

Curso 2011/12
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/39
I.S.B.N.: 978-84-15910-41-1

ADRIÁN GUTIÉRREZ CEPEDA

**Estudio de metabolitos secundarios
de rhodophytas y phaeophytas**

Directores

**MARÍA LUISA SOUTO SUÁREZ
JOSÉ JAVIER FERNÁNDEZ CASTRO
MANUEL NORTE MARTÍN**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

El trabajo de investigación que contiene la presente memoria fue desarrollado en el **Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González"**, bajo la dirección de los Doctores **María Luisa Souto Suárez, José Javier Fernández Castro y Manuel Norte Martín**, a quienes expreso mi más sincero agradecimiento por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y participar en los proyectos cuyos resultados constituyen esta tesis doctoral.

A mis hijas Adriaris y Ariadna, por ser mi fuerza y templanza,

A mis dos grandes amores: mi madre Lucrecia y mi esposa Aris,

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo mostrar mi gratitud a mis directores, los doctores María Luisa Souto, José Javier Fernández y Manuel Norte Martín, por la facilidad para formar parte de este equipo de trabajo. Quiero agradecer de forma especial a ti Mari, por tus enseñanzas, disposición y apoyo desinteresado empleados en mi formación, sin ello hubiese sido imposible afrontar con éxito la elaboración de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: José Napolitano, Francisco Cen, Tamara Vilches, Humberto Domínguez, Martín Febles, Guillermo Díaz, Caterina Rodríguez, Melania Díaz y Adrián Santiago, por la ayuda prestada durante la realización de esta memoria. A Eva Aylagas y Julián Lucio por contribuir en el estudio inicial de la *L. microcladia*.

Al Dr. Antonio Hernández Daranas por su asistencia inestimable en el estudio configuracional de distintos compuestos presentados en esta tesis doctoral.

Al Dr. José Adrián Gavín por facilitarnos un eficaz servicio con los experimentos de RMN y al Dr. Cirilo Pérez por su colaboración en distintos aspectos cristalográficos. A los doctores Matías López Rodríguez y Miguel Ángel Ramírez por el análisis de difracción de rayos X y realización de los cálculos teóricos, respectivamente. A la Dra. M. C. Gil Rodríguez por la clasificación de las algas del género *Laurencia* y al Dr. Alberto Brito por facilitarnos los especímenes de *L. variegata*. Gracias a los grupos de los doctores José M. Padrón y Azucena González Coloma por desarrollar parte de los bioensayos presentados en esta memoria.

A la Dra. Carmen R. Facundo, por preocuparse en que esta tesis concluyera con éxito.

A mis padres, hermanos y suegros por creer en mis posibilidades; a Amarilis García, mi querida Ama ¡cuánto aliento he recibido de usted! A Dña. Enerina y Don Luis por sus oraciones; y a todos los amigos de Tenerife y República Dominicana, que no los nombro porque son muchísimos. Quisiera agradecer especialmente a mi amiga, amada esposa y compañera de caminos, Aris Garrido, que a pesar de la distancia ha estado espiritualmente unida a mí, empujando hacia un mismo objetivo: por comprenderme y motivarme a alcanzar nuevas metas personales y académicas.

Agradecer el respaldo institucional y económico de la Universidad Autónoma de Santo Domingo, el soporte del Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación de España mediante una beca MAEC-AECID. Este trabajo se realizó dentro de los proyectos SAF2011-28883-C03-01, CTQ2008-06754-C04-01 y KBBE-3-245137 (MAREX FP7).

INDICE

1. METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN MARINO	1
RESUMEN	1
1.1. METABOLISMO: PRIMARIO VS SECUNDARIO	2
1.2. METABOLITOS SECUNDARIOS ACTIVOS DE ORIGEN MARINO	2
1.3. ACERCA DE ESTA MEMORIA DE TESIS, OBJETIVOS Y APARTADOS	4
2. METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>LAURENCIA MARILZAE</i>	7
RESUMEN	7
2.1. ANTECEDENTES	11
2.1.1. Estudio químico preliminar del alga	11
2.1.2. Introducción a las acetogeninas C-15: tipos y biosíntesis	13
2.1.2.1. Acetogeninas C-15 acíclicas	15
2.1.2.2. Acetogeninas C-15 carbocíclicas	16
2.1.2.3. Acetogeninas C-15 heterocíclicas	16
2.2. RECOLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL ALGA <i>LAURENCIA MARILZAE</i>	25
2.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS DE LOS EXTRACTOS	25
2.4. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS NUEVOS METABOLITOS	27
2.4.1. Acetogeninas C-15 con sistema de anillo [5.5.1]biciclotridecano	27
2.4.1.1. Marilzabicioaleno A (1)	27
2.4.1.2. Marilzabicioaleno B (2)	32
2.4.1.3. Marilzabicioaleno C (3)	35
2.4.1.4. Marilzabicioaleno D (4)	37
2.4.2. Acetogeninas C-15 con anillo de doce miembros (Obtusalenos)	40
2.4.2.1. 12-Epoxi-obtusaleno IV (5)	40
2.4.2.2. 12-Epoxi-obtusaleno IVB (6)	45
2.4.2.3. Bromopropargilo del 12-epoxi-obtusaleno IV (7)	48
2.4.2.4. 1-Metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (8)	50
2.4.2.5. Clorohidrina del 1-metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (9)	53
2.4.2.6. Obtusaleno X (10)	55
2.4.3. Acetogeninas C-15 con anillo de ocho miembros (Oxocanos)	60
2.4.3.1. Marilzaleno (11)	60
2.4.3.2. (+)-4 <i>R</i> -Acetoxi-marilzaleno (12) y (-)-4-Acetoxi-marilzaleno (13)	65
2.4.3.3. Determinación de la configuración absoluta del marilzaleno (11) por correlación química con el (+)-4 <i>R</i> -acetoxi-marilzaleno (12)	68
2.4.4. Acetogeninas C-15 con anillo de cinco miembros (Oxolanos)	68
2.4.4.1. Marilzafuraleno A (14)	68
2.4.4.2. Marilzafuraleno B (15)	73
2.4.4.3. Marilzafuraleno C (16)	75
2.4.4.4. Marilzafuraleno D (17)	76
2.4.4.5. 12-Acetoxi-marilzafurenino (18)	80
2.4.5. Acetogeninas C-15 con estructuras lineales	82
2.4.5.1. Z-Adrienino (19)	82

2.4.5.2. <i>E</i> -Adrienino (20)	85
2.4.6. Compuestos de naturaleza terpénica	87
2.4.6.1. <i>E</i> -Dactileno B (21)	87
2.4.6.2. Nor- <i>E</i> -cetodactileno (22)	91
2.5. PROPUESTA BIOGENÉTICA DE LOS MARILZABICICLOALENOS Y LOS NUEVOS OXOLANOS	94
2.6. DATOS FÍSICOS DE LOS METABOLITOS AISLADOS	97
2.6.1. Marilzabicicloaleno A (1)	97
2.6.2. Marilzabicicloaleno B (2)	98
2.6.3. Marilzabicicloaleno C (3)	99
2.6.4. Marilzabicicloaleno D (4)	100
2.6.5. 12-Epoxi-obtusaleno IV (5)	101
2.6.6. 12-Epoxi-obtusaleno IVB (6)	102
2.6.7. Bromopropargilo del 12-epoxi-obtusaleno IV (7)	104
2.6.8. 1-Metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (8)	105
2.6.9. Clorohidrina del 1-metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (9)	106
2.6.10. Obtusaleno X (10)	107
2.6.11. Marilzaleno (11)	109
2.6.12. (+)-4 <i>R</i> -Acetoxi-marilzaleno (12)	111
2.6.13. (-)-4-Acetoxi-marilzaleno (13)	112
2.6.14. Marilzafuraleno A (14)	113
2.6.15. Marilzafuraleno B (15)	114
2.6.16. Marilzafuraleno C (16)	115
2.6.17. Marilzafuraleno D (17)	116
2.6.18. 12-Acetoxi-marilzafurenino (18)	118
2.6.19. <i>Z</i> -Adrienino (19)	119
2.6.20. <i>E</i> -Adrienino (20)	120
2.6.21. <i>E</i> -Dactileno (21)	121
2.6.22. Nor- <i>E</i> -cetodactileno (22)	122
2.6.23. Metabolitos conocidos aislados de <i>L.marilzae</i>	123
2.6.24. Hidrólisis alcalina del (+)-4 <i>R</i> -Acetoxi-marilzaleno (12)	124
3. METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAURENCIA MICROCLADIA	127
RESUMEN	127
3.1. ANTECEDENTES	129
3.1.1. Esqueleto sesquiterpénico de macrocarpano: consideraciones biogenéticas	129
3.2. RECOLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL ALGA LAURENCIA MICROCLADIA	135
3.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO	135
3.4. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS NUEVOS METABOLITOS	137
3.4.1. Nuevos derivados de macrocarpano	137
3.4.1.1. Laurocarpano A (23)	137
3.4.1.2. Laurocarpano B (24)	142
3.4.1.3. Laurocarpano C (25)	145
3.4.1.4. Laurocarpano D (26)	147
3.4.1.5. Laurocarpano E (27)	150

3.4.2. Derivados tricíclicos	153
3.4.2.1. Ciclolaurocarpano (28) y bromociclococanol	153
3.5. ORIGEN BIOGENÉTICO DE LOS METABOLITOS AISLADOS	161
3.6. DATOS FÍSICOS DE LOS METABOLITOS AISLADOS	163
3.6.1. Laurocarpano A (23)	163
3.6.2. Laurocarpano B (24)	164
3.6.3. Laurocarpano C (25)	165
3.6.4. Laurocarpano D (26)	166
3.6.5. Laurocarpano E (27)	167
3.6.6. Ciclolaurocarpano (28)	168
3.6.7. Metabolitos conocidos aislados de <i>L. microcladia</i>	169
4. METABOLITOS SECUNDARIOS DE LOBOPHORA VARIEGATA	171
RESUMEN	171
4.1. ANTECEDENTES	173
4.1.1. Alga parda <i>Lobophora variegata</i> : introducción	173
4.1.1.1. Metabolitos secundarios aislados de <i>Lobophora variegata</i>	175
4.2. RECOLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL ALGA	179
4.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO	179
4.4. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS NUEVOS METABOLITOS	181
4.4.1. Nonadecacétidos con un nuevo esqueleto carbonado de lobofozano	181
4.4.1.1. Lobofozol A (29)	181
4.4.1.2. Lobofozol B (30)	185
4.4.1.3. Lobofozol C (31)	188
4.4.2. Otros policétidos	191
4.4.2.1. Lobofopiranona A (32)	191
4.4.2.2. Lobofopiranona B (33)	193
4.4.2.3. Lobofozonas A (34) y B (35)	196
4.4.2.4. Lobofozonas C (36) - E (38)	200
4.5. PROPUESTA BIOGENÉTICA DE LOS NUEVOS POLICÉTIDOS	207
4.5.1. Generalidades	207
4.5.2. Propuesta biogenética para los nuevos metabolitos aislados	210
4.6. DATOS FÍSICOS DE LOS NUEVOS METABOLITOS AISLADOS	214
4.6.1. Lobofozol A (29)	214
4.6.2. Lobofozol B (30)	215
4.6.3. Lobofozol C (31)	216
4.6.4. Lobofopiranona A (32)	217
4.6.5. Lobofopiranona B (33)	218
4.6.6. Lobofozona A (34)	219
4.6.7. Lobofozona B (35)	220
4.6.8. Lobofozona C (36)	221
4.6.9. Lobofozona D (37)	222
4.6.10. Lobofozona E (38)	223

5. EVALUACIÓN DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS	225
RESUMEN	225
5.1. INTRODUCCIÓN	226
5.2. ACTIVIDAD CITOTÓXICA	226
5.3. ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA	227
5.4. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS REALIZAS DENTRO DECONSORCIO MAREX	229
CONCLUSIONES	231
APÉNDICE I: MATERIALES Y MÉTODOS	
I.1. TÉCNICAS EXPERIMENTALES	235
I.1.1. Técnicas espectroscópicas	235
I.1.1.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	235
I.1.1.2. Absorción en el Infrarrojo (IR)	235
I.1.1.3. Rotación Óptica	235
I.1.1.4. Espectroscopía de absorción en el Ultravioleta—Visible (UV)	235
I.1.1.5. Espectroscopía de Dicroísmo Circular (DC)	236
I.1.1.6. Punto de fusión	236
I.1.1.7. Espectrometría de Masas	236
I.1.1.8. Análisis de los cristales por Difracción de Rayos X	236
I.1.2. Técnicas cromatográficas	237
I.1.2.1. Cromatografía de Exclusión Molecular	237
I.1.2.2. Cromatografía en Columna de Media Presión	237
I.1.2.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	238
APÉNDICE II: MÉTODOS DE ANÁLISIS CONFIGURACIONAL	
II.1. ESTUDIOS CONFIGURACIONALES BASADOS EN EL ANÁLISIS DE CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO	239
II.1.1. Introducción	239
II.1.2. Análisis configuracional de sistemas acíclicos	240
II.1.3. Estudio configuracional de anillos de cinco miembros	245
II.1.4. Medidas experimentales de las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares	248

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACP	<i>Acil carrier protein</i>
a. r.	Abundancia relativa
AT	Acetil transferasa
B3LYP	<i>Becke three-parameter Lee-Yang-Parr exchange functional</i>
BPO	Bromoperoxidasa
<i>br</i>	singlete ancho
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CoA	Coenzima A
d	doblete
DC	Dicroísmo Circular
DH	Deshidratasa
DQF	<i>Double Quantum Filtered</i>
dt	doblete de triplete
E_2	Eliminación bimolecular
EI-HRMS	<i>Electronical Ionization - High Resolution Mass Spectrometry</i>
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
ER	Enoil reductasa
ESI-FTICR	<i>Electrospray Ionization - Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>
ESI-HRMS	<i>Electrospray Ionization - High Resolution Mass Spectrometry</i>
FASs	Ácido graso sintasas
FDA	Agencia de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos
FI	Inhibición alimentaria
FPP	Pirofosfato de farnesilo
GC-MS	Cromatografía de Gas acoplada a Espectrometría de Masas
GI_{50}	Concentración Inhibitoria del crecimiento del 50%
GGPP	Pirofosfato de geranylgeraniol o geranylgeraniol pirofosfato
GPP	Pirofosfato de geranilo
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HSQC-HECADE	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence - Heteronuclear Couplings from-ASSCI-Domain Experiments with E.COSY-type cross peaks</i>
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IC_{50}	Concentración Inhibitoria del 50%

<i>i.e.</i>	un ejemplo
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KR	Cetorreductasa
KS	Cetosintasa
LPO	Lactoperoxidasa
m	multiplete
M	Concentración molar
MAT	Malonil/acetil transferasa
MAREX	<i>Exploring marine resources for bioactive compounds: from discovery to sustainable production and industrial applications</i>
NAPDH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NBS	N-bromosuccinimida
NCI	Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de América
NOE	Efecto Nuclear Overhauser
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NPP	Pirofosfato de nerolidilo
PKSs	Policétidosintasas
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN 1D	Resonancia Magnética Nuclear Monodimensional
RMN 2D	Resonancia Magnética Nuclear Bidimensional
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
ROE	Rotación Nuclear Overhauser
ROESY	<i>Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
s	singlete
<i>S_N1</i>	Sustitución nucleofílica unimolecular
<i>S_N2</i>	Sustitución nucleofílica bimolecular
SQDG's	Sulfoquinovosildiacilgliceroles
t	triplete
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
TPSs	Terpenosintasas
TROESY	<i>Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy</i>
UV	Ultravioleta
WM	Reagrupamiento Wagner-Meerwein

CAPÍTULO 1

Metabolitos secundarios de origen marino



1.1. METABOLISMO: PRIMARIO VS SECUNDARIO

Todos los organismos necesitan transformar e interconvertir una enorme cantidad de compuestos orgánicos a fin de ser capaces de vivir, crecer y reproducirse.¹ Para ello se hace uso de un conjunto de reacciones químicas cuidadosamente reguladas por enzimas que constituyen unos complejos procesos interrelacionados, el metabolismo, cuyos principales pasos se denominan rutas metabólicas.

En ellos hay que distinguir los involucrados en procesos cruciales para la vida, y que a pesar de las variadas características de los organismos vivos, son, con pequeñas modificaciones, esencialmente los mismos en todos ellos. Los compuestos implicados en estas rutas se denominan metabolitos primarios. Entre ellos se encuentran las proteínas, los ácidos nucleicos y los tipos más frecuentes de carbohidratos y lípidos.

Por otro lado, existe un área de metabolismo que tiene que ver con una serie de compuestos de distribución mucho más limitada en la naturaleza. Se encuentran sólo en determinados organismos o grupos de organismos, y son una expresión de la individualidad de las especies. Estas sustancias se denominan metabolitos secundarios, no se producen necesariamente bajo todas las condiciones, y en la mayoría de los casos su función o beneficio para el organismo productor todavía no se conoce. Sólo en casos obvios en que estos metabolitos secundarios son sustancias tóxicas o agentes coloreados es lógico asumir que están relacionados con la defensa frente a depredadores o con la atracción de otras especies. Los metabolitos secundarios son derivados de los primeros y constituyen la principal fuente de productos naturales activos con aplicación medicinal. Pueden emplearse directamente como fármacos o bien servir de modelos para sintetizar nuevos compuestos que optimicen alguna de sus propiedades químicas y farmacológicas: solubilidad, estabilidad, potencia, toxicidad, absorción, distribución, metabolismo, excreción, etc.²

1.2. METABOLITOS SECUNDARIOS ACTIVOS DE ORIGEN MARINO

Durante muchos años, la investigación en medicina tradicional se centró únicamente en las plantas y en los microorganismos terrestres, debido entre otros

¹ Dewick, P. M. "Medicinal natural products: a biosynthetic approach". John Wiley & Sons; 2009, pp. 7.

² Jiménez, J. C.; Marfil, M.; Francesch, A. M.; Cuevas, C.; Álvarez, M.; Albericio, F. *Inv. y ciencia*, **2007**, 75.

factores, a que sus especímenes eran fácilmente accesibles. No obstante, con el constante avance de la tecnología dedicada a la prospección, al estudio químico y de bioactividad, una parte importante de la investigación farmacéutica más prometedora se centra actualmente en los recursos del mar.^{3,4} Al hecho de que, aproximadamente el 70% de la superficie terrestre está cubierta por mares y océanos y que su diversidad marina constituye el 95% de toda la biosfera, hay que añadir que sus variadas características, desde muy favorables hasta extremas, hacen que las especies marinas generen una inmensa variedad de entidades químicas de exclusiva sofisticación y con actividades biológicas potentes, desarrolladas como una forma de defensa bioquímica para sobrevivir en un entorno extremadamente competitivo.⁵ Según el Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU. (NCI), el porcentaje de extractos activos de origen marino (1.8%) es muy superior a los de origen terrestre (0.4%).

Sin embargo, los inconvenientes más comunes de esta aproximación en la búsqueda de fármacos de origen marino ha sido la baja disponibilidad de estos productos en su fuente natural, así como la complejidad de sus estructuras. Estos hechos hacen difícil el abordaje industrial de su síntesis total y representa un reto en el desarrollo de procedimientos de síntesis, biotecnología y acuicultura, a fin de asegurar el suministro de la molécula activa para su producción masiva y comercialización con independencia de la fuente.

El papel de los productos naturales en general, y de los marinos en particular, en el descubrimiento de nuevos fármacos ha sufrido muchos cambios en los últimos 30 años, con una disminución notable de la participación de las principales compañías farmacéuticas a mediados de la década de 1990.⁴ Sin embargo, en este campo se ha producido un “renacimiento” en los últimos 7 años. Esto ha sido en parte impulsado por los nuevos desarrollos en la tecnología analítica, espectroscópica, etc, y en parte por la comprensión de que las tecnologías competidoras, como la química combinatoria no han cumplido las expectativas en la aportación significativa de nuevos fármacos. La gran ventaja de los productos naturales es la novedad de sus estructuras, que difícilmente podrían haber sido el resultado de un razonamiento humano por muy creativo que fuese.⁶ Por otro lado, la investigación científica básica en la química y farmacología de los

³ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.*, **2012**, 29, 144 y referencias anteriores correspondientes a esta misma serie.

⁴ Molinski, T. F.; Dalisay, D. S.; Lievens, S. L.; Saludes, J. P. *Nat. Rev.*, **2009**, 8, 69.

⁵ De la Calle, F. *Treballs de la SCB.*, **2007**, 58, 141.

⁶ Avendaño, M. C. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, **2011**, 77, 13.

productos naturales marinos y los esfuerzos dirigidos en el desarrollo de los medicamentos por fin ha empezado a dar sus frutos.

Datos de fuentes especializadas indican que más de 30,000 compuestos de origen marino se encuentran indexados en el “*Dictionary of Marine Natural Products*”.⁷ Estos nuevos metabolitos fueron aislados fundamentalmente de algas, esponjas, invertebrados y celentéreos; de los cuales una cantidad considerable han resultado ser candidatos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos con distintos propósitos terapéuticos,⁸ destacándose entre otros, los orientados al tratamiento del cáncer.⁹

En este sentido cabe mencionar que tras décadas de investigación de instituciones académicas y compañías farmacéuticas privadas, hoy día aproximadamente 22 fármacos de origen marino han sido debidamente aprobados por la Agencia de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), e incluso algunos de ellos ha alcanzado la comercialización. Distintos ejemplos son el analgésico (Prialt®) y el antitumoral trabectedina (Yondelis®).

1.3. ACERCA DE ESTA MEMORIA DE TESIS, OBJETIVOS Y APARTADOS

Una de las líneas fundamentales de investigación de nuestro grupo en los últimos años se orienta hacia la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas de macro y microorganismos marinos. Abarca principalmente estudios estructurales, biosintéticos y farmacológicos. Precisamente, dentro del apartado de los macroorganismos juegan un papel fundamental las macroalgas, en especial la división Rhodophytas o algas rojas, y dentro de ellas, las del género de *Laurencia*.

Las algas rojas del género *Laurencia* son las más conocidas y estudiadas desde el punto de vista quimiotaxonómico de todas las algas rojas,^{3,8} debido a su habilidad para biosintetizar una amplia variedad de metabolitos secundarios con inusuales esqueletos carbonados y destacadas actividades biológicas. Desde el punto de vista biogénico como pauta de clasificación para los metabolitos aislados de *Laurencia*, generalmente se agrupan en terpenos y acetogeninas C-15. Los primeros suelen ser en su mayoría sesquiterpenos y unos pocos di- y triterpenos; muchos de los cuales poseen halógenos y

⁷ Blunt, J. W. y Munro, M. H. G. (Eds.), “*Dictionary of marine natural products*”, Chapman & Hall, CRC, Boca Raton; 2007, <http://dmnp.chemnetbase.com/intro/index.isp>.

⁸ Kijjoo, A.; Sawangwong, P. *Mar. Drugs*, **2004**, *2*, 73.

⁹ Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67*, 1216.

otras funcionalizaciones que les confieren novedosas características estructurales y actividades biológicas. Mientras que las acetogeninas C-15, son de naturaleza no terpénica y su origen biogenético está asociado al metabolismo de los ácidos grasos. Una parte importante de estos compuestos han mostrado actividades biológicas que incluyen inhibición de proteínas fosfatasas, efectos citotóxicos o antitumorales, propiedades antihelmínticas, antibacterianas, contra la malaria, “*anti-fouling*”, insecticidas y antivirales.¹⁰ A pesar de la intensiva investigación de la que han sido objeto, las especies de *Laurencia* siguen constituyendo hoy una fuente atractiva de nuevas sustancias con estructuras únicas y con potencial bioactivo.

En esta tesis, hemos realizado el estudio fitoquímico de dos especies de algas rojas, *Laurencia marilzae* y *Laurencia microcladia*, y una alga parda, *Lobophora variegata*. La primera de ellas es una nueva especie descrita en 2009 para el Archipiélago Canario,¹¹ siendo este trabajo la culminación de un estudio preliminar que se llevó a cabo en nuestro laboratorio. En una recolección de organismos marinos realizada en 2002, llamó la atención un alga roja cuyas características taxonómicas parecían distintas a las que se solían recolectar en aquella zona, por lo que se recogieron varios especímenes para su identificación y para un estudio químico preliminar que dio lugar al aislamiento de seis nuevos diterpenos.¹² Confirmada su nueva identidad, se procedió a un segundo estudio químico más detallado. Respecto a las otras dos algas, su estudio se aborda como fruto del estrecho contacto con investigadores de otros departamentos de esta universidad. Así, el estudio del alga *Laurencia microcladia*, se inició en paralelo con los estudios taxonómicos que se desarrollaron sobre esta alga en el Departamento de Biología Vegetal de la ULL, mientras que el de la *Lobophora variegata* surge del interés que esta alga despierta en sus mecanismos de protección contra depredadores tales como los erizos *Diadema antillarum*, un organismo que ha generado enormes blanquiales en el Archipiélago Canario y cuyo seguimiento llevan a cabo en el Departamento de Biología Animal (Ciencias Marinas) de la ULL.

Como resultado se aislaron e identificaron 38 nuevos metabolitos secundarios de distinta naturaleza, algunos con nuevos esqueletos carbonados. En la elucidación estructural se aplicaron principalmente técnicas de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (RMN), y en algunos casos difracción de rayos X y dicroísmo circular. Es de destacar, que para la determinación de las configuraciones relativas de los centros

¹⁰ Carter-Franklin, J. N.; Butler, A. *J. Am. Chem.Soc.*, **2004**, *126*, 15060.

¹¹ Gil-Rodríguez, M. C.; Senties, A.; Díaz-Larrea, J.; Cassano, V.; Fujii, M. T. *J. Phycol.*, **2009**, *45*, 264.

¹² Fernández, J.J.; Souto, M. L.; Gil, L. V.; Norte, M. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 8910.

quirales se realizaron exhaustivos estudios de RMN empleando los últimos métodos basados en el estudio de constantes de acoplamiento homo y heteronucleares. Los nuevos metabolitos se agruparon según su procedencia, su estructura química y su origen biogenético. En este sentido, un apartado fundamental lo constituye las propuestas biogenéticas llevadas a cabo con cada grupo, intentando arrojar luz en la forma fascinante en que los organismos marinos elaboran estas moléculas. Por último, este trabajo se complementa con una amplia batería de ensayos de bioactividad sobre los nuevos productos aislados y sobre la serie de compuestos conocidos también obtenidos de estos organismos. Esto se ha hecho, en virtud de las colaboraciones que nuestro grupo de investigación mantiene con otros grupos y en última instancia, dentro de un proyecto marco europeo.¹³ En 2010, nuestro grupo de investigación comenzó un proyecto EU FP7 de cuatro años de duración en la que participa junto con otras 18 instituciones y que lleva por título: “*Exploring marine resources for bioactive compounds: from discovery to sustainable production and industrial applications (MAREX)*”. Dentro del MAREX, se establece una serie de ensayos biológicos que abarcan el efecto sobre canales iónicos, actividades anticáncer, anti-inflamatoria, proapoptosis, anticoagulante, “*antifouling*”, antifúngica, antiviral y antibacteriana. Sin embargo, dentro de este proyecto cada una de las actividades que se realizan debe ir acompañada de una serie de documentos oficiales expedidos por la institución correspondiente. En nuestro caso los trámites para la equiparación de los permisos de recolección de muestras, coincidió con los cambios en el Gobierno Autonómico, de modo que ha sido recientemente que las muestras de los productos se han podido enviar. Lamentablemente, aunque los ensayos biológicos están en curso, en el momento de la escritura de esta tesis los resultados de la evaluación dentro de este proyecto aún no nos han llegado.

¹³ MAREX: Exploring marine resources for bioactive compounds: from discovery to sustainable production and industrial applications. Ref. EU FP 7 (KBBE 3-245137). Instituciones: Univ. Helsinki (Finlandia), Univ. Ljubljana (Eslovenia), Univ. La Laguna (España), Univ. Gdansk (Polonia), Katholieke Univ. Leuven (Bélgica), Åbo Akademi Univ. (Finlandia), American Univ. Beirut (Líbano), Univ. Antofagasta (Chile), Univ. Strasbourg (Francia), Ege Univ. (Turkía), Univ. Degli Studi di Napoli ‘Federico II’ (Italia), Univ. Católica del Norte (Chile), Technical Research Centre of Finland (Finlandia), National Institute of Oceanography (India), IMEGO AB (Suecia), Xention (Reino Unido), Biovico (Polonia), Ebiotec S.A. (España), BiotechMarine (Francia).

CAPÍTULO 2

Metabolitos secundarios
de *Laurencia marilzae*

2

METABOLITOS SECUNDARIOS DE *LAURENCIA MARILZAE*

RESUMEN

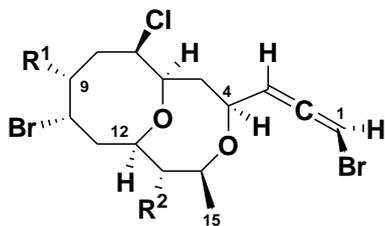
Se detalla el estudio químico de la nueva especie de alga roja descrita para las Islas Canarias, Laurencia marilzae. El único antecedente de estudio fitoquímico de esta especie consiste en un estudio preliminar realizado por nuestro grupo de investigación y donde se aislaron seis nuevos diterpenos con esqueleto de dactilomelano. En este capítulo, damos cuenta del aislamiento y elucidación estructural de una serie de metabolitos nuevos en la literatura, 20 sustancias halogenadas de naturaleza no terpénica, acetogeninas C-15, y 2 nuevos ejemplos de dactilomelanos. Dentro del grupo de acetogeninas destacan 4 bromoalenos que presentan un sistema de anillos [5.5.1]biclotridecano sin precedentes, y cuyo esqueleto carbonado tiene interesantes connotaciones biogenéticas. Las estructuras de los metabolitos y sus configuraciones relativas fueron determinadas a través del uso extenso de métodos espectroscópicos, principalmente datos de Resonancia Magnética Nuclear mono y bidimensional y en los que se abordaron métodos recientes de análisis configuracional basados en constantes de acoplamiento homo y heteronucleares. Asimismo, las configuraciones absolutas de varios compuestos fueron determinadas por análisis de difracción de rayos X. Se incluye también una amplia propuesta biogenética de las nuevas acetogeninas obtenidas en este estudio.



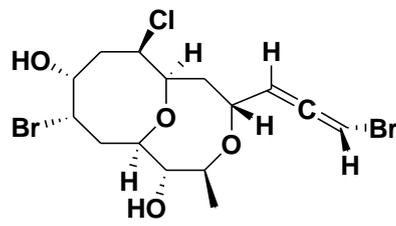
Foto de una muestra de *Laurencia marilzae* en Paraíso Floral (Adeje)

Nuevos metabolitos aislados

- Acetogeninas C-15 con sistema de anillo [5.5.1]biclotridecano:

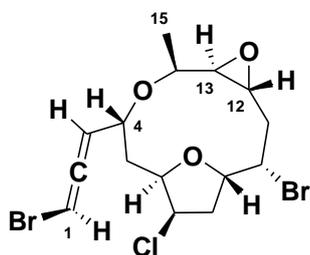


Marilzabicicloaleno A $R^1 = R^2 = OH$
 Marilzabicicloaleno C $R^1 = OCH_3, R^2 = OH$
 Marilzabicicloaleno D $R^1 = R^2 = Cl$

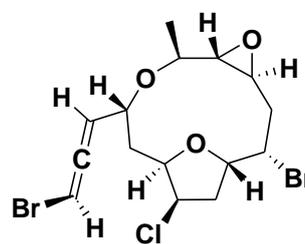


Marilzabicicloaleno B

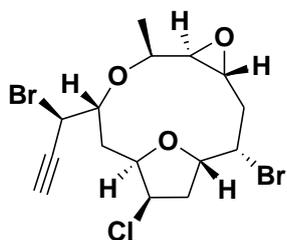
- Acetogeninas C-15 con anillos de doce miembros (obtusalenos):



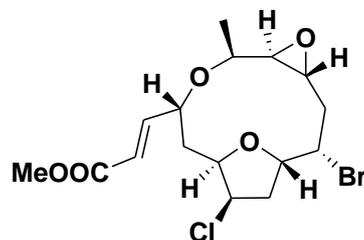
12-Epoxi-obtusaleno IV



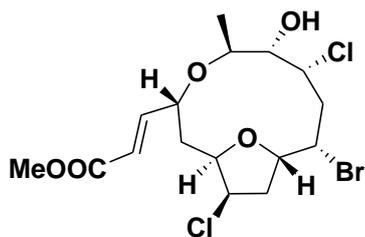
12-Epoxi-obtusaleno IVB



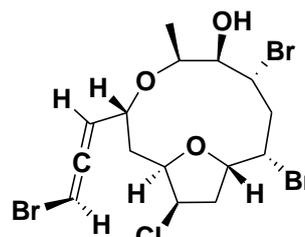
Bromopropargilo del 12-epoxi-obtusaleno IV



Metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV

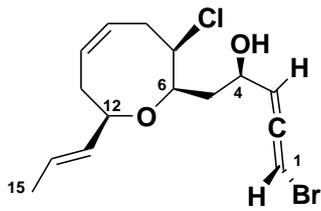


Clorohidrina del metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV

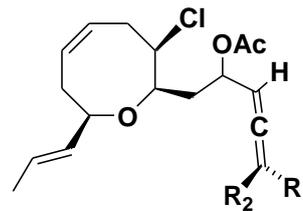


Obtusaleno X

- Acetogeninas C-15 con anillos de ocho miembros (oxocanos):

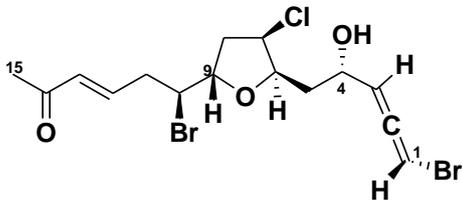


Marilzaleno

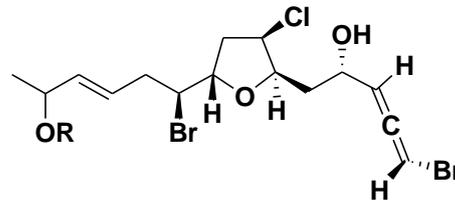


(+)-4*R*-Acetoxy-marilzaleno R₁= Br, R₂= H
 (-)-4-Acetoxy-marilzaleno R₁= H, R₂= Br

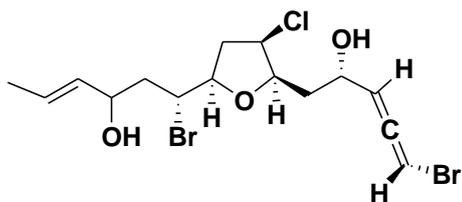
- Acetogeninas C-15 con anillos de cinco miembros (oxolanos):



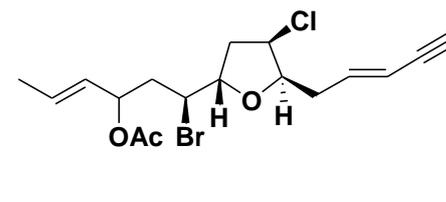
Marilzafuraleno A



Marilzafuraleno B R= H
 Marilzafuraleno C R= CH₃

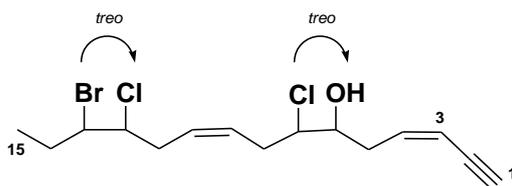


Marilzafuraleno D

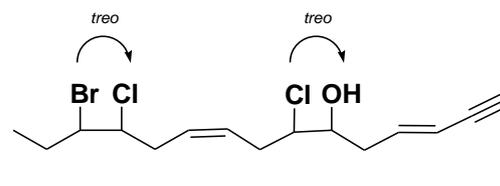


12-Acetoxy-marilzafurenino

- Acetogeninas C-15 con estructuras lineales:

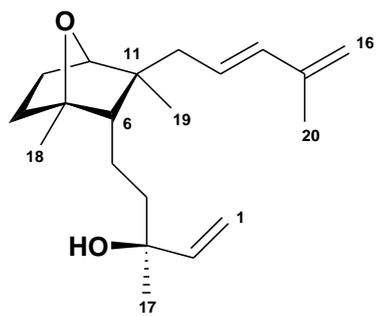


Z-Adrienino

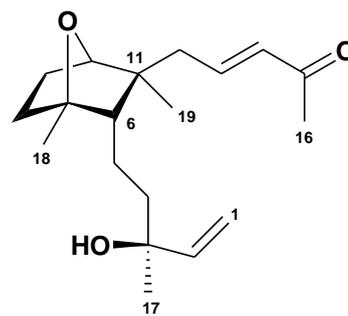


E-Adrienino

- **Compuestos de naturaleza terpénica:**



E-Dactileno B



Nor-*E*-cetodactileno

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. Estudio químico preliminar del alga

El primer estudio fitoquímico del alga *L. marilzae*, fue desarrollado en nuestro grupo de investigación antes de la clasificación del alga,¹ a partir de especímenes recolectados en Paraíso Floral (Tenerife, Islas Canarias) en el año 2002. En el mismo se aislaron y caracterizaron seis nuevos diterpenos con un esqueleto carbonado que denominamos dactilomelano (Figura 2.1.1).² Estos metabolitos fueron: *E* y *Z* dactilohidroperóxido A, dactilohidroperóxido B, 3,14-dactilodiol, dactilohidroperóxido C y puctateno. Junto a éstos, se aisló como compuesto mayoritario un metabolito relacionado, el dactilomelol, aislado previamente de una *Aplysia* recolectada en Tenerife.

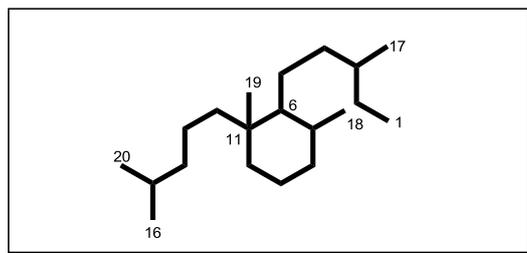
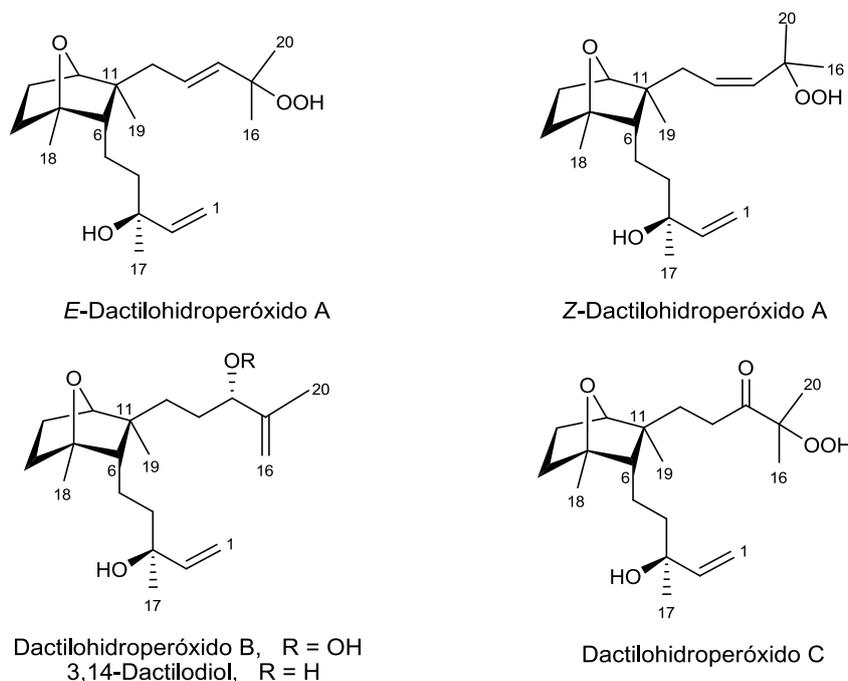


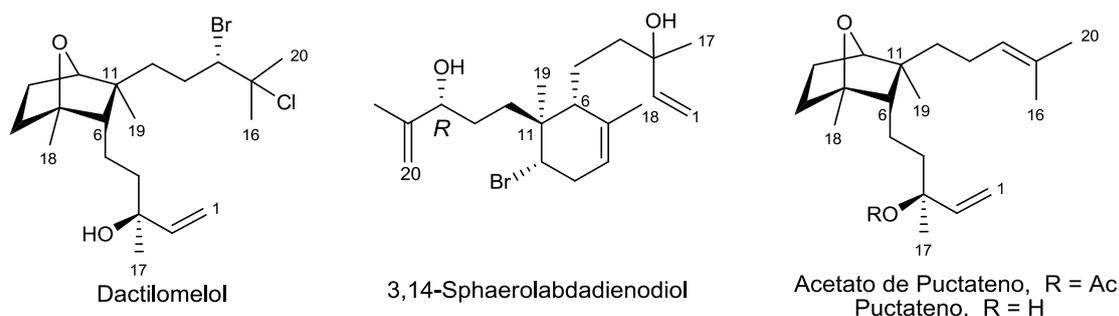
Figura 2.1.1. Los dactilomelanos pueden derivar de la ciclación entre los carbonos C-6 y C-11 de un precursor diterpénico con esqueleto de fitano.



¹ Gil-Rodríguez, M. C.; Sentfies, A.; Díaz-Larrea, J.; Cassano, V.; Fujii, M. T. *J. Phycol.*, **2009**, *45*, 264.

² Fernández, J. J.; Souto, M. L.; Gil, L. V.; Norte, M. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 8910.

Diterpenos con este tipo de esqueleto no son frecuentes, es más, hasta este momento por lo que conocemos, sólo existen publicadas tres sustancias además de los seis aislados en primer instancia de *L. marilzae*. Uno ya lo comentamos, el dactilomelol, aislado de las glándulas digestivas del molusco *Aplysia dactylomela*, que dio origen a la serie, y por ende, al nombre del singular esqueleto.³ Su estructura fue confirmada por estudios de difracción de rayos X. El segundo resultó ser el 3,14-sphaerolabdadienodiol, aislado de otra alga roja, *Sphaerococcus coronopifolius*, en el marco de un programa basado en la identificación de sustancias bioactivas de algas rojas en la costa de Marruecos y cuya estructura y configuración relativa fue establecida por métodos espectroscópicos.⁴ Por último, de *Aplysia punctata* recolectada en Sicilia (Italia), se obtuvo el tercer ejemplo, estrechamente relacionado con el dactilomelol, llamado acetato de puctateno, cuya estructura fue determinada por métodos espectroscópicos.⁵



Nuestro grupo de investigación propuso que la biosíntesis de este esqueleto monocíclico,² podría considerarse derivada de la ciclación entre las posiciones C-6 y C-11 del geranylgeraniol pirofosfato (GGPP) iniciada por la formación de un ion bromonio y el posterior ataque de agua. El intermedio resultante podría evolucionar a través de una sustitución nucleofílica S_N2 del átomo de bromo en C-10 para dar lugar al puctateno, o de una eliminación tipo E_2 para dar lugar al 3,14-sphaerolabdadienodiol (Figura 2.1.2).

Por otro lado, el puctateno podría dar lugar, a su vez, a la formación del dactilomelol, o en cambio, por acción de peroxidadas a la de los otros compuestos aislados en este estudio de la *L. marilzae* (Figura 2.1.3).

³ Estrada, D. M.; Ravelo, J. L.; Ruiz-Pérez, C.; Martín, J. D. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 6219.

⁴ Etahiri, S.; Bultel-Poncé, V.; Caux, C.; Guyot, M. *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 1024.

⁵ Findlay, J. A.; Guoqiang, L. *Can. J. Chem.*, **2002**, *80*, 1697.

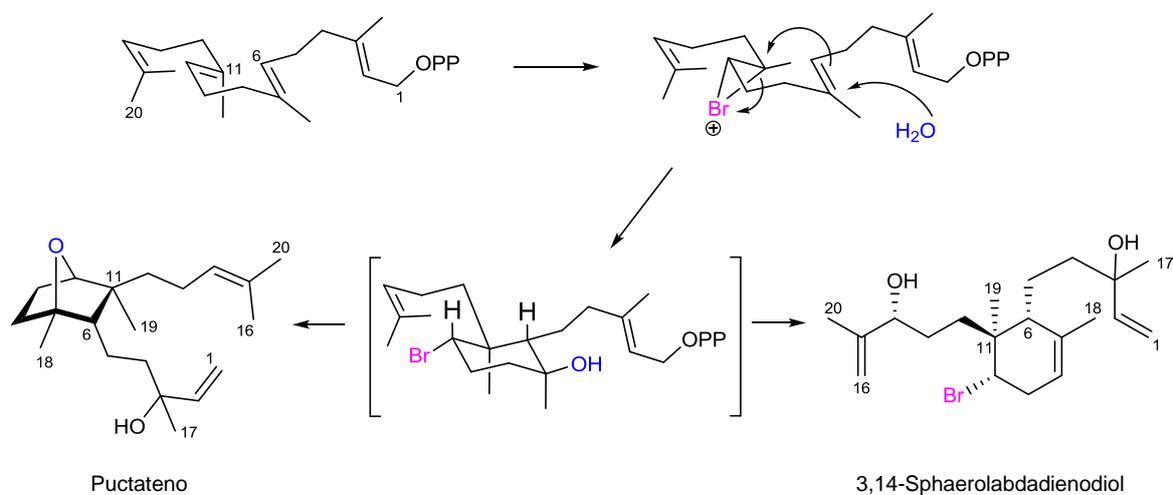


Figura 2.1.2. Posible biogénesis del esqueleto de dactilomelano

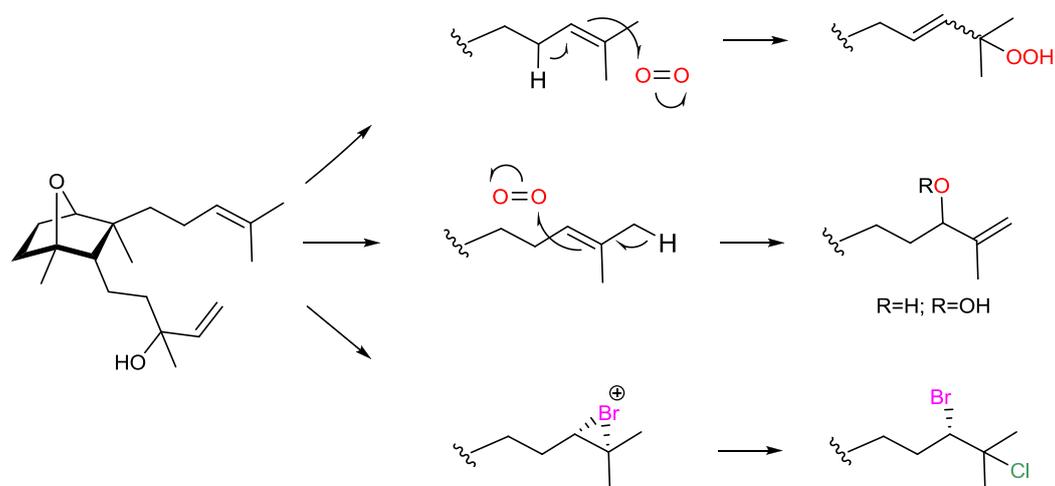


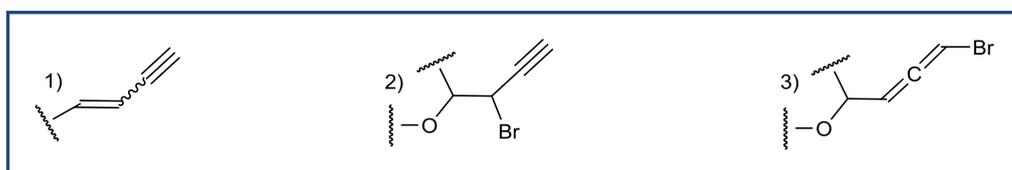
Figura 2.1.3. Propuesta biogénica para los dactilomelanos aislados en el primer estudio de *L. marilzae*

2.1.2. Introducción a las acetogeninas C-15: tipos y biosíntesis

Las acetogeninas C-15, constituyen un interesante grupo de metabolitos secundarios de naturaleza no terpénica y origen biogénico asociado al metabolismo de

los ácidos grasos.⁶ Han sido aislados únicamente de algas rojas del género *Laurencia* (Rhodomelaceae, Ceramiales), así como de algunos moluscos opisthobranchios que las incluyen como parte de su dieta.⁷ Estos metabolitos presentan una amplia gama de estructuras particulares, junto con un importante rango de actividades farmacológicas, lo que los hace foco de atención más allá del área de los productos naturales marinos, convirtiéndose en fuentes de inspiración para el desarrollo de nuevas metodologías sintéticas,^{8,9} así como para la formulación de nuevas hipótesis biogénicas.^{10,11}

Desde el punto de vista estructural, las acetogeninas C-15 se pueden dividir en acíclicas, carbocíclicas y heterocíclicas. Otro criterio general que podría ser escogido para su clasificación es la naturaleza de sus agrupamientos terminales, puesto que suelen ser tres: 1) sistema enino 2) sistema bromopropargilo y 3) sistema bromoaleno.



Se ha sugerido para la biogénesis de los sistemas (2) y (3), al sistema enino (1) como posible precursor (Figura 2.1.4), debido que suele coincidir que éstos aparecen cuando la ciclación se inicia en el carbono α a cualquiera de los dos.

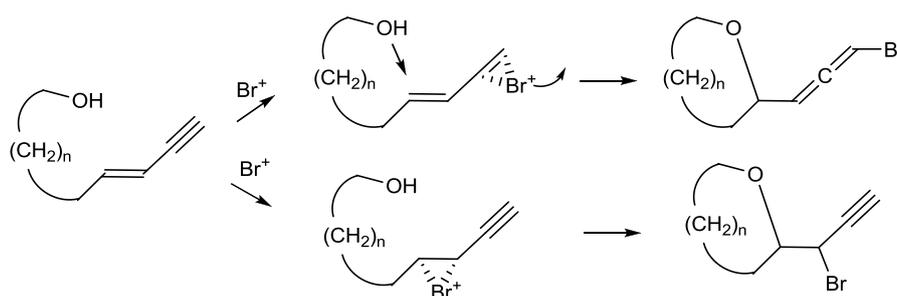


Figura 2.1.4. Posible biogénesis para los terminales bromoaleno y bromopropargilo

⁶ Erickson, K. L. "Marine natural products: chemical and biological perspectives". Scheuer, P. J. Ed.; Academic Press: NY; 1979, Vol.5, capítulo 4, pp. 131.

⁷ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.*, **2012**, 29, 144 y referencias anteriores correspondientes a esta misma serie.

⁸ Ortega, N.; Martín, V. S.; Martín, T. *J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 6660.

⁹ Park, J.; Kim, B.; Kim, H.; Kim, S.; Kim, D. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 4726.

¹⁰ Murai, A. "Comprehensive natural product chemistry"; Barton, D.; Nakanishi, K.; Meth-Cohn O., Eds.; Pergamon: Elmsford, NY; 1999; Vol. 1, pp 303.

¹¹ Braddock, D. C. *Org. Lett.*, **2006**, 8, 6055.

2.1.2.1. Acetogeninas C-15 acíclicas

Este grupo de sustancias han sido postuladas como los precursores lineales de las acetogeninas heterocíclicas, considerándose a su vez derivadas del metabolismo del ácido (*Z,Z,Z*)-hexadeca-4,7,10,13-tetraenoico.¹² Como ejemplo de este grupo destacar los *3E* y *3Z*-lauredioles y sus acetatos aislados de *Laurencia nipponica*.¹³ Murai y colaboradores han examinado la ciclación de estos lauredioles, utilizando una lactoperoxidasa comercial (LPO) y posteriormente una preparación cruda de una bromo peroxidasa (BPO) también aislada de *L. nipponica*.¹⁰ Los rendimientos de los productos cíclicos fueron extremadamente bajos pero establecieron un mecanismo para la ciclación de un precursor lineal *vía* bromoeterificación electrofílica (Figura 2.1.5).¹⁴

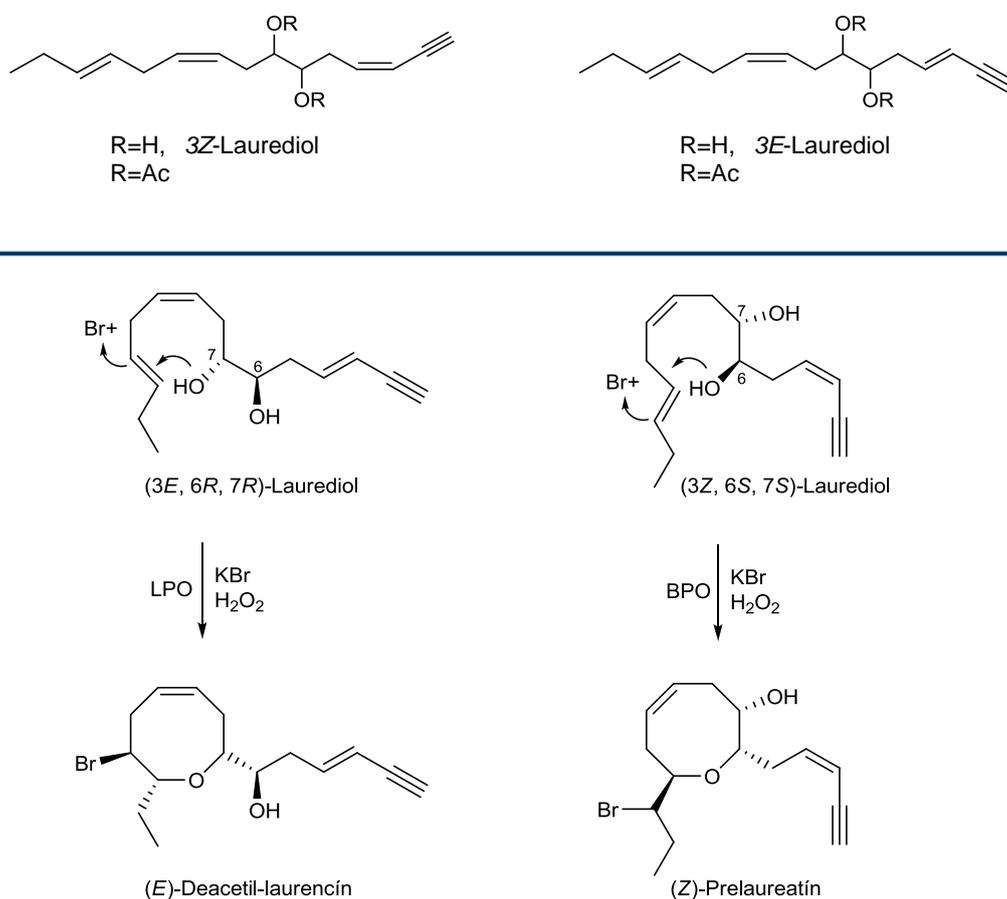


Figura 2.1.5. Propuesta biogenética de formación del *E*-deacetyl-laurencin y del *Z*-prelaureatín por ciclación de lauredioles inducidas por bromación catalítica con LPO y BPO.

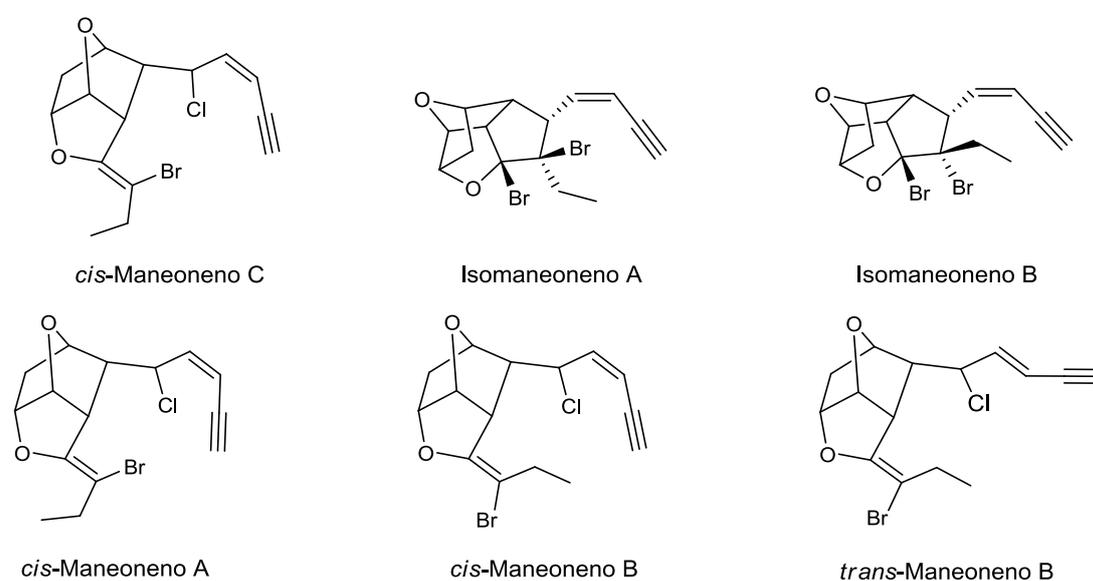
¹² Jones, E. *Chem. Br.*, **1966**, 2, 6.

¹³ Kurosawa, E.; Kuzuzawa, A.; Irie, T. *Tetrahedron Lett.*, **1972**, 2121.

¹⁴ Butler, A.; Carter-Franklin, J. N. *Nat. Prod. Rep.*, **2004**, 180.

2.1.2.2. Acetogeninas C-15 carbocíclicas

Las acetogeninas con sistemas carbocíclicos son poco frecuentes en *Laurencia*. Hasta la fecha, los únicos ejemplos aislados presentan esqueletos de maneonenos con un anillo carbocíclico en su estructura, e isomaneonenos que incluyen dos. Estas sustancias fueron inicialmente aisladas de *L. nidifica*, los *cis*-maneonenos A y B, y el *trans*-maneoneno B,¹⁵ en un primer estudio, y posteriormente junto al *cis*-maneoneno C, los isomaneonenos A y B.¹⁶ Más adelante, se confirmó la estructura y se estableció la configuración absoluta del isomaneoneno B por difracción de rayos X.¹⁷



2.1.2.3. Acetogeninas C-15 heterocíclicas

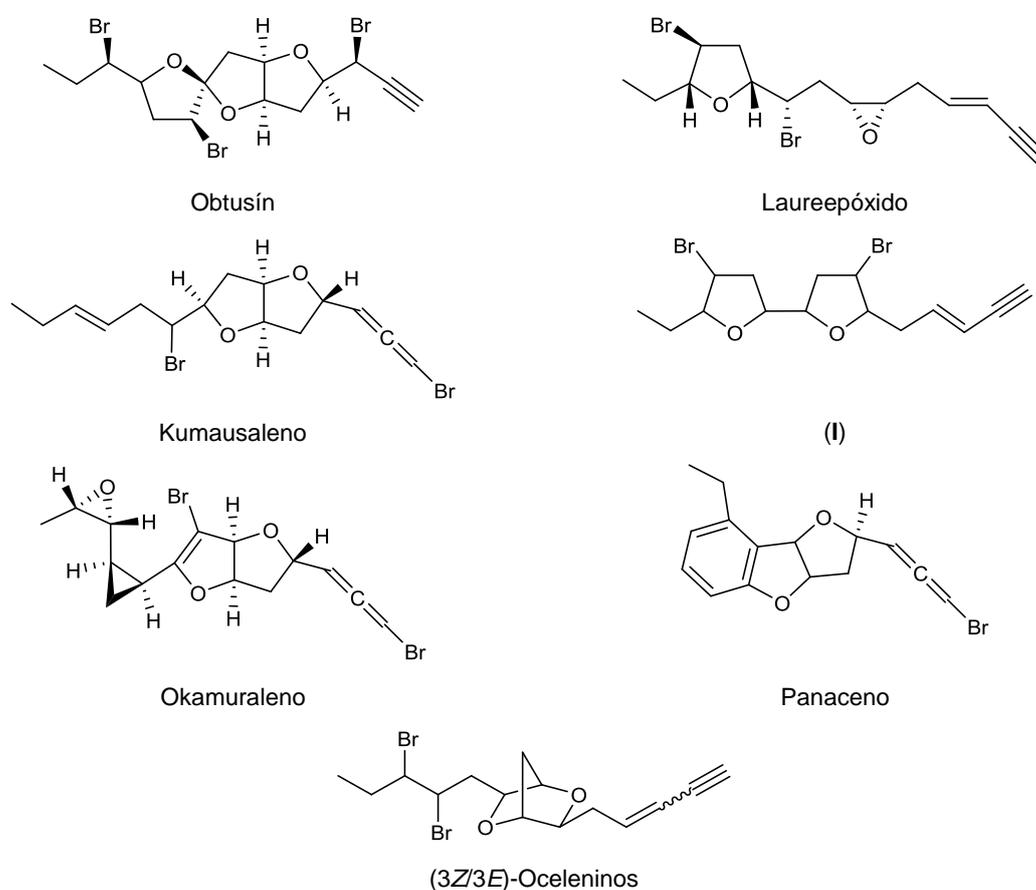
Las acetogeninas heterocíclicas son las más abundantes y muestran variaciones estructurales bastante inusuales. Son denominadas generalmente como "lauroxanos" y son clasificadas en función del anillo de mayor tamaño presente en la molécula. A continuación describiremos brevemente los distintos grupos y sus ejemplos más representativos. En el caso de los anillos de 12 miembros, la descripción será más detallada, al ser el grupo del que se han aislado más ejemplos en la presente memoria y porque las propuestas biogénicas sobre su origen tienen interesantes connotaciones en este trabajo.

¹⁵ Waraszkiewicz, S.M.; Sun, H.H.; Erickson, K.L. *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 35, 3021.

¹⁶ Waraszkiewicz, S.M.; Sun, H.H.; Erickson, K.L. *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 47, 4227.

¹⁷ Waraszkiewicz, S.M.; Sun, H.H.; Erickson, K.L.; Finer, J.; Clardy, J. *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 3194.

Oxolanos: Son también llamados lauroxolanos y se caracterizan por poseer al menos un éter cíclico de 5 miembros. El primer representante que se aisló fue el obtusín en *L. obtusa*;¹⁸ del que, posteriormente se conoció su configuración absoluta (3*R*, 4*R*, 6*R*, 7*R*, 9*R*, 10*S*, 12*S* y 13*R*);¹⁹ Los hay con: *i*) un único anillo como el laureepóxido de *L. nipponica*;²⁰ *ii*) bicíclicos fusionados o aislados, *i.e.* kumausaleno también aislado de *L. nipponica*²¹ o el lauroxolano (I) obtenido de *L. majuscula*;²² *iii*) tricíclicos con inclusiones peculiares de ciclopropano, el okamuraleno de especímenes de *L. intricata*;²³ o fusionados con un anillo aromático, el panaceno a partir del molusco *Aplysia brasiliana*;²⁴ *iv*) formando anillos policíclicos, como los isómeros geométricos (3*E*/3*Z*)-oceleninos obtenidos del molusco *A. oculifera*.²⁵



¹⁸ Howard, B. M.; Fenical, W.; Arnold, E. V.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 31, 2841.

¹⁹ González, A. G.; Martín, J. D.; Norte, M.; Pérez, R.; Rivera, P.; Ruano, J. Z.; Rodríguez, M. L.; Fayos, J.; Perales, A. *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 4143.

²⁰ Fukuzawa, A.; Kurosawa, E. *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 1471.

²¹ Suzuki, T.; Koizumi, K.; Suzuki, M.; Kurosawa, E. *Chem. Lett.*, **1983**, 1639.

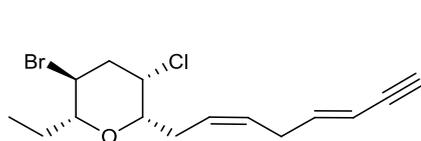
²² Kim, I. K.; Brennan, M. R.; Erickson, K. L. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 1757.

²³ Suzuki, M.; Kurosawa, E. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 3853.

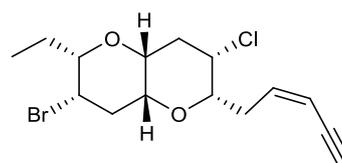
²⁴ Kinnel, R.; Duggan, A. J.; Eisner, T.; Meinwald, J.; Miura, I. *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 44, 3913.

²⁵ Schulte, G. R.; Chung, M. C. H.; Schever, P. J. *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 3870.

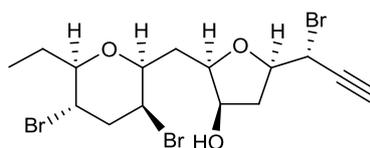
Oxanos. Se denominan oxanos o lauroxanos a los éteres cíclicos cuyo anillo principal es de seis miembros. A pesar de ser escasas las acetogeninas con estas características obtenidas de *Laurencia* u organismos relacionados, se han aislado algunos compuestos con un único anillo de oxano, como el srilankenino de *A. oculifera*, recolectado en Duwa, Ski Lanka;²⁶ o con dos anillos fusionados como el laurendecumenino B de *L. elata*.²⁷ También se han identificado otras acetogeninas C-15 que contienen dos anillos (oxano y oxolano) sin átomos comunes, tal como el bromopropargilo (II), obtenido de *L. obtusa*.²⁸



Srilankenino

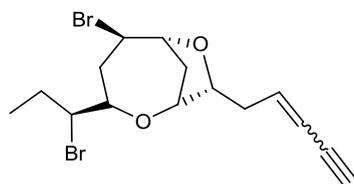
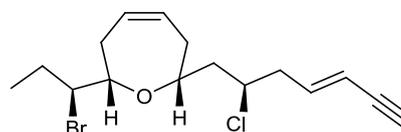


Laurendecumenino B



(II)

Oxepanos. Este grupo de lípidos C-15 halogenados se conocen también como lauroxepanos y se caracterizan por poseer un anillo principal de siete miembros. Al igual que los oxanos, existen pocos oxepanos recogidos en la literatura. Los ejemplos más representativos son los (3*E*/3*Z*)-isoprelaurefucinos de *L. nipponica*,^{29,30} y el (3*Z*)-isolaurepinnacino de *L. pinnata*.³¹

(3*E*/3*Z*)-Isoprelaurefucinos(3*Z*)-Isolaurepinnacino

²⁶ De Silva, E.D.; Schwartz, R.E.; Schever, P.F.; Shoolery, J.N. *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 395.

²⁷ Ji, N. Y.; Li, X. M.; Li, K.; Wang, B. G. *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 1499.

²⁸ Norte, M.; Fernández, J. J.; Ruano, J. Z. *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 5987.

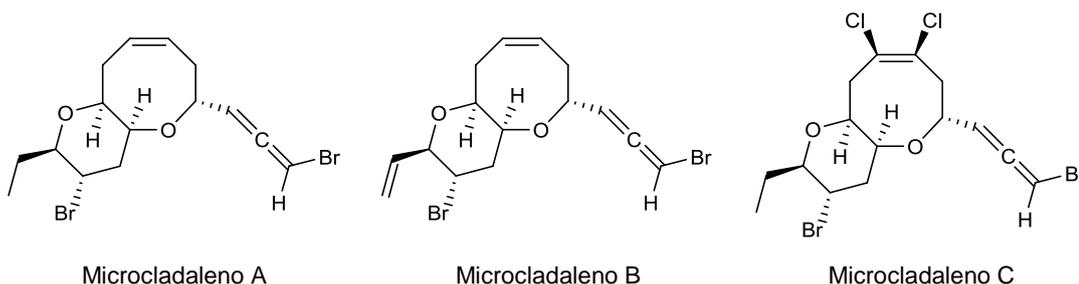
²⁹ Kurosawa, E.; Fukuzawa, A.; Irie, T. *Tetrahedron Lett.*, **1973**, *42*, 4135.

³⁰ Suzuki, M.; Kurata, K.; Suzuki, T.; Kurosawa, E. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1986**, *59*, 2953.

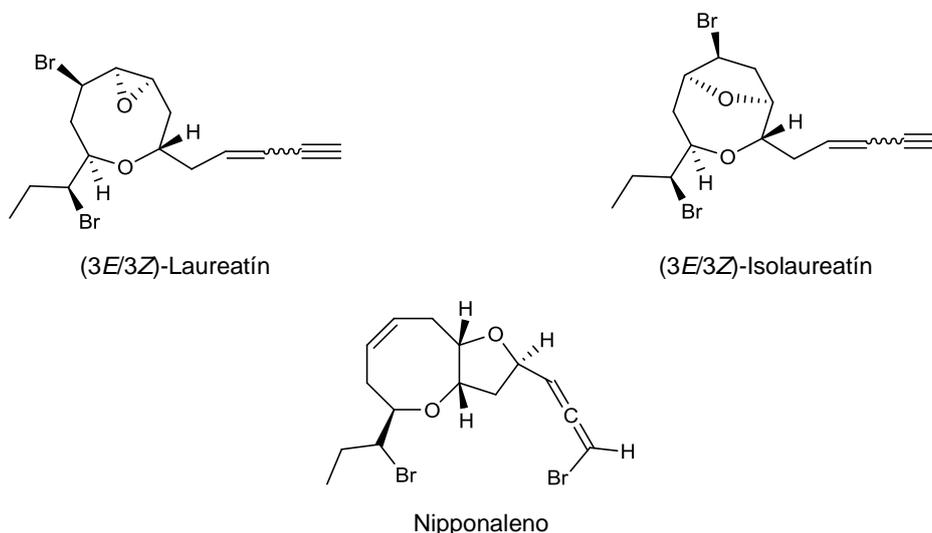
³¹ Fukuzawa, A; Masamune, T. *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22*, 4081.

Oxocanos. Reciben el nombre de lauroxocanos y se caracterizan por la presencia de al menos un anillo de ocho miembros en su estructura. Son las más abundantes de las acetogeninas C-15 halogenadas, razón por la cual se dividen en tres subgrupos, de acuerdo a la ubicación del puente éter.

a) Puente éter entre C-4 y C-10: Son llamados microcladalenos, por ser el microcladareno A junto con los derivados B y C aislados de *L. microcladia*,³² quienes dan el nombre a la serie y los únicos ejemplos de este subgrupo hasta el momento.



b) Puente éter entre C-6 y C-12: Están relacionados con el laureatín. Ejemplos de ellos, todos aislados de *L. nipponica*, son los monociclos (3*E*/3*Z*)-laureatinos y los (3*E*/3*Z*)-isolaureatinos,^{33,34} o con dos anillos (oxocano y oxolano) fusionados el nipponaleno, al que se le determinó su estereoquímica absoluta por modificación del método de Mosher.³⁵



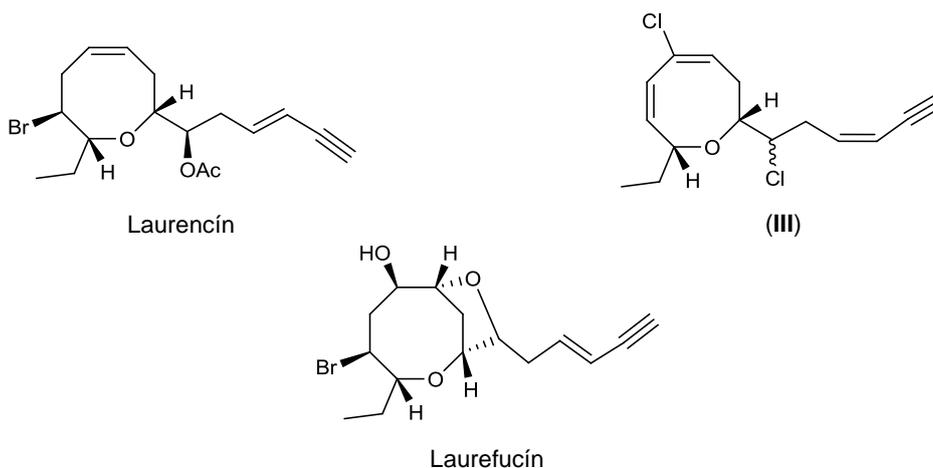
³² Kennedy, D. J.; Selby, I. A.; Cowe, H. J.; Cox, P. J.; Thomson, R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1984**, 3,153.

³³ Irie, T.; Izawa, M.; Kurosawa, E. *Tetrahedron Lett.*, **1970**, 26, 851.

³⁴ Kurosawa, E.; Furusaki, A.; Izawa, M.; Fukuzawa, A.; Irie, T. *Tetrahedron Lett.*, **1973**, 39, 3857.

³⁵ Lyakhova, E. G.; Kalinovsky, A. I.; Dmitrenok, A. S.; Kolesnikova, S. A. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 6549.

c) Puente éter entre C-7 y C-13: Están relacionados con el laurencín, compuesto que da nombre a la serie. Este éter acetogénico, procedente de *L. glandulifera*³⁶ y de *L. nipponica*,^{37,38} ha sido objeto de importantes estudios sintéticos.³⁹ Entre ellos, ya hemos visto su síntesis enzimática a partir de un laurediol (Figura 2.1.5), hecho que avala la hipótesis de que los lauredioles son los precursores biogénicos de las acetogeninas C-15 heterocíclicas.⁴⁰ Algunos metabolitos relacionados con el laurencín presentan características llamativas; entre ellas, los dobles enlaces conjugados en el oxocano (III) encontrado en *L. thysifera*,⁴¹ o estructuras bicíclicas como en el laurefucín aislado en *L. nipponica*.^{28,42}



Oxonanos: La característica general de estas acetogénicas cíclicas es la presencia de un anillo de nueve miembros en su estructura. Son conocidos como lauroxonanos y pueden existir tanto de forma aislada como fusionada con otros oxolanos. Con un ciclo aislado podemos destacar el (3*Z*)-obtusenino, reportado inicialmente de *L. obtusa*,⁴³ y luego, junto a su isómero (3*E*), se obtuvo de *L. pinnaífida*.⁴⁴ Entre los oxonanos fusionados existentes en *Laurencia* destacar el isolauraleno de *L. nipponica*.^{45,46}



³⁶ Irie, T.; Suzuki, M.; Masamune, T. *Tetrahedron*, **1968**, *24*, 4193.

³⁷ Cameron, A. F.; Cheung, K. K.; Ferguson, G.; Robertson, J. M. *J. Chem. Soc. (B)*, **1969**, *5*, 559.

³⁸ Irie, T.; Suzuki, M.; Masamune, T. *Tetrahedron Lett.*, **1977**, *29*, 2507.

³⁹ Tsushima, K.; Murai, A. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 4345.

⁴⁰ Fukuzawa, A.; Aye, M.; Murai, A. *Chem. Lett.*, **1990**, *9*, 1579.

⁴¹ Blunt, J. W.; Lake, R. J.; Munro, M. H. G. *Aust. J. Chem.*, **1984**, *37*, 1545.

⁴² Furusaki, A.; Kurosawa, E.; Fukuzawa, A.; Irie, T. *Tetrahedron Lett.* **1973**, *46*, 4579.

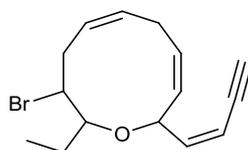
⁴³ King, T. J.; Imre, S.; Oztunç, A.; Thomson, R. H. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, *16*, 1453.

⁴⁴ Norte, M.; González, A. G.; Cataldo, F.; Rodríguez, M. L.; Brito, I. *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 9411.

⁴⁵ Kurata, K.; Furusaki, A.; Suehiro, K.; Katayama, C.; Suzuki, T. *Chem. Lett.*, **1982**, *7*, 1031.

⁴⁶ Furusaki, A.; Katsuragi, S.; Suehiro, K.; Matsumoto, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1985**, *58*, 803.

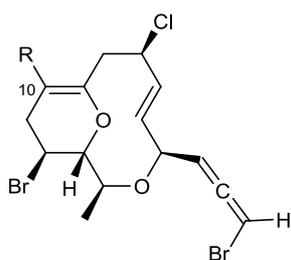
Éteres cíclicos de diez miembros: Son los más inusuales de todos los lauroxanos, el único representante conocido es el siguiente compuesto (IV) obtenido de *L. implicata*, recolectada en Australia.⁴⁷



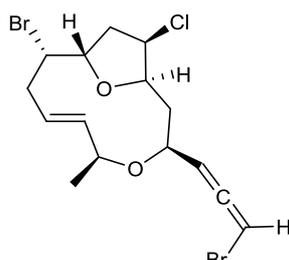
(IV)

Éteres cíclicos de 12 miembros: Estos macrociclos poseen en general una funcionalización lateral bromoalénica y la mayoría se han encontrado en *L. obtusa*, por lo que ordinariamente se les llama obtusalenos.

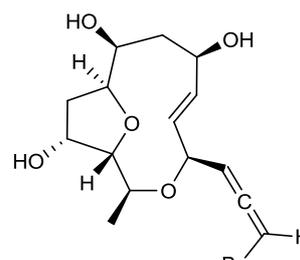
El obtusaleno I fue el primer ejemplo de este tipo publicado en 1982 después de su aislamiento de especímenes de *L. obtusa* recolectados en el Mar Egeo.⁴⁸ Su estructura se resolvió inicialmente por análisis de rayos X aunque luego se le realizó un estudio completo por RMN.^{49,50} Posteriormente, se obtuvieron el 10-bromo-obtusaleno I,⁵¹ los obtusalenos II y III;⁴⁹ el kasaleno,⁵² el obtusaleno IV,^{53,54} y los obtusalenos V-IX.⁵⁵ Es de destacar que con la excepción del obtusaleno IV, todos estos metabolitos presentaron la unidad de bromoaleno con configuración *R* y la configuración del centro C-4 como *S* (en el obtusaleno IV es *S* y *4R*, respectivamente).



Obtusaleno I, R = H
10-Bromo-obtusaleno I, R = Br



Obtusaleno II



Obtusaleno III

⁴⁷ Coll, J. C.; Wright, A. D. *Aust. J. Chem.*, **1989**, *42*, 1685.

⁴⁸ Cox, P. J.; Imre, S.; Islimyeli, S.; Thomson, R. H. *Tetrahedron Lett.*, **1982**, *23*, 579.

⁴⁹ Cox, P. J.; Howie, R. A. *Acta Cryst.*, **1982**, *B38*, 1386.

⁵⁰ Oztunc, A.; Imre, S.; Lotter, H.; Wagner, H. *Phytochemistry*, **1991**, *30*, 255.

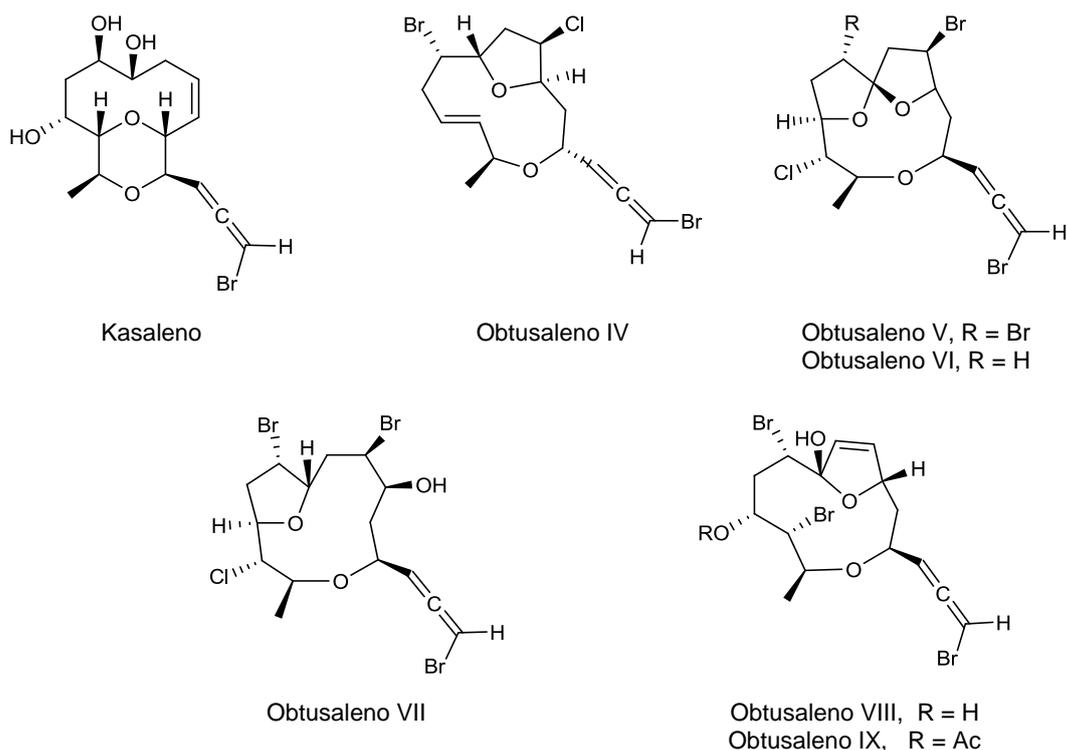
⁵¹ Oztunc, A.; Imre, S.; Wagner, H.; Norte, M.; Fernández, J. J.; González, R. *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 2273.

⁵² Oztunc, A.; Imre, S.; Wagner, H.; Norte, M.; Fernández, J. J.; González, R. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 4377.

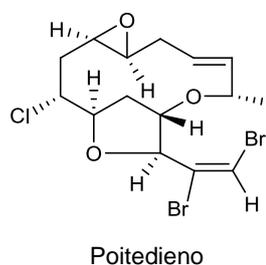
⁵³ Guella, G.; Chiasera, G.; Mancini, I.; Oztunc, A.; Pietra, F. *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 1223.

⁵⁴ Ciavatta, M. L.; Gavagnin, M.; Puliti, R.; Cimino, G.; Martínez, E.; Ortea, J.; Mattia, C. A. *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 17343.

⁵⁵ Guella, G.; Mancini, I.; Oztunc, A.; Pietra, F. *Hev. Chim. Acta*, **2000**, *83*, 336.



Por otro lado, destacar el poitedieno aislado de *L. poitei*, que hasta el momento era el único haloéter cíclico de doce miembros sin funcionalidad lateral de bromoaleno, con un sistema olefínico dibromado en su lugar.⁵⁶



Una característica de estos anillos de gran tamaño es su flexibilidad, habiéndose observado en algunos de estos metabolitos en disolución la existencia de confórmers en equilibrio. Tal comportamiento ha sido estudiado por Guella y colaboradores en varios de ellos,^{53,55} observándose por ejemplo en el caso de los obtusalenos II y IV, una importante dependencia en sus señales de RMN con la temperatura, atribuida al equilibrio, al menos, de dos confórmers producto del giro de 180° del doble enlace *trans* que involucra principalmente la inversión de los protones H-12β/H-13α a H-12α/H-13β (Figura 2.1.6). Además, se determinó que la barrera de activación depende de factores energéticos (entalpía), y en menor medida, del disolvente en que se encuentre la sustancia. El tamaño

⁵⁶ Wright, A. E.; Wing, R. M.; Sims, J. J. *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 4649.

del heterociclo es también un factor influyente, ya que la barrera de activación en una subunidad de diez miembros (*i.e.* obtusaleno I) es superior que en la de once miembros (*i.e.* obtusalenos II y IV). Estos fenómenos están íntimamente relacionados con el objeto de nuestra memoria, debido a que hemos aislado y caracterizado distintos representantes de este grupo, y en un caso hemos observado la existencia de confórmeros. Este equilibrio de confórmeros y el predominio de las distintas especies también veremos que juega un papel clave en la propuesta del origen biogenético de las acetogeninas aisladas con un nuevo esqueleto carbonado.

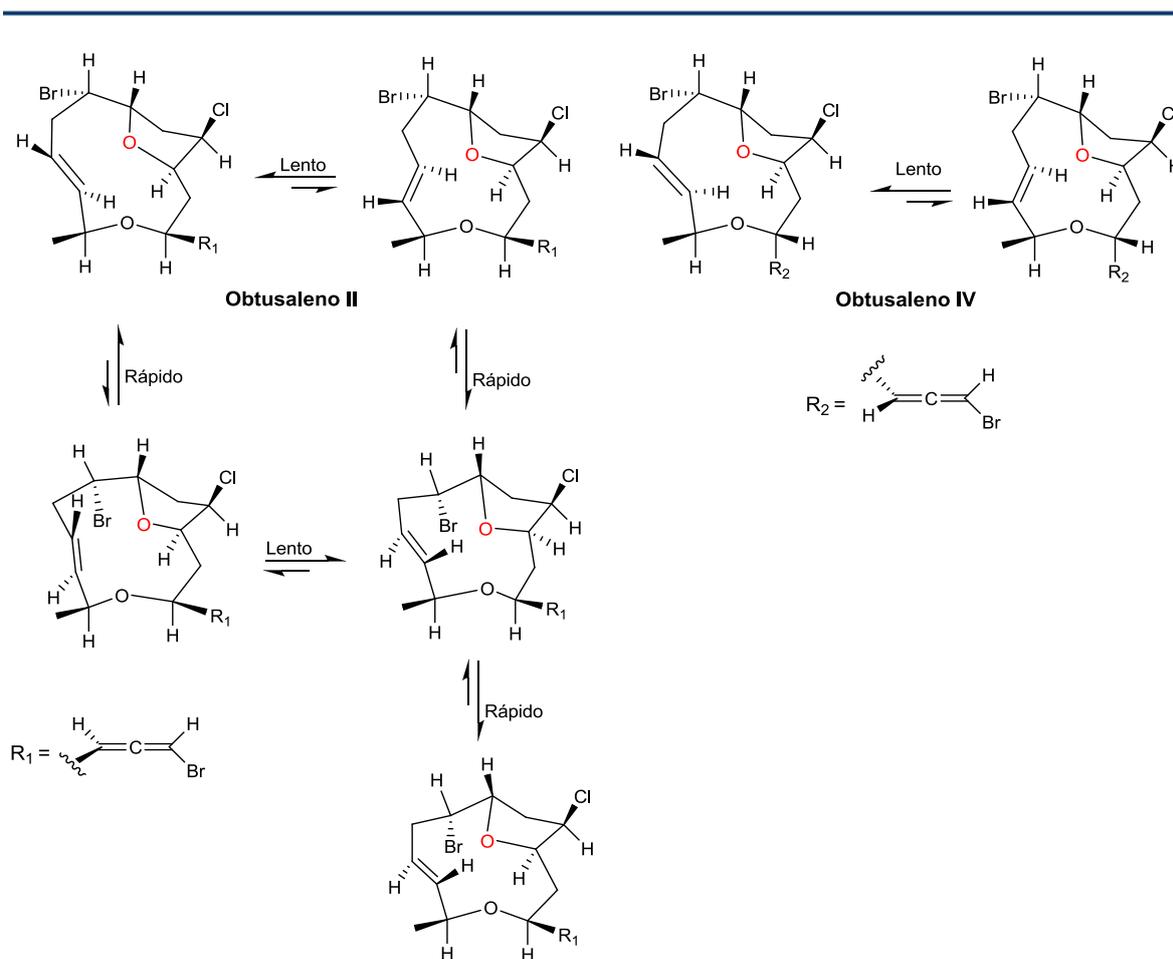


Figura 2.1.6. Equilibrios de confórmeros en disolución de los obtusalenos II y IV.

Otro aspecto importante es que en 2006, Braddock propuso una hipótesis sobre la biogénesis de los obtusalenos que involucra múltiples bromaciones.¹¹ Esta hipótesis predijo correctamente las estereoquímicas de los obtusalenos I-IV, cuyas estructuras habían sido resueltas por cristalografía de rayos X, pero cuestionó las estructuras de los obtusalenos V-VII resueltas por espectroscopía de RMN, en las que situaban un átomo de

bromo en C-7 y un átomo de bromo en C-13. Posteriormente, para validar la biogénesis propuesta y resolver la controversia sobre las estructuras de los obtusalenos V-VII, Braddock y colaboradores,⁵⁷ probaron experimentalmente la viabilidad de la formación y fragmentación de un ion oxonio *trans*-anular inducido por un ion bromonio para dar lugar al esqueleto carbonado del macrociclo del obtusaleno VII con un átomo de bromo en C-13, en línea con lo expuesto anteriormente (Figura 2.1.7). Curiosamente, en este estudio se aisló también un aducto con un sistema biciclotridecano[5.5.1] bromado, especulando los autores que podría representar el núcleo de un producto natural todavía no aislado de especies de *Laurencia*. En nuestro estudio fitoquímico de *L. marilzae*, hemos obtenido, cuatro metabolitos con este esqueleto sin precedentes en el campo de los productos naturales.

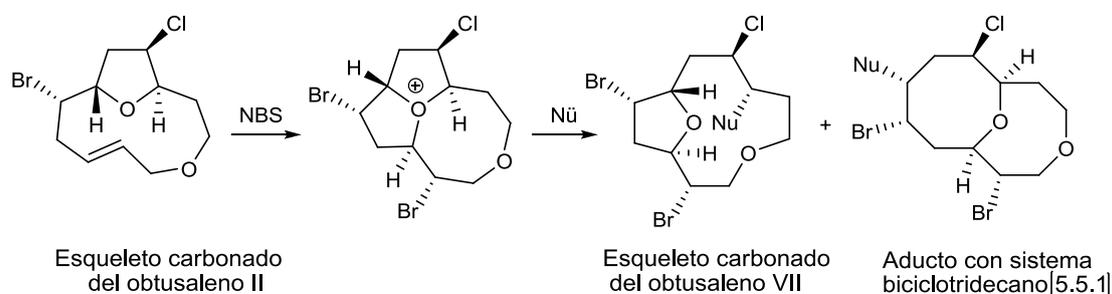


Figura 2.1.7. Validación de la propuesta de Braddock para la biogénesis de los obtusalenos.

⁵⁷ Braddock, D. C.; Millan, D. S.; Pérez-Fuertes, Y.; Pouwer, R. H.; Sheppard, R. N.; Solanski, S.; White, A. J. P. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1835.

2.2. RECOLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL ALGA *LAURENCIA MARILZAE*

Los ejemplares de *Laurencia marilzae* Gil-Rodríguez, Senties et M.T. Fujii, se recolectaron manualmente durante la bajamar en la localidad de Paraíso Floral (Adeje), en los meses de Abril y Mayo de 2009. Las muestras de peso húmedo aproximado 1.3 Kg, fueron trasladadas en neveras hasta nuestro laboratorio donde se maceraron durante cinco días a temperatura ambiente en mezclas de CH₂Cl₂:MeOH (1:1) (3x). El disolvente fue evaporado a vacío obteniéndose un primer extracto aceitoso de color amarillo oscuro y peso 34.0 g denominado LM-A. Los residuos de alga tras la maceración, se dejaron secar a temperatura ambiente y una vez triturados se sometieron a una segunda extracción en caliente, hasta agotamiento, en un equipo Soxhlet utilizando como disolvente en primer lugar CH₂Cl₂ y después MeOH. Finalmente, la reunión de estos disolventes fue evaporada, dando lugar a un segundo extracto de aspecto similar al anterior, con un peso de 1.0 g, que se denominó LM-B.

2.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS EXTRACTOS

El extracto LM-A fue sometido a una separación cromatográfica en una columna abierta de Sephadex LH-20 (600 x 70 mm Ø) usando CHCl₃:MeOH (1:1) como fase móvil y en porciones aproximadas de 6 g. La reunión de las fracciones se llevó a cabo atendiendo a un patrón similar en cromatografía de capa fina (TLC). El análisis de RMN ¹H de las cuatro fracciones obtenidas hizo que se centrara la atención en las fracciones LM-A2 y LM-A3, volviéndose a cromatografiar con el mismo soporte pero eluyendo con *n*-hexano:CHCl₃:MeOH (2:1:1). Las fracciones resultantes fueron sometidas nuevamente a separación pero esta vez en columnas de media presión Lobar LiChroprep Si-60 (310 x 25 mm Ø, 40-63 µm) eluidas en general con *n*-Hex:AcOEt:MeOH (14:5:1). La purificación final, en todos los casos, se llevó a cabo a través de cromatografía de alta resolución HPLC utilizando repetidamente una columna µ-Porasil (150 x 19 mm Ø) y mezclas isocráticas o en gradiente de *n*-hexano y AcOEt a flujos de 1 ml/min hasta conseguir el aislamiento de los productos puros. El procedimiento cromatográfico utilizado con el extracto LM-A se resume esquemáticamente en la figura 2.3.1, dando como resultado el aislamiento de 22 metabolitos nuevos y 13 compuestos ya conocidos en la literatura (ver apartado 2.6.23).

Este protocolo cromatográfico se repitió con el extracto LM-B (1.0 g) obteniéndose pequeñas cantidades adicionales de los compuestos mayoritarios.

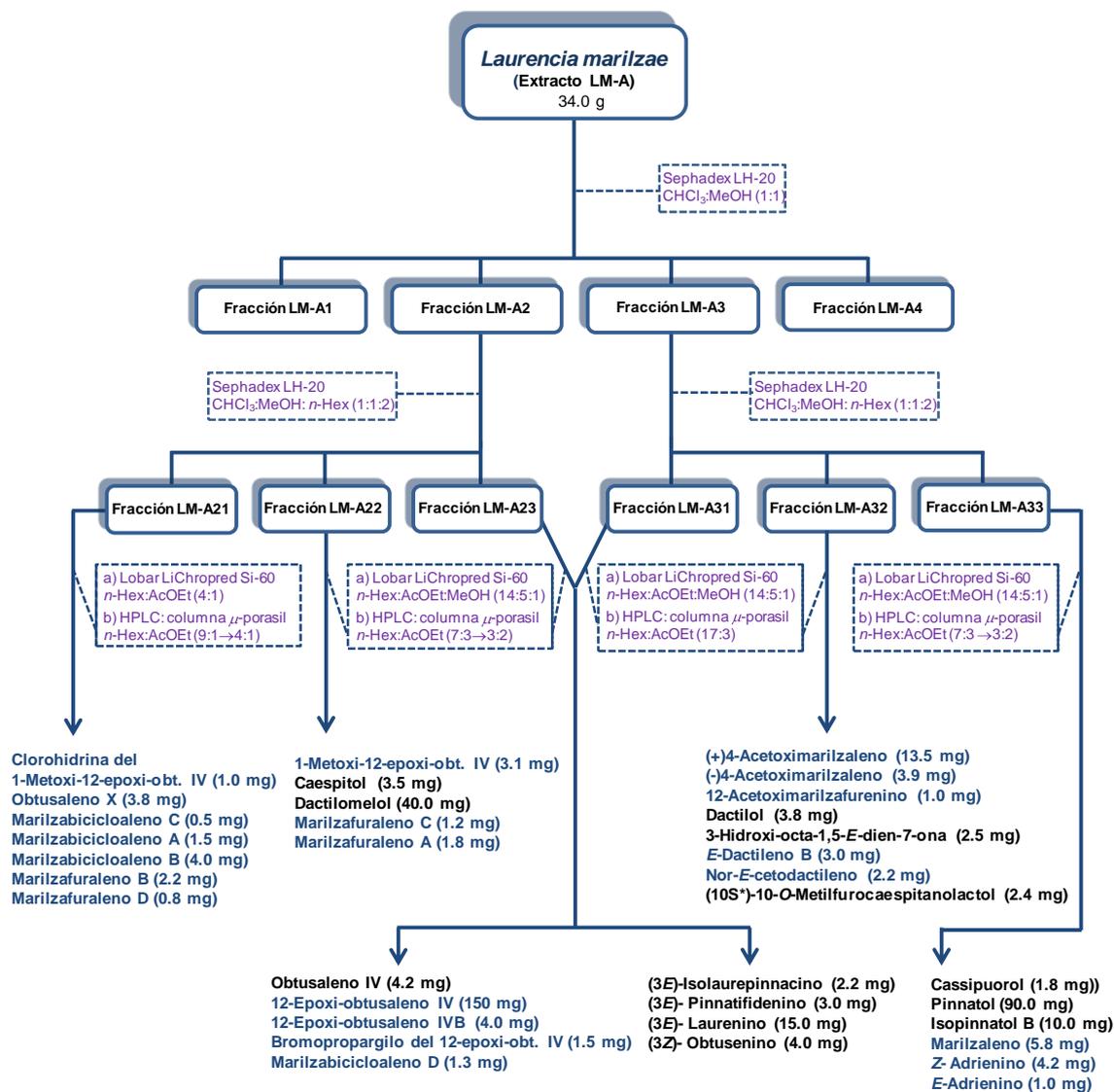


Figura 2.3.1. Marcha cromatográfica del extracto LM-A obtenido de *L. marilzae*.

2.4. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS NUEVOS METABOLITOS

A continuación, se presenta de forma detallada la elucidación estructural de los nuevos metabolitos secundarios obtenidos de los extractos orgánicos de *L. marilzae*.^{58,59} La mayoría de estas sustancias resultó ser de naturaleza no terpénica, 20 acetogeninas C-15, siendo las únicas excepciones, 2 terpenos de tipo dactilomelano. Sin embargo, dada la gran variedad estructural encontrada en el grupo de las acetogeninas, a fin de facilitar su estudio y discusión, éstas se han clasificado de la forma siguiente:

- Acetogeninas C-15 con sistema de anillo [5.5.1]bicyclotridecano.
- Acetogeninas C-15 con anillo de doce miembros (Obtusalenos).
- Acetogeninas C-15 con anillo de ocho miembros (Oxocanos).
- Acetogeninas C-15 con anillo de cinco miembros (Oxolanos).
- Acetogeninas C-15 lineales.
- Compuestos de naturaleza terpénica.

2.4.1. Acetogeninas C-15 con sistema de anillo [5.5.1]bicyclotridecano

2.4.1.1. Marilzabicycloaleno A (1)

El marilzabicycloaleno A (1) fue aislado como un sólido amorfo de color blanco con una rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} = -126$ (c 0.11, CHCl₃). Su fórmula molecular fue establecida como C₁₅H₂₁Br₂ClO₄, indicando cuatro insaturaciones en la molécula, en base a los tres iones isotópicos pseudomoleculares característicos [M + Na]⁺ a *m/z* 480.9358, 482.9375, 484.9342 (56:100:82) de su espectro de masas de alta resolución ESI-HRMS.

Un primer estudio de las señales que aparecen en los espectros monodimensionales de RMN ¹³C (Figura 2.4.1) y RMN ¹H (Figura 2.4.2), además de confirmar la presencia de 15 átomos de carbonos en la estructura, mostraron la existencia inequívoca de un grupo funcional bromoalénico terminal [δ_C 200.9 (C), 103.2 (CH), 74.1 (CH); δ_H 6.05 (dd, *J* = 2.1, 5.7 Hz) y 5.47 (dd, *J* = 5.5, 5.7 Hz)] (Tabla 2.4.1).

⁵⁸ Gutiérrez-Cepeda, A.; Fernández, J. J.; Gil, L. V.; López-Rodríguez, M.; Norte, M.; Souto, M. L. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 441.

⁵⁹ Gutiérrez-Cepeda, A.; Fernández, J. J.; Norte, M.; Souto, M. L. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2690.

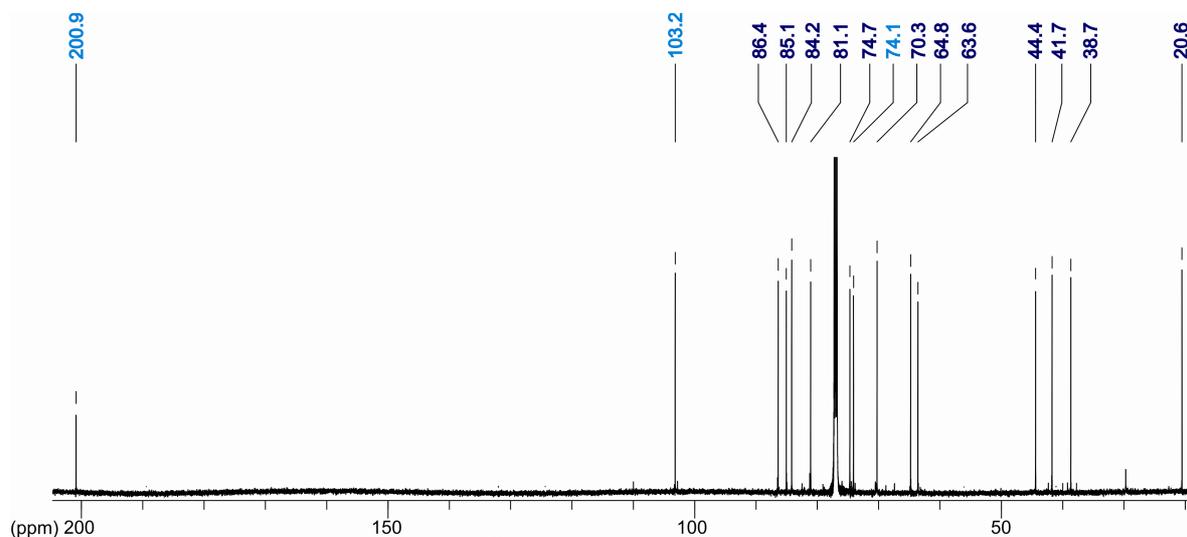


Figura 2.4.1. Espectro de RMN ^{13}C del marilzabicicloaleno A (1) en CDCl_3 (150 MHz).

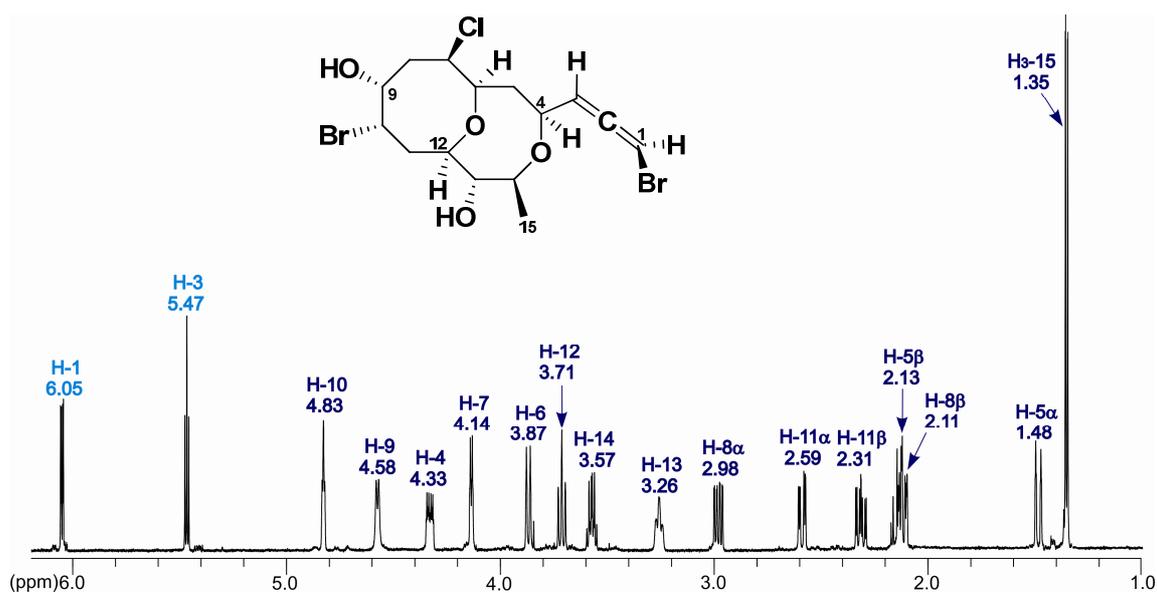


Figura 2.4.2. Espectro de RMN ^1H del marilzabicicloaleno A (1) en CDCl_3 (600 MHz).

El análisis del experimento HSQC con editado de multiplicidad (Figura 2.4.3) permitió establecer además, la presencia de ocho metinos unidos a heteroátomo (δ_{C} 86.4, 85.1, 84.2, 81.1, 74.7, 70.3, 64.8, 63.6), tres metilenos (δ_{C} 44.4, 41.7, 38.7) y un metilo secundario (δ_{C} 20.6). Estos datos fueron confirmados por las bandas de absorción propias en el espectro de IR de grupos hidroxilo (3365 cm^{-1}), aleno (1958 cm^{-1}) y éter (1074 cm^{-1}).

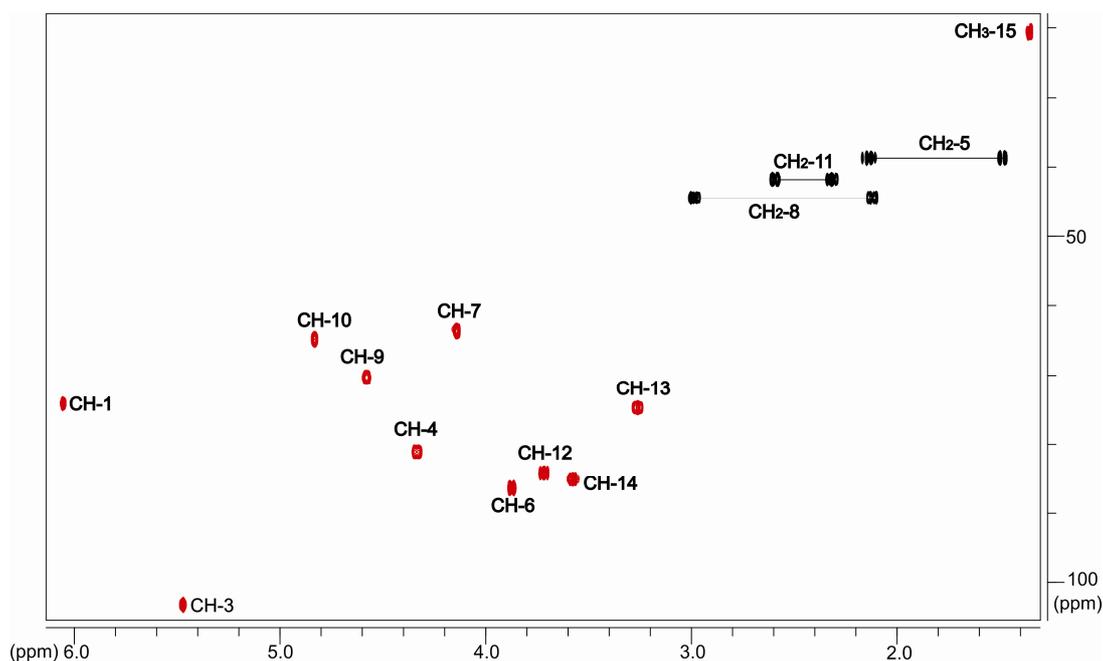


Figura 2.4.3. Espectro de HSQC con editado de multiplicidad del marizabicicloaleno A (1) en CDCl_3 (600 MHz).

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.1	6.05	dd	2.1, 5.7
2	200.9			
3	103.2	5.47	dd	5.5, 5.7
4	81.1	4.33	dddd	1.8, 2.1, 5.5, 11.3
5	38.7	β 2.13	ddd	10.9, 11.3, 14.5
		α 1.48	ddd	1.8, 1.8, 14.5
6	86.4	3.87	ddd	1.8, 1.8, 10.9
7	63.6	4.14	ddd	1.8, 1.9, 5.7
8	44.4	α 2.98	ddd	1.9, 7.4, 15.8
		β 2.11	ddd	1.1, 5.7, 15.8
9	70.3	4.58	ddd	1.1, 1.3, 7.4
10	64.8	4.83	ddd	1.3, 3.5, 4.0
11	41.7	α 2.59	ddd	1.3, 4.0, 15.3
		β 2.31	ddd	3.5, 10.6, 15.3
12	84.2	3.71	ddd	1.3, 9.0, 10.6
13	74.7	3.26	dd	8.7, 9.0
14	85.1	3.57	dd	6.2, 8.7
15	20.6	1.35 (3H)	d	6.2

Tabla 2.4.1. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del marizabicicloaleno A (1) (CDCl_3).

Las correlaciones de protones geminales y vecinales observadas en el experimento homonuclear COSY (Figura 2.4.4), revelaron la existencia de un único sistema amplio de espín que abarca la secuencia C-3→C-15 (Figura 2.4.5), y permitió situar los heteroátomos sobre los carbonos C-4, C-6, C-7, C-9, C-10 y C-14.

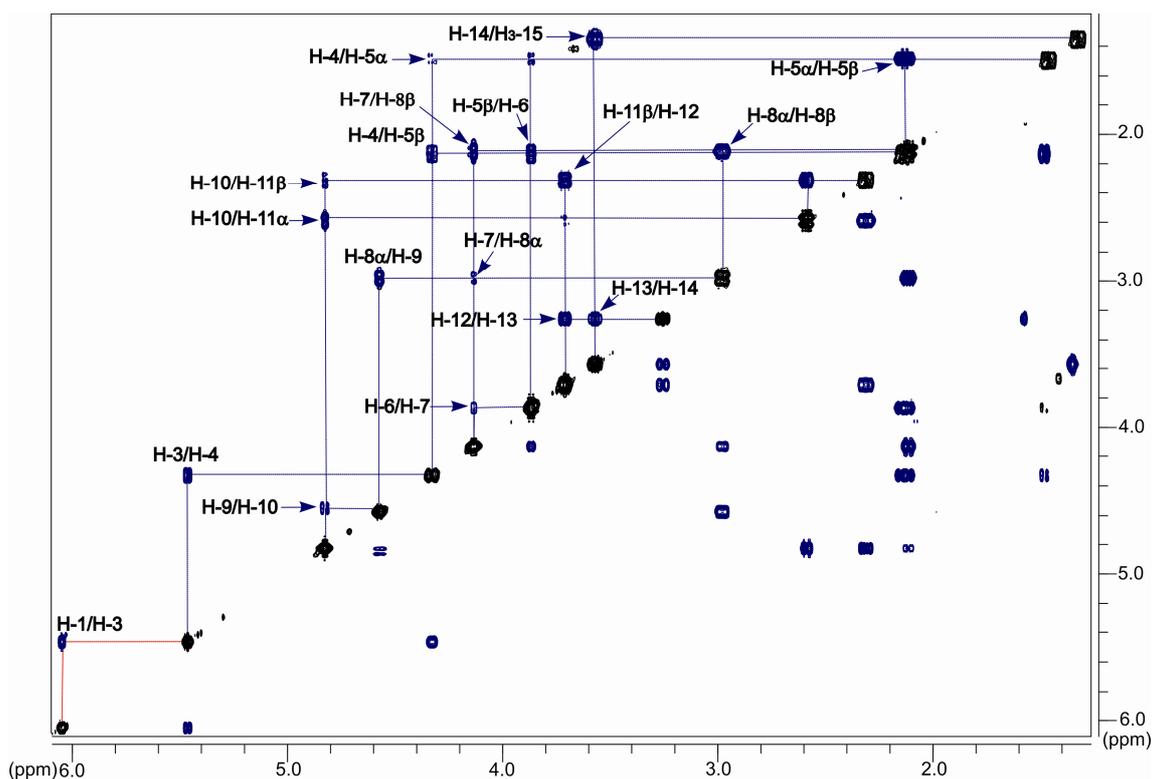


Figura 2.4.4. Espectro de COSY del marizabicicloaleno A (**1**) en CDCl_3 (600 MHz).

A través del experimento HMBC (Figura 2.4.5) se determinaron las conectividades a larga distancia del metino H-4 (δ_{H} 4.33) con el carbono C-14 (δ_{C} 85.1) y de H-6 (δ_{H} 3.87) con C-12 (δ_{C} 84.2), estableciendo dos puentes éter entre esas posiciones, y situando por lo tanto, en función de los grados de insaturación de la molécula, los dos átomos de oxígeno restantes como grupos hidroxilos sobre los carbonos C-9 y C-13. Por otro lado, también se observó las conectividades del metino H-1 (δ_{H} 6.05) con los carbonos C-4 (δ_{C} 81.1), C-3 (δ_{C} 103.2), y C-2 (δ_{C} 200.9), completando así la caracterización de la estructura plana del marizabicicloaleno A (**1**), una nueva acetogenina C_{15} con un sistema carbonado [5.5.1] biciclotridecano sin precedente en la literatura. En la tabla 2.4.1 se recogen los desplazamientos químicos de carbono y protón para este compuesto, así como los valores de constantes de acoplamiento ^1H - ^1H .

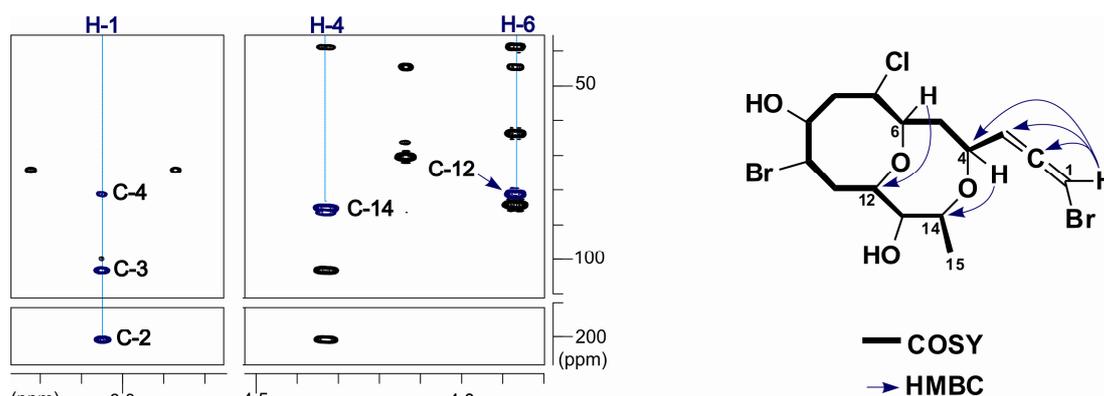


Figura 2.4.5. Secciones del experimento HMBC en CDCl_3 (600 MHz) y principales conectividades HMBC y COSY observadas para el marizabicicloaleno A (1).

El análisis del experimento ROESY y de los valores de las constantes de acoplamiento protón-protón, permitió establecer la estereoquímica relativa de los centros C-4, C-6, C-7, C-9, C-10, C-12, C-13 y C-14 del compuesto 1 (Figura 2.4.6).

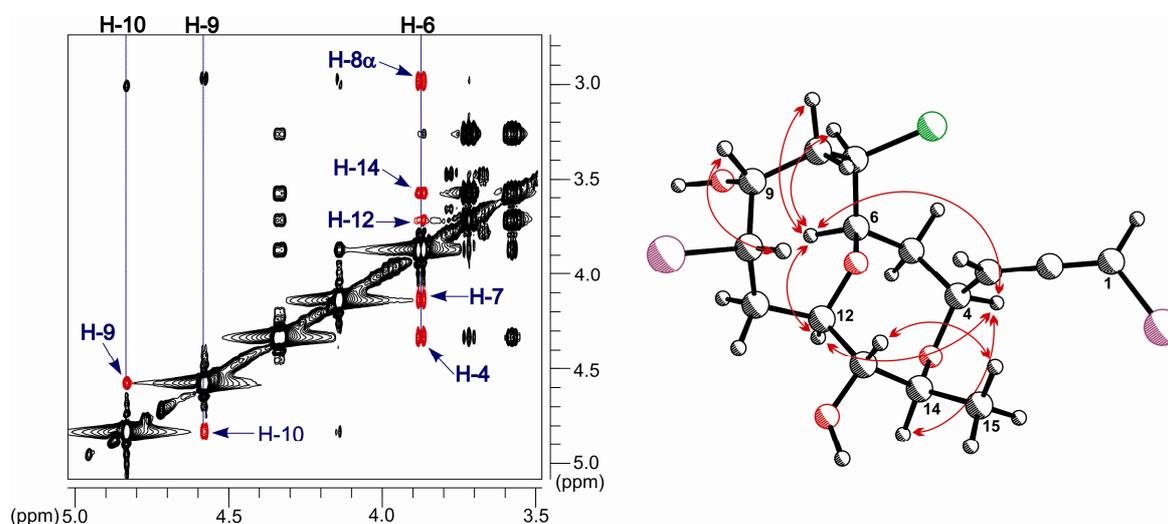


Figura 2.4.6. Sección del experimento ROESY y correlaciones ROE más importantes del marizabicicloaleno A (1) en CDCl_3 (600 MHz).

Se observó la existencia de correlaciones claras entre el protón H-4 (δ_{H} 4.33) y los protones H-14 (δ_{H} 3.57), H-6 (δ_{H} 3.87) y H-12 (δ_{H} 3.71), así como del metino H-6 con H-7 (δ_{H} 4.14) y uno de los protones diastereotópicos del metileno H-8 (δ_{H} 2.98, H-8 α). Esto indica una disposición espacial equivalente de los protones en dichos centros, y que los cierres de los anillos heterocíclicos tienen disposición *cis*. Por otra parte, los valores de las

constantes de acoplamiento entre H-8 α /H-9 ($^3J_{\text{H-8}\alpha,\text{H-9}} = 7.4$ Hz), H-12/H-13 ($^3J_{\text{H-12},\text{H-13}} = 9.0$ Hz) y H-13/H-14 ($^3J_{\text{H-13},\text{H-14}} = 8.7$ Hz), sugieren una disposición *anti* para estos protones y sitúan H-9 ($\delta_{\text{H}} 4.58$) y H-13 ($\delta_{\text{H}} 3.26$) en la cara opuesta de la molécula a donde se ubica a H-8 α , H-12 y H-14. La estereoquímica de C-10 se estableció a partir de la correlación ROE de H-9 con H-10 ($\delta_{\text{H}} 4.83$) y del valor pequeño de la constante de acoplamiento entre ellos, $^3J_{\text{H-9},\text{H-10}} = 1.3$ Hz. De acuerdo a estos datos, la configuración relativa para este compuesto fue propuesta como: 4S*, 6R*, 7R*, 9R*, 10S*, 12R*, 13S* y 14S*.

Por último, la configuración absoluta de la unidad de bromoaleno se predijo de acuerdo a las reglas semiempíricas de Lowe-Brewster's^{60,61} como *R*, confirmándose por análisis de Dicroísmo Circular (DC) en el que mostró un efecto Cotton negativo equivalente al de otros bromoalenos con esa configuración cuya estructura había sido establecida inequívocamente por difracción de rayos-X.⁵³

2.4.1.2. Marilzabicicloaleno B (2)

Este metabolito fue aislado como un sólido blanco ópticamente activo, con $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +94$ (c 0.13, CHCl₃). En su espectro de masas de alta resolución ESI-HRMS se observaron tres picos isotópicos pseudomoleculares $[\text{M} + \text{Na}]^+$ [m/z 480.9378, 482.9382, 484.9413; (26:59:47)], lo que permitió establecer su fórmula molecular como C₁₅H₂₁Br₂ClO₄, fórmula idéntica a la del marilzabicicloaleno A (1).

De hecho, al comparar los datos de IR así como los de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto **2** con los del marilzabicicloaleno A (1) (Tablas 2.4.2 y 2.4.1), se pone de manifiesto que ambos metabolitos poseen una estrecha relación entre sus estructuras, siendo el espectro de RMN ¹H del marilzabicicloaleno B (2) (Figura 2.4.7) muy similar al del compuesto 1 (Figura 2.4.2). Las principales diferencias corresponden a las variaciones en los desplazamientos químicos de los carbonos C-14 [δ_{C} 85.1 en **1**, vs δ_{C} 79.1 en **2**], y de C-4 [δ_{C} 81.1 en **1**, vs δ_{C} 67.4 en **2**], como se observa claramente al superponer los experimentos HSQC para ambos compuestos (Figura 2.4.8).

El análisis complementario de los experimentos bidimensionales COSY y HMBC, nos llevó a una estructura plana idéntica a la del compuesto 1, lo que apunta a que esos

⁶⁰ Lowe, G. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1965**, 411.

⁶¹ Elsevier, C. J.; Vermeer, P.; Gedanken, A.; Runge, W. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 364.

cambios en los desplazamientos de C-4 y C-14 obedecen a una inversión en la estereoquímica de al menos uno de estos centros estereogénicos.

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	73.9	6.03	dd	1.6, 5.7
2	201.0			
3	102.8	5.42	dd	5.7, 6.5
4	67.4	4.34	dddd	1.6, 4.7, 6.5, 10.9
5	37.8	β 2.09	ddd	4.7, 10.8, 13.7
		α 1.68	ddd	1.8, 10.9, 13.7
6	82.5	3.98	ddd	1.8, 1.9, 10.8
7	63.1	4.15	ddd	1.8, 1.9, 5.6
8	45.0	α 2.99	ddd	1.8, 7.5, 15.7
		β 2.16	dddd	0.8, 0.8, 5.6, 15.7
9	70.4	4.54	<i>br</i> d	7.5
10	64.9	4.86	<i>br</i> dd	3.5, 4.2
11	40.7	α 2.53	ddd	1.3, 4.2, 15.2
		β 2.26	ddd	3.5, 11.2, 15.2
12	82.2	3.78	ddd	1.3, 8.8, 11.2
13	76.0	3.48	m	
14	79.1	3.68	dd	6.6, 8.8
15	18.1	1.42 (3H)	d	6.6

Tabla 4.2.2. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del marilzabicicloaleno B (**2**) (CDCl_3). Señal ancha se denota como *br*.

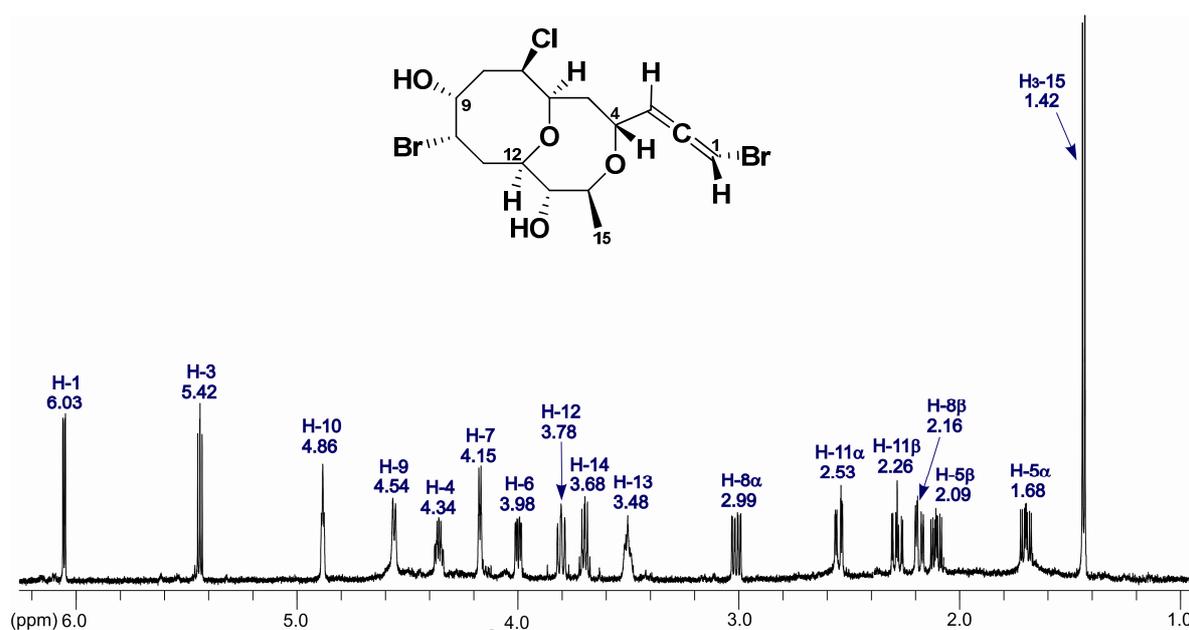
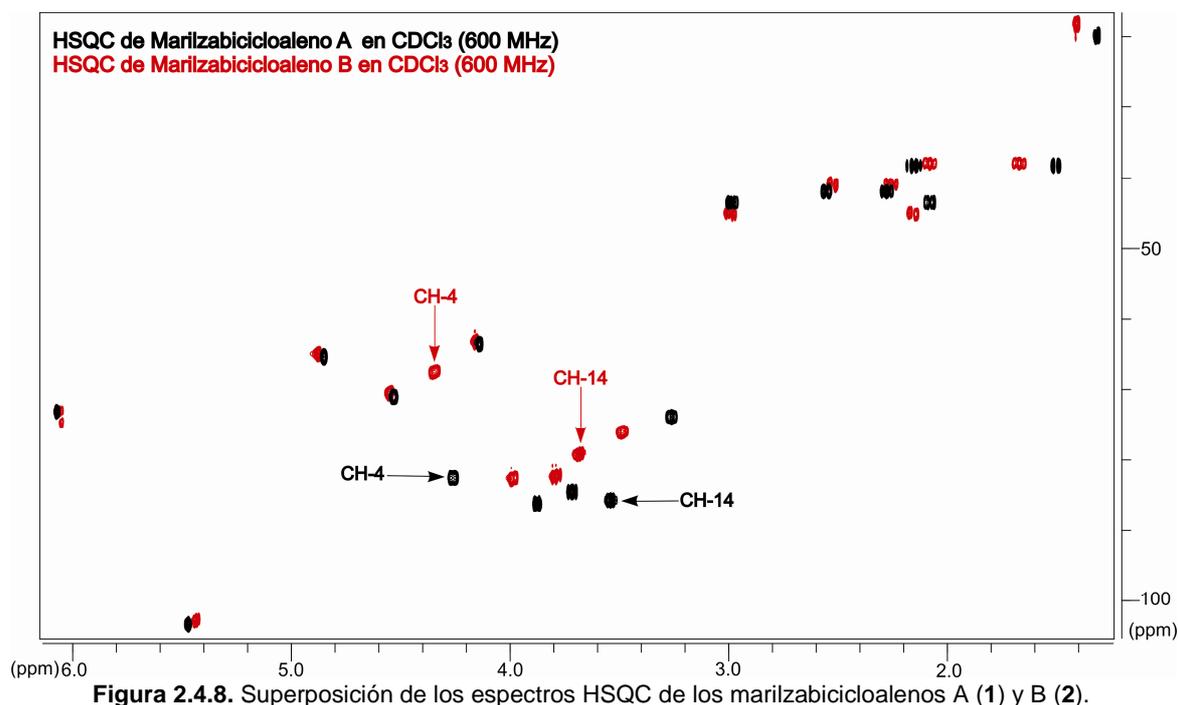
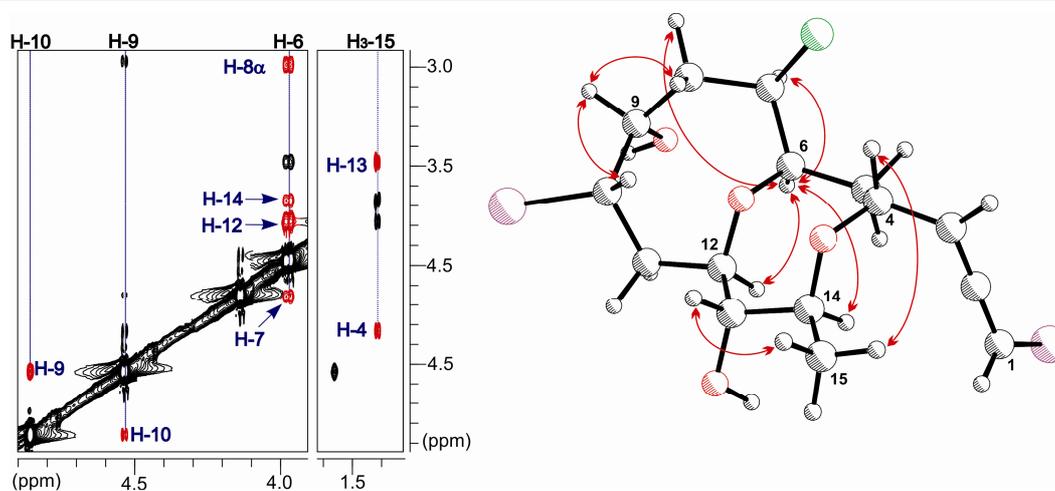


Figura 2.4.7. Espectro de RMN ^1H del marilzabicicloaleno B (**2**) en CDCl_3 (600 MHz).



En efecto, el experimento ROESY (Figura 2.4.9) confirmó el cambio de configuración en C-4 respecto al compuesto 1. Se observaron correlaciones ROE de H-6 (δ_{H} 3.98) con H-14 (δ_{H} 3.68) y H-12 (δ_{H} 3.78), pero en ningún momento con H-4 (δ_{H} 4.34), mientras en la otra cara de la molécula, el metilo H_3 -15 (δ_{H} 1.42) además de mostrar correlación con H-13 (δ_{H} 3.48), lo hizo con H-4. De esta forma se determinó que H-4 se ubica en la cara β de la molécula, con una configuración relativa R^* en dicho centro quiral.



Además, la existencia de un efecto Cotton positivo para el marilzabicicloaleno B (2), en su espectro de Dicroísmo Circular, opuesto al del marilzabicicloaleno A (1), indicó una configuración absoluta S de la cadena bromoalénica.

2.4.1.3. Marilzabicicloaleno C (3)

El compuesto 3 fue aislado como un sólido amorfo incoloro con rotación óptica $[\alpha]_D^{25} = -50$ (*c* 0.03, CHCl₃). Su fórmula molecular fue determinada como C₁₆H₂₃Br₂ClO₄ en base a los iones [M + Na]⁺ de su espectro de masas ESI-HRMS a *m/z* 494.9570, 496.9541 y 498.9563 (22:53:37), y a las señales de su espectro de RMN ¹³C (Figura 2.4.10).

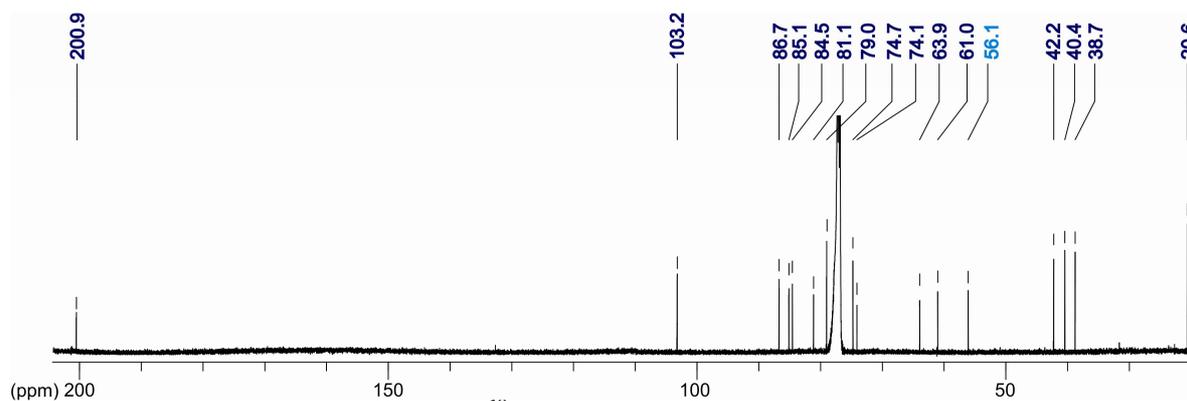


Figura 2.4.10. Espectro de RMN ¹³C del marilzabicicloaleno C (3) en CDCl₃ (150 MHz).

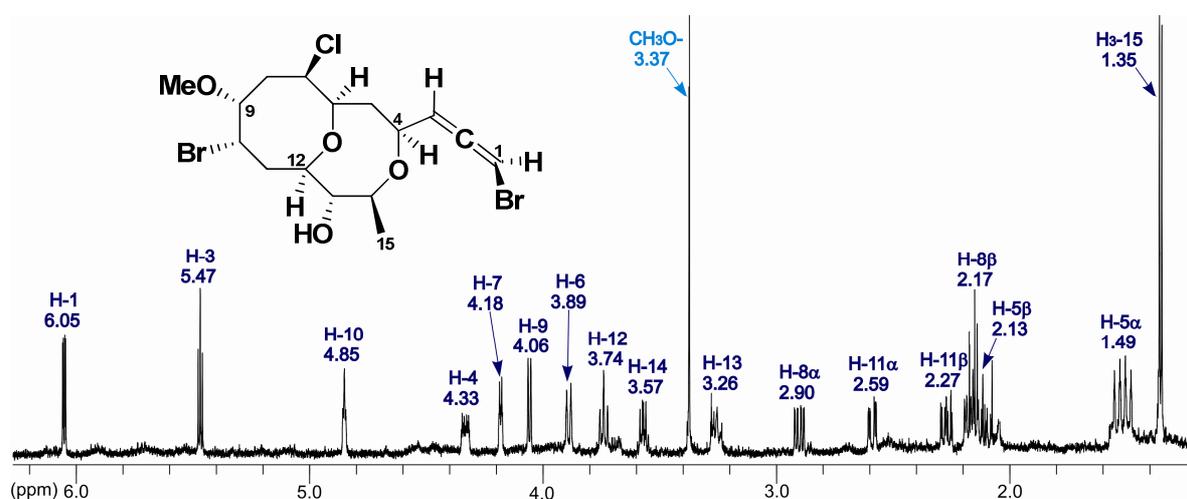


Figura 2.4.11. Espectro de RMN ¹H del marilzabicicloaleno C (3) en CDCl₃ (600 MHz).

La comparación de sus datos de RMN ^1H y ^{13}C con los del compuesto **1** (Tablas 2.4.3 y 2.4.1), indica claramente una estrecha similitud de sus estructuras, donde la principal diferencia estriba en la presencia de un grupo metoxilo [δ_{C} 56.1 y δ_{H} 3.37 (s)] en el marilzabicicloaleno C (**3**) (Figuras 2.4.10 y 2.4.11).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.1	6.05	dd	2.1, 5.6
2	200.9			
3	103.2	5.47	dd	5.5, 5.6
4	81.1	4.33	dddd	2.0, 2.1, 5.5, 11.3
5	38.7	β 2.13	ddd	10.9, 11.3, 14.8
		α 1.49	ddd	1.7, 2.0, 14.8
6	86.7	3.89	ddd	1.7, 1.9, 10.9
7	63.9	4.18	ddd	1.8, 1.9, 5.7
8	40.4	α 2.90	ddd	1.8, 7.1, 16.0
		β 2.17	ddd	1.1, 5.7, 16.0
9	79.0	4.06	ddd	1.0, 1.1, 7.1
10	61.0	4.85	ddd	1.0, 3.3, 4.1
11	42.2	α 2.59	ddd	1.4, 4.1, 15.1
		β 2.27	ddd	3.3, 10.0, 15.1
12	84.5	3.74	ddd	1.4, 9.9, 10.0
13	74.7	3.26	dd	9.0, 9.9
14	85.1	3.57	dd	6.2, 9.0
15	20.6	1.35 (3H)	d	6.2
CH ₃ O-	56.1	3.37 (3H)	s	

Tabla 2.4.3. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del marilzabicicloaleno C (**3**) en CDCl₃.

El acoplamiento HMBC a larga distancia del grupo metoxilo con C-9, así como el desplazamiento a campos bajos de la señal de este carbono (δ_{C} 79.0), permite localizar este grupo en la molécula. El resto de las correlaciones observadas en el experimento de HMBC, así como el análisis del experimento COSY corroboran la propuesta estructural (Figura 2.4.12).

Respecto a la configuración relativa del marilzabicicloaleno C (**3**), nuevamente se recurrió a las correlaciones dipolares observadas en el experimento TROESY y al análisis de los valores de las constantes de acoplamiento, tomando como referencia los datos obtenidos para los metabolitos descritos anteriormente. Sobre esta base se llegó a la conclusión de que el compuesto **3** y el marilzabicicloaleno A (**1**) comparten la misma configuración relativa, 4*S**, 6*R**, 7*R**, 9*R**, 10*S**, 12*R**, 13*S** y 14*S**, así como ambos presentan la unidad de bromoaleno con una configuración *R*.

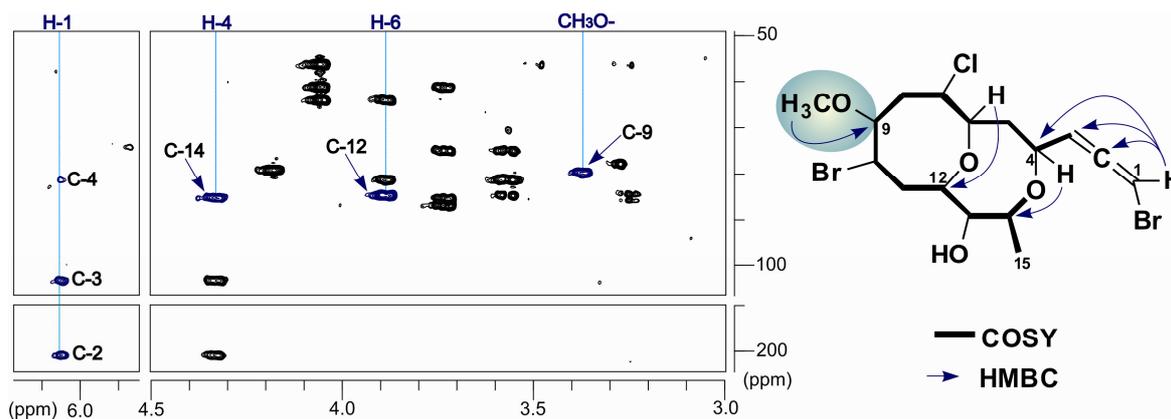


Figura 2.4.12. Secciones del experimento HMBC en CDCl_3 (600 MHz) y principales conectividades HMBC y COSY observadas para el marizabicicloaleno **C (3)**.

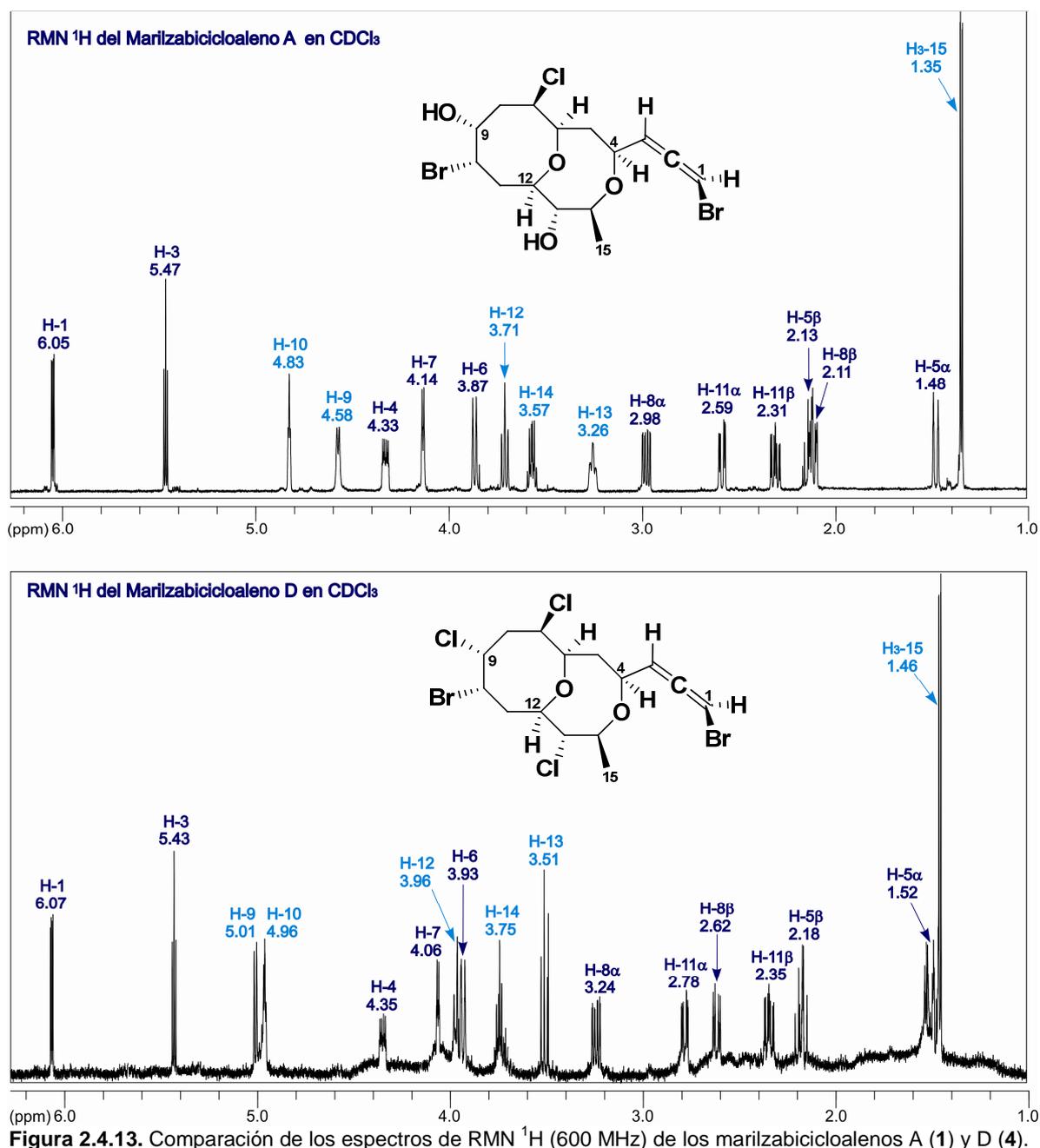
2.4.1.4. Marizabicicloaleno D (4)

El marizabicicloaleno **D (4)** fue aislado como un sólido amorfo blanco ópticamente activo ($[\alpha]_D^{25} = -28$ (c 0.05, CHCl_3)). En el análisis por ESI-HRMS se observaron los iones isotópicos pseudomoleculares $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a m/z 516.8801, 518.8710 y 520.8683; (36:95:100), que establecen la fórmula molecular empírica del marizabicicloaleno **D (4)** como $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{Cl}_3\text{O}_2$.

El análisis de los experimentos de RMN indican que **4** es también un bromoaleno representante de esta nueva clase de productos naturales, por lo que sus datos de RMN ^{13}C y RMN ^1H (Tabla 2.4.4), presentan importantes similitudes con los compuestos anteriores.

En efecto si procedemos a la comparación del espectro de RMN ^1H con el del marizabicicloaleno **A (1)** (Figura 2.4.13), vemos que las discrepancias más notables son el desplazamiento a campos bajos de los protones H-9, H-10, H-12, H-13, H-14 y H₃-15 en el compuesto **4**.

Al superponer los espectros de HSQC (Figura 2.4.14) de ambos compuestos también destacan los desplazamientos significativos de C-9 y C-13, localizados respectivamente a δ_c 60.1 y 63.0 en el marizabicicloaleno **D** frente a δ_c 70.3 y 74.7 en **1** (Tabla 2.4.4).



Las diferencias observadas obedecen al reemplazo de los grupos hidroxilos existentes en las posiciones C-9 y C-13 del compuesto 1, por dos átomos de cloro en el marizabicicloaleno D, lo cual es consistente con su fórmula molecular y la abundancia relativa de los picos isotópicos pseudomoleculares observados en su espectro de masas.

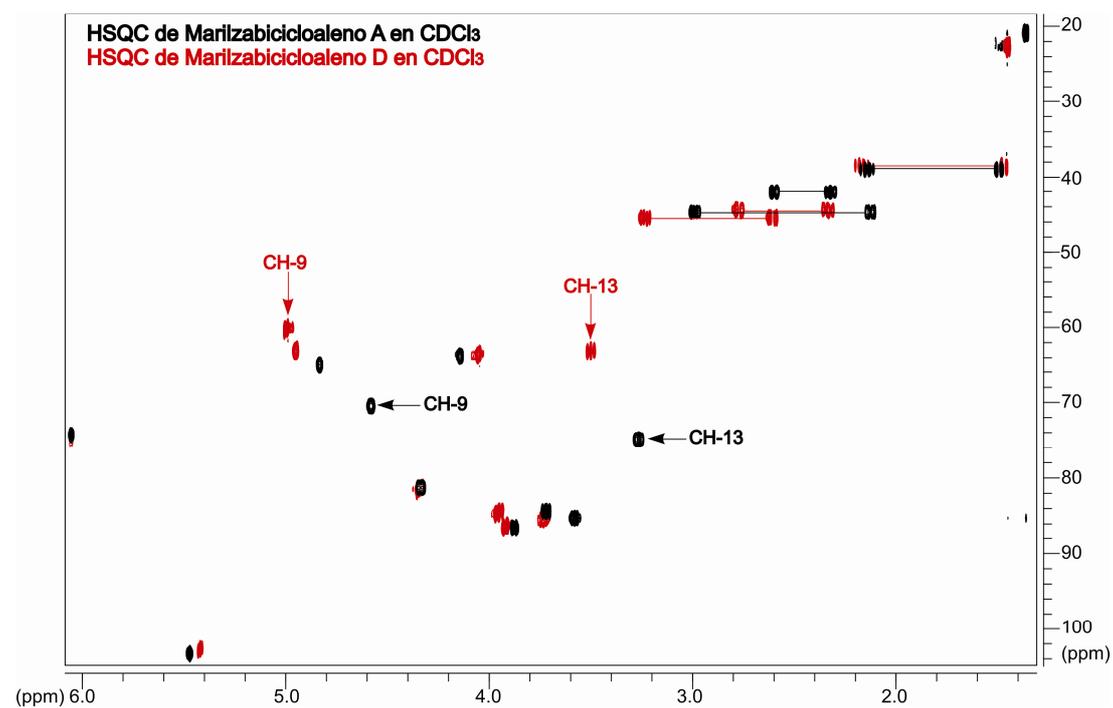


Figura 2.4.14. Superposición de los espectros HSQC (600MHz) de los marizabicicloalenos A (1) y D (4)

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.3	6.07	dd	2.1, 5.6
2	201.0			
3	102.7	5.43	dd	5.5, 5.6
4	81.1	4.35	dddd	2.1, 2.1, 5.5, 11.2
5	38.3	β 2.18	ddd	11.2, 11.2, 14.7
		α 1.52	ddd	1.7, 2.1, 14.7
6	86.2	3.93	ddd	1.7, 1.9, 11.2
7	63.4	4.06	ddd	1.9, 1.9, 5.4
8	45.2	α 3.24	ddd	1.9, 7.8, 16.4
		β 2.62	dddd	1.1, 1.1, 5.4, 16.4
9	60.1	5.01	ddd	1.1, 1.1, 7.8
10	62.9	4.96	ddd	1.1, 3.2, 4.2
11	44.1	α 2.78	ddd	1.2, 4.2, 15.1
		β 2.35	ddd	3.2, 10.5, 15.1
12	84.3	3.96	ddd	1.2, 9.8, 10.5
13	63.0	3.51	dd	9.8, 9.8
14	85.1	3.75	dd	6.2, 9.8
15	22.4	1.46 (3H)	d	6.2

Tabla 2.4.4. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del marizabicicloaleno D (4) en CDCl₃.

Por último, el análisis del experimento ROESY permitió confirmar la configuración relativa de todos los centros estereogénicos del marilzabicicloaleno D (**4**), como equivalente a la que presentan los metabolitos **1** y **3**. La configuración absoluta de la unidad de bromoaleno resultó también ser *R*.

2.4.2. Acetogeninas C-15 con anillo de doce miembros (Obtusalenos)

2.4.2.1. 12-Epoxi-obtusaleno IV (**5**)

Al derivado mayoritario de este grupo de nuevas acetogeninas aisladas de *L. marilzae*, le denominamos 12-epoxi-obtusaleno IV (**5**), y fue aislado como un sólido cristalino (p.f. 143-145 °C) con una actividad óptica de $[\alpha]_D^{25} = +53$ (c 0.12, CHCl₃). Su fórmula molecular fue determinada como C₁₅H₁₉Br₂ClO₃, en base a su espectro de masas de alta resolución ESI-FTICR, donde se pudo observar los iones pseudomoleculares a *m/z* 462.9285, 464.9262, 466.9241 [M + Na]⁺ (23:43:34).

Señales características en los espectros de RMN ¹H [δ_H 6.04 (dd, *J* = 1.7, 5.7 Hz), 5.37 (dd, *J* = 5.7, 6.4 Hz)] (Figura 2.4.15) y RMN ¹³C [δ_C 201.1 (C), 103.4 (CH), 74.1 (CH)] (Figura 2.4.16) (Tabla 2.4.5), revelaron la existencia de una cadena bromoalénica lateral. Esta funcionalidad fue confirmada por la absorción a 1959 cm⁻¹ en el espectro de IR, donde además se puso de manifiesto la ausencia de grupos hidroxilos y carbonilos, por lo que los oxígenos presentes en la molécula deben estar implicados en puentes éter.

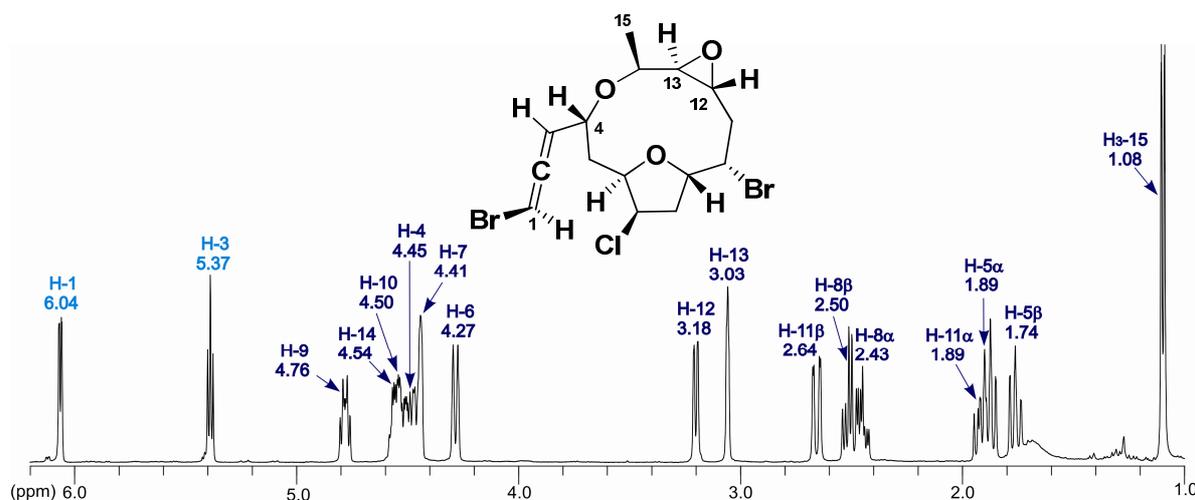


Figura 2.4.15. Espectro de RMN ¹H del 12-epoxi-obtusaleno IV (**5**) en CDCl₃ (500 MHz)

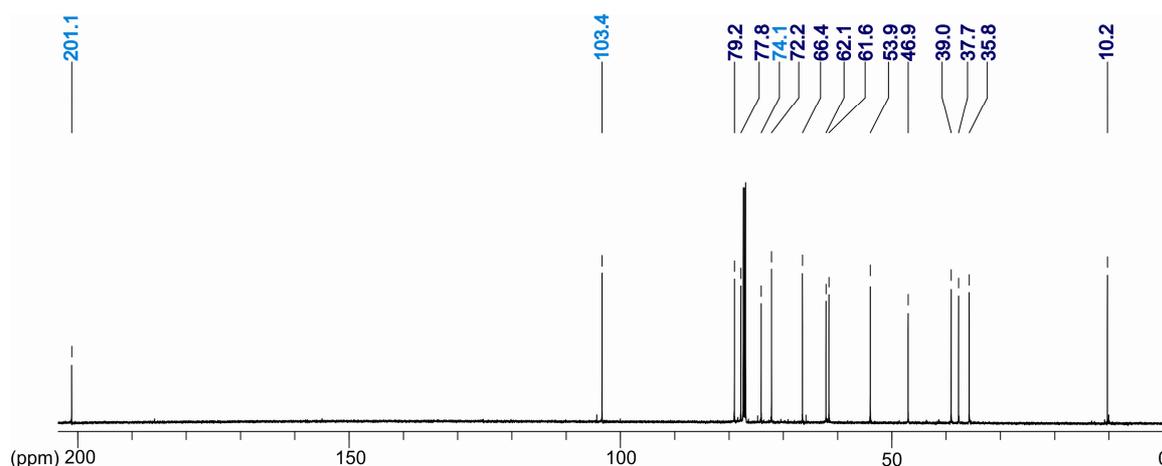


Figura 2.4.16. Espectro de RMN ^{13}C del 12-epoxi-obtusaleno IV (5) en CDCl_3 (150 MHz).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.1	6.04	dd	1.7, 5.7
2	201.1			
3	103.4	5.37	dd	5.7, 6.4
4	66.4	4.45	dddd	1.7, 1.8, 6.4, 11.0
5	37.7	β 1.89	ddd	1.8, 10.8, 13.8
		α 1.74	ddd	1.9, 11.0, 13.8
6	79.2	4.27	ddd	1.8, 1.9, 10.8
7	62.1	4.41	<i>br</i> dd	1.8, 4.4
8	39.0	β 2.50	dd	6.5, 14.4
		α 2.43	ddd	4.4, 9.5, 14.4
9	77.8	4.76	ddd	5.9, 6.5, 9.5
10	46.9	4.50	ddd	2.9, 5.9, 12.7
11	35.8	β 2.64	dd	2.9, 15.0
		α 1.89	ddd	8.7, 12.7, 15.0
12	53.9	3.18	dd	2.1, 8.7
13	61.6	3.03	dd	2.1, 3.4
14	72.2	4.54	dd	3.4, 7.1
15	10.2	1.08 (3H)	d	7.1

Tabla 2.4.5. Datos de RMN ^1H (500 MHz) y RMN ^{13}C (125 MHz) del 12-epoxi-obtusaleno IV (5) (CDCl_3).

Por otra parte, el análisis del espectro RMN ^{13}C , así como de las multiplicidades determinadas en el experimento HSQC editado (Figura 2.4.17), establecieron la presencia de ocho metinos unidos a heteroátomo (δ_{C} 79.2, 77.8, 72.2, 66.4, 62.1, 61.6, 53.9, 46.9), tres metilenos (δ_{C} 39.0, 37.7, 35.8) y un metilo secundario (δ_{C} 10.2) (Tabla 2.4.5).

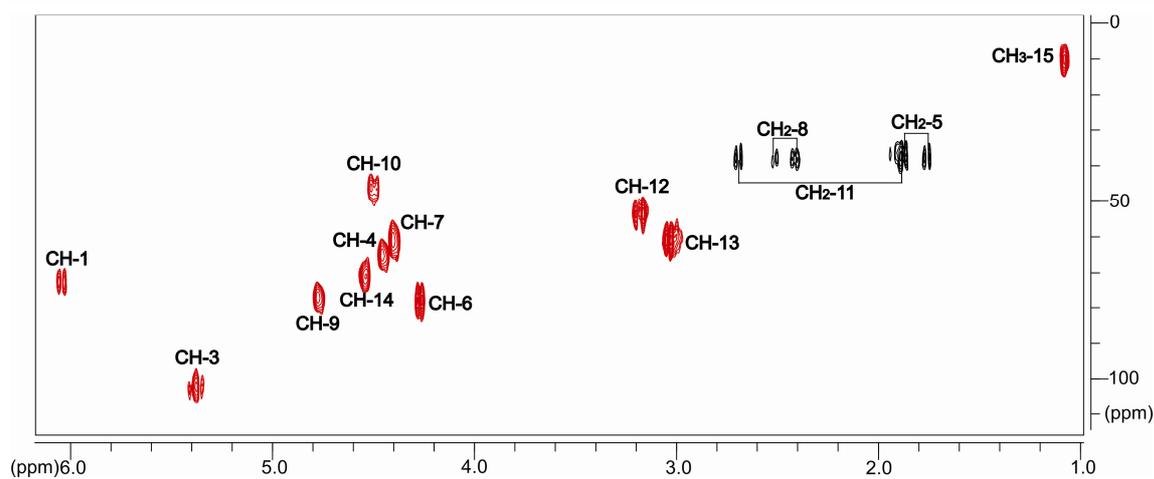


Figura 2.4.17. Espectro de HSQC editado del 12-epoxi-obtusaleno IV (**5**) en CDCl_3 (500 MHz).

La correlaciones observadas en el experimento homonuclear COSY (Figura 2.4.18) mostraron la presencia de un largo sistema de espín entre C-3→C-15. Además, este experimento indicó, a la luz de los datos anteriores, que el compuesto posee un epóxido en C-12 y C-13, y que el resto de los heteroátomos se sitúa sobre los carbonos C-4, C-6, C-7, C-9, C-10 y C-14.

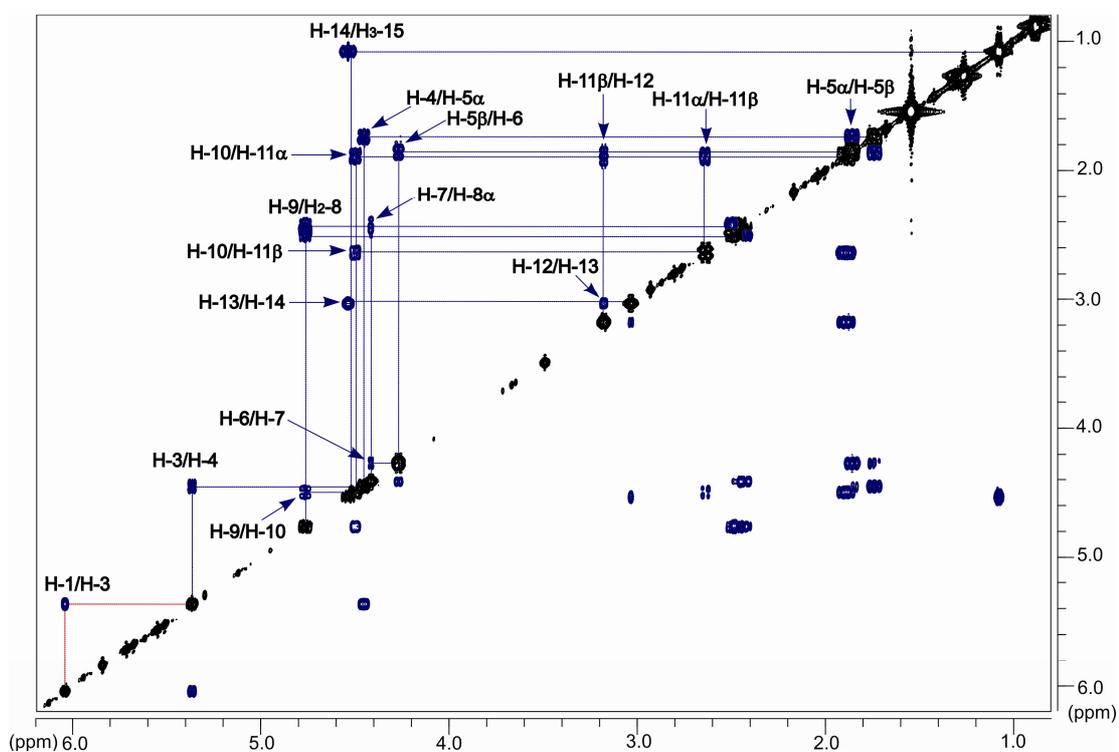


Figura 2.4.18. Espectro de COSY del 12-epoxi-obtusaleno IV (**5**) en CDCl_3 (500 MHz).

La estructura plana de la molécula se completa en base a las conectividades a larga distancia que se observaron en el experimento HMBC entre H-4 (δ_H 4.45) y C-14 (δ_C 72.2), así como entre H-9 (δ_H 4.76) y C-6 (δ_C 79.2), y que establecen dos puentes éter entre dichas posiciones. Estos datos, junto al acoplamiento HMBC con el carbono cuaternario C-2 (δ_C 201.2), de los metinos H-1 (δ_H 6.04) y H-4, indican que nos encontramos ante un derivado bromoalénico con un heterociclo carbonado de doce miembros, y que por lo tanto, el 12-epoxi-obtusaleno IV (**5**) viene a ser un nuevo representante de la familia de acetogeninas conocida como el grupo de los obtusalenos (Figura 2.4.19).

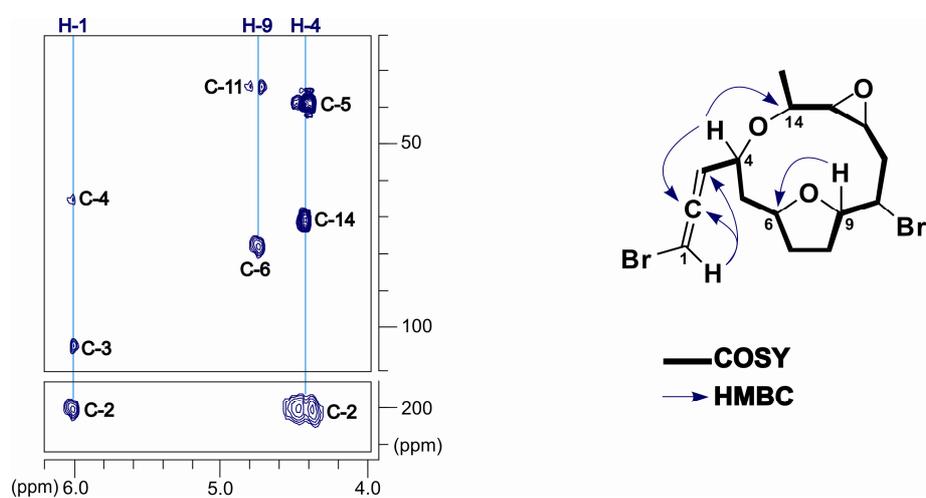


Figura 2.4.19. Secciones del experimento HMBC en $CDCl_3$ (500 MHz) y principales conectividades HMBC y COSY del 12-epoxi-obtusaleno IV (**5**).

El análisis de los valores de las constantes de acoplamiento en combinación con los datos del experimento NOESY, permitieron proponer la configuración relativa del 12-epoxi-obtusaleno IV (**5**). Así, se observaron correlaciones NOE intensas entre H₃-15 (δ_H 1.08) y H-4/H-12 (δ_H 3.18), de H-10 (δ_H 4.50) con H-9/H-12, y entre H-4 y un protón metileno diasterotópico H-5 (δ_H 1.89), lo que indica una orientación *syn* de H-4, H-5 β , H-9, H-10, H-12 y H-15 (Figura 2.4.20). Adicionalmente, el valor grande de la constante de acoplamiento $^3J_{H-5\beta, H-6} = 10.8$ Hz, denotó que los protones H-5 β y H-6 se encuentran en una disposición *antiperiplanar*. Teniendo esto en cuenta, los efectos NOE de H-6 (δ_H 4.27) con H-7 (δ_H 4.41)/H-13 (δ_H 3.03), así como el existente entre H-13 y H-14 (δ_H 4.59), sugirieron que estos protones se sitúan en la cara opuesta de la molécula a donde se ubica H-5 β . Estas afirmaciones se ven corroboradas por el desplazamiento químico relativo a campo alto de C-4, posiblemente debido a un efecto γ -*gauche* ejercido por C-15

sobre él, y que es consistente con una orientación *cisoid*e de H-4 y H₃-15. Este hecho había sido observado con anterioridad, en un único representante de esta clase de compuestos, el obtusaleno IV,^{53,54} y que también fue aislado en este estudio. Ambas acetogeninas, poseen en común la configuración S de la unidad bromoalénica.

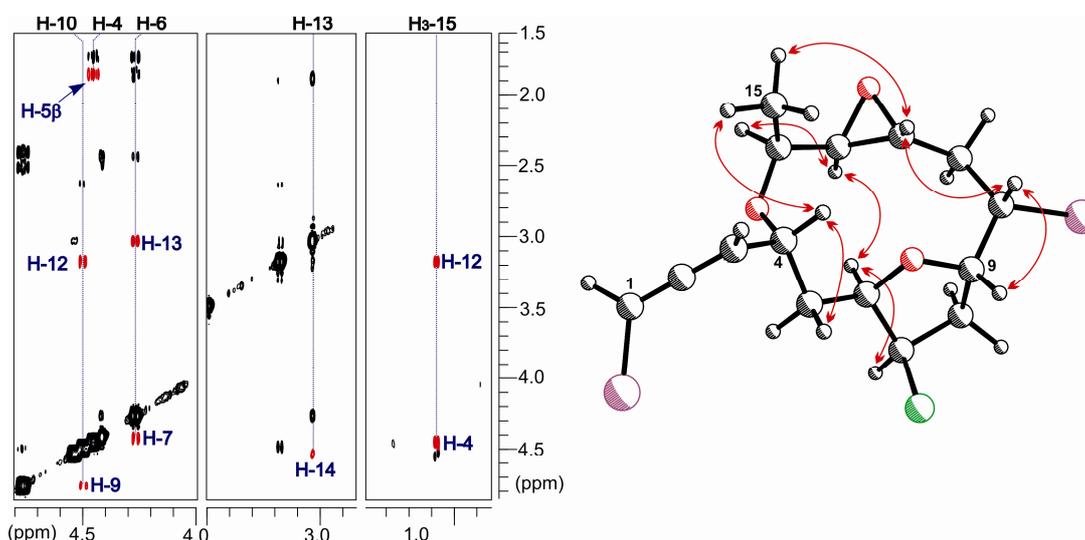


Figura 2.4.20. Secciones del experimento NOESY con las principales correlaciones observadas para el 12-epoxi-obtusaleno IV (5) en CDCl₃ (500 MHz).

Por último, un estudio de difracción de rayos X de un cristal obtenido en una mezcla de CH₂Cl₂:*n*-hexano, permitió confirmar todas las características estructurales del este nuevo metabolito y establecer su configuración absoluta como 4*R*, 6*R*, 7*R*, 9*S*, 10*S*, 12*R*, 13*R* y 14*S*. Estos resultados se muestran en la Figura 2.4.21.

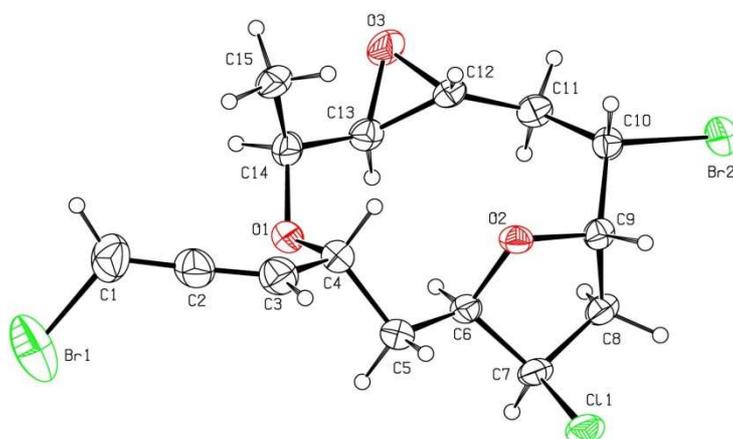


Figura 2.4.21. Estructura del 12-epoxi-obtusaleno IV (5) a partir de los datos de difracción de rayos X.

2.4.2.2. 12-Epoxi-obtusaleno IVB (6)

El 12-epoxi-obtusaleno IVB (**6**) fue aislado como un sólido blanquecino y $[\alpha]_D^{25} = +127$ (c 0.12, CHCl₃). Este compuesto resultó ser un isómero del 12-epoxi-obtusaleno IV (**5**) en base a los iones observados en su espectro de masas de alta resolución ESI-HRMS, consistente, por tanto, con la fórmula molecular C₁₅H₁₉Br₂ClO₃.

La comparación de sus datos espectroscópicos con los del compuesto **5** sugiere una estrecha relación entre sus estructuras (Tablas 2.4.5 y 2.4.6). Las diferencias más significativas se observan en el espectro de RMN ¹H (Figura 2.4.22), en el que las señales de los protones H-12 (δ_H 3.28), H-13 (δ_H 3.29) y H₃-15 (δ_H 1.45) en el compuesto **6**, se desplazan a campos más bajos en comparación a lo observado en el espectro del 12-epoxi-obtusaleno IV (**5**) que se sitúan a δ_H 3.18, 3.03 y 1.45, respectivamente, mientras que el metino H-14 (δ_H 3.29), por el contrario, sufre un fuerte apantallamiento [δ_H 3.29 en **6** vs δ_H 4.54 en **5**]. En menor medida, también destacan los desplazamientos a campos altos de los metinos H-9 y H-10 [δ_H 4.57/4.29 en **6** vs δ_H 4.76/4.50 en **5**]. Sin embargo, el análisis de los experimentos de RMN 2D (COSY, HSQC y HMBC) nos llevan a la conclusión de que ambos compuestos tienen la misma estructura plana.

Por lo tanto, procedimos a analizar en profundidad las diferencias en las señales del fragmento C-9/C-15, desde el punto de vista de la disposición espacial. Para ello, y debido al elevado solapamiento de las señales de interés en el espectro de RMN ¹H realizado con el disolvente deuterado habitual (CDCl₃), decidimos abordar los experimentos de ROESY usando C₆D₆. En la figura 2.4.22B y en la tabla 2.4.6, se ve claramente la ventaja de este cambio de disolvente. De esta forma, en el espectro de ROESY (Figura 2.4.23), se observaron correlaciones de H₃-15 (δ_H 1.30) y H-4 (δ_H 4.22) con H-13 (δ_H 2.90), y de este metino también con H-10 (δ_H 3.48)/H-9 (δ_H 3.93), por lo que la configuración de este centro C-13 se ha invertido respecto al compuesto **5**. Por otro lado, en la cara opuesta de la molécula, es el metino H-12 (δ_H 3.06) el que ahora muestra efecto ROE con H-6 (δ_H 4.05), H-7 (δ_H 3.86) y H-14 (δ_H 3.24). Podemos concluir por tanto, que la relación entre los protones H-12 y H-13 sigue siendo *trans*, como confirma la constante de acoplamiento pequeña entre ellos $^3J_{H-12,H-13} = 1.9$ Hz, habiéndose invertido la configuración en ambos centros respecto al 12-epoxi-obtusaleno IV (**5**). En base a estas observaciones, la estereoquímica relativa del compuesto **6** es: 4*R**, 6*R**, 7*R**, 9*S**, 10*S**, 12*S**, 13*S** y 14*S**, manteniéndose la configuración absoluta del bromoaleno como *S*.

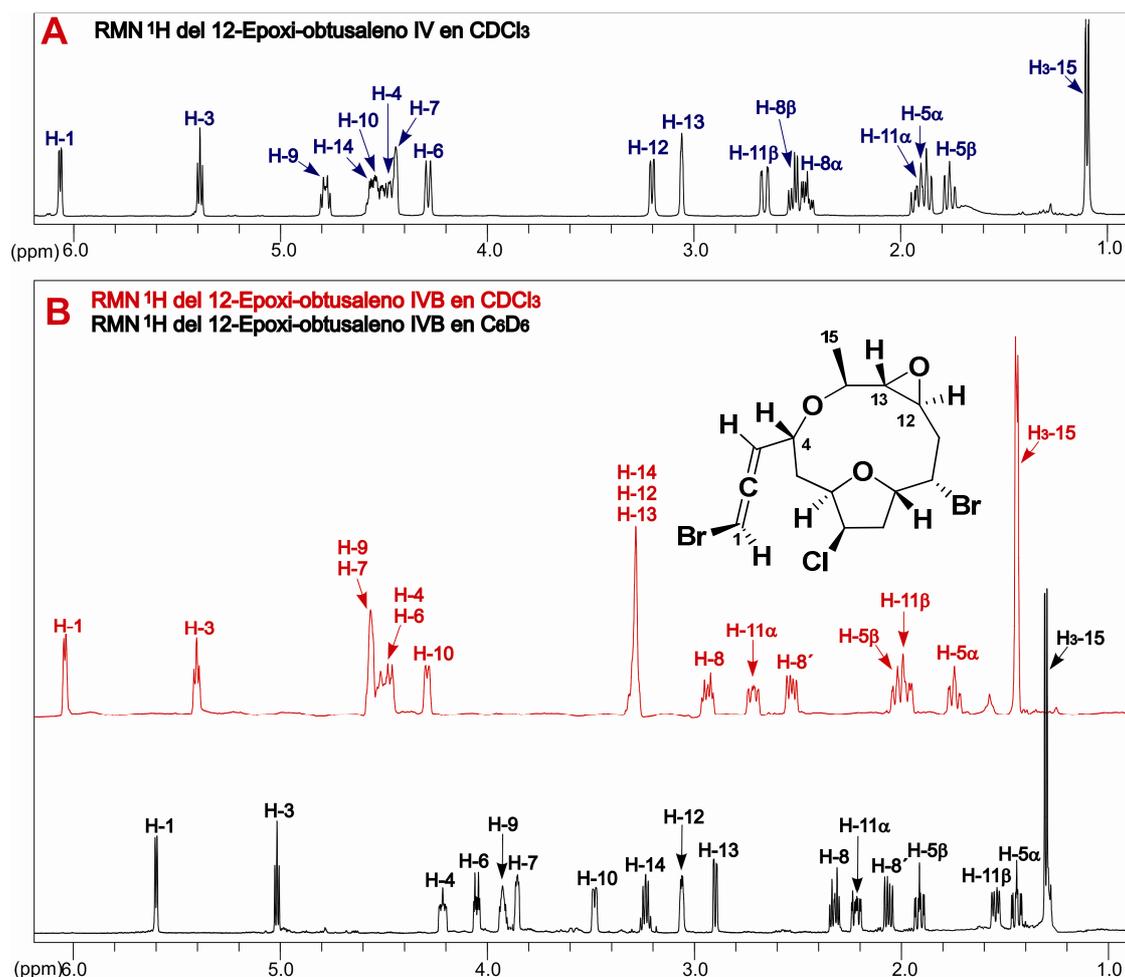


Figura 2.4.22. Comparación de los espectros de RMN ¹H del 12-epoxi-obtusaleno IV (5) (A) y del 12-epoxi-obtusaleno IVB (6) (B).

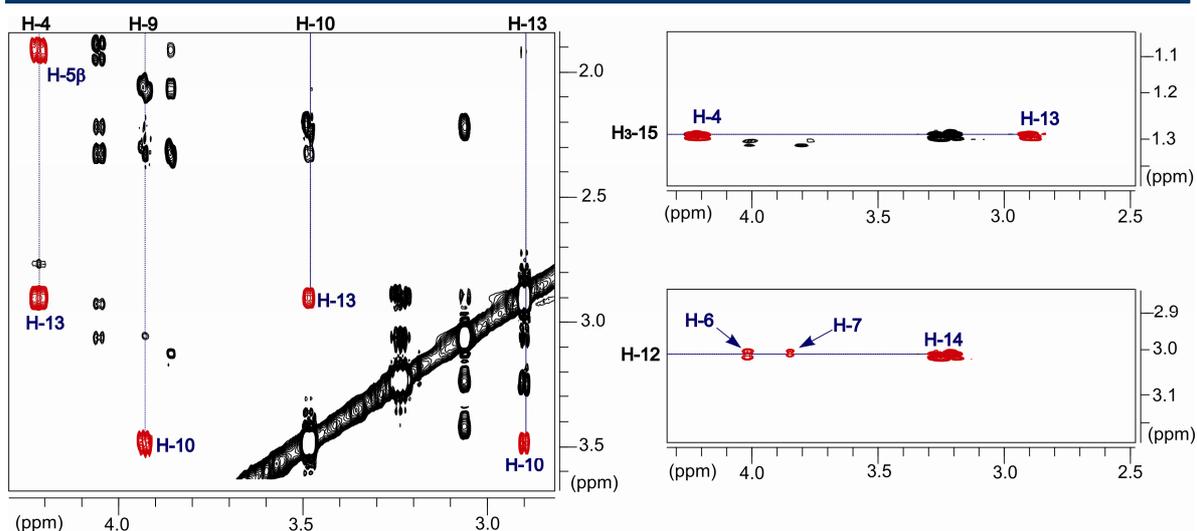


Figura 2.4.23. Secciones del experimento ROESY con las correlaciones más importantes observadas para el 12-epoxi-obtusaleno IVB (6) en C₆D₆ (600 MHz).

CDCl ₃						D ₆ D ₆		
N° C	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	73.9	6.04	dd	1.0, 5.6	74.0	5.60	dd	1.1, 5.9
2	200.6				200.8			
3	103.8	5.40	dd	5.7, 5.8	104.4	5.02	dd	5.9, 6.7
4	67.9	4.52	m		68.0	4.22	dddd	1.1, 3.1, 6.7, 11.5
5	37.3	β 2.02	ddd	2.3, 11.2, 14.9	37.5	β 1.91	ddd	3.1, 10.4, 13.7
		α 1.75	ddd	2.5, 11.5, 14.9		α 1.44	ddd	3.5, 11.5, 13.7
6	77.5	4.47	m		77.6	4.05	dt	3.5, 10.4
7	62.5	4.56	m		62.8	3.86	br d	3.5, 6.2
8	41.9	2.94	dt	6.5, 14.8	41.8	2.32	ddd	5.9, 6.2, 14.7
		2.53	ddd	1.0, 8.0, 14.8		2.06	dd	7.8, 14.7
9	79.1	4.57	m		79.0	3.93	m	
10	52.8	4.29	m		53.3	3.48	dd	2.3, 8.7
11	35.7	α 2.72	ddd	7.1, 8.9, 14.4	35.9	α 2.22	ddd	3.1, 8.7, 15.0
		β 1.97	dd	6.1, 15.1		β 1.54	dd	6.3, 15.0
12	57.3	3.28	m		56.9	3.06	ddd	1.9, 3.1, 6.3
13	61.2	3.29	m		60.9	2.90	dd	1.9, 8.7
14	77.3	3.29	m		77.4	3.24	dd	6.8, 8.7
15	18.2	1.45 (3H)	d	6.1	18.2	1.30 (3H)	d	6.8

Tabla 2.4.6. Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) del 12-epoxi-obtusaleno IVB (6).

2.4.2.3. Bromopropargilo del 12-epoxi-obtusaleño IV (7)

El compuesto **7**, fue obtenido como un sólido cristalino (p. f. 120-122 °C), con una rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} = -5$ (c 0.1, CHCl₃). En el análisis por ESI-HRMS se observó un pico correspondiente al ion pseudomolecular $[M + Na]^+$ a m/z 464.9275, lo que permitió establecer la fórmula molecular de este producto como C₁₅H₁₉Br₂ClO₃. Esta fórmula molecular es idéntica a la de los dos compuestos discutidos previamente, por lo que nos encontramos frente a otro isómero del 12-epoxi-obtusaleño IV (**5**), pero en este caso, como muestra un primer análisis del espectro de IR y de los datos de RMN (Tabla 2.4.7), la unidad bromoaleno está ausente por lo que debe tratarse de un isómero estructural.

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	77.0	2.68	s	
2	79.2			
3	37.7	4.42	d	3.9
4	71.0	4.06	ddd	1.8, 3.9, 11.2
5	31.9	β 2.31	ddd	1.8, 10.8, 14.0
		α 1.92	ddd	1.8, 11.2, 14.0
6	78.9	4.23	ddd	1.8, 1.8, 10.8
7	62.1	4.44	<i>br</i> dd	1.8, 4.5
8	38.9	β 2.51	dd	6.8, 14.4
		α 2.43	ddd	4.5, 9.7, 14.4
9	77.9	4.80	ddd	5.8, 6.8, 9.7
10	46.8	4.49	ddd	2.9, 5.8, 12.6
11	35.5	β 2.63	dd	2.9, 14.9
		α 1.88	ddd	8.7, 12.6, 14.9
12	54.1	3.14	dd	2.1, 8.7
13	61.1	3.05	dd	2.1, 3.5
14	72.5	4.59	dd	3.5, 7.1
15	10.1	1.09 (3H)	d	7.1

Tabla 2.4.7. Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) del compuesto **7** en CDCl₃.

Un análisis detallado de sus datos espectroscópicos nos advierte de una gran similitud estructural con el cabeza de serie, el compuesto **5**. Así, los desplazamientos químicos del heterociclo de 12 miembros (fragmento C-4/C-15) prácticamente coinciden en ambos compuestos (Tablas 2.4.7 y 2.4.5). Por lo tanto, la única diferencia, consiste en la sustitución de la cadena bromoalénica lateral del 12-epoxi-obtusaleño IV (**5**), por un sistema bromopropargilo [δ_C 77.0 (CH), 79.2 (C), 37.7 (CH); δ_H 2.68 (s), 4.42 (d, $J = 3.9$

H_z) (Figura 2.4.24)]. De hecho, el espectro de IR nos confirma la presencia en la molécula de un grupo acetilénico terminal (3289 cm⁻¹).

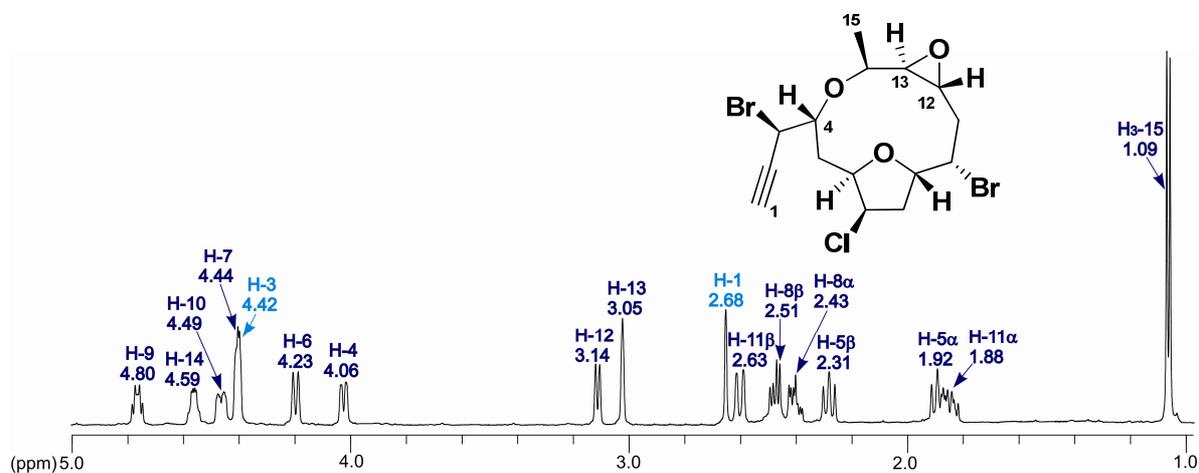


Figura 2.4.24. Espectro de RMN ¹H del compuesto **7** en CDCl₃ (600 MHz).

En la figura 2.4.25, a modo de resumen, se indica el sistema de espín observado en el experimento COSY, así como las correlaciones HMBC claves que justifican los cierres de anillos y la situación del grupo bromopropargilo en la estructura.

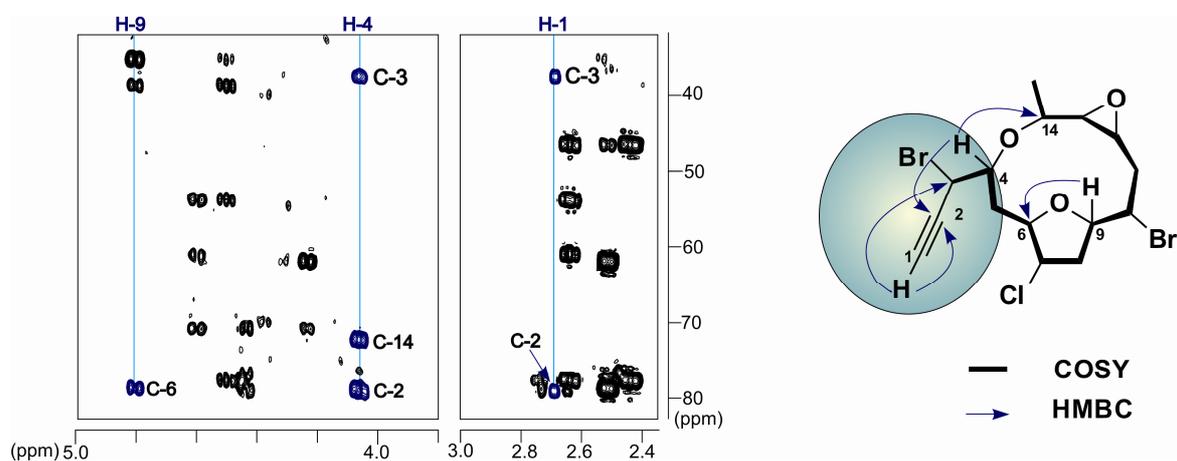


Figura 2.4.25. Secciones del experimento HMBC en CDCl₃ (600 MHz) y principales conectividades HMBC y COSY del compuesto **7**.

En lo referente a la configuración relativa de los centros quirales, siguiendo el mismo proceso que para el compuesto **5**, destacan las correlaciones ROE (Figura 2.4.26) de H₃-15 (δ_H 1.09) con H-4 (δ_H 4.06)/H-12 (δ_H 3.14), de H-10 (δ_H 4.49) con H-9 (δ_H

4.80)/H-12, y de H-4 con un protón diastereotópico H-5 β (δ_H 2.31), que sugiere una orientación *syn* para H-4, H-5 β , H-9, H-10, H-12 y H₃-15. Por otro lado, el valor de $^3J_{H-5\beta, H6} = 10.8$ Hz, indica que estos protones están en disposición *anti*. Esta orientación, sumada al efecto ROE de H-6 (δ_H 4.23) con H-13 (δ_H 3.05)/H-7 (δ_H 4.44), así como el existente de H-13 con H-6/H-14 (δ_H 4.59), ubica a estos protones en la cara contraria a la de H-5 β .

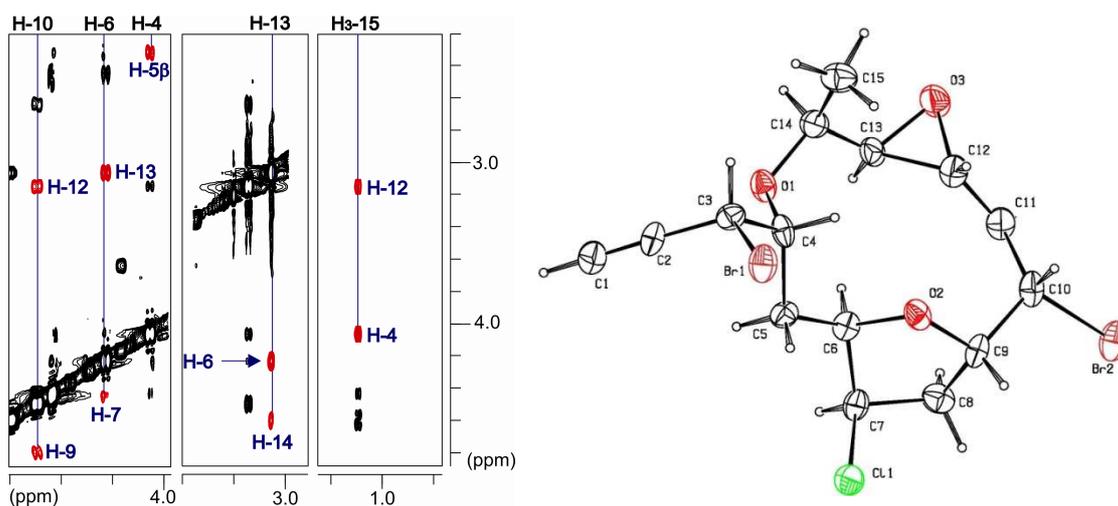


Figura 2.4.26. Izquierda: Secciones del experimento ROESY con las correlaciones principales de **7** en CDCl₃ (600 MHz). Derecha: su estructura a partir de los datos de difracción de rayos X.

Las observaciones ROE relativas al metino H-3 no son fiables a los fines de establecer su configuración relativa, debido a su libre rotación. Sin embargo, gracias a que disponíamos del compuesto en su forma cristalina, obtenido en una mezcla de CH₂Cl₂:*n*-hexano, se estableció la disposición absoluta de sus centros por difracción de rayos X quedando determinada como: 3*R*, 4*R*, 6*R*, 7*R*, 9*S*, 10*S*, 12*R*, 13*R* y 14*S* (Figura 2.4.26).

2.4.2.4. 1-Metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (**8**)

El compuesto **8** fue aislado como un sólido amorfo incoloro y $[\alpha]_D^{25} = +63$ (c 0.10, CHCl₃). La fórmula molecular fue establecida como C₁₆H₂₂BrClO₅ mediante espectrometría de masas ESI-HRMS [m/z 431.0257, 433.0280 [M + Na]⁺ (33:42)], y confirmada en base a las señales observadas en el espectro de RMN ¹³C (Tabla 2.4.8).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	167.0			
2	120.2	6.10	dd	1.8, 15.5
3	150.2	6.94	dd	4.0, 15.5
4	67.9	4.45	dddd	1.8, 1.8, 4.0, 11.2
5	37.3	β 1.89	ddd	1.8, 10.8, 14.0
		α 1.58	ddd	1.8, 11.2, 14.0
6	79.0	4.30	ddd	1.8, 1.8, 10.8
7	62.0	4.42	<i>br</i> dd	1.8, 4.5
8	39.0	β 2.52	dd	6.8, 14.4
		α 2.45	ddd	4.5, 9.7, 14.4
9	77.3	4.78	ddd	5.8, 6.8, 9.7
10	46.8	4.51	ddd	2.9, 5.8, 12.6
11	35.7	β 2.65	dd	2.9, 14.9
		α 1.91	ddd	8.7, 12.6, 14.9
12	54.0	3.17	dd	2.1, 8.7
13	61.6	3.08	dd	2.1, 3.5
14	72.0	4.59	dd	3.5, 7.1
15	10.0	0.99 (3H)	d	7.1
CH ₃ O-	51.8	3.75 (3H)	s	

Tabla 2.4.8. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del compuesto **8** en CDCl_3 .

Al comparar sus datos de RMN ^1H (Figura 2.4.27) y ^{13}C con los de los compuestos **5** y **7** (Tablas 2.4.8, 2.4.5 y 2.4.7), revelaron también una estrecha relación entre sus estructuras, de modo que los tres metabolitos comparten el mismo núcleo de sistema entre las posiciones C-4 \rightarrow C-15.

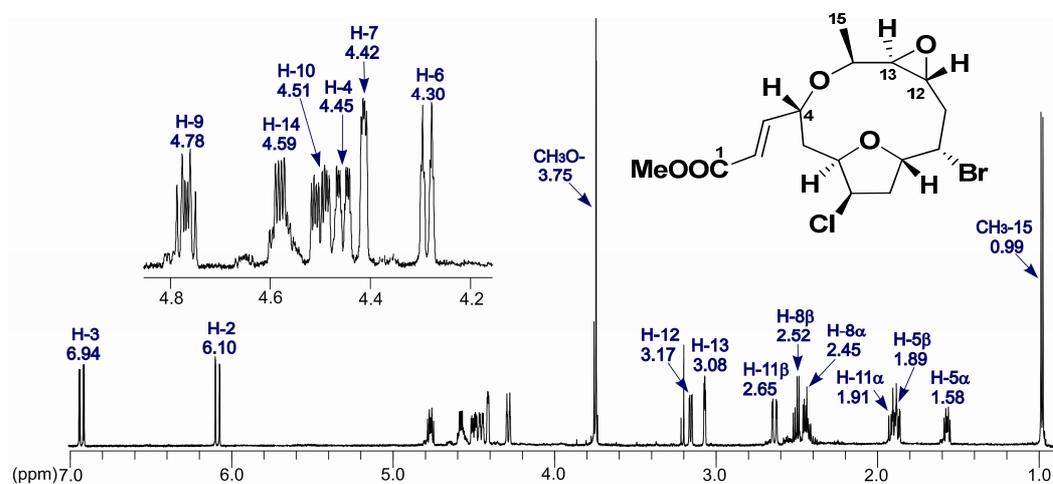


Figura 2.4.27. Espectro de RMN ^1H del metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (**8**) en CDCl_3 (600 MHz).

Refiriéndonos al cabeza de serie, las diferencias en los espectros de RMN para **5** y **8**, corresponden a aquellas resonancias asignadas al fragmento C-1 → C-3 donde los desplazamientos químicos que eran propios de la función bromoalénica en **5** [δ_C 74.1 (CH), 201.1 (C), 103.4 (CH); δ_H 6.04 (dd, $J = 1.7, 5.7$ Hz), 5.37 (dd, $J = 5.7, 6.4$ Hz)], no aparecen, y para el compuesto **8**, en su lugar se observa un conjunto de señales a δ_C 167.0 (C), 120.2 (CH), 150.2 (CH); y δ_H 6.10 (dd, $J = 1.8, 15.5$ Hz), 6.94 (dd, $J = 4.0, 15.5$ Hz). Estos datos se complementan en el experimento COSY, con la prolongación del típico sistema de espín único C-4 → C-15 de las acetogeninas descritas previamente, con un doble enlace entre C-2 y C-3, así como con la presencia de un nuevo grupo metoxilo [δ_C 51.8 y δ_H 3.75 (s)] en **8**. Este metoxilo se sitúa sobre el carbono C-1, en función de las correlaciones HMBC de los protones de éste con C-1 y C-2 (Figura 2.4.28). Por lo tanto se puede sugerir en relación al compuesto **5**, un cambio de la función bromoalénica por un sistema metil-éster α,β -insaturado en **8**. La geometría del doble enlace entre C-2 y C-3 fue establecida como *E*, en base al valor de la constante de acoplamiento entre sus protones ($^3J_{H-2,H-3} = 15.5$ Hz).

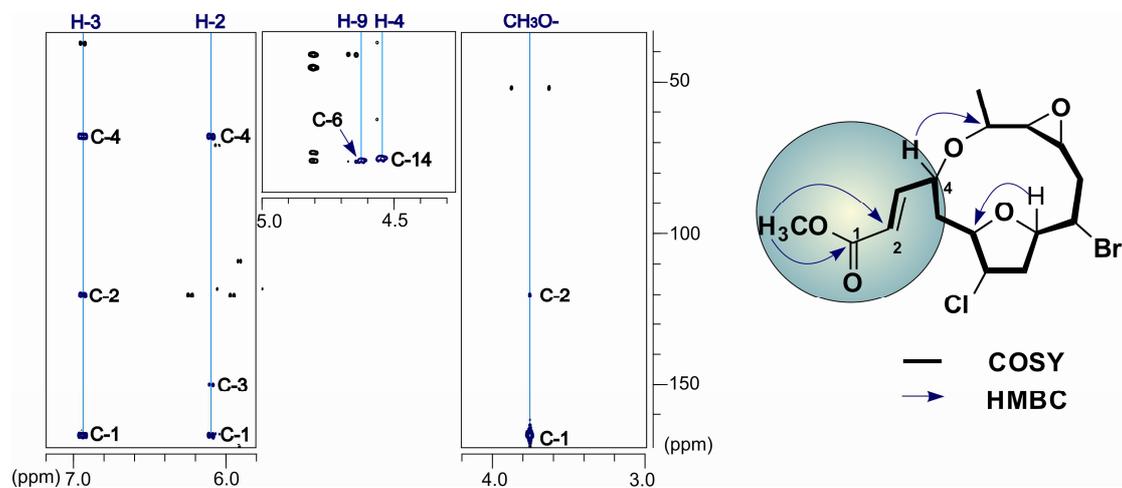


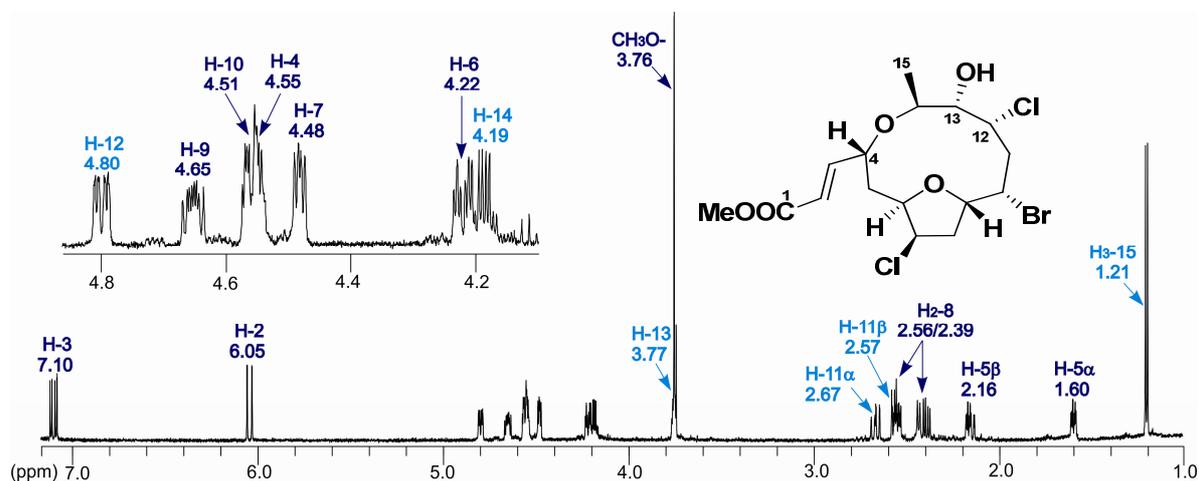
Figura 2.4.28. Secciones del experimento HMBC en $CDCl_3$ (600 MHz) y principales conectividades HMBC y COSY del 1-metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (**8**).

La configuración relativa del que hemos llamado 1-metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (**8**), resultó ser igual a la del 12-epoxi-obtusaleno IV en base al estudio de las correlaciones dipolares del experimento ROESY. El aislamiento conjunto de los metabolitos **5** y **8**, plantea la posibilidad de que el compuesto **8** derive biogénicamente del primero.

2.4.2.5. Clorohidrina del 1-metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (9)

El metabolito **9** fue también aislado como un sólido amorfo de color blanco y rotación óptica $[\alpha]_D^{25} = +9$ (c 0.06, CHCl_3). Su fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{BrCl}_2\text{O}_5$ fue determinada en base a los iones isotópicos pseudomoleculares $[\text{M} + \text{Na}]^+$ observados en el espectro de masas ESI-HRMS [m/z 467.0000, 468.9984, 468.9984, 470.9964 (64:100:100:49)].

Al analizar sus datos de RMN ^1H y ^{13}C (Tabla 2.4.9), resalta inmediatamente un marcado paralelismo con el compuesto anterior, destacando las señales del sistema metil-éster α,β -insaturado [δ_{C} 166.4 (C), 148.8 (CH), 121.8 (CH), 51.8 (CH_3); δ_{H} 7.10 (dd, $J = 6.2, 15.8$ Hz), 6.05 (dd, $J = 1.3, 15.8$ Hz), 3.76 (s)] (Figura 2.4.29).



La interpretación de los experimentos COSY, HSQC y HMBC, permitieron establecer las conectividades de la molécula que llevan a la asignación completa de las señales de los protones y carbonos en la estructura de la molécula (Figura 2.4.30 y Tabla 2.4.9).

Un análisis comparativo más detallado con los datos del compuesto **8** nos lleva a situar las principales diferencias entre ambas sustancias, en las asignaciones de los desplazamientos químicos de carbón de C-11, C-12 y C-13 [δ_{C} 43.9, 62.4 y 76.7 en **9**, vs δ_{C} 35.7, 54.0 y 61.6 en **8**], y en los de protón de H_2 -11, H-12, H-13, H-14 y H_3 -15 [δ_{H} 2.67/2.57 (ddd, $J = 1.1, 11.7, 15.5$ Hz/ddd, $J = 2.4, 9.6, 15.5$ Hz), 4.80 (ddd, $J = 1.1, 4.0, 9.6$ Hz), 3.77 (dd, $J = 3.4, 4.0$ Hz), 4.19 (dd, $J = 3.4, 6.9$ Hz) y 1.21 (d, $J = 6.9$ Hz) en **9**, vs δ_{H} 2.65/1.91 (dd, $J = 2.9, 14.9$ Hz/ddd, $J = 8.7, 12.6, 14.9$ Hz), 3.17 (dd, $J = 2.1, 8.7$ Hz),

3.08 (dd, $J = 2.1, 3.5$ Hz), 4.59 (dd, $J = 3.5, 7.1$ Hz) y 0.99 (d, $J = 7.1$ Hz) en **8**] (Tablas 2.4.8 y 2.4.9).

En conclusión, se deduce que la única diferencia entre estos dos metabolitos es la sustitución del epóxido existente en las posiciones C-12 y C-13 en **8**, por una clorohidrina en el compuesto **9**.

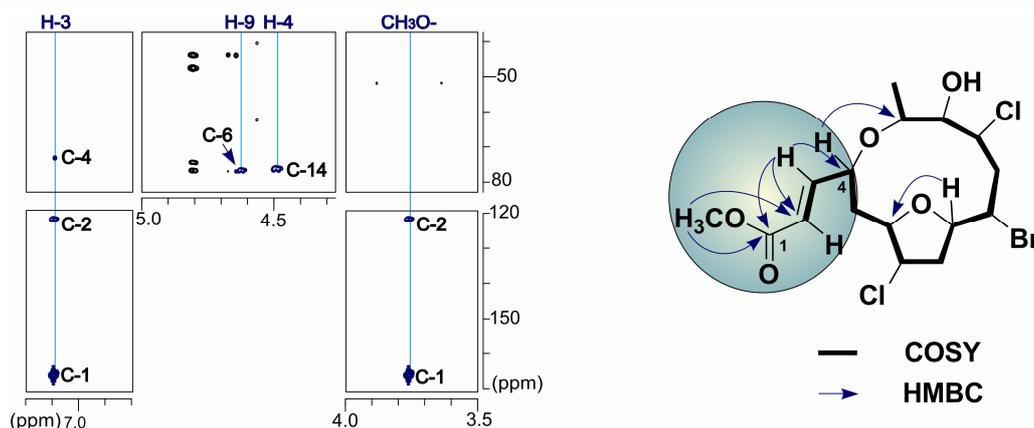


Figura 2.4.30. Sección del experimento HMBC (600 MHz) y principales correlaciones COSY y HMBC de **9**

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	166.4			
2	121.8	6.05	dd	1.3, 15.8
3	148.8	7.10	dd	6.2, 15.8
4	70.7	4.55	dddd	1.3, 2.5, 6.2, 9.4
5	36.0	β 2.16	ddd	2.5, 11.1, 14.5
		α 1.60	ddd	2.6, 9.4, 14.5
6	76.9	4.22	ddd	2.6, 3.5, 11.1
7	60.8	4.48	<i>br</i> dd	3.5, 6.1
8	40.5	2.56	ddd	6.1, 9.1, 14.4
		2.39	dd	6.7, 14.4
9	76.3	4.65	ddd	4.5, 6.7, 9.1
10	47.5	4.51	ddd	2.4, 4.5, 11.7
11	43.9	α 2.67	ddd	1.1, 11.7, 15.5
		β 2.57	ddd	2.4, 9.6, 15.5
12	62.4	4.80	<i>br</i> dd	4.0, 9.6
13	76.7	3.77	dd	3.4, 4.0
14	74.5	4.19	dd	3.4, 6.9
15	11.6,	1.21 (3H)	d	6.9
CH ₃ O-	51.8	3.76 (3H)	s	

Tabla 2.4.9. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del compuesto **9** en CDCl₃.

Para proponer la configuración relativa de esta estructura, se analizaron los valores de constantes de acoplamiento y las correlaciones ROE de la misma manera que en los casos anteriores. Así se observaron correlaciones ROE entre H₃-15 (δ_H 1.21) y H-4 (δ_H 4.55)/H-12 (δ_H 4.80)/H-13 (δ_H 3.77), de H-12 con H-4/H-9 (δ_H 4.65)/H-10 (δ_H 4.51)/H-13, y de H-4 con un protón diasterotópico H-5 β (δ_H 2.16), que ubica a estos protones del mismo lado de la molécula (orientación *syn*). Por otro lado, se observó efecto ROE entre H-6 (δ_H 4.22) con H-7 (δ_H 4.48), situados ambos en la cara opuesta en función de la orientación *anti* entre H-5 β y H-6 según el valor de su constante $^3J_{H-5\beta, H6} = 11.1$ Hz (Figura 2.4.31). Todo esto coincide con una estereoquímica relativa para el compuesto **9**: 4*R**, 6*R**, 7*R**, 9*S**, 10*S**, 12*R**, 13 *S** y 14*S**.

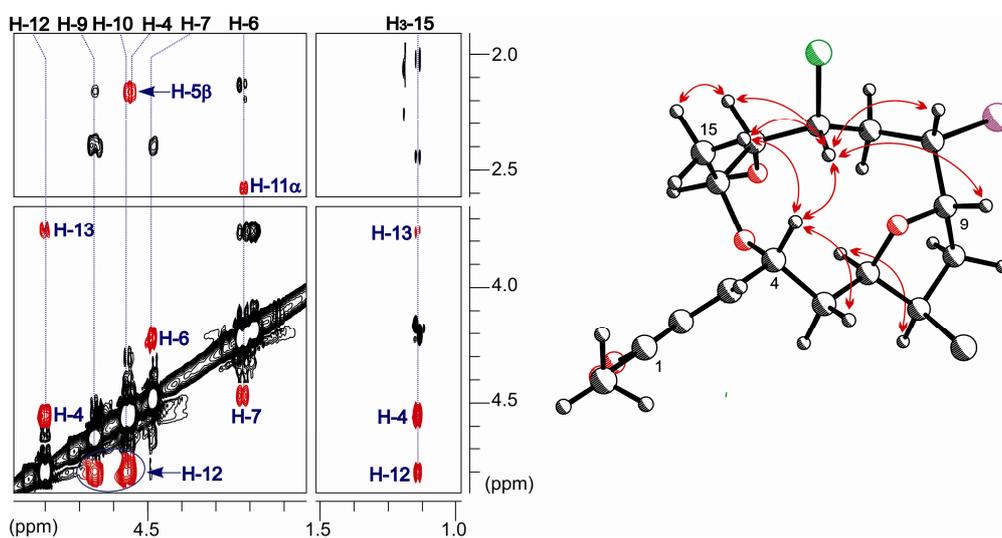


Figura 2.4.31. Secciones del experimento ROESY con las correlaciones principales del compuesto **9** en CDCl₃ (600 MHz).

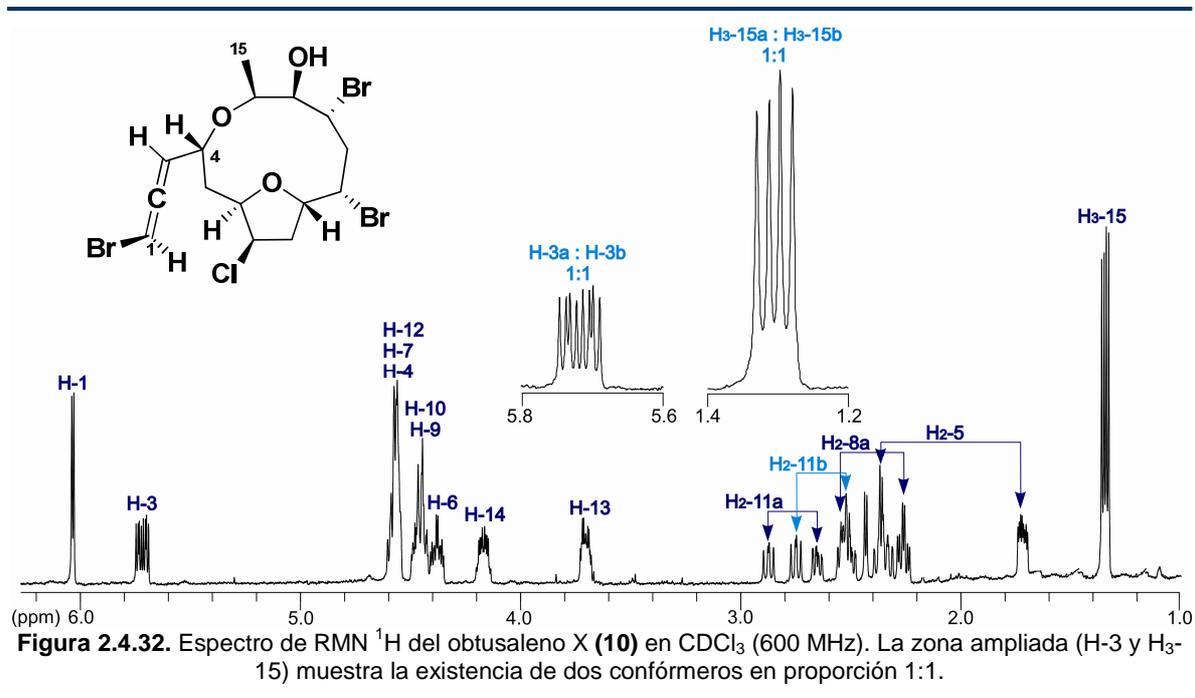
2.4.2.6. Obtusaleno X (**10**)

El obtusaleno X (**10**), fue aislado como un sólido amorfo blanco y $[\alpha]_D^{25} = +20$ (c 0.29, CHCl₃). El espectro de masas de alta resolución ESI-HRMS presenta tres iones pseudomoleculares $[M + Na]^+$ a m/z 544.8540, 546.8513 y 548.8574, que se corresponden con una fórmula molecular de C₁₅H₂₀Br₃ClO₃.

La presencia nuevamente de una cadena bromoalénica fue evidente a la luz de sus datos de RMN ^1H [δ_{H} 6.03 (*br d*, $J = 5.6$ Hz) y 5.74/5.70 (*dd/dd*, $J = 5.6, 8.9$ Hz/ $J = 5.6, 8.7$ Hz)] (Figura 2.4.32), RMN ^{13}C [δ_{C} 202.2/202.1 (C), 99.9/100.2 (CH), 73.5 (CH)] (Tabla 2.4.10), e IR (1957 cm^{-1}).

Una amplia evaluación de sus experimentos de RMN mono y bidimensionales mostró que el obtusaleno X está estrechamente relacionado con el 12-epoxi-obtusaleño IV (5). Las diferencias más significativas entre ellos se aprecian en la variación de los desplazamientos químicos en las posiciones C-12 y C-13, y que apuntan a la sustitución del epóxido en el compuesto 5, por una bromohidrina (bromo en C-12 e hidroxilo en C-13) en el nuevo compuesto (Tablas 2.4.5 y 2.4.10).

Antes de avanzar en la resolución de otros aspectos de este metabolito secundario, hay algunas particularidades a destacar del mismo. Sus espectros de RMN a temperatura ambiente mostraron la existencia de un equilibrio conformacional (relación 1:1), siendo más acentuado en el fragmento C-10 a C-15 del macrociclo, como se ilustra en la figura 2.4.32 y en la tabla 2.4.10. Este fenómeno, no observado en los compuestos 5-9, es similar al movimiento conformacional descrito para los obtusaleños II y IV,⁵³ en los antecedentes de este capítulo.



Obtusaleno X (10a)					Obtusaleno X (10b)			
N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult.	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult.	J (Hz)
1	73.5	6.03	<i>br d</i>	5.6	73.5	[a]		73.5
2	202.2				202.1			
3	99.9	5.74	<i>dd</i>	5.6, 8.9	100.2	5.70	<i>dd</i>	5.6, 8.7
4	70.4	4.55	<i>m</i>		70.2	[a]		
5	35.3	β 2.37 α 1.72	<i>ddd</i> <i>ddd</i>	1.8, 12.0, 14.4 3.8, 7.3, 14.4	35.4	2.33 [a]	<i>ddd</i>	2.0, 12.3, 14.3
6	76.4	4.39	<i>ddd</i>	3.8, 4.8, 12.0	[a]	4.37	<i>br dd</i>	3.5, 12.3
7	59.7	4.58	<i>m</i>		59.9	[a]		
8	41.1	α 2.54 β 2.26	<i>m</i> <i>br dd</i>	5.7, 13.7	41.3	[a] 2.25	<i>br dd</i>	5.6, 13.6
9	74.2	4.49	<i>m</i>		74.6	[a]		
10	48.6	4.46	<i>m</i>		48.2	4.44	<i>m</i>	
11	43.6	α 2.87 β 2.65	<i>br dd</i> <i>ddd</i>	12.1, 15.5 2.3, 9.3, 15.5	43.0	α 2.75 β 2.50	<i>br dd</i> <i>ddd</i>	11.8, 15.3 2.0, 8.9, 15.3
12	58.1	4.59	<i>m</i>		63.5	4.55	<i>m</i>	
13	76.5	3.69	<i>dd</i>	3.3, 6.1	[a]	3.72	<i>dd</i>	3.7, 6.1
14	73.0	4.18	<i>dd</i>	3.3, 6.5	72.6	4.16	<i>dd</i>	3.7, 6.6
15	13.1	1.36 (3H)	<i>d</i>	6.5	12.7	1.34 (3H)	<i>d</i>	6.6

Tabla 2.4.10. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en CDCl_3 de los conformeros del obtusaleno X (**10**). [a] Señal superpuesta con la del conformero **10a**.

Abordar la estereoquímica relativa de este compuesto fue muy difícil debido al desdoblamiento de las señales en los experimentos de RMN y a la inevitable superposición de las mismas. Esta dificultad fue resuelta gracias a la realización de nuevos experimentos de RMN en C_6D_6 y CD_3OD (Figura 2.4.33).

En las Tablas 2.4.11 y 2.4.12, se recogen las nuevas asignaciones obtenidas en estos disolventes a partir de los experimentos COSY y HSQC.

Así, mediante el análisis de los datos provistos por los experimentos TROESY en C_6D_6 y CD_3OD , combinando los resultados de los sistemas que se resuelven en los distintos disolventes (Figura 2.4.32), se propuso la configuración relativa de los centros C-4, C-6, C-7, C-9, C-10, C-12, C-13 y C-14. De esta manera se determinó que H-4, H-9, H-10, H-12 y H₃-15 se encuentran en posición *syn* y los protones H-6, H-7, H-13 y H-14 se orientan en la cara *anti*. Sobre esta base, la configuración relativa de **10** sería igual a la de **5**, determinada como $4R^*$, $6R^*$, $7R^*$, $9S^*$, $10S^*$, $12R^*$, $13R^*$ y $14S^*$; y una configuración S para la unidad bromoalénica.

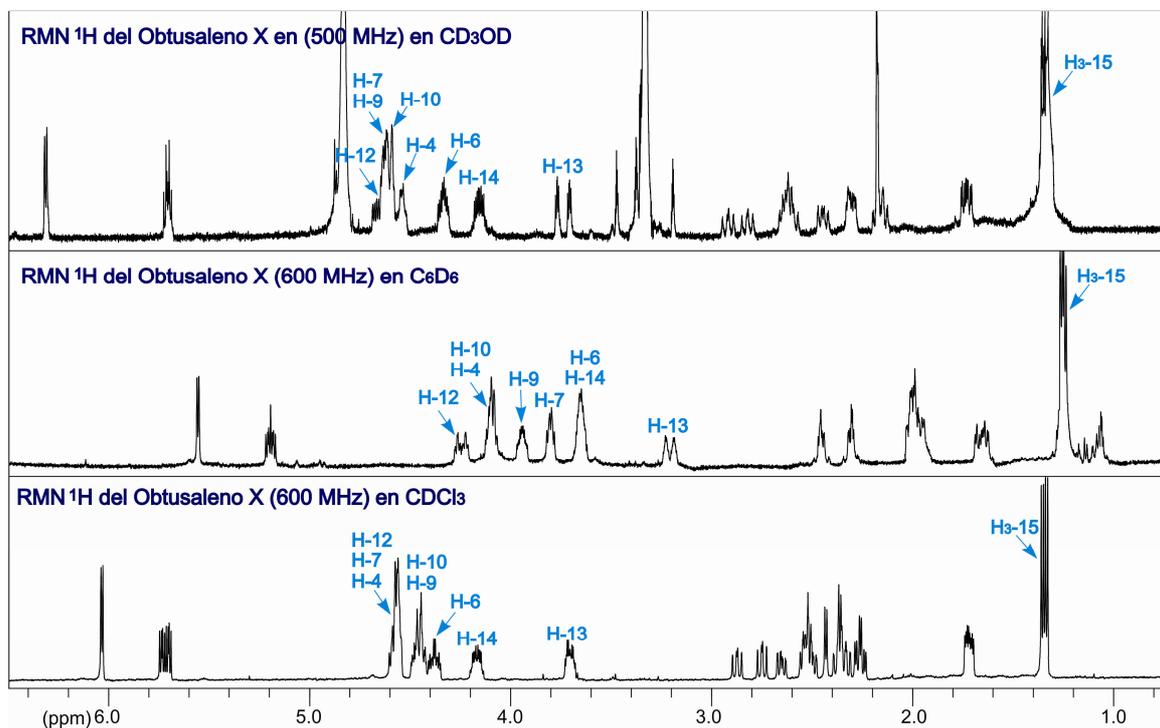


Figura 2.4.33. Superposición de los espectros de RMN ¹H del obtusaleno X (10) en distintos disolventes.

Para concluir, en la figura 2.1.34 hemos tratado de ejemplificar el posible equilibrio conformacional del obtusaleno X (10), en base a las constantes de acoplamiento y las correlaciones dipolares observadas, en comparación con el estudio antes mencionado realizado con el obtusaleno IV.

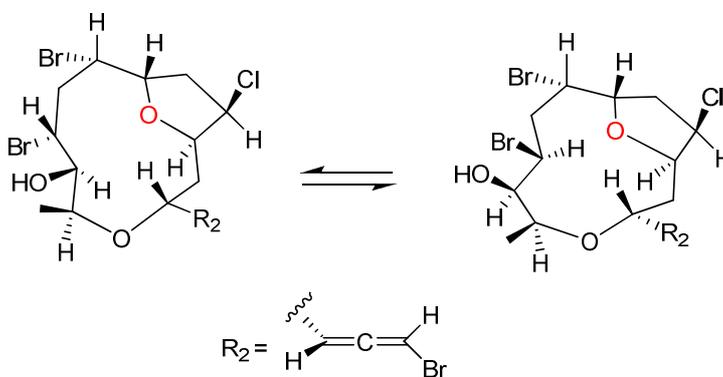


Figura 2.4.34. Propuesta de confórmers en equilibrio del obtusaleno X (10).

10a C ₆ D ₆					10b C ₆ D ₆			
N° C	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Mult.	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Mult.	J (Hz)
1	72.5	5.57	<i>br d</i>	5.7	[a]	[a]		
2 ^b								
3	100.0	5.22	dd	5.7, 8.8	100.2	5.20	dd	5.6, 8.7
4	69.8	4.10	m		[a]	[a]		
5	34.7	β 2.02	m		[a]	[a]		
		α 1.19	m			[a]		
6	75.6	3.66	m		[a]	[a]		
7	59.1	3.82	<i>br d</i>	7.2	59.2	3.80	<i>br d</i>	8.3
8	40.5	α 2.00	m		[a]	[a]		
		β 1.70	ddd	5.2, 8.9, 14.3		β 1.66	ddd	5.2, 9.4, 13.8
9	73.3	3.97	ddd	2.6, 5.4, 8.9	73.7	3.95	ddd	3.3, 5.7, 9.4
10	48.7	4.13	m		48.4	4.09	m	
11	43.4	2.47 (2H)	m		43.0	2.33 (2H)	m	
12	58.5	4.28	ddd	2.4, 6.2, 8.2	63.6	4.24	ddd	2.4, 7.3, 9.5
13	76.3	3.21	dd	4.0, 6.2	[a]	3.24	dd	4.1, 7.3
14	72.1	3.66	m		72.3	3.69	m	
15	12.7	1.33 (3H)	m		12.5	1.32 (3H)	m	

Tabla 2.4.11. Datos RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en C₆D₆ de los dos conformeros del obtusaleno X (10). [a] Señal superpuesta con la del conformero 10a. ^b Señal no observada.

10a CD ₃ OD					10b CD ₃ OD			
N° C	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Mult.	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Mult.	J (Hz)
1	72.7	6.31	<i>br dd</i>	5.7	[a]	[a]		
2 ^b								
3	100.7	5.71	dd	5.4, 5.7	100.8	5.69	dd	5.4, 5.7
4	69.2	4.54	m		[a]	[a]		
5	35.4	β 2.17	m		[a]	2.14	m	
		α 1.73	ddd	3.2, 8.6, 14.5	[a]	[a]		
6	76.6	4.35	ddd	3.2, 4.0, 10.9	[a]	4.32	ddd	3.2, 3.9, 11.0
7	60.8	4.63	m		[a]	[a]		
8	40.3	α 2.64	dddd	1.9, 6.8, 8.8, 14.3	[a]	α 2.61	m	
		β 2.31	dddd	1.0, 3.8, 6.3, 14.3	[a]	[a]		
9	75.6	4.60	m		74.6	[a]		
10	48.6	4.61	m		[a]	4.58	m	
11	44.2	α 2.92	ddd	1.2, 12.7, 15.6	43.4	α 2.82	ddd	1.2, 11.7, 15.2
		β 2.59	ddd	2.1, 9.9, 15.6		β 2.44	ddd	2.3, 9.7, 15.2
12	55.0	4.67	ddd	1.2, 4.9, 9.9	60.8	4.62	m	
13	76.6	3.70	dd	3.3, 4.9	[a]	3.77	dd	3.4, 4.5
14	74.3	4.17	dd	3.3, 6.7	74.5	4.14	dd	3.4, 6.8

Tabla 2.4.12. Datos RMN ¹H (500 MHz) y RMN ¹³C (125 MHz) en CD₃OD de los dos conformeros del obtusaleno X (10). [a] Señal superpuesta con la del conformero 10a. ^b Señal no observada.

2.4.3. Acetogeninas C-15 con anillo de ocho miembros (Oxocanos)

2.4.3.1. Marilzaleno (11)

El marilzaleno (**11**) fue obtenido como un sólido amorfo blanquecino con rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} = +77$ (*c* 0.11, CHCl₃). Su fórmula molecular se estableció como C₁₅H₂₀BrClO₂, en base a espectrometría de masas ESI-HRMS [*m/z* 369.0234, 371.0215, 373.0193 [M + Na]⁺ (27:100:78)].

La existencia de la cadena lateral bromoalénica la ponen de manifiesto los espectros de IR (1958 cm⁻¹), de RMN ¹H [δ_H 6.15 (dd, *J* = 2.2, 5.4 Hz), 5.51 (dd, *J* = 5.3, 5.4 Hz)] (Figura 2.4.35) y de RMN ¹³C [δ_C 200.2 (C), 105.1 (CH), 75.3 (CH)] (Tabla 2.4.13).

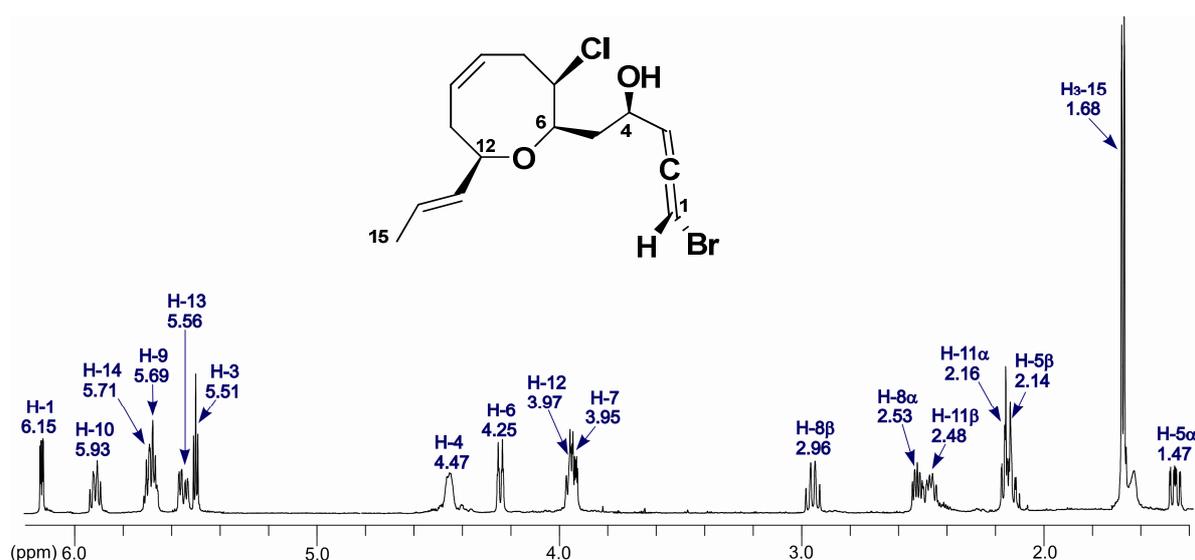


Figura 2.4.35. Espectro de RMN ¹H del marilzaleno (**11**) en CDCl₃ (600 MHz).

Los datos de RMN ¹³C junto a los del experimento HSQC con editado de multiplicidad (Figura 2.4.36), permiten además identificar: un metilo (δ_C 17.8), tres metilenos (δ_C 41.6, 35.0 y 34.6) y ocho metinos, de los cuales cuatro están unidos a heteroátomos (81.6, 75.3, 66.5 y 65.6) y cuatro son olefínicos (δ_C 132.2, 131.2, 128.5 y 126.5).

Por otra lado, su espectro de RMN ^1H indica la presencia del fragmento 1-propenilo, lo que es evidente por la aparición de una señal de metilo vinílico a δ_{H} 1.68 (dd, $J = 1.8, 6.4$ Hz) acoplada, en los experimentos bidimensionales, con las señales del doble enlace a δ_{H} 5.56 (ddd, $J = 1.8, 6.6, 15.4$ Hz) y 5.71 (dd, $J = 6.4, 15.4$ Hz). El valor de las constantes de acoplamiento de estos dos protones olefínicos indican una geometría *E* ($^3J_{\text{H-13,H-14}} = 15.4$ Hz). En el caso del otro doble enlace presente en la molécula, correspondiente a las señales δ_{H} 5.69 (ddd, $J = 6.3, 9.7, 11.2$ Hz) y 5.93 (ddd, $J = 7.1, 8.4, 9.7$ Hz), su disposición es *Z* ($^3J_{\text{H-9,H-10}} = 9.7$ Hz).

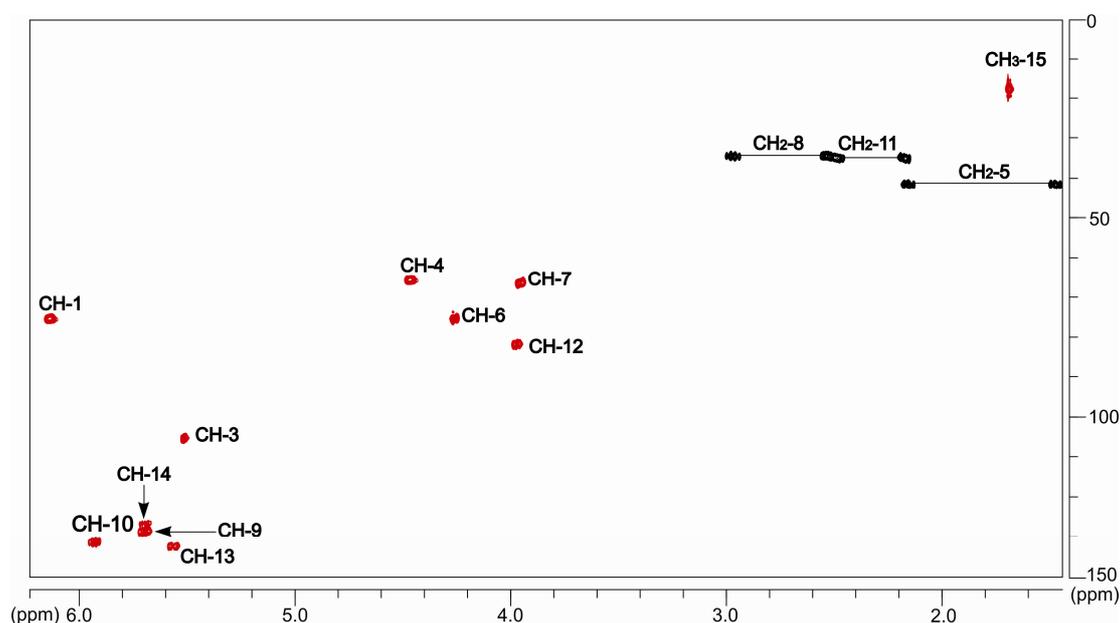


Figura 2.4.36. Espectro de HSQC con editado de multiplicidad del marilzaleno (11) en CDCl_3 (600 MHz).

Un estudio detallado de las correlaciones RMN homo y heteronuclear observadas en los experimentos COSY (Figura 2.4.37), HSQC y HMBC (Figura 2.4.38), revelaron la existencia de una cadena carbonada continua C-1→C-15.

La naturaleza de los oxígenos en este compuesto implica funciones éter o hidroxilo de acuerdo a las absorciones de IR a 3421, 1190 y 1093 cm^{-1} . Es más, la correlación HMBC de H-6 (δ_{H} 4.25) con C-12 (δ_{C} 81.6) establece un puente éter entre estas dos posiciones, indicando la presencia de un anillo de oxocano en la molécula, y por tanto, situando un grupo hidroxilo restante en C-4 (δ_{C} 65.6).

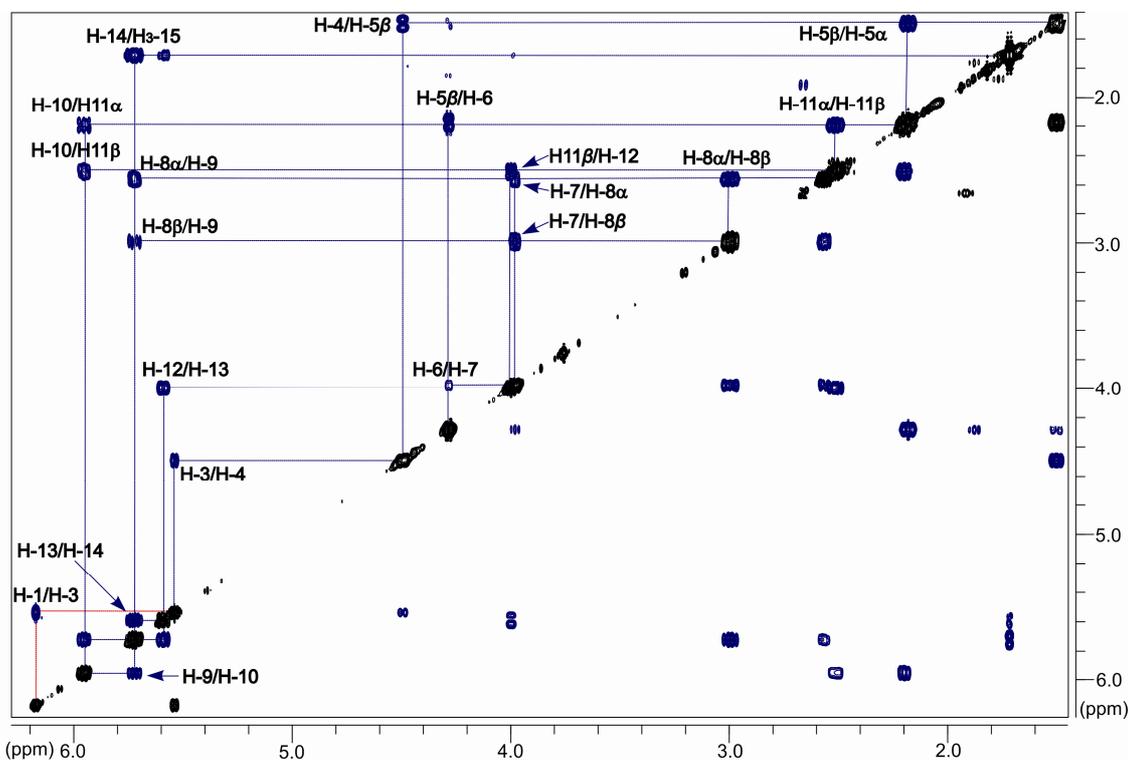
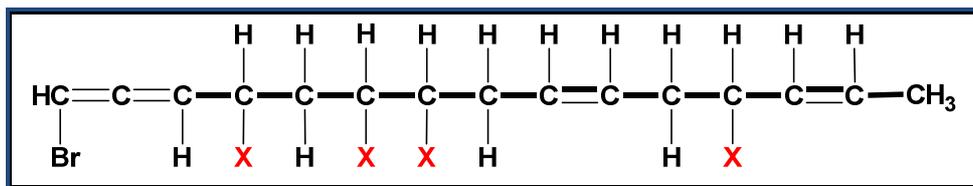


Figura 2.4.37. Espectro de COSY del marizaleno (11) en CDCl_3 (600 MHz).

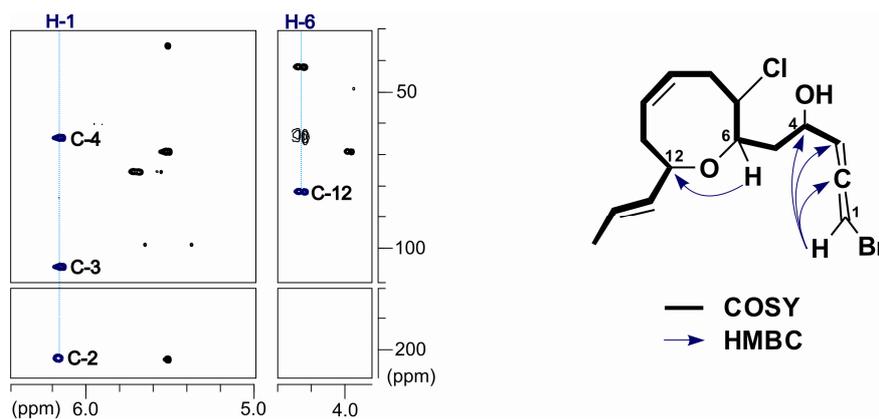


Figura 2.4.38. Secciones del experimento HMBC en CDCl_3 (600 MHz) y principales conectividades HMBC y COSY del marizaleno (11).

La configuración relativa de este metabolito se estableció en base al análisis del experimento ROESY, para lo cual fue necesario un cambio de disolvente debido al

solapamiento de las señales de H-7 y H-12 en el espectro de protón en CDCl_3 (Figura 2.4.34). El uso de piridina- d_5 resolvió tal dificultad, y así la señal de H-6 se centró a δ_{H} 4.65 (ddd, $J = 2.1, 2.1, 10.4$ Hz), mientras que las de H-7 y H-12 a δ_{H} 4.18 (ddd, $J = 2.1, 4.7, 11.4$ Hz) y 4.27 (*br* dd, $J = 5.6, 9.3$ Hz), respectivamente (Tabla 2.4.13).

En estas condiciones, la correlación ROE observada entre H-6 y H-12, así como el pequeño valor de la constante de acoplamiento $^3J_{\text{H-6,H-7}} = 2.1$ Hz, indicó claramente que H-6, H-7 y H-12 se encuentran en la misma cara de la molécula (Figura 2.4.39).

Es de destacar que la configuración del centro estereogénico C-4, no pudo ser determinada en esta primera instancia, pero que tanto ésta, como la configuración absoluta de la molécula, se estableció de forma inequívoca por correlación química con uno de los compuestos que pasaremos a discutir a continuación.

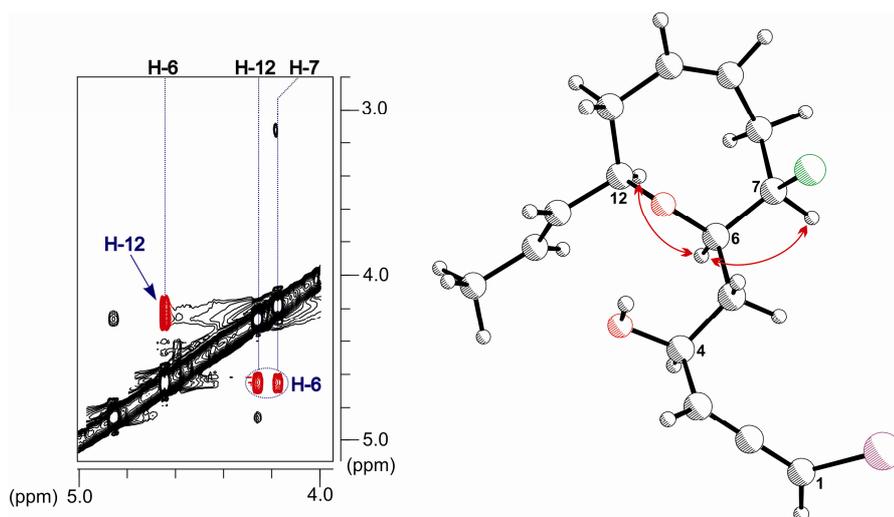


Figura 2.4.39. Sección del experimento ROESY en piridina- d_5 (600 MHz) y principales correlaciones para la asignación de la configuración relativa del marilzaleno (**11**).

La comparación de estos datos con los compuestos anteriormente aislados del grupo de las acetogeninas C-15 con anillos de ocho miembros, revelan que el marilzaleno constituye una interesante variación estructural de los laureninos (ver antecedentes). La presencia de la unidad bromoalénica lateral en **11** podría ser producida biosintéticamente mediante un ataque nucleofílico del agua como respuesta a la bromación electrofílica en el C-1 del enino.

CDCl ₃		piridina-d ₅						
N° C	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	75.3	6.15	dd	2.2, 5.4	74.8	6.47	dd	1.8, 5.9
2	200.2				201.1			
3	105.1	5.51	dd	5.3, 5.4	107.0	5.81	dd	5.9, 5.9
4	65.6	4.47	dddd	2.2, 2.9, 5.3, 9.8	65.8	4.86	dddd	1.8, 2.5, 5.9, 10.8
5	41.6	β 2.14	ddd	2.9, 10.6, 14.5	43.1	β 2.40	ddd	2.5, 10.4, 14.0
		α 1.47	ddd	2.3, 9.8, 14.5		α 1.86	ddd	2.1, 10.8, 14.0
6	75.3	4.25	ddd	2.3, 2.5, 10.6	76.1	4.65	ddd	2.1, 2.1, 10.4
7	66.5	3.95	ddd	2.5, 5.2, 11.3	68.2	4.18	ddd	2.1, 4.7, 11.4
8	34.6	β 2.96	ddd	11.2, 11.3, 11.9	35.6	β 3.15	ddd	10.9, 11.4, 11.9
		α 2.53	ddd	5.2, 6.3, 11.9		α 2.55	ddd	4.7, 5.5, 11.9
9	128.5	5.69	ddd	6.3, 9.7, 11.2	129.2	5.66	ddd	5.5, 10.1, 10.9
10	131.2	5.93	ddd	7.1, 8.4, 9.7	131.8	5.86	ddd	7.2, 8.5, 10.1
11	35.0	β 2.48	ddd	7.1, 8.9, 14.4	35.7	β 2.50	ddd	7.2, 9.3, 14.1
		α 2.16	ddd	1.7, 8.4, 14.4		α 2.14	brdd	8.5, 14.1
12	81.6	3.97	ddd	1.7, 6.6, 8.9	81.8	4.27	brdd	5.6, 9.3
13	132.2	5.56	ddd	1.8, 6.6, 15.4	133.7	5.61	ddd	1.1, 5.6, 15.5
14	126.5	5.71	dd	6.4, 15.4	125.7	5.69	dd	6.3, 15.5
15	17.8	1.68	dd	1.8, 6.4	18.1	1.54	dd	1.1, 6.3

Tabla 2.4.13. Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) del marizaleno (11) en CDCl₃ y piridina-d₅.

2.4.3.2. (+)-4*R*-Acetoxi-marizaleno (**12**) y (-)-4*R*-Acetoxi-marizaleno (**13**)

Los compuestos **12** y **13**, muestran una relación estructural muy estrecha con el marizaleno (**11**). La fórmula molecular de ambos metabolitos resultó ser $C_{17}H_{22}BrClO_3$ en base a los iones pseudomoleculares $[M + Na]^+$ observados en sus espectros de espectrometría de masas de alta resolución ESI-HRMS. En adición, destaca un fragmento de masas a m/z 368 correspondiente a un ion $[M + Na - Ac]^+$, que junto a las absorciones de IR típicas a 1743 (en **12**) y 1731 (en **13**) cm^{-1} , señalan la presencia de un grupo acetoxi.

Estos datos fueron corroborados por los espectros de RMN 1H (Tablas 2.4.14 y 2.4.15, Figura 2.4.40) que incluyeron una señal para un metilo de grupo acetato [δ_H 2.09, s, (en **12**)/2.06, s, (en **13**)] y para un metino oxigenado desapantallado [δ_H 5.45, dddd, $J = 2.0, 2.0, 4.7, 9.3$ Hz (en **12**)/ 5.40, dddd, $J = 1.9, 4.6, 5.5, 8.8$ Hz (en **13**)].

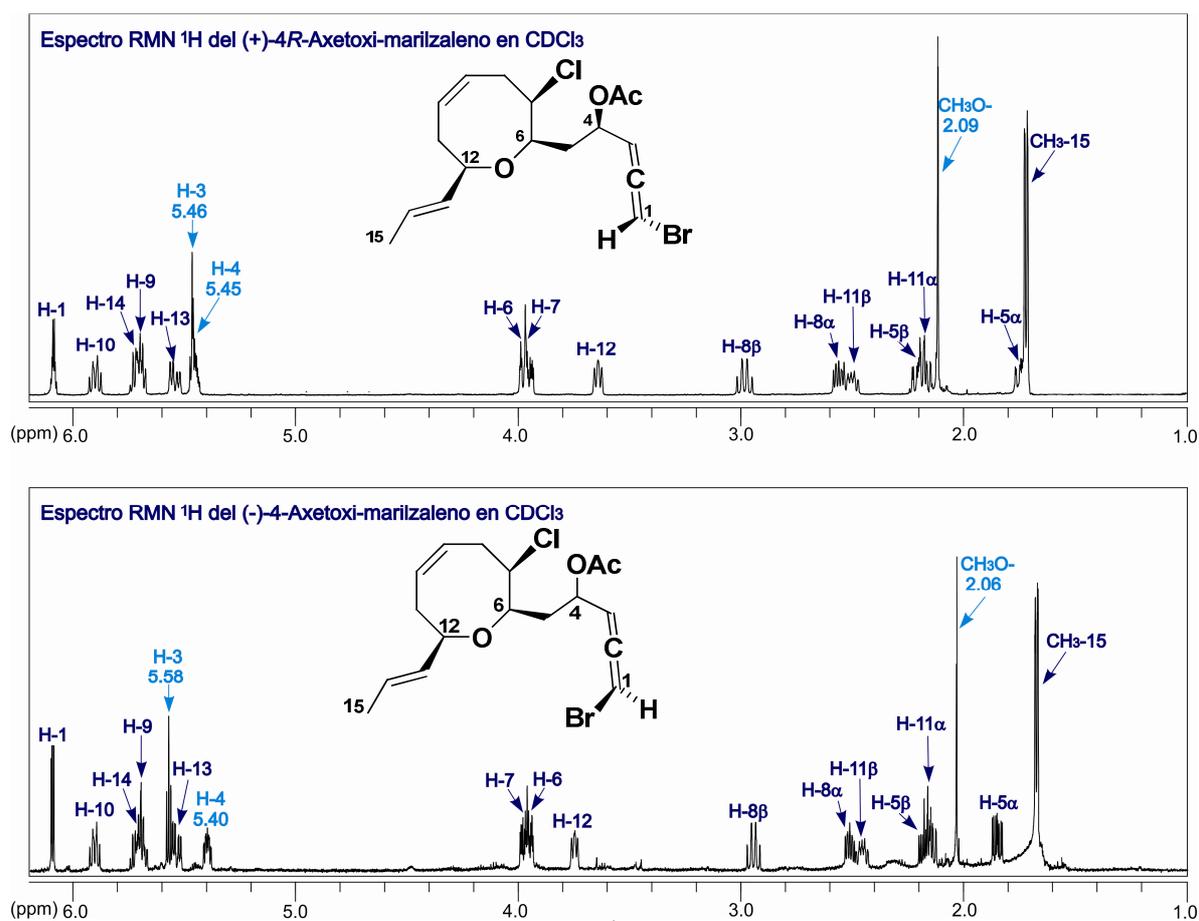


Figura 2.4.40. Comparación de los espectros de RMN 1H del (+)-4*R*-acetoxi-marizaleno (**12**) y (-)-4*R*-acetoxi-marizaleno (**13**) en $CDCl_3$ (500 MHz).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	75.0	6.09	dd	2.0, 5.3
2	201.4			
3	100.6	5.46	m	
4	67.4	5.45	dddd	2.0, 2.0, 4.7, 9.3
5	39.1	β 2.18	ddd	2.0, 10.2, 15.0
		α 1.71	ddd	2.3, 9.3, 15.0
6	75.1	3.97	ddd	2.3, 2.3, 10.2
7	65.9	3.94	ddd	2.3, 4.9, 11.9
8	34.5	β 2.97	ddd	9.9, 11.9, 12.7
		α 2.54	ddd	4.9, 6.9, 12.7
9	128.5	5.69	ddd	6.9, 9.9, 10.4
10	131.2	5.90	ddd	7.0, 8.3, 10.4
11	34.8	β 2.48	ddd	7.0, 9.6, 14.4
		α 2.15	ddd	1.8, 8.3, 14.4
12	82.1	3.63	dddd	1.1, 1.8, 6.9, 9.6
13	131.6	5.54	ddd	1.6, 6.9, 15.4
14	127.3	5.72	ddd	1.1, 6.5, 15.4
15	17.9	1.69 (3H)	dd	1.6, 6.5
CO (Ac)	170.0			
CH ₃ (Ac)	21.1	2.09 (3H)	s	

Tabla 2.4.14. Datos de RMN ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) del (+)-4*R*-acetoxi-marilzaleno (**12**) en CDCl_3 .

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.9,	6.10	dd	1.9, 5.6
2	202.4			
3	99.5	5.58	dd	5.5, 5.6
4	67.7	5.40	dddd	1.9, 4.6, 5.5, 8.8
5	38.3	β 2.20	ddd	4.6, 9.3, 14.1
		α 1.87	ddd	3.5, 8.8, 14.1
6	73.8	3.96	ddd	2.5, 3.5, 9.3
7	65.6	3.99	ddd	2.5, 4.8, 11.3
8	34.4	β 2.96	ddd	9.9, 11.3, 12.3
		α 2.53	ddd	4.8, 6.5, 12.3
9	128.6	5.69	ddd	6.5, 9.9, 10.3
10	131.0	5.91	ddd	7.1, 8.3, 10.3
11	34.8	β 2.48	ddd	7.1, 8.9, 14.3
		α 2.17	ddd	1.6, 8.3, 14.3
12	81.7	3.76	dddd	1.6, 1.6, 6.3, 8.9
13	131.7	5.54	ddd	2.3, 6.3, 15.4
14	126.8	5.72	ddd	1.6, 6.5, 15.4
15	17.8	1.70 (3H)	dd	2.3, 6.5
CO (Ac)	170.0			
CH ₃ (Ac)	21.0	2.06 (3H)	s	

Tabla 2.4.15. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y ^{13}C (150 MHz) del (-)-4*R*-acetoxi-marilzaleno (**13**) en CDCl_3 .

El análisis de los experimentos de RMN 2D (HSQC, HMBC y COSY), siguiendo un proceso equivalente al descrito para el marilzaleno (**11**), llevaron a la elucidación de una estructura plana común para los compuestos **12** y **13**, y que se diferencia de la del marilzaleno en la presencia de un grupo acetoxi en C-4. La localización de este grupo se hizo principalmente en base a las correlaciones HMBC observadas entre el metino H-4 tanto con las señales correspondientes al carbonilo del éster y al metileno C-5, como con las del bromoaleno. En la figura 2.4.41, se ejemplifican estas correlaciones para el metabolito **12**, así como la conectividad HMBC clave entre H-6 (δ_H 3.97) y C-12 (δ_C 82.1), del cierre de anillo entre esas posiciones.

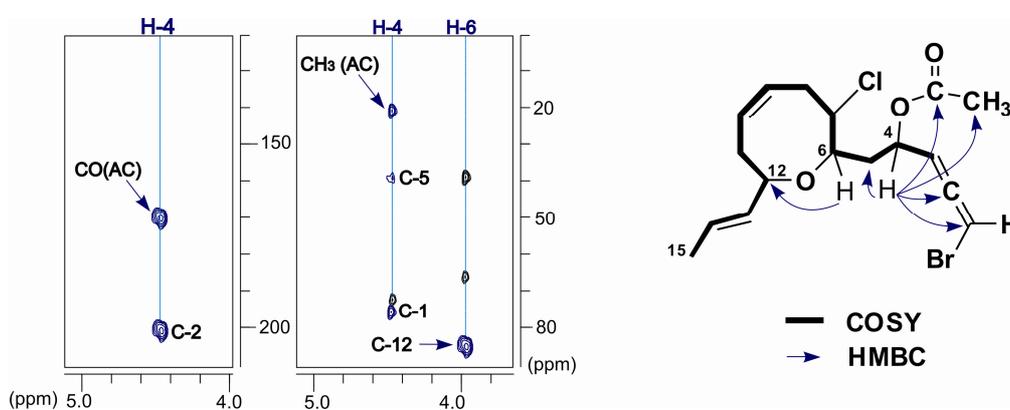


Figura 2.4.41. Secciones del experimento HMBC en CDCl_3 (600 MHz) y principales correlaciones HMBC y COSY del (+)-4*R*-acetoxi-marilzaleno (**12**)

En el caso del metabolito **12**, se obtuvo un cristal en una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/n$ -hexano. El análisis por difracción de rayos X permitió establecer su configuración absoluta en los centros estereogénicos C-4, C-6, C-7 y C-12 como 4*R*, 6*R*, 7*R* y 12*R*, así como la orientación *S* de la unidad de bromoaleno (Figura 2.4.42).

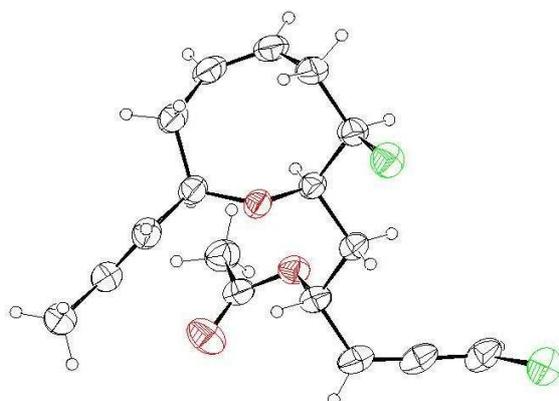


Figura 2.4.42. Estructura del (+)-4*R*-acetoxi-marilzaleno (**12**) a partir de los datos de difracción de rayos X.

La configuración relativa del (-)-4-acetoxi-marilzaleno (**13**), en los centros C-6, C-7 y C-12, fue establecida en base al análisis del experimento TROESY y la comparación con los datos de RMN del metabolito **12**, resultando equivalente para ambas sustancias en esas posiciones. Sin embargo, es de destacar el hecho de que ambos metabolitos presentan elevados valores de rotación óptica con signos opuestos, +89 para **12** y -58 para **13**, así como diferencias principalmente en el desplazamiento químico de H-3 [δ_{H} 5.46, m (en **12**) vs δ_{H} 5.58, dd, $J = 5.5, 5.6$ Hz (en **13**)], (Figura 2.4.40, Tablas 2.4.14 y 2.4.15). A la luz de esos datos, proponemos que ya que el compuesto **12** presenta la unidad de bromoaleno en una disposición S, la del (-)-4-acetoxi-marilzaleno (**13**) es R. No obstante, dado que no pudimos determinar la configuración de C-4 a través de sus datos espectroscópicos, no se puede descartar la posible aportación de la estereoquímica de este centro a los cambios antes descritos.

2.4.3.3. Determinación de la configuración absoluta del marilzaleno (**11**) por correlación química con el (+)-4R-acetoxi-marilzaleno (**12**)

A fin de completar la elucidación estructural del marilzaleno (**11**) y teniendo en cuenta que comparte el mismo signo de rotación óptica con el (+)-4R-acetoxi-marilzaleno (**12**), realizamos la conversión química a partir de este último mediante hidrólisis alcalina (ver sección experimental, apartado 2.6.24). La obtención de un compuesto idéntico a **11** como producto principal de la reacción, confirmó que tanto **11** como **12** comparten la misma configuración absoluta en C-4, C-6, C-7, C-12 y en la unidad bromoalénica.

2.4.4. Acetogeninas C-15 con anillo de cinco miembros (Oxolanos)

2.4.4.1. Marilzafuraleno A (**14**)

El compuesto que hemos denominado marilzafuraleno A (**14**), fue aislado como un sólido amorfo blanco con rotación óptica $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +32$ (c 0.06, CHCl_3). Su fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{ClO}_3$, establece cuatro insaturaciones y se dedujo por el análisis de los datos espectrométricos ESI-HRMS en base a sus tres iones pseudomoleculares $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a m/z 462.9298, 464.9296, 466.9330 (38:100:42).

El espectro IR mostró bandas de absorción propias de grupos: hidroxilo (3439 cm^{-1}), aleno (1962 cm^{-1}), cetona α,β insaturada (1684 cm^{-1}), y éter (1072 cm^{-1}). La presencia nuevamente de una unidad bromoalénica fue corroborada por sus señales características de RMN ^1H a δ_{H} 6.13 (dd, $J = 2.2, 5.6\text{ Hz}$) y 5.52 (dd, $J = 5.6, 5.6\text{ Hz}$) (Figura 2.4.43), y de RMN ^{13}C a δ_{C} 200.6 (C), 104.1 (CH) y 74.9 (CH) (Tabla 2.4.16).

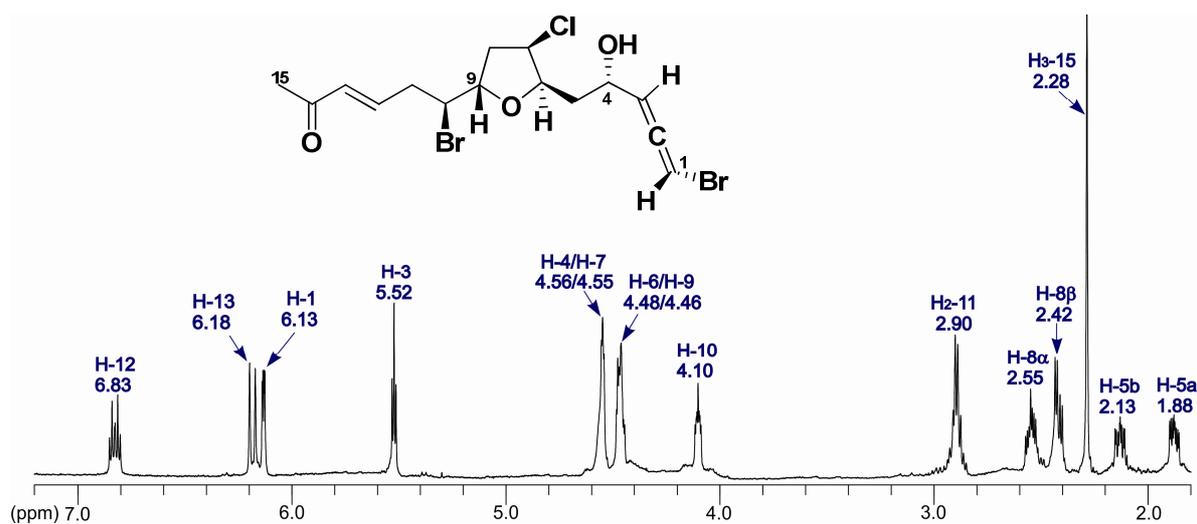


Figura 2.4.43. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) del marilzafuraleno A (**14**) en CDCl_3 .

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.9	6.13	dd	2.2, 5.6
2	200.6			
3	104.1	5.52	dd	5.6, 5.6
4	66.4	4.56	ddd	3.6, 5.6, 8.2
5	38.3	b 2.13	ddd	3.6, 8.8, 14.4
		a 1.88	ddd	3.6, 8.2, 14.4
6	80.0	4.48	ddd	3.0, 3.6, 8.8
7	63.2	4.55	ddd	0.8, 3.0, 4.8
8	40.9	α 2.55	ddd	4.8, 9.6, 13.9
		β 2.42	ddd	0.8, 6.2, 13.9
9	79.1	4.46	ddd	3.0, 6.2, 9.6
10	55.6	4.10	ddd	3.0, 5.2, 8.5
11	38.5	2.90 (2H)	m	
12	143.2	6.83	ddd	7.0, 7.0, 15.9
13	133.4	6.18	ddd	1.4, 1.4, 15.9
14	198.5			
15	27.3	2.28 (3H)	s	

Tabla 2.4.16. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del marilzafuraleno A (**14**) (CDCl_3).

Por otra parte, el análisis de los experimentos de HSQC con editado de multiplicidad (Figura 2.4.44) y de HMBC permiten establecer que de las señales de carbonos restantes (Tabla 2.4.16), siete corresponden a metinos, dos de los cuales son olefínicos (δ_C 143.2, 133.4) y cinco se unen a heteroátomos (δ_C 80.0, 79.1, 66.4, 63.2, 55.6); tres a metilenos (δ_C 40.9, 38.5, 38.3); una a metilo secundario (δ_C 27.3); y otra corresponde a carbono de carbonilo (δ_C 198.5).

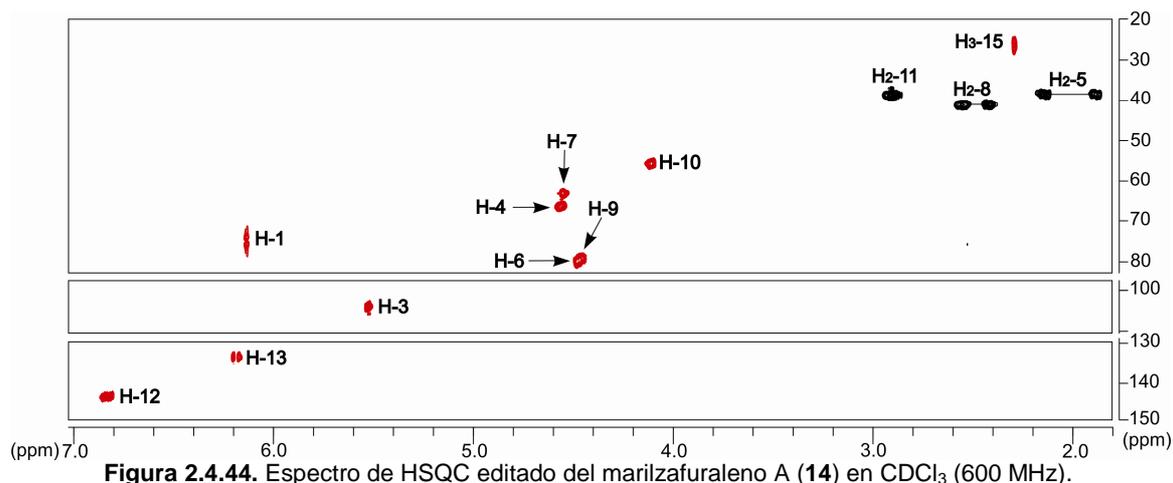


Figura 2.4.44. Espectro de HSQC editado del marilzafuraleno A (**14**) en $CDCl_3$ (600 MHz).

Los acoplamientos 1H - 1H del espectro COSY (Figura 2.4.45) revelaron un único sistema de espín entre C-3 \rightarrow C-13. Además, de acuerdo con los datos anteriores, nos permitieron ubicar un doble enlace *E* entre los metinos H-12 y H-13 ($^3J_{H-12, H-13} = 15.9$ Hz), así como situar los heteroátomos en las posiciones C-4, C-6, C-7, C-9 y C-10.

Al analizar los desplazamientos químicos de estos metinos en el experimento HSQC, se determinó que C-7 (δ_C 63.2) y C-10 (δ_C 55.6) están unidos a un átomo de cloro y un bromo, respectivamente; mientras que los restantes, se unen a átomos de oxígeno.

Mediante el acoplamiento a larga distancia HMBC entre H-6 (δ_H 4.48) y C-9 (δ_C 79.1) se fijó un puente éter entre dichas posiciones, indicando la presencia de un anillo de tetrahydrofurano en la molécula, mientras que el átomo de oxígeno restante sobre C-4 pertenece a un alcohol secundario. Además, las correlaciones del protón vinílico H-13 (δ_H 6.18) y el metilo H₃-15 (δ_H 2.28) con el carbonilo C-14 (δ_C 198.5), y las de H-4 (δ_H 4.56) con los carbonos del aleno, completan el esqueleto carbonado del compuesto **14** (Figura 2.4.46).

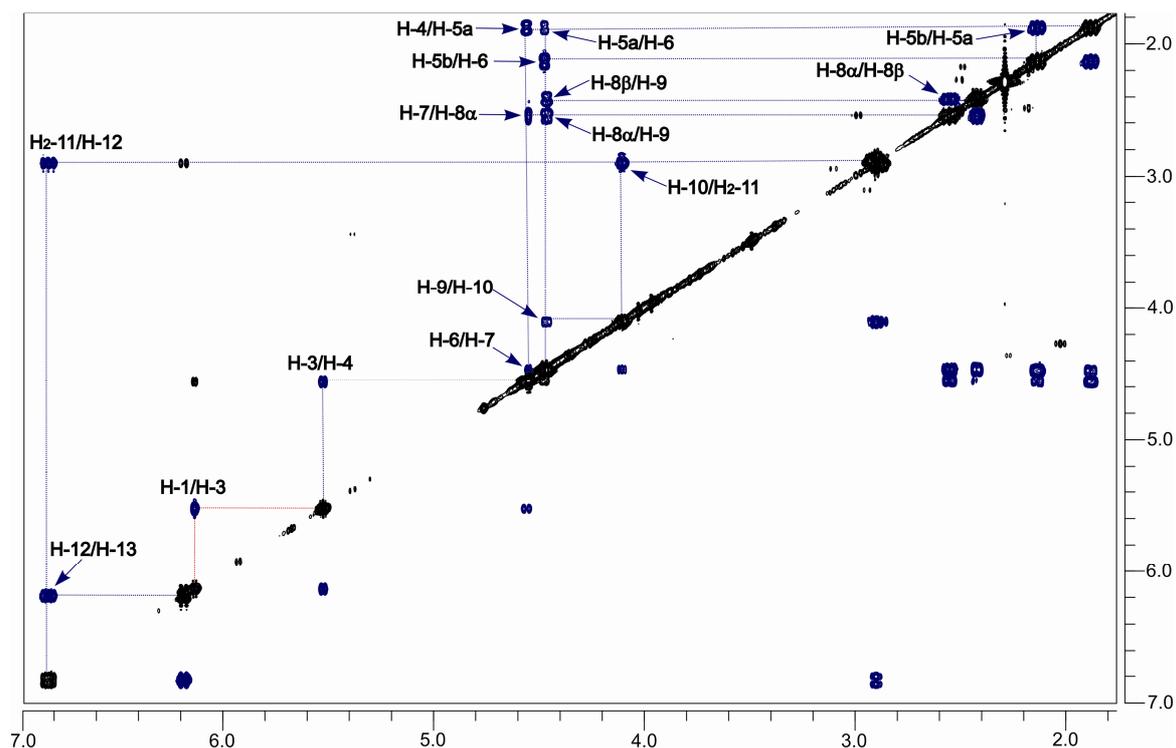


Figura 2.4.45. Espectro de COSY del marizafuraleno A (**14**) en CDCl_3 (600 MHz).

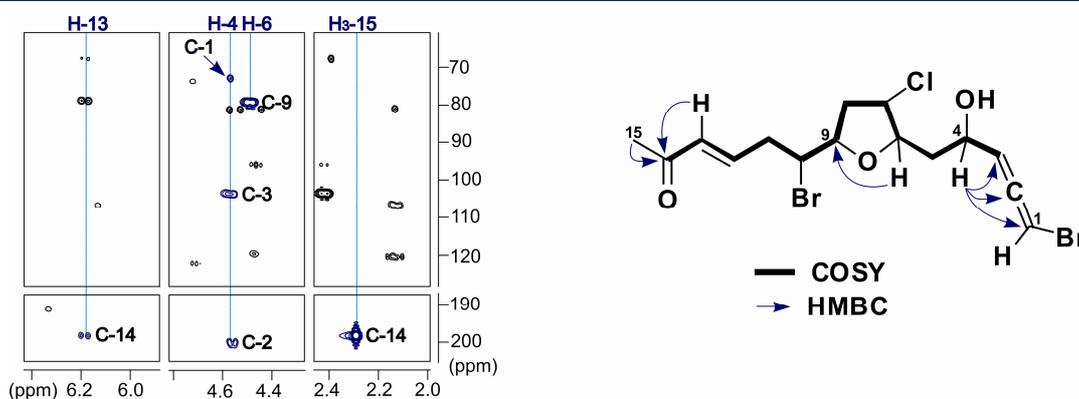


Figura 2.4.46. Secciones del experimento HMBC en CDCl_3 (600 MHz) y principales correlaciones COSY y HMBC del marizafuraleno A (**14**).

A fin de establecer la configuración de los centros quirales de la molécula se emplearon análisis configuracionales basados en el cálculo de constantes de acoplamiento homo y heteronucleares (ver apéndice II). Así en el caso del anillo de tetrahydrofurano, se aplicó un nuevo método desarrollado por nuestro grupo de

investigación para la determinación de anillos de cinco miembros,⁶² mientras que para los segmentos acíclicos se utilizaron los métodos de Murata y col.⁶³

Para la determinación de las constantes $^3J_{H,H}$ se utilizó el espectro monodimensional de RMN 1H y el experimento bidimensional DQF-COSY, mientras que para la medición de los valores de las constantes de acoplamiento heteronucleares se empleó principalmente el experimento HSQC-HECADE (Figura 2.4.47).

Tal como se muestra en la figura 2.4.47, en el caso del anillo de cinco miembros, fragmento C-6/C-9, el análisis de las constantes heteronucleares nos lleva primero a que los protones H-6 y H-7 se encuentran en la misma cara de las molécula ($^2J_{C-7,H-6} = +5.2$), mientras que H-7 y uno de los protones del metileno diasterotópico, H-8a (δ_H 2.42), se sitúan en *trans* ($^2J_{C-7,H-8a} = -5.7$). Por último, para investigar la configuración relativa del carbono C-9 se procedió a analizar las constantes de acoplamiento heteronucleares entre el carbono C-10 y los protones H₂-8. Así, el valor *pequeño* de la constante entre C-10 y H-8a ($^3J_{C-10,H-8a} = 0.5$) o el valor *grande* entre C-10 y H-8b ($^3J_{C-10,H-8b} = 6.0$), asigna las orientaciones relativas de H-8a y H-9 como *cis*.

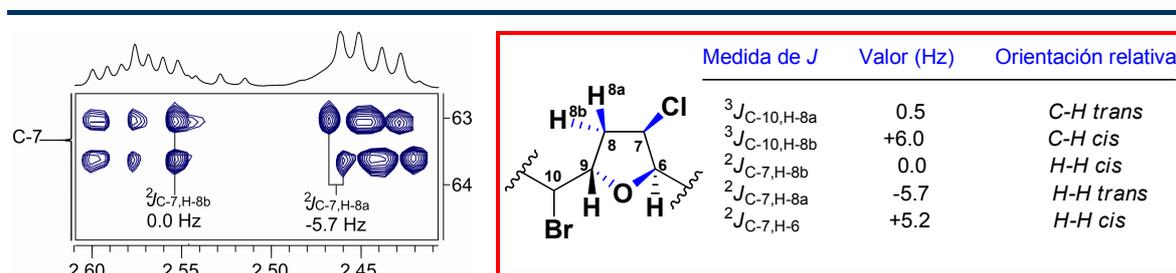


Figura 2.4.47. Sección del experimento HSQC-HECADE y determinación de la estereoquímica relativa del anillo de cinco miembros, fragmento C-6/C-9 del marilzafuraleno A (**14**).

Respecto a los segmentos acíclicos, el primero de ellos, el fragmento C-9/C-10, El valor *pequeño* de la constante homonuclear $^3J_{H-9,H-10} = +3.0$ indica una orientación *gauche* entre H-9 y H-10, mientras que los valores $^3J_{C-8,H-10}$, $^3J_{C-11,H-9}$, y $^2J_{C-9,H-10}$, al ser de 1.8, 2.2 y aproximadamente 0.0 Hz, respectivamente, sostienen una orientación *treo* entre C-9 y C-10 (Figura 2.4.48).

El caso del segmento C-4/C-6 alberga dos centros quirales e involucra a los protones del metileno en la posición C-5, por lo que hay que abordar el estudio en dos

⁶² Napolitano, J. G.; Gavín, J. A.; García, C.; Norte, M.; Fernández, J. J.; Hernández-Daranas, A. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6338.

⁶³ Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866.

etapas (Figura 2.4.48). En primer lugar se determina la orientación de cada protón del metileno diasterotópico con respecto al centro estereogénico C-4, repitiendo el análisis para determinar a su vez, la orientación de estos protones metilénicos con respecto al centro C-6. Para ello definimos H-5a (δ_H 1.88) como el protón que se encuentra a campo más alto mientras que H-5b (δ_H 2.13) es el más desapantallado. Los valores de las constantes vecinales $^3J_{H-4,H-5a} = +8.2$ y $^3J_{H-4,H-5b} = +3.6$, es consistente con una conformación *gauche* entre H-4 y H-5b, mientras que los valores *grandes* de las constantes heteronucleares $^3J_{C-4,H-5a} = -5.0$ y $^3J_{C-4,H-5b} = -2.8$, indican que el grupo hidroxilo se encuentra en disposición *gauche* a cada uno de los protones del metileno H₂-5. Estos datos establecen una configuración *eritro* entre los protones H-4 y H-5b. El análisis continúa con el segmento C-5/C-6 de la misma manera, permitiendo establecer una configuración *treo* entre los protones H-5a y H-6. En conjunto, los resultados obtenidos al analizar ambos segmentos indican que este sistema posee una configuración global *anti*. Por tanto, se establece la estereoquímica relativa de los centros quirales presentes en el metabolito **14** como 4*S*^{*}, 6*R*^{*}, 7*R*^{*}, 9*S*^{*}, 10*S*^{*}. Respecto a la unidad de bromoaleno la configuración absoluta resultó ser *S*.

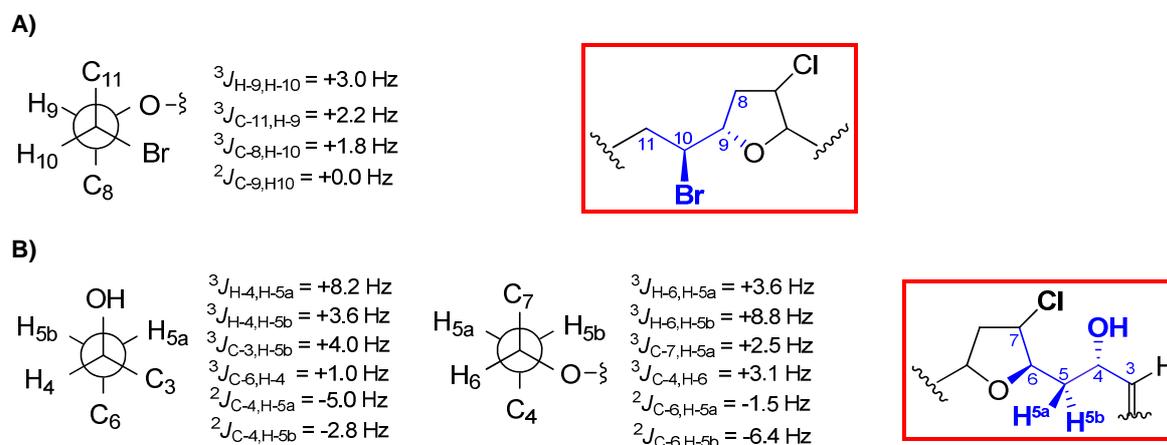


Figura 2.4.48. Determinación de la estereoquímica relativa de los fragmentos C-9/C-10 (A) y C-4/C-6 (B) del marilzafuraleno A (**14**).

2.4.4.2. Marilzafuraleno B (15)

La fórmula molecular de este compuesto, aislado como un sólido amorfo ópticamente activo $[\alpha]_D^{25} = +60$ (*c* 0.10, CHCl₃), corresponde a C₁₅H₂₁Br₂ClO₃ de acuerdo con sus datos de masas ESI-HRMS (*m/z* 464.9453, 466.9432, 468.9418, 470.9395; [M + Na]⁺ (46:100:71:15).

Al comparar de forma detallada sus datos espectroscópicos de RMN de ^1H (Figura 2.4.49) y ^{13}C con los del compuesto anterior (Tablas 2.4.16 y 2.4.17), se observa una gran similitud entre ellos. La principal diferencia se centra en torno al carbono C-14, en el que ya no se observa la presencia de un grupo carbonilo (δ_{C} 198.5 en **14**) sino en su lugar, la de un grupo hidroxilo secundario (δ_{C} 68.5 y δ_{H} 4.30, dd, $J = 6.1, 6.3$ Hz en **15**).

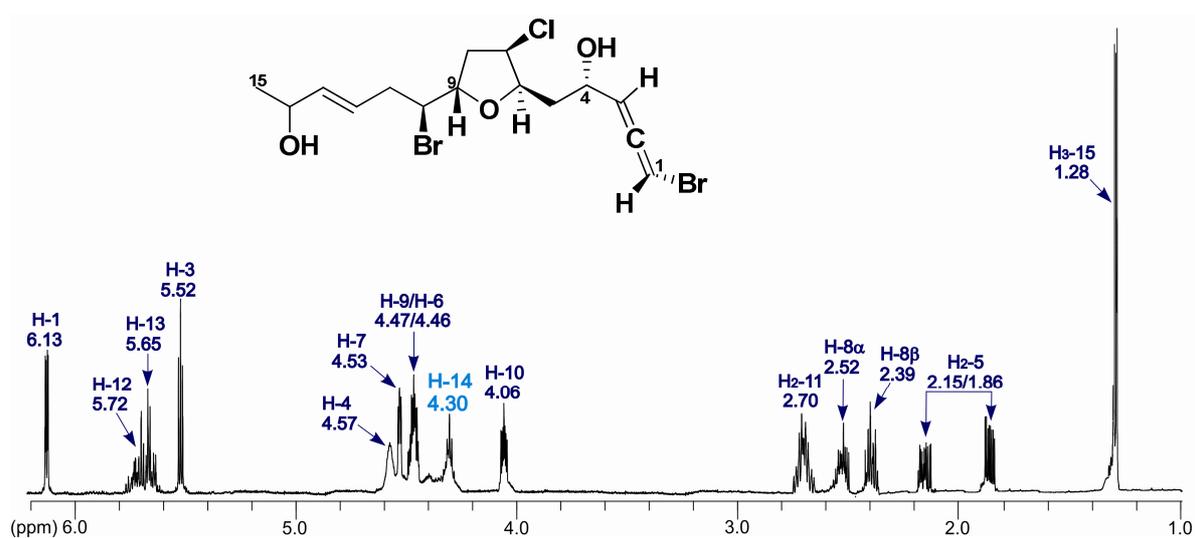


Figura 2.4.49. Espectro de RMN ^1H del marilzafuraleno B (**15**) en CDCl_3 (600 MHz).

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.8	6.13	dd	2.2, 5.7
2	200.6			
3	104.1	5.52	dd	5.5, 5.7
4	66.5	4.57	ddd	3.6, 5.5, 7.7
5	38.1	2.15	ddd	3.6, 9.1, 14.5
		1.86	ddd	3.5, 7.7, 14.5
6	79.7	4.46	ddd	3.3, 3.5, 9.1
7	63.3	4.53	ddd	0.8, 3.3, 4.8
8	40.7	α 2.52	ddd	4.8, 9.6, 13.9
		β 2.39	ddd	0.8, 6.2, 13.9
9	79.1	4.47	dddd	3.1, 6.2, 9.6
10	57.3	4.06	ddd	3.1, 5.7, 7.9
11	38.5	2.70 (2H)	m	
12	126.2	5.72	ddd	6.4, 7.0, 15.6
13	137.6	5.65	br dd	6.1, 15.6
14	68.5	4.30	dd	6.1, 6.3
15	23.4	1.28 (3H)	d	6.3

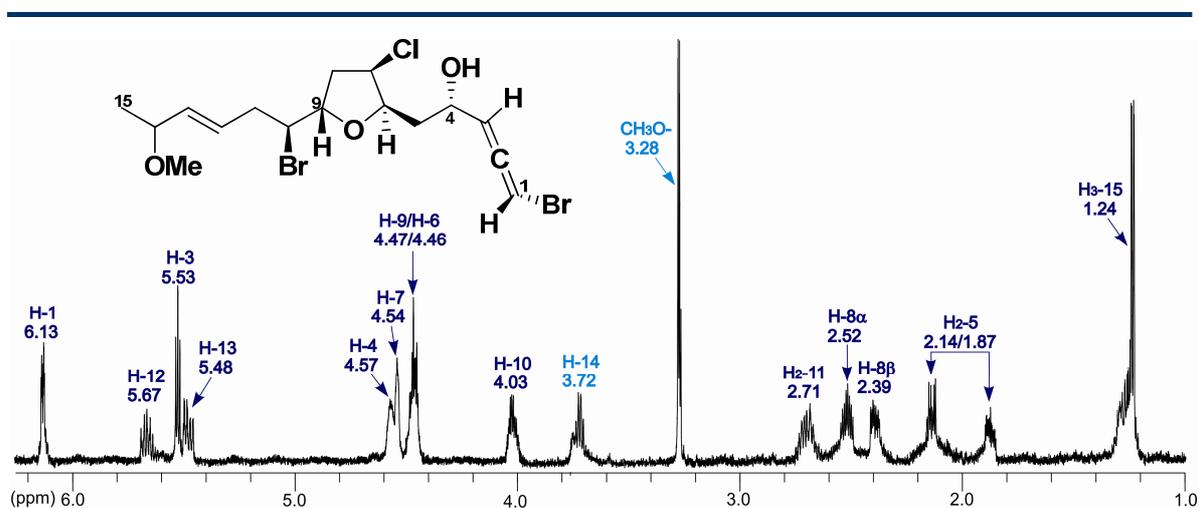
Tabla 2.4.17. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y ^{13}C (150 MHz) del marilzafuraleno B (**15**) (CDCl_3).

Estos datos fueron corroborados por el espectro de IR, donde ya no aparece la banda característica de absorción de cetona α,β insaturada, y por el análisis de los experimentos de RMN 2D (COSY y HMBC) que confirmaron el resto de la estructura de esta molécula. En base a estos resultados, se propone que el marilzafuraleno B (**15**) comparte la misma estructura que el marilzafuraleno A (**14**), excepto en la cetona α,β insaturada que aparece reducida a un grupo hidroxilo alílico. La configuración relativa en ese centro no pudo ser establecida.

2.4.4.3. Marilzafuraleno C (**16**)

El marilzafuraleno C (**16**), se aisló como un sólido amorfo incoloro. Este metabolito resultó ser aún más inestable que los otros miembros de este grupo, de modo que aunque pudimos realizarle los experimentos mono y bidimensionales de RMN, se descompuso antes de que sus datos polarimétricos, de espectrometría de masas y espectroscopías UV e IR pudieran ser medidos.

Sin embargo, en base a sus datos de RMN (Tabla 2.4.18) proponemos que su fórmula es $C_{16}H_{23}Br_2ClO_4$. Para ello, es de destacar que su espectro de RMN 1H (Figura 2.4.50) resulta prácticamente idéntico al del marilzafuraleno B (**15**), con la excepción de la presencia adicional de una señal de un grupo metoxilo [δ_H 3.28 (s)] en el presente compuesto, así como una variación en el desplazamiento del metino H-14 hacia campos altos [δ_H 4.30 (dd, $J = 6.1, 6.3$ Hz) en **15** vs δ_H 3.72 (dd, $J = 6.5, 6.8$ Hz) en **16**] (Tablas 2.4.17 y 2.4.18). Estos cambios indican que el grupo hidroxilo en el compuesto **15** ha sido reemplazado por un grupo metoxilo en **16**.



El espectro de de RMN ^{13}C , también apoya estas afirmaciones mostrando una señal extra de metilo a δ_{C} 56.0, y la señal del carbono de C-14 significativamente más desapantallada que en el marilzafuraleno B (Tabla 2.4.18).

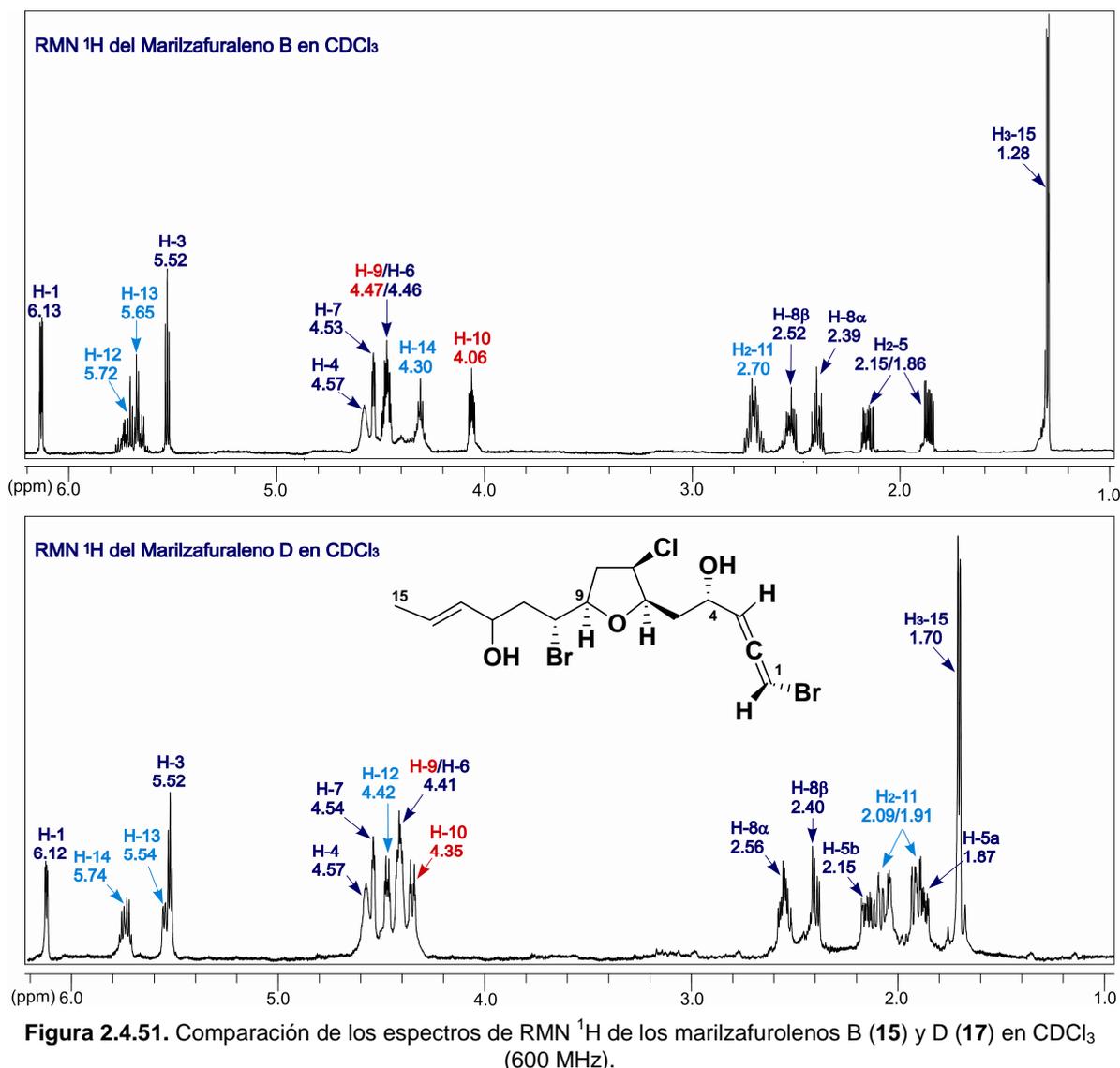
Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.8	6.13	ddd	1.5, 2.2, 5.6
2	200.8			
3	104.2	5.53	dd	5.6, 5.6
4	66.6	4.57	ddd	3.4, 5.6, 8.0
5	38.2	2.14	ddd	3.4, 8.7, 14.0
		1.87	ddd	3.1, 8.0, 14.0
6	79.8	4.46	ddd	2.5, 3.1, 8.7
7	63.4	4.54	ddd	2.5, 3.4, 4.5
8	40.9	α 2.52	ddd	4.5, 8.9, 14.1
		β 2.39	ddd	3.4, 6.3, 14.1
9	79.1	4.47	ddd	3.4, 6.3, 8.9
10	57.9	4.03	ddd	3.4, 4.6, 8.6
11	38.4	2.71 (2H)	m	
12	128.5	5.67	ddd	7.0, 7.2, 15.5
13	135.8	5.48	dddd	1.5, 1.5, 6.8, 15.5
14	77.7	3.72	dd	6.5, 6.8
15	21.3	1.24 (3H)	d	6.5
CH ₃ O-	56.0	3.28 (3H)	s	

Tabla 2.4.18. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del marilzafuraleno C (**16**) en CDCl_3 .

2.4.4.4. Marilzafuraleno D (**17**)

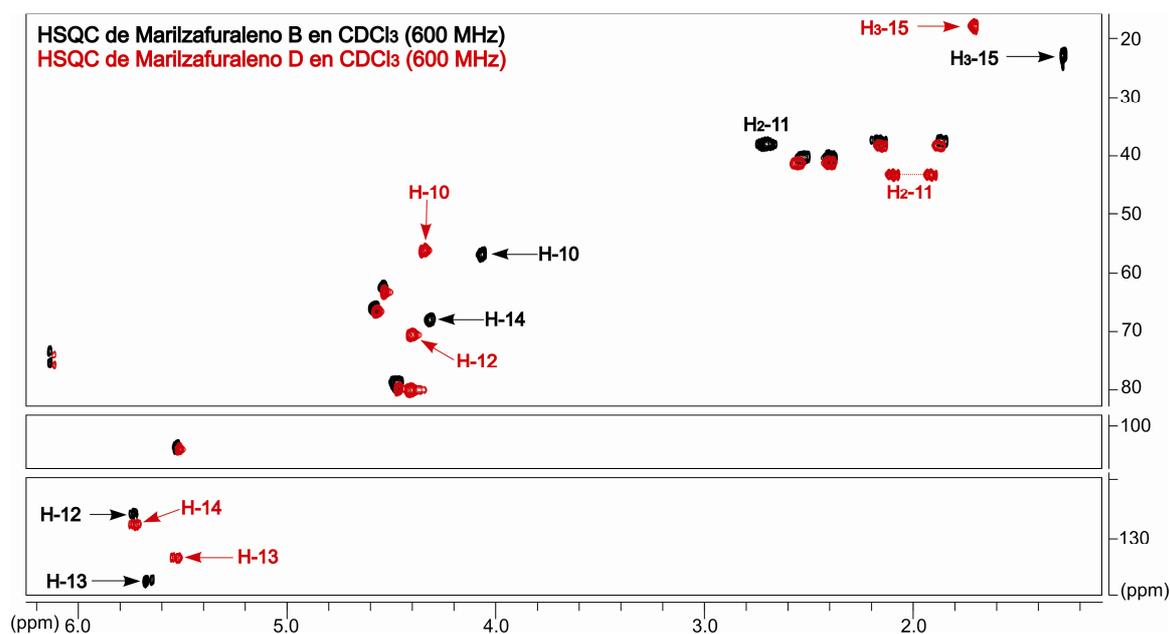
El marilzafuraleno D (**17**) fue aislado como un sólido amorfo blanquecino y actividad óptica $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +22$ (c 0.08, CHCl_3). El análisis de su espectro de masas ESI-HRMS, mostró que nos encontrábamos frente a un isómero del marilzafuraleno B ($\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{Br}_2\text{ClO}_3$, m/z 464.9445, 466.9428, 468.9416, 470.9414 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (49:100:74:12).

Un primer estudio comparativo de los espectros de IR y de las señales que aparecen en los experimentos monodimensionales de RMN ^1H (Figura 2.4.51) y ^{13}C de ambos compuestos (Tablas 2.4.17 y 2.4.19), indican que a pesar de las diferencias en los datos de RMN, los dos deben poseer una estructura similar en la que prácticamente comparten los mismos motivos funcionales.



El análisis de los datos aportados por los experimentos COSY y HMBC llevó a la elucidación de la estructura plana del marilzafuraleno D, indicando que las variaciones más importantes corresponden a las señales que conforman el fragmento C-10 \rightarrow C-15 de la molécula. Esto se observa aún más claramente en la figura 2.4.52 donde se muestran superpuestos los experimentos HSQC de los metabolitos 15 y 17.

En efecto, se puede concluir que el doble enlace situado para el marilzafuraleno B (15) entre las posiciones C-12 (δ_{C} 126.2) y C-13 (δ_{C} 137.6), se reubica entre los metinos C-13 (δ_{C} 133.3) y C-14 (δ_{C} 127.5) en el compuesto 17, manteniendo intacta su configuración *E* ($^3J_{\text{H-13,H-14}} = 15.2$ Hz); mientras que el alcohol secundario que antes estaba sobre C-14 (δ_{C} 68.5), aparece ahora sobre el metino C-12 (δ_{C} 70.4).


 Figura 2.4.52. Superposición de los espectros HSQC del marizafuraleno B (**15**) y marizafuraleno D (**17**).

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.8	6.12	dd	2.1, 5.6
2	200.6			
3	104.1	5.52	dd	5.6, 5.6
4	66.6	4.57	ddd	3.7, 5.6, 7.8
5	38.2	b 2.15	ddd	3.7, 8.9, 14.3
		a 1.87	ddd	3.6, 7.8, 14.3
6	79.8	4.41	ddd	3.4, 3.6, 8.9
7	63.4	4.54	dd	3.4, 4.5
8	41.1	α 2.56	ddd	4.5, 9.5, 13.9
		β 2.40	dd	6.2, 13.9
9	80.0	4.41	ddd	2.8, 6.2, 9.5
10	56.2	4.35	ddd	2.8, 2.8, 11.3
11	43.1	2.09	ddd	3.4, 11.3, 15.0
		1.91	ddd	2.8, 8.9, 15.0
12	70.4	4.42	ddd	3.4, 3.4, 8.9
13	133.3	5.54	dd	1.4, 6.7, 15.2
14	127.5	5.74	dq	6.4, 15.2
15	17.7	1.70 (3H)	d	6.4

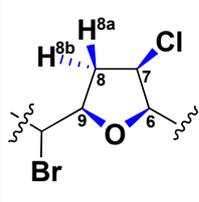
 Tabla 2.4.19. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y ^{13}C (150 MHz) del marizafuraleno D (**17**) en CDCl_3 .

A la hora de establecer la configuración relativa del marizafuraleno D (**17**), también resultaron significativas las diferencias que se observan en los desplazamientos químicos de protón de los centros estereogénicos C-9 y C-10, respecto a los metabolitos de esta

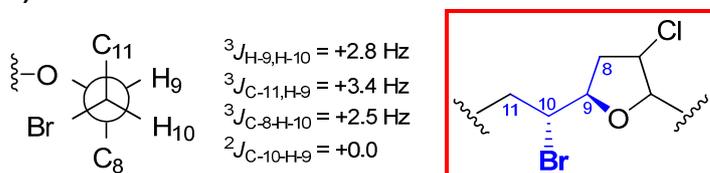
serie descritos previamente, y en particular al compararlo con su isómero estructural **15**. Mientras que los valores observados para H-4, H₂-5, H-6, H-7 y H₂-8, permanecen prácticamente iguales, la señal de H-10 se desplaza significativamente a campos bajos y la de H-9 ligeramente hacia campos altos [δ_H 4.06 (ddd, $J = 3.1, 5.7, 7.9$ Hz) y 4.47 (ddd, $J = 3.1, 6.2, 9.6$ Hz) en **15** vs δ_H 4.35 (ddd, $J = 2.8, 2.8, 11.3$ Hz) y 4.41 (ddd, $J = 2.8, 6.2, 9.5$ Hz) en **17**, respectivamente]. Estos hechos podrían deberse a un cambio de configuración en alguno o ambos centros.

A fin de confirmar esta posibilidad, se realizó un estudio configuracional, equivalente al descrito para el marilzafuraleno A (**14**). Para la medida de constantes en señales que se superponían se repitió la espectroscopía utilizando como disolvente deuterado C₆D₆ (ver apartado datos físicos 2.6.17). En función de los resultados resumidos en la figura 2.4.53, concluimos que se ha producido un cambio en la configuración relativa tanto en C-9 como en C-10, respecto a los compuestos descritos previamente. Esto supone que el cierre del anillo de cinco es ahora *cis*, y que en conclusión, la estereoquímica relativa de los centros quirales presentes en el metabolito **17** se establece como 4*S*^{*}, 6*R*^{*}, 7*R*^{*}, 9*R*^{*}, 10*R*^{*}. Respecto a la unidad de bromoaleno la configuración absoluta se mantiene como *S*.

A)

	Medida de J	Valor (Hz)	Orientación relativa
	$^3J_{C-10,H-8a}$	+6.0	<i>C-H cis</i>
	$^3J_{C-10,H-8b}$	+1.0	<i>C-H trans</i>
	$^2J_{C-7,H-8b}$	0.0	<i>H-H cis</i>
	$^2J_{C-7,H-8a}$	-5.6	<i>H-H trans</i>
	$^2J_{C-7,H-6}$	+6.2	<i>H-H cis</i>

B)



C)

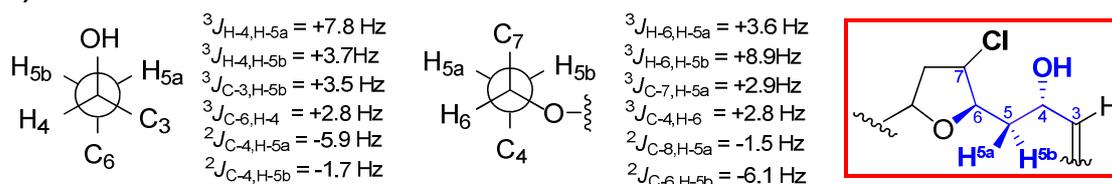


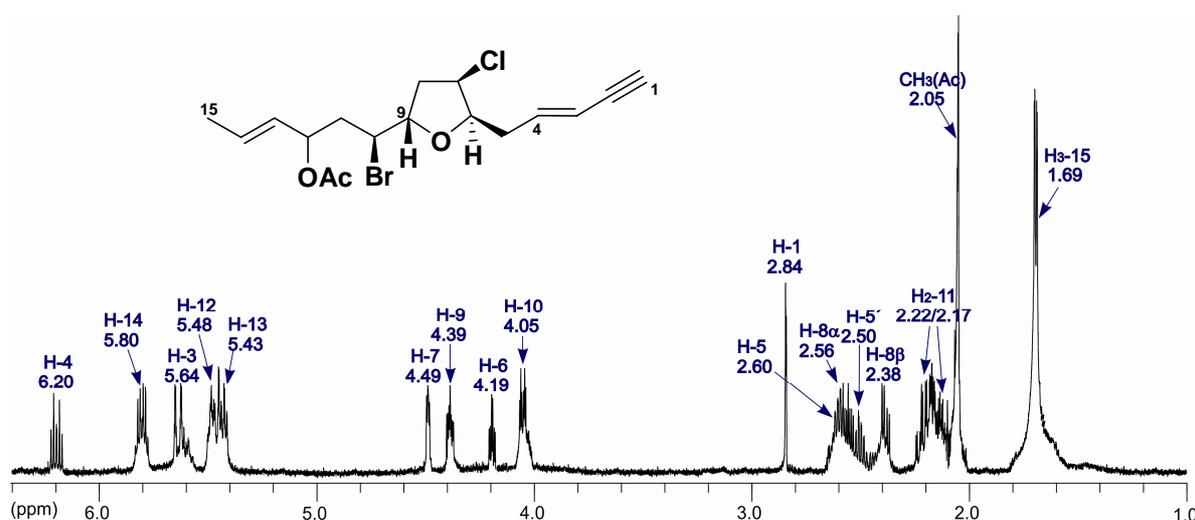
Figura 2.4.53. Determinación de la estereoquímica relativa del anillo de cinco miembros (A) y de los fragmentos C-9/C-10 (B) y C-4/C-6 (C) del marilzafuraleno D (**17**).

2.4.4.5. 12-Acetoxi-marilzafurenino (18).

El compuesto **18** fue aislado como un sólido amorfo con rotación óptica $[\alpha]_D^{25} = -13$ (c 0.07, CHCl_3). Su fórmula molecular, $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{BrClO}_3$, se dedujo del espectro de masas ESI-HRMS donde se observaron los iones pseudomoleculares $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a m/z 411.0332, 413.0320, 415.0298 (77:100:26).

Su espectro IR mostró bandas de absorción propias de grupos alquino terminal (3293 y 2326 cm^{-1}), carbonil éster (1733 cm^{-1}), doble enlace (1645 cm^{-1}) y éter (1050 cm^{-1}).

La tabla 2.4.20 recoge las asignaciones de RMN ^{13}C y ^1H del producto y confirma los 17 átomos de carbonos determinados en su fórmula molecular. Éstos, de acuerdo a sus desplazamientos químicos así como a su multiplicidad en el HSQC editado, corresponden a dos carbonos cuaternarios, diez metinos, tres metilenos y dos metilos. De entre ellos, es de destacar que uno es carbonilo (δ_{C} 170.2), dos metinos son halogenados y tres se encuentran unidos a oxígeno (δ_{C} 82.1, 79.6, 79.6, 72.8 y 62.3), mientras que otros cuatro son olefínicos (δ_{C} 140.7, 130.0, 128.7 y 111.9). Por otro lado, la presencia de una unidad enino terminal es clara en función de las resonancias de los carbonos terciarios a δ_{C} 77.0, 111.9, 140.7, y del carbono cuaternario a δ_{C} 82.0. Es más, las señales características en el espectro de RMN ^1H (Figura 2.4.54) del metabolito **18**, a δ_{H} 2.84 (1H, br d, $J = 1.7$ Hz), 5.64 (1H, dd, $J = 1.7, 16.1$ Hz) y 6.20 (1H, ddd, $J = 7.4, 7.4, 16.1$ Hz) también lo confirman y apuntan su geometría como *E*.



N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	77.0	2.84	<i>br d</i>	1.7
2	82.0			
3	111.9	5.64	<i>dd</i>	1.7, 16.1
4	140.7	6.20	<i>ddd</i>	7.4, 7.4, 16.1
5	35.0	2.60	<i>ddd</i>	6.8, 7.4, 14.7
		2.50	<i>ddd</i>	6.8, 7.4, 14.7
6	82.1	4.19	<i>ddd</i>	2.8, 6.8, 6.8
7	62.3	4.49	<i>dd</i>	2.8, 4.8
8	41.0	α 2.56	<i>ddd</i>	4.8, 9.8, 13.9
		β 2.38	<i>dd</i>	6.1, 13.9
9	79.6	4.39	<i>ddd</i>	2.5, 6.1, 9.8
10	54.8	4.05	<i>ddd</i>	2.5, 3.1, 10.7
11	40.8	2.22	<i>ddd</i>	3.3, 10.7, 14.3
		2.17	<i>ddd</i>	3.1, 9.8, 14.3
12	72.8	5.48	<i>ddd</i>	3.0, 3.3, 7.1
13	128.7	5.43	<i>ddd</i>	2.3, 6.3, 15.1
14	130.0	5.80	<i>dq</i>	6.5, 15.1
15	17.8	1.69 (3H)	<i>br d</i>	6.5
CO (Ac)	170.2			
CH ₃ (Ac)	21.3	2.05 (3H)	<i>s</i>	

Tabla 2.4.20. Datos de RMN ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) del 12-acetoxi-marilzafurenino (**18**) en CDCl_3 .

Un estudio comparativo detallado de los datos de RMN 1D y 2D del metabolito **18** con los del marilzafuraleno D (**17**), concluye que ambos compuestos poseen una estructura plana similar entre los carbonos C-6 y C-15, pero con la notable sustitución de la unidad bromoaleno existente en **17** y los otros representantes de esta serie aislados, por una función enino terminal. Además, el espectro de RMN ^1H de **18** incluye una señal de un metilo de acetato [δ_{H} 2.05 (s)] que concuerda con la presencia de un metino oxigenado más desapantallado que en el compuesto **17** [δ_{H} 5.48 (ddd, $J = 3.0, 3.3, 7.1$ Hz) en **18** vs δ_{H} 4.42 (ddd, $J = 3.4, 3.4, 8.9$ Hz) en **17**]. La posición de esta unidad de acetato sobre ese carbono del metino C-12, se confirma por las correlaciones HMBC observadas del metino H-12 con el carbono del carbonilo del éster. En la figura 2.4.55 se representa el sistema de espín establecido por el experimento COSY y resumen las correlaciones HMBC principales para esta molécula.

En cuanto a su configuración relativa, los datos de RMN indican que respecto a los centros quirales C-6, C-7, C-9 y C-10, la situación es equivalente a los metabolitos **14-16**, es decir, $6R^*$, $7R^*$, $9S^*$ y $10S^*$.

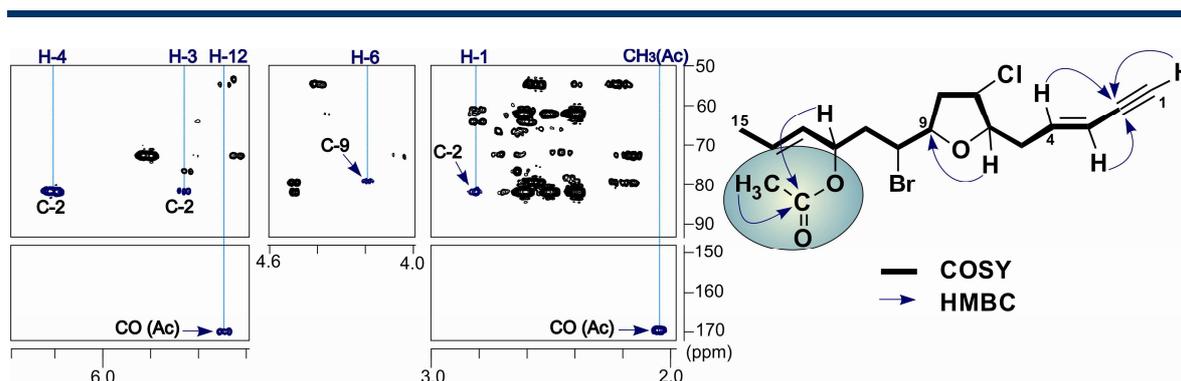


Figura 2.4.55. Secciones del experimento de HMBC (600 MHz) en CDCl_3 , y principales correlaciones HMBC y COSY del 12-acetoxi-marilzafureno (**18**).

2.4.5. Acetogeninas C-15 con estructuras lineales

2.4.5.1. Z-Adrienino (**19**)

El Z-adrienino (**19**) fue aislado como un sólido amorfo blanco con rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} = -4$ (c 0.11, CHCl_3). En el análisis por espectrometría de masas ESI-HRMS se observaron picos correspondientes a los iones pseudomoleculares $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a m/z 389.0082, 391.0040 y 392.9998 (26:38:18); lo que permitió establecer la fórmula molecular de este producto natural como $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{BrCl}_2\text{O}_3$, con tres insaturaciones en su estructura.

Los datos de su espectro de IR ponen de manifiesto la existencia de grupos hidroxilo (3440 cm^{-1}) y de sistemas enino conjugados (3298 y 2300 cm^{-1}).

La presencia de una cadena Z-2-penten-4-ilo, también se confirma por su absorción característica de UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}} = 225\text{ nm}$ ($\log \epsilon$ 3.59), y por los datos espectroscópicos de RMN ^1H [δ_{H} 3.18 (dd, $J = 0.7, 2.3\text{ Hz}$), 5.65 (dd, $J = 2.3, 10.8\text{ Hz}$), y 6.14 (dddd, $J = 0.7, 7.3, 7.3, 10.8\text{ Hz}$)] (Figura 2.4.56) y RMN ^{13}C [δ_{C} 140.2 (CH), 111.2 (CH), 82.6 (CH) y 80.0 (C)] (Tabla 2.4.21).

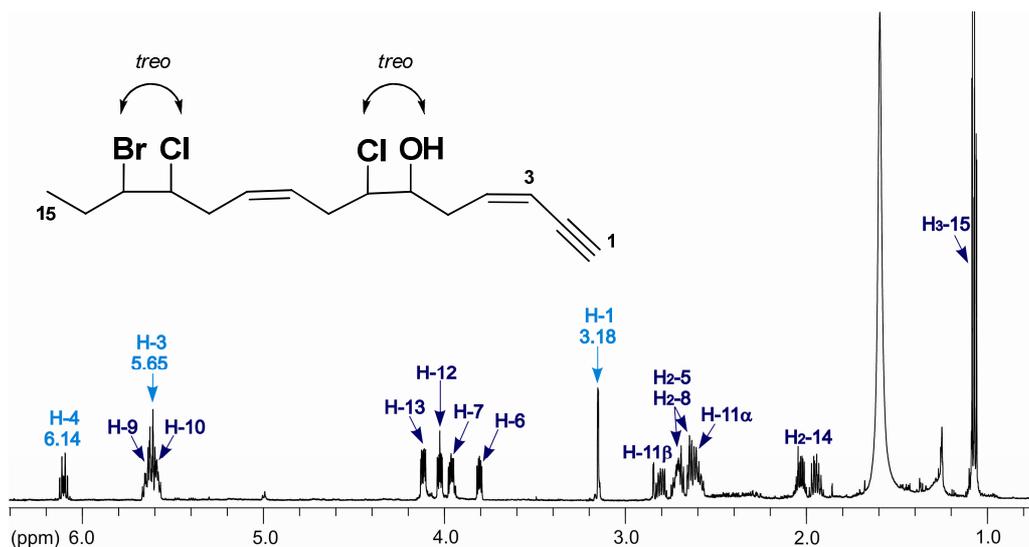


Figura 2.4.56. Experimento RMN ^1H de Z-adrienino (**19**) en CDCl_3 (500 MHz).

N $^{\circ}$ C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	82.6	3.18	dd	0.7, 2.3
2	80.0			
3	111.2	5.65	dd	2.3, 10.8
4	140.2	6.14	dddd	0.7, 7.3, 7.3, 10.8
5	35.6	2.73	m	
		2.66	m	
6	72.4	3.84	ddd	3.6, 5.1, 7.8
7	67.1	3.99	ddd	3.6, 5.6, 9.0
8	33.1	2.74	m	
		2.66	m	
9	128.4	5.68	m^a	
10	127.9	5.62	m^a	
11	34.1	2.84	ddd	5.6, 7.7, 15.1
		2.62	m	
12	64.3	4.06	ddd	2.6, 5.6, 8.3
13	61.0	4.15	ddd	2.6, 4.4, 9.5
14	28.8	2.06	dd	4.4, 7.3, 14.3
		1.98		7.3, 9.5, 14.3
15	12.6	1.10 (3H)	dd	7.3, 7.3

Tabla 2.4.21. Datos RMN ^1H (500 MHz) y RMN ^{13}C (125 MHz) del Z-adrienino (**19**) en CDCl_3 . ^aLa constante de acoplamiento $^3J_{\text{H-9,H-10}} = 11.5$ Hz se determinó a partir de un experimento DQF-COSY.

El análisis de los experimentos de COSY y HSQC permitió, asignar el esqueleto carbonado del compuesto como un único sistema de espín ^1H - ^1H , C-3 \rightarrow C-15 (Figura 2.4.57), establecer el doble enlace aislado entre las posiciones C-9 y C-10, así como situar los distintos heteroátomos sobre sus respectivos carbonos: un hidroxilo en C-6, un

cloro en C-7 y C-12, el bromo sobre C-13 (Tabla 2.4.21). La geometría del doble enlace Δ^9 , debido al solapamiento de las señales (Figura 2.4.56), fue establecida como *Z* a partir de la constante de acoplamiento de H-10 medida en el experimento COSY-DQF ($^3J_{H-9,H-10} = 11.5$ Hz), y los desplazamientos químicos de los carbonos metilénicos alílicos C-8 (δ_C 33.1) y C-11 (δ_C 34.1).⁶⁴

Las correlaciones HMBC de los protones H-1, H-3 y H-4 con el carbono cuaternario C-2 (δ_C 80.0) (Figura 2.4.57), completan los datos para determinar que la estructura química del *Z*-adrienino (**19**), corresponde con una nueva acetogenina C-15 lineal (*3Z,9Z*)-13-bromo-7,12-dicloropentadeca-3,9-dien-1-in-6-ol.

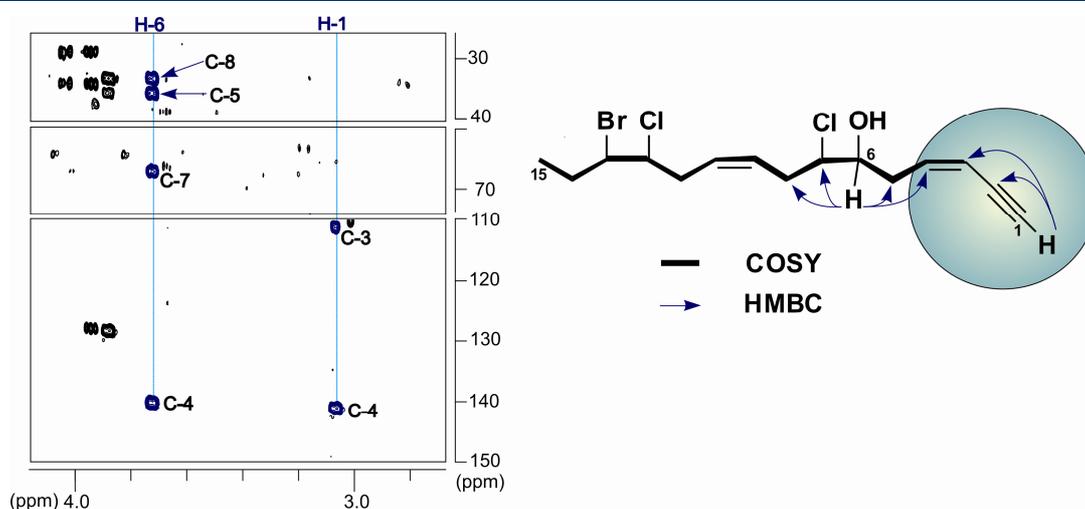


Figura 2.4.57. Experimento HMBC de *Z*-adrienino (**19**) en $CDCl_3$ (500 MHz) y principales correlaciones HMBC y COSY.

La configuración relativa de los centros estereogénicos C-6, C-7, C-12 y C-13 fue determinada una vez más, mediante el estudio configuracional basado en el análisis de constantes de acoplamiento (Figura 2.4.58). El pequeño valor de la constante de acoplamiento entre H-6 y H-7 ($^3J_{H-6,H-7} = 3.6$ Hz) es consistente con una conformación *gauche*, con cuatro posibles conformaciones relativas. Los valores de las constantes de acoplamiento heteronucleares $^3J_{C-5,H-7} < 1.0$ Hz, $^3J_{C-8,H-6} = 1.8$ Hz y $^2J_{C-7,H-6} = 3.0$ Hz indican una orientación *anti* entre C-5 y C-8. En base a estos datos, la configuración relativa entre C-6 y C-7 se propone como *treo*. De la misma manera, una orientación *gauche* entre H-12 y H-13 se deduce del valor pequeño de la constante de acoplamiento homonuclear $^3J_{H-12,H-13} = 2.6$ Hz, mientras que los valores $^2J_{C-13,H-12}$ y $^3J_{C-11,H-13}$, al resultar ser de 2.0 y 2.8 Hz, respectivamente, sostienen una orientación *treo* entre C-12 y C-13.

⁶⁴ Kladi, M.; Vagias, C.; Papazafiri, P.; Brogi, S.; Tafi, A.; Roussis, V. *J. Nat. Prod.*, **2009**, 72, 190-193.

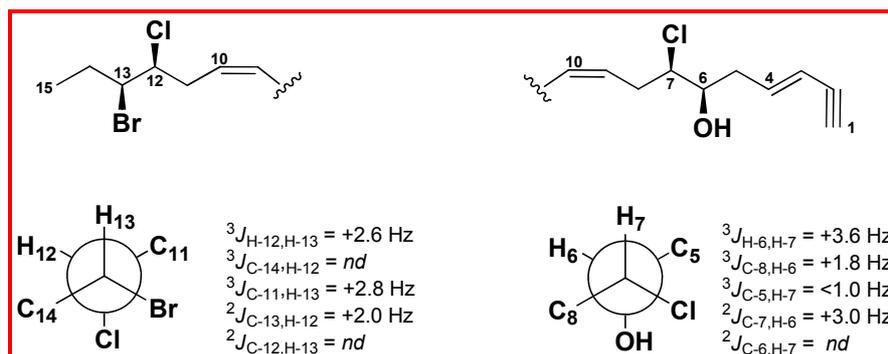


Figura 2.4.58. Configuración relativa propuesta para C-6, C-7, C-12 y C-13 en el *Z*-adrienino (**19**).

2.4.5.2. *E*-Adrienino (**20**)

El *E*-adrienino (**20**), fue también aislado como un sólido amorfo blanco ópticamente activo, $[\alpha]_D^{25} = -20$ (c 0.04, CHCl_3). Su fórmula molecular resultó idéntica a la del *Z*-adrienino (**19**), $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{BrCl}_2\text{O}$, en base a sus espectros de masa ESI-HRMS (m/z 391.0165 $[\text{M} + \text{Na}]^+$). Estos hechos, junto a la comparación de sus datos espectroscópicos con los obtenidos para el compuesto **19**, (Tablas 2.4.21 y 2.4.22) mostró que ambos metabolitos son isómeros en la terminación enino.

Esto se ve claramente al superponer sus espectros de HSQC (Figura 2.4.59) y al observar las señales características de una unidad *E*-enino en el espectro de RMN ${}^1\text{H}$ en el metabolito **20** a δ_{H} 2.84 (1H, *br* d, $J = 2.0$ Hz), 5.62 (1H, dd, $J = 2.0, 15.4$ Hz) y 6.22 (1H, ddd, $J = 7.5, 7.5, 15.4$ Hz) (Figura 2.4.60).

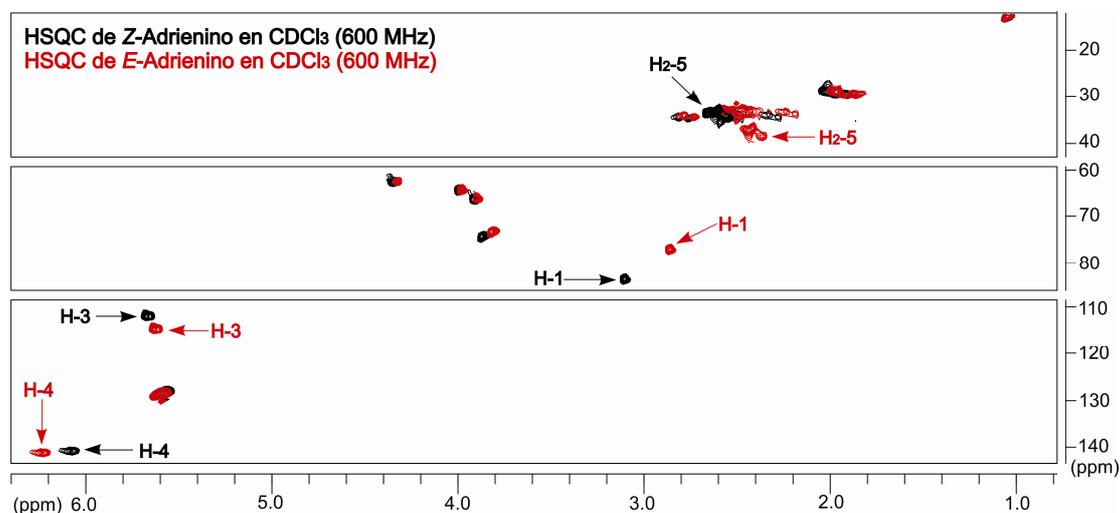
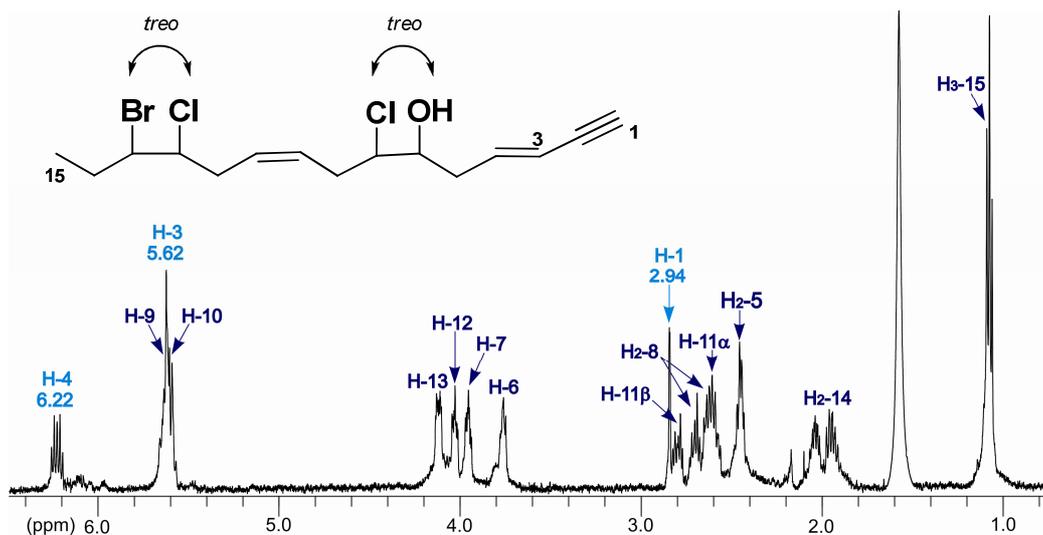


Figura 2.4.59. Superposición de los espectros HSQC del *Z*-adrienino (**19**) y del *E*-adrienino (**20**).


 Figura 2.4.60. Experimento RMN ^1H de *E*-adrienino (**20**) en CDCl_3 (500 MHz).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	77.1	2.84	<i>br d</i>	2.0
2	81.8			
3	112.2	5.62	<i>dd</i>	2.0, 15.4
4	140.9	6.22	<i>dddd</i>	7.5, 7.5, 15.4
5	38.5	2.45	<i>m</i>	
		2.45	<i>m</i>	
6	72.0	3.76	<i>m</i>	
7	66.3	3.95	<i>ddd</i>	2.9, 6.0, 8.7
8	33.2	2.71	<i>ddd</i>	6.0, 6.6, 14.7
		2.63	<i>m</i>	
9	128.3	5.63	<i>m</i>	
10	128.0	5.60	<i>m</i>	
11	34.0	2.80	<i>ddd</i>	5.5, 6.3, 14.6
		2.60	<i>ddd</i>	6.0, 8.8, 14.6
12	64.3	4.03	<i>ddd</i>	2.5, 5.5, 8.8
13	61.0	4.12	<i>ddd</i>	2.5, 4.5, 9.0
14	28.8	2.04	<i>ddd</i>	4.5, 7.3, 14.6
		1.95	<i>ddd</i>	7.5, 9.0, 14.6
15	12.6	1.08 (3H)	<i>dd</i>	7.3, 7.5

 Tabla 2.4.21. Datos RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del *E*-Adrienino (**20**) en CDCl_3 .

Como se comentó en los antecedentes, se acepta que las acetogeninas C-15 de *Laurencia*, proceden biogénicamente de un precursor lineal C_{15} hidroxi, halohidroxi o epoxi-poliénino, y éste a su vez, del ácido *hexadeca-4,7,10,13-tetraenoico*. En este sentido, estas nuevas acetogeninas lineales **19** y **20**, podrían ser consideradas como los precursores de las distintas acetogeninas cíclicas descritas anteriormente. De acuerdo

con esta hipótesis, para dar lugar a las configuraciones, por ejemplo de los macrociclos y de los lauroxanos aislados, la configuración relativa en C-6 y C-7 de los compuestos **19** y **20** debería ser $6R^*$ y $7R^*$. Esta configuración relativa únicamente se daría en el caso de que se trate de un rotámetro *treo*, tal y como se estableció para estos compuestos a través de los estudios configuracionales llevados a cabo.

2.4.6. Compuestos de naturaleza terpénica

2.4.6.1. *E*-dactileno B (**21**)

Este diterpeno fue aislado como un sólido blanco amorfo ópticamente activo $[\alpha]_D^{25} = +2$ (c 0.33, CHCl_3). Su fórmula molecular, $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$, fue establecida por espectrometría de masas ESI-HRMS (m/z 327.2167 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), indicando cinco insaturaciones en la molécula.

La presencia de un sistema de dieno conjugado se pone de manifiesto por las absorciones de UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}} = 238$ nm ($\log \varepsilon$ 4.43) e IR (1650 cm^{-1}). Además en el experimento de RMN ^1H (Figura 2.4.61) se observan las señales de dos metinos y un metileno olefínicos *exo* [δ_{H} 6.16 (d, $J = 15.5$ Hz), 5.61 (dt, $J = 7.7, 15.5$ Hz) y 4.88 (s, 2H)]. Otras bandas de IR destacables son las correspondientes a alcohol (3418 cm^{-1}) y a grupo éter (1127 cm^{-1}).

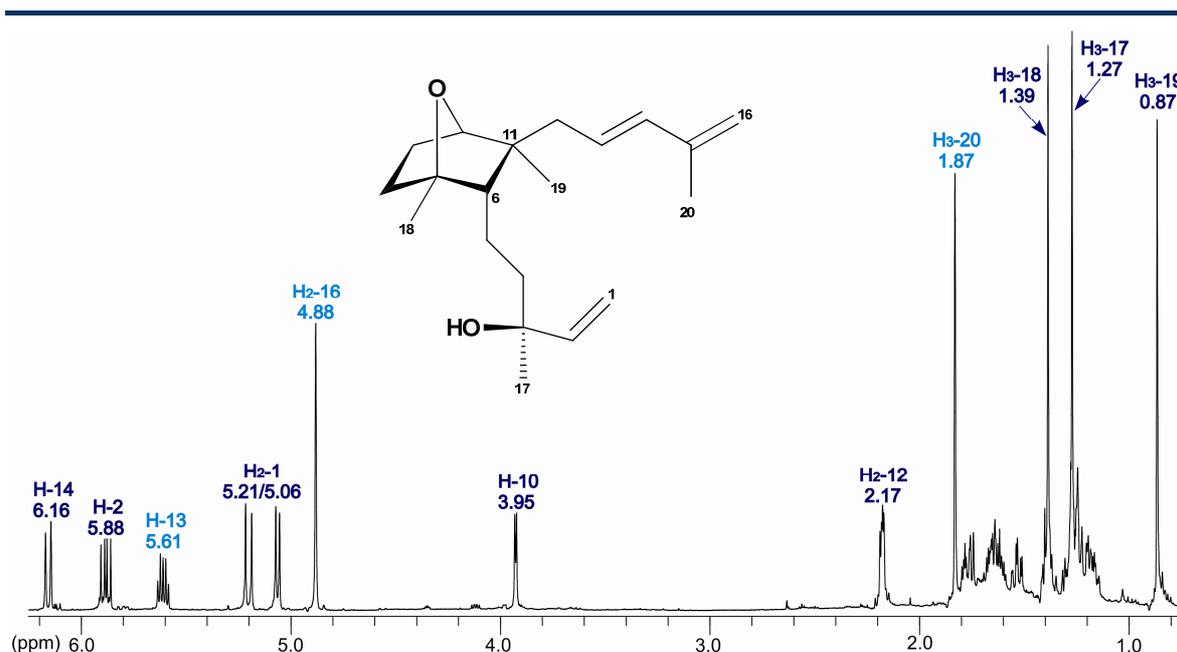


Figura 2.4.61. Espectro de RMN ^1H del *E*-dactileno B (**21**) en CDCl_3 (600 MHz).

Un primer estudio de las señales que aparecen en los espectros de RMN ^{13}C (Tabla 2.4.22) confirma la presencia de los carbonos determinados en su fórmula molecular, carbonos que de acuerdo al experimento de HSQC con editado de multiplicidad (Figura 2.4.62) se clasifican en cuatro metilos (δ_{C} 27.7, 21.5, 18.8, 17.1), siete metilenos (δ_{C} 114.7, 111.9, 47.0, 42.1, 29.1, 26.5, 21.1), cinco metinos (δ_{C} 144.7, 135.8, 127.1, 84.3, 55.2) y cuatro carbonos totalmente sustituidos a (δ_{C} 142.0, 88.1, 73.2, 45.8).

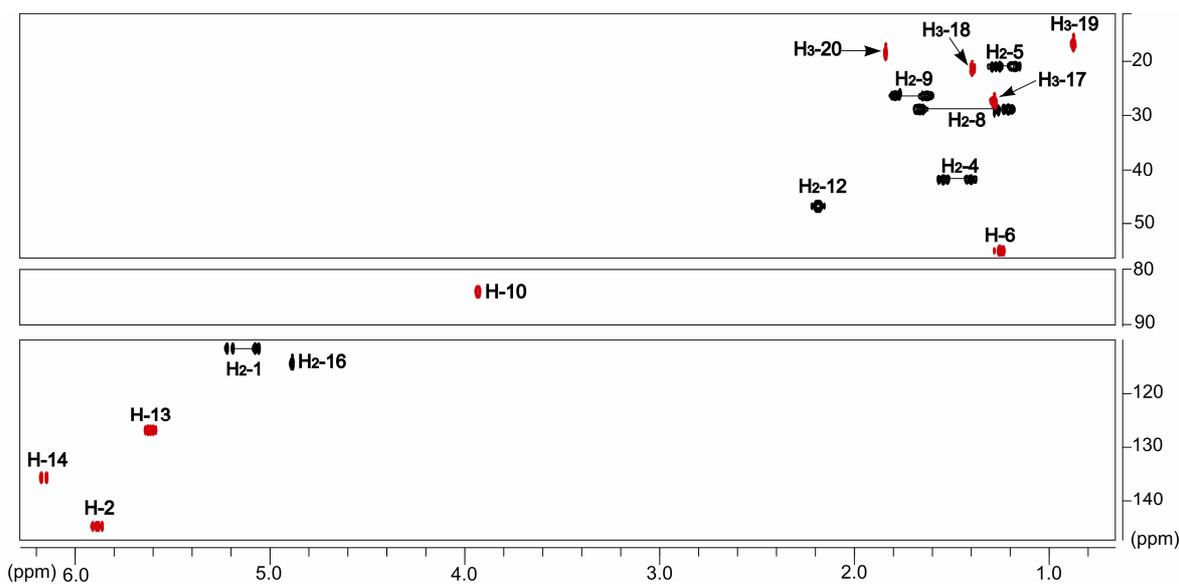


Figura 2.4.62. Fragmentos seleccionados del espectro de HSQC con editado de multiplicidad del *E*-dactileno B (**21**) en CDCl_3 (600 MHz).

Un análisis detallado del experimento COSY (Figura 2.4.63) permitió establecer cuatro sistemas de espín ^1H - ^1H : fragmento 1 (H_2 -1 \rightarrow H-2), fragmento 2 (H_2 -4 \rightarrow H-6), fragmento 3 (H_2 -8 \rightarrow H-10) y fragmento 4 (H-12 \rightarrow H-14). Como puede observarse en la Figura 2.4.64, los fragmentos 1 y 4, albergan tres metinos olefínicos. La geometría del doble enlace Δ^{13} se estableció como *E* en función del valor de la constante de acoplamiento $^3J_{\text{H-13,H-14}} = 15.5$ Hz.

Por otro lado, a través del experimento HMBC (Figura 2.4.64) se lograron conectar estas estructuras parciales junto con los carbonos cuaternarios y los restantes grupos metilo presentes en la molécula, así como establecer un puente éter. Efectivamente, las correlaciones HMBC del metino H-2 (δ_{H} 5.88) con los carbonos C-3 (δ_{C} 73.2), C-4 (δ_{C} 42.1) y C-17 (δ_{C} 27.7), enlazan los fragmentos 1 y 2, a través del carbono cuaternario en α a un grupo hidroxilo C-3 y sitúa el metilo H₃-17 sobre él. El acoplamiento de H-10 (δ_{H} 3.95) con

C-7 (δ_C 88.1) confirma un puente éter entre dichas posiciones, y las del mismo protón con C-11 (δ_C 45.8), C-6 (δ_C 55.2) y C-18 (δ_C 21.5), unen el fragmento 3 al 2 y fijan el metilo H₃-18 sobre C-7. Otras correlaciones HMBC igual de importantes son las del metileno H₂-12 (δ_H 2.17) con el carbono cuaternario C-11 y el carbono del metilo C-19 (δ_C 17.1), que sitúa al metilo H₃-19 y conecta el fragmento 4 a los segmentos anteriores de la molécula. Finalmente, los protones olefínicos *exo* H₂-16 (δ_H 4.88) se correlacionan con C-15 (δ_C 142.0), C-14 (δ_C 135.8) y C-20 (δ_C 18.8) completando la estructura plana del *E*-dactileno B (21).

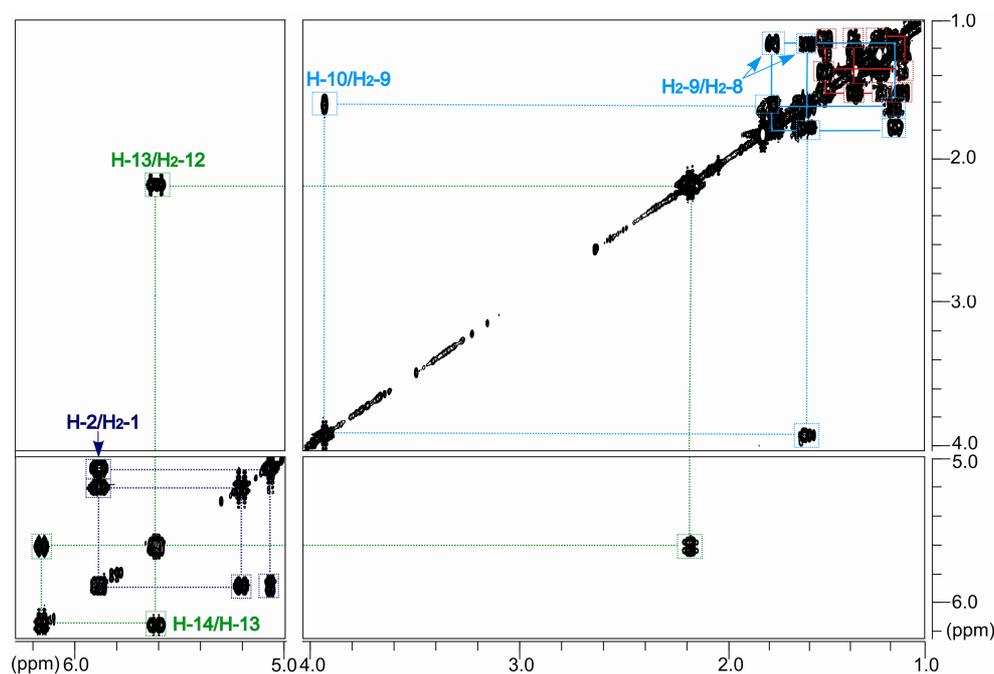


Figura 2.4.63. Experimento COSY del *E*-dactileno B (21) en CDCl₃ (600 MHz).

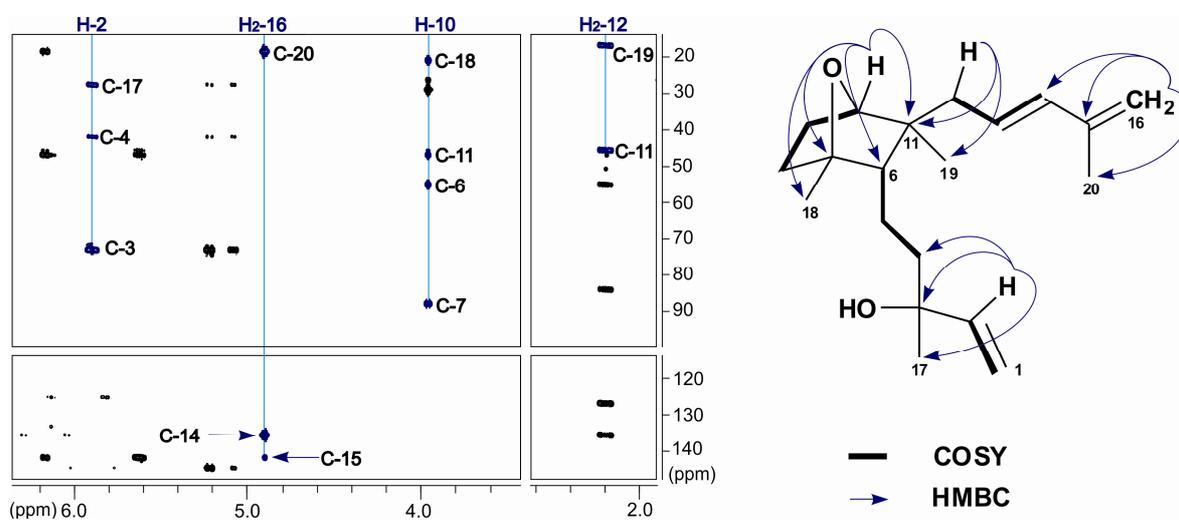


Figura 2.4.64. Principales correlaciones HMBC y COSY del *E*-dactileno B (21) en CDCl₃ (600 MHz).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	111.9	5.21/5.06	d/d	17.4/10.8
2	144.7	5.88	dd	10.8, 17.4
3	73.2			
4	42.1	1.54/1.39	m/m	
5	21.1	1.27/1.18	m/m	
6	55.2	1.24	dd	2.4, 7.5
7	88.1			
8	29.1	1.66/1.21	m/m	
9	26.5	1.78/1.60	m/m	
10	84.3	3.95	br d	5.1
11	45.8			
12	47.0	2.17 (2H)	m	
13	127.1	5.61	dt	7.7, 15.5
14	135.8	6.16	d	15.5
15	142.0			
16	114.7	4.88 (2H)	s	
17	27.7	1.27 (3H)	s	
18	21.5	1.39 (3H)	s	
19	17.1	0.87 (3H)	s	
20	18.8	1.87 (3H)	s	

Tabla 2.4.22. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del *E*-dactileno B (**21**) (CDCl_3).

En función de lo anterior podemos concluir que el metabolito **21** posee esqueleto carbonado de dactilomelano.²

La estereoquímica relativa de este compuesto fue establecida en base a las correlaciones observadas en el espectro ROESY (Figura 2.4.65). En el mismo cabe destacar, las correlaciones ROE del metino H-10 con los protones metilenos H₂-9, H₂-12 y H₂-13, que sugieren que la estereoquímica relativa en los centros quirales C-10 y C-11 son *R** y *S**, respectivamente. Por otro lado, en función del puente éter existente entre las posiciones C-7–C-10, se puede deducir que el centro quiral C-7 es *S**. Finalmente, la interacción ROE entre el par H-6 y H₃-19 implica que la estereoquímica relativa en esa región es C-6 *S**. Señalar que la disposición espacial del centro quiral restante C-3 no pudo ser definida.

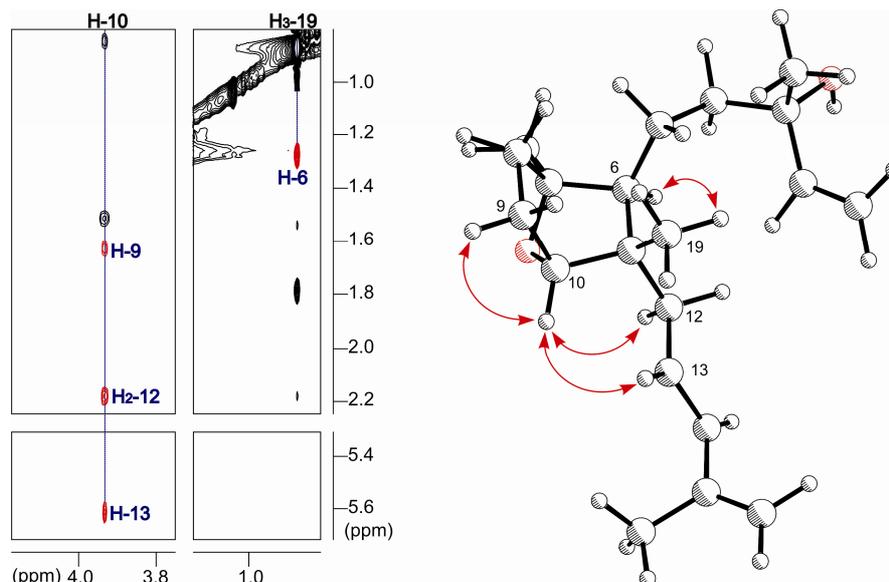


Figura 2.4.65. Secciones del experimento ROESY con las correlaciones principales del *E*-dactileno B (**21**) en CDCl_3 (600 MHz).

2.4.6.2. Nor-*E*-cetodactileno (**22**)

El nor-*E*-cetodactileno (**22**) fue aislado como un sólido blanquecino con rotación óptica $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +38$ (c 0.02, CHCl_3). Su fórmula molecular, establecida en base al ión pseudomolecular $[\text{M} + \text{Na}]^+$ a m/z 329.2088 observado en su espectro de masas de alta resolución ESI-HRMS, fue $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_3$ por lo que se trata posiblemente de un nor-diterpeno.

Los datos de IR ponen de manifiesto la presencia en la molécula de grupos hidroxilo (3540 y 3439 cm^{-1}), éter (1120 cm^{-1}) y cetona α,β -insaturada (1685 cm^{-1}).

La comparación de sus datos espectroscópicos de RMN con los de *E*-dactileno B (**21**), nos indican que ambas estructuras están muy relacionadas (Tablas 2.4.22 y 2.4.23). Eso se ve claramente al confrontar los espectros RMN ^1H de ambos compuestos (Figura 2.4.66), en las que las únicas diferencias corresponden a la ausencia en **22** del metileno olefínico H_2 -16 y al desplazamiento a campos más bajos del metino H-13 y del metilo más desapantallado [δ_{H} 5.61 (dt, $J = 7.7, 15.5$ Hz) y 1.87 (s) en **21** vs δ_{H} 6.11 (dt, $J = 7.6, 15.7$ Hz) y 2.25 (s) en **22**].

Eso se confirma con sus datos de RMN ^{13}C (Tabla 2.4.23) en el que no se observan los carbonos olefínicos del metileno (C-16, δ_{C} 114.7) ni del carbono cuaternario (C-15, δ_{C} 142.0) que estaban presentes en el *E*-dactileno B (**21**), y por el contrario, se establece la presencia de un grupo carbonilo (δ_{C} 198.5).

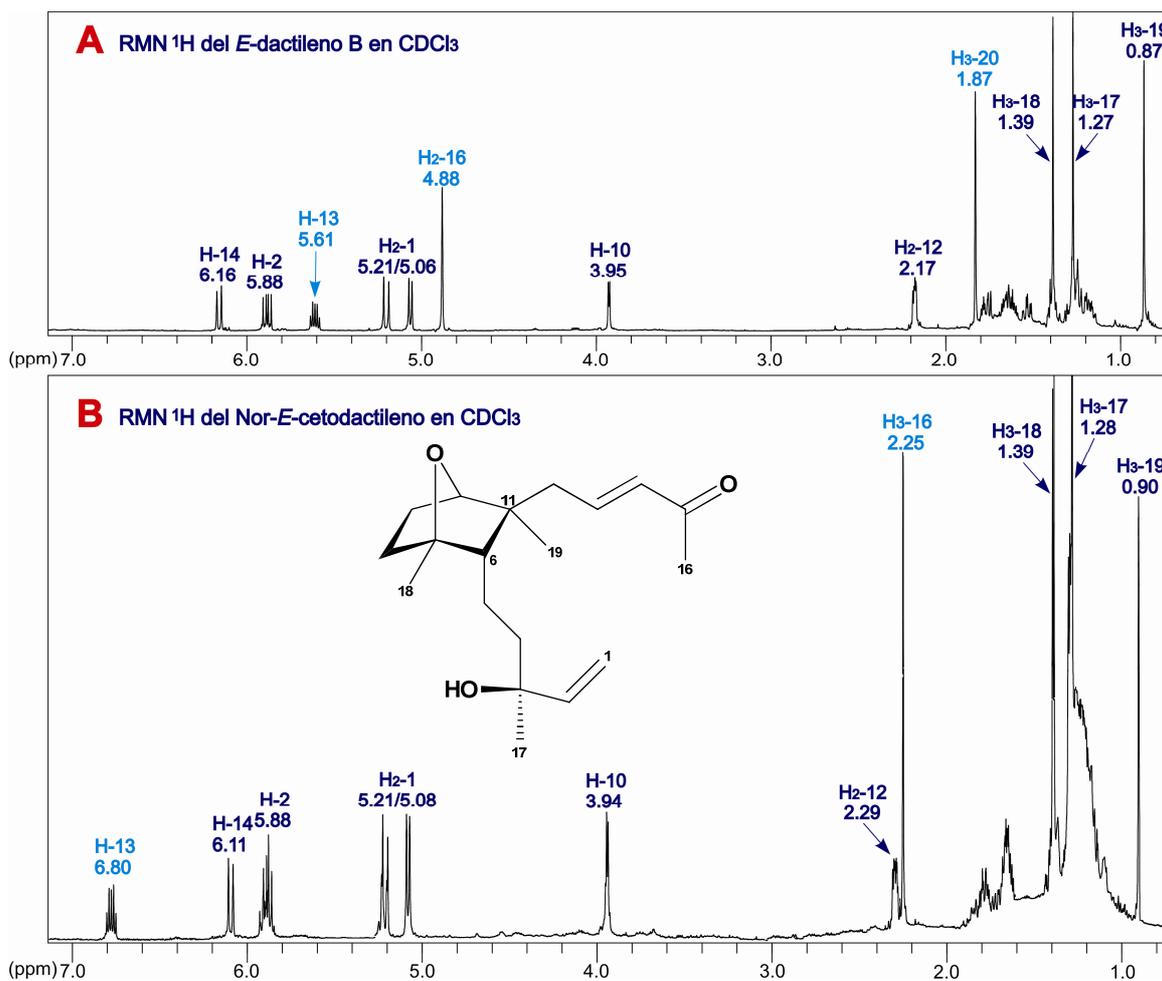


Figura 2.4.66. Comparación de los espectros de RMN ^1H (600 MHz) del *E*-dactileno B (**21**) (A) y el nor-*E*-cetodactileno (**22**) (B).

Las correlaciones de los experimentos RMN 2D (COSY y HMBC) confirman que la única diferencia entre ambos compuestos es la fragmentación del doble enlace exocíclico de **21** para dar lugar en el metabolito **22** a una metil cetona en C-15 (Figura 2.4.67).

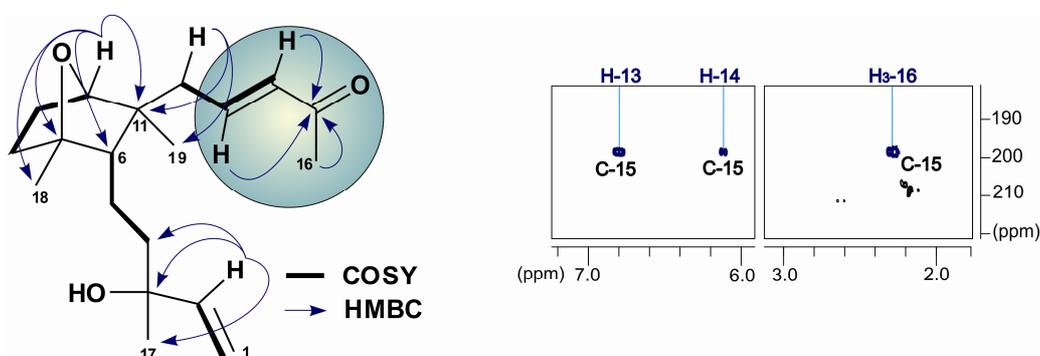


Figura 2.4.67. Secciones del experimento HMBC en CDCl_3 (600 MHz) y correlaciones principales del nor-*E*-cetodactileno (**22**).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	112.1	5.21/5.08	d/d	17.4/10.7
2	144.7	5.88	dd	10.7, 17.4
3	73.2			
4	42.1	1.54/1.45	m/m	
5	21.1	1.36/1.20	m/m	
6	55.3	1.24	dd	2.4, 7.5
7	88.3			
8	29.1	1.66/1.21	m/m	
9	26.5	1.82/1.67	m/m	
10	84.1	3.94	br d	5.1
11	45.8			
12	46.8	2.29 (2H)	m	
13	145.3	6.11	dt	7.6, 15.7
14	133.7	6.80	d	15.7
15	198.5			
16	27.9	2.25	s	
17	27.0	1.28 (3H)	s	
18	21.5	1.39 (3H)	s	
19	17.4	0.90 (3H)	s	

Tabla 2.4.23. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del nor-*E*-cetodactileno (**22**) (CDCl_3).

2.5. PROPUESTA BIOGENÉTICA DE LOS MARILZABICICLOALENOS Y LOS NUEVOS OXOLANOS

Como se señaló en los antecedentes de este capítulo, el origen biogénico de las acetogeninas C-15 heterocíclicas se considera derivado de precursores lineales C-15 con funcionalizaciones hidroxilo, halohidroxilo o epoxipolienos (acetogeninas acíclicas) que a su vez provienen del metabolismo del ácido (*Z,Z,Z*)-hexadeca-4,7,10,13-tetraenoico.¹² Un intermedio clave que ha sido sugerido en la ruta a estos precursores lineales es el (*Z*)-6,7-epóxido derivado que se muestra en la figura 2.5.1.¹⁰ Si partimos de este intermedio de forma similar a la propuesta realizada por Braddock para el grupo de los obtusalenos,¹¹ una apertura del epóxido por ataque nucleofílico de un anión cloruro daría un hidroxilcloruro con configuración *treo* (Figura 2.5.1). Posteriormente, la formación del ión bromonio sobre el doble enlace en posiciones C-9/C-10, seguido por la ciclación nos daría dos posibles tetrahidrofuranos con cierre *cis* o *trans*, según fuese un proceso *endo* o *exo*, respectivamente. El siguiente paso implicaría una nueva bromación electrofílica o epoxidación en las posiciones C-12/C-13 que evolucionarían con un ataque intramolecular del oxígeno del tetrahidrofurano correspondiente, dando lugar a un intermedio oxonio que puede fragmentarse para dar un bromuro o un alcohol alílico, o dar al 12-acetoximarilzafurenino (**18**). El bromuro alílico, puede sufrir desplazamiento con agua a través de una S_N2' , situando el alcohol en C-14. Finalmente una tercera bromación electrofílica en el grupo enino en C-1, induciría el ataque de agua en C-4 dando lugar a la unidad de bromoaleno de los marilzafuralenos A-D (**14-17**).

Un punto esencial para nuestra propuesta biogénica referente a los marilzabiccicloalenos A-D, y al 12-epoxi-obtusaleno IV (**1-5**), es el equilibrio de confórmeros en disolución y las poblaciones de confórmeros predominantes, que presentan el obtusaleno II y el obtusaleno IV (comentado en los antecedentes).^{53,55} Estos dos obtusalenos poseen el mismo núcleo tetrahidrofuránico, diferenciándose en la configuración absoluta en C-4 (4*S* para el obtusaleno II y 4*R* para el obtusaleno IV), y en la unidad de bromoaleno (*R* y *S*, respectivamente). El origen biogénico de estos dos obtusalenos se puede trazar desde el precursor lineal de la misma forma que en el caso de los marilzafureninos (Figura 2.5.1),¹¹ con la diferencia de que cuando se produce la tercera bromación electrofílica en el enino, en vez de atacar el agua en C-4, quien actúa como nucleófilo es el hidroxilo en C-14, creándose simultáneamente el macrociclo y el

terminal bromoaleno. Según sea el ataque en una u otra cara del enino, da lugar al obtusaleno II o el IV.

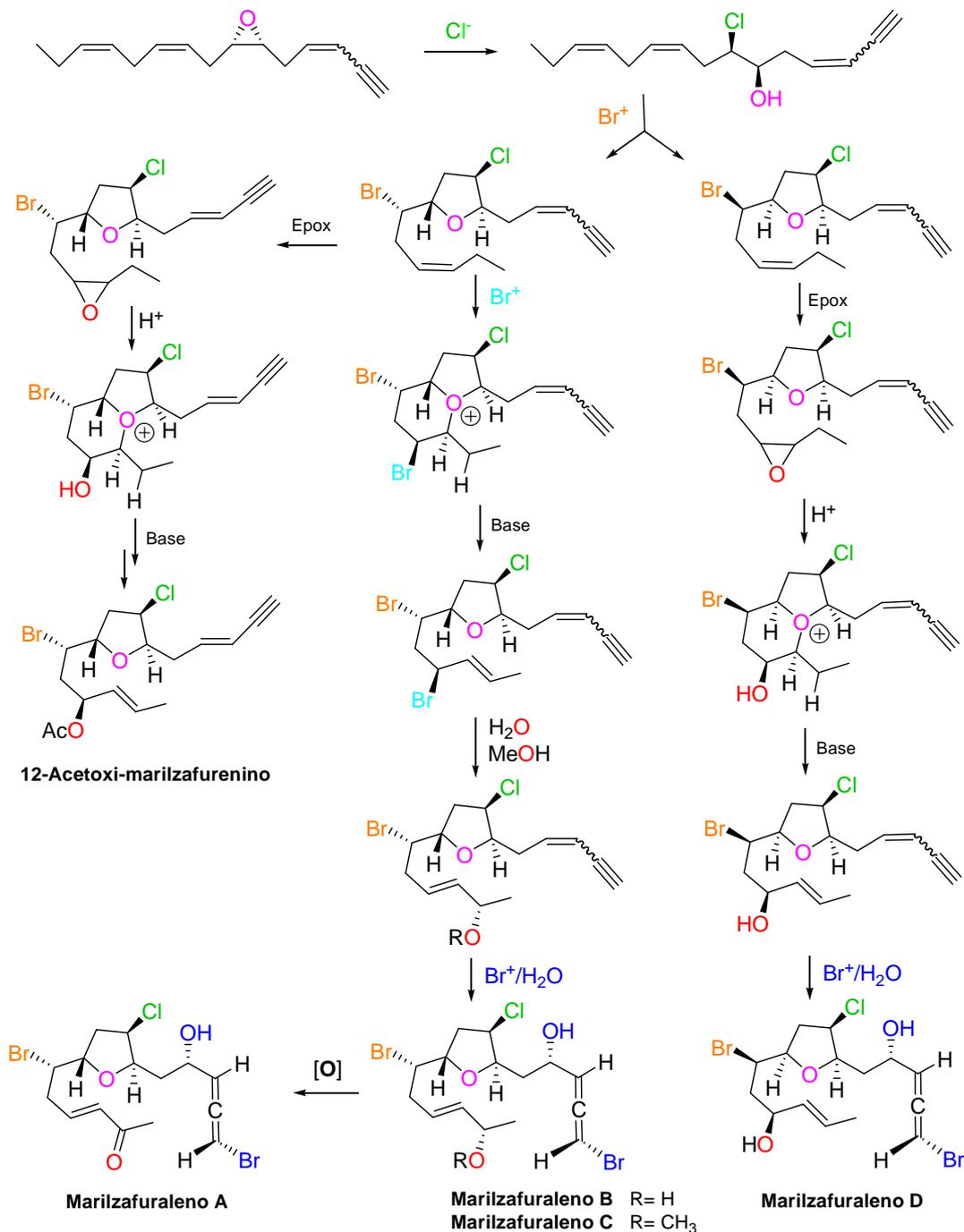


Figura 2.5.1. Propuesta biogénica para la formación de los marilzafuralenos A-D y el 12-acetoxi-marilzafurenino (14-18)

De forma similar, a como Braddock plantea para la biogénesis de los obtusalenos V-VII, nosotros proponemos que cuando los obtusalenos II y IV presentan el contacto transanular entre el oxígeno del éter del tetrahidrofurano y C-12 más cercano, puede tener lugar la formación de un epóxido o un ion cloronio en la cara *exo* del doble enlace entre C-12 y C-13. Estos intermediarios pueden evolucionar para generar nuevamente un ion oxonio pero ahora tricíclico, por ataque del oxígeno del anillo del tetrahidrofurano *via* un proceso *exo*. El ataque nucleofílico de agua o cloruro en C-9 daría lugar al sistema de anillos [5.5.1]bicultotridecano presente en los marilzabicicloalenos, con toda la estereoquímica correctamente establecida (Figura 2.5.2).

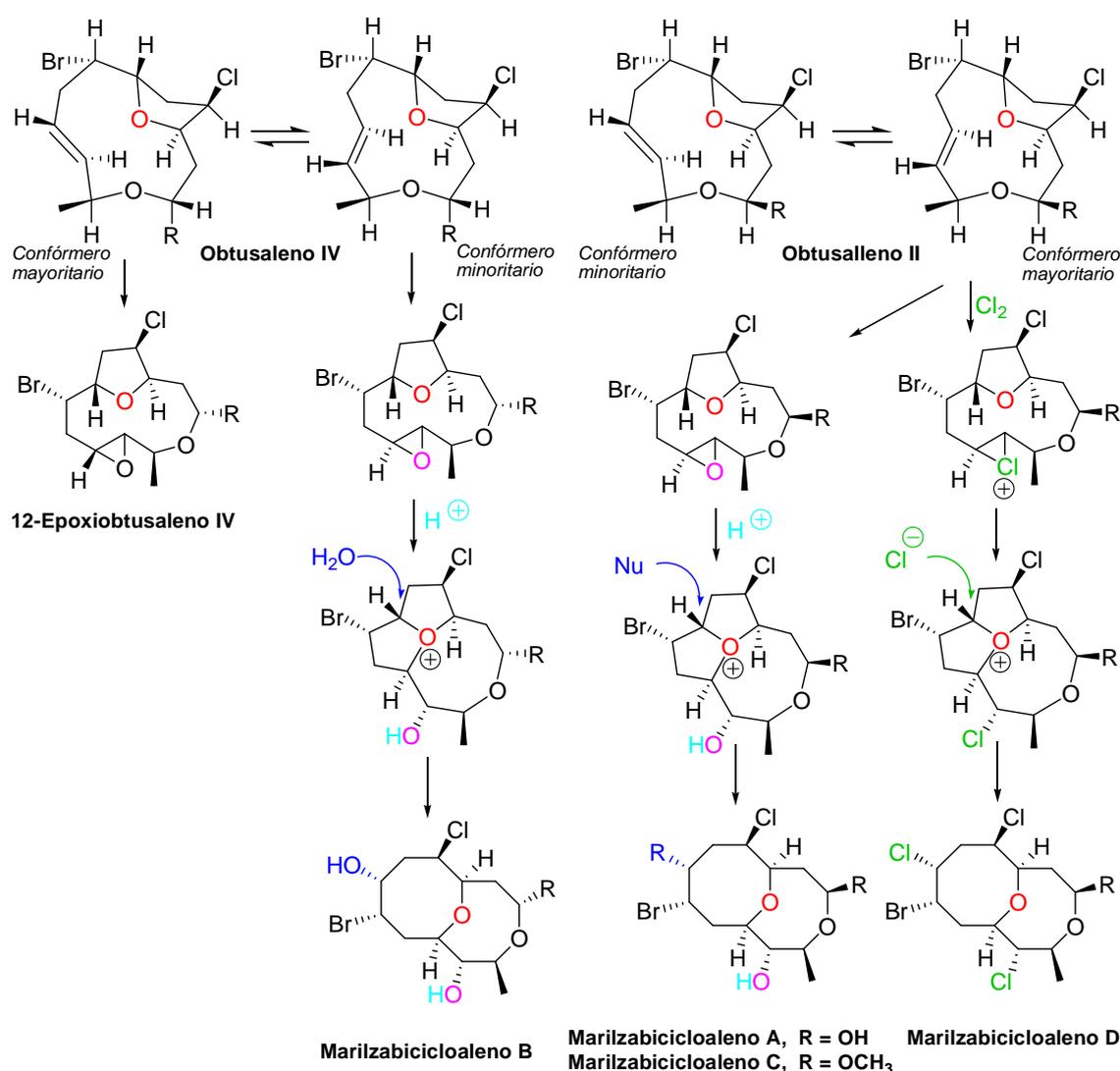


Figura 2.5.2. Propuesta biogénica para la formación del 12-epoxi-obtusaleno IV (5) y los marilzabicicloalenos A-D (1-4) a partir de los obtusalenos II y IV.

2.6. DATOS FÍSICOS DE LOS METABOLITOS AISLADOS

2.6.1. Marilzabicicloaleno A (1)

Sólido amorfo blanco.

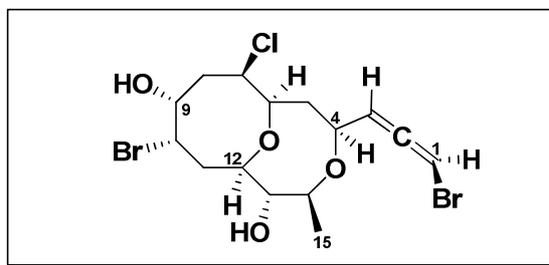
$[\alpha]_D^{25} = -126$ (*c* 0.11, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 202$ nm (log ϵ 3.94).

DC (CH₃CN) $\lambda_{max} = 220$ nm ($\Delta\epsilon$ -1.92).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3365, 3055, 2951, 2902, 1958, 1428, 1372, 1141, 1074, 1027$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: para C₁₅H₂₁⁷⁹Br₂³⁵ClO₄Na, C₁₅H₂₁⁷⁹Br⁸¹Br³⁵ClO₄Na, C₁₅H₂₁⁷⁹Br⁸¹Br³⁷ClO₄Na; [M + Na]⁺ *m/z* 480.9358, 482.9375, 484.9342; a. r.: 56:100:82; (calc. 480.9393, 482.9372, 484.9343).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

N° C	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.1	6.05	dd	2.1, 5.7
2	200.9			
3	103.2	5.47	dd	5.5, 5.7
4	81.1	4.33	dddd	1.8, 2.1, 5.5, 11.3
5	38.7	β 2.13	ddd	10.9, 11.3, 14.5
		α 1.48	ddd	1.8, 1.8, 14.5
6	86.4	3.87	ddd	1.8, 1.8, 10.9
7	63.6	4.14	ddd	1.8, 1.9, 5.7
8	44.4	α 2.98	ddd	1.9, 7.4, 15.8
		β 2.11	ddd	1.1, 5.7, 15.8
9	70.3	4.58	ddd	1.1, 1.3, 7.4
10	64.8	4.83	ddd	1.3, 3.5, 4.0
11	41.7	α 2.59	ddd	1.3, 4.0, 15.3
		β 2.31	ddd	3.5, 10.6, 15.3
12	84.2	3.71	ddd	1.3, 9.0, 10.6
13	74.7	3.26	dd	8.7, 9.0
14	85.1	3.57	dd	6.2, 8.7
15	20.6	1.35 (3H)	d	6.2

2.6.2. Marilzabicicloaleno B (2)

Sólido amorfo blanco.

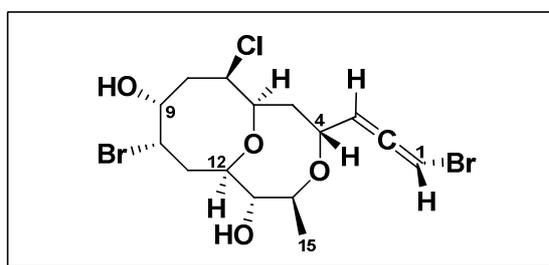
$[\alpha]_D^{25} = +94$ (c 0.13, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 202$ nm (log ϵ 4.16).

DC (CH₃CN) $\lambda_{max} = 219$ nm ($\Delta\epsilon$ +1.96).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3355, 3055, 2956, 2909, 1959, 1712, 1603, 1431, 1376, 1262, 1149, 1023, \text{cm}^{-1}$.

ESI-HRMS: para C₁₅H₂₁⁷⁹Br₂³⁵ClO₄Na, C₁₅H₂₁⁷⁹Br⁸¹Br³⁵ClO₄Na, C₁₅H₂₁⁷⁹Br⁸¹Br³⁷ClO₄Na; [M + Na]⁺ m/z 480.9378, 482.9382, 484.9413; a. r.: 26:59:47; (calc. 480.9393, 482.9372, 484.9343).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	73.9	6.03	dd	1.6, 5.7
2	201.0			
3	102.8	5.42	dd	5.7, 6.5
4	67.4	4.34	dddd	1.6, 4.7, 6.5, 10.9
5	37.8	β 2.09	ddd	4.7, 10.8, 13.7
		α 1.68	ddd	1.8, 10.9, 13.7
6	82.5	3.98	ddd	1.8, 1.9, 10.8
7	63.1	4.15	ddd	1.8, 1.9, 5.6
8	45.0	α 2.99	ddd	1.8, 7.5, 15.7
		β 2.16	dddd	0.8, 0.8, 5.6, 15.7
9	70.4	4.54	<i>br</i> d	7.5
10	64.9	4.86	<i>br</i> dd	3.5, 4.2
11	40.7	α 2.53	ddd	1.3, 4.2, 15.2
		β 2.26	ddd	3.5, 11.2, 15.2
12	82.2	3.78	ddd	1.3, 8.8, 11.2
13	76.0	3.48	m	
14	79.1	3.68	dd	6.6, 8.8
15	18.1	1.42 (3H)	d	6.6

2.6.3. Marilzabicicloaleno C (3)

Sólido amorfo blanco.

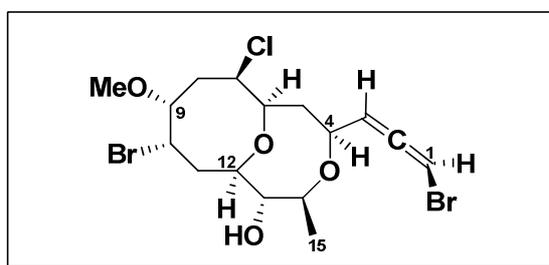
$[\alpha]_D^{25} = -50$ (*c* 0.03, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 203$ nm (log ϵ 3.97).

DC (CH₃CN) $\lambda_{max} = 220$ nm ($\Delta\epsilon$ -7.72).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3442, 3059, 2925, 1959, 1731, 1648, 1433, 1372, 1259, 1141, 1086, 1045$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: para C₁₆H₂₃⁷⁹Br₂³⁵ClO₄Na, C₁₆H₂₃⁷⁹Br⁸¹Br³⁵ClO₄Na, C₁₆H₂₃⁷⁹Br⁸¹Br³⁷ClO₄Na; [M + Na]⁺ *m/z* 494.9570, 496.9541, 498.9563; a. r.: 22:53:37; (calc. 494.9549, 496.9529, 498.9499).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.1	6.05	dd	2.1, 5.6
2	200.9			
3	103.2	5.47	dd	5.5, 5.6
4	81.1	4.33	dddd	2.0, 2.1, 5.5, 11.3
5	38.7	β 2.13	ddd	10.9, 11.3, 14.8
		α 1.49	ddd	1.7, 2.0, 14.8
6	86.7	3.89	ddd	1.7, 1.9, 10.9
7	63.9	4.18	ddd	1.8, 1.9, 5.7
8	40.4	α 2.90	ddd	1.8, 7.1, 16.0
		β 2.17	ddd	1.1, 5.7, 16.0
9	79.0	4.06	ddd	1.0, 1.1, 7.1
10	61.0	4.85	ddd	1.0, 3.3, 4.1
11	42.2	α 2.59	ddd	1.4, 4.1, 15.1
		β 2.27	ddd	3.3, 10.0, 15.1
12	84.5	3.74	ddd	1.4, 9.9, 10.0
13	74.7	3.26	dd	9.0, 9.9
14	85.1	3.57	dd	6.2, 9.0
15	20.6	1.35 (3H)	d	6.2
CH ₃ O-	56.1	3.37 (3H)	s	

2.6.4. Marilzabicicloaleno D (4)

Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = -28$ (c 0.05, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 202$ nm (log ϵ 3.55).

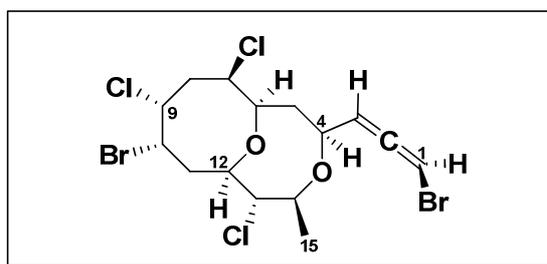
DC (CH₃CN) $\lambda_{max} = 219$ nm ($\Delta\epsilon$ -2.92).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 2930, 2859, 1957, 1730, 1445, 1414, 1355, 1293, 1139, 1025$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: para C₁₅H₁₉⁷⁹Br₂³⁵Cl₃O₂Na, C₁₅H₁₉⁷⁹Br₂³⁵Cl₂³⁷ClO₂Na,

C₁₅H₁₉⁷⁹Br⁸¹Br³⁵Cl₂³⁷ClO₂Na; [M + Na]⁺ m/z 516.8801, 518.8710, 520.8683; a. r.:

36:95:100; (calc. 516.8715, 518.8686, 520.6365).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

Nº C	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.3	6.07	dd	2.1, 5.6
2	201.0			
3	102.7	5.43	dd	5.5, 5.6
4	81.1	4.35	dddd	2.1, 2.1, 5.5, 11.2
5	38.3	β 2.18	ddd	11.2, 11.2, 14.7
		α 1.52	ddd	1.7, 2.1, 14.7
6	86.2	3.93	ddd	1.7, 1.9, 11.2
7	63.4	4.06	ddd	1.9, 1.9, 5.4
8	45.2	α 3.24	ddd	1.9, 7.8, 16.4
		β 2.62	dddd	1.1, 1.1, 5.4, 16.4
9	60.1	5.01	ddd	1.1, 1.1, 7.8
10	62.9	4.96	ddd	1.1, 3.2, 4.2
11	44.1	α 2.78	ddd	1.2, 4.2, 15.1
		β 2.35	ddd	3.2, 10.5, 15.1
12	84.3	3.96	ddd	1.2, 9.8, 10.5
13	63.0	3.51	dd	9.8, 9.8
14	85.1	3.75	dd	6.2, 9.8
15	22.4	1.46 (3H)	d	6.2

2.6.5. 12-Epoxi-obtusaleno IV (5)

Sólido cristalino.

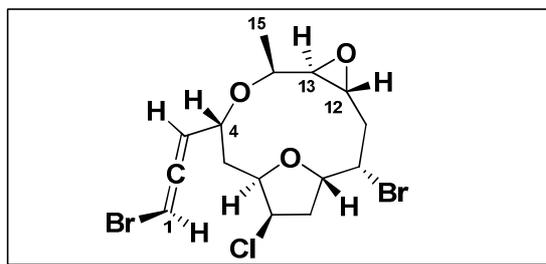
Punto de fusión: 143-145 °C.

$[\alpha]_D^{25} = +53$ (c 0.12, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 204$ nm (log ϵ 4.43).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3060, 2958, 2927, 2861, 1959, 1380, 1265, 1122, 1076, 1032$ cm⁻¹.

ESI-FTICR: para C₁₅H₁₉⁷⁹Br₂³⁵ClO₃Na, C₁₅H₁₉⁷⁹Br⁸¹Br³⁵ClO₃Na, C₁₅H₁₉⁸¹Br₂³⁵ClO₃Na; [M + Na]⁺ m/z 462.9285, 464.9262, 466.9241; a. r.: 23:43:34; (calc. 462.9287, 464.9267, 466.9246).



Datos de RMN ¹H (500 MHz) y RMN ¹³C (125 MHz) en CDCl₃

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.1	6.04	dd	1.7, 5.7
2	201.1			
3	103.4	5.37	dd	5.7, 6.4
4	66.4	4.45	dddd	1.7, 1.8, 6.4, 11.0
5	37.7	β 1.89	ddd	1.8, 10.8, 13.8
		α 1.74	ddd	1.9, 11.0, 13.8
6	79.2	4.27	ddd	1.8, 1.9, 10.8
7	62.1	4.41	br dd	1.8, 4.4
8	39.0	β 2.50	dd	6.5, 14.4
		α 2.43	ddd	4.4, 9.5, 14.4
9	77.8	4.76	ddd	5.9, 6.5, 9.5
10	46.9	4.50	ddd	2.9, 5.9, 12.7
11	35.8	β 2.64	dd	2.9, 15.0
		α 1.89	ddd	8.7, 12.7, 15.0
12	53.9	3.18	dd	2.1, 8.7
13	61.6	3.03	dd	2.1, 3.4
14	72.2	4.54	dd	3.4, 7.1
15	10.2	1.08 (3H)	d	7.1

2.6.6. 12-Epoxi-obtusaleno IVB (6)

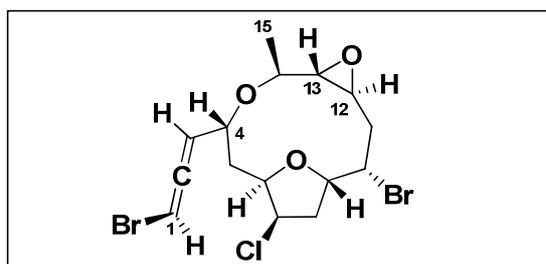
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +127$ (*c* 0.12, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 203$ nm (log ϵ 3.59).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3442, 2973, 2930, 1958, 1729, 1377, 1265, 1129, 1087, 1044$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: para C₁₅H₁₉⁷⁹Br₂³⁵ClO₃Na, C₁₅H₁₉⁷⁹Br⁸¹Br³⁵ClO₃Na, C₁₅H₁₉⁸¹Br₂³⁵ClO₃Na, C₁₅H₁₉⁸¹Br₂³⁷ClO₃Na; [M + Na]⁺ *m/z* 462.9291, 464.9272, 466.9248, 468.9232; a. r.: 45:100:100:15; (calc. 462.9287, 464.9267, 466.9246, 468.9217).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	73.9	6.04	dd	1.0, 5.6
2	200.6			
3	103.8	5.40	dd	5.7, 5.8
4	67.9	4.52	m	
5	37.3	β 2.02	ddd	2.3, 11.2, 14.9
		α 1.75	ddd	2.5, 11.5, 14.9
6	77.5	4.47	m	
7	62.5	4.56	m	
8	41.9	2.94	dt	6.5, 14.8
		2.53	ddd	1.0, 8.0, 14.8
9	79.1	4.57	m	
10	52.8	4.29	m	
11	35.7	β 2.72	ddd	7.1, 8.9, 15.1
		α 1.97	dd	6.1, 15.1
12	57.3	3.28	m	
13	61.2	3.29	m	
14	77.3	3.29	m	
15	18.2	1.45 (3H)	d	6.1

Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en C_6D_6

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.0	5.60	dd	1.1, 5.9
2	200.8			
3	104.4	5.02	dd	5.9, 6.7
4	68.0	4.22	dddd	1.1, 3.1, 6.7, 11.5
5	37.5	β 1.91	ddd	3.1, 10.4, 13.7
		α 1.44	ddd	3.5, 11.5, 13.7
6	77.6	4.05	dt	3.5, 10.4
7	62.8	3.86	<i>br</i> d	3.5, 6.2
8	41.8	2.32	ddd	5.9, 6.2, 14.7
		2.06	dd	7.8, 14.7
9	79.0	3.93	m	
10	53.3	3.48	dd	2.3, 8.7
11	35.9	α 2.22	ddd	3.1, 8.7, 15.0
		β 1.54	dd	6.3, 15.0
12	56.9	3.06	ddd	1.9, 3.1, 6.3
13	60.9	2.90	dd	1.9, 8.7
14	77.4	3.24	dd	6.8, 8.7
15	18.2	1.30 (3H)	d	6.8

2.6.7. Bromopropargilo del 12-epoxi-obtusaleno IV (7)

Sólido cristalino.

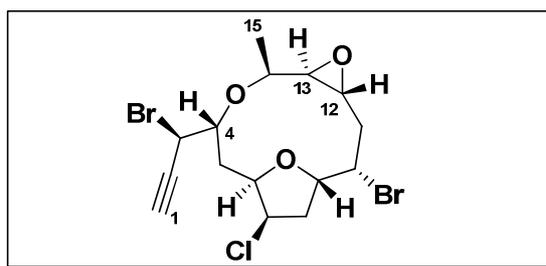
Punto de fusión: 120-122 °C

$[\alpha]_D^{25} = -5$ (c 0.1, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 202$ nm (log ϵ 4.06).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3289, 2854, 2117, 1732, 1570, 1450, 1384, 1261, 1092, 1029$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: para C₁₅H₁₉⁷⁹Br⁸¹Br³⁵ClO₃Na; [M + Na]⁺ m/z 464.9275; (calc. 464.9267).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

N° C	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	77.0	2.68	s	
2	79.2			
3	37.7	4.42	d	3.9
4	71.0	4.06	ddd	1.8, 3.9, 11.2
5	31.9	β 2.31	ddd	1.8, 10.8, 14.0
		α 1.92	ddd	1.8, 11.2, 14.0
6	78.9	4.23	ddd	1.8, 1.8, 10.8
7	62.1	4.44	<i>br</i> dd	1.8, 4.5
8	38.9	β 2.51	dd	6.8, 14.4
		α 2.43	ddd	4.5, 9.7, 14.4
9	77.9	4.80	ddd	5.8, 6.8, 9.7
10	46.8	4.49	ddd	2.9, 5.8, 12.6
11	35.5	β 2.63	dd	2.9, 14.9
		α 1.88	ddd	8.7, 12.6, 14.9
12	54.1	3.14	dd	2.1, 8.7
13	61.1	3.05	dd	2.1, 3.5
14	72.5	4.59	dd	3.5, 7.1
15	10.1	1.09 (3H)	d	7.1

2.6.8. 1-Metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (8)

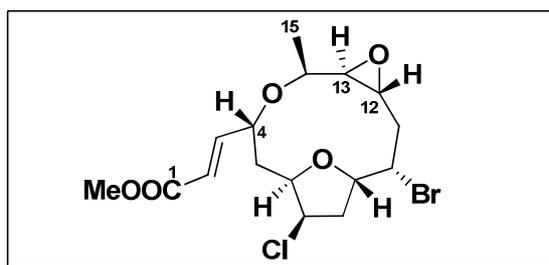
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +63$ (c 0.10, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 204$ nm (log ϵ 3.93).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3475, 2953, 2925, 2855, 1721, 1658, 1446, 1382, 1278, 1168, 1094, 1027$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: para C₁₆H₂₂⁷⁹Br³⁵ClO₅Na, C₁₆H₂₂⁷⁹Br³⁷ClO₅Na; [M + Na]⁺ *m/z* 431.0257, 433.0280; a. r.: 33:42; (calc. 431.0237, 433.0207).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	167.0			
2	120.2	6.10	dd	1.8, 15.5
3	150.2	6.94	dd	4.0, 15.5
4	67.9	4.45	dddd	1.8, 1.8, 4.0, 11.2
5	37.3	β 1.89	ddd	1.8, 10.8, 14.0
		α 1.58	ddd	1.8, 11.2, 14.0
6	79.0	4.30	ddd	1.8, 1.8, 10.8
7	62.0	4.42	<i>br</i> dd	1.8, 4.5
8	39.0	β 2.52	dd	6.8, 14.4
		α 2.45	ddd	4.5, 9.7, 14.4
9	77.3	4.78	ddd	5.8, 6.8, 9.7
10	46.8	4.51	ddd	2.9, 5.8, 12.6
11	35.7	β 2.65	dd	2.9, 14.9
		α 1.91	ddd	8.7, 12.6, 14.9
12	54.0	3.17	dd	2.1, 8.7
13	61.6	3.08	dd	2.1, 3.5
14	72.0	4.59	dd	3.5, 7.1
15	10.0	0.99 (3H)	d	7.1
CH ₃ O-	51.8	3.75 (3H)	s	

2.6.9. Clorohidrina del 1-metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (9)

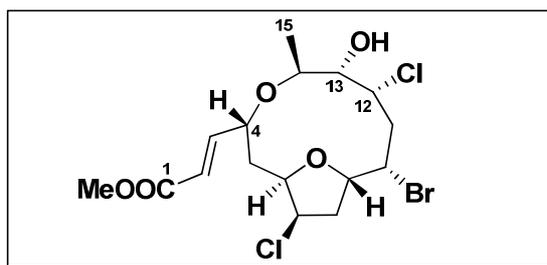
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +9$ (c 0.06, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 203$ nm (log ϵ 3.32).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3443, 2919, 2850, 1721, 1656, 1438, 1349, 1278, 1168, 1087$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: para C₁₆H₂₃⁷⁹Br³⁵Cl₂O₅Na, C₁₆H₂₃⁸¹Br³⁵Cl₂O₅Na, C₁₆H₂₃⁷⁹Br³⁵Cl³⁷ClO₅Na, C₁₆H₂₃⁷⁹Br³⁷Cl₂O₅Na; [M + Na]⁺ m/z 467.0000, 468.9984, 468.9984, 470.9964; a. r.: 64:100:100:49; (calc. 467.0004, 468.9983, 468.9974, 470.9945).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	166.4			
2	121.8	6.05	dd	1.3, 15.8
3	148.8	7.10	dd	6.2, 15.8
4	70.7	4.55	dddd	1.3, 2.5, 6.2, 9.4
5	36.0	β 2.16	ddd	2.5, 11.1, 14.5
		α 1.60	ddd	2.6, 9.4, 14.5
6	76.9	4.22	ddd	2.6, 3.5, 11.1
7	60.8	4.48	br dd	3.5, 6.1
8	40.5	2.56	ddd	6.1, 9.1, 14.4
		2.39	dd	6.7, 14.4
9	76.3	4.65	ddd	4.5, 6.7, 9.1
10	47.5	4.51	ddd	2.4, 4.5, 11.7
11	43.9	α 2.67	ddd	1.1, 11.7, 15.5
		β 2.57	ddd	2.4, 9.6, 15.5
12	62.4	4.80	br dd	4.0, 9.6
13	76.7	3.77	dd	3.4, 4.0
14	74.5	4.19	dd	3.4, 6.9
15	11.6,	1.21 (3H)	d	6.9
CH ₃ O-	51.8	3.76 (3H)	s	

2.6.10. Obtusaleno X (10)

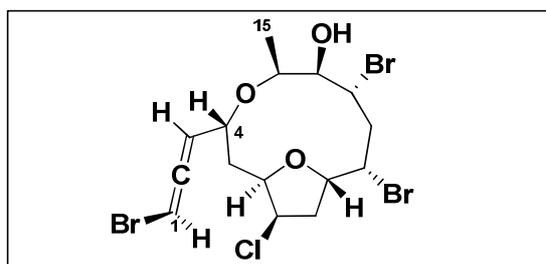
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +20$ (c 0.29, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 204$ nm (log ϵ 4.04).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3455, 3057, 2926, 1957, 1380, 1261, 1186, 1145, 1073, 1030$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: para C₁₅H₂₀⁷⁹Br₂⁸¹Br³⁵ClO₃Na, C₁₅H₂₀⁷⁹Br₂⁸¹Br³⁷ClO₃Na, C₁₅H₂₀⁷⁹Br⁸¹Br₂³⁷ClO₃Na; [M + Na]⁺ m/z 544.8540, 546.8513, 548.8574; a. r.: 34:42:24; (calc. 544.8528, 546.8499, 548.8478).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) de los confórmers en CDCl₃

Obtusaleno X (10a)					Obtusaleno X (10b)			
Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult.	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult.	J (Hz)
1	73.5	6.03	<i>br d</i>	5.6	73.5	[a]		73.5
2	202.2				202.1			
3	99.9	5.74	<i>dd</i>	5.6, 8.9	100.2	5.70	<i>dd</i>	5.6, 8.7
4	70.4	4.55	<i>m</i>		70.2	[a]		
5	35.3	β 2.37 α 1.72	<i>ddd</i> <i>ddd</i>	1.8, 12.0, 14.4 3.8, 7.3, 14.4	35.4	2.33 [a]	<i>ddd</i>	2.0, 12.3, 14.3
6	76.4	4.39	<i>ddd</i>	3.8, 4.8, 12.0	[a]	4.37	<i>br dd</i>	3.5, 12.3
7	59.7	4.58	<i>m</i>		59.9	[a]		
8	41.1	α 2.54 β 2.26	<i>m</i> <i>br dd</i>	5.7, 13.7	41.3	[a] 2.25	<i>br dd</i>	5.6, 13.6
9	74.2	4.49	<i>m</i>		74.6	[a]		
10	48.6	4.46	<i>m</i>		48.2	4.44	<i>m</i>	
11	43.6	α 2.87 β 2.65	<i>br dd</i> <i>ddd</i>	12.1, 15.5 2.3, 9.3, 15.5	43.0	α 2.75 β 2.50	<i>br dd</i> <i>ddd</i>	11.8, 15.3 2.0, 8.9, 15.3
12	58.1	4.59	<i>m</i>		63.5	4.55	<i>m</i>	
13	76.5	3.69	<i>dd</i>	3.3, 6.1	[a]	3.72	<i>dd</i>	3.7, 6.1
14	73.0	4.18	<i>dd</i>	3.3, 6.5	72.6	4.16	<i>dd</i>	3.7, 6.6
15	13.1	1.36 (3H)	<i>d</i>	6.5	12.7	1.34 (3H)	<i>d</i>	6.6

[a] Señal superpuesta con la del confórmero 10a.

Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) de los confómeros en C_6D_6

10a					10b			
N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult.	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult.	J (Hz)
1	72.5	5.57	<i>br d</i>	5.7	[a]	[a]		
2 ^b								
3	100.0	5.22	dd	5.7, 8.8	100.2	5.20	dd	5.6, 8.7
4	69.8	4.10	m		[a]	[a]		
5	34.7	β 2.02	m		[a]	[a]		
		α 1.19	m			[a]		
6	75.6	3.66	m		[a]	[a]		
7	59.1	3.82	<i>br d</i>	7.2	59.2	3.80	<i>br d</i>	8.3
8	40.5	α 2.00	m		[a]	[a]		
		β 1.70	ddd	5.2, 8.9, 14.3		β 1.66	ddd	5.2, 9.4, 13.8
9	73.3	3.97	ddd	2.6, 5.4, 8.9	73.7	3.95	ddd	3.3, 5.7, 9.4
10	48.7	4.13	m		48.4	4.09	m	
11	43.4	2.47 (2H)	m		43.0	2.33 (2H)	m	
12	58.5	4.28	ddd	2.4, 6.2, 8.2	63.6	4.24	ddd	2.4, 7.3, 9.5
13	76.3	3.21	dd	4.0, 6.2	[a]	3.24	dd	4.1, 7.3
14	72.1	3.66	m		72.3	3.69	m	
15	12.7	1.33 (3H)	m		12.5	1.32 (3H)	m	

 [a] Señal superpuesta con la del confómero **10a**. ^b Señal no observada.

 Datos de RMN ^1H (500 MHz) y RMN ^{13}C (125 MHz) de los confómeros en CD_3OD

10a					10b			
N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult.	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult.	J (Hz)
1	72.7	6.31	<i>br dd</i>	5.7	[a]	[a]		
2 ^b								
3	100.7	5.71	dd	5.4, 5.7	100.8	5.69	dd	5.4, 5.7
4	69.2	4.54	m		[a]	[a]		
5	35.4	β 2.17	m		[a]	2.14	m	
		α 1.73	ddd	3.2, 8.6, 14.5	[a]	[a]		
6	76.6	4.35	ddd	3.2, 4.0, 10.9	[a]	4.32	ddd	3.2, 3.9, 11.0
7	60.8	4.63	m		[a]	[a]		
8	40.3	α 2.64	dddd	1.9, 6.8, 8.8, 14.3	[a]	α 2.61	m	
		β 2.31	dddd	1.0, 3.8, 6.3, 14.3	[a]	[a]		
9	75.6	4.60	m		74.6	[a]		
10	48.6	4.61	m		[a]	4.58	m	
11	44.2	α 2.92	ddd	1.2, 12.7, 15.6	43.4	α 2.82	ddd	1.2, 11.7, 15.2
		β 2.59	ddd	2.1, 9.9, 15.6		β 2.44	ddd	2.3, 9.7, 15.2
12	55.0	4.67	ddd	1.2, 4.9, 9.9	60.8	4.62	m	
13	76.6	3.70	dd	3.3, 4.9	[a]	3.77	dd	3.4, 4.5
14	74.3	4.17	dd	3.3, 6.7	74.5	4.14	dd	3.4, 6.8
15	11.4	1.36 (3H)	d	6.7	11.1	1.34 (3H)	d	6.8

 [a] Señal superpuesta con la del confómero **10a**. ^b Señal no observada.

2.6.11. Marilzaleno (11)

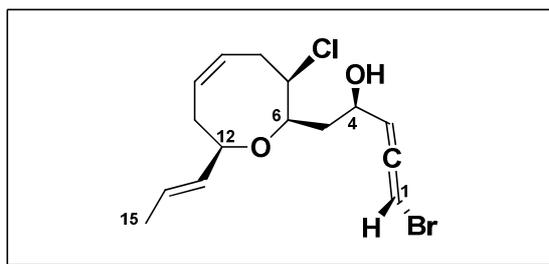
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +77$ (c 0.11, CHCl_3).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 202$ nm (log ϵ 3.97).

IR (CHCl_3) $\nu_{max} = 3421, 3022, 2926, 2854, 1958, 1720, 1646, 1451, 1378, 1190, 1093, 1064, 1042, 1011$ cm^{-1} .

ESI-HRMS: para $\text{C}_{15}\text{H}_{20}^{79}\text{Br}^{35}\text{ClO}_2\text{Na}$, $\text{C}_{15}\text{H}_{20}^{81}\text{Br}^{35}\text{ClO}_2\text{Na}$, $\text{C}_{15}\text{H}_{20}^{79}\text{Br}^{37}\text{ClO}_2\text{Na}$; $[\text{M} + \text{Na}]^+$ m/z 369.0234, 371.0215, 373.0193; a. r.: 27:100:78; (calc. 369.0233, 371.0212, 373.0183).



Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en CDCl_3

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	75.3	6.15	dd	2.2, 5.4
2	200.2			
3	105.1	5.51	dd	5.3, 5.4
4	65.6	4.47	dddd	2.2, 2.9, 5.3, 9.8
5	41.6	β 2.14	ddd	2.9, 10.6, 14.5
		α 1.47	ddd	2.3, 9.8, 14.5
6	75.3	4.25	ddd	2.3, 2.5, 10.6
7	66.5	3.95	ddd	2.5, 5.2, 11.3
8	34.6	β 2.96	ddd	11.2, 11.3, 11.9
		α 2.53	ddd	5.2, 6.3, 11.9
9	128.5	5.69	ddd	6.3, 9.7, 11.2
10	131.2	5.93	ddd	7.1, 8.4, 9.7
11	35.0	β 2.48	ddd	7.1, 8.9, 14.4
		α 2.16	ddd	1.7, 8.4, 14.4
12	81.6	3.97	ddd	1.7, 6.6, 8.9
13	132.2	5.56	ddd	1.8, 6.6, 15.4
14	126.5	5.71	dd	6.4, 15.4
15	17.8	1.68	dd	1.8, 6.4

Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en piridina- d_5 .

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.8	6.47	dd	1.8, 5.9
2	201.1			
3	107.0	5.81	dd	5.9, 5.9
4	65.8	4.86	dddd	1.8, 2.5, 5.9, 10.8
5	43.1	β 2.40	ddd	2.5, 10.4, 14.0
		α 1.86	ddd	2.1, 10.8, 14.0
6	76.1	4.65	ddd	2.1, 2.1, 10.4
7	68.2	4.18	ddd	2.1, 4.7, 11.4
8	35.6	β 3.15	ddd	10.9, 11.4, 11.9
		α 2.55	ddd	4.7, 5.5, 11.9
9	129.2	5.66	ddd	5.5, 10.1, 10.9
10	131.8	5.86	ddd	7.2, 8.5, 10.1
11	35.7	β 2.50	ddd	7.2, 9.3, 14.1
		α 2.14	<i>br</i> dd	8.5, 14.1
12	81.8	4.27	<i>br</i> dd	5.6, 9.3
13	133.7	5.61	ddd	1.1, 5.6, 15.5
14	125.7	5.69	dd	6.3, 15.5
15	18.1	1.54	dd	1.1, 6.3

2.6.12. (+)-4*R*-Acetoxi-marilzaleno (12)

Sólido cristalino.

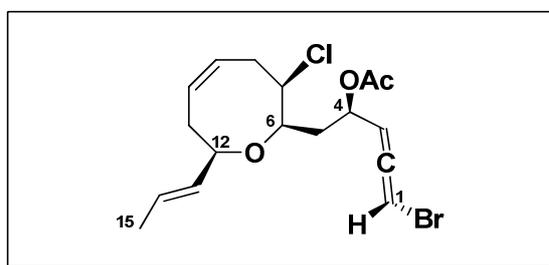
Punto de fusión: 94-96 °C.

$[\alpha]_D^{25} = +89$ (c 0.06, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 201$ nm (log ϵ 3.97).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3023, 2928, 2855, 1962, 1743, 1641, 1450, 1370, 1232, 1106, 1057, 1019$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: para C₁₇H₂₂⁷⁹Br³⁵ClO₃Na, C₁₇H₂₂⁷⁹Br³⁷ClO₃Na, C₁₇H₂₂⁸¹Br³⁷ClO₃Na; [M + Na]⁺ m/z 411.0334, 413.0298, 415.0358; a. r.: 85:100:39; (calc. 411.0339, 413.0309, 415.0289).



Datos de RMN ¹H (500 MHz) y RMN ¹³C (125 MHz) en CDCl₃

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	75.0	6.09	dd	2.0, 5.3
2	201.4			
3	100.6	5.46	m	
4	67.4	5.45	dddd	2.0, 2.0, 4.7, 9.3
5	39.1	β 2.18	ddd	2.0, 10.2, 15.0
		α 1.71	ddd	2.3, 9.3, 15.0
6	75.1	3.97	ddd	2.3, 2.3, 10.2
7	65.9	3.94	ddd	2.3, 4.9, 11.9
8	34.5	β 2.97	ddd	9.9, 11.9, 12.7
		α 2.54	ddd	4.9, 6.9, 12.7
9	128.5	5.69	ddd	6.9, 9.9, 10.4
10	131.2	5.90	ddd	7.0, 8.3, 10.4
11	34.8	β 2.48	ddd	7.0, 9.6, 14.4
		α 2.15	ddd	1.8, 8.3, 14.4
12	82.1	3.63	dddd	1.1, 1.8, 6.9, 9.6
13	131.6	5.54	ddd	1.6, 6.9, 15.4
14	127.3	5.72	ddd	1.1, 6.5, 15.4
15	17.9	1.69 (3H)	dd	1.6, 6.5
CO (Ac)	170.0			
CH ₃ (Ac)	21.1	2.09 (3H)	s	

2.6.13. (-)-4-Acetoxi-marilzaleno (13)

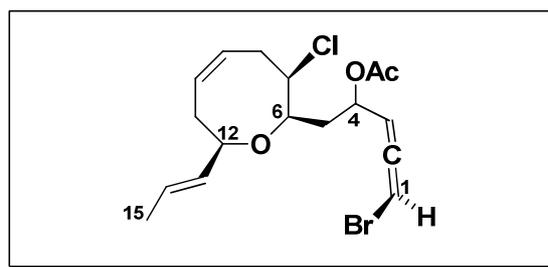
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = -58$ (c 0.08, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 202$ nm (log ϵ 3.99).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 2961, 2926, 2856, 1950, 1731, 1634, 1534, 1380, 1266, 1238, 1077, 1019, 1011$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: para C₁₇H₂₂⁸¹Br³⁵ClO₃Na, [M + Na]⁺ m/z 413.2685, (calc. 413.0318).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

Nº C	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.9,	6.10	dd	1.9, 5.6
2	202.4			
3	99.5	5.58	dd	5.5, 5.6
4	67.7	5.40	dddd	1.9, 4.6, 5.5, 8.8
5	38.3	β 2.20	ddd	4.6, 9.3, 14.1
		α 1.87	ddd	3.5, 8.8, 14.1
6	73.8	3.96	ddd	2.5, 3.5, 9.3
7	65.6	3.99	ddd	2.5, 4.8, 11.3
8	34.4	β 2.96	ddd	9.9, 11.3, 12.3
		α 2.53	ddd	4.8, 6.5, 12.3
9	128.6	5.69	ddd	6.5, 9.9, 10.3
10	131.0	5.91	ddd	7.1, 8.3, 10.3
11	34.8	β 2.48	ddd	7.1, 8.9, 14.3
		α 2.17	ddd	1.6, 8.3, 14.3
12	81.7	3.76	dddd	1.6, 1.6, 6.3, 8.9
13	131.7	5.54	ddd	2.3, 6.3, 15.4
14	126.8	5.72	ddd	1.6, 6.5, 15.4
15	17.8	1.70 (3H)	dd	2.3, 6.5
CO (Ac)	170.0			
CH ₃ (Ac)	21.0	2.06 (3H)	s	

2.6.14. Marilzafuraleno A (14)

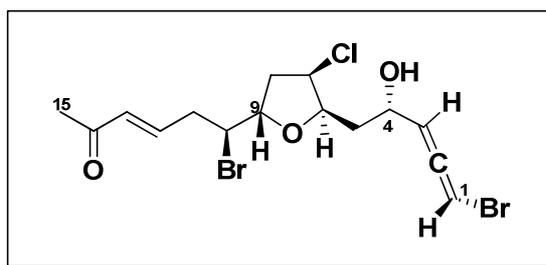
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +32$ (c 0.06, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 205$ nm (log ϵ 3.58).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3439, 2928, 1962, 1729, 1684, 1663, 1447, 1368, 1263, 1072$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: m/z 462.9298, 464.9296, 466.9330 [M + Na]⁺; 38:100:42; (calc. para C₁₅H₁₉⁷⁹Br₂³⁵ClO₃Na 462.9287, C₁₅H₁₉⁷⁹Br⁸¹Br³⁵ClO₃Na 464.9267, C₁₅H₁₉⁸¹Br₂³⁵ClO₃Na 466.9246).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

Nº C	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.9	6.13	dd	2.2, 5.6
2	200.6			
3	104.1	5.52	dd	5.6, 5.6
4	66.4	4.56	ddd	3.6, 5.6, 8.2
5	38.3	b 2.13	ddd	3.6, 8.8, 14.4
		a 1.88	ddd	3.6, 8.2, 14.4
6	80.0	4.48	ddd	3.0, 3.6, 8.8
7	63.2	4.55	ddd	0.8, 3.0, 4.8
8	40.9	α 2.55	ddd	4.8, 9.6, 13.9
		β 2.42	ddd	0.8, 6.2, 13.9
9	79.1	4.46	ddd	3.0, 6.2, 9.6
10	55.6	4.10	ddd	3.0, 5.2, 8.5
11	38.5	2.90 (2H)	m	
12	143.2	6.83	ddd	7.0, 7.0, 15.9
13	133.4	6.18	ddd	1.4, 1.4, 15.9
14	198.5			
15	27.3	2.28 (3H)	s	

2.6.15. Marilzafuraleno B (15)

Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +60$ (c 0.10, CHCl₃).

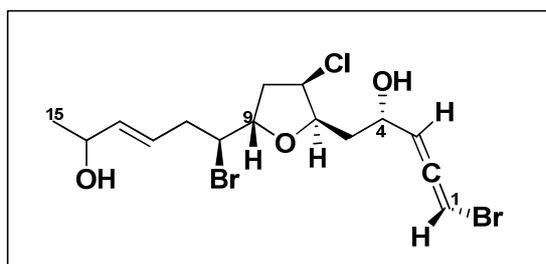
UV (MeOH) $\lambda_{max} = 203$ nm (log ϵ 3.49).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3413, 2965, 1962, 1724, 1634, 1444, 1376, 1266, 1194, 1065, \text{cm}^{-1}$.

ESI-HRMS: m/z 464.9453, 466.9432, 468.9418, 470.9395 [M + Na]⁺; a. r.: 46:100:71:15;

(calc. para C₁₅H₂₁⁷⁹Br₂³⁵ClO₃Na 464.9444, C₁₅H₂₁⁷⁹Br⁸¹Br³⁵ClO₃Na 466.9423,

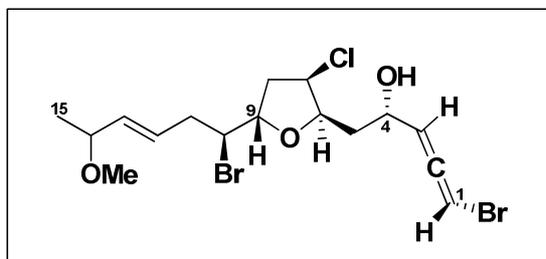
C₁₅H₂₁⁸¹Br₂³⁵ClO₃Na 468.9403, C₁₅H₂₁⁸¹Br₂³⁷ClO₃Na 470.9373).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

N° C	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.8	6.13	dd	2.2, 5.7
2	200.6			
3	104.1	5.52	dd	5.5, 5.7
4	66.5	4.57	ddd	3.6, 5.5, 7.7
5	38.1	2.15	ddd	3.6, 9.1, 14.5
		1.86	ddd	3.5, 7.7, 14.5
6	79.7	4.46	ddd	3.3, 3.5, 9.1
7	63.3	4.53	ddd	0.8, 3.3, 4.8
8	40.7	α 2.52	ddd	4.8, 9.6, 13.9
		β 2.39	ddd	0.8, 6.2, 13.9
9	79.1	4.47	dddd	3.1, 6.2, 9.6
10	57.3	4.06	ddd	3.1, 5.7, 7.9
11	38.5	2.70 (2H)	m	
12	126.2	5.72	ddd	6.4, 7.0, 15.6
13	137.6	5.65	br dd	6.1, 15.6
14	68.5	4.30	dd	6.1, 6.3
15	23.4	1.28 (3H)	d	6.3

2.6.16. Marilzafuraleno C (16)



Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en CDCl_3

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.8	6.13	ddd	1.5, 2.2, 5.6
2	200.8			
3	104.2	5.53	dd	5.6, 5.6
4	66.6	4.57	ddd	3.4, 5.6, 8.0
5	38.2	2.14	ddd	3.4, 8.7, 14.0
		1.87	ddd	3.1, 8.0, 14.0
6	79.8	4.46	ddd	2.5, 3.1, 8.7
7	63.4	4.54	ddd	2.5, 3.4, 4.5
8	40.9	α 2.52	ddd	4.5, 8.9, 14.1
		β 2.39	ddd	3.4, 6.3, 14.1
9	79.1	4.47	ddd	3.4, 6.3, 8.9
10	57.9	4.03	ddd	3.4, 4.6, 8.6
11	38.4	2.71 (2H)	m	
12	128.5	5.67	ddd	7.0, 7.2, 15.5
13	135.8	5.48	dddd	1.5, 1.5, 6.8, 15.5
14	77.7	3.72	dd	6.5, 6.8
15	21.3	1.24 (3H)	d	6.5
$\text{CH}_3\text{O}-$	56.0	3.28 (3H)	s	

2.6.17. Marilzafuraleno D (17)

Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +22$ (c 0.08, CHCl₃).

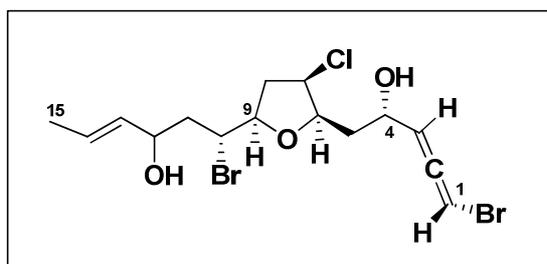
UV (MeOH) $\lambda_{max} = 203$ nm (log ϵ 3.49).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3413, 2965, 1962, 1724, 1634, 1444, 1376, 1266, 1194, 1065$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: m/z 464.9445, 466.9428, 468.9416, 470.9414 [M + Na]⁺; a. r.: 49:100:74:12;

(calc. para C₁₅H₂₁⁷⁹Br₂³⁵ClO₃Na, 464.9445, C₁₅H₂₁⁷⁹Br⁸¹Br³⁵ClO₃Na, 466.9423,

C₁₅H₂₁⁸¹Br⁷⁹Br³⁷ClO₃Na, 468.9394, C₁₅H₂₁⁸¹Br₂³⁷ClO₃Na, 470.9374).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

N° C	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.8	6.12	dd	2.1, 5.6
2	200.6			
3	104.1	5.52	dd	5.6, 5.6
4	66.6	4.57	ddd	3.7, 5.6, 7.8
5	38.2	b 2.15	ddd	3.7, 8.9, 14.3
		a 1.87	ddd	3.6, 7.8, 14.3
6	79.8	4.41	ddd	3.4, 3.6, 8.9
7	63.4	4.54	dd	3.4, 4.5
8	41.1	α 2.56	ddd	4.5, 9.5, 13.9
		β 2.40	dd	6.2, 13.9
9	80.0	4.41	ddd	2.8, 6.2, 9.5
10	56.2	4.35	ddd	2.8, 2.8, 11.3
11	43.1	2.09	ddd	3.4, 11.3, 15.0
		1.91	ddd	2.8, 8.9, 15.0
12	70.4	4.42	ddd	3.4, 3.4, 8.9
13	133.3	5.54	dd	1.4, 6.7, 15.2
14	127.5	5.74	dq	6.4, 15.2
15	17.7	1.70 (3H)	d	6.4

Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en C_6D_6

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	74.1	5.66	dd	2.1, 5.7
2	200.4			
3	104.5	5.00	dd	5.7, 5.7
4	66.1	4.22	m	
5	38.5	1.98	m	
		1.56	m	
6	79.4	4.15	ddd	3.0, 3.3, 8.7
7	63.6	3.84	dd	2.7, 4.4
8	40.7	2.02	m	
		1.83	m	
9	79.8	4.13	ddd	3.0, 6.3, 9.6
10	56.6	4.25	m	
11	43.3	1.98	m	
		1.64	m	
12	79.4	4.27	m	
13	133.3	5.29	m	
14	125.7	5.39	m	
15	17.7	1.47 (3H)	d	6.3

2.6.18. 12-Acetoxi-marilzafurenino (18)

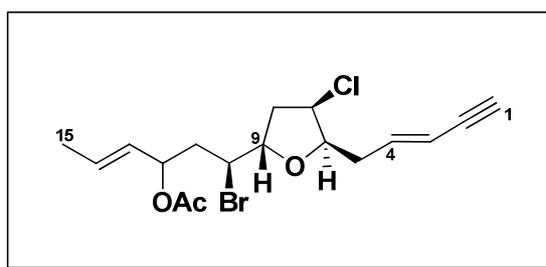
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = -13$ (c 0.07, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 225$ nm (log ϵ 2.79).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3293, 2926, 2326, 1960, 1733, 1645, 1378, 1259, 1188, 1050$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: m/z 411.0332, 413.0320, 415.0298 [M + Na]⁺; a. r.: 77:100:26; (calc. para C₁₇H₂₂⁷⁹Br³⁵ClO₃Na 411.0339, C₁₇H₂₂⁸¹Br³⁵ClO₃Na 413.0318 y C₁₇H₂₂⁷⁹Br³⁷ClO₃Na 413.0309, C₁₇H₂₂⁸¹Br³⁷ClO₃Na, 415.0289).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

Nº C	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	77.0	2.84	<i>br d</i>	1.7
2	82.0			
3	111.9	5.64	dd	1.7, 16.1
4	140.7	6.20	ddd	7.4, 7.4, 16.1
5	35.0	b 2.60 a 2.50	ddd ddd	6.8, 7.4, 14.7 6.8, 7.4, 14.7
6	82.1	4.19	ddd	2.8, 6.8, 6.8
7	62.3	4.49	dd	2.8, 4.8
8	41.0	α 2.56 β 2.38	ddd dd	4.8, 9.8, 13.9 6.1, 13.9
9	79.6	4.39	ddd	2.5, 6.1, 9.8
10	54.8	4.05	ddd	2.5, 3.1, 10.7
11	40.8	2.22 2.17	ddd ddd	3.3, 10.7, 14.3 3.1, 9.8, 14.3
12	72.8	5.48	ddd	3.0, 3.3, 7.1
13	128.7	5.43	ddd	2.3, 6.3, 15.1
14	130.0	5.80	dq	6.5, 15.1
15	17.8	1.69 (3H)	<i>br d</i>	6.5
CO (Ac)	170.2			
CH ₃ (Ac)	21.3	2.05 (3H)	s	

2.6.19. Z-Adrienino (19)

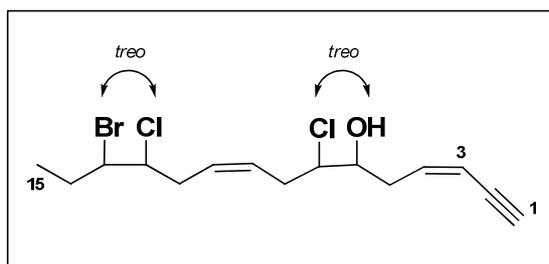
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = -4$ (c 0.11, CHCl_3).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 225$ nm (log ϵ 3.59).

IR (CHCl_3) $\nu_{max} = 3440, 3298, 2934, 2300, 1828, 1728, 1606, 1443, 1385, 1267, 1189, 1095$ cm^{-1} .

ESI-HRMS: para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}^{79}\text{Br}^{35}\text{Cl}_2\text{ONa}$, $\text{C}_{15}\text{H}_{21}^{81}\text{Br}^{35}\text{Cl}_2\text{ONa}$, $\text{C}_{15}\text{H}_{21}^{79}\text{Br}^{37}\text{Cl}_2\text{ONa}$; $[\text{M} + \text{Na}]^+$ m/z 389.0082, 391.0040, 392.9998; a. r.: 26:38:17; (calc. 389.0051, 391.0030, 392.9992).



Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en CDCl_3

N° C	δ ^{13}C (ppm)	δ ^1H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	82.6	3.18	dd	0.7, 2.3
2	80.0			
3	111.2	5.65	dd	2.3, 10.8
4	140.2	6.14	dddd	0.7, 7.3, 7.3, 10.8
5	35.6	2.73	m	
		2.66	m	
6	72.4	3.84	ddd	3.6, 5.1, 7.8
7	67.1	3.99	ddd	3.6, 5.6, 9.0
8	33.1	2.74	m	
		2.66	m	
9	128.4	5.68	m^a	
10	127.9	5.62	m^a	
11	34.1	2.84	ddd	5.6, 7.7, 15.1
		2.62	m	
12	64.3	4.06	ddd	2.6, 5.6, 8.3
13	61.0	4.15	ddd	2.6, 4.4, 9.5
14	28.8	2.06	dd	4.4, 7.3, 14.3
		1.98		7.3, 9.5, 14.3
15	12.6	1.10 (3H)	dd	7.3, 7.3

2.6.20. *E*-Adrienino (20)

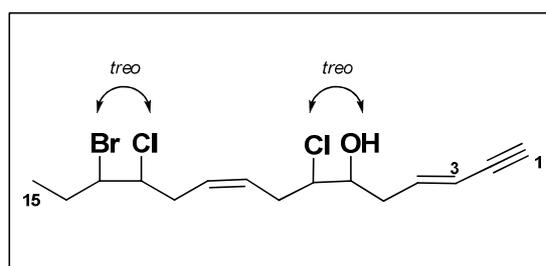
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = -20$ (*c* 0.04, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 225$ nm (log ϵ 3.58).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3411, 3302, 2959, 2925, 2854, 2341, 1725, 1641, 1461, 1379, 1261, 1094, 1030$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: para C₁₅H₂₁⁸¹Br³⁵Cl₂ONa, [M + Na]⁺ *m/z* 391.0165, (calc. 391.0030).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	77.1	2.84	<i>br d</i>	2.0
2	81.8			
3	112.2	5.62	<i>dd</i>	2.0, 15.4
4	140.9	6.22	<i>dddd</i>	7.5, 7.5, 15.4
5	38.5	2.45	<i>m</i>	
		2.45	<i>m</i>	
6	72.0	3.76	<i>m</i>	
7	66.3	3.95	<i>ddd</i>	2.9, 6.0, 8.7
8	33.2	2.71	<i>ddd</i>	6.0, 6.6, 14.7
		2.63	<i>m</i>	
9	128.3	5.63	<i>m</i>	
10	128.0	5.60	<i>m</i>	
11	34.0	2.80	<i>ddd</i>	5.5, 6.3, 14.6
		2.60	<i>ddd</i>	6.0, 8.8, 14.6
12	64.3	4.03	<i>ddd</i>	2.5, 5.5, 8.8
13	61.0	4.12	<i>ddd</i>	2.5, 4.5, 9.0
14	28.8	2.04	<i>ddd</i>	4.5, 7.3, 14.6
		1.95	<i>ddd</i>	7.5, 9.0, 14.6
15	12.6	1.08 (3H)	<i>dd</i>	7.3, 7.5

2.6.21. *E*-dactileno B (21)

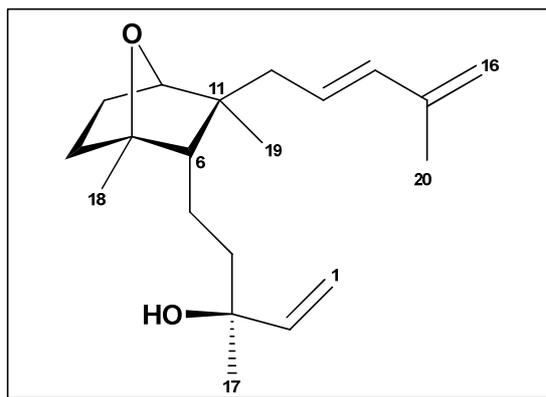
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +2$ (c 0.33, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 238$ nm (log ϵ 4.43).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3418, 2967, 2932, 2880, 1650, 1456, 1127, 1097, 996$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: para C₂₀H₃₂O₂Na, [M + Na]⁺ m/z 327.2167, calc. 327.2300.



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	111.9	5.21/5.06	d/d	17.4/10.8
2	144.7	5.88	dd	10.8, 17.4
3	73.2			
4	42.1	1.54/1.39	m/m	
5	21.1	1.27/1.18	m/m	
6	55.2	1.24	dd	2.4, 7.5
7	88.1			
8	29.1	1.66/1.21	m/m	
9	26.5	1.78/1.60	m/m	
10	84.3	3.95	br d	5.1
11	45.8			
12	47.0	2.17 (2H)	m	
13	127.1	5.61	dt	7.7, 15.5
14	135.8	6.16	d	15.5
15	142.0			
16	114.7	4.88 (2H)	s	
17	27.7	1.27 (3H)	s	
18	21.5	1.39 (3H)	s	
19	17.1	0.87 (3H)	s	
20	18.8	1.87 (3H)	s	

2.6.22. Nor-*E*-cetodactileno (22)

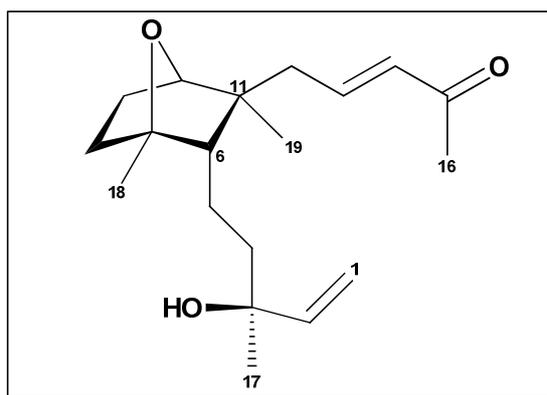
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +38$ (c 0.024, CHCl_3).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 204$ nm ($\log \epsilon$ 4.43).

IR (CHCl_3) $\nu_{max} = 3540, 3439, 2963, 2928, 2880, 1685, 1632, 1120, 1095, 995$ cm^{-1} .

ESI-HRMS: para $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{Na}$, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ m/z 329.2088, calc. 329.2093.

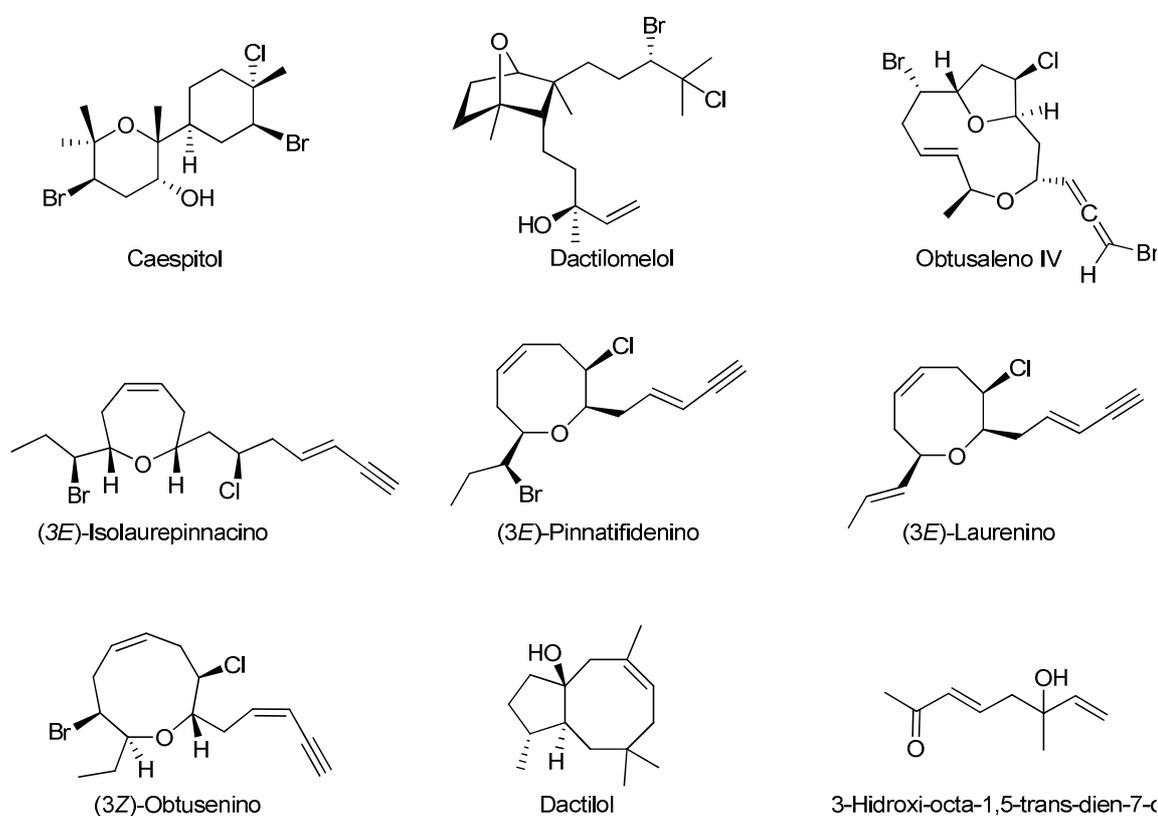


Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en CDCl_3

posición	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	112.1	5.21/5.08	d/d	17.4/10.7
2	144.7	5.88	dd	10.7, 17.4
3	73.2			
4	42.1	1.54/1.45	m/m	
5	21.1	1.36/1.20	m/m	
6	55.3	1.24	dd	2.4, 7.5
7	88.3			
8	29.1	1.66/1.21	m/m	
9	26.5	1.82/1.67	m/m	
10	84.1	3.94	br d	5.1
11	45.8			
12	46.8	2.29 (2H)	m	
13	145.3	6.11	dt	7.6, 15.7
14	133.7	6.80	d	15.7
15	198.5			
16	27.9	2.25	s	
17	27.0	1.28 (3H)	s	
18	21.5	1.39 (3H)	s	
19	17.4	0.90 (3H)	s	

2.6.23. Metabolitos conocidos aislados de *L. marilzae*

Tal y como se comentó en el apartado 2.3, el estudio cromatográfico de *L. marilzae* dio lugar al aislamiento de 13 compuestos conocidos, además de los nuevos metabolitos descritos previamente. Sus estructuras fueron identificadas mediante el análisis detallado de sus datos de RMN y masas, en comparación con los previamente reportados en la literatura. Estos metabolitos son el caespitol,⁶⁵ dactilomelol,³ obtusaleno IV,^{53,54} (3*E*)-isolaurepinnacino,³¹ (3*E*)-pinnatifidenino,⁶⁶ (3*E*)-laurenino,⁶⁷ (3*Z*)-obtuseno IV,⁴³ dactilol,⁶⁸ 3-hidroxi-octa-1,5-*E*-dien-7-ona,⁶⁹ (10*S**)-10-*O*-metilfurocaespitanolactol,⁷⁰ cassipourol,⁷¹ pinnatol e isopinnatol B⁷².



⁶⁵ Chang, M.; Vázquez, J. T.; Nakanishi, K.; Cataldo, F.; Estrada, D. M.; Fernández, J.; Gallardo, A.; Martín, J. D.; Norte, M.; Pérez, R.; Rodríguez, M. L. *Phytochemistry*, **1989**, *28*, 1417

⁶⁶ González, A. G.; Martín, J. D.; Martín, V. S.; Norte, M.; Pérez, R.; Ruano, J. Z.; Drexler, S. A.; Clardy, J. *Tetrahedron*, **1982**, *38*, 1009.

⁶⁷ Falshaw, C. P.; King, T. J.; Imre, S.; Islimyeli, S.; Thomson, R. H. *Tetrahedron Lett.*, **1980**, *21*, 4951.

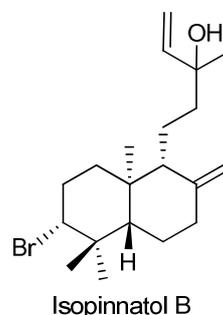
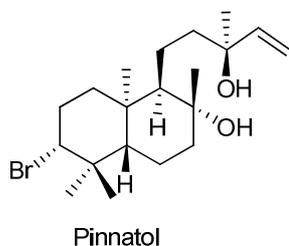
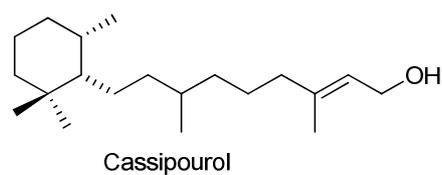
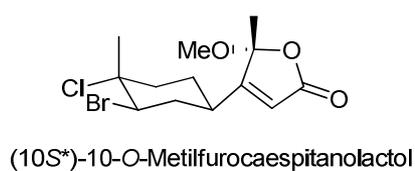
⁶⁸ Schmitz, F. J.; Hollenbeak, K. H.; Vanderah, D. J. *Tetrahedron*, **1978**, *34*, 2719.

⁶⁹ Bohlmann, F.; Gupta, R.; Jakupovic, J.; King, R.; Robinson, H. *Phytochemistry*, **1981**, *20*, 1635.

⁷⁰ Lhullier, C.; Falkenberg, M.; Ioannou, E.; Quesada, A.; Papazafiri, P.; Horta, P. Antunes S.; Eloir P.; Vagias, C.; Roussis, V. *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73*, 27.

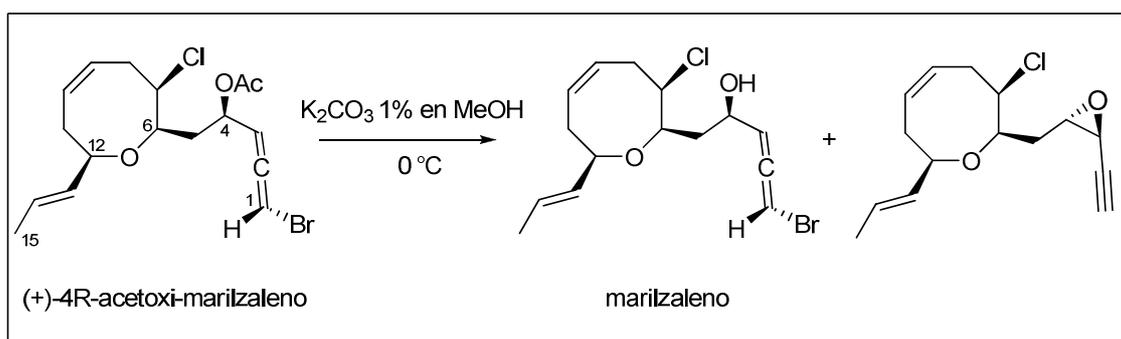
⁷¹ Chaturvedula, V.; Prakash, N.; Andrew, M.; James, S.; Ratvoson, F.; Andriantsiferana, R.; Rasamison, V.; Kingston, D. J. *J. Nat. Prod.*, **2006**, *69*, 287.

⁷² Fukuzawa, A.; Miyamoto, M.; Kumagai, Y.; Abiko, A.; Takaya, Y.; Masamune, T. *Chemistry Letters*, **1985**, *8*, 1259.



2.6.24. Hidrólisis alcalina del (+)-4*R*-acetoxi-marilzaleno (**12**)

El (+)-4*R*-acetoxi-marilzaleno (**12**) (0.5 mg, 1.3 μ mol) fue disuelto en 2 mL de una suspensión de K_2CO_3 (1% en MeOH) a 0 °C. Al cabo de 2 horas el disolvente la reacción se detuvo neutralizando con una disolución de HCl (5%). Se extrajo con CH_2Cl_2 (2x) y la fase orgánica fue eliminada al vacío. Posteriormente, el residuo obtenido fue sometida a un proceso de separación cromatográfica en HPLC empleando un columna μ -Porasil (150 x 19 mm \varnothing) y una mezcla de *n*-Hex:AcOEt (4:1) como eluyente, a un flujo de 1 mL/min.



Tras la separación, se obtuvieron dos productos: uno principal, el marilzaleno (**11**) (0.38 mg), $[\alpha]_D^{25} = +77$ (*c* 0.04, $CHCl_3$); y otro secundario (0.05 mg), cuyos datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos se detallan a continuación:

Derivado epoxidado minoritario

Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +3$ (c 0.01, CHCl₃).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 2924, 2853, 1734, 1561, 1541, 1326, 1236, 1096, 1012 \text{ cm}^{-1}$.

ESI-HRMS: para C₁₅H₁₉³⁷ClO₂Na, [M + Na]⁺ m/z 291.0954, (calc. 291.0942).

RMN ¹H (CDCl₃) δ : 1.25 (ddd, $J = 2.4, 7.9, 14.4 \text{ Hz}$, H-5 α); 1.68 (dd, $J = 1.7, 6.3 \text{ Hz}$, H₃-15); 2.18 (ddd, $J = 1.5, 8.4, 14.2 \text{ Hz}$, H-11 α); 2.24 (ddd, $J = 4.0, 10.6, 14.4 \text{ Hz}$, H-5 β); 2.36 (d, $J = 1.6 \text{ Hz}$, H-1); 2.48 (ddd, $J = 7.1, 8.9, 14.2 \text{ Hz}$, H-11 β); 2.53 (ddd, $J = 5.1, 6.3, 11.8 \text{ Hz}$, H-8 α); 2.97 (ddd, $J = 11.1, 11.3, 11.8 \text{ Hz}$, H-8 β); 3.20 (dd, $J = 1.6, 2.2 \text{ Hz}$, H-3); 3.27 (ddd, $J = 2.2, 4.0, 7.9 \text{ Hz}$, H-4); 3.89 (ddd, $J = 2.4, 5.1, 11.3 \text{ Hz}$, H-7); 3.91 (ddd, $J = 1.5, 6.5, 8.9 \text{ Hz}$, H-12); 4.09 (ddd, $J = 2.4, 2.4, 10.6 \text{ Hz}$, H-6); 5.57 (ddd, $J = 1.7, 6.5, 15.2 \text{ Hz}$, H-13); 5.68 (ddd, $J = 6.3, 9.7, 11.1 \text{ Hz}$, H-9); 5.71 (dd, $J = 6.3, 15.2 \text{ Hz}$, H-14); 5.93 (ddd, $J = 7.1, 8.4, 9.7 \text{ Hz}$, H-10).

RMN ¹³C (CDCl₃) δ : 17.8 (C-15, CH₃); 34.4 (C-8, CH₂); 35.0 (C-11, CH₂); 37.3 (C-5, CH₂); 45.8 (C-3, CH); 58.0 (C-4, CH); 65.7 (C-7, CH); 72.0 (C-1, CH); 76.5 (C-6, CH); 80.2 (C-2, C); 81.9 (C-12, CH); 126.5 (C-14, CH); 128.4 (C-9, CH); 131.2 (C-10, CH); 131.8 (C-13, CH).

CAPÍTULO 3

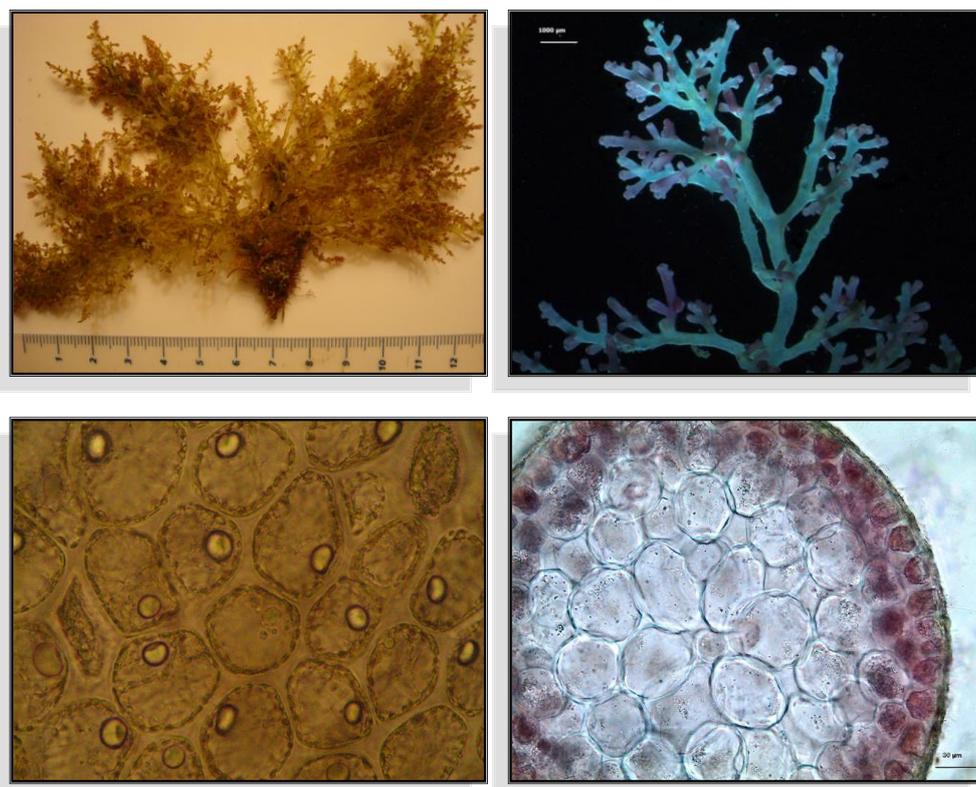
Metabolitos secundarios
de *Laurencia microcladia*

3

METABOLITOS SECUNDARIOS DE *LAURENCIA MICROCLADIA*

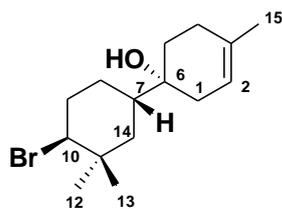
RESUMEN

Un estudio preliminar de especímenes de *Laurencia microcladia* recolectada en El Cotillo, Fuerteventura, dio como resultado el aislamiento de 5 nuevos sesquiterpenos, laurocarpanos A-E, con un esqueleto derivado de la ciclación del β -bisaboleno denominado macrocarpano, y del que existen pocos ejemplos en la literatura. Junto a éstos se aisló un nuevo derivado de este esqueleto con un anillo adicional de ciclopropano, el ciclolaurocarpano. Las estructuras de estos nuevos metabolitos fueron caracterizadas a través de un estudio exhaustivo de RMN, en el que la aplicación de las diferentes variantes del método de Murata para la determinación configuracional de segmentos acíclicos, así como las consideraciones biogenéticas, fueron de gran utilidad. Por otro lado, la elucidación estructural del ciclolaurocarpano, nos lleva a proponer la revisión de la estructura publicada para su isómero, el bromociclococanol.

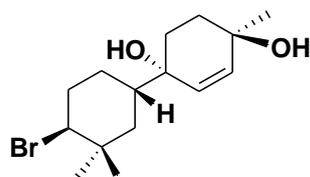


Fotos seleccionadas del hábito y las estructuras vegetativas de *Laurencia microcladia*
(Fuente: E. Aylagas, M. Machín Sánchez, M.C. Gil-Rodríguez. *Vieraea*, 2011, 39, 53-64)

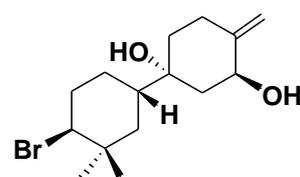
- Nuevos derivados de macrocarpanos y ciclomacrocarpanos:



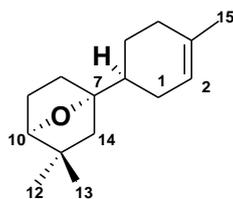
Laurocarpano A



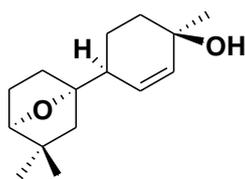
Laurocarpano B



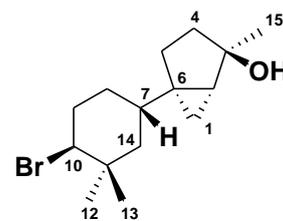
Laurocarpano C



Laurocarpano D



Laurocarpano E



Ciclolaurocarpano

3.1. ANTECEDENTES

3.1.1. Esqueleto sesquiterpénico de macrocarpano: consideraciones biogénicas

Los compuestos de naturaleza terpénica constituyen un amplio conjunto de sustancias naturales, donde han sido descritos más de 30,000 metabolitos de organismos vivos tanto terrestres como marinos.¹ La construcción biosintética de los terpenos implica siempre la participación de especies deficientes en electrones que se forman gracias a la acción estabilizadora de las terpenosintasas (TPSs) basada en la transferencia electrónica interna desde un fragmento rico en electrones de un aminoácido del enzima. Estos enzimas específicos se caracterizan por su capacidad de producir múltiples productos con esqueletos carbonados diversos a partir de un sencillo precursor prenildifosfato.² Los terpenos pueden contener un número muy variable de carbonos, desde 10 en adelante. Los de 15 átomos de carbonos, denominados sesquiterpenos, conforman el mayor grupo de terpenoides con más de 8,000 estructuras individuales, agrupadas en aproximadamente 200 esqueletos carbonados de distintas formas, tales como acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y en menor medida, tetracíclicos.

En la biosíntesis de los sesquiterpenos, una unidad de pirofosfato de isopentenilo (IPP) se adiciona al pirofosfato de geranilo (GPP) y se obtiene el pirofosfato de farnesilo (2*E*,6*E*-FPP), que es el precursor fundamental de los sesquiterpenos.³ Este precursor lineal sufre la ruptura heterolítica del enlace carbono-oxígeno del fosfato dando lugar a un carbocatión alílico que experimenta una serie de ciclaciones, transposiciones de hidruros, y otros reagrupamientos hasta que la reacción concluye con la pérdida de un protón o la adición de un nucleófilo. Por otro lado, ese carbocatión alílico también se interconvierte con facilidad por isomerización alílica al pirofosfato de 2*Z*,6*E*-farnesilo (2*Z*,6*E*-FPP), a través del pirofosfato de 6*E*-nerolidilo (6*E*-NPP) (Figura 3.1.1). La formación de estos dos últimos precursores, multiplica aún más las elevadas posibilidades de ciclaciones y/o modificaciones secundarias que darán lugar a los distintos esqueletos, y además explica la formación de numerosos sesquiterpenos cíclicos, cuya biogénesis no sería posible a partir del 2*E*,6*E*-FPP debido a posibles factores estéricos.

¹ Marco, J. A. "Química de los productos naturales", Ed. Síntesis, 2006, pp 172.

² Köllner, T. G.; Schnee, C.; Li, S.; Svatos, A.; Schneider, B.; Gershenzon, J.; Degenhardt, J. *The Journal of Biological Chemistry*, **2008**, *283*, 20779.

³ Dewick, P. M. "Medicinal natural products: a biosynthetic approach". John Wiley & Sons; 2009, pp. 194.

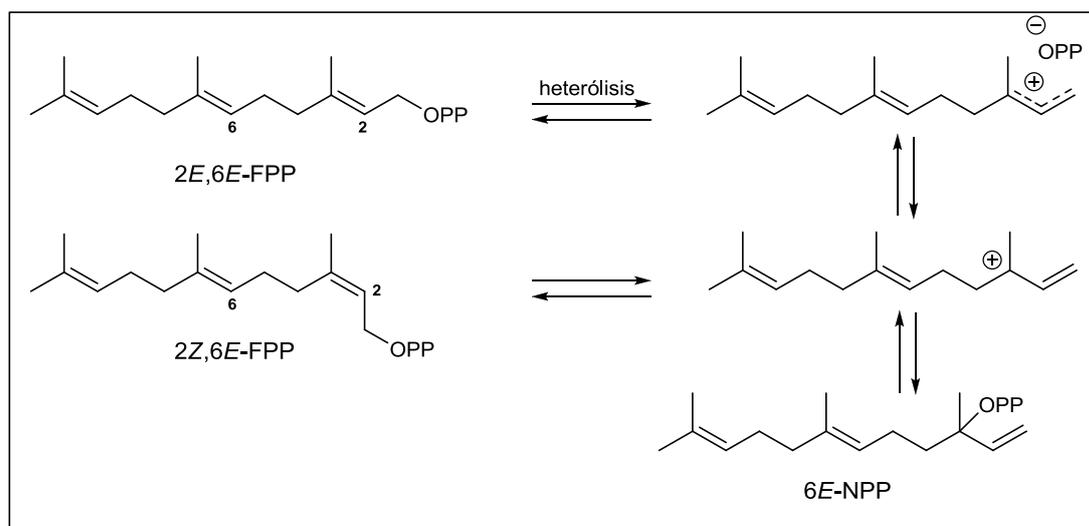


Figura 3.1.1. Isomerización del 2E,6E-FPP para generar el 2Z,6E-FPP y 6E-NPP.

De acuerdo con las pautas mecanísticas de formación de los distintos tipos de estructuras sesquiterpénicas, cuando se trata de esqueletos con dos o más ciclos, el precursor inmediato no es el FPP o NPP, sino un hidrocarburo insaturado monocíclico. Para la formación de éste son también clave las distintas configuraciones *E* y *Z* que adopta el doble enlace cercano al pirofosfato, lo que produce diferentes plegamientos de la cadena. De esta manera, la posterior protonación de la nube π olefínica causa la formación de un carbocatión que desencadena a su vez la misma secuencia de procesos que hemos mencionado anteriormente, extendiendo la variedad de derivados sesquiterpénicos por una serie de intermedios cíclicos (Figura 3.1.2).

Uno de esos sistemas, el catión de tipo bisabolano, desempeña un papel central en la biosíntesis de bastantes sesquiterpenos, siendo el precursor de varios tipos de esqueletos principales, como los cuparanos, lauranos, chamigranos, etc (Figura 3.1.3). Por otra parte, la ciclación entre las posiciones C-14,C-11 del intermedio de desprotonación del catión bisabolilo es responsable de la formación de una clase de sesquiterpenos bicíclicos no muy frecuentes, los macrocarpanos, que es el tipo de esqueleto al que pertenecen la serie de metabolitos aislados de este estudio preliminar de *L. microcladia*. Este esqueleto fue propuesto por primera vez en 2005, por Cool para una serie de cinco sesquiterpenos hidrocarbonados nuevos, los macrocarpenos, aislados de las hojas de *Cupressus macrocarpa*, de ahí el nombre común al sistema carbonado.⁴

⁴ Cool, L. G. *Phytochemistry*, 2005, 66, 249.

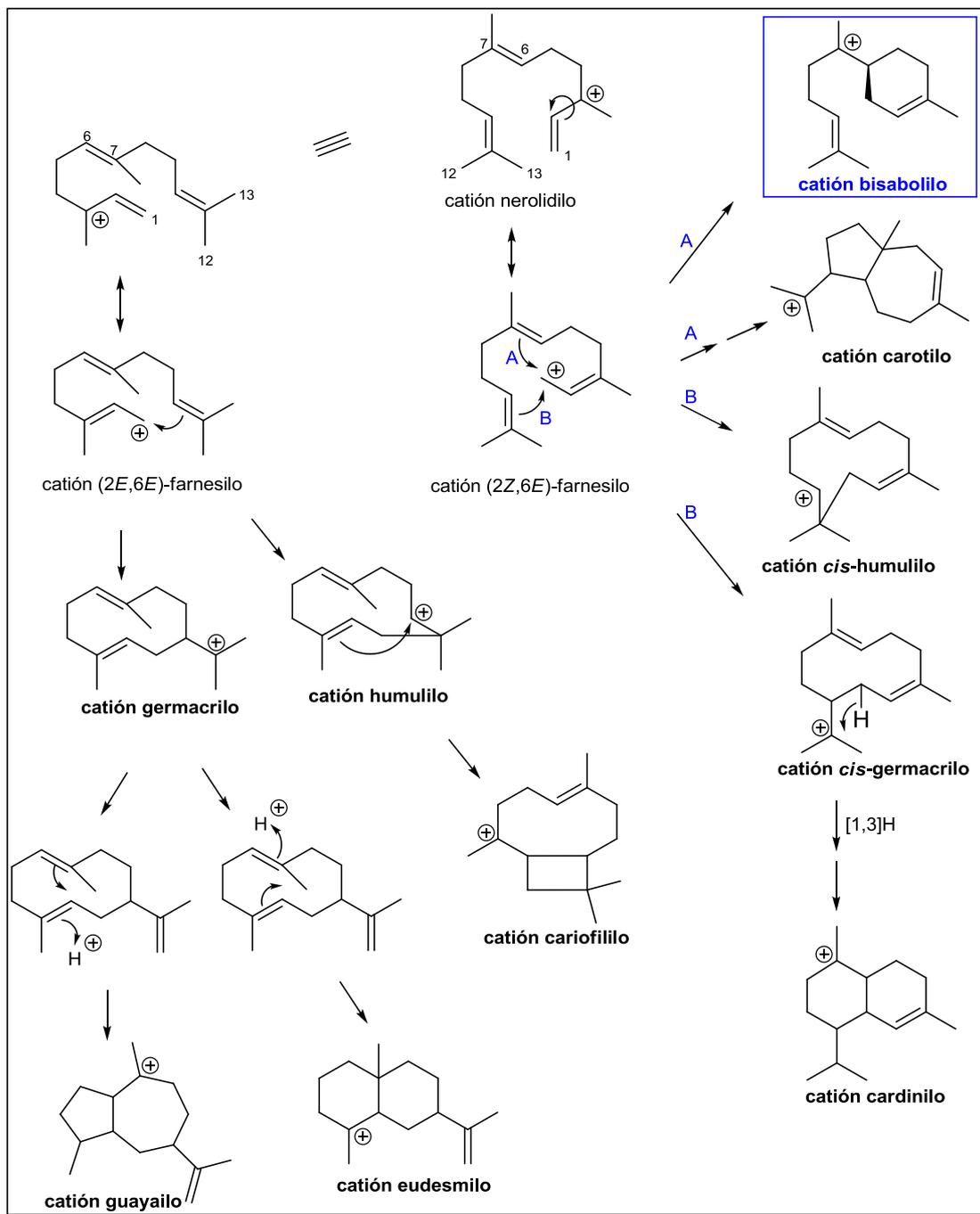
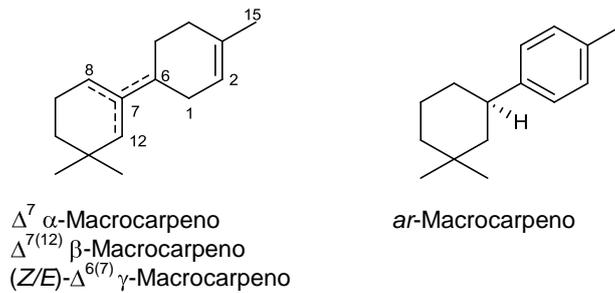


Figura 3.1.2. Formación de intermedios que juegan un papel central en la biosíntesis de variados tipos de esqueletos sesquiterpénicos.

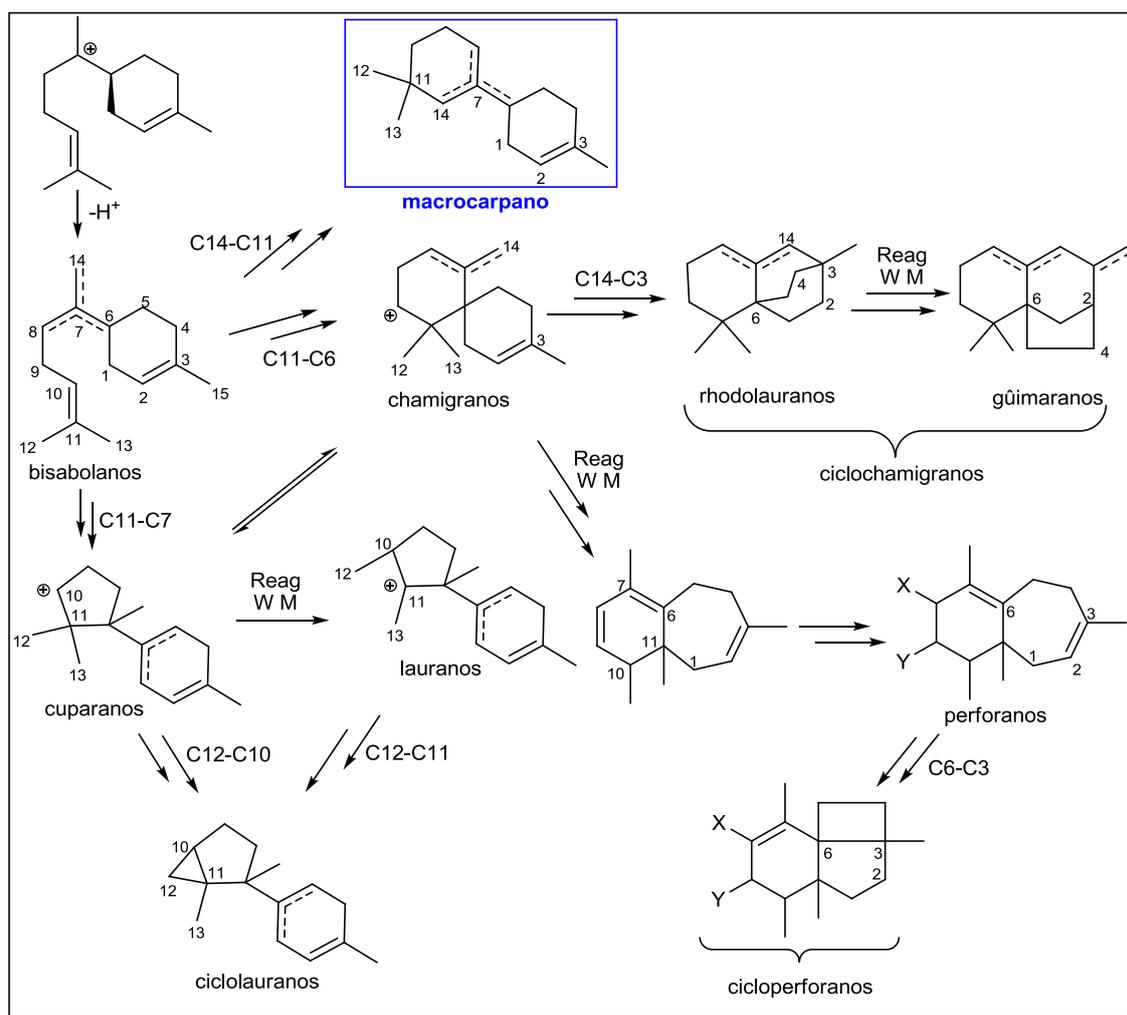


Figura 3.1.3. Formación de esqueletos a partir del catión bisabolilo.

En su propuesta Cool considera que la biogénesis de los macrocarpanos está catalizada por las macrocarpano sintasas, y una vez generado el catión *S*-bisabolilo a partir de la ionización y correspondiente ciclación C-6,C-1 del catión precursor 6*E*-nerolidilo, el primer paso conlleva la desprotonación de éste a (6*S*)- β -bisaboleno. Este bisaboleno neutro, en el mismo sitio activo de la enzima, es inmediatamente reprotonado en C-10 con un cierre de anillo desde el metileno exocíclico a C-11.

Esta hipótesis biosintética fue debidamente demostrada por Köllner y colaboradores,² mediante la expresión en *E. coli* de los genes que codifican las terpeno sintasas TPS6 y TPS11. Estas enzimas fueron aisladas y caracterizadas de plantas de maíz genéticamente manipuladas (*Zea mays*). Ambas enzimas produjeron β -bisaboleno y

β -macrocarpeno, investigándose el mecanismo de formación de este último (Figura 3.1.4). Así, mediante mutaciones en las enzimas mostraron que procedía *via* el intermedio neutro β -bisaboleno con estereoquímica definida *S*. El estudio biosintético continúa demostrando que para la reprotonación se requería un protón que debía proceder finalmente del agua, para ello producen la protonación isotópica en C-10 del (*S*)- β -bisaboleno con óxido de deuterio (D_2O). La posterior ciclación entre los carbonos C-14,C-11, y finalmente, la desprotonación del intermedio catiónico conduce al (*S*)- β -macrocarpeno.

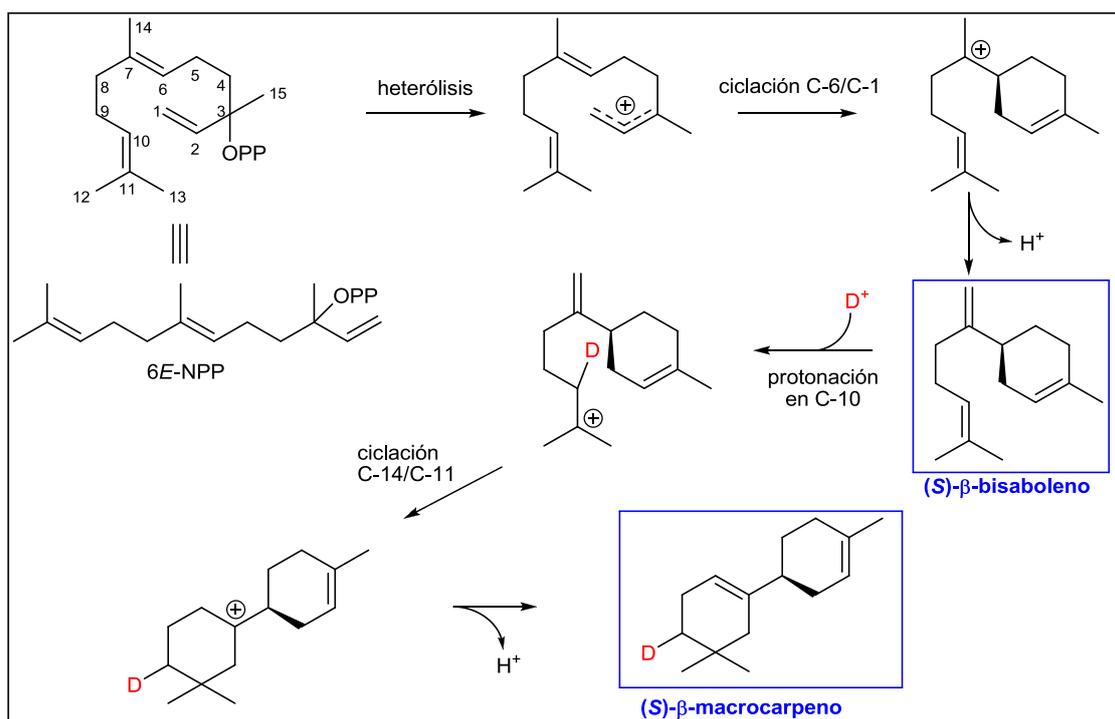
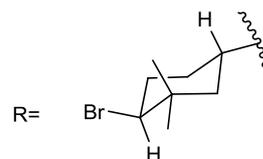
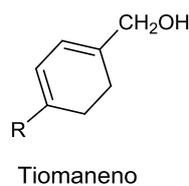
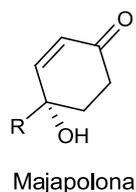
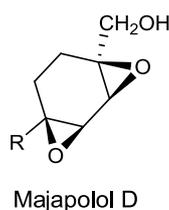
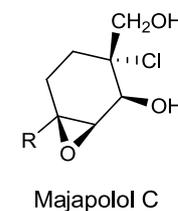
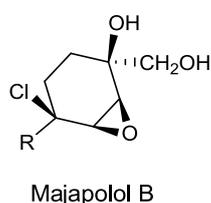
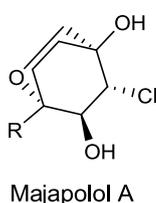
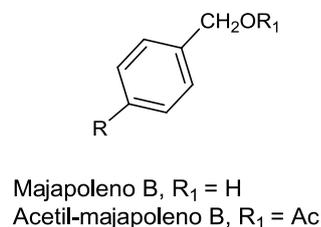
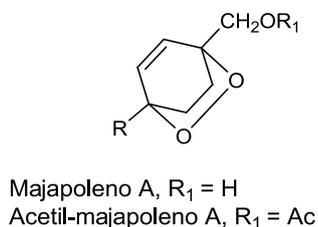
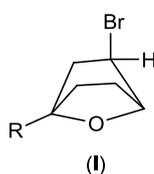


Figura 3.1.4. Mecanismo de reacción para la formación del (*S*)- β -macrocarpeno, mediante la acción de las sintasas TPS6 y TPS11.

Tal y como se comentó previamente, el número de metabolitos con esqueleto macrocarpano aislados de su fuente natural no es muy abundante. Tras una búsqueda bibliográfica de compuestos relacionados, presentamos a continuación los pocos ejemplos encontrados.

Con anterioridad a la descripción del esqueleto en sí, metabolitos con la estructura de macrocarpano fueron aislados en estudios distintos de *L. majuscula*. Un derivado dibromado fue aislado de una muestra recolectada en las Islas Canarias (compuesto I)

determinándose su estructura por rayos X.⁵ Otros seis representantes se hallaron en especímenes de las Filipinas: los majapolenos A y B, y los majapolos A, B, C y D.⁶ Junto a ellos, se aisló un *nor*-derivado, la cetona majapolona. Destacar que el majapoleno A mostró actividad citotóxica moderada.



Posteriormente, el estudio fitoquímico de distintas especies no descritas de *Laurencias* recolectadas en aguas de Malasia,⁷ llevó nuevamente al aislamiento de los majapolenos A y B, así como sus versiones acetiladas, los acetil-majapolenos A y B, respectivamente. El tiomaneno fue otro metabolito aislado en el mismo estudio, que junto a los anteriores comparten el sistema carbonado de macrocarpano.

Es curioso que en estos dos últimos trabajos tanto el majapoleno A, el majapol A y el acetil-majapoleno A, fueron aislados como mezclas de diastereómeros.

⁵ González, A. G.; Martín, J. D.; Norte, M.; Pérez, R.; Rivera, P.; Ruano, J. Z.; Rodríguez, M. L.; Fayos, J.; Perales, A. *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 4143.

⁶ Erickson K. L.; Beutler, J. A.; Gray, G. N.; Cardellina II, J. H.; Boyd, M. *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 1848.

⁷ Vairappan, C. S.; Suzuki, M.; Ishii, T.; Okino, T.; Abe, T.; Masuda, M. *Phytochemistry*, **2008**, 69, 2490.

3.2. RECOLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL ALGA *LAURENCIA MICROCLADIA*

Los especímenes de *Laurencia microcladia* Kützing fueron recolectados en la localidad de El Cotillo, Isla de Fuerteventura en Julio de 2009, en los primeros metros del sublitoral y haciendo uso de equipo de buceo ligero. La muestra húmeda cuyo peso aproximado fue de 2 Kg, se refrigeró para ser trasladada a nuestro laboratorio y posteriormente extraída por maceración a temperatura ambiente en una mezcla CHCl_3 :MeOH (1:1) (3x) durante cinco días. Al término de este periodo los disolventes fueron evaporados al vacío a 40 °C, obteniendo un extracto de color verdoso y aspecto aceitoso de peso 14 g.

3.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO

El extracto resultante de la maceración fue inicialmente sometido a cromatografía en una columna de Sephadex[®] LH-20 (600 x 70 mm Ø), usando como eluyente una mezcla de CHCl_3 :MeOH (1:1). El proceso se monitoreó por cromatografía de capa fina (TLC), para lo cual usamos un sistema de *n*-Hex:AcOEt (4:1) como fase móvil y como agentes reveladores, primero visualización de las mismas con luz UV ($\lambda=254$ nm), y segundo, por pulverización con una solución de óleum o ácido fosfomolibdico. Las fracciones que presentaron el mismo comportamiento en TLC fueron reunidas, obteniéndose finalmente cinco nuevas fracciones: (LM-1→LM-5).

Posteriormente, el análisis en base a experimentos de RMN ¹H de cada una, nos llevó a elegir la fracción LM-4 para continuar nuestro estudio. Dicha fracción se sometió a cromatografía en una columna Lobar[®] LiChroprep[®] Si-60 (310 x 25 mm Ø, 40-63 µm) y usando como eluyente mezclas (250 ml) de *n*-Hex:AcOEt en polaridad ascendente. Aquellas fracciones recogidas que mostraron un comportamiento similar fueron agrupadas, LM-41 → LM-45, y evaluadas nuevamente por RMN ¹H, centrandó nuestra atención en las dos primeras. Así, las fracciones LM-41 y LM-42 fueron nuevamente cromatografiadas en la misma columna de media presión de fase normal usando como fase móvil una mezcla de *n*-Hex:AcOEt en gradiente de concentración por pasos (19:1→9:1) y (17:3→3:2), respectivamente. Tras el habitual monitoreo por TLC se obtuvieron seis nuevas fracciones (LM-411, LM-412 y LM-413; LM-421, LM-422 y LM-423) que fueron purificadas finalmente por HPLC, empleando una columna de fase normal

preparativa μ -Porasil (150 x 19 mm \varnothing), variando la composición de la mezclas de *n*-Hex:AcOEt de la fase móvil según la polaridad relativa de los metabolitos presentes, a un flujo de 1 ml/min.

El resultado final de este proceso, esquematizado en la figura 3.3.1, fue la obtención de 7 sesquiterpenos cuyo estudio estructural se describe en el siguiente apartado, de los cuales 6 resultaron ser nuevos en la literatura. Asimismo, se realizó el aislamiento de varias acetogeninas conocidas (ver apartado 3.6.7), que fueron sometidas a distintas pruebas biológicas junto con los nuevos metabolitos.

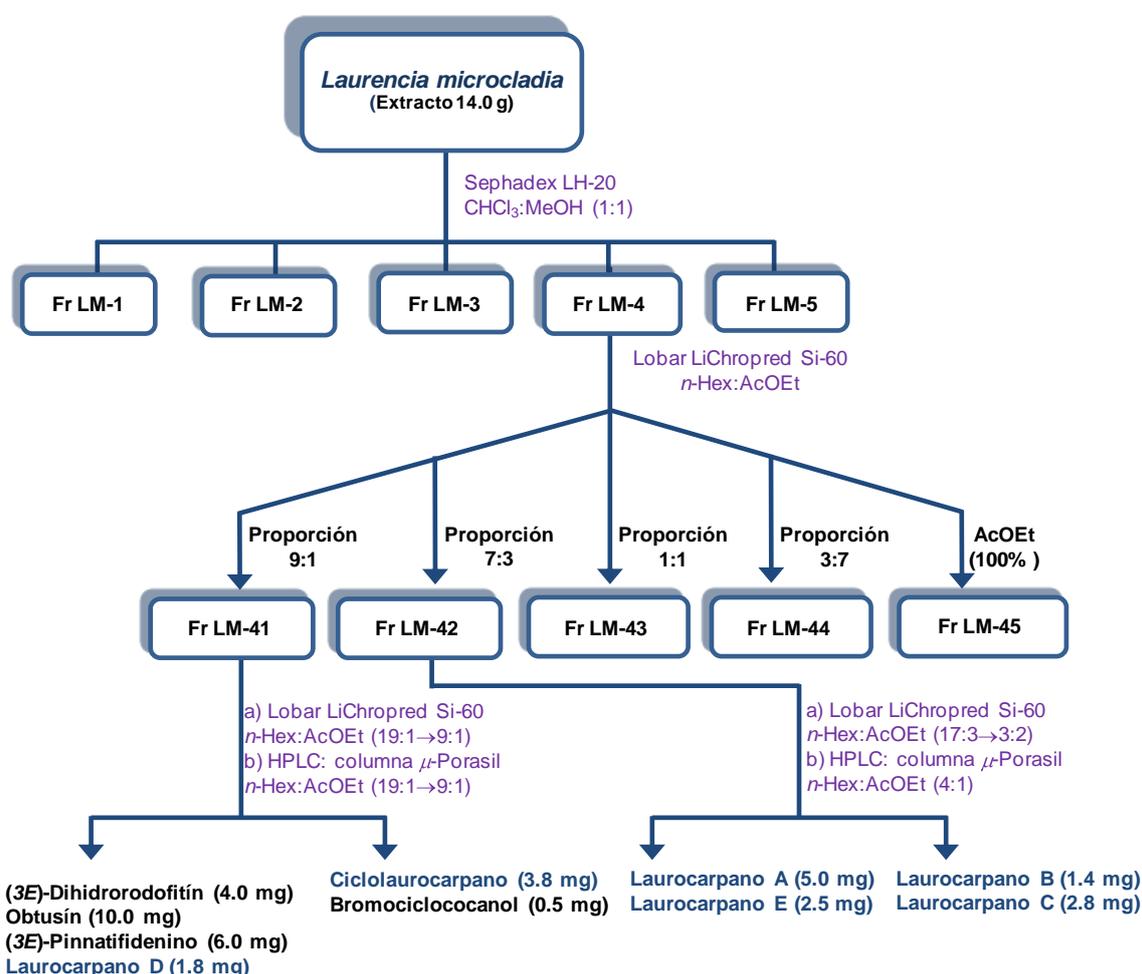


Figura 3.3.1. Marcha cromatográfica del extracto obtenido de *L. microcladia*.

3.4. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS NUEVOS METABOLITOS

Los nuevos sesquiterpenos **23-27** aislados de *L. microcladia* presentan un esqueleto carbonado de tipo macrocarpano (Figura 3.4.1). En el apartado de antecedentes de este capítulo se ha demostrado que este esqueleto deriva de la ciclación del β -bisaboleno, y se describieron los pocos trabajos publicados hasta la fecha en los que este tipo de esqueleto ha sido aislado. Junto a estas sustancias se aislaron dos sesquiterpenos ciclopropánicos, uno de ellos ya conocido, el bromociclococanol.⁸ La distinción estructural entre estas dos sustancias supone un reto, además de generar controversia con los datos publicados.

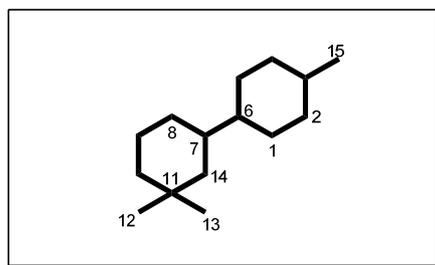


Figura 3.4.1. Esqueleto de macrocarpano

3.4.1. Nuevos derivados de macrocarpanos

3.4.1.1. Laurocarpano A (23)

Del conjunto de sesquiterpenos identificados en el estudio químico de *L. microcladia*, el laurocarpano A (**23**) se obtuvo como producto mayoritario y fue aislado como un aceite incoloro ópticamente activo $[\alpha]_D^{25} = +5$ (c 0.57, CHCl_3). Su fórmula molecular, se estableció como $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{BrO}$, de acuerdo al espectro de masas de alta resolución ESI-FTICR, que mostró los iones pseudomoleculares $[\text{M} + \text{H}]^+$ a m/z 301.14 y 303.16 para $\text{C}_{15}\text{H}_{26}^{79}\text{BrO}$ y $\text{C}_{15}\text{H}_{26}^{81}\text{BrO}$ (calc. 301.12 y 303.14). Esta fórmula sugiere tres insaturaciones, de las cuales una se infiere como doble enlace trisustituido, según sus datos de RMN (Figura 3.4.2). Su espectro de IR además evidencia la presencia de un grupo hidroxilo en base a la fuerte absorción observada a 3416 cm^{-1} .

⁸ Brito, I.; Cueto, M.; Dorta, E.; Darías, J. *Tetrahedron. Lett.*, **2002**, *43*, 2551.

El espectro de RMN ^{13}C (Figura 3.4.2A) muestra las señales de 15 carbonos que de acuerdo con las multiplicidades observadas en el experimento de HSQC editado (Figura 3.4.3A) se corresponden con: tres metinos (δ_{C} 118.1, 66.5, 41.3) seis metilenos (δ_{C} 40.3, 35.2, 34.2, 31.0, 28.1, 26.9), tres metilos (δ_{C} 31.9, 23.3, 20.4), y tres carbonos cuaternarios (δ_{C} 134.0, 71.0, 36.6).

Por otro lado, en el espectro de RMN ^1H (Figura 3.4.2B) destacan las señales de un metino olefínico como una señal ancha a δ_{H} 5.27, de un bromometino a δ_{H} 3.94 (dd, $J = 4.4, 12.8$ Hz), un metilo vinílico a δ_{H} 1.68, y los dos metilos terciarios restantes a δ_{H} 1.07 y 1.04.

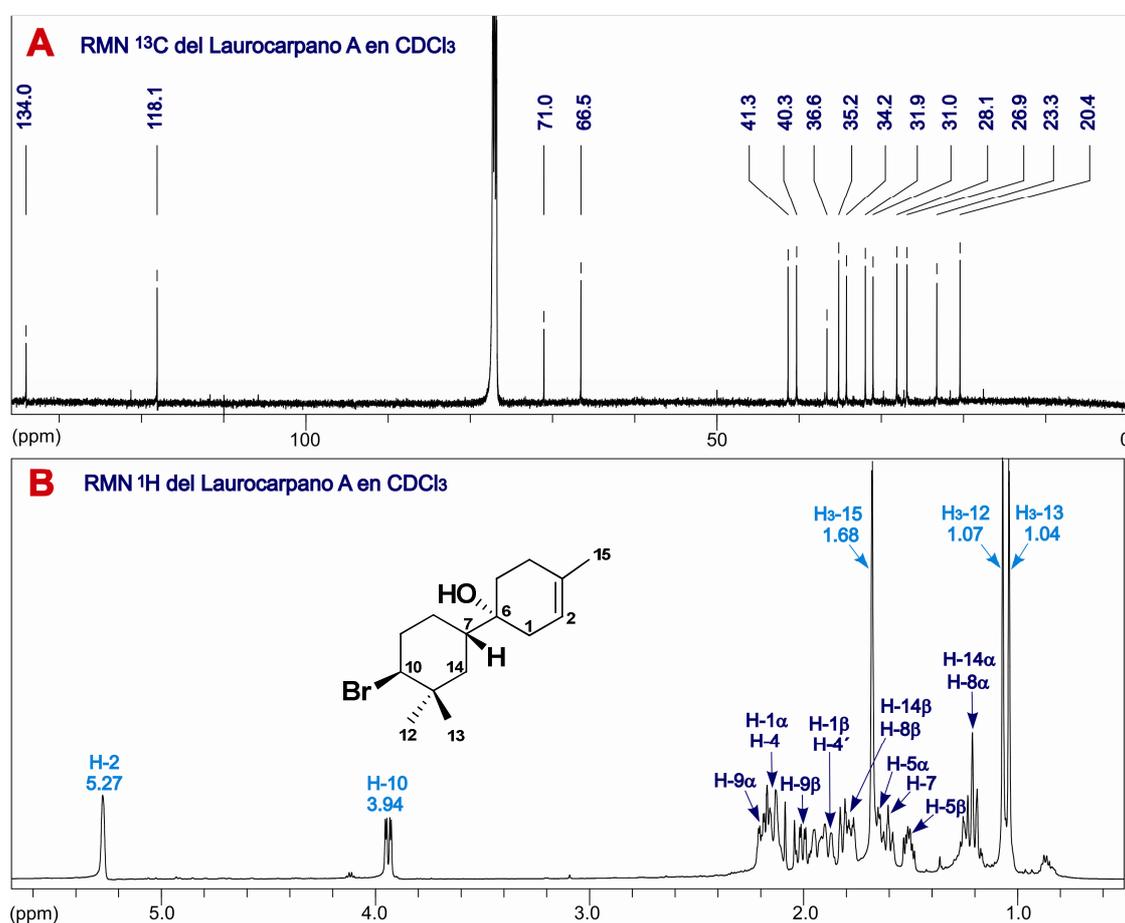


Figura 3.4.2. Espectros de RMN ^{13}C (150 MHz) (A) y RMN ^1H (600 MHz) (B) del laurocarpano A (23).

El estudio del experimento bidimensional COSY (Figura 3.4.3B) permitió identificar tres sistemas de espín ^1H - ^1H en la molécula. El primero, indicado como I lo conforman los protones del metileno alílico H_2 -1 (δ_{H} 2.14 y 1.89) y el metino olefínico H-2 (δ_{H} 5.27); el

segundo **II** engloba otros dos metilenos diasterotópicos H₂-4 (δ_{H} 2.13 y 1.94) → H₂-5 (δ_{H} 1.66 y 1.51); mientras que el tercer sistema de espín **III** se inicia en el metino H-10 (δ_{H} 3.94), sobre el que se sitúa el átomo de bromo, y que presenta correlaciones con los protones del metileno H₂-9 (δ_{H} 2.20 y 2.00), y éstos a su vez con los de H₂-8 (δ_{H} 1.78 y 1.19), siguiendo la secuencia a través del metino H-7 (δ_{H} 1.61), hasta concluir en el metileno H₂-14 (δ_{H} 1.82 y 1.21).

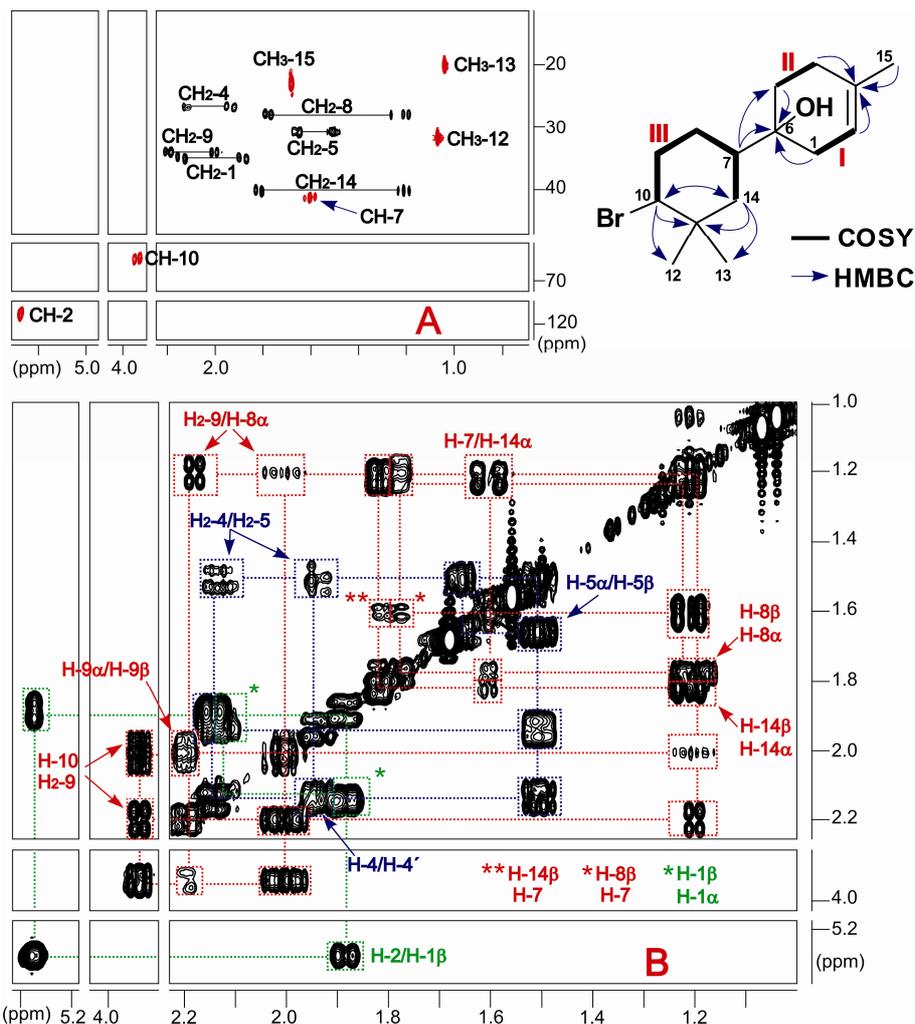


Figura 3.4.3. Secciones de los experimentos de HSQC con editado de multiplicidad (600 MHz) (A) y COSY (600 MHz) (B) del laurocarpano A (**23**). Conectividades HMBC (600 MHz) más relevantes para la elucidación estructural.

Como puede observarse en la figura 3.4.3, el análisis del experimento HMBC permitió establecer conectividades entre los dos primeros sistemas de espín **I** y **II**, los cuales se unen por la correlación HMBC de H-2 y H₂-4 con el carbono cuaternario C-3 (δ_{C} 134.0), sobre el que se sitúa el metilo angular H₃-15 (δ_{H} 1.68). De igual manera, se

identificaron conectividades entre el carbono cuaternario C-6 (δ_C 71.0), adyacente al grupo hidroxilo, y los protones H₂-1, H₂-5 y H-7, completando así la estructura de uno de los anillos de la molécula y conectando éste con el sistema de espín III. Por otra parte, las correlaciones HMBC de los metilos H₃-12 (δ_H 1.07) y H₃-13 (δ_H 1.04) con el carbono cuaternario C-11 (δ_C 36.6), los sitúa como *gem*-dimetilo en esa posición, y junto con las conectividades observadas entre los carbonos de estos metilos y los protones H-10 y H₂-14, completa la estructura del laurocarpano A (**23**), estableciendo la existencia de otro anillo de ciclohexano.

De esta forma se establece la asignación de los desplazamientos químicos de carbono y protón para el compuesto **23**, tal y como se recopilan en la tabla 3.4.1.

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	35.2	α 2.14	dd	3.2, 15.5
		β 1.89	<i>br</i> d	15.5
2	118.1	5.27	<i>br</i> s	
3	134.0			
4	26.9	2.13	m	
		1.94	m	
5	31.0	α 1.66	ddd	2.9, 5.9, 13.0
		β 1.51	ddd	6.1, 11.5, 13.0
6	71.0			
7	41.3	1.61	dddd	3.2, 3.4, 12.6, 12.6
8	28.1	β 1.78	dddd	3.4, 3.9, 4.2, 13.1
		α 1.19	dddd	3.5, 12.6, 13.1, 13.1
9	34.2	α 2.20	dddd	3.5, 3.9, 4.4, 13.4
		β 2.00	dddd	4.2, 12.8, 13.1, 13.4
10	66.5	3.94	dd	4.4, 12.8
11	36.6			
12	31.9	1.07 (3H)	s	
13	20.4	1.04 (3H)	s	
14	40.3	β 1.82	ddd	2.8, 3.2, 13.4
		α 1.21	ddd	2.8, 12.6, 13.4
15	23.3	1.68 (3H)	s	

Tabla 3.4.1. Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) del laurocarpano A (**23**) (CDCl₃).

El análisis de los valores de las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares en combinación con los datos del experimento TROESY, permitieron proponer la configuración relativa del laurocarpano A (**23**). La disposición del átomo de bromo en C-10 fue establecida como ecuatorial en base a los valores de las constantes de

acoplamiento de H-10, ${}^3J_{\text{H-H}} = 4.4$ y 12.8 Hz, sólo compatibles con una orientación axial. Por otro lado, se observó una correlación ROE intensa entre este metino y uno de los protones diasterotópicos H₂-14 (δ_{H} 1.21), que a su vez presenta un valor grande de constante de acoplamiento con el metino adyacente H-7 (${}^3J_{\text{H-14}\alpha, \text{H-7}} = 12.6$ Hz), y que es consistente con una disposición *trans*-diaxial de H-14 α y H-7. Esto indica que el enlace de unión entre los dos anillos en la posición C-7 tiene disposición ecuatorial.

La configuración relativa de C-6 se llevó a cabo analizando el segmento C-7/C-6 también en base al análisis de las constantes acoplamiento. Sin embargo, al tratarse uno de los centros de un carbono cuaternario, aplicaremos la extensión del método de Murata descrita por Bifulco y *col.*⁹ (ver apéndice II). En ella, no contamos con la información de una parte de las constantes que se emplean normalmente en estos estudios, y que pueden ser claves para resolver situaciones ambiguas, pero se ha comprobado que si no existen equilibrios de conformaciones, se puede llegar a una propuesta final con la ayuda de los datos ROE.

Así, procedimos a establecer los valores de las tres constantes de acoplamiento implicadas en la resolución de ese sistema, ${}^2J_{\text{C-6,H-7}}$, ${}^3J_{\text{C-5,H-7}}$ y ${}^3J_{\text{C-1,H-7}}$. Para medir las constantes heteronucleares se utilizaron experimentos *J*-HMBC (Figura 3.4.4), que puede ser utilizado con centros cuaternarios pero tiene la desventaja de que no aporta información sobre el signo de las constantes carbono–protón a dos enlaces (${}^2J_{\text{C,H}}$) constantes que pueden ser tanto positivas como negativas. No obstante, el valor obtenido de la constante geminal ${}^2J_{\text{C-6,H-7}} = |4.3 \text{ Hz}|$, indica con claridad que por su orden de magnitud debe ser negativa. En base a este dato se puede proponer que al tratarse de una constante *grande*, el grupo hidroxilo en posición C-6 se encuentra en disposición *gauche* con respecto al protón H-7. Por otro lado, el valor *medio* y *grande* de las constantes ${}^3J_{\text{C-5,H-7}} = 3.1 \text{ Hz}$ y ${}^3J_{\text{C-1,H-7}} = 6.5 \text{ Hz}$, respectivamente, plantean respecto a ese protón H-7 una situación *gauche* para C-5 y *anti* para C-1. Estos resultados reducen el análisis de este segmento a la revisión de dos posibles rotámeros que son los que se muestran en la figura 3.4.4.

El análisis de los datos de TROESY y de los experimentos 1D-NOE para los protones H₂-5 (δ_{H} 1.66 y 1.51), permitió establecer que cada uno de estos protones se correlaciona con uno de los protones H₂-14 y no con los del metileno H₂-8. Así se concluye que la configuración relativa de ese fragmento es 6*R**, 7*S**

⁹ Bifulco, G; Dambruoso, P.; Gómez-Paloma, L. Riccio, R. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 3744

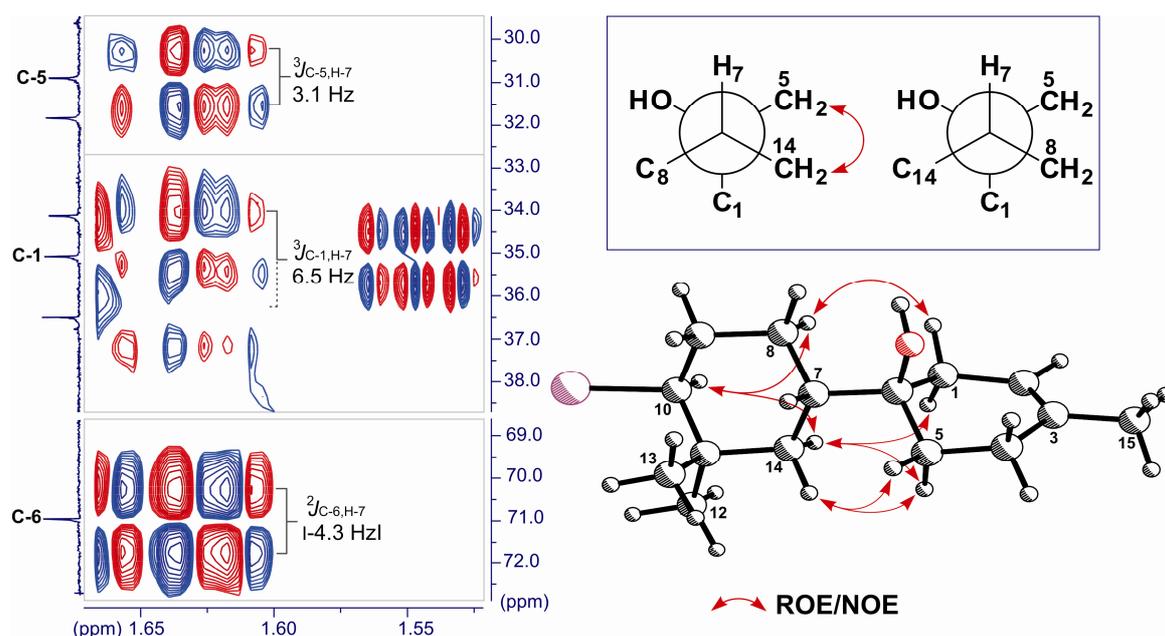


Figura 3.4.4. Determinación de la estereoquímica relativa del fragmento C-7/C-6 del laurocarpano A (**23**). Secciones del experimento de J -HMBC (600 MHz) en CDCl_3 , posibles rotámeros obtenidos de los valores de las constantes de acoplamiento y principales correlaciones ROE/NOE.

3.4.1.2. Laurocarpano B (**24**)

El compuesto **24** fue aislado como un aceite incoloro con rotación óptica $[\alpha]_D^{25} = +1$ (c 0.02, CHCl_3). Su fórmula molecular fue determinada como $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{BrO}_2$, en base al ion $[\text{M} + \text{H}]^+$ de su espectro de masas ESI-FTICR, a m/z a 317.09 para $\text{C}_{15}\text{H}_{26}^{79}\text{BrO}_2$ (calc. 317.11). El espectro de IR mostró bandas atribuibles a funciones tipo hidroxilo (3402 cm^{-1}) y alqueno (1666 cm^{-1}).

Sus datos espectroscópicos resultaron similares a los del cabeza de serie, laurocarpano A (**23**), lo cual ayudó significativamente en la asignación de la estructura de este producto. De hecho, la comparación de sus datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C (Tablas 3.4.1 y 3.4.2), evidencia la correspondencia en las asignaciones entre las posiciones C-7/C-11, C-14 (anillo B), fijando la diferencia entre ambos compuestos en el anillo A, más específicamente en la presencia de un doble enlace disustituido ($\delta_{\text{H/C}}$ 5.77/136.8 y 5.67/131.3 en **24**) en vez de trisustituido ($\delta_{\text{H/C}}$ 5.27/118.1 y 134.0 en **23**), y el desplazamiento a campos altos de los protones del metilo H_3 -15 que pasa de ser un metilo vinílico (δ_{H} 1.68 en **23**) a un metilcarbinol (δ_{H} 1.37 en **24**) (Figura 3.4.5).

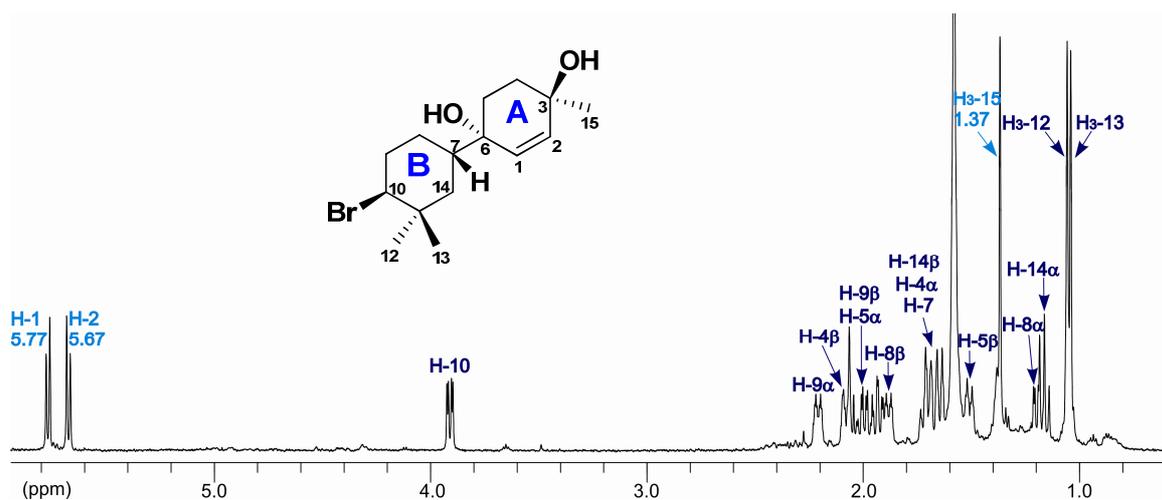


Figura 3.4.5. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) del laurocarpano B (**24**).

Siguiendo un procedimiento equivalente al descrito con el metabolito anterior, centrada la atención en las correlaciones COSY para esta parte de la molécula, se puede apreciar la existencia de un sistema aislado formado por los protones vinílicos [I: H-1 (δ_{H} 5.77) \rightarrow H-2 (δ_{H} 5.67)], junto con otro sistema de espín que engloba dos metilenos diastereotópicos [II: H₂-4 (δ_{H} 2.08 y 1.69) \rightarrow H₂-5 (δ_{H} 1.93 y 1.51)]. La geometría del doble enlace se estableció como *Z* en base al valor de la constante de acoplamiento $^3J_{\text{H-1,H-2}} = 10.1$ Hz. El análisis del experimento HMBC permitió unir estos fragmentos COSY y completar la estructura de esta anillo (Figura 3.4.6). Así, se observó correlación con el carbono cuaternario hidroxilado C-3 (δ_{C} 78.8) de los protones H₃-15, H-2 y H₂-4, mientras que de igual forma, los protones H-1, H₂-5, y H-7 (δ_{H} 1.71) se correlacionan con el carbono hidroxilado cuaternario C-6 (δ_{C} 70.9).

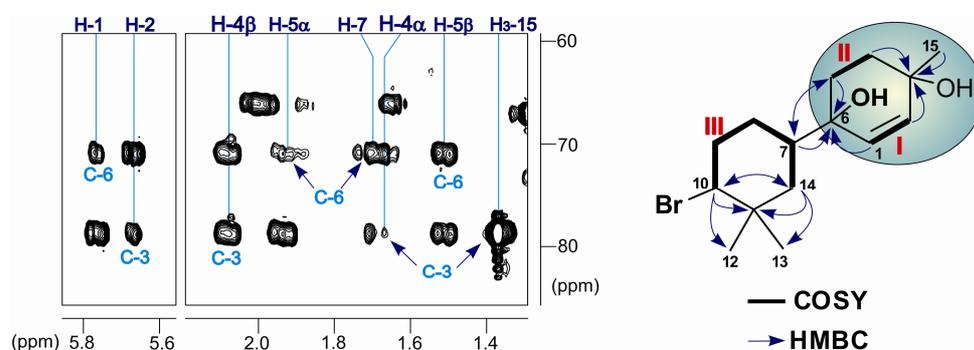


Figura 3.4.6. Secciones del espectro HMBC (600 MHz) con las correlaciones más importantes para conectar los distintos fragmentos COSY establecidos para la elucidación estructural del laurocarpano B (**24**).

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	136.8	5.77	d	10.1
2	131.3	5.67	d	10.1
3	78.8			
4	28.2	β 2.08	m	
		α 1.69	m	
5	28.0	α 1.93	ddd	3.7, 12.8, 13.7
		β 1.51	ddd	3.7, 4.8, 13.7
6	70.9			
7	42.2	1.71	dddd	2.8, 3.2, 13.1, 13.3
8	27.8	β 1.88	dddd	2.8, 3.1, 4.0, 13.2
		α 1.20	dddd	4.4, 13.0, 13.2, 13.3
9	34.1	α 2.20	dddd	3.1, 4.1, 4.4, 13.4
		β 1.99	dddd	4.0, 12.7, 13.0, 13.4
10	66.1	3.91	dd	4.1, 12.7
11	36.7			
12	31.9	1.06 (3H)	s	
13	20.6	1.04 (3H)	s	
14	40.9	β 1.64	ddd	2.9, 3.2, 13.3
		α 1.15	dd	13.1, 13.3
15	24.4	1.37 (3H)	s	

Tabla 3.4.2. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del laurocarpano B (**24**) (CDCl_3).

Las configuraciones relativas de los centros C-10, C-7 y C-6, coincidieron con la propuesta para el laurocarpano A, mientras que la de C-3 fue establecida como $3R^*$ en base a las correlaciones ROE observadas de uno de los protones metilenos H₂-4 a δ_{H} 1.69 con el protón diasterotópico más desapantallado H-5 (δ_{H} 1.93) y el metilo H₃-15. Un dato importante a destacar es que en este compuesto, a diferencia de lo que ocurre en el laurocarpano A, el protón del metileno H₂-5 que se sitúa en la misma cara del grupo hidroxilo en C-6, tiene una orientación en el espacio *axial*, tal como indican sus constantes de acoplamiento (Tabla 3.4.2, Figura 3.4.7).

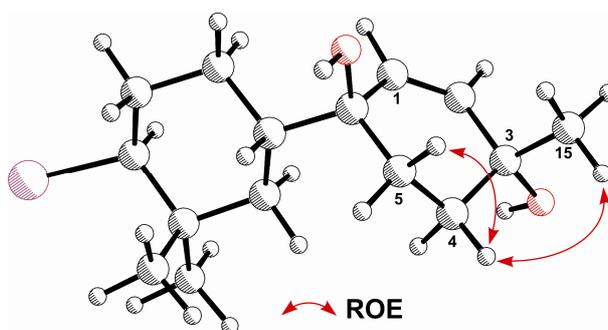


Figura 3.4.7. Asignación de la esteoquímica relativa del carbono C-3 del laurocarpano B (**24**).

3.4.1.3. Laurocarpano C (25)

El laurocarpano C (**25**) fue también aislado como un aceite incoloro, $[\alpha]_D^{25} = +4$ (c 0.08, CHCl_3). Resultó ser un isómero del laurocarpano B (**24**), como se estableció en base a su espectro de masas de alta resolución ESI-FTICR (m/z 317.09 $[\text{M} + \text{H}]^+$; calc. 317.11, para $\text{C}_{15}\text{H}_{26}^{79}\text{BrO}_2$). Los datos de IR indicaron que este compuesto también presenta absorciones de grupo hidroxilo (3393 cm^{-1}) y de alqueno (1650 cm^{-1}).

Un primer análisis comparativo de sus datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C revela que los desplazamientos químicos del anillo B prácticamente coinciden para ambos metabolitos (Tablas 3.4.2 y 3.4.3). Sin embargo, como muestra la contraposición de los espectros de RMN ^1H en la figura 3.4.8, las principales diferencias vuelven a situarse en el anillo A. De este modo destaca en **25** la presencia de un doble enlace exocíclico $[\delta_{\text{H}}$ 4.93 (s)/4.85 (s)], la aparición de un oximetino alílico (δ_{H} 4.73, dd, $J = 4.6, 11.3\text{ Hz}$) y la ausencia del metilo H_3 -15.

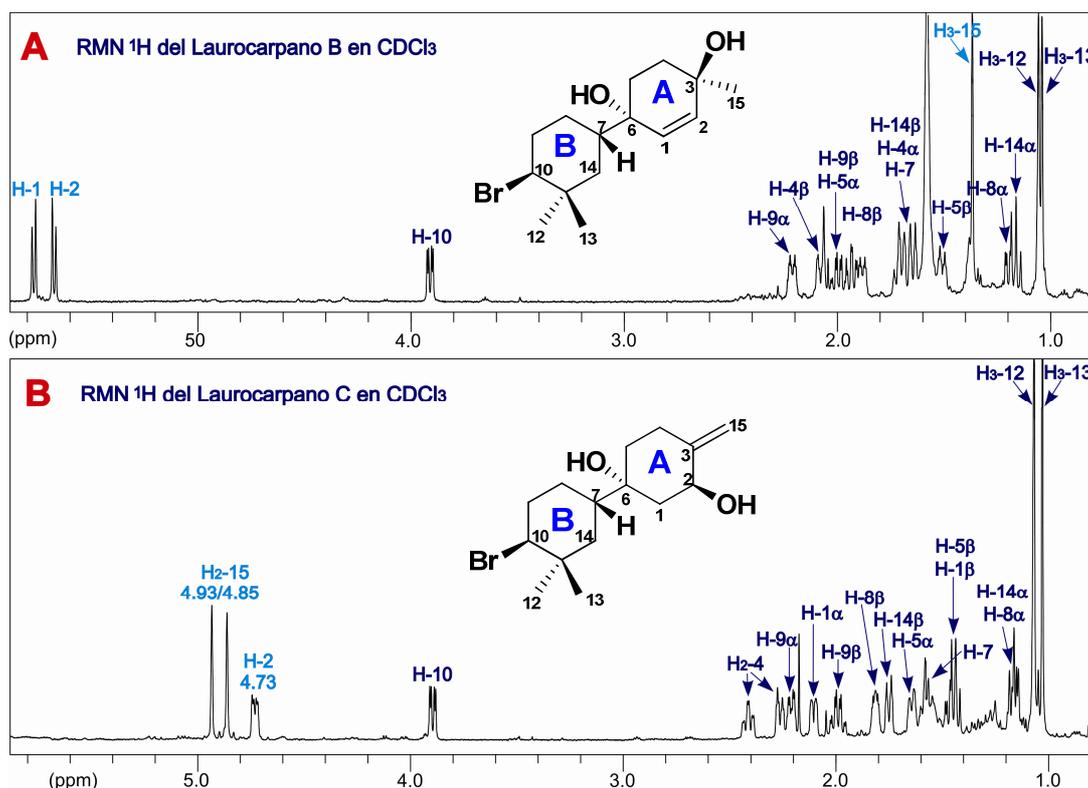


Figura 3.4.8. Comparación de los espectros de RMN ^1H (600 MHz) del laurocarpano B (**24**) (A) y C (**25**) (B).

El análisis del fragmento C-1/C-6 a través de los experimentos bidimensionales HSQC y COSY permitió identificar dos sistemas de espín ^1H - ^1H , indicados como I [H_2 -1

(δ_H 2.10 y 1.43) \rightarrow H-2 (δ_H 4.73)] y II [H₂-4 (δ_H 2.40 y 2.26) \rightarrow H₂-5 (δ_H 1.64 y 1.47)]. Por otra parte, el estudio del experimento HMBC, permitió conectar los protones del metileno H₂-4, y del metino H-2 con la señal del carbono cuaternario C-3 (δ_C 146.4), que también es correlacionado por los protones olefínicos *exo* (H₂-15). Además, se observaron conectividades de los protones H₂-1, H₂-5 y H-7 (δ_H 1.58) con el carbono C-6 (δ_C 74.9) adyacente al grupo hidroxilo, completando la estructura del laurocarpano C (**25**) (Figura 3.4.9).

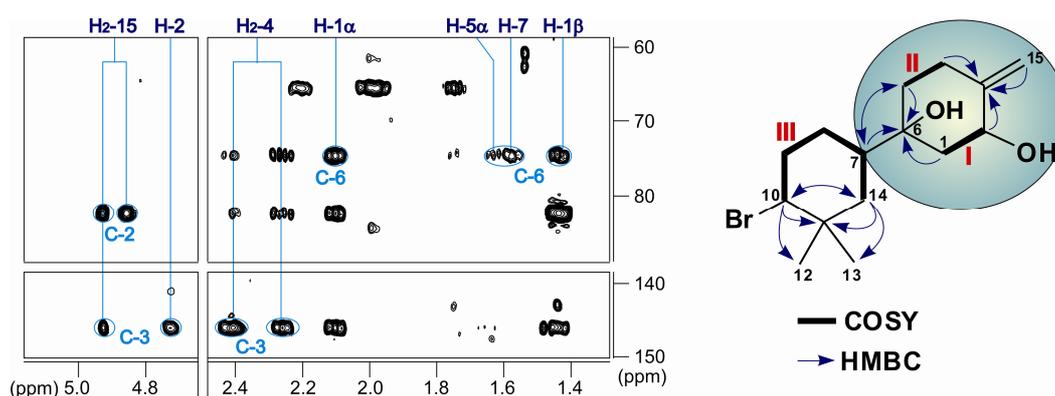


Figura 3.4.9. Secciones del espectro HMBC (600 MHz) con las correlaciones más importantes para conectar los distintos fragmentos COSY establecidos para la elucidación estructural del laurocarpano C (**25**).

La disposición relativa de los sustituyentes en C-7 y C-10 sobre el anillo de dimetilciclohexilo, y la del grupo hidroxilo sobre C-6 en el anillo A, fue determinada como *trans-diecuatorial* y axial, respectivamente, al igual que en los dos metabolitos anteriores. La disposición espacial del grupo hidroxilo en C-2 fue asignada como ecuatorial en base a las constantes de acoplamiento mostradas por el metino *axial* H-2 ($J = 4.6, 11.3$ Hz) con los dos protones del metileno H₂-1 (Figura 3.4.10). Por lo tanto, la configuración relativa en ese centro se propone como 2*S**

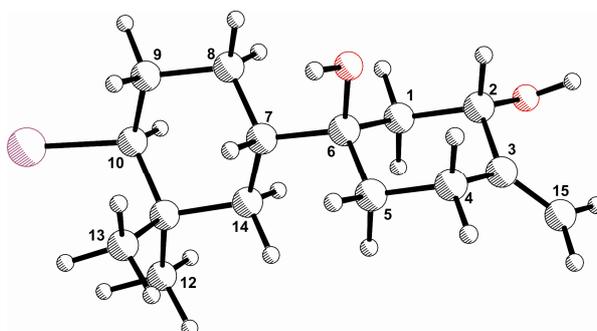


Figura 3.4.10. Representación en 3D de la estructura del laurocarpano C (**25**).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	40.0	α 2.10	dd	4.6, 12.1
		β 1.43	dd	11.3, 12.1
2	82.7	4.73	dd	4.6, 11.3
3	146.4			
4	29.5	α 2.40	ddd	4.1, 13.2, 13.7
		β 2.26	ddd	3.6, 3.8, 13.7
5	35.6	α 1.64	ddd	3.6, 4.1, 13.4
		β 1.47	ddd	3.8, 13.2, 13.4
6	74.9			
7	43.2	1.58	dddd	2.9, 3.1, 12.3, 13.2
8	28.2	β 1.84	dddd	3.1, 3.7, 3.9, 13.0
		α 1.16	dddd	3.7, 13.0, 13.2, 13.5
9	34.0	α 2.21	dddd	3.7, 3.7, 4.0, 13.3
		β 1.99	dddd	3.9, 12.7, 13.3, 13.5
10	65.7	3.90	dd	4.0, 12.7
11	36.6			
12	31.9	1.07 (3H)	s	
13	20.5	1.03 (3H)	s	
14	40.4	β 1.75	ddd	2.7, 2.9, 13.1
		α 1.17	<i>br</i> dd	12.3, 13.1
15	105.7	4.93	s	
		4.85	s	

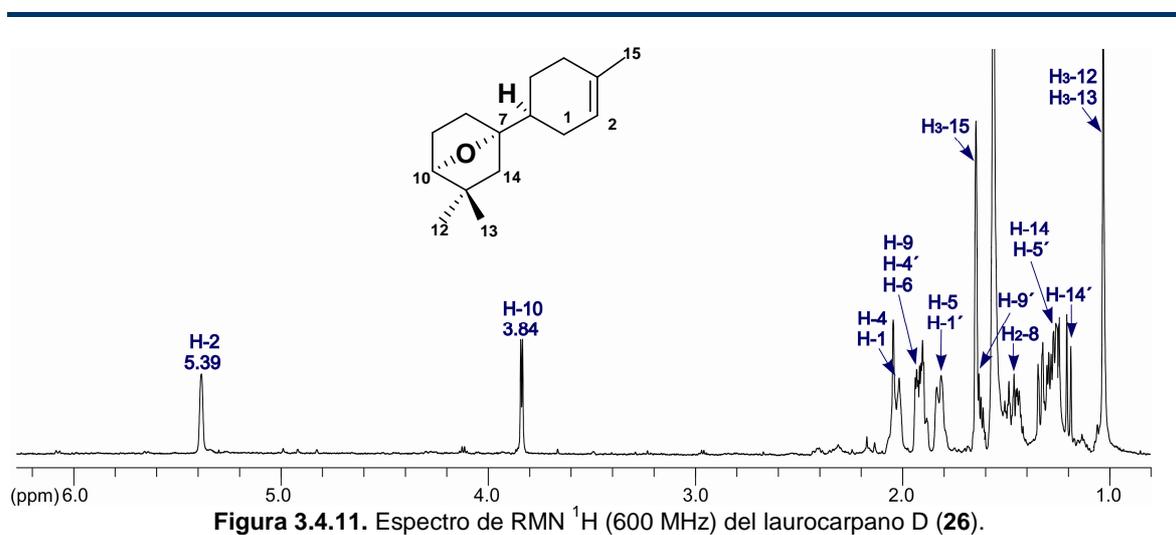
Tabla 3.4.3. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del laurocarpano C (25) (CDCl_3).

3.4.1.4. Laurocarpano D (26)

Este sesquiterpeno fue obtenido como un sólido amorfo blanco, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +16$ (c 0.03, CHCl_3), estableciéndose su fórmula molecular como $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ mediante espectrometría de masas. Así en el espectro ESI-FTICR se pudo observar el pico del ion pseudomolecular $[\text{M} + \text{K}]^+$ a m/z 259.17 (calc. 259.15), que se corresponde con cuatro insaturaciones en la molécula. La absorción de IR a 1253 cm^{-1} , y la ausencia de absorciones características de grupos hidroxilos o carbonilos, indica que el único átomo de oxígeno presente forma parte de un puente éter.

El espectro de RMN ^1H (Figura 3.4.11), junto con los datos de RMN ^{13}C y HSQC con editado de multiplicidad (Figura 3.4.12), confirmó la presencia de tres metinos, uno olefínico y otro en α a oxígeno ($\delta_{\text{H/C}}$ 5.39/120.3, 3.84/84.9 y 1.90/39.3); seis metilenos diastereotópicos ($\delta_{\text{H/C}}$ 2.04,1.92/30.3; 2.03,1.81/27.3; 1.92,1.62/25.9; 1.82,1.29/24.6; 1.50,1.44/31.2 y 1.34,1.20/48.6); tres metilos cuaternarios, uno sobre doble enlace ($\delta_{\text{H/C}}$

1.65/23.6, 1.03/30.1 y 1.03/25.0); y tres carbonos cuaternarios (δ_C 134.0, 90.5 y 40.9) (Tabla 3.4.4).



La asignación estructural se llevó a cabo a través de los experimentos bidimensionales COSY, HSQC y HMBC (Figura 3.4.12). De esta forma, las correlaciones ^1H - ^1H geminales y vecinales establecieron tres sistemas de espín, donde el primero se inicia en el metino olefínico H-2 (δ_H 5.39), el cual muestra acoplamiento con los protones H₂-1 (δ_H 2.03 y 1.81), y éstos siguen la secuencia a través del metino H-6 (δ_H 1.90), hasta concluir en los metilenos H₂-5 (δ_H 1.82 y 1.29) y H₂-4 (δ_H 2.04 y 1.92). El siguiente fragmento, el **II**, incluye otros dos metilenos adyacentes H₂-8 (δ_H 1.50 y 1.44) y H₂-9 (δ_H 1.92 y 1.62), así como al metino oxigenado H-10 (δ_H 3.84). Finalmente, el fragmento **III** está formado por los protones del metileno aislado H₂-14 (δ_H 1.34 y 1.20).

El análisis del experimento HMBC establece un primer anillo en la molécula, mediante las correlaciones observadas del metilo a δ_H 1.65 (H₃-15) con los carbonos olefínicos a δ_C 134.0 (C-3)/120.3 (C-2) y el carbono terminal del fragmento **I** a δ_C 30.3 (C-4). Por otra parte, la conectividad del metino H-10 con el carbono a δ_C 90.5 (C-7) establece un puente éter entre dichas posiciones, mientras que las correlaciones de ese protón con los carbonos a δ_C 40.9 (C-11), 30.1 (C-12), 25.0 (C-13) y 48.6 (C-14), conecta el sistema *gem*-dimetilo situado en C-11 con los fragmentos **II** y **III**, completando los dos grados de insaturación restantes de la molécula con un sistema biciclo. Finalmente, las correlaciones HMBC de H-6 con los carbonos a C-7, C-14 y C-8 (δ_C 31.2), establecen la estructura final de este metabolito (Figura 3.4.12).

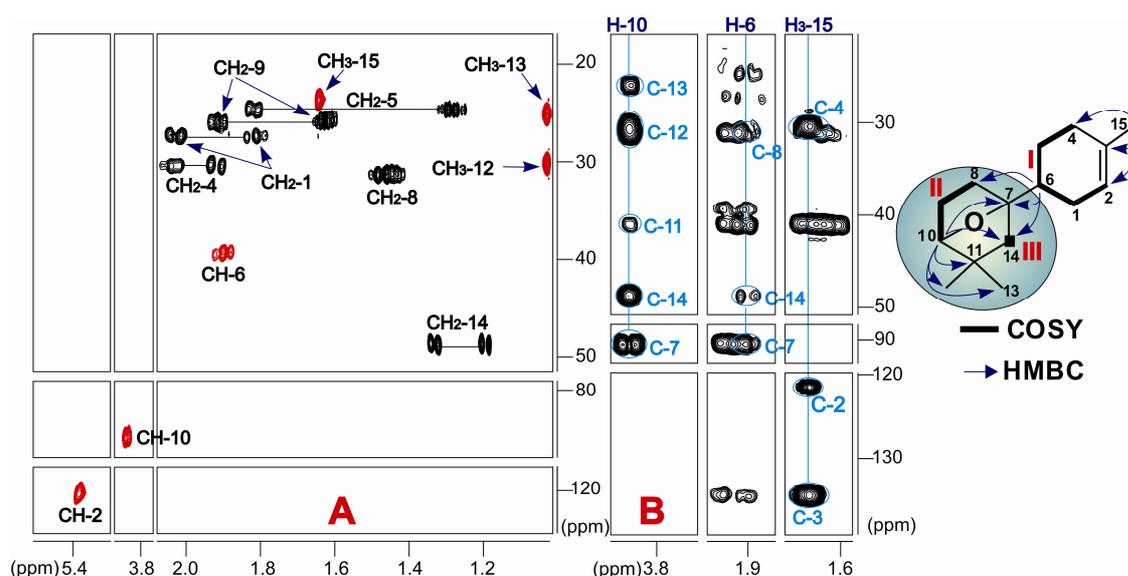


Figura 3.4.12. Secciones de los experimentos HSQC editado (A) y HMBC (B) (600 MHz). Representación de los tres sistemas de espín ^1H - ^1H y principales correlaciones HMBC para la estructura plana del laurocarpano D (26).

Respecto a la estereoquímica relativa de este compuesto, dada su estructura, sólo podemos hacer una propuesta basados en consideraciones biogénicas. Así, en el apartado de antecedentes hemos visto que se ha demostrado experimentalmente que el origen de estos metabolitos con esqueleto de macrocarpano deriva del precursor quiral (*S*)- β -bisaboleno (Figura 3.1.4), por lo que es lógico pensar que la estereoquímica del laurocarpano D en el anillo A procede de éste, mientras que el carbocatión en C-7 evoluciona por adición de agua y la posterior ciclación sobre C-10 del hidroxilo resultante por la cara opuesta a la salida del átomo de bromo (ver apartado 3.5). De esa forma proponemos una configuración relativa 6S^* , 7S^* , 10S^* (Figura 3.4.13).

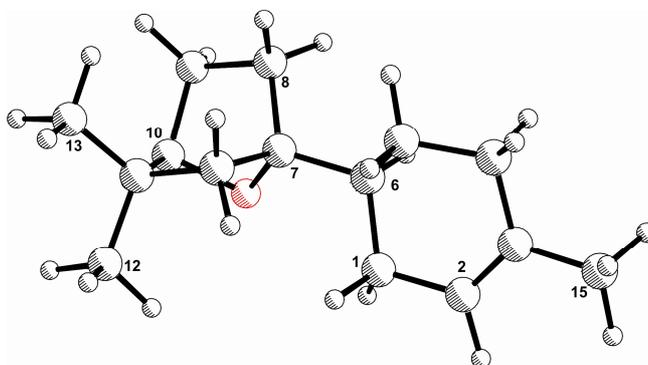


Figura 3.4.13. Representación en 3D de la estructura del laurocarpano D (26).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	27.3	2.03	m	
		1.81	m	
2	120.3	5.39	<i>br s</i>	
3	134.0			
4	30.3	2.04	m	
		1.92	m	
5	24.6	1.82	m	
		1.29	m	
6	39.3	1.90	m	
7	90.5			
8	31.2	1.50	ddd	3.5, 3.5, 11.9
		1.44	m	
9	25.9	1.92	m	
		1.62	m	
10	84.9	3.84	<i>br d</i>	5.2
11	40.9			
12	30.1	1.03 (3H)	s	
13	25.0	1.03 (3H)	s	
14	48.6	1.34	<i>br dd</i>	2.3, 11.6
		1.20	<i>br d</i>	11.6
15	23.6	1.65 (3H)	s	

Tabla 3.4.4. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del laurocarpano D (**26**) (CDCl_3).

3.4.1.5. Laurocarpano E (**27**)

El laurocarpano E (**27**) fue aislado como un sólido amorfo de color blanco y rotación óptica $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +22$ (c 0.02, CHCl_3). Su fórmula molecular, $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$, fue establecida en base al ion $[\text{M} + \text{H}]^+$ observado a m/z 237.18 (calc. 237.19) en su espectro de masas ESI-FTICR. Su espectroscopía de IR confirma la presencia de un alcohol (3400 cm^{-1}) y de un alqueno (1729 cm^{-1}).

Los datos de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **27** (Tabla 3.4.5) fueron similares a los del metabolito anterior, el laurocarpano D (**26**) (Tabla 3.4.4). En efecto, la comparación de los espectros de RMN ^1H (Figura 3.4.14) ilustra la correspondencia de prácticamente todas las señales del biciclo en ambas sustancias; mientras que las principales diferencias en el nuevo compuesto se centran en que el doble enlace no es trisustituido sino disustituido con los metinos vinílicos H-1 y H-2 a δ_{H} 6.07 y 5.65, respectivamente, el

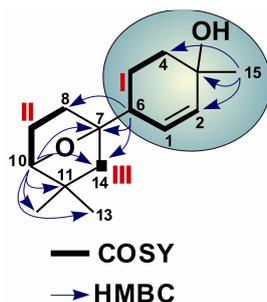


Figura 3.4.15. Correlaciones ^1H - ^{13}C más importantes del experimento HMBC (600 MHz) para la conexión de los fragmentos COSY (600 MHz) establecidos para el laurocarpano E (**27**).

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	134.9	6.07	<i>br d</i>	10.2
2	129.4	5.65	<i>br d</i>	10.2
3	78.9			
4	31.6	2.17	<i>m</i>	
		1.43	<i>m</i>	
5	21.5	1.63	<i>m</i>	
		1.51	<i>m</i>	
6	41.6	2.42	<i>m</i>	
7	89.6			
8	33.4	1.52	<i>m</i>	
		1.45	<i>m</i>	
9	25.9	1.94	<i>ddd</i>	4.0, 9.0, 12.7
		1.67	<i>m</i>	
10	84.9	3.86	<i>br d</i>	5.3
11	41.0			
12	29.4	1.03 (3H)	<i>s</i>	
13	24.9	1.02 (3H)	<i>s</i>	
14	46.6	1.32	<i>br d</i>	11.8
		1.16	<i>br d</i>	11.8
15	24.8	1.35 (3H)	<i>br s</i>	

Tabla 3.4.5. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del laurocarpano E (**27**) (CDCl_3).

Finalmente, si para formular una propuesta de estereoquímica relativa en los centros C-6, C-7 y C-10, se consideran los mismos postulados biogénéticos que en el compuesto anterior, la configuración en C-3 se propone como *R**. Esto se hace en base a la correlación observada en el experimento TROESY entre el metino H-6 y el protón diaterotópico más apantallado del metileno H₂-4 (δ_{H} 1.43) y que sitúa al grupo hidroxilo en la cara opuesta de la molécula. Esta configuración relativa sería la equivalente a la observada en ese centro para el laurocarpano B (**24**), cuyo anillo A guarda paralelismo con el de este metabolito.

3.4.2. Derivados tricíclicos

3.4.2.1. Ciclolaurocarpano (28) y bromociclococanol

Este ciclolaurocarpano (**28**) fue obtenido como un aceite incoloro y una rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} = +3$ (c 0.38, CHCl_3). El espectro de masas ESI-HRMS permitió determinar su fórmula molecular como $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{BrO}$, en base a los iones pseudomoleculares $[\text{M} + \text{Na} + \text{H}]^+$ a m/z 324.13/326.13 (calc. 324.11/326.10 para $\text{C}_{15}\text{H}_{26}^{79}\text{BrONa}/\text{C}_{15}\text{H}_{26}^{81}\text{BrONa}$) y $[\text{M} + \text{H}]^+$ a m/z 301.14 (calc. 301.12 para $\text{C}_{15}\text{H}_{26}^{79}\text{BrO}$). De acuerdo a su fórmula empírica se predicen tres insaturaciones que han de estar implicadas en igual cantidad de anillos, debido a la presencia de una absorción característica de grupo hidroxilo (3460 cm^{-1}) y la ausencia de doble o triple enlace en el espectro de IR.

En un análisis inicial de su espectro de RMN ^1H (Figura 3.4.16), lo primero que destaca es la presencia de señales propias de un ciclopropano a δ_{H} 0.38 y 0.22. Asimismo, resalta la existencia de un metino enlazado a heteroátomo a δ_{H} 3.92, y la de metilos sobre carbonos cuaternarios a δ_{H} 1.30, 1.06 y 1.01.

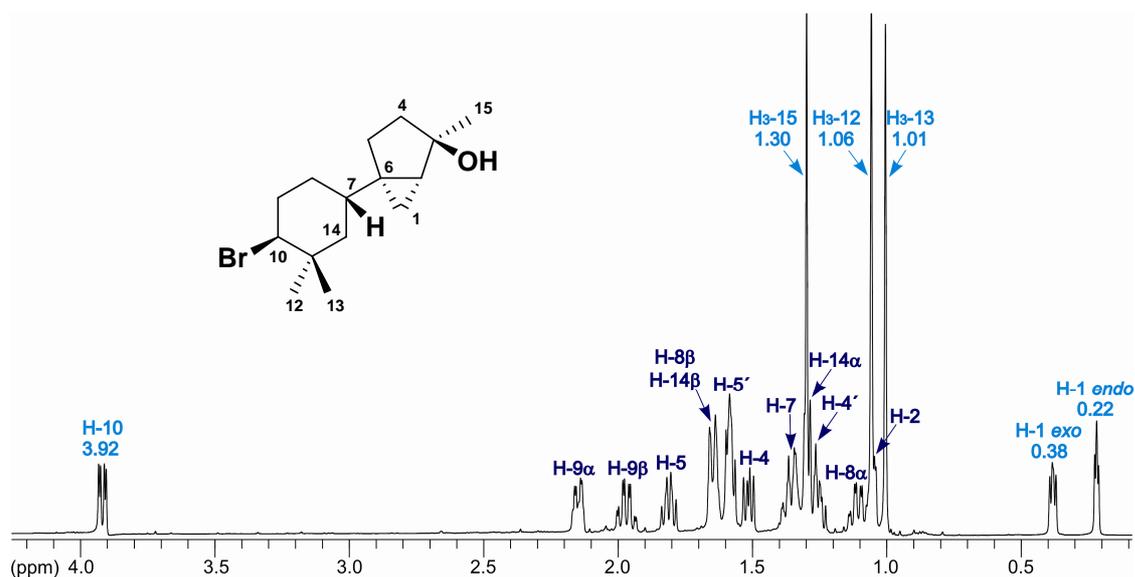


Figura 3.4.16. Espectro de RMN ^1H del ciclolaurocarpano (**28**) en CDCl_3 (600 MHz).

Por su parte, los datos de RMN ^{13}C (Tabla 3.4.6) en combinación con los del experimento HSQC con editado de multiplicidad (Figura 3.4.17) indicaron que los 15 átomos de carbono se clasifican en tres metinos, seis metilenos, tres metilos y tres carbonos totalmente sustituidos donde uno de ellos se une al alcohol.

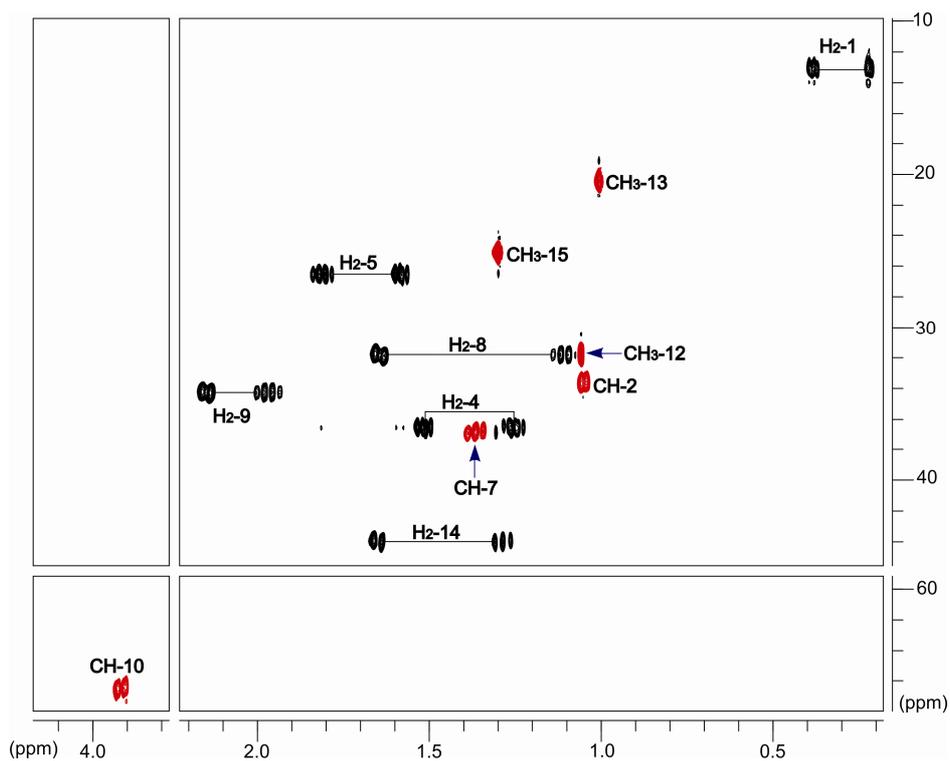
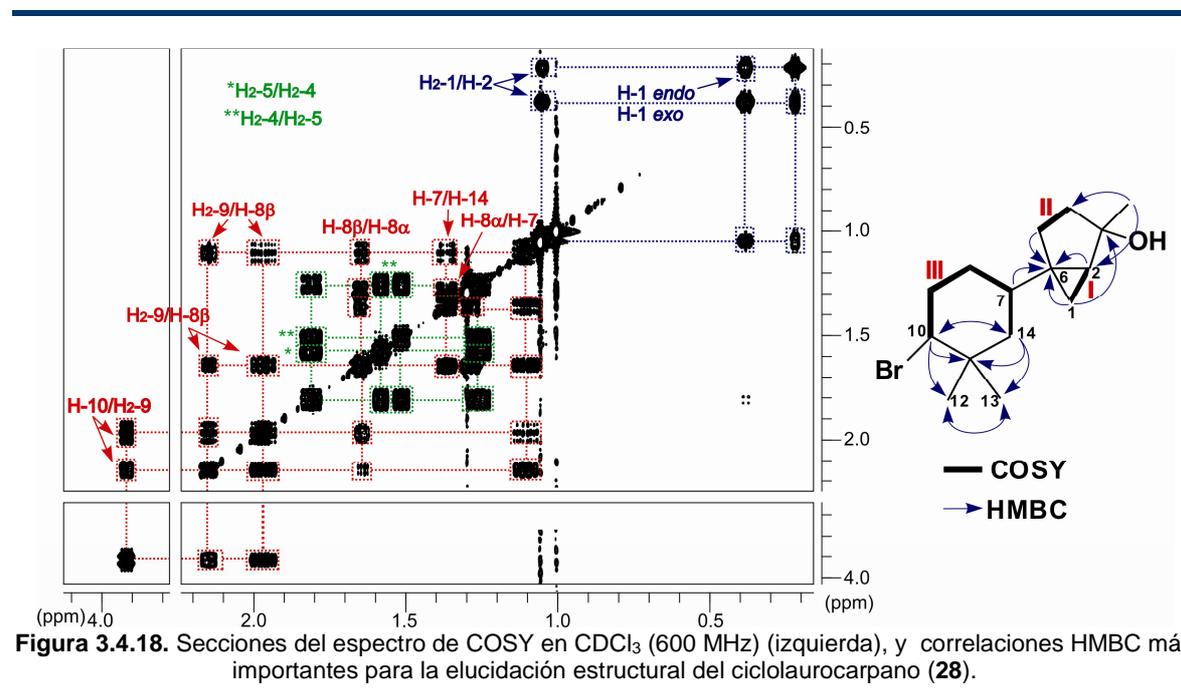


Figura 3.4.17. Espectro de HSQC editado del ciclolaurocarpano (**28**) en CDCl_3 (600 MHz).

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	13.2	<i>exo</i> : 0.38 <i>endo</i> : 0.22	dd dd	5.5, 8.2 3.4, 5.5
2	33.7	1.05	<i>br d</i>	3.4, 8.2
3	80.4			
4	36.6	1.51 1.24	<i>br dd</i> ddd	8.5, 14.1 8.5, 11.8, 14.1
5	26.6	1.81 1.58	ddd <i>br dd</i>	8.5, 11.8, 11.8 8.5, 11.8
6	32.8			
7	36.9	1.36	dddd	3.2, 3.2, 12.2, 12.6
8	31.8	β 1.65 α 1.10	dd dddd	3.2, 3.4, 3.6, 13.1 3.7, 12.6, 13.0, 13.1
9	34.3	α 2.15 β 1.97	dddd dddd	3.4, 3.7, 4.2, 13.2 3.6, 12.6, 13.0, 13.2
10	66.5	3.92	dd	4.2, 12.6
11	36.6			
12	31.8	1.06 (3H)	s	
13	20.5	1.01 (3H)	s	
14	44.0	β 1.65 α 1.29	<i>br dd</i> <i>br dd</i>	3.2, 12.3 12.2, 12.3
15	25.2	1.30 (3H)	s	

Tabla 3.4.6. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del ciclolaurocarpano (**28**) (CDCl_3).

Un análisis detallado de los experimentos HSQC (Figura 3.4.17) y ^1H - ^1H COSY (Figura 3.4.18), revelaron la presencia de los fragmentos parciales I-III en la estructura de molécula. Así, el I, engloba los protones del ciclopropano H_2 -1 ($\delta_{\text{H/C}}$ 0.38 y 0.22/13.2) \rightarrow H_2 -2 ($\delta_{\text{H/C}}$ 1.05/33.7); el II, lo conforman los metilenos H_2 -4 ($\delta_{\text{H/C}}$ 1.51 y 1.24/36.6) \rightarrow H_2 -5 ($\delta_{\text{H/C}}$ 1.81 y 1.58/26.6); mientras que, el tercer sistema de espín III se inicia en el metino H-10 ($\delta_{\text{H/C}}$ 3.92/66.5), sobre el que se sitúa el átomo de bromo, y continua la secuencia de conectividades con los protones diasterotópicos H_2 -9 ($\delta_{\text{H/C}}$ 2.15 y 1.97/34.3), pasando al metileno H_2 -8 ($\delta_{\text{H/C}}$ 1.65 y 1.10/31.8) y al metino H-7 ($\delta_{\text{H/C}}$ 1.36/36.9), hasta concluir en el metileno H_2 -14 ($\delta_{\text{H/C}}$ 1.65 y 1.29/44.0).



La confirmación de estas estructuras parciales y la determinación de las conectividades entre ellas y los tres carbonos cuaternarios que contiene la molécula, fue llevada a cabo a través del espectro de HMBC, como se indica en la figura 3.4.18. Las mutuas correlaciones ^1H - ^{13}C a larga distancia entre los dos metilos terciarios a δ_{H} 1.06 (δ_{C} 31.8) y δ_{H} 1.01 (δ_{C} 20.5), y de éstos con el carbono cuaternario a δ_{C} 36.6, establece un grupo *gem*-dimetilo formado por H_3 -12 y H_3 -13 sobre C-11. Además, estos carbonos son correlacionados por los protones H-10 y H_2 -14 del fragmento III, fijando un primer anillo de ciclohexilo tetrasustituido. Por otro lado, el acoplamiento de los protones H_2 -1 con el carbono cuaternario adyacente a un grupo hidroxilo a δ_{C} 80.4 (C-3), y del metilo a δ_{H} 1.30 (H_3 -15) con C-2 y C-4 conecta los fragmentos I y II, a través de ese carbono C-3. Finalmente, las correlaciones de los protones H_2 -1, H_2 -5, H-2 y H-7 con el carbono

cuaternario restante a δ_C 32.8 (C-6) establecen los otros dos ciclos fusionados que justifican las insaturaciones sugeridas por la fórmula molecular, y la unión de éstos con el ciclohexilo definido en primera instancia, mediante los carbonos C-6 y C-7, obteniendo la estructura plana del presente metabolito secundario.

Junto con el ciclolaurocarpano (**28**), fue aislado otro metabolito ciclopropánico minoritario como un aceite incoloro y actividad óptica de $[\alpha]_D^{25} = +2$ (c 0.013, CHCl₃).

Un análisis detallado de sus datos de RMN (Tabla 3.4.7) a través de experimentos mono (¹H y ¹³C) y bidimensionales (COSY, HSQC editado y HMBC), confirmó que se trataba del bromociclococanol aislado previamente de *L. majuscula*,⁸ un compuesto con la misma estructura plana que el ciclolaurocarpano (**28**). El problema surge a la hora de asignar la configuración relativa de cada isómero, ya que a la dificultad de establecer la orientación relativa del ciclopropilo, se suma que el bromociclococanol aparece dibujado en la publicación original en dos configuraciones distintas.

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	11.0	endo: 0.65	dd	3.8, 4.8
		exo: 0.32	dd	5.0, 7.3
2	32.9	1.03	dd	3.8, 7.3
3	79.1			
4	36.0	1.52	m	
		1.29	m	
5	26.4	1.61	m	
		1.55	m	
6	31.5			
7	37.1	1.25	m	
8	31.4	β 1.60	m	
		α 1.10	dddd	3.8, 12.8, 13.0, 13.2
9	34.2	α 2.13	dddd	3.8, 4.1, 4.2, 13.3
		β 1.95	dddd	3.9, 12.5, 13.0, 13.3
10	66.4	3.89	dd	4.2, 12.5
11	36.6			
12	31.9	1.06 (3H)	s	
13	20.5	1.00 (3H)	s	
14	43.5	β 1.55	m	
		α 1.21	dd	12.5, 12.6
15	28.1	1.31 (3H)	s	

Tabla 3.4.7. Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) del bromociclococanol (CDCl₃).

Para ello, comenzamos estableciendo las principales diferencias en los datos de RMN de ambas sustancias (Tablas 3.4.6 y 3.4.7). Básicamente, las discrepancias más notables consisten en asignaciones correspondientes al ciclopropano. En tal sentido, el espectro de RMN ^1H (Figura 3.4.19B) muestra que la señal del protón $\text{H}_2\text{-1 } endo$ (δ_{H} 0.65) en el bromociclococanol se desplaza notablemente a campos más bajos que en el espectro de RMN ^1H del ciclolaurocarpano (**28**) (Figura 3.4.19A), situado a δ_{H} 0.22. También se observaron cambios en menor medida, pero hacia campos más altos en las señales de H-7 (δ_{H} 1.25 en bromociclococanol vs δ_{H} 1.36 en **28**) y en uno de los protones del metileno $\text{H}_2\text{-5}$ (δ_{H} 1.61/1.51 en bromociclococanol vs δ_{H} 1.81/1.58 en **28**).

En tal sentido, el espectro de RMN ^1H muestra que la señal del protón $\text{H}_2\text{-1 } endo$ (δ_{H} 0.65) en el bromociclococanol se desplaza notablemente a campos más bajos que en el ciclolaurocarpano (**28**) situado a δ_{H} 0.22 (Figura 3.4.19). También se observaron cambios en menor medida, pero hacia campos más altos en las señales de H-7 (δ_{H} 1.25 en bromociclococanol vs δ_{H} 1.36 en **28**) y en uno de los protones del metileno $\text{H}_2\text{-5}$ (δ_{H} 1.61/1.51 en bromociclococanol vs δ_{H} 1.81/1.58 en **28**).

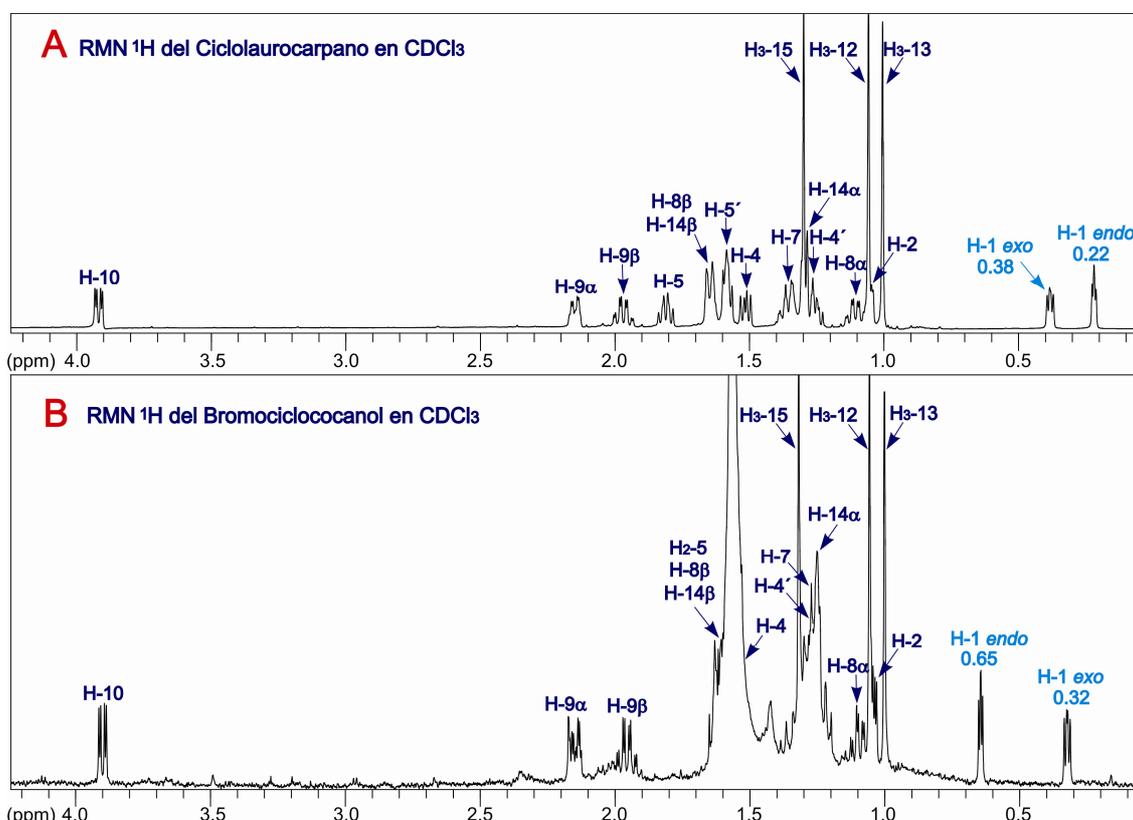


Figura 3.4.19. Comparación de los espectros de RMN ^1H (600 MHz) del ciclolaurocarpano (**28**) (A) y del bromociclococanol (B).

Analizando las constantes de acoplamiento homonucleares y los datos de los experimentos TROESY, confirmamos que en ambos productos, la configuración relativa del anillo B sigue las mismas pautas que el resto de los derivados aislados en este estudio. Respecto al sistema formado por los dos anillos fusionados no encontramos *a priori* datos de estereoquímica relativa diferenciadores entre los dos metabolitos, por lo que decidimos hacer un estudio en la bibliografía de sistemas similares. Fürstner y Schlecker abordaron la síntesis de un conjunto de miembros de familias de terpenos con sistemas sesquisabineno y sesquitujeno.¹⁰ Entre los compuestos sintetizados hay cuatro hidratos de sesquisabinenos que reflejan las cuatro posibilidades de diastereómeros posibles en nuestro caso. En la tabla 3.4.8, se recogen las estructuras, así como los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento homonucleares de los protones del metileno del ciclopropano. En ellas se observa que los datos del hidrato de *trans*-sesquisabineno coinciden con los de nuestro metabolito ciclolaurocarpano (**28**), mientras que los del hidrato de *cis*-sesquisabineno concuerdan con los obtenidos para el bromociclococanol.

	Hidrato de <i>cis</i> -sesquisabineno			Hidrato de <i>trans</i> -sesquisabineno			Hidrato de 7- <i>epi-trans</i> -sesquisabineno			Hidrato de 7- <i>epi-cis</i> -sesquisabineno		
	δ_H	Mult.	<i>J</i> (Hz)	δ_H	Mult.	<i>J</i> (Hz)	δ_H	Mult.	<i>J</i> (Hz)	δ_H	Mult.	<i>J</i> (Hz)
endo	0.65	dd	4.8, 3.7	0.34	ddd	8.4, 5.2, 0.7	0.41	dd	7.7, 5.3	0.73	dd	4.7, 4.0
exo	0.29	dd	7.6, 5.1	0.22	dd	5.1, 3.5	0.31	dd	5.1, 3.7	0.34	dd	7.9, 5.1

Tabla 3.4.8. Se indican los desplazamientos químicos correspondientes a los protones *exo* y *endo* del sistema de ciclopropano presente en distintos monoterpenos de tipo sesquisabineno.

En el primer caso, nuestros datos experimentales están de acuerdo con esta configuración, ya que observamos una correlación ROE entre el protón H-1 *endo* y el metilo H₃-15. Además una disposición 1,3-*cis*di axial entre el protón diastereotópico H-5 (δ_H 1.81, ddd, *J* = 8.5, 11.8, 11.8 Hz) y el grupo hidroxilo en C-3, podría justificar el desplazamiento a campos bajos relativo de este protón con respecto al bromociclococanol. Sin embargo, en el caso de este último, la estructura del hidrato de *cis*-sesquisabineno que debe ser propuesta en base a este estudio comparativo, no coincide con ninguna de las dos estructuras que aparecen en la publicación, ya que los

¹⁰ Fürstner, A.; Schlecker, A. *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 9181.

autores proponen una disposición del ciclopropano y del grupo hidroxilo en *trans*, en base a un ROE entre el protón *endo* y el metilo H₃-15. No obstante, en el experimento TROESY del compuesto que posee los mismos datos espectroscópicos que el bromociclococanol, hemos comprobado que esa correlación ROE no debería ser considerada del metilo sino que corresponde a uno de los protones diastereotópicos H₂-4 (δ_H 1.29) con los que éste está solapado. Por otro lado, la disposición *cis* del ciclopropano con el grupo hidroxilo en C-3, explicaría el mayor desapantallamiento que sufre el protón *endo* del ciclopropano en ese metabolito.

En conclusión, la estructura del ciclolaurocarpano posee una configuración relativa tal como se muestra en la figura 3.4.20, mientras que para el bromociclococanol, proponemos una estructura revisada como epímero del ciclolaurocarpano en C-3.

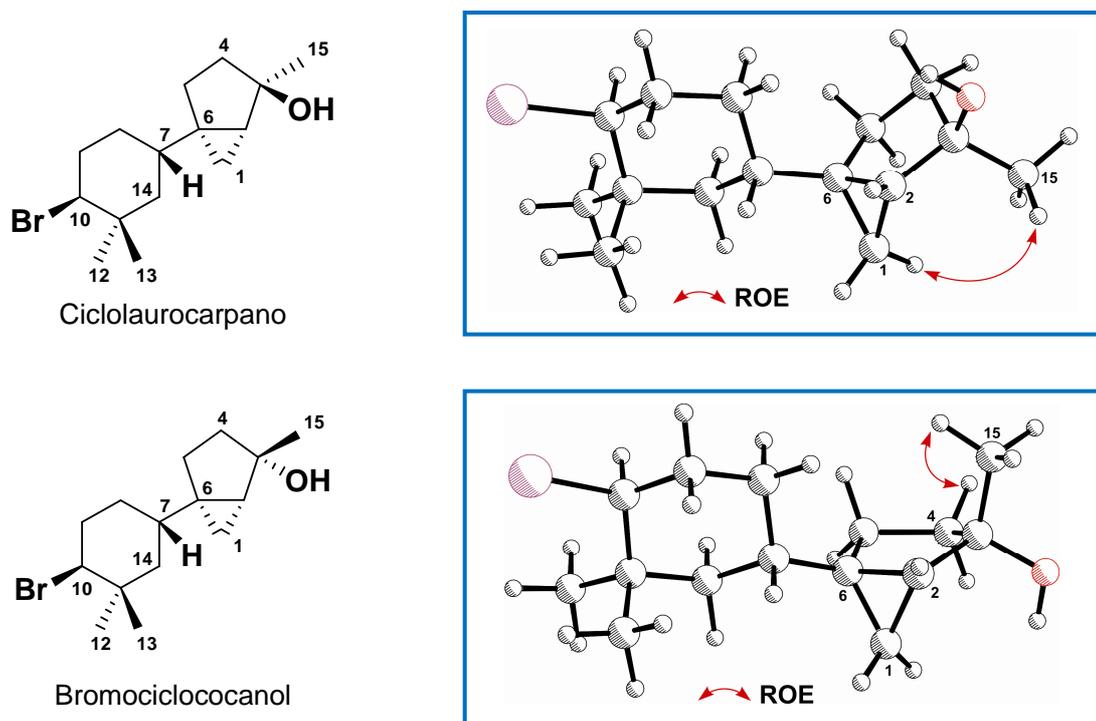


Figura 3.4.20. Configuraciones relativas propuestas para el ciclolaurocarpano (28) y el bromociclococanol.

Por último, nos ha llamado la atención que en el estudio de esta alga no encontrásemos alguno de los otros dos derivados de la ciclación del ciclopropano por la otra cara de la molécula, preguntándonos si podrían estar involucrados factores energéticos.

Por ese motivo, en colaboración con el Dr. Miguel Ángel Ramírez (IUBO-ULL) nos planteamos realizar cálculos teóricos utilizando métodos *ab initio*,¹¹ a fin de determinar si el carbocatión previo a la formación del anillo de ciclopropano podría adoptar una conformación preferente que justificase estos resultados.

En este sentido, se llevó a cabo una primera aproximación con un modelo estructural simplificado en estado gaseoso, a través del método de cálculo B3LYP y el sistema 6-311G (d,p). Se obtuvieron dos mínimos de energía del intermedio catiónico que parecen adoptar las posibles conformaciones que podría dar lugar a la ciclación por una y otra cara (Figura 3.4.21), resultando ligeramente más estable aquella que daría lugar a los dos metabolitos aislados en nuestro estudio. Este resultado preliminar, nos ha llevado a plantearnos seguir un poco más en esta línea.

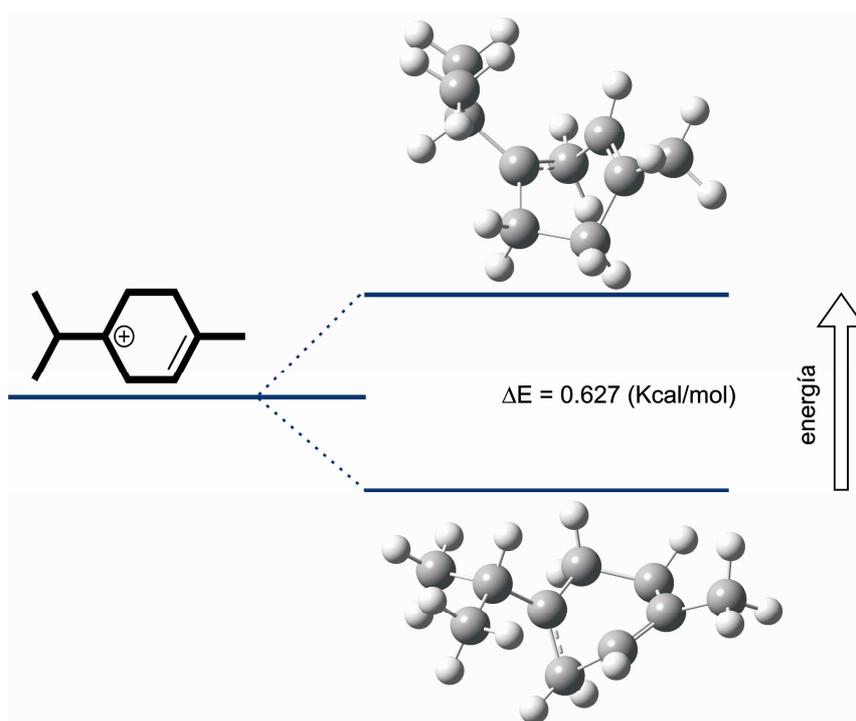


Figura 3.4.21. Conformaciones de mínima energía resultado de los cálculos teóricos preliminares.

¹¹ Helgaker, T.; Jaszunski, M.; Pecul, M. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2008**, 53, 249.

3.5. ORIGEN BIOGENÉTICO DE LOS METABOLITOS AISLADOS

El origen biogenético del esqueleto de los macrocarpanos a partir del catión 2Z,6E-nerolidilo pasando por el intermedio monocíclico clave, el (S)- β -bisaboleno se ha descrito con detalle en el apartado de antecedentes de este capítulo. En base a esos datos hacemos una propuesta biogenética para la formación de los metabolitos con ese esqueleto aislados de *L. microcladia*, y que se resume en la figura 3.5.1.

En nuestro caso planteamos que la formación del catión macrocarpeno podría venir inducida por la formación de un ion bromonio sobre la olefina entre C-13 y C-14. El ataque del agua en el carbocatión podría derivar en la posterior formación de un puente éter con C-10 por la cara opuesta a la salida del bromo dando lugar a los laurocarpanos D y E (**26-27**). Por otro lado, si lo que tiene lugar es una migración de hidruro desde C-6, la adición de agua y la acción de peroxidasas originarían los laurocarpanos A-C (**23-25**). La formación del ciclolaurocarpano y del bromociclococanol vendría de la ciclación sobre el carbocatión en C-6 por la cara *beta* de la molécula a través de una S_N1 y el posterior ataque de agua. El que la ciclación tenga lugar sólo por una cara de la molécula proponemos que puede ser en base a lo expuesto en el apartado anterior.

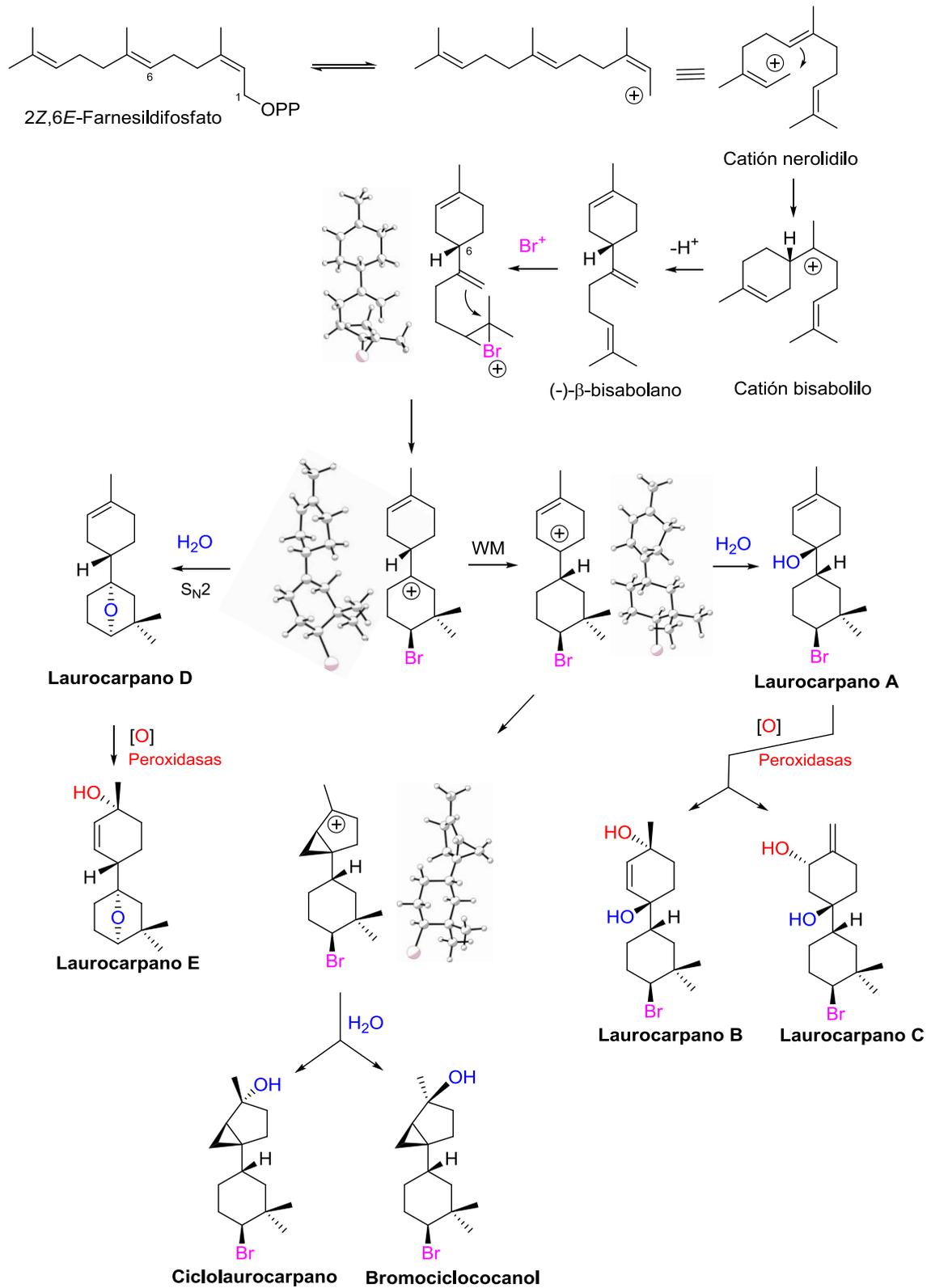


Figura 3.5.1. Propuesta biogénica para la formación de los laurocarpanos A-E (23-27), el ciclolaurocarpano (28) y el bromociclococanol

3.6. DATOS FÍSICOS DE LOS METABOLITOS AISLADOS

3.6.1. Laurocarpano A (23)

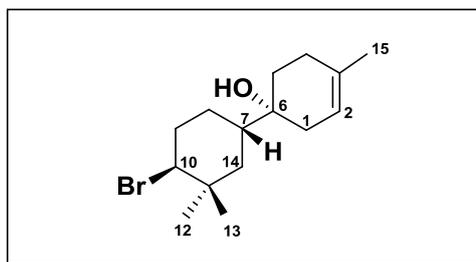
Aceite incoloro.

$[\alpha]_D^{25} = +5$ (c 0.57, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 203$ nm (log ϵ 3.11).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3416, 2950, 2871, 1706, 1665, 1453, 1369, 1265, 1217, 963$ cm⁻¹.

ESI-FTICR: para C₁₅H₂₆⁷⁹BrO, C₁₅H₂₆⁸¹BrO; [M + H]⁺ m/z 301.14, 303.16; a. r.: 100:82 (calc. 301.12, 303.14).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃:

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	35.2	α 2.14	dd	3.2, 15.5
		β 1.89	<i>br</i> d	15.5
2	118.1	5.27	<i>br</i> s	
3	134.0			
4	26.9	2.13	m	
		1.94	m	
5	31.0	α 1.66	ddd	2.9, 5.9, 13.0
		β 1.51	ddd	6.1, 11.5, 13.0
6	71.0			
7	41.3	1.61	dddd	3.2, 3.4, 12.6, 12.6
8	28.1	β 1.78	dddd	3.4, 3.9, 4.2, 13.1
		α 1.19	dddd	3.5, 12.6, 13.1, 13.1
9	34.2	α 2.20	dddd	3.5, 3.9, 4.4, 13.4
		β 2.00	dddd	4.2, 12.8, 13.1, 13.4
10	66.5	3.94	dd	4.4, 12.8
11	36.6			
12	31.9	1.07 (3H)	s	
13	20.4	1.04 (3H)	s	
14	40.3	β 1.82	ddd	2.8, 3.2, 13.4
		α 1.21	ddd	2.8, 12.6, 13.4
15	23.3	1.68 (3H)	s	

3.6.2. Laurocarpano B (24)

Aceite incoloro.

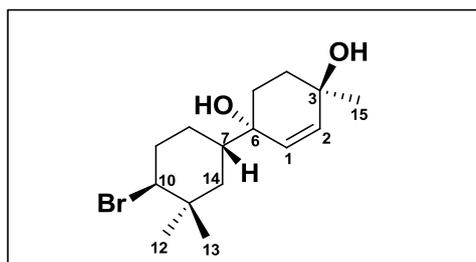
$[\alpha]_D^{25} = +1$ (c 0.02, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 204$ nm (log ϵ 3.53).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3402, 2930, 2859, 1714, 1666, 1456, 1372, 1264, 1021, 964, 865$ cm⁻¹.

ESI-FTICR: para C₁₅H₂₆⁷⁹BrO₂; [M + H]⁺ m/z 317.09; (calc. 317.11).

ESI-HRMS: para C₁₅H₂₅⁷⁹BrO₂; [M]⁺ m/z 316.10; (calc. 316.10).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃:

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	136.8	5.77	d	10.1
2	131.3	5.67	d	10.1
3	78.8			
4	28.2	β 2.08	m	
		α 1.69	m	
5	28.0	α 1.93	ddd	3.7, 12.8, 13.7
		β 1.51	ddd	3.7, 4.8, 13.7
6	70.9			
7	42.2	1.71	dddd	2.8, 3.2, 13.1, 13.3
8	27.8	β 1.88	dddd	2.8, 3.1, 4.0, 13.2
		α 1.20	dddd	4.4, 13.0, 13.2, 13.3
9	34.1	α 2.20	dddd	3.1, 4.1, 4.4, 13.4
		β 1.99	dddd	4.0, 12.7, 13.0, 13.4
10	66.1	3.91	dd	4.1, 12.7
11	36.7			
12	31.9	1.06 (3H)	s	
13	20.6	1.04 (3H)	s	
14	40.9	β 1.64	ddd	2.9, 3.2, 13.3
		α 1.15	dd	13.1, 13.3
15	24.4	1.37 (3H)	s	

3.6.3. Laurocarpano C (25)

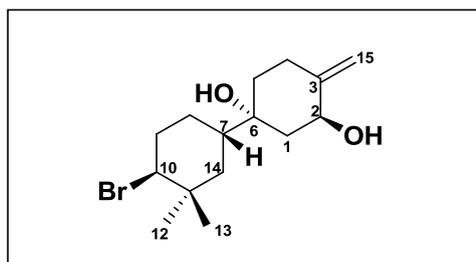
Aceite incoloro.

$[\alpha]_D^{25} = +4$ (c 0.08, CHCl_3).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 203$ nm (log ϵ 3.67).

IR (CHCl_3) $\nu_{max} = 3393, 2926, 2855, 1650, 1456, 1368, 1260, 1080, 1023, 963, 898$ cm^{-1} .

ESI-FTICR: para $\text{C}_{15}\text{H}_{26}^{79}\text{BrO}_2$; $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 317.09; (calc. 317.11).



Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en CDCl_3 :

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	40.0	α 2.10	dd	4.6, 12.1
		β 1.43	dd	11.3, 12.1
2	82.7	4.73	dd	4.6, 11.3
3	146.4			
4	29.5	α 2.40	ddd	4.1, 13.2, 13.7
		β 2.26	ddd	3.6, 3.8, 13.7
5	35.6	α 1.64	ddd	3.6, 4.1, 13.4
		β 1.47	ddd	3.8, 13.2, 13.4
6	74.9			
7	43.2	1.58	dddd	2.9, 3.1, 12.3, 13.2
8	28.2	β 1.84	dddd	3.1, 3.7, 3.9, 13.0
		α 1.16	dddd	3.7, 13.0, 13.2, 13.5
9	34.0	α 2.21	dddd	3.7, 3.7, 4.0, 13.3
		β 1.99	dddd	3.9, 12.7, 13.3, 13.5
10	65.7	3.90	dd	4.0, 12.7
11	36.6			
12	31.9	1.07 (3H)	s	
13	20.5	1.03 (3H)	s	
14	40.4	β 1.75	ddd	2.7, 2.9, 13.1
		α 1.17	br dd	12.3, 13.1
15	105.7	4.93	s	
		4.85	s	

3.6.4. Laurocarpano D (26)

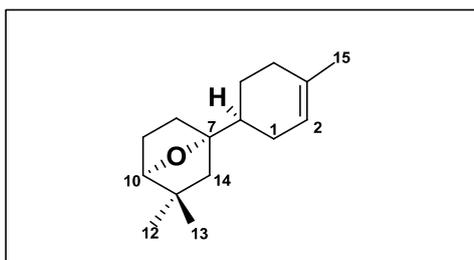
Sólido blanco amorfo.

$[\alpha]_D^{25} = +16$ (c 0.03, CHCl_3).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 202$ nm (log ϵ 3.38).

IR (CHCl_3) $\nu_{max} = 2955, 2928, 2867, 1729, 1450, 1367, 1240, 1253, 1161, 988, 751$ cm^{-1} .

ESI-FTICR: para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{OK}$; $[\text{M} + \text{K}]^+$ m/z 259.17; (calc. 259.15).



Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en CDCl_3 :

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	27.3	2.03	m	
		1.81	m	
2	120.3	5.39	<i>br s</i>	
3	134.0			
4	30.3	2.04	m	
		1.92	m	
5	24.6	1.82	m	
		1.29	m	
6	39.3	1.90	m	
7	90.5			
8	31.2	1.50	ddd	3.5, 3.5, 11.9
		1.44	m	
9	25.9	1.92	m	
		1.62	m	
10	84.9	3.84	<i>br d</i>	5.2
11	40.9			
12	30.1	1.03 (3H)	s	
13	25.0	1.03 (3H)	s	
14	48.6	1.34	<i>br dd</i>	2.3, 11.6
		1.20	<i>br d</i>	
15	23.6	1.65 (3H)	s	

3.6.5. Laurocarpano E (27)

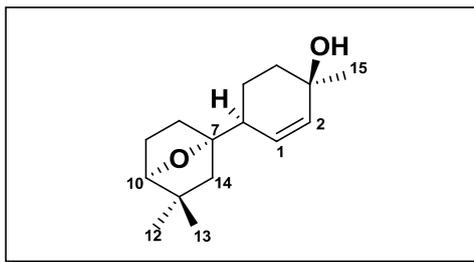
Sólido blanco amorfo.

$[\alpha]_D^{25} = +22$ (c 0.02, CHCl_3).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 202$ nm (log ϵ 3.14).

IR (CHCl_3) $\nu_{max} = 3400, 2955, 2928, 2867, 1729, 1450, 1368, 1253, 1195, 1161, 988, 751$ cm^{-1} .

ESI-FTICR: para $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}_2$; $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 237.18; (calc. 237.19).



Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en CDCl_3 :

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	134.9	6.07	<i>br d</i>	10.2
2	129.4	5.65	<i>br d</i>	10.2
3	78.9			
4	31.6	2.17	m	
		1.43	m	
5	21.5	1.63	m	
		1.51	m	
6	41.6	2.42	m	
7	89.6			
8	33.4	1.52	m	
		1.45	m	
9	25.9	1.94	ddd	4.0, 9.0, 12.7
		1.67	m	
10	84.9	3.86	<i>br d</i>	5.3
11	41.0			
12	29.4	1.03 (3H)	s	
13	24.9	1.02 (3H)	s	
14	46.6	1.32	<i>br d</i>	11.8
		1.16	<i>br d</i>	11.8
15	24.8	1.35 (3H)	<i>br s</i>	

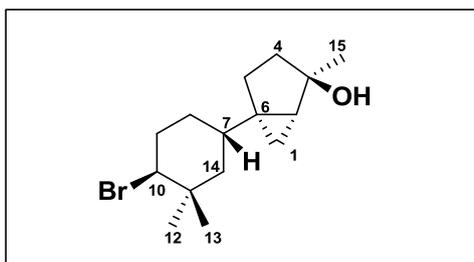
3.6.6. Ciclolaurocarpano (28)

Aceite incoloro.

$[\alpha]_D^{25} = +3$ (c 0.38, CHCl₃).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3460, 2930, 2868, 1729, 1455, 1367, 1253, 1140, 980, 763$ cm⁻¹.

ESI-HRMS: C₁₅H₂₆⁷⁹BrONa, para [M + Na + H]⁺, *m/z* obs. 324.13 (calc. 324.11); C₁₅H₂₆⁸¹BrONa para [M + Na + H]⁺, *m/z* obs. 326.13 (calc. 326.10); y C₁₅H₂₆⁷⁹BrO, [M + H]⁺, *m/z* obs. 301.14 (cal. 301.12).

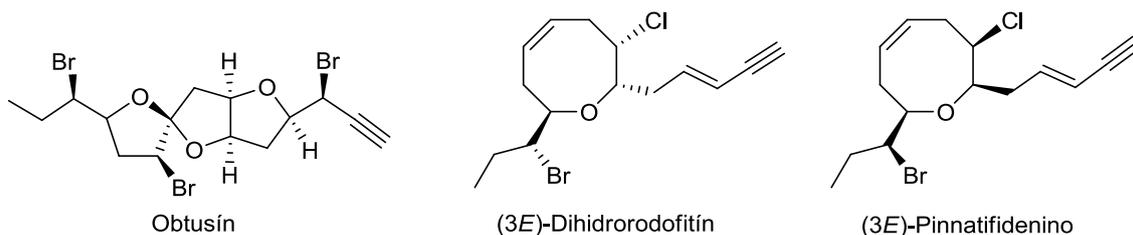


Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃:

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	13.2	<i>exo</i> : 0.38	dd	5.5, 8.2
		<i>endo</i> : 0.22	dd	3.4, 5.5
2	33.7	1.05	<i>br</i> d	3.4, 8.2
3	80.4			
4	36.6	1.51	<i>br</i> dd	8.5, 14.1
		1.24	ddd	8.5, 11.8, 14.1
5	26.6	1.81	ddd	8.5, 11.8, 11.8
		1.58	<i>br</i> dd	8.5, 11.8
6	32.8			
7	36.9	1.36	dddd	3.2, 3.2, 12.2, 12.6
8	31.8	β 1.65	dd	3.2, 3.4, 3.6, 13.1
		α 1.10	dddd	3.7, 12.6, 13.0, 13.1
9	34.3	α 2.15	dddd	3.4, 3.7, 4.2, 13.2
		β 1.97	dddd	3.6, 12.6, 13.0, 13.2
10	66.5	3.92	dd	4.2, 12.6
11	36.6			
12	31.8	1.06 (3H)	s	
13	20.5	1.01 (3H)	s	
14	44.0	β 1.65	<i>br</i> dd	3.2, 12.3
		α 1.29	<i>br</i> dd	12.2, 12.3
15	25.2	1.30 (3H)	s	

3.6.7. Metabolitos conocidos aislados de *L. microcladia*

A continuación se presentan las estructuras de los restanes metabolitos conocidos, aislados en el estudio cromatográfico de este alga. La identificación de estos compuestos se realizó mediante el análisis detallado de sus datos espectroscópicos y espectrométricos y por contraposición con los ya reportados en la literatura científica. Junto al bromociclococanol, dichos metabolitos fueron el (3*E*)-dihidrorodofitín,¹² obtusín,¹³ (3*E*)-pinnatifidenino.¹⁴



¹² Norte, M.; Fernández, J. J.; Cataldo, F.; González, A. G. *Phytochemistry*, **1989**, 28, 647.

¹³ Howard, B.M.; Fenical, W.; Arnold, E.V.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 31, 2841.

¹⁴ González, A. G.; Martín, J. D.; Martín, V. S.; Norte, M.; Pérez, R.; Ruano, J. Z.; Drexler, S. A.; Clardy, J. *Tetrahedron*, **1982**, 38, 1009.

CAPÍTULO 4

Metabolitos secundarios de *Lobophora variegata*

4

METABOLITOS SECUNDARIOS DE *LOBOPHORA VARIEGATA*

RESUMEN

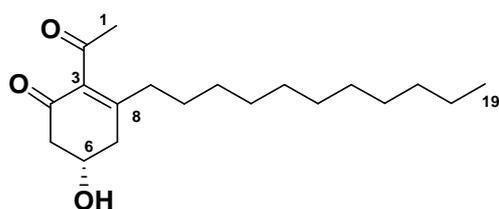
Lobophora variegata es una de las especies más comunes en las praderas de algas de las Islas Canarias. Este alga parda parece tener algún efecto frente al dominio de los erizos aunque se desconoce si el mecanismo de defensa es químico. En este capítulo se aborda su estudio fitoquímico precisando el aislamiento y la determinación estructural de 10 nuevos policétidos entre los que se incluyen 3 nonadecacétidos con un nuevo esqueleto carbonado que hemos denominado lobofoforano. Las estructuras fueron determinadas fundamentalmente en base a datos espectroscópicos. En el caso del cabeza de serie de los lobofoforanos, loboforol A, su estructura fue confirmada por estudios de difracción de rayos X. Estos nuevos metabolitos se relacionan a través de una propuesta biogenética común.



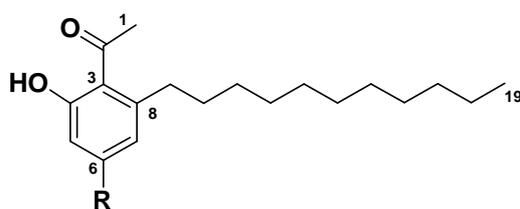
Fotos de *Lobophora variegata* en las Islas Canarias
(Fuente: www.landive.es/www.canariasporunacostaviva.org)

Nuevos metabolitos aislados

- Nonadecacétidos con esqueleto de lobofoforano:

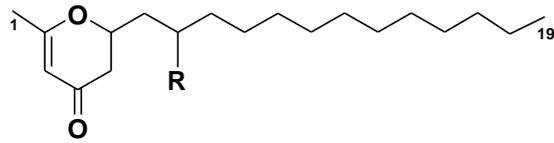


Lobofoforol A

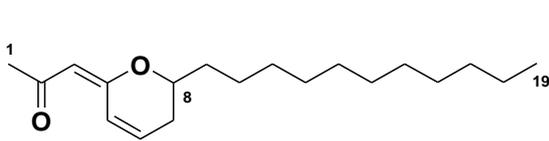


Lobofoforol B R = H
Lobofoforol C R = OH

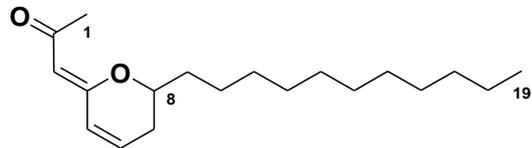
• Otros policétidos:



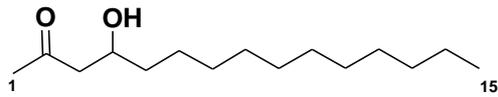
Lobofopiranona A R= H
Lobofopiranona B R= OH



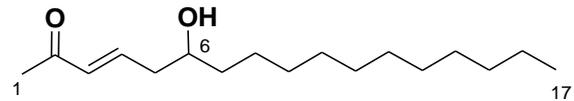
Loboforona A



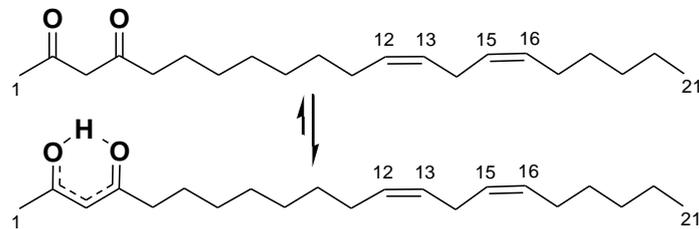
Loboforona B



Loboforona C



Loboforona D



Loboforona E

4.1. ANTECEDENTES

4.1.1. Alga parda *Lobophora variegata*: introducción

Las Phaeophytas, comúnmente llamadas algas pardas, son un conjunto importante de plantas que se clasifican en unos 265 géneros con más de 1.500 especies, siendo casi exclusivamente marinas, ya que sólo se conocen unas pocas de agua dulce.¹ Su nombre se debe a la presencia en los cloroplastos de diversos taninos y pigmentos fotosintéticos, como la fucoxantina, que enmascaran el color verde de los cloroplastos y la protegen de la luz solar.

En esta variedad de algas es notable el tamaño de sus poblaciones. Su típica distribución en praderas les permite abarcar hasta las tres cuartas partes del espacio rocoso disponible para el crecimiento de plantas marinas. Destaca también la variedad morfológica que presentan sus especies, desde filamentos pequeños hasta estructuras complejas con varios metros de longitud y gruesos troncos.

Constituyen un grupo de algas que cumplen importantes roles ecológicos y de gran interés económico, principalmente por su alto contenido en polisacáridos.² En algunas especies, los alginatos (polisacáridos sulfatados) pueden constituir entre el 20-40% del peso seco del alga, siendo más rentable su obtención de la naturaleza que su síntesis química. Los alginatos son útiles porque gelifican las soluciones acuosas y por ello se pueden emplear como aglutinantes, espesantes y estabilizantes tanto en la industria alimentaria, como en la farmacológica, textil, etc.

En las últimas décadas, numerosos estudios relacionados con la remoción de metales pesados se han desarrollado por medio de la reutilización de biomateriales procedentes por ejemplo de residuos de algas marinas, hongos, bacterias y levaduras.³ Algunas especies de algas pardas, específicamente de las familias Laminariaceae, Fucaceae y Sargassaceae, se han convertido en modelos ideales en la identificación de mecanismos de biosorción en soluciones acuosas que contienen dichos metales. La principal razón de este fenómeno se debe también a la abundancia de polisacáridos en la pared celular. Los alginatos y fucoidanos, debido a la elevada densidad electrónica de sus

¹ Bold, H. C.; Wynne, M. J. "Introduction to the algae". Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall; 1985, pp. 516.

² Chapman, V. J. "Seaweeds and their uses". London, UK: Chadman & Hall; 1980, pp. 334.

³ Cuizano, N. A.; Navarro, A. E. *Anales de Química*, **2008**, *104*, 120.

grupos funcionales, tienen capacidad de adsorber selectivamente y de forma natural mediante intercambio iónico cationes metálicos pesados.⁴

Desde el punto de vista fitoquímico, las algas pardas han sido ampliamente estudiadas. De ellas se han aislado muchas clases de metabolitos que abarcan desde polímeros fenólicos, más propiamente floroglucinol, presentes sólo en estas algas y que poseen importantes propiedades antibióticas y de protección frente a los rayos UV, utilizados en el tratamiento de melanomas; hasta las oxilipinas, un grupo de compuestos que constituyen una amplia familia de derivados lipídicos con importante variedad estructural.⁵

El alga parda *Lobophora variegata* J. V. Lamouroux (Dictyotaceae), presenta una amplia distribución en todo el mundo, tanto en mares tropicales como subtropicales.⁶ En las costas de las Islas Canarias es una de las más comunes, y se encuentra en grupos más o menos numerosos. Crece desde la zona intermareal hasta los 25 metros sobre substrato rocoso y en zonas de oleaje moderado, preferentemente al amparo de la luz directa de la superficie.

Al igual que otras de su género, la *L. variegata* ha sido objeto de importantes investigaciones relacionadas con la remediación ambiental. Se la ha caracterizado como un importante bioindicador de metales pesados, debido a su capacidad de unirse fuertemente a los mismos.⁷ Así, en aguas costeras de Nueva Caledonia altamente contaminadas por metales, esta especie logró acumular grandes cantidades de metales, tales como Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn y Zn, en un periodo de tiempo relativamente corto.⁸ Por otra parte, en un estudio donde se realizó un análisis comparativo entre algas pardas y rojas de la capacidad de captación de distintos metales pesados variando los niveles de adsorción de acuerdo al pH del medio, además de demostrarse la superioridad de las algas pardas, se cuantificó la adsorción de estos metales por la *L. variegata*.⁹ Para esto, luego de someter la biomasa a un tratamiento con CaCl₂, se puso en contacto en una solución a pH óptimo de 5.0, que contenía los iones metálicos. Después de 90 min se obtuvieron valores de retención verdaderamente sorprendentes de 1.71 y 1.79 mmol/g para el Cd (II) y Pb (II) respectivamente.¹⁰

⁴ Davis, T. A.; Volesky, B.; Mucci, A. *Water Research*, **2003**, *37*, 4311.

⁵ Gerwick, W. H. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1994**, *1211*, 143.

⁶ Manilal, A.; Selvin, J.; Thajuddin, N.; Sujith, S.; Panikkar, M.; Idhayadhulla, A.; Kumar, R. S. *Thalassas*, **2012**, *28*, 47.

⁷ Bryan, G.W. *Mar. Ecol.*, **1984**, *5*, 1290.

⁸ Hédouin, L.; Bustamante, P.; Fichez, R.; Warnau, M. *Mar. Environmental Res.*, **2008**, *66*, 438.

⁹ Vijayaraghavan, K.; Jegan, J.; Palanivelu, K.; Velan, M. *Separation and Purification Tech.*, **2005**, *44*, 53.

¹⁰ Jha, B.; Basha, S.; Jaiswar, S.; Mishra, B.; Thakur, M. C. *Biodegradation*, **2009**, *20*, 1.

El comportamiento de *L. variegata* con el ecosistema donde se desarrolla también ha sido estudiado. Esta especie es una de las algas que mejor defiende su hábitat en zonas dominadas por algunos depredadores. Llama la atención su asombrosa supervivencia en zonas de amplia distribución del erizo *Diadema antillarum*, un organismo que desempeña un papel clave en la organización y estructuración en poblaciones de macroalgas y que ha generado enormes blanquiales en zonas tradicionalmente pobladas por varias especies algas en las Islas Canarias.¹¹ Estas observaciones recientes y la hipótesis de que el mecanismo de defensa sea químico, ha despertando interés acerca del tipo de metabolitos secundarios que estas algas producen. Sin embargo, aunque la familia Dictyotecae, a la que pertenece la *L. variegata*, es quizás la familia de algas pardas más estudiada desde el punto de vista químico con un alto número de compuestos bioactivos en su mayoría de naturaleza terpénica, existen muy pocos metabolitos publicados de *L. variegata*, y eso a pesar de estar asociada a importantes acciones terapéuticas. A continuación, presentamos una breve revisión de los metabolitos aislados hasta el momento de esta especie.

4.1.1.1. Metabolitos secundarios aislados de *Lobophora variegata*

Extractos de *Lobophora variegata* recolectada en las Islas Bahamas y que exhibían potente actividad antifúngica fueron cromatografiados siguiendo el fraccionamiento por bioensayo. La purificación final de las fracciones activas dio lugar al aislamiento de un único compuesto activo, el loboforolido, una estructura de 42 átomos de carbonos con un anillo lactónico de 22 miembros.¹² Su estructura fue establecida mediante el análisis de datos espectroscópicos y por comparación con los datos publicados para dos análogos estructurales, la tolitoxina¹³ y el swinholido A,^{14,15} de los que se podría considerar un híbrido estructural. El loboforolido mostró una potente y selectiva actividad contra dos hongos filamentosos marinos, *Dendryphyella salina* y *Lindra thalassiae*. Presentó además capacidad inhibitoria frente *Candida albicans* y antineoplásica frente a la línea celular HCT-116. Por otro lado, se ha determinado que el loboforolido crea una interfase de dimerización para estabilizar el dímero de la actina y así interrumpir su dinámica de polimerización.¹⁶ La similitud de este compuesto con los macrólidos aislados de bacterias sugiere que podría ser el producto de un simbiote de *L. variegata*, aunque éste no pudo ser identificado por los autores, que en cambio sí que

¹¹ Hernández, J. C.; Clemente, S; Sangil, C.; Brito, A. *Mar. Environmental Res.* **2008**, *66*, 259.

¹² Kubanek, J.; Jensen, P. R.; Keifer, P. A.; Cameron, M.; Collins, D. O.; Fenical, W. *PNAS*, **2003**, *100*, 6916.

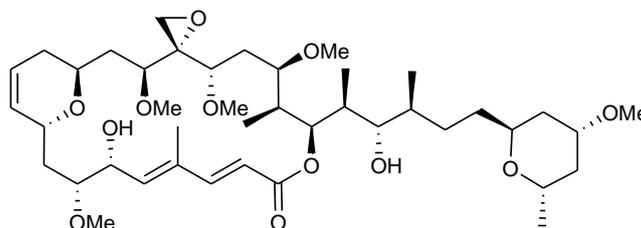
¹³ Carmeli, S.; Moore, R. E.; Patterson, G. M. L. *J. Nat. Prod.*, **1990**, *53*, 1533.

¹⁴ Carmely, S.; Rotem, M.; Kashman, Y. *Magn. Reson. Chem.*, **1986**, *24*, 343.

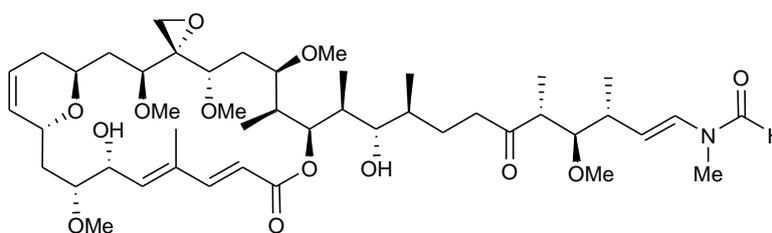
¹⁵ Kitagawa, I.; Kobayashi, M.; Katori, T.; Yamashita, M.; Tanaka, J.; Doi, M.; Ishida, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 3710.

¹⁶ Blain, J. C.; Mok, Y.-F.; Kubanek, J.; Allingham, J. S. *Chem. Biol.*, **2010**, *17*, 802.

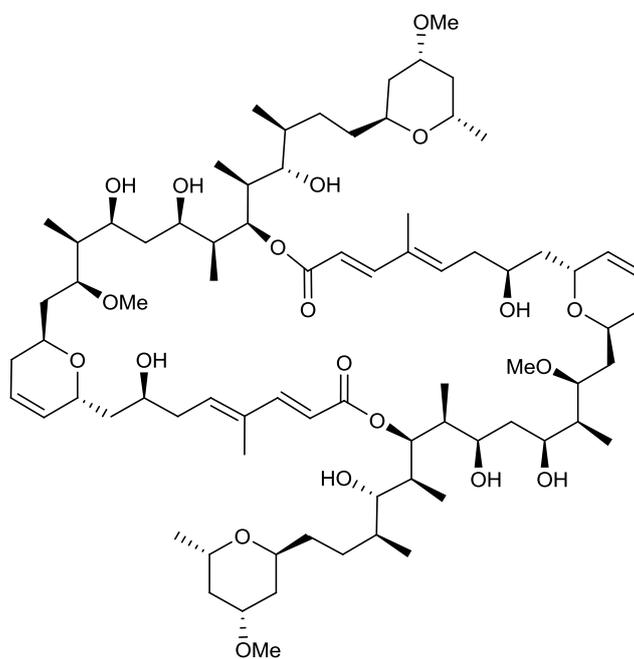
anteriormente, de la superficie de este alga habían aislado una bacteria marina que en fermentación salina les produjo dos macrolidos, las loboforinas A y B.¹⁷ Las estructuras de estos dos potentes antiinflamatorios fueron claramente determinadas mediante estudios espectroscópicos de ellos y de las agliconas C y D, resultantes de su hidrólisis y posterior acetilación.



Loboformolido

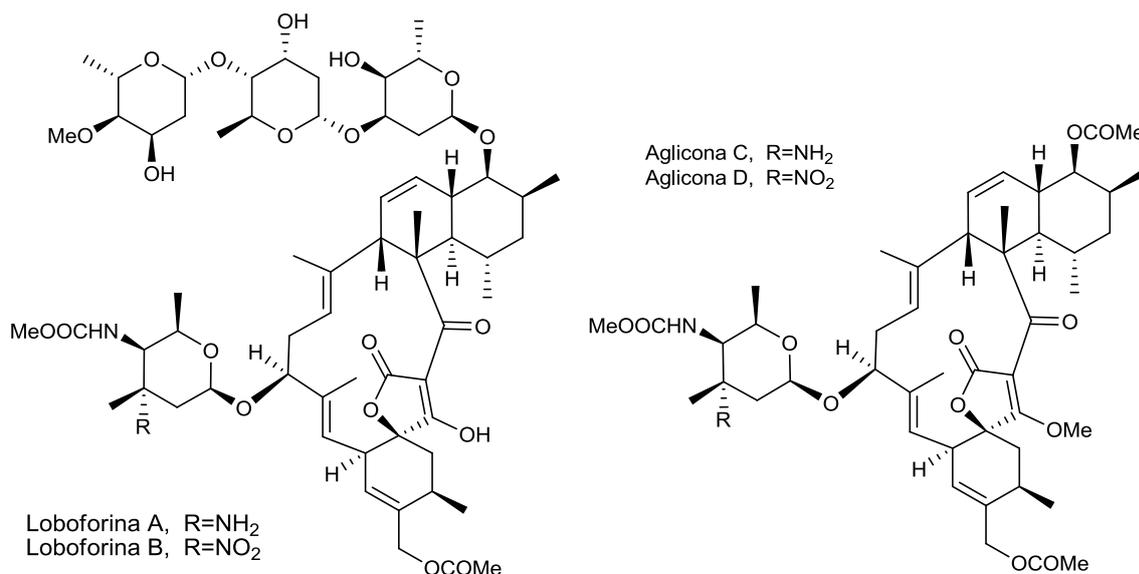


Tolitoxina



Swinholido A

¹⁷ Jiang, Z.-D.; Jensen, P. R.; Fenical, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 2003.



En la década de los cincuenta, una familia de polisacáridos sulfatados, los fucanos y fucoidanos, fue descrita a partir de algas pardas. Este tipo de metabolitos ha mostrado importantes propiedades como anticoagulantes, antibióticos y antiinflamatorios. Así, a partir de especímenes de *L. variegata* recolectada en Brasil, se aisló un fucoidano compuesto por fucosa, galactosa y sulfato en una proporción molar de 1 : 3 : 2.¹⁸ Mediante ensayos *in vitro* se comprobó su actividad como anticoagulante y antiinflamatorio, concluyendo que este heterofucano podría tener potencial terapéutico. Además, a concentraciones de 1.0 µg/ml, mostró un marcado efecto sobre la actividad de la transcriptasa reversa del HIV.¹⁹ Por otro parte, también de especies de *L. variegata* de Brasil, un polisacárido sulfatado codificado como SP-LV fue ensayado sobre modelos de actividad anti-inflamatoria *in vivo*.²⁰ Su acción parece ser *via* la inhibición de las actividades de la sintasa del óxido nítrico y de la ciclooxigenasa.

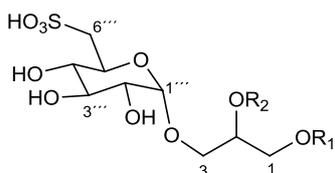
El alga *L. variegata* también ha mostrado ser una importante fuente de metabolitos con actividad antiprotozoaria.²¹ Así de muestras recogidas en las costas de la península de Yucatán, México, se identificaron tres sulfoquinovosildiacilgliceroles (SQDG's), cuya mezcla resultó activa principalmente frente a *Entamoeba histolytica* y en menor grado frente a *Trichomonas vaginalis*.

¹⁸ Medeiros, V. P.; Queiroz, K. C. S.; Cardoso, M. L.; Monteiro, G. R. G.; Oliveira, F. W.; Chavante, S. F.; Guimaraes, L. A.; Rocha, H. A. O.; Leite, E. L. *Biochemistry*, **2008**, 73, 1018.

¹⁹ Queiroz, K. C. S.; Medeiros, V. P.; Queiroz, L. S.; Abreu, L. R. D.; Rocha, H. A. O.; Ferreira, C. V.; Jucá, M. B.; Aoyama, H.; Cardoso, Leite, E. L. *Biomed. Pharmacother.*, **2008**, 62, 303.

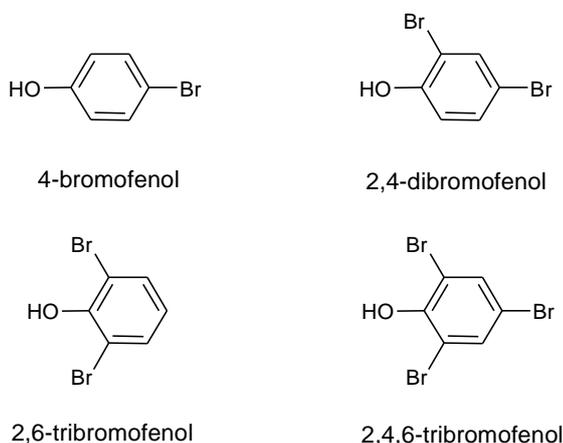
²⁰ Siqueira, R. C.L.; da Silva, M. S. J.; de Alencar, D. B.; Pires, A. F.; de Alencar, N. M.; Pereira, M. G.; Cavada, B. S.; Sampaio, A. H.; Farias, W. R. L.; Assreuy, A. M. S. *Pharmaceutical Biology*, **2011**, 49, 167.

²¹ Castillo-Ciau, Z.; Moo-Puc, R.; Quijano, L.; Freile-Peigrín, Y. *Mar. Drugs*, **2010**, 8, 1292.



SQDG A R¹=palmitoilo, R²=miristoilo
 SQDG B R¹= R²= palmitoilo
 SQDG C R¹=palmitoilo, R²=oleoilo

Un análisis químico de los compuestos fenólicos presentes en *L. variegata* y otras algas pardas fue realizado con el fin de establecer su distribución estacional. Los bromofenoles detectados en la *L. variegata* fueron el 4-bromofenol, el 2,4-dibromofenol, el 2,6-dibromofenol y el 2,4,6-tribromofenol. Para determinar su presencia y realizar su cuantificación, se empleó la técnica de GC-MS, usando referencias conocidas de estos productos.²²



2,6-dibromofenol

2,4,6-tribromofenol

Otros estudios realizados con extractos o fracciones de *L. variegata* destacan el potencial terapéutico de esta especie. Así, fracciones semipuras enriquecidas en polisacáridos de un extracto acuoso de especímenes recolectados en Asia mostraron actividad contra el virus de herpes simple (HSV) tipo 1 y tipo 2, con valores de IC₅₀ de 18.2 y 6.25 µg/ml respectivamente.²³ Fraccionamientos de un extracto en acetona de una especie brasileña presentaron citotoxicidad frente a la línea celular FEK4 asociada al cáncer de piel.²⁴ Por último, otras fracciones de muestras recolectadas en el Caribe y el Golfo Mexicano resultaron ser activas frente a *Leishmania mexicana* y *Artemia salina*.²⁵

²² Chung, H. Y.; Joyce, W. C.; Ang, P. O.; Kim, J. S.; Chen, F. J. *Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 2619.

²³ Wang, H; Shen, W. *Yingyang Xuebao*, **2007**, 29, 271.

²⁴ Rocha, F. D.; Soares, A. R.; Houghton, P.; J.; Crespo, R.; Coelho, M. A.; Laneuville, V. *Phytother. Res.*, **2007**, 21, 170.

²⁵ Freile, Y.; Robledo, D. Chan, M. J.; Ortega, B. O. *Fitoterapia*, **2008**, 79, 374.

4.2. RECOLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DEL ALGA

Las muestras de *Lobophora variegata* fueron recolectadas mediante buceo autónomo a profundidades de 3 a 5 m en la costa de El Médano, Tenerife. Los especímenes fueron congelados y trasladados al laboratorio para ser extraídos por maceración en CH₂Cl₂:MeOH (1:1) (3x) a temperatura ambiente durante 72 horas. Las mezclas de disolventes fueron evaporadas al vacío a 40 °C, para obtener un extracto crudo de aspecto aceitoso y color marrón de peso 15.8 g.

4.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO

El extracto fue inicialmente cromatografiado por filtración molecular en una columna abierta de Sephadex[®] LH-20 (600 x 70 mm Ø), usando una mezcla de CHCl₃:MeOH (1:1) como fase móvil. Para monitorizar este proceso se utilizó cromatografía de capa fina (TLC) en *n*-Hex:AcOEt (4:1), reuniéndose cuatro fracciones principales: LV-1, LV-2, LV-3 y LV-4. El perfil observado para la fracción LV-4 indicó la presencia de cantidades importantes de un compuesto muy polar, que tras realizarle espectroscopía de RMN ¹H y ¹³C, resultó ser el manitol.²⁶ El análisis de las restantes fracciones hizo que centráramos la atención en aquellas fracciones con mayor presencia de metabolitos, LV-2 y LV-3, siendo sometidas a nuevas etapas cromatográficas, esta vez en columna de media presión Lobar[®] LiChroprep[®] Si-60 (310 x 25 mm Ø, 40-63 µm) eluidas con *n*-Hex:AcOEt:MeOH (14:5:1) y posteriormente con *n*-Hex:AcOEt (4:1). De este proceso cromatográfico se obtuvieron seis nuevas fracciones, LV-2A, LV-2B, LV-2C, LV-3A, LV-3B y LV-3C, continuando el estudio con aquellas cuyos perfiles en TLC y estudio preliminar de espectroscopía de RMN ¹H indicaron la existencia relativa de metabolitos secundarios. La purificación final se llevó a cabo por HPLC, usando una columna preparativa µ-Porasil (150 x 19 mm Ø) y eluyendo con mezclas de *n*-Hex:AcOEt en distintas proporciones y un flujo de 1ml/min. Bajo estas condiciones se realizó el aislamiento de 11 policétidos, 10 de ellos nuevos en la literatura y cuyo estudio químico se detalla en el siguiente apartado. El proceso cromatográfico utilizado se resume en la figura 4.3.1.

²⁶ Rousvoal, S.; Groisillier, A.; Dittami, S.; Michel, G.; Boyen, C.; Tonon, T. *Planta*, **2011**, 233, 261.

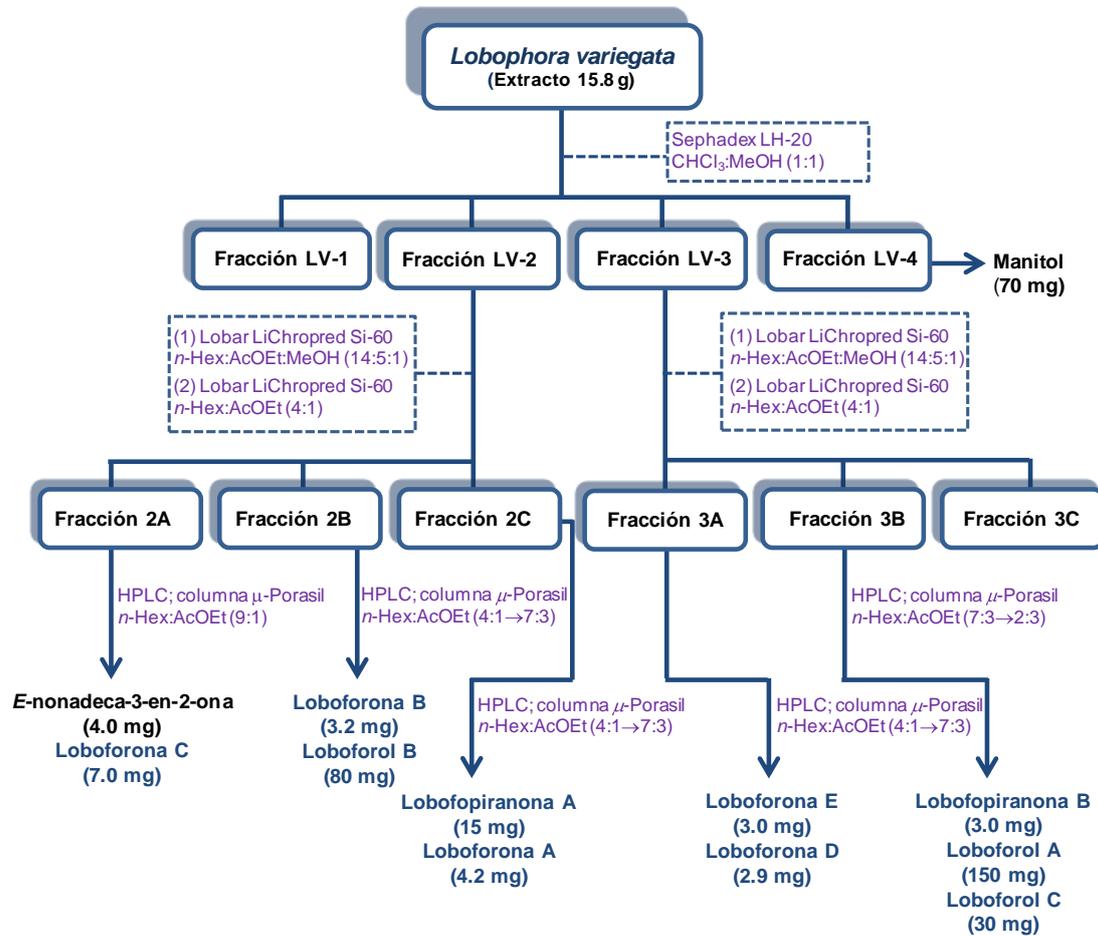


Figura 4.3.1. Marcha cromatográfica del extracto obtenido de *Lobophora variegata*.

4.4. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS NUEVOS METABOLITOS

Entre los 10 nuevos metabolitos aislados de *L. variegata*, destacan los loboforoles A-C (**29-31**) que resultaron ser nonadecacétidos con un nuevo esqueleto carbonado denominado loboforano (Figura 4.4.1). El resto de las sustancias aisladas fueron una serie de policétidos relacionados biogénicamente con los anteriores, y que van desde C₁₅ a C₂₁ átomos de carbono.

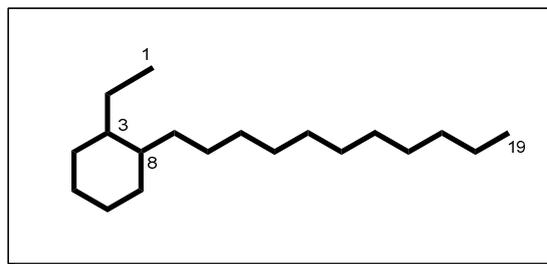


Figura 4.4.1. Nuevo esqueleto de loboforano

4.4.1. Nonadecacétidos con un nuevo esqueleto carbonado de loboforano

4.4.1.1. Loboforol A (**29**)

El loboforol A (**29**) fue aislado como un sólido cristalino (p. f. 62-63 °C), ópticamente activo [α]_D²⁵ = +17 (c 0.23, CHCl₃). Su espectro de masas de alta resolución EI-HRMS mostró un ion molecular centrado a *m/z* 308.2353, que establece su fórmula molecular como C₁₉H₃₂O₃, con cuatro grados de insaturación en la molécula.

El análisis de sus datos de RMN ¹³C (Tabla 4.4.1) y HSQC establece la presencia de dos metilos, doce metilenos, un metino y cuatro carbonos cuaternarios. De los carbonos cuaternarios presentes, dos pertenecen a carbonilos [δ_C 204.0 y 195.4], y dos son olefínicos [δ_C 159.7 y 139.6].

El espectro de RMN ¹H (Figura 4.4.2) mostró señales atribuibles a un oximetino [δ_H 4.30 (dddd, *J* = 4.1, 4.3, 7.4, 8.9 Hz)], tres metilenos desapantallados de los cuales dos son diasterotópicos [δ_H 2.75 (dd, *J* = 4.1, 16.2 Hz)/2.52 (dd, *J* = 8.9, 16.2 Hz), 2.70 (dd, *J* =

4.3, 17.9 Hz)/2.48 (dd, $J = 7.4, 17.9$ Hz) y 2.22 (2H, m)], una serie de metilenos alifáticos parcialmente solapados (entre δ_{H} 1.49 y 1.25), un metilo terciario unido a un grupo carbonilo [δ_{H} 2.34 (s)] y otro terminal [δ_{H} 0.88 (t, $J = 7.1$ Hz)].

Los datos de IR apoyan la presencia de las funcionalidades mencionadas: carbonilo conjugado (1698 cm^{-1}) y grupo hidroxilo ($3502, 1060\text{ cm}^{-1}$).

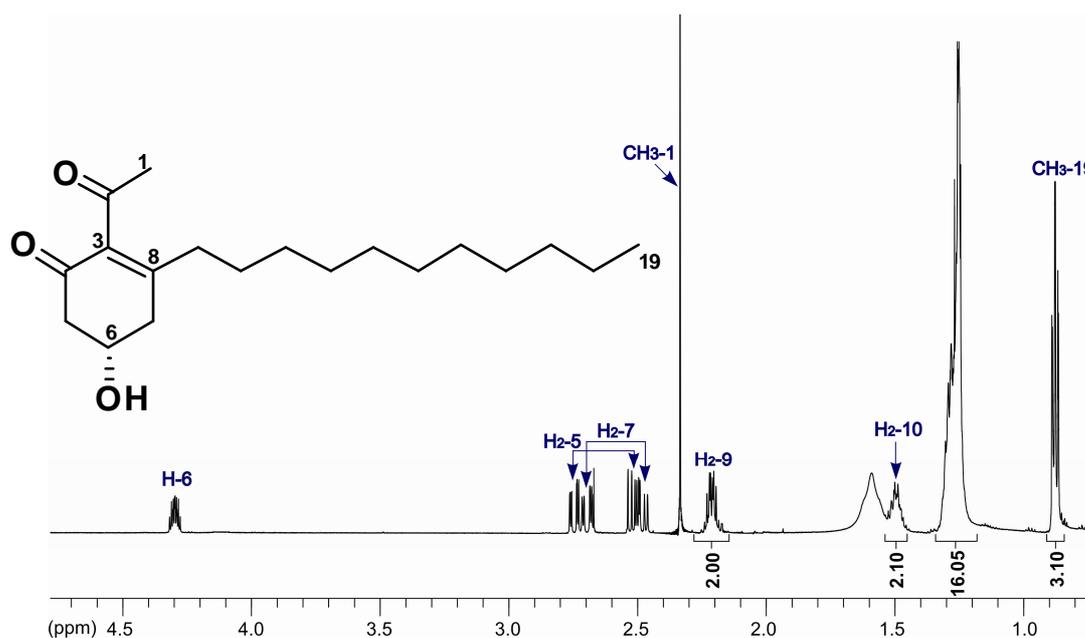


Figura 4.4.2. Espectro de RMN ^1H del loboforol A (**29**) en CDCl_3 (600 MHz).

En el experimento COSY se establece un claro sistema de espín que abarca los dos metilenos a campos bajos y el metino en α a un átomo de oxígeno [$\text{H}_2\text{-5}$ (δ_{H} 2.75/2.52) \leftrightarrow H-6 (δ_{H} 4.30) \leftrightarrow $\text{H}_2\text{-7}$ (δ_{H} 2.70/2.48)] (Figuras 4.4.3 y 4.4.4). Las señales involucradas en este fragmento fueron conectadas a través del experimento HSQC editado con los carbonos C-5 (δ_{C} 46.5), C-6 (δ_{C} 65.9), y C-7 (δ_{C} 38.5) (Figura 4.4.3).

Por otra parte, en el experimento HMBC (Figura 4.4.4) fue posible observar la correlación de los protones del metileno $\text{H}_2\text{-5}$ y el metino H-6 con la señal de uno de los carbonos carbonílicos a δ_{C} 195.4 (C-4), mientras que el mismo protón H-6 y el metileno $\text{H}_2\text{-7}$ muestran correlación con la señal de un carbono olefínico a δ_{C} 159.7 (C-8). La estructura de esta parte de la molécula se completa con las conectividades observadas entre $\text{H}_2\text{-5}$ con el otro carbono del doble enlace a δ_{C} 139.6 (C-3), carbono con el que

también muestra correlación el metilo unido a carbonilo, H₃-1, y uno de los metilenos alifáticos H₂-9 [δ_H 2.22 (m)].

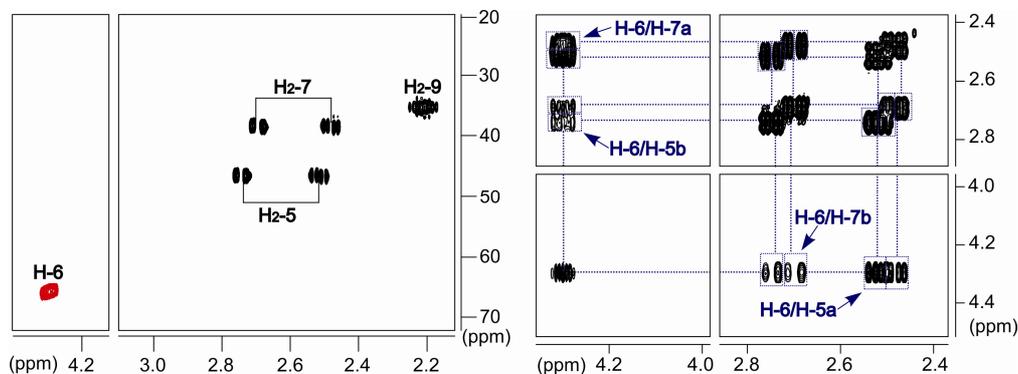


Figura 4.4.3. Fragmentos seleccionados de los espectros HSQC editado (izquierda) y COSY (derecha) en CDCl₃ (600 MHz), correspondiente a la elucidación estructural del fragmento C-5/C-7 del lobofoleol A (**29**).

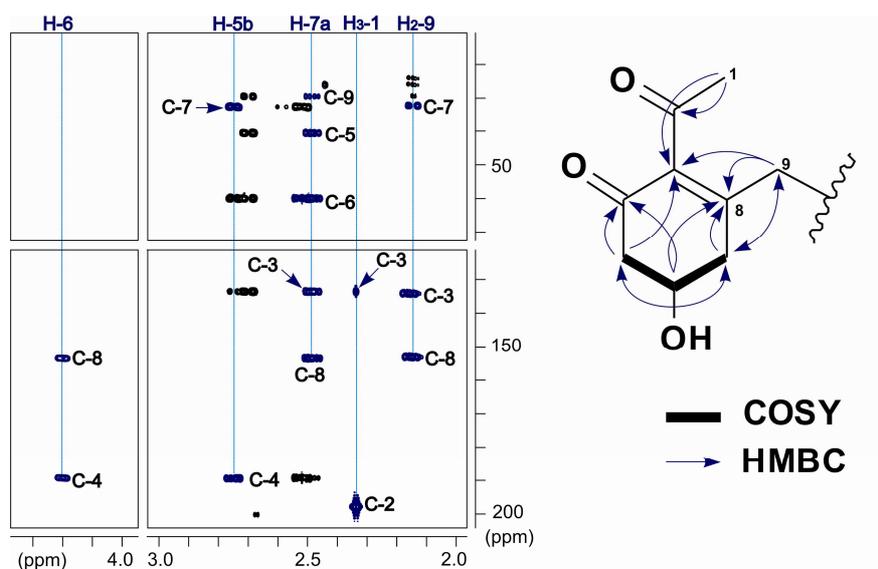


Figura 4.4.4. Secciones del experimento HMBC en CDCl₃ (600 MHz) y principales correlaciones para la asignación del fragmento C-1/C-9 del lobofoleol A (**29**).

Las restantes asignaciones corresponden a una cadena lateral saturada que en base a la fórmula molecular y a los datos de integración en el espectro de RMN ¹H corresponde a once carbonos.

El análisis del patrón de fragmentación de esta sustancia en el espectro de masas permitió confirmar la estructura propuesta (Figura 4.4.5), y que corresponde a un nuevo esqueleto carbonado 1-etil-2-undecil-1-ciclohexano, que hemos denominado loboforano (Figura 4.4.1).

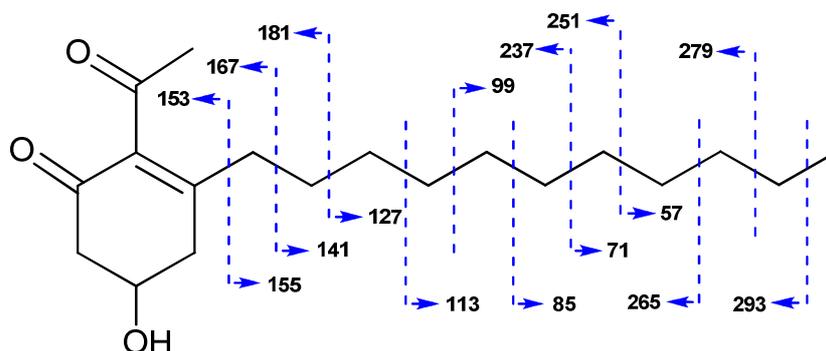


Figura 4.4.5. Principales fragmentaciones observadas en el espectro de EI-HRMS del lobofofol A (29).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.9	2.34 (3H)	s	
2	204.0			
3	139.6			
4	195.4			
5	46.5	a 2.52	dd	8.9, 16.2
		b 2.75	dd	4.1, 16.2
6	65.9	4.30	dddd	4.1, 4.3, 7.4, 8.9
7	38.5	a 2.48	dd	7.4, 17.9
		b 2.70	dd	4.3, 17.9
8	159.7			
9	35.4	2.22 (2H)	m	
10	27.9	1.49 (2H)	m	
11	29.6	1.37 (2H)	m	
12	29.4	1.36 (2H)	m	
13	29.6	1.36 (2H)	m	
14	29.7	1.29 (2H)	m	
15	29.4	1.31 (2H)	m	
16	29.4	1.28 (2H)	m	
17	31.6	1.25 (2H)	m	
18	22.7	1.27 (2H)	m	
19	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

Tabla 4.4.1. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) de lobofofol A (29) (CDCl_3).

Este compuesto pudo ser cristalizado en una mezcla de $\text{CCl}_4:\text{CH}_2\text{Cl}_2:2,2,4$ -trimetilpentano (3:1:1). Los cristales resultantes fueron sometidos a estudios de difracción de rayos X, lo que permitió confirmar la estructura propuesta. En la figura 4.4.6, se muestra la representación que se obtuvo a partir de esos datos.

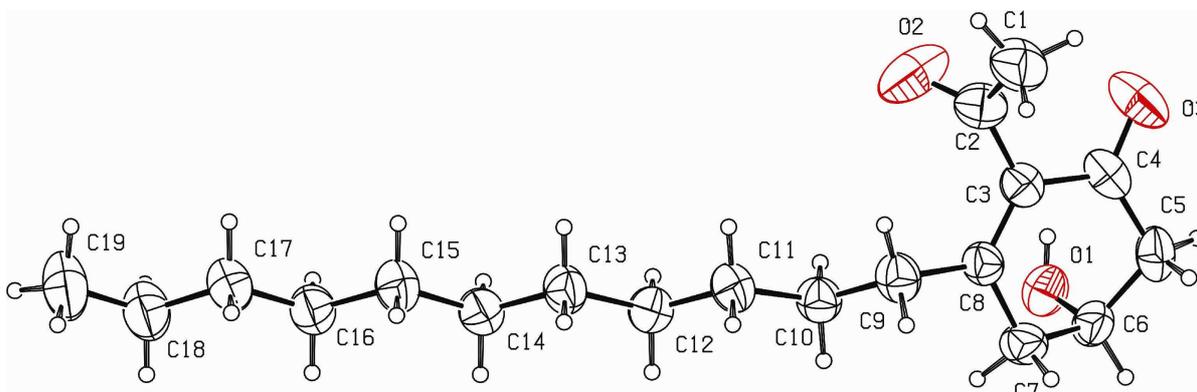


Figura 4.4.6. Estructura del loboformol A (**29**) a partir de los datos de difracción de rayos X.

4.4.1.2. Loboformol B (**30**)

El compuesto **30** fue aislado como un aceite amarillo con actividad óptica de $[\alpha]_D^{25} = +2$ (c 0.38, CHCl_3). Los datos obtenidos de la espectrometría de masas de impacto electrónico EI-HRMS mostraron el ion molecular a m/z 290.2234, que sugiere una fórmula molecular de $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_2$, y establece cinco grados de insaturación. En su espectro IR se pudieron observar absorciones características de alcoholes fenólicos (3340 cm^{-1}), doble enlaces aromáticos (1604 , 1585 , 1462 cm^{-1}) y cetona α,β -insaturada (1680 cm^{-1}).

Al realizar un análisis preliminar a través del experimento de RMN ^1H (Figura 4.4.7), destaca la presencia de tres protones aromáticos. La señal a δ_{H} 7.28 aparece como un doble doblete con dos constantes grandes ($J = 7.8$, 8.1 Hz) relativas a protones en *orto*, mientras que las señales a δ_{H} 6.80 y 6.75 se dividen en doble dobletes de una constante pequeña y una grande, correspondientes a acoplamientos *meta* y *orto* ($J = 1.1$, 8.1 Hz y $J = 1.1$, 7.8 Hz), por lo que estas tres señales están relacionadas con una secuencia de tres protones aromáticos. Por otro lado, se observa la presencia de diez metilenos, de los que sólo dos no aparecen solapados [δ_{H} 2.85 (dd, $J = 7.8$, 8.0 Hz) y 1.59 (m)], un metilo terciario a campos bajos [δ_{H} 2.67 (s)] y un metilo alifático terminal [δ_{H} 0.88 (t, $J = 7.1\text{ Hz}$)] (Tabla 4.4.2).

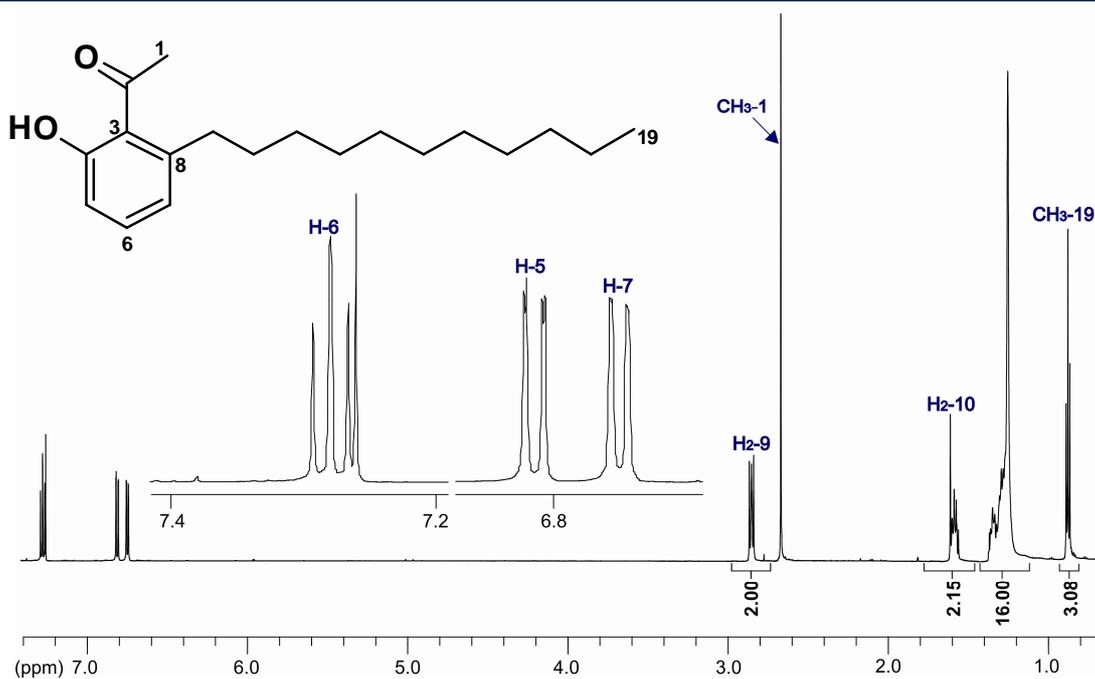


Figura 2.4.7. Espectro de RMN ^1H del loboferol B (**30**) en CDCl_3 (600 MHz).

Las señales observadas en el espectro de RMN ^{13}C (Tabla 4.4.2) confirman estos datos: tres metinos aromáticos [δ_{C} 134.2, 122.0, 116.0], diez metilenos [entre δ_{C} 35.8 y 22.7] y dos metilos [δ_{C} 32.4 y 14.1]. Además, se identificó la presencia de tres carbonos cuaternarios que completan un anillo bencénico trisustituido [δ_{C} 161.0, 144.2, 122.1] y de un carbono de carbonilo cetónico [δ_{C} 206.3].

Como se muestra en la figura 4.4.8, a través del experimento bidimensional COSY, se pudo comprobar el sistema de espín formado por los protones aromáticos, $\text{H-5} \leftrightarrow \text{H-6} \leftrightarrow \text{H-7}$, así como observar las correlaciones entre los protones iniciales y finales de la cadena alquílica lateral.

El experimento HMBC permitió completar la estructura en función de las correlaciones observadas principalmente con los carbonos cuaternarios. Así, los protones del metilo singlete $\text{H}_3\text{-1}$ mostraron correlación con los carbonos del carbonilo (C-2) y del carbono cuaternario a δ_{C} 122.1 (C-3). Asimismo, los protones del metileno bencílico $\text{H}_2\text{-9}$ se correlacionaron con C-3 y el carbono a δ_{C} 144.2 (C-8). Finalmente, las conectividades observadas a partir de los protones aromáticos y resumidas en la figura 4.4.9, completan la asignación de la molécula y sitúan el grupo fenol en C-4.

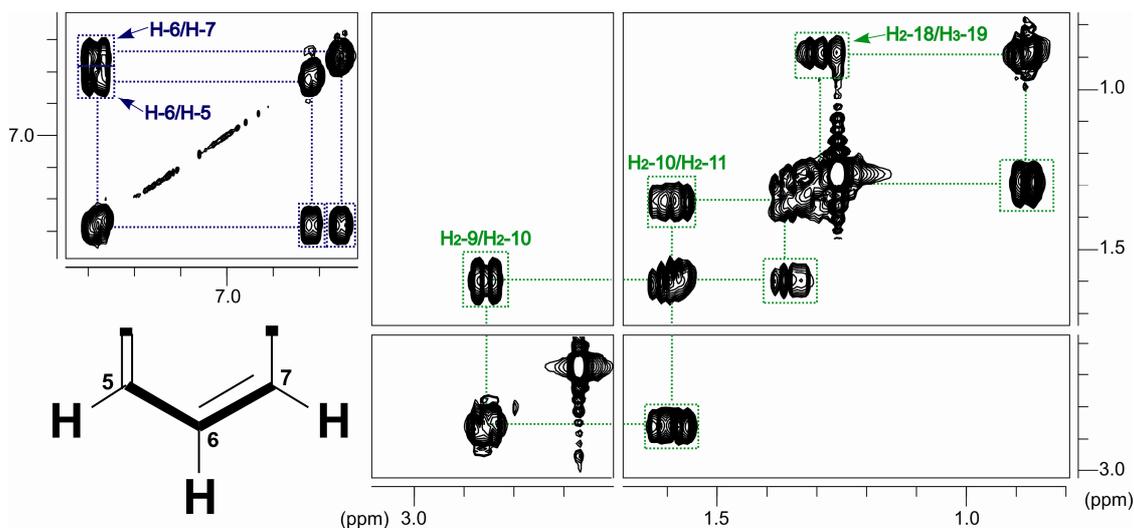


Figura 4.4.8. Secciones del espectro COSY del loboforol B (**30**) en CDCl₃ (500 MHz). Expansión para la región aromática (izquierda) y para la cadena lateral (derecha).

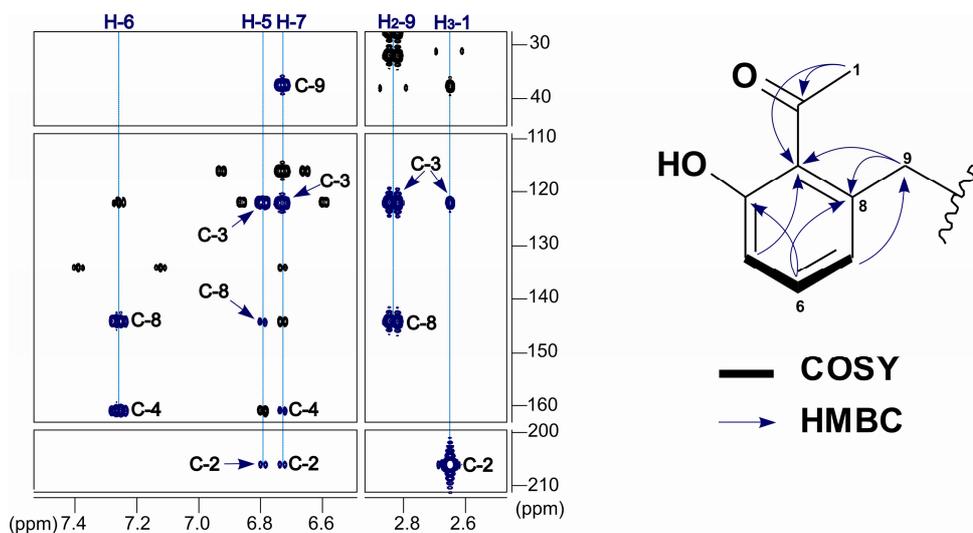


Figura 4.4.9. Secciones del experimento de HMBC en CDCl₃ (600 MHz) y principales correlaciones observadas para el loboforol B (**30**).

La estructura del loboforol B (**30**) fue comprobada por el patrón de fragmentación observado en el espectro de masas (Figura 4.4.9).

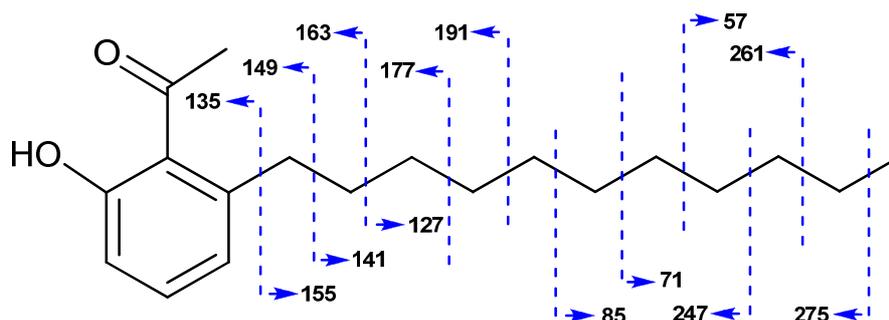


Figura 4.4.10. Principales fragmentaciones observadas en el espectro de EI-HRMS del lobofoleol B (**30**).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	32.4	2.67 (3H)	s	
2	206.3			
3	122.1			
4	161.0			
5	116.0	6.80	dd	1.1, 8.1
6	134.2	7.28	dd	7.8, 8.1
7	122.0	6.75	dd	1.1, 7.8
8	144.2			
9	35.8	2.85 (2H)	dd	7.8, 8.0
10	32.5	1.59 (2H)	m	
11	29.7	1.37 (2H)	m	
12	29.3	1.28 (2H)	m	
13	29.6	1.26 (2H)	m	
14	29.6	1.28 (2H)	m	
15	29.4	1.28 (2H)	m	
16	29.5	1.28 (2H)	m	
17	31.9	1.26 (2H)	m	
18	22.7	1.31 (2H)	m	
19	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

Tabla 4.4.2. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del lobofoleol B (**30**) (CDCl_3).

4.4.1.3. Lobofoleol C (**31**)

El lobofoleol C (**31**) fue aislado como un sólido cristalino (p. f. 79-80 °C) con actividad óptica $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +2$ (c 0.38, CHCl_3). Su fórmula molecular fue establecida como $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_3$, en base al ion molecular observado a m/z 306.2203 en su espectro de masas EI-HRMS.

Los datos espectroscópicos de RMN ^{13}C y ^1H resumidos en la tabla 4.4.3, confirman la fórmula molecular planteada e indican, que al igual que el lobofoforol B (**30**), este compuesto es de naturaleza aromática: RMN ^{13}C [δ_{C} 166.2 (C), 160.3 (C), 142.1 (C), 116.1 (C), 111.7 (CH), 101.8 (CH)] y RMN ^1H [δ_{H} 6.25 (*br s*), 6.22 (*br s*)]. La principal novedad, es la presencia de sólo dos metinos aromáticos en lugar de los tres que se observaron en el compuesto **30** (Figura 4.4.11). Además, la multiplicidad de estas señales es singlete ancho y por tanto deben pertenecer a protones en *meta*. Respecto a las señales restantes, una vez más se observa la presencia de una metilcetona [δ_{C} 207.1, 25.1; δ_{H} 2.56 (s)], así como una cadena alquílica lateral de once carbonos, determinada de forma equivalente a la descrita previamente.

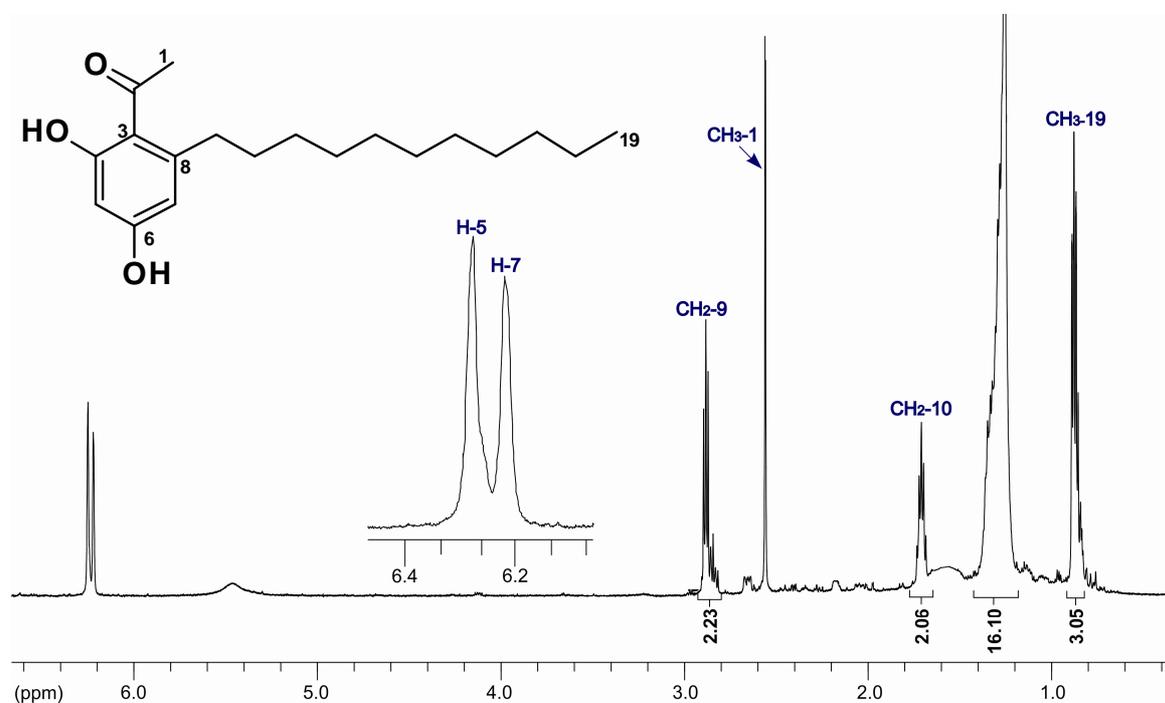


Figura 4.4.11. Espectro de RMN ^1H del lobofoforol C (**31**) en CDCl_3 (600 MHz).

La interpretación de los experimentos HSQC y HMBC permitió confirmar que el lobofoforol C es también un nuevo representante de los lobofoforanos, con una estructura muy relacionada con los dos compuestos anteriores. Así, a partir de las correlaciones HMBC mostradas por los metinos H-5 y H-7 (Figura 4.4.12), nos encontramos con una estructura equivalente a la del lobofoforol B (**30**) pero con un grupo hidroxilo adicional en C-6.

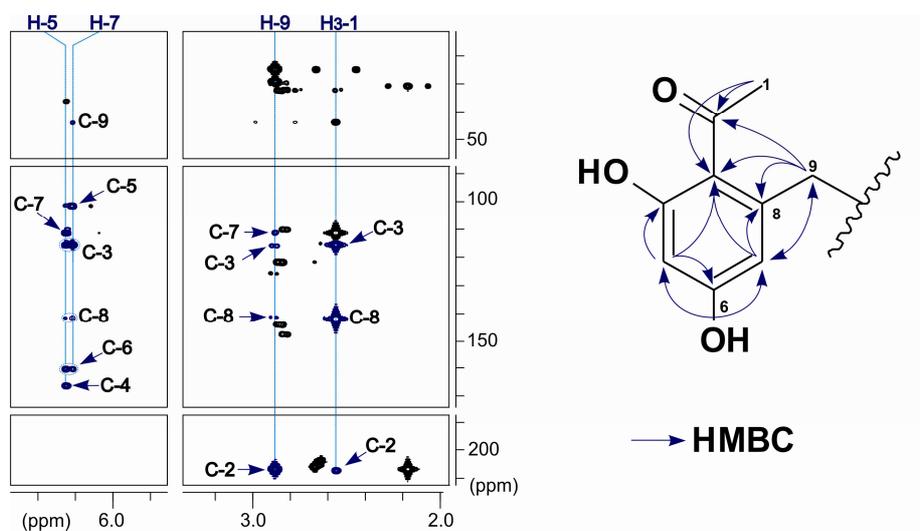


Figura 4.4.12. Secciones del experimento de HMBC en CDCl_3 (600 MHz) y principales correlaciones observadas para el loboferol C (**31**).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	25.1	2.56 (3H)	s	
2	207.1			
3	116.1			
4	166.2			
5	101.8	6.25	<i>br s</i>	
6	160.3			
7	111.7	6.22	<i>br s</i>	
8	142.1			
9	44.1	2.88 (2H)	dd	7.4, 7.5
10	25.1	1.71 (2H)	m	
11	24.9	1.59 (2H)	m	
12	31.0	1.36 (2H)	m	
13	30.0	1.36 (2H)	m	
14	29.6	1.29 (2H)	m	
15	29.5	1.31 (2H)	m	
16	29.5	1.28 (2H)	m	
17	29.3	1.26 (2H)	m	
18	22.7	1.27 (2H)	m	
19	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

Tabla 4.4.3. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) del loboferol C (**31**) (CDCl_3).

4.4.2. Otros policétidos

4.4.2.1. Lobofopiranona A (32)

Los datos obtenidos del espectro de masas EI-HRMS a m/z 294.2573, establecieron la fórmula molecular de la lobofopiranona A (**32**) como $C_{19}H_{34}O_2$. Este metabolito fue aislado como un aceite amarillo con actividad óptica de $[\alpha]_D^{25} = -116$ (c 1.14, $CHCl_3$). El espectro de IR indica que los dos átomos de oxígenos contenidos en su fórmula molecular deben de estar implicados en grupos funcionales carbonilo α,β insaturado (1685 y 1613 cm^{-1}) y éter (1126 cm^{-1}), mientras que la absorción a $\lambda_{max} = 264$ nm ($\log \varepsilon$ 3.94) en el espectro de UV está de acuerdo con la presencia de una enona.

Los datos espectroscópicos de RMN de 1H y ^{13}C se resumen en la tabla 4.4.4, siendo consistentes con la presencia de una 2,3-dehidro- γ -piranona disustituída por un grupo metilo vinílico y una cadena de tridecilo. Son de destacar las señales de carbono características a δ_C 193.1 (C), 174.4 (C), 104.7 (CH), 79.3 (CH), 40.8 (CH_2) y 21.1 (CH_3), mientras que en el espectro de RMN 1H (Figura 4.4.13) son representativos de este sistema de piranona los protones H_{3-1} [δ_H 1.99 (s)], H-3 [δ_H 5.30 (s)], H_{2-5} [δ_H 2.40 (dd, $J = 12.6, 16.6$ Hz)/2.35 (ddd, $J = 0.8, 4.6, 16.6$ Hz)] y H-6 [δ_H 4.35 (dddd, $J = 4.6, 5.1, 7.4, 12.6$ Hz)]. Asimismo, la conformación de la cadena lateral en ecuatorial también puede deducirse de la constante de acoplamiento de 12.6 Hz entre $H_{5_{ax}}$ (δ_H 2.40) y H-6.

En el experimento de COSY (Figura 4.4.14) se puede prolongar el sistema de acoplamiento 1H - 1H del metileno alílico H_{2-5} y del metino H-6 con las señales de los primeros metilenos presentes en la cadena lateral, H_{2-7} [δ_H 1.79 (m)/1.64 (m)] y H_{2-8} [δ_H 1.45 (m)/1.38 (m)], así como identificar cual es el último metileno de la cadena por su acoplamiento con el metilo terminal H_{3-19} (δ_H 0.88 (t, $J = 7.1$ Hz)]. El resto de los metilenos aparecen muy solapados e impiden distinguir más conectividades.

En la figura 4.4.14 también se recogen las principales correlaciones HMBC observadas para el compuesto **32**. Entre ellas, resaltar la del metino H-3 con los carbonos del metilo terciario C-1 (δ_C 21.1), metileno C-5 (δ_C 40.8) y los carbonos cuaternarios C-2 (δ_C 174.4) y C-4 (δ_C 193.1), y a su vez, la de los protones del metileno H_{2-5} con las señales de los carbonos C-3 (δ_C 104.7), C-4, C-6 (δ_C 79.3) y C-7 (δ_C 34.4). Por último, también destaca la correlación HMBC entre el metino H-6 y el carbono C-2 que confirma el puente éter entre esas dos posiciones.

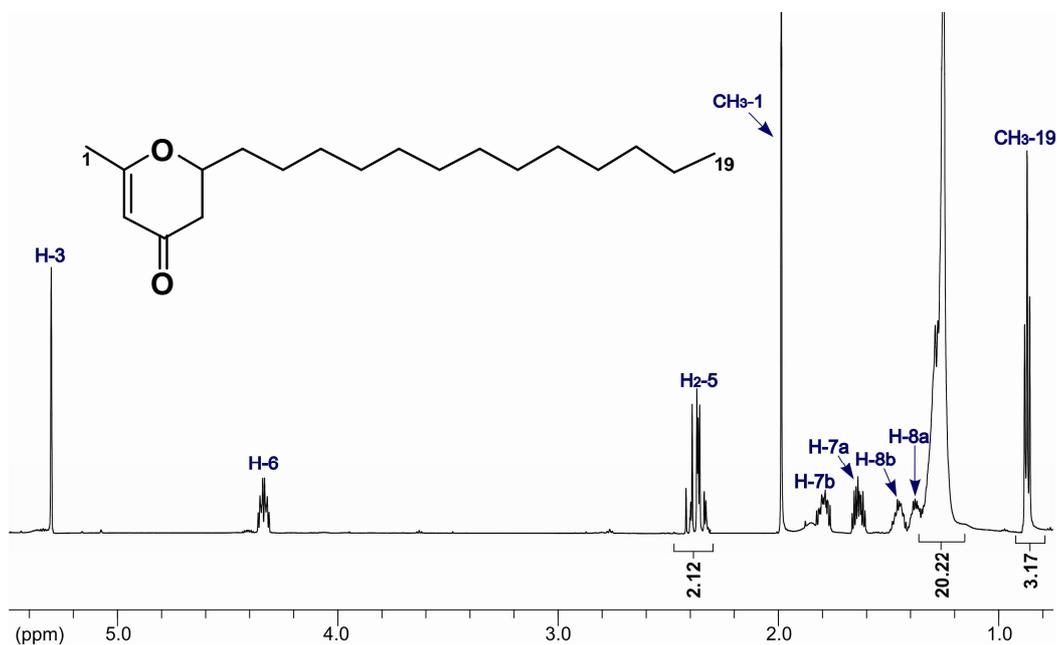


Figura 4.4.13. Espectros de RMN ^1H de la lobufopiranona A (**32**) (600 MHz).

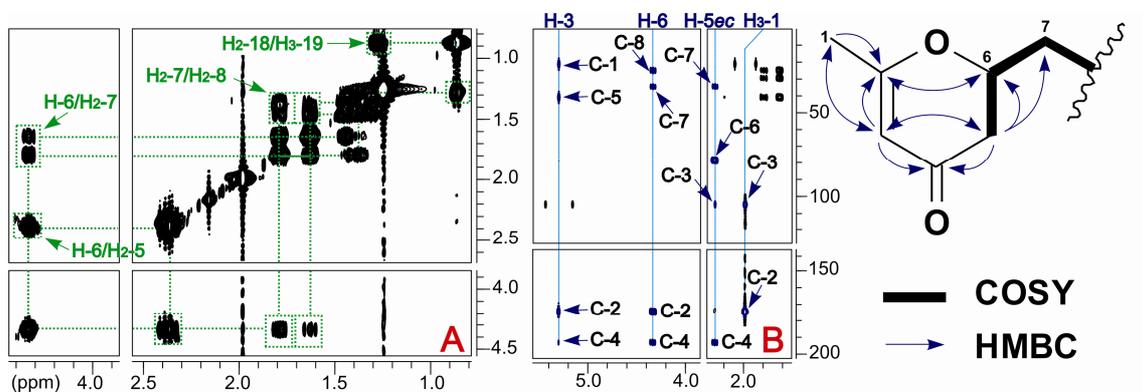


Figura 4.4.14. Secciones del experimento COSY (A) y correlaciones HMBC más importantes (B) de la lobufopiranona A (**32**) en CDCl_3 (600 MHz).

El análisis cuidadoso del espectro de masas de impacto electrónico permite trazar un patrón de fraccionamiento que apoya la elucidación estructural llevada a cabo para la lobufopiranona A (**32**) (Figura 4.4.15).

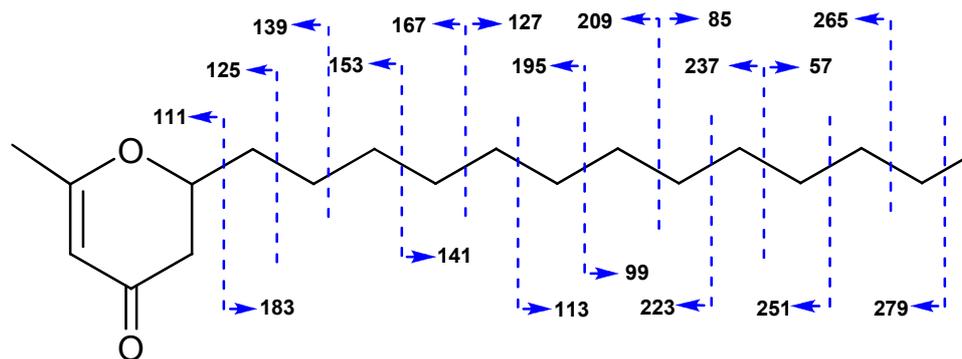


Figura 4.4.15. Fragmentaciones más relevantes observadas en el espectro de masas EI-HRMS de la lobofopiranona A (**32**).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	21.1	1.99 (3H)	s	
2	174.4			
3	104.7	5.30	s	
4	193.1			
5	40.8	(<i>ec</i>) 2.35 (<i>ax</i>) 2.40	ddd dd	0.8, 4.6, 16.6 12.6, 16.6
6	79.3	4.35	dddd	4.6, 5.1, 7.4, 12.6
7	34.4	a 1.64 b 1.79	m m	
8	24.8	a 1.38 b 1.45	m m	
9	29.9	1.33 (2H)	m	
10	29.3	1.29 (2H)	m	
11	29.4	1.30 (2H)	m	
12	29.5	1.27 (2H)	m	
13	29.6	1.25 (2H)	m	
14	29.6	1.28 (2H)	m	
15	29.6	1.25 (2H)	m	
16	29.7	1.27 (2H)	m	
17	31.9	1.26 (2H)	m	
18	22.7	1.29 (2H)	m	
19	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

Tabla 4.4.4. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) de la lobofopiranona A (**32**) en CDCl_3 .

4.4.2.2. Lobofopiranona B (**33**)

El compuesto **33** fue aislado como un sólido blanquecino ópticamente activo $[\alpha]_D^{25} = +33$ (c 0.20, CHCl_3). Su fórmula molecular, $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_3$, fue establecida a partir del ion molecular a m/z 310.2512 obtenido en el espectro de masas EI-HRMS.

Al analizar sus datos espectroscópicos se observa una estrecha relación con el compuesto anterior **32**. En el espectro de IR, se observa las mismas bandas de absorción características de grupo piranona (1651 cm^{-1} , 1604 y 1126 cm^{-1}), y además, una banda a 3421 cm^{-1} que sugiere que el oxígeno adicional de la fórmula molecular debe corresponder a un grupo hidroxilo, dato coherente con el pico de masas a m/z 293 correspondiente a la pérdida de agua, $[\text{MH} - \text{H}_2\text{O}]^+$.

En los datos de RMN ^1H y ^{13}C (Tabla 4.4.5) se comprueba la presencia de una unidad 2,3-dehidro-4H-piran-4-ona disustituida por un grupo metilo sobre la enona y una larga cadena saturada: RMN ^{13}C [δ_{C} 192.5 (C), 173.7 (C), 105.2 (CH), 78.5 (CH), 41.0 (CH₂) y 21.1 (CH₃)] y RMN ^1H [δ_{H} 5.34 (s), 4.63 (dddd, $J = 5.2, 5.4, 7.3, 12.1$), 2.46 (dd, $J = 12.1, 16.7$ Hz)/2.44 (*br* dd, $J = 5.4, 16.7$ Hz), 2.00 (s)] (Figura 4.4.16).

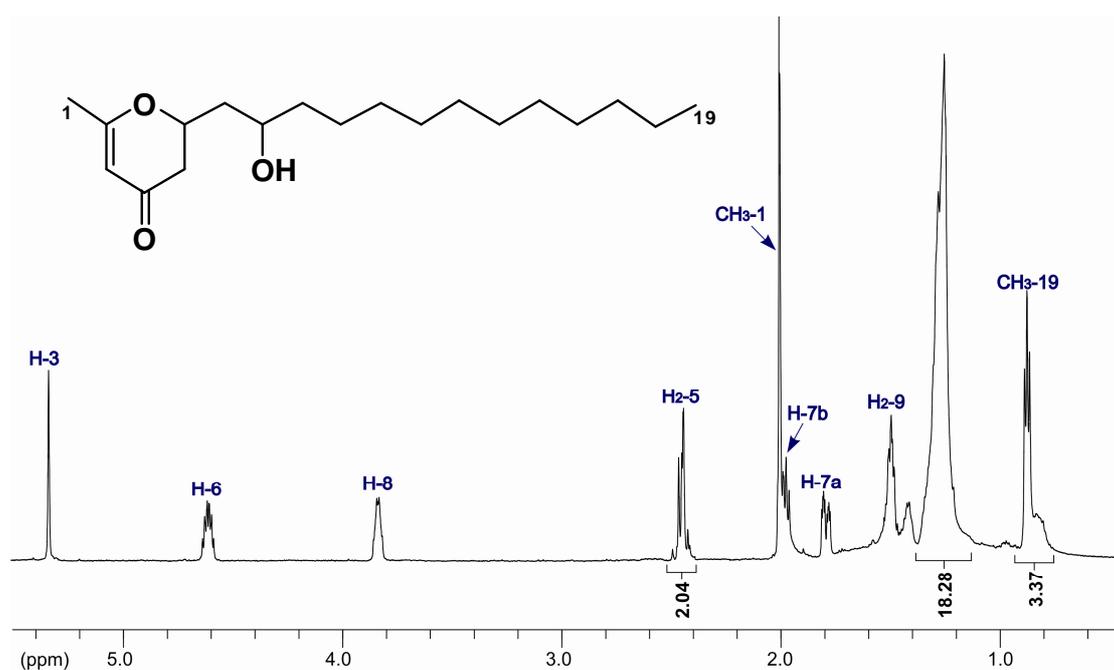


Figura 2.4.16. Espectro de RMN ^1H de la lobofopiranona B (**33**) en CDCl_3 (600 MHz).

Las únicas diferencias se sitúan en la cadena lateral alquímica, en la que se observa la ausencia de un metileno y su sustitución por un metino en α a un grupo hidroxilo [δ_{C} 69.5 y δ_{H} 3.84 (m)]. La posición de este metino se estableció en C-8 a través del experimento COSY (Figura 2.4.17) en el que se determinó un fragmento de espín parcial comenzando en C-5 y perdiéndose más allá de la posición C-9, debido al solapamiento de

las señales del resto de la cadena, cuya longitud se determinó en base a la fórmula molecular y a los datos de integración en el espectro de RMN ^1H .

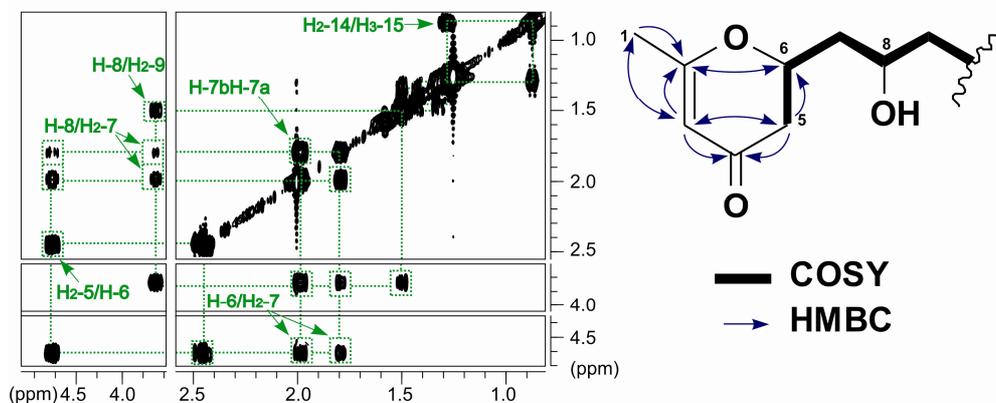


Figura 4.4.17. Secciones del experimento COSY en CDCl_3 (600 MHz) y resumen de las correlaciones HMBC más importantes de la lobofopiranona B (**33**).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	21.1	2.00 (3H)	s	
2	173.7			
3	105.2	5.34	s	
4	192.5			
5	41.0	(ec) 2.44 (ax) 2.46	br dd dd	5.4, 16.7 12.1, 16.7
6	78.5	4.63	dddd	5.2, 5.4, 7.3, 12.1
7	41.6	a 1.79 b 1.99	m m	
8	69.5	3.84	m m	
9	37.7	1.50 (2H)	m	
10	31.9	1.42 (2H)	m	
11	29.6	1.28 (2H)	m	
12	29.6	1.32 (2H)	m	
13	29.6	1.27 (2H)	m	
14	29.6	1.29 (2H)	m	
15	29.5	1.25 (2H)	m	
16	29.3	1.28 (2H)	m	
17	25.4	1.34 (2H)	m	
18	22.7	1.24 (2H)	m	
19	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

Tabla 4.4.5. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) de la lobofopiranona B (**33**) en CDCl_3 .

Las correlaciones observadas en el experimento HMBC y resumidas en la figura 4.4.17, apoyan la estructura propuesta. Dada la inestabilidad del producto, no pudimos completar los experimentos de RMN necesarios para establecer la configuración relativa del grupo hidroxilo en la molécula, a través de los métodos basados en el cálculo de constantes de acoplamiento que nos fueron útiles con otros metabolitos descritos en esta memoria.

4.4.2.3. Loboforonas A (34) y B (35)

La loboforona A (34) fue aislada como un sólido amorfo de color blanquecino ópticamente activo $[\alpha]_D^{25} = +20$ (c 0.37, CHCl₃). Su fórmula molecular C₁₉H₃₂O₂ se determinó en base a su espectro de masas EI-HRMS donde se pudo observar el ion molecular a m/z 292.2411.

En el espectro de IR se observan bandas características de grupo carbonilo α,β insaturado a 1658 cm⁻¹, datos reforzados por la absorción en el espectro de UV a $\lambda_{max} = 276$ nm (log ϵ 3.39). Además en el espectro de RMN ¹³C en combinación con los datos de HSQC con editado de multiplicidad (Tabla 4.4.6) se observó la presencia de un grupo carbonilo (δ_C 197.8), cuatro carbonos olefínicos [162.7 (C), 135.6 (CH), 121.8 (CH), 104.3 (CH)], un metino unido a oxígeno (δ_C 75.5), tres metilenos diasterotópicos (δ_C 35.0, 30.1, 25.0), ocho metilenos alifáticos (entre δ_C 32.0 y 22.7), un metilo sobre carbonilo (δ_C 31.9) y uno terminal (δ_C 14.1).

En el espectro de RMN ¹H (Figura 4.4.18), destacan las señales de tres protones vinílicos desplazados a campos bajos [δ_H 7.50 (*br* dd, $J = 2.7, 10.1$ Hz), 6.40 (*br* ddd, $J = 2.7, 6.2, 10.1$ Hz) y 5.65 (s)], el protón del oximetino [δ_H 3.97 (dddd, $J = 3.9, 4.6, 6.6, 10.9$ Hz)], un metileno alílico [(δ_H 2.29 (ddd, $J = 3.9, 6.2, 18.2$ Hz)/2.23 (dddd, $J = 2.7, 2.7, 10.9, 18.2$ Hz)], un metilo singlete [δ_H 2.15 (s)], y las señales a campo alto correspondientes a una cadena hidrocarbonada saturada C₁₁, confirmada por un fraccionamiento del ion molecular a m/z 137.0575 que se corresponde con la pérdida de la cadena alifática [M⁺ - C₁₁H₂₃].

A través del experimento COSY (Figura 4.4.19), partiendo de la señal de los metinos olefínicos acoplados entre sí, H-5 (δ_H 7.50) y H-6 (δ_H 6.40), se observaron correlaciones con las señales de los protones diasterotópicos H₂-7 (δ_H 2.29/2.23), y de éstos con el oximetino H-8 (δ_H 3.97). El análisis se completa al conectar H-8 con el metileno que da inicio a la cadena saturada H₂-9 (δ_H 1.70/1.56).

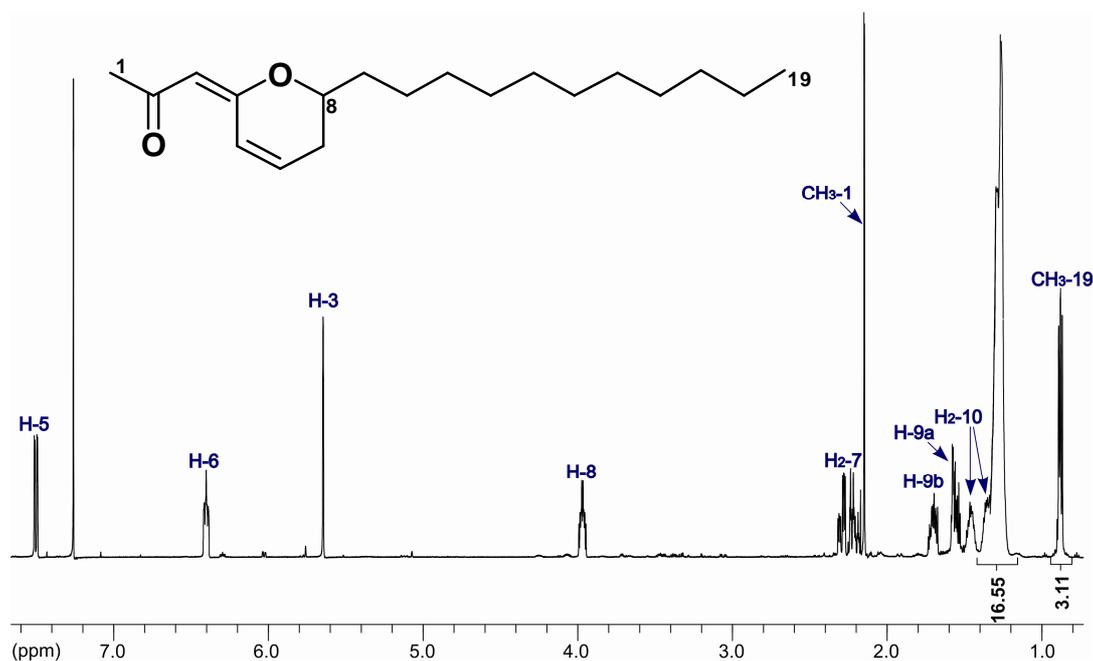


Figura 4.4.18. Espectro de RMN ^1H de la loboformona A (**34**) en CDCl_3 (600 MHz).

N $^{\circ}$ C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.9	2.15 (3H)	s	
2	197.8			
3	104.3	5.65	s	
4	162.7			
5	121.8	7.50	<i>br</i> dd	2.7, 10.1
6	135.6	6.40	<i>br</i> ddd	2.7, 6.2, 10.1
7	30.1	a 2.23	dddd	2.7, 2.7, 10.9, 18.2
		b 2.29	ddd	3.9, 6.2, 18.2
8	75.5	3.97	dddd	3.9, 4.6, 6.6, 10.9
	35.0	a 1.56	m	
		b 1.70	m	
10	25.0	a 1.35	m	
		b 1.46	m	
11	29.6	1.28 (2H)	m	
12	29.6	1.32 (2H)	m	
13	29.6	1.27 (2H)	m	
14	29.5	1.29 (2H)	m	
15	29.4	1.25 (2H)	m	
16	29.3	1.28 (2H)	m	
17	32.0	1.34 (2H)	m	
18	22.7	1.24 (2H)	m	
19	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

Tabla 4.4.6. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) de la loboformona A (**34**) en CDCl_3 .

Por último, en el experimento HMBC (Figura 4.4.19), destacan las conectividades del carbono cetónico C-2 con los protones del metilo H₃-1 y el metino H-3 del doble enlace trisustituido, mientras que éste último a su vez muestra correlación con los carbonos C-4 y C-5. Además, la correlación del metino H-8 con el carbono cuaternario C-4 establece un puente éter entre dichas posiciones completando la elucidación de esta parte de la molécula y mostrando que la estructura de la loboforona A (**34**) consiste en un sistema de 6-undecil-5,6-dehidro-2H-piran-2-iliden-propan-2-ona.

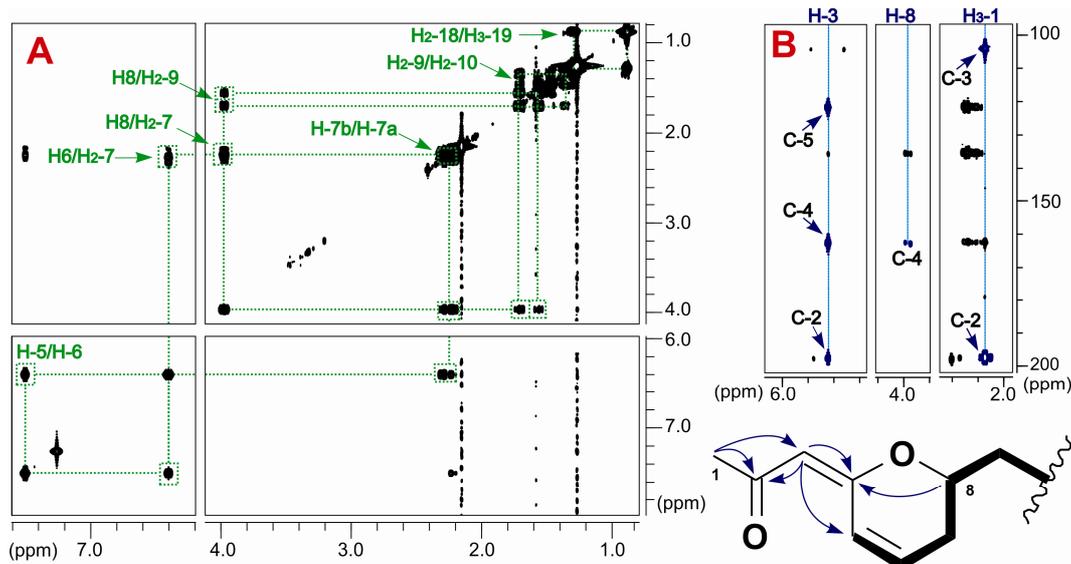


Figura 4.4.19. Expansión del espectro COSY (A), y experimento HMBC (B) de la loboforona A (**34**) en CDCl₃ (600 MHz). Principales correlaciones COSY (←) y HMBC (→) para la elucidación estructural de este metabolito

Por su parte, la loboforona B (**35**), se aisló como un sólido amorfo blanquecino, $[\alpha]_D^{25} = +23$ (*c* 0.29, CHCl₃), mostrando su espectro de masas EI-HRMS que se trata de un isómero del compuesto anterior (m/z 292.2369 [M]⁺).

El análisis de sus datos de IR, UV y RMN (Tablas 4.4.6 y 4.4.7) sugiere una estructura muy similar a la de la loboforona A. Las únicas diferencias se observan en los espectros de RMN ¹H de ambos metabolitos (Figura 4.4.20), y consisten en que para la loboforona B (**35**) las señales de H-5 y H-3 se desplazan hacia campo alto, mientras que la del metilo H₃-1 a campo bajo [δ_H 7.50, 5.65 y 2.15 en **34** vs δ_H 6.02, 5.07 y 2.40 en **35**]. Estas diferencias podrían obedecer al cambio de geometría del doble enlace formado entre los carbonos C-3 y C-4, la cual planteamos como *E* para la loboforona A (**34**) y *Z* para la loboforona B, en base al fuerte efecto de desapantallamiento o apantallamiento del carbonilo en uno u otro caso sobre los protones cercanos y especialmente sobre H-5.

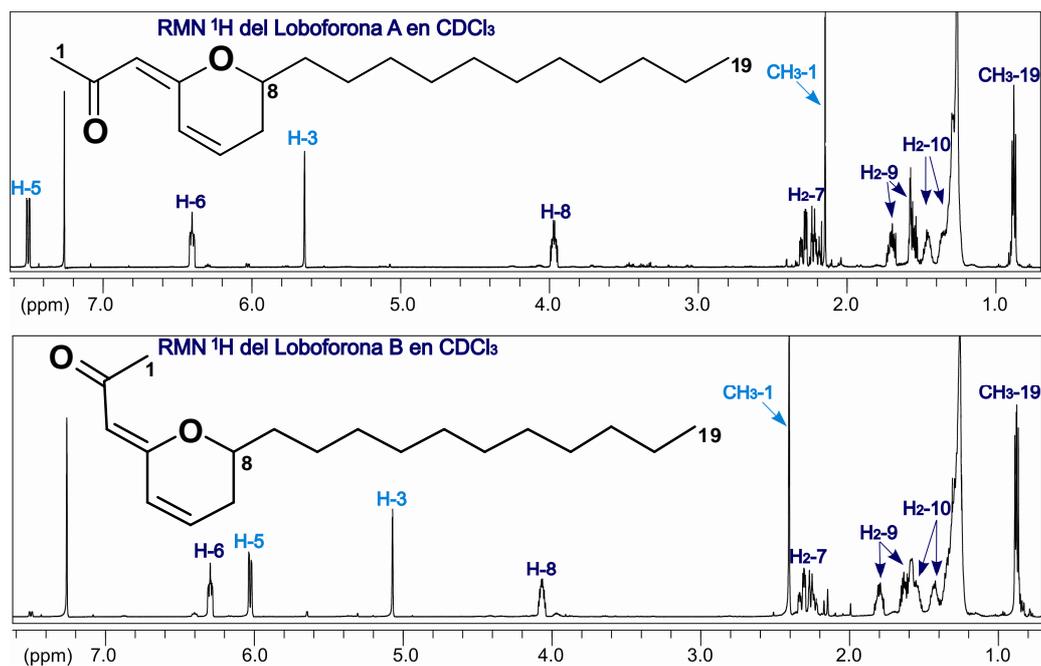


Figura 4.4.20. Comparación de los espectros de RMN ^1H (600 MHz) de las loboforonas A (34) y B (35).

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.5	2.40 (3H)	s	
2	198.4			
3	108.9	5.07	s	
4	159.9			
5	124.9	6.02	<i>br dd</i>	2.3, 9.7
6	133.7	6.30	<i>ddd</i>	2.4, 6.3, 9.7
7	29.7	a 2.25	<i>dddd</i>	2.3, 2.4, 10.7, 18.2
		b 2.32	<i>ddd</i>	3.8, 6.3, 18.2
8	76.1	4.05	<i>dddd</i>	3.8, 4.4, 7.2, 10.7
9	35.1	a 1.63	<i>m</i>	
		b 1.80	<i>m</i>	
10	25.3	a 1.43	<i>m</i>	
		b 1.55	<i>m</i>	
11	29.3	1.28 (2H)	<i>m</i>	
12	29.4	1.32 (2H)	<i>m</i>	
13	29.5	1.27 (2H)	<i>m</i>	
14	29.6	1.29 (2H)	<i>m</i>	
15	29.6	1.25 (2H)	<i>m</i>	
16	29.6	1.26 (2H)	<i>m</i>	
17	31.9	1.34 (2H)	<i>m</i>	
18	22.7	1.24 (2H)	<i>m</i>	
19	14.1	0.88 (3H)	<i>t</i>	7.1

Tabla 4.4.7. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) de la loboforona B (35) en CDCl_3 .

4.4.2.4. Loboforonas C (36) – E (38)

Los siguientes metabolitos aislados de la *L. variegata* fueron una serie de tres cetonas lineales de C₁₅, C₁₇ y C₂₁, respectivamente.

El compuesto **36** fue aislado como un sólido amorfo blanco con actividad óptica de $[\alpha]_D^{25} = +2$ (*c* 0.57, CHCl₃). Los datos obtenidos de la espectrometría de masas de impacto electrónico EI-HRMS mostraron el ion molecular centrado a *m/z* 242.2252, el cual sugiere una fórmula molecular de C₁₅H₃₀O₂.

Un primer análisis de sus datos espectroscópicos de RMN ¹H y ¹³C recogidos en la tabla 4.4.8, indicó la presencia una vez más de una metilcetona [δ_C 209.9 (C), 30.5 (CH₃) y δ_H 2.18 (s)], y la existencia de un alcohol secundario [δ_C 67.4 y δ_H 4.03 (m)], lo cual es coherente con sus respectivas absorciones del espectro IR: 1710 cm⁻¹ y 3329 cm⁻¹.

En su espectro de RMN ¹H (Figura 4.4.21) también destaca las señales correspondientes a un metileno en α a carbonilo [δ_H 2.63 (dd, *J* = 2.4, 17.7 Hz)/2.53 (dd, *J* = 9.3, 17.7 Hz)], y las de una cadena hidrocarbonada saturada de 11 carbonos que completa la estructura.

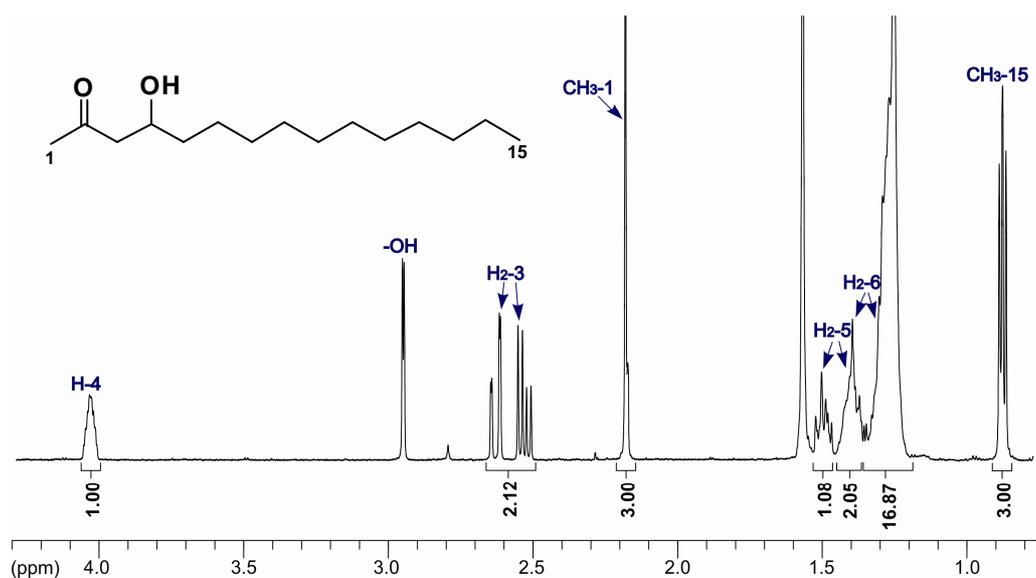


Figura 4.4.21. Espectro de RMN ¹H de la loboforona C (36) en CDCl₃ (600 MHz).

La estructura de esta molécula se traza fácilmente a través del experimento COSY (Figura 4.4.22), de esta manera el metino unido al grupo hidroxilo a δ_H 4.03 (H-4) muestra correlación con el metileno desapantallado por el carbonilo H₂-3, y con el metileno diasterotópico a δ_H 1.46/1.39 (H₂-5) y que da inicio a la cadena hidrocarbonada. Las correlaciones HMBC de estos protones también confirman la estructura propuesta.

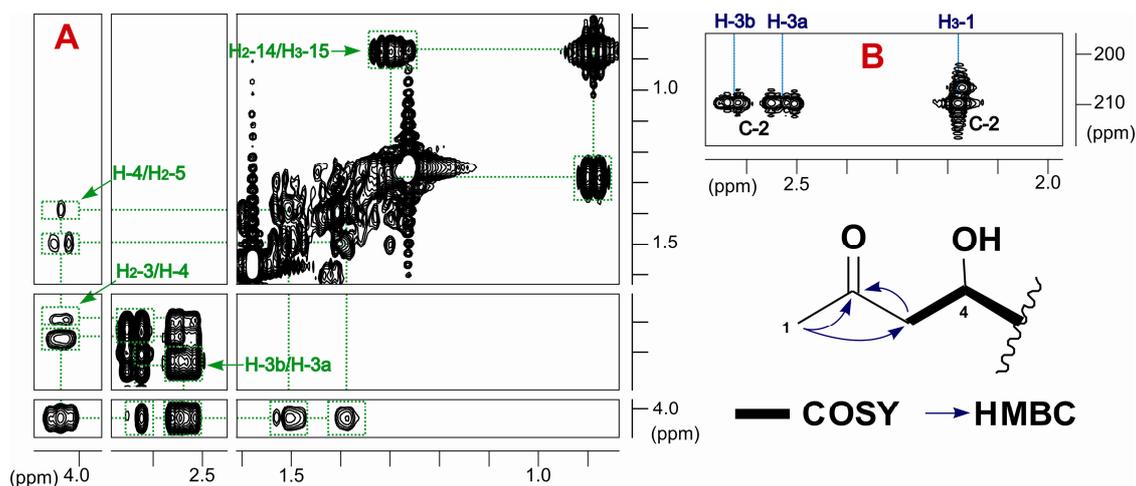


Figura 4.4.22. Secciones de los experimentos COSY (A) y HMBC (B) en CDCl₃ (600 MHz) que muestran las correlaciones más importantes para la elucidación estructural de la loboformona C (36).

posición	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	30.5	2.18 (3H)	s	
2	209.9			
3	49.7	a 2.53	dd	9.3, 17.7
		b 2.63	dd	2.4, 17.7
4	67.4	4.03	m	
5	36.1	a 1.39	m	
		b 1.46	m	
6	25.3	a 1.30	m	
		b 1.39	m	
7	29.8	1.25 (2H)	m	
8	29.5	1.28 (2H)	m	
9	29.5	1.26 (2H)	m	
10	29.6	1.26 (2H)	m	
11	26.6	1.26 (2H)	m	
12	29.3	1.27 (2H)	m	
13	31.7	1.29 (2H)	m	
14	22.5	1.31 (2H)	m	
15	14.1	0.88 (3H)	t	7.1
OH-4		2.95	d	3.4

Tabla 4.4.8. Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) de la loboformona C (36) en CDCl₃.

La loboforona D (**37**) se obtuvo como un sólido amorfo blanco, cuya actividad óptica fue $[\alpha]_D^{25} = +3$ (c 0.12, CHCl_3). El primer intento para establecer su fórmula molecular fue por EI-HRMS, al igual que con el resto de los compuestos descritos para este alga, pero no observamos el pico del ion molecular ni obtuvimos información concluyente a partir de fragmentaciones. Por lo tanto, se le sometió a espectrometría de masas ESI-HRMS que mostró iones pseudomoleculares correspondientes a $[\text{M} + \text{H}]^+$ (m/z 269.2472) y $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (m/z 291.2295), y que establecieron su fórmula molecular como $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_2$.

Procediendo de una forma equivalente a la llevada a cabo con el metabolito anterior, en función de sus datos de RMN (Tabla 4.4.9) destacar la presencia de una metilcetona α,β -insaturada [δ_C 198.5 (C), 144.4 (CH), 133.4 (CH), 25.6 (CH_3); δ_H 6.85 (ddd, $J = 7.2, 7.6, 16.0$ Hz), 6.15, (d, $J = 16.0$ Hz), 2.27 (3H, (s)], y de un alcohol secundario [δ_C 70.7 y δ_H 3.78 (m)]. El grupo hidroxilo se confirma con la banda de absorción en IR a (3398 cm^{-1}); mientras que para la cetona aparecen las bandas a 1671 cm^{-1} y 1605 cm^{-1} , así como la absorción UV a $\lambda_{\text{max}} = 224\text{ nm}$.

En el espectro de RMN ^1H (Figura 4.4.23) podemos observar además que los protones olefínicos están acoplados con una constante grande ($^3J_{\text{H-3,H-4}} = 16.0\text{ Hz}$) por lo que la configuración del doble enlace debe ser *E*.

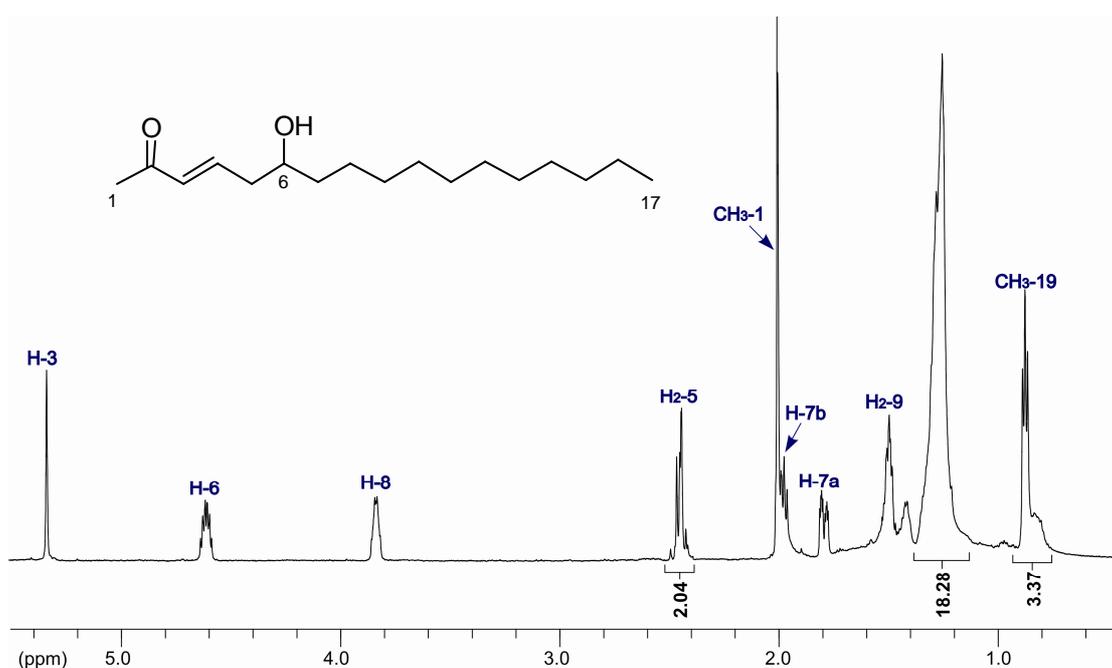


Figura 4.4.23. Espectro de RMN ^1H de la loboforona D (**37**) en CDCl_3 (600 MHz).

Análisis de los experimentos COSY y HMBC (Figura 4.4.24), establece que la estructura para este compuesto es (*E*)-6-hidroxi-heptadec-3-en-2-ona.

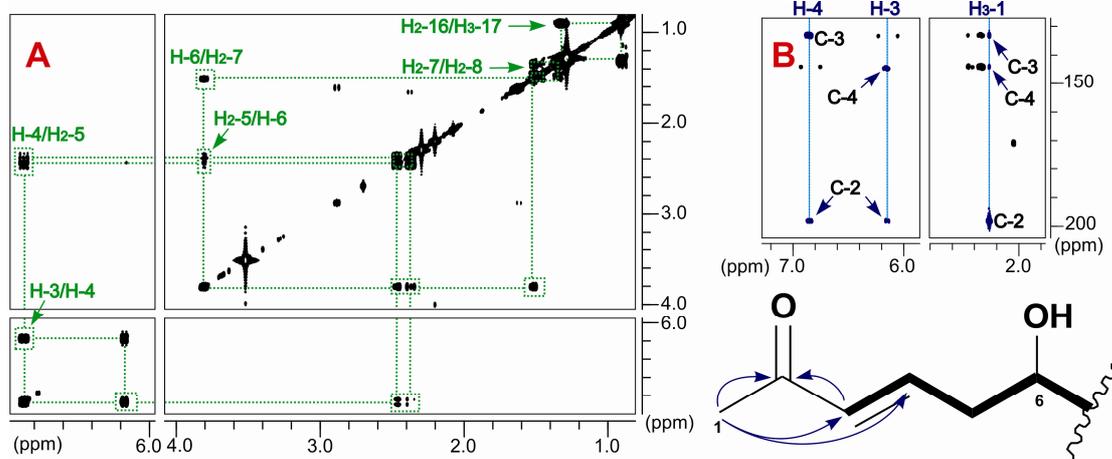


Figura 4.4.24. Expansiones de los experimentos COSY (A) y HMBC (B) en CDCl_3 (600 MHz). Representación de las principales correlaciones COSY (—) y HMBC (→) observadas para la loboforona D (**37**).

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	25.6	2.27 (3H)	s	
2	198.5			
3	133.4	6.15	d	16.0
4	144.4	6.85	ddd	7.2, 7.6, 16.0
5	40.4	a 2.34 b 2.44	dddd dddd	1.0, 7.3, 7.6, 14.5 1.3, 4.3, 7.2, 14.5
6	70.7	3.78	m	
7	37.3	1.47 (2H)	m	
8	29.6	1.29 (2H)	m	
9	29.6	1.26 (2H)	m	
10	29.6	1.26 (2H)	m	
11	29.6	1.26 (2H)	m	
12	29.5	1.26 (2H)	m	
13	29.3	1.27 (2H)	m	
14	27.0	1.26 (2H)	m	
15	31.9	1.25 (2H)	m	
16	22.7	1.26 (2H)	m	
17	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

Tabla 4.4.9. Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) de la loboforona D (**37**) en CDCl_3 .

Por último, la loboforona E (**38**) se obtuvo como un sólido amorfo amarillo y su actividad óptica fue $[\alpha]_D^{25} = -3$ (c 0.12, CHCl_3). El análisis espectroscópico preliminar de este compuesto nos indicó que se trataba de una larga cadena alifática insaturada dicarbonílica. Así, es de destacar que la absorción en IR a 722 cm^{-1} apunta la presencia de una cadena de ácido graso insaturada con un sistema *cis*-alqueno doblemente sustituido. Por otro lado, las bandas de absorción a 3461 , 1611 y 1732 cm^{-1} sugieren un sistema de equilibrio tautomérico ceto-enol, consistente con la $\lambda_{\text{max}} = 281\text{ nm}$ ($\log \epsilon 3.40$) en UV y con la pérdida de $m/z 100$ observada en el experimento de masas EI-HRMS característica de los compuestos β -dicarbonílicos $[\text{M} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2]^+$. Este espectro también estableció su fórmula molecular como $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_2$ en función al ion molecular observado a $m/z 320.2699$.

Ambos tautómeros se diferencian claramente en los datos espectroscópicos respecto a los protones de la posición C-3 (Tabla 4.4.10), donde los protones diastereotópicos H_2-3 para la β -dicetona aparecen a $\delta_{\text{H}} 3.57$, mientras que en el metino enólico, H-3 se desplaza a $\delta_{\text{H}} 5.49$. La integración de sus señales en el espectro RMN ^1H (Figura 4.4.25) nos indica que dicho equilibrio favorece la función enólica respecto a la cetónica en proporción 86:14. Adicionalmente, la señal distintiva del protón del grupo hidroxilo a $\delta_{\text{H}} 4.21$ evidencia el predominio de la forma enólica. Este comportamiento, es similar al de otros sistemas de este tipo recogidos en la literatura.²⁶

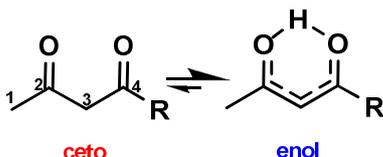
	δ de C-3 (ppm)		% relativo		Constante de equilibrio (K) $\log K = [\text{enol}] / [\text{ceto}]$
	—CH ₂ — tautómero ceto	—CH=— tautómero enol	Enol	Ceto	
$\text{R} = (\text{CH}_2)_7 \text{---} \text{CH}=\text{CH} \text{---} (\text{CH}_2)_4 \text{CH}_3$	3.57	5.49	86	14	0.788

Tabla 4.4.10. Se indican los desplazamientos para los protones en C-3 (600 MHz) en CDCl_3 y los porcentajes relativos en el sistema tautomérico de la loboforona E (**38**).

El resto de los datos de RMN ^1H y ^{13}C se recogen en tabla 4.4.11, donde además se observan otras señales distintivas del equilibrio antes mencionado, como las del metilo en α en la forma enol [$\delta_{\text{C}} 25.0$ y $\delta_{\text{H}} 2.05$ (s)] y en la forma ceto [$\delta_{\text{C}} 30.9$ y $\delta_{\text{H}} 2.24$ (s)]. Por otra parte, se establece la presencia de cuatro metinos olefínicos [$\delta_{\text{C}} 130.2$, 130.0 , 128.0 , 127.7 y $\delta_{\text{H}} 5.39$ (m), 5.37 (m), 5.35 (m) y 5.33 (m)]. Las señales de estos protones

²⁶ Kenar, J. A, *JAACS*, **2003**, *80*, 1027.

aparecen en un paquete de señales solapadas y con *J* pequeñas por lo que también respaldan que la geometría de estos dobles enlaces es *cis*.

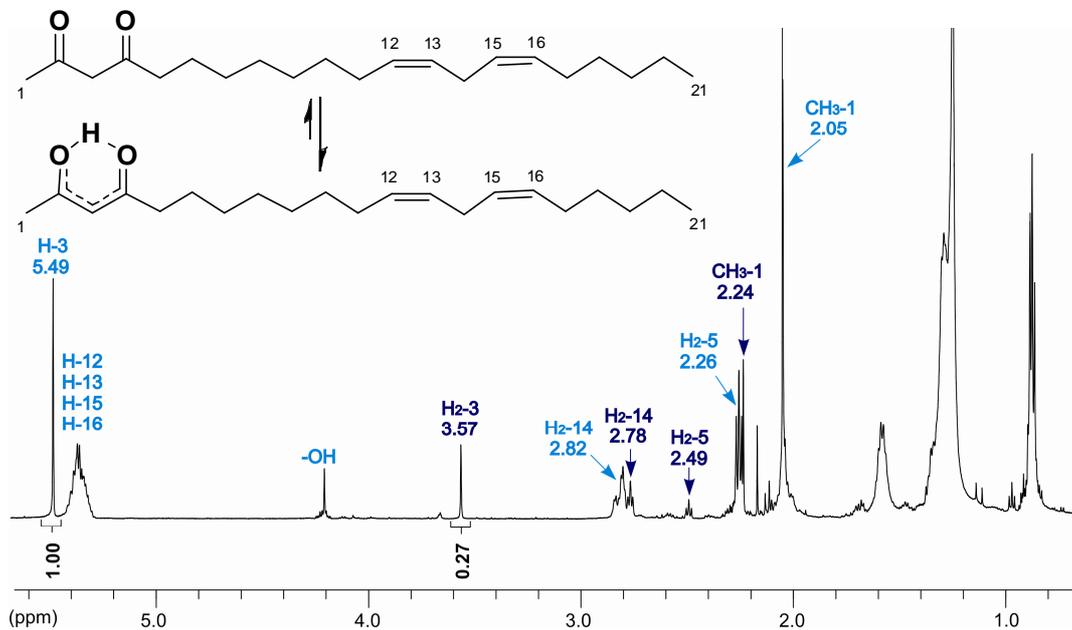


Figura 4.4.25. Espectro de RMN ^1H (600 MHz) de la loboformona E (**38**) en CDCl_3 .

Por último, la ubicación de estos dobles enlaces en la molécula y la confirmación de la estructura de la loboformona E (**38**), se realizó mediante el análisis de las distintas pérdidas en el espectro de masas, tal y como se muestra en la figura 4.4.26.

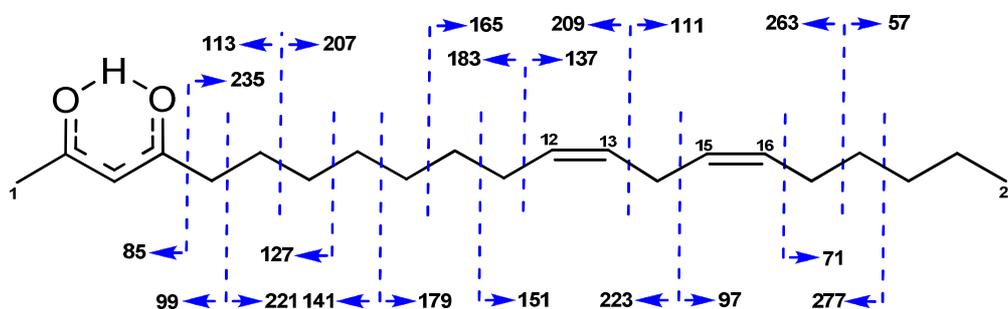


Figura 4.4.26. Fragmentaciones observadas en el espectro de masas EI-HRMS de la loboformona E (**38**).

No.	Enol				Ceto			
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult.	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult.	J (Hz)
1	25.0	2.05 (3H)	s		30.9	2.24 (3H)	s	
2	191.5		s		201.8			
3	99.7	5.49	s		57.9	3.57 (2H)	<i>br s</i>	
4	194.3				204.8			
5	38.2	2.26 (2H)	dd	7.3, 7.4	43.8	2.49 (2H)	dd	7.4, 7.5
6	25.7	1.58 (2H)	m		[a]	[a]	m	
7	29.2	1.33 (2H)	m		[a]	[a]	m	
8	29.3	1.30 (2H)	m		[a]	[a]	m	
9	29.8	1.26 (2H)	m		[a]	[a]	m	
10	29.7	1.30 (2H)	m		[a]	[a]	m	
11	27.8	1.27 (2H)	m		[a]	[a]	m	
12	130.2	5.39	m		[a]	[a]	m	
13	128.0	5.35	m		[a]	[a]	m	
14	25.6	2.82 (2H)	m		[a]	2.78 (2H)	m	
15	127.7	5.33	m		[a]	[a]	m	
16	130.0	5.37	m		[a]	[a]	m	
17	27.7	2.06 (2H)	m		[a]	[a]	m	
18	29.6	2.02 (2H)	m		[a]	[a]	m	
19	31.9	1.28 (2H)	m		[a]	[a]	m	
20	22.7	1.31 (2H)	m		[a]	[a]	m	
21	14.1	0.88 (3H)	t	7.2	[a]	[a]	t	7.2
OH-2		4.21						

Tabla 4.4.11. Datos RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) de los tautómeros de la loboforma E (**38**).
[a] Señal superpuesta con la del enol.

4.5. PROPUESTA BIOGENÉTICA DE LOS NUEVOS POLICÉTIDOS

4.5.1. Generalidades

Los policétidos constituyen una larga lista de productos naturales con estructuras muy diversas que comparten un esquema biosintético común. Los complejos enzimáticos denominados policétido-sintasas (PKSs) catalizan reacciones de condensación sucesivas tipo Claisen de diversos ácidos carboxílicos como unidades iniciales o extensoras a través de enlaces tiol-éster que incorporan unidades de 2 átomos de carbono a una cadena β -policetónica en crecimiento.²⁷

La biosíntesis de los policétidos posee analogías con la biosíntesis de los ácidos grasos, no sólo en los mecanismos involucrados sino también en el tipo de precursores empleados.^{27;28} Así, en la biosíntesis de varios policétidos y ácidos grasos de plantas, las unidades de iniciación y extensión más comunes son el acetil CoA y el malonil CoA, respectivamente. Durante la biosíntesis de los ácidos grasos, para el ensamblaje de las unidades carbonadas, cada ciclo de condensación es gobernado por la acción catalítica del complejo multienzimático sintasa de ácidos grasos (FASs) de tipo II, al cual se unen siete dominios o subunidades proteicas individuales con una misión catalítica determinada (Figura 4.5.1). Previo a la reacción de Claisen, en una etapa catalizada por la MAT (malonil/acetil transferasa), el malonil CoA se enlaza con la subunidad ACP de la sintasa ("*acyl carrier protein*") mediante un enlace tiol-éster, y la unidad de acetil CoA realiza por su lado un proceso similar catalizado por la acetiltransferasa AT. La reacción de Claisen posterior es asistida por la cetosintasa KS y conduce a un sistema β -cetoacetil-ACP (R=H); el cual, puede ser posteriormente reducido de forma estereoselectiva al correspondiente β -hidroxil-éster, consumiendo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) en el proceso catalizado por la cetorreductasa. En la figura 4.5.1 se esquematiza el ciclo de la biosíntesis de los ácidos grasos, el cual se repite de manera iterativa y la cadena carbonada se alarga en dos carbonos por cada ciclo de la síntesis. En un determinado momento, cuando la cadena ha alcanzado una cierta longitud (aproximadamente 16 ó 18 carbonos) el dominio/subdominio TE (acylACP tioesterasa) ejerce una acción de tipo hidrolítica que rompe el resto de tiol-éster liberando el ácido graso.²⁷ Hemos visto que esta secuencia de reacciones producen inicialmente a un β -cetoéster, siendo el grupo cetona reducido después de cada paso de condensación y

²⁷ Dewick, P. M. "Medicinal natural products: a biosynthetic approach". John Wiley & Sons; 2009, pp. 39.

²⁸ Hertweck, C. *Biochem. Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 4688.

antes del siguiente ciclo de condensación, donde el proceso global de reducción comprende: la reducción a un alcohol (KR, cetereductasa), la deshidratación de un éster conjugado (DH, deshidrogenasa) y la reducción del doble enlace (ER, enoilreductasa). La biosíntesis de los policétidos exhiben también los elementos básicos de la biosíntesis de los ácidos grasos (Fig 4.5.1). Sin embargo, en el caso de los policétidos, las policétido-sintasas (PKSs) claramente difieren de las FASs en que los pasos reductivos son optativos, dando lugar a un patrón de funcionalización mucho más complejo. Otras diferencias importantes es que las PKSs pueden usar una mayor variedad de precursores y dar lugar a cadenas de distintas longitudes.²⁸

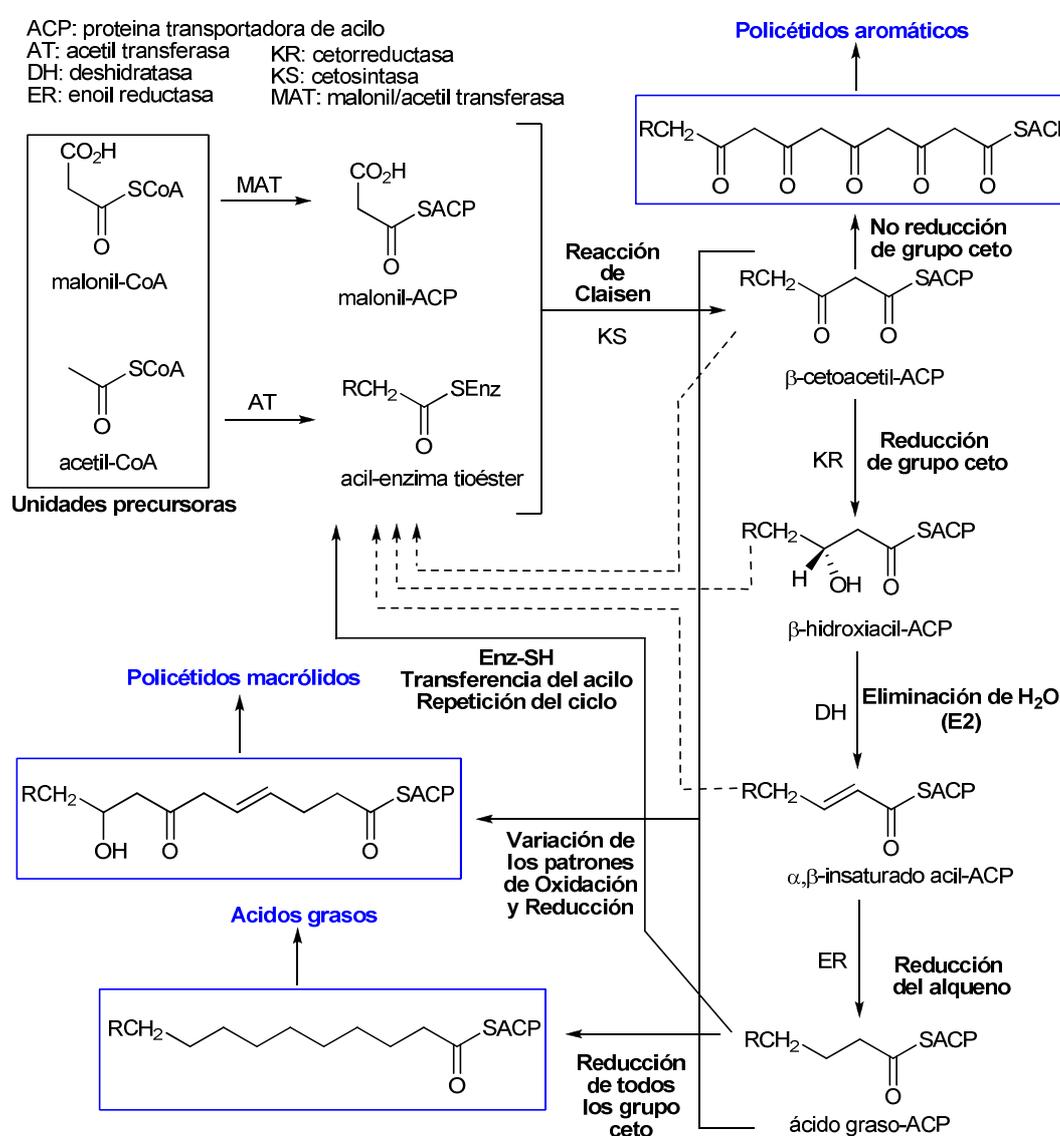


Figura 4.5.1. Modelo esquemático de la biosíntesis general de los policétidos, tomando como unidades precursoras el acetil-CoA y malonil-CoA. Este proceso es esencialmente análogo para la sintasa tipo I.

Sobre la base de su estructura y de los diferentes modos de condensación en la construcción de policétidos, las PKSs se han clasificado en varios grupos.²⁸ Las PKSs tipo I se refieren a enzimas supramoleculares multifuncionales con diferentes dominios catalíticos fusionados covalentemente, y existen preferentemente en hongos y bacterias. Las tipo II, se caracterizan por complejos de enzimas monofuncionales individuales, siendo más comunes en los organismos procariotas, fundamentalmente en actinomicetos. Un tercer grupo son las tipo III que también son multifuncionales aunque homodiméricas, y cuyo miembro más característico y mejor estudiado es la sintasa de la chalcona. Este grupo también se diferencia de los otros tipos, en que utiliza aciltiolésteres unidos a la coenzima A y no a una subunidad ACP. La mayor parte de este tipo de enzimas han sido encontradas en plantas, aunque más recientemente también se han encontrado en bacterias y hongos.

Además de por la estructura de la enzima o del complejo de enzimas, las PKS se dividen también en iterativas o no-iterativas, según catalicen o no más de un proceso completo de elongación. Un sistema no-iterativo posee un sitio activo distinto (módulo) para cada paso catalizado. Las PKSs de tipos II y III, suelen funcionar en forma iterativa, pero las PKSs I pueden hacerlo también de forma modular. Uno de los ejemplos clásicos de PKS I no-iterativa, es la 6-deoxieritronolido sintasa (DEBS). Este tipo de PKS se han encontrado fundamentalmente en procariotas y recientemente en dinoflagelados. Cada elongación se caracteriza por un módulo de enzimas que incluyen los dominios de KS (β -cetoacilsintasa); AT (aciltransferasa) y ACP ("*acil carrier protein*"), común para todas las elongaciones. Luego hay una serie de dominios opcionales que van a determinar el grado de procesamiento del β -carbonilo resultante de la elongación: KR (cetorreductasa); DH (deshidratasa) y ER (enoilreductasa). Por otro lado, las PKSs tipo I iterativas se agrupan en no reductivas, parcialmente reductivas y totalmente reductivas. Respecto a las PKSs tipo II destacar que funcionan normalmente en modo iterativo. En éstas, además de las enzimas responsables de la elongación de la cadena, juegan un papel importante otras subunidades tales como cetorreductasas, ciclasas (CYC) y aromatasas (ARO). Las PKSs tipo III tienen también un funcionamiento generalmente iterativo, siendo capaces de aceptar gran variedad de unidades iniciadoras entre las que se encuentran ácidos grasos, y asociarse a gran cantidad de enzimas dando lugar a diversas clases de productos naturales. Por último señalar, en estricto contraste con las PKSs de tipo I, que la longitud del esqueleto del policétido formado por una sintasa iterativa viene dictado por el tamaño de la cavidad dentro del componente cetosintasa o del complejo entero.²⁸

Añadir que en algunos casos estos sistemas enzimáticos pueden unirse para dar rutas mixtas del tipo híbridos PKS III/PKS I o FAS/PKS. Así, en la hipótesis biogénica de los policétidos obtenidos de *L. variegata* que pasamos a discutir a continuación, consideramos que tiene lugar un proceso de este tipo.

4.5.2. Propuesta biogénica para los nuevos metabolitos aislados

Recientemente se ha llevado a cabo el estudio cualitativo y cuantitativo acerca de los ácidos grasos presentes en *L. variegata*. Este estudio demostró que esta alga produce una cantidad importante de ácidos grasos entre los que destacan el ácido láurico y linoléico.⁶ Por tanto, teniendo en cuenta también este factor, proponemos que la unidad iniciadora para la bioconstrucción del policétido necesario para todos los derivados saturados sea el ácido láurico (ácido dodecanoico). A la unidad iniciadora se unirán distintas unidades de malonil-CoA en la extensión de la cadena en un proceso de biogénesis mixto en el que proponemos una transferencia del ácido graso de la FAS al sitio activo de la PKSs tipo III. Un proceso similar podría tener lugar en el caso de la lobofozona E pero considerando el ácido linoléico como unidad iniciadora.

Posteriormente, todavía dentro del dominio de acción de la sintasa podrían producirse reacciones de ciclación, reducción, descarboxilación, etc. El papel de la enzima en este segundo paso, no es simplemente el de una catálisis ácida, sino ellas deben también dirigir la cadena policétida dentro de lo que se podría denominar una zona “plantilla” de la enzima, que pliega la cadena del policétido en la conformación óptima para que tenga lugar la posterior ciclación (Figura 4.5.2). De esta forma producen un control molecular tal que el resultado es un único producto en vez de una mezcla enorme.²⁹

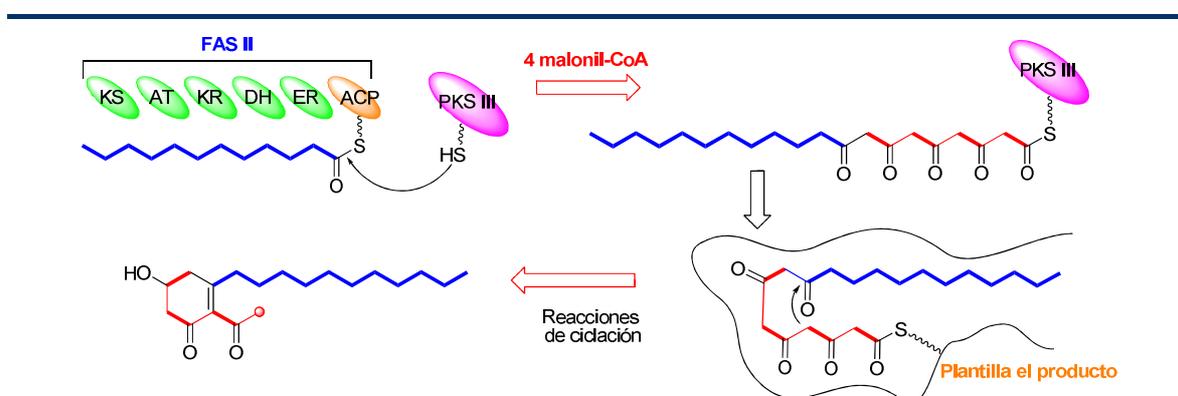


Figura 4.5.2. Ejemplo de control de la reactividad de las cadenas de policétidos por parte de las PKSs.

²⁹ Crawford, J. M.; Korman, T. P.; Labonte, J. W.; Vagstad, A. N.; Hill, E. A.; Kamari-Bibkorpep, O.; Tsai, S.-C. Townsend, C. A. *Nature*, **2009**, 461, 1139.

En base a lo anterior, es lógico suponer que la loboforona C proviene de la reducción simple de un carbonilo y posterior descaboxilación del precursor I, que a su vez, es formado por la incorporación de dos unidades de malonil-CoA sobre el ácido láurico (Figura 4.5.3). De la misma manera, la incorporación de tres unidades extensoras sobre la unidad iniciadora de dodecanoil-CoA, nos llevaría al intermedio II, que por reducción enzimática simultánea de dos grupos carbonilos a sus correspondientes alcoholes secundarios, y posterior deshidratación de uno de éstos mediante una reacción de eliminación bimolecular E₂, nos conduce después de la descarboxilación a la loboforona D. El siguiente paso consistiría en la incorporación de cuatro unidades de malonil-CoA para generar el precursor III; lo cual es coherente con la hipótesis planteada por Narkowicz y col. para la *E*-nonadeca-3-en-2-ona,³⁰ también aislada en este estudio, a través reacciones de reducción, eliminación e hidrogenación similares a las descritas anteriormente.

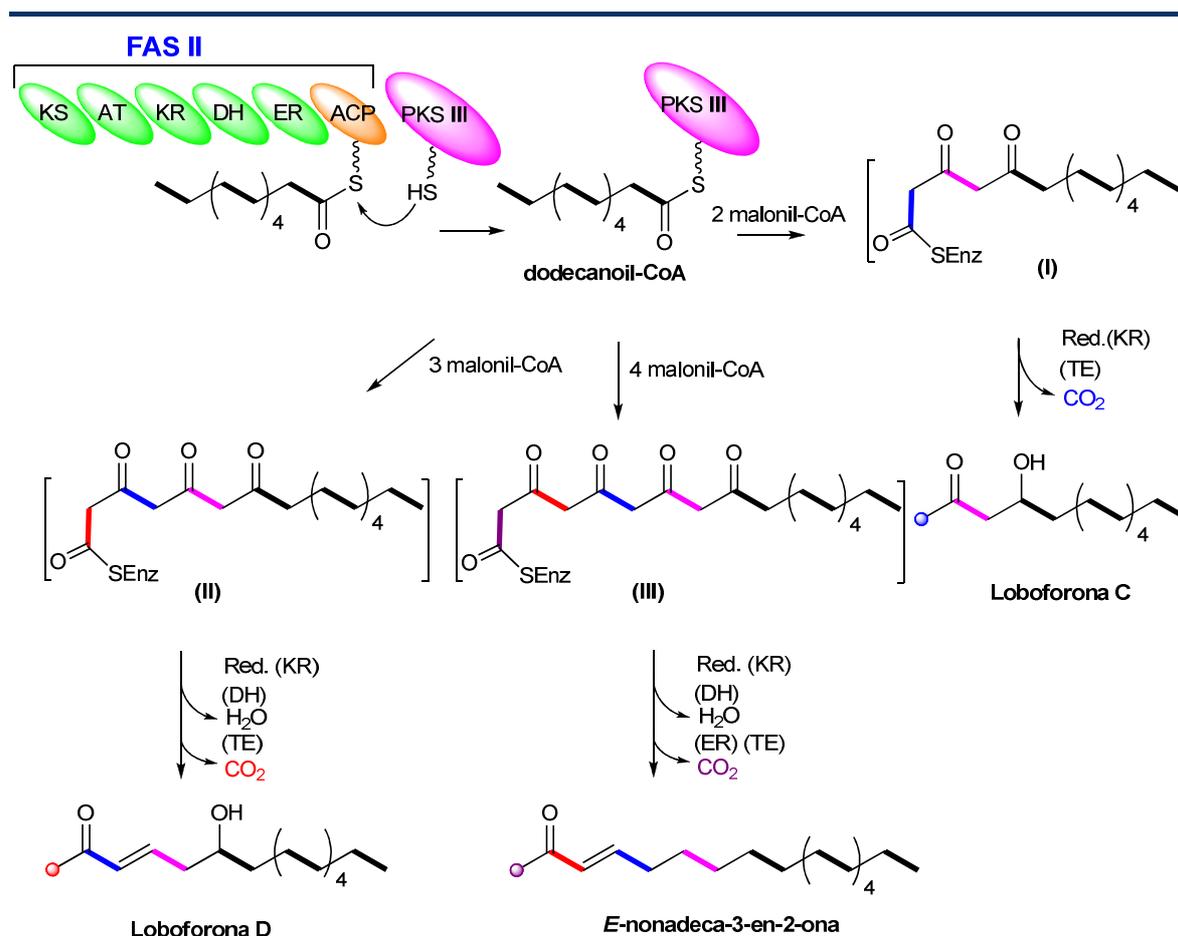


Figura 4.5.3. Propuesta de ensamblaje de los posibles precursores I, II y III en la biogénesis de los distintos policétidos saturados lineales.

³⁰ Narkowicz, C. K.; Blackman, A. J. *Biochem. System. Ecol.*, **2006**, *34*, 635.

Para la génesis de los policétidos heterocíclicos, planteamos que la formación del anillo ocurre partiendo del precursor III (Figuras 4.5.4 y 4.5.6) principalmente a través de procesos de condensación. De esta manera, la reducción del carbonilo C-7 y la posterior condensación del hidroxilo resultante en C-3, seguida de una descarboxilación conduce a la lobofopiranona B. De forma similar y mediante reacciones adicionales de deshidratación e hidrogenación catalítica del doble enlace resultante, daría la lobofopiranona A. Sin embargo, si la condensación se induce desde un hidroxilo sobre C-9, la posterior eliminación de una unidad de CO₂ originaría las lobofoforonas A y B (Figura 4.5.4).

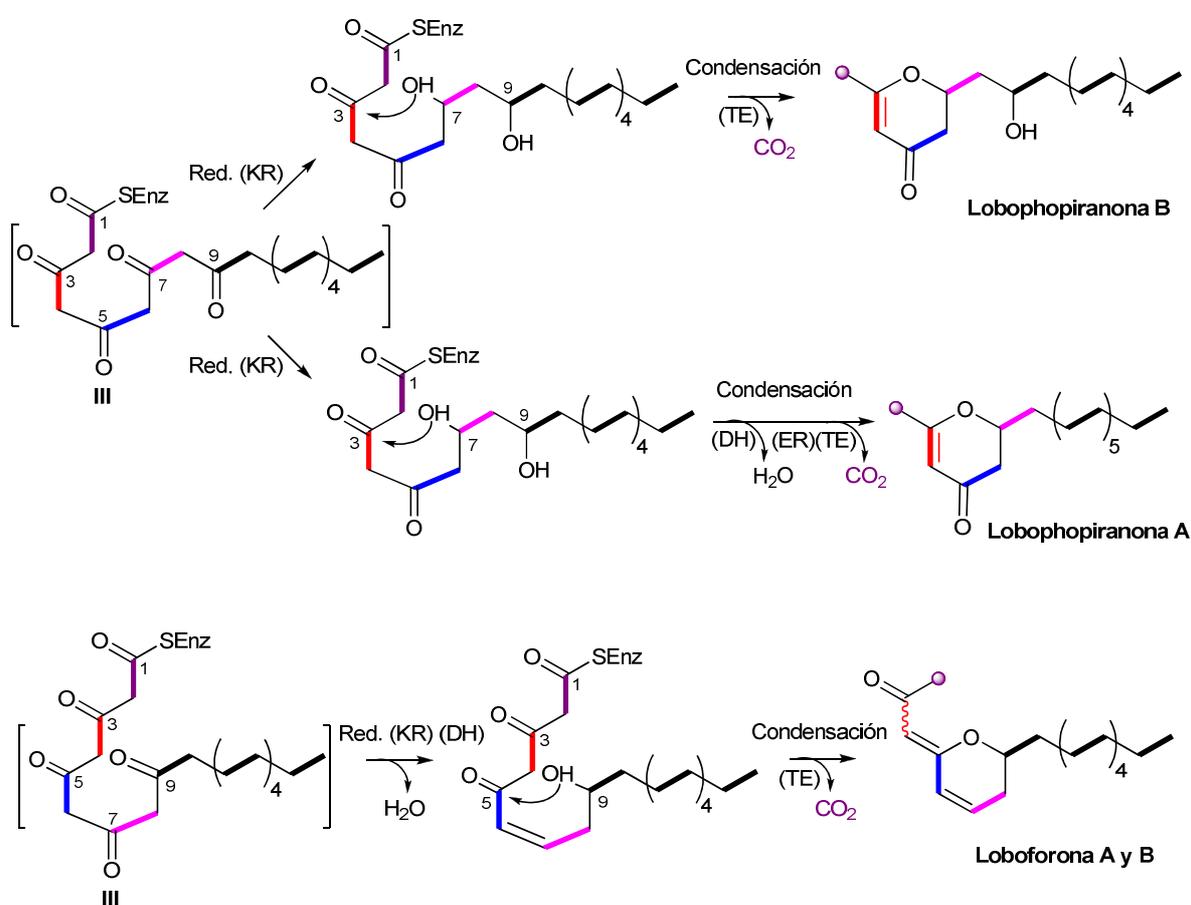


Figura 4.5.4. Ruta biogénica propuesta para la lobofopiranonas A y B y lobofoforonas A y B.

Un esquema biogénico equivalente *via* condensaciones de Claisen del intermedio III nos explicaría el origen de los loboforoles A, B y C (Figura 4.5.5).

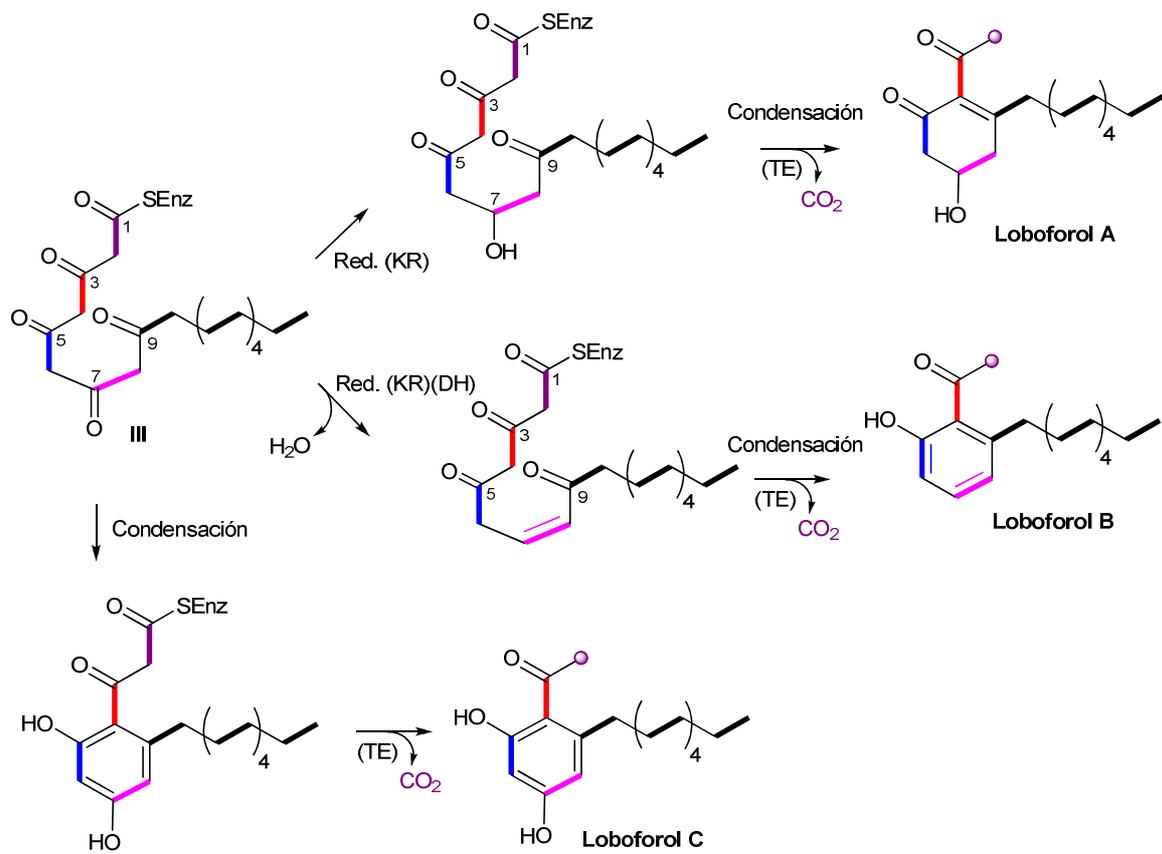


Figura 4.4.5. Ruta biogénica propuesta para los loboforoles A, B y C.

4.6. DATOS FÍSICOS DE LOS NUEVOS METABOLITOS AISLADOS

4.6.1. Loboformol A (29)

Sólido cristalino.

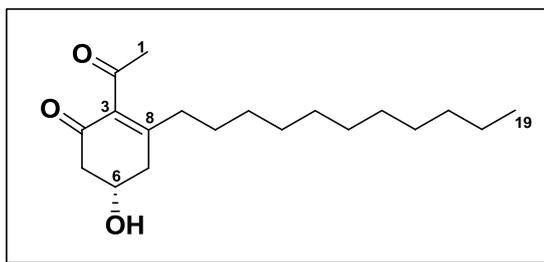
Punto de fusión: 62-63 °C.

$[\alpha]_D^{25} = +17$ (c 0.23, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 236$ nm (log ϵ 3.91).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3502, 2917, 2851, 1698, 1654, 1620, 1467, 1372, 1060, 780$ cm⁻¹.

EI-HRMS: para C₁₉H₃₂O₃, [M]⁺ m/z 308.2353 (calc. 308.2351).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃:

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.9	2.34 (3H)	s	
2	204.0			
3	139.6			
4	195.4			
5	46.5	a 2.52	dd	8.9, 16.2
		b 2.75	dd	4.1, 16.2
6	65.9	4.30	dddd	4.1, 4.3, 7.4, 8.9
7	38.5	a 2.48	dd	7.4, 17.9
		b 2.70	dd	4.3, 17.9
8	159.7			
9	35.4	2.22 (2H)	m	
10	27.9	1.49 (2H)	m	
11	29.6	1.37 (2H)	m	
12	29.4	1.36 (2H)	m	
13	29.6	1.36 (2H)	m	
14	29.7	1.29 (2H)	m	
15	29.4	1.31 (2H)	m	
16	29.4	1.28 (2H)	m	
17	31.6	1.25 (2H)	m	
18	22.7	1.27 (2H)	m	
19	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

4.6.2. Loboforol B (30)

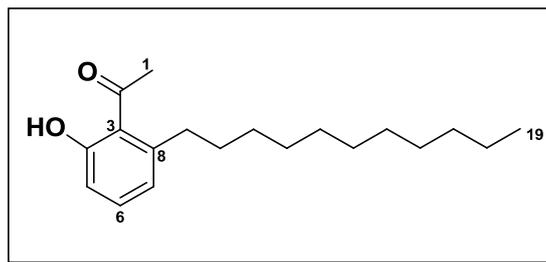
Aceite amarillo.

$[\alpha]_D^{25} = +2$ (c 0.38, CHCl_3).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 203$ nm (log ϵ 3.91).

IR (CHCl_3) $\nu_{max} = 3340, 2924, 1680, 1604, 1585, 1462, 1209, 780, 744$ cm^{-1} .

EI-HRMS: para $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_2$, $[\text{M}]^+$ m/z 290.2234 (calculado 290.2246).



Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en CDCl_3 :

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	32.4	2.67 (3H)	s	
2	206.3			
3	122.1			
4	161.0			
5	116.0	6.80	dd	1.1, 8.1
6	134.2	7.28	dd	7.8, 8.1
7	122.0	6.75	dd	1.1, 7.8
8	144.2			
9	35.8	2.85 (2H)	dd	7.8, 8.0
10	32.5	1.59 (2H)	m	
11	29.7	1.37 (2H)	m	
12	29.3	1.28 (2H)	m	
13	29.6	1.26 (2H)	m	
14	29.6	1.28 (2H)	m	
15	29.4	1.28 (2H)	m	
16	29.5	1.28 (2H)	m	
17	31.9	1.26 (2H)	m	
18	22.7	1.31 (2H)	m	
19	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

4.6.3. Loboformol C (31)

Sólido cristalino.

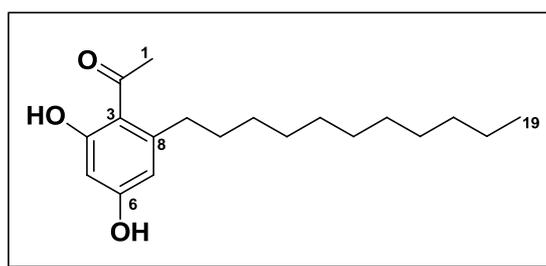
Punto de fusión: 79-80 °C.

$[\alpha]_D^{25} = +2$ (c 0.38, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 220$ nm (log ϵ 4.05).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3367, 2928, 2857, 1619, 1461, 1379, 1262, 1170, 1062, 848$ cm⁻¹.

EI-HRMS: para C₁₉H₃₀O₃, [M]⁺ m/z 306.2203 (calculado 306.2195).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃:

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	25.1	2.56 (3H)	s	
2	207.1			
3	116.1			
4	166.2			
5	101.8	6.25	br s	
6	160.3			
7	111.7	6.22	br s	
8	142.1			
9	44.1	2.88 (2H)	dd	7.4, 7.5
10	25.1	1.71 (2H)	m	
11	24.9	1.59 (2H)	m	
12	31.0	1.36 (2H)	m	
13	30.0	1.36 (2H)	m	
14	29.6	1.29 (2H)	m	
15	29.5	1.31 (2H)	m	
16	29.5	1.28 (2H)	m	
17	29.3	1.26 (2H)	m	
18	22.7	1.27 (2H)	m	
19	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

4.6.4. Lobofopiranona A (32)

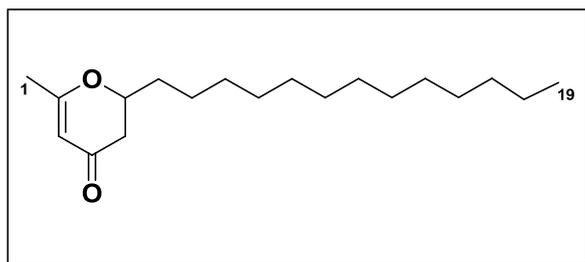
Aceite amarillo.

$[\alpha]_D^{25} = -116$ (c 1.14, CHCl_3).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 264$ nm (log ϵ 3.94).

IR (CHCl_3) $\nu_{max} = 2926, 2855, 1685, 1613, 1463, 1399, 1241, 1126, 1034, 809$ cm^{-1} .

EI-HRMS: para $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_2$, $[\text{M}]^+$ m/z 294.2573 (calculado 294.2559).



Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en CDCl_3 :

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	21.1	1.99 (3H)	s	
2	174.4			
3	104.7	5.30	s	
4	193.1			
5	40.8	(ec) 2.35 (ax) 2.40	ddd dd	0.8, 4.6, 16.6 12.6, 16.6
6	79.3	4.35	dddd	4.6, 5.1, 7.4, 12.6
7	34.4	a 1.64 b 1.79	m m	
8	24.8	a 1.38 b 1.45	m m	
9	29.9	1.33 (2H)	m	
10	29.3	1.29 (2H)	m	
11	29.4	1.30 (2H)	m	
12	29.5	1.27 (2H)	m	
13	29.6	1.25 (2H)	m	
14	29.6	1.28 (2H)	m	
15	29.6	1.25 (2H)	m	
16	29.7	1.27 (2H)	m	
17	31.9	1.26 (2H)	m	
18	22.7	1.29 (2H)	m	
19	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

4.6.5. Lobofopiranona B (33)

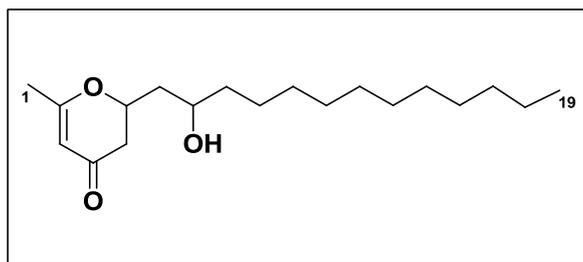
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +33$ (c 0.20, CHCl_3).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 263$ nm (log ϵ 3.96).

IR (CHCl_3) $\nu_{max} = 3421, 2923, 2852, 1651, 1604, 1401, 1341, 1126, 753$ cm^{-1} .

EI-HRMS: para $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_3$, $[M]^+$ m/z 310.2512 (calculado 310.2508).



Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en CDCl_3 :

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	21.1	2.00 (3H)	s	
2	173.7			
3	105.2	5.34	s	
4	192.5			
5	41.0	(ec) 2.44 (ax) 2.46	br dd dd	5.4, 16.7 12.1, 16.7
6	78.5	4.63	dddd	5.2, 5.4, 7.3, 12.1
7	41.6	a 1.79 b 1.99	m m	
8	69.5	3.84	m m	
9	37.7	1.50 (2H)	m	
10	31.9	1.42 (2H)	m	
11	29.6	1.28 (2H)	m	
12	29.6	1.32 (2H)	m	
13	29.6	1.27 (2H)	m	
14	29.6	1.29 (2H)	m	
15	29.5	1.25 (2H)	m	
16	29.3	1.28 (2H)	m	
17	25.4	1.34 (2H)	m	
18	22.7	1.24 (2H)	m	
19	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

4.6.6. Loboforona A (34)

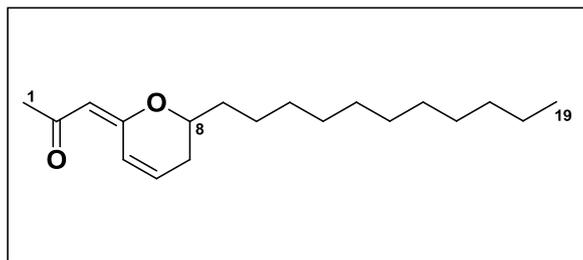
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +20$ (c 0.37, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 276$ nm (log ϵ 3.39).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 2924, 2854, 1658, 1623, 1564, 1463, 1262, 1041, 823$ cm⁻¹.

EI-HRMS: para C₁₉H₃₂O₂, [M]⁺ m/z 292.2411 (calculado 292.2402).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃:

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.9	2.15 (3H)	s	
2	197.8			
3	104.3	5.65	s	
4	162.7			
5	121.8	7.50	br dd	2.7, 10.1
6	135.6	6.40	br ddd	2.7, 6.2, 10.1
7	30.1	a 2.23	dddd	2.7, 2.7, 10.9, 18.2
		b 2.29	ddd	3.9, 6.2, 18.2
8	75.5	3.97	dddd	3.9, 4.6, 6.6, 10.9
	35.0	a 1.56	m	
		b 1.70	m	
10	25.0	a 1.35	m	
		b 1.46	m	
11	29.6	1.28 (2H)	m	
12	29.6	1.32 (2H)	m	
13	29.6	1.27 (2H)	m	
14	29.5	1.29 (2H)	m	
15	29.4	1.25 (2H)	m	
16	29.3	1.28 (2H)	m	
17	32.0	1.34 (2H)	m	
18	22.7	1.24 (2H)	m	
19	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

4.6.7. Loboforona B (35)

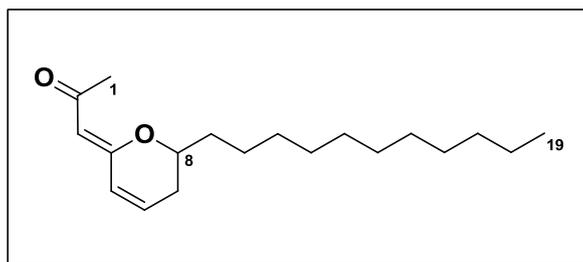
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +23$ (c 0.29, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 268$ nm (log ϵ 3.33).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 2924, 2854, 1717, 1649, 1463, 1260, 1080, 1043, 723$ cm⁻¹.

EI-HRMS: para C₁₉H₃₂O₂, [M]⁺ m/z 292.2369 (calculado 292.2402).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃:

N° C	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.5	2.40 (3H)	s	
2	198.4			
3	108.9	5.07	s	
4	159.9			
5	124.9	6.02	<i>br</i> dd	2.3, 9.7
6	133.7	6.30	ddd	2.4, 6.3, 9.7
7	29.7	a 2.25	dddd	2.3, 2.4, 10.7, 18.2
		b 2.32	ddd	3.8, 6.3, 18.2
8	76.1	4.05	dddd	3.8, 4.4, 7.2, 10.7
9	35.1	a 1.63	m	
		b 1.80	m	
10	25.3	a 1.43	m	
		b 1.55	m	
11	29.3	1.28 (2H)	m	
12	29.4	1.32 (2H)	m	
13	29.5	1.27 (2H)	m	
14	29.6	1.29 (2H)	m	
15	29.6	1.25 (2H)	m	
16	29.6	1.26 (2H)	m	
17	31.9	1.34 (2H)	m	
18	22.7	1.24 (2H)	m	
19	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

4.6.8. Loboforona C (36)

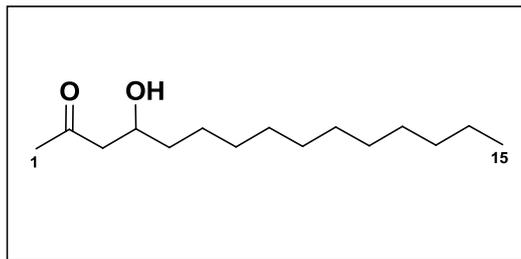
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +2$ (c 0.57, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 231$ nm (log ϵ 3.30).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3329, 3242, 2916, 1710, 1466, 1351, 1253, 1080, 890$ cm⁻¹.

EI-HRMS: para C₁₅H₃₀O₂, [M]⁺ m/z 242.2252 (calculado 242.2246).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃:

posición	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	30.5	2.18 (3H)	s	
2	209.9			
3	49.7	a 2.53	dd	9.3, 17.7
		b 2.63	dd	2.4, 17.7
4	67.4	4.03	m	
5	36.1	a 1.39	m	
		b 1.46	m	
6	25.3	a 1.30	m	
		b 1.39	m	
7	29.8	1.25 (2H)	m	
8	29.5	1.28 (2H)	m	
9	29.5	1.26 (2H)	m	
10	29.6	1.26 (2H)	m	
11	26.6	1.26 (2H)	m	
12	29.3	1.27 (2H)	m	
13	31.7	1.29 (2H)	m	
14	22.5	1.31 (2H)	m	
15	14.1	0.88 (3H)	t	7.1
OH-4		2.95	d	3.4

4.6.9. Loboforona D (37)

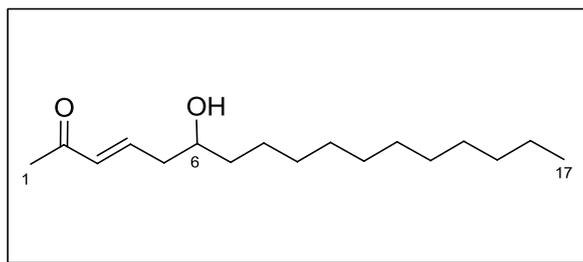
Sólido amorfo blanco.

$[\alpha]_D^{25} = +3$ (c 0.12, CHCl₃).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 224$ nm (log ϵ 3.98).

IR (CHCl₃) $\nu_{max} = 3398, 223, 1738, 1671, 1605, 1460, 1253, 1166, 1030, 979, 805$ cm⁻¹.

EI-HRMS: para C₁₇H₃₃O₂, [M + H]⁺ m/z 269.2472 (calculado 269.2481); para C₁₇H₃₃O₂Na, [M + Na]⁺ m/z 291.2295 (calculado 291.2300).



Datos de RMN ¹H (600 MHz) y RMN ¹³C (150 MHz) en CDCl₃:

N° C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	25.6	2.27 (3H)	s	
2	198.5			
3	133.4	6.15	d	16.0
4	144.4	6.85	ddd	7.2, 7.6, 16.0
5	40.4	a 2.34	dddd	1.0, 7.3, 7.6, 14.5
		b 2.44	dddd	1.3, 4.3, 7.2, 14.5
6	70.7	3.78	m	
7	37.3	1.47 (2H)	m	
8	29.6	1.29 (2H)	m	
9	29.6	1.26 (2H)	m	
10	29.6	1.26 (2H)	m	
11	29.6	1.26 (2H)	m	
12	29.5	1.26 (2H)	m	
13	29.3	1.27 (2H)	m	
14	27.0	1.26 (2H)	m	
15	31.9	1.25 (2H)	m	
16	22.7	1.26 (2H)	m	
17	14.1	0.88 (3H)	t	7.1

4.6.10. Lobofozona E (38)

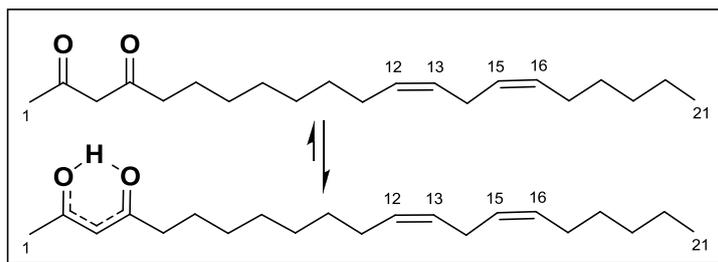
Sólido amorfo amarillo.

$[\alpha]_D^{25} = -3$ (c 0.12, CHCl_3).

UV (MeOH) $\lambda_{max} = 281$ nm (log ϵ 3.40).

IR (CHCl_3) $\nu_{max} = 3463, 2926, 2455, 1732, 1611, 1461, 1378, 1246, 1075, 958, 722$ cm^{-1} .

EI-HRMS: para $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_2$, $[\text{M}]^+$ m/z 320.2699 (calculado 320.2715).



Datos de RMN ^1H (600 MHz) y RMN ^{13}C (150 MHz) en CDCl_3 :

No.	Enol				Ceto			
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult.	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Mult.	J (Hz)
1	25.0	2.05 (3H)	s		30.9	2.24 (3H)	s	
2	191.5		s		201.8			
3	99.7	5.49	s		57.9	3.57 (2H)	<i>br s</i>	
4	194.3				204.8			
5	38.2	2.26 (2H)	dd	7.3, 7.4	43.8	2.49 (2H)	dd	7.4, 7.5
6	25.7	1.58 (2H)	m		[a]	[a]	m	
7	29.2	1.33 (2H)	m		[a]	[a]	m	
8	29.3	1.30 (2H)	m		[a]	[a]	m	
9	29.8	1.26 (2H)	m		[a]	[a]	m	
10	29.7	1.30 (2H)	m		[a]	[a]	m	
11	27.8	1.27 (2H)	m		[a]	[a]	m	
12	130.2	5.39	m		[a]	[a]	m	
13	128.0	5.35	m		[a]	[a]	m	
14	25.6	2.82 (2H)	m		[a]	2.78 (2H)	m	
15	127.7	5.33	m		[a]	[a]	m	
16	130.0	5.37	m		[a]	[a]	m	
17	27.7	2.06 (2H)	m		[a]	[a]	m	
18	29.6	2.02 (2H)	m		[a]	[a]	m	
19	31.9	1.28 (2H)	m		[a]	[a]	m	
20	22.7	1.31 (2H)	m		[a]	[a]	m	
21	14.1	0.88 (3H)	t	7.2	[a]	[a]	t	7.2
OH-2		4.21						

CAPÍTULO 5

Evaluación de actividades biológicas



5

EVALUACIÓN DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

RESUMEN

En este capítulo se presentan los resultados preliminares de las actividades biológicas realizadas tanto a los nuevos metabolitos como a los compuestos conocidos aislados de las tres especies de algas estudiadas. Así mismo se detalla la batería de ensayos que se encuentra en realización.



(Fuente: www.marine.natural.products.blogspot.com.es)

5.1. INTRODUCCIÓN

A pesar de la extensa lista de sustancias químicas de origen marino con aplicaciones terapéuticas conocidas, el interés por descubrir nuevas moléculas con actividad biológica selectiva continúa en progresivo aumento. Con la incorporación constante de nuevas técnicas de análisis, ha aumentado considerablemente la fiabilidad y velocidad con que se desarrollan los bioensayos, generando en consecuencia, la reducción en la cantidad de muestra necesaria.

El objetivo perseguido en este proyecto, una vez realizado el estudio fitoquímico sobre las especies estudiadas, ha sido el de explorar las posibilidades terapéuticas de los productos aislados y caracterizados, en colaboración con distintos grupos dedicados a esas tareas.

5.2. ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Como primera aproximación a los ensayos biológicos, realizamos estudio de toxicidad con los cabezas de series de los distintos grupos de sustancias que presentamos en esta memoria.

Los ensayos fueron realizados por el Dr. D. José Manuel Padrón Carrillo y la Lcda. Dña. Carla Ríos-Luci del Laboratorio de Bioensayos (BioLab), ubicado en el Instituto Universitario de Bio–Orgánica “Antonio González”. Se determinó la inhibición del crecimiento frente a diversas líneas celulares de tumores sólidos humanos: A2780 (líneas celulares de carcinoma de ovario humano), HLB-100 (líneas de carcinoma de *mama humano*), HeLa (*cérvix*), SW1573 (*pulmón*), T-47D (*mama*) y WiDr (*colon*), utilizando la técnica colorimétrica de la sulforrodamina B con ligeras modificaciones,¹ aplicando el protocolo del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos.²

En el caso de los metabolitos aislados de *L. marilzae*, los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5.2.1, donde se recopilan los valores las concentraciones inhibitorias del crecimiento del 50% (GI₅₀) para los compuestos analizados. Después de 48 h de

¹ Miranda, P. O.; Padrón, J. M.; Padron, J. I.; Villar, J.; Martin, V. S. *ChemMedChem*, **2006**, *1*, 323.

² Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P. *J. Nat. Cancer Inst.*, **1991**, *83*, 757.

incubación ninguno de esos metabolitos mostró actividad significativa frente a ninguna de las líneas celulares mencionadas ($GI_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$)

Compuesto	GC ₅₀ (M)					
	A2780	HBL-100	HeLa	SW1573	T47-D	WiDr
Marilzabicicloaleno A (1)		1.0 E-05				
Marilzabicicloaleno B (2)		1.0 E-05				
12-Epoxi-obtusaleno IV (5)	2.5 E-05	2.5 E-05	2.5 E-05	2.5 E-05	2.5 E-05	2.5 E-05
Metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (8)		2.5 E-05	2.5 E-05	2.5 E-05	2.5 E-05	
Marilzaleno (11)	1.0 E-05	1.0 E-05	1.0 E-05	1.0 E-05	1.0 E-05	1.0 E-05
(+)-4R-Acetoxi-marilzaleno (12)	1.0 E-05	1.0 E-05	1.0 E-05	1.0 E-05	1.0 E-05	1.0 E-05
Z-Adrienino (19)		2.5 E-05				
E-Dactileno B (21)	1.3 E-05	2.5 E-05	2.5 E-05	2.5 E-05	2.5 E-05	2.5 E-05
Obtusaleno IV	1.3 E-05	2.5 E-05	2.5 E-05	2.5 E-05	2.5 E-05	2.5 E-05

Tabla 5.2.1. Valores de GI_{50} de distintos metabolitos de *L. marilzae* ensayados frente a líneas celulares tumorales humanas.

Respecto a los metabolitos aislados de *L. variegata*, se han enviado a ensayar las siguientes sustancias: los loboforoles A, B y C (**29-31**), la lobofopiranona A (**32**) y el policétido lineal, lobofoirona E (**38**); mientras que de *L. microcladia*, sólo el compuesto obtenido en mayor cantidad, el laurocarpano A (**23**), encontrándonos a la espera de recibir los resultados.

5.3. ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA

Se evaluó la actividad antialimentaria en ensayos de elección de distintos compuestos frente al insecto *Leptinotarsa decemlineata* en estado adulto, el cual es conocido comúnmente como escarabajo de la patata o dorífora.

Este bioensayo fue llevado a cabo por el Grupo de Control Integrado de Plagas y Enfermedades: Resistencia Vegetal y Bioplaguicidas, del Instituto de Ciencias Agrarias de Madrid, dirigido por la Dra. Azucena González Coloma. Para ello fueron usando discos de hojas de *Solanum tuberosum* de acuerdo al método descrito por González-Coloma.³ Los resultados experimentales se presentan en la tabla 5.3.1. Los únicos metabolitos que mostraron actividad moderada fueron del grupo de las acetogeninas de ocho y doce miembros.

³ Burgueño-Tapia, E.; Castillo, L.; González-Coloma, A.; Joseph-Natan, P. *J. Chem. Ecol.*, **2008**, *34*, 766.

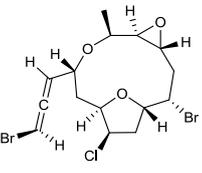
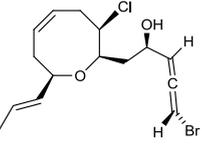
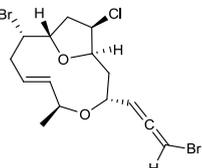
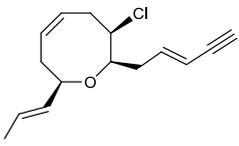
Compuesto	Dosis ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%~FI ^a	EC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
<i>Laurencia marilzae</i>			
 12-Epoxi-obtusaleno IV (5)	50	83.83±4.10	0.83 (0.16, 4.22)
	10	73.85±10.80	
	2	71.19±9.60	
	0.4	34.47±14.60	
	0.08	27.47±11.90	
 Marilzaleno (11)	50	72.13±14.40	4.87 (1.11, 20.90)
	10	52.88±15.10	
	2	44.24±14.60	
	0.4	27.77±5.17	
(+)-4R-Acetoxi-marilzaleno (12)	50	69.36±15.30	n.t
 Obtusaleno IV	50	81.84±10.40	1.10 (0.23, 5.25)
	10	73.41±12.30	
	2	52.34±22.20	
	0.4	52.59±21.40	
	0.08	17.91±7.70	
(3E)-Pinnatifidenino	50	51.07±22.40	~50
 (3E)-Laurenino	50	89.82±10.00	0.37 (0.05, 2.58)
	10	84.84±10.10	
	2	67.73±10.60	
	0.4	47.34±8.70	
(3Z)-Otusenino	50	30.80±20.2	>50
Dactilomelol	50	70.64±9.20	n.t
Pinnatol	50	32.77±15.40	>50
Isopinnatol B	50	65.48±21.20	n. t.
<i>Lobophora variegata</i>			
Loboforol A (29)	50	29.22±12.10	>50
Loboforol B (30)	50	51.28±21.30	~550
Loboforol C (31)	50	63.78±14.00	n. t.
Lobofopiranona B (33)	50	2.79±2.80	>50
Loboforona A (34)	50	37.89±23.20	>50
Loboforona B (35)	50	18.50±18.50	>50

Tabla 5.2.1. Actividad antialimentaria de distintos compuestos nuevos y conocidos. ^a %FI = $[1-(T/C)] \times 100$, donde T y C son el consumo sobre los discos tratados y consumo sobre el disco control, respectivamente. n.t.: experimento no realizado. %FI = 100 indica inhibición total de la alimentación.

Es importante señalar que bioensayos sobre otros insectos continúan en desarrollo en el marco del programa de colaboración con este grupo.

5.4. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS REALIZADAS DENTRO DEL CONSORCIO MAREX

El proyecto MAREX se inscribe en el séptimo programa del marco de investigación de la Unión Europea, y su objetivo fundamental consiste en la búsqueda de compuestos bioactivos a partir de fuentes marinas, desde su descubrimiento hasta la aplicación y producción industrial.⁴ Está conformado por un total de 19 instituciones académicas y empresas privadas de distintos países europeos, asiáticos y suramericanos. Entre ellas se encuentra nuestro grupo de investigación, dedicado a la búsqueda de metabolitos secundarios de origen marino, en el IUBO-ULL.

Tal y como se explicó en Capítulo 1 de esta memoria, la mayoría de los metabolitos nuevos y conocidos que hemos obtenido, se enviaron al consorcio Marex para realizarles distintos ensayos de bioactividad. A pesar de no contar con estos resultados en el momento de redactar esta memoria, hemos querido indicar las distintas pruebas a las que están siendo sometidos los distintos metabolitos (Tablas 5.4.1 y 5.4.2).

- I) **Antibacteriano y antifúngico:** Realizado por la Dra. Paivi Tammela del Centro de Investigación de Fármacos en Finlandia.
- II) **Inhibición de integrinas y anticoagulante:** Llevados cabo por el Dr. Janez Ilas de la Facultad de Farmacia, Universidad de Ljubljana, Eslovenia.
- III) **Efectos sobre canales iónicos y receptores:** Por Jan Tytgat, del Laboratorio de Toxicología, Universidad de Leuven, Bélgica.
- IV) **Proapoptótico y antiinflamatorio:** A cargo de Jean Peluso, Laboratorio de Innovación Terapéutica de la Universidad de Strasbourg, Francia.
- V) **Anticancerígeno:** Realizado en el Centro de Investigación Técnica VTT de Finlandia, a cargo de la Dra. Merja Perala.
- VI) **Antifouling y efectos en mitocondrias:** Por el Dr. Dag Ilver del Centro de Micro y Nanotecnología IMEGO AB, Suecia.
- VII) **Antiinflamatorio:** A cargo del Dr. Valter Lombardi de la empresa biotecnológica EBIOTEC, España.

⁴ Seventh Research Framework Programme, Exploring Marine Resources for Bioactive Compounds: From Discovery to Sustainable Production and Industrial Applications, Marex Consortium (2010).

	I	II	III	IV	V	VI	VII
<i>Laurencia marilzae</i>							
Marilzabicicloaleno A (1)	X	X	X	X		X	X
Marilzabicicloaleno B (2)			X				X
Marilzabicicloaleno C (3)			X				X
Marilzabicicloaleno D (4)			X			X	X
12-Epoxi-obtusaleno IV (5)	X	X	X	X			X
12-Epoxi-obtusaleno IVB (6)		X	X	X			X
Metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (8)			X				X
Obtusaleno X (10)		X	X	X			X
Marilzaleno (11)			X				X
(+)-4R-Acetoxi-marilzaleno (12)	X	X	X	X	X	X	X
(-)-4-Acetoxi-marilzaleno (13)		X	X	X			X
Z-Adrienino (19)		X	X				
E-Adrienino (20)		X	X	X	X		X
Obtusaleno IV		X	X	X			X
(3E)-Isolaurepinnacino		X	X	X	X	X	X
(3E)-Pinnatifidenino	X	X	X	X	X	X	X
(3E)-Laurenino	X	X	X	X	X	X	X
(3Z)-Otusenino	X	X	X	X	X	X	X
Dactilomelol	X	X	X	X	X	X	X
Dactilol	X	X	X	X	X	X	X
Caespitol			X	X			
Pinnatol	X	X	X	X	X	X	X
Isopinnatol B	X	X	X	X	X	X	X
Cassipourol	X	X	X				X
<i>Laurencia microcladia</i>							
Laurocarpano A (23)	X	X	X	X	X		X
(3E)-Dihidrorodofitín	X	X	X	X	X		
Obtusín	X	X	X	X	X	X	X

Tabla 5.4.1. Se indican los compuestos aislados de *L. marilzae* y *L. microcladia* que están siendo sometidos a ensayos de bioactividad, dentro del consorcio MAREX.

	I	II	III	IV	V	VI	VII
<i>Lobophora variegata</i>							
Loboforol A (29)	X	X	X	X	X	X	X
Loboforol B (30)	X	X	X	X	X	X	X
Loboforol C (31)	X	X	X	X	X	X	X
Lobofopiranona A (32)		X	X	X	X		
Lobofopiranona B (33)	X	X	X	X	X	X	X
Loboforona A (34)	X	X	X	X	X	X	X
Loboforona B (35)	X	X	X	X	X	X	X
Loboforona D (37)		X	X	X	X		
Loboforona E (38)	X	X	X	X	X	X	X
E-nonadeca-3-en-2-ona	X	X	X	X	X	X	X

Tabla 5.4.2. Se indican los compuestos aislados de *L. variegata* que se han enviado al entorno MAREX para ensayar distintas bioactividades.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

En el marco de nuestros objetivos de investigación centrados en la búsqueda de moléculas bioactivas y/o estructuras novedosas de fuentes marinas, se ha llevado a cabo el estudio fitoquímico detallado de las especies *Laurencia marilzae* (Rhodophyta), *Laurencia microcladia* (Rhodophyta) y *Lobophora variegata* (Phaeophyta).

El análisis cromatográfico del extracto procedente de *Laurencia marilzae* supuso el aislamiento de un total de treinta y cinco productos naturales puros, de los cuales veintidós resultaron ser nuevos en la literatura química. Este conjunto de nuevas moléculas está constituido por veinte sustancias halogenadas de naturaleza no terpénica con esqueleto de acetogeninas C-15 y dos productos diterpénicos de la serie de los dactilomelanos.

Dentro del primer grupo, es destacable la gran diversidad estructural entre sus representantes, resaltando los marilzabicicloalenos A-D (**1-4**), con un inédito sistema de anillos [5.5.1]biciclotridecano y marcadas connotaciones biogenéticas. Asimismo, se obtienen seis nuevos productos con anillo de doce miembros (obtusalenos): 12-epoxi-obtusaleno IV (**5**), 12-epoxi-obtusaleno IVB (**6**), bromopropargilo del 12-epoxi-obtusaleno IV (**7**), 1-metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (**8**), clorohidrina del 1-metoxi-12-epoxi-obtusaleno IV (**9**) y el obtusaleno X (**10**); tres acetogeninas con anillo de oxocanos: marilzaleno (**11**), (+)-4*R*-acetoxi-marilzaleno (**12**) y (-)-4-acetoxi-marilzaleno (**13**); cinco acetogeninas que poseen en su estructura un único anillo de oxolano: marilzafuralenos A-D (**14-17**) y 12-acetoxi-marilzafurenino (**18**); y finalmente, dos acetogeninas lineales: *Z* y *E*-adrienino (**19** y **20**), que se pueden considerar precursores de algunos de los metabolitos anteriormente citados.

Un segundo grupo lo componen los metabolitos de naturaleza terpénica: *E*-dactileno B (**21**) y el nor-*E*-cetodactileno (**22**) con un esqueleto de dactilomelano descrito previamente en esta especie de *Laurencia*.

La resolución estructural de todos los nuevos metabolitos, así como el establecimiento de sus configuraciones relativas, fueron realizadas principalmente en base al uso intensivo de técnicas espectroscópicas de RMN 1D y 2D, en las que destacan la aplicación de recientes métodos configuracionales basados en el análisis de constantes de acoplamiento escalar. En el caso de los compuestos **(5)**, **(7)** y **(12)**, sus configuraciones absolutas fueron determinadas por el análisis de difracción de rayos X, mientras que la configuración absoluta del marilzaleno **(11)** fue abordada por correlación química con el (+)-4*R*-acetoxi-marilzaleno **(12)**.

La segunda especie estudiada en la presente memoria, *Laurencia microcladia*, produce esqueletos de sesquiterpenos singulares. De ella se obtuvieron seis nuevos metabolitos derivados de un precursor común el β -bisaboleno. Cinco de ellos, laurocarpanos A-E **(23-27)** poseen un esqueleto carbonado bicíclico inusual denominado macrocarpano. Junto a estos fue identificado el ciclolaurocarpano **(28)**, que posee un anillo adicional de ciclopropano en su estructura. La elucidación de éste nos lleva a proponer la revisión de la estructura publicada para su isómero, el bromociclococanol, que también fue aislado en este estudio. Se hace énfasis en las consideraciones biogénicas del mencionado esqueleto, puesto que, junto al análisis amplio de las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares, y el análisis de las correlaciones dipolares, resultaron de gran utilidad para la determinación configuracional de los distintos centros quirales presentes en los metabolitos.

Finalmente, el estudio químico de *Lobophora variegata* concluye con el aislamiento y determinación estructural de diez nuevos policétidos biogénicamente relacionados, de los cuales destacan los lobofoles A-C **(29-31)** por ser nonadecacétidos con un nuevo esqueleto carbonado denominado loboforano. En el caso del cabeza de serie de los loboforanos, loboforol A, su estructura fue también confirmada mediante estudios de difracción de rayos X. Las estructuras de los restantes metabolitos denominados lobofopiranonas A y B **(32 y 33)**, y loboforonas A-E **(34-38)** fueron determinadas fundamentalmente en base a datos espectroscópicos. Cabe señalar que debido al elevado solapamiento de las señales de RMN correspondientes a la cadena lateral alquílica, los fraccionamientos observados en el espectro de masas de impacto electrónico permitieron el establecimiento final de la estructura.

Respecto a los estudios de actividades biológicas realizadas, muy pocos resultados nos han sido suministrados en el momento de la redacción de la presente memoria. La mayor parte de ensayos biológicos siguen en curso, habiendo sido enviadas muestras de la mayoría de los nuevos metabolitos a los laboratorios de farmacología que componen el consorcio MAREX. Dada la amplia variedad de nuevas moléculas y esqueletos, unido a la extensa gama de pruebas farmacológicas a las que serán sometidas confiamos en que un número importante de ellas presenten actividades biológicas interesantes.

APÉNDICE I

Materiales y métodos



I.1. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

I.1.1. Técnicas espectroscópicas

I.1.1.1. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Para la realización de los experimentos de RMN se utilizaron los espectrómetros Bruker® AVANCE 400 MHz, 500 MHz y 600 MHz, de acuerdo a las necesidades. El espectrómetro de campo 600 MHz está equipado con una criosonda de detección inversa TCI de 5 mm. Los experimentos fueron realizados usando los programas suministrados por la casa Bruker® y los espectros referenciados en base a la señal residual de ^1H y ^{13}C usando los picos de cloroformo- d_1 (δ_{H} 7.26 y δ_{C} 77.0), metanol- d_4 (δ_{H} 3.31 y δ_{C} 49.05), piridina- d_5 (δ_{H} 8.74, 7.58 y 7.22 y δ_{C} 150.3, 135.9 y 123.8, respectivamente) y benceno- d_6 (δ_{H} 7.16 y δ_{C} 128.4) a 298 K. Los desplazamientos químicos (δ) descritos se expresan en partes por millón (ppm), mientras que las constantes de acoplamiento (J) se dan en Herz (Hz). Los datos de adquisición obtenidos del espectrómetro se procesaron usando los programas Mestre-C v.4.9.9.6, Mestrenova v.6.0.2 y Topspin™ v.2.1.

I.1.1.2. Absorción en el Infrarrojo (IR)

Los espectros de IR fueron realizados en un espectrofotómetro FT-IR Bruker®, modelo IFS-55. El espectro fue registrado empleando disoluciones de los compuestos en CH_2Cl_2 sobre una pastilla de NaCl.

I.1.1.3. Rotación Óptica

Para las determinaciones de la actividad óptica se empleó un polarímetro Perkin-Elmer®, modelo 241, a 25 °C y usando la línea D del sodio ($\lambda = 589 \text{ nm}$). El producto fue disuelto en CHCl_3 anhidro y se empleó una celda con camino óptico de 1 dm.

I.1.1.4. Espectroscopía de absorción en el Ultravioleta—Visible (UV)

Los espectros UV-visible fueron registrados en un espectrofotómetro de Jasco Inc®. V-560, utilizando disoluciones de los compuestos de interés en metanol y cubetas de cuarzo con un camino óptico de 1 cm.

I.1.1.5. Espectroscopía de Dicroísmo Circular (DC)

Los espectros de dicroísmo circular fueron obtenidos en un espectrofotómetro Jasco Inc.[®] J-600, utilizando disoluciones de los compuestos de interés en acetonitrilo.

I.1.1.6. Punto de fusión

Esta determinación fue realizada por duplicado con un instrumento de punto de fusión marca Büchi[®] 535.

I.1.1.7. Espectrometría de Masas

Las medidas de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) fueron llevadas a cabo en un espectrómetro de masas VG AutoSpec FISIONS[®]. Los espectros EI-HRMS, ESI-HRMS y ESI-FTICR fueron realizados en un espectrómetro Micromass Autopec[®].

I.1.1.8. Análisis de los cristales por Difracción de Rayos X

En las mediciones de los cristales obtenidos, se empleó un equipo de difracción de rayos X Oxford Diffraction Supernova Dual[®] equipado con un Atlas CCD, usando la radiación de CuK α . El refinamiento de la celda y la optimización de los datos se hizo con el programa CryAlisPro,¹ y las estructuras fueron resueltas de usando el método SIR97.² Asimismo, los refinamientos fueron medidos con el programa SHELXL-97,³ usando una matriz completa de mínimos cuadrados, con parámetros de desplazamientos anisotrópicos para todos los átomos distintos al hidrógeno. Las correcciones de la absorción y las imágenes de las moléculas se obtuvieron usando las facilidades del PLATON,⁴ y en los distintos cálculos el conjunto de programas del WinGX.⁵ Finalmente todos los datos cristalográficos correspondientes al 12-epoxi-obtusaleno IV (**5**) y (+)-4-acetoxi-merilzaleno (**12**) están depositados en el centro de Datos Cristalográficos de Cambridge con los números CCDC 798406 y CCDC 798407, respectivamente. Los códigos correspondientes al bromopropargilo de 12-epoxi-obtusaleno IV (**7**) y al loboforol

¹ CryAlisPro, Versión 1.171.34.40 (Publicado el 27-08-2010 CryAlis171.NET); Oxford Diffraction Ltd. (compilados el 27-08-2010, 11:50:40 hr).

² Altomare, A.; Cascarano, G.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A. G. G.; Burla, M. C.; Polidori, G.; Camalli, M.; Spagna, R. *SIR97* University of Bari, Italy, **1997**.

³ Sheldrick, G. M. *SHELXL97* University of Göttingen, Germany, **1997**.

⁴ Spek, A. L. *PLATON* University of Utrecht, The Netherlands, **2003**.

⁵ Farrugia, L. J. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 837.

A (29) no están disponibles debido a que su análisis ha sido efectuado recientemente, y al momento de redacción de esta memoria estamos a la espera de dichos datos.

I.1.2. Técnicas cromatográficas

En los distintos procedimientos de extracción y purificación se utilizaron disolventes destilados de grado técnico y analítico de varias marcas. Para su eliminación se emplearon evaporadores rotatorios Büchi® R-200, equipados con un baño con agua a 37 °C y bombas de alto vacío Büchi® B-721. La monitorización de las cromatografías en columnas se siguió mediante cromatografía de capa fina (TLC), llevadas a cabo usando placas cromatográficas (F-1500/LS254) de la casa Merck®. En general, para la elución de los cromatofolios se usaron mezclas binarias de *n*-hexano y acetato de etilo en distintas proporciones. Como agentes reveladores se usaron diversos procedimientos, siendo los más utilizados:

- La visualización de las placas por exposición a la luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (365 nm) en un gabinete de la marca Spectroline® modelo CM-10.
- La pulverización sobre las placas de una solución de H₂SO₄:H₂O:AcOH (1:4:20) y posteriormente calentadas a 140 °C.
- Impregnación de la placa con una disolución al 4% de ácido fosfomolibdico en etanol en forma de aerosol y calentadas posteriormente a 140 °C.

I.1.2.1. Cromatografía de Exclusión Molecular

Se utilizó como fase estacionaria la resina lipofílica Sephadex® LH-20 (25-100 µm) de Sigma-Aldrich Co.® Las columnas (600 x 70 mm Ø) fueron preparadas siguiendo las instrucciones del fabricante, humectando el soporte en metanol durante 12 horas y empaquetadas por gravedad. Los disolventes utilizados para su elución fueron mezclas binarias y terciarias de cloroformo, metanol y hexano.

I.1.2.2. Cromatografía en Columna de Media Presión

Para este procedimiento de separación cromatográfica en fase normal se utilizaron columnas preempaquetadas Lobar Lichropred Si 60 (310 x 25 mm Ø) de tamaño de partícula 40-63 µm de Merck®, con sistemas di y trifásicos de *n*-hexano, acetato de etilo y metanol en distintas proporciones. Una bomba de émbolo Fluid Metering® sirvió para la

circulación de los disolventes y de la muestra. Para una buena separación, la relación peso muestra / peso gel sílice fue como mínimo de 1/200.

I.1.2.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Para desarrollar las separaciones finales se empleó un sistema de HPLC de la marca LKB[®] y una columna preparativa de fase normal μ -Porasil[™] (150 x 19 mm \varnothing), de WATERS[®].

APÉNDICE II

Métodos de análisis configuracional



II.1. ESTUDIOS CONFIGURACIONALES BASADOS EN EL ANÁLISIS DE CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO

II.1.1. Introducción

Los factores conformacionales y estereoquímicos de moléculas orgánicas quirales están estrechamente ligados a sus propiedades biológicas, químicas, físicas y farmacológicas.^{1,2} Por esa razón, el desarrollo de métodos efectivos para resolver problemas estereoquímicos en compuestos orgánicos, ha atraído la atención de la comunidad científica teniendo una importante repercusión en áreas de investigación diversas como la química de los productos naturales, síntesis asimétrica, química medicinal, biología, y ciencias de los materiales.

Una herramienta que ha resultado de enorme aplicación en los estudios estereoquímicos moleculares, es el análisis de la magnitud de las constantes de acoplamiento escalar. Esto se debe a su dependencia con parámetros geométricos siendo de particular relevancia, por ejemplo, la información geométrica aportada por las constantes de acoplamiento entre protones separados por tres enlaces ($^3J_{H,H}$), que pueden relacionarse directamente con el ángulo diedro (Ψ) que forman a través de la ecuación de Karplus.³⁻⁴ Igualmente características envuelven a las constantes de acoplamiento heteronuclear a tres enlaces ($^3J_{C,H}$),⁵ mientras que en el caso de las constantes de acoplamiento carbono-protón a dos enlaces ($^2J_{C,H}$), aunque los núcleos involucrados no forman un ángulo diedro, cobran importancia puesto que podrían establecer restricciones angulares siempre que exista un átomo electronegativo contiguo al carbono involucrado. De esta manera, el valor de J se puede relacionar con el ángulo de torsión formado por el protón y el átomo electronegativo (Figura II.1.1).⁶

Teniendo presente estos hechos, es de destacar que para la determinación estructural de los nuevos metabolitos que forman parte de esta tesis, ha jugado un papel clave la asignación de la configuración relativa de sus centros estereogénicos a través de métodos basados en el análisis de las constantes de acoplamiento. Así, se ha aplicado en su resolución tanto el método publicado por Murata *et al*, y sus variantes,¹ que permiten el

¹ Bifulco, G.; Dambruoso, P.; Gómez-Paloma, L.; Riccio, R. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 3744.

² Seco, J.M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 17.

³ Haasnoot, C.A.G.; de Leeuw, F.A.A.M.; Altona, C. *Tetrahedron*, **1980**, *36*, 2783.

⁴ Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2870.

⁵ Aydin, R.; Guenther, H. *Mag. Reson. Chem.*, **1990**, *28*, 448.

⁶ Contreras, R.H.; Peralta, J.E. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2000**, *37*, 321.

análisis configuracional de sistemas orgánicos acíclicos; como una método reciente desarrollado por nuestro grupo de investigación para el estudio estereoquímico de anillos de cinco miembros.⁷ A continuación, pasaremos a comentar brevemente en qué consisten ambas aproximaciones.

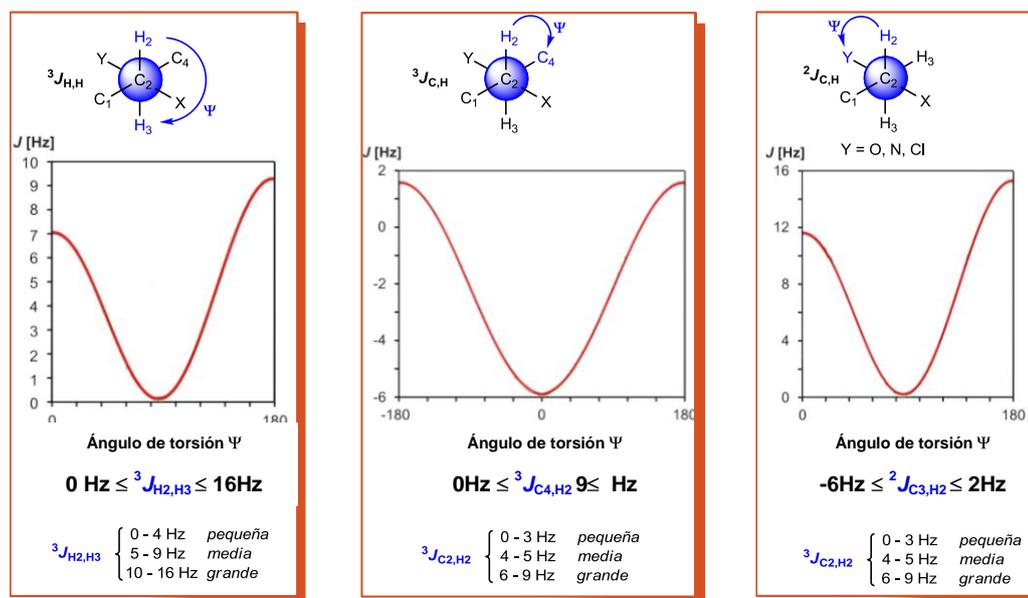


Figura II.1.1. Se ilustra la relación de las constantes de acoplamiento ${}^3J_{H,H}$, ${}^3J_{C,H}$ y ${}^2J_{C,H}$ con el ángulo de torsión (Ψ) según la ecuación de Karplus.

II.1.2. Análisis configuracional de sistemas acíclicos

Entre mediados y finales de los años noventa, Murata y colaboradores formalizaron una metodología para la determinación de la configuración relativa de sistemas acíclicos en moléculas orgánicas mediante la estimación semicuantitativa de los valores de las constantes ${}^3J_{H,H}$, ${}^3J_{C,H}$ y ${}^2J_{C,H}$.^{8,9} El fundamento del método consiste en el supuesto de que los tres rotámeros alternados *gauche-*, *anti* o *gauche+*, en cada una de las series diastereoméricas, *eritro* o *treo*, son representativos de las conformaciones adoptadas por el sistema formado por dos centros asimétricos contiguos. Así, mediante la comparación de los valores experimentales de las constantes ${}^3J_{H,H}$, ${}^3J_{C,H}$ y ${}^2J_{C,H}$ con los

⁷ Napolitano, J. G.; Gavín, J. A.; García, C.; Norte, M.; Fernández, J. J.; Hernández Daranas, A. *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 6338.

⁸ Matsumori, N.; Murata, M.; Tachibana, K. *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 12229.

⁹ Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 866.

patrones de los valores característicos esperados en cada rotámero alternado de cada serie diastereomérica (Figura II.1.2), se puede proponer la configuración de dichos centros en un amplio número de casos.

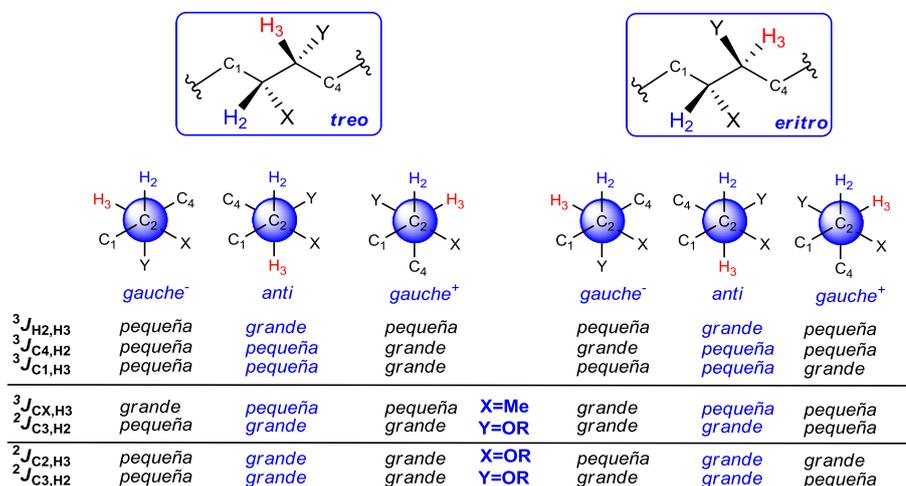


Figura II.1.2. Patrones de la magnitud de los valores de las constantes de acoplamiento (J) en el análisis configuracional de sistemas tipo 2,3-dimetino quirales.

Es importante insistir en que, tal y como se ha comentado previamente, esta metodología sólo es aplicable para rotámeros alternados de modo que sólo es una hipótesis plausible en sistemas acíclicos y que cualquier desviación importante de este comportamiento haría el análisis imposible. Otro factor limitante de este método consiste en que los rotámeros *anti* con configuración relativa opuesta, presentan el mismo patrón esperado de valores de J , lo que los hace indistinguibles. En este caso se hace necesario el análisis de las correlaciones tipo ROE/NOE entre los sustituyentes del fragmento estudiado a fin de discriminar.

Al establecer las comparaciones de las medidas de las constantes experimentales con los patrones esperados es importante establecer claramente los términos de *grande* y/o *pequeña*. De acuerdo a la ilustración de la figura II.1.1, el primer criterio es aplicable cuando los átomos involucrados en las constantes a tres enlaces ($^3J_{H,H}$, $^3J_{C,H}$) se orientan de forma antiperiplanar, es decir, que el ángulo diedro entre sí es de $180 \pm 15^\circ$. Sin embargo, si dicho ángulo es de $60 \pm 15^\circ$, entonces la orientación entre ellos es sinclinal o *gauche*, y la clasificación de la constante en términos de magnitud se define como *pequeña*. Por el contrario, cuando se trata de las constantes $^2J_{C,H}$, la categoría *grande* se define cuando el protón y el heteroátomo se encuentran en una disposición *gauche*, es

decir, cuando en términos geométricos el ángulo de torsión entre sí es del orden de $60 \pm 15^\circ$; mientras que la categoría *pequeña* correspondería con todos los valores de J para los ángulos de torsión de $180 \pm 15^\circ$, asociados con una disposición *anti*.

Los criterios anteriormente definidos se fundamentan en observaciones empíricas que indican que la implementación de esta metodología no es aplicable en confórmeros que se desvían más de 15° de la conformación de un rotámero alternado puro, puesto que conlleva a resultados erróneos.⁸ En adición, igual de importante es señalar que las características de cada conjunto de valores de constantes dependen del patrón de sustitución en el caso específico estudiado (Tabla II.1.1).

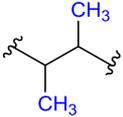
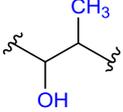
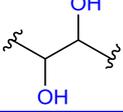
Tipo de sistema	³ J _{H,H} (Hz)		³ J _{C,H} (Hz)		² J _{C,H} (Hz)	
	<i>grande anti</i>	<i>pequeña gauche</i>	<i>grande anti</i>	<i>pequeña gauche</i>	<i>grande gauche</i>	<i>pequeña anti</i>
	9 a 12	2 a 4	6 a 8	1 a 3	--	--
	8 a 11	1 a 4	6 a 8	1 a 3	-5 a -7	0 a -2
	7 a 10	2 a 4	5 a 7	1 a 3	-4 a -6	2 a 0

Tabla II.1.1. Se indican las categorías *grande* y *pequeña* de acuerdo con la magnitud de J en diversos sistemas 2,3-dimetinos quirales.

Hasta ahora hemos explicado la aplicación de este método sólo en sistemas asimétricos adyacentes; sin embargo, tales fundamentos pueden ser extrapolables a sistemas lineales 2,4-dimetinos quirales. Una condición necesaria para ello es que ambos se unan mediante un metileno diasterotópico, posibilitando el estudio del sistema en dos etapas. Primero, se establece la configuración relativa de los protones del metileno diasterotópico respecto a uno de los metinos adyacentes, y luego, se repite el análisis entre los protones del metileno central y el metino restante (Figura II.1.3).

Una dificultad adicional, a la hora de aplicar estos métodos surge de la interpretación de los datos de RMN en términos de un único rotámero, el mayoritario, desechando las contribuciones de los minoritarios, cuando puede ser una situación frecuente la coexistencia de varios confórmeros. Si en un sistema del tipo visto hasta ahora se encuentran simultáneamente varios rotámeros, de manera que los minoritarios

contribuyen de manera importante ($1 \geq Hz$), el resultado final en la medición de la constante de acoplamiento será un valor promedio. En estos casos será muy difícil la clasificación entre *grande* y *pequeña* de las *J*, y por tanto, el método original de análisis configuracional de Murata resulta inaplicable.

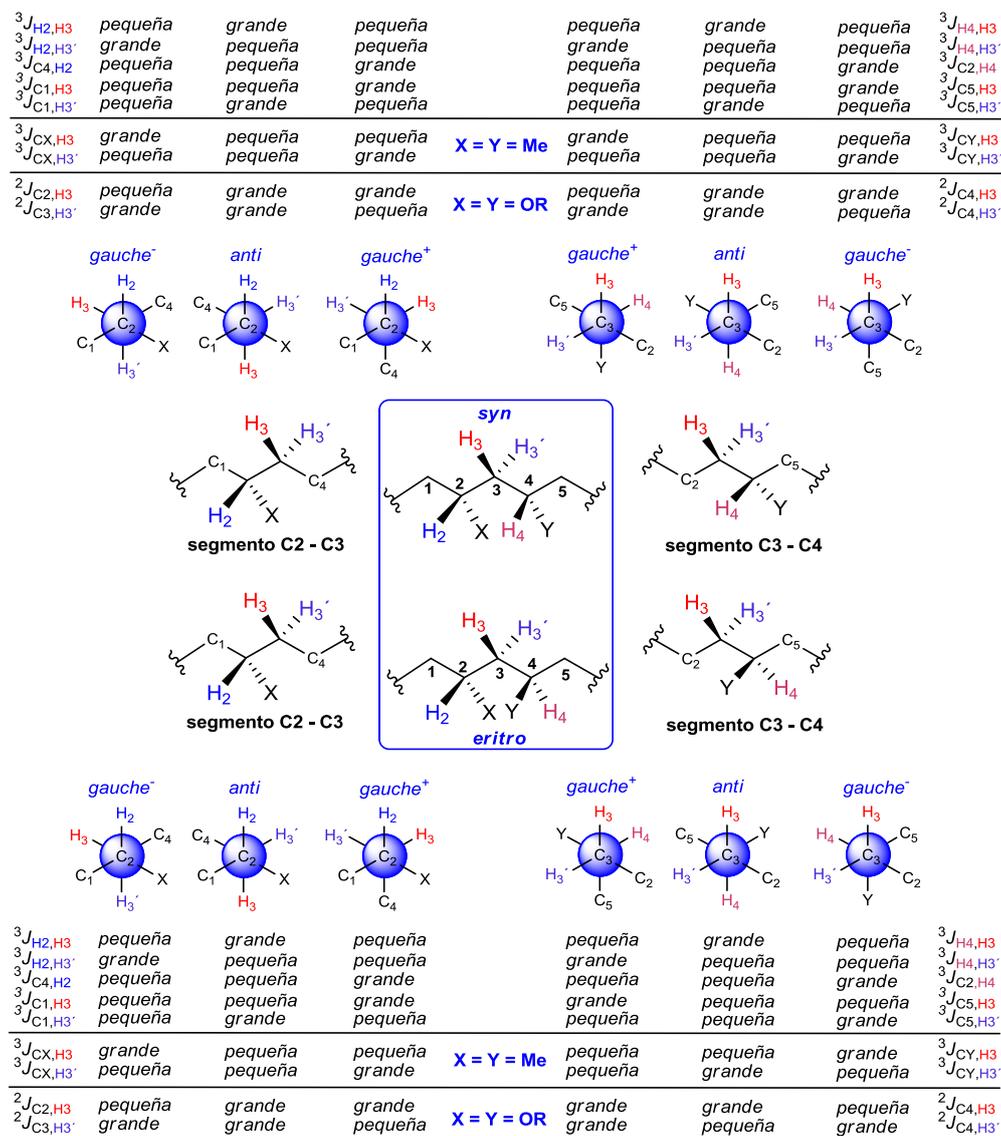


Figura II.1.3. Patrones de la magnitud de constantes de acoplamiento (*J*) en el análisis configuracional de sistemas 1,3-dimetino quirales.

Por esa razón, estos autores desarrollaron una variante del mencionado método para abordar el análisis de algunos sistemas conformacionales en equilibrio,⁹ la cual sólo permite acceder al estudio de sistemas con un equilibrio entre dos rotámeros alternados mediante el análisis de las magnitudes de las constantes en sistemas tipo *anti-gauche* o

gauche-anti (Figura II.1.4). Este análisis incluye en su patrón de predicción también constantes de acoplamiento con valores *medios*, típicas de una interconversión rápida entre rotámeros. Sin embargo, cabe mencionar que este procedimiento igualmente presenta limitaciones al impedir la diferenciación entre los equilibrios *gauche+*/*gauche-* con configuración relativa opuesta (Figura II.1.4).

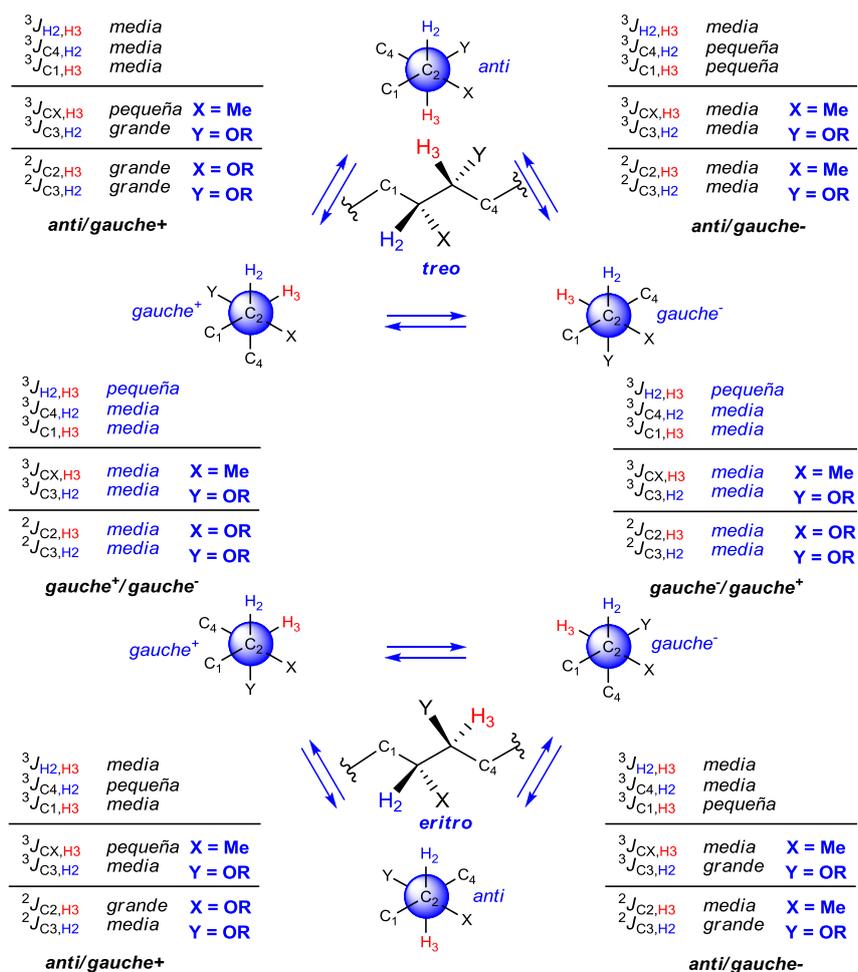


Figura II.1.4. Patrones de magnitud de constantes de acoplamiento (J) en el estudio de sistemas en equilibrio conformacional 2,3-dimetino quirales.

A pesar de sus limitaciones, el método desarrollado por Murata y colaboradores ha permitido la determinación de la configuración relativa de cadenas carbonadas acíclicas polisustituidas de una gran cantidad de productos naturales. Es más, su amplia aplicación en la última década ha provisto una base sólida para la generalización de la metodología en sistemas con un rango de sustituciones cada vez más amplio. En este sentido, es de destacar que Bifulco y colaboradores, ampliaron la aplicación de esta

metodología al caso de sistemas de dos estereocentros de un metino portador de un heteroátomo contiguo a un carbono cuaternario,¹ siendo fundamental para la asignación de la configuración relativa en algunos de los metabolitos nuevos aislados de *L. microcladia*. El que uno de los centros en estudio sea cuaternario hace que no dispongamos de la información inherente al análisis del valor de la constante protón-protón, así como de parte de las constantes de acoplamiento heteronuclear. Esto implica, que quizás no se llegue a disponer de la totalidad de los parámetros necesarios para seleccionar sin margen de dudas el conformero mayoritario y por tanto resolver la configuración relativa. Sin embargo, como ellos validaron experimentalmente con compuestos modelos, el análisis parcial de las $^{2,3}J_{C,H}$ en combinación con datos ROE, puede permitir en algunos casos resolver el problema.

II.1.3. Estudio configuracional de anillos de cinco miembros

Los anillos de cinco miembros son uno de los motivos estructurales más comunes dentro del campo de la química y la biología. Sin embargo, su análisis configuracional con frecuencia es muy difícil de llevar a cabo ya que poseen una considerable flexibilidad conformacional característica, que les lleva en muchas ocasiones a existir como una combinación de numerosas conformaciones en que cada átomo asume muchas posiciones relativas (Figura II.1.5).

A pesar de esto, la relación existente entre la magnitud de la constante de acoplamiento escalar y el ángulo diedro inherente, sigue representando notable interés en el análisis de estos sistemas.

Antes de la formulación del método que a continuación vamos a comentar brevemente, existían escasos datos publicados en los que se hubiese utilizado el análisis de las constantes de acoplamiento en el estudio configuracional de anillos de cinco miembros. En ellos el análisis se limitó al estudio de las constantes escalares entre protones vecinos, pero a pesar de que los valores de $^3J_{H,H}$ arrojaron valores muy variados, se pudo observar que sólo los protones con una orientación *trans* presentaban constantes clasificadas como *pequeñas* (0-5 Hz en ciclopentanos sustituidos y 0-3,5 Hz en furanósidos).^{10,11}

¹⁰ Gomes, C.; Gil, J. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 11363.

¹¹ Constantino, V.; Fattorusso, E.; Imperatore, C.; Mangoni, A. *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 6158.

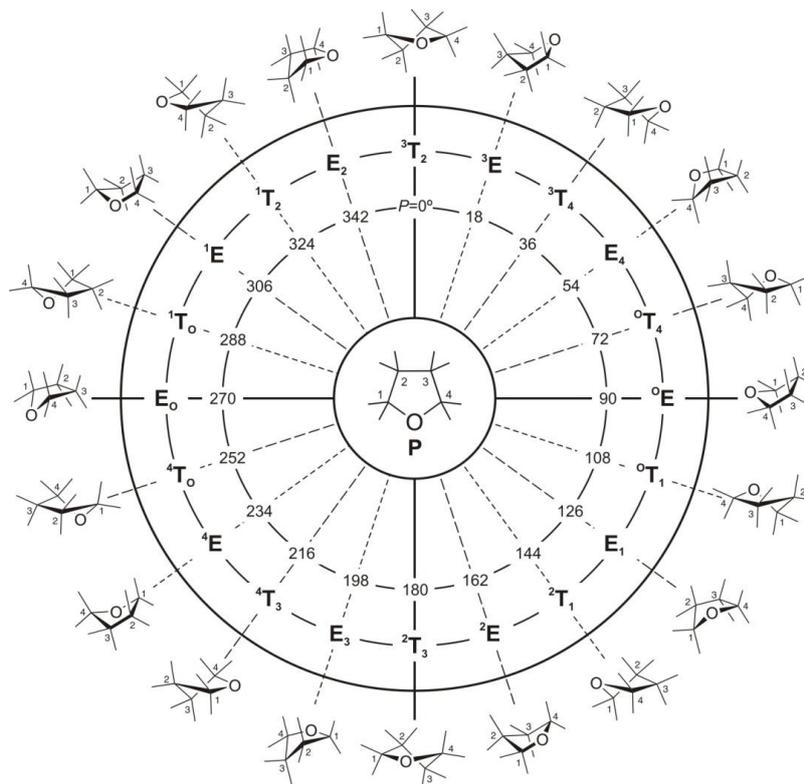


Figura II.1.5. Círculo de pseudorrotación para un anillo de tetrahidrofurano, incluyendo las diez conformaciones tipo “envelope” (E) y las diez tipo “twist” (T). (P) es el ángulo de fase característico de cada conformación, mientras que (P) es la conformación plana situada en el centro.

En 2011, nuestro grupo de investigación publicó una metodología para el análisis de la estereoquímica de oxolanos, aplicable a otros ciclos de igual cantidad de miembros (ciclopentanos, furanósidos y pirrolidinas), mediante el análisis por RMN de las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares.⁷ Para ello llevaron a cabo un estudio de dinámica molecular, intentando abarcar todas las posibles conformaciones accesibles para estos sistemas con diferentes patrones de sustitución, a fin de establecer diferencias entre los valores de las constantes de acoplamiento para sustituyentes orientados en *cis* y *trans*. En esta aproximación utilizaron como punto de partida los diez posibles conformémeros tipo E (“envelope”, donde 4 de los 5 átomos del anillo se encuentran en un plano) de anillos de tetrahidrofurano (Figura II.1.5) como muestra representativa de las distintas conformaciones que pueden surgir en el análisis de muchos anillos de cinco. Aplicando simulaciones de dinámica molecular (MD) observaron que el ángulo diedro en el anillo de tetrahidrofurano (Ψ) entre protones vecinales *cis* varía entre $+60^\circ$ y -60° , mientras que para los protones vecinales orientados en *trans*, lo hacen dentro del intervalo 160° y 1180° . Seguidamente calcularon los valores de $^3J_{H,H}$ y $^{2,3}J_{C,H}$ para cada conformémero

usando métodos DFT (*"Density Functional Theory"*). De esta forma establecieron un modelo, que se ilustra a grandes rasgos en el diagrama de flujo que se muestra en la figura II.1.6, y que permite el análisis de la orientación relativa de los protones unidos a los cuatro átomos de carbono del anillo de oxolano y sistemas equivalentes. Estos cálculos fueron contrastados experimentalmente utilizando los datos obtenidos por RMN en un conjunto de moléculas modelos.

En esta tesis doctoral, esta metodología se ha aplicado en el estudio configuracional de los marilzafuralenos (apartado 2.4.4).

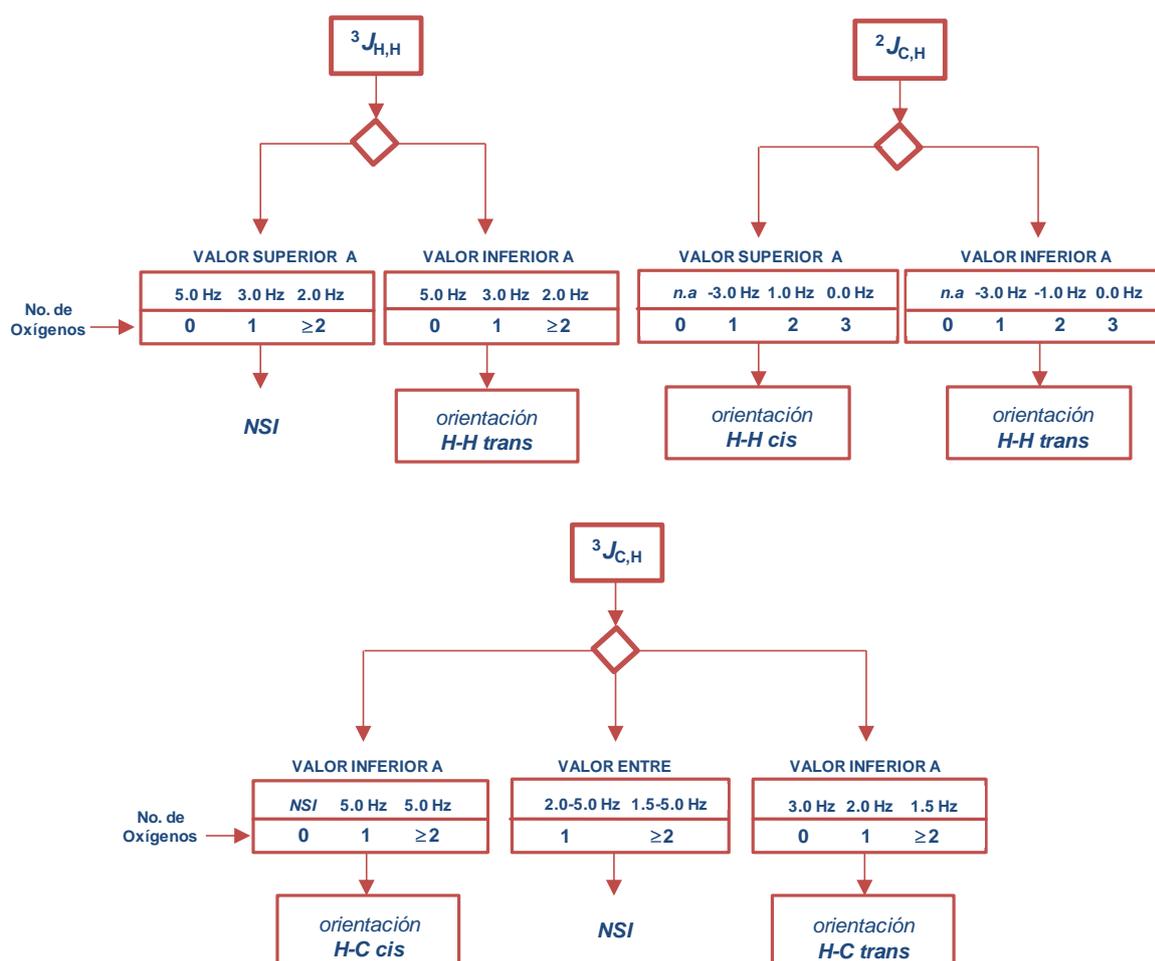


Figura II.1.6. Diagrama de flujo para el estudio configuracional de anillos de cinco miembros mediante el uso de constantes de acoplamiento ${}^3J_{H,H}$ y ${}^{2,3}J_{C,H}$ (NSI: no se obtiene información sobre estereoquímica; n.a.: no aplicable).

II.1.4. Medidas experimentales de las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares

Para la aplicación de los métodos anteriores, se requiere una apropiada determinación de las constantes de acoplamiento homonuclear (^1H - ^1H) y heteronuclear (^{13}C - ^1H). En el caso de las constantes $^3J_{\text{H,H}}$, lo normal es realizar la medición en el espectro de RMN ^1H , pero con frecuencia esta tarea se dificulta debido al parcial o total solapamiento de la señal en cuestión, por lo que se deben utilizar otros experimentos alternativos. Algunas alternativas experimentales suelen ser los experimentos TOCSY-1D, COSY DQF, ^1H - ^1H J -resuelto, entre otros.

Respecto a los experimentos espectroscópicos para medir constantes heteronucleares ($^2J_{\text{C,H}}$, $^3J_{\text{C,H}}$), podemos destacar el HSQC-HECADE y el J -HMBC, ambos utilizados en distintos episodios del trabajo que constituye esta memoria. El primero de ellos suele ser bastante utilizado debido a que aporta información respecto al signo de la constante a través de la variación de la “inclinación” de las señales. Hay que destacar que este experimento se basa en la transferencia de magnetización a través de sistemas de espín ^1H — ^1H (tipo TOCSY), lo que impide obtener información en aquellos diedros que incluyan un carbono cuaternario sp^3 . Esta dificultad se puede salvar a través del uso de experimentos como el J -HMBC; pero tiene la desventaja de ser menos sensible y de no informar del signo de la constante.