartrítica¹⁷⁴ y antitumoral,¹⁷⁵ además de ejercer una importante actividad en enfermedades neurodegenerativas actuando en el cerebro al ser capaz de atravesar la barrera hemato encefálica,¹⁷⁶ siendo efectivo en la estructura y

¹⁷⁴ Iacono, A; Gómez, R; Sperry, J; Conde, J; Bianco, G; Meli, R; Gómez-Reino, J; Smith III, AB; Gualillo, O. *Arthritis Rheum.* **2010**, *62*, 1675–1682.

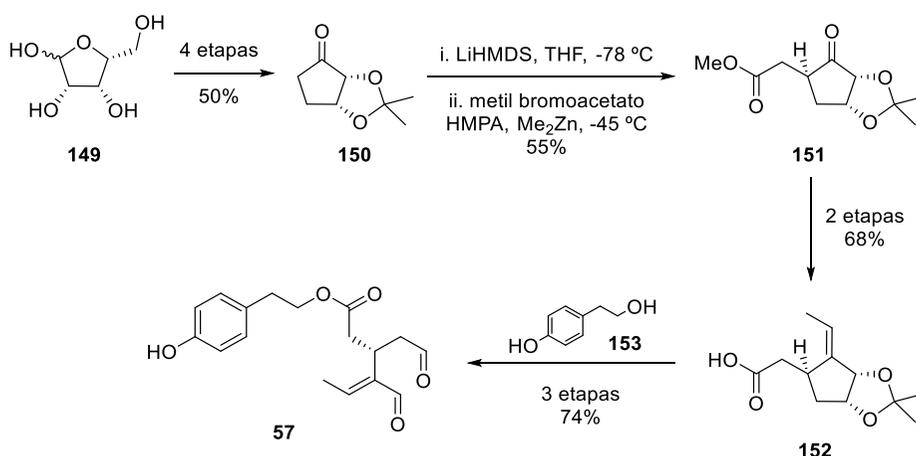
¹⁷⁵ Hodge, AM; English, DR; McCredie, MRE; Severi, G; Boyle, P; Hopper, JL; Giles, GG. *Cancer Causes Control* **2004**, *15*, 11–20; LeGendre, O; Breslin, PAS; Foster, DA. *Mol. Cell. Oncol.* **2015**, *2*, e1006077; Scotece, M; Gomez, R; Conde, J; Lopez, V; Gomez-Reino, JJ; Lago, F; Smith III, AB; Gualillo, O. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 2467–2475.

¹⁷⁶ Heneka, MT. *et al. Lancet Neurol.* **2015**, *14*, 388–405.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

reactividad de las placas β -amiloides¹⁷⁷ que según numerosos autores son clave en las primeras etapas de la enfermedad del Alzheimer.

Hasta el año 2007, la única vía para acceder a oleocantal era mediante su extracción del aceite de oliva y posterior purificación cromatográfica, algo no trivial, y sujeto a la variabilidad de la composición de la mezcla de secoiridoides del propio aceite. Fue entonces cuando Amos B. Smith *et al.*¹⁷⁸ diseñan la primera, y hasta la fecha, mejor síntesis total del oleocantal partiendo de D-lixosa **149** en 10 etapas y con un rendimiento global del 14% (Esquema 47).



Esquema 1. Primera síntesis total del oleocantal a partir de D-lixosa **149**

A partir de entonces, distintos grupos de investigación han intentado la síntesis total desde otras aproximaciones como la de Valli *et*

¹⁷⁷ Abuznait, AH; Qosa, H; Busnena, BA; El Sayed, KA; Kaddoumi, A. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 973–982.

¹⁷⁸ Smith III, AB; Sperry, JB; Han, Q. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6891–6900.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

*al.*¹⁷⁹ y Takahashi *et al.*,¹⁸⁰ sin embargo no logran mejorar el proceso de síntesis ya que, en la mayoría de los casos, el oleocantal que se obtiene es el racémico y siempre el número de etapas y el rendimiento global son peores. Actualmente se considera que la mejor vía de acceso a este compuesto, es a través de su aislamiento y purificación desde el aceite de oliva virgen extra.

Por otra parte, la oleaceína **53** es el segundo compuesto secoiridoide dialdehídico que podemos encontrar dentro del perfil fenólico del aceite de oliva. Desde el punto de vista estructural, guarda una gran relación con el oleocantal, diferenciándose sólo en el fragmento fenólico que en este caso es un catecol.

Debido a su similitud con el oleocantal, se le han atribuido diversas propiedades biológicas análogas a **57**, pero su menor estabilidad dificulta en gran medida el estudio de su actividad farmacológica. Aun así, se ha comprobado que es un potente agente antiproliferativo¹⁸¹ e inhibidor de la enzima 5-lipoxigenasa implicada en la biosíntesis de leucotrienos.¹⁸² También se ha comprobado que es capaz de elevar el nivel de la respuesta antiinflamatoria de los macrófagos en procesos relacionados con la aterosclerosis,¹⁸³ y que tiene la capacidad de tratar o

¹⁷⁹ Valli, M; Peviani, EG; Porta, A; D'Alfonso, A; Zaroni, G; Vidari, G. *Eur J. Org. Chem.* **2013**, *20*, 4332–4336.

¹⁸⁰ Takahashi, K; Morita, H; Honda, T. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 3342–3345.

¹⁸¹ Barbaro, B; Toietta, G; Maggio, R; Arciello, M; Tarocchi, M; Galli, A; Balsano, C. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 18508–18524.

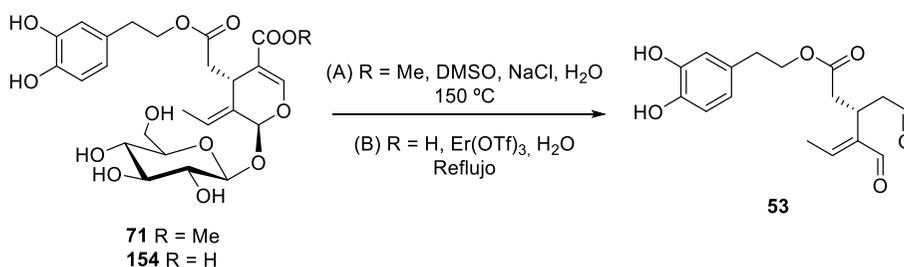
¹⁸² Vougiannopoulou, K; Lemus, C; Halabalaki, M; Pergola, C; Werz, O; Smith III, AB; Michel, S; Skaltsounis, L; Deguin, B. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 441–445.

¹⁸³ Filipek, A; Czerwińska, ME; Kiss, AK; Wrzosek, M; Naruszewicz, M. *Phytomedicine* **2015**, *22*, 1255–1261.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

prevenir las enfermedades relacionadas con la degradación de las placas ateroscleróticas.¹⁸⁴

En cuanto a su preparación, actualmente existen dos procedimientos de síntesis. El primero (A) es a través de la transformación de la oleuropeína **71** en oleaceína mediante la reacción de desalcoxicarbonilación de Krapcho en DMSO húmedo y NaCl;¹⁸² y el segundo (B), por medio de un calentamiento a reflujo en agua de la desmetil oleuropeína o ácido oleuropeínico **154** en presencia de Er(OTf)₃¹⁸⁵ (Esquema 48).



Esquema 2. Semisíntesis publicadas actualmente de la oleaceína **53**

Ambas síntesis tienen la ventaja de que experimentalmente son muy sencillas de realizar sin embargo, la publicada por Nardi *et al.* tiene el inconveniente de partir de la desmetil oleuropeína que es un compuesto de difícil acceso, siendo mejor la descrita por Vougiannopoulou *et al.* que parte de oleuropeína, una materia prima

¹⁸⁴ Czerwinska, ME; Kiss, AK; Naruszewicz, MA; Filipek, A. Oleacein for treating or preventing diseases resulting from atherosclerotic plaques, US20160008311 A1

¹⁸⁵ Nardi, M; Bonacci, S; De Luca, G; Maiuolo, J; Oliverio, M; Sindona, G; Procopio, A. *Food Chem.* **2014**, *162*, 89–93.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

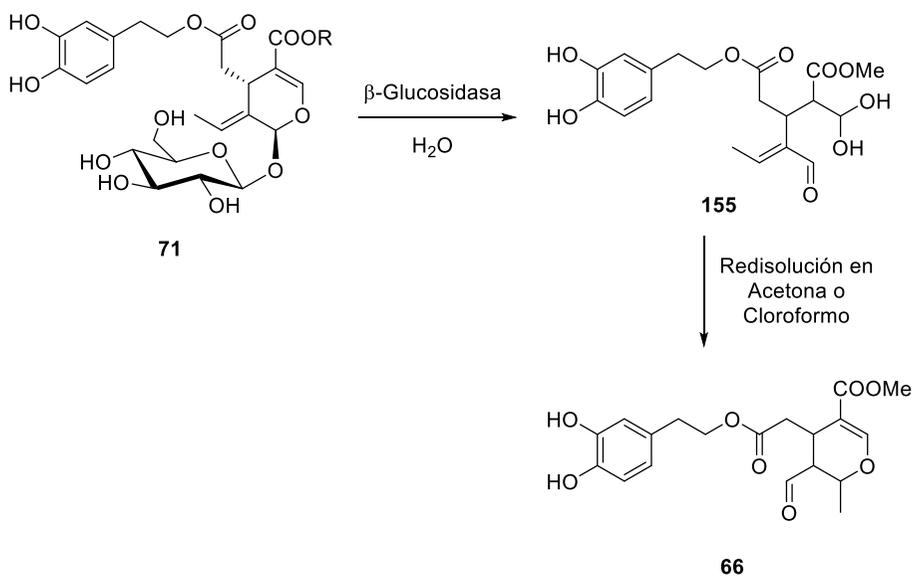
fácil de obtener en grandes cantidades y en un alto grado de pureza de la hoja del olivo.¹⁸⁶

Los aglicones de ligstrósido y oleuropeína en sus formas monoaldehídicas **65** y **66** son los otros dos secoiridoides mayoritarios. Estructuralmente hablando, al contrario que **57** y **53**, mantienen cerrado el anillo de seis miembros del fragmento de secoiridoide además del grupo carboximetilo en C-4, también presente en los glucósidos ligstrósido **84** y oleuropeína **71** de donde proceden.

De forma similar que en el caso del oleocantal **57**, ambos compuestos **65** y **66** pueden ser aislados y purificados del aceite de oliva, siendo para **65** la única vía de acceso a él ya que es posible la semisíntesis de **66** a partir de oleuropeína **71** mediante el uso de β -glucosidasas. La hidrólisis enzimática de **71** en agua conduce al *gem*-diol del aglicón de la oleuropeína **155** y su posterior redisolución en disolventes apróticos como acetona o cloroformo, conduce al aglicón en su forma monoaldehídica **66** (Esquema 49).¹⁶²

¹⁸⁶ Şahin, S; Bilgin, M. *Sep. Sci. Technol.* **2012**, *47*, 2391–2398.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización



Esquema 3. Semisíntesis de **66** a partir de oleuropeína catalizada con β -glucosidasas

Los compuestos **65** y **66** han sido poco estudiados, sin embargo se sabe que el aglicón de la oleuropeína **66** es un potente antioxidante y que junto a la oleaceína **53**, protege a los glóbulos rojos del daño inducido por estrés oxidativo eliminando el H_2O_2 ,¹⁸⁷ hasta el punto de evitar en gran medida la hemólisis.¹⁸⁸

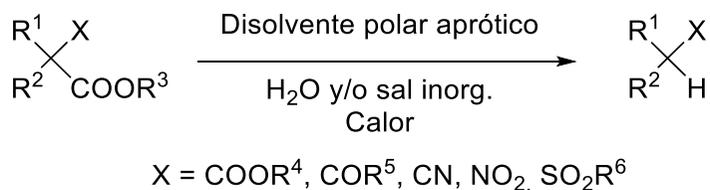
La desalcoxicarbonilación de Krapcho, o simplemente reacción de Krapcho, es aquella que permite la descarboxilación de un éster por calentamiento en presencia o ausencia de un haluro inorgánico. Los sustratos que pueden sufrir esta reacción son los ésteres malónicos y sus derivados, así como los β -cetoésteres y los α -cianoésteres. La reacción de

¹⁸⁷ Paiva-Martins, F; Fernandes, J; Rocha, S; Nascimento, H; Vitorino, R; Amado, F; Borges, F; Belo, L; Santos-Silva, A. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 609–616.

¹⁸⁸ Paiva-Martins, F; Fernandes, J; Santos, V; Silva, L; Borges, F; Rocha, S; Belo, L; Santos-Silva, A. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 135–140.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

Krapcho permite la eliminación de uno de los carbonilos sin recurrir a métodos como la hidrólisis que, según sea el caso, pueden llegar a ser inviábiles por la naturaleza del propio sustrato (Esquema 50).



Esquema 4. Esquema general de la reacción de Krapcho

Es por ello que esta reacción es una poderosa herramienta para obtener compuestos e intermedios a los que mediante otras vías serían imposibles o muy difícil de acceder, como por ejemplo la oleaceína **53** comentada anteriormente, el neurobloqueante muscular coccuvina¹⁸⁹ o el sesquiterpeno silfiperfol-6-eno.¹⁹⁰

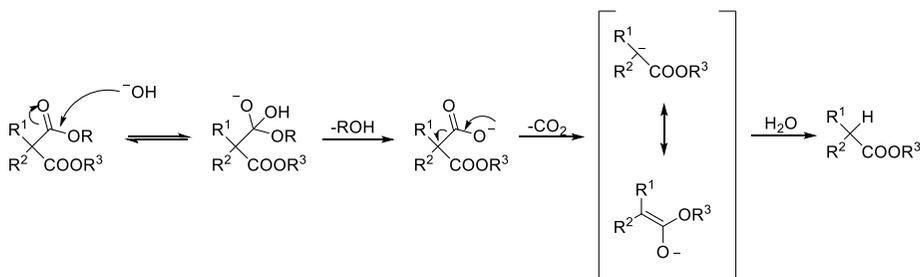
Mecánísticamente se plantean dos posibles rutas dependiendo del tipo de sustrato utilizado. En el esquema 51 se muestra cómo los malonatos de dialquilo, los β -cetoésteres y los α -cianoésteres, sin sustituyentes o monosustituidos en α , son capaces de reaccionar en disolventes polares apróticos húmedos como DMSO y DMF, en ausencia de una sal inorgánica que facilite la descarboxilación. El agua presente en el medio puede contener pequeñas cantidades de aniones hidroxilo que serían capaces de promover dicha desalcoxilación. El carboxilato

¹⁸⁹ Sano, T; Toda, J; Maehara, N; Tsuda, Y. *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 94–98.

¹⁹⁰ Wright, J; Drtina, GJ; Roberts, RA; Paquette, LA. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 5806–5817.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

intermedio generado perdería el grupo carboxilo en forma de CO_2 generando un carbanión que termina captando un protón del agua.¹⁹¹

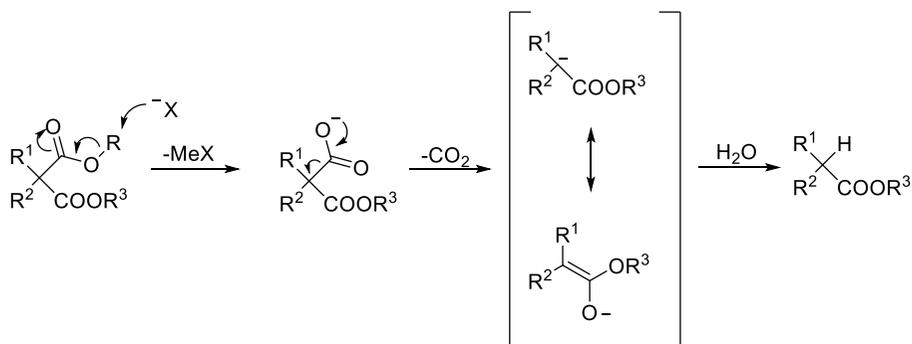


Esquema 5. Mecanismo de la reacción de Krapcho en ausencia de sal

En el caso de derivados disustituidos o que presenten impedimento estérico importante, es necesaria la adición de una sal inorgánica como NaCN, NaCl o LiCl entre otras, para que sea posible la descarboxilación. De este modo, mediante análisis de los productos de la reacción de Krapcho, se llega a la conclusión de que el anión de la sal debe atacar al fragmento *O*-metilo del éster a descarboxilar en un proceso similar a una S_N2. El carboxilato generado volvería a perder CO₂ y mediante captura de un protón del agua se obtendría el compuesto final (Esquema 52).¹⁹¹

¹⁹¹ Krapcho, AP; Engelbert, C. En *Organic Reactions* 2013; Vol. 81, pp 1–535.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización



Esquema 6. Mecanismo de la reacción de Krapcho con adición de sal

4.2. Reacción de desmetoxicarbonilación de Krapcho sobre compuestos fenólicos del olivo

4.2.1. Reacción de Krapcho sobre la oleuropeína

La desmetoxicarbonilación de Krapcho sobre compuestos fenólicos la hemos llevado a cabo siguiendo el método descrito por Vougianniopoulou *et al.*¹⁸² Dichos autores describen la obtención de oleaceína **53** con un rendimiento del 20%, por calentamiento de la oleuropeína **71** en DMSO a 150 °C, en presencia de 2 equiv de NaCl y 10 equiv de agua (Esquema 48). Los espectros de protones de los crudos de reacción revelaron que efectivamente, **71** se consumía y aparecían las señales características del fragmento dialdehídico de **53**, pero además, revelaron la presencia de un segundo compuesto desconocido y no descrito por los autores originales que no presentaba ninguna señal para protón de aldehído (Figura 29).

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

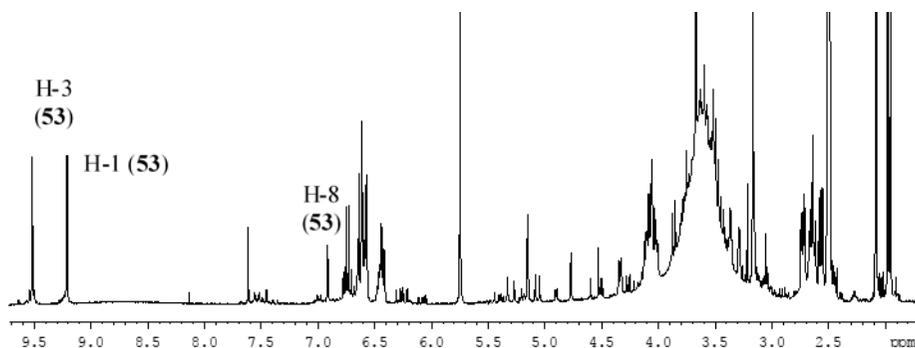


Figura 2. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) en $\text{DMSO-}d_6$ del crudo de reacción resultante de la reacción de Krapcho sobre **71**. Las señales asignadas corresponden a las señales características de la oleaceína **53**. Adicionalmente, se han marcado con un círculo las señales de un segundo compuesto desconocido.

Hemos comprobado que la reproducibilidad de esta reacción no era la esperada ya que, en repetidas ocasiones lo que obtuvimos fueron mayoritariamente productos de degradación. Tratando de optimizar y mejorar la reproducibilidad y el rendimiento, hemos llevado a cabo experiencias cambiando el disolvente, el tipo de sal, el rango de temperaturas y las cantidades de agua añadidas. Finalmente, nuestro objetivo pudo ser alcanzado haciendo reaccionar **71** en DMSO húmedo, sin adición extra de agua y en ausencia de sal, obteniendo de esta forma resultados totalmente reproducibles. Se comprobó también que la reacción necesita de alta temperatura ya que, mediante monitorización de la reacción por ^1H -RMN en $\text{DMSO-}d_6$ húmedo a diferentes tiempos, se constató que la reacción no comenzaba hasta alcanzar temperaturas superiores a 145 °C.

Habida cuenta de la alta inestabilidad de **53** en gel de sílice y otras fases estacionarias,¹⁹² el aislamiento y purificación de la oleaceína **53** y

¹⁹² Karkoula, E; Skantzari, A; Melliou, E; Magiatis, P. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*,

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

el nuevo compuesto de estructura aún por determinar, se abordó mediante acetilación de la mezcla en DMSO, sin evaporación del disolvente para evitar una posible descomposición, usando Ac₂O en exceso y una pequeña cantidad de DMAP como catalizador.

De esta forma, la purificación cromatográfica en gel de sílice permitió obtener la oleaceína acetilada (a la que llamaremos desde ahora aceoleína) **51** con un 42% de rendimiento y el compuesto desconocido acetilado **52** en un 15%. En el espectro de ¹H-RMN de **52** destacan las señales características de protones aldehídicos H-3 y H-1 a 9.6 y 9.2 ppm, así como el desapantallamiento sufrido por las señales de protones aromáticos que aparecen entre 7.5-7 ppm al encontrarse el compuesto acetilado (Figura 30).

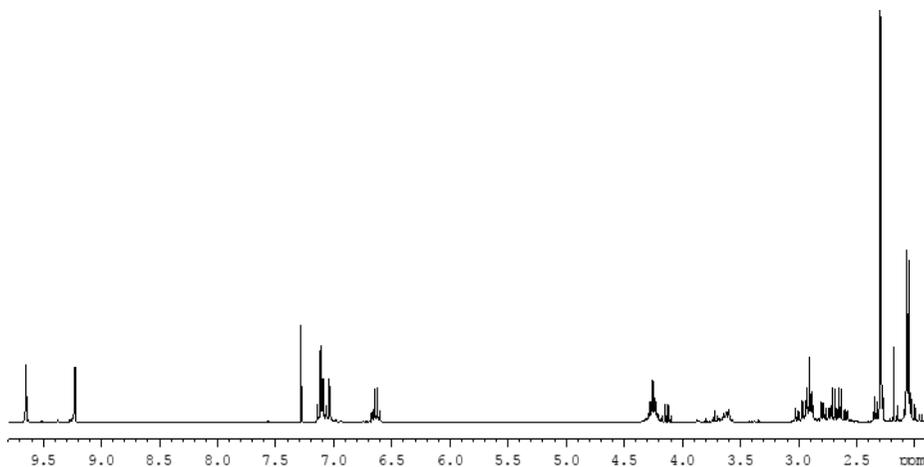


Figura 3. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz) en CDCl₃ de la aceoleína **51**

El espectro de ¹H-RMN del compuesto **52** muestra dos singuletes para 1 y 3 protones a 7.50 y 3.73 ppm respectivamente, que también

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

encontramos en la oleuropeína **71** y los aglicones **65** y **66**, ya que se corresponden con el grupo COOMe y al alqueno H-3, ambos conjugados y característicos del fragmento secoiridoide. También se observa un conjunto de tres señales a 6.14, 5.30 y 5.07 ppm para un protón cada una, y que presenta las constantes de acoplamiento típicas de tres protones de tipo vinilo (Figura 31).

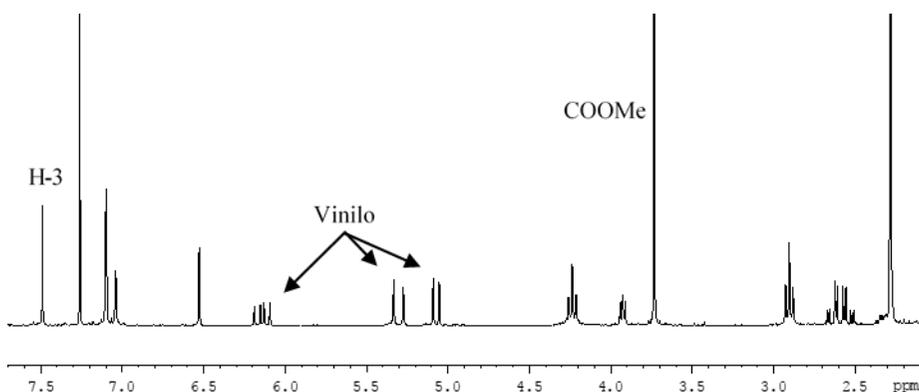


Figura 4. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) en CDCl_3 del compuesto desconocido acetilado **52**

El resto de señales de la molécula se asemeja a las de la aceoleína **51** y, con el dato de la masa molecular aportado por EM, dedujimos que la estructura era la correspondiente al aglicón del oleurosido **52** (DOA, Dehydrated Oleuroside Aglycone), pero en su forma deshidratada y acetilada (Figura 32). Esta modificación de la reacción de Krapcho ha sido objeto recientemente de una solicitud de patente.¹⁹³

¹⁹³ Fernández-Bolaños, JG; Maya, I; González-Benjumea, A. Uso del DMSO para la síntesis de oleaceína y oleocantal. P201700241, 2017.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

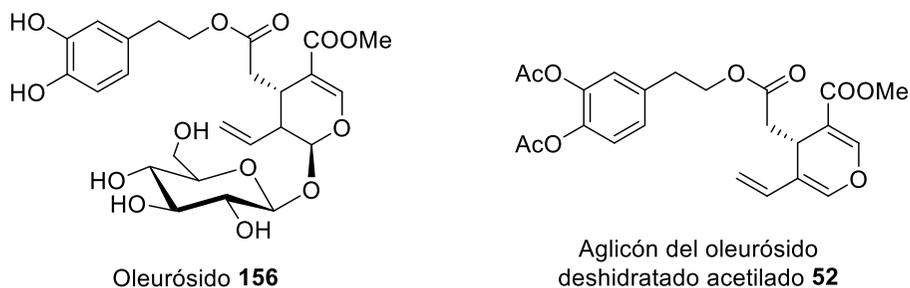


Figura 5. Estructuras del oleurosidio **156** y su aglicón deshidratado **52**

Por tanto, podemos concluir que:

a) El calentamiento de oleuropeína **71** en DMSO húmedo a 150 °C durante 5 h, en lugar de 10 h como se recoge en la bibliografía,¹⁸² conduce a la obtención de una mezcla de oleaceína **53** y del aglicón deshidratado del oleurosidio **54**.

b) La acetilación *in situ* sin evaporación del disolvente es necesaria para aislar y purificar la oleaceína, aunque en su forma acetilada, no descrita previamente (Esquema 53). Esta reacción, transcurre con un rendimiento global del 57% tras las dos etapas *one-pot*.

c) De la mezcla de reacción acetilada también se obtiene un nuevo compuesto **52**, cuya estructura corresponde al aglicón del oleurosidio deshidratado y acetilado.

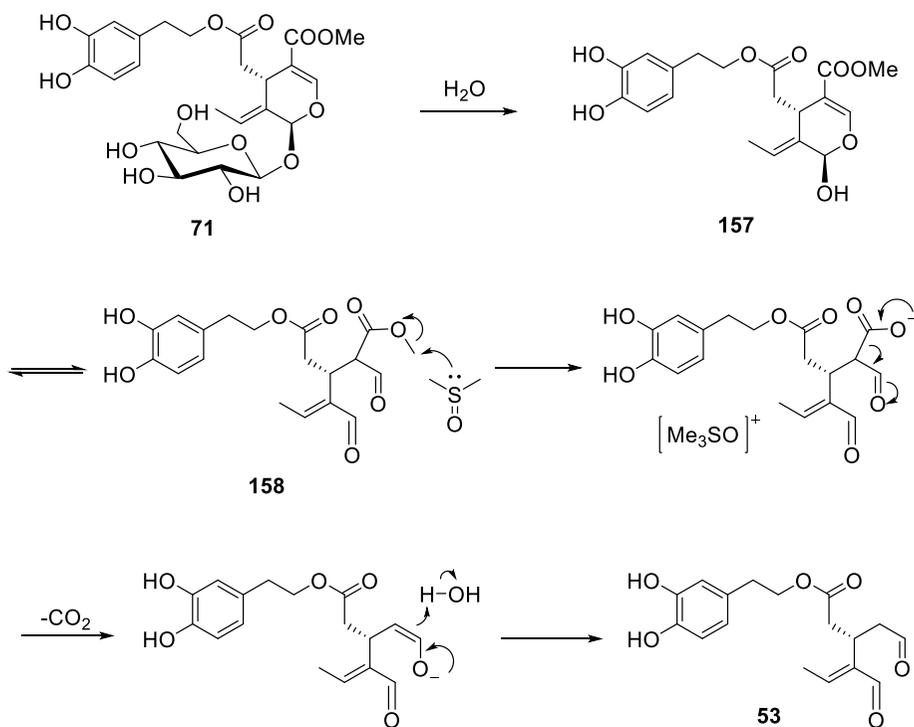
4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización



Esquema 7. Reacción de desmetoxicarbonilación de Krapcho sobre la oleuropeína **71** seguido de acetilación

Sobre la base de que las condiciones óptimas para la reacción que hemos puesto a punto no hacen uso de una sal inorgánica y de que el DMSO posee cierto carácter nucleófilo, hemos postulado que el disolvente podría jugar el papel de la sal, captando el metilo del intermedio **158** lo que daría lugar a trimetilsulfoxonio más el correspondiente carboxilato, cuya descarboxilación con pérdida de CO₂ conduciría a la formación del compuesto **53** (Esquema 54).

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización



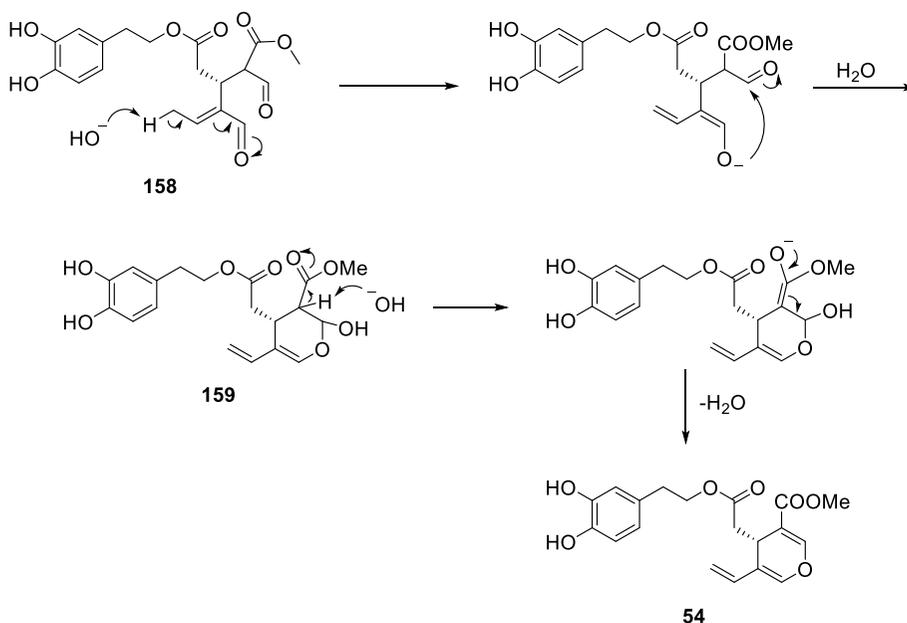
Esquema 8. Mecanismo propuesto para la reacción de Krapcho sobre **71** en DMSO húmedo

Un hecho que reforzaría esta hipótesis es que en el espectro de ^1H -RMN en $\text{DMSO}-d_6$, aparece a 3.17 ppm, un singulete que podría corresponder al metilo de la especie trimetilsulfoxonio.

En el Esquema 55 se indica el mecanismo propuesto para la formación del DOA **54**. Teniendo en cuenta que al medio se libera CO_2 y un anión hidróxido, no es de extrañar que exista una cierta cantidad de bicarbonato, lo que proporcionaría un medio ligeramente básico que podría desprotonar en la posición H-10 del intermedio **158**. De ocurrir esto, podría generarse otro intermedio de tipo enolato que atacaría intramolecularmente a C-3. Finalmente, la abstracción de un segundo protón en C-4 generaría un carbanión estabilizado por la presencia del

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

éster metílico que expulsaría el grupo hidroxilo en C-3 (E1_{CB}) para obtener el compuesto α,β -insaturado **54**.



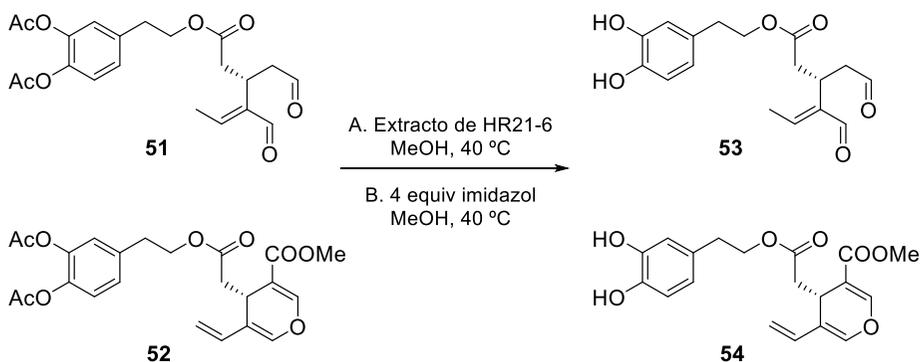
Esquema 9. Mecanismo propuesto para la formación de **54** a partir de **71**

Por último, esta misma reacción la hemos realizado por calentamiento en un microondas científico (Anton Para Monowave 300 reactor) con objeto de observar si el rendimiento de la reacción mejoraba, observándose una clara disminución de la cantidad de glucosa al término de la reacción, lo que al menos, facilita la posterior purificación cromatográfica de los compuestos acetilados.

La desacetilación de ambos catecoles **51** y **52** se realizó satisfactoriamente a través de dos rutas (Esquema 56). Por un lado, la *O*-desacetilación quimioenzimática con el extracto HR21-6 de *Bacillus pumilus* en MeOH y 40 °C, condujo a los derivados **53** y **54** en tan solo 3 y 4 h respectivamente con rendimientos cuantitativos. Por otro lado, el

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

tratamiento con 4 equiv de imidazol en MeOH a 40 °C durante 24 h también proporcionó a los dos compuestos desacetilados.



Esquema 10. *O*-Desacetilación quimioenzimática de aceoleína **51** y DOA acetilado **52** (A) mediante catálisis enzimática o bien (B) mediante catálisis química¹⁹³

Como se ha comentado, la inestabilidad de la oleaceína impide la purificación cromatográfica del compuesto tras el tratamiento con imidazol, por lo que la confirmación de que la conversión de la desacetilación fue completa, sólo se pudo realizar mediante RMN de protones (Figura 33).

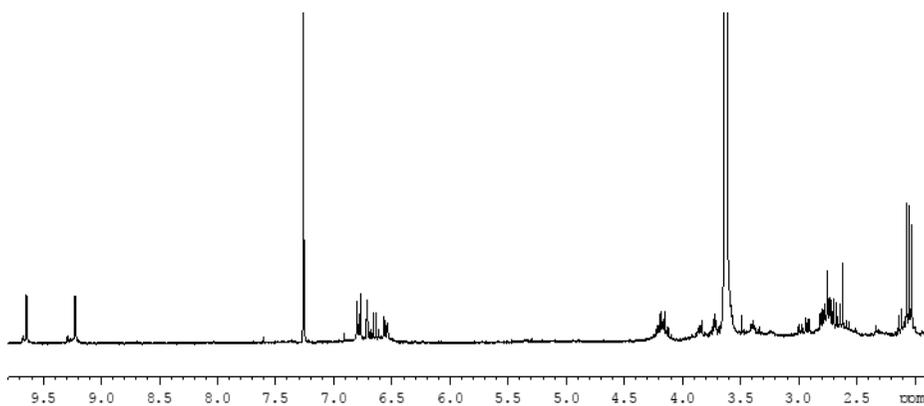


Figura 6. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz) de la oleaceína **53**

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

Por el contrario, el compuesto **54** sí pudo ser purificado mediante cromatografía en columna obteniéndose con un rendimiento del 32%. Su estructura fue confirmada por RMN y EM confirmándose la desacetilación al observarse un desplazamiento de las señales correspondientes a los protones aromáticos por debajo de 7.00 ppm en ^1H -RMN (Figura 34).

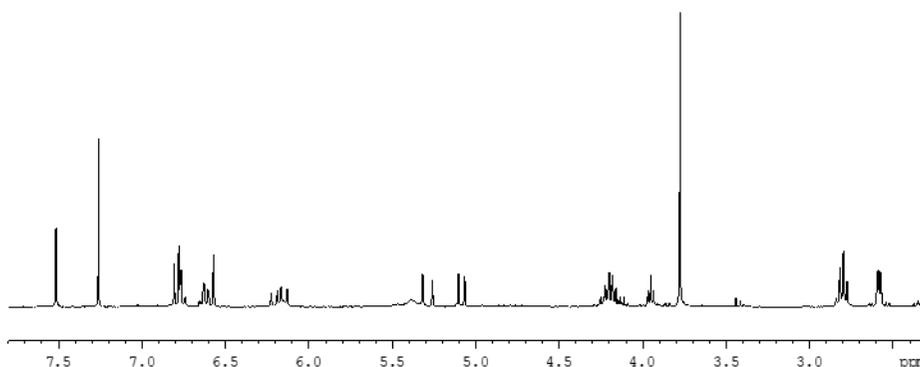


Figura 7. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) en CDCl_3 del aglicón deshidratado del oleurósido (DOA) **54**

Tras estos resultados, al comparar ambos métodos de síntesis resulta mucho más ventajoso, tanto en rendimiento y operatividad, la vía quimioenzimática pues evita el uso de columnas de gel de sílice para la purificación de los productos, pudiéndose obtener ambos exclusivamente por filtración y lavados con agua en embudo de decantación.

4.2.2. Reacción de Krapcho sobre otros fenoles de interés biológico

Con el objetivo de extender la reacción de Krapcho a otros sustratos hemos llevado a cabo la reacción tanto con los aglicones

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

monoaldehídicos **65** y **66**, como con un derivado de la oleuropeína protegida en el grupo catecol con el grupo metilendioxi **55**. En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan un grupo catecol protegido con un puente de metilideno, así como fármacos, drogas o pesticidas entre los que podemos destacar el Tadalafilo, el éxtasis o el PBO.

El Talafilo es componente de fármacos como Cialis y Adcirca, aprobados por la FDA para el tratamiento de la disfunción eréctil, la hiperplasia prostática benigna (Cialis) y la hipertensión pulmonar arterial (Adcirca). El PBO es un compuesto orgánico sencillo que se utiliza como componente de ciertos pesticidas ya que tiene la propiedad de potenciar la actividad de estos, aunque su actividad como pesticida *per se* es nula.

Una ventaja de disponer de moléculas bioactivas o potencialmente bioactivas con este grupo, es que no solo permite aumentar la lipofilia con la consiguiente mejora en su biodisponibilidad, sino que el grupo metilendioxi es fácilmente eliminado por la acción de las enzimas citocromo P450. Estas enzimas están presentes en especímenes de todo tipo (animales e incluso virus) y concretamente en los humanos, el sistema citocromo P450 se encuentra en las membranas de las células¹⁹⁴ lo que convierte a todo profármaco que incluya el grupo metilendioxi como protector en un buen candidato bioactivo.

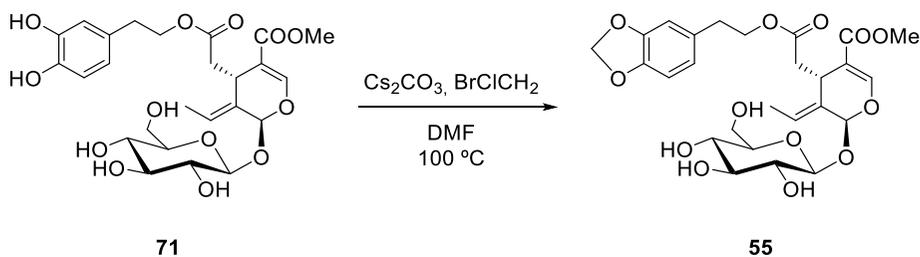
Para la síntesis de la 3,4-*O*-metilendioxi oleuropeína **55** se siguió un procedimiento similar al publicado por Zelle y McClellan¹⁹⁵ utilizando Cs₂CO₃ como base para generar el alcoholato y CH₂Cl₂ en

¹⁹⁴ Berka, K; Hendrychová, T; Anzenbacher, P; Otyepka, M. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 11248–11255.

¹⁹⁵ Zelle, R. E.; McClellan, W. J. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2461–2464.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

DMF a 100 °C. El uso de 1.5 equiv de base, junto con 20 equiv de CH₂Cl₂ condujo a **55** (55%) tras 22 h de reacción. No obstante, la sustitución del CH₂Cl₂ por BrClCH₂ aceleró considerablemente la reacción llegando al compuesto deseado en tan sólo 1 h de calentamiento con el mismo rendimiento (Esquema 57).



Esquema 11. Síntesis de 3,4-*O*-metilidendioxi oleuropeína **55**

El producto fue caracterizado mediante RMN y EM, confirmándose la inserción del metilideno por la aparición del singlete a 5.90 ppm en el espectro de protones (Figura 35).

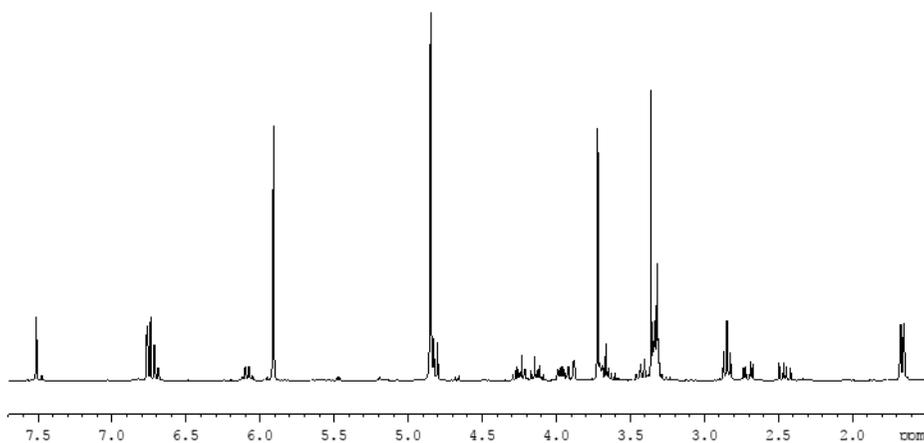
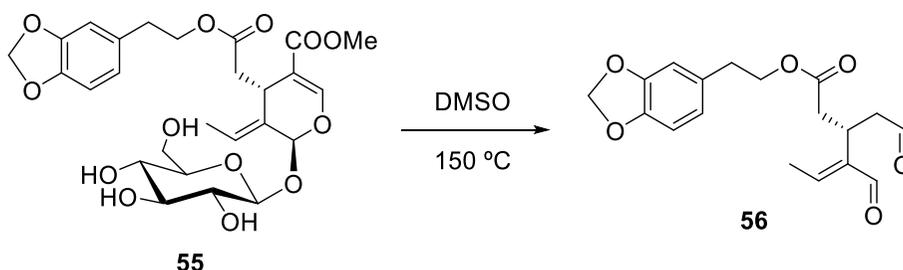


Figura 8. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz) en CD₃OD de 3,4-*O*-metilidendioxi oleuropeína **55**

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

La reacción de Krapcho sobre **55** se llevó a cabo utilizando las mismas condiciones optimizadas para la oleuropeína **71**. El calentamiento de **55** en DMSO húmedo durante 5 h condujo a la formación del dialdehído **56** sin detectarse la formación de un segundo producto análogo al DOA, obtenido en la reacción sobre **71** (Esquema 58).



Esquema 12. Síntesis de 3,4-*O*-metilidendioxi oleaceína **56** mediante reacción de Krapcho sobre **55**

El dialdehído **56** fue obtenido con un rendimiento del 37% tras purificación cromatográfica y su estructura confirmada por espectroscopia de RMN y EM, encontrando de nuevo las características señales de los protones del dialdehído entre 9.64 y 9.24 ppm, además del singulete a 5.92 ppm de los protones del grupo metilideno (Figura 36).

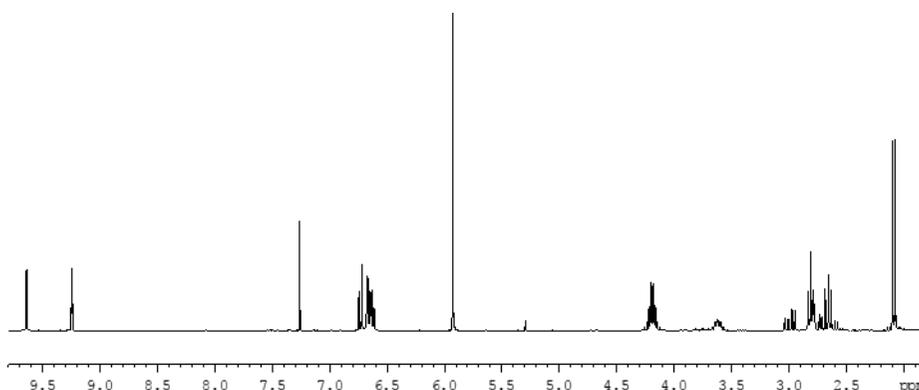
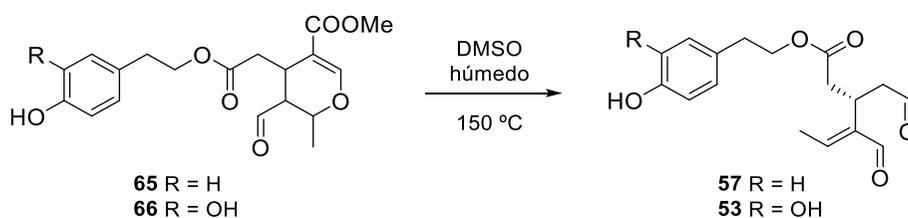


Figura 9. Espectro de ¹H-RMN (300 MHz) en CDCl₃ de 3,4-*O*-metilidendioxi oleaceína **56**

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

De la misma forma, la reacción de Krapcho sobre los aglicones monoaldehídicos de ligstrósido **65** y oleuropeína **66**, obtenidos tras purificación cromatográfica a partir de un extracto de polifenoles de aceite de oliva virgen extra, fue realizada usando las condiciones optimizadas para **71**. En todos los ensayos, los aglicones fueron disueltos en un volumen de DMSO húmedo de forma que resultaran disoluciones de concentración 10 mg/ml. Se necesitaron 4 h de calentamiento para transformar **66** en oleaceína **53**, y 7 h para obtener oleocantal **57** a partir de **65** (Esquema 59).



Esquema 13. Reacción de desmetoxicarbonilación de Krapcho de los aglicones monoaldehídicos **65** y **66** para dar oleocantal **57** y oleaceína **53**, respectivamente¹⁹³

Por otra parte, la transformación de los monoaldehídos en los dialdehídos también fue posible cuando la reacción fue llevada a cabo sobre la mezcla de polifenoles extraído del aceite de oliva. Así, es posible transformar una mezcla original que contiene hasta 4 componentes mayoritarios en una mezcla de tan los dos más interesantes, el oleocantal y la oleaceína, cuyo aislamiento y purificación cromatográfica se simplifica notablemente de esta forma (Figura 37). El oleocantal puede aislarse directamente por cromatografía en columna de la mezcla obtenida, mientras que la oleaceína requeriría un paso previo de acetilación de la mezcla¹⁹³ cuya separación proporciona la oleaceína **53** y el oleocantal acetilado (aceocantal) **58**, teniendo así acceso a dos compuestos lipófilos con un potencial farmacológico interesante.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

Resaltar también, que la aplicación de la reacción de Krapcho sobre un extracto polifenólico procedente de aceite de oliva virgen extra aporta una nueva e interesante vía de acceso hacia el oleocantal **57**, ya que podría competir con la síntesis química a nivel industrial debido a su mejor escalabilidad y viabilidad económica.

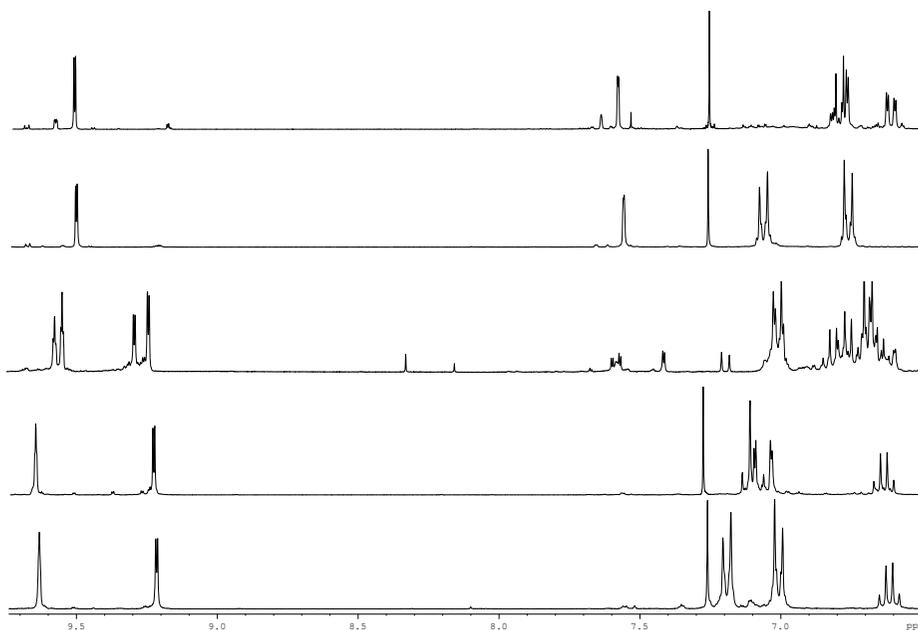
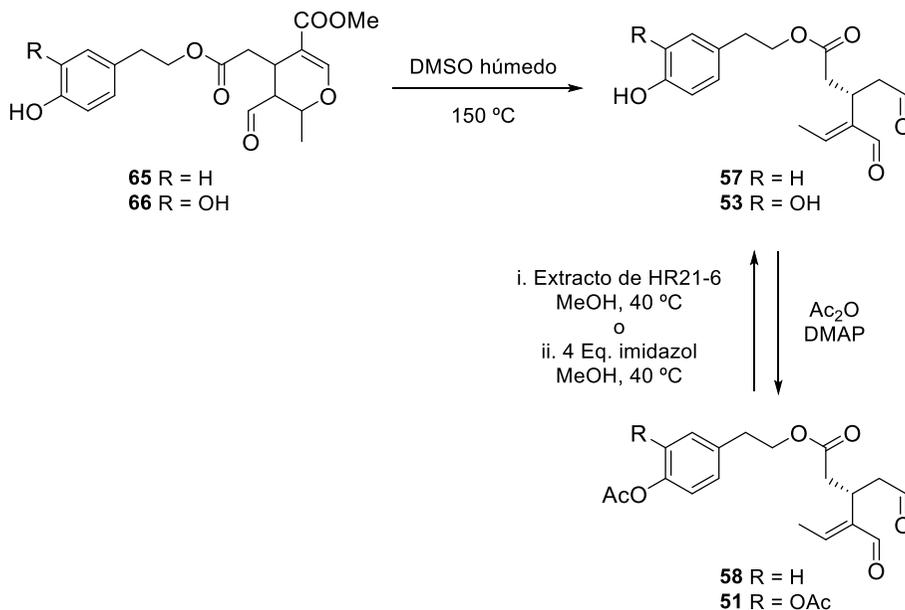


Figura 10. Espectros parciales comparativos de ¹H-RMN (300 MHz) en DMSO-*d*₆ de la región aldehídica y aromática de (de abajo hacia arriba): oleocantal **57**, oleaceína **53**, mezcla de polifenoles tras la reacción de Krapcho, aglicón de ligstrósido **65** y aglicón de oleuropeína **66**

Las posibilidades que abre este método son muchas, ya que puede permitir enriquecer aceites de oliva con extractos que prácticamente sólo contienen oleocantal y oleaceína aumentando considerablemente la capacidad antioxidante y los efectos saludables de los nuevos aceites enriquecidos.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

Finalmente, la desacetilación de **51** y **58**, mediante los procedimientos ya mencionados en el Esquema 10 da como resultado la obtención de **53** y **57**, cubriendo así todo el abanico de posibilidades (Esquema 60).¹⁹³

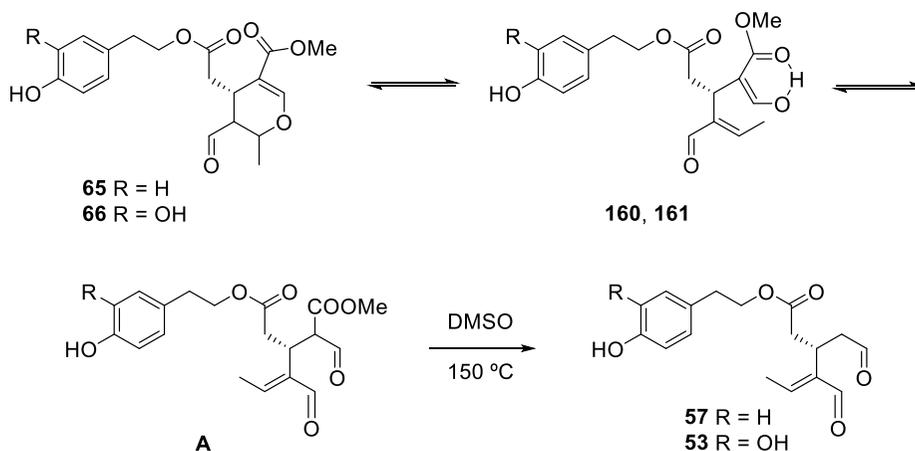


Esquema 14.

La capacidad de los aglicones para dar la reacción de Krapcho puede ser explicada atendiendo a la posibilidad de que existan en equilibrio con una forma abierta (**160**, **161**) que a su vez pueda

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

evolucionar hasta el intermedio análogo a **158 (A)** anteriormente citado (Esquema 61).



Esquema 15. Mecanismo propuesto de reacción de Krapcho sobre los aglicones monoaldehídicos **65** y **66**

Dichos intermedios han sido recientemente detectados en el aceite de oliva virgen extra tanto anterior como posteriormente al

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

proceso de extracción, denominándose oleokoronal (R = H) **160** y oleomissional (R = OH) **161**.¹⁹⁶

4.3. Derivatización de los secoiridoides dialdehídicos

En el presente apartado se describirán distintos procedimientos sintéticos para obtener derivados de oleaceína **53** y/o oleocantal **57** mediante transformación química de sus grupos aldehído.

4.3.1. Reacciones de reducción de los grupos aldehído

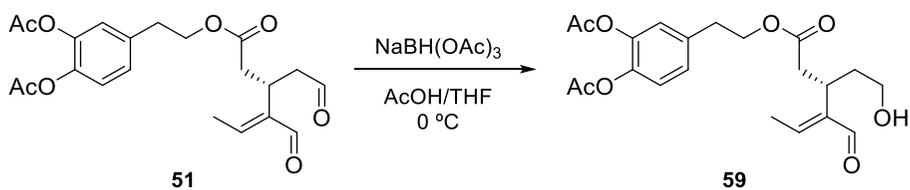
Los primeros ensayos sobre la aceoleína **51** y el aceocantal **58**, se realizaron siguiendo el método empleado por Smith III *et al.*¹⁷⁸ para la reducción de ambos carbonilos empleando NaBH₄ en MeOH a 0 °C. No obstante, este método demostró ser ineficaz debido a desacetilaciones y metanólisis de los compuestos, que fueron detectadas mediante ¹H-RMN y provocadas posiblemente al pH básico generado por el reductor.

El uso de una fuente de hidruros más suave como es el NaBH(OAc)₃ en medio ácido, permitió la reducción quimioselectiva del aldehído no conjugado de **51**, pudiéndose obtener el correspondiente alcohol **59** con un rendimiento del 46% (Esquema 62). Durante la

¹⁹⁶ Diamantakos, P; Velkou, A; Killday, KB; Gimisis, T; Melliou, E; Magiatis, P. *Olivae*, **2015**, *122*, 22–33.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

purificación cromatográfica, fue posible la recuperación del producto de partida no reaccionante.



Esquema 16. Síntesis de **59** mediante reducción regioselectiva del carbonilo no conjugado

El compuesto fue caracterizado por RMN y EM detectando en el espectro de protones la ausencia de la señal sobre 9.6 ppm, indicativa del aldehído no conjugado. En consecuencia, la aparición de dos multipletes a 3.39 y 3.28 ppm que corresponden a los protones del nuevo $-\text{CH}_2$ formado, permitieron confirmar la reducción del compuesto (Figura 38).

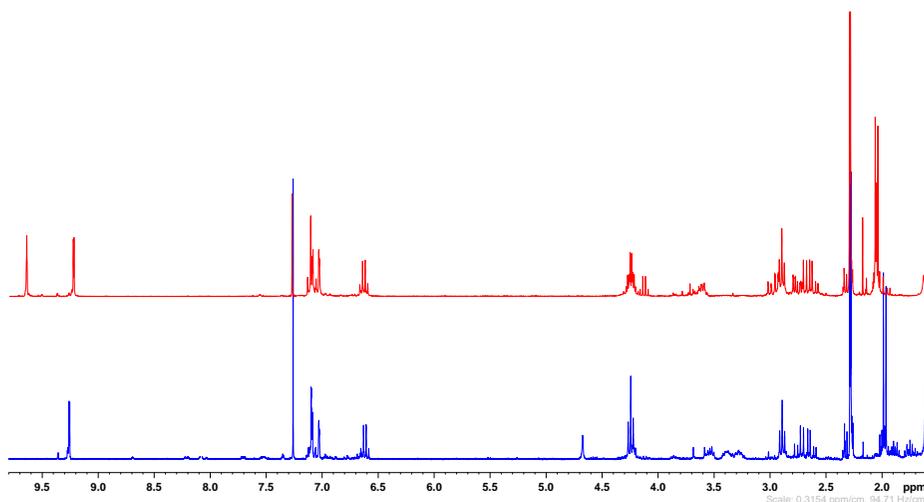
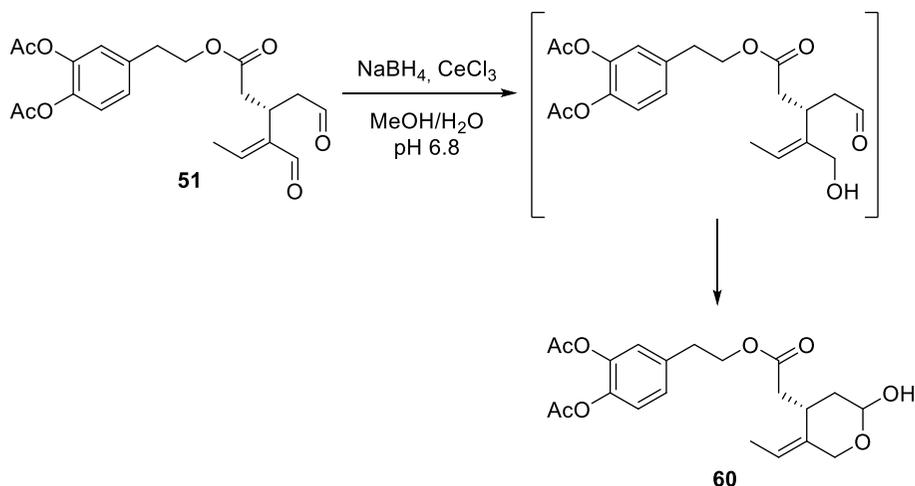


Figura 11. Espectros comparativos de ^1H -RMN (300 MHz) en CDCl_3 de aceoleína **51** (arriba) y **59** (abajo)

Paralelamente, la reducción quimioselectiva del grupo aldehído conjugado fue posible mediante la modificación del método empleado

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

por Paiva *et al.*¹⁹⁷ y que consiste en el empleo de NaBH₄ en una disolución de MeOH acuoso tamponada a pH 6.8 en presencia de un equiv de CeCl₃·6H₂O (Esquema 63).



Esquema 17. Síntesis de **60** mediante reducción regioselectiva del carbonilo conjugado

Dicho alcohol **60** se purificó mediante cromatografía en gel de sílice obteniendo el segundo derivado monoreducido con un rendimiento del 54%. El compuesto se caracterizó mediante RMN y EM, detectándose en el espectro de protones que dicho producto aparece como una mezcla prácticamente 1:1 de dos isómeros (Figura 39).

¹⁹⁷ Paiva-Martins, F; Gonçalves, P; Borges, JE; Przybylska, D; Ibba, F; Fernandes, J; Santos-Silva, A. *Food Funct.* **2015**, *6*, 2350–2356.

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

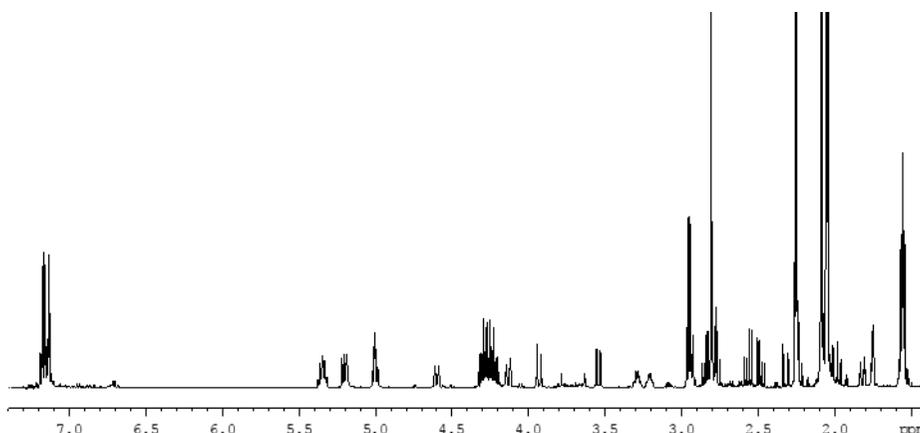


Figura 12. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) en $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ del derivado monoreducido en el aldehído conjugado **60**

El correspondiente derivado desacetilado de **60**, un posible metabolito de la oleaceína **53**, ha sido descrito como tal por Paiva, en forma de mezcla isómeros configuracionales *E/Z*. No obstante, experimentos de NOESY bidimensional realizados con el diacetilado **60** han permitido confirmar la retención de la configuración *E* del doble enlace. La aparición de idénticos efectos NOE para los H-8 y H-10 de ambos isómeros permiten confirmar que el producto se obtiene como mezcla de epímeros en C-3 (Figura 40).

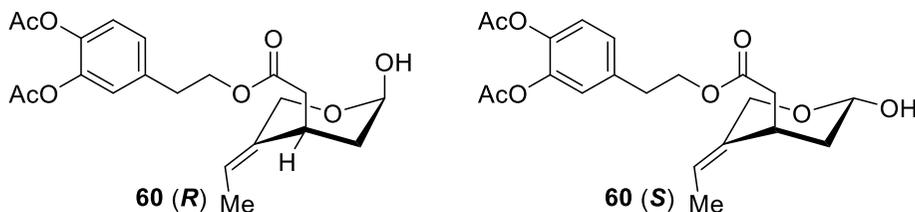


Figura 13. Estructura de la mezcla de diastereoisómeros *R/S* de **60**

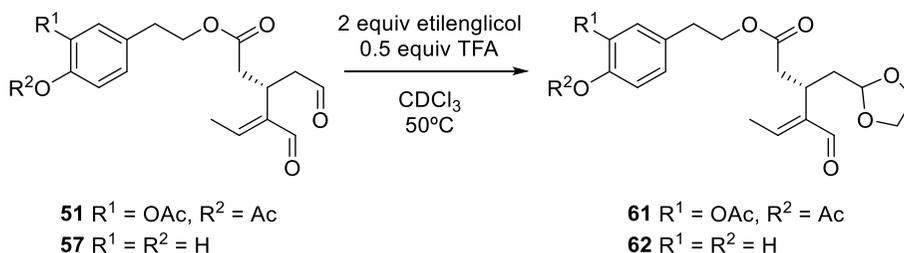
Por último, señalar que el derivado desacetilado del compuesto **60** ha demostrado ser un buen protector de los glóbulos rojos frente a la

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

hemólisis inducida por estrés oxidativo, al igual que la oleaceína **53** y el aglicón de la oleuropeína **66**,¹⁹⁷ por lo que su acetilado podría mostrar un incremento de la actividad debido a su mayor biodisponibilidad.

4.3.2. Reacciones de acetalación

Una vía potencialmente fructífera para la obtención de nuevos derivados lipófilos de oleocantal y oleaceína es la transformación en acetales de sus grupos aldehídos. Así, el tratamiento del derivado acetilado **51** con etilenglicol en presencia de TFA como catalizador ácido, condujo a la acetalación quimioselectiva del aldehído no conjugado obteniéndose el derivado **61** con un rendimiento del 68%. La monitorización de la reacción mediante ¹H-RMN empleando como disolvente CDCl₃, permitió establecer el empleo de 2 equiv de etilenglicol, 0.5 equiv de TFA y 3 h de calentamiento a 50 °C como condiciones óptimas (Esquema 64). Por otra parte, la mayor estabilidad del oleocantal permitió su acetalación selectiva dando **62** (84%) en las mismas condiciones de reacción, pudiéndose llegar al correspondiente acetilado **63** mediante acetilación estándar en Ac₂O/Py.



Esquema 18. Acetalación quimioselectiva de la aceoleína **51** y el oleocantal **57**¹⁹³

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

Los compuestos acetilados aislados fueron caracterizados por ^1H -RMN y EM, confirmándose la introducción del grupo acetal en RMN de protones debido a la desaparición de la señal a 9.6 ppm del protón aldehídico y a la aparición de un doble doblete a 4.68 ppm correspondiente al nuevo H-3 (Figura 41).

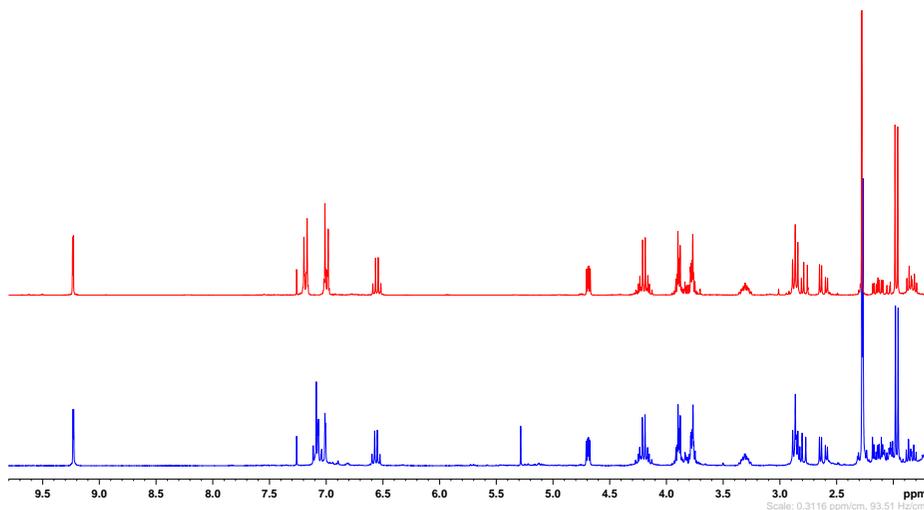
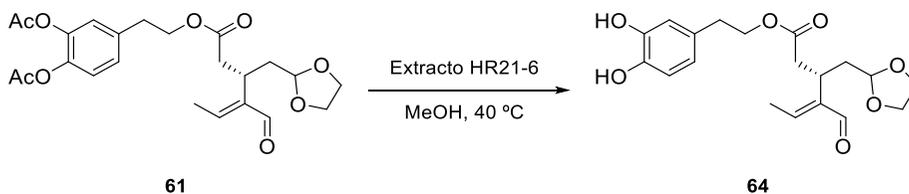


Figura 14. Espectros comparativos de ^1H -RMN (300 MHz) en CDCl_3 de los monoacetales acetilados **61** (abajo) y **62** (arriba)

Por último, el derivado acetálico de la oleaceína pudo ser desacetilado con rendimiento prácticamente cuantitativo, mediante el uso del extracto enzimático procedente de *Bacillus pumilus* en MeOH (Esquema 65).



Esquema 19. *O*-Desacetilación del monoacetal **61** mediante catálisis enzimática¹⁹³

4. Transformación química de fenoles secoiridoides procedentes del olivo. Estrategias para su estabilización

Los nuevos derivados desacetilados **62** y **64** fueron caracterizados satisfactoriamente mediante RMN y EM, observándose el apantallamiento por debajo de 7 ppm, de las señales que corresponden a protones aromáticos, lo que confirma la desprotección de los compuestos (Figura 42).

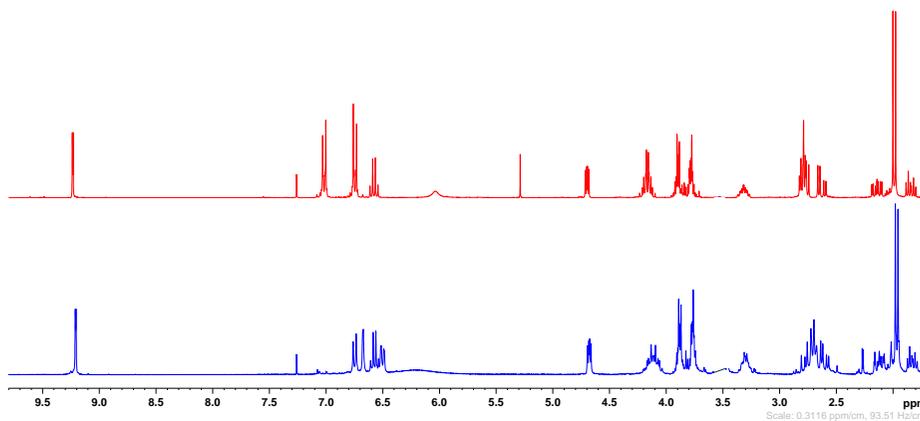


Figura 15. Espectros comparativos de ^1H -RMN (300 MHz) en CDCl_3 de los monoacetales desacetilados **62** (arriba) y **64** (abajo)

**5. DETECCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y
AISLAMIENTO DE FENOLES
SECOIRIDOIDES DE INTERÉS
BIOLÓGICO DEL ACEITE DE OLIVA
VIRGEN EXTRA**

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

5.1. Introducción

El aceite de oliva virgen (AOV) o virgen extra (AOVE), un ingrediente básico de la dieta de los países mediterráneos desde la antigüedad hasta nuestros días, ha visto cómo su popularidad no ha hecho más que aumentar en los últimos años. Como producto, no sólo hay que resaltar su contenido calórico calculado en unas 37.7 kJ/g gracias, en mayor medida, a los ácidos grasos que contiene (fundamentalmente insaturados); sino que también es un símbolo de gran valor histórico, cultural y económico.

Como alimento, este aceite vegetal ha demostrado ser excepcional y parte fundamental de la saludable dieta Mediterránea, reconocida en 2010 por la UNESCO como Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad. Tanto es así que La Fundación Dieta Mediterránea ha colocado recientemente al aceite de oliva en el centro de su famosa pirámide.

Así mismo, la Organización Mundial de la Salud ha puesto de relieve que, desde el punto de vista de la salud, el mayor problema al que se enfrenta el mundo occidental es el auge de las enfermedades crónicas. Éstas son fruto de malos hábitos diarios entre los que destacan el sedentarismo y la mala alimentación, lo que a su vez se correlaciona con el aumento en las últimas décadas de las enfermedades autoinmunes.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que únicamente las dietas tradicionales como la asiática y la Mediterránea son capaces de amortiguar el aumento de estas enfermedades en la población.^{198,199,200} La explicación estriba en que el aceite de oliva virgen extra entre otros alimentos de esta dieta, aporta considerables efectos beneficiosos fruto de su perfil graso, sus potentes antioxidantes o su contenido en tocoferoles. De hecho, numerosos estudios realizados en humanos han demostrado sus efectos positivos en el sistema cardiovascular previniendo enfermedades coronarias, trombosis, procesos inflamatorios²⁰¹ y limitando el daño producido por oxidación del ADN y de lípidos de membranas celulares.²⁰²

5.1.1. Composición del aceite de oliva virgen extra

En cuanto a su composición nos encontramos con que se trata de una mezcla compleja que depende del tipo de aceituna, del grado de maduración, las condiciones climatológicas y el estrés hídrico; así como a variables técnicas relacionadas con el proceso de producción como las condiciones de molturación o el tiempo de batido o malaxación.^{!Error!} **Marcador no definido.** Bromatológicamente, sus componentes pueden

¹⁹⁸ Alarcón-de-la-Lastra, C; Motilva, V; Herrerías, J. *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *7*, 933–950.

¹⁹⁹ Martín-Peláez, S; Covas, MI; Fitó, M; Kušar, A; Pravst, I. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 760–771.

²⁰⁰ Vargas, AJ; Neuhouser, ML; George, SM; Thomson, CA; Ho, GYF; Rohan, TE; Kato, I; Nassir, R; Hou, L; Manson, JE. *Am. J. Epidemiol.* **2016**, *184*, 23–32.

²⁰¹ Covas, MI. *Pharmacol. Res.* **2007**, *55*, 175–186.

²⁰² Fitó, M; de-la-Torre, R; Covas, MI. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *55*, 1215–1224.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

dividirse en dos grandes familias, una mayoritaria que representa el 98-99% en peso de naturaleza saponificable y otra minoritaria insaponificable que llegaría hasta el 2%.

Como parte de la fracción mayoritaria destacan:

Ácidos grasos libres

Normalmente en pequeñas concentraciones y procedentes de la hidrólisis parcial de los triglicéridos. La detección de variaciones en su concentración constituye una buena prueba acerca de posibles adulteraciones y/o mal tratamiento en la producción y/o almacenamiento. Son los responsables de la acidez del producto, elemento esencial a la hora de catalogar el aceite.

Como parte de los triglicéridos destacan los ácidos grasos monoinsaturados (en torno al 77.5%) frente a los saturados (en torno al 16.3%) y los poliinsaturados (en torno a 6.4%), siendo el ácido oleico el mayoritario.

Triglicéridos

Conforman la fracción mayoritaria dentro del grupo de los compuestos saponificables. Como es sabido, son triésteres de glicerol y ácidos grasos, siendo estos iguales o diferentes en todas sus combinaciones. Sin embargo, debido a la preponderancia de oleico en la mezcla, existe una mayoría de triglicéridos con las tres cadenas grasas insaturadas (trioleína aproximadamente 62% y oleico-oleico-linoleico

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

4%), seguida de triglicéridos con dos cadenas insaturadas (oleico-oleico-palmítico 29% y oleico-oleico-esteárico 2%).²⁰³

Mono y diglicéridos

Es una fracción minoritaria que representa aproximadamente el 1.0-3.0%. Aunque en principio proceden de una biosíntesis incompleta, pueden ayudar a detectar adulteraciones o almacenamiento indebido ya que se puede determinar la edad de un aceite por la variación de la relación entre los 1,2 y 1,3-diacilglicéridos.

Por otra parte, en la fracción minoritaria destacan:

Fosfolípidos y ceras

Todos ellos contienen ácidos grasos. Entre los fosfolípidos destaca la dioleilfosfatidilcolina, el dioleil fosfatidilinositol y la dioleil fosfatidilserina (Figura 43), encontrándose en cantidades entre 40-135 ppm.²⁰⁴

²⁰³ Abia, R; Perona, JS; Pacheco, YM; Montero, E; Muriana, FJ; Ruiz-Gutiérrez, V. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 2184–2191.

²⁰⁴ Cert, A; Lanzón, A; Carelli, AA; Albi, T; Amelotti, G. *Food Chem.* **1994**, *49*, 287–293.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

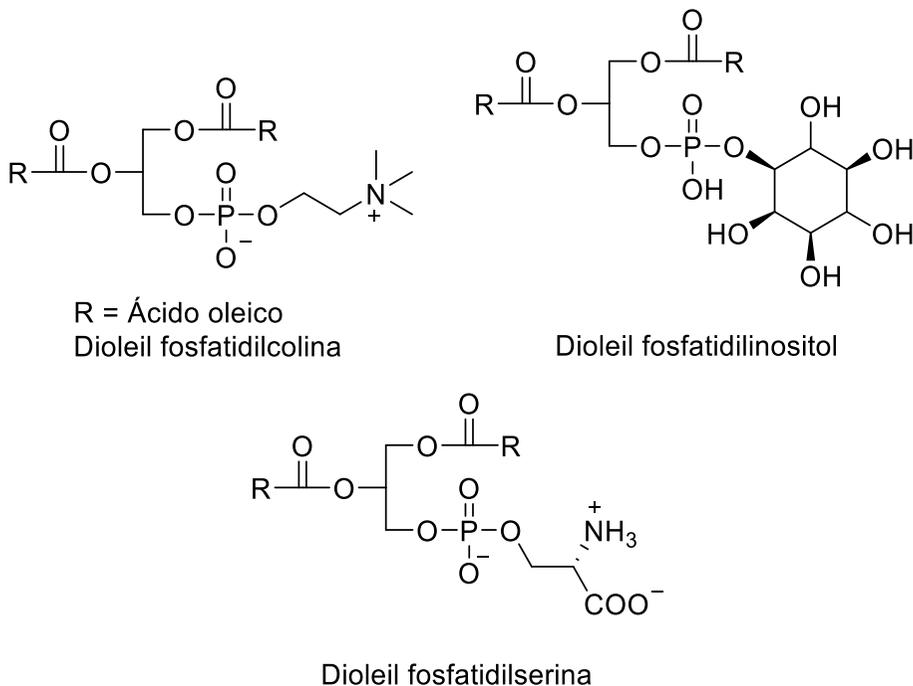


Figura 1. Estructuras de los fosfolípidos más importantes del aceite oliva

Las ceras encontradas en el aceite de oliva son ésteres de número par de carbonos (entre 36 y 46) y su contenido no suele superar los 250 ppm. Se producen de forma natural, aunque su contenido puede aumentar, por determinadas condiciones de almacenamiento y producción.²⁰⁵

²⁰⁵ Mucciarella, MR; Marsilio, V. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* **1997**, 74, 105–112.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

Hidrocarburos

Se encuentran fundamentalmente terpenos como el escualeno **166**, que representa el 40% de la fracción minoritaria, y el β -caroteno **167**, presente en pequeñas cantidades (0,5-4 ppm) (Figura 44).

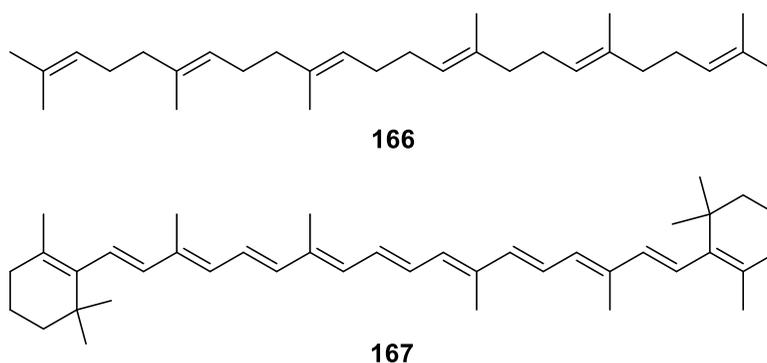


Figura 2. Estructura de los terpenos mayoritarios del aceite de oliva

Alcoholes

Se encuentran presentes alcoholes lineales con alto número de carbonos (21-28) y alcoholes terpénicos como la β -amirina, el butirospermol o el cicloartenol presentes en grandes cantidades (1000-1500 ppm).²⁰⁶

También se encuentra un grupo numeroso de esteroides entre los que destacan el β -sitosterol **168**, Δ -5-avenasterol **169**, el campesterol **170** y los dioles eritrodil **171** (150-1000 ppm²⁰⁷) y uvaol **172** (60-200 ppm)

²⁰⁶ Lozano Sánchez, J; Segura Carretero, A; Fernández Gutiérrez, A. En *Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía. Composición del aceite de oliva*, Arguval Ediciones, **2010**.

²⁰⁷ Kiritsakis, A; Markakis, P. *Adv. Food Res.* **1988**, *31*, 453–482.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

(Figura 45) siendo la concentración total de esta familia sobre los 1130-2650 ppm.²⁰⁶

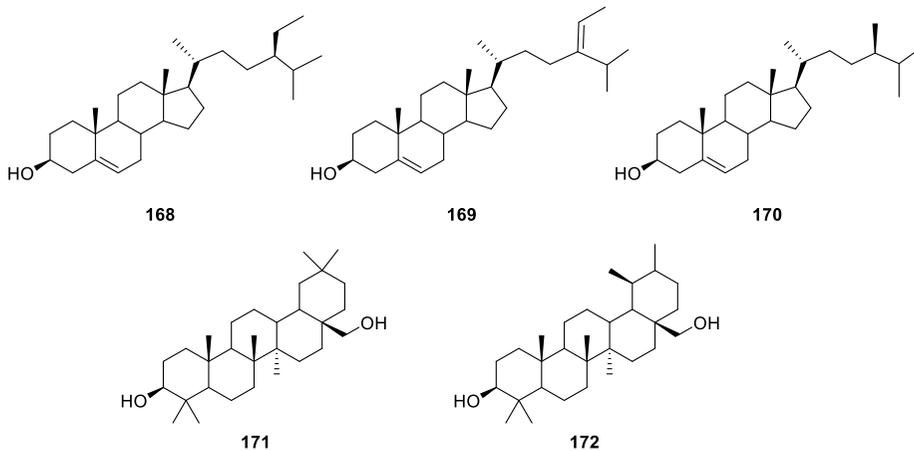


Figura 3. Estructuras de los mono y dialcoholes terpénicos más importantes del aceite de oliva

Tocoferoles

Estos fenoles con actividad antioxidante constituyen la Vitamina E, y se encuentran principalmente en su forma α **173** (90-95%) y en menor medida en la forma β **174** (<10%), aunque existe cierta controversia sobre la presencia o no del δ -tocoferol **175** (Figura 46). Su contenido depende de la variedad de la oliva, y en general, en aceites de calidad su concentración suele encontrarse en el rango de 100-300 ppm.²⁰⁶

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

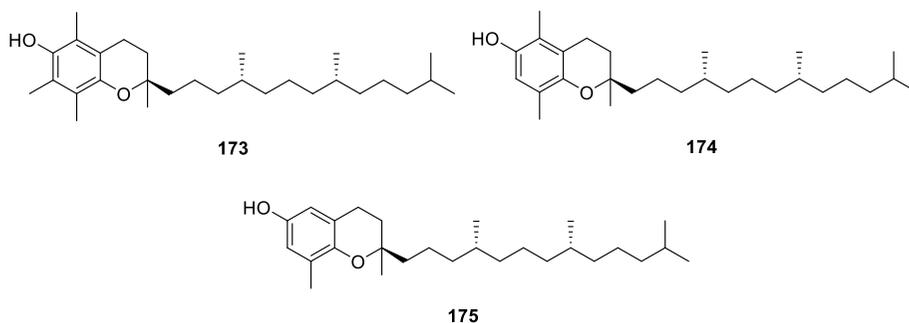


Figura 4. Estructura de los tocoferoles del aceite de oliva

Compuestos fenólicos

Es la fracción más heterogénea de todas y, como se ha comentado en el capítulo anterior, responsable de multitud de efectos beneficiosos para la salud, además de conferirle al aceite de una defensa natural frente al enranciamiento. Su concentración total es muy variable y dependiente de multitud de factores, aunque se considera que el rango se encuentra entre los 200-1500 ppm. Surgen durante la maduración de la oliva y durante los procesos de producción del aceite donde tienen lugar una serie de procesos enzimáticos que dan lugar a los compuestos detectados.

A parte de los ácidos fenólicos (cafeico, *p*-cumárico, siríngico, vanílico, ferúlico, protocatecuico y *p*-hidroxibenzoico) que se encuentran en muy pequeñas cantidades (<1 ppm), encontramos alcoholes fenólicos como el HT **67** y el tirosol **153** que se encuentran en pequeña proporción (sobre 14 ppm y 27 ppm respectivamente).²⁰⁸

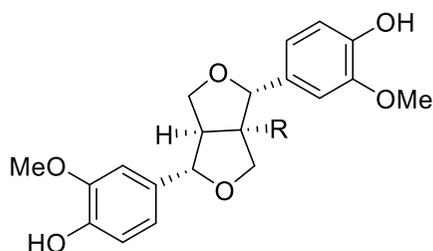
Los secoiridoides suelen ser los más abundantes y de los que aún se siguen encontrando nuevos derivados. Son exclusivos de la familia

²⁰⁸ Owen, RW; Mier, W; Giacosa, A; Hull, WE; Spiegelhalter, B; Bartsch, H. *Food Chem. Toxicol.* **2000**, *38*, 647–659.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

Oleaceae y se pueden catalogar como derivados de los glucósidos ligstrósido y oleuropeína. La concentración de los secoiridoides es altamente variable y actualmente su cuantificación es objeto de cierta controversia. Destacan el oleocantal **57**, la oleaceína **53**, con remarcables propiedades biológicas que ya fueron comentadas en el capítulo 3, y los aglicones monoaldehídicos del ligstrósido **65** y oleuropeína **66**.

Entre los lignanos destacan el (+)-1-pinoresinol **176** y (+)-1-acetoxipinoresinol **177** (Figura 47).²⁰⁹



176 R = H
177 R = OCOMe

Figura 5. Estructuras del pinoresinol **176** y acetoxipinoresinol **177**

Los flavonoides, con interesantes propiedades biológicas, también están presentes en el aceite de oliva de forma muy diversa. Existen derivados hidroxilados, isoprenilados, metilados y glicosilados. Ejemplos típicos son la luteolina **178** y la apigenina **179** (Figura 48).

²⁰⁹ Brenes, M; Hidalgo, FJ; García, A; Rios, JJ; García, P; Zamora, R; Garrido, A. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77*, 715–720.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

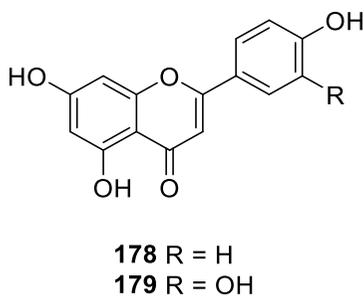


Figura 6. Estructuras de la luteolina **178** y la apigenina **179**

5.1.2. Extracción, separación y cuantificación de la fracción fenólica del aceite de oliva

La fracción fenólica del aceite de oliva la componen hasta la fecha unos 36 compuestos distribuidos en las diversas subfamilias anteriormente comentadas, y cuya estructura y concentración son muy variables. Este hecho ha desembocado en el desarrollo de multitud de propuestas para la detección y cuantificación de esta fracción variando el método de extracción de los fenoles y la técnica de caracterización y caracterización.

Respecto a las técnicas de extracción de los fenoles encontramos dos tendencias, la extracción líquido-líquido (LLE, por sus siglas en inglés) y la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés).

De las técnicas empleadas a lo largo de los últimos años para la caracterización, destaca principalmente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Otras técnicas menos empleadas son por la electroforesis capilar (CE)²¹⁰ y la cromatografía de gases.

²¹⁰ Ballus, CA; Meinhart, AD; Bruns, RE; Godoy, HT. *Talanta* **2011**, 83, 1181–1187.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

Considerando más detenidamente las técnicas de extracción, las LLE se basan en el empleo de disolventes polares tales como metanol puro o mezclas de metanol/agua, previa disolución del aceite en un disolvente apolar como el hexano o el éter de petróleo.²¹¹

Hoy día no existe unanimidad en la elección de la fase extractante; así, Montedoro proponía en 1969 la extracción con MeOH/agua 80:20 (v/v) previa disolución del aceite en una mezcla de hexano-éter de petróleo 1:0.9:0.1 (aceite/hexano/éter de petróleo). Sin embargo, en 1992 el propio Montedoro se corregiría proponiendo como mejor opción el MeOH/agua 60:40,²¹¹ para después escoger el MeOH puro aludiendo mejores porcentajes de recuperación ya que se evitaba la formación de emulsiones.²¹² No obstante, parece que la corriente mayoritaria es la de adoptar la mezcla MeOH/agua 60:40, siempre bajo la premisa de obtener recuperaciones más altas.²¹³

Mencionar que las mezclas MeOH/agua además de dar buen resultado para la extracción, también son disolventes baratos y poco peligrosos; no obstante, se han usado otros disolventes para la LLE como la DMF o el MeCN con buenos resultados.²¹⁴

²¹¹ Montedoro, G; Servili, M; Baldioli, M; Miniati, E. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1571–1576.

²¹² Angerosa, F; d'Alessandro, N; Konstantinou, P; Di Giacinto, L. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1802–1807.

²¹³ Ballus, CA; Meinhart, AD; de Souza Campos Jr, FA; Bruns, RE; Godoy, HT. *Food Chem.* **2014**, *146*, 558–568.

²¹⁴ Karkoula, E; Skantzari, A; Melliou, E; Magiatis, P. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11696–11703.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

En cuanto a las extracciones en fase sólida, éstas surgieron en torno al año 2000 en un estudio comparativo de la LLE y el SPE mediante el uso de cartuchos C₈ de Alltech.²¹⁵ Los buenos resultados obtenidos fomentaron su uso extendiéndose a otros tipos de adsorbentes como los de tipo amino, los de tipo diol,²¹⁶ los de tipo C₈ y C₁₈ y un tipo especial denominado “*endcapped*” C₁₈.²¹⁷

Estudios comparativos demostraron que los cartuchos de tipo diol arrojan mejores resultados seguido de los C₁₈ y los C₈, desaconsejando los de tipo amino y *endcapped* C₁₈ al detectarse alteraciones en la muestra y obtener a menudo artefactos extraños.^{218,219} Una limitación a tener en cuenta es que una mala elección de la capacidad del cartucho tiene consecuencias negativas en su capacidad de extracción.

Como se comentó anteriormente, el HPLC es la técnica más empleada para la separación de los compuestos fenólicos tanto en fase normal como reversa, siendo comunes las fases estacionarias de gel de sílice y C₁₈, respectivamente; aunque en la práctica totalidad de los casos se opta por la fase reversa ya que se obtienen mejores separaciones y reproducibilidades.

²¹⁵ Pirisi, FM; Cabras, P; Cao, CF; Migliorini, M; Muggelli, M. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1191–1196.

²¹⁶ Mateos, R; Espartero, JL; Trujillo, M; Ríos, JJ; León-Camacho, M; Alcudia, F; Cert, A. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2185–2192.

²¹⁷ Liberatore, L; Procida, G; d’Alessandro, N; Cichelli, A. *Food Chem.* **2001**, *73*, 119–124.

²¹⁸ Bendini, A; Bonoli, M; Cerretani, L; Biguzzi, B; Lercker, G; Gallina-Toschi, T. *J. Chromatogr. A* **2003**, *985*, 425–433.

²¹⁹ Gómez-Caravaca, AM; Carrasco-Pancorbo, A; Cañabate-Díaz, B; Segura-Carretero, A; Fernández-Gutiérrez, A. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3538–3551.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

La fase móvil a menudo está compuesta por agua y un segundo disolvente orgánico miscible como MeOH o MeCN, siendo también muy común, la adición de ácidos al agua como el AcOH, el HCOOH, el HClO₄ o el H₃PO₄ con el fin de mejorar la separación de los compuestos. Las sucesivas columnas que se vienen desarrollando de tamaños de partícula cada vez menores, también ayudan en la separación de los picos de los cromatogramas.

La cromatografía de gases se ha usado eventualmente para el análisis de los fenoles tanto a nivel cualitativo como cuantitativo.²²⁰ Sin embargo, existen dos grandes limitaciones en el uso de esta técnica ya que, en comparación con el HPLC muy pocos compuestos son volatilizables *per se*. Esto hace que sea necesario un paso previo de derivatización, normalmente trimetilsililación, para efectuar el análisis, aunque las altas temperaturas requeridas siguen poniendo en riesgo la integridad de los analitos.

En los últimos años, algunos grupos de investigación han desarrollado métodos analíticos basados en la electroforesis capilar para la cuantificación de la fracción fenólica del aceite de oliva. Esta técnica, una vez optimizada, resulta sencilla de realizar y no conlleva procesos laboriosos como en el caso de la cromatografía de gases ni largos tiempos como el HPLC. Una ventaja frente al HPLC, es que la electroforesis capilar se ha vuelto compatible con disolventes orgánicos,²²¹ algo que facilita la etapa de concentración de la muestra. Aun así, es inferior frente

²²⁰ García-Villalba, R; Pacchiarotta, T; Carrasco-Pancorbo, A; Segura-Carretero, A; Fernández-Gutiérrez, A; Deelder, AM; Mayboroda, OA. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 959–971.

²²¹ Steiner, F; Hassel, M. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 3994–4016.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

al HPLC en términos de sensibilidad y reproducibilidad de los resultados, además de su escasa capacidad para acoplar distintos detectores a parte del UV, como la EM o la RMN, que sí se acoplan con éxito para el HPLC.

En cuanto a los detectores empleados, el UV y el DAD (diode array detector, detector de red de diodos) son los más habituales en la cromatografía líquida y el detector de ionización de llama (FID), en cromatografía de gases. Concretamente, el único método analítico aceptado internacionalmente por el Consejo Oleícola Internacional (COI) para la cuantificación de la fracción fenólica emplea HPLC con un detector de UV.²²² En los últimos años, se ha aprovechado la versatilidad y la capacidad de los cromatógrafos para acoplar distintos tipos de analizadores de espectrometría de masas. Dentro de éstos, los más usados son los de tiempo de vuelo acoplado o no con un cuadrupolo (TOF²²³ o QTOF²²⁴) y los de trampa iónica (IT).²²⁵ Esto ha permitido conocer la existencia de nuevos compuestos, aunque coincidieran en el mismo pico del cromatograma, y dilucidar sus estructuras mediante el análisis de las masas moleculares y los correspondientes fragmentos.

Mención especial merece el uso de la Resonancia Magnética Nuclear para la detección y cuantificación de los compuestos fenólicos.

²²² Consejo Oleícola Internacional (COI). Determinación de los biofenoles de los aceites de oliva mediante HPLC **2009**, COI/T.20, Doc.20

²²³ Bakhouch, A; Lozano-Sánchez, J; Ballus, CA; Bendini, A; Gallina-Toschi, T; Fernández-Gutiérrez, A; Segura-Carretero, A. *Talanta* **2014**, *127*, 18–25.

²²⁴ Capriotti, AL; Cavaliere, C; Crescenzi, C; Foglia, P; Nescatelli, R; Samperi, R; Laganà, A. *Food Chem.* **2014**, *158*, 392–400.

²²⁵ Fu, S; Segura-Carretero, A; Arráez-Román, D; Menéndez, JA; de la Torre, A; Fernández-Gutiérrez, A. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11140–11147.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

Esta técnica permite cuantificar con seguridad los compuestos secoiridoides debido a que la región aldehídica (9-10 ppm) en $^1\text{H-RMN}$ es relativamente limpia;^{162,214} el resto de los compuestos fenólicos presentan en general señales superpuestas en distintas zonas del espectro. El problema se puede solventar utilizando un sistema de HPLC acoplado a cartuchos SPE que se conectan al equipo de RMN; este sistema HPLC-SPE-RMN constituye una poderosa herramienta que une la capacidad de separación de la cromatografía líquida con la capacidad de caracterización y cuantificación de la RMN.¹⁶²

La mayoría de las publicaciones en los que se cuantifican compuestos fenólicos de los AOVEs se basan en variaciones del método COI, es decir HPLC con detección por UV. El método oficial se basa en el cálculo de un factor de respuesta del tirosol usado como patrón externo y del factor de respuesta del ácido siríngico usado como patrón interno ambos medidos a 280 nm. Las señales para cada compuesto registradas a esa longitud de onda se cuantifican en base a ese factor obteniéndose los datos de concentración.

Otros métodos propuestos en la bibliografía, normalmente utilizan como patrones externos y/o internos, oleuropeína, HT o ácido *p*-cumárico, buscando que los patrones se asemejen a los compuestos analizados, sin embargo, esta solución es parcial al no existir patrones comerciales de todos los compuestos que hoy en día pueden determinarse por HPLC. Este problema incide especialmente en los secoiridoides, dado que su purificación es complicada y costosa lo que hace difícil disponer de curvas de calibrado. Además, tenemos el problema adicional de la estabilidad de la oleaceína, especialmente difícil de obtener sin una derivatización previa que la estabilice. También, no hay que obviar las

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

modificaciones químicas que se introducen en estos compuestos aldehídicos durante la elución con soluciones metanólicas ya que se forman hemiacetales y acetales; estos últimos favorecidos si se incluyen ácidos en la fase móvil.

La técnica de la RMN evita el problema de la de la alteración estructural durante la elución ya que tras la extracción de la fracción fenólica y evaporación del disolvente se realiza el registro de los espectros minimizando los efectos de alteración de la elución. Para la cuantificación de los compuestos aldehídicos basta con realizar la integración de las correspondientes señales utilizando un patrón interno que proporcione una señal de grupo formilo y bien resuelta en una región alejada de las otras señales de formilo.

5.2. Elección de la fase extractante

Para la elección de la fase extractante se realizaron pruebas en AOVE con distintos disolventes y comprobando en cada caso la cantidad de dialdehídos extraída (Tabla 11).

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

Entrada	Ciclohexano	Extractante	Dialdehídos (ppm)
1	Sí	MeCN	52.9
2	Sí	MeOH-agua (4:6)	71.2
3	No	MeOH-agua (4:6)	25.2
5a	Sí	MeOH-agua (4:6) NaHSO ₃ (org)	49.3
5b	Sí	MeOH-agua (4:6) NaHSO ₃ (ac)	11.7

Tabla 1. Optimización de la fase extractante

El resultado de las dos primeras entradas permite diferenciar la capacidad de extracción entre el acetonitrilo y la mezcla MeOH-agua constatando que se recupera mayor cantidad de dialdehídos con MeOH-agua (4:6). La comparación por otra parte, de las entradas 2 y 3, deja patente que la disolución del AOVE en un disolvente apolar como el ciclohexano mejora los resultados debido a la disminución de la viscosidad de la fase apolar.

En cuanto a las dos últimas entradas, se ensayó un método patentado por Estanove *et al.*²²⁶ que se basa en la adición de 60 ppm de

²²⁶ Estanove, C; Pruvost, F; Saldmann, F. Method for enriching an extract containing oleocanthal. WO2008/107557 A1, 2008.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

NaHSO₃ (60 mg/kg de aceite) al AOVE para que se formen los productos de la adición bisulfítica ya que al estar cargados negativamente serían fáciles de extraer en MeOH-agua (4:6). Tras la extracción, es necesario acidificar el extracto con HCl hasta pH 3 para revertir los productos de la adición hasta la función aldehído. La evaporación del MeOH en el rotavapor y extracción de la solución acuosa remanente con CH₂Cl₂ permite la obtención de los secoiridoides. Como puede observarse en la Tabla 1, los secoiridoides se reparten entre la fase de diclorometano y en la fase acuosa en una relación 42:10.

Con todo ello, se puede concluir que el mejor método de extracción es el aquel que requiere una dilución previa con ciclohexano y una fase extractante compuesta por MeOH-agua (4:6).

5.3. Método de análisis de los secoiridoides del aceite de oliva mediante Resonancia Magnética Nuclear de protones

Una cierta cantidad de aceite de oliva (entre 5 y 100 g) se disuelve en ciclo hexano a razón de 0.5 ml de disolvente/g de aceite. Una vez homogeneizado, se añade la disolución extractante en relación 0.5 ml/g aceite consistente en MeOH-agua (4:6) y se agita durante 20 min. Posteriormente, las mezclas se centrifugan a 4000 r.p.m. durante 5 min y se recupera la fracción hidroalcohólica. El proceso se repite solo una segunda vez ya que la cantidad de compuestos fenólicos es muy pequeña en la tercera extracción, no detectándose señales de dichos compuestos tras la tercera extracción. Las fracciones polares se unen, se añade exactamente 1 ml de una disolución de 3,4-dimetoxibenzaldehído (0.5 mg/ml) en MeOH y se concentra a sequedad. Una vez perfectamente

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

seco, se prepara la muestra para ^1H -RMN disolviendo en CDCl_3 y se registra el espectro. Las señales de interés se encuentran en la región de 9-10 ppm, usando para la cuantificación los dos pseudo triplete en torno a 9.64-9.62 ppm para oleocantal **57** y oleaceína **53**, y los dos dobletes en torno a 9.52-9.50 ppm para los aglicones monoaldehídicos de ligstrósido **65** y oleuropeína **66**. Estas dos señales pueden obtenerse de forma totalmente resueltas si las muestras se encuentran totalmente libres de disolvente antes de su disolución en CDCl_3 (Figura 49).

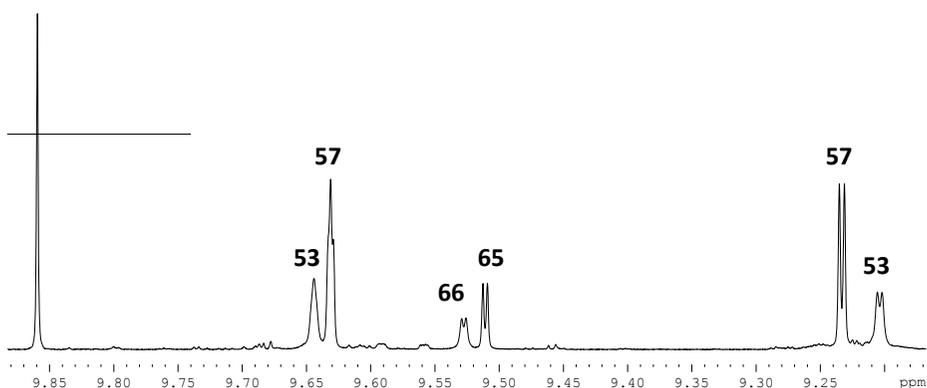


Figura 7. Espectro modelo de la región aldehídica de interés para la cuantificación de los derivados secoiridoides. Oleaceína (**53**), oleocantal (**57**), aglicón aldehídico del ligstrósido (**65**) y aglicón aldehídico de la oleuropeína (**66**)

4.4. Cuantificación de secoiridoides de aceites de oliva

A continuación, se presentan datos relativos a la cuantificación de los 4 secoiridoides empleando el método descrito anteriormente (Tablas 12, 13 y 14). Las muestras corresponden a una serie de aceites de oliva virgen extra monovarietales (excepto Dept.30) procedentes de una cooperativa sevillana de la comarca Sierra Sur.

En algunas muestras el análisis se realizó por triplicado para ver la reproducibilidad del método, calculándose el error como desviación

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

estándar. Las entradas marcadas en azul corresponden a aceites de cosecha temprana.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

Muestra	Oleocantal (ppm)	Oleaceína (ppm)	Dialdehídos (ppm)	Aglicón aldehídico del ligstrósido (ppm)	Aglicón aldehídico de la oleuropeína (ppm)	Monoaldehídos (ppm)
Dep.2 (Hojiblanca)	24.7	2.97	27.7	3.76	13.1	16.8
Dep.6 (Hojiblanca)	68.7		68.7	6.47	57.2	63.7
Dep.7 (Hojiblanca)	68.5		68.5		28.5	28.5
Dep.8 (Manzanilla)	56.2	35.6	91.8	10.9	71.3	82.1
Dep.9 (Manzanilla)	46.2	20.8	67.0	8.42	48.2	56.6
Dep.10 (Manzanilla)	67.3 ± 6.92	52.4 ± 1.73	119 ± 6.95	Solapados		121 ± 5.23
Dep.12 (Manzanilla)	36.0	23.0	58.9	8.49	72.2	80.7
Dep.13 (Manzanilla)	55.5	29.0	84.4	15.8	56.0	71.8
Dep.14 (Manzanilla)	46.1	27.3	73.4	15.1	47.6	62.7
Dep.17 (Manzanilla)	22.5	1.25	23.8	3.26	12.0	15.2

Tabla 12. Cuantificación por ¹H RMN de los secoiridoides oleocantal, oleaceína, y los aglicones monoaldehídicos del ligstrósido y de la oleuropeína

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

Muestra	Oleocantal (ppm)	Oleaceína (ppm)	Dialdehídos (ppm)	Aglicón aldehídico del ligstrósido (ppm)	Aglicón aldehídico de la oleuropeína (ppm)	Monoaldehídos (ppm)
Dep.18 (Manzanilla)	65.1 ± 2.06	41.5 ± 4.28	106 ± 3.57	19.7 ± 5.47	112 ± 8.15	132 ± 9.63
Dep.20 (Manzanilla)	47.1	33.5	80.7	12.4	66.0	78.4
Dep.21 (Manzanilla)	Solapados	88.8 ± 4.58	17.2 ± 2.11	94.8 ± 17.6	111	
Dep.22 (Manzanilla)	Solapados	103 ± 18.6	11.4 ± 0.890	71.0 ± 7.41	82.4 ± 7.41	
Dep.23 (Manzanilla)	25.0	11.2	36.2	7.44	30.4	37.9
Dep.25 (Manzanilla)	37.7	37.7	57.2	57.2		
Dep.27 (Manzanilla)	37.3	25.1	62.5	13.3	76.6	89.9
Dep.28 (Manzanilla)	Solapados	51.1	7.01	42.2	49.2	
Dep.29 (Manzanilla)	54.2 ± 3.15	39.1 ± 8.94	93.3 ± 8.05	11.1 ± 0.475	83.3 ± 9.05	94.4 ± 8.71
Dep.30 (Hojiblanca + Manzanilla 75%)	68.1	66.9	135	12.4	57.1	69.5

Tabla 13. Cuantificación por ¹H RMN de los secoiridoides oleocantal, oleaceína, y los aglicones monoaldehídicos del ligstrósido y de la oleuropeína

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

Muestra	Oleocantal (ppm)	Oleaceína (ppm)	Dialdehídos (ppm)	Aglicón aldehídico del ligstrósido (ppm)	Aglicón aldehídico de la oleuropeína (ppm)	Monoaldehídos (ppm)
Dep.31 (Arbequina)	23.1	12.2	35.3	0	0	0
Dep.32 (Manzanilla)	55.7	39.6	95.3	18.3	115	134
Dep.33 (Manzanilla)	59.1 ± 1.03	43.4 ± 4.66	102 ± 4.72	13.6 ± 3.15	105 ± 14.7	119 ± 17.7
Dep.34 (Manzanilla)	Solapados		103 ± 6.78	83.7 ± 3.59	103 ± 2.83	186 ± 6.26
Dep.36 (Hojiblanca)	Solapados		91.4	9.13	63.6	72.7
Dep.37 (Manzanilla)	56.0	43.0	99.0	92.4	107	199
Dep.38 (Arbequina)	26.3	11.7	38.0	0	0	0
Dep.39 (Manzanilla)	Solapados		144 ± 0.641	21.8 ± 1.41	117 ± 11.8	138 ± 13.1
Dep.40 (Manzanilla)	Solapados		99.7	Solapados		108
Dep.41 (Manzanilla)	Solapados		91.4 ± 9.88	9.59 ± 1.99	80.0 ± 15.9	89.6 ± 17.8

Tabla 14. Cuantificación por ¹H RMN de los secoiridoides oleocantal, oleaceína, y los aglicones monoaldehídicos del ligstrósido y de la oleuropeína

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

Tras los análisis podemos extraer algunas conclusiones. Los aceites con mayor concentración de dialdehídos son Dept.39 y 30 con 144 y 135 ppm, respectivamente, de variedad manzanilla. Los que tienen mayor contenido de aglicones monoaldehídicos son Dept.37, Dept.34 con 199 y 186 respectivamente, también de la variedad manzanilla. Destacar que los más prometedores para el aislamiento cromatográfico en gel de sílice de oleocantal son Dept.31, Dept.38 de la variedad arbequina, ya que su contenido en aglicones es nulo, lo que permite una cómoda purificación cromatográfica.

También hemos utilizado el método de cuantificación por ^1H RMN puesto a punto por el Dr. Prokopios Magiatis de la Universidad de Atenas. Su propuesta se basa en una cuantificación realizada mediante la interpolación en una recta de calibrado. Estas rectas, se encuentran disponibles para 4 compuestos, los dialdehídos oleocantal y oleaceína, y los aglicones monoaldehídicos del ligstrósido y la oleuropeína. Todas ellas han sido construidas mediante la adición de cantidades conocidas de cada uno de los compuestos a un aceite de oliva que de manera natural no contiene estos fenoles. Tras la extracción de la fracción fenólica realizada con MeCN, se lleva a sequedad y se realiza un espectro de protones en CDCl_3 referenciando la integral a la señal del grupo formilo del siringaldehído usado como referencia interna. A dicha integral, se le asigna la concentración de la correspondiente disolución patrón en aceite como una manera de corregir las pérdidas de fenoles por una extracción incompleta.^{214,192}

A continuación, se presenta la cuantificación de los 4 secoiridoides aldehídicos mencionados que corresponde a 5 AOVEs de tipo gourmet además de un aceite de acebuche (Mudéjar), todos ellos

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

españoles (Tabla 14). Todas las muestras siguieron el mismo tratamiento que consistió en la disolución de 5 g de aceite en 25 ml de ciclohexano y extracción con 20 ml de MeCN. Tras la separación de las fases por centrifugación, se añadió a cada muestra 0.1 ml de una disolución de siringaldehído 5 mg/ml. Las muestras totalmente secas se disuelven en CDCl_3 y se registra un espectro de protones en un aparato de 500 MHz provisto de criosonda.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

Aceite	Método	Oleocantal (ppm)	Oleaceína (ppm)	Suma dialdehídos (ppm)	Aglicón aldehídico ligstrósido (ppm)	Aglicón aldehídico oleuropeína (ppm)	Suma aglicones (ppm)
Castillo Canena Reserva	A	365	130	495	105	83	188
	B	655	235	890	187	140	327
Castillo Canena Ecológico	A	42	31	73	127	82	209
	B	77	61	138	145	216	361
Oli Oli	A	36	36	72	59	92	151
	B	68	70	138	105	155	260
Nobleza del Sur	A	77	30	107	58	68	126
	B	140	59	199	101	111	212
Supremo	A	36	21	57	51	94	145
	B	67	43	110	90	158	248
Mudéjar	A	129	121	6	85	120	-29
	B	374	145	519	65	52	117

Tabla 4. Comparación de los métodos de cuantificación. (A) Método descrito en el apartado 4.3; (B) método descrito por el Dr. Magiatis

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

Como se puede observar, existe una gran diferencia entre los resultados arrojados por ambos métodos. El método B, descrito por el Dr. Magiatis, da como resultado unos valores aproximadamente el doble de los determinados por nosotros usando el método A. Esta discrepancia puede deberse a la forma en que están construidas las rectas de calibrado para cada compuesto ya que, cuando se añade un determinado compuesto fenólico a un aceite libre de este tipo de compuestos y se extrae, no se tienen en cuenta los efectos sobre su extracción que derivan de las interacciones entre diferentes analitos y entre estos y la matriz. Esto significa, que no se puede comparar el resultado de una extracción en donde hay de forma natural una gran cantidad de fenoles, con la extracción cuando sólo hay un compuesto fenólico.²²⁷ Podemos suponer que los distintos fenoles interaccionan entre sí por enlaces de hidrógeno y por interacciones de apilamiento de anillo aromático facilitando su extracción conjunta, por lo que al utilizar una calibración basada en la extracción de un solo componente a partir de un aceite neutro enriquecido se llegaría a valores más alto al analizar las muestras reales. También hay que comentar que la humedad presente en un AOVE determinado afecta a la extracción y a la cantidad aparente de los fenoles, sobre todo de los secoiridoides. Se ha encontrado que el carácter anfifílico de los compuestos fenólicos hace que se distribuyan en la interfase agua-aceite, extrayéndose más fácilmente de la matriz cuando su contenido en agua es más reducido, por el contrario, la presencia de agua en el aceite dificulta la extracción, por lo que la cantidad real de polifenoles que se mide es menor.²²⁷

²²⁷ Bakhoucha, A; Lozano Sánchez, J; Fernández Gutiérrez, A; Segura Carretero, A. *Olivae*, **2015**, *122*, 3–16.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

Como se ha visto hasta ahora, la cuantificación de fenoles presentes en el aceite de oliva no es un tema trivial, incluso empleando el mismo método de detección. En última instancia cabe recurrir al aislamiento de los compuestos fenólicos mediante cromatografía de columna de gel de sílice. Esto nos puede dar al menos una idea acerca de la validez de la cuantificación realizada por los métodos analíticos previamente descritos. Hemos comprobado que los diferentes intentos de aislamiento y purificación de la oleaceína en gel de sílice fueron infructuosos ya que el compuesto se descomponía. Por el contrario, sí fue posible el aislamiento del oleocantal y de la pareja de aglicones monoaldehídicos. Mediante este procedimiento las cantidades que se aíslan tras separación cromatográfica se encuentran en un 70-75% del contenido calculado con el método A, lo que refuerza la validez de la cuantificación por dicho método.

5.5. Aislamiento de los compuestos secoiridoides de la fracción fenólica del aceite de oliva

La falta de métodos sintéticos factibles y que posibiliten el acceso a los secoiridoides del aceite de oliva con un rendimiento razonable y un coste asumible obliga a recurrir a la purificación de estos compuestos a partir de su fuente natural. Como se indicó en el apartado anterior, durante esta tesis doctoral se han conseguido aislar, mediante cromatografía en columna de gel de sílice, todos los derivados secoiridoides con la excepción de la oleaceína, ya que su inestabilidad en dichas condiciones hizo imposible su purificación.

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

El aislamiento de los secoiridoides se realiza a partir del extracto de un AOVE obtenido según lo indicado en el apartado 4.3. El extracto disuelto en la mínima cantidad posible de CH_2Cl_2 , es sembrado en una columna de cromatografía estándar de gel de sílice acondicionada con ciclohexano. A partir de entonces se procede a la elución con un gradiente de AcOEt-ciclohexano (0:1 \rightarrow 1:1).

Primero, se eluye con puro ciclohexano con objeto de retirar los restos de triglicéridos del extracto. A continuación, el primer compuesto eluido es el aglicón monoaldehídico del ligstrósido **65**, usando AcOEt-ciclohexano 1:5 (Figura 50).

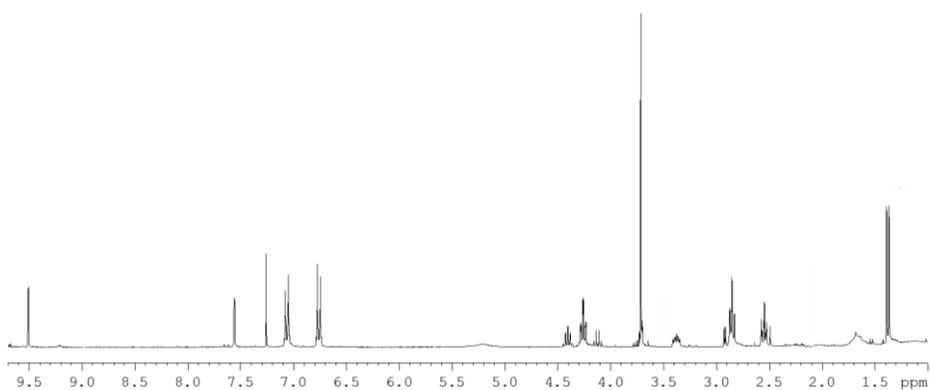


Figura 8. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) en CDCl_3 del aglicón monoaldehídico del ligstrósido **65**

A continuación, se emplea un eluyente más polar, AcOEt-ciclohexano 1:4, durante unos pocos tubos y seguido del empleo de AcOEt-ciclohexano 1:3 para aislar oleocantal **57** (Figura 51).

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

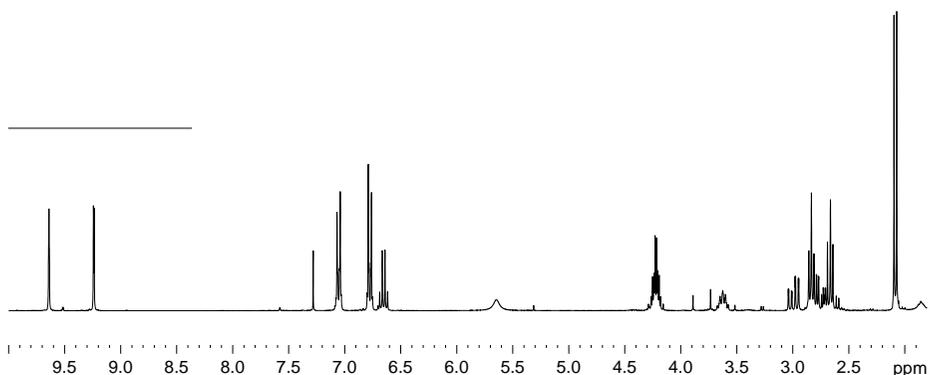


Figura 9. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) en CDCl_3 de oleocantal **57**

El último compuesto que puede ser purificado en columna, el aglicón monoaldehídico de la oleuropeína **66**, eluye tras el oleocantal empleando el AcOEt-ciclohexano 1:1 como eluyente (Figura 52). Este compuesto, lo aislamos como mezcla de varios diastereoisómeros correspondientes a distintas configuraciones en los carbonos 8 y 9 del fragmento de secoiridoide. Este hecho puede detectarse fácilmente por ^1H -RMN debido a la existencia de señales de los protones aldehídicos a 9.58, 9.68 y 9.79 ppm, las cuales se corresponden con diferentes singuletes H-3 a 7.59 y 7.65 ppm.

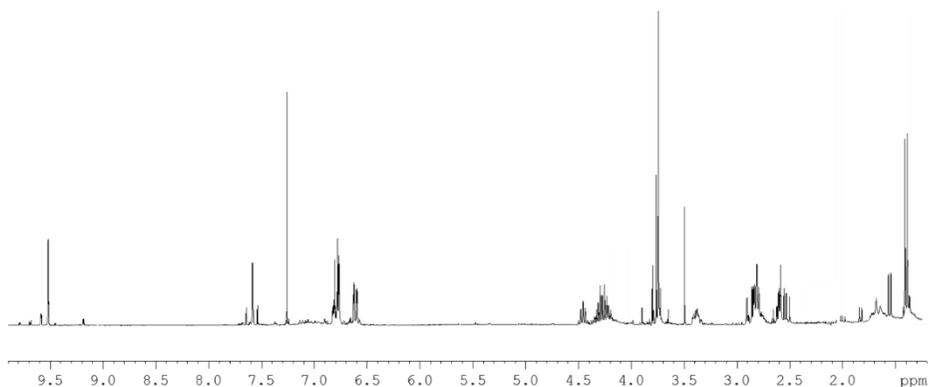


Figura 10. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz) en CDCl_3 del aglicón monoaldehídico de la oleuropeína **66**

5. Detección, cuantificación y aislamiento de fenoles secoiridoides de interés biológico del aceite de oliva virgen extra

Evaluando los posibles isómeros de este aglicón monoaldehídico y asumiendo que la configuración *S* del C-5 ya está presente en el ligstrósido y la oleuropeína y no varía, los dos centros estereogénicos restantes en C-8 y C-9 podrían dar lugar hasta 4 diastereoisómeros (Figura 53). De todos ellos, por razones estéricas, es razonable pensar que el isómero mayoritario correspondiente al doblete en $^1\text{H-RMN}$ a 9.53 ppm, sea el **A** (*5S,8R,9S*) puesto que posee todos los sustituyentes en *trans*. De los 3 restantes, es plausible descartar la aparición del isómero **C** (*5S,8R,9R*) debido al fuerte impedimento estérico, lo que nos lleva a concluir que las pequeñas señales de los isómeros minoritarios detectadas en $^1\text{H-RMN}$ deben corresponder a los diastereoisómeros **B** (*5S,8S,9R*) y **D** (*5S,8S,9R*).

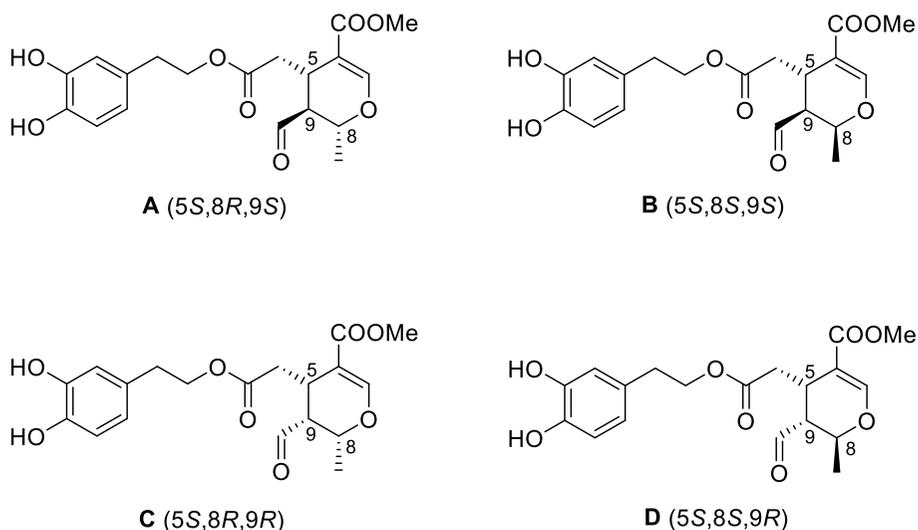


Figura 11. Diastereoisómeros posibles del aglicón monoaldehídico de la oleuropeína

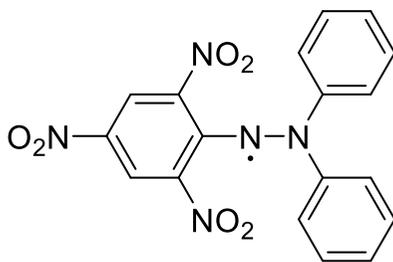
6. PROPIEDADES BIOLÓGICAS

6. Propiedades biológicas

6.1. Actividad antirradicalaria *in vitro*. Ensayo del DPPH

La evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de una sustancia aporta información relevante sobre su participación en procesos redox. Estos resultados son la primera piedra de toque en relación a su posible actividad *in vivo*. En la bibliografía se describen numerosos métodos para predecir la protección frente a la oxidación que puedan ejercer los antioxidantes, aunque hay que destacar que todos tienen un valor tentativo, así como ventajas e inconvenientes a tener en cuenta al interpretar los resultados. Así mismo, el medio de reacción, el sustrato oxidable, la concentración de iniciador de la oxidación y el pH son variables a tener en cuenta. Aun así, los métodos *in vitro*, entre los que destaca el ensayo del DPPH, son una buena herramienta para orientarnos sobre su eficacia *in vivo*.

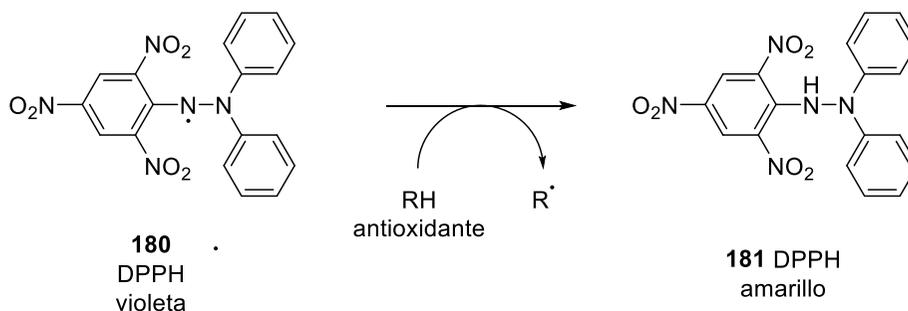
El radical DPPH **180** (2,2-difenil-1-picrilhidrazil radical, Figura 54) es un radical estable, que puede ser adquirido a través de casas comerciales.



180

Figura 1. Estructura del radical DPPH **180**

Básicamente, el ensayo consiste en evaluar la capacidad antirradicalaria de un antioxidante en particular para reducir el DPPH en un tiempo determinado. El DPPH en disolución posee un fuerte color violeta, por lo que el seguimiento de la decoloración de la disolución mediante un espectrofotómetro UV-Vis resulta en un método simple, reproducible y rápido que lleva usándose ampliamente desde 1995.²²⁸ La reducción de este radical implica la transferencia de un átomo de hidrógeno por parte de los antioxidantes, y su conversión en triarilhidrazina (Esquema 66). La extensión de la reacción depende de la capacidad de donación de hidrógeno del antioxidante.



Esquema 1. Mecanismo de reacción del radical DPPH con un antioxidante

Operativamente, el ensayo se realizó según el método utilizado por Prior *et al.*²²⁹ ligeramente modificado en nuestro grupo de investigación²³⁰ que consiste en la adición de 30 μ l de una disolución metanólica de antioxidante (a 5 concentraciones distintas) a una

²²⁸ Brand-Williams, W; Cuvelier, ME; Berset, C. *Lebensm Wiss Technol.* **1995**, 28, 25–30.

²²⁹ Prior, RL; Wu, X; Schaich, K. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4290–4302.

²³⁰ Merino-Montiel, P; Maza, S; Martos, S; López, Ó; Maya, I; Fernández-Bolaños, JG. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, 48, 582–592.

6. Propiedades biológicas

disolución metanólica de DPPH 60 μM . Como control, la adición de la disolución de antioxidante se sustituye por 30 μl de metanol. Una vez realizada la mezcla, las disoluciones se mantienen en oscuridad durante 30 min y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro de UV-Vis a 515 nm, fijando el blanco con MeOH. El resultado es mostrado como EC_{50} , que se define como la concentración de antioxidante (expresado en μM) que es capaz de reducir el 50% de la concentración inicial de DPPH, de tal forma que, a menor valor de EC_{50} , mayor es la actividad antirradicalaria del compuesto. Para el cálculo del % DPPH remanente se usó la siguiente expresión:

$$\% \text{ DPPH remanente} = \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

De esta forma, se calcularon los valores para algunos de los derivados sintetizados (Figura 55). Hay que tener en cuenta que, dada la naturaleza del método, es necesario que el grupo catecol esté desprotegido para que la transferencia de hidrógeno pueda tener lugar (Tabla 15).

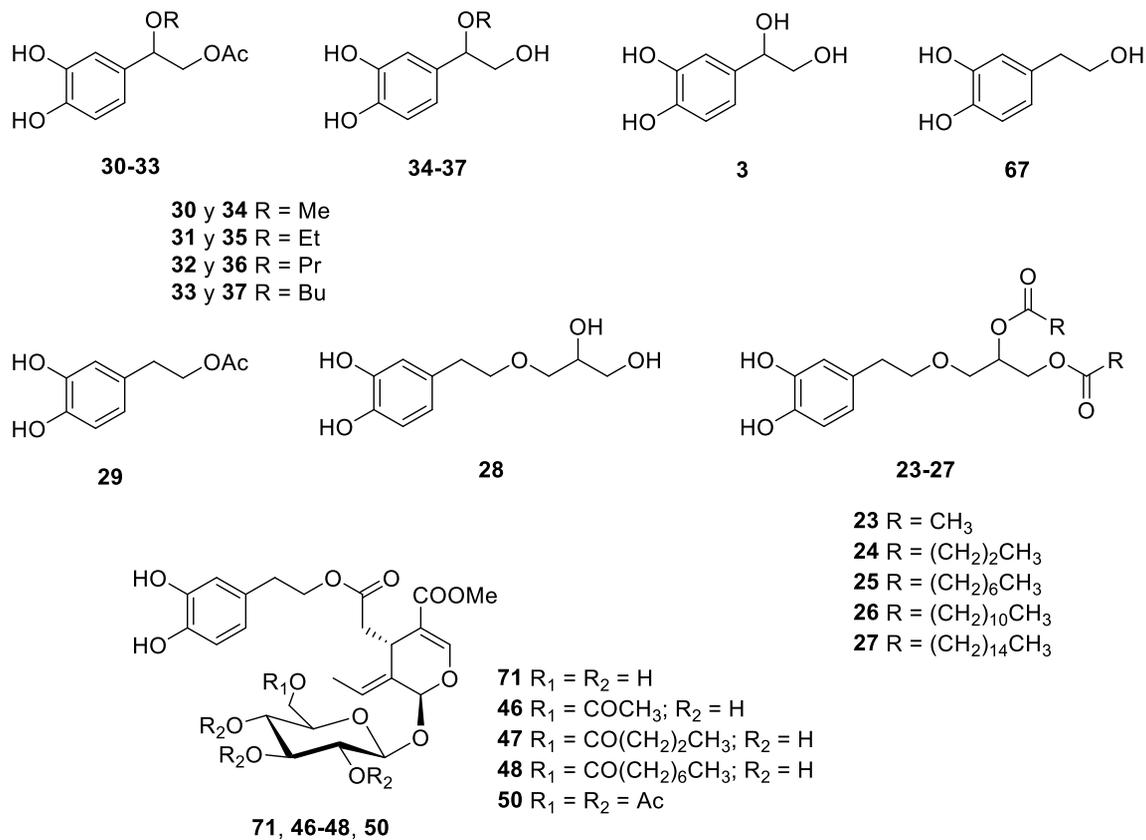


Figura 2

6. Propiedades biológicas

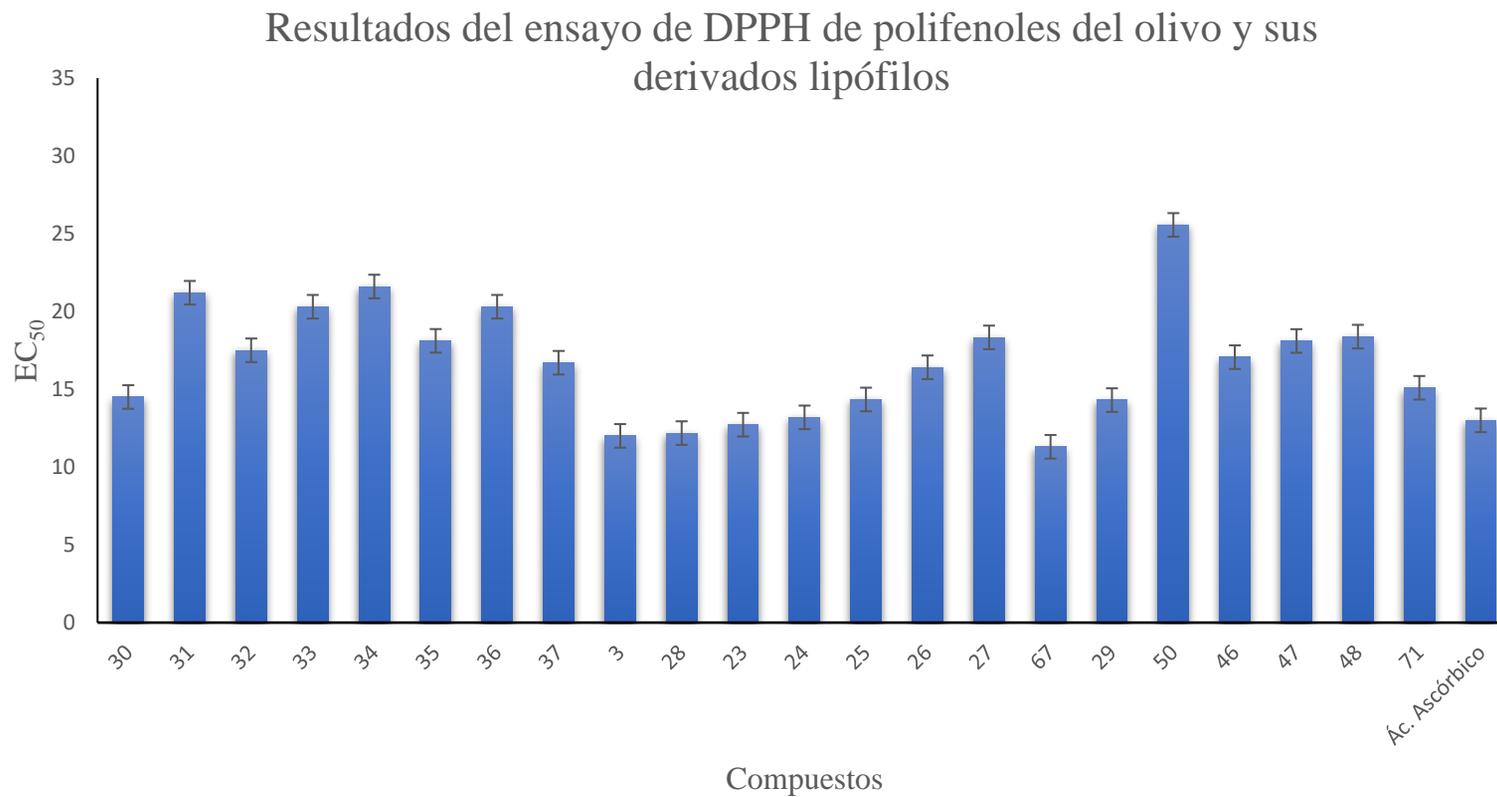


Tabla 1. Valores de EC₅₀ de polifenoles del olivo y sus derivados lipófilos

Con los datos de actividad antirradicalaria recogidos en la Tabla 15 podemos afirmar que los compuestos ensayados son buenos agentes antioxidantes *in vitro*. Aunque las diferencias no son muy grandes, tanto si consideramos a miembros de una misma familia de compuestos como de familias distintas, resultan destacables los valores de EC₅₀ del metoxi derivado **30** ($14.5 \pm 0.500 \mu\text{M}$), el 2,3-dihidroxiopropil hidroxitirosil éter **28** ($12.2 \pm 0.450 \mu\text{M}$) y del correspondiente diacetilado **23** ($12.7 \pm 0.520 \mu\text{M}$), ya que son los de menor valor de EC₅₀. No obstante, en general los derivados lipófilos testados muestran una actividad antirradicalaria peor al de su compuesto de referencia, ya sea HT, DHPG o oleuropeína, hecho que puede apreciarse especialmente en las familias derivadas de HT **23-29** y oleuropeína **46-48** y **50**, donde los valores de EC₅₀ van aumentando progresivamente conforme aumenta la lipofilia. Aun con todo, dicho aumento no es excesivo en la mayoría de los casos y los valores de EC₅₀ pueden considerarse comparables al valor obtenido por el ácido ascórbico, un antioxidante ampliamente utilizado en la industria de la alimentación.

También se puede comprobar que, en algunos derivados lipófilos sintetizados, a medida que los grupos acilo son de mayor longitud, aumenta el impedimento estérico y su EC₅₀. Hay antecedentes, que demuestran que la congestión estérica está relacionada con el aumento de EC₅₀ en el ensayo del DPPH, sin perjuicio de su posterior actividad antioxidante en otros modelos, matrices o *in vivo*.²²⁹

Por ejemplo, los radicales libres peroxilos ROO' procedentes de la peroxidación de lípidos de membrana insaturados con los que interaccionarían los derivados lipófilos sintetizados son más pequeños

que el propio radical DPPH,²³¹ por lo que cabría esperar que su actividad *in vivo* no dependa tanto de su actividad como antirradical *in vitro* (DPPH), sino de su lipofilia y de su habilidad por atravesar membranas celulares, es decir de su mejor perfil de biodisponibilidad.

6.2. Actividad antiproliferativa en células cancerígenas de los derivados lipófilos secoiridoides

Existe una fuerte relación entre la dieta Mediterránea y la menor incidencia, respecto al resto de los países occidentales, de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y especialmente, el cáncer. Esta realidad está suficientemente bien argumentada sobre la base del papel beneficioso para la salud que ejercen los polifenoles del olivo. De hecho, en cuanto a las propiedades anticancerígenas que poseen los derivados secoiridoides, la bibliografía aporta numerosos ejemplos de actividad antiproliferativa para diversas líneas celulares, como el adenocarcinoma renal,²³² el cáncer de mama,^{Error! Marcador no definido.}²³³ el melanoma maligno²³² y la leucemia.^{234,235}

²³¹ Huang, D; Boxin, OU; Prior, RL. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1841–1856.

²³² Hamdi, HK; Castellon, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 769–778.

²³³ Menendez, JA; Vazquez-Martin, A; Colomer, R; Brunet, J; Carrasco-Pancorbo, A; Garcia-Villalba, R; Fernandez-Gutierrez, A; Segura-Carretero, A. *BMC Cancer* **2007**, *7*, 80.

²³⁴ Fabiani, R; De Bartolomeo, A; Rosignoli, P; Servili, M; Selvaggini, R; Montedoro, GF; Di Saverio, C; Morozzi, G. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 614–619.

²³⁵ Fabiani, R; Rosignoli, P; De Bartolomeo, A; Fuccelli, R; Morozzi, G. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 42–48.

En la presente Tesis se presentan datos relativos a la actividad antiproliferativa de los derivados lipófilos secoiridoides en un panel de células cancerígenas de tumores sólidos humanos. Dichos ensayos fueron realizados en colaboración con los investigadores José Manuel Padrón y Gabriela Plata del Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González” perteneciente al Centro de Investigaciones Biomédicas de Canarias (CIBICAN, Universidad de La Laguna).

Las líneas celulares testeadas fueron 6 en total, correspondientes a células A549 (cáncer de pulmón), HBL-100 (cáncer de mama) y HeLa (cáncer cérvico-uterino) como líneas sensibles a fármacos; y células SW-1573 (cáncer de pulmón), T-47D (cáncer de mama) y WiDr (adenocarcinoma de colon) como líneas resistentes a fármacos. Los resultados se presentan como GI_{50} , que corresponde a la concentración de compuesto expresado en μM que es capaz de inhibir el 50% del crecimiento celular. Los compuestos elegidos para este estudio son los derivados secoiridoides parcial o totalmente acetilados (Figura 56) de modo que pueda establecerse la relación entre mejora de la actividad anticancerígena y el aumento de la lipofilia. A modo de comparación y para intentar establecer el efecto fragmento secoiridoide, se han incluido los resultados correspondientes al HT peracetilado **142** (Figura 57).

6. Propiedades biológicas

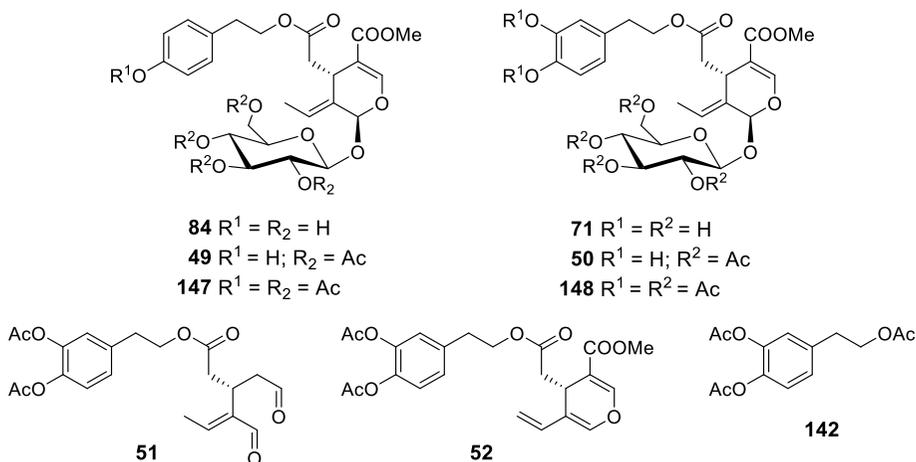


Figura 3. Derivados lipófilos secoiridoides estudiados para la actividad antiproliferativa del cáncer sobre líneas celulares de tumores sólidos humanos

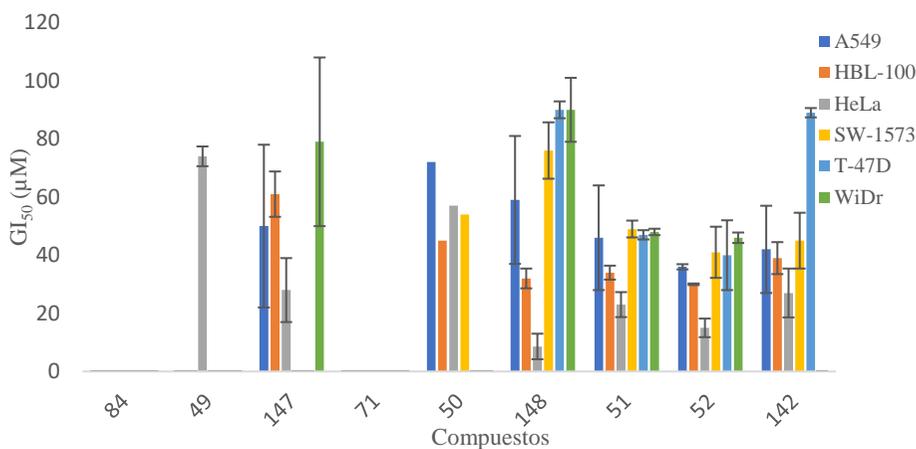


Figura 4. Valores de GI_{50} de los secoiridoides lipófilos

Como se deduce del gráfico anterior, si comparamos el ligstrósido y la oleuropeína con sus respectivos derivados acetilados, podemos comprobar una mejora de la actividad para todas las líneas celulares. De este modo, tanto el ligstrósido como la oleuropeína tienen una actividad antiproliferativa que es superior a $100 \mu M$, y es por ello que no se incluyen en el gráfico; mientras que sus correspondientes

derivados acetilados presentan mejores valores de actividad antiproliferativa. Por ejemplo, centrándonos en los derivados del ligstrósido, se observa que, el derivado desprotegido cuyo $GI_{50} > 100 \mu\text{M}$ es mejorado por el derivado tetraacetilado **49**, en donde consigue una actividad de $(72 \pm 3.4) \mu\text{M}$ para las células del HeLa, y por el peracetilado **147** que consigue disminuir la GI_{50} drásticamente en las líneas A549, HBL-100, HeLa, y WiDr, pero destacando la actividad contra las células de cáncer cérvico-uterino con un valor de $(28 \pm 11) \mu\text{M}$.

Un caso muy parecido es el que ocurre para los derivados de la oleuropeína donde el compuesto natural desprotegido vuelve a obtener $GI_{50} > 100 \mu\text{M}$ para todas las líneas celulares. Su correspondiente derivado tetraacetilado **50** mejora los valores de forma similar en que lo hace el derivado tetraacetilado del ligstrósido **49**, siendo su actividad antiproliferativa más destacada la alcanzada para las células HBL-100 de cáncer de mama ($45 \mu\text{M}$). Finalmente, es destacable el resultado alcanzado por la oleuropeína peracetilada **148**, mejorando todos los resultados anteriores y consiguiendo valores de $GI_{50} < 100 \mu\text{M}$ para todas las células analizadas. Remarcablemente, el mejor valor vuelve a ser el registrado para las células del HeLa con un valor de $GI_{50} (8.6 \pm 4.4) \mu\text{M}$, aunque también hay que destacar los $(32 \pm 3.4) \mu\text{M}$ para las células HBL-100. Estos resultados vienen a confirmar la hipótesis de que el aumento de la lipofilia promovido por la formación de ésteres mejoran la actividad de los compuestos naturales de partida como consecuencia probablemente, de una mejora en la biodisponibilidad. Por tanto, estos compuestos poseen una vida media en organismos vivos superior a la de los compuestos naturales que son más polares, ejerciendo como profármacos que, gracias a su carácter lipófilo, pueden cruzar con más

facilidad la membrana celular y, una vez dentro, serían transformados a su forma desacetilada por acción de enzimas de tipo carboxilesterasas tal y como está reportado por Mateos *et al.*²³⁶ para los derivados acetilados del HT.

Comentar también que la mejora en la actividad antiproliferativa de la oleuropeína peracetilada ha sido confirmada para células TPC-1 y BCPAP de cáncer de tiroides y para células MCF-7 de cáncer de mama por Bulotta *et al.*²³⁷ En ambos casos, la actividad antiproliferativa está relacionada con un arresto del ciclo celular, lo que impide el desarrollo de las células cancerígenas.

Los resultados de los dos compuestos acetilados **51** y **52** que resultan de la reacción de Krapcho sobre la oleuropeína son similares entre sí y mejores que los que presenta la oleuropeína peracetilada **148**, por detención del ciclo celular, para todas las líneas celulares a excepción del HeLa. Destacar que los mejores valores de inhibición vuelven a ser para las células del HeLa con GI₅₀ de $(23 \pm 4.3) \mu\text{M}$ y $(15 \pm 3.2) \mu\text{M}$ para **51** y **52** respectivamente, por lo que parece ya un hecho de que todos los derivados analizados han demostrado ser selectivos contra este tipo de cáncer.

²³⁶ Mateos, R; Goya, L; Bravo, L. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9897–9905.

²³⁷ Bulotta, S; Corradino, R; Celano, M; Maiuolo, J; D'Agostino, M; Oliverio, M; Procopio, A; Filetti, S; Russo, D. *J. Mol. Endocrinol.* **2013**, *51*, 181–189; Bulotta, S; Corradino, R; Celano, M; D'Agostino, M; Maiuolo, J; Oliverio, M; Procopio, A; Iannone, M; Rotiroti, D; Russo, D. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1609–1614.

Destacar también que los tres derivados lipófilos que presentan mejores resultados, **148**, **51** y **52**, son más activos que el HT, especialmente contra las células del HeLa.

6.3. Modulación de la respuesta inflamatoria en macrófagos peritoneales por parte de polifenoles lipófilos

La inflamación es una manifestación inespecífica del sistema inmune que se activa en los tejidos conectivos vascularizados ante agresiones externas con el objeto de aislar los patógenos causantes del daño y destruirlos. Sin embargo, la inflamación puede convertirse en un problema cuando se mantiene durante largos periodos ya que induce daños importantes en los tejidos, pasando de la inflamación aguda, típica de la respuesta inmunitaria innata a la inflamación crónica. El gran problema de la inflamación crónica es que dicha respuesta inmunitaria impide la acción correctiva que debe ocurrir una vez eliminado el patógeno causante del peligro original. Así mismo, el daño tisular asociado a esta situación puede derivar, si no se resuelve la causa, a enfermedades como la artritis reumatoide, la aterosclerosis o la fibrosis pulmonar.

Dentro de la respuesta inflamatoria, los macrófagos son los componentes mayoritarios con los que cuenta el sistema inmune, lo cual los convierte en una perfecta diana para corregir los procesos de inflamación crónica. Cuando actúan durante la respuesta inflamatoria, son capaces de expresar las enzimas proinflamatorias iNOS y COX-2,²³⁸ que son responsables directos de la producción exagerada de NO y

²³⁸ Chang, WT; Huang, WC; Liou, CJ. *Food Chem.* **2012**, *134*, 972–979.

prostaglandinas E₂ (PGE₂). Para inducir la expresión de estas dos enzimas, es necesaria la activación de ciertas cascadas de transducción de señales intracelulares en donde intervienen proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y el factor nuclear de transcripción κB (NF-κB). De esta manera, todos estos mediadores proinflamatorios, así como los canales de inducción de expresión de genes inflamatorios, pueden convertirse en objetivos de agentes antiinflamatorios.²³⁹

Por ello, se realizó un estudio de la modulación, por parte de polifenoles lipófilos, de la respuesta inflamatoria de macrófagos peritoneales en colaboración con el grupo de Farmacología Experimental y Farmacia Clínica de la profesora Catalina Alarcón de la Lastra (Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla), animados por la reconocida actividad antiinflamatoria exhibida por la fracción fenólica del aceite de oliva.²⁴⁰

El modelo escogido fue el de la estimulación de los macrófagos peritoneales con lipopolisacáridos (LPS) de origen bacteriano, ya que provoca una gran alteración en los procesos redox intracelulares induciendo un fuerte estado de estrés oxidativo y daño celular causado por ROS,²⁴¹ lo que constituye un excelente modelo para evaluar a potenciales fármacos.²⁴² Los compuestos ensayados fueron (Figura 58):

²³⁹ Lawrence, T; Willoughby, DA; Gilroy, DW. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, 2, 787–795.

²⁴⁰ Sánchez-Fidalgo, S; Sánchez de Iburgüen, L; Cárdeno, A; Alarcón de la Lastra, C. *Eur. J. Nutr.* **2012**, 51, 497–506.

²⁴¹ Brüne, B; Dehne, N; Grossmann, N; Jung, M; Namgaladze, D; Schmid, T; von Knethen, A; Weigert, A. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, 19, 595–637.

²⁴² Sánchez-Miranda, E; Lemus-Bautista, J; Pérez, S; Pérez-Ramos, J. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2013**, No. 762020.

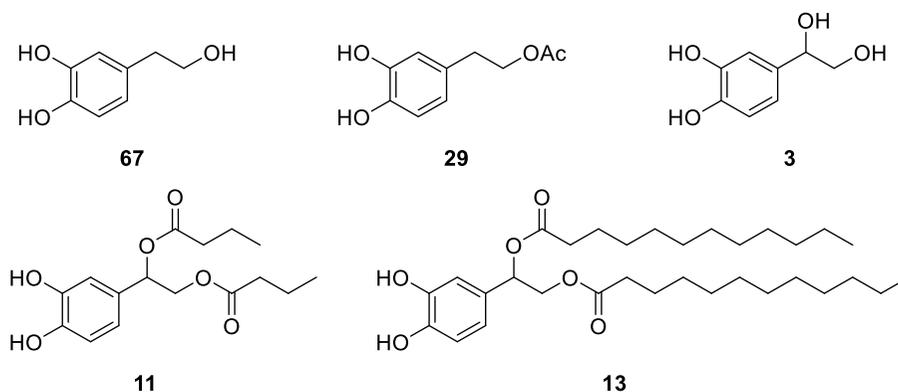


Figura 5. Compuestos ensayados para la modulación *ex vivo* de la actividad antiinflamatoria de macrófagos peritoneales

Como consecuencia de la estimulación de los macrófagos con LPS, la producción de nitritos y de nitratos se elevó considerablemente. Este aumento en la concentración de especies nitrogenadas se considera un marcador muy dañino para la integridad de la célula pues es indicativo de un alto nivel de NO, que actúa como molécula señal para la transcripción de la enzima iNOS que a su vez induce la formación de mayores cantidades de NO, lo que finalmente nos lleva a la formación de ROS en el interior de la célula, disparando la respuesta inflamatoria.²⁴³ No obstante, el tratamiento con los polifenoles redujo considerablemente tanto la producción de nitritos (Figura 59), así como la expresión de la enzima iNOS (Figura 60), siendo **29** el mejor candidato para el control de la producción de NO, mejorando levemente los resultados alcanzados por el HT para las concentraciones de 50 y 100 μM utilizadas.

²⁴³ Li, D; Xue, M; Geng, Z; Chen, P. *Cell. Physiol. Biochem.* **2012**, 29, 9–20.

6. Propiedades biológicas

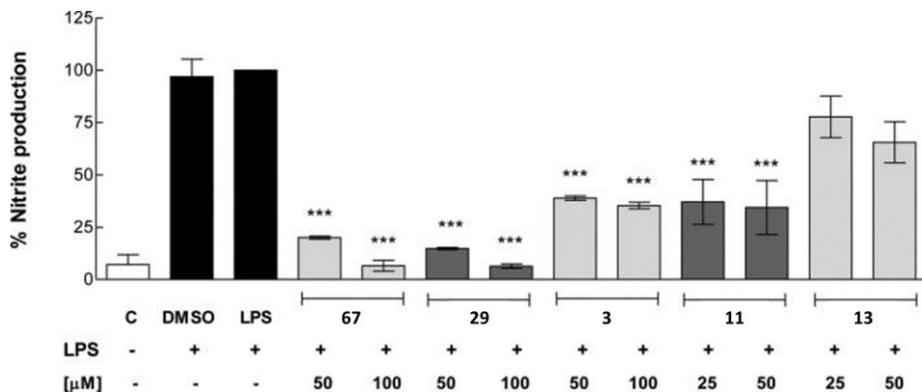


Figura 6. Efecto de los polifenoles en la producción de NO en macrófagos peritoneales estimulados con LPS

En cuanto a la expresión de la iNOS, todos los compuestos, a excepción de **13**, demostraron una excelente capacidad inhibitoria a 50 μM, igualando o incluso mejorando con el acetato de HT **29** y el 3,4-dihidroxifenilglicol **3**, la inhibición alcanzada por el HT (Figura 60).

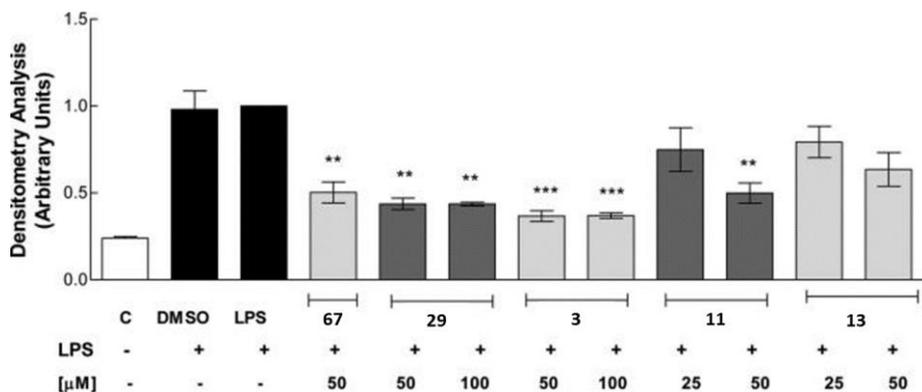


Figura 7. Efecto de los polifenoles en la expresión de la enzima iNOS en macrófagos peritoneales estimulados con LPS

La enzima COX-2, es la encargada de catalizar la biosíntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. La inhibición de esta enzima es clave en la lucha contra la inflamación ya que las

prostaglandinas son estimuladoras de los centros nerviosos del dolor, y debido a esto existe una familia de fármacos, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), dirigidos específicamente a inhibir las ciclooxigenasas. Con el objetivo de conocer si nuestros polifenoles actúan como AINEs, se evaluó la posible inhibición de la sobreexpresión de la COX-2 (Figura 61).

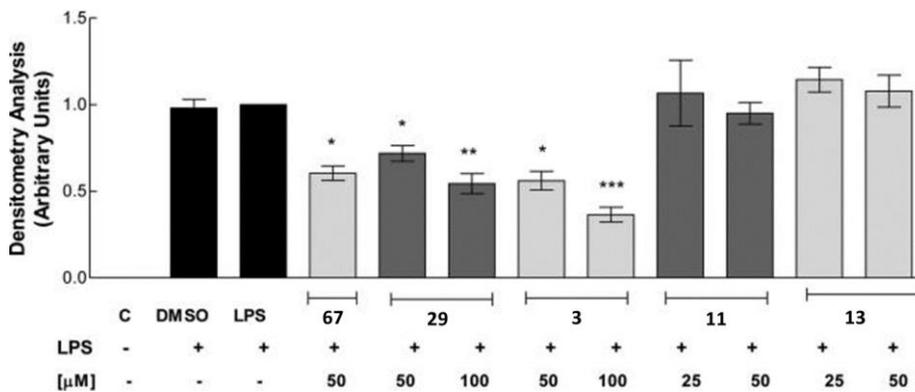


Figura 8. Efecto de los polifenoles en la expresión de la enzima COX-2 en macrófagos peritoneales estimulados con LPS

Tan sólo **29** y **3** consiguieron inhibir la expresión de dicha enzima de manera dosis dependiente.

Es de resaltar que, aunque **3** arroje buenos resultados, y no sus derivados lipófilos **11** y **13**; sí es cierto que al comparar al HT con su acetato **29**, queda patente la mejora en todos los parámetros confirmando así que un mejor balance hidrófilo-lipófilo tiene como consecuencia una mejora en sus propiedades biológicas.

6.4. Efecto de la suplementación en la dieta con HTAc en la colitis aguda

Tras los datos obtenidos en el modelo de inflamación con macrófagos peritoneales, era necesario probar en un modelo *in vivo* nuestros dos mejores candidatos con el objetivo de reafirmar los datos positivos que se obtuvieron con las células. Para ello, de nuevo en colaboración con el grupo de la profesora Alarcón de la Lastra, decidimos probar el HTAc **29** y el DHPG **3** en un modelo de inflamación intestinal basado en la inducción de colitis aguda con dextrán sulfato sódico (DSS) en ratones. La elección de este modelo se fundamenta en que la inducción con DSS de la colitis implica una respuesta aguda del sistema inmune²⁴⁴ donde intervienen células como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células T y B; y la secreción de distintos mediadores como citoquinas y quimioquinas.²⁴⁵ Todo ello convierte a este modelo en un ejemplo perfecto de los efectos que provocan las enfermedades inflamatorias del intestino como la colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn, y permite por tanto obtener resultados representativos.

El estudio se realizó distribuyendo los ratones en 3 grupos a los que se le alimentó durante 4 semanas con: dieta estándar, dieta estándar suplementada con **29** al 0.1% en peso y dieta estándar suplementada con **3** al 0.1% en peso. Teniendo en cuenta la cantidad de comida ingerida,

²⁴⁴ Zhang, YZ; Li, YY. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 91–99.

²⁴⁵ Wallace, KL; Zheng, LB; Kanazawa, Y; Shih, DQ. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 6–21.

se estimó que, durante el pretratamiento, cada ratón ingirió 4 mg/día de compuesto fenólico.

Finalizado el tiempo de pretratamiento, se indujo la colitis a 12 individuos de cada grupo con DSS al 3% en agua durante 5 días, seguido de otros 5 días para que la inflamación se desarrollara, en donde todos los ratones tomaron agua sin DSS. La evaluación de los efectos de la colitis en los ratones (diarrea, pérdida de peso y sangrado rectal) fue evaluado por un observador independiente durante todo este periodo de tiempo para poder calcular el Índice de Actividad de la Enfermedad (DAI). En este punto, se apreciaron grandes diferencias entre el grupo alimentado con **29** y el grupo con **3**. Los efectos de la colitis resultaron evidentes en todos los individuos tratados con DSS desde el comienzo de la inducción, pero sólo el grupo alimentado con **29** logró mejorar todos los síntomas de la enfermedad, resultando en una gran diferencia entre ambos grupos desde el quinto día de tratamiento (Figura 62).

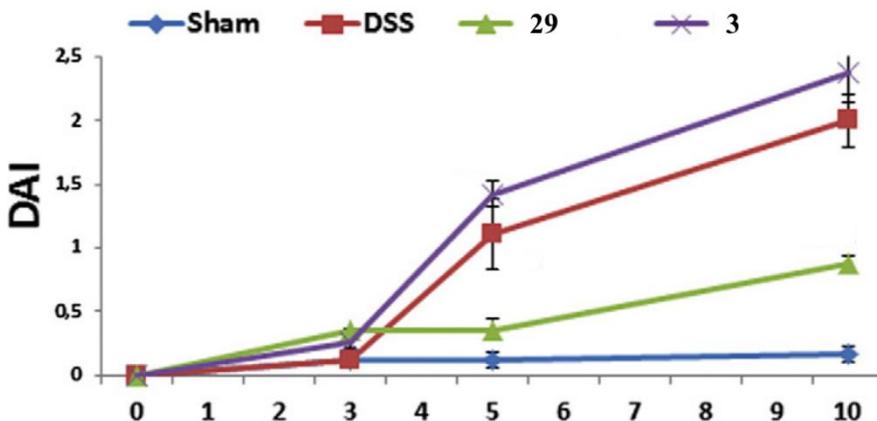


Figura 9. Efecto de la suplementación en la dieta de **HTAc** y **DHPG** en el desarrollo de la colitis aguda en ratones inducida por DSS. Sham: control sano, DSS: control de la inflamación

El efecto de la colitis fue constatado macroscópicamente justo después de sacrificar a los animales observándose un claro acortamiento de la longitud del colon que sólo se palió en parte en el grupo de HTAc **29**. Estos resultados pueden explicarse debido a la mayor lipofilia de **29** respecto de **3**, lo cual le permitiría una mejor absorción por parte de las células epiteliales intestinales, en concordancia con los datos aportados por Mateos *et al.*²⁴⁶ en un modelo de absorción intestinal con células Caco-2. De hecho, el análisis histopatológico de las muestras de tejido del colon extraídas *post mortem* revelaron la ruptura de la barrera epitelial, una disminución del número de criptas colónicas y una gran infiltración de células inflamatorias en el interior de la mucosa. Sin embargo, el daño histológico fue en gran medida paliado en el grupo alimentado con **29**, pudiendo observar la preservación de casi todas las estructuras, además de la regeneración de las criptas colónicas y del epitelio (Figura 63).

²⁴⁶ Rubió, L; Macià, A; Valls, RM; Pedret, A; Romero, MP; Solà, R; Motilva, M. J. *Food Chem.* **2012**, *134*, 1132–1136.

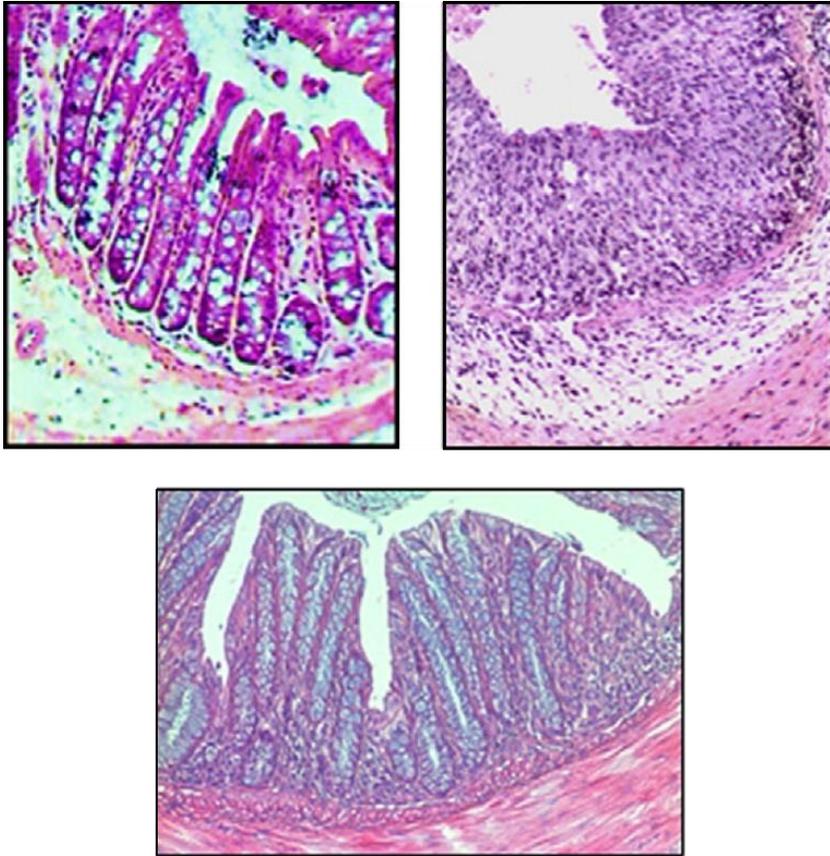


Figura 10. Imágenes al microscopio de muestras de tejidos del colon. Arriba izquierda: control sano, arriba derecha: control DSS, abajo: grupo alimentado con **29**

Asociado a estas evidencias observadas en el análisis histológico, en el grupo alimentado con dieta suplementada con **29** se produjo una drástica disminución de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en contraste con el grupo control DSS (Figura 64). Esta enzima, presente en los neutrófilos y otras células del sistema inmune, cataliza la producción de tóxicos (principalmente ácido hipocloroso) encargados de combatir agentes microbianos externos. Es por ello que la medida de la actividad de esta enzima ofrece información directa acerca del grado de

6. Propiedades biológicas

inflamación sufrido por los tejidos, además del nivel de infiltración de los neutrófilos.

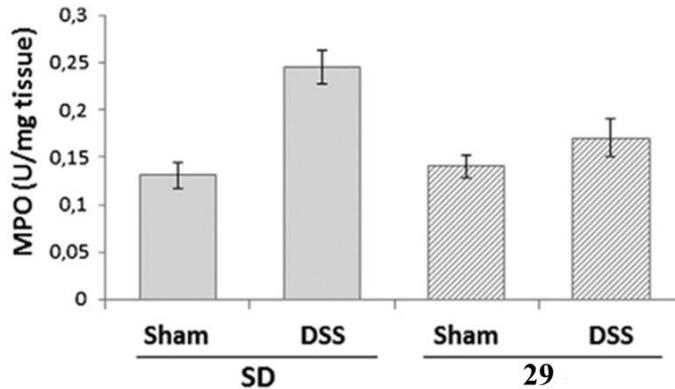


Figura 11. Efecto de la suplementación en la dieta con HTAc en la actividad de la enzima MPO. SD: dieta estándar. Sham: control no inducido con DSS

Tal y como ocurre en el modelo con macrófagos peritoneales, la actividad antiinflamatoria del HTAc en este modelo animal, está enfocada en la completa inhibición de la expresión de las enzimas iNOS y COX-2, encargadas de la producción excesiva de NO y prostaglandinas respectivamente (Figura 65).

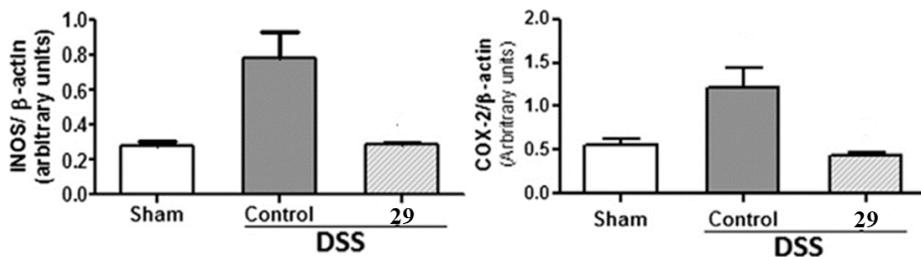


Figura 12. Efecto de la suplementación en la dieta con 29 en la actividad de las enzimas proinflamatorias iNOS y COX-2

En consecuencia, se pudo concluir que la fuerte actividad antiinflamatoria del HTAc 29 en el tratamiento de la colitis aguda en

ratones, está centrada en la inhibición de las enzimas iNOS y COX-2, vía inhibición de dos rutas para la expresión de sus genes, concretamente a través de la JNK (MAPK) y NF- κ B (datos no mostrados en esta Tesis).²⁴⁷

6.5. Efectos de la dieta suplementada con HTAc en la artritis reumatoide

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria sistémica autoinmune que se caracteriza por la aparición de inflamación en articulaciones, normalmente manos y pies, que provoca la destrucción de cartílagos y huesos de las zonas afectadas. El proceso comienza con una activación del sistema inmunitario innato por algún estímulo externo, en individuos predispuestos genéticamente, lo que a su vez conduce al desarrollo de una respuesta por parte del sistema inmunitario adaptativo y a la producción de autoanticuerpos. Los repetidos ciclos de activación del sistema inmune con producción de autoanticuerpos estimulan el aumento de los niveles de citoquinas causando la respuesta inflamatoria en un proceso que puede manifestarse completamente varios años después de los primeros síntomas.^{248,249} A partir de entonces, la inflamación resulta evidente y es cuando se diagnostica la enfermedad. El proceso continúa con la aparición de líquido sinovial y desarrollo de vasos sanguíneos sinoviales, que conducirá a un crecimiento descontrolado del tejido afectado (hiperplasia sinovial). Ello provoca una

²⁴⁷ Sánchez-Fidalgo, S; Villegas, I; Aparicio-Soto, M; Cárdeno, A; Rosillo, MÁ; González-Benjumea, A; Maset, A; López, Ó; Maya, I; Fernández-Bolaños, JG; Alarcón de la Lastra, C. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *26*, 513–520.

²⁴⁸ McInnes, I; Schett, G. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 2205–2219.

²⁴⁹ Jutley, G; Raza, K; Buckley, CD. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2015**, *27*, 249–255.

infiltración hacia la membrana sinovial de células T, B, macrófagos, neutrófilos, “natural killers” y células dendríticas que, junto con la consiguiente activación de cascadas de citoquinas, ayudan a mantener indefinidamente la inflamación, la cual produce la erosión del cartílago y del hueso subcondral (tejido óseo situado justo debajo del cartílago en una articulación).²⁵⁰

Animados tras los excelentes resultados aportados por el HTAc **29** en el ámbito de la inflamación, se ensayaron en el grupo de la profesora Alarcón de la Lastra los posibles efectos beneficiosos de dicho compuesto en un modelo de artritis inducida por colágeno en ratones.²⁵¹

Para ello se organizaron 4 grupos de 10 ratones cada uno distribuidos de la siguiente manera: control sano (Control), grupo control con artritis inducida por colágeno (CIA), grupo alimentado con **67** (HT) y grupo alimentado con **29** (HTAc). Tras 6 semanas, se indujo la artritis a los grupos CIA, HT y HTAc, y se evaluó el desarrollo de la enfermedad diariamente hasta su sacrificio tras 42 días.

Durante el proceso de evaluación de la enfermedad, quedó patente su desarrollo en el grupo CIA a partir del día 34, donde los síntomas eran evidentes. Sin embargo, el grupo HTAc mostraba una clara disminución en la afectación de la artritis en contraposición con el grupo control e incluso con el grupo HT. Hasta el último día, estas diferencias fueron aumentando, siendo el grupo HTAc exclusivamente el único que consiguió disminuir el grado de incidencia de la artritis en

²⁵⁰ Rosillo, MA; Sánchez-Hidalgo, M; Sánchez-Fidalgo, S; Aparicio-Soto, M; Villegas, I; Alarcón-de-la-Lastra, C. *Eur. J. Nutr.* **2016**, *55*, 315–325.

²⁵¹ Rosillo, MA; Sánchez-Hidalgo, M; González-Benjumea, A; Fernández-Bolaños, JG; Lubberts, E; Alarcón de la Lastra, C. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 2537–2546.

detrimento del grupo HT (Figura 66). Estos resultados preliminares recogidos antes del sacrificio parecen indicar que la mayor lipofilia del HTAc **29** le confiere no sólo una capacidad preventiva o retardante, sino de una actividad terapéutica.

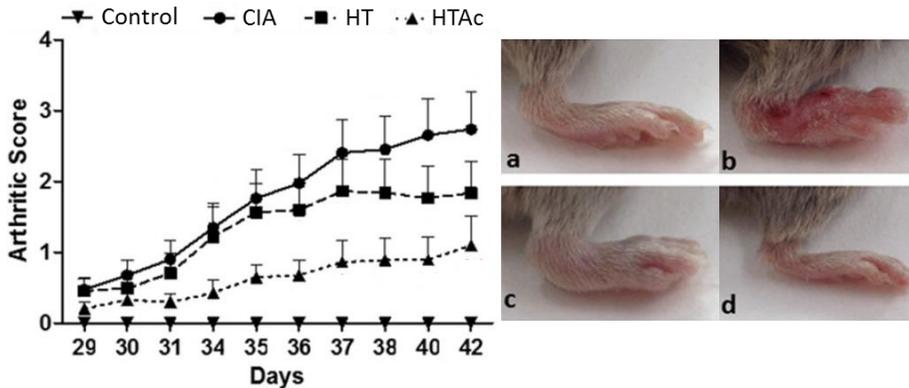


Figura 13. Efecto de la suplementación en la dieta de HT y HTAc en el desarrollo de la artritis reumatoide en ratones inducida por colágeno. Las fotografías corresponden al estado de inflamación de las patas de (a) Control, (b) CIA, (c) HT y (d) HTAc

En cuanto a la modulación de enzimas proinflamatorias, la inducción de la artritis con colágeno provocó la sobreexpresión de COX-2 y m-PGEs1 (conocida también como COX-1). Esta sobreexpresión fue convenientemente disminuida en el grupo HTAc, pero no en el grupo alimentado con HT debido probablemente a la capacidad del HTAc, pero no del HT, de disminuir los niveles de prostaglandinas E_2 .

Por último, señalar que la dieta enriquecida con **29** promovió la estimulación de mecanismos de respuesta ante procesos de estrés oxidativo. En condiciones de inflamación, cuando los niveles tanto de ROS como NOS aumentan, se pone en juego el factor Nrf2 que se encarga de activar la respuesta antioxidante.²⁵² Dicha respuesta está

²⁵² Young Bang, S; Kim, JH; Kim, HY; Ji Lee, Y; Young Park, S; Joon Lee, S; Kim,

fundamentada en la activación de genes que codifican la hemooxigenasa-1 (HO-1) que debe encargarse de actuar contra los radicales libres,²⁵³ por lo que es importante que estos dos parámetros se encuentren elevados en un proceso artrítico. Tal y como se esperaba, tanto los niveles de Nrf2 y la enzima HO-1 se encontraban muy bajos tanto en el grupo CIA como en el HT. Este efecto pudo ser corregido en parte gracias a la dieta enriquecida con **29**, donde ambos niveles son significativamente más altos (Figura 67).

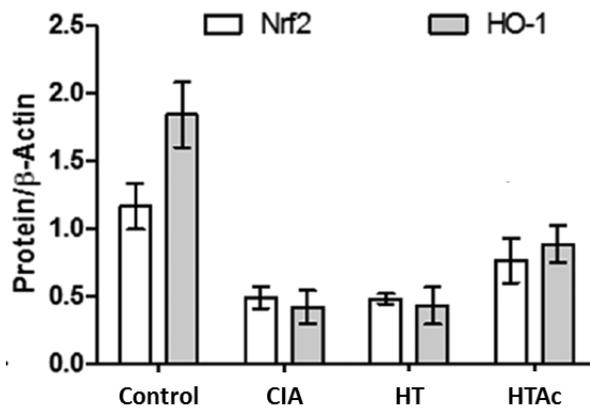


Figura 14. Efecto de la suplementación en la dieta con HT y HTAc en los niveles del factor del factor Nrf2 y la enzima OH-1

Como conclusión, se ha demostrado el efecto antiinflamatorio del HTAc en un modelo de artritis reumatoide en ratones. La actividad de dicho compuesto, evita la destrucción del cartílago, la activación de la respuesta antioxidante y por supuesto, la inhibición de las vías de señalización que controlan la producción de enzimas y citoquinas proinflamatorias (datos no mostrados en esta Tesis).

Y. J. *Ethnopharmacol.* **2012**, *144*, 109–117.

²⁵³ Hayes, JD; Dinkova-Kostova, A. T. *Trends Biochem. Sci.* **2014**, *39*, 199–218.

6.6. Modulación de la respuesta inflamatoria de fibroblastos humanos del líquido sinovial

Durante el desarrollo de la artritis reumatoide, tanto el líquido sinovial como los fibroblastos juegan un papel importante en las últimas fases del desarrollo de la enfermedad. Los fibroblastos son células características del tejido conectivo que se encargan de mantener en buenas condiciones la matriz extracelular mediante la síntesis de colágeno y glucosaminoglucanos.²⁵⁴ Sin embargo, cuando la articulación está afectada por la artritis, los fibroblastos se convierten en células que facilitan la destrucción de los cartílagos al promover la angiogénesis. Además, facilitan la adhesión de enzimas que degradan los cartílagos una vez han comenzado a erosionarse. Un problema adicional es que los fibroblastos son células que, ya sea en tejido sano o no, se encuentran en una gran proporción y en el caso de la artritis, migran de manera masiva. No obstante, en los últimos años se aboga por el control del estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria de los fibroblastos como estrategia adicional para el tratamiento de la artritis.^{255,256}

Es por ello que nos pareció atractivo que se pudiera investigar, en colaboración con la profesora Alarcón de la Lastra, los efectos antiartríticos de la oleuropeína **71**, centrándonos en el papel de los fibroblastos.²⁵⁷ Para ello, se cuenta con un modelo de inflamación que

²⁵⁴ Bhattaram, P; Chandrasekharan, U. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2016**, *62*, 86–93.

²⁵⁵ Bottini, N; Firestein, GS. *Curr. Rhe. Rep.* **2013**, *15*, 372–382.

²⁵⁶ Lefevre, S; Meier, FM; Neumann, E; Muller-Ladner, U. *Cur. Pharm. Design*, **2015**, *21*, 130–141.

²⁵⁷ Castejón, ML; Rosillo, MA; Montoya, T; González-Benjumea, A; Fernandez-Bolanos, JG; Alarcon de la Lastra, C. *Food Funct.* **2017**, *8*, 1890–1898.

simula su comportamiento durante la artritis reumatoide que consiste en la estimulación de fibroblastos humanos (SW982) con interleuquina IL-1 β , de modo que pueda determinarse el efecto de **71** en la producción de citoquinas y otros aspectos de la respuesta inflamatoria.

Antes de comentar las características más remarcables de la modulación por parte de **71** de la respuesta inflamatoria de los fibroblastos, destacar que la viabilidad de las células se mantuvo por encima del 90% en un amplio rango de concentraciones 6.25-100 μ M. Es por ello que para los estudios bioquímicos realizados se eligieron las concentraciones de 50 μ M y 100 μ M.

Uno de los principales mecanismos por el cual los fibroblastos contribuyen a la degradación de la matriz extracelular en la artritis reumatoide es a través de la producción de citoquinas proinflamatorias, principalmente la TNF- α y la IL-6.^{258,259} Como cabía esperar, la inducción de los fibroblastos con IL-1 β condujo a niveles elevados de citoquinas proinflamatorias que fueron convenientemente inhibidas mediante pretratamiento de las células con **71** (Figura 68). Estos resultados nos hacen pensar en la posible capacidad de la oleuropeína para modular la producción de citoquinas de las células sinoviales.

²⁵⁸ McInnes, IB; Schett, G. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, 7, 429–442.

²⁵⁹ Su, X; Huang, Q; Chen, J; Wang, M; Pan, H; Wang, R; Zhou, H; Zhou, Z; Liu, J; Yang, F; Li, T; Liu, L. *Pharmacol. Res.* **2016**, 113, 695–704.

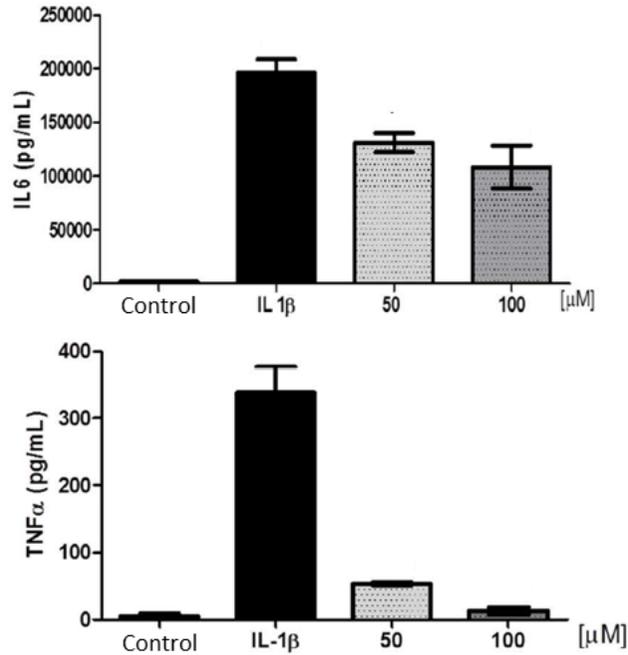


Figura 15. Efecto de **71** en la producción de citoquinas proinflamatorias en fibroblastos sinoviales estimulados por IL-1β

Resulta especialmente importante la inhibición de la expresión de las enzimas proinflamatorias COX-1 y COX-2 en el contexto de la artritis reumatoide, ya que permite controlar la sobreproducción de prostaglandinas E₂ las cuales están íntimamente ligadas con la activación del receptor prostaglandina EP₄, a su vez relacionado con el daño articular.²⁶⁰ Los resultados demuestran que el tratamiento con **71** logra disminuir la expresión de ambas ciclooxygenasas en fibroblastos estimulados con IL-1β (Figura 69).

²⁶⁰ McCoy, JM; Wicks, JR; Audoly, LP. *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 651–658.

6. Propiedades biológicas

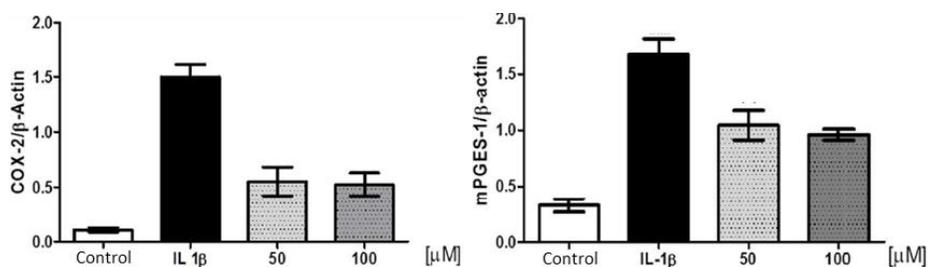


Figura 16. Efecto de **70** en la sobreexpresión de enzimas proinflamatorias en fibroblastos estimulados con IL-1β

También se ha comentado la importancia de mantener activo el factor de transcripción Nrf2 que regula la expresión de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, por lo que ejerce una importante labor en la respuesta inmunitaria contra desequilibrios asociados a los radicales libres. Este hecho se vuelve todavía más importante en enfermedades relacionadas a procesos inflamatorios donde existe una fuerte producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. La estimulación de células SW982 con IL-1β condujo a una fuerte inhibición del factor Nrf2 que tuvo como consecuencia una menor expresión de la enzima antioxidante hemooxigenasa OH-1. No obstante, el pretratamiento de las células con **71** logró restaurar Nrf2 demostrando que es posible estimular la expresión de la OH-1 con dicho compuesto.

En conclusión, la oleuropeína puede sumarse al grupo de compuestos fenólicos que pueden tener un gran impacto frente a fuertes procesos inflamatorios en general, y contra la artritis reumatoide en particular, dentro de una estrategia basada en dietas funcionales. Se ha demostrado que la oleuropeína es capaz de modular la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo en células de especial relevancia en la artritis reumatoide como es el caso de los fibroblastos.

6.7. Modulación de la respuesta inflamatoria de macrófagos peritoneales por parte de la oleuropeína y sus derivados acetilados

Con el fin de analizar el papel que juega el aumento de la lipofilia en la oleuropeína sobre sus propiedades antiinflamatorias, se eligió como modelo la modulación de la respuesta inflamatoria en los macrófagos peritoneales estimulados con LPS, de manera análoga al estudio realizado en el apartado 6.3. Dentro de las familias celulares que intervienen en la respuesta inflamatoria, los macrófagos son de las más importantes y es por ello que los resultados que deriven de estos estudios, suministran información valiosa acerca de las propiedades beneficiosas de los compuestos testados.

Está documentado que la oleuropeína **71** posee propiedades antiinflamatorias mediante inhibición de la iNOS y la COX-2 en células RAW264 (macrófagos de ratón)²⁶¹ y contra la colitis ulcerosa estimulada con DSS en ratones²⁶² sin embargo, sus derivados lipófilos nunca han sido estudiados para tal fin. Estos nuevos derivados pueden mostrar mayor actividad debido a su mayor predisposición a atravesar las membranas celulares y su mayor resistencia a la excreción, ya que disponen de un menor número de grupos hidroxilos que puedan participar en reacciones de formación de glucurónidos.²⁶³ Es por ello que resulta de especial relevancia encontrar derivados que exhiban un mejor

²⁶¹ Ryu, SJ; Choi, HS; Yoon, KY; Lee, OH; Kim, KJ; Lee, BY. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 2098–2105.

²⁶² Giner, E; Andújar, I; Recio, MC; Ríos, JL; Cerdá-Nicolás, JM.; Giner, R. M. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 12882–12892.

²⁶³ Scheepens, A; Tan, K; Paxton, JW. *Genes Nutr.* **2010**, *5*, 75–87.

perfil farmacocinético y farmacodinámico que se traduzca en una mejor actividad *in vivo* de la oleuropeína natural.

Para este estudio, nuevamente se ha contado con el grupo de investigación de la Dra. Alarcón de la Lasta, siendo ensayados la oleuropeína **71**, la oleuropeína peracetilada **148**, la 2'',3'',4'',6''-tetra-*O*-acetil oleuropeína **50** y la 6''-*O*-acetil oleuropeína **46** (Figura 70).

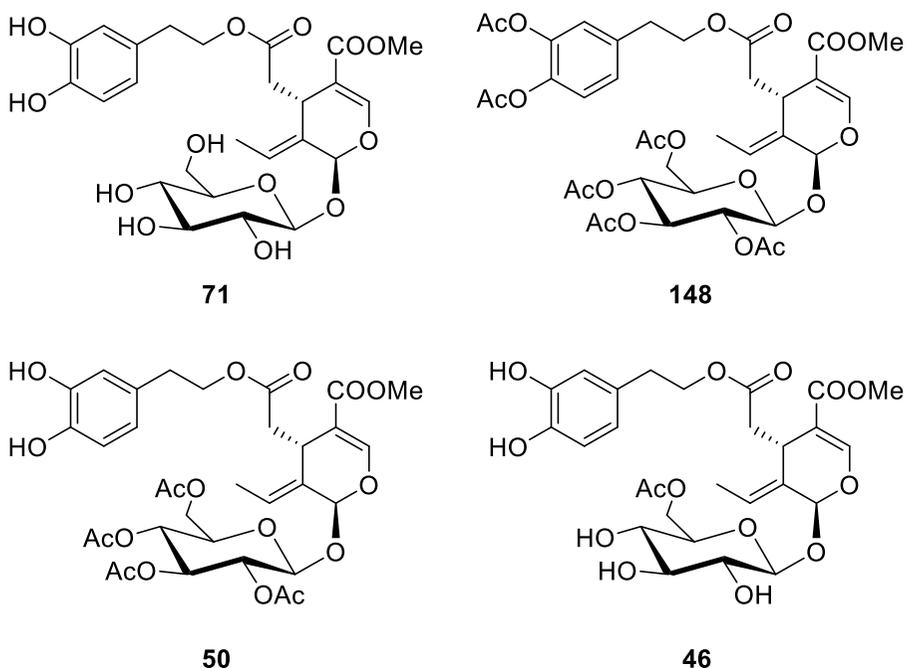


Figura 17. Compuestos ensayados en la modulación de la respuesta inflamatoria de macrófagos peritoneales estimulados con LPS

La viabilidad de las células tratadas con todos los derivados de la oleuropeína se mantuvo por encima del 85% en el rango de concentraciones de 1.6-50 μM , por lo que se escogieron dos concentraciones, 25 μM y 50 μM para la realización de todos los ensayos.

La estimulación con LPS simula la interacción de los macrófagos con la pared celular de las bacterias Gram negativas, lo cual dispara la respuesta inflamatoria ante el patógeno externo.

La estimulación de las células con LPS condujo a la producción de grandes cantidades de NO y una excesiva transcripción de los genes que codifican la enzima iNOS. Un nivel descontrolado de NO es potencialmente peligroso ya que esta molécula actúa como señal intracelular para la producción de ROS y otras especies como las *N*-nitrosaminas, que participan en procesos causantes de daños a la integridad celular, especialmente al ADN.²⁶⁴ El tratamiento de los macrófagos con **71** consiguió disminuir tanto la cantidad de NO como la expresión de la enzima iNOS no obstante, los cultivos correspondientes a los derivados acetilados mostraron una fortísima inhibición de ambos parámetros incluso a 25 μ M, alcanzando niveles propios del control sano (Figura 71).

²⁶⁴ Cárdeno, A; Sánchez-Hidalgo, M; Aparicio-Soto, M; Sánchez-Fidalgo, S; Alarcón-de la Lastra, C. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1270–1277.

6. Propiedades biológicas

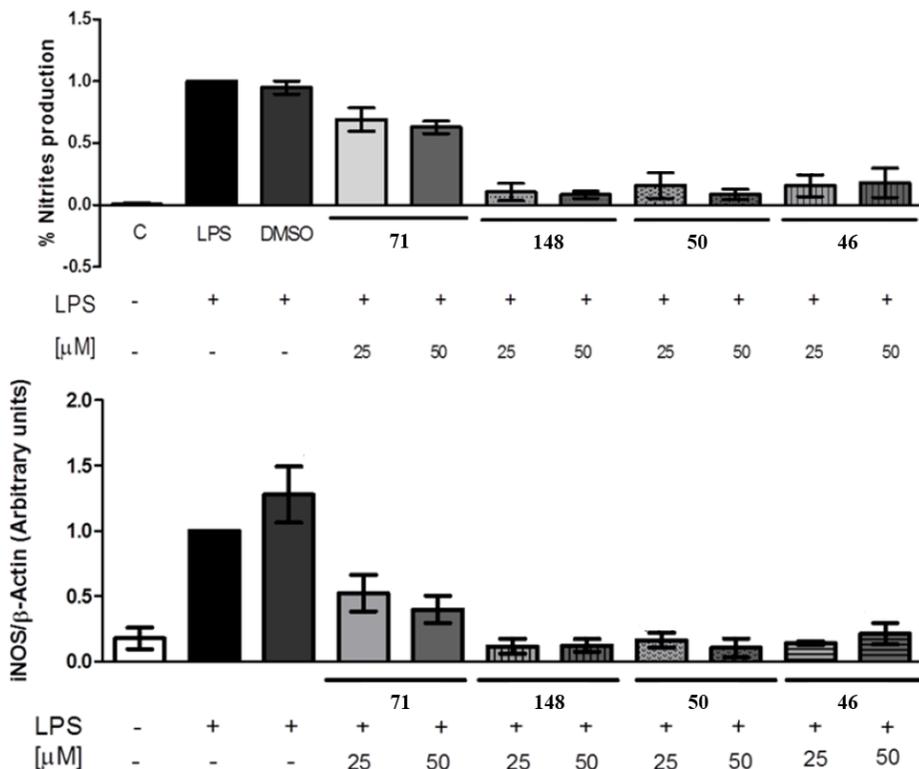


Figura 18. Efecto de los derivados lipófilos de la oleuropeína en la producción de NO (arriba) y la expresión de la enzima iNOS (abajo) en macrófagos peritoneales estimulados con LPS

Por otro lado, la inhibición de la segunda enzima proinflamatoria por excelencia, la COX-2, también fue posible mediante tratamiento con los derivados de la oleuropeína. Sin embargo, y aunque la inhibición en todos los casos fue muy significativa, no consiguió mejorar el excelente resultado alcanzado por la oleuropeína natural en las dos concentraciones ensayadas (Figura 72).

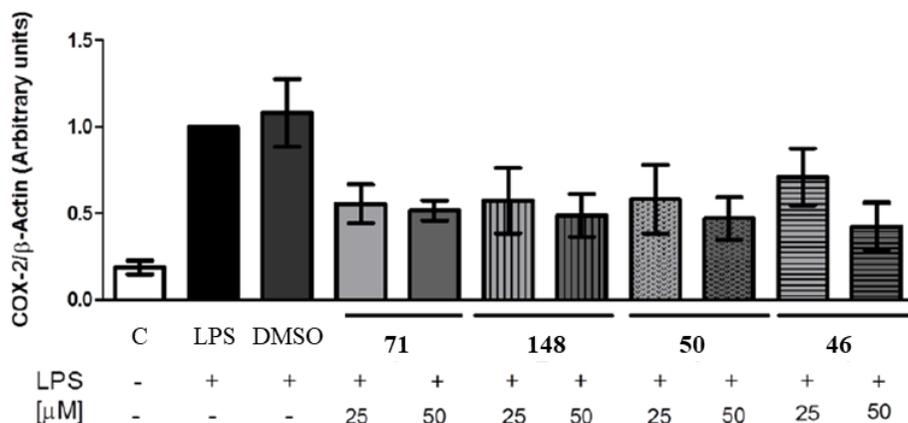


Figura 19. Efecto de los derivados lipófilos de la oleuropeína en la expresión de la enzima COX-2 en macrófagos peritoneales estimulados con LPS

Por último, se evaluó el efecto en los mecanismos naturales que combaten al estrés oxidativo, como el factor Nrf2 y la enzima OH-1, en las células tratadas con LPS. La estimulación con LPS de los macrófagos condujo a una gran disminución en la expresión tanto del factor Nrf2 como de la hemoxygenasa-1 que el tratamiento con oleuropeína no consiguió corregir. Las células tratadas con los derivados acetilados mostraron niveles de expresión significativamente más altos (Figura 73) siendo los mejores candidatos los derivados mono y tetraacetilados **46** y **50**, por delante del peracetilado **148**. Quizás estos datos sugieran que aquellas moléculas que exhiben el grupo catecol consigan una regulación positiva de la expresión de Nrf2 y OH-1 más potente, de ahí que sea el derivado tetraacetilado el más activo pues es a la vez mucho más lipófilo que la oleuropeína y mantiene el catecol desprotegido.

6. Propiedades biológicas

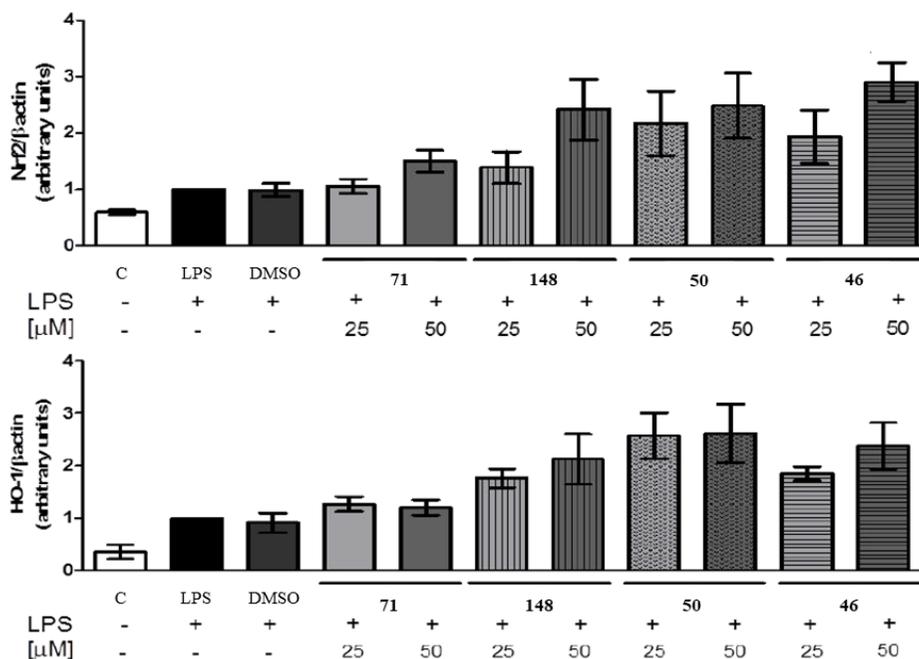


Figura 20. Efecto de los derivados lipófilos de la oleuropeína en la expresión del factor Nrf2 y la enzima OH-1

Con todos estos datos podemos afirmar que, no sólo los derivados lipófilos de la oleuropeína consiguen modular la respuesta inflamatoria de los macrófagos estimulados con LPS, sino que en general son claramente más activos que la oleuropeína natural. Dicha modulación está centrada en la inhibición de citoquinas y enzimas proinflamatorias, así como las vías de transducción de éstas últimas (datos no mostrados en esta Tesis) y, por si fuera poco, también ejercen un papel importante en la restauración de los mecanismos que controlan el estrés oxidativo. Finalmente, estos resultados positivos parecen indicar que efectivamente la mejora en el perfil hidrófilo-lipófilo como consecuencia de la modificación de los grupos funcionales trae consigo una mejor actividad, hecho que deberíamos confirmar en un estudio *in vivo* más exhaustivo.

6.8. Efectos de la dieta suplementada con HT y HTAc en el lupus eritematoso sistémico

El lupus eritematoso sistémico es una de las enfermedades autoinmunes con más prevalencia en la población mundial. Es también considerada como una enfermedad crónica, ya que se caracteriza por periodos cíclicos de exacerbaciones y remisiones; sistémica, ya que afecta a casi cualquier órgano y heterogénea, ya que dicha enfermedad se presenta con una amplia variedad de alteraciones serológicas y se manifiesta clínicamente con un grado de virulencia muy variado, desde casos leves a otros en donde la pervivencia de órganos queda en entredicho.

Su etiología es desconocida, aunque existe un consenso en considerar al lupus una enfermedad multifactorial en la que se da una combinación de factores genéticos, ambientales y hormonales.²⁶⁵ El resultado es que dicha enfermedad provoca la producción de gran cantidad de autoanticuerpos contra antígenos celulares, que llevan a respuestas inflamatorias de múltiples órganos y sistemas como los riñones, la piel, el sistema cardiovascular y el sistema nervioso.²⁶⁶ El desequilibrio de diversas líneas celulares de linfocitos Th (células T-helper o T-cooperantes) y linfocitos T-reg (células T-reguladoras) parece ser uno de los puntos de partida del lupus más común, que es aquel que afecta fundamentalmente al riñón y al bazo.²⁶⁷ Esto parece provocar la

²⁶⁵ Perry, D; Peck, AB; Carcamo, WC; Morel, L; Nguyen, CQ. *Arthritis*, **2011**, 810649.

²⁶⁶ Dooley, MA; Hogan, S; Jennette, C; Falk, R. *Kidney Int*, **1997**, 51, 1188–1195.

²⁶⁷ Kyttaris, VC. En *Systems Biology in Drug Discovery and Development. Systemic Lupus Erythematosus: From Genes to Organ Damage*, **2010**, Springer, Vol. 662, pp 265–285.

activación de más linfocitos T y B que son los encargados de liberar citoquinas proinflamatorias en grandes cantidades, produciendo por tanto inflamación y daño en los tejidos.²⁶⁸

En este contexto, el HT **67** y sobre todo el HTAc **29** han demostrado ser dos agentes antiinflamatorios muy efectivos en escenarios relacionados con la inflamación crónica como son la colitis ulcerosa y la artritis reumatoide. Nuevamente con la colaboración del grupo de la profesora Alarcón de la Lastra, se ha realizado un estudio *in vivo* del efecto de la suplementación en la dieta con ambos polifenoles con ratones a los que se indujo lupus con pristano (el terpenoide 2,6,10,14-tetrametilpentadecano), y determinar si ejercen efectos beneficiosos contra esta enfermedad autoinmune y los trastornos inflamatorios asociados.²⁶⁹

En dicho estudio se distribuyeron un total de 70 ratones en 4 grupos: control sano (control), control de lupus (LES, *lupus eritematoso sistémico*), grupo alimentado con **67** (HT) y grupo alimentado con **29** (HTAc). Tras 4 semanas con dieta estándar, se les indujo la enfermedad mediante inyección intraperitoneal de pristano a los grupos LES, HT y HTAc, y se realizó un seguimiento de los síntomas cada semana durante 6 meses.

Durante el tiempo de desarrollo de la enfermedad se monitorizó el grado de hinchazón de las patas como signo indicativo del progreso de la enfermedad, encontrando que tras los 6 meses, los grupos HT y HTAc

²⁶⁸ Takeuchi, T; Tsuzaka, K; Abe, T; Yoshimoto, K; Shiraishi, K; Kameda, H. *Autoimmunity*, **2005**, 38, 339–346.

²⁶⁹ Aparicio-Soto, M; Sánchez-Hidalgo, M; Cárdeno, A; González-Benjumea, A; Fernández-Bolaños, JG; Alarcón de la Lastra, C. *J. Funct. Foods* **2017**, 29, 84–92.

(35% y 40% respectivamente) mostraban una cierta mejoría respecto del grupo LES (45%). También se observó un gran aumento en el peso del timo y el bazo en los ratones del grupo LES, algo que fue ligeramente reducido en los grupos alimentados con **67** y **29** (Figura 74).

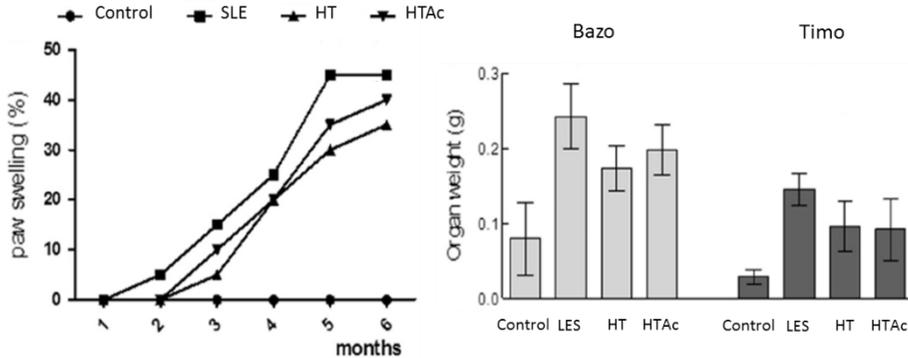


Figura 21. Efecto de la suplementación en la dieta con **67** y **29** en el desarrollo del lupus eritematoso sistémico en ratones inducida por pristano. En la izquierda se muestra la evolución de la enfermedad durante el periodo de desarrollo de la enfermedad. En la derecha se muestran los pesos para los diferentes grupos del bazo y el timo

La liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de las células del sistema inmune es clave en el desarrollo y persistencia del lupus eritematoso sistémico. Así mismo, las citoquinas TNF- α e IL-1 β contribuyen directamente en el proceso inflamatorio,²⁷⁰ la IL-6 tiene un peso importante en la producción de autoanticuerpos en el lupus²⁷¹ y la IL-17 contribuye a aumentar la virulencia de la respuesta inmune empeorando el daño causado por la inflamación.²⁷² En este estudio quedó

²⁷⁰ Umare, V; Pradhan, V; Nadkar, M; Rajadhyaksha, A; Patwardhan, M; Ghosh, KK; Nadkarni, AH. *Mediat. Inflamm*, **2014**, 385297.

²⁷¹ Richards, HB; Satoh, M; Jennette, JC; Okano, T; Kanwar, YS; Reeves, WH. *Clin Exp. Immunol*, **1999**, 115, 547–553.

²⁷² Li, D; Guo, B; Wu, H; Tan, L; Chang, C; Lu, Q. *Autoimmunity*, **2015**, 48, 353–361.

6. Propiedades biológicas

demostrado que la suplementación en la dieta con **67** y **29** consigue disminuir la respuesta inflamatoria mediada por los linfocitos Th, como se demuestra por la importante disminución en los niveles de algunas de las citoquinas producidas tanto en macrófagos peritoneales como en esplenocitos (Figura 75).

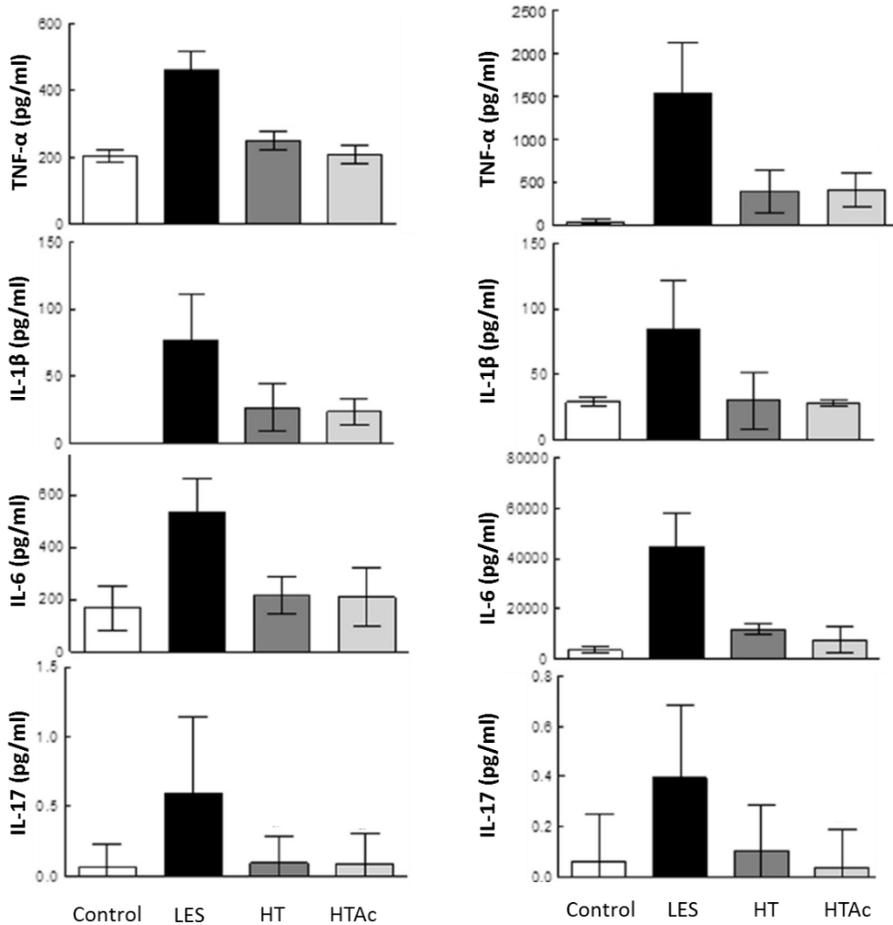


Figura 22. Efecto de la suplementación en la dieta con **67** y **29** en los niveles de citoquinas proinflamatorias procedentes de esplenocitos (izquierda) y macrófagos peritoneales (derecha)

El control de los niveles de la PGE₂ es una vía indirecta para la modulación de la respuesta inflamatoria.²⁷³ De hecho, los niveles de dicha prostaglandina se encontraban muy altos tanto en los cultivos de esplenocitos como de macrófagos del grupo LES. No obstante, los niveles de PGE₂ disminuyeron considerablemente en ambos cultivos celulares tanto del grupo HT como del grupo HTAc. Se determinó el nivel tanto de la PGE₂ como de la enzima COX-1 en el riñón, ya que su desequilibrio en este órgano puede conllevar daño renal. Los resultados fueron similares a los encontrados en los cultivos celulares anteriores, resultando en una considerable disminución de los niveles de prostaglandinas y una regulación de la expresión de la enzima que las biosintetizan a niveles iguales que los individuos sanos (Figura 76).

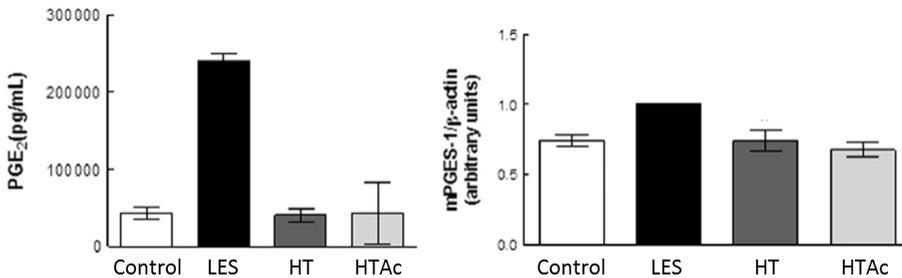


Figura 23. Efecto de la suplementación en la dieta con **67** y **29** en los niveles de PGE₂ y la expresión de la enzima proinflamatoria COX-1 en riñones de ratones con lupus inducido por pristano

Aunque en este modelo de lupus eritematoso sistémico no han podido observarse diferencias entre los efectos beneficiosos de la suplementación con **29** en comparación con el HT, a diferencia de los resultados obtenidos en las anteriores enfermedades que cursan con

²⁷³ Chae, BS; Shin, TY; Kim, DK; Eun, JS; Leem, JY; Yang, JH. *Arch. Pharm. Res.* **2008**, *31*, 503–510.

6. Propiedades biológicas

inflamación grave, previamente comentadas, queda patente el potencial uso de estos compuestos dentro del campo de la terapia nutricional, con menos problemas relacionados con la toxicidad de los fármacos que habitualmente se administran.

Para este modelo animal, podemos decir que tanto el HT como el HTAc contribuyen a reducir considerablemente los niveles de citoquinas proinflamatorias en esplenocitos y en macrófagos peritoneales, además de bloquear muy eficientemente diversas vías de activación de genes proinflamatorios.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

PRIMERA

Se ha establecido una nueva ruta de síntesis del compuesto 3,4-dihidroxifenilglicol **3** a partir del cloruro de 3,4-dihidroxifenacilo que implica transformaciones químicas sencillas y realizable a escala de multigramo, mejorando sensiblemente el procedimiento de síntesis previo y ofreciendo una alternativa viable a su obtención y purificación desde el alperujo.

SEGUNDA

Se han establecido dos procedimientos sintéticos para la preparación de dos nuevas familias de compuestos fenólicos lipófilos diacilados derivados de compuestos fenólicos **4** y **17** que portan un fragmento de catecol y un fragmento de glicol, obtenidos a partir de 3,4-dihidroxifenilglicol **3** e hidroxitirosol **67**, respectivamente.

TERCERA

Se ha establecido la viabilidad y utilidad sintética de nuevos extractos enzimáticos procedentes de microorganismos nativos con actividad lipolítica obteniendo nuevas familias de compuestos fenólicos lipofílicos derivados de hidroxitirosol **67**, alcohol protocatecuico **120**, 3,4-dihidroxifenilglicol **3**, ligustrósido **84** y oleuropeína **71**, así como del disacárido trehalosa **138**. Los mejores resultados, tanto en rendimiento como en regioselectividades, se consiguen empleando dichos extractos en desacilaciones lo que ha permitido el acceso a compuestos con

grandes propiedades biológicas como el HTAc **29**, una nueva familia de éteres lipófilos del DHPG **30-37**, los glucósidos de ligustrósido y oleuropeína parcialmente acetilados **49** y **50**, o la desimetrización de la trehalosa peracetilada **43** en tan solo dos pasos sintéticos.

CUARTA

Se ha llevado a cabo la semisíntesis de la oleaceína **53** a partir de oleuropeína **71** vía reacción de Krapcho, mejorando notablemente el único procedimiento descrito en bibliografía. Adicionalmente, conjuntamente con la síntesis de **53**, se ha determinado la formación de un nuevo compuesto, el aglicón del oleurósido deshidratado **54**. Con objeto de purificar dichos compuestos, se ha propuesto el método de la estabilización mediante acetilación que condujo a los derivados **51** y **52**. Se ha introducido el grupo metilideno en el fragmento de catecol de la oleuropeína dando **55**, que mediante la reacción de Krapcho conduce a la metilideno-oleaceína **56** estable. También se ha llevado a cabo la derivatización de la oleaceína mediante reacciones regioselectivas de reducción y acetalación de los grupos formilos que permiten obtener los derivados reducidos **59** y **60**, y el etilideno acetal **64**.

QUINTA

Se han logrado las síntesis de los secoiridoides del olivo oleaceína **53** y oleocantal **57** mediante reacción de Krapcho sobre los respectivos aglicones aldehídicos de ligustrósido **65** y oleuropeína **66** por separado, y mezclados como parte de extractos fenólicos. Este

procedimiento permite el enriquecimiento de extractos fenólicos procedentes del aceite de oliva en compuestos de alto valor añadido y con marcada actividad biológica, que a su vez pueden tener utilidad en formulaciones farmacéuticas y en alimentos funcionales.

SEXTA

Se ha puesto a punto un método de extracción y cuantificación por RMN de la fracción fenólica de aceites de oliva virgen extra, fundamentalmente de oleocantal, oleaceína y los aglicones aldehídicos de ligstrósido y oleuropeína.

SÉPTIMA

Se ha comprobado la actividad como agentes antiproliferativos en seis líneas celulares de tumores sólidos humanos de derivados lipófilos de oleuropeína **71** y ligstrósido **84**, así como de la aceoleína **51** y el aglicón del oleurósido deshidratado (DOA) acetilado **52**, observándose que existe una clara correlación entre mejora de los resultados y el aumento de la lipofilia. Tanto el derivado peracetilado de la oleuropeína **149**, como la aceoleína **51** y el DOA acetilado **52** mejoran las actividades del HT peracetilado **142** para todas las líneas celulares, alcanzándose los mejores resultados sobre las células HeLa (cáncer cérvico-uterino).

OCTAVA

Se ha comprobado la actividad antiinflamatoria de derivados lipófilos del DHPG **3**, del HTAc **29** y de la oleuropeína **71** en distintos modelos *in vitro* e *in vivo* con objeto de cuantificar su actividad frente a enfermedades inflamatorias crónicas como la colitis ulcerosa, la artritis y el lupus. Concretamente, el DHPG **3** y el HTAc **29** ofrecen excelentes propiedades antiinflamatorias en un modelo *in vitro* con macrófagos peritoneales siendo el HTAc **29** más efectivo que el DHPG **3** en el modelo *in vivo* de colitis ulcerosa. Además, el HTAc **29** resultó muy efectivo contra la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico, mejorando en todos los casos al HT **67** de partida.

Por otro lado, resultados preliminares permiten afirmar que la oleuropeína **71** tiene propiedades antiartríticas debido a la modulación que ejerce en la respuesta inflamatoria de fibroblastos sinoviales. Más aún, sus derivados lipófilos, el monoacetilado **46**, el tetraacetilado **50** y el peracetilado **148** ofrecen una actividad antiinflamatoria *in vitro* sobre macrófagos peritoneales mucho mayor que la oleuropeína de partida.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que una mayor lipofilia de los compuestos fenólicos, tiene como consecuencia una mejora en la actividad biológica.

FIRST

A novel route of synthesis of the 3,4-dihydroxyphenylglycol **3** compound has been established from 3,4-dihydroxyphenacyl chloride which involves simple and feasible multi-scale chemical transformations, significantly improving the previous procedure of synthesis and offering a viable alternative to its obtaining and purification from the alperujo

SECOND

Two synthetic procedures have been established for the preparation of two new families of diacylated lipophilic phenolic compounds derived from the phenolic compounds **4** and **17** carrying the catechol and the glycol fragments obtained from 3,4-dihydroxyphenylglycol and hydroxytyrosol **67**, respectively.

THIRD

The viability and synthetic utility of novel enzymatic extracts from native microorganisms with lipolytic activity have been established by obtaining new families of phenolic compounds derived from hydroxytyrosol **67**, protocatechuic alcohol **120**, 3,4-dihydroxyphenylglycol **3**, ligstroside **84** and oleuropein **71**, as well as of the disaccharide trehalosa **138**. The best results, both in yields and regioselectivities, are achieved by using the extracts in deacylations which has allowed the access to compounds with high biological

properties such as HTAc **29**, a new family of lipophilic ethers of DHPG **30-37**, the partially acetylated ligstroside and oleuropein **49** and **50**, or the desymmetrization of the peracetylated trehalosa **43** in only two synthetic steps.

FOURTH

Semisynthesis of oleacein **53** has been carried out from oleuropein **71** via the Krapcho reaction, remarkably improving the single procedure described in the literature. In addition, in conjunction with the synthesis of **53**, the formation of a new compound, the dehydrated oleuroside aglycone **54** has been determined. In order to purify such compounds, the stabilization method by acetylation has been proposed which led to the derivatives **51** and **52**. The methylidene group has been introducing into the catechol fragment of the oleuropein giving **55**, which by Krapcho reaction leads to the stable methylidene-oleacein **56**. The derivatization of the oleacein ha also been carried out by regioselectiva reactions of reduction and acetalation of the formyl groups which allow to obtain the reduced derivatives **59** and **60** and the ethylidene acetal **64**.

FIFTH

Synthesis of the secoiridoids of olive oleacein **53** and oleocanthal **57** has been achieved by Krapcho reaction on the respective aldehydic aglycones of ligstroside **65** and oleuropein **66** and separately, and mixed as part of phenolic extracts. This process allows the enrichment of phenolic extracts from olive oil into compounds of high added value and

with marked biological activity, which at the same time may have utility in pharmaceutical formulations and in functional foods.

SIXTH

A method of extraction and quantification by NMR of the phenolic fraction of extra virgin olive oils, mainly oleocanthal, oleacein and the aldehydic aglycones of ligstroside and oleuropein has developed.

SEVENTH

The activity as antiproliferative agents in six human solid tumor cell lines of lipophilic derivatives of oleuropein **71** and ligstroside **84**, as well as aceolein **51** and acetylated oleuroside dehydrate (DOA) aglycon **52** have been verified, showing that there is a clear correlation between improved performance and increased lipophilicity. Both peracetylated derivative of oleuropein **149**, as well as aceolein **51** and acetylated DOA **52** enhance the activities of peracetylated HT **142** for all cell lines, achieving the best results on HeLa cells (cervix-uterine cancer).

EIGHT

The antiinflammatory activity of lipophilic derivatives of DHPG **3**, HTAc **29** and oleuropein **71** has been demonstrated in different *in vitro* and *in vivo* models in order to quantify their activity against chronic inflammatory diseases such as ulcerative colitis, arthritis and lupus. Specifically, DHPG **3** and HTAc **29** offer excellent antiinflammatory

properties in an *in vitro* model with peritoneal macrophages with HTAc **29** being more effective than DHPG 3 in the *in vivo* model of ulcerative colitis. In addition, the HTAc **29** proved very effective against rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus, improving in all cases the starting HT **67**.

On the other hand, preliminary results allow to affirm that the oleuropein **71** has antiarthritic properties due to the modulation that exerts in the inflammatory response of synovial fibroblasts. Moreover, their lipophilic derivatives, monoacetylated **46**, tetraacetylated **50** and peracetylated **148** offer much higher *in vitro* antiinflammatory activity on peritoneal macrophages than the starting oleuropein.

These results reinforce the hypothesis that an increased lipophilicity of phenolic compounds results in an improvement in biological activity

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. MÉTODOS GENERALES

8.1. MÉTODOS GENERALES

La cromatografía analítica de capa fina (c.c.f.), con fines cualitativos, se ha realizado utilizando placas de gel de sílice sobre aluminio (*Merck 60 F₂₅₄*) de 0.25 mm de espesor. Como eluyentes se han empleado los que se indican en cada caso. La detección de los compuestos en las placas se ha realizado por exposición de éstas a luz UV ($\lambda = 254$ nm) y mediante revelado por inmersión en disoluciones de H₂SO₄ en EtOH al 10 %, ninhidrina en EtOH al 0.1 % o revelador de permanganato (3g KMnO₄, 20 g K₂CO₃ y 5 ml NaOH al 10% y 300 ml H₂O) y posterior calentamiento.

Para la cromatografía en columna, con fines preparativos, se ha empleado como fase estacionaria gel de sílice (*Merck 60*; tamaño de partícula 0.040-0.063 mm), eluyendo por gravedad o sometiendo a una ligera presión. Los eluyentes empleados se indican en cada caso.

La rotación óptica se ha medido en un espectropolarímetro *Jasco P-2000*, empleando la línea de emisión del sodio ($\lambda = 589$ nm) y celdas de 1 cm de camino óptico.

Los espectros de absorción de IR se han registrado en un espectrómetro *Jasco FT/IR-4100*, aplicando la muestra directamente sobre la lente.

Los espectros de RMN se han registrado en espectrómetros *Bruker Avance III 300* (300.1 MHz para ¹H y 75.5 MHz para ¹³C), *Bruker Avance III 500* (500.1 MHz para ¹H y 125.8 MHz para ¹³C) y *Bruker Avance III 700* (700.1 MHz para ¹H y 175.8 MHz para ¹³C)

8.1. Métodos generales

Se han empleado como disolventes CDCl_3 , CD_3OD , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, $\text{DMSO-}d_6$ y D_2O . Los valores de desplazamiento químico (δ) se dan en ppm y los valores de las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz. Los espectros se han calibrado usando las señales del disolvente como referencias internas.

La asignación de las señales de ^1H se ha realizado mediante experimentos de ^1H -RMN y ^1H - ^1H COSY (*Correlated Spectroscopy*).

La asignación de las señales de ^{13}C se ha realizado mediante experimentos de ^{13}C -RMN y ^1H - ^{13}C HSQC (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*).

Los espectros NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) se han obtenido utilizando un tiempo de mezcla de 300 ms.

Las abreviaturas empleadas para indicar la multiplicidad de las señales son: s (singulete), d (doblete), t (triplete), c (cuartete), q (quintete), sex (sextete), m (multiplete) y a (señal ancha).

Los espectros de masas se han realizado en los espectrómetros *Micromass AutoSpecQ*, *DFS* y *QExactive*, siendo las experiencias realizadas:

Ionización por FAB-LSIMS (*Fast Atom Bombardment-Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*). Se empleó cañón de Cs (35 kV y 2 μA) con sonda de muestra y fuente de FAB. Voltaje acelerador de 8 kV, $2 \cdot 10^{-4}$ mbar. Voltaje acelerador de 4 kV. Resolución 10000 (definición del 5% de valle) y velocidad de barrido de 5 s/dec. Las matrices usadas fueron tioglicerol y alcohol *m*-nitrobencílico. Como referencias internas se emplearon PEG-400, 600, 900 y 1000.

Ionización química (CI, *Chemical Ionization*) a 150 eV, usando como gas reactivo metano e isobutano a una presión de 0.8 bar, corriente de 500 μ A, voltaje acelerador de 8 kV, resolución 10000 (definición del 5 % de valle) y velocidad de barrido de 5 s/dec.

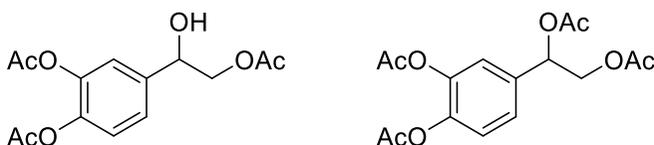
Las reacciones de Krapcho se han realizado en un microondas científico *Anton Paar Monowave 300*, agitando a 600 r.p.m. durante el calentamiento.

8.2. NUEVAS INVESTIGACIONES

8.2. NUEVAS INVESTIGACIONES

8.2.1. Síntesis de diacil derivados de glicoles procedentes del olivo. Nueva síntesis de 3,4-dihidroxifenilglicol

Diacetato de 4-(2'-acetoxi-1'-hidroxietil)-1,2-difenileno (**1**) y diacetato de 4-(1',2'-acetoxietil)-1,2-difenileno (**2**)



Método A: A una disolución de diacetato de 4-(2-acetoxiacetil)-1,2-difenileno **114** (21.5 mg, 0.07 mmol) en AcOH glacial (0.5 ml), se añadió NaBH(OAc)₃ (45 mg, 0.21 mmol) en tres porciones y en intervalos de 10 min y se agitó a ta durante otros 10 min. Transcurrido el tiempo, se evaporó el disolvente resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-hexano 1:2, dando **1** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 11.9 mg, 55%. *R_F* 0.3 (AcOEt-hexano 1:1)

Método B: A una disolución de diacetato de 4-(2-acetoxiacetil)-1,2-difenileno **114** (76.1 mg, 0.26 mmol) en EtOH (7 ml), se añadió Ac₂O (25 µl) y se hidrogenó con Pd/C 10% (40 mg) a presión atmosférica y ta 6 h. A continuación, se filtró sobre celita y se concentró a sequedad. El residuo resultante, mezcla de dos compuestos [diacetato de 4-(2'-acetoxi-1'-hidroxietil)-1,2-difenileno **1** y diacetato de 4-(1',2'-acetoxietil)-1,2-difenileno **2**], se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-hexano (1:2 → 1:1).

Diacetato de 4-(2'-acetoxi-1'-hidroxietil)-1,2-difenileno (**1**)Rendimiento: 35.1 mg, 46%. R_F 0.5 (AcOEt-hexano 1:1)IR ν (cm^{-1}): 1768, 1736, 1370, 1202, 1177, 1110, 1011.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.29-7.26 (m, 2H, H-3 y H-5), 7.19-7.16 (m, 1H, H-6), 4.95 (dd, 1H, $J_{1',2a'} = 8.1$ Hz, $J_{1',2b'} = 3.3$ Hz, H-1'), 4.29 y 4.13 (2dd, 1H cada uno, $J_{2a',2b'} = 11.6$ Hz, $J_{2a',1'} = 8.1$ Hz, $J_{2b',1'} = 3.3$ Hz, H-2'), 2.29, 2.28 y 2.10 (3s, 3H cada uno, 3 OAc).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171.5, 168.6 y 168.5 (3 CO), 142.5 (C-1), 142.1 (C-2), 139.1 (C-4), 124.6 (C-5), 123.9 (C-6), 121.7 (C-3), 71.9 (C-1'), 69.3 (C-2'), 21.2, 21.0 y 20.9 (3 AcO).

HRCI m/z calculado para $[\text{M} + \text{H}]^+$ $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_7$: 297.0974, encontrado 297.0972.

Diacetato de 4-(1,2-acetoxietil)-1,2-difenileno

Rendimiento: 24.8 mg, 32%. R_F 0.5 (AcOEt-hexano 1:1)IR ν (cm^{-1}): 1769, 1738, 1369, 1200, 1179, 1011.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.26 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.6$ Hz, $J_{5,3} = 2.0$ Hz, H-5), 7.22 (d, 1H, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, H-3), 7.19 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.6$ Hz, H-6), 6.01 (dd, 1H, $J_{1',2'a} = 7.8$ Hz, $J_{1',2'b} = 3.9$ Hz, H-1'), 4.34 y 4.27 (2dd, 1H

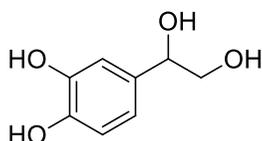
8.2. Nuevas investigaciones

cada uno, $J_{2'a,2'b} = 11.9$ Hz, $J_{2'a,1'} = 7.8$ Hz, $J_{2'b,1'} = 3.9$ Hz, H-2').

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 170.9, 170.2, 168.4 y 168.3 (4 CO), 142.5 (C-1), 142.4 (C-2), 135.5 (C-4), 125.3 (C-5), 124.0 (C-6), 122.4 (C-3), 72.5 (C-1'), 66.1 (C-2'), 21.3, 21.1, 21.0 y 20.9 (4 AcO).

HRCI m/z calculado para $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_8$: 338.1002, encontrado 338.1003.

3',4'-Dihidroxifenilglicol (3)



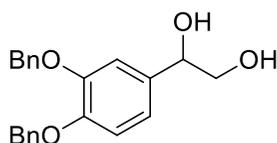
Una dispersión de diacetato de 4-(1,2-acetoxietil)-1,2-difenileno **2** (51 mg, 0.15 mmol) en H_2SO_4 2N (5 ml) se agitó a t.a. durante 24 h. El medio se neutralizó con NaHCO_3 y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH_2Cl_2 -MeOH (30:1 \rightarrow 10:1). Los datos espectroscópicos están en concordancia con la bibliografía.¹²⁸

Rendimiento: 13.5 mg, 55%. R_F 0.4 (CH_2Cl_2 -MeOH 5:1)

^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ (ppm) 6.90 (d, 1H, $J_{2',6'} = 1.8$ Hz, H-2'), 6.77 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.1$ Hz, H-5'), 6.70 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.1$ Hz, $J_{6',2'} = 1.8$ Hz, H-6'), 4.60 (dd, 1H, $J_{1,2a} = 8.0$ Hz, $J_{1,2b} = 4.1$ Hz, H-1), 3.60 y 3.52

(2dd, 1H cada uno, $J_{2a,2b} = 11.0$ Hz, $J_{2a,1} = 8.0$ Hz, $J_{2b,1} = 4.1$ Hz, H-2).

3,4-Dibenciloxifenilglicol (**4**)



A una disolución de **3** (100 mg, 0.59 mmol) en acetona seca (20 ml), se añadieron K_2CO_3 (320 mg, 2.36 mmol) y BrBn (160 μ l, 1.36 mmol). La mezcla se calentó a reflujo en oscuridad durante 12 h. Luego se filtró y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-hexano (1:5 \rightarrow 1:1) obteniendo **4** como un sirupo amarillo pálido.

Rendimiento: 162 mg, 81%. R_F 0.2 (AcOEt-hexano 1:1)

IR ν (cm^{-1}) 3382, 1515, 1258, 1226, 1135, 1012, 737, 694.

1H -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 7.50–7.29 (m, 10H, 2 Ph), 7.11 (d, 1H, $J_{3,5} = 1.9$ Hz, H-5), 7.02 (d, 1H, $J_{6,5} = 8.3$ Hz, H-6), 6.93 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, $J_{3,5} = 1.9$ Hz, H-3), 5.15 y 5.13 (2s, 2H cada uno, 2 OCH_2Ph), 4.62 (t, 1H, $J_{1',2'} = 6.0$ Hz, H-1'), 3.58 (d, 2H, $J_{2',1'} = 6.0$ Hz, H-2').

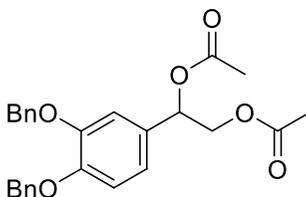
^{13}C -RMN (75.5 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 151.1 (C-1), 150.5 (C-2), 139.7 (Ph-1), 139.7 (Ph-1), 137.9 (C-4), 130.3 (Ph-3 y 5, Ph-3 y 5), 129.7 (Ph-4), 129.7 (Ph-4),

8.2. Nuevas investigaciones

129.6 (Ph-2 y 5), 129.5 (Ph-2 y 5), 121.6 (C-3), 117.2 (C-6), 115.6 (C-5), 76.4 (C-1'), 73.4 (OCH₂Ph), 73.3 (OCH₂Ph), 69.5 (C-2').

HRLSI m/z calculado para [M + Na]⁺ C₂₂H₂₂NaO₄: 373.1416, encontrado 373.1429.

1,2-Dibenciloxi-4-(1',2'-diacetoxietil)benzeno (5)



A una mezcla de Ac₂O y piridina 1:1 (v/v, 2 ml) previamente enfriada a 0 °C, se añadió **4** (107 mg, 0.39 mmol) y se agitó a 0 °C durante 20 min. Pasado ese tiempo, la reacción permaneció a 4 °C durante la noche. Seguidamente se hidrolizó con H₂O se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-hexano (1:5 → 1:1) obteniendo **5** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 140 mg, cuant. R_F 0.2 AcOEt-hexano (1:5)

IR ν (cm⁻¹): 2960, 1737, 1504, 1216, 1044, 1009, 754, 736.

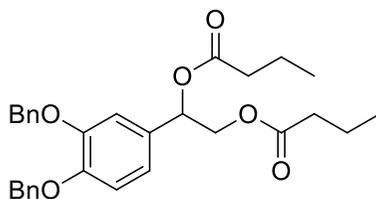
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.29–7.25 (m, 2H, Ph), 7.20-7.17 (m, 2H, Ph), 7.00 (d, 1H, $J_{3,5} = 2.1$ Hz, H-3), 6.98 (d, 1H, $J_{6,5} = 8.2$ Hz, H-6), 6.91 (dd, 1H, $J_{5,6}$

= 8.2 Hz, $J_{5,3} = 2.1$ Hz, H-5), 5.91 (dd, 1H, $J_{1',2a'} = 7.8$ Hz, $J_{1',2b'} = 4.1$ Hz, H-1'), 5.41 y 5.37 (2s, 2H cada uno, OCH_2Ph), 4.27 y 4.21 (2dd, 1H cada uno, $J_{2a',2b'} = 16.0$ Hz, $J_{2a',1'} = 7.8$ Hz, $J_{2b',1'} = 4.1$ Hz, H-2'), 2.09 y 2.03 (2s, 3H cada uno, OAc).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 170.9 y 170.3 (2 CO), 150.4 y 150.2 (C-1 y C-2), 135.9 (Ph), 132.2 (C-4), 129.4 (Ph), 128.9 (Ph), 122.5 (C-5), 122.3 (C-6), 120.8 (C-3), 75.7 y 75.6 (2 OCH_2Ph), 73.0 (C-1'), 66.3 (C-2'), 21.4 y 21.1 (2 OAc).

HRLSI m/z calculado para $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6$: 356.1260, encontrado 365.1255.

1,2-Dibenciloxi-4-(1',2'-dibutanoiloxietil)benceno (6)



A una disolución de **4** (55.3 mg, 0.16 mmol) en piridina (0.6 ml) a 0 °C se añadió cloruro de butanoilo (50 μl , 0.48 mmol) y se agitó durante 10 min. La disolución permaneció a 4 °C durante la noche y se hidrolizó con H_2O (20 ml). Se añadió CH_2Cl_2 (30 ml) y se separaron las fases. La fase orgánica se lavó con HCl 1M (porciones de 10 ml hasta pH ácido), luego con NaHCO_3 1M (porciones de 10 ml hasta pH básico) y, por último, con H_2O (porciones de 10 ml hasta pH neutro). Finalmente,

8.2. Nuevas investigaciones

la fase orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró y se concentró a sequedad obteniendo un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-hexano (1:5 \rightarrow 1:1) obteniendo **6** como un sirupo incoloro.

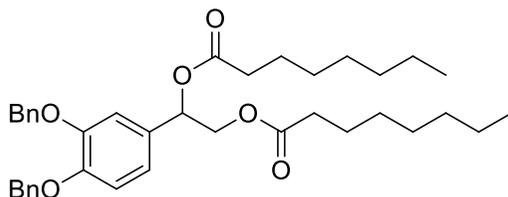
Rendimiento: 78 mg, cuant. R_F 0.9 (AcOEt-Hex 1:1)

IR ν (cm^{-1}): 2967, 1736, 1514, 1248, 1166, 1137, 1007, 735, 696.

^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 7.48–7.29 (m, 10H, 2 Ph), 7.06 (d, 1H, $J_{3,5} = 1.9$ Hz, H-3), 7.04 (d, 1H, $J_{6,5} = 8.3$ Hz, H-6), 6.94 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, $J_{5,3} = 1.9$ Hz, H-5), 5.95 (dd, 1H, $J_{1',2a'} = 7.0$ Hz, $J_{1',2b'} = 5.0$ Hz, H-1'), 5.16 y 5.15 (2s, 2H cada uno, 2 OCH_2Ph), 4.33–4.24 (m 2H, H-2'), 2.36–2.31 (m, 2H, COCH_2CH_2), 2.27 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, COCH_2CH_2), 1.65 y 1.62 (2sex, 2H cada uno, $J = 7.4$ Hz, 2 CH_2CH_3), 0.95 y 0.94 (2t, 3H cada uno, $J = 7.4$ Hz, 2 CH_3).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CD_3OD): δ 175.6 (CO), 175.1 (CO), 151.4 (C-1), 151.1 (C-2), 139.5 (2 Ph-1), 132.3 (C-4), 130.3 (2 Ph-3 y 5), 129.8 (2 Ph-4), 129.5 y 129.6 (2 Ph-2 y 6), 122.2 (C-5), 117.1 (C-6), 116.1 (C-3), 75.1 (C-1'), 73.4 y 73.3 (2 OCH_2Ph), 67.8 (C-2'), 37.9 y 37.7 (2 COCH_2), 20.3 y 20.2 (2 CH_2CH_3), 14.7 (2 CH_3).

HRLSI m/z calculado para $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_6$: 490.2355, encontrado 490.2341.

1,2-Dibenciloxi-4-(1',2'-dioctanoiloxietil)benceno (7)

A una disolución de **4** (20 mg, 0.06 mmol) en piridina (0.8 ml) a 0 °C se añadió cloruro de octanoilo (31 μ l, 0.18 mmol) y se agitó durante 10 min. La disolución permaneció a t.a durante la noche y se hidrolizó con H₂O (20 ml). Se añadió CH₂Cl₂ (30 ml) y se separaron las fases. La fase orgánica se lavó con HCl 1M (porciones de 10 ml hasta pH ácido), luego con NaHCO₃ 1M (porciones de 10 ml hasta pH básico) y, por último, con H₂O (porciones de 10 ml hasta pH neutro). Finalmente, la fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad obteniendo un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-hexano (1:5 \rightarrow 1:1) obteniendo **7** como un sólido blanco.

Rendimiento: cuant. R_F 0.9 (AcOEt-hexano 1:1)

IR ν (cm⁻¹): 2927, 2854, 1738, 1514, 1261, 1156, 733, 659.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 7.48–7.29 (m, 10H, Ph), 7.07 (d, 1H, $J_{3,5} = 1.9$ Hz, H-5), 7.05 (d, 1H, $J_{6,5} = 8.3$ Hz, H-6), 6.95 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, $J_{5,3} = 1.9$ Hz, H-5), 5.95 (dd, 1H, $J_{1',2a'} = 7.1$ Hz, $J_{1',2b'} = 4.7$ Hz, H-1'), 5.16 y 5.15 (2s, 2H cada uno, OCH₂Ph), 4.35-4.22 (m, 2H, H-2'), 2.35 y 2.31 (2t, 2H cada uno, $J = 7.3$ Hz, 2 COCH₂CH₂), 1.67-1.53 (m, 4H, 2

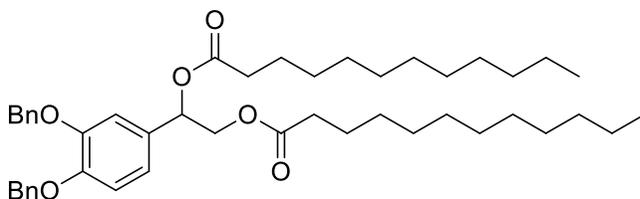
8.2. Nuevas investigaciones

COCH₂CH₂), 1.31 (m, 16H, 8 CH₂ éster), 0.94-0.89 (m, 6H, 2 CH₃ éster).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 175.8 y 175.2 (2 CO), 151.4 (C-1), 151.1 (C-2), 139.5 (2 Ph-1), 132.2 (C-4), 130.3 (2 Ph-3 y 5), 129.8 (2Ph-4), 129.5 y 129.5 (2 Ph-2 y 6), 122.2 (C-5), 116.9 (C-6), 116.0 (Ar-3), 75.1 (C-1'), 73.3 y 73.2 (2 OCH₂Ph), 67.8 (C-2'), 36.1 y 35.8 (2 COCH₂CH₂), 33.7 (2 COCH₂CH₂), 31.0, 27.0, 26.9, 24.6 (8 CH₂ éster), 15.3 (2 CH₃).

HRLSI *m/z* calculado para [M]⁺ C₃₈H₅₀O₆: 602.3607, encontrado 602.3612.

1,2-Dibenciloxi-4-(1',2'-dilauroiloxietil)benceno (8)



A una disolución de **4** (44 mg, 0.13 mmol) en piridina (0.6 ml) a 0 °C se añadió cloruro de lauroilo (88 µl, 0.38 mmol) y se agitó durante 10 min. La disolución permaneció a t.a durante la noche y se hidrolizó con H₂O (20 ml). Se añadió CH₂Cl₂ (30 ml) y se separaron las fases. La fase orgánica se lavó con HCl 1M (porciones de 10 ml hasta pH ácido), luego con NaHCO₃ 1M (porciones de 10 ml hasta pH básico) y, por último, con H₂O (porciones de 10 ml hasta pH neutro). Finalmente, la fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad

obteniendo un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-hexano (1:5 → 1:1) obteniendo **8** como un sólido blanco.

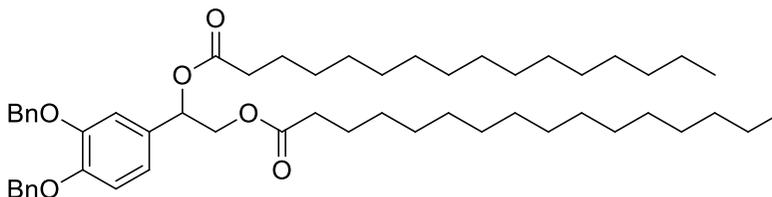
Rendimiento: 85 mg, 95% R_F 0.8 (AcOEt-hexano 1:3)

IR ν (cm^{-1}): 2922, 2852, 1739, 1263, 1155, 733, 659.

^1H -RMN (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ (ppm) 6.93 (d, 1H, $J_{3,5} = 1.9$ Hz, H-3), 6.86 (d, 1H, $J_{6,5} = 8.1$ Hz, H-6), 6.79 (dd, 1H, $J_{5,3} = 1.9$ Hz, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-5), 5.94 (dd, 1H, $J_{1',2a'} = 7.5$ Hz, $J_{1',2b'} = 4.8$ Hz, H-1'), 5.16 y 5.15 (2s, 2H cada uno, OCH_2Ph), 4.33-4.24 (m, 2H, H-2'), 2.40-2.29 (m, 4H, 2 COCH_2CH_2), 1.67-1.58 (m, 4H, 2 COCH_2CH_2), 1.33 (sa, 32H, 16 CH_2 éster), 0.94-0.90 (m, 6H, 2 CH_3).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ (ppm) 172.6 (2 CO), 149.8 (C-2), 149.7 (C-1), 138.3 (2 Ph-1), 130.9 (C-4), 128.9 (2 Ph-3 y 5), 128.3 (2 Ph-4), 128.2 y 128.0 (2 Ph-2 y 6), 120.5 (C-5), 115.2 (C-6), 114.1 (C-3), 73.1 (C1'), 71.4 y 71.3 (2 OCH_2Ph), 66.1 (C-2'), 34.5, 34.3, 33.9, 32.4, 25.5, 25.4, 23.1, 14.1 (2 CH_3).

HRLSI m/z calculado para $[\text{M} + \text{H}]^+$ $\text{C}_{46}\text{H}_{67}\text{O}_6$: 715.4938, encontrado 715.4925.

1,2-Dibenciloxi-4-(1',2'-dipalmitoiloxietil)benceno (9)

A una disolución de **4** (20 mg, 0.06 mmol) en piridina (0.6 mL) a 0 °C se añadió cloruro de palmitoilo (52 μ l, 0.17 mmol) y se agitó 10 min. La disolución permaneció a t.a durante la noche y se hidrolizó con H₂O (20 ml). Se añadió CH₂Cl₂ (30 ml) y se separaron las fases. La fase orgánica se lavó con HCl 1M (porciones de 10 ml hasta pH ácido), luego con NaHCO₃ 1M (porciones de 10 ml hasta pH básico) y, por último, con H₂O (porciones de 10 ml hasta pH neutro). Finalmente, la fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad obteniendo un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-hexano (1:5 \rightarrow 1:1) obteniendo **9** como un sólido blanco.

Rendimiento: 46 mg, 97% R_F 0.5 (AcOEt-hexano 1:3)

IR ν (cm⁻¹): 2915, 2847, 1699, 1269, 728, 694.

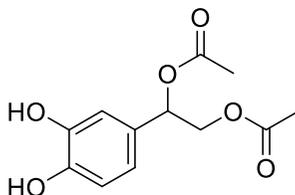
¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ (ppm) 7.46–7.28 (m, 10H, Ph), 6.95 (sa, 1H, H-3), 6.91 (d, 1H, $J_{6,5} = 8.4$ Hz, H-6), 6.87 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.4$ Hz, $J_{5,3} = 1.2$ Hz, H-5), 5.93 (dd, 1H, $J_{1',2a'} = 7.1$ Hz, $J_{1',2b'} = 5.0$ Hz, H-1'), 5.15 y 5.14 (2s, 2H cada uno, OCH₂Ph), 4.27-4.19 (m, 2H, H-2'), 2.29 y 2.27 (2t, 2H cada uno, $J = 7.4$ Hz, 2 COCH₂CH₂), 1.59-1.56 (m, 4H, 2

COCH₂CH₂), 1.26 (sa, 52H, 26 CH₂ éster), 0.88 (t, 6H, *J* = 6.4 Hz, 2 CH₃).

¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂CO): δ (ppm) 174.2 y 173.7 (2 CO), 149.8 (C-2), 149.7 (C-1), 138.3 (2 Ph-1), 130.9 (C-4), 129.0 (2 Ph-3 y 5), 128.3 (2 Ph-4), 128.2 y 128.1 (2 Ph-2 y 6), 120.5 (C-5), 115.2 (C-6), 114.2 (C-3), 73.2 (C-1'), 71.5 y 71.3 (2 OCH₂Ph), 66.2 (C-2'), 34.5, 34.3, 32.4, 25.5, 25.4, 23.1 (28 CH₂ éster), 14.1 (2 CH₃).

HRLSI *m/z* calculado para [M + Na]⁺ C₅₄H₈₂NaO₆ 849.6004, encontrado 849.6013.

4-(1',2'-Diacetoxietil)benceno-1,2-diol (**10**)



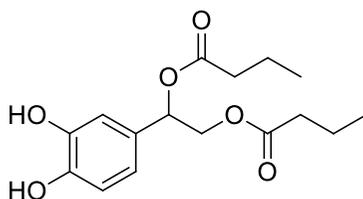
A una disolución de **5** (69 mg, 0.36 mmol) en EtOH (2 ml) se añadió Pd/C al 10% (25 mg) y se hidrogenó en oscuridad a presión atmosférica y t.a durante 2 h. La mezcla se filtró sobre celita y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando comoeluyente CH₂Cl₂-MeOH (50:1 → 10:1) obteniendo **10** como un sirupo amarillo pálido.

Rendimiento: 46 mg, 93%. *R_F* 0.5 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1)

8.2. Nuevas investigaciones

IR	ν (cm ⁻¹): 3384, 1712, 1222, 1037.
¹ H-RMN	(300 MHz, CDCl ₃): δ (ppm) 6.86 (d, 1H, $J_{3,5} = 1.5$ Hz, H-3), 6.82 (d, 1H, $J_{6,5} = 8.1$ Hz, H-6), 6.78 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, $J_{5,3} = 1.5$ Hz, H-5), 5.88 (dd, 1H, $J_{1',2a'} = 6.9$ Hz, $J_{1',2b'} = 5.2$ Hz, H-1'), 4.31–4.22 (m, 2H, H-2'), 2.10 y 2.07 (2s, 3H cada uno, OAc).
¹³ C-RMN	(75.5 MHz, CDCl ₃): δ (ppm) 171.6 y 171.1 (2 CO), 144.6 (C-1), 144.2 (C-2), 129.2 (C-4), 119.8 (C-5), 115.7 (C-6), 114.3 (C-3), 73.7 (C-1'), 66.5 (C-2'), 21.5 y 21.2 (2 OAc).
HRLSI	m/z calculado para [M + Na] ⁺ C ₁₂ H ₁₄ NaO ₆ : 277.0683, encontrado 277.0690.

4-(1',2'-Dibutanoiloxietil)benceno-1,2-diol (**11**)



A una disolución de **6** (82 mg, 0.17 mmol) en EtOH (2 ml) se añadió Pd/C al 10% (42 mg) y se hidrogenó en oscuridad a presión atmosférica y t.a durante 15 h. La mezcla se filtró sobre celita y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-hexano (1:1) obteniendo **11** como sirupo incoloro.

Rendimiento: 46 mg, 90%. R_F 0.5 (AcOEt-hexano 1:1)

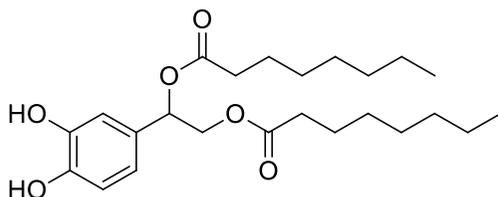
IR ν (cm^{-1}): 3400, 2967, 1720, 1170.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6.87–6.86 (m, 1H, H-3), 6.82 (d, 1H, $J_{6,5} = 8.1$ Hz, H-6), 6.76 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, $J_{5,3} = 1.5$ Hz, H-5), 5.89 (t, 1H, $J_{1',2'} = 6.0$ Hz, H-1'), 4.27 (d, 2H, H-2'), 2.35 y 2.29 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, COCH_2CH_2), 1.64 y 1.63 (sex, 2H, $J = 7.4$ Hz, COCH_2CH_2), 0.92 (t, 6H, $J = 7.3$ Hz, 2 CH_3).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 174.1 y 173.7 (2 CO), 144.7 (C-2), 144.3 (C-1), 129.3 (C-4), 119.6 (C-5), 115.7 (C-6), 114.3 (C-3), 73.4 (C-1'), 66.3 (C-2'), 36.7 y 36.4 (2 COCH_2CH_2), 18.7 y 18.6 (2 COCH_2CH_2), 13.9 (2 CH_3).

HRLSI m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+ \text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{NaO}_6$: 333.1314, encontrado 333.1315.

4-(1',2'-Diocetanoiloxietil)benceno-1,2-diol (12)



A una disolución de **7** (105 mg, 0.17 mmol) en EtOH (3 ml) se añadió Pd/C al 10% (45 mg) y se hidrogenó en oscuridad a presión atmosférica y t.a durante 15 h. La mezcla se filtró sobre celita y se

8.2. Nuevas investigaciones

concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-hexano (1:1) obteniendo **12** como sirupo incoloro.

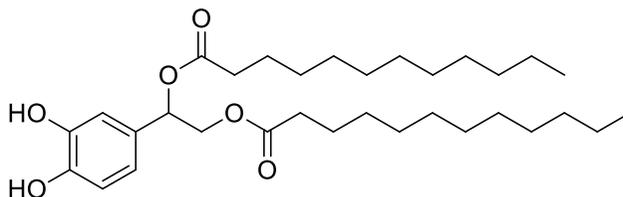
Rendimiento: mg, %. R_F 0.65 (AcOEt-hexano 1:1)

IR ν (cm^{-1}): 3421, 2927, 2855, 1739, 1710, 1158, 1107.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6.86 (d, 1H, $J_{3,5} = 1.7$ Hz, H-3), 6.82 (d, 1H, $J_{6,5} = 8.0$ Hz, H-6), 6.78 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, $J_{5,3} = 1.7$ Hz, H-5), 5.89 (t, 1H, $J_{1',2'} = 6.2$ Hz, H-1'), 4.28 (d, 2H, $J_{2',1'} = 6.1$ Hz, H-2'), 2.37-2.27 (m, 4H, 2 COCH_2CH_2), 1.66-1.54 (m, 4H, 2 COCH_2CH_2), 1.30-1.24 (m, 16H, 8 CH_2 éster), 0.90-0.85 (m, 6H, 2 CH_3).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 174.2 y 173.7 (2 CO), 144.5 (C-2), 144.1 (C-1), 129.5 (C-4), 119.8 (C-5), 115.7 (C-6), 114.3 (C-3), 73.4 (C-1'), 66.3 (C-2'), 34.8 y 34.5 (2 COCH_2CH_2), 32.0, 29.4, 29.3, 25.3, 25.2, 22.9 (10 CH_2 éster), 14.4 (2 CH_3).

HRLSI m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+ \text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{NaO}_6$ 445.2566, encontrado 445.2555.

4-(1',2'-Dilauroiloxietil)benceno-1,2-diol (13)

A una disolución de **8** (85 mg, 0.12 mmol) en THF (5 ml) se añadió Pd/C al 10% (65 mg) y se hidrogenó en oscuridad a presión atmosférica y t.a durante 12 h. La mezcla se filtró sobre celita y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-hexano (1:3) obteniendo **13** como un sólido blanco.

Rendimiento: 50 mg, 79%. R_F 0.4 (AcOEt-hexano 1:3)

IR ν (cm⁻¹): 2917, 2849, 1734, 1699, 1169.

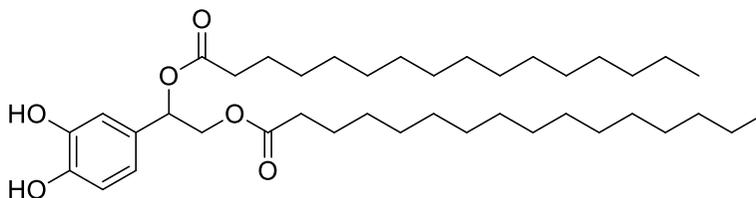
¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ (ppm) 6.93 (d, 1H, $J_{3,5} = 1.9$ Hz, H-3), 6.86 (d, 1H, $J_{6,5} = 8.1$ Hz, H-6), 6.79 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, $J_{5,3} = 1.9$ Hz, H-5), 5.94 (dd, 1H, $J_{1',2a'} = 7.5$ Hz, $J_{1',2b'} = 4.8$ Hz, H-1'), 4.33–4.24 (m, 2H, H-2'), 2.34–2.29 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 1.67–1.58 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 1.33 (sa, 32H, 16 CH₂ éster), 0.94–0.90 (m, 6H, 2 CH₃).

¹³C-RMN (75.5 MHz, (CD₃)₂CO): δ (ppm) 173.1 y 172.6 (2 CO), 145.8 (C-1), 145.6 (C-2), 129.3 (C-4), 119.0 (C-5), 115.7 (C-6), 114.5 (C-3), 73.2 (C1'), 66.2 (C-2'), 34.5, 34.3, 33.9, 32.4, 29.3, 25.3, 25.2, 22.9 (20 CH₂ éster), 14.4 (2 CH₃).

8.2. Nuevas investigaciones

HRLSI m/z calculado para $[M + Na]^+ C_{32}H_{54}NaO_6$ 557.3818, encontrado 557.3797.

4-(1',2'-Dipalmitoiloxietil)benceno-1,2-diol (**14**)



A una disolución de **9** (65 mg, 0.08 mmol) en THF (3 ml) se añadió Pd/C al 10% (55 mg) y se hidrogenó en oscuridad a presión atmosférica y t.a durante 15 horas. La mezcla se filtró sobre celita y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-hexano (1:10) obteniendo **14** como un sólido blanco.

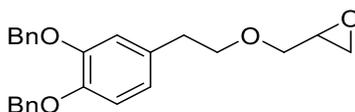
Rendimiento: 29 mg, 57%. R_F 0.6 (AcOEt-hexano 1:2)

IR ν (cm^{-1}): 1771, 1738, 1370, 1201, 1179, 1043, 1011

1H -RMN (300 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ (ppm) 6.93 (d, 1H, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, H-3), 6.86 (d, 1H, $J_{6,5} = 8.1$ Hz, H-6), 6.79 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, $J_{5,3} = 1.9$ Hz, H-5), 5.95 (dd, 1H, $J_{1',2a'} = 7.4$ Hz, $J_{1',2b'} = 4.7$ Hz, H-1'), 4.33–4.24 (m, 2H, H-2'), 2.40–2.28 (m, 4H, 2 $COCH_2CH_2$), 1.67–1.58 (m, 4H, 2 $COCH_2CH_2$), 1.33 (sa, 48H, 24 CH_2 éster), 0.92 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz, 2 CH_3).

^{13}C -RMN	(75.5 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ 174.2 y 173.7 (2 CO), 145.9 (C-2), 145.7 (C-1), 129.5 (C-4), 119.0 (C-5), 115.7 (C-6), 114.5 (C-3), 73.2 (C-1'), 66.3 (C-2'), 34.6, 34.3, 32.4, 25.5, 25.4, 23.0 (28 CH_2 éster), 14.1 (2 CH_3).
HRLSI	m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+ \text{C}_{40}\text{H}_{70}\text{NaO}_6$ 669.5070, encontrado 669.5082.

(\pm)-2-(3'',4''-Dibenciloxifenetoxi)metiloxirano (15**)**



A una disolución de **117** (96 mg, 0.29 mmol) en DMF seca (4 ml) provista de tamiz molecular 4Å, se añadió NaH al 60% (195 mg, 8.15 mmol) y epíclorhidrina (0.35 ml, 4.37 mmol). La disolución se calentó a 50 °C durante 24 h y se diluyó con éter (25 ml), extrayendo con una disolución saturada de NH_4Cl (20 ml). La fase acuosa se lavó con éter (3x25 ml), se unieron las fases orgánicas y se concentró a sequedad. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-ciclohexano (1:10 \rightarrow 1:5) obteniendo **15** como un sirupo amarillento.

Rendimiento: 68.1 mg, 60%. R_F 0.65 (AcOEt-ciclohexano 1:1)

IR ν (cm^{-1}): 2870, 1515, 1260, 1220, 1155, 1012, 738.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.47–7.30 (m, 10H, 2 Ph), 6.87 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8.2$ Hz, H-5''), 6.85 (d, 1H,

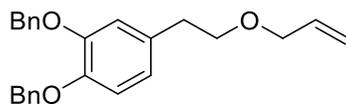
8.2. Nuevas investigaciones

$J_{2'',6''} = 2.2$ Hz, H-2''), 6.73 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 8.2$ Hz, $J_{6'',2''} = 2.2$ Hz, H-6''), 5.15 y 5.13 (2s, 2H cada uno, 2 OCH₂Ph), 3.71 (dd, 1H, $J_{gem} = 11.6$ Hz, $J_{vec} = 3.0$ Hz, OCH₂^A-epóx), 3.69-3.61 (m, 2H, H-1'), 3.36 (dd, 1H, $J_{gem} = 11.5$ Hz, $J_{vec} = 5.7$ Hz, OCH₂^B-epóx), 3.13-3.08 (m, 1H, H-1_{epóx}), 2.80 (t 2H, $J_{2',1'} = 7.2$ Hz, H-2'), 2.77 (t, 1H, $J_{cis} = 4.6$ Hz, H-2a_{epóx}), 2.58 (dd, 1H, $J_{gem} = 5.0$ Hz, $J_{trans} = 2.7$ Hz, H-2b_{epóx}).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 149.2 (C-3''), 147.8 (C-4''), 137.8 y 137.7 (2 Ph-1), 132.6 (C-1''), 128.8 (2 Ph-2 y 6), 128.1 (2 Ph-4), 127.7 y 127.6 (2 Ph-3 y 5), 122.1 (C-6''), 116.4 (C-2''), 115.6 (C-5''), 72.8 (C-1'), 71.8 (2 OCH₂Ph), 71.7 (CH₂-epóx), 51.2 (C-1), 44.6 (C-2), 36.1 (C-2').

HRCI m/z calculado para [M]⁺ C₂₅H₂₆O₄: 390.1831, encontrado 390.1833.

Alil 3',4'-dibenciloxifenetil éter (16)

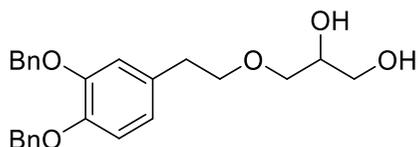


A una disolución de **117** (105 mg, 0.31 mmol) en THF seco (2 ml) a 0 °C, se añadió NaH al 60% (30 mg, 1.24 mmol) y se agitó durante 10 min. Se añadió bromuro de alilo (108 µl, 1.24 mmol) y se calentó a reflujo toda una noche. A continuación, se añadió una disolución saturada de NH₄Cl (6 ml) y se extrajo con éter etílico (3x10 ml). Las

fases orgánicas se unieron, se secó con MgSO_4 y se filtró resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-ciclohexano (1:5).

Rendimiento: 107 mg, 92%. R_F 0.9 (AcOEt-ciclohexano 1:5)

IR	ν (cm^{-1}): 2843, 1640, 1515, 1260, 1157, 990, 734.
^1H -RMN	(300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.47-7.29 (m, 10H, 2 Ph), 6.86 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.1$ Hz, H-5'), 6.85 (m, 1H, H-2'), 6.73 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.1$ Hz, $J_{6',2'} = 2.1$ Hz, H-6'), 5.89 (ddt, 1H, $J_{\text{trans}} = 17.2$ Hz, $J_{\text{cis}} = 10.4$ Hz, $J_{2'',1''} = 5.6$ Hz, H-2''), 5.25 (dc, 1H, $J_{\text{trans}} = 17.2$ Hz, $J_{3'',1''} = 1.7$ Hz, H-3''), 5.16 (dc, 1H, $J_{\text{cis}} = 10.4$ Hz, $J_{3'',1''} = 1.7$ Hz, H-3''), 5.15 y 5.13 (2s, 2H cada uno, 2 OCH_2Ph), 3.96 (dt, 2H, $J_{1'',2''} = 5.6$ Hz, $J_{1'',3''} = 1.4$ Hz, H-1''), 3.58 (t, 2H, $J_{2,1} = 7.2$ Hz, H-2), 2.80 (t, 2H, $J_{1,2} = 7.2$ Hz, H-1).
^{13}C -RMN	(75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 149.0 (C-3), 147.6 (C-4), 137.7 y 137.5 (2 Ph-1), 135.0 (C-2''), 132.6 (C-1), 128.6 (2 Ph-3 y 5), 127.9 y 127.8 (2 Ph-4), 121.9 (C-6), 117.0 (C-3''), 116.2 (C-2), 115.2 (C-5), 72.0 (C-2), 71.6 (C-1''), 71.5 y 71.4 (2 OCH_2Ph), 36.0 (C-1).
HRCI	m/z calculado para $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_3$: 374.1882, encontrado 374.1892.

(±)-1-(3'',4''-Dibenciloxifenetoxi)propano-2,3-diol (17)

Método A: A una disolución de **15** (69 mg, 0.18 mmol) en dioxano/H₂O 2:1 (3 ml) se añadió HClO₄ al 70% (10 µl) y se agitó a t.a durante 24 h. Se neutralizó con NaHCO₃ y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-ciclohexano (1:1) obteniendo **17** como un sirupo amarillo pálido.

Rendimiento: 51 mg, 69%. *R_F* 0.1 (AcOEt-ciclohexano 1:1)

Método B: A una disolución de **16** (650 mg, 1.74 mmol) en H₂O/Acetona 1:3 (8 ml) se añadieron N,O-4-metilmorfolina (468 mg, 4 mmol) y una disolución de OsO₄ en *t*-BuOH (140 µl, 12 µmol) y se agitó a t.a durante 3 h. La disolución se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-ciclohexano (1:1) obteniendo **17** como un sirupo amarillo pálido.

Rendimiento: 523 mg, 74%.

IR ν (cm⁻¹): 3434, 2924, 2868, 1501, 1261, 1101, 1023.

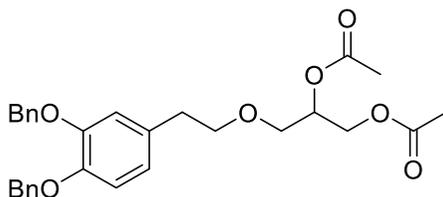
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.46–7.29 (m, 10H, 2 Ph), 6.87 (d, 1H, *J*_{5'',6''} = 8.1 Hz, H-5''), 6.81 (d, 1H, *J*_{2'',6''} = 2.0 Hz, H-2''), 6.71 (dd, 1H, *J*_{6'',5''} = 8.1 Hz, *J*_{6'',2''} = 2.0 Hz, H-6''), 5.14 y 5.13 (2s, 2H cada uno,

2 OCH₂Ph), 3.65-3.43 (m, 7H, H-1', H-1, H-2 y H-3), 2.78 (t, 2H, $J_{2',1'} = 6.9$ Hz, H-2').

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 149.1 (C-3''), 147.8 (C-4''), 137.6 y 137.5 (2 Ph-1), 132.3 (C-1''), 128.6 (2 Ph-2 y 6), 127.9 (2 Ph-4), 127.5 y 127.4 (2 Ph-3 y 5), 121.9 (C-6''), 116.2 (C-2''), 115.5 (C-5''), 72.7 (C-1'), 71.8 (2 OCH₂Ph), 71.7 (C-1), 51.2 (C-2), 44.6 (C-3), 35.8 (C-2').

HRCI m/z calculado para [M + Na]⁺ C₂₅H₂₈NaO₅: 431.1834, encontrado 431.1843.

(±)-1,2-Diacetoxi-3-(3'',4''-dibenciloxifenetoxi)propano (18)



Se disolvió **17** (135 mg, 0.33 mmol) en una mezcla 1:1 de Ac₂O/py (2 ml) y se agitó a 0 °C durante 15 min, permaneciendo a t.a durante la noche. Se hidrolizó con H₂O y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-ciclohexano (1:5 → 1:1) obteniendo **18** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 130 mg, 80%. R_F 0.8 AcOEt-ciclohexano 1:1

IR ν (cm⁻¹): 1739, 1502, 1254, 1091, 1020.

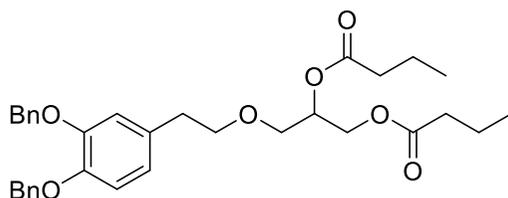
8.2. Nuevas investigaciones

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.48-7.30 (m, 10, 2 Ph), 6.87 (d, 1H, $J_{6'',5''} = 8.1$ Hz, H-6''), 6.83 (d, 1H, $J_{3'',5''} = 1.9$ Hz, H-3''), 6.72 (dd, 1H, $J_{5'',6''} = 8.1$ Hz, $J_{5'',3''} = 1.9$ Hz, H-5''), 5.21-5.17 (m, 1H, H-2), 5.15 y 5.14 (2s, 2H cada uno, 2 OCH_2Ph), 4.30 y 4.13 (2dd, 1H cada uno, $J_{1a,1b} = 11.9$ Hz, $J_{1a,2} = 3.7$ Hz, $J_{1b,2} = 6.3$ Hz, H-1), 3.61-3.53 (m, 4H, H-3 y H-1'), 2.77 (t, 2H, $J_{2',1'} = 7.0$ Hz, H-2'), 2.06 (s, 6H, 2 OAc).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171.7 y 170.0 (2 CO), 149.2 (C-2''), 147.9 (C-1''), 137.8 (2 Ph-1), 132.6 (C-4''), 128.8 (2 Ph-2 y 6), 128.1 (2 Ph-4), 127.7 (2 Ph-3 y 5), 122.1 (C-5''), 116.5 (C-3''), 115.7 (C-6''), 72.9 (C-1'), 71.8 y 71.7 (2 OCH_2Ph), 70.5 (C-1), 69.4 (C-2), 63.3 (C-3), 36.0 (C-2'), 21.4 y 21.1 (2 OAc).

HRLSI m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+ \text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{NaO}_7$: 515.2046, encontrado 515.2041.

(±)-3-(3'',4''-Dibenciloxifenetoxi)-1,2-dibutanoiloxipropano (19)



Se disolvió **17** (104 mg, 0.25 mmol) en piridina (1 ml) a 0 °C y se añadió cloruro de butanoílo (66 μl , 0.64 mmol) permaneciendo la disolución a t.a durante la noche. Se diluyó con AcOEt (60 ml) y se lavó

con HCl 1M (3x20 ml), con NaHCO₃ 5M (2x10 ml) y con H₂O hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-ciclohexano (1:5) obteniendo **19** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 128 mg, 94%. *R_F* 0.8 (AcOEt-ciclohexano 1:1)

IR ν (cm⁻¹): 2967, 1737, 1512, 1250, 1106, 1137, 745.

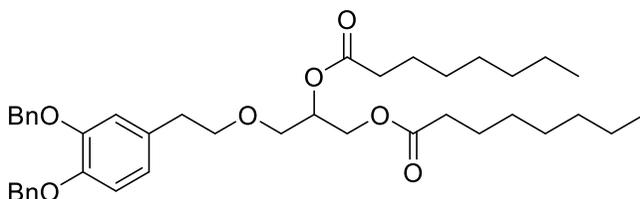
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.47-7.29 (m, 10H, 2 Ph), 6.88 (d, 1H, $J_{6'',5''} = 8.2$ Hz, H-6''), 6.82 (d, 1H, $J_{3'',5''} = 2.0$ Hz, H-3''), 6.71 (dd, 1H, $J_{5'',6''} = 8.2$ Hz, $J_{5'',3''} = 2.0$ Hz, H-5''), 5.21-5.16 (m, 1H, H-2), 5.14 y 5.12 (2s, 2H cada uno, 2 OCH₂Ph), 4.30 y 4.13 (2dd, 1H cada uno, $J_{1a,1b} = 11.9$ Hz, $J_{1a,2} = 6.5$ Hz, $J_{1b,2} = 3.7$ Hz, H-1), 3.65-3.49 (m, 4H, H-3 y H-1'), 2.76 (t, 2H, $J_{2',1'} = 7.1$ Hz, H-2'), 2.28 (td, 4H, $J = 7.3$ Hz, $J = 2.3$ Hz, 2 COCH₂CH₂), 1.63 (qd, 4H, $J = 7.5$ Hz, $J = 1.2$ Hz, 2 COCH₂CH₂), 0.94 (t, 6H, $J = 7.4$ Hz, 2 CH₃).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 173.4 y 173.1 (2 CO), 149.0 (C-2), 147.7 (C-1), 137.6 (2 Ph-1), 132.4 (C-4), 128.6 (2 Ph-2 y 6), 127.9 (2 Ph-4), 127.5 (2 Ph-3 y 5), 122.1 (C-5), 116.5 (C-3), 115.7 (C-6), 72.7 (C-1'), 71.7 y 71.5 (2 OCH₂Ph), 70.1 (C-3), 69.3 (C-2), 62.9 (C-1), 36.3, 36.1 (CH₂ éster), 35.8 (C-2'), 18.6, 18.5, (CH₂ éster), 13.8 y 13.7 (2 CH₃).

8.2. Nuevas investigaciones

HRLSI m/z calculado para $[M]^+$ $C_{33}H_{40}O_7$: 548.2774,
encontrado 548.2767.

(±)-3-(3'',4''-Dibenciloxifenetoxi)-1,2-dioctanoiloxipropano (**20**)



Se disolvió **17** (100 mg, 0.25 mmol) en piridina (1 ml) a 0 °C y se añadió cloruro de octanoílo (126 μ l, 0.74 mmol) permaneciendo la disolución a t.a durante la noche. Se diluye con AcOEt (70 ml) y se lavó con HCl 1M (3x20 ml), con NaHCO₃ 5M (2x10 ml) y con H₂O hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-ciclohexano (1:5) obteniendo **20** como un sólido blanco.

Rendimiento: 144 mg, 87%. R_F 0.8 (AcOEt-ciclohexano 1:1)

IR ν (cm⁻¹): 2930, 1738, 1515, 1264, 1138, 733, 659.

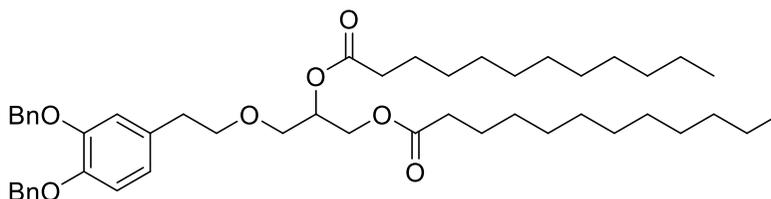
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.47-7.29 (m, 10H, 2 Ph), 6.86 (d, 1H, $J_{6'',5''} = 8.2$ Hz, H-6''), 6.82 (d, 1H, $J_{3'',5''} = 2.0$ Hz, H-3''), 6.71 (dd, 1H, $J_{5'',6''} = 8.2$ Hz, $J_{5'',3''} = 2.0$ Hz, H-5''), 5.19-5.16 (m, 1H, H-2), 5.14 y 5.12 (2s, 2H cada uno, 2 OCH₂Ph), 4.29 y 4.12 (2dd, 1H cada uno, $J_{1a,1b} = 11.9$ Hz, $J_{1a,2} = 6.5$ Hz, $J_{1b,2} = 3.7$ Hz, H-1), 3.65-3.48 (m, 4H, H-3 y H-1'),

2.76 (t, 2H, $J_{2',1'} = 7.0$ Hz, H-2'), 2.30 (td, 4H, $J = 7.4$ Hz, $J = 2.9$ Hz, 2 COCH₂CH₂), 1.62-1.58 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 1.27 (m, 16H, 8 CH₂ éster), 0.87 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz, 2 CH₃).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 173.6 y 173.3 (2 CO), 149.0 (C-2), 147.7 (C-1), 137.6 (2 Ph-1), 132.4 (C-4), 128.6 (2 Ph-2 y 6), 127.9 (2 Ph-4), 127.5 (2 Ph-3 y 5), 121.9 (C-5), 116.3 (C-3), 115.5 (C-6), 72.7 (C-1'), 71.7 y 71.5 (OCH₂Ph), 70.1 (C-3), 69.3 (C-2), 62.9 (C-1), 35.8 (C-2'), 34.5, 34.3, 31.8, 29.2, 29.1, 25.1, 25.0, 22.4 (12 CH₂ éster), 14.2 (2 CH₃ éster).

HRLSI m/z calculado para [M]⁺ C₄₁H₅₆O₇: 660.4026, encontrado 660.4005.

(±)-3-(3'',4''-Dibenciloxifenetoxi)-1,2-dilauroiloxipropano (21)



Se disolvió **17** (101 mg, 0.25 mmol) en piridina (1 ml) a 0 °C y se añadió cloruro de lauroilo (230 µl, 0.99 mmol) permaneciendo la disolución a t.a toda la noche. Se diluyó con AcOEt (70 ml) y se lavó con HCl 1M (3x20 ml), con NaHCO₃ 5M (2x10 ml) y con H₂O hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía

8.2. Nuevas investigaciones

en columna usando como eluyente AcOEt-ciclohexano (1:5) obteniendo **21** como un sólido blanco.

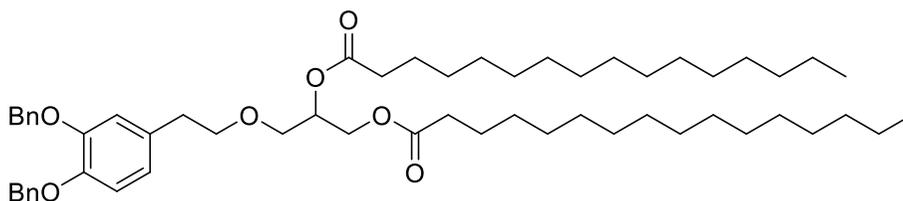
Rendimiento: 200 mg, cuantitativo. R_F 0.9 (AcOEt-ciclohexano 1:1)

IR ν (cm^{-1}): 2929, 1739, 1531, 1260, 1152, 729, 661.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.47-7.29 (m, 10H, 2 Ph), 6.86 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8.2$ Hz, H-5''), 6.82 (d, 1H, $J_{2'',6''} = 2.0$ Hz, H-2''), 6.71 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 8.2$ Hz, $J_{6'',2''} = 2.0$ Hz, H-6''), 5.22-5.17 (m, 1H, H-2), 5.14 y 5.12 (2s, 2H cada uno, 2 OCH_2Ph), 4.29 y 4.12 (2dd, 1H cada uno, $J_{1a,1b} = 12.0$ Hz, $J_{1a,2} = 6.5$ Hz, $J_{1b,2} = 3.7$ Hz, H-1), 3.62-3.48 (m, 4H, H-3 y H-1'), 2.76 (t, 2H, $J_{2',1'} = 7.0$ Hz, H-2'), 2.29 (td, 4H, $J = 7.3$ Hz, $J = 2.9$ Hz, 2 COCH_2CH_2), 1.65-1.55 (m, 4H, 2 COCH_2CH_2), 1.32-1.22 (m, 32H, 16 CH_2 éster), 0.88 (t, 6H, $J = 6.2$ Hz, 2 CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 173.6 y 173.3 (2 CO), 149.0 (C-3''), 147.7 (C-4''), 137.6 (2 Ph-1), 132.3 (C-1''), 128.6 (2 Ph-2 y 6), 127.9 (2 Ph-4), 127.5 (2 Ph-3 y 5), 121.9 (C-6''), 116.3 (C-2''), 115.5 (C-5''), 72.7 (C-1'), 71.7 y 71.5 (2 OCH_2Ph), 70.1 (C-3), 69.3 (C-2), 62.9 (C-1), 35.8 (C-2'), 34.5, 34.3, 32.1, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 25.1, 25.0, 22.3 (20 CH_2 éster), 14.3 (2 CH_3).

HRLSI m/z calculado para $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{49}\text{H}_{72}\text{O}_7$: 772.5278, encontrado 772.5283.

(±)-3-(3'',4''-Dibenciloxifenetoxi)-1,2-dipalmitoiloxipropano (22)

Se disolvió **17** (75 mg, 0.18 mmol) en piridina (1 ml) a 0 °C y se añadió cloruro de palmitoílo (224 μ l, 0.74 mmol) permaneciendo la disolución a t.a toda la noche. Se diluyó con AcOEt (70 ml) y se lavó con HCl 1M (3x20 ml), con NaHCO₃ 5M (2x10 ml) y con H₂O hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-ciclohexano (1:5) obteniendo **22** como un sólido blanco.

Rendimiento: 141 mg, 96%. R_F 0.9 (AcOEt-ciclohexano 1:1)

IR ν (cm⁻¹): 2917, 1714, 1525 1269, 728, 697.

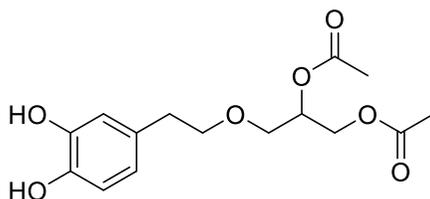
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.47–7.29 (m, 10H, 2 Ph), 6.86 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8.2$ Hz, H-5''), 6.82 (d, 1H, $J_{2'',6''} = 2.0$ Hz, H-2''), 6.71 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 8.2$ Hz, $J_{6'',2''} = 2.0$ Hz, H-6''), 5.22-5.17 (m, 1H, H-2), 5.14 y 5.12 (2s, 2H cada uno, 2 OCH₂Ph), 4.30 y 4.12 (2dd, 1H cada uno, $J_{1a,1b} = 11.9$ Hz, $J_{1a,2} = 6.5$ Hz, $J_{1b,2} = 3.7$ Hz, H-1), 3.65-3.50 (m, 4H, H-3 y H-1'), 2.76 (t, 2H, $J_{2',1'} = 7.0$ Hz, H-2'), 2.29 (td, 4H, $J = 7.4$ Hz, $J = 3.0$ Hz, 2 COCH₂CH₂), 1.64-1.55 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 1.32-1.22 (m, 48H, 24 CH₂ éster), 0.88 (t, 6H, $J = 6.9$ Hz, 2 CH₃).

8.2. Nuevas investigaciones

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 173.6 y 173.3 (2 CO), 149.0 (C-2''), 147.7 (C-1''), 137.6 (2 Ph-1), 132.4 (C-4), 128.6 (2 Ph-2 y 6), 127.9 (2 Ph-4), 127.5 (2 Ph-3 y 5), 121.9 (C-5''), 116.3 (C-3''), 115.5 (C-6''), 72.7 (C-1'), 71.7 y 71.5 (2 OCH_2Ph), 70.1 (C-3), 69.3 (C-2), 62.9 (C-1), 35.8 (C-2'), 34.5, 34.3, 32.0, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 25.1, 25.0, 22.9 (28 CH_2 éster), 14.3 (2 CH_3).

HRLSI m/z calculado para $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{57}\text{H}_{88}\text{O}_7$: 884.6530, encontrado 884.6523.

(\pm) 4-(2'-(2'',3''-Diacetoxipropoxi)etil)benceno-1,2-diol (**23**)



A una disolución de **18** (130 mg, 0.26 mmol) en AcOEt (3 ml) se añadió Pd/C al 10% (40 mg) y se hidrogenó a presión atmosférica y t.a durante la noche. Se filtró sobre celita y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-ciclohexano (1:1) obteniendo **23** como un sirupo verde oscuro.

Rendimiento: 83 mg, cuantitativo. R_F 0.4 (AcOEt-ciclohexano 1:1)

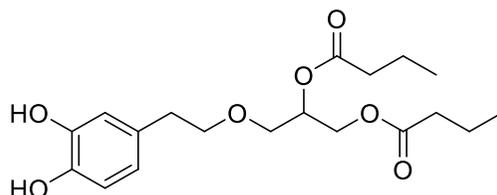
IR ν (cm^{-1}): 3422, 2924, 1710, 1505, 1261, 1109, 1023.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6.79 (d, 1H, $J_{3,5} = 1.3$ Hz, H-3), 6.77 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6), 6.59 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, $J_{5,3} = 1.3$ Hz, H-3), 6.25 y 5.60 (2s, 1H cada uno, 2 OH), 5.22-5.15 (m, 1H, H-2''), 4.32 y 4.17 (2dd, 1H cada uno, $J_{3a'',3b''} = 11.9$ Hz, $J_{3a'',2''} = 6.5$, $J_{3b'',2''} = 3.6$ Hz, H-3''), 3.64-3.55 (m, 2H, H-1''), 3.53 (d, 2H, $J_{2',1'} = 5.4$ Hz, H-2'), 2.73 (t, 2H, $J_{1',2'} = 6.2$ Hz, H-1'), 2.07 y 2.06 (2s, 3H cada uno, 2 OAc).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171.9 y 170.7 (2 CO), 143.4 (C-2), 142.8 (C-1), 131.9 (C-4), 121.4 (C-5), 116.5 (C-3), 115.1 (C-6), 72.6 (C-2''), 70.4 (C-1''), 68.9 (C-2''), 63.4 (C-3''), 35.5 (C-1'), 21.2 y 21.0 (2 OAc).

HRCI m/z calculado para $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_7$: 312.1209, encontrado 312.1204.

(\pm)-4-(2'-(2'',3''-Dibutanoiloxipropoxi)etil)benceno-1,2-diol (24**)**



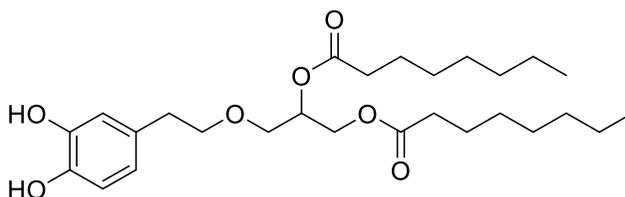
A una disolución de **19** (118 mg, 0.21 mmol) en AcOEt (3 ml) se añadió Pd/C al 10% (40 mg) y se hidrogenó a presión atmosférica y t.a durante una noche. Se filtró sobre celita y se concentró a sequedad

8.2. Nuevas investigaciones

resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-ciclohexano (1:1) obteniendo **24** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 63 mg, 82%. R_F 0.6 (AcOEt-ciclohexano 1:1)

IR	ν (cm^{-1}): 3451, 2924, 1713, 1516, 1253, 1130, 1018.
$^1\text{H-RMN}$	(300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6.82 (d, 1H, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, H-3), 6.77 (d, 1H, $J_{6,5} = 8.0$ Hz, H-6), 6.59 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, $J_{5,3} = 2.0$ Hz, H-3), 6.25 y 5.94 (2s, 1H cada uno, 2 OH), 5.23-5.18 (m, 1H, H-2''), 4.35 y 4.19 (2dd, 1H cada uno, $J_{3a'',3b''} = 11.9$ Hz, $J_{3a'',2''} = 6.7$, $J_{3b'',2''} = 3.6$ Hz, H-3''), 3.65-3.57 (m, 2H, H-1''), 3.52 (dd, 2H, $J = 5.2$ Hz, $J = 0.9$ Hz, H-2'), 2.73 (t, 2H, $J_{1',2'} = 6.2$ Hz, H-1'), 2.30 (td, 4H, $J = 7.3$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 2 COCH_2CH_2), 1.64 (m, 4H, 2 COCH_2CH_2), 0.93 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz, 2 CH_3).
$^{13}\text{C-RMN}$	(75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 174.4 y 174.3 (2 CO), 143.4 (C-2), 142.8 (C-1), 131.9 (C-4), 121.3 (C-5), 116.5 (C-3), 115.0 (C-6), 72.6 (C-2'), 70.2 (C-1''), 69.0 (C-2''), 63.2 (C-3''), 36.3 y 36.2 (2 CH_2 éster), 35.5 (C-1'), 18.5 (2 CH_2 éster), 13.7 (2 CH_3).
HRCI	m/z calculado para $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_7$: 368.1835, encontrado 368.1829.

(±) 4-(2'-(2'',3''-Diocetanoiloxipropoxi)etil)benceno-1,2-diol (25)

A una disolución de **20** (136 mg, 0.21 mmol) en AcOEt (3 ml) se añadió Pd/C al 10% (50 mg) y se hidrogenó a presión atmosférica y t.a durante la noche. Se filtró sobre celita y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-ciclohexano (1:3) obteniendo **25** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 82 mg, 81%. R_F 0.8 (AcOEt-ciclohexano 1:1)

IR ν (cm^{-1}): 3433, 2924, 1717, 1512, 1247, 1134, 1018.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6.83 (d, 1H, $J_{3,5} = 1.8$ Hz, H-3), 6.77 (d, 1H, $J_{6,5} = 8.0$ Hz, H-6), 6.59 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, $J_{5,3} = 1.8$ Hz, H-5), 5.22-5.17 (m, 1H, H-2''), 4.35 y 4.19 (2dd, 1H cada uno, $J_{3a'',3b''} = 11.9$ Hz, $J_{3a'',2''} = 6.8$, $J_{3b'',2''} = 3.6$ Hz, H-3''), 3.65-3.57 (m, 2H, H-1''), 3.52 (d, 2H, $J_{2',1'} = 5.2$ Hz, H-2'), 2.73 (t, 2H, $J_{1',2'} = 6.1$ Hz, H-1'), 2.31 (td, 4H, $J = 7.4$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 2 COCH_2CH_2), 1.68-1.55 (m, 4H, 2 COCH_2CH_2), 1.28-1.26 (m, 16H, 8 CH_2 éster), 0.88 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz, 2 CH_3).

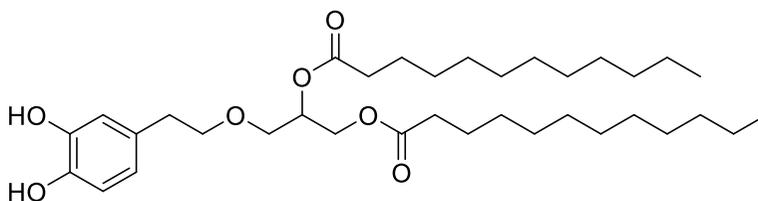
$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 174.5 y 173.6 (2 CO), 143.4 (C-2), 142.9 (C-1), 131.9 (C-4), 121.3 (C-5),

8.2. Nuevas investigaciones

116.6 (C-3), 115.0 (C-6), 72.6 (C-2'), 70.2 (C-1''), 69.0 (C-2''), 63.3 (C-3''), 35.5 (C-1'), 34.5, 34.2, 31.8, 29.2, 29.0, 25.1, 25.0, 22.7 (12 CH₂ éster), 14.2 (2 CH₃).

HRLSI m/z calculado para [M + Na]⁺ C₂₇H₄₄NaO₇: 503.2985, encontrado 503.2979.

(±)-4-(2'-(2'',3''-Dilauroiloxipropoxi)etil)benceno-1,2-diol (**26**)



A una disolución de **21** (193 mg, 0.25 mmol) en AcOEt (3 ml) y se añadió Pd/C al 10% (90 mg) y se hidrogenó a presión atmosférica y t.a durante una noche. Se filtró sobre celita y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-ciclohexano (1:3) obteniendo **26** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 130 mg, 88%. R_F 0.8 (AcOEt-ciclohexano 1:1)

IR ν (cm⁻¹): 3451, 2930, 1726, 1519, 1238, 1131, 1015.

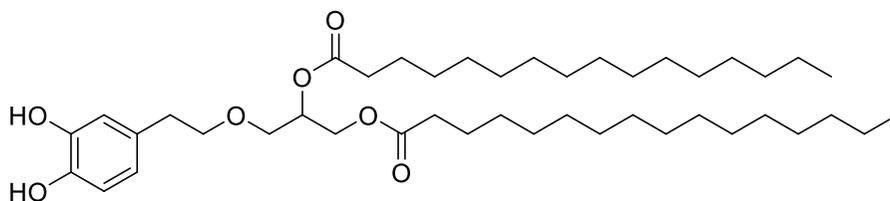
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.83 (d, 1H, $J_{3,5} = 1.8$ Hz, H-3), 6.77 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-6), 6.59 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, $J_{5,3} = 1.8$ Hz, H-5), 5.22-5.17 (m, 1H, H-2''), 4.35 y 4.18 (2dd, 1H cada uno, $J_{3a'',3b''} =$

11.9 Hz, $J_{3a'',2''} = 6.8$, $J_{3b'',2''} = 3.5$ Hz, H-3''), 3.64-3.53 (m, 2H, H-1''), 3.52-3.46 (m, 2H, H-2'), 2.73 (t, 2H, $J_{1',2'} = 6.2$ Hz, H-1'), 2.30 (td, H, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 2 COCH₂CH₂), 1.64-1.55 (m, 4H, 2 COCH₂CH₂), 1.31-1.23 (m, 32H, 16 CH₂ éster), 0.88 (t, 6H, $J = 6.9$ Hz, 2 CH₃).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 174.5 y 173.5 (2 CO), 143.4 (C-2), 143.0 (C-1), 131.8 (C-4), 121.3 (C-5), 116.5 (C-3), 115.0 (C-6), 72.6 (C-2'), 70.2 (C-1''), 69.0 (C-2''), 63.3 (C-3''), 35.5 (C-1'), 34.5, 34.4, 32.1, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 25.1, 25.0, 22.8 (20 CH₂ éster), 14.3 (2 CH₃).

HRLSI m/z calculado para [M + Na]⁺ C₃₅H₆₀NaO₇: 615.4237, encontrado 615.4219.

(±)-4-(2'-(2'',3''-Dipalmitoiloxipropoxi)etil)benceno-1,2-diol (27)



A una disolución de **22** (129 mg, 0.15 mmol) en AcOEt (3 ml) se añadió Pd/C al 10% (60 mg) y se hidrogenó a presión atmosférica y t.a durante la noche. Se filtró sobre celita y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en

8.2. Nuevas investigaciones

columna usando como eluyente AcOEt-ciclohexano (1:3) obteniendo **27** como un sirupo incoloro.

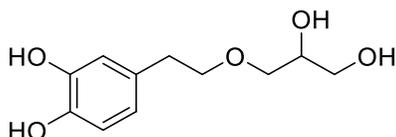
Rendimiento: 110 mg, cuant. R_F 0.8 (AcOEt-ciclohexano 1:1)

IR ν (cm^{-1}): 3454, 2932, 1720, 1534, 1241, 1137, 1005.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6.83 (d, 1H, $J_{3,5} = 1.6$ Hz, H-3), 6.77 (d, 1H, $J_{6,5} = 8.0$ Hz, H-6), 6.59 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, $J_{5,3} = 1.6$ Hz, H-5), 5.24-5.17 (m, 1H, H-2''), 4.35 y 4.19 (2dd, 1H cada uno, $J_{3a'',3b''} = 11.9$ Hz, $J_{3a'',2''} = 6.8$, $J_{3b'',2''} = 3.5$ Hz, H-3''), 3.65-3.53 (m, 2H, H-1''), 3.53-3.51 (m, 2H, H-2'), 2.73 (t, 2H, $J_{1',2'} = 6.1$ Hz, H-1'), 2.31 (td, 4H, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 2 COCH_2CH_2), 1.62-1.57 (m 4H, 2 COCH_2CH_2), 1.29-1.24 (m, 48H, 24 CH_2 éster), 0.88 (t, 6H, $J = 6.9$ Hz, 2 CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 174.5 y 173.5 (2 CO), 143.4 (C-2), 143.0 (C-1), 131.9 (C-4), 121.3 (C-5), 116.6 (C-3), 115.0 (C-6), 72.6 (C-2'), 70.2 (C-1''), 69.0 (C-2''), 63.3 (C-3''), 35.5 (C-1'), 34.5, 34.4, 32.1, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 25.1, 25.0, 22.8 (28 CH_2 éster), 14.3 (2 CH_3).

HRLSI m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+ \text{C}_{43}\text{H}_{76}\text{NaO}_7$: 727.5483, encontrado 727.5495.

(±) 1-(3'',4''-Dihidroxifenetoxi)propano-2,3-diol (28)

A una disolución de **17** (105 mg, 0.26 mmol) en MeOH (1 ml) se añadió Pd/C (40 mg) al 10% y se hidrogenó a presión atmosférica y t.a durante una noche. Se filtró sobre celita y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (5:1) obteniendo **28** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 55 mg, 92%. *R_F* 0.5 (CH₂Cl₂-MeOH 5:1)

IR ν (cm⁻¹): 3437, 2944, 2881, 1522, 1261, 1111, 1020.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 6.67 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 7.9$ Hz, H-5''), 6.66 (d, 1H, $J_{2'',6''} = 2.3$ Hz, H-2''), 6.53 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 8.0$ Hz, $J_{6'',2''} = 2.0$ Hz, H-6''), 3.78-3.70 (m, 1H, H-2), 3.61 (t, 2H, $J_{1',2'} = 7.2$ Hz, H-1'), 3.57-3.41 (m, 4H, H-1 y H-3), 2.72 (t, 2H, $J_{1',2'} = 7.1$ Hz, H-2').

¹³C-RMN (75.5 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 146.1 (C-3''), 144.6 (C-4''), 131.8 (C-1''), 121.2 (C-6''), 117.0 (C-2''), 116.3 (C-5''), 73.9 (C-1'), 73.3 (C-1), 72.2 (C-2), 64.6 (C-3), 36.5 (C-2').

HRCI m/z calculado para [M]⁺ C₁₁H₁₆O₅: 228.0998, encontrado 228.0998.

8.2.2. Síntesis quimioenzimática de derivados lipófilos de fenoles y carbohidratos mediante el uso de nuevas lipasas procedentes de bacterias lipolíticas

Procedimiento general para acetilaciones del hidroxitirosol con empleo de lipasas

A una disolución de HT (10 mg) en acetato de isopropenilo (0.6 ml) se añadieron celita (10 mg) y el extracto enzimático (10 mg). La mezcla se agitó en la oscuridad a 40 °C durante 24 h. La disolución se filtró y se concentró a sequedad, redisolviendo el residuo en CDCl_3 para su análisis mediante $^1\text{H-RMN}$.

Procedimiento general para acetilaciones del 3,4-dihidroxifenilglicol con empleo de lipasas

A una disolución de 3,4-dihidroxifenilglicol (10 mg) en DMF/acetato de isopropenilo 1:1 (1.2 ml) se añadió el extracto enzimático (10 mg). La disolución se agitó en oscuridad a 40 °C durante 24 h. Posteriormente, se concentró a sequedad resultando un residuo que se redisolvió en $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ y se microfiltró para su análisis mediante $^1\text{H-RMN}$.

Procedimiento general para acetilaciones del alcohol protocatecuico con empleo de lipasas

A una disolución de alcohol protocatecuico (10 mg) en acetato de isopropenilo (0.6 ml) se añadieron celita (10 mg) y el extracto enzimático (10 mg). La mezcla se agitó en oscuridad a 40 °C durante 24 h. La disolución se filtró y se concentró a sequedad, redisolviendo el residuo en CDCl_3 para su análisis mediante ^1H -RMN.

Datos espectroscópicos de la mezcla de compuestos obtenidos mediante acetilación con lipasas

Derivados de HT: 67, 121, 122, 29, 123–125

^1H -NMR (700 MHz, CDCl_3): δ 7.11 (m, 2H, H-5', H-6' **123**), 7.06 (m, 1H, H-2' **123**), 7.02 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H-5' **124**), 7.01 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-5' **121**), 6.99 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H-6' **122**), 6.98 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H-6' **125**), 6.96 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H-2' **122**), 6.95 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H-2' **125**), 6.93 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H-5' **122**), 6.92 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H-5' **125**), 6.87 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H-2' **121**), 6.86 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H-2' **124**), 6.80 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H-5' **29**), 6.79 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H-6' **124**), 6.78 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H-5' **67**), 6.77 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H-6' **121**), 6.74 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H-2' **67**), 6.73 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H-2' **29**), 6.64 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H-6' **67**), 6.62 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, H-6' **29**), 4.26, 4.24 (2t, 2H cada uno, $J = 7.1$ Hz, H-1 **124**, **125**), 4.22 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-1 **29**), 3.86 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-1 **123**), 3.84 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-1 **121**), 3.82 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-1 **122**), 3.81 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-1 **67**), 2.92 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-2 **123**), 2.87 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-2 **124**), 2.85 (t, 2H, $J =$

8.2. Nuevas investigaciones

7.1 Hz, H-2 **125**), 2.81 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-2 **120**), 2.80 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-2 **121**), 2.79 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-2 **122**), 2.75 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-2 **67**), 2.35, 2.34, 2.28 (4s, 3H cada uno, ArOCOMe **121**, **122**, **29**, **123-125**), 2.04, 2.03 (3s, 3H cada uno, OCOMe **29**, **124**, **125**).

^{13}C -NMR (175 MHz, CDCl_3): δ 170.4, 169.8, 169.6, 169.5, 169.4, 168.7, 168.6, 168.4 (OCOMe **67**, **121**, **122**, **29**, **123-125**), 146.1 (C-3' **121**), 146.0 (C-3' **124**), 144.8 (C-4' **125**), 144.7 (C-4' **122**), 143.0 (C-3' **67**), 142.9 (C-3' **29**), 141.6 (C-4' **67**), 141.5 (C-4' **120**), 137.7 (C-3' **67**), 136.9 (C-1' **121**), 136.8 (C-1' **125**), 136.3 (C-4' **121**), 136.1 (C-4' **124**), 130.6 (C-1' **122**), 130.3 (C-1' **67**), 129.7 (C-1' **29**), 126.7 (C-6' **122**), 126.5 (C-6' **125**), 126.4 (C-5' **125**), 123.1 (C-2' **123**), 122.5 (C-5', C-6' **123**), 122.0 (C-2' **122**), 121.9 (C-2' **125**), 121.6 (C-5' **121**), 121.5 (C-5' **124**), 120.6 (C-6' **121**), 120.3, 120.2 (C-6' **67**, **29**), 117.4 (C-2' **121**), 117.3 (C-2' **124**), 117.0 (C-5' **122**), 116.9 (C-6' **125**), 115.2, 115.0 (C-2' **67**, **29**), 114.6 (C-5' **67**), 114.5 (C-5' **29**), 64.3 (C-1 **120**), 63.9, 63.8 (C-1 **124**, **125**), 62.9 (C-1 **67**), 62.7 (C-1 **122**), 62.6 (C-1 **121**), 62.4 (C-1 **123**), 37.7 (C-2 **121**), 37.6, 37.5 (C-2 **125**, **67**), 37.3 (C-2 **122**), 33.7 (C-2 **124** ó **125**), 33.6 (C-2 **120**), 33.3 (C-2 **124** o **125**), 28.8 (OCOMe **29**, **124**, **125**), 20.1, 20.0 (ArOCOMe **121**, **122**, **29**, **123-125**).

Derivados del DHPG: **3**, **126–130**

^1H -RMN (700 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ 7.12 (dd, 1H, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H-6' **130**), 7.08 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H-2' **130**), 7.07 (dd, 1H, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H-6' **127**), 7.06 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H-2' **126**), 7.04 (dd, 1H, $J = 2.3$ Hz, H-2' **127**), 7.03 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H-2' **129**), 6.98 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-5' **126**), 6.94 (2d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-5' **129**, **130**), 6.91 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-5' **127**), 6.90 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H-2' **128**), 6.88 (dd,

1H, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H-6' **129**), 6.87 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H-2' **3**), 6.84 (dd, 1H, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H-6' **126**), 6.78 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-5' **129**), 6.75 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-5' **3**), 6.72 (dd, 1H, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H-6' **128**), 6.68 (dd, 1H, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H-6' **3**), 4.85, 4.84 (2dd, 1H cada uno, $J = 7.5$ Hz, $J = 4.0$ Hz, H-2 **129**, **130**), 4.75 (dd, 1H, $J = 7.5$ Hz, $J = 4.6$ Hz, H-2 **128**), 4.64, 4.63 (2dd, 1H cada uno, $J = 7.8$ Hz, $J = 4.2$ Hz, H-2 **126**, **127**), 4.55 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 3.9$ Hz, H-2 **3**), 4.16-4.04 (m, 6H, H-1 **128-130**), 3.59-3.46 (m, 6H, H-2 **3**, **126**, **127**), 2.25, 2.24, 2.23 (3s, 3H cada uno, ArOCOMe **126**, **127**, **129**, **130**), 2.00, 1.99, 1.98 (3s, 3H cada uno, OCOMe **12-130**).

^{13}C -NMR (175 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ 171.0, 170.1, 170.0 (OCOMe **128-130**), 169.5, 169.4, 169.4 (ArOCOMe **126**, **127**, **129**, **130**), 149.3 (C-3' **126**), 149.5 (C-3' **129**), 149.3 (C-4' **130**), 148.9 (C-4' **127**), 146.0 (C-3' **128**), 145.9 (C-3' **3**), 145.7 (C-**128**), 145.3 (C-4' **3**), 142.3 (C-4' **126**), 141.3 (C-4' **129**), 139.4 (C-3' **127**), 139.3 (C-3' **130**), 138.9 (C-1' **126**), 138.6 (C-1' **129**), 135.1, 135.0 (C-1' **127**, **130**), 134.1 (C-1' **3**, **128**), 125.2, 125.1 (C-6' **127**, **130**), 123.6 (C-5' **126**), 123.4 (C-5' **129**), 121.9 (C-2' **130**), 121.8 (C-2' **127**), 118.4 (C-6' **128**), 118.3 (C-6' **3**), 118.1 (C-6' **126**, **129**), 117.5 (C-5' **130**), 117.3 (C-5' **127**), 116.0 (C-5' **128**), 115.8 (C-5' **3**), 115.7 (C-2' **126**), 115.6 (C-2' **129**), 114.5 (C-2' **128**, **3**), 75.1 (C-2 **3**), 74.9, 74.6 (C-2 **126**, **127**), 71.9 (C-2 **128**), 71.7, 71.4 (C-2 **129**, **130**), 70.1 (C-1 **128**), 69.8 (C-1 **129**, **130**), 69.1 (C-1 **3**), 68.9, 68.8 (C-1 **126**, **127**), 20.8, 20.7, 20.6, 20.5 (OCOMe **3**, **126-130**).

Derivados del alcohol protocatecuico: **120**, **131-136**)

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.13 (m, 4H, H-2', H-6' **132**, **136**), 7.08 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz, H-5' **135**), 7.06 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz, H-5' **131**), 7.01

8.2. Nuevas investigaciones

(d, 1H, $J = 1.9$ Hz, H-2' **131**), 7.00 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, H-2' **135**), 6.98 (2d, 1H cada uno, $J = 7.4$ Hz, H-5' **132**, **136**), 6.90 (2dd, 1H cada uno, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.9$ Hz, H-6' **131**, **135**), 6.89 (2d, 1H cada uno, $J = 1.9$ Hz, H-2' **120**, **133**), 6.84 (2d, 1H cada uno, $J = 7.4$ Hz, H-5' **120**, **133**), 6.80 (2dd, 1H cada uno, $J = 7.4$ Hz, $J = 1.9$ Hz, H-6' **120**, **133**), 5.04 (s, 2H, H-1, **135**), 5.02 (2s, 2H, H-1, **136**), 4.98 (s, 2H, H-1 **133**), 4.75 (s, 2H, H-1 **134**), 4.69 (s, 2H, H-1, **120**), 4.63 (s, 2H, H-1 **131**), 4.61 (s, 2H, H-1 **132**), 2.36, 2.35 (2s, 3H cada uno, ArOCOMe **131**, **132**, **134–136**), 2.08, 2.07 (2s, 3H cada uno, OCOMe **133**, **135**, **136**).

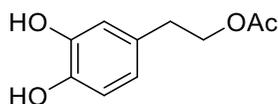
^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 170.8, 170.5, 170.3 (OCOMe **133–136**), 169.5, 169.4, 169.3 (ArOCOMe **131**, **132**, **134–136**), 147.2 (C-3' **131**), 147.2 (C-3' **135**), 146.8 (C-4' **136**), 146.6 (C-4' **132**), 144.1 (C-3' **133**), 143.8 (C-4' **133**), 140.2 (C-1' **133**), 138.7 (C-3' **132**), 138.0 (C-4' **131**), 134.1 (C-1' **136**), 128.9 (C-1' **132**), 127.5 (C-6' **136**), 125.9 (C-6' **132**), 123.0 (C-2' **136**), 122.7 (C-5' **131**, **135**), 121.6 (C-6' **133**), 121.5 (C-2' **132**), 120.9 (C-6' **135**), 119.4 (C-6' **131**), 117.9 (C-5' **132**, **136**), 117.7 (C-2' **135**), 116.3 (C-2' **131**), 116.0 (C-2' **133**), 115.4 (C-5' **133**), 66.3 (C-1 **133**), 65.7, 65.4 (C-1 **135**, **136**), 64.8 (C-1 **131**), 64.7 (C-1 **132**), 21.2 (OCOMe **133**, **135**, **136**), 21.1 (ArOCOMe **131**, **132**, **134–136**).

Procedimiento general de acetilación del metil α -D-glucopiranosido (**137**) mediante el empleo de lipasas

A una disolución de **137** (6.0 mg, 17 μmol), y acetato de isopropenilo (0.5 mL) en DMF (0.3 mL) se añadió el extracto enzimático procedente de *Bacillus* (3.0 mg). La suspensión se calentó a 60 °C durante 100 h. La mezcla se concentró a sequedad y el residuo se analizó por ^1H -RMN dando como resultado una mezcla de **136**, metil 6-*O*-acetil-

α -D-glucopiranosido (**140**) y metil 4,6-di-*O*-acetil- α -D-glucopiranosido (**141**) en relación 3.9:1.0:2.8.

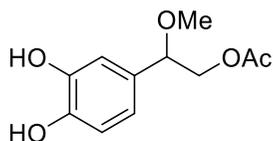
Acetato de hidroxitirosilo (**29**)



A una disolución de **142** (50 mg, 0.18 mmol) en MeOH, se añadieron el extracto 2B122 procedente de *Terribacillus* (50 mg) y gel de sílice (63-200 μ m, 100 mg). La suspensión se agitó a 40 °C durante 18 h. Luego se filtró sobre celita y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-hexano (1:2 \rightarrow 1:1) obteniendo **29** como un sirupo naranja.

Rendimiento: 31 mg, 90%, R_F 0.6 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1). Los datos espectroscópicos están en concordancia con la bibliografía²⁷⁰

Acetato de 2-(3',4'-dihidroxifenil)-2-metoxietilo (**30**)



Método A: A una disolución de **2** (28 mg, 0.08 mmol) en MeOH (3 mL) se añadieron el extracto 2B122 procedente de *Terribacillus* (28

²⁷⁰ Trujillo, M; Mateos, R; de Teran, LC; Espartero, JL; Cert, R; Jover, M; Alcuía, F; Bautista, J; Cert, A; Parrado, J. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3779–3785.

8.2. Nuevas investigaciones

mg) y gel de sílice (63-200 μm , 56 mg). La suspensión se agitó a t.a. durante 48 h, tras lo cual se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH_2Cl_2 -MeOH (60:1) obteniendo **30** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 16.7 mg, 90%, R_F 0.6 (CH_2Cl_2 -MeOH 10:1)

Método 2: A una disolución de **2** (100 mg, 0.30 mmol) en MeOH (6 ml) y se añadieron el extracto HR21-6 procedente de *Bacillus pumilus* (100 mg) y gel de sílice (63-200 μm , 200 mg). La suspensión se agitó a 40 °C durante 48 h, tras lo cual se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH_2Cl_2 -MeOH (40:1 \rightarrow 10:1) obteniendo **30** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 54 mg, 79%. R_F 0.5 (CH_2Cl_2 -MeOH 10:1)

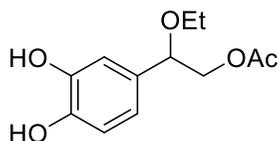
IR ν (cm^{-1}): 1389, 1367, 1235, 1114, 1036.

^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 6.80 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.0$ Hz, H-5'), 6.79 (d, 1H, $J_{2',6'} = 2.0$ Hz, H-2'), 6.68 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.0$ Hz, $J_{6',2'} = 2.0$ Hz, H-6'), 4.32 (dd, 1H, $J_{2,1a} = 8.0$ Hz, $J_{2,1b} = 3.9$ Hz, H-2), 4.18 y 4.07 (dd, 2H cada uno, $J_{1a,1b} = 11.4$ Hz, $J_{1a,2} = 8.0$ Hz, $J_{1b,2} = 3.9$ Hz, H-1), 3.25 (s, 3H, OMe), 2.06 (s, 3H, OAc).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 173.6 (CO), 147.5 (C-3' y C-4'), 131.4 (C-1'), 120.7 (C-6'), 117.2 (C-5'), 115.8 (C-2'), 83.4 (C-2), 69.5 (C-1), 57.7 (OMe), 21.6 (OAc).

HRCI m/z calculado para $[M]^+$ $C_{11}H_{14}O_5$: 226.0841,
encontrado 226.0850.

Acetato de 2-(3',4'-dihidroxifenil)-2-etoxietilo (31)



Método A: A una disolución de **2** (60 mg, 0.18 mmol) en EtOH (6 ml) se añadieron el extracto 2B122 procedente de *Terribacillus* (60 mg) y gel de sílice (63-200 μ m, 100 mg). La suspensión se agitó a 40 °C durante 48 h. Se añadieron otros 57 mg de extracto enzimático y se continuó con la agitación a t.a. durante 48 h. Se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH_2Cl_2 -EtOH (40:1) obteniendo **31** como un sirupo incoloro.

Método B: A una disolución de **2** (60 mg, 0.18 mmol) en EtOH (6 ml) se añadieron el extracto HR21-6 procedente de *Bacillus pumilus* (60 mg) y gel de sílice (63-200 μ m, 120 mg). La suspensión se agitó a 60 °C durante 24 h, tras lo cual se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH_2Cl_2 -EtOH (40:1) obteniendo **31** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 23 mg, 55%, R_F 0.5 (CH_2Cl_2 -MeOH 10:1)

IR ν (cm^{-1}): 3368, 1713, 1232, 1109, 1035.

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 6.89 (d, 1H, $J_{2',6'} = 2.0$ Hz, H-2'), 6.83 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.1$ Hz, H-5'), 6.72 (dd,

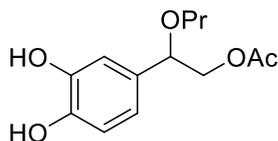
8.2. Nuevas investigaciones

1H, $J_{6',5'} = 8.1$ Hz, $J_{6',2'} = 2.0$ Hz, H-6'), 4.42 (dd, 1H, $J_{2,1a} = 6.9$ Hz, $J_{2,1b} = 5.0$ Hz, H-2), 4.20-4.12 (m, 2H, H-1), 3.43 (cc, 2H, $J_{1a'',1b''} = 16.4$ Hz, $J_{1'',2''} = 9.4$ Hz, CH₂ OEt), 2.06 (s, 3H, OAc), 1.17 (t, 3H, $J_{2'',1''} = 7.0$ Hz, CH₃ OEt).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 172.0 (CO), 144.5 (C-4'), 144.4 (C-3'), 131.0 (C-1'), 119.9 (C-6'), 115.5 (C-5'), 113.9 (C-2'), 79.6 (C-2), 68.4 (C-1), 64.8 (OCH₂ Et), 21.3 (OAc), 15.4 (CH₃ Et).

HRCI m/z calculado para [M]⁺ C₁₂H₁₆O₅: 240.0998, encontrado 240.0990.

Acetato de 2-(3',4'-dihidroxifenil)-2-propoxietilo (**32**)



Método A: A una disolución de **2** (54 mg, 0.16 mmol) en PrOH (5 ml) se añadieron el extracto 2B122 procedente de *Teribacillus* (55 mg) y gel de sílice (63-200 μm, 102 mg). La suspensión se agitó a 40 °C durante 48 h. Se añadieron otros 50 mg de extracto 2B122 y se continuó con la agitación durante 120 h. Se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt-hexano (1:3 → 1:1) obteniendo **32** como un sirupo incoloro.

Método B: A una disolución de **2** (190 mg, 0.56 mmol) en PrOH (4 ml) se añadieron el extracto HR21-6 procedente de *Bacillus pumilus*

(190 mg) y gel de sílice (63–200 μm , 400 mg). La suspensión se agitó a 60 °C durante 48 h, tras lo cual se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt–hexano (1:3 \rightarrow 1:1) obteniendo **32** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 81.4 mg, 57%, R_F 0.6 (AcOEt–hexano 1:3 \rightarrow 1:1)

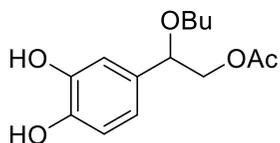
IR ν (cm^{-1}): 3368, 1714, 1230, 1109, 1003.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6.90 (d, 1H, $J_{2',6'} = 2.0$ Hz, H-2'), 6.84 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.1$ Hz, H-5'), 6.73 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.1$ Hz, $J_{6',2'} = 2.0$ Hz, H-6'), 4.41 (dd, 1H, $J_{2,1a} = 7.6$ Hz, $J_{2,1b} = 4.5$ Hz, H-2), 4.21–4.10 (m, 2H, H-1), 3.40–3.24 (m, 2H, OCH_2 Pr), 2.06 (s, 3H, OAc), 1.59 (sext, 2H, $J = 7.4$ Hz, CH_2 Pr), 0.88 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH_3 Pr).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171.9 (CO), 144.4 (C-4'), 144.3 (C-3'), 131.2 (C-1'), 120.0 (C-6'), 115.5 (C-5'), 113.9 (C-2'), 79.7 (C-2), 71.1 (C-1), 68.4 (OCH_2 Pr), 23.1 (CH_2 Pr), 21.3 (OAc), 10.8 (CH_3 Pr).

HRCI m/z calculado para $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5$: 254.1154, encontrado 254.1148.

Acetato de 2-(3',4'-dihidroxifenil)-2-butoxietilo (**33**)



8.2. Nuevas investigaciones

Método A: A una disolución de **2** (104 mg, 0.31 mmol) en BuOH (3 ml) se añadieron el extracto 2B122 procedente de *Terribacillus* (104 mg) y gel de sílice (63–200 μm , 200 mg). La suspensión se agitó a 40 °C durante 48 h. Se añadieron otros 100 mg de extracto 2B122 y se continuó con la agitación durante 120 h. Se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt–hexano (1:2 \rightarrow 1:1) obteniendo **33** como un sirupo incoloro.

Método B: A una disolución de **2** (190 mg, 0.56 mmol) en BuOH (4 ml) se añadieron el extracto HR21-6 procedente de *Bacillus pumilus* (190 mg) y gel de sílice (63–200 μm , 380 mg). La suspensión se agitó a 60 °C durante 40 horas tras lo cual, se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt–hexano (1:2) obteniendo **33** como un sirupo incoloro.

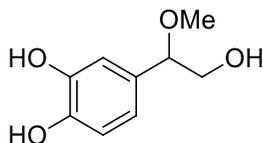
Rendimiento: 91 mg, 61%, R_F 0.6 (CH₂Cl₂–MeOH 10:1)

IR ν (cm⁻¹): 3361, 2960, 1711, 1232, 1036.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6.90 (d, 1H, $J_{2',6'} = 1.9$ Hz, H-2'), 6.84 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.0$ Hz, H-5'), 6.73 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.0$ Hz, $J_{6',2'} = 1.9$ Hz, H-6'), 6.50 y 5.95 (2s, 1H cada uno, 2 OH), 4.44 (dd, 1H, $J_{2,1a} = 7.7$ Hz, $J_{2,1b} = 4.4$ Hz, H-2), 4.22-4.10 (m, 2H, H-1), 3.45-3.28 (m, 2H, OCH₂ Bu), 2.07 (s, 3H, OAc), 1.55 (c, 2H, $J = 6.6$ Hz, CH₂ Bu), 1.39-1.25 (m, 2H, CH₂ Bu), 0.86 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH₃ Bu).

^{13}C -RMN	(75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 172.1 (CO), 144.4 (C-4'), 144.3 (C-3'), 131.1 (C-1'), 120.0 (C-6'), 115.5 (C-5'), 113.9 (C-2'), 79.7 (C-2), 69.2 (OCH ₂ Bu), 68.4 (C-1), 32.0 (CH ₂ Bu), 21.3 (OAc), 19.6 (CH ₂ Bu), 14.2 (CH ₃ Bu).
HRCI	m/z calculado para $[\text{M}]^+$ C ₁₄ H ₂₀ O ₅ : 268.1311, encontrado 268.1320.

2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-metoxietanol (**34**)



A una disolución de **3** (60 mg, 0.35 mmol) en MeOH (1.5 ml) se añadió AcCl (6.2 μl , 0.35 mmol) y se agitó a ta durante 1 h. Concluida la reacción, se neutralizó con NaHCO_3 , se microfiltró y se concentró a sequedad, resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como CH_2Cl_2 -MeOH (1:0 \rightarrow 1:20) obteniendo **34** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 70 mg, cuant., R_F 0.2 (CH_2Cl_2 -MeOH 10:1)

IR	ν (cm^{-1}): 3315, 1520, 1281, 1198, 1104, 1064, 1029.
^1H -RMN	(300 MHz, D_2O): δ (ppm) 6.94 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.1$ Hz, H-5'), 6.89 (d, 1H, $J_{2',6'} = 2.0$ Hz, H-2'), 6.80 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.1$ Hz, $J_{6',2'} = 2.0$ Hz, H-6'), 4.80 (s, 3H, OH), 4.29 (dd, 1H, $J_{2,1a} = 7.5$ Hz, $J_{2,1b} = 4.6$ Hz, H-2), 3.71

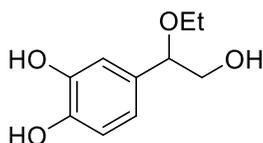
8.2. Nuevas investigaciones

y 3.64 (2dd, 1H cada uno, $J_{1a,1b} = 11.9$ Hz, $J_{1a,2} = 7.5$ Hz, $J_{1b,2} = 4.6$ Hz, H-1), 3.27 (s, 3H, OMe).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, D_2O): δ (ppm) 144.1 (C-4'), 144.0 (C-3'), 130.5 (C-1'), 119.8 (C-6'), 116.1 (C-2'), 114.7 (C-3'), 83.6 (C-2), 65.0 (C-1), 56.0 (OMe).

HRCI m/z calculado para $[\text{M}]^+$ $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$: 184.0736, encontrado 184.0735.

2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-etoxietanol (**35**)



Método A: A una disolución de **31** (25 mg, 0.10 mmol) en MeOH seco (1 ml) se añadieron Cs_2CO_3 (66 mg, 0.20 mmol) y ascorbato sódico (20 mg, 0.10 mmol) en presencia de Ar y en oscuridad. Se agitó a t.a. durante 3 h y se purificó, sembrando en gel de sílice, mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH_2Cl_2 -EtOH (1:0 \rightarrow 1:10) obteniendo **35** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 12.4 mg, 62%

Método B: A una disolución de **3** (60 mg, 0.35 mmol) en EtOH absoluto (1.5 ml) se añadió AcCl (6.2 μl , 0.35 mmol) y se agitó a t.a. durante 45 min. Concluida la reacción, se neutralizó con NaHCO_3 , se microfiltró y se concentró a sequedad, resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como CH_2Cl_2 -MeOH (1:0 \rightarrow 1:20) obteniendo **35** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 60 mg, 90%, R_F 0.3 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1)

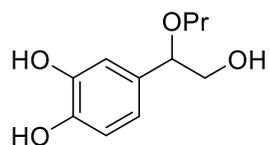
IR ν (cm⁻¹): 3347, 1280, 1092, 1082.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 6.91 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.1$ Hz, H-5'), 6.88 (d, 1H, $J_{2',6'} = 1.8$ Hz, H-2'), 6.80 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.1$ Hz, $J_{6',2'} = 2.0$ Hz, H-6'), 4.84 (s, 3H, OH), 4.38 (dd, 1H, $J_{2,1a} = 7.7$ Hz, $J_{2,1b} = 4.4$ Hz, H-2), 3.70 y 3.61 (2dd, 1H cada uno, $J_{1a,1b} = 11.7$ Hz, $J_{1a,2} = 8.0$ Hz, $J_{1b,2} = 4.4$ Hz, H-1), 3.48 (c, 2H, $J_{1'',2''} = 6.9$ Hz, OCH₂ Et), 1.19 (t, 3H, $J_{2'',1''} = 7.1$ Hz, CH₃ OEt).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 146.1 (C-4'), 145.9 (C-3'), 133.1 (C-1'), 121.3 (C-6'), 117.7 (C-5'), 116.3 (C-2'), 83.9 (C-2), 67.3 (C-1), 66.3 (OCH₂ Et), 16.1 (CH₃ Et).

HRCI m/z calculado para [M + H]⁺ C₁₀H₁₅O₄: 199.0970, encontrado 199.0972.

2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-propoxietanol (36)



Método A: A una disolución de **32** (55 mg, 0.22 mmol) en MeOH seco (1 ml) se añadieron Cs₂CO₃ (66 mg, 0.20 mmol) y ascorbato sódico (40 mg, 0.20 mmol) en presencia de Ar y en oscuridad. Se agitó a t.a. durante 2 h y se purificó, sembrando en gel de sílice, mediante

8.2. Nuevas investigaciones

cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt–hexano (1:1) obteniendo **36** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 14.5 mg, 31%

Método B: A una disolución de **3** (60 mg, 0.35 mmol) en PrOH (2 ml) se añadió AcCl (6.2 μ l, 0.35 mmol) y se agitó a t.a. durante 45 min. Concluida la reacción, se neutralizó con NaHCO₃, se microfiltró y se concentró a sequedad, resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como CH₂Cl₂–MeOH (1:0 \rightarrow 1:10) obteniendo **36** como un sirupo incoloro.

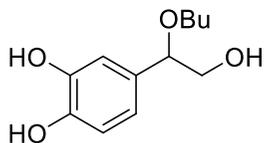
Rendimiento: 80 mg, cuant., R_F 0.1 (AcOEt–hexano 1:1)

IR ν (cm⁻¹): 3338, 2928, 1281, 1101, 1021.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 6.78 (d, 1H, $J_{2',6'} = 1.9$ Hz, H-2'), 6.76 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.0$ Hz, H-5'), 6.65 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.0$ Hz, $J_{6',2'} = 2.0$ Hz, H-6'), 4.86 (s, 3H, OH), 4.22 (dd, 1H, $J_{2,1a} = 8.0$ Hz, $J_{2,1b} = 4.1$ Hz, H-2), 3.64 y 3.51 (2dd, 1H cada uno, $J_{1a,1b} = 11.6$ Hz, $J_{1a,2} = 8.0$ Hz, $J_{1b,2} = 4.1$ Hz, H-1), 3.37-3.29 (m, 2H, OCH₂ Pr), 1.61 (m, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH₂ Pr), 0.93 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, CH₃ Pr).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 147.3 (C-4'), 146.9 (C-3'), 133.3 (C-1'), 120.6 (C-6'), 117.0 (C-5'), 115.8 (C-2'), 85.2 (C-2), 72.5 (C-1), 68.9 (OCH₂ Pr), 24.9 (CH₂ Pr), 11.8 (CH₃ Pr).

HRCI m/z calculado para [M + Na]⁺ C₁₁H₁₆NaO₄: 235.0941, encontrado 235.0939.

2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-butoxietanol (37)

Método A: A una disolución de **33** (78 mg, 0.29 mmol) en MeOH seco (2 ml), se añadieron Cs_2CO_3 (280 mg, 0.88 mmol) y ascorbato sódico (58 mg, 0.29 mmol) en presencia de Ar y en oscuridad. Se agitó a t.a. durante 3 h y se purificó, sembrando en gel de sílice, mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt–hexano (1:1) obteniendo **37** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 28.1 mg, 43%, R_F 0.3 (CH_2Cl_2 –MeOH 10:1)

Método B: A una disolución de **3** (60 mg, 0.35 mmol) en BuOH (2 ml) se añadió AcCl (6.2 μl , 0.35 mmol) y se agitó a t.a. durante 45 min. Concluida la reacción, se neutralizó con NaHCO_3 , se microfiltró y se concentró a sequedad, resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH_2Cl_2 –MeOH (1:0 → 1:10) obteniendo **37** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 79 mg, cuant.

IR ν (cm^{-1}): 3317, 2956, 1281, 1098, 1023.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6.84 (d, 1H, $J_{2',6'} = 1.8$ Hz, H-2'), 6.83 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.0$ Hz, H-5'), 6.72 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.0$ Hz, $J_{6',2'} = 1.8$ Hz, H-6'), 6.04 (sa, 3H, OH), 4.29 (dd, 1H, $J_{1,2a} = 7.8$ Hz, $J_{1,2b} = 4.4$ Hz, H-1), 3.69-3.57 (m, 2H, H-2), 3.47-3.28 (m, 2H, OCH_2

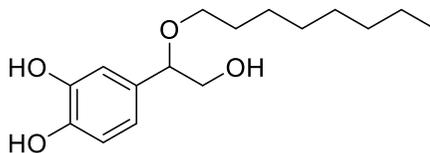
8.2. Nuevas investigaciones

Bu), 1.60-1.51 (m, 2H, CH₂ Bu), 1.43-1.26 (m, 2H, CH₂ Bu), 0.88 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₃ Bu).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 144.3 (C-4'), 144.2 (C-3'), 131.8 (C-1'), 119.9 (C-6'), 115.7 (C-5'), 114.1 (C-2'), 82.5 (C-1), 69.2 (CH₂ OBU), 67.6 (C-2), 32.2 (CH₂ OBU), 19.7 (CH₂ OBU), 14.2 (CH₃ OBU).

HRCI *m/z* calculado para [M]⁺ C₁₂H₁₈O₄: 249.1097, encontrado 249.1087.

2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-octiloxietanol (**38**)



A una disolución de **3** (30 mg, 0.17 mmol) en 1,4-dioxano (1 ml) provisto de tamiz molecular 3Å se añadieron octanol (186 µl, 1.76 mmol) y AcCl (51.2 µl, 0.71 mmol) y se agitó a t.a. durante 1 h. Concluida la reacción, se neutralizó con NaHCO₃, se microfiltró y se concentró a sequedad, resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (80:1 → 50:1) obteniendo **38** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 19 mg, 36% *R_F* 0.5 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1)

IR ν (cm⁻¹): 3320, 2959, 1284, 1100, 1021.

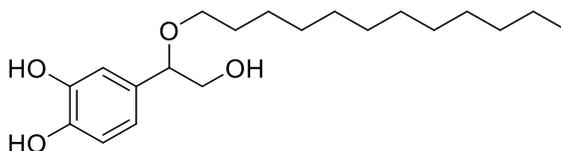
¹H-RMN (CDCl₃ 300 MHz): δ (ppm) 6.75 (d, 1H, *J*_{2',6'} = 2.1 Hz, H-2'), 6.74 (d, 1H, *J*_{5',6'} = 8.1 Hz, H-5'), 6.62 (dd,

1H, $J_{6',5'} = 8.1$ Hz, $J_{6',2'} = 2.1$ Hz, H-6'), 4.18 (dd, 1H, $J_{2,1a} = 8.1$ Hz, $J_{2,1b} = 4.2$ Hz, H-2), 3.61 y 3.48 (2dd, 1H cada uno, $J_{1a,1b} = 11.4$ Hz, $J_{1a,2} = 8.1$ Hz, $J_{1b,2} = 4.2$ Hz, H-1), 3.40-3.27 (m, 2H, OCH₂ octilo), 1.56 (m, 2H, CH₂ octilo), 1.27 (m, 10H, 7 CH₂ octilo), 0.89 (t, 3H, $J = 6.6$ Hz, CH₃ octilo).

¹³C-RMN (CDCl₃ 75.5 MHz): δ (ppm) 146.4 (C-4'), 146.1 (C-3'), 132.5 (C-1'), 119.7 (C-6'), 116.1 (C-5'), 115.0 (C-2'), 84.4 (C-2), 69.9 (OCH₂ octilo), 68.0 (C-1), 33.0, 30.9, 30.5, 30.4, 27.2, 23.7 (6 CH₂ octilo), 14.4 (CH₃ octilo).

HRCI m/z calculado para $[M + Na]^+$ C₁₆H₂₄O₆: 305.1723, encontrado 305.1712.

2-(3',4'-Dihidroxifenil)-2-dodeciloxietanol (**39**)



A una disolución de **3** (32 mg, 0.19 mmol) en 1,4-dioxano (1 ml) provisto de tamiz molecular 3 Å se añadieron dodecanol (450 μ l, 1.93 mmol) y AcCl (13.5 μ l, 0.19 mmol) y se agitó a t.a. durante 8 h. Concluida la reacción, se neutralizó con NaHCO₃, se microfiltró y se concentró a sequedad, resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (80:1) obteniendo **39** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 51 mg, 80% R_F 0.5 (CH₂Cl₂–MeOH 10:1)

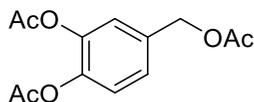
IR ν (cm⁻¹): 3331, 2952, 1280, 1102, 1030.

¹H-RMN (CDCl₃ 300 MHz): δ (ppm) 6.75 (d, 1H, $J_{2',6'} = 2.1$ Hz, H-2'), 6.74 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8.1$ Hz, H-5'), 6.62 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8.1$ Hz, $J_{6',2'} = 2.1$ Hz, H-6'), 4.18 (dd, 1H, $J_{2,1a} = 8.1$ Hz, $J_{2,1b} = 4.2$ Hz, H-2), 3.62 y 3.49 (2dd, 1H cada uno, $J_{1a,1b} = 11.4$ Hz, $J_{1a,2} = 8.1$ Hz, $J_{1b,2} = 4.2$ Hz, H-1), 3.38-3.27 (m, 2H, OCH₂ dodecilo), 1.27 (m, 20H, 10 CH₂ dodecilo), 0.89 (t, 3H, $J = 6.6$ Hz, CH₃ dodecilo).

¹³C-RMN (CDCl₃ 75.5 MHz): δ (ppm) 146.4 (C-4'), 146.1 (C-3'), 132.4 (C-1'), 119.7 (C-6'), 116.1 (C-5'), 115.0 (C-2'), 84.4 (C-1), 69.9 (CH₂ O-Dodecilo), 68.0 (C-2), 33.1, 30.9, 30.7, 30.5, 30.4, 27.2, 23.7 (10 CH₂ O-Dodecilo), 14.5 (CH₃ O-Dodecilo).

HRCI m/z calculado para [M + Na]⁺ C₂₀H₃₄O₄: 361.2349, encontrado 361.2345.

Diacetato de 4-(acetoximetil)-1,2-fenileno (40)



Se disolvió **119** (104 mg, 0.75 mmol) en una mezcla de Ac₂O/Py 1:1 (v/v, 2 ml) a 0 °C durante 10 min. Pasado ese tiempo se dejó a t.a. toda la noche. Se hidrolizó con hielo y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en

columna usando como eluyente AcOEt–ciclohexano (1:10) obteniendo **40** como un sirupo incoloro.

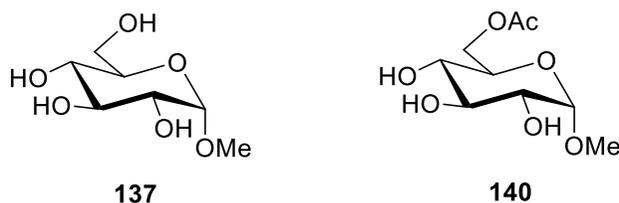
Rendimiento: 190 mg, cuant. R_F 0.5 (AcOEt–ciclohexano 1:10)

IR ν (cm^{-1}): 1767, 1738, 1200, 1179, 1110, 1013.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.24 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, $J_{5,3} = 2.0$ Hz, H-5), 7.21 (d, 1H, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, H-3) 7.17 (d 1H, $J_{6,5} = 8.2$ Hz, H-6), 5.08 (s, 2H, CH_2), 2.29, 2.28 y 2.10 (3s, 3H cada uno, 3 OAc).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171.0 y 168.5 (3 CO), 142.4 (C-1), 142.3 (C-2), 135.1 (C-4), 126.8 (C-5), 123.9 (C-6), 123.7 (C-3), 65.5 (CH_2), 21.3, 21.0 y 20.9 (3 OAc).

Procedimiento de desacetilación de metil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosido (**144**) mediante el empleo de lipasas



Método A: Una suspensión de **144** (6.0 mg, 17 μmol) y el extracto enzimático (3.0 mg) en CD_3OD (1.0 ml) se agitó a t.a. durante el tiempo indicado para cada caso. Para los casos donde fueron usadas lipasas comerciales (*Pseudomonas cepacea* y *Candida antártica*), se usó una relación (p/p) de 1:1.5 carbohidrato-lipasa, calentado a 60 $^\circ\text{C}$ durante 22 h de reacción en CD_3OD (1.0 ml). A continuación, la reacción

se filtró y el crudo se analizó mediante ^1H -RMN.

Método B: La reacción se realizó según el método A, pero sustituyendo CD_3OD por MeOH en 8.5 h. La reacción se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH_2Cl_2 -MeOH (1:0 \rightarrow 1:2) obteniendo el glucósido desprotegido **137** (1.6 mg, 48%) y el 6-*O*-acetilado **140** (1.3 mg, 33%). Los datos espectroscópicos para el **140** están en concordancia con los publicados en la literatura.²⁷¹

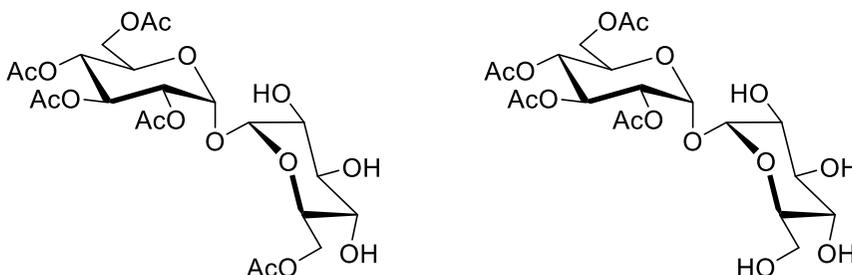
^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 4.65 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.8$ Hz, H-1), 4.36 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 2.3$ Hz, $J_{6a,6b} = 11.7$ Hz, H-6a), 4.19 (dd, 1H, $J_{5,6b} = 5.9$ Hz, H-6b), 3.70 (ddd, 1H, $J_{4,5} = 9.9$ Hz, H-5), 3.61 (t, 1H, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-4), 3.45 (m, 1H, H-2), 3.40 (s, 3H, OMe), 3.28 (m, 1H, H-3), 2.06 (s, 3H, OAc).

Procedimiento general de desacetilación de la trehalosa per-*O*-acetilada **145 mediante el empleo de lipasas**

Una suspensión de trehalosa per-*O*-acetilada **145** (6.0 mg, 8.8 μmol) y el correspondiente extracto enzimático (3.0 mg) en CD_3OD (1.0 ml) se agitó a t.a. durante el tiempo indicado para cada caso. Luego, la reacción se filtró y el residuo se analizó mediante ^1H -RMN.

²⁷¹ Kurahashi, T; Mizutani, T; Yoshida, JI. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8669–8677.

2,3,4,6,6'-Penta-*O*-acetiltrehalosa (42) y 2,3,4,6-tetra-*O*-acetiltrehalosa (43)



Una suspensión de trehalosa per-*O*-acetilada **145** (60 mg, 88.0 μmol) y el extracto enzimático HR21-6 procedente de *Bacillus pumilus* (30.0 mg) en MeOH (20 ml) se agitó a t.a. durante 3.5 h. La reacción se concentró a sequedad, resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH_2Cl_2 -MeOH (1:0 \rightarrow 1:2) obteniendo **42** y **43** como sirupos.

Datos de **42**: Rendimiento: 14 mg (29%). $[\alpha]_D^{26} +75$

^1H -RMN (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 5.57 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 5.30 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1), 5.07 (dd, 1H, $J_{4,5} = 10.3$ Hz, H-4), 5.04 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.7$ Hz, H-1'), 4.94 (dd, 1H, H-2), 4.43 (ddd, 1H, $J_{5,6a} = 4.1$ Hz, $J_{5,6b} = 2.4$ Hz, H-5), 4.28 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 2.0$ Hz, $J_{6a',6b'} = 11.7$ Hz, H-6a'), 4.24 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, H-6a), 4.15 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 7.3$ Hz, H-6b'), 4.12 (dd, 1H, H-6b), 3.82 (ddd, 1H, $J_{4',5'} = 9.7$ Hz, H-5'), 3.74 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 9.7$ Hz, $J_{3',4'} = 9.1$ Hz, H-3'), 3.51 (dd, 1H, H-2'), 3.26 (dd, 1H, H-4'), 2.08, 2.05 (x2), 2.01, 2.00 (5s, 3H cada uno, 5 OAc).

8.2. Nuevas investigaciones

^{13}C -RMN (125.7 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 172.7, 172.4, 171.7, 171.5, 171.3 (5 CO), 96.3 (C-1'), 92.8 (C-1), 74.6 (C-3'), 72.8 (C-2'), 72.2 (C-5'), 72.0 (C-4'), 71.9 (C-2), 71.5 (C-3), 69.9 (C-4), 69.1 (C-5), 65.0 (C-6'), 62.9 (C-6).

HRLSI m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{NaO}_{16}$: 575.1588, encontrado 575.1598.

Datos de **43**: Rendimiento: 22 mg (49%). $[\alpha]_{\text{D}}^{26} +108$

^1H -RMN (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 5.55 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.2$ Hz, $J_{3,4} = 9.5$ Hz, H-3), 5.34 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.7$ Hz, H-1), 5.07 (dd, 1H, $J_{4,5} = 10.3$ Hz, H-4), 5.05 (d, 1H, $J_{1',2'} = 3.3$ Hz, H-1'), 4.96 (dd, 1H, H-2), 4.46 (ddd, 1H, $J_{5,6a} = 3.8$ Hz, $J_{5,6b} = 2.4$ Hz, H-5), 4.23 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 12.4$ Hz, H-6a), 4.12 (dd, 1H, H-6b), 3.75 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 2.1$ Hz, $J_{6a',6b'} = 11.3$ Hz, H-6a'), 3.75 (t, 1H, $J_{3',4'} = 9.7$ Hz, H-3'), 3.70 (ddd, 1H, $J_{4',5'} = 9.8$ Hz, $J_{5',6b'} = 5.7$ Hz, H-5'), 3.65 (dd, 1H, H-6b'), 3.50 (dd, 1H, H-2'), 3.31 (m, 1H, H-4'), 2.06, 2.05, 2.01, 1.99 (4s, 3H cada uno, 4 OAc).

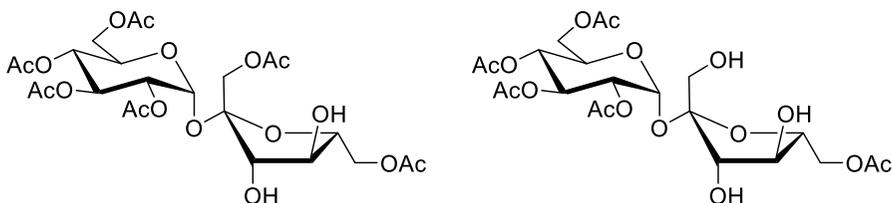
^{13}C -RMN (125.7 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 172.4, 171.7, 171.6, 171.3 (4 CO), 96.8 (C-1'), 93.3 (C-1), 74.7 (C-3', C-5'), 72.9 (C-2'), 71.7 (x2), 71.6 (C-2, C-3, C-4'), 69.9 (C-4), 69.0 (C-5), 62.9 (C-6), 62.6 (C-6').

HRLSI m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{NaO}_{15}$: 533.1482, encontrado 533.1495.

Procedimiento general de desacetilación de la sacarosa peracetilada **146** mediante el empleo de lipasas

Una suspensión de **146** (6.0 mg, 8.8 μmol) y el extracto enzimático que corresponda (3.0 mg) en CD_3OD (1.0 ml) se agitó a t.a. durante el tiempo indicado para cada caso. A continuación, la reacción se filtró y el residuo se analizó mediante ^1H -RMN.

2,3,4,6,1',6'-Hexa-*O*-acetilsacarosa (**44**) y 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetilsacarosa (**45**)



Una suspensión de **146** (50 mg, 74.0 μmol) y el extracto enzimático HR21-6 procedente de *Bacillus pumilus* (25.0 mg) en MeOH (16 mL) se agitó t.a. durante 4 h. La reacción se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH_2Cl_2 -MeOH (1:0 \rightarrow 1:2) obteniendo **44** y **45** como sirupos. Los datos espectroscópicos para **44** y **45** están en concordancia con los publicados en la bibliografía.¹⁵⁴

Datos para **44**: Rendimiento: 11.2 mg, 26%

^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 5.64 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.6$ Hz, H-1), 5.50 (t, 1H, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.9$ Hz, H-3), 5.01 (dd, 1H, $J_{4,5} = 9.5$ Hz, H-4), 4.89 (dd, 1H, H-2), 4.41

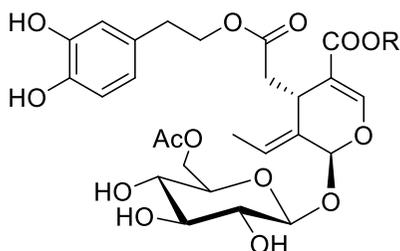
8.2. Nuevas investigaciones

(ddd, 1H, $J_{5,6a} = 2.9$ Hz, $J_{5,6b} = 4.5$ Hz, H-5), 4.32–4.30 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.17–4.06 (m, 5H, H-6a, H-6b, H-1a', H-1b', H-6a'), 4.03 (t, 1H, $J_{5',6b'} = J_{6a',6b'} = 8.4$ Hz, H-6b'), 3.89 (ddd, 1H, $J_{4',5'} = 9.9$ Hz, $J_{5',6a'} = 3.9$ Hz, H-5'), 2.09, 2.08 (x2), 2.07, 2.02, 1.98 (6s, 3H cada uno, 6 OAc).

Datos para **45**: Rendimiento: 10.9 mg, 27%

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 5.64 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, H-1), 5.49 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9.6$ Hz, $J_{3,4} = 10.3$ Hz, H-3), 5.00 (dd, 1H, $J_{4,5} = 9.4$ Hz, H-4), 4.83 (dd, 1H, H-2), 4.41 (ddd, 1H, $J_{5,6a} = 2.9$ Hz, $J_{5,6b} = 4.5$ Hz, H-5), 4.33–4.30 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.23–4.16 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-6a'), 4.05 (t, 1H, $J_{5',6b'} = J_{6a',6b'} = 8.6$ Hz, H-6b'), 3.89 (ddd, 1H, $J_{4',5'} = 9.9$ Hz, $J_{5',6a'} = 3.6$ Hz, H-5'), 3.58 (d, 1H, $J_{1a',1b'} = 11.9$ Hz, H-1a'), 3.40 (d, 1H, H-1b'), 2.08, 2.07, 2.04, 2.20, 1.98 (5s, 3H cada uno, 5 OAc).

6''-O-Acetil oleuropeína (46)



A una disolución de **71** (50 mg, 0.09 mmol) en $t\text{BuOH}$ anhidro (3 ml) se añadieron acetato de vinilo (173 μl , 1.85 mmol) y lipasa

Thermomyces lanuginosus soportada en Immobed (150 mg), y se agitó a 60 °C durante 20 h. Se filtró y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (30:1) obteniendo **46** como un sirupo amarillo.

Rendimiento: 30 mg, 57% *R*_F 0.3 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1). [α]_D²² -96

IR ν (cm⁻¹): 3350, 2928, 2851, 1738, 1714, 1634, 1516, 1444, 1273, 1244, 1128, 975.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 7.52 (s, 1H, H-3), 6.69 (d, 1H, *J*_{7',8'} = 8.0 Hz, H-7'), 6.64 (d, 1H, *J*_{4',8'} = 2.0 Hz, H-4'), 6.53 (dd, 1H, *J*_{8',7'} = 8.0 Hz, *J*_{8',4'} = 2.0, H-8'), 6.07 (c, 1H, *J*_{8,10} = 7.1 Hz, H-8), 5.83 (m, 1H, H-1), 4.80 (d, 1H, *J*_{1'',2''} = 7.7 Hz, H-1''), 4.36 (dd, 1H, *J*_{6'',a,6''b} = 12.0 Hz, *J*_{6'',a,5''} = 2.2 Hz, H-6''a), 4.25-4.06 (m, 3H, H-6''b, H-1'), 3.96 (dd, 1H, *J*_{5,6a} = 9.2 Hz, *J*_{5,6b} = 4.5 Hz, H-5), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.65-3.36 (m, 3H, H-2'', H-3'', H-4''), 2.73 (t, 2H, *J*_{2',1'} = 7.1 Hz, H-2'), 2.72 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} = 13.9 Hz, *J*_{6a,5} = 4.5 Hz, H-6a), 2.40 (dd, 1H, *J*_{6b,6a} = 13.9 Hz, *J*_{6b,5} = 9.2 Hz, H-6b), 1.99 (s, 3H, Ac), 1.65 (dd, 3H, *J*_{10,8} = 7.1 Hz, *J*_{10,1} = 1.4 Hz, H-10).

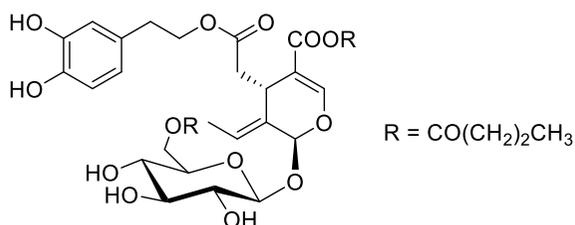
¹³C-RMN (75.5 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 172.9 (C-7), 172.8 (CO Glc), 168.6 (COOMe), 155.1 (C-3), 146.2 (C-5'), 144.9 (C-6'), 130.7 (C-3'), 130.2 (C-9), 125.1 (C-8), 121.3 (C-8'), 117.0 (C-4'), 116.5 (C-7'), 109.4 (C-4), 101.2 (C-1''), 95.5 (C-1), 77.7 (C-5''), 75.5 (C-3''), 74.6 (C-2''), 71.4 (C-4''), 66.8 (C-1'), 64.6

8.2. Nuevas investigaciones

(C-6''), 51.9 (COOMe), 41.2 (C-6), 35.4 (C-2'), 31.8 (C-5), 20.7 (Ac), 13.5 (C-10).

HRLSI m/z calculado para $[M + Na]^+$ $C_{27}H_{34}NaO_{14}$: 605.1841, encontrado 605.1836.

6''-*O*-Butanoil oleuropeína (47)



A una disolución de **71** (20 mg, 0.04 mmol) en t BuOH anhidro (2 ml) se añadieron butanoato de vinilo (96 μ l, 0.75 mmol) y lipasa *Thermomyces lanuginosus* soportada en Immobed (80 mg), y se agitó a 60 °C durante 20 h. Se filtró y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH_2Cl_2 -MeOH (10:1) obteniendo **47** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 17 mg, 74% R_F 0.3 (CH_2Cl_2 -MeOH 10:1). $[\alpha]_D^{21} -76$

IR ν (cm^{-1}): 3350, 2920, 2859, 1740, 1714, 1634, 1510, 1445, 1273, 1244, 1129, 973.

1H -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 7.52 (s, 1H, H-3), 6.69 (d, 1H, $J_{7',8'} = 8.0$ Hz, H-7'), 6.64 (d, 1H, $J_{4',8'} = 2.0$ Hz, H-4'), 6.53 (dd, 1H, $J_{8',7'} = 8.0$ Hz, $J_{8',4'} = 2.0$, H-8'), 6.07 (c, 1H, $J_{8,10} = 8.0$ Hz, H-8), 5.82 (m, 1H, H-1), 4.80 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 7.8$ Hz, H-1''), 4.42 (dd, 1H, $J_{6''a,6''b} = 11.9$ Hz, $J_{6''a,5''} = 2.1$ Hz, H-6''a), 4.24-4.04

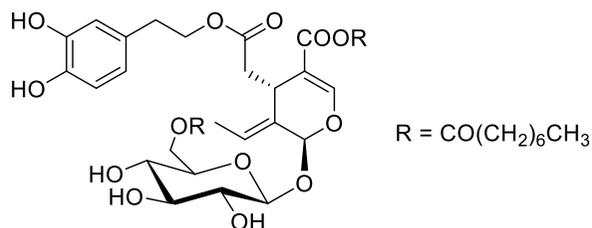
(m, 3H, H-6''b, H-1'), 3.97 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 9.2$ Hz, $J_{5,6b} = 4.5$ Hz, H-5), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.67-3.39 (m, 3H, H-2'', H-3'', H-4''), 2.73 (t, 2H, $J_{2,1'} = 7.1$ Hz, H-2'), 2.70 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 14.0$ Hz, $J_{6a,5} = 4.5$ Hz, H-6a), 2.39 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 14.0$ Hz, $J_{6b,5} = 9.2$ Hz, H-6b), 2.26 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.65 (dd, 3H, $J_{10,8} = 8.0$ Hz, $J_{10,1} = 1.3$ Hz, H-10), 1.58 (sext, 2H, $J = 7.4$ Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.89 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

¹³C-RMN

(75.5 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 175.2 (C-7), 172.9 (CO Glc), 168.6 (COOMe), 155.1 (C-3), 146.2 (C-5'), 144.5 (C-6'), 130.7 (C-3'), 130.2 (C-9), 125.2 (C-8), 121.3 (C-8'), 117.0 (C-4'), 116.5 (C-7'), 109.4 (C-4), 101.0 (C-1''), 95.3 (C-1), 77.8 (C-5''), 75.6 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.4 (C-4''), 66.9 (C-1'), 64.4 (C-6''), 51.9 (COOMe), 41.2 (C-6), 36.8 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 35.4 (C-2'), 31.8 (C-5), 19.4 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 14.0 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 13.5 (C-10).

HRLSI

m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+ \text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{NaO}_{14}$: 633.2154, encontrado 633.2146.

6''-O-Octanoil oleuropeína (48)

A una disolución de **71** (20 mg, 0.04 mmol) en ^tBuOH anhidro (2 ml) se añadieron octanoato de vinilo (147 μ l, 0.75 mmol) y lipasa *Thermomyces lanuginosus* soportada en Immobed (80 mg), y se agitó a 60 °C durante 20 h. Se filtró y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (20:1 \rightarrow 10:1) obteniendo **48** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 15 mg, 56% R_F 0.4 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1). $[\alpha]_D^{21}$ -96

IR ν (cm⁻¹): 3354, 2924, 2858, 1741, 1712, 1632, 1512, 1440, 1247, 1125, 975.

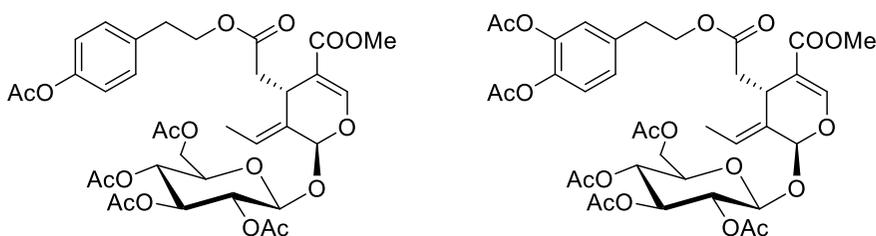
¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 7.52 (s, 1H, H-3), 6.69 (d, 1H, $J_{7',8'} = 8.0$ Hz, H-7'), 6.64 (d, 1H, $J_{4',8'} = 2.0$ Hz, H-4'), 6.52 (dd, 1H, $J_{8',7'} = 8.0$ Hz, $J_{8',4'} = 2.0$, H-8'), 6.07 (c, 1H, $J_{8,10} = 7.1$ Hz, H-8), 5.83 (m, 1H, H-1), 4.80 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 7.7$ Hz, H-1''), 4.42 (dd, 1H, $J_{6''a,6''b} = 11.9$ Hz, $J_{6''a,5''} = 2.1$ Hz, H-6''a), 4.24-4.04 (m, 3H, H-6''b, H-1'), 3.97 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 9.2$ Hz, $J_{5,6b} = 4.4$ Hz, H-5), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.46-3.34 (m, 3H, H-2'', H-3'', H-4''), 2.73 (t, 2H, $J_{2',1'} = 7.0$ Hz, H-2'), 2.70 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 14.0$ Hz, $J_{6a,5} = 4.5$ Hz, H-6a), 2.39 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 14.0$ Hz, $J_{6b,5} = 9.3$ Hz, H-6b), 2.28 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH₂ éster), 1.65 (dd,

3H, $J_{10,8} = 7.1$ Hz, $J_{10,1} = 1.4$ Hz, H-10), 1.55 (m, 2H, CH₂ éster), 1.26 (m, 8H, 4 CH₂ éster), 0.88 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH₃).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 175.4 (C-7), 172.9 (CO Glc), 168.6 (COOMe), 155.1 (C-3), 146.2 (C-5'), 145.0 (C-6'), 130.7 (C-3'), 130.2 (C-9), 125.2 (C-8), 121.3 (C-8'), 117.0 (C-4'), 116.5 (C-7'), 109.4 (C-4), 101.0 (C-1''), 95.3 (C-1), 77.8 (C-5''), 75.6 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.4 (C-4''), 66.9 (C-1'), 64.4 (C-6''), 51.9 (COOMe), 41.3 (C-6), 35.4 (CH₂ éster), 35.0 (C-2'), 32.8 (CH₂ éster), 31.8 (C-5), 30.2, 30.1, 26.0 y 23.7 (4 CH₂ éster), 14.4 (CH₃), 13.6 (C-10).

HRLSI m/z calculado para $[M + Na]^+$ C₃₃H₄₆NaO₁₄: 689.2780, encontrado 689.2771.

Penta-*O*-acetil ligstrósido (147) y hexa-*O*-acetil oleuropeína (148)



A partir de hojas de olivo del género *Picual* se realizó una extracción de ligstrósido y oleuropeína utilizando etanol acuoso (70:30 v/v) según el método descrito por Stamatopoulos *et al.*⁵⁷ La evaporación del disolvente dio como resultado un residuo que se acetiló en Ac₂O/piridina.

Tras la hidrólisis y evaporación del disolvente se procedió a la purificación del crudo de reacción mediante cromatografía en columna en AcOEt–ciclohexano (1:5 → 1:1) consiguiéndose aislar el ligstrósido per-*O*-acetilado **147** y la oleuropeína per-*O*-acetilada **148** como sirupos. Los datos espectroscópicos de **147** y **148** están en concordancia con los publicados en bibliografía.^{272,273}

Datos de **147**

IR	ν (cm ⁻¹): 2934, 2863, 1761, 1741, 1735, 1712, 1632, 1512, 1247, 1240, 1125, 975.
¹ H-RMN	(300 MHz, CDCl ₃): δ (ppm) 7.46 (s, 1H, H-3), 7.20 (m, 2H, H-5', H-7'), 7.01 (m, 2H, H-4', H-8'), 5.97 (c, 1H, $J_{10,8} = 7.1$ Hz, H-8), 5.69 (sa, 1H, H-1), 5.27 (t, 1H, $J_{3'',4''} = 9.3$ Hz, H-3''), 5.12 (t, 1H, $J_{2'',1''} = 9.5$ Hz, H-4''), 5.11 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 7.8$ Hz, H-2''), 5.03 (d, 1H, $J_{2'',1''} = 7.8$ Hz, H-1''), 4.28 (dd, 1H, $J_{6''b,6a''} = 12.5$ Hz, $J_{5'',6a''} = 4.7$ Hz, H-6''a), 4.20 (2dt, 1H cada uno, $J_{1'a,1'b} = 10.8$ Hz, $J_{2',1'} = 7.0$ Hz, H-1'), 4.10 (dd, 1H, $J_{6''a,6b''} = 12.5$ Hz, $J_{5'',6''b} = 2.3$ Hz, H-6''b), 3.95 (dd, 1H, $J_{6a,5} = 8.8$ Hz, $J_{6b,5} = 4.4$ Hz, H-5), 3.76 (m, 1H, H-5''), 3.72 (s, 3H, OMe), 2.91 (t, 2H, $J_{1',2'} = 7.1$ Hz, H-2'), 2.71 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 14.5$ Hz, $J_{5,6a} = 4.4$ Hz, H-6a), 2.41 (dd, 2H, $J_{6a,6b} = 14.5$ Hz, $J_{5,6b} = 8.8$ Hz, H-6b), 2.28 (s, 3H, ArOCOMe), 2.03, 2.02

²⁷² Damtoft, S; Franzyk, H; Jensen, SR. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 4197–4201.

²⁷³ Procopio, A; Alcaro, S; Nardi, M; Oliverio, M; Ortuso, F; Sacchetta, P; Pieragostino, D; Sindona, G. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11161–11167.

(2s, 6H cada uno, 4 *OCOMe*), 1.62 (dd, 3H, $J_{8,10} = 7.1$ Hz, $J_{1,10} = 1.4$ Hz, H-10).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171.2, 170.7, 170.3, 169.7, 169.5, 169.4, 166.9 (7 CO), 153.2 (C-3), 149.5 (C-6'), 135.4 (C-3'), 130.0 (C-4', C-8'), 128.1 (C-9), 125.0 (C-8), 121.7 (C- C-5', C-7'), 108.8 (C-4), 97.2 (C-1), 93.8 (C-1''), 72.7 (C-5''), 72.3 (C-3''), 70.8 (C-2''), 68.3 (C-4''), 65.1 (C-1'), 61.8 (C-6''), 51.6 (*OMe*), 40.1 (C-6), 34.5 (C-2'), 30.4 (C-5), 21.2 (*ArOCOMe*), 20.7 (*OCOMe*), 13.6 (C-10).

HRESI m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{NaO}_{17}$: 757.2314, encontrado 757.2296.

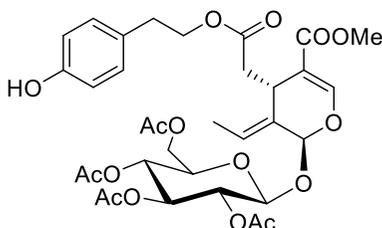
Datos de **148**

IR ν (cm^{-1}): 2934, 2862, 1761, 1740, 1735, 1715, 1632, 1512, 1248, 1242, 1126, 972.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.45 (s, 1H, H-3), 7.13-7.06 (m, 2H, H-7', H-8'), 7.04 (d, 1H, $J_{4',8'} = 1.8$ Hz, H-4'), 5.98 (q, 1H, $J_{8,10} = 6.9$ Hz, H-8), 5.69 (m, 1H, H-1), 5.27 (t, 1H, $J_{3'',4''} = 9.3$ Hz, H-3''), 5.12 (t, 2H, $J_{2'',1''} = 7.8$ Hz, H-2'', H-4''), 5.02 (d, 1H, H-1''), 4.29 (dd, 1H, $J_{6'',6''b} = 12.6$ Hz, $J_{6'',5''} = 4.8$ Hz, H-6''a), 4.28, 4.18 (2dt, 1H cada uno, $J_{1'a,1'b} = 10.8$ Hz, $J_{1',2'} = 6.9$ Hz, H-1'), 4.10 (dd, 1H, $J_{6''b,5''} = 2.1$ Hz, H-6''b), 3.96 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 8.7$ Hz, $J_{5,6b} = 4.5$ Hz, H-5), 3.75 (m, 1H, H-5''), 3.72 (s, 3H, *OMe*), 2.90 (t, 2H, H-2'),

2.71 (dd, 1H, H-6b), 2.41 (dd, 1H, H-6a), 2.28, 2.27 (2s, 3H cada uno, ArOCOMe), 2.04, 2.03, 2.02 (3s, 12H, OCOMe), 1.68 (dd, 3H, $J_{10,1} = 1.3$ Hz, H-10).

2'',3'',4'',6''-Tetra-*O*-acetil ligstrósido (**49**)



A una disolución de **147** (30 mg, 39.5 μ mol) en MeOH (1 ml) se añadió extracto de lipasa 2B120 procedente de *Pseudomonas* (15 mg) y se agitó a 40 °C durante 20 h. Se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH_2Cl_2 -MeOH (200:1) obteniendo **49** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 10 mg, 35% R_F 0.4 (CH_2Cl_2 -MeOH 10:1). $[\alpha]_D^{28} -98$

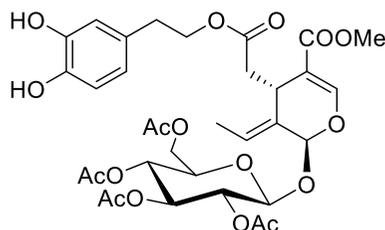
IR ν (cm^{-1}): 3352, 2930, 2854, 1743, 1735, 1717, 1632, 1514, 1245, 1224, 1129, 976.

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.45 (s, 1H, H-3), 7.02 (m, 2H, H-4', H-8'), 6.76 (m, 2H, H-5', H-7'), 5.89 (c, 1H, $J_{10,8} = 7.1$ Hz, H-8), 5.66 (sa, 1H, H-1), 5.49 (sa, 1H, OH), 5.28 (t, 1H, $J_{3'',4''} = 9.5$ Hz, H-3''), 5.14 (t, 1H, $J_{4'',3''} = 9.5$ Hz, H-4''), 5.11 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 7.9$ Hz, H-2''), 5.03 (d, 1H, $J_{2'',1''} = 7.9$ Hz, H-1''), 4.29 (dd, 1H, $J_{6'',6a''} = 12.5$ Hz, $J_{5'',6a''} = 4.7$ Hz, H-

6''a), 4.27 (dt, 1H, $J_{1'b,1'a} = 10.8$ Hz, $J_{2',1'} = 7.0$ Hz, H-1'a), 4.14 (dd, 1H, $J_{6''a,6b''} = 12.5$ Hz, $J_{5'',6a''} = 2.3$ Hz, H-6''b), 4.12 (dt, 1H, $J_{1'a,1'b} = 10.8$ Hz, $J_{2',1'} = 7.0$ Hz, H-1'b), 3.94 (dd, 1H, $J_{6a,5} = 8.8$ Hz, $J_{6b,5} = 4.4$ Hz, H-5), 3.76 (m, 1H, H-5''), 3.72 (s, 3H, *OMe*), 2.81 (t, 2H, $J_{1',2'} = 7.1$ Hz, H-2'), 2.71 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 14.5$ Hz, $J_{5,6a} = 4.4$ Hz, H-6a), 2.36 (dd, 2H, $J_{6a,6b} = 14.5$ Hz, $J_{5,6b} = 8.8$ Hz, H-6b), 2.05, 2.04, 2.03, 2.02 (4s, 3H cada uno, *OCOMe*), 1.62 (dd, 3H, $J_{8,10} = 7.1$ Hz, $J_{1,10} = 1.4$ Hz, H-10).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 171.2, 170.9, 170.4, 169.8, 169.6, 166.9 (6 CO), 154.7 (C-6'), 153.2 (C-3), 130.1 (C-4', C-8'), 129.9 (C-3''), 127.8 (C-9), 125.1 (C-8), 115.6 (C- C-5', C-7'), 109.0 (C-4), 96.9 (C-1), 93.6 (C-1''), 72.6 (C-3''), 72.4 (C-2''), 70.9 (C-5''), 68.4 (C-4''), 65.5 (C-1'), 61.9 (C-6''), 51.6 (*OMe*), 40.0 (C-6), 34.3 (C-2'), 30.4 (C-5), 21.2, 20.8, 20.7 (4 *OCOMe*), 13.6 (C-10).

HRESI m/z calculado para $[M + Na]^+$ C₃₃H₄₀NaO₁₆: 715.2209, encontrado 715.2193.

2'',3'',4'',6''-Tetra-O-acetil oleuropeína (50)

Método A: A una disolución de **148** (100 mg, 0.13 mmol) en MeOH (3 ml) se añadió el extracto enzimático 2B122 procedente de *Terribacillus* (96 mg) y se agitó a 40 °C durante 12 h. Se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (60:1 → 10:1) obteniendo **50** como un sirupo marrón.

Rendimiento: 20 mg, 22%. R_F 0.5 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1)

Método B: A una disolución de **148** (200 mg, 0.25 mmol) en MeOH (3 ml) se añadió el extracto enzimático 2B120 procedente de *Pseudomonas* (100 mg) y se agitó a 40 °C durante 20 h. Se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH₂Cl₂-MeOH (60:1 → 30:1) obteniendo **50** como un sirupo marrón.

Rendimiento: 90 mg, 51% R_F 0.7 (CH₂Cl₂-MeOH 10:1). $[\alpha]_D^{22}$ -98

IR ν (cm⁻¹): 3350, 2937, 2860, 1746, 1731, 1717, 1632, 1513, 1244, 1224, 1129, 972.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 7.50 (s, 1H, H-3), 6.70 (d, 1H, $J_{7',8'} = 8.0$ Hz, H-7'), 6.66 (d, 1H, $J_{4',8'} = 2.0$ Hz, H-4'), 6.54 (dd, 1H, $J_{8',7'} = 8.0$ Hz, $J_{8',4'} = 2.0$, H-8'), 5.98 (c, 1H, $J_{8,10} = 7.7$ Hz, H-8), 5.79 (m, 1H, H-

1), 5.34 (t, 1H, $J_{3'',4''} = 9.4$ Hz, H-3''), 5.18 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 8.0$ Hz, H-1''), 5.08 (t, 1H, $J_{4'',3''} = 10.0$ Hz, H-4''), 5.05 (dd, 1H, $J_{2'',4''} = 9.5$ Hz, $J_{2'',1''} = 8.0$ Hz, H-2''), 4.32 (dd, 1H, $J_{6''a,6''b} = 12.4$ Hz, $J_{6''a,5''} = 4.4$ Hz, H-6''a), 4.25-4.06 (m, 3H, H-6''b, H-1', H-5), 3.99-3.94 (m, 1H, H-5'), 3.73 (s, 3H, OMe), 2.75 (t, 2H, $J_{2',1'} = 7.1$ Hz, H-2'), 2.72 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 14.0$ Hz, $J_{6a,5} = 4.6$ Hz, H-6a), 2.43 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 14.0$ Hz, $J_{6b,5} = 9.2$ Hz, H-6b), 2.02, 2.00 y 1.99 (3s, 3H cada uno, 4 Ac), 1.67 (dd, 3H, $J_{10,8} = 7.1$ Hz, $J_{10,1} = 1.4$ Hz, H-10).

¹³C-RMN

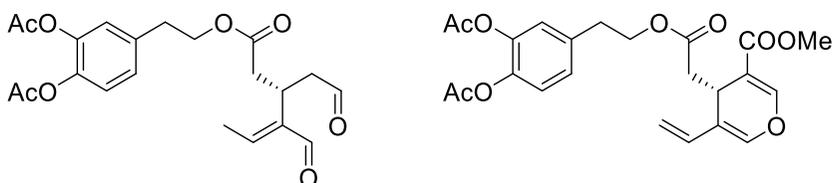
(75.5 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 172.9 (C-7), 172.4, 171.6, 171.3 (4 CO Glc), 168.5 (COOMe), 154.8 (C-3), 153.3 (C-5' y 6'), 130.7 (C-3'), 130.0 (C-9), 125.3 (C-8), 121.4 (C-8'), 117.0 (C-4'), 116.5 (C-7'), 109.8 (C-4), 98.9 (C-1''), 95.8 (C-1), 74.0 (C-5''), 73.2 (C-3''), 72.4 (C-2''), 69.6 (C-4''), 66.9 (C-1'), 62.9 (C-6''), 52.0 (C-COOMe), 41.1 (C-6), 35.4 (C-2'), 31.8 (C-5), 20.6 y 20.5 (4 Ac), 13.6 (C-10).

HRLSI

m/z calculado para $[M + Na]^+$ C₃₃H₄₀NaO₁₇: 731.2158, encontrado 731.2133.

4. TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE FENOLES SECOIRIDOIDES PROCEDENTES DEL OLIVO. ESTRATEGIAS PARA SU ESTABILIZACIÓN

Oleaceína acetilada (Aceoleína, 51) y Aglicón del OleurósidoDeshidratado acetilado (DOA acetilado, 52)



Una disolución de **71** (110 mg, 0.20 mmol) en DMSO húmedo (3 ml) se calentó a 150 °C durante 5 h. La mezcla se acetiló sin evaporar el disolvente empleando DMAP (2 mg) y Ac₂O (0.4 ml). El exceso de Ac₂O se hidrolizó con unas gotas de H₂O, y la disolución se concentró a sequedad en la bomba de aceite resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt–ciclohexano (1:3 → 1:1) obteniendo **51** como un sirupo amarillo muy pálido y **52** como un sirupo incoloro.

Datos de **51**: Rendimiento: 38 mg, 42% *R_F* 0.4 (AcOEt–ciclohexano 1:1). $[\alpha]_D^{24} +103$.

IR ν (cm⁻¹): 2931, 1762, 1739, 1680, 1649, 1241, 1224, 824.

¹H-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 9.63 (m, 1H, H-3), 9.21 (d, 1H, *J*_{1,8} = 2.0 Hz, H-1), 7.12 (d, 1H, *J*_{7',8'} = 8.3 Hz, H-7'), 7.06 (dd, 1H, *J*_{8',7'} = 8.3 Hz, *J*_{8',4'} = 1.9 Hz, H-8'), 6.62 (c, 1H, *J*_{8,10} = 7.1 Hz, H-8), 4.29-4.19 (m, 2H, H-1'), 3.63-3.55 (m, 1H, H-5), 2.97 (ddd, 1H, *J*_{4a,4b} = 18.4

Hz, $J_{4a,5} = 8.5$ Hz, $J_{4a,3} = 1.2$ Hz, H-4a), 2.89 (t, 1H, $J_{2',1'} = 6.7$ Hz, H-2'), 2.74 (ddd, 1H, $J_{4b,4a} = 19.0$ Hz, $J_{4b,5} = 6.3$ Hz, $J_{4b,3} = 1.2$ Hz, H-4b), 2.68 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 15.8$ Hz, $J_{6a,5} = 8.5$ Hz, H-6a), 2.60 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 15.8$ Hz, $J_{6b,5} = 6.5$ Hz, H-6b), 2.28 y 2.27 (2s, 3H cada uno, 2 Ac), 2.04 (d, 3H, $J_{10,8} = 7.1$ Hz, H-10).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 200.6 (C-3), 195.3 (C-1), 172.0 (C-7), 168.5 y 168.4 (2 CO Ac), 154.6 (C-8), 143.3 (C-9), 142.1 (C-5'), 140.9 (C-6'), 136.8 (C-3'), 127.1 (C-8'), 124.0 (C-4'), 123.5 (C-7'), 64.5 (C-1'), 46.3 (C-4), 37.0 (C-6), 34.5 (C-2'), 27.4 (C-5), 20.8 (2 Ac), 15.4 (C-10).

HRLSI-MS m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+ \text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{NaO}_8$: 427.1363, encontrado 427.1362.

Datos de **52**: Rendimiento: 12.5 mg, 15% R_F 0.6 (AcOEt–ciclohexano 1:1). $[\alpha]_D^{24} -26$.

IR ν (cm^{-1}): 3090, 2937, 1743, 1735, 1711, 1642, 1244, 1224, 998, 911.

^1H -RMN (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.49 (s, 1H, H-3), 7.10 (m, 2H, H-7' y H-8'), 7.04 (m, 1H, H-4'), 6.53 (s, 1H, H-1), 6.14 (dd, 1H, $J_{8,10trans} = 17.6$ Hz, $J_{8,10cis} = 11.0$ Hz, H-8), 5.30 (d, 1H, $J_{10,8trans} = 17.6$ Hz, H-10 $_{trans}$), 5.07 (d, 1H, $J_{10,8cis} = 11.0$ Hz, H-10 $_{cis}$), 4.23 (td, 2H, $J_{1',2'} = 6.9$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H-1'), 3.93 (t, 1H, $J_{5,6} = 4.8$

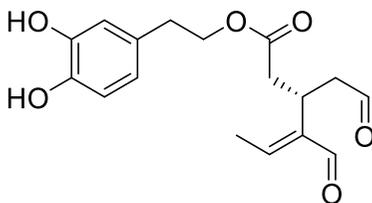
8.2. Parte experimental

Hz, H-5), 3.73 (s, 3H, COOMe), 2.90 (t, 2H, $J_{2',1'} = 6.9$ Hz, H-2'), 2.63 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 14.4$ Hz, $J_{6a,5} = 4.1$ Hz, H-6a), 2.54 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 14.4$ Hz, $J_{6b,5} = 5.5$ Hz, H-6b), 2.29 y 2.28 (2s, 3H cada uno, 2 Ac).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171.3 (C-7), 168.5 y 168.4 (2 CO Ac), 166.9 (COOMe), 151.5 (C-3), 142.1 (C-5'), 141.2 (C-1), 140.8 (C-6'), 137.1 (C-3'), 131.6 (C-8), 127.2 (C-7'), 123.9 (C-4'), 123.4 (C-8'), 117.7 (C-4), 112.7 (C-10), 108.9 (C-9), 64.5 (C-1'), 51.7 (COOMe), 39.3 (C-6), 34.4 (C-2'), 29.8 (C-5), 27.2 (C-4), 20.8 (2 Ac).

HRLSI-MS m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+ \text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{NaO}_9$: 467.1313, encontrado 467.1310.

Oleaceína (53)



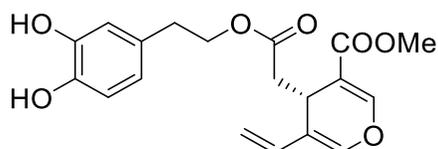
A una disolución de **51** (40 mg, 99 μmol) en MeOH (1 ml) se añadió el extracto enzimático HR21-6 procedente de *Bacillus pumilus* (40 mg) y se agitó a 40 °C durante 2 h. Tras finalizar la reacción, se filtró y se concentró a sequedad dando como resultado un sirupo incoloro correspondiente a **53** como único producto. Los datos espectroscópicos están en concordancia con la bibliografía.¹⁶¹

Rendimiento: cuant. R_F 0.35 (AcOEt–ciclohexano 1:1)

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 9.64 (m, 1H, H-3), 9.22 (d, 1H, $J_{1,8} = 1.9$ Hz, H-1), 6.78 (d, 1H, $J_{7',8'} = 8.0$ Hz, H-7'), 6.71 (d, 1H, $J_{4',8'} = 1.9$ Hz, H-4'), 6.64 (c, 1H, $J_{8,10} = 7.0$ Hz, H-8), 6.54 (dd, 1H, $J_{8',7'} = 8.0$ Hz, $J_{8',4'} = 1.9$ Hz, H-8'), 4.25-4.09 (m, 2H, H-1'), 3.73-3.64 (m, 1H, H-5), 2.92 (ddd, 1H, $J_{4a,4b} = 19.2$ Hz, $J_{4a,5} = 8.5$ Hz, $J_{4a,3} = 1.2$ Hz, H-4a), 2.81-2.62 (m, 6H, H-4, H-1' y H-6), 2.05 (d, 3H, $J_{10,8} = 7.1$ Hz, H-10).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 200.9 (C-3), 195.3 (C-1), 171.9 (C-7), 154.9 (C-8), 144.4 (C-9), 143.5 (C-5'), 143.4 (C-6'), 130.0 (C-3'), 120.9 (C-8'), 116.0 (C-4'), 115.8 (C-7'), 65.4 (C-1'), 46.4 (C-4), 37.1 (C-6), 34.4 (C-2'), 27.4 (C-5), 15.4 (C-10).

Aglicón deshidratado del oleurósido (DOA) (54)



Método A: A una disolución de **52** (40 mg, 90 μmol) en MeOH (1 ml) se añadió el extracto enzimático HR21-6 procedente de *Bacillus pumilus* (40 mg) y se agitó a 40 °C durante 2 h. Tras finalizar la reacción, la disolución se filtró y se concentró a sequedad, redisolviendo el residuo en CH_2Cl_2 (5 ml) y lavando con H_2O (3x5 ml) obteniendo **54** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: cuant. R_F 0.45 (AcOEt–ciclohexano 1:1)

8.2. Parte experimental

Método B: A una disolución de **52** (40 mg, 90 μ mol) en MeOH (1 ml) se añadió imidazol (24 mg, 0.36 mmol) y se agitó a 40 °C durante 24 h. La reacción se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt–ciclohexano (1:2) obteniendo **54** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 32%

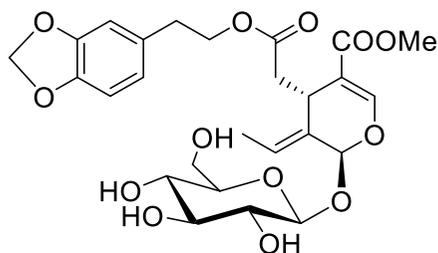
IR ν (cm^{-1}): 3348, 2935, 1745, 1735, 1713, 1642, 998, 914.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.52 (s, 1H, H-3), 6.78 (d, 1H, $J_{7',8'} = 8.0$ Hz, H-7'), 6.77 (d, 1H, $J_{4',8'} = 2.0$ Hz, H-4'), 6.61 (dd, 1H, $J_{8',7'} = 8.0$ Hz, $J_{8',4'} = 2.0$ Hz, H-8'), 6.57 (s, 1H, H-1) 6.15 (dd, 1H, $J_{8,10\text{trans}} = 17.6$ Hz, $J_{8,10\text{cis}} = 11.1$ Hz, H-8), 5.35 (d, 1H, $J_{10,8} = 17.6$ Hz, H-10 $_{\text{trans}}$), 5.08 (d, 1H, $J_{10,8} = 11.1$ Hz, H-10 $_{\text{cis}}$), 4.14 (m, 2H, H-1'), 3.95 (dd, 1H, $J_{5,4a} = 4.1$ Hz, $J_{5,4b} = 5.5$ Hz H-5), 3.77 (s, 3H, COOMe), 2.80 (t, 2H, $J_{2',1'} = 6.9$ Hz, H-2'), 2.58 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 14.4$ Hz, $J_{6a,5} = 4.1$ Hz, H-6a), 2.54 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 14.4$ Hz, $J_{6b,5} = 5.5$ Hz, H-6b).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 171.4 (C-7), 167.0 (C-3), 164.0 (COOMe), 151.5 (C-1), 145.2 (C-5'), 143.9 (C6'), 141.2 (C-8), 131.2 (C-3'), 129.4 (C-8'), 117.8 (C-4), 116.6 (C-4'), 116.0 (C-7'), 112.7 (C-10), 109.0 (C-9), 65.6 (C-1'), 51.8 (COOMe), 39.5 (C-6), 34.4 (C-5), 27.1 (C-2').

HRLSI-MS m/z calculado para $[M + Na]^+ C_{19}H_{20}NaO_7$: 383.1101, encontrado 383.1112.

5',6'-Metilidéndioxi oleuropeína (55)



A una disolución de **70** (100 mg, 0.185 mmol) en DMF (5 ml), se añadieron Cs_2CO_3 (78 mg, 0.24 mmol) y $BrClCH_2$ (250 μ l, 3.7 mmol), y se agitó a 100 °C durante 1 h. Se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente CH_2Cl_2 -MeOH (30:1 \rightarrow 20:1) obteniendo **55** como un sirupo amarillo.

Rendimiento: 56.2 mg, 55%. R_F 0.15 (CH_2Cl_2 -MeOH 10:1); $[\alpha]_D^{21}$ -146.88.

IR ν (cm^{-1}): 3353, 2921, 2873, 1741, 1719, 1634, 1516, 1444, 1273, 1234, 1123, 827.

1H -RMN (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 7.51 (s, 1H, H-3), 7.75 (m, 2H, H-4' y H-7'), 6.69 (dd, 1H, $J_{7',8'} = 8.0$ Hz, $J_{4',8'} = 1.5$ Hz, H-8'), 6.08 (c, 1H, $J_{10,8} = 7.1$ Hz, H-8), 5.91 (s, 3H, H-1 y OCH_2O), 4.81 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 7.7$ Hz, H-1''), 4.25, 4.13 (2dt, 1H cada uno, $J_{1'a,1'b} = 10.8$ Hz, $J_{2',1'} = 6.8$ Hz, H-1'), 3.97 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 8.9$ Hz,

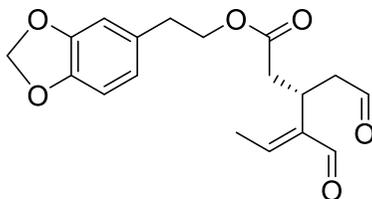
8.2. Parte experimental

$J_{5,6b} = 4.5$ Hz, H-5), 3.90 (dd, 1H, $J_{6''a,6''b} = 12.2$ Hz, $J_{6''a,5''} = 1.8$ Hz, H-6''a), 3.72 (s, 3H, COOMe), 3.67 (dd, 1H, $J_{6''b,6''a} = 12.2$ Hz, $J_{6''b,5''} = 5.6$ Hz, H-6''b), 3.42, 3.34 (2m, 4H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5''), 2.85 (t, 2H, $J_{2',1'} = 6.8$ Hz, H-2'), 2.70 (dd, 1H, $J_{6'b,6'a} = 14.1$ Hz, $J_{6'b,5'} = 4.6$ Hz, H-6'b), 2.45 (dd, 1H, $J_{6'a,6'b} = 14.1$ Hz, $J_{6'a,5'} = 9.0$ Hz, H-6'a), 1.66 (dd, 3H, $J_{8,10} = 7.1$ Hz, $J_{5,10} = 1.4$ Hz, H-10).

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 173.1 (C-7), 168.6 (COOMe), 155.1 (C-3), 149.1 (C-5'), 147.6 (C-6'), 133.1 (C-3'), 130.5 (C-9), 124.8 (C-8), 123.1 (C-8'), 110.2 (C-4'), 109.3 (C-1''), 109.2 (C-7'), 102.1 (C-1), 100.8 (OCH₂O), 95.1 (C-4), 78.4 (C-5''), 77.9 (C-3''), 74.7 (C-2''), 71.5 (C-4''), 66.7 (C-1'), 62.8 (C-6''), 51.9 (COOMe), 41.2 (C-6), 36.7 (C-2'), 31.8 (C-5), 13.5 (C-10).

HRESI m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{NaO}_{13}$: 575.1735, encontrado 575.1740.

5',6'-Metilidéndioxi oleaceína (56)



Una disolución de **55** (90 mg, 0.16 mmol) en DMSO húmedo (2 ml) se calentó en un microondas científico a 150 °C durante 5 h. Tras el

calentamiento, la disolución se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna AcOEt–ciclohexano (1:4 → 1:2) obteniendo **56** como un sirupo incoloro.

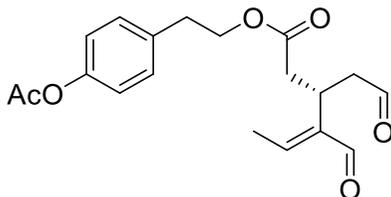
Rendimiento: 20.0 mg, 37% R_F 0.6 (AcOEt–ciclohexano 1:1). $[\alpha]_D^{21}$ –2.5.

IR ν (cm⁻¹): 2931, 1761, 1740, 1680, 1649, 1241, 1224, 820.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 9.64 (m, 1H, H-3), 9.25 (d, 1H, $J_{1,8} = 2.0$ Hz, H-1), 6.73 (d, 1H, $J_{7',8'} = 7.9$ Hz, H-7'), 6.37 (d, 1H, $J_{4',7'} = 1.5$ Hz, H-4'), 6.65-6.60 (m, 2H, H-8', H-8), 5.93 (s, 2H, OCH₂O), 4.19 (m, 2H, H-1'), 3.62 (m, 1H, H-5), 2.99 (dd, 1H, $J_{4a,4b} = 18.3$ Hz, $J_{4a,5} = 1.2$ Hz, H-4a), 2.81 (t, 2H, $J_{2',1'} = 6.9$ Hz, H-2'), 2.75 (dd, 1H, $J_{4b,4a} = 18.3$ Hz, $J_{4b,5} = 0.8$ Hz, H-4b), 2.69 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 16.0$ Hz, $J_{6a,5} = 8.4$ Hz, H-6a), 2.61 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 16.0$ Hz, $J_{6b,5} = 6.8$ Hz, H-6b), 2.08 (d, 3H, $J_{10,8} = 7.1$ Hz, H-10).

¹³C-RMN (775.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 200.5 (C-3), 195.2 (C-1), 172.0 (C-7), 154.4 (C-8), 147.8 (C-5'), 146.4 (C-6'), 143.4 (C-9), 131.5 (C-3'), 121.9 (C-8'), 109.4 (C-4'), 108.4 (C-7'), 101.0 (OCH₂O), 65.2 (C-1'), 46.4 (C-4), 37.0 (C-6), 34.9 (C-2'), 27.4 (C-5), 15.4 (C-10).

HRESI m/z calculado para $[M + Na]^+$ C₁₈H₂₀NaO₆: 355.1152, encontrado 355.1150.

Aceocantal (58)

Se disolvió **57** (100 mg, 0.33 mmol) en una mezcla de Ac_2O /piridina 1:1 (v/v, 2 ml) a 0 °C. Tras 15 min, se dejó en agitación a t.a. durante la noche. El exceso de Ac_2O se hidrolizó con H_2O y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente (AcOEt–ciclohexano 1:2) obteniendo **57** como un sirupo incoloro.

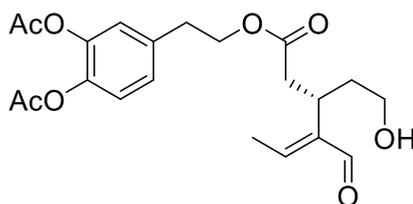
Rendimiento: cuant. R_F 0.5 (AcOEt–ciclohexano 1:1)

IR ν (cm^{-1}): 2931, 1762, 1743, 1677, 1649, 1241, 1220, 824.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 9.63 (m, 1H, H-3), 9.21 (d, 1H, $J_{1,8} = 2.0$ Hz, H-1), 7.19 (d, 2H, $J_{4',5'} = 8.5$ Hz, H-4' y H-8'), 7.01 (d, 2H, $J_{5',4'} = 8.5$ Hz, H-5' y H-7'), 6.61 (c, 1H, $J_{8,10} = 7.1$ Hz, H-8), 4.24 (m, 2H, H-1'), 3.61 (m, 1H, H-5), 2.97 (ddd, 1H, $J_{4,3} = 1.1$ Hz, $J_{4,5} = 8.5$ Hz, $J_{4a,4b} = 18.3$ Hz, H-4a), 2.89 (t, 2H, $J_{2',1'} = 6.9$ Hz, H-2'), 2.74 (dd, 1H, $J_{5,4} = 8.5$ Hz, $J_{4b,4a} = 18.3$ Hz, H-4b), 2.70 (dd, 1H, $J_{6,5} = 8.4$ Hz, $J_{6a,6b} = 15.8$ Hz, H-6a), 2.60 (dd, 1H, $J_{5,6} = 8.4$ Hz, $J_{6b,6a} = 15.8$ Hz, H-6b), 2.29 (s, 3H, Ac), 2.05 (d, 3H, $J_{10,8} = 7.1$ Hz, H-10).

^{13}C -RMN	(75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 200.5 (C-3), 195.3 (C-1), 172.0 (C-7), 154.4 (C-8), 149.5 (C-6'), 143.4 (C-9), 135.5 (C-3'), 130.0 (C-4' y C-8'), 121.8 (C-5' y C-7'), 64.9 (C-1'), 46.4 (C-4), 37.0 (C-6), 34.5 (C-2'), 27.4 (C-5), 15.3 (C-10).
HRESI	m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+$ $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{NaO}_6$: 369.1309, encontrado 369.1309.

2,3-Dihidro aceoleína (59)



Una disolución de **51** (100 mg, 0.25 mmol) en AcOH/THF 2.5:1 (v/v, 2 ml) se añadió $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (54.4 mg, 0.25 mmol) y se agitó a 0 °C durante 45 min. A continuación, se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente (AcOEt–ciclohexano 1:3 \rightarrow 1:1) obteniéndose **59** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 46.7 mg, 46%. R_F 0.4 (AcOEt–ciclohexano 1:1)

IR ν (cm^{-1}): 3633, 2939, 1762, 1743, 1682, 1243, 1227, 1130, 821.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 9.26 (d, 1H, $J_{1,10} = 1.9$ Hz, H-1), 7.09 (m, 2H, H-7' y H-8'), 7.03 (d, 1H, $J_{4',8'} = 1.5$ Hz, H-4'), 6.62 (c, 1H, $J_{8,10} = 7.1$ Hz, H-8), 4.24 (t,

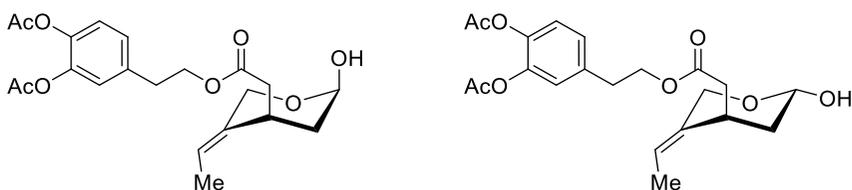
8.2. Parte experimental

2H, $J_{1',2'} = 6.7$ Hz, H-1'), 3.53 (m, 1H, H-5), 3.38 y 3.28 (2m, 1H cada uno, H-3), 2.89 (t, 2H, $J_{1',2'} = 6.7$ Hz, H-1'), 2.74 y 2.63 (2dd, 1H cada uno, $J_{6a,6b} = 15.8$ Hz, $J_{6a,5} = 8.4$ Hz, $J_{6b,5} = 6.5$ Hz, H-6), 2.29 y 2.28 (2s, 3H cada uno, 2 Ac), 1.97 (d, 3H, $J_{10,8} = 7.1$ Hz, H-10), 1.90 y 1.75 (2m, 1H cada uno, H-4).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 195.2 (C-1), 172.0 (C-7), 168.4 y 168.3 (2 CO Ac), 154.7 (C-8), 143.3 (C-9), 142.3 (C-5'), 140.9 (C-6'), 136.5 (C-3'), 127.0 (C-8'), 124.0 (C-4'), 123.8 (C-7'), 64.5 (C-1'), 61.2 (C-3), 37.0 (C-6), 34.6 (C-4), 34.5 (C-2'), 27.1 (C-5), 20.8 (2 Ac), 15.4 (C-10).

HRESI m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+ \text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{NaO}_8$: 429.1520, encontrado 429.1510.

3R y 3S-1,2-Dihidro aceoleína (60)



A una disolución de **51** (100 mg, 0.25 mmol) en MeOH–Buffer $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (1:1, 5 ml) se añadieron $\text{CeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (88.6 mg, 0.25 mmol) y NaBH_4 (16.5 mg, 0.43 mmol). La disolución se agitó a t.a durante 2 h y se concentró a sequedad resultando un residuo que se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt–ciclohexano (1:5 \rightarrow 1:1) obteniendo **60** como un sirupo incoloro.

Por ^1H RMN se detecta la formación de los epímeros $3R$ y $3S$ en proporción parecida.

Rendimiento: 54 mg, 54%. R_F 0.3 (AcOEt–ciclohexano 1:1)

IR ν (cm^{-1}): 3610, 2939, 1764, 1743, 1240, 1130, 1054.

^1H -RMN (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ (ppm) 7.18 (2dd, 1H cada uno, $J_{8',7'} = 8.3$ Hz, $J_{8',4'} = 2.0$ Hz, H-8' (R) y (S)), 7.16 (2d, 1H cada uno, $J_{4',8'} = 2.0$ Hz, H-4' (R) y (S)), 7.13 (2d, 1H cada uno, $J_{7',8'} = 8.3$ Hz, H-7' (R) y (S)), 5.35 y 5.34 (2c, 1H cada uno, $J_{8,10} = 6.7$ Hz, H-8 (R) y (S)), 5.21 (d, 1H, $J_{\text{OH},3} = 6.2$ Hz, OH (R)), 5.19 (m, 1H, H-3 (R)), 5.00 (m, 1H, OH (S)), 4.99 (m, 1H, H-3 (S)), 4.60 (m, 1H, H-1ax (R)), 4.26 (2dt, 2H cada uno, $J_{1a',1b'} = 11.8$ Hz, $J_{1a',2'} = 6.7$ Hz, H-1' (R) y (S)), 4.13 (m, 1H, H-1ax (S)), 3.93 (d, 1H, $J_{1ec,1ax} = 13.0$ Hz, H-1ec (R)), 3.54 (d, 1H, $J_{1ec,1ax} = 12.2$ Hz, H-1ec (S)), 3.29 (m, 1H, H-5 (S)), 3.21 (m, 1H, H-5 (R)), 2.95 y 2.94 (2t, 2H cada uno, $J_{2',1'} = 6.7$ Hz, H-2' (R) y (S)), 2.85 y 2.77 (2dd, 1H cada uno, $J_{6a,6b} = 15.2$ Hz, $J_{6b,5} = 8.26$ Hz, $J_{6a,5} = 7.3$ Hz, H-6 (R)), 2.56 y 2.48 (2dd, 1H cada uno, $J_{6a,6b} = 14.5$ Hz, $J_{6a,5} = 8.3$ Hz, $J_{6b,5} = 7.5$ Hz, H-6 (S)), 2.26, 2.25 y 2.24 (4 Ac (R) y (S)), 1.82 (dt, 2H, $J_{4a,4b} = 13.5$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H-4 (S)), 1.75 (m, 2H, H-4 (R)), 1.55 y 1.54 (2dd, 3H cada uno, $J_{10,8} = 6.7$ Hz, $J_{10,1} = 1.3$ Hz, H-10 (R) y (S)).

^{13}C -RMN (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ (ppm) 173.0 y 172.3 (2 C-7), 168.7 (4 CO Ac), 143.3 (C-5'), 142.0 (C-6'),

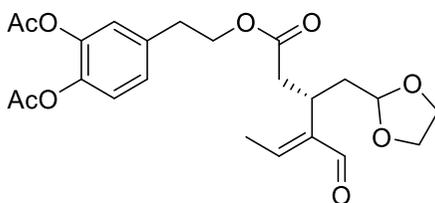
8.2. Parte experimental

138.0 (C-3'), 137.3 (C-1'), 136.8 (C-9), 127.7 (C-8'), 124.8 (C-4'), 120.8 y 120.5 (C-8), 93.0 y 92.3 (C-3), 67.9 y 62.4 (C-1), 39.6 y 38.1 (C-6), 37.9 y 35.8 (C-4), 34.9 (C-2'), 31.4 y 30.6 (C-5), 12.7 y 12.4 (C-10).

HRESI

m/z calculado para $[M + Na]$ $C_{21}H_{26}NaO_8$:
429.1520, encontrado 429.1513.

Acceoleína 3-etilideno acetal (**61**)



A una disolución de **51** (115 mg, 0.28 mmol) en $CDCl_3$ (2 ml) se añadieron etilenglicol (31 μ l, 0.56 mmol) y TFA (10.7 μ l, 0.14 mmol). La disolución se calentó a 50 °C hasta la desaparición del producto de partida monitorizándose la reacción mediante 1H -RMN. Por último, se neutralizó el medio con $NaHCO_3$ y el producto se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt–ciclohexano (1:2) obteniendo **61** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: 86 mg, 68% R_F 0.4 (AcOEt–ciclohexano 1:1).

IR ν (cm^{-1}): 2940, 2874, 1749, 1685, 1243, 1222, 1130, 820.

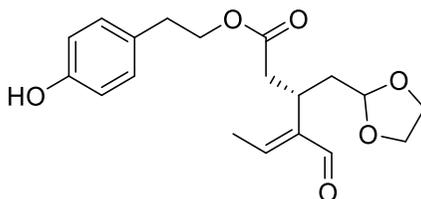
1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 9.20 (d, 1H, $J_{1,8} = 2.0$ Hz, H-1), 7.09 (d, 1H, $J_{7,8'} = 8.2$ Hz, H-7'), 7.06 (dd, 1H, $J_{8',7'} = 8.2$ Hz, $J_{8',4'} = 1.9$ Hz, H-8'), 6.99 (d, 1H, $J_{4',8'} = 1.9$ Hz, H-4'), 6.56 (c, 1H, $J_{8,10} = 7.1$ Hz, H-

8), 4.68 (dd, 1H, $J_{3,4a} = 6.1$ Hz, $J_{3,4b} = 3.6$ Hz, H-3), 4.19 (m, 2H, H-1'), 3.89 y 3.76 (2m, 2 H cada uno, OCH₂CH₂O), 3.28 (m, 1H, H-5), 2.85 (t, 2H, $J_{2',1'} = 6.8$ Hz, H-2'), 2.81 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 15.6$ Hz, $J_{6a,5} = 9.6$ Hz, H-6a), 2.60 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 15.6$ Hz, $J_{6b,5} = 5.5$ Hz, H-6b), 2.26 y 2.25 (2s, 3H cada uno, 2 Ac), 2.10 (m, 1H, H-4b), 1.96 (d, 3H, $J_{10,8} = 7.1$ Hz, H-10), 1.83 (dt, 1H, $J_{4b,4a} = 14.0$ Hz, $J_{4a,3} = 5.9$ Hz, H-4a).

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 195.2 (C-1), 172.4 (C-7), 168.3, 168.2 (OCOMe), 153.0 (C-8), 144.1 (C-9), 141.9, 140.7 (C-5', C-6'), 136.8 (C-3'), 127.0 (C-8'), 123.8 (C-4'), 123.3 (C-7'), 103.2 (C-3), 64.8 y 64.7 (OCH₂CH₂O), 64.3 (C-1'), 37.5 (C-6), 36.0 (C-4), 34.3 (C-2'), 29.3 (C-5), 20.6 (OCOMe), 14.0 (C-10).

HRLSI m/z calculado para [M + Na]⁺ C₂₃H₂₈NaO₉: 471.1626, encontrado: 471.1613.

Oleocantal 3-etilideno acetal (62)



A una disolución de **57** (33 mg, 0.11 mmol) en CDCl₃ (1ml) se añadió etilenglicol (0.22 mmol) y TFA (0.054 mmol). La disolución se calentó a 50 °C hasta la desaparición del producto de partida

8.2. Parte experimental

monitorizándose la reacción mediante ^1H -RMN. Por último, se neutralizó el medio con NaHCO_3 y el producto se purificó mediante cromatografía en columna usando como eluyente AcOEt–ciclohexano (1:2) obteniendo **62** como un sirupo incoloro.

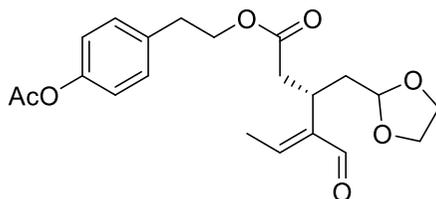
Rendimiento: 31 mg, 84%. R_F 0.4 (AcOEt–ciclohexano 1:1)

IR ν (cm^{-1}): 3341, 2948, 2870, 1747, 1682, 1240, 1222, 820.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 9.23 (d, 1H, $J_{1,8} = 2.0$ Hz, H-1), 7.02 (d, 2H, $J_{4',5'} = 8.5$ Hz, H-4' y H-8'), 6.75 (d, 2H, $J_{5',7'} = 8.5$ Hz, H-5' y H-7'), 6.57 (c, 1H, $J_{8,10} = 7.1$ Hz, H-8), 6.04 (s, 1H, OH), 4.70 (dd, 1H, $J_{3,4a} = 6.0$ Hz, $J_{3,4b} = 3.7$ Hz, H-3), 4.16 (m, 2H, H-1'), 3.86 y 3.78 (2m, 2H cada uno, CH_2 acetal), 3.31 (m, 1H, H-5), 2.79 (t, 2H, $J_{2',1'} = 7.0$ Hz, H-2'), 2.78 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 15.7$ Hz, $J_{6a,5} = 9.3$ Hz, H-6a), 2.62 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 15.7$ Hz, $J_{6,5} = 5.8$ Hz, H-6b), 2.14 (ddd, 1H, $J_{4b,4a} = 14.0$ Hz, $J_{4a,5} = 9.3$ Hz, $J_{4b,3} = 3.7$ Hz, H-4b), 1.98 (d, 3H, $J_{10,8} = 7.1$ Hz, H-10), 1.84 (dt, 1H, $J_{4a,4b} = 14.0$ Hz, $J_{4a,3} = 6.0$ Hz, H-4a).

^{13}C -RMN (300MHz, CDCl_3): δ (ppm) 195.3 (C-1), 172.0 (C-7), 154.8 (C-6'), 153.5 (C-8), 143.2 (C-9), 130.1 (C-4' y C-8'), 129.6 (C-3'), 115.5 (C-5' y C-7'), 103.4 (C-3), 65.3 (C-1'), 64.8 y 64.9 (CH_2 acetal), 37.7 (C-6), 36.1 (C-4), 34.3 (C-2'), 29.3 (C-5), 15.1 (C-10).

HRCI m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}] \text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NaO}_6$: 371.1465, encontrado 371.1456.

Acceocantal 3-etilideno acetal (63)

A una disolución de **62** (31 mg, 0.108 mmol) en CH₂Cl₂ (1 ml) se añadió Ac₂O (12.2 µl, 0.16 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP. La disolución se agitó a t.a. durante una noche y se hidrolizó con H₂O. Se separaron las fases y la orgánica se lavó con H₂O (2x5 ml), se secó con MgSO₄ y se concentró a sequedad obteniendo **63** como un sirupo incoloro.

Rendimiento: cuant. R_F 0.8 (AcOEt–ciclohexano 1:1)

IR ν (cm⁻¹): 2940, 2870, 1746, 1683, 1240, 1222, 820.

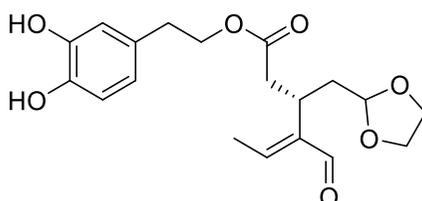
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 9.23 (d, 1H, $J_{1,8} = 2.0$ Hz, H-1), 7.17 (d, 2H, $J_{4',5'} = 8.5$ Hz, H-4' y H-8'), 7.00 (d, 2H, $J_{5',4'} = 8.5$ Hz, H-5' y H-7'), 6.55 (c, 1H, $J_{8,10} = 7.1$ Hz, H-8), 4.69 (dd, 1H, $J_{3,4a} = 6.1$ Hz, $J_{3,4b} = 3.6$ Hz, H-3), 4.17 (m, 2H, H-1'), 3.85 y 3.77 (2m, 2H cada uno, CH₂ acetal), 3.30 (m, 1H, H-5), 2.86 (t, 2H, $J_{2',1'} = 6.9$ Hz, H-2'), 2.80 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 15.7$ Hz, $J_{6a,5} = 9.5$ Hz, H-6a), 2.62 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 15.7$ Hz, $J_{6,5} = 5.6$ Hz, H-6b), 2.28 (s, 3H, Ac), 2.14 (ddd, 1H, $J_{4b,4a} = 13.9$ Hz, $J_{4a,5} = 9.2$ Hz, $J_{4b,3} = 3.6$ Hz, H-4b), 1.97 (d, 3H, $J_{10,8} = 7.0$ Hz, H-10), 1.84 (dt, 1H, $J_{4a,4b} = 14.0$ Hz, $J_{4a,3} = 5.9$ Hz, H-4a).

8.2. Parte experimental

^{13}C -RMN (75.5 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 195.2 (C-1), 172.5 (C-7), 169.7 (CO Ac), 153.0 (C-8), 149.5 (C-6'), 144.2 (C-9), 135.6 (C-3'), 130.0 (C-4' y C-8'), 128.7 (C-5' y C-7'), 103.4 (C-1), 64.9 (CH_2 acetal), 64.8 (C-1'), 64.7 (CH_2 acetal), 37.6 (C-6), 36.1 (C-4), 34.5 (C-2'), 29.4 (Me Ac), 21.2 (C-5), 15.0 (C-10).

HRESI m/z calculado para $[\text{M} + \text{Na}]^+ \text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{NaO}_9$: 471.1626, encontrado 471.1613.

Oleaceína 3-etilideno acetal (**64**)



A una disolución de **61** (87 mg, 0.19 mmol) en MeOH (1 ml) se añadió el extracto enzimático HR21-6 procedente de *Bacillus pumilus* (30 mg) y se agitó a t.a. durante 4 h. La mezcla se filtró y se concentró a sequedad, redisolviendo el residuo en CH_2Cl_2 (8 ml) y lavando con H_2O (3x8 ml), obteniendo **64** como un sirupo naranja.

Rendimiento: cuant. R_F 0.3 (AcOEt–ciclohexano 1:1)

IR ν (cm^{-1}): 3359, 2963, 2874, 1750, 1686, 1222, 1130, 821.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 9.21 (d, 1H, $J_{1,8} = 1.9$ Hz, H-1), 6.76 (d, 1H, $J_{7,8'} = 8.0$ Hz, H-7'), 6.67 (d, 1H, $J_{4',8'} = 1.5$ Hz, H-4'), 6.57 (c, 1H, $J_{8,10} = 7.1$ Hz, H-8), 6.50 (dd, 1H, $J_{8',7'} = 8.0$ Hz, $J_{8',4'} = 1.5$ Hz, H-

8'), 4.67 (dd, 1H, $J_{3,4a} = 6.0$ Hz, $J_{3,4b} = 3.6$ Hz, H-3), 6.19 (sa, 2H, OH), 4.11 (m, 2H, H-1'), 3.89 y 3.75 (2m, 2 H cada uno, OCH₂CH₂O), 3.31 (m, 1H, H-5), 2.77 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 15.5$ Hz, $J_{6a,5} = 9.4$ Hz, H-6a), 2.68 (t, 2H, $J_{2',1'} = 6.8$ Hz, H-2'), 2.59 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 15.5$ Hz, $J_{6b,5} = 5.6$ Hz, H-6b), 2.12 (m, 1H, H-4b), 1.97 (d, 3H, $J_{10,8} = 7.1$ Hz, H-10), 1.83 (dt, 1H, $J_{4a,4b} = 14.1$ Hz, $J_{4a,3} = 5.8$ Hz, H-4a).

¹³C-RMN

(75.5 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 195.7 (C-1), 172.6 (C-7), 153.8 (C-8), 144.4 (C-5'), 144.1 (C-9), 143.3 (C-6'), 129.9 (C-3'), 120.7 (C-8'), 116.4 (C-4'), 116.0 (C-7'), 103.3 (C-3), 65.3 (C-1'), 64.9, 64.8 (OCH₂CH₂O), 37.7 (C-6), 36.1 (C-4), 34.4 (C-2'), 29.3 (C-5), 15.1 (C-10).

HRESI

m/z calculado para $[M + Na]^+ C_{19}H_{24}NaO_7$: 387.1414, encontrado 387.1401.