

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**Estudio y funcionalización quimioenzimática de los  
componentes químicos de *Jasminum odoratissimum***

**Autor: Hernández Expósito, José Manuel**

**Directores: José Andrés Pérez Pérez  
y Juan Manuel Trujillo Carreño**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE BIOORGÁNICA "ANTONIO GONZÁLEZ"**

**y**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Estudio y funcionalización quimioenzimática de los  
componentes químicos de *Jasminum odoratissimum***

La Laguna, Junio del 2001

Memoria presentada para acceder al  
grado de Doctor por el Licenciado D.  
José Manuel Hernández Expósito.





D JOSÉ ANDRÉS PÉREZ PÉREZ, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD Y D. JUAN MANUEL TRUJILLO CARREÑO, COLABORADOR CIENTÍFICO DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.

**CERTIFICAN:** Como directores del trabajo titulado, "Estudio y funcionalización quimioenzimática de los componentes químicos de *Jasminum odoratissimum* " realizado por el Lcdo. D. José Manuel Hernández Expósito, que dicho trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios del Instituto Universitario de Bioorgánica "Antonio González", Universidad de la Laguna, durante los cursos, 1995/96 hasta 2000/01 por lo que,

**AUTORIZAN:** La presentación de la presente Memoria dado que reúne la calidad y cantidad de trabajo necesaria para constituir la Tesis Doctoral que el citado Licenciado presenta para aspirar al Grado de Doctor.

La Laguna, Junio del 2001

Fdo.: José Andrés Pérez Pérez

Fdo.: Juan Manuel Trujillo Carreño



Esta tesis ha sido realizado en los laboratorios del Instituto Universitario de Bioorgánica "Antonio González" y en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Universidad de la Laguna, bajo la dirección del Doctor Don José Andrés Pérez Pérez y el Doctor Don Juan Manuel Trujillo Carreño a quienes expreso mi más profundo y sincero agradecimiento.



La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a las siguientes personas:

A Don José Andrés Pérez Pérez y Don Juan Manuel Trujillo Carreño de los que con la sabiduría, humanidad, sencillez y humildad de lo que tienen mucho que enseñar he recibido amistad y conocimientos. Espero no haber defraudado la confianza que depositaron en mí.

A Don Hermélo López Dorta por su inestimable colaboración en la realización de este trabajo.

A todo el personal técnico de Instituto Universitario de Bioorgánica "Antonio González" que contribuyeron de alguna manera a la realización de este trabajo.

A mis padres y a mi hermano que me animaron y apoyaron para terminar este trabajo.

A mi querido amigo José Ángel Romero Pitti por su apoyo y porque siempre encuentra el lado positivo de las cosas , incluso en los peores momentos.

A Beatriz por su ayuda, comprensión y paciencia.

A mis amigos María Jesús, Susi, Gloria, Rodri y por fortuna muchos otros, que siempre me han animado a terminar esta obra.



# ÍNDICE

## 1.- INTRODUCCIÓN

❖	Introducción.....	3
❖	Descripción botánica.....	19
❖	Etnobotánica.....	40
❖	Actividad biológica de los iridoides.....	46
❖	Catálisis enzimática en disolventes orgánicos.....	58
❖	El ácido mevalónico AMV origen de los iridoides.....	79
❖	Formación del esqueleto iridano.....	82
❖	Iridoides y secoiridoides en <i>Gentianales</i> .....	99
❖	Iridoides y secoiridoides en <i>Oleaceae</i> .....	119
❖	Hidrólisis por glucosidasas de iridoides y secoiridoides.....	155
❖	Patrones de acilación en oleoiridoides.....	163

## 2.- PARTE TEÓRICA

❖	Parte teórica.....	169
❖	Descripción de los productos aislados.....	171
❖	Acetilación parcialmente regioselectiva.....	252

## 3.- PARTE EXPERIMENTAL

❖	Parte experimental.....	259
---	-------------------------	-----

## 4.- CONCLUSIONES

❖	Conclusiones.....	291
---	-------------------	-----

5.-	ÍNDICE DE PRODUCTOS CITADOS.....	295
-----	----------------------------------	-----







# INTRODUCCIÓN

Una de las líneas de investigación del Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", es el aislamiento y análisis estructural de metabolitos secundarios de origen vegetal. Es escasa la información de que se dispone acerca de la función que dichos metabolitos llevan a cabo en la planta, en comparación con la que se dispone sobre los intermediarios de las principales vías metabólicas de biosíntesis y degradación. En general, se les asigna funciones de defensa frente a depredadores (sobre lo que hay abundante bibliografía<sup>1</sup>) o bien se les relega al papel de simples productos de desecho. No obstante la importancia de los metabolitos secundarios en plantas (llamados también "productos naturales") radica en su aplicación práctica en farmacología y en agricultura.

Tan importante como el estudio de nuevos productos naturales con aplicación práctica directa o con posibles utilidades futuras, es el poder desarrollar métodos para su producción masiva por medio de cultivo directo o a través de cultivos de tejidos in vitro, así como el desarrollar protocolos de aislamiento y purificación prácticos, efectivos y de alto rendimiento. O métodos para su síntesis con las mismas características de eficacia, teniendo en cuenta que muchas de las fuentes naturales son escasas y/o en peligro real de extinción.

Los productos naturales suelen ser moléculas muy complejas y con una gran cantidad de centros quirales, que convierten en una aventura su síntesis parcial o total, y cuando esta se consigue, implica un proceso tan complejo y costoso que ninguna empresa farmacéutica se aventura a su producción.

Importantes anticancerígenos como la vinblastina y vincristina se aíslan todavía de la planta *Catharanthus roseus* pese a años de investigación en la síntesis. Anticancerígenos de origen microbiano como bleomicinas y daunorubicinas se producen aún por fermentación.

El taxol, un anticancerígeno que se obtiene de *Taxus brevifolia*, presenta 11 centros quirales y 2048 potenciales diastereoisómeros: imposible económicamente hablar de una síntesis parcial a partir de precursores o moléculas relacionadas. En muchos casos solo nos queda la extracción de la fuente natural.

Los vegetales han sido utilizados por el hombre durante toda su historia como fuente de alimentos o de materiales para la manufactura o la industria. Pero también le ha servido como fuente de salud, y cada cultura cuenta con un conjunto de especies vegetales en su territorio con determinadas propiedades medicinales. Constituyen la base de lo que conocemos como medicina tradicional o medicina natural.

La industria de las plantas medicinales en Europa y Estados Unidos está moviendo cantidades cuantificadas en centenares de millones de dólares, y ello sin considerar las producciones para la industria farmacéutica, con un crecimiento que en los últimos años supone un 20% anual.<sup>2</sup>

Son muchas las especies que ya son cultivadas por su enorme demanda:

*Ginkgo biloba* que se usa para el tratamiento de la circulación periférica, haciendo a la sangre más elástica y selectiva en la dilatación de los capilares. En Europa se utiliza para el tratamiento del vértigo, degeneración muscular, demencia ...

---

<sup>1</sup> Kubo I., Matsumoto A. y Takase I. (1985) J. Chem. Ecol. 1, 251

Juren B., Henis Y. Y Jacoby B. (1972) J. Appl. Bacteriol. 35, 559

Nakajima S., Kitamura T., Baba N., Iwasa L. y Ichikawa T. (1995) Biosci. Biotech. Biochem. 59(4), 769

<sup>2</sup> Israelsen, L.D. Phytomedicines as a new crop opportunity. (1993), Janick and J.E. Simon (Eds.), New Crops Wiley, New York, 669

La hierba de San Juan *Hypericum perforatum*, utilizada por sus propiedades antivirales y antidepresivas.

El cardo mariano *Sylibum marianum* en el tratamiento del envenenamiento con setas y otros hepatotóxicos.

Sedativas como *Nepeta cataria* y la valeriana de *Valeriana officinalis*.

*Sanguarina canadiensis* fuente de un ingrediente muy conocido de las pastas de dientes "Viadent" que se utiliza en el control de la placa y la gingivitis.

*Serenoa repens* que utiliza en el tratamiento de la hipertrofia de prostata.

Una planta americana *Cimicifuga racemosa* utilizada por los nativos y la población de los Appalaches en la regulación del ciclo hormonal de la mujer.

*Tanacetum parthenium* que en estudios en Inglaterra ha mostrado reducir la frecuencia e intensidad de la migraña.

La echinacea *Echinacea purpurea*, que es un popular inmunoestimulante.

Ginseng siberiano *Eleutherococcus senticosus* que en estudios en Rusia ha mostrado ser un potente adaptógeno.

*Hydrastis canadiensis* utilizada desde muy antiguo en la farmacopea americana y nativa de los Apalaches, se ha colocado al borde de la extinción por su gran demanda.

Estas plantas medicinales son la fuente de más del 50% de las drogas de uso clínico. Muchas plantas proporcionan nuevos productos para el tratamiento y prevención de diversos tipos de cáncer, SIDA y enfermedades infecciosas como la malaria<sup>3</sup>. De las 119 drogas de origen vegetal de uso más frecuente, el 74% derivan de estudios fitoquímicos de los constituyentes de plantas usadas en la medicina natural<sup>4</sup>. El término fitomedicina engloba a un categoría de drogas vegetales que están estandarizadas, lo que significa que ciertos componentes de ese material vegetal (productos naturales) han sido cuantificados y estudiada su estructura química, en un proceso reproducible en el que los componentes se extraen miligramo a miligramo. Pero los principales problemas que se plantean siempre son que los contenidos en estas drogas en la fuente suelen ser ínfimos y que el propio material biológico es muy escaso.

La reserpina, un antihipertensivo y tranquilizante aislado de *Rawolfia serpentina*. Los glucósidos cardiacos de *Digitalis purpurea*. La quinina utilizada en el tratamiento de la malaria de *Cinchona ssp.* y los analgésicos codeína y morfina de *Papaver somniferum* son algunos ejemplos de estos productos naturales. Otros metabolitos secundarios han servido como precursores por semisíntesis de drogas como el etópsido, un anticancerígeno derivado de la epipodofilotoxina de *Podophyllum ssp.* o la atropina, un anticolinérgico de *Atropa belladonna*.

Pero el tejo *Taxus brevifolia*, hasta el momento es la más controvertida e interesante fitomedicina; es la fuente del taxol que muestra grandes promesas en el tratamiento de varios tipos de cáncer, en especial el de ovario. Pero no existen suficientes árboles, ya que estos crecen muy lentamente, y si se cosechan los tejos naturales, estos podrían desaparecer.

Los estudios preclínicos y clínicos requirieron una modesta cantidad de taxol hasta 1990, aproximadamente se aislaron unos 4 Kg. Pero tras descubrir sus propiedades la demanda aumento hasta los 25 Kg. por año, lo que requiere unos 340.000 Kg. de *Taxus brevifolia*, equivalente a 38.000 árboles. Si el taxol se muestra activo contra otros tipos de cáncer, las demandas podrían exceder de 200 o 300Kg por año, y solo en EEUU.

<sup>3</sup> Kinghorn A.D y Balandrin M.F., "Human Medicinal Agents from plants" (1993) ACS Symposium Series 534, Washington DC.,

<sup>4</sup> Farnsworth N.R.; Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D. y Guo Z. (1985) Bull. W.H.O., 63,965

Pero de nada sirve encontrar un potente anticancerígeno como el taxol o un potente cardiotónico como en *Isoplexis* ssp. si su extracción o producción se hace imposible con las fuentes protegidas por su rareza. Esas 119 drogas que hemos considerado proceden de tan sólo 90 especies vegetales, y si tenemos en cuenta que existen entre 250.000 y 500.000 especies sólo de vegetales superiores, el potencial para encontrar nuevos productos naturales es enorme.

Un 60% de esas especies se concentran en los trópicos, muchas de ellas todavía por descubrir, y desaparecerán antes de las llegemos a conocer<sup>5</sup>. La degradación de los ecosistemas, en especial los tropicales, y la mundialización cultural preocupan a la comunidad científica por la pérdida del conocimiento de la medicina tradicional y de la riqueza genética ligada a su vez a la pérdida de biodiversidad, al margen de otras consideraciones ecológicas.

La investigación fitoquímica debe servir para la protección de las fuentes vegetales y sus ecosistemas, y nunca pueden poner en peligro su existencia. Deben ser la fuente de una investigación básica que sirvan para enriquecer el conocimiento y el bienestar humano, y no de innumerables y novedosas publicaciones.

Ante este problema se han iniciado una serie de vías de búsqueda de fuentes alternativas, en la que participan gran cantidad de gobiernos y instituciones de investigación como el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) y Departamento de Agricultura en Estados Unidos ;<sup>6</sup> como son:

- El cultivo a gran escala de la fuente natural, así como el desarrollo de variedades resistentes y altamente productivas.

(En 1987, una muestra de las hojas de una liana identificada como *Ancistrocladus* sp. fue recolectada en la región de Korup en el sureste de Camerún dentro de una colaboración entre el NCI con el Missouri Botanical Garden para sus recolecciones en Africa y Madagascar. Los extractos de las hojas muestran in-vitro actividades significativas anti- VIH, y el alcaloide dimérico naphthylisoquinolina, michellamina B, se aisló como agente activo<sup>7</sup>. La planta fue identificada después como una nueva especie *Ancistrocladus korupensis* D. Thomas & Gereau<sup>8</sup> (Thomas and Gereau 1993). La michellamina B muestra in-vitro actividad tanto contra el VIH-1 y VIH-2, y se han desarrollado los estudios pre-clínicos.

Un estudio botánico inicial indica que el rango de distribución de la especie se limita al Parque Nacional de Korup. El NCI ha iniciado un programa para el estudio de su cultivo en colaboración con el gobierno camerunés).

- Determinar las estructuras mas ricas en la fuente natural así como la época del año más propicia para su recolección si está sujeta a variaciones estacionales.

---

<sup>5</sup> Baker J.T., Borris R.P., Carté B., Cordell G.A., Soejarto D.D., Cragg G.M., Gupta M.P. Madulid D.R. y Tyler V.E. (1995) Journal of Natural Products, **58**,9, 1325

<sup>6</sup> Cragg, G.M., M.R. Boyd, J.H. Cardellina II, M.R. Grever, S. Schepartz, K.M. Snader, and M. Suffness. (1993). The search for new pharmaceutical crops: Drug discovery and development at the National Cancer Institute. p. 161-167. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), New crops. Wiley, New York.

<sup>7</sup> Manfredi, K.P., J.W. Blunt, J.H. Cardellina, II, J.B. McMahon, L.K. Pannell, G.M. Cragg, y M.R. Boyd. (1991). J. Med. Chem. **34**:3402-3405.

Boyd, M.R., Y.F. Hallock, J.H. Cardellina II, K.P. Manfredi, J.W. Blunt, J.B. McMahon, R.W. Buckheit Jr., G. Bringmann, M. Schaffer, G.M. Cragg, D.W. Thomas, y J.G. Jato. 1994. J. Med. Chem. **37**:1740-1745.

<sup>8</sup> Thomas, D.W., M.R. Boyd, J.H. Cardellina II, R.E. Gereau, J. Jato, y P. Symonds. (1994) Econ. Bot. **48**:31

Thomas, D.W. y R.E. Gereau. (1993). *Ancistrocladus korupensis* (Ancistrocladaceae): A new species of liana from Cameroon. Novon **3**:494

El taxol se encuentran en las acículas en cantidades de 5 a 10 veces menores que en la corteza).

-Búsqueda del producto en otras fuente taxonómicamente relacionadas o variedades que puedan tener un contenido mayor.

(El análisis de especies relacionadas con *Taxus brevifolia* muestran cantidades altas de taxol y precursores importantes de este como la 10-desacetilbactina III. La conversión de estos precursores por métodos semisintéticos se está desarrollando por varios grupos.<sup>9</sup>)

(Muchos calanolidos se han aislados como potenciales anti-SIDA de *Calophyllum sp.* especies recolectadas en la selvas tropicales de las regiones de Sarawak, Malasia. Calanolide A es una nueva cumarina aislada de *Calophyllum lanigerum* Miq. var. *austrocariaceum* (T.C. Whitmore) P.F. Stevens, recolectada en 1987. Recolecciones de material vegetal determinada como *C. lanigerum* en la misma localización no muestran la suficiente cantidad de producto para los estudios pre-clínicos, y este isómero no ha sido detectado en otras especies. Pero el látex de *C. teysmannii* var. *inophylloide* P.F. Stevens recolectado en la misma región y con un producto relacionado, (-)-calanolido B (costatolido) presenta gran actividad anti-VIH<sup>10</sup> y las recolecciones de látex no afectan a la salud de los árboles).

- Desarrollar programas de investigación dirigidos a establecer cultivos celulares que aporten una rápida y abundante cantidad de producto, teniendo en cuenta las ventajas que presentan estos cultivos en la producción y extracción, como son la facilidad para establecer líneas celulares altamente productivas, eliminar otros productos que interfieran, posibilidad de elicitar la producción y el ser un material con menos impurezas.<sup>11</sup>

La presente tesis doctoral, está dirigida al estudio de los componentes mayoritarios del endemismo macaronésico *Jasminum odoratissimum*, y su modificación por enzimas en disolventes orgánicos.

Se ha comprobado que los iridoides con un grupo hidroxilo libre en C1 son significativamente mas bioactivos que sus correspondientes glucosídico o acetal esteres, partiendo de la hipótesis de que los iridoides pueden actuar como pro-drogas cuya actividad vendría dada por la posterior hidrólisis.<sup>1</sup>

También se ha mencionado la posibilidad de que la actividad de muchos iridoides venga determinada por su conversión en alcaloides piridinmonoterpenoides (APMT).

Como veremos la modificación química de estos productos naturales aislados puede aportar un aumento de su actividad biológica o de la propiedad farmacológica buscada, e incluso podemos obtener un amplio espectro de nuevas actividades. Nuevos protocolos idóneos y prácticos para su obtención pueden ser de gran interés.

Una característica importante de los iridoides en general y de los secoiridoides presentes en *Oleaceae* es el amplio espectro de derivados por acilación. Muchos de estos derivados presentan actividades intensificadas o diferentes al producto origen.

Su posible interés se ve dificultado por la baja proporción en la que aparecen en las fuentes naturales. Nos hemos propuesto desarrollar métodos para la obtención de acilderivados de los

<sup>9</sup> Denis J-N., Greene A.F., Guenard D., Gueritte-Voegelein F., Mangatal I. y Potier P. (1988) J. Amer. Chem. Soc. **110**, 5917

<sup>10</sup> Fuller, R.W., H.R. Bokesch, K.R. Gustafson, J.H. Cardellina II, J.B. McMahon, G.M. Cragg, D.D. Soejarto, y M.R. Boyd. (1994).

HIV-inhibitory coumarins from the latex of the tropical rainforest tree *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*. Biorganic Med. Chem. Letter. **4**:1961.

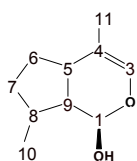
<sup>11</sup> Zenk M.H. (1991) Phytochemistry **30**, 3861

productos presentes en *Jasminum odoratissimum* con un amplio espectro de patrones de acilación que puedan aplicarse a otros iridoideos.

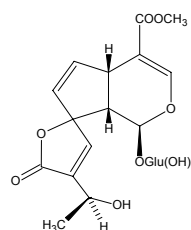
Prácticamente la totalidad de los productos naturales que aparecen en *J. odoratissimum* son Iridoides, productos ampliamente representados en el género y toda la familia *Oleaceae*.

Los Iridoides engloban a un gran grupo de monoterpenos basados en una estructura ciclopentano- (c) piranoide , generalmente glucosilada y que se encuentran representados en un gran número de familias del reino *Metafitas*.

El término Iridoide se utiliza para designar a un gran número de tipos estructurales que pueden considerarse derivados del iridano (cis-2-oxabicyclo[4.3.0] nonano)<sup>12</sup>.



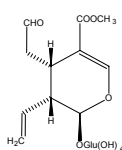
Iridano



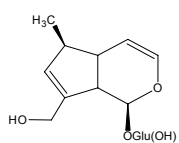
106

Estos productos se aislaron por primera vez a finales del siglo XIX, "Iridoide" es un término derivado de los nombres iridomyrmecina, iridolactona e iridoidal, compuestos aislados de algunas especies de *Iridomyrmex spp.*, un género de hormigas australianas en las cuales aparece como secreciones defensivas<sup>13</sup> y descritos en los años 50. Pero no fue hasta 1958 cuando Halpern y H. Schmid<sup>14</sup> proponen el esqueleto básico de los iridoides en sus investigaciones de la estructura del plumerido (106). El término fue posteriormente adaptado por Briggs y col. (1960)<sup>15</sup> a toda una clase estructural de compuestos (aproximadamente 600) aislados de plantas.

Aunque el nombre se acepta de forma general, estos compuestos también se han denominado pseudoindicanos por dar coloración azul por hidrólisis, y glucosidos tipo aucubina.



24 secologanina



aucubina

El interés químico por estos compuestos se inicia y estimula por el papel que tienen en los mecanismos de defensa de las hormigas<sup>16</sup> y porque uno de ellos, la secologanina (24), interviene de forma importante en la biosíntesis de alcaloides indolmonoterpenoides encontrados en las familias *Apocynaceae*, *Loganiaceae* y *Rubiaceae*.

<sup>12</sup> Tietze, L.F. (1983) *Angew. Chem.* **22**, 828

<sup>13</sup> L. M. Roth, y T. Eisner, (1962) *Ann. Rev. Entomol.*, **7**, 107

<sup>14</sup> Yeowell, D.A., y Schmid. (1960) *Experientia* **20**,250

<sup>15</sup> Briggs L.H., Cain B. F., Le Quesne P.W., Shoolery J.W. (1963) *Tetrahedron Letters* , 69

<sup>16</sup> L. M. Roth, y T. Eisner, (1962) *Ann. Rev. Entomol.*, **7**, 107

Encontrados en un enorme número de medicinas populares en los que se valoran sus propiedades como sedantes, febrífugos, hipotensivos, antihelmínticos, colárgicos, laxantes, remedios contra problemas epidérmicos y una amplia lista,<sup>17</sup> durante mucho tiempo se han considerado como compuestos de interés farmacológico.

Recientemente un gran número de publicaciones hacen referencia a su potencial farmacológico y revelan que los iridoides muestran un amplio rango de bioactividades: cardiovasculares, antihepatotóxicas, coleréticas, hipoglucémicas, hipolipídicas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antitumorales, antivirales e inmunomodulatorias entre otras.<sup>18</sup>

Muchas publicaciones se han ocupado del estudio del grupo iridoides incluyendo los de Bobbitt y Seagebarth<sup>19</sup>, una publicación que incluye datos fitoquímicos; Plouvier y Favre-Bonvin<sup>20</sup>, que estudia la distribución, estructura, propiedades y biosíntesis; Buchbauer<sup>21</sup>, discuten el significado farmacológico de los iridoides; Sticher y Junod-Busch<sup>22</sup>, presentan un estudio de los procedimientos de aislamiento en 1978, Jahodar<sup>23</sup>, Rimpler<sup>24</sup>, y Sticher<sup>25</sup> tratan el aislamiento y elucidación de la estructura de los iridoides glucosilados. Recientemente un gran número de artículos han contribuido a aumentar el conocimiento sobre su estructura y aislamiento (Junior, 1990)<sup>26</sup>, química (Bianco,1990)<sup>27</sup>, distribución (Jensen,1991)<sup>28</sup>, biosíntesis (Inouye y Uesato,1986)<sup>29</sup>, actividades biológicas (Ghisalberti, 1998)<sup>30</sup> y secreción por insectos (Rimpler,1991)<sup>31</sup>.

Jensen, Nielsen y Dahlgren<sup>32</sup>, en 1975, presentan un trabajo relativo a su distribución botánica, y el significado taxonómico de los iridoides de *Tubiflora* se discute por Hegnauer y P. Kooiman<sup>33</sup>. P. Kooiman presenta información de la distribución en las familias *Rubiaceae*<sup>34</sup>, *Scrophulariaceae*<sup>35</sup>, y *Lamiaceae*<sup>36</sup>. Son frecuentes las reseñas que utilizan a los iridoides como posibles marcadores taxonómicos. El estudio de los iridoides presentes en *Jasminum odoratissimum* nos puede permitir una clasificación filogenética y evolutiva más clara de esta especie dentro del género *Jasminum* y la familia *Oleaceae* y subtaxones.

<sup>17</sup> Phytochemical Database, USDA-ARS-NGRL, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland

<sup>18</sup> E.L., Ghisalberti. *Phytomedicine*, **5**(2), 147 Holton R.A. (1990) Approaches to the total synthesis of taxol. Abstracts of Workshop on Taxol and Taxus: Current and future Perspectives. J. Nat. Can. Inst.

<sup>19</sup> J.M. Bobbitt, y K.P. Seagebarth en W.I. Taylor, y A.R. Battersby (Ed): "Cyclopentanoid Terpene Derivates", Marcel Dekker Inc., New York, 1969, Capítulo 1.

<sup>20</sup> V. Plouvier, y J. Favre-Bonvin, (1971) *Phytochemistry*, **10**, 1697

<sup>21</sup> G. Buchbauer, (1974) *Oesterr. Apto. Ztg.*, **28**(10),173

<sup>22</sup> O. Sticher, y U. Junod-Busch, (1975), *Pharm. Acta Helv.*,**50**(5), 127

<sup>23</sup> L. Jahodar, (1978) *Farm. Obzor.*, **47**(8),353

<sup>24</sup> H. Rimpler, (1978) *Planta Med.*,**33**(4), 313

<sup>25</sup> O. Sticher, 11<sup>th</sup> International Symposium on Chemistry of Natural Products, Bulgaria, (1978) Symposium papers, Vol.4, parte 2, 146

<sup>26</sup> Junior P. (1990) *Planta Med.* **56**, 1

<sup>27</sup> Bianco A. (1990) *Stud. Nat. Prod. Chem.* **7**, 439

<sup>28</sup> Jensen R.S. Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms. En: Harborne J.B. Tomas-Barberan F.A. (Eds): *Ecological Chemistry and Biochemistry of plant terpenoids*. Proc. Phytochem. Soc. Europe. Clarendon Press, Oxford (1991), 133-158

<sup>29</sup> Inouye H. y Uesato S. : Biosynthesis of iridoids and secoiridoid. En: Herz, W., Grisebach H., Kirby G.W., Tamm Ch. (Eds): *Progress in the chemistry of organic natural products*. Vol. 50 Springer-Verlag, Viena,(1986), 169

<sup>30</sup> E.L., Ghisalberti. *Phytomedicine*, **5**(2), 147

<sup>31</sup> Rimpler H.: Sequestration of iridoids by insects .En: Harborne J.B. Tomas-Barberan F.A. (Eds): *Ecological Chemistry and biochemistry of plant terpenoids*. Proc. Phytochem. Soc. Europe. Clarendon Press, Oxford , (1991),314-330

<sup>32</sup> S.R. Jensen, B.J. Nielsen, y R. Dahlgren, (1975) *Bot. Notiser*, **128**,148

<sup>33</sup> R. Hegnauer, y P. Kooiman, (1978) *Planta Med.*, **33**(1),1

<sup>34</sup> P.Kooiman, (1969) *Acta Bot. Neerl.*,**18**,124

<sup>35</sup> P.Kooiman, (1970) *Acta Bot. Neerl.*,**19**,329

<sup>36</sup> P.Kooiman, (1972) *Acta Bot. Neerl.*,**21**,417



En 1978, Vand Der Sluis y Labadie<sup>37</sup>, hacen una revisión de los secoiridoides. Más recientemente los iridoides naturales se han clasificado por muchos autores en diferentes subgrupos en base a sus demostraciones o postulados biosintéticos así como en base a sus propiedades químicas .

De acuerdo con la clasificación de Hegnauer<sup>38</sup>, los iridoides naturales se representan por nueve grupos estructurales, formados por ciclopentano monoterpenos y secoiridoides, en general caracterizados estructuralmente por la 7,8-seco cadena, incluyendo pseudoalcaloides así como complejos tipo indol- e isochinoline- alcaloides. Todo ello asumiendo que los iridoides no eran más de 1000 compuestos. (ver **Figura 1**).

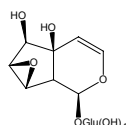
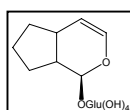
Otros autores como El-Naggar y Beal<sup>39</sup> han recopilado sólo iridoides glucosilados, secoiridoides glucosilados y compuestos no-glucosídicos, omitiendo todos los iridoides que contienen nitrógeno. Alcaloides simples como la gentianina (8) y otros se han considerado como artefactos formados por la sustitución del oxígeno por nitrógeno en los iridoides originales por tratamiento con amonio durante la extracción. Los importantes complejos de alcaloides de la ajmalicina-, catharanthina-, y ibogamina-, aunque contienen un resto secoiridoide en la molécula se toman como un grupo bien definido por ellos mismos.

En la mencionada fuente<sup>39</sup>, se listan 258 compuestos junto con todos los datos conocidos en ese momento. Se dividieron en diez grupos de acuerdo con el diferente número de carbonos en el esqueleto iridano e incrementando el grado de oxidación así como los diferentes patrones de sustitución.

Siguiendo esta clasificación se realizó la más completa y reciente clasificación de los iridoides conocidos hasta 1989.<sup>40,41</sup>

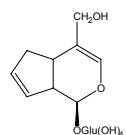
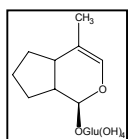
- Iridoides glucosilados con esqueletos carbonados:

**GRUPO I C-8**

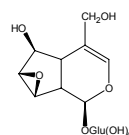


**stilbericosido**

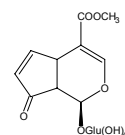
**GRUPO II C-9** (Que incluye dos subgrupos dependiendo de la posición del carbono 9 en C-4 o C-8)



**lychnitoido**



**epoxidecalosido**



**randiosido**

<sup>37</sup> W.G. Van Der Sluis, y R.P. Labadie, (1978) Pharmaceutisch II' eekblad, **133**,21

<sup>38</sup> Hegnauer, R. (1986) Chemotaxonomie der Pflanzen, vol VII Birk-hauser Verlag, Basel, pg. 325

<sup>39</sup> El Naggar, L.J., Beal, J. L.: Iridoides. A review. (1980) J. N. Prod. **43**, 649

<sup>40</sup> Christie A. Boros y Frank Stermitz (1990) J.N. Prod. 53, 1055

<sup>41</sup> Christie A. Boros y Frank Stermitz (1990) J.N. Prod. 54, 1173

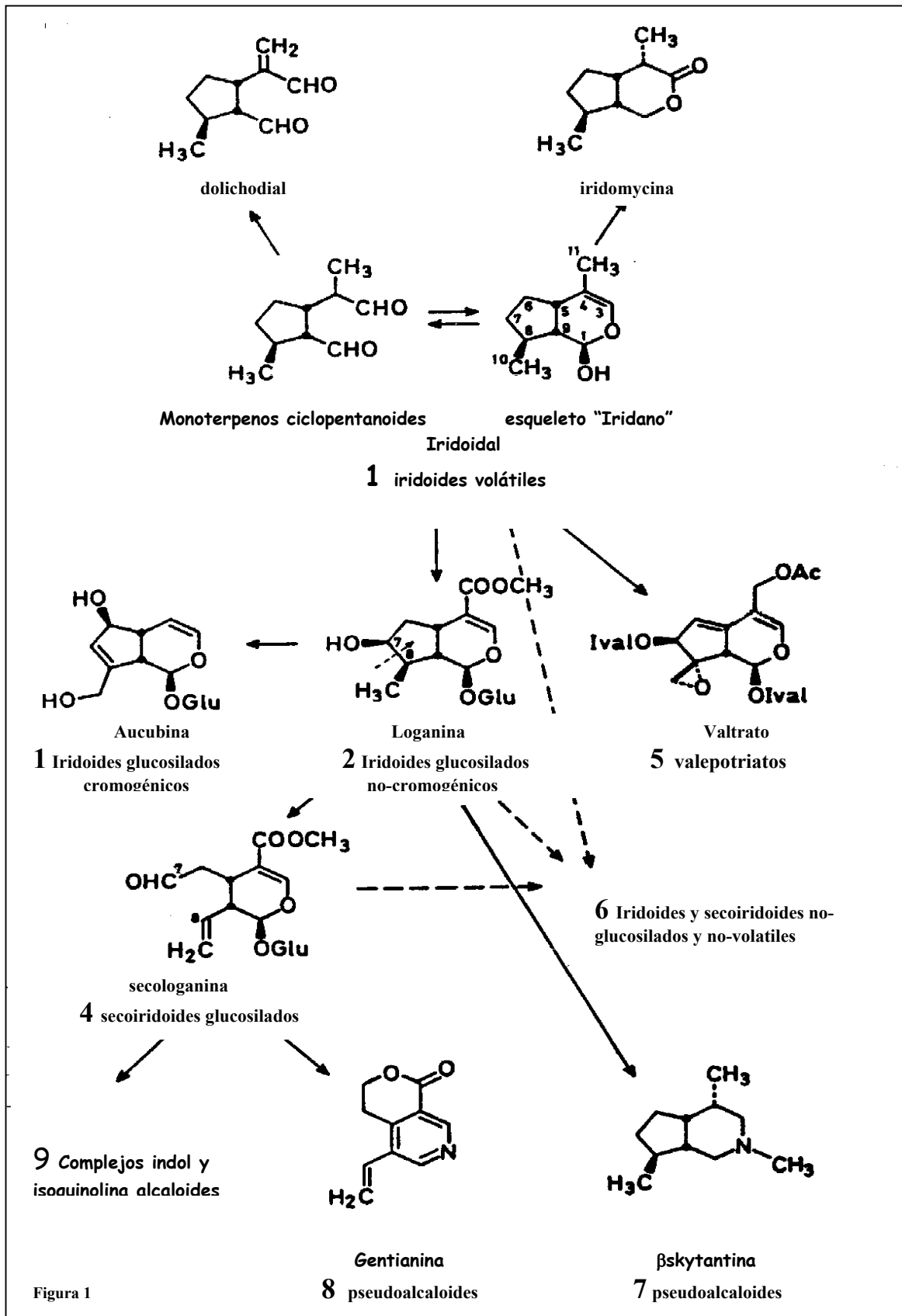
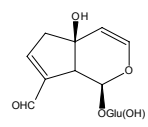
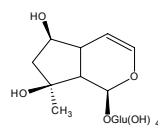
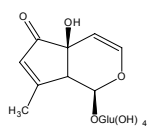
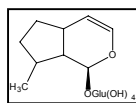


Figura 1

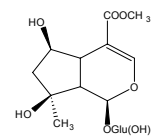
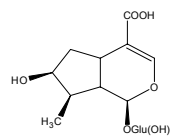
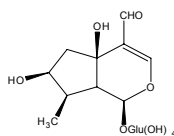
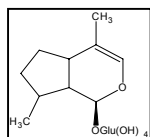


teuhircosido

ajugol

hygrophilosido

GRUPO III C-10



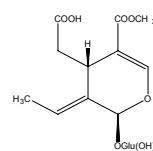
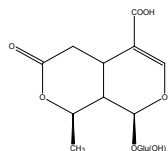
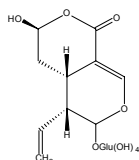
tecomosido

14 ácido logánico

shanzhisido metil ester

- Secoiridoides:

GRUPO IV Secoiridoides simples.

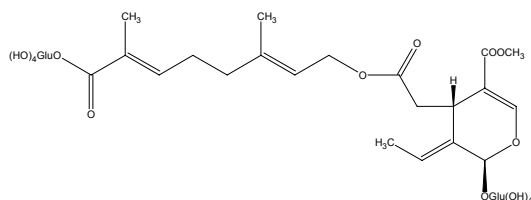


29 ácido secologánico

25 ácido epikingisídico

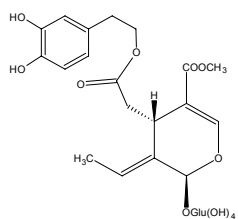
38 oleosido 11 metil ester

GRUPO V Secoiridoides conjugados con cadenas de tipo terpeno.

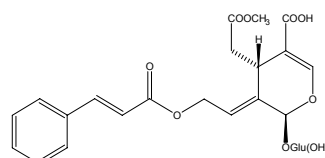


3803 jaspofoliamosido

GRUPO VI Secoiridoides con un grupo fenólico como sustituyente.

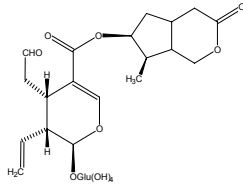


3808 oleuropeina

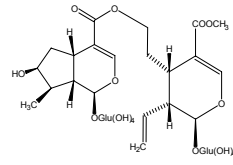


4902 jasminosido

GRUPO VII Bis-iridoides y bis-secoiridoides.



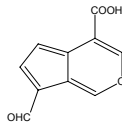
abeliosido A



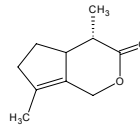
2303

- Iridoides no glucosídicos.

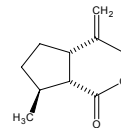
GRUPO VIII Miscelaneo de estructuras.



ácido cerberínico

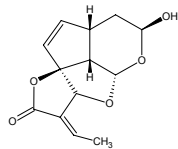


dehidroiridomirceína

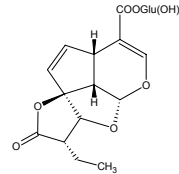


dolicholactona

GRUPO IX Iridoides tetracíclicos no glucosilados tipo -plumiera.

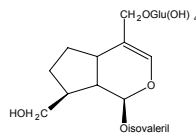


10616

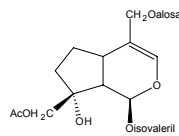


10618

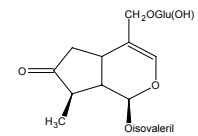
GRUPO X Iridoides tipo-valeriana.



dihidropenstemido

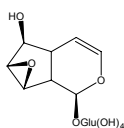


furcatosidoC

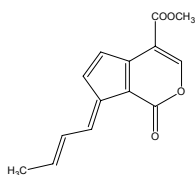


ebulosido

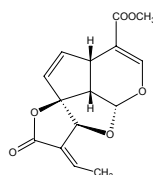
El esqueleto carbonado de los iridoides consiste en general en diez o nueve y raramente (unedosido; 10) ocho carbonos, pero también se conocen compuestos de trece (fulvoplumierina), catorce (plumericina) y diecinueve carbonos (orowacina).<sup>42</sup>



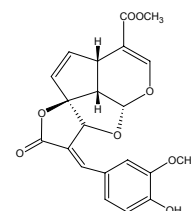
unedosido



fulvoplumierina



plumericina

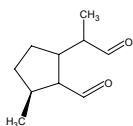


orowacina

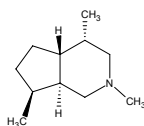
Inouye y Uesato<sup>43</sup> en base a la biosíntesis de iridoides y secoiridoides presentan otra clasificación desde el punto de vista biogenético, dividiendo los compuestos en iridoides no glucosídicos (incluyendo pseudoalcaloides del tipo skytantina), iridoides y secoiridoides glucosilados, y excluyen secoiridoides no glucosídicos y pseudoalcaloides tipo gentianina. Los dos primeros grupos no están subdivididos, pero el tercer grupo se ha subdividido en cuatro subgrupos desde el punto de vista de las vías biosintéticas y similitudes estructurales.

### 1. Iridoides no glucosilados:

Iridoidal (10), iridomyrmecina, nepetolactona,  $\beta$ -skytanthina.

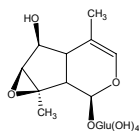


10 iridoidal

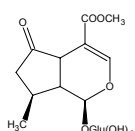
 $\beta$ -skytanthina

### 2. Iridoides glucosilados:

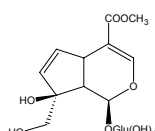
Loganina (16), deutziosido, verbenalina, gardenosido (107).



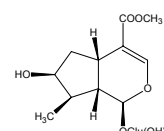
verbenalina



deutziosido



107



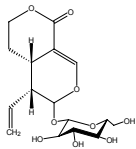
16

<sup>42</sup> Peter Junior (1990) *Planta Medica* **56**

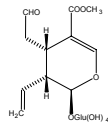
<sup>43</sup> Inouye H. y Uesato S. : Biosynthesis of iridoids and secoiridoid. En: Herz, W., Grisebach H., Kirby G.W., Tamm Ch. (Eds): *Progress in the chemistry of organic natural products*. Vol. 50 Springer-Verlag, Viena, (1986), 169

**Secoiridoïdes glucosilados:**

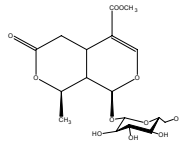
- a) Tipo swerosido-morrónisido: secologanina (24), swerosido (90), morronisido (47), kingisido (27).



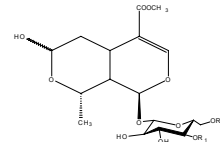
90



24

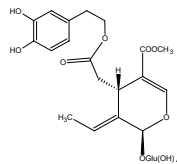


27

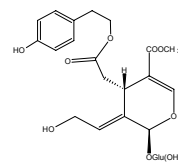


4

- b) Oleosidos del tipo 10-hidroxiolosidos: Oleuropeina (3808), 10-hidroxiligustrosido (4601).

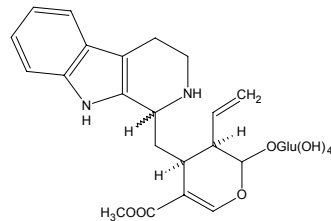


3808

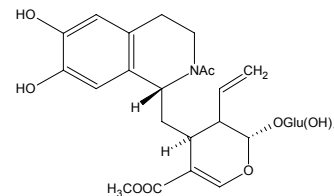


4601

- c) Alcaloides glucosilados conteniendo un esqueleto secoiridoïde: strictosidina, vincosido, ipecosido.



strictosidina  
vincosido

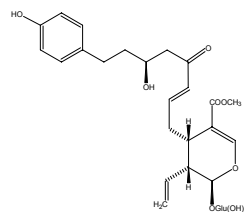


ipecosido

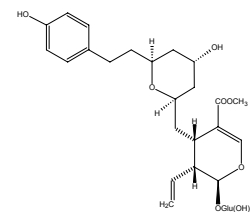
- d) Hydrangenosidos: Hydrangenosidos A, E y G.



A



E



G

En este trabajo seguiremos las iniciativas de Jensen que utiliza los criterios biosintéticos y sistemáticos para clasificar los iridoides. La importancia sistemática de estos productos ya se ha puesto de manifiesto por Jensen<sup>44</sup> y Dahlgreen<sup>45</sup>.

Como justificación hay que decir que muchos de estos productos relacionados desde le punto de vista químico y mostrados juntos en las revisiones proceden de fuentes muy alejadas taxonómicamente y por tanto previsiblemente originados por vías biosintéticas muy diferentes. Y un mismo producto como el ácido geniposídico puede originarse en diferentes fuentes no relacionadas y por diferentes vías.<sup>46</sup> (ver **Página 97**)

---

<sup>44</sup> Jensen, S.R., Nielsen, B.J. y Dahlgreen R. (1975) Iridoids compounds. Their occurrence and systematic importance in the angiosperms. *Botaniska Notiser (Lund)* **128**, 148

<sup>45</sup> Dahlgreen, R.M.T., Jensen S.R. y Nielsen, B.J (1981) A revised classification of the angiosperms with comments on correlation between chemical and other character. In *Phytochemistry and angiosperm phylogeny* (ed. D.A. and Young D.S. Seigler .pg 149-199. Praeger, New York

<sup>46</sup> Jensen S.R. Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms. *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*. Proc. Phytochem. Soc. Europe. Clarendon Press, Oxford, (1991) 133-158

### Descripción Botánica

La especie en estudio *Jasminum odoratissimum* L. es conocida como jazmín oloroso o jazmín amarillo. Un arbusto siempreverde de hasta 4 m. de altura, con hojas alternas, pinnadas, trifoliadas, con folíolos oblongos u obovados. Flores en grupos axilares de 1-4. Cáliz campanulado con 5 lóbulos y corola amarilla con tubo largo y 5 lóbulos patentes y más cortos que el tubo. Con el característico fruto del género , una baya oblonga y negra. (ver **Figura 3**) Las flores secas retienen su perfume natural que sugiere una mezcla de jazmín, jonquil y olor frutal.



Figura 1 *Jasminum odoratissimum* L. Linnean herbarium (S-LINN)<sup>47</sup>

<sup>47</sup> Department of Phanerogamic Botany. Swedish Museum of Natural History (S). Microficha número: IDC 3.18. <http://linnaeus.nrm.se/botany/fbo/j/jasmodo.html> en



Los jazmineros (*Jasminum odoratissimum*) se desarrollan en el **Bosque Termoesclerófilo**, un piso de vegetación propio de Canarias y Madeira<sup>48</sup>. Cultivada como ornamental y confundida con otras especies del género se la ha citado para Kenia, Malawi, Tanzania, Zaire y Zambia.<sup>49</sup>

Vegetación que se desarrolla por debajo del pinar en las orientaciones sur, y de la laurisilva en las vertientes norte de las islas no afectadas directamente por el mar de nubes. Forman parte de la misma los palmerales, acebuchales, almacigales, sabinares, lentiscales, dragonales.

Estos bosques se sitúan entre los 50-500 metros según las orientaciones y su composición florística varía en función de su situación geográfica.

Son especies características de esta vegetación, acebuches (*Olea europaea ssp. cerasiformis*), almácigos (*Pistacia atlántica*), lentiscos (*Pistacia lentiscus*), dragos (*Dracaena draco*), sabinas (*Juniperus phoenicea*), la palmera (*Phoenix canariensis*), el peralillo (*Maytenus canariensis*), el jediondo (*Bosea yervamora*), y arbustos como los granadillos (*Hypericum canariense*), tréboles de risco (*Dorycnium spp.*), malvas de risco (*Lavatera acerifolia*, *L. phoenicea*), guaydil (*Convolvulus floridus*), rudas (*Ruta spp.*), espineros (*Rhamnus crenulata*), palo de sangre (*Marcetella moquiniana*), etc...

Vemos por tanto que dadas las diversas situaciones climáticas en las que se desarrollan estas comunidades, son muchísimas las especies e incluso familias que tienen representación en dicho piso. Ello unido a los bancos genéticos limítrofes del monteverde o pinar y el cardonal-tabaiabal, hacen a este piso ecotónico el de mayor potencial para la evolución de las estirpes hoy existentes.

Pese a su importancia, interés y riqueza, resulta frustrante saber que esta franja de ecotonía es también la más esquilada y amenazada desde tiempos de la conquista. Dichas formaciones han sido generalmente arrasadas en casi todas las islas debido a que sus áreas potenciales corresponden a las zonas más favorables para el establecimiento de las grandes poblaciones y caseríos, así como para los cultivos que llevan aparejados.

Desde el punto de vista fitosociológico<sup>50,51</sup> estas comunidades vegetales se engloban en la Clase **Kleino-Euphorbietea canariensis** (Rivas Goday & Esteve 1965) A. Santos 1976. Más concretamente *Jasminum odoratissimum* es la especie diferencial de la subasociación **jasminetosum odoratissimi** Rivas Martínez y col. 1993, dentro de la asociación endémica de Tenerife **Periploco laevigatae-Euphorbietum canariensis** Rivas Martínez y col. 1993, con vicarías geográficas en Gran Canaria **Aeonio-Euphorbietum canariensis** (Rivas Goday & Esteve 1965) Sunding 1972, La Gomera **Euphorbietum bertheloto-canariensis** Rivas Martínez y col. 1993 y la Palma **Echio brevirmae-Euphorbietum canariensis** A. Santos 1983.

<sup>48</sup> J. R. Press & M. J. Short, eds. 1994. Flora of Madeira. (F Madeira)

<sup>49</sup> A. W. Exell et al., eds. 1960-. Flora zambesiaca. (F Zamb)

<sup>50</sup> Rivas Martínez S., Wildpret de la Torre W., del Arco Aguilar M.J., Rodríguez Delgado O., Pérez de Paz P.L., García Gallo A., Acebes Ginovés J.R., Díaz González T.E. y Fernández González F. (1993) Las Comunidades Vegetales de la Isla de Tenerife (Islas Canarias). Itinera Geobot. 7: 169

<sup>51</sup> Rodríguez Delgado O., del Arco Aguilar M.J., García Gallo A., Acebes Ginovés J.R., Pérez de Paz P.L. y de Wildpret de la Torre W. (1998) Catálogo sintaxonómico de las comunidades vegetales de plantas vasculares de la Subregión Canaria: I.C. e Islas Salvajes.

Materiales didácticos universitarios.

En Tenerife lo podemos encontrar además de en la Sierra de Anaga, en la Punta de Teno, Icod y Güimar. En la Gomera en el Barranco de la Villa, Vallehermoso, Lomo de Carretón, Argaga. En el Hierro en en El Golfo, y en La Palma en los Barrancos del Carmen y Las Angustias, Mazo, Los Sauces. Esporádico en Gran Canaria y Fuerteventura.<sup>52</sup>

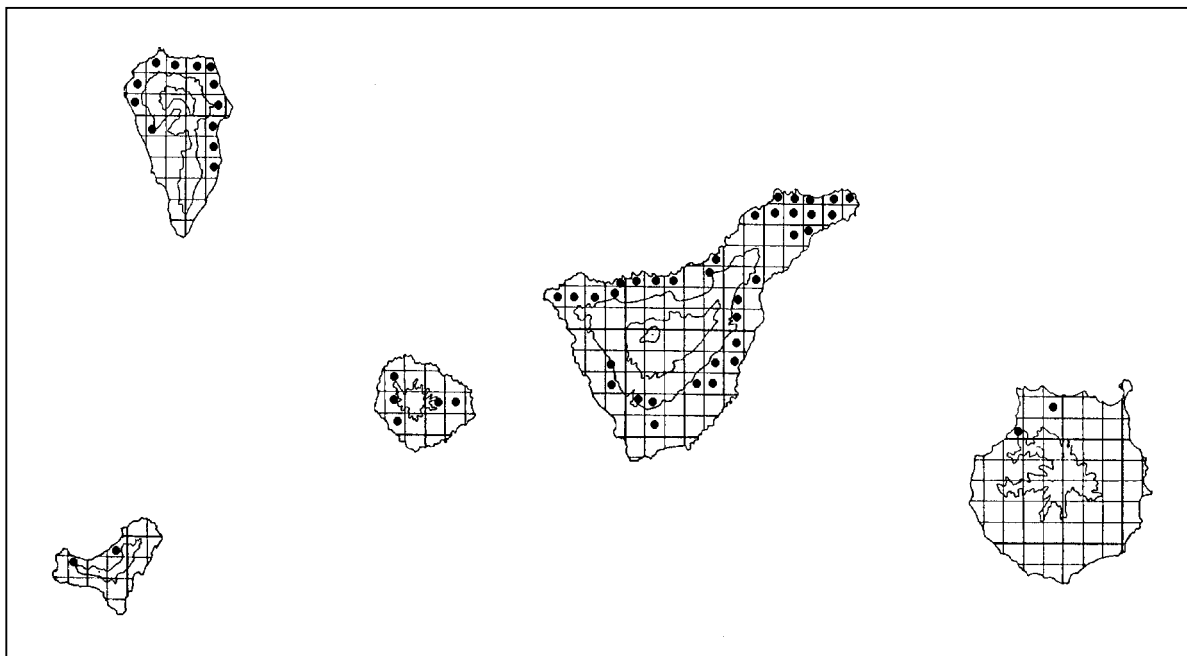


Figura 2 *Jasminum odoratissimum* Mapa de distribución potencial<sup>53</sup>

El género *Jasminum* L.

Linnaeus, C. von 1753, *Species Plantarum*. 2 7.

**Typus:** (no designado).

Linnaeus, C. von 1754, *Genera Plantarum* ed. 5. 7.

**Typus:** (no designado).

Andrews, H.W. 1800, *Bot. Repos.* 2. t. 127.

Britton, N.L. 1918, *Fl. Bermuda*. 287.

**Lectotypus:** *Jasminum officinale* L.

Green, P.S. 1984, *A Revision of Jasminum in Australia*. *Allertonia*. 3(6) 403-438.

Comprende unas 200 especies de arbustos y trepadoras leñosas con hojas unifoliadas, trifoliadas o imparipinnadas. Las inflorescencias son normalmente terminales, con flores bisexuales de color blanco, amarillo o rojizo. El cáliz es acampanado, con 4-9 lóbulos. La corola tiene el tubo alargado y posee 4-11 lóbulos. Androceo con 2 estambres insertos en el tubo de la corola. El fruto es una baya generalmente negra.<sup>54</sup>

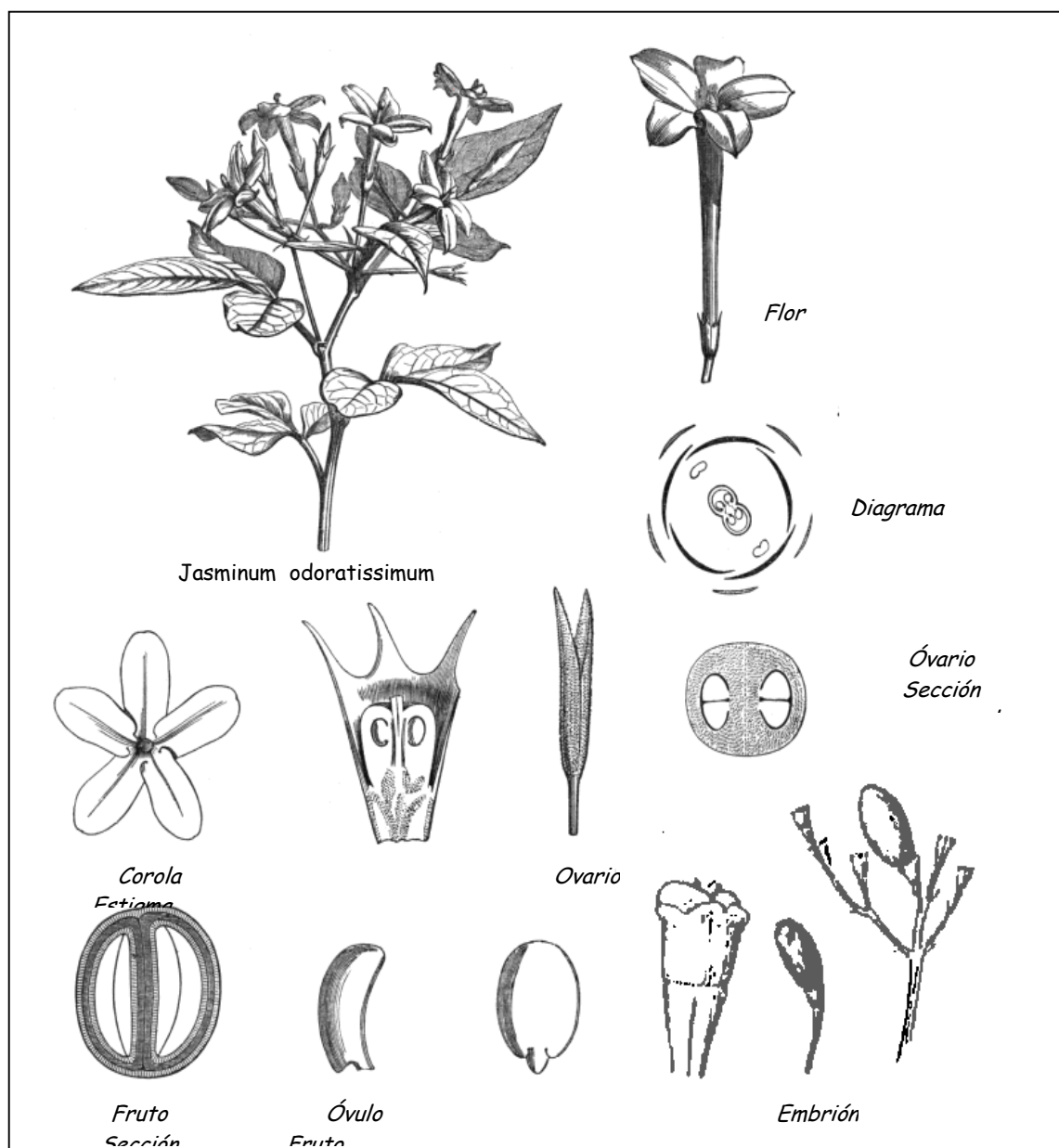
<sup>52</sup> Bramwell David y Zoe. Flores Silvestres de las Islas Canarias.

<sup>53</sup> A. Hansen & P. Sunding. 1993. *Flora of Macaronesia: checklist of vascular plants*, ed. 4. *Sommerfeltia* vol. 17. (L Macar ed4)

Voggenreiter (1974) *Dissertationes Botanicae*, 26:1-718

Bramwell David y Zoe. Flores Silvestres de las Islas Canarias.

<sup>54</sup> Watson, L., and Dallwitz, M. J. (1992 onwards). 'The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval.' Version: 19th August 1999

Figura 3 Morfología floral de *Jasminum odoratissimum*

Su nombre deriva del persa "ysmym" y muchas de las especies son cultivadas con fines ornamentales y algunas otras son utilizadas en la industria de la perfumería o tienen aplicaciones medicinales. Se suelen cultivar por sus abundantes flores, en muchos casos fragantes, y dependiendo de su hábito de crecimiento tienen diversas aplicaciones en verjas, pérgolas y cercados.<sup>55,56,57,58</sup>

<sup>55</sup> Burras, J.K. (1994) Manual of Climbers and Wall Plants. Timber Press.

<sup>56</sup> Grey-Wilson, C. & Matthews, V. (1983) Gardening on Walls. Collins.

<sup>57</sup> Kobuski, C.E. (1959). A revised key to the chinese species of jasminum. Arnoldia 40(4): 385

<sup>58</sup> Griffiths, M. (1994) Index of Garden Plants. MacMillan Press.

Tabla 1

<p><i>Jasminum humile</i> L. (Jazmín italiano). Arbusto siempreverde o semicaduco de 4-5 m. de altura, erecto, con hojas alternas de 7 folíolos ovado-lanceolados de 4 cm de longitud. Flores en racimos umbeliformes con cáliz de pequeños dientes y corola amarilla con el tubo de 2 cm de longitud y los lóbulos redondeados. Nativo de Oriente Medio, China, Burma. 'Revolutum' = <i>Jasminum revolutum</i> Sims es robusto, con 3-7 folíolos, siendo el terminal mucho más grande que los laterales. Tiene flores amarillas de 2,5 cm de diámetro dispuestas en grupos de 6-12. <i>f. farreri</i> (Gilmour) P.S.Green = <i>Jasminum farreri</i> Gilmour es un arbusto de hasta 1,5 m de altura, con las ramillas nuevas angulosas, pubescentes, con tintes rojizos al principio. Tiene hojas de 3 folíolos oval-lanceolados con el envés pubescente. Flores amarillas dispuestas en cimas terminales. <i>f. wallichianum</i> (Lindl.) P.S.Green = <i>Jasminum wallichianum</i> Lindl. tiene los tallos más angulosos y 7-13 folíolos ovado-lanceolados de unos 5 cm de longitud, siendo el terminal más largo. Flores de 1 cm de longitud, colgantes. Nativo de Nepal.</p>
<p><i>Jasminum sambac</i> (L.) Ait. = <i>Nyctanthes sambac</i> L. (Diamela). Arbusto trepador siempreverde con tallos pubescentes y angulosos. Hojas opuestas o en verticilos de tres, semirígidas, glabras o pubescentes, ovadas, de unos 8 cm de longitud, con la nervadura muy marcada. Flores fragantes dispuestas en racimos. Cáliz con lóbulos estrechos. Corola blanca con tubo de 1,2 cm de longitud y 6-9 lóbulos oblongos. Nativo de la India. 'Flore Pleno' tiene flores dobles que recuerdan a una pequeña gardenia.</p>
<p><i>Jasminum nitidum</i> Skan, = <i>Jasminum laurifolium</i> Roxb. <i>f. nitidum</i> (Skan) P.S.Green (Jazmín estrella). Arbusto trepador siempreverde con los tallos ligeramente pilosos. Hojas opuestas, simples, elíptico-lanceoladas a ovado-lanceoladas, de 8 cm de longitud. Flores fragantes con la corola blanca, tubo de 2 cm de longitud y 9-11 lóbulos linear-lanceolados formando ángulo recto con el tubo. Nativo de la India probablemente.</p>
<p><i>Jasminum azoricum</i> L. = <i>Jasminum fluminense</i> Hort. Arbusto trepador siempreverde con las ramas redondeadas. Hojas opuestas con 3 folíolos ovados, agudos, de base cordada, siendo el terminal de mayor tamaño. Flores fragantes largamente pediceladas naciendo en panículas terminales. Cáliz tubular con 5 dientes; corola blanca con 6 lóbulos. Nativo de Azores.</p>
<p><i>Jasminum nudiflorum</i> Lindl. (Jazmín de invierno). Arbusto caducifolio abierto con ramas alargadas y colgantes que requieren soporte y que puede alcanzar 2-3 m de altura. Ramillas de sección cuadrangular. Hojas opuestas, trifoliadas, con folíolos oval-oblongos de 1-3 cm de longitud. Flores que aparecen antes que las hojas en disposición axilar en las ramas del año anterior. Corola de 3 cm de diámetro, amarilla, con 6 lóbulos. Nativo de China. 'Nanum' compacto y de poco crecimiento.</p>
<p><i>Jasminum mesnyi</i> Hance = <i>Jasminum primulinum</i> Hance. (Jazmín de invierno). Arbusto siempreverde con largos tallos colgantes de hasta 2 m de altura, con tallos cuadrangulares y hojas opuestas trifoliadas. Folíolos lanceolados de 3-7 cm de longitud. Flores solitarias de 3-5 cm de diámetro que aparecen en brotes cortos axilares y están rodeadas de pequeñas brácteas foliáceas. Cáliz con 5-6 lóbulos estrechos. Corola generalmente semidoble de color amarillo, con lóbulos obtusos. Nativo de China.</p>
<p><i>Jasminum officinale</i> L. (Jazmín común). Arbusto trepador caducifolio de hasta 10 m de altura con tallos desparramados, largos, cuadrangulares. Hojas opuestas con 5-9 folíolos elípticos de 1-6 cm de longitud, acuminados, sésiles excepto el folíolo terminal. Flores en grupos terminales de 5, muy olorosas. Cáliz con 5 dientes lineares. Corola blanca con el tubo de 2 cm de longitud y 4-5 lóbulos triangular-ovados más cortos que el tubo. Nativo de Asia Menor, Himalaya, China. 'Affine' = <i>Jasminum affine</i> Carriere, tiene mayor profusión de flores de mayor tamaño y con exterior de color rosado. <i>f. grandiflorum</i> (L.)Kob. = <i>Jasminum grandiflorum</i> L. Es más robusta, con 5-7 folíolos y flores blancas teñidas de rosado en la base.</p>

***Jasminum grandiflorum* L.** (Jazmín español, jazmín catalán, jazmín oloroso). Nativo del noreste de los Himalayas, y cultivado en el nuevo y viejo mundo, es muy parecido a *J. officinale*, pero se diferencia en el tamaño de sus hojas: ramas más cortas y fuertes, y las flores mucho más grandes y rojizas. Es el jazmín más empleado en perfumería.

***Jasminum polyanthum* Franch.** Arbusto trepador siempreverde o caducifolio de hasta 8 m de altura. Tiene hojas opuestas con 5-7 folíolos lanceolados, acuminados, siendo el terminal más largo que los laterales. Flores fragantes en panículas axilares con la corola de unos 2 cm de diámetro, de color blanco teñida de rosa en el exterior. Nativo de China.

***Jasminum angulare* Vahl.** Es un arbusto trepador siempreverde con hojas opuestas de 3 folíolos, rara vez 5 folíolos, ovados a lanceolados, siendo el folíolo terminal de mayor tamaño y más estrecho. Flores sin aroma en grupos axilares de 3, de unos 3 cm de diámetro. Corola blanca con 5 lóbulos ovales a lanceolados. Nativo de Suráfrica.

***Jasminum beesianum* Forrest & Diels.** Es un arbusto caduco o semicaduco, algo desparramado, con las ramillas jóvenes ligeramente pubescentes, ligeramente trepadoras. Hojas opuestas, simples, ovado-lanceoladas, de 2-5 cm de longitud, de color verde oliva. Flores en grupos axilares de 1-3. Son pequeñas, fragantes, de color rosa pálido. Produce abundantes frutos negros que persisten en el invierno. Nativo de China.

***Jasminum fruticans* L. (Jazmín silvestre).** Arbusto siempreverde o semicaduco de 1,25 m de altura, erecto, con ramillas angulosas, verdes. Hojas alternas con 3 folíolos estrechamente oblongos de 1-2 cm de longitud, obtusos. Flores en cimas terminales. Corola amarilla con 5 lóbulos obtusos que miden la mitad de la longitud del tubo. Nativo de la Región Mediterránea y Asia Menor.

***Jasminum parkeri* Dunn** Pequeño arbusto siempreverde de hasta 30 cm de altura con hojas alternas de 3-5 folíolos ovado-acuminados, de 0,3-0,6 cm de longitud, sésiles. Flores 1-2 axilares o terminales, amarillas, de 1,5 cm de diámetro. Nativo de la India.

***Jasminum angustifolium*** Una especie Indian introducida en Gran Bretaña en la pasada centuria. Un hermoso jazmín trepador de hojas verdes brillantes, flores terminales, blancas con matices rojos, fragante.

***Jasminum paniculatum*** En China es cultivado por sus flores que se conocen como Sien-hing-hwa, las flores se utilizan junto con las de *J. sambac*, Sambac-mo-le-hwa, para fabricar el té de jazmín.

***Jasminum x stephanense* Lemoine, híbrido entre *J. beesianum* y *J. officinale*.** Es un arbusto trepador de hasta 5 m de altura con tallos al principio amarillentos, glabros, acostillados. Hojas 1-3-5 foliadas con folíolos de color verde oliva pálido, con el envés pubescente. Flores pequeñas de color rosa pálido.

Este género se engloba en la familia *Oleaceae Hoffmanns. & Link*, árboles o arbustos, algunas veces trepadores. Hojas opuestas o rara vez alternas (algunas especies de *Jasminum*), de simples a pinnaticompuestas, trifoliadas o unifoliadas, estípulas ausentes.

Flores en inflorescencias fundamentalmente cimosas, pero a menudo racemiformes o paniculiformes, o a veces flores solitarias. Generalmente bastante pequeñas, actinomorfas, hermafroditas o algunas veces algunas de ellas unisexuales (plantas dioicas).

En cuanto al perianto, el cáliz tiene normalmente de 4 (-15) lóbulos valvados, o rara vez ausente (especies de *Fraxinus*). Corola típicamente simpétala y 4-lobulada, lóbulos imbricados o induplicado-valvados o convolutos, rara vez corola de hasta 12 lóbulos, o algunas veces pétalos esencialmente libres (especies de *Fraxinus*) o incluso ausentes (*Forestiera* y otras especies de *Fraxinus*).

El androceo por lo común con 2 estambres, sujetos al tubo de la corola simpétala, alineados con las sinusias, rara vez 4 (*Hesperelaeae* y *Tessarandra*).

Gineceo de 2 carpelos unidos; ovario súpero, bilocular; estilo terminal y seco con estigma 2-lobulado, o estigma sésil; primordios seminales generalmente 2 en cada lóbulo, algunas veces 1-4, rara vez numerosos.

Fruto diverso, cápsula loculicida o circuncisida, sámara, baya, drupa, a menudo monoseminado.

La familia *Oleaceae* comprende alrededor de 600 especies agrupadas en 24 géneros (uno extinto), casi cosmopolita pero mejor desarrollada en Asia y Malasia.

En Canarias además de por la especie en estudio está representada por el acebuche (*Olea europaea* subespecie *ceraciformis* (Webb et Brth.) Kunk. et Sund.), y el palo blanco (*Picconia excelsa* (Ait.) DC.), también citada para Madeira. Junto con *Jasminum azoricum* L., *Olea europaea* subespecie *maderensis* Lowe de Madeira, y *Picconia azorica* (Tutin) Knobl. De Azores forman el grupo de taxones endémicos de la Macaronesia. Y de forma relativamente espontánea o cultivadas se citan a parte de la subespecie típica del olivo *Olea europaea* L.; el aligustro *Ligustrum vulgare* L., *Phillyrea angustifolia* L., el lilo *Syringa vulgaris* L. y el fresno *Fraxinus excelsior* L.

Se encuentran entre ellas plantas de interés económico por sus maderas, por los aceites o esencias de ellos obtenidos o por sus valores ornamentales. En España podemos ver especies de los géneros:

#### **Abeliophyllum Nakai**

Arbustos caducifolios con ramillas tetragonas y hojas opuestas, simples, enteras. Flores en pares en los brotes del año anterior. Cáliz con 4 lóbulos imbricados. Corola con 4 lóbulos anchos e imbricados tan largos como el tubo. Androceo con 2 estambres con filamento corto. El fruto es una sámara redondeada y aplastada. Comprende 1 especie nativa de Corea.

#### **Abeliophyllum distichum Nakai**

#### **Chionanthus L.**

Arboles y arbustos caducifolios con hojas opuestas, enteras. Flores funcionalmente dioicas, blancas, en panículas sobre brotes laterales en las ramas del año anterior. Cáliz con 4 segmentos; corola dividida cerca de la base en 4 pétalos estrechos; androceo con 2 estambres con filamentos muy cortos. Drupa ovalada de color azul oscuro. Comprende 2 especies nativas de Norteamérica y China.

#### **Chionanthus virginicus L.**

**Fontanesia** Labill.

Arbustos caducifolios de yemas globosas y ramillas cuadrangulares. Hojas opuestas, enteras o diminutamente aserradas. Flores pequeñas dispuestas en cortos racimos axilares y panículas terminales. Cáliz diminuto con 4 segmentos. Corola con 4 pétalos estrechos. Androceo con 2 estambres más largos que los pétalos. Fruto en sámara con ala a todo alrededor. Comprende 1-2 especies nativas de China y Oeste de Asia.

**Fontanesia phillyreoides** Labill.

**Forestiera** Poir.

Arbolillos y arbustos generalmente caducifolios con hojas opuestas de corto pecíolo, enteras o aserradas. Flores muy pequeñas, poligamo-dioicas, en racimos axilares que nacen en los brotes de la estación anterior. Tienen 4-6 sépalos desiguales, carecen de pétalos y 2-4 estambres. Fruto en drupa pequeña negruzca. Comprende 20 especies nativas de Norte y Centro América.

**Forestiera neomexicana** A.Gray (Olivo del desierto)

**Forsythia** Vahl

Arbustos caducifolios generalmente glabros con hojas opuestas, enteras o aserradas, ocasionalmente trifoliadas o tripartidas, de textura subcoriácea. Flores axilares en grupos de 1-6, apareciendo antes que las hojas. Cáliz con 4 lóbulos; corola amarilla con 4 lóbulos oblongos; androceo con 2 estambres generalmente insertos. Fruto en cápsula dehiscente con numerosas semillas aladas. Comprende 6 especies nativas de Centro Europa y Este de Asia.

**Forsythia europaea** Degen & Bald.

**Forsythia girdiana** Lingelsh.

**Forsythia ovata** Nakai

**Forsythia suspensa** (Thunb.) Vahl

**Forsythia viridissima** Lindl.

**Forsythia x intermedia** Zabel (forsitia)

**Fraxinus** L.

Arboles caducifolios con yemas a menudo de color marrón o negras, escamosas. Hojas opuestas, pinnadas, rara vez unifoliadas. Flores bisexuales o unisexuales, pequeñas, dispuestas en panículas que aparecen antes que las hojas. Cáliz con 4 segmentos o lóbulos o ausente; corola normalmente con 4 pétalos, rara vez ausentes; androceo con 2 estambres. Fruto en sámara con ala alargada. Comprende unas 65 especies nativas de zonas templadas de Europa, Asia y Norteamérica.

**Fraxinus angustifolia** Vahl (Fresno de la tierra)

- Fraxinus excelsior*** L. (Fresno común)
- Fraxinus floribunda*** Wall. (Fresno del Himalaya)
- Fraxinus ornus*** L. (Fresno de flor, orno, árbol del maná)
- Fraxinus pennsylvanica*** Marshall (Fresno rojo, fresno verde)
- Fraxinus nigra*** Marshall (Fresno negro)
- Fraxinus americana*** L. (Fresno blanco)
- Fraxinus berlandieriana*** A.DC.
- Fraxinus velutina*** Torr. (Fresno de Arizona)
- Fraxinus griffithii*** C.B. Clarke
- Fraxinus chinensis*** Roxb.

### **Ligustrum** L.

Arbustos o arbolitos caducos o siempreverdes con hojas opuestas, con pecíolo corto, enteras. Flores pequeñas, blancas, dispuestas en panículas terminales. Cáliz acampanado con 4 dientes. Corola rotada de tubo normalmente corto y 4 lóbulos. Androceo con 2 estambres insertos o exsertos. Fruto en drupa bacciforme con 1-4 semillas de color negruzco o negro-azulado. Comprende unas 50 especies distribuidas principalmente por el Este de Asia y Malasia hasta Australia. Una especie en Europa y Norte de África.

- Ligustrum lucidum*** Ait. (Aligustre de China)
- Ligustrum japonicum*** Thunb. (Aligustre del Japón)
- Ligustrum compactum*** Brandis
- Ligustrum acuminatum*** Koehne
- Ligustrum amurense*** Carriere
- Ligustrum delavayanum*** Har.
- Ligustrum henryi*** Hemsl.
- Ligustrum massalongianum*** Vis.
- Ligustrum obtusifolium*** Siebold & Zucc.
- Ligustrum ovalifolium*** Hassk. (Aligustre de California)
- Ligustrum robustum*** Blume
- Ligustrum sempervirens*** (Franch.) Lingelsh.



*Ligustrum sinense* Lour. (Aligustre chino)

*Ligustrum vulgare* L. (Aligustre común)

#### **Olea L.**

Arboles y arbustos siempreverdes con tallos lisos o espinosos y hojas opuestas, simples, enteras o dentadas, coriáceas. Flores hermafroditas o unisexuales dispuestas en racimos axilares. Cáliz con 4 lóbulos poco notables. Corola con tubo corto y 4 lóbulos más largos que el tubo. Androceo con 2 estambres insertos con filamentos cortos. Fruto en drupa ovoide o globosa. Comprende 20 especies distribuidas por la Región Mediterránea, Norte y Sur de África, Asia tropical y Central, Australia, Nueva Zelanda y Polinesia.

*Olea europaea* L. (Olivo, acebuche)

*Olea africana* Mill. (Olivo africano)

#### **Osmanthus Lour.**

Arbustos o arbolillos siempreverdes con hojas opuestas de pecíolo corto, enteras o aserradas, generalmente coriáceas. Flores hermafroditas, polígamas o dioicas dispuestas en cimas o panículas axilares o terminales. Cáliz con 4 dientes. Corola con tubo por lo general corto y 4 lóbulos imbricados. Androceo con 2 estambres insertos. Fruto en drupa ovoide. Comprende unas 15 especies nativas del Este y Sur de Asia y Polinesia, con dos especies en Norteamérica.

*Osmanthus fragrans* (Thunb.) Lour. (Olivo oloroso)

*Osmanthus heterophyllus* (G.Don) P.S.Green. (Acebo chino)

*Osmanthus armatus* Diels

*Osmanthus yunnanensis* (Franch.) P.S.Green

*Osmanthus delavayi* Franch.

*Osmanthus x burkwoodii* (Burkwood & Skipw.) P.S.Green

#### **Phillyrea L.**

Arbustos o arbolillos siempreverdes con hojas opuestas, simples, glabras. Flores hermafroditas dispuestas en racimos axilares cortos. Cáliz con 4 lóbulos poco marcados. Corola rodada con el tubo corto y 4 lóbulos más largos que el tubo. Estambres insertos en el tubo con filamento corto. Fruto en drupa. Comprende 4 especies nativas desde el Mediterráneo hasta Asia Menor.

*Phillyrea latifolia* L. (Agracejo, aderno)

*Phillyrea angustifolia* L. (Labiérnago, ladierna)

*Phillyrea decora* Boiss. & Balansa

#### **Picconia DC.**

Arbusto o árboles siempreverdes de corteza blanquecina y hojas opuestas, simples, enteras o rara vez aserradas, coriáceas, glabras. Flores hermafroditas. Cáliz con 4 lóbulos; corola con 4 lóbulos, sin tubo. Fruto en drupa. Comprende 2 especies nativas de Canarias, Madeira y Azores.

*Picconia excelsa* (Ait.) DC. (Palo blanco)

### **Syringa** L.

Arbustos o arbolillos caducifolios con hojas opuestas, enteras o a veces lobuladas o pinnadas. Flores hermafroditas en panículas terminales o laterales sobre las ramas del año anterior. Cáliz acampanado con 4 dientes. Corola rotada o hipocrateriforme con tubo cilíndrico y 4 lóbulos valvados. Androceo con 2 estambres insertos o exertos. Fruto en cápsula loculicida coriácea con semillas aladas. Comprende alrededor de 20 especies nativas de Asia y Sureste de Europa.

*Syringa vulgaris* L. (Lilo)

*Syringa wolfii* C.K.Schneid.

*Syringa julianae* C.K.Schneid.

*Syringa* x *laciniata* Mill.

*Syringa meyeri* C.K.Schneid.

*Syringa microphylla* Diels.

*Syringa patula* (Palib.) Nakai

*Syringa reticulata* (Blume) Hara (Lilo japonés)

*Syringa villosa* Vahl

*Syringa* x *chinensis* Willd. (Lilo chino)

La posición taxonómica de la familia *Oleacea* varía dependiendo del sistema de clasificación utilizado. En el sistema de Cronquist<sup>59</sup> se le da rango de familia dentro del orden *Scrophulariales*.

**Tabla 3**

DIVISIÓN	CLASE	SUBCLASE	ORDEN	FAMILIA
Magnoliophyta	Magnoliopsida	Magnolidae	<i>Gentianales</i> Solanales <i>Lamiales</i> Callitrichales Plantaginales <b>Scrophulariales</b>	<i>Buddlejaceae</i> <b>Oleaceae</b> <i>Scrophulariaceae</i> <i>Globulariaceae</i> <i>Myoporaceae</i> Orobanchaceae Gesneriaceae <i>Acanthaceae</i> <i>Pedaliaceae</i> <i>Bignoniaceae</i> Mendonciaceae <i>Lentibulariaceae</i>
		Hammamelidae		
Cariophyllidae				
Dilleniidae				
Rosidae				
<b>Asteridae</b>				
Liliopsida	Alismatidae	Campanulales		
	Arecidae	<i>Rubiales</i>		
	Commelinidae	<i>Dipsacales</i>		
	Zingiberidae	Calycerales		
	Lilidae	Asterales		

Taxones en los que está probada la existencia de iridoides.

<sup>59</sup> Cronquist (1981) An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, 1262 pp., ISBN 0-231-038801

El Sistema Takhtajan<sup>60</sup> la familia *Oleaceae* se clasifica dentro de un superorden y orden monofiléticos dentro de la Subclase *Lamiidae*.

Tabla 4

DIVISIÓN	CLASE	SUBCLASE	SUPERORDEN	ORDEN	FAMILIA	
Magnoliophyta	Liliopsida (Monocotiledoneas)	Liliidae				
		Commelinidae				
		Arecidae				
	Magnoliopsida (Dicotiledoneas)		Magnoliidae			
			Nymphaeidae			
			Nelumbonidae			
			Ranunculidae			
			Alismatidae			
			Caryophyllidae			
			Triurididae			
			Hamamelididae			
			Aridae			
			Dilleniidae			
			Rosidae			
			<i>Cornidae</i>			
			Asteridae			
			<b>Lamiidae</b>	<b><i>Gentiananae</i></b>	<b><i>Gentianales</i></b>	
					<b><i>Rubiales</i></b>	
				Solananae	Solanales	
					Convolvulales	
				Polemoniales		
				Boraginales		
				Limnanthales		
		<b><i>Loasanae</i></b>	<b><i>Loasales</i></b>			
		<b>Oleanae</b>	<b>Oleales</b>	<b>Oleaceae</b>		
		<b><i>Lamianae</i></b>	<b><i>Scrophulariales</i></b>			
			<b><i>Lamiales</i></b>			
			<b><i>Callitrichales</i></b>			
			Hydrostachyales			
			<b><i>Hippuridales</i></b>			

Taxones en los que está probada la existencia de iridoides.

<sup>60</sup> Armen Takhtajan. 1997. Diversity and Classification of Flowering Plants

Thorne<sup>61</sup> trata las plantas con flor en el rango de Clase con una bifurcación inicial en dos Subclases. Los ordenes pertenecientes a cada clase se agrupan en Superordenes.

Tabla 5

SUBCLASE	SUPERORDEN	ORDEN	SUBORDEN	FAMILIA	
<b>Magnoliidae</b> (Dicotiledoneas)	Magnolianae				
	Nymphaeanae				
	Rafflesianae				
	Caryophyllanae				
	Dilleniana				
	Celastranae				
	Malvanae				
	Violanae				
	Santalanae				
	Geranianae				
	Rutanae				
	Proteanae				
	Rosanae				
	Asteranae				
	Aralianae				
	Solananae				
	<u>Loasanae</u>				
	Myrtanae				
	<b>Lamianae</b>		<b><u>Rubiales</u></b>		<b><u>Loganiaceae</u></b>
					<b><u>Rubiaceae</u></b>
				<b><u>Dialypetalanthaceae</u></b>	
				<b><u>Apocynaceae</u></b>	
				<b><u>Gentianaceae</u></b>	
				<b><u>Sacccifoliaceae</u></b>	
		<b>Lamiales</b>	<b>Scrophulariineae</b>	<b><u>Oleaceae</u></b>	
				<b><u>Buddlejaceae</u></b>	
				<b><u>Stilbaceae</u></b>	
				<b><u>Pedaliaceae</u></b>	
				<b><u>Martyniaceae</u></b>	
				<b><u>Myoporaceae</u></b>	
				<b><u>Scrophulariaceae</u></b>	
				Plocospermataceae	
				Gesneriaceae	
				<b><u>Globulariaceae</u></b>	
				<b><u>Plantaginaceae</u></b>	
				<b><u>Lentibulariaceae</u></b>	
				<b><u>Acanthaceae</u></b>	
				<b><u>Callitrichaceae</u></b>	
				<b><u>Hippuridaceae</u></b>	
			<b><u>Lamiineae</u></b>	<b><u>Verbenaceae</u></b>	
				Symphoremataceae	
				Nesogenaceae	
				Avicenniaceae	
				<b><u>Lamiaceae</u></b>	
Liliidae (Monocots)					

Taxones en los que está probada la existencia de iridoides.

<sup>61</sup> Robert F. Thorne.. Classification and Geography of Flowering Plants. Botanical Review (1992) 58, 225-348.

El sistema de clasificación APG (Angiosperm Phylogeny Group,1998) está basado en un método cladístico, que los autores establecen como grupos monofiléticos "clades". Los niveles altos están descritos "informalmente", y muchas familias y ordenes no son asignados a estos grupos. Es muy difícil establecer una correlación entre los sistemas de clasificación funcional (completa); Cronquist, Thorne y Takhtajan, pero el sistema APG es considerado como un elemento comparativo.

En base a este sistema Judd y col. (1999) presenta las interrelaciones filogenéticas de los ordenes de las plantas con flor. Los primeros valores provienen del análisis de 545 secuencias génicas de *rbcl*, *atpB*, y *ADNr 18S* (D. E. Soltis, M. W. Chase, P. S. Soltis, D. Albach, M. E. Mort, V. Savolainen, M. Zanis, and J. S. Farris) y un segundo valor del análisis de las secuencias 2538 *rbcl* (et al., 1998), (un guión para valores <50%).<sup>62,63,64</sup>

Figura 1

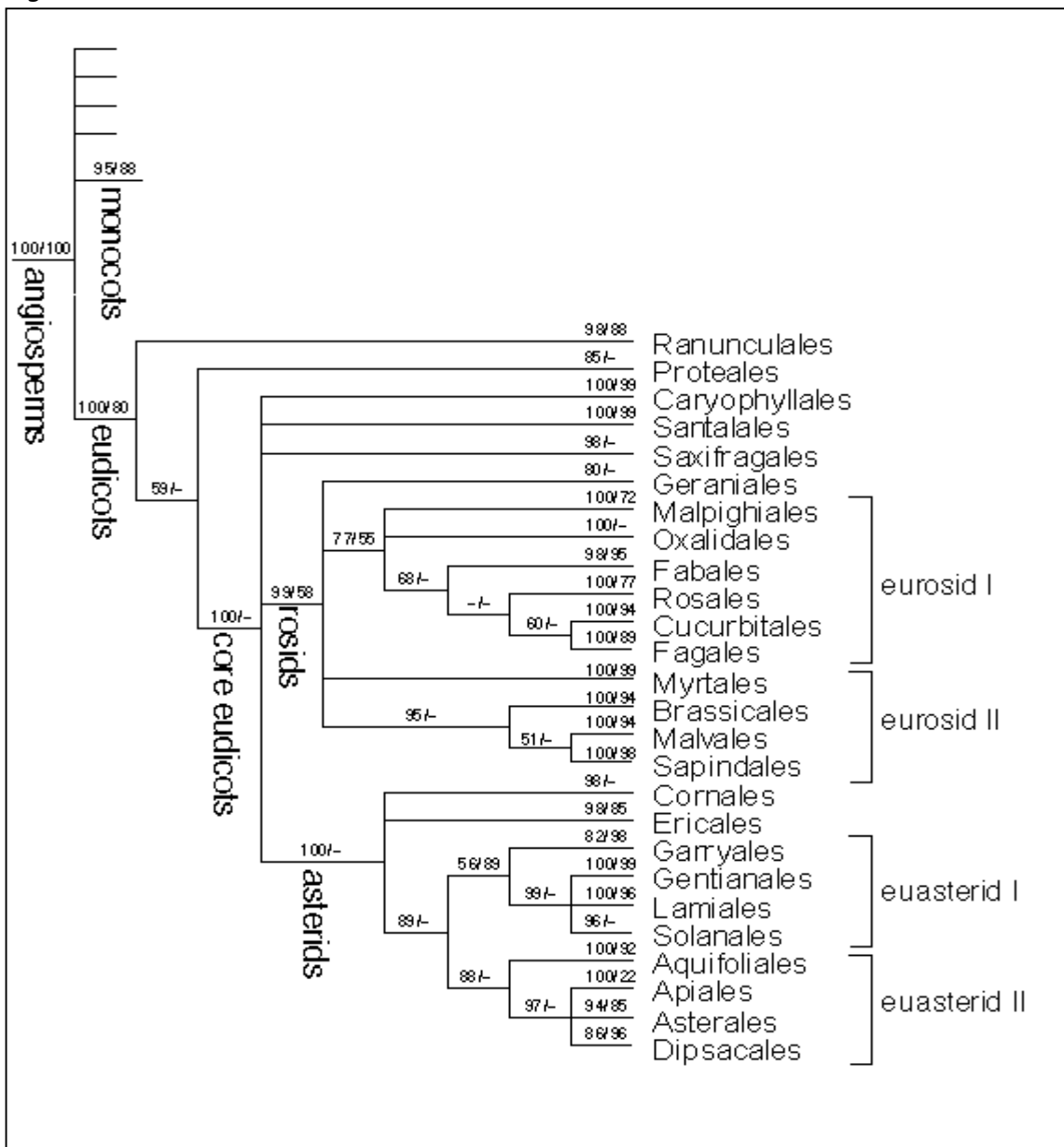


Tabla 6

Euasterids I	No asignadas a orden	
	<i>Garryales</i>	<i>Garryaceae</i>
	Solanales	Solanaceae Convolvulaceae "Hydrophyllaceae" Boraginaceae Lennoaceae
	<i>Gentianales</i>	<i>Gentianaceae</i> <i>Rubiaceae</i> <i>Apocynaceae</i> "Loganiaceae"
Lamiales	<i>Globulariaceae</i> <i>Pedaliaceae</i> <i>Oleaceae</i> <i>Plantaginaceae</i> <i>Lamiaceae</i> <i>Scrophulariaceae</i> Orobanchaceae <i>Bignoniaceae</i> <i>Acanthaceae</i> Gesneriaceae <i>Lentibulariaceae</i> <i>Verbenaceae</i> <i>Buddlejaceae</i> <i>Myoporaceae</i>	

Taxones en los que está probada la existencia de iridoides.

La familia *Oleaceae* se encuentra dentro del clade *Euasterid I* y el orden *Lamiales*. Si comparamos las familias en las cuales se ha establecido la existencia de iridoides con esta clasificación podemos observar que la mayoría de estas están incluidas en este clade. A excepción del orden *Cornales* y *Ericales*. Sin embargo dentro de *Lamiales* la familia *Oleaceae* es la única que sintetiza sus iridoides por una ruta diferente.

Nosotros seguiremos la clasificación APG aunque la de Dahlgren<sup>65,66</sup> se ajusta muy bien con los datos obtenidos a partir de dos grupos de compuestos presentes en *Oleaceae* con un alto potencial sistemático como son los iridoides. Este dato que será discutido a lo largo de esta introducción en los datos sobre biosíntesis, establece una fuerte relación de esta familia con *Gentianales*. (ver **Tabla 7**).

Los sistemas de clasificación de Takhtajan y Dahlgren establecen una relación más cercana entre las *Oleaceae* y *Gentianales* y los de Cronquist, Thorne y APG con *Scrophulariales*. El acetosido un producto habitual en *Oleaceae* es idéntico al verbascosido ampliamente distribuido en *Lamiales*. (ver **Página 42**)

<sup>65</sup> Jensen, S.R. (1991) 6. Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms. En "Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids". Proc. Phytochem. Soc. Europe, Clarendon press, Oxford. Pg. 133

<sup>66</sup> Dahlgren G. (1989) The last Dahlgrenogram. System of classification of the dicotyledons. In The Davis and Hedge Festschrift, pg.249. Edimburg University Press.

Tabla 7

SUPERORDEN	ORDEN	FAMILIA
Rutanae	Polygalales	Malpigiaceae
Rosanae	Buxales	Daphniphyllaceae
	Hamamelidales	Hamamelidaceae
Cornanae	Cornales	Garryaceae
		Alangiaceae
		Nyssaceae
		Cornaceae
		Davidiaceae
		Escalloniaceae
		Toricelliaceae
		Aucubaceae
		Aralidaceae
		Symplocaceae
		Icacinaceae
		Montiniaceae
		Hydrangeaceae
		Sambucaceae
		Viburnaceae
		Menyanthaceae
		Adoxaceae
	Eucommiales	Eucommiaceae
	Dipsacales	Caprifoliaceae
		Valerianaceae
		Dipsacaceae
		Calyceraceae
Loasanae	Loasales	Loasaceae
Gentiananae	Gentianales	Desfontaniaceae
		Loganiaceae
		Rubiaceae
		Theligonaceae
		Gentianaceae
		Apocynaceae
	Goodeniales	Goodeniaceae
	Oleales	Oleaceae
Lamianae	Lamiales	Retziaceae
		Stilbaceae
		Buddlejaceae
		Scrophulariaceae
		Myoporaceae
		Globulariaceae
		Plantaginaceae
		Lentiburaliaceae
		Pedaliaceae
		Martyniaceae
		Bignonaceae
		Acantaceae
		Verbenaceae
		Lamiaceae
		Callitricaceae
	Hippuridales	Hippuridaceae
Ericanae	Fouquieriales	Fouquieriaceae
	Ericales	Actinidiaceae
		Ericaceae
		Monotropaceae
		Pyrolaceae
	Stylidiales	Stylidiaceae
	Serracniales	Serracniaceae

Ante esta contradicción datos recientes de la biología molecular de *Oleaceae* establecen profundas afinidades con *Scrophulariaceae* :



- La secuencia del gen *rbcl* (gen que codifica para la enzima ubicua Rubisco) de cloroplastos sugiere la inclusión (representado por *Ligustrum vulgare*) en *Scrophulariales*.<sup>67</sup>
- Similares resultados se muestran en estudios filogenéticos basados en el mapa de sitios de restricción del genoma de cloroplasto. De nuevo hay más relación de *Oleaceae* (*Forsythia*, *Ligustrum*, *Syringa*) con *Scrophulariales* que con *Gentianales*.<sup>68</sup>

Seguiremos una nueva clasificación en la familia basada en la filogénea molecular<sup>69</sup> (secuencia *rps16* y *trnL-F*) presentada como poster en el XVI Congreso Internacional de Botánica de San Luis en Agosto de 1999. Esta clasificación difiere de la de Johnson (1957) en dos grandes aspectos: se abandona el nivel subfamilia (ya que la subfamilia *Jasminoideae* es parafilética) y se establece la posición de géneros de clasificación incierta como *Nyctanthes*, *Dimetra* y *Myxopyrum* (los dos últimos antes en *Verbenaceae*). (ver **Tabla 2**)

Según esta clasificación el género *Jasminum* estaría englobado en la tribu *Jasmineae* junto con el género *Menodora*.

Los trabajos de Wallander y Albert sobre filogénea y clasificación de *Oleaceae* consideran a la tribu *Jasmineae* como hermana de *Oleeae* en base a 8 niveles y una diferencia del 76% en el filograma, lo que coincide con los datos fitoquímicos de Jensen ya que ambas tribus contienen los oleosidos y no *Fontanesieae*<sup>70</sup>, *Forsythieae*<sup>71</sup> y *Myxopyreae*<sup>72</sup>. (ver **Figura 2**)

Sus datos indican una tribu parafilética, lo que coincide con lo propuesto por Kim y Jensen<sup>73</sup>, y Rohrwer<sup>74</sup>, ya que *Menodora* nace de la misma rama que *Jasminum*. Aunque no se puede excluir que sea monofilético ya que basándonos en la anatomía del género *Jasminum* es el único en la familia que tiene frutos bilobulados (cada lóbulo con una o dos semillas, un lóbulo frecuentemente abortado) y *Menodora*, su contrapartida en América, presenta una cápsula bilobulada aunque el desarrollo de ambos frutos es muy similar excepto en los últimos pasos.

<sup>67</sup> Olmstead R.G., Micheals H.J., Scott K.M. y Palmer J.D. (1992) Ann. Missouri Bot. Gard. **79**,249

<sup>68</sup> Downie S.R. y Palmer J.D. (1992) Ann. Missouri Bot. Gard. **79**,266

<sup>69</sup> Eva Wallander y Victor A. Albert. (2000). Phylogeny and classification of *Oleaceae* based on *rps16* and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany* (87), 1827

<sup>70</sup> Damtoft, S., H. Franzyk, y S. R. Jensen. 1995 .Biosynthesis of secoiridoids in *Fontanesia*. *Phytochemistry* **38**: 615

<sup>71</sup> Damtoft, S., H. Franzyk, y S. R. Jensen. 1994 Biosynthesis of iridoids in *Forsythia* spp. *Phytochemistry* **37**: 173

<sup>72</sup> S. R. Jensen. Datos no publicados.

<sup>73</sup> Kim, K. y R. K. Jansen. 1993 Phylogeny of *Oleaceae* based on *ndhF* sequence variation and chloroplast genome rearrangements. In Abstracts. XV International Botanical Congress, Tokyo. (abstract number 1065, p. 209)

<sup>74</sup> Rohwer . 1995 Fruit and seed structures in *Menodora* (*Oleaceae*): a comparison with *Jasminum*. *Botanica Acta* **108**: 163

Eva Wallander y Victor A. Albert. (2000). Phylogeny and classification of Oleaceae based on *rps16* and *trnL-F* sequence data. *American Journal of Botany* (87), 1827

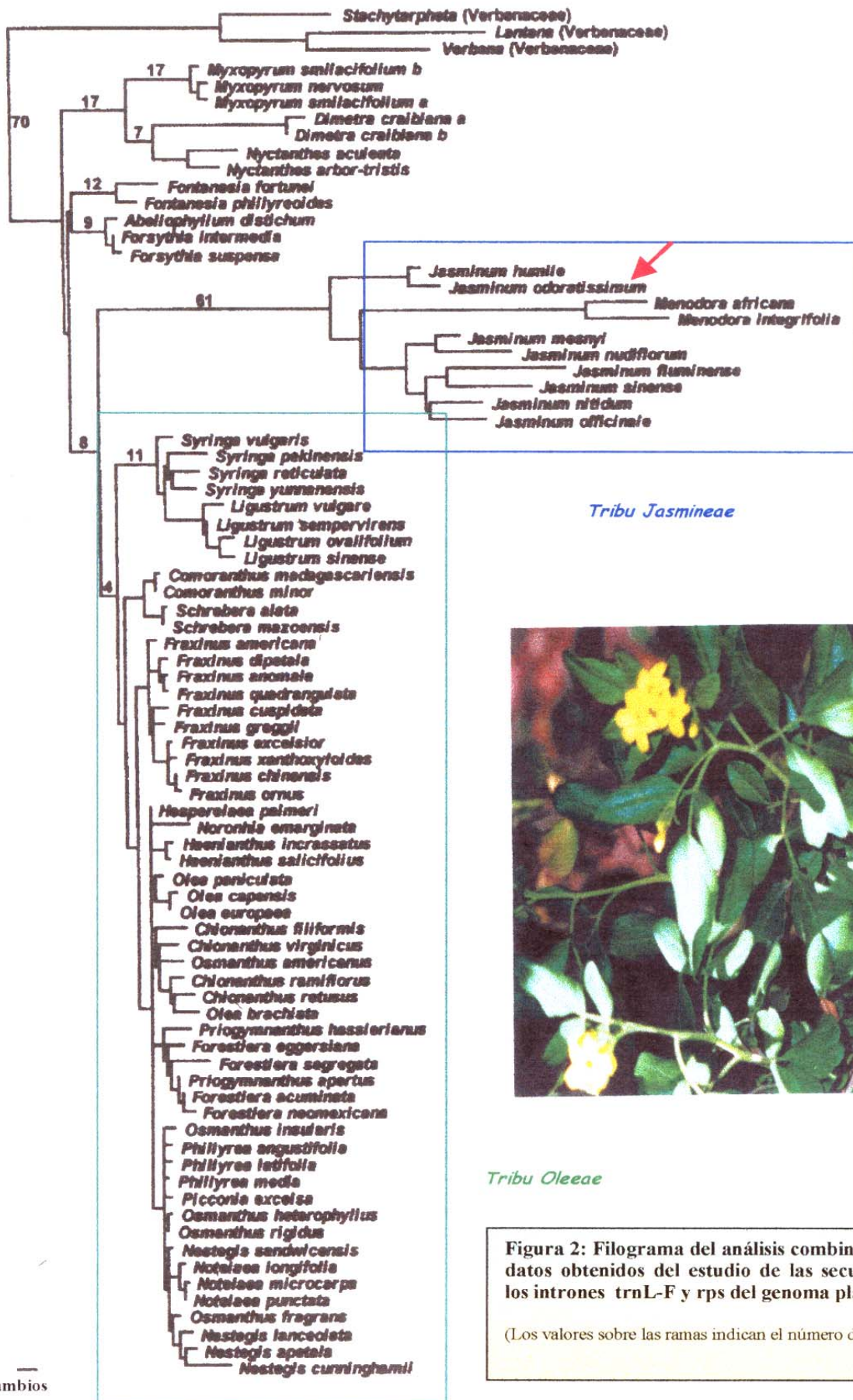


Figura 2: Filograma del análisis combinado de los datos obtenidos del estudio de las secuencias de los intrones *trnL-F* y *rps* del genoma plastídico.  
(Los valores sobre las ramas indican el número de cambios)



**Tabla 2**

Tribu	Subtribu	Género	Sinónimos (de RBG Kew)	Nº de especies y área de distribución	
Myxopyreae		Myxopyrum	Chondrospermum, Myospyrum	3 especies en C & S.E. Asia	
		Nyctanthes		2 especies en Asia	
		Dimetra		1 especie en Tailandia	
Fontanesieae		Fontanesia	Desfontainesia, Fontainesia	2 especies en la región Mediterránea, S.O. Asia y China	
Forsythieae		Abeliophyllum		Una especie en Corea	
		Forsythia	Rangium	Una especie en S. Europa y alrededor de 10 en E. Asia	
<b>Jasmineae</b>		Menodora	Bolivaria, Calyptospermum, Menodoropsis	Alrededor de 20 especies en N.& C. América (S.O. EE.UU., Méjico), S. América (Argentina) y S. Africa	
		<b>Jasminum</b>	Jacksonia, Jasminium, Mogorium, Noldeanthus, algunos Nyctanthes	Alrededor de 200 especies en Africa, Asia, Australia	
Oleaceae	Ligustrinae	Ligustrum	Esquirolia, Faulia, Ligustridium, Parasyringa, Phlyarodoxa, Visiania	Alrededor de 45 especies en Euroasia, Australia y N. America	
		Syringa	Busbeckia, Ligustrina, Lilac, Lilaca, Lilacum	Alrededor de 20 en la Euroasia templada	
	Schreberinae	Comoranthus		3 especies en Madagascar y en las Comores	
		Schrebera	Nathusia	Alrededor de 4 especies en Africa e India	
	Fraxininae	Fraxinus	Apilia, Aplilia, Calycomelia, Fraxinoides, Leptalix, Mannaphorus, Meliopsis, Ornanthes, Ornus, Petlomelia, Samarpsea	Alrededor de 60 especies en áreas templadas y subtropicales del hemisferio norte	
	Oleinae	Chionanthus	Chionanthus	Bonamica, Campanolea, Ceranthus, Cylindria, Dekindtia, Freyeria, Linociera, Majepea, Mayepea, Minutia, Minuta, Thouinia, Tessarandra	Alrededor de 80 especies en America, Africa, Asia y Australia
			Forestiera	Adelia, Bigelovia, Borya, Carpoxis, Geisarina, Nudilus	Principalmente en S. EE.UU. y Méjico y algunas en el Oeste de la India y S. América
		Haenianthus		3 especies en el Oeste de la India	
		Hesperelaea		Una especie en Méjico (extinguida)	
		Nestegis	Gymnelaea	4 especies en Nueva Zelanda y una en Hawaii	
		Noronhia	Binia, Noronhaea	Alrededor de 40 especies en Madagascar y las Comores	
		Notelaea	Notelea, Postuera, Rhysospermum	9 especies en Australia y Tasmania	
		Olea	Enaimon, Leuranthus, Pachyderma, Picricarya, Pogenda, Tetrapilus, Stenganthus, Stereoderma	Una especie en el área mediterránea y alrededor de 40 en S. Africa, S. Asia, E. Australia y Nueva Caledonia	
		Osmanthus	Amarolea, Cartrema, X Osmarea, Pausia, Siphonosmanthus	Alrededor de 30 especies en el S. E. Asia, Nueva Caledonia y N. America (EE:UU. Y Méjico)	
		Phillyrea	Phillyraea, Phillyrea, Phyllirea	2 especies en la región del Mediterráneo y O. Asia	
		Picconia	Henslowia	Dos especies en Macaronesia	
		Priogymnanthus		2 especies en S. América	



## Etnobotánica

El hombre ha utilizado las plantas durante los últimos 5000 años. Los egipcios escribieron sobre las hierbas en el 2000 aC., y las primeras fechas de los herbarios chinos se remontan 1000 años más. En el bajo imperio Romano, las hierbas y las especias fueron tan valoradas que se utilizaron como moneda. En la biblia se dice que el anís, el comino y la menta eran pagos del impuesto aceptables durante en primer siglo de nuestra era. Plinio el viejo (23 dC.) menciona las hierbas como parte del conocimiento humano. En la época medieval el conocimiento de las hierbas era tan importante para la salud y la felicidad que se guardó celosamente en los monasterios ("Herbals manuscrito").

Del conocimiento de la medicina tradicional la ciencia moderna ha encontrado las pistas para el descubrimiento de innumerables productos farmacológicamente importantes.

En la actualidad se vuelve a los orígenes y la fitoterapia se ha mostrado como una "moda", a veces muy eficaz. Por ejemplo de las hojas del olivo se han aislado tres componentes con diferente efecto hipotensivo. La oleuropeina es hipotensiva y tiene un efecto de dilatación coronaria. La oleaceina es inhibidora ACE. El  $\beta$ -(3,4- dihidroxifenil) etanol tiene una actividad antagonista del calcio. La presencia de los tres principios en el extracto de olivo es beneficioso en el tratamiento de la hipotensión. La terapia combinada usada en baja dosis con diferentes dianas generalmente minimiza la toxicidad y los efectos colaterales.

Pero nuestro centro de atención es otra *oleacea* cuyo nombre vulgar nos inspira belleza y dulces aromas.

Jazmín es un nombre muy común pero puede llevar a la confusión con diferentes plantas que contienen aceites. El "aceite de jazmín" contiene benzil acetato, terpinol, jasmona, benzil benzoato, linalool, varios alcoholes, y otros compuestos.<sup>75</sup>

El aceite de sus flores es importante en perfumes de alto grado y cosméticos, como cremas, aceites, jabones y champús. Pero también las flores se usan en el té de jazmín y otros tes de hierbas o tes negros.

*Jasminum grandiflorum* es la especie del jazmín más empleada en perfumería y su delicado y dulce olor es muy peculiar y sin comparación con otros aromas naturales. Hasta hace unos años fue la única esencia que no podía fabricarse artificialmente. Actualmente existe un aroma sintético de jazmín y su composición está más o menos relacionada con el aceite, conteniendo benzil acetato, un benzil ester encontrado en el aceite natural de jazmín, pero el verdadero perfume de jazmín no puede reproducirse solo por la combinación de sus componentes químicos y debe añadirsele una proporción del aceite original.

Este jazmín se cultiva extensivamente en Cannes y Grasse. No crece en sus propias raíces sino que se injerta sobre plantas de dos años de *J. officinale*, obteniéndose un arbusto que no requiere tutor. Necesitan una zona soleada, en un suelo fresco, abierto y abrigado de los vientos del norte, pues son muy susceptibles al frío y se dañan fácilmente por la helada. Las flores, que son muy grandes y de intensa fragancia, aparecen a partir de julio hasta finales de octubre, pero agosto y septiembre son los meses más odoríferos. Se cosechan generalmente sobre mediados de agosto. Las flores se abren cada mañana a las seis y se entresacan después de salida del sol, pues el rocío de la mañana dañaría su fragancia.

Un hongo, agaricus, es una plaga de los campos de jazmín, atacando las raíces de las plantas

---

<sup>75</sup> <http://newcrop.hort.purdue.edu/newcrop/med-aro/factsheets/JASMINE.html>



injertadas. Cuando esta seta ha invadido una plantación, es muy difícil de combatir, causando muchas pérdida, y la cosecha es substituida por las rosas o las aceitunas.

El perfume se extrae por un proceso denominado enfleurage, absorción sobre un cuerpo graso, como aceite puro de oliva o la manteca de cerdo. Las flores de jazmín una vez elegidas contienen solo una porción del perfume que pueden proporcionar, y es el solvente el que arrastra todo el aceite de las flores.

Hay un jazmín y un falso jazmín, ambos frecuentemente confundidos por su fragancia. El jazmín verdadero es de la familia de las *Oleaceae*, es un arbusto o liana, y no es venenoso.

Por otro lado el falso jazmín pertenece a un género y a una familia completamente diferentes, *Gelsemium* (*Loganiaceae*), y es considerado muy tóxico para el consumo humano.<sup>76</sup> Los hindúes fabrican guirnaldas con sus flores para honrar a los invitados. Las flores de algunas variedades dobles son ofrecidas a Vishnu y usadas como ofrendas en las ceremonias religiosas hindúes.

En Ghazipur, una ciudad en el Ganges, los jazmines llamado "Chameli", se usan para fabricar aceites perfumadas para el pelo. El olor es absorbido en semillas de sésamo. Las semillas se preparan por lavado y frotado, y al ser decorticadas son drenadas. El preparado de semillas y hojas se colocan en capas alternadas y reposan de doce a catorce horas. Las semillas se separan de las flores y se repite el tratamiento con flores frescas. Las flores sobrantes son usadas una y otra vez con semillas frescas para dar aceites de inferior calidad. El aceite obtenida solo con flores frescas es la mejor.

En Borneo es costumbre entre las mujeres envolver flores de jazmín en su pelo perfumado.



S. Edward Samsun *The Botanical Magazine* 8, 1794

Ya hemos visto que existen numerosas especies de *Jasminum*, muchas originarias de Eurasia y otras de regiones tropicales, pero muy adaptables a otras zonas y poco susceptibles al ataque de insectos y enfermedades. Algunas pueden incluso considerarse como malas hierbas por su facilidad para adaptarse a diferentes climas.<sup>77</sup>

Como planta medicinal, el jazmín ha sido considerado tradicionalmente como afrodisiaco y calmativo. Y las raíces y hojas de algunas especies de jazmín se ha utilizado en la medicina tradicional como antihelmíntico, activo frente lombrices y gusanos planos. Incluso estas plantas han sido empleadas frente al cáncer. Probablemente actividades que están relacionadas con su componente químico más importante, los secoiridoides. En la **Tabla 1** se muestran los usos tradicionales de las especies de *Jasminum* más estudiadas.

<sup>76</sup> Encarta Online

<sup>77</sup> Dirr, Michael A., *Manual of Woody Landscape Plants: Their Identification, Ornamental Characteristics, Culture, Propagation and Uses*, Fourth Ed., Stipes Publishing Company (Champaign, IL, 1990), p. 425-426.

Tabla 1

Especie	Nombre vulgar	Uso	Región
<b>Jasminum sambac</b>	Jazmín árabe MatsuriKa	Utilizado para dar sabor al té, té de jazmín o Mo-Li-Nhua-Cha. Lactifugo Tratamiento de erosiones y dolor en ojos <sup>78</sup> Las flores se utilizan como droga para el tratamiento de la diarrea, dolor abdominal, conjuntivitis y dermatitis. Las hojas y raíces se usan para el tratamiento de la diarrea y la fiebre, y como anestésico y analgésico. <sup>79,80</sup> repectivamente. Se ha publicado que contiene actividades antimicrobiales <sup>81</sup> .	Sureste de Asia, India y Arabia.
<i>Jasminum polyanthum</i>	Ye su xin	Utilizado como droga en la medicina china <sup>82</sup>	Oeste de China, introducida en Taiwan
<i>Jasminum nervosum</i>		La cocción de las hojas y tallos se utiliza como purificador de la sangre. <sup>83</sup>	Cochin-China
<i>Jasminum lanceolarium</i>		Tallos y raíces para el tratamiento de fiebre y dolor reumático <sup>84</sup> Hojas utilizadas como antiinflamatorio y en el dolor en los ojos <sup>85</sup>	
<i>Jasminum floribundum</i>	Habbez-zelim	Mezclado con kousso, es considerado un poderoso antihelmíntico, las hojas y ramas se añaden a licores de fermentación para aumentar sus cualidades.	Abysinia

<sup>78</sup> Chopra R.N. Indigenous Drugs of India. Dhur&Sons. Private Ltd., Calcuta, 2ns De., 1958, 62

<sup>79</sup> Kunming Institute of Botany (1986) Flora Yunnanica Tomus 4,668. Academica Sinica.

<sup>80</sup> Jiangsu New Medical College (1977) The Dictionary of Traditional Chinese Medicines, pg. 297. Shanghai People Press, Shanghai

<sup>81</sup> Simon, J.E., A.F. Chadwick and L.E. Craker. 1984. Herbs: An Indexed Bibliography. 1071-1980. The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone. Archon Books, 770pp., Hamden CT.

<sup>82</sup> Jiangsu New Medical College (1977) The Dictionary of Traditional Chinese Medicines, pg. 297. Shanghai People Press, Shanghai

<sup>83</sup> Jiangsu New Medical College (1977) The Dictionary of Traditional Chinese Medicines, pg. 297. Shanghai People Press, Shanghai

<sup>84</sup> Kan. W. S. Pharmaceutical Botany. National Research Institute o Chinese Medicine. Taipei. 1981, 442

<sup>85</sup> Chiu. N-Y y Chang. K.-H., The Illustrated Medicinal Plants of Taiwan. Vol.4. SMC. Taipei. 1995, 171



<i>Jasminum officinale</i>	Jazmín comun Jazmín blanco	Ornamental La infusión de sus flores se utiliza en medicina popular como sedante y contra cefaleas. Mencionado por Millsbaugh (American Medicinal Plants) como "una planta comprobada" en sentido homeopático, aunque añade: 'la autoridad para el uso del cual soy incapaz de determinar.'	Actualmente en todas las regiones
<i>Jasminum angustifolium</i>		Raíz amarga que se mezcla con el polvo de la raíz de <i>Acorus calamus</i> , para su aplicación externa.	India
<i>Jasminum amplexicaule</i>	Niu du teng	Tratamiento de la trachelopanus, disenteria, eczema y artritis reumatoide.	<sup>86</sup> China
<i>Jasminum multiflorum</i>		Ornamental	Taiwan
<i>Jasminum mesnyi</i>	Unnan-obai	Ornamental	Japón
<i>Jasminum nudiflorum</i>	Ying Chun hua Ying Chun huaye	Medicina popular	China
<i>Jasminum azoricum var travancorensis</i>		En Kerala por drenado de hojas y raíces. Utilizado para el tratamiento del dolor de cabeza, edema, mareos y vértigo. <sup>87</sup>	India
<i>Jasminum grandiflorum</i>	Pichiyila koottu	Medicina popular preparada mezclando 20g. de hojas frescas con 120 ml de leche de vaca, obteniendo un residuo que es evaporado y drenado. En Kerala se utiliza como diurético.	India

Pero también se le han atribuido efectos negativos, como el de causar dermatitis, Schwartz y col.. (1957), (Greenberg y Lester 1954).

La manipulación de las flores puede causar dermatitis por contacto (Behl y col. 1966). La dermatitis ocupacional fue observada en un vendedor de flores; la erupción afectó los dedos de un hombre que escogió y vendió las flores durante la época de floración que en la India es en agosto. El jazmín usado como la pulsera alrededor de la muñeca y guirnalda alrededor del cuello produjo dermatitis en una mujer (Bel y col. 1966).

El jazmín puede ser irritante y tener las características de la sensibilización. Su jugo fresco aplicado a los granos los ablanda. Las hojas contienen ácido salicílico (Quisumbing 1951, Behl y col. 1966).

<sup>86</sup> Chiang Su New Medical College (1978) Zhong.yao-dai-ci-dian (Diccionario de las drogas Chinas) 1110. Scioentific Tecnologic Publisher, Shanghai.

<sup>87</sup> The Wealth of India Raw Materials (1959) Vol. 5, 282. Publications an Informations Directorate, CSIR, New Delhi.  
Nadkarni K.M. (1992) Dr. K.M. Nadkarni 's Indian Materia Medica, 3<sup>rd</sup> ed., Vol. 1, 700, Popular Prakshan Bombay

El aceite de jazmín (al 20%) produce reacción positiva a la prueba de la corrección en personas (19/103) que presentaban dermatitis por cosméticos; tal reacción positiva se encontró en 1/49 de los controles que tenían otras dermatitis y no se encontró (0/42) en los controles sanos (Nakayama 1973, Nakayama et al. 1974).

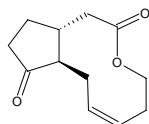
Reacciones positivas a la prueba de la corrección de *Jasminum* en algunos pacientes eran debidas al contacto con cinamaldehído. El absoluto del jazmín puede contener aldehído cinámico amílico, un alergénico (Schorr 1975). El carbonato de metilheptino usado para la producción de los olores artificiales del jazmín es un sensibilizante (Tulipan 1938, Whitacre y Parsil 1950).

Los productos que presentan estas especies y que determinan sus propiedades son en su mayoría los iridoides. Productos que se encuentran en una alta proporción en las especies de la familia *Oleaceae* y más concretamente en el género *Jasminum* y en la especie en estudio *Jasminum odoratissimum*.

Se han citado para el género ácido ursólico,  $\alpha$ -amirina, sucrosa, manitol, esteroides, triterpenos, pero los más interesantes por sus propiedades y por su relación con los patrones de acilación con los iridoides sean:

#### Jasmonoides.

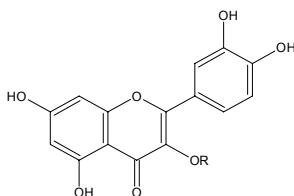
Estos productos son determinantes en las fragancias propias de estas especies y recientemente se les han atribuido propiedades biológicas en la regulación del crecimiento en plantas (elicitación de fitoalexinas<sup>88</sup>, tuberización de la papa<sup>89</sup>).



Cetolactona un componente del aceite de jazmín. Aislado de *J. grandiflorum*.<sup>90</sup>

#### Flavonoides.

Como la quercitina, isoquercitina, rutina, kaempferol-3-rhamnoglucosido.



R=H quercitina  
R=Rh-Rh-Glu quercitina 3-dirhamnoglucosido

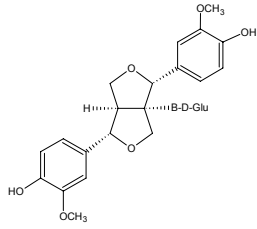
<sup>88</sup> Tamogamis S, Rokwal R. y Kodama O. (1997) FEBS Letters **412**, 61

<sup>89</sup> Koda (1997) Physiologica Plantarum **100**, 639

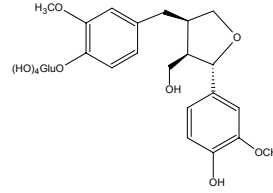
<sup>90</sup> Naves Y.R. y Grampolof A.V. (1942) Helv. Chim. Acta **25**, 1500

Lignan.

Libres o esterificad

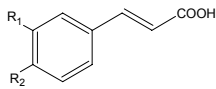


(+) 1-hidroxi-pinoresinol-1-O-β -D-glucosido *Jasminum sambac*

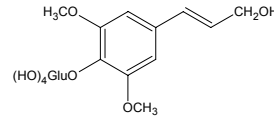


Larirecinol-4-O-β -D-glucosido *Jasminum hemsleyi*

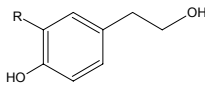
Compuestos fenólicos.



- R1=H, R2=H ácido cinámico
- R1=H, R2=OH ácido coumárico
- R1=OH, R2=OH ácido cafeico
- R1=OH, R2=OCH<sub>3</sub> ácido ferúlico



Syringin *Jasminum mensyi*

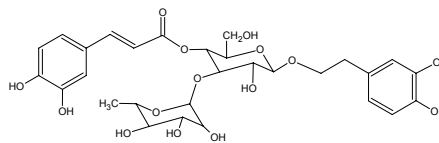


- R=OH 2-(3,4 dihidroxi fenil) etanol
- R=H 2-(4 hidroxí fenil) etanol

Libres o esterificados con los iridoides

Verbascosido y compuestos relacionados.

Libres o esterificados con los iridoides



Verbascosido= acteosido *Jasminum polyanthum*

## Actividad biológica de los iridoides

Durante mucho tiempo los iridoides no se consideraron farmacológicamente importantes. Pero como hemos visto estaban presentes en un gran número de tónicos, sedativos, febrífugos, antitusivos, remedios para las heridas y desordenes de la piel y como hipotensivos. Y los secoiridoides glucosilados están presentes en muchas preparaciones para el tratamiento de dolencias de estómago.

Recientes investigaciones han revelado su amplio espectro de bioactividades y su potencial farmacológico.<sup>1</sup>

### Propiedades farmacológicas.

#### Actividad antihepatotóxica.

Del extracto de las raíces y rizomas de *Picrorhiza kurroa* se obtiene un tónico "Ayurvedic", usado en la India frente a todo tipo de hepatitis.

El picroliv es una mezcla estandar obtenida de esta planta y contiene iridoides glucosilados en un 60% (kurkosido, picrosido que son acil derivados del catalpol). Este extracto presenta un gran número de propiedades beneficiosas y representa un nuevo procedimiento para el tratamiento de desordenes hepáticos. Se encuentra en la segunda fase de control para su aplicación clínica en casos de hepatitis viral<sup>2</sup>, y los test realizados indican que puede tener efectos parecidos al de la "silymarina" obtenida de extractos purificados de *Silybum marianum*.

Facilita la regeneración del hígado en ratas parcialmente hepatotectomizadas aumentando el índice mitótico y la síntesis de ADN y ARN<sup>3</sup> y protege a las ratas de la hepatotoxicidad inducida por *Amanita phalloides*.<sup>4</sup>

Parece operar de dos formas. Protegiendo a las membranas celulares por interacción con sus componentes, y tiene un efecto antioxidante.

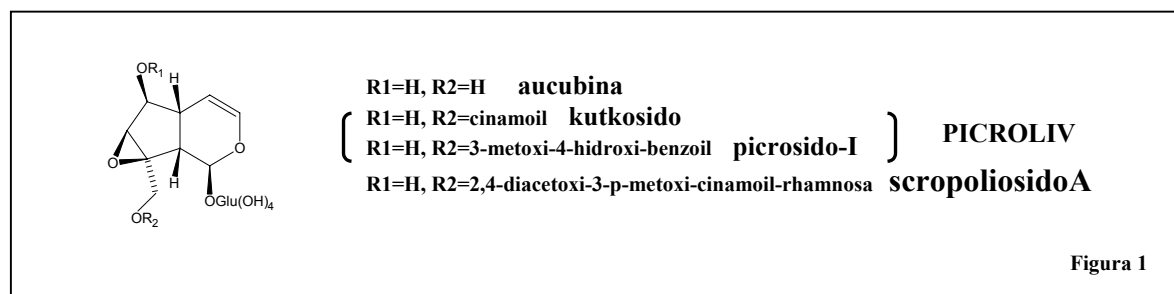


Figura 1

El scropoliodido-A similar al picroliv muestra actividades hepatoprotectoras frente a la toxicidad por tioacetato<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Ghisalberti E.L. (1998) *Phytomedicine* **52**, 147

<sup>2</sup>Dhawan B.H. (1995) *Med. Chem. Res.* **5**, 595

<sup>3</sup>Saksena S., Rastogi R., Garg N.K. y Dhawan B.N. (1995) *Phytother. Res.* **9**, 158

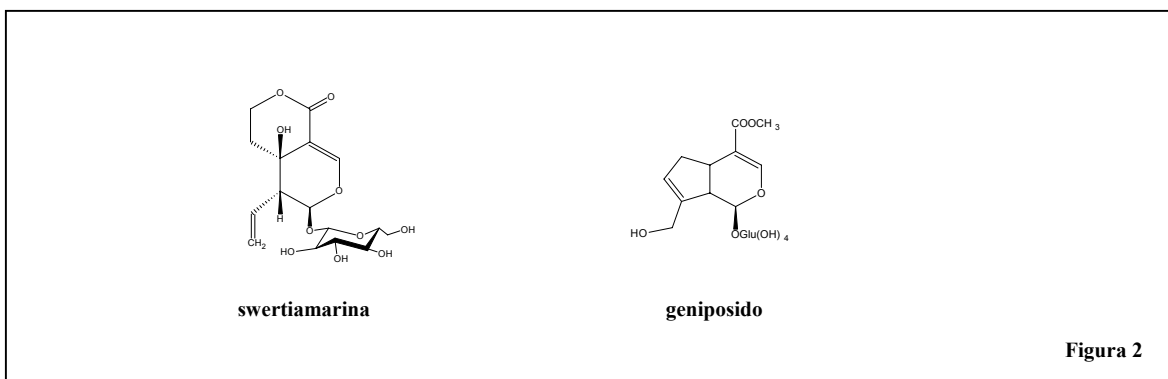
<sup>4</sup>Dwivedi Y., Rastogi R., Garg N.K. y Dhawan B.N. (1992) *Acta Pharm. Sinica* **13**, 197

<sup>5</sup>Garg H.S., Bhandari S.P.S., Tripathi S.C., Patnaik G.K., Puri A., Saxena R. Y Saxena R.P. (1994) *Phytother. Res.* **8**, 224

La aucubina protege frente a la intoxicación que provoca la amanitina al inhibir la biosíntesis de ARN en el hígado de las rata,<sup>6</sup> y frente a la hepatotoxicidad en ratón por  $CCl_4$ <sup>7</sup> y contra otros venenos.

La swertiamarina confiere protección frente a  $CCl_4$  o galactosamina. También un análogo el gentiopicrósido presenta esta actividad inhibiendo el incremento de aminotransferasas hepáticas inducidas por el  $CCl_4$  y lipopolisacáridos de bacilos.<sup>8</sup> (Figura 2)

La loganina y 6-esteres y derivados 4,5 insaturados muestran este tipo de protección<sup>9</sup>. El geniposido y su pentacetato inhiben la hepatotoxicidad por afatoxina B1 en hepatocitos primarios de rata probablemente aumentando los niveles de glutathion S-transferasa y GSH peroxidasa.<sup>10,11</sup>



### Actividad antiviral.

*Nyctanthes arbortristis* se utiliza en la India como antihelmíntico, colágeno y laxante. De esta especie se extraen los arbotristosidos A y C activos frente a la encefalomiocarditis y virus Semliki en el ratón.<sup>12</sup>

También el pricoliv (Figura 1) presenta actividad antiviral (hepatitis B y encefalomiocarditis de ratón).<sup>13</sup>

Una preparación oral que contenía oleuropeina se ha patentado frente al virus del herpes.<sup>14</sup>

Y la fluvoplumiericina inhibe la transcriptasa inversa del VIH-I y II.<sup>15</sup> (Figura 3)

<sup>6</sup> Chang I.M., Yun Y.S., Kim Y.S. y Ahn J.W. (1984) J. Toxicol.-Clin. Toxicol. **22**, 77

<sup>7</sup> Chang I.M., Ryu J.C., Park Y.C., Yun Y.S. y Yang K.H. (1983) Drug Chem. Tox. **6**, 443

<sup>8</sup> Kondo Y., Takano F., y Hojo H. (1994) Planta Med. **60**, 414

<sup>9</sup> Ghisalberti E.L. (1998) Phytomedicine **52**, 147

<sup>10</sup> Ghisalberti E.L. (1998) Phytomedicine **52**, 147

<sup>11</sup> Tseng T. H., Chu C.Y., y Wang C. (1994) J. Ocol. Rep. **1** 165

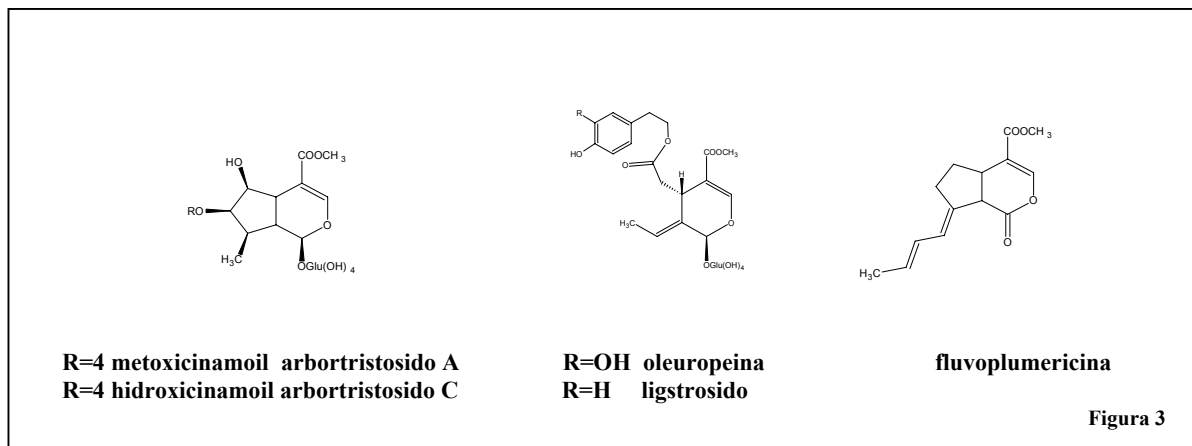
<sup>12</sup> Rathore A., Srivastava V., Srivastava K.C., y Tandon J.S. (1990) Phytochem **29**, 1917

<sup>13</sup> Dhawan B.H. (1995) Med. Chem. Res. **5**, 595

<sup>14</sup> Frederickson W.R. (1996) Chem. Abstr. 125: 96055

<sup>15</sup> Tan G. T., Miller J.F., Kinghorn A.D., Hughes S.H., y Pezudo (1992) J.M. Biochem. Biophys. Res. Commun. **185**, 370

Tan G. T., Pezudo J.M., Miller J.F., Kinghorn A.D., y Hughes S.H. (1991) J. Nat. Prod. **54**, 1102



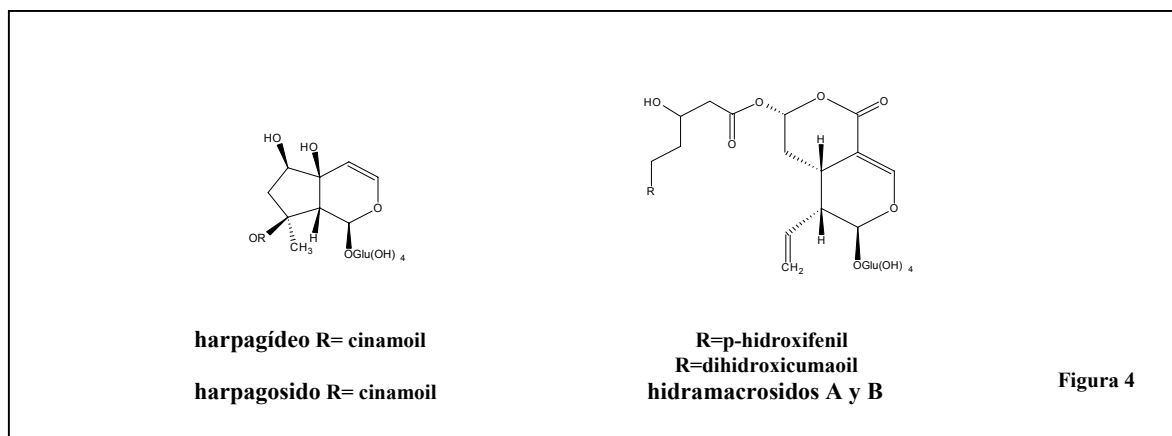
### Acción purgativa.

El extracto crudo de *Gardenia jasmonoides* facilita el tránsito intestinal probablemente mediado por el geniposido (**Figura 2**). Se han ensayado otros iridoides glucosilados de *Gardenia sp.* mostrando que la actividad decrece con un grupo carboxilo en C11, y que un hidroxilo en 6 retrasa la diarrea. Su actividad se debe probablemente a sus agliconas.<sup>16,17</sup>

### Actividad inmunomodulatoria.

La administración oral del Picroliv (**Figura 1**) a ratones antes de la inmunización con eritrocitos de oveja producen un incremento significativo en la hemaglutinación, formación de plaquetas y retraso de la hipersensibilidad. También aumenta la respuesta inmune no-específica y protegen al hamster dorado frente a *Leishmania donovani*.<sup>18</sup>

El harpagosido induce la respuesta inmune<sup>19</sup> y hidramacrosidos A y B inhiben la síntesis de histamina en células madre de rata por reacción antígeno-anticuerpo.<sup>20</sup>



<sup>16</sup> Inouye H. Y., Uesato S. (1974) *Planta Med.* **25**, 285

<sup>17</sup> Ghisalberti E.L. (1998) *Phytomedicine* **52**, 147

<sup>18</sup> Puri A., Saxena R.P., Sumati, Guru P.Y., Kulshreshtha D.K., Saxena K.C. y Dhawan B.N. (1992) *Planta Med.* **58**, 528

<sup>19</sup> Garg H.S., Bhandari S.P.S., Tripathi S.C., Patnaik G.K., Puri A., Saxena R.P. y Saxena K.C. (1994) *Phytother. Res.* **8**, 224

<sup>20</sup> Ghisalberti E.L. (1998) *Phytomedicine* **52**, 147

Los arbotristósido A y C (**Figura 3**) muestra actividad hacia la anafilaxis cutánea pasiva y estabiliza la actividad de las células madre de forma comparable al disodio cromoglicato.<sup>21</sup>

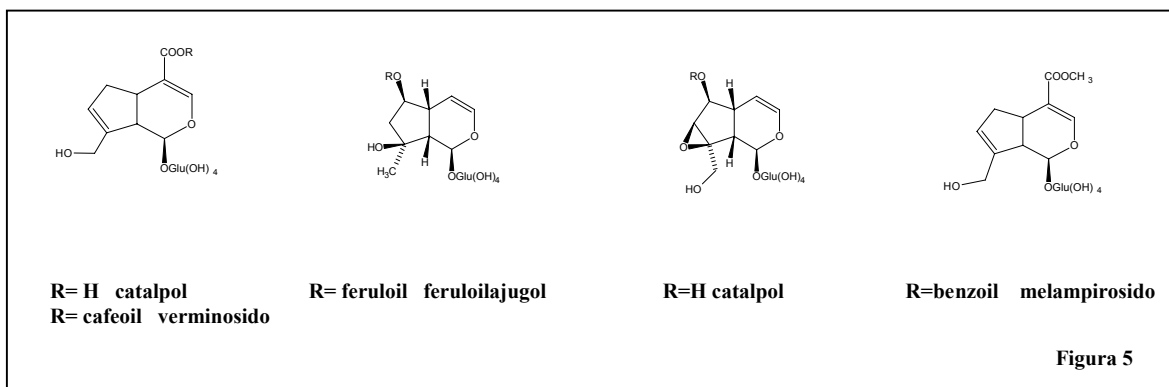
También protegen al ratón frente a la infección sistémica por *Candida albicans*.<sup>22</sup>

#### Actividad cardiovascular.

Los efectos benéficos de las hojas del olivo para el tratamiento de la hipertensión se conoce desde los años 50. El iridoide más abundante en las hojas de olivo es la oleuropeina que ensayado en corazón de conejo produce un incremento del 50% en el flujo de sangre coronaria y muestra efectos antiarrítmicos y espasmolíticos.

En el extracto crudo de *Eremophila longifolia*, una planta medicinal de la cultura aborígen australiana, el ácido geniposídico se muestra como el responsable de la actividad cardiovascular que presenta. Probado con el ensayo Langendorff en corazón de rata media en un efecto inhibitorio con valores negativos de ionotropismo (-13.4%), cronotropismo (-39.8) y tasa de perfusión coronaria (CPR, -39.5%).

Estudiando otros iridooides presentes en *Eremophila sp.* el melampirosido y el verminosido inducen la mayor reducción en el efecto inotrópico negativo (26%) y (18%) respectivamente. Ambos también son los más potentes en la tasa de perfusión coronaria CPR. 41 y 39%. El feruloilajugol reduce la fuerza contráctil en un 16% y el catalpol en un 14%. (**Figura 5**)



Una comparación entre el catalpol y su cafeoil ester, verminosido, muestra que este último presenta una actividad cronotrópica positiva significativamente mayor y un incremento en CPR, quizás como consecuencia del resto aromático orto-dihidroxi. También es más activo que el feruloilajugol con los hidroxilos fenólicos metilados.

Similares efectos presentan el catalpol y el ácido geniposídico, pero este último tiene mayores efectos negativos inotrópicos y en CPR.

El harpagósido (**Figura 4**) de la planta medicinal africana *Harpagophytum procumbens* (*Pedaliaceae*), presenta un efecto inotrópico positivo dosis-dependiente (40%) en el corazón de conejo (Langendorff) que a dosis muy altas tiene un efecto cronotrópico dosis-dependiente negativo(33%).

<sup>21</sup> Gupta P.P., Srimal R.C., Srivastava M., Singh K.L. y Tandon J.S. (1995) Int. J. Pharmacogn. 33,70

<sup>22</sup> Khan Z.K., Manglani A. Shukla P.K., Puri A., Saxena R.P., y Tandon J:S. (1995) Int. J. Pharma. 33, 297

Muy relacionado, el harpangide tiene un leve efecto cronotrópico negativo, pero un considerable efecto ionotrópico negativo muy similar al del melampyrosido.

### Actividad antitumoral.

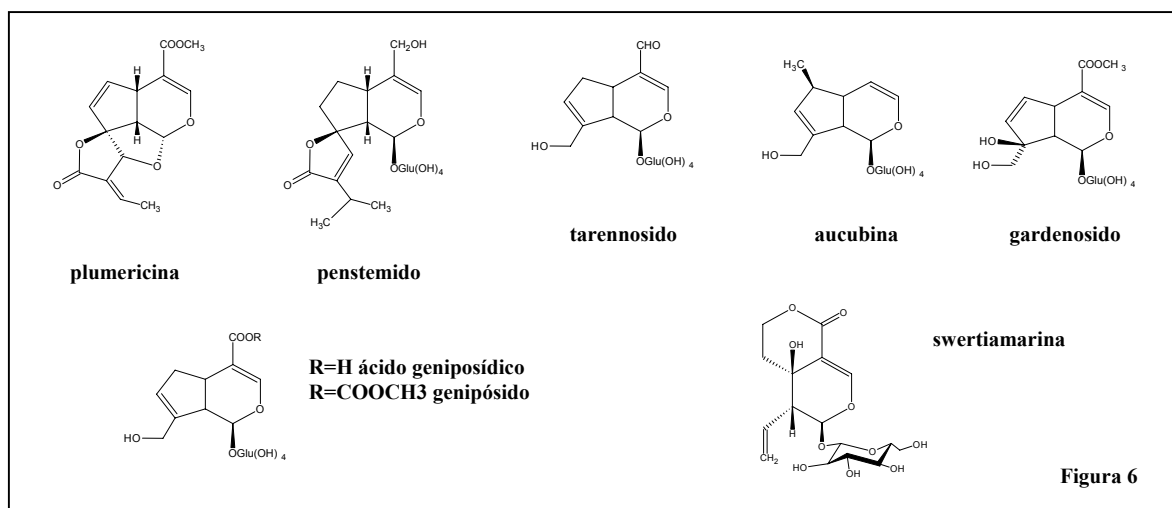
La plumericina de *Plumeria rubra* muestra actividad citotóxica frente a seis líneas de células cancerígenas humanas (fibrosarcoma, melanoma, nasofaringe, pulmón, mama y colon).<sup>23</sup>

El penstemido es activa contra la línea celular P-338.<sup>24</sup>

El ácido geniposídico y el genipósido, ambos presentes en el té Japonés "To", un extracto acuoso de las hojas de *Eucommia ulmoideschu*, presentan actividad protectora frente a tumores inducidos por radiaciones subletales de RX. Tanto el extracto como ambos iridooides presentan actividad anticlastogénica en células CHO tratadas con MMC como determina una caída de la frecuencia de aberraciones cromosómicas.<sup>25</sup>

Un gran número de iridooides de *Genipa americana* muestra actividad inhibitoria de la activación del virus Epstein Barr por 12-O-tetradecanoylphorbol-3-acetato. El tarenosido es el más activo (tanto como el ácido retinoico).

La aucubina, swertiamarina y el gardenosido inhiben la síntesis de proteínas y de ARN en células de sarcoma 180 (tumor murino).<sup>26</sup>



### Actividades coleréticas.

El picroliv (**Figura 1**) muestra efectos coleréticos en estudios sobre ratas y cobayas al medir el volumen y concentración de los ácidos biliares. Produce un aumento dosis-dependiente en el volumen de bilis, concentración de sales, ácido cólico y deoxicólico. La colestasis inducida por tetracloruro de carbono, etinilestradiol, galactosamina, paracetamol y 7 tioacetamida en rata, cerdo o gato es contrarrestada de forma dosis-dependiente por el picroliv.

<sup>23</sup> Kardono L.B.S. Tsauri S., Padmawinata K., Pezzet J.M. y Kinghorn A.D. (1990) J. Nat. Prod. 53, 1447

<sup>24</sup> Jolad S., Hofmann J.J. Wiedhopf R.M., Cole J.R. Bates R.B., Krick, G.R. (1976) Tetrahedron Lett. 4119

<sup>25</sup> Nakamura T. Nakazawa Y., Onizuka S. Satoh S. Chiba A., Sekihashi K. Miura A., Yasugahiro N., y Sasaki Y.F. (1997) Mutation Res. 388,7

<sup>26</sup> Ghisalberti E.L. (1998) Phytomedicine 52, 147



La administración intraduodenal del genipósido muestra también este tipo de actividades pero mediada por su aglicona .

#### Actividades hipoglucémicas e hipolipídicas.

La oleuropeina (**Figura 3**) muestra efectos hipoglucemiantes y aumenta la tolerancia a la administración oral de glucosa en ratas diabéticas normales.

El ácido deacetil-asperulosídico metil ester baja los niveles de glucosa en sangre de ratón. En otros productos se muestra que la pérdida u otra configuración del alcohol en C6 determina la desaparición de la actividad.

El picroliv (**Figura 1**) baja los niveles de lípidos en suero de ratas albinas con hiperlipemia inducida con tritón WR-1339.

El genipósido baja los niveles de triglicéridos séricos, peróxidos lipídicos, glucosa, insulina y glutámico-pirúvico transaminasa en ratas con una dieta rica en azúcar.

#### Otras actividades.

El Picroliv (**Figura 1**) inhibe la generación no enzimática de aniones  $O^{2-}$  (superóxido) generados por el sistema xantina-xantina oxidasa, y la generación de malondialdehído inducida por el sistema ascorbato- $Fe^{2+}$  y NADP-ADP- $Fe^{2+27}$ . Proporciona protección frente a la bajada de los niveles de glutathion en el hígado y cerebro de *Mastomys natalensis* infectado con *Plasmodium berhe*<sup>28</sup>.

La oleuropeina (**Figura 3**) reduce la producción de malondialdehído debido a peroxidación lipídica inducida por hierro en el hepatocito como modelo<sup>29</sup>.

El ácido geniposídico se muestra como potente antioxidante en estudios de la oxidación del ácido linoleico con aire. Esta actividad que la presentan otros iridoideos como la aucubina, geniposido y gardenosido (**Figura 6**).<sup>30</sup> La presencia de un grupo carboxílico  $\alpha,\beta$ -insaturado puede intervenir como aceptor. El ácido geniposídico y el genipósido administrado oralmente a ratones con estrés crónico protegen frente a la pérdida de actividad sexual, de memoria e incremento del tamaño de la glándula adrenal.<sup>31</sup>

Arbortristosido A y congéneres (**Figura 3**) de *Nyctanthes arbortristis* muestra in-vitro actividad frente a *Leishmania donovani* en cultivos de macrófagos e in-vivo usando hamster<sup>32</sup>.

Amarogentina inhibe la relajación del superhelicoide del ADN catalizada por la topoisomerasa I de *L. donovani*, al unirse al enzima e impedir la unión topoisomerasaI-ADN.<sup>33</sup>

Si realizamos una revisión de las actividades farmacológicas y biológicas de los iridoideos comprobaremos la importancia de las agliconas ya mencionada.

<sup>27</sup> Chander R., Kapoor N.K. y Dahawan B. (1992) Biochem. Pharmacol. **44**, 180

<sup>28</sup> Ghisalberti E.L. (1998) Phytomedicine **52**, 147

<sup>29</sup> Chimi H. Morel I., Lescoat G. Pasdeloup N., Cillard P., y Cillard (1995) J. Chem. Abstr. 123:332322

<sup>30</sup> Todoa S., Miyase T., Arichi H., Tanizawa H., y Takino Y. (1985) Chem. Pharm. Bull. **33**, 1270

<sup>31</sup> Imai T., Kishi T., Inoue H., Nishiyama N., y Saito H. (1988) Chem. Abstr. 109:104651

<sup>32</sup> Tandon J.S., Srivastava V., y Guru P.Y. (1991) J. Nat. Prod. **54**, 1102

<sup>33</sup> Ray S., Majunder H.K., Chakravaty A.K., Mukhopachay S., Gil R.R., y Cordell G.A. (1996) J. Nat. Prod. **59**, 27

### Aplicaciones fitoterápicas.

El Pagosid<sup>34</sup> es un antiinflamatorio antirreumático fitoterápico del extracto de raíces secundarias de *Harpagophytum procumbens* D.C. (*Pedaliaceae*). Conocida como "garra del diablo" se desarrolla en áreas relativamente limitadas de África, especialmente en el desierto del Kalahari y estepas de Namibia. Su nombre proviene de su fruto de aspecto leñoso provisto de barbas semejantes a garras. Comúnmente usada por los africanos en forma de infusión frente a dolencias reumáticas., diabetes, arteriosclerosis, dolencias de hígado, riñón y vejiga . También le atribuyen efectos beneficiosos para venas y arterias a las que hacen más elásticas. Aunque se la conoce desde el siglo XIX no fue hasta la primera guerra mundial cuando, especialmente en Alemania, se estudiaron sus propiedades farmacológicas.

Los principales constituyentes de la droga son iridoides glucosilados, principalmente el harpagosido (cinamil éster del harpagídeo). (ver **Figura 4**) En menor cantidad existen harpagídeo y procumbídeo, flavonoides, varios ácidos fenólicos, triterpenos, fitosteroles, una quinona (harpagoquinona) en alta concentración de azúcares. La contribución terapéutica de varios constituyentes no han sido establecida, pero ensayos realizados con animales indicaron que los iridoides glucosilados están relacionados con los efectos antiinflamatorios y analgésicos.

Los procesos crónicos están relacionados con procesos inmunológicos mediados por células sanguíneas blancas, especialmente dentro de las articulaciones. Los leucocitos y sus sustancias neurotransmisoras tienen un papel crucial especialmente en procesos inflamatorios crónicos tipo osteoartritis. Los iridóides son efectivos en procesos inmunológicos, afectando a la división celular iniciada por interleucinas en leucocitos. Actúa por mecanismos de inhibición de la síntesis de prostaglandinas, interfiriendo en la permeabilidad de la membrana celular e influenciando la inhibición de la prostaglandina sintetasa. Favorece un aumento de la actividad del hígado, estimulando la desintoxicación especialmente en la eliminación de urea. También parece tener efectos sobre la vesícula, páncreas, estómago, intestino y riñones. Y tiene un efecto estimulante sobre el sistema linfático.

La ventaja de este preparado está en que se trata de un antiinflamatorio antirreumático fitoterápico con un perfil de actuación equivalente a los antiinflamatorios no esteroideos, pero totalmente exento de efectos colaterales gastrointestinales normalmente observados con los análogos sintéticos.

---

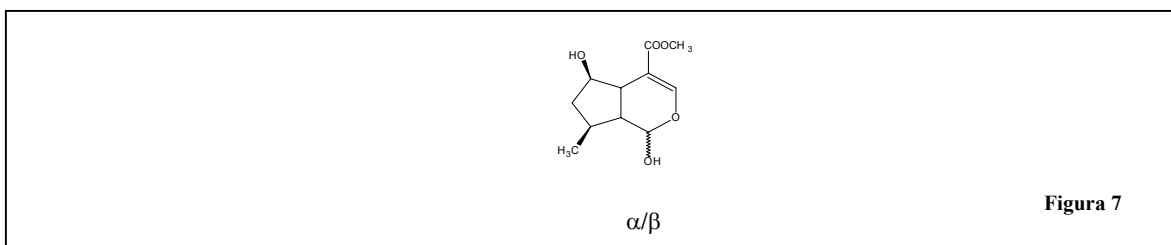
<sup>34</sup> Herbarium - Compêndio de Fitoterapia - Magrid Teske & Anny Margaly M. Trentini

**Mecanismos de defensa en plantas.**

Kubo y col.<sup>35</sup> relacionan a la oleuropeina y ligstrosido con la defensa frente a insectos y microbios, considerando a la oleuropeina como un precursor de fitoalexinas y citan su efecto frente al gasterópodo sudamericano *Biomphalaria glabratus*. También son conocidas sus propiedades antimicrobianas.<sup>36</sup> (ver **Figura 3**)

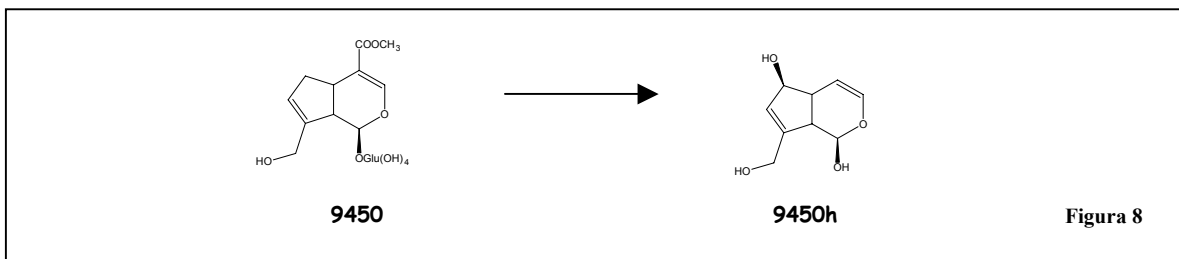
La oleuropeina estimula el ataque del coleóptero *Dyscerus perforatus* (*Curculionidae*) (Roelofs) a los olivos. Este insecto que tiene como huéspedes habituales a *L. japonicum* y *L. obtusifolium* producen en el olivo una explosión demográfica que causa la muerte del árbol.<sup>37</sup>

Agliconas y sus acetilados aislados de *Alibertia macrophylla* (*Rubiaceae*) muestran actividad antifúngica frente a *Aspergillus niger*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporioides* y *Colletotrichum gloeporioides*.<sup>38</sup>

**Actividades biológicas de las agliconas de iridoideas.**

Como hemos visto anteriormente las agliconas tienen actividades más altas que sus correspondiente glucósidos y en muchos casos en los que un iridoide se considera una prodroga<sup>39</sup> sugiriendo una actividad polifuncional cuando es liberado.<sup>40</sup>

La genipina (*9450h*) presente en todo el tracto gastrointestinal, especialmente en el ciego y el colon, es probablemente la causante del efecto propulsivo en el intestino largo que presenta la administración del genipósido (*9450*).<sup>41</sup>



Presenta la mayor actividad inhibitoria (80%) y la menor toxicidad celular, frente a la activación frente al virus Epstein-Barr inducida por el 12-O-tetradecanoilforbol-3-acetato.<sup>42</sup>

<sup>35</sup> Kubo I., Matsumoto A. y Takase I. (1985) J. Chem. Ecol. **1**, 251

<sup>36</sup> Juren B., Henis Y. y Jacoby B. (1972) J. Appl. Bacteriol. **35**, 559

<sup>37</sup> Nakajima S., Kitamura T., Baba N., Iwasa L. y Ichikawa T. (1995) Biosci. Biotech. Biochem. **59**(4), 769

<sup>38</sup> Claudia M., Young M., Braga M.R., Dietrich S.M.C., Gottlie H.E., Trevisan L.M.V. y Bolzani V.D.S. (1992) Phytochemistry **31**, 3433

<sup>39</sup> Nishibe S., Pure (1994) Appl. Chem. **66**, 2263

<sup>40</sup> Ghisalberti E.L. (1998) Phytomedicine **52**, 147

<sup>41</sup> Inouye H., Takeda Y., Uobe K., Yamauchi N. y Kuwano S., (1974) Planta Med. **25**, 285

<sup>42</sup> Ueda S., Iwahashi Y. y Tokuda H., (1991) J. Nat. Prod. **54**, 1677

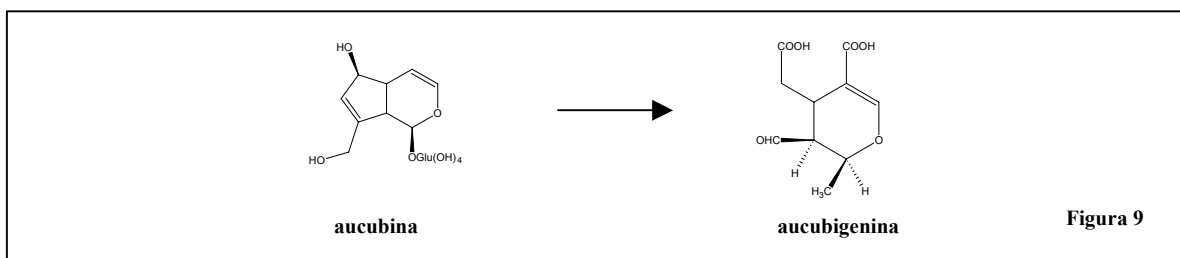
También presenta la mayor actividad antiinflamatoria de todas las agliconas e iridoides ensayados<sup>43</sup>

El genipósido y su aglicona genipina muestran actividades hipolepidémicas en ratas hiperlipidémicas (genipina 100mg/Kg), mediando en la bajada de los niveles de triglicéridos, en la bajada de los niveles de triglicéridos ricos en colesterol lipoproteico y en la secreción de triglicéridos por el hígado. La genipina (1mM) descende la síntesis de gliceraldehído en el hígado en un 70% y la reduce en la cantidad de ciclomicrones y lipoproteínas VID en ratas hiperlipidémicas<sup>44</sup>

La administración intraduodenal del genipósido muestra una retardada pero potente acción colerética, que se hace mucho más rápida cuando se administra su aglicona, indicando que es este el agente activo.<sup>45</sup> Inyectada en la vena mesentérica de ratas incrementa en gran medida el flujo de bilis y antagoniza la bajada del flujo de bilis inducida por el factor colestático (una linfocina). Incrementa el flujo de bilis ácido-dependiente<sup>46</sup>

La genipina y su 10-monoacetato (LD50 22-26 ppm) son activos frente a *Budinus africanus*, huesped intermediario de el parásito *Schistosoma haematobium*<sup>47</sup>

La aglicona de la acubina, aucubigenina, también presenta mayor inhibición de la síntesis de proteínas y la formación de ARN en las células sarcoma 180 (tumor murino)<sup>48</sup> que la propia acubina, la swertiamarina o el gardenosido.



Aunque la aucubina no muestra actividad antiviral esta aglicona formada por preincubación de la aucubina con  $\beta$ -glucosidasa suprime la replicación in-vitro del ADN del virus de la hepatitis B.<sup>49</sup>

Se muestra como un potente inhibidor dependiente de tiempo de la etoxi cumarina O-deetilasa, una enzima citocromo P-450, en sistemas microsomales de hepatocitos recién aislados. La aucubina no presenta actividad.<sup>50</sup>

También induce la diferenciación neuronal de células PC12h (un cultivo celular de paraneuronas).<sup>51</sup>

La catalpina, aglicona del catalpol presenta actividad mutagénica frente a *Salmonella typhimurium* cepa TA100 en presencia o ausencia fracción homogeneizada de hígado de rata (S9) en el test de Ames<sup>52</sup>.

<sup>43</sup> Oshima Y., Takata S., Hikino H., Deyama T. y Kinoshita G. (1988) J. Ethnopharmacol **23**, 159

<sup>44</sup> Hatta A., Toho (1993) Igakzet Zasshi **40**, 16

<sup>45</sup> Aburada M., Takeda S., Shibata Y. y Harata M. (1978) J. Pharmacobio.-Dyn. **1**, 81

<sup>46</sup> Mizoguchi Y., Sagasami Y., Miyajima K., Yamamoto S., Takeda S., Aburada M. y Morisawa S. (1986) Chem. Abstr. **104**,180001

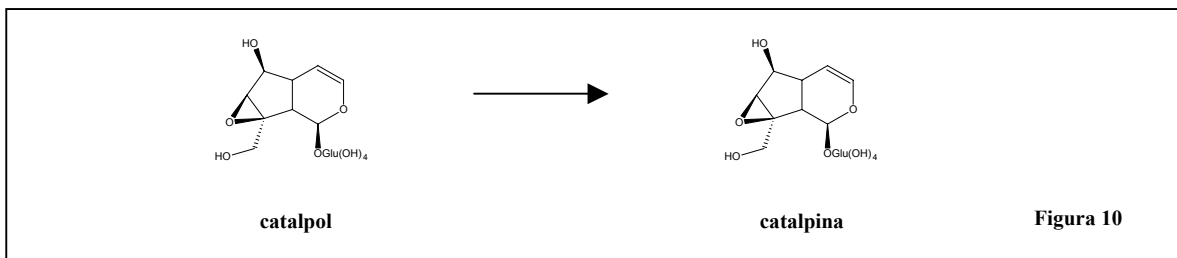
<sup>47</sup> Drewes S.E., Kayonga L., Clark T.E., Brackenbury T.D., y Apreton C.C. (1996) J. Nat. Prod. **59**,1169

<sup>48</sup> Huh S.O., Kim J.H., Chang I.M. (1985) Chem. Abstr. **103**, 205810

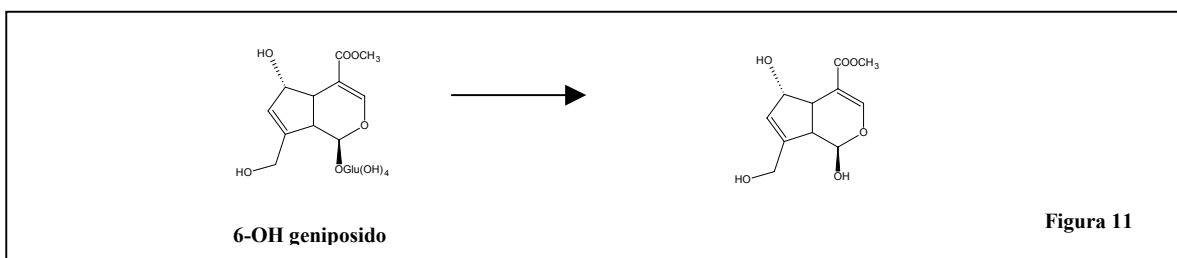
<sup>49</sup> Chang I.M. (1997) Phytother. Res. **11**, 189

<sup>50</sup> Bartholomaeus A. y Ahokas J. (1995) Tox. Lett. **80**, 75

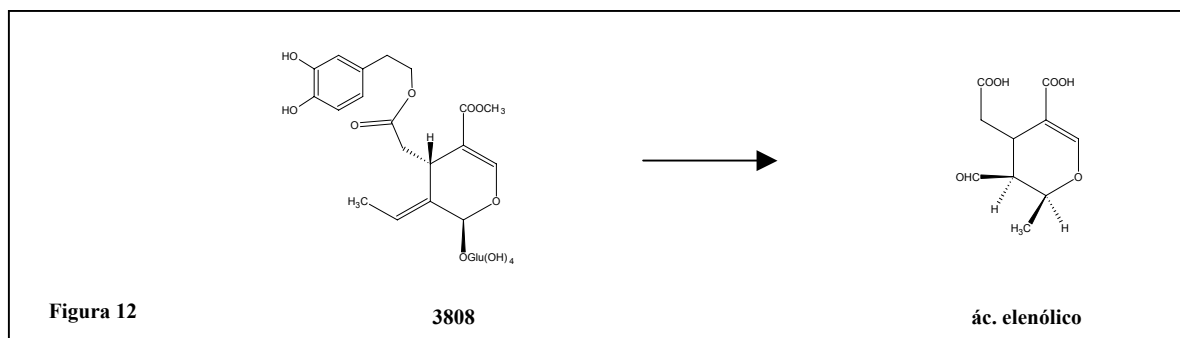
<sup>51</sup> Yamazaki M., Hirota K., Chiba K. Y Mori (1994) Biol. Pharm. Bull. **17(2)**, 1604



Algunas agliconas de iridoideas son activas en ensayo frente a la leucemia linfocítica murina (P-388), como la aglicona de el 6 $\beta$ -epímero del 6-OH geniposido, la más activa. Y se muestra que el hemiacetal de las correspondientes agliconas muestra un papel importante.



El iridoide más abundante en las hojas del olivo la oleuropina (3808) produce un incremento del 50% en el flujo de la sangre coronaria y muestra efectos antiarrítmicos y espasmolíticos.<sup>53</sup>



El ácido elenólico obtenido de la hidrólisis por ácido fosfórico del extracto de olivo tiene propiedades hipotensivas, indicando que el resto 3,4 dihidroxifenilestanol y el grupo glucosídico en C1 no son necesario para la actividad hipotensiva.<sup>54</sup>

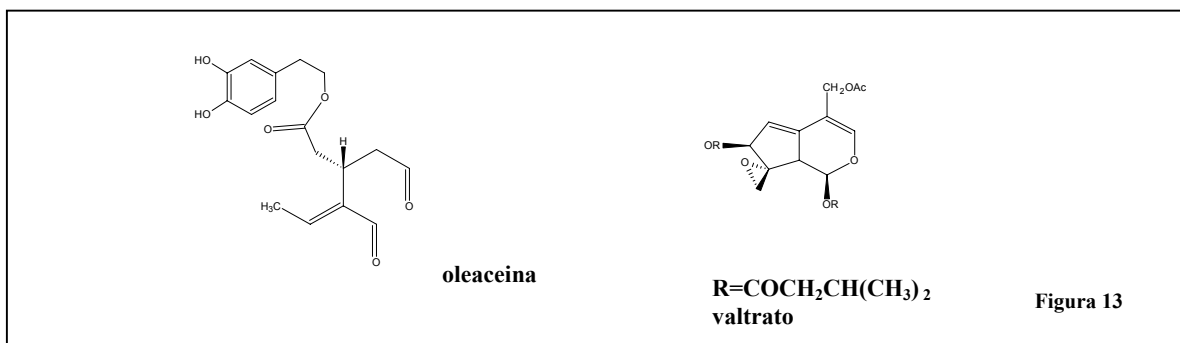
La oleaceina es un iridoide no glucosilado aislado de *Olea europea* y *O. lancea* que muestra una fuerte inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE)<sup>55</sup>. Este enzima que actúa en la angiotensina 1 para producir la angiotensina 2 que media en el incremento de la presión sanguínea, retención de sodio y agua e inactiva la bradicinina que controla la vasodilatación y natriuresis.

<sup>52</sup> Nozaka T., Watanabe F., Ishino M., Morimoto I., Kondoh H., Koyama K. y Natori S. (1989) Chem. Pharm. Bull. **37**, 2838

<sup>53</sup> Petkov V. y Manolov P. (1978) Comp. Med East West **6**, 123

<sup>54</sup> Rauwald H.W., Brehm O., y Odenthal K.P. (1994) Phytother. Res. **8**, 135(1996)

<sup>55</sup> Hansen K., Andersen, A., Brogger Christensen, S., Rosendal Jensen S., Nyman U. y Wagner Smitt U. (1996) Phytomedicina **2**, 319



Parece ser un inhibidor irreversible de la ACE, debida a la función 2,3-dialquil glutaraldehído altamente reactiva que podría explicar el efecto duradero sobre la presión sanguínea del extracto de hojas de olivo en ratas, gatos y perros.

En el mismo test, la B-(3,4-dihidroxifenetil) etanol que contribuye a la parte alcohólica de el éster muestra sólo una inhibición del 26% en 2.1 mM.

La oleaceina (ver **Figura 13**) también se ha aislado de *J. grandiflorum* y de *J. azoricum* var. *travancorensis*. De esta última especie también se han aislado iridoideos oligoméricos con la misma actividad, y con valores de inhibición de 26-36  $\mu\text{M}$ .<sup>56</sup>

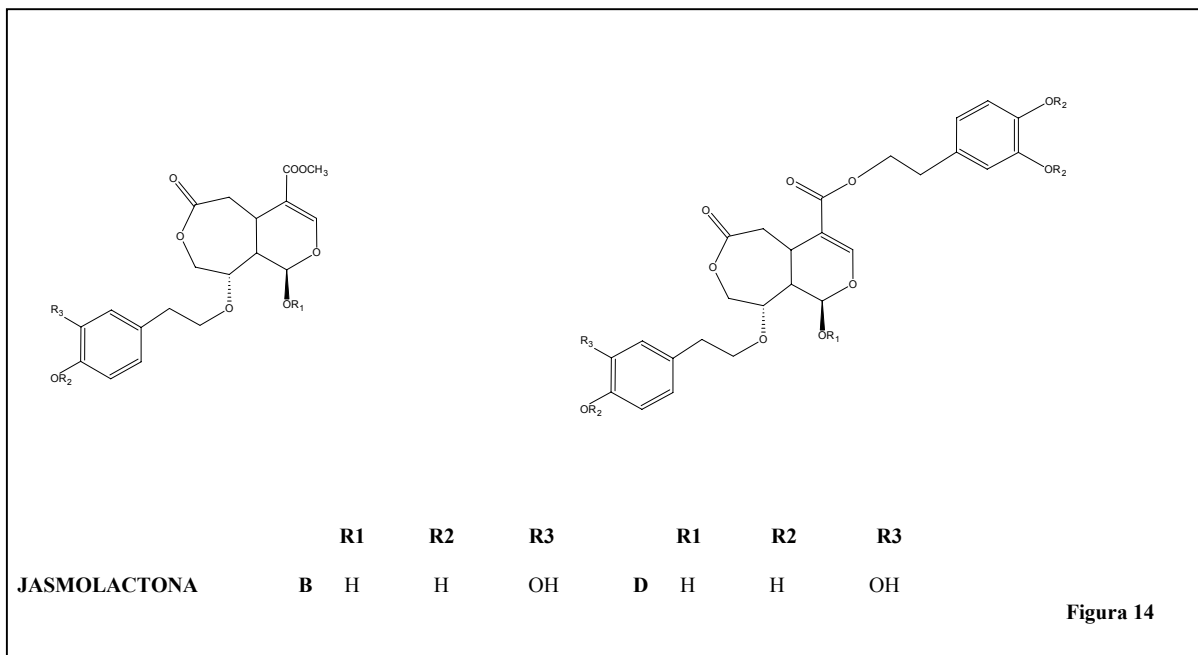
Como prueba más del papel jugado por la función dialdehído hemiacetal se deriva de la observación de que algunos secoiridoideos glucosilados, incluida la oleuropeina, no muestran actividad inhibitoria de la ACE pero las agliconas producidas por hidrólisis enzimática muestran una actividad similar a la de la oleaceina.

Las jasmolactonas B y D (ver **Figura 14**) en el corazón de cobayas induce la dilatación coronaria, efectos cronotrópicos e ionotrópicos negativos y un efecto antiarrítmico marginal con 100mg/Kg. Similar a lo observado para el ác. geniposídico en el corazón de rata Langendorff. Las jasmolactonas con 3-hidroxiladas en la cadena aromática fenetoxi son inactivas.<sup>57</sup>

El valtrato (ver **Figura 13**) un iridoide no glucosilado media en un 65% en el incremento de flujo de sangre coronaria en corazón de conejo, y elimina las perturbaciones inducidas por  $\text{BaCl}_2$  en conejos.

<sup>56</sup> Somanadhan B., Smitt U.W., George V., Pushpangadan P., Rajasekharan S., Duus J.O., Nyman U., Olsen C.E. y Jaroszewski J.W. (1998) *Planta Medica* **64**, 246

<sup>57</sup> Shen Y-CH y Chen CH-CH (1989) *J. Nat. Prod.* **52**, 1060



## Catálisis enzimática en disolventes orgánicos.

### Introducción

Hasta mediados de la década de los ochenta se consideraba casi un dogma que las enzimas sólo podían ejercer su poder catalítico en medio acuoso y de hecho todo lo que se sabía acerca de catálisis enzimática había sido aprendido de estudios llevados a cabo en ese medio. La idea de que puedan ejercer su actividad en otro disolvente parece ridícula puesto que esta actividad depende de su estructura terciaria (conformación) que a su vez es el resultado de un sutil equilibrio entre interacciones no covalentes en las cuales participa el agua<sup>58</sup>. La ausencia de agua alteraría radicalmente la conformación de la enzima y esta perdería su poder catalítico.

No obstante para A.M. Klibanov<sup>59</sup>, este razonamiento no es completo puesto que la cuestión clave no es si el agua es necesaria para la actividad catalítica sino qué cantidad de agua se precisa. La enzima sólo puede "ver" una monocapa de moléculas de agua, que de alguna manera está localizada sobre su superficie, y que es "esencial" para la conformación y la actividad. Este razonamiento es consistente con los datos sobre hidratación de proteínas secas<sup>60</sup>. Por tanto la sustitución del resto del agua por un disolvente orgánico ¿alteraría la conformación? ¿se perdería la actividad?

Para contestar a estas preguntas, Klibanov<sup>59</sup> utilizó dos proteasas,  $\alpha$ -quimotripsina pancreática y subtilisina Carlsberg. Estas enzimas hidrolíticas deberían catalizar la reacción de transesterificación entre un éster y un alcohol (es decir la reacción inversa a la de hidrólisis que catalizan en su medio natural) en disolventes orgánicos anhidros, entendiendo por "anhidro" aquel que contuviera por debajo del 0.01% en agua. La elección de esas dos enzimas se debía a que precisamente utilizaban agua como sustrato y que por tanto su funcionamiento en medios no acuosos podría extrapolarse a otras enzimas que no la precisaran.

Los resultados fueron sorprendentes. No sólo las enzimas poseen actividad en disolventes orgánicos anhidros sino que en este medio no natural adquieren nuevas propiedades. Son más estables térmicamente. Exhiben diferentes especificidades para sus sustratos y diferente especificidad enantiomérica. Y adquieren "memoria molecular" y catalizan reacciones poco usuales.

Los estudios de Klibanov y col.<sup>61</sup> revelaron que para asegurar la actividad enzimática en disolventes orgánicos deberían ser seguidas determinadas reglas. En primer lugar, la naturaleza del disolvente es crítica: los mejores medios de reacción son los hidrofóbicos<sup>62</sup>. Por ejemplo para la quimotripsina la  $k_{cat}/K_m$  en octano es  $10^4$  veces mayor que en piridina. Se sugería que este hecho era debido a que los disolventes hidrofílicos despojaban a la enzima de su agua esencial para la actividad. Esta hipótesis fue confirmada midiendo la cantidad de agua que permanece sobre el enzima después de incubarla con un determinado disolvente: a mayor hidrofilia del disolvente menor cantidad de agua es retenida por la enzima. Además la adición de 1.5% de agua a acetona, por ejemplo, da como resultado que la enzima retenga más agua y que la actividad aumente más de 1000 veces.

---

<sup>58</sup> Creighton, T.E. (1983) en Proteins: Structure and Molecular Properties, Cap.4, Freeman

<sup>59</sup> Klibanov, A.M. (1989) Trends Biochem. Sci., (14), 141-144

<sup>60</sup> Rupley, J.A., Gratton, E., Careri, G. (1983) Trends Biochem. Sci., (8), 18-22

<sup>61</sup> Klibanov, A. M. (1986) Chemtech. 16, 354-359

<sup>62</sup> Zaks, A. y Klibanov, A.M. (1988) J.Biol..Chem. 263, 3194-3201



La segunda regla es que las enzimas que van a ser usadas en disolventes orgánicos deben ser liofilizadas o precipitadas de soluciones acuosas al pH óptimo para su actividad. Los grupos ionizables de la enzima adquieren el estado de ionización correspondiente al pH de la solución acuosa, y este estado de ionización debe ser mantenido en el disolvente orgánico.

Por último, debido a la insolubilidad de los enzimas en esos medios<sup>1</sup>, los problemas de difusión y heterogeneidad, deben solventarse por medio de sonicación o agitación vigorosa.

La eficacia de la catálisis en estos medios fue determinada para la quimotripsina y la subtilisina<sup>5</sup>. Usando la reacción modelo de transesterificación puede verse como la relación entre las constantes bimoleculares de reacción enzimática y la espontánea es de  $10^{10}$ - $10^{11}$ . Además las enzimas preinactivadas térmicamente o por modificación del centro activo, fueron inactivas en medios orgánicos. También fueron comparadas las actividades de alcoholdehidrogenasa, tirosinasa y alcoholdehidrogenasa en agua y en disolventes orgánicos. Las tres enzimas apenas fueron activas en estos últimos, pero la adición de un pequeño porcentaje de agua (todavía por debajo de la solubilidad de la enzima) aumentó la actividad hasta hacerla comparable a la observada en agua.

Las transesterificaciones catalizadas por quimotripsina y subtilisina en disolventes orgánicos siguen la cinética de Michaelis-Menten<sup>5</sup> indicando la formación del complejo enzima-sustrato.

Nuevas propiedades de las enzimas en medios orgánicos

## I. - Especificidad por el sustrato

Está bien establecido que el enlace es la fuerza que dirige la catálisis molecular<sup>63,64</sup>. La energía de enlace de una enzima con un sustrato está determinada por la diferencia de energía entre el complejo enzima-sustrato y la energía de la enzima y el sustrato interaccionando con el disolvente<sup>63</sup>, es decir el enlace está siempre influenciado por el disolvente. Zaks y Klibanov<sup>65</sup> encontraron, que la especificidad por el sustrato de quimotripsina, subtilisina y esterasa cambia dramáticamente al sustituir el medio acuoso de la reacción por el medio orgánico. En concreto, la especificidad de la quimotripsina (enlace peptídico con un grupo hidrofóbico por el lado N-terminal) en agua es la contraria en octano (enlace peptídico con un grupo hidrofílico por el lado N-terminal). Para la quimotripsina, las interacciones hidrofóbicas en agua contribuyen significativamente al enlace enzima-sustrato<sup>66</sup>. Sobre la base de ello se sugirió que el cambio en la especificidad se debía a la falta de interacciones hidrofóbicas en medios no acuosos.

---

<sup>63</sup> Fersht, A. (1985) Enzyme Structure and Mechanism, 2nd edn. W.H Freeman and Co., New York

<sup>64</sup> Menger, F.M. (1993) Acc. Chem. Res., 26, 206-212

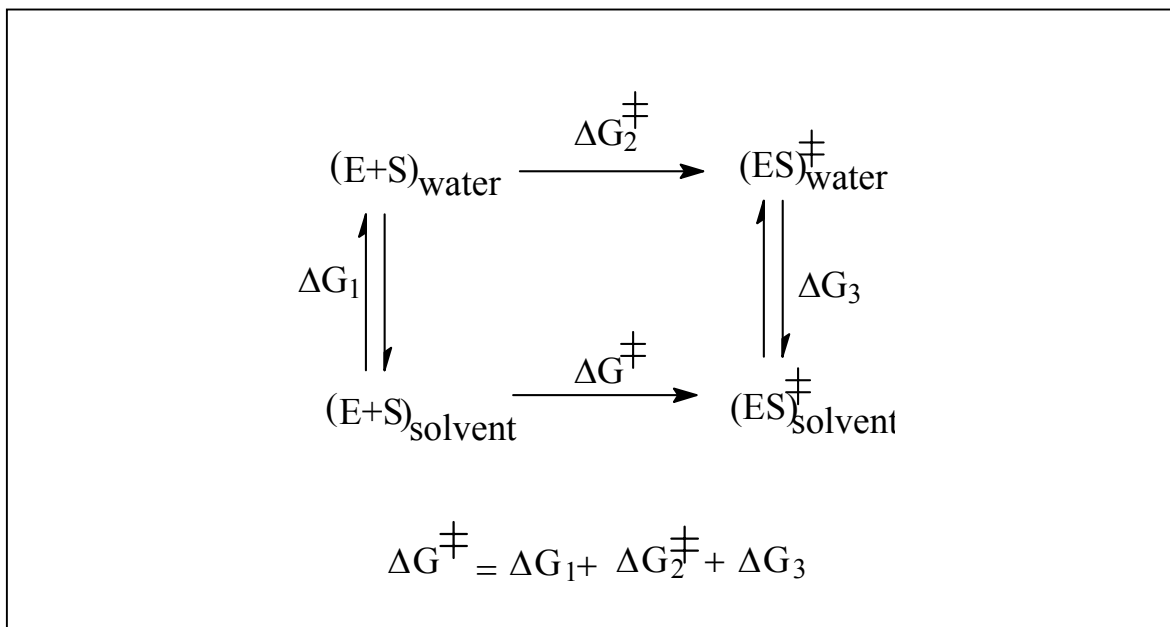
<sup>65</sup> Zaks, A. y Klibanov, A.M. (1986) J. Amer. Chem. Soc., 108, 2767-2768

<sup>66</sup> Dorovska, V.N., Varfolomoyev, S.D., Kazanskaya, N.F., (1972), FEBS Lett., 23, (1), 122-124

Gaertner y Puigserver<sup>67</sup> obtuvieron resultados cualitativamente similares con quimotripsina, tripsina y subtilisina, modificadas con polietilenglicol en benceno. Mientras que  $k_{cat}/K_M$  para quimotripsina en agua variaba en más de tres órdenes de magnitud cuando se pasaba de aminoácidos aromáticos a básicos en benceno los valores de  $k_{cat}/K_M$  eran aproximadamente los mismos. Además, el N-Bz-Lys-OMe, que es hidrolizado en agua a una velocidad 15 veces menor que la del N-Bz-Tyr-OEt, llega a ser tres veces más reactivo en benceno. Estos mismos autores demostraron que la especificidad para inhibidores específicos del centro activo es también la contraria para el caso de la quimotripsina. Así, el fluoruro de fenilmetilsulfonylo que reacciona con la serina del centro activo e inactiva rápidamente la enzima en agua, no tiene efecto en benceno. Por el contrario, el fluoruro de (4-amidinofenil) -metanosulfonylo, más hidrofílico, inactiva completamente la enzima en tres horas en un medio no acuoso.

A la falta de interacciones hidrofóbicas en los medios orgánicos son también achacados los resultados de otros experimentos parecidos con resultados análogos a los anteriores<sup>68,69</sup>

Wescott y Klivanov<sup>70</sup> han desarrollado un modelo termodinámico que puede predecir la especificidad de sustrato de la subtilisina Carlsberg en medios orgánicos sobre la base de la especificidad en agua y de las características físico-químicas del disolvente. Estos autores determinaron  $k_{cat}/K_M$  para la transesterificación de N-acetil-L-fenilalanina y N-Acetil-L-serina con propanol en 20 disolventes anhidros y encontraron que la relación  $[k_{cat}/K_M]_{Ser}/ [k_{cat}/K_M]_{Phe}$  variaba 68 veces. Ellos racionalizaron sus resultados sobre la base del ciclo termodinámico siguiente:



<sup>67</sup> Gaertner, H. and Puigserver, A.. (1989) Eur.J.Biochem., 181, 207-213

<sup>68</sup> Clapes, P., y Adlercreutz, P.(1991) Biochim. Biophys. Acta, 1118, 70-76

<sup>69</sup> Gololobov, M.Y., Voyushina, T.L., Stepanov, V.M., y Adlercreutz (1992), FEBS Lett., 307 (3), 309-12

<sup>70</sup> Wescott, C.R. y Klivanov, A.M. (1993) J. Amer.Chem.Soc., 115, 1629-1631

$$\Delta G^{\ddagger} = -RT \ln \left[ \left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{\text{solvent}} \left( \frac{h}{kT} \right) \right]$$

$$\Delta G_2^{\ddagger} = -RT \ln \left[ \left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{\text{water}} \left( \frac{h}{kT} \right) \right]$$

$$\Delta G_1 = RT \ln P + RT \ln P_E$$

$$\ln \left[ \left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{\text{solvent}} \left( \frac{h}{kT} \right) \right] = -\ln P - \ln P_E + \ln \left[ \left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{\text{water}} \left( \frac{h}{kT} \right) \right] - \frac{\Delta G_3}{RT}$$

$$\log \left[ \frac{\left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{Ser}}{\left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{Phe}} \right]_{\text{solvent}} = \log \frac{P_{Phe}}{P_{Ser}} + \log \left[ \frac{\left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{Ser}}{\left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{Phe}} \right]_{\text{water}}$$

En este desarrollo  $h, k, P$  y  $P_E$  son la constante de Plank, la constante de Boltzman y los coeficientes de partición de solvente a agua del sustrato y la enzima respectivamente. Para llegar a la ecuación final se ha supuesto que  $\Delta G_{3, Ser} = \Delta G_{3, Phe}$

Esta ecuación final nos permite relacionar la razón de los parámetros de especificidad para dos sustratos en cualquier disolvente con la del agua, siempre que los coeficientes de partición de los dos sustratos sean conocidos. Puesto que el modelo se basa en el análisis termodinámico, que es independiente de la enzima debería ser aplicable a cualquier par enzima-sustrato.

El uso de la ingeniería genética en combinación con la catálisis en medios no acuosos ha resultado ser una poderosa herramienta para alterar la especificidad de sustrato de las enzimas. Wangikar y col.<sup>71</sup> han demostrado que el efecto de mutaciones específicas en el centro activo sobre la especificidad de subtilisina BNP' depende de la naturaleza del medio orgánico. La mutación polar en el centro activo (*Gly166Asn*) redujo 30 veces  $k_{cat}/K_M$  para la transesterificación de N-Ac-L-Ser-OEt con *n*-propanol en acetona. Sin embargo la misma mutación activó la enzima en un factor de 4.5 en hexano. Los autores proponen que el efecto es debido a una significativa estabilización del estado de transición por una mutación polar en un disolvente no polar. Así algunas mutaciones que tienen efectos negativos en medios acuosos mejoran la actividad en medios no acuosos.

Aunque los efectos del medio sobre la especificidad han sido demostrados para las lipasas y proteasas, algunos estudios indican que el fenómeno no está limitado a las enzimas hidrolíticas.

<sup>71</sup> Wangikar, P.P., Graycar, T.P., Estell, D.A. (1993) J. Amer. Chem. Soc., 115, 12231-7

Por ejemplo, la dependencia de  $V_{\max}/K_M$  de peroxidasa de raíz de rábano de la hidrofobicidad de fenoles para-sustituídos en disolventes orgánicos se ha encontrado que es diferente que la correspondiente al agua<sup>72</sup>.

Así como la naturaleza del disolvente tiene efecto inmediato sobre la especificidad, hay otros métodos para alterarla en un disolvente dado. La liofilización de subtilisina y quimotripsina de soluciones acuosas que contengan inhibidores competitivos<sup>73</sup>, no sólo aumenta actividad de la enzima en un factor de 100 sino que también cambia la especificidad. Se sugiere que cuando un ligando enlaza a una enzima en solución acuosa induce cambios conformacionales (análogos a los que producen los reguladores alostéricos) que permanecen durante la liofilización y luego en un determinado disolvente cuando se elimina el ligando.

## 2.-Estereoselectividad

La enantioselectividad, que es quizás el aspecto más atractivo de la catálisis enzimática, surge de la especial habilidad de las enzimas para diferenciar entre los enantiómeros de un par racémico. Esta capacidad se basa en la diferencia de energía libre de los estados de transición diastereoisoméricos para los dos enantiómeros. Aunque la mutagénesis se ha usado<sup>74</sup> para alterar la enantioselectividad de las enzimas, pocos métodos han resultado ser tan versátiles como el uso de disolventes no acuosos<sup>75</sup>. Margolin y col.<sup>76</sup> informaron de la diferencia de enantioselectividad de la subtilisina en disolventes orgánicos con respecto al agua, lo cual les permitió la incorporación de D-aminoácidos en péptidos en condiciones no acuosas. Una investigación mecanicista detallada de este fenómeno<sup>77</sup> reveló que la enantioselectividad de las subtilisinas Carlsberg y BNP', elastasa, proteasa  $\alpha$ -lítica,  $\alpha$ -quimotripsina y tripsina fueron más bajas en medio no acuoso. Además existía una correlación inversa entre la enantioselectividad de la subtilisina en la transesterificación de cloroetilo de N-acetilalanina y propanol y la hidrofobicidad del disolvente, esto es cuanto más alta es la hidrofobicidad del disolvente más baja la enantioselectividad de la enzima. Estos hallazgos fueron racionalizados sobre la base de que la unión del sustrato a la enzima va acompañada de la separación de moléculas de agua del centro activo<sup>78</sup> El enlace "productivo" de D-aminoácidos no implica la incorporación de la cadena lateral en el "bolsillo" hidrofóbico del enzima y así está acompañada de la salida de muy pocas moléculas de agua comparadas con la incorporación del L-isómero. Los autores concluyen que puesto que la salida de moléculas de agua hacia un disolvente hidrofóbico es termodinámicamente desfavorable, la reactividad del L-enantiómero en esos disolventes disminuye en mayor medida que la del D-enantiómero. El modelo predecía que la diferencia en enantioselectividad en agua y disolventes orgánicos debería ser más alta para los sustratos con cadenas laterales voluminosas. Este resultó ser el caso.

<sup>72</sup> Ryu, K., y Dordick, J.S. (1992) *Biochemistry*, 31, 2588-2598

<sup>73</sup> Russell, A.J. y Klibanov, A.M. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 11624-6

<sup>74</sup> Ozaki, S.I. y Ortiz de Montellano, P.R. (1994) *J. AMER. Chem. Soc.* 116, 4487-8

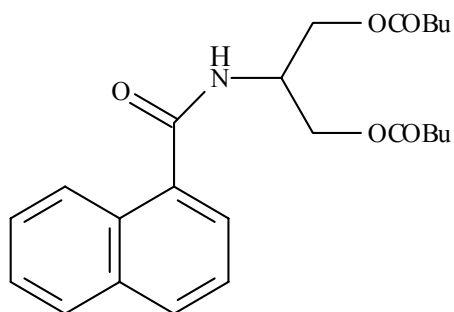
<sup>75</sup> Klibanov, A.M. (1990) *Acc. Chem. Res.*, 23, 114-120

<sup>76</sup> Margolin, A.L., Tai, D-F., y Klibanov, A.M. (1987) *J. Amer. Chem. Soc.*, 109, 7885-7

<sup>77</sup> Sakurai, T., Margolin, A.L., Russell, A.J. and Klibanov, A.M. (1988) *J. Amer. Soc.*, 110, 7236-7237

<sup>78</sup> Dewar, M.J.S. y Storch, D.M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 2225-2229

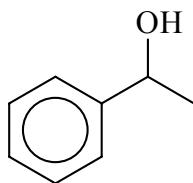
Esta correlación inversa enantioselectividad-hidrofobicidad se encontró también para la esterificación de ácido 2-cloroetilpropiónico con *n*-butanol<sup>79</sup> catalizada por lipasa de *Candida cylindracea* y para la hidrólisis del compuesto I



I

catalizada por lipasa de *Pseudomonas*<sup>80</sup>. En este último caso la selectividad proquiral de la enzima varió desde >30 en acetonitrilo a 2.6 en tetracloruro de carbono. Los autores emitieron la hipótesis de que, en el "modo" estereoselectivo de enlace, el bolsillo hidrofóbico de la lipasa está ocupado por el resto de naftilo. En el "modo" no-estereoselectivo este resto se reparte entre la enzima y el disolvente y así el sustrato diéster puede estar orientado en las configuraciones *pro-R* o *pro-S* con igual probabilidad. Puesto que es termodinámicamente favorable para el residuo de naftilo hidrofóbico estar en el bolsillo hidrofóbico de la enzima cuando se utiliza un disolvente hidrofílico, prevalece en este caso el modo estereoselectivo.

Alternativamente Sakurai y col.<sup>81</sup> encontraron, estudiando la transesterificación del butirato de vinilo con el *sec*-fenetilalcohol II.



II

catalizada por subtilisina, que la correlación enantioselectividad-hidrofobicidad del disolvente era muy pobre. En vez de ello el factor de enantioselectividad  $(k_{cat}/K_M)_S/(k_{cat}/K_M)_R$  correlacionaba bien con el momento dipolar y la constante dieléctrica del medio. Esta disparidad se atribuyó a que los sustratos enlazan a diferentes sitios de la enzima. Así se introdujo un nuevo modelo que explicaba el efecto del disolvente sobre la selectividad para el alcohol. El modelo implicaba la presencia de dos bolsillos en el sitio de enlace de la subtilisina, uno mayor que otro. Los autores sugirieron que el enlace del enantiómero menos reactivo de II

<sup>79</sup> Gubicza, L. Y Kelemen-Hovárth, I. (1993) J. Mol. Catálisis, 84, L27-L32

<sup>80</sup> Terradas, F., Teston-Henry, M., Fitzpatrick, P.A. y Klivanov, A.M. (1993) J. Amer. Chem. Soc. 115, 390-6

<sup>81</sup> Fitzpatrick, P.A., y Klivanov, A.M. (1991) J. Amer. Chem. Soc. 113, 3166-71

creaba un alto impedimento estérico entre el grupo naftilo y el bolsillo pequeño de la enzima. Así una disminución en la rigidez de la proteína que redujera este impedimento estérico aumentaría la reactividad del enantiómero menos reactivo en mayor grado que la del enantiómero más reactivo, ya que este último no está sujeto a impedimentos estéricos. Entonces, puesto que la rigidez de una proteína se debe principalmente a interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno, es más alta en disolventes con baja constante dieléctrica (por ej. dioxano) que en los de alta constante dieléctrica (acetonitrilo). Así, la enantioselectividad en acetonitrilo es más alta.

La validez de este modelo fue sustentada por experimentos de modelización en computador que revelaron que el grupo fenilo del S-enantiómero de II ocupaba el espacio abierto del centro activo mientras que el grupo metilo ocupaba una pequeña cavidad en dicho sitio<sup>82</sup>. El enlace del R -enantiómero fue justamente al contrario.

No obstante aunque los modelos hasta ahora sugeridos explican el efecto del disolvente sobre la enantioselectividad para la subtilisina Carlsberg no son en absoluto universales. Por ejemplo la hidrofobicidad del disolvente tiene un efecto muy minoritario sobre la enantioselectividad de la lipasa pancreática en la transesterificación de butirato de trifluoroetilo con 2-octanol y 1-feniletanol<sup>83</sup>. El factor de enantioselectividad en la transesterificación del 2,2,2-trifluoretil éster de Z-norvalina con metanol catalizada por lipasa de *Pseudomonas* varía desde 1 en DMF (dimetilformamida) hasta 45 en benceno. Sin embargo no se encuentra correlación entre hidrofobicidad de disolvente y selectividad de la lipasa<sup>84</sup>.

Nakamura y col<sup>85</sup> observaron una inesperada correlación, en forma de campana, entre selectividad de lipasa de *Pseudomonas* y hidrofobicidad de los disolventes cuando éstos eran separados en dos grupos: cíclicos y acíclicos. Para explicar el diferente comportamiento de los disolventes cíclicos y acíclicos, los autores sugirieron que la interacción en el sitio activo entre enzima y disolvente afectaba a la enantioselectividad de la lipasa. Por término medio las moléculas cíclicas son más voluminosas que las acíclicas y por tanto el volumen molar del disolvente debía ser tenido en cuenta. De hecho se obtuvo una buena correlación entre enantioselectividad y volumen molar<sup>86</sup>.

Bovara y col.<sup>87</sup> y Secundo y col.<sup>88</sup> informaron acerca de la transesterificación de (±)-*trans*-sobrerol (III), (±)-sulcatol (IV) y (±)-3-bromo-5-hydroximetil isoxazolin (V) catalizada por lipasa PS.

<sup>82</sup> Fitzpatrick, P.A., Ringe, D., y Klibanov, A.M. (1992) *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 735-742

<sup>83</sup> Kanerva, L.T., Vihanto, J. y Halme, M.H. (1990) *Acta Chem. Scand.*, 44, 1032-5

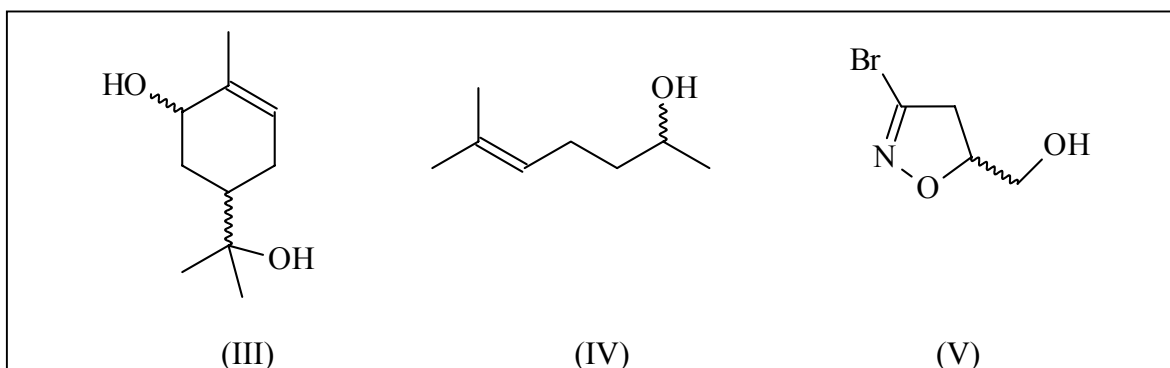
<sup>84</sup> Miyazawa, T., Mio, M. Y Watanabe, Y. (1992) *Biotechnol. Lett.* 14(9), 789-794

<sup>85</sup> Nakamura, K., Takebe, Y., Kitayama, T., y Ohno, A. (1991) *Tetrahedron Lett.*, 32(37), 4941-4

<sup>86</sup> Nakamura, K., Kinoshita, M., y Ohno, A. (1994) *Tetrahedron*, 50(16), 4681-4690

<sup>87</sup> Bovara, R., Carrea, G., Ferrara; L. Y Riva, s. (1991) *Tetrahedron: Asymmetry*, 2 (9), 931-8

<sup>88</sup> Secundo, F., Riva, S. Y Carrea, G. (1992) *Tetrahedron: Asymmetry*, 3(2), 267-280



Los resultados mostraron que la razón enantiomérica variaba desde 500 en *ter*-amilalcohol hasta 69 en THF pero no había correlación entre enantioselectividad y hidrofobicidad o constante dieléctrica del medio.

La enantioselectividad de la lipasa de páncreas de porcino (PPL) en la acilación de (IV) estaba muy poco influenciada por la naturaleza del disolvente y por la del agente acilante. Interesantemente, mientras que la  $V_{\max}$  para la acilación de (IV) era similar en todos los disolventes ensayados los valores de  $K_M$  aumentaron con la polaridad del disolvente<sup>88</sup>. No se ha dado ninguna explicación a este fenómeno. Los autores reconocieron que aunque la enantioselectividad de PPL y la lipasa PS, estaba influenciada por el disolvente, el resultado estereoquímico de la reacción no podía ser predicho únicamente sobre la base de las propiedades fisicoquímicas del disolvente: la tendencia variaba para un sustrato dado en función de la enzima, y para una enzima dada en función del sustrato. De manera similar a Nakamura<sup>86</sup>, los autores sugirieron que la selectividad del enzima estaba controlada, al menos en parte, por interacciones locales e inespecíficas entre el disolvente y la enzima que afectan a la reactividad de un enantiómero en mayor grado que al otro.

Para evaluar el efecto de la geometría del disolvente sobre la actividad, enantio- y regioselectividad de los enzimas Ottolina y col.<sup>89</sup> ensayaron varias lipasas y proteasas en dos disolventes enantioméricamente puros, (R)- y (S)-carvona. Aunque la actividad de todos los enzimas ensayados dependía de la configuración del disolvente, no se observó ninguna variación significativa en la regio- y enantioselectividad de las enzimas.

La magnitud del efecto del medio de reacción sobre la enantioselectividad de las enzimas fue revelada por Tawaki y Klivanov<sup>90</sup>, quienes demostraron que la preferencia enantiomérica de la proteasa de *Aspergillus oryzae* podía ser invertida por el medio de reacción. Mientras la transesterificación del cloroetil éster de *N*-acetil-fenilalanina con propanol en disolventes hidrofílicos tales como acetonitrilo, DMF y piridina fue más rápido para el L-enantiómero, lo contrario fue cierto en disolventes hidrofóbicos tales como tolueno, octano, y tetracloruro de carbono. Los autores explicaron este fenómeno sobre la base de dos modos alternativos de enlace del L- y el D- enantiómero: en el "modo productivo" el L-enantiómero enlaza al enzima de tal manera que el grupo bencilo está sobre el bolsillo hidrofóbico de la enzima. Por el contrario, el D-isómero, con objeto de colocar el enlace hidrolizable en la posición adecuada orienta el

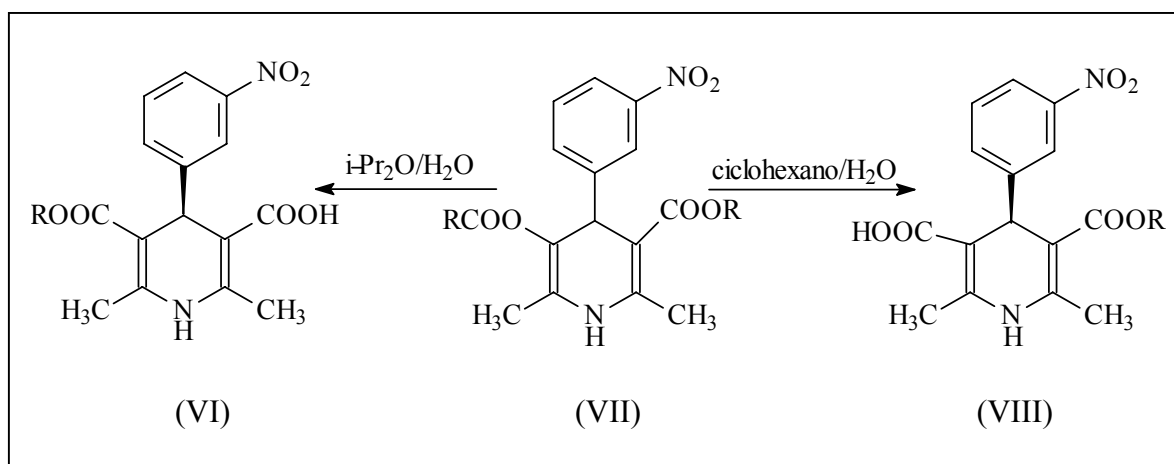
<sup>89</sup> Ottolina, G., Bovara, R. y Riva, S. (1994) *Biotechnol. Lett.* 14(10), 947-952

<sup>90</sup> Tawaki, S. Y Klivanov, A. M. (1993) *Biocatalysis*, 8, 3-19

grupo bencilo hacia el disolvente. Lógicamente, si este disolvente es hidrofóbico, la hidrólisis será más rápida para el D-enantiómero.

También fue observada inversión de la enantioselectividad para la esterificación de derivados del ácido fenilpropiónico catalizada por lipasa de *Candida cylindracea*<sup>91,92</sup>. El producto con la configuración R se obtenía (ee 84-86%) en tetracloruro de carbono, mientras que la acetona y el acetonitrilo favorecían la configuración S (ee 16%). Los autores dieron la hipótesis de que los cambios en la conformación de la enzima causados por interacción directa con los disolventes eran los responsables de la inversión de la enantioselectividad.

Para la lipasa de *Pseudomonas* se ha observado un importante cambio en la estereoselectividad de la hidrólisis de derivados de la 1,4-dihidropiridina (VII)<sup>93</sup>



Cuando se usa isopropiléter como medio de reacción se obtiene el producto en la configuración S (VI) con un 87 % de rendimiento y >99% ee. Sin embargo cuando la hidrólisis se lleva a cabo en ciclohexano saturado con agua, se obtiene el isómero R (VIII) con un 88 % de rendimiento y 89% ee. Puesto que la hidrofobicidad de los dos disolventes es similar, parece poco probable que la inversión de la enantioselectividad se deba a una diferencia en el reparto del sustrato entre la enzima y el disolvente. Los autores atribuyen el cambio a la interacción directa de la enzima con el disolvente.

La mayoría de los trabajos sobre el efecto del agua sobre la selectividad de las enzimas en medios orgánicos, indican que la enantioselectividad de aquéllas aumenta con el contenido en agua del medio<sup>94,95,79,96,97</sup>. Aunque no se ha dado ninguna explicación a este fenómeno, puede argumentarse que dado que en la mayoría de los casos el aumento en enantioselectividad va acompañado de un aumento en la velocidad de la reacción, la adición de agua alivia las

<sup>91</sup> Wu, S.-H., Chu, F.-Y., y Wang, K.-T. (1991) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1(7), 339-342.

<sup>92</sup> Uejí, S., Fujino, R. y Okubo, S.I. (1992) *Biotechnol. Lett.*, 14(3), 163-8

<sup>93</sup> Hirose, Y., Kariya, K. y Sasaki, I. (1992) *Tetrahedron Lett.*, 33(47), 7157-7160

<sup>94</sup> Bodnár, J., Gubizca, L y Szabó, L.-P. (1990) *J. Molec. Catal.*, 61, 353-361

<sup>95</sup> Kitaguchi, H., Itoh, I. Y Ono, M. (1990) *Chem. Lett.*, 1203-6

<sup>96</sup> Högberg, H.-E., Edlund, H., Berglund, P y Hedeström, E. (1993) *Tetrahedron: Asymmetry*, 4(10), 2123-6

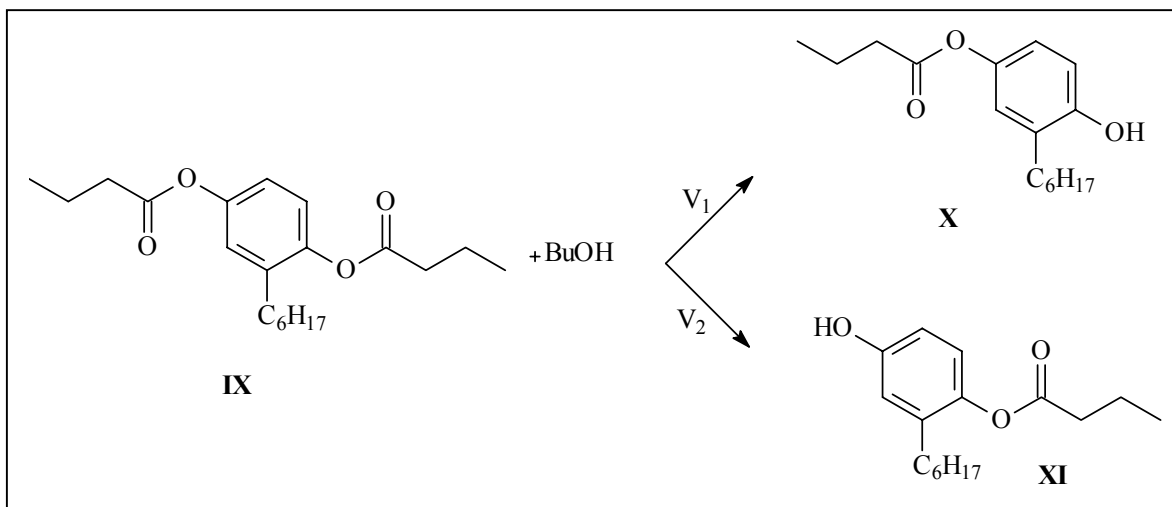
<sup>97</sup> Arroyo, M. Y Sinisterra, J.V. (1994) *J. Org. Chem.*, 59, 4410-7



interacciones desfavorables enzima-disolvente y restaura la conformación nativa, inherentemente más selectiva.

### 3.-Regioselectividad. La influencia del disolvente

Hay algunos trabajos sobre la influencia del medio en la regioselectividad de las enzimas. Rubio y col.<sup>98</sup> encontraron que la relación de velocidades ( $v_1/v_2$ ) para la transesterificación de (IX) con butanol, catalizada por lipasa de *Pseudomonas cepacia* difería significativamente en disolventes orgánicos.



Existe una buena correlación entre el factor de regioselectividad  $(k_{cat}/K_M)_1/(k_{cat}/K_M)_2$  y el parámetro de hidrofobicidad del disolvente,  $\log P$ . Para explicar este hallazgo, los autores sugieren que la lipasa tiene un surco hidrofóbico en la vecindad del sitio catalítico. Si el enlace de (IX) ocurre de tal manera que el radical octilo ocupa el surco hidrofóbico el grupo butirilo proximal se coloca en el sitio catalítico y se obtiene (X). Alternativamente el grupo butirilo distal puede quedar en la vecindad del centro activo, lo que conduciría a la formación de (XI). Para un disolvente hidrofóbico no existe la ventaja termodinámica de que el radical octilo se aloje en el surco hidrofóbico de la enzima y así se obtendría (XI) en ese tipo de disolvente. En un disolvente hidrofílico, el radical octilo prefiere el surco hidrofóbico de la enzima lo que conduce a la formación de (X).

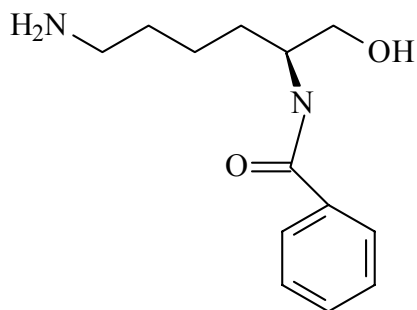
### 4.-Quimioselectividad

La quimioselectividad, esto es, la capacidad para distinguir entre grupos funcionales distintos, es también una propiedad de las enzimas que puede estar influenciada por el medio. Chinsky y col.<sup>99</sup> informaron que la acilación de 6-amino-1-hexanol catalizada por lipasa de *Aspergillus niger* se producía preferentemente sobre el grupo hidroxilo. Esta inesperada selectividad que es la contraria a la de la reacción química permitió a los autores obtener una serie de monoésteres de aminoalcoholes con buen rendimiento, sin tener que recurrir a los

<sup>98</sup> RubioE., Fernández-Mayorales, A. y Klivanov, A. M. (1991) J. Amer. Chem. Soc., 113, 695-6

<sup>99</sup> Chinsky, N., Margolin, A.L. y Klivanov, A.M. (1989) J. Amer. Chem. Soc., 111, 386-8

grupos protectores. Tawaki y Klivanov<sup>90</sup> continuaron el estudio e informaron que la quimioselectividad de las enzimas puede estar influenciada por el medio de reacción. La butirilación de una serie de aminoalcoholes en una variedad de disolventes orgánicos reveló que la razón de velocidades de *O*- a *N*- acilación era marcadamente dependiente del disolvente. Por ejemplo, la quimioselectividad de la lipasa de *Pseudomonas* en la acilación *N*- $\alpha$ -benzoil-lisinoil (XII) con butirato de fluoroetilo varió desde 1.1 en *tert*-butil alcohol a 21 en 1,2-dicloroetano, siendo el grupo hidroxilo mas reactivo que el grupo amino en todos los disolventes ensayados.



(XII)

Sorprendentemente, en los mismos disolventes la lipasa de *Mucor meihei* exhibía preferencia por el grupo amino, con la quimioselectividad variando 18 veces. En este caso se observó una correlación entre quimioselectividad de la lipasa y capacidad para formar enlaces de hidrógeno: mientras la enzima catalizaba la acilación del grupo hidroxilo de los aminoalcoholes en los disolventes con baja tendencia a formar enlaces de hidrógeno, exhibía una fuerte preferencia por los grupos amino en los disolventes con alta tendencia a formar enlaces de hidrógeno. Los autores razonaron que para llevar a cabo un ataque nucleofílico sobre el intermediario acil-enzima los grupos nucleofílicos deben estar libres de enlaces de hidrógeno. Puesto que el grupo hidroxilo tiene una tendencia mayor a formar estos enlaces, se desactiva en mayor grado que el grupo amino en los disolventes que propicien enlaces de hidrógeno. De esta manera la acilación en estos disolventes va hacia el grupo amino.

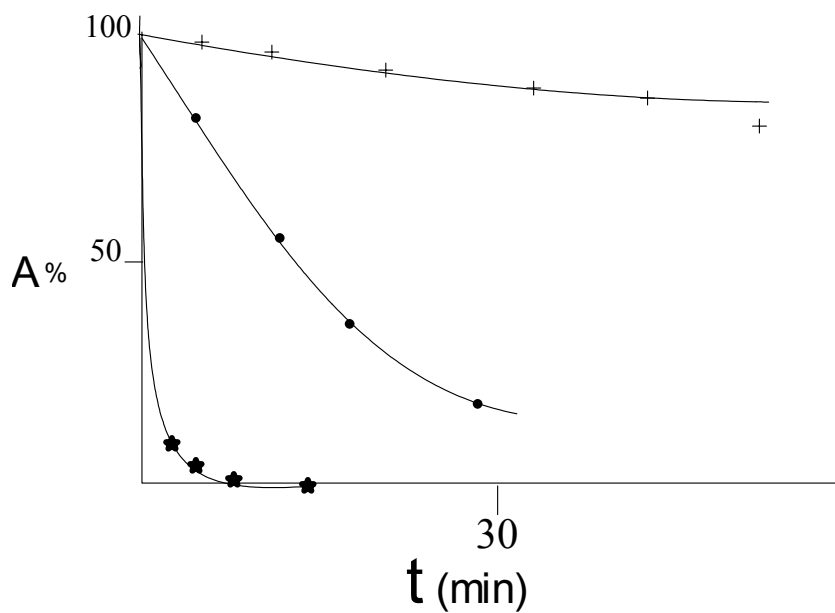
### 5.-Estructura y estabilidad de las enzimas en medios orgánicos

Varios estudios han indicado que enzimas tan diversas como PPL<sup>100</sup>, quimotripsina<sup>101</sup>, ribonucleasa y lisozima<sup>102</sup> son más termoestables en disolventes orgánicos que en agua. Por ejemplo, PPL permaneció activa durante muchas horas (vida media más de 12 horas) cuando se incubó a 100°C en una mezcla casi anhidra de heptanol y tributirina (Figura 1)<sup>100</sup>

<sup>100</sup> Zaks, A. y Klivanov, A.M.(1984) Science, 224, 1249-51

<sup>101</sup> Reslow, M., Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. (1987) Appl. Microbiol. Biotechnol., 26, 1-8

<sup>102</sup> Volkin, D.B., Staubli, A., Langer, R. y Klivanov, A.M. (1991) Biotechnol. Bioeng., 37, 843-853



**Figura 1.- Caída de la actividad de PPL (polvo seco) a 100°C en agua o tampón fosfato 0.1M (●) y en una solución 2M de heptanol en tributirina conteniendo el 0.8% (●) o 0.015% (+) de**

La estabilidad más baja se observó en presencia de 0.8% p/v de agua, mientras que la inactivación fue casi instantánea en tampón o agua. Esta alta estabilidad térmica de las enzimas en disolventes orgánicos, especialmente en los hidrofóbicos y a bajo contenido en agua, se atribuyó a un aumento de la rigidez conformacional y la ausencia de casi todas las modificaciones covalentes que dan lugar a la termoinactivación irreversible en agua<sup>102</sup>.

Debe mencionarse que, como se ha demostrado por espectroscopia FTIR de lisozima y subtilisina, la estructura de un enzima es mucho más similar a la nativa en disolventes orgánicos puros como acetonitrilo, THF y 1-propanol que en mezclas agua-disolvente<sup>103</sup>. Este comportamiento es debido a la inherente restricción de la movilidad conformacional de la enzima en medios anhidros en contraste con las mezclas agua-disolventes orgánicos.

Las estructuras cristalinas obtenidas de Rayos X han permitido obtener una imagen directa de las conformaciones de subtilisina en acetonitrilo y  $\gamma$ -quimotripsina en hexano.<sup>104</sup> La estructura de la subtilisina en acetonitrilo es esencialmente idéntica a la estructura tridimensional de la enzima en agua; las diferencias observadas han resultado ser menores que las que se observan entre dos estructuras obtenidas independientemente en solución acuosa. La  $\gamma$ -quimotripsina cristalina retenía su conformación en hexano y podía catalizar tanto reacciones de hidrólisis como de síntesis. Sin embargo, la movilidad disminuía y la conformación de las cadenas laterales cambiaba. Un estudio de intercambio isotópico con NMR de alta resolución ha mostrado también que la estructura del inhibidor de la tripsina de páncreas de bovino es muy

<sup>103</sup> Griebenov, K. Y Klibano, A.M. (1996) J. Amer. Chem. Soc., 118, 11695-11700

<sup>104</sup> Fitzpatrick, P.L., Steinmetz, A.C.U., Ringe, D. y Klibanov, A.M. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 8653-7

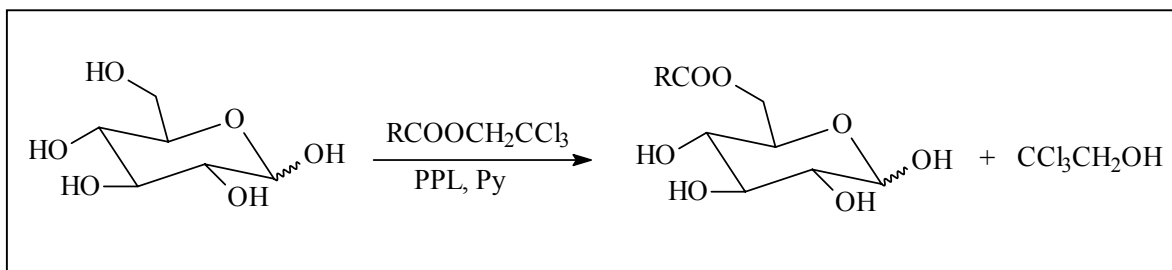
poco afectada por disolventes tales como acetonitrilo, THF, acetato de etilo, y butanol<sup>105</sup>. Además, el análisis de Hammett, un método que da información sobre los estados de transición de las reacciones, ha revelado que el estado de transición de una reacción catalizada por subtilisina es el mismo en agua que en disolventes orgánicos<sup>106</sup>.

### Regioselectividad de hidrolasas

Según la definición de la IUPAC, "una reacción regioselectiva es aquella en la cual la rotura o formación de un enlace ocurre en una determinada dirección preferentemente sobre todas las demás posibles"<sup>107</sup>. En 1985<sup>108</sup> Klivanov publicó la acilación regioselectiva de glicoles alifáticos sencillos usando lipasa pancreática como catalizador. Desde entonces esta metodología ha sido usada profusamente para una gran variedad de sustratos y bajo varias condiciones, que revisamos a continuación.

#### 1.-Carbohidratos.-

La polaridad de la mayoría de estas moléculas restringe mucho la elección del disolvente, muy frecuentemente limitada a piridina, DMF, o dimetilacetamida. Consecuentemente sólo pueden usarse aquellas enzimas que retengan su actividad en disolventes tan polares. Tales limitaciones afectan también a la naturaleza del agente acilante<sup>109</sup>. Generalmente los anhídridos son demasiado activos en disolventes apróticos y dan lugar a acilaciones inespecíficas no enzimáticas. A veces ocurre esto mismo para los vinilésteres, cuando se usan en un gran exceso en disolventes tales como piridina y DMF. En un primer trabajo<sup>110</sup> aplicado a los carbohidratos, se encontró que la lipasa pancreática catalizaba las esterificaciones regioselectivas de monosacáridos en piridina.



Las reacciones se llevaron cabo a escala de multigramos usando ésteres de 2,2,2-tricloroetilo ácidos alifáticos lineales como dadores de acilo.

Para ampliar el espectro de enzimas que pudieran emplearse en la acilación de monosacáridos, Wang<sup>111</sup> sugirió el uso de mezclas de disolventes para lograr buenas actividades de la lipasa y buenas solubilidades de los sustratos. Por ejemplo una mezcla benceno-piridina (2:1) fue útil

<sup>105</sup> Desai, U.R. y Klivanov, A.M., J. Amer. Chem. Soc. (1995), 117, 3940-5

<sup>106</sup> Pasta, P., Riva, S., Carrea, G., FEBS Lett. (1988), 236, 329-332

<sup>107</sup> Muller, P. (1994) Pure Appl. Chem., 66, 1077-1184

<sup>108</sup> Cesti, P., Zaks, A. y Klivanov, A.M. Appl. Biochem. Biotechnol., 11, 401-7

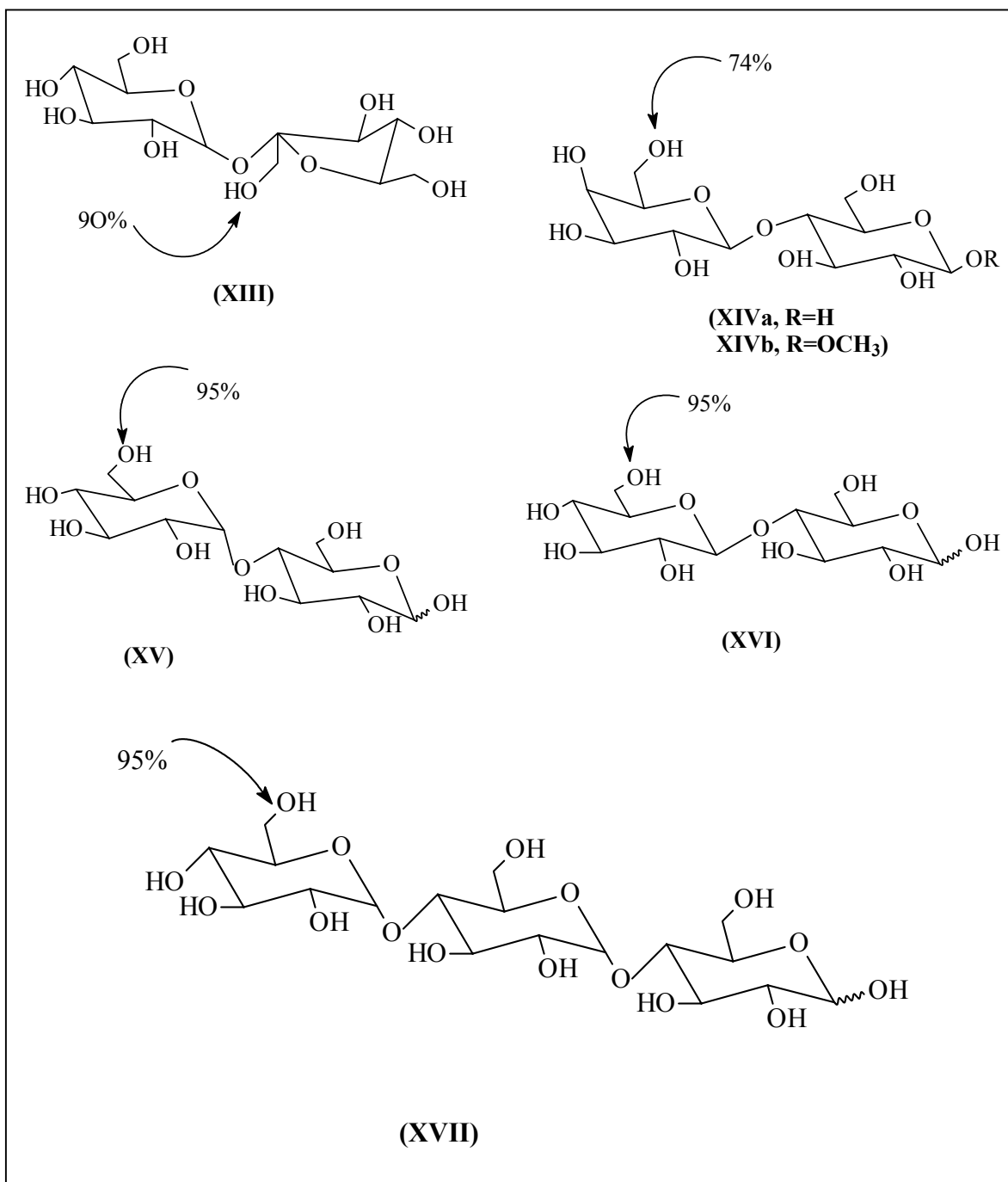
<sup>109</sup> Riva, S., y Secundo, F. (1990) Chimica Oggi. (6) 9-16

<sup>110</sup> Therisod, M. Y Klibaabov, A.M. (1986) J. Amer. Chem. Soc, 108, 5638-40

<sup>111</sup> Wang, Y.F., Lalonde, J.J. y Momongan, M. (1988), J. Amer. Chem. Soc., 110, 7200-5

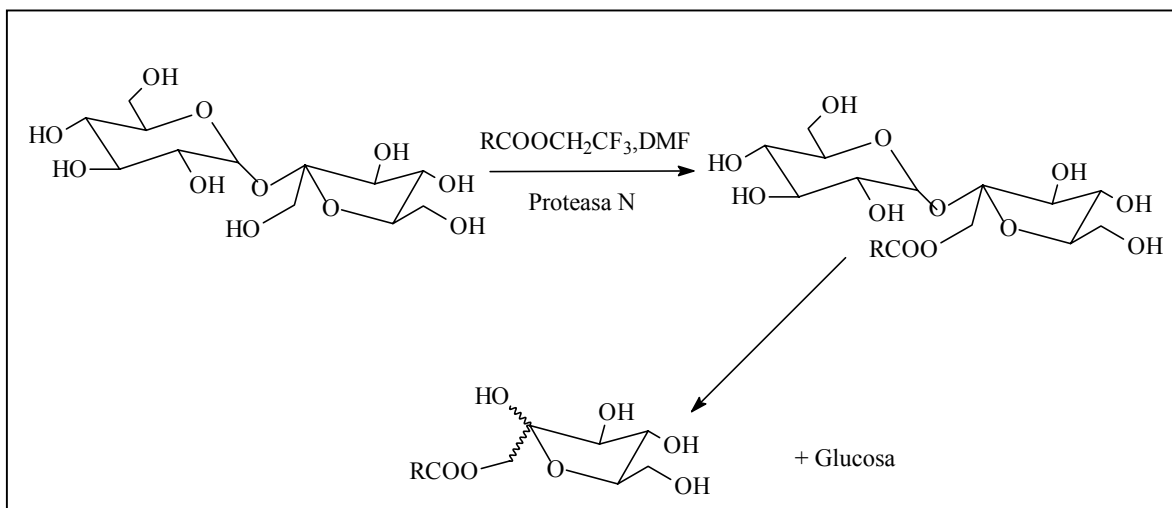
para la catálisis, por lipasa de *Candida cylindraceae*, de la acilación selectiva del hidroxilo en 6 de diferentes azúcares con acetato de vinilo.

Posteriormente, Riva<sup>112</sup> sugirieron el uso de otro tipo de hidrolasas, en concreto proteasas. Se encontró que la subtilisina, una proteasa de *Bacillus licheniformis* era estable y activa en numerosos disolventes, incluyendo piridina y dimetilformamida. De este modo se obtuvieron, a escala preparativa una serie de ésteres primario de monobutanoilo de mono- di- y oligosacáridos.



<sup>112</sup> Riva, S., Chopineau, J. y Kieboom, A.P.G. (1988) J. Amer. Chem. Soc., 110, 584-9

En el caso de la sacarosa (**XIII**) se observó la esterificación del OH en 1', el menos reactivo de los hidroxilos primarios. Como continuación a este trabajo Carrea y col<sup>113</sup> llevaron a cabo una investigación sistemática de la utilidad del método para la síntesis de una serie de ésteres de la sacarosa en el 1'-OH con grupos acilo de diferentes tipos y tamaños. Estos compuestos podían ser fácilmente convertidos, vía hidrólisis catalizada por  $\alpha$ -glucosidasa en la correspondiente 1-*O*-acil fructosa:



La discriminación regioselectiva de grupos hidroxilo secundarios es aún más interesante desde el punto de vista sintético. El primer trabajo sobre este tema fue también publicado por el grupo de Klivanov<sup>114</sup>. Por ejemplo, cuando se usa 6-*O*-butanoil-glucosa como sustrato de la lipasa de *Chemobacterium viscosum* en THF, esta enzima tiene una marcada preferencia por el hidroxilo en la posición 3, mientras que la lipasa pancreática dirige su acción hacia el OH en 2. Se obtienen los mismos resultados cuando el OH primario en 6 se protege con tritil éter o con *t*-butil-difenil-sililéter. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente.

6- <i>O</i> -butanoil azúcar	Relación 3,6/2,6- di- <i>O</i> -butanoilo			
	Lipasa Pancreática	PPL	C.cylindr Lipasa	Aspergillus Lipasa
Glucosa	>50	0.1	0.4	<50

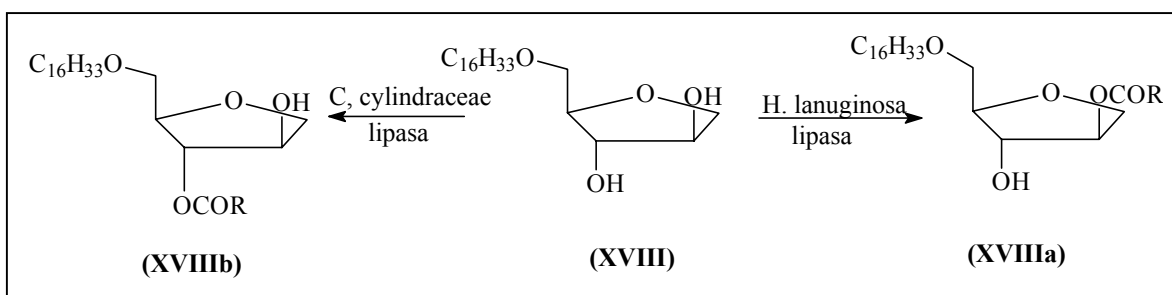
<sup>113</sup> Carrea, G., Riva, S., y Secundo, F. (1989) J. Chem. Perkin Trans. I. 1057-61

<sup>114</sup> Therisod, M. y Klivanov, A.M. (1987) J. Amer. Chem. Soc., 109, 3977-3981

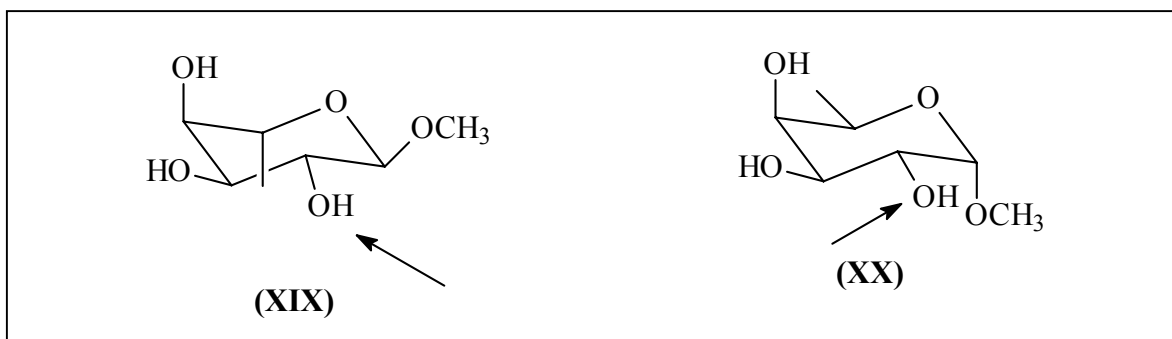
<b>Galactosa</b>	<b>1.5</b>	<b>1.5</b>	<b>0.5</b>	<b>4.9</b>
<b>Manosa</b>	<b>4.0</b>	<b>0.7</b>	<b>2.0</b>	<b>1.5</b>

El punto más llamativo es la posibilidad de modular la posición de acilación simplemente cambiando el origen de la lipasa.

De manera análoga, Riva y col<sup>115</sup> informaron de un interesante ejemplo de complementariedad en la acilación por diferentes lipasas. La esterificación enzimática de 1,4-anhidro-5-*O*-hexadecil-D-arabinitol (XVIII) en benceno dio lugar a los productos (XVIIIa ó XVIIIb):



Los resultados obtenidos por Ronchetti y col<sup>116</sup> fueron asimismo muy interesantes. Ellos compararon la acilación catalizada por tres lipasas diferentes de metil-6-deoxy-piranosidos pertenecientes a series estéricas opuestas. Dos azúcares, el D-fucosido (XIX) y el L-ramnósido (XX) fueron los mejores sustratos.



Estos resultados se explicaron, sugiriendo que la orientación del azúcar en el centro activo de las lipasas estaba determinado por los tres grupos hidroxilos secundarios. Como se indica en la

<sup>115</sup> Nicotra, F., Riva, S y Secundo, F. (1989) Tetrahedron Lett., 30, 1703-4

<sup>116</sup> Ciuffreda, P., Colombo, D. Y Ronchetti, F. (1990) J. Org. Chem. 55, 4187-4190

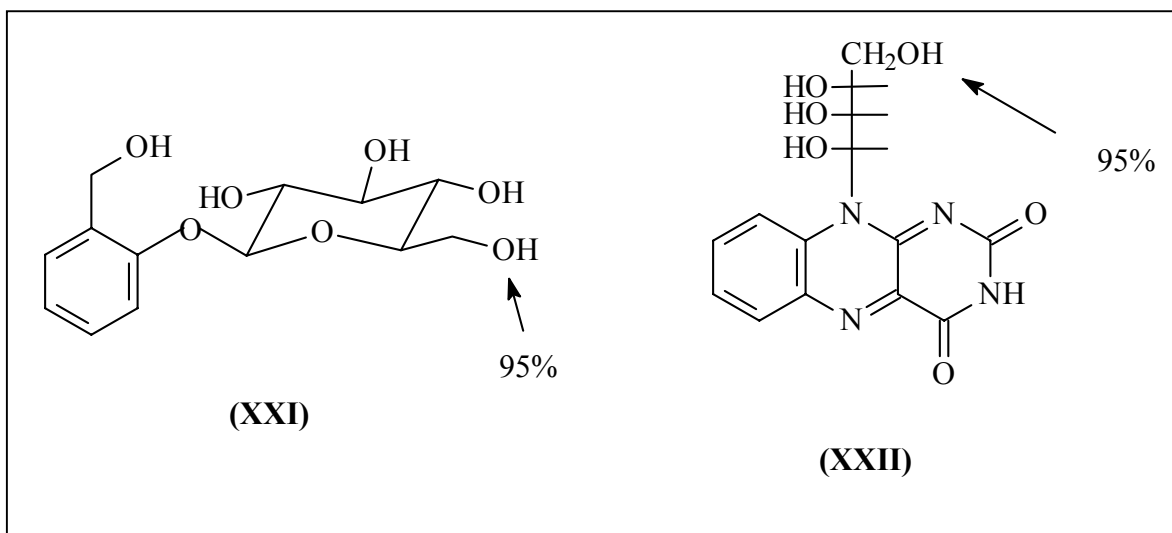
figura anterior, (XIX) y (XX) poseen la misma secuencia, axial-ecuatorial-axial, y entonces la acilación tiene lugar en el mismo extremo de este triplete. Se obtienen resultados similares los azúcares "padre", metil- $\alpha$ -galactopiranosidos y metil- $\alpha$ -manopiranosidos, previamente protegidos en sus hidroxilos primarios<sup>117</sup> y con los correspondientes glucopiranosidos y 6-deoxiglucopiranosidos<sup>118</sup>.

Bashir y col.<sup>119</sup> han hecho una revisión muy completa de la esterificación y de-esterificación enzimática de carbohidratos.

## 2.-Glicósidos de productos naturales

Los glicósidos de varias clases de productos naturales se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, y frecuentemente aparecen esterificados con grupos alifáticos y aromáticos (principalmente acetato, malonato, p-cumarato, y ferulato) en grupos hidroxilo específicos de sus anillos de azúcar. Muchas de estas moléculas son bioactivas. En la naturaleza la formación de estos ésteres es el último paso en el proceso biosintético y es catalizado por diferentes aciltransferasas. Estas enzimas muestran relativa flexibilidad hacia el grupo acilo pero son estrictamente selectivas para el sustrato a ser esterificado. Además se requieren cantidades estequiométricas del correspondiente acil-CoA y por todo ello estas enzimas no son muy útiles para la síntesis *in vitro* de laboratorio.

En uno de los artículos antes mencionados Klivanov y col.<sup>112</sup> informaron de que la subtilisina era también capaz de acilar glucosidos naturales regioselectivamente. La reacción fue llevada a cabo en cuatro sustratos modelo: salicina (XXI), riboflavina (XXII), y los nucleosidos adenosina (XXIII) y uridina (XXIV).

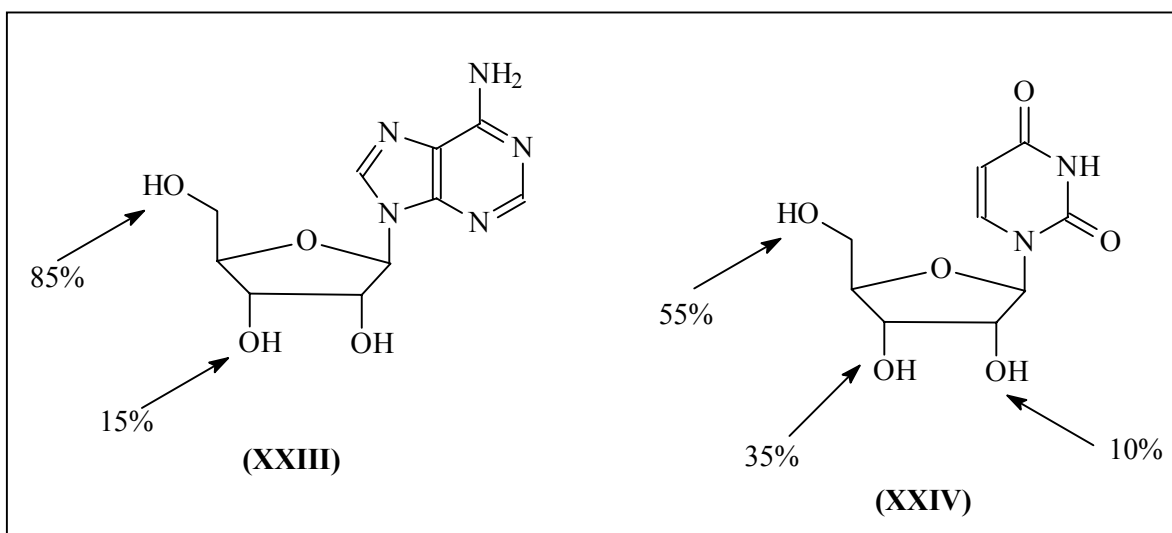


<sup>117</sup> Colombo, D., Ronchetti, F., y Toma, L. (1991) Tetrahedron, 47, 103-110

<sup>118</sup> Colombo, D. Ronchetti, F. Y Scala, A. (1992) J. Carbohydr. Chem., 11, 89-94

<sup>119</sup> Bashir, N. B., Phytian, S.J., Reason, A.J. y Roberts, S.M. (1995), J. Chem. Perkin. Trans. I, 2203-2222

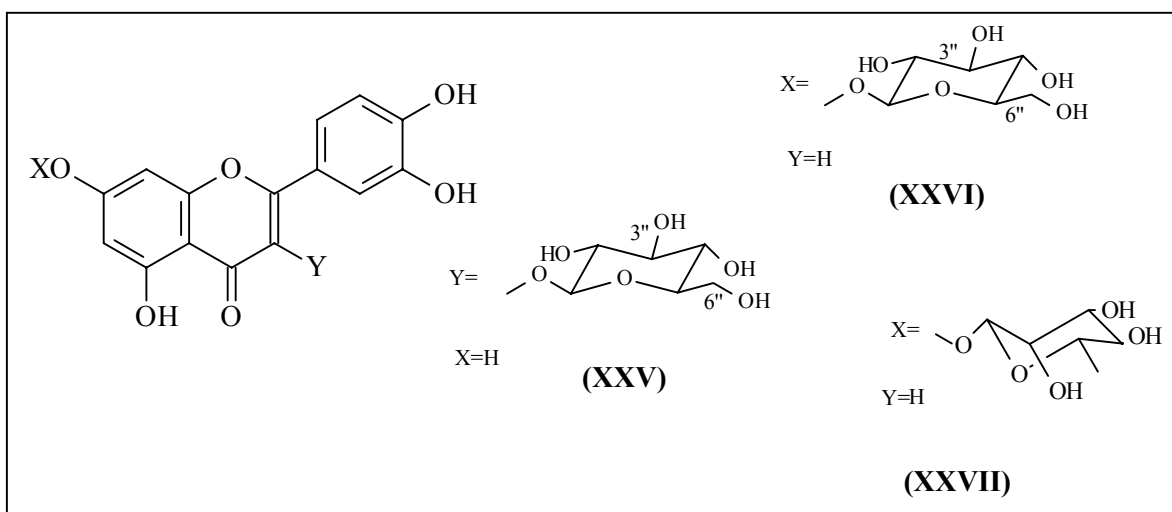




La subtilisina no solo mostró regioselectividad dentro del anillo glicosídico sino de éste con respecto a los grupos funcionales de la aglicona.

### 2.1.- Glicósidos de flavonoides.

Éstas sustancias y sus ésteres son un importante grupo de productos naturales que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. En un primer trabajo Danieli y col.<sup>120</sup> aplicaron la metodología usual (subtilisina suspendida en una disolución del sustrato en piridina y butanoato de trifluoroetilo) a tres flavonoles monoglicosidos: isoquercetina (XXV), luteolina-7-glucosido (XXVI) y quercitrina (XXVII),

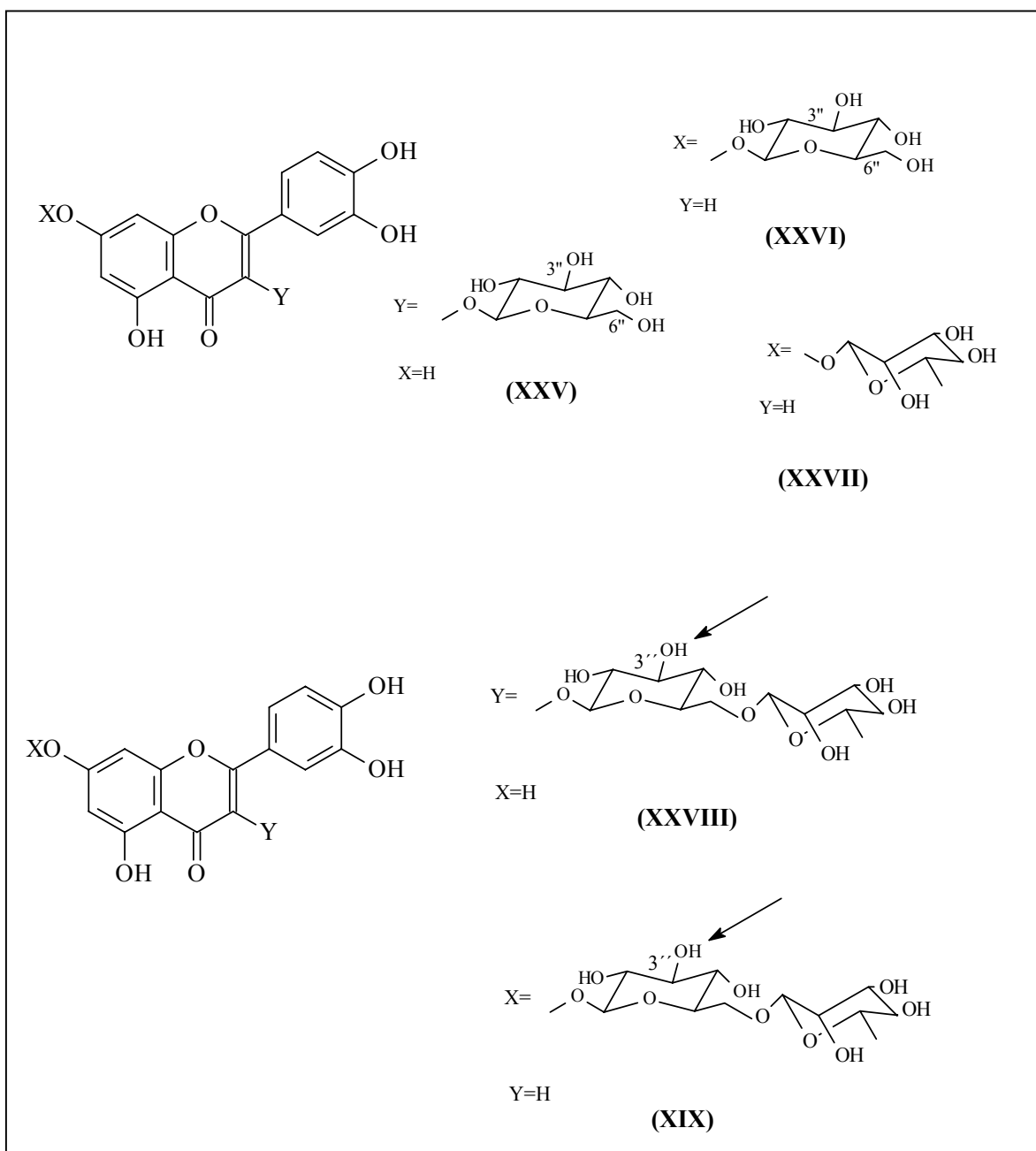


Los dos glucósidos (XXV) y (XXVI), fueron acilados para dar los correspondientes 6''-*O*-butanoatos, junto con pequeñas cantidades de 3''-*O*-mono y 3',6''-*O*-dibutanoatos-. El ramnósido (XXVII) no reaccionó en absoluto.

En un trabajo posterior<sup>121</sup> se consideraron glicósidos de flavonoles más complejos con disacáridos como rutina (XXVIII) y hesperidina (XIX),

<sup>120</sup> Danieli, B., DeBellis, P., y Carrea, G. (1989), *Heterocycles*, 29, 2061-4

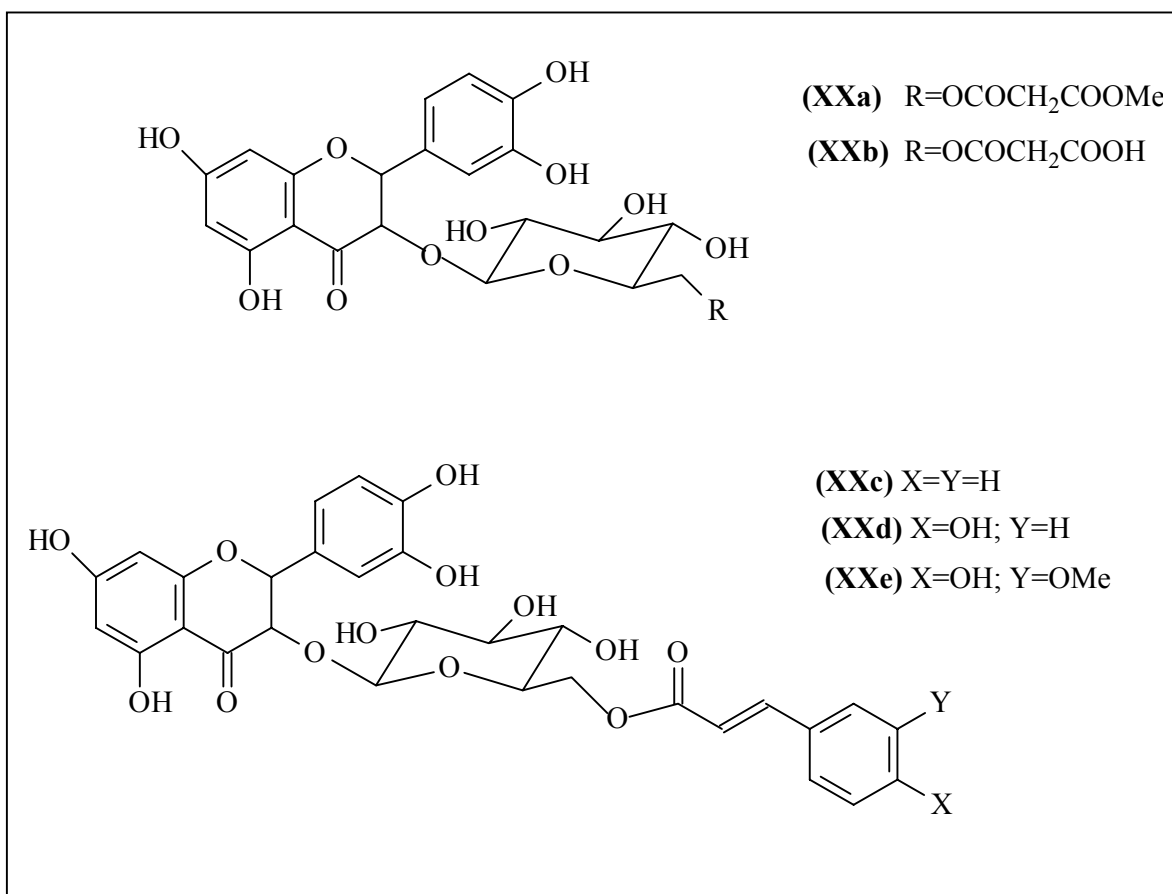
<sup>121</sup> Danieli, B., Bertario, A. y Carrea, G. (1990) *Helv. Chim. Acta*, 73, 1837-1844



Los resultados fueron particularmente curiosos dado que la posición acilada fue la 6'' en los dos casos.

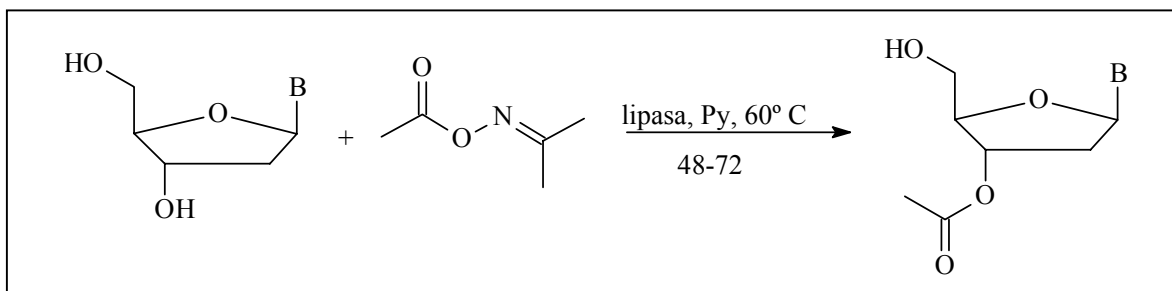
Posteriormente los mismos autores<sup>122</sup> abordaron la síntesis quimioenzimática de fenilpropeonatos (cinamato, cumarato, ferulato) de la flavona (XX). Los productos (XXc-XXe) se obtuvieron a partir de la introducción inicial del residuo de metilmalonato en el 6''-OH catalizada por subtilisina, hidrólisis enzimática selectiva del diéster mixto (XXa) por la acción de biophina esterasa y condensación de Knoevenagel del monoéster malónico (XXb) con los aldehídos aromáticos apropiados.

<sup>122</sup> Danielli, B., Bertario, A. y Carrea, G. (1993) *Helv. Chim. Acta*, 76, 2981-2991



## 2.2.- Nucleosidos.

Esta área fue cuidadosamente investigada por Gotor y Moris<sup>123</sup>. Usando ésteres de oxima como dadores de acilo irreversibles y lipasa obtuvieron la acilación regioselectiva de 2'-deoxinucleosidos en el grupo alcohólico secundario, en vez de en el grupo hidroxilo primario químicamente más reactivo.



## 2.3.- Agliconas.

En casi todos los casos la acilación tiene lugar sobre el residuo de azúcar. Sin embargo hay dos ejemplos descritos para la acilación en la aglicona<sup>124,125</sup>

<sup>123</sup> Gotor, V. y Moris, F. (1991) Síntesis, 626-8

<sup>124</sup> Evidente, A., Fujii, T. and Iacobellis, N. S. (1991) Phytochemistry, 30, 3505-3510

## 2.4.- Otros polioles.

Evidentemente la habilidad de las hidrolasas para discriminar entre grupos hidroxilo no se limita a los azúcares y glicósidos. Ciclitoles, esteroides, alcaloides, etc han sido sustratos para las hidrolasas, en reacciones del tipo de las que estamos tratando. Para una revisión véase Riva<sup>126</sup>. Este mismo autor hace un resumen en una revisión<sup>127</sup> posterior según el cual las proteasas y lipasas han sido utilizadas para,

- (1) Catalizar un paso de protección en una síntesis quimioenzimática de derivados de azúcar. Por ejemplo la esterificación catalizada por subtilisina de lactósidos ha sido utilizada para un abordaje quimioenzimático al 6'-deoxi-6'-fluoro- y 6-deoxi-6-fluoro-lactosidos<sup>128</sup>.
- (2) Sintetizar ésteres específicos de glicósidos naturales. Por ejemplo, se ha descrito la obtención de ésteres malónicos de glicósidos de flavonoides tales como isoquercetina, rutina y naringina<sup>129</sup>
- (3) Aumentar el conocimiento básico de la selectividad de las hidrolasas. El control de la regioselectividad catalizada por enzimas ha sido estudiada<sup>130</sup> usando la acilación de la sacarosa con ésteres de vinilo como reacción modelo.
- (4) La producción en gran escala de acrilatos de azúcar, monómeros asequibles para la producción de nueva hidrogel poliméricos<sup>131</sup>
- (5) La producción en gran escala de nuevos biosurfactantes<sup>132</sup>

---

<sup>125</sup> Colombo, D., Ronchetti, F. and Scala, A. (1994) *Tetrahedron: Asymmetry*, 5, 1377-1384

<sup>126</sup> Riva, S, en *Enzymatic Reactions in Organic Media* (Ed. A.M.P. Koshinen, A.M. Klibanov), Blackie Academic & Professional, London, 1996), pp 140-169

<sup>127</sup> Carrea, G. and Riva, S. (2000) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, 2226-2254

<sup>128</sup> Cai, S., Hakomori, S. and Toyokuni, T. (1992) *J. Org. Chem.*, 57, 3431-67

<sup>129</sup> Riva, S., Danielli, B. and Luisetti, M. (1996) *J. Nat. Prod.*, 59, 618-621

<sup>130</sup> Rich, J.O., Bedell, B.A. and Dordick, J.S. (1995) *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 426-434

<sup>131</sup> Chen, X., Jonson, J.S., Dordick, J.S. and Rethwisch, D.G. (1994) *Macromol. Chem. Phys* 195, 3567-3578

<sup>132</sup> Adelhörst, K., Björklind, F., Godtfredsen, S.E. and Kirk, O. (1990) *Synthesis*, 112-5

### El ácido mevalónico AMV origen de los iridoides

Los primeros estudios en iridoides glucosilados se hicieron en plumierido (106) por el grupo de Schmid<sup>1</sup> que estableció su estructura.

En 1964, se encontró en *Plumiera acutifolia* que el AMV (1) marcado con <sup>14</sup>C se incorpora en C7, C3 y C15 del plumierido (106), donde el marcaje se incorpora en C12 y C13 de (106) y en el marcaje del precursor se reparte igualmente entre C3 y C15. Basado en estos datos, deducen que el plumierido se biosintetiza a través de una ciclación tipo Michael del 10-oxogeranial/10-oxonerol (60/61) a iridoidal (10), posterior oxidación a sustancias como el epi-iridotrial (11), en los cuales el reparto tiene lugar entre C3 y C15, y posterior elaboración incluyendo la introducción de dos unidades de acetato (AA). (ver Figura 1)

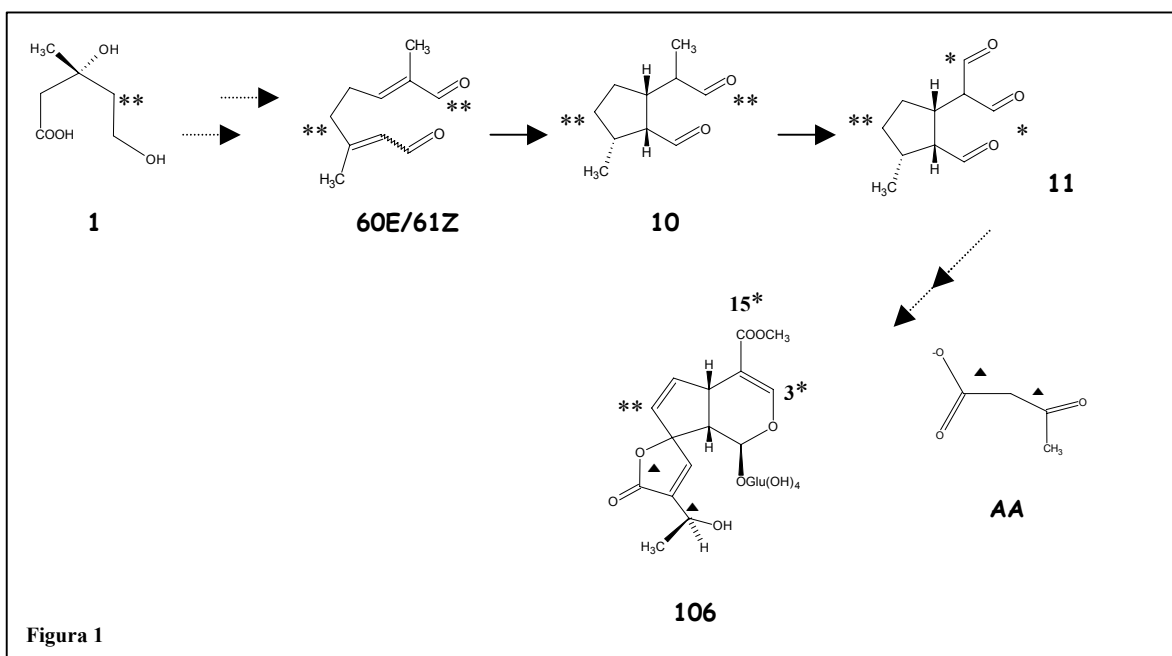


Figura 1

El mecanismo de formación del iridoidal descrito ha sido propuesto también por Robinson y col.<sup>2</sup>

La incorporación del AMV en los indol alcaloides se demuestra en 1965<sup>3,4,5</sup>, apareciendo otra vez el reparto del marcaje en los carbonos de los indol alcaloides que corresponden a C3 y C11 de un iridoide como fue demostrado en la biosíntesis del plumierido (106)<sup>6</sup>.

Coscia y col.<sup>7,8</sup> han realizado múltiples experimentos de incorporaciones del AMV en los iridoides y secoiridoides en *Gentianaceae*. En base a estos experimentos deducen el curso estérico en la biosíntesis del gentiopicrosido (92), a partir del AMV (ver apartado relativo a esta familia).

<sup>1</sup> Yeowell, D.A., y Schmid.(1960) *Experientia* **20**,250

<sup>2</sup> Clark, K.J., G.I. Fray, R.H. Jaeger, y R. Robinson. (1959) *Tetrahedron* **6**, 217

<sup>3</sup> Money, T.,I.G. Wright, F. McCapra, y A.I. Scott. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **53**,901

<sup>4</sup> McCapra F., Money, T., A.I. Scott, y I.G. Wright (1965) *Chem. Commun.* 537

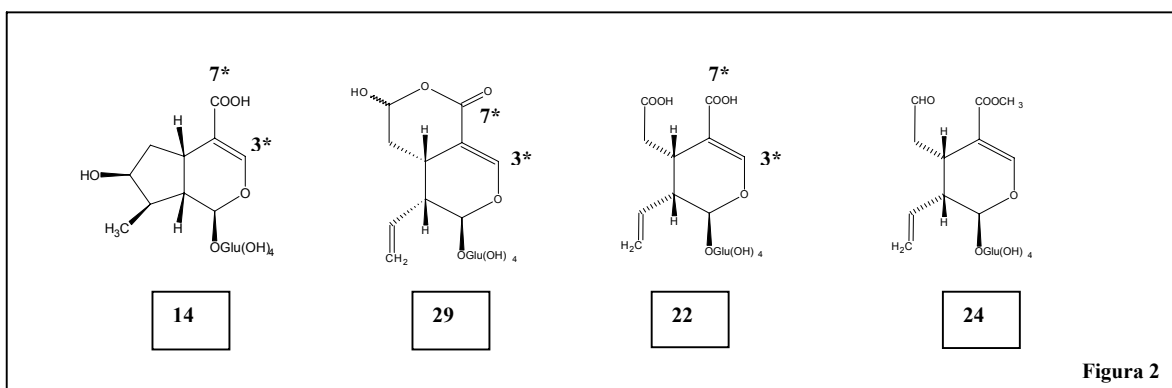
<sup>5</sup> Goeggel, H., y D. Arigoni (1965) *Chem. Commun.*, 538

<sup>6</sup> Yeowell, D.A., y Schmid.(1960) *Experientia* **20**,250

<sup>7</sup> Coscia, C.J., y R. Guanagarcia. (1967) *J. Amer. Chem. Soc.* **89**, 1280

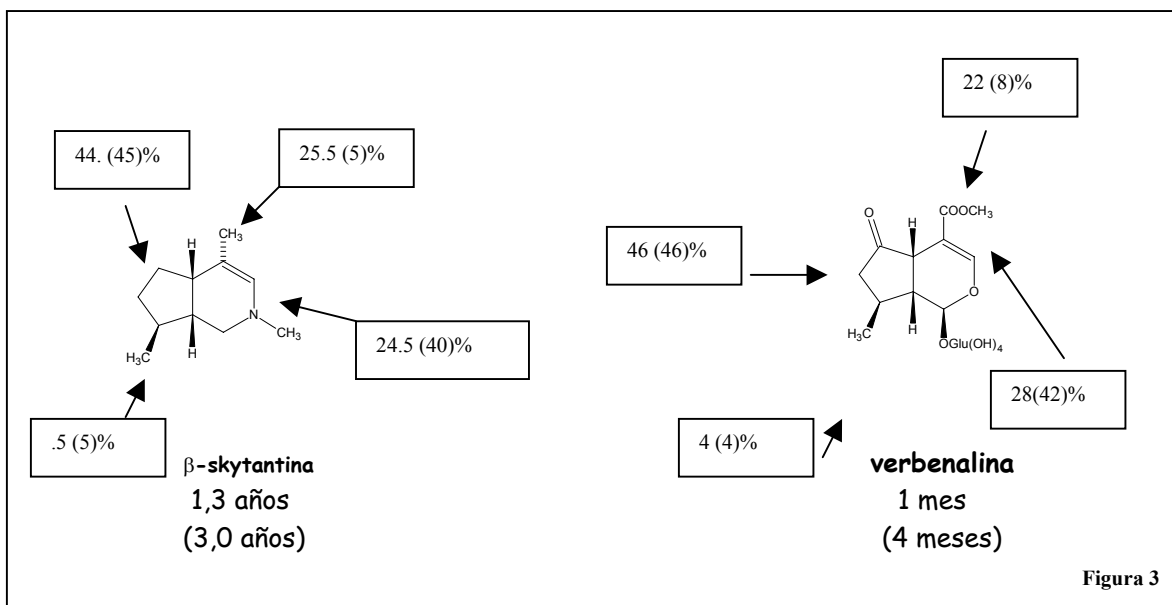
<sup>8</sup> Coscia, C.J., y R. Guanagarcia y L. Botta. (1969) *Biochemistry* **8**, 5036

La administración de  $[2-^3\text{H}, 2-^{14}\text{C}]$  AMV a *Catharanthus roseus* da lugar a la incorporación del marcaje en C3 y C7 de ácidos glucosilados como el ácido logánico (14), ácido secologánico (29) y secologanosido (22) pero no en la secologanina (24).<sup>9,10</sup> (ver Figura 2)



Se han realizado múltiples experimentos que prueban la incorporación del AMV en los iridoides y secoiridoides glucosilados. En estos experimentos, siempre aparece el reparto del marcaje del  $[2-^{14}\text{C}]$  AMV entre C3 y C11 en los iridoides y secoiridoides glucosilados y en los indol alcaloides.

Por otro lado, aparece una distribución inusual del marcaje  $^{14}\text{C}$  del  $[2-^{14}\text{C}]$  AMV en algunos iridoides.



Waller y col. demuestran la incorporación del  $[2-^{14}\text{C}]$  AMV en el  $\beta$ -skytantina<sup>11</sup> de *Skythantus acutus*, actidina<sup>12</sup> de *Actinidia polygama* y verbenalina<sup>13</sup> de *Verbena officinalis*. (ver Figura 3)

En estos experimentos con *S. acutus* y *V. officinalis*, las tasas del marcaje  $^{14}\text{C}$  del  $[2-^{14}\text{C}]$  AMV en C3 y C11 de  $\beta$ -skytantina y verbenalina varía con la edad de la planta.

<sup>9</sup> Guanagarcía, R. y Coscia, C.J. (1971) J. Amer. Chem. Soc. **93**, 6320

<sup>10</sup> Guanagarcía, R., L. Botta. y Coscia, C.J. (1974) J. Amer. Chem. Soc. **96**, 7079

<sup>11</sup> Auda, H., H. R. Juneja, E.J. Eisenbraun, G.R. Waller, W.R. Kays, y H.H. Apel. (1967) J. Amer. Chem. Soc. **89**, 2476

<sup>12</sup> Auda, H., G.R. Waller y E.J. Eisenbraun, (1967) J. Amer. Chem. Soc. **242**, 4157

<sup>13</sup> Horodysky, G.R. Waller y E.J. Eisenbraun, (1969) J. Amer. Chem. Soc. **244**, 3110

Este fenómeno puede explicarse como sigue: En la planta joven, el pool de iridoides es bajo, el pool de monoterpenos acíclicos como el geraniol y su fosfato es grande y hay mayor reparto del marcaje en el grupo dimetil terminal.

Por contraste, en plantas mas viejas la situación es la contraria, el pool de iridoides es grande y el pool de monoterpenos es pequeño; hay un un pequeño cambio en el reparto de los grupos dimetil terminales. No hay datos sobre la estereoquímica del reparto del grupo terminal o del sistema enzimático.

En el caso de la verbenalina, Schid y col.<sup>14</sup> también observan el reparto completo del marcaje entre C3 y C11 al añadir [2-<sup>14</sup>C] AMV a *V. officinalis*.

Waller y col.<sup>15</sup> encuentran en *Nepeta cataria* un reparto del marcaje del [2-<sup>14</sup>C] AMV entre C3 y C11 pero también entre C7 y C10 de la nepetolactona.

Para explicar el inusual fenómeno descrito asumen que el reparto entre C3 y C11 y/o entre C7 y C10 de los iridoides ocurre en un estado anterior de la formación del ciclopentano, contrariamente a lo propuesto por Schmid en la biosíntesis del plumierido (106) donde la randomización de C3 y C15 tiene lugar después de cerrado a iridoidal (10)<sup>16</sup>.

---

<sup>14</sup>Hüni, J.E.S., H. Hiltbrand, H. Schmid, D. Gröger, S. John, y K. Mothes.(1966) *Experientia* **22**, 656

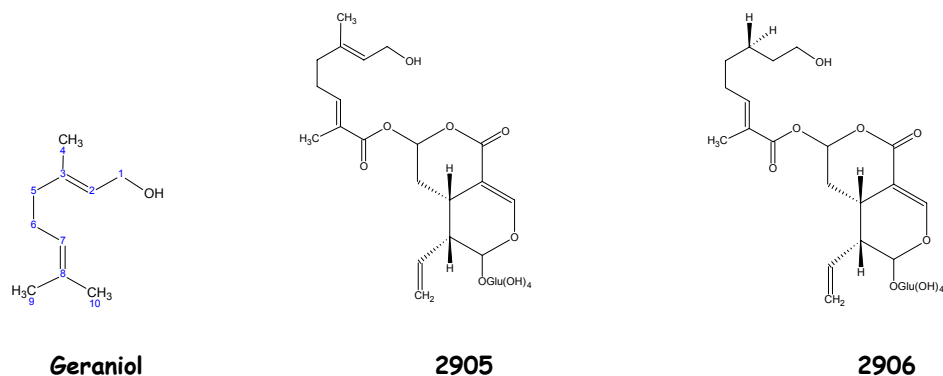
<sup>15</sup>Regnier, F.E., G.R. Waller, E.J. Eisenbraun, y H. Auda (1968) *Phytochemistry* **7**, 221

<sup>16</sup>Yeowell, D.A., y Schmid.(1960) *Experimentia* **20**,250

## Formación del esqueleto iridano a partir de monoterpenos acíclicos.

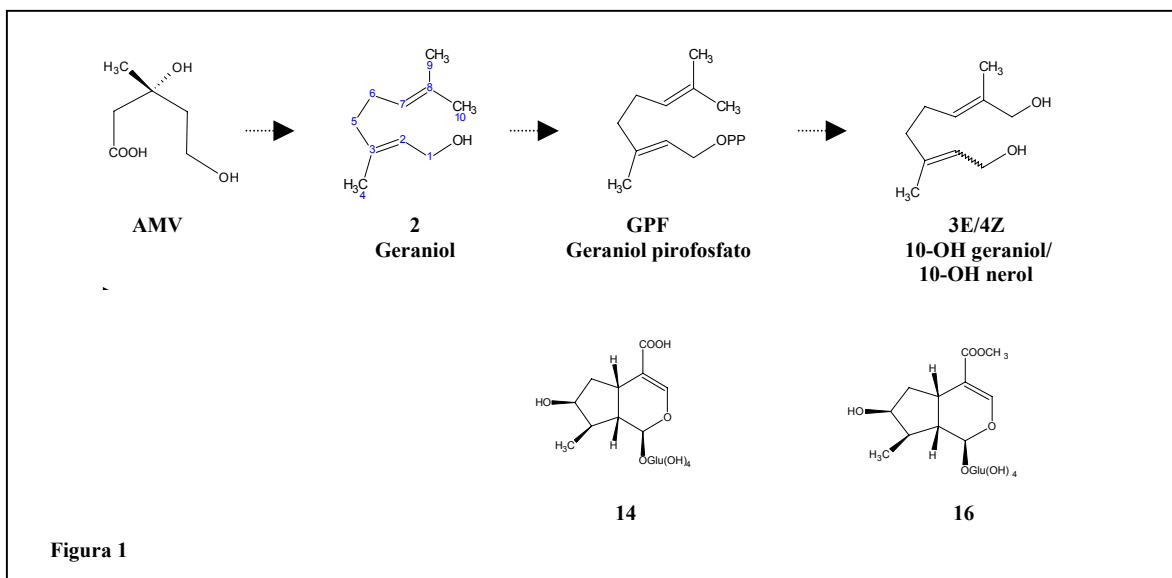
Arigoni y col.<sup>17</sup> muestran la incorporación de [4-<sup>14</sup>C] geraniol (2) en el monoterpeno acíclico y en la porción secoiridoide del foliamenthin (2905) en *Menyanthes trifoliata* (*Gentiniaceae*).

Al mismo tiempo Battersby<sup>18</sup> y col. observan la incorporación de [2-<sup>14</sup>C] geraniol en el monoterpeno acíclico y en la porción secoiridoide del dihidrofoliamenthin (2906) de la misma planta.



Battersby<sup>19</sup> también demuestra la incorporación de [2-<sup>14</sup>C] geraniol (2) en el glucoalcaloide ipecosido en *Cephaelis ipecacuanha* y Coscia<sup>20</sup> muestra incorporaciones de [2-<sup>14</sup>C] geraniol pirofosfato (GPF) en el ácido logánico (14) en *Swertia caroliniensis*. (ver **Figura 1**)

Parece lógico pensar que los siguientes pasos de la biosíntesis en la formación del esqueleto iridano sean el geraniol (2) y los 10-hidroxiderivados del nerol y el geraniol (3E/4Z).



<sup>17</sup> Loew, P., Ch. Von Szczepanski, C.J. Coscia, y D. Arigoni. (1968), Chem. Commun., 1276

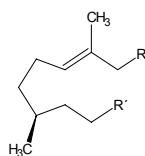
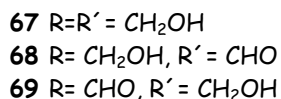
<sup>18</sup> Battersby, A.R., A.R. Burnett, G.D. Knowles, y P.G. Parsons (1968), Chem. Commun., 1277

<sup>19</sup> Battersby, A.R., y R.J. Parry (1971), Chem. Commun., 901

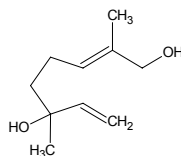
<sup>20</sup> Coscia, C.J., y R. Guarnaccia (1968) Chem. Commun., 138



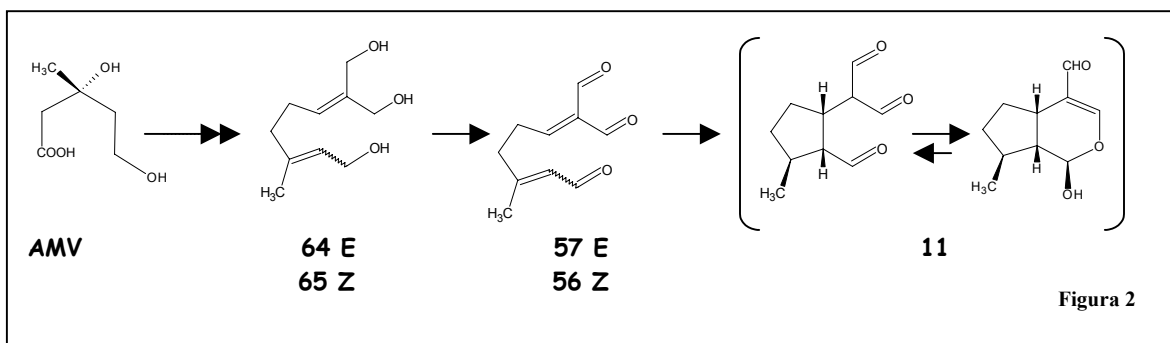
Arigoni<sup>21</sup> y Battersby<sup>22</sup> realizan múltiples experimentos de marcaje con <sup>14</sup>C y <sup>3</sup>H en *Catharanthus roseus* en los cuales el 10-hidroxigeraniol (3) y el 10-hidroxinerol (4) se incorporan en la loganina (16) y en los indol alcaloides como ajmalacina, vindolina y catharantina. Pero no se incorporan citronellol, citronellal, 10-hidroxicitronellol (67), 10-hidroxicitronellal (68) o 10-oxocitronellol (69) y 10-hidroxilinaol (70). (ver Figura 1)



70



Arigoni y col. observan el clásico reparto del marcaje de entre C3 y C11 en (16) y las correspondientes posiciones en los alcaloides derivados y proponen la vía de ciclación de la Figura 2.



Desde mediados de los años 70 Inouye y col. estudian los mecanismos de formación de los esqueletos de el iridano a partir de monoterpenos acíclicos en la biosíntesis de iridoides glucosilados con un alto grado de oxidación del ciclopentano, encontrando dos modalidades de ciclación.

Experimentos con [2-<sup>14</sup>C]AMV indican la incorporación del AMV en el lamiosido, ipolamiido, lamiido en *Lamium amplexicaule*, deutziosido en *Deutzia crenata* y asperulosido (9501) en *Galium spurium* var. *echinospermon*, y retención del marcaje <sup>14</sup>C solo en C3 y C7 de estos glucósidos. Sugiriendo que en estas plantas los glucósidos se sintetizan por la ciclación del 10-oxogeraniol (60), 10 oxoneral (61) hasta el iridoidal (10) y la posterior elaboración sin permuta entre C3 y C11 hasta los iridoides<sup>23,24</sup>. Este supuesto se confirma por el hecho de que [10-<sup>3</sup>H]-10 hidroxigeraniol (3) se incorpora en el deutziosido, el [10-<sup>3</sup>H]- iridoidal (10) en el lamiosido,

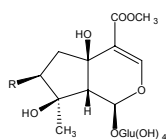
<sup>21</sup> Escher, S., P. Loew, y D. Arigoni (1979) Chem. Commun., 823

<sup>22</sup> Battersby, A.R., S.H. Brown, y T.G. Parry (1970), Chem. Commun., 827

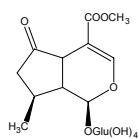
<sup>23</sup> Inouye, H., S. Ueda, y Uesato, S. (1977) Tetrahedron Letters, 709

<sup>24</sup> Inouye, H., S. Ueda, y Uesato, S. (1977) Phytochemistry 16,1669

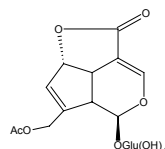
ipolamiido, lamiido, deutziosido y asperulosido (9501), y el [10-<sup>3</sup>H]- iridoidal glucósido en el lamiosido y deutziosido<sup>25,26</sup>. (ver **Figura 3**)



**R=H ipolamiido**  
**R=OH lamiido**

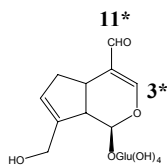


**deutziosido**

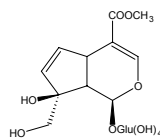


**9501 asperulosido**

Posteriormente se estudia la formación del esqueleto iridano en la biosíntesis del tarenosido (104) y gardenosido (107) de *Gardenia jasminoides f. grandiflora* en suspensiones de células<sup>27</sup>. Se administraron varias combinaciones de los siguientes precursores <sup>13</sup>C marcados<sup>28</sup> : [9-<sup>13</sup>C]-10-hidroxigeraniol (3), [2-<sup>13</sup>C]-9,10-dihidroxigeraniol (64)/ <sup>13</sup>C -9,10-dihidroxinerol (65) (4:1), (3R)-(+)- y (3S)-(-)- [9-<sup>13</sup>C]-10-hidroxicitronellol (52) y (3S)-(-)- [8-<sup>13</sup>C]-9,10-hidroxicitronellol (66). El compuesto (3) fue incorporado en el tarenosido (104) en alta tasa, pero no lo fueron los compuestos de las series citronellol, también el marcaje <sup>13</sup>C de (3) fue igualmente distribuido en C3 y C11 de (104). Además, [2-<sup>13</sup>C]-(64)/ [2-<sup>13</sup>C]-(65) fue incorporado en (104) mucho menos que el [9-<sup>13</sup>C]-(3).



**104 tarenosido**



**107 gardenosido**

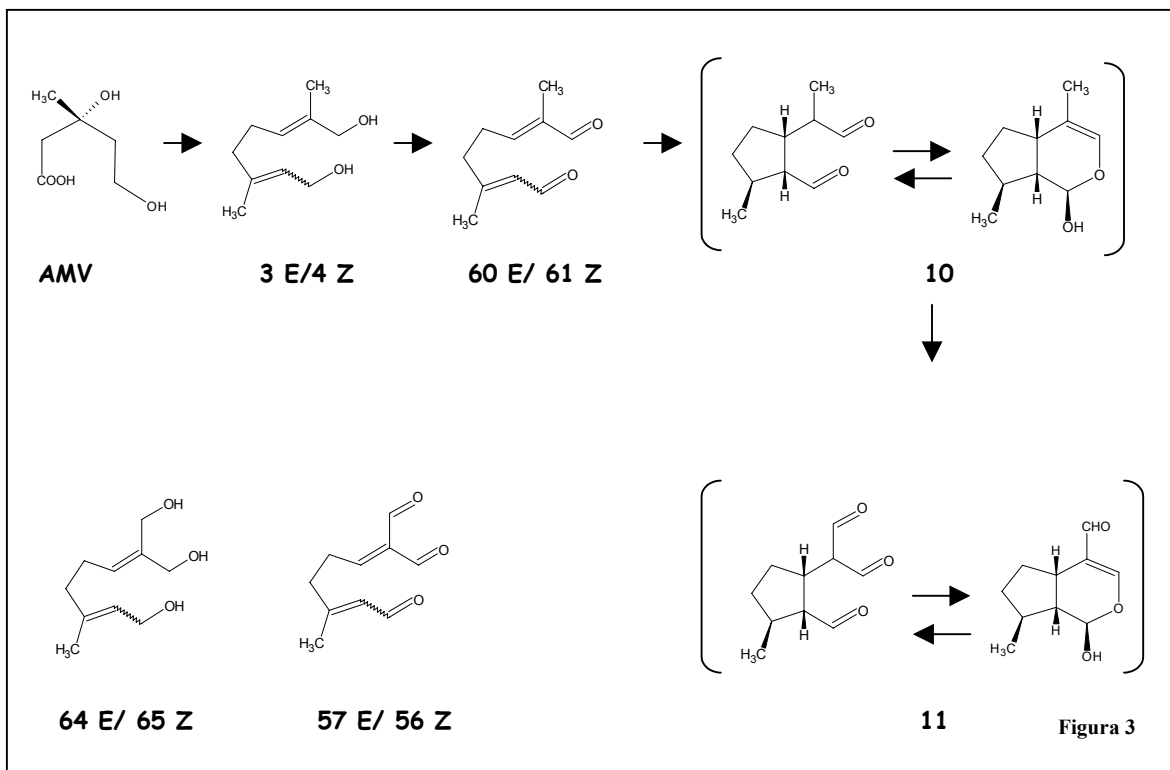
<sup>25</sup> Inouye, H., S. Ueda, y Uesato, S. (1977) Tetrahedron Letters, 713

<sup>26</sup> Inouye, H., S. Ueda, S. Uesato, y K. Kobayashi (1978) Chem. Pharm. Bull. (Japón) **26**, 3384

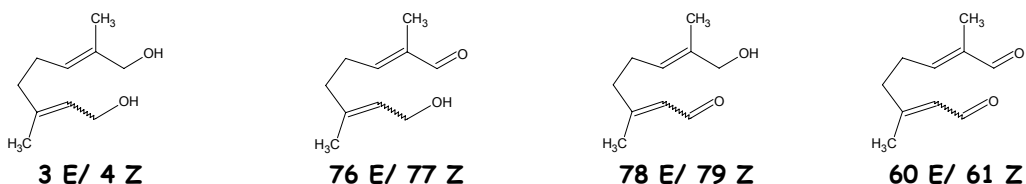
<sup>27</sup> Ueda, S., K. Kobayashi, T. Muramatsu, y H. Induye, (1981) Planta Med. **41**, 186

<sup>28</sup> Uesato, S., K. Kobayashi, y H. Inouye, (1982) Chem. Pharm. Bull. **30**, 927

Se deduce que en los cultivos celulares de *Gardenia jasminoides f. grandiflora* el tarenoside (104) y gardenoside (107) se forman también por la ciclación de 10-oxogeranial (60) o 10-oxonerol (61) a iridoidal (10) y la oxidación a iridotrial (11)<sup>29,30</sup>. Los 9,10-dihidroxigeraniol (64)/ 9,10-dihidroxineral (65) y sus oxoderivados, 9,10-dioxogeraniol (57)/ 9,10-dioxonerol (56), presumiblemente no están en esta vía biosintética.



Tietze y col. en 1981<sup>31</sup> demuestran que el 10-oxogeraniol (76)/10-oxonerol (77), 10-hidroxigeranial (78)/10-hidroxineral (79) y 10-oxogeranial (60)/10-oxonerol (61) se incorporan en la loganina (16), vindoline y catharanthine de *C. roseus*, y no discuten si 60/61 o los correspondientes 9,10-dioxo derivados son directamente responsables de la ciclación.

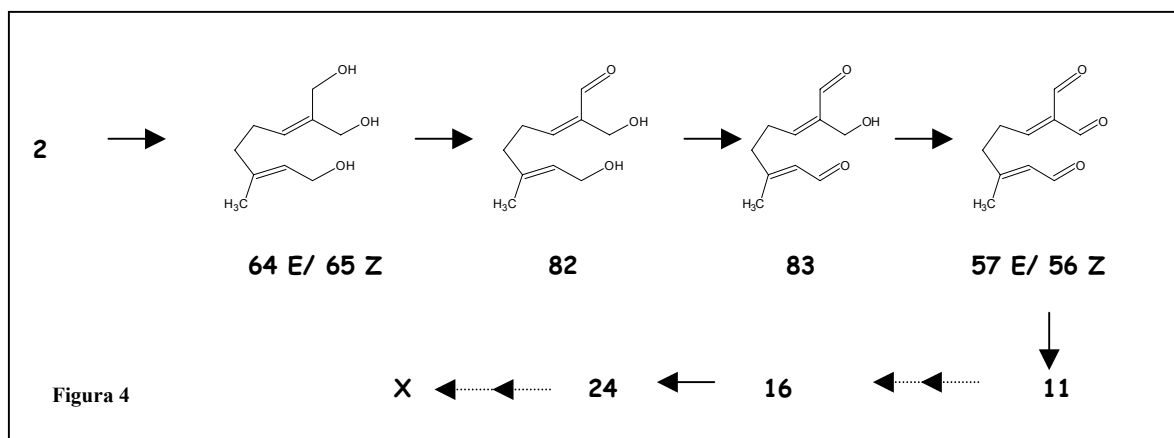


<sup>29</sup>Uesato, S., S. Ueda, K. Kobayashi, y H. Inouye, (1983) Chem. Pharm. Bull. **31**, 4185

<sup>30</sup>Kobayashi, K., S. Uesato, S. Ueda, y H. Inouye, (1985) Chem. Pharm. Bull. **33**, 4228

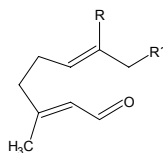
<sup>31</sup>Battersby, A.R., M. Thompson, K.H. Glüsenkamp, y L.F. Tietze. (1981) Chem. Ver. **114**, 3430

En 1983, Balsevich y Kurz<sup>32</sup> proponen la ciclación para la secologanina (24) y ajmalicine en suspensiones de células de *Catharanthus roseus*, en base a que monoterpenos acíclicos marcados <sup>2</sup>H incluyendo 9,10 dihidroxigeraniol (64), 9-oxo-10 hidroxigeraniol (82) y 9,9,10,10-tetraetoxigeraniol (83) fueron incorporados en altas tasas en (24) y ajmalicine. Esta vía esta de acuerdo con lo postulado por Arigoni y col.<sup>33</sup>



Inouye y colaboradores obtienen lo siguiente. Tanto [1-<sup>3</sup>H]-10-hidroxigeraniol (78) y [10-<sup>3</sup>H]-iridoidal (10) se incorporan en vindoline de *C. roseus* y secologanina (24) de *Lonicera morrowii*, donde el (R,S)-(±) [10-<sup>3</sup>H]-hidroxicitronellol (52) no está. Adicionalmente, la respectiva tasa de incorporación de [1-<sup>3</sup>H]-9,10-dihidroxigeraniol (64) y una mezcla de [1-<sup>3</sup>H]-9-hidroxi-10 oxogeraniol (6) y [1-<sup>3</sup>H]-9-oxo-10-hidroxigeraniol (5) en estos compuestos fue mucho mas baja que las tasas de incorporación del [1-<sup>3</sup>H]- (49) y [10-<sup>3</sup>H]- (15). Se presume que la secologanina (24) y los indol alcaloides de estas plantas se biosintetizan vía ciclación de 10-oxogeraniol (60)/10-oxonerol (61) a iridoidal (10) en el mismo camino que el asperulosido (9501) y deutzosido<sup>34</sup>. Esto parece contradictorio con lo propuesto por Balsevich y Kurzk<sup>16</sup> para la biosíntesis de (24) y los indol alcaloides.

6 R = CH<sub>2</sub>OH, R' = CHO  
5 R = CHO R' = CH<sub>2</sub>OH,



Para examinar la aplicabilidad de lo propuesto en otras plantas, se añadieron a *Lonicera tartarica*, especie que contiene secologanina (24), [1-<sup>3</sup>H]-10-hidroxigeraniol (3) y [1-<sup>3</sup>H]-9,10-dihidroxigeraniol (64). Y el [4-<sup>13</sup>C]-3/[4-<sup>13</sup>C]-4 (4:1), [9-<sup>13</sup>C]-10-hidroxinerol, [2-<sup>13</sup>C]-9,10-dihidroxigeraniol (64)/ [2-<sup>13</sup>C]-9,10-dihidroxinerol (65) (4:1) y [1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-iridoidal (10) se suministraron a cultivos de células en suspensión de *Rauwolfia serpentina*, que producen vomilenina, ajmalina, etc...

<sup>32</sup> Balsevich, J., y W.G.W. Kurz. (1983) *Planta Med.* **49**,79

<sup>33</sup> Escher, S., P. Loew, y D. Arigoni. (1970) *Chem. Commun.*,823

<sup>34</sup> Uesato S., Matsuda S. Y Inouye H. *Chem. Pharm. Bull.* (Japón) (1984) **32**,1671

Se obtienen altas incorporaciones de 3,4 y 10 en la secologanina y en 84 y 85, en comparación con 64, indicando que la vía activa en estos cultivos celulares es la que implica a 3,4 y 10.

Para clarificar definitivamente este punto los grupos de Inouye y Zenk usando extractos libres de células a partir de células en suspensión de *Rauwolfia serpentina*, realizan estudios enzimáticos.

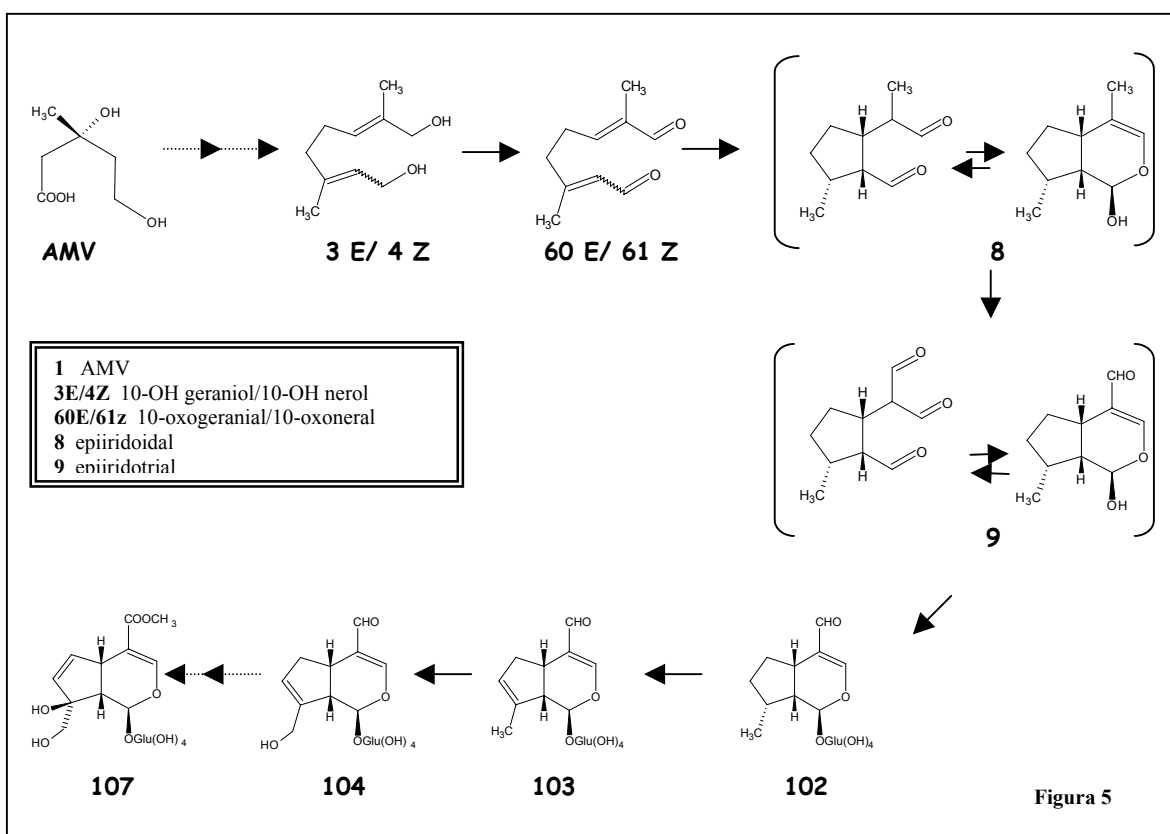
Al incubar [1-<sup>3</sup>H]-10-dihidroxigeraniol (3) en presencia de NAD/NADH y NADP/NADPH a 25°C durante 24h. se obtiene el iridoidal (10) que al suministrarlo a los cultivos de células en suspensión, se incorpora perfectamente a los alcaloides presentes en estas plantas.

En posteriores experimentos, incubando en ausencia de ATP/Mg y añadiendo ATPasa (trazas de ATP endógeno), se produce la conversión enzimática de 3 y 4 a 10 sugiriendo la intervención del 10 oxogeraniol (60) o 10 oxonerol (61), como prueba la conversión de 9-<sup>13</sup>C (60) y 9-<sup>13</sup>C (61) en (10). No se incorporan el 10-hidroxicitronellol, 9,10 dihidroxigeraniol (64) o 9,10 dihidroxinerol (65), provando los resultados anteriores.

Inouye y col. trabajaron con cultivos celulares de *Gardenia jasminoides f. grandiflora*, desarrollando una línea que produce tarennosido (104) y gardenosido (107), y susceptibles de ser utilizados en experimentos biosintéticos.

Cuando se añade iridoidal se produce iridotrial glucosilado que puede aislarse y que no se incorpora en 104 y 107. Además los glucósidos de epiiridotrial y el 7,8-epiiridotrial se muestran como intermediarios.

En todas las experiencias que hemos visto la glucosilación tiene lugar después de la oxidación final hasta el carboxilo C11. Pero los experimentos con precursores <sup>2</sup>H,<sup>13</sup>C y las incorporaciones en el tarennosido (104), junto con que el marcaje <sup>13</sup>C en el C9 del 10-hidroxicitronaniol no permuta en el glucósido del epiiridotrial. (ver Figura 5)



Con el fin de detectar los derivados glucosilados posteriores al iridotrial (11), realizaron un análisis de la dilución del iridotrial glucósido (68) y 7,8-dehidroiridotrial glucósido (69) después de la administración de  $[4-^{13}\text{C}]$ -(3)/  $[4-^{13}\text{C}]$ -(4) (4:1) en los cultivos celulares. Inesperadamente se detecta  $[10-^{13}\text{C}]$  boschanalósido (102) en el examen del espectro  $^{13}\text{C}$  NMR de la mezcla de (68)/(69), la cual no muestra enriquecimiento en el carbono  $10\beta$ -metil, pero muestra una señal en  $\delta 16.10$  del carbono  $10\alpha$ -metil del contaminante  $[10-^{13}\text{C}]$ -(102). Podría deducirse que el producto de ciclación del monoterpeno acíclico no es el iridoidal (10), sino 8-epiiridoidal (8)<sup>35,36</sup>. Esta deducción se sustenta por la alta incorporación de  $[10-^2\text{H}_3]$ -8-epiiridoidal (8) (13.2%) y  $[11-^2\text{H}]$  boschanalósido (102) (41%) en el tarenósido (104).

Poco antes Damtoft publica<sup>37</sup> que la 8-epideoxiloganina (34) es un precursor para ipolamiido y lamiido con incorporaciones del 16% y 1% respectivamente en *Hebenstretia dentata*, pero la deoxiloganina (33) no se incorpora. Y que el ácido 8-epideoxiloganico (35)<sup>38</sup> es un buen precursor para la aucubina en *Plantago major* (*Plantaginaceae*), *Buddleja davidii* (*Buddlejaceae*) y *Srophularia racemosa* (*Scrophulariaceae*) y para el antirrhinosido en *Antirrhinum majus* (*Scrophulariaceae*), demostrando la indirecta intermediación del 8-epiiridoidal (71) en la biosíntesis. En este caso tampoco fue incorporado el ácido deoxiloganico. (ver Figura 6)

Hasta 1980 todos los estudios biosintéticos en iridoides se habían basado en compuestos con una estereoquímica  $8\beta$  que derivaban del iridoidal. Pero, previamente, un trabajo de Inouye y col.<sup>39</sup> en el cual el iridoidal y su glucósido se suministraban como precursores en *Lamium amplexicaule* (*Lamiaceae*), mostraba bajas incorporaciones en lamiósido y lamiido (menos del 0.01%), indicando que al menos en esta planta el iridoidal no era un buen precursor.

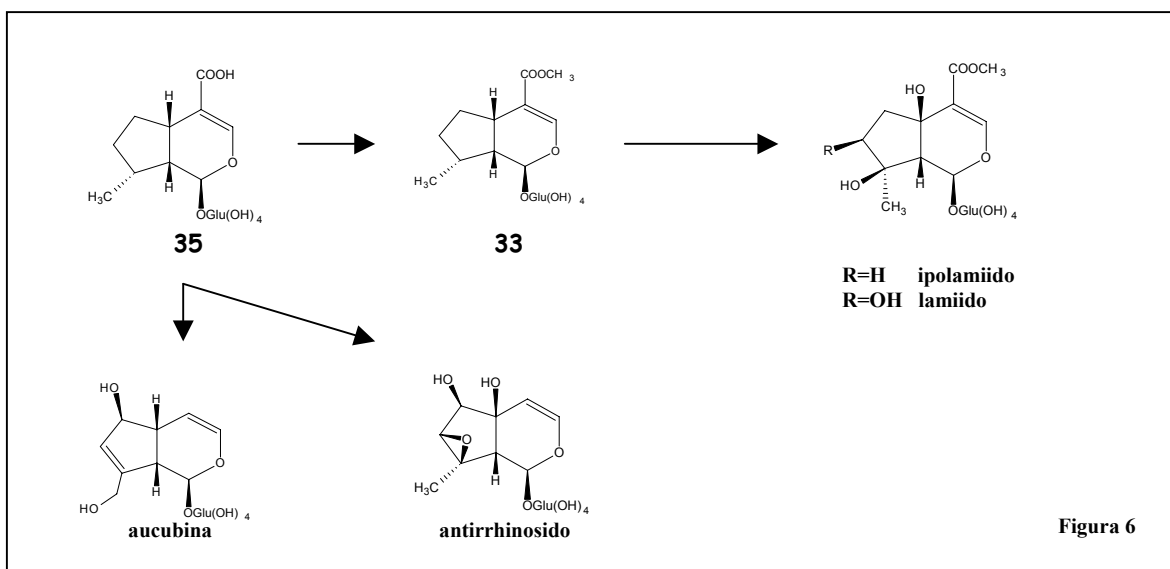


Figura 6

<sup>35</sup> Uesato, S., S. Ueda, K. Kobayashi, M. Miyauchi, y H. Inouye. (1984) *Tetrahedron Letters* **25**, 573

<sup>36</sup> Uesato, S., S. Ueda, K. Kobayashi, M. Miyauchi, H. Itoh, y H. Inouye. (1986) *Phytochemistry* **25**, 2309

<sup>37</sup> Damtoft, S., (1981) *J.C.S Chem. Comm.*, 228

<sup>38</sup> Damtoft, S., (1983) *Phytochemistry* **22**, 1929

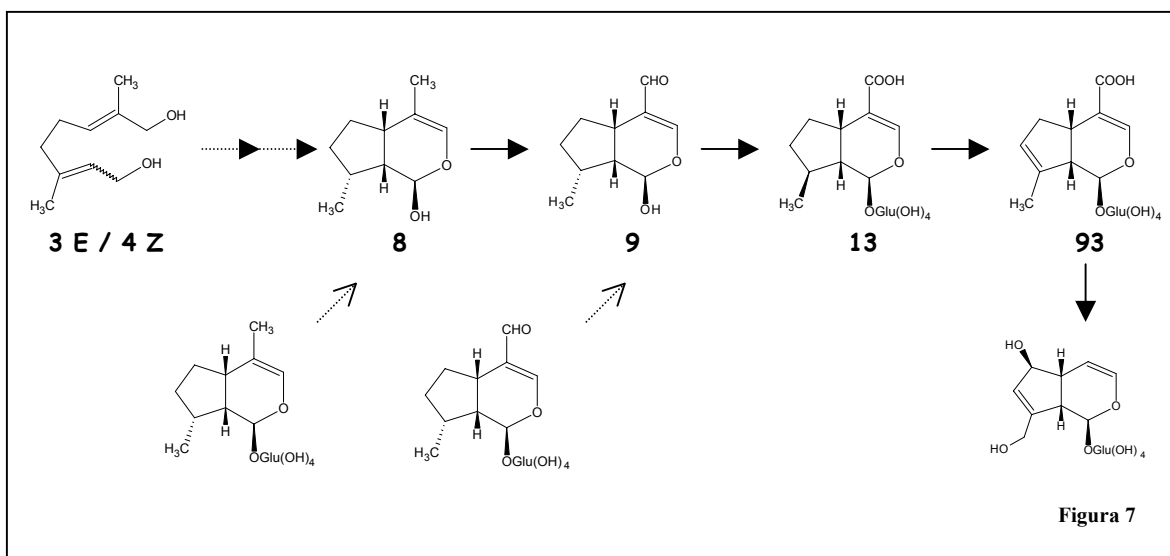
<sup>39</sup> H. Inouye, Ueda, S., y K. Kobayashi, (1978) *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 3384

El estudio de la distribución de iridoides y secoiridoides en las diferentes familias y estos estudios biosintéticos llevan a establecer una ruta diferente para los iridoides con estereoquímica  $8\alpha$ .<sup>40</sup>

Los estudios posteriores parecen indicar que los primeros pasos en la biosíntesis de la serie  $8\alpha$  son similares a los de la serie  $8\beta$  excepto por la diferente estereoquímica.

En *Plantago major* el [9-<sup>13</sup>C]-10-hidroxigeraniol (**4**) se incorpora en la aucubina con separación del marcaje.

Además el 8-epiiridoidal (**8**) y el 8-epiiridotrial (**9**) así como sus glucósidos deuterados en C10 y con <sup>13</sup>C en C11 dan altas incorporaciones con separación del marcaje en C11, la mitad de la cual se encuentra en el C3 del aucubina. Los glucósidos no parecen ser intermediarios, sino que son hidrolizados e incorporados por la planta de forma diferente a lo encontrado en *Gardenia*.



Todos los intentos por establecer las rutas biosintéticas de los iridoides se topaban con la dificultad de la enorme cantidad de publicaciones que muchas veces presentaban resultados contradictorios, y en las revisiones previas que hemos visto en la introducción y que se basaban en las características químicas de una inmensa cantidad de iridoides y secoiridoides.

Jensen tuvo la fortuna que hacer una revisión basada en las implicaciones taxonómicas de la distribución de los iridoides.

Es imposible establecer las rutas biosintéticas que originan los diferentes tipos de iridoides porque probablemente encontraríamos una para cada especie. Este hecho que es aplicable para todo tipo de compuestos, no impide sin embargo que establezcamos las rutas principales características de amplios grupos taxonómicos, e incluso subrutas propias de *familias* o *géneros* concretos.

Esto nos proporcionaría por un lado una herramienta taxonómica poderosa e incluso una herramienta para estudios filogenéticos. Por otro lado facilitaría los estudios fitoquímicos de nuevas especies siempre y cuando su determinación botánica sea correcta.

<sup>40</sup> Jensen, S.R. (1991) 6. Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms. En "Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids". Proc. Phytochem. Soc. Europe, Clarendon press, Oxford. Pg. 133

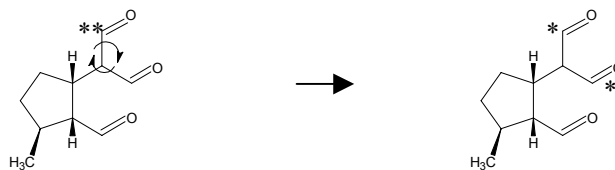
En el caso de los iridoides Jensen propuso una serie de rutas que analizaremos a continuación basadas en los datos biosintéticos que hemos visto y en un análisis por taxones de los iridoides publicados.

La **Ruta I** derivaría del geraniol (2),, via iridoidal(10), e iridotrial(11), ,el cual con reparto del marcaje entre C3 y C11 daría el ácido deoxilogánico (13), que sería el intermediario de todos los compuestos oxidados hasta carboxilo en C11 con estereoquímica 8 $\beta$ , incluidos todos los secoiridoides. En principio en esta ruta nunca se produciría la descarboxilación en C11. La formación de compuestos como del deutzeosido y el patrinósido serían digresiones de esta ruta ya que las plantas que los contienen presentan glucósidos claramente derivados por esta ruta.

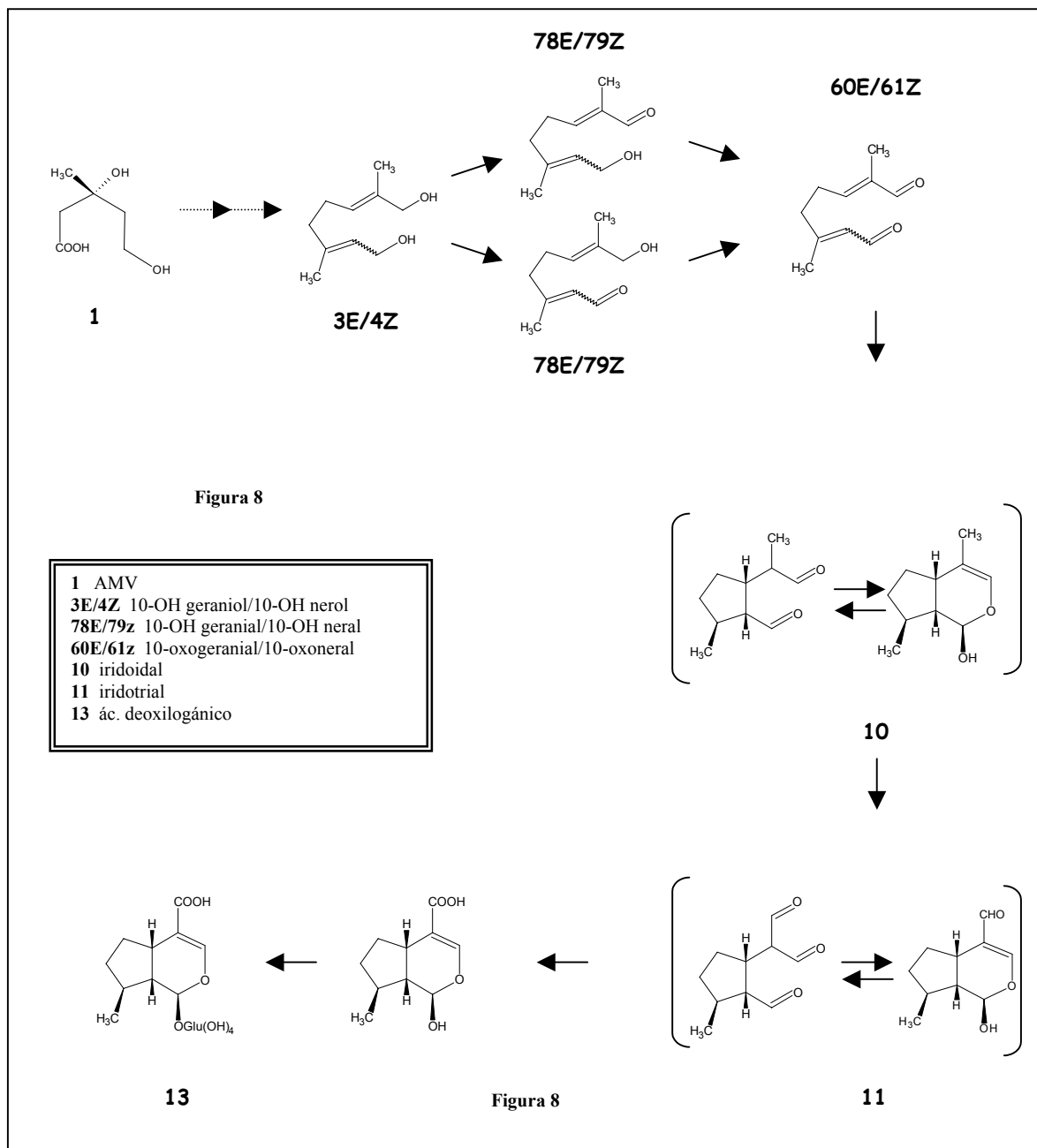
La presencia de secoiridoides esta ligada a esta ruta.

Abundantemente distribuida en los superordenes *Cornanae*, *Loasanae* y *Gentiananae*. (ver **Tabla 1**)

El reparto del marcaje frecuentemente observado en los experimentos de marcaje entre C3 y C11 se puede explicar si y solo si la glucosilación ocurre una vez oxidado hasta carboxilo en C11, en base a los precursores administrados.

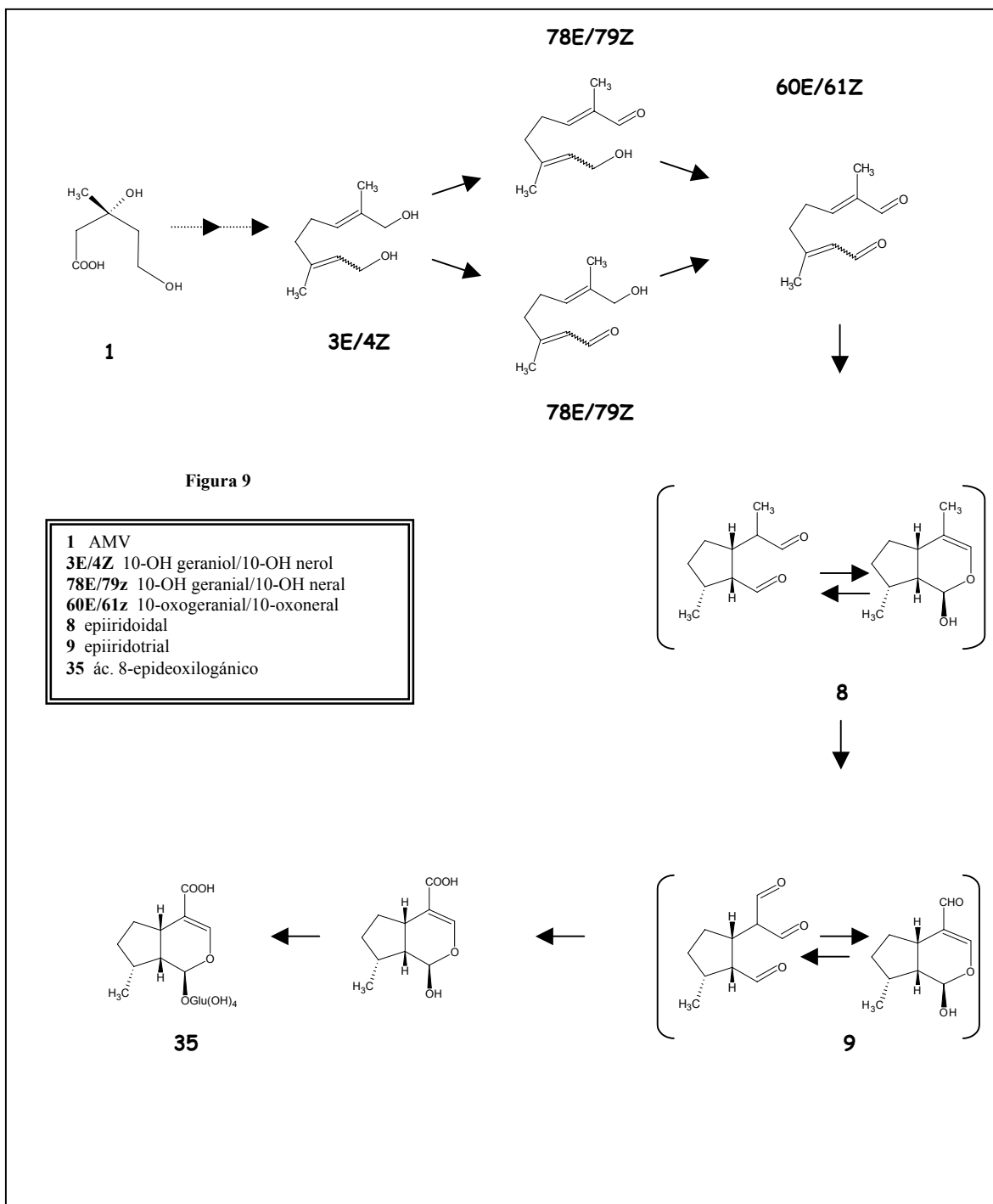




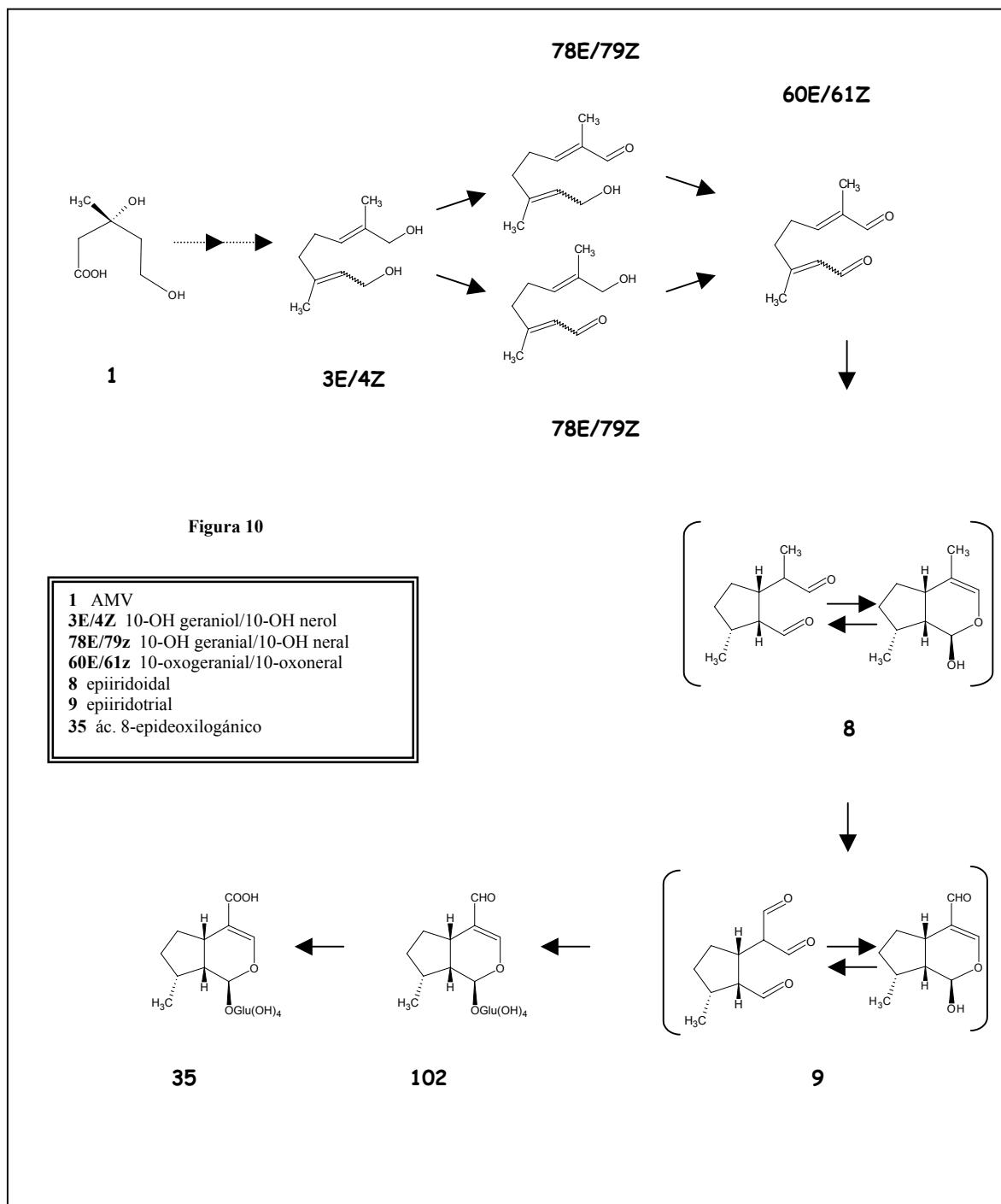


La **Ruta II** comprende la serie epi y puede ser dividida en dos subrutas.

La **Ruta II a** comprende al 10-OH-geraniol y va via epiiridoidal (**8**), y epiiridotrial (**9**), con reparto del marcaje hasta el ácido epi-deoxilogánico (**35**) de forma similar a la Ruta I pero después de la elaboración del ácido, es frecuente la descarboxilación en C11. Esta ruta está representada fundamentalmente en el superorden *Lamianae* y algunas familias de *Cornanae* y *Ericanae* (ver **Tabla 1**).

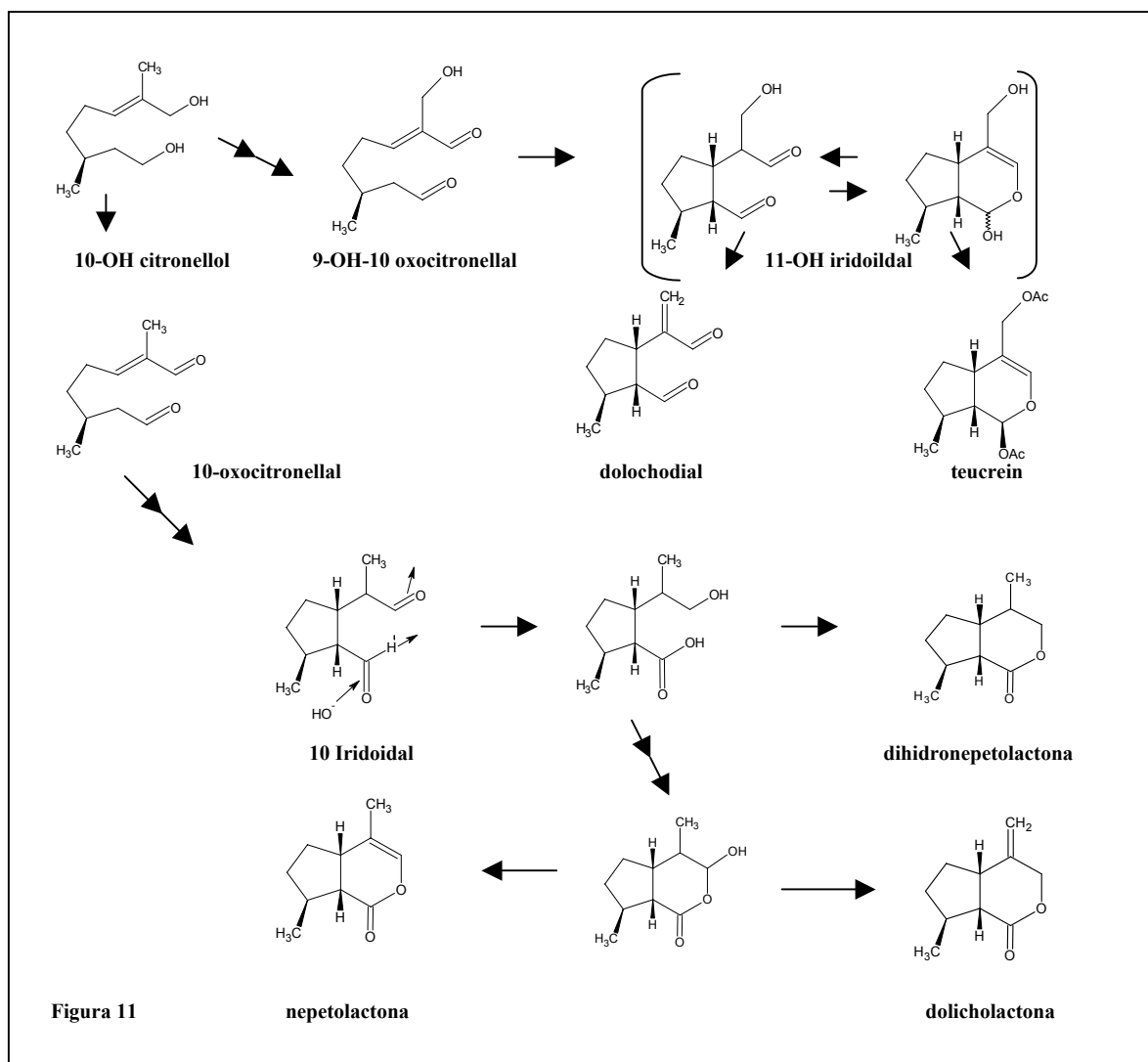


La **Ruta II b** es idéntica a la anterior hasta el epi-iridotrial (**9**), donde tiene lugar la glucosilación. Es decir algunos pasos antes, y posterior oxidación hasta carboxilo en C11. No se tienen datos de descarboxilación. Produce iridoides como los vistos en *Gardenia jasminoides*, y en principio con escasa representación (familia *Rubiaceae* y quizás *Apocinaceae*). (ver **Figura 10**)



La **Ruta III** es una vía que probablemente incluye al 10-OH-citronellol e iridoidal (10). Pagnoni y col. encuentran que (S)-(-)-citronellol y (S)-(-)-10-hidroxicitronellol, y no sus correspondientes análogos 3,4 insaturados sirven como intermediarios para el dolichodial, dolicholactona y teucrein en *Teucrium marum* y la nepetolactona y dihidronepetolactona en *Nepeta cataria*.<sup>41,42,43,44,45</sup>

En muchas subfamilias de *Lamiaceas* los iridoideos son habituales, pero en *Saturejoideae* *Nepeta* es el único género conocido que contiene iridoideos, pero todos ellos inusuales. En concreto la 9-epideoxiloganina contiene tres centros con una estereoquímica diferentes a la del resto de los iridoideos conocidos. (ver **Figura 11**)



<sup>41</sup> Bellesia, F., U.M. Pagnoni, A. Pinetti, y R. Trave. (1983) *Phytochemistry* **22**, 2197

<sup>42</sup> Grandi, R., U.M. Pagnoni, A. Pinetti, y R. Trave. (1983) *Phytochemistry* **22**, 2723

<sup>43</sup> Bellesia, F., U.M. Pagnoni, A. Pinetti, y R. Trave. (1983) *J. Chem. Research*, 328

<sup>44</sup> Bellesia, F., U.M. Pagnoni, A. Pinetti, y R. Trave. (1984) *J. Chem. Research*, 192

<sup>45</sup> Bellesia, F., Grandi, R., U.M. Pagnoni, A. Pinetti, y R. Trave. (1984) *Phytochemistry* **23**, 83

Para el dolichodial y teucrein de *T. marum* postulan una biosíntesis con la ciclación del 9-OH-10-oxocitronellal hasta el 11-OH-iridoidal, basándose en que el [10-<sup>3</sup>H]-10-OH-citronellol se incorpora en el C3 del dolichodial sin permuta del marcaje y no se incorpora el [10-<sup>3</sup>H]-iridoidal (10). Para la dolicholactona de *T. marum* y la nepetolactona de *N. cataria* proponen la ciclación del (S)-(-)-10-oxocitronellal hasta iridoidal (10), que posteriormente pasa a hidroxíácido. El marcaje del iridoidal y del 10-OH-citronellol se retiene en el C3 de los productos. La dihidronepetolactona derivaría de 10. (ver **Figura 11**)

Finalmente en *N. cataria* 10-OH-geraniol se incorpora mejor que el (R,S)-(±)-[10-<sup>3</sup>H]-10-hidroxicitronellol en el ácido 1,5,9-epideoxilogánico que también aparece en la planta.

### Importancia taxonómica de los iridoides.

Hegnauer<sup>46</sup> fue el primero en mostrar la importancia que podrían tener los iridoides en la taxonomía de las angiospermas. Jensen<sup>47</sup> los ha utilizado frecuentemente como sistema de clasificación para realizar estudios taxonómicos y biosintéticos en sus fuentes vegetales. Pero se plantea el problema de la poca cantidad de trabajos que no permiten que algunas aseveraciones sean significativas.

En base a su sistema de clasificación, Dahlgren<sup>48</sup> presentó un esquema de distribución de los iridoides, Dahlgrenograma, dejando a un lado la controversia de la posición taxonómica de la familia *Oleaceae* y las apariciones puntuales en *Stigmaphyllon* (*Malphiaceae*, *Rutanae*) *Liquidambar* (*Hamamelidaceae*, *Rosanae*) y *Daphniphyllum* (*Daphniphyllaceae*, *Rosanae*). La distribución de los iridoides se restringe a los superórdenes *Ericanae*, *Cornanae*, *Loasanae*, *Gentiananae* y *Lamiana* (ver **Figura 12** y **Tabla 1**).

<sup>46</sup> Hegnauer R. (1986) Chemotaxonomia der Pflanzen vol. 3, 325 Birkhäuser Verlag

<sup>47</sup> Jensen, S.R. (1991) 6. Plant iridoids, their biosynthesis and distribution in angiosperms. En "Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids". Proc. Phytochem. Soc. Europe, Clarendon press, Oxford. Pg. 133

<sup>48</sup> Dahlgren G. (1989) The last Dahlgrenogram. System of classification of the dicotyledons. In The Davis and Hedge Festschrift, pg.249. Edimburg University Press.

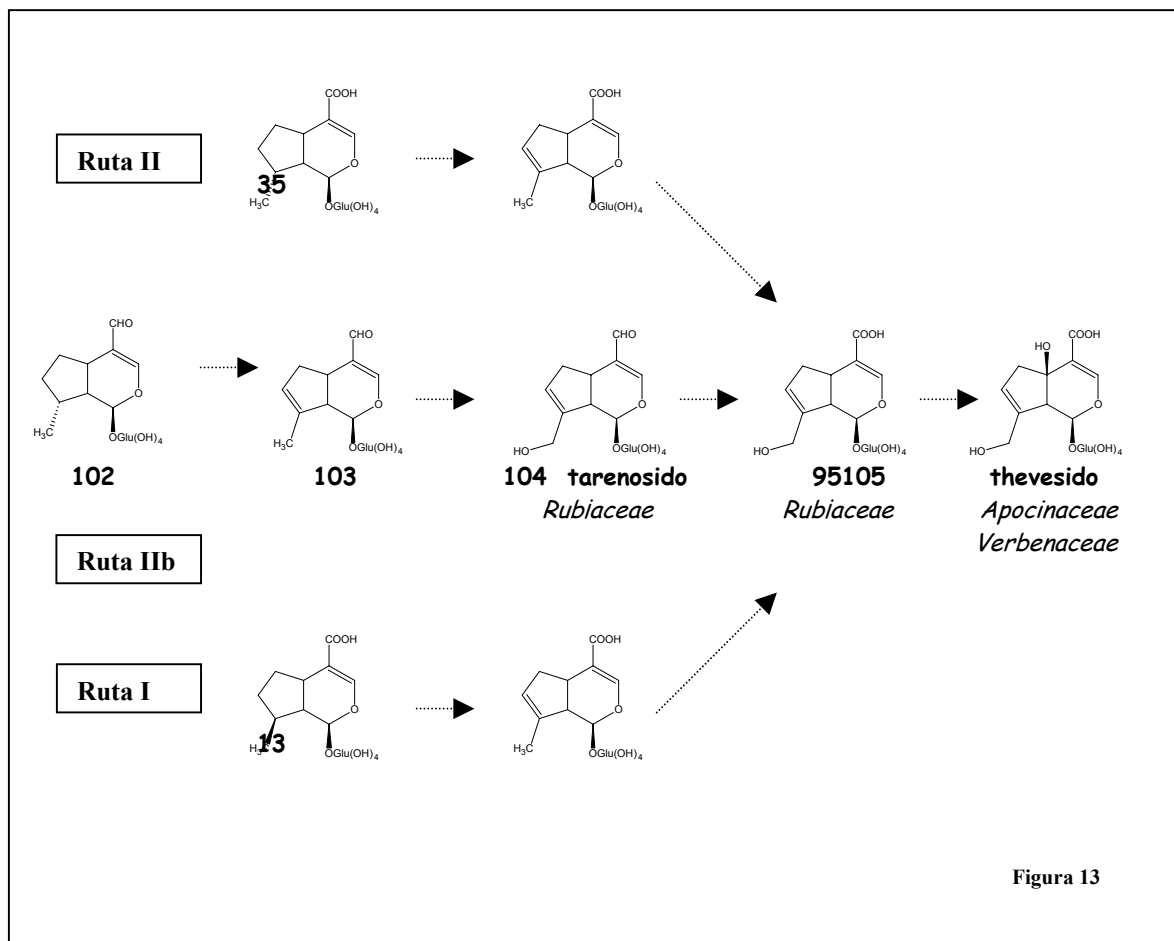


Tabla 1

SUPERORDEN	ORDEN	FAMILIA	RUTA I		RUTA II		RUTA III
			Normal	Seco	Normal	Descarb	
Rutanae	Polygalales	Malpigiaceae	¿?				
Rosanae	Buxales	Daphniphyllaceae	¿?				
	Hamamelidales	Hamamelidaceae	¿?				
Cornanae	Cornales	Garryaceae			▲	▲	
		Alangiaceae	▲	▲			
		Nyssaceae		▲			
		Cornaceae	▲	▲			
		Davidiaceae	▲	▲			
		Escalloniaceae	▲	▲			
		Toricelliaceae	▲				
		Aucubaceae			▲	▲	
		Aralidaceae	▲				
		Symplocaceae	▲				
		Icacinaceae	▲	▲			
		Montiniaceae	▲				
		Hydrangeaceae	▲	▲			
		Sambucaceae	▲	▲			
		Viburnaceae	▲	▲			
		Menyanthaceae	▲	▲			
		Adoxaceae	▲	▲			
	Eucommiales	Eucommiaceae			▲	▲	
	Dipsacales	Caprifoliaceae	▲	▲			
		Valerianaceae	▲	▲			
		Dipsacaceae	▲	▲			
		Calyceraceae	▲	▲			
Loasanae	Loasales	Loasaceae	▲	▲			
Gentiananae	Gentianales	Desfontaniaceae	▲	▲			
		Loganiaceae	▲	▲			
		Rubiaceae	▲	▲			▲
		Theligonaceae	▲				
		Gentianaceae	▲	▲			
		Apocynaceae	▲	▲			¿?
	Goodeniales	Goodeniaceae	▲	▲			
	Oleales	Oleaceae	▲	▲			
Lamianae	Lamiales	Retziaceae				▲	
		Stilbaceae				▲	
		Buddlejaceae				▲	
		Scrophulariaceae	¿?		▲	▲	
		Myoporaceae				▲	
		Globulariaceae	¿?			▲	
		Plantaginaceae				▲	
		Lentiburaliaceae			▲	▲	
		Pedaliaceae			▲	▲	
		Martyniaceae				▲	
		Bignonaceae	¿?		▲	▲	
		Acantaceae			▲	▲	
		Verbenaceae	▲		▲	▲	
		Lamiaceae			▲	▲	
		Callitricaceae				▲	
	Hippuridales	Hippuridaceae				▲	
Ericanae	Fouquieriales	Fouquieriaceae	▲				
	Ericales	Actinidiaceae	▲				
		Ericaceae	¿?			▲	
		Monotropaceae	¿?				
		Pyrolaceae	¿?				
	Stylidiales	Stylidiaceae	▲	▲			
	Serraceniales	Serraceniaceae		▲			

La clasificación debe realizarse en base a vías biosintéticas y no en base a la presencia o ausencia de compuestos aislados ya que un mismo producto puede originarse por dos vías diferentes.

El thevesido puede formarse por la Ruta I o Ruta IIb en *Apocinaceae* o Ruta IIa en *Verbenaceae*. (ver Figura 13)



Mussaenosido 10050, shanzhisido 101 y su metil éster 10150 aparecen en *Rubiaceae* (Ruta IIb) y son comunes en *Lamiales* (Ruta IIa). Y en *Verbenaceae* la síntesis general se realiza por la RutaIIa pero también aparecen productos 8 $\beta$  como el cornin. (ver **Tabla 1**)

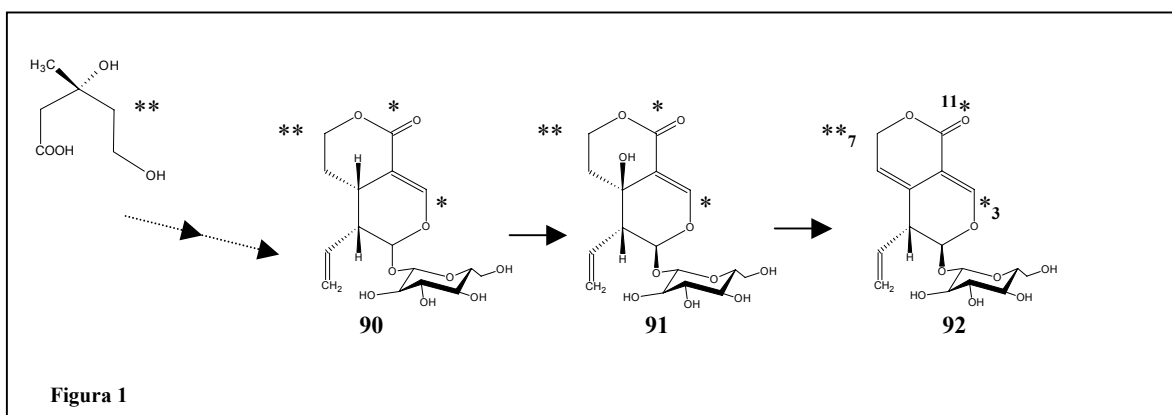
Si realizamos un estudio de las rutas biosintéticas seguidas en las diferentes familias observamos que existe una buena correlación entre la presencia de iridoides con 8 $\beta$  estereoquímica de la Ruta I y los secoiridoides por un lado, y los iridoides con 8 $\alpha$  estereoquímica de la Ruta II y los iridoides descarboxilados en C4. Excepciones a esta regla aparecen en *Gentianales* (*Rubiaceae* y *Apocynaceae*), que pueden explicarse por otra vía más difícil de distinguir, la Ruta IIb.

La Ruta I se concentra en *Cornanae*, *Loasanae* y *Gentianane*, con dos ocurrencias en *Ericanae* (*Sarraceniaceae*, *Stylidiaceae*). Las descarboxilaciones de la Ruta IIa se concentran en *Lamiana*e y ocurrencias en *Cornanae* (*Eucomniaceae*, *Aucubaceae*, *Garryaceae*) y *Ericanae*.



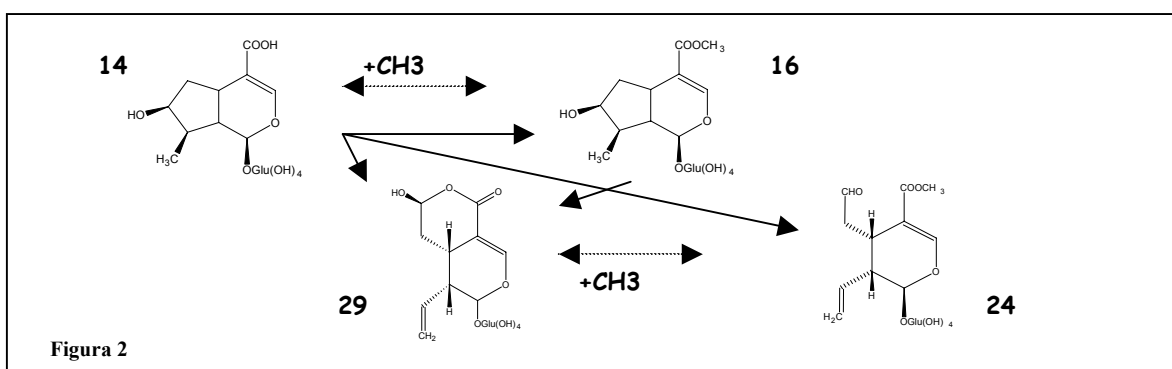
## Clasificación biosintética de iridoides y secoiridoides en *Gentianales*

En 1967, Coscia y col.<sup>49,50</sup> observan la incorporación de [2-<sup>14</sup>C] AMV en el gentiopicrosido (92) de *Swertia caroliniensis*. Tras la publicación de este trabajo Inouye y col. informan de la incorporación de [2-<sup>14</sup>C] AMV en el swerosido (90) y en el swertiamarina (91) de *Swertia japonica* así como en el gentiopicrósido de *Gentiana triflora* var. *japonica*. De estos trabajos se puede deducir la siguiente secuencia swerosido (90), swertiamarina (91), gentiopicrósido (92) por comparación de las actividades específicas de (90), (91) y (92) y de las estructuras de estos glucosidos<sup>51</sup>. Además, ambos grupos encuentran que el marcaje del [2-<sup>14</sup>C] AMV se encuentra igualmente distribuido entre C3 y C11 en estos glucósidos.



Posteriormente encontraron<sup>52,53</sup> que el ácido logánico (14) y el ácido secologánico (29) aparecían en *C. roseus* y demuestran que el [<sup>14</sup>C] ácido logánico (14) preparado biosintéticamente del [2-<sup>14</sup>C] AMV se incorpora en la loganina (16), ácido secologánico (29) y la secologanina (24) y que la [<sup>14</sup>C] loganina (16) se incorpora en el ácido secologánico. Se puede sacar la conclusión de que la metilación del grupo carboxilo C11 puede ser reversible.

Los mismos autores encuentran que una fracción de *C. roseus* cataliza la metilación del ácido logánico (14) y secologánico (14) a loganina (16) y secologanina (24), pero no la conversión de ácido deoxilogánico (13) a deoxiloganina (33)<sup>54,55</sup> (ver Figura 2).



<sup>49</sup> Coscia, C.J., y R. Guarnaccia. (1967), *J.Amer. Chem. Soc.* **89**,1280

<sup>50</sup> Coscia, C.J., R. Guarnaccia y L. Botta (1969), *Biochemistry* **8**,5036

<sup>51</sup> Inouye, H., S. Ueda, y Y. Nakamura. (1970) *Chem. Pharm. Bull.* **18**, 2043

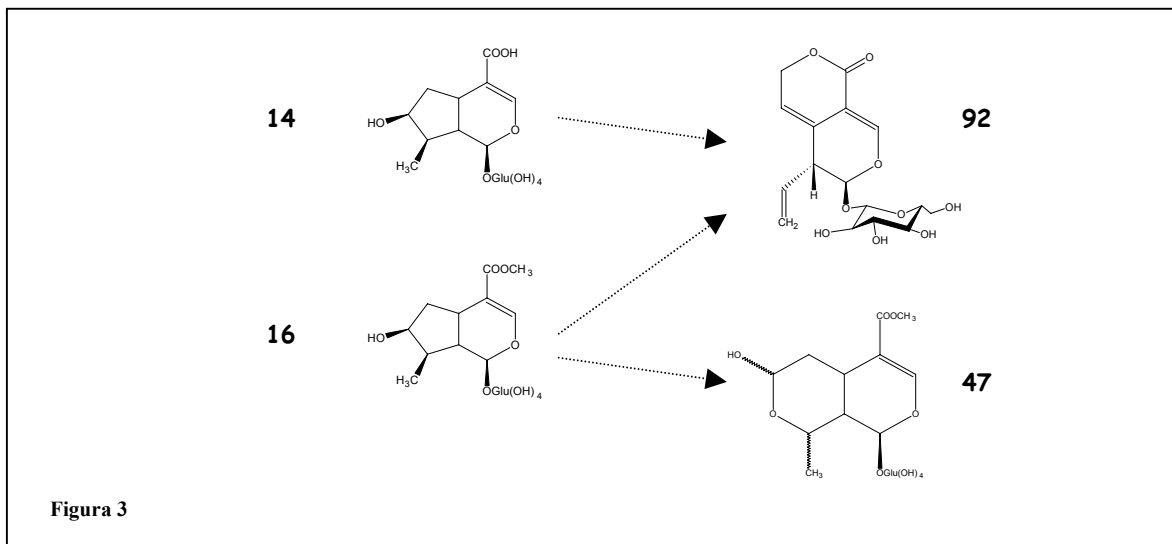
<sup>52</sup> R. Guarnaccia y C.J Coscia (1971), *J.Amer. Chem. Soc.* **93**,6320

<sup>53</sup> R. Guarnaccia, L. Botta y C.J Coscia (1974), *J.Amer. Chem. Soc.* **96**,7079

<sup>54</sup> Madyastha, K.M.,R. Guarnaccia y C.J Coscia.(1971) *FEBS Letters* **14**, 175

<sup>55</sup> Madyastha, K.M.,R. Guarnaccia, C. Baxter, y C.J Coscia.(1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 2497

Otros pasos importantes en el conocimiento de la ruta biosintética de los iridoides en *Gentianae* se suceden en trabajos posteriores. Coscia<sup>56,57</sup> y col. demuestran la incorporación del ácido logánico (14) preparado biosintéticamente del [2-<sup>14</sup>C, 4R, 4-<sup>3</sup>H] AMV en el gentiopicrósido (92) en *Swertia carolinensis*. Inouye y col.<sup>58,59</sup>, y Göger y Simchem<sup>60</sup> demuestran la incorporación de la loganina (16) en el gentiopicrósido en *Gentiana triflora* var. *japonica* y la loganina en el gentiopicrósido en *S. petiolata* respectivamente. Inouye y col. demuestran la incorporación de la loganina en el morronisido (47) en *G. thunbergii* (ver **Figura 3**). El grupo de Battersby verifica que el marcaje de la loganina (16) y secologanina (24) se retiene en *C. roseus*.



Cosia y col. (64,65) administran [4R-4-<sup>3</sup>H]-, [4S-4-<sup>3</sup>H]- o [2S-2-<sup>3</sup>H] AMV junto con [2-<sup>14</sup>C] AMV en *S. carolinensis* y se obtiene los siguientes resultados a través de la degradación química del ácido logánico (14) y el gentiopicrósido (92) aislados:

- 1) El C-4 pro-R hidrógenos de las dos moléculas de AMV se retienen en el ácido logánico (14) donde el C4 pro-S hidrógenos desaparecen en (14).
- 2) Solo un hidrogeno C4 pro-R de los dos moléculas de AMV se retien en el gentiopicrosido (92), tampoco los dos hidrógenos pro-s C4 están presentes.
- 3) El C2 pro R-hidrógenos del AMV se encontró en en C3 y C7 de (14), uno pro-S hidrógenos fue en C-, el otro siendo eficientemente eliminado de la hidroxilación en la posición C7.
- 4) El Gentiopicrósido (92) obtenido en la incorporación [2S-2-<sup>3</sup>H, 2-<sup>14</sup>C] AMV tiene el mismo ratio 3H/<sup>14</sup>C del ácido logánico (14).

Basándose en estos datos, Cosia y col. deducen que el curso estérico en la biosíntesis del gentiopicrósido (92), como se muestra en la **Figura 4**.

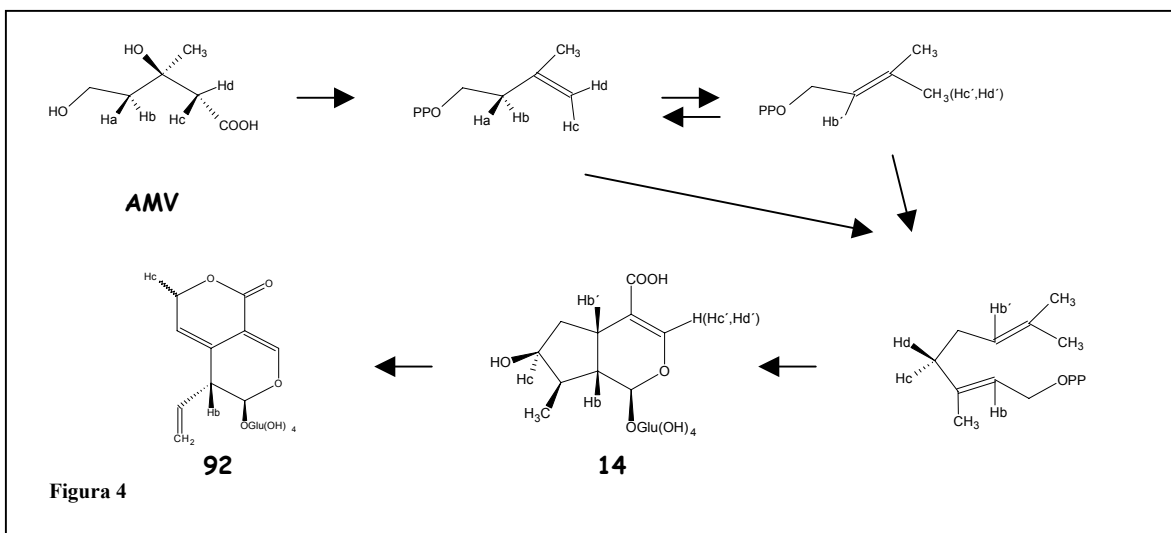
<sup>56</sup> Coscia, C.J., R. Guarnaccia y L. Botta (1969), J.Amer. Chem. Soc. **91**,204

<sup>57</sup> Coscia, C.J., R. Guarnaccia y L. Botta (1970), Arch. Biochem. Biophys. **136**, 498

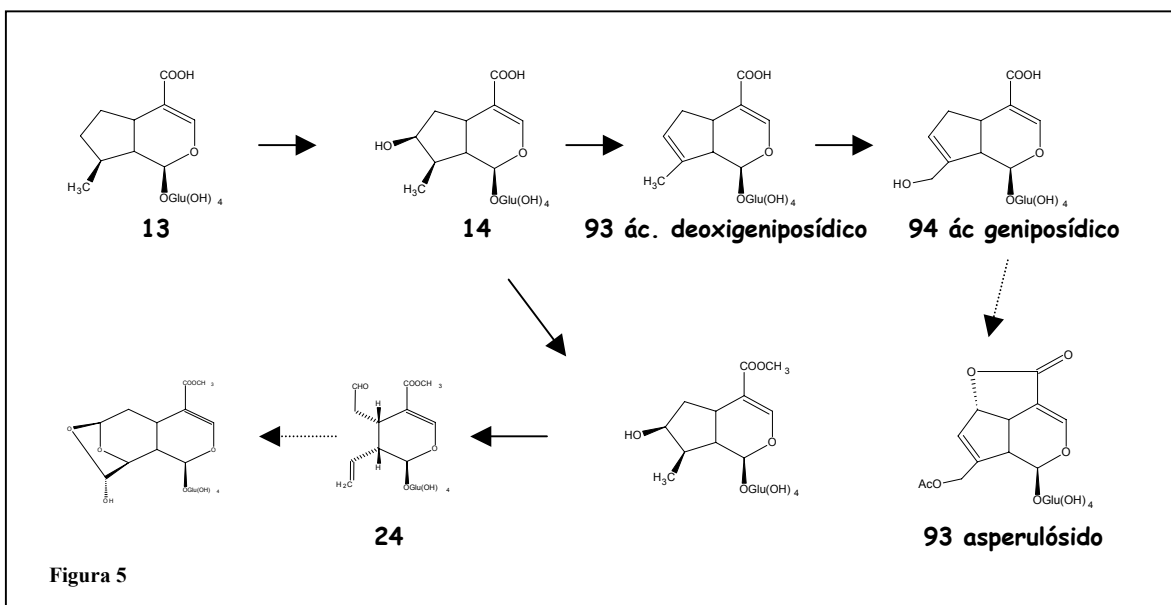
<sup>58</sup> Inouye, H., S. Ueda, Y. Aoki, y Y. Takeda. (1969) Tetrahedron Letter, 2351

<sup>59</sup> Inouye, H., S. Ueda, K. Inoue, y Y. Takeda. (1974) Chem. Pharm. Bull. (Japón) **22**, 676

<sup>60</sup> Göger, D., y P. Simchem (1969) Naturforsch **24b**, 356



Pero el ácido logánico o la loganina no solo son precursores de los secoiridoides e indol alcaloides, sino también de los glucoiridoides con un anillo altamente oxidado presentes en *Rubiaceae*. Uesato y col.<sup>61</sup> estudian las incorporaciones del ácido deoxilogánico (13) y del ácido epi-deoxilogánico (35) en el asperulosido (9501) de *Galium spurium*. Los experimentos mostraban una mayor incorporación del primero (15%) frente al segundo (3%). En el mismo trabajo el ácido deoxilogánico (13) y el ácido logánico (14) se muestran como precursores del ácido geniposídico (94), asperulosido (9501), y secologaliosido en *Galium mollugo*, con la loganina y la secologanina como posibles intermediarios. Al establecerse que el ácido deoxigeniposídico es un buen precursor del asperulósido, la secuencia biosintética parece estar más clara.



<sup>61</sup> Uesato, S., Miyauchi, M., Itoh, H., y Inouye, H. (1986) *Phytochemistry* **25**, 2511

Analizando las experiencias biosintéticas y los productos presentes en el orden *Gentianales* podemos establecer que la mayoría de los iridoides presentes se forman por la Ruta I (ver biosíntesis), salvo las excepciones que veremos. Las posibles rutas a partir del ácido deoxilogánico (13) se muestran en la **Figura 6**, e implicarían a toda una serie de secoderivados.

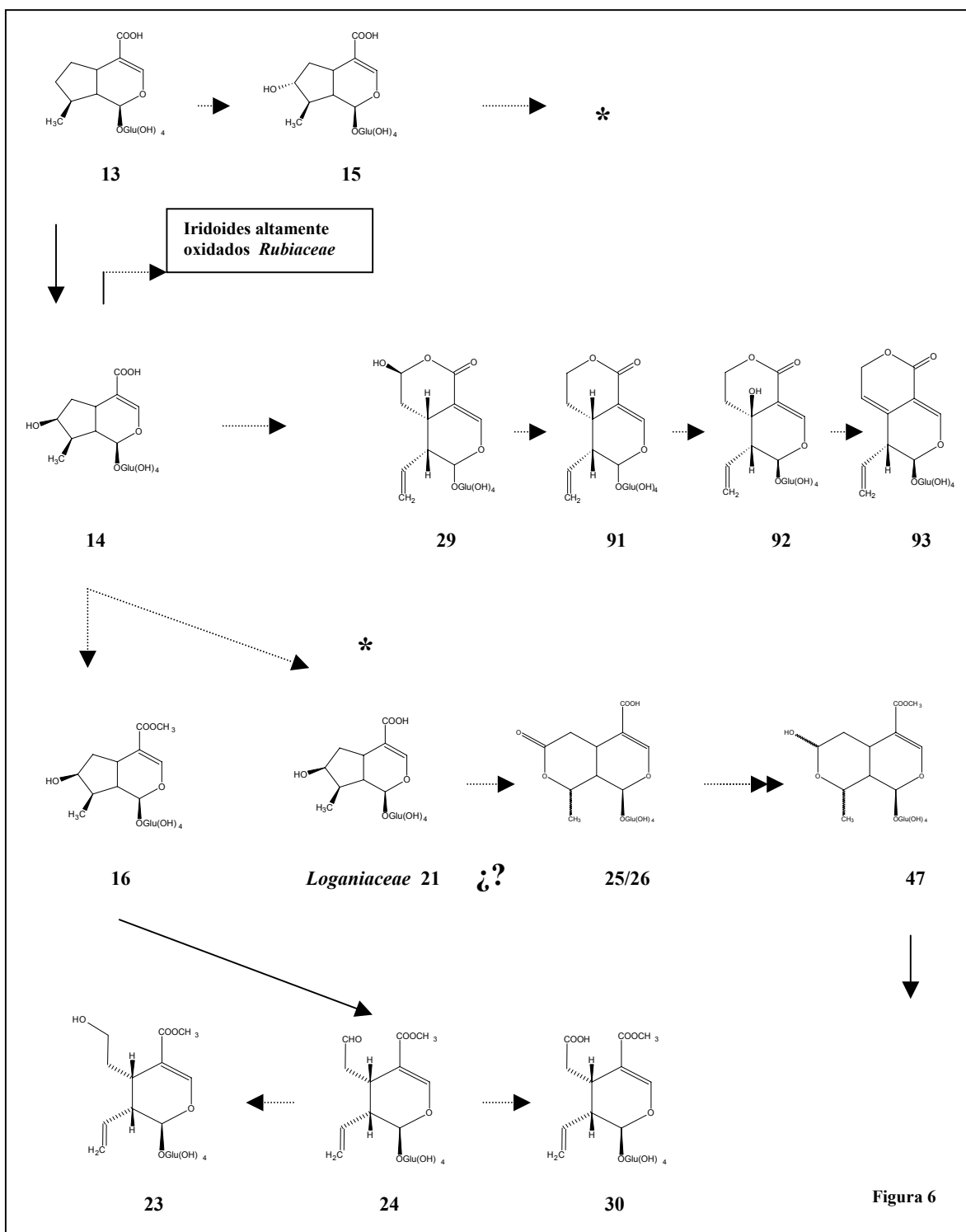
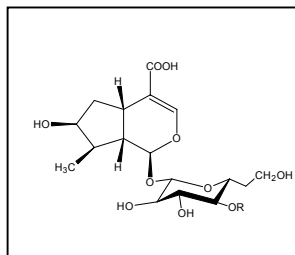
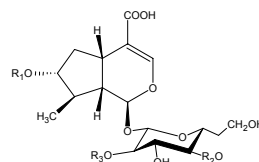
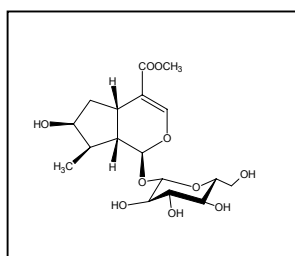
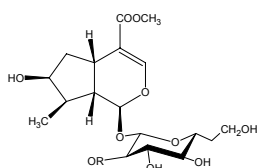


Figura 6

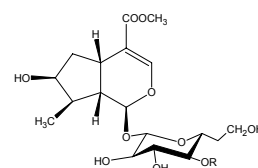
El origen de secoiridoides tipo kingísido no parece claro, si bien en *Oleaceae* se ha propuesto al ácido cetologánico como intermediario. Producto sólo aislado en *Loganiaceae*,

**14**

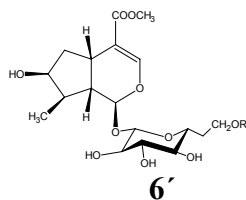
1401/1402 R1=H, R2=cis/trans-p-coumaroil, R3=H *Gentianaceae*  
 1403 R1=m-hidroxibenzoil, R2=H, R3=H *Gentianaceae*  
 1404 R1=m-hidroxibenzoil R2=H, R3= *Gentianaceae*  
 1405 R1=di-m-hidroxibenzoil R2=H, R3= *Gentianaceae*

1601 R= p-coumaroil *Loganiaceae***2'**

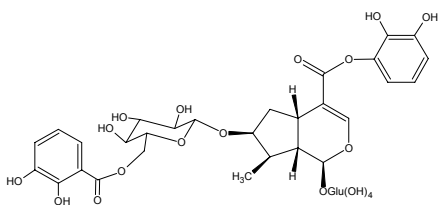
1603/1604 R= cis/trans coumaroil *Gentianaceae*  
 1605/1606 R= cis/trans cafeoil *Gentianaceae*  
 1607/1608 R= cis/trans feruloil *Gentianaceae*

**4'**

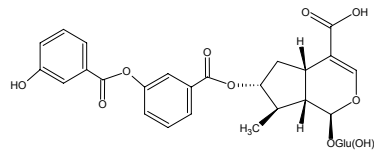
1609 R= m-benzoil *Gentianaceae*  
 1610/1611 R = cis/trans coumaroil *Gentianaceae*

**6'**

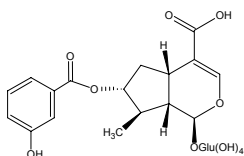
1612 R= m-benzoil *Gentianaceae*  
 1613 R= 2 (R)-metil-3 veratroiloxipropanoil *Gentianaceae*



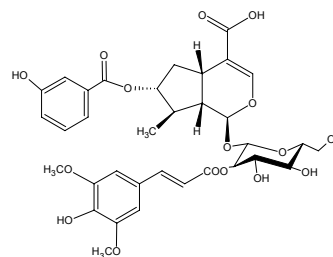
1614 Depresosido *Gentianaceae*



1501 Senburisido II *Gentianaceae*



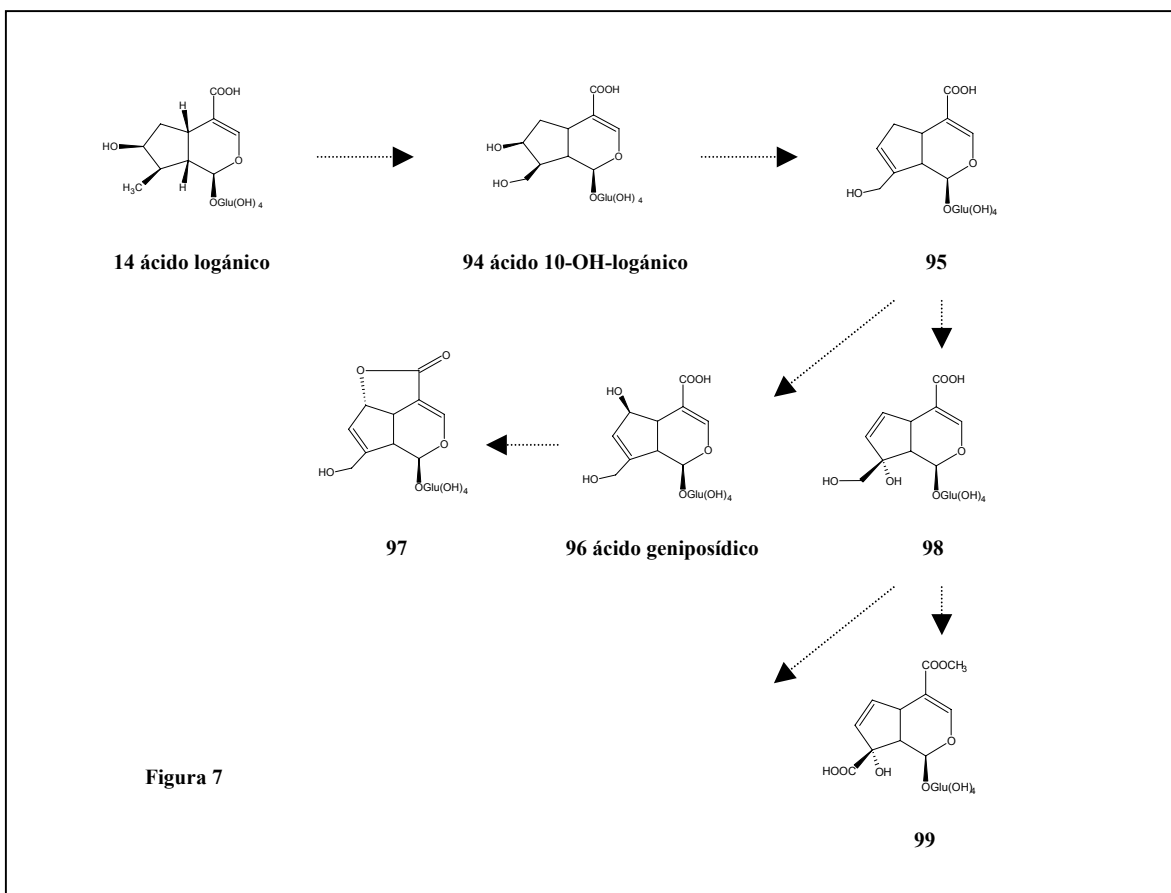
1502 Swertiasido *Gentianaceae*

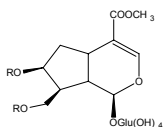


1503 Senburisido I *Gentianaceae*

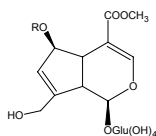
**Iridoides altamente oxidados en *Rubiaceae***

En esta familia aparece un grupo de productos originados a partir del ácido logánico por oxidación progresiva.

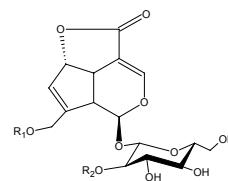




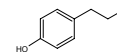
9450 R= H *Rubiaceae*  
9451 R= Ac *Rubiaceae*



9601 *Rubiaceae*



9701 R1=Ac R2=H *Rubiaceae*  
9702 R1=H *Rubiaceae*  
R2=



### Formación de los secoiridoides.

La presencia de secoiridoides parece estar ligada a la Ruta I como hemos visto en el capítulo de la biosíntesis, y se extiende a un gran número de las familias que tienen activa esta ruta. Secoiridoides de los que podemos hacer una clasificación basada en su posible origen. Secoiridoides tipo seloganina, que están presentes en los superordenes *Cornanae*, *Loasanae*, *Ericanae*? y el superorden *Gentiananae* que nos ocupa en este apartado. Secoiridoides tipo secologánico de *Cornanae* y *Gentiananae*. Y secoiridoides tipo oleosido exclusivos de *Gentiananae* y posiblemente solo presentes en la familia *Oleaceae*.

Si bien se ha propuesto a la loganina como origen de la rotura para dar la secologanina y sus derivados, el mecanismo de conversión aún no está claro. Battersby propuso que la rotura se produce a través de la 10-hidroxiloganina o su fosfato.

Otros posibles candidatos son la 7-cetologanina o compuestos 7,8-dihidroxiados. Pero la [7-<sup>3</sup>H] loganina se incorpora en la secologanina y los indol alcaloides de *C. roseus* reteniendo el marcaje en C7 tanto en la secologanina como en los alcaloides. También se retiene en C7 al incorporarse la [7-<sup>3</sup>H] loganina en el morronisido de *Gentiana thunbergii*.

Takeda y Inouye demuestran que el [7,8-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>] ácido deoxilogánico se incorpora en la secologanina de *L. morrowii*, y en la loganina y morronisido de *Cornus officinalis* y *Gentiana thunbergii*, con retención del marcaje en C7 y C8. (ver **Figura 8**)

Estas y otras experiencias parecen indicar que la hipótesis de la 10-hidroxiloganina como intermediaria es la acertada.

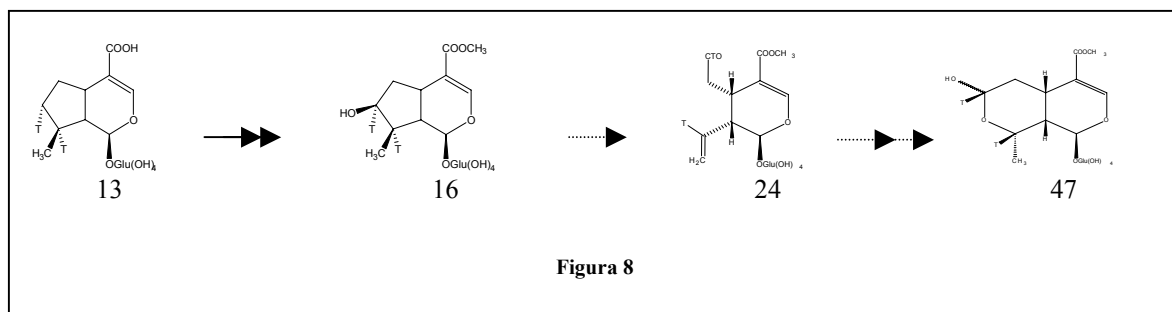


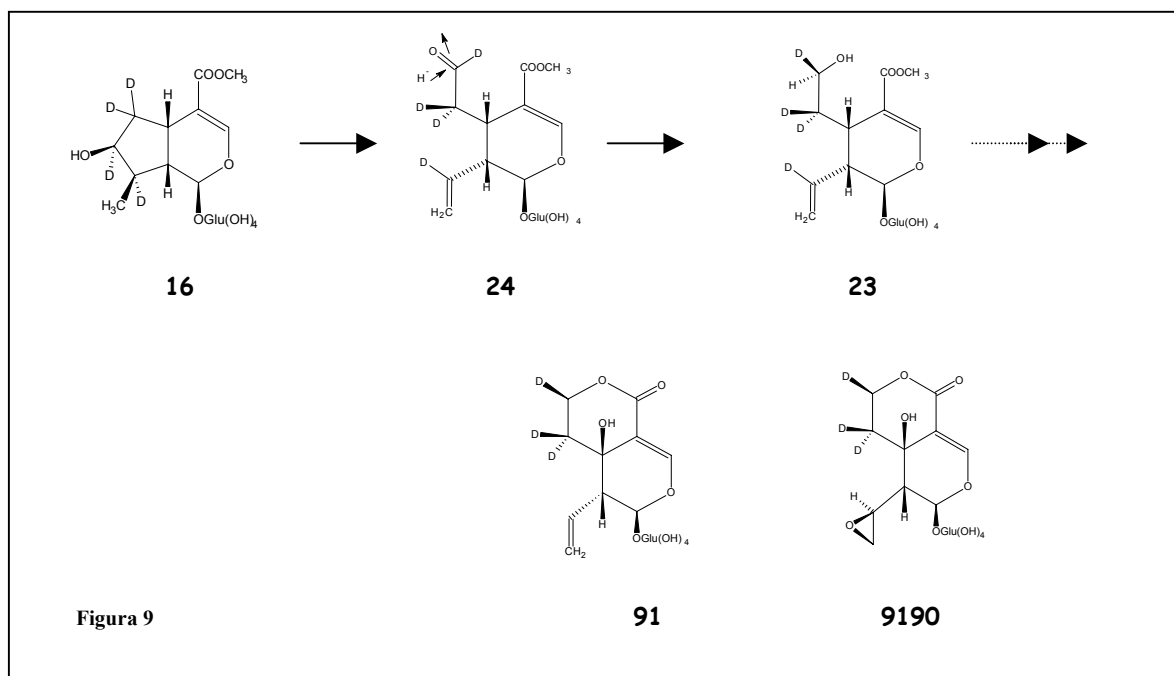
Figura 8

Inouye estudia las incorporaciones de la, 10 hidroxiloganina 9650 y 7-epi-10 hidroxiloganina 4850, tras la administración de ácido deoxilogánico y loganina a *L. morrowii* y loganina a *Adinia pilulifera*. Observándose bajas incorporaciones de 9650 y 4850 en la secologanina y de 16 y 10 en 9650 y 4850, al compararlas con la incorporación de 92 y 16 en 24, indicando que ni 9650 ni 4850 actúan como precursores de 24.

Parecidos resultados obtiene los grupos de Tietze y Battersby al, estudiar las incorporaciones de 10-hidroxiloganina y 7-epi-10 hidroxiloganina en los indol alcaloides de *C. roseus*.

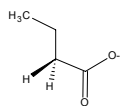
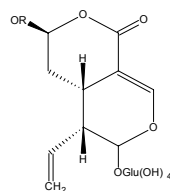
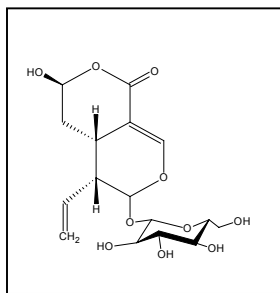
Inouye y col. postulan que la 6β-hidroxiloganina o su fosfato podrían mediar en la rotura para originar la secologanina. Este hecho se descarta en una experiencia en la cual se administra loganina a *E. rusellianum* y *S. japonica* y loganina *Lonicera morrowii* y *Adinia pilulifera*. El espectro H RMN del eustomosido 9109, swertiamarina, secologanina y morronisido y sus acetatos muestran que los dos deuterones se retienen en C6 y un deuterón tanto en C7 y C8. (ver Figura 9)

La estereoquímica de la reducción de la secologanina para dar 91 y 9190 parece clara ya que el deuterón C7 de la loganina se incorpora en posición C7 pro-R tanto de 91 como de 9190. El grupo aldehído sufriría un ataque de un ión hidrído para dar secologanol y los posteriores derivados.

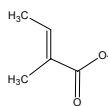




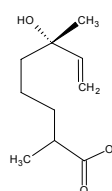
Derivados del ácido secologánico 29



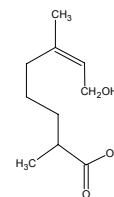
2901 *Gentiniaceae*



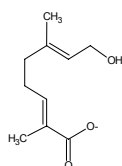
2902 *Gentiniaceae*



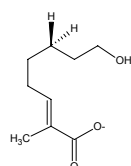
2903 *Gentiniaceae*



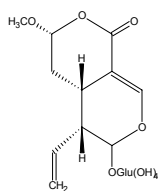
2904 *Gentiniaceae*



2905 foliamenthin *Gentiniaceae*

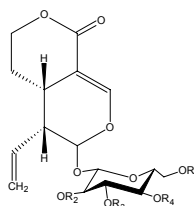
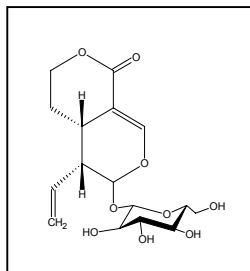


2906 dihidrofoliamenthin *Gentiniaceae*



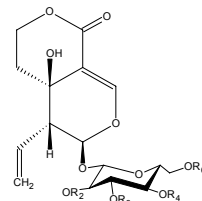
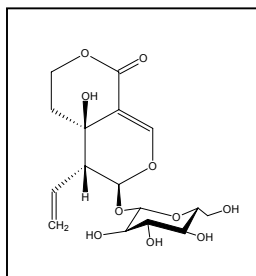
2907 *Rubiaceae*

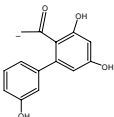
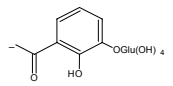
## Derivados del swerosido 90.



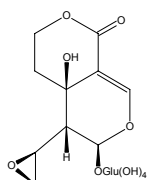
R2	R3	R4	R6	
	COCH <sub>3</sub>	H	H	9001 Centapicrin <i>Gentiniaceae</i>
	H	H	H	9002 Desacetilcentapicrin <i>Gentiniaceae</i>
H		H	H	9003 Decentapicrin A <i>Gentiniaceae</i>
H	H		H	9004 Decentapicrin B <i>Gentiniaceae</i>
H	H	H		9005 Decentapicrin C <i>Gentiniaceae</i>
	H	H	H	9006 Amarogentin <i>Gentiniaceae</i>
	H	H	H	9007 <i>Gentiniaceae</i>
COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>		COCH <sub>3</sub>	9008 Triflorosido <i>Gentiniaceae</i>
	COCH <sub>3</sub>		COCH <sub>3</sub>	9009 Scabrosido <i>Gentiniaceae</i>

Derivados del swertiamarin. 91

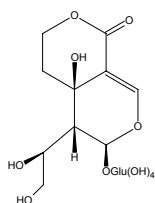


R2	R3	R4	R6	
COCH <sub>3</sub>	H	H	H	9101 <i>Gentiniaceae</i>
COCH <sub>3</sub>	H	trans feruoil	H	9102 <i>Gentiniaceae</i>
COCH <sub>3</sub>	H	cis feruoil	H	9103 <i>Gentiniaceae</i>
COCH <sub>3</sub>	H		H	9104 <i>Gentiniaceae</i>
COCH <sub>3</sub>	H	trans cumaroil	H	9105 <i>Gentiniaceae</i>
COCH <sub>3</sub>	H	cis cumaroil	H	9106 <i>Gentiniaceae</i>
	H	H	H	9107 Amaroswerin <i>Gentiniaceae</i>
COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>		COCH <sub>3</sub>	9108 Rindosido <i>Gentiniaceae</i>

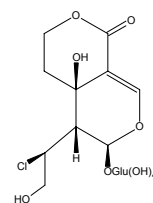
Un epóxido aparece con sus cloruro y diol correspondientes en *Eustoma russellianum* (*Gentiniaceae*), probablemente derivados del ataque de un anión cloruro y un anión hidroxilo al epóxido.



9109 Eustomosido *Gentiniaceae*

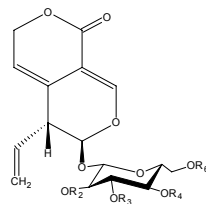
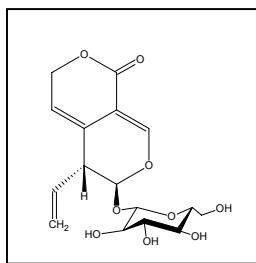


9110 *Gentiniaceae*



9111 *Gentiniaceae*

Derivados del gentiopicosido 92.



R2

R3

R4

R6

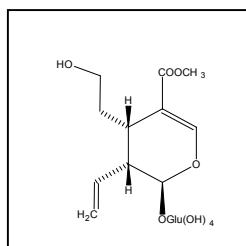
H

H

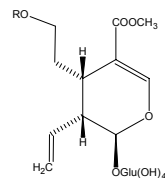
H

Glu 9201 *Gentiniaceae*

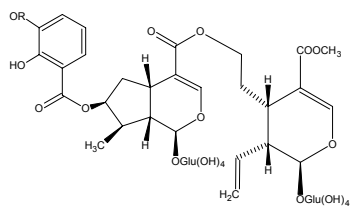
Derivados del secologanol 23.



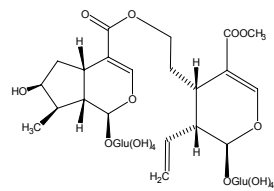
*Gentiniaceae*



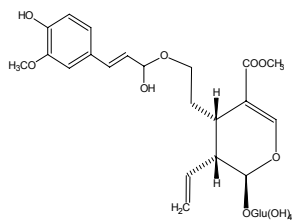
2301 R=Ac *Gentiniaceae*



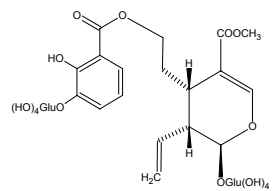
2302 *Gentiniaceae*



2303 *Gentiniaceae*

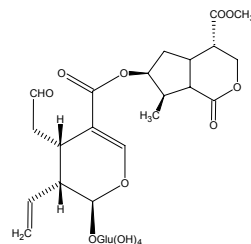
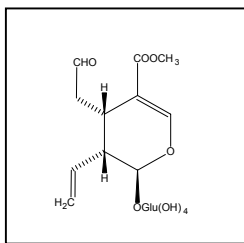


2304 *Gentiniaceae*

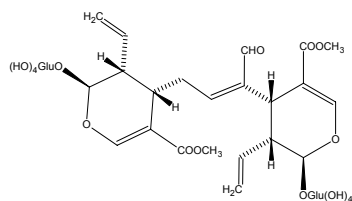


2305 *Gentiniaceae*

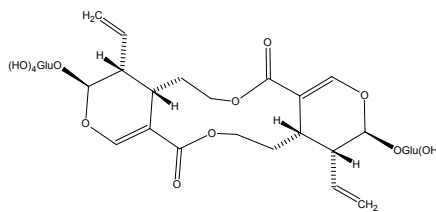
Derivados de la secologanina 24.



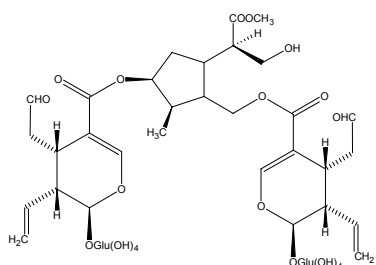
2401 Scaevolosido *Goodeniaceae* (*Goodeniales*)



2402 centaurosido *Gentianaceae*

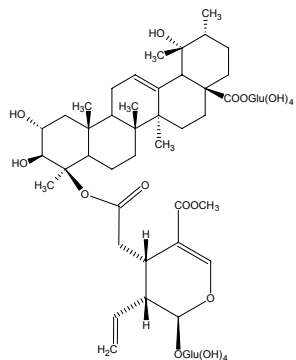
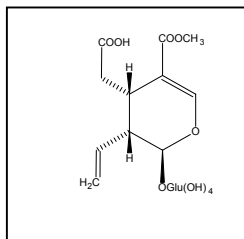
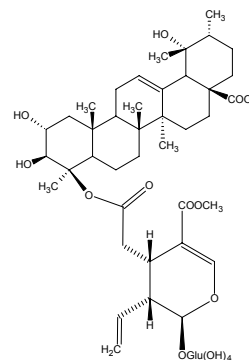


2404 lianthosido *Gentianaceae*

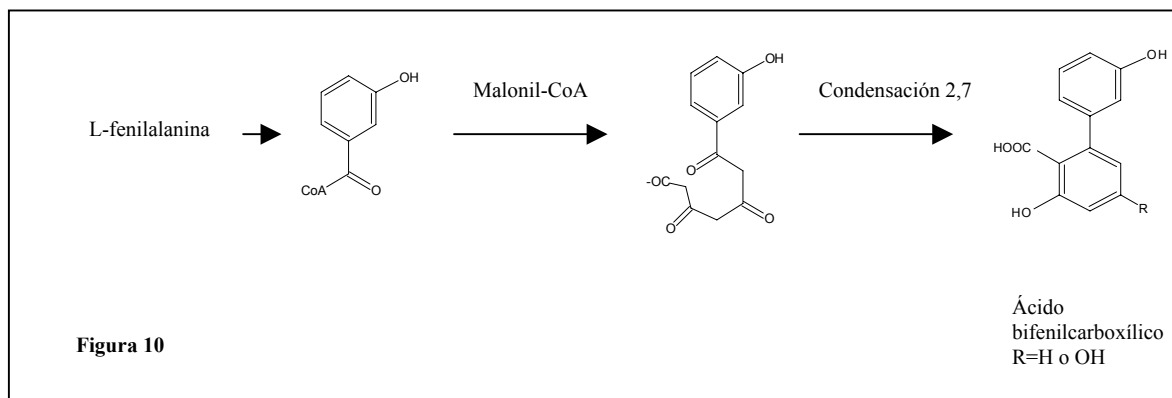


2403 *Apocinae*

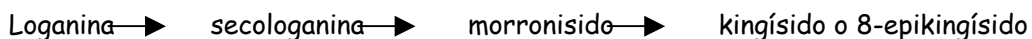
## Derivados de la secoxyloganina 30.

3001 defontaniosido *Loganiaceae*3002 ác. defontánico *Loganiaceae*

Amaroargentina, amaroswerina y amaropanina (desoxiamarogentina) son secoiridoides glucosilados que aparecen en *Gentiniaceae*. El resto ácido bifencilcarboxílico de estos glucosidos parece biosintetizarse la vía propuesta en la **Figura 10**. El ácido m-hydroxybenzoico es el precursor de esa porción de los compuestos como sugiere la concurrencia del ácido m-hidroxibenzoico conjugado con secoiridoides (153), en muchas *Gentiniaceae*.



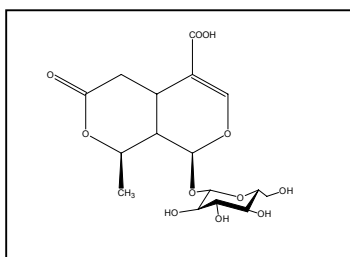
El morronisido se ha aislado del genero *Gentiana* y *Cornus*, y otras especies como *Lonicera morrowii* (*Caproifoliaceae*). El kingísido 27 también aparece en *Lonicera morrowii* y en *Gentiana* el epikingísido 28, y derivados del kingísido y epikingísido. En base a comparaciones estructurales y a la incorporación de [carbo-<sup>14</sup>C-metoxi] secologanina en *Cornus officinalis* y [7-<sup>3</sup>H] loganina en *Gentiana thunbergii* se ha propuesto la siguiente ruta:



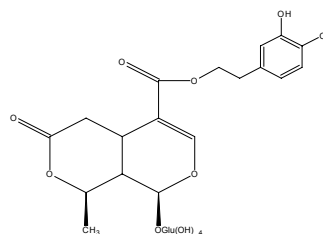
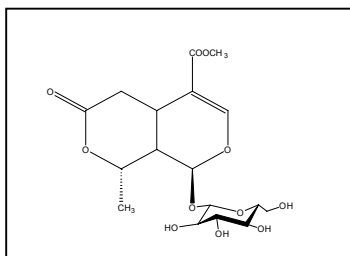
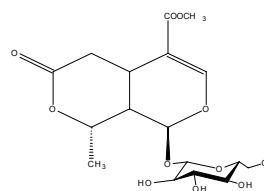
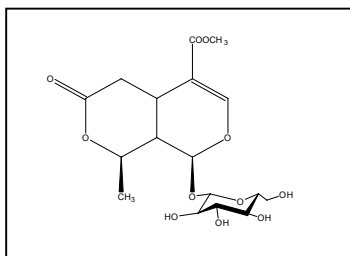
Sin embargo como veremos, en *Oleaceae* esta presente el 8-epikingísido y sus derivados pero no el morronisido, incluyendo además al ácido 7-cetologánico como intermediario, por ello y si no aparecen datos en contra es posible que la ruta sea diferente.



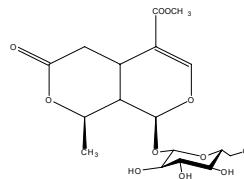
### Derivados del ác. kingísídico, ác. epikingísídico y morronisido.

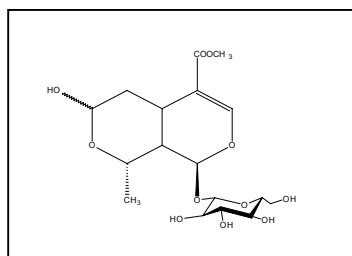


25

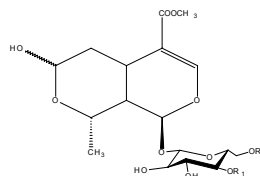
2501 *Gentianaceae*27 Kingísido *Gentianaceae*2701 R= vainilloil *Gentianaceae*

28 8-epikingísido

2801 R= vainilloil *Gentianaceae*

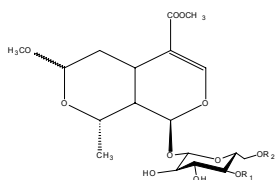


47 morronisido

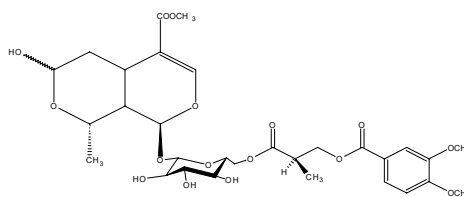


Mezcla 4701 R1=4'-O-cis-p-coumaroil-7 $\alpha$ -morronisido, R2=H  
 4702 R1=4'-O-trans-p-coumaroil-7 $\alpha$ -morronisido, R2=H  
 4703 R1=4'-O-cis-p-coumaroil-7 $\beta$ -morronisido, R2=H  
 4704 R1=4'-O-trans-p-coumaroil-7 $\beta$ -morronisido, R2=H  
*Gentianaceae*

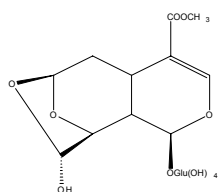
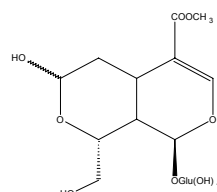
4705 R1=H, R2=6'-O-cis-p-coumaroil-7 $\alpha$ -henkeanosido  
 4706 R1=H, R2=6'-O-trans-p-coumaroil-7 $\alpha$ -henkeanosido  
 4707 R1=H, R2=6'-O-cis-p-coumaroil-7 $\beta$ -henkeanosido  
 4708 R1=H, R2=6'-O-trans-p-coumaroil-7 $\beta$ -henkeanosido  
*Rubiaceae*



4709 R1=H, R2=6'-O-cis-p-coumaroil-7 $\alpha$ -metilhenkeanosido  
 4710 R1=H, R2=6'-O-trans-p-coumaroil-7 $\alpha$ - metilhenkeanosido  
 4711 R1=H, R2=6'-O-cis-p-coumaroil-7 $\beta$ - metilhenkeanosido  
 4712 R1=H, R2=6'-O-trans-p-coumaroil-7 $\beta$ - metilhenkeanosido  
*Rubiaceae*



4713 6'-O-[(2R)-metil-3-veratroloxipropanoil]-7 $\alpha$ -morronisido  
 4714 6'-O-[(2R)-metil-3-veratroloxipropanoil]-7 $\beta$ -morronisido  
*Gentianaceae*

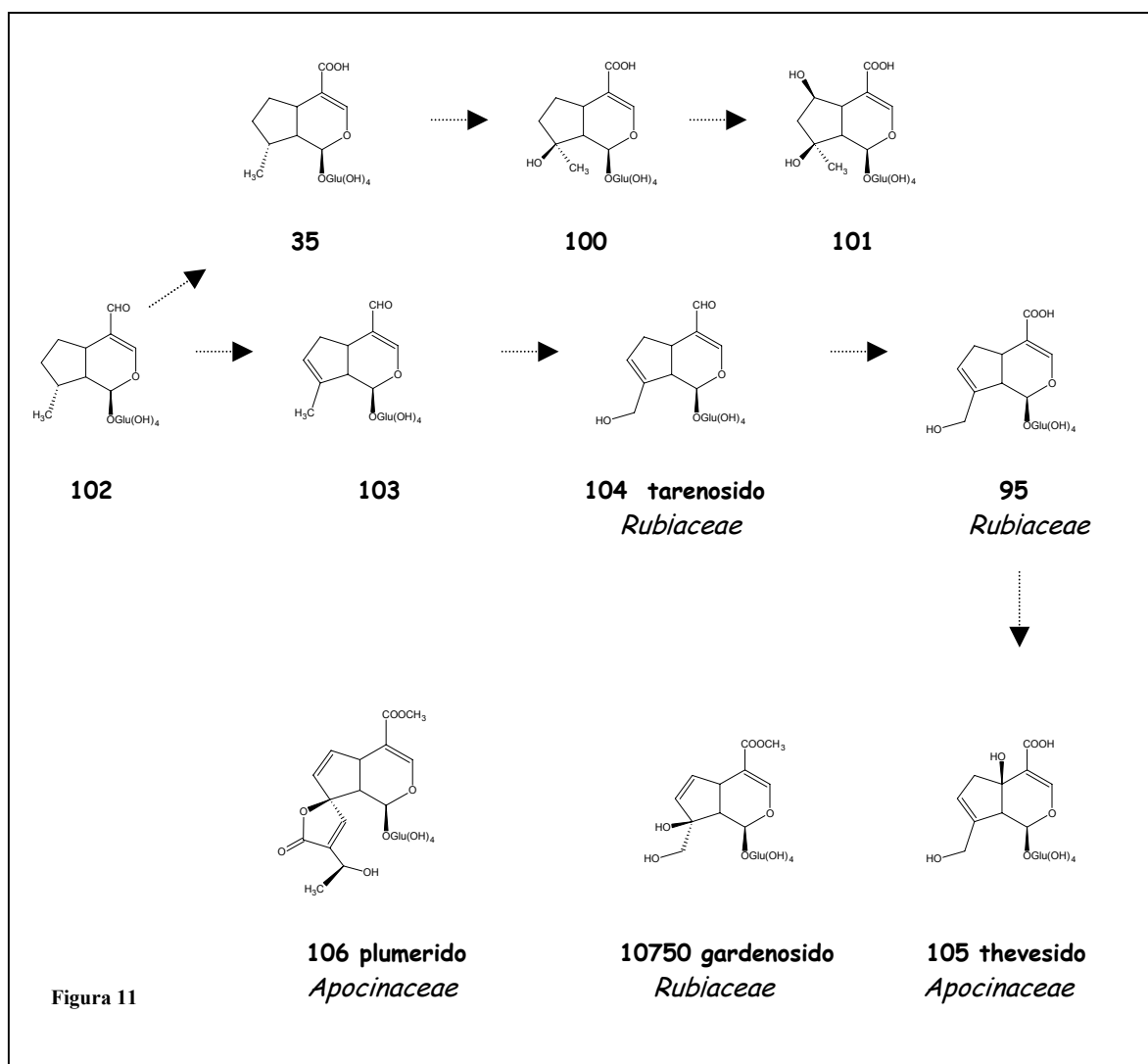
4715 *Rubiaceae*4716 secogaliosido *Rubiaceae*



## Derivados de la Ruta IIb.

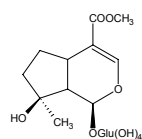
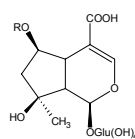
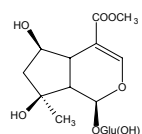
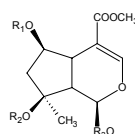
Pero en *Rubiaceae* y probablemente en *Apocinaceae* también está activa la Ruta II b (ver pg. ). El gardeniosido (107) en *Gardenia* se forma por esta ruta. El dehidrogardeniosido, oruwacin de *Randia canthioides*<sup>62</sup> y *Morinda lucida*<sup>63</sup>, ambas *Rubiaceae*, y otros compuestos como el plumierido (106) y otros similares presentes en especies de *Plumeria* y *Allamanda* (*Apocinaceae*), todos relacionados con el gardeniosido (107) probablemente se forman por la misma ruta. (ver Figura 11)

Compuestos como mussaenosido (10050), shanzhisido (101) y su metil éster (10150) presentes en *Lamiales* y que se formarían por la Ruta II, también aparecen en *Gardenia* pero en este caso probablemente por la citada Ruta II b.

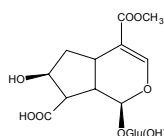
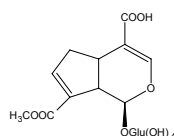
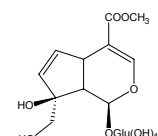
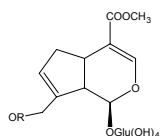
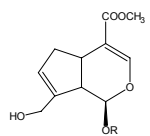


<sup>62</sup> Uesato, S., Ali, E., Nishimura, H., Kawamura, I., y Inouye, H. (1986) *Phytochemistry* **21**, 353

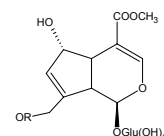
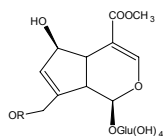
<sup>63</sup> Adesogan, E.K. (1979) *Phytochemistry* **18**, 175

10050 mussaenosido *Rubiaceae*10101 R= feruloil *Rubiaceae*10150 *Rubiaceae*

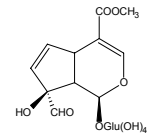
10150 R1=H, R2=H, R3= gentiobiosa *Rubiaceae*  
 10151 R1=benzoil, R2=H, R3=Glu *Rubiaceae*  
 10152 R1=H, R2=benzoil, R3=Glu *Rubiaceae*  
 10153 R1=benzoil, R2=H, R3=Glu-6'OAc *Rubiaceae*  
 10154 R1=benzoil, R2=H, R3=Glu-6'O-benzoil *Rubiaceae*

10850 *Rubiaceae*109 *Rubiaceae*10750 *Rubiaceae*9451 R=AC *Rubiaceae*

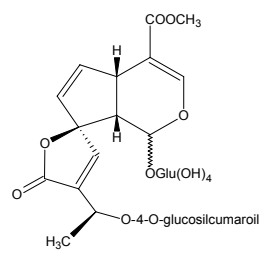
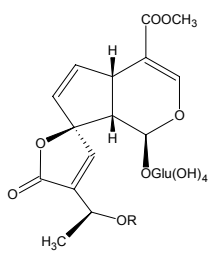
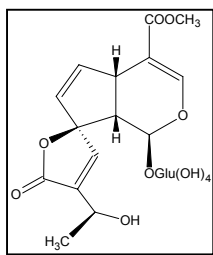
9452 R=gentibiosa-6'-O-p-coumaroil

9851 R= cafeoil *Rubiaceae*

9951 R= p-coumaroil *Rubiaceae*  
 9952 R= p-metoxicinamoil *Rubiaceae*  
 9953 R= feruol *Rubiaceae*

11050 *Rubiaceae*

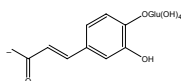
Derivados del plumerido. 106



10601 R=Ac *Apocinaceae*  
 10602 R=cafeoil *Apocinaceae*  
 10603 R=cumaroil *Apocinaceae*

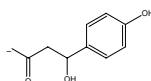
10606 1  $\alpha$  *Apocinaceae*  
 10607 1 $\beta$  *Apocinaceae*

10604 R=

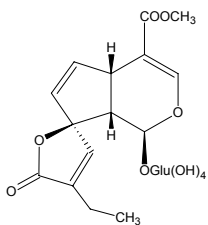


**Apocinaceae**

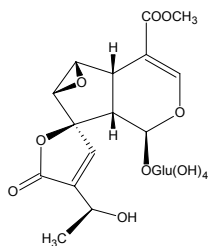
10605 R=



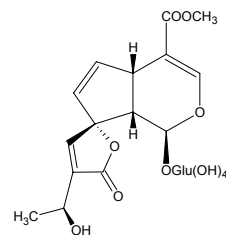
**Apocinaceae**



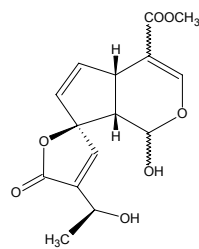
**10608 Apocinaceae**



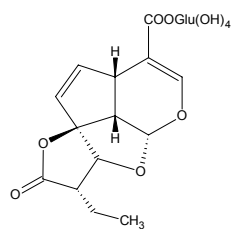
**10609 Apocinaceae**



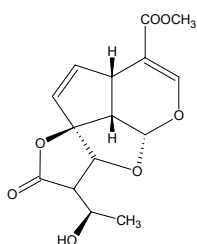
**10610 Apocinaceae**



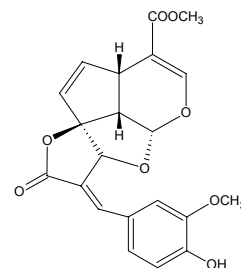
10611/10612  
 allamcin  $\alpha/\beta$  Apocinaceae



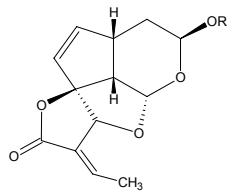
10613 *Apocinaceae*



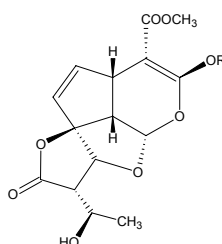
10614 *Apocinaceae*



10615 *Rubiaceae*



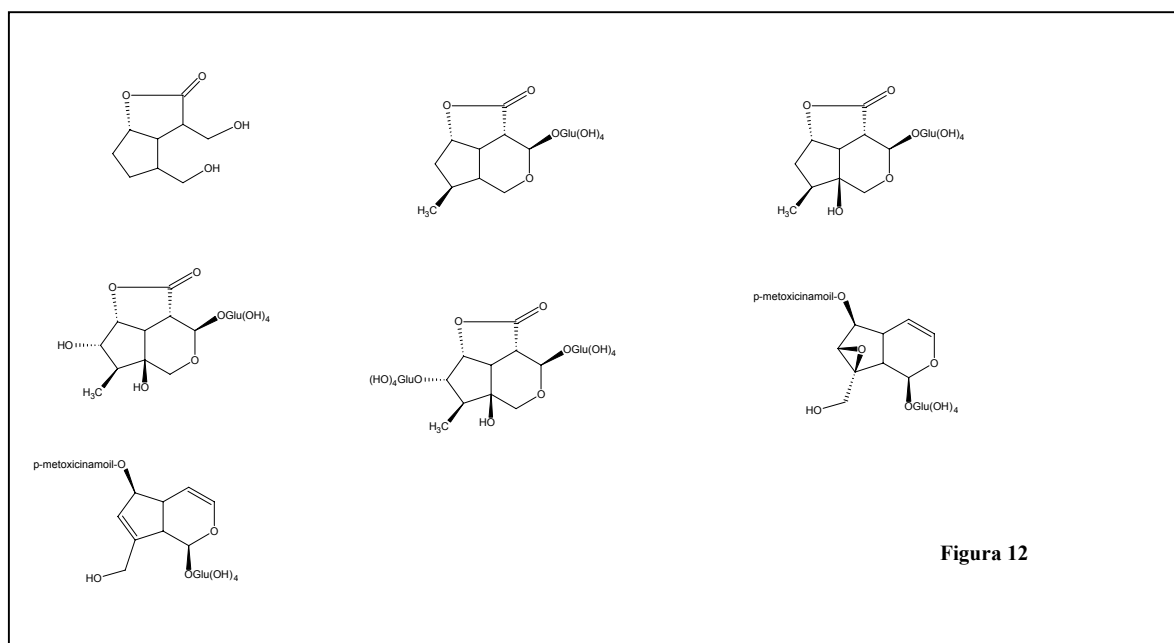
10616 R=H *Apocinaceae*  
10617 R=CH<sub>3</sub> *Apocinaceae*



10618 R=H *Apocinaceae*  
10619 R=CH<sub>3</sub> *Apocinaceae*

**Iridoides exclusivos de *Loganiaceae*.**

Junto con iridoides muy similares al resto de las familias del orden, esta familia tiene una serie de compuestos que en gran medida pueden constituir excepciones a las rutas vistas. (ver **Figura 12**)

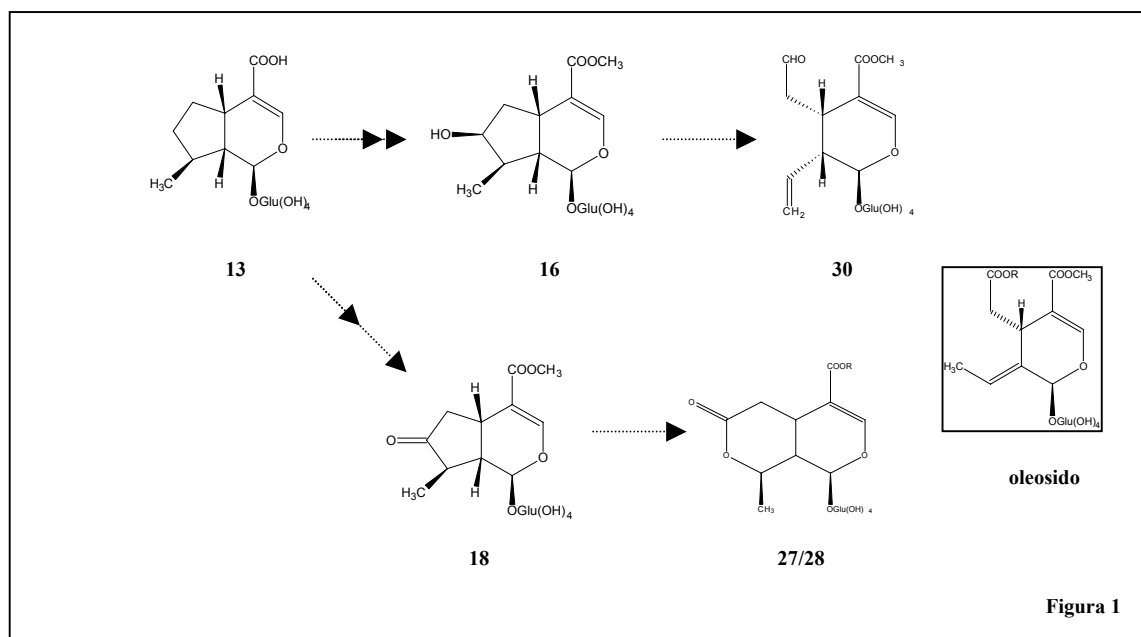


**Figura 12**

## Clasificación biosintética de iridoides y secoiridoides en *Oleaceae*

La mayoría de los secoiridoides que se encuentran en la *Oleaceae* derivan del oleosido (ver **Figura 1**), caracterizados por una función 8,9 exociclo-olefínica, limitándose su distribución a esta familia.

Los estudios biosintéticos previos, concluyen que la biosíntesis de los oleosidos en *Oleaceae* puede ser similar a lo observado para los derivados de la secologanina en *Gentianales* y *Cornales*. Partiendo de el ácido 10 deoxilogánico (**13**), a través de la loganina (**16**) y la secologanina (**30**), seguida de la oxidación en C7. El reagrupamiento de enlace vinílico 8,10 podría dar el doble enlace exocíclico 8,9 (ver **Figura 1**).



Una posible vía a través de la 7-cetologanina (**18**) y del 8-epikingísido (**28**) o kingísido (**27**) fue en principio descartada dada las bajas incorporaciones (0.13%) de estos dos últimos en la oleuropeína. Mientras que la secologanina se incorpora (0.34%), ambos datos en *Olea europaea*.<sup>1,2</sup> (ver **Figura 1**).

Damtoft y col.<sup>3</sup> ensayaron el ácido 10 deoxilogánico (**13**) y su 8-epímero como posibles precursores de los secoiridoides en dos especies de *Oleaceae*. Se administraron a *Fraxinus excelsior* y *Syringa josikaea* derivados deuterados de esos compuestos para estudiar las incorporaciones en los secoiridoides propios de estas especies.

En *S. josikaea* junto con el ác. 8-epikingísídico (**25**), 7 $\beta$ 1 glucopiranosil 11 metil oleosido (**51**), 11 metiloleosido (**50**), oleuropeína (**3808**) y ligstrosido (**3807**), todos sin significativas

<sup>1</sup> Inouye, H., Ueda, S., Inoue, K., y Takeda, Y. (1971) Tetrahedron Letters **43**, 4073

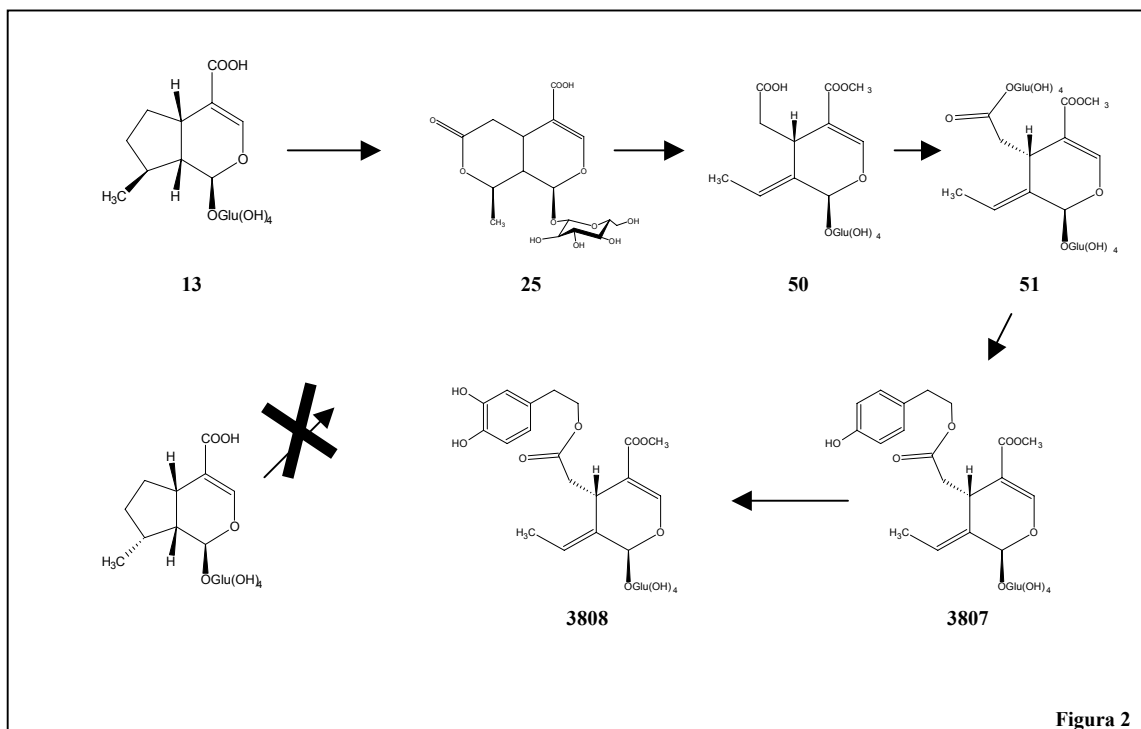
<sup>2</sup> Inouye, H., Ueda, S., y Takeda, Y. (1974) Chem. Pharm. Bull, **22**, 676

<sup>3</sup> Damtoft, S. Franzyk, H. y Jensen, S.R. (1993) Phytochemistry **34**, 1291

incorporaciones, aparece una fracción deuterada del ácido 8-epi-10-deoxilogánico, indicando que no es un buen intermediario. (Ver **Figura 2**)

Al administrar deuterio ácido 10 deoxilogánico (**13**) se incorpora un total de 12.5% del marcaje en **50** (5%), **3807** (2.5%) y **3808** (5%), valores que suponen mejores resultados de los obtenidos en otros experimentos en especies de la misma familia.

Contrariamente a lo esperado el enriquecimiento de (**3807**) fue cuatro veces mayor que (**3808**) indicando que este último se forma por hidroxilación del resto tirosil mas que por esterificación con dopalol.



Similares resultados se obtienen para *F. excelsior*. La incorporación de ác. 8-epilogánico es <0.1 % y la del ác. logánico fue del 11.5% dividido equitativamente en (**50**), (**51**) y excelsiosido (**3842**).

Dado el papel central del ácido logánico en la biosíntesis de secoiridoides tipo secologanina era lógico estudiar las incorporaciones de este compuesto. (ver **Figura 3**)

Por otro lado el ácido 7-epilogánico se aisló de *Phillyrea latifolia* y *Ligustrum ovalifolium*, indicando que este, mas que el ácido logánico puede ser el candidato a intermediario.

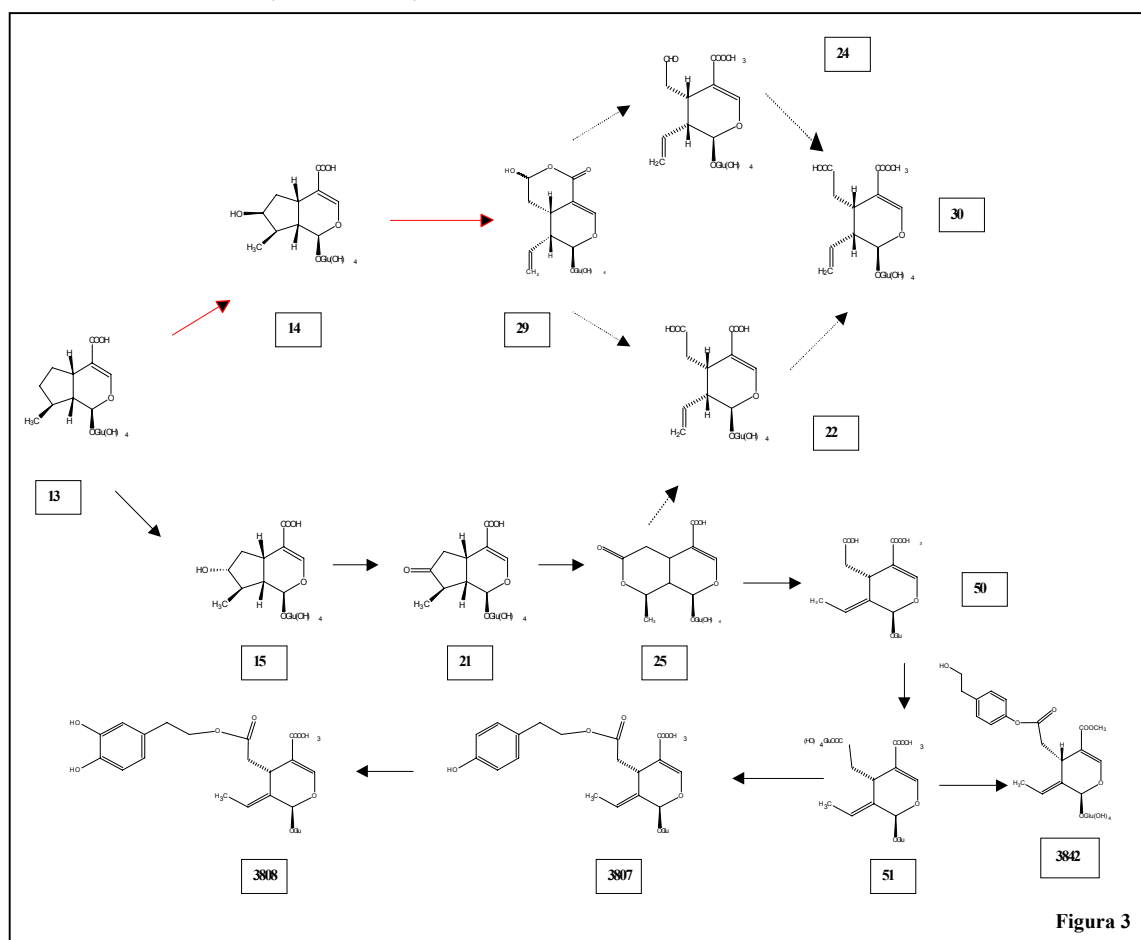
Derivados deuterados del ácido logánico (**14**) y de su 7-epímero (**15**) se administraron en *Fraxinus excelsior*. Se observa una alta incorporación en (**3807**), así como una falta de transformación en el 10-hidroxiligtrosido (**4601**).

Sorprendentemente ambos epímeros se incorporaron de igual forma, indicando al ácido 7-cetologánico como siguiente paso en la cadena de biosíntesis.

Es importante indicar la baja incorporación (<0.5%) del ácido logánico (**14**) en el ácido 8-epikingisídico (**25**). Este ácido está presente tanto en *P. latifolia* y *L. ovalifolium*. Su papel como intermediario en la biosíntesis y en la rotura del ciclo que origina los secoderivados aún no está clara.

También se propone un análogo biosintético de la oxidación Baeyer-Villiger de la 7-cetologanina, como posibilidad para la rotura del ciclopentano, en la biosíntesis de oleosidos.<sup>4</sup>

Los autores proponen una vía a (52),(3807) y (3808) con (51) como intermediario. Durante la administración hidropónica de los precursores no se suplió con nutrientes. Teniendo esto en cuenta parece razonable pensar que la glucosilación tenga un papel esencial en la biogénesis de un gran metabolito. El producto (51) podría ser un intermediario entre el oleosido 11 metiléster y los oleosidos esterificados. La glucosilación podría ser necesaria para el transporte al interior de la célula donde tendría lugar la esterificación. Este punto necesitaría de muchos mas datos para su comprobación.



Por otro lado secoiridoides del tipo secologanina coexisten junto con secoiridoides tipo oleosido tanto en *P. latifolia* como en *F. excelsior*.

Para explicar este hecho los autores proponen tres posibles explicaciones: (ver **Figura 3**)

- Que existan dos vías alternativas en la planta. Una ruta I para la síntesis de secologanina derivados y una ruta II para los oleosido derivados.
- Que ambos tipos se originen por la ruta I.
- Que el secologanosido se forme a partir del ácido 8-epikingisídico (25).

<sup>4</sup> Inouye, H., Ueda, S., Inoue, K., y Takeda, Y. (1971) Tetrahedron Letters **43**, 4073

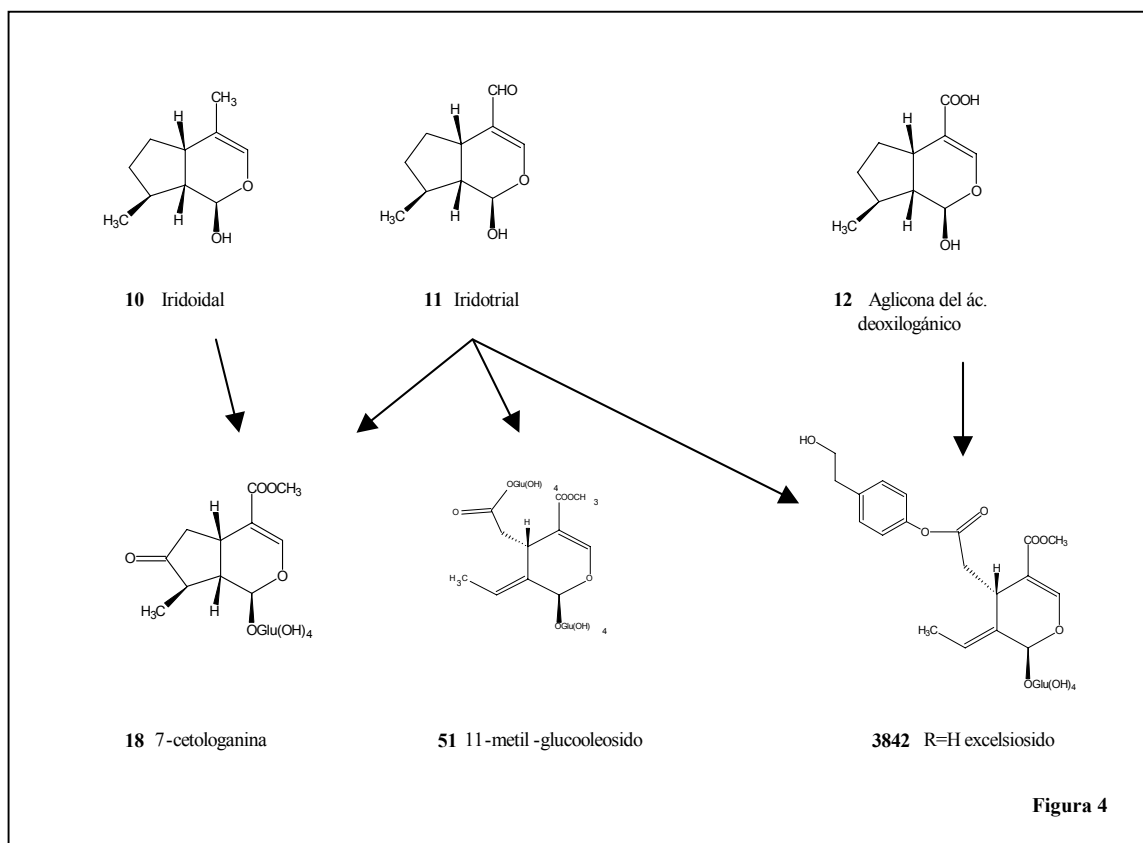
Aunque ni (24) ni (29) no se habían encontrado en *Oleaceas* hasta ese momento, (29) fue detectado en *Fontanesia* posteriormente.

De cualquier forma estos datos junto con el hecho de que las incorporaciones del secologanoso y la secoxyloganina no son significativas en ninguno de los experimentos, no permiten establecer conclusiones definitivas.

Lo único que queda claro en los experimentos realizados por Damtoft y col. es que el ácido 10 deoxilogánico (13) más que su 8-epímero es el precursor temprano de la biosíntesis de oleosidos.

En un trabajo posterior Damtoft y col.<sup>5</sup> administraron a tres especies de la familia de las *Oleaceas* análogos marcados con deuterio del ácido 7-epilogánico (15), ácido logánico (14), ácido 7-cetologánico (21) y sus metil ésteres, así como otros posibles precursores.

En el primer grupo de experimentos se estudiaron las incorporaciones en *Fraxinus excelsior*. Se administraron iridodial, iridotrial y la aglicona del ácido deoxilogánico (12) marcados. El iridodial da incorporaciones detectables en la 7-cetologanina (18). El iridotrial además de incorporarse en la 7-cetologanina, da incorporaciones en el 7-glucozil -11-metil oleosido (51) y en el excelsiosido (3842). La aglicona del ácido deoxilogánico solo da incorporaciones del 2% en el excelsiosido.



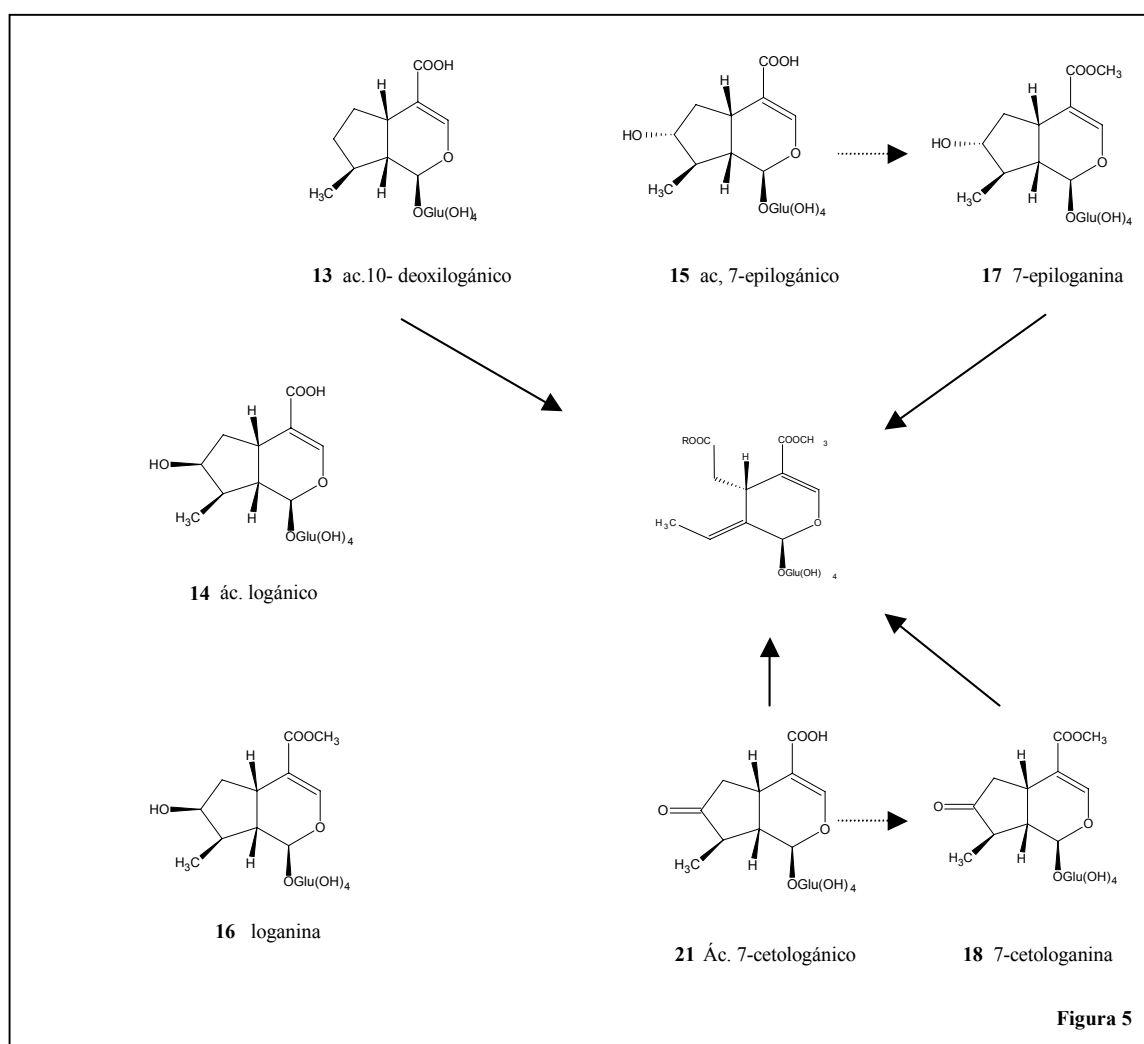
Asumiendo como un hecho que la 7-cetologanina (18) es un intermediario en la biosíntesis, es verosímil pensar que los tres compuestos administrados también lo son.

<sup>5</sup> Damtoft, S. Jensen, S.R. y Nielsen B. J. (1994) *Phytochemistry* 40, 785



En un segundo grupo de experimentos se administraron el ácido deoxilogánico (13) y el ácido 7-cetologánico (21), dando ambas incorporaciones del 7-8% en el excelsiosido (3842). Pero solo el ácido 7-cetologánico da incorporaciones significativas en el oleosido 11 metiléster (50) y ligstrosido (3807). (Ver **Figura 5**)

Esto confirma lo propuesto en un principio al indicar que el ácido 7-cetologánico (21) está implicado en la biosíntesis de oleosidos.



**Figura 5**

En una última serie de experimentos el ácido deoxilogánico fue administrado junto con la 7-epiloganina (17), loganina (16) y 7-cetologanina (18).

La loganina no se incorporó mientras que los otros tres compuestos dan incorporaciones significativas en los oleosidos. (Ver **Figura 5**)

La ausencia de incorporación de la loganina podría ser una variación con respecto a lo obtenido anteriormente por los mismos autores, donde se proponía como un eficiente precursor<sup>6</sup>. Una explicación puede ser que la planta es capaz de utilizar el ácido con una estereoquímica errónea

<sup>6</sup> Damtoft, S. Franzyk, H. y Jensen, S.R. (1993) *Phytochemistry* 34, 1291

en C7. El sitio activo de la enzima oxidativa que origina la 7-cetologanina solo sería capaz de reconocer o admitir la 7-epiloganina en detrimento de la loganina.

También podría explicarse por variaciones en la formación de iridoideas en la planta. La capacidad biosintética de las plantas usadas en estos experimentos fue menor de las utilizadas antes, en función de las incorporaciones.

Los resultados muestran que la vía biosintética de los oleosidos comprende la 7  $\alpha$  hidroxilación del ácido deoxilogánico seguida por una metilación y oxidación a 7-cetologanina.

La secuencia de los últimos pasos no está clara, tanto 7-epiloganina como el ácido 7-cetologánico dan altas incorporaciones.

Otro grupo de experimentos se realizó sobre *Syringa josikaea*. Los glucósidos marcados del iridoideal y del iridotrial dieron muy bajas incorporaciones en el oleosido 11-metil éster, indicando que son malos intermediarios en la biosíntesis de los oleosidos. Probablemente son hidrolizados a sus agliconas, como se observa en la síntesis del cornin en *Verbena*<sup>7</sup> y del antirrhinosido en *Antirrhinum*<sup>8</sup>.

Por otro lado quedó que la loganina no es buena precursora, mientras que la 7-epiloganina y la 7-cetologanina son eficientemente incorporadas en los oleosidos.

Sus correspondientes ácidos no se incorporan en los oleosidos elaborados (3807 y 3808) y solo en (50), posiblemente el intermediario en la biosíntesis de ambos. Puede ser que los ácidos no sean directamente precursores, pero si débilmente incorporados, tras su metilación, claro está. Otra posibilidad es que el transporte de los ácidos en la planta sea bajo.

Pero los resultados en general son coincidentes con los obtenidos para *Fraxinus* donde la 7-epiloganina y la 7-cetologanina o sus correspondientes ácidos están implicados en la biosíntesis de los oleosidos presentes. (Ver Figura 5)

Los experimentos biosintéticos con *Syringa vulgaris* se realizaron en diferentes épocas del año mostrando interesantes resultados.

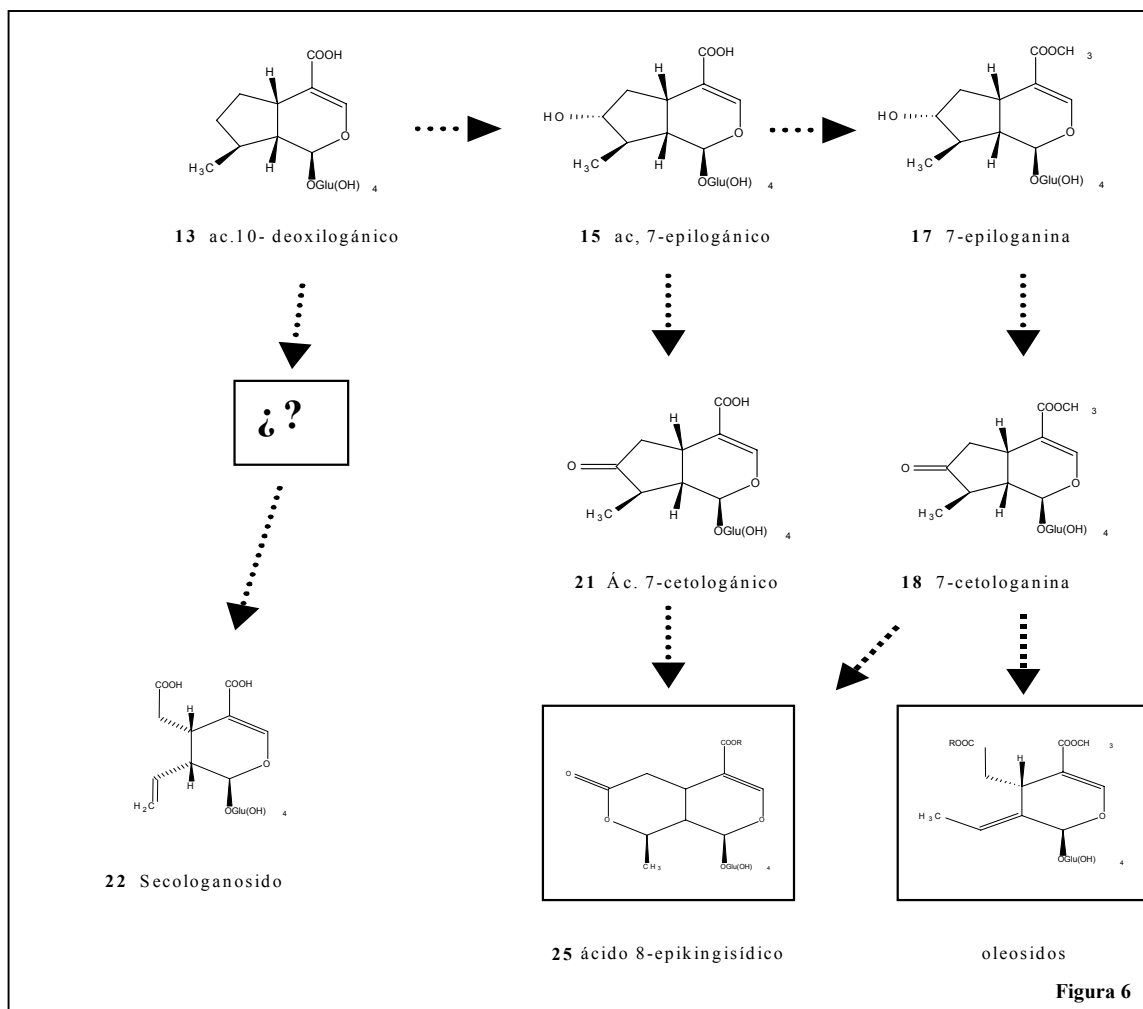
En un primer grupo de experimentos se administra el ácido deoxilogánico (13) y la 7-cetologanina (18). Sorprendentemente no se observan incorporaciones en los oleosidos, pero si altas incorporaciones (6 y 8%) en el ácido 8-epikingisídico (25). El hecho de que (21) sea un eficiente precursor de (25) indica que este último debe considerarse más como un iridoide tipo oleosido que como un iridoide tipo secologanina. (Ver Figura 6)

En los últimos experimentos se obtienen diferentes resultados. El ácido deoxilogánico da incorporaciones en todos los iridoideas, excepto el secologanósido (22), con una recuperación del 20% del marcaje, donde la 7-cetologanina fue incorporada (>16%) en los oleosidos. Una baja incorporación ( $\cong$ 1%) en el 8-epikingisídico (28) es un dato curioso, demostrando que la biosíntesis de iridoideas parece variar durante el año, al menos en esta especie. (Ver Figura 6)

<sup>7</sup> Kirk, O., Jensen, S.R. y Nielsen B.J. (1989) *Phytochemistry* **28**, 97

<sup>8</sup> Breinholt, J. Damtoft, S., Demuth, H. Jensen, S.R. y Nielsen B.J. (1992) *Phytochemistry* **31**, 795

El resultado de los experimentos muestra que la biosíntesis de los oleosidos encontrados en *Fraxinus* y *Syringa* proceden vía iridoidal (10) iridotrial (11), la aglicona de ácido deoxilogánico (12) y el ácido deoxilogánico (13).



La hidroxilación en la posición 7 origina el ácido 7-epilogánico (15) y su posterior transformación da los oleosidos. La biosíntesis de los secoiridoides del tipo secologanina partiría del ácido deoxilogánico (13). Este compuesto es probablemente el intermediario en la biosíntesis de todos los iridoides encontrados en las *Oleaceae* como muestra la **Figura 7**.

La 7  $\alpha$  hidroxilación, no solo origina los oleosidos, sino que también los compuestos derivados del ácido 8-epikingisídico (25). La hidroxilación de (13) origina el ácido logánico (14) que inicia la formación de los derivados de la secologanina como el ácido secologánico de Fontanesia<sup>9</sup>. Y la hidroxilación en la posición 10 origina el ácido adoxosídico (19) que se oxida para dar forsytido (31) en *Forsythia*<sup>10</sup>.

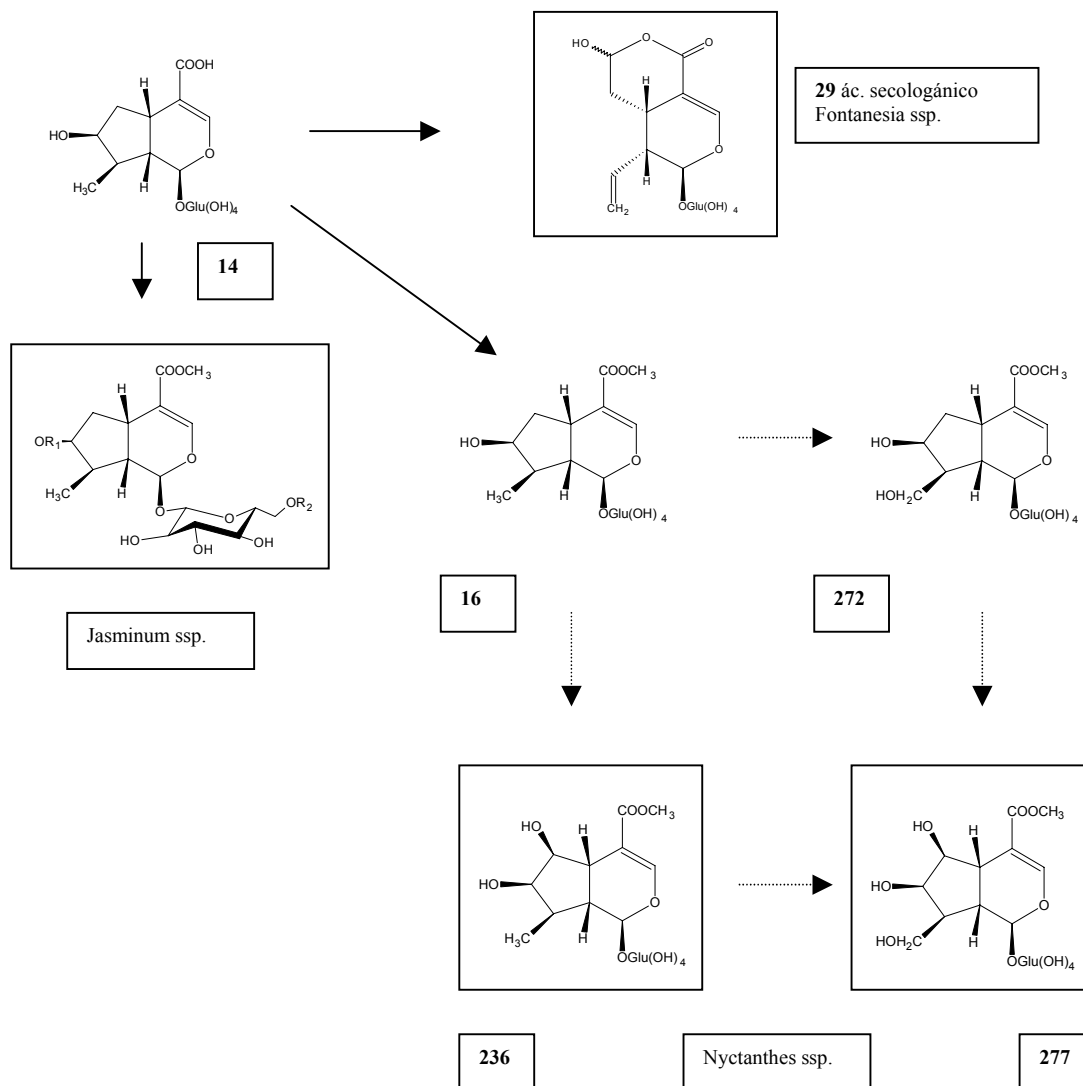
<sup>9</sup> Damtoft, S. Franzyk, H. y Jensen, S.R. (1994) *Phytochemistry* 35, 705

<sup>10</sup> Damtoft S., Franzyk H. y Jensen, S.R. (1994) *Phytochemistry* 37, 173



## Derivados del ácido logánico (14).

Si bien parece probado el origen de los secoiridoides tipo oleosido a partir del ácido 7-epilogánico (15) a través de la 7-cetologanina (18), en las *Oleaceae* también parece estar activa la vía que lleva desde el ácido 10 deoxilogánico (13) hasta el ácido logánico (14) como prueba la gran cantidad de derivados candidatos a proceder de este ácido.

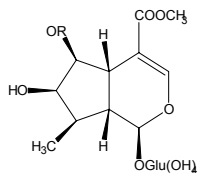


Por un lado el ácido logánico es el precursor del ácido secologánico (29), que como veremos, parece ser el inicio de una serie de secoiridoides presentes en *Fontanesia ssp.*

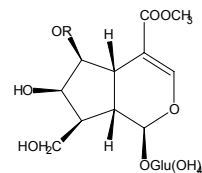
Pero sin duda el derivado más importante de este ácido es su metil éster, la loganina, compuesto que da origen a un considerable número de derivados en esta familia.

Aunque no existen trabajos al respecto, es muy probable que los compuestos aislados de *Nyctanthes arbortristis*, procedan o deriven también de este compuesto (237, 238, 278). Los dos primeros posiblemente vía 6-hidroxioganina (236), no aislado aún en *Oleaceae*. Y el arbortristosido B por oxidación del anterior o a partir de la 10-hidroxioganina (272) tampoco

aislada en *Oleaceas*. Tampoco existen datos sobre el supuesto producto origen de este derivado, el nyctanthosido (277).



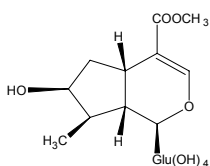
237 R= 6-O-trans-p-coumaroil-6 $\beta$ -hidroxiloganina  
238 Arbotristosido A R= p-metoxicinamoil



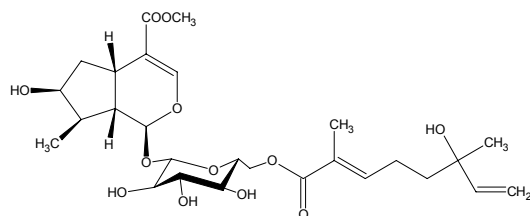
278 Arbotristosido B(6-O-cafeoilnyctanthoside) R= cafeoil

### Derivados del tipo 7-O y 6'-O derivados en *Jasminum hemdeleyi*.

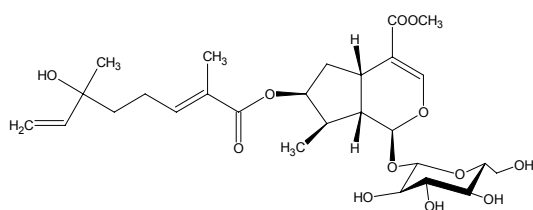
Loganina esterificada en C7 por ác. mentiafólico (1615) y el ác. mentiafólico glucosilado en 6" (1616/7), y loganina esterificada en C6' por ácido mentiafólico (1620) y cis/trans cinámico (1618/9).<sup>11</sup>



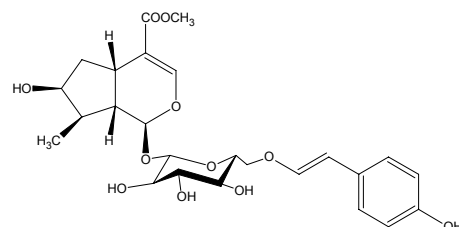
16 loganina  
*Jasminum hemsleyi*



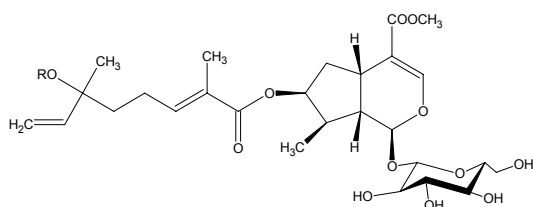
1620



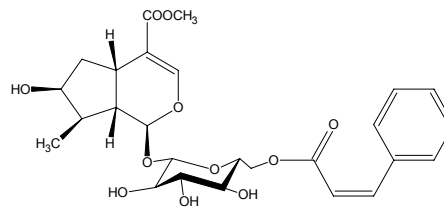
1615



1618



1616 R=Glu (6''S)  
1617 R=Glu (6''R)

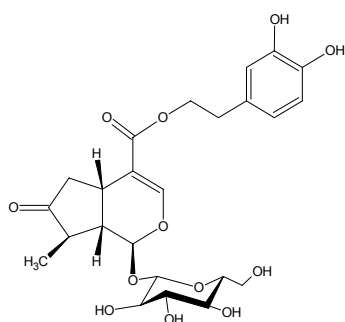
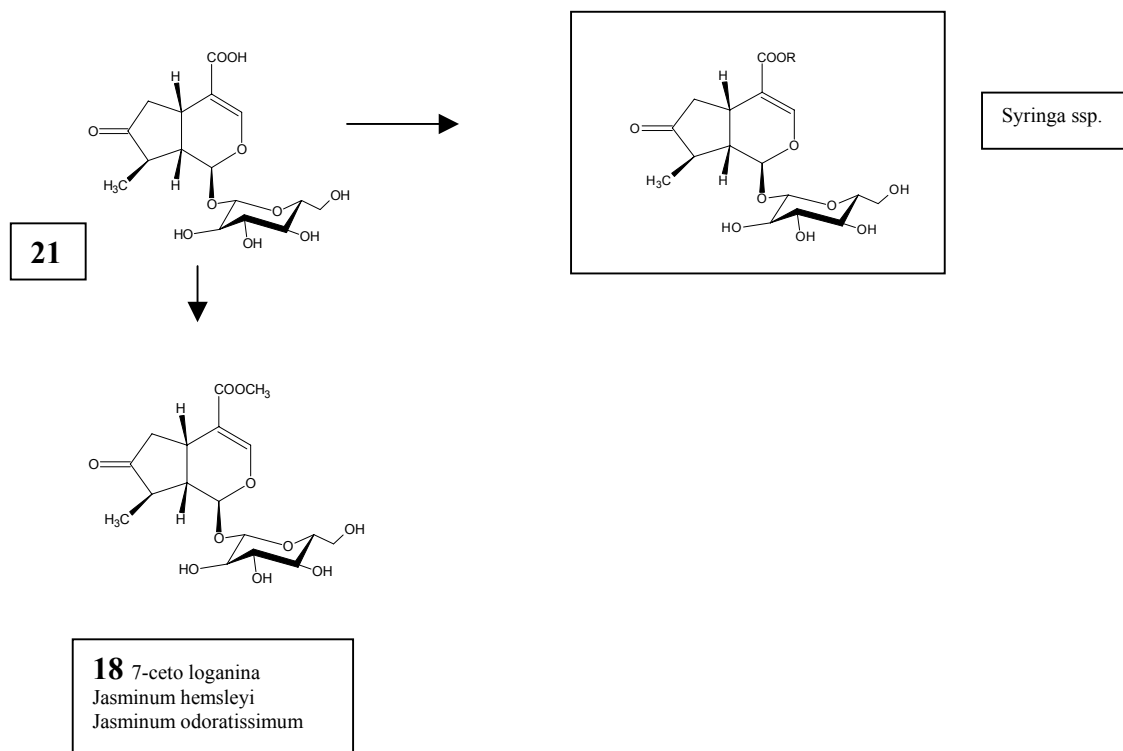
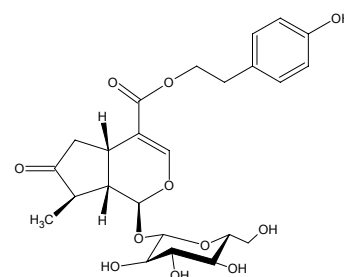


1619

<sup>11</sup> Tanahashi T., Fujita T., Shimada A., Chen CH-CH, Nagakura N., Inoue K T. y Ono M. (1995) Chem. Pharm. Bull. 43(5), 729

## Derivados del ácido 7-cetologánico (21).

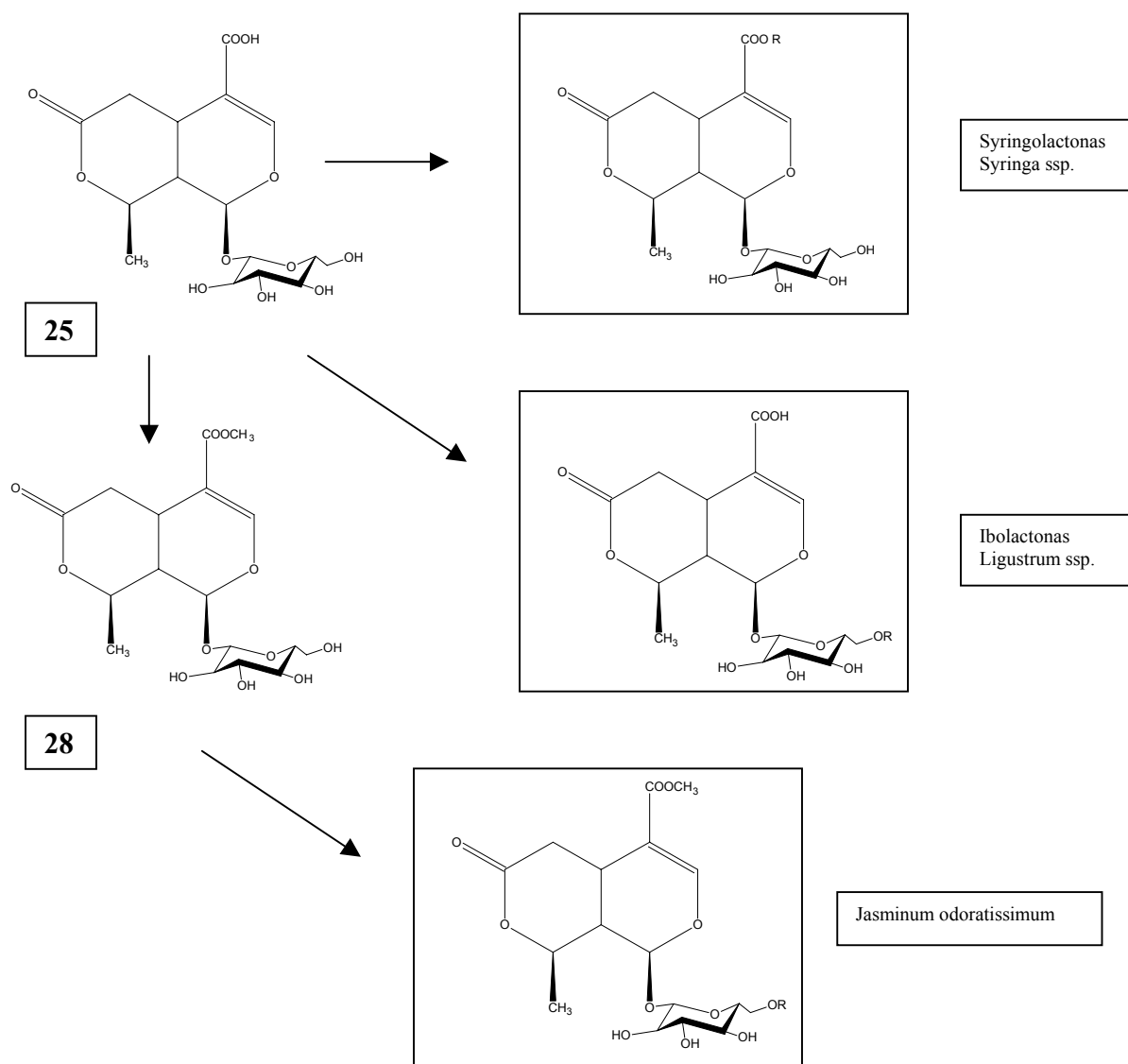
Derivados del propio ácido 7-cetologánico (21) presentes en *Syringa reticulata*.<sup>12</sup>  
 (Posibles agliconas de estos productos se han descrito, ver efecto de las glucosidasas sobre los iridoides).

2101 Syringopicrosido B *Syringa reticulata*2102 Syringopicrosido C *Syringa reticulata*

<sup>12</sup> Christie A. Boros y Frank R. Stermitz (1990) Journal of Natural Products **53**, 1055

## Derivados del ácido 8-epikingísido (25).

El propio ácido se ha detectado en los géneros *Phillyrea ssp.*, *Syringa ssp.* y *Ligustrum ssp.*<sup>13</sup>



Y derivados esterificados en el carboxilo C11 (Syringolactonas) o 6'-O-glucoderivados (Ibolactonas). También aparece frecuentemente el 8-epikingísido en esta familia (*Jasminum ssp.*<sup>14</sup>, *Osmanthus ssp.*, *Fraxinus ssp.*, *Syringa ssp.*), incluida la planta en estudio *Jasminum odoratissimum*<sup>15</sup>. También en *Jasminum odoratissimum* hemos encontrado derivados del propio epikingísido<sup>16</sup>

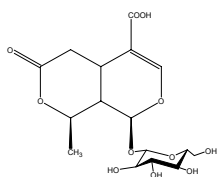
<sup>13</sup> Christie A. Boros y Frank R. Stermitz (1991) *Journal of Natural Products* **54**, 1173

<sup>14</sup> Shen Y-CH, Lin S-L, Chein CH-CH (1996) *Phytochemistry* **42**, 1629

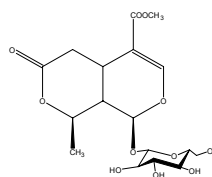
<sup>15</sup> Datos no publicados.

<sup>16</sup> H. Lopez, Pérez J.A., Hernández J.M. y Trujillo J. M. (1997) *Journal of Natural Products* **60**, 1337

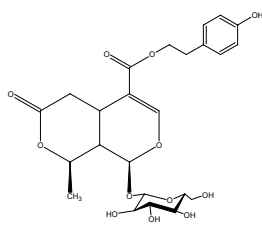




**25** ác. 8-epikingisídico  
Fraxinus excelsior  
Syringa vulgaris

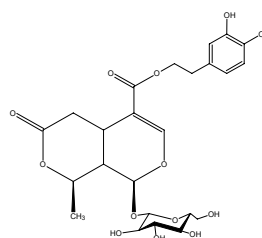


**28** 8-epikingisido  
Ligustrum japonicum.  
Jasminum odoratissimum  
Fraxinus excelsior  
Syringa vulgaris

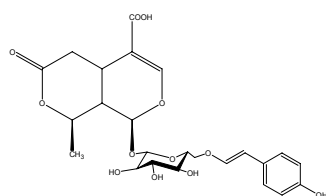


**2501** Syringolactona A

*Syringa vulgaris*

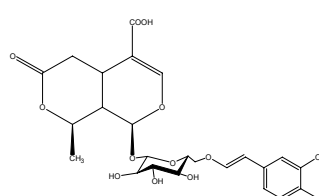


**2502** Syringolactona B

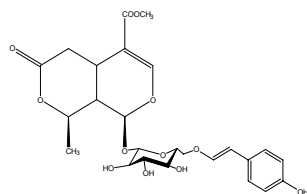


**2503** Ibolactona A

*Ligustrum obtusifolium*

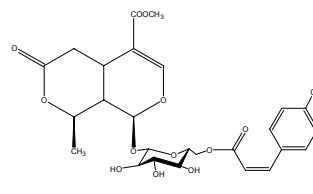


**2504** Ibolactona B



**2801/2802** cis/trans 6'-p-coumaroil 8epikingisido

*Jasminum odoratissimum*



## Derivados del ácido secologánico (29).

También aparecen en *Oleaceae* algunos secoiridoides derivados del ácido secologánico. Este último aparece de forma natural en *Fraxinus ssp.* y *Syringa ssp.* Algunos productos pueden tener origen en este ácido como el secologanosido y derivados (22,45) y otros pueden tener origen en el propio secologanosido (22) o en la secologanina(24) como son la secoxiloganina y derivados (30,3001). (ver Figura 7)

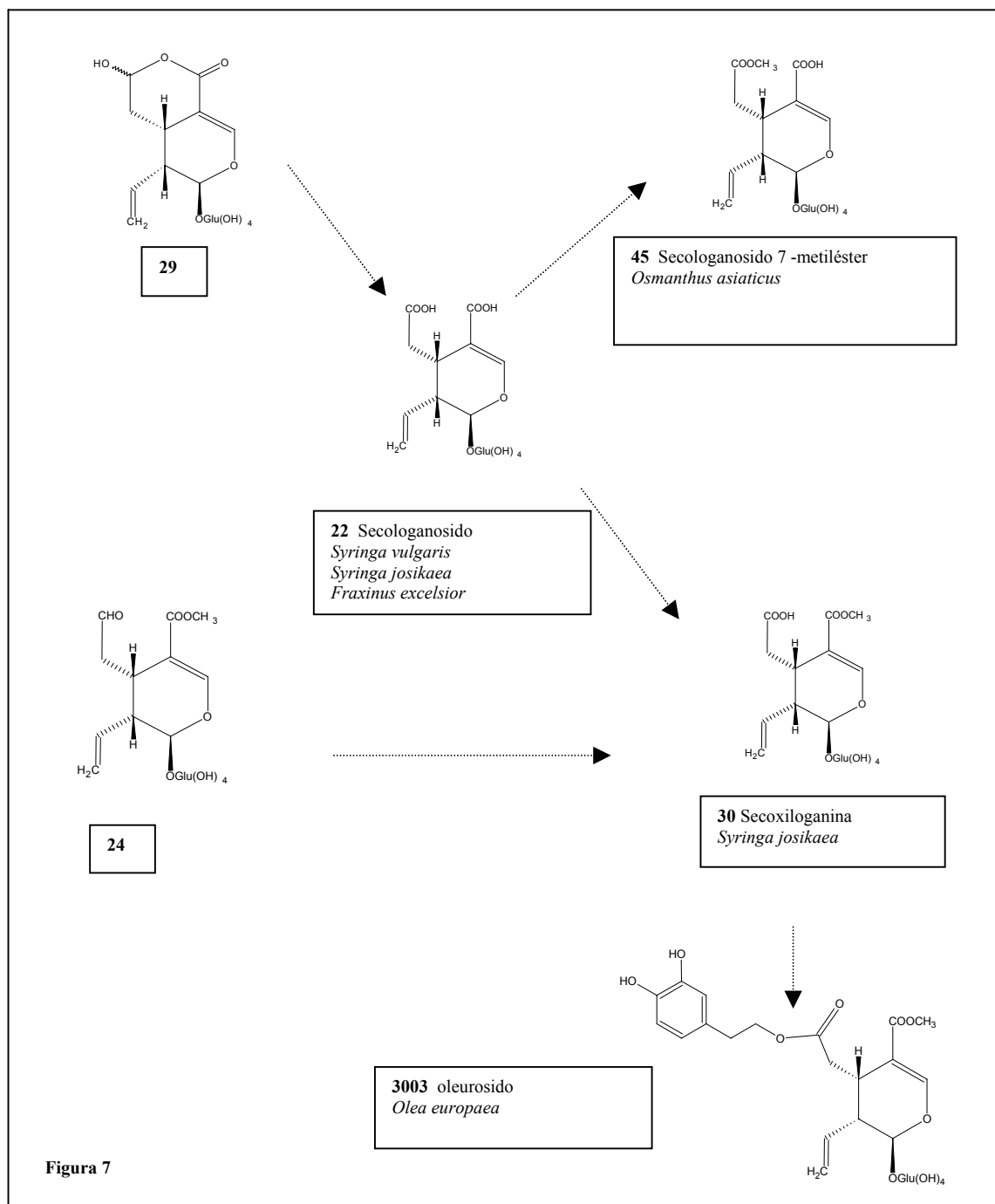


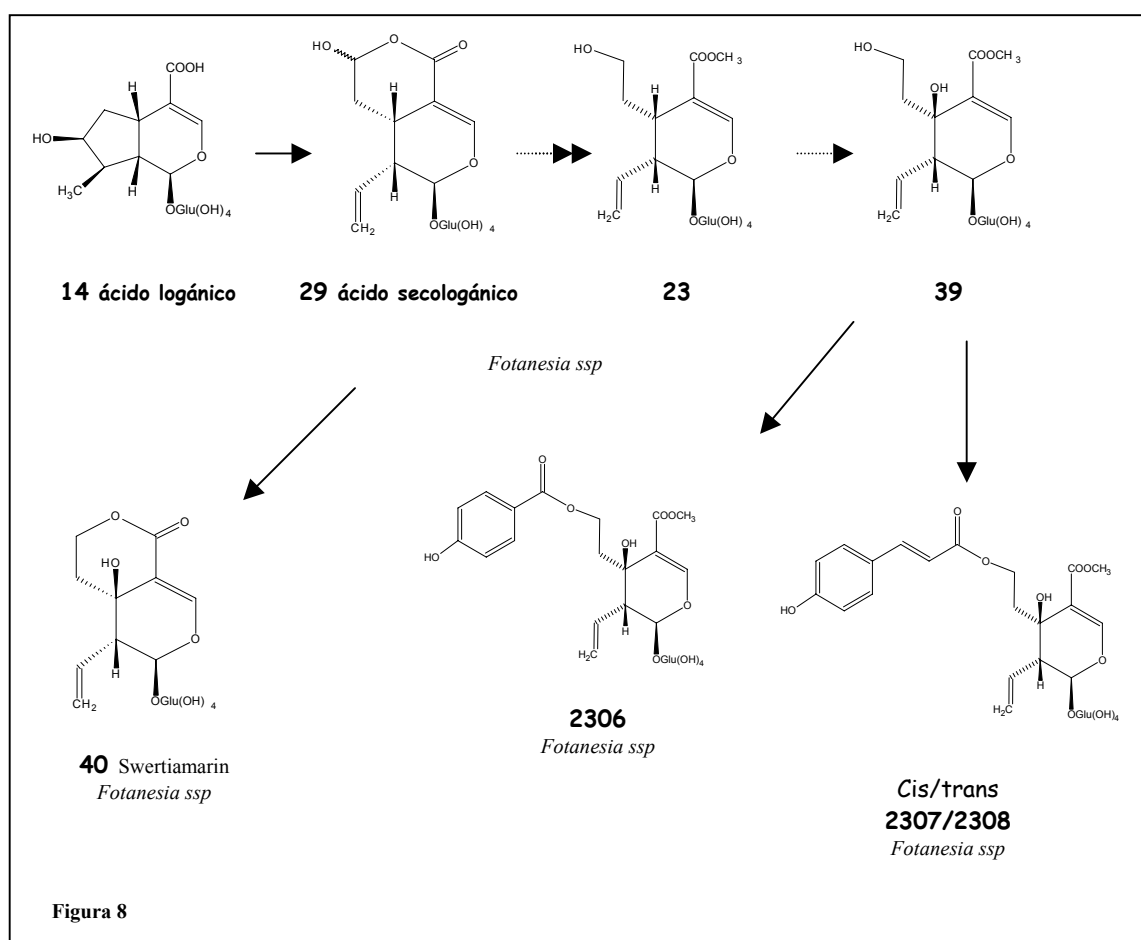
Figura 7

Los secoiridoides presentes en *Fontanesia* son diferentes a los encontrados en otros géneros de las *Oleaceae*. No aparecen los típicos secoiridoides derivados del oleosido, sino otros más próximos a los derivados del ácido secologánico muy similares a los presentes en otras familias como las *Gentiniaceae* (40,2306,2307,2308). (ver **Figura 8**)

Damtoft y colaboradores<sup>17</sup> estudian la biosíntesis de secoiridoides presentes en este género. En concreto en las dos especies reconocidas *F. phillyreoides* y *F. fortunei*.<sup>18</sup> La ruta biosintética que hemos visto propuesta para familias como las *Cornaceae* o las *Gentiniaceae*, en la que la loganina (16) o el ácido logánico (14) se convierten en secologanina (24) o ácido secologánico (29) con retención de H7 y H8, parece similar a la que se produce en *Fontanesia*. Contrariamente a los secoiridoides encontrados en las *Oleaceae*, donde el ácido 7-epilogánico (15) o el ácido logánico (14) son precursores eficientes<sup>19</sup>.

El ácido deoxilogánico (13), 7-epilogánico (15) y el ácido logánico (14) se testaron como precursores en *F. fortunei*. Con experimentos hidropónicos en hojas cortadas frescas usando [6,7,8,10-<sup>2</sup>H]-13, [10-<sup>2</sup>H]-14 y [10-<sup>2</sup>H]-15.

No se observan incorporaciones en 40,2306,2307 o 2308 pero el ácido [6,7,8,10-<sup>2</sup>H]-deoxilogánico da incorporaciones tanto en 14 como en 29, 14% y 19%, respectivamente.



**Figura 8**

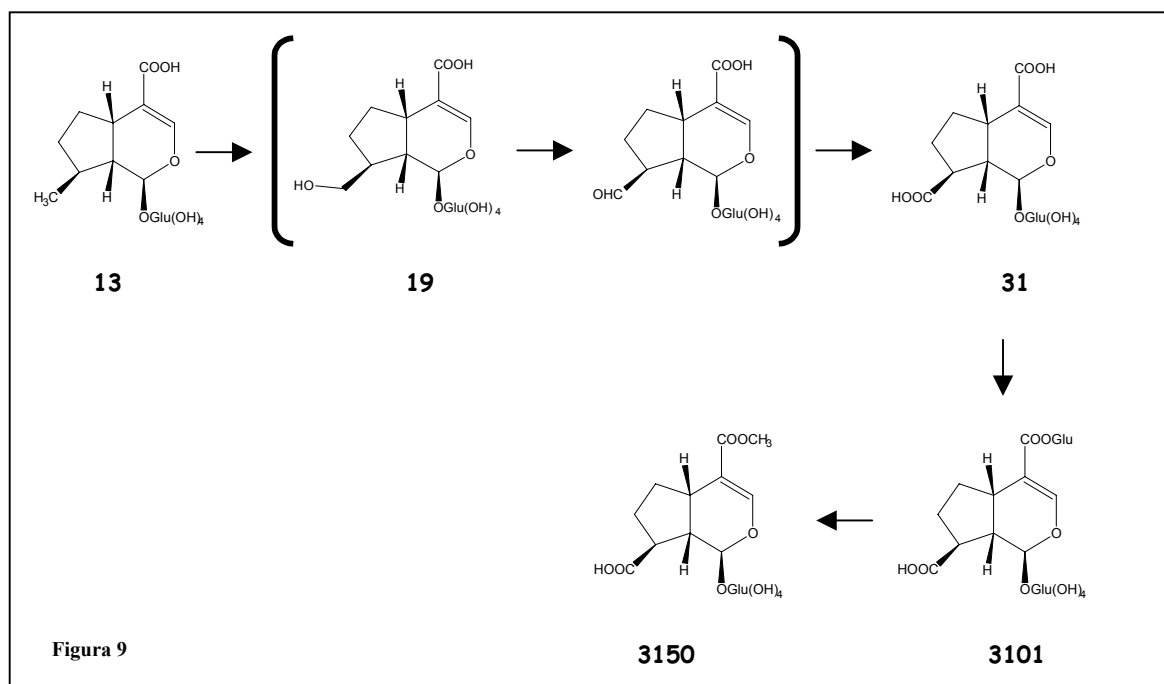
<sup>17</sup> Damtoft, S. Franzyk, H. y Jensen, S.R. (1995) *Phytochemistry* **38**, 615

<sup>18</sup> Damtoft, S. Franzyk, H. y Jensen, S.R. (1994) *Phytochemistry* **35**, 705

<sup>19</sup> Damtoft, S. Jensen, S.R. y Nielsen B. J. (1994) *Phytochemistry* **40**, 785

**Derivados del forsitido (31).**

De los estudios biosintéticos realizados por Damtoft y col. en el género *Forsythia*<sup>20</sup> se puede concluir que sus iridooides se originarían también a partir del ácido 10-deoxilogánico (13) para dar forsitido (31) a través del ác. adoxosídico (19). (ver Figura 9)

**Iridooides tipo secoiridoide. Oleosidos y 10-OH Oleosidos .**

El aislamiento de los compuestos ligustaliosido A (4605) y B (4606) de *Ligustrum japonicum* por Inoue y col. inicia la primera hipótesis sobre la biogénesis de los secoiridooides glucosidados del tipo oleosido y del tipo 10- hidroxioleosido<sup>21</sup>. Todos estos glucósidos, que sólo se han encontrado en *Oleaceas*, se caracterizan estructuralmente por el grupo carboxi C7 esterificado y por un grupo etilideno o hidroxietilideno en C9.

Se supuso que son sintetizados vía secologanina en base a las incorporaciones de los estudios biosintéticos con marcaje, pero los detalles de la vía después del secologanina no se han aclarado. La concurrencia de los productos tipo ligustaliosido, oleosido y 10-OH oleosido en la misma planta indica según Inoue que la biogénesis de las tres series de glucósidos podría explicarse razonablemente por el postulado de un intermediario epóxido. (ver Figura 10).

1. La rotura del epóxido en el intermediario acompañado por la entrada de un protón conduciría a los ligustaliosidos A y B (41,41).
2. La rotura del intermediario epóxido a 8-lo seguidas de una deshidratación conduciría a glucósidos del tipo oleosido.

<sup>20</sup> Damtoft S., Franzyk H. y Jensen, S.R. (1994) *Phytochemistry* 37, 173

<sup>21</sup> Inoue K., Nishioka T., Tanahashi T. y Inouye H (1982) *Phytochemistry* 21, 2305

3. La rotura del epóxido seguida de desprotonación en C9 daría glucósidos del tipo 10-hidroxiolosidos.

La geometría del grupo etilideno sugiere que la configuración en C8 del intermediario epóxido debería ser S, asumiendo que la deshidratación de 30 podría proceder por trans eliminación.

Un epóxido de este tipo ha sido aislado de *Eustoma russelianum*<sup>22</sup>.

Parece posible que un epóxido de este tipo pueda jugar un papel intermediario en la vía biosintética de los glucósidos secoiridoides. Aunque una alternativa para los 10-hidroxiolosidos es originarse por la hidroxilación de los glucósidos tipo oleosido.

Sin embargo las bajas incorporaciones de epóxidos marcados en experimentos de Damtoft y col. parecen descartar esta hipótesis.

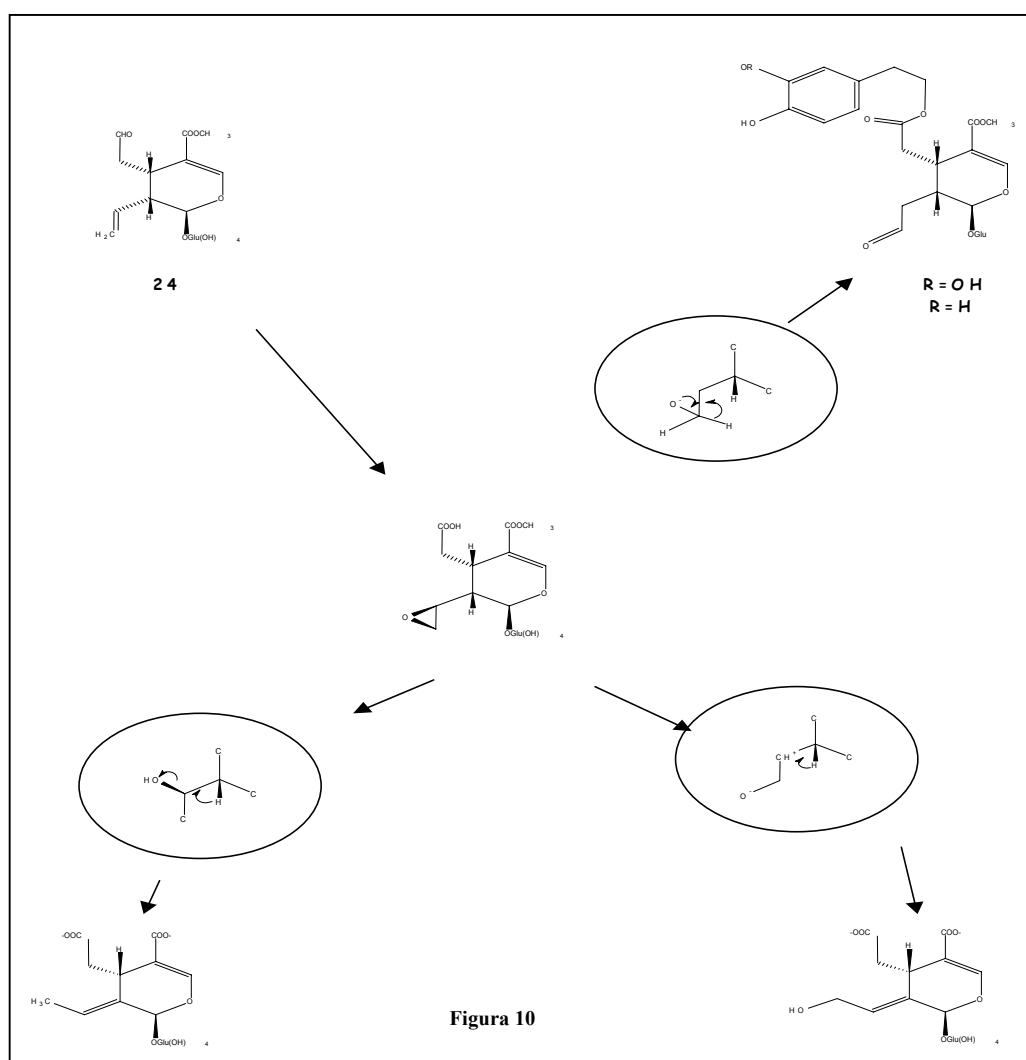


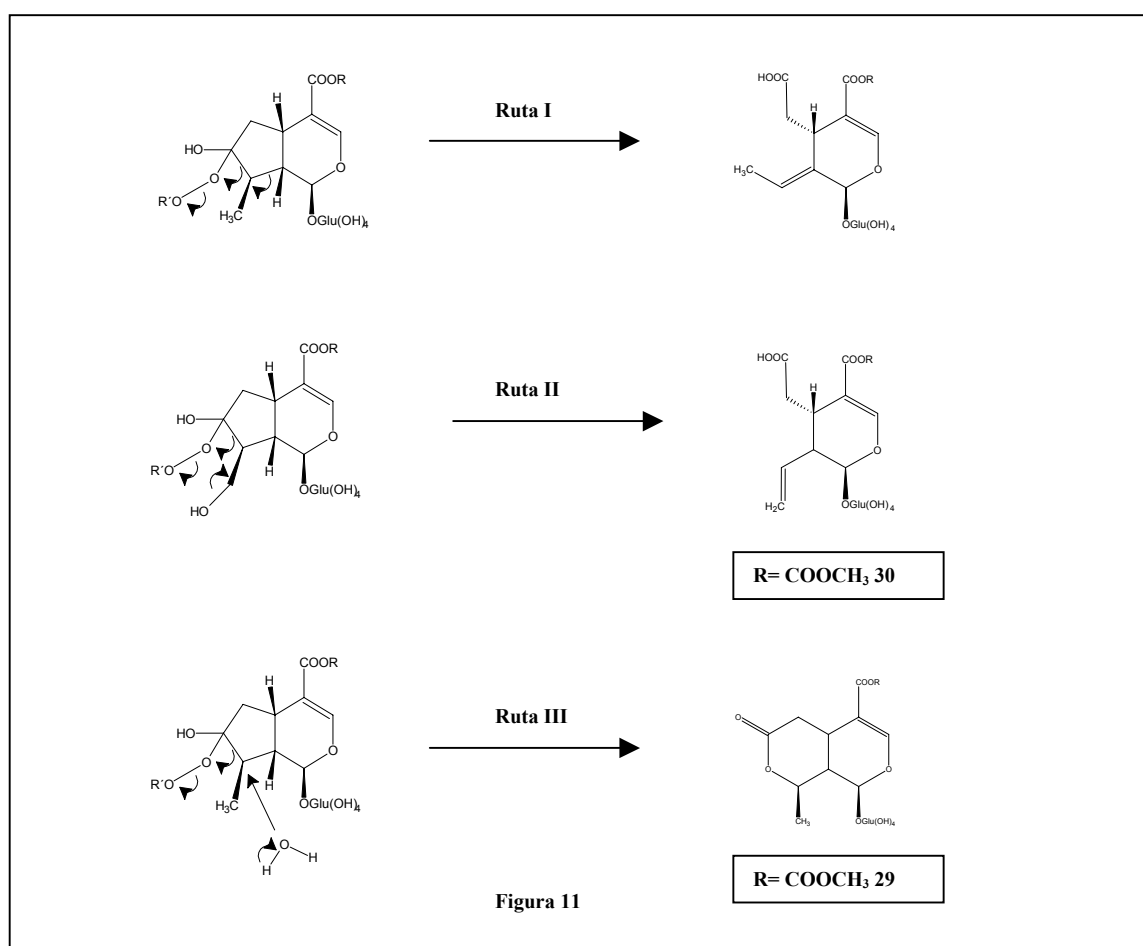
Figura 10

<sup>22</sup> Uesato S., Hashimoto T. y Inouye H (1979) *Phytochemistry* **18**, 1981

Si bien parece claro que el origen de los oleosidos está en la 7-cetologanina **18**, sigue sin estar clara su conversión final, y el papel jugado por el 8-epikingísido **28**. Damtoft<sup>23</sup> ha propuesto una conversión en un paso vía intermediario tipo Baeyer-Villiger para originar :

- 1- Una reacción iniciada por la ruptura del peróxido seguida por el del enlace 7-8 y pérdida simultánea de H9. **Ruta I**
- 2- Similar a la anterior con eliminación de un protón en C10 para originar la secoxiloganina **30** y derivados. **Ruta II**
- 3- Vía ataque a C8 para originar el 8-epikingísido **28** y productos relacionados. **Ruta III**

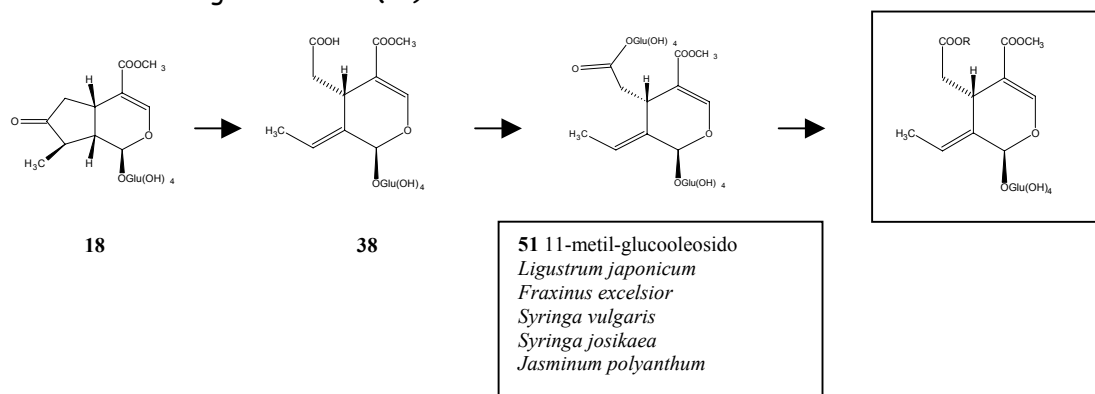
Si esta hipótesis es cierta, explicaría la ocurrencia de los tres tipos de productos en *Oleaceae*. En este caso la similitud de iridooides entre *Oleaceae* y *Gentianales* podría ser circunstancial. En este último caso la secologanina (**24**) sería el origen de los secoiridooides frente a la vía propuesta para *Oleaceae*. Este hecho aclararía la controversia de su clasificación próxima a *Scrophulariaceae* (*Lamiales*).



<sup>23</sup> Damtoft S., Franzyk H. y Jensen, S.R. (1994) *Phytochemistry* **40**, 773

## Derivados del oleosido 11 metil éster (38).

El oleosido 11 metil éster (38) aparece en un gran número de especies de la familia *Oleaceae*<sup>24</sup>. Y origina un gran número de derivados esterificados en posición C7, probablemente a través del 11 metil glucooleosido (51).



El Jaspoliosido es un estereoisómero con C6 y C1" con  $\alpha$  orientación y es el único secoiridoide de este tipo encontrado.



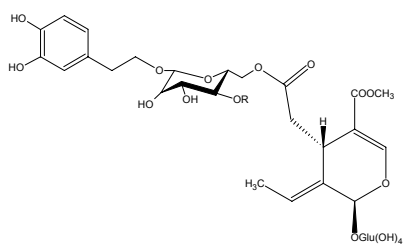
Aparecen algunos productos que se pueden considerar derivados del 11 metil glucooleosido como el sambacolignosido (3812).<sup>25</sup>

<sup>24</sup> Tanahashi T. y Nagakura N. (1988) Tetrahedron Letters **29**, 1793

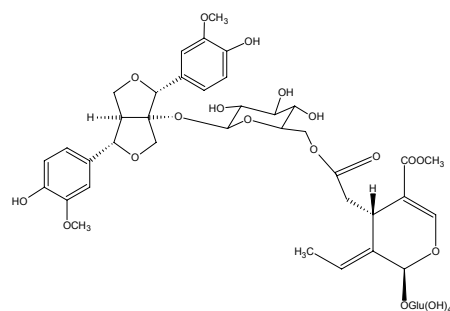
Christie A. Boros y Frank R. Stermitz (1991) Journal of Natural Products **54**, 1173

Tanahashi T., Takenaka Y. y Nagakura N. (1997) Journal of Natural Products **60**, 514

<sup>25</sup> Tanahashi T., Nagakura N., Inouye K., Inouye H. y Shingu T. (1987) Chem. Pharm. Bull. **35**, 5032

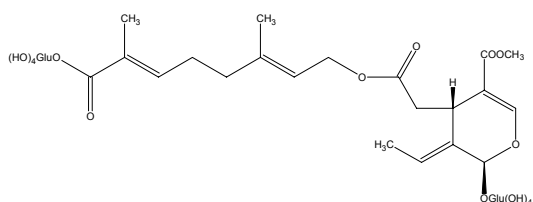


**5101 R=H** neonuezhenido *Ligustrum japonicum*  
**5103 R=cafeoil** *Fraxinus insularis*



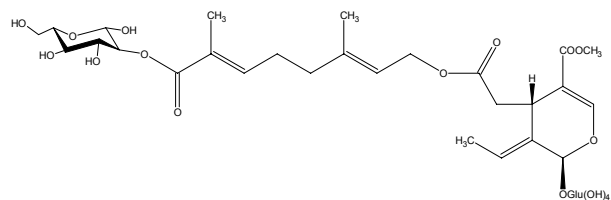
**5102**  
*Ligustrum japonicum*

En *J. polyanthum* aparece un grupo de derivados esterificados con monoterpenos lineales Jaspofoliamosido A y B (3803, 3804), y el Jaspolinalosido (3805)<sup>26</sup>.

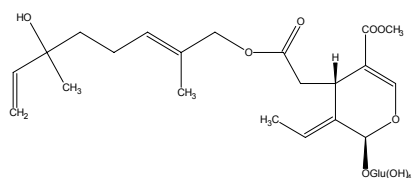


**3803**

*Jasminum polyanthum*



**3804**



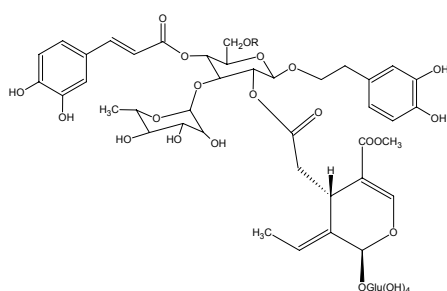
**3805**

<sup>26</sup> Tanahashi T., Takenaka Y. y Nagakura N. (1997) *Journal of Natural Products* **60**, 514



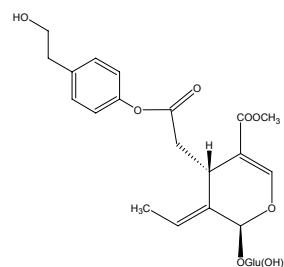
Pero la posición C7 puede estar esterificada por gran cantidad de sustituyentes, como el acteosido (3811). En algunas especies del género *Jasminum* es muy común la esterificación con el iridano en la posición C7 del oleosido 11-metil éster que da lugar a una gran variedad de derivados.

La ruta biosintética de los secoiridoides de este tipo presentes en *J. mesnyi* es explicada por Inoue y col. por la formación de un intermediario a través de la unión del 11-metiloleosido y el dihidroxiiridano<sup>27</sup>, como se muestra en la **Figura 12**. Varias unidades de oleosido o incluso secologanosido pueden unirse a esta unión para formar dímeros o trímeros de secoiridoides<sup>28</sup>, probablemente a partir del jasmesido o su derivado 9" OH presentes en *J. mensyi*. (ver **Figura 13**).



**3811** R=H oleoacteosido  
**3812** R= Glu oleoechinacosido  
*Syringa reticulata*

**3842** R=H excelsiosido  
*Fraxinus excelsior*



Otro grupo de derivados están formados por la esterificación en C7 por un resto de tirosil o dopalol. Como indican Damtoft y col.<sup>29</sup> los segundos se forman por hidroxilación de los primeros.

<sup>27</sup>Tanahashi T., Nagakura N., Kuwajima H., Asaka Y., Kamikawa T., Takaishi K., Inoue K., Fujita T. y Inouye H. (1989) *Phytochemistry* **28**, 1413

Inoue K., Fujita T., Inouye H., Kuwajima H., Takaishi K., Tanahashi T., Nagakura N., Asaka Y., Kamikawa T. y Shingu T. (1991) *Phytochemistry* **30**, 1191

<sup>28</sup>Tanahashi T. y Nagakura N. (1988) *Tetrahedron Letters* **29**, 1793

Zhang Y-J, Liu Y-Q, Pu X-Y, Yang C-R (1995) *Phytochemistry* **38**, 899

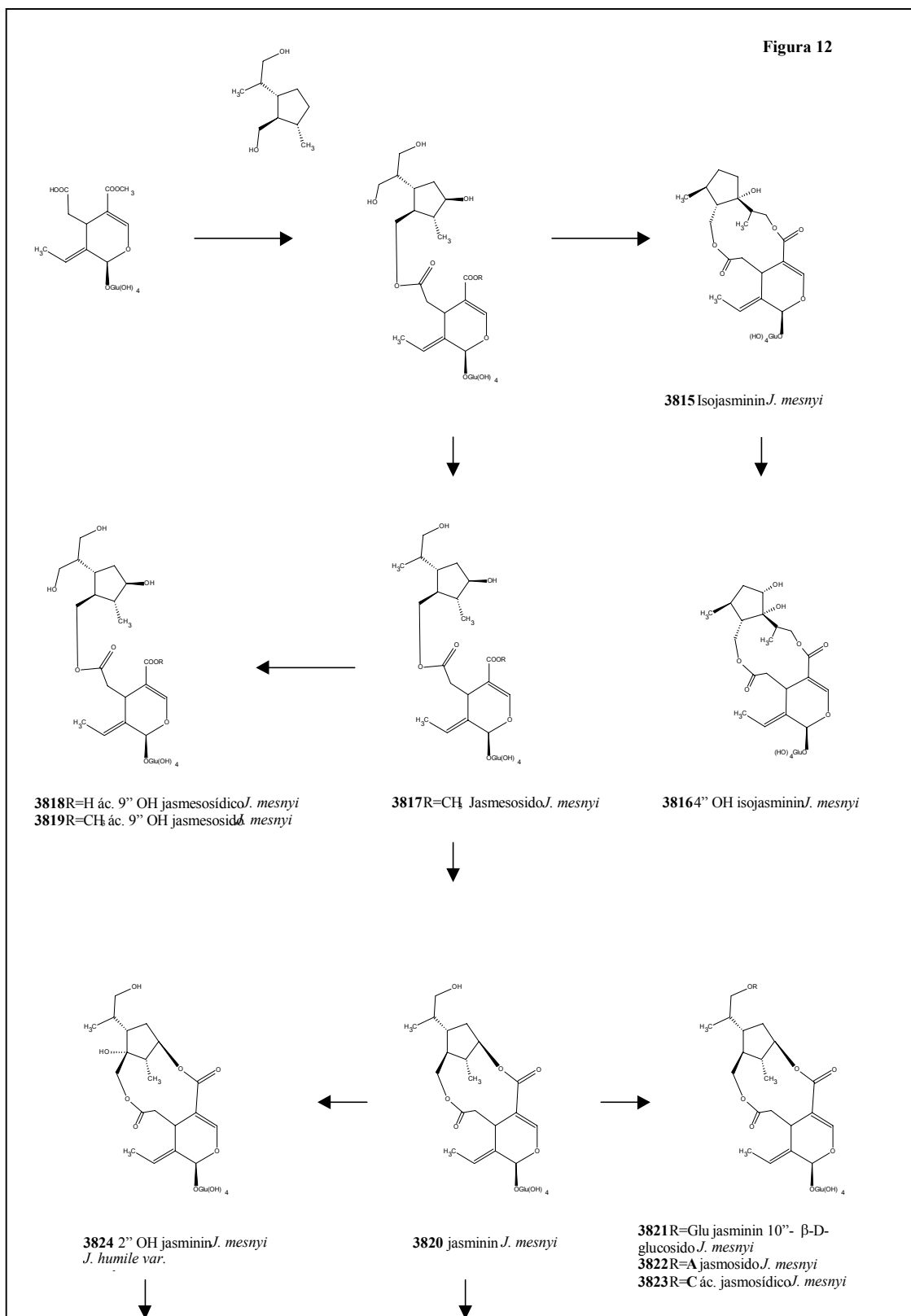
Shen Y-CH, Hsieh P-W. (1997) *Journal of Natural Products* **60**, 453

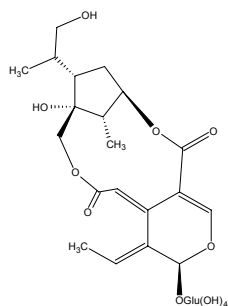
Tanahashi T., Takenaka Y., Nagakura N. y Nishi t. (1999) *Journal of Natural Products* **62**, 1311

Tanahashi T., Takenaka Y., Nagakura N. y Nishi t. (2000) *Chem. Pharm. Bull.* **48(8)**, 1200

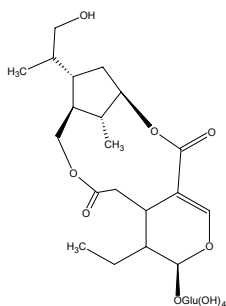
Somanadhan B., Smitt U.W., George V., Pushpangadan P., Rajasekharan S., Duus J.O., Nyman U., Olsen C.E. y Jaroszewski J.W. (1998) *Planta Medica* **64**, 246

<sup>29</sup>Damtoft. S. Franzyk, H. y Jensen, S.R. (1993) *Phytochemistry* **34**, 1291

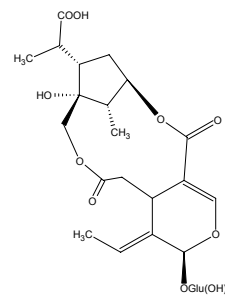




**3843** sambacin  
*J. sambac*

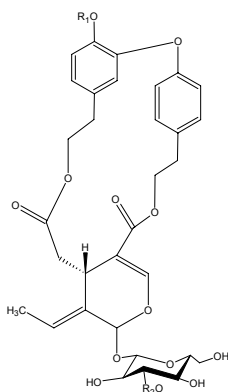


**3844** 8,9 dehidrojasminin  
*J. sambac*



**3845** jasminisnyrosido  
*J. sambac*

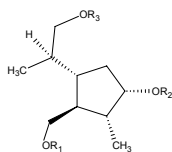
Los secoiridoides tipo dilactonas aparecen en el género *Fraxinus*.<sup>30</sup>



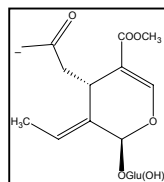
**3846** R1=H,R2=H insularosido  
**3847** R1=Glu(OH)<sub>4</sub>, R2=H fraxuhdosido  
*Fraxinus insularis*  
*Fraxinus uhdei*  
**3855** R1=H,R2= Glu(OH)<sub>4</sub>  
**3856** R1= Glu(OH)<sub>4</sub>, R2= Glu(OH)<sub>4</sub>  
*Fraxinus insularis*

<sup>30</sup> Shen Y-CH, Chen CH-H y Lee K-H, (1993) *Phytochemistry* **33**, 1531

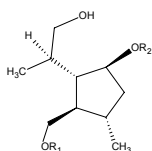
Tanahashi T., Shimada A., Nagakura N., Inoue K., Kuwajima H., Takaishi K., Chen CH-CH, He Z-D. y Yang CH-R (1993) *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 1649



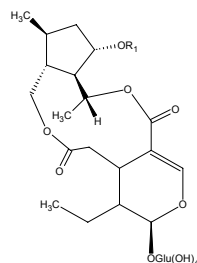
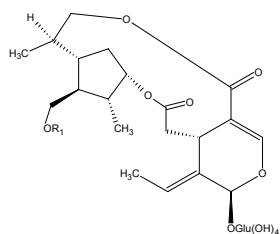
A



PRODUCTO	R1	R2	R3	REFERENCIA	FUENTE
JASNUDIFLOSIDO A	A	A	H	3848	<i>J. nudiflorum</i>
JASNUDIFLOSIDO B	A	A	A	3849	<i>J. nudiflorum</i>
JASNUDIFLOSIDO D	A	A	H	3850	<i>J. nudiflorum</i>
JASNUDIFLOSIDO E	A	A	A	3851	<i>J. nudiflorum</i>



PRODUCTO	R1	R2	R3	REFERENCIA	FUENTE
NUDIFLOSIDO A	A	A	H	3852	<i>J. nudiflorum</i>

3853 JASNUDIFLOSIDO B *J. nudiflorum*3854 NUDIFLOSIDO B *J. nudiflorum*  
3855 NUDIFLOSIDO C *J. nudiflorum*

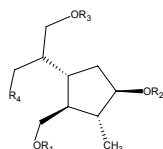
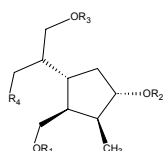
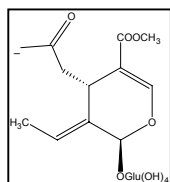


Figura 13

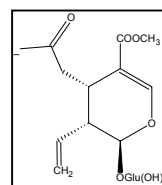
PRODUCTO	R1	R2	R3	R4	REFERENCIA	FUENTE
MOLIHUASIDO A	A	A	H	OH	3825	J. sambac, azoricum
MOLIHUASIDO B	B	A	A	OH	3826	J. sambac
MOLIHUASIDO C	OH	A	A	OH	3827	J. sambac, azoricum?
MOLIHUASIDO D	A	OH	A	OH	3828	J. sambac
MOLIHUASIDO E	A	OH	H	O-A	3829	J. sambac
SAMBACOSIDO A	A	A	A	OH	3830	J. sambac, azoricum
SAMBACOSIDO E	A	OH	A	O-A	3831	J. sambac
SAMBACOSIDO F	A	A	OH	O-A	3832	J. sambac



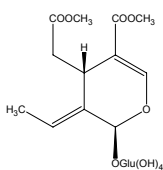
PRODUCTO	R1	R2	R3	R4	REFERENCIA	FUENTE
JASUROSIDO A	A	A	H	H	3833	J. urophyllum
JASUROSIDO B	A	A	A	H	3834	J. urophyllum
JASUROSIDO C	A	A	H	OH	3835	J. urophyllum
JASUROSIDO D	A	A	A	OH	3836	J. urophyllum



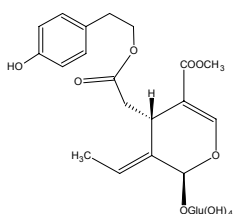
A



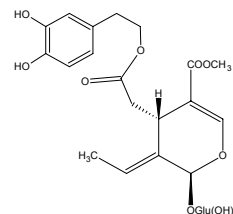
B



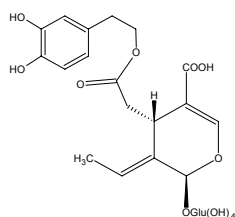
**3850**  
*Jasminum polyanthum*



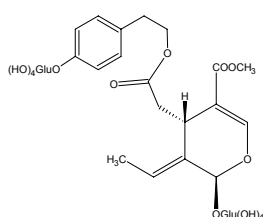
**3807** Ligstrosido  
*Osmanthus asiaticus*  
*Fraxinus excelsior*  
*Syringa vulgaris*  
*Syringa josikaea*  
*Phillyrea latifolia*  
*Jasminum polyanthum*



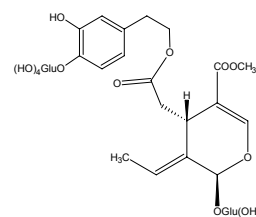
**3808** Oleuropeina  
*Osmanthus asiaticus*  
*Fraxinus excelsior*  
*Syringa vulgaris*  
*Syringa josikaea*  
*Phillyrea latifolia*  
*Jasminum polyanthum*  
*Olea europaea*  
*Ligustrum japonicum*  
*Ligustrum lucidum*



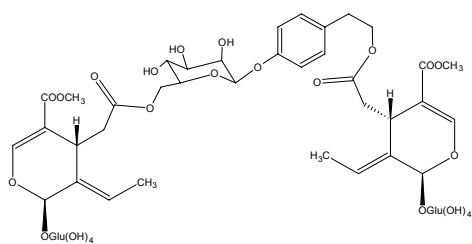
**3843** Demetiloleuropeina  
*Fraxinus angustifolia*



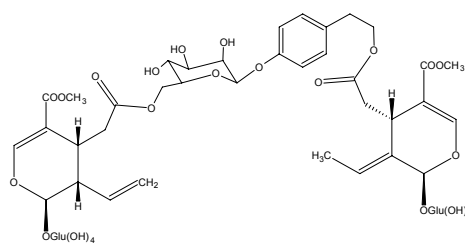
**3809** Angustifoliosido B  
*Fraxinus angustifolia*



**3810** Angustifoliosido A  
*Fraxinus angustifolia*

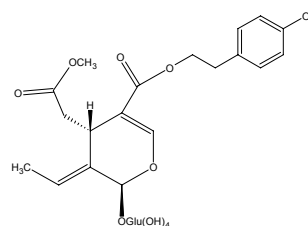
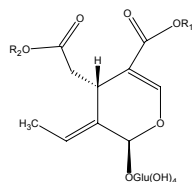


**3840** polyanosido *J. polyanthum*



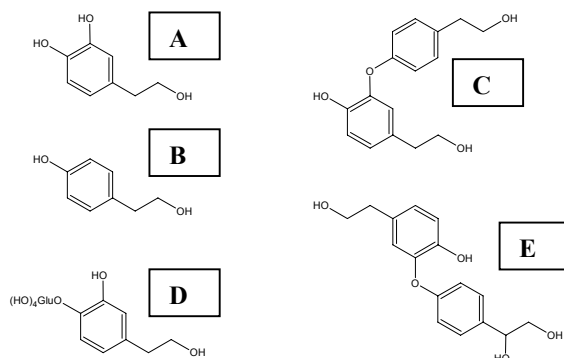
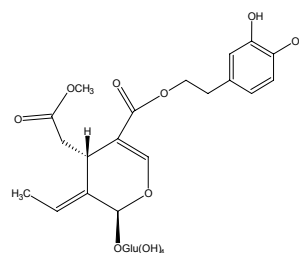
**3841** neopolyanosido *J. polyanthum*





**3601 R1= A, R2=A** Jasmultisido  
*Jasminum multiflorum*  
**3602 R1= B, R2=A** Hidroxiframosido A  
**3603 R1= A, R2=B** Hidroxiframosido B  
**3604 R1= B, R2=B** Framosido  
**3605 R1= E, R2=E** Hidroxiornosido  
*Fraxinus ornus*  
**3606 R1= C, R2=A**  
*Fraxinus insularis*  
**3607 R1= A, R2=D** Angustifoliosido C  
*Fraxinus angustifolia*

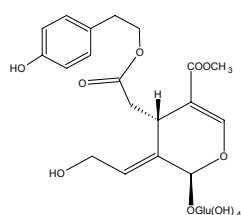
**3701** Isoligstroside  
*Syringa vulgaris*



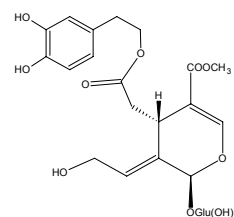
**3702** Isooleuropeina  
*Syringa vulgaris*



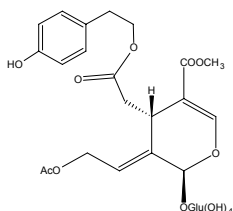
Los 10-OH oleosidos se forman probablemente por hidroxilación en C10 de los correspondientes oleosidos como lo prueba la coexistencia de productos como: Ligstrosido (3807) y 10-OH ligstrosido (4601) en *Fraxinus ssp.* y *Osmanthus ssp.* Oleuropeina (3808) y 10-OH oleuropeina (4602) en *Ligustrum ssp.* y *Osmanthus ssp.* Jasmultisido (3601) y multiflorosido<sup>33</sup> (3611) en *J. multiflorum*. Posteriormente este hidroxilo puede oxidarse hasta ácido<sup>34</sup> o esterificarse con un amplio patrón de acilos desde acetilaciones hasta la formación de dímeros o trímeros de oleosidos.<sup>35</sup>



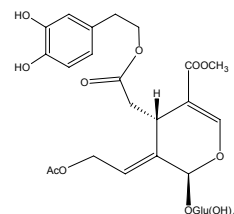
**4601** 10-OH-Ligstrosido  
*Osmanthus asiaticus*  
*Fraxinus excelsior*  
*Jasminum multiflorum*  
*Jasminum amplexicaule*



**4602** 10-OH-Oleuropeina  
*Osmanthus asiaticus*  
*Ligustrum japonicum*  
*Jasminum multiflorum*



**4603** 10-OAc-Ligstrosido  
*Osmanthus asiaticus*

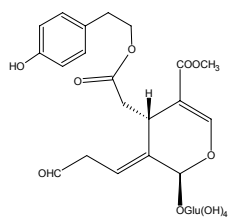


**4604** 10-OAc-Oleuropein  
*Osmanthus asiaticus*  
*Osmanthus fragans*

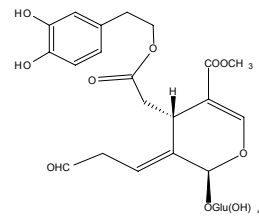
<sup>33</sup> Shen Y-CH., Lin CH-Y y Chen CH-H (1990) *Phytochemistry* **29**, 2905

<sup>34</sup> Christie A. Boros y Frank R. Stermitz (1991) *Journal of Natural Products* **54**, 1173

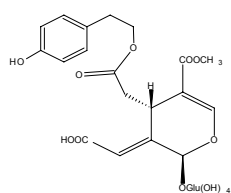
<sup>35</sup> Tanahashi T., Shimada A., Nagakura N. y Nayeshiro H. (1992) *Planta Med.* **58**, 552



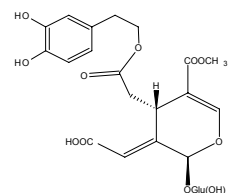
**4605** Ligustalioside B  
*Ligustrum japonicum*  
*Ligustrum ovalifolium*



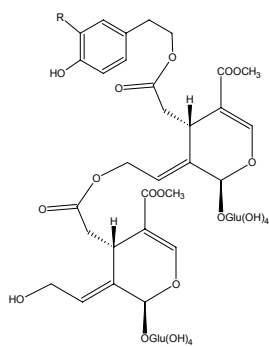
**4606** Ligustalioside A  
*Ligustrum japonicum*



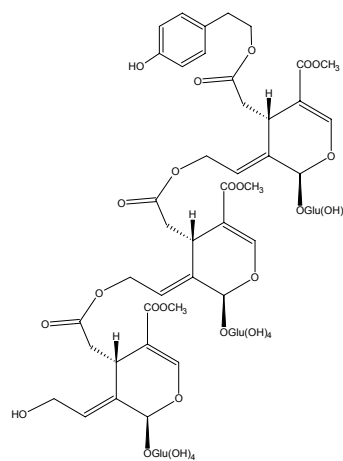
**4607** Ac. Listrosídico  
*Ligustrum japonicum*



**4608** Ac. Oleuropeínico  
*Ligustrum japonicum*

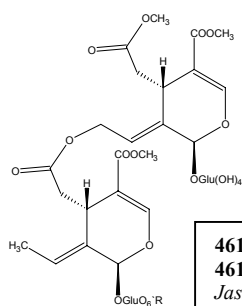


**4609** R=H  
**4610** R=OH

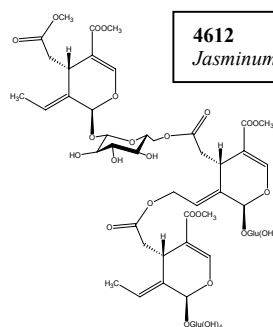


**4611**

*J. amplexicaule*

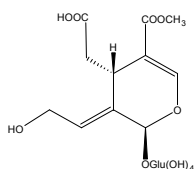


**4613 R=H**  
**4614 R=oleosido**  
*Jasminum polyanthum*

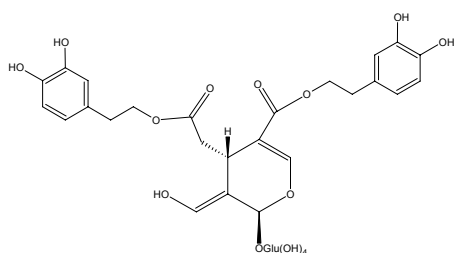


**4612**  
*Jasminum polyanthum*

También aparecen productos 10-hidroxilados doblemente esterificados o con 7-COO libre.<sup>36</sup>

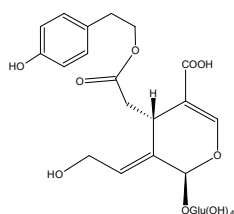


**50**  
*Jasminum multiflorum*



**3612 Multiflorosido**  
*Jasminum multiflorum*

Productos 10-hidroxilados y el carboxilo C11 libre.<sup>37</sup>

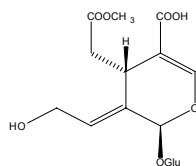


**3613 Udenosido**  
*Fraxinus uhdei*

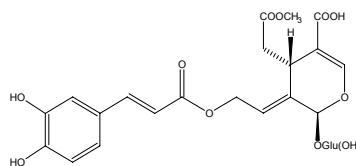
<sup>36</sup> Shen Y-CH., Lin CH-Y y Chen CH-H (1990) *Phytochemistry* **29**, 2905

<sup>37</sup> Shen Y-CH., Chen CH-Y (1995) *Planta Med.* **61**, 281

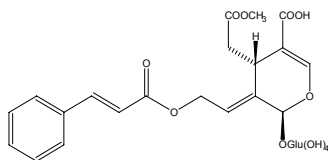
## Secoiridoides derivados del 10-OH- oleosido 7-metil éster (49).



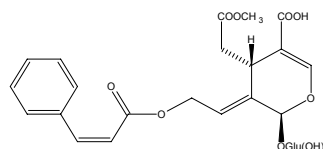
49



4907  
*J. lanceolarium*



4901 Jasminosido  
*J. odoratissimum*  
*J. amplexicaule*  
*J. lanceolarium*  
*J. humile var. revolutum*  
*J. hemsleyi*



4902 Cis-Jasminosido  
*J. odoratissimum*

El Jasminosido<sup>38</sup> es un producto que aparece en un gran número de especies del género *Jasminum* y que se puede considerar derivado del 10-OH-oleosido 7 metil éster por esterificación en posición C10. En el caso del Jasminosido la esterificación se realiza con el ácido cumárico. En *J. lanceolarium* aparecen un grupo de compuestos muy relacionados con el anterior y que podrían originarse a partir de él o por esterificaciones con ácidos como el cinámico, el ferúlico y el caféico<sup>39</sup>. Todos ellos aparecen como mezclas cis/trans en equilibrio desigual. (la forma cis caféico no pudo ser purificada por los autores pero parece probada su existencia en la planta).

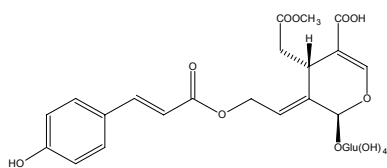
En *J. odoratissimum* hemos obtenido la "curiosa" forma cis-Jasminosido<sup>40</sup>, aunque en una proporción mínima en relación con el contenido total de secoiridoides y con la forma trans.

<sup>38</sup> Inoue K., Tanahashi T., Inouye H., Murai F. y Tagawa M. (1982) *Phytochemistry* **21**, 359

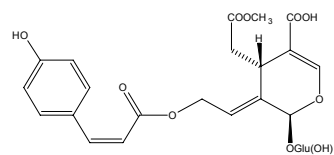
<sup>39</sup> Shen Y-C. y Lin S-L. (1996) *Planta Medica* **62**, 515

Shen Y-C., Lin S-L. y Chein CH-CH (1997) *Phytochemistry* **44**, 891

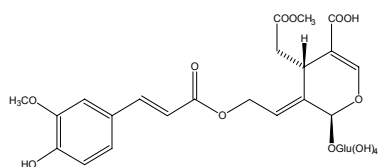
<sup>40</sup> Pérez J.A., Hernández J.M., López H. Y Trujillo J.M., *Natural Products Letters* (1999) **13(4)**, 247



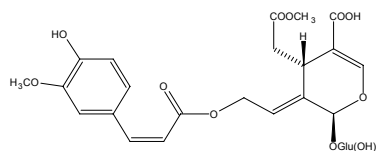
4903



4904



4905



4906

*J. lanceolarium*

El 10-OH oleosido dimetil éster puede considerarse derivado del 10-OH oleosido-7-metil éster por metilación en la posición 11.

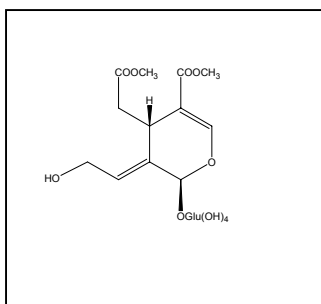
Este producto también presente en *J. odoratissimum* puede ser el origen por esterificación de otros productos de la planta (4952-4)<sup>41</sup>, en una forma equivalente a lo observado en *J. lanceolarium*, pero también podrían originarse a partir del Jasminosido por metilación del 11-COOH.

El producto (4951) es una acetilación del 10-OH oleosido dimetil éster<sup>42</sup>. Aunque los secoiridoides acetilados son derivados comunes en muchas familias, en las *Oleaceae* sólo encontramos compuestos equivalentes en especies del género *Osmanthus*<sup>43</sup>.

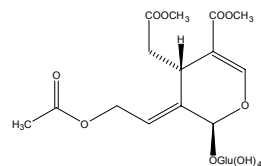
<sup>41</sup>H. López, Pérez J.A., Hernández J.M. y Trujillo J. M. (1997) Journal of Natural Products **60**, 1337

<sup>42</sup> Trujillo J. M., Hernández J.M., Pérez J.A., H. Lopez, y Frías I. (1996) Phytochemistry **42**, 533

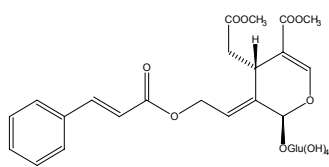
<sup>43</sup> Inouye H., Inoue K., Nishioka T. y Kaniwa M. (1975) Phytochemistry **14**, 2029



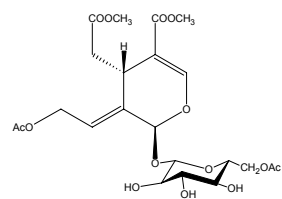
**4950** 10-OH-Oleosido  
dimetiléster  
*Osmanthus asiaticus*  
*Fraxinus excelsior*  
*Jasminum multiflorum*  
*Jasminum amplexicaule*



**4951** 10-OAc-Oleosido  
dimetiléster  
*Jasminum odoratissimum*

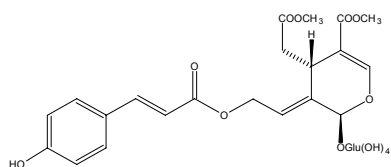


**4952**

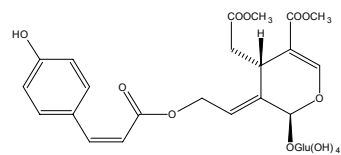


**4955**

*J. odoratissimum*



**4953**



**4954**

Si estudiamos las últimas fases de la biosíntesis de los iridoides en *Oleaceae* observamos que los oleosido y 10-OH oleosidos derivados son comunes en las tribus *Jasmineae* y *Oleae*. (ver **Figura 14**)

Taylor<sup>44</sup> consideró a los géneros *Forsythia*, *Abeliophyllum* y *Fontanesia* los más antiguos ya que no contienen oleosidos, mientras que *Chionanthus*, *Fraxinus*, *Ligustrum*, *Olea*, *Osmanthus*, *Phillyrea* y *Syringa* que si los producen, serían los evolucionados.

Si bien Taylor incluyó a *Jasminum* entre los taxones más primitivos presenta un enorme número de estos compuestos. Los iridano derivados en C11 son particularmente abundantes, entre ellos los esterificados con tirosil y dopalol. Pero son particularmente interesantes las esterificaciones con el iridano y derivados ya que, y hasta que no se pruebe lo contrario, son exclusivas del género *Jasminum* y concretamente de un grupo de especies. Mostrando ser un potente indicador taxonómico.(ver **Tabla 1**)

A falta de más datos los 10-OH- oleosidos derivados originados a partir de los anteriores por hidroxilación también son habituales en la tribu *Jasmineae* y *Oleae* (subtribus *Ligustrinae*, *Fraxininae*, *Oleinae*)

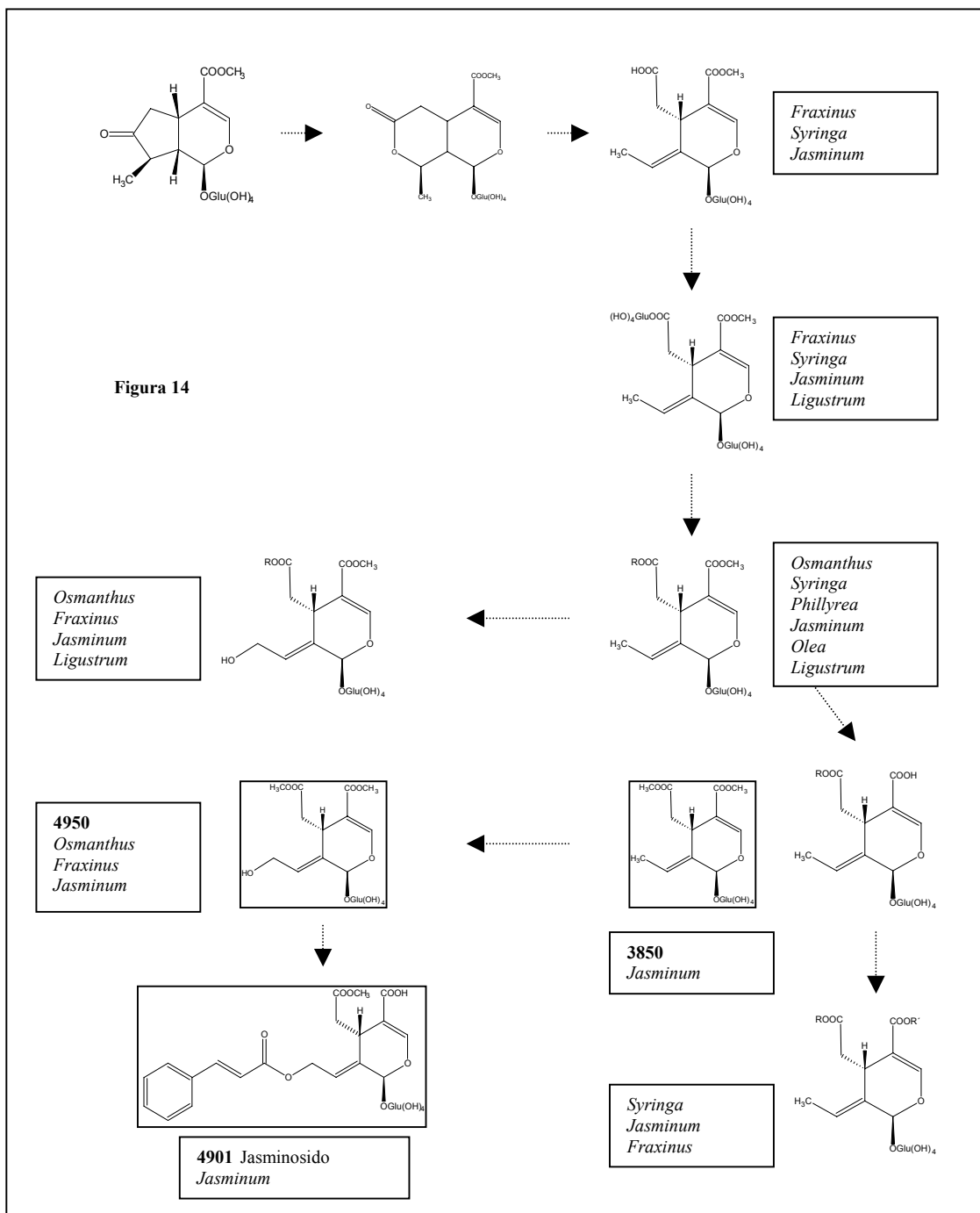
**Tabla 1**

Ssp.	7 derivados 11 metil éster oleosidos	1-OH-oleosidos	7-iridano oleosidos	jasminosido
<i>J. lanceolarium</i>		♦		♦
<i>J. amplexicaule</i>		♦		♦
<i>J. humile</i> revo.		♦		♦
<i>J. hemsleyi</i>		♦		♦
<i>J. odoratissimum</i>		♦		♦
<i>J. multiflorum</i>	♦	♦		
<i>J. polyanthum</i>	♦			
<i>J. sambac</i>	♦		♦	
<i>J. urophyllum</i>	♦		♦	
<i>J. mensyi</i>	♦		♦	
<i>J. azoricum</i>	♦		♦	
<i>J. grandiflorum</i>	♦		♦	
<i>J. nudiflorum</i>	♦		♦	
<i>L. japonicum</i>	♦	♦		
<i>L. lucidum</i>	♦			
<i>F. excelsior</i>	♦	♦		
<i>F. uhdei</i>	?	♦		
<i>F. angustifolium</i>	♦			
<i>S. vulgaris</i>	♦			
<i>S. josikaea</i>	♦			
<i>S. reticulata</i>	♦			
<i>O. asiaticus</i>	♦	♦		
<i>O. fragans</i>	♦	♦		
<i>P. latifolia</i>	♦			
<i>Ol. europaea</i>	♦			

<sup>44</sup> Taylor H. (1945) *Brittonia* 5, 337

Otro potente indicador puede ser la presencia del jasminosido y productos relacionados, también exclusivos de un grupo de especies de *Jasminum*.

Por lo tanto y aunque el número de especies estudiadas es ridículo podemos distinguir dos grupos fitoquímicos dentro de *Jasminum*. Un ambiente metabólico con presencia de metil oleosidos 7-derivados (frecuentemente con iridano) que puede esterificarse en C11 y un ambiente que propicia el origen del jasminosido y similares, ambos excluyentes. Estos datos coinciden con los datos moleculares obtenidos por Wallar y Albert ( ver pg. 37 ) que encuentran dos grupos de especies en el género con una divergencia de cuatro cambios en su filogenia.



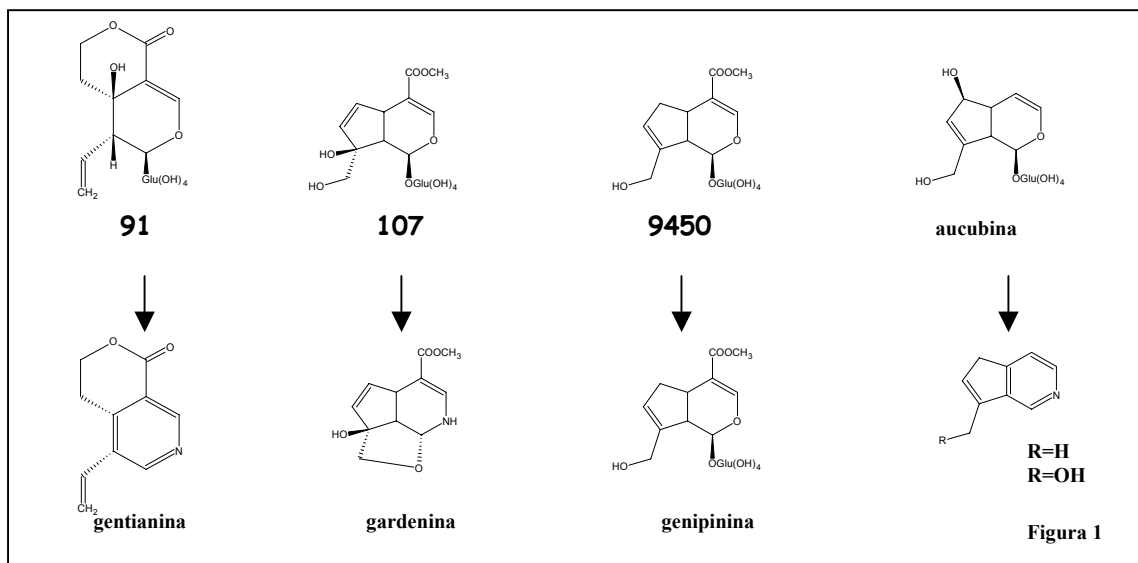


## Hidrólisis por glucosidasas de iridoides y secoridoides glucosilados Jasmolactonas y Jasmolaldehídos

A la hora de estudiar la bioactividad de los iridoides hay que tener en cuenta que son sustratos de ácidos y glucosidasas, y sus acetil ésteres de ácidos y acilasas. En la primera revisión hecha sobre la farmacología de los iridoides Sticher <sup>45</sup> considera esta labilidad y su predisposición a formar polímeros como características ineficaces para considerarlos como agentes farmacológicos.

Pero es frecuente la observación de que las agliconas tienen actividades más altas que sus correspondiente glucósidos, sugiriendo que el farmacóforo se asocia con una actividad polifuncional cuando es liberado. <sup>46</sup>

Hay muchos casos en los que un iridoide se considera una pro-droga. <sup>47</sup>, y es que los iridoides glucosilados son hidrolizados en el tracto intestinal. El geniposido (9450) es metabolizado a su aglicona genipina que se encuentra en todo el tubo intestinal del ratón, especialmente en el ciego y el colon. Esta aglicona no se forma en el homogeneizado de rata que si muestra actividades  $\beta$ -glucosidasa y esterasa, siendo necesaria la  $\beta$ -glucosidasa de *Bifidobacterium ssp.* Bacterias humanas (*Peptostreptococcus anaerobius*, *Klebsiella pneumoniae* ...) también transforman el geniposido (9450), gardeniosido <sup>48</sup> (107), swertiamarina <sup>49</sup> (91) y acubina <sup>50</sup> a sus correspondientes agliconas. También se muestran actividades acilasa <sup>51</sup>. *Eubacterium sp.* A-44 hidroliza el genipósido a genipinina y después a la aglicona del ácido geniposídico. <sup>52</sup>



<sup>45</sup> Sticher New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutic activity. Springer-Verlag, Berlín(1977), 137

<sup>46</sup> Ghisalberti E.L. Phytomedicine (1998) **52**, 147

<sup>47</sup> Nishibe S., Pure Appl. Chem. (1994) **66**, 2263

<sup>48</sup> Kawata Y., Hattori M., Akao T. y Namoa T. Planta Medica (1991) **57**,537

<sup>49</sup> Hattori M., Kawata Y., Inoue K., Shu Y.Z., Che Q. M., Namba T. y Kobashi K. Phytother. Res. (1990) **4**, 66

<sup>50</sup> El- Sedawi A.L., Shu Y.Z.Hattori M., Kobashi K y Namba T. Planta Med.(1989) **55**, 147

<sup>51</sup> Kawata Y., Hattori M., Akao T. y Namoa T. Planta Medica (1991) **57**,537

El- Sedawi A.L., Shu Y.Z.Hattori M., Kobashi K y Namba T. Planta Med.(1989) **55**, 147

<sup>52</sup> Akao T., Kobashi K y Abdura M. Biol. Pharm. Bull. (1994) **17**, 1573

Está bastante estudiada la formación de los alcaloides piridin monoterpenoides (APMT) por el tratamiento de los iridoideos glucosilados con ácidos y glucosidasas en presencia de una fuente de  $\text{NH}_3$ , normalmente iones amonio.<sup>53</sup>

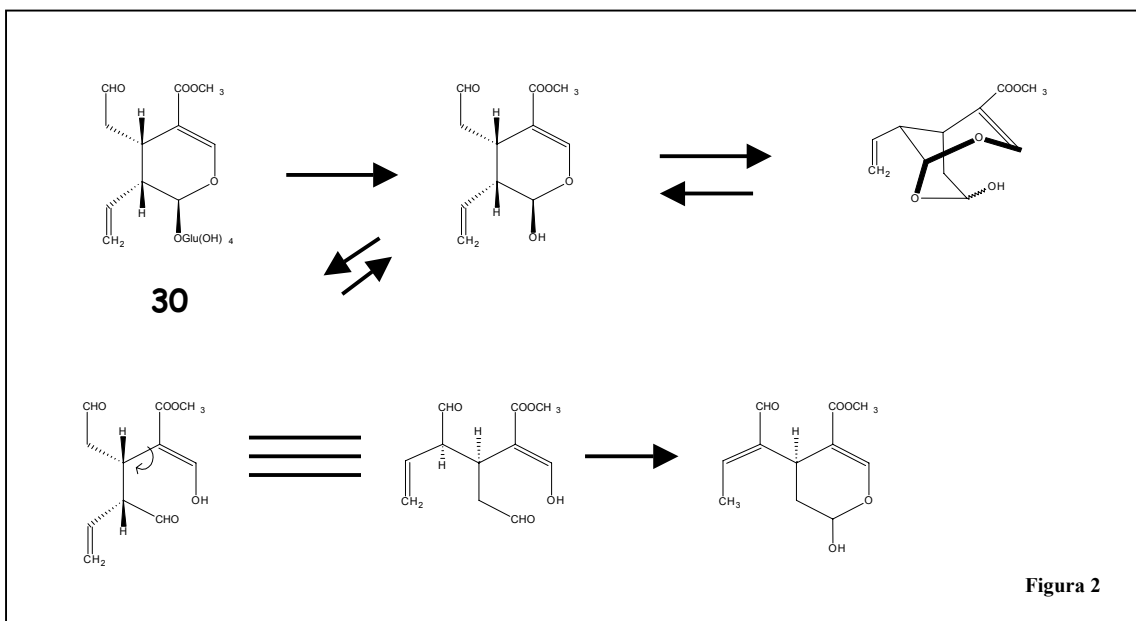
Bacterias intestinales humanas transforman la aucubina en dos alcaloides, el geniposido (9450) y gardenosido (107) en genipinina y gardenina y la swertiamarina (91) en gentianina (ver Figura 1).<sup>54</sup>

Algunas de estas reacciones son reproducibles in-vitro por tratamiento con glucosidasa y acetato amónico, dando reordenaciones y dímeros de APMT.

La importancia de estos compuestos está en sus propiedades antiinflamatoria, relajante muscular, sedativa, antihistamínicas, hipoglucemiante e hipotensivas junto con las atribuidas a los iridoideos.

Por lo tanto la reacción de hidrólisis no significa una desaparición de las actividades farmacológicas, sino que origina un intermediario dialdehído-hemiacetal con mucho más poder bioactivo. El dialdehído se puede considerar como un aceptor de amina en la formación de una base de Schiff.

Por ejemplo, el tratamiento de la secologanina (30) con glucosidasas origina un compuesto bicíclico que se convierte rápidamente en un hemiacetal con la aglicona y el dialdehído de cadena abierta actuando como intermediarios. (ver Figura 2)



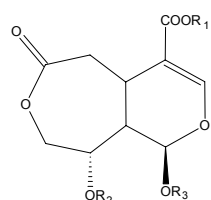
Por lo tanto en el estudio de la bioactividad de los iridoideos hay que considerar el glucósido, el hemiacetal o dialdehído y un posible APMT.

<sup>53</sup> Fredericksen S.M. y Stermitz F.R. J. Nat. Prod. (1966) 59,41

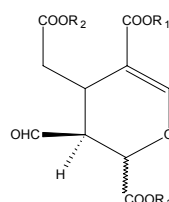
<sup>54</sup> Kawata Y., Hattori M., Akao T., Kobashi K. y Namba T., Planta Medica (1991) 57, 536

El Sedawi A.I., Shu Y.Z., Hattori M., Kobashi K. y Namba T., Planta Medica (1991) 55, 147

En la familia *Oleaceae* aparecen dos grupos de productos con estructuras diferentes, pero con el mismo origen, la acción de  $\beta$ -glucosidasas sobre los secoiridoides glucosilados presentes en cada especie.



Jasmolactonas



Jasmoaldehídos

Ya-Ching Shen y Chung-Hsiung Chen<sup>55</sup> describen la presencia de secoiridoides tipo lactonas de *Jasminum multiflorum* (*Burm.f.*) *Andr.* (*Oleaceae*)

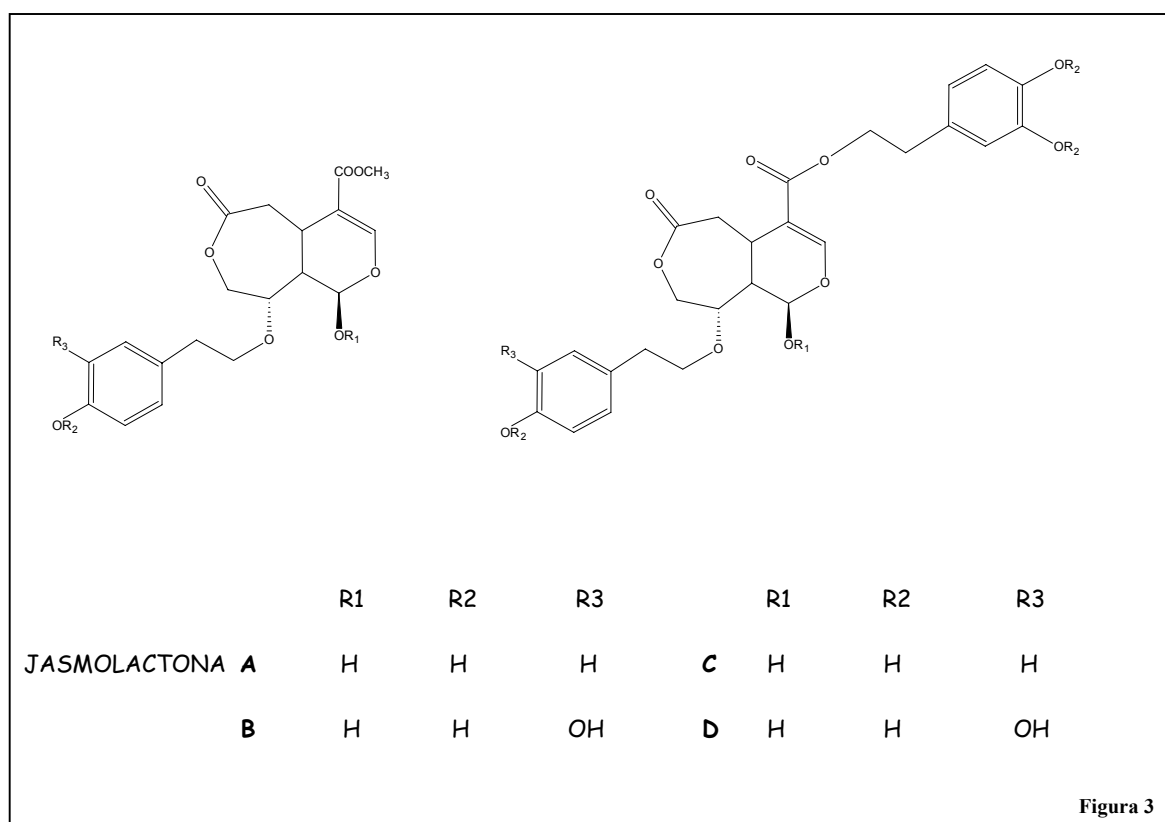


Figura 3

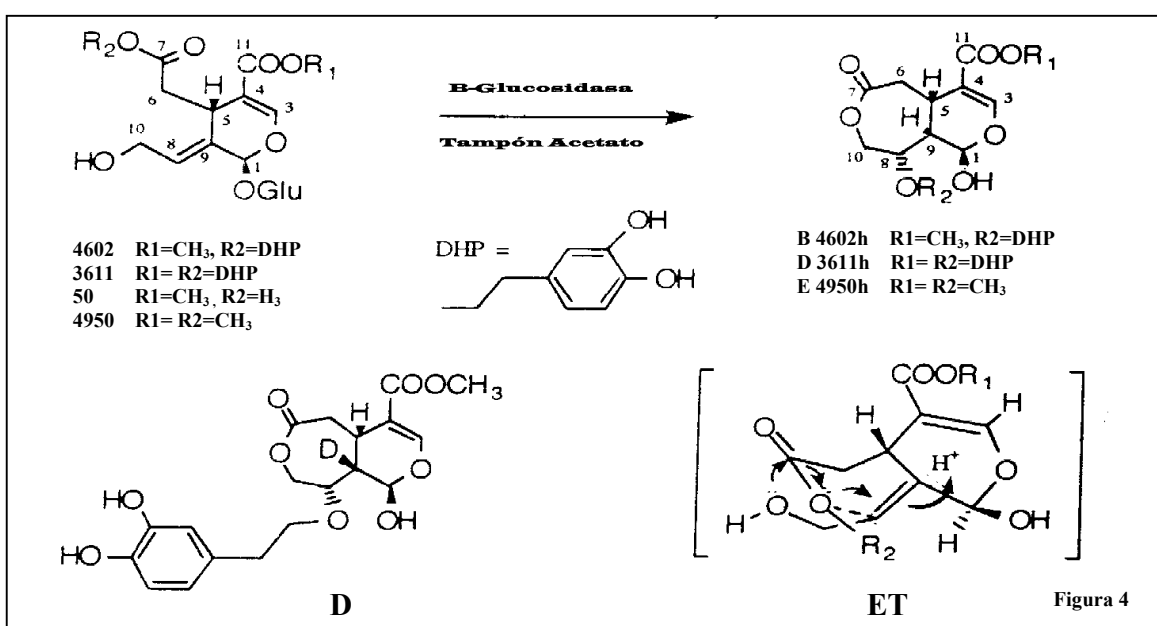
Posteriormente los mismos autores obtienen estos productos al tratar los secoiridoides glucosilados presentes en *Jasminum multiflorum* con  $\beta$ -glucosidasa (EC. 3.2.1.2.1, tipo 1).<sup>56</sup> (Ver **Figura 4**)

<sup>55</sup> Shen Y-CH y Chen CH-CH, *J. Nat. Prod.*(1989) **52**,1060

<sup>56</sup> Shen Y-CH., y Chen CH-CH., *Tetrahedron Letters* (1993) **34**,1949

En la reacción se produce un reagrupamiento estereoespecífico del esqueleto carbonado en dos pasos.

- Una lactonización y una alcoxil transferencia estereoespecífica de C7 a C8. Una reacción concertada en la que podría mediar un intermediario. Después del ataque nucleofílico (si-face) del éster C7 por el grupo C-10 alil hidroxílico, la cadena catecólica se transfiere a C8 a través de un estado de transición con seis miembros (C5,C6,C7,O,C8,C9). (**ET**). (ver **Figura 4**).
- El segundo paso es una trans adición de un doble enlace donde se generan dos centros quirales nuevos. Y el resultado es estereoespecífico con respecto a la alcoxil adición en C8 y protonación en C9B.



De este modo la Jasmolactona B (4602h) se formaría a partir del 10 hidroxioleuropeina (4602) y la Jasmolactona D (3611h) a partir del multiflorosido (3611), presentes ambos en *J. multiflorum*.

Del mismo modo es previsible que el origen de la Jasmolactona A (4601h) sea a partir del 10 hidroxiligustrosido (4601) y la Jasmolactona C a partir de un compuesto equivalente al multiflorosido, no descrito hasta el momento.

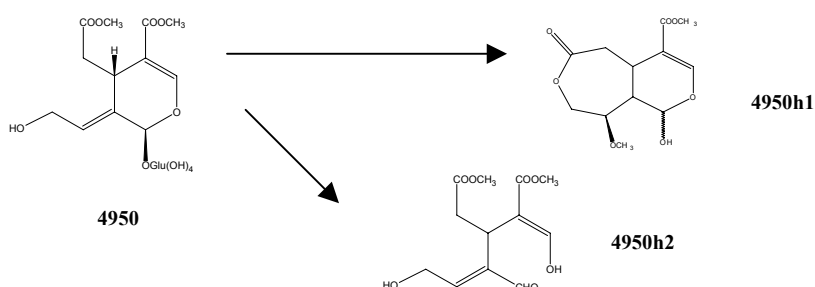
- Para comprobar el mecanismo de reacción propuesto los autores realizan la reacción en un medio de óxido de deuterio (99.75%). Como era esperado se obtiene Jasmolactona B (**D**) que presenta un ión a m/z 395 en el espectro EM. Sus RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fueron iguales a la Jasmolactona B excepto en la señal C9 que aparece como un pequeño triplete y el pico H9 que desaparece. (ver **Figura 4**).

La función ácida en C7 no permite la lactonización según proponen los mismos autores. El sustrato debe contener una función éster en la posición C7. Este hecho se comprueba al tratar con  $\beta$ -glucosidasa el ácido 10-hidroxiolosido 11 metiléster (50) sin que se obtenga reacción.

Los mismos autores al tratar el 10 hidroxiosido dimetil éster (4950) con  $\beta$ -glucosidasa obtienen la denominada Jasmolactona E (4950h1).

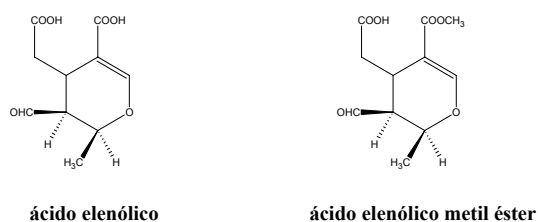
Este producto aparece de forma natural en *J. odoratissimum*<sup>57</sup>.

Con el fin de comprobar su naturaleza se trató el 10 hidroxiosido 7,11 dimetil éster con  $\beta$ -Glucosidasa y de hecho se obtuvo la Jasmolactona E, pero como producto minoritario, ya que también aparece el jasmoaldehído correspondiente. (Ver **Parte Experimental**)

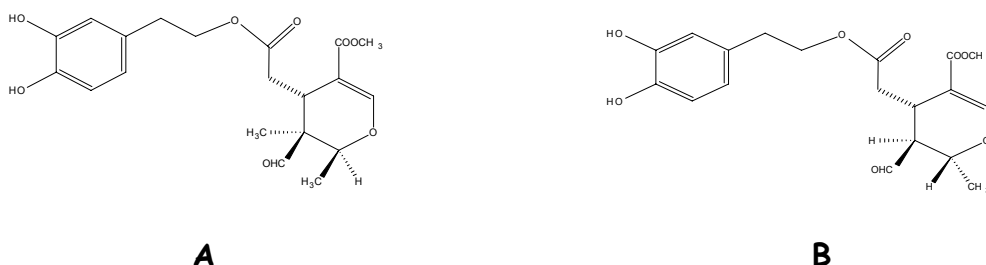


Panizzi y col.<sup>58</sup> obtienen en 1960 de la hidrólisis ácida de la oleuropeina el ácido elenólico, cuya estructura fue resuelta por McKellar y col.<sup>59</sup>

Posteriormente R.T.Brown y col. transforman la secologanina en ácido elenólico y su metiléster.



P. Gariboldi y col.<sup>60</sup> aislan de *Olea europaea* dos productos, Jasmoaldehídos A y B, que coinciden con la estructura de los anteriores, excepto por la presencia de un fragmento de 3,4- dihidrofeniletanol. Con el fin de compararlos con los anteriores repiten las experiencias y dan datos más actualizados de las constantes de acoplamiento.



<sup>57</sup> Trujillo J. M., Pérez J.A., H. López y Hernández J.M. **Datos no publicados**

<sup>58</sup> Panizzi, L., Scarpati, M. L. y Oriente, G. (1960) Gazz. Chim. Ital. **90**, 1149

<sup>59</sup> Mackellar, F. A., Kelly, R. C., van Tamelen, y Dorschel, C. (1973) J. Am. Chem. Soc. **95**, 7155

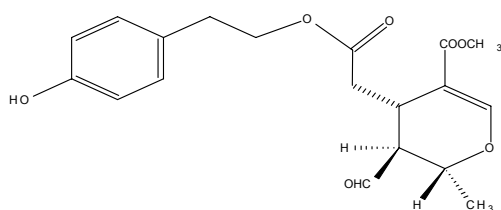
<sup>60</sup> P. Gariboldi, G. Jommi y L. Verotta (1986) Phytochemistry. **25**, 865-869

De los datos obtenidos se observa que son una mezcla de diastereoisómeros en proporción 1:7. En el H-NMR se observa:

- que el grupo metilo C-10 da una señal más baja en el producto A ( $\Delta\delta=0.18\text{ppm}$ ).
- todo lo contrario en H8 ( $\Delta\delta=0.28\text{ppm}$ ).
- H5 es similar en ambos ( $\Delta\delta=0.001\text{ppm}$ ).

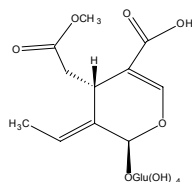
H8 debe estar en trans con respecto al grupo aldehído en B y cis en el A.

Ihsan Calis y col.<sup>61</sup> aislan de *Fraxinus angustifolia* un producto de similares características al que denominaron ligstral y que por simple comparación de las señales parece corresponder al diastereoisómero trans.

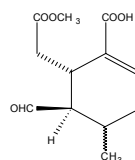


**ligstral**

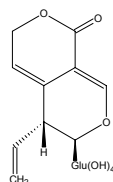
Otras agliconas encontradas en la bibliografía pueden tener idéntico origen.



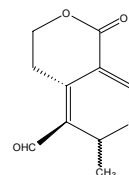
37



37h  
Metilsimuraldehído  
*Swina amurensis*



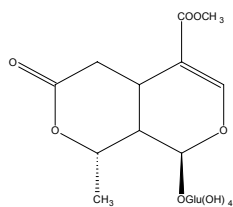
92



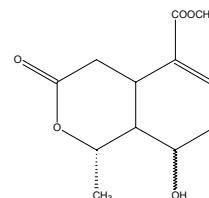
92h  
*Gentianaceae*

<sup>61</sup> Ihsan Calis, Mohammed Hosny, Taha Khalifa y Sansi Nishibe (1993) 6, 1453-1456

También otros productos



27



27h 3:7  $\alpha/\beta$   
*Strychnos spinosa* (Loganiaceae)

Un simple iridoide como la 7-cetologanina (*18*) puede ser hidrolizado a su correspondiente hemiacetal (*18h*) el cual está en equilibrio con el dialdehído (*18d*). Estas especies pueden sufrir hidrólisis del éster para dar los correspondientes ácidos (*21*, *21h*, *21d*). Otras reacciones pueden generar un número de posibles intermediarios.<sup>62</sup> (Ver **Figura 5**).

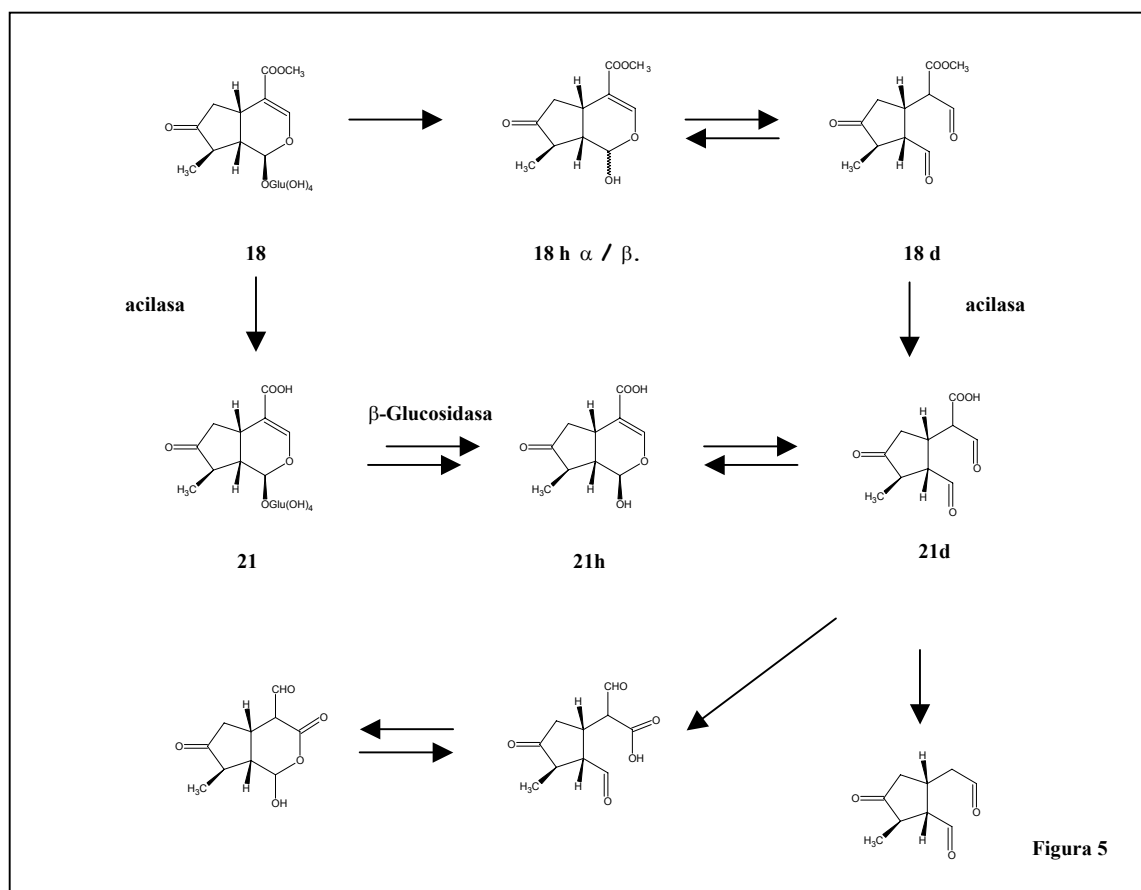


Figura 5

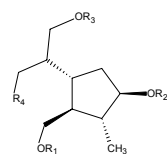
<sup>62</sup> Ghisalberti E.L. (1998) *Phytomedicine* 52, 147

De *J. grandiflorum* y de *J. azoricum* var. *travancorensis* se han aislado agliconas de iridoides oligoméricos junto con la oleaceína<sup>63</sup> cuya formación debe proceder de la hidrólisis enzimática de los correspondientes glucósidos, seguida por la apertura del anillo lactol (cetonización) y descarboxilación del oxoácido del oleósido, lo que requiere una hidrólisis previa del grupo 11 metil éster.

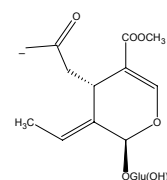
Aparentemente estas reacciones hidrolíticas tendrían lugar durante la extracción por enzimas endógenas.

Estudios en TLC muestran que en los extractos acuosos aumenta la concentración de hidrolizados, mientras que en la extracción con etanol ocurre todo lo contrario como se esperaba, ya que las enzimas estarían desnaturalizadas.

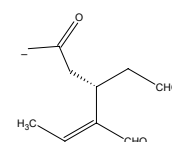
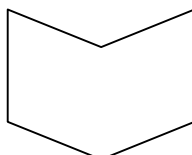
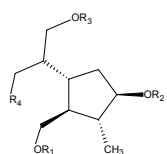
Parece interesante el hecho de que las medicinas naturales que utilizan estas especies necesitan de un cocimiento previo para conseguir las propiedades buscadas.



A

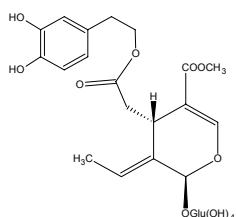


PRODUCTO	R1	R2	R3	R4	REFERENCIA	FUENTE
MOLIHUASIDO A	A	A	H	OH	<b>3825</b>	<i>J. azoricum</i>
MOLIHUASIDO C	OH	A	A	OH	<b>3827</b>	<i>J. azoricum</i>
SAMBACOSIDO A	A	A	A	OH	<b>3830</b>	<i>J. azoricum</i>

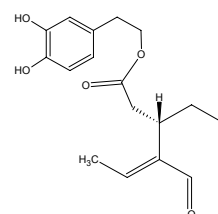
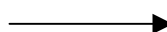


HD

PRODUCTO	R1	R2	R3	R4	REFERENCIA	FUENTE
SAMBACEINA I	HD	A	H	OH	<b>3825HD</b>	<i>J. azoricum</i>
SAMBACEINA II	OH	HD	HD	OH	<b>3827HD</b>	<i>J. azoricum</i>
SAMBACEINA III	HD	HD	HD	OH	<b>3830HD</b>	<i>J. azoricum</i>



3808 oleuropeina



3808 HD oleaceina

<sup>63</sup> Somanadhan B., Smitt U.W., George V., Pushpangadan P., Rajasekharan S., Duus J.O., Nyman U., Olsen C.E. y Jaroszewski J.W. (1998) *Planta Medica* **64**, 246



### Patrones de acilación en oleoiridoides

Al igual que en otros grupos de productos naturales en los iridoides encontramos un enorme espectro de estructuras. La variabilidad en este caso está causada por una amplia variedad de patrones de acilación. Prácticamente cualquier grupo hidroxilo es susceptible de sufrir una esterificación, y a medida que aumenta el número de especies estudiadas aumenta la cantidad y variedad de estas estructuras. (ver **Figura 3 pg.165**)

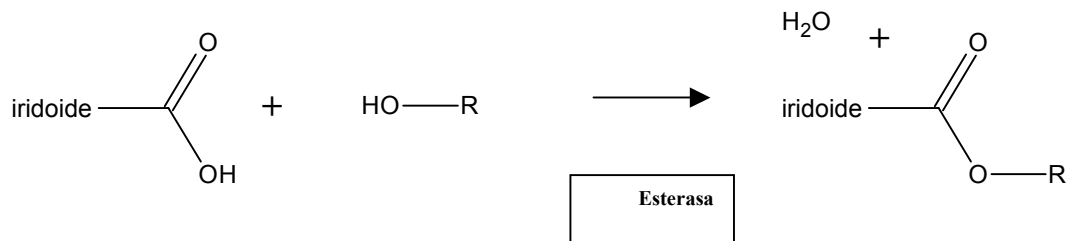
Sabemos que la bioquímica de una planta está sometida a una presión evolutiva al igual que su fisiología o morfología. Durante el curso de millones de años de evolución ininidad de productos han sido sintetizados por diferentes especies. Pero podemos preguntarnos que sentido tiene para las especies que los contienen esta enorme cantidad de variantes en una "orgía metabólica" que parece en principio sin sentido. Pero no debemos olvidar que la variabilidad es la base de la selección natural.

La evolución fisiológica o morfológica se basa en la expresión de nuevas proteínas estructurales o enzimas que se traducen en mínimas ventajas o desventajas acumulativas. Pero la evolución bioquímica es más compleja y no podemos tener en cuenta únicamente la aparición de nuevas enzimas o nueva actividad, sino la evolución de "ambientes metabólicos".

La acumulación de productos de las vías principales del metabolismo proporciona las concentraciones idóneas para que reacciones poco viables y catalizadas por enzimas de baja especificidad sean llevadas a término originando nuevas propiedades en un principio en muy baja proporción. Productos que pasan desapercibidos para el consumo energético del ser vivo que los contiene, pero que ante un cambio en su medio se pueden volver importantes, e incluso indispensables para su supervivencia. Es decir, se ven sometidos a una presión selectiva que favorece su producción. Al mismo tiempo mecanismos como la duplicación génica permite que las copias sigan una evolución divergente sin poner en peligro la supervivencia del individuo y sus descendientes, evolucionando para proporcionar mayor especificidad y eficacia en la catálisis de las enzimas que expresan. Los estadios evolutivos de dichas proteínas explicarían su gran "promiscuidad" y la variedad de reacciones que una misma enzima podría catalizar.

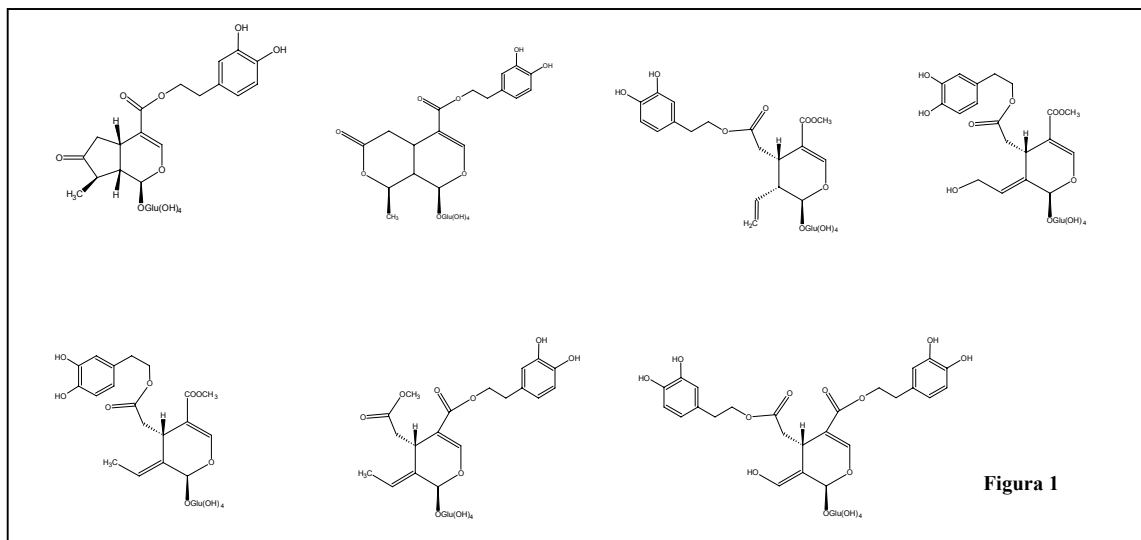
La variabilidad de los iridoides presentes en *Oleaceae* viene determinada principalmente por dos reacciones:

#### Esterificaciones con alcoholes presentes en sus ambientes metabólicos.



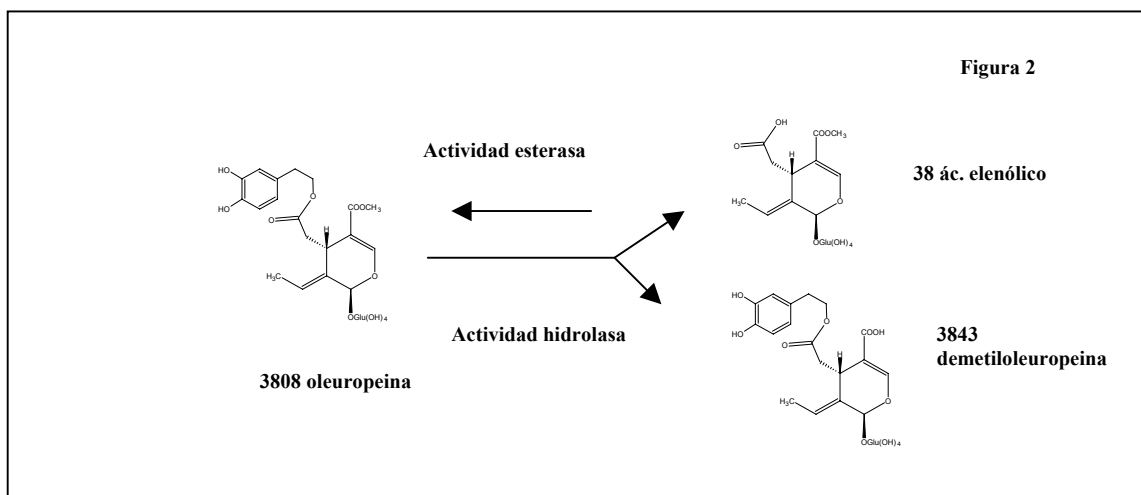
Si bien el grupo carboxilo C11 suele estar metilado, tanto este como el grupo carboxilo C7 cuando están libre pueden estar esterificados con una amplia variedad de alcoholes.

Destacan las eterificaciones con el tirosil (2-(4 hidroxifenil) etanol) y dopalol (2-(3,4 dihidroxifenil) etanol) y con el iridano. Pero también hemos visto que pueden esterificarse con el acteosido, lignanos, e incluso otro iridoide puede actuar como alcohol.



El papel de estas enzimas parece ser importante en el nivel de acumulación de los diferentes iridoideos en la planta. En la maduración del fruto del olivo *Olea europaea* se muestra una variación en los niveles de tres de sus iridoideos presentes:

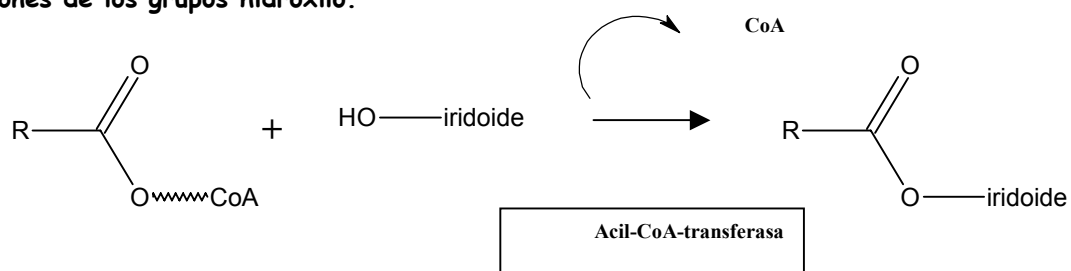
- Esta maduración que se divide en tres fases y se inicia con una fase de crecimiento en la cual se acumula la oleuropeina.
- En la siguiente fase de maduración en verde se produce una reducción de los niveles de clorofila y de oleuropeina. Comienza una acumulación de ácido elenólico y de demetil oleuropeina (esta última en los cultivares que la presentan). Se produce un aumento de la actividad esterasa.
- En la maduración en negro aparecen antocianinas y los niveles de oleuropeina siguen bajando. La acumulación de ácido elenólico y de demetil oleuropeina alcanza su máximo. La actividad esterasa alcanza su máximo. Se produce un incremento de flavonoides, verbascosido y 3,4 dihidroxifeniletanol.



Pese a estos resultados<sup>64</sup> no podemos excluir que el ácido elenólico y la demetil oleuropeina puedan ser intermediarios en la biosíntesis de oleuropeina y que se acumulen progresivamente cuando desciende la biosíntesis.

El fruto solo acumula iridoides glucosilados que probablemente son menos tóxicos que sus agliconas, que si se encuentran en sus hojas, y que lo hacen comestible.<sup>65</sup>

#### Acilaciones de los grupos hidroxilo.



Los restos más habituales son el acetilo, cinamilo, cumaroilo, feruloilo y cafeoilo. Estos restos también son habituales en *Gentianales* y otros ordenes con iridoides. Otro iridoide también puede actuar como acilo.

Las acilaciones pueden ser:

- Acilaciones de los grupos hidroxilos del esqueleto básico.
- Acilaciones de los grupos hidroxilos del resto carbohidrato.

La posición habitual en *Oleaceae* es la 6'.

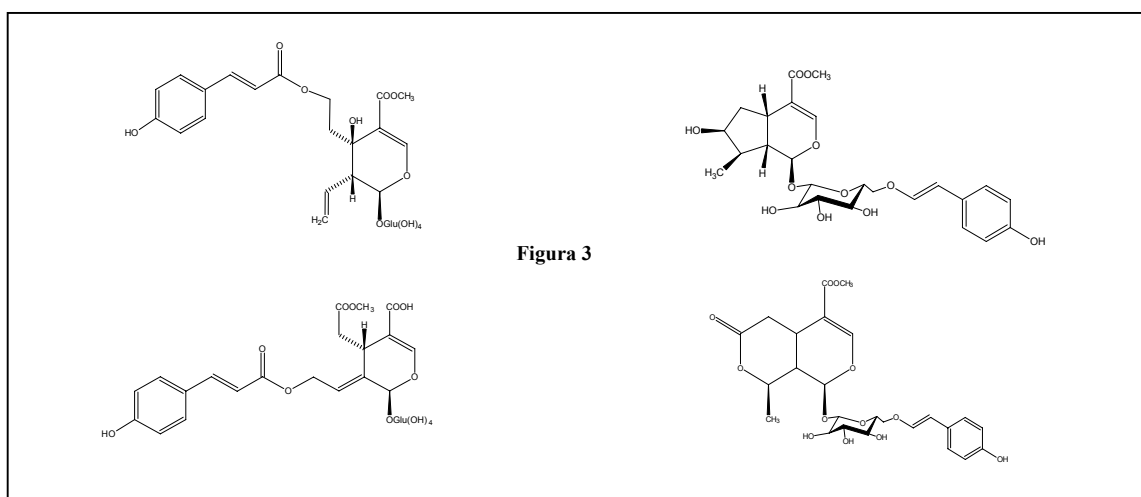
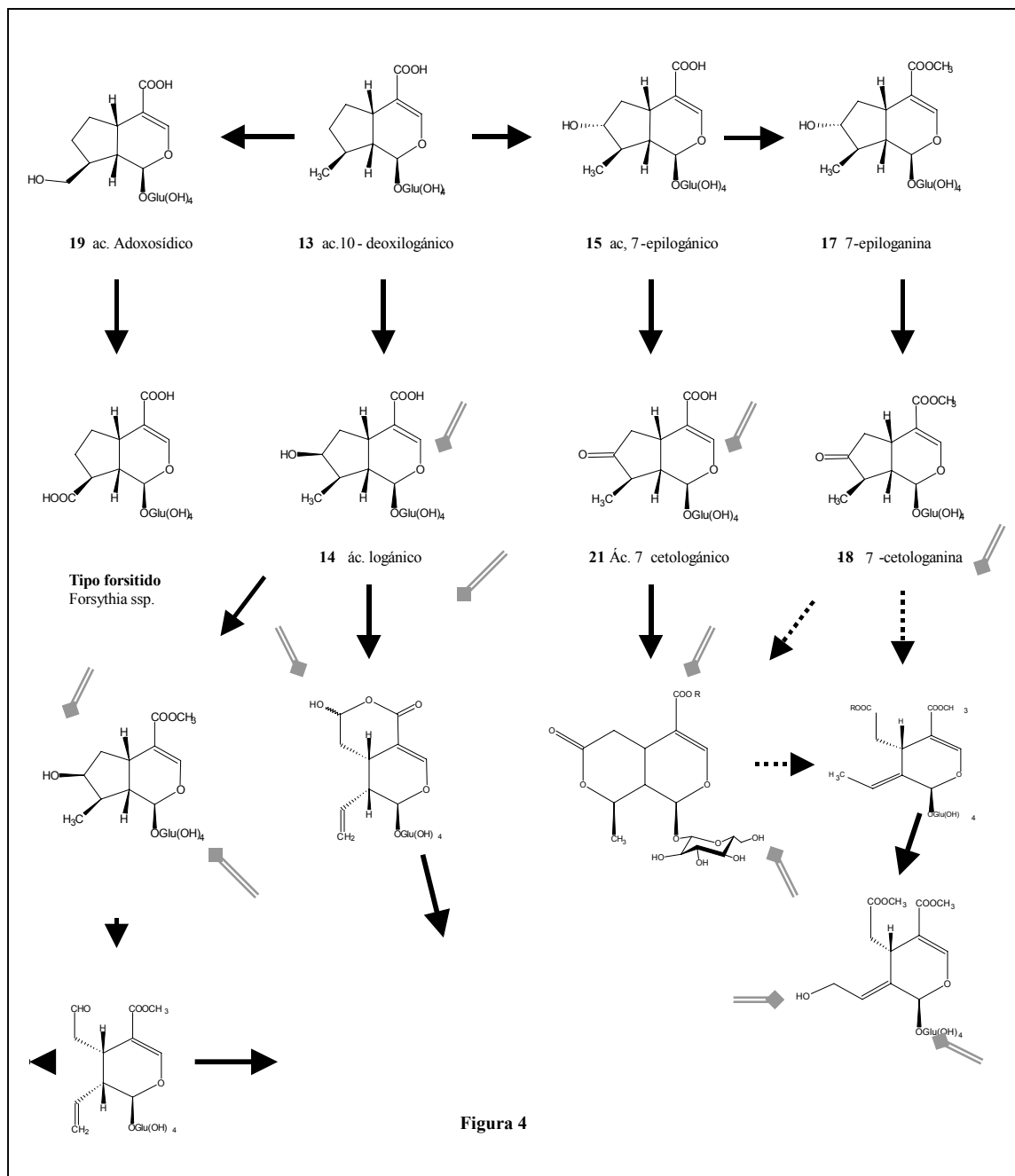


Figura 3

<sup>64</sup> Amiot M.J., Fleuriot A. y Macheix J.J. (1989) *Phytochemistry* **28**(1), 67

<sup>65</sup> Harborne J.B. (1980) *Enciclopedia of Plant Physiology. New Series* (Bell E.A. y Charlwood B.V. eds) Vol. 8,239. Springer, Berlin.

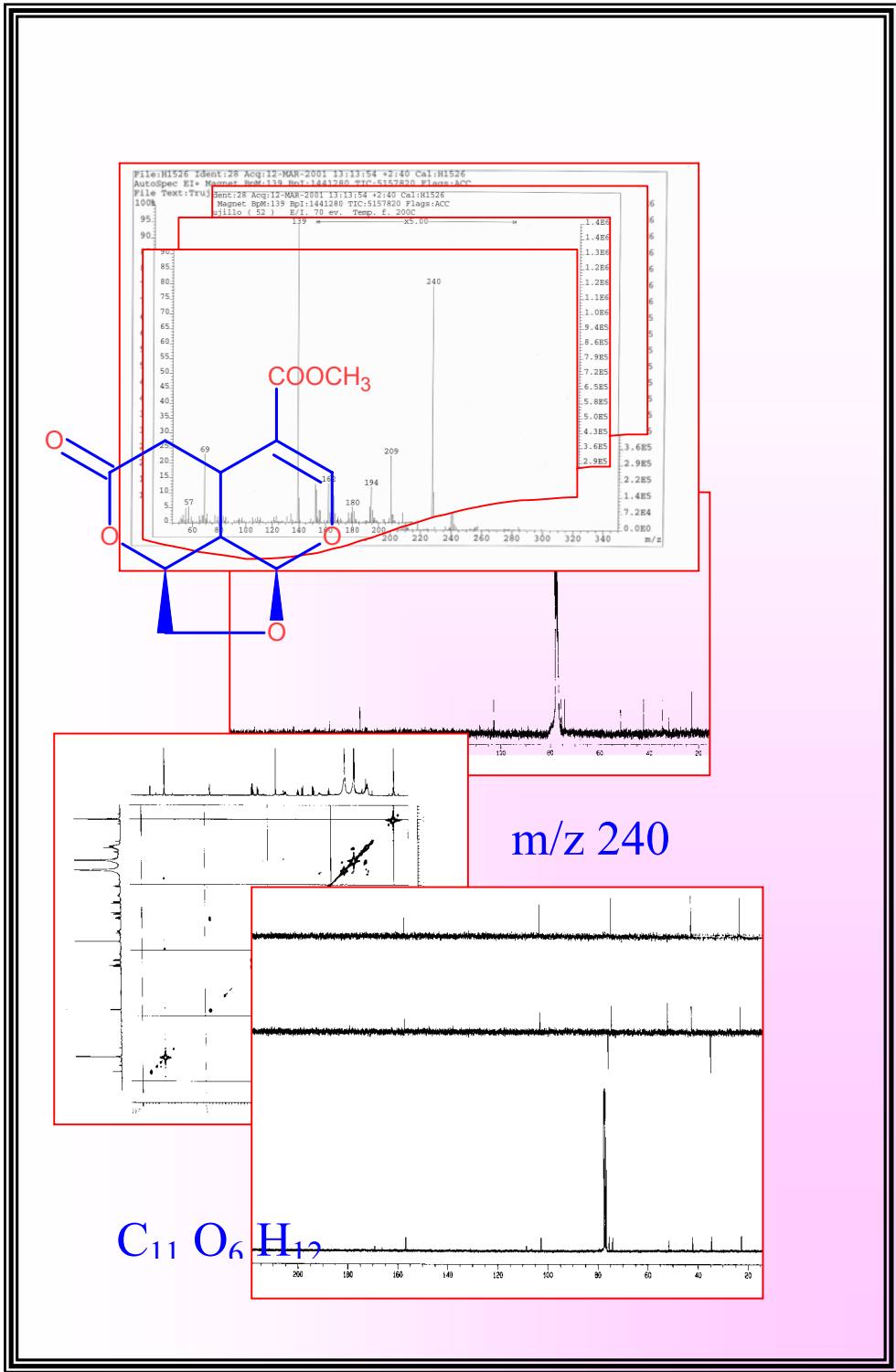


Las acilaciones actúan como bloqueantes de productos fundamentales en las rutas biosintéticas impidiendo su consumo y acumulándolos de forma que alcancen concentraciones susceptibles de ser detectadas. Nos proporcionan "fotogramas" de la sucesión biosintética a partir de los cuales podemos establecer modelos de cómo se desarrolla. Productos tan importantes en la biosíntesis de los iridoides como la loganina o la epiloganina muchas veces solo son detectadas por la presencia de derivados acilados, si bien su presencia es segura en todas las especies que contienen iridoides.

Desde el punto de vista taxonómico tanto la naturaleza del resto acilado como la posición de acilación se pueden utilizar como marcadores. Hemos visto que las acilaciones con iridano y derivados del oleosido son características de un grupo de especies del género *Jasminum*. Las acilaciones en la posición 10 del 10-hidroxiolosido, lo son de otro grupo de especies y típicas de este género. Los secoiridoides acilados con el ác. m-hidroxibenzoico y derivados, son típicos de *Gentianaceae*.

En la **Figura 4** se muestran las posiciones de acilación más comunes de los representantes principales de la biosíntesis de iridoides.





# P. TEÓRICA

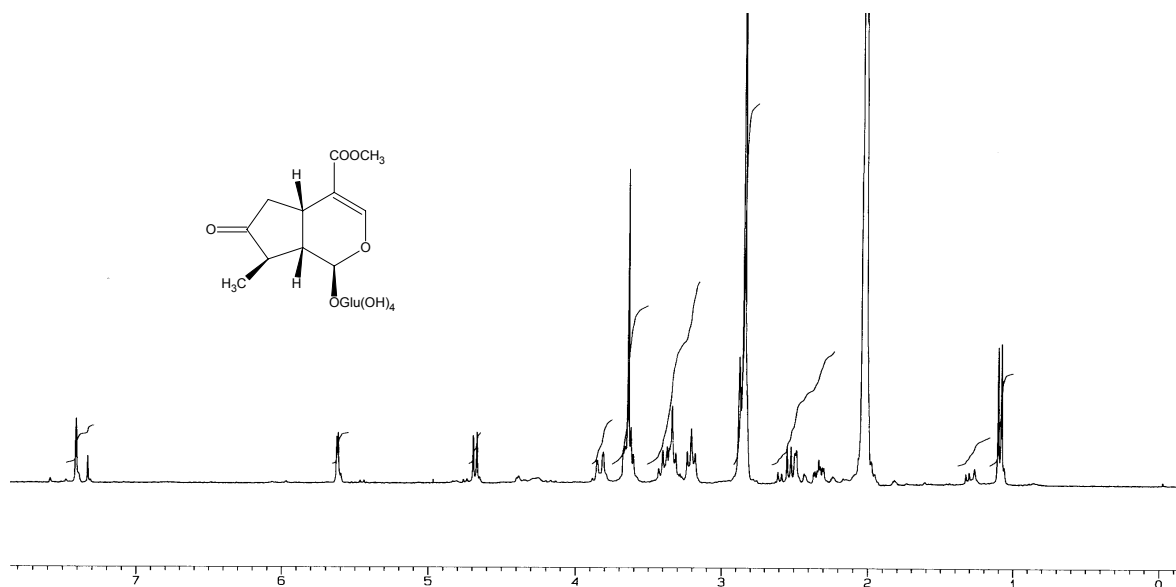




Descripción de los productos aislados de *Jasminum odoratissimum*

**Producto 18**

7-cetologanina

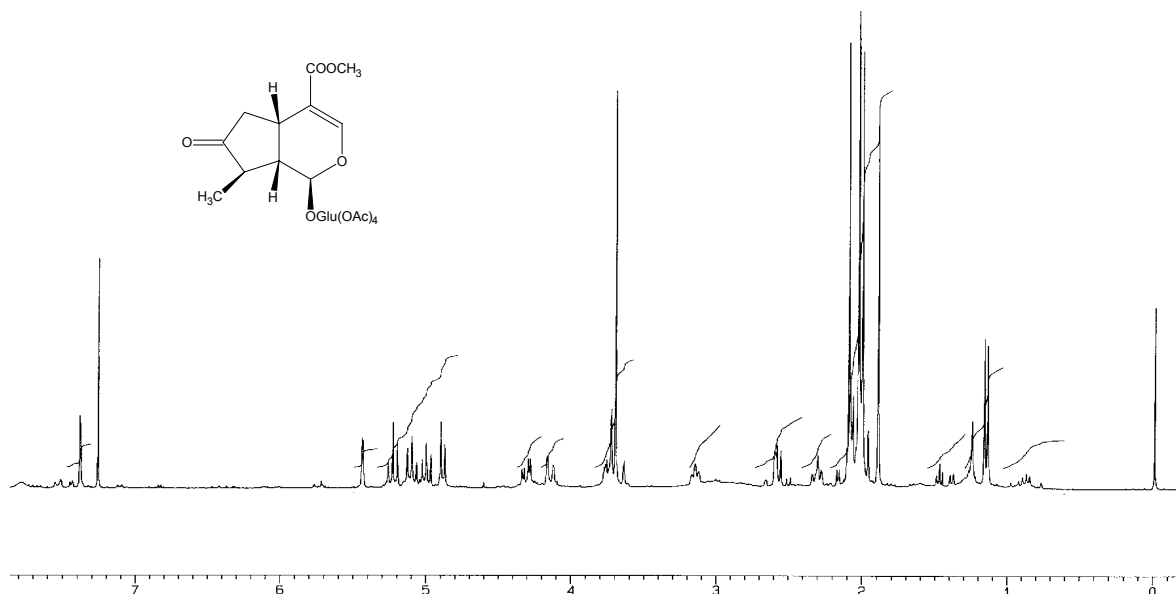


ppm

Espectro RMN <sup>1</sup>H

**Producto 18a**

7-cetologanina 2',3',4',6' tetraacetato.



ppm

Espectro RMN <sup>1</sup>H

El espectro RMN  $^1\text{H}$  del producto **18** exhibe las señales características del protón H3 de un iridoide glucosilado a  $7.41\delta$  (s), las señales de un grupo metilo secundario a  $1.09\delta$  (d,  $J=7.2$ ), un grupo carbometoxi a  $3.65\delta$  (s), un protón anomérico a  $4.68\delta$  (d,  $J=7.8$ ), y un protón acetal a  $5.63\delta$  (d,  $J=3$ ).

Estos datos espectroscópicos coinciden con la estructura de la 7-cetologanina que se confirma con otros datos físicos como MS, IR, UV. (ver **Experimental**).

En los espectros RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  el resto de azúcar aparece muy complejo y para confirmar la estructura del producto **18** se somete a acetilación para obtener el correspondiente tetraacetato (**18a**) con un espectro muy claro, particularmente en las señales del resto glucosilo.

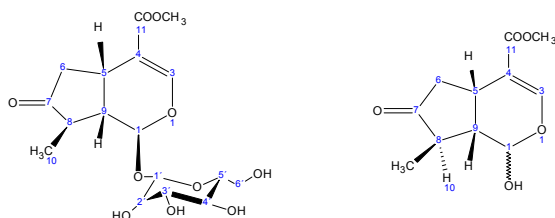


Tabla 1. RMN  $^1\text{H}$  de los compuestos **18**, **18h  $\alpha$** , **18h  $\beta$** , **18a**

H	<b>18</b>	<b>18h <math>\alpha</math></b>	<b>18h <math>\beta</math></b>	<b>18a</b>	<b>18ha</b>
1	5.61d (3.2)	5.38† (3.7)	5.51† (3.3)		6.31† (2.6)
3	7.48d (1.4)	7.43s	7.48s		7.43d (1.4)
5	3.5-3.1m	3.30m	3.30m		3.30† (7.9)
6A	2.51ddd(19.1,8.0)	2.55dd (19.5,8.3)	2.46dd (19.5,8.3)		2.62dd (19.5, 7.9)
6B	2.63ddd (19.1,8.0)	2.65dd (19.5,8.3)	2.65dd (19.5,8.3)		2.69d (19.5)
8	2.17-2.08m	2.13m	2.41m		2.18-2.10
9	2.33ddd(10.2,7,3.2)	2.25m	2.34m		2.28m
10-CH3	1.15d (7.0)	1.18d (7.1)	1.24d (7.5)		1.20d (7.0)
1'	4.67d (7.8)				
2'	4.07-3.97m				
3'	3.55-3.16				
4'					
5'	3.55-3.16				
6' A	3.65dd (12,5.9)				
6' B	3.9dd (12,2)				
CH <sub>3</sub> CO-11	3.69s	3.73s	3.74s		3.74s
OCO-CH3					2.14s
1-OH		3.45d (4.5)	3.34d (4.0)		

Los espectros **18h $\alpha$** , **18h $\beta$** , **18a** y **18ha** se midieron en  $\text{CDCl}_3$  y el espectro **18** en  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ .

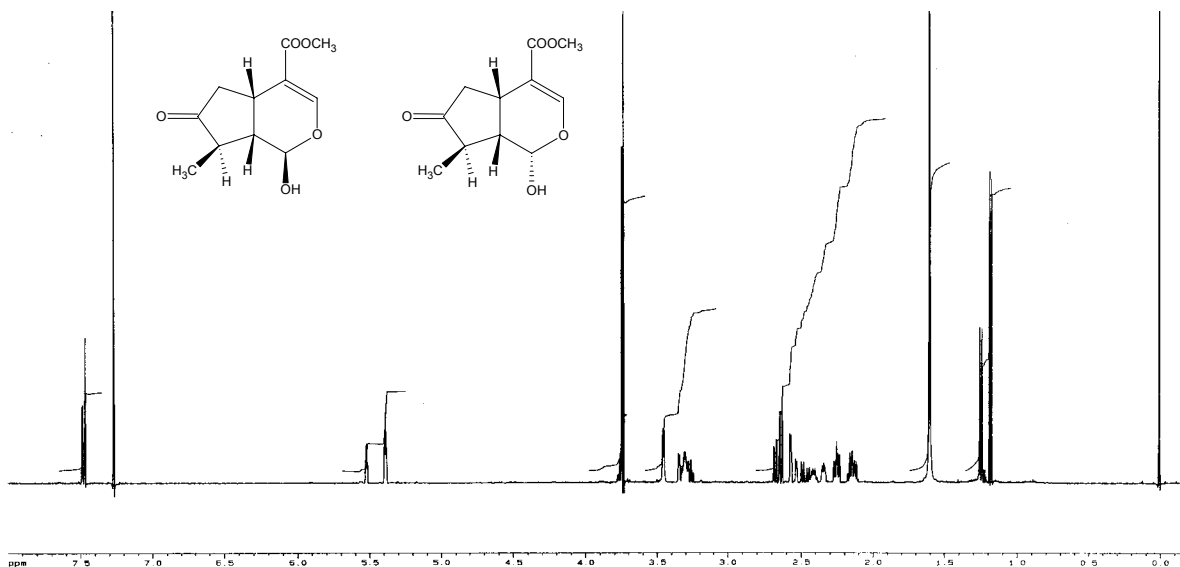
Tabla 2. RMN <sup>13</sup>C de los compuestos 18, 18h α, 18h β, 18ha

C	18	18hα	18hβ	18ha
1	95.5	92.5	94.2	89.1
3	153.4	151.5	151.4	151.2
4	112.2	109.3	109.3	109.1
5	28.4	26.7	28.6	26.4
6	46.6	42.5	42.2	42.1
7	220.7	218.2	218.2	217.5
8	44.8	45.9	44.2	43.0
9	46.7	43.5	43.5	44.4
10	13.9	13.6	16.2	13.6
11	169.0	166.9	166.9	166.5
1'	100.4			
2'	74.8			
3'	78.1			
4'	71.7			
5'	78.6			
6'	62.9			
CH <sub>3</sub> CO-11				169.0
OCO-CH <sub>3</sub>				16.3
OCO-CH <sub>3</sub>				

Los espectros 18hα, 18hβ y 18ha se midieron en CDCl<sub>3</sub> y el espectro 18 en CD<sub>3</sub>OD.

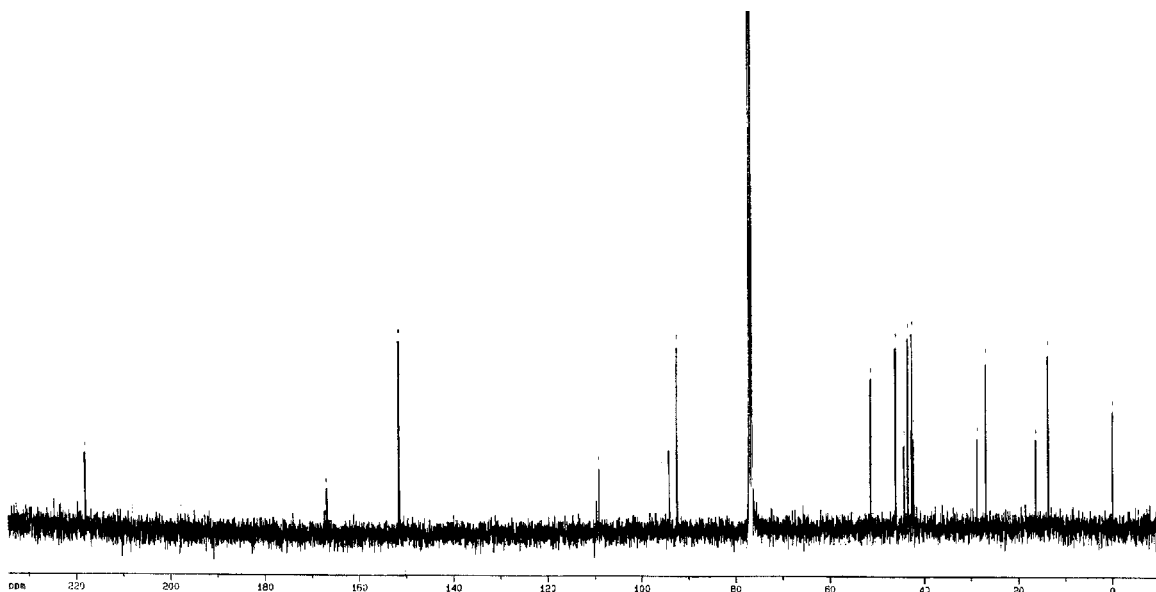
## Producto 18h

Aglicona de la 7-cetologanina



ppm

Espectro RMN <sup>1</sup>H



Espectro RMN <sup>13</sup>C

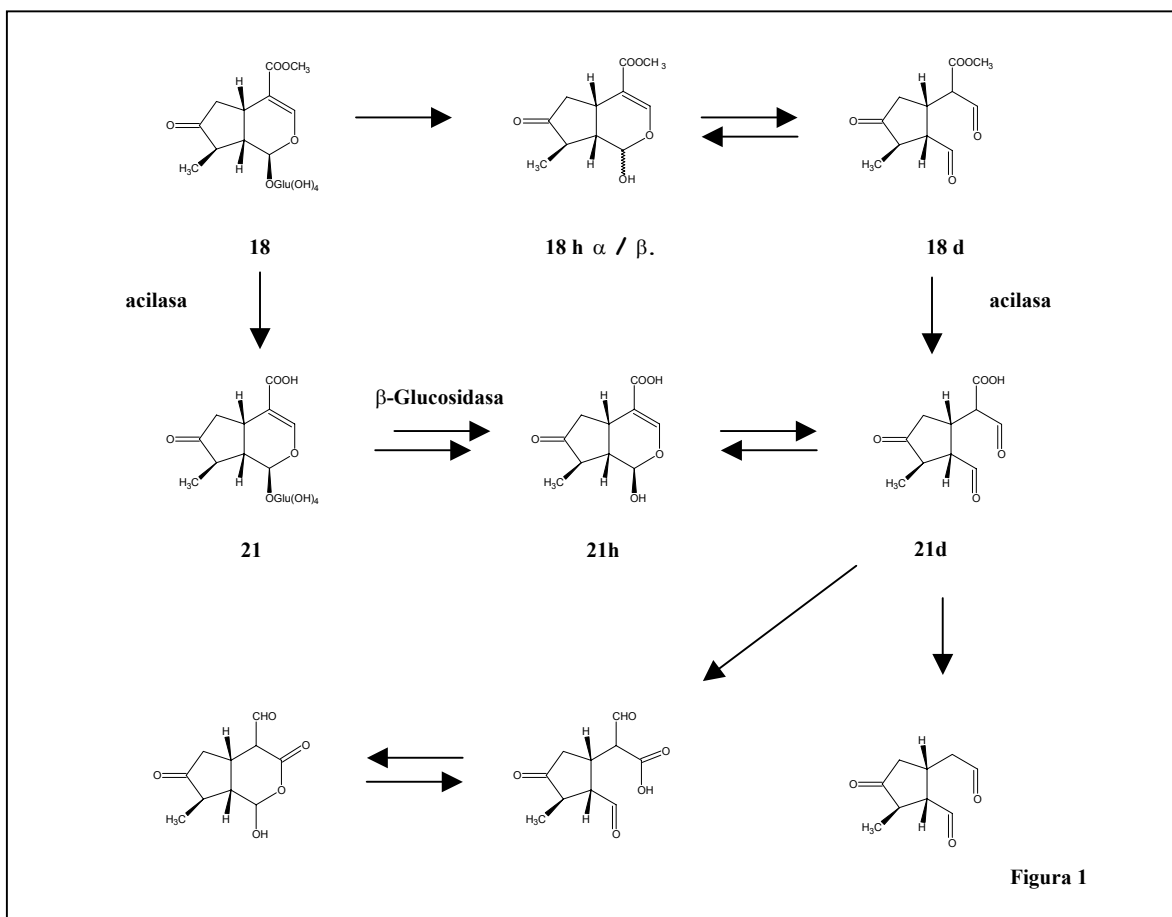
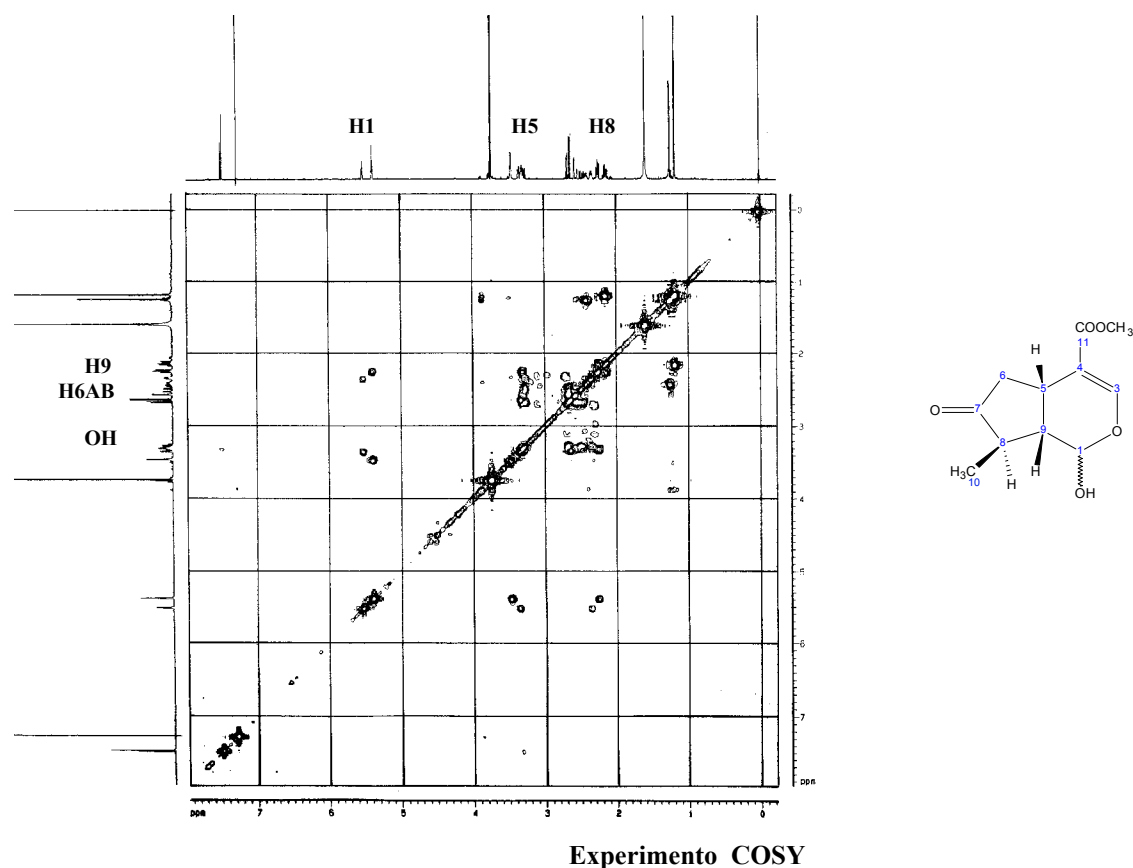


Figura 1

En *Jasminum odoratissimum* aparece una mezcla compleja de agliconas de las cuales el producto (*18h*) es el pico mayoritario lo que permite su estudio, mostrando ser en realidad una mezcla de diastereoisómeros  $\alpha / \beta$ ,<sup>1</sup> posiblemente derivados de la acción de una glucosidasa sobre la 7-cetologanina (*18*) también detectada en *Jasminum odoratissimum*. (Ver **Figura 1**). Se aislaron como una mezcla en equilibrio en las condiciones de separación por HPLC. En el espectro RMN <sup>1</sup>H los protones H1 aparecen como un triplete, estando acoplados con H9 y con el protón del grupo hidroxilo que aparece como un doblete.

Como hemos visto en la introducción un iridoide como la 7-cetologanina (*18*) puede ser hidrolizado a su correspondiente hemiacetal (*18h*) el cual está en equilibrio con el dialdehído (*18d*). Estas especies pueden sufrir hidrólisis para dar los correspondientes ácidos (*21*, *21h*, *21d*).<sup>2</sup> (Ver **Figura 1**).



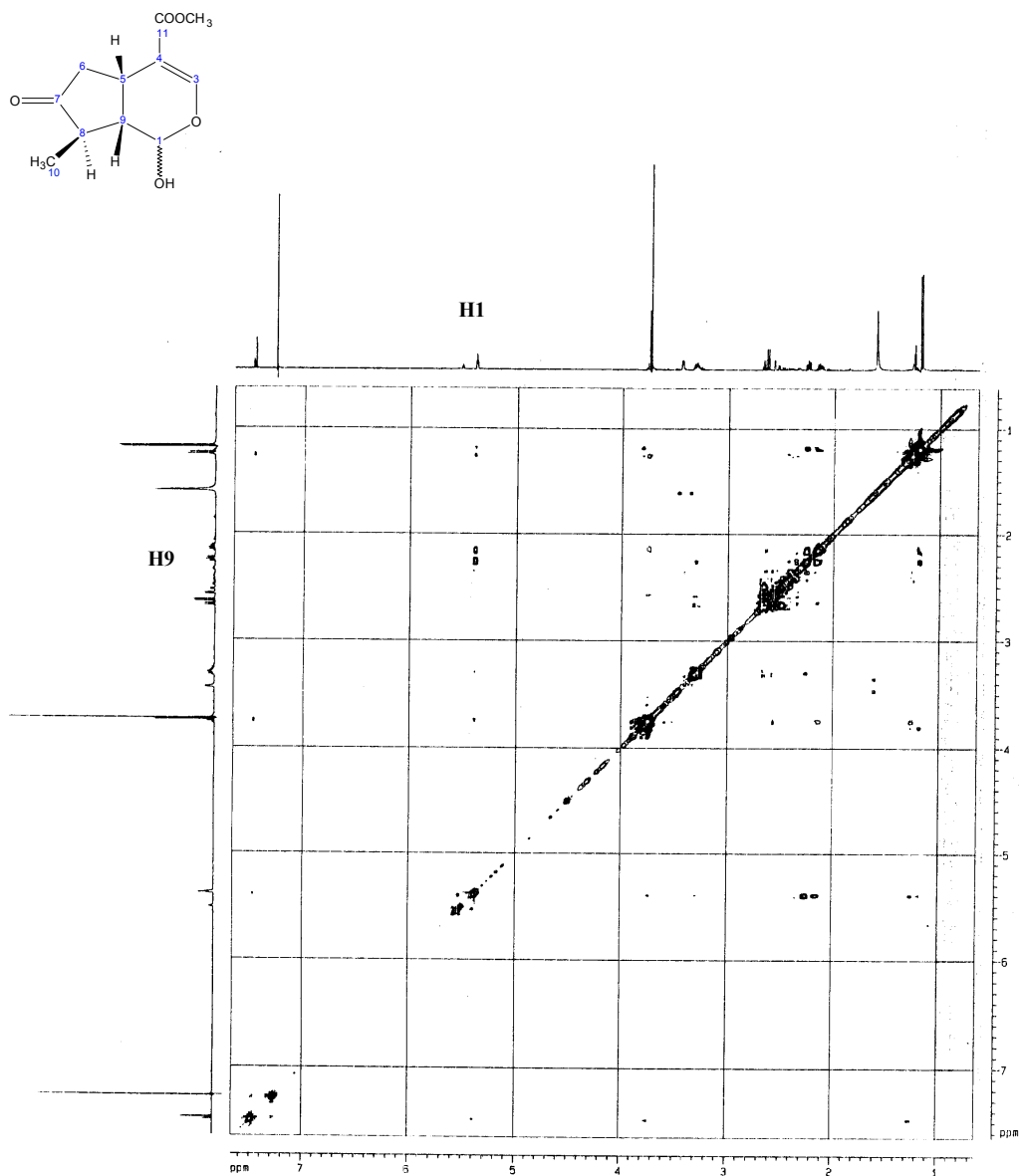
Experimento COSY

Los espectros RMN <sup>1</sup>H y COSY de la mezcla permiten establecer sus estructuras como epímeros en el carbono acetálico C1. Se observan dobles relaciones entre el protón acetálico con H9 y con el grupo OH. Una zona compleja de relaciones entre H5 y los protones H6AB, y las dobles relaciones entre los protones H8 y los metilos correspondientes.

<sup>1</sup> Pérez J.A., Hernández J.M., López H. Y Trujillo J.M., Natural Products Letters (1999) 13(4), 247

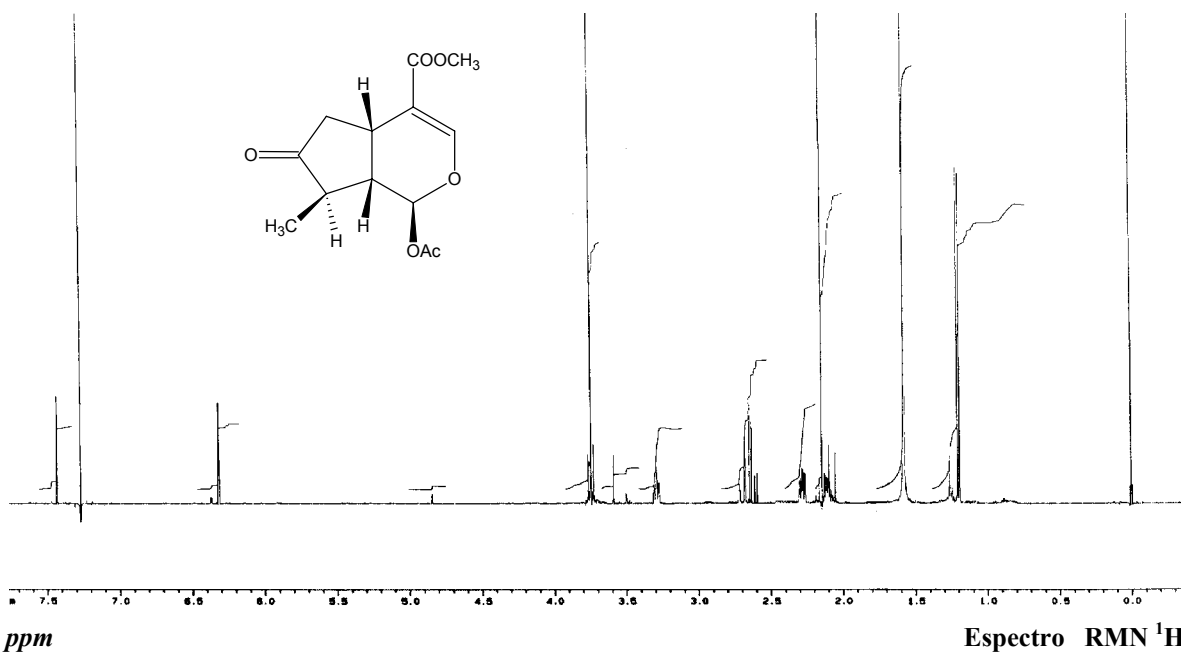
<sup>2</sup> Ghisalberti E.L. Phytomedicine (1998) 52, 147

El espectro **ROESY** muestra una correlación entre H1,H9 y 10CH<sub>3</sub>, para el componente mayoritario de la mezcla, indicando un grupo  $\alpha$ -hidroxilo de la función hemiacetal.

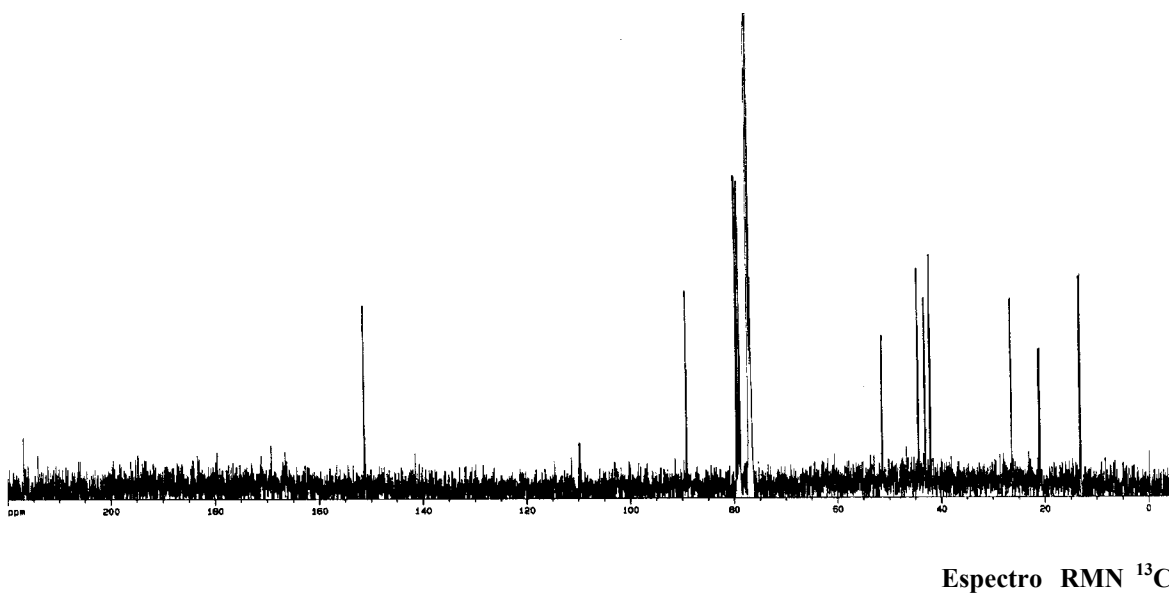


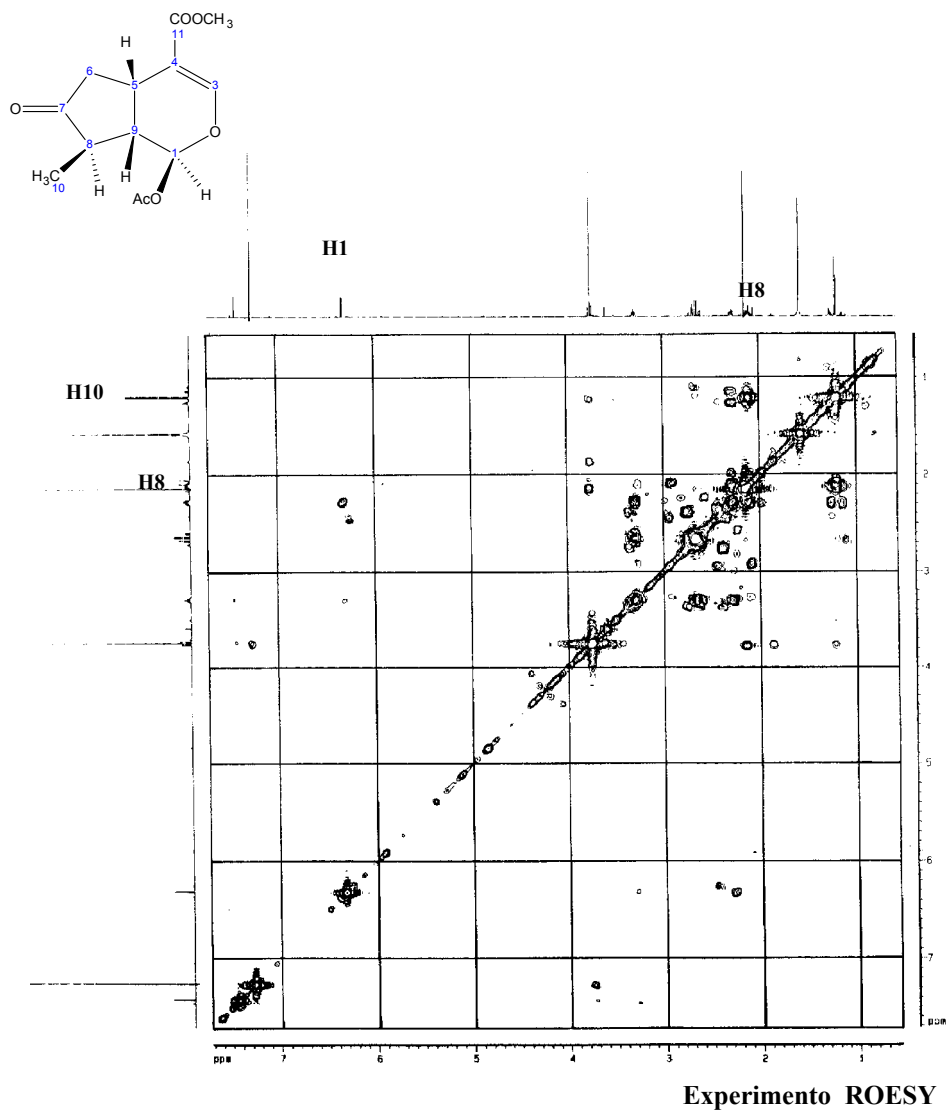
Experimento ROESY

## Producto 18ha



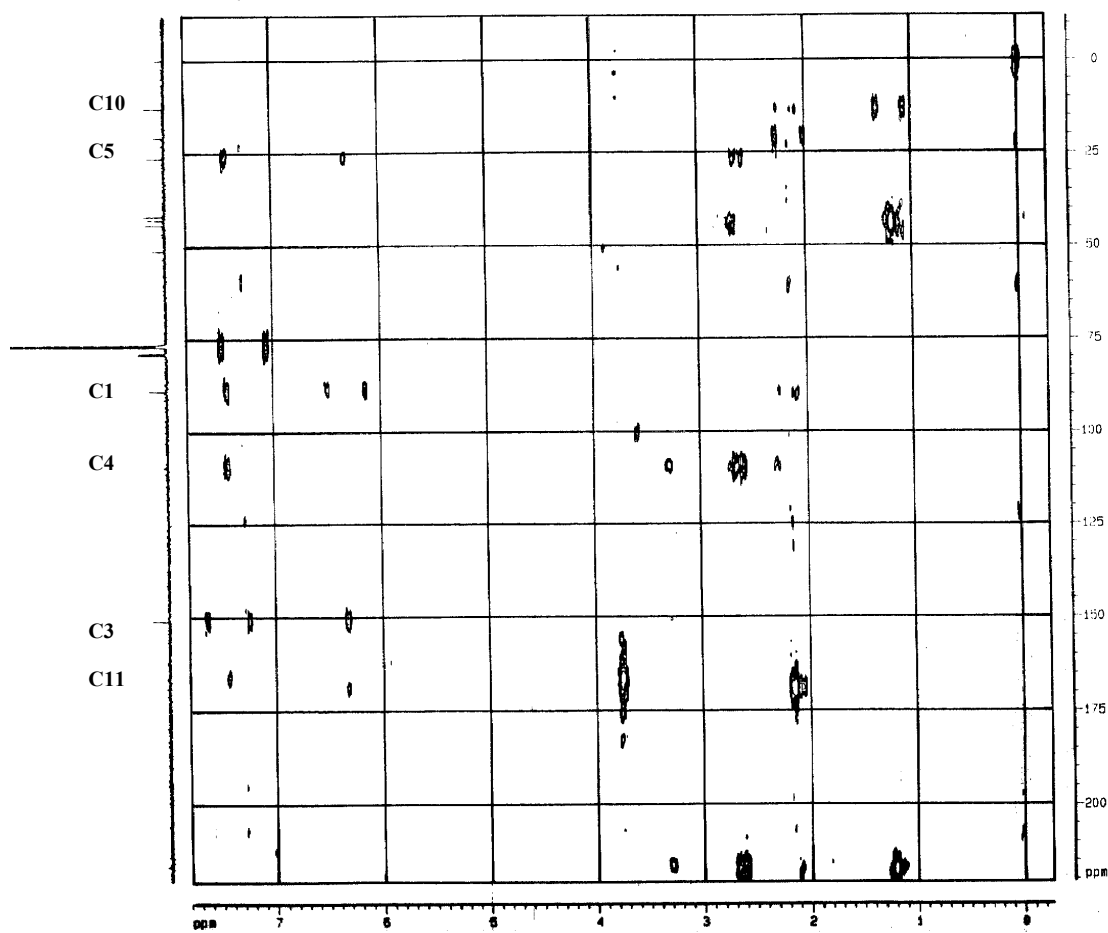
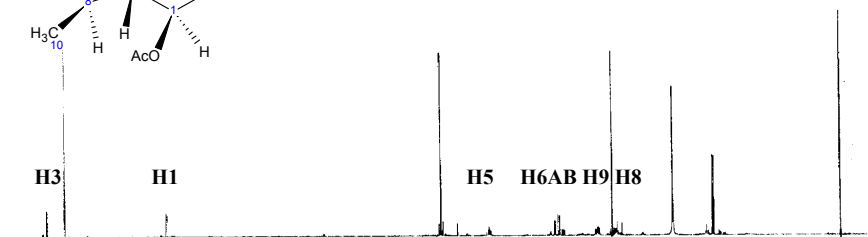
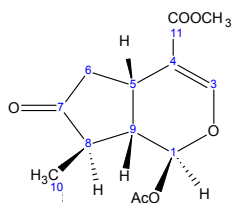
Es producto de la acetilación de la mezcla anterior. Solo se obtiene un componente el cual en su espectro **ROESY** muestra tener un grupo alfa-acetiloxi en C1. En este derivado acetilado, la multiplicidad de H1 cambia a un doblete como se esperaba.





En el experimento **HMBC** se observan las relaciones entre el carbono C1 y el protón H3 y viceversa C3 y H1. También aparecen otras relaciones interesantes como las C4-H5, C5-H6AB y la del carbono C11 y los protones del grupo metoxilo.

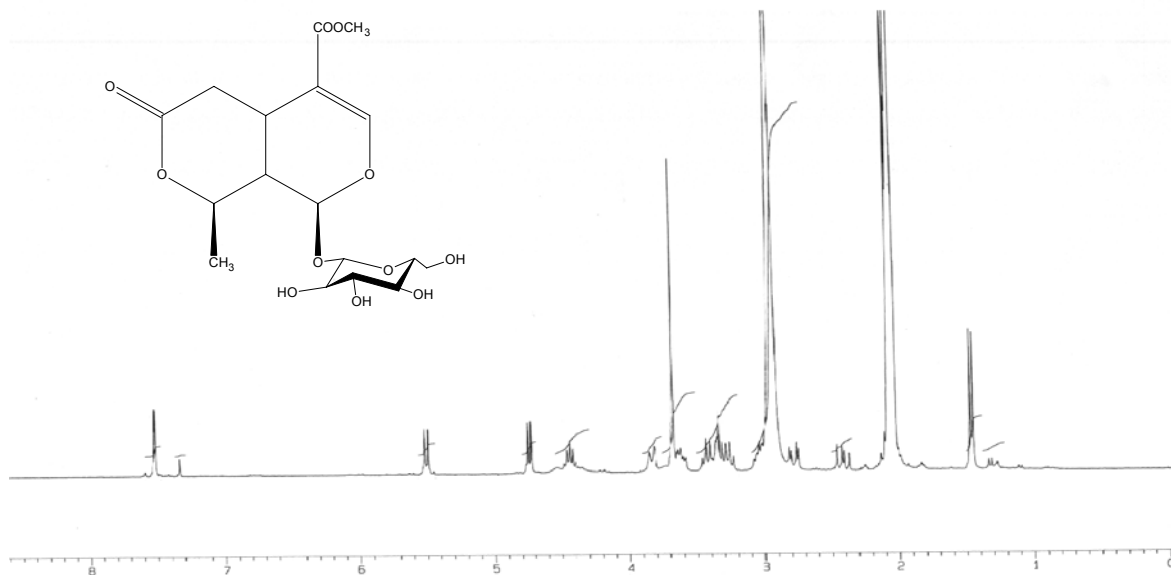




Experimento HMBC

## Producto 28

## 8-epikingísido



ppm

Espectro RMN <sup>1</sup>H

La señal de un doblete a 7.51 $\delta$  de un protón H3 y un doblete a 5.51 $\delta$  asignable a un protón H1, junto con un dos dobles dobles a 2.77 $\delta$  y 2.42 $\delta$  correspondientes a protones H6a y H6b respectivamente indican que este producto es un secoiridoide. El doblete a 4.73 $\delta$  y el grupo de señales entre 3.25 y 3.89 indican la presencia de un resto de glucosa. Un doblete a 1.45 $\delta$  de un grupo metilo y la existencia de un único grupo metoxilo junto con el valor de masas FAB m/z 405 [M+H<sup>+</sup>] (C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub>) indica que se trata del producto denominado en la literatura química 8-epikingísido. Este producto fue inicialmente sintetizado por Inouye y col.<sup>3</sup> a partir de la loganina, y posteriormente citado de forma natural de dos fuentes casi al mismo tiempo (*Syringa vulgaris* y *Ligustrum japonicum*).<sup>4,5</sup>

Los datos espectroscópicos aportados por Inouye y col. de este compuesto, concuerdan perfectamente con los datos obtenidos.

Para confirmar la estructura propuesta se procede a su acetilación.

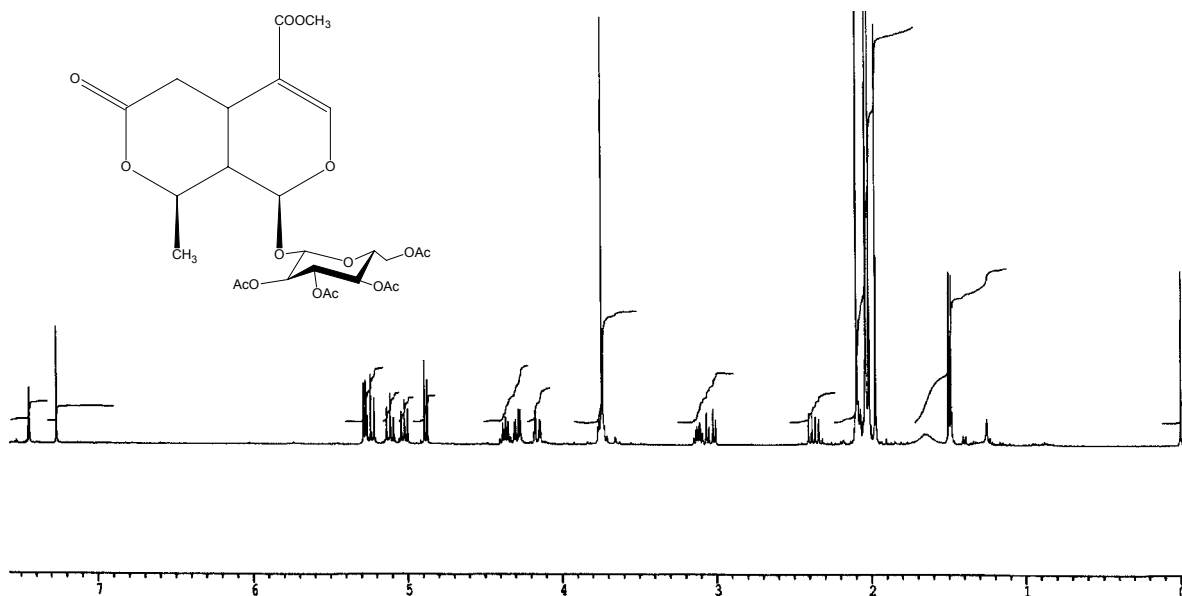
<sup>3</sup> Inouye, H., Yoshida, T., Tobita, S., Tanaka, K. y Nishioka, T. (1974) *Tetrahedron* **30**, 201

<sup>4</sup> Kikuchi, M., Yamauchi, Y., Takahashi, Y., Nagaoka, I., y Sugiyama, M. (1988) *Yakugaku Zasshi* **108**, 355

<sup>5</sup> Kuwajima, H., Matsuuchi, K., Takaishi, K., Inoue, K., Fujita, T. y Inouye, H. (1989) *Phytochemistry* **25**, 359-361

**Producto 28a**

2',3',4',5'-O-tetracetil-8-epikingísido



ppm

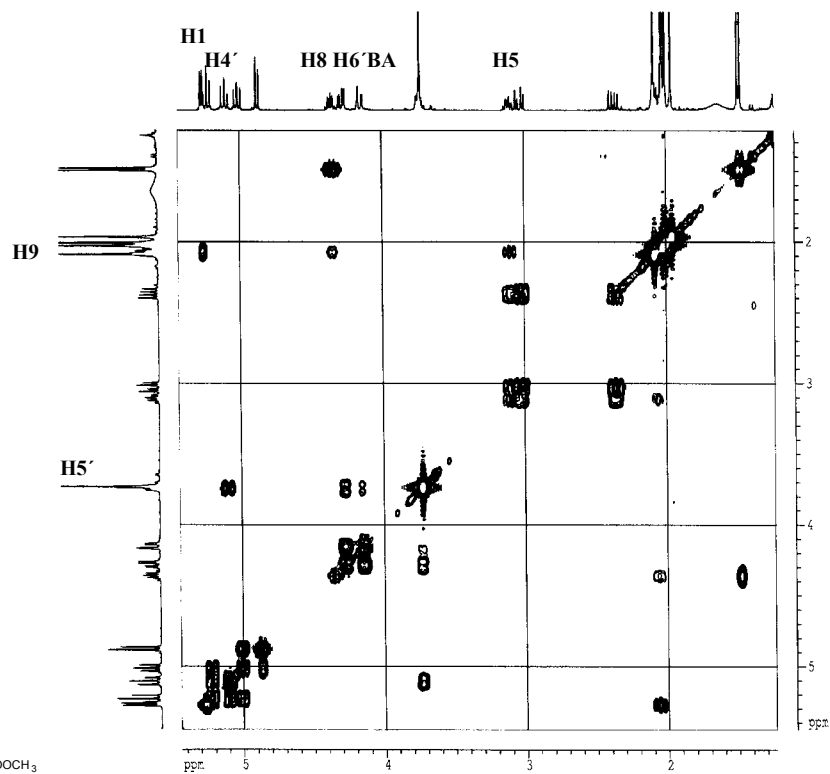
**Espectro RMN <sup>1</sup>H**

Como cabría esperar la acetilación del producto 28 proporciona un tetraacetato que muestra espectros **RMN <sup>1</sup>H** y **RMN <sup>13</sup>C** muy claros que permiten su estudio y confirmar la estructura propuesta.

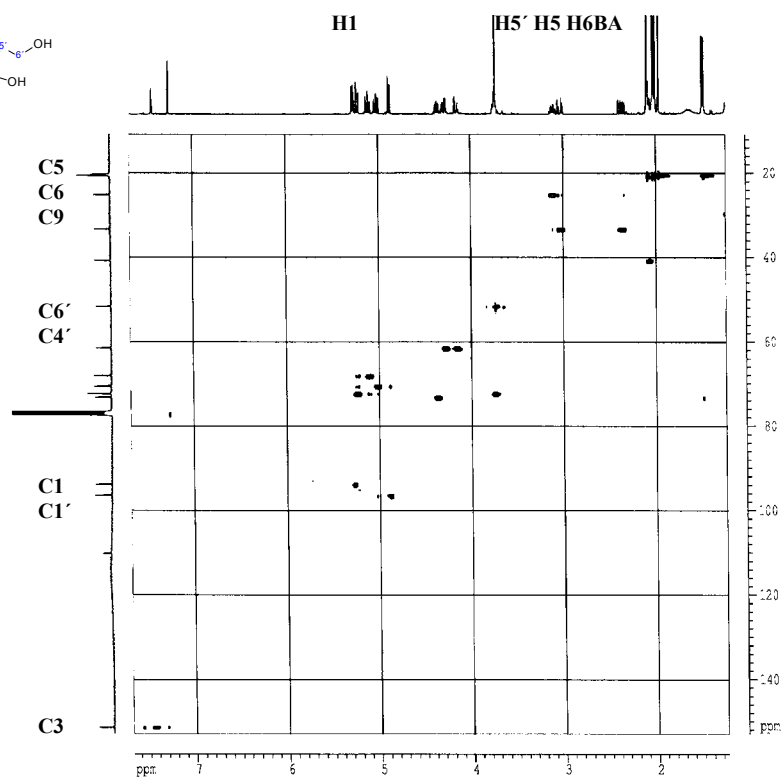
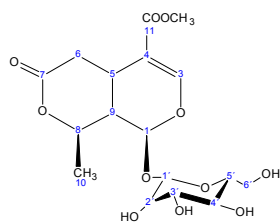
Un experimento **COSY** puso de manifiesto las conexiones entre los protones H1,H8 y H5 con una señal oculta en que permite asignarla al protón H9. Del mismo modo el protón H5' oculto bajo la señal de los protones del grupo metoxilo se puede asignar gracias a las relaciones con los protones H4', H6A' y H6B'.

<b>COSY</b>	H1	H8	H5	H4	H6A'	H6B'
10CH3	⊕					
H9	⊕	⊕	⊕			
H5'				⊕	⊕	⊕

El experimento **HMQC** permite confirmar la estructura propuesta y confirma los valores de los protones H9 y H5, así como asignar los valores de los carbonos del resto de glucosa.



Experimento COSY



Experimento HMBC

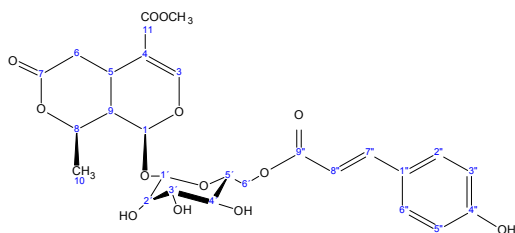
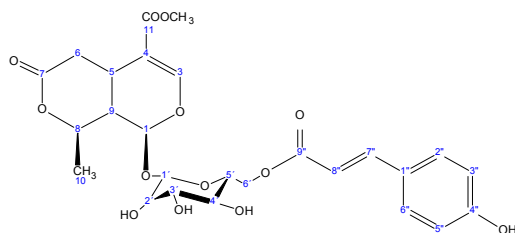


Tabla 3. RMN <sup>1</sup>H de los compuestos 28,2801, 2802

H	28	2801	2802
1	5.49d (7.6)	5.26d (7.4)	5.21d (7.4)
3	7.88s	7.49s	7.49s
5	3.08m	2.98m	2.98m
6A	2.50dd (16.5,11.4)	2.26dd (16.4,11.3)	2.26dd (16.4,11.3)
6B	2.86dd (16.5,4.4)	2.75m	2.75m
8	4.49m	4.24-4.38m	4.24-4.38m
9	2.14m	1.95-2.05m	1.95-2.05m
10-CH <sub>3</sub>	1.51d (6.4)	1.37d (6.3)	1.37d (6.3)
1'	4.70d (7.8)	4.66d (7.8)	4.62d (7.8)
2' - 6'	3.63-3.92	3.30-4.50	3.30-4.50
2''+6''		7.41d (8.6)	7.56d (8.6)
3''+4''+5''		6.74d (8.6)	6.70d (8.6)
7''		7.55d (16.0)	6.78d (16.0)
8''		6.28d (16.0)	5.72d (16.0)
CH <sub>3</sub> CO-11	3.73s	3.66s	3.63s

Los espectros se midieron en CD<sub>3</sub>OD.

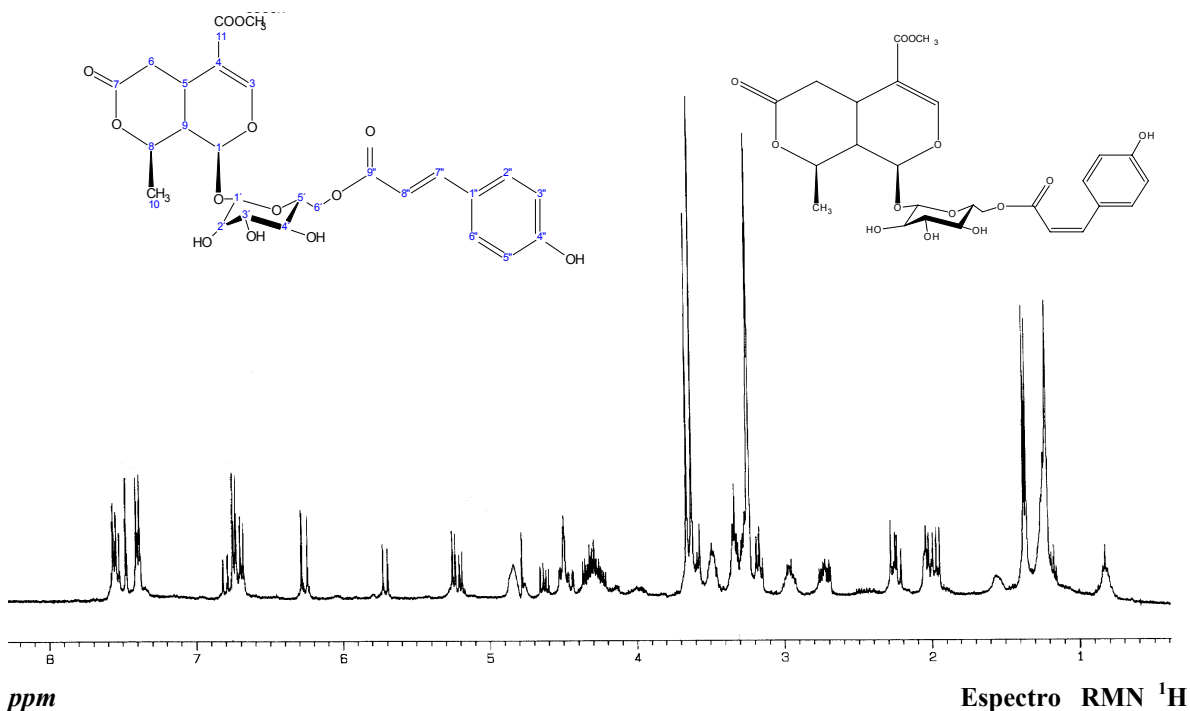
Tabla 4. RMN  $^{13}\text{C}$  de los compuestos 28, 2801, 2802

C	28	2801	2802
1	96.3	96.8	96.8
3	154.4	154.4	154.4
4	109.6	109.6	109.8
5	28.1	28.1	28.1
6	33.6	34.6	34.6
7	174.7	174.7	174.5
8	75.8	75.9	76.1
9	41.9	41.9	41.9
10	21.7	21.7	21.7
11	168.3	168.9	168.9
1'	100.7	101.0	101.0
2'	74.7	74.9	74.9
3'	78.5	78.5	78.5
4'	71.7	71.7	71.7
5'	77.9	77.9	77.9
6'	62.9	62.9	62.9
1''		126.8	127.4
2''+6''		131.3	133.8
3''+5''		115.9	116.8
4''		161.3	161.3
7''		145.3	147.2
8''		114.6	116.1
9''		168.0	167.8
OCH <sub>3</sub>	52.0	52.0	52.0

Los espectros 2801 y 2802 se midieron en  $\text{CD}_3\text{OD}$  y 28 en  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ .

## Productos 2801/2802

## 6'-O-cis/trans-p-(cumaroioxi) - 8-epikingísido



Del extracto polar HPLC fase reversa en una proporción MeOH/H<sub>2</sub>O (46:54) se aísla un aceite que en espectroscopía de masas **FAB** muestra una fórmula molecular C<sub>26</sub> H<sub>30</sub> O<sub>13</sub>.

El espectro **RMN** <sup>1</sup>H de la mezcla muy similar al del producto 28 (8-epikingísido), muestra además de las señales típicas de un secoiridoide, señales de protones olefínicos asignables a un grupo trans- y cis- p-cumaroilo, así como señales atribuibles a un resto de glucosa.

La presencia de un solo un grupo metoxilo (3.63δ, 3.66δ), los protones H1 en forma de doblete (5.21δ, 5.26δ) y un grupo metilo (1.37δ), indican que se trata de un secoiridoide tipo kingísido o su isómero 8-epi.

Estos secoiridoideos se obtuvieron como una mezcla de isómeros geométricos en equilibrio e inseparables en las condiciones de purificación.

Las señales a 21.5 ppm y 21.7 ppm (C-10 grupo metilo) en el espectro **RMN** <sup>13</sup>C son características de un secoiridoide del tipo 8-epikingísido<sup>6,7</sup>, frente a los valores encontrados característicos del kingísido a 18.4 δ<sup>8</sup> (17.7 δ para su aglicona<sup>9</sup>).

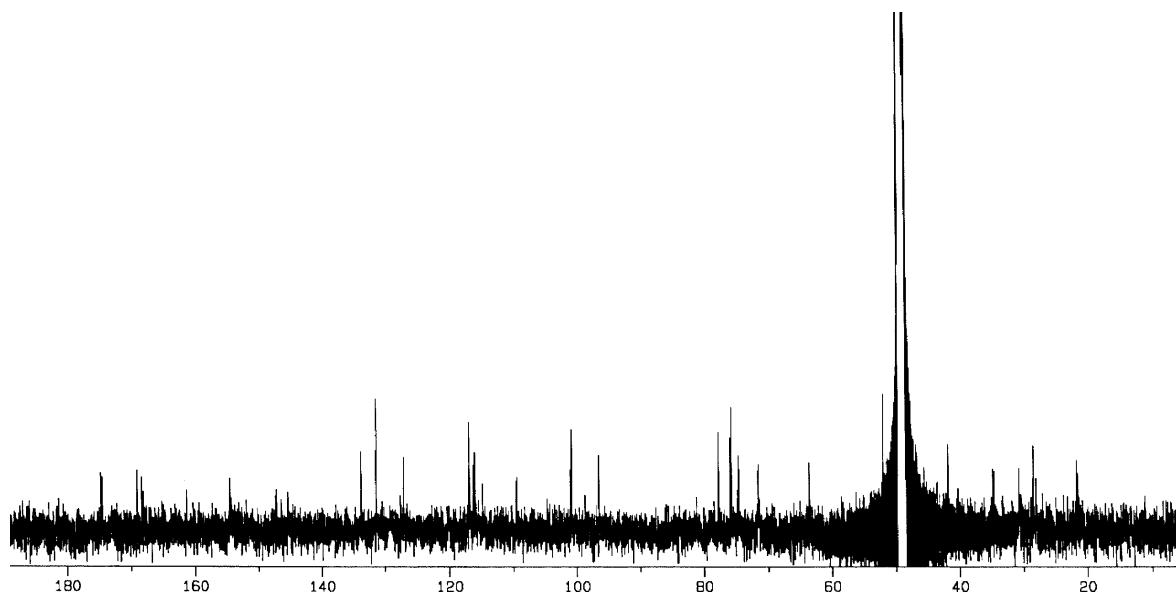
<sup>6</sup> García, J., Lavaitte, S. and Gey, C. C. (1989) *Phytochemistry* **28**, 2199

<sup>7</sup> Kuwajima, H. Matsuuchi, K., Takaishi, K., Inoue, K., Fujita, T. and Inouye, H. (1989) *Phytochemistry* **28**, 1409

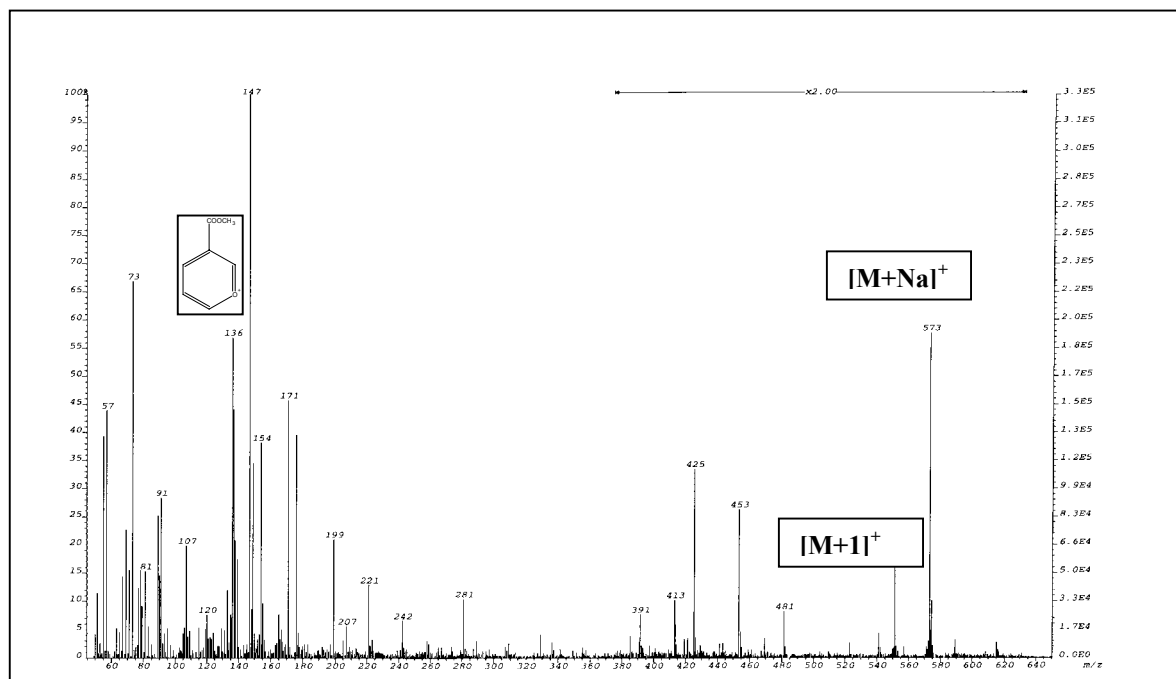
<sup>8</sup> Msonthi, J. D., Galeffi, C., Nicoletti, M., Messana, I. and Marini-Bettolo, G. B. (1985) *Phytochemistry* **24**, 771

<sup>9</sup> Hassam, S. B. y Hutchinson, C. R. (1980) *Tetrahedron Letters* **21**, 1209

Las señales a 76.0 ppm y 63.9 ppm varían  $-1.9$  y  $+1.0$ , respectivamente, con respecto a los valores normales para  $C5'$  y  $C6'$  de un molécula de glucosa, lo que es indicativo de que el grupo cumarilo está unido al  $C6'$  del resto de glucosa. Para separar y estudiar la mezcla se somete a acetilación para obtener los dos tetracetatos esperados.



ppm

Espectro RMN  $^{13}\text{C}$ 

Espectro EM-FAB 2801/2802



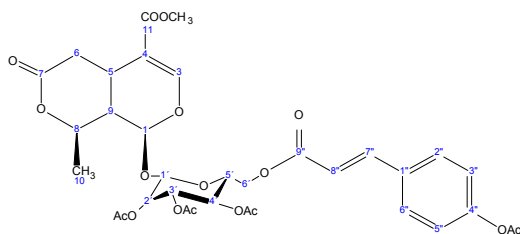
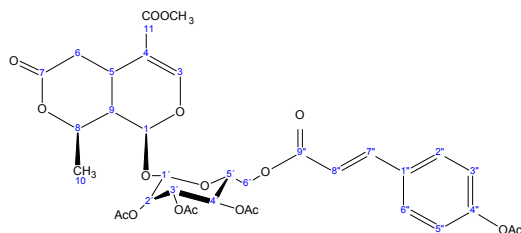


Tabla 5. RMN <sup>1</sup>H de los compuestos 28,2801a, 2802a

H	28a	2801a	2802a
1	5.26d (5.7)	5.25d (5.9)	5.24d (4.7)
3	7.44d (1.16)	7.42d (1.2)	7.43d (1.2)
5	3.11m	3.08m	3.10m
6A	2.38dd (16.9,8.7)	2.32dd (17.0,9.5)	2.35dd (17.0,8.9)
6B	3.03dd (16.9,6.6)	2.98dd (17.0,8.3)	3.01dd (17.0,6.6)
8	4.34-4.37m	4.32-4.28m	4.35-4.21m
9	1.95-2.07m	2.06-2.01m	2.07-2.01m
10-CH <sub>3</sub>	1.48d (6.4)	1.44d (6.2)	1.42d (6.4)
1'	4.87d (8.0)	4.88d (6.4)	4.86d (8.0)
2'	5.01dd(9.6,8.0)	5.01dd (6.4,7.7)	4.99dd (8.0,9.6)
3'	5.22†(9.5)	5.23† (7.7)	5.23† (9.6)
4'	5.10†(8.0)	5.13† (7.7)	5.06† (9.6)
5'	4.36m	3.79m	3.77-3.73m
6' A	4.15dd (12.4,2.3)	4.32-4.28m	4.35-4.21m
6' B	4.30dd (12.4,4.5)	4.39dd (12.4,2.6)	4.35-4.21m
2''+6''		7.54d (8.5)	7.66d (8.7)
3''+4''+5''		7.11d (8.5)	7.09d (8.7)
7''		7.66d (16.0)	6.98d (12.6)
8''		6.38d (16.0)	5.97d (12.6)
CH <sub>3</sub> CO-11	3.73s	3.70s	3.73s
OCOCH <sub>3</sub>	1.97,2.00,2.02,2.08	1.95, 1.99, 2.03, 2.29s	1.96, 2.01, 2.02, 2.30s

Los espectros se midieron en CDCl<sub>3</sub>.

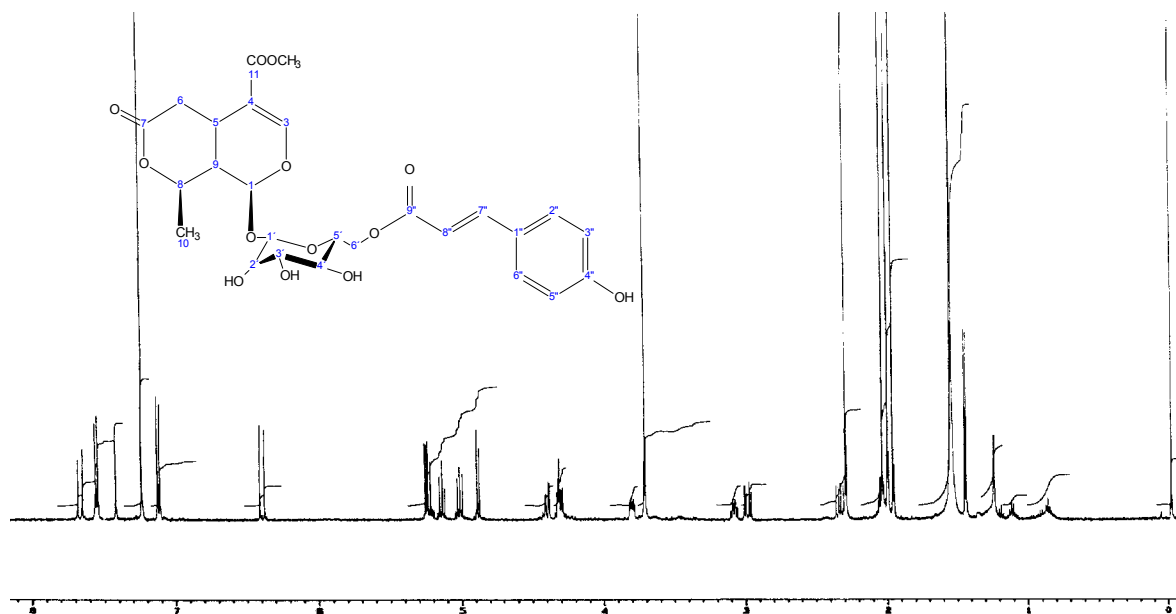
Tabla 6. RMN  $^{13}\text{C}$  de los compuestos 28a, 2801a, 2802a

C	28a	2801a	2802a
1	93.9	93.8	93.8
3	151.4	151.4	151.4
4	110.3	109.9	110.1
5	25.3	25.3	25.2
6	33.4	33.3	33.3
7	170.5	170.6	170.6
8	73.2	73.2	73.2
9	40.8	40.7	40.8
10	20.4	20.4	20.4
11	166.1	166.1	166.1
1'	96.6	96.3	96.4
2'	70.6	70.5	70.5
3'	72.4	72.3	72.2
4'	68.2	68.3	68.4
5'	72.4	72.3	72.2
6'	61.5	61.5	61.7
1''		131.7	132.1
2''+6''		129.3	131.3
3''+5''		122.1	121.2
4''		152.3	151.4
7''		144.8	144.1
8''		117.0	118.4
9''		166.1	165.1
OCOCH <sub>3</sub>		21.1, 20.6, 20.5, 20.3	20.3, 20.4, 20.5, 21.1
O <sub>2</sub> COCH <sub>3</sub>		170.0, 169.2, 168.9	170.1, 169.3, 169.1, 169.0
OCH <sub>3</sub>	51.6	51.6	51.6

Los espectros se midieron en en  $\text{CDCl}_3$ .

**Producto 2801a**

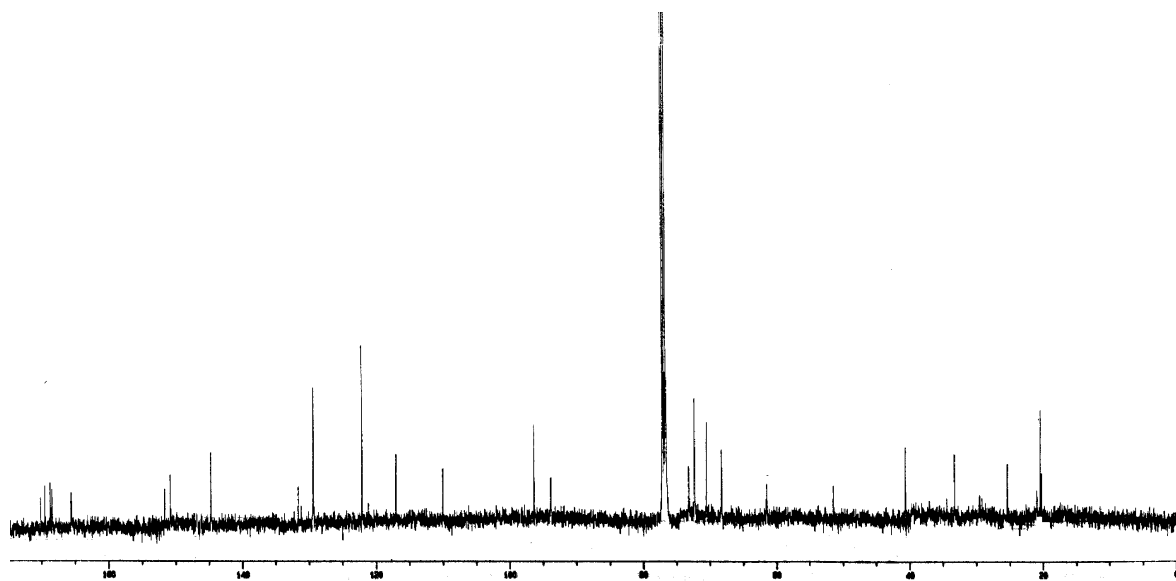
6'-O-trans-p-cumaroil-2',3',4',4''-O-tetraacetil-8-epikingísido



ppm

Espectro RMN <sup>1</sup>H

De la acetilación de los productos 2801/2802 se obtienen dos acetatos aceitosos isómeros cis/trans. El espectro RMN <sup>1</sup>H del producto trans muestra señales que confirman que esta sustancia es un compuesto del tipo secoiridoide. Las señales a 7.42δ y 5.25δ, que aparecen como dobletes con una constante de acoplamiento de 1.2 y 5.9 Hz., respectivamente, se consideraron indicativas de la estructura, siendo asignadas al protón H3 y el último como el



ppm

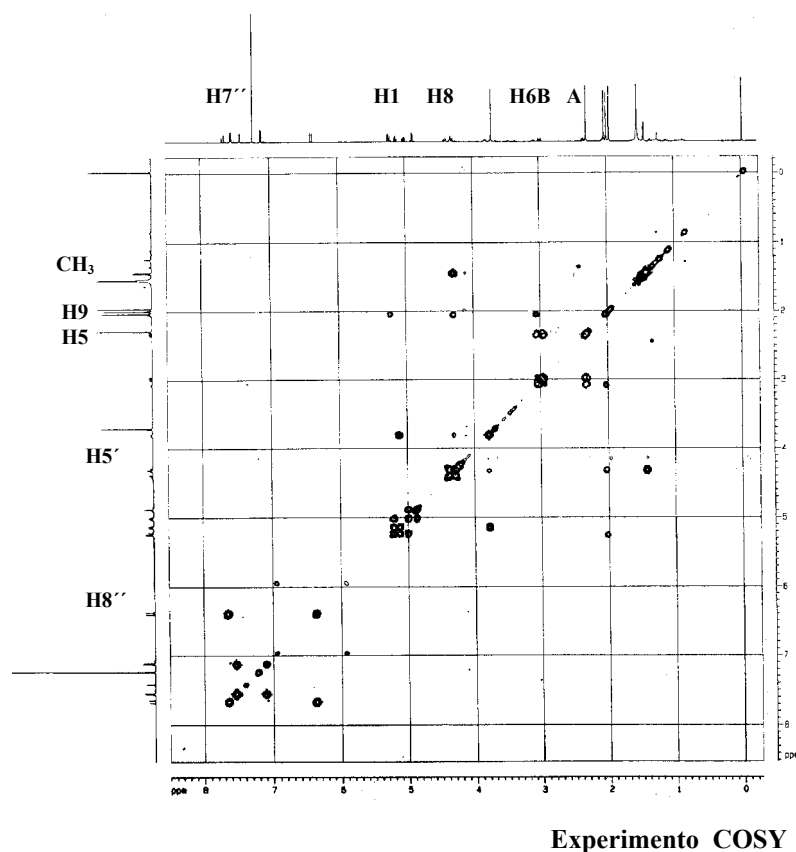
Espectro RMN <sup>13</sup>C

protón acetal H1 en la estructura propuesta como tipo 8-epikingísido.

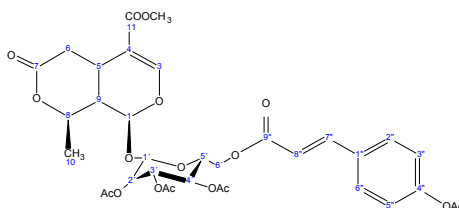
Los dobletes en 7.54 $\delta$  y 7.11 $\delta$ , con una constante de acoplamiento de 8.5 Hz. cada una integrando para dos protones, se atribuyeron a un sistema AA'BB' en un grupo aromático para-sustituido. Además, las señales oleofínicas en 7.66 $\delta$  y 6.88 $\delta$  (d, J=16 Hz) evidencian la presencia de un grupo p-cumaroilo, que se encuentra frecuentemente en este tipo de compuestos.

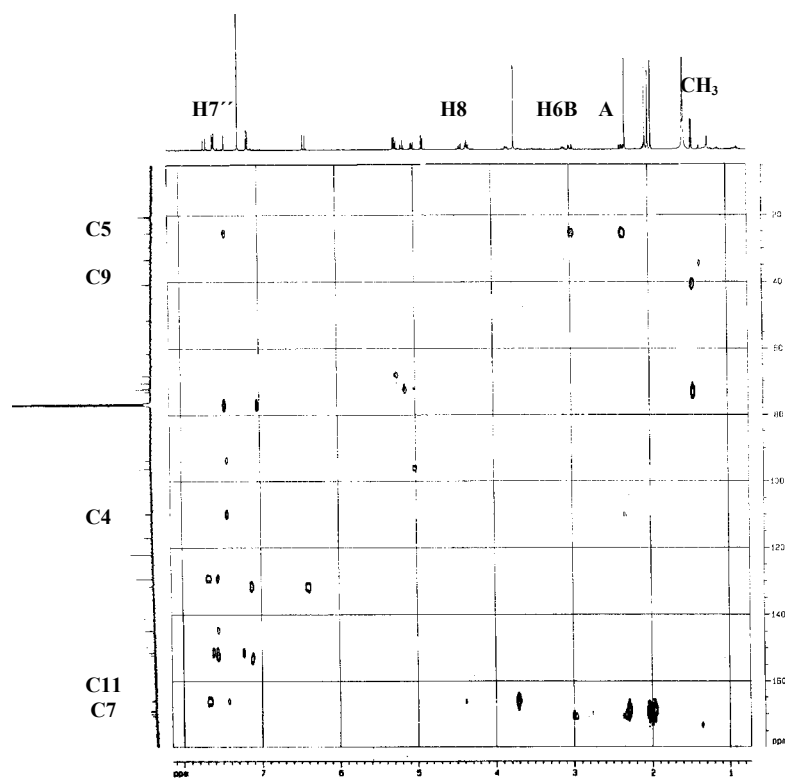
Las señales RMN  $^1\text{H}$  se establecieron en base a un experimento **COSY**.

La correlación de una serie de señales entre 3.79 $\delta$  y 5.23 $\delta$  en este experimento muestra la presencia de un resto de glucosa esterificado, extremo que se confirma por un ión en 477.1399 en EM-FAB de alta resolución, de un resto de glucosa acilada con un grupo p-acetoxicumaroilo.

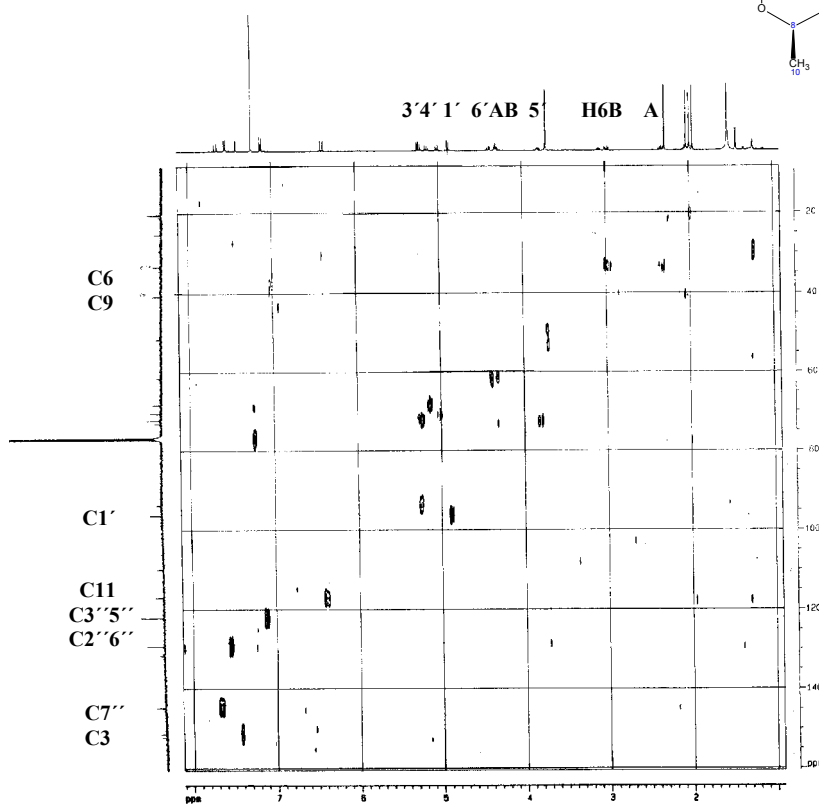
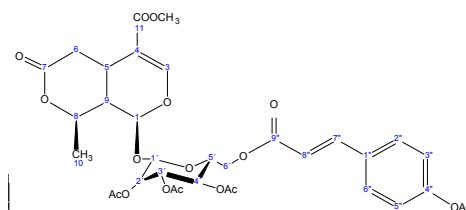


Las asignaciones del espectro RMN  $^{13}\text{C}$  se hicieron en base a los experimentos **HMQC** Y **HMBC**, con señales en 93.8 y 96.3 ppm correlacionadas con carbonos acetálicos C1 y C1'. El experimento **HMBC** también muestra correlaciones entre uno de los protones de el metileno C6' con el carbono carbonilo C9'', de acuerdo con el grupo p-cumaroilo unido a el carbono C6' del resto de glucosa.





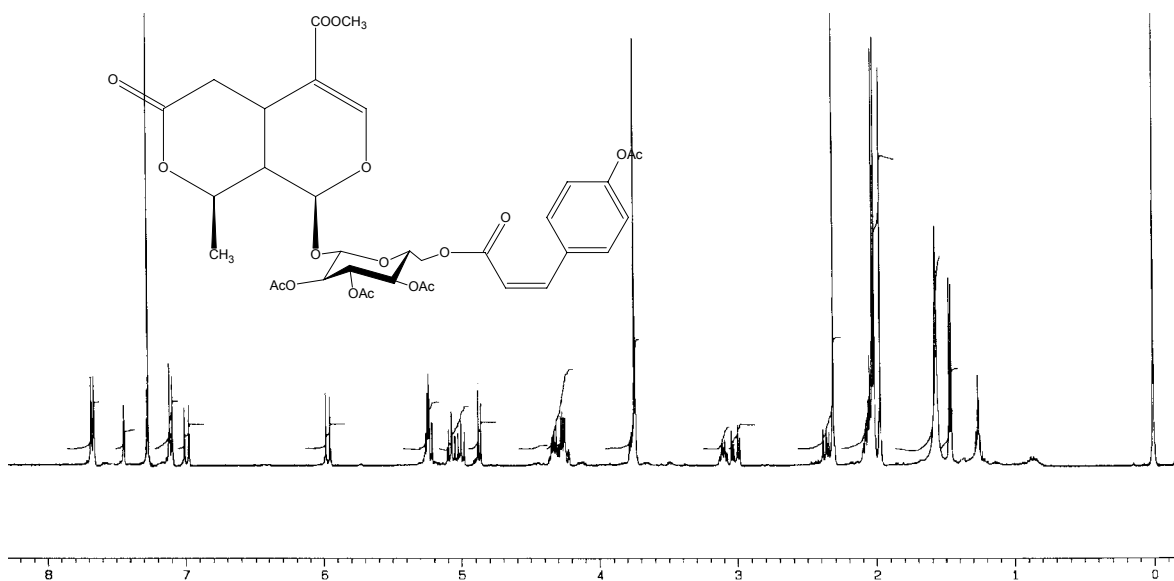
Experimento HMBC



Experimento HMQC

## Producto 2802a

6'-O-cis-p-cumaroil-2',3',4',4''-O-tetraacetil-8-epikingísido



ppm

Espectro RMN <sup>1</sup>H

El isómero cis de la mezcla presenta las señales típicas de un secoiridoide glucosilado. Un protón correspondiente a H3 en 7.43δ con una constante de acoplamiento de 1.2 Hz. y el protón acetal H1 a 5.24δ con una constante de acoplamiento de 4.7 Hz. Los protones H6A y H6B a 2.35δ dd y 3.01δ dd respectivamente y el protón H1' de un azúcar a 4.86δ.

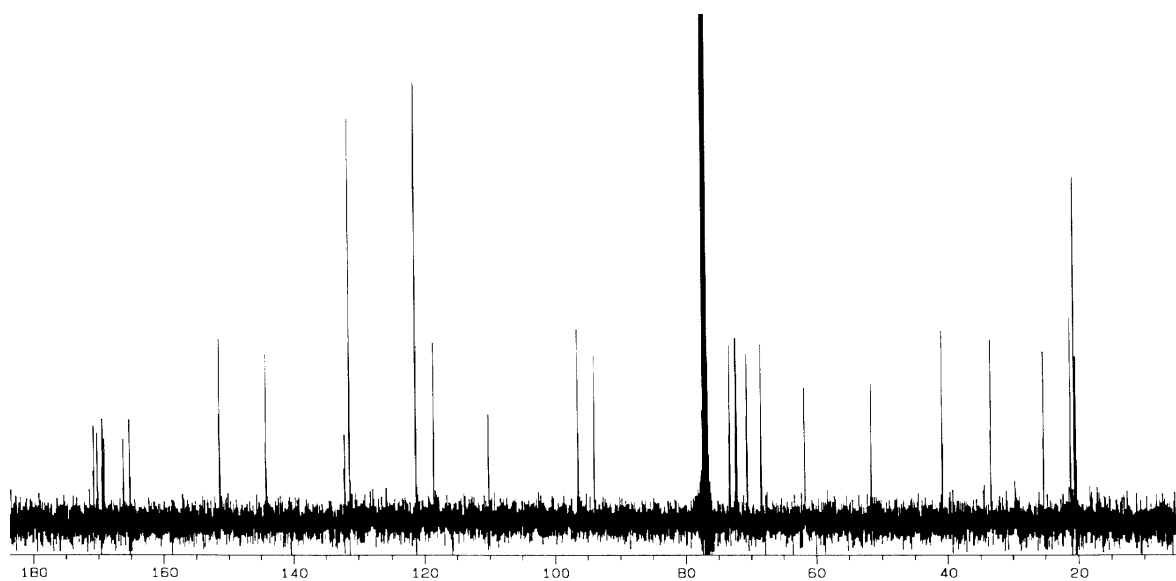
También aparecen las señales de protones aromáticos a 7.66δ d (2"6") y a 7.09δ d (3"5") junto con protones cis oleofínicos Hα a 5.96δ y Hβ a 6.98δ de un resto p-cumaroilo, lo que confirma un acetato aromático a 2.30 s.

La presencia de:

- un doblete a 1.46δ atribuible a un metilo
- un solo grupo de protones metilénicos a 3.74δ
- el valor de los carbono -  $\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$  a 170.6 ppm y -  $\text{COO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$  a 73.21 ppm
- la forma en doblete del protón H3

Indican como se esperaba que se tratara de un secoiridoide tipo kingísido o su 8-epi isómero. Pero el C10 está más acorde con un derivado del 8-epikingísido lo que se confirma con el valor de C10 en los productos de partida 2801/2802. El 8-epikingísido es característico de esta familia *Oleaceae* al aparecer en distintas fuentes como *Syringa vulgaris* o *Ligustrum japonicum*<sup>10</sup> y como hemos visto también en la planta en estudio *Jasminum odoratissimum*.

<sup>10</sup> Christie A. Boros y Frank R. Stermitz (1991) Journal of Natural Products 54, 1173



*ppm*

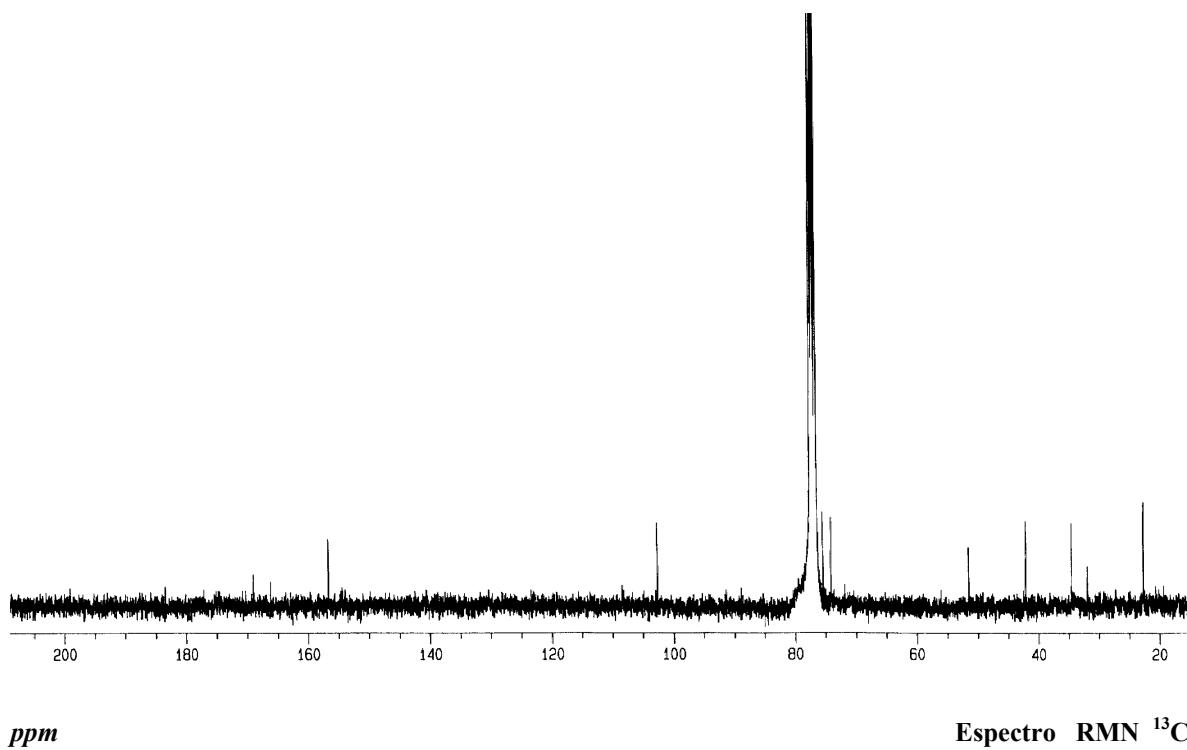
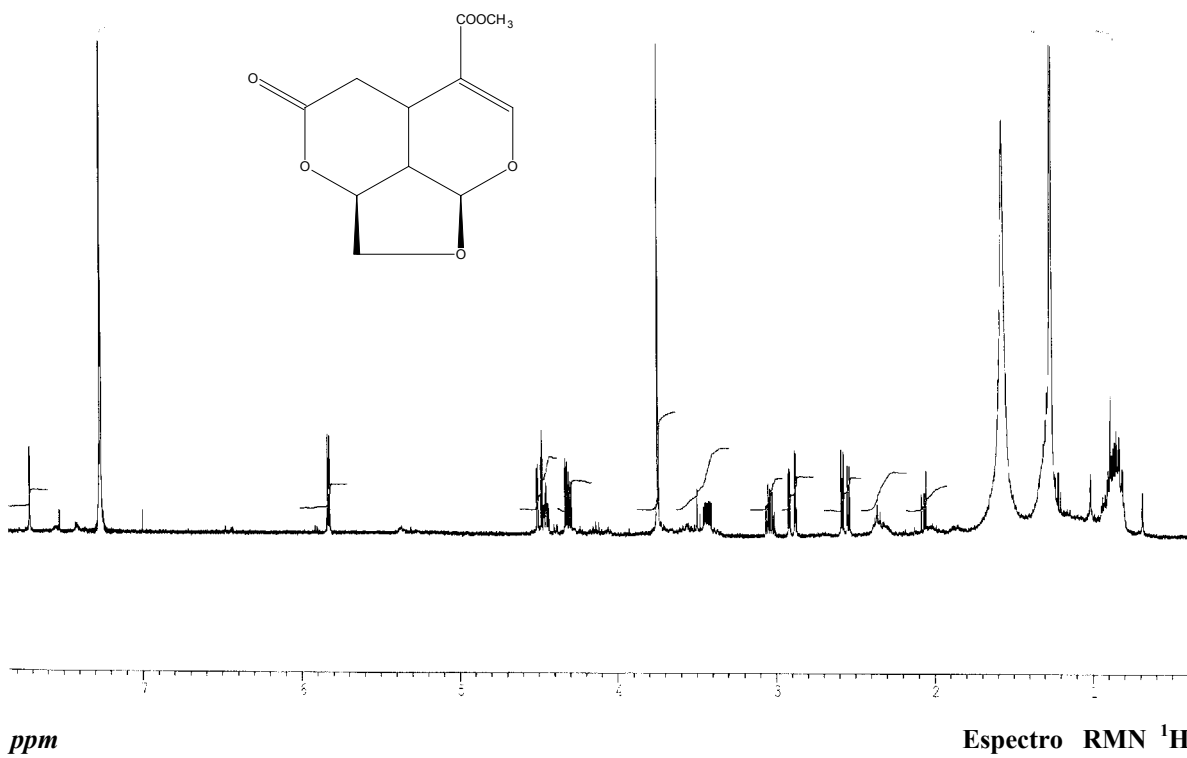
Espectro RMN <sup>13</sup>C

El estudio de la posición de acilación realizada con más detalle en el isómero trans de estos productos confirma la posición 6' que por otro lado es la más habitual en esta familia y en el género *Jasminum*. De hecho las Ibolactonas A y B de *Ligustrum obtusifolium* que son los productos más similares encontrados en la bibliografía<sup>11</sup>, son derivados del ácido 8-epikingisídico en esta posición.

<sup>11</sup> Christie A., Boros y Frank Stermitz (1991) *Journal of Natural Products* **54**, 1173

## Producto 28h

Silvianosido

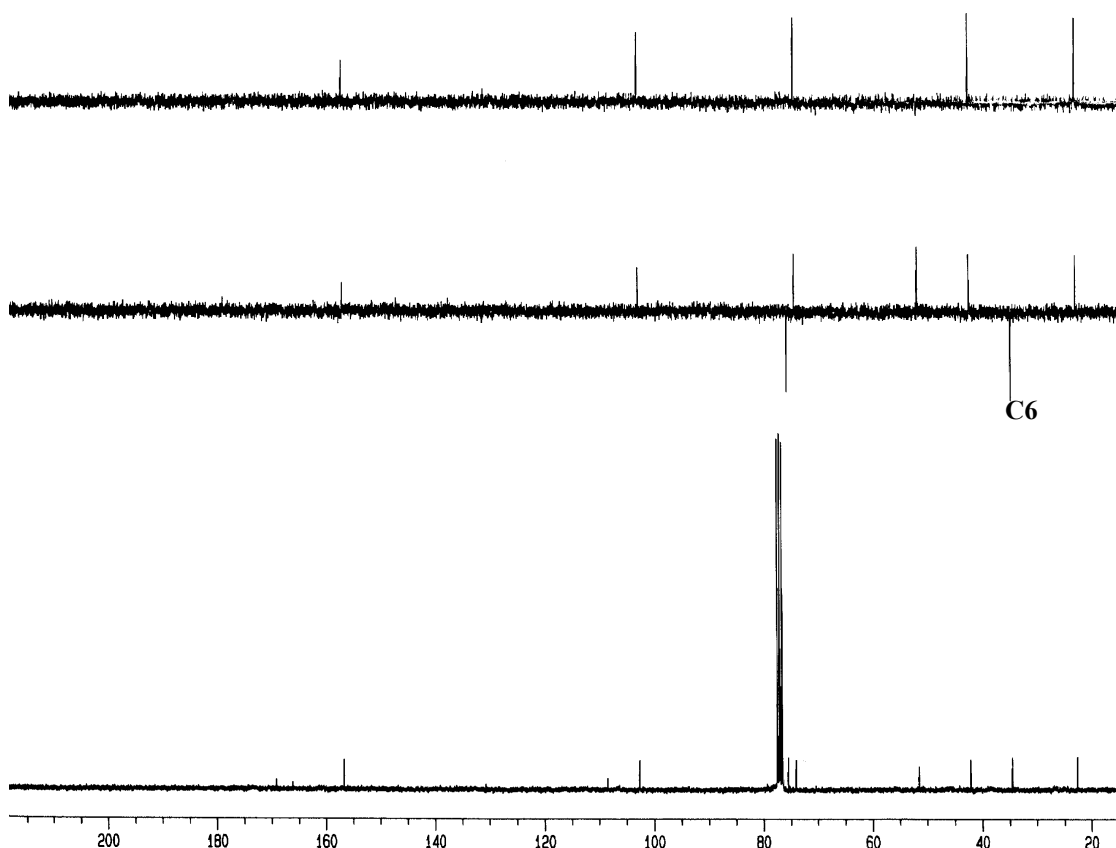




El producto 28h se aísla como un sólido blanco cuyo espectro de masa muestra un ión molecular  $m/z$  240 correspondiente a una fórmula molecular  $C_{11}O_6H_{12}$ .

El espectro RMN  $^1H$  muestra las señales típicas de un secoiridoide tipo 8-epikingísido con el protón H3 a  $7.71\delta$  y el correspondiente a H1 a  $5.82\delta$  y dos dobles dobletes a  $2.26\delta$  y  $2.55\delta$  que integran para un protón cada uno y correspondientes a los protones H6A y H6B.

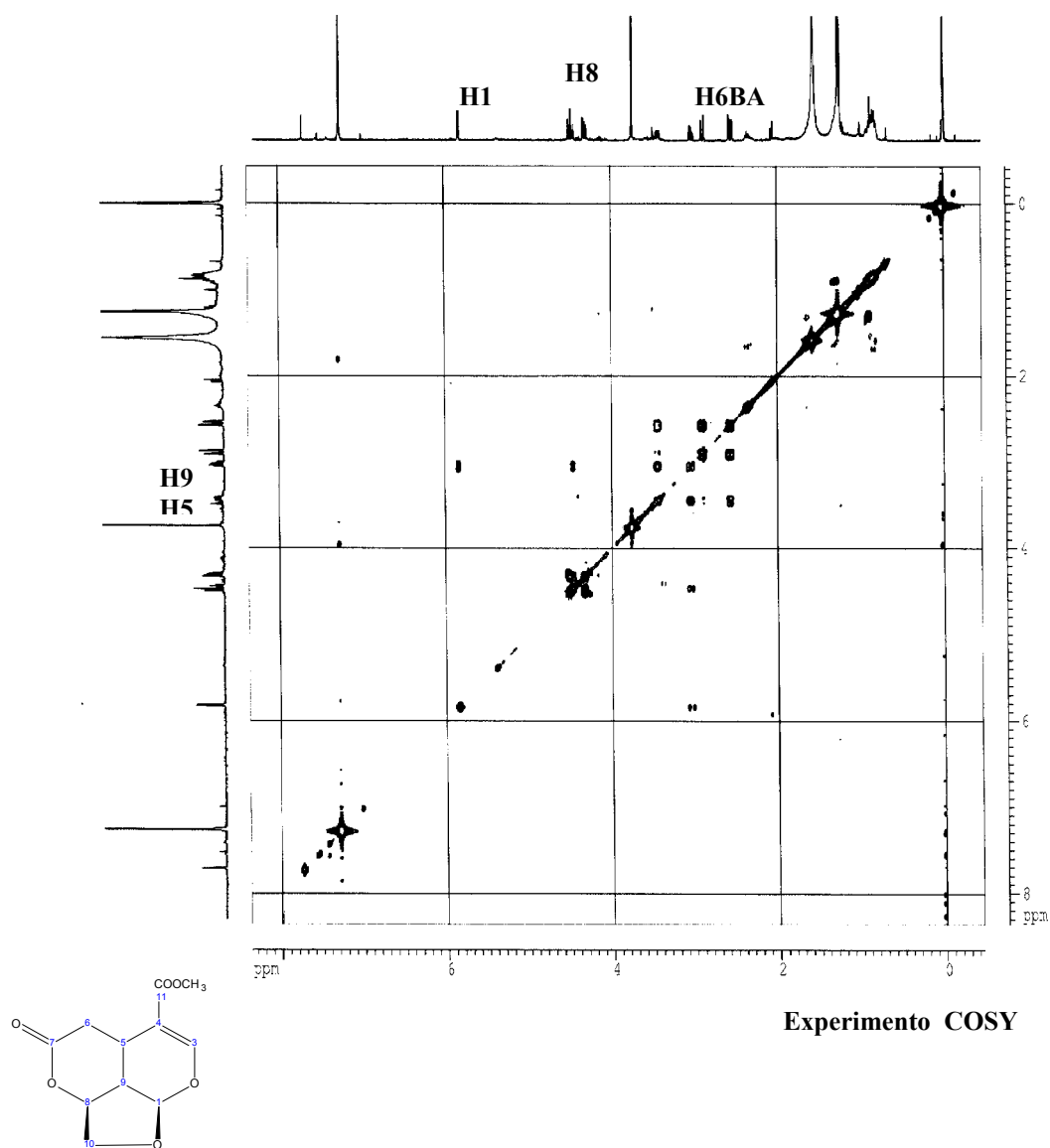
Pero el espectro RMN  $^1H$  también muestra claramente la ausencia del resto de glucosa y del grupo metilo típico de los derivados del 8-epikingísido. Sin embargo esta aglicona no presenta el grupo hidroxilo libre en C1 ya que su acetilación no muestra cambio alguno en la estructura del producto.



### Experimento DEPT

El experimento DEPT evidencia la existencia de 1 grupo  $CH_3$ , de 2 grupos  $CH_2$ , 5 grupos  $CH$  y 3 carbonos cuaternarios.

La existencia de otro grupo metileno a valores más alto como muestra el espectro RMN  $^1H$  y el experimento DEPT, y asignable al carbono C10, permite establecer la estructura propuesta.



El experimento **COSY** permite confirmar la relación entre los metilenos H10 y el protón H8. Este último superpuesto con el protón H10 se asigna por su relación con el protón H9. El resto de las relaciones son las esperadas para la estructura propuesta.

COSY	H1	H3	H5	H6A	H6B	H8	H9	H10A	H10B
H1	⊕						⊕		
H3		⊕							
H5			⊕	⊕			⊕		
H6A				⊕	⊕				
H6B					⊕				
H8						⊕	⊕	⊕	⊕
H9							⊕		
H10A								⊕	⊕
H10B									⊕

## Descripción de los productos

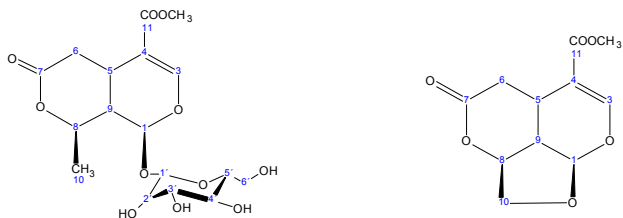


Tabla 7. RMN  $^1\text{H}$  de los compuestos 28,28h

H	28	28h
1	5.49d (7.6)	5.82d (5.13)
3	7.88s	7.71s
5	3.08m	3.41m
6A	2.50dd (16.5,11.4)	2.26dd (15.1,3.2)
6B	2.86dd (16.5,4.4)	2.55dd (15.1,5.4)
8	4.49m	4.45t (4.7)
9	2.14m	3.02m
10	1.51d (6.4)	4.30dd (10.2,4.5) 4.51dd (10.2,1.5)
1'	4.70d (7.8)	
2' - 6'	3.63-3.92	
11-COO $\text{CH}_3$	3.73s	3.73s

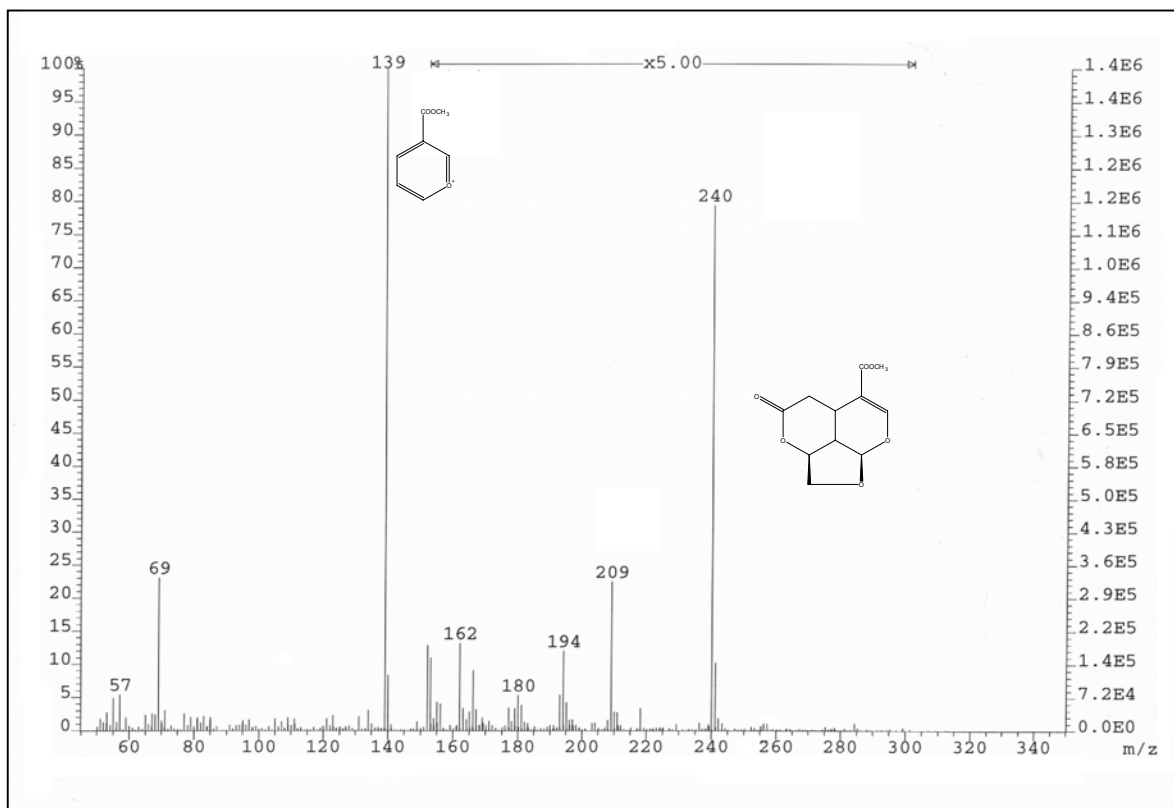
El espectro 28 se midió en  $\text{CD}_4$  y 28h en  $\text{CDCl}_3$ .

## Parte teórica

Tabla 8. RMN  $^{13}\text{C}$  de los compuestos 28,28h

C	28	28h
1	96.3	102.7
3	154.4	156.7
4	109.6	108.5
5	28.1	22.7
6	33.6	34.5
7	174.7	169.1
8	75.8	74.1
9	41.9	42.9
10	21.7	75.5
11	168.3	166.2
1'	100.7	
2'	74.7	
3'	78.5	
4'	71.7	
5'	77.9	
6'	62.9	
11-COO $\text{CH}_3$	52.0	51.6

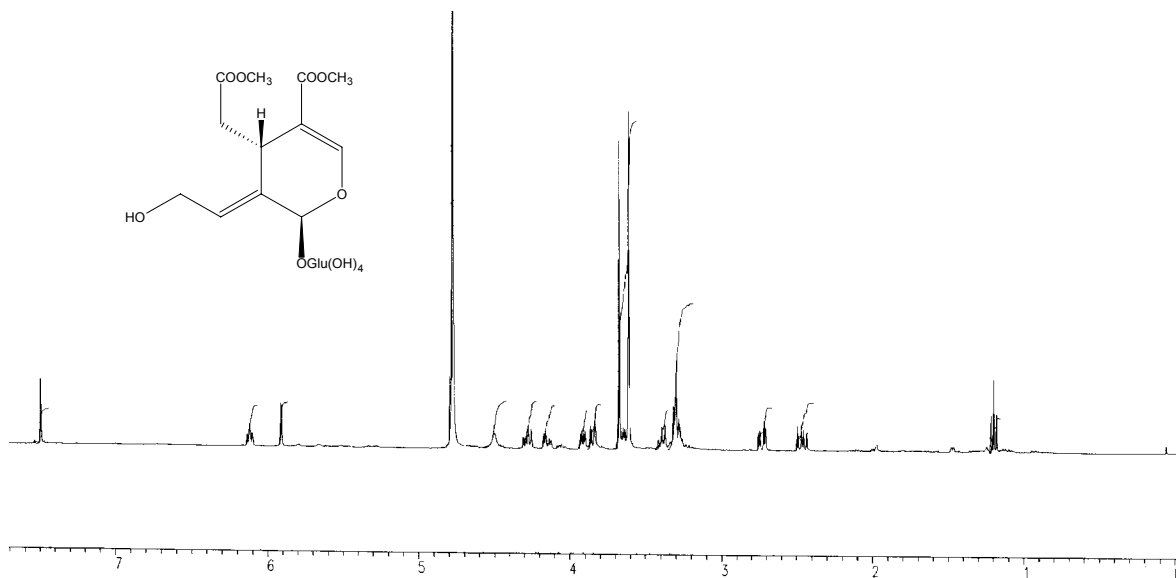
El espectro 28 se midió en  $\text{CD}_4$  y 28h en  $\text{CDCl}_3$ .



Espectro EM

## Producto 4950

10-hidroxiolosido dimetil éster.



ppm

Espectro RMN  $^1\text{H}$

Los datos aportados por el espectro RMN  $^1\text{H}$  y el espectro RMN  $^{13}\text{C}$ , y una vez consultada la bibliografía nos indica que este producto pertenece al grupo de los secoiridoides muy común en el género *Jasminum*.

Los singletes a 7.48 $\delta$  y 5.91 $\delta$  atribuidos a H3 y H1 respectivamente, y un doble doblete a 6.12 $\delta$  correspondiente al protón H8 son característicos de los compuestos tipo secoiridoide.

Junto con un grupo de señales que indican un resto de glucosa y la presencia de dos señales que integran para tres protones de grupos metoxilo a 3.61 $\delta$  y 3.67 $\delta$ .

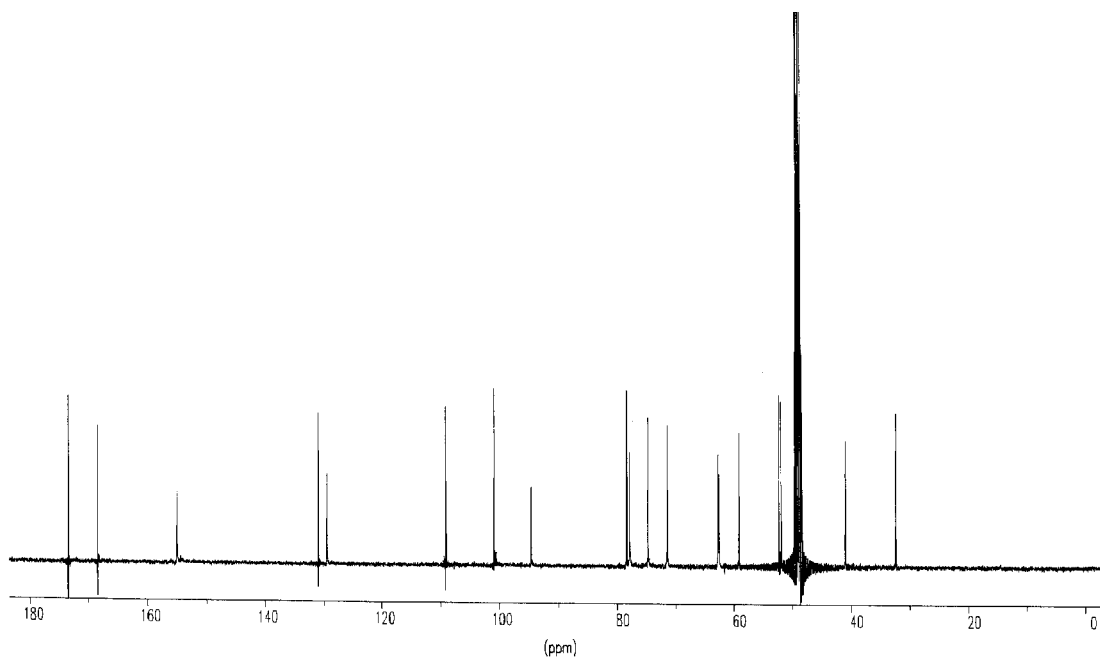
Este compuesto se considera el origen de todo un grupo de secoiridoides típicos del género *Jasminum*. Citado previamente para *Osmanthus asiaticus*<sup>12</sup> no se aportan datos espectroscópicos.

En el experimento **HMQC** se observa una relación entre los dobles dobletes asignados a los protones H6A y H6B con una señal en 40.96 ppm que se corresponde con el carbono C6. Del mismo modo dos dobles dobletes en 4.23 y 4.15 $\delta$  correspondientes a los protones H10A y H10B se relacionan con un carbono a 59.12 ppm que se asigna al carbono C10.

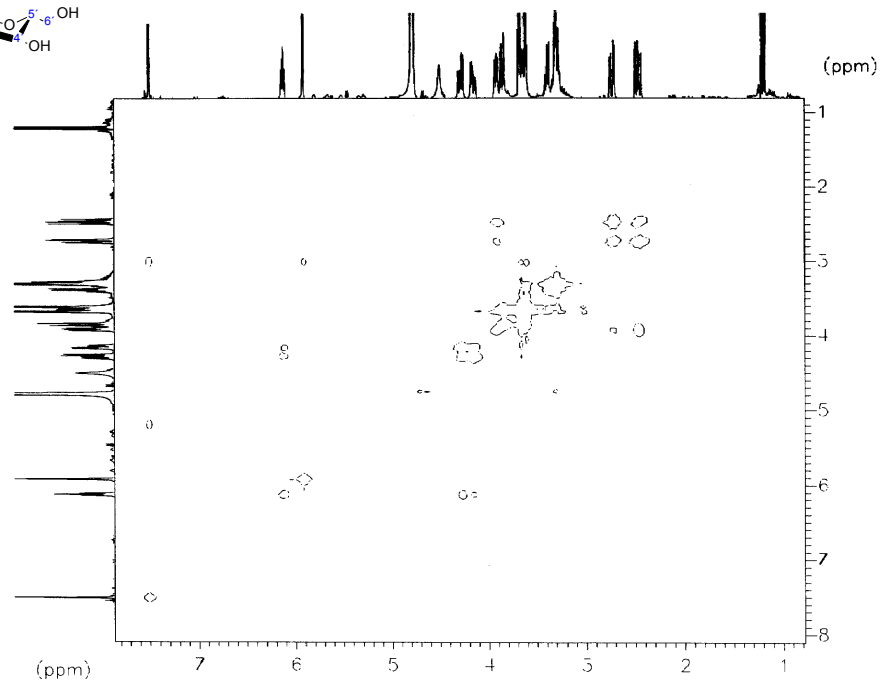
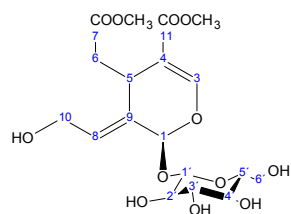
Otra relación apreciable es la de un doble doblete 3.91 $\delta$  y un doblete a 3.85 $\delta$  asignadas a los protones H6' A y H6' B del resto de glucosa y el carbono correspondiente a 62.65 ppm.

Por espectrometría de masa **FAB** se obtiene un fragmentos m/z 457  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  y m/z 435  $[\text{M}+1]^+$  para una masa calculada 434.307 ( $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$ ), junto con otros fragmentos previsibles para este producto.

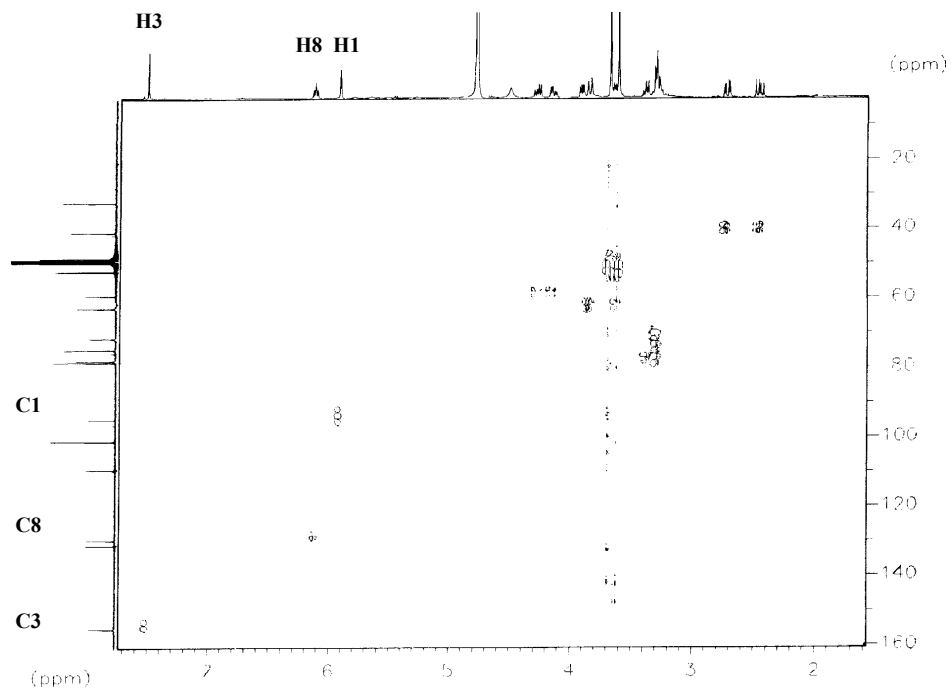
<sup>12</sup> Sugiyama, M., Machida, Matsuda, N. y Kikuchi, M. (1993) *Phytochemistry* 34,1169



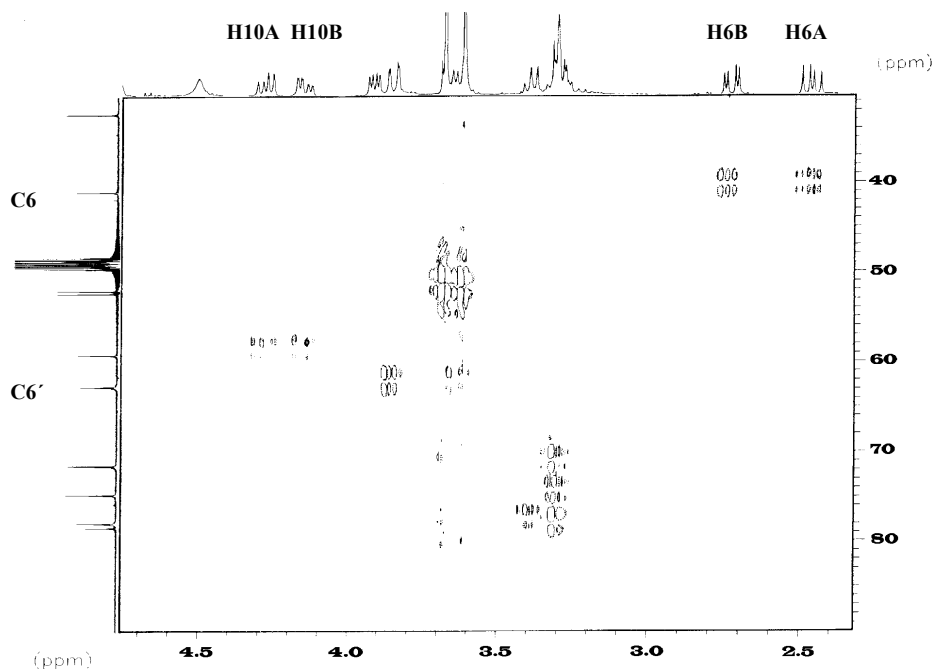
Espectro RMN <sup>13</sup>C



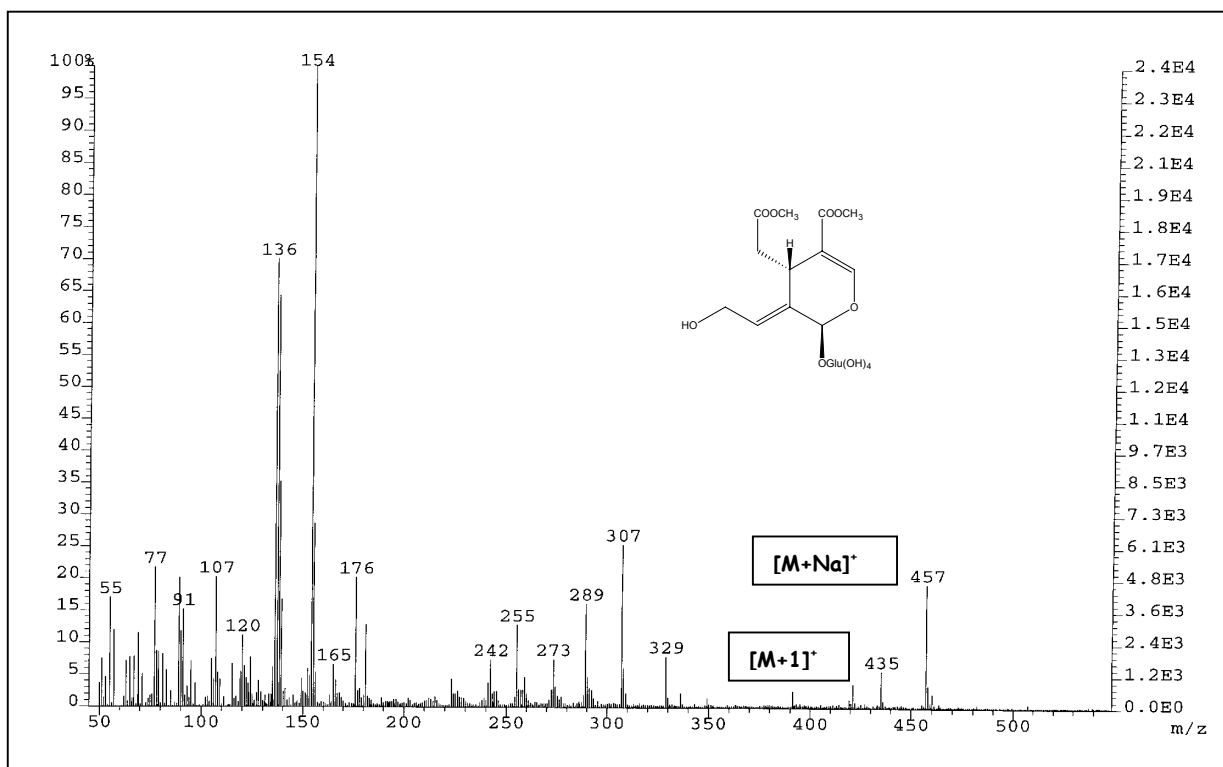
Experimento COSY



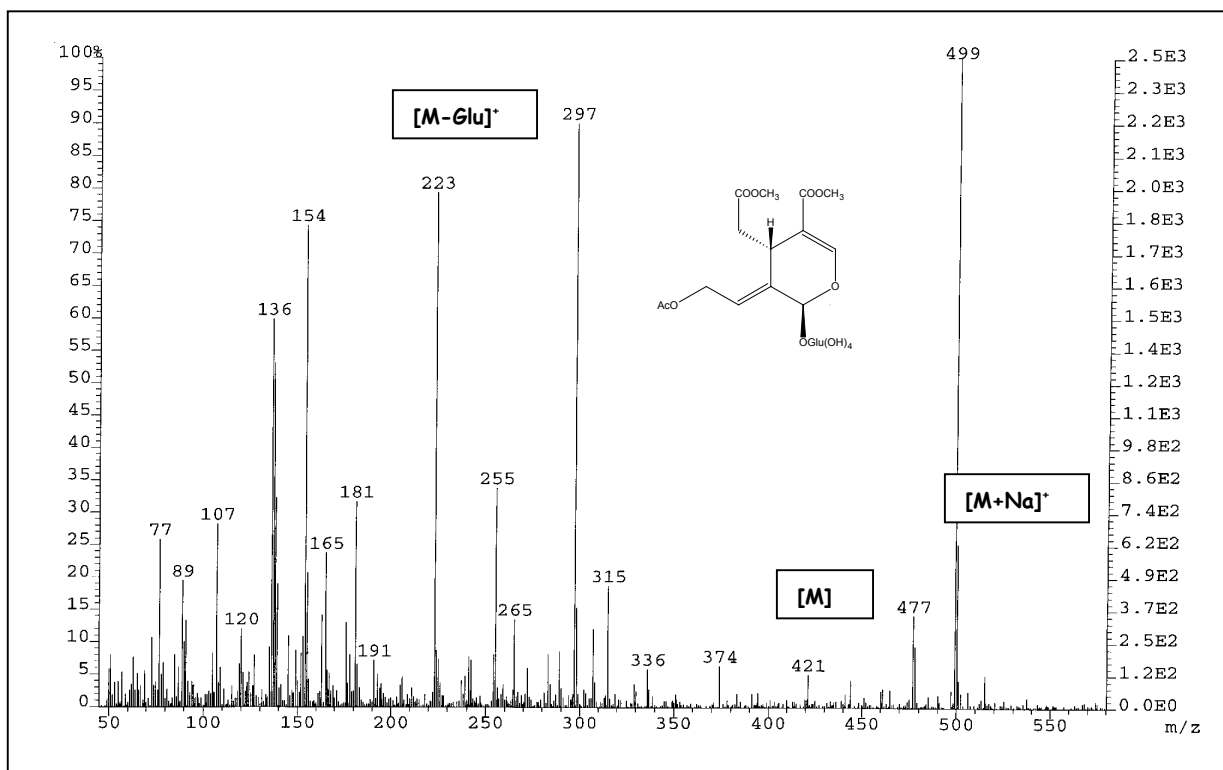
Experimento HMQC



Experimento HMQC (Detalle)



4950 Espectro EM-FAB

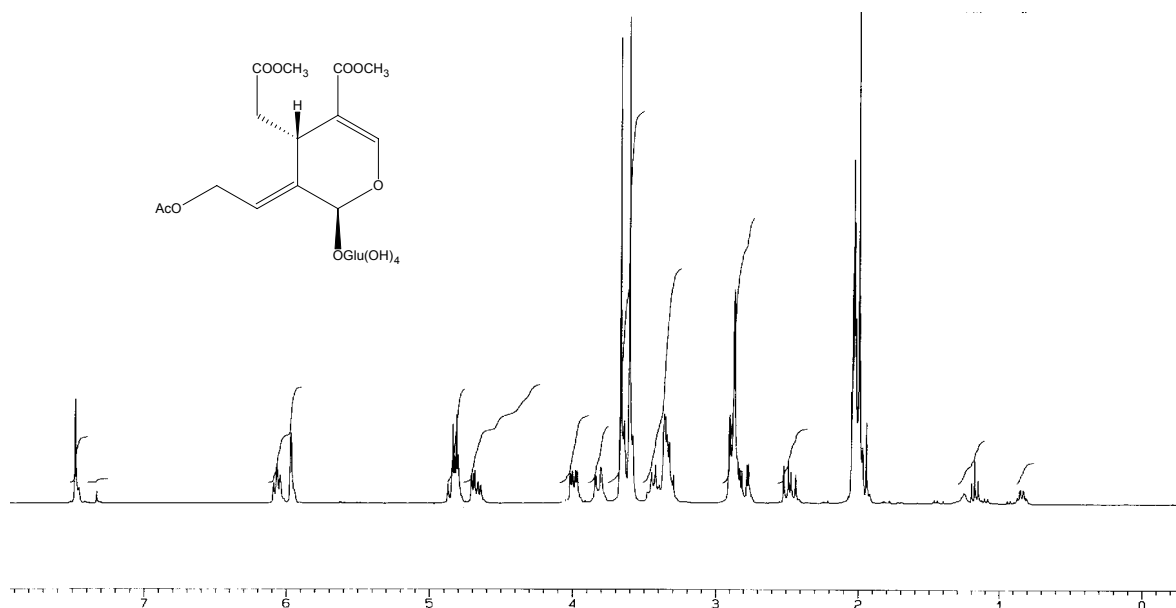


4951 Espectro EM-FAB



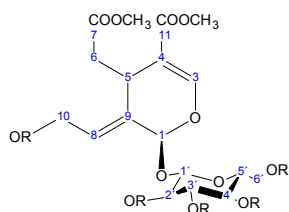
## Producto 4951

10-acetoxioleosido dimetil éster.

*ppm*Espectro RMN  $^1\text{H}$ 

Concuerda con el producto anterior aunque en el espectro RMN  $^1\text{H}$  aparece una señal adicional a 2.05 $\delta$  asignable a un grupo acetato, que se confirma con dos señales en el espectro RMN  $^{13}\text{C}$  a 20.78 y 117.04 ppm. La fórmula molecular  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_7$ , (calculada 296.0896) se estable por espectrometría de masas de alta resolución para un ión molecular  $m/z$  296.0891  $[\text{M-Glc}]^+$ . Más claramente por espectrometría de masa FAB se obtiene un fragmento  $m/z$  476 para una masa calculada 476.375 ( $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$ ), junto con otros fragmentos previsibles para esta estructura.

La posición de acetilación es la 10 ya que los valores de los protones del resto de glucosa no sufren cambios apreciables pero se produce una variación de la señal del grupo metileno C10 que baja de 4.15 a 4.68 $\delta$ .

Tabla 9. RMN <sup>1</sup>H de los compuestos 4950,4951, 4955,4950a

H	4950	4951	4955	4950a
1	5.91s	5.81s	5.75s	5.72s
3	7.49s	7.49s	7.48s	7.45s
5	3.64m	3.98dd (9.5,4.0)	4.02dd (9.5,4.0)	4.02dd (9.5,4.0)
6A	2.46dd (14.8,9.5)	2.43dd (14.6,9.4)	2.43dd (15.3,9.5)	2.43dd (15.3,9.5)
6B	2.79dd (14.8,4.2)	2.83dd (14.6,4.0)	2.83dd (15.3,9.5)	2.83dd (15.3,9.5)
8	6.12dd(7.0,5.7)	6.11t(6.5)	6.10t(6.0)	6.00t(6.5)
10A	4.28dd (13.5,7.0)	4.78dd (13.2,6.5)	4.75dd (13.2,6.2)	4.72d(6.0)
10B	4.15ddd	4.68m	4.88-4.82m	4.88-4.82m
1'	4.78d(7.5)	4.85(7.5)d	4.83(7.8)d	4.83d
2'	3.42-3.22m	3.70-3.40m	3.55-3.42m	3.55-3.42m
3'	3.64 (bajo H1')	3.64 (bajo H1')	3.64 (bajo H1')	3.64 (bajo H1')
4'	3.55-3.42	3.55-3.42 m	3.55-3.42m	3.55-3.42m
5'	3.42-3.22m	3.70-3.40 m	3.55-3.42m	3.55-3.42m
6' A	3.85d	3.80m	4.27dd (12.3,2.0)	4.27dd (12.3,2.0)
6' B	3.91dd (10.0,4.2)		4.51dd (12.3,4.3)	4.51dd (12.3,4.3)
CH <sub>3</sub> CO-7	3.61s	3.65s	3.62s	3.65s
CH <sub>3</sub> CO-11	3.67s	3.72s	3.74s	3.75s
CH <sub>3</sub> -OAc		2.05s	2.07,2.13s	2.02,2.03,2.06,2.08s

Los espectros 4950,4951 se midieron en CD<sub>3</sub>OD y los espectros 4955,4950 a CDCl<sub>3</sub>

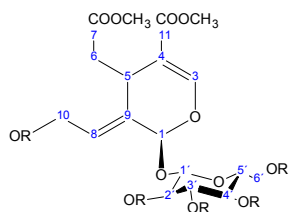


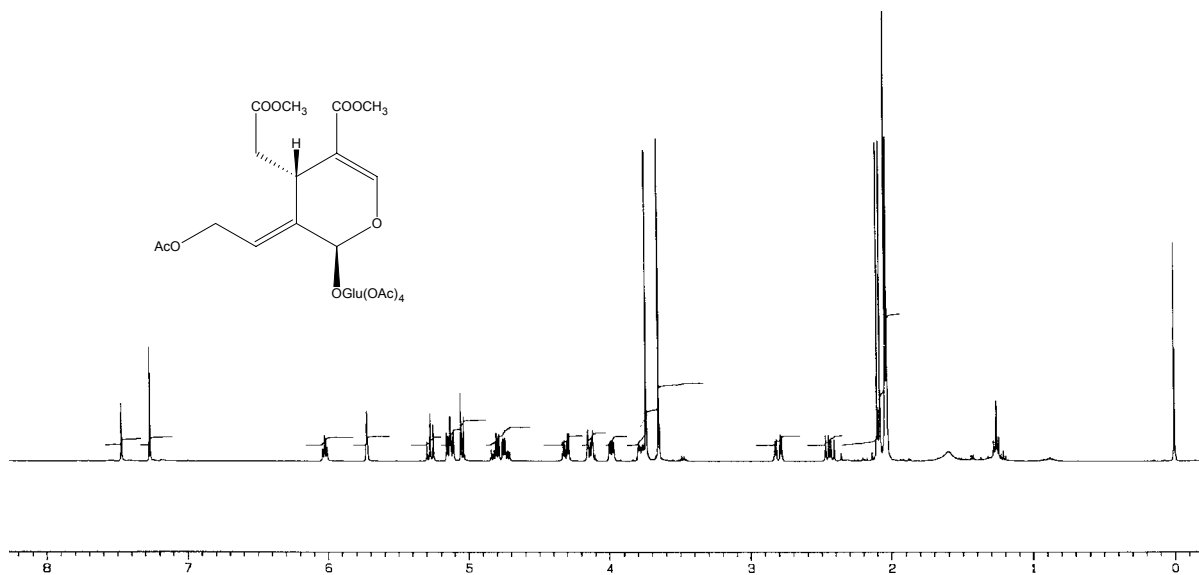
Tabla 10. RMN <sup>13</sup>C de los compuestos 4950, 4951, 4955

C	4950	4951	4955
1	94.60	93.57	93.3
3	155.04	153.41	153.0
4	109.17	107.94	108.2
5	32.31	31.10	30.9
6	40.96	39.99	39.9
7	173.47	171.54	171.1
8	129.43	123.45	124.0
9	130.92	132.13	131.6
10	59.12	59.12	60.6
11	166.4	166.4	166.4
1'	100.90	100.90	99.5
2'	74.67	74.67	73.1
3'	78.34	78.34	74.5
4'	71.38	71.38	75.8
5'	77.83	77.83	69.5
6'	62.65	62.65	62.9
	52.00,52.31	51.55,51.86	
OCO-CH <sub>3</sub>	20.8	20.78	20.8
OCO-CH <sub>3</sub>		171.04	171.8,166.4

Los espectros 4950,4951 se midieron en CD<sub>3</sub>OD y el espectro 4955 en CDCl<sub>3</sub>

**Producto 4950a**

10, 2', 3', 4', 6' -O-pentacetiloleosido dimetil éster.



*ppm*

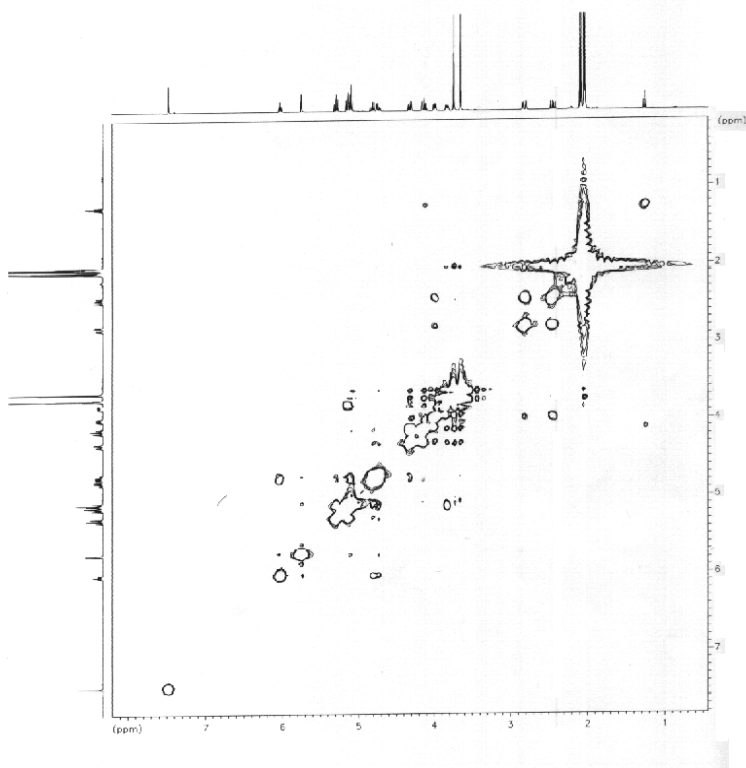
**Espectro RMN <sup>1</sup>H**

Producto resultado de la acetilación de los productos 4950, 4951 y 4952 que permite confirmar sus estructuras.

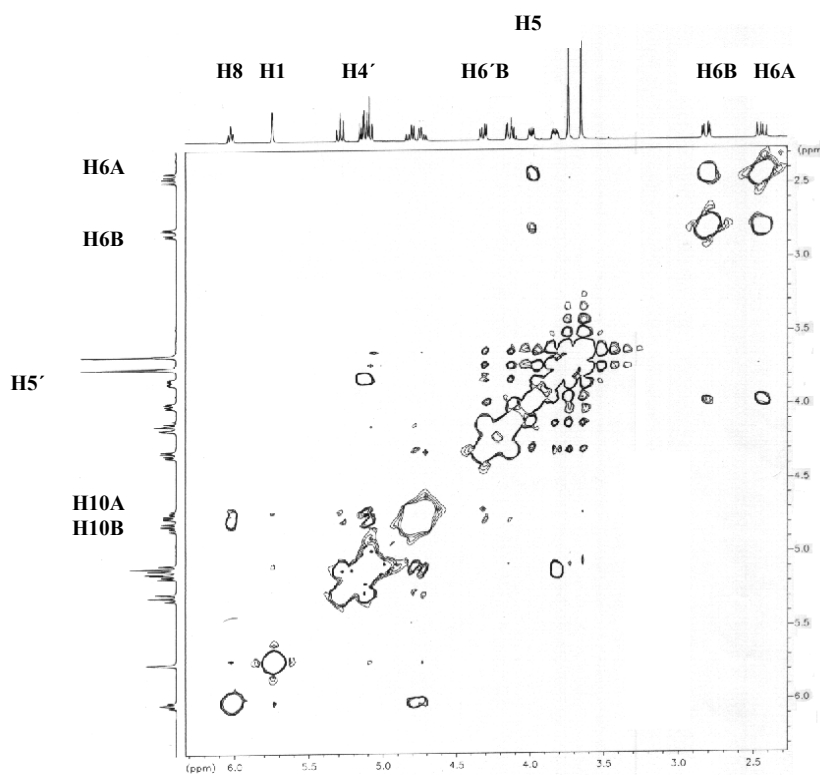
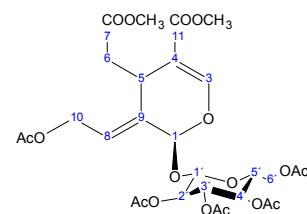
Sus espectros coinciden con los publicados por Inouye y col.<sup>13</sup> para este producto obtenido por hidrólisis del 10-acetoxiligustrosido con NaOH y posterior metilación con diazometano y acetilación, de la porción secoiridoide.

El experimento **COSY** permite asignar los valores de los protones. La relación entre el protón H8 y los protones H10 permite asignar estos últimos. Los protones H6 nos llevan a la posición del protón H5 y los protones del azúcar nos llevan al protón H5'.

<sup>13</sup> Inouye H., Inoue K., Nishioka T. y Kaniwa M. (1975) *Phytochemistry* **14**,9



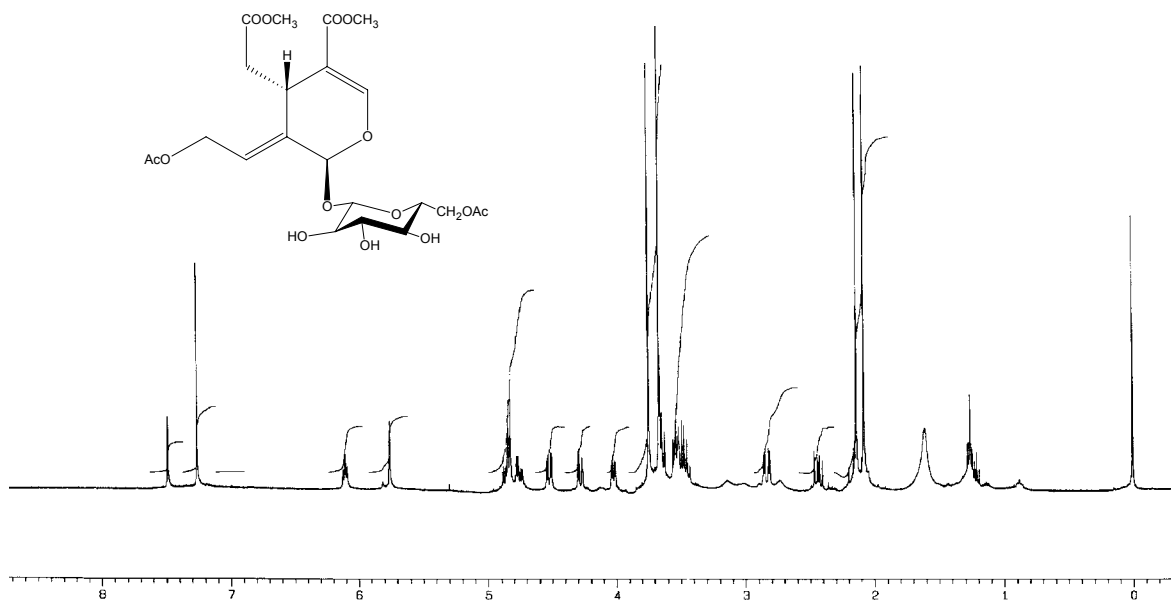
Experimento COSY



Experimento COSY (Detalle)

## Producto 4955

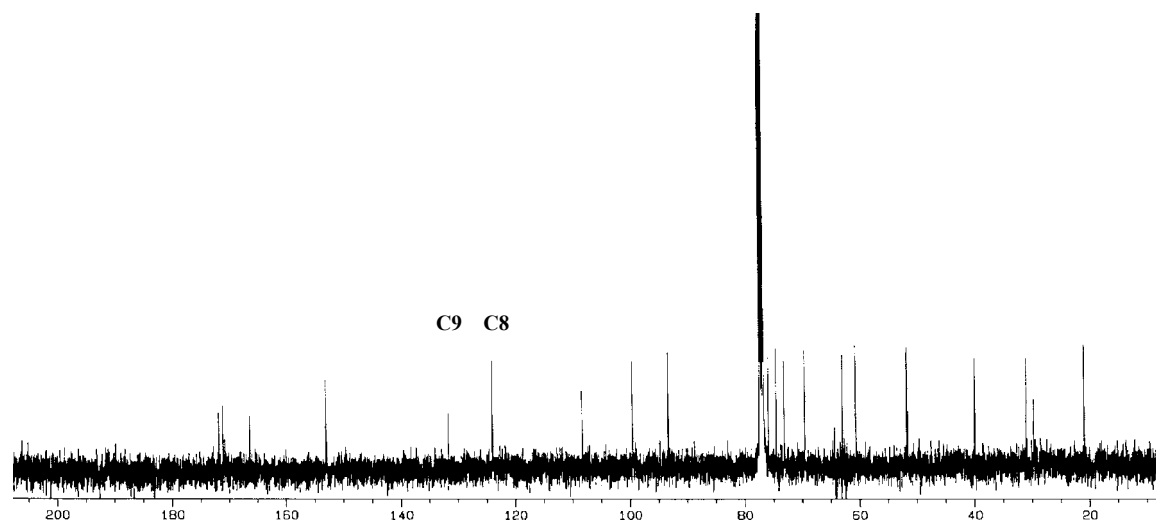
6'-O-acetil-10-acetoxioleosido dimetil éster



ppm

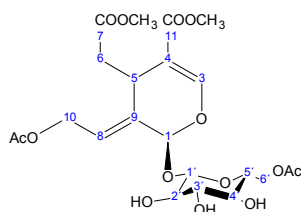
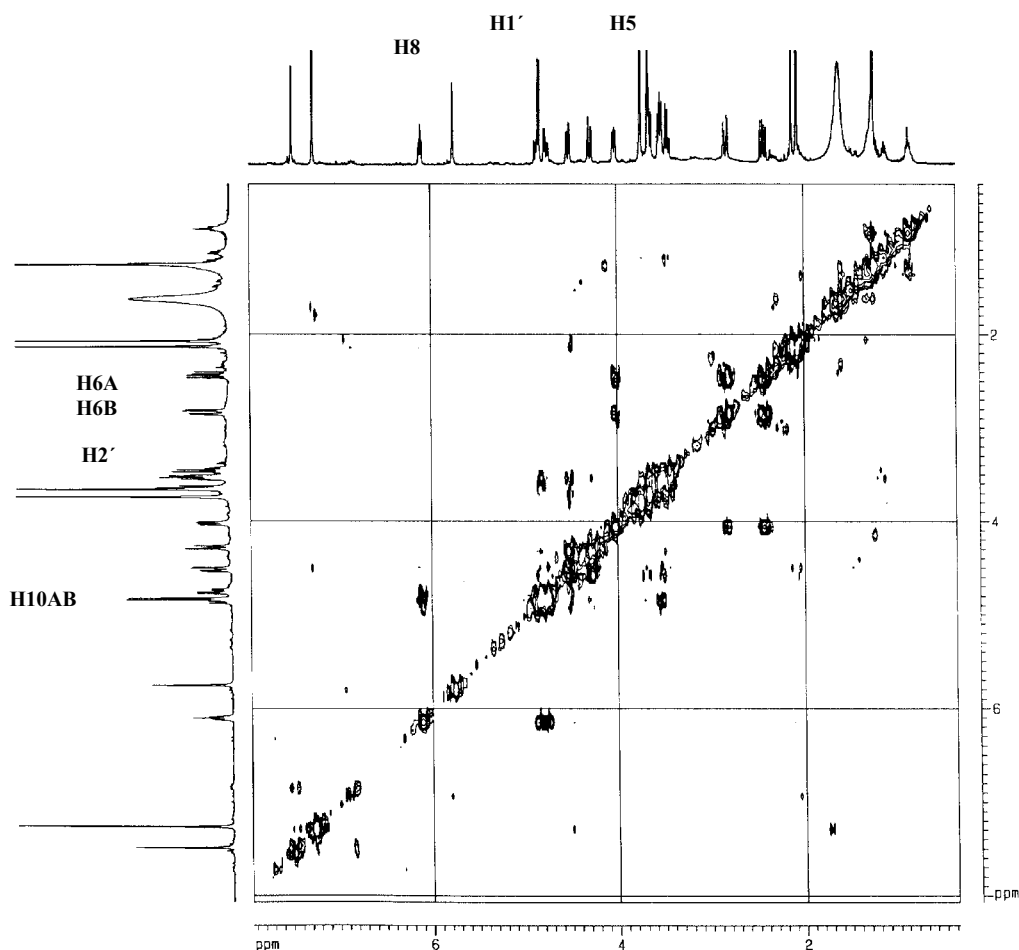
Espectro RMN  $^1\text{H}$ 

El espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 4952 muestra singletes a 7.48  $\delta$  (H-3) y 5.75  $\delta$  (H-1) característicos de un secoiridoide. Un doblete a 4.83  $\delta$  (CH3-10) y una serie de señales entre 4.51 y 3.51 indican la presencia de un secoiridoide glucosilado.



ppm

Espectro RMN  $^{13}\text{C}$



Experimento COSY

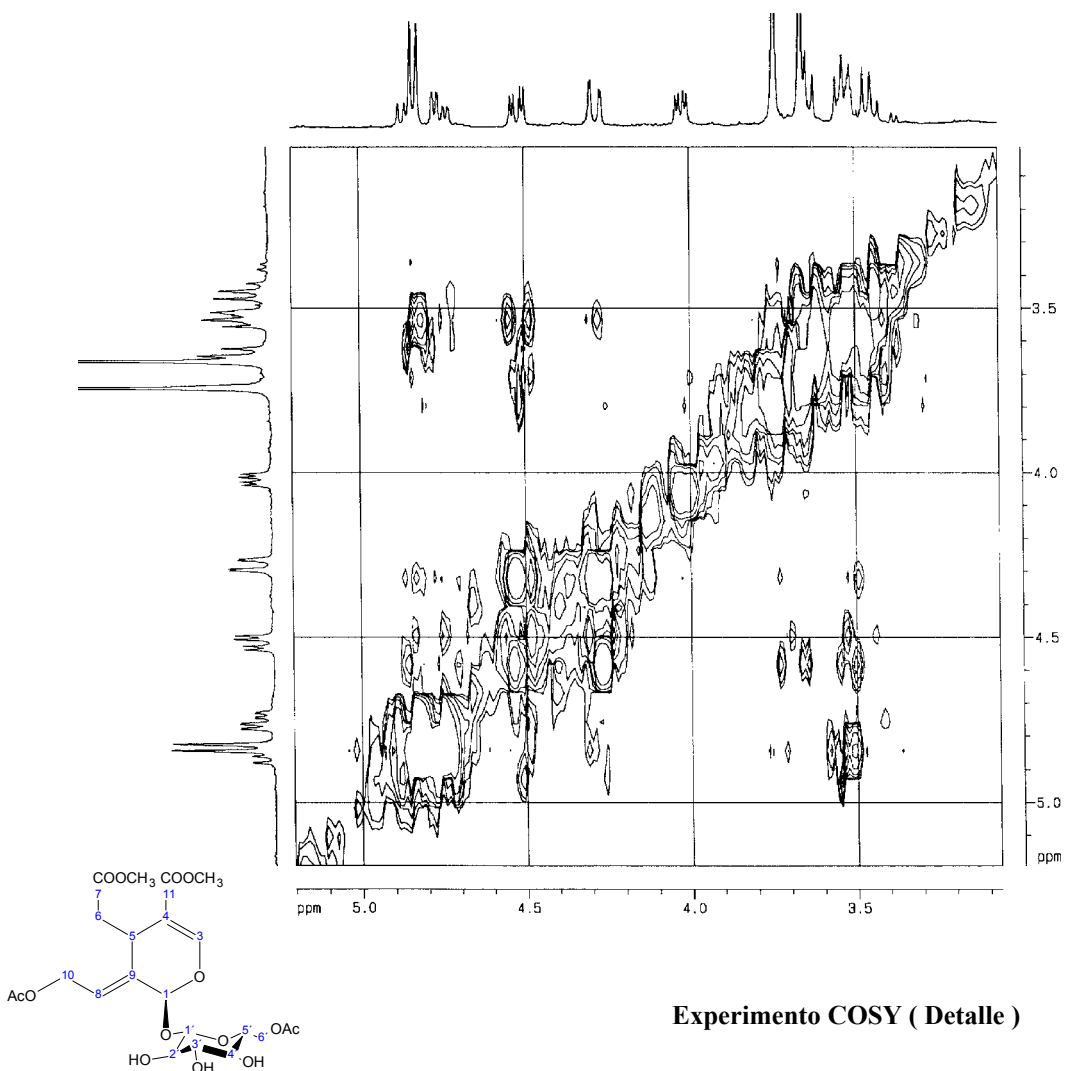
Era evidente que un doble enlace estaba presente entre C8 y C9, lo que se confirma por los respectivos valores de estos carbonos (124.0 y 131.6 ppm) en el espectro **RMN <sup>13</sup>C**.

Un experimento **COSY** permitió establecer los valores para los protones de ese resto de azúcar y mostró una correlación entre la señal de un protón vinílico a 6.10 δ y la señal atribuible a los protones metilénicos en C10 (4.75 δ y la señal superpuesta en el protón anomérico).

En el experimento **COSY** se observa además la relación entre los dos dobles dobletes H6A y H6B con una señal doble doblete a 4.05 δ que corresponde a H5.

La relación establecida entre el monoete 3.55-3.92 asignado a H2' con una señal en 4.83d confirma que el protón H1' se encuentra superpuesto al monoete 4.88-4.82 de los protones H10.

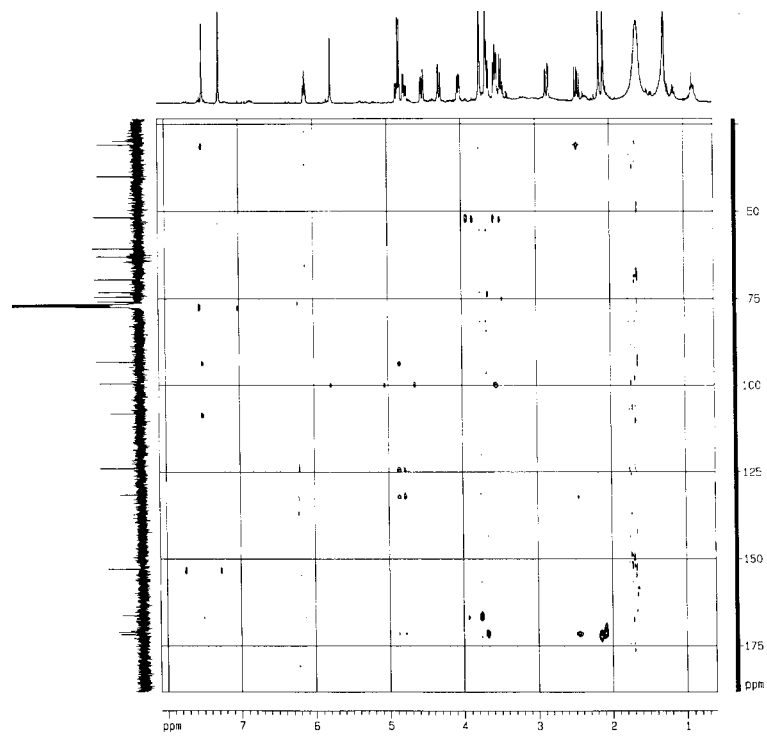
La presencia de señales a 3.74  $\delta$  y 3.62  $\delta$ , integrando para tres protones en cada caso, se asignaron a dos grupos metil éster, mientras que las señales a 2.07  $\delta$  y 2.13  $\delta$  corresponden a dos grupos acetatos. El experimento **HMBC** llevó a la observación de una correlación entre una señal metoxilo a 3.74  $\delta$  y el carbón carbonilo a 166.4 ppm. Un pico cruzado de este último con H3 indica que el carbón carbonilo C11 aparece a 166.4 ppm.



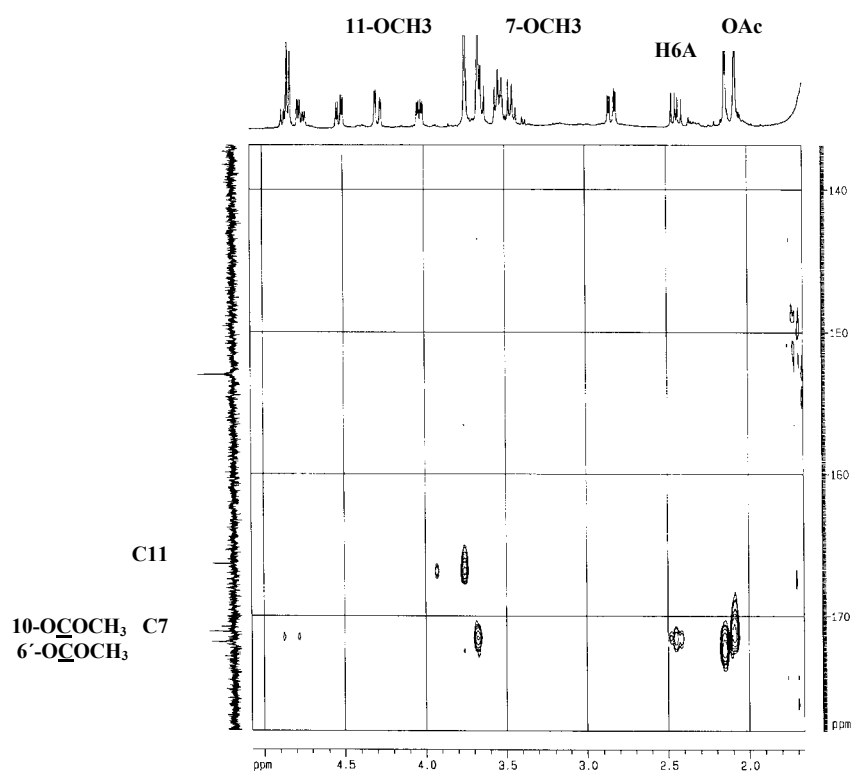
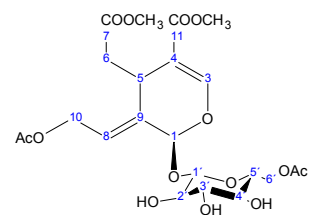
Además, las señales químicas a 3.62  $\delta$  y 161.1 ppm se correlacionaron también con este último siendo asociadas con el grupo metileno a C6. Esta observación indica muy bien que el carbonilo C7 da señal a 171.1.

El experimento **HMBC** muestra picos cruzados para el grupo acetato en 2.07  $\delta$  con el carbono carbonilo en 171.1 ppm, y el último valor con el grupo metileno en C10. Por lo tanto el carbono carbonilo C7 como el grupo acetato C10 da señal en 171. El grupo acetato en 2.13  $\delta$ , correspondiente a la señal carbonilo en 171.8 ppm se asignó a la posición C-6', debido al hecho de que los protones de este último grupo dan señales mas bajas con respecto al resto de los protones del sistema del azúcar.





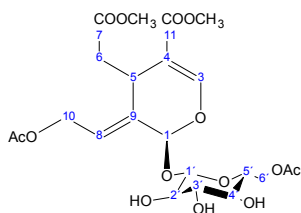
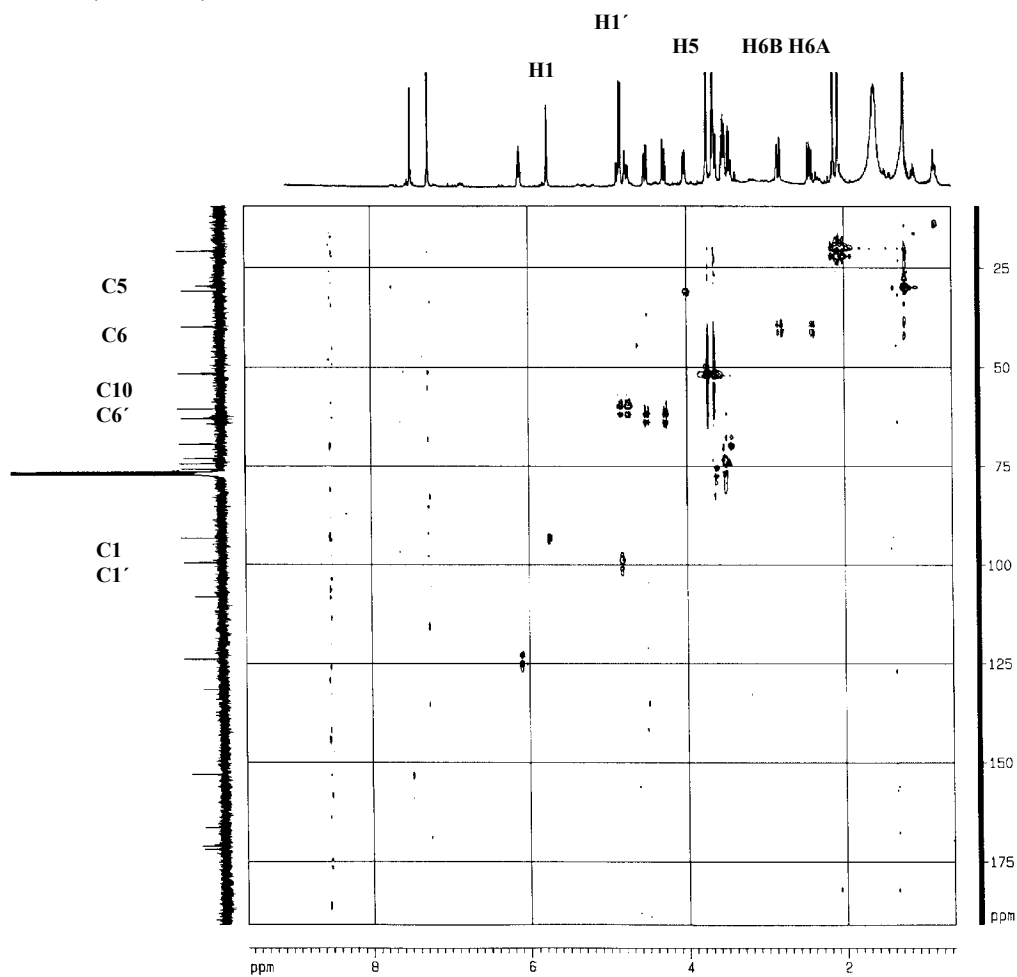
Experimento HMBC



Experimento HMBC (Detalle)

El experimento **HMQC** permite confirmar la estructura propuesta. Se observa la relación entre el carbono  $C6'$  y sus protones a valores más altos de lo común.

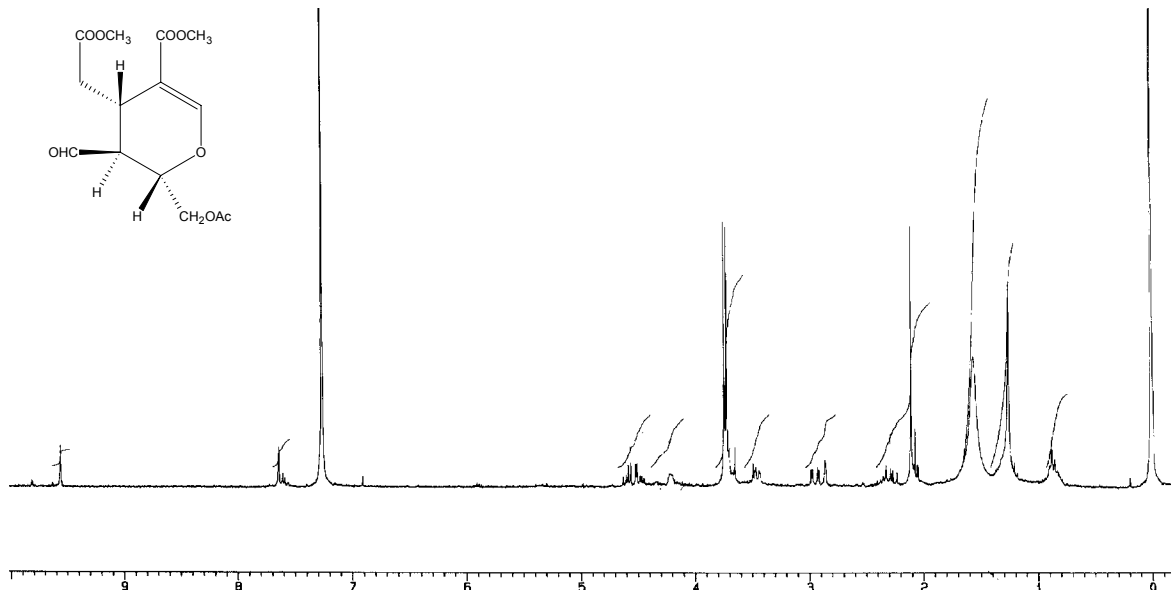
La acetilación de 132 dio el 10,2',3',4',6'-pentaacetoxioleosido dimetil éster **4950a**, descrito previamente por Inouye & col.<sup>14</sup>



Experimento HMQC

<sup>14</sup> Inouye H., Inoue K., Nishioka T. y Kaniwa M. (1975) *Phytochemistry* **14**,9

Producto 4951h trans



ppm

Espectro RMN <sup>1</sup>H

En *Jasminum odoratissimum* aparece un nuevo jasmoaldehído cuyo origen está posiblemente en la acción de una glucosidasa sobre el 10 acetoxioleosido 7,11 dimetil éster (4951), descrito por primera vez.<sup>15</sup> (Ver Figura 2).

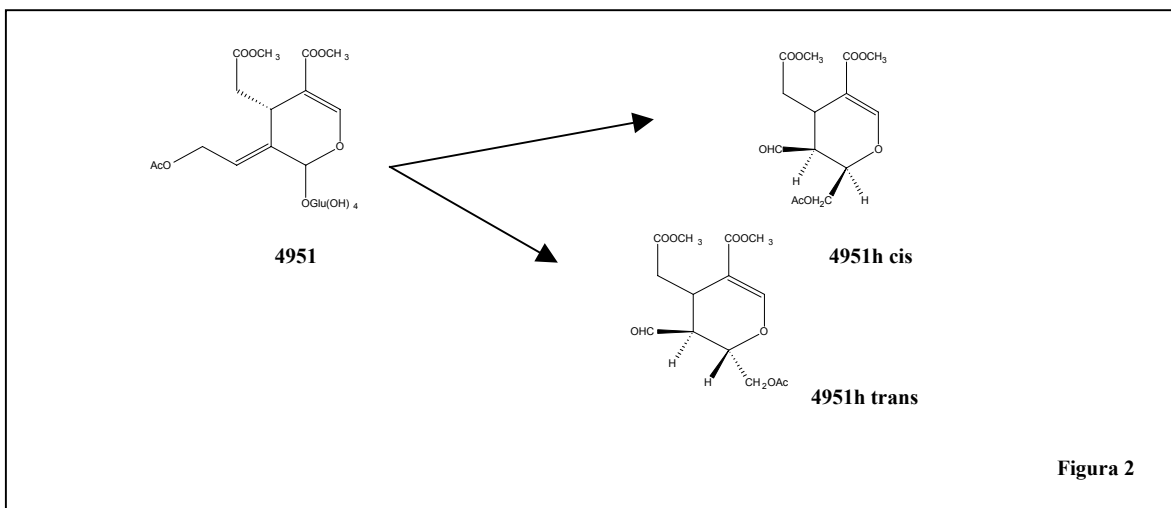


Figura 2

Aislado en muy pequeña cantidad con un aspecto pulverulento, sus espectros UV e IR sugieren la presencia de un sistema enol-éter típico del núcleo de un secoiridoide. El espectro IR muestra la presencia de un grupo aldehído conjugado con el sistema anterior, confirmado por un doblete a 9.56 δ. (Ver **Tabla 11**)

<sup>15</sup> Trujillo J. M., Hernández J.M., Pérez J.A., H. López, y Frías I. (1996) *Phytochemistry* **42**, 533

Su espectro de masas muestra un ión molecular  $m/z$  314 correspondiente a una fórmula molecular  $C_{14}O_8H_{18}$ .

Presenta las señales típica de un secoiridoide para H3 y los protones H6, junto con dos grupos metoxilo. Además el RMN  $^1H$  muestra un singlete que integra para tres protones de un grupo acetato (Ver **Tabla 11**)

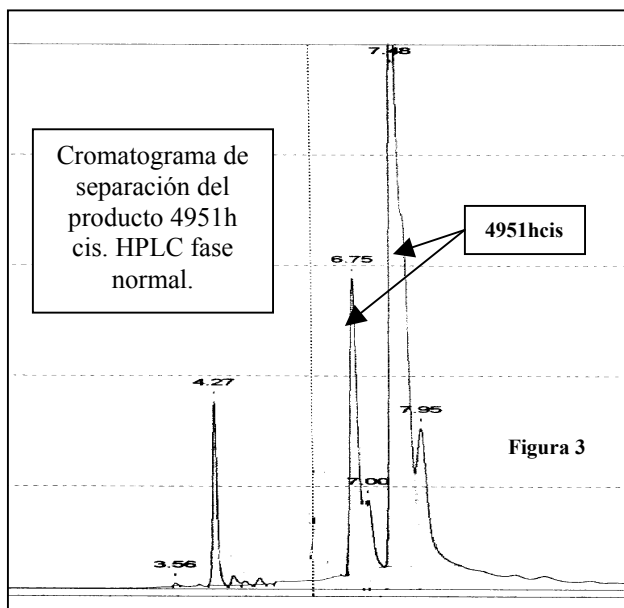
El acoplamiento entre las señales  $3.47\delta$  (H5) y  $2.27\delta, 2.95\delta$  (H6) junto con el acoplamiento entre las señales  $3.47\delta$  (H5) y  $2.86\delta$  (H9) confirma la secuencia C6-C5-C9.

La búsqueda bibliográfica de agliconas tipo secoiridoide aisladas en *Oleacea* nos muestra un grupo de compuestos con grupos carbonilos, espectros RMN  $^1H$  y RMN  $^{13}C$ , y constantes de acoplamiento muy similares. Dos productos aislados de *Olea europea*<sup>16</sup> y un producto aislado de *Fraxinus angustifolia*<sup>17</sup>. (Ver **Tabla 11**)

Todos los datos indican que (4951h) trans se trata de un jasmoaldehído originado a partir del 10 -acetoxioleosido dimetil éster (4951) aislado por primera vez de esta planta<sup>18</sup>. El estudio de los espectros RMN  $^1H$  y RMN  $^{13}C$  indica que este producto es diastereoisómero trans (H1 9.56 d, H9 4.21 m). El rastreo del isómero cis da resultados negativos indicando que este no aparece en la planta o lo hace en una proporción no detectable.

La poca cantidad de producto aislado debido a su poca representación en la planta y a la dificultad para su separación, complica considerablemente su estudio.

Con el fin de comprobar la identidad de este producto y su posible origen se sometió al 10 acetoxioleosido 7,11 dimetil éster (producto 4951) a la acción de la  $\beta$ -Glucosidasa. Curiosamente, como veremos, el producto de la reacción fue únicamente el diastereoisómero cis, sin rastro del otro isómero. (H1 9.63 d, H9 4.73 m).



<sup>16</sup> P. Gariboldi, G. Jommi y L. Verotta (1986) *Phytochemistry*. **25**, 865-869

<sup>17</sup> Ihsan Calis, Mohammed Hosny, Taha Khalifa y Sansei Nishibe (1993) **6**, 1453-145

<sup>18</sup> Trujillo J. M., Hernández J.M., Pérez J.A., H. Lopez, y Frías I. (1996) *Phytochemistry* **42**, 533

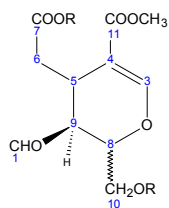
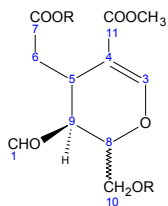


Tabla 11. RMN <sup>1</sup>H de los compuestos a, b, ligstral, 4951h trans, 4951h cis.

H	a	b	ligstral	4951h trans	4951h cis
1	9.50d	9.61 dd	9.56 s	9.56 d (1.3)	9.63 d (0.7)
3	7.57 s	7.66 s	7.62 s	7.64 s	7.56 s
5	3.38 m	3.37 m	3.34 dd	3.47 m	3.46 m
6a	2.53 dd	2.22 dd	2.20 dd	2.27 dd (16.8,9.4)	2.41 dd (12.4,7.7)
6b	2.88 dd	2.86 dd	2.89 dd	2.95 dd (16.8,4.0)	2.99 dd(12.4,2.7)
8	4.46 m	4.18 m	4.16 m	4.22 m	4.73 m
9	2.57 m	2.62 m	2.49 s	2.86 m	2.96 m
10a	1.38 d	1.56 d	1.54 d	4.49 dd,(12.3,4.5)	4.16 dd (8.9,8.9)
10b				4.59 dd (12.3,7.2)	4.35 dd (8.9,8.9)
7-OCH <sub>3</sub>	3.72 s	3.74 s	3.73 s	3.72 s	3.69 s
11-OCH <sub>3</sub>				3.74 s	3.73 s
α	4.28dt , 4.26 dt	4.37 m, 4.20 m	4.29 m		
β	2.80 bt	2.82 m	2.87 m		
2''			6.76 d		
3''	6.78 d	6.85 d	7.06d		
5''	6.74 d	6.81 d	7.06d		
6''	6.60 dd	6.63 dd	6.76 d		
OCO-CH <sub>3</sub>				2.10 s	2.10 s

Los espectros se midieron en CDCl<sub>3</sub>.



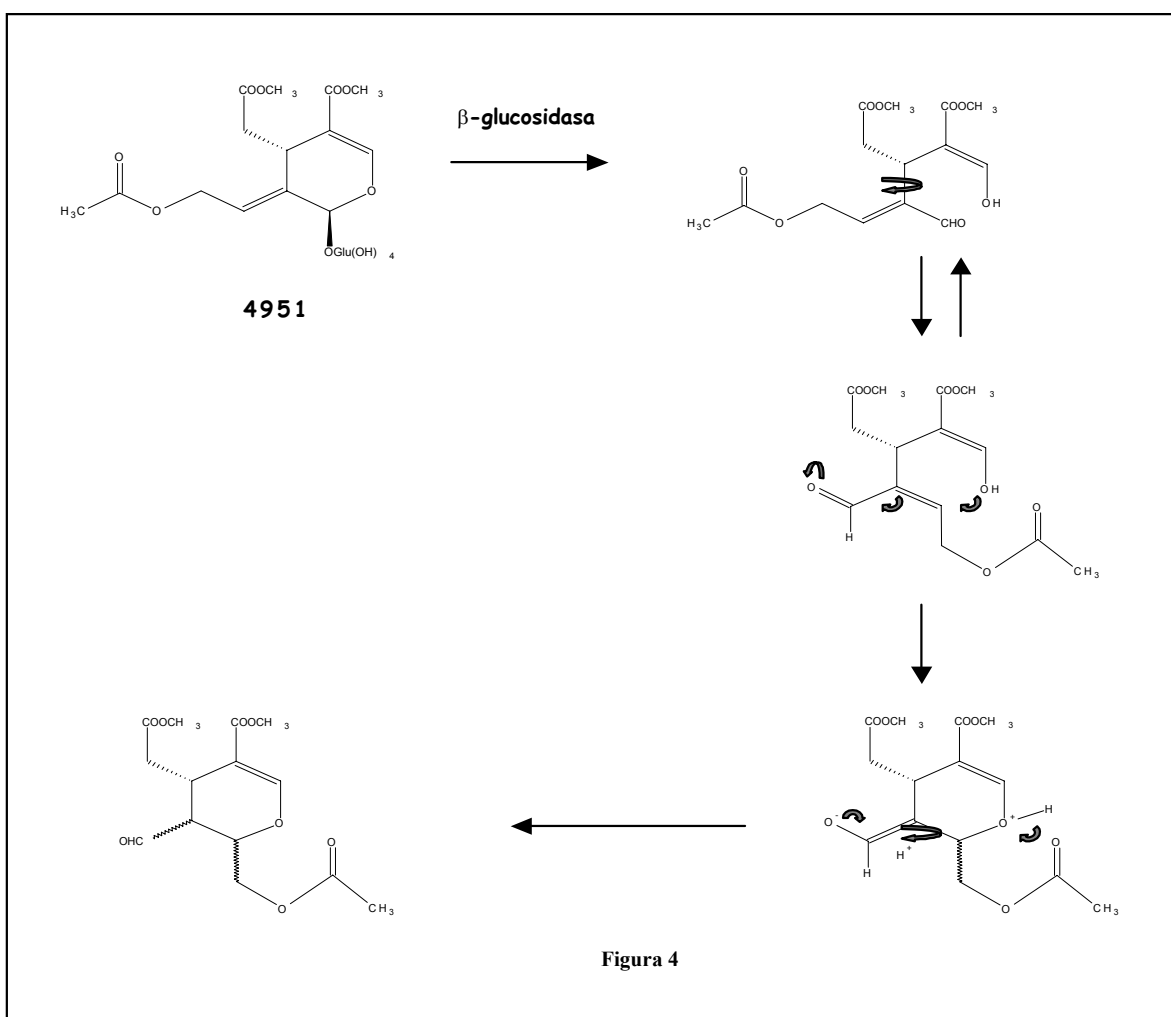
**Tabla 12.** RMN  $^{13}\text{C}$  de los compuestos a, b, ligstral, 4951h cis.

C	a	b	ligstral	4951h cis
1	199.55	199.62	199	198.54
3	156.90	153.38	156.8	154.62
4	130.09	129.88	106.5	106.62
5	28.08	26.79	20.8	26.15
6	38.88	36.89	38.7	36.77
7	170.92	171.45	171.2	172.07
8	69.57	70.53	69.5	71.65
9	50.89	54.12	50.8	63.18
10	17.80	19.06	17.9	20.63
11	167.11	167.14	167.1	166.54
7-OCH <sub>3</sub>	51.63	51.28	51.5	51.83
11-OCH <sub>3</sub>				51.49
1''	65.36	64.96	65.3	
2''	34.20	33.95	34.1	
3''	106.34	106.10	129.6	
4''	115.08	114.95	130.0	
5''	143.29	143.23	115.4	
6''	142.85	142.52	156.7	
7''	116.21	115.78	115.4	
8''	120.97	120.75	130.0	
OCO-CH <sub>3</sub>				20.63
O <sub>2</sub> C-CH <sub>3</sub>				170.27

Los espectros se midieron en CDCl<sub>3</sub>.

Tanto el diastereoisómero natural *trans* como el obtenido por la acción de la  $\beta$ -glucosidasa *cis* aparecen en las condiciones de separación como una mezcla de dos formas en equilibrio (Ver **Figura 3**), pero ambas presentan espectros superponibles y corresponden a la aglicona (producto *4951h*). Tras repetir la reacción y rastrear otros posibles productos se confirma que la acción de la  $\beta$ -glucosidasa es altamente específica para el isómero *cis* (ver **Experimental**).

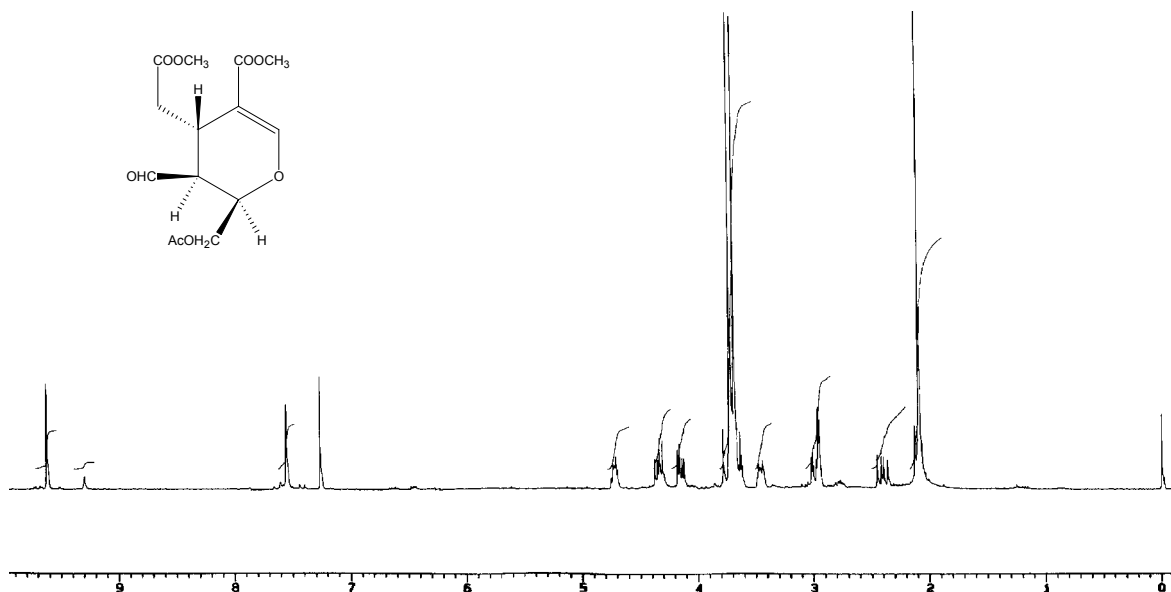
Siguiendo el esquema de reacción propuesto por Gariboldi<sup>19</sup> se espera que la reacción de hidrólisis transcurra con la formación de un aldehído en la posición 1 que gira sobre el enlace 5-9 para dar lugar a las correspondientes formas *cis* y *trans*. Sin embargo el estudio del producto de reacción solo muestra la presencia del diastereoisómero *cis*. (Ver **Figura 4**).



<sup>19</sup> P. Gariboldi, G. Jommi y L. Verotta (1986) *Phytochemistry*. **25**, 865-869

## Producto 4951h cis

Jasmoaldehído A cis



ppm

Espectro RMN  $^1\text{H}$ 

Este producto obtenido tras la hidrólisis enzimática del producto 4951 (5ml de tampón acetato 0.1 M con 0.1-0.2% de  $\beta$ -glucosidasa a 37° C en agitación, 48 horas) muestra la estructura prevista de un jasmoaldehído originado por el mecanismo que hemos visto.

Su espectro de masas revela la pérdida del resto de glucosa con un ión molecular  $m/z$  314 que se corresponde con una fórmula molecular  $\text{C}_{11}\text{O}_6\text{H}_{12}$ .

En el espectro RMN  $^1\text{H}$  se observa que:

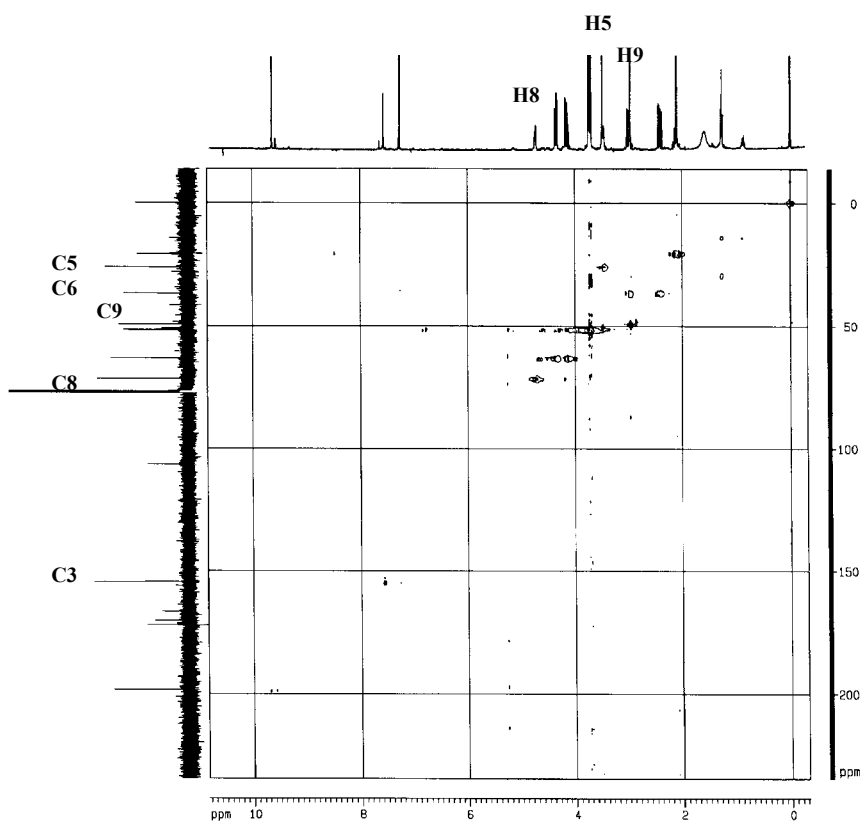
- Los protones metileno C-10 dan una señal más baja que en el producto 4951h trans ( $\Delta\delta=0.33\text{ppm}$  y  $\Delta\delta=0.24\text{ppm}$ ).
- todo lo contrario en H8 ( $\Delta\delta=0.1\text{ppm}$ ).
- H5 es similar en ambos ( $\Delta\delta=0.01\text{ppm}$ ).

H8 debe estar en cis con respecto al grupo aldehído.

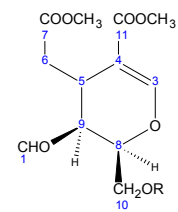
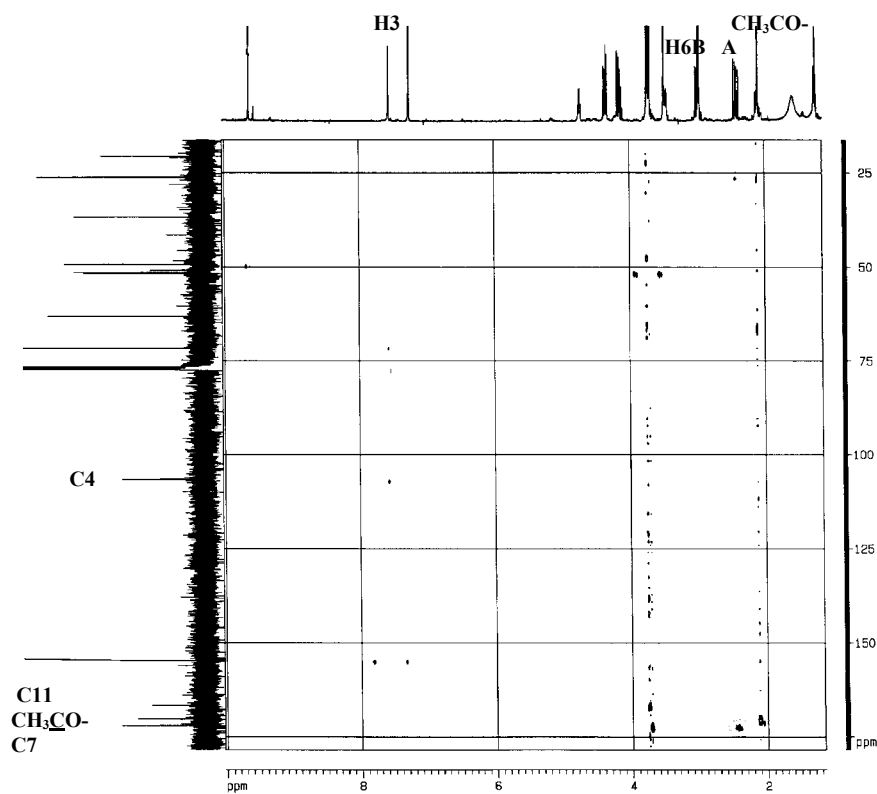
Los experimentos **HMBC** y **HMQC** permiten asignar los carbonos y confirmar la estructura de este producto e indirectamente la de su trans-isómero natural.

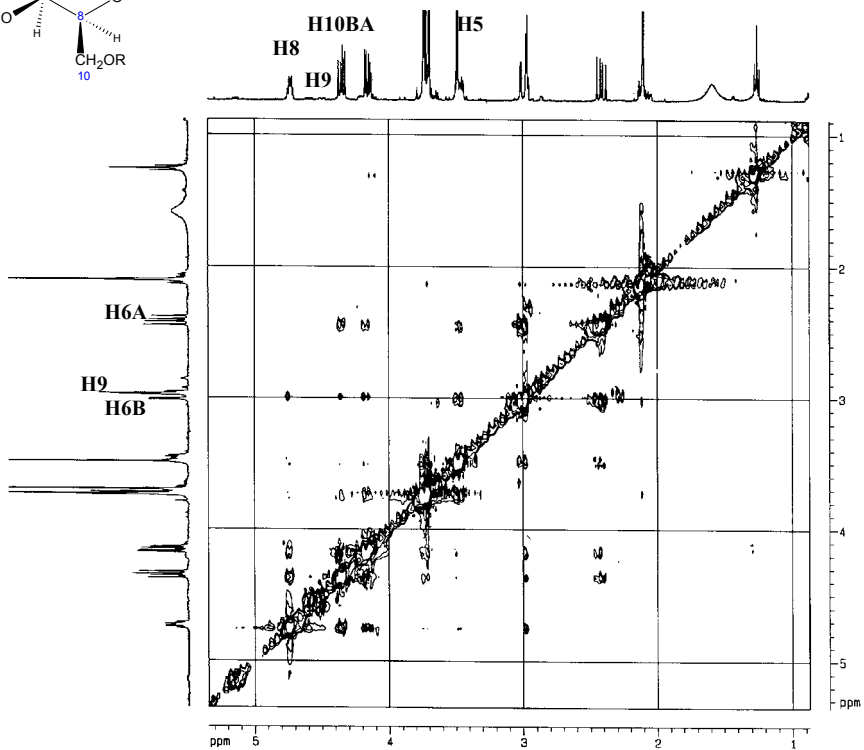
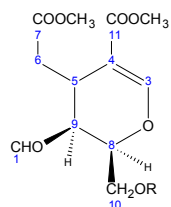
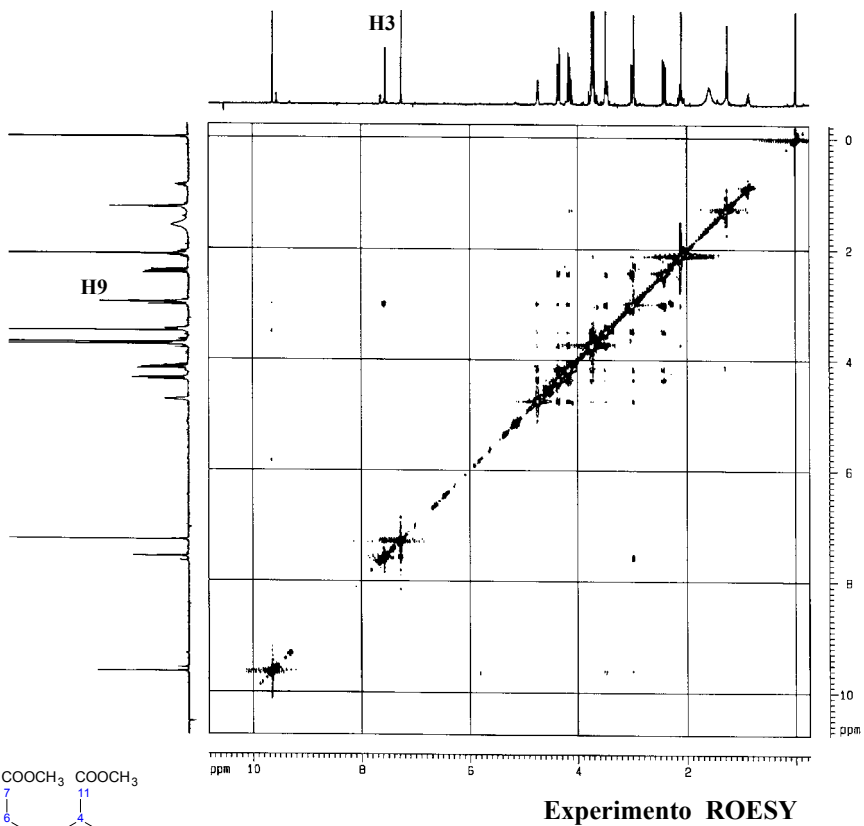
En el experimento **ROESY** se aprecian las relaciones entre los protones H8 y H9 de acuerdo con una forma cis.





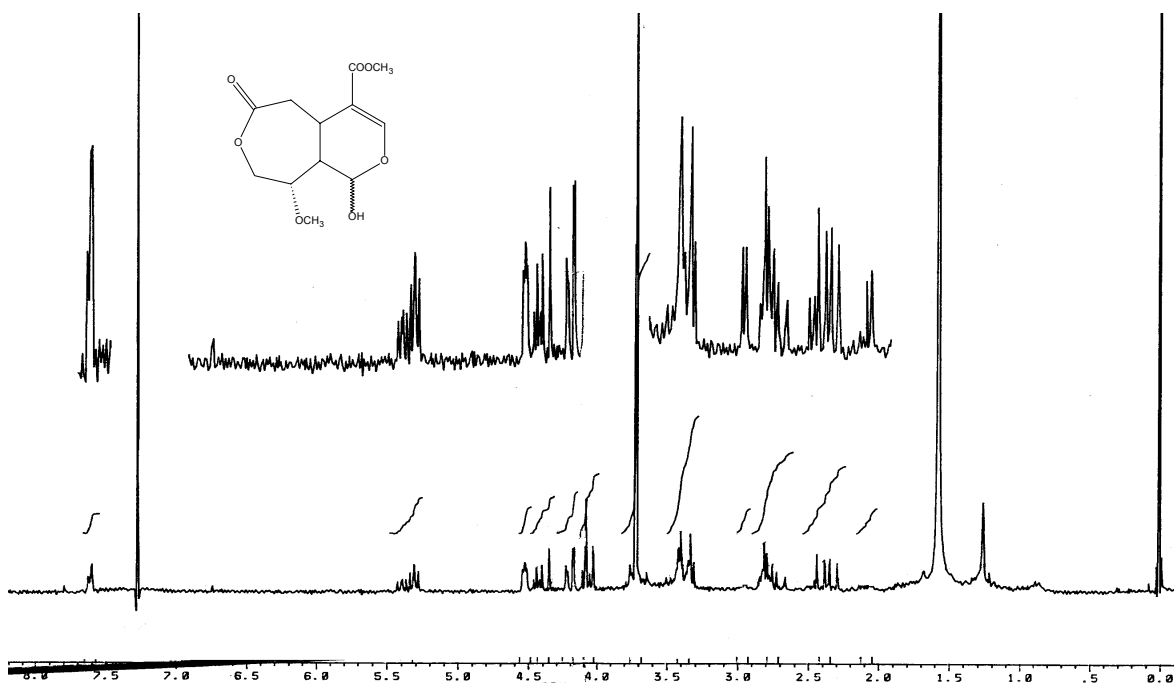
Experimento HMQC





## Producto 4950h1

## Jasmolactona E



ppm

Espectro RMN  $^1\text{H}$ 

El espectro RMN  $^1\text{H}$  muestra las señales de un protón hemiacetalico a 5.29,5.38 $\delta$  (t, 5.2 Hz) y protones a valores bajos 7.58,7.60 $\delta$  (t, 1.0 Hz) pertenecientes respectivamente al H1 y H3 de una estructura secoiridoide. La presencia de un singlete a 3.70 $\delta$  correspondiente a un metoxilo y un fragmento de un ión a m/z 139 en el espectro EM característico de una posición 11 esterificada sugieren un metoxicarbonil secoiridoide.

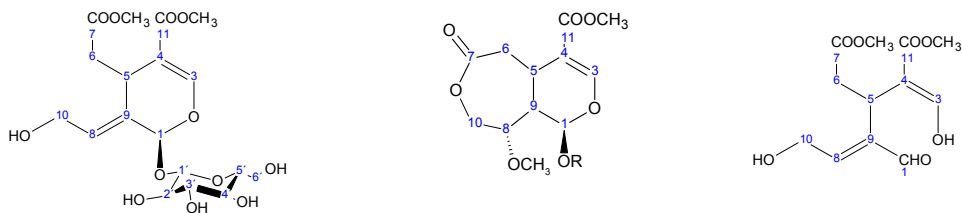
La acetilación da un monoacetato de fórmula empírica  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_8$  que muestra en RMN el correspondiente singlete acetil alifático (2.05 $\delta$ ). Se observa una bajada del valor del protón H1 en 0.7 ppm, lo que nos indica la posición de acetilación y nos confirma la presencia de un grupo hidroxilo en C1 del producto original. En su espectro RMN  $^1\text{H}$  se observa que los protones H10 que originalmente aparecen como dobles dobletes se transforman en un ancho singlete.

Estos datos nos sugiere que estamos ante una Jasmolactona por comparación con sus datos espectroscópicos<sup>20</sup>, y en concreto se trata de la Jasmolactona E obtenida artificialmente al someter el producto 4950 a la acción de  $\beta$ -glucosidasas.<sup>21</sup>

Una observación detallada del espectro RMN  $^1\text{H}$  nos muestra algunas señales duplicadas lo que indican que nos encontramos ante una mezcla natural de los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  en C1 de la Jasmolactona E. (ver **Tabla 13**).

<sup>20</sup> Shen Y-S y Chen Ch-H (1989) Journal of Natural Products 52(5), 1060

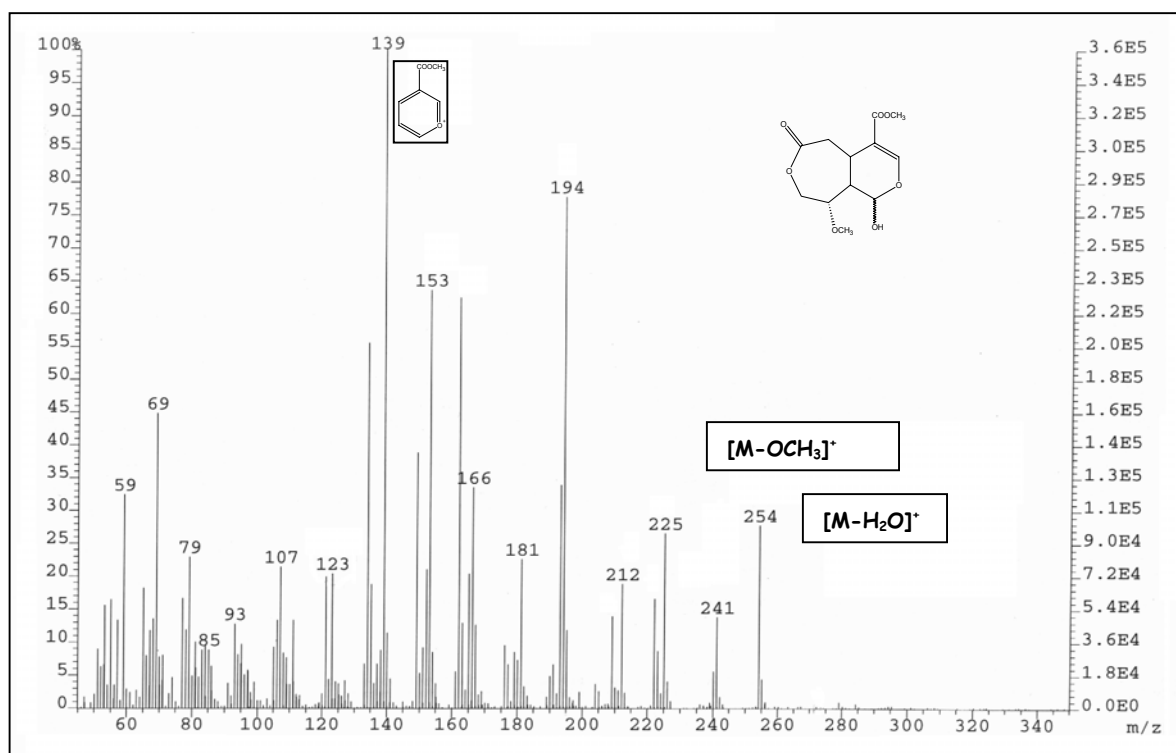
<sup>21</sup> Shen Y-CH., y Chen CH-CH., Tetrahedron Letters (1993) 34,1949



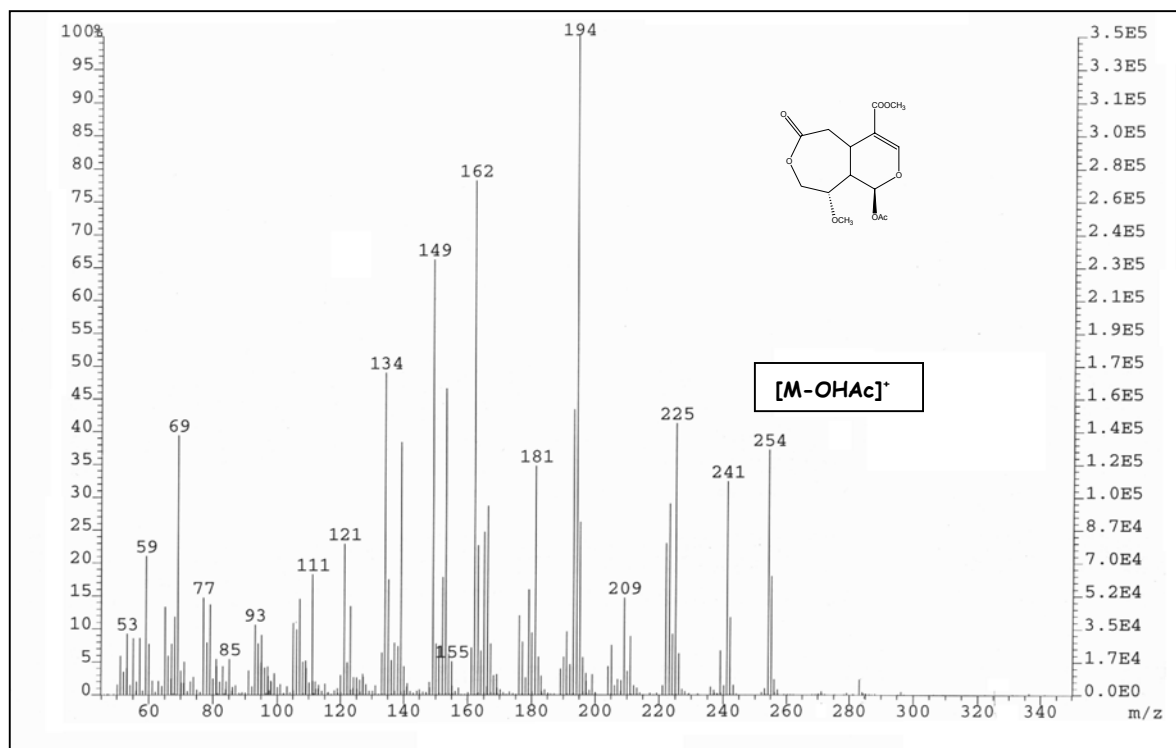
**Tabla 13.** RMN <sup>1</sup>H de los compuestos 4950, 4950h1 $\alpha$ ,4950h1 $\beta$ ,4950h1 $\alpha$ ,4950h2

H	4950	4950h1 $\alpha$	4950h1 $\beta$	4950h1 $\alpha$	4950h2
1	5.91s	5.29t(5.2)	5.38t(5.2)	6.06d (6.6)	9.39s
3	7.49s	7.58d(1.0)	7.60d(1.0)	7.60s	6.67dd(3,1.8)
5	3.64m	3.39-3.32	3.39-3.32	3.38m	2.98m
6A	2.46dd (14.8,9.5)	2.33dd	2.56dd	2.20dd(18,10.8)	2.52dd(15,6.6)
6B	2.79dd (14.8,4.2)	3.35dd	3.35dd	3.48dd(18,4)	2.79dd(15,7.7)
8	6.12dd (7.0,5.7)	4.51dd	4.43dd	4.58d(3.6)	5.68dd(8.7,3)
9		2.79m	2.79m	3.04m	
10A	4.28dd (13.5,7.0)	4.19 dd (10.0,2.3)	4.19 dd (10.0,2.3)	4.13s	4.91dd(19.3,1.14)
10B	4.15ddd	4.05d(10.0)	4.1d(10.0)	4.13s	4.30dd(19.3,5.25)
1'	4.78d				
2'	3.42-3.22m				
3'	3.64 (bajo H1')				
4'	3.55-3.42				
5'	3.42-3.22m				
6' A	3.85d				
6' B	3.91dd (10.0,4.2)				
CH <sub>3</sub> CO-7	3.61s				3.62s
CH <sub>3</sub> CO-11	3.67s	3.70s	3.70s	3.70s	3.74s
OCH <sub>3</sub>		3.71s	3.71s	3.72s	
OAc				2.05s	

Los espectros 4950h1 $\alpha$ ,4950h1 $\beta$ ,4950h1 $\alpha$ ,4950h2 se midieron en CDCl<sub>3</sub> y el espectro 4950 en CD<sub>3</sub>OD.

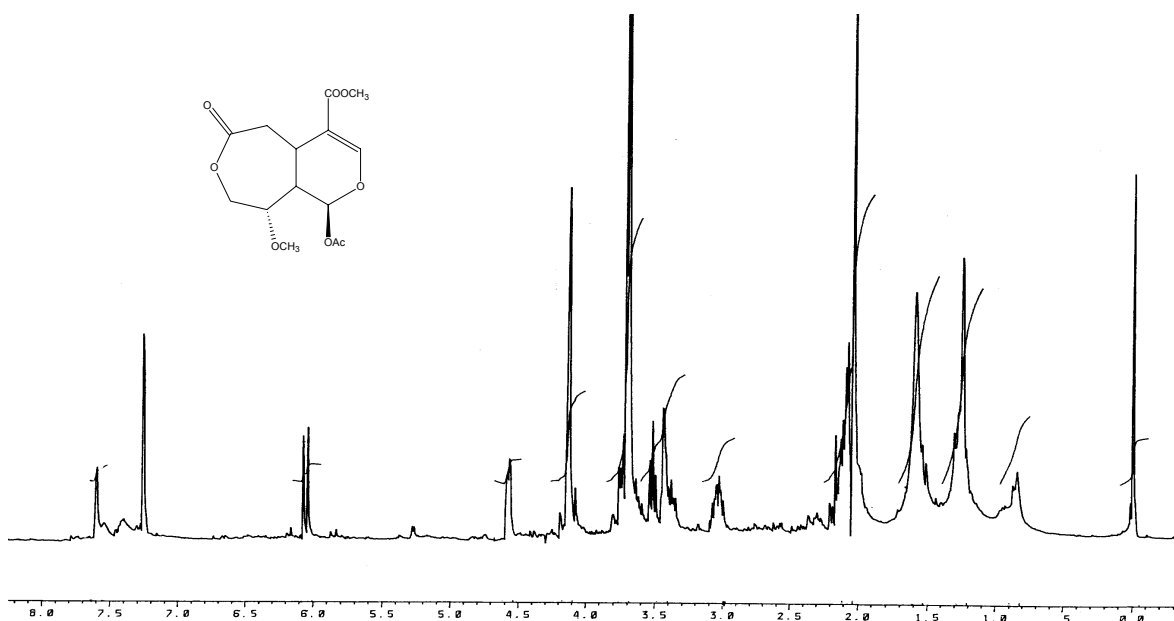


4950h1 Espectro EM



4950h1a Espectro EM

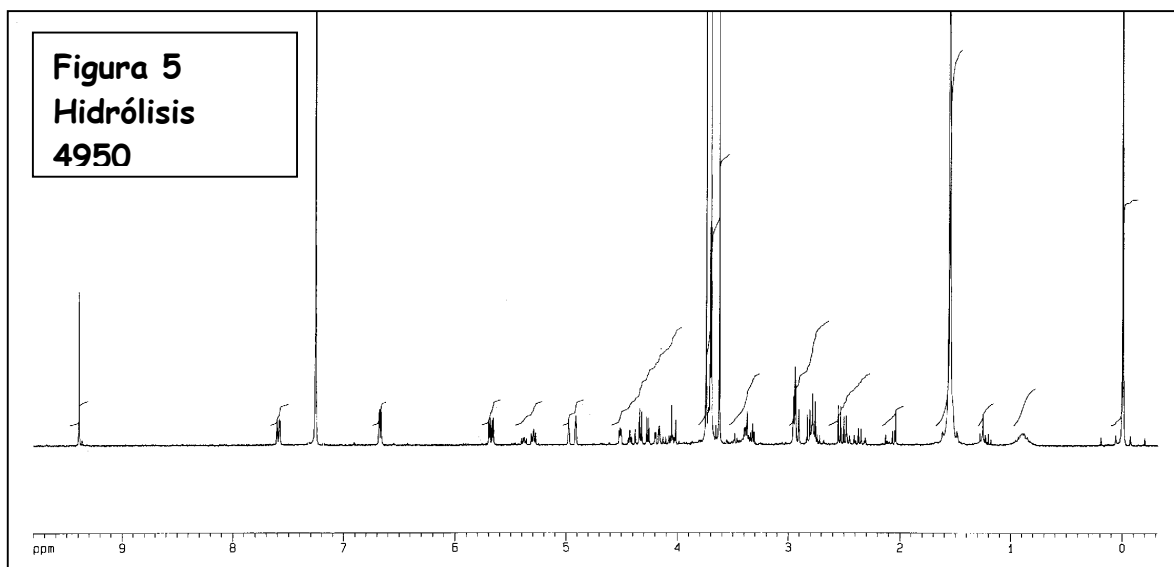
## Producto 4950h1a



ppm

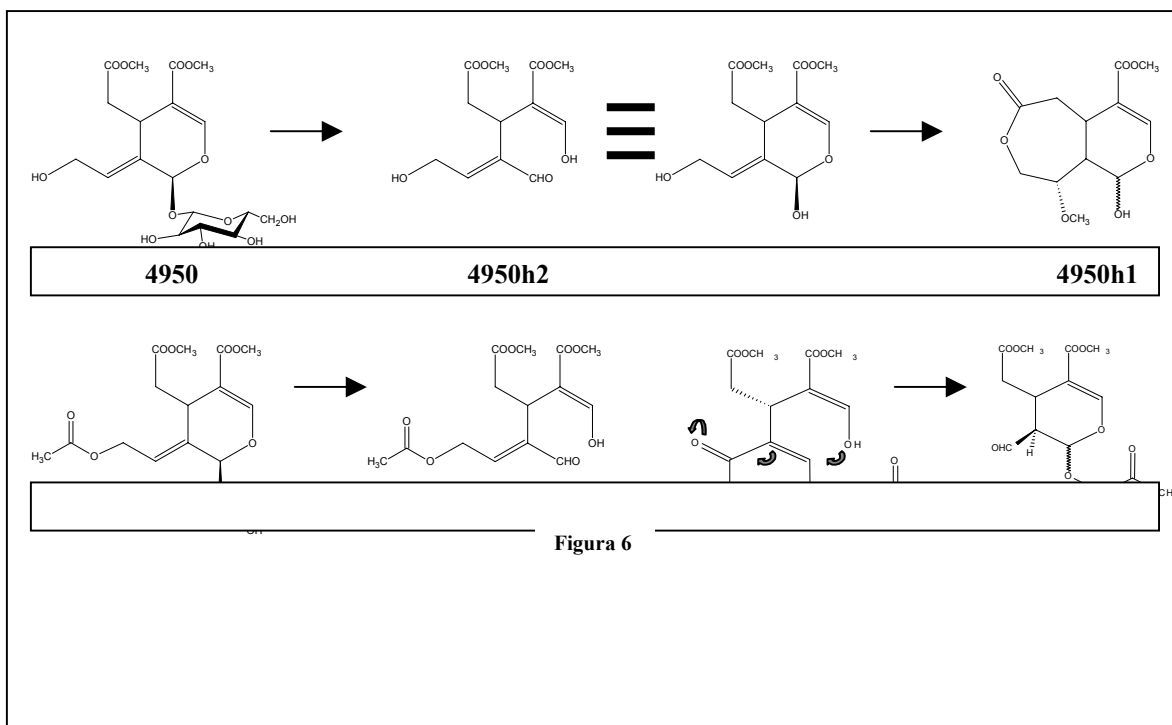
Espectro RMN  $^1\text{H}$ 

Para confirmar el origen y la estructura del producto *4050h1* se somete al producto *4950* a la acción de  $\beta$ -glucosidasas (5ml de tampón acetato 0.1 M con 0.1-0.2% de  $\beta$ -glucosidasa a  $37^\circ\text{C}$  en agitación, 48 horas). El producto de reacción es idéntico al obtenido de la fuente natural, aunque en las condiciones de reacción y purificación se obtiene como producto minoritario de una mezcla inseparable con un jasmoaldehído *4950h2*. (ver **Figura 5**)

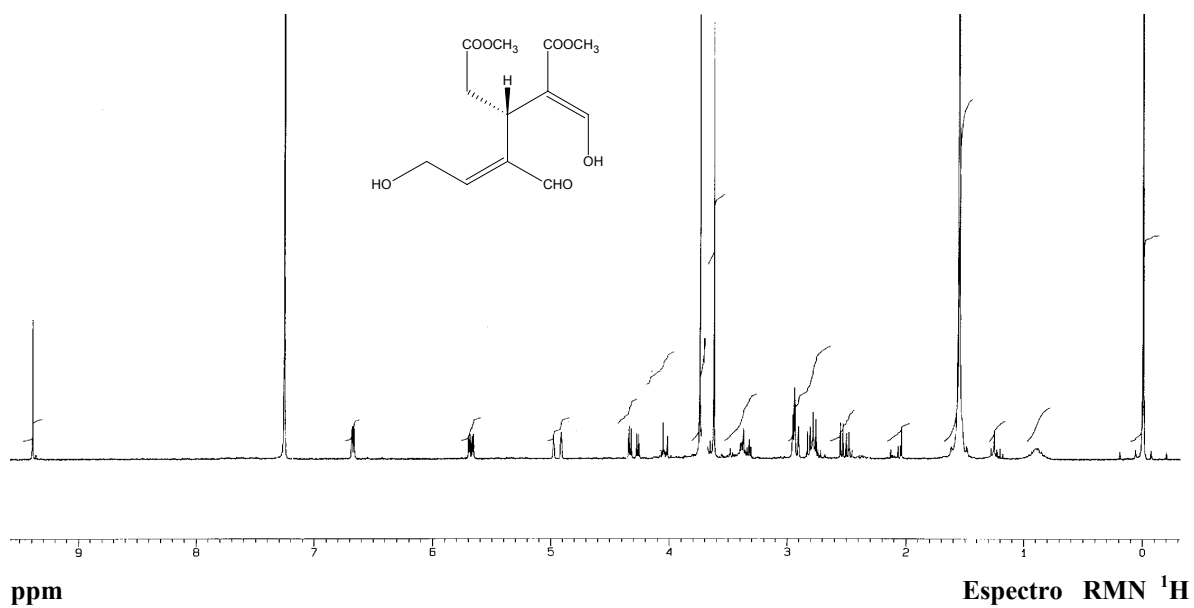


El estudio detallado de su espectro RMN  $^1\text{H}$  nos indica que este jasmoaldehído es un intermediario en la formación de la Jasmolactona E. Como se muestra en la **Figura 4** durante la hidrólisis por glucosidasas de los secoiridoides se forma un intermediario aldehído que puede originar jasmoaldehídos o jasmolactonas dependiendo de la estructura original. (ver **Figura 6**)

Los datos bibliográficos no citan la existencia de las jasmolactonas como mezclas, ni la presencia de otros productos durante la hidrólisis de los correspondientes secoiridoides,<sup>22</sup>



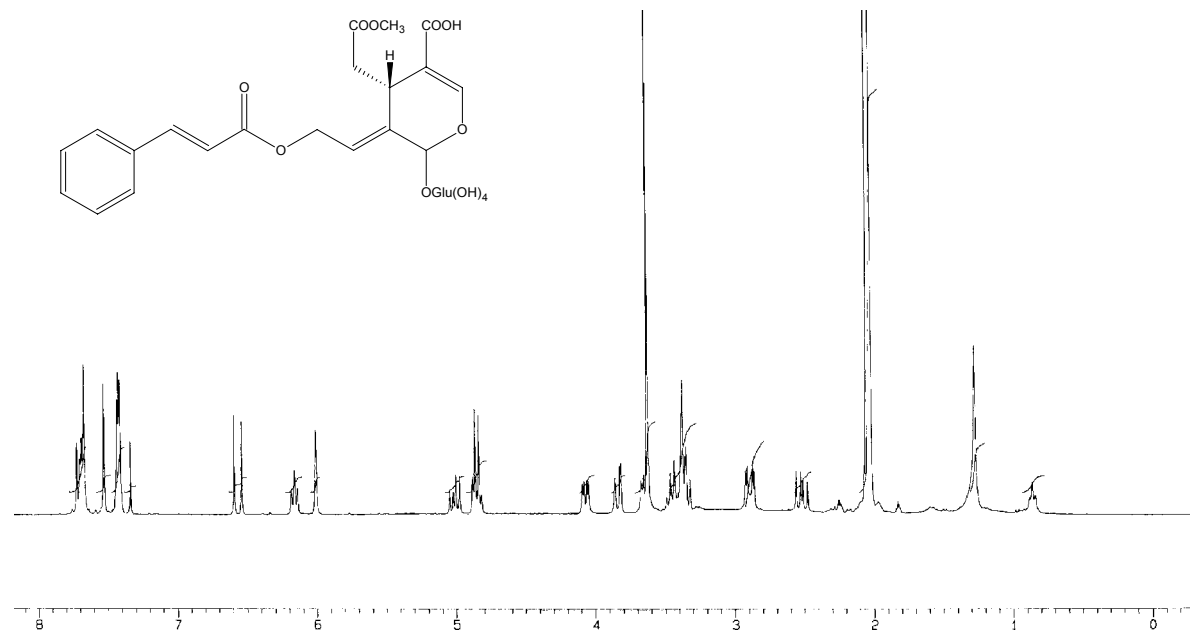
**Producto 4950h2**



<sup>22</sup> Shen Y-CH., y Chen CH-CH., Tetrahedron Letters (1993) 34,1949

## Producto 4901

trans-10-(cinamoiloxi) oleosido metil éster (jasminosido)



ppm

Espectro RMN <sup>1</sup>H

El espectro RMN <sup>1</sup>H muestra la señal de un protón a 7.54 (1H,s). Un protón oleofínico a 6.21 (1H, t) y un protón acilalílico a 5.99 (1H, s) que se asemejan al espectro del 10-acetoxioleosido dimetil éster (4951).

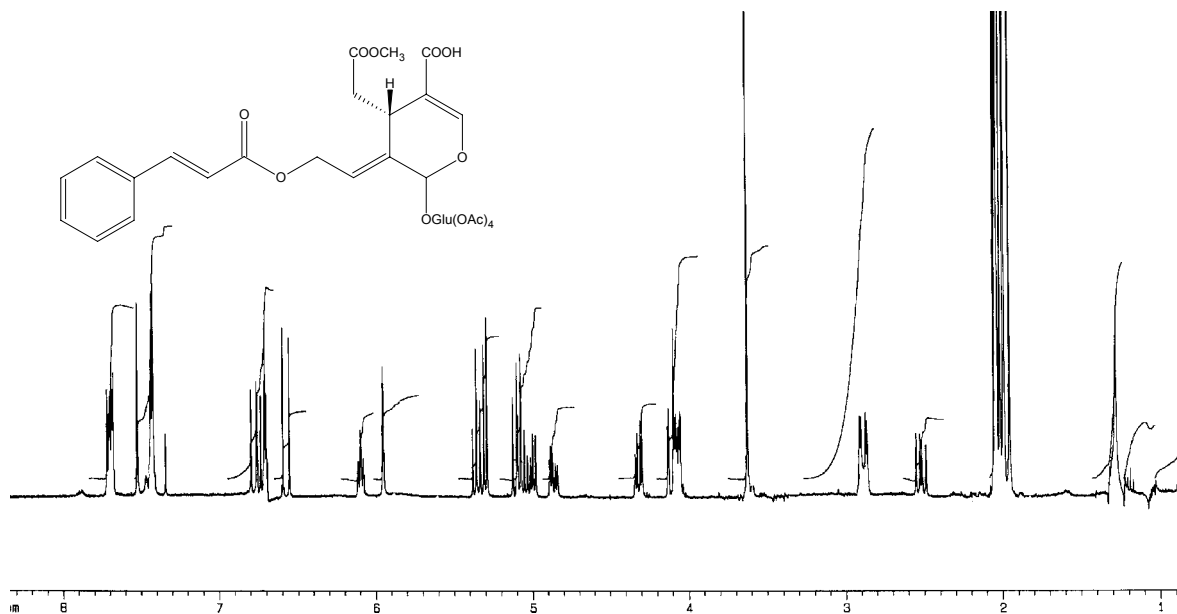
La gran coincidencia entre los espectros de ambos productos excepto en las señales del acilo, junto con las señales a 7.22-7.66 (5H) , 6.94 y 7.68 asignables a protones aromáticos y dos protones transoleofínicos de un grupo trans cinamoil, nos indica que la posición 10 está esterificada con el ácido transcinámico.

Otra diferencia apreciable con el 10 acetoxioleosido dimetil éster, es la presencia de una sólo señal metoxilo. Para establecer la posición exacta de metilación (C7 o C11) y confirmar la estructura propuesta se sometió al producto a acetilación.



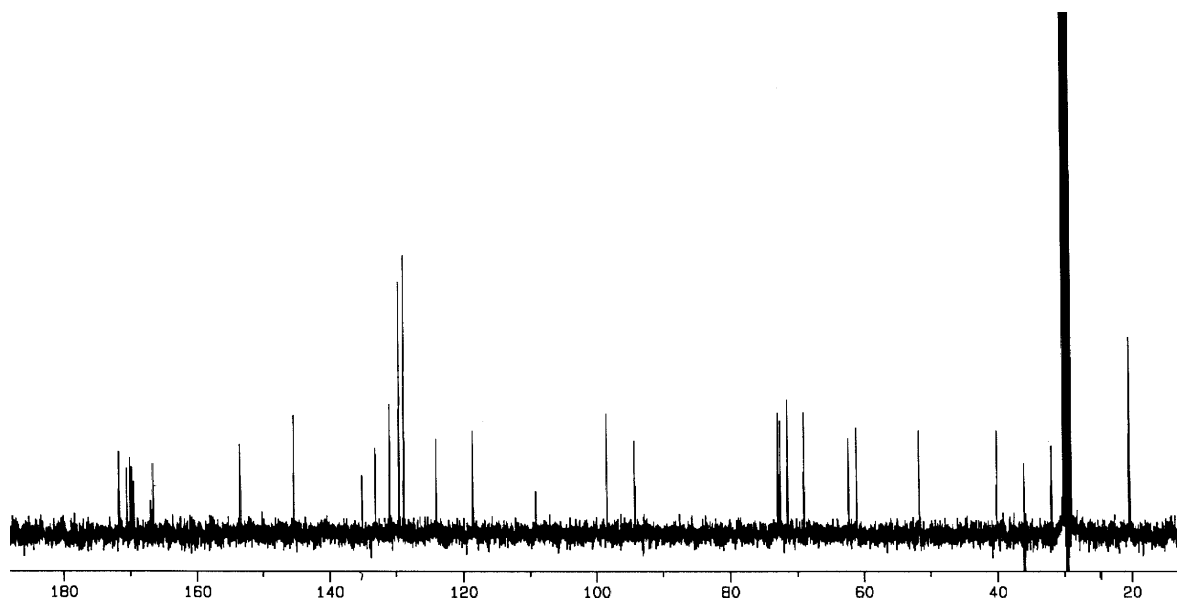
**Producto 4901a**

10-trans-(p-cinamoiloxi)-2',3',4',6'-O-tetraacetiloleosido dimetil éster (Jasminoside tetracetato)



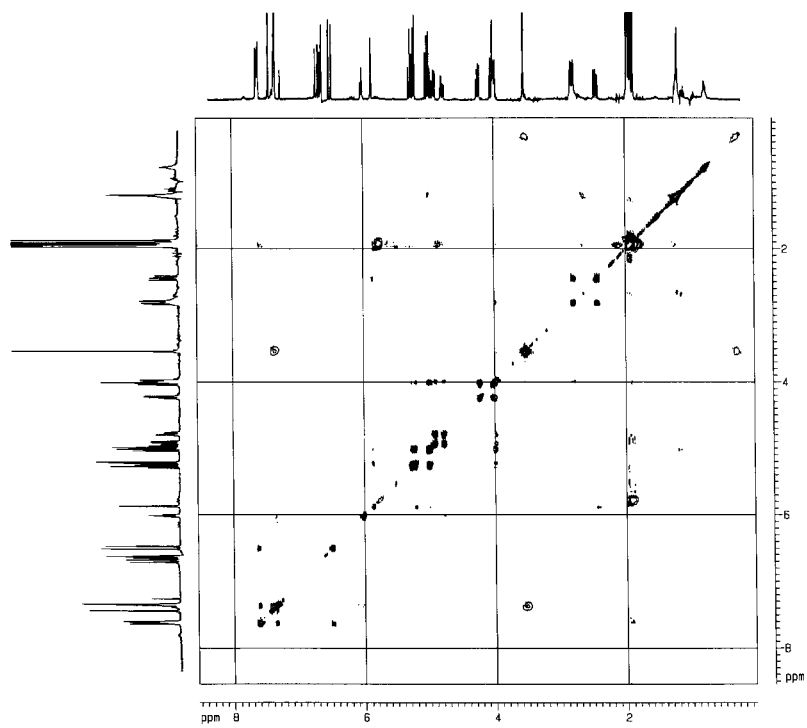
ppm

Espectro RMN <sup>1</sup>H

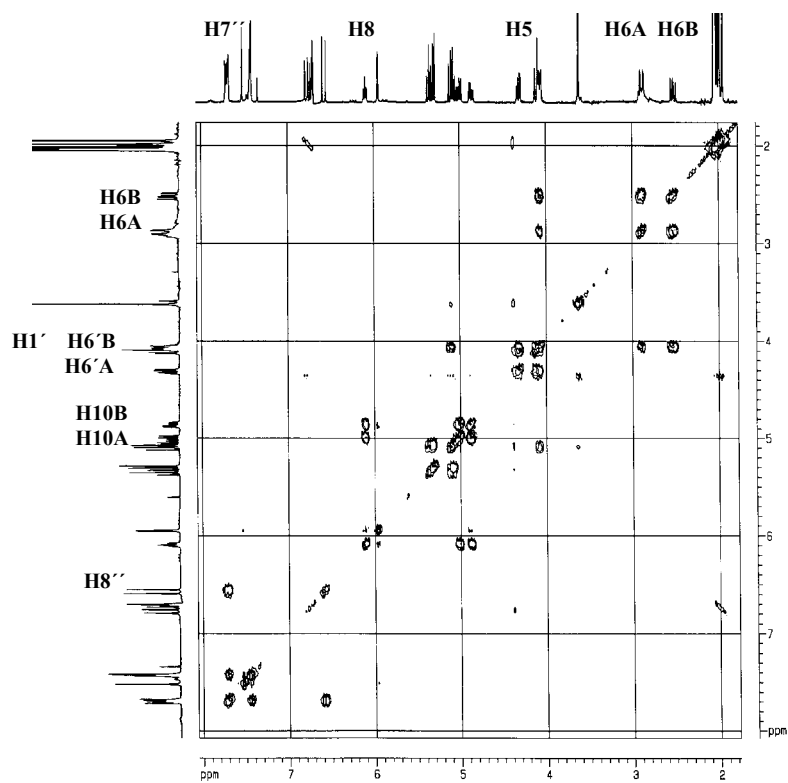


ppm

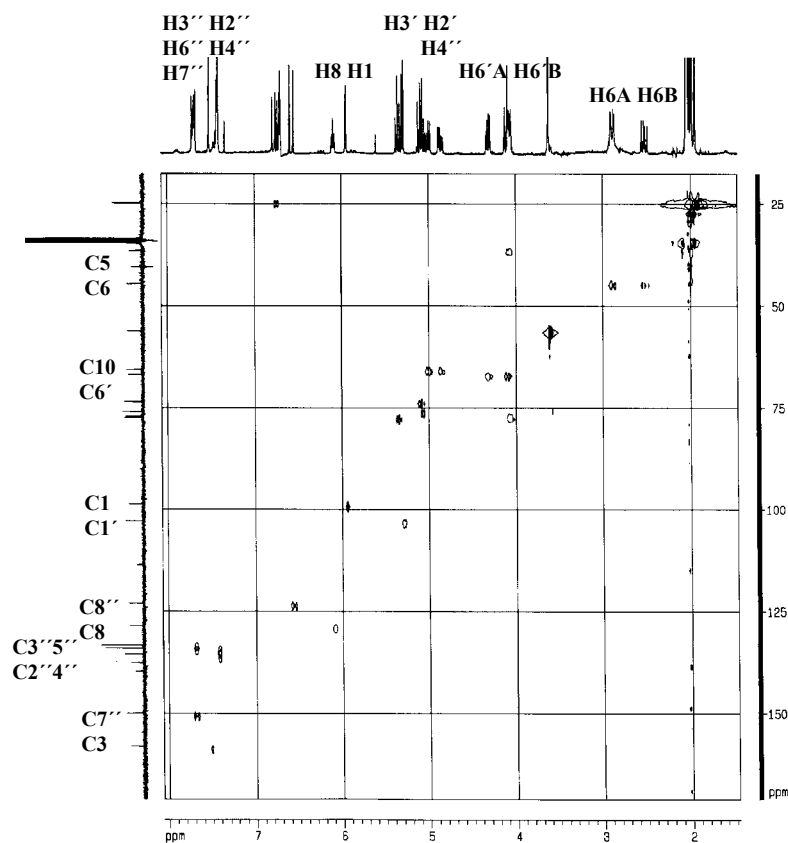
Espectro RMN <sup>13</sup>C



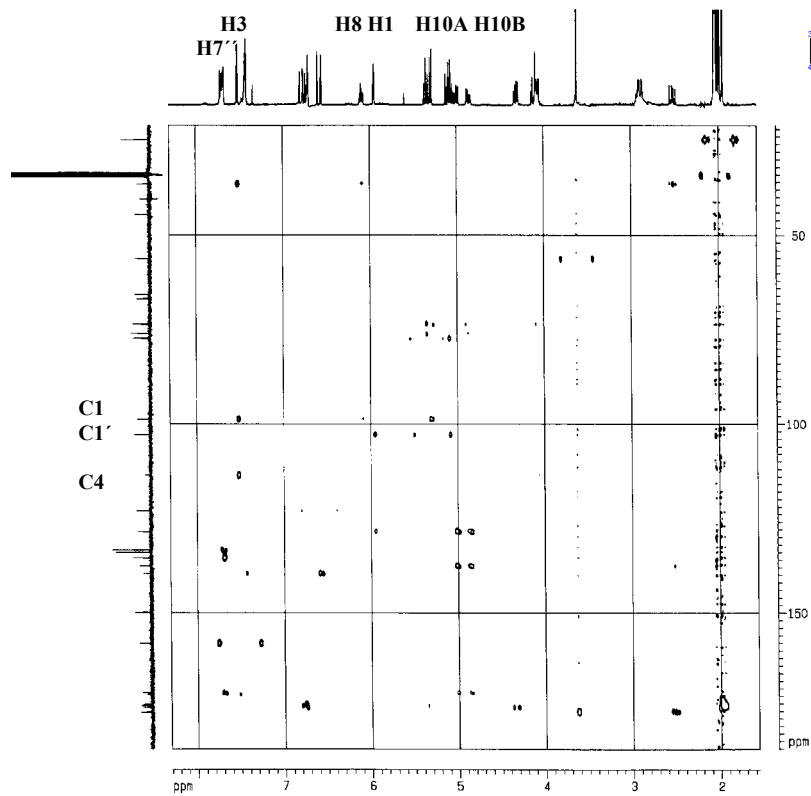
Experimento COSY



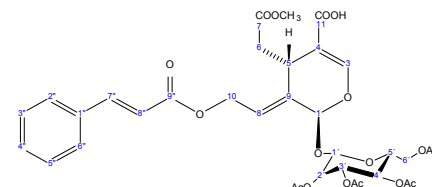
Experimento COSY ( Detalle )



Experimento HMQC



Experimento HMBC

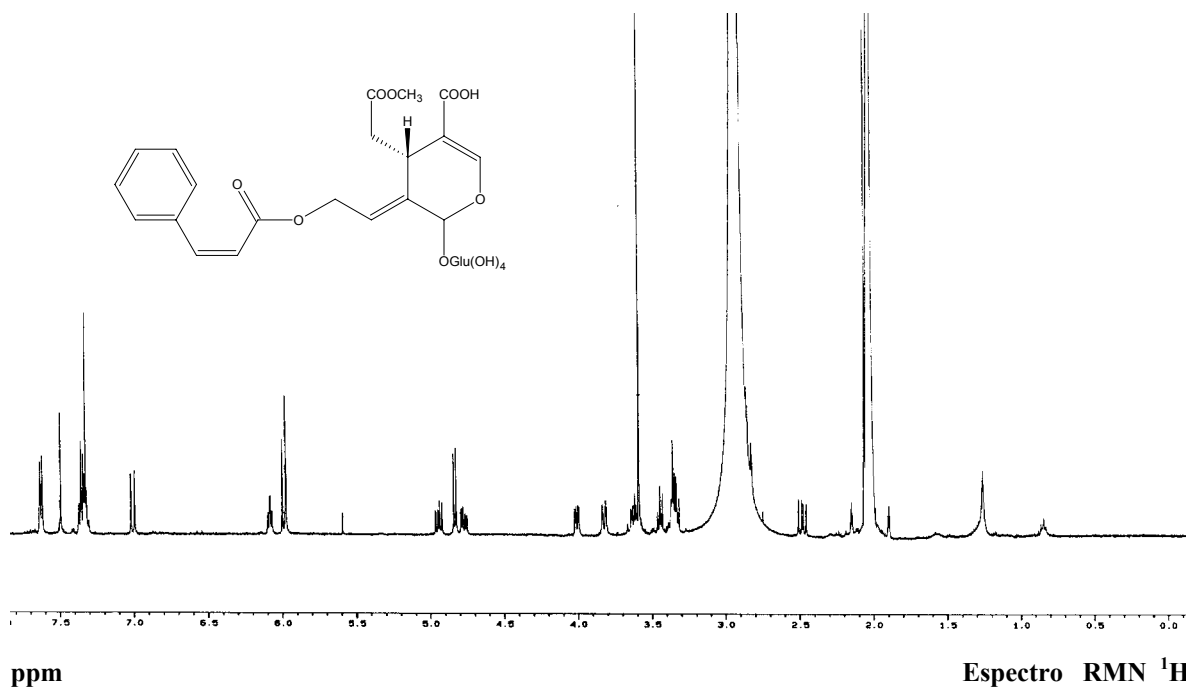


El experimento **COSY** permitió asignar las posiciones de los protones según la estructura prevista.

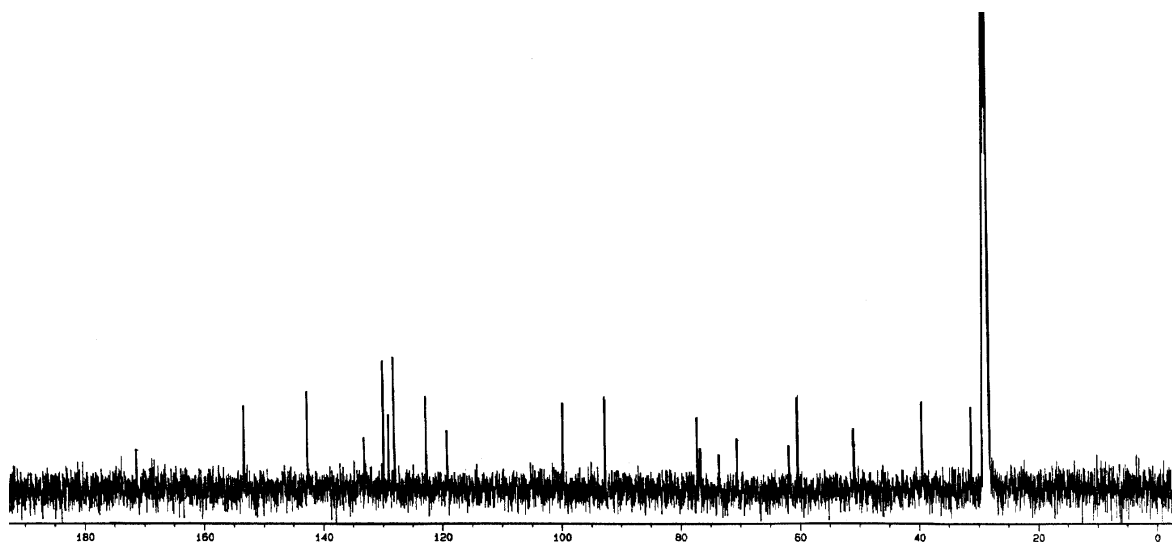
En el experimento **HMBC** la correlación entre H10 y los dobletes del sistema vinílico en  $\delta$  y con la señal carbonilo en C9'' y C8.

## Producto 4902

cis-10-(cinamoiloxi) oleosido metil éster (cis jasmínosido)



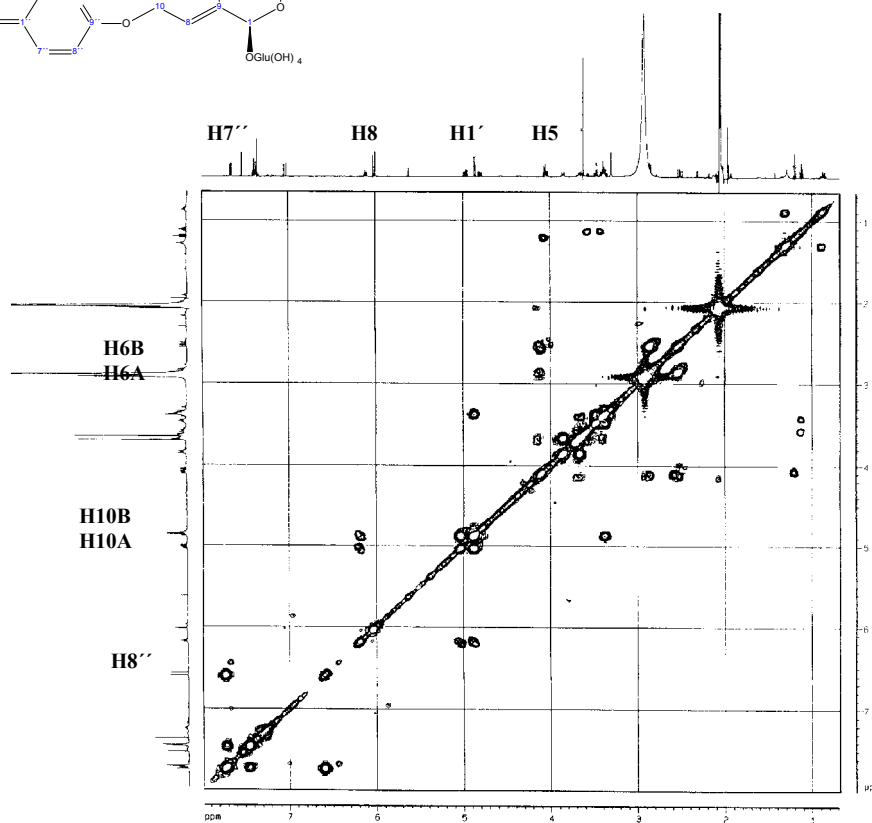
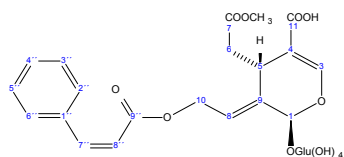
El producto *4902* fue identificado como un secoiridoide del mismo tipo que el Jasmínosido (*4901*) con un espectro **RMN  $^1\text{H}$**  casi superponible con la única diferencia considerable de las señales de los protones vinílicos.



ppm

Espectro RMN <sup>13</sup>C

El experimento COSY permite confirmar las posiciones de los protones.



Experimento COSY



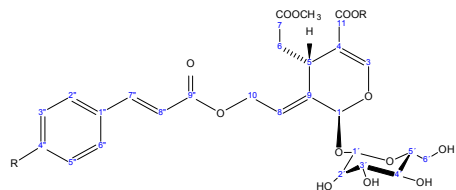


Tabla 14. RMN <sup>1</sup>H de los compuestos 4901, 4902, 4953, 4954, y 4952.

H	4901	4902	4953	4954	4952		
1	6.00s	5.99s	5.98s	5.97s	6.02s		
3	7.52s	7.44s	7.54s	7.54s	7.51s		
5	4.07dd (3.7,10.1)	4.01dd (3.8,10.2)	4.08m	4.08m	4.10dd (3.9,10.0)		
6A	2.51dd (9.9,15.0)	2.49dd (10.2,15.0)	2.52-2.57	2.52-2.57	2.53dd (15.0,10.0)		
6B	2.88dd (3.9,15.0)	2.86dd (3.8,15.0)	2.75-2.85	2.75-2.85	2.84dd (3.9,15.0)		
8	6.21t(6.0)	6.10t(6.0)	6.18t(6.1)	6.14t(6.1)	6.17t(6.2)		
10A	4.85d (7.8)	4.77ddd (1.6,6,15.0)	4.90m	4.90m	4.89m		
10B	4.93m	4.93dd (7.8,15.0)			5.02dd (7.8,13.5)		
1'		4.85d (7.7)	4.73 (bajo MeOH)	4.73 (bajo MeOH)	4.86d (7.6)		
2'	3.46-3.31		} 3.30-4.50	} 3.30-4.50			
3'		3.48-3.37					3.46-3.33
4'							
5'							
6' A	3.83dd (2.1,10)	3.62dd (5.6,10.6)					3.85-3.82m
6' B	4.07dd (3.7,10)	3.82dd (1.6,10.6)			3.62m		
2''+6''	7.68m	7.65m	7.45d (8.7)	7.58d (8.7)	7.70m		
3''+4''+5''	7.41-7.43	7.39-7.32	6.80d (8.7)	6.76d (8.7)	7.46m		
7''	7.68d (16.0)	7.03d (12.7)	7.61d (16.0)	6.86d (12.8)	7.70d (16.1)		
8''	6.56d (16.0)	6.01d (12.7)	6.31d (16.0)	6.30d (12.8)	6.58d(16.1)		
CH <sub>3</sub> CO-7	3.62s	3.61s	3.72s	3.71s	3.64s		
CH <sub>3</sub> CO-11			3.63s	3.67s	3.82s		

Los espectros 4902, 4953, 4954, y 4952 se midieron en CD<sub>3</sub>OD. El espectro 4901 se midió en (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO.

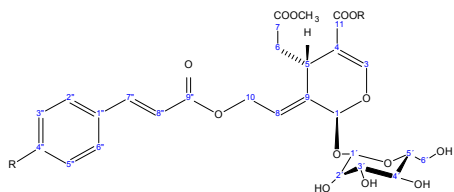


Tabla 15. RMN <sup>13</sup>C de los compuestos 4901, 4902, 4953, 4954, y 4952.

C	4901	4902	4953	4954	4952
1	94.2	92.7	94.2	94.2	93.8
3	154.8	153.1	153.9	153.9	154.4
4	109.2	108.3	110.0	110.0	109.0
5	32.4	31.3	33.0	33.0	32.3
6	40.8	31.4	41.1	41.1	40.4
7	173.2	172.0	173.7	173.7	173.0
8	124.2	122.6	124.0	124.0	123.9
9	134.1	133.0	135.0	135.0	133.8
10	61.9	60.3	62.0	62.0	61.5
11	169.4	166.0	167.6	167.6	167.6
1'	100.8	99.7	101.0	101.0	100.7
2'	74.6	74.0	74.9	74.9	74.0
3'	78.3	77.1	78.6	78.6	78.2
4'	71.3	70.4	71.6	71.6	71.4
5'	77.7	76.9	78.0	78.0	77.9
6'	62.6	61.8	62.8	62.8	62.8
1''	135.5	132.3	127.2	127.7	135.4
2''+6''	129.8	129.8	131.3	133.8	131.3
3''+5''	129.1	127.9	117.0	116.1	129.0
4''	131.4	128.9	161.4	160.2	129.8
7''	146.4	142.5	145.2	146.7	145.9
8''	118.5	119.1	116.6	118.8	118.7
9''	168.1	165.5	168.4	168.9	167.6
CH <sub>3</sub> CO-7	52.3	51.0			51.6
CH <sub>3</sub> CO-11					51.9

Los espectros se midieron en CD<sub>3</sub>OD.



## Producto 4952

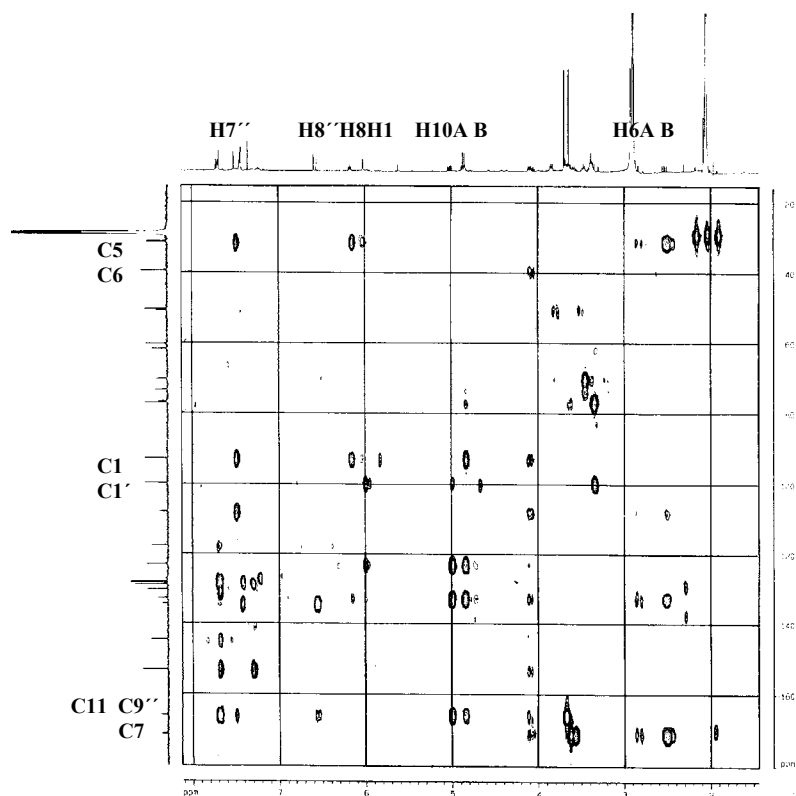
trans-10-(cinamoiloxi) oleosido dimetil éster (metil jasminosido)



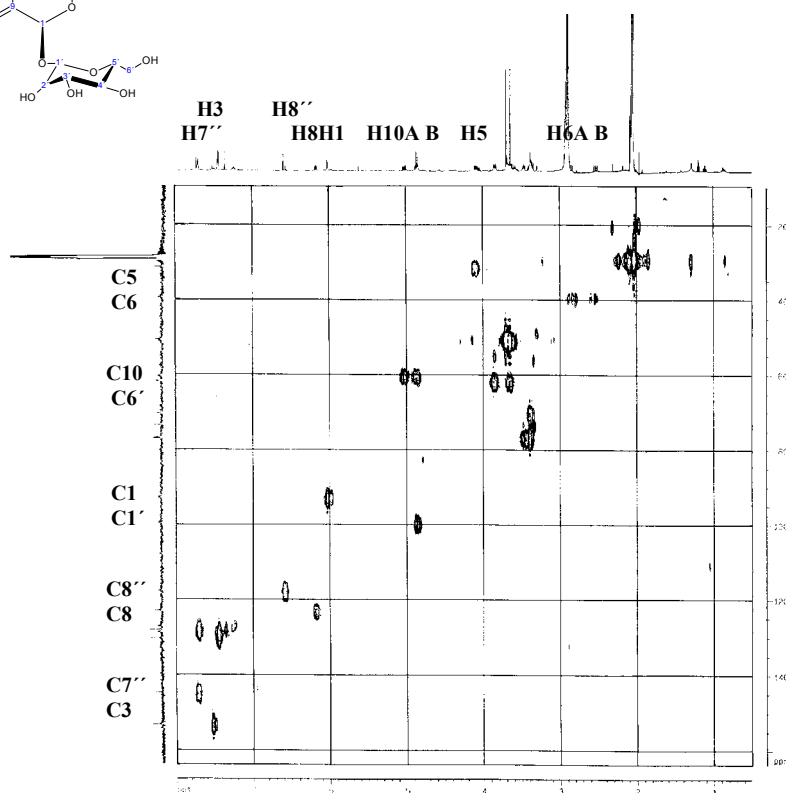
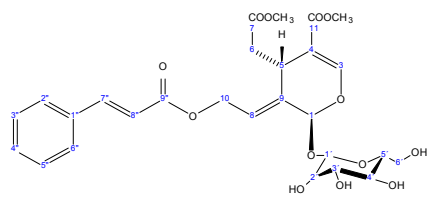
El espectro **RMN <sup>1</sup>H** del compuesto muestra dos singletes en 7.51 y 6.02δ que se consideran característicos de los secoiridoides, siendo asignados a el protón H-3 y el a el protón de tipo acetal H1.

El espectro **COSY** muestra señales en 4.89 y 5.02δ, como un multiplete y un doble doblete, respectivamente, atribuidos a los protones metilénicos en C-10 acoplados cada uno con el otro y ambos con la señal en 6.17δ, asignada a H-8.

El H-8 se estableció por una correlación con C-5 y C-1 en el experimento **HMBC**. Una correlación en el espectro **HMBC** entre H-10 y los dobletes de el sistema vinílico en 7.70 y 6.58δ con la señal del carbono carbonilo en C-9'' en 167.6δ, el cual muestra que este último valor era accounting tanto para C-9'' y el C-11. Del mismo modo, este espectro muestra una correlación entre el grupo metileno en C-6 y la señal metil éster en 3.64 con el carbono carbonilo en δ 173.0, el cual definitivamente establece la señal química para todos estos grupos. En 4.86δ un doblete integra para un protón, oculto con una de las señales de los protones H-10, que fue asignado a H-1' del resto glucosil en C-1 el cual en el espectro **COSY**, estaba conectado con una serie de señales entre 3.85 y 3.33δ del mismo resto carbohidrato. El espectro **RMN <sup>1</sup>H** del derivado acetilado **4952a** (Tabla 16) muestra una alta resolución en la zona de resonancia de estos protones los cuales, junto con un pico en 331 m/z en MS del derivado acetilado, permite establecer esta parte de la molécula como un resto glucosilo. Por otro lado la acetilación y metilación del Jasminosido coincide perfectamente con **4952a** dio, el cual definitivamente confirma la estructura.



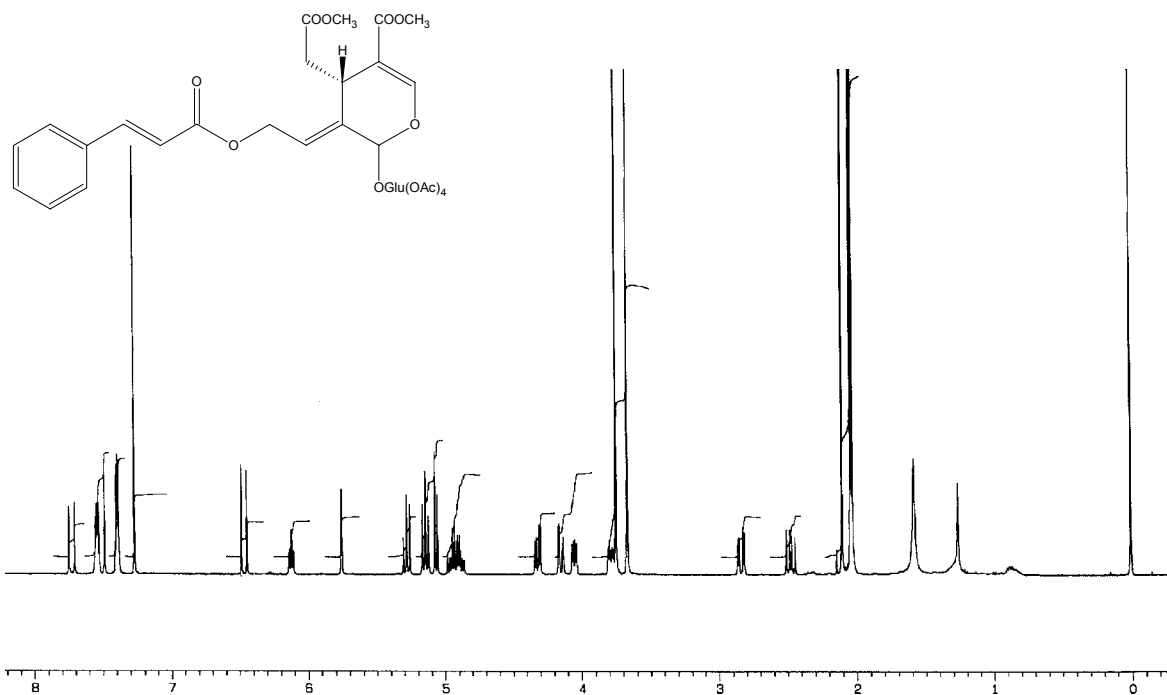
Experimento HMBC



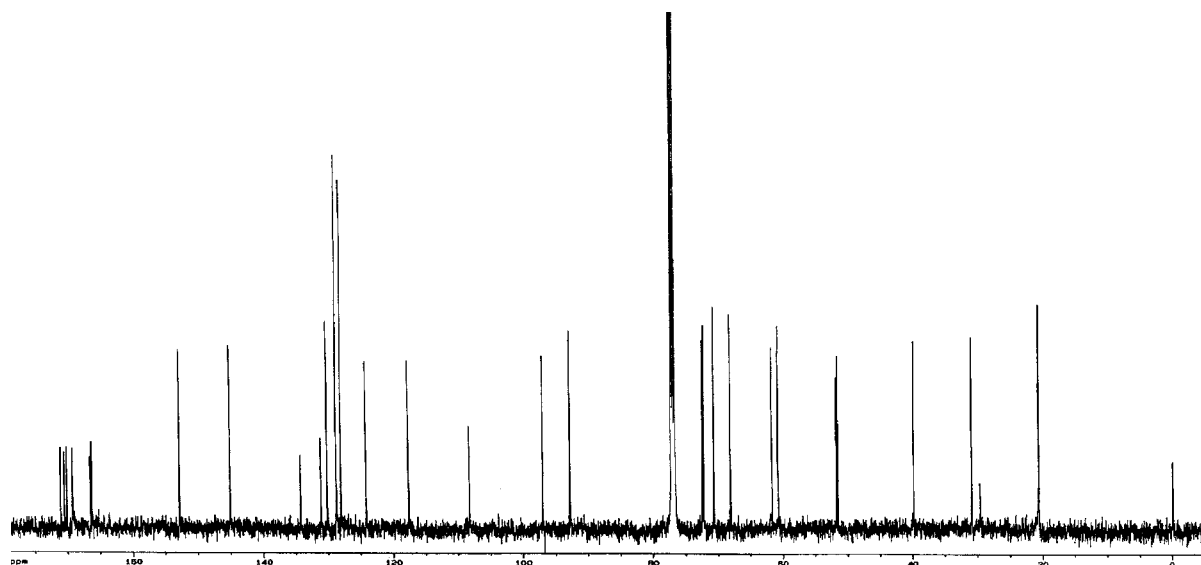
Experimento HMQC

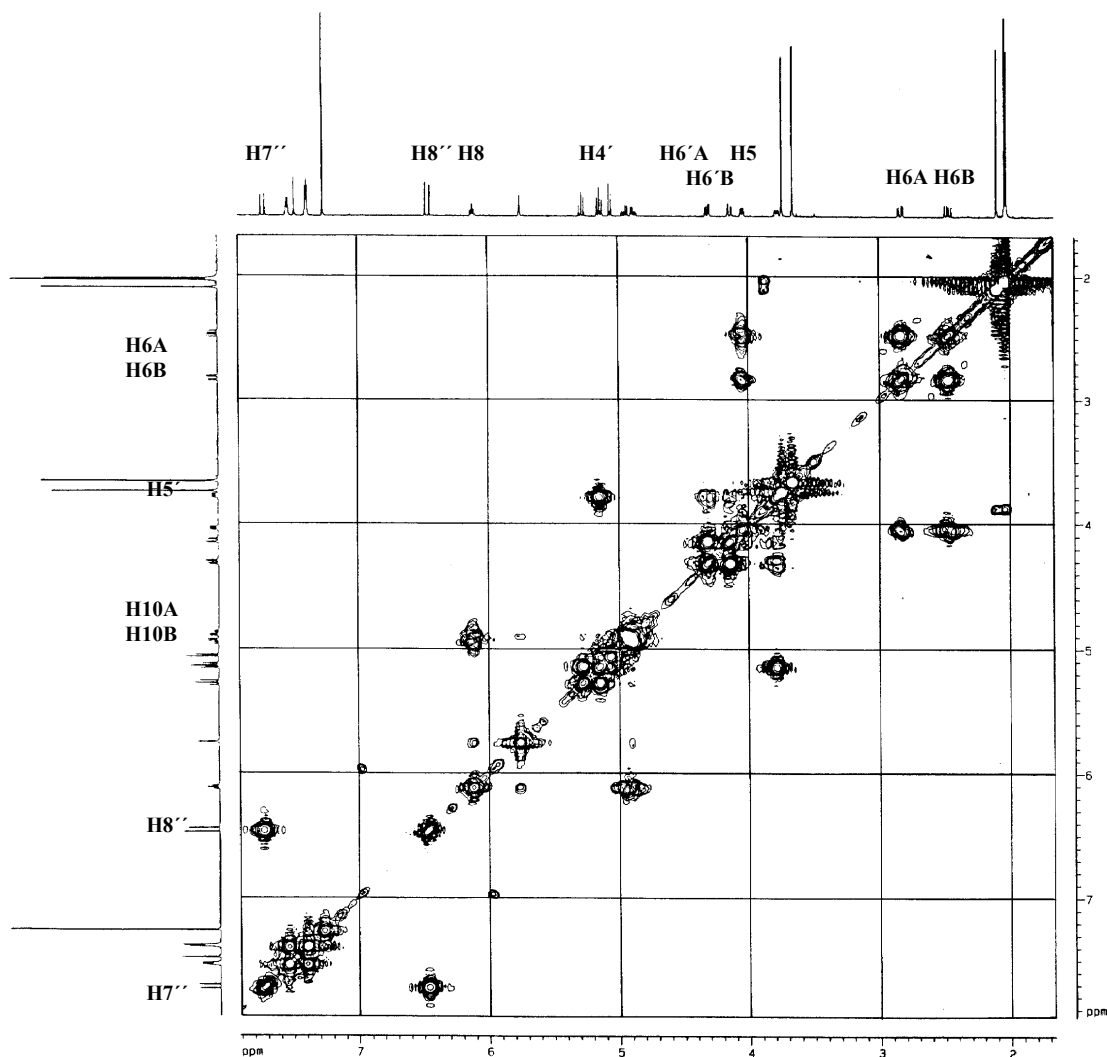
**Producto 4952a**

10-trans-(cinamoiloxi)-2',3',4',6'-O-tetracetiloleosido dimetil éster.

*ppm*Espectro RMN <sup>1</sup>H

Este tetraacetato obtenido previamente por metilación y acetilación del Jasminosido (4901) presenta espectros RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C superponibles con los publicados y permite confirmar la estructura del nuevo secoiridoide natural 4952, fuente para su acetilación.

*ppm*Espectro RMN <sup>13</sup>C



Experimento COSY

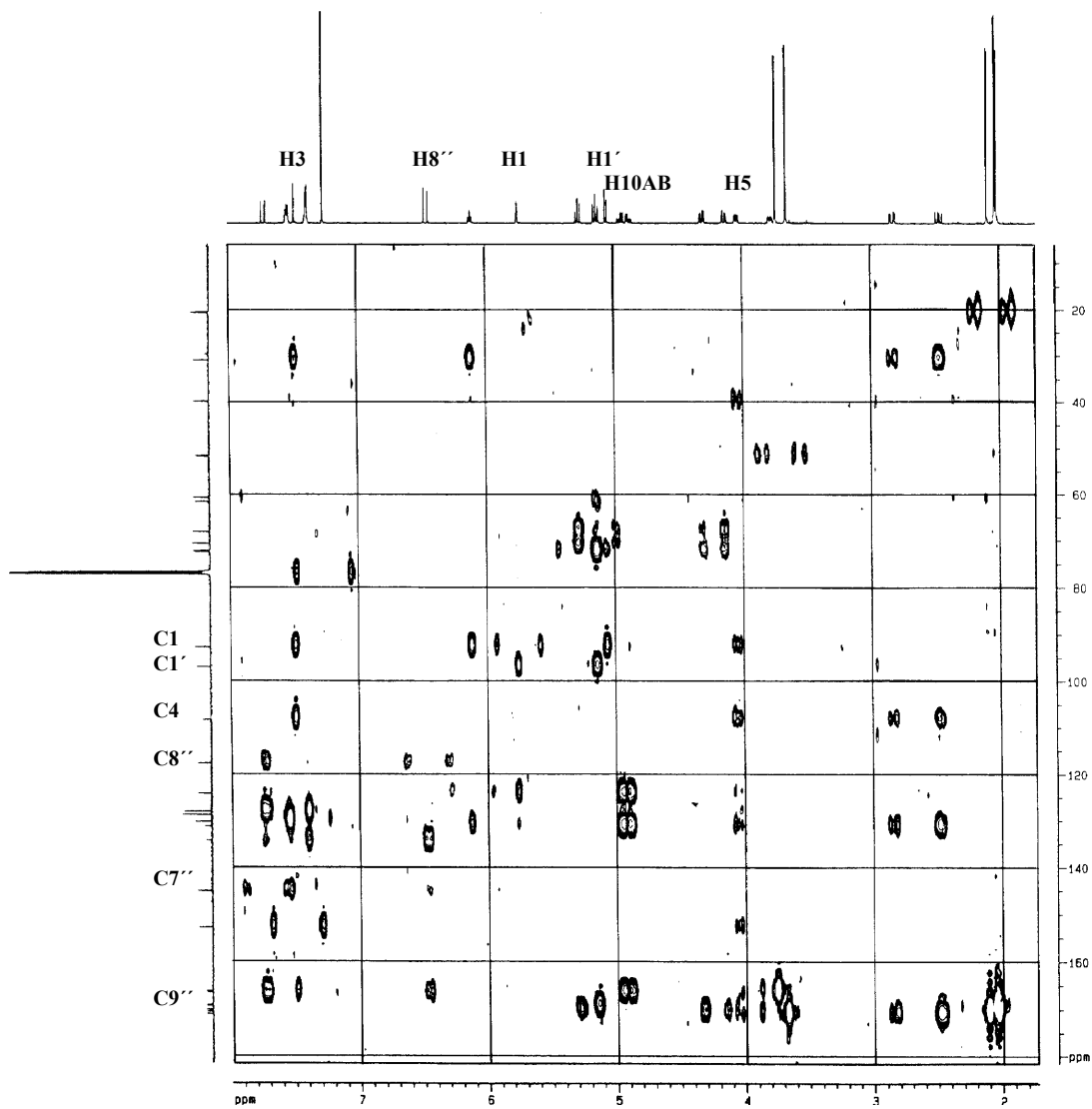
En el experimento **COSY** se pueden apreciar claramente las relaciones de los protones que forman la estructura central 10-OH oleosido dimetil éster. Los protones metilénicos H10 influenciados por el resto cinamoilo y el protón H8, y los protones H6 entre si y con el protón H5.

También nos permite confirmar la posición del protón H5' por su relación con las señales H4' y H6' AB del mismo resto glucosilo.

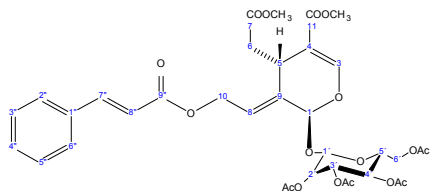
Las relaciones entre los protones vinílicos del resto cinamoilo destacan en las zonas bajas del espectro.

Las relaciones entre el carbono C1' y el protón H1 del núcleo secoiridoide, o la relación C1-H1', visibles en el experimento **HMBC** nos confirman la estructura de esta familia de secoiridoide glucosilados. En cuanto a la posición del resto cinamoilo destacan las relaciones entre el carbono carboxilo C9'' y los protones H10 por un lado, y el protón H8'' por otro. Las relaciones se continúan entre esta última posición y la 7'' (C7'' y H8'', C8'' y H7'').

Y la posición C4 aparece más clara por sus relaciones con H3 y H5.



Experimento HMBC



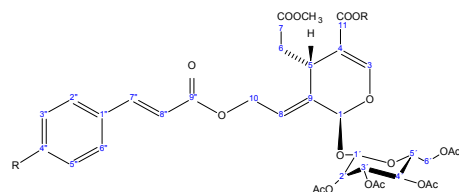


Tabla 16. RMN <sup>1</sup>H de los compuestos 4901a, 4953a, 4954a, y 4952a.

H	4901a	4953a	4954a	4952a
1	5.94s	5.75s	5.72s	5.76s
3	7.51s	7.48s	7.46s	7.48s
5	4.04-4.09	4.04dd (9.3,4.1)	4.00dd (9.3,4.1)	4.05dd (5.1,11.7)
6A	2.52dd (15.2,10)	2.46dd (15.2,9.3)	2.43dd (15.2,9.3)	2.47dd (15.2, 9.6)
6B	2.88dd (15.2,3.8)	2.83dd (15.2,4.1)	2.80dd (15.2,4.1)	2.83dd (15.2, 5.1)
8	6.09t(6.2)	6.11t(6.2)	6.05t(6.2)	6.12t(6.2)
10A	4.85dd (13.1,5.8)	4.88dd (13.8,6.2)	4.79dd (13.8,6.2)	4.87ddd (1.3,6.4,13.2)
10B	5.00dd (13.1,7.5)	4.94dd (13.8,6.2)	4.88dd (13.8,6.2)	4.95dd (7.1,13.2)
1'	5.29d (7.9)	5.05d (7.8)	5.04d (7.8)	5.06d (7.7)
2'	5.09t(9.8)	5.13t(8.8)	5.13m	5.14t(8.3)
3'	5.35t(9.5)	5.27t(6.2)	5.27t(9.3)	5.28t(9.2)
4'	5.09t(9.8)	5.13t(8.8)	5.13m	5.14t(8.3)
5'	4.04-4.09	3.80-3.75m	3.79-3.76m	3.80-3.76m
6' A	4.14dd (12.8,2.5)	4.14dd (12.4,2.3)	4.14dd (12.4,2.3)	4.14dd (12.3,2.3)
6' B	4.31dd (12.8,4.2)	4.31dd (12.4,4.7)	4.31dd (12.4,4.7)	4.31dd (12.3,4.7)
2"+6"	7.71-7.67	7.54d (8.8)	7.67d (8.8)	7.55-7.52
3"+4"+5"	7.41-7.44	7.10d (8.8)	7.09d (8.8)	7.39-7.38
7"	7.69d (16.0)	7.69d (16.0)	6.91d (12.8)	7.72d (16.0)
8"	6.57d (16.0)	6.40d (16.0)	5.96d (12.8)	6.43d(16.0)
CH <sub>3</sub> CO-7	3.62s	3.65s	3.63s	3.66s
CH <sub>3</sub> CO-11		3.74s	3.73s	3.74s
OCO-CH3	1.94,1.98,2.01,2.02s	2.01,2.02,2.03,2.09,2.31s	2.01,2.02,2.03,2.08,2.31s	2.09,2.05,2.02s

Los espectros 4953a, 4954a, y 4952a se midieron en CDCl<sub>3</sub>. El espectro 4901a se midió en (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO.

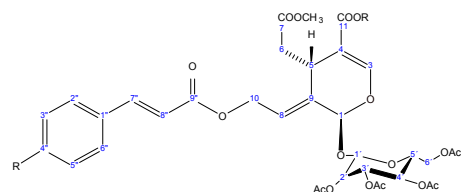


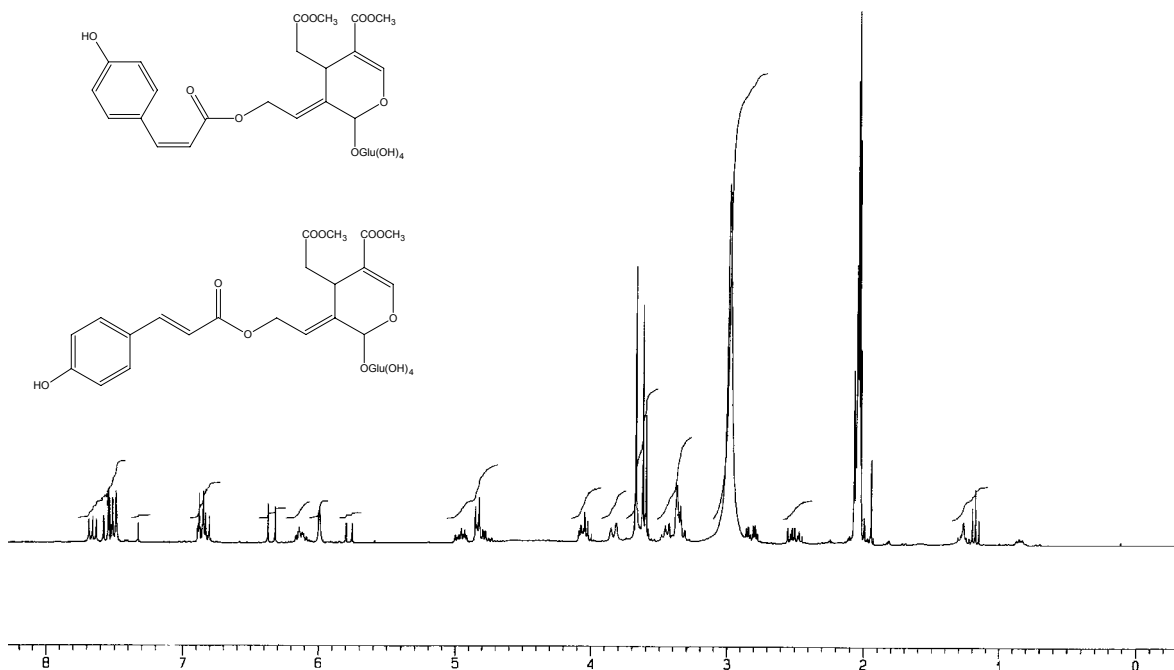
Tabla 17. RMN  $^{13}\text{C}$  de los compuestos 4901a, 4953a, 4954a, y 4952a.

C	4953a	4954a	4952a
1	92.8	92.8	92.7
3	152.9	152.9	152.8
4	108.3	108.3	108.3
5	30.9	30.9	30.8
6	39.9	40.0	39.8
7	171.1	171.0	171.0
8	124.2	124.0	124.2
9	131.3	131.4	131.2
10	60.7	60.5	60.6
11	166.3	166.3	166.3
1'	97.0	97.0	96.9
2'	72.2	70.7	70.6
3'	72.4	72.5	72.2
4'	68.1	68.2	68.1
5'	72.4	72.2	72.4
6'	61.6	61.7	61.6
1''	132.1	132.2	134.3
2''+6''	129.3	131.4	128.8
3''+5''	122.1	121.2	128.0
4''	152.1	151.2	130.2
7''	144.0	142.8	145.1
8''	117.9	119.1	117.6
9''	166.4	165.5	166.5
CH <sub>3</sub> CO-7			51.5
CH <sub>3</sub> CO-11			51.7
OCO-CH3	170.6,170.1,169.3,169.2,169.1	169.1,169.2,169.3,170.1,170.5	170.5,170.1,169.3,169.2
OCO-CH3	20.4,20.5,20.6,21.1	20.5,20.5,20.6,21.1	20.6,20.5,20.4

Los espectros 4953a, 4954a, y 4952a se midieron en CDCl<sub>3</sub>.

## Producto 4953/4954

10-cis/trans-(p-cumaroiloxi)-oleosido dimetil éster.



ppm

Espectro RMN  $^1\text{H}$ 

Los glucósidos *4953* y *4954* aparecen como isómeros geométricos con una fórmula molecular  $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$ . Estos compuestos que fueron separados por HPLC preparativo con  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  pero la inyección inmediata de las fracciones correspondientes en HPLC analítico proporciona de nuevo la mezcla de ambos productos indicando un equilibrio entre los dos compuestos. Tanto la evaporación del solvente como su liofilización proporciona la mezcla. Los intentos de separación por HPLC fase normal proporcionan un único pico que no se resuelve con las diferentes fases móviles.

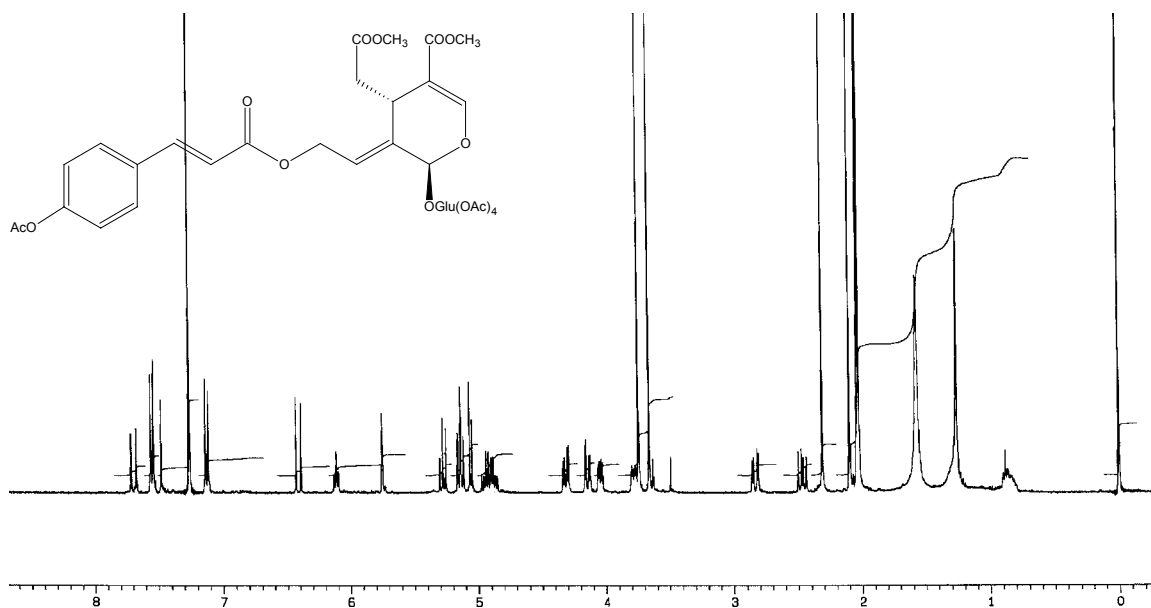
Los espectros RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  muestran las señales características de un secoiridoide 6' O acilado. Un protón H1 (*4953*: 5.98 $\delta$  y *4954*: 5.97 $\delta$ ) en forma de singlete o el H3 (7.54 $\delta$ ) y el triplete H8 (*4953*: 6.18 $\delta$  J=6.1Hz y *4954*: 6.14 $\delta$  J=7.8Hz). Adicionalmente aparecen las señales correspondientes a restos trans y cis cumariloil; un par de dobletes de protones oleofínicos (*4953*: 6.31, 7.61 $\delta$  J=16.0Hz y *4954*: 6.30, 6.86 $\delta$  J=12.8Hz) y un sistema spin aromático AA'BB' (*4953*: 6.80, 7.45 $\delta$  y *4954*: 6.76, 7.58 $\delta$ ). La presencia del resto p-cumaroilo también se muestra en su espectro Uvmax (300, 312nm)

Para realizar un estudio más detallado se somete a la mezcla a acetilación para dar los correspondientes acetatos (*4953a* y *4954a*) solo separables por HPLC fase reversa.



**Producto 4953a**

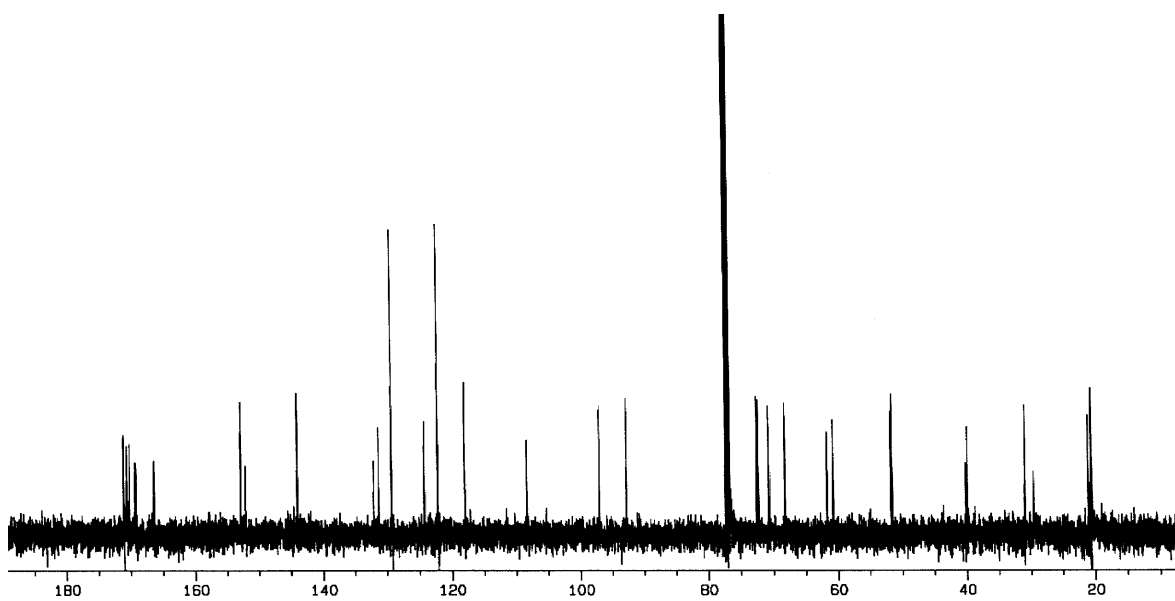
10-trans-(p-cumaroiloxi)-2',3',4',6',4''-O-pentacetiloleosido dimetil éster.



*ppm*

**Espectro RMN <sup>1</sup>H**

Como cabía esperar para este derivado acetilado, en su espectro **RMN <sup>1</sup>H** aparecen las señales típicas de un secoiridoide.



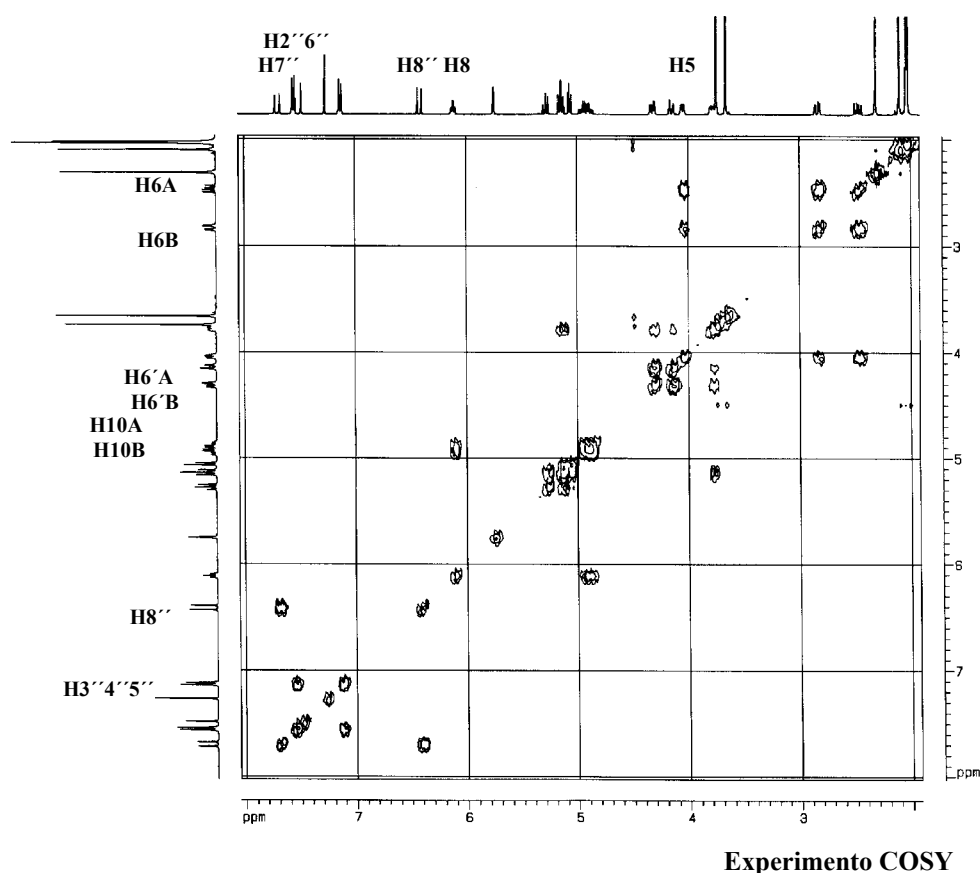
*ppm*

**Espectro RMN <sup>13</sup>C**

Un singlete en  $5.75\delta$  correspondiente al protón H1, otro singlete a  $7.48\delta$  correspondiente al protón H3 y un triplete en  $6.11\delta$  correspondiente al protón H8, y dos dobles dobles a  $2.83$  y  $2.35\delta$  correspondientes a los protones H6A y H6B.

Otros datos de interés del espectro RMN  $^1\text{H}$  son la presencia de las señales correspondientes a grupos metoxilos en  $3.74$  y  $3.65\delta$ . Y las señales químicas en  $7.54$  y  $7.10\delta$ , aparecen como dobles dobles con una constante de acoplamiento de  $8.8$  Hz que integran para dos protones cada una. Estas señales junto con dos dobles dobles a  $7.64$  y  $6.4\delta$  ( $16.0$  Hz), con cada señal integrando para un protón, indican la presencia de un resto trans p-cumárico.

Un experimento **COSY** muestra una serie de señales entre  $5.27$  y  $5.05$  relacionadas entre si y con un multiplete en  $3.80$ - $3.75$  y dos dobles dobles  $4.31$  y  $4.14\delta$  que indican la presencia de un resto de glucosa.



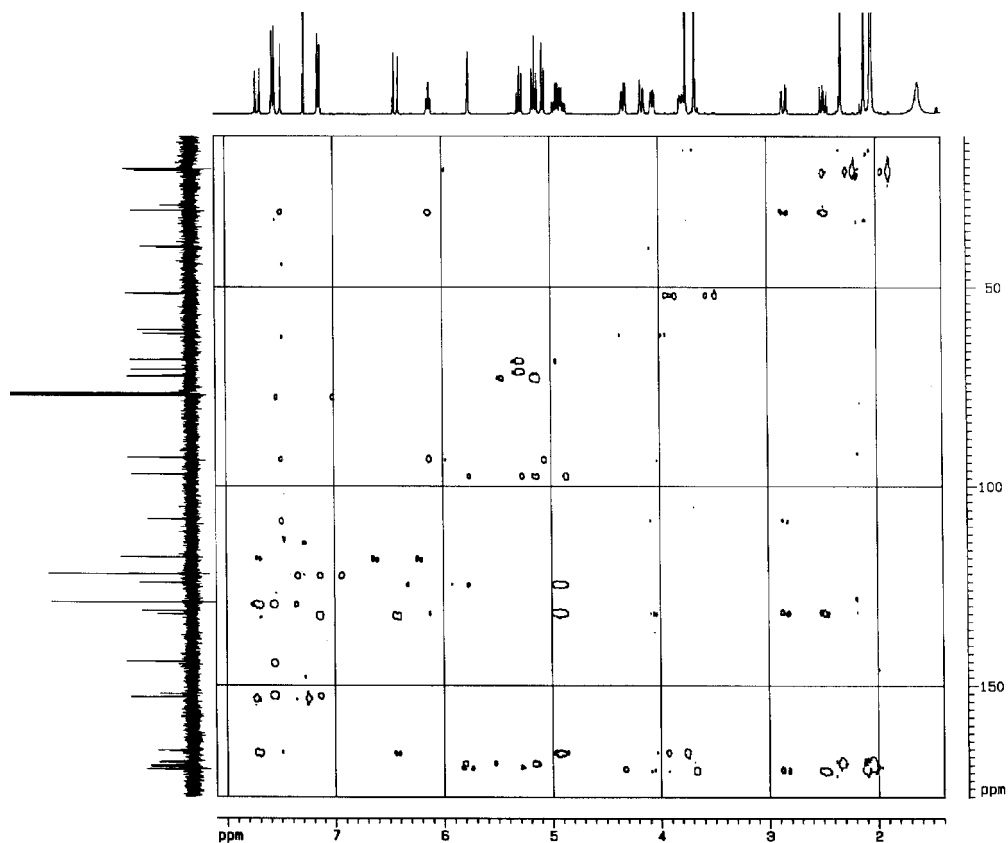
Todos los datos anteriores indican que estamos ante el pentaacetato de un derivado glucosilado del 10-hidroxioliosido dimetil éster, esterificado con un resto de p-cumárico.

También en el experimento **COSY** se aprecia una relación entre el triplete correspondiente al protón H8 y dos dobles dobles en  $4.94$  y  $4.88\delta$  que correspondería con los dos protones H10A y H10B.

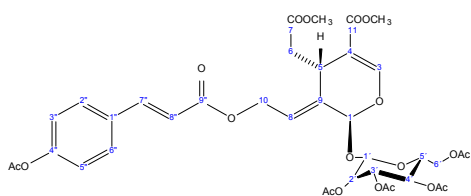
Otras relaciones de interés son las de dos dobles dobles H6A y H6B con un doble doblete a  $4.04\delta$  que correspondería con el protón H5.

También aparecen claramente las relaciones entre los protones atribuidos a un sistema AA'BB' en un grupo aromático para-sustituido, 7.54 y 7.10 $\delta$ . Y la señales a 7.69 y 6.40 $\delta$  de los protones 7'' y 8''.

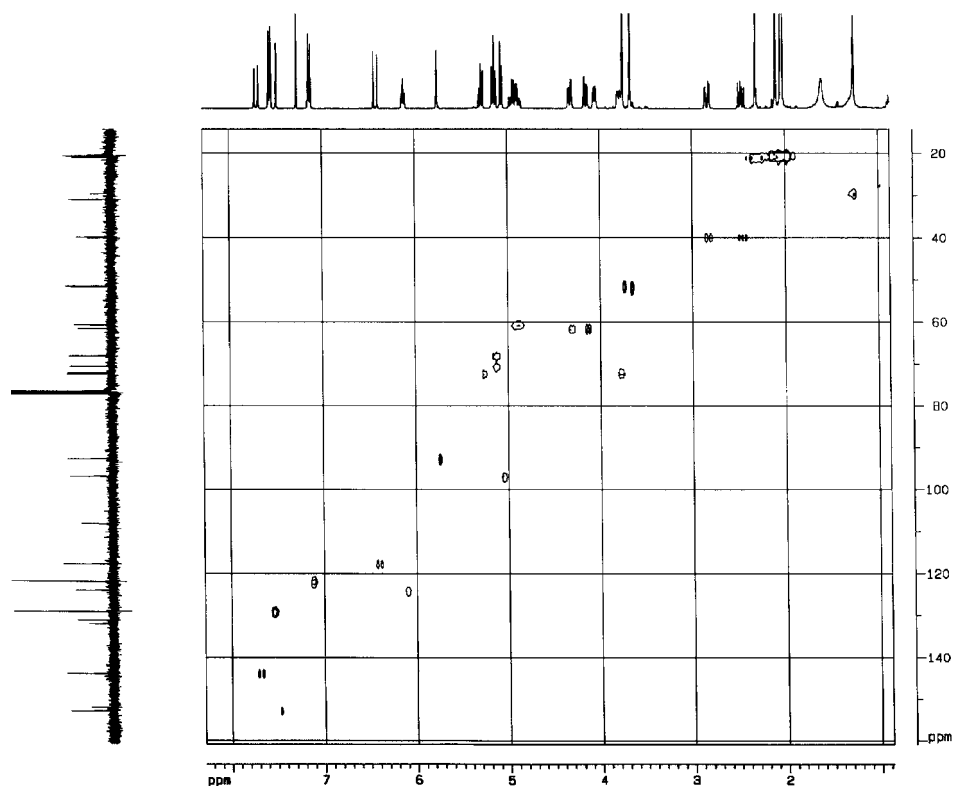
El experimento **HMBC** muestra correlaciones entre C8 (dos relaciones), C9 (tres relaciones) y señales 4.94 y 4.88, de acuerdo con un grupo metileno para C10. También se observa una correlación entre los protones metilénicos C10 y el carbono carbonilo C-9' estableciendo que el resto p-cumaroilo está unido al C10 y no al C6 del resto de glucosa.



Experimento HMBC



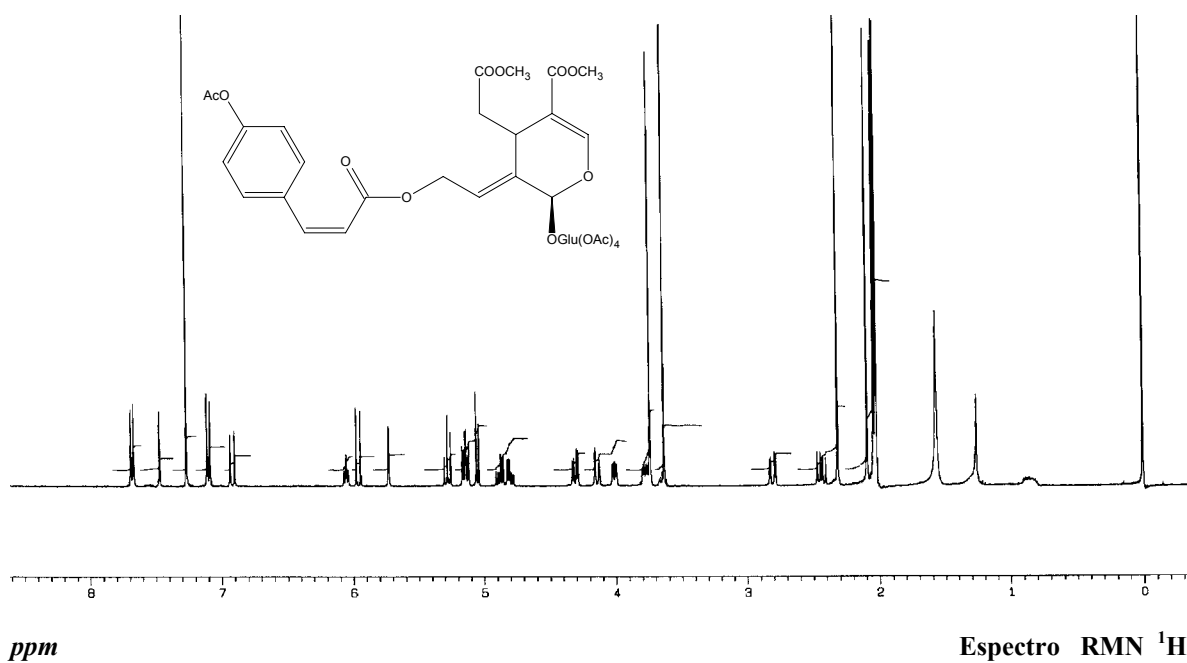
El experimento **HMQC** permitió asignar con mayor seguridad los valores de algunos carbonos que podrían presentar dudas. Como el caso del C3 en 159.9.



Experimento HMQC

## Producto 4954a

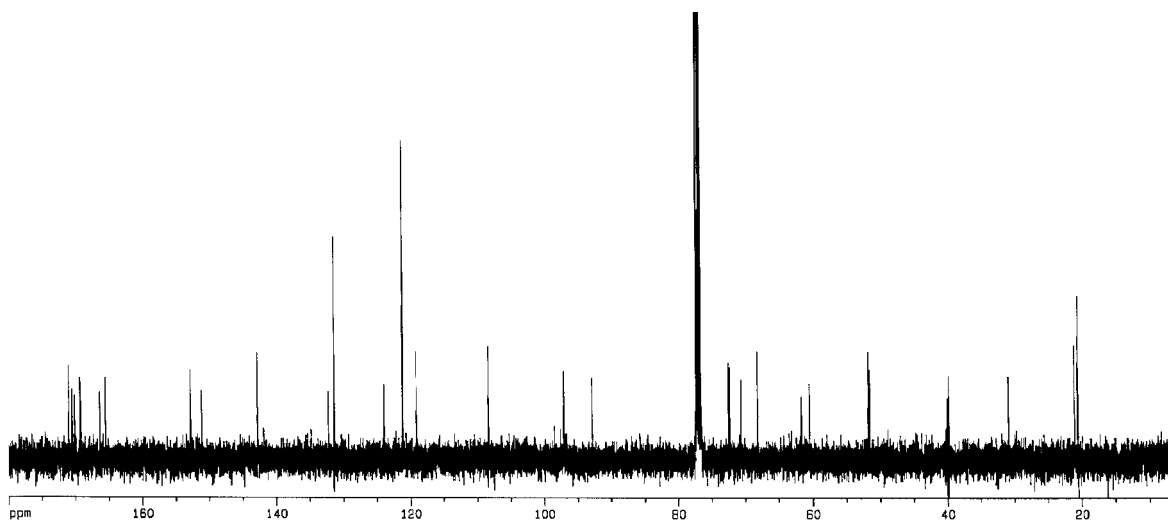
10-cis-(p-cumaroiloxi)-2',3',4',6',4''-O-pentacetiloleosido dimetil éster.



ppm

Espectro RMN  $^1\text{H}$

Como esperábamos los espectros RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  son muy similares a los del producto anterior, aunque los protones vinílicos del resto cumarilo presentan grandes diferencias ( $\delta$  6.91,  $\delta$  5.96) y una constante de acoplamiento de  $J=12.8$  indicativo de un resto cis-p-cumarilo.

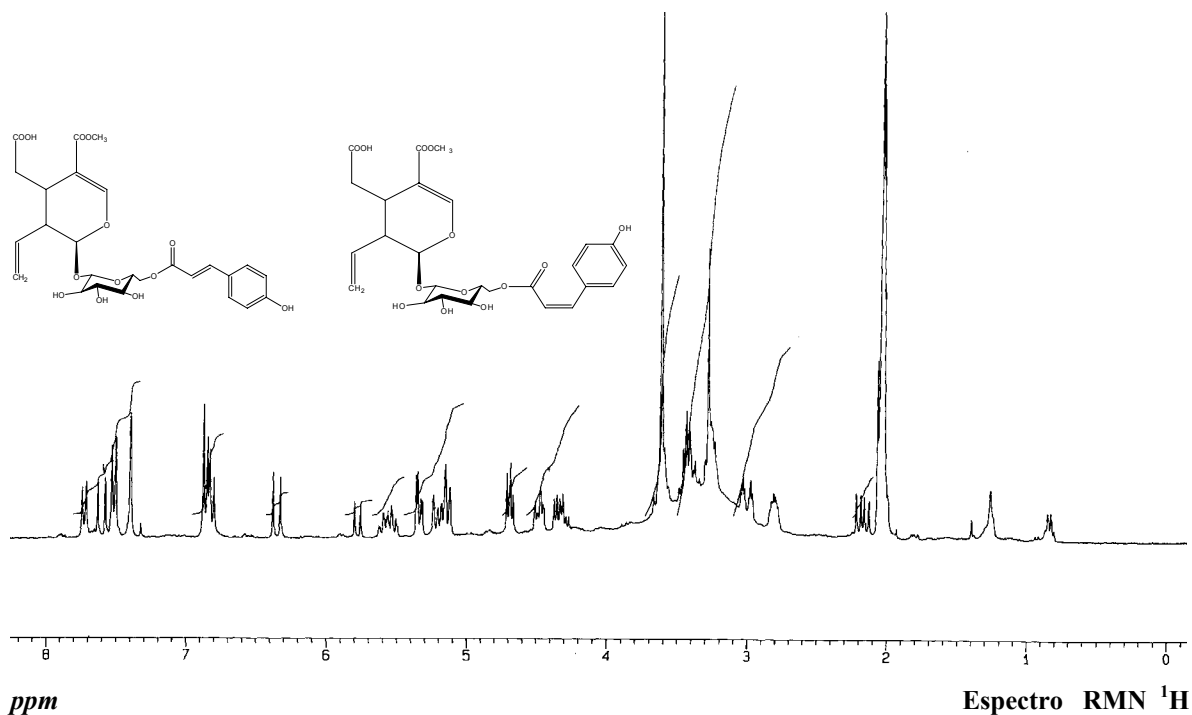


*ppm*

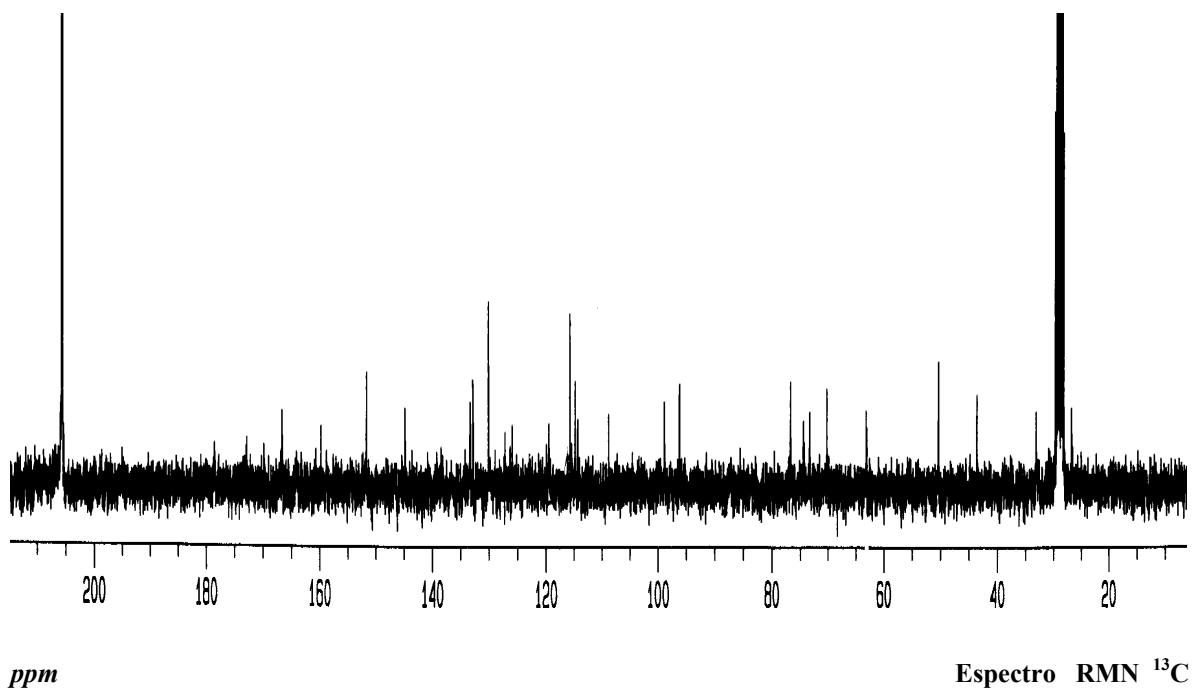
Espectro RMN  $^{13}\text{C}$

## Producto 3001/3002

6'-O-cis/trans-p-(cumaroiloxi) - secoxiloganina



De las fracciones polares del extracto de *Jasminum odoratissimum* se aísla un aceite por HPLC fase reversa en una proporción MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50), que en espectroscopía de masa FAB muestra el ión molecular m/z 550, al que le corresponde una fórmula molecular C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>O<sub>13</sub>.



## Descripción de los productos

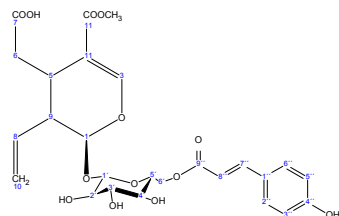


Tabla 18. RMN <sup>1</sup>H de los compuestos 3001,3002

H	3001	3002
1	5.36d (3.6)	5.33d (3.6)
3	7.40d (1.5)	7.40d (1.5)
5	3.29m	3.29m
6A	2.52-2.57	2.52-2.57
6B	2.75-2.85	2.75-2.85
8	5.55	5.55
9	2.80m	2.80m
10	5.24-5.10	5.24-5.10
1'	4.70d (7.8)	4.68d (7.5)
2''+6''	7.52d (8.4)	7.73d (8.7)
3''+4''+5''	6.89d (8.4)	6.82d (8.7)
7''	7.60d (15.9)	6.82d (12.9)
8''	6.35d (15.9)	5.78d (12.9)
CH <sub>3</sub> CO-7	3.62s	3.62s

Los espectros se midieron en (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO.

## Parte teórica

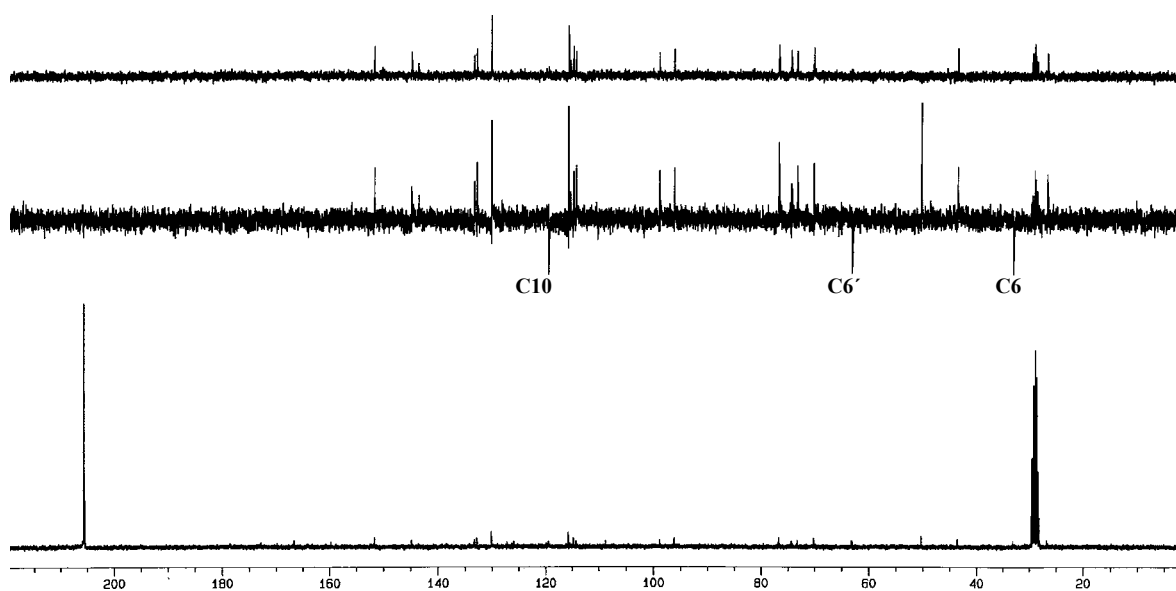
Tabla 19. RMN <sup>13</sup>C de los compuestos 3001,3002

C	3001	3002
1	96.2	96.2
3	151.7	151.7
4	108.8	108.8
5	26.8	26.8
6	33.1	33.1
7	178.5	178.5
8	132.8	133.3
9	43.6	43.6
10	119.5	119.5
11	172.8	172.8
1'	98.9	98.9
2'	73.3	73.3
3'	74.4	74.3
4'	70.2	70.2
5'	76.7	76.7
6'	63.2	63.1
1''	125.9	127.2
2''+6''	130.1	130.1
3''+5''	115.8	115.8
4''	159.8	159.8
7''	144.9	145.3
8''	114.8	114.4
9''	166.6	166.6
CH <sub>3</sub> CO-7	50.4	50.4

Los espectros se midieron en (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C

El espectro RMN  $^1\text{H}$  es muy similar al del secologanosido 7-metil ester aislado de *Osmanthus asiaticus* y la secoxiloganina aislada de *Syringa josikaea*,<sup>23</sup> con señales típicas de un iridoide, y señales de protones oleofínicos asignables a un grupo trans- y cis- p-cumaroilo, así como señales atribuibles a un resto de glucosa. Estos secoiridoide se obtuvieron como una mezcla de isómeros geométricos en equilibrio que en HPLC aparecen mal resueltos. La presencia de un solo un grupo metoxilo (3.62 $\delta$ ), el protón H1 en forma de doblete (5.21,5.26 $\delta$ ), el protón H8 inusualmente complejo y la ausencia de la señal en forma de doblete para grupos metilo típica de iridoide tipo oleosido, epikingísido o loganina, indican que el núcleo iridoide es el de un secoiridoide tipo secologanina.

Dicha estructura se confirma con el experimento DEPT que muestra la señal de un carbono metileno extra a valores altos (119.5 ppm) junto con las esperadas para los carbonos metilénicos C6 (33.1ppm) y C6' (63.2, 63.1ppm).



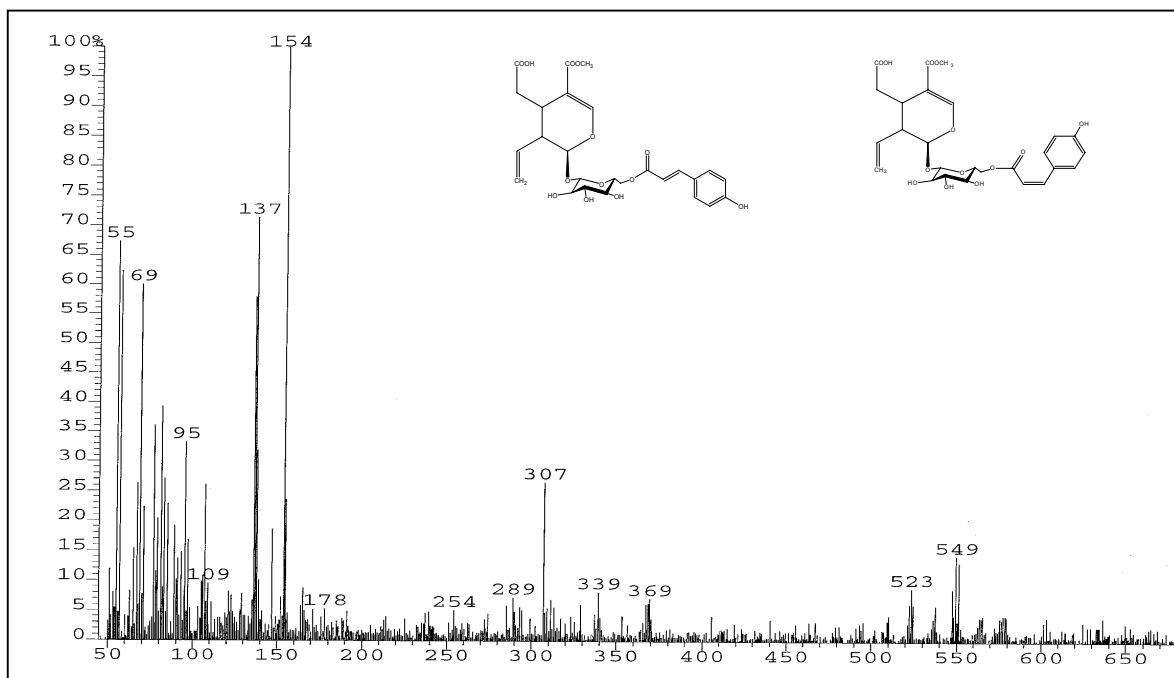
Experimento DEPT

La acetilación proporciona de nuevo una mezcla inseparable que muestra cuatro señales acetato, una de las cuales se encuentra a valores típicos de un acetato aromático, y un grupo carboxilo libre.

El espectro EM-FAB presenta un pico a  $m/z$  550 que coincide con la masa calculada del producto (550.465) y un grupo de fragmentos  $m/z$  entre 136 y 139 característicos de un fragmento con la posición C11 esterificada, muy habitual en este tipo de compuestos.

<sup>23</sup> Sugiyama M., Machida K., Matsuda N. y Masao K. (1993) *Phytochemistry* **34**(4), 1169

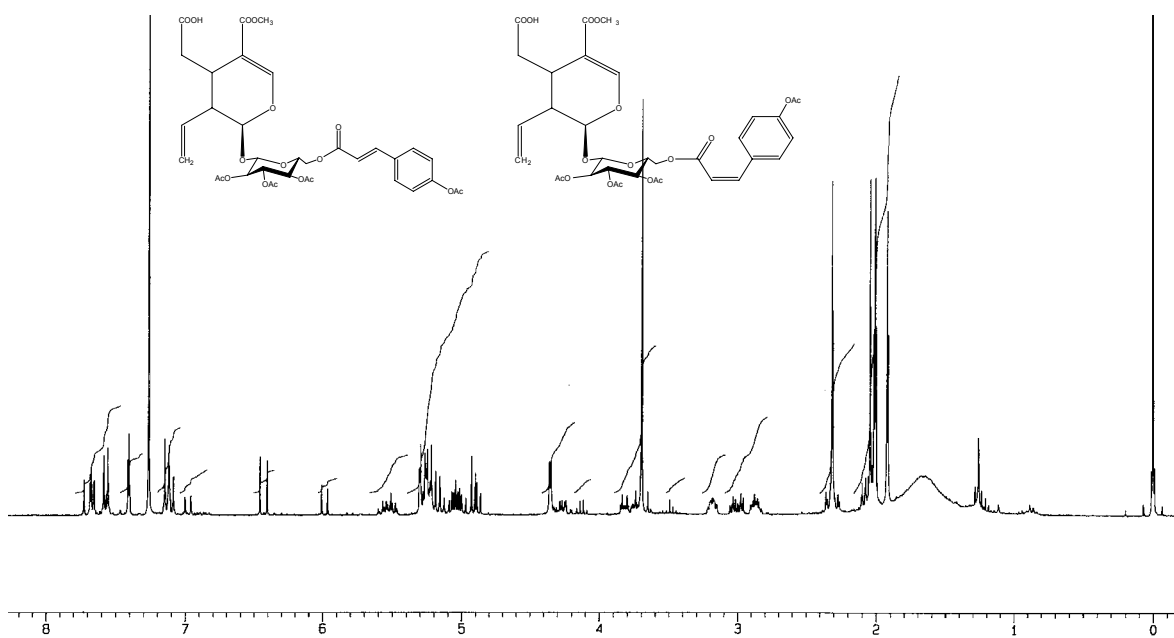




3001/3002 Espectro EM-FAB

Producto 3001a/3002a

6'-O-cis/trans-p-(cumaroiloxi) - secoxiloganina



ppm

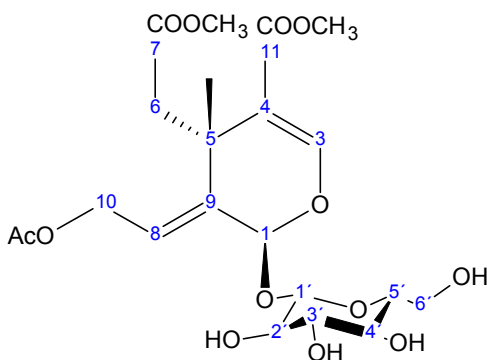
Espectro RMN <sup>1</sup>H

### Acetilación parcialmente regioselectiva del 10-acetoxioleosido dimetil éster (4951)

Uno de los objetivos del presente trabajo ha sido la puesta a punto de un método para la obtención de ésteres de acetilo en lugares específicos del anillo de glucosa de los secoiridoides obtenidos de *Jasminum odoratissimum*, con objeto de aumentar el rango de posibles actividades biológicas y llevando a cabo la correspondiente transesterificación en disolventes orgánicos con hidrolasas como catalizadores.

Desde el principio nos propusimos que este método debería reunir una serie de condiciones entre las cuales destaca la asequibilidad, tanto en el terreno económico como en el práctico, es decir, no tendría que suponer el uso de reactivos de coste medio o alto, ni precisaría de la adquisición de material que no estuviera en el laboratorio y no supondría el uso de tecnología fuera de su alcance. Además de ello la regioselectividad no debería ser demasiado precisa dentro de un determinado experimento, de tal manera que bajo una serie de condiciones se obtuvieran unos productos, fácilmente separables, en una cierta proporción, y bajo otras condiciones experimentales se obtuvieran otros.

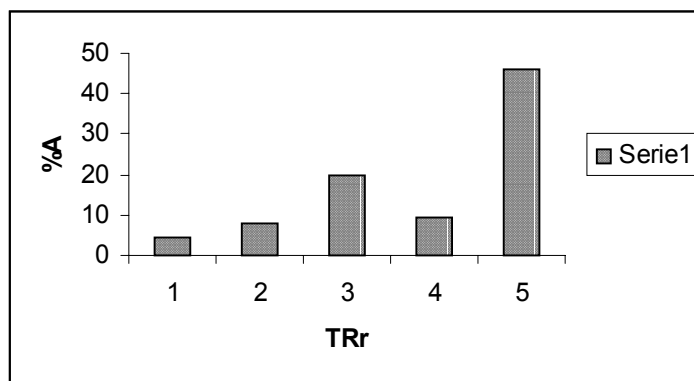
Así, en un experimento previo se incubaron 100 mg de (4951)



disueltos en 2.5 ml en TFH (seco sobre tamiz molecular de 3Å) con 0.15 ml de acetato de tricloroetilo, 0.05 ml de dimetilamina, y 200mg de pancreatina Sigma que se mantuvieron en suspensión. La mezcla se agitó a 39°C durante siete días y en mitad de este período se añadieron 0.1 ml de éster y 50mg de enzima adicionales. Al cabo de los siete días se centrifugó a 8000 rpm para eliminar la enzima y se separaron los componentes del sobrenadante por HPLC. Una representación del cromatograma aparece en la **Figura 7**.

El producto señalado como **5** en la **Figura 7** corresponde al producto de partida (4951) y el señalado como **3** coincide en sus datos espectroscópicos y constantes físicas con el obtenido de *Jasminum odoratissimum* y descrito en este trabajo (4955) (ver **pg. 198**). Así, en este caso la acetilación ha tenido lugar de manera específica en la posición 6' del anillo de glucosa.

En el espectro RMN  $^1\text{H}$  del producto señalado como **2** (4956) (ver **Tabla 20**) se observa el desplazamiento de un triplete en 4.96 $\delta$  que integra para un protón. En su espectro de **COSY** homonuclear se observa el acoplamiento del protón anomérico del anillo de glucosa con la señal del protón geminal a un nuevo grupo acetato. Asimismo aparece un singlete de tres protones de ese grupo acetato a 2.19 $\delta$ . Debe tratarse por lo tanto del 2' acetoxi derivado del producto de partida.



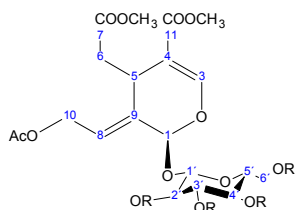
**Figura 1.** - Esquema de la separación por HPLC de los productos de reacción de transacetilación entre acetato de cloroetilo con el dimetil éster del 10-acetoxioleosido . TRr=tiempos de retención relativos. %A Porcentaje de área del pico.

En el espectro **RMN**  $^1\text{H}$  (ver **Tabla 20**) del producto señalado como **1** aparece una señal compleja sobre la señal del protón anomérico. Además se observa el desplazamiento con respecto al producto de partida de las señales correspondientes a los protones 6' A y 6' B. Este hecho nos indica que han entrado dos grupos acetilos en la molécula, dado que además aparecen dos singletes a 2.11 y 2.14 $\delta$ . Por tanto uno de los grupos acetilo se debe encontrar sobre la posición 6' del anillo de glucosa. La posición del otro grupo acetilo se puede deducir del estudio de su espectro **COSY** en el que se observa el acoplamiento entre la señal del protón anomérico y la señal del protón geminal a dicho acetato. Dicho grupo se encuentra por tanto en la posición 2' del anillo de glucosa. Se concluye que la acetilación ha tenido lugar en las posiciones 2' y 6'.

Por último el producto señalado como **4** se obtiene como una mezcla que no se ha logrado separar. En cualquier caso sus espectros de **RMN** señalan que se trata de un diacetato y que ha habido una acetilación en una posición distinta a la de los demás.

Como puede verse en el esquema del cromatograma los productos de la reacción son fácilmente separables aunque los rendimientos son relativamente bajos. La acetilación en 2', 6' puede tener lugar a partir de la acetilación en 6', dado que la cantidad de enzima que se incluye es suficientemente alta. Interesantemente la posición 3' del anillo de glucosa no se acetila. Este hecho puede achacarse a un efecto de orientación del sustrato sobre la enzima y sugiere que el grupo hidroxilo 3' quedaría más alejado del centro activo que el resto de los hidroxilos.

Una de las variables que introdujimos entonces fue la de modificar el grupo saliente del dador de acetilo. Pensando en la posibilidad de disminuir la reactividad del dador de acetilo, podría aumentarse la selectividad (ver **pg. 70, Parte Teórica**) de la acetilación, usamos simplemente acetato de etilo seco sobre tamiz molecular de 3Å .

Tabla 20. RMN <sup>1</sup>H de los compuestos 4951,4952,4953,4954

H	5 4951	3 4955	2 4956	1 4957
1	5.81s	5.75s	5.80s	5.71s
3	7.49s	7.48s	7.47s	7.46s
5	3.98dd (9.5,4.0)	4.02dd (9.5,4.0)	3.99dd (9.8,4.2)	3.98dd (9.5,4.0)
6A	2.43dd (14.6,9.4)	2.43dd (15.3,9.5)	2.45dd (14.8,9.8)	2.42dd (15.3,9.5)
6B	2.83dd (14.6,4.0)	2.83dd (15.3,9.5)	2.87dd (14.8,4.2)	2.87dd (15.3,4.0)
8	6.11t(6.5)	6.10t(6.0)	6.00t(6.5)	6.02t(6.2)
10A	4.78dd (13.2,6.5)	4.75dd (13.2,6.2)	4.71dd(13.5,5.8)	4.72dd(15.15,6.15)
10B	4.68m	4.88-4.82m	4.79dd(13.5,7.5)	4.79dd(15.15,7.77)
1'	4.85(7.5)d	4.83(7.8)d	4.89(7.7)d	4.96-4.90m
2'	3.70-3.40m	3.55-3.42m	3.70-3.65m	4.96-4.90m
3'	3.64 (bajo H1')	3.64 (bajo H1')	4.96t(9.33)	4.69t(8.1)
4'	3.55-3.42 m	3.55-3.42m	3.70-3.65m	4.48t(8.4)
5'	3.70-3.40 m	3.55-3.42m	3.49 m	3.51 m
6' A	3.80m	4.27dd (12.3,2.0)	3.81dd (12.1,5.3)	4.29dd (12.3,1.8)
6' B		4.51dd (12.3,4.3)	3.94dd (12.1,3.0)	4.49dd (12.3,4.1)
CH <sub>3</sub> CO-7	3.65s	3.62s	3.66s	3.64s
CH <sub>3</sub> CO-11	3.72s	3.74s	3.74s	3.73s
CH <sub>3</sub> -OAc	2.05s	2.07,2.13s	2.07,2.19s	2.07,2.11, 2.14s

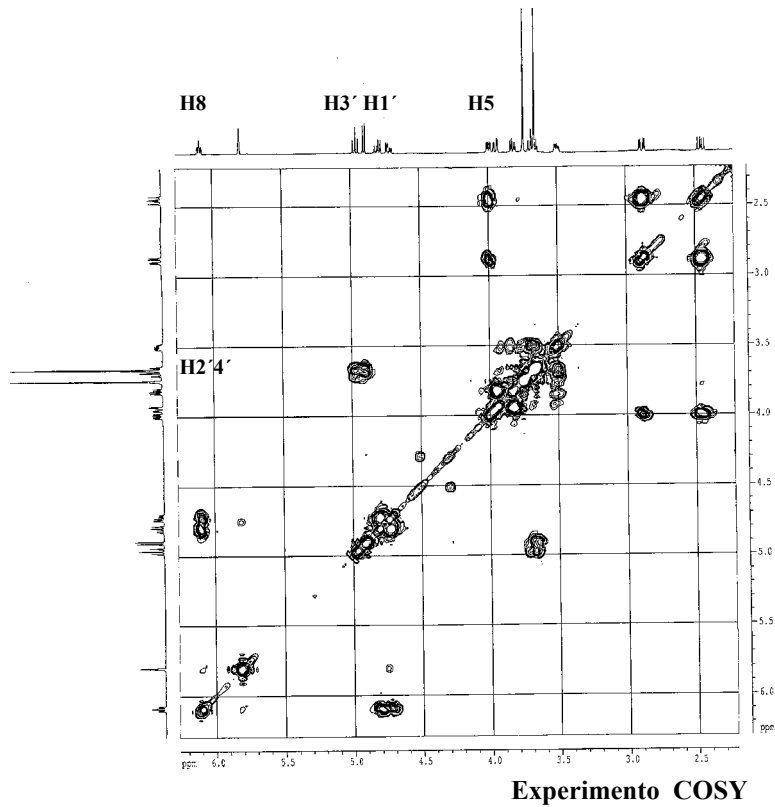
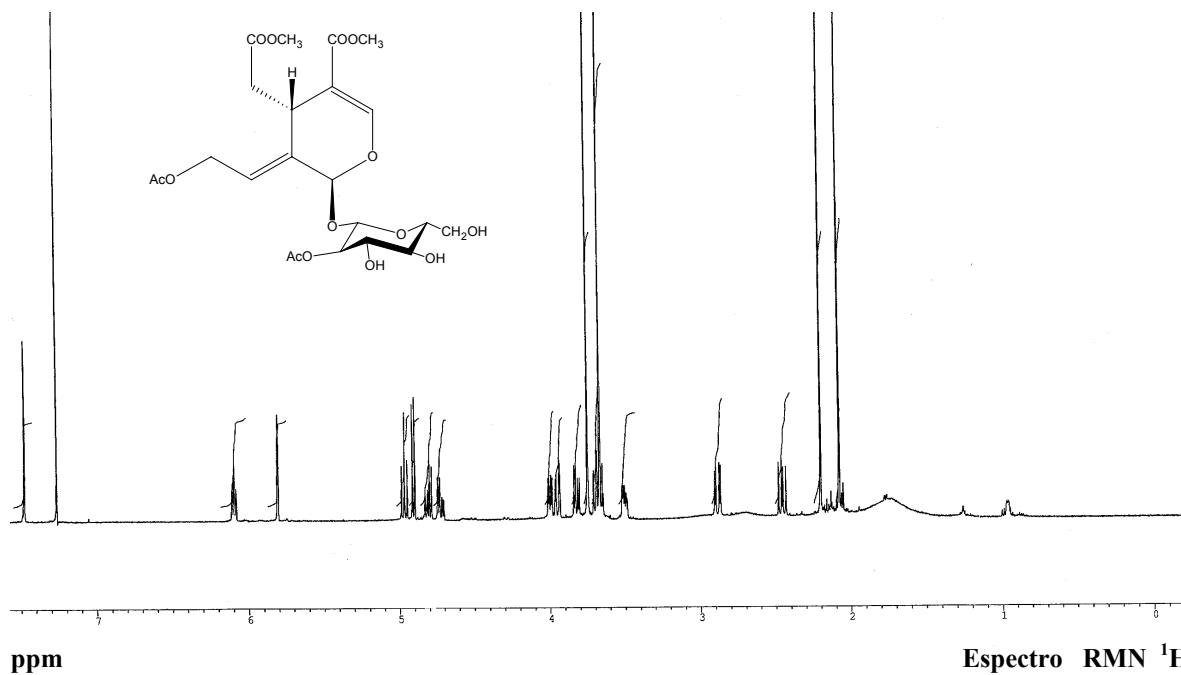
Los espectros 4951 se midió en CD<sub>3</sub>OD y los espectros 4952,4953,4954 en CDCl<sub>3</sub>

Éste serviría tanto de disolvente como de reactivo, de tal manera que la transesterificación estuviera única y exclusivamente catalizada por la enzima y se aumentaba de manera considerable la sencillez de la operación.

Se hicieron una serie de experimentos, utilizando proporciones variables sistrato/AcOEt/enzima, y se siguió el curso de la reacción por HPLC a lo largo de 9 días, inyectando alícuotas a diferentes tiempos: Aunque en los primeros días puede verse la exclusiva formación del producto acetilado en 6', el resultado final es idéntico al representado en el cromatograma esquematizado en la **Figura 7**. Es decir la naturaleza del grupo saliente no parece tener ninguna influencia, en este caso, sobre la regioselectividad de la reacción.

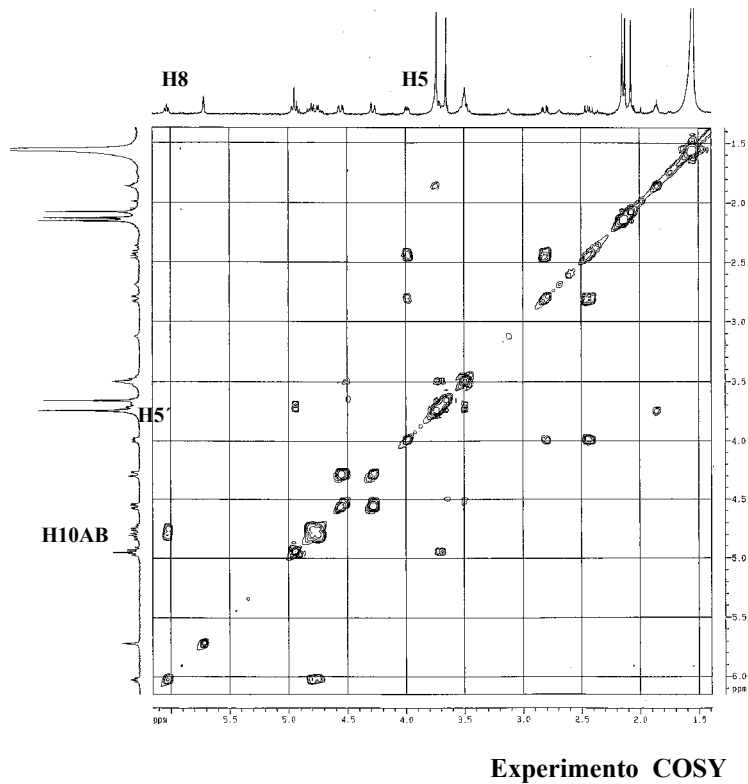
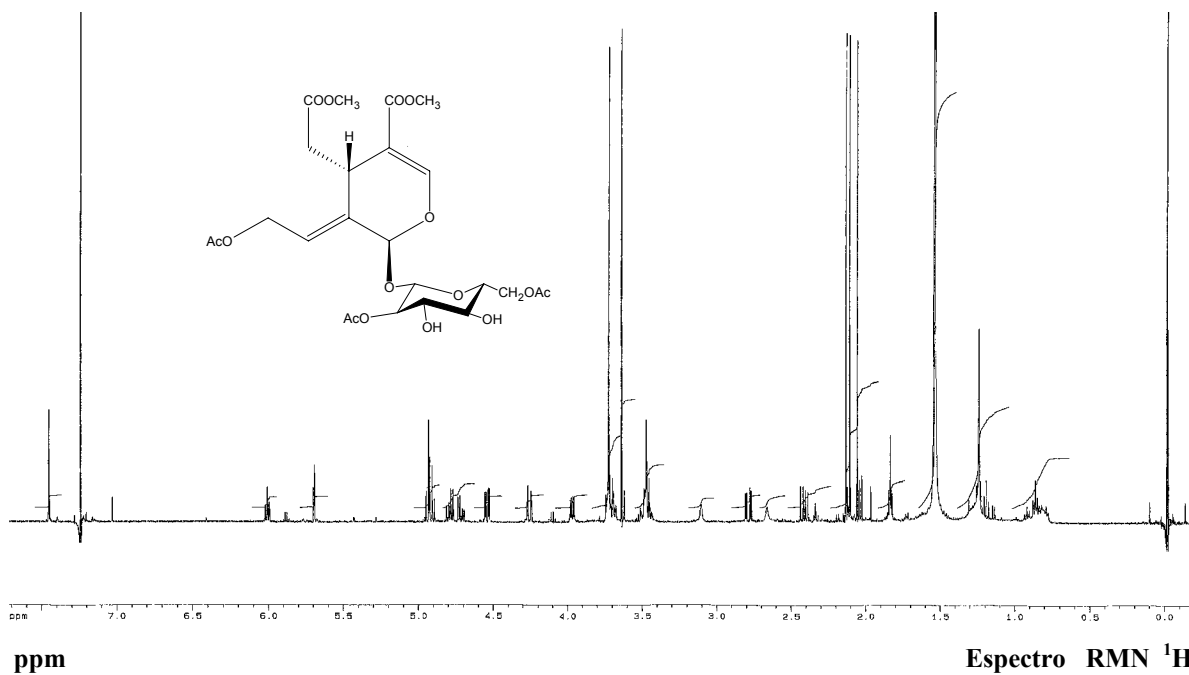
**Producto 4956**

2'-O-acetil-10-acetoxioleosido dimetil éster



## Producto 4957

2'6'-O-diacetil-10-acetoxioleosido dimetil éster



Se hicieron ensayos con acetato de vinilo, acetato de metilo y acetato de t-butilo. En los dos primeros casos los resultados fueron similares a los del acetato de etilo. Y en el segundo caso apenas hubo transformación apreciable.

#### Efecto de la temperatura.

Como se describe en la parte teórica, las enzimas son particularmente termoestables y activas en disolventes orgánicos. Pensamos que el aumento de la temperatura hasta al menos 100°C (temperatura máxima descrita para preservar la actividad) podría aumentar el rendimiento de la reacción. Se hicieron experimentos, a 80°C, con 50 mg. de sustrato y 5 ml. de AcOEt (o acetato de vinilo) y 340 mg. de pancreatina. Se fueron tomando alícuotas aproximadamente cada 24 horas e inyectando en HPLC. Las posiciones de acetilación fueron las mismas a los del experimento llevado a cabo a 39°C (**Figura 7**). Así pues la posiciones de acetilación no variaron con la temperatura. No obstante, con respecto a los rendimientos puede deducirse que cada una de las posiciones de acetilación tiene una temperatura y un tiempo de incubación idóneos. Así por ejemplo el máximo rendimiento para la acetilación en 2' tiene lugar a 80°C y a las 48 horas. La acetilación en 6' tendría su máximo a 80°C y 72 horas. Por último el acetato en 2'-6' es el producto mayoritario al cabo de 6 días a 80°C, en este caso el rendimiento es del 100%.

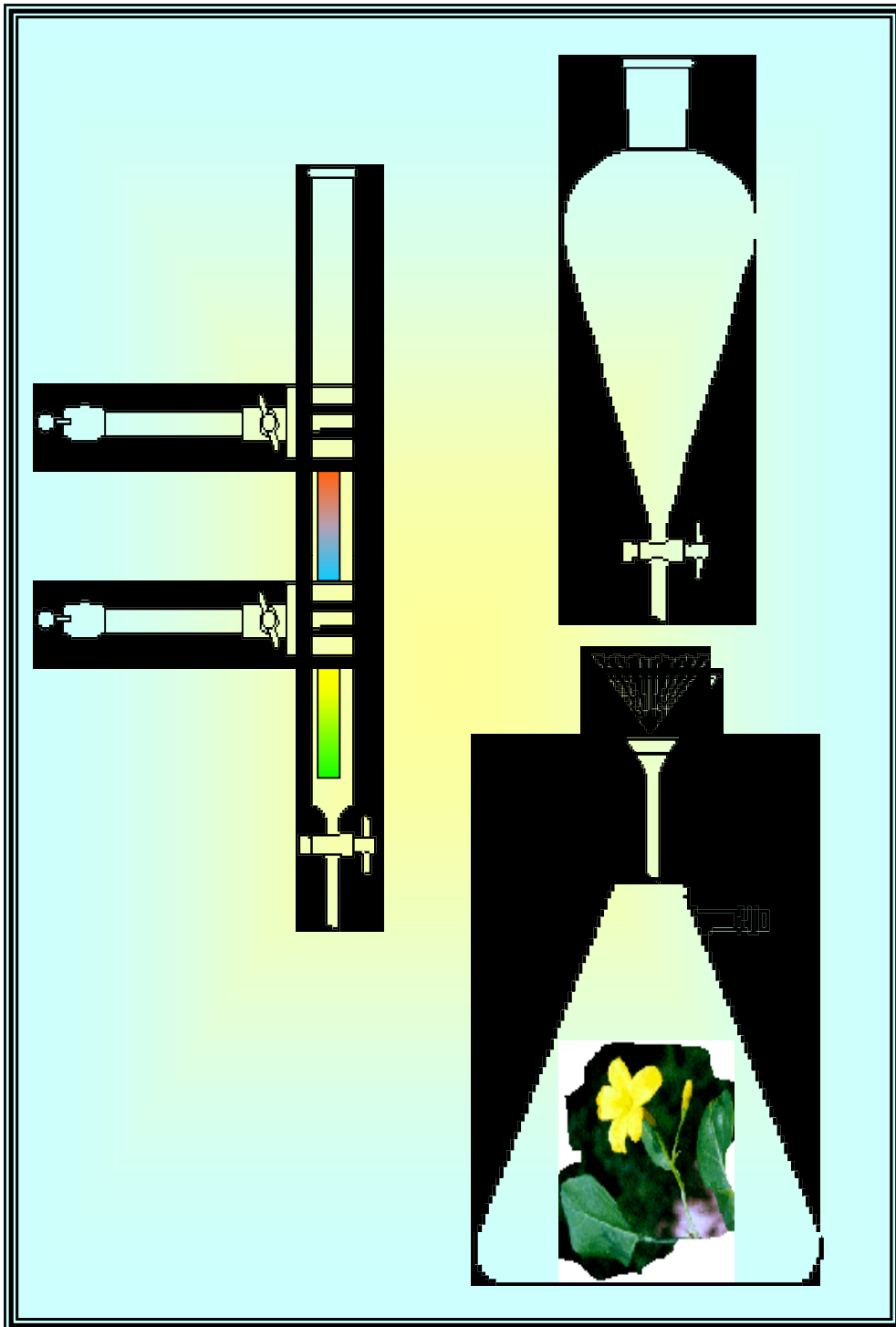
#### Efecto de tipo de hidrolasa.

La encima (pancreatina) que se ha estado utilizando hasta ahora es en realidad un extracto de páncreas de porcino con actividad hidrolítica. Su uso es la enzimología "no-acuosa" para reacciones de transesterificación se debe principalmente a su bajo coste. En el catálogo de Sigma Co., empresa que la comercializa, se especifica que es una mezcla de ribonucleasa, tripsina, proteasa, amilasa y lipasa, principalmente estas tres últimas. Con objeto de comparar resultados decidimos repetir nuestros experimentos utilizando cada una de estas enzimas puras por separado (excepto ribonucleasa). Además ensayamos una lipasa de origen vegetal (lipasa de germen de trigo) dado que el sustrato también lo era.

Los ensayos se realizaron a cabo simultáneamente, para todas las enzimas, a 50°C, con las cantidades y condiciones ya descritas durante nueve días. Para tripsina, proteasa y lipasa de germen de trigo, no se observó transformación apreciable. Para lipasa se observan los mismos resultados que para la pancreatina.







**P. EXPERIMENTAL**



## **Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.**

Los experimentos RMN se realizaron disolviendo los productos en  $\text{CDCl}_3$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  atendiendo a su solubilidad, usando TMS como referencia interna.

Los espectros RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  fueron realizados en espectrómetros BRUKER WP-200 SY (200MHz), BRUKER AMX (400Hz).

Los programas utilizados fueron suministrados por la casa BRUKER.

## **Espectroscopía Infraroja.**

Los espectros IR fueron realizados usando células NaCl de 0.1mm de espesor. Se utiliza un espectrofotómetro PERKIN ELMER PE1605 (FT-IR)

## **Espectroscopía Ultravioleta.**

Los espectros UV se efectuaron en un espectrofotómetro PERKIN ELMER 560; utilizando células de cuarzo de 10 y 5 mm.. Como disolventes se utilizó EtOH y MeOH.

## **Espectrometría de Masas de Baja Resolución.**

Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro Micromass Autoespec .

## **Actividad óptica.**

Se utilizó un polarímetro PERKIN ELMER 241.

## **Cromatografía en Capa Fina.**

Las cromatografías en capa fina fueron realizadas sobre cromatofolios de gel de sílice tipo G, con indicador de luminiscencia a 254 nm, SCHLEICHER6SCHULL, F-1500/LS254.

Las placas se visualizan con luz UV a 254 nm y se revelan con OLEUM (solución formada por un 4% de ácido sulfúrico, 80% de ácido acético y 16% de agua), calentándolas posteriormente a 120° durante unos minutos.

## **Cromatografía en Columna a gravedad.**

Se usó gel de sílice (0.063-0.2 mm) de la marca MERK.

Se aplica vacío al extremo inferior de la columna y se vierte el gel a vibración.

Tras montar la cabeza (producto impregnado sobre gel de sílice 0.2-0.5 mm) se vierte un poco de sílice y se pasa Hex. 100% para humedecer y desgasificar la columna.

Se añade la mezcla a purificar impregnada sobre gel de sílice (0.2-0.5 mm). La relación peso gel/producto fue siempre como mínimo de 100/1.

### **Cromatografía en Columna a Media Presión.**

Se usó gel de sílice (0.063-0.2 mm) ó 60G de capa fina de la marca MERK.

Se aplica vacío al extremo inferior de la columna y se vierte el gel a vibración.

Tras montar la cabeza se vierte un poco de sílice y se pasa Hexano 100% para humedecer y desgasificar la columna.

Se mantiene la presión con una bomba peristáltica.

### **Cromatografía líquida de Alta Presión en Fase Normal.**

Se utiliza un equipo formado por una bomba Jasco PV-980, y un detector Jasco UV 975 (256nm) con la columna Kromasil 100 Si 5 $\mu$  (25X1.0 cm), utilizando disolventes (Hex, AcOEt, MeOH, H<sub>2</sub>O) filtrados y desgasificados previamente.

Las muestras son filtradas a través de un filtro de teflón de 0.45 $\mu$ .

Las fracciones recogidas se llevan a sequedad al vacío.

### **Cromatografía líquida de Alta Presión en Fase Reversa.**

Se utiliza un equipo formado por una bomba MSI Concept PU II, y un detector MSI con la columna Kromasil 100 C18 5 $\mu$  (25X1.0 cm), utilizando disolventes (H<sub>2</sub>O, MeOH, AcOEt) filtrados y desgasificados previamente.

Las muestras son filtradas a través de un filtro de teflón de 0.45 $\mu$ .

Las fracciones recogidas se evaporan al vacío para eliminar el contenido en MeOH, los productos separados se extraen de la fracción acuosa resultante con AcOEt, secados con , filtrados y llevados a sequedad al vacío.

		PRODUCTOS				
A	1					
	2					
	3					
	4					
	5	50				
		5A	5A1			
			5A2	5A2/1		4951h trans
				5A2/2		18h $\alpha/\beta$
		5A2/3				
		5B	5B/1		18h $\alpha/\beta$	
			5B/2		Ác. cinámico	
		5C	5C1			
			5C2	5C2/1		28h
				5C2/2		4951h1 $\alpha/\beta$
	5C2/3					
	5C2/4					
5C3						
6						
B	7A	7A/1				
		7A/2		4952		
		7A/3		2802		
		7A/4		2801		
	7B	7B0				
		7B1				
		7B2	7B21	7B21/1		4953
				7B21/2		4954
				7B21/3		4952
		7B2	7B22	7B221		
				7B22/2		3001
				7B22/3		3002
		7B3	7B3/1		4951	
			7B3/2		4902	
	7B3/3		4901			
	7C			4951		
	7D	7D1				
7D2		7D2/1		4950		
		7D2/2		18		
		7D2/3		28		
7D3						

Con 1100 gramos de la parte aérea de *Jasminum odoratissimum* se hace una extracción con etanol a reflujo, en dos partes, durante cuatro días, de los cuales se concentra el extracto obtenido. Se obtienen tres litros de extracto etanólico que se concentra y se divide en agua destilada.

Se fracciona por cambio de fase repetidamente con acetato de etilo. Para obtener una fracción acuosa (**A**) y una fracción soluble en acetato de etilo (**B**) que se concentra al vacío para dar 390 gramos de extracto.

### Columna B

Con el extracto (**B**) se hace una cabeza de gel gruesa 0,2 y se monta una columna de percolado, obteniéndose después de agrupar comunes las siguiente fracciones:

	% Hexano	% Acetato de etilo	% Metanol
Fracción 1	100	0	0
Fracción 2	70	30	0
Fracción 3	60→30	40→70	0
Fracción 4	0	100	0
Fracción 5	0	70	30
Fracción 6	0	40	60
Fracción 7	0	0	100

### ◆Columna 5

Con las fracciones extraídas con mezclas acetato de etilo/metanol en proporciones 70/30 de la columna de percolado, se hace una cabeza y se monta una columna gravitatoria con gel de sílice 0.063 aumentando la polaridad progresivamente para obtener las siguientes fracciones:

	% Hexano	% Acetato de etilo	% Metanol
Fracción 50	50	50	0
Fracción 5A	0	100	0
Fracción 5B	0	100	0
Fracción 5C	0	95	5
Fracción 5D	0	70	30

### ◆◆Columna 5A

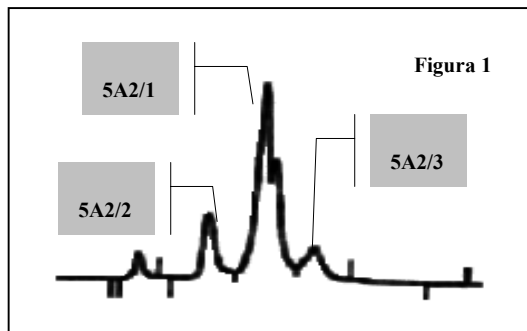
Se monta una columna para purificar las fracciones reunidas como **5A**. La separación se realiza a media presión Hex/AcOEt/MeOH 20:80:0. Siguiendo el proceso por capa fina se obtienen las siguientes agrupaciones

**Fracción 5A1** Gran cantidad de esteroides

**Fracción 5A2** Aparentemente un producto puro en capa fina

### ◆◆◆Columna 5A2

La fracción 5A2 contiene un producto mayoritario mezclado con al menos dos productos minoritarios y restos de una mezcla de esteroides. Los intentos de purificarlo por HPLC fase normal con diferentes mezclas AcOEt/Hex no dan un buen resultado y se procede a su purificación con éxito en HPLC fase reversa con una mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O 55:45.



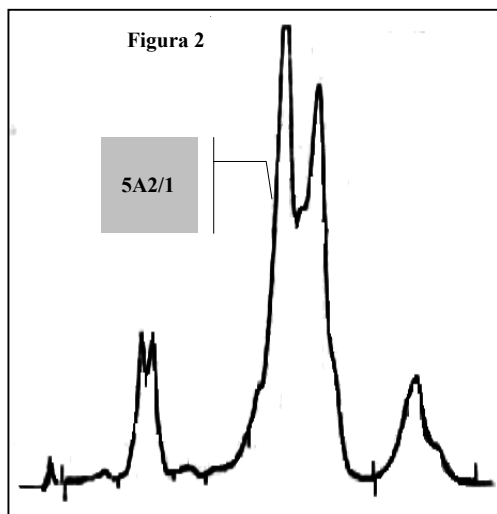
Aparentemente existen dos picos mayoritarios (Rf. 7.6 y 8.1 min.) muy próximos. Para intentar separarlos se aumenta progresivamente la proporción de H<sub>2</sub>O hasta un máximo de 40:60 y se hace más selectiva la recogida de los picos.

Sin embargo los espectros RMN <sup>1</sup>H de ambos picos son idénticos y se designan para su estudio como producto **5A2/1**.

El producto **5A2/2** es aislado en mayor cantidad en la siguiente fracción, pero la cantidad del producto **5A2/3** no permitió su estudio.

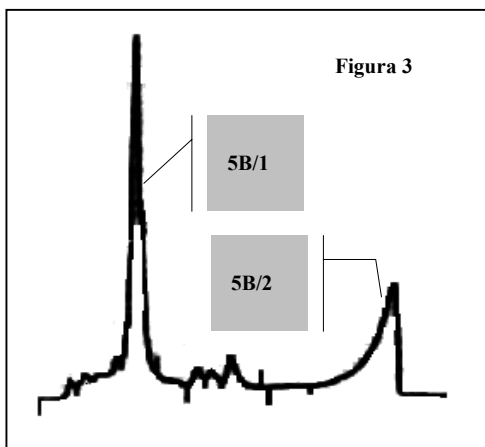
### 5A2/1 PRODUCTO 4951h trans

4 mg. Aislado con un aspecto pulverulento.



**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz):** 9.56δ (d, J=1.3 Hz, H-1), 7.64δ (s, H-3), 3.47δ (m, H-5), 2.27 (dd, J=16.8, J=9.4 Hz, H-6a), 2.95δ (dd, J=116.8, J=4.0 Hz, H-6b), 4.73δ (m, H-8), 2.86δ (m, H-9), 4.59δ (dd, J=12.3, J=7.2 Hz, H-10a), 4.49 (dd, J=12.3, J=4.5 Hz, H-10b), 3.72δ (s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.74δ (s, 11-OCH<sub>3</sub>), 2.10 (s, CH<sub>3</sub>-OAc).

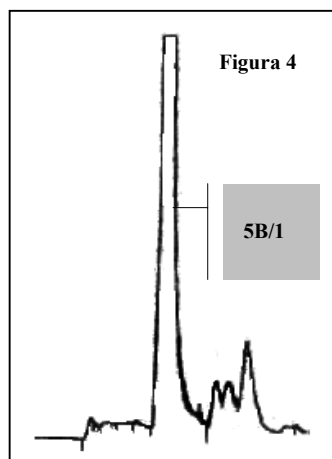
## ♦♦Columna 5B



La fracción **5B** se concentra y filtra para su separación por HPLC fase reversa con una polaridad 50:50 MeOH/H<sub>2</sub>O. (ver **Figura 3**).

Se obtiene lo que parece un pico mayoritario que se designa **5B/1** y uno minoritario pero de alta absorbancia a 254nm, designado **5B/2**.

El pico **5B/1** manifiesta en resonancia ser una mezcla de isómeros, sin embargo el retraso en la separación hasta los límites razonables en la proporción de H<sub>2</sub>O no consiguieron la selectividad necesaria para su separación. Se procede a su repurificación a 50:50 MeOH/H<sub>2</sub>O y estudio .



El estudio producto **5B/2** revela que se trata del **ácido cinámico**.

**5B/1 PRODUCTO 18h $\alpha$** 

1- $\alpha$ -7-dehidrologanina (aglicona de la 7-cetologanina)

Aislado como un polvo,  $[\alpha]_D^{25} +17^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>; c 0.02).

**EM 70 eV, m/z (rel. int):** 226[M]<sup>+</sup>(38),197(30),155(35),128(100),123(46)

**EM AR m/z:** encontrados 226.0818 [M]<sup>+</sup>, C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub> requeridos 226.0841

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz):** 5.38 $\delta$  (t, 3.7, H-1), 7.43 $\delta$  (s, H-3), 3.30 $\delta$  (m, H-5), 2.65 $\delta$  (dd, J=19.5, J=8.3 Hz, H-6a), 2.55 $\delta$  (dd, J=19.5, J=8.3 Hz, H-6b), 2.13 $\delta$  (m, H-8), 2.25 $\delta$  (m, H-9), 1.18 $\delta$  (d, J=7.1 Hz, 10-Me), 3.73 $\delta$  (s, 7-OMe), 3.45 $\delta$  (d, J=4.5 Hz, 1-OH).

**Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125MHz):** 92.5 (C-1), 151.5 (C-3), 109.3 (C-4), 26.7 (C-5), 42.5 (C-6), 218.2 (C-7), 45.9 (C-8), 43.5 (C-9), 13.6 (C-10), 166.9 (C-11).



### 5B/1 PRODUCTO 18h $\beta$

1- $\beta$ -7-dehidrologanina aglicona de la 7-cetologanina)

Aislado como un polvo,  $[\alpha]_D^{25} +17^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>;c 0.02).

EM 70 eV,m/z (rel. int): 226[M]<sup>+</sup>(38),197(30),155(35),128(100),123(46)

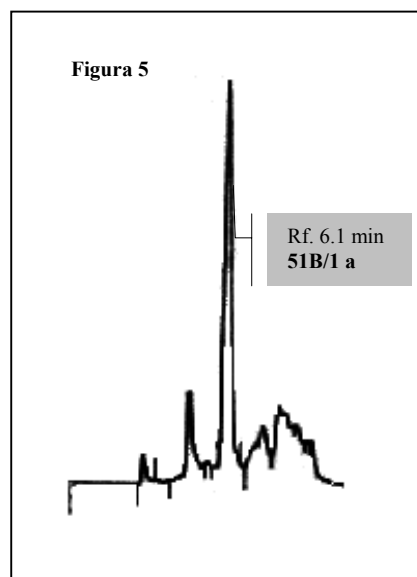
EM Ar m/z: encontrados 226.0818 [M]<sup>+</sup>, C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub> requeridos 226.0841

Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz): 5.51 $\delta$  (t,3.3,H-1),7.48 $\delta$  (s,H-3),3.30 $\delta$  (m, H-5),2.65 $\delta$  (dd, J=19.5, J=8.3 Hz,H-6a),. 2.46 $\delta$  (dd, J=19.5, J=8.3 Hz ,H6b),2.41 $\delta$  (m,H-8),2.34 $\delta$  (m,H-9), 1.24 $\delta$  (d , J=7.5 Hz,10-Me), 3.74 $\delta$  (s,7-OMe),3.34 $\delta$  (d, J=4.0 Hz,1-OH).

Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125MHz): 94.2 (C-1),151.4 (C-3),109.3 (C-4),28.6 (C-5),42.2 (C-6),218.2 (C-7),44.2 (C-8),43.5 (C-9),16.9 (C-10),166.9 (C-11).

### Acetilación de la mezcla 5B/1

5 mg de la mezcla **5B/1** fueron tratados con exceso de anhídrido acético disueltos en 5 gotas de piridina. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 12 h. y posteriormente mezclada en frío con MeOH Tras ser llevada a sequedad con metanol se disuelve en acetato de etilo y se repurifica por HPLC fase normal Hexano/Acetato de etilo 57:43 (Ver **Figura 5**). La acetilación de la mezcla solo proporciona un compuesto **18ha**.



### PRODUCTO 18ha

Aislado como un aceite,  $[\alpha]_D^{25} -46^\circ$  (MeOH;c 0.02).

EM 70 eV,m/z (rel. int): 268[M]<sup>+</sup>(10),237(21),226(67),208(95),197(100),128(75)

EM Ar m/z: encontrados 268.904 [M]<sup>+</sup>, C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> requeridos 268.0906

**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz):** 6.31 $\delta$  (d,2.6,H-1),7.43 $\delta$  (d,1.4,H-3),3.30 $\delta$  (t,7.9 H-5),2.69 $\delta$  (d, J=19.5 Hz,H-6a),. 2.62 $\delta$  (dd, J=19.5, J=7.9 Hz ,H6b),2.18-2.10 $\delta$  (m,H-8),2.28 $\delta$  (m,H-9), 1.20 $\delta$  (d , J=7.0 Hz,10-Me), 3.74 $\delta$  (s,7-OMe),2.14 $\delta$  (s,1-OAc).

**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  125MHz):** 89.1 (C-1),151.2 (C-3),109.1 (C-4),26.4 (C-5),42.1 (C-6),217.5(C-7),43.0 (C-8),44.4 (C-9),13.6 (C-10),166.5 (C-11),16.3 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 169.0 ( $\text{OCOCH}_3$ ).

### ◆◆Columna 5C

Productos 52,53,54,55

La mezcla 5C se separa en una columna a media presión Hexano/Acetato de Etilo 50:50 para dar tres fracciones distinguibles en capa fina:

Fracción 5C1: Mezcla muy abundante de esteroides

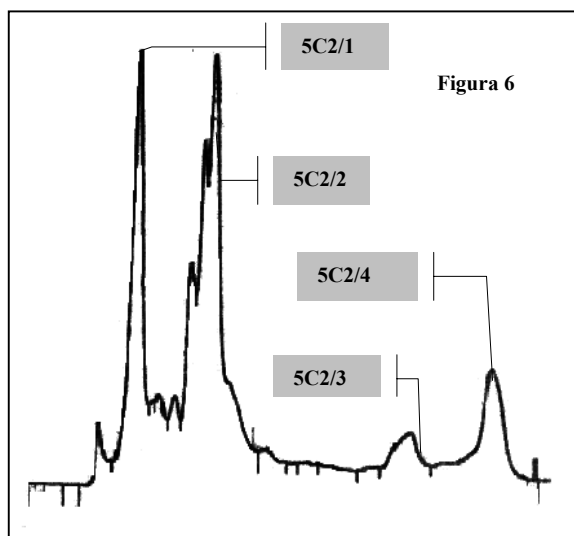
Fracción 5C2: Un producto en capa fina.

Fracción 5C3: Mezcla indefinida.

### ◆◆◆Columna 5C2

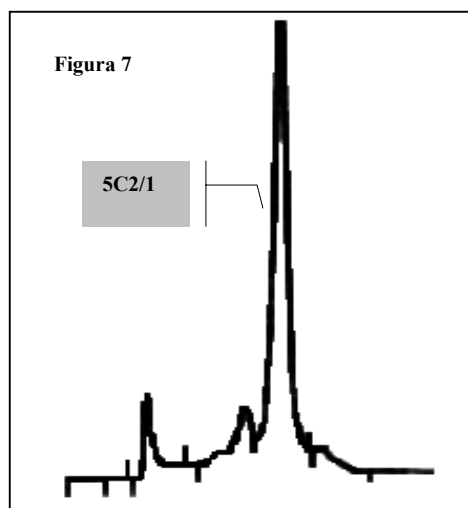
45 mg de la mezcla 5C2 que aparentan ser un producto en capa fina se intentan repurificar con diferentes mezclas Hexano/Acetato en HPLC fase normal revelándose en todos los casos como una mezcla compleja inseparable en estas condiciones.

Se procede a su separación por HPLC fase reversa (ver **Figura 6**) con un resultado discreto del que se obtienen cuatro picos destacables designados 5C2/1, 5C2/2, 5C2/3, 5C2/4.



5C2/1 PRODUCTO 28h

.Silvianosido



El producto **28h** es repurificado repetidas veces por HPLC fase reversa MeOH/H<sub>2</sub>O (30:70). Se obtiene el producto relativamente puro que permite realizar un espectro RMN <sup>1</sup>H, sin embargo se encuentra muy mezclado con ceras que unido con la poca cantidad de producto no permitían realizar un espectro RMN <sup>13</sup>C satisfactorio. Se procede a su acetilación, tras la cual no se refleja cambios en su espectro RMN <sup>1</sup>H pero si se ha conseguido eliminar los residuos de ceras.

12mg. De aspecto pulverulento

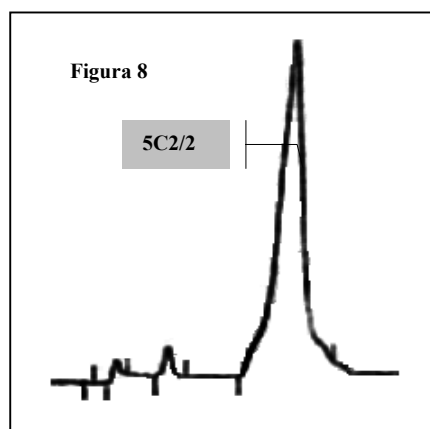
EM 70 eV, m/z (rel. Int): 240[M]<sup>+</sup> (74), 209[M-OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (22), 194(12), 180(5), 162(13), 139[C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100).

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz):** 5.281δ (d, 5.13, H-1), 7.71δ (s, H-3), 3.41δ (m, H-5), 2.55δ (dd, J=15.1, J=5.4 Hz, H-6a), 2.26δ (dd, J=15.1, J=3.2 Hz, H-6b), 4.45δ (t, 4.7H-8), 3.02δ (m, H-9), 4.30δ (dd, J=10.2, J=4.5 Hz, H-10a), 4.51δ (dd, J=10.2, J=1.5 Hz, H-10b), 3.73δ (s, 11-OMe).

**Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125MHz):** 102.7 (C-1), 156.7 (C-3), 108.5 (C-4), 22.7 (C-5), 34.5 (C-6), 169.1 (C-7), 74.1 (C-8), 42.9 (C-9), 75.5 (C-10), 166.2 (C-11), 51.6 (11-COOCH<sub>3</sub>).

5C2/2 PRODUCTO 4950h1α

α-Jasmolactona E



El pico **5C2/2** que aparenta ser una mezcla es repurificado por HPLC fase reversa (10mg.) MeOH/H<sub>2</sub>O(40:60).

Polvo blanquecino.

**EM 70 eV, m/z (rel. int):** 272[M]<sup>+</sup>(0.7), 254[M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (29), 241[M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (18), 225(36), 222(29), 212(29), 209(21), 194(100), 162(89), 153(93), 139[C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100).

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz):** 5.29δ (t, 5.2, H-1), 7.58δ (d, 1.0, H-3), 3.39-3.32δ (m, H-5), 2.33δ (dd, J=15.1, J=5.4 Hz, H-6a), 3.35δ (dd, J=15.1, J=3.2 Hz, H-6b), 4.51δ (dd, J=15.1, J=3.2, H-8), 2.79δ (m, H-9), 4.19δ (dd, J=10.0, J=2.3 Hz, H-10a), 4.05δ (d, J=10.0 Hz, H-10b), 3.70δ (s, 11-OMe), 3.71δ (s, OMe).

#### 5C2/2 PRODUCTO 4950h1α

β-Jasmolactona E

Polvo blanquecino.

**EM 70 eV, m/z (rel. int):** 272[M]<sup>+</sup>(0.7), 254[M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (29), 241[M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (18), 225(36), 222(29), 212(29), 209(21), 194(100), 162(89), 153(93), 139[C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (100).

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz):** 5.29δ (t, 5.2, H-1), 7.58δ (d, 1.0, H-3), 3.39-3.32δ (m, H-5), 2.33δ (dd, J=15.1, J=5.4 Hz, H-6a), 3.35δ (dd, J=15.1, J=3.2 Hz, H-6b), 4.51δ (dd, J=15.1, J=3.2, H-8), 2.79δ (m, H-9), 4.19δ (dd, J=10.0, J=2.3 Hz, H-10a), 4.05δ (d, J=10.0 Hz, H-10b), 3.70δ (s, 11-OMe), 3.71δ (s, OMe).

#### Acetilación de la mezcla 5C2/2

7 mg de la mezcla 5C2/2 fueron tratados con exceso de anhídrido acético disueltos en 5 gotas de piridina. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 6 h. y posteriormente mezclada en frío con MeOH. Es llevada a sequedad con metanol y disuelve en acetato de etilo para repurificar por HPLC fase normal Hexano/Acetato de etilo 60:30. La acetilación de la mezcla solo proporciona el compuesto 4950h1a.

#### PRODUCTO 4950h1a.

5 mg. Polvo blanquecino.

**EM 70 eV, m/z (rel. int):** 254[M-OHAc]<sup>+</sup>(36), 241 (32), 225(41), 209(14), 194(100), 181(35), 162(77), 149(65), 154(45), 139[C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (38).

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz):** 6.06δ (d, 6.6, H-1), 7.60δ (s, H-3), 3.38δ (m, H-5), 2.20δ (dd, J=18, J=10.8 Hz, H-6a), 3.48δ (dd, J=18, J=4 Hz, H-6b), 4.58δ (d, 3.6, H-8), 3.04δ (m, H-9), 4.13δ (s, H-10a), 4.13δ (s, H-10b), 3.70δ (s, 11-OMe), 3.72δ (s, OMe), 2.05δ (s, OAc).

### Hidrólisis enzimática del producto 4950.

Con el fin de comprobar la naturaleza y el origen del producto 4950h1 a partir de 4950 se somete a este último a un hidrólisis enzimática con  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.2.1 Tipo I).

Se disuelven 60 mg. del producto **4950** en 5ml de tampón acetato 0.1 M con 0.1-0.2% de  $\beta$ -glucosidasa. La reacción transcurre a 37° C en agitación y durante 48 horas.

La reacción se controla en períodos de 12 horas hasta alcanzar una cantidad suficiente de aglicona. Para ello se toman alícuotas de 500 $\mu$ l que se filtran y desarrollan en HPLC fase reversa MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50).

Un vez finalizada la reacción se centrifuga y se extraen repetidamente los productos de la fracción acuosa con AcOEt y se secan sobre sulfato sódico anhidro. La mezcla se separa

en una columna a media presión Hex:AcOEt (0:100) para eliminar los restos del producto de partida, la aglicona se concentra y se filtran para su separación por HPLC fase reversa MeOH/H<sub>2</sub>O (55:45).

Aunque en las condiciones de separación aparece un sólo pico e idénticos resultados en fase normal, el espectro H<sup>1</sup>RMN muestra la mezcla de dos productos. El producto minoritario coincide perfectamente con el producto esperado (**4950h1**). Y el producto mayoritario es un aldehído que es designado como **4950h2**.



## ◆Columna 7

La fracción 7 se seca al vacío para dar 82,5 gramos de extracto con 10g. se monta una cabeza y se separa en columna cromatográfica a media presión con una polaridad 0:100:0 (Hex:AcOEt:MeOH).

Fracción 70

Fracción 7A

Fracción 7B

Fracción 7C      Producto 4951    250mg.

Fracción 7D

### 7C PRODUCTO 4951

10-acetoxioleosido dimetil éster.

Aislado como un aceite de aspecto siruposo y ópticamente activo, 250 mg,  $[\alpha]_D^{25} -196.3$  (CHCl<sub>3</sub>).

**EMFAB** m/z 477. El espectro de masas HR presenta un ión molecular a m/z 296.0891 [M-Glc]<sup>+</sup> de acuerdo con la fórmula C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>, (calculada 296.0896).

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz):** 5.81δ (s,H-1),7.49δ (s,H-3),3.98δ (dd, J=9.5, J=4.0 Hz, H-5),2.43 (dd, J=14.6, J=9.4 Hz,H-6a), 2.83δ (dd, J=14.6, J=4.0 Hz,H6b), 6.11δ (t, J=6.5 Hz, H-8), 4.68δ (m, H-10a), 4.78 (dd, J=13.2, J=6.5 Hz,H10b), 4.85δ (d, J=7.5 Hz,H-1'), 3.40-3.70δ (2H,m,H-2', H-5'), 3.80δ (2H,m, H-6'), 3.65δ (s,7-OCH<sub>3</sub>), 3.72δ (s,11-OCH<sub>3</sub>), 2.05 (s,CH<sub>3</sub>-OAc).

**Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz):** 93.57 (C-1), 153.41 (C-3), 107.94 (C-4), 31.10 (C-5), 39.99 (C-6), 171.54 (C-7), 123.45 (C-8), 132.13 (C-9), 60.54 (C-10), 166.36 (C-11), 51.5,51.86 (OCH<sub>3</sub>), 99.79 (C-1'), 73.03 (C-2'), 76.07 (C-3', C-5'), 69.53 (C-4'), 61.42 (C-6'), 20.78 (OCOCH<sub>3</sub>), 171.54 (OCOCH<sub>3</sub>).

### Acetilación del producto 4951

A 50 mg. del compuesto **4951** disueltos en la mínima cantidad de Py, se le añade exceso de anhídrido acético, se deja 24 horas en reposo, al cabo de los cuales en cromatografía en capa fina no queda producto de partida. Se extrae después de añadir clorhídrico diluido y disolución saturada de bicarbonato sódico. Se seca sobre sulfato sódico anhidro y se filtra, una vez concentrado se purifica en columna cromatográfica a media presión Hex/AcOEt (0:100) y se procede a su estudio espectroscópico.

**PRODUCTO 4951 A**

10 hidroxioleosido dimetil éster 10,2',3',4',6' pentacetato.

Aislado como un polvo, 40 mg,  $[\alpha]_D^{23} -149.8$  (c 1.3 CHCl<sub>3</sub>).

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 236 (3.94) nm

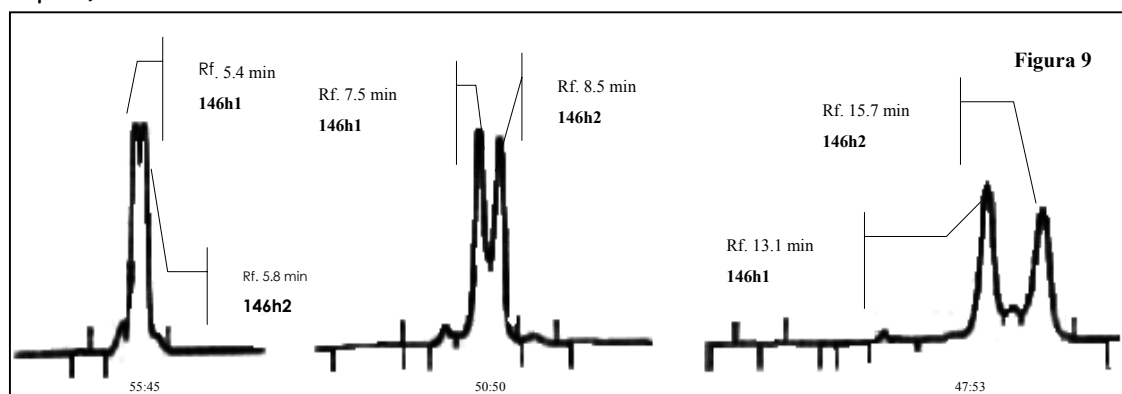
IR<sub>vmax</sub> 1745,1705, 1635 cm<sup>-1</sup>.

EM m/z (%):

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz):** 5.72 $\delta$  (s,H-1),7.46 $\delta$  (s,H-3),3.98 $\delta$  (dd, J=9.4, J=4.0 Hz, H-5),2.43 (dd, J=14.6, J=9.4 Hz,H-6a), 2.80 $\delta$  (dd, J=14.6, J=4.0 Hz,H6b), 6.01 $\delta$  (t, J=6.5 Hz, H-8), 4.78 (dd, J=13.2, J=6.5 Hz,H-10a), 4.78 (dd, J=13.2, J=6.5 Hz,H-10b), 5.04 $\delta$  (d, J=7.5 Hz,H-1'), 5.27 $\delta$  (t, J=7.05 Hz, H-5'), 4.32 (dd, J=13.2, J=6.5 H, H-6'a), 4.13 (dd, J=13.2, J=6.5 Hz, H-6'b), 3.64 $\delta$  (s,7-OCH<sub>3</sub>), 3.73 $\delta$  (s,11-OCH<sub>3</sub>), 2.02,2.03,2.07,2.08,2.09 (5s,CH<sub>3</sub>-OAc)

**Hidrólisis enzimática del producto 4951.**

Con el fin de comprobar la naturaleza y el origen del producto 4951h trans a partir de 4951 se somete a este último a un hidrólisis enzimática con  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.2.1 Tipo I) .



Se disuelven 40 mg. del producto **4951** en 5ml de tampón acetato 0.1 M con 0.1-0.2% de  $\beta$ -glucosidasa . La reacción transcurre a 37° C en agitación y durante 48 horas.

La reacción se controla en periodos de 12 horas hasta alcanzar una cantidad suficiente de aglicona. Para ello se toman alícuotas de 500 $\mu$ l que se filtran y desarrollan en HPLC fase reversa MeOH/H<sub>2</sub>O (55:45).

Un vez finalizada la reacción se centrifuga y se extraen repetidamente los productos de la fracción acuosa con AcOEt y se secan sobre sulfato sódico anhidro. La mezcla se separa en una columna a media presión Hex:AcOEt (0:100) para eliminar los restos del producto

de partida, la aglicona se concentra y se filtran para su separación por HPLC fase reversa MeOH/H<sub>2</sub>O (55:45).

Aunque en las condiciones iniciales de separación MeOH/H<sub>2</sub>O (55:45) aparece prácticamente un solo pico, se aumenta progresivamente la polaridad hasta MeOH/H<sub>2</sub>O (47:53) donde se distinguen progresivamente dos picos de igual área. (ver **Figura 9**). Idénticos resultados se obtienen en fase normal.

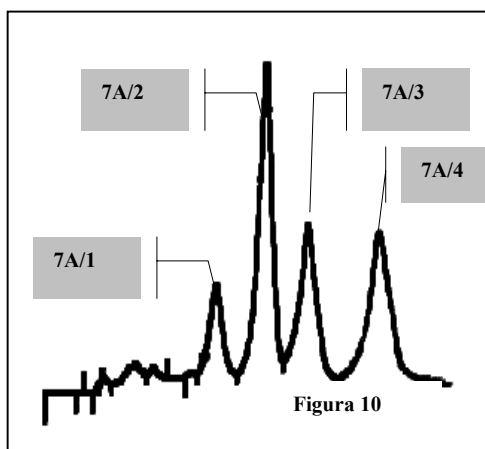
Sin embargo ambos picos, al igual que como ocurre en la separación del producto 4951h trans, son superponibles, pero no coinciden con este. Se trata del isómero cis. No aparece ningún otro producto ni siquiera en forma de traza, por lo tanto esta reacción y en estas condiciones es altamente específica para la aglicona cis del producto 4951.

#### PRODUCTO 4951h cis.

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz):** 9.63δ (d, J=0.7 Hz, H-1), 7.56δ (s, H-3), 3.46δ (m, H-5), 2.41 (dd, J=12.4, J=7.7 Hz, H-6a), 2.83δ (dd, J=12.4, J=2.7 Hz, H-6b), 4.73δ (m, H-8), 4.73δ (m, H-9), 4.35δ (dd, J=8.9, J=8.9 Hz, H-10a), 4.16 (dd, J=8.9, J=8.9 Hz, H-10b), 3.69δ (s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.73δ (s, 11-OCH<sub>3</sub>), 2.10 (s, CH<sub>3</sub>-OAc).

**Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz):** 198.54 (C-1), 154.62 (C-3), 106.62 (C-4), 20.15 (C-5), 36.77 (C-6), 172.07 (C-7), 71.65 (C-8), 63.18 (C-9), 20.63 (C-10), 166.54 (C-11), 51.49, 51.83 (OCH<sub>3</sub>), 49.34 (OCOCH<sub>3</sub>), 170.27 (OCOCH<sub>3</sub>).

#### ♦♦Columna 7A



La mezcla **7A** se concentra para dar un peso de 80mg. que se disuelven en metanol y se filtran para ser separados en HPLC fase reversa en una proporción MeOH/H<sub>2</sub>O (46:54).

En la separación (ver **Figura 10**) se obtienen cuatro picos designados **7A/1**, **7A/2**, **7A/3**, **7A/4**.

Pese al área del pico **7A/1** la masa no fue suficiente para su estudio.



**7A/2 PRODUCTO 4955**

6'-O-acetil-10-acetoxioleoside dimetil éster.

Aislado como un aceite,  $[\alpha]_D^{25} -63$  (c 0.55, CHCl<sub>3</sub>).

**UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ):** 235(4.11),314(3.03) nm

**IR<sub>v</sub>max:** 2919(CH),1731(C=O),1637,1601,1437,1372,1296,1237,1161,1079,1038,949,908 cm<sup>-1</sup>.

**MSFAB m/z [M+Na]<sup>+</sup>** 541(80), [M+H]<sup>+</sup>

**EM m/z (%):**519(6),329(47),307(37),297(28),176(94),154(100),136(52)

**FAB Ar m/z [M + Na]<sup>+</sup>** 541.1537 (calculado C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>NaO<sub>14</sub>, 541.1533).

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz):** 5.75 $\delta$  (s,H-1),7.48 $\delta$  (s,H-3),4.02 $\delta$  (dd, J=9.5, J=4.0 Hz,H-5), 2.43 $\delta$  (dd, J=15.3, J=9.5 Hz,H-6a), 2.83 $\delta$  (dd, J=15.3, J=4.0 Hz,H6b), 6.10 $\delta$  (t,H-8), 4.75 $\delta$  (dd, J=13.2, J=6.2 Hz,H-10a), 4.88-4.82 $\delta$  (m,H10b), 4.83 $\delta$  (d, J=7.8 Hz,H-1'), 3.55-3.42 $\delta$  (m,H-2'), 3.64 $\delta$  (oculto por H-1,H-3'), 3.55-3.42 $\delta$  (m,H-4'), 3.55-3.42 $\delta$  (m,H-5'), 4.27 $\delta$  (dd, J=12.3, J=2.0 Hz,H-6'a), 4.51 $\delta$  (dd, J=12.3, J=4.3 Hz,H6'b), 3.62 $\delta$  (s,7-OMe), 3.74 $\delta$  (s,11-OMe),2.07/2.13 (2/s,CH<sub>3</sub>-OAc).

**Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz):** 93.3 (C-1), 153.0 (C-3), 108.2 (C-4), 30.9 (C-5), 39.9 (C-6), 171.1 (C-7), 124.0 (C-8), 131.6 (C-9), 60.6 (C-10), 166.4 (C-11), 99.5 (C-1'), 73.1 (C-2'), 74.5 (C-3'), 75.8 (C-4'), 69.5 (C-5'), 62.9 (C-6'), 20.8 (OCOCH<sub>3</sub>), 171.8/166.4 (O<sub>2</sub>COCH<sub>3</sub>).

**7A2/4 PRODUCTO 2801**

6'-O-cis-(p-cumaroiloxi)-8-epikingísido

Aislado como un aceite,  $[\alpha]_D^{25} -43.8^\circ$  (c 1.2, MeOH).

**UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ):** 230(3.82),313(3.75) nm

**EM FAB m/z [M+Na]<sup>+</sup>** 573(29), [M+H]<sup>+</sup> 551(9),453(13),425(16),281(15),147(100)

**FAB Ar m/z [M + Na]<sup>+</sup>** 573.1579 (calculado C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>NaO<sub>13</sub>, 573.1584).

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400MHz):** 5.21 $\delta$  (d,7.4,H-1),7.49 $\delta$  (s,H-3),2.98 $\delta$  (m, H-5),2.26 $\delta$  (dd, J=16.4, J=11.3 Hz,H-6a),. 2.75 $\delta$  (m,H6b), 4.24-4.38 $\delta$  (m,H-8),1.95-2.05 $\delta$  (m,H-9), 4.62 $\delta$  (d, J=7.8 Hz,H-1'), 3.30-4.50 $\delta$  (H-2'-6'), 7.56 $\delta$  (d, J=8.6 Hz,H-2''-6''), 6.70 $\delta$  (d, J=8.6 Hz,H-3''-5''), 6.78 $\delta$  (d, J=12.8 Hz,H-7''), 6.78 $\delta$  (d, J=12.8 Hz,H-8''), 3.71 $\delta$  (s, CH<sub>3</sub>CO-7), 3.67 $\delta$  (s, CH<sub>3</sub>CO-11).

**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100MHz):** 96.8 (C-1), 154.4 (C-3), 109.8 (C-4), 28.1 (C-5), 34.6 (C-6), 174.5 (C-7), 76.1 (C-8), 49.1 (C-9), 21.7 (C-10), 168.9 (C-11), 101.0 (C-1'), 74.9 (C-2'), 78.5 (C-3'), 71.7 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.9 (C-6'), 127.4 (C-1''), 133.8 (C-2''+6''), 116.8 (C-3''+5''), 161.3 (C-4''), 147.2 (C-7''), 116.1 (C-8''), 167.8 (C-9'').

### 7A2/3 PRODUCTO 2802

6'-O-trans-(p-cumaroiloxi)-8-epikingísido

Aislado como un aceite,  $[\alpha]_D^{25}$   $-43.8^\circ$  (c 1.2, MeOH).

**UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ):** 230(3.82), 313(3.75) nm

**EMFAB m/z**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  573(29),  $[\text{M}+\text{H}]^+$  551(9), 453(13), 425(16), 281(15), 147(100)

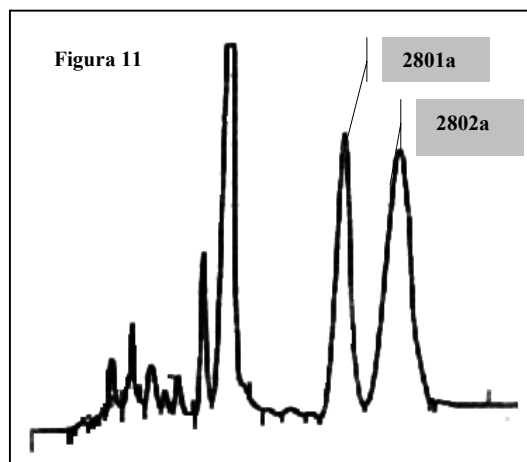
**FAB Ar m/z**  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  573.1579 (calculado  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{NaO}_{13}$ , 573.1584).

**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400MHz):** 5.26 $\delta$  (d, 7.4, H-1), 7.49 $\delta$  (s, H-3), 2.98 $\delta$  (m, H-5), 2.26 $\delta$  (dd, J=16.4, J=11.3 Hz, H-6a), 2.75 $\delta$  (m, H-6b), 4.24-4.38 $\delta$  (m, H-8), 1.95-2.05 $\delta$  (m, H-9), 4.66 $\delta$  (d, J=7.8 Hz, H-1'), 3.30-4.50 $\delta$  (H-2'-6'), 7.41 $\delta$  (d, J=8.6 Hz, H-2''-6''), 6.74 $\delta$  (d, J=8.6 Hz, H-3''-5''), 7.55 $\delta$  (d, J=16 Hz, H-7''), 6.28 $\delta$  (d, J=12.8 Hz, H-8''), 3.72 $\delta$  (s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ -7), 3.63 $\delta$  (s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ -11) 3.77-3.73 $\delta$  (m, H-5'),

**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100MHz):** 96.8 (C-1), 154.4 (C-3), 109.6 (C-4), 28.1 (C-5), 34.6 (C-6), 174.7 (C-7), 75.9 (C-8), 49.1 (C-9), 21.7 (C-10), 168.9 (C-11), 101.0 (C-1'), 74.9 (C-2'), 78.5 (C-3'), 71.7 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.9 (C-6'), 126.8 (C-1''), 131.3 (C-2''+6''), 115.9 (C-3''+5''), 161.3 (C-4''), 145.3 (C-7''), 114.6 (C-8''), 168.0 (C-9'').

### Acetilación de la mezcla 7A

30 mg de la mezcla **7A** fueron tratados con exceso de anhídrido acético disueltos en la mínima cantidad de piridina. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 12 h. y posteriormente mezclada en frío con MeOH. Tras ser llevada a sequedad con MeOH se disuelve en AcOEt y se repurifica por HPLC en fase reversa MeOH/H<sub>2</sub>O (63:37) (ver **Figura 11**).



**PRODUCTO 2801a**

6'-O-cis-(p-cumaroiloxi)-2',3',4',4''-O-tetraacetil-8-epikingísido

Aislado como un aceite,  $[\alpha]_D^{25} -20^\circ$  (c 0.7, CHCl<sub>3</sub>).

**UV (EtOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ):** 219(4.33),223(4.32), 281(4.29) nm

**IR<sub>vmax</sub>:** 2953(CH),1757 y 1713(C=O),1636,1602, 1505, 1438, 1370, 1246, 1096, 1074, 1038, 980, 915, 856 cm<sup>-1</sup>.

**EMFAB m/z** [M+Na]<sup>+</sup> 741(100), [M+H]<sup>+</sup> 719(27),477(13),189(31),176(22),154(30), 147(23), 139(16), 137(19)

**FAB Ar m/z** [M + Na]<sup>+</sup> 741.2009 (calculado C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>NaO<sub>17</sub>, 741.2007).

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz):** 5.24 $\delta$  (d, J=4.7,H-1),7.43 $\delta$  (d, J=1.2 H-3), 3.10 $\delta$  (m, H-5), 2.35 $\delta$  (dd, J=17.0, J=8.9 Hz,H-6a), 3.01 $\delta$  (dd, J=17.0, J=6.6 Hz,H-6b), 4.35-4.21 $\delta$  (m,H-8), 2.07-2.01 $\delta$  (m,H-9), 1.42 $\delta$  (d, J=6.4 Hz,CH<sub>3</sub>-10), 4.86 $\delta$  (d, J=8.0 Hz,H-1'), 4.99 $\delta$  (dd, J=8.0, J=9.6 Hz,H-2'), 5.23 $\delta$  (t, J=9.6 H-3'), 5.06 $\delta$  (t, J=9.6 H-4'), 3.77-3.73 $\delta$  (m,H-5'), 4.35-4.21 $\delta$  (m,H-6'a), 3.77-3.73 $\delta$  (m,H-6'b), 7.66 $\delta$  (d, J=8.7 Hz,H-2''-6''), 7.09 $\delta$  (d, J=8.7 Hz,H-3''-5''), 6.98 $\delta$  (d, J=12.6 Hz,H-7''), 5.97 $\delta$  (d, J=12.8 Hz,H-8''), 3.73 $\delta$  (s, CH<sub>3</sub>CO-11), 1.96,2.01,2.02,2.30 $\delta$  (4/s, CH<sub>3</sub>-OAc).

**Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz):** 93.8 (C-1), 151.4 (C-3), 110.1 (C-4), 25.2 (C-5), 33.3 (C-6), 170.6 (C-7), 73.2 (C-8), 40.8 (C-9), 20.4 (C-10), 166.1 (C-11), 96.4 (C-1'), 70.5 (C-2'), 72.2 (C-3'), 68.4 (C-4'), 72.2 (C-5'), 61.7 (C-6'), 132.1 (C-1''), 131.3 (C-2''+6''), 121.2 (C-3''+5''), 151.4 (C-4''), 144.1 (C-7''), 118.1 (C-8''), 165.1 (C9''),20.3,20.4,20.5,21.1 (4/s, CH<sub>3</sub>-OCO), 170.1,169.3,169.1,169.0 (4/s, CH<sub>3</sub>-OCO).

**PRODUCTO 2802a**

6'-O-trans-(p-cumaroiloxi)-2',3',4',4''-O-tetraacetil-8-epikingísido

Aislado como un aceite,  $[\alpha]_D^{25} -17^\circ$  (c 2, CHCl<sub>3</sub>).

**UV (EtOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ):** 219(4.33),223(4.34), 283(4.32) nm

**IR<sub>vmax</sub>:** 2942(CH),1754 y 1713(C=O),1637,1601, 1501, 1437, 1372, 1161, 1095, 1072, 1037, 1008, 979 cm<sup>-1</sup>.

**EMFAB m/z** [M+Na]<sup>+</sup> 741(91), [M+H]<sup>+</sup> 719(25),477(16),189(100),176(48),154(57), 147(52), 139(34), 137(38)

**FAB Ar m/z** [M + Na]<sup>+</sup> 741.2015 (calculado C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>NaO<sub>17</sub>, 741.2007), [M -glucosa esterificada]<sup>+</sup> 477.1399 (calculado C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>11</sub>, 477.1396)

**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz):** 5.25 $\delta$  (d, J=4.7, H-1), 7.42 $\delta$  (d, J=1.2 H-3), 3.08 $\delta$  (m, H-5), 2.32 $\delta$  (dd, J=17.0, J=9.5 Hz, H-6a), 2.98 $\delta$  (dd, J=17.0, J=8.3 Hz, H-6b), 4.32-4.28 $\delta$  (m, H-8), 2.06-2.01 $\delta$  (m, H-9), 1.44 $\delta$  (d, J=6.4 Hz,  $\text{CH}_3$ -10), 4.88 $\delta$  (d, J=8.0 Hz, H-1'), 5.01 $\delta$  (dd, J=8.0, J=9.6 Hz, H-2'), 5.23 $\delta$  (t, J=7.7 H-3'), 5.13 $\delta$  (t, J=7.7 H-4'), 3.79 (m, H-5'), 4.32-4.28 $\delta$  (m, H-6'a), 4.39 $\delta$  (dd, J=12.4, J=2.6 Hz, H-6'b), 7.54 $\delta$  (d, J=8.5 Hz, H-2''-6''), 7.11 $\delta$  (d, J=8.5 Hz, H-3''-5''), 7.66 $\delta$  (d, J=66 Hz, H-7''), 6.38 $\delta$  (d, J=12.8 Hz, H-8''), 3.70 $\delta$  (s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ -11), 1.95, 1.99, 2.03, 2.29 $\delta$  (4/s,  $\text{CH}_3$ -OAc).

**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz):** 93.8 (C-1), 151.4 (C-3), 109.9 (C-4), 25.3 (C-5), 33.3 (C-6), 170.6 (C-7), 73.2 (C-8), 40.7 (C-9), 20.4 (C-10), 166.1 (C-11), 96.3 (C-1'), 70.5 (C-2'), 72.3 (C-3'), 68.4 (C-4'), 72.3 (C-5'), 61.5 (C-6'), 131.7 (C-1''), 129.3 (C-2''+6''), 122.1 (C-3''+5''), 152.3 (C-4''), 144.8 (C-7''), 117.0 (C-8''), 166.1 (C-9''), 21.1, 20.6, 20.5, 20.3 (4/s,  $\text{CH}_3$ -OCO), 170.0, 169.2, 168.9 (4/s,  $\text{CH}_3$ -OCO).

#### ◆◆Columna 7B

Se monta una columna con 150mg. a media presión iniciándola con polaridad Hex/AcOEt/MeOH 50:50:0.

7B1

y continuando con polaridad Hex/AcOEt/MeOH 20:80:0.

7B2

7B3

#### ◆◆◆Columna 7B2

Columna a media presión polaridad 0:100:10 (Hex:AcOEt:MeOH).

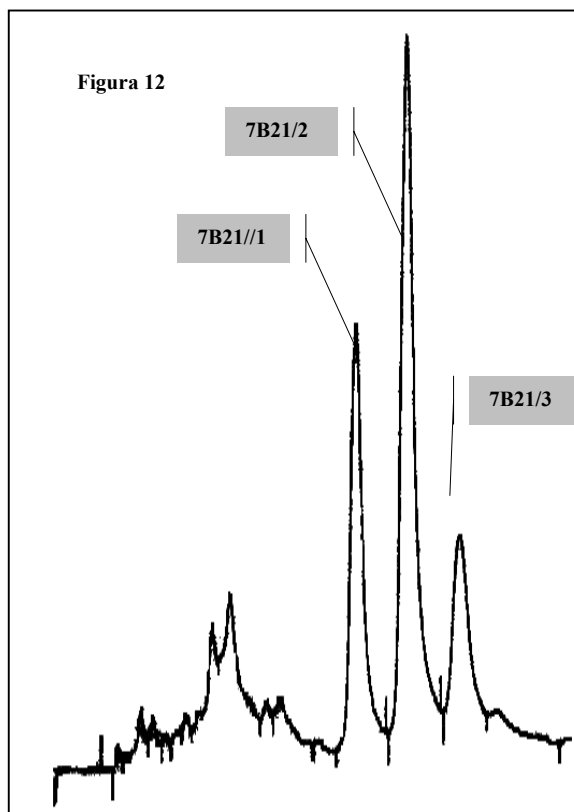
7B21

7B22

#### ◆◆◆◆Columna 7B21

La fracción 7B21 se concentra y filtra para su separación por HPLC en fase reversa MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (50:50), para obtener tres picos mayoritarios de lo que parecía en capa fina como un solo producto. La separación en fase normal

Figura 12



con diferentes mezclas de disolventes no permitió su separación.

**7B21/1 PRODUCTO 4954**

10-cis-(p-cumaroiloxi) oleosido dimetil éster

Aislado como un aceite,  $[\alpha]_D^{25} -43.8^\circ$  (c 1.2, MeOH).

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 230(3.82), 313(3.75) nm

EM FAB m/z  $[M+Na]^+$  573(29),  $[M+H]^+$  551(9), 453(13), 425(16), 281(15), 147(100)

FAB Ar m/z  $[M + Na]^+$  573.1579 (calculado  $C_{26}H_{30}NaO_{13}$ , 573.1584).

**Espectro de RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 400MHz):** 5.97 $\delta$  (s, H-1), 7.54 $\delta$  (s, H-3), 4.08 $\delta$  (m, H-5), 2.52-2.57 $\delta$  (H-6a), 2.75-2.85 $\delta$  (H6b), 6.14 $\delta$  (t, J=6.1 Hz, H-8), 4.90 $\delta$  (m, H-10), 4.73 $\delta$  (oculto por MeOH, H-1'), 7.58 $\delta$  (d, J=8.7 Hz, H-2''-6''), 6.76 $\delta$  (d, J=8.7 Hz, H-3''-5''), 6.86 $\delta$  (d, J=12.8 Hz, H-7''), 6.30 $\delta$  (d, J=12.8 Hz, H-8''), 3.71 $\delta$  (s,  $CH_3CO$ -7), 3.67 $\delta$  (s,  $CH_3CO$ -11).

**Espectro de RMN  $^{13}C$  ( $CD_3OD$ , 100MHz):** 94.2 (C-1), 153.9 (C-3), 110.0 (C-4), 33.0 (C-5), 41.1(C-6), 173.7 (C-7), 124.0 (C-8), 135.0 (C-9), 62.0 (C-10), 167.6 (C-11), 101.0 (C-1'), 74.9 (C-2'), 78.6 (C-3'), 71.6 (C-4'), 78.0 (C-5'), 62.8 (C-6'), 127.7 (C-1''), 131.3 (C-2''+6''), 116.1 (C-3''+5''), 160.2 (C-4''), 146.7 (C-7''), 118.8 (C-8''), 168.9 (C-9'').

**7B21/2 PRODUCTO 4953**

10-trans-(p-cumaroiloxi) oleosido dimetil éster

Aislado como un aceite,  $[\alpha]_D^{25} -165.8^\circ$  (c 1, MeOH).

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 231(4.03), 300(3.73), 312(3.75) nm

EMFAB m/z  $[M+Na]^+$  603(24),  $[M+H]^+$  581(15), 503(7), 429(38), 355(48), 355(48), 149(100)

FAB Ar m/z  $[M + Na]^+$  603.1682 (calculado  $C_{27}H_{32}NaO_{14}$ , 603.1689).

**Espectro de RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 400MHz):** 5.98 $\delta$  (s, H-1), 7.54 $\delta$  (s, H-3), 4.08 $\delta$  (m, H-5), 2.52-2.57 $\delta$  (H-6a), 2.75-2.85 $\delta$  (H6b), 6.18 $\delta$  (t, J=7.8 Hz, H-8), 4.90 $\delta$  (m, H-10), 1.37 $\delta$  (d, J=6.3 Hz,  $CH_3$ -10), 4.73 $\delta$  (oculto con MeOH, H-1'), 3.30-4.50 $\delta$  (H-2'-6'), 7.45 $\delta$  (d, J=8.7 Hz, H-2''-6''), 6.80 $\delta$  (d, J=8.7 Hz, H-3''-5''), 7.61 $\delta$  (d, J=16 Hz, H-7''), 6.31 $\delta$  (d, J=16 Hz, H-8''), 3.72 $\delta$  (s,  $CH_3CO$ -11), 3.63 $\delta$  (s,  $CH_3CO$ -11).

**Espectro de RMN  $^{13}C$  ( $CD_3OD$ , 100MHz):** 94.2 (C-1), 153.9 (C-3), 110.0 (C-4), 33.0 (C-5), 41.1(C-6), 173.7 (C-7), 124.0 (C-8), 135.0 (C-9), 62.0 (C-10), 167.6 (C-11), 101.0 (C-1'), 74.9 (C-2'), 78.6 (C-3'), 71.6 (C-4'), 78.0 (C-5'), 62.8 (C-6'), 127.7 (C-1''), 131.3 (C-2''+6''), 117.0 (C-3''+5''), 161.4 (C-4''), 145.2 (C-7''), 116.6 (C-8''), 168.4 (C-9'').

**7B21/3 PRODUCTO 4952**

10-trans-(cinamoiloxi) oleosido dimetil éster

Aislado como un aceite,  $[\alpha]_D^{25} -152^\circ$  (c 0.04, MeOH).

**UV (MeOH)**  $\lambda_{max}$ : 216,222,234(sh),278 nm

**EM 70 eV, m/z (rel. int):** 564[M]<sup>+</sup>(2),549(3),313(5),225(12),193(12),181(24)

**EM Ar m/z:** encontrados 564.1840 [M]<sup>+</sup>, C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub> requeridos 564.1843

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz):** 6.02δ (s,H-1), 7.51δ (s,H-3),4.10δ (dd, J=3.9, J=10.0 Hz, H-5), 2.53δ (dd, J=15.0, J=10.0 Hz, H-6a),. 2.84δ (dd, J=3.9, J=15.0 Hz, H6b), 6.17δ (t, J=6.2 Hz, H-8), 4.89δ (m, H-10a) , 5.02δ (dd, J=7.8, J=13.5 Hz, H10b), 4.86δ (d, J=7.6 Hz, H-1'), 3.46-3.33δ (m,H-3'),3.85-3.82δ (m,H-6'a), 3.62δ (m,H-6'b), 7.70δ (m,H-2''+6''), 7.46δ (m,H-3''+4''+5''), 7.70δ (d, J=16.1 Hz,H-7''), 6.58δ (d, J=16.1 Hz,H-8''), 3.64δ (s, CH<sub>3</sub>CO-7),3.82δ (s, CH<sub>3</sub>CO-11).

**Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 125MHz):** 93.8(C-1), 154.4 (C-3), 109.0 (C-4), 32.3 (C-5), 40.4(C-6), 173.0 (C-7), 123.9 (C-8), 133.8 (C-9), 61.5 (C-10), 167.6 (C-11), 100.7 (C-1'), 74.0 (C-2'), 78.2 (C-3'), 71.4 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.8 (C-6'), 135.4 (C-1''), 131.8 (C-2''+6''), 129.0 (C-3''+5''), 129.8 (C-4''), 145.9 (C-7''), 118.7 (C-8''), 167.6 (C-9'') 51.6 (CH<sub>3</sub>CO-7), 51.9 (CH<sub>3</sub>CO-11).

**Acetilación de la mezcla 7B21**

40mg de la mezcla **7A** fueron tratados con exceso de anhídrido acético disueltos en la mínima cantidad de piridina. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 12 h. y posteriormente mezclada en frío con MeOH. Tras ser llevada a sequedad con MeOH se disuelve en AcOEt y se repurifica por HPLC en fase reversa MeOH/H<sub>2</sub>O (55:45).

**PRODUCTO 4954a**

10-cis-(p-cumaroiloxi) -2',3',4',6', 4'' -O-pentaacetiloleosido dimetil éster

Aislado como un aceite,  $[\alpha]_D^{25} -144^\circ$  (c 0.07, CHCl<sub>3</sub>).

**UV (MeOH):** 220,224,240,278 nm

**IR<sub>vmax</sub>:** 2919(CH),1754 y 1707(C=O),1631,1601, 1502, 1437, 1367, 1161, 1096, 1072, 1043, 908 cm<sup>-1</sup>.

**EMFAB m/z [M+Na]<sup>+</sup>** 813(100),443(37),331(69),189(45),176(65),169(93),154(74)

**EM Ar m/z:** encontrados 813.2211 [M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>37</sub>H<sub>42</sub>O<sub>19</sub> requeridos 813.2218

**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz):** 5.72 $\delta$  (s,H-1), 7.46 $\delta$  (s,H-3),4.00 $\delta$  (dd, J=4.1, J=9.3Hz, H-5), 2.43 $\delta$  (dd, J=15.2, J=9.3 Hz, H-6a),. 2.80 $\delta$  (dd, J=15.2, J=4.1 Hz, H6b), 6.05 $\delta$  (t, J=6.2 Hz, H-8), 4.79 $\delta$  (dd, J=13.8, J=6.2 Hz,, H-10a) , 4.88 $\delta$  (dd, J=13.8, J=6.2 Hz, H10b), 5.04 $\delta$  (d, J=7.8 Hz, H-1'), 5.13 $\delta$  (m,H-2'), 5.27 $\delta$  (t, J=9.3, H-3'), 5.13 $\delta$  (m,H-4'), 3.79-3.76 $\delta$  (m,H-3'),4.41 $\delta$  (dd, J=12.4, J=2.3 Hz,, H-6' a), 4.31 $\delta$  (dd, J=12.4, J=4.7 Hz,, H-6' b) 7.67 $\delta$  (d, J=8.8 H-2''+6''), 7.09 $\delta$  (d, J=8.8 H-3''+4''+5''), 6.91 $\delta$  (d, J=16.1 Hz,H-7''), 5.96 $\delta$  (d, J=16.1 Hz,H-8''), 3.63 $\delta$  (s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ -7),3.73 $\delta$  (s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ -11),2.01,2.02, ,2.03, ,2.08,2.31 $\delta$  (5/s,  $\text{CH}_3$ -OAc).

**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz):** 92.8(C-1), 152.9 (C-3), 108.3.0 (C-4), 30.9 (C-5), 40.40(C-6), 171.0 (C-7), 124.0 (C-8), 131.4 (C-9), 60.5 (C-10), 166.3 (C-11), 97.0 (C-1'), 70.7 (C-2'), 72.5 (C-3'), 68.2 (C-4'), 72.2 (C-5'), 61.7 (C-6'), 132.2 (C-1''), 131.4 (C-2''+6''), 121.2 (C-3''+5''), 151.2 (C-4''), 142.8 (C-7''), 119.1 (C-8''), 165.5 (C-9''), 51.6( $\text{CH}_3\text{CO}$ -7), 51.9( $\text{CH}_3\text{CO}$ -11),20.5,20.5, 20.4, 20.11(5/s,  $\text{CH}_3$ -OCO) 170.5,170.1,169.3,169.2,169.1 (5/s,  $\text{CH}_3$ -OCO).

### PRODUCTO 4953a

10-trans-(p-cumaroiloxi) -2',3',4',6', 4' '-O-pentaacetiloleosido dimetil éster

Aislado como un aceite,  $[\alpha]_D^{25}$  -107° (c 0.48,  $\text{CHCl}_3$ ).

UV (MeOH): 219,223,283 nm

IR $_{\text{vmax}}$ : 2954(CH),1755 y 1707(C=O),1637,1601, 1508, 1437, 1367, 1161, 1102, 1067, 1043, 985,908,832  $\text{cm}^{-1}$ .

EMFAB m/z  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  813(100),443(37),331(53),189(24),176(25),169(76),154(35)

EM Ar m/z: encontrados 813.2209  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{O}_{19}$  requeridos 813.2218

**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz):** 5.75 $\delta$  (s,H-1), 7.48 $\delta$  (s,H-3),4.04 $\delta$  (dd, J=4.1, J=9.3Hz, H-5), 2.46 $\delta$  (dd, J=15.2, J=9.3 Hz, H-6a),. 2.83 $\delta$  (dd, J=15.2, J=4.1 Hz, H6b), 6.11 $\delta$  (t, J=6.2 Hz, H-8), 4.88 $\delta$  (dd, J=13.8, J=6.2 Hz,, H-10a) , 4.94 $\delta$  (dd, J=13.8, J=6.2 Hz, H10b), 5.05 $\delta$  (d, J=7.8 Hz, H-1'), 5.13 $\delta$  (m,H-2'), 5.27 $\delta$  (t, J=9.3, H-3'), 5.13 $\delta$  (m,H-4'), 3.80-3.75 $\delta$  (m,H-3'),4.41 $\delta$  (dd, J=12.4, J=2.3 Hz,, H-6' a), 4.31 $\delta$  (dd, J=12.4, J=4.7 Hz,, H-6' b) 7.54 $\delta$  (d, J=8.8 H-2''+6''), 7.10 $\delta$  (d, J=8.8 H-3''+4''+5''), 7.69 $\delta$  (d, J=16.1 Hz,H-7''), 6.40 $\delta$  (d, J=16.1 Hz,H-8''), 3.65 $\delta$  (s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ -7),3.74 $\delta$  (s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ -11),2.01,2.02, ,2.03, ,2.09,2.31 $\delta$  (5/s,  $\text{CH}_3$ -OAc).

**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125MHz):** 92.8(C-1), 152.9 (C-3), 108.3.0 (C-4), 30.9 (C-5), 39.9(C-6), 171.0 (C-7), 124.2 (C-8), 131.3 (C-9), 60.7 (C-10), 166.3 (C-11), 97.0 (C-1'), 72.2 (C-2'), 72.5 (C-3'), 68.1 (C-4'), 72.4 (C-5'), 61.7 (C-6'), 132.1 (C-1''), 132.1 (C-2''+6''), 122.1 (C-3''+5''), 152.1 (C-4''), 144.0 (C-7''), 117.9 (C-8''), 166.4 (C-9''), 51.6( $\text{CH}_3\text{CO}$ -7),

51.9(CH<sub>3</sub>CO-11),20.6,20.5, 20.4, 20.11(5/s, CH<sub>3</sub>-OCO) 170.6,170.1,169.3,169.3,169.1 (5/s, CH<sub>3</sub>-OCO).

### PRODUCTO 4952a

10-trans-(cinamoiloxi) -2',3',4',6'-O-tetraacetiloleosido dimetil éster

Aislado como un aceite,  $[\alpha]_D^{25} -139^\circ$  (c 0.07, CHCl<sub>3</sub>).

UV (MeOH): 217,222,235,277 nm

EM 70eV, m/z(rel.int):732[M]<sup>+</sup>(1),585(2),460(18),385(13),331(91),169(100),131(83)

EM Ar m/z: encontrados 732.2228 [M]<sup>+</sup>, C<sub>35</sub>H<sub>40</sub>O<sub>17</sub> requeridos 732.2265

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz):** 5.76δ (s,H-1), 7.48δ (s,H-3),4.05δ (dd, J=5.1, J=11.7Hz, H-5), 2.47δ (dd, J=15.2, J=9.6 Hz, H-6a),. 2.83δ (dd, J=15.2, J=5.1 Hz, H6b), 6.12δ (t, J=6.2 Hz, H-8), 4.87 δ (ddd, J=13.6, J=6.4, J=13.2Hz,, H-10a) , 4.95δ (dd, J=13.2, J=7.1 Hz, H10b), 5.06δ (d, J=7.7 Hz, H-1'), 5.17δ (t, J=8.3H-2'), 5.28δ (t, J=9.2, H-3'), 5.14δ (t, J=8.3,H-4'), 3.80-3.76δ (m,H-3'),4.31δ (dd, J=12.3, J=4.7 Hz,, H-6' a), 4.14δ (dd, J=12.3, J=2.3 Hz,, H-6' b) 7.55-7.52δ (m, H-2''+6''), 7.39-7.38δ (m, H-3''+4''+5''), 7.72δ (d, J=16.0 Hz,H-7''), 6.43δ (d, J=16.0 Hz,H-8''), 3.66δ (s, CH<sub>3</sub>CO-7),3.74δ (s, CH<sub>3</sub>CO-11), 2.02 ,2.05, ,2.09δ (3/s, CH<sub>3</sub>-OAc).

**Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz):** 92.7(C-1), 152.8 (C-3), 108.3 (C-4), 30.8 (C-5), 39.8(C-6), 171.0 (C-7), 124.2 (C-8), 131.2 (C-9), 60.6 (C-10), 166.3 (C-11), 96.9 (C-1'), 70.6 (C-2'), 72.2 (C-3'), 68.1 (C-4'), 72.4 (C-5'), 61.6 (C-6'), 134.3 (C-1''), 128.8 (C-2''+6''), 128.0 (C-3''+5''), 130.2 (C-4''), 145.1 (C-7''), 117.6 (C-8''), 166.5 (C-9''), 51.5(CH<sub>3</sub>CO-7), 51.7(CH<sub>3</sub>CO-11),20.6,20.5, 20.4 (4/s, CH<sub>3</sub>-OCO) 170.5,170.1,169.3,169.2 (4/s, CH<sub>3</sub>-OCO).

### ◆◆◆Columna 7B22

Se separa por HPLC fase reversa polaridad 50:50 (H<sub>2</sub>O:MeOH).

7B221

7B22/2

7B22/3

### 7B22/3 PRODUCTO 3002

10-trans-(p-cumaroiloxi) -secoxiloganina.

Aislado como un aceite.

EM 70eV, m/z(rel.int):732[M]<sup>+</sup>(1),585(2),460(18),385(13),331(91),169(100),131(83)

EM Ar m/z: encontrados 732.2228 [M]<sup>+</sup>, C<sub>35</sub>H<sub>40</sub>O<sub>17</sub> requeridos 732.2265



**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 400MHz):** 5.36 $\delta$  (d, J=3.6, H-1), 7.40 $\delta$  (d, J=1.5, H-3), 3.29 $\delta$  (m, H-5), 2.52-2.57 $\delta$  (m, H-6a), 2.75-2.85 $\delta$  (m, H6b), 5.55 $\delta$  (, H-8), 2.80 $\delta$  (m, H-9), 5.24-5.10 $\delta$  (m, H10), 4.70 $\delta$  (d, J=7.8 Hz, H-1'), 7.52 $\delta$  (d, J=8.4, H-2''+6''), 6.89 $\delta$  (d, J=8.4, H-3''+4''+5''), 7.60 $\delta$  (d, J=15.9 Hz, H-7''), 6.35 $\delta$  (d, J=15.9 Hz, H-8''), 3.62 $\delta$  (s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ -7).

**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 100MHz):** 96.2 (C-1), 151.7 (C-3), 108.8 (C-4), 26.8 (C-5), 33.1(C-6), 178.5 (C-7), 132.8 (C-8), 43.6 (C-9), 119.5 (C-10), 172.8 (C-11), 98.9 (C-1'), 743.3 (C-2'), 74.4 (C-3'), 70.2 (C-4'), 76.7 (C-5'), 63.2 (C-6'), 125.9 (C-1''), 130.1 (C-2''+6''), 115.8 (C-3''+5''), 159.8 (C-4''), 144.9 (C-7''), 114.8 (C-8''), 166.6 (C-9''), 50.4 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ -7).

## 7B22/2 PRODUCTO 3001

10-cis--(p-cumaroiloxi) - secoxiloganina

45mg Aislado como un aceite.

**EM 70eV, m/z(rel.int):** 732[M]<sup>+</sup>(1), 585(2), 460(18), 385(13), 331(91), 169(100), 131(83)

**EM Ar m/z:** encontrados 732.2228 [M]<sup>+</sup>,  $\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{O}_{17}$  requeridos 732.2265

**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 400MHz):** 5.33 $\delta$  (d, J=3.6, H-1), 7.40 $\delta$  (d, J=1.5, H-3), 3.29 $\delta$  (m, H-5), 2.52-2.57 $\delta$  (m, H-6a), 2.75-2.85 $\delta$  (m, H6b), 5.55 $\delta$  (, H-8), 2.80 $\delta$  (m, H-9), 5.24-5.10 $\delta$  (m, H10), 4.68 $\delta$  (d, J=7.5 Hz, H-1'), 7.73 $\delta$  (d, J=8.7, H-2''+6''), 6.82 $\delta$  (d, J=8.7, H-3''+4''+5''), 6.82 $\delta$  (d, J=12.9 Hz, H-7''), 5.78 $\delta$  (d, J=12.9 Hz, H-8''), 3.62 $\delta$  (s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ -7).

**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , 100MHz):** 96.2 (C-1), 151.7 (C-3), 108.8 (C-4), 26.8 (C-5), 33.1(C-6), 178.5 (C-7), 133.3 (C-8), 43.6 (C-9), 119.5 (C-10), 172.8 (C-11), 98.9 (C-1'), 743.3 (C-2'), 74.3 (C-3'), 70.2 (C-4'), 76.7 (C-5'), 63.1 (C-6'), 127.2 (C-1''), 130.1 (C-2''+6''), 115.8 (C-3''+5''), 159.8 (C-4''), 145.3 (C-7''), 114.4 (C-8''), 166.6 (C-9''), 50.4 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ -7).

## Acetilación de los productos 3001/3002

10mg de la mezcla **7B22** fueron tratados con exceso de anhídrido acético disueltos en la mínima cantidad de piridina. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 10 h. y posteriormente mezclada en frío con MeOH. Tras ser llevada a sequedad con MeOH se disuelve en AcOEt y se repurifica por HPLC en fase normal Hex.:AcOEt (55:45).

## ♦♦Columna 7B3

80 mg. de la mezcla **7B3** se concentraron y filtraron disueltos en MeOH para su separación por HPLC fase reversa (MeOH/H<sub>2</sub>O) 50:50. Se obtienen tres picos mayoritarios, de los cuales el pico con Rf 6.4 min. Coincide como se esperaba con el producto **4951**.

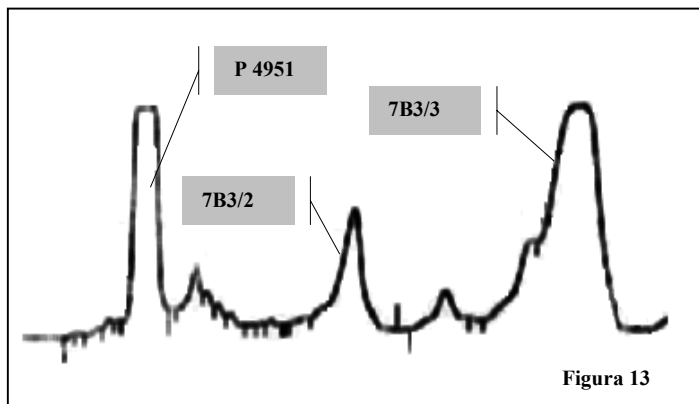


Figura 13

Se procede al estudio de los productos con Rf 16.09 min y 26.3 min.

**7B3/3 PRODUCTO 4901**

Rf 26.3 min. 40 mg.

10 trans-(cinamoiloxi) oleosido monometil éster.

Aislado como un aceite,  $[\alpha]_D^{29} -194.7^\circ$  (c 1.3, MeOH).

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400MHz):** 6.00δ (s, H-1), 7.52δ (s, H-3), 4.07δ (dd, J=3.7, J=10.1 Hz, H-5), 2.88δ (dd, J=15.0, J=3.9 Hz, H-6a), 2.51δ (dd, J=15.0, J=9.9 Hz, H-6b), 6.21δ (t, J=6.0 Hz, H-8), 4.93δ (m, H-10), 4.85δ (d, J=7.8 Hz, H-1'), 3.46-3.31δ (H-3'), 4.07δ (dd, J=10, J=3.7 Hz, H-6'a), 3.83δ (dd, J=10, J=2.1 Hz, H-6'b), 7.68δ (m, H-2''-6''), 7.41-7.43δ (m, H-3''-4''-5''), 7.68δ (d, J=16 Hz, H-7''), 6.56δ (d, J=16 Hz, H-8''), 3.62δ (s, CH<sub>3</sub>CO-7).

El producto 4901 es conocido en la literatura química con el nombre de Jasminosido.

**7B3/2 PRODUCTO 4902**

Rf 16.09 min. 6 mg.

10-cis-(cinamoiloxi) oleosido monometil éster

Aislado como un aceite,  $[\alpha]_D^{25} -111^\circ$  (c 0.03, MeOH).

**UV (MeOH) λ<sub>max</sub>:** 221,232(sh),271 nm

**EM 70 eV, m/z (rel. int):** 549[M]<sup>+</sup>(1),495(2.3),371(11.9),297(10),131(100)

EM m/z: encontrados 549.1576 [M]<sup>+</sup>, C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>O<sub>13</sub> requeridos 549.1608

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz):** 5.99δ (s,H-1),7.44δ (s,H-3),4.01δ (dd, J=3.8, J=10.2 Hz, H-5), 2.86δ (dd, J=3.8, J=15.0 Hz,H-6a),. 2.49δ (dd, J=10.2, J=15.0 Hz,H6b), 6.10δ (t, J=6.0 Hz, H-8), 4.90δ (dd, J=7.8, J=15.0 Hz,H-10a) , 4.77δ (ddd, J=1.6, J=6.0, J=15.0 Hz,H-10b) 4.85δ (d, J=7.7 Hz, H-1'), 3.48-3.37δ (H-3'), 3.82δ (dd, J=1.6, J=10.6 Hz,H-6'a),. 3.62δ (dd, J=5.6, J=10.6 Hz,H6'b), 7.65δ (m,H-2''-6''), 7.39-7.32δ (H-3''-4''-5''), 7.03δ (d, J=12.7 Hz,H-7''), 6.01δ (d, J=12.7 Hz,H-8''), 3.61δ (s, CH<sub>3</sub>CO-7)

**Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 125MHz):** 92.7(C-1), 153.1 (C-3), 108.0 (C-4), 31.3 (C-5), 31.4(C-6), 172.0 (C-7), 122.6 (C-8), 133.0 (C-9), 60.3 (C-10), 166.0 (C-11), 99.7 (C-1'), 74.0 (C-2'), 77.1 (C-3'), 70.4 (C-4'), 76.9 (C-5'), 61.8 (C-6'), 132.3 (C-1''), 129.8 (C-2''+C-6''), 127.9 (C-3''+C-5''), 128.9 (C-4''), 142.5 (C-7''), 119.1 (C-8''), 165.5 (C-9'') 51.0(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>CO-7)

El producto 4902 se describe por primera vez y corresponde al isómero cis del anterior.

### Acetilación del producto 4901

25 mg del producto 4901 se acetilaron con el fin de confirmar la estructura propuesta. Se disolvieron en anhídrido acético y se añadieron unas gotas de piridina. En 12h había finalizado la reacción . Se extraen repetidamente con AcOEt y se trata con una solución diluida de HCl y solución saturada de bicarbonato sódico. Se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se procede a su separación por HPLC fase reversa.

### Metilación del producto 4901a

10 mg del acetato anterior fueron metilados par confirmar la estructura del producto 4952a.

El estudio espectroscópico del producto resultante coincide exactamente con el acetato del producto 4952a.

### ◆Columna 7D

Se monta una cabeza con los 300 mg de la fracción **7D** concentrada al vacío y se separa en una columna cromatográfica a media presión AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O(790:60:50), para obtener las siguientes fracciones:

7D1

7D2

7D3

7D4

**7D3 PRODUCTO 4950**

10-hidroxiolosido dimetil éster.

Aislado como un aceite de aspecto siruposo ópticamente activo, 250 mg,  $[\alpha]_D^{25} -196.3$  ( $\text{CHCl}_3$ ).

**MSFAB m/z** 477.

El espectro de masas **HR** presenta un ión molecular a m/z 296.0891  $[\text{M-Glc}]^+$  de acuerdo con la fórmula  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_7$ , (calculada 296.0896).

**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300MHz):** 5.91 $\delta$  (s,H-1),7.49 $\delta$  (s,H-3),3.98 $\delta$  (dd, J=9.4, J=4.0 Hz, H-5),2.46 (dd, J=14.8, J=9.5 Hz,H-6a), 2.79 $\delta$  (dd, J=14.8, J=4.2 Hz,H6b), 6.12 $\delta$  (dd, J=7.0, J=5.7 Hz,H-8), 4.15 $\delta$  (ddd, J=13.5, J=5.7, J=1.4 Hz, H-10a), 4.28 (dd, J=13.5, J=7.0 Hz,H-10b), 4.78 $\delta$  (d, J=7.5 Hz,H-1'), 3.22-3.42 $\delta$  (2H,m,H-2', H-5'), 3.85 $\delta$  (d, J=10.0 Hz, H-6'a), 3.91 (dd, J=10.0, J=4.2 Hz, H-6'b), 3.61 $\delta$  (s,7-OCH<sub>3</sub>), 3.67 $\delta$  (s,11-OCH<sub>3</sub>)

**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100MHz):** 94.60 (C-1), 155.04 (C-3), 109.17 (C-4), 32.31 (C-5), 40.96 (C-6), 173.47 (C-7), 129.43 (C-8), 130.92 (C-9), 59.12 (C-10), 168.43 (C-11), 52.00,52.31 (OCH<sub>3</sub>), 100.90 (C-1'), 74.67 (C-2'), 78.34 (C-3'), 71.38 (C-4'), 77.83 (C-5'), 62.65 (C-6')

**Acetilación del producto 4950**

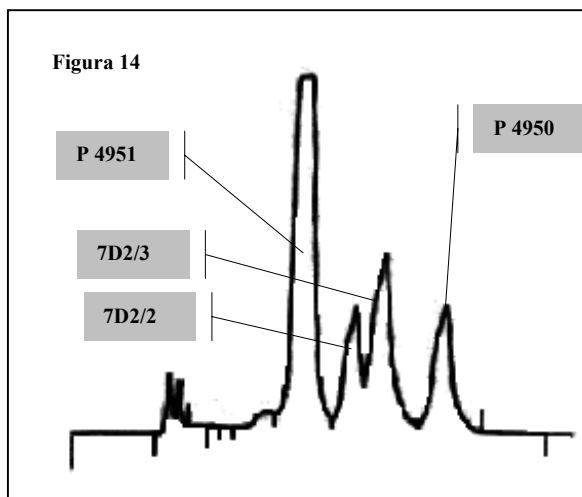
A 10 mg del producto **4950** se le añade la misma cantidad de Py y un exceso de anhídrido acético, tras 12 h. en reposo la reacción ha terminado. Se mezcla con un exceso de MeOH en frío. Se concentra progresivamente añadiendo MeOH hasta la sequedad.

Como se esperaba el espectro del pentaacetato coincide con los acetatos de los productos **4951,4952,(el 4951a)**.

**◆◆◆Columna 7D2**

Las fracción designada 7D2 se concentra y se toman 300mg que se disuelven en MeOH y se filtran para su separación por HPLC en fase normal con una proporción AcOEt/MeOH (95:5).

Se obtienen cuatro picos (ver **Figura 14**), de los cuales el mayoritario tras su estudio espectroscópico, es como se esperaba el producto **4951**. El resto de los picos se designan 7D2/2, 7D2/3, 7D2/4 y se procede a su estudio.



El producto 7D2/4 coincide con **4950**.

### **7D2/2 PRODUCTO 18**

7-cetologanina

20 mg. Producto incoloro.

**UV (MeOH):** 234 nm

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400MHz):** 5.61δ (d, J=3.2, H-1), 7.48δ (s, H-3), 3.5-3.1δ (m, H-5), 2.51δ (ddd, J=19, J=3.6, J=1.3 Hz, H-6a), 2.63δ (dd, J=19.1, J=8, H6b), 2.17-2.08δ (m, H-8), 2.33δ (ddd, J=10.2, J=7, J=3.2, H-9), 1.15δ (d, J=7, 10-CH<sub>3</sub>) 4.67δ (d, J=7.8 Hz, H-1'), 4.07-3.97δ (m, H-2'), 3.55-3.16δ (m, H-2', H-5'), 2.65δ (dd, J=12, J=5.9 Hz, H-6a), 3.90δ (dd, J=12, J=2, H6b), 3.65δ (s, CH<sub>3</sub>CO-11).

**Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100MHz):** 95.5 (C-1), 153.4 (C-3), 112.2 (C-4), 28.4 (C-5), 46.6 (C-6), 220.7 (C-7), 44.8 (C-8), 46.7 (C-9), 13.9 (C-10), 169.0 (C-11), 100.4 (C-1'), 74.8 (C-2'), 78.1 (C-3'), 71.7 (C-4'), 78.6 (C-5'), 62.9 (C-6').

### **Acetilación del producto 18**

10 mg del producto **18** se acetilaron de la forma habitual. Se extraen repetidamente con AcOEt y se trata con una solución diluida de HCl y solución saturada de bicarbonato sódico. Se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se procede a su separación por HPLC fase normal Hex.: AcOEt(10:80).

### **PRODUCTO 18a**

7-cetologanina 2',3',4',6'-O-tetraacetato

**7D2/3 PRODUCTO 28**

8-epikingísido

Producto incoloro,  $[\alpha]_D^{25} -45.87^\circ$  (c 1.88, MeOH).**UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ):** 232(4.15) nm**IR<sub>vmax</sub>:** 3350,1700,1620 cm<sup>-1</sup>.**EM FAB m/z:** encontrados 405 [M]<sup>+</sup>, C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub> requeridos 405

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400MHz):** 5.49δ (d,7.6,H-1),7.88δ (s,H-3),3.08δ (m, H-5), 2.50δ (dd, J=16.5, J=11.4 Hz,H-6a),. 2.86δ (dd, J=16.5, J=4.4 Hz,H6b), 4.49δ (m,H-8), 2.14δ (m,H-9), 1.51δ (d,10-CH<sub>3</sub>), 4.70δ (d, J=7.8 Hz,H-1'), 3.63-3.92δ (H-2'-6'), 3.73δ (s, CH<sub>3</sub>CO-11).

**Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100MHz):** 96.3(C-1), 154.4 (C-3), 109.6 (C-4), 28.1 (C-5), 33.6 (C-6), 174.7 (C-7), 75.8 (C-8), 41.9 (C-9), 21.7 (C-10), 168.3 (C-11), 100.7 (C-1'), 74.7 (C-2'), 78.5 (C-3'), 71.7 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.9 (C-6'), 52.0 (O CH<sub>3</sub>).

**Acetilación del producto 28**

25 mg del producto **28** se acetilaron de la forma habitual. Se extraen repetidamente con AcOEt y se trata con una solución diluida de HCl y solución saturada de bicarbonato sódico. Se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se procede a su separación por HPLC fase normalHex.:AcOEt(10:80)

**PRODUCTO 28a**

8-epikingísido 2',3',4',6'-O-tetraacetato

Producto incoloro,  $[\alpha]_D^{25} -44.4^\circ$  (c 0.54, CHCl<sub>3</sub>).**UV (EtOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ):** 231(4.03) nm**IR<sub>vmax</sub>:** 1740,1620 cm<sup>-1</sup>.**EM FAB m/z:** encontrados 573 [M]<sup>+</sup>, C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub> requeridos 573

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz):** 5.28δ (d,5.6,H-1),7.47δ (s,H-3),2.98-3.18δ (m, H-5),2.31-2.46δ (m,H-6a),. 2.98-3.18δ (m,H6b), 4.24-4.38δ (m,H-8), 2.31-2.46δ (m,H-9), 4.88δ (d, J=8.1 Hz,H-1'), 5.02δ (d, J=9.03Hz,H-2'), 5.24δ (d, J=9.3Hz,H-3'),5.11δ (dd, J=9.5, J=9 Hz,H4'), 3.74δ (ddd, J=11.6, J=4.6, J=2.4 Hz,H5'), 4.29δ (dd, J=12.5, J=4.4 Hz,H6'a), 4.16δ (dd, J=12.5, J=2.4 Hz,H6'b), 3.74δ (s, CH<sub>3</sub>CO-11).

**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100MHz):** 96.8 (C-1), 154.4 (C-3), 109.6 (C-4), 28.1 (C-5), 34.6 (C-6), 174.7 (C-7), 75.9 (C-8), 49.1 (C-9), 21.7 (C-10), 168.9 (C-11), 101.0 (C-1'), 74.9 (C-2'), 78.5 (C-3'), 71.7 (C-4'), 77.9 (C-5'), 62.9 (C-6'), 126.8 (C-1''), 131.3 (C-2''+6''), 115.9 (C-3''+5''), 161.3 (C-4''), 145.3 (C-7''), 114.6 (C-8''), 168.0 (C-9'')

### Acetilación enzimática del dimetiléster del 10-acetoxioleosido.

50 mg. de sustrato, 250 mg. de pancreatina (Sigma) y 5 ml. de AcOEt, se someten a agitación en baño de aceite a 36 o (80°C, reflujo) durante 7-9 días. En algunos casos se usa THF como disolvente.

Como dadores de acetilo se usaron acetato de etilo, acetato de vinilo, acetato de metilo y acetato de ter-butilo en las proporciones descritas arriba para el acetato de etilo.

La separación de productos de reacción se llevó a cabo por HPLC fase normal en un aparato Jasco, en una columna de Kromasil Si de 5 $\mu$  y 1 x 25 cm. Usando como eluyente AcOEt/Hex/MeOH 70/25/5.

### PRODUCTO 4956

2'-O-acetil-10-acetoxioleosido dimetil éster.

Aislado como un aceite

**EMFAB m/z** [M+Na]<sup>+</sup> 541(80), [M+H]<sup>+</sup>

**FAB Ar m/z** [M + Na]<sup>+</sup> 541.1537 (calculado  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NaO}_{14}$ , 541.1533).

**Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz):** 5.80 $\delta$  (s,H-1),7.47 $\delta$  (s,H-3),3.99 $\delta$  (dd, J=9.8, J=4.2 Hz,H-5), 2.45 $\delta$  (dd, J=14.8, J=9.8 Hz,H-6a), 2.87 $\delta$  (dd, J=14.8, J=4.2 Hz,H6b), 6.00 $\delta$  (t, J=6.5,H-8), 4.71 $\delta$  (dd, J=13.5, J=5.8 Hz,H-10a), 4.79 $\delta$  (dd, J=13.5, J=7.8 Hz,H10b), 4.89 $\delta$  (d, J=7.7 Hz,H-1'), 3.70-3.65 $\delta$  (m,H-2'), 4.96 $\delta$  (t, J=9.33, H-3'), 3.70-3.65 $\delta$  (m,H-4'), 3.49 $\delta$  (m,H-5'), 3.81 $\delta$  (dd, J=12.1, J=5.3 Hz,H-6'a), 3.94 $\delta$  (dd, J=12.1, J=3.0 Hz,H6'b), 3.66 $\delta$  (s,7-OMe), 3.74 $\delta$  (s,11-OMe),2.07/2.19 (2/s,CH<sub>3</sub>-OAc).

**PRODUCTO 4957**

2' 6' -O-acetil-10-acetoxioleosido dimetil éster.

Aislado como un aceite

**EMFAB m/z** [M+Na]<sup>+</sup> 560(80), [M+H]<sup>+</sup>

**FAB Ar m/z** [M + Na]<sup>+</sup> 560.447 (calculado C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>NaO<sub>14</sub>, 560.448).

**Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz):** 5.71δ (s,H-1),7.46δ (s,H-3),3.98δ (dd, J=9.5, J=4.0 Hz,H-5), 2.42δ (dd, J=15.3, J=9.5 Hz,H-6a), 2.87δ (dd, J=15.3, J=4.0 Hz,H6b), 6.02δ (t, J=6.2, H-8), 4.72δ (dd, J=15.15, J=6.15 Hz,H-10a), 4.79δ (dd, J=15.15, J=7.77 Hz,H10b), 4.96-4.90δ (d, J=7.7 Hz,H-1'), 4.96-4.90δ (m,H-2'), 4.69δ (t, J=8.1, H-3'), 3.48δ (t, J=8.4, H-4'), 3.51δ (m,H-5'), 4.29δ (dd, J=12.3, J=1.8 Hz,H-6'a), 4.49δ (dd, J=12.3, J=4.1 Hz,H6'b), 3.64δ (s,7-OMe), 3.73δ (s,11-OMe),2.07/2.11,2.14 (3/s,CH<sub>3</sub>-OAc).



- 1.- Se hace una revisión bibliográfica de los iridoides presentes en *Gentiananae* y se propone una clasificación biosintética de los mismos.
- 2.- Se hace una revisión bibliográfica de los datos conocidos sobre la biosíntesis de iridoides.
- 3.- Se discute sobre la posición filogenética de la familia *Oleaceae* dentro de los órdenes *Gentianales* y *Lamiales* en base a datos fitoquímicos y moleculares.
- 4.- Se propone la existencia de dos taxones dentro de *Jasminum* en base a la presencia excluyente de iridano oleosidos (especies de morfología trepadora) y jasminosido oleosidos (especies de morfología leñosa).
- 5.- Se hace una revisión bibliográfica de las aplicaciones en la medicina popular de las especies del género *Jasminum*.
- 6.- Se hace una revisión bibliográfica de las actividades biológicas de los iridoides y sus agliconas.
- 7.- Se establece la estructura y se describen por primera vez dos iridoides derivados del 8-epikingísido aislados de *Jasminum odoratissimum*, como 6'-O-cis-p-(cumaroiloxi)-8-epikingísido y 6'-O-trans-p-(cumaroiloxi)-8-epikingísido.
- 8.- Se establece la estructura de dos agliconas de la 7-cetologanina aisladas de *Jasminum odoratissimum*, y descritas por primera vez, como 1- $\alpha$ -7-dehidrologanetina y 1- $\beta$ -7-dehidrologanetina.

- 9.- Se establece la estructura de tres secoiridoides tipo 10-OH-oleosido , descritos por primera vez, como 10-OH-oleosido dimetil éster, 10-acetoxioleosido dimetil éster y 6'-O-acetil-10-acetoxioleosido dimetil éster.
- 10.- Se establece la estructura y se describen por primera vez dos secoiridoides derivados de la secoxiloganina aislados de *Jasminum odoratissimum* , como 6'-O-cis-p-(cumaroiloxi)-secoxiloganina y 6'-O-trans-p-(cumaroiloxi)-secoxiloganina.
- 11.-Se establece la estructura de cuatro secoiridoides tipo jasminosido, descritos por primera vez, como cis-10-(cinamoiloxi) oleosido metil éster (cis jasminosido), trans-10-(cinamoiloxi) oleosido dimetil éster (metil jasminosido), 10-cis-(p-cumaroiloxi)-oleosido dimetil éster, 10-trans-(p-cumaroiloxi)-oleosido dimetil éster.
- 12.- Se describe por primera vez la estructura correspondiente a un secoiridoide no glucosídico, y se propone para el mismo el nombre de Silvianosido.
- 13.- Se establece por primera vez la estructura de una aglicona aislada de *Jasminum odoratissimum* , probablemente derivada del 10-acetoxioleosido dimetil éster, y se propone para la misma el nombre de trans- jasmoaldehído A.
- 14.- Se obtiene por hidrólisis enzimática del 10-acetoxioleosido dimetil éster un producto no conocido isómero del anterior y se propone para la mismo el nombre de cis- jasmoaldehído A.
- 15.- Se aíslan e identifican de *Jasminum odoratissimum* L. los iridoides 7-cetologanina, 8-epikingísido y el secoiridoide jasminosido.

- 16.- Se corrigen las asignaciones dadas por Ya-Ching Shen y Chung-Hsiung Chen para un producto de síntesis al que llaman Jasmolactona E, como una mezcla natural  $\alpha/\beta$  en la posición 1.
- 17.- Se obtienen por hidrólisis enzimática los productos anteriores junto con un producto no conocido que se propone como intermediario en la biosíntesis y formación de las Jasmolactonas, revisando el mecanismo propuesto por Ya-Ching Shen y Chung-Hsiung Chen.
- 18.- Se pone a punto un método fácil para la acetilación enzimática parcialmente regioselectiva del anillo glucosídico de secoiridoides glucosilados.
- 19.- Se obtienen, por el método anterior, el producto 6'-O-acetil-10-acetoxioleosido dimetil éster y se describen los productos 2'-O-acetil-10-acetoxioleosido dimetil éster y 2',6'-O-diacetil-10-acetoxioleosido dimetil éster por primera vez.
- 20.- Se propone a *Jasminum odoratissimum* Tribu *Jasmineae* como una especie idónea para estudios biosintéticos en iridoides al presentar un amplio espectro de dichos productos y relaciones fitoquímicas con otros taxones más alejados filogenéticamente en la familia *Oleaceae* como el género *Osmanthus* Subtribu *Oleinae* Tribu *Oleeae*.



CÓDIGO	PRODUCTO	PÁGINAS
1	ác. mevalónico (AMV)	79,82,87,91
2	geraniol	82
3	10-OH-geraniol	82,89,93
4	10-OH-nerol	82,89,93
8	epi-iridoidal	87,89,92
9	epi-iridotrial	87,89,92
10	iridoidal	16,79,91,126
11	iridotrial	79,91,126
12	aglicona del ác. deoxilogánico	126
13	ác. deoxilogánico	90,101,119,123,134
14	ác. logánico	14,82,99,103,119,123,133
16	loganina	123,127
1615		128
1616		128
1617		128
1618		128
1619		128
1620		128
1401		103
1402		103
1403		103
1404		103
1405		103
15	ác. 7-epilogánico	126
1501	senburosido I	104
1502	swertiasido	104
1503	senburiosido I	104
16	loganina	16,82,103,120,123
1601		103
1603		103
1604		103
1605		103
1607		103
1608		103
1609		103
1610		103
1611		103
1612	6'-O-m-benzoil loganina	103
1613		103
1614		104
17	7-epiloganina	123,126
18	cetologanina	123,129,137,161,178,287

CÓDIGO	PRODUCTO	PÁGINAS
18a		287
18h		260
18ha		177,267
19	ác. adoxosídico	126,134
21	ác. 7-cetologánico	123,129,161
2101	syrimgopicrosido B	129
2102	syrimgopicrosido C	129
22	secologanosido	16,80,132
23	secologanol	110,133
2301		110
2302		110
2303		15,110
2304		110
2305		110
2306		133
2307		133
2308		133
236	6-hidroxiloganina	127
237	6-O-trans-p-cumaroil-6-β-hidroxiloganina	128
238	arbortristosido A	128
24	secologanina	10,17,80,86,132
25	ac. epikingisídico	14,120,130
2501	syringolactona A	131
2502	syringolactona B	131
2503	Ibolactona A	131
2504	Ibolactona B	131
27	kingísido	17,161
27hαβ		161
272	10-hidroxiloganina	127
277	nyctanthosido	128
278	arbortristosido B	128
28	8-epikingísido	130,180,288
28h	silvianosido	169,194
28a		181,288
2801	cis-6'-p-cumaroil-8-epikingísido	131,185,275
2801a		189,277
2802	trans-6'-p-cumaroil-8-epikingísido	131,185,276
2802a		189,277
29	ác. secologánico	14,99,127,80,132
2904		107
2905	foliamenthin	82,107
2906	dihidrofoliamenthin	82,107

CÓDIGO	PRODUCTO	PÁGINAS
2907		107
30	secoxiloganina	112,132
3001		248,283
3001a		251
3002		248.
3002a		251
3003	oleurosido	132
31	forsitado	134
3101		134
3150		134
33		88
35	ác. epi-deoxilogánico	101
3601	jasmultisido	146
3602	hidroxiframosido A	146
3603	hidroxiframosido B	146
3604	framosido	146
3605	hidroxioramosido	146
3606		146
3607	angustifoliosido C	146
3611	jasmolactona D	157
37h	metilsimuraldehído	160
3701	isoligstrosido	146
3702	isooleuropiana	146
38	oleosido 11-metiléster	14,137
3801	jaspoliosido	137
3803	jaspofoliamosido A	14,138
3804	jaspofoliamosido B	138
3805	jaspolinalosido	138
3807	ligstrosido	120,144
3808	oleuropeina	14,17,120,144
3809	angustifoliosido B	144
3810	angustifoliosido A	144
3811	oleoacteosido	139
3812	oleoechinacosido	139
3815	isojasminin	140
3816		140
3817	jasmesosido	140
3818		140
3819		140
3820	jasminin	140
3821		140
3822	jasmosido	140

CÓDIGO	PRODUCTO	PÁGINAS
3823	ác. jasmosídico	140
3824		140
3825	molihuasido A	143,162
3825hd	sambaceina I	162
3826	molihuasido B	143
3827	molihuasido C	143,162
3827hd	sambaceina II	162
3828	molihuasidoD	143
3829	molihuasidoE	143,162
3830	sambacosido A	143,162
3830hd	sambaceina III	162
3831	sambacosido E	143
3832	sambacosido F	143
3833	jasurosido A	143
3834	jasurosido B	143
3835	jasurosido C	143
3836	jasurosido D	143
3837	demetiloleuropeina	144
3840	polyanosido	144
3841	neopolyanosido	144
3842	excelsiosido	139
3843	sambacin	141,143
3844	8,9-dehidrojasminin	141
3845	jasminisnyrosido	141
3846	insularosido	141
3847	fraxundosido	141
3848	jasnuloso A	142
3849	jasnuloso B	142
3850	jasnuloso C	142
3851	jasnuloso D	142
3852	nudiflosido A	142
3853	jasnudiflosido	142
3854	nudiflosido B	142
3855	nudiflosido C	142
3856		141
3857		145
3858		145
3859		145
3860		145
3861		145
39		133
3611h	jasmolactona D	157

CÓDIGO	PRODUCTO	PÁGINAS
4605	ligustaliosido A	134,148
4606	ligustaliosido B	134,148
45	secologanosido 7-metiléster	132
47	morrnisido	114
4701		114
4702		114
4703		114
4703		114
4704		114
4705		114
4708		114
4709		114
4710		114
4711		114
4712		114
4713		114
4714		114
4715		114
4716	secogaliosido	114
4706		114
4850	7-epi-10-hidroxiloganina	106
49		150
4901	jasminosido	150,226,284
4901a		227
4902	cis-jasminosido	230,284
4903		151
4904		151
4905		151
4906		151
4907		150
4950	10-OH-oleosido dimetiléster	199,286
4950a		206,286
4950h1 $\alpha\beta$	jasmolactona E $\alpha\beta$	221,269,271
4950h1a		224,270
4950h2		225,258,271
4951	10-Ac-oleosido dimetiléster	203,252,272
4951a		273
4951h/c		218,274
4951h/t		213,265
4952		152
4952a		237,282
4953		152

CÓDIGO	PRODUCTO	PÁGINAS
4953a		243,281
4954		152
4954a		246,280
4955	6'-O-acetil-10-Ac-oleosido dimetiléster	152,208
4956	2'-O-acetil-10-Ac-oleosido dimetiléster	252,278
4957	2'6'-O-diacetil-10-Ac-oleosido dimetiléster	253,278
51	11-metil-glucooleosido	120,137
5101	neonuezhenido	138
5102		138
5103		138
52	OH-citronellol	84
56	9,10-dihidroxineral	83
57	9,10-dihidroxisgeranial	83
60	10-oxogeranial	82,89,93
61	10-oxoneral	82,89,93
64	9,10-dihidroxisgeraniol	83
65	9,10-dihidroxinerol	83
66	9,10-dihidroxicitronellal	
67	10-OH-citronellol	83
68	10-OH-citronellal	83
69	oxocitronellol	83,94
70	10-OH-linalol	83
78	10-OH-geranial	91,93
79	10-OH-nerol	91,93
82	9-oxo-10-OH-geraniol	86
83	9,9,10,10-tetraetoxigeraniol	86
90	swerosido	17,99,102,108
9010	centapicrin	108
9002	desacetilcentapicrin	108
9003	decentapicrin A	108
9004	decentapicrin B	108
9005	decentapicrin C	108
9006	amarogentin	108
9007		108
9008	trifloriosido	108
9009	scabrosido	108
91	swertiamarin	47,99,109,133,147
9101		109
9102		109
9103		109
9104		109
9105		109

CÓDIGO	PRODUCTO	PÁGINAS
9106		109
9107	amoroswerin	109
9108	rindosido	109
9109	customosido	106,109
9110		109
9111		109
92	gentiopicrósido	99,102,110
92h		160
9201		110
93		89
94	ác. 10-OH logáico	101,104
9450	geniposido	53,105,147
9451		105
9452		106
95		104
9501	asperulosido	84
9450h	genipina	53
96	ác. geniposídico	101,104
9650	10-OH-loganina	106
9601		105
97		104
9701		105
9702		105
98		104
9851		116
99		104
9951		116
9952		116
9953		116
100		115
10050	mussaenosido	98,116
101	shanzhisido	98,115
10101		116
10150	shanzhisido metiléster	98,115
10151		116
10152		116
10153		116
10154		116
102	boschanalosido	87,98
103		87,98
104	tarenosido	50,84,87,98,115
105	thevesido	98,115

CÓDIGO	PRODUCTO	PÁGINAS
106	plumierido	10,79,115,117
10601		117
10602		117
10603		117
10604		117
10605		117
10606		117
10607		117
10608		117
10609		117
10610		117
10611	allamein $\alpha$	117
10612	allamein $\beta$	117
10613		117
10614		117
10615		117
10616		15,118
10617		118
10618		15,118
10609		118
107	gardenosido	16,84,87,115,147
10750	gardenosido metiléster	115
11050		116

Se listan todos los productos naturales citados en la presente tesis correspondientes a los iridoides y secoiridoides aislados de *Gentianales* y *Lamiaceae*. Las dos (tres) primeras cifras se corresponden con productos de las vías principales de la biosíntesis de iridoides, seguidas de otras dos cifras en el caso de ser derivados por acilación de los primeros.

Igualmente se listan todas las agliconas naturales derivadas de los anteriores con el código del producto de origen seguido de **h** y para el caso de dialdehídos **hd**.

Se listan todos los acetatos de los productos aislados de *Jasminum odoratissimum* con el código del producto de origen seguido de **a**.



Parte de los datos obtenidos en la presente tesis se han publicados en los siguientes trabajos:

#### UN SECOIRIDOIDE DE *JASMINUM ODORATISSIMUM*

Trujillo J. M. , Hernández J.M., Pérez J.A., H. López, y Frías I. (1996) *Phytochemistry* **42**, 533

**Resumen:** Un secoiridoide glucosilado, 10-acetoxioleosido dimetil éster, junto con el conocido 10-OH oleosido dimetil éster se aislaron de las hojas de *Jasminum odoratissimum*. La estructura de estos compuestos se ha caracterizado en base a evidencias espectroscópicas.

#### A SECOIRIDOID GLUCOSIDE FROM *JASMINUM ODORATISSIMUM*

**Abstract:** A new secoiridoid glucoside, 10-acetoxioleosido dimetil éster, together with the known 10-OH oleosido dimetil ester was isolated from the leaves of *Jasminum odoratissimum*. The structures of these compounds have been characterized on the basis of spectroscopic evidence.

#### SECOIRIDOIDES DE *JASMINUM ODORATISSIMUM*

H. López, Pérez J.A., Hernández J.M. y Trujillo J. M. (1997) *Journal of Natural Products* **60**, 1337

**Resumen:** Cinco nuevos secoiridoïdes, trans- and cis-6'-O-p-cumaroil-8-epikingisido (**1a**) y (**1b**), trans- y cis-10-(p-cumarioiloxi) oleosido dimetil éster (**2a**) y (**2b**), y 6'-O-acetil-10 acetoxioleosido (**2e**), fueron aislados de *Jasminum odoratissimum* y sus estructuras determinadas por datos espectroscópicos. Los compuestos **1a, 1b, 2a** y **2b** se caracterizaron como derivados peracetilados (**1c, 1d, 2c** y **2d**, respectivamente).

#### SECOIRIDOIDS FROM *JASMINUM ODORATISSIMUM*

**Abstract:** Five new secoiridoids, trans- and cis-6'-O-p-coumaroyl-8-epikingiside (**1a**) y (**1b**), trans- and cis-10-(p-coumaroyloxi) oleoside dimethylester (**2a**) and (**2b**), and 6'-O-acetyl-10 acetoxioleoside (**2e**), were isolated from *Jasminum odoratissimum* and their structures determined by spectroscopic means. Compounds **1a** and **1b** and **2a** and **2b** were characterized as their peracetylated derivatives (**1c** and **1d** and **2c** and **2d**, respectively).

#### SECOIRIDOIDES GLUCOSILADOS E IRIDOIDES DE *JASMINUM ODORATISSIMUM*

Pérez J.A., Hernández J.M., López H. Y Trujillo J.M., *Natural Products Letters* (1999) **13(4)**, 247

**Resumen:** Dos nuevos iridoïdes glucosilados, trans-10-(cinamoiloxi) oleosido dimetil éster (metil jasminosido) and cis-10-(cinamoiloxi) oleosido monometil éster; y dos nuevos iridoïdes, 1 $\alpha$ - y 1 $\beta$  -, 7-

dehidrologanetina, junto con los iridoides conocidos jasminosido fueron aislados de las hojas de *Jasminum odoratissimum*. La estructura de estos compuestos se ha caracterizado en base a datos espectroscópicos.

#### SECOIRIDOID GLUCOSIDES AND IRIDOIDS FROM *JASMINUM ODORATISSIMUM*

Two new secoiridoid glucosides, trans-10-(cinnamoyloxy) oleoside dimethylester (methyl jasminoside) and cis-10-(cinnamoyloxy) oleoside monomethylester; and two new iridoids, 1 $\alpha$ - and 1 $\beta$  -, 7-dehidrologanetin, together with the known iridoid jasminoside were isolated from leaves of *Jasminum odoratissimum*. The structures of these compounds have been characterised on the basis of spectroscopic evidence.

#### Otros trabajos publicados:

#### LIGNAN MODELS AS INHIBITORS OF *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* LIGNIN PEROXIDASE

Frías I., Trujillo J. M., Romero J.A., Hernández J.M., y Pérez J.A. (1995) Biochimie, 707

**Resumen:** El lignano 8,8'-bis- (metiledioxi)-cinamic acid (BMDCA) es un potente inhibidor competitivo ( $K_i=2.0 \mu\text{M}$ ) de la lignin peroxidasa (LiP) de *Phanerochaete chrysosporium* y de la peroxidasa extracelular de *Phlebia radiata* ( $I_{0.5}=10\mu\text{M}$ ). Los derivados del BMDCA con el mismo doble enlace también inhiben estas enzimas con la misma intensidad. Si el doble enlace estaba hidrogenado se perdía el efecto inhibitor. HRP-VIII y HRP-XI fueron mínimamente inhibidas por BMDCA ( $I_{0.5}>50\mu\text{M}$ ) y dos peroxidases de plantas descritas como eficientes sintetizadoras de lignanos no fueron afectadas. Cultivos líquidos de *P. chrysosporium* no decoloraron el Poly R478 cuando están presentes  $250\mu\text{M}$  de BMDCA.

#### LIGNAN MODELS AS INHIBITORS OF *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* LIGNIN PEROXIDASE

**Abstract:** The lignan 8,8'-bis- (metiledioxi)-cinamic acid (BMDCA) is a powerful competitive inhibitor ( $K_i=2.0 \mu\text{M}$ ) of the lignin peroxidase (LiP) from *Phanerochaete chrysosporium* and the extracelular peroxidase of *Phlebia radiata* ( $I_{0.5}=10\mu\text{M}$ ). BMDCA derivatives with the same double bond system also inhibit these enzymes to the same extent. If the double bond were hydrogenated, the inhibitory effect was lost. HRP-VIII and HRP-XI were slightly inhibited by BMDCA ( $I_{0.5}>50\mu\text{M}$ ) and two plant peroxidases described as efficient lignan synthesizers were unaffected. Liquid cultures of *P. chrysosporium* did not discolor the dye Poly R478 when  $250\mu\text{M}$  of BMDCA was present.