

Curso 2006/07
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/27
I.S.B.N.: 978-84-7756-777-6

CAROLINA PÉREZ REYES

Maytenus cuzcoina,
fuelle de metabolitos secundarios bioactivos.
Estudios de relación estructura-actividad

Directores

ISABEL LÓPEZ BAZZOCCHI
IGNACIO ANTONIO JIMÉNEZ DÍAZ



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

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

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores, Isabel y Antonio, por haber depositado su confianza en mí desde el primer momento, enseñándome, apoyándome y haciendo que estos años hayan sido tan extraordinarios.

En ello también ha contribuido el buen ambiente reinante en el laboratorio. Gracias a mis compañeros, tanto del “antiguo laboratorio 4” como del actual laboratorio 14, a las personas que han venido de otros países, aportando su alegría, música, palabras “curiosas” y sobretodo su amistad. Este trabajo no hubiera sido posible sin todos ustedes o al menos no hubiera sido tan divertido, muchísimas gracias. Perdonen por no nombrarlos uno por uno, ya que sería una lista enorme y además, ustedes saben que forman parte de ella.

Este trabajo estaría incompleto sino hubiera sido por todos los grupos de investigación que colaboraron con nosotros, realizando los ensayos de las actividades biológicas y cuyos resultados forman parte de esta Memoria. Agradezco al grupo dirigido por la Dra. Laila Moujir (Departamento de Microbiología y Biología Celular, Universidad de La Laguna), la Dra. M. José Alcaráz (Departamento de Farmacología, Universidad de Valencia), los Drs. Francisco Gamarro y Santiago Castanys (Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” del Consejo Superior de Investigaciones Científicas Granada) y Dr. Harukuni Tokuda (Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japón).

Gracias a los Prof. Mercedes Campillo y Leonardo Pardo y a todo su grupo, por su buen hacer, por haberme recibido en su laboratorio en las dos estancias que estuve con ustedes, haciéndome sentir como en casa, enseñándome lo bonita que es Barcelona.

Quisiera también agradecer a todas las personas que forman parte de IUBO, a los compañeros de otros laboratorios, que me han ayudado muchas veces dejando su trabajo para ello, a todos los miembros de apoyo a la investigación y al personal de seguridad que en muchas ocasiones exceden su trabajo para que las cosas sean posibles, gracias.

Por otra parte, quisiera agradecer a las personas que estando fuera del entorno de trabajo, no participando directamente en él, me han ayudado. Gracias a mis amigas (Dulce, Mari Luz y Tamara), a mis primas, casi hermanas (Patricia, Cecilia y Laura), a mis tíos, casi padres (Pili y Manolo) y a la persona que ha tenido que aguantar más mi mal humor, mi querida hermana Cristina.

Quisiera agradecer a la persona que he tenido la suerte de encontrar en este “camino”, a Fernando, por compartir conmigo todas las ilusiones, decepciones, alegrías y metas, haciendo que éstas se cumplan.

Y por último, a las dos personas que sin ellas, no podría haber hecho nada, no sólo desde el punto de vista biológico, sino también por su apoyo y ánimo continuos, a los que les dedico esta Tesis, a mis padres. Ellos han sido los “catalizadores”, me dieron la energía y apoyo para comenzar la Tesis y me han ayudado a llegar hasta aquí.

Nota al lector:

En esta Tesis Doctoral se ha realizado el estudio fitoquímico de *Maytenus cuzcoina*, especie de la familia *Celastraceae*, endémica de Perú (Cusco).

La presente Memoria la hemos dividido en dos grandes bloques, en los que se recogen:

- El estudio fitoquímico de la **corteza de la raíz de *M. cuzcoina* (capítulo 4)**, los metabolitos obtenidos del extracto de *n*-hexano:Et₂O (1:1), agrupados según su naturaleza química. Se recogen, además, las actividades biológicas evaluadas (capítulo 4.4).
- El estudio de los **sesquiterpenos dihidro-β-agarofurano (capítulo 5)**, incluyéndose los alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos aislados de la corteza de la raíz. Se llevó a cabo el estudio fitoquímico de los **frutos de *M. cuzcoina***, realizado con anterioridad en nuestro grupo de investigación, con el objetivo de obtener cantidad suficiente de los sesquiterpenos, que nos permitiera evaluarlos como revertidores del fenotipo MDR (**capítulo 5.5**) y realizar modificaciones estructurales que nos permitieran completar el estudio de relación estructura-actividad y determinar sus configuraciones absolutas. Además, dada la amplia quimioteca de sesquiterpenos evaluados como inhibidores de la Pgp, se realizó un estudio cuantitativo de la relación estructura-actividad (**QSAR**), recogido en el **capítulo 5.5.4**.

Cada capítulo consta de una introducción, resultados y discusión y parte experimental. En el apéndice se adjunta un listado de los productos nuevos en la bibliografía química, indicando el número de página donde se describe su elucidación estructural, parte experimental y actividades biológicas evaluadas. En el CD, que se incluye, se recoge los espectros de RMN ¹H de todos los metabolitos aislados y sus derivados y la Memoria de Tesis en formato pdf y Microsoft Reader.

Se ha optado por este formato, con la esperanza que la lectura de esta Tesis, sea lo más “placentera” posible y que recoja todos los resultados del trabajo de investigación realizado.

Carolina Pérez Reyes


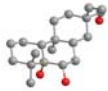
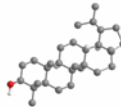
Abreviaturas

3D-QSAR:	<i>(three-Dimensional Quantitative Structure-Activity. Relationships)</i> , Estudio cuantitativo de la relación estructura-actividad en tres dimensiones
ADME:	(Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción) acrónimo empleado en farmacología y farmacocinética que explica la disposición interna de un fármaco
AINES:	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos
AT:	Antígenos Tempranos
BCRP:	Proteína transportadora con fenotipo MDR
c:	cuaternario
CADD:	<i>(Computer-Assisted Drug Design)</i> , diseño de fármacos asistido por ordenador
CAL:	calceína
CAL-AM:	Acetoximetilester de la calceína
Células A-549:	Línea celular de carcinoma humano de pulmón
Células COLO-205	Línea celular de carcinoma de colon
Células HCT-8:	Línea celular de carcinoma humano de colon
Células HeLa:	Línea celular de carcinoma de cervix humano
Células Hep-2:	Línea celular de carcinoma de laringe humano
Celulas Hepa-3B:	Línea celular de carcinoma de hígado
Células HL-60:	Línea celular leucemia mieloide humana
Células HT-29:	Línea celular de carcinoma humano de colon
Células KB:	Línea celular de carcinoma nasofaringe
Células L-1210:	Línea celular linfocíticas de leucemia de ratón
Células MCF-7:	Línea celular de carcinoma humano de pecho
Células MEL-28:	Línea celular de melanoma humano
Células NIH-3T3:	Línea celular de fibroblasto de ratón
Células P-388:	Línea celular monocítica de leucemia de ratón
Células Vero:	Línea celular de riñón de mono verde africano
CI ₅₀ :	Concentración mínima que inhibe el crecimiento en un 50%
CMB:	Concentración mínima bactericida
CMI:	Concentración mínima inhibitoria
CoMFA:	<i>Comparative Molecular Fields Analysis</i>
CoMSIA:	<i>Comparative Molecular Similarity Indices Analysis</i>
COSY:	<i>Correlation Spectroscopy</i>
COX:	Ciclooxigenasa
CS:	Cepa salvaje
d:	doblete
DC:	Dicroísmo circular
DCC:	Diciclohexilcarboiimida
DDPH:	1,1-Difenil-2-picrihidrazilo
DE ₅₀ :	Dosis que produce el 50% de la respuesta máxima

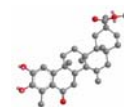
DEPT:	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DL ₅₀ :	Dosis que produce la muerte del 50%
DMAP:	4-dimetilaminopiridina
DMF:	Dimetilformamida
DMS:	Dimetilsulfóxido
DNM:	Daunomicina
EM	Espectrometría de Masas
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
eq:	equivalentes
ESI:	Ionización por electroespray
FDA:	<i>(Food Drug Administration)</i>
FPTasa:	Farnesil-transferasa
GC:	Glucocorticoides
h:	horas
HMBC:	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherente</i>
HPLC:	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSF1:	Factor transcripcional 1 de golpe de calor
HSQC:	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HSV:	Virus del Herpes simplex 1
Hz:	Hertzio
I.R.:	Índice de Resistencia
IE:	Impacto Electrónico
ILU:	Índice de lesión ulcerosa
I _{max} :	Inhibición máxima
iNOS:	Oxido nítrico sintasa inducible
IR:	Infrarrojo
IT:	Índice terapéutico
IUPAC:	<i>(Internacional Union of Pure and Applied Chemistry)</i> Autoridad mundial encargada del avance de la química y aspectos relacionados con ésta.
J:	Constante de acoplamiento
K _i :	Constante de inhibición
log P:	Coefficiente de partición octanol-agua
LOO:	<i>(Leave One Out)</i> , validación cruzada
L-Selectride:	Tri- <i>sec</i> -butilborohidruro de litio
LTD:	Leucotrieno D
LT _s :	Leucotrienos
m/z:	Unidades de masa
m-CPBA:	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzoico
MDR:	<i>(MultiDrug Resistance)</i> multirresistencia a fármacos
<i>mdr1</i>	Gen que codifica para la Pgp (MDR1)
MIA:	Anhídrido <i>N</i> -metilisotoico


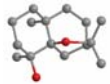
MIF _s :	(<i>Molecular Interaction Fields</i>), campos de interacción molecular
MPA:	2-Fenil-2-metoxi-acético
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente
MTT:	bromuro de 3-(4,5-dimetiltrazol-2-1)-2,5-difeniltetrazolio
NBD:	Dominio citosólico de unión e hidrólisis del ATP
NCI:	(<i>Internacional Cancer Institute</i>) Instituto Nacional del Cáncer de USA
NF- κ B:	Factor de Transcripción kappaB
PDB:	(<i>Protein Data Bank</i>), banco de datos que recoge las estructuras de las proteínas.
PGE:	Prostaglandina-E
Pgp:	(<i>P-glycoprotein</i>) glicoproteína P
PG _s :	prostaglandinas
PLS:	(<i>Partial Least Square</i>), análisis multivariante de mínimos cuadrados parciales
PP:	pirofosfato
PPGG:	Pirofosfato de geranilgeranilo
Proteínas ABC:	(<i>ATP-binding cassette</i>)
Py:	Piridina
R:	Rendimiento
RAW 264,7:	Macrófagos de ratón
RMN ¹³ C:	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
RMN ¹ H:	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear
ROE:	<i>Rotatory Overhauser Effect</i>
ROESY:	<i>Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
s:	singulete
SAR:	(<i>Structure-Activity Relationship</i>), relación estructura-actividad
t.a.:	temperatura ambiente
t:	triplete
TBX:	Tromboxanos
THF:	Tetrahidrofurano
TMD:	Fragmentos transmembranales de una proteína
TNF α :	Factor de necrosis tumoral alfa
TOCSY:	<i>Total Correlated Spectroscopy</i>
TPA:	13-Acetato-12-O-tetradecanoil-forbol
UV:	Ultravioleta
VEB:	Virus Epstein-Barr
VIH:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
W.M:	Wagner-Merwein
α_D :	Rotación óptica
δ :	ppm (partes por millón)
$\omega_{1/2}$	Ancho a la mitad de la señal

Maytenus cuzcoina, fuente de metabolitos secundarios bioactivos. Estudios de relación estructura-actividad.

ÍNDICE	página
1. Introducción	1
1.1. Productos naturales	5
1.2. Familia <i>Celastraceae</i>	7
2. Objetivos	11
3. Descripción botánica, recolección, extracción y fraccionamiento cromatográfico de <i>Maytenus cuzcoina</i>	
3.1. Descripción botánica	13
3.2. Recolección	14
3.3. Extracción y fraccionamiento cromatográfico	15
3.3.1. Corteza de la raíz	15
3.3.2. Frutos	16
4. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA CORTEZA DE LA RAÍZ DE <i>M. cuzcoina</i>	
4.1. Diterpenos	
4.1.1. Introducción	19
4.1.1.1. Actividad biológica de los diterpenos aislados de celastráceas	21
4.1.1.1.1. Actividad anticancerígena	21
4.1.1.1.2. Actividad inmunosupresora y antiinflamatoria	21
4.1.1.1.3. Actividad anticonceptiva	22
4.1.1.1.3. Actividad antialérgica	23
4.1.1.1.4. Actividad inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr	23
4.1.1.2. Aproximaciones sintéticas a los diterpenos de tipo triptolida	24
4.1.2. Resultados y discusión	25
4.1.3. Parte Experimental	33
4.1.3.1. Separación cromatográfica de los diterpenos con esqueleto de <i>ent</i> -rosano de la corteza de la raíz de <i>Maytenus cuzcoina</i>	33
4.1.3.2. Datos físicos y espectroscópicos	34
4.2. Triterpenos	
4.2.1. Introducción	37

4.2.1.1. Actividad biológica de los triterpenos y esteroides aislados de la familia <i>Celastraceae</i>	40
4.2.2. Resultados y discusión	45
4.2.2.1. Derivados de los triterpenos con esqueleto de lupano	62
4.2.3. Parte Experimental	73
4.2.3.1. Separación cromatográfica de los triterpenos de la corteza de la raíz de <i>Maytenus cuzcoina</i>	73
4.2.3.2. Datos físicos y espectroscópicos de los nuevos triterpenos	77
4.2.3.2.1. Triterpenos con esqueleto de lupano	77
4.2.3.2.2. Derivados de los triterpenos con esqueleto de lupano	84
4.2.3.2.3. Triterpenos con esqueleto de oleano	89
4.2.3.2.4. Triterpenos con esqueleto de friedelano	90
4.3. Celastroloides	
4.3.1. Introducción	93
4.3.1.1. Actividades biológicas de los celastroloides	100
4.3.1.1.1. Actividad insecticida	100
4.3.1.1.2. Actividad antimicrobiana	101
4.3.1.1.3. Actividad anticancerígena	103
4.3.1.1.4. Actividad antiinflamatoria	104
4.3.1.1.5. Actividad antioxidante	104
4.3.1.1.6. Otras actividades	105
4.3.2. Resultados y discusión	106
4.3.3. Parte Experimental	136
4.3.3.1. Separación cromatográfica de los celastroloides de la corteza de la raíz de <i>Maytenus cuzcoina</i>	136
4.3.3.2. Datos físicos y espectroscópicos de los nuevos celastroloides	140
4.4. Actividades biológicas	
4.4.1. Antimicrobiana	
4.4.1.1. Introducción	151
4.4.1.1.1. Productos naturales con actividad antimicrobiana	152
4.4.1.2. Resultados y discusión	155
4.4.2. Antiinflamatoria	
4.4.2.1. Introducción	157



4.4.2.1.1. Respuesta inflamatoria, mecanismo celular	157
4.4.2.1.2. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES)	159
4.4.2.1.3. Productos naturales con actividad antiinflamatoria	160
4.4.2.2. Resultados y discusión	162
4.4.3. Citotóxica	
4.4.3.1. Introducción	165
4.4.3.1.1. Productos naturales con actividad citotóxica	166
4.4.3.2. Resultados y discusión	170
5. SESQUITERPENOS DIHIDRO-β-AGAROFURANOS	
5.1. Introducción	175
5.1.1. Actividades biológicas de los sesquiterpenos y alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos dihidro- β -agarofuránicos	181
5.1.1.1. Actividad inhibidora del proceso fotosintético	181
5.1.1.2. Actividad antialimentaria e insecticida	182
5.1.1.3. Actividad antiviral	184
5.1.1.4. Actividad inmunosupresora	186
5.1.1.5. Actividad inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr	187
5.1.1.6. Actividad citotóxica	188
5.1.1.7. Actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos	191
5.1.1.8. Actividad antiinflamatoria	192
5.1.1.9. Actividad relajante intestinal	193
5.1.2. Aproximaciones a la síntesis de los sesquiterpenos agarofuránicos	194
5.2. Resultados y discusión	197
5.2.1. Estudio fitoquímico de los frutos de <i>Maytenus cuzcoina</i>	198
5.2.2. Sesquiterpenos dihidro- β -agarourano aislados de la corteza de la raíz de <i>Maytenus cuzcoina</i>	207
5.2.3 Modificaciones estructurales de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos aislados de <i>Maytenus cuzcoina</i>	214
5.2.3.1. Introducción	214

5.2.3.2. Derivados realizados para modular la actividad biológica	219
5.2.3.3. Preparación de un derivado fluorescente para el estudio del mecanismo de acción de sesquiterpenos como inhibidores de la Pgp	234
5.2.4. Determinación de la configuración absoluta: Dicroísmo Circular	236
5.3. Parte Experimental	243
5.3.1. Estudio cromatográfico del extracto de los frutos de <i>Maytenus cuzcoina</i>	243
5.3.2. Separación cromatográfica de los sesquiterpenos dihidro- β -agarourano del extracto de la corteza de la raíz de <i>Maytenus cuzcoina</i>	246
5.3.3. Modificaciones estructurales de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos aislados de <i>Maytenus cuzcoina</i>	248
5.3.4. Datos físicos y espectroscópicos	251
5.3.4.1. Sesquiterpenos aislados de los frutos de <i>Maytenus cuzcoina</i>	251
5.3.4.2. Sesquiterpenos aislados de la corteza de la raíz de <i>Maytenus cuzcoina</i>	253
5.3.4.3. Derivados realizados para modular la actividad biológica	255
5.3.4.4. Marcaje con un grupo fluorescente para el estudio del mecanismo de acción de estos sesquiterpenos como inhibidores de la Pgp	291
5.3.4.5. Derivados preparados al objeto de determinar la configuración absoluta de los sesquiterpenos aislados de los frutos de <i>Maytenus cuzcoina</i> y sus derivados	293
5.4. Quimiopreención: virus Epstein-Barr	299
5.4.1. Introducción	299
5.4.1.1. Generalidades del virus Epstein-Barr	302
5.4.1.2. Identificación de agentes quimiopreventivos: inhibición de la activación del virus Epstein-Barr	305
5.4.2. Resultados y Discusión	307
5.5. Actividad Revertidora de la Multirresistencia a Fármacos (MDR)	311
5.5.1. Introducción	311
5.5.1.1. Aspectos generales de la glicoproteína-P (Pgp)	314
5.5.1.2. Reversión del fenotipo MDR mediante moduladores de la Pgp	317
5.5.2. Resultado y Discusión	322
5.5.2.1. Actividad revertidora del fenotipo de multirresistencia a fármacos en <i>Leishmania</i>	323

5.5.2.2. Actividad revertidora del fenotipo de multirresistencia a fármacos en células tumorales	328
5.5.3. Estudio del mecanismo de acción de los sesquiterpenos como revertidores de la Pgp humana	330
5.5.4 Diseño de fármacos asistido por ordenador: 3D-QSAR	331
5.5.4.1. Introducción	331
5.5.4.2. Metodología	337
5.5.4.3. Resultados y discusión	339
5.5.4.3.1. Modelo de sesquiterpeno como revertidor de la MDR en <i>Leishmania</i>	339
5.5.4.3.2. Modelo de sesquiterpeno como inhibidor de la Pgp humana	347

6. Técnicas experimentales



6.1. Técnicas espectroscópicas y espectrométricas	355
6.1.1. Rotación óptica ($[\alpha]_D$)	355
6.1.2. Espectroscopía ultravioleta (UV)	355
6.1.3. Dicroísmo circular (DC)	355
6.1.4. Espectroscopía infrarroja (IR)	355
6.1.5. Resonancia magnética nuclear (RMN)	355
6.1.6. Espectrometría de masas de baja resolución (EM)	356
6.1.7. Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR)	356
6.2. Técnicas cromatográficas	357
6.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF)	357
6.2.2. Cromatografía preparativa en capa fina (CPCF)	357
6.2.3. Cromatografía en capa fina de alta resolución (CCFAR)	357
6.2.4. Cromatografía en columna (CC)	358
6.2.5. Cromatografía de exclusión molecular (CEM)	358
6.2.6. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	358
6.3. Programas informáticos	358

7. Conclusiones 361

8. Anexos

8.1. Índice de productos nuevos en la bibliografía química	365
8.2. Sesquiterpenos incluidos en el estudio 3D-QSAR	369
8.3. Tabla resumen de los sesquiterpenos utilizados en el estudio 3D-QSAR	371



1. Introducción

1. Introducción.

La IUPAC define a la Química Médica¹ como una disciplina basada en la química, en la que están involucrados aspectos biológicos, médicos y farmacológicos. Tiene como objetivo descubrir, identificar, preparar o diseñar compuestos biológicamente activos, así como, el estudio del metabolismo, mecanismo de acción a nivel molecular y establecimiento de relaciones estructura-actividad de los candidatos a fármacos. La Química Médica abarca tres aspectos críticos en el desarrollo de un nuevo medicamento²:

- 1) El descubrimiento. Este consiste en seleccionar primero una diana terapéutica, que puede ser un receptor, una enzima, proteínas transportadoras, modelos *in vivo* o modelos celulares. Por otro lado, la identificación, descubrimiento o síntesis de nuevas sustancias bioactivas (con la diana seleccionada), llamadas cabeza de serie o compuestos líderes, pueden ser metabolitos de fuentes naturales, compuestos sintéticos o resultantes de procesos de biotecnología.
- 2) La optimización. Una vez seleccionada la estructura cabeza de serie, se desea incrementar la potencia, selectividad y toxicidad de la sustancia bioactiva, estableciéndose un estudio de relación estructura-actividad, con el que se pretende entender las características estructurales que modulan la actividad. Por otro lado, en estas etapas iniciales se tienen en cuenta las características farmacocinéticas, parámetros como la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME), para seleccionar candidatos. Esta es una etapa crítica, el paso de sistemas *in vitro* a *in vivo*, en el que muchos candidatos son eliminados. Las reglas desarrolladas por Lipinski y *col.*³ nos permiten predecir la farmacocinética de una sustancia, evaluando una serie de características, que han sido el resultado del estudio de la correlación de las propiedades fisicoquímicas con la biodisponibilidad de los fármacos existentes en el mercado. Las cinco reglas de Lipinski consisten en que la sustancia debe tener un peso molecular <500 Da, un $\log P < 5$, menos de 5 dadores

¹ <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/ix.html#15>

² Wermuth, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 2003, Ed. Elsevier Science: Londres.

³ Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug. Del. Rev.* 2001, 46, 3-26.

de puentes de hidrógeno en la molécula y menos de 10 aceptores de puentes de hidrógeno, para presentar una biodisponibilidad por vía oral.

- 3) El desarrollo. En esta etapa se mejoran las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas, estableciéndose la formulación química del principio activo para su comercialización.

El papel de la Química Médica ha cambiado en los últimos 25 años, debido fundamentalmente al desarrollo de las nuevas tecnologías, como la evaluación *in vitro* de alto rendimiento (*high-throughput in vitro screening*) de grandes librerías de compuestos, la química combinatoria, la definición de las dianas moleculares y el diseño racional de fármacos⁴. Hoy en día, la Química Médica es una ciencia interdisciplinar, que está situada en la interface entre la Química Orgánica y las ciencias de la vida, como la Bioquímica, Farmacología, Biología Molecular, Inmunología, Farmacocinética y Toxicología, además de otras disciplinas como Fisicoquímica, Cristalografía, Espectroscopia y Técnicas Computacionales⁵.

El químico dispone hoy de una amplia gama de herramientas que le facilitan el proceso de síntesis, purificación y análisis de los compuestos, como son por ejemplo: la formación de enlaces carbono-carbono mediante reacciones catalizadas por metales de transición, los avances en RMN y la disponibilidad del HPLC. La química combinatoria permite generar librerías de una forma racional, pudiendo generarse a partir de compuestos cabeza de serie que se unen a un receptor específico. La revolución de la genética molecular⁶ y el uso de las características moleculares que definen una diana, permiten diseñar nuevas moléculas, determinándose la interacción del compuesto cabeza de serie con la proteína diana (*Docking*)⁷. Esto sólo se puede realizar si se conoce la estructura tridimensional de la proteína determinada por rayos X, RMN o por modelización molecular.

Pero todos estos avances tecnológicos y el aumento de los recursos dedicados a la investigación, no han incrementado el número de nuevas entidades moleculares, sino lo contrario, estas han disminuido en la última década⁸. Una de las principales causas es la multitud de requerimientos sanitarios que deben cumplir los candidatos a fármaco, el proceso de validación es cada vez más complejo y la gran cantidad de

⁴ Lombardino, J. G.; Lowe III, J. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 853-862.

⁵ Jurgen, D. *Science.* **2000**, *287*, 1960-1965.

⁶ Chanda, S. K.; Cadwell, J. S. *Drug Discov. Today.* **2003**, *8*, 168-174.

⁷ Jorgensen, W. L. *Science.* **2004**, *303*, 1813-1818.

⁸ Class, S. *Chem. Eng. News.* **2002**, *80*, 39-49.

información que hay que cumplimentar en las agencias de regulación, cada vez más exigentes.

El proceso del desarrollo de un fármaco (figura 1.1) es largo, complejo, caro y conlleva un alto riesgo económico, ya que la investigación y desarrollo de un nuevo medicamento requiere una media de 12 a 24 años y un costo de unos 1,4 billones de dólares por medicamento. Además, sólo uno de cada 15 a 25 candidatos supera la evaluación de eficacia y baja toxicidad (tanto en animales como en humanos) que se requieren para su comercialización. Por otro lado, en algunos casos la inversión realizada no se recupera una vez comercializado el medicamento, debido a la gran competencia existente en el mercado.

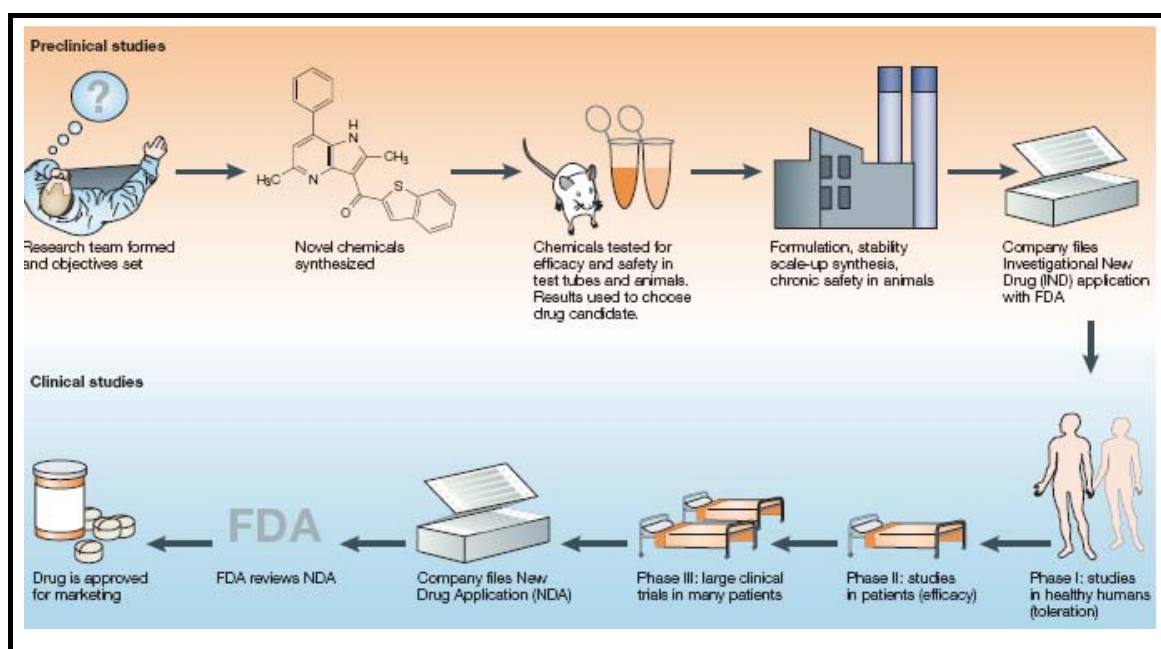


Figura 1.1. Proceso en el descubrimiento de un nuevo fármaco (Nat. Rev. Drug Discov. 2004). En una primera etapa se selecciona una enfermedad que tenga un gran impacto en la sociedad actual, eligiendo posteriormente un grupo de productos, que pueden ser naturales o sintéticos, para ser evaluados *in vitro*. El compuesto más eficaz y que tenga las características que lo hagan posible candidato *in vivo*, se somete a los ensayos *in vivo*. Si pasa esta etapa toda la información se envía al organismo pertinente, para comenzar las fases clínicas, fase I, II y III, revisándose posteriormente la información antes de permitir su comercialización.

Esto ha llevado en los últimos años al desarrollo de nuevas estrategias para la búsqueda de nuevos fármacos. Existen cinco estrategias principales que han servido para la identificación de nuevos compuestos cabeza de serie⁹:

⁹ Wermuth, C. G. J. *Med. Chem.* **2004**, *47*, 1303-1314.

- Una **primera estrategia** consiste en la evaluación de la actividad de grupos de compuestos elegidos por su gran diversidad estructural. Debido a los desarrollos tecnológicos, como la evaluación *in vitro* de alto rendimiento (*high-throughput in vitro screening*) se puede identificar de manera rápida nuevos hits, existiendo diversos ejemplos en la literatura en los que se han identificado nuevos fármacos usando esta estrategia. Un inconveniente, es la selección de bibliotecas de productos no adecuadas y que los cabezas de serie identificados tengan una elevada toxicidad o una baja biodisponibilidad.
- **Segunda estrategia:** comienza con un principio activo conocido y se somete a diversas modificaciones químicas, preparando nuevas moléculas que incrementen su potencia, su especificidad, su seguridad y/o desarrollar una nueva formulación que facilite su administración a los pacientes. Se refieren a esta estrategia habitualmente como compuestos *me-too*. Ha sido aplicado con éxito en los análogos de la lovastatina, un conocido inhibidor de una enzima clave en la síntesis del colesterol.
- La **tercera estrategia**, se basa en observaciones clínicas, en datos obtenidos directamente de los ensayos clínicos con humanos (no con animales), pudiendo identificar nuevos agentes terapéuticos cuando no existen modelos farmacológicos en animales.
- La **cuarta estrategia** consiste en el diseño racional de fármacos, basado en el conocimiento de los mecanismos moleculares de una patología. Ejemplo de un fármaco obtenido utilizando esta estrategia es el captotril, utilizado para el tratamiento de la hipertensión.
- La **quinta estrategia**, la aproximación de SOSA (*selective optimization of sides activities*) consiste en potenciar los efectos secundarios de un fármaco, preparando derivados sintéticos, convirtiendo estos en la diana terapéutica de los nuevos compuestos. Al partir de un fármaco que ya ha pasado todos los controles sanitarios, se incrementa la posibilidad de obtener compuestos cabeza de serie con una alta biodisponibilidad y baja toxicidad. Un ejemplo de cabezas de serie obtenidos mediante esta estrategia son los derivados de la talidomina, utilizados como agentes inmunomoduladores.

Es difícil comparar las estrategias ya que todas son útiles y la industria farmacéutica normalmente utiliza estrategias combinadas. Aunque sea un proceso largo y muy

costoso, el descubrimiento de un nuevo fármaco conlleva el beneficio para millones de pacientes. Además, la necesidad de nuevos agentes específicos para curar ciertas enfermedades como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, infecciones víricas, bacterianas resistentes y de protozoos como el causante de la malaria, que aún no tienen un tratamiento adecuado, ha reavivado el interés por la identificación de nuevas moléculas bioactivas.

1.1. Productos naturales.

Los productos naturales se definen como sustancias químicas de bajo peso molecular, sintetizadas por los seres vivos. Estos compuestos y sus derivados han sido utilizados para el tratamiento de las enfermedades desde el inicio de la historia¹⁰.

Cabe destacar que un 50% de las nuevas entidades químicas identificadas entre 1980-2002 son productos naturales (figura 1.2), análogos semisintéticos o compuestos sintetizados basándose en sus farmacóforos¹¹.

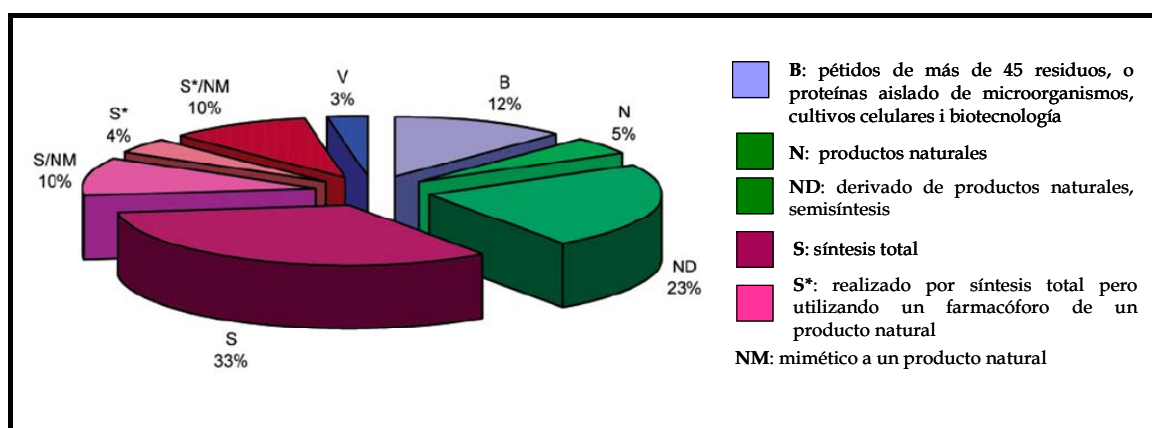


Figura 1.2. Nuevas entidades químicas (N= 1031) entre 1981-2002, clasificadas según su origen (J. Nat. Prod. 2003).

Entre 1970-1980 la investigación de los productos naturales para la búsqueda de nuevos fármacos alcanzó el máximo interés debido, fundamentalmente al impulso que le dió la industria farmacéutica a las sustancias no sintéticas. Sin embargo, en la década de los 90 el interés por la investigación de los productos naturales decae, debido a diversas razones¹², entre las que cabe destacar:

¹⁰ Phillipson, J. D. *Phytochemistry*. **2001**, 56, 237-243.

¹¹ Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022-1037.

¹² Koehn, F. E.; Carter, G. T. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4, 206-220.

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

Sin embargo, el poco éxito de la química combinatoria en la identificación de nuevos compuestos cabeza de serie, ha llevado a reconocer que el número de compuestos no determina la calidad de las librerías moleculares, sino que esta viene determinada por la diversidad y las características similares que tengan las moléculas con los fármacos actuales (*drug-likeness*), como tamaño, solubilidad, etc. Esto ha provocado un renovado interés por los productos naturales en la búsqueda de diversidad química y la obtención de nuevas cabezas de serie^{13,14}.

Los productos naturales constituyen un buen punto de partida para el descubrimiento de nuevos fármacos, ya que se pueden considerar como un grupo de *estructuras privilegiadas* que han sido seleccionadas por la evolución por su capacidad de interaccionar con una amplia variedad de proteínas y otras dianas biológicas¹⁵. Son sustancias que son biosintetizadas, modificadas y que ejercen su función interaccionando con los dominios proteicos de diferentes proteínas, que son estructuras muy conservadas en la naturaleza. Por lo que los productos naturales, sintetizados en un determinado organismo con una determinada función, pueden ejercer un efecto similar en los humanos. Un ejemplo es la ciclosporina y la rapamicina que son sintetizados como un mecanismo de defensa frente, por ejemplo, a las levaduras, existiendo cierta homología entre las proteínas de estos organismos y las

¹³ Harvey, A. D. D. T. **2000**, 5, 294-298.

¹⁴ Butler, M. S. J. *Nat. Prod.* **2004**, 67, 2141-2153.

¹⁵ Breinbauer, R.; Vetter, I. R.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2878-2890.

implicadas en la respuesta inmunosupresora en humanos, por lo que no es accidental su actividad.

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

Dado la pérdida acelerada de la biodiversidad, la necesidad de nuevas sustancias para enfermedades que no tienen el tratamiento adecuado y teniendo en cuenta que una cuarta parte de las prescripciones médicas se basan en sustancias de origen vegetal, determina que el estudio de los productos naturales aislados de plantas superiores resulte prioritario¹⁶.

1.2. Familia Celastraceae.

La familia *Celastraceae* consta de 98 géneros y 1211 especies de árboles y arbustos, muchos de los cuales son trepadores, arbóreos o enredaderas, que recibe el nombre común de la familia agridulce (bittersweet)¹⁷. Presenta una distribución pantropical, ya que sus especies se encuentran en su mayoría en zonas tropicales y subtropicales con irradiación hacia climas templados o templados-fríos.

La clasificación botánica de esta familia ha experimentado cambios debido a las hibridaciones¹⁸. Así, el género *Maytenus* incluye actualmente las especies antiguamente incluidas en *Gymnosporia* y algunas especies de *Rhacoma* hoy en día son incluidas en el género *Crossopetalum*, lo que ha dado lugar a que muchas especies tengan varios sinónimos. La familia *Celastraceae* pertenece:

División:	<i>Spermathophyta</i>
Subdivisión:	<i>Magnoliophyta</i> (Angiospermas)
Clase:	<i>Magnoliatae</i>
Subclase:	<i>Rosidae</i>
Orden:	<i>Celastrales</i>
Suborden:	<i>Celastranae</i>
Familia:	<i>Celastraceae</i>

¹⁶ Balunas, J. M.; Kinghorn, K. *Life Sciences*. **2005**, *78*, 431-441.

¹⁷ Simmons, M. P. *Celastraceae. En: The families and genera of vascular plants*. **2004**, *6*, 29-64, Kubitzki, K. Ed. Springer: Berlin.

¹⁸ Bruning, R.; Wagner, H. *Phytochemistry*. **1978**, *17*, 1821-1858.

Esta familia fue reconocida por la FDA (Food Drugs Administration) como una de las más prometedoras para su estudio, dada la amplia distribución, amplia gama de propiedades farmacológicas de sus especies y el interés de los metabolitos aislados tanto por su estructura química como por sus actividades biológicas.

Numerosas especies de la familia *Celastraceae* son conocidas por su uso en la medicina tradicional o en la agricultura (figura 1.3), en todo el mundo, destacando las especies del género *Maytenus*.

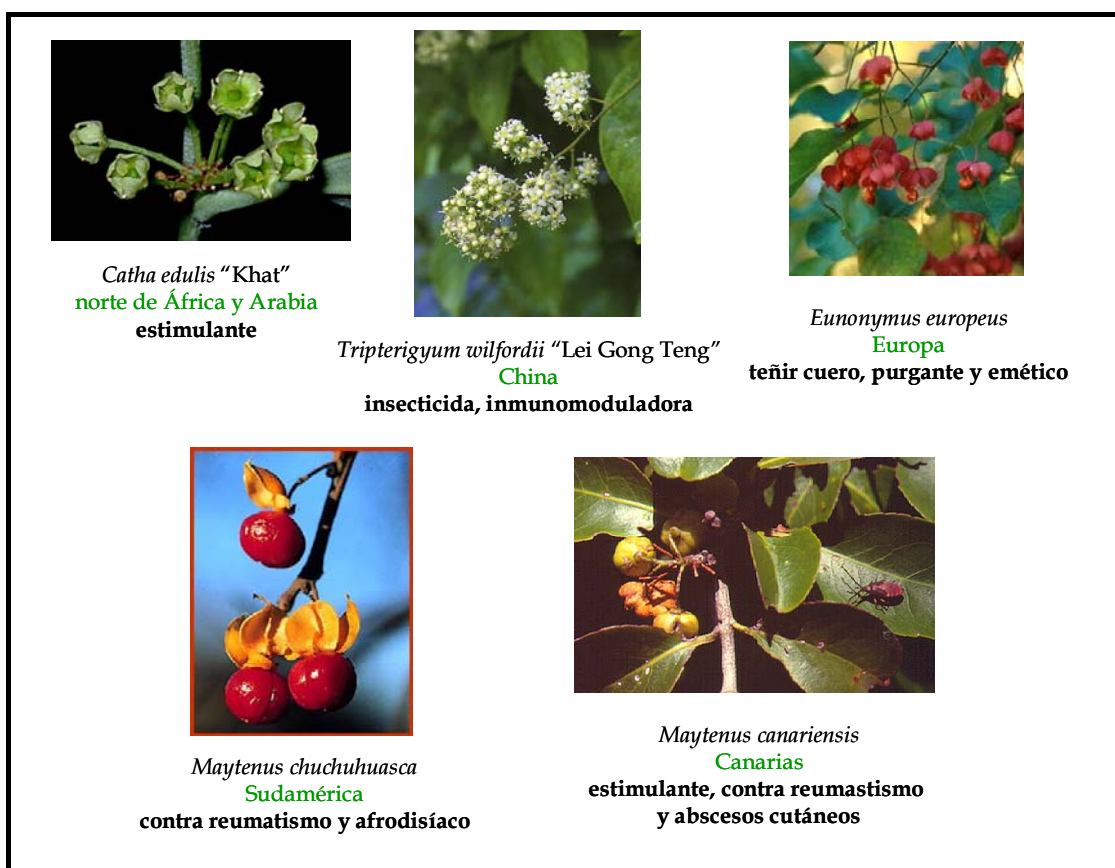


Figura 1.3. Ejemplos de especies de celastráceas y su uso etnobotánico.

En la zona de la Amazonía peruana, colombiana y de Ecuador, el polvo rojo de la corteza de una planta conocida como "chuchuhuasha" o "chuchhuasi" es usado por los indígenas como tónico, para el tratamiento del reumatismo y como afrodisíaco. De forma tópica, este polvo es empleado incluso como antitumoral en el cáncer de piel y para combatir la soriasis¹⁹. En los últimos años se ha ampliado de forma apreciable la literatura sobre la "chuchuhuasca" y diversas especies del género *Maytenus* han

¹⁹ González, J. G.; Delle Monache, G.; Delle Monache, F.; Marini-Bettolo, G. B. J. *Ethnopharmacol.* **1982**, *5*, 73-77.

recibido este nombre (*M. chuchuhuasca*, *M. krukovii* y *M. laevis*)²⁰. El estudio de la corteza de estas especies ha mostrado que poseen actividad antiinflamatoria²¹.

Como único representante de esta familia en las Islas Canarias, se encuentra *Maytenus canariensis*, arbusto de ambiente termófilo, que recibe el nombre local de “peralillo”. Los agricultores y pastores lo usan como un estimulante suave, mascan sus hojas para aliviar la fatiga, lo que recuerda al uso del “khat” en África. Sus frutos machacados se utilizan externamente para rebajar tumorações en la piel y abscesos cutáneos y la infusión de sus hojas contra el reuma²².

De celastráceas se han aislado un gran número de metabolitos secundarios, destacando los maytensinoides, terpenoides y glucósidos cardiotónicos, los cuales presentan una amplia gama de actividades biológicas^{23,24}. El grupo más numeroso de compuestos biactivos de la familia *Celastraceae* son, sin duda, los terpenoides y entre ellos podemos destacar los celastroloides y los sesquiterpenos dihidro-β-agarofuranos, tipo de metabolitos que únicamente se han aislado de especies de esta familia, considerándose indicadores quimiotaxonómicos de la misma (figura 1.4).

Los celastroloides son un grupo pequeño de metabolitos que están restringidos a las raíces de las especies de esta familia y que engloba a los nor-triterpenometilénquinonas, los derivados fenólicos y los dímeros y trímeros triterpénicos. A este tipo de metabolitos, especialmente a los nor-triterpenos se les atribuye un gran número de actividades biológicas. Así, por ejemplo tingenona presenta actividad citotóxica frente a las líneas celulares Hep-G2, H-4-II y SK-Mel-28 con CI_{50} de 1,9, 2,7 y 1,7 μ M, respectivamente²⁵ y actividad antimicrobiana frente a diferentes bacterias²⁶.

²⁰ Colas, R. *Les plantes amazoniennes designées sous le nom de “Chuchuhuasha”*. These Imprimerie André Lesot. **1937**, Paris.

²¹ Olarte, J. C. Contribución al estudio de la flora colombiana. *Seminario Latinoamericano de la Química de los Productos Naturales*. **1976**, Bogotá.

²² J. Otero. *Nuestras hierbas medicinales*. **1984**, Caja Insular de Ahorros. Santa Cruz de Tenerife.

²³ Spivey, A.; Weston, M.; Woodhead, S. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 43-59.

²⁴ González, A. G; Bazzocchi, I. L; Jiménez, I. A; Moijir, L *Studies in Natural Products Chemistry Elsevier Science: The Netherland*. **2000**, *23*, 649-738.

²⁵ Setzer, W. N.; Setzer, M. C.; Hopper, A.; Moriaty, D.; Lehrman, G. K.; Niekman; A.; Morcomb, S.; Bates, R. B.; Mc. Clure, K.; Stessman, C.; Haber, W. *Planta Med.* **1998**, *64*, 583.

²⁶ Sotanaphun, U.; Lipipum, V.; Suttisri, R.; Bavovada, R. *Planta Med.* **1999**, *65*, 450-452.

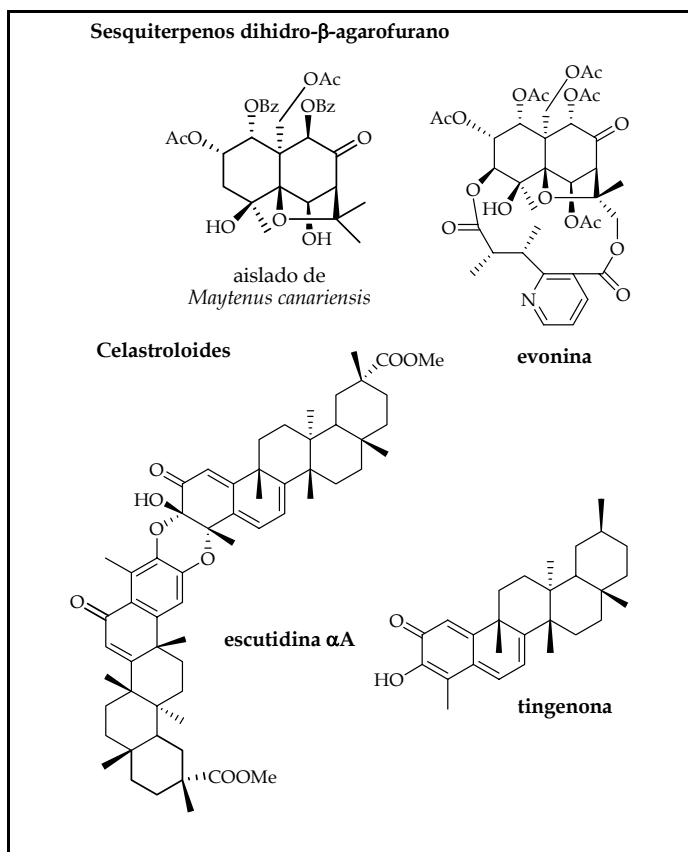


Figura 1.4. Ejemplos de sesquiterpenos dihidro- β -agarofurano y celastroloides.

Los sesquiterpenos y alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos con esqueleto de dihidro- β -agarofuranos se consideran *estructuras privilegiadas*, ya que a sus características estructurales se suma que se han descrito numerosas propiedades biológicas, como son antialimentaria e insecticida, inmunosupresora, antitumoral, inhibidora de la multirresistencia a fármacos y de la activación del virus Epstein-Barr, así como actividad anti-VIH.



2. Objetivos

2. Objetivos.

En el marco de la Química Médica, nuestro grupo de investigación desarrolla un proyecto interdisciplinar, basado en la búsqueda de nuevos metabolitos bioactivos de especies de la flora iberoamericana. La medicina tradicional de los países latinoamericanos es sumamente rica, dado la gran biodiversidad y el desarrollo etnobotánico de culturas milenarias.

Nuestras investigaciones se dirigen a especies de la familia *Celastraceae* basándonos en su uso extendido en la medicina popular y en los antecedentes bibliográficos que describen productos con actividad citotóxica, antimicrobiana, inmunosupresora, antiinflamatoria, inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr, revertidora de la multirresistencia a fármacos, antialimentaria e insecticida. Entre los principales metabolitos responsables de estas actividades destacan los celastroloides y los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos.

Estos antecedentes, han llevado a que nos planteemos los objetivos que resumimos en los siguientes puntos:

- El aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios del extracto de *n*-hexano:éter dietílico (1:1) de la corteza de la raíz y de los frutos de *Maytenus cuzcoina*.
- Aplicación de nuevas técnicas en problemas de elucidación estructural y determinación de configuraciones absolutas.
- Revisión bibliográfica de los diterpenos, triterpenos, celastroloides y sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos bioactivos aislados de celastráceas.
- Estudio de las actividades biológicas de los metabolitos aislados del extracto de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*: actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, citotóxica y quimiopreventiva (inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr).
- Desarrollar alternativas que nos permitan obtener por semisíntesis aquellos metabolitos que resulten activos *in vitro* y que no tengamos cantidad suficiente para su evaluación *in vivo*, utilizando como producto de partida compuestos comerciales o que lo hayamos obtenido en mayor cantidad de la planta.

- Evaluación de la actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos en *Leishmania* e inhibidora de la Pgp humana de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de los frutos de *M. cuzcoina*.
- Preparación de derivados al objeto de completar el estudio de la relación estructura-actividad de los sesquiterpenos como quimiomoduladores de la multirresistencia a fármacos y como agentes quimiopreventivos (virus Epstein-Barr).
- Estudio del mecanismo de acción de los sesquiterpenos como inhibidores de la Pgp humana.
- Desarrollar un modelo 3D-QSAR de sesquiterpenos aislados de celastráceas como revertidores de la MDR en *Leishmania* e inhibidores de la Pgp humana.
- Estudio de las cuestiones que se susciten a lo largo de la investigación.



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



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

3.1. Descripción botánica.

El género *Maytenus* fue descrito en una obra prelinnea por Feuillée bajo el nombre de maitén, basándose en la especie *Maytenus boaria*. El género *Maytenus* presenta como caracteres taxonómicos: fruto capsular, dehiscente por 2-3 valvas; inflorescencia normalmente en las axilas de brácteas, en ramitas muy cortadas, generalmente aglomeradas (figura 3.1).

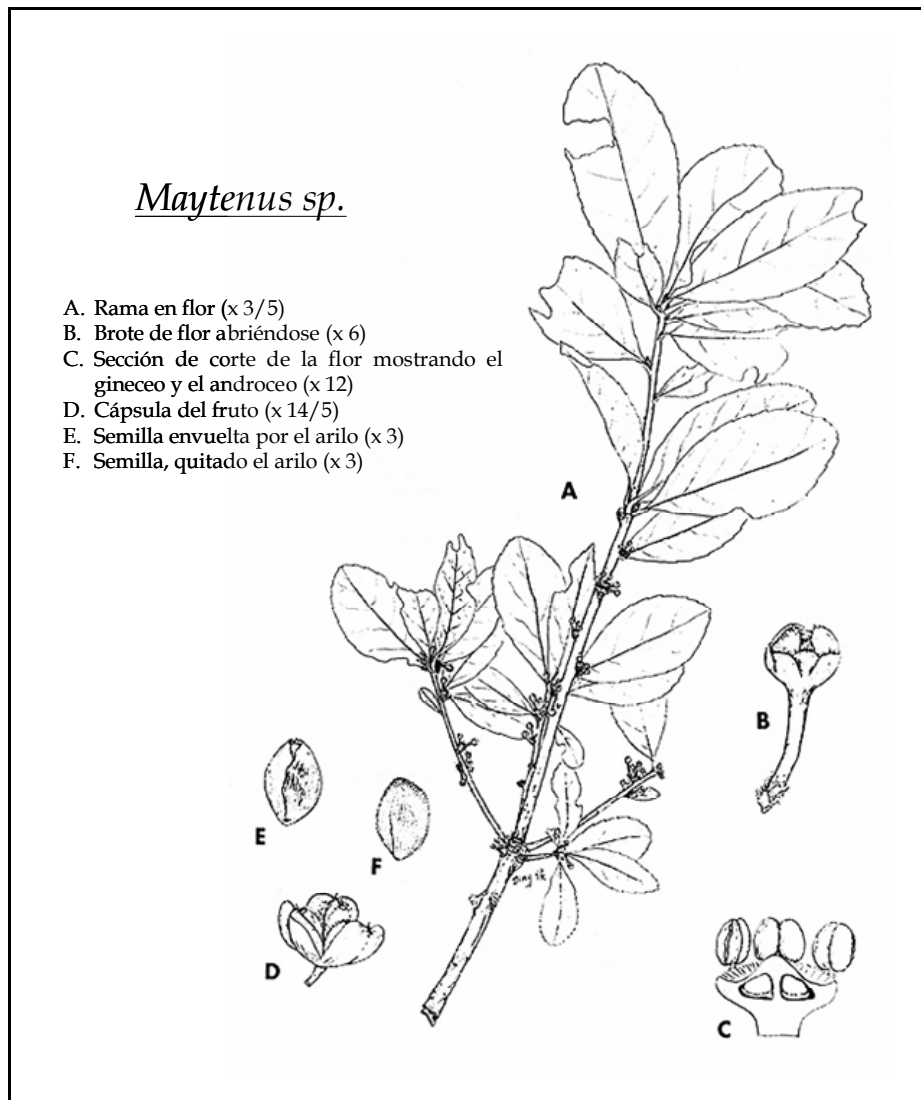


Figura 3.1. Características taxonómicas del género *Maytenus*.

Maytenus cuzcoina Loesener es un arbusto endémico de Cusco (Perú) de ramas decumbentes propio de bosque seco espinoso de valles interandinos, en rangos altitudinales entre 2600 y 3300 m (figura 3.2). Presentan hojas enteras, alternas, dísticas, glabras o escasamente pubescentes con pelos simples cortos de consistencia coriácea, con pecíolo decurrente y estípulas caducas. Inflorescencias en cimas paucifloras o a veces en fascículos terminales o axilares. Flores hermafroditas o unisexuales, actinomorfas, pequeñas, verdes amarillentas sostenidas por pedúnculos cortos; sépalos de cuatro a cinco piezas imbricadas, unidos en la base y persistentes en el fruto; pétalos con cuatro o cinco piezas libres algo mayor que los sépalos, alternando con ellos; estambres alternipétalos, con anteras biloculares introrsas con dehiscencia longitudinal o poricida; ovario súpero con dos a cuatro lóculos y uno a dos óvulos de placentación axilar, estilo generalmente reflexas al abrirse; semillas ariladas.

Posición Sistemática:

División	<i>Spermathophyta</i>
Subdivisión	<i>Magnoliophyta</i> (Angiospermas)
Clase	<i>Magnoliatae</i>
Subclase	<i>Rosidae</i>
Superorden	<i>Celastranae</i>
Orden	<i>Celastrales</i>
Familia	<i>Celastraceae</i>
Género	<i>Maytenus</i>
Especie	<i>Maytenus cuzcoina</i>
Nombre científico	<i>Maytenus cuzcoina</i> Loesener
Nombre común	Paltay-Paltay

3.2. Recolección.

La corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*, fue recolectada en diciembre de 1998 y los frutos en diciembre del 2000, en la comunidad de Huayllabamba-Urquillos a 2970 metros de altitud (figura 3.2), Provincia de Urubamba, Cusco (Perú). El espécimen se encuentra depositado como "CUZ" 02765 A.T. 1004 (MO) en el Herbario Vargas del Departamento de Botánica de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad en Cusco. El material seco fue transportado y almacenado en condiciones de ausencia de humedad y luz.

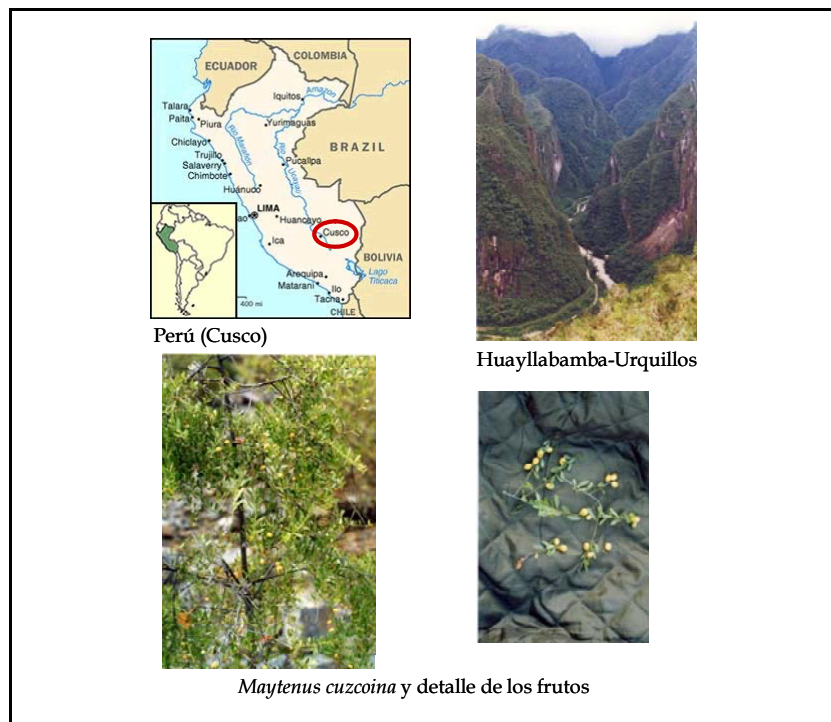
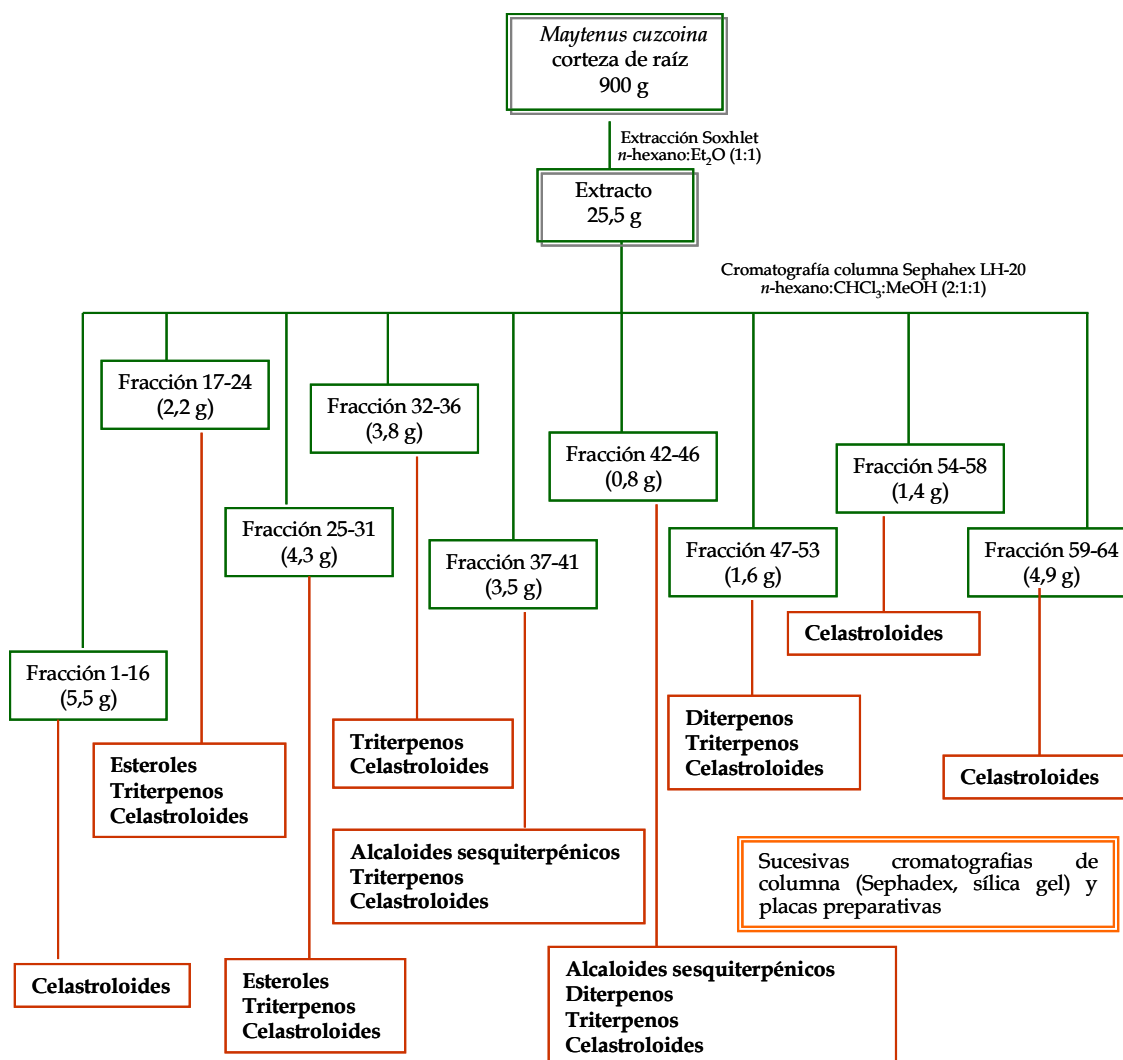


Figura 3.2. Zona de recolección e imagen de *Maytenus cuzcoina*.

3.3. Extracción y fraccionamiento cromatográfico.

3.3.1. Corteza de la raíz.

La corteza de las raíces (900 gramos) finamente divididas se extrajeron con una mezcla de *n*-hexano: éter dietílico (1:1) en un equipo Soxhlet a reflujo durante 48 horas, obteniéndose 25,5 gramos de un extracto de color rojizo (esquema 3.1). El extracto se fraccionó posteriormente sobre una columna de Sephadex LH-20, usando como eluyente *n*-hexano-cloroformo-metanol (2:1:1). Se recogieron 94 fracciones que se reunieron en 9 grupos de acuerdo con la similitud presentada en cromatografía en capa fina. Los diferentes grupos se sometieron a sucesivas cromatografías sobre gel de sílice en columnas y placas preparativas usando como eluyente mezclas de *n*-hexano, acetato de etilo, acetona, diclorometano, éter dietílico, dioxano y tolueno. Así, de manera general, se obtuvieron alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos, diterpenos, triterpenos, esteroides y celastrolídeos. En la parte experimental de cada uno de los capítulos de la presente Memoria, se detalla el tipo de metabolito y las cantidades aisladas.



Esquema 3.1. Esquema general del fraccionamiento cromatográfico de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*.

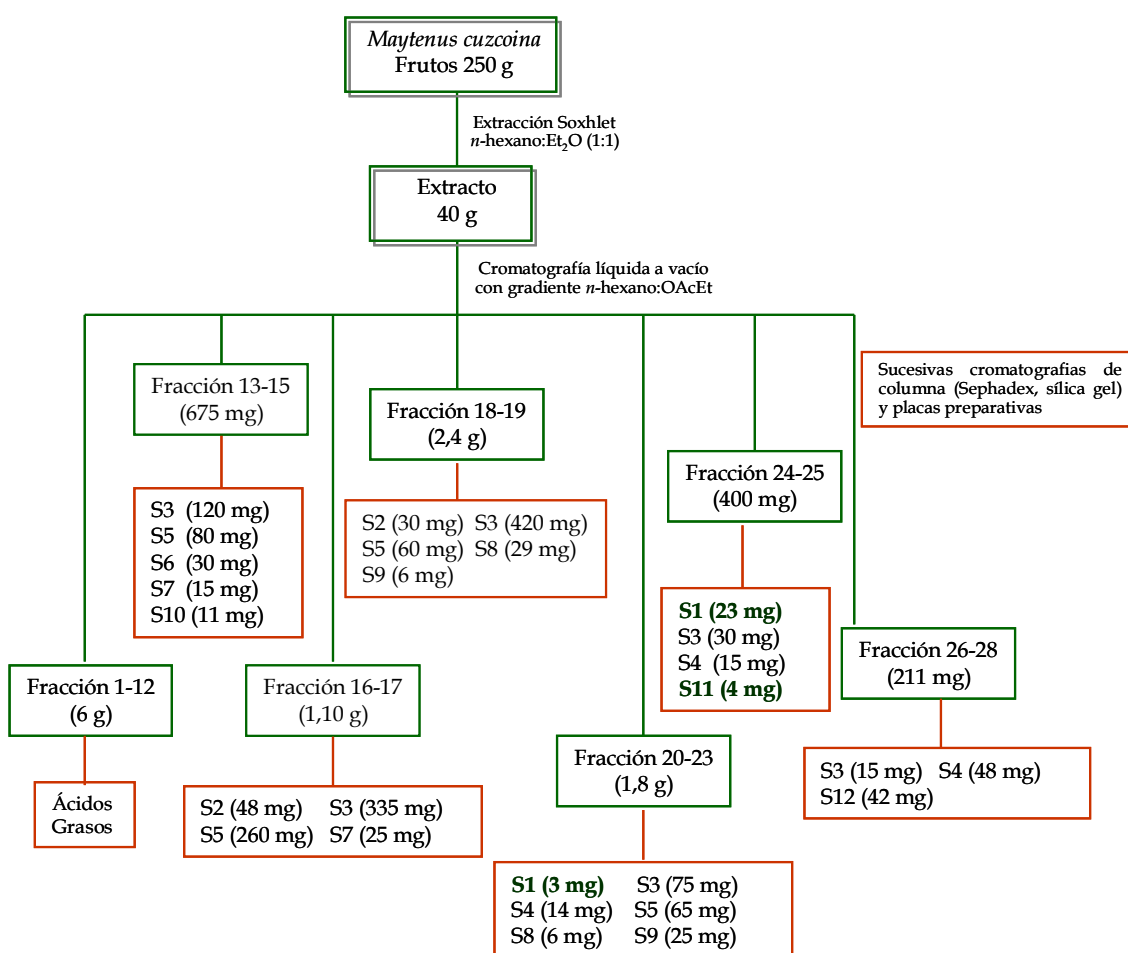
3.3.2. Frutos.

Los frutos molidos (250 g) se extrajeron con una mezcla de *n*-hexano-éter dietílico (1:1) en un equipo Soxhlet a reflujo durante 48 horas, a continuación el disolvente fue eliminado a vacío, obteniéndose 40 gramos de extracto. El extracto fue fraccionado siguiendo la metodología descrita en un trabajo anterior de nuestro grupo¹ obteniéndose, además de los metabolitos anteriormente descritos, dos sesquiterpenos (**S1** y **S11**) que resultaron nuevos en la bibliografía.

¹ Tincusi, B. M. *Metabolitos secundarios bioactivos de la flora medicinal iberoamericana: Piper elongatum, Copaifera paupera, Crossopetalum tonduzzi y Maytenus cuzcoina*. 1999, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.



Así, el extracto fue fraccionado mediante una cromatografía líquida a vacío sobre gel de sílice de capa fina, utilizando como eluyente una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo de polaridad creciente, de esta manera se recogieron veintiocho fracciones. Estas fracciones fueron reunidas, de acuerdo con la similitud que presentaban en cromatografía de capa fina, en siete grupos que se purificaron mediante sucesivas cromatografías sobre gel de sílice en columnas y placas preparativas, como se detalla en el esquema 3.2, usando como eluyentes mezclas de *n*-hexano, acetona, acetato de etilo, diclorometano, éter dietílico y dioxano. Se obtuvieron así, un total de 12 sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano, que denominamos de **S1** a **S12**.

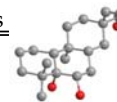


Esquema 3.2. Fraccionamiento cromatográfico de los metabolitos secundarios de los frutos de *Maytenus cuzcoina*.



4. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA CORTEZA DE LA RAÍZ

4.1. Díterpenos



4.1. Diterpenos

4.1.1. Introducción

Los diterpenos son poco frecuentes en la familia *Celastraceae*¹. Sin embargo, esto no hace menos interesante a este tipo de metabolitos, ya que algunos de los diterpenos aislados de especies de esta familia han mostrado interesantes actividades biológicas.

Hasta la fecha sólo se han aislado diterpenos de 13 especies de celastráceas: *Celastrus hypoleucus*², *Crossopetalum gaumeri*³, *C. stephanotifolius*⁴, *C. uragoga*⁵, *Gyminda costarricensis*^{6,7}, *Maytenus dispermus*⁸, *Orthosphenia mexicana*⁹, *Rzedowskia tolantonguensis*¹⁰, *Salacia oblonga*¹¹, *Tripterygium hypoglaucum*¹², *T. regelii*^{13,14}, *T. doianum*¹⁵ y *T. wilfordii*^{16,17,18}.

La biosíntesis de la mayoría de los diterpenos comienza con un ataque electrofílico al doble enlace terminal del pirofosfato de geranilgeranilo (PPGG, C₂₀), proceso que da lugar a una serie de ciclaciones y modificaciones posteriores que conducen a una gran variedad de estructuras químicas (figura 4.1.1). Dependiendo del

¹ González, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez, I. A.; Moijir, L. *Studies in Natural Products Chemistry* Elsevier Science: The Netherland. **2000**, 23, 649-738.

² Wang, H.; Tian, X.; Yao-Zu, C. *J. Chin. Chem. Soc.* **2002**, 49, 3, 433-436.

³ Ankli, A.; Heilmann, J.; Heinrich, M.; Sticher, O. *Phytochemistry*. **2000**, 54, 531-537.

⁴ Chen, B.; Duan, H.; Takaishi, T. *Phytochemistry*. **1999**, 51, 683-687.

⁵ Núñez, M., *C. Metabolitos secundarios bioactivos aislados de Maytenus chiapensis y Crossopetalum uragoga (Celastraceae)*. **2003**, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.

⁶ Castro, V.; Calzada, J.; *Rev. Latinoam. Quím.* **1984**, 15, 135-136.

⁷ Castro, V.; Mojica, E.; Calzada, J. *Ing. Cien. Quím.* **1986**, 10, 5-6.

⁸ Martín, J. D. *Tetrahedron*. **1973**, 29, 2553-2559.

⁹ González, A. G.; San Andrés, L.; Ravelo, A. G.; Luis, J. G.; Jiménez, I. A. *J. Nat. Prod.* **1989**, 52, 6, 1338-1341.

¹⁰ González, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Luis, J. G.; Ravelo, A. G.; Fraga, B. M.; Domínguez, X. A. *Perales, A. J. Chem: Res, Synop.* **1986**, 12, 442-443.

¹¹ Matsuda, H.; Murakami, T.; Yashiro, K.; Yamahara, J.; Yoshikawa, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, 77 (2), 1725-1729.

¹² Duan, H.; Kawazoe, K.; Bando, M.; Kido, M.; Takaishi, Y. *Phytochemistry*. **1997**, 46, 535-543.

¹³ Wu, D.-G.; Sun, X.-C.; Li, F. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*. **1979**, 1, 29,36.

¹⁴ Shen, J.; Zhou, B. *Chinese Chem. Lett.* **1992**, 3, 113-116.

¹⁵ Tanaka, N.; Ooba, N.; Duan, H.; Takaishi, Y.; Nakanishi, Y.; Bastow, K.; Lee, K. H. *Phytochemistry*. **2004**, 65, 2071-2076.

¹⁶ Wu, X. Y.; Qin, G. W.; Xu, R. S.; Fan, D. J. *Planta Med.* **1994**, 60, 189-192.

¹⁷ Takaishi, Y.; Wariishi, N.; Tateishi, H.; Kawazoe, K.; Miyagi, K.; Kunhua, L.; Hongquan, D. *Phytochemistry*. **1997**, 45, 979-984.

¹⁸ Shishido, K.; Nakano, K.; Wariishi, N.; Tateishi, H.; Omodani, T.; Shibuya, M.; Goto, K.; Ono, I.; Takaishi, Y. *Phytochemistry*, **1994**, 35, 731-737.

plegamiento del PPGG, el sistema bicíclico formado inicialmente tendrá una configuración distinta en los estereocentros creados y dará lugar a series diferentes de compuestos (la serie natural y la enantiomérica, *ent*).

Desde el aislamiento de los primeros diterpenos de especies de las celastráceas en la década de los sesenta por S. M. Kupchan¹⁹, hasta la actualidad se han identificado aproximadamente 250 diterpenos, siendo los diterpenos con esqueleto de abietano los más frecuentes. También se han descrito diterpenos con esqueleto de labdano, isopimarano, kaureno, podocarpano y totarano.

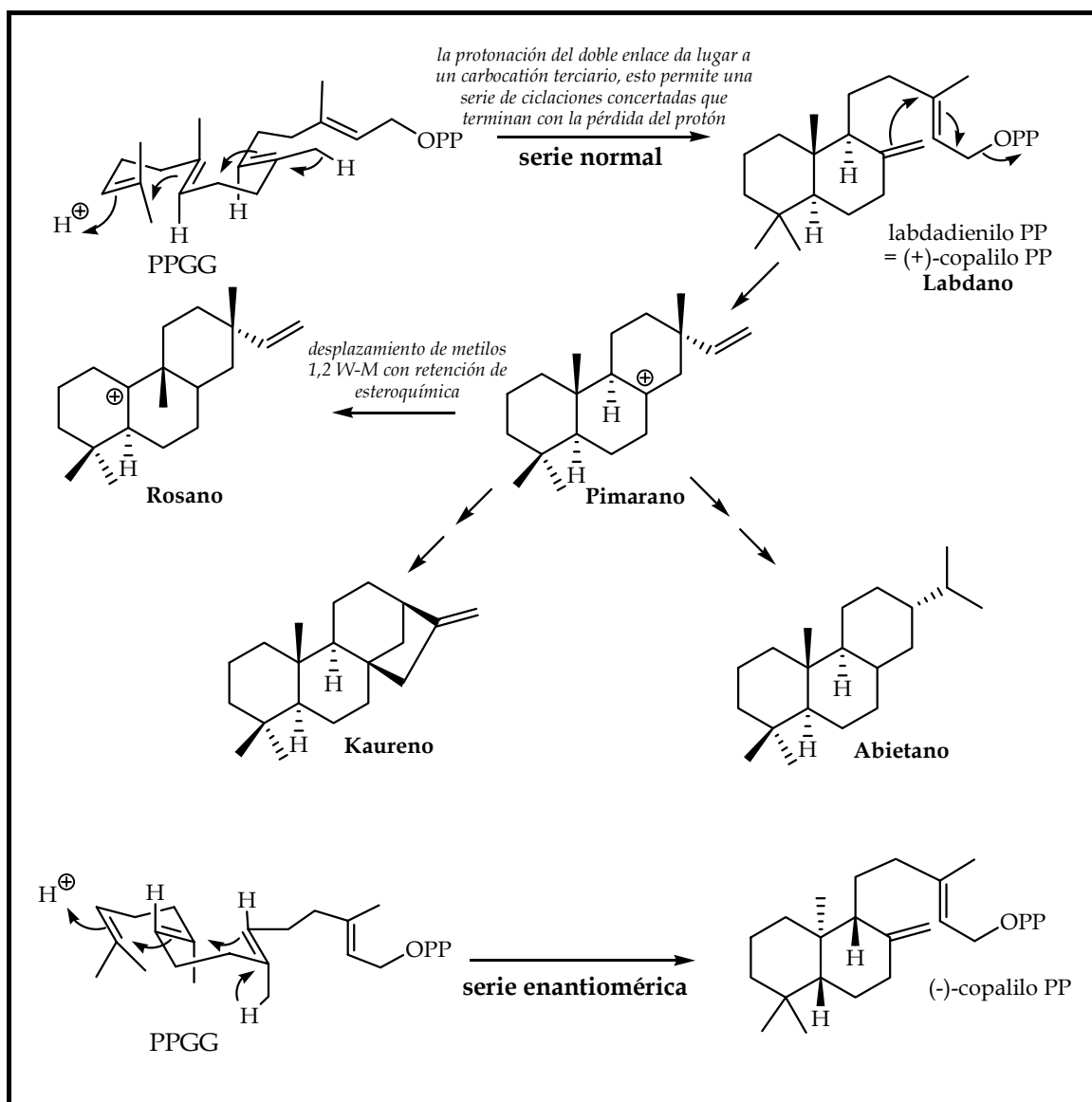
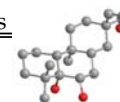


Figura 4.1.1. Biosíntesis de diferentes diterpenos aislados de especies de *Celastraceae*.

¹⁹ Kupchan, S. M.; Court, W. A.; Dailey, Jr. R. G.; Gilmore, C. J.; Bryan, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 7194-7195.



4.1.1.1. Actividad biológica de los diterpenos aislados de celastráceas

Los diterpenos con esqueleto de abietano aislados de la familia *Celastraceae*, presentan un alto grado de oxidación e interesantes actividades biológicas, lo que ha estimulado la búsqueda de diterpenos en esta familia. A continuación detallaremos las actividades biológicas descritas para este tipo de metabolitos.

4.1.1.1.1. Actividad anticancerígena

En 1972 Kupchan y colaboradores publicaron que el extracto etanólico de *Tripterigium wilfordii* mostraba significativa actividad *in vivo* frente a ratones con leucemias tipo L-210 y P-388, e *in vitro* frente a células KB, derivadas de carcinoma humano carciofaríngeo. El fraccionamiento bio-dirigido reveló que los responsables de dicha actividad eran triptolida, triptodiolida y triptonida (figura 4.1.2). En trabajos posteriores se publicaron los efectos citotóxicos de la **triptolida** frente a células de cáncer de mama, estómago y leucemia²⁰, resultados que sugieren su posible potencial sobre algunos tipos de tumores sólidos.

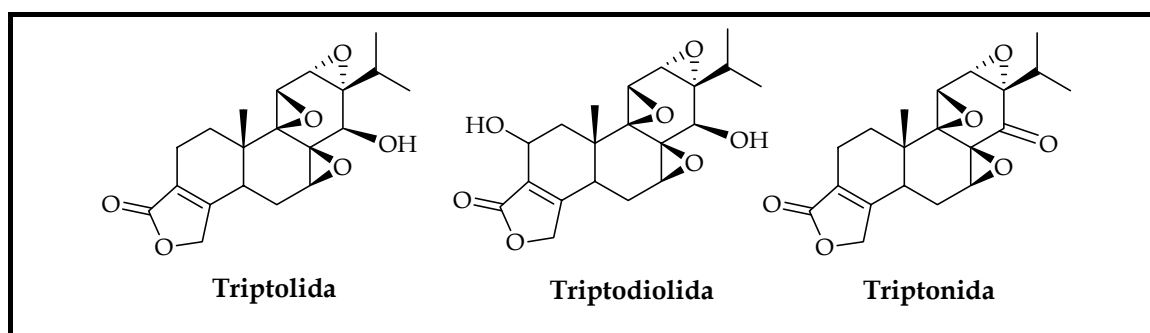


Figura 4.1.2. Diterpenos aislados de *T. wilfordii* con actividad citotóxica y antitumoral.

4.1.1.1.2. Actividad inmunosupresora y antiinflamatoria

En los últimos 20 años, se han estudiado numerosas plantas usadas en la medicina tradicional China en la búsqueda de metabolitos con actividad inmunomoduladora. Una de las plantas más prometedoras es *T. wilfordii*, aislándose de la misma, lactonas diterpénicas con actividad antiinflamatoria e

²⁰ Shamon, L. A.; Pezzuto, J. M.; Graves, J. M.; Mehta, R., R.; Wangcharoentrakul, S.; Sangsuwan, R.; Chaichana, S.; Tuchinda, P.; Cleason, P.; Reutrakul, V. *Cancer Lett.* **1997**, *112*, 113-117.

inmunomoduladora^{21,22}, siendo la triptolida y relacionados, uno de los principales componentes inmunomoduladores de esta planta, no estando claro su mecanismo de acción. Estos metabolitos representan una nueva clase de productos con un futuro potencial clínico.

4.1.1.1.3. Actividad anticonceptiva

El desarrollo de anticonceptivos ha estado encaminado al aparato reproductor femenino. La dificultad de aplicar este método a los hombres y la falta de concienciación al respecto, han obstaculizado la obtención de anticonceptivos masculinos. Desde que en los años 60 se introdujera la píldora anticonceptiva femenina, no se han producido avances importantes en lo referente a los anticonceptivos para el hombre.

Los extractos acuosos y alcohólicos de las raíces de *T. wilfordii*, han mostrado tener efecto sobre el sistema reproductor, lo que ha estimulado la investigación, particularmente en lo relacionado con el sistema reproductor masculino y su posible uso en el control de la natalidad. En diversos estudios, se ha concluido que la administración de pequeñas dosis de *T. wilfordii* causa una esterilidad masculina reversible.

Zhen y col.²³ aislaron de esta planta seis diterpenos epoxidados, que fueron evaluados, resultando los metabolitos responsables de la actividad anticonceptiva la triptolidenol y tripclorida (figura 4.1.3).

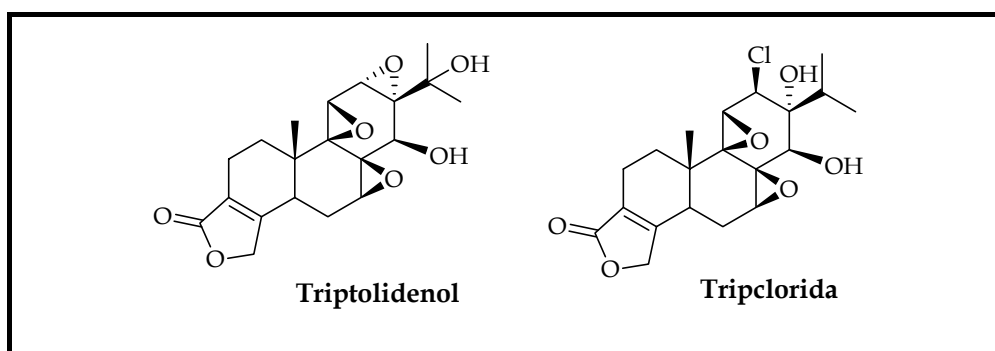
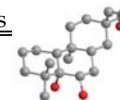


Figura 4.1.3. Diterpenos aislados de *T. wilfordii* con actividad anticonceptiva

²¹ Duan, H.; Takaishi, Y.; Momota, H.; Ohmoto, Y.; Taki, T. Jia, Y. Li, D. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1522-1525.

²² Duan, H.; Takaishi, Y.; Momota, H.; Ohmoto, Y.; Taki, T.; Tori, M.; Takaoka, S.; Jia, Y.; Li, D. *Tetrahedron.* **2001**, *57*, 8413-8424.

²³ Zheng, J. *Acta Academiae Medicinae Sinicae.* **1991**, *13* (6), 398-403.



4.1.1.1.4. Actividad antialérgica

En el curso de un programa de búsqueda de compuestos antialérgicos a partir de plantas de la flora China, el extracto etanólico de *T. wilfordii* mostró potente actividad antagonista del leucotrieno D₄ (LTD₄). Del fraccionamiento bioguiado del extracto, se aislaron cuatro compuestos bioactivos, todos ellos diterpenos. Estos compuestos son los primeros diterpenos que se reportan como antagonistas de LTD₄ y sus resultados explican porque se prescribe *T. wilfordii* en la medicina tradicional China como un agente antiasmático²⁴ (figura 4.1.4).

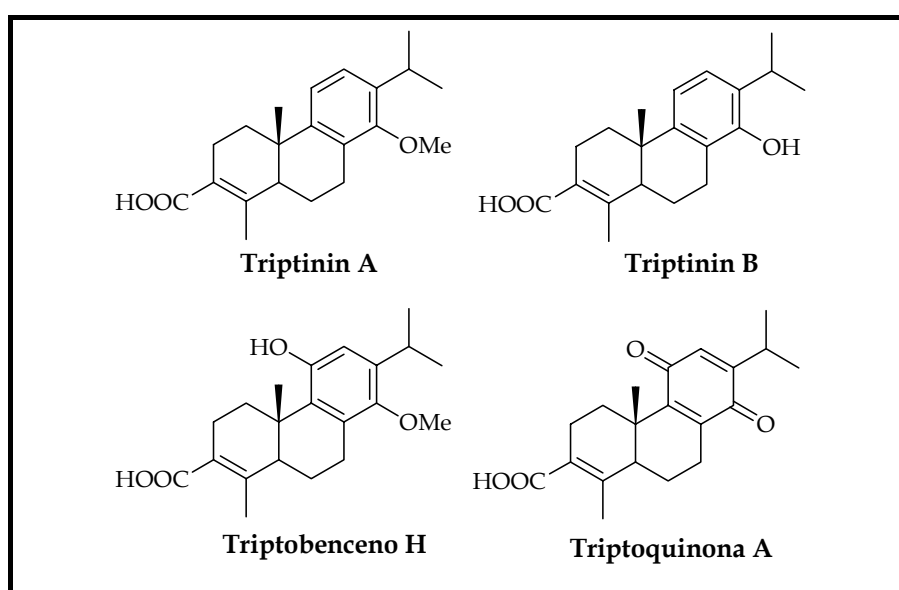


Figura 4.1.4. Diterpenos aislados de *T. wilfordii* con actividad antialérgica.

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

Dentro de una línea de investigación existente en nuestro grupo de trabajo, centrada en la búsqueda de nuevos agentes quimiopreventivos, los diterpenos de la serie del abietano aislados de *Crossopetalum uragoga*, resultaron tener una prometedora actividad inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr⁵.

²⁴ Xu, J.; Ikekawa, T.; Ohkawa, M.; Yolota, I.; Hara, N.; Fujimoto, Y. *Phytochemistry*. **1997**, *44*, 1511-1514.

El producto más activo fue el carnosol (figura 4.1.5), que reduce la carcinogénesis inducida en ratones, hasta en un 73,4 % en 10 semanas de tratamiento, resultados que hacen de este compuesto un potencial agente quimiopreventivo.

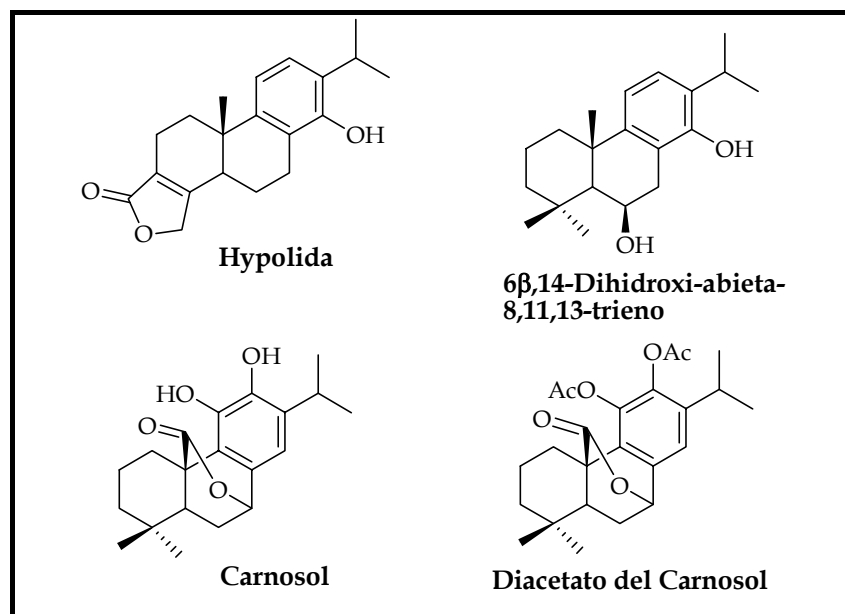


Figura 4.1.5. Diterpenos aislados de *Crossopetalum uragoga* con actividad quimiopreventiva.

4.1.1.2. Aproximaciones sintéticas a los diterpenos de tipo triptolida.

El amplio rango de actividades biológicas de los diterpenos triepoxidados, triptolida y sus derivados, ha estimulado la obtención de este tipo de metabolitos, desarrollándose líneas de cultivos celulares de plantas, que produzcan estos compuestos en mayor rendimiento y bajo condiciones controladas. Así, Kutney y col.^{25,26} desarrollaron una línea celular estable de *T. wilfordii*, conocida como TRP4a, capaz de producir los diterpenos citotóxicos, triptolida (1) y triptodiolida (2), con un rendimiento de 3 a 16 veces mayor que el observado en plantas colectadas en el campo.

Van Tamelen²⁷ y Buckanin²⁸, realizaron los primeros esfuerzos en la síntesis total de triptolida. Posteriormente, Yang y col.²⁹, describieron un método eficaz para la síntesis total de análogos de triptolida, utilizando dioxiranos generados *in situ*.

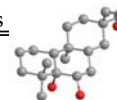
²⁵ Kutney, J. P.; Hewitt, G. M.; Kurihara, T.; Salisbury, P. J.; Sindelar, R. D.; Stuart, K. L.; Townsley, P. M.; Chalmers, W. T.; Jacoli, G. G. *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 2677-2683.

²⁶ Kutney, J. P.; Hewitt, G. M.; Lee, G.; Piotrowska, K.; Roberts, M.; Rettig, S. J. *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 1455-1480.

²⁷ Van Tamelen, E. E.; Demers, J. P.; Taylor, E. G.; Soller, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5424-5425.

²⁸ Buckanin, R. S.; Chen, S. J.; Zimmerman, D. F.; Sher, F. T.; Berchtold, G. A. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 2364-2369.

²⁹ Yang, D.; Wong, M. K.; Cheung, K. K.; Chan, E. W. C.; Xie, Y. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6865-6868.



Recientemente, se llevó a cabo con éxito la síntesis total enantioselectiva de triptolida (1) y triptonida (3), entre otros diterpenos por Yang y *col.*³⁰, utilizando $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ como catalizador asimétrico en la etapa clave, la ciclación oxidativa radicalaria del éster (+)-8-fenilmentilo (figura 4.1.6).

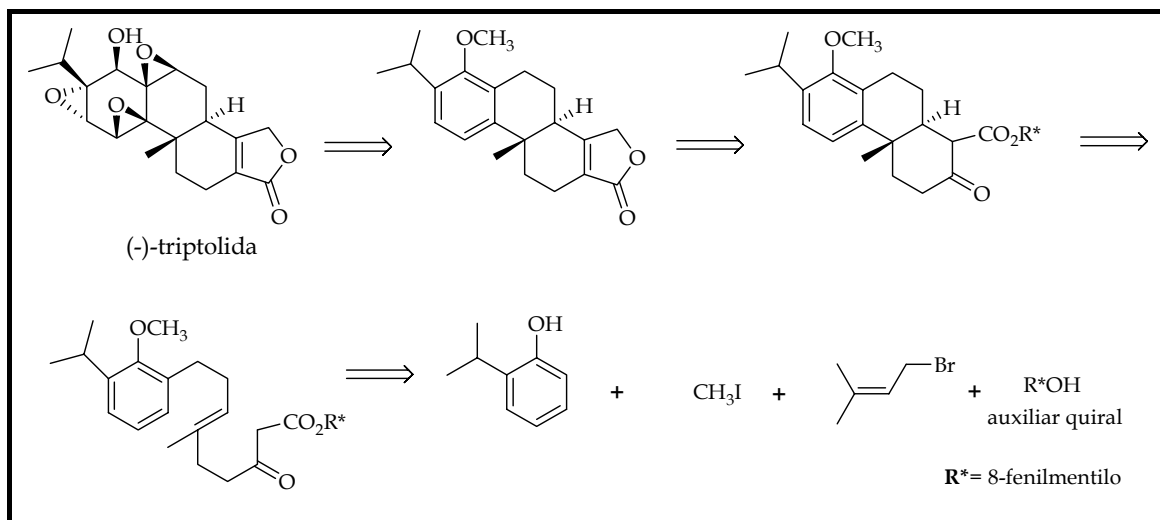


Figura 4.1.6. Esquema retrosintético de la síntesis de triptolida y derivados (Yang y *col.*).

4.1.2. Resultados y discusión.

Del extracto de *n*-hexano-etér dietílico (1:1) de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*, se aislaron dos diterpenos con esqueleto de *ent*-rosano, que hemos denominado **D1** y **D2**. La estructura de estos diterpenos la determinamos mediante el estudio de sus datos físicos y espectroscópicos, resultando ambos nuevos en la bibliografía química.

A continuación pasamos a discutir la elucidación estructural de **D1** y **D2**.

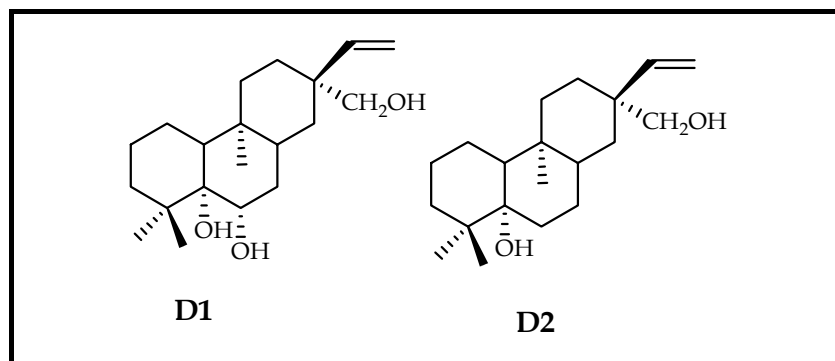


Figura 4.1.7. Diterpenos aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*.

³⁰ Yang, D.; Ye, X.-Y.; Xu, M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2208-2217.

Diterpeno D1

El diterpeno que hemos denominado **D1** presentó una fórmula molecular $C_{20}H_{34}O_3$, determinada por espectrometría de masas de alta resolución, fórmula que indica cuatro grados de insaturación para nuestro metabolito y que está de acuerdo con los datos de RMN 1H y ^{13}C . El espectro de masas presentó fragmentos correspondientes a la pérdida de metilo (M^+-CH_3 , 307) y agua (M^+-H_2O , 304).

En su espectro de IR, mostró una banda de absorción característica de grupo hidroxilo (3418 cm^{-1}). El espectro de RMN 1H (figura 4.1.8) presentó como señales más características un sistema vinílico ABX, con un protón como doblete centrado a $5,59\text{ }\delta$ ($J= 10,9, 17,8\text{ Hz}$) y dos protones como dobletes a $5,32\text{ }\delta$ ($J= 10,9\text{ Hz}$) y $5,13\text{ }\delta$ ($J= 17,8\text{ Hz}$). Además, se observaron señales para un protón geminal a un alcohol primario como singlete a $3,25\text{ }\delta$ y un alcohol secundario, como doblete a $3,78\text{ }\delta$ ($J= 5,5, 11,1\text{ Hz}$), así como dos singletes a $0,91\text{ }\delta$ (3H) y $1,00\text{ }\delta$ (6H), asignables a tres metilos angulares.

Por otra parte, se observó un singlete a $2,18\text{ }\delta$, que integra para dos protones y que es intercambiable con agua deuterada, D_2O , lo que nos indica que corresponden a dos protones de grupos hidroxilos.

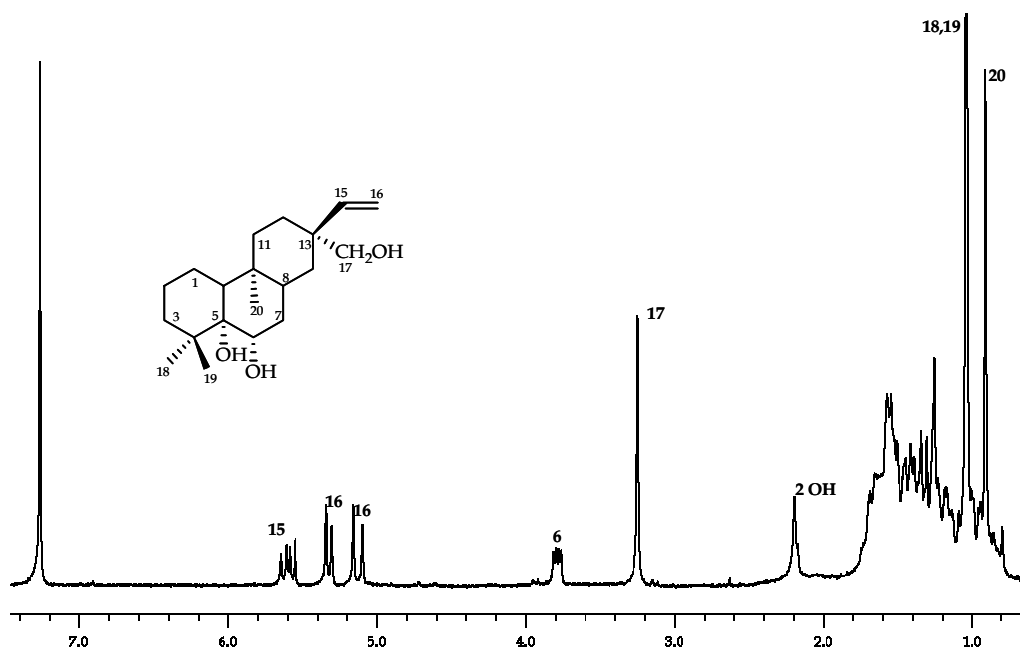
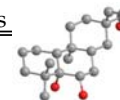


Figura 4.1.8. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **D1**.

En su espectro de RMN ^{13}C (figura 4.1.9) y experimentos DEPT, se observaron señales para 20 carbonos, distribuidos en tres metilos, nueve metilenos, cuatro metinos



y cuatro carbonos cuaternarios. Además de confirmar la presencia del doble enlace monosustituido a 116,5 δ (t) y 143,1 δ (d), presenta como señales características tres carbonos unidos a oxígeno, correspondientes a un carbono metilénico a 71,7 δ , un carbono metínico a 71,9 δ y un carbono cuaternario a 77,9 δ .

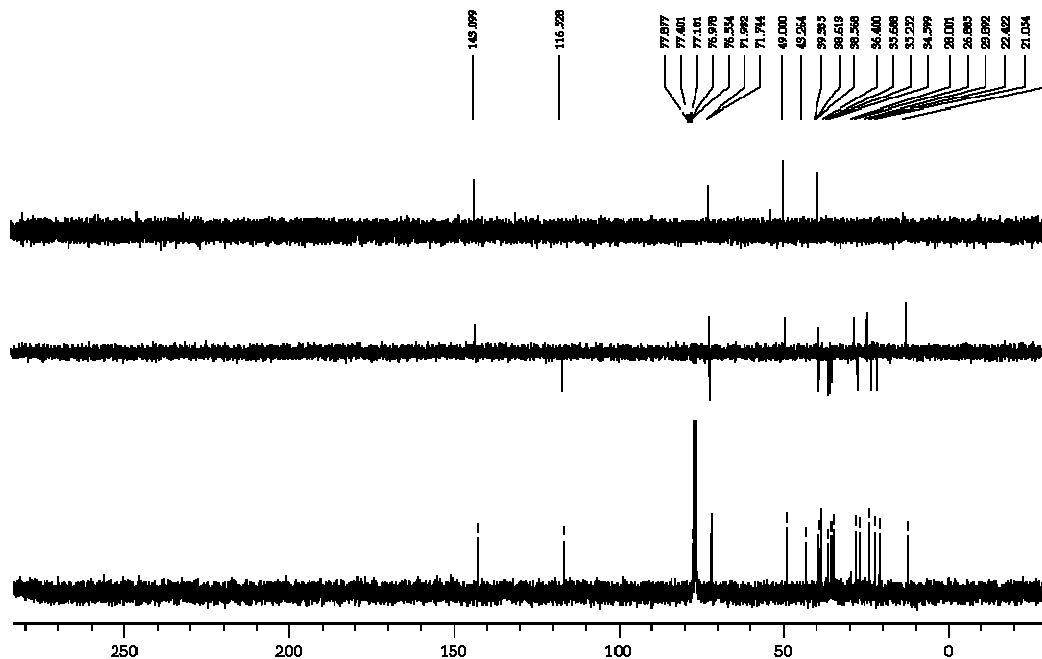


Figura 4.1.9. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de **D1**.

Estos datos y la comparación con los existentes en la bibliografía para metabolitos aislados de especies de *Celastraceae*, está de acuerdo con una estructura de diterpeno tricíclico, con tres grupos hidroxilos y un doble enlace monosustituido.

La posición de los distintos grupos funcionales sobre el esqueleto se determinó mediante el estudio de un experimento HMBC (figura 4.1.10). Así, correlación a larga distancia de los Me18 y 19 con el C5, de H6 con el C7 y de H17 con C12, C13, C14 y C15, nos permitió situar los alcoholes terciario y secundario sobre los carbonos 5 y 6, respectivamente y el alcohol primario sobre el carbono 17. El doble enlace monosustituido lo situamos sobre los carbono 15 y 16 por la correlación observada de H15 con C12 y C13. Por otro lado, se observó correlación a tres enlaces entre los protones del metilo 20 a 0,91 δ_{H} y dos carbonos metínicos a 38,6 y 49,0 δ_{C} , asignados a C8 y C10, respectivamente, lo que indicó que el Me20 está situado sobre el carbono 9. Los diterpenos con esqueleto de isopimarano, tipo de diterpenos que han sido aislados anteriormente de especies de celastráceas, presentan el Me20 sobre el C10, mientras que aquellos con esqueleto de rosano presentan como única diferencia la posición de este metilo, que se encuentra sobre C9. Así, en nuestro caso el diterpeno **D1** presenta

un esqueleto de rosano, que posteriormente determinamos que correspondía a la serie enantiomérica.

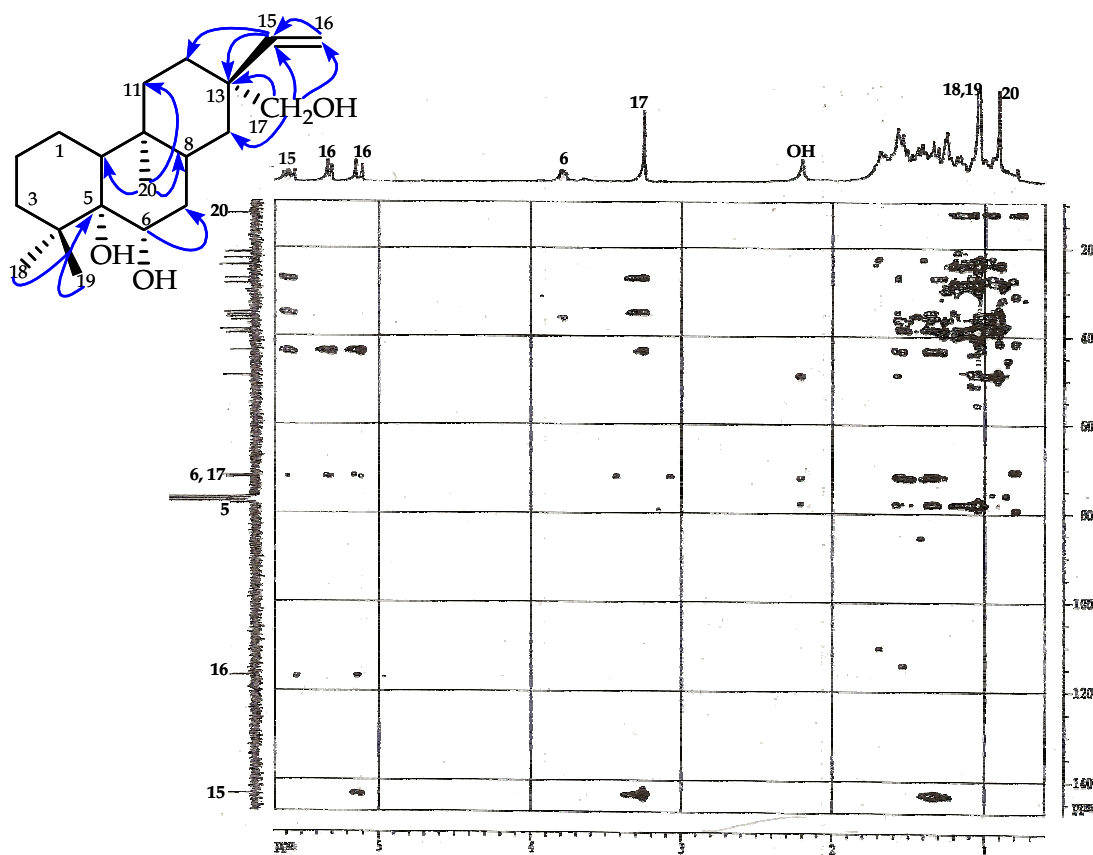
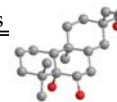


Figura 4.1.10. Experimento **HMBC** para D1

El estudio de las constantes de acoplamiento, así como de los experimentos ^1H - ^1H de RMN (COSY y ROESY), nos permitieron establecer la estereoquímica relativa de los diferentes grupos sobre la molécula. Así, las constantes de acoplamiento de H6 indicaron que está en disposición β , lo que fue confirmado por el efecto ROE observado en el experimento ROESY entre H6 y H10 y H8. La estereoquímica α para el grupo hidroxilo sobre H17 se estableció por el efecto ROE observado entre H17 y el Me20, situando a su vez el doble enlace monosustituido en disposición β (figura 4.1.11).

Por otra parte, se observó efecto ROE entre el Me18 y Me20 con la señal correspondiente a los dos protones de los grupos hidroxilos en C5 y C6, dato que está de acuerdo con los existentes en la bibliografía, en la que todos los diterpenos con esqueleto de *ent*-rosano con un grupo hidroxilo terciario sobre C5 tiene una



esteroquímica α ^{31,32,33}. Además, en un estudio de mecánica molecular (PC Model 7.0)³⁴, el conformero de menor energía presenta un puente de hidrógeno entre los grupos hidroxilo situados en el C5 y C6, lo que sólo es posible si ambos presentan la misma estereoquímica relativa.

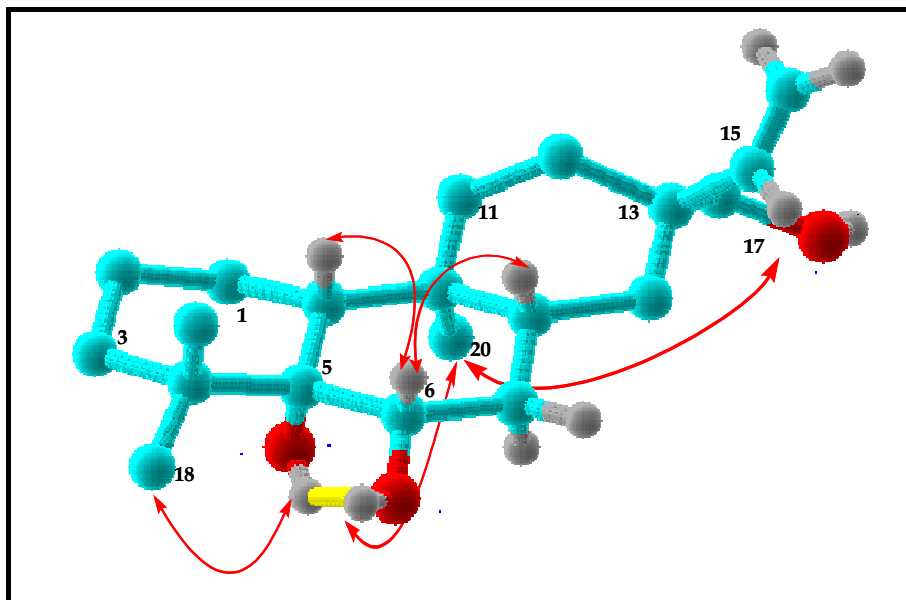


Figura 4.1.11. Conformero de menor energía de **D1**, en **amarillo** se indica el puente de hidrógeno entre los dos grupos hidroxilos y las **flechas rojas** señalan los efectos ROE más significativos.

Los diterpenos con esqueleto de *ent*-rosano descritos en la bibliografía tienen un valor de rotación óptica (α_D) con signo negativo, por lo que dado que **D1** presentó un $[\alpha]_D^{20} -5,9^\circ$ (c 0,10, CHCl_3), dedujimos que es un diterpeno de la serie enantiomérica. Con estos datos proponemos la estructura de 5 α , 6 α , 17-trihidroxi-*ent*-ros-15-eno para **D1**.

La configuración absoluta del alcohol secundario sobre C6 se determinó aplicando el método de Riguera^{35,36}, una variación del método de Mosher, basada en el uso del ácido 2-fenil-2-metoxi-acético (MPA) como reactivo y sal de bario (II) como agente quelante. Esta metodología presenta como ventaja que sólo se requiere una pequeña cantidad de muestra, ya que sólo es necesario preparar uno de los ésteres, el

³¹ Yiping, Y.; Zongjian, T.; Shengchu, F.; Xu, R.; Zhong, Q.; Zhong, Y. *Huaxue Xuebao*. **1992**, 50 (2), 200-204.

³² Liu, X.T.; Pan, Q.; Shi, Y.; Willians, I. D.; Sung, H. Y.; Zhang, Q.; Liang, J. Y.; Ip, N. Y.; Min, Z. D. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 255-260.

³³ Geis, W.; Becker, H. *Phytochemistry*. **2000**, 53, 247-252.

³⁴ PC Model from Serena Software, P. O. Box. 3076, Bloomington, IN 47402-3076.

³⁵ García, R.; Seco, J. M.; Vázquez, S. A.; Quiñoa, E.; Riguera, R. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4579-4589.

³⁶ Seco, J. M.; Quiñoa, E.; Riguera, R. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 17-117.

(*R*) o el (*S*)-MPA, asignándose la configuración absoluta mediante la comparación de los desplazamientos químicos en RMN ^1H de los sustituyentes (G_1 y G_2) antes y después de saturar con BaSO_4 [$\Delta\delta^{\text{Ba}} = (\text{MPA éster}) \delta - (\text{MPA éster} + \text{Ba}) \delta$].

Siguiendo este procedimiento, esterificamos **D1** con el ácido (*R*)-(-)-2-fenil-2-metoxi-acético [(*R*)-(-)-MPA] (figura 4.1.12) y registramos los espectros de RMN ^1H del éster resultante (**D1A**), antes y después de saturar con sulfato de bario. Con la finalidad de establecer de forma inequívoca el desplazamiento y multiplicidad de las señales correspondientes a H7 y H8, los cuales están solapados con otras señales entorno a 1-2 ppm, realizamos un experimento TOCSY selectivo, irradiando la señal correspondiente a H6 a 4,04 δ .

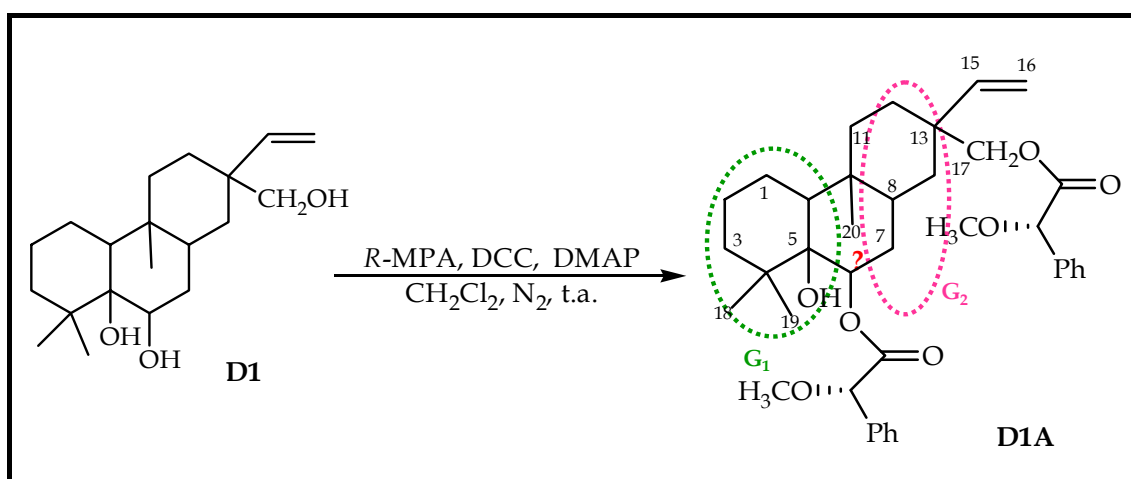


Figura 4.1.12. Preparación del derivado **D1A**.

Así, observamos que las señales correspondientes a G_1 , señalado en verde en la figura 4.1.12, se desplazan a campos más bajos al saturar la muestra con BaSO_4 ($\Delta\delta^{\text{Ba}} = -$) y las variaciones en los desplazamientos de las señales de G_2 (H7 y H8) son hacia campos más altos ($\Delta\delta^{\text{Ba}} = +$). Aplicando el modelo de Riguera (figura 4.1.13), se sitúa el sustituyente más apantallado (G_2) enfrente al fenilo del éster quiral, lo que permite determinar la configuración absoluta del alcohol secundario como 6*S*.

Estos datos confirman que el diterpeno que hemos denominado como **D1** es de la serie enantiomérica, quedando establecida su estructura como (5*S*,6*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*S*)-5,6,17-trihidroxi-*ent*-ros-15-eno.

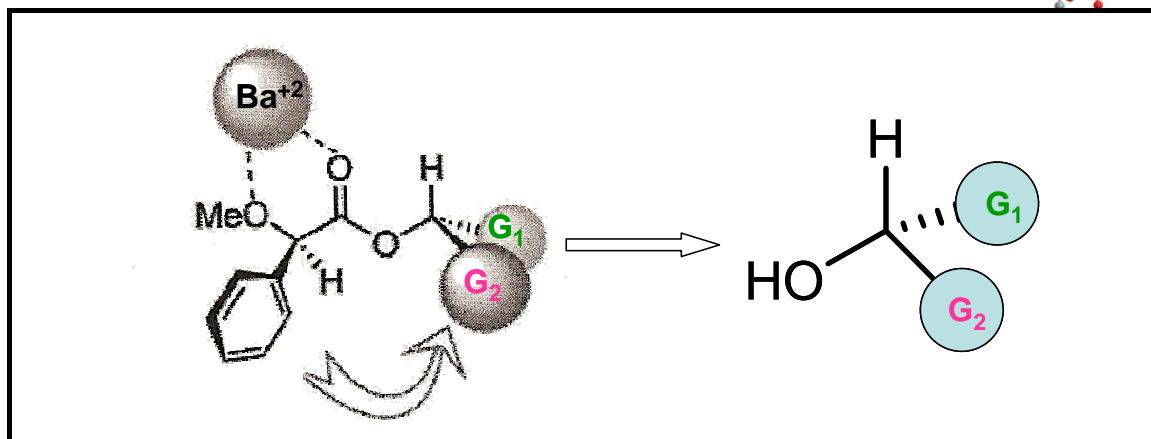
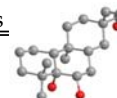


Figura 4.1.13. Aplicación del modelo de Riguera para D1.

Diterpeno D2

La estructura del compuesto que hemos denomina **D2**, fue establecida mediante sus datos físicos y espectroscópicos. Su fórmula molecular fue determinada como $C_{20}H_{34}O_2$ basándonos en sus datos de espectrometría de masas de alta resolución y resonancia magnética nuclear de 1H y ^{13}C . El estudio de sus datos espectroscópicos de RMN, incluyendo experimentos bidimensionales, homo y heteronucleares, indicaron que el producto, **D2**, corresponde a un diterpeno tricíclico con dos grupos hidroxilo, uno primario y otro terciario y un doble enlace monosustituido.

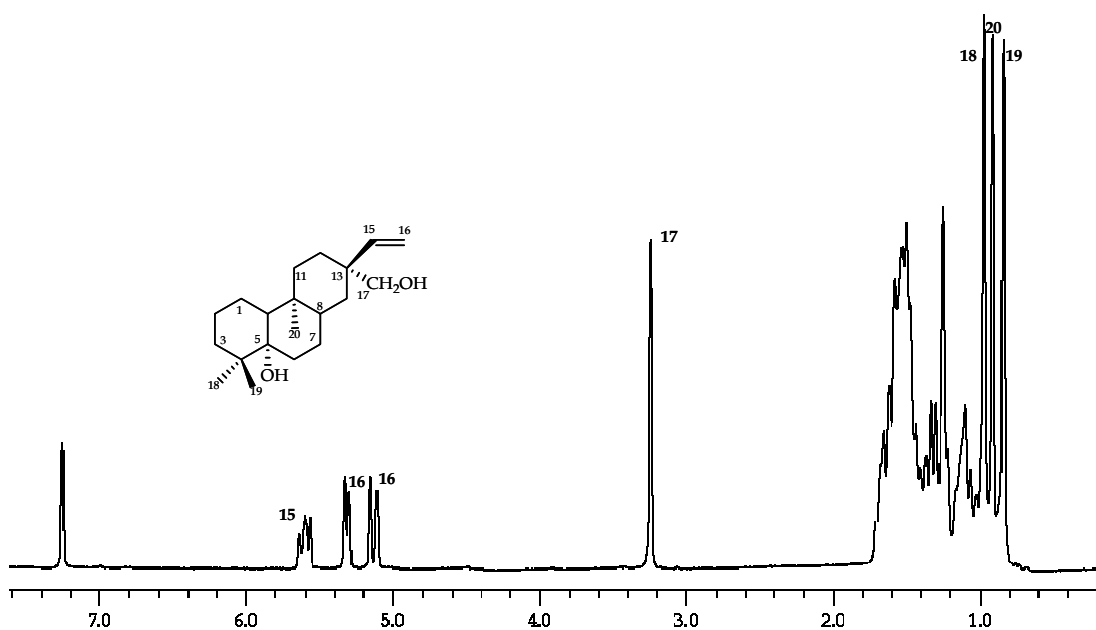


Figura 4.1.14. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de D2.

Un estudio comparativo de sus datos espectroscópicos con los del diterpeno **D1**, nos indicó que ambos metabolitos están relacionados, siendo la única diferencia en sus espectros de RMN la desaparición de la señal correspondiente al protón germinal al alcohol secundario en el C6 a 3,78 δ_{H} y del carbono metínico a 71,9 δ_{C} y la presencia de un carbono metilénico a 32,5 δ_{C} asignado a C6 (tabla 4.1.14).

Estos datos que están de acuerdo con una estructura de 5 α ,17-dihidroxi-*ent*-ros-15-eno para el diterpeno **D2**, que por relación biogenética con **D1** establecemos como (5*S*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*)-5,17-dihidroxi-*ent*-ros-15-eno.

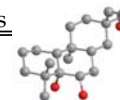
Cabe destacar que estos metabolitos constituyen el primer ejemplo de diterpenos con esqueleto de *ent*-rosano aislados de especies de la familia *Celastraceae*.

Tabla 4.1.1. Datos^a de RMN ^1H y ^{13}C de los diterpenos **D1** y **D2**.

	D1		D2	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
1	1,39*, 1,59	21,1 t	1,22, 1,55	21,2 t
2	1,39*, 1,56	22,4 t	1,52	22,0 t
3	1,01, 1,72	38,5 t	1,11, 1,63	36,9 t
4		39,3 s		38,8 s
5	2,18 s (OH)	77,9 s		76,9 s
6	3,78 dd (5,5, 11,1)	71,9 d	1,53, 1,68	32,5 t
7	1,36	35,7 t	1,15, 1,53*	25,1 t
8	1,19	38,6 d	1,14	41,9 d
9		36,4 s		36,9 s
10	1,18	49,0 d	1,25	48,5 d
11	1,23, 1,50	34,6 t	1,25, 1,32	35,1 t
12	1,42, 1,59	26,9 t	1,45, 1,61	26,8 t
13		43,3 s		43,3, s
14	0,98, 1,56	35,2 t	1,00, 1,59	35,2 t
15	5,59 dd (10,9, 17,8)	143,1 d	5,61 dd (10,9, 17,8)	143,5 d
16	5,13 d (17,8) 5,32 d (10,9)	116,5 t	5,14 d (17,8) 5,32 d (10,9)	116,4 t
17	3,25 s	71,7 t	3,25 s	71,9 t
18	1,00s*	23,9 c	0,98 s	24,0 c
19	1,00 s*	28,0 c	0,84 s	24,4 c
20	0,91 s	12,2 c	0,92 s	12,4 c

^a CDCl_3 , 400 MHz. *J* entre paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC en el caso de RMN ^1H y en experimentos DEPT, HSQC y HMBC en los datos de RMN ^{13}C .

* señales solapadas.

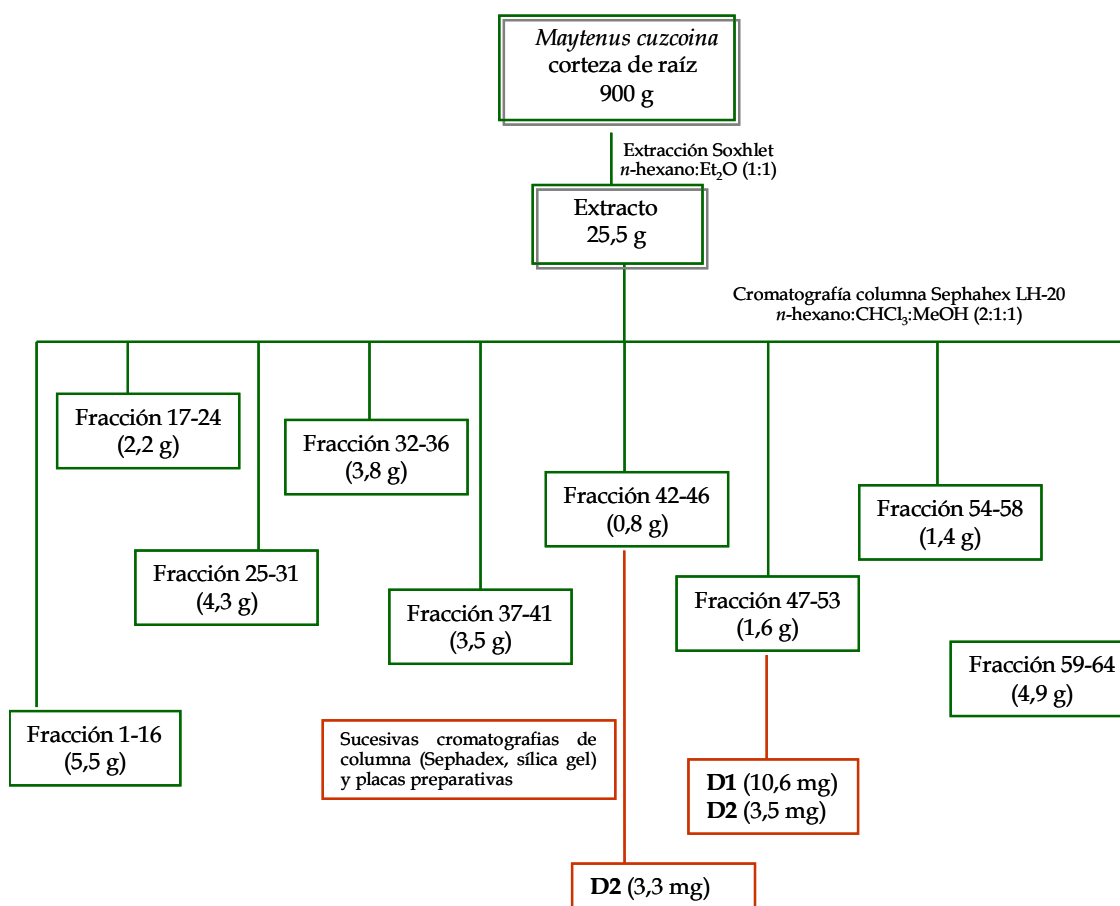


4.1.3. Parte experimental

4.1.3.1. Separación cromatográfica de los diterpenos con esqueleto de *ent*-rosano de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*

La purificación mediante cromatografía del extracto de *n*-hexano-éter dietílico (1:1) de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*, dio lugar al aislamiento de dos diterpenos con esqueleto de *ent*-rosano.

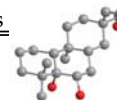
Estos metabolitos se obtuvieron de las fracciones 42-46 y 47-53 de la primera Sephadex que se realizó al extracto, tal como se detalla en el esquema 4.1.1, resultando ambos metabolitos nuevos en la bibliografía química.



Esquema 4.1.1. Separación cromatográfica de los diterpenos del extracto de *n*-hexano:éter dietílico (1:1) de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*.

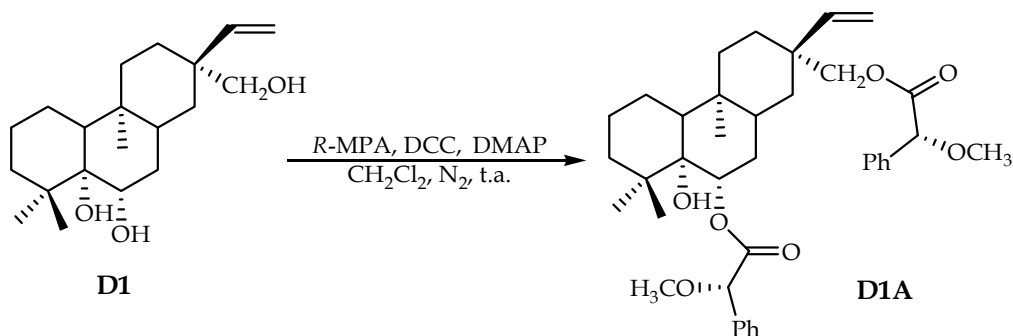
4.1.3.2. Datos físicos y espectroscópicos

Diterpeno D1	
(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>S</i>)-5,6,17-trihidroxi- <i>ent</i> -ros-15-eno	
Se obtuvo como sólido amorfo (10,5 mg)	
$[\alpha]_{D}^{20}$:	-5,9° (c 0,10, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	3418, 2927, 2859, 1715, 1633, 1452, 1376, 1055, 978, 756 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0,91 (3H, s, Me20); 0,98 (1H, m, H14); 1,00 (6H, s, Me18, Me19); 1,01 (1H, m, H3); 1,18 (1H, m, H10); 1,19 (1H, m, H8); 1,23 (1H, m, H11); 1,36 (2H, m, H7); 1,39 (2H, m, H1, H2); 1,42 (1H, m, H12); 1,50 (1H, m, H11); 1,56 (2H, m, H2, H14); 1,59 (2H, m, H1, H12); 1,72 (1H, m, H3); 2,18 (1H, s ancho, OH5); 3,25 (2H, s, H17); 3,78 (1H, dd, J= 5,5, 11,1 Hz, H6); 5,13 (1H, d, J= 17,8 Hz, H16B); 5,32 (1H, d, J= 10,9Hz, H16A); 5,59 (1H, dd, J= 10,9, 17,8 Hz, H15)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) δ :	12,2 (c, Me20); 21,1 (t, C1); 22,4 (t, C2); 23,9 (c, Me18); 26,9 (t, C12); 28,0 (c, Me19); 34,6 (t, C11); 35,2 (t, C14); 35,7 (t, C7); 36,4 (s, C9); 38,5 (t, C3); 38,6 (d, C8), 39,3 (s, C4); 43,3 (s, C13); 49,0 (d, C10); 71,7 (t, C17); 71,9 (d, C6); 77,9 (s, C5); 116,5 (t, C16); 143,1 (d, C15)
EM (IE) m/z (%):	322 (M ⁺ , 35), 307 (100); 304 (50), 286 (63), 271 (53), 201 (28), 147 (28), 137 (33), 133 (39), 119 (49), 105 (62), 81 (64), 69 (68)
EMAR m/z :	Observado 322,2553 (calculado para C ₂₀ H ₃₄ O ₃ [M ⁺]: 322,2508)



Diterpeno D2	
<p>(5S,8S,9S,10S,13S)-5,17-dihidroxi-ent-ros-15-eno</p> <p>Se obtuvo como sólido amorfo (6,8 mg)</p>	
[α] _D ²⁰ :	-10,1° (c 0,70, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	3448, 2911, 2853, 1637, 1451, 1398, 1175, 1031, 958, 867 cm ⁻¹
<p>RMN ¹H</p> <p>(CDCl₃, 400 MHz) δ:</p>	<p>0,84 (3H, s, Me19); 0,92 (3H, s, Me20); 0,98 (3H, s, Me18); 1,00 (1H, m, H14); 1,11 (1H, m, H3); 1,14 (1H, m, H8); 1,15 (1H, m, H7); 1,22 (1H, m, H1); 1,25 (2H, m, H10, H11); 1,32 (1H, m, H11); 1,45 (1H, m, H12); 1,52 (2H, m, H2); 1,53 (2H, m, H6, H7); 1,55 (1H, m, H1); 1,59 (1H, m, H14); 1,61 (1H, m, H12); 1,63 (1H, m, H3); 1,68 (1H, m, H6); 3,25 (2H, s, H17); 5,14 (1H, d, J= 17,8 Hz, H16B); 5,32 (1H, d, J= 10,9 Hz, H16A); 5,61 (1H, dd, J= 10,9, 17,8 Hz, H15)</p>
<p>RMN ¹³C</p> <p>(CDCl₃, 100 MHz) δ:</p>	<p>12,4 (c, C20); 21,2 (t, C1); 22,0 (t, C2); 24,0 (c, C18); 24,4 (c, C19); 25,1 (t, C7); 26,8 (t, C12); 32,5 (t, C6); 35,1 (t, C11); 35,2 (t, C14); 36,9 (t, s, C3, C9); 38,8 (s, C4); 41,9 (d, C8); 43,3 (s, C13); 48,5 (d, C10); 71,9 (d, C17); 76,9 (s, C5); 116,4 (t, C16); 143,5 (d, C15)</p>
EM (IE) m/z (%):	306 (M ⁺ , 21), 291 (100), 273 (28), 255 (7), 207 (5), 176 (6), 105 (9), 93 (13), 81 (10), 69 (9)
EMAR m/z :	Observado 306, 2569 (calculado para C ₂₀ H ₃₄ O ₂ [M ⁺]: 306,2559)

• Esterificación de D1 con R-(-)-MPA



A una solución de 3,5 mg de **D1** (0,01 mmoles) en 2,0 ml de diclorometano seco, se le adicionó 0,28 mg (2,0 eq) del ácido (R)-(-)-2-fenil-2-metoxiacético (R-(-)-MPA), 4,1 mg (2,0 eq) de dicitclohexilcarboimida (DCC) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (DMAP). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó la mezcla de reacción mediante cromatografía en capa fina, usando como eluyente una mezcla de *n*-hexano:OAc (6:4), obteniéndose 2,1 mg de **D1A** (R= 40,2%) como un sólido amorfo.

D1A, (5*S*,6*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*S*)-6, 17-di-(2-fenil-2-metoxiacetil)-5-hidroxi-*ent*-ros-15-eno

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -6,4° (c 0,18, CHCl₃)

IR ν_{max} (película): 3472, 2924, 2854, 1729, 1450, 1263, 1109, 710 cm⁻¹

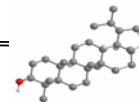
RMN ¹H
(CD₃CN, 400 MHz) δ : 0,92 (1H, m, H8); 0,93 (3H, s); 0,94 (3H, s); 0,96 (3H, s); 1,39, 1,67 (2H, m, H7); 3,36 (3H, s, OMe); 3,38 (3H, s, OMe); 3,75 (1H, d, *J*= 10,8 Hz, H17B); 3,84 (1H, d, *J*= 10,8 Hz, H17A); 4,04 (1H, m, H6); 4,78 (1H, s); 4,82 (1H, s); 5,04 (1H, d, *J*= 17,6 Hz, H16); 5,15 (1H, d, *J*= 10,4 Hz, H16); 5,57 (1H, dd, *J*= 10,4, 17,6 Hz, H15); 7,37-7,74 (10H, m)

RMN ¹H
(CD₃CN saturado con Ba SO₄, 400 MHz) δ : 0,83 (1H, m, H8); 0,84 (3H, s); 1,17 (3H, s); 1,24, 1,59 (2H, m, H7); 1,30 (3H, s); 3,21 (3H, s, OMe); 3,23 (3H, s, OMe); 3,25-3,60 (3H, m, H6, H17); 4,93 (1H, s); 5,00 (1H, s); 5,04 (1H, d, *J*= 17,4 Hz, H16); 5,16 (1H, d, *J*= 10,6 Hz, H16); 5,39 (1H, dd, *J*= 10,6, 17,4 Hz, H15); 7,37-7,70 (10H, m)

EM (IE) *m/z* (%): 618 (M⁺, 9), 452 (4), 307 (1), 286 (2), 201 (2), 131 (15), 121 (100)

EMAR *m/z*: Observado 618,3591 (calculado para C₃₈H₅₀O₇ [M⁺]: 618,3557)

4.2. *Triterpenos*



4.2. Triterpenos

4.2.1. Introducción

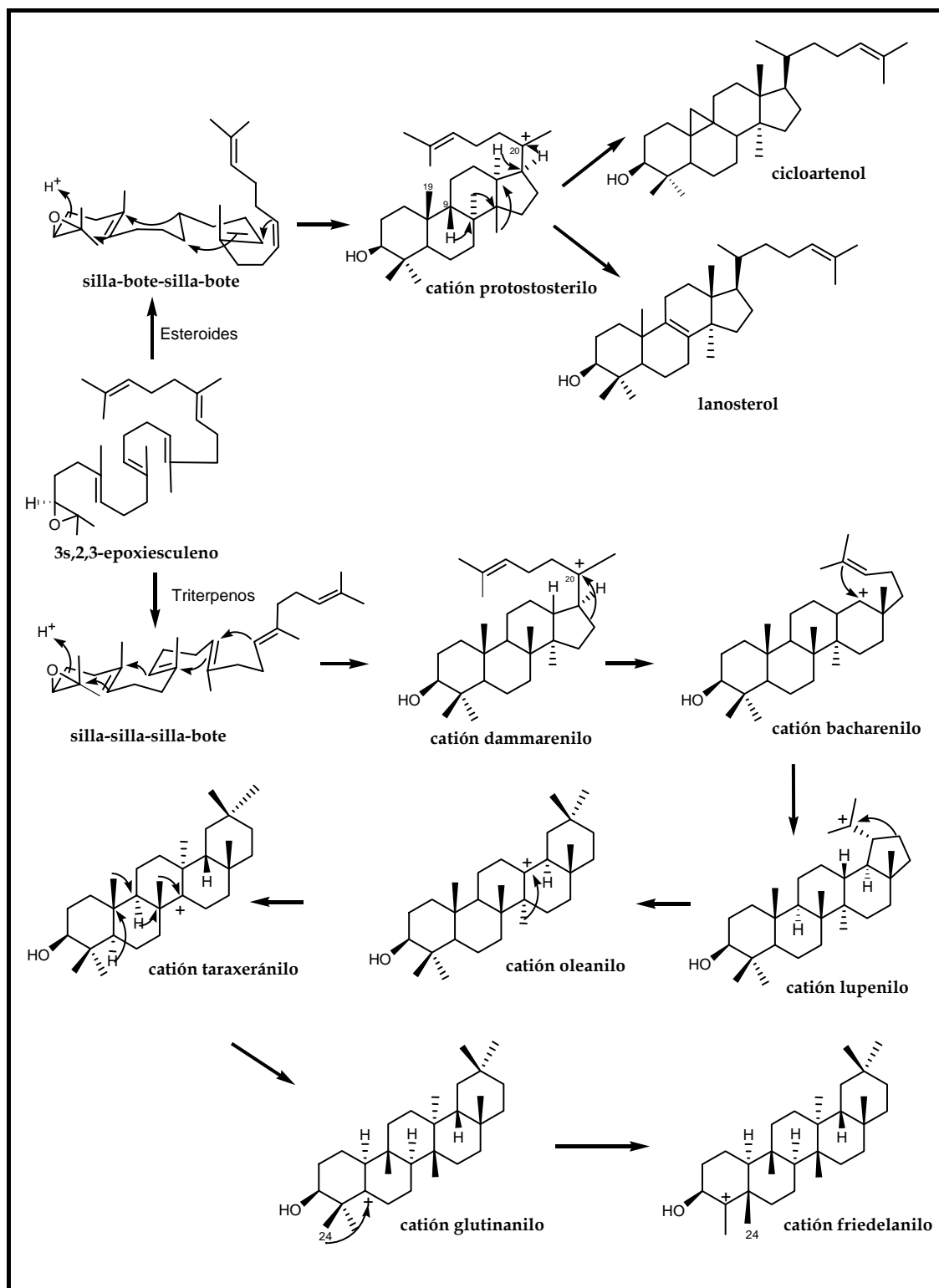
Los triterpenos constituyen un grupo muy amplio de metabolitos secundarios, con más de 5000 compuestos descritos hasta el momento, que pueden dividirse en diferentes familias químicas, siendo metabolitos frecuentes en numerosas especies vegetales.

Estos terpenos se forman por la unión de dos unidades de farnesil pirofosfato, que da lugar al escualeno, el cual es epoxidado enantioselectivamente por la cara β mediante acción enzimática, formándose el 3S,2,3-epoxiesqualeno¹. La mayoría de los esqueletos triterpénicos, tanto tetracíclicos como pentacíclicos, derivan de la ciclación del conformero *silla-silla-silla-bote* de este epóxido. Una apertura regioselectiva del grupo epóxido y a través de una secuencia de adiciones electrofílicas sobre los dobles enlaces presentes en la molécula, generan los correspondientes anillos, formándose así el intermedio clave, el **catión dammarenilo**, tal como se muestra en el esquema 4.2.1.

Un grupo importante de metabolitos secundarios se originan a partir de la ciclación del conformero *silla-bote-silla-bote* del 3S,2,3-epoxiesqualeno, originando el **catión protosterilo**, precursor de la estructura tetracíclica característica de los **esteroides**. Los esteroides incluyen un buen número de compuestos de gran relevancia química, biológica y médica, que se encuentran tanto en el reino animal como vegetal y en muchos microorganismos. El catión protosterilo da lugar al **cicloartenol** en plantas y algas o al **lanosterol** en animales y hongos, originando este último el colesterol, que es el principal esteroide animal que forma parte de las membranas celulares y es precursor de las hormonas sexuales, los ácidos biliares, y la vitamina D, entre otras moléculas de interés fisiológico. Un esteroide ampliamente distribuido en las plantas es el sitosterol², que ha sido utilizado junto al stigmasterol para la semi-síntesis de esteroides con aplicación farmacológica.

¹Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. 2001, 2^a edc., Ed. Jonh Wiley and Sons, LTD, Inglaterra.

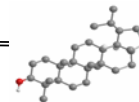
²Ovesna, Z.; Vachalkova, A.; Horvathova, K. *Neoplasma*. 2004, 51, 407-414.



Esquema 4.2.1. Esquema biosintético de triterpenos y esteroides.

La mayoría de los triterpenos y esteroides naturales contienen un grupo hidroxilo en el carbono 3 que proviene del epóxido de escualeno.

Un grupo importante de triterpenos pentacíclicos se obtienen a partir del **catione dammarenilo**. Los triterpenos pentacíclicos están constituidos por un esqueleto de 30 carbonos, que pueden estar dispuestos en cinco anillos de seis miembros, como en el



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

Los triterpenos descritos de especies de la familia *Celastraceae* pertenecen, casi invariablemente, a las series del **friedelano**, **lupano**, **baccharano**, **oleano**, **glutinano**, **taraxerano**, **ursano** y **dammarano**³.

Los **nor-triterpenometilenquinonas** son un grupo pequeño de triterpenos con esqueleto *D:A*-nor-friedoleano, que presentan oxidados los carbonos 2 y 3. Este grupo de metabolitos únicamente han sido aislados de especies de la familia *Celastraceae* y *Hippocrateaceae*, siendo considerados indicadores quimiotaxonómicos⁴.

Este tipo de metabolitos recibieron el nombre de **celastroloides**^{5,6} (figura 4.2.1), término que incluye a aquellos que poseen un agrupamiento fenólico, así como, los dímeros y trímeros de estos compuestos. Debido a la importancia de estos metabolitos, los abordaremos en un capítulo separado, 4.3.

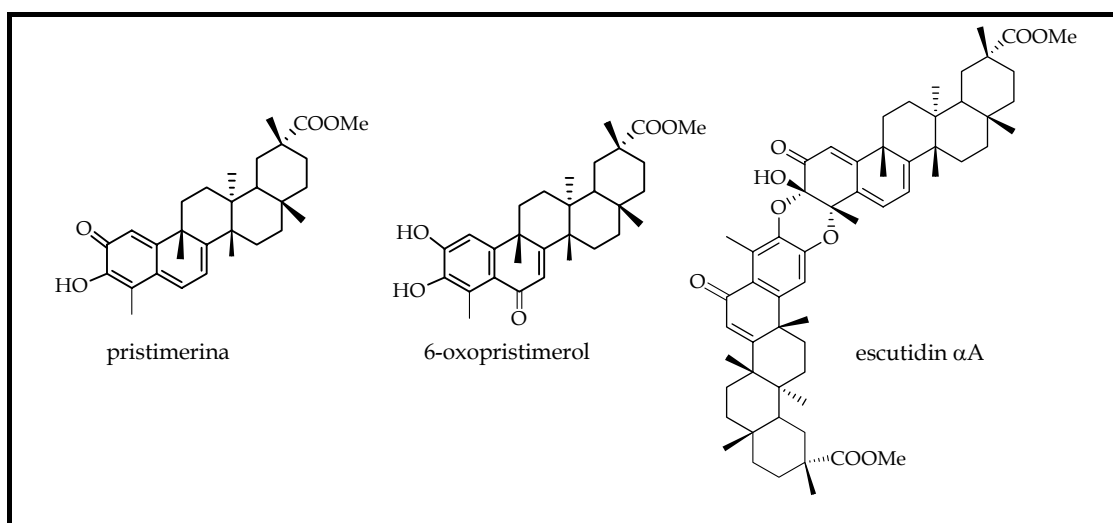


Figura 4.2.1. Ejemplos de celastroloides.

4.2.1.1. Actividad biológica de los triterpenos y esteroides aislados de la familia *Celastraceae*.

En los últimos años, se ha incrementado el número de artículos científicos que describen actividades biológicas de triterpenos y su potencial uso como fármacos. Así,

³ Alveranga, N.; Ferro, E. A. *Studies in Natural Products Chemistry*. **2005**, *30*, 635-702, Elsevier Science: The Netherlan.

⁴ Hegnauer, R. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. **1996**, Basel: Birkhäuser.

⁵ Brüning, R.; Wagner, H. *Phytochemistry*. **1978**, *17*, 1821.

⁶ Gunatilaka, A. A. L. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. **1996**, *67*, 1-123.

por ejemplo más de 100 triterpenos con diferentes esqueletos han revelado ser prometedores agentes citostáticos⁷.

La función fisiológica de los triterpenos en las plantas se cree que está relacionada con la defensa química contra patógenos y herbívoros. Esto abre una enorme posibilidad para su uso en el tratamiento de diversas infecciones.

El **β -sitosterol** (figura 4.2.2) es un esterol presente en muchas plantas superiores, que ha sido aislado en la familia *Celastraceae* y sobre él se ha publicado una extensa relación de actividades biológicas². Así, cabe destacar que posee actividad antiinflamatoria y antipirética, con un efecto similar a la hidrocortisona y la oxifenbutazona⁸. Además, presenta un amplio margen de seguridad debido a su mínimo efecto ulcerogénico, lo que le confiere un alto valor terapéutico. Por otro lado, se ha descrito como posible fármaco para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata⁹.

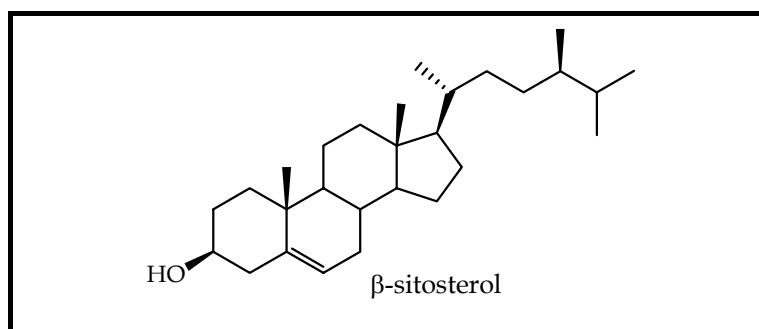


Figura 4.2.2. Esterol más frecuente en las celastráceas.

Los triterpenos con esqueleto de friedelano son bastante abundantes en la familia *Celastraceae*, existiendo numerosos ejemplos de este tipo de triterpenos que han mostrado una actividad citostática significativa *in vivo* frente a diferentes tipos de células cancerígenas. Así, el **ácido polpunónico**, aislado de *Orthosphenia mexicana*, presentó citotoxicidad frente a células A-549 (células de carcinoma de pulmón) con una DE_{50} de 0,21 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ¹⁰ y su administración (100 mg/kg) disminuye el índice de lesión ulcerosa (ILU) en un 55,3%¹¹. El **ácido salaspérmico**, aislado del extracto de la corteza

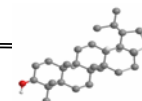
⁷ Setzer, W. N.; Setzer, M. C. *Mini. Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 540-556.

⁸ Villasenor, I. M.; Angelada, J.; Canlas, A. P.; Echegoyen, D. *Phytother. Res.* **2002**, *16*, 417-421.

⁹ Wilt, T. J. B. *J. U. International.* **1999**, *83*, 976-983.

¹⁰ Nozaki, H.; Matsuura, Y.; Hirono, S.; Kasai, R.; Chang, J. J.; Lee, K. H. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1039-1041.

¹¹ Andrade, S. F.; Antonioli, D.; Comunello, E.; Cardoso, L. G. V.; Carvalho, J. C. T.; Bastos, J. K. *Z.Naturforsch.(C).* **2006**, *61c*, 329-333.



de raíz de *Tripterygium wilfordii*, mostró una importante actividad antivírica frente al VIH¹².

La serie de friedelanos con una función hemicetálica entre el carbono 24 y el carbono 3 son frecuentes en la familia *Celastraceae*. Este tipo de compuestos, como el **ácido salaspérmico** y el **ácido orthosphenico** han sido propuestos como posibles intermediarios en la biosíntesis de las quinonas triterpénicas¹³ (figura 4.2.3).

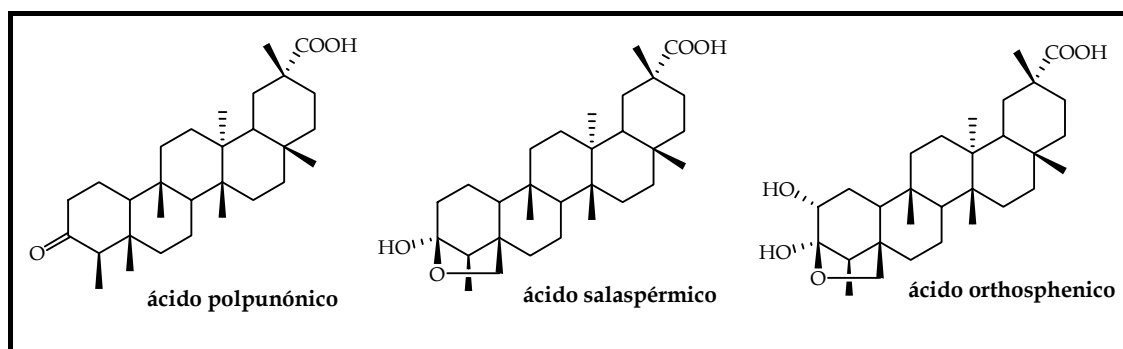


Figura 4.2.3. Friedelanos aislados de celastráceas.

Otro grupo de triterpenos presentes en las celastráceas son aquellos de las **series del oleano y ursano**, los cuales han mostrado un perfil farmacológico similar al de los retinoides y esteroides, destacando su actividad antiinflamatoria, supresora tanto de la promoción tumoral como de la síntesis de inmunoglobulinas, hepatoprotectora e inductora de la síntesis de colágeno¹⁴. Durante la última década, se han publicado más de 700 artículos científicos sobre las actividades biológicas de los triterpenos de estas dos series, lo que refleja su enorme interés.

Así, el **ácido ursólico**, un triterpeno habitual en las especies de celastráceas, presenta actividad antiinflamatoria e hipolipidémica, así como, ha mostrado ser efectivo en el tratamiento de la artritis, la diabetes, úlceras y la arteriosclerosis. La citotoxicidad de este producto y varios ésteres derivados fue ensayada por Lee y col.¹⁵ frente a varias líneas celulares de cánceres humanos. Este ácido mostró actividad frente al crecimiento celular de las leucemias linfocíticas P-388 y L-1210 y frente al carcinoma A-549, así como citotoxicidad frente a células tumorales de colon (HCT-8) y mama (MCF-7)⁶.

¹² Chen, K.; Shi, Q.; Kashiwada, Y.; Zhang, D. C.; Hu, C. Q.; Jin, J. Q.; Nozaki, H.; Kllkuskie, R. E.; Tramontano, E.; Chen, Y. C.; McPhail, D. R.; McPhail, A. T.; Lee, K. H. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 340-346.

¹³ Tezuka, Y.; Kikuchi, T.; Dhanabalasingham, B.; Gunatilaka, A. A. L. *Nat. Prod. Lett.* **1993**, *3*, 273-275.

¹⁴ Liu, J. J. *Ethnopharm.* **2005**, *3*, 92-94.

¹⁵ Lee, K. H.; Lin, Y. M.; Wu, T. S.; Zhang, D. C.; Yamagishi, T.; Hayashi, T.; Hall, I. H.; Chang, J. J.; Wu, R. Y.; Yang, T. H. *Planta Med.* **1988**, *54*, 308-311.

Por otro lado, el **ácido ursólico**, junto con el **ácido oleanólico** (figura 4.2.4) son inhibidores de la activación del virus Epstein-Barr, con actividad similar a los revertidores de la promoción de tumores, ácido retinoico y glicirrético, lo que sugiere que estos ácidos pueden ser valiosos agentes quimiopreventivos.

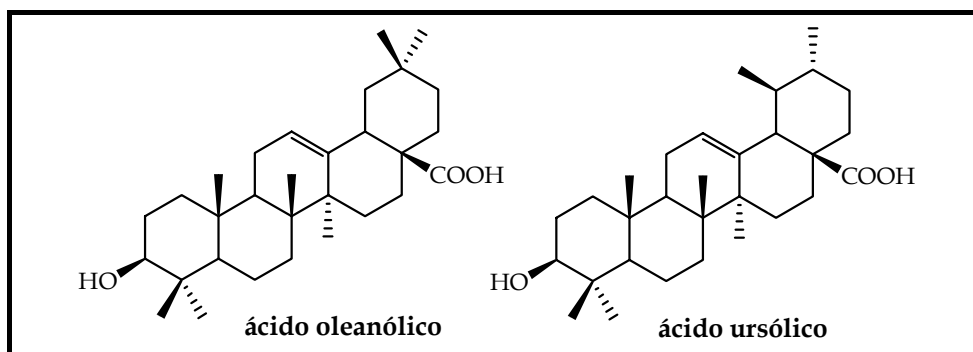


Figura 4.2.4. Triterpenos con esqueleto de oleano y ursano aislados de celastráceas.

Otro grupo de triterpenos frecuentes en especies de celastráceas son los **lupanos**, cuyo interés se remonta al siglo XIX, así la **betulina** era empleada como un componente de los emplastos antisépticos¹⁶. El interés por estos metabolitos surgió en la última década, tras observar que estos compuestos mostraban una prometedora actividad antiviral (en particular anti-VIH) y antineoplásica. En concreto, el **ácido betulínico** se reconoció como un interesante agente antitumoral¹⁷ y prometedor inhibidor del virus del SIDA¹⁸.

A partir de estos resultados, se han llevado a cabo numerosos estudios que evalúan las actividades biológicas y farmacológicas de esta clase de triterpenos (figura 4.2.5)¹⁹.

Así, el **lupeol** ha mostrado ser un efectivo agente citostático, además de un inhibidor de la elastasa leucocitaria humana (CI_{50} 1,9 μ M)²⁰. Así mismo, se ha publicado que inhibe el crecimiento de células leucémicas humanas (HL-60) induciendo su apoptosis²¹ e inhibe selectivamente la topoisomerasa humana II²². La administración tópica de 1-2 mg/ratón previene la formación y crecimiento del cáncer

¹⁶ Weeler, J. *Pharm. J.* **1899**, 494-505.

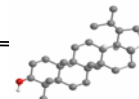
¹⁷ Einsznhamer, D. A.; Xu, Z. Q. *Drugs.* **2004**, 7, 359-373.

¹⁸ DeClercq, E. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 1543-1572.

¹⁹ Tolstikoba, T. G.; Sorokina, I. V.; Tolstikov, G. A.; Tolstikov, A. G.; Flekhter, O. B. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2006**, 32, 42-55.

²⁰ Mitaine-Offer, A. C.; Hornebeck, W.; Sauvain, M.; Zesch-Hanrot, M. *Planta Med.* **2002**, 68, 930-932.

²¹ Aratanechemuge, Y.; Hibasami, H.; Sanrin, K.; Katsuzaki, H.; Imai, K.; Komiya, T. *Oncol. Rep.* **2004**, 11, 289-292.



de piel²³. Por otro lado, muestra efecto antiinflamatorio, lo que junto a su baja toxicidad hacen de esta sustancia un interesante agente terapéutico²⁴. Además, posee actividad analgésica y antipirética, con la ventaja de que no induce úlcera gástrica²⁵.

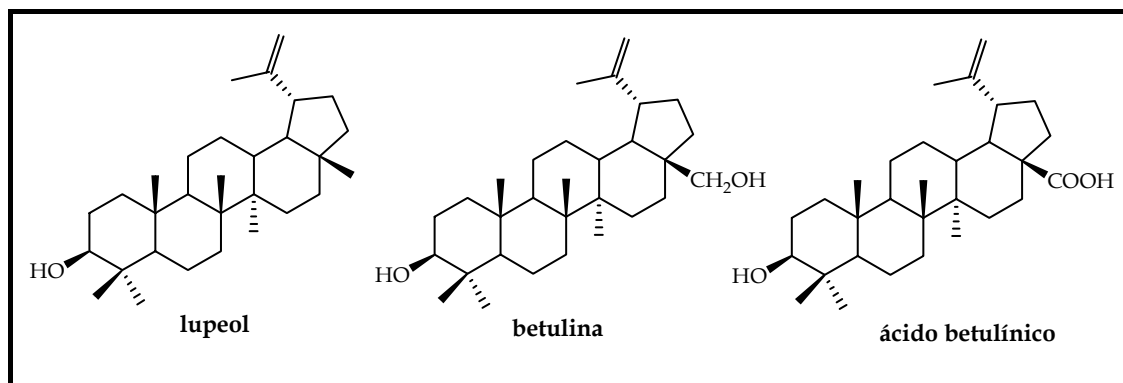


Figura 4.2.5. Triterpenos con esqueleto de lupano frecuentes en las celastráceas.

La **betulina** inhibe la ADN topoisomerasa II a concentraciones comparables al etopósido²⁶. Además, muestra efecto inhibitor de la activación del virus Epstein-Barr y actividad bacteriostática frente a *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus*²⁷. Así mismo, se ha publicado que presenta un efecto protector frente a la toxicidad del cadmio, observándose que los grupos hidroxilo sobre C-3 y C-28 y el grupo isopropileno sobre C-19 son fundamentales para dicha actividad²⁸. La administración conjunta de la betulina con aciclovir disminuye la replicación del virus VIH-1 y 2²⁹.

El **ácido betulínico** ha atraído la atención en los últimos 10 años por su extraordinaria actividad biológica. Así, además de actividad anti-VIH, ha mostrado actividad citotóxica frente al melanoma humano mediante inducción de apoptosis, actividad leishmanicida frente a *Leishmania amazonensis* y actividad antimalárica frente a los estadios asexuales eritrocíticos del *Plasmodium falciparum*³⁰. Se han realizado ensayos *in vivo* que han mostrado que la administración del ácido betulínico disminuye sustancialmente los tumores de piel inducidos por el TPA (13-acetato-12-O-

²² Wada, S. I.; Iida, A.; Tanaka, R. *J. Nat. Prod.* **2001**, *61*, 1545-1547.

²³ Saleem, M.; Afad, F.; Adhauri, V. M.; Mukhtar, H. *Oncogene.* **2004**, *23*, 5203-5214.

²⁴ Ramirez-Apan, A. A.; Perez-Castorena, A. L.; De Vivar, A. R. *Naturforsch.* **2004**, *59*, 237-243.

²⁵ Patocka, J. *J. App. Biomed.* **2003**, 7-12.

²⁶ Wada, Sh. S.; Iiada, A.; Tanaka, R. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1545-1547.

²⁷ Krasutsky, P.; Carlson, R. M. *PCT Int. Appl.* **2002**, 97.

²⁸ Hiroya, K.; Takahashi, T.; Miura, N.; Naganuma, A.; Sakamoto, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3229-3236.

²⁹ Zhang, H. J.; Tang, G. T.; Hoang, V. D.; Hung, N. V.; Cuong, N. M.; Soejarta, D. D.; Pezzuto, J. M.; Fong, H. U. S. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 263-268.

tetradecanoil-forbol) en ratones³¹. Su especificidad por las células de melanoma, lo hace ser una de las sustancias más prometedoras frente a este tipo de cáncer³².

La **ochraceolida A** (figura 4.2.6) es un ejemplo de lupano con un reagrupamiento γ -lactona entre C-21 y C-30, que exhibió actividad citotóxica frente a cultivos de células P-388 con un valor de CI_{50} de 0.26 $\mu\text{g/ml}$, así como actividad inhibidora del farnesil-transferasa, FPTasa (CI_{50} 1.0 $\mu\text{g/ml}$), lo que demuestra su potencial como agente anticancerígeno³³. Esta actividad se pierde cuando se reduce el carbonilo en C-3, lo que sugiere a esta posición como sitio de anclaje a la enzima. Este compuesto se ensayó frente a 60 líneas de células cancerígenas humanas en el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI) y ha sido seleccionado para su evaluación *in vivo* en varios sistemas xenográficos de ratón.

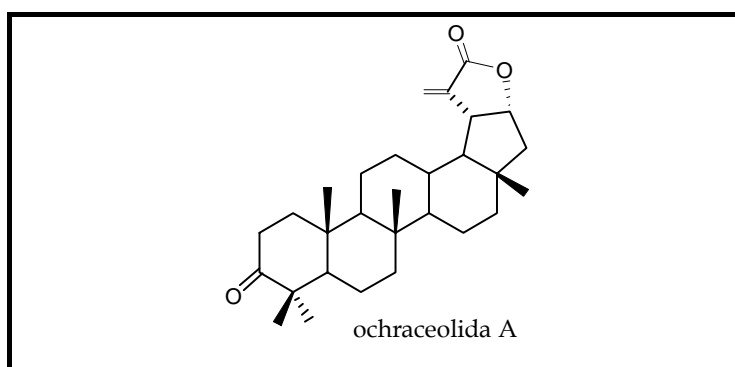


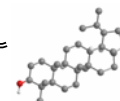
Figura 4.2.6. Estructura de ochraceolida.

³⁰ Bringmann, G.; Saeb, W.; Assi, L. A.; François, G.; Narayanan, A. S. S.; Peters, K.; Peters, E.M. *Planta Med.* **1997**, *63*, 255-257.

³¹ Jasukawa, K.; Takido, M.; Matsumoto, T.; Takeuchi, M.; Nakagawa, S. *Oncology.* **1991**, *48*, 72-76.

³² Zuko, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, K.; Marchesi, E.; Gambacorti, C. Formelli, F. *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 17-25.

³³ Sturm, S.; Gil, R. R.; Chai, H. B.; Ngassapa, O. D.; Santisuk, T.; Reutrakul, V.; Howe, A.; Moss, M.; Besterman, J. M.; Yang, S. L.; Farthing, J. E.; Tait, R. M.; Lewis, J. A.; O'Neill, M. J.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 658-663.



4.2.2. Resultados y discusión

Del extracto en *n*-hexano-éter dietílico 1:1 de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina* se aislaron un total de cuarenta y cuatro triterpenos, que se agruparon para su estudio según su esqueleto base. Incluimos en este capítulo los esteroides, ya que poseen un precursor común con los triterpenos, el óxido de escualeno.

Todos los triterpenos aislados son pentacíclicos, excepto el triterpeno tetracíclico baruol, que presenta un esqueleto de baccharano, resultando esta la segunda vez que se aísla de especies de *Celastraceae*. Por otro lado, para nombrar los diferentes triterpenos y esteroides usaremos la primera letra del esqueleto al que pertenecen (excepto en el caso de los dos esteroides que los nombraremos con la letra E) y los enumeramos para facilitar su descripción, como se relaciona a continuación:

- **Esteroides:** β -sitosterol (**E1**)³⁴ y β -sitosterona (**E2**)³⁵.
- **D:B Friedobaccharano:** baruol (**B1**)³⁶.
- **Lupanos:** L1-L7, nepeticina³⁷ (**L8**), lupenona (**L9**)³⁸, betulona (**L10**)³⁹, aldehído betulónico (**L11**)⁴⁰, ácido betulónico (**L12**)⁴¹, rigidinol, (**L13**)⁴², glochidonol (**L14**)⁴³, lupeol (**L15**)³⁸, cafeato del lupeol (**L16**)⁴⁴, 25-hidroxi-lupeol (**L17**)⁴⁵, betulina (**L18**)⁴⁶, 3-*epi*betulina (**L19**)⁴⁷, aldehído betulínico (**L20**)⁴¹, aldehído 3-*epi*betulínico (**L21**)⁴⁸, ácido 3-*epi*betulínico (**L22**)⁴⁹, glochidiol (**L23**)⁵⁰, 3-*epi*glochidiol (**L24**)⁵¹ y glochidona (**L25**)⁵⁰ (figura 4.2.7).

³⁴ Rathmann, D. M.; Morrow, L. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 5647-5650.

³⁵ Toshi, K. C.; Bansal, R. K.; Singh, P. *Indian J. Chem.* **1974**, *12*, 903-904.

³⁶ Núñez, M. J.; López, M. R.; Jiménez, I. A.; Moujir, L. M.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7367-7370.

³⁷ Ahmad, V. U.; Bano, S.; Voelter, W.; Fuchs, W. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1715-1718.

³⁸ Wembert, E.; Baddeley, G. V.; Burfitt, I. R.; Moreno, L. N. *Org. Magn. Resonance.* **1978**, *11*, 337-343.

³⁹ Hase, T.; Suokas, E.; Weckman, A. *Synthetic Commun.* **1981**, *11*, 489-92.

⁴⁰ Bohlmann, F.; Knoll, K. H.; Zdero, C.; Mahanta, P. K.; Grenz, M.; Suwita, A.; Ehlers, D.; Le Van, N.; Abraham, W. R.; Natu, A. A. *Phytochemistry.* **1977**, *16*, 965.

⁴¹ Aplin, R. T.; Halsall, T. G.; Norin, T. J. *Chem. Soc.* **1963**, 3269-3273.

⁴² Maria, M.; Monache, F. D.; Bettolo, G. B. M.; De Mello, J. F.; Lima, O. G. *Gazz. Chim. Ital.* **1979**, *109*, 61-63.

⁴³ Hui, W. H.; Li, M. M. *Phytochemistry.* **1976**, *15*, 561-562.

⁴⁴ Fuchino; Hiroyuki; Tanaka; Nobutoshi. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1937-1942.

⁴⁵ Prakash Chaturvedula, V. S.; Schilling, J. K.; Johnson, R.; Kingston, D. G. I. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 419-422.

⁴⁶ Sholichin, M.; Yamasaki, K.; Kasai, R.; Tanaka, O. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 1006-1008.

⁴⁷ Bhattacharya, A. K.; Das, S. C. *Chem. Ind.* **1971**, *31*, 885-886.

⁴⁸ Monaco, P.; Previtara, L. *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 673-676.

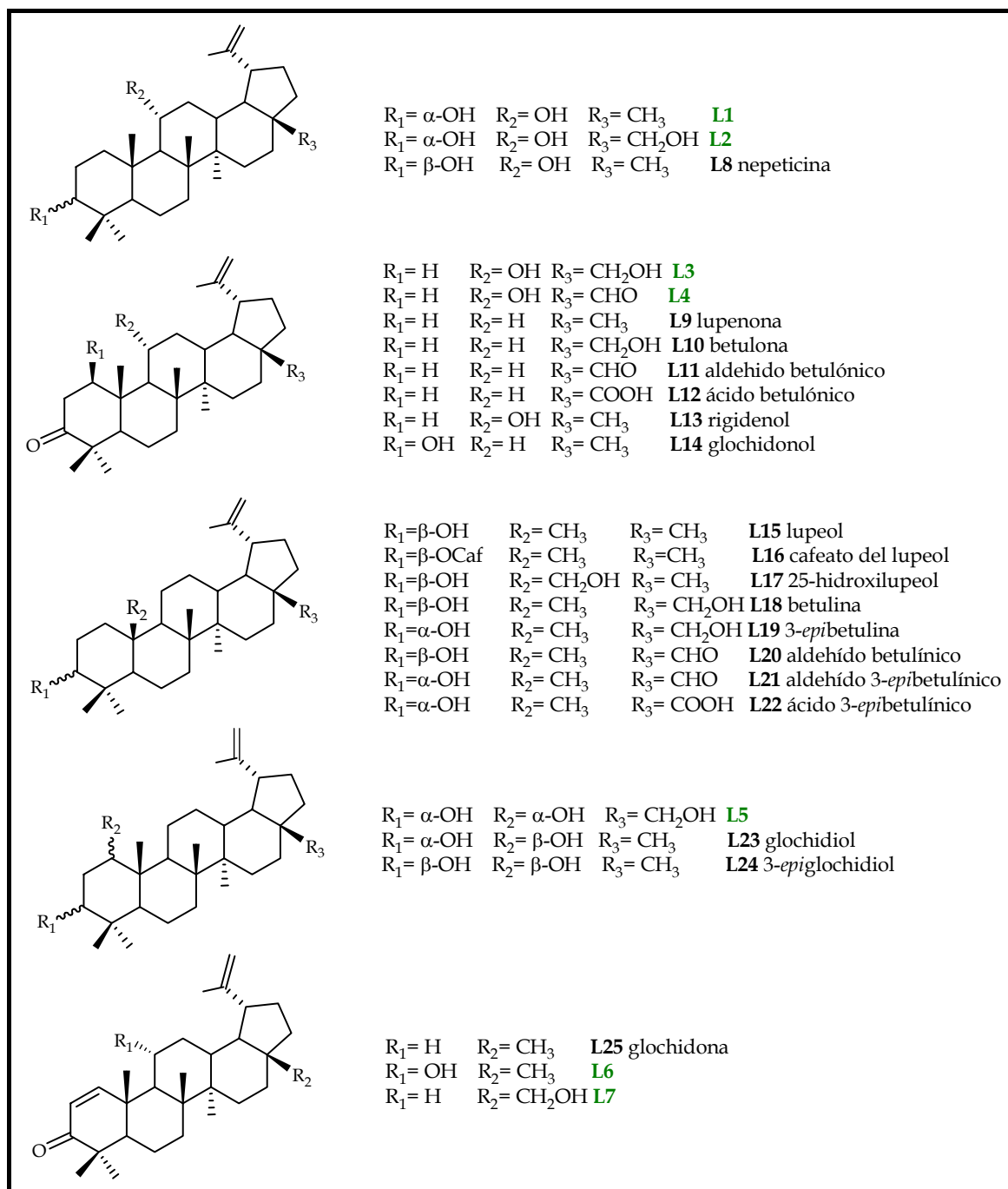
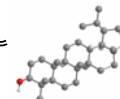


Figura 4.2.7. Triterpenos con esqueleto de lupano aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*. En verde se señalan los que resultaron nuevos en la bibliografía química.

⁴⁹ Allsop, I. L.; Cole, A. R. H.; White, D. E.; Willix, R. L. S. *J. Chem. Soc.* **1956**, 4868-4873.

⁵⁰ Ganguly, A. K.; Govindachari, T. R.; Mohamed, P. A.; Rahimtulla, A. D.; Viswanathan, N. *Tetrahedron.* **1966**, 22, 1513-1519.

⁵¹ Hui, W. H.; Lee, W. K.; Cham, C. K. *Phytochemistry.* **1970**, 9, 1099-1102.



- **Oleanos:** O1, β -amirenonol⁵² (O2), 11 α -hidroxi- β -amirona⁵³ (O3), 11-oxo- β -amirona⁵⁴ (O4), 3 β -hidroxi-olean-9(11):12-dieno⁵⁵ (O5), 3-oxoolean-9(11):12-dieno⁵⁵ (O6).
- **Ursanos:** α -amirenonol⁵⁶ (U1), 11 α -hidroxi- α -amirona⁵⁷ (U2), 11-oxo- α -amirona⁵⁶ (U3), 3 β -hidroxiursan-9(11):12-dieno (U4), 3-oxoursan-9(11):12-dieno⁵⁸ (U5).

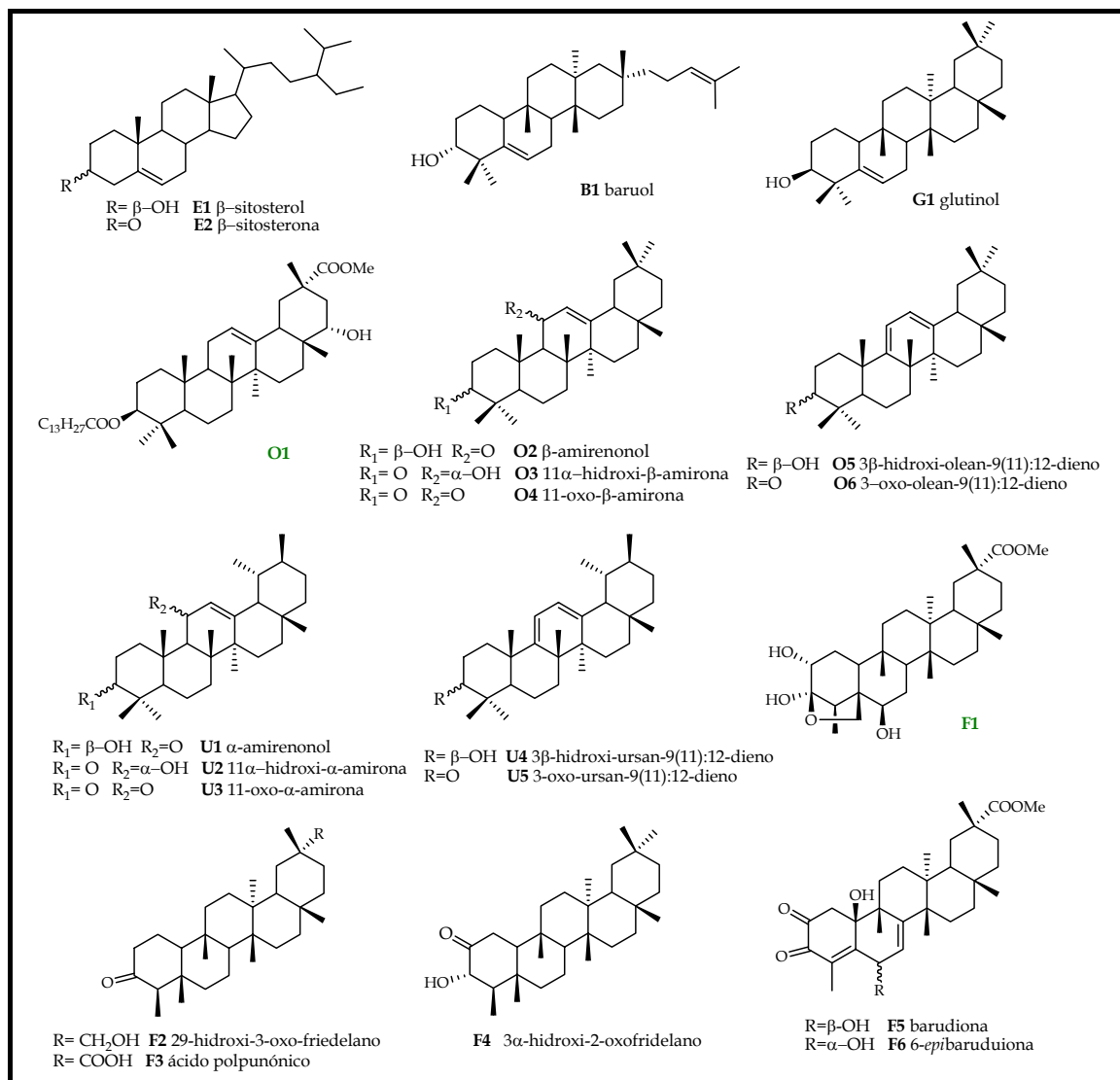


Figura 4.2.8. Esteroles y triterpenos con esqueleto de baccharano, oleano, ursano, glutinano y friedelano aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*.

⁵² Hui, W.-H.; Li, M.-M.; Luk, K. *Phytochemistry*. **1975**, *14*, 833-834.

⁵³ Xiao, Y.; Wang, G.; Gong, F. *Zhiwu Xuebao*. **1994**, *36*, 153-158.

⁵⁴ Bandaranayake, W. M. *Phytochemistry*. **1980**, *19*, 255-257.

⁵⁵ Barnes, R. A.; Pereira, A. L.; Teraza, C.; Scofield, V.; Braz Filho, V.; Pinto, A. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3674-3677.

⁵⁶ Yagishita, K.; Nishimura, M. *Agr. Biol. Chem.* **1961**, *25*, 517-518.

⁵⁷ Luis, J. G.; Andres, L. S. *Nat. Prod. Lett.* **1999**, *13*, 187-194.

⁵⁸ Lai, J.; Ito, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1979**, *27*, 2248-2251.

- **Glutinano:** glutinol⁵⁹ (**G1**).
- **Friedelanos:** **F1**, 29-hidroxi-3-oxo-friedelano⁶⁰ (**F2**), ácido polpunónico⁶¹ (**F3**), 3 α -hidroxi-2-oxofriedelano⁶² (**F4**), barudiona⁶³ (**F5**) y 6-epibaruduiona⁵³ (**F6**).

De estos triterpenos, nueve resultaron nuevos en la bibliografía química, **L1-L7**, **O1** y **F1**. El resto de triterpenos se identificaron por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los existentes en la literatura.

A continuación pasamos a discutir la elucidación estructural de los metabolitos que resultaron nuevos.

Triterpeno L1

El compuesto que denominamos **L1**, aislado como un sólido amorfo, presentó en su espectro de masas de baja resolución un ión molecular a 442 m/z y una fórmula molecular de $C_{30}H_{50}O_2$ basada en sus espectros de masas de alta resolución y RMN ^{13}C .

En su espectro de IR se observó una banda característica de grupo hidroxilo a 3413 cm^{-1} . Su espectro de RMN 1H (figura 4.2.9, tabla 4.2.1) mostró señales que corresponden a siete metilos angulares, seis como singuletes a 0,77, 0,85, 0,94, 0,97, 1,03, 1,05 δ y uno de ellos sobre doble enlace, a 1,68 δ ; dos protones vinílicos como singuletes anchos a 4,71 y 4,58 δ ; dos protones geminales a grupos hidroxilos secundarios, a 3,36 δ como un singulete ancho y a 3,92 δ como un doble triplete con constantes de acoplamiento de 5,3 y 10,7 Hz.

Su espectro de RMN ^{13}C (figura 4.2.10, tabla 4.2.2) mostró señales para 30 carbonos, lo que junto con los experimentos DEPT 90° y 135°, corroboró la existencia de siete metilos, diez metilenos, siete metinos y seis carbonos cuaternarios. La presencia de un grupo isopropilénico, característico de los triterpenos con esqueleto de lupano, se determinó al observar la presencia de un carbono cuaternario a 150,2 δ y un metileno a 109,8 δ . Además, se confirmó la presencia de dos alcoholes secundarios al observarse dos carbonos metínicos a 75,9 δ y 70,6 δ .

⁵⁹ Starrat, A. N. *Phytochemistry*. **1966**, 5, 1341-1344.

⁶⁰ Betancor, C.; Freire, R.; González, A. G.; Salazar, J. A.; Pascard, C.; Prange, T. *Phytochemistry*. **1980**, 19, 1989-1991.

⁶¹ Ramiah, P. A.; Devi, P. U.; Frolow, F.; Lavie, D. *Phytochemistry*. **1984**, 23, 2251-2255.

⁶² Gottlieb, H. E.; Ramaiah, P. A.; Lavie, D. *Mag. Res. Chem.* **1985**, 23, 616-620.

⁶³ Rodríguez, F. M. *Estudio fitoquímico de especies de la familia Celastraceae (flora panameña): Maytenus blepharodes, Crossopetalum lobatum*. **2000**, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.

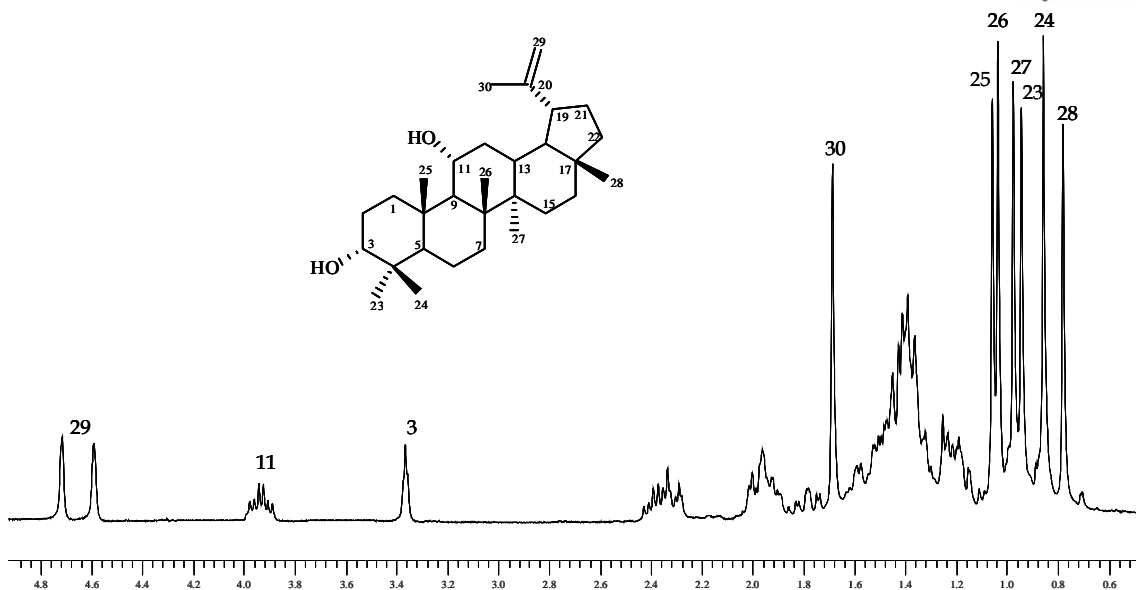
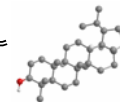


Figura 4.2.9. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de L1.

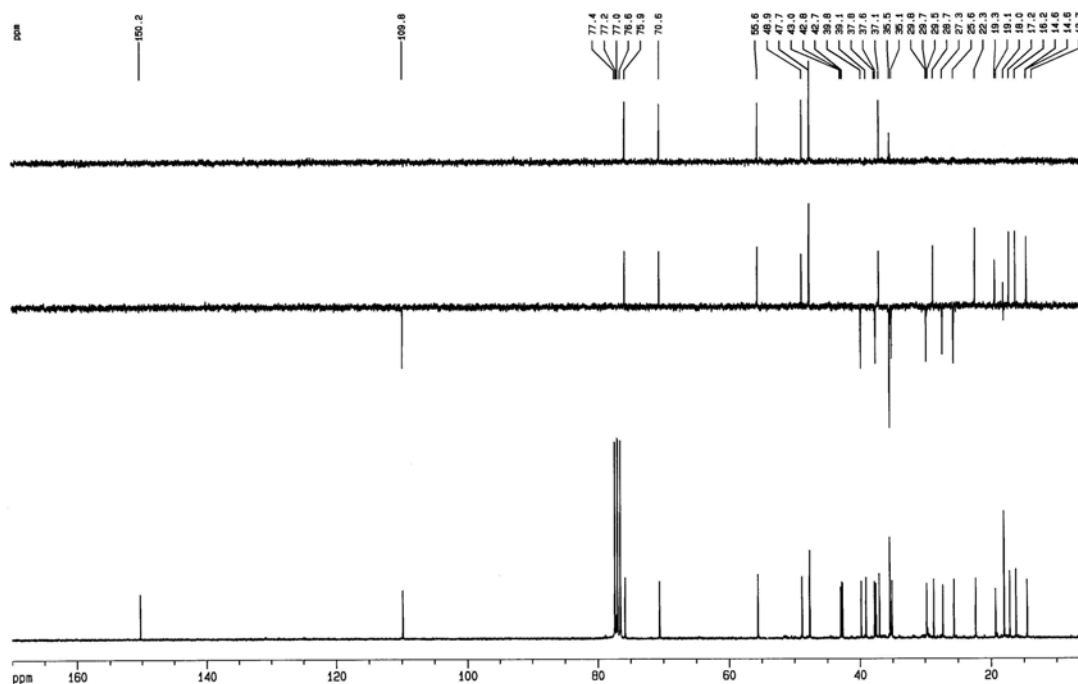


Figura 4.2.10. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de L1.

Siguiendo consideraciones biogénicas, uno de los alcoholes secundarios debería estar localizado sobre el carbono 3; el análisis de la señal correspondiente a su protón geminal, a 3.36 δ como un singulete, nos indica que H3 es β ecuatorial. El otro alcohol secundario dado la forma y multiplicidad de la señal del protón geminal al mismo, debía estar localizado en el carbono 6, 11, 12 o 21, pero en cualquier caso el grupo hidroxilo debe ser ecuatorial.

El conjunto de estos datos está de acuerdo con la estructura de un triterpeno de la serie del lupano con dos alcoholes secundarios, para el metabolito L1.

El estudio de los experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), nos permitió situar los grupos funcionales en la molécula de forma inequívoca.

Así, en el experimento HMBC (figura 4.2.11) podemos destacar la correlación entre los metilos 23 y 24 a 0,94 y 0,85 δ_H , respectivamente, con un carbono secundario unido a oxígeno a 75,9 δ_C , lo que confirma la presencia de un grupo hidroxilo sobre el carbono C3; por otra parte, la correlación de los metilos 25 y 26 a 1,05 y 1,03 δ_H , respectivamente, y del protón geminal a un grupo hidroxilo secundario (3,92 δ_H) con el carbono 9 (55,6 δ_C), permitió fijar la posición del otro grupo hidroxilo secundario sobre el carbono C11. De igual manera el experimento HMBC fijó el grupo isopropilénico sobre el carbono 19 (47,7 δ_C), al observarse correlación a tres enlaces entre este carbono con el metilo 30 (1,68 δ_H) y el metileno 29 (4,58 y 4,71 δ_H).

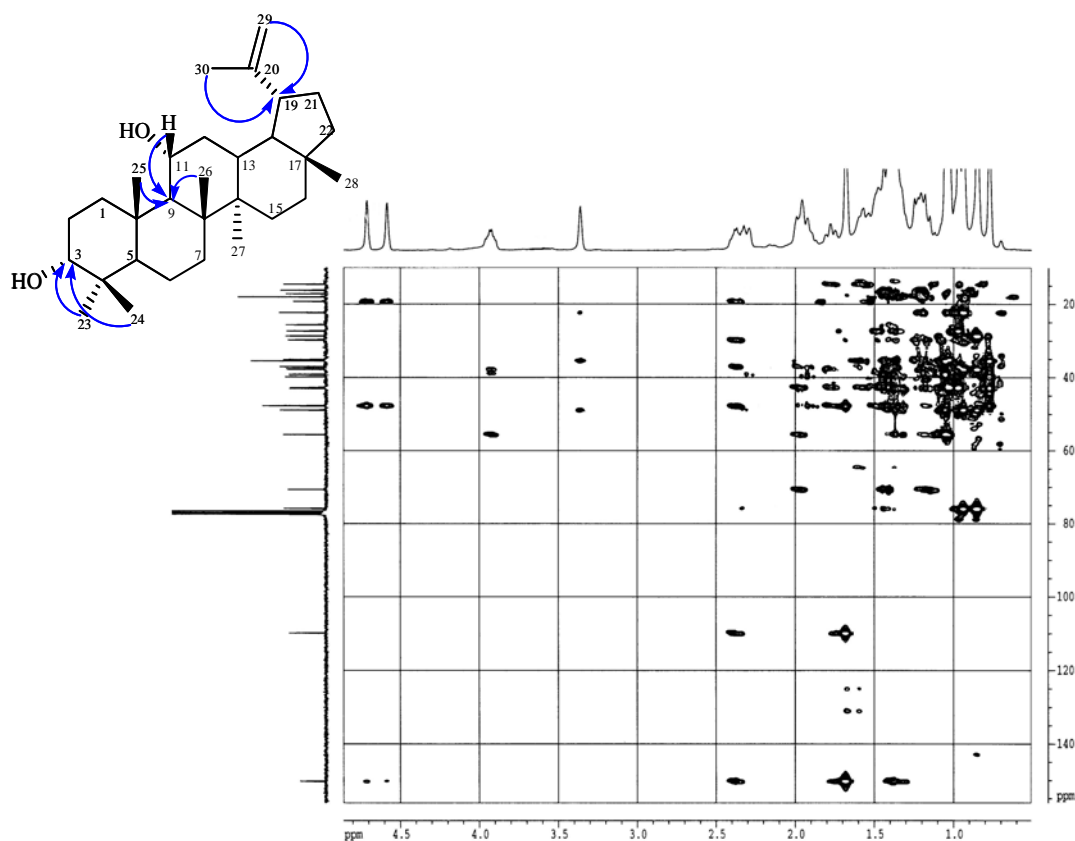
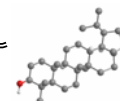


Figura 4.2.11 Experimento HMBC de L1.



La estereoquímica de los dos alcoholes secundarios se determinó mediante el estudio de las constantes de acoplamiento y un experimento ROESY (figura 4.2.12), donde se observa correlación entre el protón 3 y los metilos 23 y 24, lo que sólo es posible si la estereoquímica para dicho hidrógeno es β ecuatorial. Además, se observó un efecto ROE entre el protón 11 y los metilos 25 y 26, lo que nos indica que tiene una disposición β axial. Ello nos permite establecer una estereoquímica α para los grupos hidroxilos situados sobre los carbonos 3 y 11.

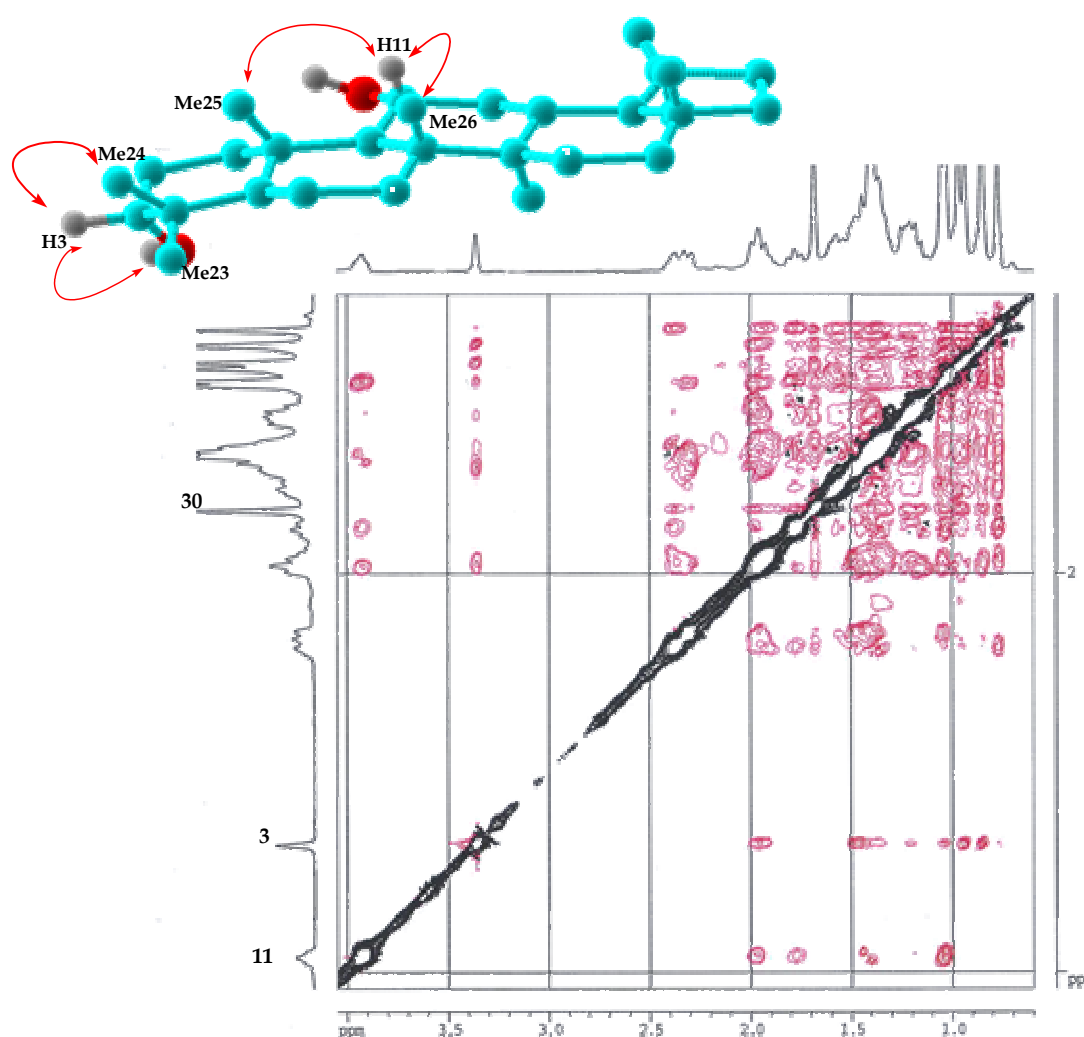


Figura 4.2.12. Experimento **ROESY** de L1.

Quedó así establecida la estructura de L1 como $3\alpha,11\alpha$ -dihidroxi-lup-20(29)-eno, para el que proponemos el nombre de *3-epinepeticina*, ya que revisada la literatura, encontramos que nepeticina³⁷, tiene la misma estructura pero con una estereoquímica β para el grupo hidroxilo sobre el carbono C3, compuesto que de igual forma fue aislado en este estudio fitoquímico.

Triterpeno L2

El producto que hemos denominado **L2** presentó una fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_3$ en su espectro de masas de alta resolución. El conjunto de sus datos espectroscópicos, mostró que este compuesto estaba relacionado con **L1**, siendo la diferencia más significativa en sus espectros de RMN de 1H y ^{13}C (tablas 4.2.1 y 4.2.2) la desaparición de la señal correspondiente al metilo 28 y la aparición de un sistema AX de dos protones a 3,33 y 3,74 δ , ambos como dobletes con una constante de acoplamiento de 10,8 Hz. Estos datos indicaron que **L2** es un producto de oxidación en el carbono C-28 del compuesto **L1**.

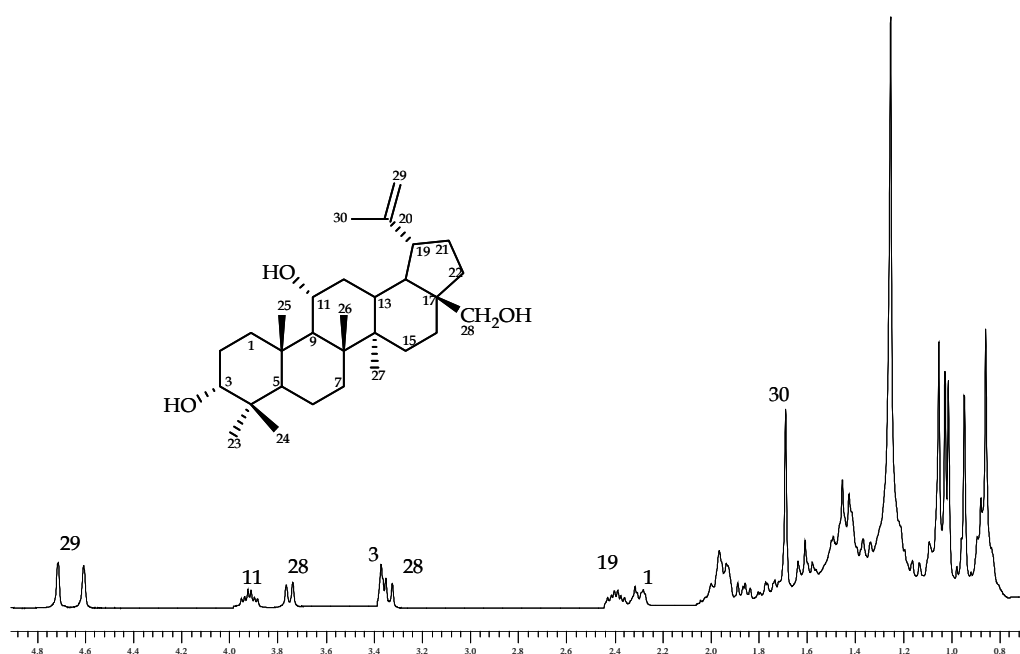
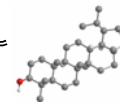


Figura 4.2.13. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **L2**.

Al objeto de establecer de forma inequívoca la estructura de **L2** se realizaron experimentos bidimensionales, tanto homonucleares (COSY y ROESY) como heteronucleares (HMQC y HMBC) de RMN. En el experimento HMBC se observó correlación entre H28 con C17, C16, C22 y C18, lo que nos permitió situar el grupo hidroxilo primario sobre C28. Así, quedó establecida la estructura del compuesto **L2** como 3 α ,11 α , 28-trihidroxi-lup-20(29)-eno y para la que proponemos el nombre de 11 α -hidroxi-3-*epi*betulina, al estar relacionado estructuralmente con la betulina⁴⁶.

**Triterpeno L3**

El metabolito que hemos denominado **L3** presentó una fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$, determinada por espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). Esta fórmula indica siete grados de insaturación, observándose en el espectro de masas fragmentos correspondientes a la pérdida de una molécula de agua ($m/z= 18, H_2O$) y metanol ($m/z= 31, CH_3O^+$). En el espectro de IR observamos bandas correspondientes a grupo hidroxilo (3438 cm^{-1}) y carbonilo (1698 cm^{-1}).

Un estudio detallado de sus datos espectroscópicos de RMN 1H y ^{13}C (tablas 4.2.1 y 4.2.2), experimentos de correlación $^1H-^1H$ y $^1H-^{13}C$, mostró que el producto **L3** estaba muy relacionado con el compuesto **L2**, siendo la única diferencia en su espectro de RMN 1H (figura 4.2.14) la desaparición de la señal correspondiente al protón H3 presente en **L2** y la presencia en el espectro RMN ^{13}C de **L3** de un carbono carbonílico a $218,3\text{ }\delta_C$.

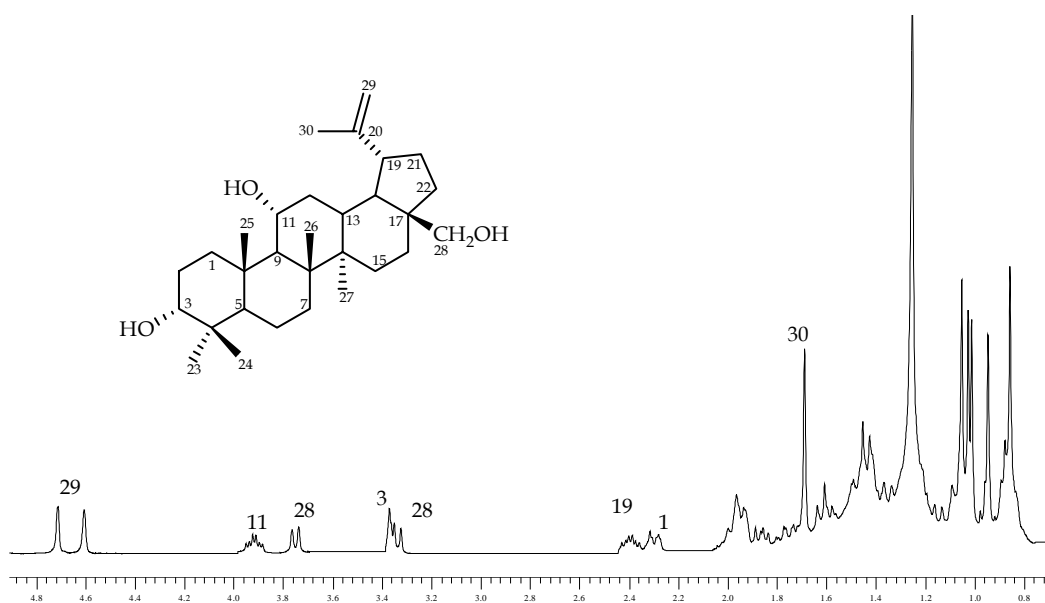


Figura 4.2.14. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **L3**.

Estos datos nos indican que **L3** presenta un grupo carbonilo en C3 en vez de un alcohol secundario como ocurre en **L2**, estableciéndose así, la estructura de **L3** como $11\alpha,28$ -dihidroxi-3-oxo-lup-20(29)-eno, para el que proponemos el nombre de 28 -hidroxi-rigidenol, ya que corresponde al derivado hidroxilado en C28 del rigidenol (**L13**)⁴².

Triterpeno L4

El compuesto que denominamos **L4**, se aisló como un sólido amorfo y presentó en su espectro de masas de baja resolución un ión molecular a 454 m/z y una fórmula molecular de $C_{30}H_{46}O_3$, basándonos en su espectros de masas de alta resolución y RMN ^{13}C . En su espectro de IR se observaron bandas características de grupo hidroxilo a 3426 cm^{-1} , aldehído a 2854 cm^{-1} y cetona a 1702 cm^{-1} .

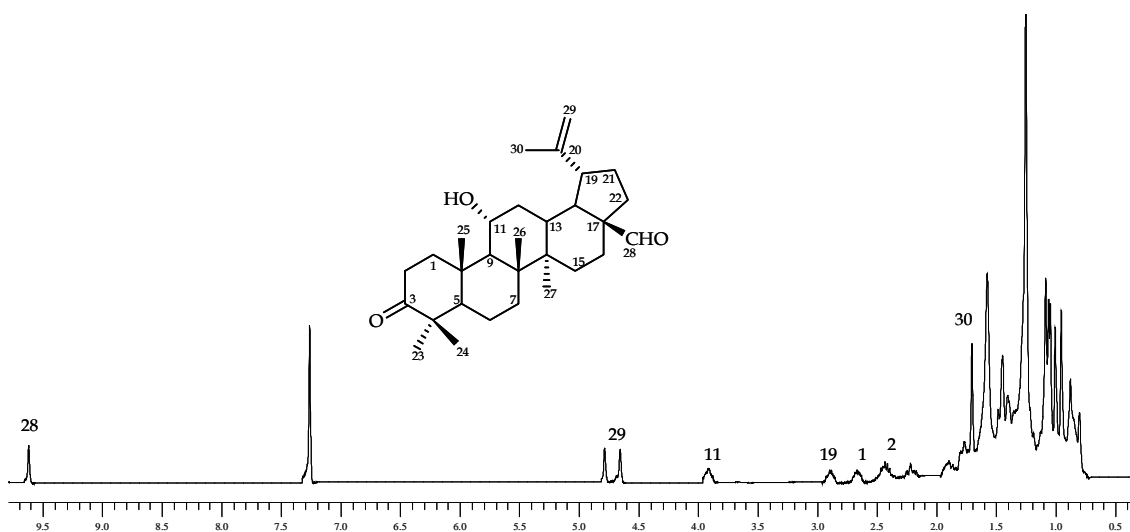
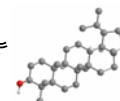


Figura 4.2.15. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **L4**.

Su espectro de RMN 1H (figura 4.2.15) mostró señales que corresponden a seis metilos angulares como singuletes a 0.95, 0.95, 1.04, 1.06, 1.08 δ y uno de ellos sobre doble enlace a 1.73 δ ; dos protones vinílicos como singuletes anchos a 4.78 y 4.65 δ ; un protón geminal a un grupo hidroxilo secundario a 3.90 δ como un doble triplete con constantes de acoplamiento de 5.3 y 10.7 Hz y un protón de aldehído como singulete a 9.61 δ . Comparando estos datos con los del metabolito **L3**, observamos que ambos productos están relacionados siendo la única diferencia la desaparición de las señales correspondientes a los protones geminales al alcohol primario sobre C28 y la aparición en **L4** de una señal correspondiente a un aldehído a 9.61 δ .

Con objeto de establecer de forma inequívoca la estructura de **L4** se realizaron experimentos bidimensionales, homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HMQC y HMBC) de RMN, lo que permitió establecer su estructura, para la que proponemos el nombre de aldehído de rigidenol⁴².

**Triterpeno L5**

El compuesto que denominamos **L5**, aislado como un sólido amorfo, presentó en su espectro de masas de baja resolución un ión molecular a 458 m/z y una fórmula molecular de $C_{30}H_{50}O_3$, en su espectro de masas de alta resolución y RMN ^{13}C . Esta fórmula molecular coincide con la del triterpeno **L2**, resultando **L5** al igual que **L2**, un triterpeno con esqueleto de lupano con tres grupos hidroxilos y observándose como principales diferencias en sus espectros de RMN 1H , la desaparición de la señal doble triplete a 3,92 δ y la aparición de una señal a 3,80 δ , solapada con uno de los dobletes correspondientes del sistema AX de H28 (tabla 4.2.1, figura 4.2.16).

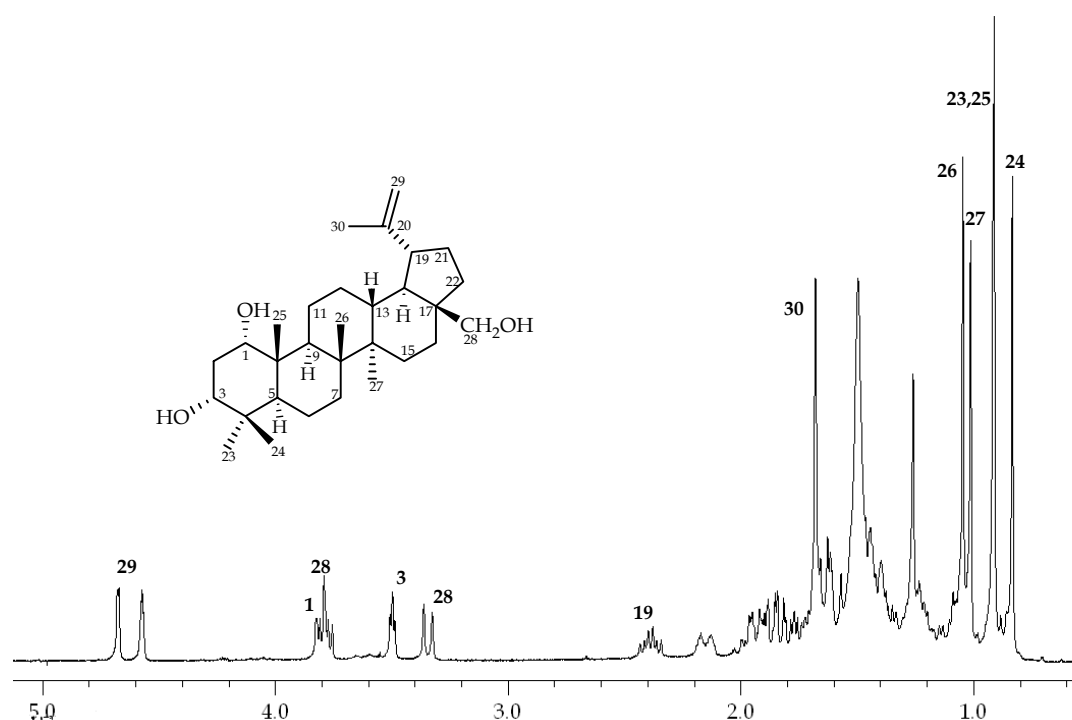


Figura 4.2.16. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **L5**.

La disposición de los grupos hidroxilos se estableció mediante el estudio de los experimentos bidimensionales de RMN (COSY, ROESY, HMBC y HSQC). Así, en el experimento HMBC se observaron como correlaciones más significativas las del Me25 a 0,91 δ_H con un carbono cuaternario a 43,6 δ_C (C10) y dos carbonos metínicos a 51,9 (C9) y 75,9 (C1) y este último carbono mostró correlación también con el protón a 3,50 δ_H (H3). Por otro lado, los Me 23 y 24 a 0,91 y 0,83 δ_H , respectivamente, presentaron correlación con un carbono cuaternario a 37,4 δ_C (C4) y un carbono metínico unido a oxígeno a 76,6 δ_C . Estos datos nos permitieron situar los dos grupos hidroxilos en la molécula, sobre C1 y C3.

La estereoquímica de ambos grupos hidroxilo fue determinada mediante el estudio de las constantes de acoplamiento y un experimento ROESY, en el que se observó correlación de los Me23 y 24 con H3, lo que sólo es posible para una disposición β ecuatorial para H3, así como correlación del Me25 y H3 β con H1. Ello permite establecer una estereoquímica 1 α y 3 α para los grupos hidroxilos.

Estos datos nos permitieron establecer la estructura de **L5** como 1 α ,3 α ,28-trihidroxi-lup-20(29)-eno, al que le asignamos el nombre de 28-hidroxi-1-epiglochidiol, dado su relación estructural con el glochidiol⁵⁰.

Triterpeno L6

El compuesto que denominamos **L6**, se aisló como un sólido amorfo y presentó en su espectro de masas de baja resolución un ión molecular a 438 m/z y una fórmula molecular de $C_{30}H_{46}O_2$, basándonos en sus espectros de masas de alta resolución y RMN ^{13}C .

En su espectro de IR se observó una banda característica de grupo hidroxilo a 34487 cm^{-1} y grupo carbonilo a 1732 cm^{-1} , mientras en su espectro de UV se observó una banda de absorción a 229 nm, característica de un carbonilo α,β -insaturado.

Su espectro de RMN 1H (figura 4.2.17) mostró señales correspondientes a dos protones vinílicos a 8,30 y 5,71 δ como dobletes, con constante de acoplamiento de 10,4 Hz y cuya forma y desplazamiento sugiere que corresponden a dos protones vinílicos de un sistema carbonílico α,β -insaturado. Así mismo, se observaron señales correspondientes a otros dos protones vinílicos como singuletes anchos a 4,73 y 4,61 δ , un protón geminal a un grupo hidroxilo secundario a 4,09 δ como un doble triplete, con constantes de acoplamiento de 4,9 y 10,7 Hz, y señales que corresponden a siete metilos angulares, seis como singuletes a 0,80, 0,98, 1,11, 1,12, 1,12, 1,26 δ y uno sobre doble enlace a 1,70 δ (tabla 4.2.1).

El espectro de RMN ^{13}C (figura 4.2.18) mostró señales para 30 carbonos, observándose un carbono cuaternario a 205,3 δ , asignado a un grupo carbonilo; cuatro carbonos vinílicos, dos de ellos dobletes a 165,1 y 123,6 δ , un triplete a 113,5 δ y un singulete a 150,2 δ , así como un carbono secundario unido a oxígeno a 70,64 δ (tabla 4.2.2).

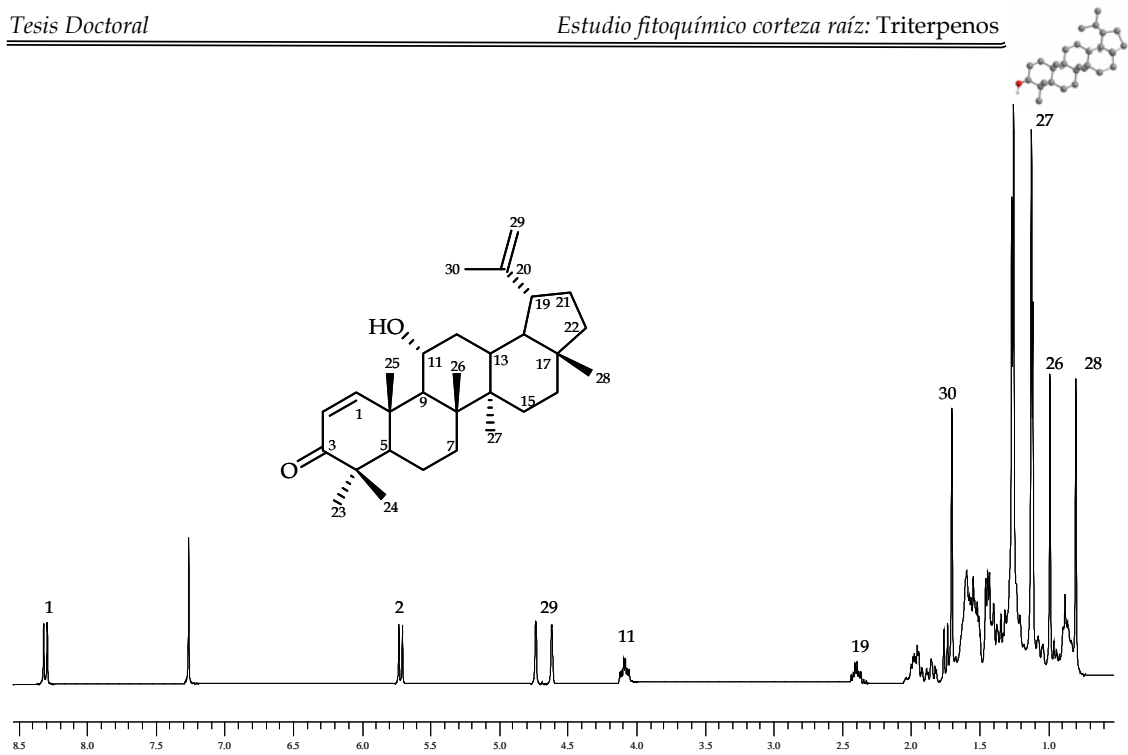


Figura 4.2.17. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de L6.

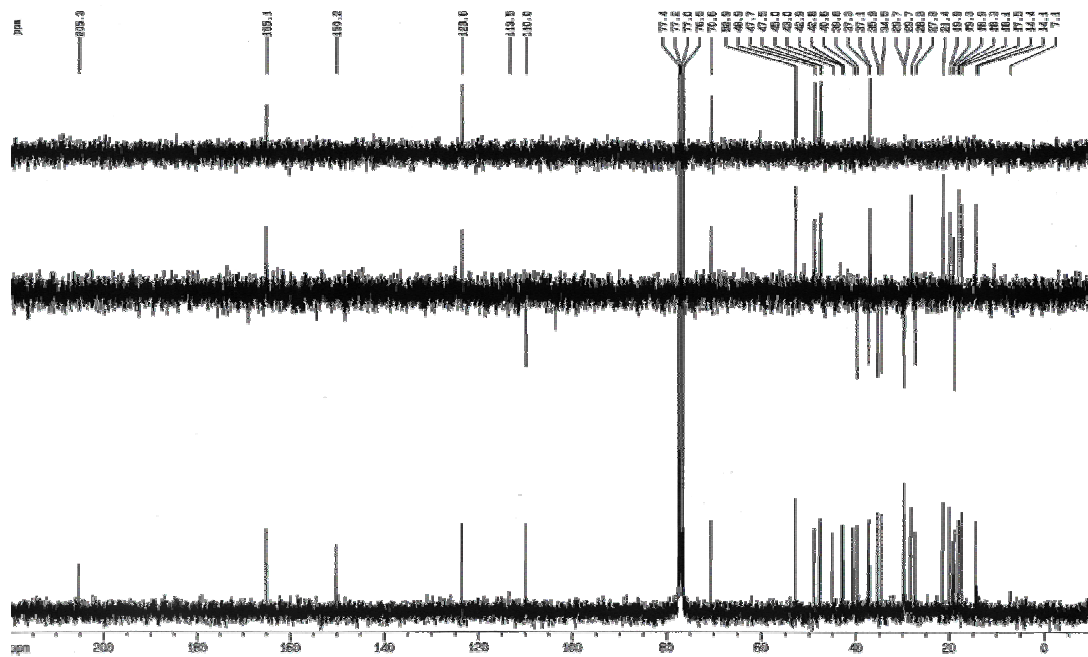


Figura 4.2.18. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de L6.

Estos datos indican que nos encontramos ante un triterpeno de la serie del lupano, que presenta un alcohol secundario y una cetona α,β -insaturada.

El estudio de los experimentos bidimensionales de COSY, ROESY, HSQC y HMBC permitió establecer de forma inequívoca la posición de los grupos funcionales

en la molécula. Así, podemos destacar en el experimento HMBC (figura 4.2.19) la correlación entre los metilos 23 y 24, ambos a 1,12 δ , con un carbonilo a 205,3 δ y éste a su vez mostró correlación con los dos protones vinílicos a 8,30 y 5,71 δ , a dos y tres enlaces respectivamente, lo que nos confirmó la presencia de un grupo carbonilo α,β -insaturado en el anillo A. La correlación de los metilos 25 (1,05 δ) y 26 (1,03 δ) y del protón geminal a un grupo hidroxilo a 3,92 δ con el carbono 9 a 55,6 δ , nos permitió situar el grupo hidroxilo secundario sobre el carbono 11.

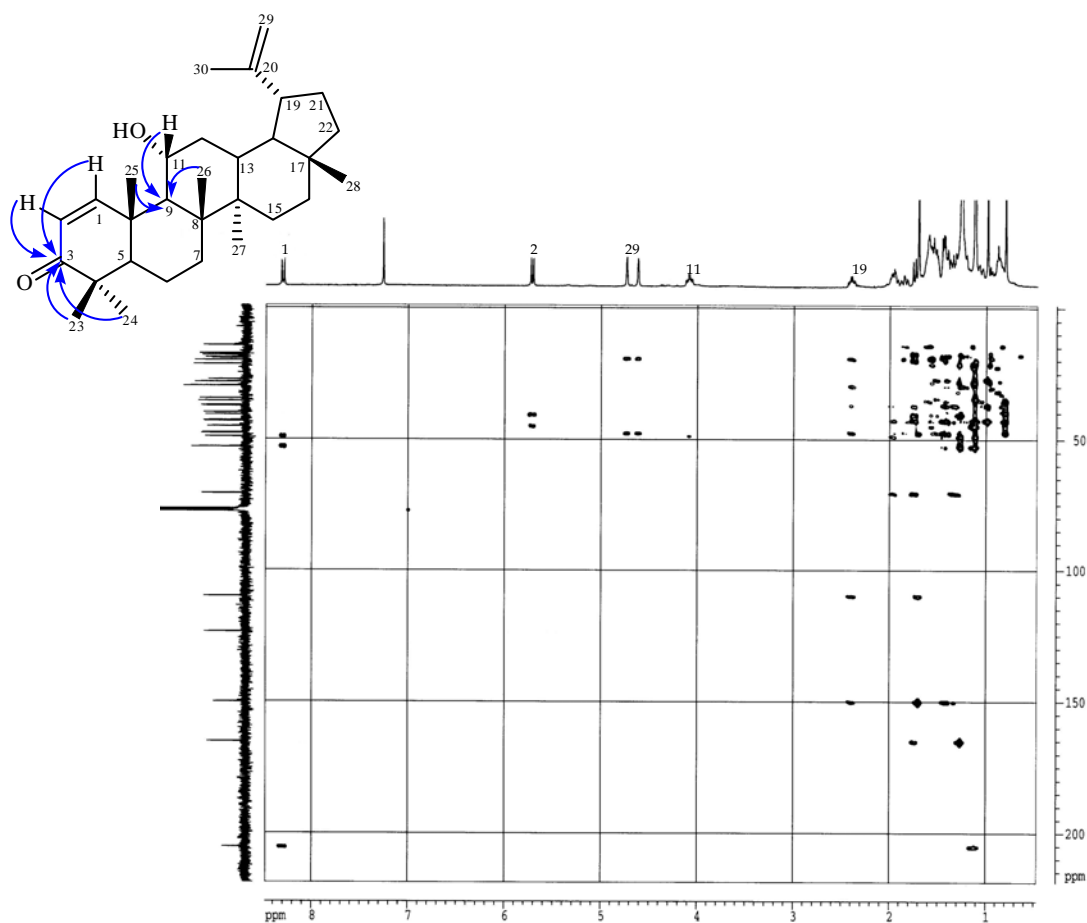
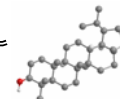


Figura 4.2.19. Experimento HMBC de L6.

La estereoquímica del grupo hidroxilo sobre el carbono 11 se determinó mediante un experimento ROESY, en el que se observó efecto ROE entre H11 y los Me25 y Me26, quedando así establecida la estructura del compuesto L6 como 11 α -hidroxi-3-oxo-lup-1:20(29)-dieno, para el que proponemos el nombre de 11 α -hidroxi-glochidona, dada su relación estructural con la glochidona⁵⁰.

**Triterpeno L7**

Al compuesto que hemos denominado **L7** se le asignó una fórmula molecular de $C_{30}H_{46}O_2$, basándonos en sus datos de masas de alta resolución y espectro de RMN ^{13}C . El estudio de sus datos de IR, UV, RMN 1H y RMN ^{13}C nos indicaron que el producto **L7** estaba relacionado con **L6**, siendo las diferencias más reseñables, en sus espectros de RMN 1H , la ausencia de un alcohol secundario sobre el carbono 11 y del metilo sobre el carbono 28 y la aparición de un sistema AX de dos protones a 3,35 y 3,80 δ como dobletes con una constante de acoplamiento de 10,6 Hz, asignables a un alcohol primario sobre el carbono 28.

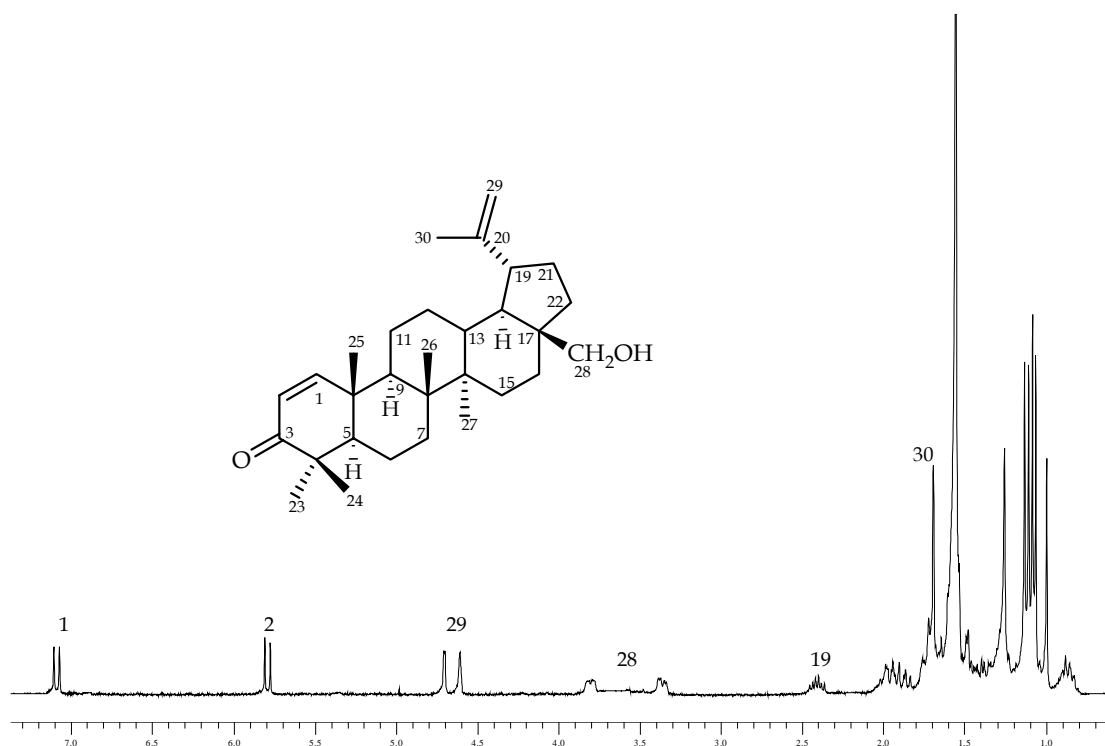


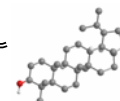
Figura 4.2.20. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **L7**.

El estudio de los experimentos bidimensionales de COSY, ROESY, HSQC y HMBC, nos permitieron establecer de forma inequívoca la estructura del compuesto **L7** como 28-hidroxi-3-oxo-lup-1:20(29)-dieno, para el que proponemos el nombre de 28-hidroxi-glochidona.

Tabla 4.2.1. Datos^a de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) para los lupanos L1-L7.

H	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
1	1,47, 2,30 ^b	1,47, 2,28	1,61, 2,68	1,60, 2,66	3,80	8,30 d (10,4)	7,09 d (10,1)
2	1,48, 1,97	1,48, 1,98	2,46	2,42	1,75, 1,85	5,71 d (10,4)	5,70 d (10,1)
3	3,36 s ancho	3,36 s ancho			3,50 t (3,1)		
5	1,20	1,24	1,48	1,48 ^a	1,28	1,55	1,55
6	1,38	1,42		1,52	1,44	1,35, 1,90	1,39
7	1,32	1,47	1,48	1,55	1,42	1,44	1,56
9	1,47	1,45	1,48	1,48 ^a	1,62	1,75	1,65
11	3,92 dt (5,3, 10,7) ^c	3,92 dt (5,3, 10,7)	3,90 dt (5,3, 10,7)	3,90 dt (5,3, 10,7)	1,35, 2,15	4,15 dt (4,8, 10,7)	1,48
12	1,18, 1,99	1,10, 1,91	1,12, 1,92	1,12, 2,10	1,12, 1,65	1,98	1,65
13	1,77 t (10,9)	1,75 t (10,9)	1,83	2,25	1,65	1,90 t (10,9)	1,72
15	1,02, 1,56	1,10, 1,62	1,17, 1,62	0,75, 1,63	1,15, 1,75	1,24, 1,40	1,80
16	1,45, 2,28	0,99, 1,85	1,98	2,08	1,22, 1,43	1,45, 1,56	1,52
18	1,42	1,59	1,70	1,75	1,58	1,45	1,68
19	2,35 dt (4,9, 10,8)	2,39 dt (4,9, 10,8)	2,42	2,89 dt (4,9, 10,8)	2,37 dt (4,9, 10,8)	2,40 dt (4,9, 10,8)	2,40 dt (5,7, 10,7)
21	1,34, 1,92	1,95	1,99	2,01	1,95	1,40, 2,01	1,98
22	1,25, 1,40	1,45	1,86	1,80	1,03, 1,85	1,31, 1,40	1,91
23	0,94 s	0,94 s	1,12 s	1,08 s	0,91 s	1,12 s	1,13 s
24	0,85 s	0,85 s	1,08 s	1,04 s	0,83 s	1,12 s	1,08 s
25	1,05 s	1,05 s	1,09 s	1,05 s	0,91 s	1,26	1,06 s
26	1,03 s	1,02 s	1,07 s	0,95 s	1,05 s	1,11 s	1,04 s
27	0,97 s	1,01 s	1,03 s	0,95 s	1,01 s	0,98 s	0,99 s
28	0,77 s	3,33, 3,74 d _{AX} (10,8)	3,37, 3,78 d _{AX} (10,8)	9,61 s	3,34, 3,79 d _{AX} (10,6)	0,80 s	3,35, 3,80 d _{AX} (10,6)
29	4,58 s ancho 4,71 s ancho	4,60 s ancho 4,71 s ancho	4,61 s ancho 4,71 s ancho	4,65 s ancho 4,78 s ancho	4,57 s ancho 4,67 s ancho	4,61 s ancho 4,73 s ancho	4,60 s ancho 4,69 s ancho
30	1,68 s	1,68 s	1,87 s	1,73 s	1,68 s	1,70 s	1,69 s

^a Datos en δ basados en experimentos COSY y HSQC. ^b Sino se indica la multiplicidad es que son señales solapadas. ^c J en paréntesis expresada en Hz.

**Tabla 4.2.2.** Datos^a de RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) para los lupanos L1-L7.

C	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
1	35,4 t	35,5 t	41,8 t	42,4 t	75,9 d	165,1 d	159,6 d
2	25,6 t	25,6 t	34,0 t	34,3 t	36,4 t	123,6 d	125,2 d
3	75,9 d	75,9 d	218,3 s	218,6 s	76,6 d	205,3 s	205,0 s
4	37,8 s	37,8 s	47,5 s	47,6 s	37,4 s	45,0 s	44,6 s
5	48,9 d	48,9 d	54,6 d	54,9 d	47,8 d	52,9 d	53,5 d
6	18,3 t	18,0 t	19,4 t	19,5 t	18,4 t	18,9 t	19,0 t
7	35,1 t	35,1 t	33,9 t	34,2 t	34,0 t	34,5 t	33,7 t
8	42,7 s	42,6 s	42,2 s	42,1 s	42,9 s	42,9 s	41,8 s
9	55,6 d	55,6 d	54,5 d	54,7 d	51,2 d	48,9 d	44,5 d
10	39,1 s	39,1 s	37,9 s	38,2 s	37,4 s	40,6 s	39,5 s
11	70,6 d	70,5 d	70,1 d	70,1 d	23,7 t	70,6 d	21,2 t
12	37,6 t	37,6 t	37,2 t	37,6 t	25,2 t	37,3 t	25,2 t
13	37,1 d	36,3 d	36,1 d	37,6 d	36,9 d	37,1 d	37,5 d
14	42,7 s	42,9 s	42,2 s	42,3 s	41,7 s	42,8 s	43,0 s
15	27,3 t	27,0 t	26,8 t	28,8 t	27,1 t	27,3 t	27,0 t
16	35,4 t	33,8 t	33,6 t	28,9 t	29,2 t	35,3 t	29,1 t
17	43,0 s	47,8 s	47,3 s	59,3 s	43,6 s	43,0 s	47,7 s
18	47,7 d	48,2 d	47,8 d	47,2 d	48,8 d	47,5 d	48,6 d
19	47,7 d	47,6 d	47,4 d	47,2 d	47,8 d	47,7 d	47,8 d
20	150,2 s	149,8 s	149,5 s	149,1 s	150,3 s	150,0 s	150,3 s
21	29,8 t	29,1 t	29,4 t	29,8 t	29,7 t	29,7 t	29,7 t
22	39,8 t	29,3 t	28,8 t	32,9 t	34,0 t	39,8 t	33,9 t
23	28,7 c	28,7 c	27,2 c	27,4 c	27,7 c	28,2 c	27,8 c
24	22,3 c	22,3 c	20,5 c	20,7 c	21,9 c	21,4 c	21,4 c
25	16,2 c	16,5 c	16,4 c	16,8 c	11,7 c	19,9 c	19,2 c
26	17,2 c	17,2 c	16,6 c	16,7 c	16,2 c	17,4 c	16,5 c
27	14,6 c	14,1 c	14,4 c	14,1 c	14,8 c	14,4 c	14,6 c
28	18,0 c	60,6 t	60,3 t	206,0 d	60,6 t	18,0 c	60,6 t
29	109,8 t	110,2 t	110,1 t	110,7 t	109,8 t	113,5 t	109,9 t
30	19,3 c	19,1 c	18,9 c	19,0 c	19,0 c	19,3 c	19,0 c

^a Los datos en δ_C , están basados en experimentos DEPT y HSQC.

4.2.2.1. Derivados de los triterpenos con esqueleto de lupano.

Para completar el estudio de relación estructura-actividad de los lupanos como inhibidores del proceso inflamatorio⁶⁴ (inhibidores de la producción de NO₂ y PGE) y ante la necesidad de obtener cantidad suficiente de los metabolitos más activos para realizar los ensayos *in vivo*, se prepararon los derivados que se muestran en las figuras 4.2.21 y 4.2.22.

Así, se requerían al menos 100 mg de cada uno de los metabolitos activos para su evaluación *in vivo*, cantidad que no obtuvimos en el estudio fitoquímico. Por ello, realizamos la semisíntesis de 3-*epi*betulina (**L19**) y 11 α -hidroxi-glochidona (**L6**), partiendo de betulina comercial y rigidinol (**L13**), aislado del estudio fitoquímico, respectivamente.

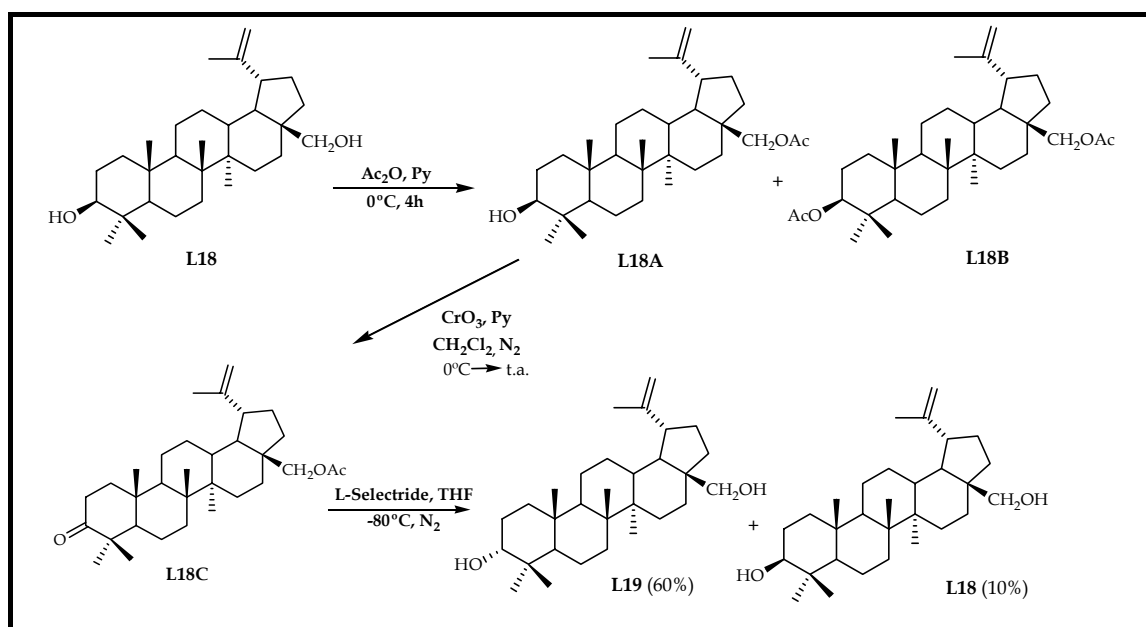
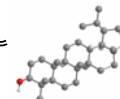


Figura 4.2.21. Semisíntesis para la obtención de **L19**.

Para la obtención de **L19**, teníamos dos posibilidades: la epimerización del grupo hidroxilo 3 β o la reducción de la cetona en C3 de la betulona (**L10**). Optamos por la segunda estrategia ya que en la bibliografía existían ejemplos⁶⁵ en los que la utilización de la reacción de Mitsunobu para la epimerización de C3 en lupanos que no daban el producto deseado, sino que se formaba el producto de eliminación $\Delta^{2,3}$.

⁶⁴ Safayhi, H.; Sailer, E.-R. *Planta Med.* **1997**, *63*, 487-493.

⁶⁵ Symon, A. V.; Kaplun, A. P.; Vlasenkoba, N. K.; Gerasinova, G. K. Shon; L. B.; Litvin, E. F.; Kozlova, L. M.; Surkova, E. L.; Shvets, V. I. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2003**, *29*, 185-189.



Así, partiendo de betulina (**L18**), se protegió el alcohol primario mediante acetilación a 0°C (figura 4.2.21), posteriormente se oxidó el alcohol secundario sobre C3 a cetona utilizando óxido crómico y por último utilizamos un agente reductor, el L-Selectride (tri-*sec*-butilborohidruro de litio) 1,0 M en THF, obteniendo como producto mayoritario el epímero en C3 de **L18** (**L19**, R= 60%). La estructura de los derivados **L18A** a **L18C**, fue establecida basándonos en sus datos físicos y espectroscópicos y comparación con los existentes en la bibliografía⁶⁶.

Para la preparación de **L6**, partimos de rigidinol (**L13**), que acetilamos (**L13A**) utilizando el procedimiento habitual (figura 4.2.22). La cetona α,β -insaturada se obtuvo tratando **L13A** con cloruro de fenilselenio en acetato de etilo y posterior adición de piridina y ácido *m*-cloroperbenzoico. Esta metodología⁶⁷, anteriormente utilizada en triterpenos con esqueleto de oleano y ursano, podría dar lugar a la cloración del doble enlace⁶⁸ exocíclico o la formación de la cetona α,β -insaturada⁶⁹. En nuestro caso, obtuvimos como producto mayoritario **L13B**, resultante de la cloración del doble enlace exocíclico del grupo isopropilideno, además del producto con cetona α,β -insaturada y con un grupo cloruro en C30 (**L13C**).

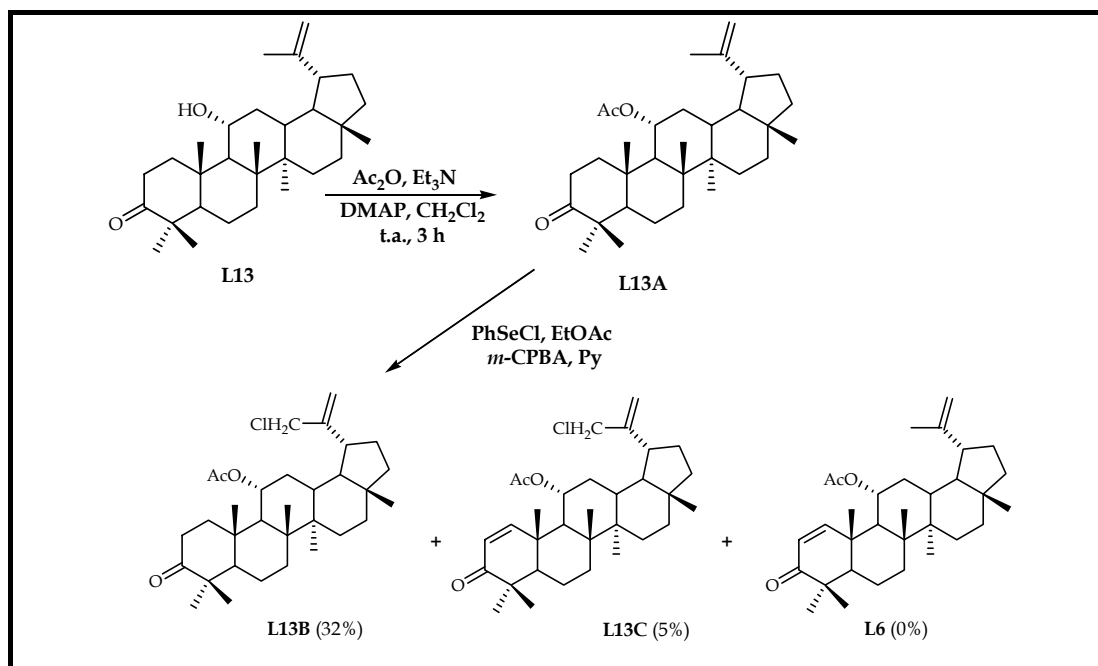


Figura 4.2.22. Preparación de derivados de **L13**.

⁶⁶ Hiroya, K.; Takahashi, T.; Miura, N.; Naganuma, A.; Sakamoto, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3229-3236.

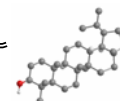
⁶⁷ Honda, T.; Gribble, G. W.; Such, N.; Finlay, H. J.; Rounds, B. V.; Bore, L. F.; Favalaro, Jr.; Wang, Y.; Sporn, M. B. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1866-1877.

⁶⁸ Hori, T.; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4204-4208.

⁶⁹ Sharpless, K. B.; Lauer, R. F.; Teranishi, A. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 6137-6139.

La estructura de los derivados del rigidol, **L13 A-C**, que no habían sido descritos con anterioridad, se determinó mediante el estudio de sus datos espectroscópicos. Así, en el espectro de RMN ^1H de **L13A** se observó el desplazamiento de H11 de 3,85 δ en **L13** a 5,08 δ y la aparición de un singulete a 1,91 δ , correspondiente al metilo del grupo acetato sobre C11.

En los espectros de RMN ^1H de **L13B** y **L13C** observamos la desaparición de la señal correspondiente al Me30 a 1,68 δ en **L13A** y la aparición de un singulete a 5,02 y 4,03 δ , respectivamente, que integra para dos protones. El estudio de los espectros RMN de ^{13}C y 2D y espectrometría de masas, nos permitió determinar la estructura de **L13B** como 11 α -acetoxi-30-cloro-3-oxo-lup-20(29)-eno. Con respecto a **L13C** sus datos de RMN indicaron que, además de la cloración alílica al doble enlace como ocurrió en **L13B**, se formó la cetona α,β -insaturada; así, su espectro de RMN ^1H presentó un sistema AX de dos protones a 5,74 y 7,80, ambos como dobletes con una constante de acoplamiento de 10,4 Hz, correspondientes a H1 y H2, respectivamente.

**Triterpeno O1**

Al triterpeno que denominamos **O1** se le asignó una fórmula molecular de $C_{45}H_{76}O_5$, basándonos en los datos de sus espectros de masas junto con los de RMN 1H y ^{13}C . Su espectro de infrarrojo mostró bandas de absorción características de grupo hidroxilo (3571 cm^{-1}) y de grupo éster (1731 cm^{-1}).

En el espectro de RMN 1H de **O1** (figura 4.2.23) se observaron señales que corresponden a siete metilos angulares como singuletes a 0,91, 0,96, 0,97, 1,00, 1,16 y 1,25 δ ; un grupo metoxilo a 3,68 δ ; tres protones metínicos, asignables a un protón geminal a un grupo hidroxilo a 3,57 δ (dd, $J=3,9, 11,9\text{ Hz}$), a un protón geminal a un grupo éster a 4,52 δ (t, $J= 8,6\text{ Hz}$) y a un protón vinílico a 5,25 (t, $J= 3,4\text{ Hz}$), característico de un $\Delta^{12,13}$.

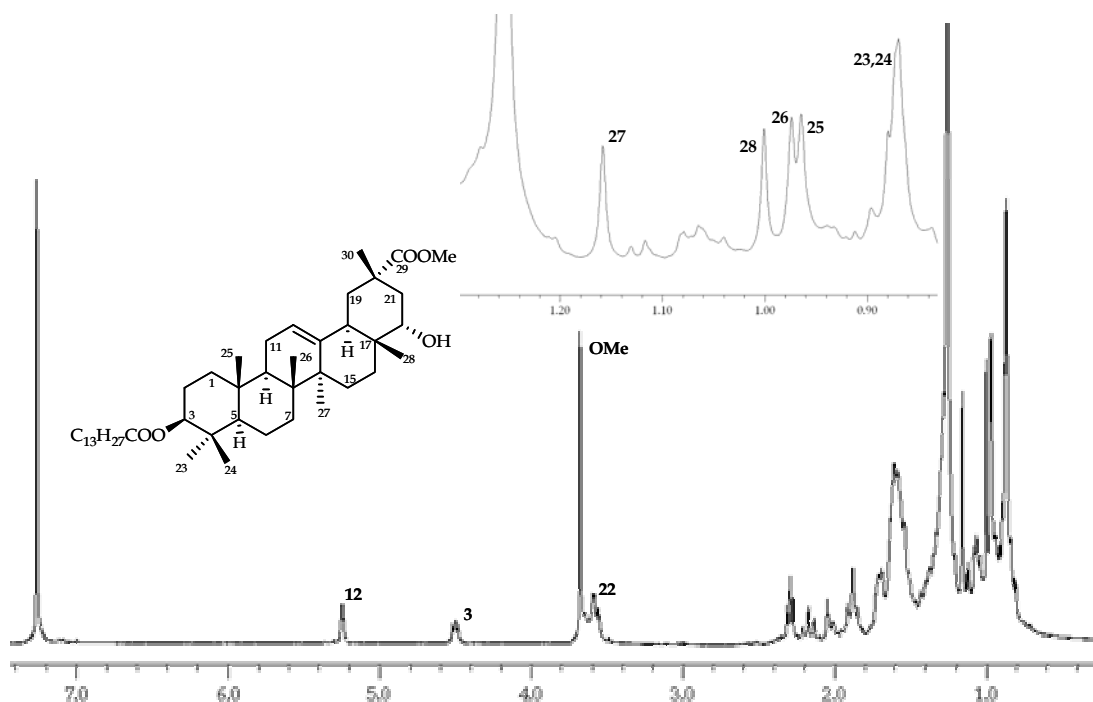
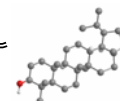


Figura 4.2.23. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **O1**.

Estos datos fueron confirmados en el espectro de RMN ^{13}C (figura 4.2.24), que mostró señales para 45 carbonos, lo que junto a los experimentos DEPT 90° y 135° , determinó la existencia de nueve metilos, veintiún metilenos, seis metinos y ocho carbonos cuaternarios. Como señales más características podemos destacar la presencia de dos carbonos carboxílicos a 177,9 δ (s, C29) y 173,5 δ (s, C1'), dos olefínicos a 142,6 δ



El grupo éster fue confirmado mediante RMN ^1H y ^{13}C . Así en su espectro de RMN ^{13}C se observó la presencia de un singulete a 173,5 δ , doce tripletes entre 22,4 - 31,7 δ y un cuarteto a 13,9 δ .

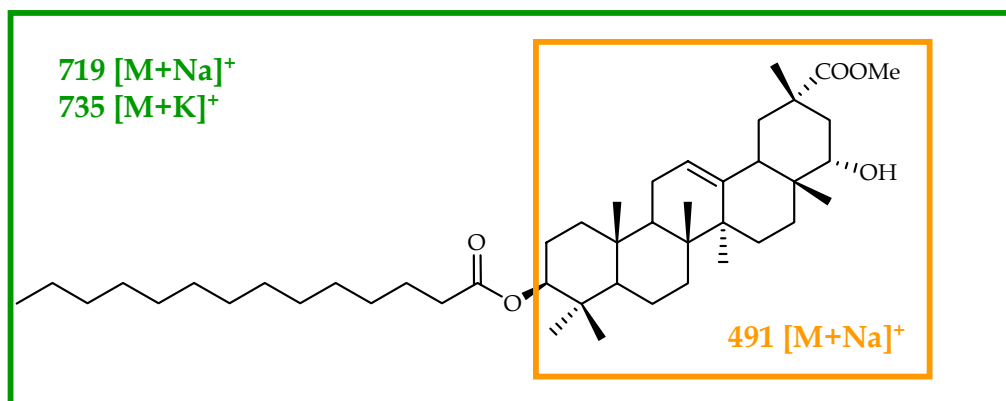


Figura 4.2.25. Datos obtenidos en el espectro de masas de baja resolución de O1.

El estudio de experimentos bidimensionales homonucleares (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), nos permitió situar los grupos funcionales en la molécula de forma inequívoca.

El experimento ^1H - ^1H COSY reveló acoplamiento entre el protón geminal a un grupo hidroxilo, a 3,57 δ_{H} , con los protones correspondientes a C21 a 1,67 (1H, m) y 1,86 (1H, d, $J= 11,9$ Hz) y correlación en el experimento HMBC (figura 4.2.26) con el Me28 (24,9 δ_{C}) y con un carbono metilénico (36,6 δ_{C}), nos permitió situar el grupo hidroxilo sobre el C22. Este dato junto con las correlaciones a larga distancia de H19, H21, Me30 y MeO con el carbono carboxílico a 177,9 δ_{C} , permitieron fijar la estructura del anillo E. Otras correlaciones significativas en el experimento HMBC son las de H3 a 4,52 δ_{H} con los Me23 y 24 y con el carbono carboxílico del éster, C1' (173,5 δ_{C}), lo que nos permitió situar el grupo éster, miristato, sobre el C3. Por otro lado, el doble enlace se situó entre C12 y C13, al observarse correlación del Me27 (1,16 δ_{H}) y el protón H19 α (2,17 δ_{H}) con el carbono cuaternario a 142,6 δ_{C} (C13) en el experimento HMBC.

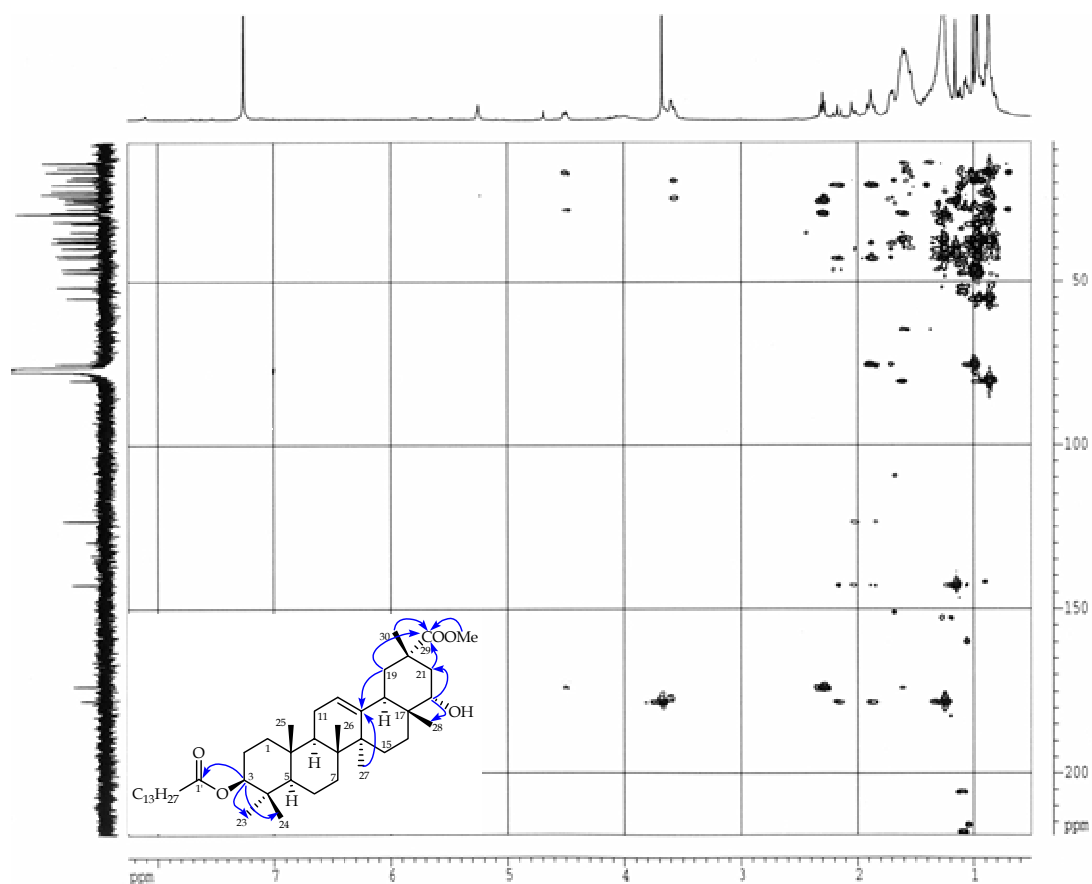


Figura 4.2.26. Experimento **HMBC** de **O1**.

La estereoquímica de los grupos sobre los C3 y C22 se determinó mediante el estudio de las constantes de acoplamiento y fue confirmada mediante experimento ROESY (figura 4.2.27), donde se observó efecto ROE entre H22 y los Me30 y 28 y entre H3 y los Me23 y Me24.

Estos datos nos permitieron establecer la estructura de **O1** como 11 α -hidroxi-29-metoxi-3 β -miristato-olean-12-eno.

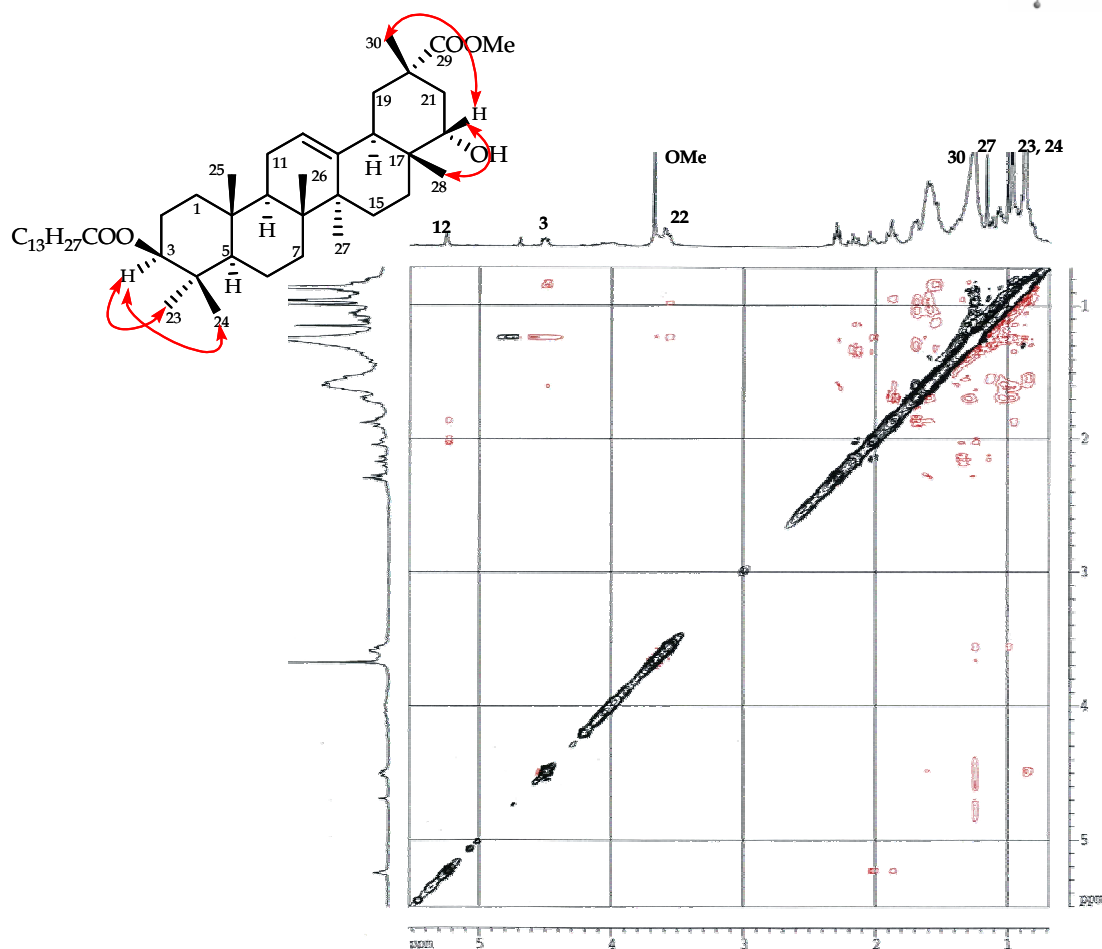
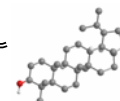


Figura 4.2.27. Experimento **ROESY** de O1.

Triterpeno F1

El compuesto que hemos denominado **F1** presentó una fórmula molecular $C_{31}H_{50}O_6$, determinada por espectrometría de masas de alta resolución, indicando siete grados de insaturación. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción correspondientes a grupo hidroxilo a 3508 cm^{-1} y grupo éster a 1731 cm^{-1} .

Su espectro de RMN ^1H (figura 4.2.28) presentó señales para cinco metilos como singletes a 0,79, 0,83, 0,93, 1,06 y 1,16 δ_{H} , un metilo doblete a 1,12 δ_{H} (7,2 Hz) y un metoxilo como singlete a 3,63 δ_{H} . Además, se observaron señales de un sistema AM de dos protones metilénicos unido a oxígeno a 4,26 y 3,81 δ_{H} ambos como dobletes con una constante de 8,4 Hz y dos señales a 3,82 y 3,87 δ_{H} (H6 y H2), que integran cada una para un protón, señales características de protones geminales a oxígeno.

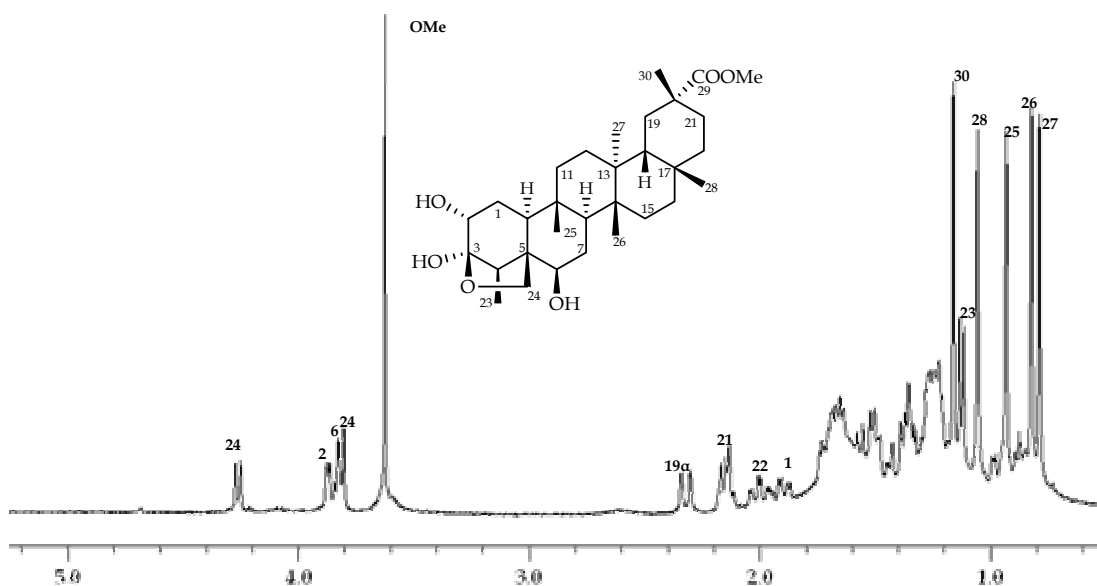


Figura 4.2.28. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de O1.

Su espectro de RMN ^{13}C mostró señales para 31 carbonos, lo que junto con los experimentos DEPT 90° y 135° , indicaron la existencia de siete metilos, diez metilenos, seis metinos y ocho carbonos cuaternarios. La presencia de un grupo metil éster se corroboró al observar un carboxilo a $179,1 \delta_{\text{C}}$ y un metilo a $51,6 \delta_{\text{C}}$. Se observaron además dos carbonos metínicos a $72,7$ y $72,8 \delta_{\text{C}}$, un carbono metilénico a $64,6 \delta_{\text{C}}$, lo que nos sugiere que uno de los metilos se ha oxidado, formando un hidroximetileno y un carbono cuaternario a $106,3 \delta_{\text{C}}$, característico de un sistema hemicetálico.

Todos estos datos nos indican que **F1** es un triterpeno con esqueleto de friedelano, con un grupo metoxilo, dos alcoholes secundarios y un hemicetal, datos que al compararlos con los existentes en la literatura mostraron que se trataba de un derivado del ácido orthosphenico⁷⁰.

La disposición de los grupos funcionales en la molécula se determinó mediante un experimento HMBC, en el cual se observó correlación del Me23 ($1,12 \delta_{\text{H}}$) con un carbono metínico a $45,6 \delta_{\text{C}}$ (C4) y dos carbonos cuaternarios a $52,8$ y $106,3 \delta_{\text{C}}$ (C5 y C3, respectivamente), así como, correlación de los protones a $3,81$, $4,26$ (H24) y $3,84$ (H2) δ_{H} con el carbono hemicetálico a $106,3 \delta_{\text{C}}$ (C3). Estos datos nos permitieron situar un alcohol secundario sobre C2 y el hemicetal cíclico entre C3 y C24.

⁷⁰ González, A.; Fraga, B. M.; Gonzalez, P.; Gonzalez, C. M.; Ravelo, A. G.; Ferro, E. Domínguez, X. A.; Martínez, M.; Perales, A.; Fayos, J. J. *Org. Chem.* **1983**, *48*, 3759-3761.

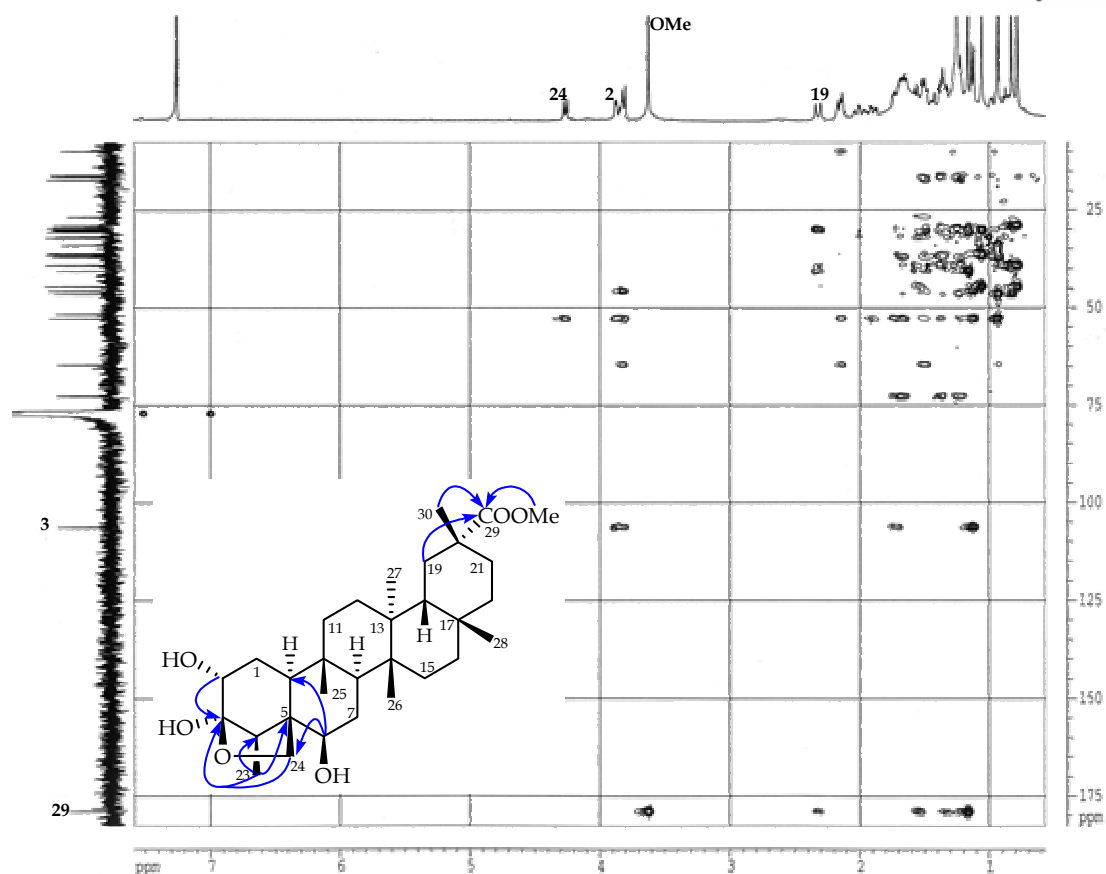
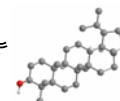


Figura 4.2.29. Experimento **HMBC** de F1.

El grupo metoxilo se situó sobre el C29 al observar correlación del Me30 ($1,16 \delta_{\text{H}}$) y H19 α ($2,32 \delta_{\text{H}}$) con el carbono carboxílico a $179,1 \delta_{\text{C}}$ (C29). Con respecto al otro grupo hidroxilo secundario, establecimos su posición sobre C6 por las correlaciones observadas en el experimento HMBC de su protón geminal a $3,82 \delta_{\text{H}}$ con un carbono metilénico a $64,6 \delta_{\text{C}}$ (C24) y dos carbonos metínicos a $52,8 \delta_{\text{C}}$ (C10) y $45,6 \delta_{\text{C}}$ (C4).

Debido al solapamiento de las señales entre $3,80$ - $3,87 \delta$ en el espectro de RMN ^1H y tras probar, sin éxito, con diferentes disolventes deuterados, decidimos acilar **F1** utilizando las condiciones habituales, tal como se detalla en la parte experimental.

El espectro de RMN ^1H del derivado acetilado, **F1A**, nos permitió estudiar la multiplicidad y las constantes de acoplamiento de las señales solapadas, anteriormente mencionadas. Así, H6 se desplaza a $4,95 \delta$ (dd, $J = 5,4, 11,5 \text{ Hz}$), H2 a $5,84 \delta$ (d, $J = 3,7 \text{ Hz}$) y el sistema AB correspondiente a H24 se observó como dos dobletes a $4,13$ y $4,39 \delta$ ($J = 8,5 \text{ Hz}$). Un estudio detallado de las constantes de acoplamiento y un experimento ROESY de **F1A** (figura 4.2.30), nos permitió establecer la estereoquímica de H2 como β ecuatorial, H6 α axial, el grupo hemicetálico como β axial y el grupo metoxicarbonilo

en disposición α . Quedó así establecida la estructura de **F1** como 3 β ,24-epoxi-29-metoxi-2 α ,3 α ,6 α -trihidroxi-*D:A*-friedelano.

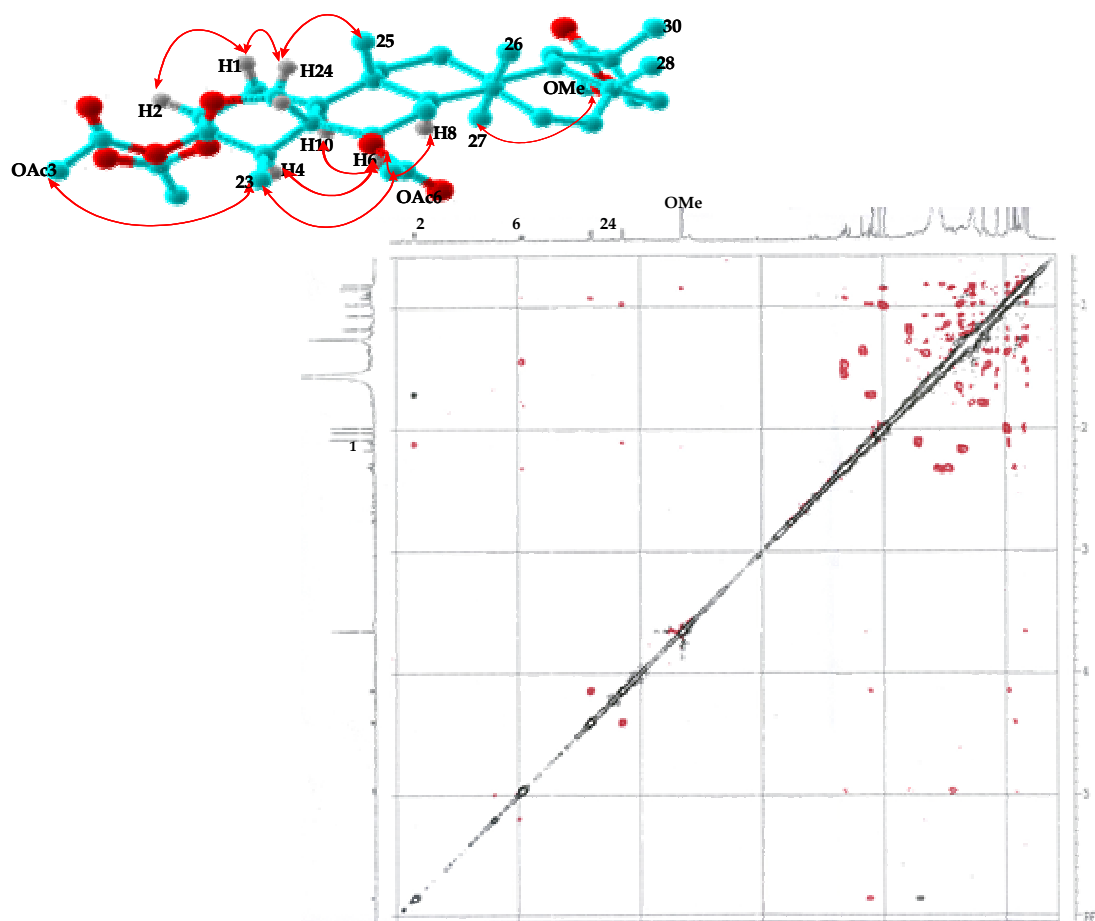
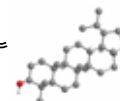


Figura 4.2.30. Experimento **ROESY** de F1A.

Este compuesto había sido descrito anteriormente, como derivado obtenido de la metilación de una fracción del extracto de *Maytenus horrida*⁷¹, sin embargo es la primera vez que se aísla de forma natural y que se da la completa asignación de todas sus señales de RMN ^1H y ^{13}C , utilizando experimentos de RMN bidimensionales. Esta sustancia se ha propuesto como precursor en la biosíntesis de las nor-triterpenometilénquinonas y compuestos relacionados de naturaleza fenólica (celastroloides), como mostraremos en el capítulo 4.3.

⁷¹ González, A. G.; González, C. M.; Ferro, E. A.; Ravelo, A. G.; Domínguez, X. A. *J. Chem. Research.* 1988, 20-21



4.2.3. Parte experimental

4.2.3.1. Separación cromatográfica de los triterpenos de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*

En la separación cromatográfica realizada al extracto de *n*-hexano-éter dietílico (1:1) de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*, se aislaron cuarenta y cuatro triterpenos y dos esteroides (figura 4.2.31 y 4.2.32), que los agrupamos para su estudio según el tipo de esqueleto que presentan:

- Esteroles (**E1-E2**)
- *D:B* Friedobaccharano (**B1**)
- Lupanos (**L1-L25**)
- Oleanos (**O1-O6**)
- Ursanos (**U1-U5**)
- Glutinano (**G1**)
- Friedelanos (**F1-F6**)

De los triterpenos aislados, nueve resultaron nuevos en la bibliografía química, de los cuales siete son triterpenos con esqueleto de lupano (**L1-L7**), un oleano (**O1**) y un friedelano (**F1**). Cabe destacar que el friedelano **F1**⁷¹, es la primera vez que se aísla de forma natural y se establece la completa asignación de sus señales de ¹H y ¹³C de forma inequívoca mediante experimentos de RMN, tanto mono como bidimensionales. Además, se preparó el derivado acetilado, **F1A**, que nos permitió establecer la estereoquímica de los grupos hidroxilos sobre la molécula.

Los triterpenos anteriormente descritos fueron identificados por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los existentes en la bibliografía.

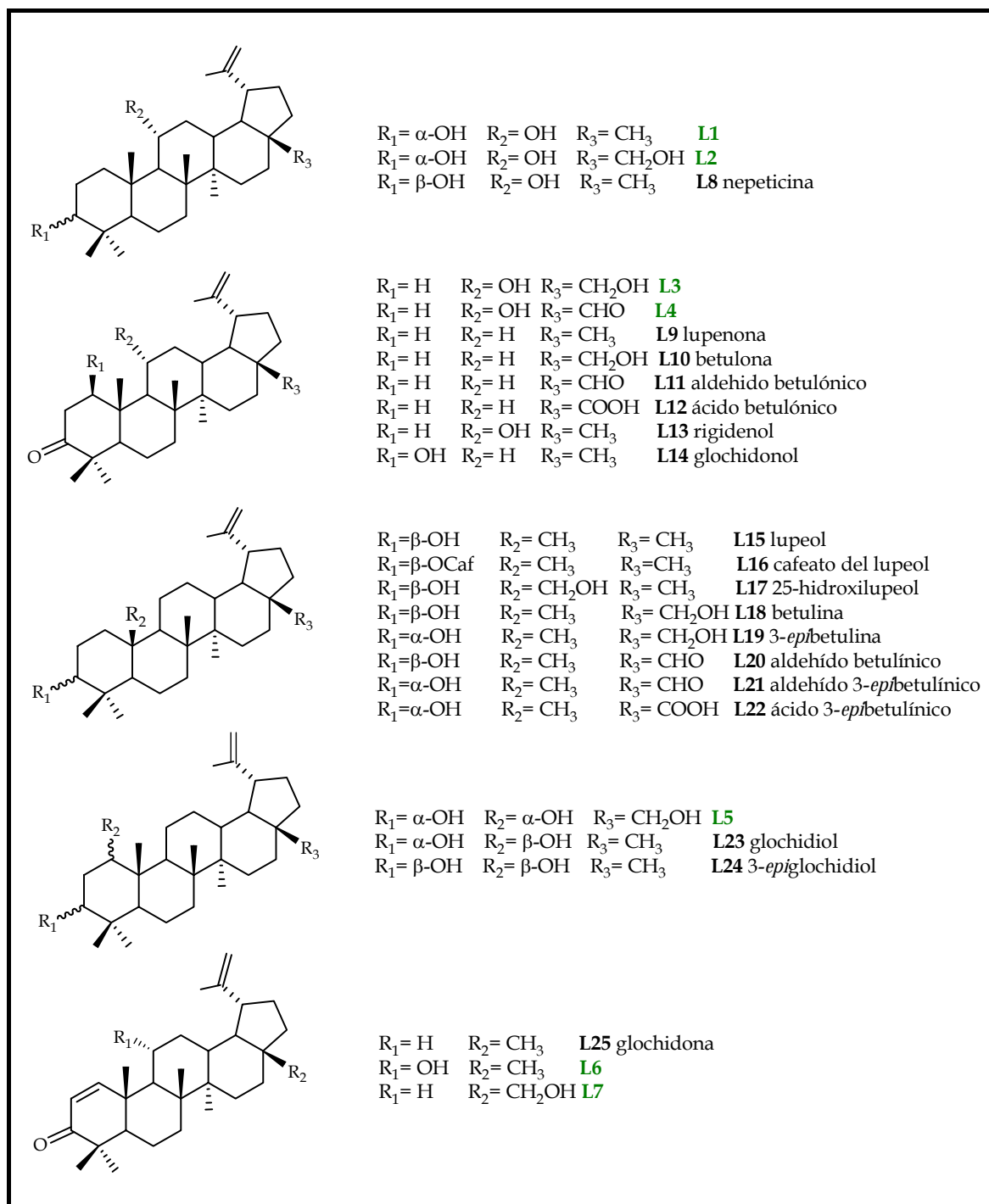


Figura 4.3.31. Triterpenos con esqueleto de lupano aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*. En verde se señalan los que resultaron nuevos en la bibliografía química.

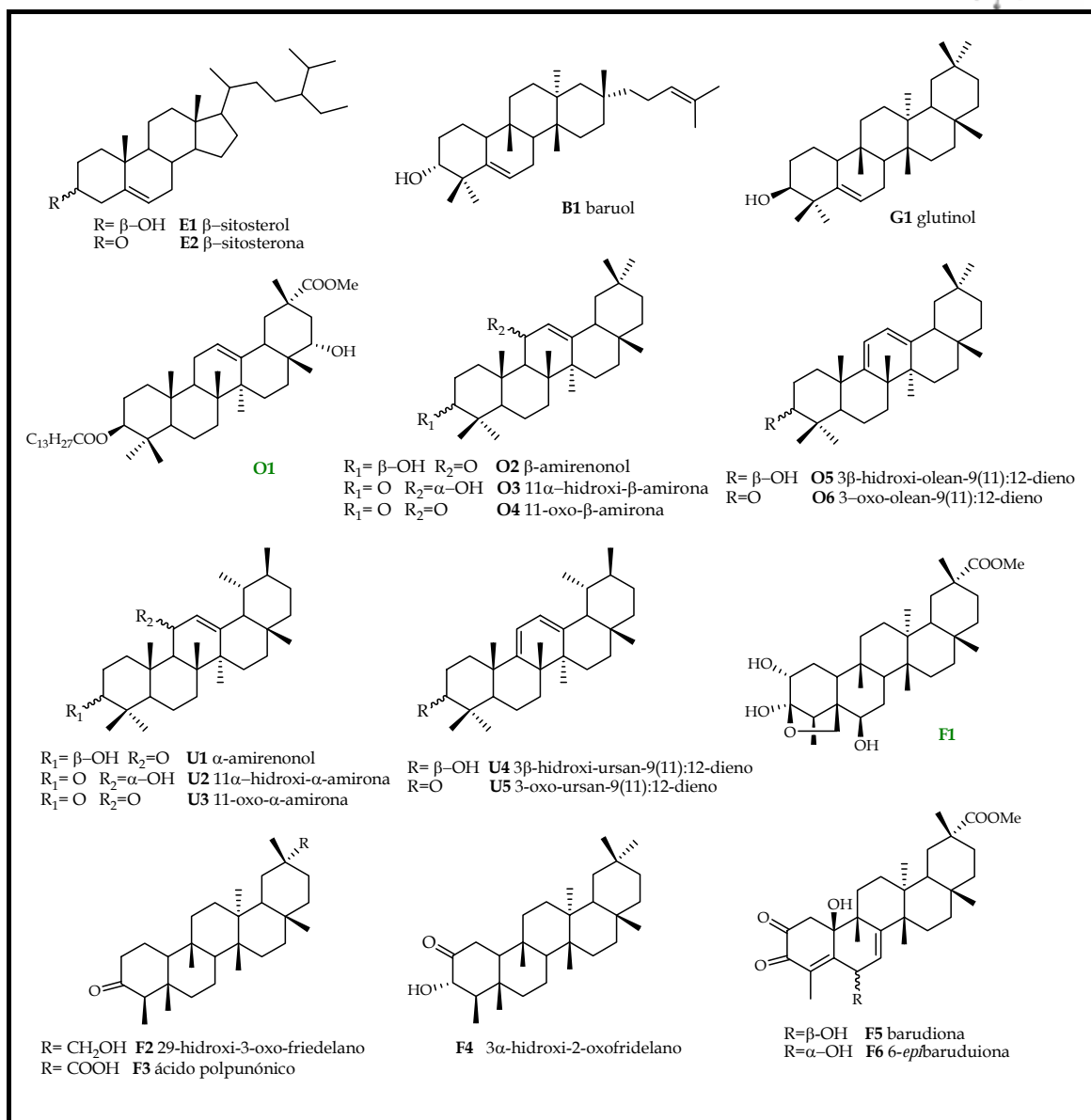
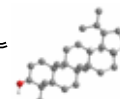
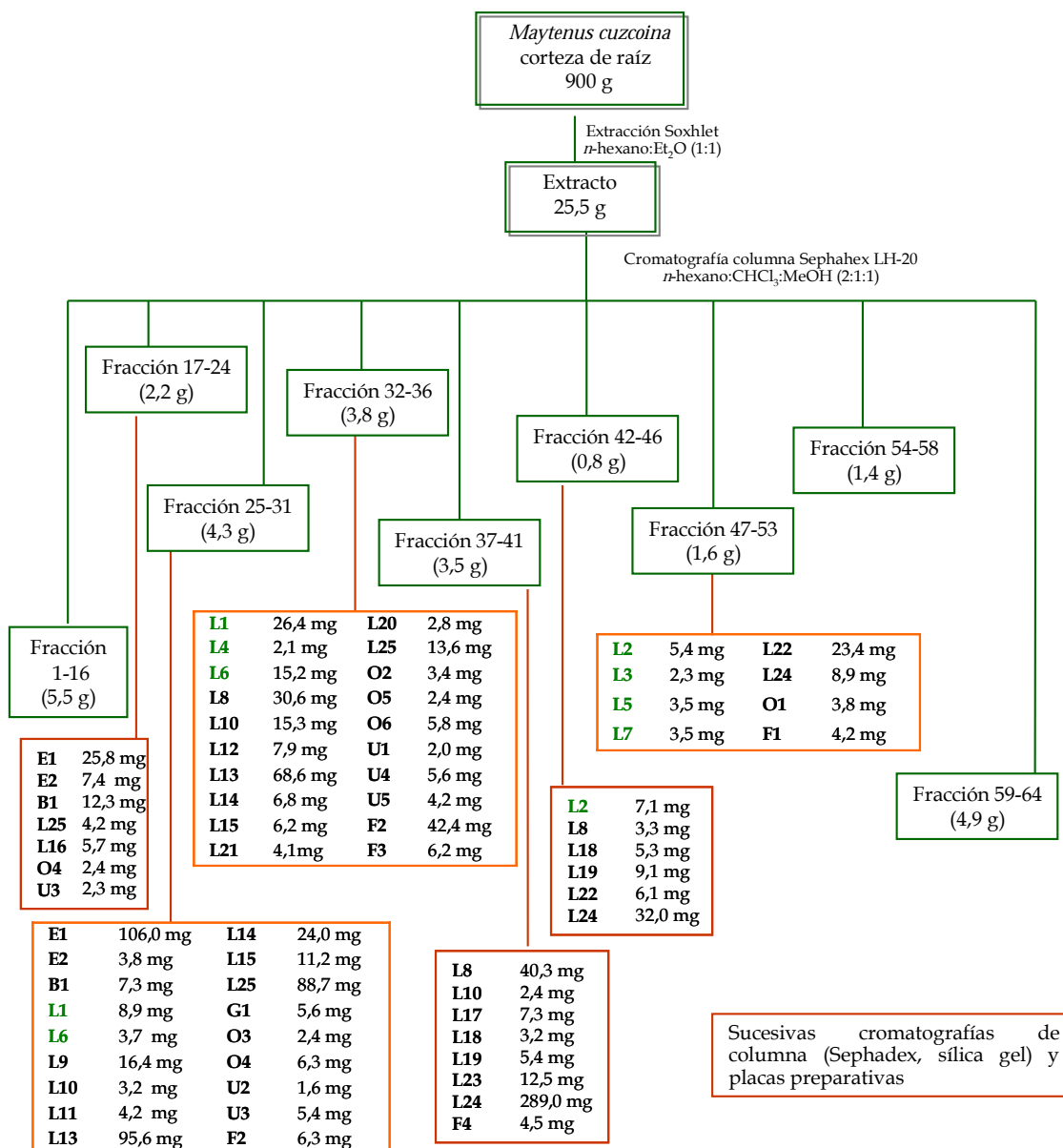
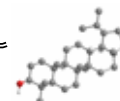


Figura 4.2.32. Triterpenos con esqueleto de oleano, ursano y friedelano aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*. En verde se señalan los que resultaron nuevos en la bibliografía química.

Estos metabolitos se obtuvieron de la cromatografía sobre Sephadex que se realizó al extracto, tras sucesivas cromatografías tanto en columna como en placa de gel de sílice, tal como se detalla en el esquema 4.2.2.



Esquema 4.2.2. Separación cromatográfica de los triterpenos del extracto de *n*-hexano: éter dietílico (1:1) de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*.

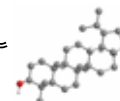


4.2.3.2. Datos físicos y espectroscópicos de los nuevos triterpenos

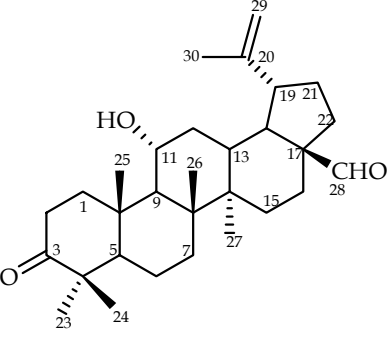
4.2.3.2.1. Triterpenos con esqueleto de lupano

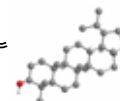
Triterpeno L1	
<p>3-epinepeticina 3α,11α-dihidroxi-lup-20(29)-eno</p> <p>Se obtuvo como sólido amorfo (35,3 mg)</p>	
[α] ²⁰ _D :	+13,6° (c 0,58, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	3413, 2926, 2855, 1731, 1458, 1381, 1070, 990, 883, 757 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0,77 (3H, s, Me28); 0,85 (3H, s, Me24); 0,94 (3H, s, Me23); 0,97 (3H, s, Me27); 1,03 (3H, s, Me26); 1,05 (3H, s, Me25); 1,02, 1,56 (2H, m, H15); 1,18, 1,99 (2H, m, H12); 1,20 (1H, m, H5); 1,25, 1,40 (2H, m, H22); 1,32 (1H, m, H7); 1,34, 1,92 (2H, m, H21); 1,38 (2H, m, H6); 1,42 (1H, m, H18); 1,45, 2,28 (2H, m, H16); 1,47 (1H, m, H9); 1,47, 2,30 (2H, m, H1); 1,48, 1,97 (2H, m, H2); 1,68 (3H, s, Me30); 1,77 (1H, t, J = 10,9 Hz, H13); 2,35 (1H, dt, J = 4,9, 10,8 Hz, H19); 3,36 (1H, s ancho, H3); 3,92 (1H, dt, J = 5,3, 10,7 Hz, H11); 4,58 (1H, s ancho, H29); 4,71 (1H, s ancho, H29)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	14,6 (c, C27); 16,2 (c, C25); 17,2 (c, C26); 18,0 (c, C28); 18,3 (t, C6); 19,3 (c, C30); 22,3 (c, C24); 25,6 (t, C2); 27,3 (t, C15); 28,7 (c, C23); 29,8 (t, C21); 35,1 (t, C7); 35,4 (2 x t, C1, C16); 37,1 (d, C13); 37,6 (t, C12); 37,8 (s, C4); 39,1 (s, C10); 39,8 (t, C22); 42,7 (2 x s, C8, C14); 43,0 (s, C17); 47,7 (2 x d, C18, C19); 48,9 (d, C5); 55,6 (d, C9); 70,6 (d, C11); 75,9 (d, C3); 109,8 (t, C29); 150,2 (s, C20)
EM (IE) m/z (%):	442 (M ⁺ , 1), 424 (18), 406 (100), 391 (64), 255 (38), 216 (17), 201 (38), 189 (26), 175 (19), 159 (21), 121 (35), 95 (43), 81 (34)
EMAR m/z :	Observado 442,3790 (calculado para C ₃₀ H ₅₀ O ₂ [M ⁺]: 442,3811)

Triterpeno L2	
<p>11α-hidroxi-3-<i>epi</i>betulina 3α,11α,28-trihidroxi-lup-20(29)-eno</p> <p>Se obtuvo como sólido amorfo (12,5 mg)</p>	
[α] _D ²⁰ :	+29,0° (c 0,15, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	3404, 2923, 2852, 2852, 1733, 1595, 1459, 1026, 885 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0,85 (3H, s, Me24); 0,94 (3H, s, Me23); 0,99, 1,85 (2H, m, H16); 1,01 (3H, s, Me27); 1,02 (3H, s, Me26); 1,05 (3H, s, Me25); 1,10, 1,62 (2H, m, H15); 1,10, 1,91 (2H, m, H12); 1,24 (1H, m, H5); 1,42 (2H, m, H6); 1,45 (3H, m, H19,H22); 1,47 (2H, m, H7); 1,47 2,28 (2H, m, H1); 1,48, 1,98 (2H, m, H2); 1,59 (1H, m, H18); 1,68 (3H, s, Me30); 1,75 (1H, t, <i>J</i> = 10,9 Hz, H13); 1,95 (2H, m, H21); 2,39 (1H, dt, <i>J</i> = 4,9, 10,8 Hz, H19); 3,33 (1H, d _{AX} , <i>J</i> = 10,8 Hz, H28X); 3,36 (1H, s ancho, H3); 3,74 (1H, d _{AX} , <i>J</i> = 10,8 Hz, H28A); 3,92 (1H, dt, <i>J</i> = 5,3, 10,7 Hz, H11); 4,60 (1H, s ancho, H29); 4,71 (1H, s ancho, H29)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	14,1 (c, C27); 16,3 (c, C25); 17,2(c, C26); 18,0 (t, C6); 19,1 (c, C30); 22,3 (c, C24); 25,6 (t, C2); 27,0 (t, C15); 28,7 (c, C23); 29,1 (t, C21); 29,3 (t, C22); 33,8 (t, C16); 35,1 (t, C7); 35,5 (t, C1); 36,3 (d, C13); 37,6 (t, C12); 37,8 (s, C4); 39,1 (s, C10); 42,6 (s, C8); 42,9 (s, C14); 47,6 (d, C19); 47,8 (s, C17); 48,2 (d, C18); 48,9 (d, C5); 55,6 (d, C9); 60,6 (t, C28); 70,5 (d, C11); 75,9 (d, C3); 110,2 (t, C29); 149,8 (s, C20)
EM (IE) <i>m/z</i> (%):	458 (M ⁺ , 10), 440 (44), 422 (21), 409 (18), 391 (9), 255 (23), 219 (29), 199 (89), 189 (80), 175 (61), 159 (15), 135 (13), 119 (56), 109 (66), 95 (100), 81 (86), 69 (96)
EMAR <i>m/z</i> :	Observado 458,3741 (calculado para C ₃₀ H ₅₀ O ₃ [M ⁺]: 458,3760)

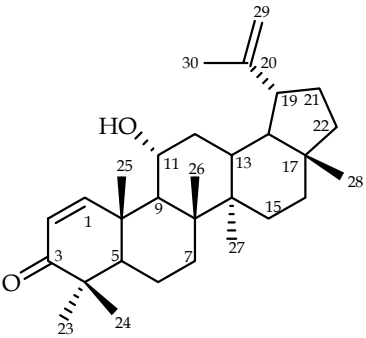


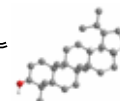
Triterpeno L3	
<p>28-hidroxi-rigidenol 11α,28-dihidroxi-3-oxo-lup-20(29)-eno</p> <p>Se obtuvo como sólido amorfo (2,3 mg)</p>	
[α] _D ²⁰ :	+29,9° (c 0,23, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	3438, 3071, 2928, 2868, 1698, 1643, 1462, 1383, 1071, 1030, 757 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	1,04 (3H, s, Me27); 1,07 (3H, s, Me26); 1,08 (3H, s, Me24); 1,09 (3H, s, Me25); 1,12 (3H, s, Me23); 1,12, 1,92 (2H, m, H12); 1,17, 1,62 (2H, m, H15); 1,48 (4H, m, H5, H7, H9); 1,61, 2,68 (2H, m, H1); 1,70 (1H, m, H18); 1,83 (1H, m, H13); 1,86 (2H, m, H22); 1,72 (3H, s, Me30); 1,98 (2H, m, H16); 1,99 (2H, m, H21); 2,42 (1H, m, H19); 2,46 (2H, m, H2); 3,37 (1H, d _{AX} , J = 10,8 Hz, H28X); 3,78 (1H, d _{AX} , J = 10,8 Hz, H28A); 3,91 (1H, dt, J = 5,3, 10,7 Hz, H11); 4,64 (1H, s ancho, H29); 4,74 (1H, s ancho, H29)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	14,4 (c, Me27); 16,5 (c, Me25); 16,6 (c, Me26); 18,9 (c, Me30); 19,4 (t, C6); 20,5 (c, Me24); 26,8 (t, C15); 27,2 (c, Me23); 28,8 (t, C22); 29,4 (t, C21); 33,6 (t, C16); 33,9 (t, C7); 34,0 (t, C2); 36,1 (d, C13); 37,2 (t, C12); 38,0 (s, C10); 41,8 (t, C1); 42,2 (2 x s, C8, C14); 47,3 (s, C17); 47,4 (d, C19); 47,5 (s, C4); 47,8 (d, C18); 54,5 (d, C9); 54,6 (d, C5); 60,3 (t, C28); 70,1 (d, C11); 110,1 (t, C29); 149,5 (s, C20); 218,3 (s, C3)
EM (IE) <i>m/z</i> (%):	456 (M ⁺ , 32); 438 (71); 425 (50); 407 (61); 233 (26); 219 (37), 201 (89); 189 (91); 175 (77); 161 (41); 121 (82); 107 (91); 95 (100)
EMAR <i>m/z</i> :	Observado 456,3604 (calculado para C ₃₀ H ₄₈ O ₃ [M ⁺]: 456,3603)

Triterpeno L4	
<p>28-aldehído del rigidenol 11α-hidroxi-3-oxo-lup-20(29)-en-28-al</p> <p>Se obtuvo como sólido amorfo (2,1 mg)</p>	
[α] _D ²⁰ :	+34,3° (c 0,21, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	3426, 2925, 2854, 1702, 1640, 1459, 1382, 1074, 755 cm ⁻¹
<p>RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:</p>	<p>0,75, 1,63 (2H, m, H15); 0,95 (3H, s, Me27); 0,95 (3H, s, Me26); 1,04 (3H, s, Me24); 1,06 (3H, s, Me25); 1,08 (3H, s, Me23); 1,12, 2,10 (2H, m, H12); 1,48 (2H, m, H5, H9); 1,52 (2H, m, H6); 1,55 (2H, m, H7); 1,60, 2,66 (2H, m, H1); 1,73 (3H, s, Me30); 1,75 (1H, m, H18); 1,80 (2H, m, H22); 2,01 (2H, m, H21); 2,08 (2H, m, H16); 2,25 (1H, m, H13); 2,42 (2H, m, H2); 2,89 (1H, dt, <i>J</i>= 5,9, 10,8 Hz, H19); 3,90 (1H, dt, <i>J</i>= 4,8, 10,7 Hz, H11); 4,65 (1H, s ancho, H29); 4,78 (1H, s ancho, H29); 9,61 (1H, s, H28)</p>
<p>RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ:</p>	<p>14,1 (c, C27); 16,7 (c, C26); 16,8 (c, C25); 19,0 (c, C30); 19,5 (t, C6); 20,7 (c, C24); 27,4 (c, C23); 28,8 (t, C15); 28,9 (t, C16); 29,8 (t, C21); 32,9 (t, C22); 34,2 (t, C7); 34,3 (t, C2); 37,6 (t x d, C12, C13); 38,2 (s, C10); 42,1 (s, C8); 42,3 (s, C14); 42,4 (t, C1); 47,2 (d, C19); 47,2 (d, C18); 47,6 (s, C4); 54,7 (d, C9); 54,9 (d, C5); 59,3 (s, C17); 70,1 (d, C11); 110,7 (t, C29); 149,1 (s, C20); 206,0 (d, C28); 218,6 (s, C3)</p>
EM (IE) <i>m/z</i> (%):	454 (M ⁺ , 1), 436 (14), 420 (1), 407 (8), 269 (1), 217 (6), 203 (100), 189 (10), 149 (5), 121 (13), 105 (16), 93 (14), 81 (22)
EMAR <i>m/z</i> :	Observado 454,3432 (calculado para C ₃₀ H ₄₆ O ₃ [M ⁺]: 454,3447)



Triterpeno L5	
<p>28-hidroxi-1-epiglochidiol 1α,3α,28-trihidroxi-lup-20(29)-eno</p> <p>Se obtuvo como sólido amorfo (3,5 mg)</p>	
$[\alpha]_D^{20}$:	+4,0 (0,31, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	3305, 2920, 2858, 1450, 1374, 1248, 1040, 1008, 983, 880, 756 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0,83 (3H, s, Me24); ,091 (6H, s, Me23, Me25); 1,01 (3H, s, Me27); 1,03, 1,85 (2H, m, H22); 1,05 (3H, s, Me26); 1,12, 1,65 (2H, m, H12); 1,15, 1,75 (2H, m, H15); 1,22, 1,43 (2H, m, H16); 1,28 (1H, m, H5); 1,35, 2,15 (2H, m, H11); 1,42 (2H, m, H7); 1,44 (2H, m, H6); 1,58 (1H, m, H18); 1,62 (1H, m, H9); 1,65 (1H, m, H13); 1,68 (3H, s, Me30); 1,75, 1,85 (2H, m, H2); 1,95 (2H, m, H21); 2,37 (1H, dt, $J = 4,9, 10,8$ Hz, H19); 3,34 (1H, d _{AX} , $J = 10,6$ Hz, H28X); 3,50 (1H, t, $J = 3,1$ Hz, H3); 3,79 (1H, d _{AX} , $J = 10,6$ Hz, H28A); 3,80 (1H, m, H1); 4,57 (1H, s ancho, H29); 4,67 (1H, s ancho, H29)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	11,7 (c, C25); 14,8 (c, C27); 16,2 (c, C26); 18,4 (t, C6); 19,0 (c, C30); 21,9 (c, C24); 23,7 (t, C11); 25,2 (t, C12); 27,1 (t, C15); 27,7 (c, C23); 29,2 (t, C16); 29,7 (t, C21); 34,0 (2 x t, C7, C22); 36,4 (t, C2); 36,9 (d, C13); 37,4 (2 x s, C4, C10); 41,7 (s, C14); 42,9 (s, C8); 43,6 (s, C17); 47,8 (2 x d, C5, C19); 48,8 (d, C18); 51,2 (d, C9); 60,6 (t, C28); 75,9 (d, C1); 76,6 (d, C3); 109,8 (t, C29); 150,3 (s, C20)
EM (IE) m/z (%):	458 (M ⁺ , 14), 440 (100), 427 (39), 422 (32), 409 (26), 391 (16), 273 (12), 245 (28), 219 (31), 201 (48), 189 (79), 175 (89), 159 (30), 135 (47), 119 (53), 95 (62)
EMAR m/z :	Observado 458,3748 (calculado para C ₃₀ H ₅₀ O ₃ [M ⁺]: 458,3760)

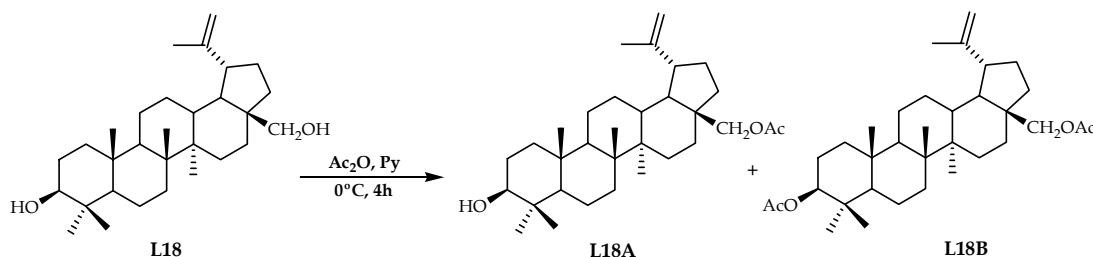
Triterpeno L6	
<p>11α-hidroxi-glochidona 11α-hidroxi-3-oxo-lup-1:20(29)-dieno</p> <p>Se obtuvo como sólido amorfo (18,9 mg)</p>	
	
$[\alpha]_D^{20}$:	+23,8° (c 0,66, CHCl ₃)
UV (EtOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$:	227 (4,82)
IR γ_{\max} (película):	3447, 2925, 2854, 1732, 1659, 1459, 1382, 1261, 1075, 937, 883, 803, 697cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0,80 (3H, s, Me28); 0,98 (3H, s, Me27); 1,11 (3H, s, Me26); 1,12 (6H, s, Me23, Me24); 1,24, 1,40 (2H, m, H15); 1,26 (3H, s, Me25); 1,31, 1,42, (2H, m, H22); 1,35, 1,90 (2H, m, H6); 1,40, 2,01 (2H, m, H21); 1,44 (2H, m, H7); 1,45 (2H, m, H16, H18); 1,55 (1H, m, H5); 1,56 (1H, m, H16); 1,70 (3H, s, Me30); 1,75 (1H, m, H9); 1,90 (1H, t, $J=10,9$ Hz, H13); 1,98 (2H, m, H12); 2,40 (1H, dt, $J=4,9, 10,8$ Hz, H19); 4,15 (1H, dt, $J=4,8, 10,7$ Hz, H11); 4,61 (1H, s ancho, H29); 4,73 (1H, s ancho, Hz, H29); 5,71 (1H, d, $J=10,4$ Hz, H2); 8,30 (1H, s ancho, H1)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	14,4 (c, C27); 17,4 (c, C26); 18,0 (c, C28); 18,9 (t, C6); 19,3 (c, C30); 19,9 (c, C25); 21,4 (c, C24); 27,3 (t, C15); 28,2 (c, C23); 29,7 (t, C21); 34,5 (t, C7); 35,3 (t, C16); 37,1 (d, C13); 37,3 (t, C12); 39,8 (t, C22); 40,6 (s, C10); 42,8 (s, C14); 42,9 (s, C8); 43,0 (s, C17); 45,0 (s, C4); 47,5 (d, C18); 47,7 (d, C19); 48,9 (d, C9); 52,9 (d, C5); 70,6 (d, C11); 113,5 (t, C29); 123,6 (d, C2); 150,0 (s, C20); 165,1 (d, C1); 205,3 (C3)
EM (IE) m/z (%):	438 (M ⁺ , 16), 420 (100), 405 (21), 339 (7), 329 (38), 283 (13), 255 (9), 229 (15), 216 (11), 201 (15), 189 (25), 175 (20), 150 (31), 121 (41), 95 (47)
EMAR m/z :	Observado 438,3494 (calculado para C ₃₀ H ₄₆ O ₂ [M ⁺]: 438,3498)



Triterpeno L7	
<p>28-hidroxi-glohidona 28-hidroxi-3-oxo-lup-1:20(29)-dieno</p> <p>Se obtuvo como sólido amorfo (3,5 mg)</p>	
$[\alpha]_D^{20}$:	+33,0° (c 0,19, CHCl ₃)
UV (EtOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$:	229 (4,39)
IR γ_{\max} (película):	3428, 2924, 2853, 1728, 1667, 1459, 1377, 1283, 1261, 1035, 882, 822, 715cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0,99 (3H, s, Me27); 1,04 (3H, s, Me26); 1,06 (3H, s, Me25); 1,08 (3H, s, Me24); 1,13 (3H, s, Me23); 1,39 (2H, m, H6); 1,48 (2H, m, H11); 1,52 (2H, m, H16); 1,55 (1H, m, H5); 1,56 (2H, m, H7); 1,65 (3H, m, H9, H12); 1,68 (1H, m, H18); 1,69 (3H, s, Me30); 1,72 (1H, m, H13); 1,80 (2H, m, H15); 1,91 (2H, m, H22); 1,98 (2H, m, H21); 2,40 (1H, dt, $J=5,7, 10,7$ Hz, H19); 3,35 (1H, d _{AB} , $J=10,6$ Hz, H28); 3,80 (1H, d _{AB} , $J=10,6$ Hz, H28); 4,60 (1H, s ancho, H29); 4,69 (1H, s ancho, H29); 5,79 (1H, d, $J=10,1$ Hz, H2); 7,09 (1H, d, $J=10,1$ Hz, H1)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	14,6 (c, C27); 16,5 (c, C26); 19,0 (t x c, C6, C30); 19,2 (c, C25); 21,2 (t, C11); 21,4 (c, C24); 25,2 (t, C12); 27,0 (t, C15); 27,8 (c, C23); 29,1 (t, C16); 29,7 (t, C21); 33,7 (t, C7); 33,9 (t, C22); 37,5 (d, C13); 39,5 (s, C10); 41,8 (s, C8); 43,0 (s, C14); 44,5 (d, C9); 44,6 (s, C4); 47,7 (s, C17); 47,8 (d, C19); 48,6 (d, C18); 53,5 (d, C5); 60,6 (t, C28); 109,9 (t, C29); 125,2 (d, C2); 150,3 (s, C20); 159,6 (d, C1); 205,0 (s, C3)
EM (IE) m/z (%):	438 (M ⁺ , 27), 420 (41), 408 (13), 322 (12), 279 (7), 255 (5), 243 (15), 227 (23), 215 (28), 205 (54), 187 (37), 175 (44), 150 (67), 137 (94), 121 (45), 91 (69), 69 (91), 57 (100)
EMAR m/z :	Observado 438,3500 (calculado para C ₃₀ H ₄₆ O ₂ [M ⁺]: 438,3498)

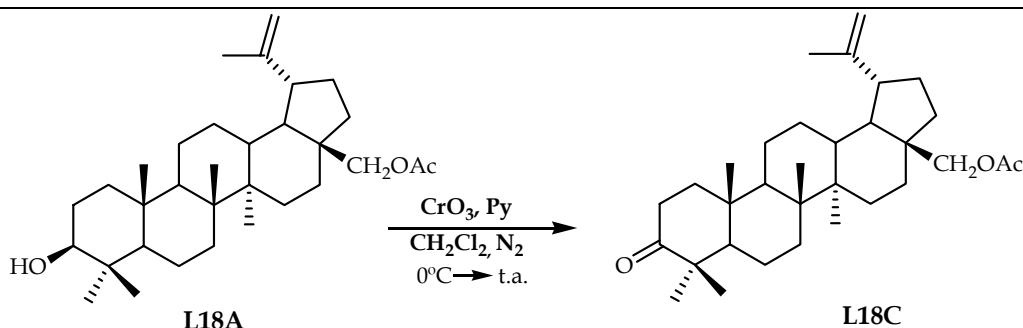
4.2.3.2.2. Derivados de los triterpenos con esqueleto de lupano

- Acetilación de betulina (L18)

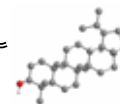


A una solución de 442,0 mg de **L18**, betulina (0,10 mmoles) en 0,4 ml de piridina a 0°C, se le añadió 0,1 ml de anhídrido acético (0,1 mmoles, 1 eq). La reacción se agitó durante 4 horas a 0°C. Transcurrido este tiempo, se concentró a vacío y el residuo fue purificado por cromatografía en columna de gel de sílice, usando como eluyente *n*-hexano y acetato de etilo en un gradiente de polaridad (del 5 al 50%), obteniéndose 375,2 mg del derivado monoacetilado, **L18A** (28-acetoxi-betulina, R= 77,5%) y 40,3 mg del diacetilado, **L18B** (3,28-acetoxibetulina, R= 7,6%), que fueron identificados al comparar sus datos físicos y espectroscópicos con los existentes en la bibliografía.

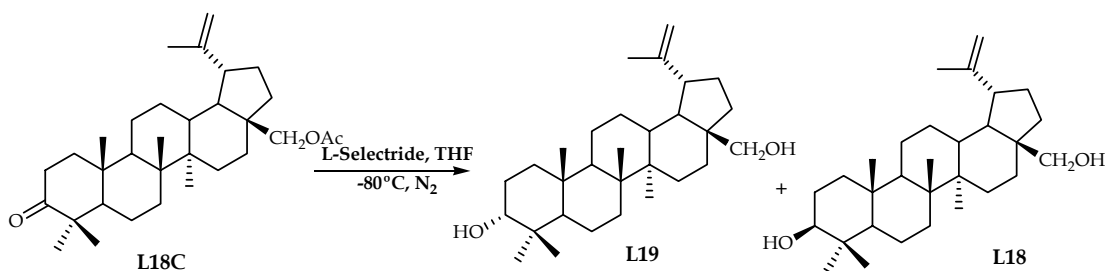
- Oxidación del monoacetato de betulina (L18A)



A una disolución de 368,0 mg de óxido crómico, CrO₃ (3,68 mmoles, 6 eq), en 2,0 ml de piridina y 10 ml de diclorometano a 0°C en atmósfera de nitrógeno, se le añadió 300,0 mg (0,62 mmoles) de **L18A** disuelto en 3,0 ml de diclorometano. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h, hasta que se observó por cromatografía de capa fina la desaparición del producto de partida. La mezcla de reacción se filtró en una columna cromatográfica de gel de sílice, usando como eluyente diclorometano, eliminando posteriormente el disolvente a vacío. Se obtuvieron así 256,6 mg del acetato de betulona, **L18C** (R= 82,5 %), que fue identificado al comparar sus datos físicos y espectroscópicos con los existentes en la bibliografía.

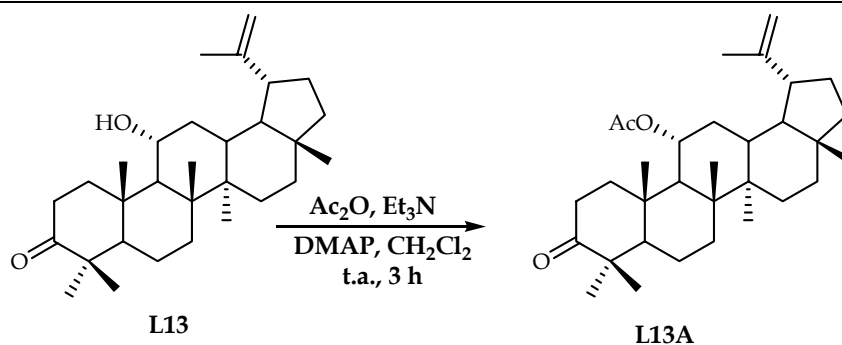


- Reducción del acetato de betulona (L18C)



A 203,0 mg de **L18C** (0,42 mmoles) disueltos en 9,0 ml de THF seco en atmósfera de nitrógeno y a -80°C, se le añadieron 3,36 ml de L-Selectride 1M (3,36 mmoles, 8,0 eq) y se agitó la mezcla durante 5 horas a -80° C. Se evaporó el THF y se añadieron al crudo de reacción 5,0 ml de glicerina y 5,0 ml de solución tampón con un pH de 7,0. Posteriormente, la mezcla se lavó 3 veces con éter dietílico, se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice, usando como eluyente *n*-hexano y acetato de etilo en un gradiente de polaridad (del 10 al 70%). Se obtuvieron así 165,1 mg de **L19**, 3-*epi*betulina (R= 60%) y 27,5 mg de **L18**, betulina (R= 10%).

• **Acetilación del rigidinol (L13)**



A una solución de 160,3 mg de **L13** (0,4 mmoles) en 8,0 ml de diclorometano, se le adicionó 0,2 ml de trietilamina (1,4 mmoles, 3,5 eq), 0,1 ml de anhídrido acético (1,0 mmoles, 2,5 eq) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina. La reacción se agitó durante 3 h a temperatura ambiente, hasta que se observó por cromatografía en capa fina que no quedaba producto de partida. Posteriormente, se adicionó 3,0 ml de etanol y dejó la mezcla agitando durante 30 minutos. Se eliminó el disolvente a vacío y purificó la mezcla mediante cromatografía en columna, utilizando como eluyente *n*-hexano acetato de etilo en un gradiente de polaridad (20 al 40 %), obteniéndose 169,4 mg de **L13A** (R= 87,9%) como un sólido amorfo.

L13A, acetato de rigidinol, 11 α -acetoxi-3-oxo- lup-20(29)-eno

$[\alpha]_D^{20}$: +31,2° (c 0,25, CHCl₃)

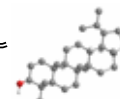
IR γ_{\max} (película): 2959, 2926, 2854, 1728, 1712, 1643, 1456, 1379, 1243, 1018, 801 cm⁻¹

RMN ¹H
(CDCl₃, 500 MHz) δ : 0,74 (3H, s); 0,85 (3H, s); 0,99 (3H, s); 1,00 (3H, s); 1,04 (3H, s); 1,06 (3H, s); 1,68 (3H, s); 1,91 (3H, s); 2,25 (1H, m); 2,34 (1H, m); 2,48 (1H, m); 4,56 (1H, s ancho); 4,70 (1H, s ancho); 5,08 (1H, dt, *J* = 5,2, 11,1 Hz)

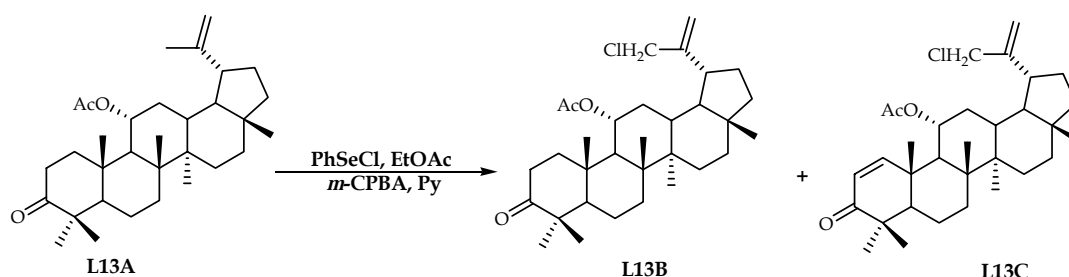
RMN ¹³C
(CDCl₃, 75 MHz) δ : 14,2 (c); 16,6 (c); 17,5 (c); 18,0 (c); 19,4 (c); 19,5 (t); 20,3 (c); 21,9 (c); 27,3 (t); 27,7 (c); 29,7 (t); 32,3 (t); 33,8 (t); 34,1 (t); 35,3 (t); 36,7 (d); 37,7 (s); 39,8 (t); 42,1 (t); 42,5 (s); 42,6 (s); 43,0 (s); 47,3 (d); 47,4 (s); 47,7 (d); 52,2 (d); 54,0 (d); 72,7 (d); 109,9 (t); 149,8 (s); 169,8 (s); 218,2 (s)

EM (IE) *m/z* (%): 482 (M⁺, 1), 440 (1), 422 (100), 407 (30), 379 (6), 339 (7), 311 (11), 216 (17), 203 (22), 147 (9), 121 (8), 81 (5)

EMAR *m/z*: Observado 482,3762 (calculado para C₃₂H₅₀O₃ [M⁺]: 482,3760)



• Cloración del acetato del rigidolol (L13A)



Una solución de 150,0 mg de **L13A** (0,3 mmoles) y 76,0 mg de cloruro de fenilselenio al 98% (0,4 mmoles, 1,3 eq) en 65,0 ml de acetato de etilo se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas, añadiéndole posteriormente 20,0 ml de una solución acuosa saturada de NaHCO₃. Después de que la fase acuosa se retirara, se le adicionó a la fase orgánica 0,3 ml de piridina (0,8 mmoles, 2,7 eq) y 284,0 mg de ácido *m*-cloroperbenzoico al 50-60% (0,8 mmoles, 2,7 eq), dejando la mezcla de reacción durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó tres veces con una solución acuosa de NaOH al 5%, con una solución de NH₄Cl otras tres veces y por último con una solución saturada de NaCl, secando la mezcla de reacción con sulfato magnésico anhidro. Se llevó a sequedad y purificó mediante una columna flash de gel de sílice usando como disolvente una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo con un gradiente de polaridad (del 40% al 70%), obteniéndose 55,3 mg de **L13B** (R= 32%) y 7,1 mg de **L13C**, (R= 5%) ambos como sólidos amorfos.

L13B, 11 α -acetoxi-30-cloro-3-oxo-lup-20(29)-eno

[α]_D²⁰: + 5,5° (c 0,12, CHCl₃)

IR γ_{\max} (película): 2957, 2870, 1728, 1712, 1643, 1456, 1381, 1246, 1019, 971, 910, 756, 580 cm⁻¹

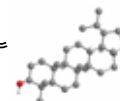
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 0,80 (3H, s); 0,90 (3H, s); 1,01 (3H, s); 1,04 (3H, s); 1,09 (6H, s); 1,11 (3H, s); 1,85 (1H, m); 1,78 (1H, m); 1,96 (3H, s); 2,38 (1H, m); 4,05 (2H, s); 5,02 (1H, s); 5,08 (1H, s); 5,09 (1H, m)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ : 14,3 (c); 16,7 (c); 17,5 (c); 17,9 (c); 19,5 (t); 20,3 (c); 21,9 (c); 27,3 (t); 27,7 (c); 32,2 (t); 33,7 (t); 34,0 (t); 34,1 (t); 35,2 (t); 36,6 (d); 37,8 (s); 39,6 (t); 42,1 (t); 42,5 (s); 42,7 (s); 43,1 (s); 43,3 (d); 47,5 (s); 48,1 (t); 49,3 (d); 52,3 (d); 54,1 (d); 72,8 (d); 112,7 (t); 150,5 (s); 169,9 (s); 218,3 (s)

EM (IE) *m/z* (%): 456 (M⁺-60, 100), 441 (24), 422 (12), 407 (3), 311 (17), 250 (14), 237 (17), 107 (12), 81,1 (8)

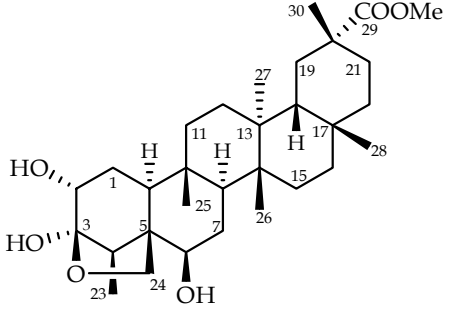
EMAR (FAB) *m/z*: Observado 517,3464 (calculado para C₃₂H₅₀ClO₃ [M⁺+1]: 517,3448)

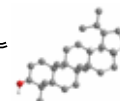
L13C , 11 α -acetoxi-30-cloro-3-oxo-lup-1:20(29)-dieno	
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$:	+44,7° (c 0,4, CHCl ₃)
IR ν_{max} (película):	2927, 2856, 1735, 1673, 1459, 1380, 1242, 1021, 903, 751 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) δ :	0,80 (3H, s); 1,01 (3H, s); 1,08 (3H, s); 1,11 (3H, s); 1,13 (3H, s); 1,17 (3H, s); 2,02 (3H, s); 4,03 (2H, s); 5,03 (1H, s ancho); 5,09 (1H, s ancho); 5,17 (1H, dt, $J = 4,8, 11,2$ Hz); 5,74 (1H, d, $J = 10,4$ Hz); 7,80 (1H, d, $J = 10,4$ Hz)
EM (IE) m/z (%):	514 (M ⁺ , 1), 472 (3), 454 (48), 420 (16), 318 (14), 218 (19), 203 (28), 137 (100), 95 (64)
EMAR (FAB) m/z :	Observado 514,3206 (calculado para C ₃₂ H ₄₇ ClO ₃ [M ⁺]: 514,3214)

4.2.3.2.3. Triterpenos con esqueleto de oleano

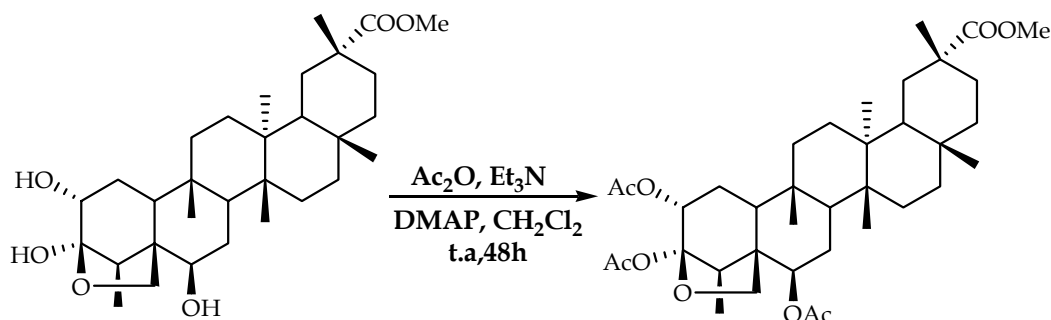
Triterpeno O1	
11 α -hidroxi-29-metoxi-3 β -miristato-olean-12-eno	
Se obtuvo como sólido amorfo (3,8 mg)	
[α] _D ²⁰ :	+17,2° (c 0,3, CHCl ₃)
IR γ_{\max} (película):	3571, 2925, 2854, 1731, 1463, 1379, 1263, 1231, 1179, 1116, 1035, 989, 808, 732 cm ⁻²
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0,91 (6H, s, Me23, Me24); 0,93 (3H, m, Me14'); 0,94 (1H, m, H5); 0,96 (3H, s, Me25); 0,97 (3H, s, Me26); 1,00 (3H, s, Me28); 1,12 (1H, m, H1); 1,16 (3H, s, Me27); 1,25 (3H, m, Me30); 1,25 (20H, m, H3'-H13'); 1,35-1,39 (3H, m, H6, H7, H19); 1,54-1,63 (8H, m, H1, H2, H7, H9, H11, H16); 1,67 (1H, m, H21 β); 1,69, 1,70 (4H, m, H6, H15, H21); 1,86 (1H, d, J = 11,9 Hz, H21 α); 2,04 (1H, d, J = 12,7 Hz, H18); 2,17 (1H, d, J = 12,7 Hz, H19 α); 2,29 (2H, t, J = 7,4 Hz, H2'); 3,57 (1H, dd, J = 3,9, 11,9 Hz, H22); 3,68 (3H, s, OMe); 4,52 (1H, t, J = 8,6 Hz, H3); 5,25 (1H, t, J = 3,4 Hz, H12)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	13,9 (c, Me14'); 15,3 (c, Me25); 16,5 (c, Me26); 16,5 (c, Me24); 18,0 (t, C16); 18,8 (t, C6); 20,3 (c, Me30); 22,4 (t, C13'); 23,3 (t, C3'); 23,3 (t, C11); 24,0 (t, C2); 24,9 (c, Me28); 25,2 (t, C15); 25,9 (c, Me27); 27,8 (c, Me23); 28,9-29,4 (8 x t, C4'-C11'); 31,7 (t, C12'); 32,2 (t, C7); 34,6 (t, C2'); 36,6 (t, C21); 37,5 (s, C4); 38,0 (s, C10); 38,1 (t, C1); 39,6 (s, C8); 40,0 (t, C19); 41,8 (s, C14); 42,6 (s, C20); 46,1 (d, C18); 47,2 (d, C9); 51,7 (c, OMe); 55,0 (d, C5); 75,2 (d, C22); 80,3 (d, C3); 123,1 (d, C12); 142,6 (s, C13); 173,5 (s, C1'); 177,9 (s, C29)
EM (ESI) m/z (%):	719 (M ⁺ +23, 100)
EM (ESI+K ⁺) m/z (%):	735 (M ⁺ +39, 75), 719 (M ⁺ +23, 100)
EM (ESI) m/z (%):	719 (M ⁺ +23, 25), 696 (M ⁺ , 3), 491 ([M ⁺ +23-228, 100)

4.2.3.2.4. Triterpenos con esqueleto de friedelano

<p>Triterpeno F1</p> <p>metil éster del ácido 6β-hidroxi-orthosphenico</p> <p>3β,24-epoxi-2α,3α,6β-trihidroxi-29-metoxi-<i>D:A</i>-friedoleano</p> <p>Se obtuvo como sólido amorfo (4,2 mg)</p>	
<p>[α]²⁰_D: +13,3° (c 0,3, CHCl₃)</p>	
<p>IR γ_{\max} (película): 3508, 2925, 2855, 1731, 1698, 1456, 1384, 1212, 1142, 1063, 980, 757 cm⁻¹</p>	
<p>RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:</p>	<p>0,79 (3H, s, Me27); 0,83 (3H, s, Me26); 0,93 (3H, s, Me25); 0,98 (1H, m, H22β); 1,06 (3H, s, Me28); 1,12 (3H, d, $J = 7,2$ Hz, Me23); 1,16 (3H, s, Me30); 1,20, 1,33 (2H, m, H11); 1,23 (2H, m, H15); 1,24, 1,78 (2H, m, H7); 1,39, 1,74 (2H, m, H16); 1,40 (1H, m, H8); 1,46 (2H, m, H12); 1,50 (1H, m, H18); 1,51 (1H, m, H10); 1,55 (1H, m, H19β); 1,73 (1H, t, $J = 4,0$ Hz, H1); 1,91 (1H, dt, $J = 4,8, 13,6$ Hz, H1); 2,00 (1H, dt, $J = 4,0, 13,9$ Hz, H22α); 2,16 (2H, m, H21); 2,17 (1H, m, H4); 2,32 (1H, d, $J = 14,9$ Hz, H19α); 3,63 (3H, s, OMe29); 3,81 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H24); 3,82 (1H, m, H6); 3,87 (1H, d, $J = 4,4$ Hz, H2); 4,26 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H24)</p>
<p>RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ:</p>	<p>9,9 (c, Me23); 16,1 (c, Me26), 16,5 (c, Me25); 17,4 (c, Me27); 26,7 (t, C1); 29,1 (t, C15); 29,7 (t, C12); 30,0 (t, C21); 30,1 (t, C19); 30,4 (t, C7); 30,5 (s, C17); 31,8 (c, Me28); 32,0 (c, Me30); 34,0 (t, C11); 36,1 (t, C16); 36,5 (t, C22); 37,0 (s, C9); 38,9 (s, C14); 39,2 (s, C13); 40,5 (s, C20); 44,5 (d, C18); 45,6 (d, C4); 46,5 (d, C8); 51,6 (c, OMe); 52,7 (d, C10); 52,8 (s, C5); 64,6 (t, C24); 72,7 (d, C2); 72,8 (d, C6); 106,3 (s, C3); 179,1 (s, C29)</p>
<p>EM (IE) m/z (%):</p>	<p>518 (M⁺, 100), 500 (21), 442 (18), 317 (9), 249 (19), 189 (25), 135 (21), 121 (37), 109 (49), 95 (44)</p>
<p>EMAR m/z:</p>	<p>Observado 518,3643 (calculado para C₃₁H₅₀O₆ [M⁺]: 518,3607)</p>



• Acetilación de F1



A una disolución de 2,8 mg de **F1** (0,01 mmoles), 1,0 ml de trietilamina (1,08 mmoles, 108 eq) y 2,0 ml de CH_2Cl_2 , se le añadió 0,3 ml de anhídrido acético (0,95 mmoles, 95 eq) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina. La mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante 48 horas, hasta comprobar por capa fina que no quedaba producto de partida. Posteriormente, se le añadió 2,0 ml de etanol y se dejó agitando a temperatura ambiente durante 45 minutos, se llevó a sequedad y purificó el crudo de reacción mediante placa preparativa de capa fina de gel de sílice eluida con *n*-hexano- Et_2O (4:1), obteniéndose 1,9 mg (R= 58%) del derivado triacetilado, como un sólido amorfo.

F1A, 2 α ,3 α ,6 β -triacetoxi-3 β ,24-epoxi-29-metoxi-*D:A*-friedoleano

$[\alpha]_D^{20}$: +53,5° (*c* 0,2, CHCl_3)

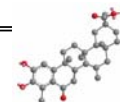
IR ν_{max} (película): 2960, 2925, 2855, 1734, 1460, 1371, 1260, 1140, 1093, 1029, 801 cm^{-1}

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 0,81 (3H, s); 0,84 (3H, s); 0,91 (3H, d, $J = 7,1$ Hz); 0,99 (3H, s); 1,06 (3H, s); 1,21 (3H, s); 1,99 (3H, s, OAc); 2,02 (3H, s, OAc); 2,08 (3H, s, OAc); 3,65 (3H, s, OMe₂₉); 4,13, 4,39 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H₂₄); 4,95 (1H, dd, $J = 5,4, 11,5$ Hz, H₆); 5,84 (1H, d, $J = 3,7$ Hz, H₂)

EM (IE) m/z (%): 602 ($\text{M}^+ - 42$, 13), 503 (28), 429 (55), 369 (35), 356 (27), 295 (47), 281 (61), 221 (100), 207 (41), 147 (31), 95 (16)

EMAR m/z : Observado 602,3806 (calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{O}_8$ [$\text{M}^+ - 42$]: 602,3819)

4.3. *Celastroloides*



4.3. Celastrolóides.

4.3.1. Introducción.

El término **celastrolóides** hace referencia a las nor-triterpenometilenquinonas, pigmentos que están restringidos a las raíces de las especies de *Celastraceae* (incluyendo *Hippocrataceae*), que fue acuñado por el grupo de Brüning y Wagner¹, siendo utilizado, posteriormente² para nombrar también a los derivados fenólicos, los dímeros y trímeros de estos metabolitos. Aunque pequeño en cantidad, este grupo de triterpenos se caracteriza por poseer unas estructuras complejas e interesantes actividades biológicas.

El primer trabajo científico sobre celastrolóides lo publicó Gisvold³ en 1939, que estudió el pigmento rojo extraído de la corteza de la raíz de *Celastrus scandens*. Su intención era obtener una fuente natural para aislar con facilidad β -caroteno, pigmento de gran importancia como precursor de la vitamina A, que él suponía componente mayoritario del extracto. Para su desagrado no aisló el carotenoide, sino un pigmento rojo al que denominó celastrol (figura 4.3.1).

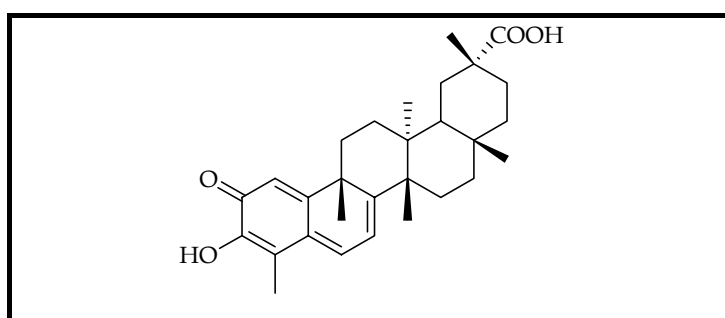


Figura 4.3.1. Estructura del celastrol.

El esqueleto básico de las **nor-triterpenometilénquinonas** es el núcleo 24-nor-D:A-friedoleano con sistema metilenquinónico en el anillo A y con funciones oxigenadas en los carbonos C2 y C3. Oxidaciones adicionales en los carbonos C4, C7,

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

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

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

C15, C20, C21, C22, C28, C29 y C30 e insaturaciones en C5-C6, C7-C8, C9-C11, C14-C15, C20-C21 y C20-C30, dan lugar a los diferentes compuestos aislados presentes en la bibliografía. La clasificación más generalizada se basa en la conjugación del cromóforo principal de la molécula, una metilénquinona.

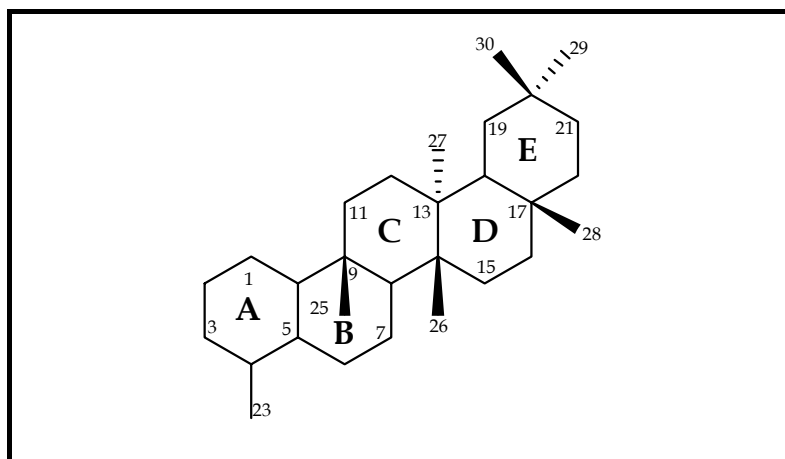


Figura 4.3.2. Estructura del núcleo 24-nor-D:A-friedoleano.

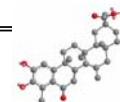
Los **nor-triterpenofenoles** se diferencian estructuralmente de las metilénquinonas por tener aromatizado el anillo A, por lo cual son ligeramente amarillos. El esqueleto básico de los nor-triterpenometilénfenoles es el núcleo 24-nor-D:A-friedoleano aromatizado en el anillo A y con funciones oxigenadas en los carbonos C2 y C3. Oxidaciones adicionales en los carbonos C4, C6, C7, C15, C21, C22, C23 y C29, e insaturaciones en C6-C7, C7-C8, C9-C11, C20-C21, dan lugar a los diferentes compuestos aislados.

En una revisión bibliográfica realizada por nuestro grupo de investigación en el año 2000⁴, se da la relación de los 101 compuestos (50 triterpenometilénquinonas y 51 triterpenofenoles) aislados hasta ese momento, clasificados según el grado de conjugación de los anillos, criterio propuesto previamente por Gunatilaka.

Una posible ruta biosintética para los celatroloides ha sido propuesta por nuestro grupo de investigación⁵ (figura 4.3.3), basada en los metabolitos que han sido aislados

⁴ Rodríguez, F. M. *Estudio fitoquímico de especies de la familia Celastraceae (flora panameña): Maytenus blepharodes, Crossopetalum lobatum*. 2000, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.

⁵ González, A. G.; Fraga, B. M.; Ravelo, A. G.; Luis, J. G.; Ferro, E.; González, C. M.; Bazzocchi, I. L. *Consideraciones sobre la biosíntesis de los nor-triterpeno de las celastráceas*. 1990, 1, 389-395, Secretariado de Publicaciones la Universidad de La Laguna.



de especies de celastráceas. La ruta propuesta está en línea con la de Kutney y *col.*⁶, que partiendo de friedelina, por oxidación del C29 a grupo ácido carboxílico y de C24 a alcohol, da lugar a los productos intermedios, ácido salaspérmico, orthospnéico y 6 β -hidroxiorthospnéico. A partir de este último, por apertura oxidativa del agrupamiento hemiacetalico se forma un compuesto con un grupo ácido en C24, cuya descarboxilación y posterior aromatización da lugar a los triterpenofenoles, que por deshidratación en C6 da lugar al sistema quinónico, característico de las quinonas triterpénicas como el celastrol.

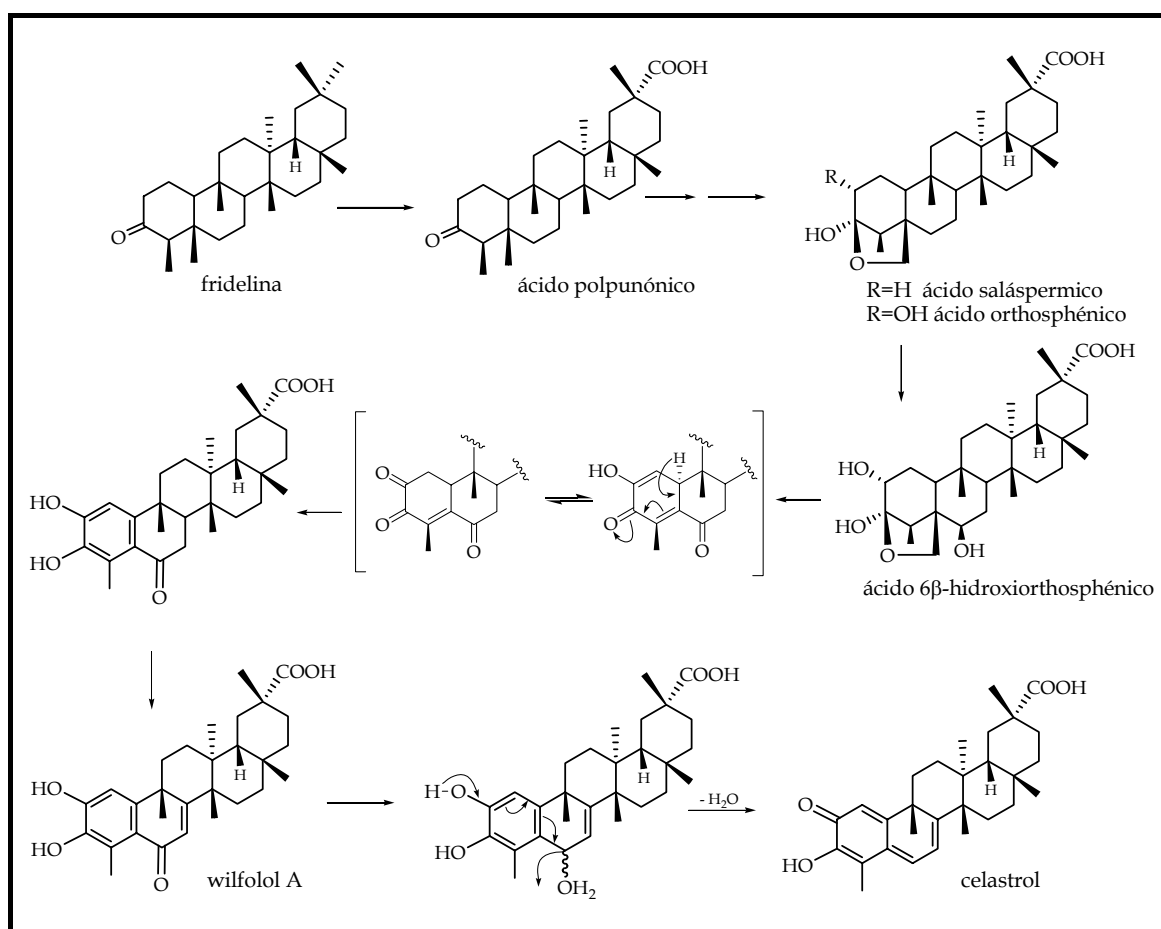


Figura 4.3.3. Esquema propuesto para la biosíntesis de las nor-triterpenometilénquinonas.

Los **dímeros triterpénicos** están constituidos por dos unidades de una triterpenometilénquinona, derivada de pristimerina, tingenona, netzahualcoyona y/o sus congéneres; con una subunidad en forma quinónica y la otra en forma aromática, unidas por un puente diéter en disposición *cis* entre los anillos A de ambas

⁶ Kutney, J. P.; Boada, N. M.; Salisbury, P. J.; Stuart, K. L.; Warth, B. R.; Townsley, P. M.; Chalmers, W. T.; Nilson, K.; Jacoli, G. G. *Phytochemistry*. **1981**, 653.

subunidades o bien entre el anillo A de la unidad aromática y el anillo B de la quinónica (figura 4.3.4).

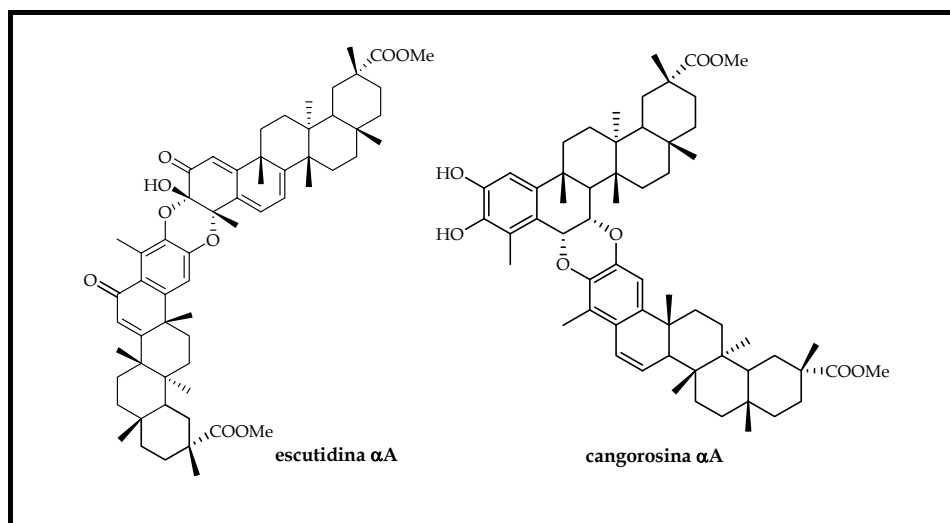


Figura 4.3.4. Ejemplos de un dímero triterpénico con unión A-A y B-A.

Itokawa y *col.*⁷ postularon una ruta para la biosíntesis de este tipo de dímeros, basada en reacciones Diels-Alder, las cuales se han postulado como paso clave en diversas conversiones biosintéticas⁸. Ello sugiere que una triterpenometilénquinona como la pristimerina puede estar en equilibrio tautomérico con la forma ortoquinona (figura 4.3.5), la 2,3-dicetona correspondiente, y que ambos podrían reaccionar para dar el correspondiente dímero de triterpeno.

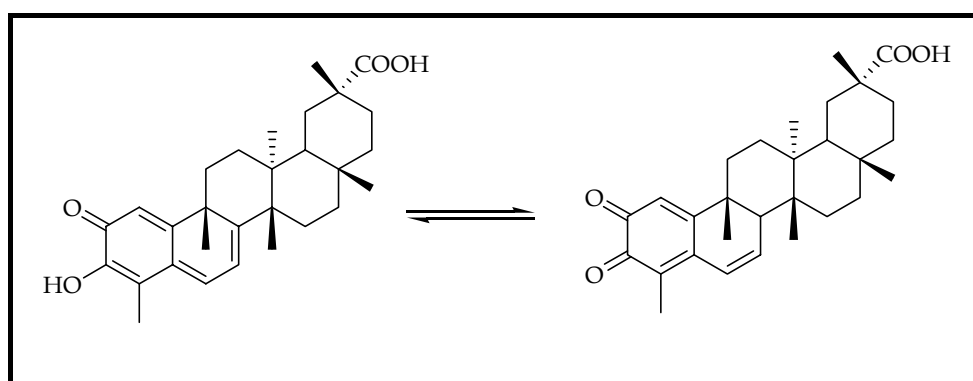
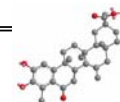


Figura 4.3.5. Equilibrio tautomérico metilénquinona-ortoquinona.

Para comprobar si efectivamente estos dímeros podría formarse mediante una reacción de Diels-Alder se preparó en nuestro laboratorio, un dímero por reacción de

⁷ Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. *Tetrahedron*. **1995**, *51*, 1107-1120.

⁸ Laschat, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 289-291.



una ortoquinona, obtenida por tratamiento de la pristimerina con dimetildioxano (DMDO) y Cl_4Sn (figura 4.3.6). De forma similar a la ruta biogenética postulada, se obtuvo así un dímero⁹, no descrito anteriormente en la bibliografía.

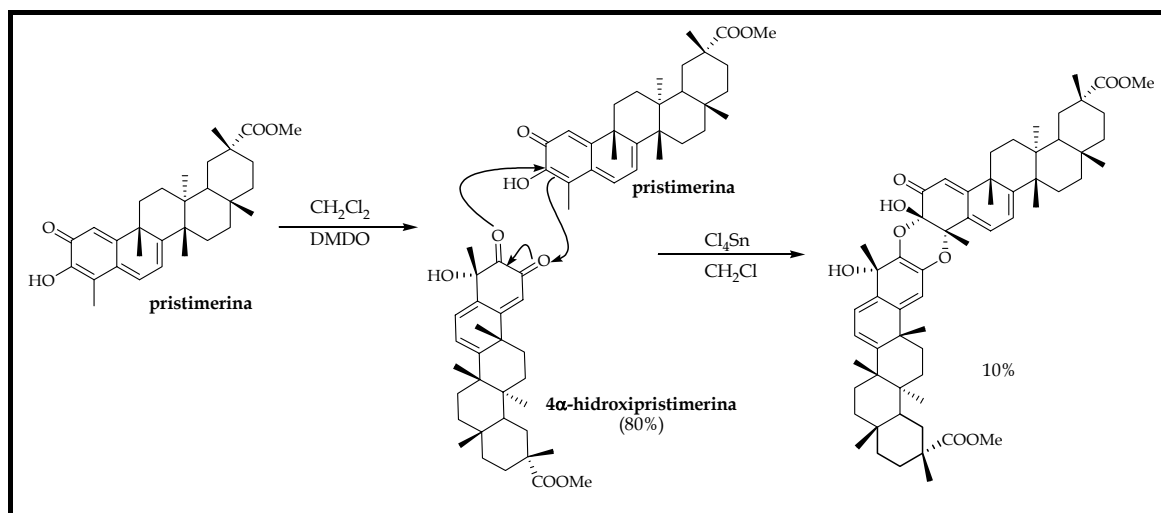


Figura 4.3.6. Esquema de reacción seguido para la obtención de un dímero triterpénico.

Estos resultados y el aislamiento de diferentes regio y estereoisómeros de estos compuestos refuerzan la ruta biogenética propuesta por Itokawa y abren la posibilidad de estudiar sistemas enzimáticos con actividad diels-alderasa. En los últimos años se han purificado tres enzimas diels-alderasas naturales^{10,11,12}, determinándose el mecanismo catalítico de una de ellas, basado en su estructura cristalina¹³. Esto abre la posibilidad de que sistemas enzimáticos con actividad diels-alderasas en las especies de la familia *Celastraceae* catalicen la formación de estos dímeros y trímeros triterpénicos.

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

⁹ González, A. G.; Alvarenga, N. L.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Moujir, L. M. *Tetrahedron*. **1996**, 52(28), 9597-9608.

¹⁰ Oikawa, H.; Katayama, K.; Suzuki, Y.; Ichiara, A. *J. Chem. Soc. Chem Commun.* **1995**, 1321.

¹¹ Auclair, K.; Sutherland, A.; Kennedy, J.; Witter, D. J.; Van den Heever, J. P.; Hutchinson, C. R.; Vederas, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11519.

¹² Watanabe, K.; Oikawa, H.; Yagi, K.; Ohashi, S.; Mie, T.; Ichihara, A. Honma, m. *J. Biochem.* **2000**, 127, 467.

¹³ Ose, T.; Watanabe, K.; Mie, T.; Honma, M.; Watanabe, H.; Yao, M.; Oikawa, H.; Tanaka, I. *Nature*. **2003**, 422, 185-189.

una ortoquinona (dímeros A-A) pueden presentar una unión [3-O-3', 4-O-2'] (regioisómero A o *iso*) o una unión [3-O-2', 4-O-3'] (regioisómero B). Por otro lado, los regioisómeros resultantes de la reacción entre el doble enlace del anillo B de un fenol y la ortoquinona (dímeros B-A) pueden presentar una unión [6-O-3', 7-O-2'] o [6-O-2', 7-O-3'] (regioisómero *iso*) (figura 4.3.7).

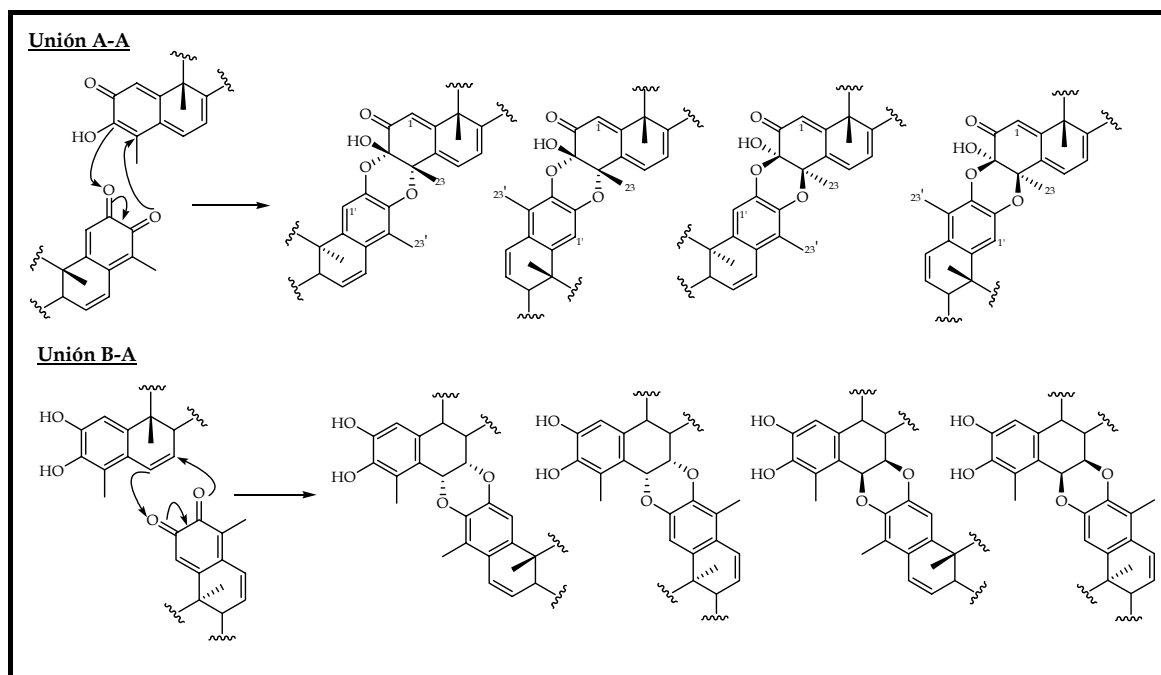


Figura 4.3.7. Posibles regio y estereoisómeros de los dímeros triterpénicos.

Se han aislado trímeros triterpénicos¹⁴ basados en unidades de pristimerina, que implican dos unidades en forma aromática y una en forma quinónica, unidas a través de los anillos A-A, B-A. Su biosíntesis podría tener lugar mediante reacción de un dímero triterpénico como el escutionina α A⁹, aislado de *Maytenus scutioides* y la forma ortoquinónica de una triterpenoquinona como pristimerina (figura 4.3.8).

¹⁴ González, A.G.; Alvarenga, N.L.; Bazzocchi, I.L.; Ravelo, A.G.; Moujir, L. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62(8), 1185-1187.

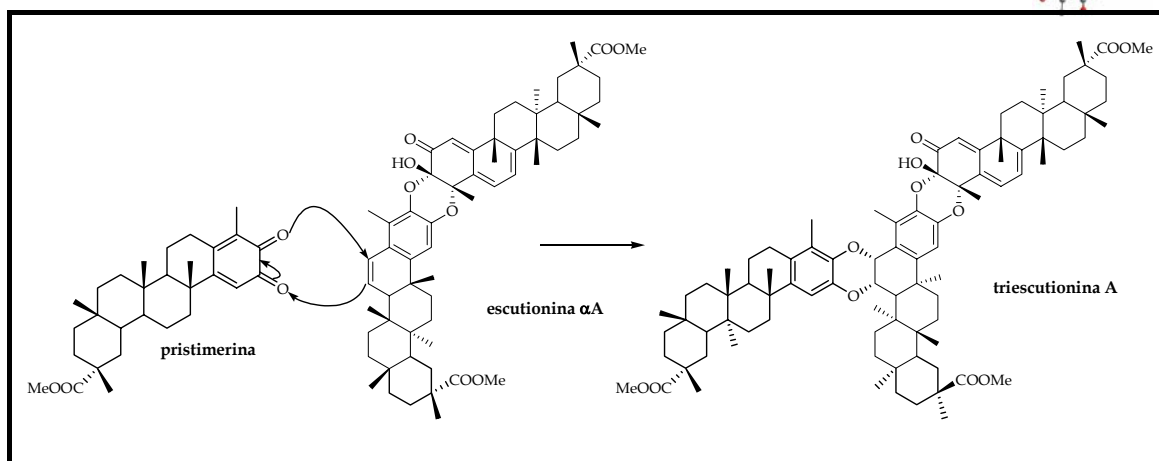
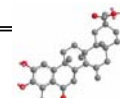


Figura 4.3.8. Biosíntesis propuesta para los trímeros triterpénicos.

En una revisión bibliografía realizada por nuestro grupo de investigación en el año 2000, se realizó un exhaustivo estudio de los datos espectroscópicos de los dímeros aislados hasta el momento, lo que se ha confirmado con otros dímeros aislados posteriormente, con el fin de obtener información sistematizada que ayudara a la elucidación estructural de estos metabolitos y que se resumen en los siguientes aspectos:

- Los desplazamientos de H6 aparecen a mayores δ (campos más bajos) en la serie β que en la α .
- Los desplazamientos de H1 y H6 aparecen a menores δ (campos más altos) en los compuestos de la serie A que los correspondientes en la B.
- Los desplazamientos de H7 son menores en la serie α que β .
- Los desplazamientos de H1' son menores en los regioisómeros B que en los A.
- El Me 23' presenta un desplazamiento mayor en la serie β que en la α , y en los dímeros con carbonilo sobre C6', aumenta el valor de δ más en la serie B que en la serie A.
- El desplazamiento del Me27 aumenta en los compuestos que tienen reducido el doble enlace sobre C7 - C8 (7,8-dihidro).
- El C4 presenta desplazamientos entorno a 79 δ en la serie α , más altos que en la serie β (77 δ).
- El Me23 tiene un desplazamiento aproximado a 22 δ en la serie α y a 24 δ en la β .

Los estudios de actividades biológicas realizados a estos polímeros, aportan como conclusión una pérdida de actividad elevada en el caso de los dímeros y total en el caso de los trímeros¹⁵, con respecto a las unidades que los forman. La pérdida de actividad se ha relacionado en parte a su mayor tamaño y en parte, a que la unión entre ambos monómeros se produce por la parte de la molécula responsable de la actividad.

En función de estos estudios y dado que las nor-triterpenometilénquinonas y los triterpenofenoles han resultado sumamente interesantes por sus propiedades biológicas, podemos postular que las plantas utilizan una estrategia de **destoxificación reversible**, según la cual cuando la concentración de monómeros aumenta y se hace tóxica, la planta los transforma en dímeros y trímeros inactivos, y por tanto no tóxicos, que puede almacenar. Estos polímeros pueden liberar unidades activas, como ortoquinonas o metilénquinonas, vía una reacción enzimática tipo *retro*Diels-Alder, dependiendo de la demanda de la planta, que controla así el nivel de sus sustancias bioactivas.

4.3.1.1. Actividades biológicas de los celastroloides.

4.3.1.1.1. Actividad insecticida.

Existe un interés creciente en la identificación de nuevos compuestos con actividad insecticida, debido a la creciente aparición de resistencia y al riesgo del uso de compuestos no biodegradables para el medio ambiente. En general, las especies de la familia *Celastraceae* se conocen por su actividad insecticida y anti-alimentaria, siendo los principales responsables de ésta, los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos.

Se han evaluado únicamente tres nor-triterpenometilénquinonas: pristimerina, tingenona y 20 α -hidroxi-tingenona (figura 4.3.9), como inhibidores del crecimiento de la larva de *Cydia pomonella* (*Lepidoptera*). Estos metabolitos presentaron la misma actividad que el control, el extracto del árbol Net que contiene un 2% de azadirachtina¹⁶. El más activo de los metabolitos ensayados fue 20 α -hidroxi-tingenona que a una concentración de 20 mg/ml inhibió el 100% el crecimiento de las larvas.

¹⁵ González, A. G.; Alvarenga, N. L.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Moujir, L. M. *Tetrahedron*. 52(28), 9597-9608, **1996**.

¹⁶ Avila, J.; Teixidó, A.; Velásquez, C.; Alveranga, N.; Ferro, E.; Canela, R. J. *Agric. Food. Chem.* **2000**, 48, 88-92.

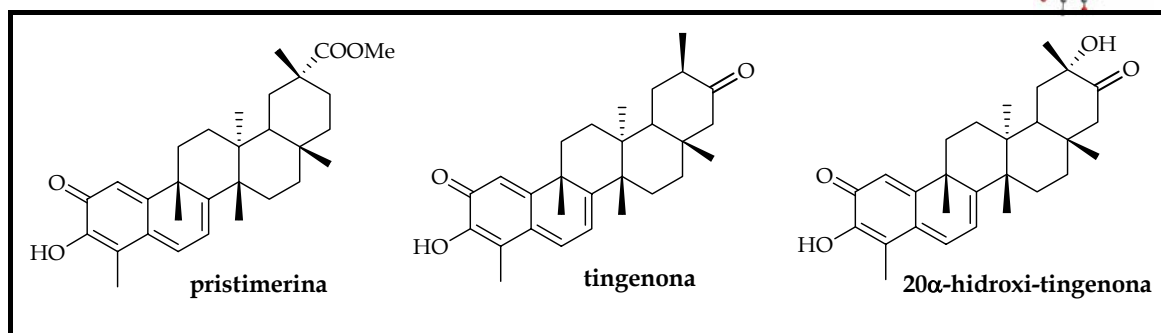
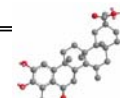


Figura 4.3.9. nor-Triterpenometilénquinonas evaluados por su actividad insecticida.

4.3.1.1.2. Actividad antimicrobiana.

Las nor-triterpenometilenquinonas son los triterpenos aislados de especies de celastráceas que han resultado más activos como agentes antibacterianos, incrementándose la actividad al aumentar el grado de oxidación de la molécula¹⁷. Se han ensayado tanto frente a bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, resultando todos los metabolitos ensayados inactivos frente a bacterias Gram-negativas. Podemos destacar netzahualcoyona, el más activo de la serie del netzauolcoyeno, con una CMI (concentración mínima inhibitoria) de 1,5-1,6 µg/ml frente a *Staphylococcus aureus*, en el que la presencia de una cetona y un alcohol secundario en el anillo E es indispensable para la expresión de la actividad¹⁸.

Los 6-oxo-fenoles triterpénicos, zeylasteral y demetilzeylasteral, presentaron una actividad antibacteriana significativa, resultando más activos en la fase de crecimiento exponencial del microorganismo, disminuyendo la formación de colonias de *Bacillus subtilis* en un 10⁻³. Estudios realizados con estos triterpenofenoles indicaron que su mecanismo de acción radica en la inhibición de la síntesis de la pared celular o de la membrana plasmática¹⁹. En otro trabajo, realizado por nuestro grupo de investigación, se ensayaron diversos triterpenofenoles frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y una levadura, *Candida albicans*, resultando el metabolito más activo pristimerol, activo frente bacterias Gram-positivas, incluyendo *Enterococcus faecalis*, bacteria multirresistente²⁰.

¹⁷ Muñoz, O.; Penaloza, A.; González, A. G.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, Alveranga, N. L. *Studies in Natural Products Chemistry*. **1996**, *18*, 739-784, Elsevier Science: The Netherland.

¹⁸ González, A. G.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez, J.; González, C. M.; Luis, J. G.; Ferro, E. A.; Gutiérrez, A.; Moujir, L.; Las Heras, F. G. *Il Fármaco*. **1988**, *43*, 501-505.

¹⁹ De León, L.; Beltrán, B.; Moujir, L. *Planta Med*. **2005**, *71*, 313-319.

²⁰ Rodríguez, F. M.; López, M. R.; Jiménez, I. A.; Moujir, L.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L. *Tetrahedron*. **2005**, *61*, 2513-2519.

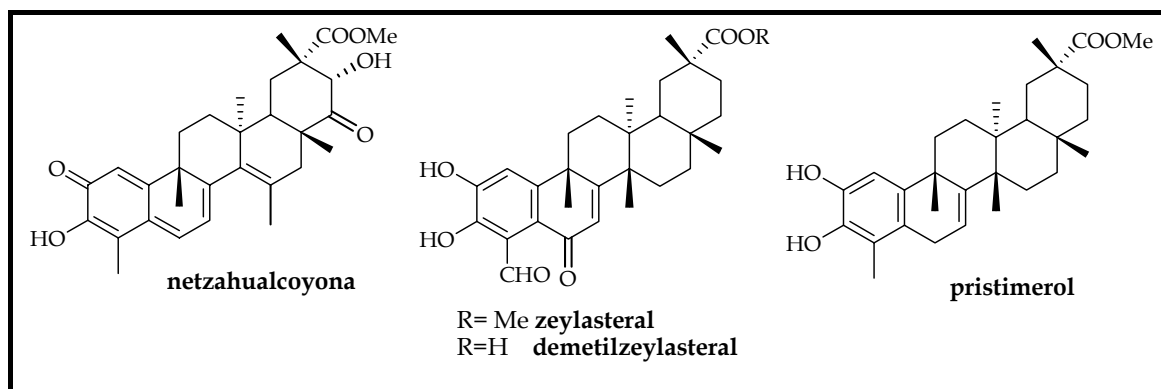


Figura 4.3.10. Celastroloides con actividad antibacteriana.

Diversas especies de la familia *Celastraceae* se han descrito por su actividad antimalárica. Así, una serie de nor-triterpenometilénquinonas aisladas de *Salacia krauss*, se evaluaron por su actividad antimalárica *in vitro*, resultando 17-metoxycarbonil-28-nor-isoiguesterina e isoiguesterol tres veces más activos que la cloroquina frente a la cepa multirresistente K1²¹. Sin embargo, la administración vía parenteral de estos compuestos (10 mg/kg peso del animal) provocó la muerte de los animales, lo que confirma la toxicidad de estos metabolitos. La administración en dosis más bajas (1 y 5 mg/kg) o la administración vía oral (30 mg/kg) no producían ningún efecto.

Dos metabolitos aislados de *Salacia madagascariensis*, isoguesterina y 20-*epi*-isoiguesterol presentaron una potente actividad leishmanicida, siendo ambos más activos y con el mismo índice de selectividad que anfotericina B, usado actualmente en el tratamiento de esta parasitosis²².

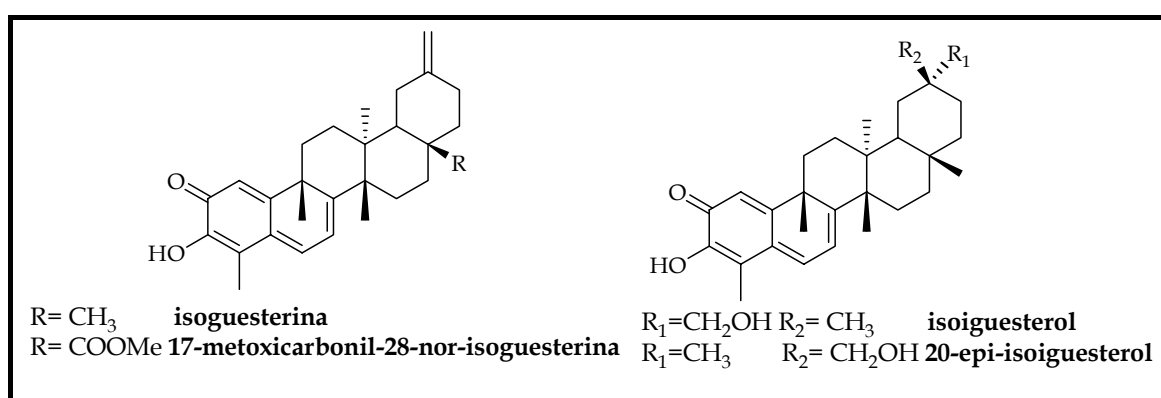
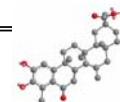


Figura 4.3.11. Celastroloides con actividad antiparasitaria.

²¹ Figueiredo, J. N.; Rätz, B.; Séquin, U. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 718-723.

²² Thiem, D.A.; Sneden, A. T.; Khan, S. I.; Tekwani, B. L. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 251-254.



4.3.1.1.3. Actividad anticancerígena.

Se han publicado diversos trabajos que revelan que los celastroloides poseen actividad anticancerígena²³. Los nor-triterpenometilénfenoles con un grupo aldehído sobre C23 y un grupo carbonilo en C6 resultan los más activos, destacando 22 β -hidroxi-6,23-dioxotingenol, aislado de *Maytenus amazonica*, con una CI₅₀ de 0,25 μ g/ml, frente a las líneas celulares P-388 (linfoma de ratón) y A-459 (carcinoma humano de pulmón) y el acetato del macrocarpin A, derivado obtenido de *Maytenus macrocarpa*, con un CI₅₀ de 0,25 frente a las cuatro líneas ensayadas, P-388, A-459, HT-29 (carcinoma humano de colon) y MEL-28 (melanoma humano).

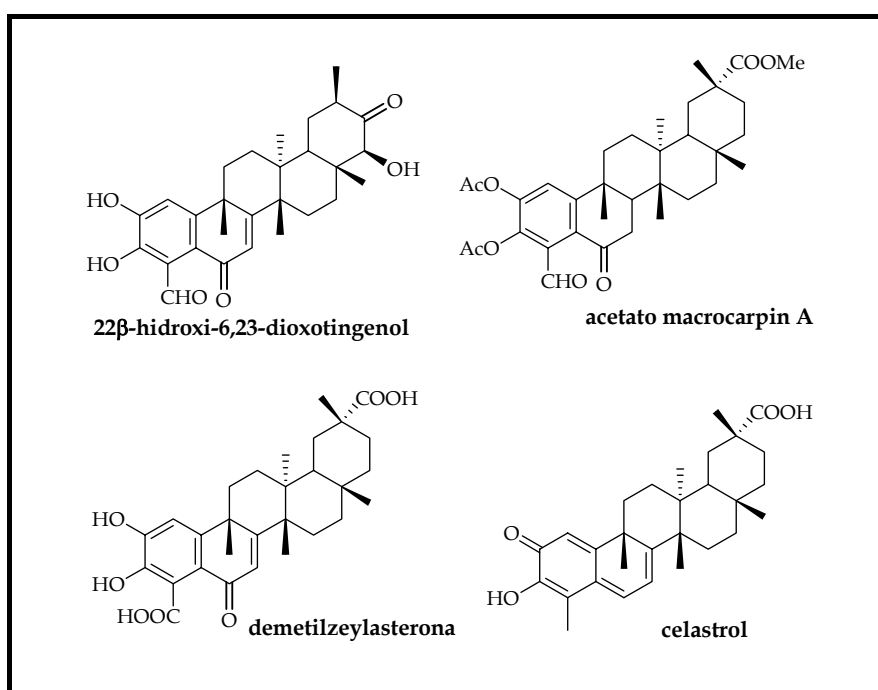


Figura 4.3.12. Celastroloides con actividad anticancerígena.

Se ha evaluado la actividad inhibidora de la topoisomerasa II de una serie de celastroloides, resultando demetilzeylasterona el más activo, con un valor de CI₅₀ de 17,6 μ M²⁴. Este metabolito resultó, así mismo, citotóxico frente a la línea celular MCF-7 (cáncer de pecho), con una CI₅₀ 12,5 μ M. Por otra parte, el celastrol también se ensayó como inhibidor de la topoisomerasa II, resultando más eficaz que el etopósido (CI₅₀ 7,4 μ M y 30,3 μ M, respectivamente), usado en clínica. El celastrol induce apoptosis en una

²³ Alveranga, N.; Ferro, E. A. *Studies in Natural Products Chemistry, Bioactive Natural Products (part K)*. **2005**, 30, 635-702, Elsevier Science: The Netherlands.

²⁴ Furbacher, T. R.; Gunatilaka, L. J. *Nat. Prod.* **2001**, 64, 1294-1296.

línea de leucemia humana (HL-60) y M. Nagase y *col.*²⁵ postularon que su mecanismo de inducción radica en la inhibición de la topoisomeras II o de la peroxidación lipídica.

4.3.1.1.4. Actividad antiinflamatoria.

El celastrol se evaluó por su actividad antiinflamatoria, tanto *in vitro* como *in vivo*. La producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α y IL-1 β) en monocitos humanos y macrófagos se redujo, presentando una CI₅₀ entre 30-100 nM. Así mismo, se evaluó por su capacidad inhibidora de la inducción de artritis en ratón, inhibiéndola a una concentración de 3 mg/kg, lo que confirma su actividad *in vitro*. Los resultados obtenidos han llevado a sugerir el uso de celastrol para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que van acompañadas de inflamación, como el Alzheimer²⁶.

También se ha evaluado la actividad antiinflamatoria *in vivo* de la pristimerina y la tingenona, que inhiben la producción de IL-1 β en monocitos humanos, con CI₅₀ de 40,6 y 58 nM, respectivamente²⁷.

4.3.1.1.5. Actividad antioxidante.

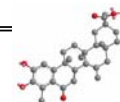
Los antioxidantes son un conjunto heterogéneo de sustancias que bloquean el efecto dañino de los radicales libres ocasionados en las reacciones metabólicas o son producidos por factores exógenos. En los últimos años, se ha estudiado el papel de los antioxidantes en las enfermedades de máximo impacto en Occidente, como son las enfermedades cardiovasculares, diversos tipos de cáncer, sida, enfermedades neurodegenerativas y otros procesos relacionados con el envejecimiento.

La actividad antioxidante depende en la mayoría de los casos de la presencia de fenoles, describiéndose esta propiedad en flavonoides, lignanos, fenilpropanoides y otros compuestos aromáticos. Los terpenos antioxidantes son menos frecuentes, entre ellos se han descrito algunos diterpenos del abietano, derivados del rosmanol y del ácido carnósico con actividad antioxidante. El celastrol, pristimerina y el acetato del celastrol se evaluaron por su actividad inhibidora de la peroxidasa lipídica en la mitocondria de hígado de ratón, resultando ser inhibidores potenciales.

²⁵ Nagase, M.; Oto, J.; Sugiyama, S.; Yube, K.; Takaishi, Y.; Sakato, N. *Bios. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 1883-1887.

²⁶ Allison, A. C.; Cacabelos, R.; Lombardi, V. R. M.; Álvarez, X. A. *Prog. Neuro-PsychoPharma. Biol. Psych.* **2001**, *25*, 1341-1347.

²⁷ Calixto, J. B.; Campos, M. M.; Otuki, M. F.; Santos, A. R. S. *Planta Med.* **2004**, *70*, 93-103.



Por otro lado, se ha utilizado un ensayo que consiste en la reducción de un radical libre estable, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), para la búsqueda de nuevos antioxidantes, evaluándose diferentes celastroloides^{28,29}. Uno de los metabolitos más activos fue el netzahualcayeno, que produce un incremento de la absorvancia en un 53% a una concentración de 50 μ M, lo que llevó a postular que el aumento de la conjugación de este metabolito debe aumentar la estabilidad del radical netzahualcoyeno, de ahí que sea más efectivo.

4.3.1.1.6. Otras actividades.

Las proteínas de golpe de calor (*heat shock protein*) son un conjunto de moléculas cuya expresión aumenta cuando las células son sometidas a elevadas temperaturas. Estas proteínas son reguladas por factores transcripcionales (HSF, *heat shock factor*), que se sobre-expresan en condiciones de estrés: toxinas, hipoxia,... Las proteínas de golpe de calor son chaperonas, que intervienen en diversos procesos intracelulares, jugando un papel importante en el control de la "calidad" de las proteínas, dando lugar a la flexibilidad conformacional de las proteínas e intervienen en la respuesta a las señales de estrés. Esto se relaciona con diversas enfermedades como el cáncer, fibrosis quística y enfermedades neurodegenerativas. El celastrol activa específicamente un factor transcripcional de golpe de calor (HSF1) de igual manera que lo hace el estrés causado por altas temperaturas, provocando la unión de HSF1 con el ADN, la hiperfosforilación de HSF1 y la expresión de los genes que codifican las chaperonas³⁰. El celastrol, además activa la transcripción de los genes del golpe de calor en sinergismo con otras condiciones de estrés, lo que le confiere acción citoprotectora y por lo tanto una prometedora actividad farmacológica como regulador de la respuesta al golpe de calor.

²⁸ Carvalho, P. R. F.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Furlan, M. *Chem. Biodiv.* **2005**, 2, 367-372.

²⁹ Jeller, A. H.; Silva, D. H. S.; Liao, L. M.; Bolzani, V. S.; Burlan, M. *Phytochemistry*. **2004**, 65, 1977-1982.

³⁰ Westerheide, S. D.; Bosman, J. D.; Mbadurgha, B. N. A.; Kawahara, T. L. A.; Matsumoto, G.; Kim, S.; Gu, W.; Devlin, J. P.; Silverman, R. B.; Morimoto, R. I. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 56053-56060.

4.3.2. Resultados y discusión

Del estudio fitoquímico de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina* aislamos triente y tres celastroloides, distribuidos en:

- **Seis nor-triterpenometilénquinonas**, que hemos denominado de **Q1** a **Q6**. Estas habían sido descritos con anterioridad en la bibliografía química y se identificaron como: pristimerina³¹ (**Q1**), tingenona³² (**Q2**), 20-hidroxitingenona³³ (**Q3**), netzahualcoyeno³⁴ (**Q4**), netzahualcoyonal³⁴ (**Q5**) y dispermoquinona³⁵ (**Q6**).
- **Diez nor-triterpenometilénfenoles**, que hemos denominado de **Fe1** a **Fe10** y de los cuales cuatro resultaron nuevos en la bibliografía (**Fe1-Fe4**). El resto fueron identificados como: cognatina²⁹ (**Fe5**), 6-oxopristimerol³⁶ (**Fe6**), 7-hidroxi-6-oxopristimerol³⁷ (**Fe7**), blepharodol²⁰ (**Fe8**), 7 α -hidroxiblepharodol²⁰ (**Fe9**) y 6-deoxoblepharodol²⁰ (**Fe10**).
- **Dieciséis dímeros triterpénicos**, que hemos agrupado para facilitar su estudio, en función de las subunidades metilénquinónica y fenólica que los forman. Los hemos denominado de **DT1** a **DT16**, resultando cuatro de ellos nuevos en la bibliografía química (**DT1-DT4**), el resto fueron identificados como: netzaescutionina α A³⁸ (**DT5**), 7,8-dihidroisoxuxuarina $E\alpha$ ³⁹ (**DT6**), 7,8-dihidroescutionina α B (**DT7**), 7,8-dihidroescutionina α A (**DT8**), 7,8-dihidroescutionina β B (**DT9**), escutionina α A (**DT10**), escutionina α B⁴⁰ (**DT11**),

³¹ Johnson, A.; Juby, P.; King, T.; Tam, S. J. *Chem. Soc.* **1993**, 2884.

³² Monache, F.; Marini-Bettolo, G.; Gonçalves de Lima, O.; D'Albuquerque, I.; Barros Coelho, J. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. I.* **1973**, 1, 2725-2728.

³³ Sotanaphun, U.; Suttisri, R.; Lupipun, V.; Bavovada, R. *Phytochemistry.* **1998**, 49, 1749-1755.

³⁴ González, A. G.; González, C. M.; Ferro, E. A.; Ravelo, A. G.; Domínguez, X. A. *J. Chem. Research.* **1988**, 20, 273.

³⁵ Martin, J. D. *Tetrahedron.* **1973**, 29, 2997-3000.

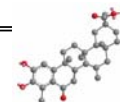
³⁶ Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 1675-1681.

³⁷ Ankli, A.; Heilmann, J.; Heinrich, M.; Sticher, O. *Phytochemistry.* **2000**, 54, 531-537.

³⁸ González, A. G.; Alvarenga, N. L.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Moujir, L. *Tetrahedron.* **1996**, 52, 9597-9608.

³⁹ Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, 46, 102-106.

⁴⁰ González, A. G.; Kennedy, M. L.; Rodríguez, F. M.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G. Moujir, L. *Tetrahedron.* **2001**, 57, 1283-1287.



escuticionina β B⁴ (DT12), escutidina α A (DT13), xuxuarina α E⁴¹ (DT14), 6' β -metoxi-6',7'-dihidroescuticionina³⁸ (DT15), 6',7'-dihidrocangorosina A⁴ (DT16).

• **Un trímero triterpénico**, que hemos denominado **TT1** (triescuticionina B)¹⁴, que ya había sido aislado con anterioridad en un trabajo realizado en nuestro grupo de investigación de *M. scutioides*.

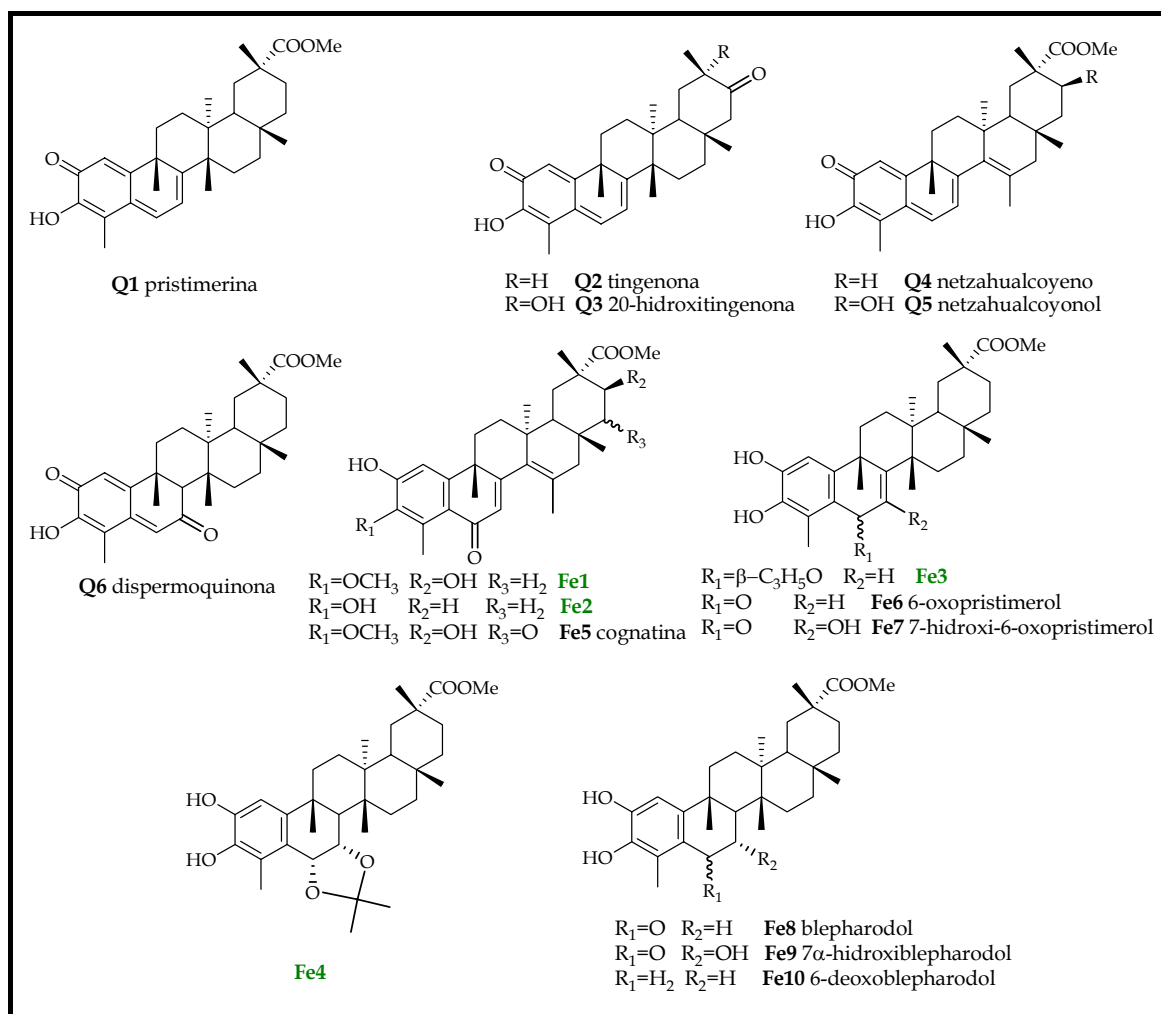


Figura 4.3.13. nor-Triterpenometilénquinonas y fenoles aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*. En verde se señalan los que resultaron nuevos en la bibliografía química.

⁴¹ González, A. G.; Rodríguez, F. M.; Bazzocchi, I. L.; Ravleo, A. G. J. *Nat. Prod.* **2000**, 63, 48-51.

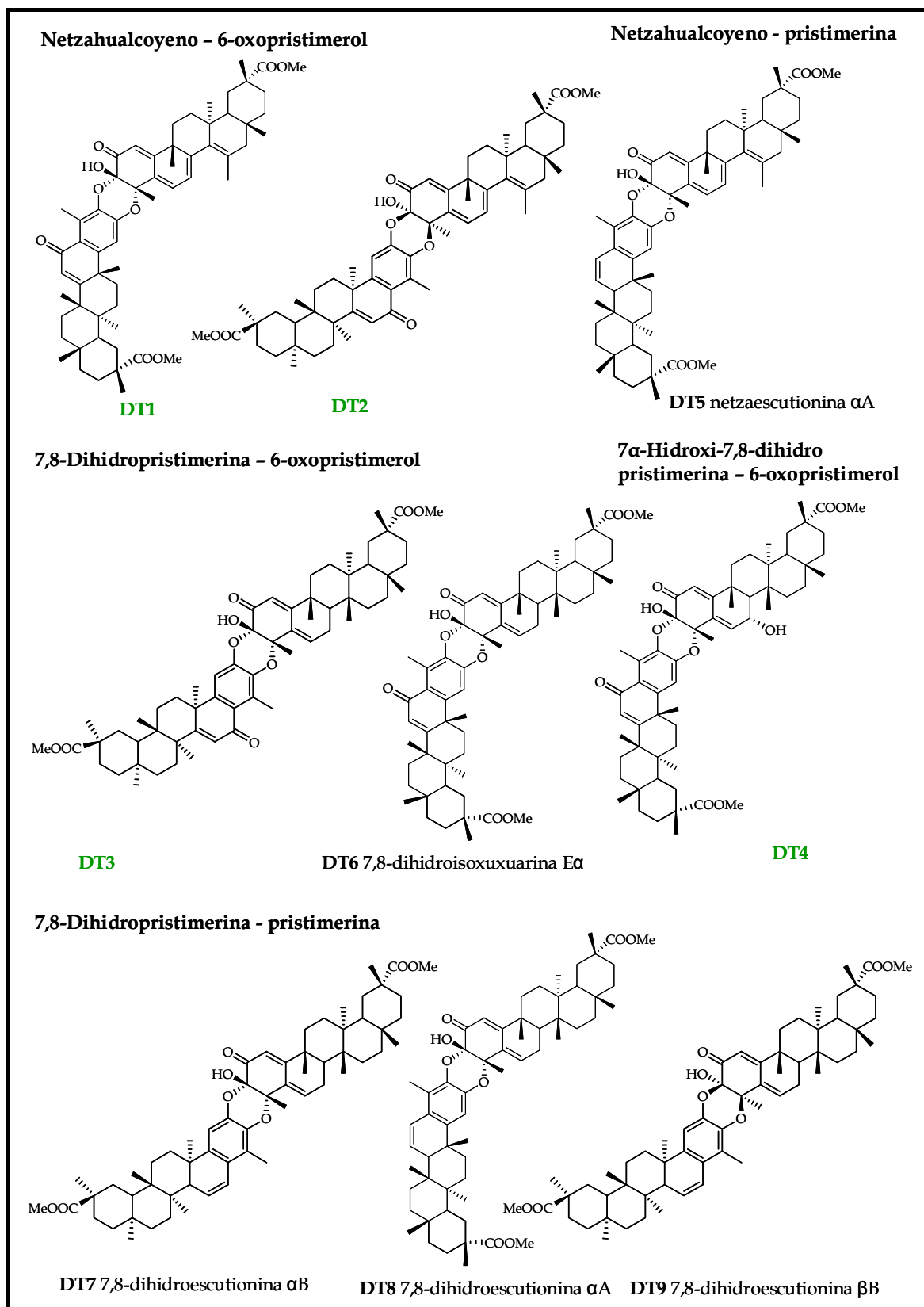


Figura 4.3.14. Dímeros y trímero triterpénicos aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*. En verde se señalan los que resultaron nuevos en la bibliografía química.

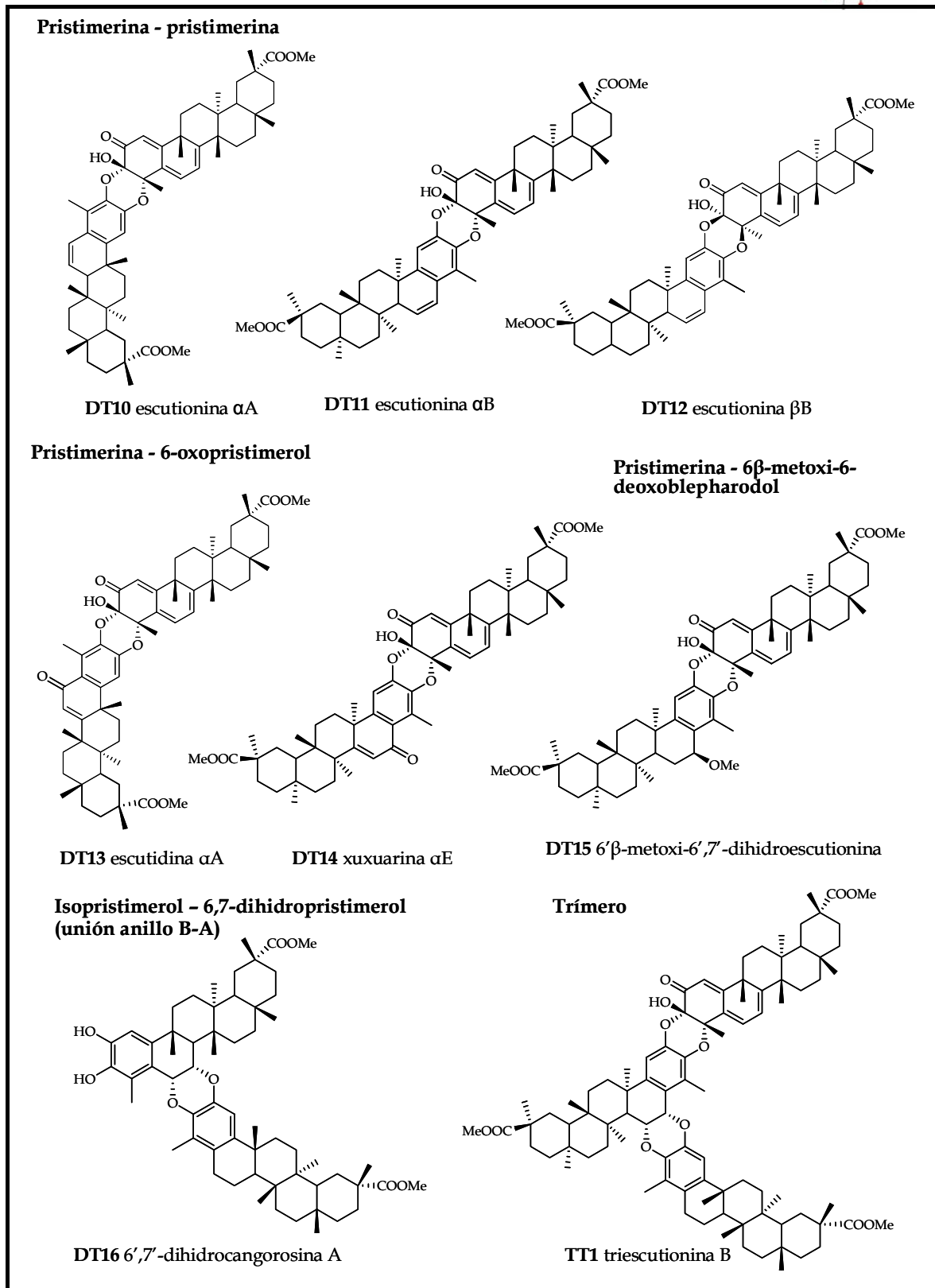
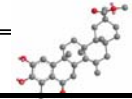


Figura 4.3.14. (continuación)

La elucidación estructural de los metabolitos conocidos se realizó por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los existentes en la bibliografía química.

Por otro lado, la estructura de los nuevos metabolitos se determinó mediante técnicas espectroscópicas de RMN ^1H y ^{13}C , incluyendo experimentos bidimensionales tanto homo como heteronucleares, infrarrojo (IR), ultravioleta (UV) y espectrometría de masas (EM). La determinación de la configuración absoluta se realizó mediante el estudio de las curvas dicroísmo circular (DC).

A continuación pasamos a discutir la elucidación estructural de los nuevos celastroloides aislados de *M. cuzcoina*.

Celastroloide Fe1

El metabolito que denominamos **Fe1** se aisló como un sólido amorfo de fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_6$ calculada por espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) y datos de RMN ^{13}C . Su espectro de IR mostró bandas para grupo hidroxilo (3391 cm^{-1}) y grupo éster (1724 cm^{-1}).

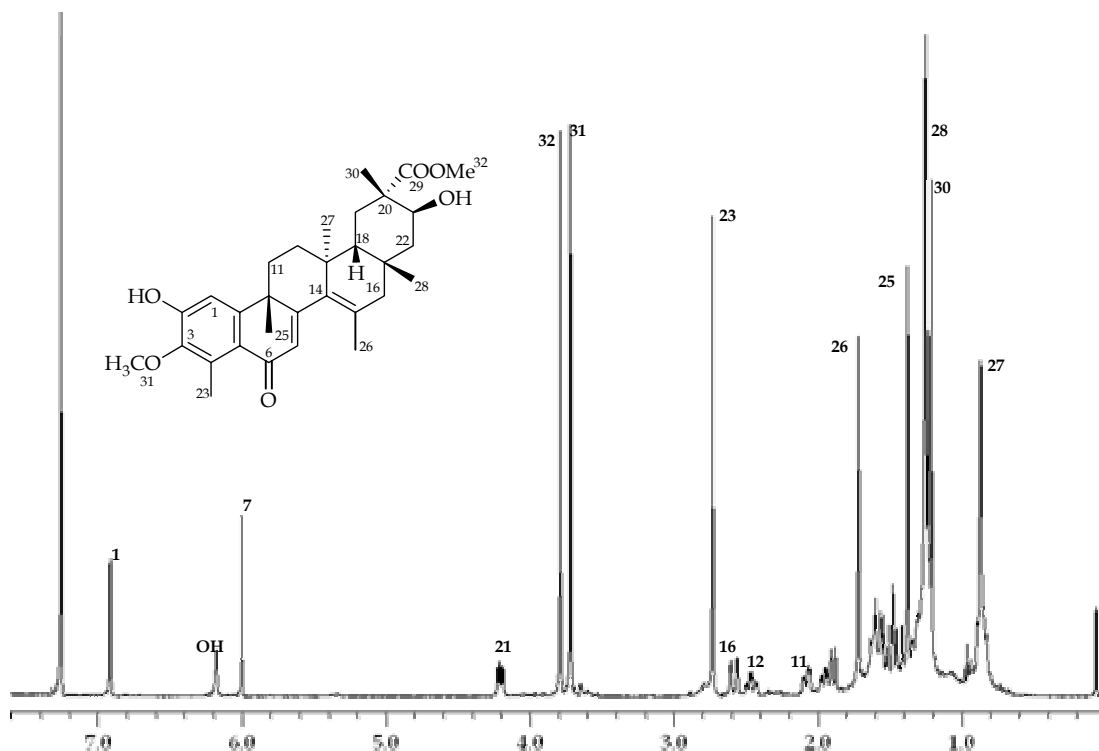
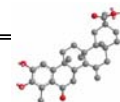


Figura 4.3.15. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de Fe1.



Su espectro de RMN ^1H (figura 4.3.15) presentó señales correspondientes a seis metilos singuletes, cuatro de ellos angulares a 0,87, 1,21, 1,23 y 1,37 δ , uno sobre doble enlace a 1,72 δ y otro sobre anillo aromático a 2,73 δ , cuyo desplazamiento se debe a su disposición *sinperiplanar* con un grupo carbonilo en C6. Además, se observaron señales correspondientes a dos grupos metoxilos a 3,72 y 3,79 δ , un protón aromático a 6,92 δ (s), un protón en posición α a una cetona α,β -insaturada a 6,00 δ (s) y una señal asignada a un protón geminal a un alcohol secundario a 4,20 δ (dd, $J= 5,4, 11,6$ Hz). Por otro lado, un singulete a 6,18 δ intercambiable con agua deuterada, indicó que es un protón de un grupo hidroxilo.

En su espectro de RMN ^{13}C (figura 4.3.16) se observaron señales para treinta y un carbonos, siendo significativa la presencia de señales características de un carbonilo α,β -insaturado a 186,1 δ , diez carbonos olefínicos, seis de ellos aromáticos a 110,2 (d), 122,0 (s), 134,2 (s), 144,7 (s), 151,6 (s) y 151,9 (s) δ y cuatro vinílicos a 127,5 (d), 128,8 (s), 134,9 (s) y 161,5 (s) δ . Además, se observó un carbono metínico unido a oxígeno a 68,1 δ y señales de dos grupos metoxilos a 52,2 δ (c) y 61,1 δ (c).

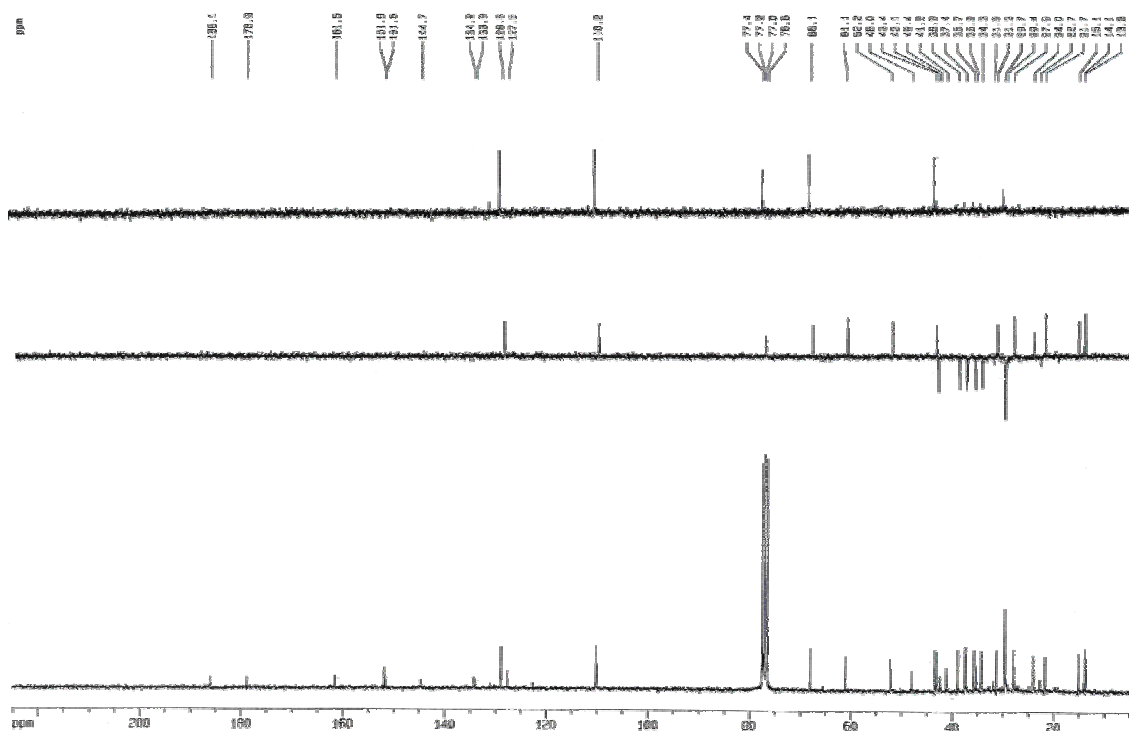


Figura 4.3.16. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de Fe1.

Los datos anteriores están de acuerdo con una estructura de nor-triterpenofenol derivado del netzahualcoyeno para nuestro compuesto y relacionado con un producto descrito en la bibliografía, cognatina²⁹, que fue aislado también en este estudio de *M.*

cuzcoina y que denominamos **Fe5**. La diferencia más significativa en sus espectros de RMN ^{13}C es la desaparición de la señal correspondiente al grupo carbonilo presente en C22 para **Fe5** ($214,0 \delta_{\text{C}}$) y la presencia de un metileno a $43,1 \delta_{\text{C}}$, lo que nos indicó que **Fe1** no posee el grupo carbonilo sobre C22 presente en **Fe5**. Se propone así la estructura de 22-deoxo-3-metoxicognatina para nuestro compuesto **Fe1**.

El análisis de los experimento bidimensionales (COSY, ROESY, HMBC y HSQC) nos permitieron confirmar esta estructura.

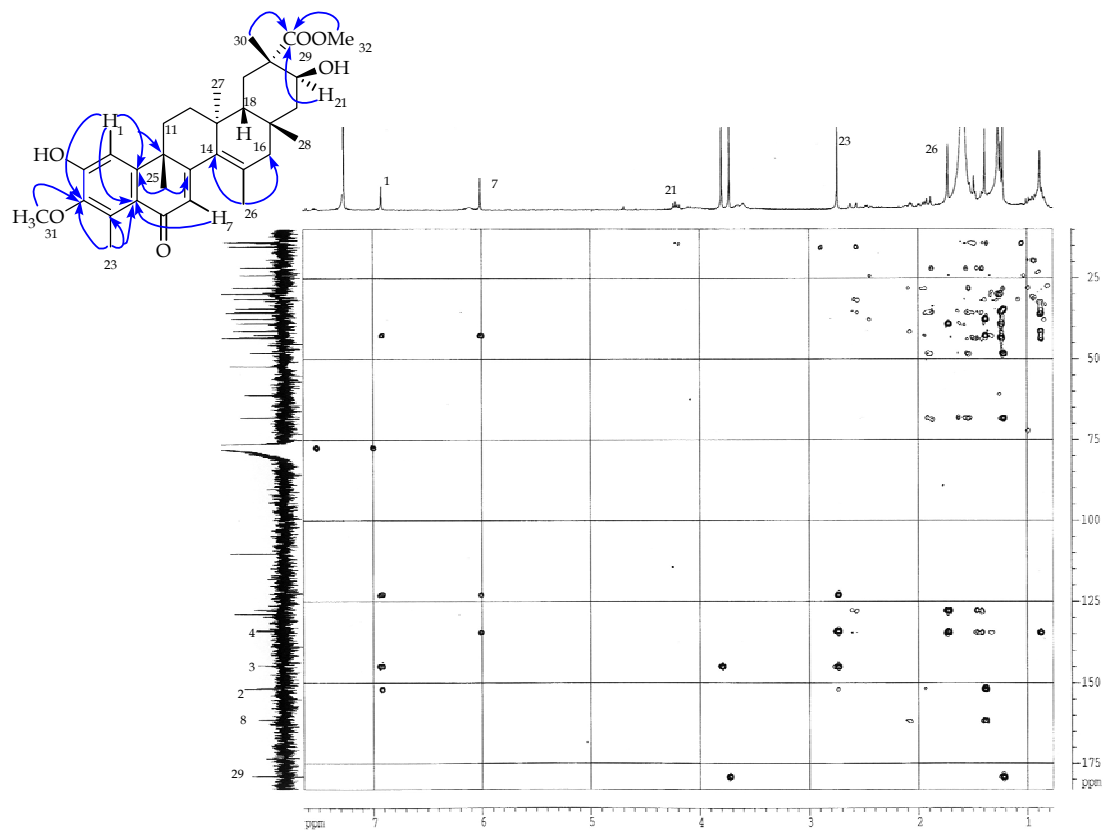
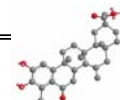


Figura 4.3.17. Experimento **HMBC** de **Fe1**.

El estudio del experimento HMBC (figura 4.3.17) nos permitió fijar la posición de cada uno de los grupos funcionales en la molécula de forma inequívoca. Así, las correlaciones observadas entre el protón H1 con los carbonos cuaternarios aromáticos C3, C10 y C5; correlación del metoxilo a $3,72 \delta_{\text{H}}$ con C3 y del Me23 con los carbonos C3, C4 y C5, estableció la estructura del anillo A. Por otro lado, las correlaciones observadas entre el Me25 ($1,37 \delta_{\text{H}}$) y los carbonos cuaternarios a $151,9 \delta_{\text{C}}$ (C10) y $161,5 \delta_{\text{C}}$ (C8) y de H7 ($6,00 \delta_{\text{H}}$) con los carbonos a $122,0 \delta_{\text{C}}$ (C5) y $34,3 \delta_{\text{C}}$ (C9), confirmó la presencia de la cetona α,β - insaturada en el anillo B. El doble enlace se situó entre los C14 y C16 por la correlación observada del Me27 a $0,87 \delta_{\text{H}}$ con C13 ($35,2 \delta_{\text{C}}$) y C14 ($134,9 \delta_{\text{C}}$) y del Me26 a $1,72 \delta_{\text{H}}$ con C14 ($134,9 \delta_{\text{C}}$) y C16 ($38,9 \delta_{\text{C}}$). Las correlaciones



observadas entre H19 α (1,89 δ_H), H21 (4,20 δ_H), Me30 (1,21 δ_H) y OMe (3,79 δ_H) con C29 (178,9 δ_C) permitió establecer la regiosustitución en el anillo E.

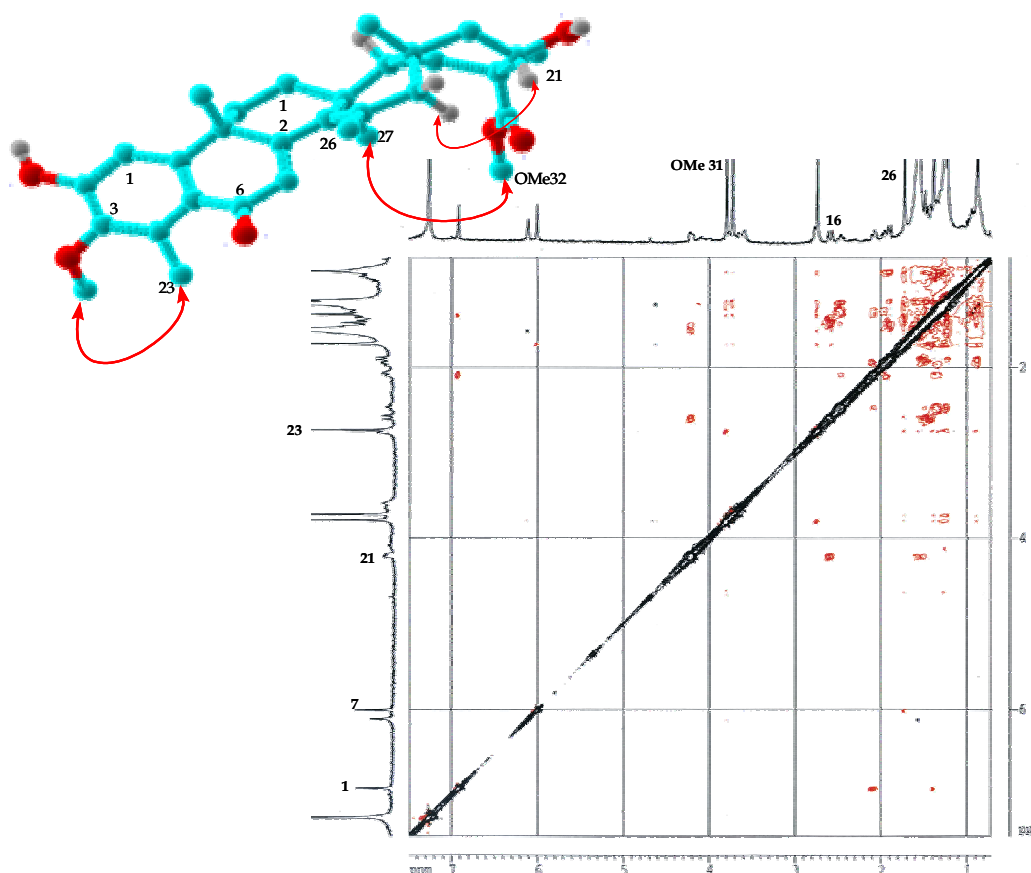


Figura 4.3.18. Experimento **ROESY** de Fe1.

Un cuidadoso estudio de las constantes de acoplamiento y un experimento ROESY (figura 4.3.18), en el que se observa como efectos ROE más significativos, los existentes entre el OMe31 y el Me23, entre el OMe32 y el Me27 y entre H21 y H16 α , nos permiten establecer la estereoquímica del alcohol secundario sobre C21 como β -ecuatorial y el grupo metoxilo sobre C29 como α . Quedó así confirmada la estructura de **Fe1**, para el que proponemos el nombre de **21 β -hidroxicuzcoinol**.

Celastrolóide Fe2

El metabolito **Fe2** se aisló como un sólido amorfo de fórmula molecular $C_{30}H_{38}O_5$, cuyos datos físicos y espectroscópicos indicaron que es un nor-triterpenofenol con esqueleto de netzahualcoyeno relacionado con **Fe1**, exhibiendo desplazamientos químicos similares en sus espectros de RMN 1H (figura 4.3.19) y ^{13}C (tabla 4.3.2), siendo significativa la ausencia de las señales correspondientes al grupo OMe en C3 y del alcohol secundario presente en C21.

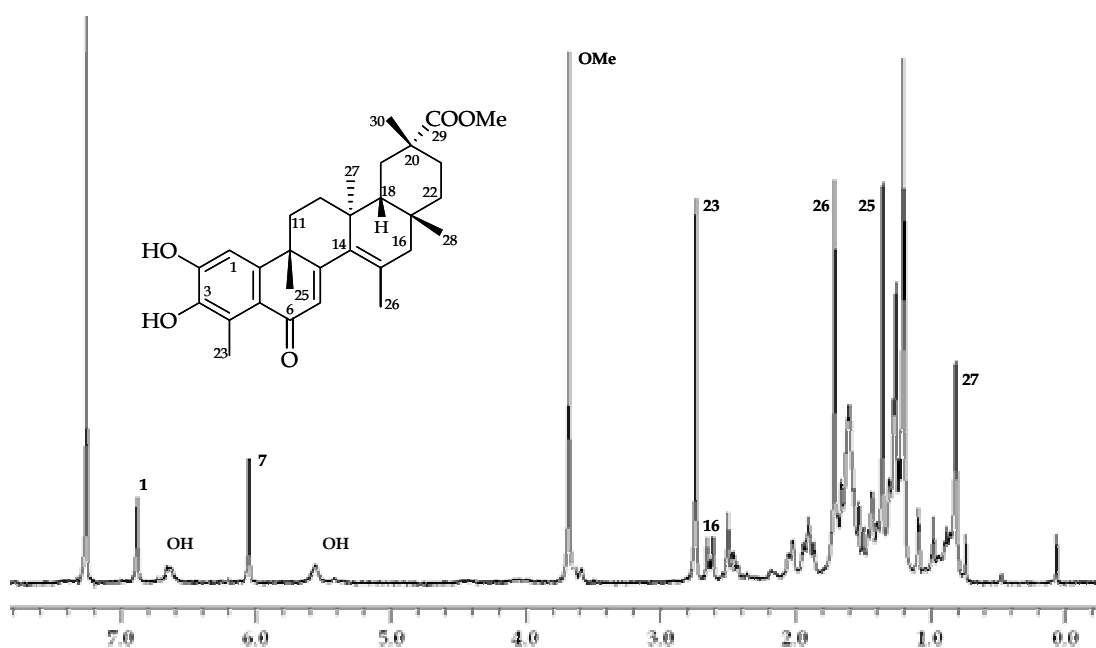
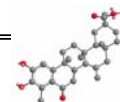


Figura 4.3.19. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **Fe2**.

La estructura propuesta para **Fe2** fue confirmada mediante experimentos de RMN bidimensionales, tanto homonucleares como heteronucleares y por los datos físicos y espectroscópicos del derivado acetilado, **Fe2A** (parte experimental), quedando así confirmada la estructura de **Fe2** para la que proponemos el nombre de cuzcoinol.

Cabe destacar que **Fe1** y **Fe2** constituyen los segundos ejemplos en la bibliografía química de triterpenofenol con esqueleto de netzahualcoyeno, ya que hasta el momento solo se ha descrito la cognatina²⁹, aislada de *Cheiloclinium cognatum*, que por otra parte hemos aislada en este estudio y que denominamos **Fe5**.

**Celastroloide Fe3**

El metabolito que denominamos **Fe3** se aisló como un sólido amorfo de fórmula molecular $C_{33}H_{46}O_5$, calculada por espectrometría de masas de alta resolución y datos de RMN ^{13}C . Su espectro de IR mostró bandas características de grupo hidroxilo (3418 cm^{-1}) y grupo éster (1724 cm^{-1}).

Su espectro de RMN 1H (figura 4.3.20) presentó señales correspondientes a siete metilos singuletes, cinco de ellos angulares a $0,52, 1,05, 1,17 (6H)$ y $1,45\ \delta$, uno en posición α a un grupo carbonilo a $2,16\ \delta$ y otro sobre anillo aromático a $2,18\ \delta$. Además, se observaron dos singuletes asignables a un grupo metoxilo a $3,52\ \delta$ y un protón aromático a $6,81\ \delta$, así como señales correspondientes a dos protones metínicos, que forman parte de un sistema AMRX, con señales a $5,85\ \delta$ (d, $J= 6,2\text{ Hz}$), $3,99\ \delta$ (ddd, $J= 2,5, 6,2, 10,4\text{ Hz}$), $2,71\ \delta$ (dd, $J= 2,5, 16,7\text{ Hz}$) y $2,45\ \delta$ (d, $J= 10,4, 16,7\text{ Hz}$), que integran cada uno para un protón, señales que fueron asignadas a los protones H7, H6 y 2H1', respectivamente. Por otro lado, las señales a $5,55$ y $6,63\ \delta$, intercambiables con agua deuterada, indicaron que corresponden a protones de dos grupos hidroxilos.

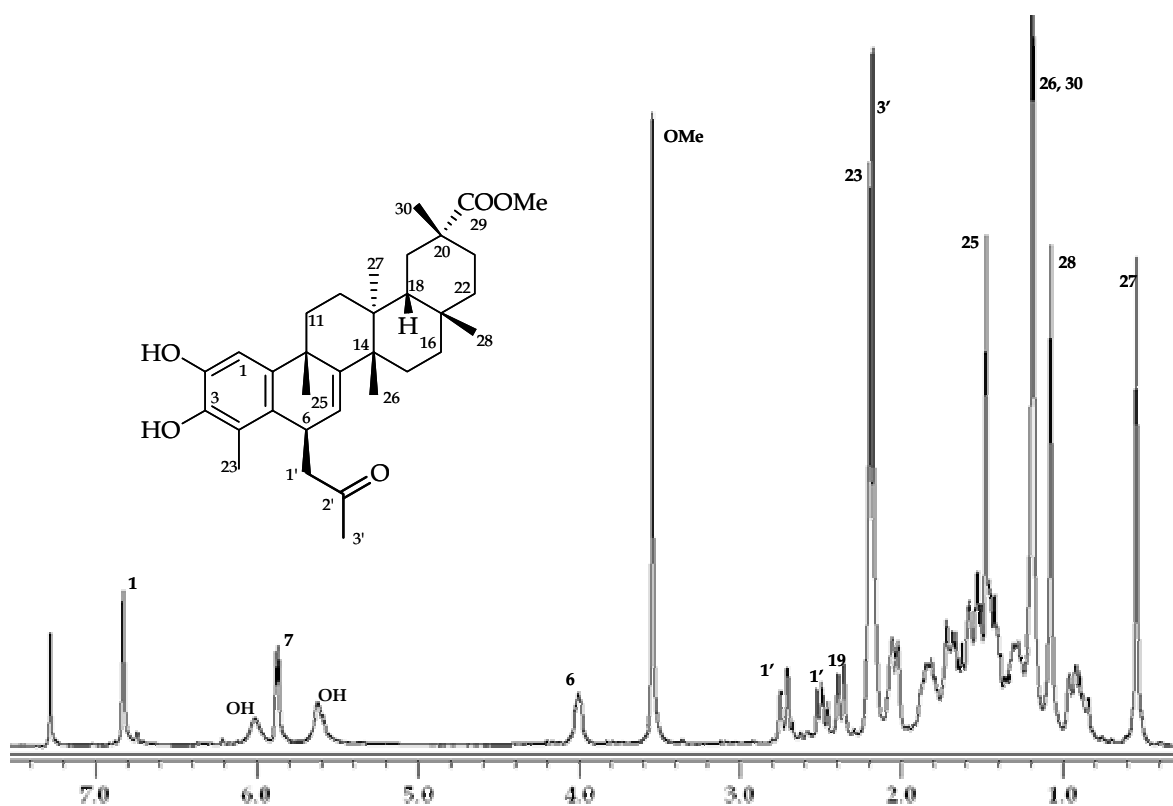


Figura 4.3.20. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **Fe3**.

Su espectro de RMN ^{13}C (figura 4.3.21), presentó señales para treinta y tres carbonos, resultando características las señales a 51,5 y 179,3 δ , que indican la existencia de un grupo metil éster en nuestra molécula, ocho señales entre 109,2 y 150,1 δ , que confirman la existencia de un anillo aromático y un doble enlace, así como, una cetona a 208,1 δ .

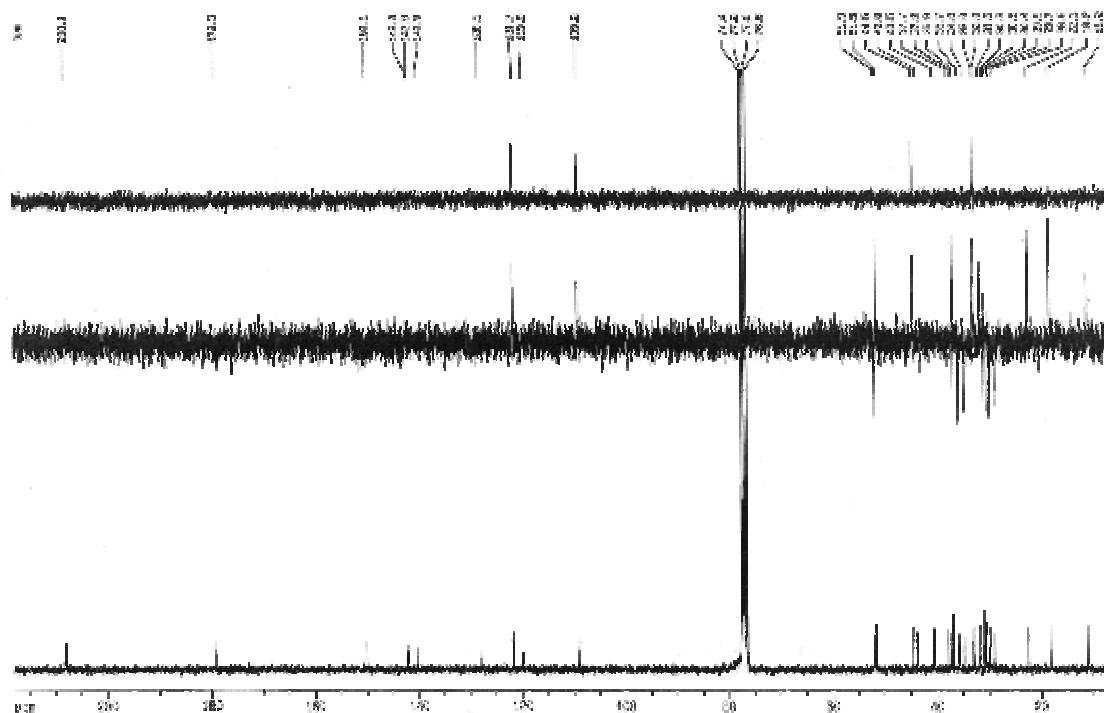


Figura 4.3.21. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de **Fe3**.

Estos datos y los experimentos bidimensionales, COSY, ROESY, HSQC y HMBC, están de acuerdo con una estructura de nor-triterpenofenol derivado de la pristimerina para nuestro compuesto y relacionado con el 6-oxopristimerol³⁶, también aislado en este estudio (**Fe6**). Las diferencias más significativas en sus espectros de RMN ^1H es la aparición del sistema AMRX formados por H7, H6 y 2H1', un metilo a 2,16 δ y el desplazamiento del Me23 de 2,78 δ en el 6-oxopristimerol a 2,18 δ , lo que nos indica que no está en posición *sinperiplanar* a un grupo carbonilo en C6. Esto indica la presencia de un grupo 2-oxo-propilo en la molécula, lo que fue confirmado en un experimento COSY, en el que se observó correlación del protón H6 con H7 y con los dos protones metilénicos asignados a H1'. Por otra parte, la posición de este grupo sobre C6 se confirmó mediante un experimento HMBC (figura 4.3.22), en el que se observó correlación de H6 a 3,99 δ_{H} con C1' (51,9 δ_{C}), C7 (121,7 δ_{C}), C5 (128,1 δ_{C}), C10 (142,0 δ_{C}) y C8 (150,1 δ_{C}).

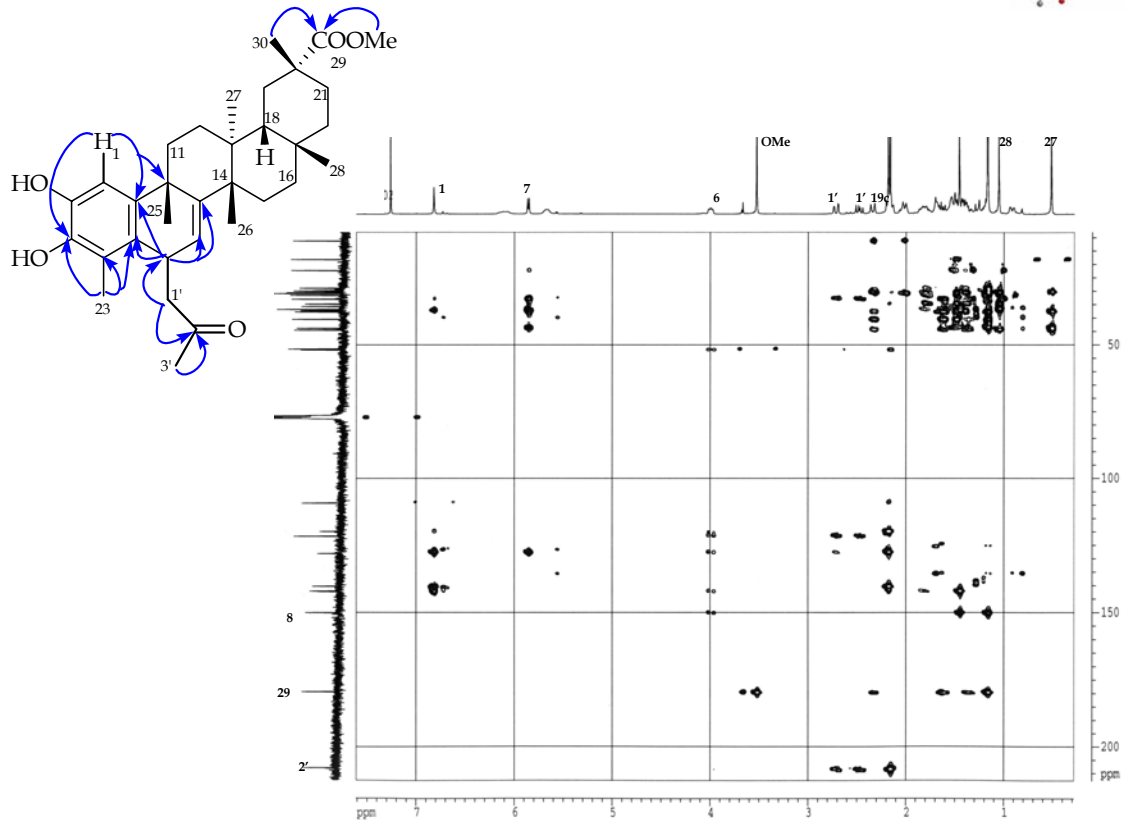
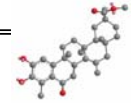


Figura 4.3.22. Experimento **HMBC** de Fe3.

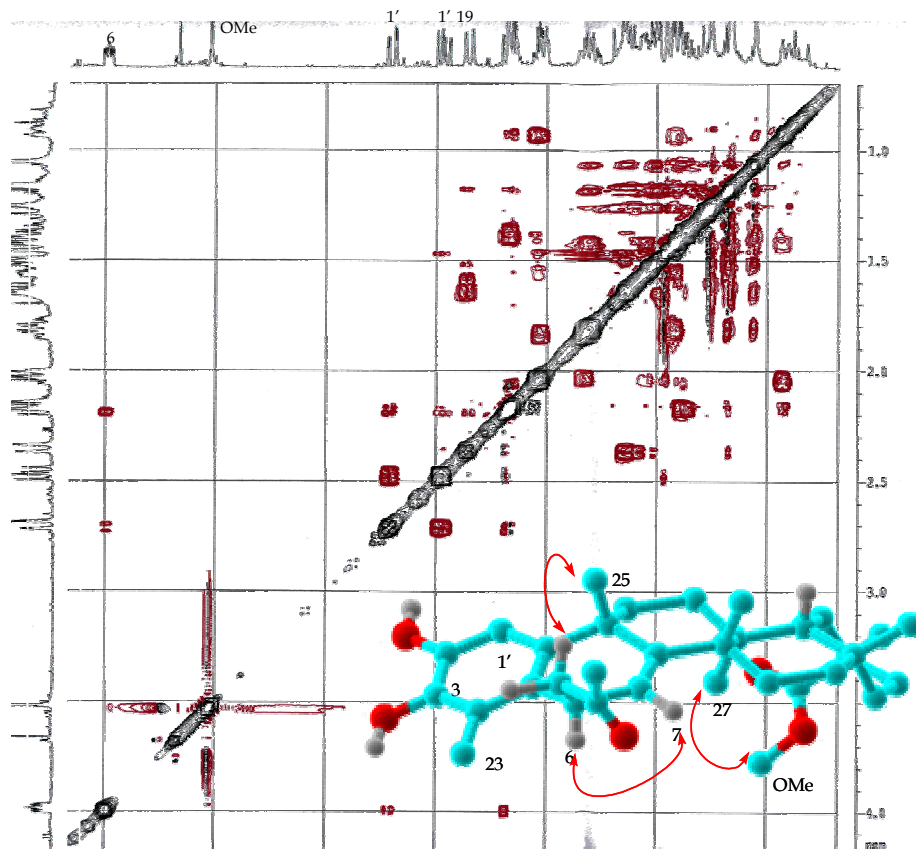


Figura 4.3.23. Experimento **ROESY** de Fe3.

La estereoquímica α para H6 se determinó mediante el estudio de sus constantes de acoplamiento y un experimento ROESY (4.3.23), al observarse correlación de uno de los protones H1' con el Me25 lo que indica una disposición β para el grupo 2-oxopropilo. Estos datos nos permitieron confirmar la estructura de **F3** como **6 β -(2-oxopropil)-pristimerol**.

Celastrolóide Fe4

El metabolito **Fe4**, aislado como un sólido amorfo, presentó una fórmula molecular $C_{33}H_{48}O_6$, obtenida por espectrometría de masas de alta resolución y datos de RMN ^{13}C . En su espectro de IR se observaron bandas características de grupos hidroxilo (3418 cm^{-1}) y carboxilo (1730 cm^{-1}).

Su espectro de RMN 1H (figura 4.3.24) presentó señales correspondientes a ocho metilos como singuletes, cinco de ellos angulares a 0,78, 1,06, 1,07, y 1,18 δ (6H), uno sobre anillo aromático a 2,30 δ y dos correspondientes a un grupo cetala a 1,41 y 1,45 δ . Además, se observaron señales asignables a un grupo metoxilo a 3,61 δ , dos protones metínicos geminales a oxígeno a 4,72 δ (dd, $J= 6,0, 11,2\text{ Hz}$) y 5,13 δ (d, $J= 6,0\text{ Hz}$) y un protón aromático a 6,61 δ . La señal a 5,51 δ fue intercambiable con agua deuterada, lo que indicó que es un protón de grupo hidroxilo.

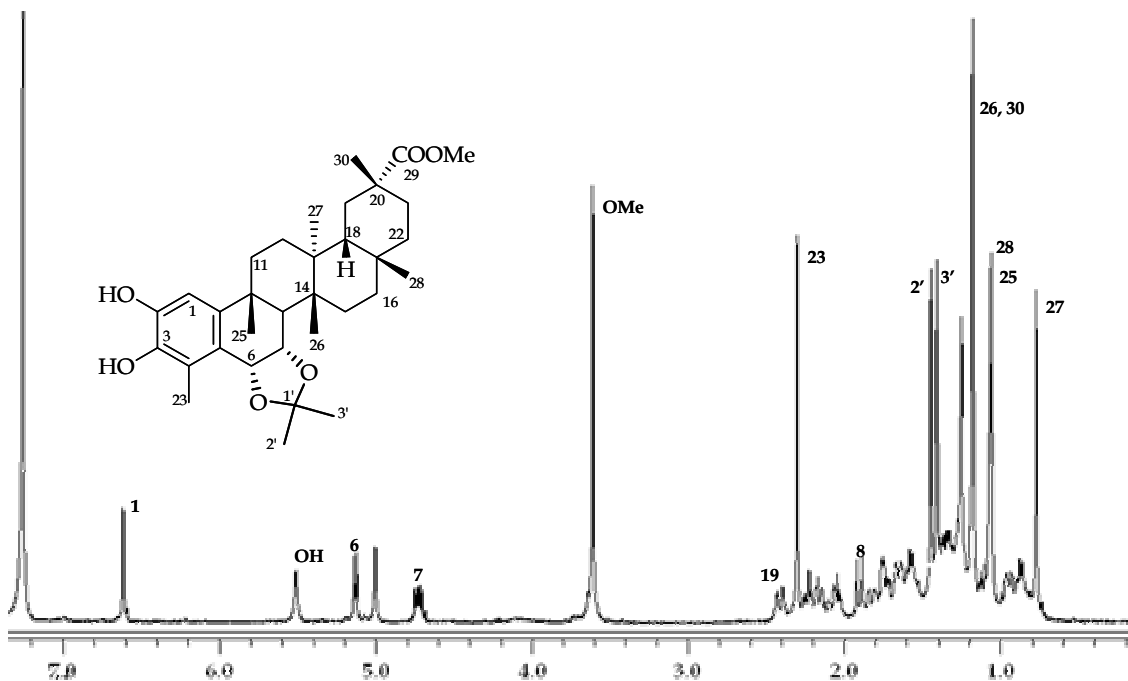


Figura 4.3.24. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **Fe4**.

En su espectro de RMN ^{13}C presenta señales que indican la existencia de un grupo metil éster a 51,6 y 179,4 δ , seis carbonos aromáticos entre 107,1-143,9 δ y un carbono cetálico a 107,1 δ .

Estos datos están de acuerdo con una estructura de nor-triterpenofenol derivado de la pristimerina³¹ y relacionado con el 6-deoxoblepharodol²⁰ (Fe10), siendo la diferencia más significativa en sus espectros de RMN ^1H la presencia de dos protones geminales a oxígeno (4,72 y 5,13 δ) y dos metilos adicionales (1,41 y 1,45 δ).

Esta estructura fue confirmada mediante el estudio de los experimentos bidimensionales de RMN. Así, la presencia de un grupo cetal se hizo evidente por la presencia en el experimento COSY (^1H - ^1H) de un sistema ABX formado por H6 a 5,13 δ (d, $J= 6,0$ Hz), H7 a 4,72 δ (dd, $J= 6,0, 11,2$ Hz) y H8 a 1,90 δ (d, $J= 11,2$ Hz) y las correlaciones observadas en el experimento HMBC (figura 4.3.25) entre los Me2' (1,41 δ_{H}) y Me3' (1,45 δ_{H}) con C1' (107,1 δ_{C}) y de H6 (5,13 δ_{H}) y H7 (4,72 δ_{H}) con C1' (107,1 δ_{C}), C8 (43,8 δ_{C}) y C5 (122,7 δ_{C}), lo que sitúa el grupo cetal entre C6 y C7.

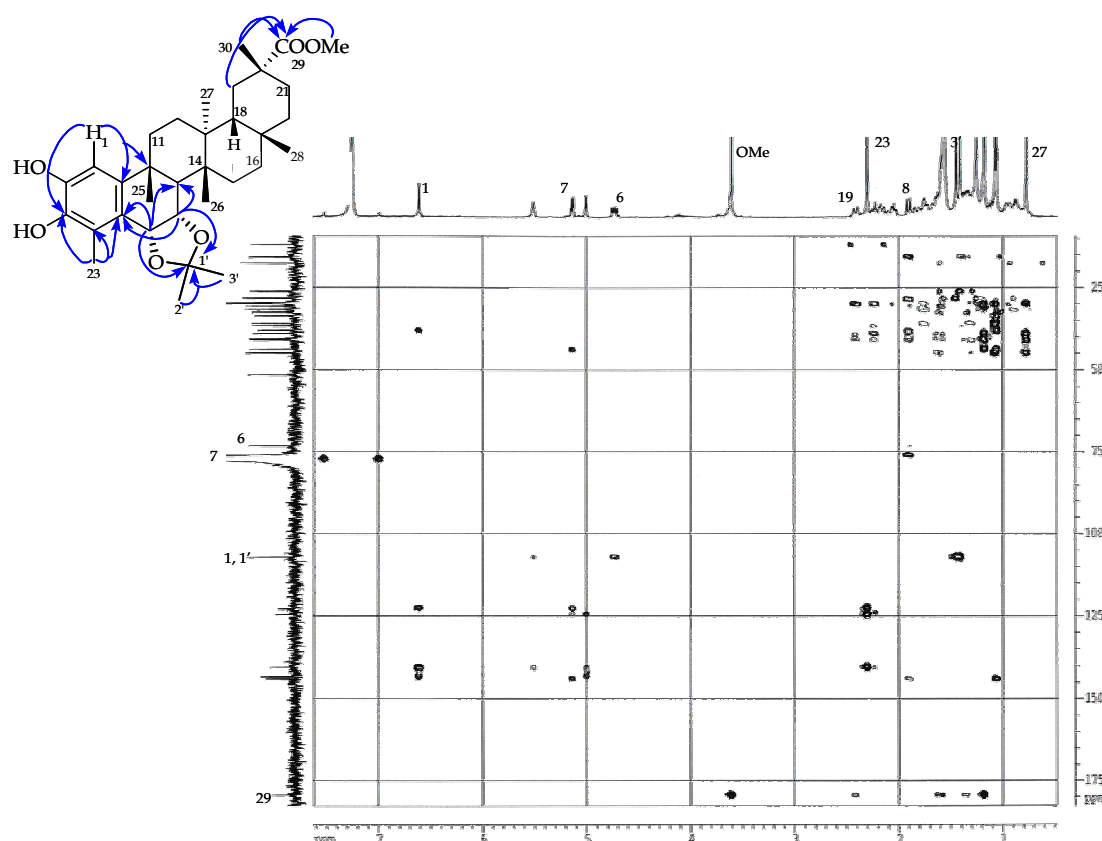
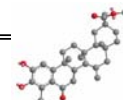


Figura 4.3.25. Experimento **HMBC** de Fe4.

La estereoquímica α para el grupo cetal se determinó mediante el estudio de sus constantes de acoplamiento y fue confirmado mediante un experimento ROESY (figura



4.3.26), en el que se observó correlación entre H6 y el Me25 y correlación de H7 con los Me25 y Me26, lo que confirmó una disposición β ecuatorial y β axial para H6 y H7, respectivamente.

Estos datos nos permitieron confirmar la estructura de **F4** como **6 α ,7 α -isopropilidendioxo-blepharodol**.

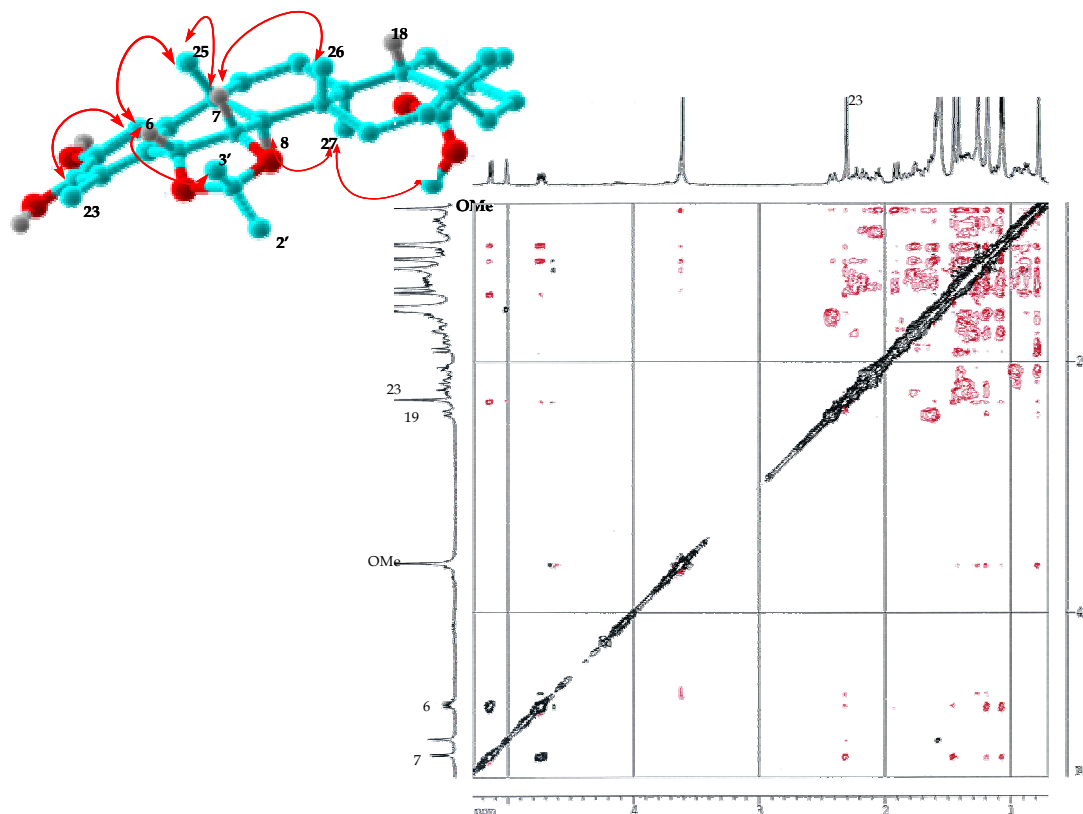


Figura 4.3.26. Experimento **ROESY** de **Fe4**.

Al comparar los triterpenofenoles derivados del netzahulcoyeno (**Fe1-Fe2**) con los de la pristimerina (**Fe3-Fe4**), se observa que las señales correspondientes a H19 α aparecen a campos más altos en los derivados del netzahulcoyeno (1,89 *versus* 2,33, en **Fe1** y **Fe3**, respectivamente), mientras que el Me27 y H16 α aparecen en estos fenoles a campos más bajos. Por otra parte, el desplazamiento del carbono del Me27 aparece a campos más altos (24,0 *versus* 18,2 δ_C) y el Me 30 a campos más bajos (13,8 en **Fe1** *versus* 33,0 δ_C en **Fe3**). Esto se debe a que el doble enlace presente en el anillo D de los fenoles derivados del netzahulcoyeno, provoca un cambio conformacional en el anillo E, quedando enfrentado el grupo carbonilo del grupo metil éster sobre C29 a H16 α y no a H19 α .

Tabla 4.3.1. Datos^a de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de los nor-triterpenofenoles aislados que resultaron nuevos en la bibliografía.

H	Fe1	Fe2	Fe3	Fe4
1	6,92 s	6,88 s	6,81 s	6,61 s
6			3,99 ddd (2,5, 6,2, 10,4)	5,13 d (6,0)
7	6,00 s	6,05 s	5,85 d (6,2)	4,72 dd (6,0, 11,2)
8				1,90 d (11,2)
11	1,94 dd (5,1, 13,4) 2,04 dd (3,4, 13,4)	1,92 2,05 dd (3,3, 12,5)	1,80, 2,05*	1,42, 2,23
12	1,33 dd (3,4, 13,8) 2,46 td (5,1, 13,8)	1,37 2,48 td (5,2, 13,6)	1,53*	1,43
15			1,40, 1,53*	1,35
16	1,43 2,58 d (16,8)	1,36 2,63 d (16,5)	1,82	1,33, 1,65
18	1,48	1,43	1,49 d (8,0)	1,60*
19	1,50 1,89 d (10,9)	1,45, 1,90	1,63 dd (8,0, 16,0) 2,33 d (16,0)	1,60* 2,40 d (12,4)
21	4,20 dd (5,4, 11,6)	1,39, 1,61	2,05*	1,68, 2,06*
22	1,55	1,55, 1,70	0,99, 2,01	0,98, 2,06*
23	2,73 s	2,74 s	2,18 s	2,30 s
25	1,37 s	1,35 s	1,45 s	1,06 s
26	1,72 s	1,71 s	1,17 s	1,18 s
27	0,87 s	0,74 s	0,52 s	0,78 s
28	1,23 s	1,19 s	1,05 s	1,07 s
30	1,21 s	1,20 s	1,17 s	1,18 s

^a Datos en δ basados en experimentos COSY y HSQC, en el caso que no se indica multiplicidad, son señales solapadas.

^b J entre paréntesis en Hz.

* Señales solapadas.

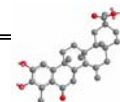


Tabla 4.3.2. Datos^a de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de los nor-triterpenofenoles aislados que resultaron nuevos en la bibliografía.

C	Fe1	Fe2	Fe3	Fe4
1	110,2 d	109,7 d	109,2 d	107,1 s
2	151,6 s	147,8 s	142,3 s	143,3 s
3	144,7 s	140,7 s	140,3 s	140,3 s
4	134,2 s	126,1 s	119,8 s	124,5 s
5	122,0 s	122,1 s	128,1 s	122,7 s
6	186,1 s	186,9 s	32,8 d	73,2 d
7	128,8 d	128,6 d	121,7 d	76,1 d
8	161,5 s	162,0 s	150,1 s	43,8 d
9	41,2 s	42,4 s	37,2 s	38,1 s
10	151,9 s	147,8 s	142,0 s	143,9 s
11	37,4 t	37,6 t	35,7 t	30,6 t
12	35,7 t	35,6 t	30,4 t	29,9 t
13	35,2 s	41,7 s	37,7 s	39,0 s
14	134,9 s	134,1 s	43,8 s	41,0 c
15	127,5 s	128,0 s	28,9 t	29,7 t
16	38,9 t	37,6 t	36,7 t	36,6 t
17	42,4 s	33,9 s	29,7 s	29,7 s
18	43,3 d	43,9 d	44,5 d	44,9 d
19	34,3 t	26,6 t	30,8 t	30,8 t
20	48,0 s	42,7 s	40,5 s	40,7 s
21	68,1 d	36,2 t	30,0 t	30,0 t
22	43,1 t	38,2 t	34,8 t	36,0 t
23	15,1 c	14,0 c	11,2 c	11,9 c
25	27,9 c	28,1 c	36,8 c	28,4 c
26	21,7 c	21,7 c	22,3 c	15,7 c
27	24,0 c	23,7 c	18,2 c	17,6 c
28	31,3 c	31,6 c	31,6 c	32,5 c
29	178,9 s	179,4 s	179,3 s	179,4 s
30	13,8 c	19,8 c	33,0 c	33,6 s

^a Los datos en δ , están basados en experimentos DEPT y HSQC.

Celastroloide DT1

El metabolito que hemos denominado **DT1** fue aislado como un sólido amorfo de color amarillo y presentó una actividad óptica $[\alpha]^{20}_D +60,8^\circ$ (c 0,63, CHCl_3). Su espectro de espectrometría de masas (FAB) presentó un ión molecular $[M+1]^+$ a 941 m/z , que está de acuerdo con una fórmula molecular $\text{C}_{60}\text{H}_{76}\text{O}_9$, basada en el análisis de sus espectros de masas de alta resolución y RMN ^{13}C . Su espectro de IR mostró bandas de absorción de grupo hidroxilo (3442 cm^{-1}), carboxilo (1728 cm^{-1}) y carbonilo (1669 cm^{-1}).

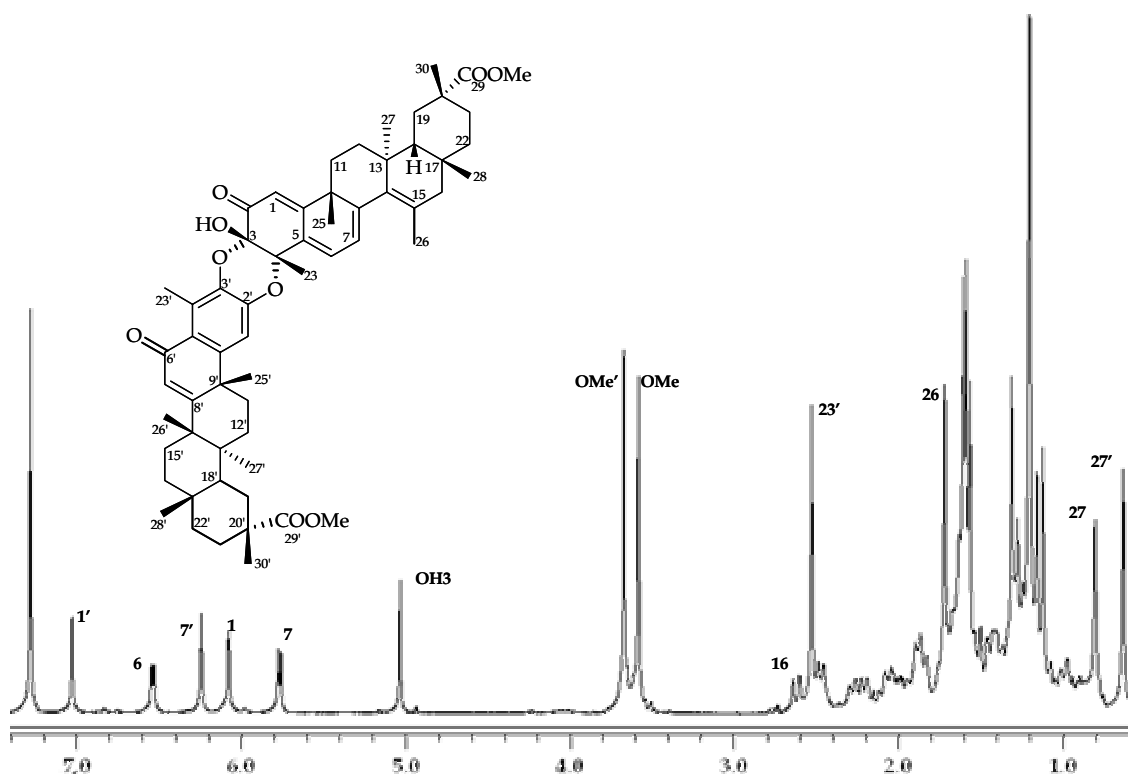


Figura 4.3.27. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **DT1**.

Su espectro de RMN ^1H (figura 4.3.27) presentó dos singuletes a 6,22 y 7,01 δ , asignables a un protón en posición α a un sistema α,β -insaturado ($\text{H}7'$) y a un protón aromático ($\text{H}1'$), característicos de una subunidad de nor-triterpenofenol, junto con un sistema AMX de tres protones vinílicos a 6,06 δ (s ancho), 6,54 δ (dd, $J=1,5, 6,4$ Hz) y 5,74 δ (1H, d, $J=6,4$ Hz), asignables a los protones $\text{H}1$, $\text{H}6$ y $\text{H}7$, característicos de un sistema triterpenoquinónico. Así mismo, se observaron diez metilos angulares (0,62, 0,78, 1,10, 1,13, 1,18 (9H), 1,29, 1,57, 1,59 δ), un metilo sobre anillo aromático a 2,51

como singuletes a 3,56 y 3,65 δ . Estos datos y el análisis de su espectro de RMN ^{13}C y experimentos DEPT, que presentó señales correspondientes a 60 carbonos, sugieren que **DT1** es un dímero triterpénico formado por una subunidad quinónica tipo netzahualcoyeno y otra fenólica tipo 6-oxopristimerol.

El análisis de los experimentos de RMN bidimensional, COSY, ROESY, HSQC y HMBC (tabla 4.3.3), nos permitieron la asignación de las señales de la subunidad quinónica y aromática, incluyendo las señales de C3 (91,1 δ_{C}) y C4 (78,7 δ_{C}) en el sistema 3-hidroxi-4-metil-3,4-dioxo de la unidad quinónica y de los carbonos C2' (144,2 δ_{C}) y C3' (138,3 δ_{C}) de la unidad fenólica. Los datos de C3 y C4 junto con los desplazamientos de H6 (6,54 δ_{H}) y C23 (22,3 δ_{C}) sugieren una orientación *cis* del enlace 3,4-dioxo.

Al no observarse efecto ROE entre H6 y el M23' y con el objeto de determinar la regiosustitución de las subunidades, se preparó el derivado metilado de **DT1** con carbonato potásico y sulfato de dimetilo, obteniéndose **DT1Me**. El experimento ROESY de este derivado presentó efecto ROE entre Me23' a 2,62 δ y el OMe en C3 a 3,64 δ , lo que corroboró el enlace [3-O-3', 4-O-2'] entre las dos subunidades triterpénicas (figura 4.3.28).

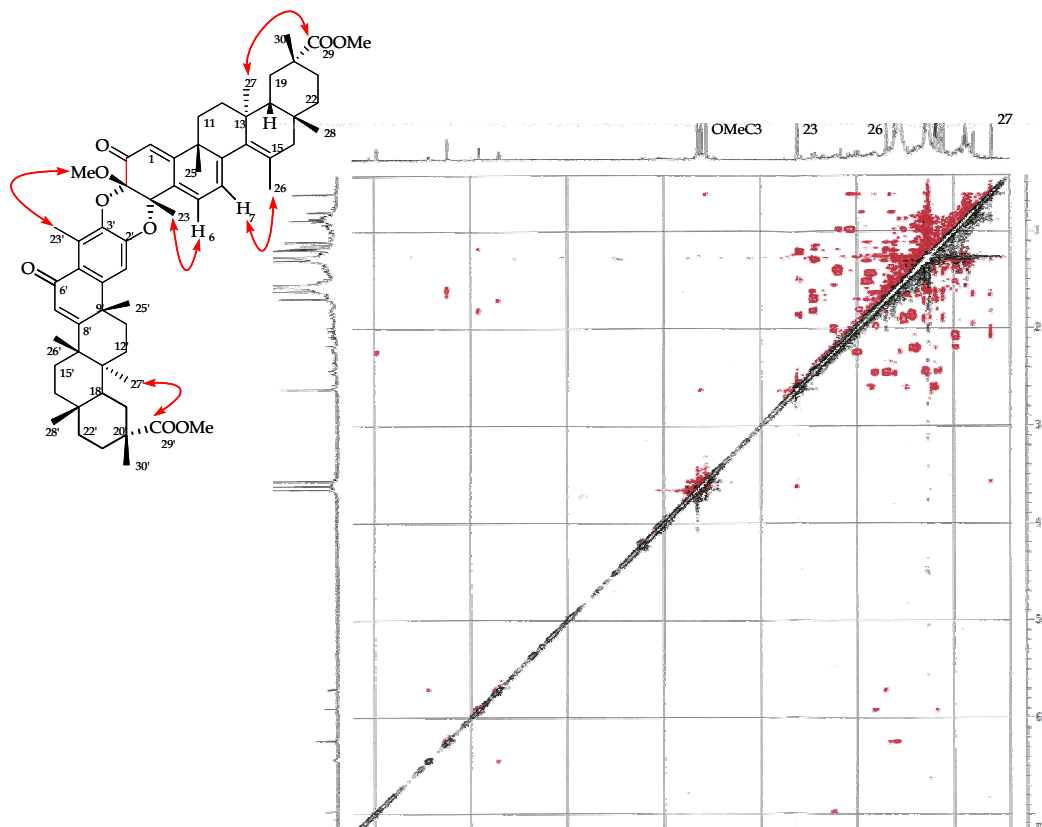
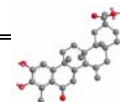


Figura 4.3.28. Experimento **ROESY** de **DT1Me**.



La configuración absoluta de **DT1** se determinó como 3*S*, 4*S* mediante el análisis de su espectro de dicroísmo circular (figura 4.3.29), que mostró una curva bisignada con un efecto Cotton positivo a 303,0 nm ($\Delta\epsilon = +24,4$) y un segundo efecto Cotton negativo a 251,0 nm ($\Delta\epsilon = -24,7$).

Estos datos nos permitieron establecer la estructura y configuración absoluta de **DT1**, que por su relación estructural con el anteriormente descrito netzaescutionina αA^{38} nos llevó a proponer el nombre de netzaescutidina αA para **DT1**. Cabe destacar que este es el primer ejemplo existente en la bibliografía de un dímero formada por unidades de netzahulcoyeno y 6-oxopristimerol.

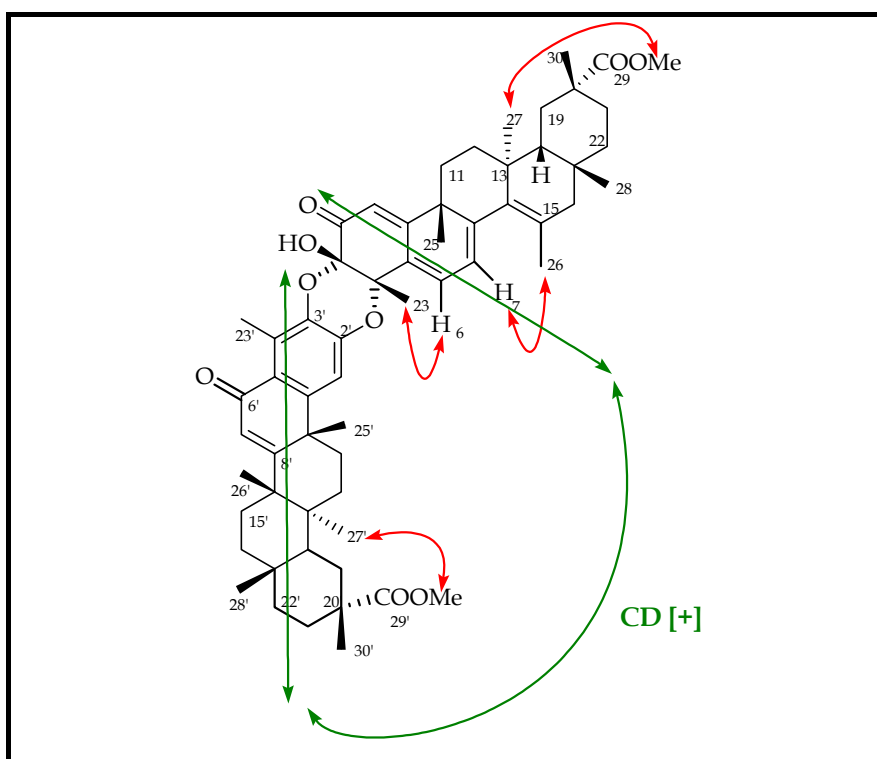


Figura 4.3.29. Efectos **ROE** observados en el experimento ROESY y dicroísmo circular (DC) de **DT1**.

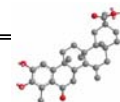
Tabla 4.3.3. Datos de RMN ^1H , RMN ^{13}C y correlaciones HMBC de **DT1** (Netzaescutidina αA).

posición	unidad quinónica			unidad fenólica		
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	HMBC
1	6,06 d (1,2)	115,3 d	3, 5, 9, 10*	7,01 s	110,3 d	2', 3', 10', 5', 9'
2		189,6 s			144,2 s	
3	5,02 s (OH)	91,1 s			138,3 s	
4		78,7 s			129,1 s	
5		131,0 s			123,2 s	
6	6,54 dd (1,5, 6,4)	127,3 d	4, 5*, 8, 10		187,0 s	
7	5,74 d (6,4)	119,8 d	5, 6*, 9	6,22 s	126,0 d	5', 8', 9', 14'
8		151,3 s			170,8 s	
9		44,0 s			39,8 s	
10		169,7 s			151,4 s	
11	0,98, 2,10	34,7 t		1,45, 1,63	33,7 t	
12	1,30, 2,45	35,3 t		1,82	29,7 t	
13		42,4 s			38,7 s	
14		134,4 s			44,5 s	
15		128,5 s			28,5 t	
16	1,20 2,62 d (16,5)	37,7 t	14, 15*, 17*, 26, 28	1,92	36,2 t	
17		41,9 s			30,3 s	
18	1,60	43,7 d		1,48	44,0 d	
19	1,33, 2,18	29,4 t		1,73 2,45 d (10,1)	30,8 t	13', 17', 18', 20', 21'
20		33,4 s			40,3 s	
21	2,01, 2,26	34,0 t		1,40	29,5 t	
22	1,53	36,1 t		1,28, 1,61	35,8 t	
23	1,59 s	22,7 c	3, 5, 4*	2,51 s	13,1 c	3', 4', 5'
25	1,18 s	28,3 c	8, 10	1,57 s	37,5 c	8', 10', 11'
26	1,70 s	22,1 c	14, 15*, 16	1,29 s	20,6 c	8', 13', 14', 15'
27	0,78 s	23,8 c	12, 13*, 14	0,62 s	18,3 c	13', 14'
28	1,13 s	31,4 c	16, 18	1,10 s	31,3 c	
29		179,2 s			179,0 s	
30	1,18 s	19,5 c	29	1,18 s	32,7 c	29'
OMe	3,56 s		29	3,65 s		29'

^a δ , CDCl_3 , 400 MHz, valores de J en Hz entre paréntesis. Datos basados en experimentos COSY y HSQC, en el caso que no se indica multiplicidad, son señales solapadas.

^b δ , CDCl_3 , 75 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

* acoplamiento a dos enlaces.

**Celastroloide DT2**

El metabolito que hemos denominado **DT2** fue aislado como un sólido amorfo de color amarillo con un $[\alpha]_D^{20} -14,4^\circ$ (c 0,56, CHCl_3). El espectro de masas (FAB) presentó un ión molecular $[M+1]^+$ a 941 m/z que está de acuerdo con una fórmula molecular $\text{C}_{60}\text{H}_{76}\text{O}_9$, basada en el análisis de sus espectros de masas de alta resolución y RMN ^{13}C .

El estudio de sus datos espectroscópicos de IR, UV, RMN ^1H y ^{13}C , nos indicó que **DT2** es un dímero triterpénico formado por una subunidad quinónica tipo netzahualcoyeno y otra fenólica tipo 6-oxopristimerol, relacionado con **DT1** y cuya diferencia radica en la estereoquímica del enlace diéter y en la regiosustitución de ambas subunidades.

El análisis de los experimentos COSY, HSQC y HMBC permitió la asignación de las señales de ^1H y ^{13}C , incluyendo las correspondientes a los carbonos C3 (90,8 δ) y C4 (78,1 δ) que forman parte del puente 3-hidroxi-4-metil-3,4-dioxo de la unidad quinónica.

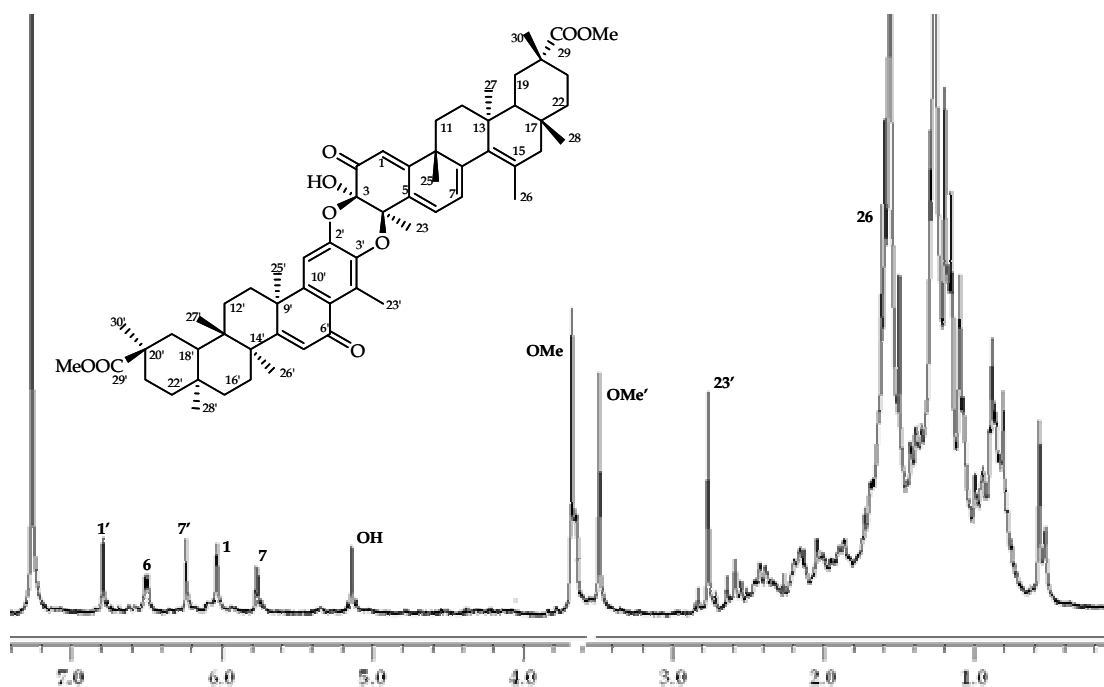


Figura 4.3.30. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **DT2**.

En el experimento ROESY se observó efecto ROE entre H6 (6,49 δ) y Me23' (2,76 δ), lo que indicó una unión [3-O-2', 4-O-3'] entre las dos subunidades. La pequeña cantidad en que se aisló este compuesto no nos permitió determinar la configuración absoluta del mismo mediante dicroísmo circular. Sin embargo, basándonos en los

estudios previos de compuestos relacionados⁴ y los desplazamientos químicos de H6 (6,49 δ_H), H23' (2,76 δ_H), C4 (78,1 δ_C) y C23 (23,7 δ_C), nos permitieron determinar que la unión del enlace 3,4-dioxo posee una orientación β .

Estos datos nos permiten determinar la estructura de **DT2**, para la que proponemos el nombre de **netzaescutidina β B**.

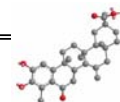
Tabla 4.3.4. Datos de RMN ¹H, RMN ¹³C y correlaciones HMBC de **DT2**.

posición	unidad quinónica			unidad fenólica		
	δ_H^a	δ_C^b	HMBC	δ_H^a	δ_C^b	HMBC
1	6,03 d (1,2)	114,8 d	3, 5, 9	6,79 s	111,0 d	2', 3', 5', 9'
2		188,9 s			144,9 s	
3	5,14 s (OH)	90,8 s	2, 3*, 4		137,5 s	
4		78,1 s			127,8 s	
5		131,6 s			123,4 s	
6	6,49 dd (1,2, 6,6)	128,7 d	4, 8, 10		187,3 s	
7	5,76 d (6,6)	119,9 d	5, 9, 14	6,23 s	125,8 d	5', 9', 14'
8		153,4 s			171,0 s	
9		44,7 s			39,7 s	
10		169,5 s			150,8 s	
11	0,96, 2,00	37,2 t		1,39, 1,62	33,8 t	
12	1,24, 2,46	35,2 t		1,90	29,6 t	
13		43,1 s			38,6 s	
14		133,8 s			44,2 s	
15		128,8 s			28,3 t	
16	1,18 2,64 d (16,5)	37,5 t	14, 15*, 17*, 26, 28	1,88	36,1 t	
17		33,7 s			30,4 s	
18	1,57	43,9 d		1,49	44,1 d	
19	1,42, 2,18	29,5 t		1,63, 2,40	30,0 t	
20		42,5 s			40,2 s	
21	1,50, 2,15	33,6 t			29,9 t	
22	1,53	35,9 t		1,30, 1,59	34,7 t	
23	1,62 s	23,7 c	3, 4*, 5	2,76 s	13,0 c	3', 4*', 5'
25	1,29 s	28,4 c	8, 10	1,47 s	37,6 c	8', 10'
26	1,59 s	21,8 c	14, 15*	1,27 s	20,5 c	8'
27	0,81 s	23,6 c	12, 13*, 14	0,57 s	18,2 c	12', 13**, 18'
28	1,14 s	31,2 c	16, 17*, 22	1,08 s	31,4 c	16', 17**, 18', 22'
29		179,0 s			178,8 s	
30	1,19 s	19,5 c	29	1,16 s	32,5 c	29'
OMe	3,67 s	51,5 c	29	3,48 s	51,1 c	29'

^a δ , CDCl₃, 400 MHz, valores de *J* en Hz entre paréntesis. Datos basados en experimentos COSY y HSQC, en el caso que no se indica multiplicidad, son señales solapadas.

^b δ , CDCl₃, 75 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

* acoplamiento a dos enlaces.

**Celastroloide DT3**

El metabolito que hemos denominado **DT3** se aisló como un sólido amorfo de color amarillo y presentó una actividad óptica $[\alpha]^{20}_D +128,5^\circ$ (c 0,20, CHCl_3). En espectrometría de masas (FAB) se obtuvo un ión molecular $[\text{M}+1]^+$ a 945 m/z , que está de acuerdo con una fórmula molecular $\text{C}_{60}\text{H}_{80}\text{O}_9$, basada en el análisis de sus espectros de masas de alta resolución y RMN ^{13}C . Su espectro de IR mostró bandas de absorción de grupo hidroxilo (3443 cm^{-1}), carboxilo (1731 cm^{-1}) y carbonilo (1647 cm^{-1}).

Su espectro de RMN ^1H (figura 4.3.31) presentó dos singuletes a 6,25 y 6,82 δ , asignables a un protón en posición α a un sistema α,β -insaturado ($\text{H}7'$) y a un protón aromático ($\text{H}1'$), junto con dos protones vinílicos a 5,98 δ (s) y 6,28 δ (s ancho), asignables a los protones $\text{H}1$ y $\text{H}6$. Así mismo, se observaron señales correspondientes a once metilos angulares (0,54, 0,78, 0,98, 1,07 (6H), 1,09, 1,17, 1,18, 1,28, 1,42, 1,49 δ), un metilo sobre anillo aromático a 2,71 δ y señales características de dos grupos metoxilos como singuletes a 3,54 y 3,64 δ . Estos datos y el análisis de su espectro de RMN ^{13}C , sugieren que **DT3** es un dímero triterpénico con una unión A-A, formado por dos unidades derivadas de la pristimerina, una subunidad quinónica tipo 7,8-dihidropristimerina y otra fenólica tipo 6-oxopristimerol.

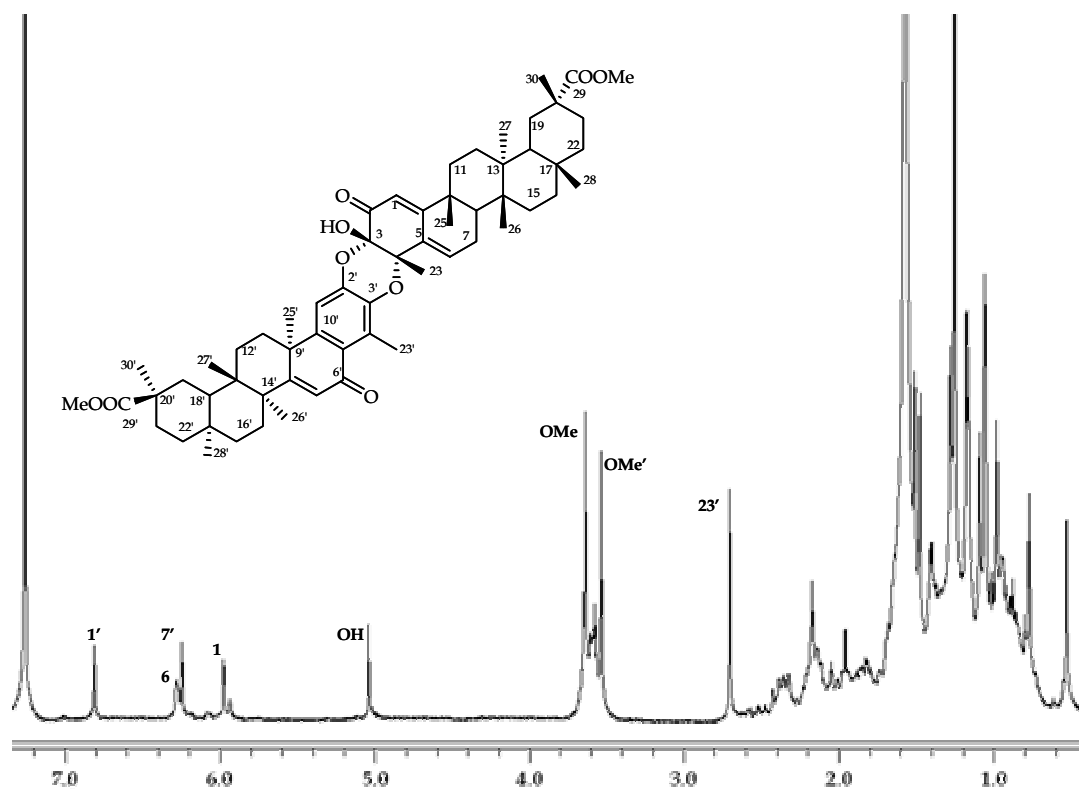


Figura 4.3.31. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **DT3**.

El análisis de los experimentos COSY, HSQC y HMBC (tabla 4.3.6) permitió la asignación de las señales de ambas subunidades, incluyendo las correspondientes a los carbonos C3 (91,4 δ) y C4 (79,1 δ) que forman parte del puente 3-hidroxi-4-metil-3,4-dioxo de la unidad quinónica.

La regiosustitución de ambas subunidades se determinó mediante un experimento ROESY, en el cual se observó efecto ROE entre H6 a 6,28 δ y el Me23'a 2,71 δ (figura 4.3.32), lo que indicó una unión [3-O-2', 4-O-3']. La configuración absoluta se determinó mediante dicroísmo circular, que mostró una curva bisignada tipo Davidoff, con un primer efecto Cotton positivo a 285,2 nm ($\Delta\epsilon = +6,1$) y un segundo efecto negativo a 253,4 nm ($\Delta\epsilon = -3,5$), que corresponde a la interacción de la enona y el sistema aromático, lo que está de acuerdo con una configuración absoluta 3*S*,4*S*.

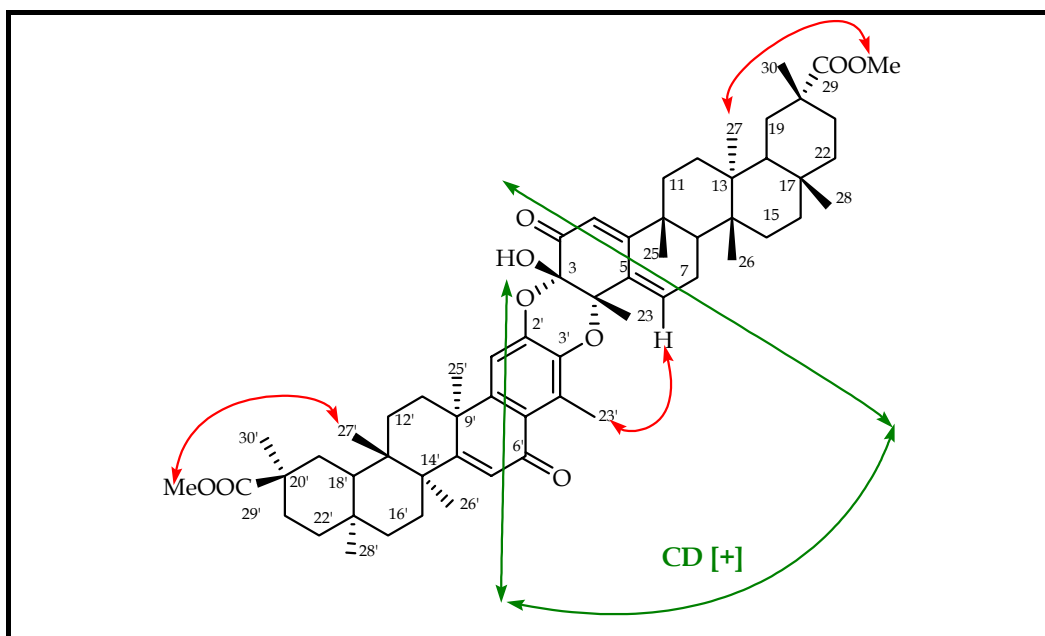


Figura 4.3.32. Efectos **ROE** observados en el experimento ROESY y dicroísmo circular (DC) de **DT3**.

Una vez consultada la bibliografía química observamos que la estructura propuesta para **DT3** ya se había descrito con el nombre de 7,8-dihidroescutidina α B⁴⁰, aislado de *Maytenus scutioides*. Sin embargo, los datos espectroscópicos de **DT3** y de 7,8-dihidroescutidina α B (tabla 4.3.5) presentaban algunas diferencias.

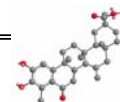
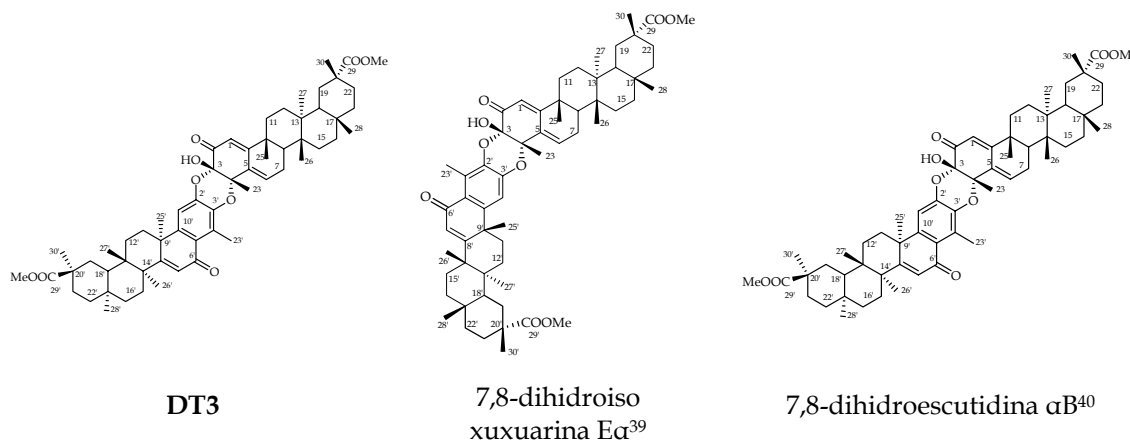


Tabla 4.3.5 Datos de RMN de ^1H de 7,8-dihidroescutidina αB , 7,8-dihidroisoxuxuarina $\text{E}\alpha$ y DT3.



Posición	DT3	7,8-dihidro isoxuxuarina $\text{E}\alpha$	7,8-dihidro escutidin αB
		RMN ^1H	
1	5,98 s	5,98 s	5,97 s
6	6,28 sa	6,33 sa	6,32 sa
7	2,18 m	2,14 m	2,06, 2,21 m
23	1,42 s	1,48 s	1,47 s
OMe	3,64 s	3,65 s	3,64 s
1'	6,82 s	6,97 s	6,96 s
6'
7'	6,25 s	6,23 s	6,22 s
23'	2,71 s	2,53 s	2,52 s
OMe	3,54	3,55 s	3,55 s

Esto nos llevó a plantearnos que la estructura propuesta para 7,8-dihidroescutidina αB , compuesto aislado en nuestro grupo de trabajo de *Maytenus scutioides*, en realidad debería ser 7,8-dihidroisoxuxuarina $\text{E}\alpha$, ya que sus datos físicos y espectroscópicos son coincidentes con los descritos en la bibliografía por Shirota y *col.*³⁹ para este compuesto.

Con el objeto de confirmar dicha propuesta y dado que disponíamos de una muestra del dímero aislado de *M. scutioides*, decidimos preparar el derivado metilado, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito para DT1. El experimento ROESY realizado a este derivado, presentó como correlación mas significativa el efecto ROE entre H6 y Me23', lo que indica que la estructura del dímero anteriormente aislado corresponde con el 7,8-dihidroisoxuxuarina $\text{E}\alpha$. Estos datos confirman la estructura de DT3 como 7,8-dihidroescutidina αB , siendo la primera vez que se describe este dímero.

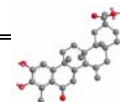
Tabla 4.3.6. Datos de RMN ^1H , RMN ^{13}C y correlaciones HMBC de **DT3** (7,8-dihidroescutidina αB).

posición	unidad quinónica			unidad fenólica		
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	HMBC
1	5,98 s	112,4 d	3, 5	6,82 s	111,1 d	2', 3', 5', 9'
2		191,2 s			144,5 s	
3	5,04 s (OH)	91,4 s	3*, 4		137,7 s	
4		79,1 s			127,2 s	
5		132,2 s			124,3 s	
6	6,28 s	134,4 d			188,2 s	
7	2,18	24,0 t		6,25 s	125,9 d	5', 9', 14'
8	1,81	41,6 d			171,6 s	
9		37,4 s			39,7 s	
10		170,6 s			150,2 s	
11	0,98, 2,38	30,6 t		1,94, 2,15	33,9 t	
12		29,7 t			29,5 t	
13		38,6 s			38,7 s	
14		39,8 s			44,5 s	
15		28,3 t			28,3 t	
16	1,30, 2,00	35,8 t		1,48, 1,51	36,2 t	
17		30,3 s			30,6 s	
18	1,57	44,4 d		1,57	44,1 d	
19	1,60, 2,39	30,3 t		1,52, 2,35	31,5 t	
20		40,2 s			40,3 s	
21	2,20	29,9 t		2,20	29,9 t	
22	1,62, 1,65	35,8 t		0,95, 2,05	34,5 t	
23	1,42 s	22,6 c	3, 4*, 5	2,71 s	12,7 c	3', 4', 5'
25	1,07 s	21,8 c	8, 9*, 10	1,49 s	37,3 c	8', 9', 10', 11'
26	0,98 s	15,7 c	8, 13, 14*, 15	1,28 s	20,6 c	8', 13', 14', 15'
27	0,78 s	16,7 c	12, 13*, 14	0,54 s	18,0 c	12', 13', 14', 18'
28	1,07 s	31,4 c	18, 22	1,09 s	31,3 c	18', 22'
29		178,8 s			178,5 s	
30	1,17 s	32,0 c	19, 20*, 21, 29	1,18 s	32,4 c	19', 20', 21', 29'
OMe	3,64 s	51,3 c	29	3,54 s	51,3 c	29'

^a δ , CDCl_3 , 400 MHz, valores de J en Hz entre paréntesis. Datos basados en experimentos COSY y HSQC, en el caso que no se indica multiplicidad, son señales solapadas.

^b δ , CDCl_3 , 75 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

* acoplamiento a dos enlaces.

**Celastroloide DT4**

El metabolito **DT4**, aislado como un sólido amorfo de color amarillo, presentó una actividad óptica $[\alpha]^{20}_D +73,5^\circ$ (c 0,40, CHCl_3) y un ión molecular $[\text{M}+1]^+$ a 961 m/z (FAB), lo que está de acuerdo con una fórmula molecular $\text{C}_{60}\text{H}_{80}\text{O}_{10}$, basada en el análisis de sus espectros de masas de alta resolución y RMN ^{13}C .

El estudio de sus datos espectroscópicos de IR, UV, RMN ^1H y ^{13}C , nos indicó que **DT4** es un dímero triterpénico con una unión A-A muy relacionado con **DT3**, siendo la única diferencia la presencia de un alcohol secundario en **DT4**. Así, en sus espectros de RMN ^1H (figura 4.3.33) y ^{13}C , se observó una señal a 4,45 δ_{H} (t, $J=7,5$ Hz) y un carbono metínico unido a oxígeno a 68,2 δ_{C} , así como la desaparición de las señales correspondientes a un metileno presente en **DT3** (2,18 δ_{H} , 24,0 δ_{C}).

Estos datos están de acuerdo con un dímero triterpénico con unión A-A formado por una subunidad quinónica tipo 7-hidroxi-7,8-dihidropristimerina y otra fenólica tipo 6-oxopristimerol. El estudio de los experimentos de RMN bidimensionales, tanto homonucleares (COSY y ROESY) como heteronucleares (HSQC y HMBC), nos permitió establecer su estructura.

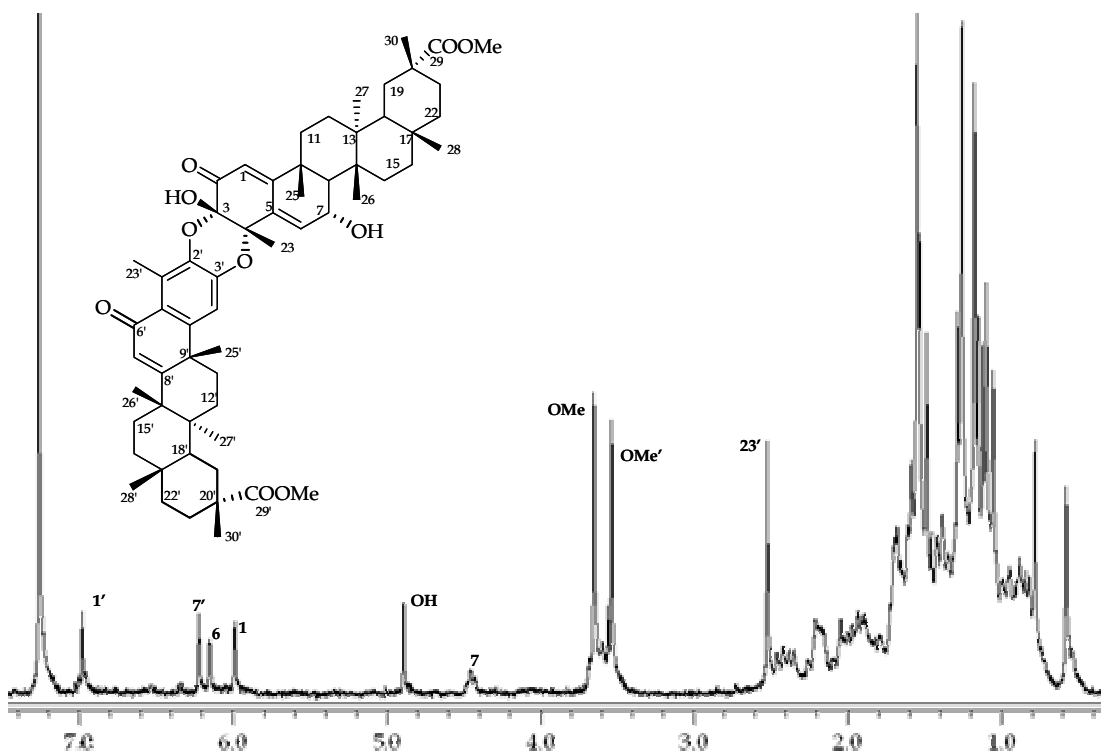


Figura 4.3.33. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **DT4**.

Así, el experimento HMBC nos permitió establecer la posición del alcohol secundario adicional sobre C7, al observar correlaciones del protón a 4,45 δ_H (H7) con 51,4 δ_C (C8), 40,8 δ_C (C9), 41,6 δ_C (C14) y 131,4 δ_C (C5). Por otra lado, la estereoquímica β de H7 se determinó por el efecto ROE observado entre H7 (4,45 δ) y el Me26 (1,16 δ) en el experimento ROESY.

La configuración absoluta se estableció mediante dicroísmo circular, que mostró una curva bisignada tipo Davidoff, con un primer efecto Cotton positivo a 290,4 nm ($\Delta\epsilon = +3,6$) y un segundo efecto negativo a 251,2 nm ($\Delta\epsilon = -2,2$), que corresponde a la interacción de la enona y el sistema aromático, lo que está de acuerdo con una configuración absoluta 3*S*,4*S*.

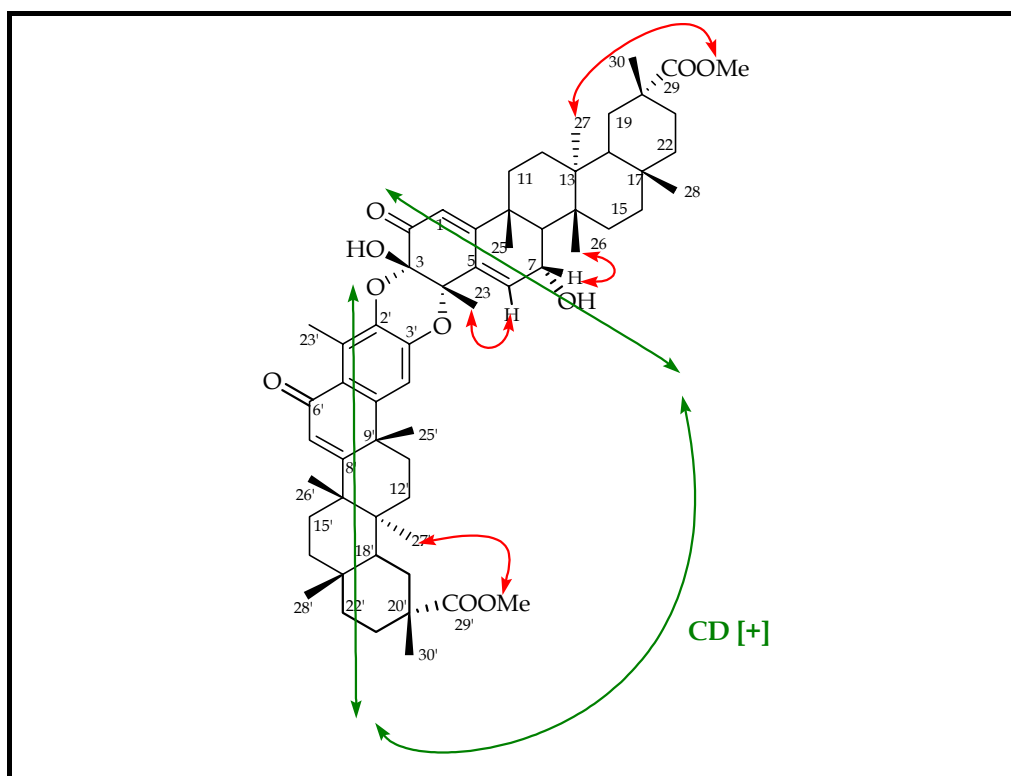


Figura 4.3.34. Efectos **ROE** observados en el experimento ROESY y dicroísmo circular (DC) de DT4.

Estos datos nos permiten concluir que DT4 es un dímero triterpénico que presenta la misma regiosustitución entre las subunidades triterpénicas y la misma configuración absoluta que 7,8-dihidroisoxuxuarina E α ³⁹, por lo que proponemos el nombre de 7 α -hidroxi-7,8-dihidroisoxuxuarina E α para este compuesto.

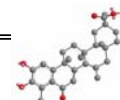


Tabla 4.3.7. Datos de RMN ^1H , RMN ^{13}C y correlaciones HMBC de **DT4** (7 α -hidroxi-7,8-dihidroisoxuxarina E α).

posición	unidad quinónica			unidad fenólica		
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	HMBC	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	HMBC
1	5,99 s	113,7 d	3, 5, 9	6,97 s	110,2 d	2', 3*, 5', 9'
2		190,2 s			144,5 s	
3	4,90 s (OH)	91,1 s	3*, 4		137,8 s	
4		78,9 s			129,2 s	
5		134,4 s			123,2 s	
6	6,15 s	135,7 d	4, 10		187,0 s	
7	4,45 t (7,5)	68,2 d		6,23 s	126,0 d	5', 9', 14'
8	1,68	51,4 d			170,9 s	
9		40,8 s			39,9 s	
10		168,4 s			151,8 s	
11	1,40, 1,90	36,8 t		1,96, 2,24	33,9 t	
12	1,64	29,1 t		1,79	29,6 t	
13		39,4 s			38,7 s	
14		41,6 s			44,4 s	
15		30,8 t		1,54	28,3 t	
16		36,1 t		1,49, 1,61	36,2 t	
17		29,8 s			30,1 s	
18	1,56	44,6 d		1,58	44,7 d	
19	1,60 2,35 d (10,8)	30,3 t		1,41 2,44 d (11,0)	30,8 t	
20		40,4 s			40,4 s	
21		28,6 t			28,6 t	
22	1,24, 1,58	35,1 t		0,98, 2,07	34,8 t	
23	1,49 s	22,1 c	3, 4*, 5	2,53 s	13,1 c	3', 4*, 5'
25	1,13 s	23,7 c	8, 9*, 11	1,53 s	37,4 c	8', 9*, 10', 11'
26	1,16 s	16,2 c	8, 14*	1,29 s	20,6 c	8', 13', 14*, 15'
27	0,78 s	17,0 c		0,58 s	18,0 c	13', 14'
28	1,05 s	31,5 c		1,10 s	31,4 c	
29		178,9 s			178,9 s	
30	1,18 s	32,3 c	29	1,18 s	32,3 c	29'
OMe	3,65 s			3,53 s		

^a δ , CDCl_3 , 400 MHz, valores de J en Hz entre paréntesis. Datos basados en experimentos COSY y HSQC, en el caso que no se indica multiplicidad, son señales solapadas.

^b δ , CDCl_3 , 75 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

* acoplamiento a dos enlaces.

4.3.3. Parte experimental

4.3.3.1. Separación cromatográfica de los celastroloides de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*

En la separación cromatográfica realizada al extracto de *n*-hexano-etér dietílico (1:1) de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*, se aislaron cinco nor-triterpenometilénquinonas (**Q1-Q6**), diez nor-triterpenometilénfenoles (**Fe1-Fe10**), dieciséis dímeros triterpénicos (**DT1-D16**) y un trímero (**TT1**). De estos metabolitos, ocho resultaron nuevos en la bibliografía química, cuatro nor-triterpenometilénfenoles (**Fe1-Fe4**) y cuatro dímeros triterpénicos (**DT1-DT4**). El resto de los metabolitos fueron identificados por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los existentes en la bibliografía.

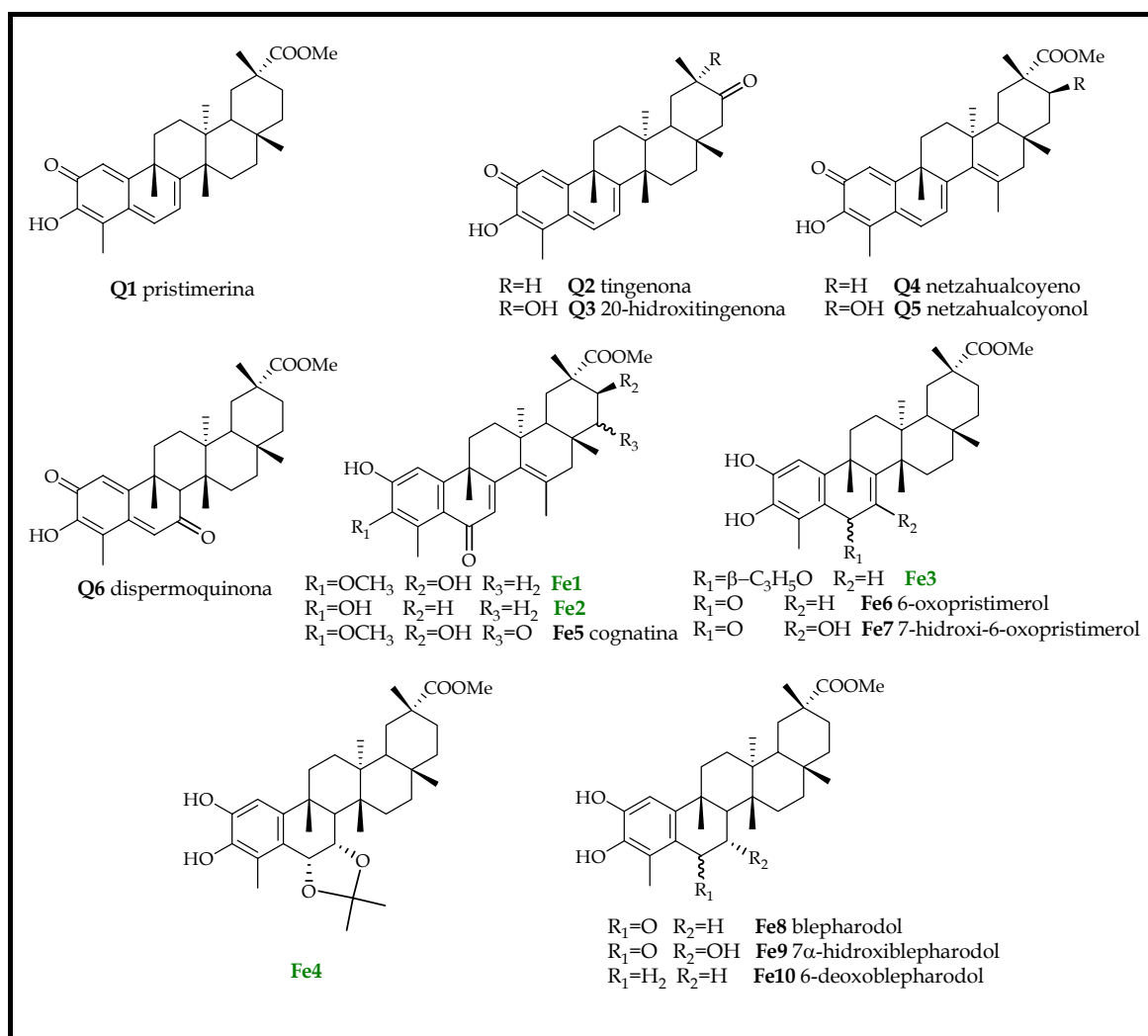


Figura 4.3.35. nor-Triterpenometilénquinonas y fenoles aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*. En verde se señalan los que resultaron nuevos en la bibliografía química.

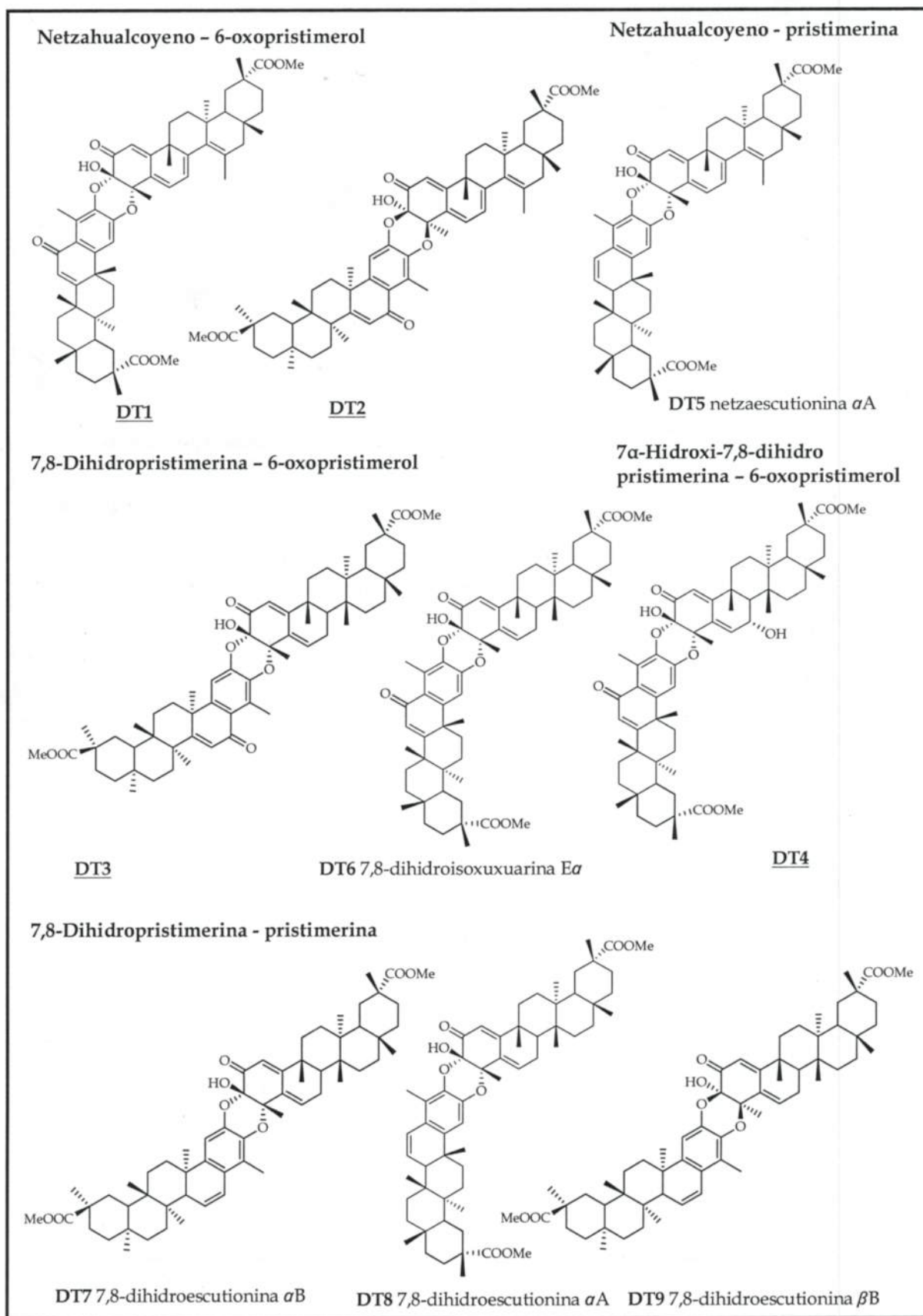
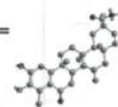


Figura 4.336. Dímeros y trímero triterpénicos aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*. Se subrayan los que resultaron nuevos en la bibliografía química.

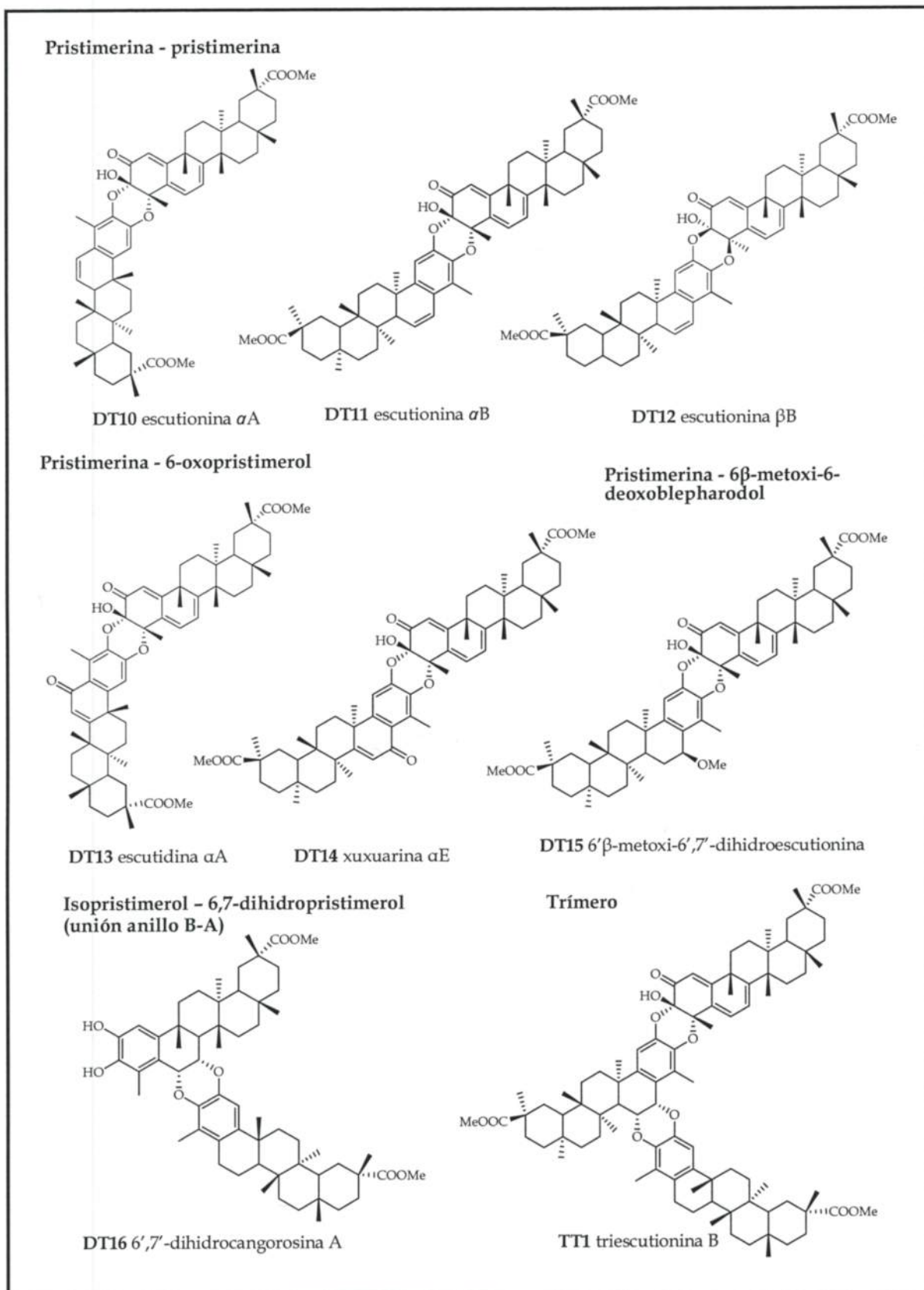
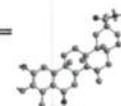
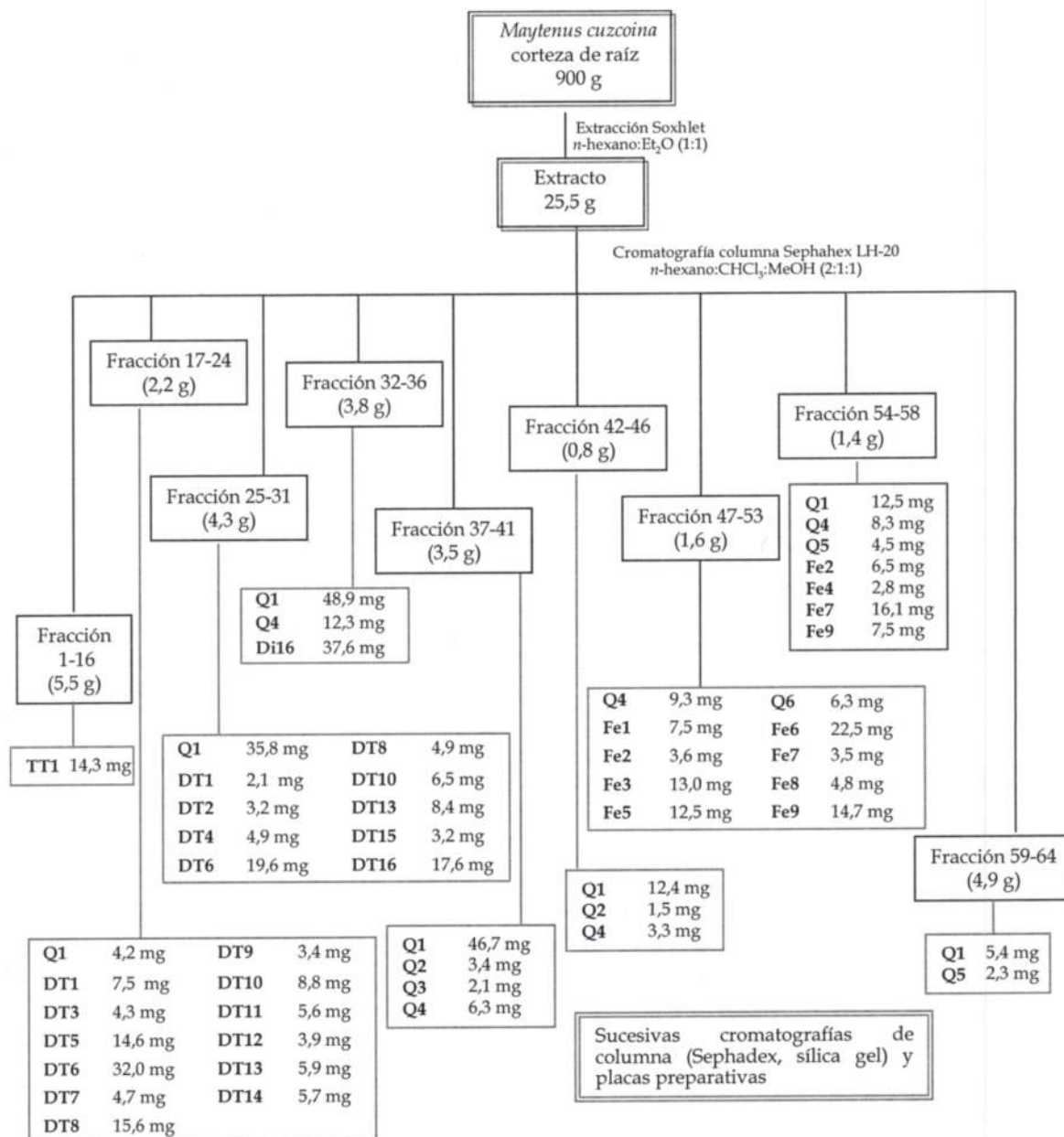


Figura. (continuación)

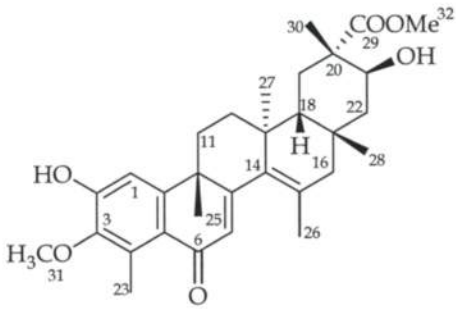


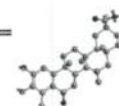
Estos metabolitos se obtuvieron después de una primera cromatografía en columna sobre Sephadex que se realizó al extracto y tras sucesivas cromatografías, tanto en columna como en placa preparativa de gel de sílice, tal como se detalla en el esquema.



Esquema 4.3.1. Separación cromatográfica de los celastrolíoides del extracto de *n*-hexano: éter dietílico (1:1) de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*.

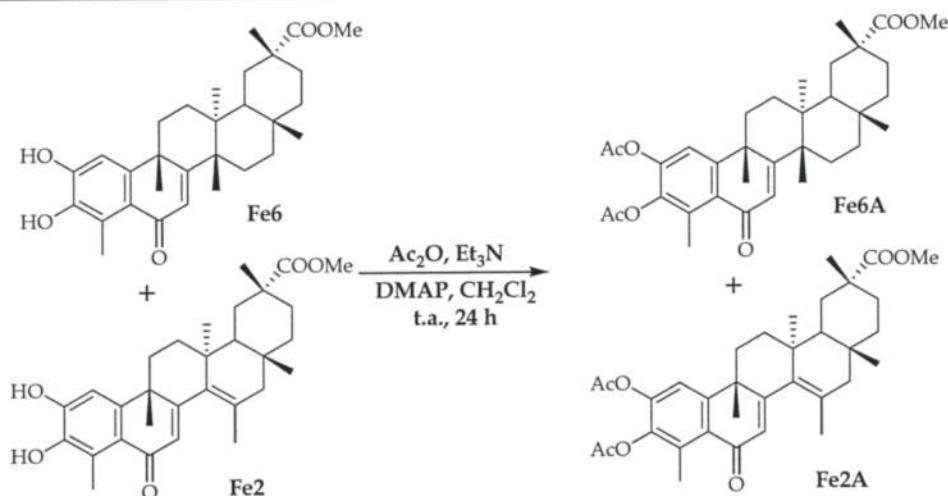
4.3.3.2. Datos físicos y espectroscópicos de los nuevos celastroloides

<p>Fe1</p> <p>21β-hidroxicuzcoinol</p> <p>Se obtuvo como sólido amorfo de color amarillo (7,5 mg)</p>	
<p>[α]²⁰_D:</p>	<p>+51,2° (0,64, CHCl₃)</p>
<p>UV (EtOH) λ_{\max}(log ϵ):</p>	<p>308 (3,7), 267 (3,3), 217 (3,9), 211 (4,1) nm</p>
<p>IR γ_{\max} (película):</p>	<p>3391, 2925, 2855, 1724, 1646, 1574, 1455, 1294, 1051, 757 cm⁻¹</p>
<p>RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ:</p>	<p>0,87 (3H, s, Me27); 1,21 (3H, s, Me30); 1,23 (3H, s, Me28); 1,33 (1H, dd, J= 3,4, 13,8 Hz, H12); 1,37 (3H, s, Me25); 1,43 (1H, m, H16); 1,48 (1H, m, H18); 1,50 (1H, m, H19β); 1,55 (2H, m, H22); 1,72 (3H, s, Me26); 1,89 (1H, d, J= 10,9 Hz, H19α); 1,94 (1H, dd, J= 5,1, 13,4 Hz, H11); 2,04 (1H, dd, J= 3,4, 13,4 Hz, H11); 2,46 (1H, td, J= 5,1, 13,8 Hz, H12); 2,58 (1H, d, J= 16,8 Hz, H16); 2,73 (3H, s, Me23) 3,72 (3H, s, OMe31); 3,79 (3H, s, OMe32); 4,20 (1H, dd, J= 5,4, 11,6 Hz, H21); 6,00 (1H, s, H7); 6,18 (1H, s, OH2); 6,92 (1H, s, H1)</p>
<p>RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ:</p>	<p>13,8 (c, Me30); 15,1 (c, Me23); 21,7 (c, Me26); 24,0 (c, Me27); 27,9 (c, Me25); 31,3 (c, Me28); 34,3 (t, C19); 35,2 (s, C13); 35,7 (t, C12); 37,4 (t, C11); 38,9 (t, C16); 41,2 (s, C9); 42,4 (s, C17); 43,1 (t, C22); 43,3 (d, C18); 48,0 (s, C20); 52,2 (c, OMe32); 61,1 (c, OMe31); 68,1 (d, C21); 110,2 (d, C1); 122,0 (s, C5); 127,5 (s, C15); 128,8 (d, C7); 134,2 (s, C4); 134,9 (s, C14); 144,7 (s, C3); 151,6 (s, C2); 151,9 (s, C10); 161,5 (s, C8); 178,9 (s, C29); 186,1 (s, C6)</p>
<p>EM (IE) m/z (%):</p>	<p>508 (M⁺, 100), 493 (32), 490 (26), 475 (19), 461 (8), 447 (6), 415 (12), 377 (21), 361 (18), 349 (9), 325 (7), 309 (19), 295 (6), 283 (6), 257 (11), 231 (12), 217 (6)</p>
<p>EMAR m/z:</p>	<p>Observado 508,2855 (calculado para C₃₁H₄₀O₆ [M⁺]: 508,2825)</p>



Fe2	
cuzcoinol	
Se obtuvo como sólido amorfo de color amarillo (5,7 mg)	
$[\alpha]^{20}_D$:	+30,0° (c 0,12, CHCl ₃)
UV (EtOH) $\lambda_{max}(\log \epsilon)$:	308 (3,7), 268 (3,6), 204 (4,5) nm
IR γ_{max} (película):	3418, 2926, 2856, 1728, 1644, 1574, 1455, 1315, 1119, 1034, 798, 758 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0,74 (3H, s, Me27); 1,19 (3H, s, Me28); 1,20 (3H, s, Me30); 1,35 (3H, s, Me25); 1,36 (1H, m, H16); 1,37 (1H, m, H12); 1,39 (1H, m, H21); 1,43 (1H, m, H18); 1,45 (1H, m, H19); 1,55 (1H, m, H22); 1,61 (1H, m, H21); 1,70 (1H, m, H22); 1,71 (3H, s, Me26); 1,90 (1H, m, H19); 1,92 (1H, m, H11); 2,05 (1H, dd, $J = 3,3, 12,5$ Hz; H11); 2,48 (1H, td, $J = 5,2, 13,6$ Hz, H12); 2,63 (1H, d, $J = 16,5$ Hz, H16); 2,74 (3H, s, Me23); 5,55 (1H, s, OH); 6,05 (1H, s, H7); 6,63 (1H, s, OH); 6,88 (1H, s, H1)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	14,0 (c, C23); 19,8 (c, C30); 21,7 (c, C26); 23,7 (c, C27); 28,1 (c, C25); 26,6 (t, C19); 31,6 (c, C28); 33,8 (t, C22); 33,9 (s, C17); 35,6 (t, C12); 36,2 (t, C21); 37,6 (2 x t, C11, C16); 41,7 (s, C13); 42,4 (s, C9); 42,7 (s, C20); 43,9 (d, C18); 51,9 (c, OMe); 109,7 (d, C1); 122,1 (s, C5); 126,1 (s, C4); 128,0 (s, C15); 128,6 (d, C7); 134,1 (s, C14); 140,7 (s, C3); 147,8 (2 x s, C2, C10); 162,0 (s, C8); 179,4 (s, C29); 186,9 (s, C6)
EM (IE) m/z (%):	478 (M ⁺ , 100), 463 (31), 449 (4); 419 (5); 403 (9); 309 (4); 295 (13); 269 (5); 243 (6); 217 (9); 203 (7)
EMAR m/z :	Observado 478,2729 (calculado para C ₃₀ H ₃₈ O ₅ [M ⁺]: 478,2719)

• Acetilación de una mezcla de Fe6 y Fe2, para facilitar su separación



A una solución de 4,5 mg de una fracción de difícil separación en 3,0 ml de diclorometano, se le adició 0,1 ml de trietilamina (0,7 mmoles), 0,05 ml de anhídrido acético (0,5 mmoles) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (DMAP). La reacción se dejó agitando durante 24 horas a temperatura ambiente, eliminando posteriormente el disolvente a vacío. Se purificó el crudo de reacción mediante cromatografía en columna, utilizando como eluyente un gradiente de polaridad (0 al 20%) de CH₂Cl₂ y Et₂O, obteniéndose 2,1 mg del derivado diacetilado del 6-oxopristimerol, **Fe6A**, identificado por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los existentes en la bibliografía química y 2,3 mg del derivado diacetilado de **Fe2**, **Fe2A**, como un sólido amorfo.

Fe2A, 2,3-di-acetilado de cuzcoinol

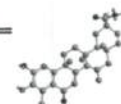
[α]²⁰_D: +6,7° (c 0,15, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 2923, 2853, 177, 1732, 1651, 1462, 1375, 1289, 1202, 1040 cm⁻¹

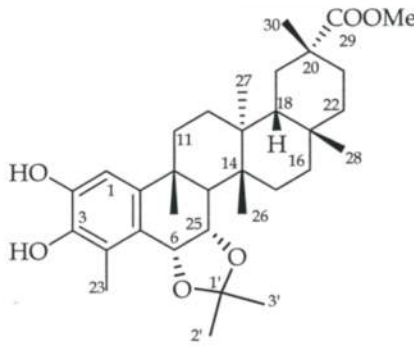
RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ: 0,73 (3H, s); 0,76 (3H, s); 1,21 (3H, s); 1,45 (3H, s); 1,73 (3H, s); 2,31 (3H, s); 2,36 (3H, s); 2,67 (3H, s); 3,68 (3H, s); 6,07 (1H, s); 7,21 (1H, s)

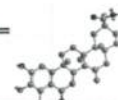
EM (IE) m/z (%): 562 (M⁺, 91); 547 (17), 520 (62), 505 (18), 478 (48), 330 (18), 293 (17), 280 (18), 243 (16), 231 (21), 219 (27), 181 (41), 169 (36), 125 (22), 119 (65), 69 (100)

EMAR m/z: Observado 562,2920 (calculado para C₃₄H₄₂O₇ [M⁺]: 562,2931)

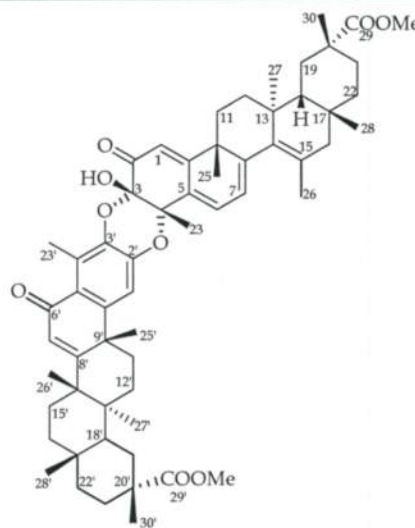


Fe3	
6β-(2-oxo-propil)-pristimerol	
Se obtuvo como sólido amorfo de color naranja (13,0 mg)	
[α] ²⁰ _D :	-36,4° (c 1,02, CHCl ₃)
UV (EtOH) λ _{max} (log ε):	314 (3,1), 284 (3,4), 262 (3,4) nm
IR γ _{max} (película):	3418, 2946, 2870, 1714, 1618, 1506, 1486, 1455, 1290, 1216, 1157, 1019, 756 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ:	0,52 (3H, s, Me27); 0,99 (1H, m, H22); 1,05 (3H, s, Me28); 1,17 (6H, s, Me26, Me30); 1,40 (1H, m, H15); 1,45 (3H, s, Me25); 1,49 (1H, d, J= 8,0 Hz, H18); 1,53 (3H, m, H12, H15); 1,63 (1H, dd, J= 8,0, 16,0 Hz, H19); 1,80 (1H, m, H11); 1,82 (2H, m, H16); 2,01 (1H, m, H22); 2,05 (3H, m, H11, H21); 2,16 (3H, s, Me3'); 2,18 (3H, s, Me23); 2,33 (1H, d, J= 16,0 Hz, H19); 2,45 (1H, dd, J= 10,4, 16,7 Hz, H1'); 2,71 (1H, dd, J= 2,5, 16,7 Hz, H1'); 3,52 (3H, m, OMe); 3,99 (1H, ddd, J= 2,5, 6,2, 10,4 Hz, H6); 5,55 (1H, s, OH); 5,85 (1H, d, J= 6,2 Hz, H7); 6,63 (1H, s, OH); 6,81 (1H, s, H1)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ:	11,2 (c, Me23); 18,2 (c, Me27); 22,3 (c, Me26); 28,9 (t, C15); 29,7 (s, C17); 30,0 (t, C21); 30,4 (t, C12); 30,5 (c, Me3'); 30,8 (t, C19); 31,6 (c, Me28); 32,8 (d, C6); 33,0 (c, Me30); 34,8 (t, C22); 35,7 (t, C11); 36,7 (t, C16); 36,8 (c, Me25); 37,2 (s, C9); 37,7 (s, C13); 40,5 (s, C20); 43,8 (s, C14); 44,5 (d, C18); 51,5 (c, OMe); 51,9 (t, C1'); 109,2 (d, C1); 119,8 (s, C4); 121,7 (d, C7); 128,1 (s, C5); 140,3 (s, C3); 142,0 (s, C10); 142,3 (s, C2); 150,1 (s, C8); 179,3 (s, C29); 208,1 (s, C2')
EM (IE) m/z (%):	522 (M ⁺ , 6), 464 (16), 253 (15), 243 (20), 241 (36), 215 (22), 203 (18), 201 (100), 149 (10), 123 (15), 109 (14), 95 (23)
EMAR m/z:	Observado 522,3363 (calculado para C ₃₃ H ₄₆ O ₅ [M ⁺]: 522,3345)

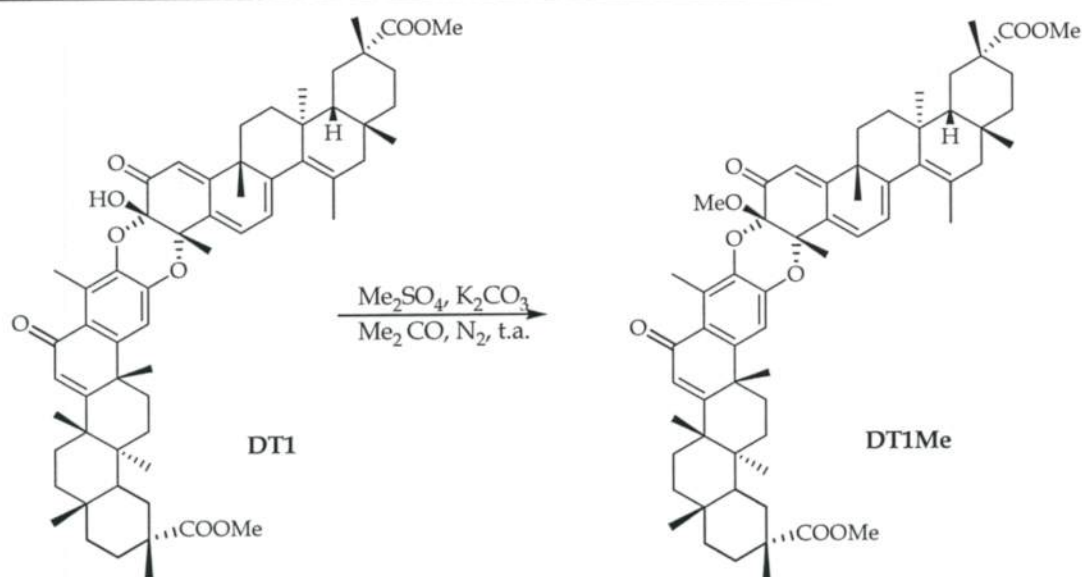
<p>Fe4</p> <p>6α,7α-isopropilidendioxo-blepharodol</p> <p>Se obtuvo como sólido amorfo de color amarillo pálido (2,8 mg)</p>	
<p>[α]²⁰_D: +12,1° (c 0,14, CHCl₃)</p>	
<p>UV (EtOH) λ_{\max}(log ϵ): 311 (3,3), 284 (3,6), 264 (2,5) nm</p>	
<p>IR γ_{\max} (película): 3418, 2926, 2856, 1730, 1645, 1456, 1373, 1244, 1151, 1061, 756 cm⁻¹</p>	
<p>RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 0,78 (3H, s, Me27); 0,98 (1H, m, H22); 1,06 (3H, s, Me25); 1,07 (3H, s, Me28); 1,18 (6H, s, Me26, Me30); 1,33 (1H, m, H16); 1,35 (2H, m, H15); 1,41 (3H, s, Me2'); 1,42 (1H, m, H11); 1,43 (2H, m, H12); 1,45 (3H, s, Me3'); 1,60 (2H, m, H18, H19); 1,65 (1H, m, H16); 1,68 (1H, m, H21); 1,90 (1H, d, J= 11,2 Hz, H8); 2,06 (2H, m, H21, H22); 2,23 (1H, m, H11); 2,30 (3H, s, Me23); 2,40 (1H, d, J= 12,4 Hz, H19); 3,61 (3H, s, OMe); 4,72 (1H, dd, J= 6,0, 11,2 Hz, H7); 5,00 (1H, s, OH3); 5,13 (1H, d, J= 6,0 Hz, H6); 5,51 (1H, s, OH2); 6,61 (1H, s, H1)</p>	
<p>RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ: 11,9 (c, Me23); 15,7 (c, Me26); 17,6 (c, Me27); 26,1 (c, Me2'); 28,2 (c, Me3'); 28,4 (c, Me25); 29,7 (t x s, C15, C17); 29,9 (t, C12); 30,0 (t, C21); 30,6 (t, C11); 30,8 (t, C19); 32,5 (c, Me28); 33,6 (c, Me30); 36,0 (t, C22); 36,6 (t, C16); 38,1 (s, C9); 39,0 (s, C13); 40,7 (s, C20); 41,0 (c, C14); 43,8 (d, C8); 44,9 (d, 18); 51,6 (c, OMe); 73,2 (d, C6); 76,1 (d, C7); 107,1 (d x s, C1, C1'); 122,7 (s, C5); 124,5 (s, C4); 140,3 (s, C3); 143,3 (s, C2); 143,9 (s, C10); 179,4 (s, C29)</p>	
<p>EM (IE) m/z (%): 540 (M⁺, 47), 482 (100), 465 (19), 449 (9), 423 (7), 407 (6), 259 (20), 227 (22), 217 (40), 203 (72), 188 (44)</p>	
<p>EMAR m/z: Observado 540,3467 (calculado para C₃₃H₄₈O₆ [M⁺]: 540,3451)</p>	



DT1	
netzaescutidina α A	
Se obtuvo como sólido amorfo de color amarillo (9,6 mg)	
$[\alpha]_{D}^{20}$:	+ 60,8° (c 0,63, CHCl ₃)
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	397 (3,9), 298 (3,9), 252 (4,1) nm
DC λ_{\max} (EtOH) nm:	392,0 ($\Delta\epsilon$ = +23,1), 303,0 ($\Delta\epsilon$ = +24,4), 271,2 ($\Delta\epsilon$ = 0), 251,0 ($\Delta\epsilon$ = -24,7) nm
IR γ_{\max} (película):	3442, 1927, 2870, 1728, 1669, 1648, 1465, 1305, 1201, 1150, 1019, 755 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0,62 (3H, s, Me27'); 0,78 (3H, s, Me27); 0,98, 2,10 (2H, m, H11); 1,10 (3H, s, Me28'); 1,13 (3H, s, Me28); 1,18 (9H, s, Me25, Me30, Me30'); 1,20 (1H, m, H16); 1,28, 1,61 (2H, m, H22'); 1,29 (3H, s, Me26'); 1,30, 2,45 (2H, m, H12); 1,33, 2,18 (2H, m, H19); 1,40 (2H, m, H21'); 1,45, 1,63 (2H, m, H11'); 1,48 (1H, m, H18'); 1,53 (2H, m, H22); 1,57 (3H, s, Me25'); 1,59 (3H, s, Me23); 1,60 (1H, m, H18); 1,70 (3H, s, Me26); 1,73 (1H, m, H19'); 1,82 (2H, m, H12'); 1,92 (2H, m, H16'); 2,01, 2,26 (2H, m, H21); 2,45 (1H, d, J= 10,1 Hz, H19'); 2,51 (3H, s, Me23'); 2,62 (1H, d, J= 16,5 Hz, H16); 3,56 (3H, s, OMe); 3,65 (3H, s, OMe'); 5,02 (1H, s, OH3); 5,74 (1H, d, J= 6,4 Hz, H7); 6,06 (1H, d, J= 1,2 Hz, H1); 6,22 (1H, s, H7'); 6,54 (1H, dd, J= 1,5, 6,4 Hz, H6); 7,01 (1H, s, H1')
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	13,1 (c, Me23'); 18,3 (c, Me27'); 19,5 (c, Me30); 20,6 (c, Me26'); 22,1 (c, Me26); 22,7 (c, Me23); 23,8 (c, Me27); 28,3 (c, Me25); 28,5 (t, C15'); 29,4 (t, C19); 29,5 (t, C21'); 29,7 (t, C12'); 30,3 (s, C17'); 30,8 (t, C19'); 31,3 (c, Me28'); 31,4 (c, Me28); 32,7 (c, Me30'); 33,4 (s, C20); 33,7 (t, C11'); 34,0 (t, C21); 34,7 (t, C11); 35,3 (t, C12); 35,8 (t, C22'); 36,1 (t, C22); 36,2 (t, C16'); 37,5 (c, Me25'); 37,7 (t, C16); 38,7 (s, C13'); 39,8 (s, C9'); 40,3 (s, C20'); 41,9 (s, C17); 42,4 (s, C13); 43,7 (d, C18); 44,0 (s x d, C9, C18'); 44,5 (s, C14'); 51,4 (c, OMe'); 51,6 (c, OMe); 78,7 (s, C4); 91,1 (s, C3); 110,3 (d, C1'); 115,3 (d, C1); 119,8 (d, C7); 123,2 (s, C5'); 126,0 (d, C7'); 127,3 (d, C6); 128,5 (s, C15); 129,1 (s, C4'); 131,0 (s, C5); 134,4 (s, C14); 138,3 (s, C3'); 144,2 (s, C2'); 151,3 (s, C8); 151,4 (s, C10'); 169,7 (s, C10); 170,8 (s, C8'); 179,0 (s, C29'); 179,2 (s, C29); 187,0 (s, C6'); 189,6 (s, C2)
EM (FAB) m/z (%):	941 (M+1, 14), 720 (21), 549 (50), 480 (21), 462 (100)
EMAR m/z :	Observado 940,5447 (calculado para C ₆₀ H ₇₆ O ₉ [M ⁺]: 940,5489)



• Metilación del grupo hidroxilo en C3 de DT1



A una solución de 3,5 mg de DT1 (0,004 mmoles) en 2,0 ml de acetona seca, se le añadió un exceso de carbonato potásico y 0,5 ml de sulfato de dimetilo (5,3 mmoles). La reacción se dejó a temperatura ambiente, bajo atmósfera de nitrógeno y agitación durante 48 horas. Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el crudo de reacción mediante cromatografía en capa fina, usando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-Et}_2\text{O}$ al 10%, obteniéndose 2,4 mg de DT1Me (R= 67,6 %) como un sólido amorfo de color amarillo.

DT1Me, metilado netzaescutidina αA

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +77,6° (c 0,17, CHCl_3)

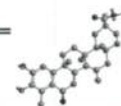
UV (EtOH) λ_{max} 291 (3,9), 249 (4,0) nm
(log ϵ):

IR γ_{max} (película): 2926, 2856, 1730, 1647, 1464, 1261, 1099, 1031, 802 cm^{-1}

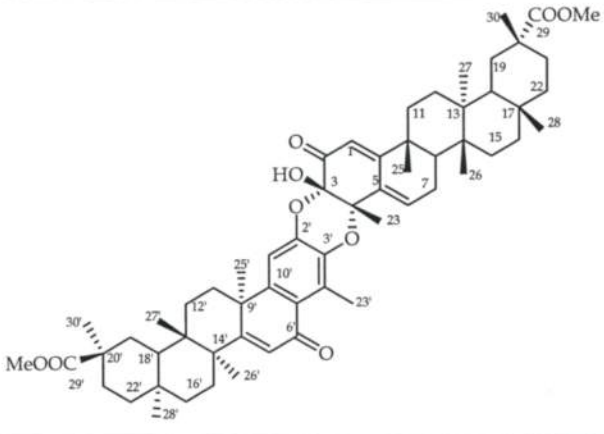
RMN ^1H
(CDCl_3 , 500 MHz) δ : 0,61 (3H, s); 0,88 (3H, s); 1,10 (3H, s); 1,13 (3H, s); 1,17 (3H, s); 1,18 (3H, s); 1,19 (3H, s); 1,29 (3H, s); 1,55 (3H, s); 1,59 (3H, s); 2,44 (1H, d, $J = 12,0$ Hz); 2,59 (1H, d, $J = 16,1$ Hz); 2,62 (3H, s); 3,56 (3H, s); 3,61 (3H, s); 3,64 (3H, s); 5,70 (1H, d, $J = 6,4$ Hz); 6,24 (1H, s); 6,42 (1H, dd, $J = 1,5, 6,4$ Hz); 6,96 (1H, s)

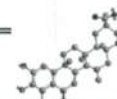
EM (FAB) m/z (%): 955 (M^++1 , 21)

EMAR m/z : Observado 954,5600 (calculado para $\text{C}_{61}\text{H}_{79}\text{O}_9$ [M^+]: 954,5646)



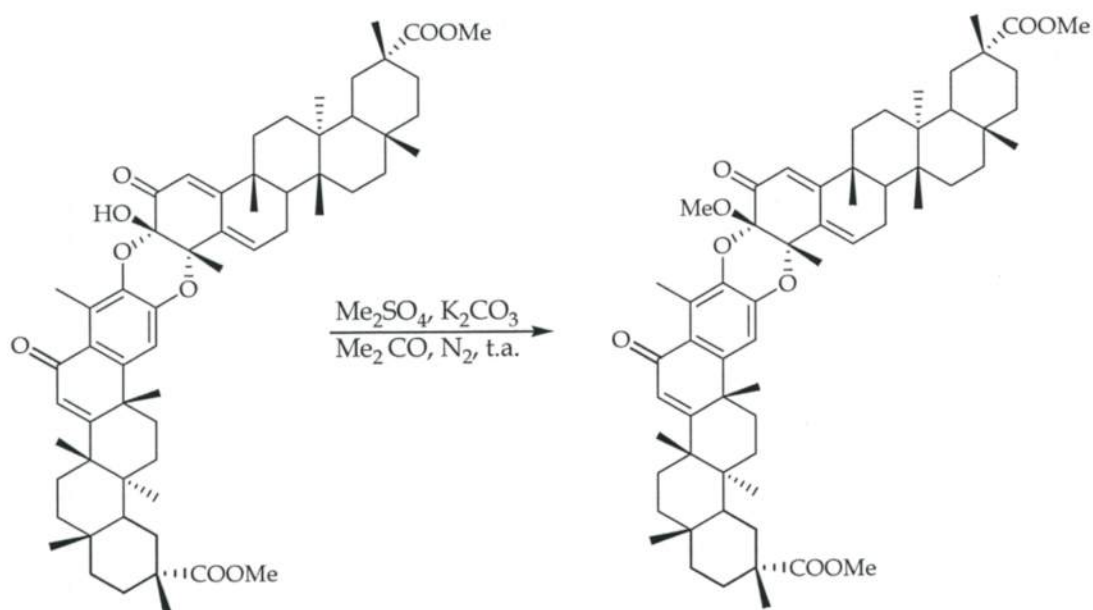
DT2	
netzaescutidina βB	
Se obtuvo como sólido amorfo de color amarillo (3,2 mg)	
$[\alpha]^{20}_D$:	-14,4° (c 0,56, CHCl ₃)
UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ):	397 (3,4), 293 (3,5), 250 (3,7) nm
IR γ_{max} (película):	3440, 2925, 2856, 1730, 1649, 1461, 1305, 1202, 864, 755 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0,57 (3H, s, Me27'); 0,81 (3H, s, Me27); 0,96, 2,00 (2H, m, H11); 1,08 (3H, s, Me28'); 1,14 (3H, s, Me28); 1,18 (1H, m, H16); 1,16 (3H, s, Me30'); 1,19 (3H, s, Me30); 1,24, 2,46 (2H, m, H12); 1,27 (3H, s, Me26'); 1,29 (3H, s, Me25); 1,30, 1,59 (2H, m, H22'); 1,39, 1,62 (2H, m, H11'); 1,42, 2,18 (2H, m, H19); 1,47 (3H, s, Me25'); 1,49 (1H, m, H18'); 1,53 (2H, m, H22); 1,57 (1H, m, H18); 1,59 (3H, s, Me26); 1,50, 2,15 (2H, m, H21); 1,62 (3H, s, Me23); 1,63, 2,40 (2H, m, H19'); 1,88 (2H, m, H16'); 1,90 (2H, m, H12'); 2,64 (1H, d, J = 16,5 Hz, H16); 2,76 (3H, s, Me23'); 3,48 (3H, s, OMe'); 3,67 (3H, s, OMe); 5,14 (1H, s, OH3); 5,76 (1H, d, J = 6,6 Hz, H7); 6,03 (1H, d, J = 1,2 Hz, H1); 6,23 (1H, s, H7'); 6,49 (1H, dd, J = 1,2, 6,6 Hz, H6); 6,79 (1H, s, H1')
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	13,0 (c, Me23'); 18,2 (c, Me27'); 19,5 (c, Me30); 20,5 (c, Me26'); 21,8 (c, Me26); 23,6 (c, Me27); 23,7 (c, Me23); 28,3 (t, C15'); 28,4 (c, Me25); 29,5 (t, C19); 29,6 (t, C12'); 29,9 (t, C21'); 30,0 (t, C19'); 30,4 (s, C17'); 31,2 (c, Me28); 31,4 (c, Me28'); 32,5 (c, Me30'); 33,6 (t, C21); 33,7 (s, C17); 33,8 (t, C11'); 34,7 (t, C22'); 35,2 (t, C12); 35,9 (t, C22); 36,1 (t, C16); 37,2 (t, C11); 37,5 (t, C16); 37,6 (c, Me25'); 38,6 (s, C13'); 39,7 (s, C9'); 40,2 (s, C20'); 42,5 (s, C20); 43,1 (s, C13); 43,9 (d, C18); 44,1 (d, C18'); 44,2 (s, C14'); 44,7 (s, C9); 51,1 (c, OMe'); 51,5 (c, OMe); 78,1 (s, C4); 90,8 (s, C3); 111,0 (d, C1'); 114,8 (d, C1); 119,9 (d, C7); 123,4 (s, C5'); 125,8 (d, C7'); 127,8 (s, C4'); 128,7 (d, C6); 128,8 (s, C15); 131,6 (s, C5); 133,8 (s, C14); 137,5 (s, C3'); 144,9 (s, C2'); 150,8 (s, C10'); 153,4 (s, C8); 169,5 (s, C10); 171,0 (s, C8'); 178,8 (s, C29'); 179,0 (s, C29); 187,3 (s, C6'); 188,9 (s, C2)
EM (FAB) m/z (%):	941 (M+1, 12), 479 (12), 462 (33), 322 (24), 109 (100)
EMAR m/z :	Observado 941,5591 (calculado para C ₆₀ H ₇₇ O ₉ [M ⁺]: 941,5568)

DT3	
7,8-dihidroescutidinaaB	
Se obtuvo como sólido amorfo de color amarillo (4,3 mg)	
[α] _D ²⁰ : +128,5° (c 0,20, CHCl ₃)	
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	291 (3,9), 249 (4,0) nm
DC λ_{\max} (EtOH) nm:	285,2 ($\Delta\epsilon = +6,1$), 265,2 ($\Delta\epsilon = 0$), 253,4 ($\Delta\epsilon = -3,5$) nm
IR γ_{\max} (película):	3443, 2924, 2870, 1731, 1647, 1461, 1307, 1203, 1142, 756 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0,54 (3H, s, Me27'); 0,78 (3H, s, Me27); 0,95, 2,05 (2H, m, H22'); 0,98, 2,38 (2H, m, H11); 0,98 (3H, s, Me26); 1,07 (6H, Me25, Me28); 1,09 (3H, s, Me28'); 1,17 (3H, s, Me30); 1,18 (3H, s, Me30'); 1,28 (3H, s, Me26'); 1,30, 2,00 (2H, m, H16); 1,42 (3H, s, Me23); 1,48, 1,51 (2H, m, H16'); 1,49 (3H, s, Me25'); 1,52, 2,35 (2H, m, H19'); 1,57 (2H, m, H18, H18'); 1,60, 2,39 (2H, m, H19); 1,62, 1,65 (2H, m, H22); 1,81 (1H, m, H8); 1,94, 2,15 (2H, m, H11'); 2,18 (2H, m, H7); 2,20 (4H, m, H21, H21'); 2,71 (3H, s, Me23'); 3,54 (3H, s, OMe'); 3,64 (3H, s, OMe); 5,04 (1H, s, OH3); 5,98 (1H, s, H1); 6,25 (1H, s, H7'); 6,28 (1H, s ancho, H6); 6,82 (1H, H1')
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	12,7 (c, Me23'); 15,7 (c, Me26); 16,7 (c, Me27); 18,0 (c, Me26'); 20,6 (c, Me26'); 21,8 (c, Me25); 22,6 (c, Me23); 24,0 (t, C7); 28,3 (2 x t, C15, C15'); 29,5 (t, C12'); 29,7 (t, C12); 29,9 (2 x t, C21, C21'); 30,3 (s x t, C17, C19); 30,6 (t x s, C11, C17); 31,3 (c, Me28'); 31,4 (c, Me28); 31,5 (t, C19'); 32,0 (c, Me30); 32,4 (c, Me30'); 33,9 (t, C11'); 34,5 (t, C22'); 35,8 (t, C22); 36,0 (t, C16); 36,2 (t, C16'); 37,3 (c, Me25'); 37,4 (s, C9); 38,6 (s, C13); 38,7 (s, C13'); 39,7 (s, C9'); 39,8 (s, C14); 40,2 (s, C20); 40,3 (s, C20'); 41,6 (d, C8); 44,1 (d, C18'); 44,4 (d, C18); 44,5 (s, C14'); 51,3 (2 x c, OMe, OMe'); 79,1 (s, C4); 91,4 (s, C3); 111,1 (d, C1'); 112,4 (d, C1); 124,3 (s, C5'); 125,9 (d, C7'); 127,2 (s, C4'); 132,2 (s, C5); 134,4 (d, C6); 137,7 (s, C3'); 144,5 (s, C2'); 150,2 (s, C10'); 170,6 (s, C10); 171,6 (s, C8'); 178,5 (s, C29'); 178,8 (s, C29); 188,2 (s, C6'), 191,2 (s, C2)
EM (FAB) m/z (%):	945 (M+1, 7), 475 (15), 468 (2), 462 (17), 154 (100)
EMAR m/z :	Observado 945,5904 (calculado para C ₆₀ H ₈₁ O ₉ [M ⁺]: 945,5881)



DT4	
7 α -hidroxi-7,8-dihidroisoxuxuarina E α	
Se obtuvo como sólido amorfo de color amarillo (4,9 mg)	
$[\alpha]_D^{20}$:	+ 73,5° (c 0,40, CHCl ₃)
UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ):	295 (3,7), 252 (3,7) nm
DC λ_{max} (EtOH) nm:	290,4 ($\Delta\epsilon$ = +3,6), 265,0 ($\Delta\epsilon$ = 0), 251,2 ($\Delta\epsilon$ = -2,2)
IR γ_{max} (película):	3459, 2925, 2868, 1729, 1648, 1461, 1306, 1203, 1142, 756 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	0,58 (3H, s, Me27'); 0,78 (3H, Me27); 0,98, 2,07 (2H, m, H22'); 1,05 (3H, s, Me28); 1,10 (3H, s, Me28'); 1,13 (3H, s, Me25); 1,16 (3H, s, Me26); 1,18 (6H; s, Me30, Me30'); 1,24, 1,58 (2H, m, H22); 1,29 (3H, s, Me26'); 1,40, 1,90 (2H, m, H11); 1,41 (1H, m, H19'); 1,49 (3H, s, Me23); 1,49, 1,91 (2H, m, H16'); 1,53 (3H, s, Me25'); 1,54 (2H, m, H15'); 1,56 (1H, m, H18); 1,58 (1H, m, H18'); 1,60 (1H, m, H19); 1,64 (2H, m, H12); 1,68 (1H, m, H8); 1,79 (2H, m, H12'); 1,96, 2,24 (2H, m, H11'); 2,35 (1H, d, J= 10,8 Hz, H19); 2,44 (1H, d, J= 11,0 Hz, H19'); 2,53 (3H, s, Me23'); 3,53 (3H, s, OMe'); 3,65 (3H, s, OMe); 4,45 (1H, t, J= 7,5 Hz, H7); 4,90 (1H, s, OH3); 5,99 (1H, s, H1); 6,15 (1H, s ancho, H6); 6,23 (1H, s, H7'); 6,97 (1H, s, H1')
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	13,1 (c, Me23'); 16,2 (c, Me26); 17,0 (c, Me27); 18,0 (c, Me27'); 20,6 (c, Me26'); 22,1 (c, Me23); 23,7 (c, Me25); 28,3 (t, C15'); 28,6 (2 x t, C21, C21'); 29,1 (t, C12); 29,6 (t, C12'); 29,8 (s, C17); 30,1 (s, C17'); 30,3 (t, C19); 30,8 (2 x t, C15, C19'); 31,4 (c, Me28'); 31,5 (c, Me28); 32,3 (2 x c, Me30, Me30'); 33,9 (t, C11'); 34,8 (t, C22'); 35,1 (t, C22); 36,1 (t, C16); 36,2 (t, C16'); 36,8 (t, C15); 37,4 (c, Me25'); 38,7 (s, C13'); 39,4 (s, C13); 39,9 (s, C9'); 40,4 (2 x s, C20, C20'); 40,8 (s, C9); 41,6 (s, C14); 44,4 (s, C14'); 44,6 (d, C18); 44,7 (d, C18'); 51,3 (c, OMe'); 51,4 (d, C8); 51,5 (c, OMe); 68,2 (d, C7); 78,9 (s, C4); 91,1 (s, C3); 110,2 (d, C1'); 113,7 (d, C1); 123,2 (s, C5'); 126,0 (d, C7'); 129,2 (s, C4'); 134,4 (s, C5); 135,7 (d, C6); 137,8 (s, C3'); 144,5 (s, C2'); 151,8 (s, C10'); 168,4 (s, C10); 170,9 (s, C8'); 178,9 (2 x s, C29, C29'); 187,0 (s, C6'); 190,2 (s, C2)
EM (FAB) m/z (%):	961 (M+1, 3), 484 (2), 549 (50), 480 (2), 201 (100)
EMAR m/z :	Observado 960,5682 (calculado para C ₆₀ H ₈₀ O ₁₀ [M ⁺]; 960,5751)

- Metilación de 7,8-dihidroescutidina α A



Siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la obtención de DT1Me, metilamos 6,5 mg de DT6 aislado de *Maytenus scutioides*, obteniéndose 4,3 mg (R=66,1%) de un producto cuyos datos físicos y espectroscópicos fueron coincidentes con los de un producto descrito en la bibliografía química³⁹.

4.4. *Actividades Biológicas*



4.4.1. Actividad antimicrobiana.

4.4.1.1. Introducción

Durante los últimos 50 años, los antibióticos han sido una de las estrategias más eficaces para el tratamiento y el control de las enfermedades infecciosas. Esta situación está amenazada por la creciente aparición de resistencias a los antibióticos, llegando a ser hoy uno de los mayores problemas relacionados con la salud pública mundial, constituyendo una seria amenaza en el siglo XXI. Estudios estadísticos llevados a cabo por la Organización Mundial de la Salud, han demostrado que un tercio de las cincuenta y siete millones de muertes acaecidas a lo largo del año 1997 fueron responsabilidad directa de enfermedades infecciosas¹.

Las condiciones que han provocado esta situación han sido el desmesurado crecimiento que ha experimentado la población mundial, lo que ha generado importantes presiones ecológicas, así como los movimientos poblacionales que convierten los nuevos brotes infecciosos en un problema global². Un factor a tener en cuenta es que los microorganismos poseen poblaciones extraordinariamente mutables, capaces de diseminar el carácter de resistencia a través de plásmidos, transposones e integrones, que pueden proveer a una bacteria de elementos que codifiquen resistencia a los diferentes antimicrobianos en uso³.

Muchas de las enfermedades infecciosas que se consideraban erradicadas han resurgido, denominándose a los patógenos causantes bacterias “reemergentes”, como las neumonías (producen 4,4 millones de muertes al año), la tuberculosis (más de 3 millones al año), el cólera, la fiebre amarilla, etc.

Por otra parte, hay un número considerable de microorganismo que son resistentes no a uno sino a muchos de los antibióticos actuales, este fenómeno se denomina multirresistencia a fármacos (MDR), que es aplicable tanto a las células tumorales resistentes a la quimioterapia, como a cualquier microorganismo, bacteria, hongo o parásito resistente a más de uno de los fármacos en uso.

¹ Tomasz, A. *Fighting Infection in the 21 st Century: Lessons from the First Antibiotic Era*. 2000, Blackwell Science: London.

² Iwu, M. M.; Duncan, A. R.; Okunji, C. O. *Perspectives on new crops and new uses: New Antimicrobials of Plant Origin*. 1999, ASHS Press: Alejandria.

³ Coates, A.; Hu, Y.; Bax, R.; Page, C. *Nat. Rev. Drug Disc.* 2002, 1, 895-910.

La emergencia de MDR está relacionada con el mal uso de los antibióticos, lo que está provocando la existencia de agentes antibacterianos obsoletos. Esto ocurre no sólo con patógenos hospitalarios como *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), sino también con infecciones adquiridas frecuentemente como los neumococos⁴.

Frente a este problema, solo cabe fomentar el uso racional de los antibióticos y la búsqueda de nuevos fármacos. Dos son las principales estrategias que se utilizan en la búsqueda de sustancias con carácter antimicrobiano. Por un lado, la mejora de los antimicrobianos en uso y por otro la búsqueda de nuevos agentes con renovados mecanismos de acción.

4.4.1.1.1. Productos naturales con actividad antimicrobiana.

En los últimos años se ha incrementado el interés en la búsqueda de nuevos antimicrobianos de las plantas superiores. Esto ha sido debido a la necesidad de nuevos agentes terapéuticos, las alergias ante muchos de los antibióticos en uso, como la alergia a la penicilina que afecta al 8-10% de la población y el fenómeno de la resistencia que hemos comentado anteriormente.

El conocimiento de algunos remedios usando diversas plantas superiores se remonta a muchos años atrás en la historia de la humanidad⁵. Como ejemplo podemos citar el ajo y la cebolla, que eran recomendados en el papiro de Ebers (1550 a.C) para el tratamiento de diarreas e infecciones. En 1944 se aislaron de estas plantas una sustancia llamada alicina (figura 4.4.1), que posee actividad *in vitro* frente a diferentes microorganismos y se cree que es la que le confiere sus propiedades terapéuticas⁶.

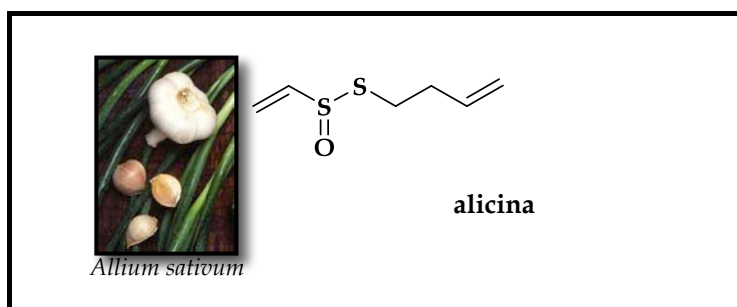


Figura 4.4.1. La alicina principio activo del ajo.

En la bibliografía existen numerosos ejemplos de metabolitos secundarios aislados de plantas superiores con actividad antimicrobiana. Estos pertenecen a diferentes familias químicas: fenoles, polifenoles, quinonas, flavonoides, flavonas,

⁴ Levy, S. B. *J. Antimicrob. Chemoth.* **2002**, *49*, 25-30.

⁵ Ríos, J. L.; Recio, M. C. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 80-84.

⁶ Harris, J. C.; Cottrell, S. Plummer, S. Lloyd, D. *Appl. Microbiol. Biot.* **2001**, *57*, 282-286.



taninos, cumarinas, terpenos y alcaloides⁷. En la fig. 4.4.2 se muestran los ejemplos más representativos y la actividad de cada uno de ellos.

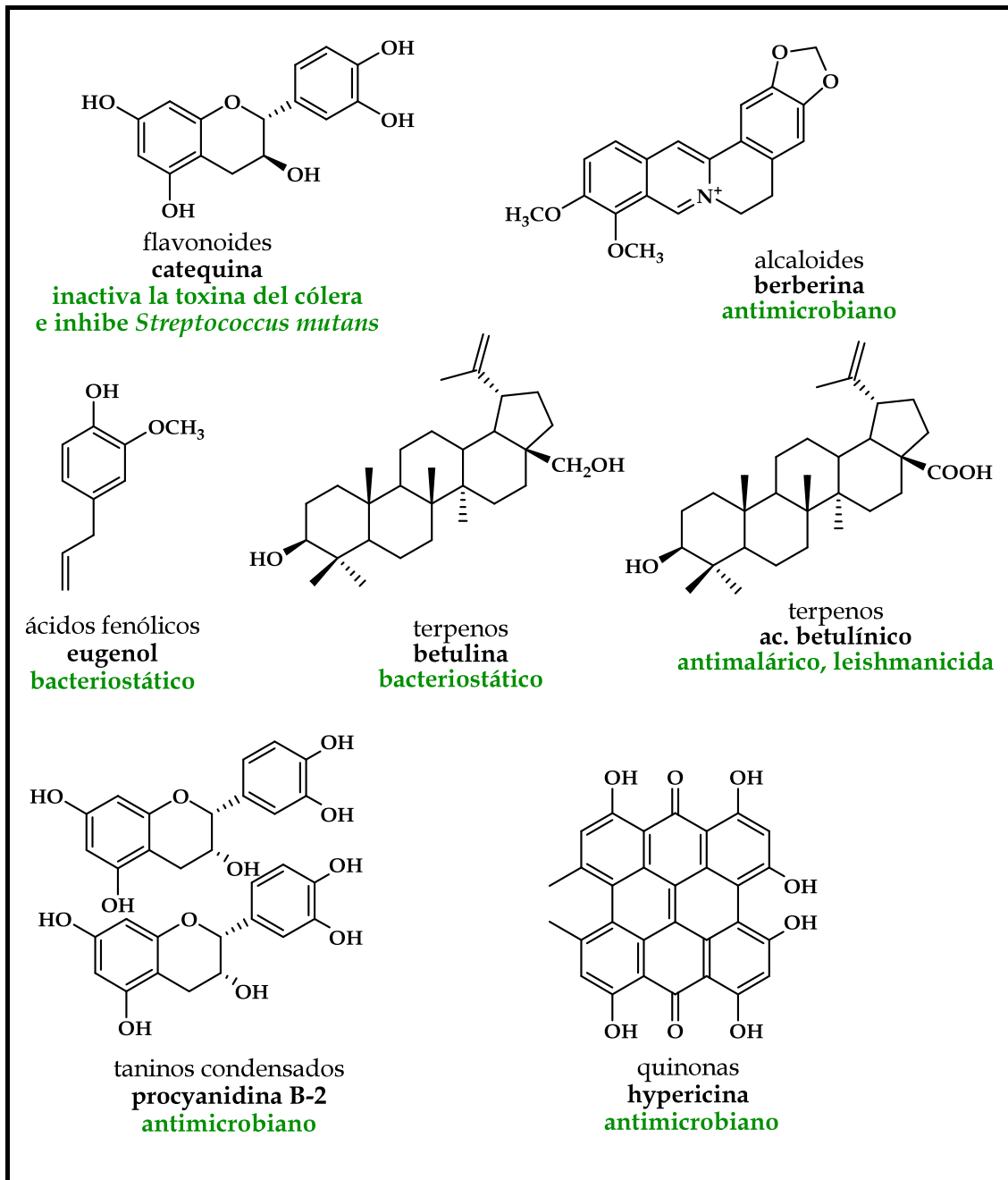


Figura 4.4.2. Metabolitos aislados de plantas superiores con actividad antimicrobiana.

Un grupo de terpenos frecuentes en especies de celastráceas son los triterpenos con esqueleto de **lupano**, cuyo interés se remonta al siglo XIX, cuando la **betulina** era

⁷ Cowan, M. M. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, 12, 564-582.

empleada como un componente de los emplastos antisépticos⁸. Se ha descrito la actividad bacteriostática de la betulina frente a *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus*⁹ y al ácido betulínico con actividad leishmanicida frente a *Leishmania amazonensis* y actividad antimalárica frente a estadios asexuales eritrocíticos del parásito de la malaria, *Plasmodium falciparum*¹⁰.

Otro grupo de triterpenos con actividad antimicrobiana son las nortriterpenometilenquinonas¹¹. En ensayos *in vitro* realizados a la pristimerina, 15- α -hidroxipristimerina y 15- α -hidroxi-21-ceto-pristimerina (figura 4.4.3) frente a diferentes bacterias, se determinó que los dos últimos metabolitos son más activos que la pristimerina y en el caso de 15- α -hidroxipristimerina, más activo frente a algunas bacterias que la cephalotoxina, usada como control. Esto apoya la hipótesis realizada por nuestro grupo, según la cual, cuanto mayor es el grado de oxidación del esqueleto de nortriterpenometilenquinona mayor es la actividad antimicrobiana.

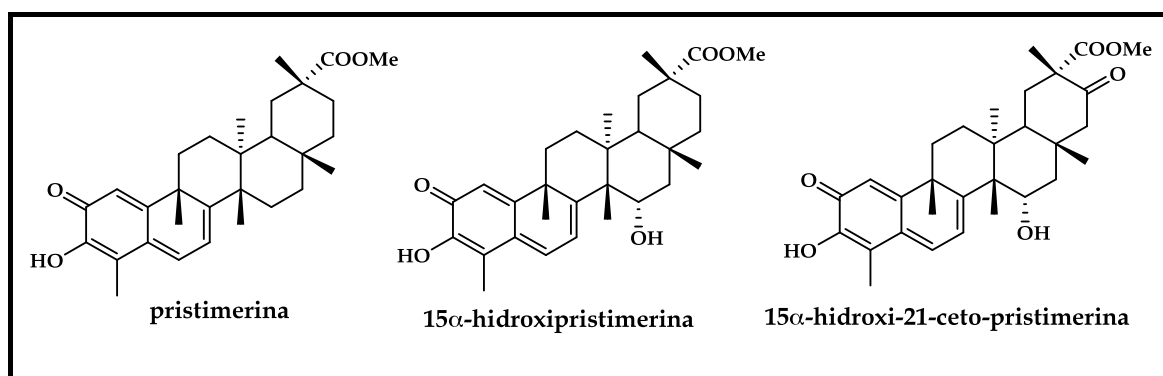


Figura 4.4.3. nor-Triterpenometilenquinonas con actividad antimicrobiana.

4.4.1.2. Resultados y discusión.

⁸ Arkadiy, L. B.; Rathnam, P.; Saxena, B. B. Numero de Patente US 6890533 B2, 2005.

⁹ Krasutsky, P.; Carlson, R. M. *PCT Int. Appl.* **2002**, 97.

¹⁰ Bringmann, G.; Saeb, W.; Assi, L. A.; François, G.; Narayanan, A. S. S.; Peters, K.; Peters, E.M. *Planta Med.* **1997**, 63, 255-257.

¹¹ Alvarenga, N.; Ferro, E. A. *Studies in Natural Products Chemistry, Bioactive Natural Products (Part K)* **2005**, Elsevier Science Publisher: Amsterdam.



Ante la necesidad de nuevos agentes antimicrobianos y con los antecedentes anteriormente descritos, se evaluó la actividad antimicrobiana de los metabolitos aislados del estudio fitoquímico realizado a la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*. Estos ensayos fueron realizados en el Departamento de Microbiología y Biología Celular de la Universidad de La Laguna bajo la dirección de la Dra. Laila Moujir.

Se ensayó la actividad antimicrobiana empleando los siguientes microorganismos:

- Bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *S. epidermis* CECT232, *S. saprophyticus* CECT335, *Bacillus subtilis* CECT39, *B. cereus* CECT496, *B. pumilus* CECT29, *B. megaterium* CECT44, *Mycobacterium smegmatis* CECT3032, *Enterococcus faecalis* CECT481.
- Bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* CECT99, *Proteus mirabilis* CECT170, *P. aeruginosa* CECT118, *Salmonella sp* CECT450.
- Levadura: *Candida albicans* UBC1.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) de los compuestos, previamente disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), se determinó por el método de microdilución en medio líquido, utilizando placas de 96 pocillos y siguiendo la metodología descrita en diversas publicaciones^{12,13}.

Los compuestos evaluados son los que se relacionan a continuación:

- 2 diterpenos con esqueleto de *ent*-rosano: **D1** y **D2**.
- 10 triterpenos con esqueleto de lupano: **L1**, **L2**, **L6**, **L7**, nepeticina (**L8**), rigidinol (**L13**), cafeato del lupeol (**L16**), 3-*epi*betulina (**L19**), ácido 3-*epi*betulínico (**L22**) y glochidiol (**L23**).
- 2 triterpenos con esqueleto de friedelano: barudiona (**F5**) y 6-*epi*barudiona (**F6**).
- 1 nor-triterpenometilenquinona: netzahualcoyonol (**Q5**).
- 4 nor-trirpenometilenfenoles: **Fe1**, **Fe2**, **Fe3**, cognatina (**Fe5**).

De los compuestos ensayados los únicos que presentaron actividad frente a las bacterias Gram positivas, fueron nepeticina, 6-*epi*barudiona, netzahualcoyonol y **Fe3** (figura 4.4.4) y cuyos resultados se presentan en la tabla 4.1.1. Ninguno resultó ser activo frente a las bacterias Gram-negativas y la levadura *Candida albicans* (CMI <40 g/ml)

¹² Charibi, D. S.; Giron, S.; Michel, G. J. *Periodontal Res.* **1990**, 25, 201-206.

¹³ Núñez, M. J.; Reyes, C. P.; Jiménez, I. A.; Moujir, L.; Bazzocchi, I. L. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1018-1021.

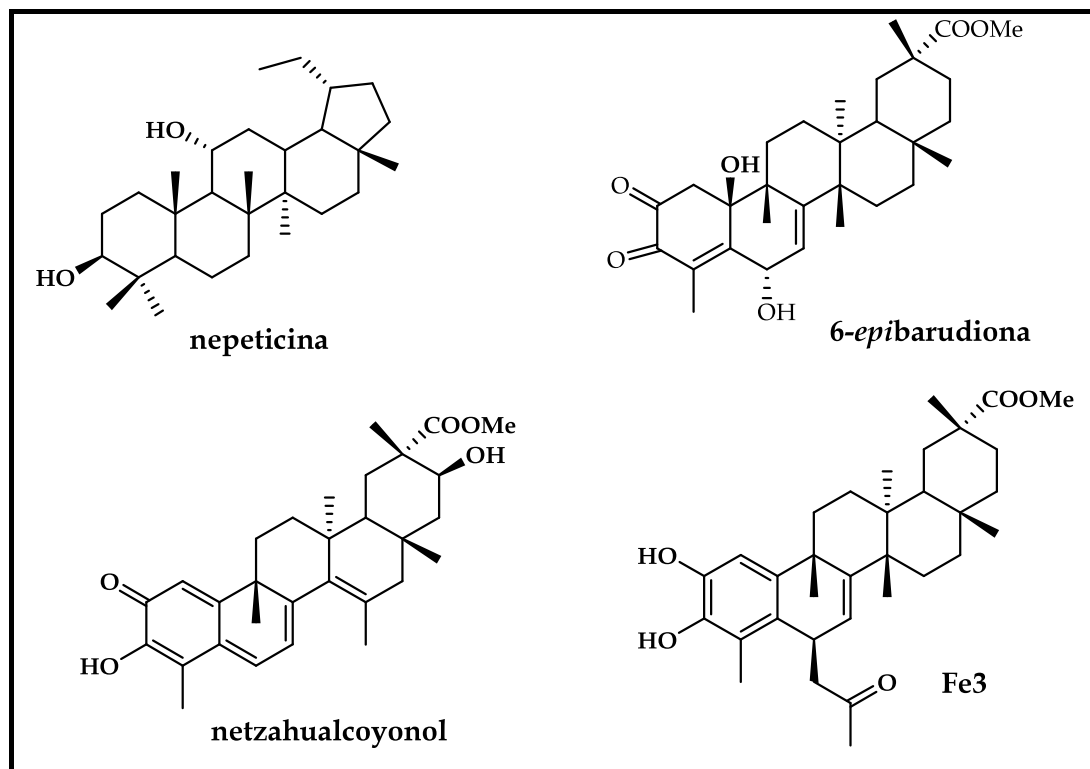


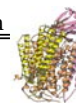
Fig.4.4.4. Metabolitos con actividad antimicrobiana aislados de *M. cuzcoina*.

Tabla 4.4.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bacteriostática (CMB) de 6-epibarudiona, nepeticina, netzahualcoyonol y F3, expresada en g/ml, frente a bacterias Gram positivas^a.

Bacterias	6-epibarudiona		Nepeticina		Netzahualcoyonol		Fe3		control
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI
<i>S. aureus</i>	40-20	>40	>40	>40	5	10	>20	>20	5-2
<i>S. epidermis</i>	10-5	20	>40	>40	1,25	>40	>20	>20	5
<i>S. saprophyticus</i>	20-10	>40	>40	>40	2,5	>40	>20	>20	40-20
<i>B. subtilis</i>	20-10	40	20-10	>40	2,5-1,25	5-2,5	10-5	10	2-5
<i>B. cereus</i>	5-2,5	5	>40	>40	1,25-0,625	1,25	>20	>20	n.e ^c
<i>B. pumilus</i>	n.e ^c	n.e ^c	20-10	>40	n.e ^c	n.e ^c	n.e ^c	n.e ^c	>10

^a Todos los ensayos se realizaron por triplicado. ^b Se usó como control positivo, cefotaxima. ^c n.e: no ensayado.

Como era de esperar, teniendo en cuenta los antecedentes, el metabolito más activo resultó ser la nor-triterpenometilenquinona, siendo más activa que el control usado y que otros metabolitos de esta familia química que han sido ensayados previamente¹¹.



4.4.2. Actividad antiinflamatoria.

4.4.2.1. Introducción.

La **inflamación** es un proceso fisiopatológico complejo, caracterizado por el enrojecimiento, aumento de la temperatura, hinchazón y disminución de la función de los órganos. Se trata de una respuesta del organismo frente a una infección, a un agente químico/físico, o frente a la lesión de un tejido, que proporciona una señal de alarma que dispara las repuestas inmunitarias específicas. La respuesta inflamatoria surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado¹.

La inflamación está relacionada con los diferentes tipos de alergias, algunas enfermedades autoinmunes, como el shock séptico y la artritis reumatoide. Recientemente se ha descrito que muchas de las células y sustancias implicadas en el proceso inflamatorio juegan un papel importante en patologías que anteriormente no se habían relacionado con el proceso inflamatorio, como son el Alzheimer, enfermedades cardiovasculares como la arteriosclerosis y el cáncer. Estos descubrimientos han incrementado el interés por comprender el mecanismo molecular y celular del proceso inflamatorio, así como por identificar nuevas dianas para el desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias².

4.4.2.1.1. Respuesta inflamatoria, mecanismo celular

La respuesta inflamatoria está mediada por una gran cantidad de señales moleculares producidas por neutrófilos, monocitos/macrófagos, células de la matriz, plaquetas y linfocitos, como consecuencia de la activación de una cascada de señales. Ello ocasiona la formación de un edema, como resultado del trasvaso de proteínas, fluidos y acumulación de leucocitos en el lugar de la inflamación.

Los macrófagos juegan un papel crucial en la iniciación, modulación y perpetuación de la respuesta inflamatoria. La activación de estas células por citoquinas pro-inflamatorias y componentes celulares bacterianos, promueve la síntesis y liberación de gran cantidad de óxido nítrico (NO), eicosanoides, lípidos bioactivos,

¹ Flores, J. *Farmacología Humana* **2003**, Masson, Barcelona.

²Heras, B.; Rodríguez, B.; Bosca, L.; Villar, A. M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, 3 (2), 171-185.

citoquinas (factor de necrosis-tumoral TNF-) e interleuquinas, mediadores que están relacionados con el comienzo de la inflamación. El metabolismo oxidativo del ácido araquidónico (fig 4.4.5), produce la síntesis de las prostaglandinas (PGs), los leukotrienos (LTs), los tromboxanos (TBX o TX) y hidroxiperoxiácidos (HPETES)³.

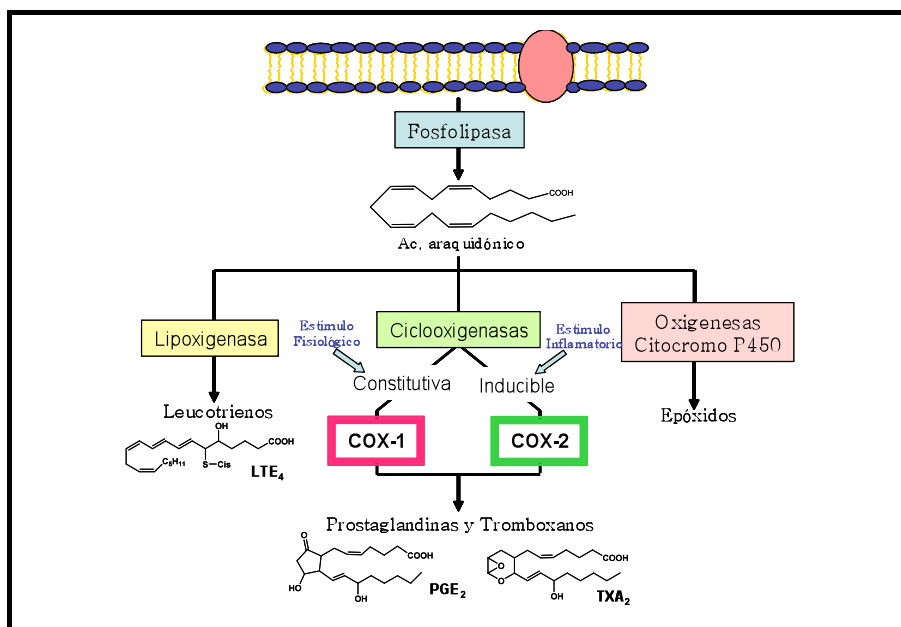


Fig 4.4.5. Esquema general de la biosíntesis de las distintas familias de eicosanoides.

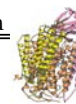
Las ciclooxygenasas catalizan el primer paso limitante en la síntesis de las prostaglandinas y tromboxanos (TXs) a partir del ácido araquidónico. Se han identificado dos ciclooxygenasas: la constitutiva, la COX-1 y la inducible, la COX-2. La COX-1 es la isoforma constitutiva, que está implicada en la homeostasis, mediante el mantenimiento de la mucosa gástrica, control de la agregación plaquetaria, en el balance de electrolitos y en ciertas funciones renales. Con respecto a la COX-2 también es expresada de forma constitutiva en ciertas zonas del organismo, pero en mayor medida en circunstancias fisiopatológicas como la inflamación, hiperalgesia, artritis reumatoide, glomérulo nefrítico, angiogénesis, resorción ósea, cáncer de colon, mama y enfermedad de Alzheimer⁴.

Otra molécula implicada en la respuesta inflamatoria es el óxido nítrico (NO), en los tejidos inflamados se observa una alta concentración de este metabolito que es sintetizado por muchas de las células que participan en la respuesta inflamatoria⁵. La enzima inducible, la isoforma 2 de la óxido nítrico sintetasa (NOS-2 o iNOS), produce

³ del Rio, J. Farmacología Básica. 1996, Síntesis. Madrid.

⁴ Simmons, D. L.; Botting, R. M.; HLA, T. *Pharmacol. Rev.* 2004, 56 (3), 387-437.

⁵ Bandarage, U. K.; Janero, D. R. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2001, 1 (1), 57-70.



altas concentraciones de NO tras la estimulación por agentes pro-inflamatorios, como citoquinas y lipopolisacáridos bacterianos. En el tratamiento de inflamaciones crónicas (artritis reumatoide, gastritis,...) la inhibición en la producción de NO ha dado resultados satisfactorios.

4.4.2.1.2. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

Para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, el dolor y la fiebre se han usado ampliamente los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) (fig. 4.4.6). Estos fármacos actúan inhibiendo la síntesis de las prostanglandinas, por inhibición de las dos ciclooxigenasas (COX).

El descubrimiento en la pasada década de la COX-2 abrió una nueva era en la farmacología de los AINES, lo que ocasionó la síntesis, comercialización y uso generalizado de fármacos inhibidores selectivos de la COX-2, que muestran las mismas propiedades farmacológicas y terapéuticas que los antiinflamatorios no esteroideos conocidos, pero que carecen de los efectos adversos de índole gastrointestinal y renal.

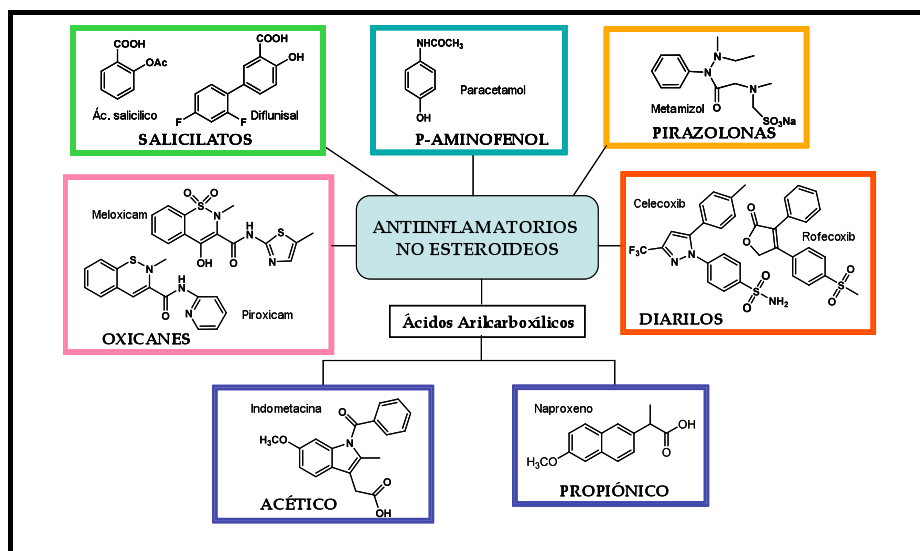


Figura 4.4.6. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

La mayoría de AINES actualmente disponibles inhiben, a concentraciones terapéuticas, la actividad enzimática de ambas isoformas de la ciclooxigenasa (fig. 4.4.7). Algunos AINES, como meloxicam y el piroxicam, muestran una inhibición preferencial por la COX-2, mientras que el celecoxib y el rofecoxib inhiben exclusivamente esta isoenzima⁶.

Tras doce años de investigación sobre la COX-2 se han comercializado tres fármacos (celecoxib, rofecoxib y valdecoxib) que son selectivos para esta enzima y que

⁶ Gilroy, D. W. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 2004, 1 (3), 313-319.

poseen la misma actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria que los AINES no selectivos. Tras tratamientos largos con este tipo de fármacos, sobre todo con rofecoxib, se ha demostrado que poseen menos toxicidad gástrica que los no selectivos, sin embargo, se ha observado una elevada incidencia de infartos de miocardio en las personas tratadas, lo que ha suscitado cierto recelo en el uso de los mismos, al no conocerse sus efectos secundarios.

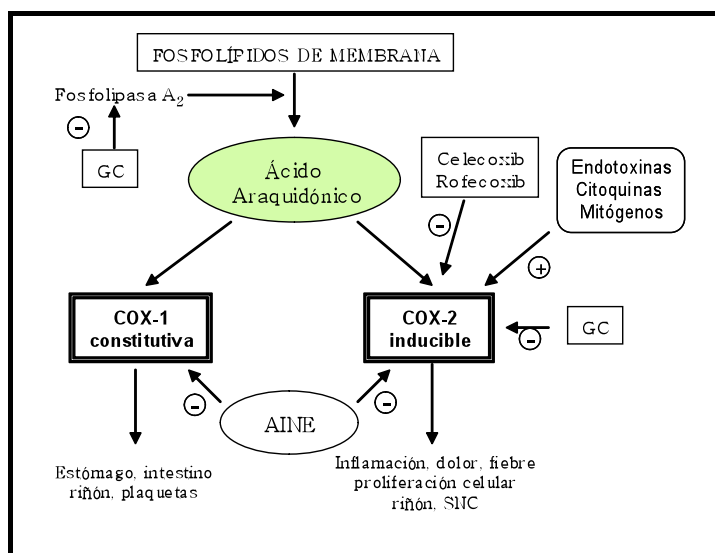


Figura 4.4.7. Esquema del mecanismo de acción de los AINES, glucocorticoides (GC) e inductores de la expresión de COX-1 y COX-2

4.4.2.1.3. Productos naturales con actividad antiinflamatoria.

Diversos extractos y metabolitos secundarios aislados de plantas superiores han mostrado una potente actividad antiinflamatoria, al interferir directamente o indirectamente con moléculas proinflamatorias claves como la iNOS y COX-2.

Entre los metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria podemos destacar, por ser uno de los más ampliamente estudiados y presentar una interesante actividad, los triterpenos pentacíclicos⁸.

Se ha descrito que la resina de *Boswellia serrata* posee un efecto beneficioso en el tratamiento de pacientes con colitis crónica, siendo uno responsables de esta actividad el ácido boswellico. Un derivado de este metabolito, el ácido 3-acetil-11-ceto- -boswellico, inhibe la producción de moléculas proinflamatorias, con una CI₅₀ de 1,5 M⁸.

⁷ Calixto, J. B.; Otuki, M. F.; Santos, A. R. S. *Planta Med.* **2003**, *69*, 973-983.

⁸ Safayhi, H.; Sailer, E.-R. *Planta Med.* **1997**, *63*, 487-493.

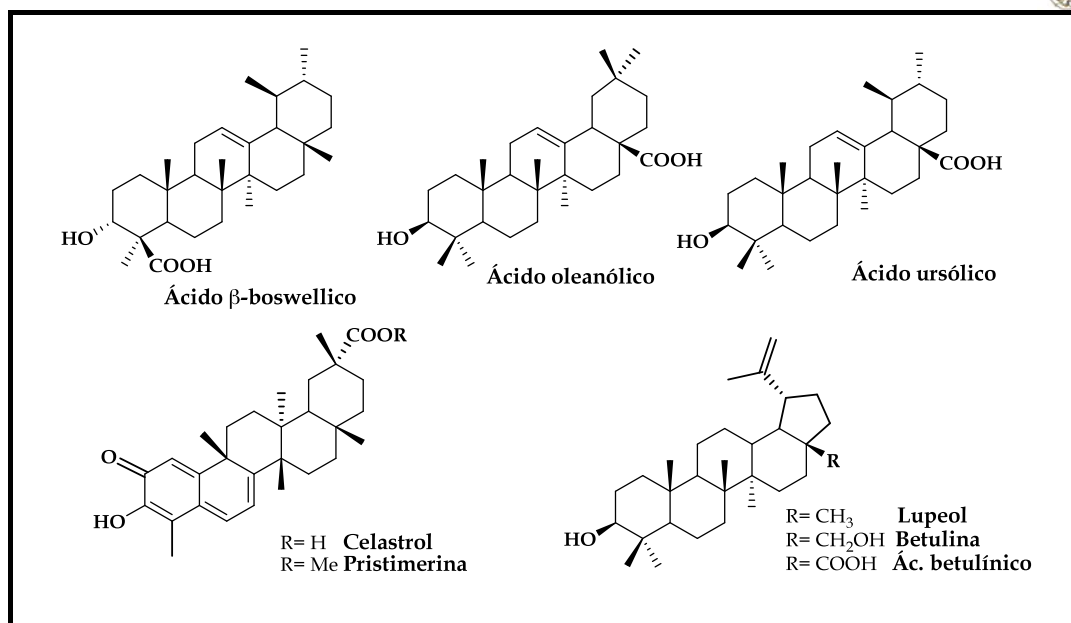
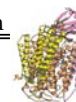


Figura 4.4.8. Ejemplos de triterpenos pentacíclicos con actividad antiinflamatoria.

Los ácidos ursólico y oleanólico presentaron, en ensayos *in vitro*, una inhibición selectiva de COX-2 a 130 y 295 μ M, respectivamente. El ácido oleanólico en ensayos *in vivo* redujo el edema producido por bradiquinin, aproximadamente en un 60% a una dosis de 30 mg/kg.

El lupeol ha sido también evaluado *in vivo*, observándose una disminución del edema, del 58% a una dosis de 50 mg/kg. La betulina, el ácido betulínico, el lupeol y el acetato del lupeol inhiben así mismo la inflamación a bajas concentraciones.

La pristimerina y el celastrol, son *nor*-triterpenometilenquinonas y este tipo de metabolitos únicamente se han aislado de especies de la familia *Celastraceae*, siendo indicadores quimiotaxonómicos de esta familia. La pristimerina reduce la actividad de iNOS, inhibiendo la producción de NO en ensayos *in vitro* con una CI_{50} de 0,2 μ M. Por otro lado, el celastrol disminuyó la producción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos con una CI_{50} de 30 nM, por lo que dado el extraordinario resultado *in vitro*, se realizaron los ensayos *in vivo*, inhibiendo la artritis inducida en ratón a una dosis 3 mg/kg⁹.

Se ha evaluado la actividad antiinflamatoria, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, de un gran número de triterpenos pentacíclicos, mostrando algunos de ellos una extraordinaria actividad. Esto hace que la investigación en este tipo de metabolitos resulte prometedora para el futuro desarrollo de fármacos clínicamente útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y que puedan prevenir o paliar algunas de

⁹ Calixto, J. B.; Campos, M. M.; Otuki, M. F.; Santos, A. R. S. *Planta Med.* **2004**, 70, 93-103.

las enfermedades más acuciantes en la actualidad, como son la artritis reumatoide, el Alzheimer, la arterosclerosis o el cáncer.

Las especies de la familia *Celastraceae* son una extraordinaria fuente de triterpenos pentacíclicos y con los antecedentes expuestos anteriormente, el estudio fitoquímico de especies de esta familia resulta de interés en la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios.

4.4.2.2. Resultados y discusión.

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de dieciséis triterpenos con esqueleto de lupano, aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina* y de cuatro derivados (figura 4.4.9). Esta actividad fue realizada por el grupo de la Prof. M. J. Alcaráz de la Universidad de Valencia, con el que mantenemos una colaboración.

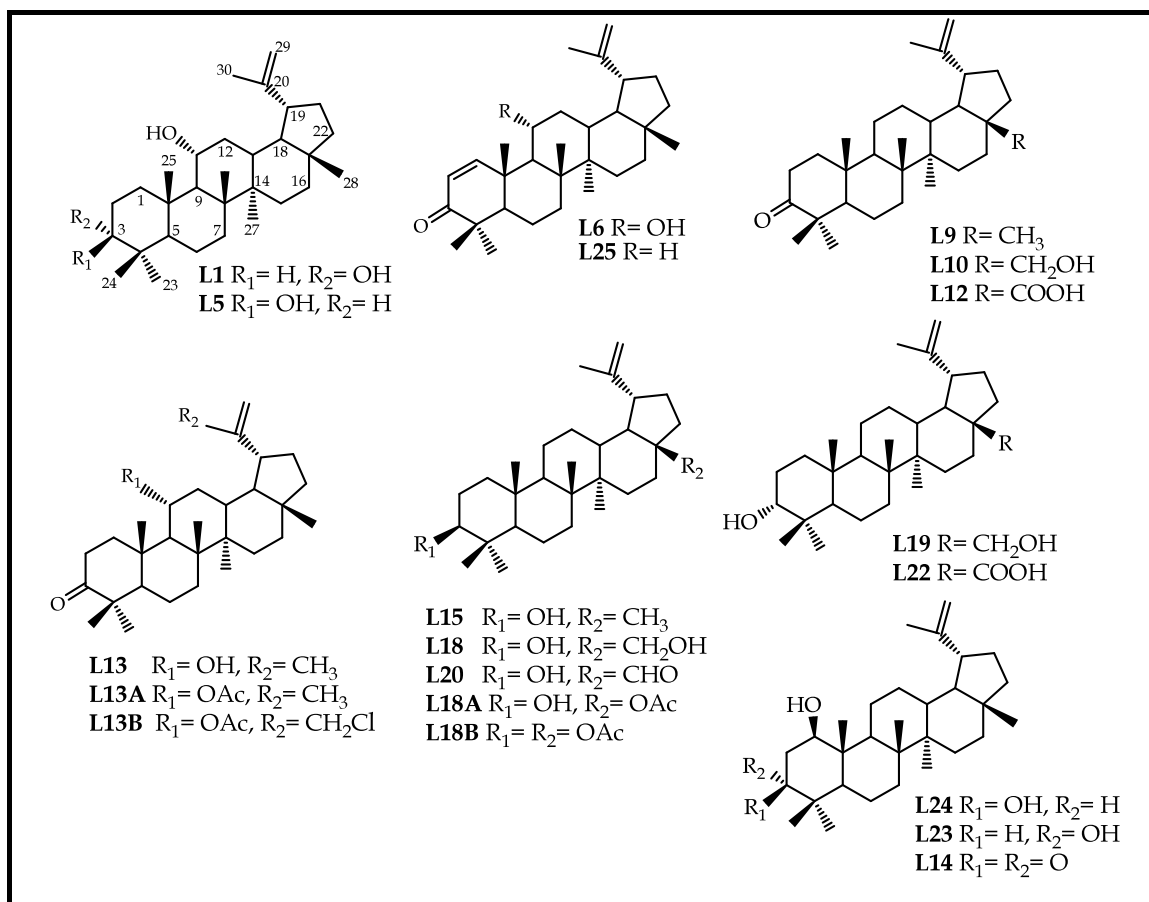
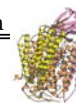


Figura 4.4.9. Lupanos evaluados por su actividad antiinflamatoria.

Estos metabolitos fueron ensayados como inhibidores de la producción de NO y PGE₂ (Tabla 4.4.2) en macrófagos de ratón (RAW 264,7), usándose como referencia 1400W (inhibidor específico de la iNOS) y NS 398 (inhibidor de la COX-2). La



metodología empleada se encuentra recogida en diversas publicaciones^{10,11}, usándose como un ensayo preliminar en la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios.

Tabla 4.4.2. Efecto de los lupanos aislados y derivados en la producción de NO y PGE.

Compuesto	Viabilidad ^a	NO		PGE ₂	
	(10 ⁻⁶ M)	% Inhibición ^a	CI ₅₀ (M) ^b	% Inhibición ^a	CI ₅₀ (M) ^b
L1	100,0±0,0	22,0±3,6 ^c	N.D.	20,2±0,2 ^c	N.D.
L6	88,4±1,9	53,1±4,2 ^d	8,2	53,6±5,9 ^d	5,4
L8	96,8±3,1	4,0 ±4,0	N.D.	27,1±4,2 ^c	N.D.
L9	92,7 ±3,1	7,5 ±3,3	N.D.	35,2 ±4,9 ^c	N.D.
L10	100,0 ±0,0	27,3 ±2,3 ^c	N.D.	34,5 ±12,7 ^c	N.D.
L12	72,1 ±2,9 ^c	69,2 ±5,1 ^d	0,3	58,4±3,9 ^d	2,7
L13	100,0±0,0	42,7±1,7 ^d	12,9	44,6±4,7 ^d	20,7
L13A	90,9±2,3	67,7±4,8 ^d	5,3	59,6±3,9 ^d	3,9
L13B	98,4±1,2	69,4±4,3 ^d	4,7	78,8±5,3 ^d	0,3
L14	99,0 ±1,0	14,3 ±1,7	N.D.	0,0 ±0,0	N.D.
L15	98,8±0,7	8,0±2,5	N.D.	42,1±2,1 ^d	18,0
L18	69,9±1,2 ^c	50,1±3,0 ^d	5,0	47,7±4,3 ^d	12,9
L18A	84,4±1,2	55,9±5,0 ^d	4,7	69,5±5,1 ^d	1,7
L18B	90,1±1,6	27,4±4,4 ^c	N.D.	32,5±6,6 ^c	N.D.
L20	100,0±0,0	19,5 ±4,0	N.D.	0,0 ±0,0	N.D.
L19	91,0 ±5,3	44,9 ±5,7 ^d	12,8	49,3 ±2,7 ^d	9,6
L22	67,1 ±4,1 ^c	89,1 ±4,4 ^d	0,7	68,7 ±5,7 ^d	0,6
L23	100,0 ±0,0	25,8 ±0,5 ^c	N.D.	47,2 ±5,1 ^d	15,5
L24	96,1 ±2,2	26,5 ±2,8 ^c	N.D.	0,0 ±0,0	N.D.
L25	100,0±0,0	0,0±0,0	N.D.	33,2±0,6 ^c	N.D.
1400W	99,0 ±0,2	71,8 ±6,4 ^d	0,4	N.D.	N.D.
NS 398	98,2±0,4	N.D.	N.D.	100,0 ±0,9 ^d	2,5 nM

^a Los datos son la media ± la desviación estándar (n=6). Los compuestos fueron ensayados a una concentración de 10⁻⁶ M. Los porcentajes de inhibición, tanto de NO como PGE₂, de **7**, **10** y **13** fueron obtenidos a una concentración de 5⁻⁶ M. ^b Los valores representan la concentración requerida para producir el 50% de la respuesta inhibitoria, con un límite de confianza del 95%. ^c P<0,05 ^d P<0,01 con respecto al control. N.D. no determinado.

Algunos de los lupanos ensayados mostraron una excelente actividad, inhibiendo la producción de NO y PGE. Los triterpenos que resultaron más activos fueron **L6** (11⁻hidroxi-glochidona), **L12** (ácido betulónico), **L13** (rigidenol), **L13A** (acetilado del rigidenol), **L13B** (11⁻acetoxi-30-cloro-3-oxo-lup-20(29)-eno), **L18** (betulina), **L19** (*epibetulina*) y **L22** (ácido *epibetulínico*), que inhibieron tanto la

¹⁰ Fernández, P.; Guillén, M. I.; Ubeda, A.; López-Cremades, P.; Aller, E.; Lorenzo, A.; Molina, P.; Alcaraz, M. J. *N-S Arch. Pharmacol.* **2003**, *368*, 26-32.

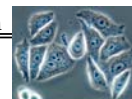
¹¹ Reyes, C. P.; Núñez, M. J.; Jiménez, I. A.; Busserolles, J.; Alcaraz, M. J.; Bazzocchi, I. L. *Bioorg. Med Chem.* **2006**, *14*, 1573-1579.

producción de NO como de PGE. Por otra parte, los lupanos **L15** (lupeol) y **L23** (glochidiol) inhibieron preferentemente la producción de PGE, lo que indica una selectividad en la inhibición de la COX-2.

Un cuidadoso estudio de los resultados obtenidos nos permite realizar un estudio preliminar de la relación estructural-actividad, revelando:

- La estereoquímica del grupo hidroxilo del C-3 juega un importante papel en la actividad, esto se advierte al comparar **L1** y **L24** con **L8** y **L23**, respectivamente, observándose la preferencia de la estereoquímica .
- La presencia de un grupo oxigenado en el C-28 tiene importantes consecuencias en la actividad. La sustitución del metilo por un grupo hidroximetilo (**L10** y **L18**) incrementa la inhibición sobre todo del NO, mientras que la presencia de un grupo carboxilo (**L12** y **L22**) incrementa la actividad, pero también la citotoxicidad.
- La acetilación del C-28 de la betulina (**L18A**) incrementa la actividad y reduce la citotoxicidad, mientras que la doble acetilación del C-28 y C-3 (**L18B**) reduce de forma importante la inhibición.
- Un grupo hidroxilo sobre el C-11 (**L6 versus L25**) aumenta la actividad inhibitoria sobre todo de NO. La acetilación del grupo hidroxilo sobre C-11 (**L13A**) aumenta la actividad, pero también la citotoxicidad.
- La cloración del C-30 incrementa significativamente la actividad (**L13B**).

Estos datos indican que los triterpenos con esqueleto de lupano son efectivos inhibidores de la producción de NO y PGE *in vitro* y por lo tanto la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina* una extraordinaria fuente de potenciales agentes antiinflamatorios.



4.4.3. Actividad citotóxica.

4.4.3.1. Introducción.

El cáncer engloba a un grupo complejo y heterogéneo de patologías, en las que las células proliferan descontroladamente e invaden y dañan los tejidos vecinos. Esto se produce al eliminar las restricciones que limitan la división celular en células y tejidos ya diferenciados¹.

El cáncer no es causado por un único factor, sino por una combinación de varios factores que se engloban en dos grupos: la herencia y el ambiente. Por lo que, el cáncer es un grupo de enfermedades de origen multigénico y multifactorial.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud², el cáncer es la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados, en los que una de cada cuatro personas fallece debido a esta enfermedad. Once millones de personas en todo el mundo son diagnosticadas de algún tipo de cáncer al año, de las que siete millones fallecen por esta causa, que representa el 12,5% de todas las muertes anuales en el planeta.

La quimioterapia se basa fundamentalmente en el uso de fármacos con actividad antiproliferativa, siendo los compuestos más utilizados hoy día los que pertenecen al grupo de los citotóxicos. Su mecanismo de acción se basa en que son más activos frente a las células cancerosas que frente a las células normales. La mayoría de cánceres carecen de una única diana vital y específica que los haga sensibles a un fármaco en particular sin atacar también a las células sanas. Por ello, la especificidad de la quimioterapia contra el cáncer sólo puede conseguirse limitadamente, explotando las sutiles diferencias existentes entre las células cancerosas y las normales³.

Los tratamientos contra el cáncer basados en la combinación de fármacos, con diferentes dianas celulares y mecanismos de acción farmacológica, incrementan la especificidad de acción y la efectividad de la quimioterapia. Ya en la década de los 60, el uso combinado de fármacos citotóxicos demostró ser mucho más efectivo, tanto para

¹ Evan, G. I.; Vousden, K. H. *Nature*. **2001**, *411*, 342-348.

² <http://www.who.int/cancer/en/>.

³ Chabner, B. A.; Roberts, T. G. *Nat. Rev. Cancer*. **2005**, *5*, 65-72.

el tratamiento de cánceres metastásicos como para evitar la reaparición de tumores en pacientes a los que se les ha extirpado un tumor.

En los últimos años se ha producido una revolución en el tratamiento del cáncer, la terapia de diana específica (*targeted-therapy*). Este nuevo enfoque ha surgido debido a los estudios de biología celular y molecular de los tumores, que ha permitido identificar nuevas dianas de acción citotóxica en células cancerosas con potencial interés terapéutico⁴. Las nuevas dianas identificadas son en su mayoría elementos pertenecientes a las redes de la señalización intracelular encargados del control de la proliferación, supervivencia y muerte celular, que están alteradas en las células tumorales.

Además del problema de la especificidad y efectividad de la quimioterapia, está la multirresistencia a fármacos, unos de los principales inconvenientes que limita el éxito del tratamiento farmacológico del cáncer (capítulo 5.5).

4.4.3.1.1. Productos naturales con actividad citotóxica.

En la década de los 50, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) inició un programa de búsqueda de nuevos agentes anticancerígenos de plantas. Más de 400000 productos, tanto naturales como sintéticos, fueron evaluados por su actividad anticancerígena, incluyendo cerca de 180000 productos derivados de microorganismos y 114000 extractos de plantas. Este programa representó un esfuerzo combinado de diversas organizaciones de investigación en el área de la química médica, industrias y centros, tanto farmacéuticos como químicos⁵.

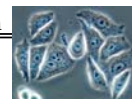
Entre 1990 y 1996 se aprobó el uso clínico de 20 fármacos anticancerígenos procedentes de productos naturales o derivados semi-sintéticos de estos. Esto incluye, Bisantreno (1990), Idarubicina (1990), Fosfato Fludarabina (1991), Pentostatina (1992), Interferón gamma 1^a (1992), Miltefosina (1993), Paclitaxel/Taxol (1993), Citarabina octofosfato (1993), Porfímero sódico (1993), Formestano (1993), Irinotecan (1994), Pegaspargaso (1994), Sobuzoxano (1994), Zinostatina estimalamer (1994), Bicalutamina (1995), Docetaxel/Taxotere (1995), Gemcitabina (1995), Raltitrexedo (1996) y Topotecan (1996).

Podemos destacar diversos alcaloides con actividad anticancerígena⁶, como es la **camptotecina**, un alcaloide pirano-indolizinoquinolina, aislado por primera vez de la

⁴ Sawyers, C. *Nature*. **2004**, 432, 297-297.

⁵ Mukherjee, A. K.; Basu, S.; Sarkar, N.; Ghosh, A. C. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 1467-1486.

⁶ Tringali, C. *Bioactive Compounds from Natural Sources*. 2001, Taylor and Francis: Nueva York.



madera y la corteza de *Camptotheca acuminata*. El Topotecan, un derivado de la camptotecina, recibió la aprobación de la FDA para el tratamiento del cáncer de pecho y ovario y su mecanismo de acción es por inhibición de la topoisomera I, esencial en el proceso de replicación del ADN. Por otra parte, la camptotecina es capaz de inhibir el fenotipo MDR mediado por la Pgp⁷. La 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38) presentó actividad frente al carcinoma de pulmón y el tratamiento combinado de SN-38 con otros agentes anticancerígenos ha dado excelentes resultados para el tratamiento del carcinoma de pulmón de células no-pequeñas. Un derivado de la camptotecina, el irinotecan se usa en clínica para el tratamiento del cáncer de colon y recto⁸.

Elíptica es un alcaloide antineoplásico presente en numerosas especies de la familia *Apocyanaceae*. Diversos derivados de la elicitina que poseen el núcleo de piridocarbazol, han mostrado una significativa selectividad en líneas tumorales de leucemia, adenocarcinoma y sarcoma. Estos compuestos actúan como agentes intercalantes del ADN, lo que lo favorece su estructura planar, impidiendo la síntesis del ADN y ARN.

Las **harringtoninas** son un grupo de alcaloides con núcleo de cefalotaxina, aislados de diversas especies de *Cephalotaxus*, de las cuales el más activo de ellos, el homoharringtonina, ha sido seleccionado para estudios clínicos en Estados Unidos.

La **colchicina** y alcaloides relacionados se han aislado del bulbo o semillas de *Colchicum autumnale* y de algunas especies de *Liliaceae*. La colchicina no se utiliza como antitumoral debido a su elevada toxicidad, pero es empleada como referencia en la evaluación de otros posibles fármacos con mecanismo similar, inhibidor de las tubulinas y microtubulos. Un derivado, la democolchicina es usado actualmente para el tratamiento de la leucemia mielocítica.

Los **alcaloides de la vinca**, aislados de *Catharanthus roseus*, son un grupo de metabolitos (vincristina, vinblastina, leurosina y leurosidina) extremadamente activos, empleados ampliamente en clínica para el tratamiento de diversas neoplasias. Actúan inhibiendo el ensamblaje de los microtubulos.

⁷ Chauvier, D.; Kegelaer, G.; Morjani, H.; Manfait, M. J. *Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1765-1775.

⁸ Srivasta, V.; Negi, A. S.; Kumar, J. K.; Gupta, M. M.; Khanuja, S. P. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5892-5908.

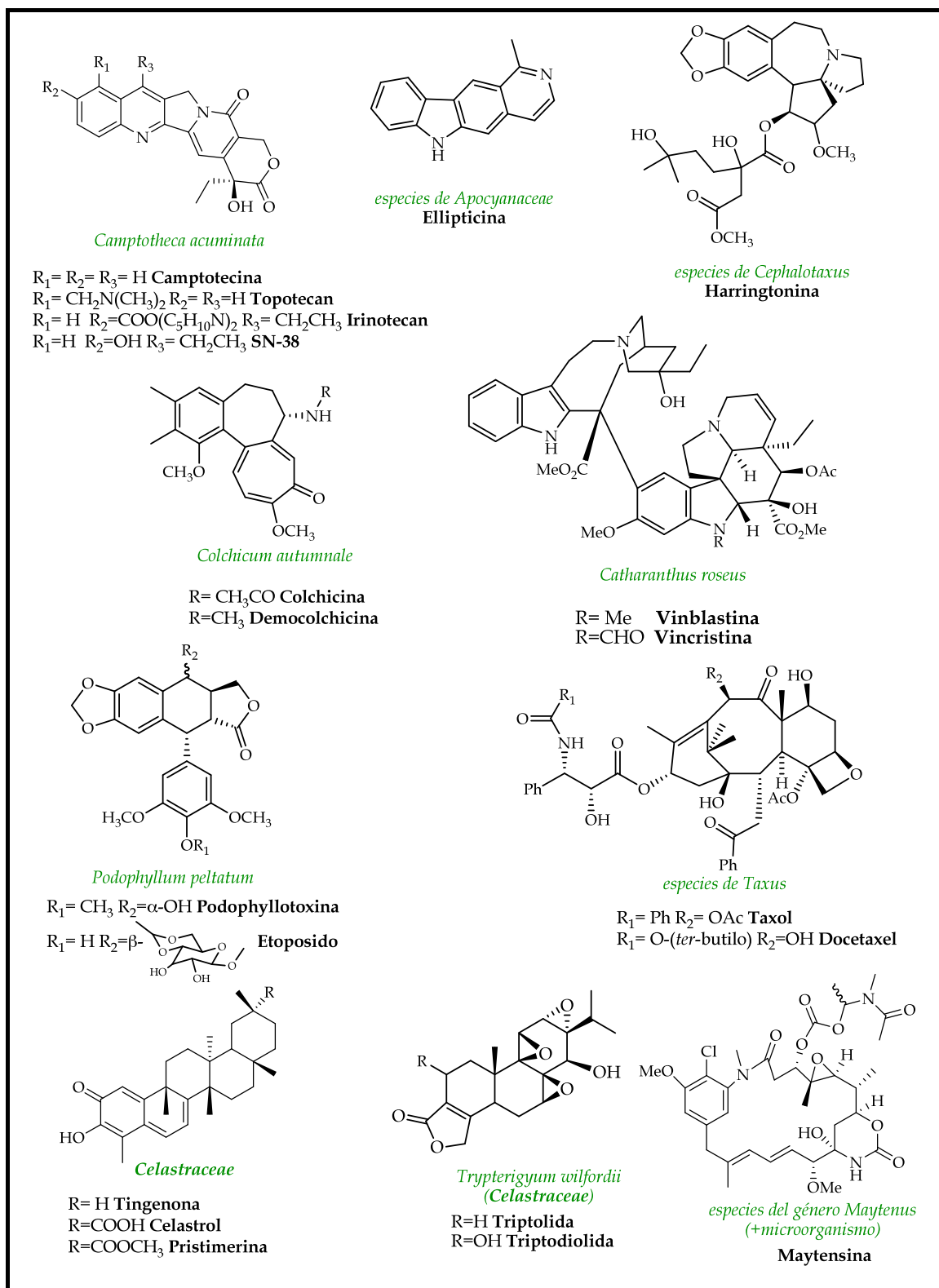
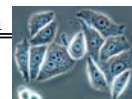


Figura 4.4.10. Productos naturales aislados de plantas superiores con actividad anticancerígena.

La **podophyllotoxina** es un lignano fenilpropanoide, aislado de *Podophyllum peltatum*. Los primeros ensayos de este metabolito en humanos no mostraron una respuesta significativa. Modificaciones posteriores, dieron lugar a metabolitos más



activos, destacando el etopósido, empleado actualmente en clínica, que fue el primer inhibidor de la topoisomerasa II identificado.

El **taxol** es un diterpeno que se obtiene de diversas especies de *Taxus* y presenta mayor actividad en tumores sólidos que en leucemias, utilizándose en el tratamiento del cáncer de ovario y pecho.

Por otro lado, se han identificado diversos metabolitos con actividad anticancerígena de especies de la familia *Celastraceae*. En la década de los 70 se estimuló el estudio de las especies de esta familia como consecuencia del aislamiento de los **maytensinoides**, ansamacrólidos con una significativa actividad antitumoral⁹. Estudios posteriores han revelado que la biosíntesis de este tipo de metabolitos puede ser producto de la simbiosis entre la raíz y un microorganismo¹⁰. El primer maytensinoide aislado fue maytensina, un agente antitumoral excepcionalmente interesante que presenta actividad a dosis de microgramos por kilogramo de individuo. Sin embargo, debido a sus efectos secundarios (hepatotóxicos) se abandonó su aplicación clínica. Recientes investigaciones han dado una nueva posibilidad para su uso terapéutico, al combinarla con anticuerpos específicos¹¹.

Los diterpenos triepoxidados, **triptolida** y triptidiolida, aislados de *Trypterigium wilfordii* (*Celastraceae*), presentan una significativa actividad inhibidora de células de leucemia (L-1210). Otro grupo de metabolitos con actividad citotóxica, aislados de celastráceas, son los **celastróloides**, las nor-triterpenometilénquinonas y fenoles, que han sido ensayados empleando diversas líneas tumorales¹². Debido a su actividad citotóxica han sido elegidos por el Comité de Evaluación Biológica de Fármacos Anticancerígenos, perteneciente al NCI, para los ensayos *in vivo* y evaluar su eficacia terapéutica.

⁹ Hamel, E. *Pharmacol. Ther.* **1992**, *55*, 31-51.

¹⁰ Pullen, C.; Schmitz, P; Hoffmann, D.; Meurer, K.; Boettcher, T.; Bamberg, D.; Pereira, A.; Castro, F.; Hauser, M.; Geertsema, H.; Van Wyk, A.; Mahmud, T.; Floss, H.; Leistner, E. *Phytochemistry*. **2003**, *62*, 377-387.

¹¹ Liu, C.; Chari, V. J. *Expert. Opin. Invest. Drugs*. **1997**, *6*, 169-172.

¹² Ravelo, A. G.; Estévez-Braun, A.; Chávez-Orellana, H.; Pérez-Sacau, E.; Mesa-Siverio, D. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 241-265.

4.4.3.2. Resultados y discusión.

La actividad citotóxica fue realizada en colaboración con el grupo de la Dra. Laila Moujir del Departamento de Microbiología y Biología Celular de la Universidad de La Laguna.

La actividad se determinó usando el método colorimétrico de Mosmann¹³, que se basa en la capacidad que poseen las células vivas de reducir el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)-2,5-difeniltetrazolio) por medio de la succinato deshidrogenasa existente en las mitocondrias. La metodología empleada se encuentra recogida en diversas publicaciones^{14,15}.

Las células empleadas para llevar a cabo los experimentos proceden de líneas celulares establecidas a partir de: carcinoma epitelial de cuello de útero humano (células HeLa), carcinoma de laringe humano (Hep-2), carcinoma humano de pulmón (A-549) y células no tumorales (Vero, células de riñón de mono verde africano).

Se evaluó la actividad a (figura 4.4.11):

- Dos diterpenos con esqueleto de *ent*-rosano: **D1** y **D2**
- Diez triterpenos con esqueleto de lupano: **L1-L2, L6-L7, L8, L13, L16, L19, L22 y L23.**
- Dos triterpenos friedelanos: **F5** y **F6.**
- Cuatro celastroloides: **Q5, Fe1, Fe3 y Fe5.**

Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en las tablas 4.4.3 y 4.4.4, en las que no se presenta la actividad de aquellos metabolitos con una $CI_{50} > 20$ g/ml.

¹³ Mosmann, T. J. *Immunol. Methods.* **1983**, *65*, 55-63.

¹⁴ Rodríguez, F. M.; López, M. R.; Jiménez, I. A.; Moujir, L.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L. *Tetrahedron.* **2005**, *61*, 2513-2519.

¹⁵ Núñez, M. J.; Reyes, C. P.; Jiménez, I. A.; Moujir, L.; Bazzocchi, I. L. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1018-1021.

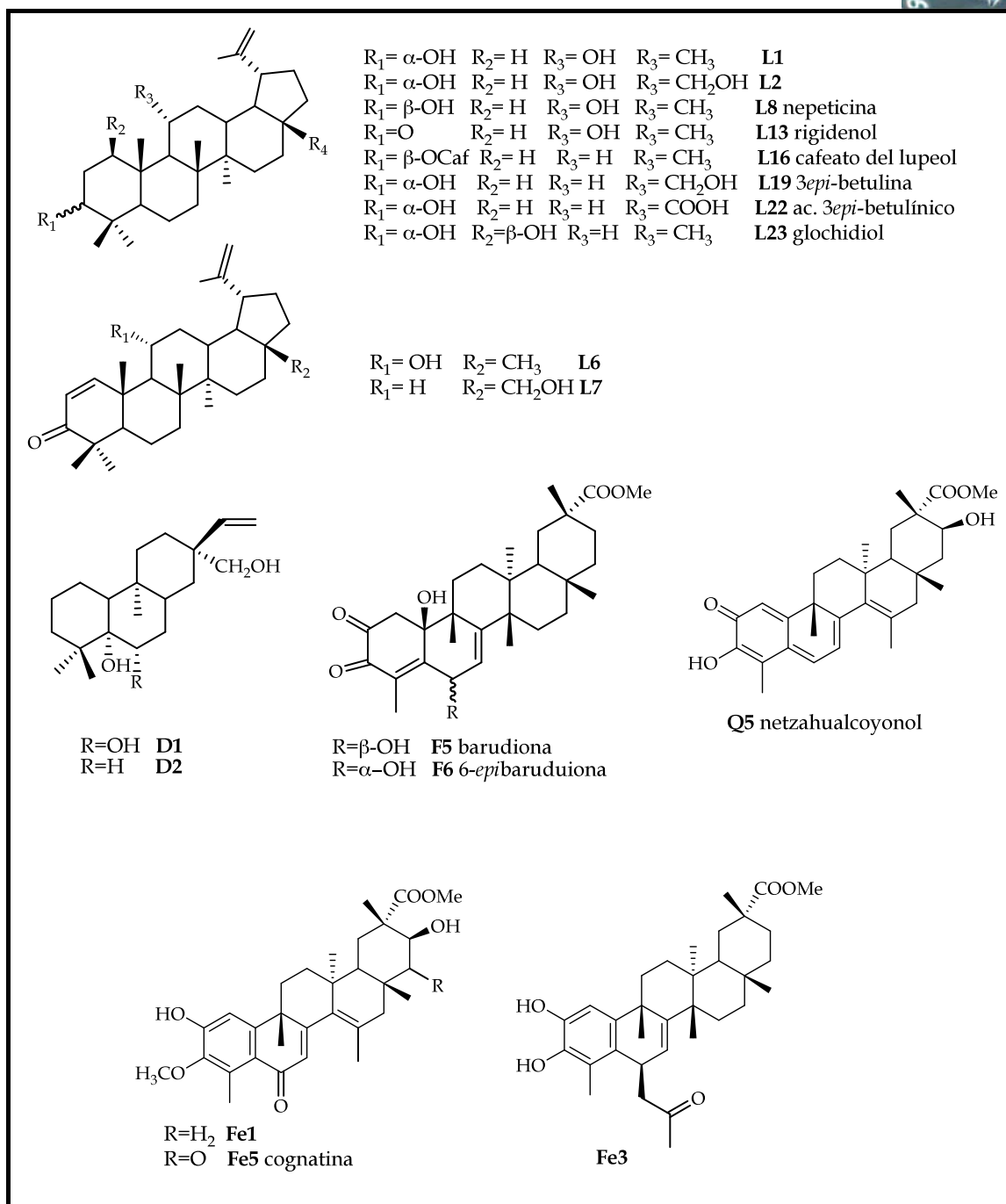
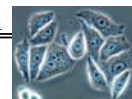


Figura 4.1.11. Metabolitos aislados de *M. cuzcoina* evaluados por su actividad citotóxica.

Los dos diterpenos ensayados resultaron inactivos ($\text{CI}_{50} > 20$ g/ml). Por otra parte, el triterpeno lupano más activo fue el ácido 3-epibetulínico (**L22**) con una CI_{50} de 1,8 y 8,9 g/ml frente a HeLa y Hep-2, respectivamente, tras 48 horas de exposición. Cabe destacar, que la actividad se incrementó aproximadamente 3 veces cuando las células Hep-2 estaban dividiéndose activamente (CI_{50} 3,1 g/ml). De igual manera es significativo el incremento de la actividad experimentado por **L3** y **L23** cuando las células se estaban dividiendo (fase logarítmica), e incluso a mayor tiempo de división

en el caso de las células HeLa. **L22** también presentó una toxicidad moderada (CI_{50} 5,1 g/ml, Vero), lo que nos indica que la presencia de un ácido carboxílico en C28 aumenta la citotoxicidad. Además, los lupanos con un grupo hidroxilo en C11 son más activos, **L1** y **L8** versus **lupeol** (CI_{50} >20 g/ml) y **L6** versus **glochidona** (CI_{50} >20 g/ml)¹⁶. Al comparar **L1** con **L8** se deduce que la esteroquímica para el grupo hidroxilo en C3 disminuye la toxicidad, manteniendo la actividad en las dos líneas tumorales. Sin embargo, un grupo hidroxilo en C28 disminuye la actividad, **L1** versus **L2**.

Tabla 4.4.3. Actividad citotóxica de los triterpenos con esqueleto de lupano. Datos^a expresados como valores de CI_{50} (g/ml).

Metabolitos	HeLa			Hep-2			Vero	
	log ^b	log+48h	log+72h	log	log+48h	log+72h	log	log +48 h
L1	6,1	5,2	-	6,1	7,4	-	6,4	7,5
L2	13,3	14,8	-	>20	>20		15,8	16,1
L6	5,8	9,2	-	10,6	10,4	-	11,6	14,0
L8	6,0	14,6	-	13,6	>20	-	>20	>20
L13	>20	13,3	8,0	>20	5,1	6,6	4,2	2,7
L22	1,8	2,1	-	8,9	3,1	-	5,1	4,6
L23	>20	13,6	4,6	>20	5,5	5,3	12,6	13,5
control^c	0,5	0,7	-	73,1	54,1	-	11,5	20,2

^a Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

^b Fase logarítmica de crecimiento.

^c Mercapturina se usó como control positivo.

Por otro lado, la única nor-triterpenometilénquinona ensayada (**Q5**), ya que las otras aisladas en este estudio ya habían sido ensayadas en otros estudios¹¹, resultó inactiva, lo que confirma que la extensión de la conjugación al anillo D no aumenta la actividad. De igual manera, los fenoles ensayados mostraron una moderada actividad (CI_{50} 14,8-20 g/ml), poniendo en evidencia que la presencia de un grupo aldehído o ácido en C23, que no se encuentra presente en nuestros metabolitos, son responsables de la actividad (por ejemplo: demetilzeylasterona¹¹).

¹⁶ Núñez, M., C. *Metabolitos secundarios bioactivos aislados de Maytenus chiapensis y Crossopetalum urugoga (Celastraceae)*. 2003, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.

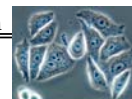


Tabla 4.4.4. Actividad citotóxica de los triterpenos con esqueleto de friedelano y celastroloide. Datos^a expresados como valores de CI₅₀ (g/ml).

Metabolitos	HeLa		A-549		Vero	
	log ^b	log+48h	log	log+48h	log	log+48 h
F5	>20	18,1	>20	>20	>20	>20
F6	14,8	12,0	19,8	17,0	9	13,6
Fe3	>20	15,8	>20	>20	17,8	>20
Fe5	17,4	14,8	>20	>20	>20	>20
control^c	0,5	0,7	-	-	11,5	20,2

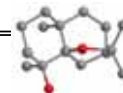
^a Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

^b Fase logarítmica de crecimiento.

^c Mercapturina se usó como control positivo.



5. SESQUITERPENOS DIHIDRO- β -AGAROFURANOS



5.1. Introducción

Los **sesquiterpenos y alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos**, con esqueleto básico de dihidro- β -agarofurano [5,11-epoxi-5 β ,10 α -eusedeman-4(14)-eno], están ampliamente distribuidos en las especies de las celastráceas y son considerados indicadores quimiotaxonómicos de esta familia¹.

Los agarofuranos son sesquiterpenos tricíclicos de la familia del **eudesmano** que poseen, como esqueleto base, un sistema decalínico con una unión *trans* y un anillo tetrahidrofuránico, entre los carbonos 5 y 7, en posición β con respecto al plano del sistema decalínico (figura 5.1.1).

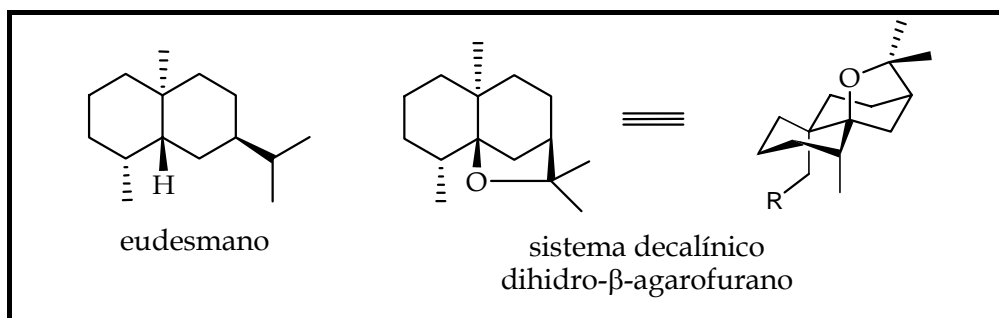


Figura 5.1.1. Esqueletos de eudesmano y dihidro- β -agarofurano.

Los primeros agarofuranos descritos en la literatura fueron α -agarofurano, β -agarofurano y dihidro- β -agarofurano (figura 5.1.2), aislados del aceite de la madera de *Aquilaria agallocha* (Timelaceae) por Jain y col.² en 1962.

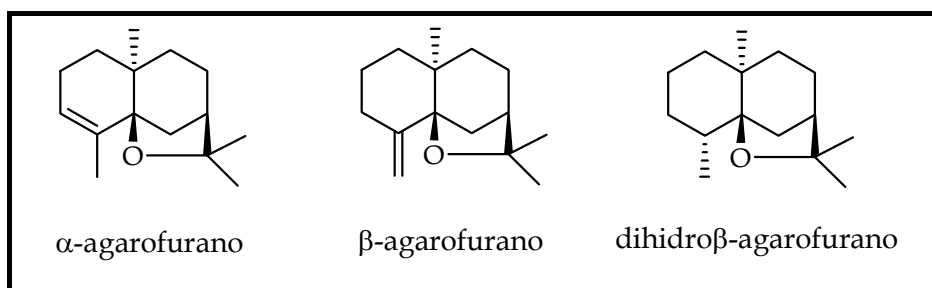


Figura 5.1.2. Primeros agarofuranos descritos aislados de *Aquilaria agallocha* (Timelaceae).

¹ Brüning, R.; Wagner, H. *Phytochemistry*. **1978**, *17*, 1821-1858.

² Jain, T. C.; Maheshwari, M. L.; Bhattacharyya, S. C. *Perf. Ess. Oil Res.* **1962**, *53*, 294-296.

Sus estructuras fueron determinadas un año más tarde por Maheshwari³ mediante estudios espectroscópicos (IR y RMN) y transformaciones químicas, que confirmaron la existencia en estas moléculas de un anillo decalínico, un anillo tetrahydrofuránico y una configuración α para el metilo angular en el carbono 10. Posteriormente, en 1967, Barrett y Büchi⁴ determinan la conformación de la unión de los dos anillos como *trans* y una disposición β del sustituyente tetrahydrofuránico.

Estudios de Rayos X y conformacionales realizados a estos sesquiterpenos han demostrado que, con pequeñas variaciones, los anillos A-B con unión *trans* forman un sistema decalínico de silla-silla, ligeramente distorsionado por la presencia del enlace 1,3-diaxial del anillo tetrahydrofuránico, prácticamente perpendicular al plano formado por los carbonos 5, 7, 8 y 10.

El precursor de los sesquiterpenos, tanto lineales como cíclicos, es el pirofosfato de farnesilo (FPP) que se ha formado por la repetición de tres subunidades de isopreno (5 carbonos) que se unen entre si, mediante una reacción “cabeza-cola”. En la figura 5.1.3 se resume la biogénesis de los sesquiterpenos agarofuránicos.

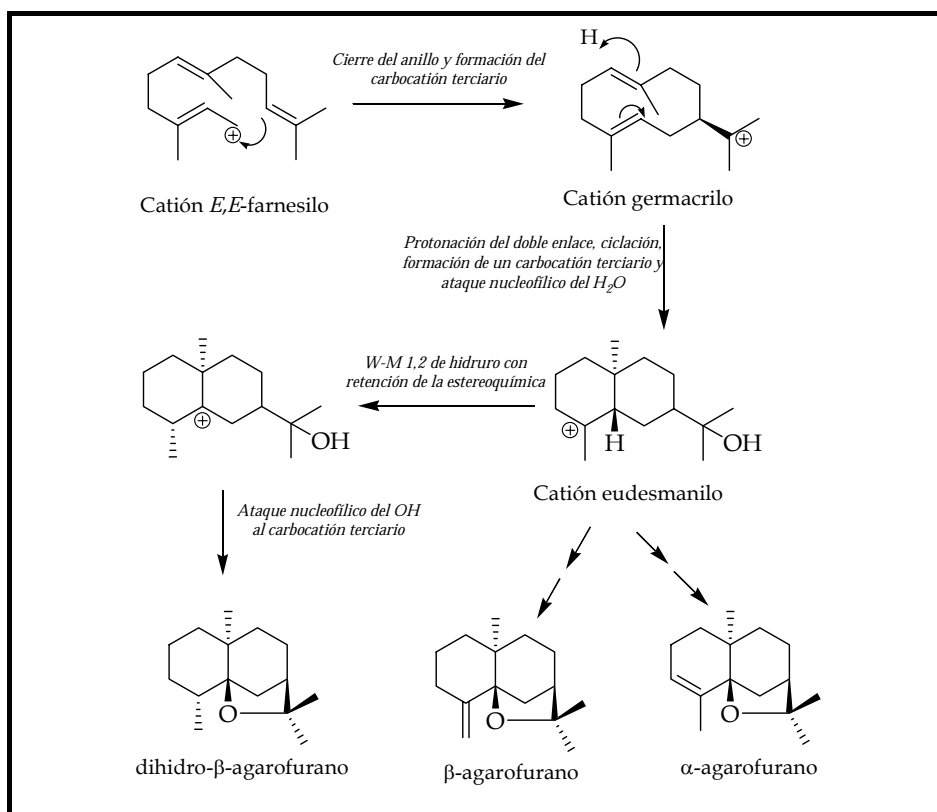
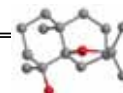


Figura 5.1.3. Biogénesis de los sesquiterpenos agarofuránicos.

³ Maheshwari, M. L.; Jain, T. C.; Bates, R. B.; Bhattacharyya, S. C. *Tetrahedron*. **1963**, *19*, 1079-1090.

⁴ Barrett, H. C.; Büchi, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5665-5667.



Los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos suelen encontrarse en forma de **poliésteres**, esterificados por una gran variedad de ácidos alifáticos, olefínicos, aromáticos o heterocíclicos, tales como acético, metilbutírico, benzoico, *t*-cinámico, 2 y 3-furoico y nicotínico, y con menos frecuencia se han encontrado los ácidos *isobutírico*⁵, epoxicinámico^{6,7}, hexanoico⁸, *N*-metil-2-piridin-5-carboxílico⁹, ácido trimetoxigálico, tíglico y angélico¹⁰ (figura 5.1.4).

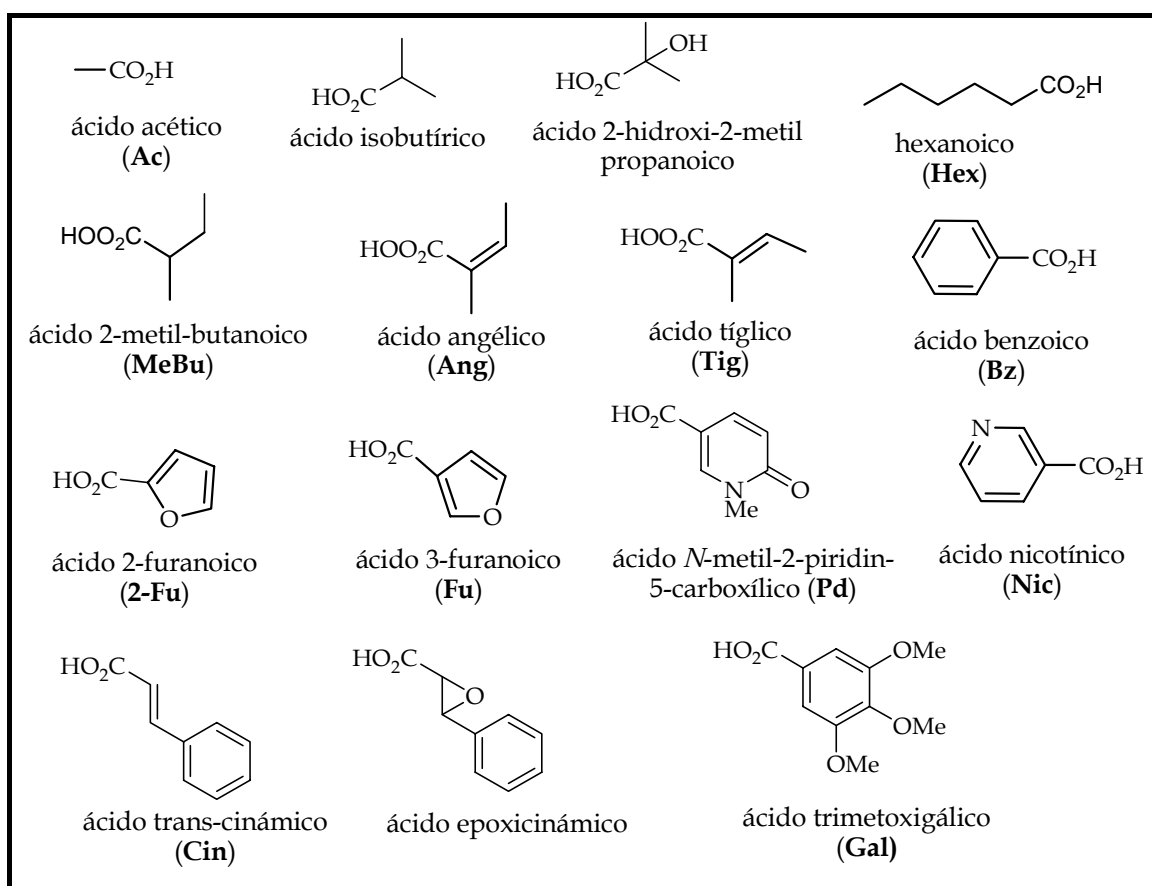


Figura 5.1.4. Los principales ácidos carboxílicos que esterifican a los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos.

En algunos casos, se encuentran ésteres procedentes de diácidos piridínicos (figura 5.1.5), como el ácido evonínico, wilfórdico, hidroxiwilfórdico o cassínico¹¹, esterificando las posiciones 3 β y 12, formando una macrolactona, entre las

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

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

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

⁸ Takaishi, Y., Tokura, K., Tamai, S., Ujita, K., Nakamo, K., Tomimatsu, T. *Phytochemistry*. **1991**, *30*, 1561-1566.

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

¹⁰ González, A. G., Jiménez, I. A., Ravelo, A. G., Bazzocchi, I. L. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57* (8), 1178-1182.

¹¹ Spivey, A.; Weston, M.; Woodhead, S. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 43-59.

posiciones C₃-C₁₂ del esqueleto sesquiterpenoide del tipo evoninol, euniminol o *isoeuniminol*. Independientemente del esqueleto base, cuando la función éster es el ácido nicotínico o sus derivados, se designan como **alcaloides sesquiterpénicos**.

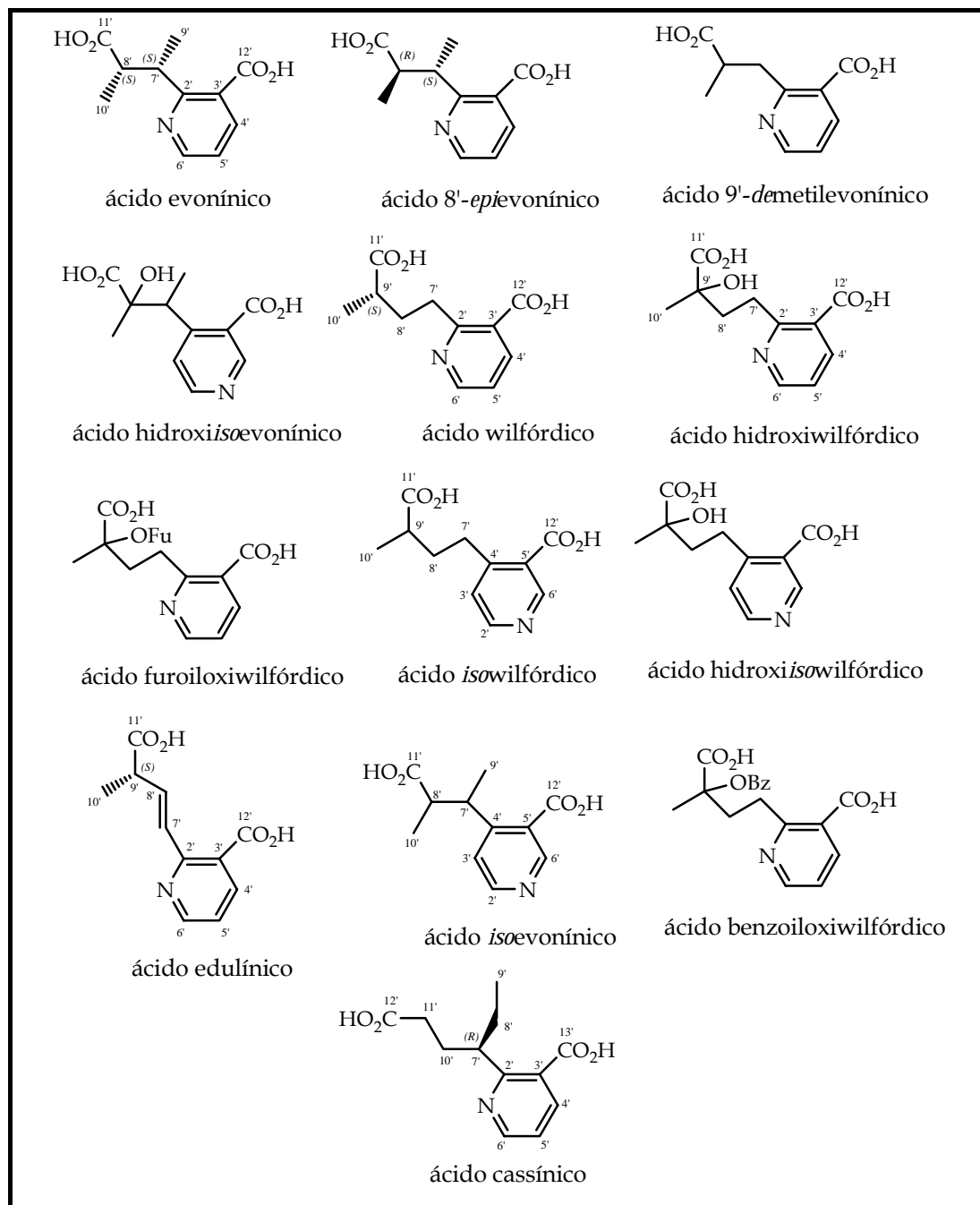
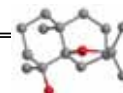


Figura 5.1.5. Ácidos dicarboxílicos que esterifican a los alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos.



Algunos ejemplos de estos alcaloides macrocíclicos son **evonina**¹² y **orthosphenina**¹³ (figura 5.1.6).

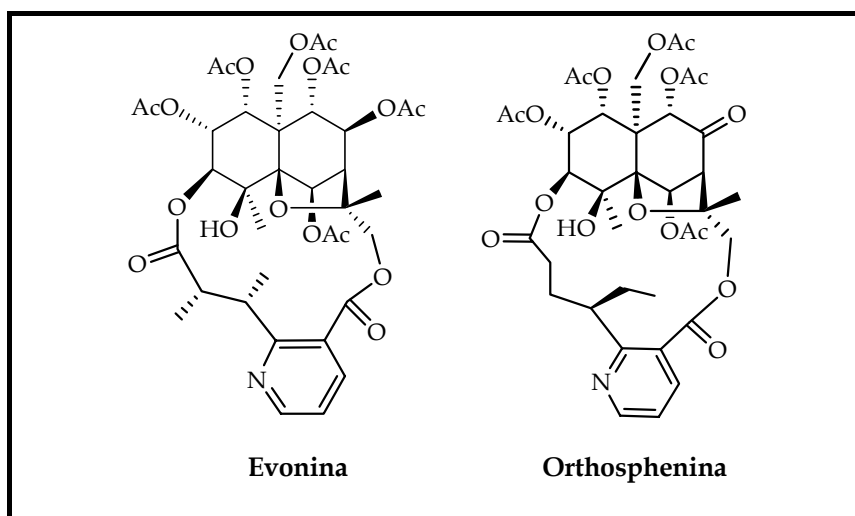


Figura 5.1.6. Alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos

La configuración absoluta de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos se ha resuelto en muchos casos mediante estudios de dicroísmo circular¹⁴, haciendo uso del método de la quiralidad del benzoato, que es una extensión del método del excitón quiralidad¹⁵, ya que presentan en la mayoría de los casos grupos cromóforos (benzoato, nicotinato ó cinamato), por lo que nos encontramos con productos que, bien naturales o derivados por introducción de nuevos cromóforos, son susceptibles de análisis mediante esta técnica.

Dada la complejidad y número de sesquiterpenos con esqueleto de agarofurano aislados y con el objeto de simplificar su estudio, se han clasificado en series dependiendo de sus esqueletos polihidroxílicos base, es decir, según el número, posición y estereoquímica de los sustituyentes (figura 5.1.7). De acuerdo a ello, nos encontramos más de cincuenta series de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos, con esqueletos que van desde los más simples como es el caso del **boariol**¹⁶, que posee dos

¹² Klasek, A.; Samek, Z.; Santavy, P. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *10*, 941-944.

¹³ González, A. G.; San Andrés, L.; Ravelo, A. G.; Jiménez, I. A.; Domínguez, X. A. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 1338-1341.

¹⁴ Takaishi, Y.; Noguchi, H.; Murakami, K.; Nakamo, K. K.; Tomimatsu, T. *Phytochemistry.* **1990**, *29*, 3869-3873.

¹⁵ Harada, N.; Nakanishi, K. *Circular Dichroic Spectroscopy-Exciton Coupling in Organic Stereochemistry.* **1983**, University Science Books, Mil Valley, C.A.

¹⁶ González, A. G.; Muñoz, O. M.; Ravelo, A. G.; Crespo, A.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez, I. A.; Solans, X.; Ruiz-Pérez, C.; Rodríguez-Romero, V. *Tetrahedron Let.* **1992**, *33* (14), 1921-1924.

grupos hidroxilo, hasta los más complejos con nueve grupos hidroxilos en la serie del euoniminol¹⁷.

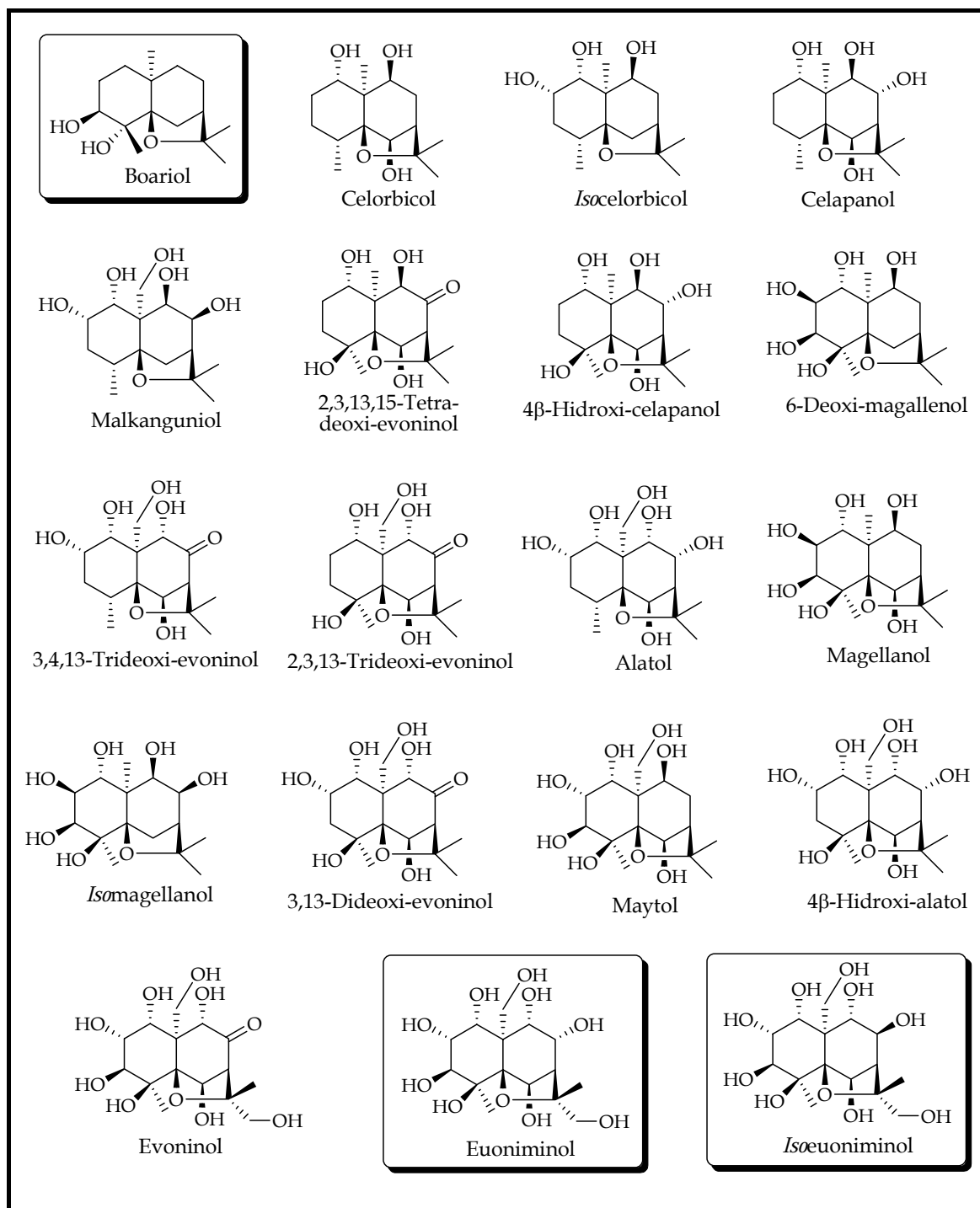
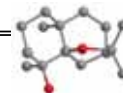


Figura 5.1.7. Algunos esqueletos polihidroxílicos base de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos. En el recuadro se señalan la estructura más simple y las dos más complejas.

¹⁷ Shizuri, Y.; Wada, K.; Sugiura, K.; Hirata, Y. *Tetrahedron*. **1973**, *29*, 1773-1794.



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

El interés generado por los sesquiterpenos poliesterificados de las celastráceas se ha incrementado en los últimos años dada la amplia gama de actividades biológicas que presentan y que se describen a continuación.

5.1.1.1. Actividad inhibidora del proceso fotosintético.

La **alelopatía** se define como cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por las plantas, microorganismos, virus y hongos que influyen en el crecimiento y desarrollo de sistemas agrícolas y biológicos.

El proceso de la fotosíntesis es la diana de un amplio rango de aleloquímicos y así la inhibición de dicho proceso por productos naturales, particularmente de plantas alelopáticas, son una buena estrategia para el descubrimiento de herbicidas naturales¹⁸.

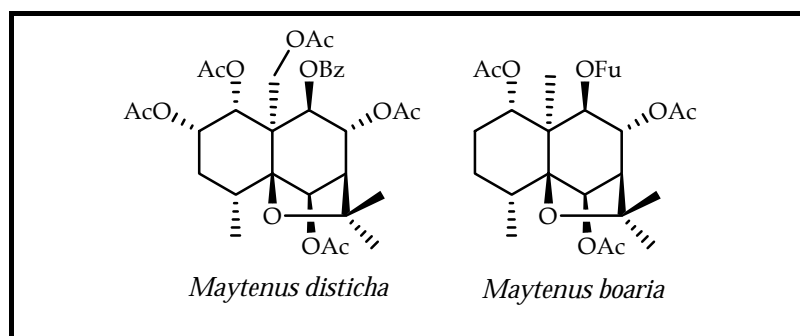


Figura 5.1.8. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos con actividad inhibidora del proceso fotosintético.

En este sentido, Céspedes y *col.*¹⁹ investigaron el modo de acción de dos sesquiterpenos β -agarofuranos (figura 5.1.8), aislados de *Maytenus disticha* y *Maytenus boaria*, como inhibidores del crecimiento vegetal, mediante la interferencia del proceso fotosintético en cloroplastos aislados de espinaca. La fotofosforilación y el transporte de electrones fue inhibida de una manera dependiente de la concentración de los sesquiterpenos.

¹⁸ Hoagland, R. E.; Williams, R. D. *Allelopathy*. **2004**, 315-351.

¹⁹ Céspedes, C.; Achnine, L.; Alarcón, J.; Becerra J.; Lotina-Hennsen, B. Z. *Naturforsch.* **2000**, 55c, 631-637.

5.1.1.2. Actividad antialimentaria e insecticida.

En China son conocidas las propiedades insecticidas de *Celastrus angulatus* Maxim. y *Tripterygium wilfordii* Hook²⁰, cuyas partes aéreas molidas y mezcladas con agua se han utilizado tradicionalmente en la china rural, añadiéndolas sobre las plantas para protegerlas de diversas plagas.

Los esfuerzos realizados por Acree²¹, Swingle y Beroza^{22,23,24}, condujeron al aislamiento de wilfordina, wilforina, wilforgina y wilfortrina, como responsables de la actividad insecticida de esta planta. Sin embargo, la estructura de wilfordina no fue elucidada hasta 1973 por Shizuri²⁵ y *col.*, mientras que las estructuras de wilforina, wilforgina y wilfortrina fueron establecidas por el grupo de Wu^{26,27}. Por otro lado, la wilfordina y wilforina, resultaron ser altamente tóxicos frente a la larva europea *Pyrausta nubilalis* “taladro del maíz²⁸ y la wilforina exhibe una efectiva actividad antialimentaria frente a la larva *Pieris rapae* y la conocida “langosta migratoria africana”, *Locusta migratoria*, resultando la wilforina más potente para estas plagas que la azadiractina, aislada del árbol del Neem (*Azadirachta indica* Bark, Meliaceae), el más notable antialimentario natural conocido.

Los metabolitos responsables de la actividad insecticida de otras especies de *Celastraceae*^{29,30}, al igual que en el caso de *Celastrus angulatus* y *Tripterygium wilfordii*, son los alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos y se ha evaluado esta actividad en muchos de estos metabolitos³¹, resultando algunos de ellos con una actividad comparable con la azidaractina (figura 5.1.9).

²⁰ Swingle, W. T.; Haller, H. L.; Siegler, E. H.; Swingle, M. C. *Science*. **1941**, *93*, 60-61.

²¹ Acree, F. Jr.; Haller, H. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 1608-1611.

²² Beroza, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 3656-3659.

²³ Beroza, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 1585-1588.

²⁴ Beroza, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2136-2138.

²⁵ Shizuri, Y.; Yamada, K. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *10*, 741-744.

²⁶ Wu, D. G.; Liu, L.; Chen, K. C. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*. **1981**, *3*, 471-711.

²⁷ Wu, D. G. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*. **1986**, *8*, 343-354.

²⁸ Beroza, M. J.; Bottger, G. T. *J. Econom. Entomol.* **1954**, *47*, 188.

²⁹ Hohmann, J.; Nagy, G.; Dini, Z.; Günther, G.; Pelczer, Y.; Jerkouich, G.; Varjas, L. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1192-1199.

³⁰ Ichinobe, Y.; Fujimoto, Y.; Takai, S., *Jnp. Kokai Tokkyo Koho*. **2000**, *9*.

³¹ Jinbo, Z.; Mangan, W.; Wenjun, W.; Zhiging, J.; Zhaonong, H. *Phytochemistry*. **2002**, *61*, 699-704.

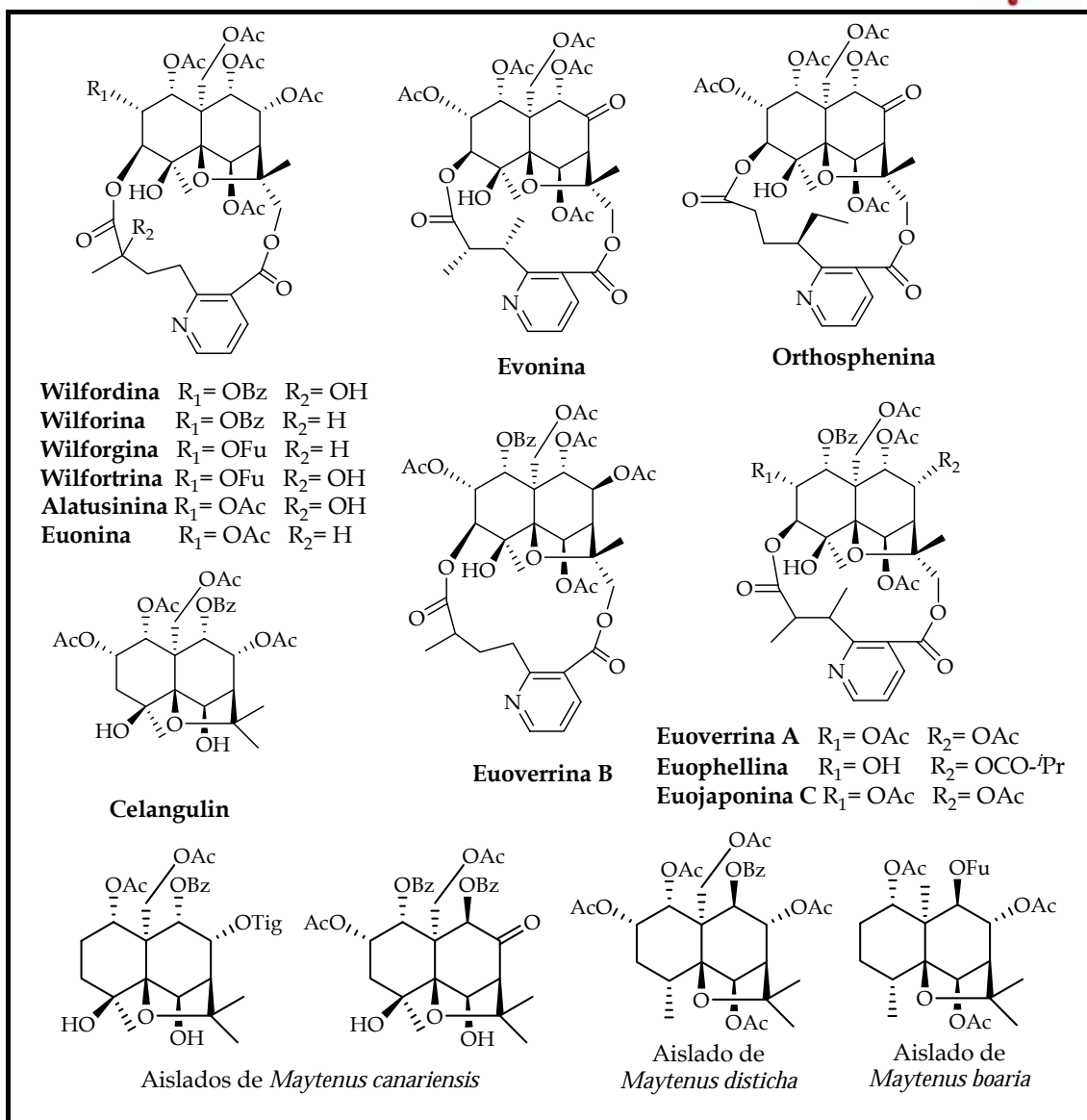
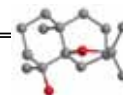


Figura 5.1.9. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos con actividad antialimentaria y/o insecticida.

El primer trabajo sobre la actividad antialimentaria de sesquiterpenos poliesterificados no alcaloídicos fue publicado por Wakabayashi y *col.*³², quienes aíslan celangulin de *C. angulatus*, activo frente a *Spodoptera frugiperda* "gusano cogollero". Recientemente, de esta misma planta, se han aislado ocho sesquiterpenos con actividad insecticida frente a *Mythimna separate*, "insecto del ejército norteno"^{33,34}. Así mismo, dos sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de *Maytenus disticha* y *Maytenus boaria*,

³² Wakabayashi N.; Wu, W. J.; Waters, R. M.; Redfern, R. E.; Mills, Jr G. D.; De Milo A. B.; Lusby W. R. Andrzejewski. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 537-542.

³³ Wenjun, W.; Mingan, W.; Wenming, Z.; Jinbo, Z.; Zhiqing, J.; Zhaonong, H. *Phytochemistry.* **2001**, *58*, 1183-1187.

³⁴ Wenjun, W.; Mingan, W.; Wenming, Z.; Jinbo, Z.; Zhiqing, J.; Zhaonong, H. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 364-367.

presentaron actividad insecticida e inhibidora del crecimiento frente a *Spodoptera frugiperda*, resultando uno de ellos más activo incluso que la toosendanina, usado como control positivo³⁵.

Desde entonces, se ha llevado a cabo un extenso trabajo sobre la actividad antialimentaria e insecticida de este tipo de metabolitos. En nuestro grupo de investigación se evaluó la actividad de cuarenta y un sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano y catorce derivados, aislados de diversas especies de celastráceas, frente a *Spodoptera littoralis* "rosquilla negra" en el quinto estadio³⁶. Estos estudios permitieron establecer que la actividad antialimentaria aumenta con el número de grupos acetatos presentes en la molécula y disminuye con el número de benzoatos. No se observó actividad antialimentaria o insecticida en los productos de síntesis que se ensayaron (tetrahidrofuranos), lo que demostró que el sistema tricíclico es un requisito para la expresión de estas actividades.

En otro estudio realizado por nuestro grupo de trabajo se evaluó la actividad insecticida y antialimentaria frente al gusano egipcio del algodón, *Spodoptera littoralis* de sesquiterpenos aislados de *Maytenus chiapensis*³⁷, resultando los metabolitos más activos la wilfordina, alatusinina y euonina.

Estos datos indican que nos encontramos con una familia de productos activos y potencialmente útiles en la protección de los cultivos, quedando aún por estudiar algunas variables como son el uso de estas sustancias naturales con otros antialimentarios sintéticos, dentro de un control integrado de plagas con el objetivo de evitar los problemas de resistencia en los insectos o bien retrasar su aparición.

5.1.1.3. Actividad antiviral.

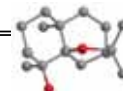
La actividad de trece sesquiterpenos aislados de *T. wilfordii* fue evaluada frente a los virus: herpes simplex 1 (HSV-1), virus de la influenza A, citomegalovirus y el virus de la rubéola³⁸. De todos los compuestos evaluados sólo triptofordin C-2 mostró actividad frente al herpes simplex 1, aumentado su efecto antiviral cuando se combinó con aciclovir, usado actualmente en clínica.

³⁵ Céspedes, C. L.; Alarcón, J.; Aranda, E.; Becerra, J.; Silva, M. Z. *Naturforsch.* **2001**, *56*, 603-613.

³⁶ González, A. G.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Coll, J.; González, J. A.; Lloria, J. *Biochem. Syst. Ecol.* **1997**, *25*, 513-519.

³⁷ Núñez, M. J.; Guadaño, A.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; González-Coloma, A.; Bazzocchi, I. L. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 114-118.

³⁸ Hayashi, K.; Toshimitsu, U.; Ujita, K.; Takaishi, Y. *J. Antimicrob. Chemoth.* **1996**, *37*, 759-768.



Alcaloides sesquiterpénicos, aislados de *Trypterygium hypoglaucum*, fueron ensayados por su actividad anti-VIH. Los resultados obtenidos indican que este tipo de compuestos son potenciales agentes terapéuticos. Así, triptonina A, con una estructura de di-macrosciclo relacionado con cathedulín-K 20, inhibe la replicación del VIH en linfocitos H9 con valores de CE_{50} de 2,54 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e inhibe el crecimiento celular (H9) con una $CI_{50} > 100 \mu\text{g}/\text{ml}$, representando un índice terapéutico (IT) de 39,4. Por otro lado, triptonina B e hypoglaunina B, mostraron una potente actividad anti-VIH con valores de CE_{50} de 0,10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 0,13 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente y un valor de $IT > 1000$, lo que es poco frecuente en un compuesto bioactivo de fuentes naturales^{39,40} (figura 5.1.10).

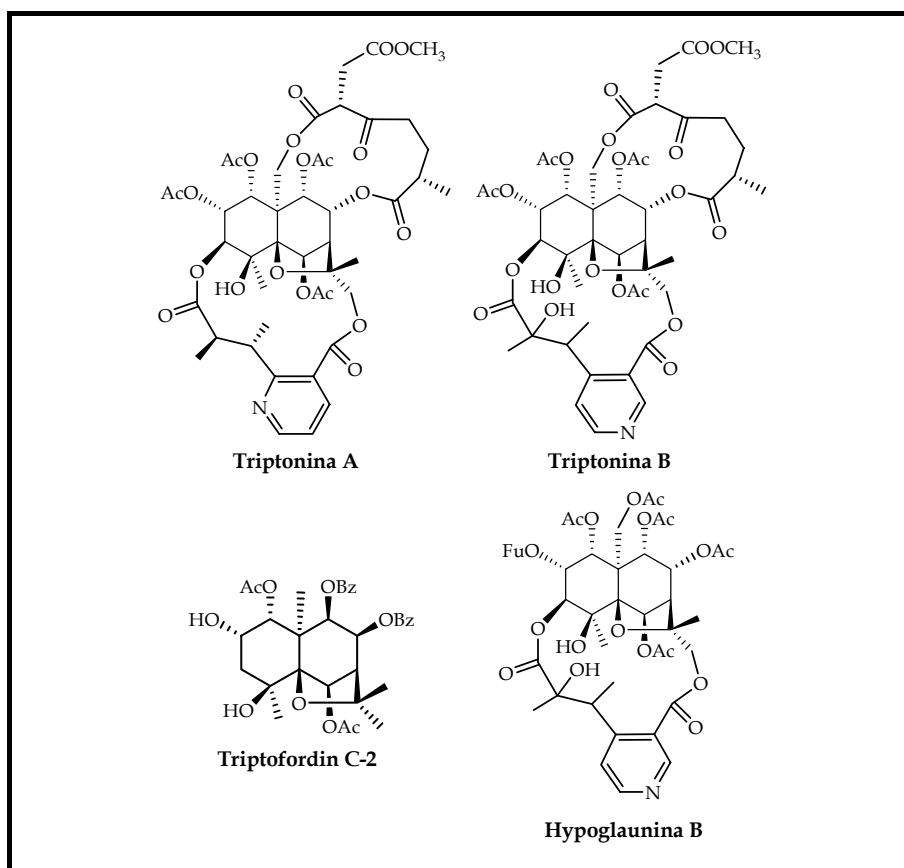


Figura 5.1.10. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos con actividad antiviral.

³⁹ Duan, H.; Takaishi, Y.; Bando, M.; Kido, M.; Imakura, Y.; Lee, K. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2969-2972.

⁴⁰ Duan, H.; Takaishi, Y.; Bando, M.; Kido, M.; Imakura, Y.; Lee, K. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 357-361.

5.1.1.4. Actividad inmunosupresora.

El extracto crudo del xilema de *T. wilfordii* ha sido usado para tratar la artritis reumatoide, la nefritis crónica y diversos desórdenes de la piel, incluyendo la soriasis, lupus eritematoso sistémico, lepra, así como otros desórdenes inmunológicos, obteniéndose resultados prometedores en un gran número de ensayos clínicos. Por otra parte, los alcaloides wilfortrina y wilforina, aislados de esta especie inhibieron la respuesta inmune humoral en animales de laboratorio.

Wilforina fue efectiva en el tratamiento de artritis reumatoide, siendo la toxicidad intraperitoneal (DL_{50}) en ratones de 418 mg/kg⁴¹. Wilforina, es un inmunosupresor usado en el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática y su eficacia terapéutica fue evidente, basada en la observación patológica, aunque no fue tan buena como la de la hidrocortisona. Una terapia combinada de wilforina e hidrocortisona mostró mejores resultados terapéuticos⁴². Wilfordina, mostró un efecto inmunofarmacológico sobre pacientes afectados con lupus eritematoso sistémico (LES)⁴³.

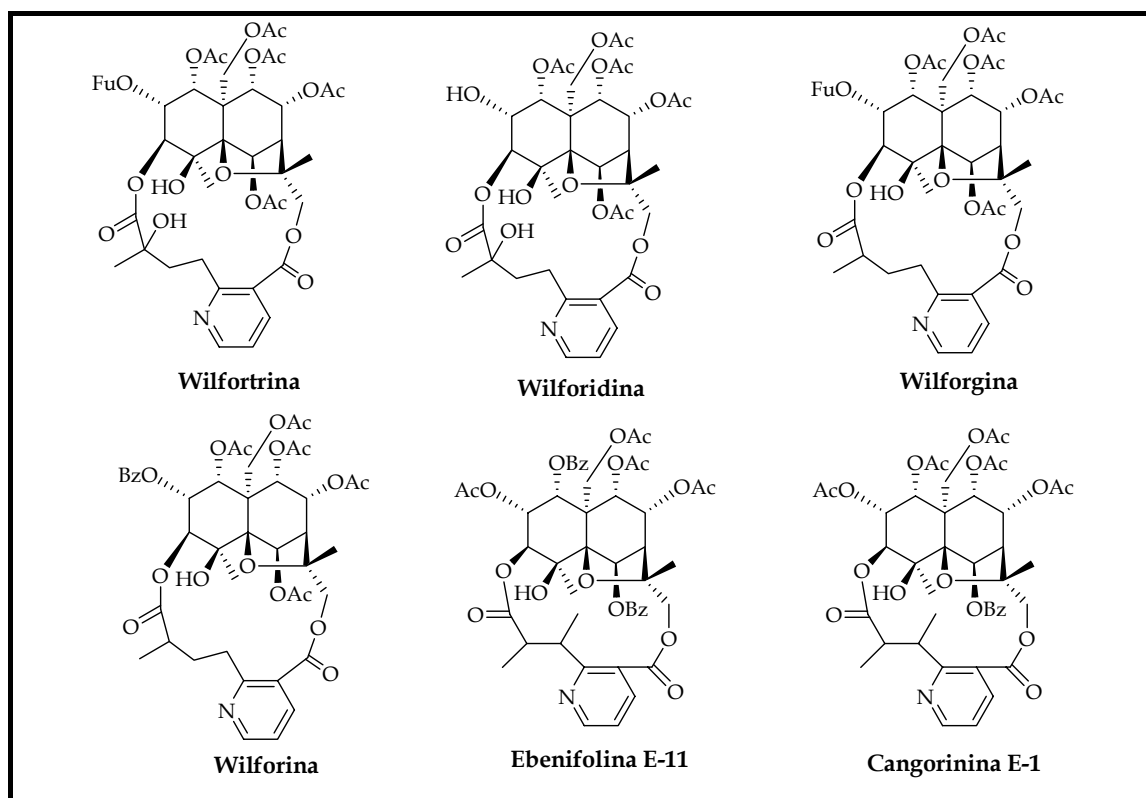
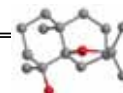


Figura 5.1.11. Alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos con actividad inmunosupresora.

⁴¹ Xia, Z.; Chen, J. *Zhongguo Yaoxue*. **1990**, *25*, 266-267.

⁴² Dai, L.; Hou, J.; Cai, H.; Wang, W. *Jiangsu Yiyao*. **1998**, *24*, 28-30.

⁴³ Yu, H.; Qin, W.; Wu, H. *Zhongguo Mianyixue*. **1999**, *15*, 27-31.



Además, se ensayaron 15 alcaloides sesquiterpénicos aislados del extracto de *T. wilfordii*, conocido como “extracto T_{II}”, evaluándose el efecto inhibitor sobre la producción de citoquina. Los compuestos ebenifolina E-11 y cangorinina E-1 (figura 5.1.11), mostraron efecto inhibitor sobre la producción de citoquinas de células humanas mononucleares periféricas de lipopolisacáridos, comparadas con la prednisolona⁴⁴, inmunomodulador utilizado actualmente en clínica.

5.1.1.5. Actividad inhibitora de la activación del virus Epstein-Barr.

En los últimos años se han publicado estudios sobre la actividad inhibitora de la inducción de tumores de numerosos productos naturales⁴⁵, incluyendo flavonoides⁴⁶, triterpenoides⁴⁷ y quinonas⁴⁸. Takaishi y *col.*⁴⁹ ensayaron, por primera vez, sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos, aislados de *T. wilfordii*, obteniendo excelentes resultados como inhibidores de la activación de los antígenos tempranos del virus Epstein-Barr, inducido por el 13-acetato-12-*O*-tetra-decanoilforbol (TPA), lo que se vincula a una actividad quimiopreventiva.

Nuestro grupo de trabajo llevó a cabo un estudio, en colaboración con el Profesor H. Tokuda del Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto (Japón), sobre la relación estructura-actividad de una serie de sesquiterpenos aislados de *Maytenus cuzcoina* Loesener⁵⁰ y *Crosopetalum tonduzii* (Loes.) Lund^{51,52}. La actividad inhibitora de algunos de estos compuestos resultó aun mayor que la de glycyrrhizina y el ácido retinoico⁵³, los cuales son conocidos inhibidores de los promotores de actividad tumoral. Cabe destacar que los alcaloides sesquiterpénicos no presentaron actividad, lo que sugiere que el tamaño de la molécula afecta fuertemente a su actividad inhibitora.

⁴⁴ Duan, H.; Takaishi, Y.; Momota, H.; Ohmota, Y.; Taki, T.; Jia, Y.; Li, D. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 582-587.

⁴⁵ Akihisa, T.; Yusakawa, K.; Tokuda, H. *Studies in Natural Products Chemistry. Atta-ur-Rahman. Bioactive Natural Products (Part I)*. **2003**, *29*, 73.

⁴⁶ Konoshima, T.; Tabasaki, M.; Kozuka, M.; Inada, A.; Nekanishi, T.; Tokuda, H.; Matsumoto, T. *Shoyakugaku Sashhi*. **1989**, *43*, 135-141.

⁴⁷ Diablo, B.; Vanhaelen, M.; Vanhaelen-Fastré, R.; Konoshima, T.; Kozuka, M.; Tokuda, H. S. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 879-881.

⁴⁸ Konoshima, T.; Kozuka, M.; Koyama, J.; Okatani, T.; Tagahara, K.; Tokuda H. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 987-995.

⁴⁹ Takaishi, Y.; Ujita, K.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Iwashima, A.; Fujita, T. *Cancer Lett.* **1992**, *65*, 19.

⁵⁰ González, A. G.; Tincusi, B. M.; Bazzocchi, I. L.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Konoshima, T.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1773-1778.

⁵¹ Jiménez, I. A.; Bazzocchi, I. L.; Núñez, M. J.; Mukainaka, T.; Tokuda, H.; Ravelo, A. G. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1047-1050.

⁵² Mendoza, C.; Jiménez, I. A.; Tokuda, H.; Kushida, H.; Bazzocchi, I. L. *Chem. Biodivers.* **2005**, *2*, 286-294

⁵³ O'Brian, C. A.; Word, N. E.; Vogel, V. G. *Cancer Lett.* **1990**, *49*, 9-12.

De ello se deduce que nos encontramos ante un nuevo tipo de compuestos realmente prometedores como agentes quimiopreventivos (figura 5.1.12).

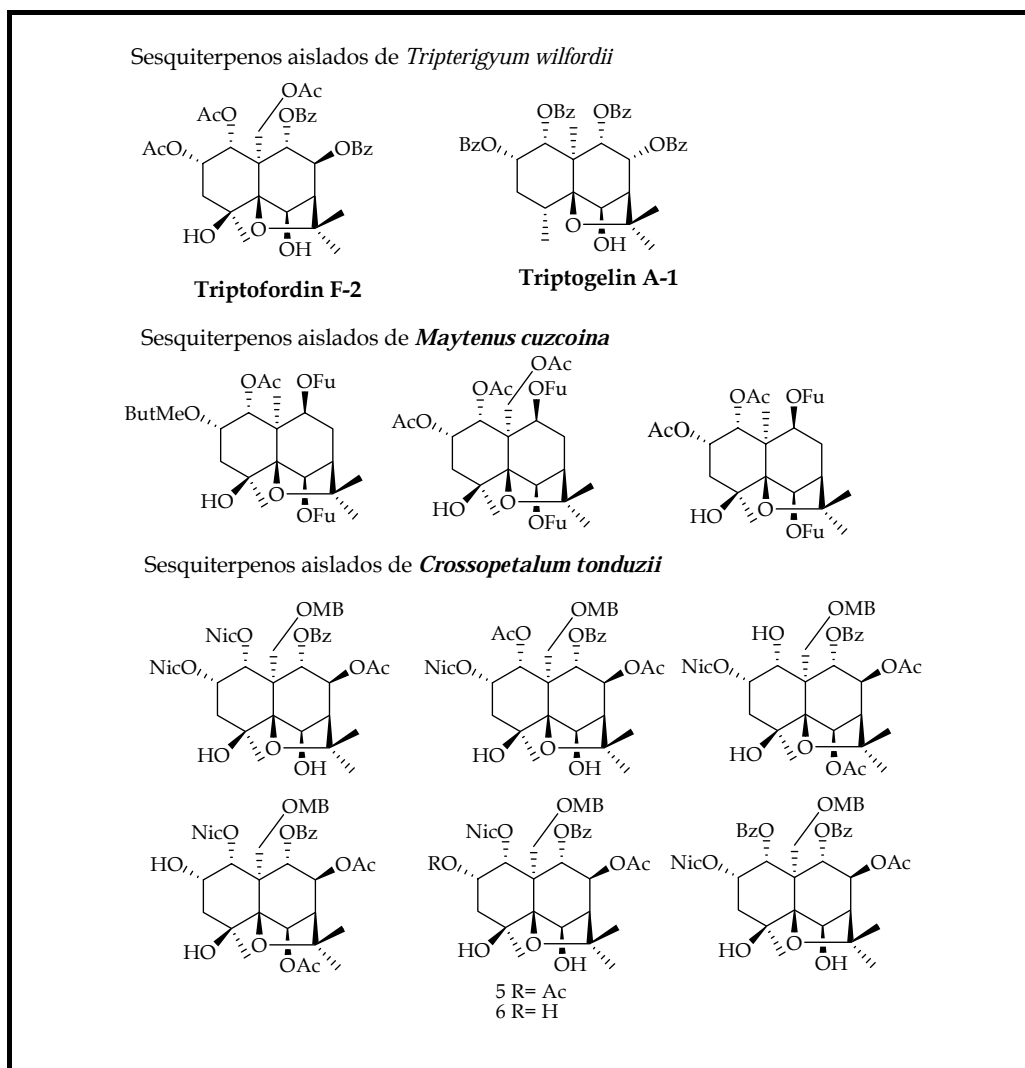


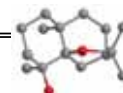
Figura 5.1.12. Sesquiterpenos inhibidores de la activación del virus Epstein-Barr: potenciales agentes quimiopreventivos.

5.1.1.6. Actividad citotóxica.

Kuo y *col.*⁵⁴ estudiaron la fracción clorofórmica de *Maytenus emarginata* mediante un ensayo bioguiado *in vitro* frente a un cultivo de células KB (carcinoma de nasofaringe) aislando como productos activos emarginatina A y emarginatina B, siendo la primera vez que se observa actividad citotóxica en este tipo de alcaloides. Posteriores investigaciones de la planta condujeron al aislamiento de emarginatinas C-G y emarginatinina^{55,56}, que se evaluaron frente a una batería de líneas celulares

⁵⁴ Kuo, Y.; Chen, C.; Kuo, M. Y. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 422-428.

⁵⁵ Kuo, Y.; Chen, C.; King, M.; Wu, T.; Lee, K. *Phytochemistry.* **1994**, *35*, 803-807.



cancerígenas. Los resultados mostraron que emarginatina F fue el más activo, mientras que emarginatina G resultó inactivo. Estudios de la relación estructura-actividad indicaron que la citotoxicidad estaba relacionada con los grupos funcionales sobre C-1 y C-9 y con la configuración del protón H-8 (α o β). Posteriormente, se ensayó emarginatina E⁵⁷ sobre cuatro líneas celulares: carcinoma de nasofaringe (KB), de colon (COLO-205), de hígado (Hepa-3B) y de cervix (HeLa), resultando activo frente a células KB ($DE_{50} = 1,7 \mu\text{g/ml}$) y COLO-205 ($DE_{50} = 4,1 \mu\text{g/ml}$) (figura 5.1.13).

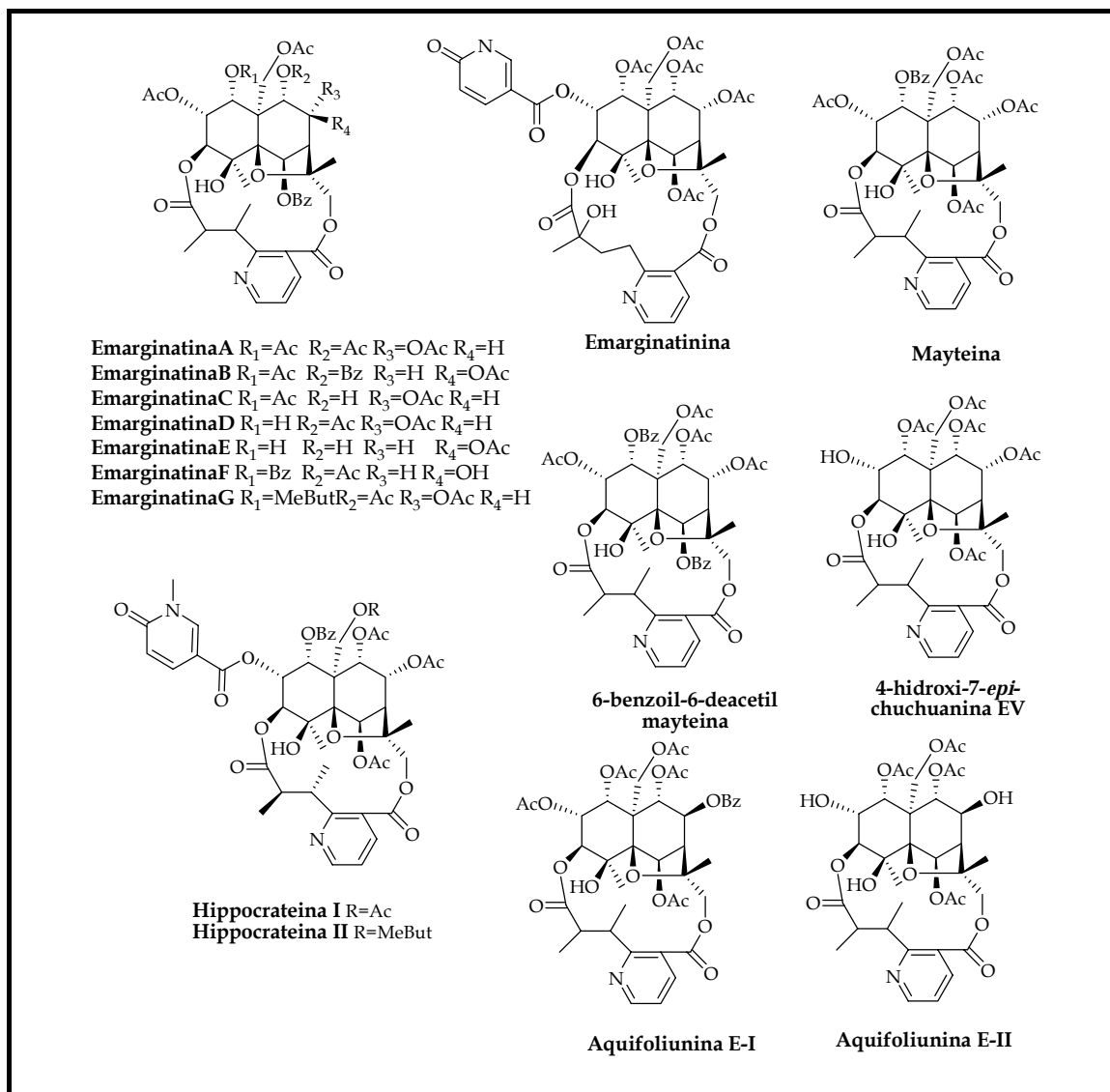


Figura 5.1.13. Alcaloides sesquiterpénicos citotóxicos.

El estudio fitoquímico del extracto etanólico de la corteza del tallo de *Maytenus krukovii* A. C. Smith, rindió mayteina y 6-benzoil-6-deacetilmayteina, ambos

⁵⁶ Kuo, Y.; King, M.; Chen, G.; Chen, H.; Chen, C.; Chen, L.; Lee, K. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 263-269.

⁵⁷ Huang, H. C.; Shen, C. C.; Chen, C. F.; Wu, Y. C.; Kuo, Y. H. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1079-1080.

compuestos mostraron toxicidad en el ensayo de letalidad de *Artemia salina* (BST), con $DL_{50} < 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ⁵⁸.

La corteza roja de *Hippocratea excelsa*, comúnmente conocida como “cancerina”, es usada en el tratamiento de afecciones de la piel y úlcera gástrica, así como por sus propiedades como pesticida. De la corteza del tallo y raíces se aislaron los alcaloides sesquiterpénicos hippocrateina I y II. Hippocrateina I mostró moderada actividad en la prueba de letalidad de *Artemia salina* (BST) y frente a la línea celular 9PS (carcinoma de nasofaringe humano)⁵⁹.

La fracción diclorometánica, procedente del extracto metanólico de la corteza de raíz de *Maytenus aquifolium* Martius, exhibió una débil actividad frente a cepas mutantes de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*. De dicha fracción se aislaron los alcaloides aquifoliunina E-I y E-II, que mostraron débil pero selectiva actividad de daño al ADN. Estos resultados indican que estos compuestos son los responsables de la ligera actividad del daño al ADN observado en el extracto diclorometánico de *M. aquifolium*⁶⁰.

Las raíces de *Peritassa campestris* Cambess., conocida en Brasil como “bacupari do campo”, son utilizadas en la medicina folclórica para sanar heridas; de éstas se aisló un alcaloide sesquiterpénico, 4-hidroxi-7-epichuchuhuanina E-V, que mostró actividad en el ensayo de letalidad de *Artemia salina* (BST)⁶¹.

Los alcaloides sesquiterpénicos, ebenifolina E-II, carigorinina E, euojaponina C y emarginatina E, aislados de *Euonymus laxiflorus*⁶², se ensayaron frente a cuatro líneas celulares: carcinoma nasofaríngeo (KB), carcinoma de colon (COLO-205), hepatoma (Hepa-3B) y carcinoma de cervix (HeLa). De estos compuestos solo emarginatina E, que presenta una configuración *trans* entre H-8 y H-9 presentó citotoxicidad frente a las líneas celulares KB y COLO-205, mientras que los otros compuestos fueron inactivos. Estos resultados coinciden con estudios previos, en los que el epímero H-8 α y el grupo 5-carboxi-*N*-metil-2-piridona, en el esqueleto sesquiterpénico, así como el diácido evonínico, son relevantes para la expresión de esta actividad.

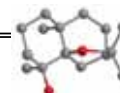
⁵⁸ Sekar, K. V. S.; Sneden, A. T.; Flores, F. A. *Planta Med.* **1995**, *61*, 390.

⁵⁹ Mata, R.; Calzada, F.; Díaz, E.; Toscano, R. A. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1212-1219.

⁶⁰ Corsino, J.; Da Silva Bolzani, V.; S. Pereira, A. M.; Castro França, S.; Burlan, M. *Phytochemistry*. **1998**, *48*, 137-140.

⁶¹ Lião, L. M.; Vieira, P. C.; Rodrigues-Filho, E.; Fernandes, J. B.; Fernandes da Silva, M. F. G. *Phytochemistry*. **2001**, *58*, 1205-1207.

⁶² Kuo, Y.; Huang, H.; Chiou, W.; Shi, L.; Wu, T.; Wu, Y. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 554-557.



5.1.1.7. Actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos.

La resistencia a la quimioterapia desarrollada por los organismos infecciosos y por las células tumorales representa uno de los problemas más importantes a los que se enfrenta la medicina en la actualidad, al impedir el éxito del tratamiento farmacológico de numerosas enfermedades.

En nuestro grupo de trabajo se determinó el efecto revertidor *in vivo* de sesquiterpenos (figura 5.1.14) sobre el crecimiento de una línea de *Leishmania tropica* resistente a daunomicina (DNM) ^{63,64,65,66,67}. Los resultados obtenidos mostraron que dicha actividad depende del esqueleto polihidroxílico base y del número, tipo y posición de los ésteres en la molécula⁶⁸, no resultando activos los alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos.

Por otra parte, estos sesquiterpenos se han revelado como excelentes revertidores de la multirresistencia a fármacos en líneas celulares humanas^{69,70} y se llevaron a cabo estudios del mecanismo molecular de estos sesquiterpenos como inhibidores específicos no transportados de la Pgp⁷¹.

⁶³ Pérez-Victoria, J. M.; Tincusi, B. M.; Jiménez, I. A.; Bazzocchi, I. L.; Gupta, M. P.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Ravelo, A. G. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4388-4393.

⁶⁴ Kennedy, M. L.; Cortés-Selva, F.; Pérez-Victoria, J. M.; Jiménez, I. A.; González, A. G.; Muñoz, M.; Gamarro, F.; Castanys, S.; Ravelo, A. G. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4668-4676.

⁶⁵ Núñez, M.; Cortés-Selva, F.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez, I. A.; González, A. G.; Ravelo, A. G.; Gavin, J. A. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 572-574.

⁶⁶ Cortés-Selva, F.; Campillo, M.; P. Reyes, C.; Jiménez, I. A.; Castanys, S.; Bazzocchi, I. L.; Pardo, L.; Gamarro, F.; Ravelo, A. G. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 576-587.

⁶⁷ Pérez-Victoria, J. M.; Pérez-Victoria, F. J.; Parodi-Talice, A.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2468-2474.

⁶⁸ Pérez, J. M.; Di Pietro, A.; Barron, D.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Current Drug Targets.* **2002**, *3*, 311-333.

⁶⁹ Muñoz-Martínez, F.; Lu, Peihua; Cortés-Selva, F.; Pérez-Victoria, J.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Sharom, F.; Gamarro, F.; Castanys, S. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7130-7138.

⁷⁰ Muñoz-Martínez, F.; Mendoza, C.; Bazzocchi, I. L.; Castanys, S.; Jiménez, I. A.; Gamarro, F. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4266-4275.

⁷¹ Muñoz-Martínez, F.; P. Reyes, C.; Pérez-Lomas, A.; Jiménez, I. A.; Gamarro, F.; Castanys, S., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2006**, *1758*, 98-110.

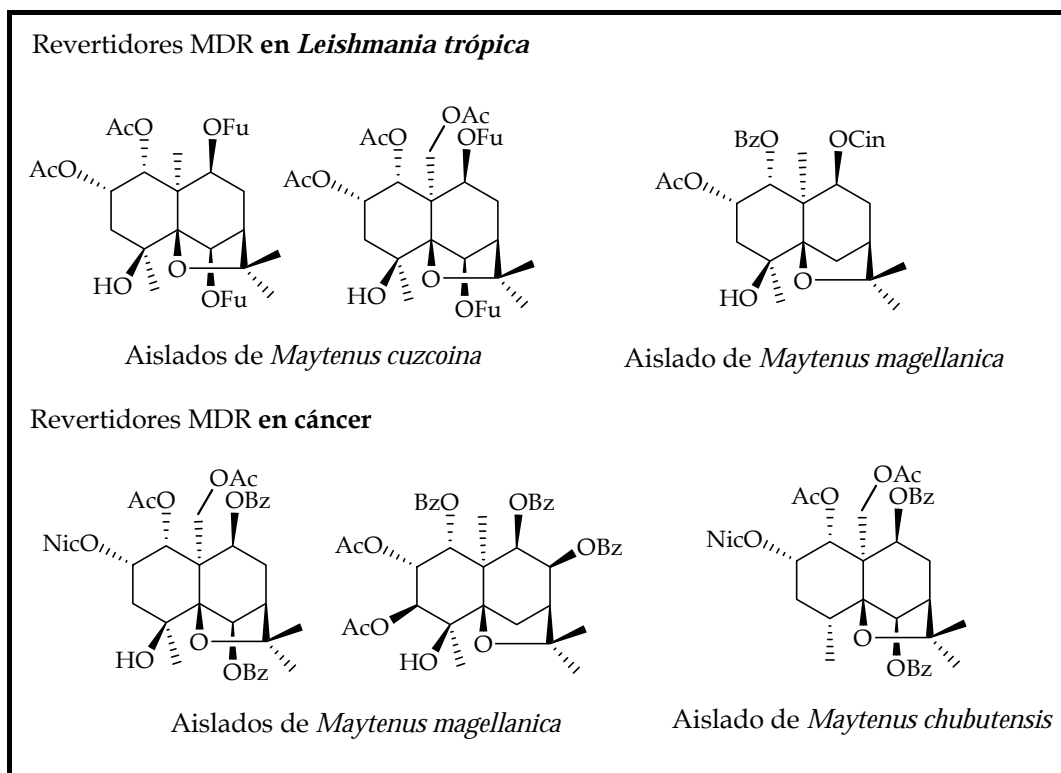


Figura 5.1.14. Sesquiterpenos con actividad revertidora del fenotipo de multiresistencia a fármacos.

5.1.1.8. Actividad antiinflamatoria.

Jin y *col.*⁷² ensayaron seis sesquiterpenos agarofuránicos aislados de *Celastrus orbiculatus* como inhibidores de la activación del factor NF- κ B, tres de los cuales mostraron una actividad moderada tanto en la inhibición de NF- κ B como en la producción de NO, utilizando como control un inhibidor de iNOS, la aminoguanidina (figura 5.1.15).

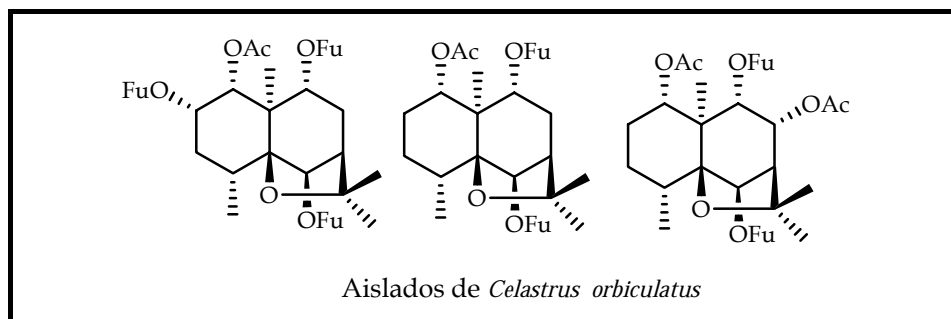
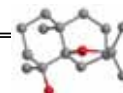


Figura 5.1.15. Sesquiterpenos con actividad antiinflamatoria.

⁷² Jin, H. Z.; Hwang, B. H.; Kim, H. S.; Lee, J. H.; Kim, Y. H.; Lee, J. H. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 89-91.



5.1.1.9. Actividad relajante intestinal.

Los trastornos funcionales del tubo digestivo representan una parte importante de las consultas médicas y en España constituyen entre el 35-40% de las mismas. Un trastorno funcional gastrointestinal da lugar a un desequilibrio en la absorción y la eliminación, con consecuencias graves y en el caso extremo mortales.

En esta línea, diversas especies de la familia *Celastraceae* han sido utilizadas como remedio tradicional para los desórdenes gastrointestinales, destacando el uso en la medicina Ayurvédica de *Celastrus paniculatus*, de la cual se ha descrito la aplicación de extractos para combatir los espasmos intestinales⁷³. De esta especie, F. Borrelli y col.⁷⁴ aislaron los únicos ejemplos, hasta el momento de sesquiterpenos que han mostrado actividad relajante intestinal (figura 5.1.16).

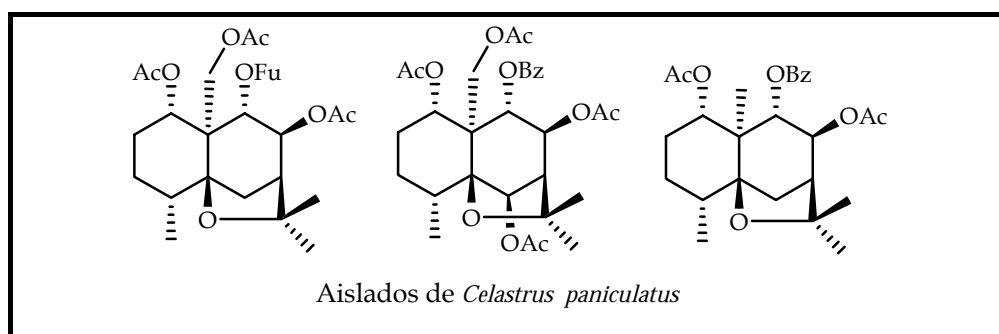


Figura 5.1.16. Sesquiterpenos con actividad relajante intestinal.

⁷³ Kapoor, L. D. *Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants*. 2000, CRC Press, Boca Raton.

⁷⁴ Borrelli, F.; Borbone, N.; Capasso, R.; Montesano, D.; Izzo, A. A.; De Marino, S.; Capasso, F.; Ferrara, L.; Longo, R.; Zollo, F. *Planta Med.* 2004, 70, 652-656.

5.1.2. Aproximaciones a la síntesis de los sesquiterpenos agarofuránicos.

El amplio rango de actividades biológicas de los sesquiterpenos agarofuránicos ha incrementado, en los últimos años, el interés por estas moléculas, a fin de determinar sus mecanismos de acción, establecer relaciones estructura-actividad y realizar su síntesis, como alternativa al aislamiento de fuentes naturales.

Existen pocos estudios encaminados a la síntesis de estas moléculas y sólo se han publicado algunas aproximaciones sintéticas de estos complejos sesquiterpenos. Aunque el interés despertado por estos metabolitos, dada su amplia gama de actividades biológicas, ha motivado que en los últimos años, diversos grupos de investigación hayan centrado su atención en la síntesis de precursores de los mismos. La aportación más significativa ha sido sin duda la desarrollada por White y *col.*⁷⁵ (figura 5.1.17), quienes llevaron a cabo la síntesis total de (±)-euoniminol y (±)-3,4-dideoximaytol, usando una estrategia basada en una ciclación en cascada que conduce al esqueleto de dihidroagarofurano, característico de estos compuestos.

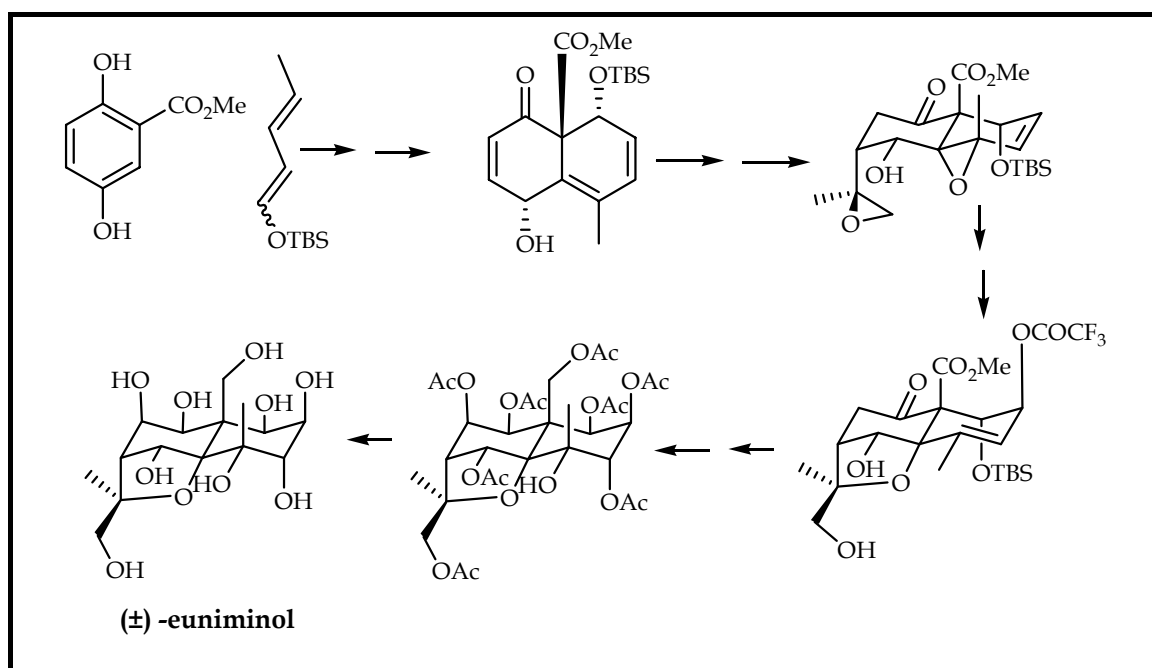
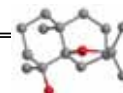


Figura 5.1.17. Aproximación sintética de sesquiterpenos de White y *col.*

⁷⁵ White, J. D.; Shin, H.; Kim, T. S.; Cutshall, N. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2404-2419.



En 1999, Charles Descoins Jr. y *col.*⁷⁶ desarrollaron una nueva estrategia para la síntesis de decalinas polihidroxiladas (figura 5.1.18), cuya posterior funcionalización conduciría a los agarofuranos polihidroxilados y donde la introducción del anillo de tetrahydrofurano se realiza en los últimos pasos de la síntesis. Ello supone un rápido acceso a compuestos que pueden ser intermediarios útiles en la síntesis de los dihidro- β -agarofuranos polihidroxilados⁷⁷.

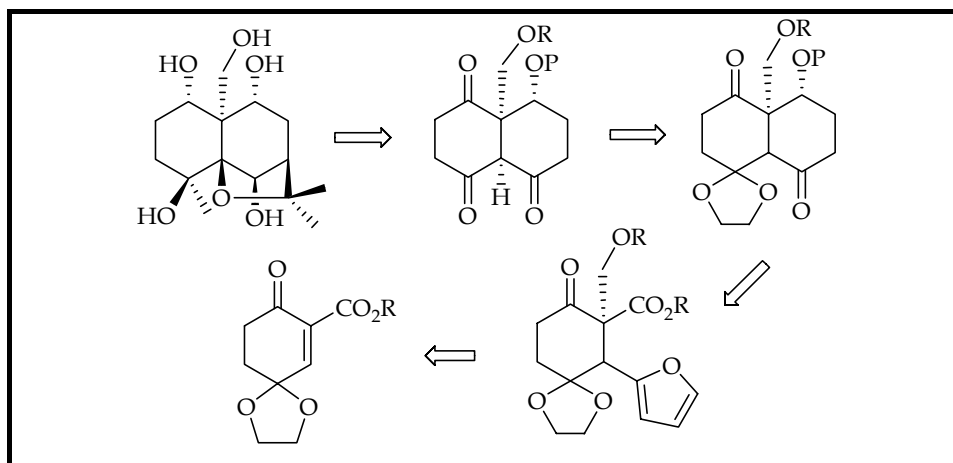


Figura 5.1.18. Esquema retrosintético de la síntesis de agarofuranos polihidroxilados (Descoins Jr. y *col.*).

Mehta y *col.*⁷⁸ desarrollan una aproximación sintética enantioespecífica hacia eudesmanos, partiendo de carvona y a través de una reacción de metátesis de cierre de anillo como paso clave, para posteriormente llegar hasta el esqueleto de agarofurano polifuncionalizado. De forma similar, Floreancig y *col.*⁷⁹ han desarrollado una nueva estrategia para la síntesis estereoselectiva de dihidro- β -agarofuranos a partir de carvona, siendo las etapas determinantes la formación del anillo decalínico mediante reacción de metátesis del correspondiente dieno, formación del anillo tetrahydrofuránico y finalmente, reducción diastereoselectiva (figura 5.1.19).

⁷⁶ Descoins, C. Jr.; Thamh, G. V.; Boyer, F. D.; Ducrot, P. H.; Descoins, C.; Lallemand, J. Y. *Synlett*. **1999**, 2, 240242.

⁷⁷ Descoins, C. *Mecanismo de acción y síntesis de sustancias con actividad antiapetente de posible uso en la protección de cultivos*. **1999**, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.

⁷⁸ Mehta, G.; Kumaran, S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 7055-7059.

⁷⁹ Christopher, A. L.; Floreancig, P. E. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 7193-7196.

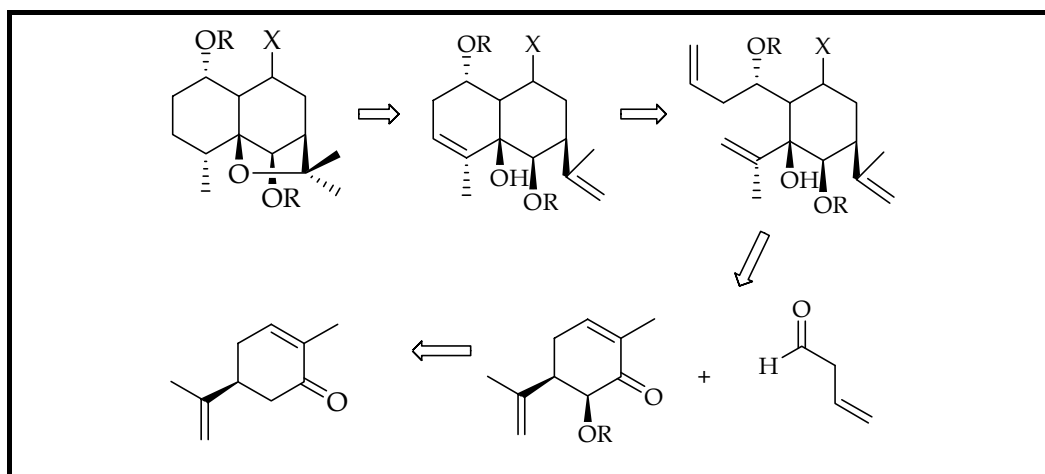


Figura 5.1.19. Esquema retrosintético de la síntesis de agarofuranos polihidroxilados (Floreancig y *col.*).

Recientemente, se ha publicado una aproximación a la síntesis de precursores de agarofuranos polihidroxilados a partir de una reacción de Diels-Alder entre 1,4-benzoquinonas activadas y 1,3-butadienos oxigenados, que conducen a la síntesis de biciclo decanos [4.4.0], precursores de dihidroagarofuranos polihidroxilados (figura 5.1.20). Este trabajo aporta la síntesis con un nuevo reagrupamiento de un aducto Diels-Alder, así como procedimientos que evitan otros reagrupamientos y que permiten acceder a derivados con esqueleto decalínico, útiles en la síntesis de agarofuranos⁸⁰.

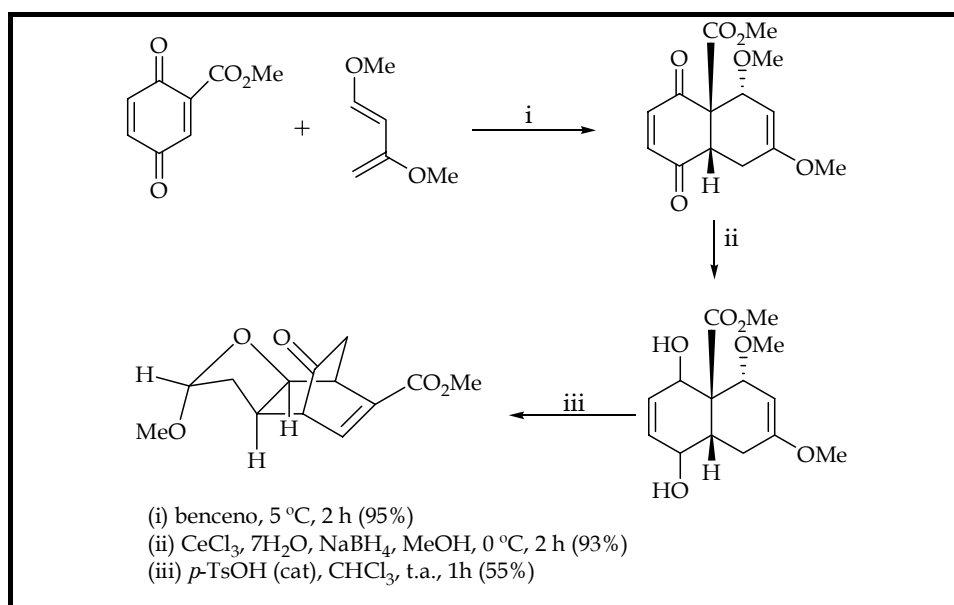
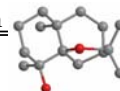


Figura 5.1.20. Aproximación Diels-Alder de precursores de dihidroagarofuranos de Helliwell y *col.*

⁸⁰ Helliwell, M.; Thomas, E.; Whitehouse, D. *Synthesis*. 2005, 19, 3235-3238.



5.2. Resultados y discusión

El estudio fitoquímico de los frutos y la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*, permitió el aislamiento de dieciséis sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano (**S1-S16**) (figura 5.2.1), de los cuales cinco son alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos (**S12-S16**). A continuación pasaremos a discutir el aislamiento y la elucidación estructural de aquellos que resultaron nuevos en la bibliografía química (**S1**, **S11**, **S14** y **S15**).

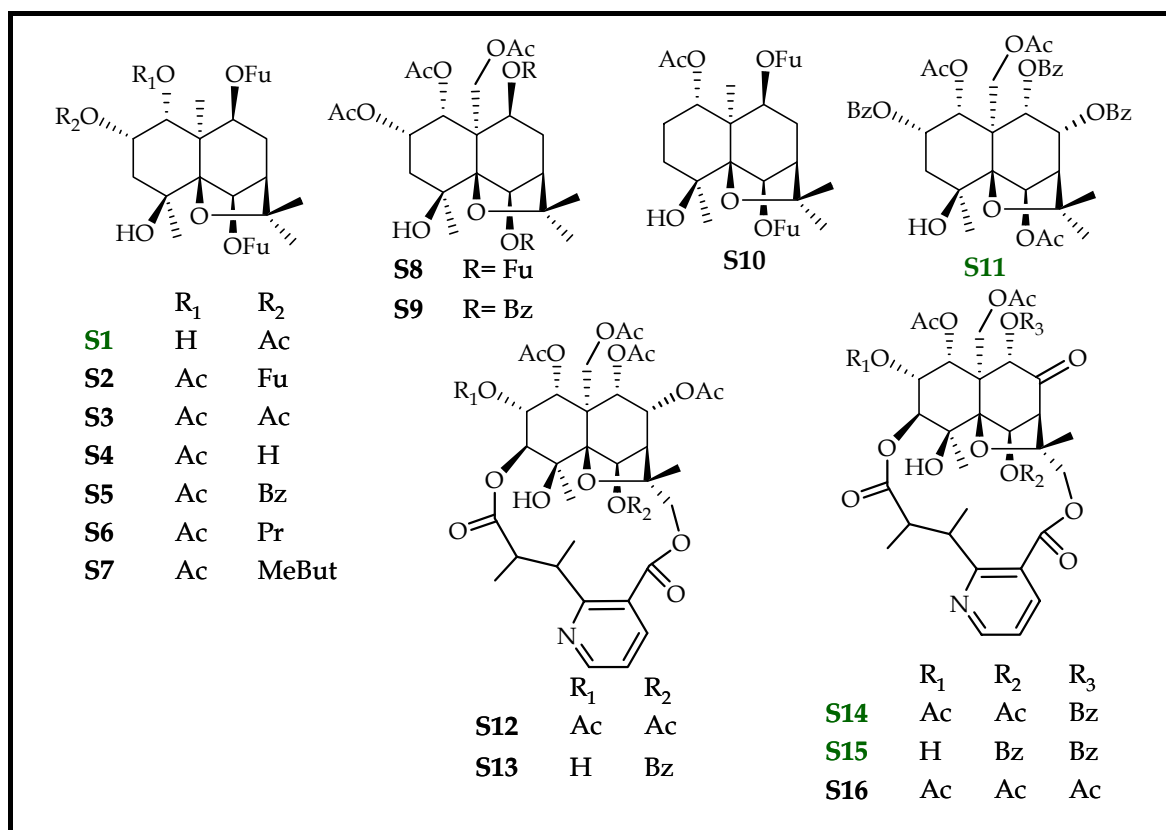


Figura 5.2.1. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de los frutos (**S1-S12**) y de la corteza de la raíz (**S12-S16**) de *Maytenus cuzcoina*. En verde los sesquiterpenos que resultaron nuevos en la bibliografía.

5.2.1. Estudio fitoquímico de los frutos de *Maytenus cuzcoina*.

Con los antecedentes anteriormente descritos, decidimos realizar el estudio fitoquímico de los frutos de *Maytenus cuzcoina*, al objeto de obtener cantidad suficiente de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos para evaluar y modular la actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos, así como la inhibición de la activación del antígeno temprano del virus Epstein Barr, como potenciales agentes quimiopreventivos.

El estudio fitoquímico de los frutos de esta especie ya había sido realizado con anterioridad por nuestro grupo^{1,2}, demostrando ser una extraordinaria fuente de estos interesantes metabolitos. Además de los sesquiterpenos aislados en el estudio anterior (S2-S10 y S12), obtuvimos dos sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos (S1 y S11), que resultaron nuevos en la bibliografía química.

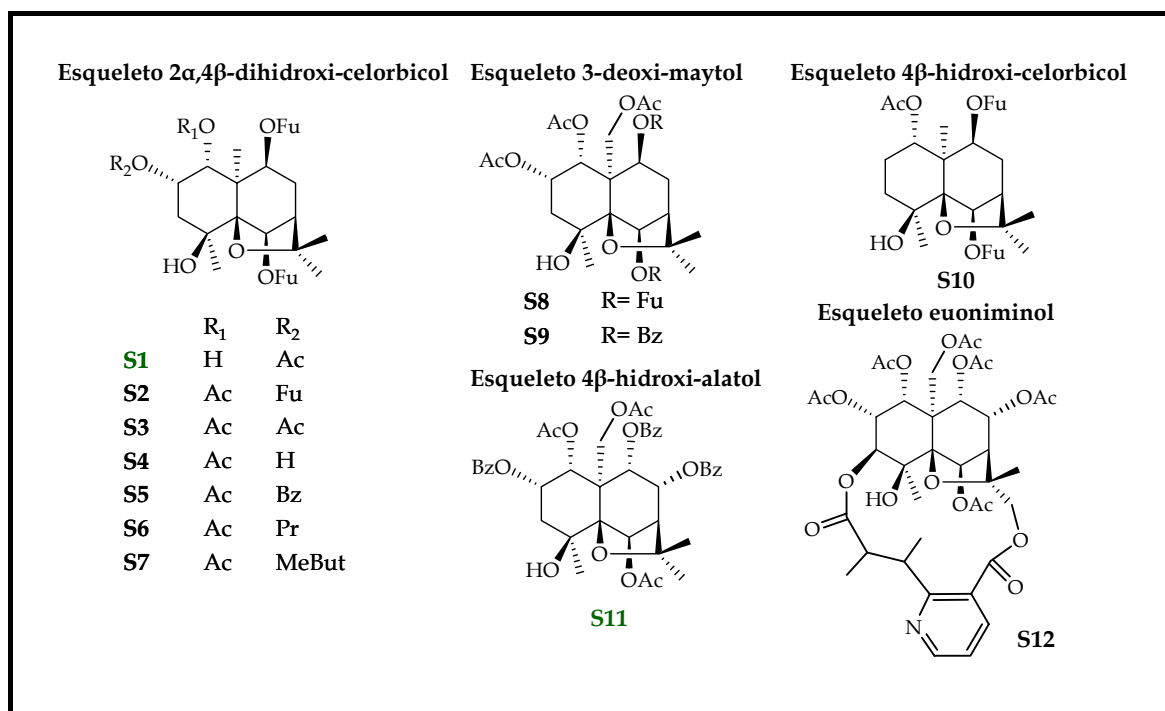
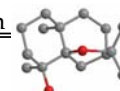


Figura 5.2.2. Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados, agrupados según su esqueleto polihidroxílico. En **verde** los sesquiterpenos que resultaron nuevos en la bibliografía.

¹ González, A. G; Tincusi, B. M.; Bazzocchi, I. L.; Tokuda, H.; Nishino, N.; Konoshima, T.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1773-1778.

² Tincusi, B. M. *Metabolitos secundarios bioactivos de la flora medicinal iberoamericana: Piper elongatum, Copaifera paupera, Crossopetalum tonduzzi y Maytenus cuzcoina*. **1999**, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.



Los sesquiterpenos aislados los hemos agrupado para su estudio de acuerdo a la similitud de sus sistemas polihidroxilicos básicos (figura 5.2.2). Así, los productos denominados de **S1** a **S7**, presentan un esqueleto de 2 α ,4 β -dihidroxi-celorbicol³, las estructuras de **S8** y **S9** corresponden a la serie del 3-deoximaytol⁴, **S10** posee un esqueleto básico de 4 β -hidroxi-celorbicol, el metabolito **S11** un esqueleto de 4 β -hidroxi-atalol⁵, mientras que el sesquiterpeno macrocíclico **S12** corresponde a la serie del euoniminol⁶.

A continuación pasamos a discutir la elucidación estructural de los dos nuevos sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados de los frutos de *Maytenus cuzcoina*.

Sesquiterpeno **S1**

El metabolito que hemos denominado **S1**, presentó una fórmula molecular de C₂₇H₃₂O₁₁, determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución y resonancia magnética nuclear de ¹³C. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción características de grupo hidroxilo (3467 cm⁻¹) y grupo carbonilo de éster (1719 cm⁻¹).

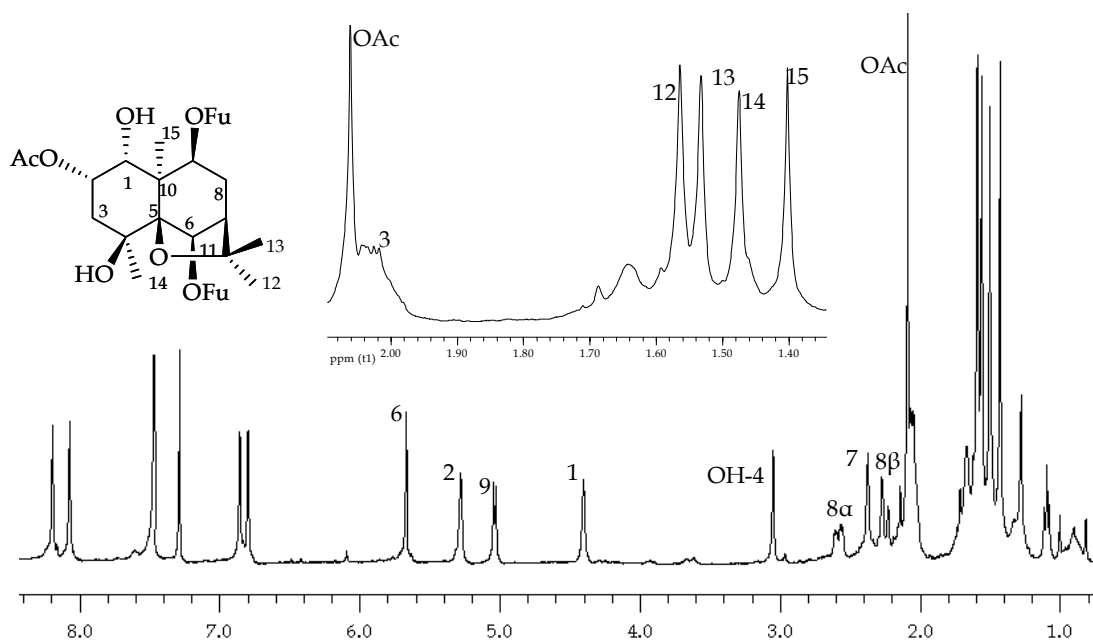


Figura 5.2.3. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de **S1**.

³ Smith, C. R.; Millar, R. W.; Weisleder, D.; Rohwedder, W. K.; Eickman, N.; Clardy, J. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3264-3269.

⁴ Kupchan, S. M.; Smith, R. M. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 115-118.

⁵ Sugiura, K.; Shizmi, Y.; Hirota, Y.; Yamada, K. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 3465.

⁶ Taylor, I. Q.; Whathson, J. R. *Acta Cryst.* **1977**, *33*, 3176.

El espectro de masas presentó fragmentos correspondientes a la pérdida de metilo (M^+-15 , 517 m/z , CH_3), de agua ($M^+-15-18$, 499 m/z , H_2O), ácido acético (M^+-60 , 472 m/z , $C_2H_4O_2^+$) y ácido furoico ($M^+-15-112$, 405 m/z , $C_5H_4O_3$, 95 m/z $C_5H_3O^+$). En el espectro de ultravioleta se observó la presencia de un grupo cromóforo a 231 nm, que corresponde a un grupo furoato.

Los grupos ésteres fueron confirmados mediante estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón (1H) y carbono (^{13}C). Así, en el espectro de RMN 1H (figura 5.2.3.) se observa la presencia de un singulete que integra para tres protones a 2,06 δ correspondiente al metilo del grupo acetato y señales para cinco protones aromáticos entre 6,77 y 8,17 δ , lo que indica la presencia de dos grupos 3-furoato en la molécula. Estos datos fueron corroborados en el espectro de RMN ^{13}C (figura 5.2.4), donde se observan señales para un carbono alifático (21,3 δ) y un carbono carboxílico (171,4 δ), correspondientes al grupo acetato y señales correspondientes a ocho carbonos aromáticos entre 109,8 y 149,1 δ y dos carboxílicos (161,9 y 162,3 δ), asignables a dos grupos 3-furoato.

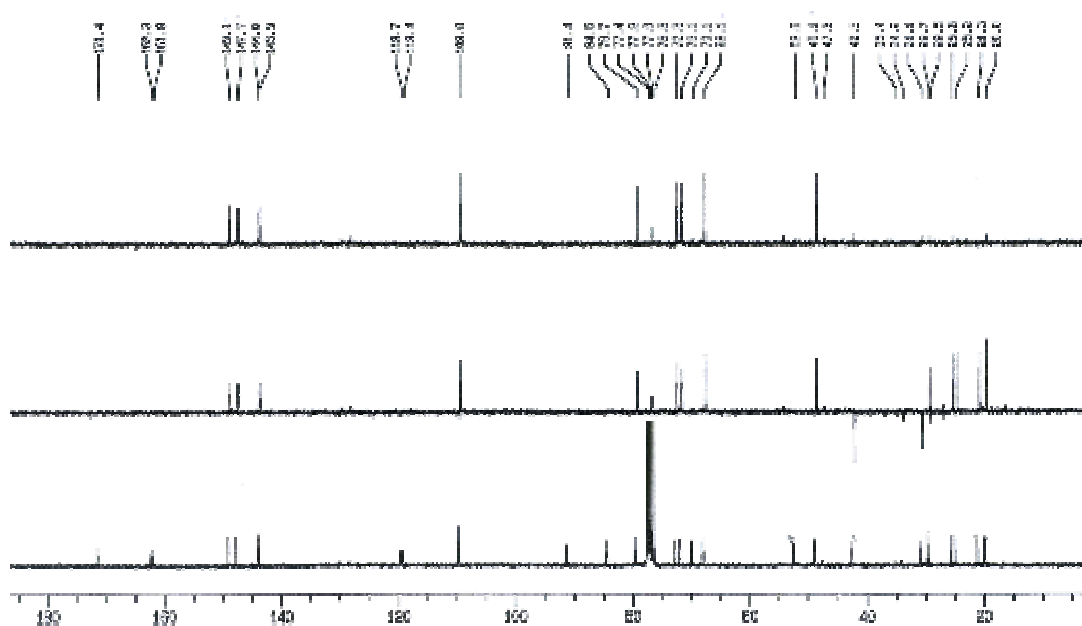
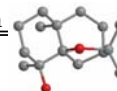


Figura 5.2.4. Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) de S1.

Un cuidadoso estudio del espectro de RMN 1H y de los experimentos bidimensionales, tanto homonucleares $^1H-^1H$ (COSY, *Correlated Spectroscopy*) como heteronucleares $^1H-^{13}C$ (HSQC, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*), nos



permitieron la completa asignación de los protones existentes en la molécula. Así, en su espectro de RMN de ^1H se observan señales para 5 protones metínicos, dos de los cuales están formados parte de un sistema AMX_2 , con señales a 5,25 δ como multiplete y un singlete ancho a 4,38 δ , que integran cada uno para un protón y un multiplete que integra para dos protones a 2,02 δ , señales que fueron asignadas a los protones H2, H1 y H3, respectivamente. Las señales a 2,35 δ (s ancho), 5,64 δ (s) y 5,01 δ (d, $J=6,7$ Hz), que integran para un protón cada una, fueron asignadas a H7, H6 y H9, respectivamente.

Además, se observaron en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , señales correspondientes a un metilo a 1,47 δ_{H} (s, Me14), situado sobre un carbono tetrasustituido a 70,1 δ_{C} (s, C4) unido a un grupo hidroxilo, cuyo protón aparece como un singlete a 3,02 δ (OH4) y es intercambiable con D_2O , lo que confirma la presencia de un grupo hidroxilo terciario en la molécula. Se observaron además tres metilos angulares a 1,40 (Me15), 1,53 (Me13) y 1,56 (Me12) δ_{H} , así como tres carbonos cuaternarios a 52,6 (C10), 84,9 (C11) y 91,4 (C5) δ_{C} . Estos datos indican que **S1** es un sesquiterpeno poliesterificado pentasustituido, con un esqueleto de dihidro- β -agarofurano que tiene un grupo acetato, dos grupos 3-furoato, un grupo hidroxilo secundario y otro terciario en su estructura.

La estereoquímica relativa de los sustituyentes en el sistema decalínico fue establecida basándonos en un estudio de las constantes de acoplamiento, que indicó una relación *cis* ecuatorial-axial para el sistema H1 (s ancho $\omega_{1/2}=10$ Hz) y H2, lo que se confirmó con los experimentos bidimensionales homonucleares, COSY y ROESY (*Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy*). En el ROESY (figura 5.2.5) se observaron efectos ROE (*Rotatory Overhauser Effect*) del Me15 con H9, H6, H8 α y el Me14, así como entre H1 y el Me13 y H2, lo que nos permitió establecer la estereoquímica relativa como 1 α , 2 α , 4 β , 6 β y 9 β .

La regiosustitución de los grupos ésteres sobre el esqueleto base fue resuelta mediante un experimento HMBC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherente*), donde se observó (figura 5.2.6) que los grupos carboxílicos de los grupos furoatos a 161,9 y 162,3 δ_{C} , muestran correlación a tres enlaces con las señales a 5,01 y 5,64 δ_{H} , asignadas a los protones H9 y H6, respectivamente. Quedando así establecida la estructura de **S1** como 2 α -acetoxi-9 β ,6 β -di-(3-furoiloxi)-1 α ,4 β -dihidroxi-dihidro- β -agarofurano.

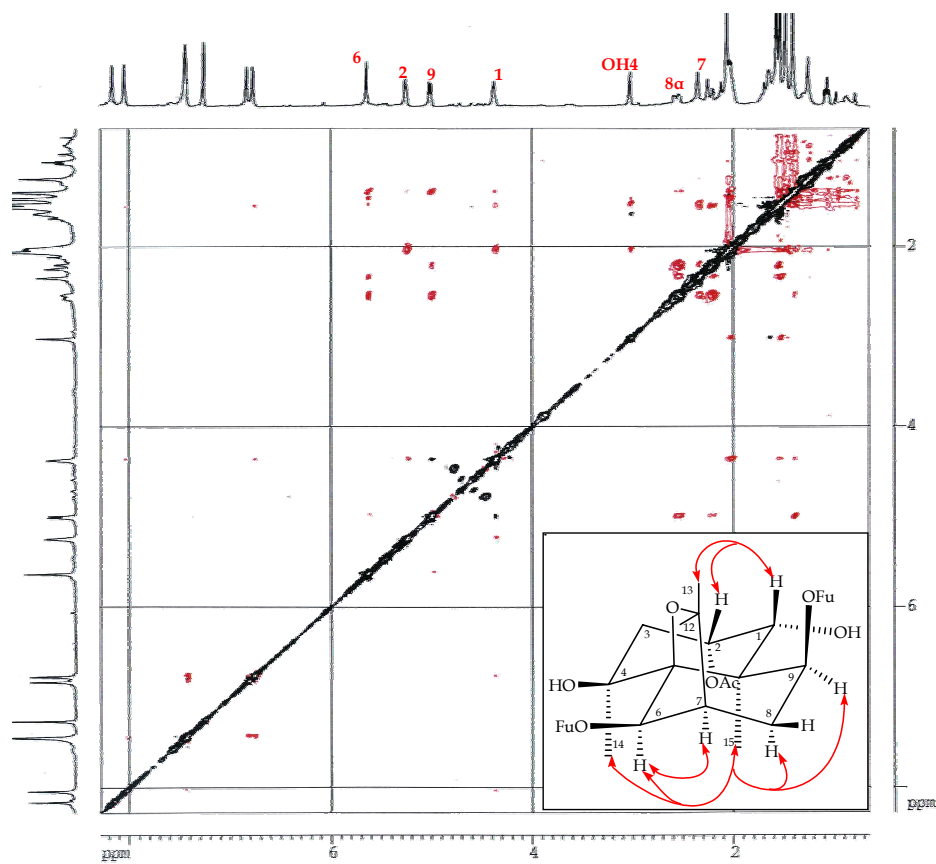


Figura 5.2.5. Experimento **ROESY** de S1.

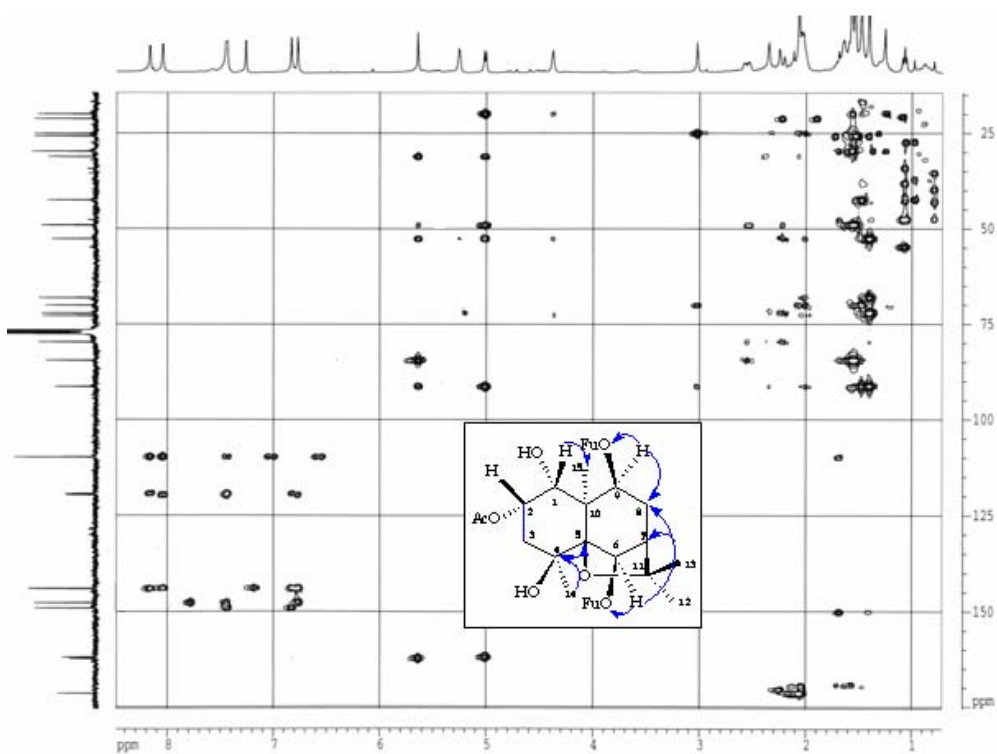
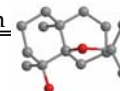


Figura 5.2.6. Experimento **HMBC** de S1.



El conjunto de los datos muestran que el producto **S1** está muy relacionado con el producto que hemos denominado **S3**^{1,2}, descrito anteriormente, siendo la única diferencia en sus espectros de RMN ¹H, la presencia de un grupo acetato adicional en el producto **S3**, así como el desplazamiento de H1 desde 5,63 δ_{H} en **S3** a 4,38 δ_{H} en **S1** (figura 5.2.7).

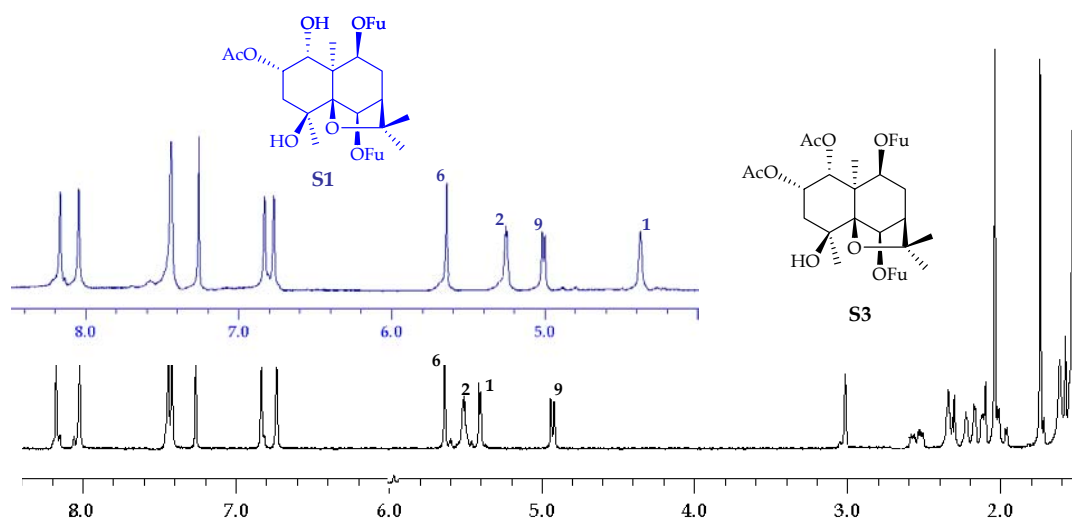


Figura 5.2.7. Espectros de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de **S1** y de **S3**, donde se observa el diferente desplazamiento de H1.

Estos datos fueron confirmados mediante correlación química (figura 5.2.8). Así, la acetilación de **S1**, utilizando las condiciones habituales con anhídrido acético y piridina, rindió un compuesto cuyos datos físicos y espectroscópicos son idénticos a los del sesquiterpeno **S3**.

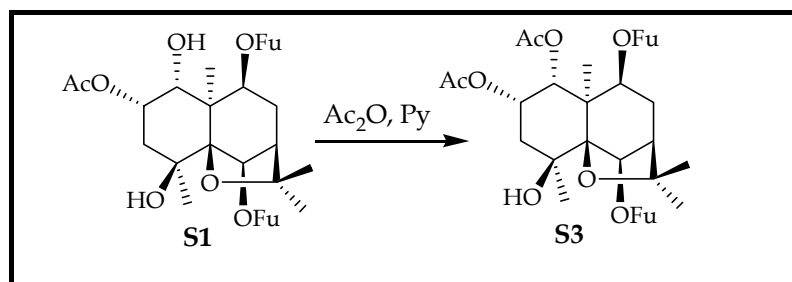


Figura 5.2.8. Correlación química de **S1** y **S3**.

Sesquiterpeno S11

El producto **S11** presentó una fórmula molecular $C_{42}H_{44}O_{14}$, determinada por el estudio de sus espectros de RMN 1H , ^{13}C y espectrometría de masas de alta resolución (EMAR), observándose en el espectro de masas fragmentos correspondientes a la pérdida de grupos acetato y benzoato.

En su espectro de IR se observaron bandas de absorción correspondientes a grupos carbonilos de ésteres (1733 cm^{-1}) y grupos hidroxilos (3478 cm^{-1}), revelando además, el espectro de UV la presencia de anillos aromáticos. Los grupos ésteres fueron confirmados mediante experimentos de RMN, observándose en su espectro de RMN 1H (figura 5.2.9) señales para tres grupos acetatos y quince protones aromáticos, asignables a tres grupos benzoatos.

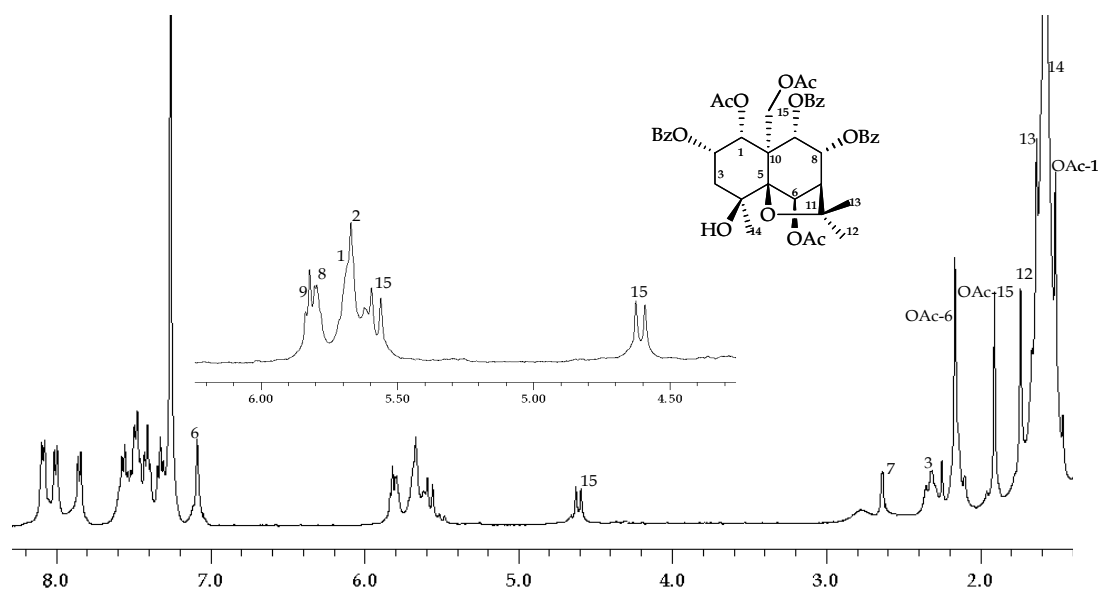
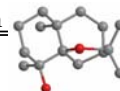


Figura 5.2.9. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **S11**.

En su espectro de RMN 1H (tabla 5.2.1) se observó además, la presencia de un sistema AMX_2 que presenta señales a 5,67 y 2,32 δ , que integra cada una para dos protones y que fueron asignadas a H1 y H2 y H3, respectivamente. Por otro lado, se observó un sistema ABX con señales a 5,82 δ (1H, d, $J= 5,9\text{ Hz}$), 5,79 δ (1H, dd, $J= 3,3\ 5,9\text{ Hz}$) y 2,64 δ (1H, d, $J= 3,3\text{ Hz}$), que fueron asignadas a los protones H9, H8 y H7, respectivamente. Así mismo, se observó una señal a 7,09 δ como singulete (H6), dos protones de un agrupamiento hidroximetilénico (AX) en forma de d_{AX} a 4,61 y 5,58 δ



(2H, $J = 13,5$ Hz, H15) y señales para tres metilos singuletes a $1,59 \delta$ (Me14), $1,69 \delta$ (Me13) y $1,74 \delta$ (Me12), datos que fueron confirmados por su espectro de RMN ^{13}C (tabla 5.2.1).

El conjunto de estos datos está de acuerdo con que el metabolito **S11** es un sesquiterpeno poliesterificado con esqueleto de dihidro- β -agarofurano que posee tres grupos benzoatos, tres grupos acetatos y un grupo hidroxilo terciario, en las posiciones 1, 2, 4, 6, 8, 9 y 15.

La regiosustitución de los diferentes sustituyentes sobre el esqueleto sesquiterpénico fue fijada mediante un experimento HMBC. En la figura 5.2.10, se señalan las principales correlaciones observadas; así, las señales a $164,6$, $165,6$ y $166,1 \delta_{\text{C}}$ se correlacionaron con las señales de los protones aromáticos a $7,33$ - $8,08 \delta_{\text{C}}$. La unión de los grupos benzoatos a los C2, C8 y C9, se estableció por la correlación de las señales de los carbonilos de los grupos benzoatos con las señales de los protones geminales a $5,79 \delta_{\text{H}}$ (H8), $5,82 \delta_{\text{H}}$ (H9) y $5,67 \delta_{\text{H}}$ (H2). De igual manera se estableció la posición de los grupos acetatos sobre C1, C6 y C15, al observarse la correlación de los carbonos carboxílicos a $169,5$, $169,6$ y $170,3 \delta_{\text{C}}$ con sus correspondientes metilos a $1,52$, $2,17$ y $1,96 \delta_{\text{H}}$ y con los protones geminales a $5,67 \delta_{\text{H}}$ (H1), $7,09 \delta_{\text{H}}$ (H6) y $4,61$, $5,58 \delta_{\text{H}}$ (H15), respectivamente.

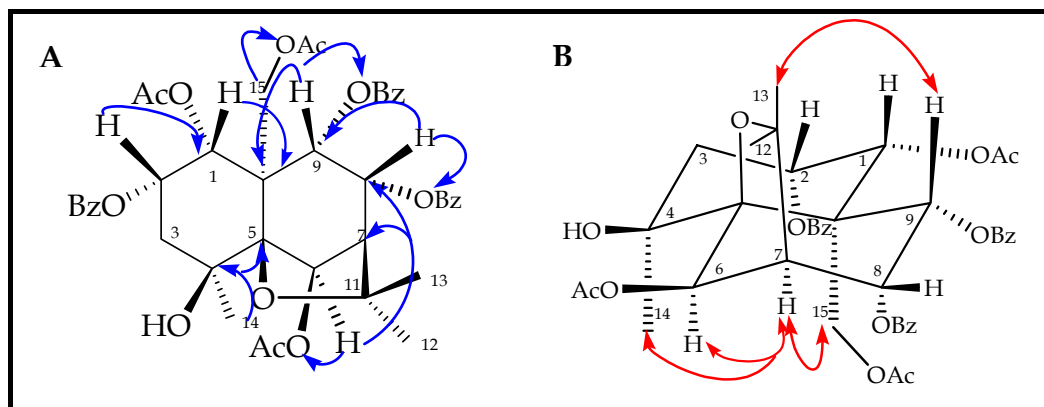


Figura 5.2.10. A. Correlaciones más significativas observadas en el experimento HMBC del sesquiterpeno **S11**. B. Efectos ROE más relevantes observados en el experimento ROESY.

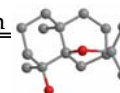
La configuración relativa se estableció mediante un estudio de las constantes de acoplamiento $J_{8,9} = 5,9$ Hz, que nos indicó una relación *cis* para el sistema H8, H9, lo que fue confirmado mediante un experimento ROESY (figura 5.2.10), al observarse un efecto ROE del Me13 con H9 y del protón H7 con H15, H6 y el Me14.

Estos datos nos permitieron establecer la estructura del compuesto **S11** como 1 α ,6 β ,15 α -triacetoxi-2 α ,8 α ,9 α -tribenzoiloxi-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano.

Tabla 5.2.1. Datos^a de RMN ¹H y ¹³C de los sesquiterpenos **S1** y **S11**.

	S1		S11	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	4,38 s ancho $\omega_{13} = 10$ Hz	68,1 d	5,67 m*	75,9 d
2	5,25 m	72,8 s	5,67 m*	68,2 d
3	2,02 m*	42,5 t	2,32 m*	42,3 t
4		70,1 s		69,8 s
5		91,4 s		91,7 s
6	5,64 s	79,7 d	7,09 s	74,8 d
7	2,35 s ancho	49,1 d	2,64 d (3,3)	53,6 d
8	2,22 dd (1,6, 18,4) 2,54 m*	31,1 t	5,79 dd (3,3, 5,9)	70,6 d
9	5,01 d (6,7)	72,1 d	5,82 d (5,9)	72,1 d
10		52,6 s		52,6 s
11		84,9 s		82,7 s
12	1,56 s	29,7 c	1,74 s	29,2 c
13	1,53 s	25,8 c	1,69 s	24,4 c
14	1,47 s	25,2 c	1,59 s	24,3 c
15	1,40 s	20,0 c	4,61 d _{AX} (13,5) 5,58 d _{AX} (13,5)	61,2 t

^a CDCl₃, 400 MHz. *J* entre paréntesis en Hz. * señales solapadas.



5.2.2. Sesquiterpenos dihidro- β -agarourano aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*

Del extracto de *n*-hexano-éter dietílico (1:1) de la corteza de la raíz, además de los metabolitos que se describen en el capítulo 4, se aislaron cinco sesquiterpenos macrocíclicos (**S12-S16**), de los cuales dos resultaron nuevos en la bibliografía química (**S14** y **S15**).

Las estructuras de estos sesquiterpenos se muestran en la figura 5.2.11, agrupadas en series según su esqueleto polihidroxílico básico. Así, **S12** y **S13** presentan un esqueleto de euniminol y los metabolitos **S14** a **S16** presentan un esqueleto de evoninol. Tres de los alcaloides sesquiterpénicos aislados ya habían sido descritos con anterioridad en la bibliografía y fueron caracterizados por el estudio de sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación de los mismos con los datos existentes en la bibliografía química. Así, se identificó **S12**, aislado también de los frutos de *M. cuzcoina*, como eunimina, **S13** como wilfornine F⁷ y **S16** como evonina.

A continuación pasamos a discutir la elucidación estructural de **S14** y **S15**, los dos nuevos alcaloides sesquiterpénicos aislados de la corteza de la raíz.

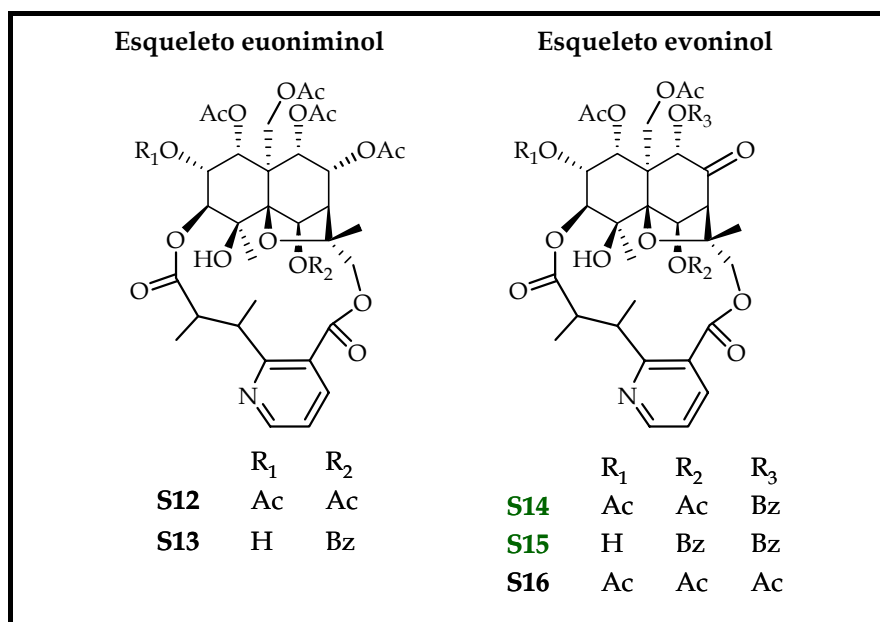


Figura 5.2.11. Alcaloides sesquiterpénicos aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*. En verde los que resultaron nuevos en la bibliografía.

⁷ Duan, H.; Takaishi, Y.; Momota, H.; Ohmoto, Y.; Taki, T.; Jia, Y.; Li, D. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 582-587.

Sesquiterpeno S14

Este producto presentó una fórmula molecular de $C_{41}H_{45}NO_{17}$ determinada por espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). En su espectro de IR se observaron bandas de absorción para grupos hidroxilos y carboxilos (3487 y 1751 cm^{-1}) y el espectro de UV reveló la presencia de anillo aromático (201 , 229 y 269 nm).

En el espectro de RMN ^1H (figura 5.2.12) se observó la presencia de cuatro singuletes que integran para tres protones a $1,47$, $2,08$, $2,17$ y $2,25\text{ }\delta$, correspondientes a los metilos de tres grupos acetatos y señales para cinco protones aromáticos entre $7,47$ y $7,97\text{ }\delta$, características de un grupo benzoato. Además, presentó señales para seis protones metínicos a $3,09\text{ }\delta$ (s), $4,81\text{ }\delta$ (d, $J=2,9\text{ Hz}$), $5,27\text{ }\delta$ (t, $J=3,1\text{ Hz}$), $5,76\text{ }\delta$ (d, $J=3,4\text{ Hz}$), $5,86\text{ }\delta$ (s) y $6,85\text{ }\delta$ (s), que fueron asignados mediante el estudio del experimento ^1H - ^1H COSY, a H7, H3, H2, H1, H9 y H6, respectivamente.

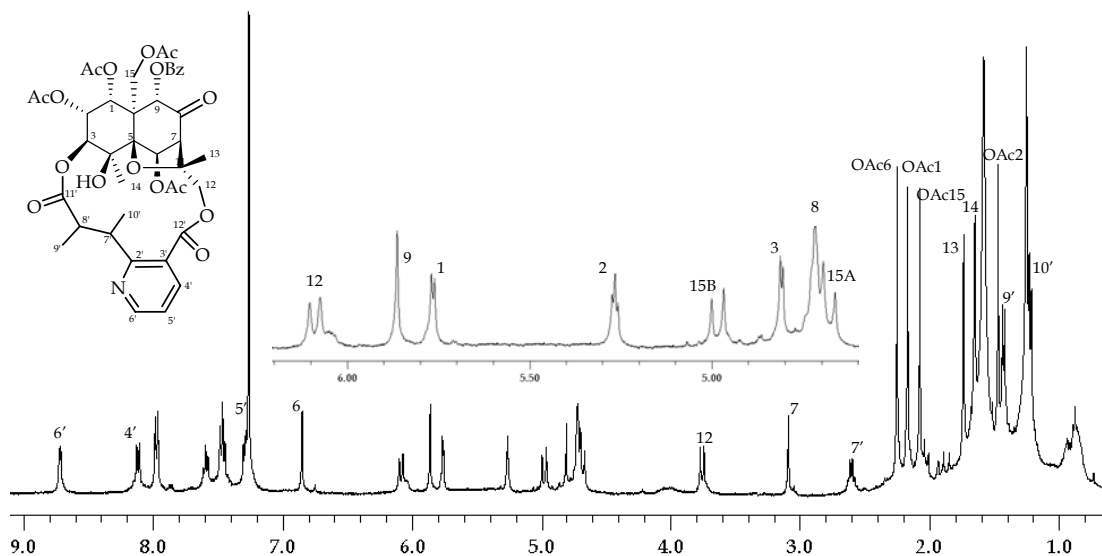
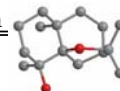


Figura 5.2.12. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **S14**.

La forma y desplazamiento de las señales asignadas a H9 y H7 en el espectro de RMN ^1H , indicaron que estos deben estar en posición α a un grupo carbonilo, lo que se corroboró en el espectro de RMN ^{13}C (tabla 5.2.2) donde se observó una señal singlete a $195,9\text{ }\delta_{\text{C}}$, característica de un grupo carbonilo.

En el espectro de RMN ^1H se observaron además señales correspondientes a dos pares de protones metilénicos a $3,75$ y $6,08\text{ }\delta$ (d, $J=11,4\text{ Hz}$) y $4,68$ y $4,98\text{ }\delta$ (d, $J=13,1$



Hz), que por su forma y desplazamiento fueron asignados a H12 y H15, respectivamente. Estos datos indican que **S14** es un sesquiterpeno dihidro- β -agarofuránico de la serie del evoninol.

La presencia del ácido evonínico en la molécula se determinó por las señales de los tres protones aromáticos correspondientes a la unidad de piridina 2,3-disustituida a 7,29 δ_H (m, H5'), 8,11 δ_H (dd, $J= 1,7, 7,8$ Hz, H4') y 8,72 δ_H (dd, $J= 1,7, 4,7$ Hz, H6') y dos protones metínicos a 2,60 δ_H (m, H8') y 4,71 δ_H (m, H7'), que en el experimento 1H - 1H COSY se correlacionan entre sí y cada uno de ellos con un metilo a 1,20 δ_H (d, $J= 7,1$ Hz, Me10') y 1,43 δ_H (d, $J= 6,9$ Hz, Me9'), respectivamente. Estos datos fueron corroborados en su espectro de RMN ^{13}C , que presentó, además de las señales correspondientes a cinco carbonos aromáticos de la unidad piridínica disustituida a 121,0 δ_C (d, C5'), 124,7 δ_C (s, C3') y 137,6 δ_C (d, C4'), señales para dos metilos a 9,8 δ_C (C10') y 11,7 δ_C (C9'), dos metinos a 36,2 δ_C (C7') y 44,9 δ_C (C8') y dos carbonos carboxílicos a 168,4 δ_C (C12') y 175,8 δ_C (C-11'). Estos datos son similares a los datos de la literatura para la evonina (**S16**), que fue aislada también en este estudio fitoquímico.

Todos estos datos indican que **S14** es un alcaloide sesquiterpénico con un esqueleto de dihidro- β -agarofurano nonasustituido, que presenta cuatro grupos acetatos, un grupo benzoato, un alcohol terciario, una cetona y un grupo evonínico.

La regiosustitución de los ésteres sobre el esqueleto base fue resuelta mediante un experimento HMBC (figura 5.2.13). Así, los cuatro carbonos carboxílicos de los grupos acetatos a 168,2, 169,2, 169,3 y 170,1 δ_C , se correlacionaron con sus metilos singuletes a 2,17, 1,47, 2,25 y 2,08 δ_H , respectivamente. La disposición de los grupos acetatos en el C1, C2, C6 y C15 se estableció por la correlación de sus carbonos carboxílicos con las señales de los protones geminales a 5,76 δ_H (H1), 5,27 δ_H (H2), 6,85 δ_H (H6) y 4,98 y 4,68 δ_H (H15A y H15M). La correlación entre el carbono carboxílico a 165,4 δ_C del grupo benzoato con los protones a 7,97 δ_H y la señal del protón a 5,86 δ_H (H9), permitió situar dicho grupo sobre el C9. La señal a 165,9 δ_C fue asignada al C2', basándonos en su correlación con los protones a 4,71 δ_H (H7') y 2,60 δ_H (H8'). Así mismo, la correlación de las señales de los carbonos a 175,8 δ_C (C11') y 168,4 δ_C (C12') con los protones a 4,81 δ_H (H3), 3,75 y 6,08 δ_H (H12), respectivamente, confirmaron la unión del agrupamiento evonínico al esqueleto sesquiterpénico entre los carbonos C3 y C12.

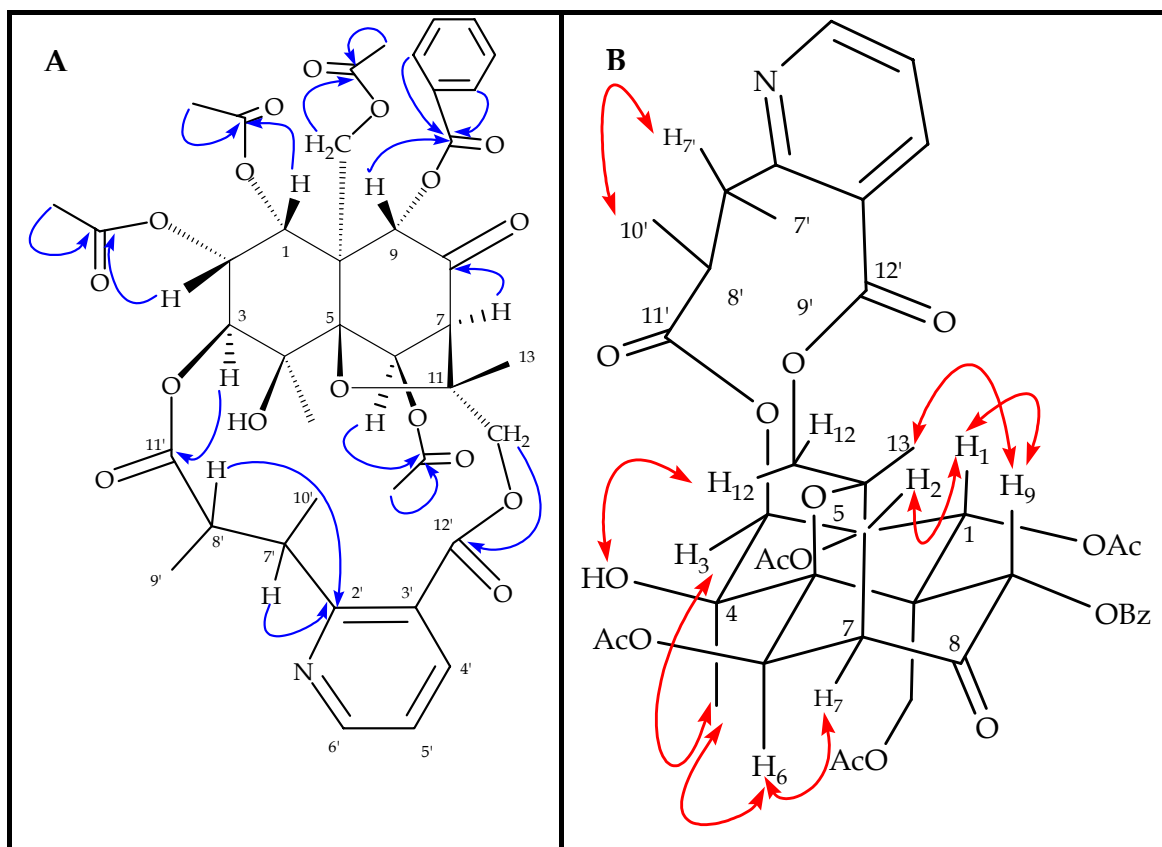
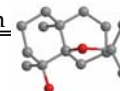


Figura 5.2.13. A Las flechas **azules** indican las correlaciones más importantes observadas en el experimento HMBC del sesquiterpeno **S14**. B. Efectos ROE más relevantes observados en el experimento ROESY, indicados con flechas **rojas**.

Un cuidadoso estudio de las constantes de acoplamiento y un experimento ROESY (figura 5.2.13), en los que se observaron efectos ROE de H1 con H2 y H9, correlación de H6 con H7 y con el Me14, y del protón H9 con el Me13, permitieron establecer la disposición relativa de los grupos ésteres en la molécula como 1 α , 2 α , 3 β , 4 β , 6 β , 9 α y 15 α . Estos datos y comparación con los datos en la bibliografía para evonina, nos permitió establecer la estructura de **S14** como 9 α -benzoiloxi-9-deacetilevonina.

**Sesquiterpeno S15**

El producto denominado **S15** presentó una fórmula molecular $C_{44}H_{45}NO_{16}$, de acuerdo con su espectro de masas de alta resolución.

El estudio de sus espectros de IR, UV, RMN 1H y ^{13}C (Tabla 5.2.2) y experimentos RMN 2D, nos indicó que se trataba de un alcaloide sesquiterpénico macrocíclico, con dos grupos benzoatos, dos grupos acetatos, un grupo hidroxilo secundario y otro terciario, una cetona y un evoninato.

El conjunto de estos datos nos mostró que el producto **S15** estaba muy relacionado con el producto que hemos denominado **S14**, siendo la única diferencia en sus espectros de RMN 1H , la desaparición de las señales correspondientes a dos grupos acetatos y la aparición de señales para cinco protones aromáticos asignadas a un grupo benzoato, además del desplazamientos de la señal correspondiente a H2 desde 5,27 δ en **S14** a 4,08 δ en **S15**.

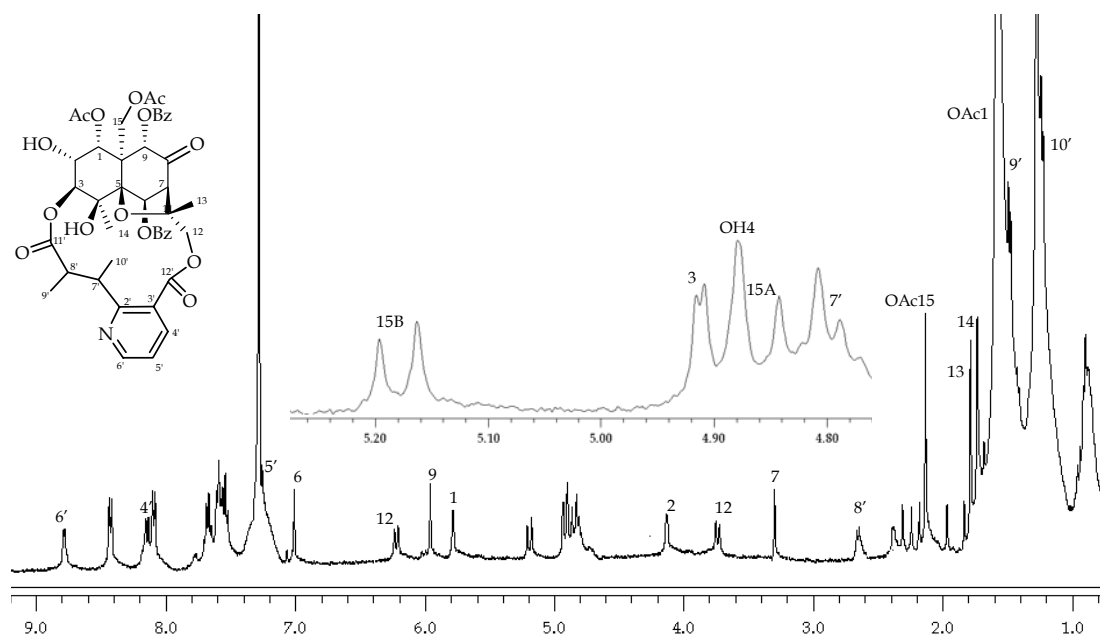


Figura 5.2.14. Espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) de **S15**.

Un experimento HMBC (figura 5.2.15A) nos permitió establecer de forma inequívoca la posición de los distintos ésteres en la molécula, siendo las principales correlaciones observadas las que se indican en la figura. La estereoquímica relativa fue determinada por medio de un experimento ROESY (figura 5.2.15B), donde se observó

efecto ROE entre H1 y H2, lo que indica la posición relativa del grupo hidroxilo sobre el C2 como α .

Estos datos, comparación con los datos dados en la bibliografía para la evonina (S16) y los datos del sesquiterpeno descrito anteriormente S14, determinaron la estructura de S15 como 6β , 9α -dibenzoiloxi- 2α -hidroxi-2,6,9-trideacetilvonina.

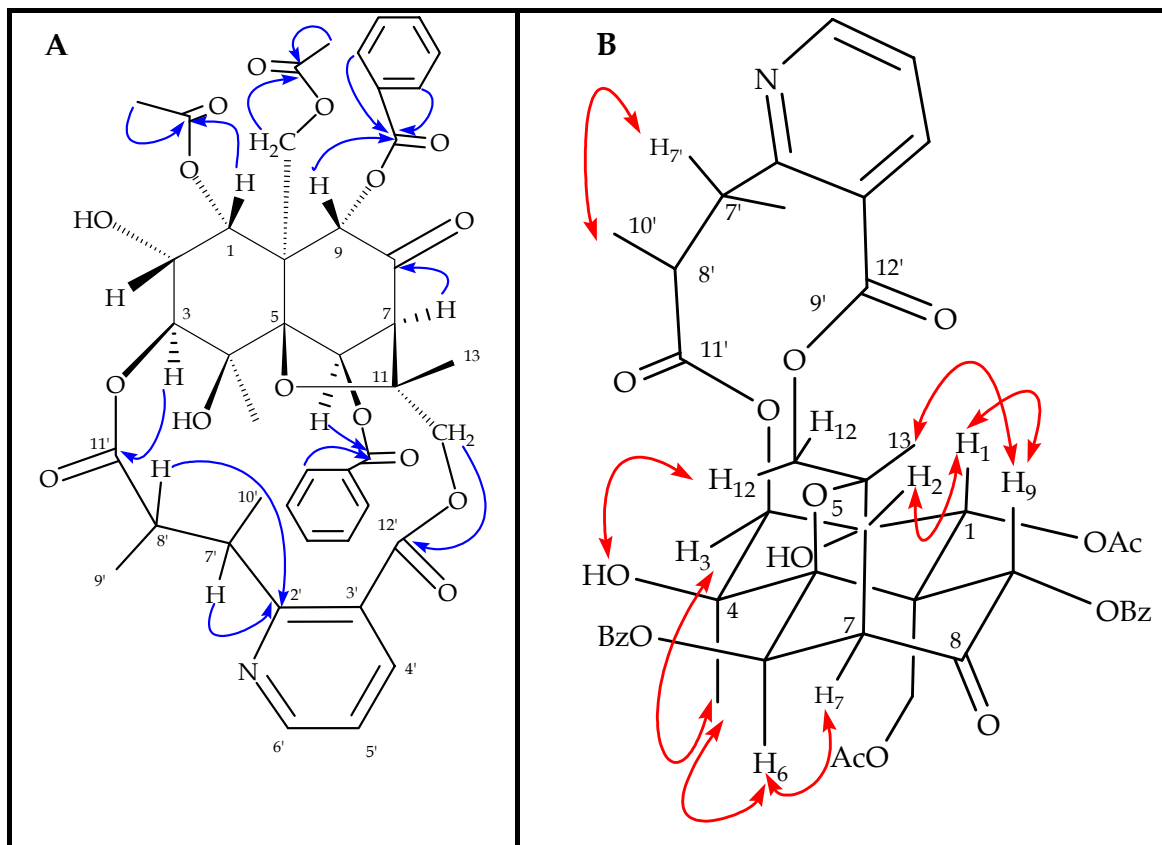
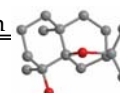


Figura 5.2.15. A Las flechas azules indican las correlaciones más importantes observadas en el experimento HMBC del sesquiterpeno S15. B. Efectos ROE más relevantes observados en el experimento ROESY, indicados con flechas rojas.

**Tabla 5.2.2.** Datos^a de RMN ¹H y ¹³C de los sesquiterpenos **S14** y **S15**.

	S14		S15	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	5,76 d (3,4)	71,4 d	5,74 d (2,9)	73,5 d
2	5,27 t (3,1)	68,6 d	4,08 m	69,9 d
3	4,81 d (2,9)	74,8 d	4,90 d (3,0)	77,0 d
4		70,1 s		70,4 s
5		95,4 s		95,5 s
6	6,85 s	73,6 d	6,98 s	74,9 d
7	3,09 s	61,9 d	3,26 s	61,8 d
8		195,9 s		195,5 s
9	5,86 s	79,3 d	5,92 s	76,9 d
10		53,0 s		52,9 s
11		86,0 s		85,7 s
12	3,75 d _{AX} (11,4) 6,08 d _{AX} (11,4)	70,0 t	3,68 d _{AX} (11,1) 6,19 d _{AX} (11,1)	70,1 t
13	1,74 s	19,3 c	1,76 s	19,6 c
14	1,65 s	23,6 c	1,71 s	24,0 c
15	4,68 d _{AM} (13,1) 4,98 d _{AM} (13,1)	60,6 t	4,80 d _{AM} (13,4) 5,16 d _{AM} (13,4)	60,8 t
2'		165,9 s		165,0 s
3'		124,7 s		124,0 s
4'	8,11 dd (1,7, 7,8)	137,6 d	8,08 dd (1,6, 7,8)	137,6 d
5'	7,29 m	121,0 d	7,30 m	121,2 d
6'	8,72 dd (1,7, 4,7)	151,6 d	8,72 dd (1,6, 4,8)	151,0 d
7'	4,71 m	36,2 d	4,78 m	36,3 d
8'	2,60 m	44,9 d	2,61 m	44,9 d
9'	1,43 d (6,9)	11,7 c	1,46 d (6,9)	12,1 c
10'	1,20 d (7,1)	9,8 c	1,22 d (7,1)	9,5 c
11'		175,8 s		174,2 s
12'		168,4 s		168,1 s

^a CDCl₃, 400 MHz. *J* entre paréntesis en Hz.

5.2.3. Modificaciones estructurales de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos aislados de *Maytenus cuzcoina*

5.2.3.1. Introducción.

Desde la segunda mitad del siglo XIX se observó que el efecto fisiológico que produce una molécula estaba relacionado con su estructura^{8,9}. El estudio de esta relación, cuando es cualitativa, se denomina estudio de relación estructura-actividad (RSA), más conocido como estudio **SAR** (*Structure-Activity Relationship*) y **QSAR** (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) cuando se establecen relaciones cuantitativas.

La finalidad de dichos estudios es determinar qué partes de una molécula son esenciales para su actividad biológica. Esto se lleva a cabo mediante la comparación estructural de metabolitos secundarios similares o mediante la síntesis o semisíntesis de una serie de compuestos, con pequeñas variaciones estructurales con respecto a la molécula natural y ver que efecto tienen sobre la actividad biológica. Un ejemplo de estudios SAR, es el del producto natural anticancerígeno, paclitaxel (taxol)¹⁰, que tras un gran número de modificaciones estructurales, se pudo determinar que partes de la molécula son imprescindibles para su actividad (figura 5.2.16).

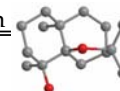
La **modificación estructural** de un prototipo o cabeza de serie tiene por objeto optimizar su actividad farmacológica, con el fin de disponer de fármacos más selectivos y menos tóxicos. Este proceso es prácticamente indispensable en el desarrollo de cualquier fármaco. Incluso si no se llegan a conseguir análogos con mejor actividad, las correlaciones cualitativas y cuantitativas que pueden establecerse entre las modificaciones estructurales realizadas y los datos de actividad biológica son de gran utilidad para avanzar en el conocimiento del **farmacóforo** (parte de la molécula que interactúa con la diana farmacológica, que explica la acción biológica a nivel molecular).

La identificación de los distintos grupos farmacofóricos es esencial en el diseño de fármacos y constituye uno de los principales objetivos de la Química Médica, determinándose, en algunos casos, características geométricas que pueden ser

⁸ Crum-Brown, A.; Fraser, T. R. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*. **1872**, 7, 663.

⁹ Richardson, B. W. *Med. Times Gaz.* **1869**, 18, 703.

¹⁰ Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. **2005**, Ed. Elsevier: Chicago.



utilizadas para el diseño de otras moléculas activas¹¹. Así por ejemplo la mitoxantrona, un agente anticancerígeno, fue sintetizada como resultado de las conclusiones obtenidas al examinar la estructura de algunos compuestos antitumorales, como la camptotecina y la estreptonigrina, al comprobarse que todos ellos forman un triángulo con dimensiones semejantes, en cuyos vértices se sitúan dos oxígenos y un nitrógeno¹¹ (figura 5.2.17).

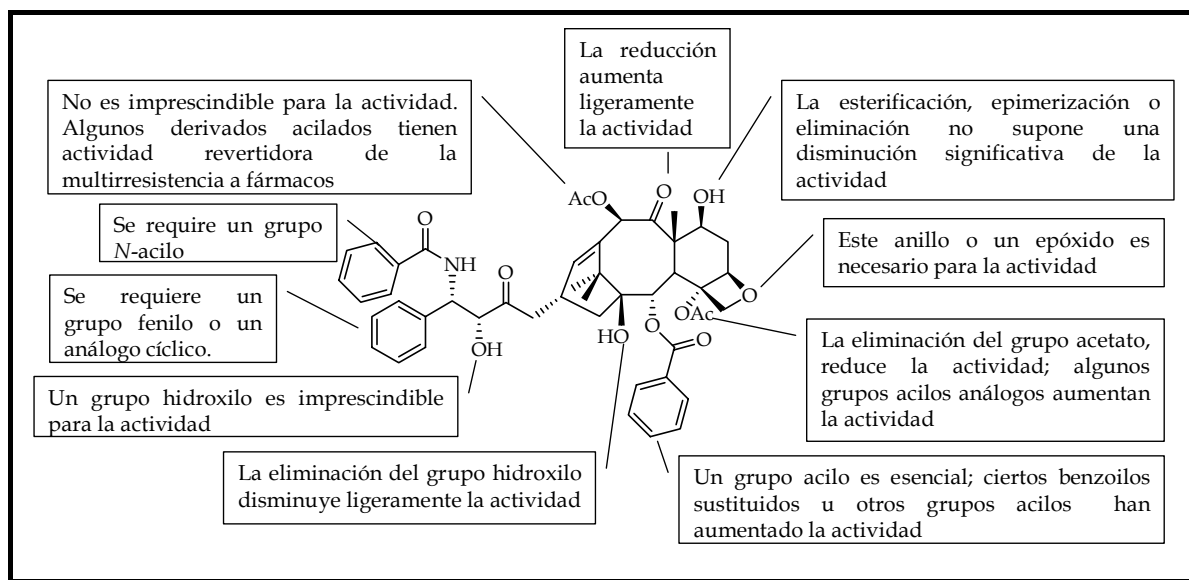


Figura 5.2.16. Estudios SAR del paclitaxel (Taxol).

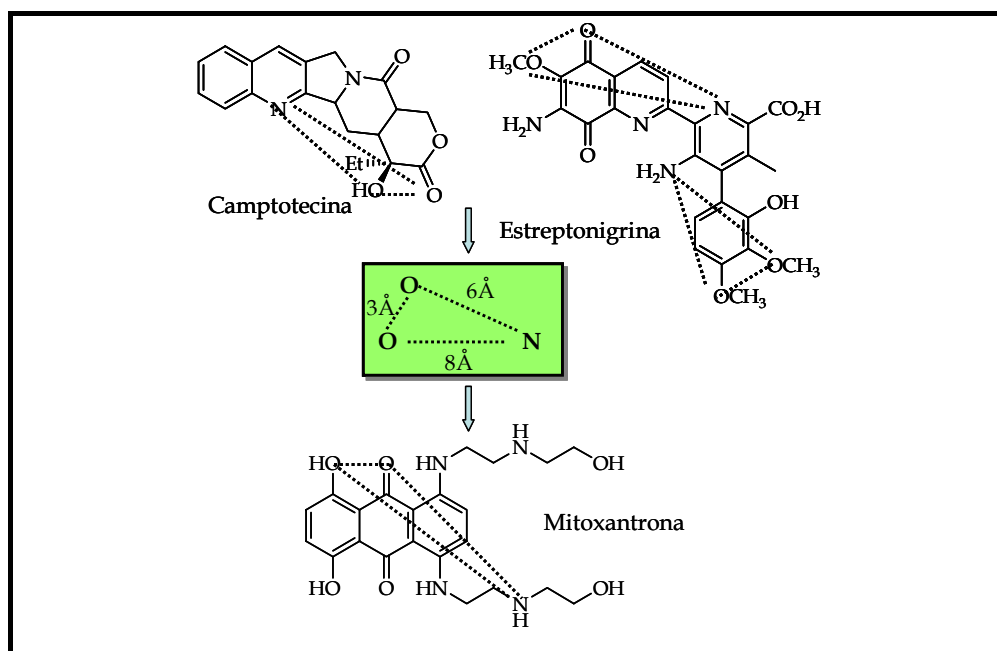


Figura 5.2.17. Diseño de la mitoxantrona basándose en el farmacóforo, expresado en distancias interatómicas.

¹¹Avendaño, C. *Introducción a la Química Farmacéutica*. 2001, Madrid, McGraw-Hill/Interamericana de España S. A. U.

Al realizar modificaciones estructurales en un cabeza de serie, se tienen en cuenta las siguientes estrategias estándar, que se han ido estableciendo a lo largo de muchos años de estudios de relación estructura-actividad:

- **Simplificación de la estructura.** Conocida tradicionalmente como variación disyuntiva, se aplica frecuentemente a los productos naturales con estructura compleja, facilitando su síntesis, pero con el inconveniente de la posible pérdida de selectividad. Por ejemplo, los análogos simplificados de la morfina, por eliminación de estereocentros, mantienen la actividad analgésica (figura 5.2.18).

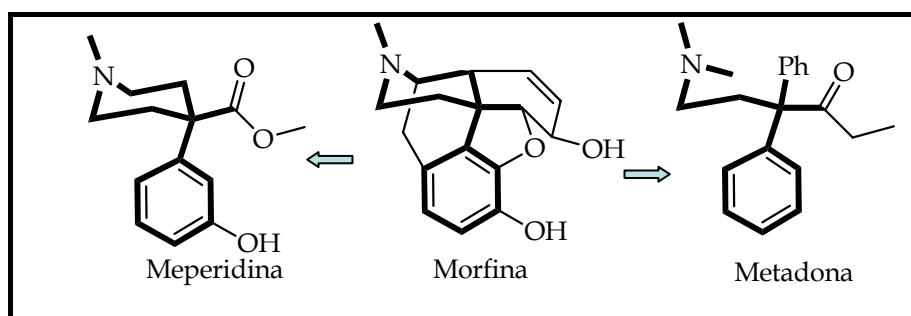


Figura 5.2.18. Simplificación estructural de la morfina. El farmacóforo está representado en trazo más grueso. La metadona tiene una potente actividad analgésica al igual que la morfina, pero tiene un único estereocentro, mientras que la morfina posee cinco. La meperidina, un análogo aquiral de la morfina, es un potente narcótico y analgésico.

- **Asociación de dos moléculas.** En ocasiones se fusionan fármacos entre sí (híbridos idénticos) o con otros fármacos (híbridos no idénticos) para formar una nueva estructura que potencie la acción de ambos. Así, por ejemplo, el analgésico benorilato (figura 5.2.19) que procede de la unión covalente entre la aspirina y el paracetamol. En otros casos se reúnen fármacos cuyas acciones sean complementarias. Las uniones de estos fármacos puede ser a través de cadenas, uniones covalentes o solapamientos.

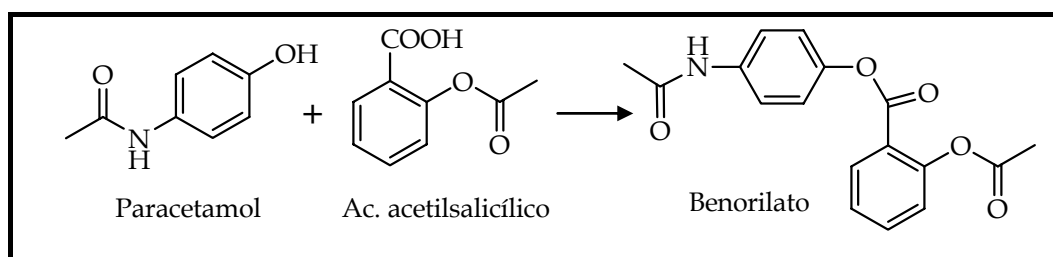
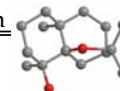


Figura 5.2.19. Benorilato es un analgésico generado por la reacción de dos fármacos, el paracetamol y el ácido acetilsalicílico.



- **Variación de los sustituyentes**, introduciendo grupos dadores y aceptores de electrones, halógenos (uno de cada tres fármacos poseen un grupo halogenado), grupos metilos, etc.

Compuesto Original	Compuesto modificado	Resultado
 <chem>CC(C)C(C(=O)N1CCCC1)C(=O)CCS</chem>	 <chem>CC(C)C(C(=O)N1CCCC1)C(=O)CCS</chem> Camptopril	Es 10 veces más activo como anticolésterolémico
 <chem>CC(C)CNC(=O)S(=O)(=O)c1ccc(C)cc1</chem> Tolbutamida	 <chem>CC(C)CNC(=O)S(=O)(=O)c1ccc(Cl)cc1</chem> Cloropropamida	Prolonga su acción hipoglucémica
 <chem>CN1CC[C@]23[C@@H]4OC5=C2C=CC(=C5C=C4)O</chem> Morfina	 <chem>CN1CC[C@]23[C@@H]4OC5=C2C=CC(=C5C=C4)OC</chem> Codeína	Cambio en el perfil farmacológico, de analgésico a antitúxico

Figura 5.2.20. Ejemplos de variaciones realizadas a fármacos en un sustituyente.

- **Aumento de la rigidez**, por ejemplo, con el cierre de anillos o la introducción de dobles enlaces, lo que disminuye la libertad conformacional. Evans y *col.*¹² realizaron derivados de los β -bloqueantes tipo fenilpropanolaminas (figura 5.2.21) con el objeto de disminuir su actividad β -bloqueante pero manteniendo la actividad hipotensora, al restringir la conformación, lo que consiguieron con el cromakalim.

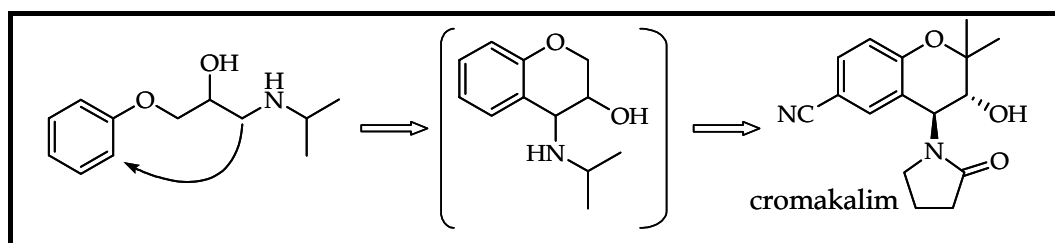


Figura 5.2.21. Análogos cíclicos de los β -bloqueantes fenilpropanolaminas.

¹² Evans, J. M.; Fake, C. S.; Hamilton, T. C.; Poyser, R. H.; Watts, E. A. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1582-1589.

- **Extensión y contracción del anillo.** En la figura 5.2.22 se presenta como afectada a la actividad inhibidora de la enzima que sintetiza la angiotensina el aumento del tamaño del anillo¹³ en análogos del enalaprilat, incrementando la actividad 4000 veces cuando aumentamos el anillo de 5 (n=2) a 8 miembros (n=5).

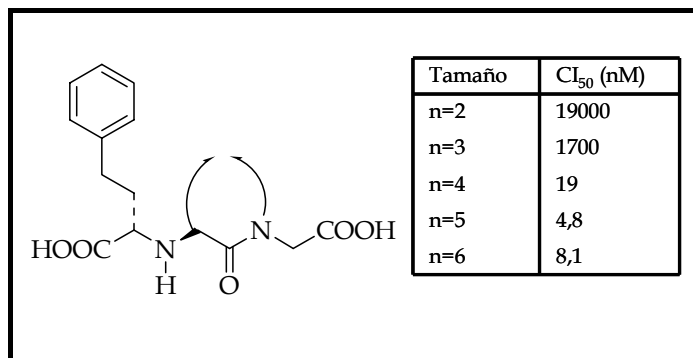


Figura 5.2.22. Análogos del enalaprilat y su actividad inhibidora de la angiotensina convertasa.

- **Bioisosterismo.** Los grupos o moléculas que tienen propiedades físicas y químicas semejantes y que producen efectos fisiológicos similares o antagónicos (ya que frecuentemente interactúan con la misma diana), se les conoce como bioisómeros. Este término surgió con la idea de usar el isosterismo como criterio en la preparación de fármacos, siendo cientos los fármacos diseñados siguiendo esta estrategia. En la figura 5.2.23 se presentan algunos ejemplos.

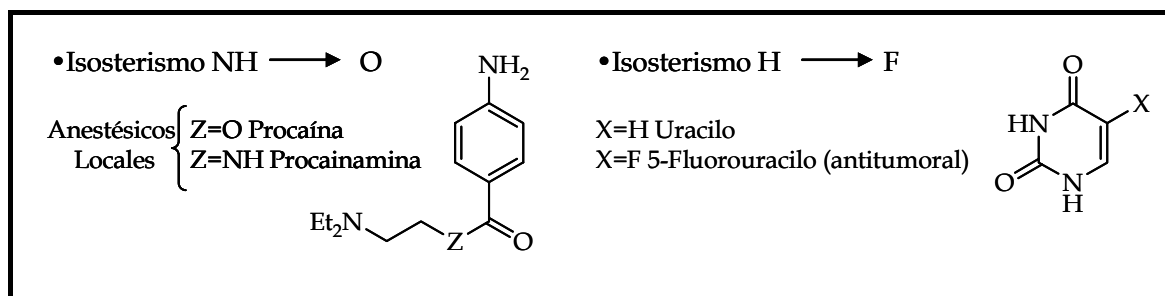
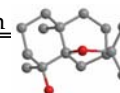


Figura 5.2.23. Ejemplos de fármacos diseñados siguiendo como estrategia el isosterismo.

¹³ Thorsett, E. D.; Harris, E. E.; Aster, S. D.; Peterson, E. R.; Snyder, J. P.; Springer, J. P.; Hirshfield, J.; Tristram, E. W.; Patchett, A. A.; Ulm, E. H. *J. Med. Chem.* **1986**, 29 (2), 251-260.



5.2.3.2. Derivados realizados para modular la actividad biológica

Con la finalidad de profundizar en el conocimiento de la relación estructura-actividad (SAR), se prepararon una **serie de derivados** a partir de los sesquiterpenos agarofuranos aislados de los frutos de *Maytenus cuzcoina*, utilizando diferentes cloruros de ácidos y anhídridos (figura 5.2.24), que fueron seleccionados para conferir diferentes características estereo-electrónicas a los derivados sesquiterpénicos:

- Derivados **alifáticos**: ácido acético, ácido 2-metil-butanoico, ácido láurico, ácido trifluoroacético y ácido pivaloico.
- Derivados **aromáticos**: ácido benzoico, ácido nicotínico, ácido 1-naftoico, ácido 4-nitrobenzoico, ácido 4-metoxibenzoico, ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico y ácido 2-*N*-metilaminobenzoato.

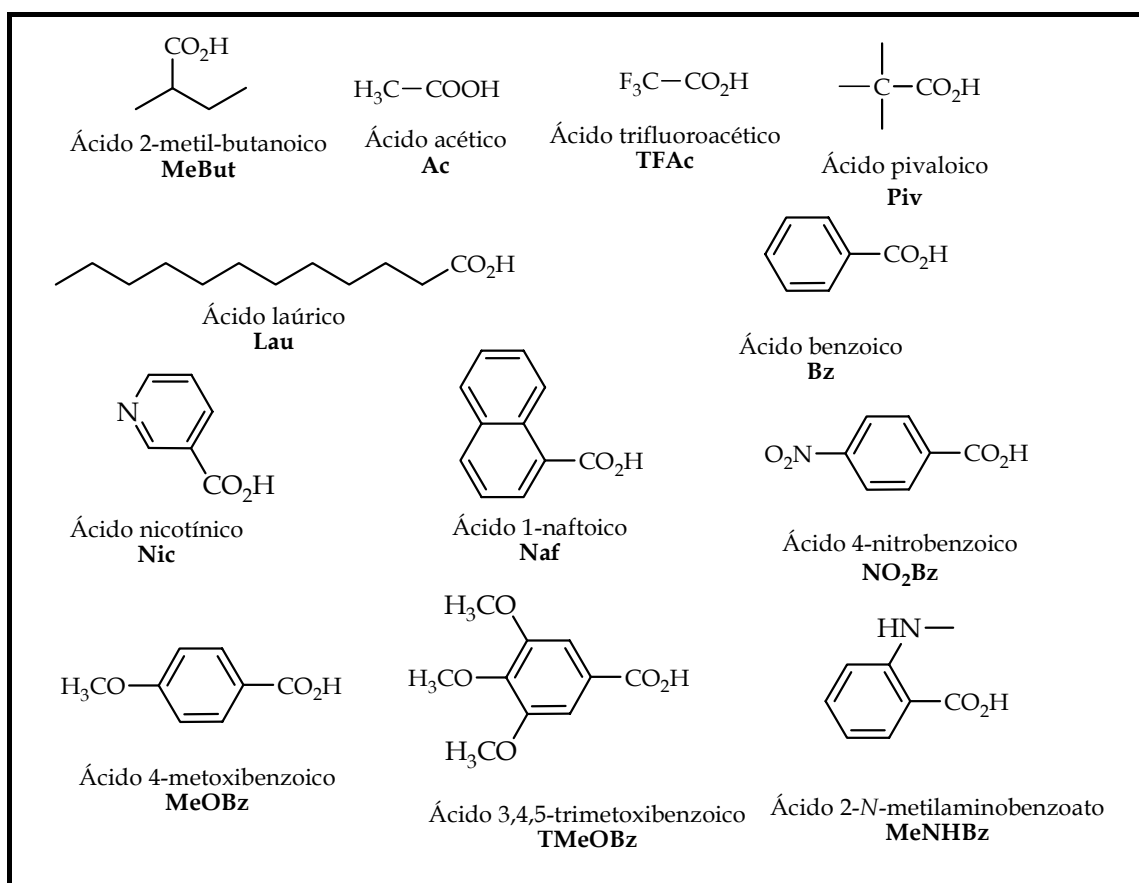


Figura 5.2.24. Ácidos empleados en la esterificación de los sesquiterpenos. La abreviatura que emplearemos para cada ácido se indica en **negrita**.

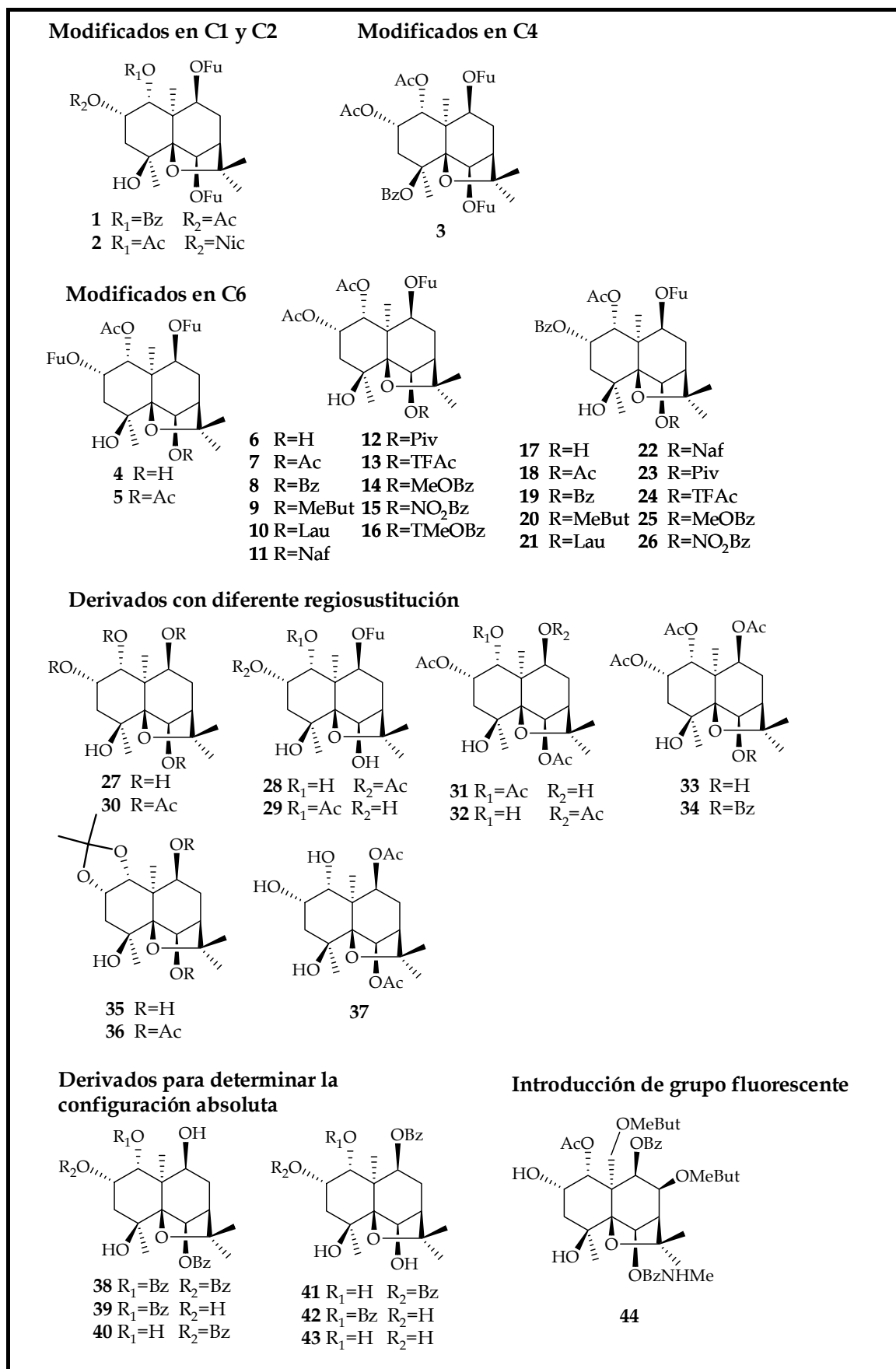
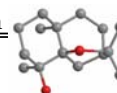


Figura 5.2.25. Derivados preparados a partir de los sesquiterpenos S1-S5 y T3.



Así, se prepararon un total de 44 derivados (figura 5.2.25), modificando el éster presente en C1 (**1**), en C2 (**2**), en C4 (**3**) o en C6 (**4** al **26**). Por otra parte, nos planteamos desarrollar una secuencia de reacciones que nos permitiera controlar la regiosustitución, prestando especial atención al sustituyente en C9 para analizar posteriormente, como afecta a la actividad. Para ello, realizamos hidrólisis parciales (**28-29**) y totales (**27**), acetilaciones parciales (**30-32**), la protección con un grupo acetónido de los grupos hidroxilos en C1 y C2 (**33-35**) y benzoilaciones parciales (**36-43**).

Al objeto de determinar el mecanismo de acción de este tipo de sesquiterpenos como inhibidores de la Pgp humana, introdujimos un grupo fluorescente, 2-N-metilaminobenzoato, a un sesquiterpeno aislado de *Crossopetalum tonduzii*², **T3** obteniéndose el derivado **44**.

En los siguientes apartados se describirán las modificaciones realizadas, las condiciones de reacción empleadas y los resultados obtenidos.

➤ Modificación del sustituyente en el **carbono 1**: benzoilación de **S1**.

La mayoría de los sesquiterpenos aislados de los frutos de *Maytenus cuzcoina* tienen un grupo acetato en el carbono 1 (**S2-S10**). El aislamiento e identificación del sesquiterpeno **S1** de los frutos de *M. cuzcoina*, el cual presenta un grupo hidroxilo sobre C1, nos permitió preparar el derivado benzoilado y determinar la importancia de un grupo aromático en dicha posición.

Cabe destacar que el 50% de los fármacos presentan un grupo aromático en su estructura¹⁴, que participa, no sólo en interacciones hidrofóbicas (interacciones π - π), sino que también el sistema π puede actuar formando puentes de hidrógeno¹⁵, por lo que resulta de gran interés la introducción de un grupo aromático en la molécula y estudiar su efecto en la actividad biológica.

¹⁴ Wermuth, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 2003, Academic Press: Elsevier Science, San Diego.

¹⁵ Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F. *Angw. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 11, 1210-1250.

El sesquiterpeno **1**, fue preparado mediante benzoilación de **S1** con cloruro de benzoilo, piridina, imidazol y una cantidad catalítica de DMAP (4-dimetilaminopiridina) (figura 5.2.26).

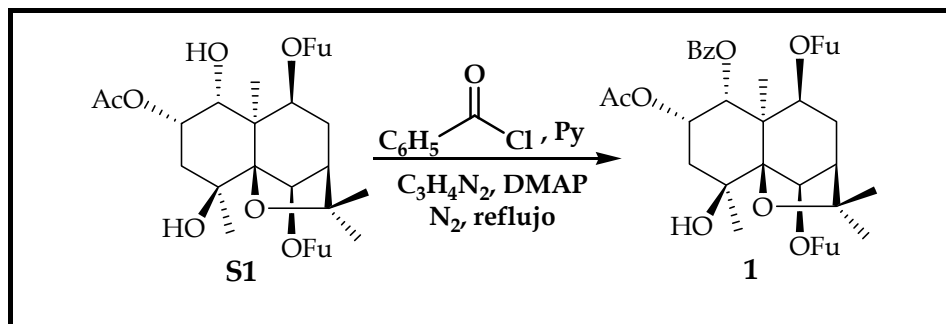


Figura 5.2.26. Esquema de reacción del sesquiterpeno **S1**.

La estructura del compuesto **1** se determinó por el estudio de sus datos espectroscópicos, observándose en su espectro RMN ^1H el desplazamiento de la señal del protón H1 desde 4,37 δ en **S1** a 5,67 δ en **1** y la aparición de señales correspondientes a cinco protones aromáticos, entre 7,32-7,66 δ , correspondiente al grupo benzoato (figura 5.2.27).

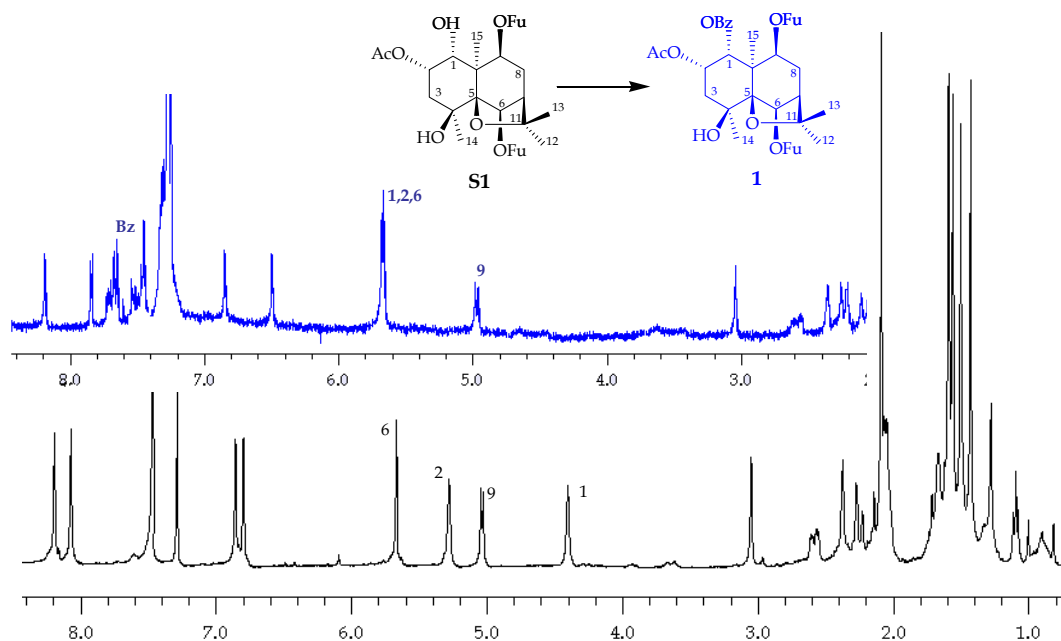
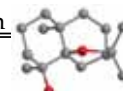


Figura 5.2.27. Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **S1** y del derivado benzoilado, **1**.



➤ Modificación del sustituyente en el **carbono 2**: esterificación de **S4**.

Estudios de relación estructura-actividad realizados en quimiomoduladores de la Pgp, se ha observado que la mayoría de ellos poseen al menos un nitrógeno terciario¹⁴, por lo que consideramos de interés introducir un grupo nicotinato en la molécula. Por otra parte, ello nos permitiría estudiar el efecto de un grupo aromático con un heteroátomo, que puede actuar como aceptor y completar así el estudio de relación estructura-actividad.

Así, esterificamos el sesquiterpeno con un grupo hidroxilo en el carbono 2, **S4**¹, con cloruro de nicotinilo, siguiendo las condiciones de reacción que se detallan en la figura 5.2.28.

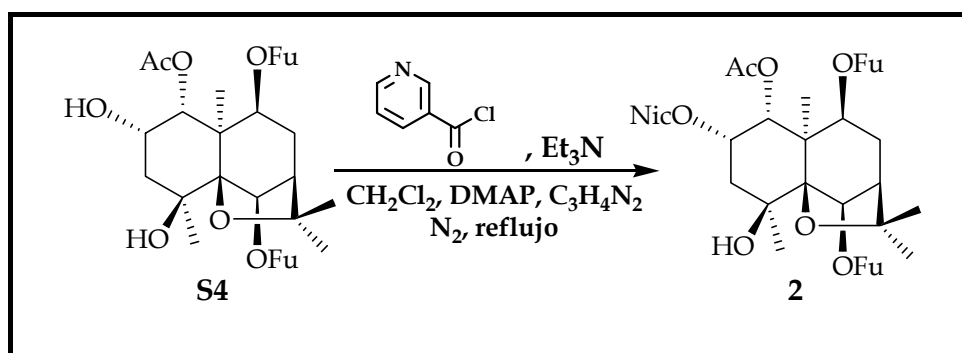


Figura 5.2.28. Esquema de reacción de **S4**.

La estructura del compuesto **2** se determinó por el estudio de sus datos espectroscópicos, observándose en su espectro de RMN ¹H (figura 5.2.29) el desplazamiento de la señal del protón H2 desde 4,35 δ en **S4** a 5,82 δ en **2**, así como la aparición de señales correspondientes a cuatro protones aromáticos a 8,22 δ (2H, dd, *J*= 1,8, 6,3 Hz); 8,79 δ (1H, d, *J*= 4,9 Hz) y 9,17 δ (1H, s), característicos de un grupo nicotinato.

¹⁴ Wang, R. B.; Kuo, C. L.; Lien, L. L.; Lien, E. J. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2003**, *28*, 203-228.

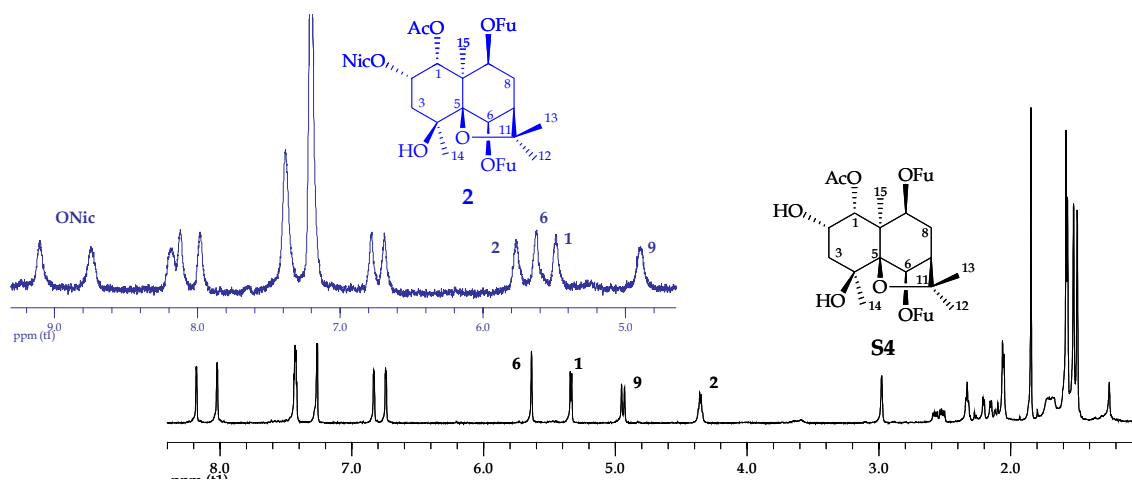


Figura 5.2.29. Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **S4** y del producto de su esterificación en el carbono 2, **2**.

- Modificación del sustituyente en el **carbono 4**: benzoilación del alcohol terciario de **S3**.

Todos los sesquiterpenos aislados de *Maytenus cuzcoina*, presentan un grupo hidroxilo terciario en el carbono 4. Para estudiar su efecto sobre la actividad, decidimos esterificarlo.

Para ello, realizamos varios intentos utilizando diferentes métodos^{15,16,17} en los que se emplean diferentes catalizadores, no detectándose reacción en ninguno de los casos. Se obtuvo únicamente el producto benzoilado **3**, con un 32% de rendimiento cuando se utilizó como catalizador el triflato de plata¹⁸. Las condiciones que se emplearon se encuentran resumidas en la figura 5.2.30 y detalladas en la parte experimental.

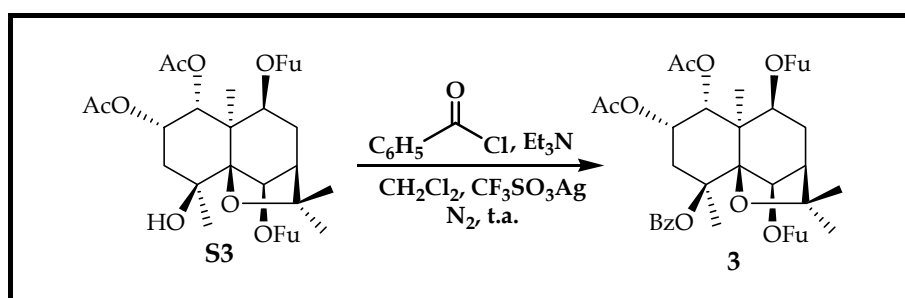


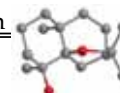
Figura 5.2.30. Esquema de reacción de **S3**.

¹⁵ Otera, J. *Esterification. Methods, Reactions and Applications*. 2003, Wiley-VCH: Weinheim, Germany.

¹⁶ Ishira, K.; Kubota, M.; Kurihara, H.; Yamamoto, H. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4560-4567.

¹⁷ Lee, S.; Fuchs, P. L. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 317-318.

¹⁸ Buró, R. M.; Gas, T. S.; Roof, M. B. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8111-8112.



La estructura del producto **3** se determinó mediante el estudio de sus datos espectroscópicos, observándose en su espectro de RMN ^1H (figura 5.2.31) la desaparición de la señal correspondiente al protón del grupo hidroxilo en el carbono 4 a 3,00 δ en **S3**¹ y la aparición de las señales correspondientes al grupo benzoato, cinco protones aromáticos entre 7,43-8,05 δ .

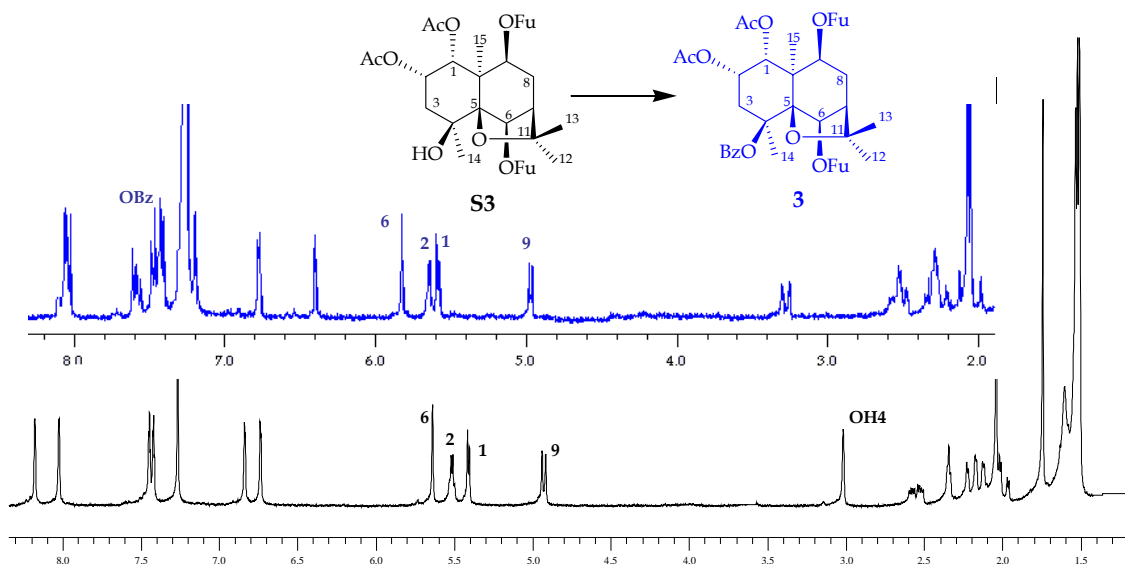


Figura 5.2.31. Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de **S3** y de su derivado benzoilado **3**.

- Modificación del sustituyente en el carbono 6: hidrólisis regioselectiva de **S2**, **S3** y **S5** y posterior esterificación.

Los derivados que hemos denominado del **4** al **26**, fueron preparados mediante transformaciones realizadas en el carbono 6 de los sesquiterpenos naturales, **S2**, **S3** y **S5**¹, como se indica en la figura 5.2.32.

Los derivados **4**, **6** y **17** se prepararon mediante la hidrólisis parcial de **S2**, **S3** y **S5**, respectivamente. El éster 3-furoilo presente en C6 de estos sesquiterpenos, fue hidrolizado regioselectivamente con bicarbonato sódico 0,1 M, sin que se vieran afectados los otros ésteres (figura 5.2.33).

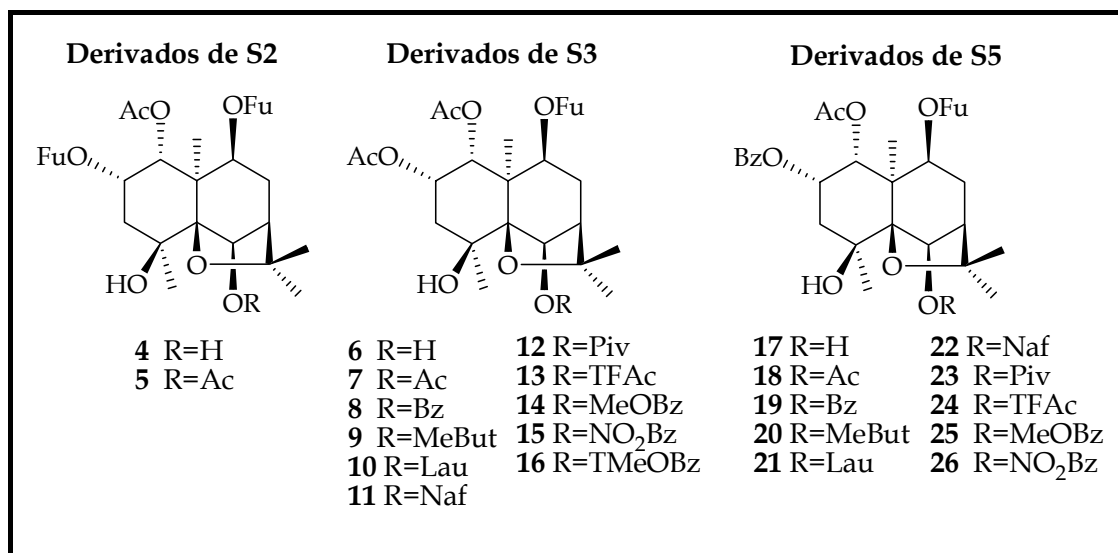


Figura 5.2.32. Derivados obtenidos por modificación del sustituyente en el C6.

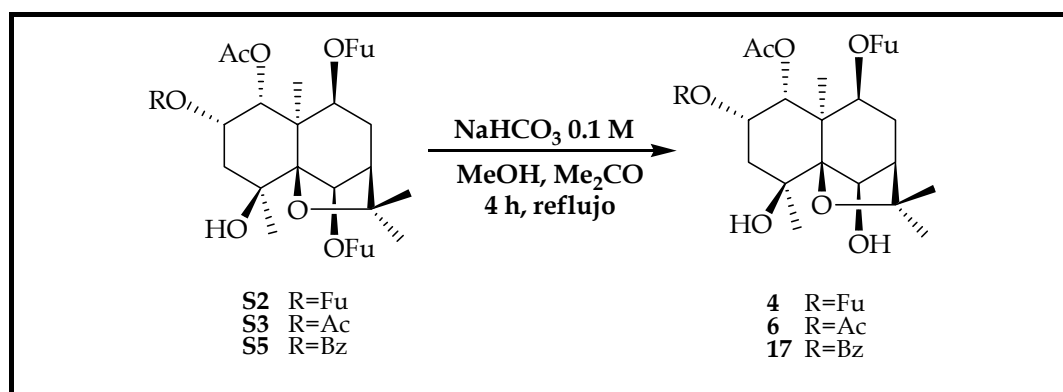


Figura 5.2.33. Esquema de reacción de la hidrólisis regioselectiva de S2, S3 y S5.

Las estructuras de los compuestos **4**, **6** y **17** se establecieron mediante el estudio de sus datos espectroscópicos. Así por ejemplo, el espectro de RMN ¹H del producto **6** (figura 5.2.34.) muestra el desplazamiento de la señal del protón H6 desde 5,63 δ en **S3**¹ a 4,85 δ en el producto **6**, así como la desaparición de las señales de tres protones aromáticos del grupo 3-furoato a 6,83, 7,44 y 8,18 δ, quedando así establecida la estructura del derivado **6** como el 6-defuroil de **S3**.

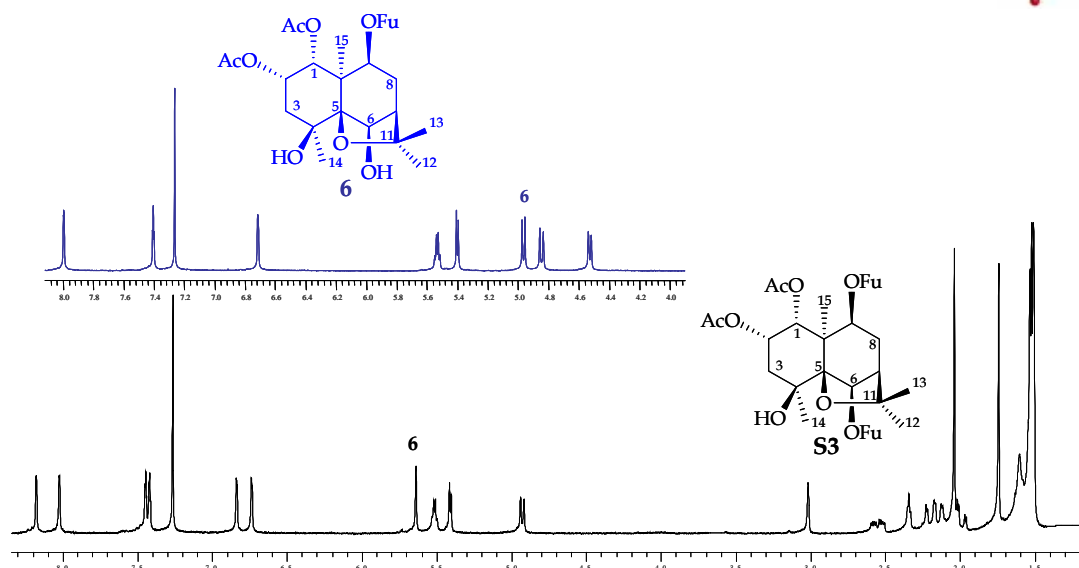
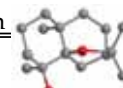


Figura 5.2.34. Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **S3** y del producto de su hidrólisis **6**.

De forma similar se establecieron las estructuras de los compuestos **4** y **17**, como los derivados de **S2** y **S5**, respectivamente.

Los derivados **5**, **7** al **16** y **18** al **26** se obtuvieron por tratamiento de **4**, **6** y **17**, respectivamente, con los diferentes cloruros de ácido o anhídridos seleccionados, obteniéndose diferentes ésteres sobre el carbono 6. Estos derivados presentan diferentes propiedades estereo-electrónicas que van a permitir completar el estudio de relación estructura-actividad, aportando más información sobre el sitio de unión a la Pgp y los requerimientos que debe tener un sesquiterpeno para que tenga un mejor rango terapéutico como quimiomodulador de la Pgp.

Dada la diferente reactividad de los agentes acilantes fueron empleadas diferentes condiciones de reacción, tal como se describe en la parte experimental.

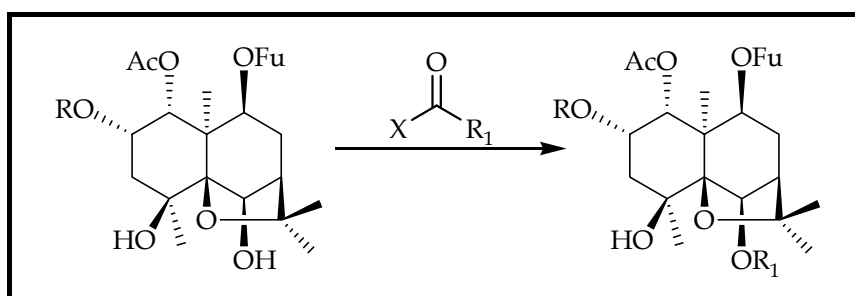


Figura 5.2.35. Esquema general de esterificación de C6.

Así, como ejemplo, comentaremos como los derivados **5**, **7** y **18** se obtuvieron por acetilación de los productos **4**, **6** y **17**, respectivamente, con anhídrido acético, piridina y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (figura 5.2.36).

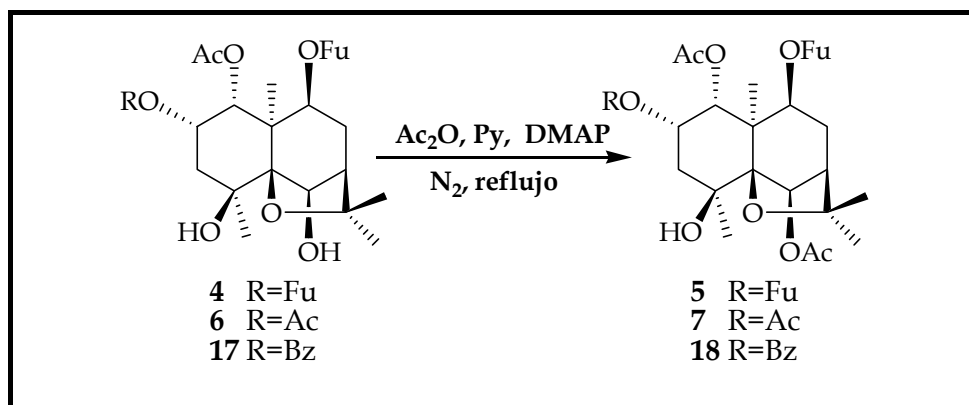


Figura 5.2.36. Esquema reacción de acetilación de **4**, **6** y **17**.

Los datos espectroscópicos muestran que el compuesto **18** es el derivado acetilado de **17**. Así, en su espectro de RMN ^1H (figura 5.2.37) se observa la presencia adicional de una señal correspondiente a un metilo de acetato a 2,14 δ y el desplazamiento del protón H6 de 4,99 δ en el compuesto **17** a 5,64 δ en su derivado **18**.

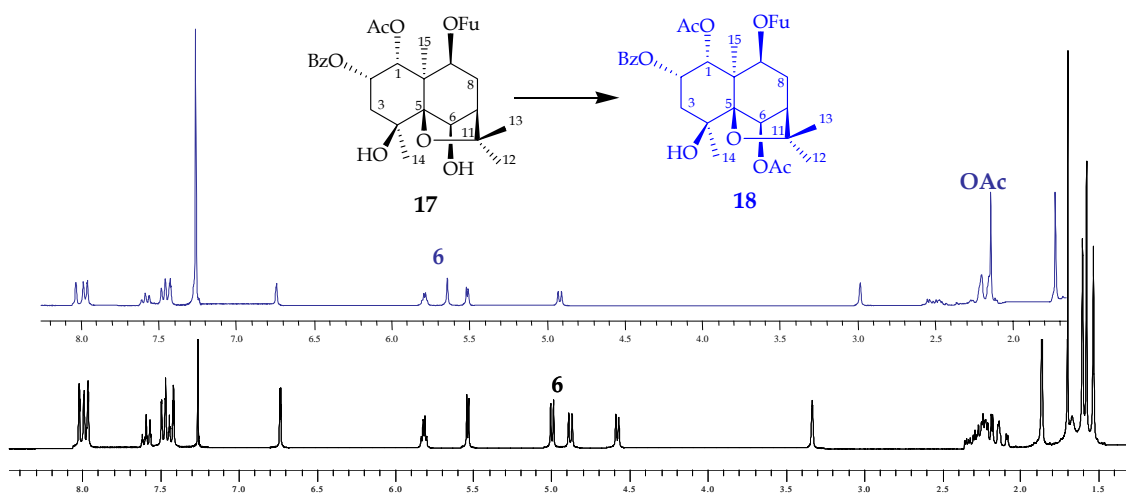
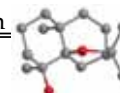


Figura 5.2.37. Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **17** y de su derivado acetilado, **18**.

De forma similar se establecieron las estructuras de los compuestos **5** y **7**, como los derivados acetilados en el carbono 6 de **4** y **6**, respectivamente.

La estructura de los derivados de los compuestos **6** y **17**, del **8** al **16** y del **18** al **26**, respectivamente, fueron establecidas de igual manera, mediante el estudio de los datos espectroscópicos, observándose en los espectros de RMN ^1H , el desplazamiento de la señal del protón H6 a campos más bajos y la aparición de las señales correspondientes a los ésteres introducidos en cada uno de los derivados.



➤ Derivados de S3 con diferente regiosustitución

• La **hidrólisis parcial** de **S3** se realizó utilizando la misma metodología que empleamos para la obtención de los productos hidrolizados regioselectivamente en el carbono 6, pero modificando el tiempo de reacción, en lugar de 4 horas a reflujo, dejamos la reacción durante 10 horas (figura 5.2.38). Utilizando este procedimiento, el producto mayoritario fue el derivado hidrolizado en el carbono 6, **6** (R= 42%), obteniéndose además, el sesquiterpeno totalmente hidrolizado **27** (R= 17%) y los sesquiterpenos parcialmente hidrolizados **28** (R= 10%) y **29** (R= 6%).

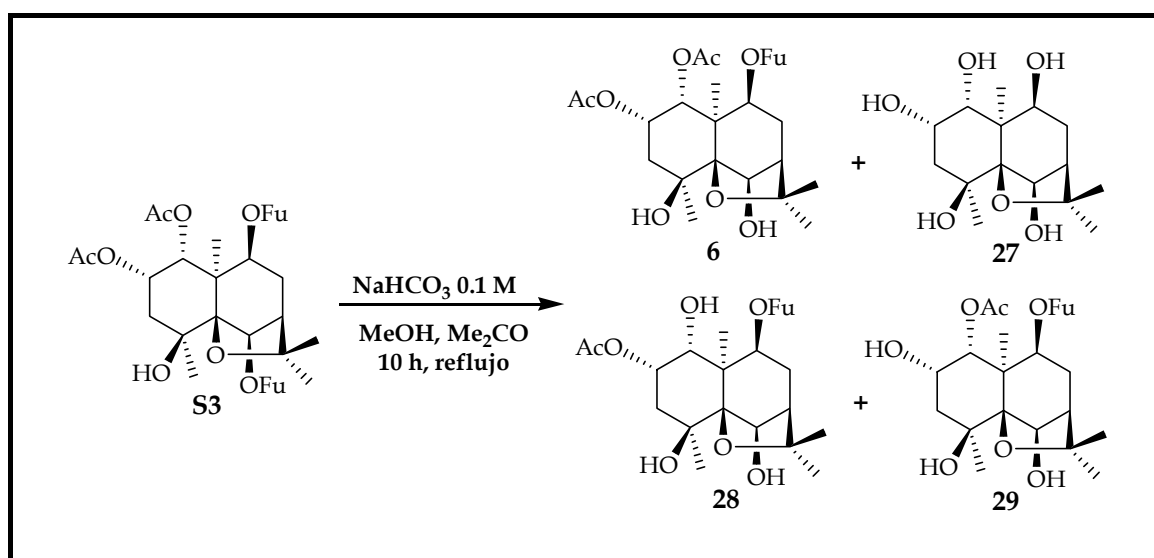


Figura 5.2.38. Esquema de reacción de la hidrólisis de S3.

La estructura de estos derivados se determinó basándose en sus datos espectroscópicos, tanto de RMN mono como bidimensionales, destacando el desplazamiento de los protones geminales a los ésteres y la desaparición de las señales del éster o ésteres hidrolizados, con respecto a los datos espectroscópicos de S3¹.

Tabla 5.2.3. Datos^a de RMN ¹H de los derivados hidrolizados de **S3**, indicando únicamente el desplazamiento de los protones geminales a grupo hidroxilo o éster.

	S3	6	27	28	29
H1	5,39 d (3,5)	5,41 d (3,6)	4,24 s	4,38 d (4,3)	5,33 d (3,4)
H2	5,49 m	5,54, m	4,21 t (3,5)	5,27, m	4,36, m
H6	5,63 s	4,96 d (5,3)	4,98 d (5,6)	4,94, m	5,06 d (5,2)
H9	4,91 d (6,8)	4,85 d (6,7)	3,51 m	4,54 d (5,4)	4,86 d (6,8)

^a CDCl₃, 400 MHz. *J* en paréntesis.

- La **hidrólisis total de S3** se realizó para, posteriormente, realizar **esterificaciones parciales**. Esto nos permitió obtener estructuras más simples (estudio de simplificación estructural), determinar el número de ésteres idóneo y la preferencia por ésteres aromáticos, alifáticos o grupos hidroxilos para la expresión de la actividad. Por otra parte, aumentamos la quimioteca de sesquiterpenos para evaluar su actividad biológica, lo que nos permitió tener más información referente a la relación estructura-actividad.

Así, hidrolizamos totalmente **S3**, utilizando carbonato potásico, metanol, acetona y dejando la mezcla de reacción durante 4 horas a reflujo, obteniéndose así el sesquiterpeno hidrolizado **27** (R= 90%) (figura 5.3.39).

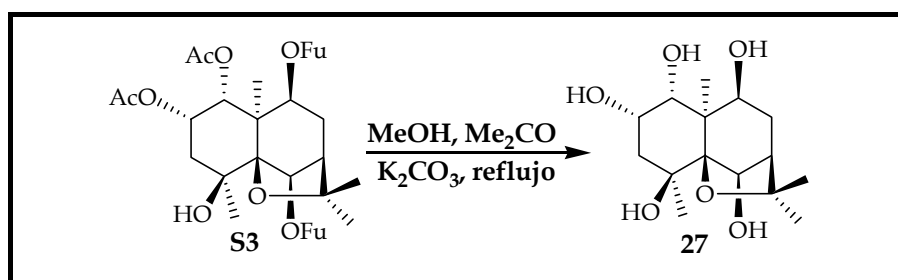


Figura 5.3.39. Esquema de la reacción de hidrólisis total de **S3**.

El derivado **27** se acetiló a temperatura ambiente (figura 5.3.40), obteniéndose además del producto totalmente acetilado **30** (R= 40%), los parcialmente acetilados, **31** (R= 39 %) y **32** (R= 20 %).

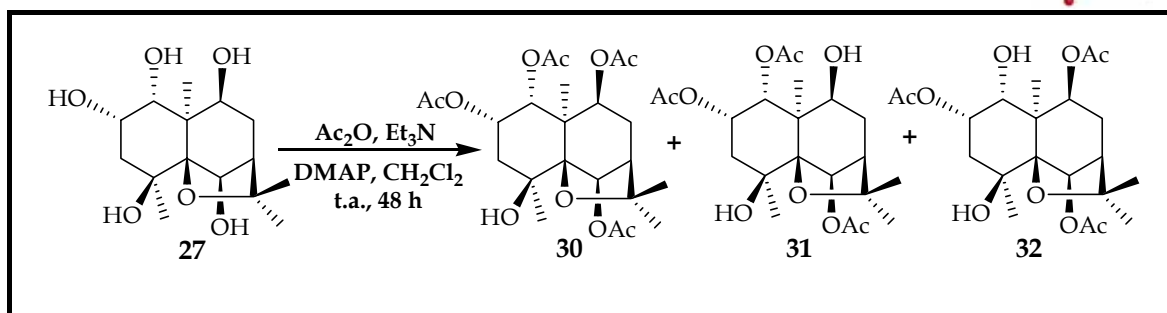
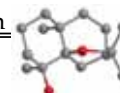


Figura 5.2.40. Esquema de la reacción de acetilación del sesquiterpene 27.

Las estructuras de los derivados obtenidos se determinaron mediante el estudio de sus datos espectroscópicos de RMN, tanto mono como bidimensionales, observándose los diferentes desplazamientos de los protones metínicos geminales a los ésteres o hidroxilos (tabla 5.2.4) y la aparición de los metilos correspondientes a los grupos acetato.

Tabla 5.2.4. Datos^a de RMN ¹H de 27 y sus derivados, indicando únicamente el desplazamiento de los protones geminales a un grupo éster o hidroxilo.

	27	30	31	32	33	34
H1	4,24 s	5,37 d (3,6)	5,35 d (3,5)	4,31 m	5,40 d (3,8)	5,42 d (3,6)
H2	4,21 t (3,5)	5,42 m	5,48 m	5,23 m	5,47 dd (3,5, 7,0)	5,45 m
H6	4,98 d (5,6)	5,56 s	5,56 s	5,52 s	4,92 d (5,1)	5,70 s
H9	3,51 m	4,69 d (6,5)	3,40 s ancho	4,75 d (6,8)	4,65 d (6,5)	4,76 d (6,4)

^aCDCl₃, 400 MHz. *J* en paréntesis.

Con la finalidad de obtener un derivado con la única variación del sustituyente en el carbono 9, hidrolizamos regioselectivamente el grupo acetato en C6 del compuesto 30, obteniéndose 33, que posteriormente benzoilamos utilizando las condiciones habituales, rindiendo así el producto 34 (figura 5.2.41). Ello nos permitirá estudiar el efecto en la actividad de la sustitución de un grupo aromático, 3-OFu (8), por un grupo acetato (34) en el carbono 9.

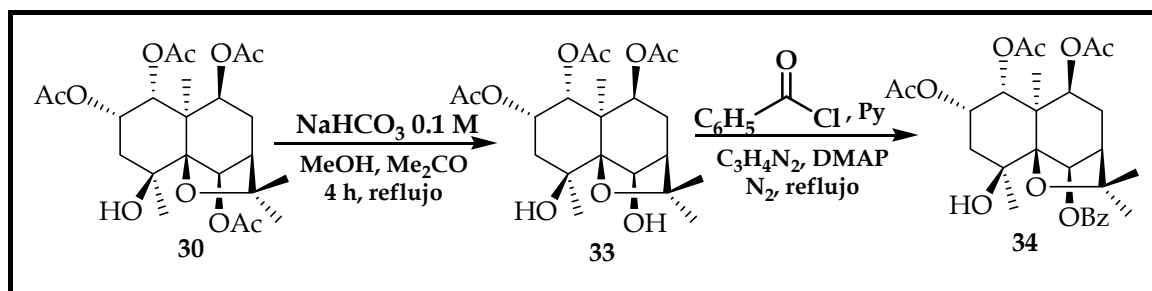


Figura 5.2.41. Secuencia de reacciones para la obtención del producto 34.

La estructura de los derivados **33** y **34**, al igual que la del resto de los derivados preparados, se determinó mediante el estudio de sus datos espectroscópicos de RMN, mono y bidimensionales, observándose en el espectro de RMN ^1H del derivado **33**, la desaparición de la señal correspondiente al metilo del grupo acetato y el desplazamiento del protón H6 de 5,56 δ (s) en **30** a 4,92 δ (d, $J = 5,1$ Hz) en **33** y a 5,70 δ (s) en el derivado **34** (tabla 5.2.4), con la aparición de señales correspondientes a cinco protones aromáticos del grupo benzoato (tal como se detalla en la parte experimental).

- **Protección con un grupo acetónido** de los grupos hidroxilos 1 α y 2 α del sesquiterpeno totalmente hidrolizado **27**, dio lugar al derivado **35** con un buen rendimiento. Posteriormente acetilamos, utilizando anhídrido acético, trietilamina y una cantidad catalítica de DMAP, dejando la reacción a temperatura ambiente, lo que rindió el producto diacetilado **36** (figura 5.2.42).

El grupo protector se eliminó selectivamente, añadiendo a una disolución del producto **36** en metanol, 8 equivalentes de la resina ácida, Dowex 50 W-8X, obteniéndose el derivado **37** (R= 93%).

Las estructuras de los productos **35-37**, se establecieron basándonos en sus datos espectroscópicos de RMN, tanto 1D como 2D. Así, el espectro de RMN ^1H de **33** presentó señales asignadas a 2 metilos adicionales con respecto al producto **27**, que corresponden al grupo isopropilidendioxo y el espectro de RMN ^{13}C presentó un singlete a 102,9 δ_{C} , señal característica de un carbono cetálico del grupo acetónido. Con respecto al derivado diacetilado **34**, su espectro de RMN ^1H presenta dos señales a 2,05 y 2,11 δ , que corresponden a los dos metilos del grupo acetato y el desplazamiento de las señales de los protones H9 y H6 de 3,43 δ (m) y 4,63 δ (d, $J = 4,1$ Hz) en **33** a 3,46 δ (d, $J = 6,7$ Hz) y 5,39 δ (s) en **34**, respectivamente (tabla 5.2.5).

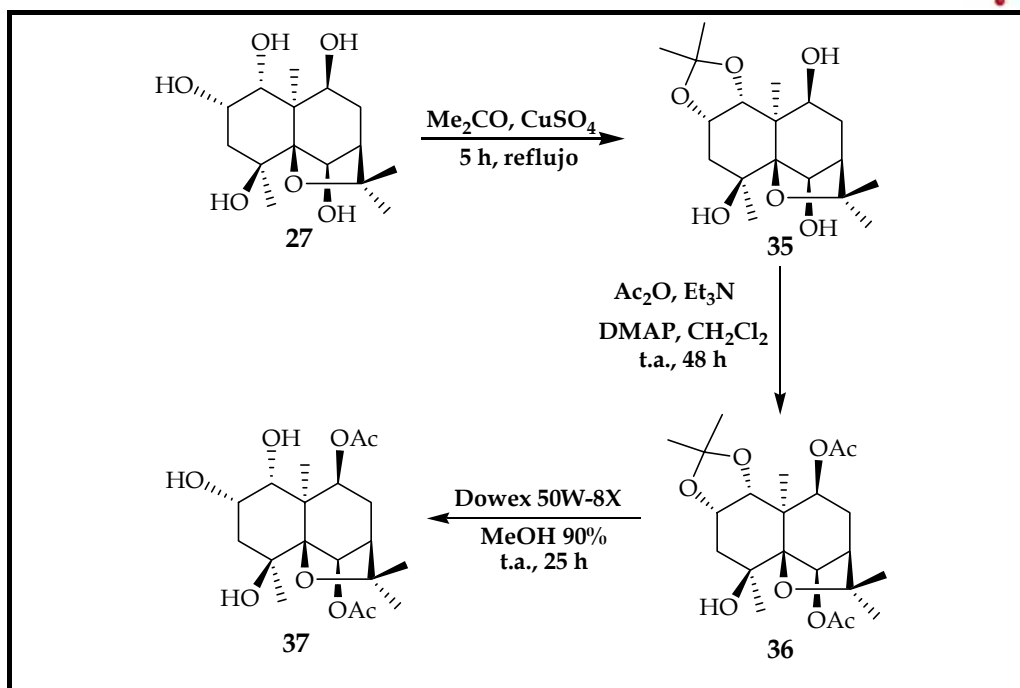
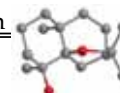


Figura 5.2.42. Secuencia de reacciones para la obtención de 37.

En el espectro RMN ^1H de 37 se observó con respecto al de 36, la desaparición de las señales de los dos metilos correspondientes al grupo acetónido, no así de las señales correspondientes a los dos metilos de los grupos acetatos. Las estructuras de estos derivados fueron confirmadas mediante el estudio de sus espectros de masas de alta y baja resolución.

Tabla 5.2.5. Datos^a de RMN ^1H de los productos resultantes de la protección, acetilación y posterior desprotección del derivado 27. Sólo indicamos los desplazamientos de los protones geminales a grupos hidroxilo o éster.

	27	35	36	37
H1	4,24 s	4,28 d (2,4)	4,38 d (2,2)	4,41 d (3,4)
H2	4,21 t (3,5)	4,19 s	5,21 m	5,28 m
H6	4,98 d (5,6)	4,63 d (4,1)	5,39 s	5,49 s
H9	3,51 m	3,43 m	3,46 d (6,7)	3,56 d (6,2)

^a CDCl_3 , 400 MHz. *J* en paréntesis.

Este último procedimiento es el que resulta de mayor interés, ya que nos va a permitir obtener, tras hidrólisis total del sesquiterpeno S3, en tres etapas y con un excelente rendimiento, sesquiterpenos con modificaciones en el carbono 9.

5.2.3.3. Preparación de un derivado fluorescente para el estudio del mecanismo de acción de sesquiterpenos como inhibidores de la Pgp.

La síntesis de un derivado con un grupo fluorescente nos va a permitir hacer un estudio del mecanismo de estos sesquiterpenos como quimiomoduladores de la proteína Pgp, pudiendo establecer aspectos tan importantes como si estos sesquiterpenos tienen algún efecto en la expresión de esta proteína, el número e identidad de los sitios de unión y si son o no transportados por ésta.

Los estudios sobre el mecanismo de acción fueron realizados por el grupo de investigación de los doctores F. Gamarro y S. Castanys, del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra", Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Granada.

Para la obtención de este derivado, en primer lugar teníamos que seleccionar un grupo fluorescente que no modificara la actividad del sesquiterpeno, no alterando la unión del sesquiterpeno a la Pgp. Esta es la razón por la que seleccionamos el éster 2-*N*-metilaminobenzoato, al ser una de las moléculas más pequeñas que producen una fluorescencia, relativamente intensa, al ser irradiada con luz ultravioleta^{19, 20}. Además, este grupo tiene el tamaño y las características de los ésteres habituales en el esqueleto de dihidro- β -agarofurano.

Por otra parte, teníamos que seleccionar un sesquiterpeno, con un grupo hidroxilo libre y que tuviera una buena actividad moduladora de la Pgp. Por ello, seleccionamos **T3**, un sesquiterpeno aislado de *Crossopetalum tonduzii*.

El nuevo derivado fluorescente se obtuvo por tratamiento de **T3** con anhídrido *N*-metilisoticoico (MIA), en *N,N*-dimetilformamida y una cantidad catalítica de DMAP, utilizando las condiciones de reacción mostradas en la figura 5.2.43.

¹⁹ De Angelis, P. L. *Anal. Biochem.* **2000**, *284*, 167-169.

²⁰ Kuhn, K.; Owen, D. J.; Bader, B.; Wittinghofer, A.; Kuhlmann, J.; Waldmann, H. *J Am Chem Soc.* **2001**, *123*, 1023-1035.

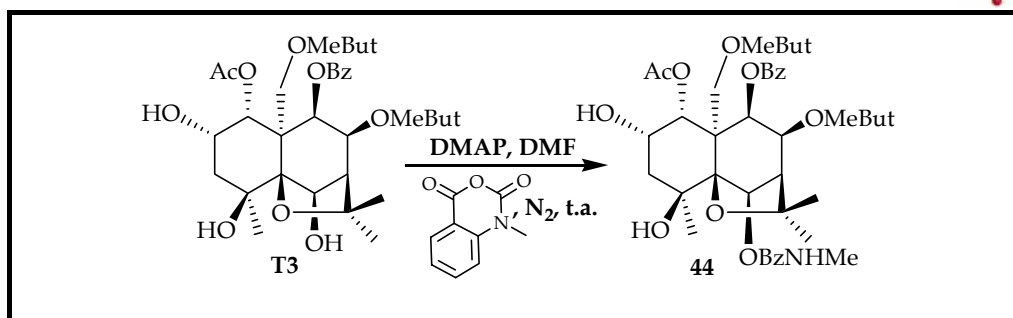
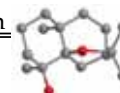


Figura 5.2.43. Esquema de esterificación de **T3**, para la obtención del sesquiterpeno **44** con un grupo fluorescente.

La elucidación estructural del sesquiterpeno **44** se llevó a cabo mediante el estudio de sus datos físicos y espectroscópicos, observándose en su espectro de RMN ^1H (figura 5.2.44), el desplazamiento de la señal del protón H6 desde 5,31 δ (d, $J = 4,9$ Hz) en **T3**¹⁴, a 6,50 δ (s) en **44** y la aparición de las señales correspondientes al grupo 2-*N*-metilaminobenzoato, a 2,91 δ (3H, d, $J = 5,0$ Hz), 6,63 δ (2H, m), 7,70 δ (1H, d, $J = 5,6$ Hz) y 8,18 δ (2H, dd, $J = 1,4, 7,9$ Hz).

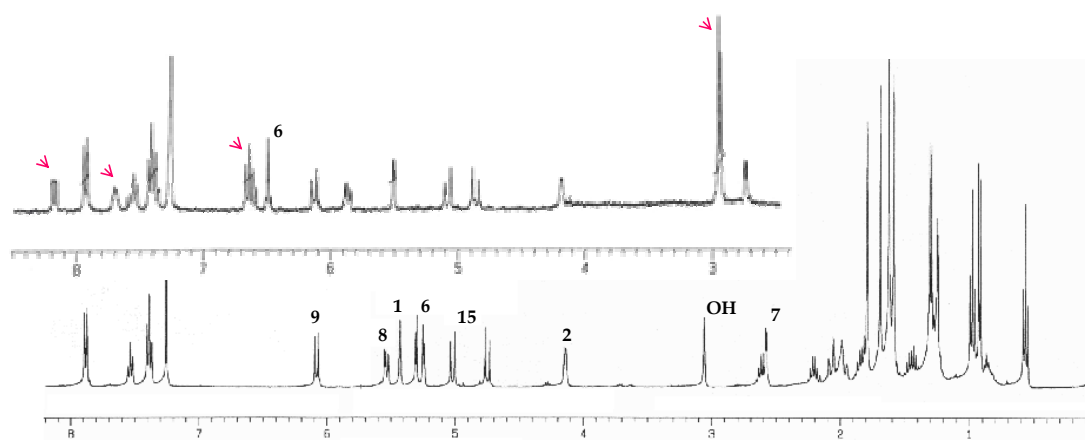


Figura 5.2.44. Espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de **T3** (en la parte inferior) y región del espectro de su derivado **44** (en la parte superior), indicando con flechas rosadas las señales correspondientes al éster 2-*N*-metilaminobenzoato.

El sesquiterpeno **44** se evaluó como revertidor de la Pgp humana, manteniendo la actividad inhibidora con respecto a **T3**, por lo que se pudo emplear para el estudio del mecanismo de acción de este tipo de sesquiterpenos. Los resultados obtenidos en dicho estudio se resumen en el capítulo 5.5.3.

5.2.4. Determinación de la configuración absoluta: Dicroísmo Circular

La mayoría de los productos naturales bioactivos se aíslan como compuestos enantioméricamente puros, siendo la determinación de la configuración absoluta de sus centros quirales una etapa crucial en su caracterización. Esto resulta de vital importancia cuando los diferentes estereoisómeros tienen diferentes propiedades biológicas o farmacológicas. Uno de los casos más conocidos, es el de la talidomida²¹, que provocó numerosos casos de malformaciones en los fetos cuando fue administrado como antiemético a mujeres embarazadas. La causa que provocó esta tragedia fue que se administraba en forma de racemato, presentando uno de los enantiómeros el efecto deseado, mientras que el otro era teratogénico.

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

Un método particularmente útil para la determinación de configuraciones absolutas, dentro de las técnicas de **dicroísmo circular**, es el de **excitón quiralidad**. Este método se basa en la mecánica cuántica (figura 5.2.45) y fue aplicado por primera vez por Mason²² en 1966, para la determinación de la configuración absoluta de un producto natural.

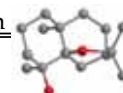
Los Profesores Nakanishi y Harada^{23, 24} pusieron a punto el “**método de la quiralidad del dibenzoato**”. Este método está basado en el hecho de que grupo benzoato presente en una molécula da lugar a una banda de absorción a 227 nm, pero cuando existen dos grupos, no necesariamente en posiciones 1, 2 pero que estén los suficientemente próximos en el espacio, se produce una interacción entre ambos que da

²¹ Raje, N.; Anderson, K. N. *Engl. J. Med.* **1999**, *341*, 1606-1609.

²² Mason, S. F.; Vane, G. W. *J. Chem. Soc.* **1966**, 370-374.

²³ Harada, N.; Nakanishi, K. *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 257-263.

²⁴ Harada, N.; Nakanishi, K. *Circular Dichroism Spectroscopy Exciton Coupling in Organic Spectroscopy*. **1983**, University Science Book: Mill Valley.



lugar a dos efectos Cotton de la misma amplitud ($\Delta\epsilon = 9-18$) pero de signos opuestos a 233 nm y 219 nm (curva bi-signada).

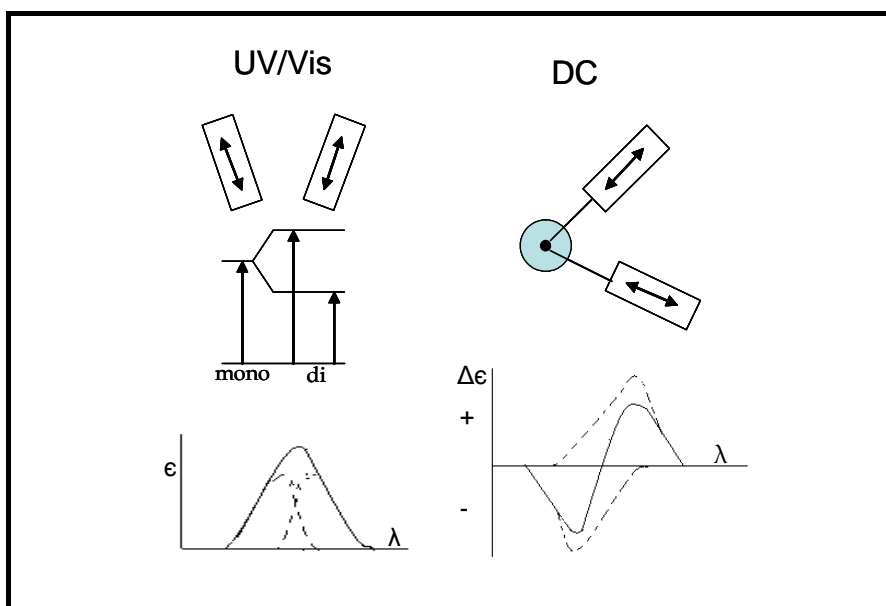


Figura 5.2.45. Método del excitón quiralidad. La orientación oblicua de los dos grupos cromóforos (rectángulos) y de ambos momentos dipolares (flechas de doble sentido), origina un ensanchamiento o división de la banda de absorción en el espectro de UV o visible, debido a la interacción de los dos cromóforos. Si los momentos dipolares no son coplanares, la curva de dicroísmo muestra un efecto Cotton positivo y otro negativo.

Este tipo de acoplamientos debidos a las interacciones del dipolo-dipolo entre los momentos de transición electrónica de dos grupos cromóforos, se denomina excitón o acoplamiento Davydov.

Si los grupos benzoatos están en una disposición tal que nos dan un ángulo de torsión en sentido de las agujas del reloj, se dice que existe una quiralidad positiva y existirá un máximo a 233 nm y un mínimo a 219 nm y consecuentemente, si se da el hecho opuesto se dice que hay una quiralidad negativa (figura 5.2.46).

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

La configuración absoluta de los sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano ha sido poco estudiada, sólo se encuentra en la bibliografía un ejemplo en el que se aplicó la difracción de Rayos X a un monocristal con y sin átomos pesados^{25,26}.

²⁵ Smith, C. R.; Miller, R. W.; Weisleder, D.; Rohwedder, W. K.; Eickman, N.; Clardy, J. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3264-3269.

En otros casos se ha hecho uso de métodos ópticos, como es el método de Horeau²⁷. Ambos métodos se han aplicado a sesquiterpenos polihidroxílicos muy poco funcionalizados como el boariol²⁷ o el *isocelorbicol*²⁵.

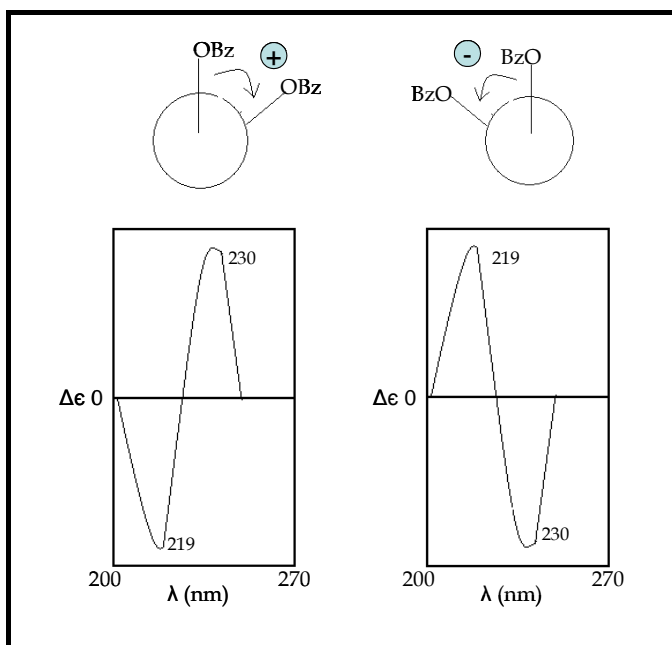


Figura 5.2.46. Determinación de la configuración absoluta por el "método de la quiralidad del dibenzoato". Se observa que según la disposición de los grupos benzoatos se obtienen diferentes efectos Cotton.

Recientemente, se ha utilizado el método de excitón quiralidad, conjuntamente con correlaciones químicas o consideraciones biogénicas, para la determinación de la configuración absoluta de estos metabolitos. La rapidez, sencillez, fiabilidad y la poca cantidad de muestra necesaria, unido a que los sesquiterpenos son esqueletos poliesterificados que presentan grupos cromóforos como benzoatos, cinamatos o nicotinatos, hace que estos metabolitos sean susceptibles al análisis por técnicas de dicroísmo circular^{28,29,30}.

Con la finalidad de determinar la configuración absoluta de los sesquiterpenos aislados de los frutos de *Maytenus cuzcoina*, aplicamos el método de excitón quiralidad, para lo cual, consideramos el éster 3-furoato como grupo cromóforo, teniendo en cuenta, que los cromóforos presentes en la molécula tienen que formar un ángulo

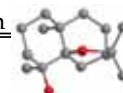
²⁶ Den Hertog, H. J.; Kruk, C.; Nanavati, D. D. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *26*, 2219-2222.

²⁷ González, A. G.; Muñoz, O. M.; Ravelo, A. G.; Crespo, A.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez, I. A.; Solans, X.; Ruiz-Pérez, C.; Rodríguez-Romero, V. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1921-1924.

²⁸ Kennedy, M. L.; Cortés-Selva, F.; Pérez-Victoria, J. M.; Jiménez, I. A.; González, A. G.; Muñoz, O.; Gamarro, F.; Castanys, S.; Ravelo, A. G. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4668-4676.

²⁹ Núñez, M. J.; Cortés-Selva, F.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez, I. A.; González, A. G.; Ravelo, A. G.; Gavin, J. A. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 572-574.

³⁰ Muñoz-Martínez, F.; Mendoza, C. R.; Bazzocchi, I. L.; Castanys, S.; Jiménez, I. A.; Gamarro, F. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4266-4275.



diedro, por lo que descartamos los productos que tienen dos grupos 3-furoatos en C6 y C9.

En aquellos productos que poseen tres cromóforos, como sucede en el caso del sesquiterpeno **S2**, hay que tener en cuenta la suma o cancelación de efectos. El ángulo que forman los grupos 3-furoatos en posición 2α , 9β y 6β , 9β no es el adecuado para la aplicación de dicroísmo circular, pero sí es adecuado el de los cromóforos en posición 2α , 6β que forman un ángulo de 60° , lo que lo hace susceptible para su estudio por dicroísmo circular.

Así, realizamos el estudio por dicroísmo circular del sesquiterpeno **S2**, obteniéndose un espectro que no presenta curva bi-signada de tipo Davydov. Ante la duda de si la ausencia de curva de dicroísmo era debido al sesquiterpeno o al cromóforo y como en la bibliografía no existían ejemplos de grupo 3-furoato como cromóforos en la aplicación del método de excitón quiralidad, preparamos el difuroato del (1*S*,2*S*)-*trans*-ciclohexano-diol, ópticamente puro y de configuración absoluta conocida, con el objeto de conocer la interacción de los dos grupos furoatos y ver los dos efectos Cotton que generan, la amplitud y en que región del espectro.

El derivado difuroato se preparó siguiendo el esquema que se presenta en la figura 5.2.47. El cloruro del ácido 3-furoico se obtuvo por tratamiento del ácido con un exceso de cloruro de oxalilo en dimetilformamida (DMF) y CH_2Cl_2 seco a temperatura ambiente; posteriormente, se esterificó el diol con dicho cloruro de ácido disuelto en CH_2Cl_2 , trietilamina y una cantidad catalítica de dimetilaminopiridina (DMAP).

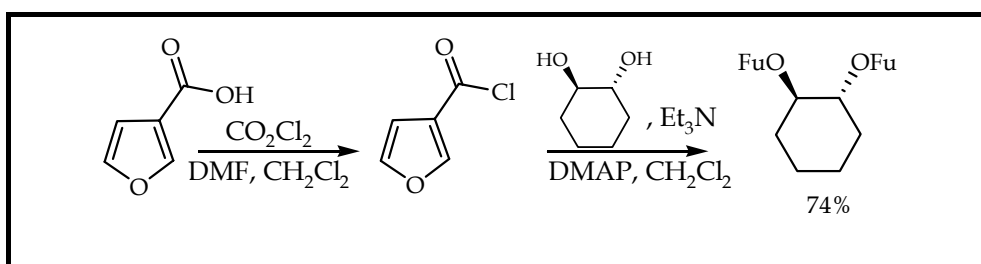


Figura 5.2.47. Preparación del (1*S*,2*S*)-*trans*-ciclohexano-di-furoato.

Aplicamos dicroísmo circular al difuroato del ciclohexano obtenido, resultando el grupo furoato transparente para el dicroísmo, es decir, no se obtiene una curva bi-signada, aunque absorba en el UV, por tanto lo tanto no es un grupo cromóforo válido para la determinación de configuraciones absolutas mediante esta metodología.

Como alternativa, nos planteamos la siguiente secuencia de reacciones (figura 5.2.48): hidrólisis total de **S3** por tratamiento con carbonato potásico, lo que rindió el

esqueleto polihidroílico básico **27**, cuya posterior benzoilación parcial dio los derivados **38**, **39** y **40**. El producto mayoritario, **38**, se hidrolizó parcialmente con bicarbonato sódico, obteniéndose tres derivados, **41**, **42** y **43**, productos de la transesterificación.

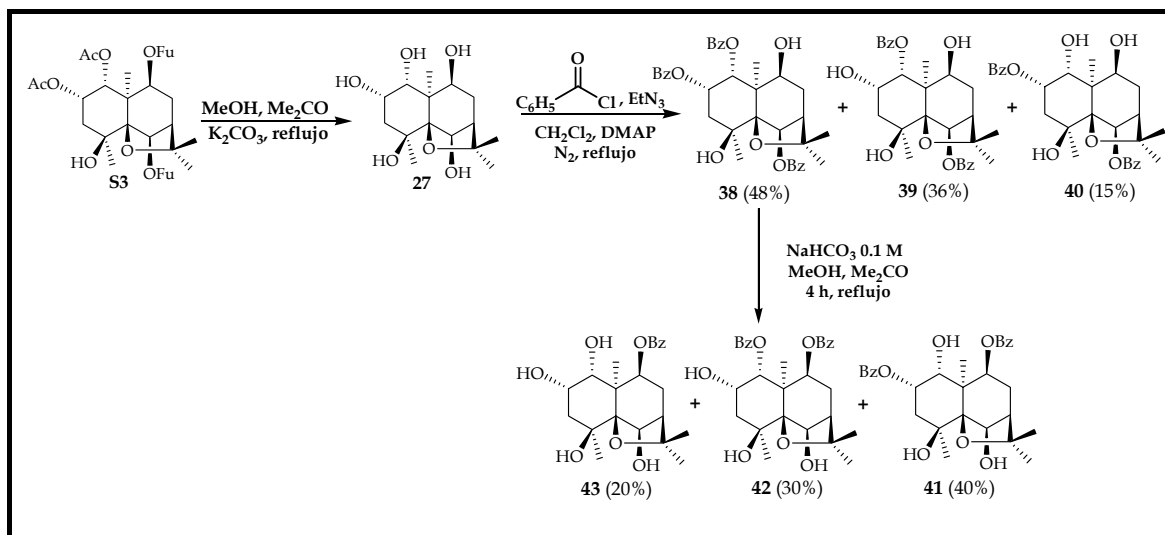


Figura 5.2.48. Secuencia de reacciones para la obtención de un producto óptimo para la determinación de su configuración absoluta, utilizando el método del dibenzoato.

La estructura de los derivados **27** y **38-43**, se determinó mediante el estudio de sus datos físicos y espectroscópicos, determinando la regiosustitución mediante experimentos de RMN.

El producto $1\alpha,9\beta$ -dibenzoiloxi- $2\alpha,4\beta,6\beta$ -trihidroxi-dihidro- β -agarofurano (**42**) fue sometido a dicroísmo circular, ya que el estudio de su estructura tridimensional utilizando un programa de mecánica molecular (PC Model 7.0)³¹, indicó que los dos grupos benzoatos forman un ángulo diedro aproximado de $68,5^\circ$ (figura 5.2.49), lo que nos permite determinar la configuración absoluta utilizando esta técnica. Además, existen ejemplos en la bibliografía de otros sesquiterpenos con grupos benzoatos en las posiciones 1α , 9β a los cuales se les ha aplicado con éxito esta metodología³².

³¹ PC Model from Serena Software, P. O. Box. 3076, Bloomington, IN 47402-3076.

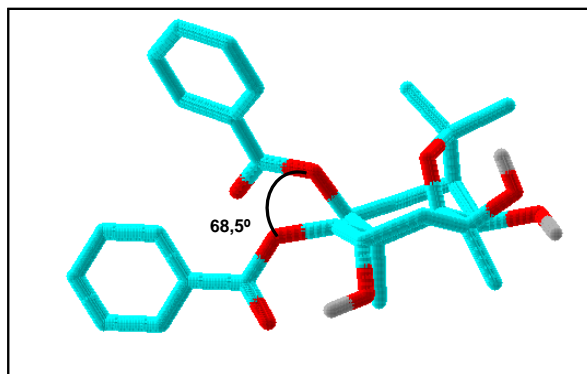
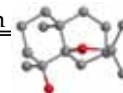


Figura 5.2.49. Estructura tridimensional del sesquiterpeneo **42**.

La curva de dicroísmo circular del derivado **42** (figura 5.2.50) presentó un primer efecto Cotton positivo a 238,4 nm ($\Delta\epsilon = +26,9$) y un segundo efecto negativo a 221,8 nm ($\Delta\epsilon = -18,4$), debido al acoplamiento de los dos grupos cromóforos benzoatos. La aplicación del método del dibenzoato nos permitió determinar la configuración del producto **42** como (1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,9-dibenzoiloxi-1,4,6-trihidroxi-dihidro- β -agarofurano.

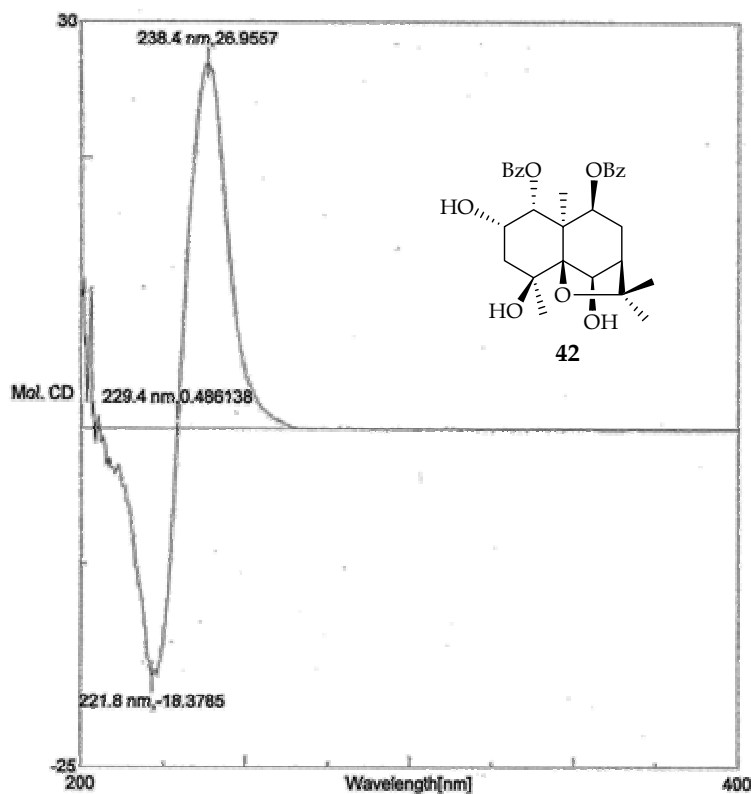


Figura 5.2.50. Curva de dicroísmo circular obtenida del producto **42**.

La configuración absoluta de **42**, determinada mediante dicroísmo circular, nos permitió establecer la configuración absoluta de los sesquiterpenos aislados (**S1-S7**) y de sus derivados (**1-43**) mediante correlación química, según se esquematiza en la figura 5.2.51 y se detalla en la parte experimental.

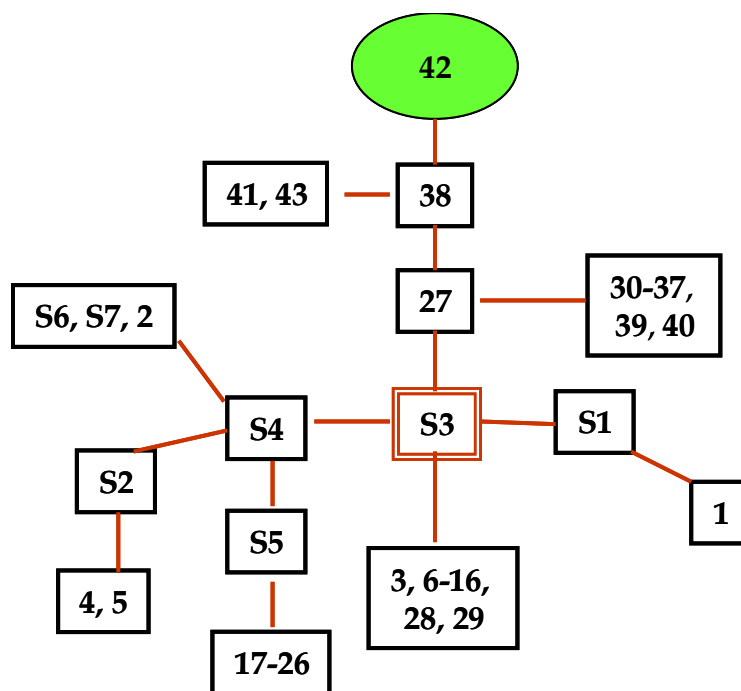
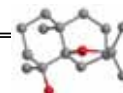


Figura 5.2.51. Esquema en el que se relacionan los diferentes sesquiterpenos y derivados por correlación química. En el círculo verde se resalta el sesquiterpeno al que se le determinó la configuración absoluta por dicroísmo circular y con líneas naranjas se indican las correlaciones químicas con los otros sesquiterpenos.

Por otra parte, la configuración absoluta de los sesquiterpenos **S8**, **S9** y **S10** se estableció basándonos en consideraciones biogénicas. Así, los metabolitos **S8** y **S9** presentan como única diferencia con los otros sesquiterpenos aislados de *Maytenus cuzcoina* (**S1-S7**), la presencia de un grupo acetato en C15, lo que no supone la adición de ningún centro estereogénico; mientras que el sesquiterpeno **S10** presenta como única diferencia la pérdida de quiralidad en C2.

Se estableció así la configuración absoluta de los sesquiterpenos aislados, **S1** a **S10** y de los derivados **1** al **43**, mediante dicroísmo circular, correlación química o consideraciones biogénicas.



5.3. Parte experimental

5.3.1. Estudio cromatográfico del extracto de los frutos de *Maytenus cuzcoina*.

Los frutos de *Maytenus cuzcoina* fueron recolectados en el mes de Diciembre del 2000, en la comunidad de Huayllabamba-Urquillos a 2970 metros de altitud, en la provincia de Urubamba, Cusco (Perú).

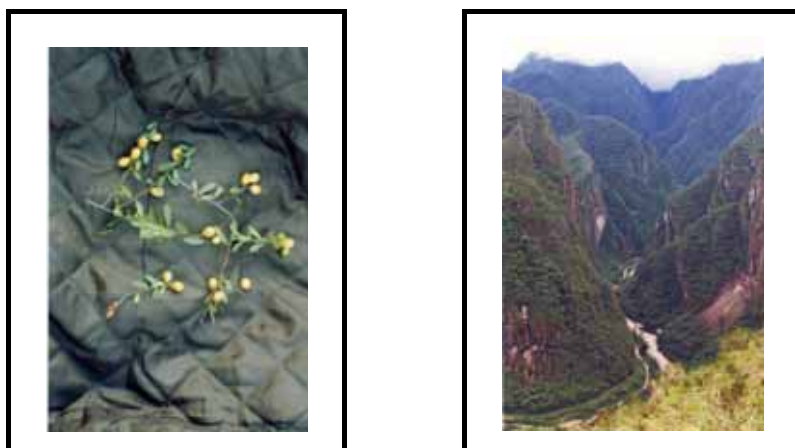


Figura 5.3.1. Frutos de *Maytenus cuzcoina* y a la derecha imagen de Huayllabamba-Urquillos, zona donde se recolectó la planta.

Los frutos molidos (250 g) se extrajeron con una mezcla de *n*-hexano-éter dietílico (1:1) en un equipo Soxhlet a reflujo durante 48 horas; a continuación el disolvente fue eliminado a vacío, obteniéndose 40 gramos de extracto. El extracto fue fraccionado siguiendo la metodología descrita en un trabajo anterior de nuestro grupo¹, obteniéndose además de los metabolitos anteriormente descritos, dos sesquiterpenos (**S1** y **S11**) que resultaron nuevos en la bibliografía química.

Así, el extracto se fraccionó mediante cromatografía líquida a vacío sobre gel de sílice de capa fina, utilizando como eluyente una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo

¹ Tincusi, B. M. *Metabolitos secundarios bioactivos de la flora medicinal iberoamericana: Piper elongatum, Copaifera paupera, Crossopetalum tonduzii y Maytenus cuzcoina*. 1999, Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna.

de polaridad creciente, de esta manera se recogieron veintiocho fracciones. Estas fracciones fueron reunidas, de acuerdo con la similitud que presentaban en cromatografía de capa fina, en siete grupos que se purificaron mediante sucesivas cromatografías sobre gel de sílice en columnas y placas preparativas, como se detalla en el esquema 5.3.1, usando como eluyentes mezclas de *n*-hexano, acetona, acetato de etilo, diclorometano, éter dietílico y dioxano. Se obtuvieron así, un total de 12 sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano, que denominamos de **S1** a **S12** (figura 5.3.2).

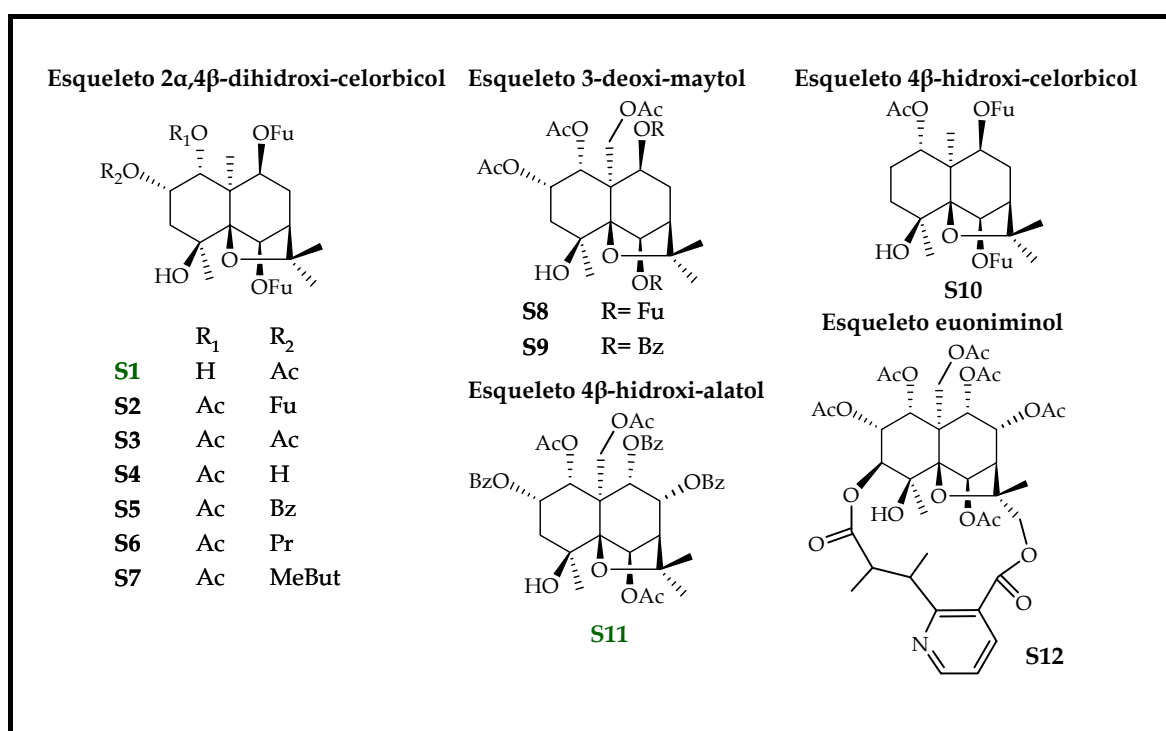
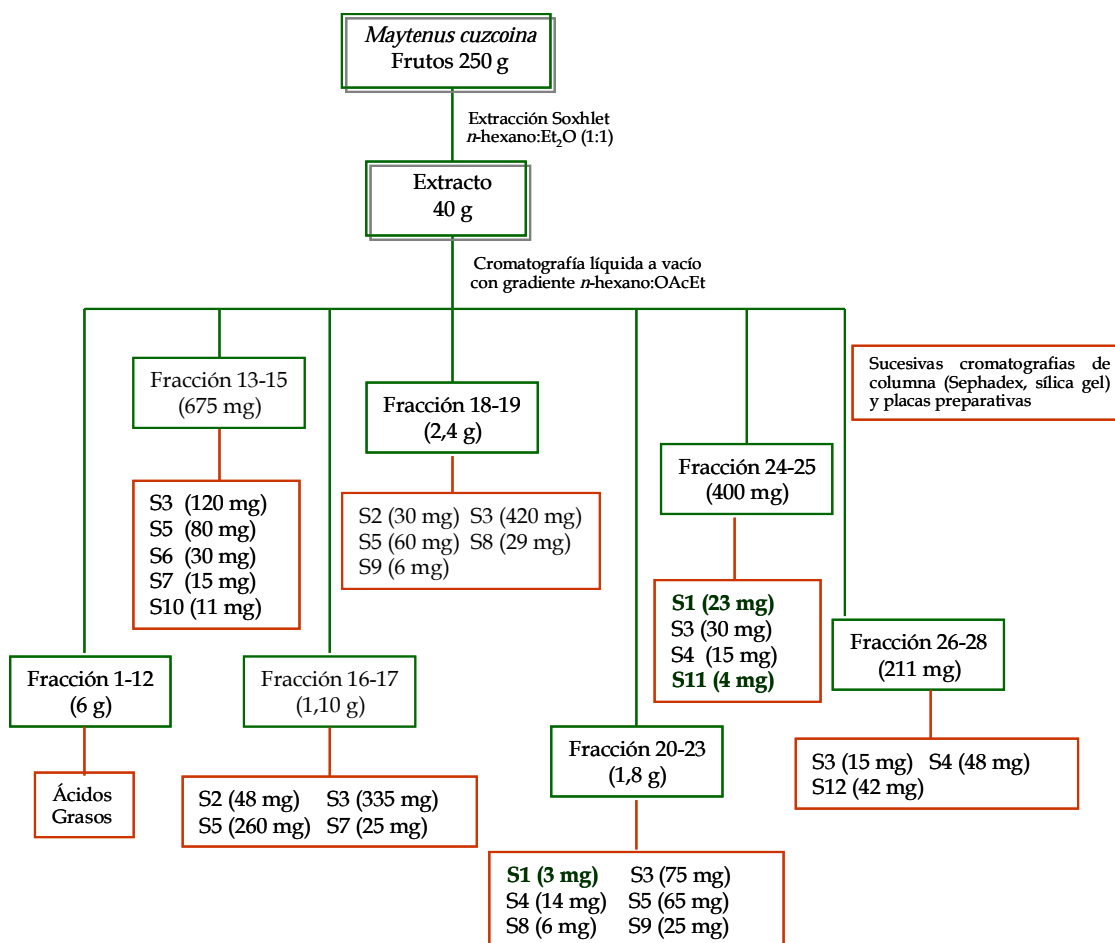
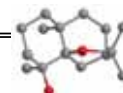


Figura 5.3.2. Estructura de los sesquiterpenos aislados de los frutos de *M. cuzcoina*, agrupados según su esqueleto polihidroxílico básico. En **verde** se señalan los dos sesquiterpenos nuevos en la bibliografía química.



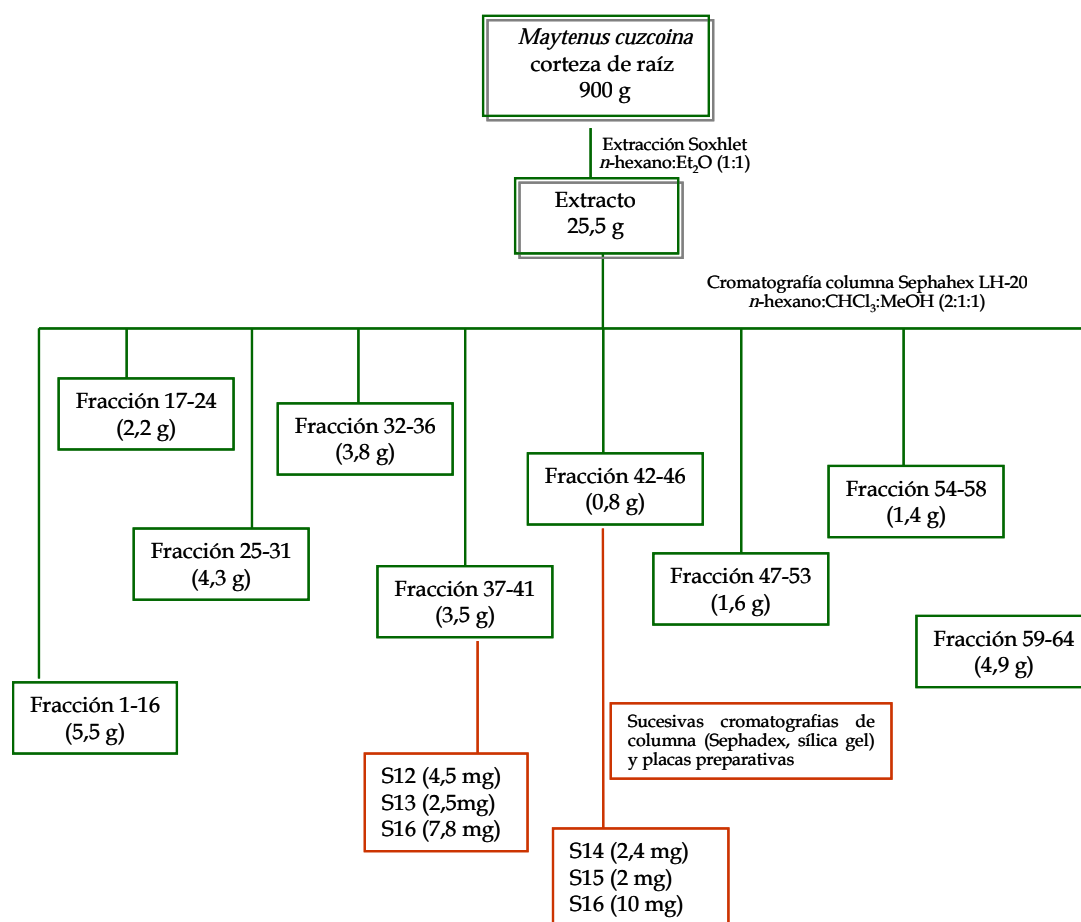
Esquema 5.3.1. Separación cromatográfica de los metabolitos secundarios de los frutos de *Maytenus cuzcoina*.

Sesquiterpeno	(mg)	% del total
S1	26	1,5 ^a (0,06) ^b
S2	78	4,5 (0,19)
S3	995	56,9 (2,48)
S4	77	4,4 (0,19)
S5	400	22,9 (1,00)
S6	30	1,7 (0,07)
S7	25	1,4 (0,06)
S8	35	2,0 (0,08)
S9	25	1,4 (0,06)
S10	11	0,6 (0,03)
S11	4	0,2 (0,01)
S12	42	2,4 (0,11)

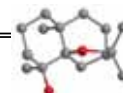
Tabla 5.3.1. Cantidades de los sesquiterpenos aislados de los frutos de *Maytenus cuzcoina* y el porcentaje con respecto a: ^ala cantidad total de sesquiterpeno aislados y ^bcon respecto al peso del extracto, entre paréntesis.

5.3.2. Separación cromatográfica de los sesquiterpenos dihidro- β -agarourano del extracto de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*.

En el estudio cromatográfico del extracto en *n*-hexano-éter dietílico (1:1) de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*, además de los metabolitos que se han descrito anteriormente en el capítulo 4, se aislaron cinco alcaloides sesquiterpénicos. Estos metabolitos se obtuvieron de las fracciones 37-41 y 42-46 de la primera Sephadex que se realizó al extracto, tal como se detalla en el esquema 5.3.2.



Esquema 5.3.2. Separación cromatográfica de los alcaloides sesquiterpénicos del extracto de *n*-hexano:éter dietílico (1:1) de la raíz de *Maytenus cuzcoina*.



Las estructuras de estos sesquiterpenos se muestran en la figura 5.3.3, agrupados según su esqueleto polihidroxílico básico. Los hemos denominado **S12** a **S16**, resultando **S15** y **S16** nuevos en la bibliografía química.

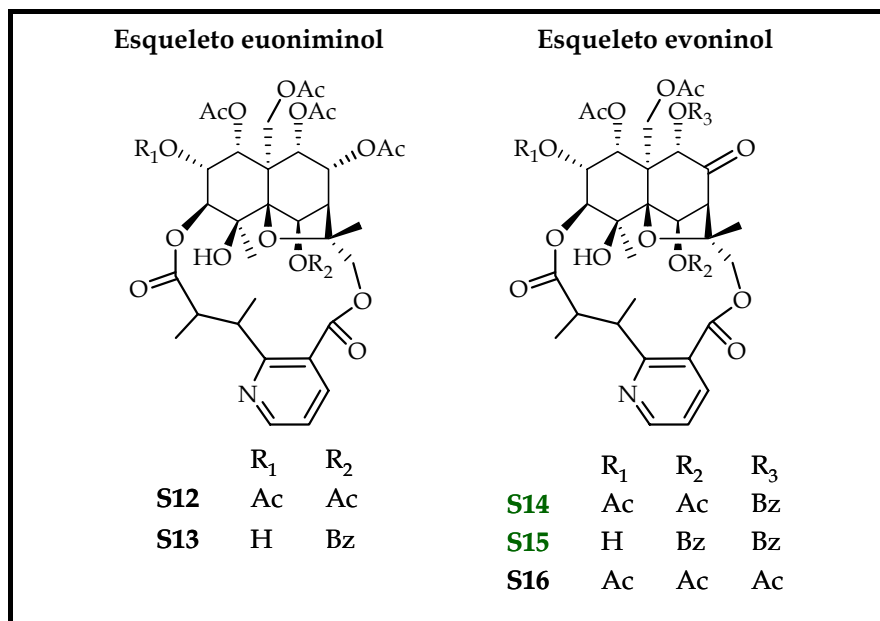


Figura 5.3.3. Alcaloides sesquiterpénicos aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*. En verde los que resultaron nuevos en la bibliografía química.

5.3.3. Modificaciones estructurales de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos aislados de *Maytenus cuzcoina*.

Se prepararon una serie de derivados al objeto de determinar la configuración absoluta utilizando técnicas de dicroísmo circular, así como, para modular la actividad biológica, tanto como revertidores de la multirresistencia a fármacos como inhibidores de la activación del virus Epstein Barr. Además, se preparó un sesquiterpeno con un grupo fluorescente que nos permitió realizar el estudio del mecanismo de acción de los sesquiterpenos como inhibidores de la Pgp humana implicada en la multirresistencia a fármacos.

Así, obtuvimos cuarenta y cuatro derivados, que los denominamos del **1** al **44** y cuyas estructuras se representan en la figura 5.3.4.

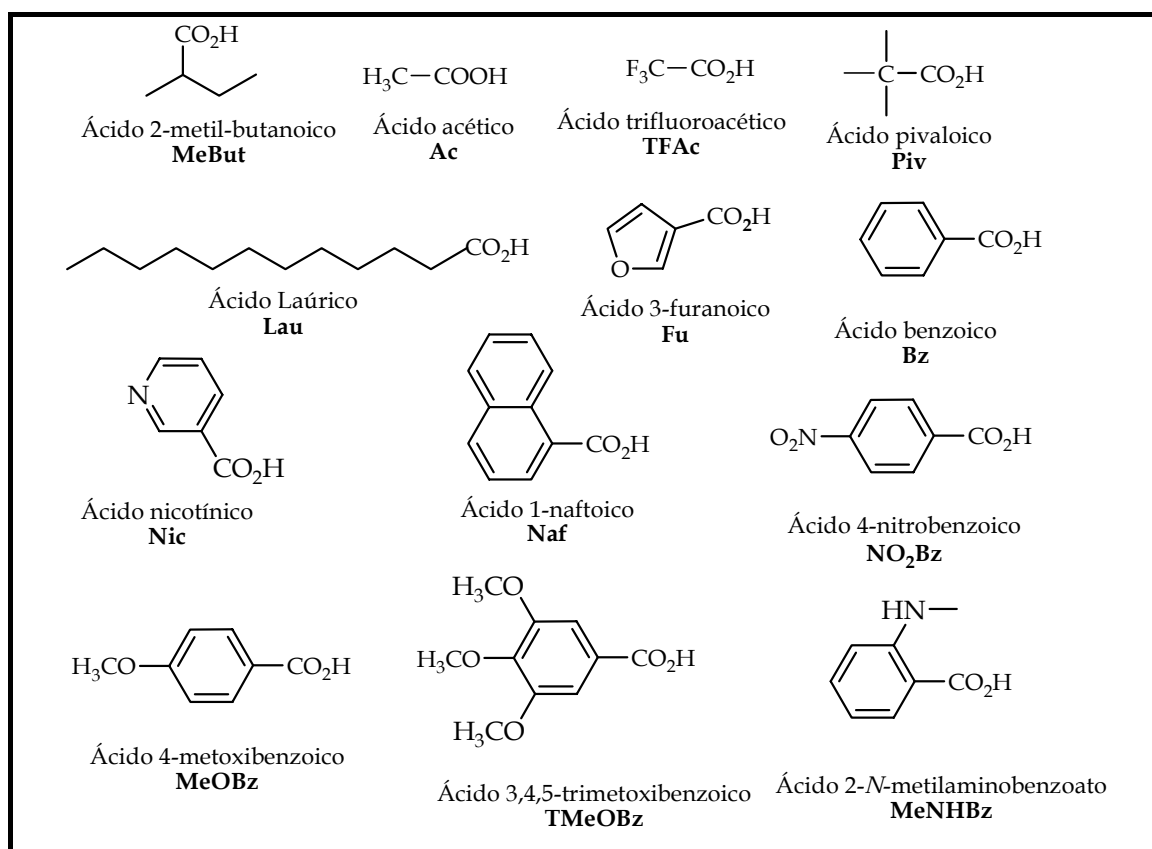


Figura 5.3.5. Ácidos que esterifican con más frecuencia los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos aislados, además de los utilizados para preparar los diferentes derivados. En **negrita** se indica la abreviatura empleada para cada ácido.

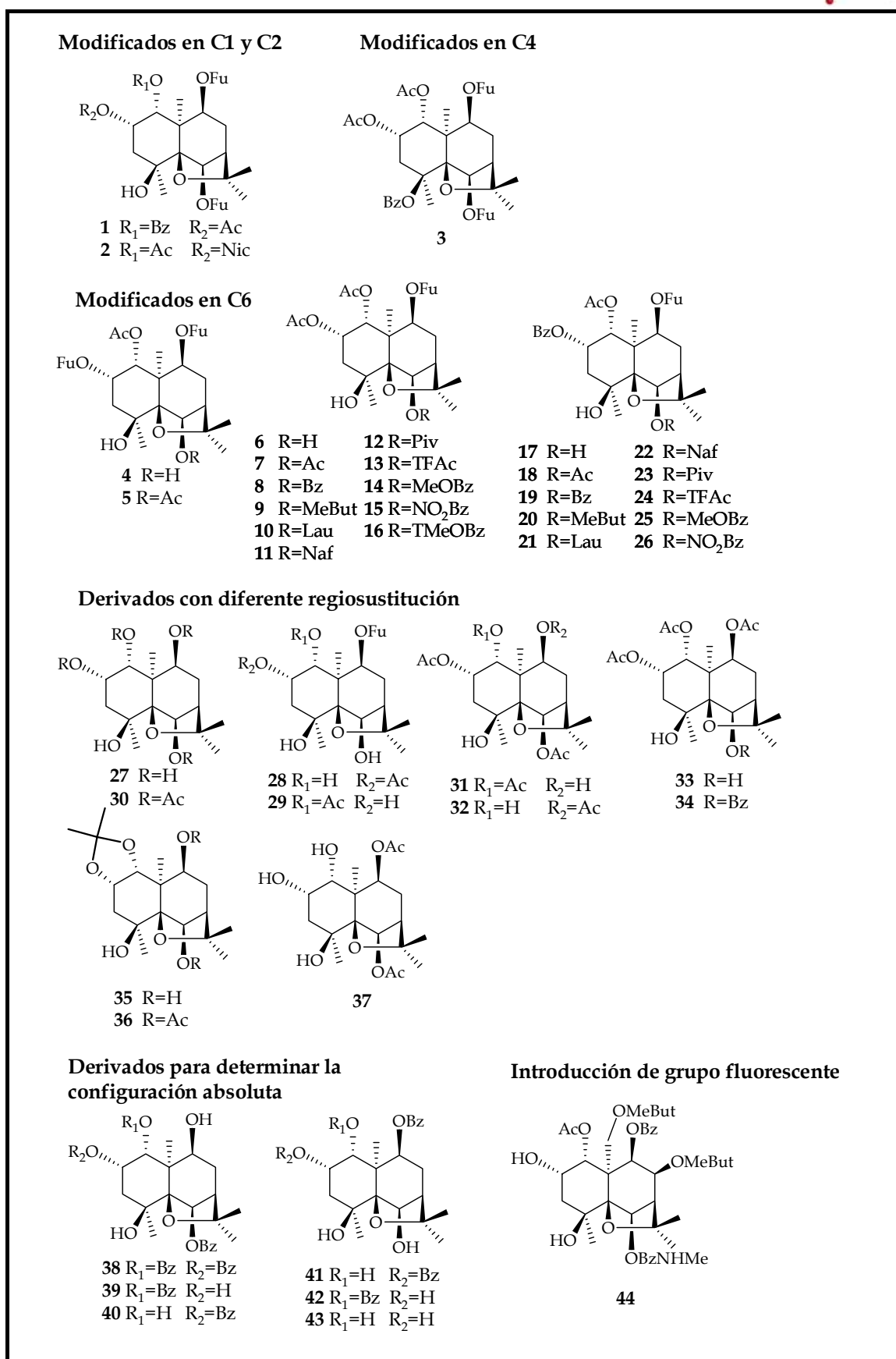
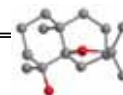
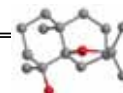


Figura 5.3.4. Derivados preparados a partir de los sesquiterpenos S1-S5 y T3.

La mayoría son derivados del metabolito que se aísla de forma mayoritaria, **S3 (3, 6-16 y del 27-43)**, preparándose también derivados de **S1 (1)**, **S2 (4 y 5)**, **S4 (2)** y **S5 (17 al 26)**. Para la reacción de marcaje con un grupo fluorescente elegimos un sesquiterpeno aislado del estudio fitoquímico de la parte aérea de *Crossopetalum tonduzii*, **T3 (44)**.

En la figura 5.3.5 se representan los diferentes ácidos que esterifican los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos aislados y los derivados que se han preparado.

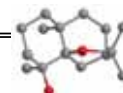


5.3.4. Datos físicos y espectroscópicos.

5.3.4.1. Sesquiterpenos aislados de los frutos de *Maytenus cuzcoina*

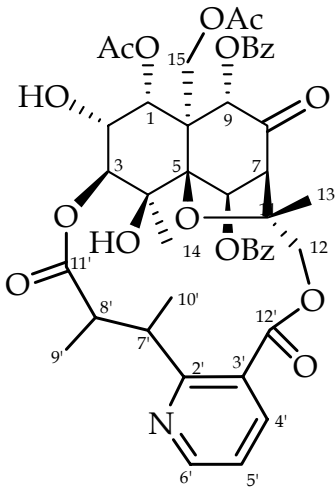
Sesquiterpeno S1	
(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-acetoxi-6,9-di-(3-furoiloxi)-1,4-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano	
Se obtuvo como sólido amorfo (26,0 mg)	
[α] ²⁰ _D :	+ 18,1° (c 0,16, CHCl ₃)
UV (EtOH) λ _{max} (log ε):	231 (3,8), 220 (3,7) nm
IR γ _{max} (película):	3467, 2956, 2925, 2847, 1719, 1640, 1361, 1310, 1159, 1073, 1025, 979, 877, 760 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ:	1,40 (3H, s, Me15); 1,47 (3H, s, Me14); 1,53 (3H, s, Me13); 1,56 (3H, s, Me12); 2,02 (2H, m, H3); 2,06 (3H, s, OAc2); 2,22 (1H, dd, <i>J</i> = 1,6, 18,4 Hz, H8β); 2,35 (1H, s ancho, H7); 2,54 (1H, m, H8α); 3,02 (1H, s ancho, OH4); 4,38 (1H, s ancho ω _{1/2} =10 Hz, H1); 5,01 (1H, d, <i>J</i> = 6,7 Hz, H9); 5,25 (1H, m, H2); 5,64 (1H, s, H6); OFu x 2 [6,77 (1H, d, <i>J</i> = 1,1 Hz); 6,83 (1H, d, <i>J</i> = 1,1 Hz); 7,44 (2H, s ancho); 8,04 (1H, s); 8,17 (1H, s)]
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ:	20,0 (c, C15); 21,3 (c, OAc2); 25,2 (c, C14); 25,8 (c, C13); 29,7 (c, C12); 31,1 (t, C8); 42,5 (t, C3); 49,1 (d, C7); 52,6 (s, C10); 68,1 (d, C1); 70,1 (s, C4); 72,1 (d, C9); 72,8 (d, C2); 79,7 (d, C6); 84,9 (s, C11); 91,4 (s, C5); OFu x 2 [109,8 (2 x d); 119,4 (s); 119,7 (s); 143,9 (d); 144,0 (d), 147,7 (d); 149,1 (d); 161,9 (s, OFu9); 162,3 (s, OFu6)]; 171,4 (s, OAc2)
EM (IE) <i>m/z</i> (%):	517 (M ⁺ - 15, 2), 499 (1), 472 (1), 422 (2), 405 (3), 360 (3), 342 (2), 248 (5), 233 (4), 230 (4), 205 (4), 191 (5), 173 (4), 149 (4), 95 (100), 77 (5), 63 (20)
EMAR <i>m/z</i> :	Observado 517,1693 (calculado para C ₂₆ H ₂₉ O ₁₁ [M ⁺ -CH ₃]: 517,1710)

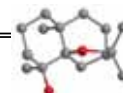
Sesquiterpeno S11	
1 α ,6 β ,15 α -triacetoxi-2 α ,8 α ,9 α -tribenzoiloxi-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano	
Se obtuvo como sólido amorfo (4,0 mg)	
$[\alpha]_D^{20}$:	+ 6,3° (c 0,25, CHCl ₃)
UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ):	229 (3,9) nm
IR γ_{max} (película):	3478, 2924, 2854, 1733, 1457, 1371, 1223, 1095, 758, 713 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	1,52 (3H, s, OAc1); 1,59 (3H, s, Me14); 1,69 (3H, s, Me13); 1,74 (3H, s, Me12); 1,96 (3H, s, OAc15); 2,17 (3H, s, OAc6); 2,32 (2H, m, H3); 2,64 (1H, d, J = 3,3 Hz, H7); 4,61 (1H, d _{AX} , J = 13,5 Hz, H15X); 5,58 (1H, d _{AX} , J = 13,5 Hz, H15A); 5,67 (2H, m, H1, H2); 5,79 (1H, dd, J = 3,3, 5,9 Hz, H8); 5,82 (1H, d, J = 5,9 Hz, H9); 7,09 (1H, s, H6); 3 x OBz [7,33 (2H, t, J = 7,5 Hz); 7,41 (2H, t, J = 7,5 Hz); 7,47 (3H, m); 7,55 (2H, m); 7,85 (2H, d, J = 7,5 Hz); 8,01 (2H, d, J = 7,5 Hz); 8,08 (2H, d, J = 7,5 Hz)]
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	20,1 (c, OAc1); 20,9 (c, OAc15); 21,3 (c, OAc6); 24,3 (c, C14); 24,4 (c, C13); 29,2 (c, C12); 42,3 (t, C3); 52,6 (s, C10); 53,6 (d, C7); 61,2 (t, C15); 68,2 (d, C2); 69,8 (s, C4); 70,6 (d, C8); 72,1 (d, C9); 74,8 (d, C6); 75,9 (d, C1); 82,7 (s, C11); 91,7 (s, C5); OBz x 3 [128,2 (2 x d); 128,3 (2 x d); 128,4 (2 x d); 128,5 (d); 129,3 (2 x d), 129,5 (2 x d); 129,6 (d); 130,2 (s); 130,3 (s); 130,5 (s); 133,1 (3 x d); 164,6 (s, OBz8); 165,6 (s, OBz9); 166,1 (s, OBz2)]; 169,5 (s, OAc1); 169,6 (s, OAc6); 170,3 (s, OAc15)
EM (IE) m/z (%):	712 (M ⁺ -60, C ₂ H ₄ O ₂ , 1), 650 (8), 608 (4), 591 (2), 528 (2), 468 (1), 426 (1), 366 (1), 304 (1), 202 (18), 105 (100), 77 (10)
EMAR m/z :	Observado 712,2548 (calculado para C ₄₀ H ₄₀ O ₁₂ [M ⁺ - C ₂ H ₄ O ₂]: 712,2520)



5.3.4.2. Sesquiterpenos aislados de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina*.

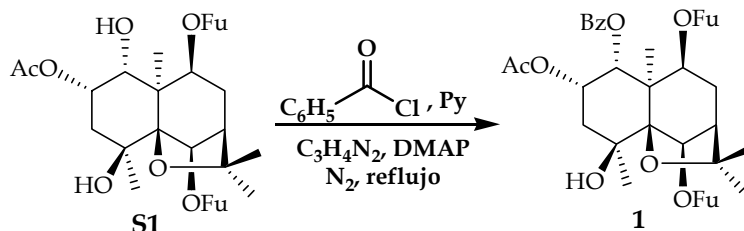
Sesquiterpeno S14		
9α-benzoiloxi-9-deacetoxievonina		
Se obtuvo como sólido amorfo (2,4 mg)		
[α] ²⁰ _D :	+10,8° (c 0,15, CHCl ₃)	
UV (EtOH) λ _{max} (log ε): 269 (2,0), 229 (3,9), 201 (4,1) nm		
IR γ _{max} (película):	3487, 2925, 2854, 1751, 1725, 1564, 1454, 1371, 1273, 1220, 1168, 1113, 1067, 756, 712 cm ⁻¹	
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ:	1,20 (3H, d, J = 7,1 Hz, Me10'); 1,43 (3H, d, J = 6,9 Hz, Me9'); 1,47 (3H,s, OAc2); 1,65 (3H, s, Me14); 1,74 (3H, s, Me13); 2,08 (3H, s, OAc15); 2,17 (3H, s, OAc1); 2,25 (3H, s, OAc6); 2,60 (1H, m, H8'); 3,09 (1H, s, H7); 3,75 (1H, d _{AX} , J = 11,4 Hz, H12X); 4,68 (1H, d _{AM} , J = 13,1 Hz, H15M); 4,71 (1H, m, H7'); 4,72 (1H, s, OH4); 4,81 (1H, d, J = 2,9 Hz, H3); 4,98 (1H, d _{AM} , J = 13,1 Hz, H15A); 5,27 (1H, t, J = 3,1 Hz, H2); 5,76 (1H, d, J = 3,4 Hz, H1); 5,86 (1H, s, H9); 6,08 (1H, d _{AX} , J = 11,4 Hz, H12A); 6,85 (1H, s, H6); 7,29 (1H, m, H5'); OBz [7,47 (2H, m); 7,60 (1H, m); 7,97 (2H, m)]; 8,11 (1H, dd, J = 1,7, 7,8 Hz, H4'); 8,72 (1H, dd, J = 1,7, 4,7 Hz, H6')	
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ:	9,8 (c, C10'); 11,7 (c, C9'); 19,8 (c, OAc2); 19,3 (c, C13); 20,3 (c, OAc15); 20,7 (c, OAc1); 21,1 (c, OAc6); 23,6 (c, C14); 36,2 (d, C7'); 44,9 (d, C8'); 53,0 (s, C10); 60,6 (t, C15); 61,9 (d, C7); 68,6 (d, C2); 70,0 (t, C12); 70,1 (s, C4); 71,4 (d, C1); 73,6 (d, C6); 74,8 (d, C3); 79,3 (d, C9); 86,0 (s, C11); 95,4 (s, C5); 121,0 (d, C5'); 124,7 (s, C3'); OBz [128, 5 (2 x d); 128,6 (s); 129,7 (2 x d)]; 133,7 (d); 165,4 (s, OBz-9); 137,6 (d, C4'), 151,6 (d, C6'), 165,9 (s, C2'); 168,2 (s, OAc1); 168,4 (s, C12'); 169,2 (s, OAc2), 169,3 (s, OAc6); 170,1 (s, OAc15); 175,8 (s, C11'); 195,9 (s, C8)	
EM (FAB) m/z (%):	824 (M ⁺⁺¹ , 100), 764 (5), 722 (4), 630 (4), 528 (5), 423 (5), 391 (36), 206 (23), 153 (61), 149 (74), 105 (84)	
EMAR m/z:	Observado 824,2775 (calculado para C ₄₁ H ₄₆ NO ₁₇ (M ⁺⁺¹): 824,2766)	

Sesquiterpeno S15		
6 β ,9 α -dibenzoiloxi-2 α -hidroxi-2,6,9-trideacetoxievonina		
Se obtuvo como sólido amorfo (2,0 mg)		
[α] _D ²⁰ :	+10,0° (c 0,15, CHCl ₃)	
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ): 266 (3,2), 231 (4,0) nm		
IR γ_{\max} (película):	3493, 2957, 2923, 2854, 1753, 1728, 1455, 1374, 1261, 1227, 1099, 1067, 801, 756 cm ⁻¹	
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) δ :	1,22 (3H, d, J = 7,1 Hz, Me10'); 1,46 (3H, d, J = 6,9 Hz, Me9'); 1,57 (3H, s, OAc1); 1,71 (3H, s, Me14); 1,76 (3H, s, Me13); 2,11 (3H, s, OAc15); 2,61 (1H, m, H8'); 3,26 (1H, s, H7); 3,68 (1H, d _{AX} , J = 11,1 Hz, H12X); 4,08 (1H, m, H2); 4,78 (1H, m, H7'); 4,80 (1H, d _{AM} , J = 13,4 Hz, H15M); 4,82 (1H, s, OH4); 4,90 (1H, d, J = 3,0 Hz, H3); 5,16 (1H, d _{AM} , J = 13,4 Hz, H15A); 5,74 (1H, d, J = 2,9 Hz, H1); 5,92 (1H, s, H9); 6,19 (1H, d _{AX} , J = 11,1 Hz, H12A); 6,98 (1H, s, H6); OBz x 2 [7,47-7,62 (6H, m); 8,01 (2H, d, J = 7,1 Hz); 8,36 (2H, d, J = 7,3 Hz)]; 7,30 (1H, m; H5'); 8,08 (1H, dd, J = 1,6, 7,8 Hz, H4'); 8,72 (1H, dd, J = 1,6, 4,8 Hz, H6')	
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	9,5 (c, C10'); 12,1 (c, C9'); 19,6 (c, C13); 20,5 (c, OAc15); 20,6 (c, OAc1); 24,0 (c, C14); 36,3 (d, C7'); 44,9 (d, C8'); 52,9 (s, C10); 60,8 (t, C15); 61,8 (d, C7); 69,9 (d, C2); 70,1 (t, C12); 70,4 (s, C4); 73,5 (d, C1); 74,9 (d, C6); 77,0 (d, C3); 79,6 (d, C9); 85,7 (s, C11); 95,5 (s, C5); 121,2 (d, C5'); 124,0 (s, C3'); 2 x OBz [128,9 (2 x d); 128,7 (d); 128,7 (s); 129,1 (s); 129,9 (3 x d); 130,3 (2 x d); 133,5 (2 x d); 164,8 (s, OBz9); 165,8 (s, OBz6)]; 137,6 (d, C4'); 151,0 (d, C6'); 165,0 (s, C2'); 168,1 (s, C12'); 169,3 (s, OAc1); 169,9 (s, OAc15); 174,2 (s, C11'); 195,5 (s, C8)	
EM (IE) m/z (%):	843 (M ⁺ , 7), 815 (1), 783 (2), 722 (2), 608 (3), 590 (2), 446 (6), 422 (4), 224 (12), 206 (17), 122 (55), 105 (100), 77 (56), 69 (36)	
EMAR m/z :	Observado 843,2714 (calculado para C ₄₄ H ₄₅ NO ₁₆ [M ⁺]: 843,2738)	



5.3.4.3. Derivados realizados para modular la actividad biológica

• Benzoilación de S1



A una disolución de 3,5 mg de **S1** (0,01 mmoles) en 0,3 ml de piridina seca (3,09 mmoles, 309 eq), se le añadió una cantidad catalítica de DMAP e imidazol ($C_3H_4N_2$) y 0,1 ml de cloruro de benzoilo (1,10 mmoles, 110 eq). La mezcla, tras agitación durante 16 horas a reflujo y bajo atmósfera de nitrógeno, se llevó a sequedad y se lavó el crudo de reacción dos veces con una disolución de $NaHCO_3$ al 10 % y se concentró a presión reducida. Posteriormente, se disolvió en 3,0 ml de éter dietílico, adicionándole 64,0 mg de fluoruro potásico (1,1 mmoles, 110 eq) dejándolo agitando durante 1 hora a temperatura ambiente, filtrándolo posteriormente a través de una capa de celita y llevándose a sequedad. El residuo fue purificado en placa preparativa de gel de sílice usando $CH_2Cl_2:Et_2O$ (9:1) como eluyente, obteniéndose 3,4 mg de **1** (R= 80%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-2-acetoxi-1-benzoiloxi-6,9-di-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano (**1**)

$[\alpha]^{20}_D$: +24,7° (*c* 0,17, $CHCl_3$)

IR γ_{max} (película): 3442, 2956, 2924, 2846, 1724, 1452, 1270, 1157, 1026, 760, 713 cm^{-1}

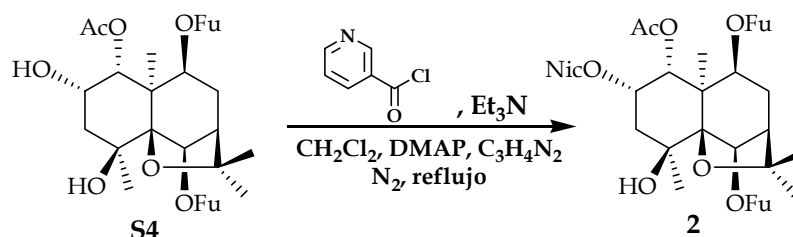
RMN 1H

($CDCl_3$, 300 MHz) δ : 1,51 (3H, s); 1,57 (6H, s); 1,69 (3H, s); 2,00 (3H, s); 2,05 (1H, m); 2,18 (2H, m); 2,36 (1H, s); 2,56 (1H, m); 3,05 (1H, s); 4,99 (1H, d, $J = 6,8$ Hz); 5,67 (3H, m); 6,50 (1H, s); 6,85 (1H, s); 7,32 (3H, m); 7,46 (2H, m); 7,66 (2H, d, $J = 7,2$ Hz); 7,84 (1H, s); 8,19 (1H, s)

EM (IE) m/z (%): 621 (M^+-15 , 1), 577 (1), 532 (2), 509 (2), 464 (11), 192 (10), 105 (100), 95 (76)

EMAR m/z : Observado 621,1957 (calculado para $C_{33}H_{33}O_{12}$ [M^+-CH_3]: 621,1972)

• Esterificación de S4



3,5 mg de S4 (0,01 mmoles) en 2,0 ml de diclorometano seco, bajo atmósfera de nitrógeno, fue tratado con 0,1 ml de trietilamina (0,53 mmoles, 53 eq), 20,0 mg de cloruro de nicotínico (0,14 mmoles, 14 eq) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina e imidazol. La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo y agitación durante 16 horas, tras lo cual, se adicionó 3,0 ml de etanol, después de haber comprobado que no quedaba producto de partida por capa fina. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos y se llevó a sequedad. El crudo se purificó mediante cromatografía preparativa de gel de sílice de capa fina, usando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Et}_2\text{O}$ (5:1), obteniéndose 1,4 mg del producto esterificado 2 (R= 33%), como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-acetoxi-6,9-di-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-2-nicotinoiloxi-dihidro- β -agarofurano (2)

$[\alpha]_D^{20}$: +33,6° (*c* 0,14, CHCl_3)

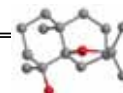
IR γ_{max} (película): 3423, 2956, 2915, 2847, 1722, 1308, 1284, 1230, 1159, 1023, 761 cm^{-1}

RMN ^1H

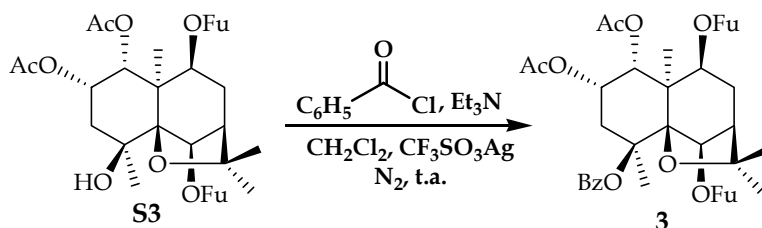
(CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1,54 (3H, s); 1,57 (3H, s); 1,60 (3H, s); 1,62 (3H, s); 1,74 (3H, s); 2,04 (1H, m); 2,18 (2H, m); 2,37 (1H, s); 2,62 (1H, m); 3,07 (1H, s); 4,95 (1H, d, $J = 6,7$ Hz); 5,54 (1H, m); 5,69 (1H, s); 5,82 (1H, m); 6,75 (1H, s); 6,84 (1H, s); 7,44 (3H, m); 8,04 (1H, s); 8,18 (1H, s); 8,22 (1H, dd, $J = 1,8, 6,3$ Hz); 8,79 (1H, d, $J = 4,9$ Hz); 9,17 (1H, s)

EM (IE) m/z (%): 637 (M^+ , 2), 622 (1), 510 (1), 402 (1), 393 (1), 322 (8), 279 (7), 167 (17), 149 (82), 125 (8), 111 (16), 105 (4), 97 (26), 95 (18), 71 (59), 57 (100)

EMAR m/z : Observado 637,2169 (calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_1\text{O}_{12}$ [M^+]: 637,159)



• Benzoilación del alcohol terciario de S3



A una disolución de 10,0 mg de S3 (0,02 mmoles), 2,20 ml de CH₂Cl₂ seco, 0,05 ml de trietilamina seca (0,54 mmoles, 27 eq) y 0,05 ml de cloruro de benzoilo (0,55 mmoles, 27,5 eq) con tamiz molecular y bajo atmósfera de nitrógeno, se le añadieron 3,0 mg de triflato de plata (0,01 mmoles, 0,6 eq), previamente activado (120°C durante 4 horas). Se dejó la reacción en agitación durante 14 horas, tras las cuales se eliminó el disolvente. El crudo de reacción se resuspendió en Et₂O y añadió 32,0 mg de fluoruro potásico (0,55 mmoles, 28 eq), dejándolo bajo agitación durante 1 hora a temperatura ambiente; se filtró posteriormente a través de una capa de celita y se llevó a sequedad. La mezcla fue purificada en una placa preparativa de gel de sílice, eluida en CH₂Cl₂:Et₂O (9:1), obteniéndose el producto benzoilado 3 (4,5 mg, R= 38%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2-diacetoxi-4-benzoiloxi-6,9-di-(3-furoiloxi)-dihidro-β-agarofurano (3)

[α]_D²⁰: +11,7° (c 0,30, CHCl₃)

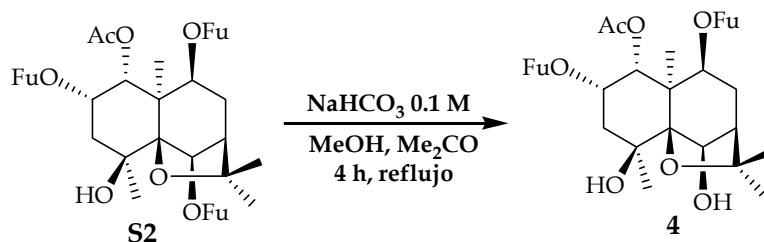
IR γ_{max} (película): 2922, 2852, 1748, 1721, 1309, 1276, 1244, 1159, 1096, 1033, 761, 718 cm⁻¹

RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ: 1,56 (3H, s); 1,67 (3H, s); 1,68 (3H, s); 1,75 (3H, s); 2,05 (3H, s); 2,07 (3H, s); 2,21 (1H, m); 2,26 (1H, s); 2,50 (1H, dd, *J* = 3,6, 14,6 Hz); 2,54 (1H, m); 2,57 (1H, dd, *J* = 3,6, 14,6 Hz); 4,97 (1H, d, *J* = 6,6 Hz); 5,58 (1H, d, *J* = 3,5 Hz); 5,64 (1H, m); 5,82 (1H, s); 6,39 (1H, d, *J* = 1,1 Hz); 6,77 (1H, d, *J* = 1,1 Hz); 7,19 (2H, d, *J* = 1,4 Hz); 7,43 (4H, m); 7,58 (1H, m); 8,02 (1H, d, *J* = 1,1 Hz); 8,05 (2H, d, *J* = 7,5 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 678 (M⁺, 10), 663 (5), 472 (4), 447 (16); 402 (7), 350 (5), 308 (4), 290 (13), 230 (10), 202 (7), 164 (10), 105 (100), 95 (89), 77 (11), 69 (2)

EMAR *m/z*: Observado 678,2333 (calculado para C₃₆H₃₈O₁₃ [M⁺]: 678,2312)

• **Hidrólisis regioselectiva de S2**



A una disolución de 10,0 mg de **S2** (0,02 mmoles) en metanol (3,0 ml) y acetona (2,0 ml), se le añadió 1,0 ml (0,1 mmoles, 5,0 eq) de una disolución acuosa de bicarbonato sódico 0,1 M. La disolución se calentó a reflujo durante 4 horas, comprobando por cromatografía en capa fina que la reacción había finalizado. El crudo de reacción se concentró a vacío y al residuo se le añadió agua extrayéndose tres veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre sulfato magnésico anhidro, se filtraron y el disolvente se eliminó a vacío. Posteriormente, el residuo fue purificado por cromatografía en placa de gel de sílice de capa fina (*n*-hexano:AcOEt, 1:1), obteniéndose 8,2 mg de **4** (R= 96,5 %), como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-acetoxi-2,9-di-(3-furoiloxi)-4,6-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano (4**)**

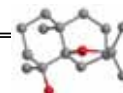
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +39,4° (*c* 0,34, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3433, 2925, 2853, 1746, 1720, 1312, 1244, 1162, 1140, 763 cm⁻¹

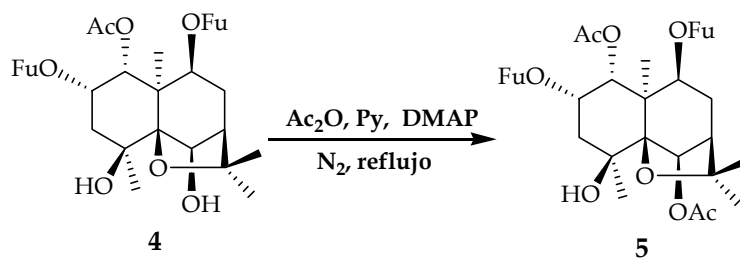
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,52 (6H, s); 1,60 (3H, s); 1,71 (3H, s); 1,83 (3H, s); 2,16 (5H, m); 3,31 (1H, s); 4,56 (1H, s); 4,87 (1H, d, *J* = 6,9 Hz); 4,97 (1H, s); 5,49 (1H, d, *J* = 3,7 Hz); 5,73 (1H, m); 6,70 (1H, s); 6,73 (1H, s); 7,42 (1H, d, *J* = 1,5 Hz); 7,45 (1H, d, *J* = 1,5 Hz); 7,97 (1H, d, *J* = 0,7 Hz); 8,01 (1H, d, *J* = 0,7 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 532 (M⁺, 1), 517 (4), 420 (3), 405 (11), 345 (1), 233 (4), 205 (4), 168 (6), 149 (16), 95 (100)

EMAR *m/z*: Observado 532,1914 (calculado para C₂₇H₃₂O₁₁ [M⁺]: 532,1945)



• Acetilación del derivado 4



A una disolución de 4,0 mg de **4** (0,01 mmoles) en 0,1 ml de piridina (1,23 mmoles, 125 eq) se le añadió 0,5 ml de anhídrido acético (1,06 mmoles, 106 eq) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (DMAP). La reacción se llevó a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno y se agitó durante 16 horas. Transcurrido este tiempo, se concentró a vacío y el residuo fue purificado por cromatografía en placa de gel de sílice de capa fina (*n*-hexano:AcOEt, 3:2), obteniéndose 3,5 mg de **5** (R= 81%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,6-diacetoxi-2,9-di-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano (**5**)

$[\alpha]_D^{25}$: +30,0° (*c* 0,10, CHCl₃)

IR γ_{\max} (película): 3446, 2925, 2853, 1731, 1368, 1309, 1260, 1160, 1024, 799 cm⁻¹

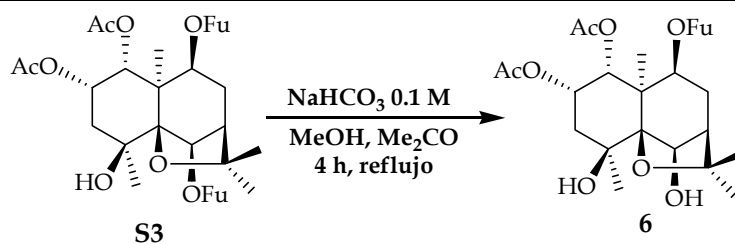
RMN ¹H

(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,50 (3H, s); 1,56 (3H, s); 1,59 (6H, s); 1,73 (3H, s); 2,14 (3H, s); 2,10-2,19 (4H, m); 2,47 (1H, m); 3,59 (1H, s); 4,91 (1H, d, *J*= 6,7 Hz); 5,46 (1H, d, *J*= 3,5 Hz); 5,61 (1H, s); 5,69 (1H, m); 6,69 (1H, d, *J*= 1,7 Hz); 6,73 (1H, d, *J*= 1,3 Hz); 7,42 (1H, d, *J*= 1,7 Hz); 7,44 (1H, d, *J*= 1,7 Hz); 7,95 (1H, s); 8,03 (1H, s)

EM (IE) *m/z* (%): 574 (M⁺, 1), 559 (2), 514 (1), 447(5), 402 (14), 290 (8), 192 (10), 95 (100)

EMAR *m/z*: Observado 574,2078 (calculado para C₂₉H₃₄O₁₂ [M⁺]: 574,2050)

• **Hidrólisis regioselectiva de S3**



Siguiendo el procedimiento descrito para la obtención de **4**, se hidrolizaron 141,1 mg de **S3** (0,25 mmoles), obteniéndose 116,0 mg (0,24 mmoles, R= 98%) de **6**, como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4,6-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano (6)

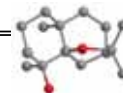
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$: +12,8° (*c* 0,25, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3536, 2959, 1746, 1721, 1366, 1244, 1140, 1026, 762 cm⁻¹

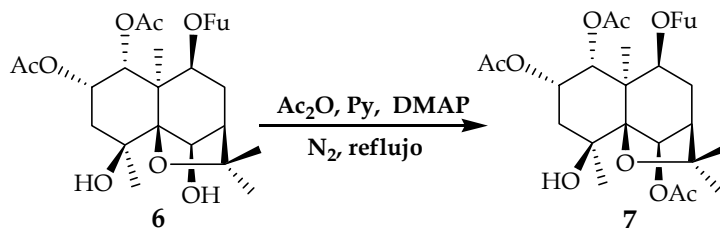
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,46 (3H, s); 1,51 (3H, s); 1,58 (3H, s); 1,70 (3H, s); 1,78 (3H, s); 2,06 (3H, s); 2,00-2,32 (5H, m); 3,27 (1H, s); 4,53 (1H, d, *J* = 5,3 Hz); 4,85 (1H, d, *J* = 6,7 Hz); 4,96 (1H, d, *J* = 5,3 Hz); 5,41 (1H, d, *J* = 3,6 Hz); 5,54 (1H, m); 6,72 (1H, t, *J* = 0,7 Hz); 7,41 (1H, s); 8,00 (1H, d, *J* = 0,7 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 480 (M⁺, 3), 465 (25), 420 (10), 353 (35), 233 (13), 168 (12), 95 (100)

EMAR *m/z*: Observado 480,2023 (calculado para C₂₄H₃₂O₁₀ [M⁺]: 480,1995)



• Acetilación del derivado 6



Siguiendo el procedimiento general descrito para la obtención de 5, se acetilaron 3,7 mg de 6 (0,01 mmoles), obteniéndose 3,9 mg (R= 95%) de 7, como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2,6-triacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano (7)

$[\alpha]_{25}^D$: +7,6° (*c* 0,40, CHCl₃)

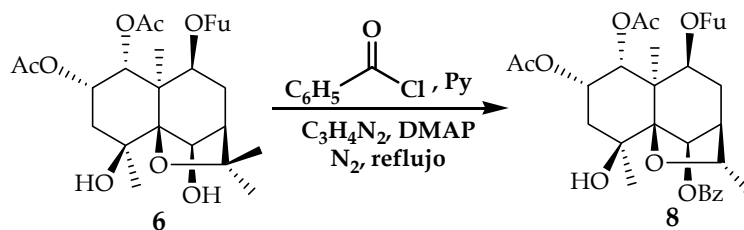
IR γ_{\max} (película): 3547, 2927, 2855, 1747, 1720, 1367, 1309, 1243, 1160, 762 cm⁻¹

RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,49 (3H, s); 1,50 (6H, s); 1,54 (3H, s); 1,74 (3H, s); 2,05 (3H, s); 2,14 (3H, s); 1,98-2,18 (4H, m); 2,47 (1H, m); 2,94 (1H, s); 4,89 (1H, d, *J* = 6,7 Hz); 5,39 (1H, d, *J* = 3,5 Hz); 5,50 (1H, m); 5,57 (1H, s); 6,73 (1H, t, *J* = 0,7 Hz); 7,42 (1H, t, *J* = 0,7 Hz); 8,01 (1H, t, *J* = 0,7 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 522 (M⁺, 1), 507 (2), 480 (3), 462 (4), 420 (4), 402 (19), 233 (9), 192 (17), 95 (50), 57 (100)

EMAR *m/z*: Observado 522,2071 (calculado para C₂₆H₃₄O₁₁ [M⁺]: 522,2101)

• Benzoilación del derivado 6



Siguiendo el procedimiento descrito para la obtención del derivado 1, se benzoilaron 5,5 mg de 6 (0,01 mmoles), obteniéndose 4,2 mg de 8 (R= 63%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2-diacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano (8)

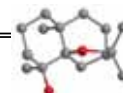
$[\alpha]_D^{20}$: + 6,9° (*c* 0,16, CHCl₃)

IR γ_{\max} (film): 3512, 2955, 2924, 2854, 1745, 1717, 1366, 1280, 1254, 1025, 760, 715 cm⁻¹

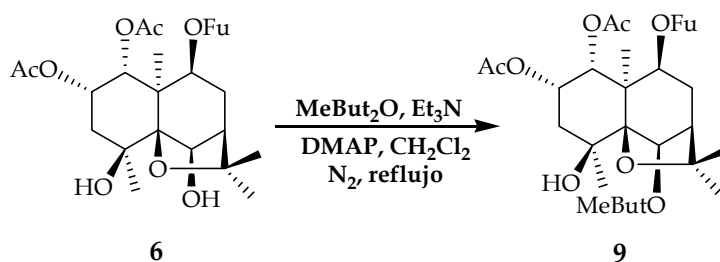
RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,51 (3H, s); 1,54 (3H, s); 1,55 (6H, s); 1,75 (3H, s); 1,99 (1H, m); 2,04 (3H, s); 2,18 (2H, m); 2,37 (1H, s); 2,55 (1H, m); 3,14 (1H, s); 4,95 (1H, d, *J* = 6,8 Hz); 5,43 (1H, d, *J* = 3,4 Hz); 5,52 (1H, m); 5,73 (1H, s); 6,74 (1H, d, *J* = 1,8 Hz); 7,42 (1H, s); 7,47 (2H, m); 7,59 (1H, m); 8,02 (1H, s); 8,21 (2H, d, *J* = 7,5 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 569 (M⁺-15, 2); 524 (1); 457 (4); 434 (6); 402 (13); 236 (3); 192 (9); 125 (4); 105 (100); 95 (25)

EMAR *m/z*: Observado 569,1996 (calculado para C₃₀H₃₃O₁₁ [M⁺-15]: 569,2023)



• Esterificación del derivado 6 con anhídrido (*S*)-(+)-2-metilbutírico



Una disolución de 4,0 mg de **6** (0,01 mmoles), 0,1 ml de anhídrido (*S*)-(+)-2-metilbutírico (0,50 mmoles, 50 eq), 0,1 ml trietilamina (1,08 mmoles, 107 eq) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina en 3,0 ml de diclorometano seco, se calentó a reflujo durante 16 horas, bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se concentró a vacío y el residuo fue purificado por cromatografía en placa de gel de sílice de capa fina (*n*-hexano:AcOEt, 3:2), obteniéndose 3,3 mg de **9** (R= 70%), como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1, 2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-[(*S*)-(+)-2-metilbutiroiloxi]-dihidro-β-agarofurano (**9**)

[α]²⁵_D: +5,0° (*c* 0,24, CHCl₃)

IR γ_{max} (film): 3547, 2962, 2928, 1745, 1731, 1366, 1243, 1147, 1070, 1027, 762 cm⁻¹

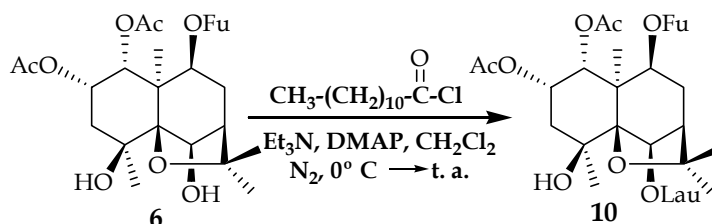
RMN ¹H

(CDCl₃, 300 MHz) δ: 0,91 (3H, t, *J*= 7,5 Hz); 1,19 (3H, d, *J*= 7,0 Hz); 1,46 (1H, m); 1,50 (3H, s); 1,51 (3H, s); 1,55 (3H, s); 1,56 (3H, s); 1,73 (3H, s); 1,74 (1H, m); 2,05 (3H, s); 1,94-2,20 (4H, m); 2,50 (2H, m); 2,92 (1H, s); 4,90 (1H, d, *J*= 6,8 Hz); 5,39 (1H, d, *J*= 3,5 Hz); 5,50 (1H, m); 5,62 (1H, s); 6,73 (1H, d, *J*= 1,6 Hz); 7,41 (1H, d, *J*= 1,6 Hz); 8,01 (1H, s)

EM (IE) *m/z* (%): 549 (M⁺-15, 4), 504 (1), 480 (5), 462 (1), 437 (15), 402 (32), 290 (18), 233 (14), 192 (23), 95 (74), 57 (100)

EMAR *m/z*: Observado 549,3331 (calculado para C₂₈H₃₇O₁₁ [M⁺-15]: 549,2336)

• Esterificación del derivado 6 con cloruro de laurilo



A una disolución de 4,0 mg de **6** (0,01 mmoles), 0,1 ml trietilamina (1,08 mmoles, 107 eq) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina en 1,0 ml de diclorometano seco a 0° C, se le adicionó 0,1 ml de cloruro de laurilo (0,43 mmoles, 43 eq), dejando la reacción a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno durante 2 horas, hasta comprobar, por capa fina que la reacción había finalizado. Seguidamente, se le adicionó 0,5 ml de etanol y se dejó agitando durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró y se fraccionó mediante columna flash, usando como eluyente un gradiente de polaridad (del 50% al 100%) de Et₂O en *n*-hexano y finalmente el producto se purificó tras una cromatografía en placa de gel de sílice (CH₂Cl₂:Et₂O, 5:1), obteniéndose 2,3 mg de **10** (R= 39 %), como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-lauriloxi-dihidro-β-agarofurano (**10**)

[α]²⁰_D: +8,3° (c 0,18, CHCl₃)

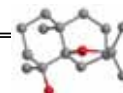
IR γ_{max} (película): 3554, 2924, 2853, 1747, 1366, 1310, 1243, 1158, 762 cm⁻¹

RMN ¹H

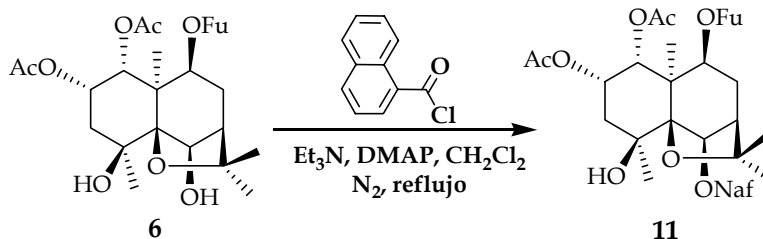
(CDCl₃, 300 MHz) δ: 0,88 (3H, t, *J*= 5,5 Hz); 1,25 (14H, s); 1,50 (3H, s); 1,57 (3H, s); 1,63 (6H, s); 1,57-1,65 (4H, m); 1,74 (3H, s); 2,04 (3H, s); 1,94-2,17 (4H, m); 2,37 (2H, dt, *J*= 2,4, 7,3 Hz); 2,46 (1H, m); 2,92 (1H, s); 4,89 (1H, d, *J*= 6,6 Hz); 5,38 (1H, d, *J*= 3,4 Hz); 5,50 (1H, m); 5,59 (1H, s); 6,72 (1H, d, *J*= 1,1 Hz); 7,41 (1H, d, *J*= 1,1 Hz); 8,01 (1H, s)

EM (IE) *m/z* (%): 647 (M⁺-15, 9), 602 (2), 535 (11), 480 (14), 463 (3), 420 (9), 402 (67), 192 (34), 126 (47), 95 (100)

EMAR *m/z*: Observado 647,3439 (calculado para C₃₅H₅₁O₁₁ [M⁺-15]: 647,3431



• Esterificación del derivado 6 con el cloruro de 1-naftoilo



A una disolución de 3,0 mg de **6** (0,01 mmoles), 0,1 ml de trietilamina (1,08 mmoles, 107 eq) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina en 3,0 ml de diclorometano seco y bajo atmósfera de nitrógeno, se le adicionó 0,1 ml de cloruro de 1-naftoilo (0,66 mmoles, 66 eq). La reacción se calentó a reflujo durante 2 horas, comprobando por capa fina que la reacción había finalizado; seguidamente se le adicionó 0,5 ml de etanol y se dejó agitando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se concentró y se fraccionó por columna flash, usando como eluyente un gradiente de polaridad (del 50% al 100%) de CH₂Cl₂ en *n*-hexano y finalmente el producto se purificó tras una cromatografía en placa de gel de sílice (*n*-hexano:AcOEt, 3:2), obteniéndose así 3,0 mg de **11** (R= 70%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-(1-naftoiloxi)-dihidro-β-agarofurano (**11**)

[α]_D²⁰: +23,9° (c 0,28, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3546, 2924, 2853, 1747, 1716, 1366, 1244, 1134, 787, 761 cm⁻¹

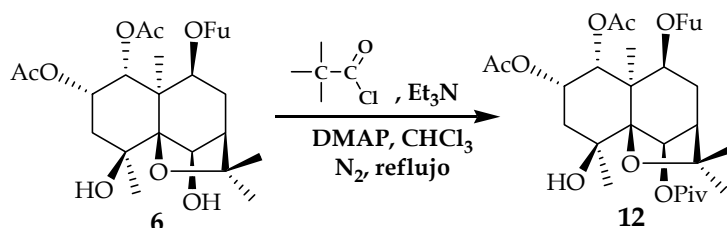
RMN ¹H

(CDCl₃, 300 MHz) δ: 1,53 (3H, s); 1,56 (6H, s); 1,60 (3H,s); 1,76 (3H, s); 2,05 (1H, m); 2,07 (3H, s); 2,22 (2H, m); 2,40 (1H, s); 2,64 (1H, m); 3,19 (1H, s); 4,98 (1H, d, *J*= 6,8 Hz); 5,46 (1H, d, *J*= 3,4 Hz); 5,55 (1H, m); 5,93 (1H, s); 6,75 (1H, d, *J*= 1,1 Hz); 7,43 (1H, d, *J*= 1,1 Hz); 7,56 (2H, m); 7,65 (1H, m); 7,91 (1H, d, *J*= 8,2 Hz); 8,03 (1H, s); 8,07 (1H, d, *J*= 8,5 Hz); 8,71 (1H, d, *J*= 7,4 Hz); 9,20 (1H, d, *J*= 8,6 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 634 (M⁺, 1), 619 (1), 574 (1), 507 (2), 462 (1), 402 (9), 290 (2), 192 (2), 155 (100), 127 (8), 95 (9)

EMAR *m/z*: Observado 634,2412 (calculado para C₃₅H₃₈O₁₁ [M⁺]: 634,2414)

• Esterificación del derivado **6** con cloruro de pivaloilo



A una disolución de 4,0 mg de **6** (0,01 mmoles), 0,1 ml trietilamina (1,08 mmoles, 107 eq) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina en 2,5 ml de cloroformo seco, se le adicionó 0,1 ml cloruro de pivaloilo (0,81 mmoles, 81 eq). La reacción se calentó a reflujo durante 16 horas, bajo atmósfera de nitrógeno, comprobando por capa fina que la reacción había finalizado; seguidamente, se le añadió 0,5 ml de etanol y se dejó agitando durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se concentró y purificó por columna flash, usando como eluyente una mezcla de CH_2Cl_2 y *n*-hexano en gradiente de polaridad (del 50% al 100%), obteniéndose 3,5 mg de **12** (R= 75 %) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-pivaloiloxi-dihidro- β -agarofurano (12**)**

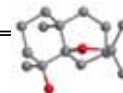
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +10,6° (*c* 0,34, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 3553, 2958, 2925, 2853, 1748, 1721, 1366, 1244, 1148, 1070, 1027, 762 cm^{-1}

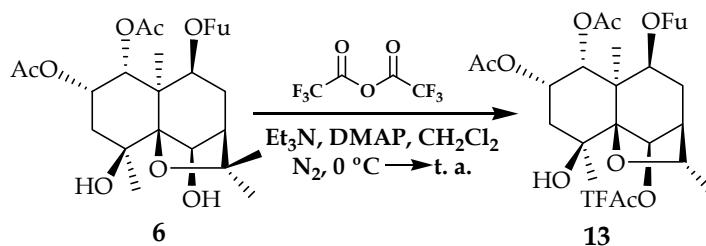
RMN ^1H
(CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1,24 (9H, s); 1,49 (6H, s); 1,50 (3H, s); 1,55 (3H, s); 1,73 (3H, s); 2,04 (3H, s); 1,94-2,19 (4H, m); 2,46 (1H, m); 2,90 (1H, s); 4,90 (1H, d, $J = 6,8$ Hz); 5,40 (1H, d, $J = 3,5$ Hz); 5,50 (1H, m); 5,62 (1H, s); 6,72 (1H, d, $J = 1,1$ Hz); 7,41 (1H, t, $J = 1,1$ Hz); 8,01 (1H, s)

EM (IE) m/z (%): 549 ($\text{M}^+ - 15$, 6), 437 (15), 402 (52), 290 (20), 233 (16), 192 (40), 173 (12), 149 (23), 57 (100)

EMAR m/z : Observado 549,2350 (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{O}_{11}$ [$\text{M}^+ - 15$]: 549,2336)



• Esterificación del derivado **6** con anhídrido trifluoroacético



A una disolución de 3,0 mg de **6** (0,01 mmoles) y 0,1 ml piridina (1,23 mmoles, 125 eq) en 2 ml de diclorometano seco y bajo atmósfera de nitrógeno, se le adicionó 0,1 ml de anhídrido trifluoroacético (0,71 mmoles, 71 eq) a 0° C, se dejó la reacción a temperatura ambiente durante 5 minutos y se comprobó por capa fina que la reacción había finalizado. Posteriormente, se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en placa de gel de sílice (*n*-hexano:AcOEt, 3:2), obteniéndose 2,4 mg de **13** (R= 67%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-trifluoroacetoxi-dihidro-β-agarofurano (**13**)

$[\alpha]^{20}_D$: +13,6° (*c* 0,22, CHCl₃)

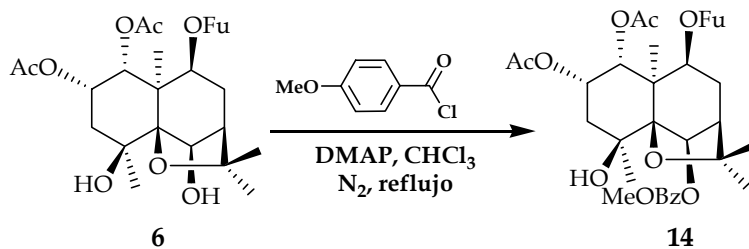
IR γ_{\max} (película): 3449, 2925, 2854, 1775, 1750, 1369, 1221, 1174, 1142, 1038, 762 cm⁻¹

RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,48 (3H, s); 1,51 (3H, s); 1,57 (3H, s); 1,73 (3H, s); 1,94 (3H, s); 2,07 (3H, s); 2,22-2,54 (4H, m); 3,12 (1H, dd, *J*= 3,4, 14,7 Hz); 4,94 (1H, d, *J*= 6,7 Hz); 5,51 (1H, d, *J*= 3,6 Hz); 5,63 (1H, m); 5,68 (1H, s); 6,72 (1H, d, *J*= 1,7 Hz); 7,42 (1H, d, *J*= 1,7 Hz); 8,02 (1H, s)

EM (IE) *m/z* (%): 558 (M⁺-18, 1), 543 (1), 503 (1), 449 (8), 405 (0,9), 329 (1), 290 (1), 247 (2), 230 (2), 215 (2), 149 (9), 95 (100)

EMAR *m/z*: Observado 558,1757 (calculado para C₂₆H₂₉O₁₀F₃ [M⁺-18]: 558,1713)

• Esterificación del derivado **6** con cloruro de 4-metoxibenzoilo



El producto **6** (3,0 mg, 0,01 mmoles) se trató con cloruro de 4-metoxibenzoilo (0,1 ml, 0,74 mmoles, 74 eq) siguiendo el mismo procedimiento descrito para la obtención de **12**, obteniéndose 2,7 mg de **14** (R= 70%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-(4-metoxibenzoiloxi)-dihidro- β -agarofurano (**14**)

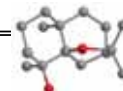
$[\alpha]_D^{20}$: +14,5° (*c* 0,22, CHCl₃)

IR γ_{\max} (película): 3547, 2924, 2852, 1746, 1717, 1606, 1366, 1312, 1254, 1163, 1027, 761 cm⁻¹

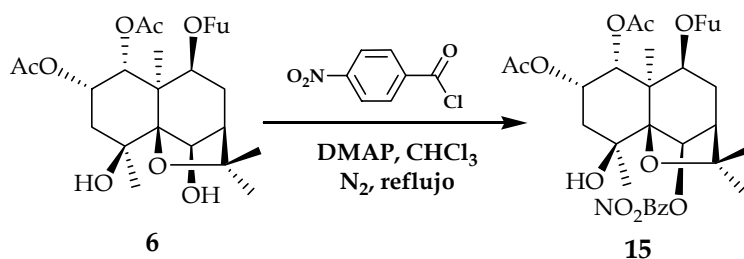
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,51 (3H, s); 1,53 (3H, s); 1,54 (3H, s); 1,56 (3H, s); 1,75 (3H, s); 2,04 (3H, s); 1,99-2,24 (3H, m); 2,36 (1H, m); 2,56 (1H, m); 3,13 (1H, s); 3,87 (3H, s); 4,94 (1H, d, *J*= 6,7 Hz); 5,43 (1H, d, *J*= 3,4 Hz); 5,53 (1H, m); 5,70 (1H, s); 6,74 (1H, t, *J*= 1,1 Hz); 6,96 (2H, dd, *J*= 2,7, 8,9 Hz); 7,42 (1H, t, *J*= 1,7 Hz); 8,03 (1H, t, *J*= 0,7 Hz); 8,15 (2H, dd, *J*= 2,7, 8,9 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 614 (M⁺, 1), 599 (1), 533 (3), 502 (10), 402 (39), 290 (14), 192 (47), 149 (82), 120 (97), 95 (100)

EMAR *m/z*: Observado 614,2388 (calculada para C₃₂H₃₈O₁₂ [M⁺]: 614,2363)



• Esterificación del derivado **6** con cloruro de 4-nitrobenzoilo



El derivado **6** (3,0 mg, 0,01 mmoles) se trató con cloruro de 4-nitrobenzoilo (0,1 ml, 0,76 mmoles, 76 eq) siguiendo el mismo procedimiento descrito para la obtención de **12**, obteniéndose 2,8 mg de **15** (R= 71%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-(4-nitrobenzoiloxi)-dihidro- β -agarofurano (**15**)

$[\alpha]_D^{20}$: +22,3° (*c* 0,13, CHCl₃)

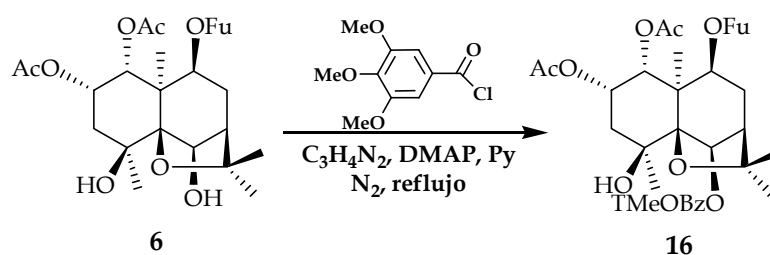
IR γ_{\max} (película): 3546, 2924, 2853, 1746, 1724, 1530, 1366, 1282, 1254, 1119, 1027, 760, 721 cm⁻¹

RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,52 (3H, s); 1,55 (3H, s); 1,56 (6H, s); 1,75 (3H, s); 2,04 (3H, s); 2,00-2,27 (3H, m); 2,39 (1H, m); 2,57 (1H, m); 3,09 (1H, s); 4,95 (1H, d, *J* = 6,7 Hz); 5,43 (1H, d, *J* = 3,5 Hz); 5,53 (1H, m); 5,74 (1H, s); 6,74 (1H, d, *J* = 1,6 Hz); 7,42 (1H, t, *J* = 1,6 Hz); 8,03 (1H, s); 8,32 (2H, dd, *J* = 1,9, 6,9 Hz); 8,41 (1H, dd, *J* = 1,9, 6,9 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 614 (M⁺-15, 1), 590 (7), 569 (12), 502 (12), 402 (40), 290 (15), 233 (16), 192 (49), 150 (72), 120 (70), 95 (100)

EMAR *m/z*: Observado 614,189 (calculado para C₃₀H₃₂N₁O₁₃ [M⁺-15]: 614,1874)

• Esterificación del derivado **6** con cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo



Siguiendo el procedimiento descrito para la obtención del derivado **1**, se trataron 4,2 mg de **6** (0,01 mmoles) con 20,0 mg del cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo (0,09 mmoles, 9 eq), obteniéndose 4,1 mg de **16** (R= 69%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-dihidro-β-agarofurano (**16**)

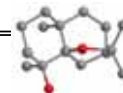
[α]_D²⁰: +18,0° (c 0,41, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3542, 2952, 2925, 2852, 1745, 1718, 1586, 1506, 1365, 1335, 1224, 1127, 761 cm⁻¹

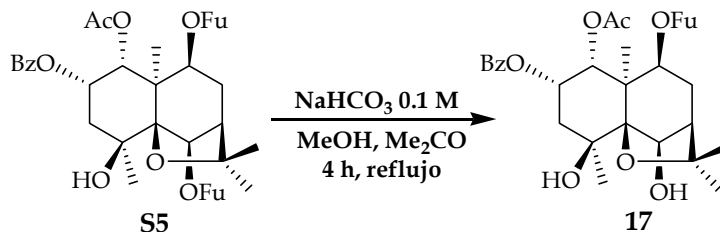
RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ: 1,51 (3H, s); 1,53 (3H, s); 1,54 (6H, s); 1,75 (3H, s); 1,98 (1H, m); 2,04 (3H, s); 2,12-2,24 (2H, m); 2,39 (1H, s); 2,56 (1H, m); 3,05 (1H, s); 3,90 (6H, s); 3,92 (3H, s); 4,95 (1H, d, *J* = 6,6 Hz); 5,42 (1H, d, *J* = 3,5 Hz); 5,52 (1H, m); 5,64 (1H, s); 6,74 (1H, d, *J* = 1,8Hz); 7,41 (1H, t, *J* = 3,4 Hz); 7,56 (2H, s); 8,03 (1H, s)

EM (IE) *m/z* (%): 674 (M⁺, 11), 659 (1); 547 (1), 322 (1), 212 (6), 195 (100), 123 (1), 97 (3), 95 (14)

EMAR *m/z*: Observado 674,2568 (calculado para C₃₄H₄₂O₁₄ [M⁺]: 674,2575)



• Hidrólisis regioselectiva de S5



Siguiendo el procedimiento general descrito para la obtención de **4**, se hidrolizaron 104,0 mg de **S5** (0,17 mmoles), obteniéndose 86,0 mg (R= 99,8%) de **17**, como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-acetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4,6-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano (17)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +60,0° (*c* 0,36, CHCl₃)

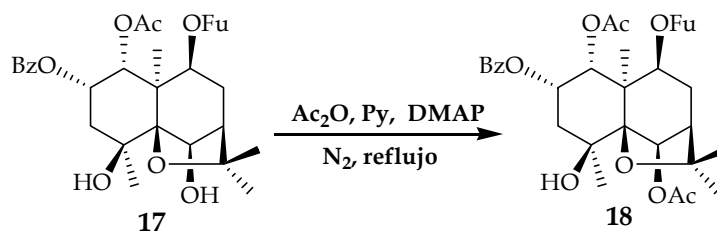
IR γ_{max} (película): 3433, 2928, 1720, 1366, 1277, 1233, 1105, 1025, 761, 711 cm⁻¹

RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,53 (3H, s); 1,58 (3H, s); 1,60 (3H, s); 1,70 (3H, s); 1,86 (3H, s); 2,08-2,35 (5H, m); 3,33 (1H, s); 4,58 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 4,88 (1H, d, *J*= 6,7 Hz); 4,99 (1H, d, *J*= 5,4 Hz); 5,53 (1H, d, *J*= 4,0 Hz); 5,81 (1H, m); 6,73 (1H, d, *J*= 1,6 Hz); 7,43 (2H, m); 7,50 (1H, d, *J*= 1,6 Hz); 7,59 (1H, m); 7,98 (1H, d, *J*= 7,4 Hz); 8,02 (1H, s)

EM (IE) *m/z* (%): 527 (M⁺-15, 6), 420 (5), 415 (11), 360 (1), 349 (3), 308 (3), 289 (3), 105 (100), 94 (63), 77 (21), 57 (26)

EMAR *m/z*: Observado 527,1852 (calculado para C₂₈H₃₁O₁₀ [M⁺-15]: 527,1917)

• Acetilación del derivado 17



Siguiendo el procedimiento general descrito para la obtención de 5, se acetilaron 3,0 mg de 17 (0,01 mmoles), obteniéndose 2,1 mg de 18 (R= 65%), como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,6-diacetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano (18)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +30,6° (*c* 0,16, CHCl₃)

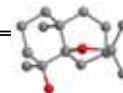
IR γ_{max} (película): 3547, 2925, 2853, 1723, 1368, 1275, 1236, 1099, 1070, 760, 712cm⁻¹

RMN ¹H

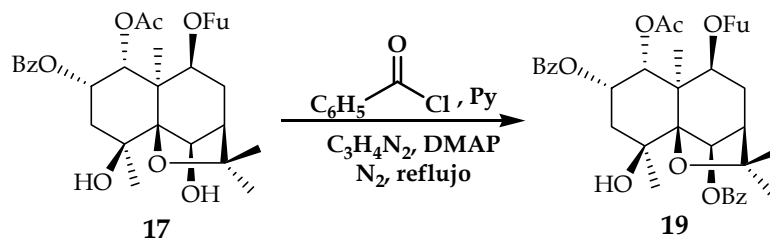
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,51 (3H, s); 1,56 (3H, s); 1,60 (3H, s); 1,61 (3H, s); 1,73 (3H, s); 2,14 (3H, s); 2,10-2,30 (4H, m); 2,50 (1H, m); 2,98 (1H, s); 4,91 (1H, d, *J* = 6,8 Hz); 5,51 (1H, d, *J* = 3,6 Hz); 5,64 (1H, s); 5,78 (1H, m); 6,74 (1H, d, *J* = 1,1 Hz); 7,42 (1H, d, *J* = 1,1 Hz); 6,74 (2H, m); 7,57 (1H, m); 7,97 (2H, dd, *J* = 1,2, 7,0 Hz); 8,03 (1H, s)

EM (IE) *m/z* (%): 569 (M⁺-15, 1), 542 (1), 524 (3), 457 (4), 420 (3), 402 (22), 192 (26), 149 (100), 105 (86), 94 (51), 57 (47)

EMAR *m/z*: Observado 569,1995 (calculado para C₃₀H₃₃O₁₁ [M⁺-15]: 569,2023)



• Benzoilación del derivado 17



Se benzoilaron 6,0 mg del producto 17 (0,01 mmoles), siguiendo la metodología descrita para la obtención de 1, lo que rindió 6,9 mg de 19 (R= 96%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-acetoxi-2,6-dibenzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano (19)

$[\alpha]_D^{20}$: 31,8° (*c* 0,69, CHCl₃)

IR γ_{\max} (película): 3546, 2926, 2855, 1719, 1452, 1312, 1276, 1144, 1109, 1070, 1024, 759, 712 cm⁻¹

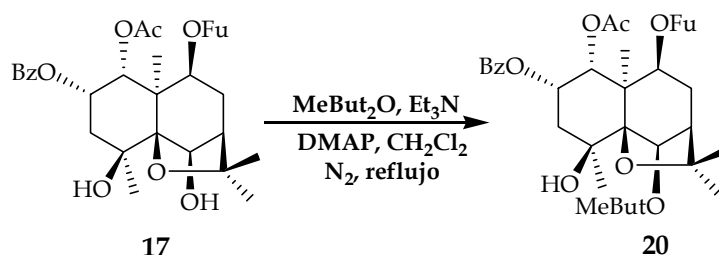
RMN ¹H

(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,54 (3H, s); 1,58 (3H, s); 1,64 (3H, s); 1,66 (3H, s); 1,74 (3H, s); 2,17-2,77 (3H, m); 2,40 (1H, s); 2,60 (1H, m); 3,19 (1H, s); 4,97 (1H, d, *J* = 6,6 Hz); 5,56 (1H, d, *J* = 3,5 Hz); 5,80 (1H, s); 5,82 (1H, m); 6,75 (1H, t, *J* = 1,1 Hz); 7,74- 7,61 (7H, m); 7,96 (2H, dd, *J* = 1,3, 7,1 Hz); 8,05 (1H, d, *J* = 1,1 Hz); 8,22 (2H, dd, *J* = 1,3, 7,1 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 631 (M⁺-15, 1), 519 (2), 412 (1), 308 (3), 230 (3), 212 (4), 172 (4), 122 (4), 105 (100), 95 (3), 77 (15)

EMAR *m/z*: Observado 631,2208 (calculada para C₃₅H₃₅O₁₁ [M⁺-15]: 631,2179)

• Esterificación del derivado 17 con anhídrido (S)-(+)-2-metilbutírico



El producto **17** (4,0 mg, 0,01 mmoles) se trató con anhídrido (S)-(+)-2-metilbutírico, siguiendo el mismo procedimiento descrito para la obtención de **9**, lo que rindió 3,2 mg de **20** (R= 69%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-acetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-[(S)-(+)-2-metilbutiroiloxi]-dihidro-β-agarofurano (**20**)

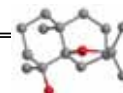
[α]²⁰_D: +6,3° (c 0,3, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3553, 2924, 2854, 1727, 1462, 1273, 1144, 1098, 1071, 1026, 800, 712 cm⁻¹

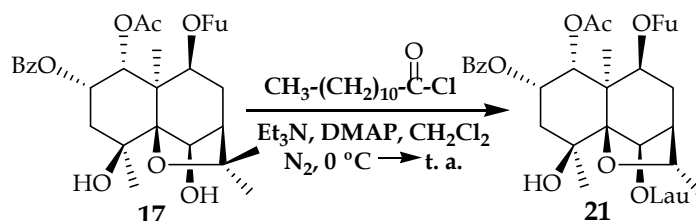
RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ: 0,91 (3H, t, *J*= 7,4 Hz); 1,20 (3H, d, *J*= 7,0 Hz); 1,51 (3H, s); 1,58 (6H, s); 1,62 (3H, s); 1,72 (3H, s); 1,74 (1H, m); 1,98-2,27 (4H, m); 2,44-2,50 (2H, m); 2,97 (1H, s); 4,92 (1H, d, *J*= 7,0 Hz); 5,52 (1H, d, *J*= 3,6 Hz); 5,69 (1H, s); 5,78 (1H, m); 6,73 (1H, s); 7,47 (3H, m); 7,58 (1H, m); 7,97 (2H, dd, *J*= 1,3, 7,0 Hz); 8,03 (1H, s)

EM (IE) *m/z* (%): 611 (M⁺-15, 4), 542 (2), 524 (1), 499 (7), 462 (1), 402 (43), 290 (8), 192 (25), 105 (100), 95 (66), 57 (83)

EMAR *m/z*: Observado 611,2467 (calculado para C₃₃H₃₉O₁₁ [M⁺-15]: 611,2492)



• Esterificación del producto 17 con cloruro de laurilo



El producto 17 (6,0 mg, 0,01 mmoles) se esterificó siguiendo el mismo procedimiento descrito para la obtención de 10, lo que rindió 4,3 mg de 21 (R= 54%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-acetoxi-2α-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6β-lauriloxi-dihidro-β-agarofurano (21)

$[\alpha]_{20D}^{20}$: +27,5° (*c* 0,43, CHCl₃)

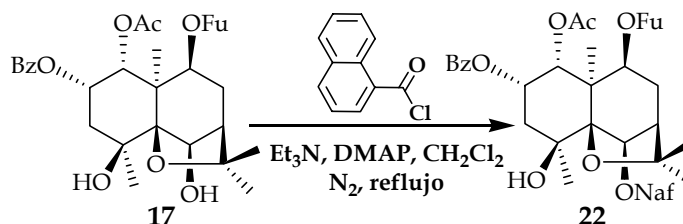
IR γ_{max} (película): 3554, 2925, 2854, 1724, 1311, 1273, 1228, 1160, 1106, 1070, 762, 711 cm⁻¹

RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 0,87 (3H, t, *J*= 6,2 Hz); 1,26 (14H, s); 1,51 (3H, s); 1,51-1,66 (4H, m); 1,56 (3H, s); 1,59 (3H, s); 1,67 (3H, s); 1,73 (3H, s); 2,15-2,50 (7H, m); 2,98 (1H, s); 4,92 (1H, d, *J*= 6,7 Hz); 5,51 (1H, d, *J*= 3,6 Hz); 5,66 (1H, s); 5,78 (1H, m); 6,74 (1H, t, *J*= 1,1 Hz); 7,46 (3H, m); 7,58 (1H, m); 7,97 (2H, dd, *J*= 1,2, 7,1 Hz); 8,03 (1H, t, *J*= 0,7 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 709 (M⁺-15, 4); 597 (7); 560 (1); 542 (1); 524 (3); 420 (6); 402 (56); 192 (4); 105 (100); 95 (59); 57 (32)

EMAR *m/z*: Observado 709,3531 (calculado para C₄₀H₅₃O₁₁ [M⁺-15]: 709,3588)

• Esterificación del derivado 17 con cloruro de 1-naftoilo



El derivado 17 (3,5 mg, 0,01 mmoles) se esterificó siguiendo el mismo procedimiento descrito para la obtención de 11, lo que rindió 3,1 mg de 16 (R= 71%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-acetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-(1-naftoiloxi)-dihidro- β -agarofurano (22)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +31,8° (*c* 0,28, CHCl₃)

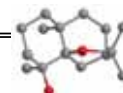
IR γ_{max} (película): 3434, 2924, 2853, 1724, 1366, 1277, 1244, 1134, 759, 712 cm⁻¹

RMN ¹H

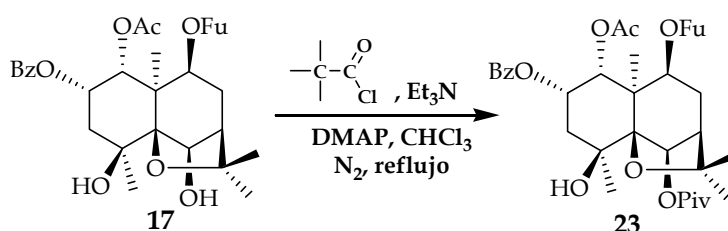
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,55 (3H, s); 1,59 (3H, s); 1,70 (3H, s); 1,71 (3H, s); 1,75 (3H, s); 2,04-2,33 (4H, m); 2,66 (1H, m); 3,24 (1H, s); 5,01 (1H, d, *J*= 6,6 Hz); 5,58 (1H, d, *J*= 3,6 Hz); 5,84 (1H, m); 5,99 (1H, s); 6,76 (1H, d, *J*= 1,6 Hz); 7,46 (3H, m); 7,56 (2H, m); 7,65 (1H, m); 7,90 (2H, m); 7,97 (2H, m); 8,05 (3H, m); 8,72 (1H, d, *J*= 7,3 Hz); 9,20 (1H, d, *J*= 8,7 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 681 (M⁺-15, 1), 569 (1), 533 (1), 420 (1), 402 (7), 155 (100), 127 (14), 105 (24)

EMAR *m/z*: Observado 681,2311 (calculado para C₃₉H₃₇O₁₁ [M⁺-15]: 681,2336)



• Esterificación del derivado 17 con cloruro de pivaloilo



El derivado **17** (3,0 mg, 0,01 mmoles) se trató con cloruro de pivaloilo, siguiendo el mismo procedimiento descrito para la obtención de **12**, rindiendo 2,9 mg de **23** (R= 84%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-acetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-pivaloiloxi-dihidro-β-agarofurano (**23**)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: +40,8° (*c* 0,25, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3553, 2958, 2925, 2853, 1722, 1366, 1313, 1275, 1231, 1118, 1106, 1068, 1026, 760, 712 cm⁻¹

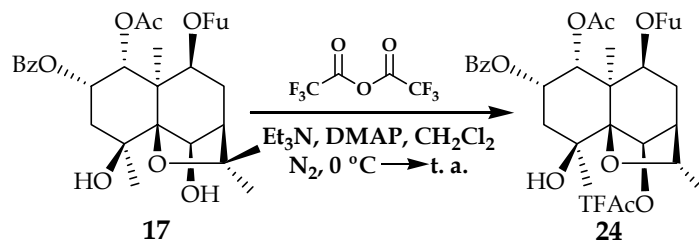
RMN ¹H

(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,25 (9H, s); 1,51 (3H, s); 1,58 (6H, s); 1,62 (3H, s); 1,72 (3H, s); 2,10-2,27 (4H, m); 2,50 (1H, m); 2,94 (1H, s); 4,92 (1H, d, *J* = 6,7 Hz); 5,52 (1H, d, *J* = 3,6 Hz); 5,69 (1H, s); 5,79 (1H, m); 6,74 (1H, d, *J* = 1,6 Hz); 7,44 (3H, m); 7,58 (1H, m); 7,97 (2H, dd, *J* = 1,3, 7,4 Hz); 8,03 (1H, s)

EM (IE) *m/z* (%): 611 (M⁺-15, 1), 499 (3), 402 (26), 290 (6), 192 (8), 105 (100), 95 (54), 57 (63)

EMAR *m/z*: Observado 611,2487 (calculado para C₃₃H₃₉O₁₁ [M⁺-15]: 611,2492)

• Esterificación del derivado 17 con anhídrido trifluoroacético



El producto 17 (5,0 mg) se trató con anhídrido trifluoroacético, siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de 13, obteniéndose 4,2 mg de 24 (R= 71%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-acetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-trifluoroacetoxi-dihidro-β-agarofurano (24)

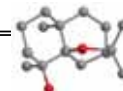
$[\alpha]_D^{20}$: +46,6° (*c* 0,36, CHCl₃)

IR γ_{max} (película): 3448, 2926, 2851, 1775, 1726, 1369, 1271, 1223, 1174, 1142, 1095, 1038, 760, 711 cm⁻¹

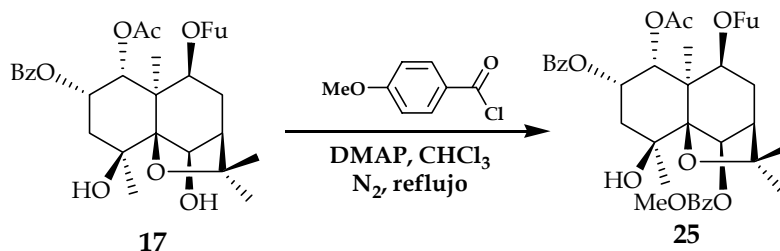
RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,51 (3H, s); 1,54 (3H, s); 1,67 (3H, s); 1,73 (3H, s); 2,07 (3H, s); 2,25-2,61 (4H, m); 3,29 (1H, dd, *J*= 3,3, 14,7 Hz); 4,96 (1H, d, *J*= 6,6 Hz); 5,63 (1H, d, *J*= 3,8 Hz); 5,73 (1H, s); 5,91 (1H, m); 6,74 (1H, d, *J*= 1,6 Hz); 7,45 (3H, m); 7,60 (1H, m); 7,94 (2H, dd, *J*= 1,3, 7,1 Hz); 8,04 (1H, s)

EM (IE) *m/z* (%): 638 (M⁺, 1), 623 (1), 499 (1), 457 (1), 363 (1), 345 (1), 307 (1), 289 (1), 231 (1), 173 (2), 137 (24), 105 (100), 95 (71)

EMAR *m/z*: Observado 623,1698 (calculado para C₃₀H₃₃O₁₁F₃ [M⁺-15]: 623,1740)



• Esterificación del derivado 17 con cloruro de 4-metoxibenzoilo



El derivado **17** (3,0 mg) se trató con cloruro de 4-metoxibenzoilo (0,1 ml), siguiendo el mismo procedimiento descrito para la obtención de **12**, obteniéndose 2,5 mg de **25** (R= 67%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-acetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-(4-metoxibenzoiloxi)-dihidro-β-agarofurano (**25**)

$[\alpha]_{D}^{20}$: +18,3° (*c* 0,18, CHCl₃)

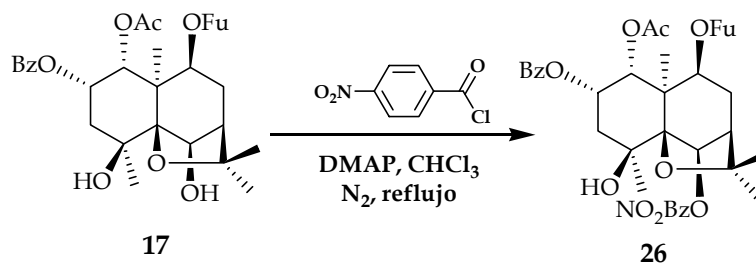
IR γ_{\max} (película): 3546, 2924, 2853, 1721, 1606, 1366, 1257, 1168, 1106, 1025, 760, 712 cm⁻¹

RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,53 (3H, s); 1,57 (3H, s); 1,63 (3H, s); 1,65 (3H, s); 1,74 (3H, s); 2,20-2,38 (4H, m); 2,58 (1H, m); 3,18 (1H, s); 3,86 (3H, s); 4,96 (1H, d, *J* = 6,3 Hz); 5,55 (1H, d, *J* = 3,6 Hz); 5,76 (1H, s); 5,81 (1H, m); 6,75 (1H, d, *J* = 1,4 Hz); 6,96 (2H, dd, *J* = 8,8, 1,9 Hz); 7,43 (3H, m); 7,55 (1H, m); 7,96 (2H, dd, *J* = 1,3, 7,1 Hz); 8,04 (1H, s); 8,17 (2H, dd, *J* = 8,8, 1,9 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 661 (M⁺-15, 1), 549 (2), 402 (11), 135 (100), 105 (18) 95 (68), 77 (12)

EMAR *m/z*: Observado 661,2241 (calculado para C₃₆H₃₇O₁₂ [M⁺-15]: 661,2285)

• Esterificación del derivado 17 con cloruro de 4-nitrobenzoilo



El producto **17** (6,0 mg) se trató con cloruro de 4-nitrobenzoilo (0,1 ml), siguiendo el mismo procedimiento descrito para la obtención de **12**, rindiendo 4,7 mg de **26** (R=62%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1-acetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-(4-nitrobenzoiloxi)-dihidro-β-agarofurano (26)

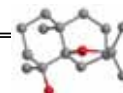
$[\alpha]^{20}_{\text{D}}$: +26,5° (*c* 0,47, CHCl₃).

IR γ_{max} (película): 3546, 2925, 2853, 1721, 1530, 1348, 1277, 1106, 1025, 760, 715 cm⁻¹

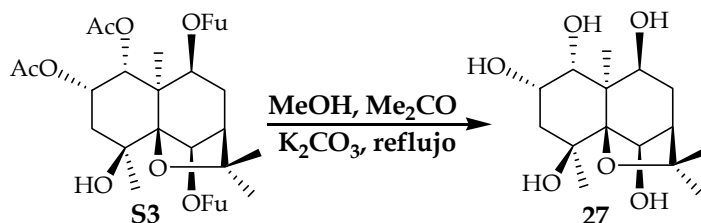
RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,56 (6H, s); 1,63 (3H, s); 1,67 (3H, s); 1,75 (3H, s); 2,18-2,60 (5H, m); 4,98 (1H, d, *J* = 6,7 Hz); 5,56 (1H, d, *J* = 3,6 Hz); 5,82 (2H, m); 6,76 (1H, d, *J* = 1,7 Hz); 7,44 (3H, m); 7,57 (1H, m); 7,96 (2H, d, *J* = 7,3 Hz); 8,05 (1H, s); 8,31 (2H, m); 8,42 (2H, d, *J* = 8,7 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 676 (M⁺-15, 1), 564 (6), 402 (49), 290 (11), 192 (42), 150 (29), 120 (20), 105 (100), 95 (68), 77 (12)

EMAR *m/z*: Observado 676,2014 (calculado para C₃₅H₃₄NO₁₃ [M⁺-15]: 676,2030)



• **Hidrólisis total de S3**



72,0 mg de **S3** (0,13 mmoles) se disolvieron en metanol (10,0 ml) y acetona (6,0 ml), se añadieron 300,0 mg de carbonato potásico (2,20 mmoles, 17 eq) y se calentó a reflujo durante 4 horas, hasta que se observó por cromatografía en capa fina que no quedaba producto de partida. El crudo de reacción se filtró, concentró a vacío y purificó por columna flash, usando como eluyente una mezcla de *n*-hexano y acetato de etilo en un gradiente de polaridad (del 30 al 100%), obteniéndose así 34,1 mg del sesquiterpeno totalmente hidrolizado **27** (R= 90 %) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-2,4-dihidroxi-celorbicol (27)

$[\alpha]^{20}_D$: -13,0° (*c* 0,50, EtOH)

IR γ_{max} (película): 3397, 2932, 1429, 1385, 1364, 1139, 1071, 922, 826 cm^{-1}

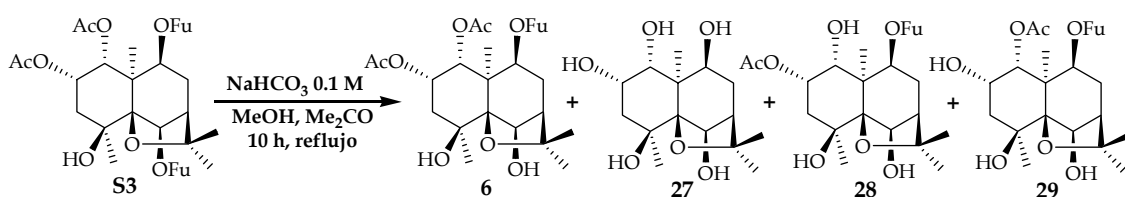
RMN 1H
($CDCl_3$, 300 MHz) δ : 1,28 (3H, s); 1,55 (3H, s); 1,63 (3H, s); 1,76 (3H, s); 1,88 (1H, dd, $J = 3,5, 14,5$ Hz); 2,04 (1H, dd, $J = 2,9, 14,5$ Hz); 2,11 (2H, m); 2,63 (1H, d, $J = 5,6$ Hz); 3,16 (1H; s); 3,51 (1H, m); 4,21 (1H, t, $J = 3,5$ Hz); 4,24 (1H, s); 4,45 (1H, d, $J = 5,6$ Hz); 4,98 (1H, d, $J = 5,6$ Hz)

RMN ^{13}C
($CDCl_3$, 75 MHz) δ : 20,8 (c); 25,4 (c); 26,9 (c); 30,1 (c); 32,6 (t); 43,5 (t); 50,5 (d); 51,0 (s); 69,2 (d); 70,8 (d); 72,7 (s); 73,6 (d); 79,4 (d); 84,6 (s); 92,6 (s)

EM (IE) m/z (%): 287 (M^+-15 , 100), 266 (17), 233 (15), 191 (29), 168 (74), 151 (21), 125 (24), 111 (66), 85 (33), 69 (31)

EMAR m/z : Observado 287,1479 (calculado para $C_{14}H_{23}O_6$ [M^+-CH_3]: 287,1495)

• Hidrólisis parcial de S3



Siguiendo la misma metodología que se utilizó para la obtención de **4**, pero en vez de 4 horas de agitación y reflujo, dejamos la reacción 10 horas para obtener derivados parcial y/o totalmente hidrolizados. Así, se hidrolizaron 110,0 mg de **S3** (0,19 mmoles) obteniéndose 39,0 mg de **6** (R= 42%), 9,0 mg de **27** (R= 17%), 8,4 mg de **28** (R= 10%) y 4,5 mg de **29** (R= 6%).

Los datos experimentales de los productos **6** y **27** se han presentado anteriormente, en las páginas: 260 y 281, respectivamente.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-2-acetoxi-9-(3-furoiloxi)-1,4,6-trihidroxi-dihidro-β-agarofurano (28**)**

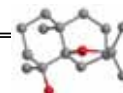
$[\alpha]_D^{20}$: -16,8° (*c* 0,25, CHCl₃)

IR γ_{\max} (película): 3400, 2923, 1852, 1723, 1308, 1250, 1158, 1137, 1004, 977, 760 cm⁻¹

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,35 (3H, s); 1,56 (3H, s); 1,57 (3H, s); 1,58 (3H, s); 1,73-1,81 (2H, m); 2,01 (1H, d, *J* = 3,2 Hz); 2,09 (3H, s); 2,14-2,27 (2H, m); 3,25 (1H, s); 4,38 (1H, d, *J* = 4,3 Hz); 4,54 (1H, d, *J* = 5,4 Hz); 4,94 (2H, m); 5,27 (1H, m); 6,75 (1H, d, *J* = 1,7 Hz); 7,44 (1H, t, *J* = 1,7 Hz); 8,03 (1H, s)

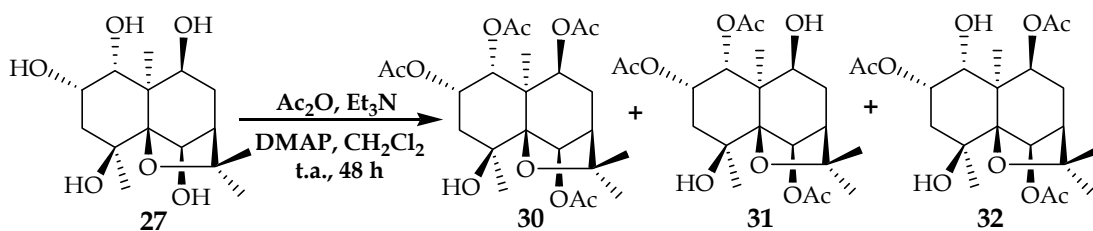
EM (IE) *m/z* (%): 423 (M⁺-15, 19); 405 (21), 345 (4), 233 (15), 215 (4), 205 (7), 191 (18), 179 (38), 167 (10), 137 (11), 99 (16), 95 (100), 71 (9), 69 (27)

EMAR *m/z*: Observado 423,1661 (calculado para C₂₁H₂₇O₉ [M⁺-15]: 423,1655)



(1<i>R</i>,2<i>S</i>,4<i>S</i>,5<i>S</i>,6<i>S</i>,7<i>R</i>,9<i>S</i>,10<i>R</i>)-1-acetoxi-9-(3-furoiloxi)-2,4,6-trihidroxi-dihidro-β-agarofurano (29)	
[α] ²⁰ _D :	+8,3° (c 0,30, CHCl ₃)
IR γ _{max} (película):	3441, 2927, 2855, 1725, 1368, 1313, 1242, 1141, 1077, 978, 760 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) δ:	1,46 (3H, s); 1,50 (3H, s); 1,58 (6H, s); 1,66-1,77 (1H, m); 1,82 (3H, s); 2,03 (2H, m); 2,06 (1H, s); 2,19-2,31 (1H, m); 3,23 (1H, s); 4,36 (1H, m); 4,54 (1H, d, <i>J</i> = 5,2 Hz); 4,86 (1H, d, <i>J</i> = 6,8 Hz); 5,06 (1H, d, <i>J</i> = 5,2 Hz); 5,33 (1H, d, <i>J</i> = 3,4 Hz); 6,73 (1H, s); 7,41 (1H, d, <i>J</i> = 1,3 Hz); 8,00 (1H, s)
EM (IE) <i>m/z</i> (%):	423 (M ⁺ -15, 5), 405 (4), 353 (8), 308 (4), 293 (5), 248 (10), 230 (12), 215 (11), 205 (12), 191 (15), 151 (20), 109 (36), 95 (100), 69 (57)
EMAR <i>m/z</i> :	Observado 423,1665 (calculado para C ₂₁ H ₂₇ O ₉ [M ⁺ -15]: 423,1655)

• Acetilación del sesquiterpeno totalmente hidrolizado **27**



A una disolución de 30,0 mg de **27** (0,10 mmoles), 3,0 ml de trietilamina (3,24 mmoles, 32 eq) y 6 ml de CH_2Cl_2 , se le añadió 1,8 ml de anhídrido acético (3,82 mmoles, 38 eq) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina; la mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante 48 horas, hasta comprobar por capa fina que no quedaba producto de partida. Posteriormente, se le añadieron 3,0 ml de etanol, se dejó agitando a temperatura ambiente durante 45 minutos y se llevó a sequedad, purificándose el crudo de reacción mediante placa preparativa eluida con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Me}_2\text{CO}$ (9:1). Se obtuvieron así 15,0 mg de **30** (R= 40%), 16,4 mg de **31** (R= 39%) y 8,6 mg de **32** (R= 20%).

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2,6,9-tetraacetoxi-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano (**30**)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -15,2° (*c* 0,84, CHCl_3)

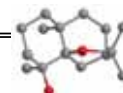
IR γ_{max} (película): 3467, 3025, 2952, 2925, 1743, 1646, 1368, 1241, 983, 874, 755 cm^{-1}

RMN ^1H
(CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1,44 (3H, s); 1,48 (3H, s); 1,49 (3H, s); 1,52 (3H, s); 1,89 (3H, s); 2,00-2,16 (4H, m); 1,98 (3H, s); 2,04 (3H, s); 2,10 (3H, s); 2,35 (1H, m); 2,92 (1H, s); 4,69 (1H, d, $J = 6,5$ Hz); 5,37 (1H, d, $J = 3,6$ Hz); 5,42 (1H, m); 5,56 (1H, s)

RMN ^{13}C
(CDCl_3 , 75 MHz) δ : 20,7 (c); 21,1 (c); 21,3 (2 x c); 21,6 (c); 25,2 (c); 25,5 (c); 29,8 (c); 31,2 (t); 42,0 (t); 49,1 (d); 51,0 (s); 68,7 (d); 69,6 (d); 69,8 (s); 71,8 (d); 79,3 (d); 84,6 (s); 91,3 (s); 169,8 (s); 169,9 (s); 170,1 (s); 170,4 (s)

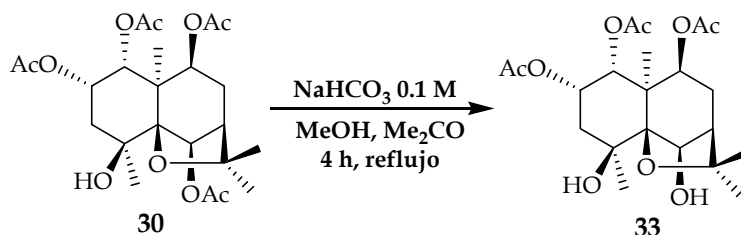
EM (IE) m/z (%): 470 (M^+ , 1), 455 (12), 428 (12), 395 (15), 350 (100), 308 (12), 293 (15), 248 (16), 233 (43), 191 (40), 168 (62), 109 (65), 95 (54), 69 (86)

EMAR m/z : Observado 470,2169 (calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$ [M^+]: 470,2152)



(1<i>R</i>,2<i>S</i>,4<i>S</i>,5<i>S</i>,6<i>S</i>,7<i>R</i>,9<i>S</i>,10<i>R</i>)-1,2,6-triacetoxi-4,9-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano (31)	
[α] ²⁰ _D :	-12,4° (<i>c</i> 0,59, CHCl ₃)
IR γ _{max} (película):	3538, 2926, 2854, 1741, 1367, 1244, 1032, 755 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) δ:	1,37 (3H, s); 1,48 (3H, s); 1,57 (3H, s); 1,65 (3H, s); 1,98-2,29 (4H, m); 2,00 (3H, s); 2,06 (3H, s); 2,11 (3H, s); 2,28 (1H, t, <i>J</i> = 3,4 Hz); 3,40 (1H, s ancho); 5,35 (1H, d, <i>J</i> = 3,5 Hz); 5,48 (1H, m); 5,56 (1H, s)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ:	20,7 (c); 20,9 (c); 21,1 (c); 21,6 (c); 25,2 (c); 26,1 (c); 29,6 (c); 32,5 (t); 42,1 (t); 49,4 (d); 51,1 (s); 69,1 (d, s); 69,8 (d, s); 72,8 (d); 79,5 (d); 85,7 (s); 93,1 (s); 169,8 (s); 170,0 (s); 170,3 (s)
EM (IE) <i>m/z</i> (%):	413 (M ⁺ -15, 10), 395 (30), 350 (42), 308 (72), 290 (42), 233 (50), 191 (54), 168 (100), 111 (56), 99 (46), 69 (63)
EMAR <i>m/z</i> :	Observado 413,1846 (calculado para C ₂₀ H ₂₉ O ₉ [M ⁺ -15]: 413,1812)
(1<i>R</i>,2<i>S</i>,4<i>S</i>,5<i>S</i>,6<i>S</i>,7<i>R</i>,9<i>S</i>,10<i>R</i>)-2,6,9-triacetoxi-1,4-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano (32)	
[α] ²⁰ _D :	-22,3° (<i>c</i> 0,30, CHCl ₃)
IR γ _{max} (película):	3522, 2954, 2925, 2853, 1736, 1387, 1240, 1170, 1099, 875, 755 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) δ:	1,24 (3H, s); 1,31 (3H, s); 1,43 (3H, s); 1,51 (3H, s); 1,94-2,26 (3H, m); 2,07 (6H, s); 2,11 (3H, s); 2,21 (1H, s); 2,38 (1H, m); 2,93 (1H, s); 4,31 (1H, m); 4,75 (1H, d, <i>J</i> = 6,8 Hz); 5,23 (1H, m); 5,52 (1H, s)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ:	19,6 (c); 21,1 (c); 21,2 (c); 21,4 (c); 25,1 (c); 25,4 (c); 29,5 (c); 30,9 (t); 41,9 (t); 48,8 (d); 52,0 (s); 67,6 (d); 69,6 (s); 72,0 (d); 72,7 (d); 79,4 (d); 84,1 (s); 92,1 (s); 168,8 ((s); 169,5 (s); 170,3 (s)
EM (IE) <i>m/z</i> (%):	413 (M ⁺ -15, 18), 395 (8), 350 (24), 308 (28), 290 (25), 233 (47), 209 (47), 191 (60), 168 (68), 109 (73), 85 (69) 69 (100)
EMAR <i>m/z</i> :	Observado 413,1794 (calculado para C ₂₀ H ₂₉ O ₉ [M ⁺ -15]: 413,1812)

• **Hidrólisis regioselectiva de 30**



Seguendo el procedimiento descrito para la obtención del producto **4**, hidrolizamos 7,0 mg del producto **30** (0,01 mmoles), obteniendo 4,2 mg del producto **33** (R= 66%), como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2,9-triacetoxi-4,6-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano (**33**)

$[\alpha]_D^{20}$: -22,6° (c 0,34, CHCl₃)

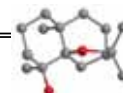
IR γ_{max} (película): 3516, 2958, 2926, 1735, 1367, 1240, 1141, 1026, 874, 756 cm⁻¹

RMN ¹H

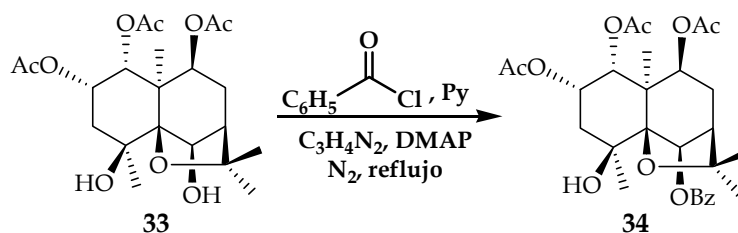
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,41 (3H, s); 1,52 (3H, s); 1,58 (3H, s); 1,77 (3H, s); 1,91 (3H, s); 1,98-2,23 (5H, m); 1,99 (3H, s); 2,07 (3H, s); 3,26 (1H, s); 4,50 (1H, d, *J* = 5,1 Hz); 4,65 (1H, d, *J* = 6,5 Hz); 4,92 (1H, d, *J* = 5,1 Hz); 5,40 (1H, d, *J* = 3,8 Hz); 5,47 (1H, dd, *J* = 3,5, 7,0 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 413 (M⁺-15, 9), 395 (5), 350 (20), 308 (38), 290 (16), 233 (22), 209 (17), 191 (56), 168 (68), 109 (65), 85 (46) 69 (100)

EMAR *m/z*: Observado 413,1872 (calculado para C₂₀H₂₉O₉ [M⁺-15]: 413,1812)



• Benzoilación del derivado **33**



Seguendo el procedimiento para la obtención del producto **1**, benzoilamos 3,5 mg de **33** (0,01 mmoles), obteniendo 2,4 mg de **34** (R= 55%) como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2,9-triacetoxi-6-benzoiloxy-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano (**34**)

$[\alpha]_D^{20}$: +4,0° (*c* 0,30, CHCl₃)

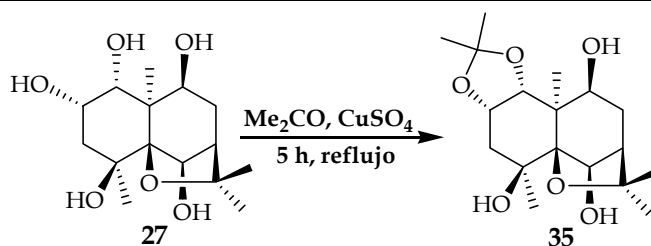
IR γ_{\max} (película): 3551, 2957, 2923, 2854, 1739, 1462, 1257, 1111, 1072, 1026, 801 cm⁻¹

RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,15 (3H, s); 1,33 (3H, s); 1,35 (3H, s); 1,44 (3H, s); 1,70 (3H, s); 1,96-2,11 (3H, m); 2,04 (3H, s); 2,09 (3H, s); 2,32 (1H, s); 2,48 (1H, m); 3,12 (1H, s); 4,76 (1H, d, *J* = 6,4 Hz); 5,42 (1H, d, *J* = 3,6 Hz); 5,45 (1H, m); 5,70 (1H, s); 7,55 (2H, m); 7,70 (1H, m); 8,20 (2H, dd, *J* = 1,4, 7,1 Hz)

EM (IE) *m/z* (%): 517 (M⁺-15, 5), 457 (7), 350 (39), 322 (11), 290 (6), 233 (6), 191 (4), 173 (6), 105 (100), 69 (11), 57 (21)

EMAR *m/z*: Observado 517,2089 (calculado para C₂₇H₃₃O₁₀ [M⁺-15]: 517,2074)

• Preparación del cetal de 27



Una mezcla de 30,0 mg de **27** (0,10 mmoles) y 9,0 ml de acetona seca, se colocó bajo atmósfera de nitrógeno y se le añadió 300,0 mg de sulfato de cobre anhidro (1,88 mmoles, 19 eq). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 5 horas, hasta que se observó por capa fina que no quedaba producto de partida, filtrando posteriormente el crudo de reacción y llevándolo a sequedad. Se purificó mediante cromatografía en placa preparativa eluida con una mezcla *n*-hexano:AcOEt (7:3), obteniéndose 32,0 mg de **35** (R= 94%) como una sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-4,6,9-trihidroxi-1,2-isopropilidendioxi-dihidro- β -agarofurano (**35**)

$[\alpha]_{20}^D$: -41,9° (*c* 0,70, EtOH)

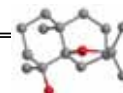
IR γ_{\max} (película): 3447, 2976, 2937, 1384, 1365, 1220, 1145, 1126, 1020, 956, 878 cm^{-1}

RMN ^1H
(CDCl_3 , 400 MHz) δ : 1,34 (3H, s); 1,35 (3H, s); 1,41 (3H, s); 1,53 (3H, s); 1,54 (3H, s); 1,70 (3H, s), 1,92 (1H, dd, $J = 2,4, 10,8$ Hz); 2,02 (1H, m); 2,06 (1H, d, $J = 11,0$ Hz); 2,15 (1H, s); 2,18 (1H, m); 3,41 (1H, s); 3,43 (1H, m); 4,19 (1H, s); 4,28 (1H, d, $J = 2,4$ Hz); 4,33 (1H, d, $J = 4,1$ Hz); 4,63 (1H, d, $J = 4,1$ Hz)

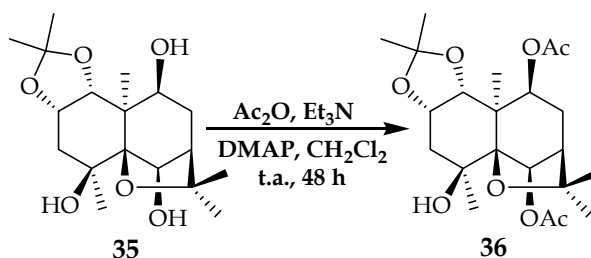
RMN ^{13}C
(CDCl_3 , 75 MHz) δ : 22,4 (c); 22,6 (c); 26,1 (c); 26,2 (c); 26,7 (c); 29,8 (c); 30,7 (t); 45,7 (t); 48,8 (s); 50,5 (d); 68,2 (d); 69,6 (d); 72,8 (d); 73,2 (s); 78,7 (d); 82,6 (s); 91,3 (s); 102,9 (s)

EM (FAB) m/z (%): 365 (M^{++23} , 15), 325 (6), 267 (7), 218 (10), 154 (56), 136 (80), 109 (24), 95 (40), 83 (43), 69 (100), 55 (91)

EMAR m/z : Observado 365,1921 (calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{Na}$ [M^{++23}]: 365,1940)



• Acetilación del derivado 35



Siguiendo el procedimiento descrito para la acetilación del sesquiterpeno totalmente hidrolizado **27**, se acetilaron 6,0 mg del producto **35** (0,02 mmoles), obteniéndose tras 48 horas de reacción 5,5 mg del producto diacetilado **36** (R= 74%), como un sólido amorfo.

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-6,9-diacetoxi-4-hidroxi-1,2-isopropilidendioxi-dihidro- β -agarofurano (**36**)

$[\alpha]_D^{20}$: -15,9° (*c* 0,55, CHCl₃)

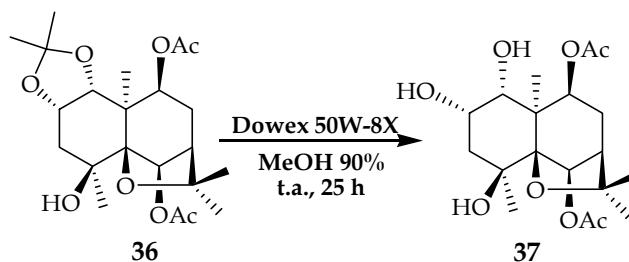
IR γ_{\max} (película): 3539, 2997, 2929, 2847, 1741, 1381, 1366, 1246, 1228, 1143, 881, 755 cm⁻¹

RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 1,37 (6H, s); 1,39 (3H, s); 1,40 (3H, s); 1,48 (3H, s); 1,56 (3H, s); 1,63-2,11 (4H, m); 2,05 (3H, s); 2,11 (3H, s); 2,39 (1H, m); 3,15 (1H, s); 3,46 (1H, d, *J* = 6,7 Hz); 4,38 (1H, d, *J* = 2,2 Hz); 5,21 (1H, m); 5,39 (1H, s)

EM (IE) *m/z* (%): 426 (M⁺, 1), 408 (7), 350 (11), 308 (19), 270 (21), 265 (19), 248 (16), 205 (19), 168 (100), 150 (25), 135 (23), 111 (59), 95 (33), 69 (38), 59 (47)

EMAR *m/z*: Observado 426,2248 (calculado para C₂₂H₃₄O₈ [M⁺]: 426,2254)

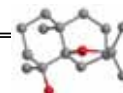
• Ruptura del cetal 36



A una disolución de 4,5 mg del producto **36** (0,01 mmoles) en 3,0 ml de MeOH al 90% se le añadieron 4,0 mg de Dowex 50 W-8X (0,08 mmoles, 8 eq), dejando la mezcla de reacción en agitación a temperatura ambiente durante 25 horas. Posteriormente, se filtró y se llevó a sequedad, purificando la mezcla mediante cromatografía en placa preparativa usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:Et₂O (9:1), obteniéndose 3,8 mg del producto **37** (R= 93%) como un sólido amorfo.

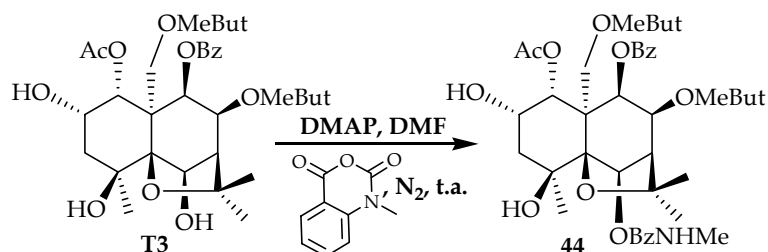
(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-6,9-diacetoxi-1,2,4-trihidroxi-dihidro-β-agarofurano (37)

[α] ²⁰ _D :	-11,8° (c 0,38, CHCl ₃)
IR γ _{max} (película):	3526, 2925, 2853, 1736, 1435, 1367, 1247, 1146, 1101, 1031, 756 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) δ:	1,50 (3H, s); 1,55 (3H, s); 1,64 (6H, s); 1,99 (2H, m); 2,10 (3H, s); 2,11 (3H, s); 2,27 (2H, m); 2,34 (1H, m); 2,93 (1H, s); 3,56 (1H, d, <i>J</i> = 6,2 Hz); 4,41 (1H, d, <i>J</i> = 3,4 Hz); 5,28 (1H, m); 5,49 (1H, s)
EM (IE) <i>m/z</i> (%):	371 (M ⁺ -15, 10), 353 (28), 308 (27), 293 (10), 265 (15), 233 (27), 210 (54), 191 (36), 168 (100), 149 (34), 111 (71), 99 (37), 85 (54), 69 (48)
EMAR <i>m/z</i> :	Observado 371,1718 (calculado para C ₁₈ H ₂₇ O ₈ [M ⁺ -15]: 371,1706)



5.3.4.4. Marcaje con un grupo fluorescente para el estudio del mecanismo de acción de estos sesquiterpenos como inhibidores de la Pgp.

• **Esterificación con anhídrido *N*-metilisatoico de T3**



Una disolución 6,0 mg del sesquiterpeno **T3** (0,01 mmoles), aislado de *Crossopetalum tonduzzi*, en 1,5 ml en *N,N*-dimetilformamida seca, se colocó bajo atmósfera de nitrógeno y se le añadieron 4,0 mg de anhídrido *N*-metilisatoico (MIA) (0,02 mmoles, 2eq) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina. Tras agitar durante 18 horas a temperatura ambiente, se añadió 3,0 ml de etanol y se dejó agitando durante 30 minutos, llevándolo posteriormente a sequedad. El crudo de reacción se purificó mediante placa preparativa, utilizando como eluyente una mezcla de *n*-hexano:AcOEt (1:1), obteniéndose 2,6 mg del producto **44** (R= 36%), como un sólido amorfo, quedando 2,8 mg del producto de partida sin reaccionar.

1 α -acetoxi-9 β -benzoiloxi-2 α ,4 β -dihidroxi-8 β ,15-di-(2-metilbutiroiloxi)-6 β -(2-*N*-metilaminobenzoiloxi)-dihidro- β -agarofurano (44**)**

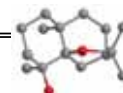
$[\alpha]_D^{20}$: +40,0° (*c* 0,16, CHCl₃)

IR γ_{\max} (película): 3525, 3385, 2960, 2925, 2854, 1732, 1681, 1580, 1368, 1263, 1239, 1154, 1094, 1031, 755, 712 cm⁻¹

RMN ¹H

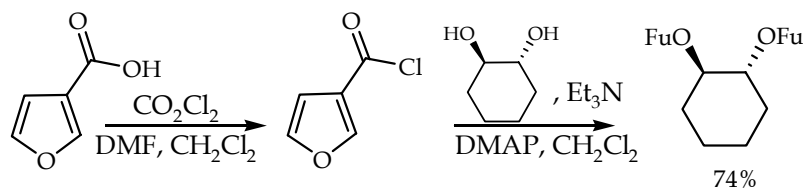
(CDCl₃, 300 MHz) δ : 0,58 (3H, t, *J* = 7,4 Hz); 0,87 (3H, d, *J* = 7,0 Hz); 0,95 (3H, t, *J* = 7,4 Hz); 1,33 (3H, d, *J* = 6,8 Hz); 1,38 (3H, s); 1,56 (3H, s); 1,64 (3H, s); 1,71 (3H, s); 1,82 (2H, m); 2,08 (2H, m); 2,21 (1H, m); 2,71 (1H, d, *J* = 3,4 Hz); 2,77 (1H, m); 2,91 (3H, d, *J* = 5,0 Hz); 4,16 (1H, d, *J* = 2,7 Hz); 4,86 (1H, d_{AB}, *J* = 13,4 Hz); 5,06 (1H, d_{AB}, *J* = 13,4 Hz); 5,49 (1H, d, *J* = 2,9 Hz); 5,84 (1H, dd, *J* = 3,4, 9,8 Hz); 6,14 (1H, d, *J* = 9,8 Hz); 6,50 (1H, s); 6,63 (2H, m); 7,45 (3H, m); 7,57 (1H, d, *J* = 7,6 Hz); 7,70 (1H, d, *J* = 5,6 Hz); 7,94 (2H, dd, *J* = 1,2, 8,3 Hz); 8,18 (1H, dd, *J* = 1,4, 7,9 Hz)

RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ	11,1 (c); 11,7 (c); 16,1 (c); 16,8 (c); 21,0 (c); 24,7 (c); 25,8 (c); 26, 2 (t); 26,6 (t); 29,5 (c); 31,9 (c); 41,1 (d); 41,6 (d); 44,3 (t); 51,7 (s); 52,1 (d); 62,1 (t); 67,5 (s); 69,9 (d); 73,8 (d); 75,6 (d); 84,0 (s); 78,1 (d); 92,2 (s); 109,5 (s); 110,7 (d); 114,9 (d); 128,6 (2x d); 129,6 (2x d; s); 132,7 (d); 133,4 (d); 135,0 (d); 152,0 (s); 165,9 (s); 167,2 (s); 169,7 (s); 175,2 (s); 176,3 (s)
EM (IE) <i>m/z</i> (%):	781 (M ⁺ , 1), 691 (1), 675 (1), 663 (1), 569 (1), 394 (1), 369 (1), 322 (3), 283 (1), 250 (1), 221 (2), 191 (1), 136 (15), 109 (20), 81 (38), 57 (100)
EMAR <i>m/z</i> :	Observado 781,3671 (calculado para C ₄₂ H ₅₅ NO ₁₃ [M ⁺]: 781,3673)



5.3.4.5. Derivados preparados al objeto de determinar la configuración absoluta de los sesquiterpenos aislados de los frutos de *Maytenus cuzcoina* y sus derivados.

• **Obtención del di-furoato del (1*S*,2*S*)-*trans*-ciclohexan-diol**

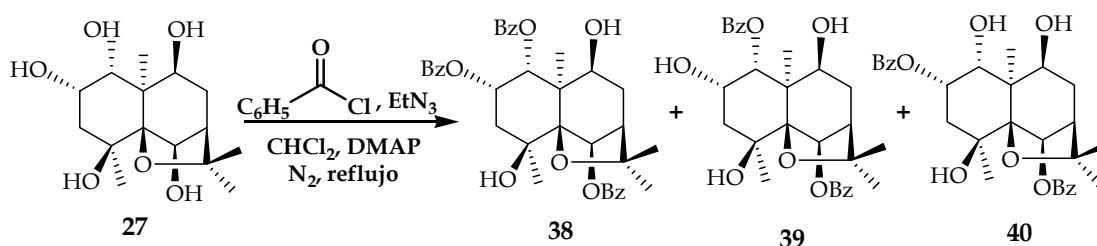


A una disolución de 224,0 mg de ácido 3-furoico (2,00 mmoles) en 8,0 ml de diclorometano seco y una gota de dimetilformamida (DMF), se le añadió 0,4 ml de cloruro de oxalilo (4,00 mmoles, 2 eq). La mezcla se dejó agitando en atmósfera inerte y en oscuridad durante 24 horas. El disolvente fue evaporado a baja presión reducida y el residuo lavado 3 veces con diclorometano seco. A continuación, se añadieron 100 mg del cloruro del ácido obtenido (0,77 mmoles, 3 eq) a una disolución de 28,2 mg de (1*S*,2*S*)-*trans*-ciclohexano-diol (0,24 mmoles) en 2,0 ml de diclorometano seco, 0,1 ml de trietilamina (1,07 mmoles, 5 eq) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (DMAP). La mezcla se agitó en atmósfera inerte durante 20 horas hasta observar por placa de capa fina que no quedaba producto de partida, adicionándole entonces 3,0 ml de agua y extrayendo 3 veces con diclorometano. Se reunieron las fases orgánicas y lavaron dos veces con una disolución de bicarbonato sódico al 10%, secando posteriormente con sulfato magnésico anhidro, filtrando y llevando a sequedad. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en placa preparativa de gel de sílice eluída con CH₂Cl₂:Me₂CO (9:1), obteniéndose 54,9 mg del difuroato (R= 74%) como un sólido amorfo.

(1*S*,2*S*)-*t*-di-(3-furoiloxi)-ciclohexano

[α] ²⁰ _D :	+2,75° (c 1,1, CHCl ₃)
UV (EtOH) λ_{\max} (log ϵ):	284 (1,7), 235 (2,5), 205 (2,8) nm
IR γ_{\max} (película):	2942, 2982, 1722, 1582, 1325, 1306 1172, 997, 760 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) δ :	1,46 (6H, m); 1,81 (2H, m); 2,17 (2H, m); 5,07 (2H, m); 6,67 (2H, s); 7,36 (2H, s); 7,98 (2H, s)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ :	23,5 (2 x t); 30,2 (2 x t); 73,9 (2 x d); 109,7 (2 x d); 119,2 (2 x s); 143,6 (2 x d); 147,8 (2 x d); 162,5 (2 x s)
EM (IE) m/z (%):	306 (M ⁺ , 1), 305 (1), 304 (6), 206 (1), 192 (17), 113 (1), 95 (100)
EMAR m/z :	Observado 306,1088 (calculado para C ₁₆ H ₁₈ O ₆ [M ⁺]: 306,1103)

• **Benzoilación parcial del sesquiterpeno totalmente hidrolizado 27**



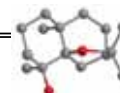
A una disolución de 30,0 mg (0,10 mmoles) de **27** en 4,0 ml de diclorometano seco y bajo atmósfera de nitrógeno, se le añadió 0,2 ml de trietilamina seca (2,14 mmoles, 21 eq) 0,2 ml de cloruro de benzoilo (1,10 mmoles, 11 eq) y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (DMAP). La mezcla se agitó a reflujo durante 45 minutos hasta observar por cromatografía de capa fina que no quedaba producto de partida. A continuación, se añadió EtOH (0,5 ml) y se dejó agitando durante 30 minutos a temperatura ambiente; se extrajo dos veces con diclorometano y una con acetato de etilo, se reunieron las fases orgánicas, secaron sobre sulfato magnésico anhidro, filtraron y se eliminó el disolvente a vacío. Posteriormente, el residuo se resuspendió en 2,0 ml de éter dietílico y se añadieron 128,0 mg de fluoruro potásico (2,2 mmoles, 22 eq), dejando la mezcla de reacción en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtró a través de una capa de celita y se llevó a sequedad. La mezcla se purificó mediante una columna cromatográfica de gel de sílice de capa fina, eluida con una mezcla de CH₂Cl₂ y Me₂CO con un gradiente (1% al 20%), lo que rindió tres productos: **38** (29,5 mg, R= 48%), **39** (18,5 mg, R= 36%) y **40** (7,6 mg, R= 15%).

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2,6-tribenzoiloxi-4,9-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano (**38**)

[α]_D²⁰: +20,0° (c 0,76, CHCl₃)

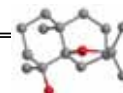
IR γ_{max} (película): 3535, 2925, 2853, 1720, 1452, 1314, 1278, 1143, 1113, 1027, 756, 712 cm⁻¹

RMN ¹H
(CDCl₃, 300 MHz) δ: 1,63 (3H, s); 1,65 (3H, s); 1,71 (3H,s); 1,74 (3H, s); 2,30 (2H, m); 2,38 (1H, m); 2,45 (1H, s); 2,20 (1H, m); 2,69 (1H, s ancho); 3,08 (1H, s ancho); 3,61 (1H, s ancho); 5,82 (1H, d, J= 3,7 Hz); 5,85 (1H, s); 5,92 (1H, m); 7,35-7,56 (9H, m); 7,93 (4H, m); 8,22 (2H, m)

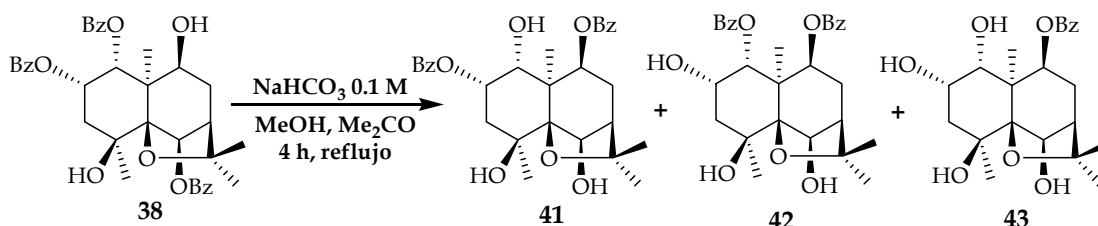


RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ:	21,4 (c); 25,1 (c); 25,9 (c); 29,5 (c); 32,4 (t); 42,3 (t); 49,3 (d); 51,4 (s); 69,8 (d); 70,0 (s); 70,3 (d); 72,7 (d); 80,0 (d); 85,6 (s); 92,8 (s); 128,1 (2 x d); 128,3 (d); 128,4 (2 x d); 129,0 (s); 129,3 (2 x d); 129,4 (2 x d); 129,5 (s); 129,8 (s); 129,9 (2 x d); 132,8 (d); 132,9 (d); 133,2 (d); 165,3 (s); 165,5 (s); 165,9 (s)
EM (IE) <i>m/z</i> (%):	581 (M ⁺ -15-18, 2), 474 (1), 434 (3), 370 (14), 327 (7), 272 (3), 205 (3), 105 (100), 77 (15)
EMAR <i>m/z</i> :	Observado 581,2211 (calculado para C ₃₅ H ₃₃ O ₈ [M ⁺ -CH ₃ -H ₂ O]: 581,2175)
(1<i>R</i>,2<i>S</i>,4<i>S</i>,5<i>S</i>,6<i>S</i>,7<i>R</i>,9<i>S</i>,10<i>R</i>)-1,6-dibenzoiloxi-2,4,9-trihidroxi-dihidro-β-agarofurano (39)	
[α] _D ²⁰ :	+12,6° (c 1,51, CHCl ₃)
IR γ _{max} (película):	3517, 1065, 3024, 2829, 1711, 1601, 1585, 1450, 1348, 1277, 1114, 1052, 755, 713 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) δ:	1,56 (3H, s); 1,62 (3H, s); 1,63 (3H, s); 1,64 (3H, s); 2,10 (2H, m); 2,40 (3H, m); 3,54 (1H, s); 4,49 (1H, m); 5,58 (1H, d, <i>J</i> = 3,3 Hz); 5,77 (1H, s); 7,49 (4H, m); 7,58 (2H, m); 8,05 (2H, d, <i>J</i> = 7,0 Hz); 8,20 (2H, d, <i>J</i> = 7,1 Hz)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ:	21,4 (c); 25,2 (c); 25,9 (c); 29,5 (c); 32,4 (t); 44,1 (t); 49,2 (d); 51,4 (s); 68,4 (d); 70,0 (s); 72,8 (d); 72,9 (d); 80,0 (d); 85,3 (s); 93,3 (s); 128,2 (2 x d); 128,3 (2 x d); 128,4 (s); 129,4 (2 x d); 129,6 (s); 129,9 (2 x d); 133,1 (d); 133,3 (d); 165,4 (s); 165,8 (s)
EM (IE) <i>m/z</i> (%):	495 (M ⁺ -15, 1), 477 (2), 370 (5), 355 (2), 330 (3), 290 (5), 248 (3), 168 (7), 122 (13), 105 (100), 77 (25)
EMAR <i>m/z</i> :	Observado 495,2047 (calculado para C ₂₈ H ₃₁ O ₈ [M ⁺ -15]: 495,2019)

(1<i>R</i>,2<i>S</i>,4<i>S</i>,5<i>S</i>,6<i>S</i>,7<i>R</i>,9<i>S</i>,10<i>R</i>)-2,6-dibenzoiloxi-1,4,9-trihidroxi-dihidro-β-agarofurano (40)	
[α] _D ²⁰ :	-18,2° (c 0,75, CHCl ₃)
IR γ _{max} (película):	3535, 2926, 2854, 1715, 1602, 1450, 1278, 1114, 1070, 1027, 757, 713 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) δ:	1,40 (3H, s); 1,59 (3H, s); 1,65 (3H, s); 1,70 (3H, s); 2,19 (2H, m); 2,40 (3H, m); 3,66 (1H, d, <i>J</i> = 6,7 Hz); 4,60 (1H, d, <i>J</i> = 3,5 Hz); 5,60 (1H, m); 5,71 (1H, s); 7,47 (4H, m); 7,60 (2H, m); 8,00 (2H, d, <i>J</i> = 7,1 Hz); 8,22 (2H, d, <i>J</i> = 7,0 Hz)
RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) δ:	20,2 (c); 25,3 (c); 25,9 (c); 29,4 (c); 31,8 (t); 42,9 (t); 49,2 (d); 52,0 (s); 68,9 (d); 70,0 (s); 72,9 (d); 73,7 (d); 80,3 (d); 84,6 (s); 91,7 (s); 128,2 (d); 128,4 (3 x d); 129,4 (2 x d); 129,7 (2 x s); 129,9 (2 x d); 133,2 (d); 133,4 (d); 165,6 (s); 165,7 (s)
EM (IE) <i>m/z</i> (%):	495 (M ⁺ -15, 1), 477 (5), 370 (6), 355 (2), 290 (6), 233 (3), 191 (3), 168 (6), 122 (8), 105 (100), 77 (22)
EMAR <i>m/z</i> :	Observado 495,1982 (calculado para C ₂₉ H ₃₄ O ₈ [M ⁺ -15]: 495,2019)



• **Hidrólisis parcial de 38**



A una disolución de 5,0 mg de **38** (0,01 mmoles) en metanol (3,0 ml) y acetona (2,0 ml), se le añadió 0,5 ml (0,05 mmoles, 5 eq) de bicarbonato sódico 0,1 M. La disolución se llevó a reflujo durante 4 horas, comprobando por capa fina que la reacción había finalizado. El crudo de reacción se concentró a vacío y se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se secaron con sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se eliminó a vacío. Posteriormente, el residuo fue purificado por cromatografía en placa preparativa de gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Et}_2\text{O}$, 5:1), obteniéndose tres productos: **41** (2,2 mg, R= 40%), **42** (1,6 mg, R= 30%) y **43** (1,0 mg, R= 20 %).

(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-2,9-dibenzoiloxi-1,4,6-trihidroxi-dihidro- β -agarofurano (41**)**

$[\alpha]_D^{20}$: +14,2° (*c* 0,12, CHCl_3)

IR γ_{max} (película): 3448, 2923, 2852, 1716, 1453, 1278, 1105, 1069, 1025, 978, 712 cm^{-1}

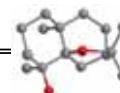
RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 1,49 (3H, s); 1,60 (3H, s); 1,65 (3H,s); 1,83 (3H, s); 2,20 (2H, m); 2,26 (1H, s); 2,34 (2H, m); 3,35 (1H, s); 4,62 (1H, s); 4,63 (1H, d, $J= 3,9$ Hz); 4,98 (1H, s); 5,04 (1H, d, $J= 6,9$ Hz); 5,54 (1H, m); 7,38 (2H, m); 7,49 (2H, m); 7,59 (2H, m); 7,98 (2H, d, $J= 7,3$ Hz); 8,08 (2H, d, $J= 7,4$ Hz)

EM (IE) m/z (%): 495 (M^+-15 , 5), 477 (11), 370 (3), 355 (2), 248 (6), 179 (17), 105 (100), 77 (18)

EMAR m/z : Observado 495,2047 (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{O}_8$ [M^+-CH_3]: 495,2019)

(1<i>R</i>,2<i>S</i>,4<i>S</i>,5<i>S</i>,6<i>S</i>,7<i>R</i>,9<i>S</i>,10<i>R</i>)-1,9-dibenzoiloxi-2,4,6-trihidroxi-dihidro-β-agarofurano (42)	
[α] ²⁰ _D :	+ 20,5° (<i>c</i> 0,15, CHCl ₃)
IR γ _{max} (película):	3439, 2956, 2928, 2850, 1720, 1605, 1310, 1268, 1102, 1034, 954, 712 cm ⁻¹
UV (EtOH) λ _{max} (log ε):	230 (7,1), 200 (7,3) nm
DC λ _{max} (EtOH) nm:	238,4 (Δε= +26,9), 229,4 (Δε= 0), 221,8 (Δε= -18,4)
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) δ:	1,53 (3H, s); 1,61 (3H, s); 1,71 (3H, s); 1,89 (3H, s); 2,15 (2H, m); 2,24 (1H, s); 2,37 (2H, m); 3,32 (1H, s); 4,58 (1H, m); 4,62 (1H, d, <i>J</i> = 4,8 Hz); 5,03 (1H, d, <i>J</i> = 6,9 Hz); 5,64 (1H, d, <i>J</i> = 3,4 Hz); 7,33 (2H, m); 7,47 (2H, m); 7,55 (2H, m); 7,74 (2H, d, <i>J</i> = 7,2 Hz); 8,10 (2H, d, <i>J</i> = 6,9 Hz)
EM (IE) <i>m/z</i> (%):	495 (M ⁺ -15, 3), 477 (2), 388 (3), 370 (4), 330 (2), 280 (3), 248 (4), 181 (8), 122 (10), 105 (100), 77 (25)
EMAR <i>m/z</i> :	Observado 495,2000 (calculado para C ₂₈ H ₃₁ O ₈ [M ⁺ -15]: 495,2019)
(1<i>R</i>,2<i>S</i>,4<i>S</i>,5<i>S</i>,6<i>S</i>,7<i>R</i>,9<i>S</i>,10<i>R</i>)-9β-benzoiloxi-1α,2α,4β,6β-tetrahidroxi-dihidro-β-agarofurano (43)	
[α] ²⁰ _D :	+ 7,8° (<i>c</i> 0,1, CHCl ₃)
IR γ _{max} (película):	3517, 2925, 2854, 1721, 1601, 1450, 1279, 1313, 1027, 757, 712 cm ⁻¹
RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) δ:	1,42 (3H, s); 1,57 (3H, s); 1,59 (3H, s); 1,82 (3H, s); 1,95 (1H, dd, <i>J</i> = 2,9, 13,8 Hz); 2,10 (1H, dd, <i>J</i> = 2,7, 13,8 Hz); 2,15 (2H, m); 2,34 (1H, m); 3,23 (1H, s); 4,12 (1H, d, <i>J</i> = 3,4 Hz); 4,36 (1H, m); 4,58 (1H, d, <i>J</i> = 4,9 Hz); 4,36 (1H, m); 4,58 (1H, d, <i>J</i> = 4,9 Hz); 4,99 (1H, d, <i>J</i> = 7,1 Hz); 5,11 (1H, d, <i>J</i> = 4,9 Hz); 7,47 (2H, m); 7,58 (1H, m); 8,07 (2H, d, <i>J</i> = 7,5 Hz)
EM (IE) <i>m/z</i> (%):	391 (M ⁺ -15, 8), 331 (1), 305 (2), 284 (2), 266 (3), 248 (5), 179 (24), 123 (12), 105 (100), 77 (29)
EMAR <i>m/z</i> :	Observado 391,1776 (calculado para C ₂₁ H ₂₇ O ₇ [M ⁺ -15]: 391,1757)

5.4. *Quimioprevención: virus Epstein-Barr*



5.4. Quimioprevención: virus Epstein-Barr

5.4.1. Introducción

Actualmente, la prevención del cáncer es uno de los proyectos más urgentes de la salud pública. La Sociedad Americana del Cáncer¹ tiene como principal objetivo hasta el 2015, la prevención y detección precóz del cáncer, dedicando grandes esfuerzos en campañas de sensibilización contra el tabaquismo, obesidad, mal nutrición e inactividad física. Según datos de esta institución, al menos el 50% de las muertes por cáncer ocurridas en el 2005 en Estados Unidos, podían haberse evitado.

Entre las estrategias de prevención podemos destacar la **quimioprevención**, control del cáncer mediante la administración de compuestos naturales o sintéticos capaces de detener o inhibir el inicio del proceso carcinogénico. Este mecanismo se presenta como una solución prometedora, siendo de particular interés la inhibición de promotores de procesos carcinogénicos.

El proceso químico de la carcinogénesis está sustancialmente dividido en tres etapas: iniciación, promoción y progresión² (figura 5.4.1). La etapa de iniciación se caracteriza por la activación metabólica de una serie de enzimas que pueden pasar de precarcinogénicas en carcinogénicas por acción de promotores. La etapa intermedia, la promoción, implica la proliferación clonal de las células iniciales y su conversión en células tumorales pre-malignas, con una variedad de señales intracelulares que son reversibles. La tercera etapa, progresión, se caracteriza por ser irreversible e inestable, con alteraciones genéticas y biológicas debido a la conversión de los papilomas en carcinomas, con capacidad de invasión y metástasis.

¹http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1x_Cancer_Prevention_and_Early_Detection_Facts_Figures_2006.asp

² H. C. Pilot, Y. P. Dragan. *FASEB J.* **1991**, 5, 2280-2286.

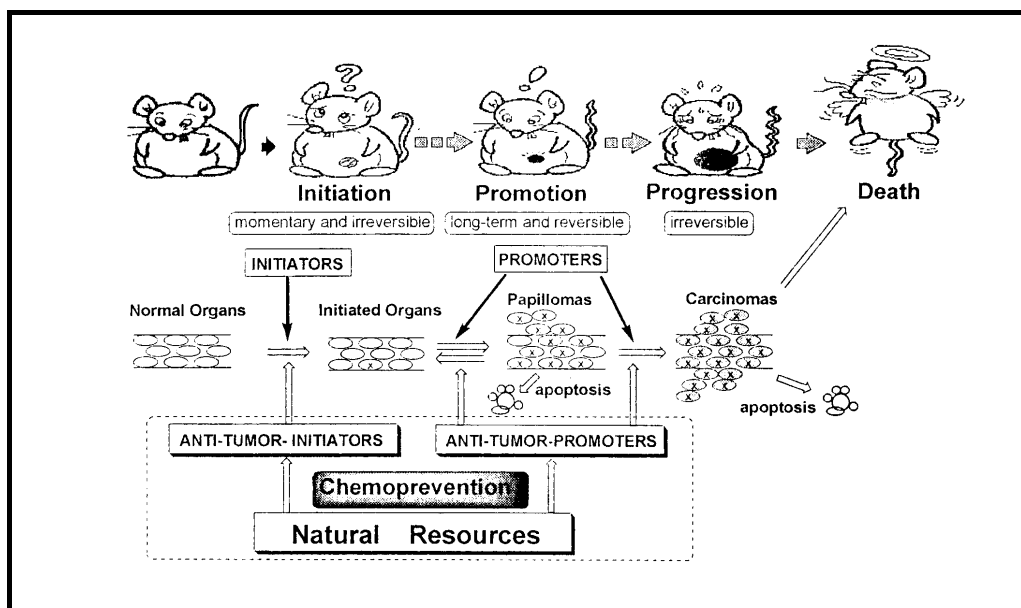


Figura 5.4.1. Proceso químico de la carcinogénesis y de la quimiopreención.

De estas tres etapas, la de **promoción** es la más larga y la que podría ser reversible, al menos en los primeros estadios. Por lo tanto, la inhibición de tumores en la etapa de promoción es una de las estrategias más prometedoras en la quimiopreención del cáncer.

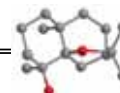
Ciertas **infecciones virales** se han asociado con algunos tipos de cánceres (tabla 5.4.1), siendo algunos de ellos cánceres muy comunes en la población³. Se ha establecido que del 15- 20% del total de cánceres humanos a nivel mundial tienen una etiología viral. Los virus pueden inducir cáncer por un mecanismo directo (mediante oncogénes) o indirectamente, participando en la promoción y/o estabilización del proceso carcinogénico.

El **virus Epstein-Barr (VEB)** fue el primer virus humano que se implicó en la carcinogénesis.

Desde que en 1964, Epstein, Barr y Achong⁴ descubrieron en biopsias procedentes de pacientes con linfoma de Burkitt partículas virales con características ultraestructurales propias de los virus *Herpes*, se han sucedido notables progresos en el

³ Hausen, H. Z. *Curr. Science*. 2001, 81, 523-527.

⁴ Epstein M. A.; Achong B.G.; Barr Y. M. *Lancet*. 1964, 1, 702-703.



conocimiento de la estructura, organización genética y funcionamiento biológico del virus Epstein-Barr (VEB)⁵.

Tabla 5.4.1 Principales virus identificados como agentes carcinogénicos. Se indican los cánceres que en mayor medida están implicados y los factores de riesgo.

Virus	Cáncer	Factores de riesgo
Hepatitis B	Carcinoma hepatocelular	Aflatoxina, alcohol, tabaco
Epstein-Barr	Linfoma de Burkitt Carcinoma nasofaríngeo	Malaria, nitrosaminas
Herpes Humano 8	Sarcoma de Kaposi	
Papilomavirus:		
HPV 16 y 18	Cáncer cervicouterino	Tabaco
HPV 5, 8 y 17	Cáncer de piel	Alteración genética, excesiva exposición a la luz solar
Retrovirus:		
HTLV-I	Leucemia células T, linfoma	
HTLV-II	Leucemia células peludas	

En 1968, se demostró la relación causa-efecto del VEB con la mononucleosis infecciosa (MNI)⁶ y desde entonces es cada día más amplia la lista de complicaciones y procesos oncológicos con los que se le relaciona⁷. El ADN del VEB se detectó en 1970 en tejidos de pacientes con carcinoma nasofaríngeo y en los años 80 se relacionó con el linfoma no Hodgkin y con la leucoplaquia oral en pacientes con SIDA. Posteriormente, también se encontró en tejidos con otros cánceres como los linfomas de células T y la enfermedad de Hodgkin.

⁵ Young, L. S.; Rickinson, A. B. *Nature Rev. Cancer*. **2004**, *4*, 757-768.

⁶ Henle W.; Henle G. *The virus as the etiologic agent of infectious mononucleosis*. Epstein M. A., Achong B. G., editors. *The Epstein-Barr virus*. **1979**, Springer-Verlag, Berlin, 62-78.

⁷ Purtilo D. T.; Strobach R. S.; Okano M.; Davis J. R. *Lab. Invest.* **1992**; *67*, 5-23.

5.4.1.1. Generalidades del virus Epstein-Barr

El VEB es un virus ADN de la familia *Herpesviridae* y se incluye en la subfamilia de γ -*Herpesvirus* por su capacidad de transformar y crecer en células linfoides⁸. Posee una cubierta lipoproteica compleja y una nucleocápsida que en su organización y tamaño es similar a la de otros virus del grupo *Herpes*⁹ (figura 5.4.2).

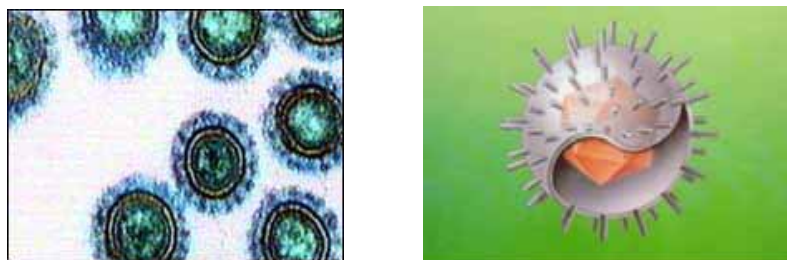


Figura 5.4.2. Imagen del virus Epstein-Barr. A la derecha un dibujo en el que se observa la cubierta lipoproteica del virus y la nucleocápsida en su interior.

Su huésped natural es el hombre. El VEB está ampliamente distribuido en la población de los cinco continentes y más del 90% de los adultos presentan evidencias serológicas de infección por este virus¹⁰. La infección se inicia, generalmente, a través del epitelio nasofaríngeo, donde el virus establece su ciclo lítico. Con la producción de nuevos viriones se infectan células contiguas susceptibles y en estas células el VEB es capaz de establecer infección latente¹¹. Esta estrategia le permite eludir la respuesta inmune y mantener su genoma indefinidamente, protegido en el núcleo de las células diana¹².

Las células susceptibles de mantener infecciones latentes del VEB son, generalmente, células linfoides B con una vida media relativamente corta y que se encuentran en íntimo contacto con efectores de la respuesta inmune. El VEB ha hecho frente a estos factores limitantes de su persistencia mediante el desarrollo de un abanico de genes que se expresan durante la etapa de latencia y aseguran la

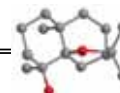
⁸ Mitchell, J. R.; Anderson, G. R.; Bowles, C. A.; Hinz, R. W. *Lancet*. **1967**, *1*, 702-703.

⁹ Miller, S.; Lipman M. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*.**1973**, *70*, 190-192.

¹⁰ Pereira, M. S.; Blake J. M.; Macrae, A. D. *Br. Med. J.* **1969**, *4*, 526-531.

¹¹ Sixbey, J. W.; Lemon, S. M.; Pagano J. S. *Lancet*. **1986**, *2*, 122-124.

¹² Robertson, E. S. *Epstein-Barr Virus*. **2005**, Caister Academic Press, Norfolk: Inglaterra.



proliferación e inmortalización de los linfocitos infectados¹³. El sistema inmune humano mantiene a su vez el equilibrio, evitando una expansión sin control de las células infectadas por el virus, eliminando así la mayoría de las células que expresan antígenos de latencia del VEB y sólo un pequeño grupo de células con una expresión más restringida es capaz de persistir¹⁴.

Cuando actúan otros factores, que bien ofrecen una ventaja proliferativa adicional a las células infectadas por el VEB, o debilitan la respuesta inmune frente a aquellas, este equilibrio se rompe, pudiendo originar neoplasias.

Con la aparición del SIDA, el desarrollo de los trasplantes, tanto de órganos sólidos como de médula ósea y de alternativas terapéuticas para un creciente número de enfermedades que exigen inmunosupresión farmacológica agresiva, la incidencia de neoplasias relacionadas con el VEB ha aumentado¹⁵, tal como se presenta en la tabla 5.4.2., siendo la saliva la principal vía de transmisión del virus.

Tabla 5.4.2. Cánceres asociados con el virus Epstein-Barr.

Cáncer	Subtipo	% positivo VEB
Pacientes Inmunocompetentes		
Linfoma de Burkitt	Endémico	> 95
	Esporádico	15-30
Linfoma nasal		95
Linfoadenopatía	Angioimmunoblástico	-
Linfoma de Hodgkin		≈ 40
Carcinoma nasofaríngeo	No diferenciado	> 95
Carcinoma gástrico	Parecido a un linfocitoma	*
Pacientes Inmunodeprimidos		
Desórdenes linfoproliferativos post-trasplante		> 90
Linfomas asociados al VIH	Burkitt	20-30
	Hodgkin	> 95
	Inmunoblástico	> 95
Leiomioma		*

(-) no se conoce. (*) no está claro.

¹³ Menezes, J.; Jondal, M.; Leibold, W.; Dorval, G. *Infect. Immuno.* **1976**, *13*, 303-310.

¹⁴ Robinson, J.; Smith, D. *Virology.* **1981**, *109*, 336-345.

¹⁵ Dolcetti, R.; Guidoboni, M.; Gloghini, A.; Carbone, A. *Curr. Cancer Ther. Rev.* **2005**, *1*, 27-44.

Para comprender el papel patogénico que posee el VEB en el desarrollo de algunas neoplasias es importante conocer que después de la infección primaria, el VEB no es erradicado completamente del organismo, permaneciendo presente en una pequeña población de linfocitos B en una situación de relativa inactividad, conocida como infección latente¹⁶.

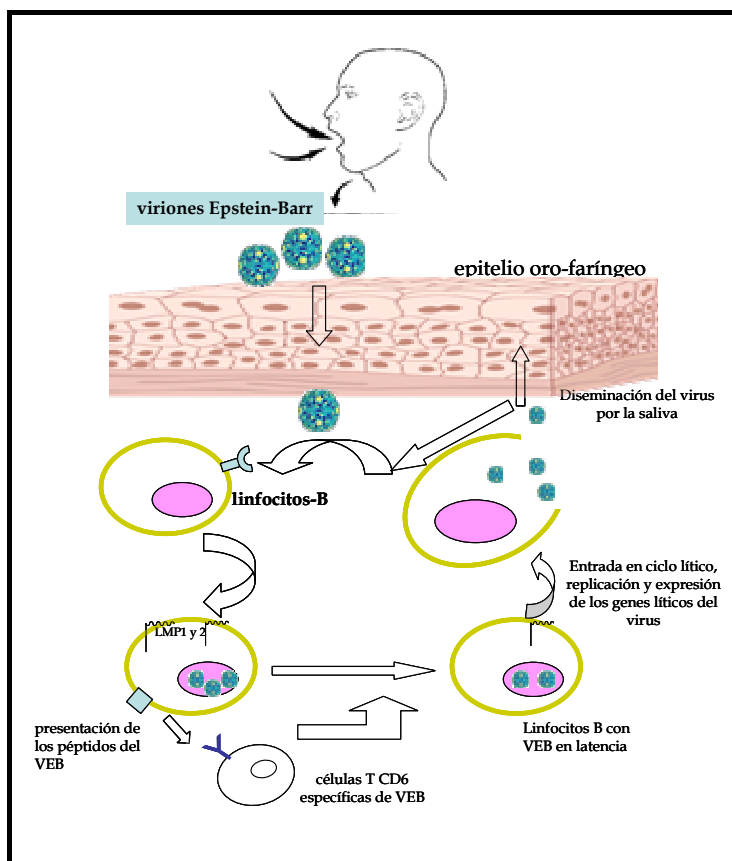


Figura 5.4.3. Ciclo de vida del virus Epstein-Barr. La infección es transmitida por la saliva. El virus pasa a través del epitelio orofaríngeo a los linfocitos B donde prolifera. Las células T controlan la proliferación de las células B infectadas, quedando el virus en fase latente. Cuando entra en ciclo lítico, se lisan las células y los viriones pueden infectar a otras células B o incorporarse a la saliva, diseminándose.

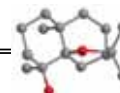
Durante la fase aguda, el virus expresa unos 90 antígenos, mientras que en la fase latente solo son expresados seis antígenos nucleares y tres antígenos de membrana. Entre los productos de latencia del VEB destaca la LMP-1 (proteína de membrana expresada durante las infecciones latentes), por su papel individual en la transformación celular, lo que se ha demostrado *in vitro* e *in vivo*^{17,18,19}, sin embargo, los mecanismos específicos por los que la LMP-1 induce la transformación oncogénica celular no se han aclarado.

¹⁶ Thorley-Lawson, D. A. J. *Allergy Clin. Immunol.* **2005**, 116 (2), 251-261.

¹⁷ Kaye, K.; Izumi K. M.; Kieff E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1993**, 90 (19), 9150-9154.

¹⁸ Faraheus, R.; Rymo, R.; Rhim J. S.; Klein G. *Nature.* **1990**, 345, 447-449.

¹⁹ Wilson J.B.; Weinberg W.; Johnson R.; Yuspa S.; Levine A. J. *Cell.* **1990**, 61, 1315-1327.



Por otro lado, una vez que se produce la infección celular comienza la producción de proteínas virales. Estas proteínas incluyen, además de las anteriormente citadas los antígenos tempranos, que representan el primer signo de que la célula entra en estado lítico.

5.4.1.2. Identificación de agentes quimiopreventivos: inhibición de la activación del VEB

En la bibliografía existen numerosos bioensayos para la búsqueda de agentes quimiopreventivos²⁰. Así, en la búsqueda de agentes inhibidores de la promoción de tumores, la metodología *in vitro* que se utiliza con más frecuencia, es la inhibición de la producción de antígenos tempranos (AT) por el virus Epstein-Barr cuando entra en ciclo lítico. La relación entre la actividad inhibidora de la activación del VEB y la actividad inhibidora de la promoción de tumores, está bien establecida y se ha estudiado en modelos animales²¹. Así, el ensayo de inhibición de AT por el VEB en células Raji (línea celular de linfoma de Burkitt humano), activado por el promotor 13-acetato-12-*O*-tetradecanoil-forbol (TPA), es un método efectivo en la identificación de agentes quimiopreventivos.

Existen numerosos ejemplos de productos naturales de origen vegetal que han sido evaluados por su efecto inhibidor de la activación del VEB mediada por TPA en células Raji²⁰, destacando los terpenoides, tanto monoterpenos, como sesquiterpenos y diterpenos. La actividad de estos metabolitos es comparable con la del β -caroteno, un conocido inhibidor de la promoción de tumores, usado como control en este tipo de ensayos.

Entre los metabolitos activos podemos destacar los que se presentan en la figura 5.4.4. Así, entre los sesquiterpenos cabe citar aquellos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano, siendo los sesquiterpenos aislados de *Maytenus cuzcoina*²², **S2**, **S3**, **S4**, **S7** y **S8** los más activos, con valores de CI_{50} de 10 a 11 nM, comparables con los del β -caroteno, utilizado como referencia ($CI_{50}=9,4$ nM). Además, los sesquiterpenos trichocinol A-C²⁰, aislados del hongo *Trichothelium roseum*, presentan una excelente actividad con valores de CI_{50} menores de 0,3 nM. Como inhibidores de la activación

²⁰ Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Tokuda, H. *Studies in Natural Product*. **2003**, Atta-ur-Raham, Elsevier Science B. V., Amsterdam, 29, 73-126.

²¹ Saito, Y.; Takizawa, H.; Konishi, S.; Yoshida, D.; Mizusaki, S. *Carcinogenesis*. **1985**, 6, 1189-1194.

²² González, A. G.; Tincusi, B. M.; Bazzocchi, I. L.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Konoshima, T.; Jimenez, I. A.; Ravelo, A. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 1773-1778.

del VEB, monoterpenos y sesquiterpenos con esqueleto de acilfloroglucinol, aislados de diferentes especies del género *Eucalyptus*, presentaron una CI_{50} entorno a 4,0 nM²⁰.

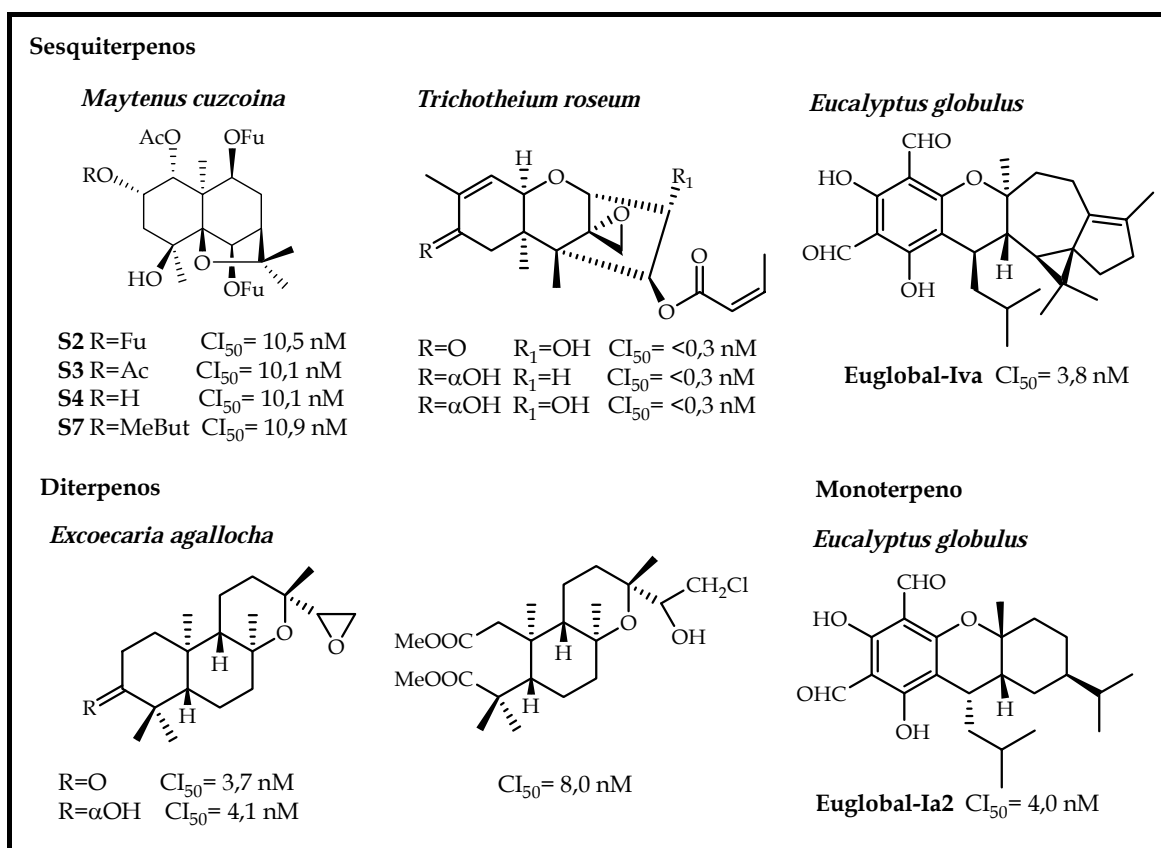
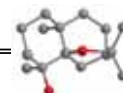


Figura 5.4.4. Metabolitos secundarios inhibidores de la activación del antígeno temprano del virus Epstein-Barr (VEB-AT). La actividad se expresa como CI_{50} (concentración de metabolito que produce una reducción en la expresión del AT en un 50%).

Hay descritos numerosos diterpenos en la literatura que muestran una potente actividad inhibidora de la activación del VEB. Podemos destacar los diterpenos aislados de la resina de una *Euphorbiaceae*, *Excoecaria agallocha*, que muestran valores de CI_{50} entorno a 4 nM.

Con estos antecedentes, decidimos evaluar los sesquiterpenos aislados de los frutos de *M. cuzcoina*, derivados sesquiterpénicos y diterpenos con esqueleto de *ent*-rosano aislados de la corteza de raíz de *M. cuzcoina*, como potenciales agentes quimiopreventivos.



5.4.2. Resultados y discusión

Se evaluó la actividad inhibidora de la activación del virus Epstein-Barr del sesquiterpeno **S1** aislado de los frutos de *M. cuzcoina* y de ocho derivados sesquiterpénicos, **6**, **16**, **27**, **30-32**, **35** y **36** (figura 5.4.5). Así mismo, se ensayó la actividad de los dos diterpenos con esqueleto de *ent*-rosano, **D1** y **D2**, que fueron aislados de la corteza de raíz de *M. cuzcoina*.

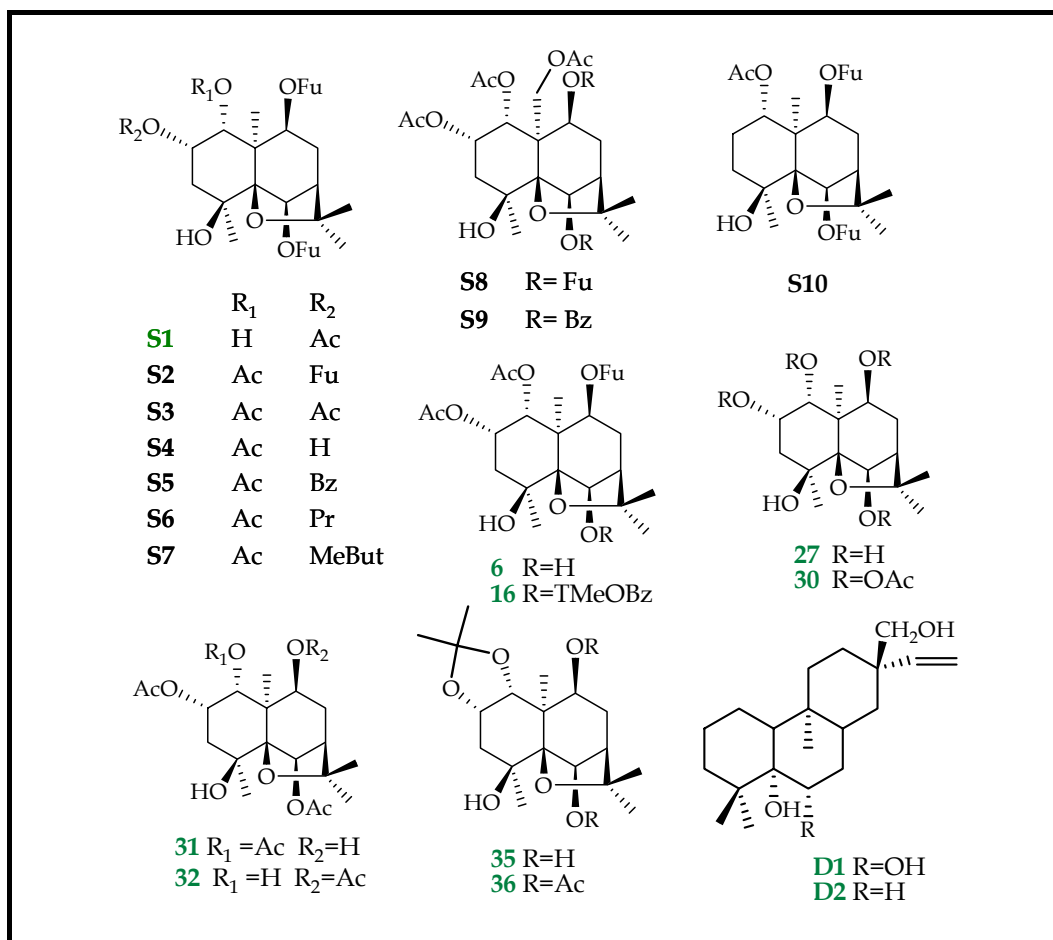


Figura 5.4.5. Metabolitos evaluados como inhibidores de la producción de antígenos tempranos del VEB. En **negro** se indican los que se evaluaron en un estudio previo.

La evaluación de esta actividad fue realizada por el Dr. Harukuni Tokuda, del Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japón. La metodología empleada por el grupo del Dr. Tokuda es la recogida en diversas publicaciones^{22,23,24}.

²³ Jiménez, I. A.; Bazzocchi, I. L.; Núñez, M. J.; Mukainaka, T.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Konoshima, T.; Ravelo, A. G. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1047-1050.

²⁴ Mendoza, C. R.; Jiménez, I. A.; Harukuni, T.; Kushida, H.; Bazzocchi, I. L. *Chem. Biodiv.* **2005**, *2*, 286-294.

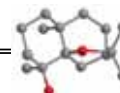
Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5.4.3, en la que incluimos la actividad de los sesquiterpenos **S2-S9**, que ya habían sido evaluados con anterioridad, con el objetivo de comparar los resultados y hacer un estudio más amplio de la relación estructura-actividad.

Tabla 5.4.3. Porcentaje de activación de antígenos tempranos del VEB inducido por el TPA en presencia de los metabolitos ensayados respecto a un control positivo^a.

Metabolitos	Concentración (relación en moles/TPA) ^b			
	1000	500	100	10
S1	15,2 (60) ^c	59,8	85,1	100
S2	0 (70)	30,2	76,9	94,6
S3	0 (70)	27,4	74,8	93,0
S4	0 (70)	28,5	76,7	95,8
S5	11,7 (60)	42,9	87,1	100
S6	6,3 (70)	34,9	77,9	100
S7	0 (70)	32,7	78,0	96,2
S8	0 (70)	25,9	72,0	91,0
S9	12,6 (60)	48,0	86,9	100
S10	10,5 (70)	40,2	84,6	100
6	13,9 (60)	59,8	85,1	100
16	15,3 (60)	61,7	87,6	100
27	1,2 (60)	27,3	74,0	94,5
30	0(60)	25,0	71,6	90,5
31	0 (60)	24,1	71,1	90,3
32	0 (60)	25,7	72,4	91,7
35	5,9 (60)	39,2	74,6	97,6
36	5,0 (60)	37,0	73,5	95,2
D1	0 (70)	27,8	71,3	93,4
D2	0 (70)	29,1	73,4	95,9
β-caroteno	9,1 (60)	34,3	82,7	100

^aLos valores representan el % de inducción de antígenos tempranos del VEB con respecto al control positivo 100% (n=3).^b Relación en moles del metabolito con respecto a la concentración de TPA (32 pmol= 20 ng/mol): 1000= 32 nmol del metabolito, 500= 16 nmol, 100= 3,2 nmol y 10= 0,32 nmol. ^c Entre paréntesis se indica el % de viabilidad de las células Raji.

Entre los sesquiterpenos ensayados, los más activos son **S2, S3, S8, 27, 30, 31** y **32**, que presentan una actividad significativa con respecto al β-caroteno, utilizado como control, inhibiendo entorno al 10% la activación de la producción del AT del VEB, a la concentración más baja ensayada. Además, todos los compuestos presentaron una



citotoxicidad moderada frente a las células Raji, siendo la viabilidad de éstas mayor del 60%, incluso a la concentración más alta evaluada de los productos.

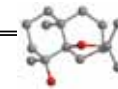
Un estudio cuidadoso de los resultados obtenidos nos permitió establecer una relación estructura-actividad, que podemos resumir en los siguientes puntos:

- La regiosustitución es importante para la actividad, un grupo hidroxilo en el carbono 1 ó 6 reduce la actividad en relación aun grupo éster, **S1** 0% y **6** 0% *versus* **S3** 7%. Así mismo, la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 2 no afecta a actividad de forma significativa, como ocurre en los casos anteriores, **S4** 4,2 % *versus* **S3** 7%.
- El sustituyente sobre el carbono 2 juega un importante papel en la actividad:
 - a) La ausencia de sustituyente en esta posición reduce la actividad, **S10** (0%) *versus* **S4** (OH, 4,2%) y **S3** (OAc, 7%).
 - b) Se observa la preferencia por un grupo acetato (**S3**, 7%), un grupo hidroxilo (**S4**, 4,2%) o un metilbutirato (**S7**, 3,8%) a un grupo benzoato (**S5**, 0%) o propionato (**S6**, 0%).
- La presencia de un grupo acetato en el carbono 15 incrementa la actividad, **S8** (9%) *versus* **S3** (7%), siendo **S8** el más activo de los sesquiterpenos aislados del estudio fitoquímico de los frutos. La comparación de **S8** (9%) y **S9** (0%) pone de manifiesto la preferencia de grupos furoatos en los carbonos 6 y 9 frente a grupos benzoatos, corroborando que el éster benzoato es negativo para la actividad.
- La sustitución del grupo OFu en el carbono 6 por un OTMBz (**S3** *versus* **16**) reduce la actividad de forma radical (del 7 % al 0%).
- Los resultados obtenidos muestran que el sesquiterpeno totalmente acetilado **30** y totalmente acetilado menos el carbono 9, **31**, son los más activos de la serie, confirmando que el grupo acetato es el mejor de los sutituyentes.
- Al preparar los derivados **30** y **31** hemos conseguido potenciar la actividad del sesquiterpeno más activo, **S3**, desde un 7% a 9,7% y 9,5 % de inhibición para los derivados sesquiterpénicos **31** y **30**, respectivamente.
- Estos resultados muestran la influencia no sólo de la regiosustitución sobre el esqueleto, sino también del tipo de sustituyente, con preferencia por sutituyentes alifáticos, como el acetato sobre los grupos aromáticos, como el furoato o benzoato.

Con respecto a los dos diterpenos ensayados, ambos tienen una potente actividad, no observándose cambios significativos en la actividad debido a la presencia o ausencia de un grupo hidroxilo en el carbono 6, **D1** (6,7%) y **D2** (4,1%) respectivamente.

Estos datos demuestran que las celastráceas son una fuente extraordinaria de agentes quimiopreventivos, destacando los sesquiterpenos dihidro- β -agarofurano y los diterpenos.

5.5. Actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos



5.5. Actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos

5.5.1. Introducción

La resistencia a la quimioterapia desarrollada por los organismos infecciosos y por las células tumorales representa uno de los problemas más importantes a los que se enfrenta la medicina en la actualidad. El fenómeno de la resistencia impide el éxito en el tratamiento farmacológico de numerosas enfermedades, habiéndose identificado cepas resistentes a fármacos en casi todos los agentes infecciosos estudiados, desde virus a parásitos¹. La ineficacia en el tratamiento de muchos cánceres también suele ir asociado a problemas de resistencia a la quimioterapia, siendo de especial importancia el fenómeno de la **multirresistencia a fármacos (MDR)**.

La multirresistencia a fármacos (MDR, *Multi-Drug Resistance*) se puede definir como la resistencia intrínseca o adquirida a diferentes fármacos simultáneamente, que difieren en estructura química, mecanismo de acción y diana molecular. Esta es la causa del fallo en el tratamiento de alrededor del 90% de los pacientes con cáncer metastático² y si este fenómeno clínico pudiera ser evitado, el porcentaje de curación y supervivencia tras el tratamiento del cáncer podría verse incrementado enormemente.

La MDR es un problema multifactorial, ya que se ve afectado por diversas alteraciones genéticas, cambios epigenéticos y diferentes condiciones ambientales³. Existen dos clases generales de resistencia a fármacos:

- *Mecanismos que impiden que el fármaco alcance la diana.* Esto puede ser debido a una baja absorción intestinal, porque son rápidamente metabolizados y excretados o por una difusión reducida desde la sangre a las células tumorales o infectadas.

¹ Teodori, E.; Dei, S.; Scapecchi, S.; Gualtieri, F. *Il Farmaco*. **2002**, 57, 385-415.

² Longley, D. B.; Johnston, P. G. J. *Pathol.* **2005**, 205, 275-292.

³ Gorre, M. E.; Mohammed, M.; Ellwood, K.; Hsu, N.; Paquette, R.; Nagesh Rao, P.; Sawyers, C. L. *Science*. **2001**, 293, 876-880.

• *Mecanismos celulares*. Estos surgen debido a cambios genéticos o epigenéticos en la célula y afectan a la efectividad del fármaco. Existen diversos mecanismos celulares (figura 5.5.1), ampliamente estudiados.

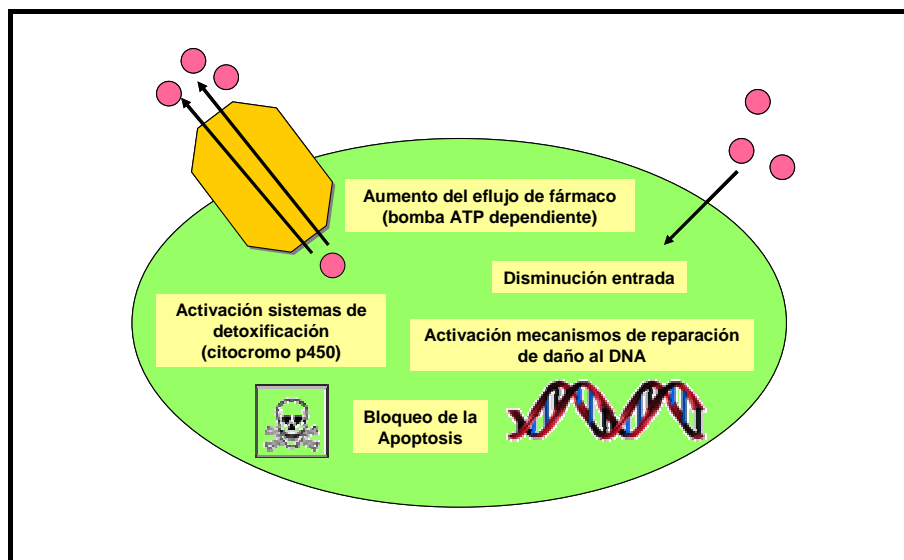


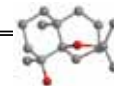
Figura 5.5.1. Mecanismos celulares que causan MDR.

Un factor a considerar, es que el fenotipo revertidor puede estar causado por más de un mecanismo celular, fenómeno que se denomina **multirresistencia multifactorial**. Ello exige respuestas múltiples, combinadas para dar respuesta a cada una de las facetas del problema.

De todos los mecanismos celulares, el mejor estudiado ha sido la resistencia a fármacos naturales e hidrofóbicos, conocido como **MDR clásica**, que resulta generalmente, de la sobre-expresión en las membranas celulares **de bombas transportadoras de fármacos** con una **amplia especificidad**, capaces de expulsar los fármacos fuera de las células con consumo de ATP⁴. Estas bombas de fármacos ATP-dependientes pertenecen a la superfamilia de proteínas ABC (*ATP-binding cassette*).

La resistencia debida a la expresión de estas proteínas se debe al incremento en el transporte de fármacos fuera de las células, disminuyendo la concentración intracelular y como consecuencia, su efectividad para causar daños en las células. Los fármacos afectados por la MDR clásica (figura 5.5.2) incluyen los alcaloides de la “vinca” (vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, etc.), antraciclinas (daunorubicina, doxorubicina, adriquina, etc.), taxanos (paclitaxel, docetaxel), lignano (etopósido),

⁴ Gottesman, M. M.; Fojo, T. Bates, S. E. *Nat. Rev. Cancer*. **2002**, 2, 48-58.



actinomicina-D, mitoxantron, etc. Estos representan un alto porcentaje de los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de los cánceres humanos⁵.

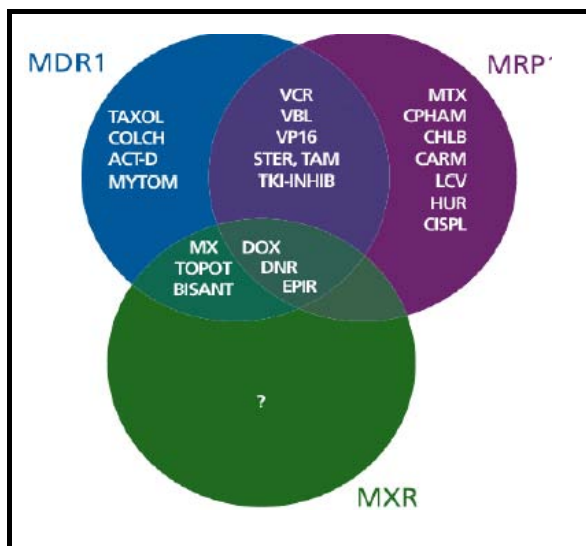


Figura 5.5.2. Sustratos de los transportadores ABC responsables del fenotipo MDR. Abreviaturas: COLCH (colchicina), ACT-D (actinomicina D), MYTOM (mitomicina), VCR (vincristina), VBL (vinblastina), VP16 (etopósido), STER (esteroides), TAM (tamoxifeno), TKI-INHIB (inhibidores tirosin-quinasas), MTK (metotrexano), CPHAM (ciclosfofamida), CHLB (clorambucil), CARM (carmustina), LCV (leucovorina), HUR (hidroxiurea), CISPL (cisplatino), MX (mitoxantrona), TOPOT (topotecan), BISANT (bisantreno), DOX (doxorubicina y adricina), DNR (daunorubicina), EPIR (epirucina).

La primera proteína humana ABC conocida fue la **glicoproteína-P (Pgp)** ⁶, o **MDR1**, transportador implicado en MDR en cáncer y que ha sido el más intensamente estudiado. En 1992 se describió el segundo transportador, MDRP1 implicado en la multirresistencia a fármacos⁷, que sólo comparte un 15% de homología con la Pgp. La descripción de esta proteína facilitó el descubrimiento de las proteínas MRP2 a MRP5, potencialmente relacionadas con la multirresistencia⁸. En 1998 se descubrió la última proteína que se ha identificado con fenotipo MDR, la BCRP⁹.

Sin embargo, hasta el momento, la Pgp es la única cuya implicación clínica se ha demostrado, ya que se encuentra sobreexpresada en el 50% de los tumores multirresistentes¹⁰.

⁵ Ambudkar, S. V.; Dey, S.; Hrycyna, C. A.; Ramachandra, M., Pastam, I, Gottesman, M. M. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol.* **1999**, *39*, 361-398.

⁶ Juliano R. L.; Ling, V. *Biochim. Biophys. Acta.* **1976**, *455*, 152-162.

⁷ Cole, S. P.; Bhardwaj, G.; Gerlach, J. H.; Mackie, J. E.; Grant, C. E.; Almquist, K. C.; Stewart, A. J., Kurz E. U.; Duncan, A. M.; Deeley, R. G. *Science.* **1992**, *258*, 1650-16454.

⁸ Evers R., Kool, M.; van Deemter, L; Janssen, H.; Calafat, J.; Oomen, L. C. Paulusma, C. C.; Oude Elferink, R. P.; Baas, F.; Schinkel, A. H.; Bort, P. *J Clin. Invest.* **1998**, *101*, 1310-1319.

⁹ Doyle, L. A; Yang, W.; Abruzzo, I. V.; Krognann, T.; Gao, Y.; Rishi, A. K.; Ross, D. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**, *95*, 15665-15670.

¹⁰ Leonard, G. D.; Fojo, T.; Bates, S. E. *Oncologist.* **2003**, *8*, 411-424.

5.5.1.1. Aspectos generales de la glicoproteína-P (Pgp)

La **glicoproteína-P (Pgp)** es una proteína transportadora ATP-dependiente de alto peso molecular (150-180 kDa). Se suele encontrar sobreexpresada en células cancerígenas, en parásitos, en hongos y levaduras patógenas, confiriendo altos niveles de resistencia frente a productos naturales voluminosos y anfipáticos, con cierta preferencia por cationes orgánicos que posean en su molécula aminas terciarias.

Esta proteína se expresa de manera constitutiva en la membrana apical de las células epiteliales, sobre todo en santuarios farmacológicos tales como la barrera hematoencefálica, ovarios, testículos y placenta, donde la protección de los tejidos del efecto de los xenobióticos es fundamental¹¹. También se expresan en niveles relativamente altos en el hígado, lumen intestinal y los riñones, donde su papel en la regulación de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación parece más que clara.

Esta glicoproteína está compuesta por **dos mitades homólogas** (figura 5.5.3), cada una formada por seis segmentos transmembrana (TMDs), involucrados en el eflujo del fármaco y un dominio citosólico de unión a nucleótidos (NBD), responsable de la unión e hidrólisis del ATP, esencial para el funcionamiento de la misma. Tiene una estructura con 4 dominios de tipo [TMD-NBD-TMD-NBD] integrados en la misma cadena polipeptídica¹².

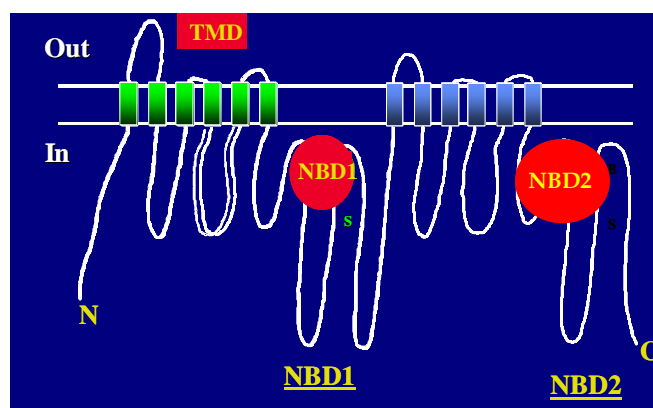
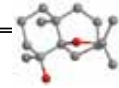


Figura 5.5.3. Estructura secundaria de la Pgp.

¹¹ Leslie, E. M.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2005**, *204*, 216-237.

¹² Loo, T. W.; Clarke, D. M. *Biochem. Cell. Biol.* **1999**, *77*, 11-23.



La cristalización de la Pgp para la determinación de su estructura tridimensional por difracción de rayos X, aun no se ha conseguido, ya que es una proteína fuertemente embebida en la membrana plasmática, siendo muy difícil purificar en las cantidades suficientes. Sin embargo, se ha obtenido información estructural de baja resolución mediante estudios de microscopía electrónica de cristales 2-D¹³. Además, se ha realizado un **modelo tridimensional de la estructura** (figura 5.5.4) generado por homología de secuencia, usando como modelo estructural los datos cristalográficos disponibles del transportador homólogo, MsbA, así como otros datos concernientes a la asociación dimérica de los NBDs de la Pgp¹⁴.

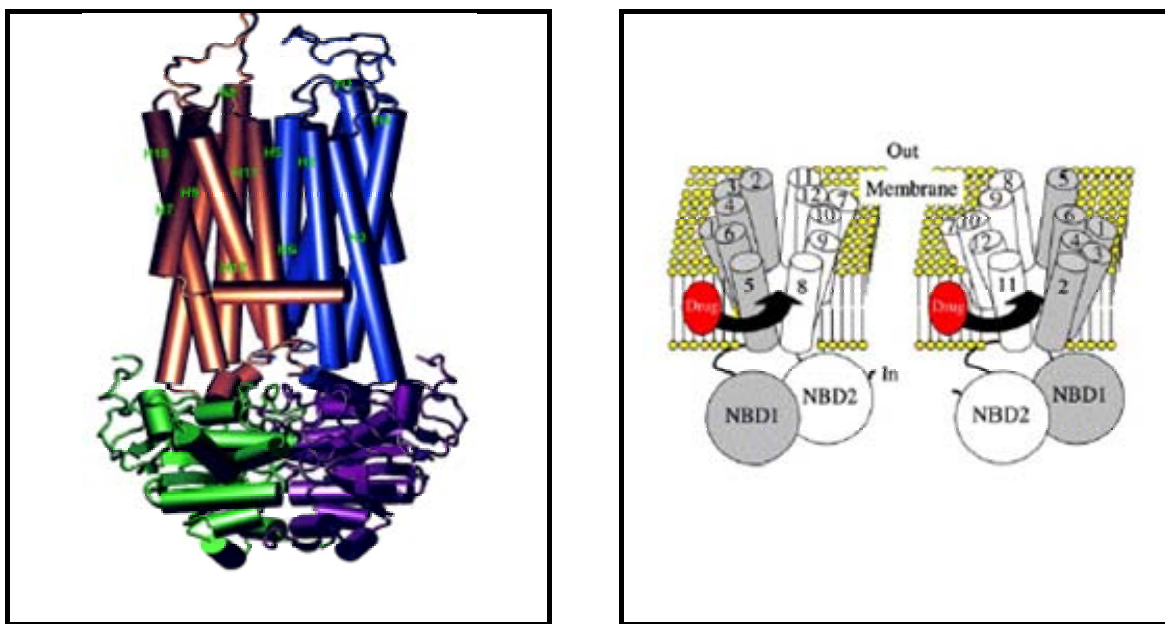


Figura 5.5. 4. A la **izquierda**, el modelo tridimensional de la Pgp. En la imagen de la **derecha**, se representa el mecanismo por el cual los fármacos acceden al interior del bolsillo de unión de sustratos de la Pgp.

En cuanto al funcionamiento de la Pgp, los fármacos deben solubilizarse primero en la matriz de la membrana plasmática de acuerdo con su coeficiente de partición, para posteriormente interactuar con el transportador desde la fase lipídica, a nivel de la cara citosólica de la membrana, accediendo a los sitios de unión en el interior de los TMDs¹⁵ (figura 5.5.4). Así, la Pgp se puede ver como una “flipasa”, que transporta los fármacos hidrofóbicos desde la cara citosólica a la cara externa de la membrana, o bien como

¹³ Lee, J. Y.; Urbatsch, I. L.; Senior, A. E.; Wilkens, S. J. *Biol. Chem.* **2002**, 277, 40125-4131.

¹⁴ Stenham D. R; Campbell, J. D.; Sansom, M. P. Higgins, C. F., Kerr, I. D. Linton, K. J. *FASEB J.* **2003**, 17, 2287-2289.

¹⁵ Loo, T. W. Clarke, D. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 329, 419-422.

“aspiradora hidrofóbica”, que aspira los fármacos que difunden a la cara interna de la membrana y los expulsa directamente al medio acuoso extracelular¹⁶.

En la Pgp se han identificado al menos **tres sitios de unión de fármacos**, que interactúan entre si y desde los cuales puede ocurrir el transporte efectivo y **un sitio adicional**, al que se unen los moduladores de la proteína no transportables¹⁷. La localización precisa de los sitios de unión a las TMDs se desconoce, aun no se ha conseguido cristalizar un complejo proteína-sustrato. El modelo con más credibilidad hasta hoy, habla de una región de unión poliespecífica, “un gran bolsillo hidrofóbico” (figura 5.5.5), en el que cada molécula acomodaría su propia unión a la proteína, interactuando con una porción diferente del canal transmembrana limitada por los TMDs^{18, 19}. Serían posibles múltiples combinaciones de residuos, lo que explicaría como la Pgp puede unir tantas moléculas diferentes y porque la afinidad por cada sustrato es diferente.

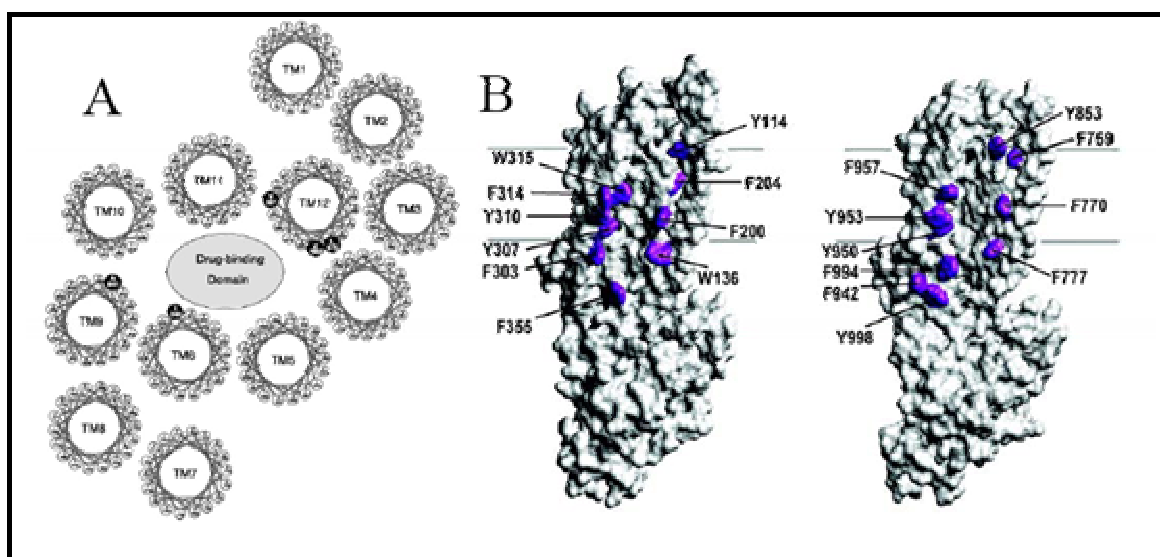


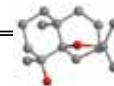
Figura 5.5.5. A) Segmentos transmembrana de la Pgp que parecen definir el gran “bolsillo hidrofóbico” de unión de fármacos. B) Modelo tridimensional de este “bolsillo”, en azul se destacan los aminoácidos que contribuyen en la unión del sustrato.

¹⁶ Varma, M. V.; Ashokraj, Y.; Dey, C. S.; Panchagnula, R. *Pharmacol. Res.* **2003**, *48*, 347-359.

¹⁷ Martin, C.; Berridge, G.; Higgins, C. Charlton, P.; Callaghan, R. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *58*, 624-632.

¹⁸ Loo, T. W.; Clarke, D. M. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44332-44338.

¹⁹ Seigneuret, M.; Garnier-Suillerot, A. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 30115-30124.



5.5.1.2. Reversión del fenotipo MDR mediante moduladores de la Pgp.

Puesto que la multirresistencia a fármacos (MDR) es el principal obstáculo para el éxito clínico de la quimioterapia, el desarrollo de agentes farmacológicos capaces de inhibir los mecanismos de resistencia a fármacos en tumores ha sido uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica en los últimos 10 años. Por otra parte, la certeza de la implicación de la Pgp en el fenómeno de la multirresistencia, hace que ésta sea la principal diana terapéutica para el desarrollo de compuestos revertidores o quimiosensibilizadores.

La **reversión del fenotipo MDR**, o **quimiosensibilización** a la quimioterapia, implica la administración conjunta de un inhibidor de la Pgp con un fármaco o fármacos empleados para el tratamiento, con el objetivo de incrementar la acumulación intracelular de los agentes terapéuticos por medio de la inhibición de la actividad de la proteína transportadora.

Desde la identificación del primer compuesto capaz de revertir el fenotipo MDR, el **verapamilo**²⁰, en el año 1981, se han descrito centenares de compuestos capaces de modular la función Pgp, al menos *in vitro*, que pertenecen a diferentes familias químicas, muchos de ellos productos naturales o derivados²¹ (figura 5.5.6):

- Arilalquilaminas (verapamilo y sus derivados).
- Ariloxipropanolaminas (propafenonas).
- Antranilamidas, salicilamidas y compuestos relacionados (tariquidar XR9576).
- Heterociclos nitrogenados (estaurosporina y derivados, derivados del imidazol, dihidropiridinas, quinolinas e isoquinolinas, acridinas y compuestos relacionados, quinoxalinas, quinazolinas y otros derivados condensados, fenotiazinas, 1,3,5-triazinas).
- Heterociclos oxigenados (derivados piránicos, flavonoides, carbohidratos y glicósidos).
- Péptidos cíclicos y depsipéptidos (ciclosporina y análogos, aureobasidinas y hapalosinas).
- Macrolactonas y compuestos relacionados (biricodar VX-710).
- Esteroides y compuestos relacionados.
- Terpenoides (taxoides, polienes, sequiterpenos dihidro- β -agarofuranos).

²⁰ Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 1967-72.

²¹ Avendaño, C.; Menéndez, J. C. *Med. Chem. Rev-Online.* **2004**, *1*, 419-444.

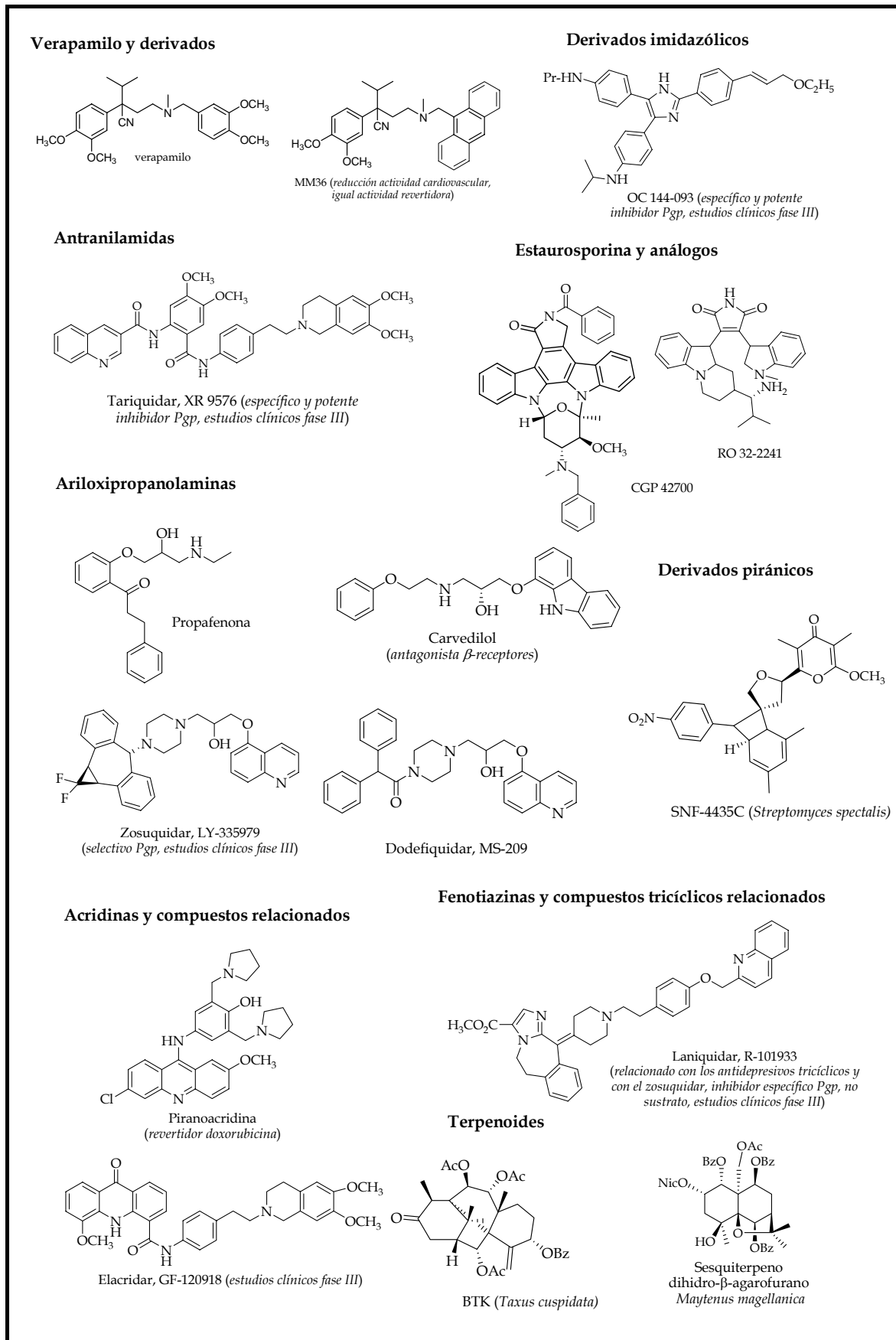


Figura 5.5.6. Clasificación de los moduladores de la Pgp según su familia química.

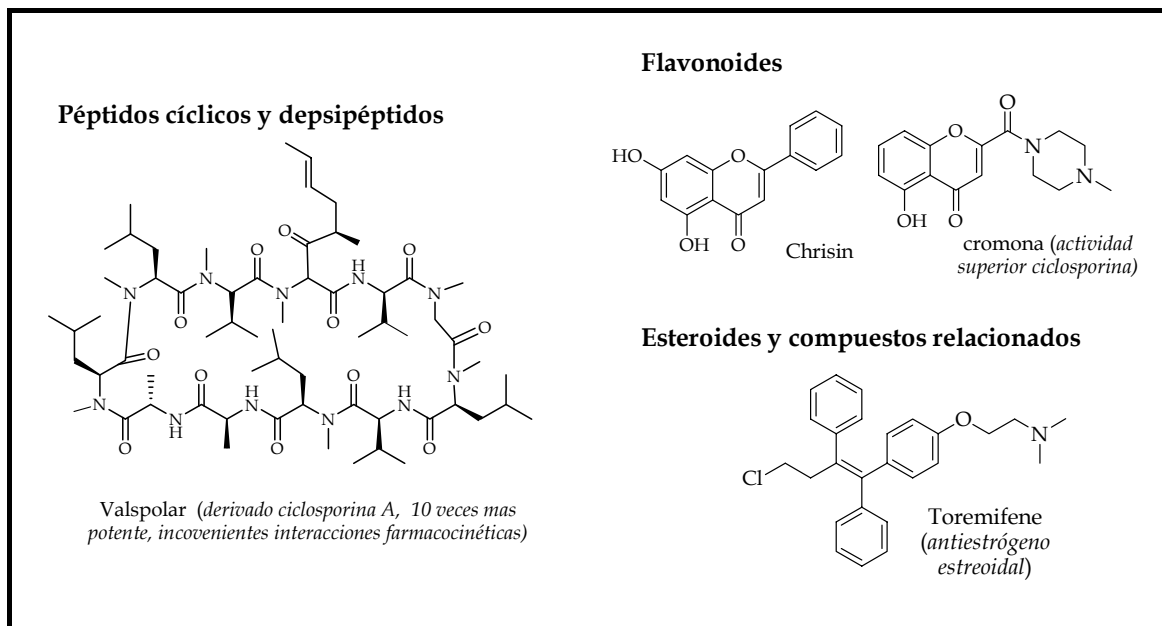
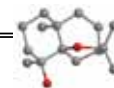


Figura 5.5.6. Clasificación de los moduladores de la Pgp según su familia química.

Dado la **amplia variedad** de quimomoduladores de la Pgp descritos y las diferentes características estructurales que presentan, no se ha logrado identificar ningún elemento estructural común a todos ellos, sólo se ha reconocido la existencia de anillos aromáticos coplanares y grupos aminos terciarios, pero esto no es general. Esto se podría explicar por la existencia de un gran sitio de unión inespecífico, el “bolsillo hidrofóbico”.

En cuanto a las características fisicoquímicas de estos quimiomoduladores²², en general son moléculas hidrofóbicas, anfipáticas, con un $\log P$ superior a 2,92, un axis molecular de 18 átomos o superior, una alta energía HOMO y al menos un átomo de nitrógeno terciario.

Se han realizado numerosos estudios 3D-QSAR para identificar el farmacóforo de estos moduladores²³. En general, se caracterizan por la presencia de al menos un aceptor de puentes de hidrógeno, zonas hidrofóbicas, algunas de ellas aromáticas y en algunos casos, un grupo ionizable.

Sin embargo, hasta la fecha ningún compuesto con actividad quimiosensibilizadora ha mostrado ser clínicamente útil, debido a su ineficacia *in vivo* o

²² Wang, R. B.; Kuo, C. L.; Lien, L. L.; Lien, E. J. *J. Clin. Pharm. Ther.* **2003**, 28, 203-228.

²³ Langer, T.; Eder, M.; Hoffman, R. D.; Chiba, P.; Ecker, G. F. *Arch. Pharm. Med Chem.* **2004**, 337, 317-327.

principalmente, a su toxicidad intrínseca o a la de los fármacos administrados conjuntamente²⁴.

Actualmente están en fase clínica los inhibidores de la Pgp de tercera generación, potentes inhibidores altamente específicos que han sido el resultado del diseño racional de fármacos basado en estudio de relación estructura-actividad²⁵.

Los inhibidores de 3ª generación que están actualmente en ensayos clínicos son: biricodar (VX-710), tariquidar (XR9576), zosuquidar (LY335979), elacridar (GF120918), laniquidar (R101933) y OC144-093. Sin embargo, ninguno de ellos ha incrementado los índices de curación o los tiempos de supervivencia en los pacientes tratados. Por lo tanto, la identificación de compuestos revertidores más específicos, potentes, no transportados y menos tóxicos para el paciente continúa siendo prioritario para tratar de revertir el fenómeno de la multirresistencia a fármacos mediada por la Pgp.

Actualmente, la **leishmaniasis** es la más importante de las enfermedades infecciosas emergentes e incontroladas²⁶ que afecta a 88 países. Se estima que unos 12 millones de personas están afectadas por alguno de las diferentes formas de la enfermedad (cutánea, cutánea difusa, mucocutánea y visceral) y alrededor de 350 millones de personas están en situación de riesgo²⁷. Recientemente, se ha producido un aumento desmesurado en la incidencia de la leishmaniasis, debido principalmente a los pacientes inmunodeprimidos por infecciones víricas y a fenómenos de resistencia desarrollados por los parásitos frente a los fármacos utilizados.

La quimioterapia es su principal tratamiento, pero el limitado número de fármacos efectivos, las diferentes manifestaciones de la enfermedad, la diferente sensibilidad al tratamiento de las diferentes especies de *Leishmania* y la aparición de resistencias, dificultan el control de la leishmaniasis. Entre los fármacos más utilizados están los antimoniales pentavalentes, como el Pentostam o el Glucantime, fármacos que necesitan tratamientos muy largos y costosos, su administración es por vía parenteral y tienen un alto nivel de resistencia, llegando a ser en países como la India superior al 60%²⁸. Los alquil-lisofosfolípidos (ALP), originalmente desarrollados como fármacos anticancerígenos, son considerados los agentes leishmanicidas más prometedores hoy

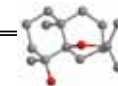
²⁴ Robert, J.; Jarry, C. *J Med Chem.* **2003**, *46*, 4805-4817.

²⁵ Krishna, R.; Mayer, L. D. *Eur J Pharm Sci.* **2000**, *11*, 265-283.

²⁶ <http://www.who.int/inf/en/pr-2002-46.html>; noticia hecha público por OMS/46, 17 de Junio del 2002.

²⁷ Hirst, S.; Staplet, L. A. *Parasitology. Today.* **2000**, *16*, 1.

²⁸ Sundar, S.; More, D. K.; Singh, M. K.; Singh, V. P.; Sharma, S.; Makharia, A. *Clin. Infect. Dis.* **2000**, *31*, 1104-1107.



día, principalmente mitelfosina y edelfosina.²⁹ La sobreexpresión de la Pgp se ha identificado como uno de los mecanismos causantes de la resistencia, resultando ineficaces los inhibidores convencionales de la Pgp humana, por lo que es necesario encontrar moduladores efectivos para la Pgp de los protozoos parásitos.

En nuestro grupo de investigación se ha evaluado la actividad de una amplia serie de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos, tanto como inhibidores de la Pgp humana como de la de *Leishmania tropica*^{30,31}. Estos metabolitos presentan una actividad quimiomoduladora prometedor y una baja toxicidad, lo que los convierte en potenciales agentes revertidores de la MDR, principal causa de la ineficacia en el tratamiento de la leishmaniasis, una de las parasitosis de mayor incidencia, así como del cáncer.

Con estos antecedentes y dada la estricta necesidad de buscar alternativas al grave problema que implica el fenómeno de la MDR, realizamos el estudio de la actividad revertidora de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos aislados de los frutos de *Maytenus cuzcoina* y sus derivados, cuyos resultados pasamos a describir.

²⁹ Urbina, J. A. *Parasitology*. **1997**, *114*, 91.

³⁰ Muñoz-Martínez, F.; Lu, P.; Cortés-Selva, F.; Pérez-Victoria, J. M.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Sharom, F. J.; Gamarro, F.; Castanys, S. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7130-7138.

³¹ Cortés-Selva, F.; Jiménez, I. A.; Muñoz-Martínez, F.; Campillo, M.; Bazzocchi, I. L.; Pardo, L.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Curr. Pharm. Desing.* **2005**, *11* (8), 3125-3139.

5.5.2. Resultados y discusión

Se realizó el estudio de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuránicos aislados de los frutos de *Maytenus cuzcoina*, **S1** a **S10** y **S12** y sus derivados, **1**, **2**, del **4** al **15**, **17**, **18** y del **20** al **26** (figura 5.5.7), como agentes revertidores de la resistencia múltiple a fármacos, evaluando su actividad tanto como inhibidores de la Pgp de *Leishmania tropica* como de la humana.

Los ensayos de la actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos se realizaron en el grupo de los Drs. Santiago Castanys y Francisco Gamarro, en el Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Granada.

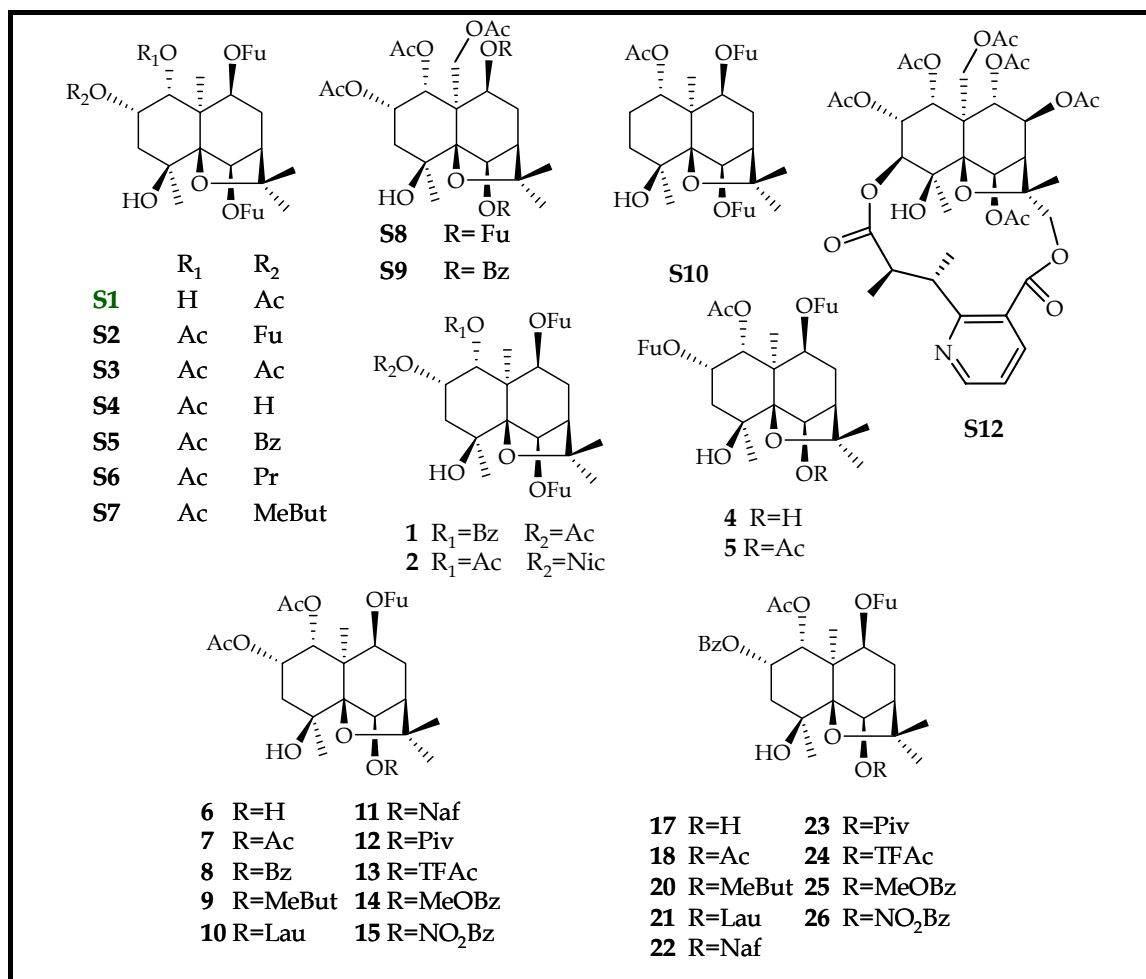
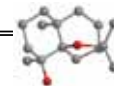


Figura 5.5.7. Sesquiterpenos ensayados como inhibidores de la Pgp de *Leishmania*



5.5.2.1. Actividad revertidora del fenotipo de multirresistencia a fármacos en *Leishmania*

Los sesquiterpenos aislados, **S1** a **S10**, **S12** y los derivados, **1**, **2**, del **4** al **15**, **17**, **18** y del **20** al **26**, fueron ensayados frente a una línea de *Leishmania tropica* con fenotipo MDR resistente a la daunomicina (DMN) y los resultados fueron comparados con la cepa salvaje (CS) de parásitos sin fármaco. Después de 72 horas de incubación de los parásitos resistentes en un medio con 150 μM DMN, empleando dos concentraciones diferentes de los sesquiterpenos ensayados, 7 y 15 μM , se observó una inhibición significativa del crecimiento, como se refleja en la Tabla 5.5.1. La metodología empleada por el grupo de investigación de los doctores F. Gamarro y S. Castanys se encuentra resumida en diversas publicaciones³².

Un cuidadoso estudio de los resultados obtenidos nos ha permitido establecer correlación entre las estructuras de los compuestos ensayados y su actividad, cuyas conclusiones resumimos a continuación:

- La serie de los productos naturales fueron los más activos, dentro de los cuales **S3** (94,4%), **S8** (94,3%) y **S9** (90,9%) resultaron los más potentes.
- De los derivados, sólo **11** (95,2%) y **12** (96,2%) mostraron una potente actividad, siendo ambos derivados de **S3**.
- Al comparar **S1** (OH, 46,8%), **S3** (OAc, 94,4%) y **1** (OBz, 51,1%), observamos que el mejor sustituyente en el C1 es un grupo acetato.
- Los productos aislados **S2** a **S7**, **S10** y el derivado **2**, constituyen una serie de sesquiterpenos con variaciones sobre el carbono 2, los resultados indican la preferencia por sustituyentes lipofílicos como un grupo acetato (**S3**) frente a sustituyentes hidrofílicos, como un grupo hidroxilo (**S4**).
- La presencia de un grupo acetato en el carbono 15 disminuye ligeramente la toxicidad en la línea salvaje, sin modificar su efecto revertidor, como se observa al comparar **S8** y **S3**.
- El compuesto macrocíclico **S12** no muestra actividad, debido probablemente a que es demasiado voluminoso para poder interactuar con el sitio activo del receptor. Estos resultados están de acuerdo con observaciones previas, que indicaron que las propiedades estéricas modulan la actividad.

³² Cortés-Selva, F.; Campillo, M.; Reyes, C. P.; Jiménez, I. A.; Castanys, S.; Bazzocchi, I. L.; Pardo, L.; Gamarro, F. Ravelo, A. G. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 576-587.

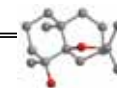
Tabla 5.5.1. Efecto de los sesquiterpenos en el crecimiento de una cepa salvaje (CS) y una con fenotipo MDR de *Leishmania tropica*.

Compuesto	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO (%)			
	15 μ M		7 μ M	
	CS	MDR	CS	MDR
S1	1,09 \pm 1,02	46,8 \pm 6,5	23,4 \pm 8,6	1,9 \pm 2,0
S2	23,4 \pm 3,1	93,5 \pm 1,7	18,1 \pm 6,4	86,2 \pm 0,2
S3	15,2 \pm 3,5	94,4 \pm 1,8	9,7 \pm 6,5	90,9 \pm 2,1
S4	-	28,7 \pm 8,1	-	9,1 \pm 6,3
S5	35,3 \pm 5,8	92,7 \pm 5,5	21,4 \pm 8,6	93,7 \pm 1,5
S6	26,8 \pm 2,9	95,8 \pm 1,6	20,6 \pm 2,5	94,8 \pm 4,5
S7	31,5 \pm 6,2	94,7 \pm 2,5	24,9 \pm 8,0	92,0 \pm 1,6
S8	7,2 \pm 6,0	94,3 \pm 3,0	-	89,5 \pm 2,0
S9	15,2 \pm 5,6	90,9 \pm 5,0	11,0 \pm 6,6	89,9 \pm 5,2
S10	24,6 \pm 7,1	89,9 \pm 4,8	16,4 \pm 4,9	89,0 \pm 1,3
S12	-	-	-	-
1	3,6 \pm 2,5	51,1 \pm 1,2	3,4 \pm 2,8	29,1 \pm 6,8
2	8,4 \pm 0,6	59,6 \pm 2,2	4,6 \pm 0,4	29,4 \pm 1,8
4	-	44,5 \pm 2,1	-	28,5 \pm 13,4
5	-	-	-	-
6	-	10,9 \pm 7,9	-	-
7	-	50,6 \pm 9,3	-	17,1 \pm 6,7
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	80,5 \pm 4,5	-	29,2 \pm 10,6
11	10,6 \pm 0,6	95,2 \pm 1,3	-	50,7 \pm 8,5
12	-	96,7 \pm 0,0	-	82,5 \pm 5,9
13	-	7,1 \pm 2,7	-	-
14	17,2 \pm 0,6	98,4 \pm 0,7	-	85,0 \pm 3,2
15	-	59,5 \pm 2,8	-	15,5 \pm 3,0
17	8,0 \pm 4,6	81,9 \pm 3,3	-	41,1 \pm 6,7
18	-	45,0 \pm 5,2	-	14,3 \pm 7,3
20	-	28,0 \pm 9,2	-	10,4 \pm 6,3
21	-	9,2 \pm 4,2	-	-
22	-	8,6 \pm 3,5	-	-
23	-	77,6 \pm 4,5	-	25,9 \pm 3,5
24	-	36,9 \pm 4,6	-	9,7 \pm 2,3
25	-	11,8 \pm 0,7	-	-
26	10,8 \pm 2,5	51,1 \pm 4,1	-	26,4 \pm 1,3

CS: cepa salvaje de parásitos. MDR: cepa con fenotipo MDR. Los resultados se expresan como el % de inhibición del crecimiento (%IC) con respecto al control en ausencia de sesquiterpeno.

Los datos son la media de tres experimentos independientes \pm la desviación estándar.

Los porcentajes de inhibición entre 0 y 6 % se indican con una línea.



- La comparación de la actividad de **S2**, **S3** y **S5** con **4**, **6** y **17**, respectivamente, nos permite concluir la preferencia de un éster sobre el carbono 6 a un grupo hidroxilo.
- En general, el mejor sustituyente en el carbono 6 para la expresión de la actividad MDR en *Leishmania* es un grupo furoato.

Al objeto de confirmar la capacidad de estos sesquiterpenos como revertidores, se determinaron las CI_{50} de daunomicina (DNM) en una línea de parásitos con fenotipo MDR (tabla 5.5.2), usando dos concentraciones, 7 y 15 μM , de los sesquiterpenos más activos y más selectivos (**S3**, **S8** y **S9**). Los parásitos fueron expuestos a concentraciones crecientes de DNM en presencia o ausencia de los sesquiterpenos, expresando los resultados como la concentración de daunomicina necesaria para inhibir el crecimiento del 50% de los parásitos (CI_{50}).

Tabla 5.5.2. CI_{50} de daunomicina en una línea MDR de *L. tropica*^a de los sesquiterpenos **S3**, **S8** y **S9**.

Línea del parásito	Concentración μM	Compuesto	CI_{50} μM	I.R. ^b
MDR	7	S3	30.0 \pm 3.6	7.8
		S8	33.3 \pm 9.8	8.7
		S9	39.0 \pm 6.0	10.2
	15	S3	9.0 \pm 1.4	2.3
		S8	11.0 \pm 2.8	2.9
		S9	20.0 \pm 4.2	5.2
		c ^c	290 \pm 24.8	75.5
CS		c ^c	3.8 \pm 0.9	1

^a los resultados mostrados son la media de tres ensayos independientes \pm la desviación estándar.

^b **I.R. Índice de Resistencia:** relación de CI_{50} de la línea MDR y la línea CS.

^cc: control, ensayo sin sesquiterpeno.

Los resultados indican (tabla 5.5.2) que a la concentración de 15 μM de los compuestos **S3**, **S8** y **S9** se reduce el índice de resistencia (I.R.) de 75,5 a 2,3, 2,9 y 5,2, respectivamente.

La resistencia a la daunomicina en una línea de *Leishmania tropica* con fenotipo MDR está relacionada con un descenso de la concentración intracelular del fármaco.

Para confirmar que el efecto revertidor observado con estos sesquiterpenos se correlaciona con un incremento de la acumulación del fármaco (DMN) como consecuencia de la inhibición de la glicoproteína P, se realizó el análisis por citometría de flujo de la acumulación de la calceína. El acetoximetilester de la calceína (CAL-AM) es un compuesto neutro muy hidrofóbico, no fluorescente que se transporta al interior celular por difusión y al exterior por la Pgp. Las esterasas intracelulares hidrolizan los enlaces éster de la CAL-AM y la transforman en el ácido libre, calceína (CAL), hidrofílica (no atraviesa la bicapa lipídica), intensamente fluorescente y no es transportada por la Pgp, siendo retenida en el interior celular. El alto coeficiente de emisión molar de la CAL, el hecho que sea retenida por las células, que la fluorescencia sea insensible a cambios fisicoquímicos de la célula, así como sus valores máximos de excitación y emisión (496 y 517 nm, respectivamente) hacen que este compuesto sea idóneo para los estudios sobre la funcionalidad de la Pgp mediante técnicas de fluorometría de flujo.

El análisis de citometría de flujo mostró el efecto quimiomodulador de estos sesquiterpenos, al producirse un aumento de la concentración intracelular de calceína, lo que significa una inhibición de la Pgp (figura 5.5.8).

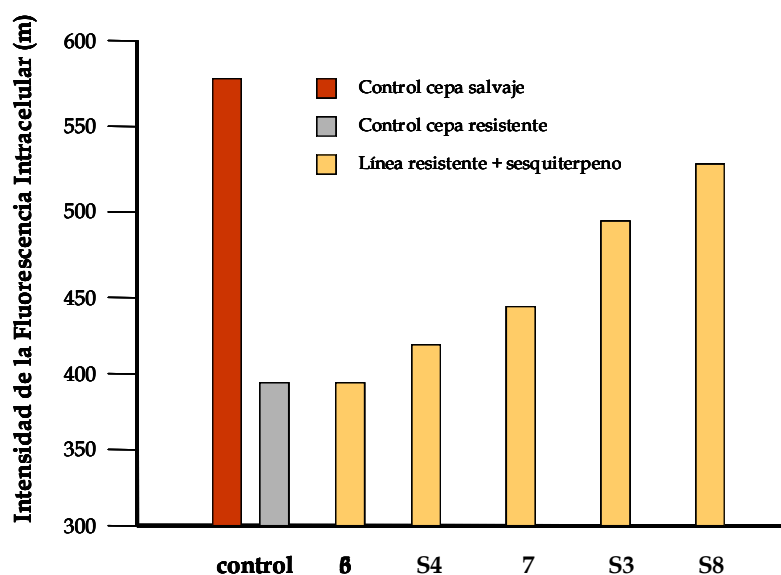
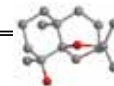


Figura 5.5.8 . Acumulación intracelular de calceína en las líneas de *L. trópica*. Los histogramas de intensidad de fluorescencia se obtuvieron por citometría de flujo, tras incubar durante 1h a 28°C los parásitos resistentes con 2 μM de acetoximetiléster de calceína y 200 μM de los sesquiterpenos ensayados.



Estos datos permiten concluir que nos encontramos ante un grupo de sesquiterpenos realmente prometedores como agentes moduladores de la multirresistencia a fármacos en *Leishmania*, resultando **S3**, **S7** y **S8** los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos más activos ensayados hasta el momento²⁷.

Cabe destacar que el interés despertado por estos compuestos por su actividad como quimiomoduladores de la Pgp en *Leishmania tropica*, ha dado lugar a que este tema fuera objeto de un trabajo de investigación, recogido en la Memoria de la Tesis Doctoral³³ titulada “*Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos naturales y semisintéticos como revertidores del fenotipo MDR mediado por la glicoproteína-P en Leishmania tropica*”.

³³ Cortés-Selva, F. *Sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos naturales y semisintéticos como revertidores del fenotipo MDR mediado por la glicoproteína-P en Leishmania tropica*. 2004, Tesis Doctoral, Universidad de Granada.

5.5.2.2. Actividad inhibidora de la Pgp humana.

Los sesquiterpenos aislados, **S1** a **S10** y los derivados, **1**, **2**, **4** -**15**, **17**, **18** y **20** -**26**, se evaluaron por su actividad revertidora mediada por la Pgp humana.

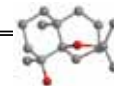
En la tabla 5.5.3 se presentan los resultados obtenidos para la resistencia a la daunomicina en células NIH-3T3 (células de fibroblastos de ratón) que expresan la Pgp (NIH-3T3 MDR1-G185). La metodología empleada para la determinación de la actividad revertidora de estos sesquiterpenos se describe en la parte experimental del trabajo que se recoge en el *Cancer Research* 2004, 64, 7130-7138.

Los resultados se expresan como la constante de inhibición (K_i) en μM , que se define como la concentración de sesquiterpeno que inhibe el transporte de la daunomicina mediado por la Pgp en un 50% (tabla 5.5.3).

Tabla 5.5.3. Inhibición de la resistencia a la daunomicina mediada por la Pgp en células NIH 3T3 transfectadas con *mdr1*^a

sesquiterpeno	K_i^b (μM)	sesquiterpeno	K_i (μM)
S1	>100	9	2,81±2,10
S2	2,19±0,46 ^c	10	0,80±0,09
S3	2,91±0,43	11	1,64±0,05
S4	4,16±0,21	12	0,96±0,07
S5	0,70±0,05	13	12,08±2,40
S6	1,13±0,16	14	0,70±0,05
S7	0,56±0,06	15	4,76±0,58
S8	2,44±0,25	17	2,50±0,51
S9	1,50±0,08	18	2,92±0,16
S10	6,61±0,85	20	1,00±0,07
1	3,45±2,15	21	5,16 ±3,01
2	7,42±0,25	22	4,59±0,87
4	5,53±0,79	23	1,04±0,07
5	4,13±0,03	24	1,55±0,24
6	17,48±8,27	25	1,88±0,11
7	>100	26	1,79±0,22
8	8,94±1,02		

^a Los sesquiterpenos se ensayaron como inhibidores del transporte de la daunomicina mediado por la Pgp en células NIH-3T3 transfectadas con el gen de la Pgp *mdr1* humana. ^b Los valores de K_i se determinaron usando la ecuación de Hill para interacciones alostéricas usando el software SigmaPlot 2000: $i = (I_{max} \times S^n) / (K_i + S^n)$, donde i es la inhibición del transporte de daunomicina a la concentración del sesquiterpeno administrada, I_{max} es la inhibición máxima (causada por 5 mmol/L de vanadato, un potente inhibidor de la Pgp), S es la concentración de sesquiterpeno y n el coeficiente de Hill. ^c Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar ($P < 0,001$) de 2-3 experimentos independientes, realizados por triplicado.



Los sesquiterpenos que resultaron mas activos (con una $K_i < 1,0 \mu\text{M}$) fueron **S5** ($0,70 \mu\text{M}$) y **S7** ($0,56 \mu\text{M}$) y los derivados de **S3**, **12** ($0,96 \mu\text{M}$), **14** ($0,8 \mu\text{M}$) y **10** ($0,70 \mu\text{M}$). En un estudio de la relación de la estructura con la actividad inhibidora de la Pgp (K_i), podemos establecer las siguientes conclusiones:

- Al comparar **S1** (OH, $>100 \mu\text{M}$) con **S3** (OAc, $2,91 \mu\text{M}$) y con el derivado **1** (OBz, $3,45 \mu\text{M}$), que presentan variación del sustituyente en el carbono 1, se deduce que la presencia de un grupo hidroxilo en C1 disminuye drásticamente la actividad, resultando el grupo acetato el mejor de los sustituyentes en esta posición.
- La presencia de un éster en el carbono 2 es fundamental para la actividad, así, el sesquiterpeno no sustituido (**S10**, $6,61 \mu\text{M}$) es menos activo que aquellos con un grupo hidroxilo (**S4**, $4,16 \mu\text{M}$) y a su vez éstos menos activos que los que tienen un grupo éster en esta posición (**S2**, **S3**, **S5-S7**; $2,91-0,56 \mu\text{M}$).
- Existe una preferencia por ésteres voluminosos, alifáticos tipo 2-metilbutirato (**S7**, $0,56 \mu\text{M}$) o aromáticos, tipo benzoato (**S5**, $0,70 \mu\text{M}$) en el carbono 2. Mientras que los ésteres aromáticos con un heteroátomo, tipo furoato (**S2**, $2,19 \mu\text{M}$) o nicotinato (**2**, $7,42 \mu\text{M}$) en esta posición, disminuyen la actividad inhibidora.
- Con respecto al sustituyente sobre el carbono 6, un grupo hidroxilo o acetato incrementa significativamente la K_i : **S2** (OFu, $2,19 \mu\text{M}$) *versus* **4** (OH, $5,53 \mu\text{M}$) y **5** (OAc, $4,13 \mu\text{M}$); **S3** (OFu, $2,91 \mu\text{M}$) *versus* **6** (OH, $17,48 \mu\text{M}$) y **7** (OAc, $>100 \mu\text{M}$); **S5** (OFu, $0,70 \mu\text{M}$) *versus* **17** (OH, $2,50 \mu\text{M}$) y **18** (OAc, $2,92 \mu\text{M}$).
- En cuanto al mejor éster en el carbono 6 para la expresión de la actividad, no se pudo concluir, ya que los derivados más activos del sesquiterpeno **S3** (**6-15**) y **S5** (**17-18-26**), no presentan el mismo sustituyente en dicho carbono.
- La presencia de un grupo acetato en el carbono 15 disminuye la K_i , lo que se refleja al comparar **S3** (CH_3 , $2,91 \mu\text{M}$) con **S8** (CH_2OAc , $2,44 \mu\text{M}$).
- Comparación de **S8** ($2,44 \mu\text{M}$) y **S9** ($1,50 \mu\text{M}$), que presentan sobre C6 y C9 grupos benzoatos (**S9**) y furoatos (**S8**), respectivamente, indica que el éster furoato en estas posiciones disminuye la actividad. Esto es algo general, ya que la presencia de un OFu sobre C2 (**S2**) disminuye también la actividad.

5.5.3. Estudio del mecanismo de acción de los sesquiterpenos como revertidores de la Pgp humana.

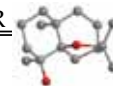
Se estudió el mecanismo de acción de estos sesquiterpenos, trabajos que se han llevado a cabo utilizando diferentes metodologías. Para la medición *in situ* de la capacidad de la Pgp humana para transportar los sesquiterpenos, se empleó el derivado marcado **43**, preparado a partir de **T3**, aislado de *Crossopetalum tonduzii*, ya que ninguno de los sesquiterpenos poseía una fluorescencia intrínseca.

La evaluación de la actividad como quimiomoduladores de la Pgp humana de estos sesquiterpenos y el estudio de su mecanismo de acción ha sido objeto de una Tesis Doctoral³⁴, cuyos resultados podemos resumir en las siguientes conclusiones:

- Los sesquiterpenos revierten el fenotipo MDR en células tumorales que sobre-expresan la Pgp porque bloquean su capacidad para transportar fármacos.
- Los sesquiterpenos son selectivos para la Pgp, ya que son incapaces de bloquear la actividad de los transportadores homólogos, MRP1, MRP2 y BCRP.
- La unión de los sesquiterpenos a los dominios transmembrana de la proteína provoca sutiles cambios conformacionales que afectan a la hidrólisis del ATP (no a su unión) y a la unión y transporte de los fármacos.
- Los sesquiterpenos se unen al dominio transmembrana de la Pgp, estableciéndose al menos dos sitios de unión, a los que se unen con diferente afinidad. Dichos sitios de unión se solapan con los del verapamilo y la ciclosporina A, pero son físicamente distintos a los de la vinblastina, progesterona y elacridar.
- La Pgp no confiere resistencia cruzada a los sesquiterpenos estudiados en las células en las que se sobre-expresa. Ello es debido a que la Pgp es incapaz de transportar los sesquiterpenos, o lo hace con muy baja eficiencia.

Todas estas características hacen de los sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos potenciales agentes quimiomoduladores, que podrían solucionar el problema de la multirresistencia a fármacos, uno de los principales responsables de la ineficacia de la quimioterapia.

³⁴ Muñoz-Martínez, F. *Sesquiterpenos dihidro- β -agarofurano como revertidores de la resistencia celular a múltiples fármacos causada por la Glicoproteína-P MDR1 humana*. 2005, Tesis Doctoral, Universidad de Granada.



5.5.4. Diseño de fármacos asistido por ordenador: 3D-QSAR.

5.5.4.1. Introducción

La búsqueda de nuevos fármacos es un proceso largo y costoso, en el que el uso de técnicas informáticas ha facilitado y abaratado muchas de las etapas en la investigación y desarrollo de un nuevo medicamento¹. Ejemplo de aplicaciones informáticas, específicamente creadas para la industria farmacéutica, son las utilizadas en la búsqueda de dianas terapéuticas empleando métodos bioinformáticos², los procedimientos de búsqueda en bibliotecas moleculares³, el diseño de compuestos con una alta probabilidad de presentar la actividad biológica deseada o la predicción de reacciones químicas mediante técnicas de química computacional⁴.

En el diseño de un nuevo fármaco se maneja una gran cantidad de información, cuyo procesamiento se ha visto simplificado por la aplicación de técnicas informáticas, que se conocen en su conjunto como técnicas computacionales en el diseño de fármacos o diseño de fármacos asistido por ordenador⁵ (CADD, *Computer-Assisted Drug Design*).

Estas técnicas nos permiten tanto almacenar como visualizar datos biológicos y estructurales, que se pueden procesar generando un modelo que nos aporta una mayor comprensión sobre la interacción ligando-receptor, además de permitirnos realizar predicciones de nuevos fármacos con mejores propiedades (figura 5.5.9).

¹ Ambesi-Impiombato, A.; di Benardo, D. *Curr. Bioinformatics*. **2006**, *1*(1), 3-13.

² Jiang, Z.; Zhou, Y. *Am. J. Pharmacogenomics*. **2005**, *5* (6), 387-396.

³ Langer, T.; Wolber, G. *Drug Discov. Today: Technologies*. **2004**, *1* (3), 203-207.

⁴ Warshel, A. *Computer Modeling of Chemical Reactions in Enzymes and Solution*. 1991, New York: Wiley VCH.

⁵ Avendaño, C. *Introducción a la Química Farmacéutica*. **2001**, Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España S. A. U.

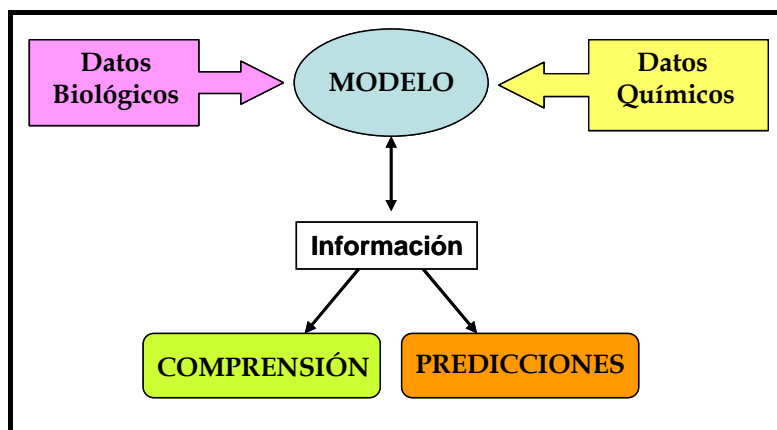


Figura 5.5.9. Elementos en el diseño de fármacos asistido por ordenador.

Al abordar el diseño de fármacos asistido por ordenador, también denominado modelización molecular (figura 5.5.10), existen actualmente dos estrategias: los métodos directos y los indirectos⁶.

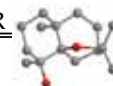
- **Métodos Directos.** Se emplean cuando conocemos la estructura tridimensional de la proteína implicada en el estudio por medios experimentales, estudios de Rayos X o de RMN, o bien a través de la construcción de modelos moleculares, utilizando la estructura tridimensional del receptor o diana terapéutica para el diseño de ligandos.

Existe un base de datos de proteínas (PDB, *protein data bank*) que recoge todas las estructuras experimentales publicadas (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Además, se conoce la estructura tridimensional de muchos complejos proteína-ligando (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>), de forma que el sitio y modo de unión sirven como un excelente punto de partida para el diseño de fármacos. En el resto de los casos, para la determinación del sitio de unión hay que recurrir a técnicas de biología molecular o de modelización computacional. Esta última técnica se puede emplear también cuando no poseemos experimentalmente la estructura tridimensional de la proteína, como ocurre en la mayoría de las ocasiones, obteniendo un modelo teórico de la estructura proteica, que si bien en ninguno de los casos es la representación exacta, nos permite explorar las zonas de interés de la proteína con una cierta garantía.

Los programas informáticos que se conocen como *docking* o acoplamiento nos permiten explorar y evaluar los posibles modos de interacción de nuevos ligandos con la proteína, determinándose los residuos implicados en dicha unión⁷. Se pueden

⁶ Jorgensen, W. L. *Science*. 2004, 303, 1813-1818.

⁷ Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. *Nature Rev. Drug Discov.* 2004, 3, 935-949.



realizar estudios cuantitativos que relacionan los parámetros de la unión ligando-receptor con la actividad biológica, evaluándose la constante de acoplamiento de cada ligando mediante la modelización teórica de la energía de unión del ligando al receptor. Estos cálculos son mas costosos y se suelen realizar en los casos en que se ha identificado de manera experimental el sitio de unión del ligando a la proteína.

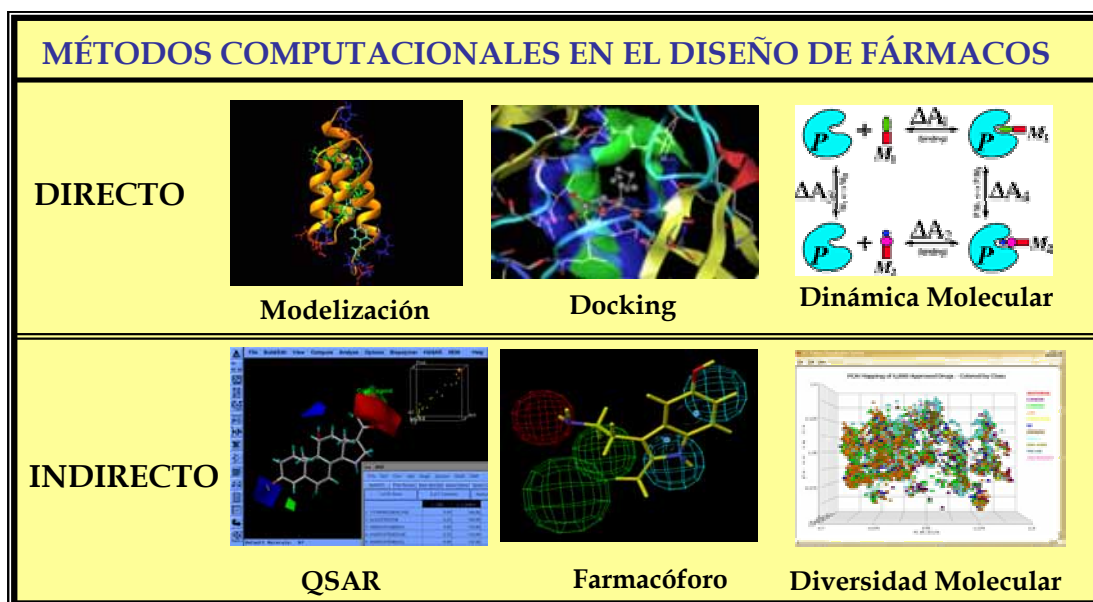


Figura 5.5.10. Métodos computacionales empleados en la búsqueda de nuevos fármacos.

- **Métodos Indirectos.** Se basan en el análisis de las propiedades moleculares y datos de actividad biológica de una serie de ligandos, no teniendo en cuenta la estructura del receptor. Estos métodos se fundamentan en la semejanza molecular y se conocen como estudios cuantitativos de la relación estructura actividad (QSAR, *Quantitative Structure Relationship*). Estos métodos requieren datos biológicos relevantes y datos químicos descriptivos (descriptores), definiendo posteriormente un modelo que nos va a permitir optimizar la potencia y selectividad de los ligandos^{8,9}.

Los primeros intentos de expresar cuantitativamente estas relaciones datan del siglo XIX, pero no fue hasta la década de los 60 cuando Hansch¹⁰ y Fujita¹¹ introdujeron esta metodología en la química farmacéutica, planteando relaciones cuantitativas entre parámetros fisicoquímicos moleculares (descriptores moleculares) y actividad biológica, utilizando técnicas estadísticas. En los últimos años se han desarrollado

⁸ Kubinyi. *Drug Discov. Today*. **1997**, 2, 457-467.

⁹ Kubinyi, H. *Drug Discov. Today*. **1997**, 2, 538-546.

¹⁰ Hansch; C.; Steward; A. R. *J. Med. Chem.* **1964**, 44, 691-694

¹¹ Iwasa, J.; Fujita, T.; Hansch; C. *J. Med. Chem.* **1965**, 56, 150-153.

nuevos y potentes métodos que estudian la relación estructura-actividad, utilizando descriptores moleculares que tienen en cuenta la estructura tridimensional del ligando, denominándose estos estudios 3D-QSAR (*Three Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship*, estudios cuantitativos en tres dimensiones de la relación estructura-actividad). La complejidad de los cálculos matemáticos necesarios y la representación gráfica de los modelos hace que los ordenadores sean imprescindibles para el desarrollo de estos métodos.

Actualmente existen los estudios 4D-QSAR (incorpora el libre alineamiento y conformación de los ligandos)¹², 5D (considera tanto la flexibilidad del ligando como del receptor)¹³, hasta 6D (podemos considerar simultáneamente diferentes modelos de solvatación), con los que se han obtenido buenos resultados (mayores coeficientes de correlación)¹⁴.

Para la mayoría de los fármacos no se conoce la estructura tridimensional de sus receptores, por lo que la elaboración de un modelo hipotético del farmacóforo (grupos relevantes de la molécula que interactúan con el receptor y que son responsables de la actividad), a partir de una serie de compuestos que interactúan con un mismo receptor con diferentes afinidades, es esencial para la comprensión de la interacción ligando-receptor a nivel molecular. Si se establecen relaciones geométricas entre los diferentes grupos farmacofóricos, tenemos un farmacóforo tridimensional, y con ello una imagen gráfica del lugar de unión del receptor, ya el farmacóforo hace referencia a los lugares del receptor que interactúan con él.

Los diferentes métodos 3D-QSAR se dividen según los descriptores (propiedades químicas de la molécula implicadas en la unión con el receptor) y según el análisis estadístico que se emplea. Los métodos 3D-QSAR más empleados son el análisis comparativo de los factores moleculares (CoMFA, *Comparative Molecular Fields Analysis*)¹⁵, el análisis comparativo de los índices de similitud molecular (CoMSIA, *Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*)¹⁶ y el método GRID/GOLPE¹⁷. El CoMFA calcula dos tipos de campo de interacción molecular: el estérico y el electrostático, mientras que el que el CoMSIA emplea además de estos, los factores

¹² Hopfinger, A. J.; Wang, S.; Tokarski, J. S.; Baiqiang, J.; Albuquerque, M.; Prakash, J. M.; Duraiswami, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10509-10524.

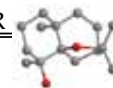
¹³ Vendani, A.; Dobler, M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2139-2149.

¹⁴ Vendani, A.; Dobler, M.; Lill, M. A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3700-3703.

¹⁵ Cramer, R. D.; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5959-5967.

¹⁶ Klebe, G.; Abraham, U.; Mietzner, T. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4130-4146.

¹⁷ Baroni, M.; Constantino, G.; Cruciale, G.; Riganelli, D.; Valigi, R.; Clementi, S. *Quan. Struct-Act. Relat.* **1993**, *12*, 9-20.



hidrofóbicos y descriptores de grupos aceptores y dadores en el receptor, utilizando ambos métodos el mismo tratamiento estadístico, el análisis multivariante de mínimos cuadrados parciales (PLS, *Partial Least Square*), mientras que en el método GRID/GOLPE se realiza una serie de pre-tratamientos de los valores de los campos de interacción molecular (MIF_s, *Molecular Interaction Fields*). En todas estas técnicas, existen dos aspectos cruciales para obtener buenos resultados, disponer de un conjunto de ligandos adecuados y que estos estén correctamente alineados, es decir, adecuadamente superpuestos en el seno de la red de puntos en los que se calcularán los potenciales de interacción. El alineamiento se realiza teniendo en cuenta los grupos funcionales responsables de la interacción. Existen varios programas que no requieren la alineación de las moléculas en el espacio, lo que supone una ventaja y además, consideran la flexibilidad de los ligandos a la hora de construir el farmacóforo, siendo uno de los más usados el Catalyst, disponible por Accelrys Inc (<http://www.accelrys.com/products/catalyst/>). Este programa tiene la ventaja de incorporar un buscador rápido en bases de datos tridimensionales (figura 5.5.11).

Una vez que conocemos el farmacóforo requerido para una cierta actividad biológica, que se puede conocer a partir de un grupo de ligandos o mediante un estudio del receptor, existen dos métodos para la identificación de nuevas moléculas que tengan las características de dicho farmacóforo: el diseño *de novo* y la realización de una búsqueda en una base datos¹⁸ (*in silicon screening*), (figura 5.5.11). Existen diferentes bases de datos con estructuras moleculares tridimensionales, algunas de ellas gratuitas como la del Instituto Nacional del Cáncer (<http://cactus.nci.nih.gov/ncidb2//>).

Además, existen estudios QSAR que relacionan la estructura con los fenómenos farmacológicos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME) del candidato a fármaco. Estos métodos representan un ahorro, tanto económico como de tiempo, en el desarrollo de nuevos fármacos¹⁹.

¹⁸ Miller, M. A. *Nature. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 220-227.

¹⁹ Hansch, C.; Leo, A.; Meikapati, S. B.; Kurup, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3391-3400.

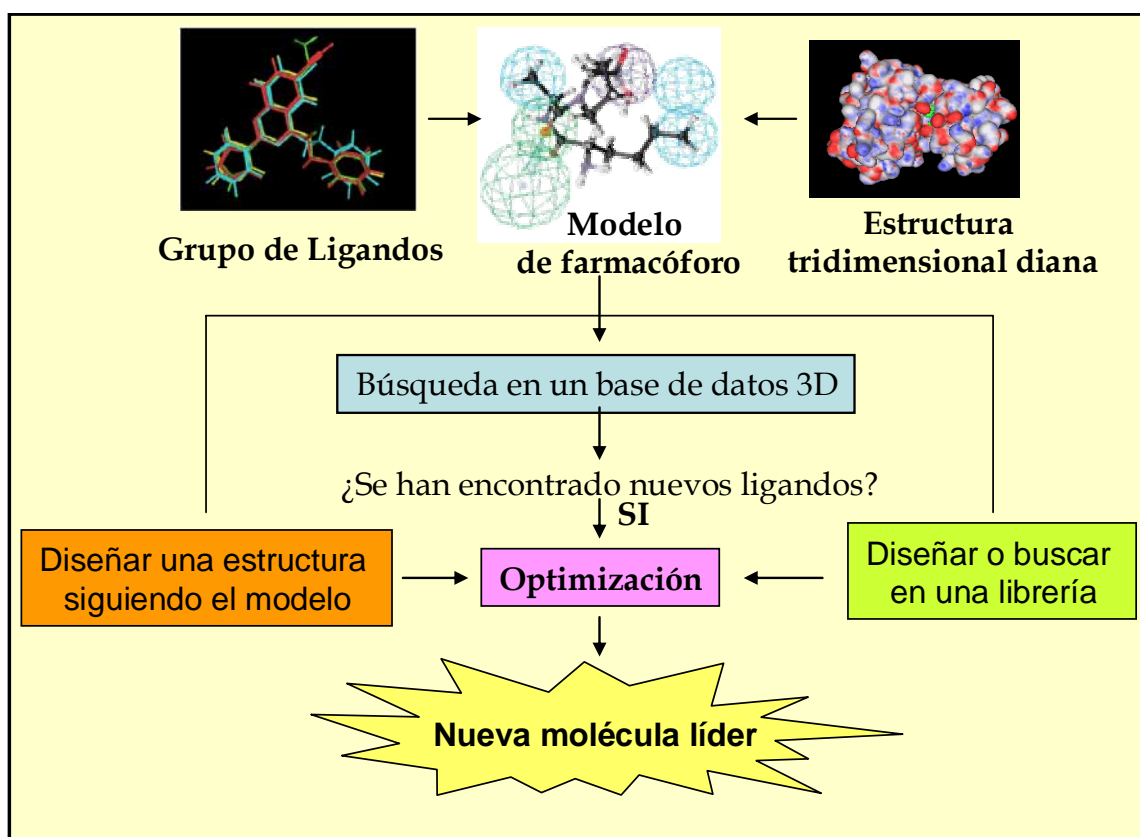
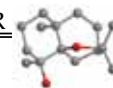


Figura 5.5.11. Pasos que se siguen en la búsqueda de nuevas moléculas activas en bases de datos tridimensionales basada en el farmacóforo.

Todo esto hace que hoy día los estudios 3D-QSAR estén muy extendidos en la investigación farmacéutica. El concepto de farmacóforo ha demostrado ser extremadamente eficaz, no sólo en el estudio de las relaciones estructura-actividad, sino también en el desarrollo de herramientas tridimensionales, apropiadas para la búsqueda eficaz de nuevos ligandos y por consiguiente de nuevos compuestos bioactivos²⁰.

En nuestro grupo de investigación poseemos una **amplia quimioteca de sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos**, resultado del trabajo objeto de esta Tesis Doctoral y de investigaciones previas, los cuales han sido evaluados como revertidores de la multirresistencia a fármacos en *Leishmania* e inhibidores de la Pgp humana. Dada la gran cantidad de metabolitos ensayados, nos pareció de interés elaborar **un modelo de farmacóforo** mediante **estudios 3D-QSAR** utilizando un análisis CoMSIA, que nos proporcionara información sobre la resgiosustitución y la disposición espacial de los

²⁰ Güner, O. *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 1321-1332.



distintos grupos funcionales que debe tener este tipo de metabolitos para que sea más potente y selectivo como modulador de la Pgp, además de poder predecir la actividad de un sesquiterpeno de origen natural, derivado o sintético.

Así, con los metabolitos obtenidos del estudio fitoquímico de *Maytenus cuzcoina* y sus derivados (**S1-S10**, **1**, **2**, **4-15**, **17**, **18**, **19-26**)^{21,22}, y sesquiterpenos aislados de otras especies de *Celastraceae*: *Maytenus magellanica* (**MAMA 1-14**)^{22, 23}, *M. chiapiensis* (**MACHI1-5**)²³, *M. canariensis* (**MACA3 y 4**)^{22, 23}, *M. chubutensis* (**MACHU1 y 4**)^{22, 23}, *Euonymus europeus* (**EUNE3 y 4**), *Crossopetalum tonduzii* (**CROU3-6**)²³ y *Zinowewia costaricensis* (**ZINO1-19**)²⁴, cuyas estructuras y actividades se encuentran en los anexos 2 y 3, llevamos a cabo los estudios 3D-QSAR. **Se realizaron dos modelos**, uno empleando el porcentaje de inhibición del crecimiento (%IC) en la cepa de *Leishmania tropica* con el fenotipo MDR y otro modelo estudiando la actividad revertidora en células animales, utilizando como parámetro la constante de inhibición de la Pgp humana (*K_i*). A continuación pasamos a discutir los resultados obtenidos en estos estudios.

5.5.4.2. Metodología.

Para la elaboración de los modelos 3D-QSAR se empleó un análisis CoMSIA, que se lleva a cabo en el módulo QSAR del programa SYBYL 6.6²⁵, usando los parámetros que vienen por defecto. Este trabajo se realizó durante una estancia que llevé a cabo con los profesores Mercedes Campillo y Leonardo Pardo en el laboratorio de Química Computacional, Unidad de Bioestadística de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Al generar el modelo se siguieron los siguientes pasos:

A) Creación de la base de datos, con los valores de la actividad revertidora y la estructura, calculando previamente la conformación de menor energía, la distribución de cargas, la solvatación y el log *P*. Un paso crítico en el análisis CoMSIA es seleccionar

²¹ Cortés-Selva, F.; Campillo, M.; Reyes, C. P.; Jiménez, I. A.; Castanys, S.; Bazzocchi, I. L.; Pardo, L.; Gamarro, F.; Ravelo, A. G. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 576-587.

²² Muñoz-Martínez, F.; Pehiu, L. Cortés-Selva, F.; Pérez-Victoria, J. M.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Sharom, F. J.; Gamarro, F.; Castanys, S. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7130-7138.

²³ Cortés-Selva, F.; Jiménez, I. A.; Muñoz-Martínez, F.; Campillo M.; Bazzocchi, I. L.; Pardo, L.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Curr. Pharm. Design.* **2005**, *11*, 3125-3139.

²⁴ Muñoz-Martínez, F.; Mendoza, C. R.; Bazzocchi, I. L.; Castanys, S.; Jiménez, I. A.; Gamarro, F. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4266-4275.

²⁵ SYBYL 6.6, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, MO, 63144.

la correcta alineación de las moléculas en el espacio. **Todos los sesquiterpenos se alinearon por superposición del esqueleto común de dihidro- β -agarofurano.**

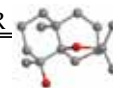
La actividad revertidora se explica en función tanto de la energía de estabilización del complejo ligando (sesquiterpeno)-receptor (la glicoproteína-P), como de la energía que necesita el ligando para desolvatarse y entrar en la membrana plasmática (energía de solvatación y $\log P$).

En la base de datos se incluyeron los descriptores, calculados por el CoMSIA y que van a mimetizar la energía de estabilización del complejo receptor-ligando. En los modelos se emplearon los factores estérico, electroestático, hidrofóbico y descriptores de grupos dadores así como de aceptores de puentes de hidrógeno en el receptor.

B) Análisis estadístico multivariante. El CoMSIA emplea el análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS, *Partial least squares*) para obtener las ecuaciones lineales de las matrices resultantes. Aplicamos una validación cruzada, denominada *Leave One Out* (LOO) para seleccionar el número de componentes principales y calcular los parámetros estadísticos de la validación cruzada. El modelo final de CoMSIA se obtuvo utilizando una validación no cruzada con el número de componentes sugerido por la validación LOO, obteniéndose el valor final (r^2) que nos indica la fiabilidad del modelo generado, es decir, su poder de predicción.

C) Representación de los mapas de contorno. Estos mapas indican las zonas de preferencia estérica, electroestática, hidrofóbica, de aceptores y dadores de puentes de hidrógeno de la diana. Para la visualización de los mapas ajustamos los valores de contribución para cada uno de los descriptores:

- **Estérico**
 - Zonas verdes** (favorable): los grupos voluminosos que interaccionen con estas zonas aumentan la actividad.
 - Zonas amarillas** (desfavorable): los grupos que interaccionen con esta zona se correlacionan con una disminución de la actividad.
- **Electroestático**
 - Zonas rojas** (favorable carga negativa): una densidad de carga negativa en esta zona se correlaciona con un aumento de la actividad.
 - Zonas azules** (favorable carga positiva): una zona con una deficiencia de carga aumenta la actividad.
- **Hidrofóbico**
 - Zonas amarillas** (favorable): los grupos hidrofóbicos que interaccionen en estas zonas aumentan la actividad.
 - Zonas blancas** (desfavorable): los grupos hidrofílicos que interaccionen en esta zona aumentan la actividad.



- **Dador**
 - Zonas magenta** (favorable): zona donde se predice la presencia de grupos dadores de puentes de hidrógeno en el receptor, así, la presencia de un grupo aceptor en el ligando aumenta la actividad.
 - Zonas naranja** (desfavorable): grupo aceptor de puentes de hidrógeno en el ligando, disminuye la actividad.

- **Aceptor**
 - Zonas cian** (favorable): zona donde se predice la presencia de grupos aceptores de puentes de hidrógeno en el receptor, así, la presencia de un grupo dador en el ligando mejora la actividad.
 - Zonas violeta** (desfavorable): los grupos dadores en el ligando se correlacionan con una disminución de la actividad.

5.5.4.3. Resultados y discusión

5.5.4.3.1. Modelo de sesquiterpeno como revertidor de la MDR en *Leishmania*.

Se llevó a acabo un estudio 3D-QSAR CoMSIA con los sesquiterpenos aislados de *Maytenus cuzcoina* (**S2-S10**) y derivados (**4-7, 9-15, 17, 18, 19-26**) como revertidores del fenotipo MDR en *Leishmania tropica*. Se obtuvo un modelo para el porcentaje de inhibición del crecimiento (%IC) en una cepa con fenotipo MDR, con un alto valor estadístico ($r^2=0,997$) y cuyos resultados se presentan en la tabla 5.5.4.

Este modelo resultó ser una herramienta eficaz para explicar y predecir la actividad biológica de estos compuestos. Las conclusiones podemos resumirlas en los siguientes aspectos (figura 5.5.12):

1. El grupo carbonilo del éster en el carbono 2, OFu (**S2**), OAc (**S3**), OBz (**S5**), OPr (**S6**) y OMeBut (**S7**), actúa como aceptor de puentes de hidrógeno con la región dadora del receptor, que se representa en la figura con una esfera magenta.
2. El oxígeno del anillo furánico (OFu) en el carbono 6 forma puentes de hidrógeno con el receptor (esfera magenta en la figura), mientras que los hidrógenos del anillo furánico intervienen a través de interacciones hidrofóbicas con el receptor (esfera amarilla).
3. El grupo OAc en el C15 (**S8**) forma puentes de hidrógeno con el receptor (esfera magenta).

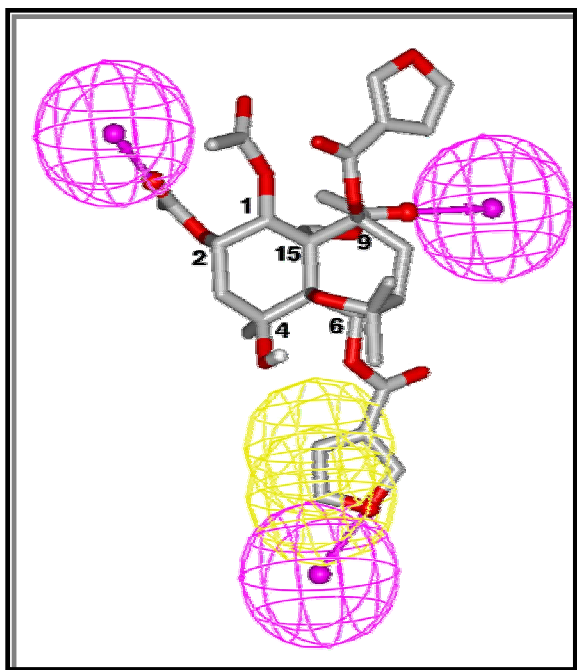


Figura 5.5.12. Elementos estructurales del ligando claves en la inhibición del crecimiento de la cepa MDR, obtenidos en el análisis 3D-QSAR/CoMSIA, que se llevó a cabo con los sesquiterpenos aislados de *Maytenus cuzcoina* y sus derivados.

Esferas **magenta**: zonas del receptor que interactúan con grupos aceptores de puentes de hidrógeno del ligando.

Esfera **amarilla**: región del receptor que interactúa con grupos hidrofóbicos del ligando.

Este modelo resultó idóneo para explicar la actividad revertidora de la serie de sesquiterpenos que se incluyeron, sin embargo, la ausencia de variación de los sustituyentes en el C1, C4 y C9, en el conjunto de sesquiterpenos analizados, no nos permitió llegar a conclusiones sobre el mejor tipo de sustituyente en estas posiciones. Así, para ampliar este modelo, decidimos realizar otro análisis CoMSIA en el que se incluyeran un total de 79 sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofuranos, aislados de diversas especies de la familia *Celastraceae* o bien derivados de estos.

Una característica común que tienen estos sesquiterpenos con otros moduladores o sustratos de la Pgp es su significativa lipofilia, por lo que nos pareció interesante el cálculo teórico del $\log P$, con el fin de encontrar una relación con los datos de la actividad revertidora. Al representar los valores de $\log P$ frente a la actividad revertidora (figura 5.5.13), observamos que los sesquiterpenos que tienen un $\log P$ menor a 5 y mayor de 9,5 (sesquiterpenos de la serie **MACHI**, los menos activos de *Maytenus cuzcoina* y los de la serie **CROU**), tienen una actividad revertidora casi nula, por lo que el $\log P$ parece determinante para la actividad quimiomoduladora de estos compuestos. Sin embargo, los sesquiterpenos con valores de $\log P$ entre 5 y 9,5 poseen una actividad que varía entre el 0 y el 95%, por lo que en este intervalo deben de influir otros factores en la actividad quimiomoduladora. Por ello, al no existir una relación lineal entre la actividad quimiomoduladora y el $\log P$, decidimos **no incluir aquellos sesquiterpenos que tienen un $\log P$ menor a 5 y mayor de 9,5** en el modelo, para los que el $\log P$ parece un factor determinante.

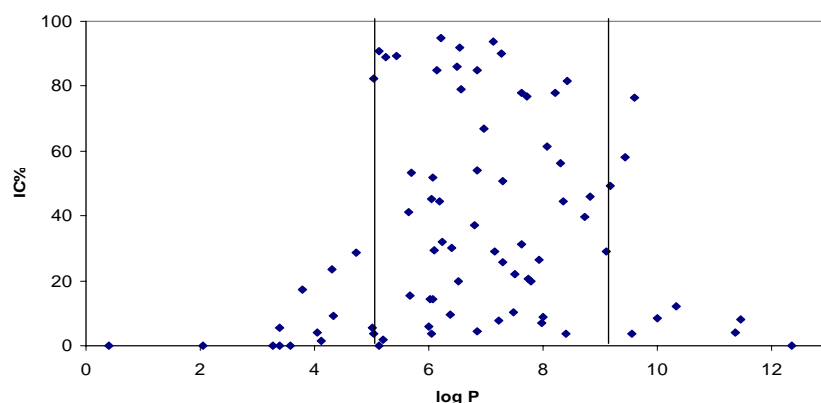
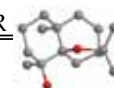


Figura 5.5.13. Representación del porcentaje de inhibición del crecimiento en la cepa con fenotipo MDR frente a los valores de $\log P$ teóricos. A valores de $\log P < 5$ y $> 9,5$ el %IC es próxima a 0%.

Así, de los **60 sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos** seleccionados para llevar a cabo el análisis CoMSIA se excluyeron seis debido a que su valor residual era mayor de dos desviaciones estándar.

Por lo tanto, se realizó un análisis PLS, utilizando como variable dependiente 54 sesquiterpenos, obteniéndose un modelo con un alto valor estadístico, cuyos parámetros se presentan en la tabla 5.5.4. Los coeficientes de correlación del análisis de validación cruzada ($q^2= 0,613$) y la validación no cruzada ($r^2= 0,930$) utilizando 7 componentes principales, muestran que este modelo es una herramienta eficaz a la hora de explicar la actividad revertidora de la Pgp en *Leishmania*.

Tabla 5.5.4. Datos obtenidos en los dos modelos CoMSIA realizados utilizando los sesquiterpenos aislados y derivados de *Maytenus cuzcoina* (A) y todos los sesquiterpenos ensayados (B), siendo la constante dependiente el porcentaje de inhibición del crecimiento (%IC) en la línea MDR de *Leishmania trópica*.

	%IC	
	A	B
q^2	0,790	0,613
n^b	28	54
N^c	19	7
r^{2d}	0,997	0,930
F	155,752	87,514
Electroestático	58,9 ^a	37,8 ^a
Estérico	5,4 ^a	6,0 ^a
Dador de puentes de hidrogeno ^b	13,3 ^a	14,7 ^a
Aceptor de puentes de hidrógeno ^b	7,5 ^a	16,8 ^a
Hidrofobicidad	10,0 ^a	17,8 ^a
Solvatación	4,9 ^a	6,9 ^a

q^2 : coeficiente de correlación de validación cruzada. n : número de compuestos. N : número óptimo de componentes principales. r^2 : coeficiente de correlación de la validación no cruzada. ^a Porcentaje de contribución. ^b En el receptor.

En la tabla 5.5.4 se presentan los porcentajes de contribución en el modelo de cada uno de los descriptores empleados en el análisis CoMSIA, siendo el factor electroestático (37,8%), al igual que en el modelo realizado anteriormente (54,5%), el que contribuye en mayor medida a explicar el modelo.

Los porcentajes de inhibición del crecimiento (%IC) de la cepa con el fenotipo MDR experimental y el calculado por el modelo (tabla 5.5.5) se representan en la figura 5.5.14.

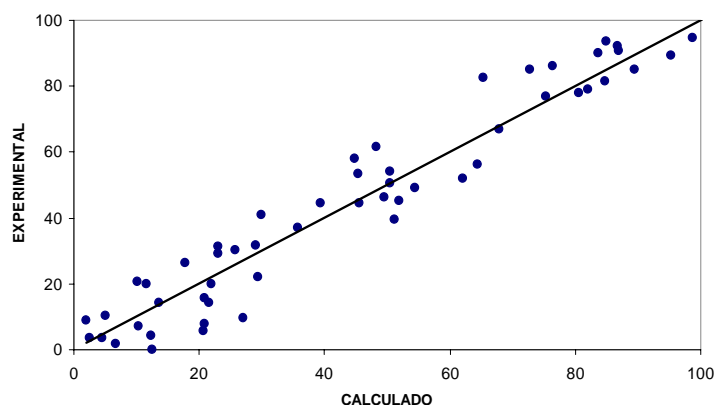


Figura 5.5.14. Representación de los valores de %IC experimentales frente a lo que predice el modelo utilizando la metodología 3D-QSAR/CoMSIA.

En la figura 5.5.15 se presenta el mapa de contornos obtenido en este modelo, representándose los factores electroestático (i), estérico (ii), dador (iii) y aceptor de puentes de hidrógeno en el receptor (iv) y el hidrofóbico (v), utilizando **S5** (%IC= 93,7) y **MAMA6** (%IC= 37) como las moléculas de referencia. Así, en el mapa de contornos del factor electroestático (figura 5.5.15i) se obtienen dos regiones de color rojo, que indican que la presencia de una densidad de carga negativa favorece la actividad, que se corresponden con el enlace entre el carbono 5 y el carbono 6 y los carbonos del éster situado sobre el carbono 6. La densidad de carga en estas dos regiones se ve afectada por el tipo de sustituyente sobre C6, corroborando lo observado en el estudio de la relación estructura-actividad, que indica que el mejor sustituyente en el C6 es un grupo furoato y el peor un grupo acetato para la expresión de la actividad [**S2** (OFu, 86,2%) *versus* **5** (OAc, 0%), **S5** (OFu, 93,7 %) *versus* **18** (OAc, 14,3 %)]. Esto se corrobora con el segundo descriptor más significativo en el modelo, el hidrofóbico, que presenta dos zonas de color blanco, lo que indica que la presencia de un grupo hidrofóbico disminuye la actividad y uno hidrofílico la aumenta y que coinciden con los hidrógenos del metilo del OAc y con el oxígeno del anillo furánico.

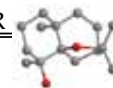


Tabla 5.5.5. Porcentajes de inhibición (%IC) experimental en la línea MDR de *Leishmania* y calculado por el modelo CoMSIA, valores de log *P* calculado, energía libre de solvatación (ΔG_{solv}) y %IC en la cepa salvaje (%CS) de los sesquiterpenos ensayados como revertidores en *Leishmania*.

Sesquiterpenos	%IC		%CS	ΔG_{solv}	Log <i>P</i>
	Exp ^a	Calc ^b			
S1	23,4	*	1,9	-13,44	4,31
S2	86,2	76,4	18,1	-15,49	6,49
S3	90,9	86,9	9,7	-13,67	5,14
S4	9,1	*	4,2	-15,52	4,34
S5	93,7	84,9	21,4	-13,99	7,13
S6	94,8	98,7	20,6	-12,83	6,21
S7	92,0	86,8	24,9	-15,61	6,55
S8	89,5	95,3	2,1	-17,10	5,44
S9	89,9	83,7	11,0	-16,33	7,28
S10	89,0	103,9	16,4	-11,40	5,26
1	29,1	-	3,4	-12,67	7,16
2	29,4	-	4,6	-15,66	6,10
4	28,5	*c	0,0	-15,68	4,73
5	0,0	12,47	0,0	-15,62	5,14
6	5,5	*	0,0	-13,81	3,39
7	17,1	*	0,0	-13,80	3,80
8	51,8	62,1	2,4	-12,68	6,07
9	1,8	6,77	0,0	-11,51	5,21
10	29,2	23,1	0,0	-11,37	9,11
11	50,7	50,5	0,0	-13,39	7,30
12	82,5	65,4	0,0	-11,15	5,03
13	1,3	*	0,0	-10,48	4,12
14	85,0	72,8	1,7	-13,75	6,14
15	15,5	20,8	5,2	-15,66	5,67
17	41,1	29,9	5,3	-14,16	5,65
18	14,3	21,6	0,0	-14,13	6,07
20	10,4	5,1	0,4	-11,78	7,48
21	3,9	*	0,0	-11,68	11,38
22	3,7	*	0,0	-13,69	9,56
23	25,9	-d	0,8	-11,50	7,29
24	9,7	27,1	0,0	-10,70	6,39
25	3,8	-	0,0	-14,07	8,41
26	26,4	17,7	4,1	-16,00	7,94
MAMA1	7,00	10,4	1,20	-17,04	7,99
MAMA2	8,9	2,0	2,10	-16,50	8,01
MAMA3	22,1	29,4	0,20	-15,94	7,52
MAMA4	19,9	11,6	0,00	-16,13	7,79
MAMA5	46,1	49,6	0,00	-14,23	8,83
MAMA6	37,0	35,7	1,10	-15,08	6,81
MAMA7	78,0	-	2,10	-14,85	7,64
MAMA10	85,0	89,4	0,00	-12,60	6,85
MAMA11	78,9	82,1	5,00	-11,97	6,56
MAMA12	77,8	80,6	7,20	-17,16	8,23
MAMA13	39,6	51,2	1,30	-13,99	8,73
MAMA14	58,0	44,9	9,00	-12,96	9,44
MACHU1	30,2	25,7	0,00	-14,61	6,41
MACHU4	81,6	84,7	10,80	-16,26	8,42
MACA3	67,0	67,8	4,90	-12,00	6,97
MACA4	76,5	*	5,24	-14,66	9,60
MACHI1	0,00	*	0,00	-19,49	3,40
MACHI2	0,00	*	0,00	-18,24	3,59
MACHI3	0,00	*	0,00	-18,41	3,28
MACHI4	0,00	*	0,00	-19,08	2,04
MACHI5	0,00	*	0,00	-27,36	0,40
EUNE4	54,10	50,5	0,00	-15,90	6,85
EUNE6	19,80	21,9	0,00	-15,74	6,53
CROU3	76,80	75,3	0,00	-15,15	7,72
CROU4	12,00	*	3,00	-15,40	10,34

CROU5	8,10	*	1,90	-16,25	11,46
CROU6	0,00	*	0,00	-13,59	12,36
ZINO1	61,5	48,3	1,3	-16,72	8,08
ZINO2	45,1	51,9	0,0	-18,64	6,06
ZINO3	3,6	2,5	0,0	-17,59	5,03
ZINO4	3,6	4,5	2,8	-19,20	6,06
ZINO5	4,1	*	0,2	-17,35	4,04
ZINO6	7,7	20,9	0,0	-17,44	7,23
ZINO7	20,7	10,1	0,0	-19,06	7,74
ZINO8	8,6	*	1,6	-17,47	10,00
ZINO9	5,9	-	0,0	-24,35	6,01
ZINO10	4,3	12,4	0,6	-17,29	6,85
ZINO11	31,3	23,0	5,6	-17,69	7,63
ZINO12	56,2	64,4	4,0	-18,31	8,32
ZINO13	49,2	54,4	8,4	-12,28	9,19
ZINO14	44,4	39,4	4,8	-12,52	8,35
ZINO15	31,8	29,0	0,0	-12,88	6,25
ZINO16	44,6	45,6	1,2	-13,07	6,20
ZINO17	14,2	13,6	0,0	-12,81	6,02
ZINO18	5,6	20,7	0,0	-16,30	5,01
ZINO19	53,4	45,3	2,3	-15,05	5,70

^a Experimental empleando una concentración del sesquiterpeno de 7 μ M. ^b Calculado por el modelo. ^c (*) sesquiterpenos no incluidos en el modelo por tener un $\log P < 5$ o $> 9,5$. ^d (-) metabolitos no incluidos en el modelo CoMSIA.

Además, la presencia de un grupo OMeBut en el C6 disminuye la actividad, lo que se refleja al comparar **S3** (OFu, 90,9%) *versus* **9** (OMeBut, 1,8 %) y **S5** (OFu, 93,7 %) *versus* **20** (OMeBut, 10,4%). Ello se explica dada la distinta orientación que adquiere el grupo carbonilo del OMeBut por impedimento estérico con el metilo situado sobre el C4 y que se representa con un área azul en el mapa de contornos del factor electrostático (figura 5.5.15i) y con un área naranja en el descriptor de dadores de puentes de hidrógeno en el receptor (figura 5.5.15iv), lo que indica que un aceptor de puentes de hidrógeno en el ligando en esta zona disminuye la actividad.

En cuanto al mapa de contornos del descriptor de aceptores de puentes de hidrógeno en el receptor (figura 5.5.15iii), éste presenta cuatro áreas violetas cerca de los sustituyentes en los carbonos 2, 3 y 4, lo que indica que la presencia de grupos dadores de puentes de hidrógeno, como un grupo hidroxilo, en el sesquiterpeno disminuye la actividad. Estas observaciones del modelo corroboran lo observado en el estudio SAR, lo que se pone de manifiesto al comparar los datos obtenidos para los siguientes sesquiterpenos:

- En el carbono 2: **ZINO17** (β OH, 14,2%) *versus* **ZINO15** (β OAc, 31,8%).
- En el carbono 3: **ZINO17** (β OH, 14,2%) *versus* **ZINO16** (β OAc, 44,6%).
- En el carbono 4: **ZINO18** (OH, 5,6%) *versus* **ZINO19** (H, 53,4%), **ZINO7** (OH, 20,7%) *versus* **ZINO1** (H, 65,5%), **ZINO11** (OH, 31,3 %) *versus* **ZINO12** (H, 56,2%) y **MAMA12** (OH, 77,8 %) *versus* **MACHU4** (H, 81,6%).

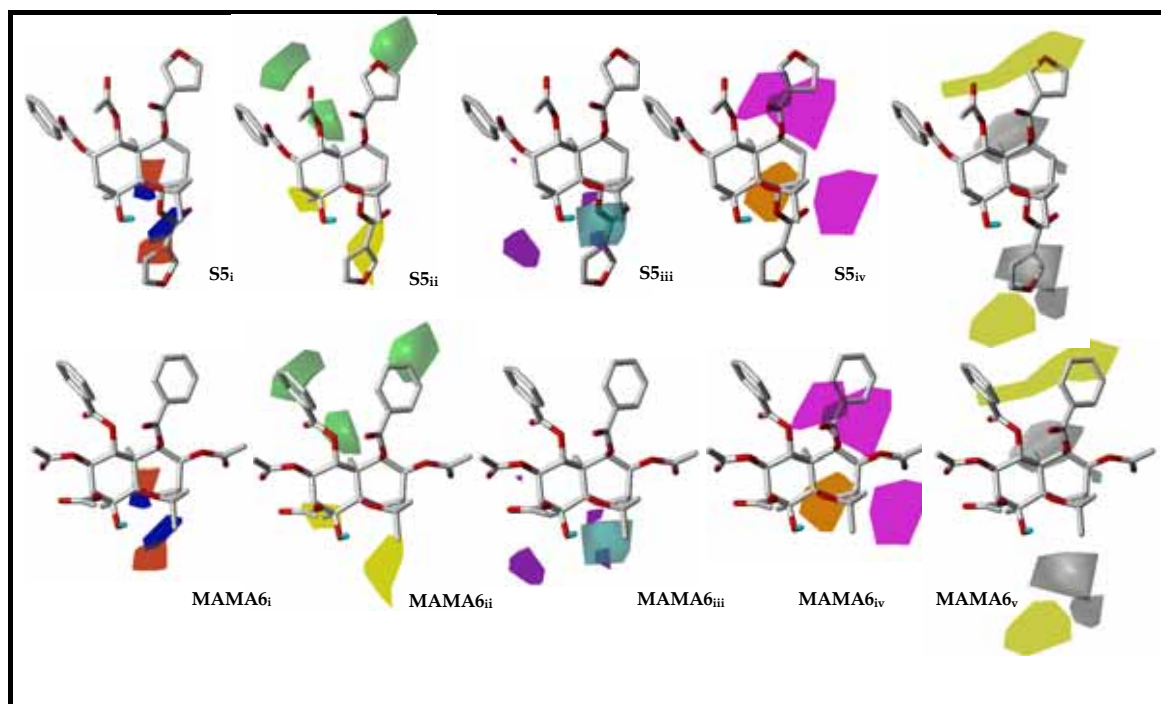
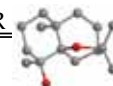


Figura 5.5.15. Mapa de contornos obtenido del análisis CoMSIA realizado para la actividad MDR en *Leishmania*, utilizando el %IC como variable dependiente. Mapa electroestático (i): áreas donde la alta densidad de electrones provoca un aumento (rojo) o disminución (azul) de la actividad; estérico (ii): las zonas verdes y amarillas representan zonas del espacio donde la ocupación por el ligando aumenta o disminuye el %IC, respectivamente; dador de puentes de hidrógeno (iii): zonas donde se predice la presencia de aceptores de puente de hidrógeno en el receptor por lo que la presencia de un donador en el ligando en esta área aumenta (cian) o disminuye (violeta) la actividad; aceptor de puentes de hidrógeno (iv): predicción de dadores de puentes de hidrógeno en el receptor, por lo que la presencia de un grupo aceptor de puentes de hidrógeno en el ligando aumenta (magenta) o disminuye (naranja) la actividad e hidrofóbico (v): las regiones blancas y amarillas definen zonas del espacio donde grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, respectivamente, aumentan %IC. Los sesquiterpenos **S5** y **MAMA6** lo utilizamos como referencia.

La presencia de grupos hidroxilos en la molécula es negativa para la actividad MDR, esto no sólo lo explica el descriptor de aceptores de puentes de hidrógeno en el receptor, sino también, la energía libre de solvatación (ΔG_{solv}) que contribuye con un 6,3 % en el modelo. Además, la presencia de un grupo hidroxilo afecta en mayor medida en el carbono 3 que en el carbono 4, lo que se evidencia al comparar los dos regio-isómeros, **ZINO15** (31,3%) y **MAMA10** (85,0%), lo que pone de manifiesto la importancia de la regio-sustitución para la actividad.

A diferencia del modelo descrito anteriormente con los sesquiterpenos de *Maytenus cuzcoina*, en este modelo el sustituyente sobre el carbono 2 no parece ser importante en la actividad, ya que en el mapa de contornos ningún descriptor señala esta zona, excepto el mapa de grupos aceptores de puente de hidrógeno en el receptor, en el que se señala que un grupo hidroxilo disminuye la actividad, como comentamos

anteriormente. Esto se refleja al comparar **S9** (H, 89,0%) con otros sesquiterpenos que presentan un éster en esta posición: **S2** (OFu, 86,2%), **S3** (OAc, 90,9%), **S5** (OBz, 93,7%), **S6** (OPr, 94,8%) y **S7** (OMeBut, 92,0%), entre los que no hay una diferencia significativa en su actividad quimiomoduladora.

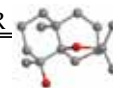
Con respecto a la influencia del sustituyente sobre los carbonos 1 y 9, sobre lo que el modelo anterior no aportaba información, éste indica la importancia de un grupo voluminoso (área verde en el factor estérico, figura 5.7.15_{ii}) e hidrofóbico (área amarilla, figura 5.7.15_v) en ambas posiciones. Así, comparando **ZINO1** (α OBz, 61,5%) *versus* **ZINO4** (α OAc, 3,6%) y **ZINO2** (α OBz, 45,1%) *versus* **ZINO5** (α OAc, 4,1%), se observa que es imprescindible la presencia de un éster aromático en el C9, con preferencia de un OBz a un OFu, ya que el oxígeno del anillo furánico coincide con el área amarilla del factor hidrofóbico (figura 5.7.15_v). El grupo furoato sólo aumenta la actividad si esterifica el carbono 6, ya que tanto en el carbono 1 [**EUNE4** (OMeBut, 54,1%) *versus* **EUNE6** (OFu, 19,8%)] como en el carbono 2 [**S7** (α OMeBut, 92%) *versus* **S2** (α OFu, 86,2%)] disminuye la actividad.

La introducción de un grupo éster en el carbono 3 reduce la actividad, lo que se explica por la región amarilla en el mapa del factor estérico (figura 5.7.15_{ii}), que coincide con la posición del éster sobre el carbono 3 y que indica que la presencia de un grupo voluminoso disminuye la actividad.

Por otro lado, la presencia de un grupo acetato en el carbono 15 aumenta la actividad, lo que se corrobora en el mapa de los factores hidrofóbico, estérico y dador de puentes de hidrógeno en el receptor. Ello se representa con una región blanca, que coincide con el grupo carbonilo (figura 5.7.15_v), una región verde (figura 5.7.15_{ii}), que indica que un grupo voluminoso aumenta la actividad y una zona magenta (figura 5.7.15_{iv}), que señala que la presencia de un aceptor en el sesquiterpeno, como el carbonilo del éster, aumenta la actividad.

Este estudio 3D-QSAR CoMSIA realizado con todos sesquiterpenos evaluados hasta el momento como revertidores del fenotipo MDR en *Leishmania*, nos permite **concluir** que:

El sesquiterpeno ideal como revertidor de la multirresistencia a fármacos en *Leishmania* debe tener un log *P* entre 5 y 9,5, así como una serie de elementos estructurales que son clave en la actividad revertidora y que han sido



satisfactoriamente explicados por el modelo creado con el análisis 3D-QSAR CoMSIA. Las características más relevantes en el mapa de contornos obtenidos del análisis realizado, para el factor electrostático, estérico, aceptor y dador de puentes de hidrógeno e hidrofóbico, las podemos resumir en los siguientes aspectos:

- La presencia de un grupo voluminoso e hidrofóbico en el carbono 1 incrementa el %IC.
- El anillo furánico sobre el carbono 6 parece formar parte de la interacción del sesquiterpeno con el receptor, como aceptor de puentes de hidrógeno y mediante interacciones hidrofóbica.
- El sustituyente sobre el C9 juega un papel importante en la actividad, resultando un éster aromático tipo OBz mejor sustituyente que un OFu.
- El grupo OAc sobre el C15 parece estar implicado en la interacción con el receptor.

El modelo obtenido nos permite predecir la actividad de otros sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano, pudiendo diseñar revertidores más potentes y selectivos como agentes inhibidores de la Pgp.

5.5.4.3.2. Modelo de sesquiterpenos como inhibidor de la Pgp humana.

Se evaluó la actividad inhibidora de la Pgp humana de 76 sesquiterpenos. Sin embargo, al realizar un análisis de la relación estructura-actividad de estos metabolitos y su actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos en células animales, no fue posible obtener conclusiones que nos permitieran determinar el tipo y la ubicación de los diferentes ésteres que potencian la actividad.

Por ello, decidimos abordar un análisis CoMSIA 3D-QSAR, generando un modelo tridimensional, utilizando la constante de inhibición (K_i) de la Pgp humana como variable dependiente.

Los descriptores del análisis CoMSIA, factores electrostático, estérico, hidrofóbico, dador y aceptor de puentes hidrógeno en el receptor, se utilizaron para mimetizar la energía de estabilización entre el sesquiterpeno y la Pgp y explicar así la K_i .

En trabajos previos sobre inhibidores de la Pgp humana, se ha establecido que una propiedad importante que tienen los sustratos e inhibidores de la Pgp es su alta

lipofilicidad ($\log P$, coeficiente de partición octanol - agua). Al representar la actividad frente al $\log P$, observamos una relación lineal (Fig. 5.5.16), por lo que incluimos en el modelo este descriptor, que resultó contribuir significativamente en el modelo (6,4 %, tabla 5.5.6), ya que a valores mayores del $\log P$ menor es la K_i .

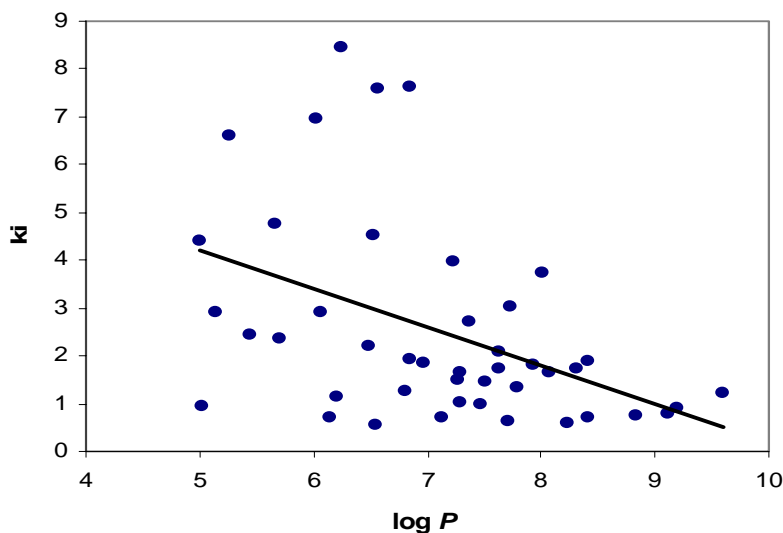
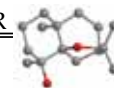


Figura 5.5.16. Gráfica donde se representa el $\log P$ frente a la K_i , observándose una relación lineal entre ambas variables (representada por la línea de tendencia de los datos).

En el estudio 3D-QSAR utilizando el análisis CoMSIA, se excluyeron aquellos sesquiterpenos que aunque poseían una constante de inhibición baja (K_i) no tenían una inhibición máxima (I_{\max}) alta, lo que implica que estos sesquiterpenos aunque tengan una alta afinidad por la proteína, no se unen en el sitio activo de la proteína para inhibir el transporte de los fármacos. Por lo que para homogenizar los datos sólo consideramos los compuestos que tenían una I_{\max} mayor del 70%, que resultaron ser 57 sesquiterpenos. Por otra parte, se excluyeron en el modelo, once sesquiterpenos debido a que su valor residual era mayor de dos desviaciones estándar.

Así, en el modelo obtenido con la K_i como variable dependiente, se emplearon 46 sesquiterpenos como la variable dependiente en un modelo PLS para evaluar la potencia y selectividad de estos compuestos y en la tabla 5.5.6 se presentan los resultados del modelo obtenido. Desde un punto de vista estadístico, los coeficientes de correlación, $q^2=0,66$ y $r^2=0,944$, utilizando 8 componentes principales, muestran que este modelo muestra un alto valor estadístico, resultando una herramienta eficaz para la predicción de la actividad biológica de este tipo de compuestos. El descriptor que contribuye en mayor medida para explicar el modelo es el factor electroestático (38,6%), seguido del hidrofóbico (17 %), el dador de puentes de hidrógeno en el



receptor (16,7%), el aceptor de puentes de hidrógeno (18%), el $\log P$ (6,4 %) y por último el factor de solvatación (1,3 %).

Tabla 5.5.6. Resultados estadísticos de la K_i utilizada como variable dependiente en el modelo CoMSIA.

	K_i
q^2	0,66
N	8
n	46
r^2	0,944
F	77,623
Electroestático	38,6 ^a
Estérico	8,3 ^a
Donor de puente de hidrógeno ^b	16,7 ^a
Aceptor de puente de hidrógeno ^b	11,5 ^a
Hidrofobicidad	17,0 ^a
Solvatación	1,3 ^a
$\log P$	6,4 ^a

q^2 : coeficiente de correlación de validación cruzada. n.: número de compuestos. N: número óptimo de componentes principales. r^2 : coeficiente de correlación de la validación no cruzada. ^a Porcentaje de contribución. ^b En el receptor.

Los valores de K_i obtenidos experimentalmente, así como los calculados por el modelo se representan en la figura 5.5.17 y están recogidos en la tabla 5.5.7.

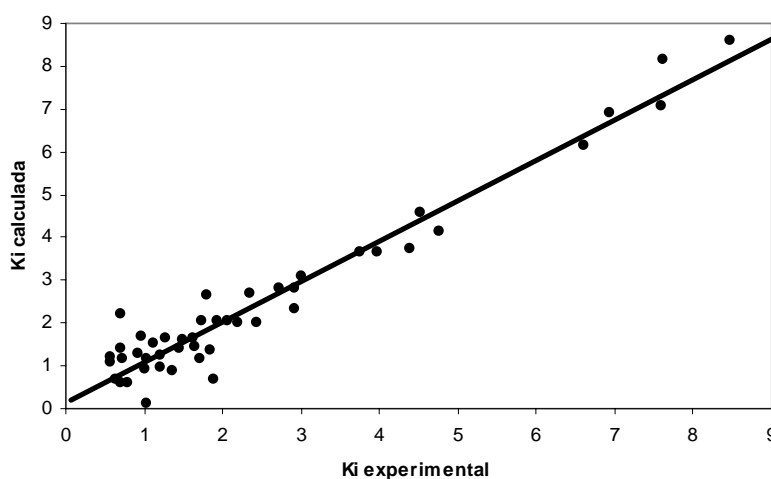


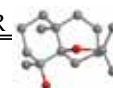
Figura 5.5.17. Representación gráfica de los valores experimentales y los calculados por el modelo CoMSIA de K_i (μM).

Tabla 5.5.7. Valores experimentales y calculados por el análisis^a CoMSIA de *Ki*.

Sesquiterpeno	<i>Ki</i>		DS	ΔG_{solv}	logP	I_{max}
	Experimental	Calculado	Experimental			
S1	100,00	-	1,00	-13,44	4,31	100,00
S2	2,19	1,99	0,16	-15,49	6,49	80,50
S3	2,91	2,83	0,43	-13,67	5,14	95,70
S5	0,69	1,42	0,05	-13,99	7,13	93,12
S6	1,13	1,54	0,17	-12,83	6,21	100,00
S7	0,56	1,19	0,06	-15,61	6,55	95,50
S8	2,44	2,02	0,25	-17,10	5,44	76,90
S9	1,50	1,61	0,08	-16,33	7,28	100,00
S10	6,61	6,15	0,85	-11,40	5,26	96,30
2	7,42	-	0,25	-15,66	6,10	100,00
6	17,48	-	8,27	-13,81	3,39	100,00
10	0,80	0,60	0,09	-11,37	9,11	72,70
11	1,65	1,46	0,05	-13,39	7,30	91,10
12	0,96	1,68	0,07	-11,15	5,03	75,20
14	0,70	2,21	0,05	-13,75	6,14	85,90
15	4,76	4,13	0,59	-15,66	5,67	76,80
18	2,92	2,34	0,16	-14,13	6,07	92,60
20	1,00	0,92	0,07	-11,78	7,48	83,30
23	1,04	0,14	0,07	-11,50	7,29	90,00
25	1,88	0,70	0,11	-14,07	8,41	75,80
26	1,79	2,64	0,22	-16,00	7,94	100,00
MAMA1	25,04	-	2,83	-17,04	7,99	100,00
MAMA2	3,75	3,65	0,27	-16,50	8,01	98,80
MAMA3	1,45	1,39	0,33	-15,94	7,52	100,00
MAMA4	1,36	0,89	0,18	-16,13	7,79	100,00
MAMA5	0,73	1,16	0,24	-14,23	8,83	98,70
MAMA6	1,27	1,63	0,08	-15,08	6,81	88,70
MAMA7	2,07	2,04	0,10	-14,85	7,64	95,20
MAMA10	7,61	8,14	0,57	-12,60	6,85	120,00
MAMA11	7,59	7,08	1,11	-11,97	6,56	89,79
MAMA12	0,58	1,07	0,04	-17,16	8,23	100,00
MAMA13	7,72	-	2,18	-13,99	8,73	92,30
MAMA14	11,27	-	14,38	-12,96	9,44	80,70
MACHU4	0,71	0,60	0,07	-16,26	8,42	85,80
MACA3	1,83	1,35	0,00	-12,00	6,97	87,70
MACA4	1,22	1,25	0,14	-14,66	9,60	100,00
EUNE4	1,94	2,05	0,13	-15,90	6,85	91,30
EUNE6	4,51	4,57	1,17	-15,74	6,53	99,40
CROU3	0,63	0,70	0,05	-15,15	7,72	88,00
CROU4	33,85	-	3,46	-15,40	10,3	100,00
ZINO1	1,63	1,63	0,25	-16,72	8,08	81,60
ZINO3	18,39	-	5,13	-17,59	5,03	91,70
ZINO4	5,74	-	2,87	-19,20	6,06	96,40
ZINO5	9,83	-	4,13	-17,35	4,04	100,00
ZINO6	3,97	3,64	0,42	-17,44	7,23	74,40
ZINO7	3,01	3,09	0,12	-19,06	7,74	81,10
ZINO8	1,03	1,15	0,06	-17,47	10,00	80,00
ZINO10	7,04	-	0,33	-17,29	6,85	73,00
ZINO11	1,74	2,04	0,24	-17,69	7,63	97,00
ZINO12	1,71	1,16	0,18	-18,31	8,32	86,21
ZINO13	0,91	1,29	0,08	-12,28	9,19	84,90
ZINO14	1,21	0,98	0,21	-12,52	8,35	100,00
ZINO15	8,46	8,59	1,49	-12,88	6,25	82,90
ZINO17	6,94	6,92	3,64	-12,81	6,02	76,60
ZINO17D1	2,72	2,80	0,30	-12,10	7,37	75,80
ZINO18	4,39	3,74	0,12	-16,30	5,01	85,00
ZINO19	2,36	2,68	0,50	-15,05	5,70	80,80

^a sólo se consideraron los sesquiterpenos con una I_{max} mayor del 70%.

DS: Desviación estándar; (-) compuestos no incluidos en el modelo.



En la figura 5.5.18 se ilustra el mapa de contornos de los descriptores electrostático (i), estérico (ii), dador (iii) y receptor (iv) de puentes de hidrógeno e hidrofóbico (v), obtenido del análisis CoMSIA utilizando como variable dependiente la K_i empleando.

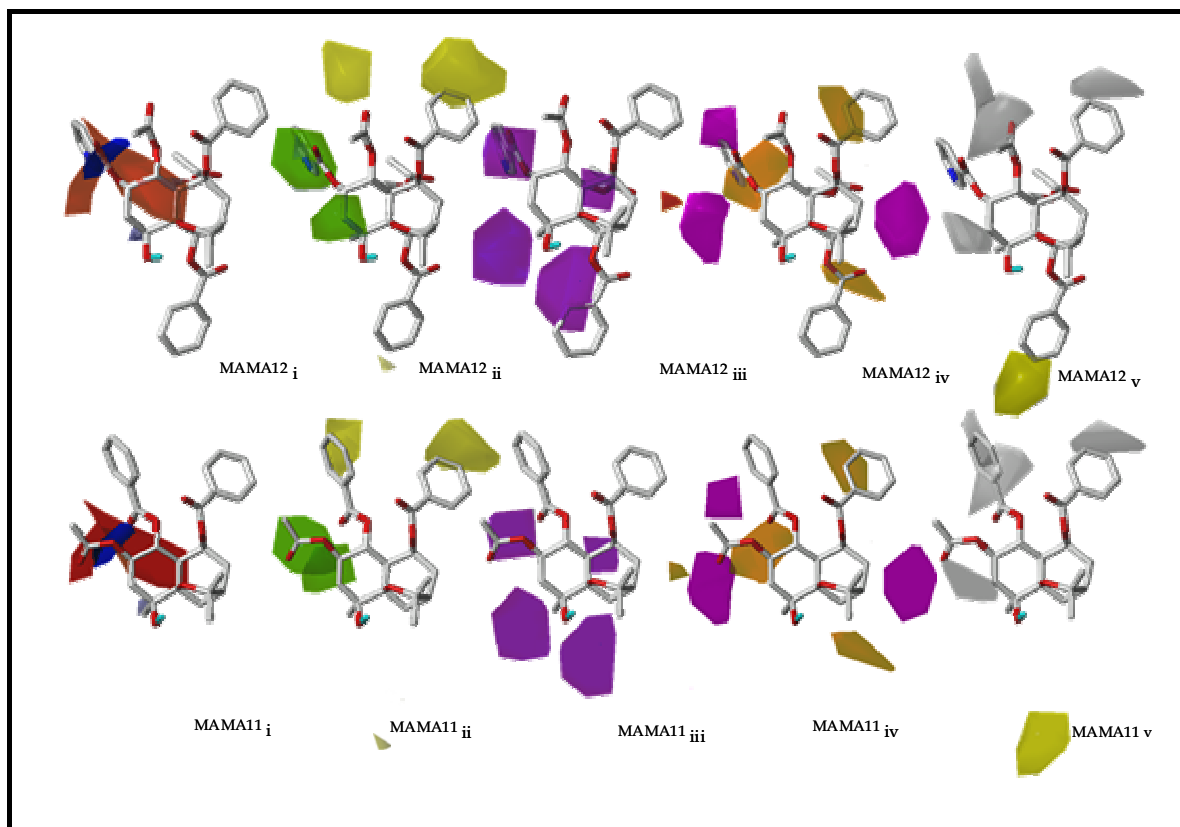


Figura 5.5.18. Mapa de contornos obtenido del análisis CoMSIA realizados para la actividad inhibidora de la Pgp humana, utilizando la K_i como variable dependiente. Mapa electrostático (i): áreas donde la alta densidad de electrones provoca un aumento (rojo) o disminución (azul) de la actividad; estérico (ii): las zonas verdes y amarillas representan zonas del espacio donde la ocupación por el ligando disminuye o aumenta la K_i , respectivamente; dador de puentes de hidrógeno (iii): zonas donde se predice la presencia de aceptores de puente de hidrógeno en el receptor por lo que la presencia de un donador en el ligando en esta área aumenta (cian) o disminuye (violeta) la actividad; receptor de puentes de hidrógeno (iv): predicción de dadores de puentes de hidrógeno en el receptor, por lo que la presencia de un grupo aceptor de puentes de hidrógeno en el ligando aumenta (magenta) o disminuye (naranja) la actividad e hidrofóbico (v): las regiones blancas y amarillas definen zonas del espacio donde grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, respectivamente, disminuyen la K_i . Los sesquiterpenos **MAMA12** y **MAMA11** lo utilizamos como referencia.

En el modelo obtenido el factor electrostático es el que contribuye en mayor medida (38,9%) y se representa en el mapa de contornos (figura 5.5.18i) con una zona de color rojo, que indica que la presencia de una alta densidad de carga incrementa la actividad, zona que coincide con el grupo carbonilo del éster en 2α y 3β . Además, se observa una zona azul que indica que la deficiencia de densidad de carga aumenta la actividad, correspondiendo con los hidrógenos del éster presente en $C2\alpha$. Ello explica

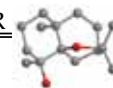
la preferencia de un éster en las posiciones anteriormente citadas, C2 y C3, lo que se pone de manifiesto al comparar los valores de K_i de los siguientes sesquiterpenos:

1. **S5** (OBz, 0,70), **S2** (OFu, 2,20), **S7** (OMeBut, 0,57), **S3** (OAc, 2,91) y **S6** (OPr, 1,13) que presentan en C2 α un grupo éster con respecto a **S9** (H, 6,61) que carece de sustituyente en dicha posición.
2. La preferencia de un grupo éster sobre C3 β , se observó al comparar **ZINO17D1** (OAc, 2,72) con **MAMA10** (H, 7,61).

Estas conclusiones se corroboran con los datos obtenidos para el descriptor hidrofóbico, variable que contribuye en segundo término en el modelo (17,0%) y el estérico (8,3%), en los cuales la presencia de un grupo voluminoso en C2 α y un éster en el carbono 3 disminuye la K_i (figura 5.5.18_{ii}). Es importante destacar que los grupos OBz, OMeBut y OPr son los sustituyentes idóneos en la posición 2 α (**S2-S7**). Esto se explica por la presencia de un área verde (figura 5.5.18_{ii}), región cuya ocupación por un grupo voluminoso es favorable. Así, los hidrógenos del éster OBz, OMeBut y OPr alcanzan esta zona, resultando los mejores sustituyentes en dicha posición. Aunque el grupo furoato en C2 (**S2**, 2,1) también interacciona con el área verde del mapa del descriptor estérico, éste no es favorable para la actividad lo que se explica por el aumento de la energía de solvatación (ΔG_{sol} , 1,3%) y la disminución de la hidrofobicidad ($\log P$, 6,9%) que supone la presencia de este éster con respecto a un benzoato (**S5**, 0,7). Esto explicaría también la preferencia en los carbonos 6 y 9 de dos grupos benzoatos (**S9**, 1,5) frente a dos grupos OFu (**S8**, 2,4).

La relevancia del sustituyente sobre C2 y C3 para la afinidad del sesquiterpeno por la Pgp, es reforzada por el descriptor de grupos dadores de puentes de hidrógeno en el receptor (figura 5.5.18_{iv}, 16,7 %), representado por dos zonas de color magenta que coinciden con el grupo carbonilo de los ésteres situados sobre C2 α y C3 β . Esto explica que el valor de la K_i se reduce a una décima parte con respecto a sesquiterpenos no sustituidos en C2 α (**S5**, OBz, 0,7 *versus* **S10**, 6,61).

Por otra parte, la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 3 aumenta de manera significativa la K_i , **ZINO15** (OH, 8,46) *versus* **ZINO17D1** (OAc, 2,72), lo que explica el modelo en el mapa de contornos del aceptor de puentes de hidrógeno (figura 5.5.18_{iii}, 11,5%). En éste se observan dos zonas de color violeta que coinciden con la posición C3 del esqueleto sesquiterpénico, lo que predice que esta posición está en una



zona o residuo del receptor donde un aceptor de puentes de hidrógeno desfavorecería la unión del sesquiterpeno a la Pgp. Además, este descriptor presenta otra zona de color violeta (figura 5.5.18_{iii}) que corresponde con el sustituyente en el carbono 6, lo que indica que la presencia de un grupo hidroxilo aumenta la K_i (**ZINO14**, OH, 1,2 *versus* **ZINO13**, OAc, 0,9).

En general la presencia de un grupo hidroxilo en la molécula aumenta la K_i , ya que ello implica una mayor energía de solvatación (ΔG_{sol}) y una disminución de la hidrofobicidad ($\log P$). Al comparar sesquiterpenos que sólo varían en la presencia o ausencia de un grupo OH en el carbono 4, tales como: **ZINO1** (H, 1,6) *versus* **ZINO7** (OH, 3,0) o **ZINO19** (H, 2,3) *versus* **ZINO18** (OH, 4,3) o **MACHU4** (H, 0,7) *versus* **MAMA12** (OH, 0,6), se concluye que la ausencia de un grupo hidroxilo disminuye la K_i .

Con respecto al sustituyente en C6, la influencia de un grupo OBz en esta posición se refleja en el mapa de contornos del descriptor hidrofóbico (figura 5.5.18), donde se observa una zona amarilla que indica que un grupo hidrofóbico que alcance esta zona aumenta la actividad.

Por otro lado, el efecto del sustituyente en C8 se pone de manifiesto al comparar **ZINO11** (β OBz, 1,7) y **ZINO18** (H, 4,3), así como de **ZINO12** (β OBz, 1,7) y **ZINO19** (H, 2,4). El mapa de dadores de puentes de hidrógeno (figura 5.5.18_{iv}), presenta un área magenta que corresponde al grupo carbonilo del éster en ésta posición, poniendo de manifiesto, algo que ya se había observado en el estudio de la relación estructura-actividad, la posible presencia de una región dadora de puentes de hidrógeno en el receptor que interacciona con el grupo carbonilo del éster en el C8.

El mapa del factor electroestático, (figura 5.5.18_i) presenta una zona de color rojo que coincide con el anillo A del esqueleto (carbonos 1, 5 y 10), lo que indica que la presencia de una alta densidad de carga aumenta la actividad **S5** (OBz, $\delta=+0,02$) *versus* **S10** (H, $\delta=+0,55$). Esta densidad de carga (δ) sobre el anillo A se ve influenciada por la presencia o ausencia de un éster en el carbono 2 y por el número de ésteres presentes en la molécula, observándose que los sesquiterpenos más activos son aquellos que tienen al menos 4 ésteres en su estructura, dos de ellos aromáticos. Esta conclusión se refuerza con los datos de $\log P$, factor que contribuye con un 6,4 % en el modelo, ya que los sesquiterpenos que tienen un $\log P$ más alto son aquellos que tienen más de 4 ésteres en la molécula, dos de ellos aromáticos.

El análisis exhaustivo del modelo obtenido nos permite **concluir** que el **sesquiterpeno ideal** como inhibidor de la Pgp humana debe reunir los siguientes requisitos estructurales (figura 5.5.19):

- Al menos 4 ésteres, dos de ellos aromáticos, con un log *P* superior a 5,5.
- Un grupo éster en la posición C2, ya que el grupo carbonilo del éster en esta posición parece estar implicado en la interacción con la Pgp humana. Además, existe preferencia por ésteres voluminosos en C2 α , tanto aromáticos como alifáticos, como por ejemplo grupos benzoato, propionato o metilbutirato.
- No debe tener grupos hidroxilos primarios o secundarios, ya que disminuyen la actividad.
- Un éster en el carbono 3 incrementa la afinidad por la Pgp, ya que éste participa en la interacción con el receptor.
- Un éster hidrofóbico en C6 incrementa la actividad.
- El grupo carbonilo de un éster sobre el carbono 8 interactúa con el receptor.

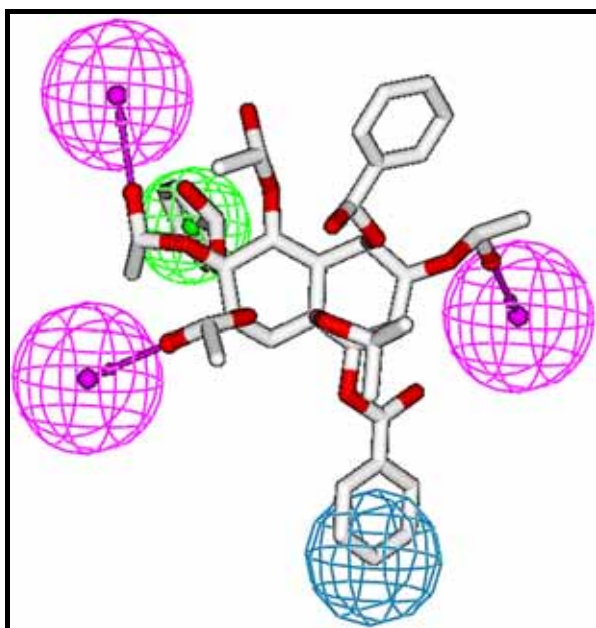


Figura 5.5.19. Elementos estructurales del ligando claves en la inhibición de la Pgp humana, obtenidos en el análisis 3D-QSAR/CoMSIA.

Esferas **magenta**: zonas del receptor que interaccionan con grupos aceptores de puentes de hidrógeno del ligando.

Esfera **verde**: grupos voluminosos en el ligando aumenta la actividad.

Esfera **azul**: región del receptor que interacciona con grupos hidrofóbicos del ligando.



6. Técnicas Experimentales



6. Técnicas experimentales.

6.1. Técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

6.1.1. Rotación óptica ($[\alpha]_D$).

La determinación del valor de la actividad óptica se realizó en polarímetros Perkin Elmer, modelos 241 y 343, usando la línea D del sodio a 25 °C y/o 20 °C, respectivamente. Para la realización de la medida, el producto se disuelve en cloroformo seco y se usa una célula de 1 ml de volumen y 1 dm de paso de luz. La concentración (c) está expresada en gramos por 100 ml de disolución.

6.1.2. Espectroscopía ultravioleta (UV).

Los espectros de ultravioleta se realizaron en un espectrofotómetro Jasco V-560. El producto se disolvió en etanol puro y se colocó en una celda de cuarzo de 1 ml de volumen y con un paso de luz de 10 mm. Los valores de la longitud de onda de absorción (λ) se expresan en nm.

6.1.3. Dicroísmo circular (DC).

Los espectros de DC se realizaron en un polarímetro Jasco J-600, usando células circulares de cuarzo de 1 cm de longitud. Los disolventes utilizados fueron acetonitrilo, etanol o metanol grado espectrofotométrico.

6.1.4. Espectroscopía infrarroja (IR).

Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro Bruker IFS 55 (FTIR). Los productos se disolvieron en cloroformo seco y se aplicaron formando una película sobre una pastilla de NaCl. Los valores de ν se expresan en cm^{-1} .

6.1.5. Resonancia magnética nuclear (RMN).

Los espectros de RMN se realizaron en los espectrofotómetros Bruker Avance 300 (300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C), Bruker Avance 400 (400 MHz para ^1H y 100

MHz para ^{13}C) y/o Bruker AMK 500 (500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C). Los productos se disuelven en un disolvente deuterado, preferiblemente si el producto es soluble, en cloroformo deuterado (CDCl_3) que contiene tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. El uso de uno u otro disolvente deuterado está en función de la solubilidad del producto en el mismo. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. En los experimentos de RMN ^1H , la multiplicidad de las señales se indica por las abreviaturas: (s) singlete, (d) doblete y (m) multiplete y en los experimentos de ^{13}C RMN: (c) CH_3 , (t) CH_2 , (d) CH y (s) C.

Se utilizaron programas COSY,¹ DEPT,² HSQC,³ HMBC y ROESY⁴ convencionales de la librería de pulsos de BRUKER. Además, se realizaron experimentos 1D-TOCSY selectivo, que por irradiación selectiva de una señal de protón, se obtiene un subespectro de un sistema de spin, en que sólo aparecen las señales que hayan “recibido” la magnetización de spin excitado. La ventaja de los experimentos 1D frente a los 2D es que necesitan menor tiempo de adquisición y tienen una mayor resolución digital.

6.1.6. Espectrometría de masas de baja resolución (EM).

Los espectros de masas de baja resolución se llevaron a cabo en espectrómetros Hewlett Packard 5995, VG Micromass ZAB-2F y/o Espire 3000 Bruker. Los métodos de ionización empleados son impacto electrónico (IE) empleando potenciales de ionización de 70 eV, bombardeo con átomos rápidos (FAB) y electrospray (ESI).

6.1.7. Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR).

La determinación de las fórmulas moleculares, de fragmentos y/o iones moleculares, se realizan en espectrómetros VGMicromass ZAB-2F (a potenciales de ionización de 15 - 70 eV) y Fisons Instruments VG Autospec.

¹ (a) Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229. (b) Nagayama, K. y col. *J. Magn. Reson.* **1980**, *40*, 321.

² Pegg, D. T.; Doddrell, D. M.; Bendall, M. R. *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 2745.

³ Muller, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4481.

⁴ Bax, A.; Davis, D. G. *J. Magn. Reson.* **1985**, *63*, 207.



6.2. Técnicas cromatográficas.

6.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF).

Las cromatografías en capa fina se realizan sobre cromatofolios (20 x 20 cm) de gel de sílice tipo G de 0,25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel Sil G/UV₂₅₄.

La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando óleum (disolución de H₂O:H₂SO₄:AcOH, 4:1:20) o una disolución de vainillina (EtOH:H₂SO₄:AcOH, 15:1:1.3 añadiendo un gramo de vainillina por cada 10 ml de AcOH) y posterior calentamiento a 120°C.

6.2.2. Cromatografía preparativa en capa fina (CPCF).

Se utilizan placas (20 x 20 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice tipo G, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel SIL G-100 UV₂₅₄. La cantidad de muestra a sembrar en estas placas es de unos 40 mg, usándose para la elusión diferentes mezclas de disolventes.

La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando óleum sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la placa con una lámina de vidrio, y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.

6.2.3. Cromatografía en capa fina de alta resolución (CCFAR).

Se utilizan placas (10 x 10 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice de 60, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel NANO-SIL 20 UV₂₅₄. La resolución de estas placas es mayor que las anteriores y la cantidad a sembrar es entorno a 10 mg, usándose para la elusión diferentes mezclas de disolventes.

La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando oleum sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la placa con una lámina de vidrio, y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.

6.2.4. Cromatografía en columna (CC).

En la realización de columnas cromatográficas (secas y húmedas) se emplea gel de sílice fina de 0,063–0,200 nm de diámetro, de la empresa Macherey-Nagel. La gel de sílice se suspende en el eluyente y se compacta con una bomba de vacío. La muestra se puede aplicar disuelta o adsorvida en gel de sílice de 0,2-0,5 nm de diámetro.

6.2.5. Cromatografía de exclusión molecular (CEM).

Se usa como soporte Sephadex LH-20, que suministra la empresa Sigma, que requiere una previa estabilización del polímero en suspensión con metanol (4,1 ml/gr) durante, al menos, doce horas. Esta columna se estabiliza posteriormente en la mezcla que se va a usar como eluyente, para lo cual se eluye tres veces la cantidad correspondiente al volumen muerto. El eluyente que en general se utiliza es *n*-hexano-cloroformo-metanol (2:1:1). La muestra a cromatografiar tras ser filtrada se coloca en la cabeza de la columna disuelta en una cantidad de eluyente no superior al 5% del volumen muerto de la columna. La columna puede ser reutilizada tras ser lavada con metanol y estabilizada con el eluyente que se va utilizar.

6.2.6. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Para la cromatografía líquida de alta resolución se usa una bomba *HPLC Pump LKB 2248*, con un detector *2MD Rapid Spectral LKB*, o bien una bomba *Waters 515* con un detector *Waters 2487*. Se usa una columna semipreparativa μ -*Porosil*TM *sílica 125 Å 10 μm* de 15 cm de longitud y 19 mm de diámetro interno de la empresa *Waters*, siendo el sistema isocrático de disolventes utilizado mezclas de *n*-hexano/acetato de etilo en diferentes proporciones y a diferentes velocidades de flujo, según necesidad de resolución.

6.3. Programas informáticos.

Para la elaboración de los modelos 3D-QSAR se empleó un análisis CoMSIA, que se lleva a cabo en el modulo QSAR del programa SYBYL 6.6⁵, usando los parámetros que vienen por defecto. Para la obtención del equilibrio estructural de los

⁵ SYBYL 6.6, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, MO, 63144.



sesquiterpenos se empleó una optimización geométrica total *ab initio*, utilizando el 3-21G del Gaussian 98⁶. Para el cálculo de la energía libre de solvatación (ΔG_{sol}) se empleó el procedimiento PM-SR5.42R que viene incluido en el programa AMSOL 6.7.2⁷. El cálculo de las cargas atómicas que utiliza el CoMSIA para evaluar la contribución electrostática se realizó usando primero el 6-31G del Gaussian 98 y luego se calcularon las cargas RESP (*Restrained Electrostatic Potential Fitting*)⁸ empleando el AMBER 8.0. El log *P* se cálculo empleando ACD/LogP DB, versión 5.15.

Para los cálculos de mecánica molecular se utilizó el PC Model 7.0⁹, en la simulación de espectros de RMN ¹H y ¹³C hemos empleado el ACD/Labs, para el procesamiento y el análisis de los espectros de RMN el MestReC¹⁰ y en la representación de las moléculas el ChemDraw Ultra 8.0.

⁶ Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.;

⁷ HawKins, G. D.; Huyesen, D. J.; Lynch, G. C.; Chambers, C. C.; Rossi, I.; Storer, J. W.; Li, J.; Zhu, T.; Winget, P.; Rinaldi, D.; Liotard, D. A.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. J. *AMSOL 6.7.2*; University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455-0431.

⁸ Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W. D.; Kollman, P. A. *J Phys Chem.* **1993**, *97*, 10269-10280.

⁹ PC Model from Serena Software, P. O. Box. 3076, Bloomington, IN 47402-3076.

¹⁰ <http://www.mestrec.com/>



7. Conclusiones

7. Conclusiones Generales.

*El estudio fitoquímico de la corteza de la raíz de *Maytenus cuzcoina* y la evaluación de la actividad biológica de sus metabolitos, nos permiten extraer las siguientes conclusiones:*

- ✓ Se aíslan **2 diterpenos con esqueleto de *ent-rosano*** nuevos en la bibliografía química, siendo la primera vez que se describen este tipo de metabolitos de especies de la familia *Celastraceae*. Su **configuración absoluta** se determinó por RMN, utilizando el **método de Riguera**, una variación del método de Mosher.
- ✓ Se aíslan **44 triterpenos** con diferentes esqueletos: *D:B* friedobaccharano, lupano, oleano, ursano, glutinano y friedelano. De estos metabolitos **9 resultaron nuevos en la bibliografía**: el **11 α -hidroxi-29-metoxi-3 β -miristato-olean-12-eno**, cuyo ion molecular se determinó utilizando espectrometría de electrospray; el **metil éster del ácido 6 β -hidroxi-orthosphenico**, metabolito que se propone como precursor en la ruta biosintética hacia las nor-triterpenometilénquinonas, es la primera vez que se aísla de forma natural y se aporta la completa asignación de sus datos de RMN ^1H y ^{13}C , y los triterpenos con esqueleto de lupano, **3-*epi*-nepeticina**, **11 α -hidroxi-3-*epi*-betulina**, **28-hidroxi-rigidenol**, **28-aldehído del rigidenol**, **11 α -hidroxi-glochidona**, **28-hidroxi-glochidiol** y **28-hidroxi-glochidona**.
- ✓ Se aíslan **33 celastroloides** con esqueleto de nor-triterpenometilénquinona, nor-triterpenofenol y dímero y trímero triterpénico, **8 de los cuales resultaron nuevos en la bibliografía química**: **21 β -hidroxicuzcoinol**, **cuzcoinol**, **6 β -(2-oxopropil)-pristimerol**, **6 α ,7 α -isopropilidendioxo-blepharodol**, **netzaescutidina αA** , **netzaescutidina βB** , **7,8-dihidroescutidina αB** y **7 α -hidroxi-7,8-dihidroisoxuxuarina E α** .
- ✓ La **configuración absoluta de los dímeros triterpénicos** se determina mediante dicroísmo circular.
- ✓ **Se revisa la estructura de un dímero triterpénico** anteriormente aislado de *Maytenus scutioides*, concluyendo que se trata del **7,8-dihidroisoxuxuarina E α** .

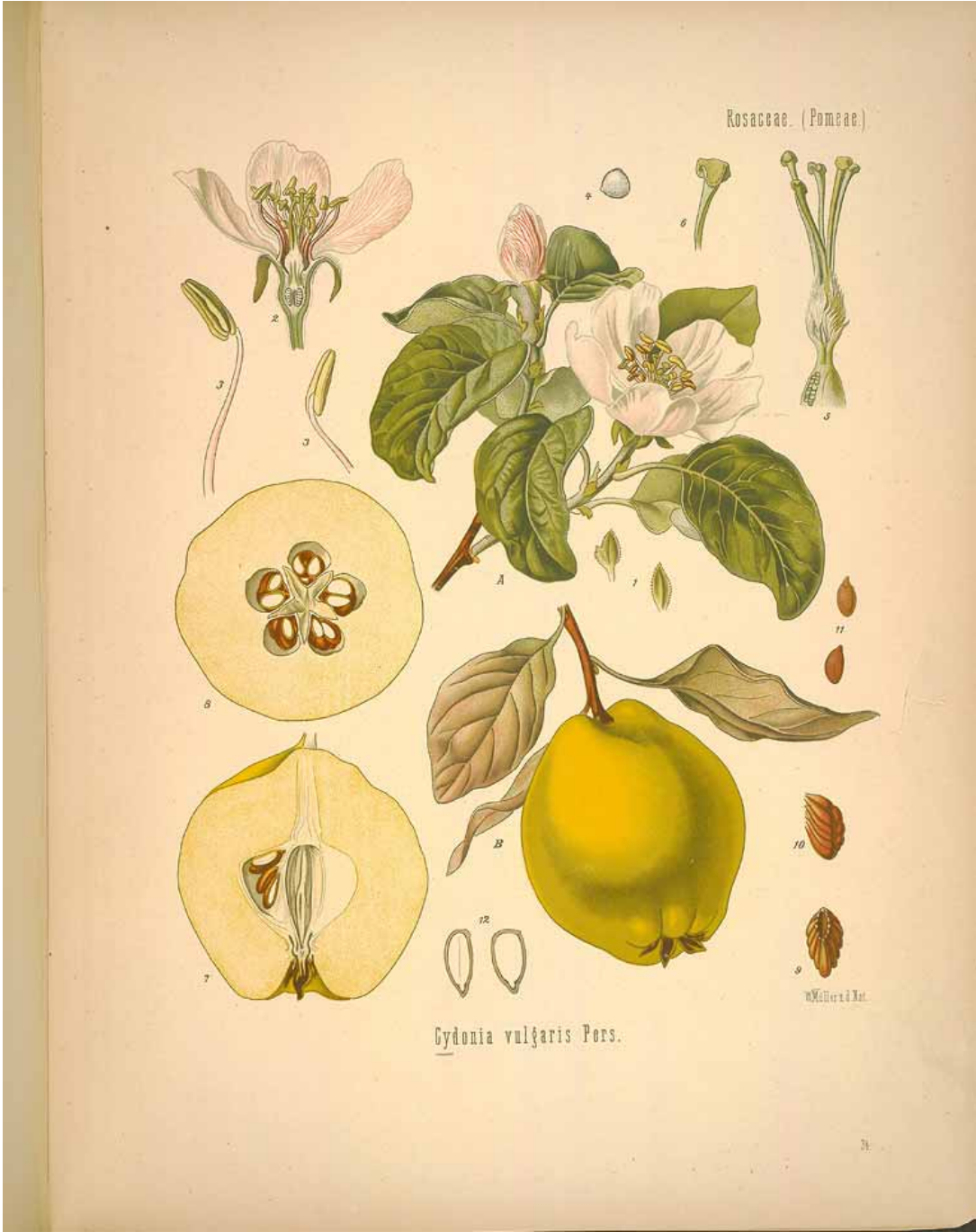
- ✓ Se aislan **5 alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos**, de los cuales resultaron nuevos en la bibliografía química, **9 α -benzoiloxi-9-deacetilevonina** y **6 β ,9 α -dibenzoiloxi-2 α -hidroxi-2,6,9-trideacetilevonina**.
- ✓ **Se evalúa la actividad antimicrobiana** frente a bacterias Gram positivas y una levadura de los diterpenos, triterpenos y celastroloides aislados. **netzahualcoyonol** resultó más activo que el control y otras quinonas anteriormente ensayadas frente a las cepas de *Bacillus* y *Staphylococcus* (CMI 0,625-2,5 μ g/ml).
- ✓ **Se evaluó la actividad citotóxica** frente a tres líneas tumorales (HeLa, Hep-2 y A-549) y una no tumoral (Vero) de los diterpenos, triterpenos y celastroloides aislados. El lupano **glochidona** fue el metabolito más activo y un estudio preliminar de la relación estructura-actividad indicó que la presencia de un grupo ácido carboxílico sobre C28 y un hidroxilo sobre C11 en el esqueleto aumentan esta actividad.
- ✓ **Se determinó el efecto inhibitorio de la producción de los AT del virus Epstein-Barr** inducido por el promotor TPA de los diterpenos aislados, resultando ambos prometedores agentes quimiopreventivos, con un 78,2 y 70,9% de inhibición a una concentración de 16 nM.
- ✓ Se evaluó la **actividad antiinflamatoria** utilizando como parámetro la inhibición de la producción de NO y de PGE (COX-2) *in vitro* de los triterpenos con esqueleto de lupano. El derivado **11 α -acetoxi-30-cloro-3-oxo-lup-20(29)-eno**, resultó el producto más activo de los ensayos *in vitro*. Se lleva a cabo la **semi-síntesis de la 3-epibetulina** para posteriores ensayos *in vivo*, utilizando en la etapa clave *L*-Selectride como agente reductor, obteniéndose con mejores rendimientos que los descritos en la bibliografía. Los resultados indican que los **lupanos son prometedores agentes antiinflamatorios, compuestos líderes** en futuros estudios.

Los resultados obtenidos del estudio fitoquímico de los frutos de Maytenus cuzcoina, estudios SAR y 3D-QSAR, nos llevan a las siguientes conclusiones:

- ✓ **Se aislan diez sesquiterpenos con esqueleto dihidro- β -agarofurano**, aislados anteriormente de esta especie, así como dos nuevos en la bibliografía química: **2 α -acetoxi-9 β ,6 β -di-(3-furoiloxi)-1 α ,4 β -dihidroxi-dihidro- β -agarofurano** y **1 α ,6 β ,15 α -triacetoxi-2 α ,8 α ,9 α -tribenzoiloxi-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano**.

- ✓ Se preparan **43 derivados de estos sesquiterpenos**, empleando diferentes ésteres para conferir **diferentes características estéreo-electrónicas** y determinar cómo éstas afectan a la actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos.
- ✓ Se obtiene el derivado **(1*R*,2*S*,4*S*,5*S*,6*S*,7*R*,9*S*,10*R*)-1,2-diacetoxi-4-benzoiloxi-6,9-di-(3-furoiloxi)-dihidro-β-agarofurano** por benzoilación del alcohol terciario del esqueleto carbonado, empleando el triflato de plata como catalizador.
- ✓ Se llevan a cabo diferentes estrategias para la obtención de **sesquiterpenos modificados en el carbono 9**, resultando la protección con un grupo acetónido de los carbonos 1 y 2, la que mejores perspectivas presenta.
- ✓ Se **determina la configuración absoluta** de los sesquiterpenos aislados y sus derivados mediante diacromismo circular, correlación química o consideraciones biogénicas.
- ✓ Se **determina que el método de quiralidad del dibenzoato no es aplicable al cromóforo furoato**.
- ✓ Se prepara el derivado **1α-acetoxi-9β-benzoiloxi-2α,4β-dihidroxi-8β,15-di-(2-metilbutiroiloxi)-6β-(2-*N*-metilaminobenzoiloxi)-dihidro-β-agarofurano** con fluorescencia intrínseca, para determinar el **mecanismo de acción** de los sesquiterpenos dihidro-β-agarofurano como revertidores de la MDR.
- ✓ Se evalúan sesquiterpenos naturales y derivados como **agentes quimiopreventivos**. El estudio SAR indicó la **preferencia por ésteres alifáticos (acetato) frente aromáticos (benzoato, furoato)** para la expresión de esta actividad.
- ✓ Se evalúan los sesquiterpenos como **inhibidores de la Pgp en *Leishmania trópica***. Los estudios SAR indicaron que los **sesquiterpenos naturales son los más potentes ensayados hasta el momento**, resultando los mejores sustituyentes sobre los C2 y C6 un grupo lipofílico (OAc, OBz) y un furoato, respectivamente.
- ✓ Se evalúan los sesquiterpenos como **inhibidores de la Pgp humana**. El estudio SAR determinó que la presencia de un grupo benzoato o alifático voluminoso (2-metilbutirato) sobre el C2 y un grupo OAc sobre C15 incrementan la actividad, mientras que un grupo hidroxilo secundario o un furoato la disminuye.
- ✓ **Los resultados indican que los sesquiterpenos dihidro-β-agarofuránicos son potenciales agentes quiomoduladores de la MDR tanto en el tratamiento de la leishmaniasis como del cáncer.**

- ✓ Se realiza un **modelo 3D-QSAR utilizando un análisis CoMSIA** con 79 sesquiterpenos como revertidores del fenotipo MDR en *Leishmania* y 76 como quimiomoduladores de la Pgp humana. Los modelos obtenidos poseen un **alto valor estadístico** y explican satisfactoriamente las características estructurales que modulan la actividad. Ello permitirá en el **futuro el diseño racional de revertidores de la MDR** y la obtención de **quimiomoduladores más selectivos y potentes**.



8. Anexos

8.1. Índice de productos nuevos en la bibliografía química.

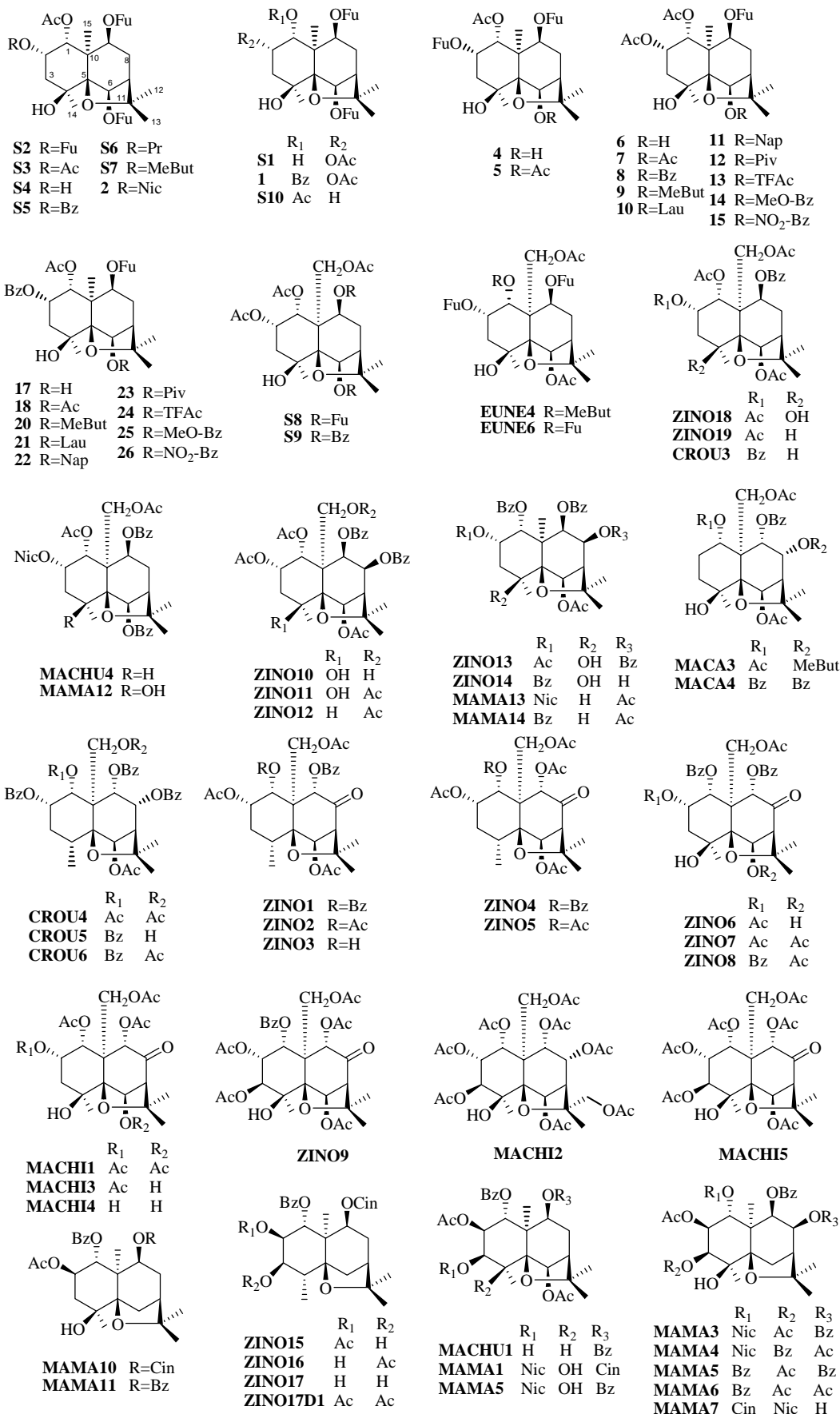
Siglas	Producto	Elucidación estructural	Parte experimental	Actividad Biológica
D1	(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>S</i>)-5,6,17-trihidroxi- <i>ent</i> -ros-15-eno	26	34	155, 171, 308
D2	(5 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i>)-5,17-dihidroxi- <i>ent</i> -ros-15-eno	31	35	155, 171, 308
D1A	(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,13 <i>S</i>)-6,17-di-(2-fenil-2-metoxiacetil)-5-hidroxi- <i>ent</i> -ros-15-eno	30	36	
L1	3- <i>epi</i> nepeticina	48	77	155, 163, 172
L2	11 α -hidroxi-3- <i>epi</i> betulina	52	78	155, 172
L3	28-hidroxi-rigidenol	53	79	
L4	28-aldehído del rigidenol	54	80	
L5	28-hidroxi-1- <i>epi</i> glochidiol	55	81	
L6	11 α -hidroxi-glochidona	56	82	155, 163, 170
L7	28-hidroxi-glochidona	59	83	155, 170
L13A	acetato de rigidenol	64	86	163
L13B	11 α -acetoxi-30-cloro-3-oxo-lup-20(29)-eno	64	87	163
L13C	11 α -acetoxi-30-cloro-3-oxo-lup-1:20(29)-dieno	64	88	
O1	11 α -hidroxi-29-metoxi-3 β -miristato-olean-12-eno	65	89	
F1	metil éster del ácido 6 β -hidroxi-orthosphenico	69	90	
F1A	2 α ,3 α ,6 β -triacetoxi-3 β ,24-epoxi-29-metoxi- <i>D:A</i> -friedoleano	72	91	
Fe1	21 β -hidroxicuzcoinol	110	140	155, 170
Fe2	cuzcoinol	114	141	155
Fe2A	2,3-diacetilado de cuzcoinol		142	
Fe3	6 β -(2-oxo-propil)-pristimerol	115	143	155, 170
Fe4	6 α ,7 α -isopropilidendioxo-blepharodol	118	144	
DT1	netzaescutidina α A	123	145	
DT1A	metilado netzaescutidina α A	124	146	
DT2	netzaescutidina β B	127	147	
DT3	7,8-dihidroescutidina α B	129	148	

Siglas	Producto	Elucidación estructural	Parte experimental	Actividad Biológica
DT4	7 α -hidroxi-7,8-dihidroisoxuxarina E α	133	149	
S1	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-acetoxi-6,9-di-(3-furoiloxi)-1,4-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano	199, 242	251	308, 324, 328
S11	1 α ,6 β ,15 α -triacetoxi-2 α ,8 α ,9 α -tribenzoiloxi-4 β -hidroxi-dihidro- β -agarofurano	204	252	
S14	9 α -benzoiloxi-9-deacetoxievonina	208	253	
S15	6 β ,9 α -dibenzoiloxi-2 α -hidroxi-2,6,9-trideacetoxievonina	211	254	
1	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-acetoxi-1-benzoiloxi-6,9-di-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano	221, 242	255	324, 328
2	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-acetoxi-6,9-di-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-2-nicotinoiloxi-dihidro- β -agarofurano	223, 242	256	324, 328
3	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2-diacetoxi-4-benzoiloxi-6,9-di-(3-furoiloxi)-dihidro- β -agarofurano	224, 242	257	
4	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-acetoxi-2,9-di-(3-furoiloxi)-4,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano	225, 242	258	324, 328
5	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,6-diacetoxi-2,9-di-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano	228, 242	259	324, 328
6	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano	225, 242	260	308, 328
7	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2,6-triacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano	228, 242	261	324, 328
8	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2-diacetoxi-6-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano	242	262	324, 328
9	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-[(<i>S</i>)-(+)-2-metilbutiroiloxi]-dihidro- β -agarofurano	242	263	324, 328
10	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-lauriloxi-dihidro- β -agarofurano	242	264	324, 328
11	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-(1-naftoiloxi)-dihidro- β -agarofurano	242	265	324, 328
12	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-pivaloiloxi-dihidro- β -agarofurano	242	266	324, 328
13	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-trifluoracetoxi-dihidro- β -agarofurano	242	267	324, 328
14	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-(4-metoxi benzoiloxi)-dihidro- β -agarofurano	242	268	324, 328
15	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-(4-nitrobenzoiloxi)-dihidro- β -agarofurano	242	269	324, 328
16	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2-diacetoxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-(3,4,5-trimetoxi benzoiloxi)-dihidro- β -agarofurano	242	270	308
17	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-acetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4,6-dihidroxi-dihidro- β -agarofurano	225, 242	271	324, 328
18	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,6-diacetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro- β -agarofurano	228, 242	272	324, 328

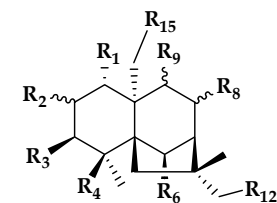
Siglas	Producto	Elucidación estructural	Parte experimental	Actividad Biológica
19	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-acetoxi-2,6-dibenzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano	242	273	
20	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-acetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-[(<i>S</i>)-(+)-2-metilbutiroiloxi]-dihidro-β-agarofurano	242	274	324, 328
21	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-acetoxi-2α-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6β-lauriloxi-dihidro-β-agarofurano	242	275	324, 328
22	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-acetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-(1-naftoiloxi)-dihidro-β-agarofurano	242	276	324, 328
23	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-acetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-pivaloiloxi-dihidro-β-agarofurano	242	277	324, 328
24	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-acetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-trifluoroacetoxi-dihidro-β-agarofurano	242	278	324, 328
25	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-acetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-(4-metoxibenzoiloxi)-dihidro-β-agarofurano	242	279	324, 328
26	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-acetoxi-2-benzoiloxi-9-(3-furoiloxi)-4-hidroxi-6-(4-nitrobenzoiloxi)-dihidro-β-agarofurano	242	280	324, 328
27	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2,4-dihidroxicelorbicol	229, 242	281	308
28	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2-acetoxi-9-(3-furoiloxi)-1,4,6-trihidroxi-dihidro-β-agarofurano	229, 242	282	
29	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1-acetoxi-9-(3-furoiloxi)-2,4,6-trihidroxi-dihidro-β-agarofurano	229, 242	283	
30	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2,6,9-tetraacetoxi-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano	231, 242	284	308
31	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2,6-triacetoxi-4,9-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano	231, 242	285	308
32	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2,6,9-triacetoxi-1,4-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano	231, 242	285	308
33	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2,9-triacetoxi-4,6-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano	232, 242	286	
34	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2,9-triacetoxi-6-benzoiloxi-4-hidroxi-dihidro-β-agarofurano	232, 242	287	
35	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-4,6,9-trihidroxi-1,2-isopropilidendioxi-dihidro-β-agarofurano	233, 242	288	308
36	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-6,9-diacetoxi-4-hidroxi-1,2-isopropilidendioxi-dihidro-β-agarofurano	233, 242	289	308
37	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-6,9-diacetoxi-1,2,4-trihidroxi-dihidro-β-agarofurano	233, 242	290	
38	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,2,6-tribenzoiloxi-4,9-dihidroxi-dihidro-β-agarofurano	240, 242	294	
39	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,6-dibenzoiloxi-2,4,9-trihidroxi-dihidro-β-agarofurano	240, 242	295	
40	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2,6-dibenzoiloxi-1,4,9-trihidroxi-dihidro-β-agarofurano	240, 242	296	
41	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-2,9-dibenzoiloxi-1,4,6-trihidroxi-dihidro-β-agarofurano	240, 242	297	

Siglas	Producto	Elucidación estructural	Parte experimental	Actividad Biológica
42	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-1,9-dibenzoiloxi-2,4,6-trihidroxi-dihidro- β -agarofurano	240, 241	298	
43	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-9 β -benzoiloxi-1 α ,2 α ,4 β ,6 β -tetrahidroxi-dihidro- β -agarofurano	240, 242	298	
44	1 α -acetoxi-9 β -benzoiloxi-2 α ,4 β -dihidroxi-8 β ,15-di-(2-metilbutiroiloxi)-6 β -(2- <i>N</i> -metilaminobenzoiloxi)-dihidro- β -agarofurano	235	291	330

8.2. Sesquiterpenos incluidos en el estudio 3D-QSAR.



8.3. Tabla resumen de los sesquiterpenos utilizados en el estudio 3D-QSAR.



Sesquiterpeno ^a	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₆	R ₈	R ₉	R ₁₂	R ₁₅	ΔG_{solv}^b	Log P^c	%IC MDR ^d	K_i^e
S1	OH	α OAc		OH	OFu		β OFu			-13,44	4,31	23,4	100,0
S2	OAc	α OFu		OH	OFu		β OFu			-15,49	6,49	86,2	2,20
S3	OAc	α OAc		OH	OFu		β OFu			-13,67	5,14	90,9	2,91
S4	OAc	α OH		OH	OFu		β OFu			-15,52	4,34	9,1	4,159
S5	OAc	α OBz		OH	OFu		β OFu			-13,99	7,13	93,7	0,70
S6	OAc	α OPr		OH	OFu		β OFu			-12,83	6,21	94,8	1,13
S7	OAc	α OMeBut		OH	OFu		β OFu			-15,61	6,55	92,0	0,57
S8	OAc	α OAc		OH	OFu		β OFu		OAc	-17,10	5,44	89,5	2,44
S9	OAc	α OAc		OH	OBz		β OBz		OAc	-16,33	7,28	89,9	1,50
S10	OAc			OH	OFu		β OFu			-11,40	5,26	89,0	6,61
1	OBz	α OAc		OH	OFu		β OFu			-12,67	7,16	29,1	3,45
2	OAc	α ONic		OH	OFu		β OFu			-15,66	6,10	29,4	7,42
4	OAc	α OFu		OH	OH		β OFu			-15,68	4,73	28,5	5,53
5	OAc	α OFu		OH	OAc		β OFu			-15,62	5,14	0,0	4,13
6	OAc	α OAc		OH	OH		β OFu			-13,81	3,39	5,5	17,48
7	OAc	α OAc		OH	OAc		β OFu			-13,80	3,80	17,1	100
8	OAc	α OAc		OH	OBz		β OFu			-12,68	6,07	51,8	8,94
9	OAc	α OAc		OH	OMeBut		β OFu			-11,51	5,21	1,8	2,81
10	OAc	α OAc		OH	OLau		β OFu			-11,37	9,11	29,2	0,80
11	OAc	α OAc		OH	ONaf		β OFu			-13,39	7,30	50,7	1,65
12	OAc	α OAc		OH	OPiv		β OFu			-11,15	5,03	82,5	0,96
13	OAc	α OAc		OH	OTFAc		β OFu			-10,48	4,12	1,3	12,08

Sesquiterpeno ^a	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₆	R ₈	R ₉	R ₁₂	R ₁₅	ΔG_{solv}^b	Log <i>P</i> ^c	%IC MDR ^d	K _i ^e
14	OAc	α OAc		OH	OMeOBz		β OFu			-13,75	6,14	85,0	0,70
15	OAc	α OAc		OH	ONO2Bz		β OFu			-15,66	5,67	15,5	4,76
17	OAc	α OBz		OH	OH		β OFu			-14,16	5,65	41,1	2,50
18	OAc	α OBz		OH	OAc		β OFu			-14,13	6,07	14,3	2,92
20	OAc	α OBz		OH	OMeBut		β OFu			-11,78	7,48	10,4	1,00
21	OAc	α OBz		OH	OLau		β OFu			-11,68	11,38	3,9	5,16
22	OAc	α OBz		OH	ONaf		β OFu			-13,69	9,56	3,7	4,59
23	OAc	α OBz		OH	OPiv		β OFu			-11,50	7,29	25,9	1,04
24	OAc	α OBz		OH	OTFAc		β OFu			-10,70	6,39	9,7	1,56
25	OAc	α OBz		OH	OMeOBz		β OFu			-14,07	8,41	3,8	1,88
26	OAc	α OBz		OH	ONO2Bz		β OFu			-16,00	7,94	26,4	1,79
MAMA1	OBz	β OAc	β ONic	OH	OAc		β OCin			-17,04	7,99	7,00	25,04
MAMA2	OBz	β OAc	β ONic	OH	OAc		β OBz			-16,50	8,01	8,90	3,75
MAMA3	ONic	β OAc	β OAc	OH		β OBz	β OBz			-15,94	7,52	22,10	1,45
MAMA4	ONic	β OAc	β OBz	OH		β OAc	β OBz			-16,13	7,79	19,90	1,36
MAMA5	OBz	β OAc	β OAc	OH		β OBz	β OBz			-14,23	8,83	46,10	0,73
MAMA6	OBz	β OAc	β OAc	OH		β OAc	β OBz			-15,08	6,81	37,00	1,27
MAMA7	OCin	β OAc	β ONic	OH			β OBz			-14,85	7,64	78,00	2,07
MAMA10	OBz	β OAc		OH			β OCin			-12,60	6,85	85,00	7,61
MAMA11	OBz	β OAc		OH			β OBz			-11,97	6,56	78,90	7,59
MAMA12	OAc	α ONic		OH	OBz		β OBz		OAc	-17,16	8,23	77,80	0,58
MAMA13	OBz	α ONic			OAc	β OAc	β OBz			-13,99	8,73	39,60	7,72
MAMA14	OBz	α OBz		OH	OAc	β OAc	β OBz			-12,96	9,44	58,00	11,27

Sesquiterpeno ^a	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₆	R ₈	R ₉	R ₁₂	R ₁₅	ΔG_{solv}^b	Log <i>P</i> ^c	%IC MDR ^d	Ki ^e
MACHU1	OBz	βOAc	βOH		OAc		βOBz			-14,61	6,41	30,20	-
MACHU4	OAc	αONic			OBz		βOBz		OAc	-16,26	8,42	81,60	0,71
MACA3	OAc			OH	OAc	αOMeBut	αOBz		OAc	-12,00	6,97	67,00	1,83
MACA4	OBz			OH	OAc	αOBz	αOBz		OAc	-14,66	9,60	76,55	1,22
MACHI1	OAc	αOAc		OH	OAc	O	αOAc		OAc	-19,49	3,40	0,00	-
MACHI2	OAc	αOAc	βOAc	OH	OAc	αOAc	αOAc	OAc	OAc	-18,24	3,59	0,00	6,97
MACHI3	OAc	αOAc		OH	OH	O	αOAc		OAc	-18,41	3,28	0,00	7,65
MACHI4	OAc	αOH		OH	OH	O	αOAc		OAc	-19,08	2,04	0,00	-
MACHI5	OAc	αOAc	βOAc	OH	OAc	O	αOAc	OAc	OAc	-27,36	0,40	0,00	-
EUNE4	OMeBut	αOFu		OH	OAc		βOFu		OAc	-15,90	6,85	54,10	1,94
EUNE6	OFu	αOFu		OH	OAc		βOFu		OAc	-15,74	6,53	19,80	4,51
CROU3	OAc	αOBz			OAc		βOBz		OAc	-15,15	7,72	76,80	0,63
CROU4	OAc	αOBz			OAc	αOBz	αOBz		OAc	-15,40	10,34	12,00	33,85
CROU5	OBz	αOBz			OAc	αOBz	αOBz		OH	-16,25	11,46	8,10	1,30
CROU6	OBz	αOBz			OAc	αOBz	αOBz		OAc	-13,59	12,36	0,00	1,98
ZIN1	OBz	αOAc			OAc	O	αOBz		OAc	-16,72	8,08	61,5	1,63
ZIN2	OAc	αOAc			OAc	O	αOBz		OAc	-18,64	6,06	45,1	2,54
ZIN3	OH	αOAc			OAc	O	αOBz		OAc	-17,59	5,03	3,6	18,39
ZIN4	OBz	αOAc			OAc	O	αOAc		OAc	-19,20	6,06	3,6	5,74
ZIN5	OAc	αOAc			OAc	O	αOAc		OAc	-17,35	4,04	4,1	9,83
ZIN6	OBz	αOAc			OH	O	αOBz		OAc	-17,44	7,23	7,7	3,97
ZIN7	OBz	αOAc		OH	OAc	O	αOBz		OAc	-19,06	7,74	20,7	3,01
ZIN8	OBz	αOBz		OH	OAc	O	αOBz		OAc	-17,47	10,00	8,6	1,03

Sesquiterpeno ^a	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₆	R ₈	R ₉	R ₁₂	R ₁₅	ΔG_{solv}^b	Log <i>P</i> ^c	%IC MDR ^d	K _i ^e
ZIN9	OBz	α OAc	β OAc	OH	OAc	O	α OAc		OAc	-24,35	6,01	5,9	6,52
ZIN10	OBz	α OBz		OH	OAc	β OBz	β OBz		OH	-17,29	6,85	4,3	7,04
ZIN11	OAc	α OAc		OH	OAc	β OBz	β OBz		OAc	-17,69	7,63	31,3	1,74
ZIN12	OAc	α OAc			OAc	β OBz	β OBz		OAc	-18,31	8,32	56,2	1,71
ZIN13	OBz	α OAc		OH	OAc	β OBz	β OBz			-12,28	9,19	49,2	0,91
ZIN14	OBz	α OBz		OH	OAc	β OH	β OBz			-12,52	8,35	44,4	1,21
ZIN15	OBz	β OAc	β OH				β OCin			-12,88	6,25	31,8	8,46
ZIN16	OBz	β OH	β OAc				β OCin			-13,07	6,20	44,6	4,25
ZIN17	OBz	β OH	β OH				β OCin			-12,81	6,02	14,2	6,94
ZIN17D1	OBz	β OAc	β OAc				β OCin			-12,10	7,37	- ^d	2,72
ZIN18	OAc	α OAc		OH	OAc		β OBz		OAc	-16,30	5,01	5,6	4,39
ZIN19	OAc	α OAc			OAc		β OBz		OAc	-15,05	5,70	53,4	2,36

^a El nombre de los sesquiterpenos (excepto los de *M. cuzcoina*, que han sido objeto de esta Tesis) hacen referencia a la planta de procedencia: *Maytenus magellanica* (MAMA), *Maytenus chubutensis* (MACHU), *Maytenus canariensis* (MACA), *Maytenus chiapensis* (MACHI), *Euonimus europeus* (EUNE), *Crossopetalum uragoga* (CROU) y *Zinowewia costaricensis* (ZINO). ^b Energía libre de solvatación calculada. ^c Coeficiente teórico de partición octanol-agua. ^d Porcentaje de inhibición del crecimiento de la cepa MDR de *Leishmania tropica*. ^e Constante de inhibición de la Pgp humana. ^d No evaluado.