

Curso 2010/11
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/8
I.S.B.N.: 978-84-15287-26-1

FRANCISCO ABELARDO CEN PACHECO

**Estudio químico y bioactividad
de poliéteres de origen marino**

Directores

**MANUEL NORTE MARTÍN
JOSÉ JAVIER FERNÁNDEZ CASTRO
ANTONIO MANUEL HERNÁNDEZ DARANAS**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

El trabajo de investigación que constituye la presente memoria fue llevado a cabo en el **Instituto Universitario de Bio–Orgánica “Antonio González”** (IUBO–AG), bajo la dirección de los Dres. **D. Manuel Norte Martín, D. José Javier Fernández Castro y D. Antonio Manuel Hernández Daranas**, a quienes expreso mi más sincero agradecimiento por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y participar en los proyectos cuyos resultados forman parte de esta tesis doctoral. Muchas gracias.

A Nelva y a mi hijo Rubén

AGRADECIMIENTOS

Si bien esta tesis doctoral ha requerido de mucho esfuerzo y dedicación por mi parte y la de mis directores de tesis, *Manuel Norte y José Javier Fernández y Antonio Hernández Daranas*, su realización no hubiese sido posible sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que integran o integraron nuestro laboratorio. Por este motivo, es un placer expresarles mis agradecimientos.

A mis compañeros doctorandos, y a los que hoy ya son doctores: *Laurete Nordström, Laura Vázquez, Patricia Cruz, Tamara Vilches, Yaiza García, Adrián Gutiérrez, Humberto Domínguez, José Napolitano y Martín Febles*. Por todo el ánimo, la paciencia y sobre todo por la valiosa amistad que siempre me brindaron, los recordaré siempre con una sonrisa.

A los Dres. *María Luisa Souto, José Adrian Gavín y Cirilo Pérez*, ya que siempre me brindaron toda su experiencia y me ayudaron en todo momento para la realización de este trabajo. Especialmente a ti *Mari*, por haberme guiado desinteresadamente en mis primeros pasos en el laboratorio.

A la *Universidad de La Laguna y CajaCanarias* por el apoyo económico brindado durante este trabajo de investigación.

Y, por supuesto, el agradecimiento más grande está dirigido hacia mis padres y hermanas (*José, María, Alejandra y Mayra*), ya que sin ellos, no sería el hombre que soy...

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Metabolitos polietéreos de origen marino	3
I.2. Poliéteres derivados del escualeno	6
I.2.1. Triterpénos polietéreos del género <i>Laurencia</i>	6
I.2.1.1. Triterpenos con sistema dioxabicyclo[4.4.0]decano	6
I.2.1.2. Triterpenos con sistema dioxabicyclo[5.4.0]undecano	15
I.2.1.3. Compuesto con sistema trioxatriciclo[10.4.0.0 ^{4,10}]hexadecano	16
I.2.1.4. Compuestos sin anillos fusionados	17
I.3. Origen biogénico de los poliéteres triterpénicos	21
I.3.1. Consideraciones sintéticas	22
II. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	27
II.1. Recolección y extracción del alga <i>Laurencia viridis</i>	29
II.2. Antecedentes	29
II.3. Estudio de elucidación estructural	32
II.3.1. 1,2-Dehidropseudodehidrotirsiferol	33
II.3.2. Secodehidrotirsiferol	37
II.3.3. Espirodehidrovenustatriol	40
II.3.4. 14-Cetodehidrotirsiferol	44
II.3.5. Pretirsenol A	48
II.3.6. 13-Hidroxipretirsenol A	51
II.3.7. 15-Dehidroxitirsenol A	54
II.3.8. 14-Hidroxiyucatecol	59
II.3.9. Yucatecona	64
II.3.10. Saiyacenol A y B	77
II.3.11. Adejeno A y B	90
II.3.12. 22-Hidroxidehidrotirsiferol	94
II.3.13. Piranodehidrotirsiferol	98
II.2.14. Nivariol A	102

II.3.15. Nivariol B	111
II.3.16. (+)-Peróxido de longileno	116
II.3.17. (+)-Longileno	122
II.3.18. Prolongileno	124
II.3.19. 23,24-Dehidroprolongileno	127
III. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS NUEVOS METABOLITOS	131
III.1. Actividad inhibitoria de las proteínas fosfatasas PP1 y PP2A	133
III.1.1. Ensayos in vitro de inhibición de fosfatasas	135
III.2. Búsqueda conformacional del (+)-peróxido de longileno y prolongileno	138
III.2.1. Estudio conformacional por RMN	142
III.2.2. Análisis de los resultados de la modelización a partir de los datos de RMN	148
III.3. Estudio de interacciones proteína—ligando	149
III.3.1. Establecimiento de un modelo de interacción PP2A—ligando	152
III.3.2. Modelos de interacción de los longilenos y la PP2A	158
III.4. Actividad citotóxica de los nuevos metabolitos	162
IV. ORIGEN BIOGENÉTICO DE LOS NUEVOS METABOLITOS	165
IV.1. 1,2-Dehidropseudodehidrotirsiferol y secodehidrotirsiferol	167
IV.2. Espirodehidrovenustatriol	169
IV.3. 14-Cetodehidrotirsiferol, pretirsenol A, 13-hidroxipretirsenol A y 15-dehidroxitirsenol A	170
IV.4. 14-Hidroxiyucatecol y yucatecona	172
IV.5. Saiyacenol A y B	173
IV.6. Adejeno A y B	174
IV.7. Nivariol A y B	175
IV.8. (+)-Peróxido de longileno, (+)-longileno, prolongileno y 23,24-dehidroprolongileno	176
V. PARTE EXPERIMENTAL	177
V.1. Técnicas espectroscópicas	179

V.2. Técnicas cromatográficas	180
V.3. Recolección y extracción del material vegetal	183
V.4. Marcha cromatográfica del extracto de maceración	183
V.5. Ensayos in vitro de inhibición de la Proteína Fosfatasa PP2A	191
V.6. Evaluación de la actividad citotóxica	195
V.7. Métodos computacionales	197
V.8. Datos físicos de los compuestos aislados	201
APÉNDICE	223
CONCLUSIONES	239

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

B3LYP	<i>Becke three-parameter Lee–Yang–Parr exchange functional</i>
<i>bd</i>	<i>Doblete ancho</i>
<i>bs</i>	<i>Singulete ancho</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	doblete
<i>dd</i>	doble doblete
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DMSO	Dimetil Sulfoxido
HECADE	<i>Heteronuclear Couplings from ASSCI–Domain Experiments with</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple–Bond Correlation</i>
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HSQMBBC	<i>Heteronuclear Single Quantum Multiple–Bond Correlation</i>
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria del 50%
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LC	Cromatografía líquida
<i>m</i>	multiplete
MCMC	<i>Monte Carlo Multiple Minimum</i>
MPW1PW91	<i>modified Perdew–Wang one–parameter 1991 exchange functional</i>
MS	Espectrometría de masas
XTT	Sal de tetrazolio
NOE	Efecto Nuclear Overhauser
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
PP1	Proteína fosfatasa de serina/treonina de tipo 1
PP2A	Proteína fosfatasa de serina/treonina de tipo 2A
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
ROESY	<i>Rotational Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
<i>s</i>	singulete
TAD	<i>Total Absolute Deviation</i>
TLC	Cromatografía de capa fina
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Metabolitos polietéreos de origen marino

El medio marino contiene más del 80% de las especies vegetales y animales que hay en la Tierra, la mayoría de las cuales posee una composición fitoquímica que está todavía por conocerse, y por consiguiente, podrían ser el origen de moléculas con estructuras inesperadas con un potencial farmacéutico importante.

En las últimas dos décadas la llegada de medios sofisticados y eficaces para la recolección de los organismos, el constante avance de las técnicas biofísicas dedicadas al estudio químico y el perfeccionamiento de la metodología para determinar actividades biológicas, han impulsado la investigación de los productos naturales de origen marino, permitiendo que biólogos, especialistas en química médica y científicos del mundo académico y la industria farmacéutica colaboren de forma coordinada en la exploración del mar y su abundante diversidad biológica para descubrir nuevos medicamentos.

Los problemas más comunes en el aislamiento de productos naturales de origen marino son la baja concentración de los mismos en los organismos productores y también la complejidad de sus estructuras. Estas cuestiones que limitan la disponibilidad de principios activos en cantidades suficientes que permitan su desarrollo como un producto farmacéutico constituyen un gran desafío para toda la comunidad científica. Aún así, en un período de tiempo muy corto, los productos de origen marino se han equiparado en número a los identificados de organismos terrestres. Hasta la fecha, se han descrito en la literatura aproximadamente unos 20000 metabolitos secundarios aislados fundamentalmente de algas, esponjas, celentéreos e invertebrados. Un número significativo de estos metabolitos son candidatos excelentes para el

desarrollo de nuevos fármacos, y algunos de estos ejemplos los podemos observar en la **Tabla 1**.^{1,2}

Actividad biológica	Compuesto	Organismo
Cáncer	Briostatinas	Briozoo
	Hallicodrina B y derivados	Esponja
	Kahalaide F	Molusco
VIH	Trisulfato de ciclodidemniserinol	Tunicado
	Lamellarina sulfatada	Tunicado
Infección por nemátodos	Dictiocianato	Esponja
Anti-asmática	Contignasterol y derivados	Esponja
Dolor	Conotoxina	Caracoles

Tabla 1. Compuestos de origen marino en fase pre-clínica y clínica.

Recientemente, todos estos esfuerzos se han traducido en el desarrollo de una primera generación de principios activos que desde el mar han alcanzado los ensayos clínicos. Así la trabectedina (Yondelis) fue el primer representante de un producto natural marino en recibir la autorización de comercialización para el tratamiento de pacientes con *sarcomas de tejidos blandos* (STB) los tumores malignos que tienen su origen en el tejido conectivo: ligamentos, tendones, músculos, nervios y tejidos subcutáneos. El STB representa aproximadamente el 1% de todos los cánceres en adultos y el 10% de todos los cánceres pediátricos, dando idea de la gran importancia de la sustancia. En este sentido, ecteinascidinas y su compuesto líder trabectedina han estimulado un intenso esfuerzo de síntesis, debido a su potente actividad antitumoral y a su novedoso mecanismo de acción como nuevo medicamentos contra el cáncer.³

¹ A. Kijjoa, P. Sawangwong. *Mar. Drug.*, **2004**, *2*, 73.

² D. J. Newman y G. M. Cragg. *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67*, 1216.

³ Carmen Cuevas y Andrés Francesch. *Nat. Prod. Rep.*, **2009**, *26*, 322.

Este importante hecho ha dado un potente impulso al estudio de los productos naturales de origen marino que sigue siendo una área de la investigación muy prometedora para la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos, suplementos nutricionales, productos agrícolas, búsqueda de nuevas dianas moleculares, inhibidores enzimáticos selectivos, etc.

Uno de los grupos de metabolitos con mayor interés, tanto desde el punto de vista estructural, como por las potentes actividades biológicas que presentan son los compuestos de naturaleza poliétera. Este grupo de moléculas de naturaleza policíclica con múltiples sistemas "C—O—C" presentan una importante variedad en el tamaño y número de anillos en las moléculas consideradas prototipos o "cabezas de serie".

Desde el punto de vista biosintético entre los poliéteres encontramos tanto sustancias de naturaleza policétida como oxaescualenoides. Los miembros de ambas familias presentan actividades biológicas que van desde propiedades terapéuticas hasta la letalidad extrema. Por este motivo, han recibido una considerable atención de las diversas comunidades científicas, debido a su participación en las floraciones de algas nocivas, sus devastadores efectos sobre los ecosistemas marinos y las industrias de acuicultura, su impacto en la salud pública en las zonas costeras, sus propiedades biológicas que las hacen útiles para estudiar la relación entre la estructura de proteínas y su función, y en los últimos años, por su potencial para tratar los síntomas de la fibrosis quística.⁴

El grupo de los oxaescualenoides está producido principalmente por las esporas de la familia Axinellidae y algas rojas del género *Laurencia*.⁵

⁴ I. Vilotjevic y T. F. Jamison. *Mar. Drugs*, **2010**, *8*, 763.

⁵ J. J. Fernández; M. L. Souto y M. Norte. *Nat. Prod. Rep.*, **2000**, *17*, 235.

El presente trabajo se enfocará en este segundo grupo, poniendo especial énfasis en el aislamiento, identificación, elucidación estructural y actividades biológicas de nuevos ejemplos de estos compuestos aislados de *Laurencia viridis*.

1.2. Poliéteres derivados del escualeno

1.2.1. Triterpenos polietéreos del género Laurencia

El género *Laurencia* produce un gran número de metabolitos secundarios, que atendiendo a su origen biogenético, pueden ser clasificados en dos grandes grupos: compuestos de origen terpénicos y aquellos de origen no terpénico.^{6,7}

El grupo de metabolitos de origen no terpénico está compuesto principalmente por sustancias que tienen su origen en la ruta de los ácidos grasos y se les conoce con el nombre genérico de *acetogeninas C-15*. En el grupo de los de naturaleza terpénica nos encontramos principalmente sesquiterpenos, que son los más abundantes tanto en número como en diversidad estructural; mientras que el número de diterpenos y triterpenos son sensiblemente menores.

Sin embargo, como ya se mencionó antes, uno de los grupos más importantes lo constituyen los *oxaescualenoides*. Estos compuestos han sido clasificados según el sistema de anillos fusionados que presentan y/o los elementos de simetría que poseen de la forma siguiente:

⁶ J. D. Martín y J. Darias. Algal Norisoprenoid y algal Sesquiterpenoid, *Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives, Vol 1*, Ed. P. J. Scheuer, academic Press, **1978**, p. 43, 125.

⁷ K. L. Ericsson. Constituents of *Laurencia*, *Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives, Vol 5*, Ed. P. J. Scheuer, academic Press, **1983**, p. 13.

- *Compuestos con sistema dioxabicyclo[4.4.0]decano.*
- *Compuestos con sistema dioxabicyclo[5.4.0]undecano.*
- *Compuestos con sistema trioxatriciclo[10.4.0.0^{A,10}]hexadecano*
- *Compuestos sin anillos fusionados.*

1.2.1.1 *Triterpenos con sistema dioxabicyclo[4.4.0]decano*

Este grupo contiene el mayor número de representantes de triterpenos polioxigenados. El primer ejemplo de este tipo de metabolitos se identificó en el año de 1978, cuando J. W. Blunt y colaboradores aislaron el tirsiferol **1** a partir de *L. thyriferea* recolectada en Nueva Zelanda. Su estructura fue determinada por estudios de difracción de rayos X de su derivado acetilado y con posterioridad fue publicado un detallado estudio espectroscópico.^{8,9} El dehidrotirsiferol **2** es el segundo ejemplo de esta serie cuya única diferencia con el tirsiferol **1** es la presencia de una insaturación entre los carbonos 15 y 28. Fue identificado por nuestro grupo a partir de especímenes endémicos de la región de la Macaronesia del género *Laurencia* que actualmente se clasifica como *L. viridis*.^{10,11} A partir de *L. obtusa* se aisló otro metabolito de esta serie denominado 23-acetato de tirsiferilo **3**, cuya estructura fue determinada por su hidrólisis a tirsiferol **1**. Este metabolito mostró una potente actividad citotóxica frente a células de neoplasma linfóide de ratón P-388 (ED₅₀= 0.5 ηM).^{12,13}

⁸ J. W. Blunt, T. J. Hartshorn, T. J. McLennan, M. H. G. Munro, W. T. Robinson y S. C. Yorke. *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 69.

⁹ J. W. Blunt, J. D. McCombs, M. H. G. Munro y F. N. Thomas. *Magn. Reson. Chem.*, **1989**, 27, 792.

¹⁰ A. G. González, J. M. Arteaga, J. J. Fernández, J. D. Matín, M. Norte y J. Z. Ruano. *Tetrahedron*, **1984**, 14, 2751.

¹¹ M. C. Gil-Rodríguez y R. Haroun. *Bot. Mar.*, **1992**, 35, 227.

¹² T. Susuki, M. Susuki, A. Furasaki, T. Matsumoto, A. Kato, Y. Imanaka y E. Kurosawa. *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 1329.

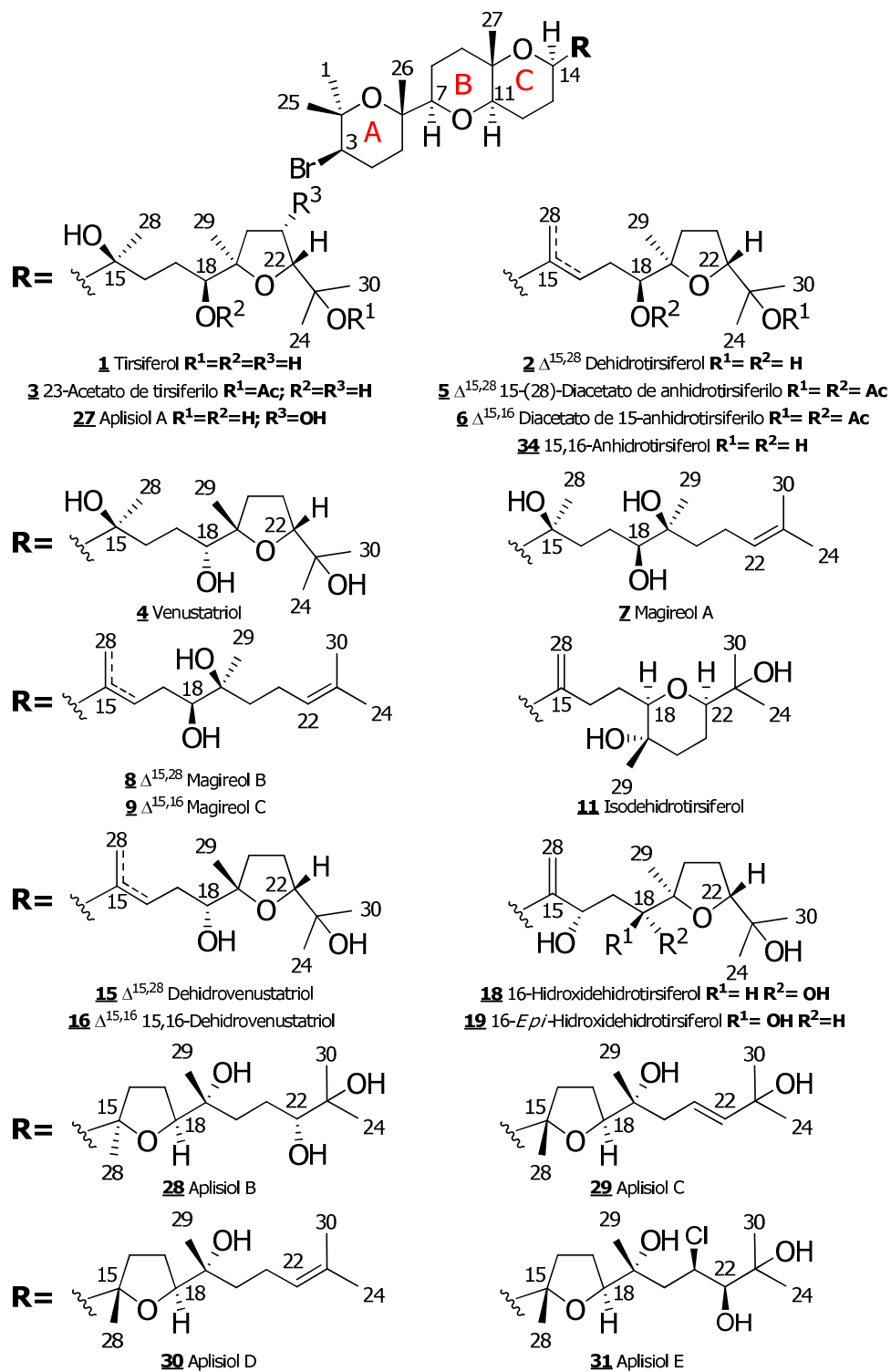
¹³ T. Susuki, M. Takeda, M. Susuki, E. Kurosawa, A. Furasaki, T. Matsumoto, Y. Imanaka y A. Kato. *28th Symposium on the Chemistry of Natural Products, Symposium Papers, Sendai*, **1986**, p. 215.

Posteriormente fue identificado el venustatriol **4** a partir de *L. venusta*. Su elucidación estructural se realizó mediante difracción de rayos X y permitió determinar correctamente la estereoquímica de **1** y **4** observándose que poseen una configuración $3R, 6S, 7R, 10S, 11R, 14R$ y $15S$, así como una disposición espacial de los anillos **A**, **B** y **C** idéntica. Estos dos compuestos se diferencian únicamente en la configuración de C-18 y C-19. Así, el tirsiferol **1** tiene una configuración $18S$ y $19R$, mientras que el venustatriol **4** posee la configuración contraria. Sin embargo, la estereoquímica de C-22 en ambos compuesto es R , este hecho fue muy importante para proponer una ruta biogenética de estos compuestos.¹⁴

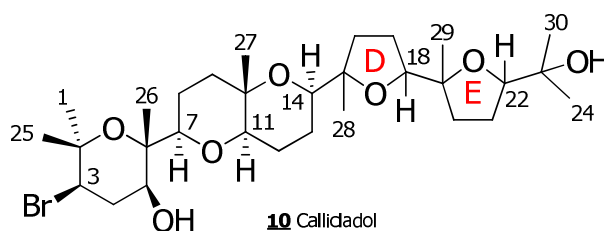
Además de estos metabolitos, también fueron aislados de *L. obtusa* otros cinco compuestos de la misma familia: diacetato de 15(28)-anhidrotirsiferilo **5**, diacetato de 15,16-anhidrotirsiferilo **6**, magireol A **7**, B **8** y C **9**.¹⁵ Todos ellos fueron elucidados a partir de sus datos espectroscópicos y/o correlaciones químicas.

¹⁴ S. Sakemi, T. Higa, C. W. Jefford y G. Bernardinelli, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4287.

¹⁵ T. Susuki, M. Takeda, M. Susuki, E. Kurosawa, A. Kato e Y. Imanaka. *Chem. Lett.*, **1987**, 361.



El callicladol **10** es un metabolito aislado de *L. calliclada*, y aunque tiene el sistema de anillos **A**, **B** y **C** análogo al observado para el tirsiferol **1** presentó un grupo β -hidroxi secundario en posición C-5, lo que da lugar a un nuevo centro quiral. Dicho centro fue determinado como *S* mediante estudios de RMN aplicando el método de Mosher. Además, el callicladol **10** posee dos anillos oxolanos contiguos en su estructura (anillos **D** y **E**). Dichos anillos no mostraron correlación NOE entre los enlaces éteres, lo cual sugirió a los autores que estos sistemas deben estar en disposición *trans*.¹⁶



L. viridis es una especie descrita por primera vez en las Islas Canarias. Endémica de la Macaronesia, crece en la zona intermareal a principios de la primavera.¹¹ De esta alga se han descrito una gran cantidad de metabolitos secundarios con estructuras novedosas, incluyendo terpenoides y acetogeninas *C-15*. Así, en nuestro laboratorio además del dehidrotirsiferol **2**, se han aislados dos isómeros de éste, el isodehidrotirsiferol **11** y el 10-*epi*-dehidrotirsiferol **12**.¹⁷ El anillo terminal del compuesto **11** presentó un sistema oxolano entre C-18 y C-22 en lugar del típico anillo de oxano entre C-19—C-22 presente en la gran mayoría de estos compuestos. Mientras en el isómero **12** se observa que el sistema de anillos **B**—**C** están fusionados *trans*. Estudios posteriores permitieron el aislamiento del tirsenol A **13** y B **14** que presentan un sistema enol—eter en el anillo **C**.¹⁸ La única diferencia entre estos dos

¹⁶ M. Susuki, Y. Maqtsuo, Y. Takahashi y M. Masuda. *Chem. Lett.*, **1995**, 1045.

¹⁷ M. Norte, J. J. Fernández, M. L. Souto y M. D. García-Grávalos, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 2671.

¹⁸ M. Norte, J. J. Fernández, M. L. Souto, J. A. Gavín y M. D. García-Grávalos. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 53, 3173.

isómeros está en la configuración del carbono 15 que para el tirsenol A **13** es R^* y para el tirsenol B **14** es S^* .

El dehidrovenustatriol **15** y el 15,16-dehidrovenustatriol **16**, en comparación con el venustatriol **4**, presentan respectivamente un doble enlace en la posición C-15—C-28 y un doble enlace trisustituido con una configuración Z en las posiciones C-15—C-16. En el 10-*epi*-15,16-dehidrotirsiferol **17** se observó claramente la presencia de un doble enlace trisustituido con la configuración E entre los carbonos C-15—C-16 y el 16-hidroxidehidrotirsiferol **18**, cuyo nuevo centro estereogénico en la posición 16, se determinó como S^* con base a sus datos espectroscópicos.¹⁹ En el 16-*epi*-hidroxidehidrotirsiferol **19** y el 3-*epi*-dehidrotirsiferol **20** los datos espectroscópicos indicaron la presencia de un grupo hidroxilo sobre el carbono C-16 con una configuración relativa R^* y por la epimerización del carbono C-3 ahora configuración S^* , respectivamente.^{20,21}

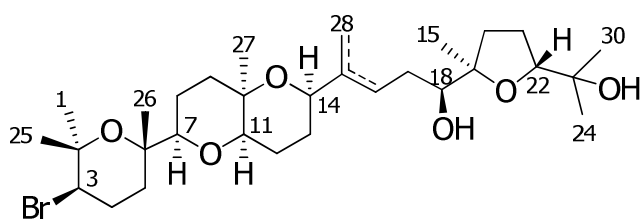
Uno de los compuestos más interesantes aislados de *L. viridis* es el acetato de predehidrovenustatriol **21**, ya que tiene la particularidad de no poseer el anillo **A** y en lugar del átomo de bromo sobre el carbono 3 posee un doble enlace entre los carbonos C-2—C-3. Este hecho como se verá posteriormente es importante a la hora de proponer una ruta biosintética de estos compuestos.¹⁹ Martiriol **22** posee un inusual sistema enol-éter en el anillo **B**, específicamente entre los carbonos C-7—C-8, además de un ciclo adicional formado por un enlace éter entre los carbonos cuaternarios C-15 y C-19. Por otra parte, es importante resaltar la sustitución del átomo de bromo en el carbono C-3 por un grupo hidroxilo. La estereoquímica relativa de este

¹⁹ M. Norte, J. J. Fernández y M. L. Souto. *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 4649.

²⁰ C. P. Manríquez, M. L. Souto, J. A. Gavín, M. Norte y J.J. Fernández. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 3117.

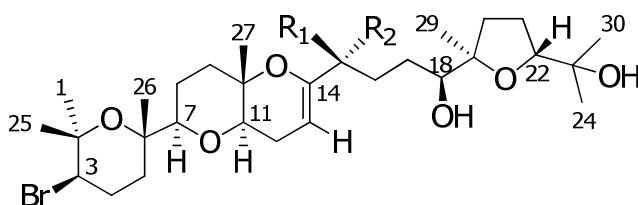
²¹ M. L. Souto, C. P. Manríquez, M. Norte y J. J. Fernández. *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 8119.

compuesto fue propuesta con base a las correlaciones selectivas observadas en el espectro NOESY y los valores de las constantes de acoplamiento.²⁰



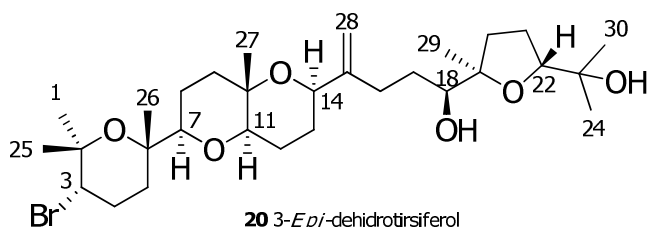
12 $\Delta^{15,28}$ 10-*Epi*-dehidrotirsiferol

17 $\Delta^{15,16}$ 10-*Epi*-15,16-dehidrotirsiferol

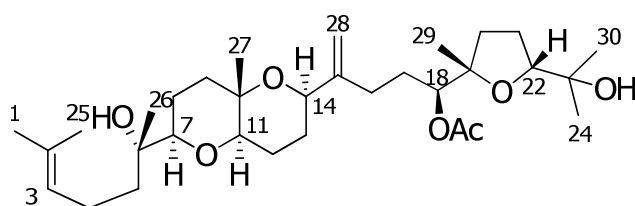


13 Tirsenol A $R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$

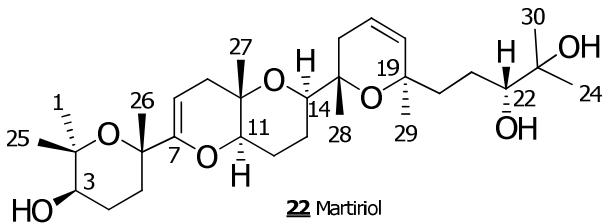
14 Tirsenol B $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ $R_2 = \text{OH}$



20 3-*Epi*-dehidrotirsiferol

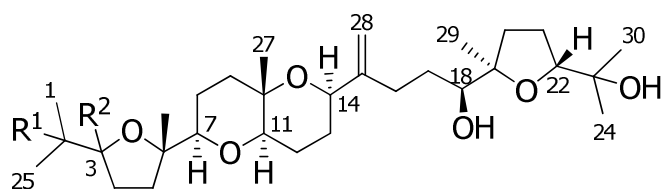


21 Acetato de Predehidrovenustatriol



22 Martiriol

El pseudodehidrotirsiferol **23**, el 3-metoxi-pseudodehidrotirsiferol **24** y el 2-metoxi-pseudodehidrotirsiferol **25** poseen un sistema tetrahidrofurano formado por un puente éter entre los carbonos C-3 y C-6 en lugar del anillo tetrahidropirano.^{20,21}

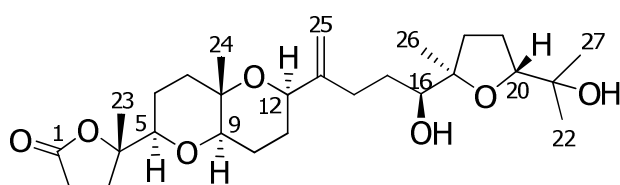


23 Pseudodehidrotirsiferol

24 3-Metoxi-pseudodehidrotirsiferol $R^1 = H$ $R^2 = \beta OCH_3$

25 2-Metoxi-pseudodehidrotirsiferol $R^1 = OCH_3$ $R^2 = \alpha H$

Lactodehidrotirsiferol **26**, es el único metabolito con menos de 30 átomos de carbono. El anillo **A** está formado por un anillo γ -lactona posiblemente originado por una fragmentación oxidativa.²¹



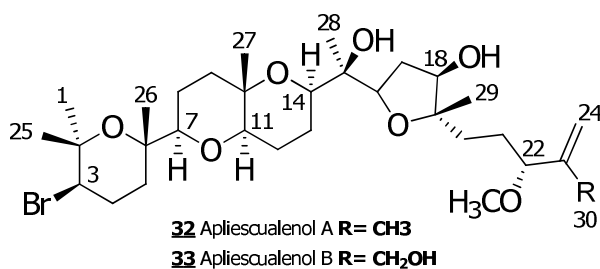
26 Lactodehidrotirsiferol

Otros cinco nuevos metabolitos de esta serie aplisiol A **27**, B **28**, C **29**, D **30** y E **31**, han sido reportados recientemente. Los dos primeros fueron aislados de *Aplysia dactylomela* colectada en el sur de China.²² Cabe suponer que el origen de estos dos compuestos se debe encontrar en la dieta del molusco. Aplisiol A **27** posee un nuevo grupo hidroxilo sobre C-21, lo que origina un nuevo centro estereogénico, la configuración de dicho centro fue establecida como *S* en base a sus datos espectroscópicos de RMN y la

²² E. Manzo, M. Gavagnin, G. Bifulco, P. Cimino, S. Di Micco, M. L. Ciavatta, Y. Wei Guo, y G. Cimino. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 9970.

aplicación del método de Mosher. Aplisiol B **28** mantiene el sistema de anillos **A**, **B** y **C** característica de esta serie. Además, posee un nuevo anillo tetrahidrofuranico entre los átomos C-15 y C-18. Recientemente se han aislado de *Chondria armata* los compuestos aplisiol C **29**, D **30** y E **31**, cuya estructura fue determinada por su comparación química con **28**. La estereoquímica relativa de los tres compuestos fue determinada por RMN y por consideraciones biogenéticas.²³

Dos nuevos poliéteres triterpénicos, apliescualenol A **32** y B **33**, fueron aislados de *Aplysia dactylomela*. Las estereo-estructuras determinadas por cálculos de mecánica cuántica y RMN, establecieron que ambos compuestos presentan inusual anillo oxolano entre los carbonos C-16 y C-19.²⁴ En 2008, Morimoto y *col.* a partir del alga *L. omaezakiana* aislaron el 15,16-anhidrotirsiferol **34** cuya estructura fue determinada mediante el uso de métodos espectroscópicos.²⁵



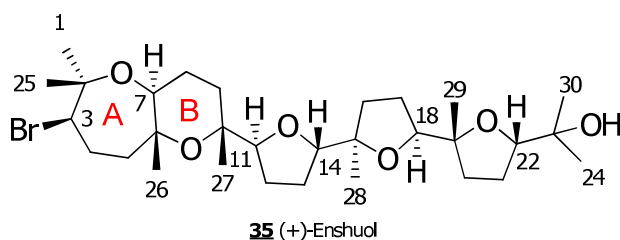
²³ Antonius R. B. Ola, Anna-Marie Babey, Cherie Motti y Bruce F. Bowden. *Aus. J. of Chem.*, **2010**, 63 907.

²⁴ Vera B., Rodríguez A. D., Avilés E. y Ishikawa Y. *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 5327

²⁵ Y. Matsuo, M. Suzuki, M. Masuda, T. Iwai e Y Morimoto. *Helv. Chim. Acta*, **2008**, 91, 1261.

I.2.1.2. Triterpenos con sistema dioxabicyclo[5.4.0]undecano

El primer metabolito de este grupo descrito en la literatura fue el (+)-enhuol **35**.²⁶ Aislado de *L. omaezakiana* y cuya estructura está conformada por un sistema de anillos 2,8-dioxabicyclo[5.4.0]undecano (correspondientes a los anillos **A** y **B**). Además posee en su estructura otros tres anillos oxolanos aislados. Mediante experimentos de RMN (NOE y NOESY) y la aplicación del método avanzado de Mosher se pudo determinar la estereoquímica de los centros quirales de los anillos **A** y **B** como 3*R*, 6*R*, 7*S* y 10*R*. En un principio Suzuki y *col.* propusieron que los tres anillos oxolanos de **35** estaban en disposición *trans*, ya que no se observó correlación espacial entre los enlaces éter. Sin embargo, Morimoto y *col.* a través de su síntesis total, determinaron que la correcta configuración de estos tres anillos es *trans,cis,cis*.²⁷



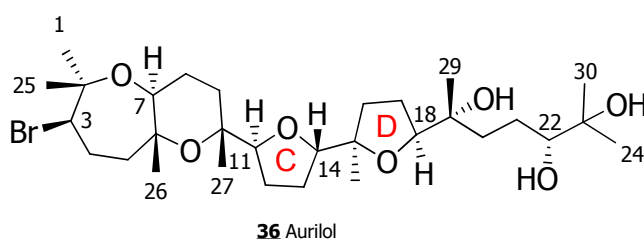
El aurilol **36** se aisló de *Dolabella auricularia* (orden Aplysiacea, familia Aplisidae) y los autores proponen que el origen del mismo debe encontrarse en la dieta del molusco.²⁸ Presenta un sistema de anillo **A** y **B** idéntico al (+)-enhuol y dos anillos oxolanos aislados. La estereoquímica de **36** se estableció mediante estudios de NOESY por comparación de las constantes de acoplamiento con modelos estereoisoméricos simples y la preparación del (*R*) y (*S*)-bisMTPA, estableciéndose así la estereoquímica absoluta de cinco centros quirales como 3*R*, 6*R*, 7*S*, 10*R* y 22*R*. Aunque en el experimento NOESY no se observaron correlaciones espaciales entre los enlaces éter, se sugirió que la

²⁶ Y. Matsuo, M. Suzuki y M. Masuda. *Chem. Lett.*, **1995**, 1043.

²⁷ Y. Morimoto, H. Yata, Y. Nishikawa. *Angewandte Chemie*, **2007**, *46*, 6481.

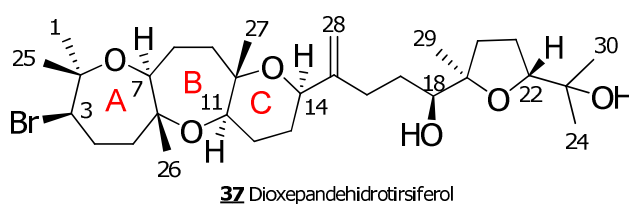
²⁸ K. Suenaga, T. Shibata, N. Takada, H. Kigoshi y K. Yamada. *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 515.

estereoquímica de los anillos **C** y **D** fuesen *trans* y *cis* respectivamente. La estereoquímica absoluta fue resuelta por Morimoto y *col.* en el 2005 mediante la síntesis total.²⁹



I.2.1.3. Compuesto con sistema trioxatriciclo[10.4.0.0^{4,10}]hexadecano

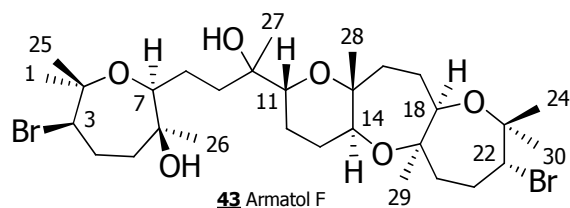
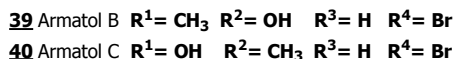
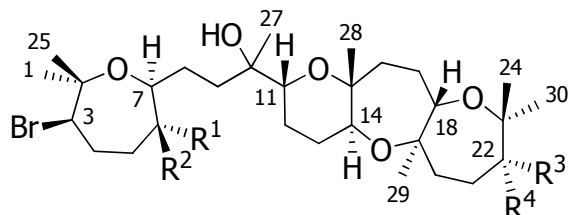
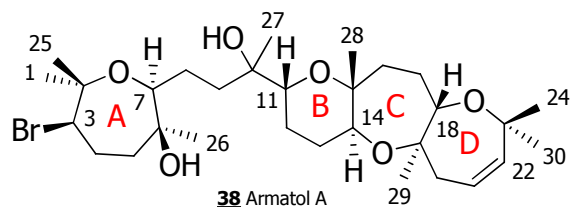
Los datos espectroscópicos observados para el dioxepandehidrotirsiferol **37** solo podían ser explicados por la presencia de tres éteres cíclicos fusionados (anillos **A**, **B** y **C**). Este agrupamiento nos recuerda a los observados en algunas toxinas de origen marino como las brevetoxinas, hemibrevetoxina y ciguatoxinas.²⁰



Seis nuevos poliéteres triterpénicos con el sistema trioxatriciclo[10.4.0.0^{4,10}]hexadecano, armatol A **38**, B **39**, C **40**, D **41**, E **42** y F **43**, fueron aislados del alga *Chondria armata*. Las estructuras de los metabolitos fueron establecidas por espectroscopía de RMN y la preparación de los ésteres de Mosher.³⁰

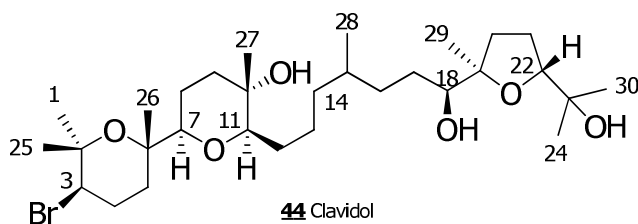
²⁹ Y. Morimoto, Y. Nishikawa y M. Takaishi. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5806.

³⁰ M. L. Ciavatta, S. Wahidulla, L. D'Souza, G. Scognamiglio y G. Cimino. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 617.

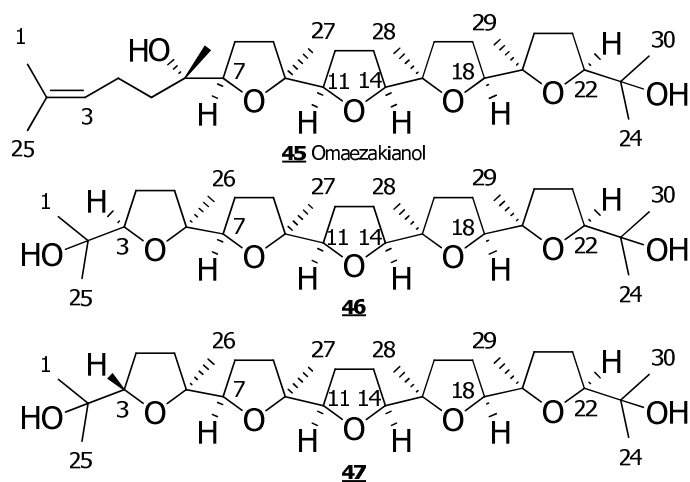


1.2.1.4. Compuestos sin anillos fusionados

El clavidol **44** se diferenció de los demás metabolitos de esta familia por la ausencia del anillo tetrahidropirano en el segmento C-11—C-15, lo que originó la pérdida del sistema dioxabicyclo[4.4.0]. Además, este metabolito no mostró la insaturación entre los carbonos 15 y 28.²¹



El omaezakianol **45** obtenido de *L. omaezakiana* resulto ser un triterpeno que posee cuatro unidades de THF contiguos. La estructura plana y la estereoquímica de este compuesto fue determinada mediante un tratamiento de **45** con ácido *m*-cloroperbenzoico y fosfato disódico en diclorometano, seguido de un tratamiento con trazas de ácido *p*-toluensulfónico dando lugar a los epímeros pentacíclicos **46** y **47**.²⁵ El compuesto simétrico **46** resulto ser idéntico al *meso*-compuesto sintetizado por Corey³¹ y Morimoto³² en el año 2000, cuya estructura fue incorrectamente propuesta para el glabrescol.³³

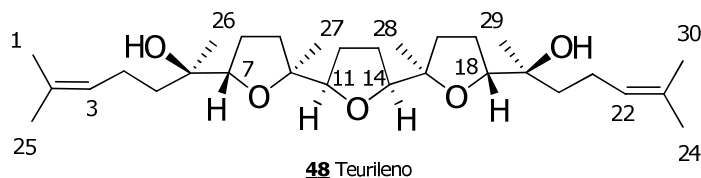


A partir del extracto de *L. obtusa* recolectada en la Isla de Teuri se aisló un compuesto *meso*, el teurileno **48**. La estructura fue determinada mediante estudios de difracción de rayos X observándose que posee tres unidades de tetrahydrofurano enlazadas en el centro de la molécula conteniendo ocho centros quirales y una simetría C_s .¹²

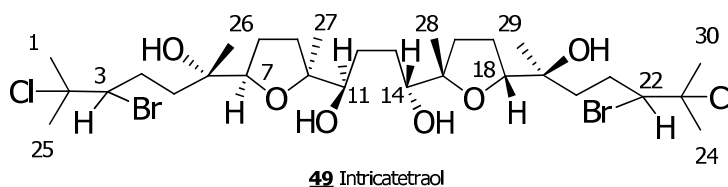
³¹ W. W. Xiong, E. J. Corey. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 9328.

³² Y Morimoto, T. Iwai y T. Kinoshita. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 7124.

³³ W. W. Harding, P. A. Lewis, H. Jacobs, S. McLean, W. F. Reynolds, L-L. Tay, J-P. Yang. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 9137.



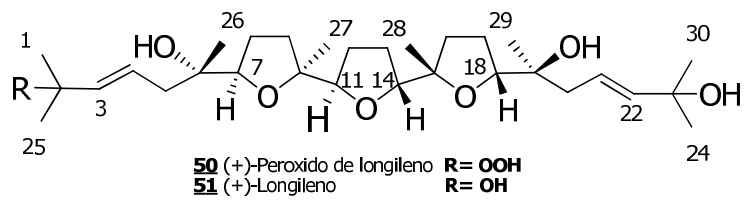
El intricatetraol **49** fue aislado a partir de *L. intricata* siendo este uno de los primeros ejemplos de compuestos simétricos C_2 que poseen cloro en su estructura.³⁴ La deshalogenación de **49** con zinc y ácido acético dio como resultado un compuesto vinílico simétrico que ayudo a la determinación de las posiciones de los cuatro halógenos. La configuración de los carbonos C-11 y C-14 se estableció por la aplicación de métodos avanzados de Mosher. Por otro lado, la estereoquímica relativa de los anillos de oxolano se determinó por experimentos NOE.



El (+)-peróxido de longileno **50** y (+)-longileno **51** se aislaron de las fracciones mas polares de *L. viridis*. La estereoquímica del primer compuesto pudo ser establecida por comparación de sus datos espectroscópicos con los de su enantiómero, el (-)-peróxido de longileno, el cual ya había sido descrito en 1991 a partir de *Eurycoma longifolia*. La estructura de **51** fue inicialmente propuesta a partir de unos escasos datos espectroscópicos y destacaba por tener una simetría C_5 . Debido a la rápida degradación que sufre esta sustancia no fue posible completar en su momento todo su estudio estructural con detalle y la finalización del mismo se abordará en la presente memoria.³⁵

³⁴ M. Suzuki, Y. Matsuo, S. Takeda y T. Suzuki. *Phytochemistry*, **1993**, *33*, 651

³⁵ H. Itokawa, E. Kishi, H. Morita, K. Takeya e Y. Iitaka. *Chem. Lett.*, **1991**, 2221. C. P. Manríquez. Tesis doctoral, Instituto Universitario de Bioquímica, Universidad de La Laguna, La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, España. **2001**, ISBN 84-688-4371-7, p 87.



1.3. Origen biogénico de los poliéteres triterpénicos

Es muy habitual observar en los productos naturales de origen marino compuestos que contienen en su estructura la función éter. Como ya se ha visto, los poliéteres triterpénicos son un ejemplo de estos metabolitos ya que poseen múltiples motivos "C—O—C". Estos metabolitos, junto con los policétidos y los poliéteres ionóforos, conforman la gran familia de los poliéteres policíclicos.

Desde el aislamiento del (10*R*,11*R*)-epoxiescualeno **52** a partir del alga *L. okamurai*,³⁶ se ha sugerido a este metabolito como un precursor común de los poliéteres triterpénicos. Este compuesto puede evolucionar al (6*S*,7*S*,10*R*,11*R*,14*R*,15*R*,18*S*,19*S*)-tetraepóxido de escualeno **53** y a su vez podría dar lugar a los poliéteres triterpénicos a través de ciclaciones intramoleculares de los epóxidos.^{5,35} Sin embargo, ¿cómo es posible que la apertura del tetraepóxido **53** origine diferentes tipos de ciclaciones, que en muchos casos son considerados químicamente desfavorables?. Una suposición lógica para explicar lo anterior es que las ciclaciones estén controladas enzimáticamente. Sin embargo, es incoherente encontrar en la naturaleza varias rutas para la biosíntesis de compuestos químicamente relacionados.

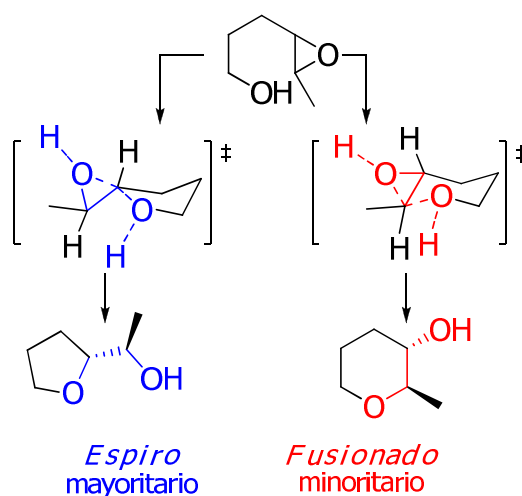
Se piensa que la gran diversidad estructural observada en los poliéteres triterpénicos se debe al tipo de ciclación que sufre el tetraepóxido **53**. En este sentido, las aperturas intramoleculares de epóxidos pueden suceder de dos maneras. La primera, denominada ciclación *endo* da lugar a los anillos de mayor tamaño, mientras que las ciclación de tipo *exo* origina anillos de menor tamaño. Estos dos tipos de ciclaciones transcurrirían de forma exclusiva o combinada en la biosíntesis de los poliéteres.

³⁶ H. Kigoshi, M. Ojika, Y. Shizuri, H. Niwa y K. Yamada, *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 5413.

1.3.1. Consideraciones sintéticas

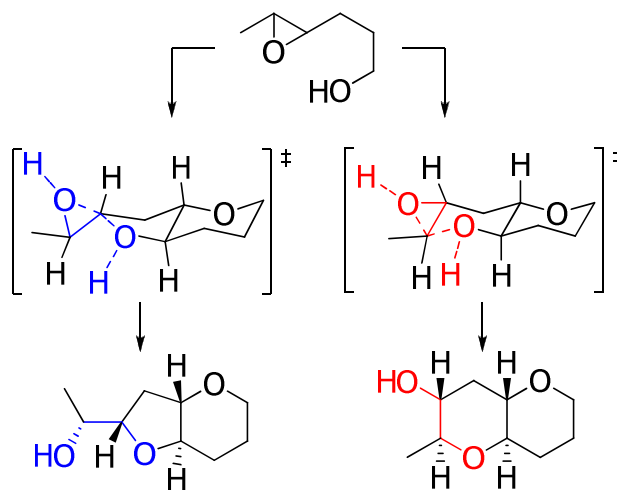
La regio y estereoselectividad en la apertura intramolecular de epóxidos juega un papel importante en el contexto de la biogénesis de los polímeros triterpénicos ya que determinan la viabilidad de un proceso de ciclación. Las **Reglas de Baldwin** son un conjunto de directrices empíricas que se utilizan para predecir la formación de heterociclos por sustitución intramolecular que incluye la apertura de los epóxidos. Los cierres de anillos se ven favorecidos generalmente cuando los átomos que interaccionan en el cierre de un anillo alcanzan la geometría adecuada para la reacción (*entropía*). Los procesos de ciclación desfavorecidos requieren distorsiones en los ángulos y distancia de enlace, por lo que estas ciclaciones demandan demasiada energía.

Aun cuando, las **Reglas de Baldwin** no fueron formuladas para las ciclaciones por apertura intramolecular de epóxidos, estas reacciones tienden a seguir estas directrices, favoreciendo generalmente los procesos *exo*, que tienen el estado de transición *espiro* y que dan lugar a la formación del anillo más pequeño (**Esquema 1**).³⁶



Esquema 1. Clasificación según las reglas de Baldwin's de las reacciones de apertura de epóxidos. En azul se muestra la reacción favorecida (*espiro*) y en rojo la desfavorecida (*fusionado*).

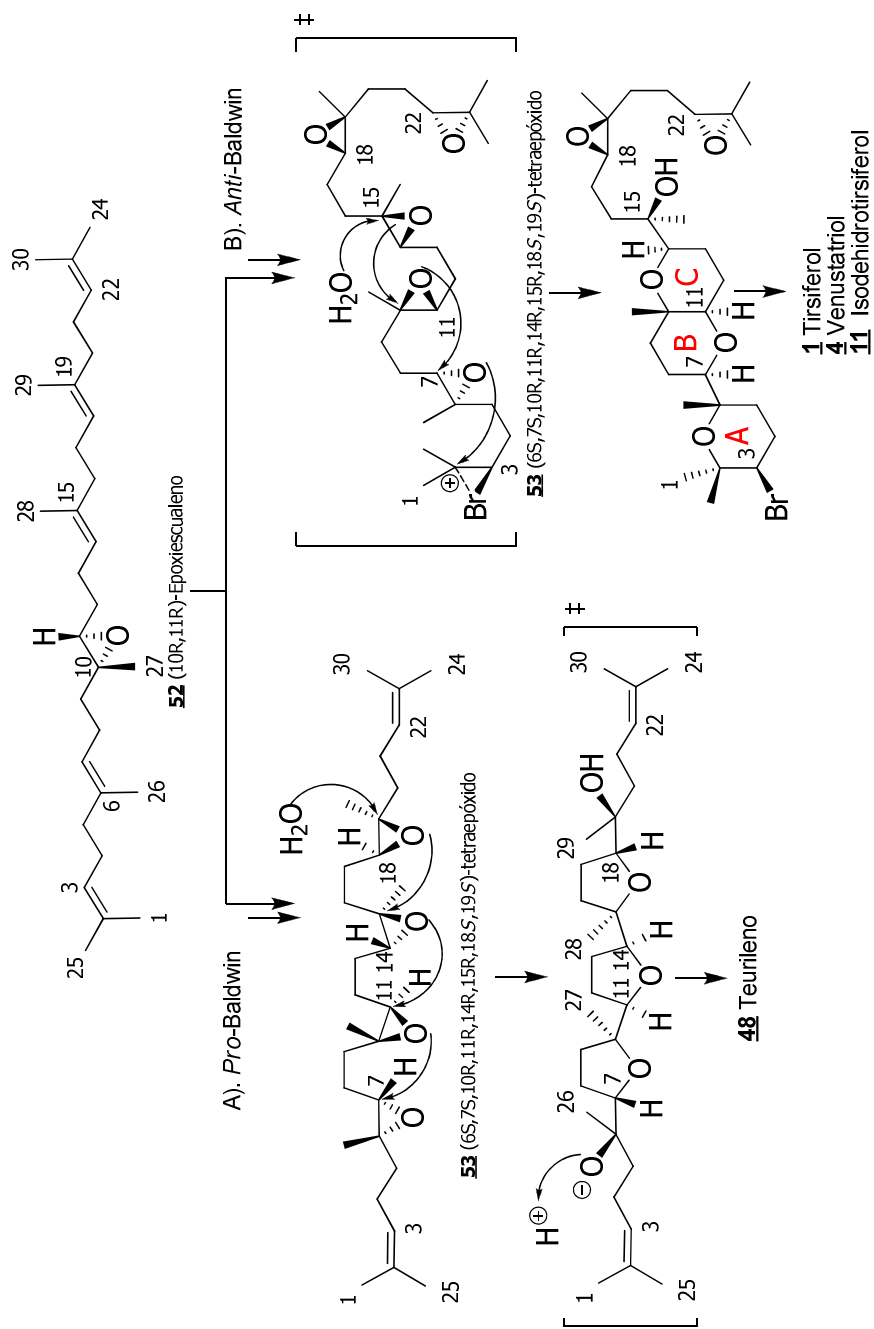
Con el fin de explicar las ciclaciones del tipo *endo* y así obtener anillos de mayor tamaño en este tipo de reacciones, Vilotijevic y *col.* utilizaron un modelo de oxano para modular los factores que regulan la regioselectividad en las ciclaciones por apertura de epóxidos. La presencia inicial del anillo oxano parece reducir los factores *entrópicos* que favorecen el estado de transición *espiro* y en cambio acrecienta la importancia que poseen las contribuciones *entálpicas* en los estados de transición. Los derivados del *trans*-bicyclo[4.4.0]decano casi siempre poseen menos tensión anular que su contraparte, *trans*-bicyclo[4.3.0]nonano, estas tensiones que se ven reflejadas también en sus estados de transición favorecen la ciclación *endo* en estas reacciones (**Esquema 2**). El anillo oxano podría estar actuando como un sustituto de las restricciones impuestas por la conformación del sitio activo de la proteína.³⁷



Esquema 2. Ciclación por apertura de epóxidos con el modelo oxano. En rojo se muestra el sistema con menos tensión anular y en azul el sistema de mayor tensión.

³⁷ I. Vilotijevic y T. F. Jamison. *Science*, **2007**, *317*, 1189. I. Vilotijevic y T. F. Jamison. *Angew. Chem. Int.*, **2009**, *48*, 5250. I. Vilotijevic y T. F. Jamison. *Mar. Drugs*, **2010**, *8*, 763.

Tomando en cuenta todo lo anterior y considerando al (6*S*,7*S*,10*R*,11*R*,14*R*,15*R*,18*S*,19*S*)—tetraepóxido de escualeno **53** como un intermediario común en la biogénesis de estos poliéteres triterpénicos. Proponemos que existe una ruta general para biogénesis de los compuestos mayoritarios y que los compuestos minoritarios son el resultado de modificaciones químicas que sufren los intermediarios de dicha ruta general. Así, por ejemplo, el intermediario (6*S*,7*S*,10*R*,11*R*,14*R*,15*R*,18*S*,19*S*)—tetraepóxido de escualeno **53** podría continuar la ruta general para dar lugar a los compuestos con sistema dioxabicyclo[4.4.0]decano (*anti*-Baldwin). Sin embargo, cierta cantidad de este intermediario podría salirse de esta ruta y reaccionar siguiendo las Reglas de Baldwin lo cual daría lugar a la génesis de compuestos simétricos como el teurileno **48** (**Esquema 3**).



Esquema 3. Rutas biosintéticas propuestas para el origen de los poliéteres triterpénicos. A). Cidación en cascada iniciada por el ataque de agua sobre C-15. B). Cidación iniciada por la formación de un bromonio en C-2—C-3.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

II. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

II.1. Recolección y extracción del alga *Laurencia viridis*

Como ya se comentó en la introducción, estudios fitoquímicos previos del alga *L. viridis* han puesto de manifiesto que este organismo produce una plétora de poliéteres triterpénicos derivados del escualeno. Estos metabolitos además de poseer una gran diversidad estructural han demostrado tener interesantes actividades farmacológicas, principalmente como agentes citotóxicos y/o inhibidores selectivos de la proteína fosfatasa tipo 2A.^{5,35,38,39}

Así, en la presente memoria damos cuenta del aislamiento e identificación de 19 nuevos poliéteres derivados del escualeno: 1,2-dehidropseudodehidrotirsiferol **54**, secodehidrotirsiferol **55**, espirodehidrovenustatriol **56**, 14-cetodehidrotirsiferol **57**, pretirsenol A **58**, 13-hidroxipretirsenol A **59**, 15-dehidroxitirsenol A **60**, 14-hidroxiyucatecol **61**, yucatecona **62**, saiyacenol A **65**, saiyacenol B **66**, adejeno A **68**, adejeno B **69**, 22-hidroxidehidrotirsiferol **70**, piranodehidrotirsiferol **71**, nivariol A **72**, nivariol B **73**, prelongileno **75** y 23,24-dehidroprelongileno **76**. Junto con estos metabolitos, se aislaron los compuestos (+)-peróxido de longileno **50** y (+)-longileno **51**, que aunque ya habían sido aislados anteriormente, no pudieron ser caracterizados completamente en ese momento. (**Esquema 4**).³⁵

II.2. Antecedentes

El alga *L. viridis* fue recolectada en Paraíso Floral (Adeje), en el mes de Mayo de 2006 (**Figura 1**). Estos especímenes se maceraron en una mezcla de CHCl₃:MeOH (50:50) durante cuatro días. Después de evaporar el disolvente, se obtuvo un primer extracto de color verde oscuro (83 g). Posteriormente, el

³⁸ M. L. Souto, C. P. Manríquez, M. Norte, F. Leira y J. J. Fernández. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Lett.*, **2003**, *13*, 1261.

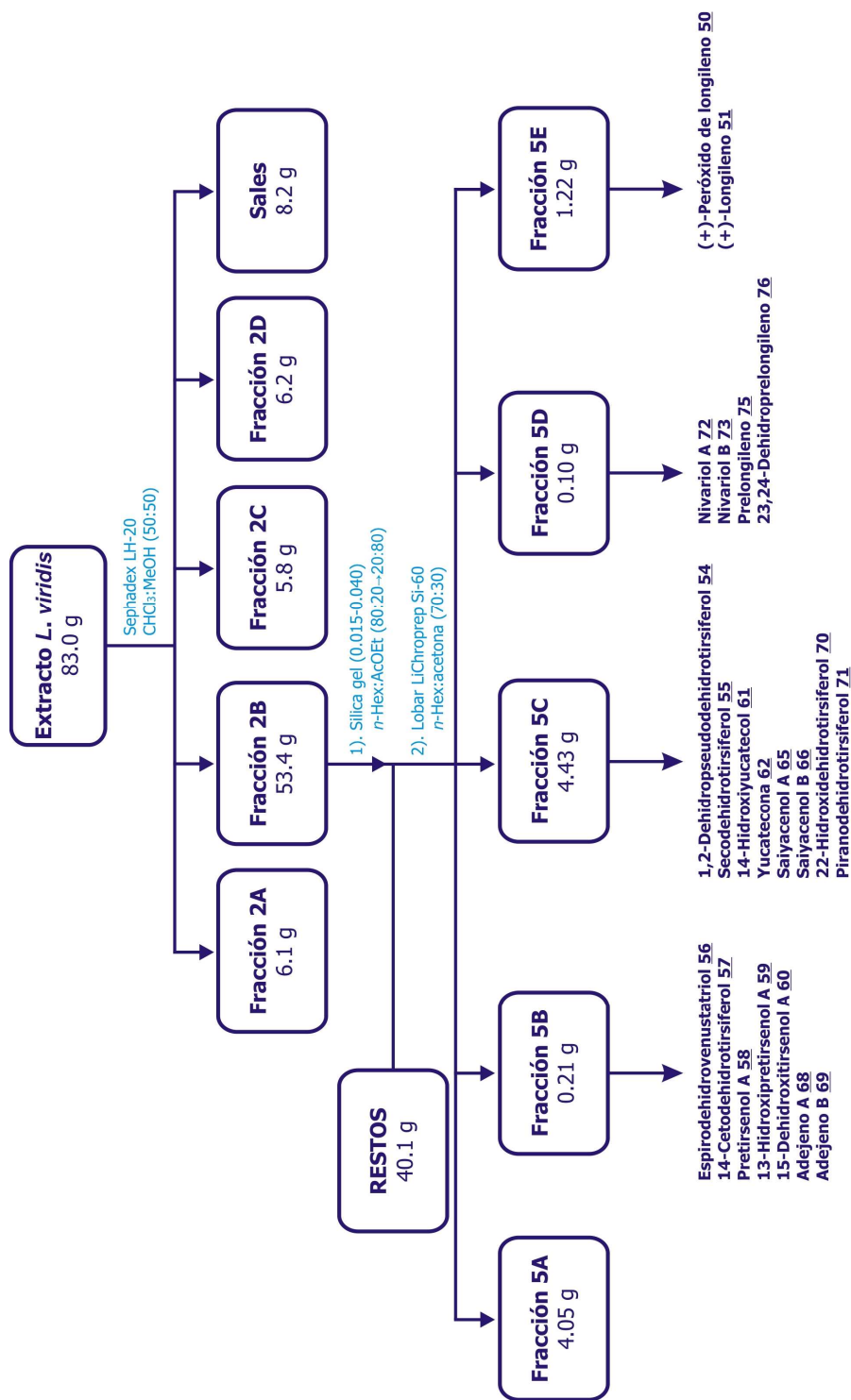
³⁹ J. J. Fernández, M. L. Candenás, M. L. Souto, M. M. Trujillo y M. Norte. *Curr. Med. Chem.*, **2002**, *9*, 229.

alga se secó a temperatura ambiente y se molió para su extracción en caliente utilizando en primer lugar CH_2Cl_2 y a continuación MeOH hasta agotamiento, empleando para este proceso un equipo Soxhlet. Estas dos últimas extracciones fueron reunidas y llevadas a sequedad, obteniéndose así un segundo extracto de coloración verde oscura que peso 37 g.



Figura 1. Especímenes de *Laurencia viridis* recolectada en Paraíso Floral (Adeje).

El extracto resultante de la maceración en frío de *L. viridis* se cromatografió siguiendo las pautas que se exponen en el **Esquema 4**.



Esquema 4. Marcha cromatográfica del extracto *L. Viridis*. Se entiende por RESTOS, todas aquellas fracciones donde no se encontraron polímeros triterpénicos.

II.3. Estudio de elucidación estructural

El análisis de los datos espectroscópicos de los nuevos metabolitos, nos indicó que en su gran mayoría están estructuralmente relacionados con el dehidrotirsiferol **2** (**Figura 2**), compuesto mayoritario en este alga y que se utilizará en la presente memoria como "cabeza de serie" para hacer el estudio espectroscópico (**Tabla 31**). Con el fin de facilitar la comparación de los datos espectroscópicos se recogen en el apéndice la espectroscopía detallada del dehidrotirsiferol **2**. De este modo, en el texto se marcará en rojo aquellas **Tablas, Figuras,...** que aparecen en dicho apéndice.

Siguiendo esta analogía estructural, los nuevos compuestos pueden ser clasificados en función de las modificaciones observadas en cinco grupos que a continuación se detallan.

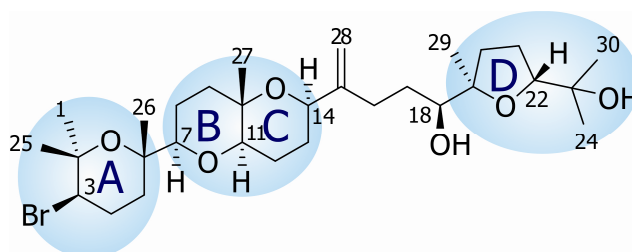
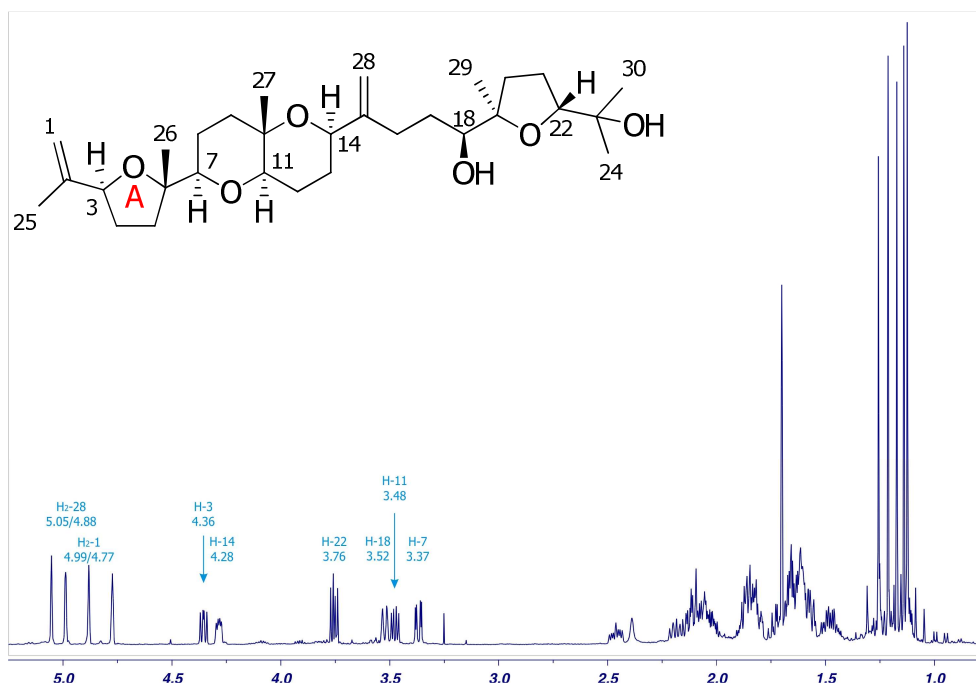


Figura 2. Estructura del dehidrotirsiferol **2**.

- *Compuestos con modificaciones en el anillo A*
- *Compuestos con modificaciones en el sistema B—C*
- *Compuestos con modificaciones en la parte acíclica*
- *Compuestos con modificaciones en el anillo D*
- *Compuestos oxoescualenoides*

*Compuestos con modificaciones en el anillo A***II.3.1. 1,2-Dehidropseudodehidrotirsiferol 54**

La fórmula molecular del 1,2-dehidropseudodehidrotirsiferol **54**, C₃₀H₅₀O₆ fue establecida por espectrometría de masas ([M]⁺ *m/z* 506.3627) que además indicó la ausencia de bromo en este compuesto. Esta información, junto con el análisis de los datos obtenidos por espectroscopía de RMN, apuntaba a que los mayores cambios con respecto al cabeza de serie **2** se localizan en el anillo **A** (Figura 3 y Figura 92).



Efectivamente, las correlaciones observadas en el experimento COSY establecieron cinco sistemas de espines ¹H—¹H a los que llamamos **Fragmento 1** (H-3—H₂-5), **Fragmento 2** (H-7—H₂-9), **Fragmento 3** (H-11—H-14), **Fragmento 4** (H₂-16—H-18) y **Fragmento 5** (H₂-20—H-22)

(**Figura 4**). Los Fragmentos **2**, **3**, **4** y **5** resultaron ser equivalentes a los descritos para el dehidrotirsiferol **2** en tanto que las diferencias más significativas se encontraron en el **Fragmento 1**. Así, las correlaciones protón—protón y carbono—protón, junto con los desplazamientos químicos que presentan C-3 y C-6 (δ_c 83.2 y 84.1), permitieron establecer inequívocamente la existencia de un anillo oxolano en esta parte de la molécula. También a partir del experimento HMBC se pudo precisar la localización de una unidad de isopropileno sobre C-3 (**Figura 4** y **Tabla 2**).

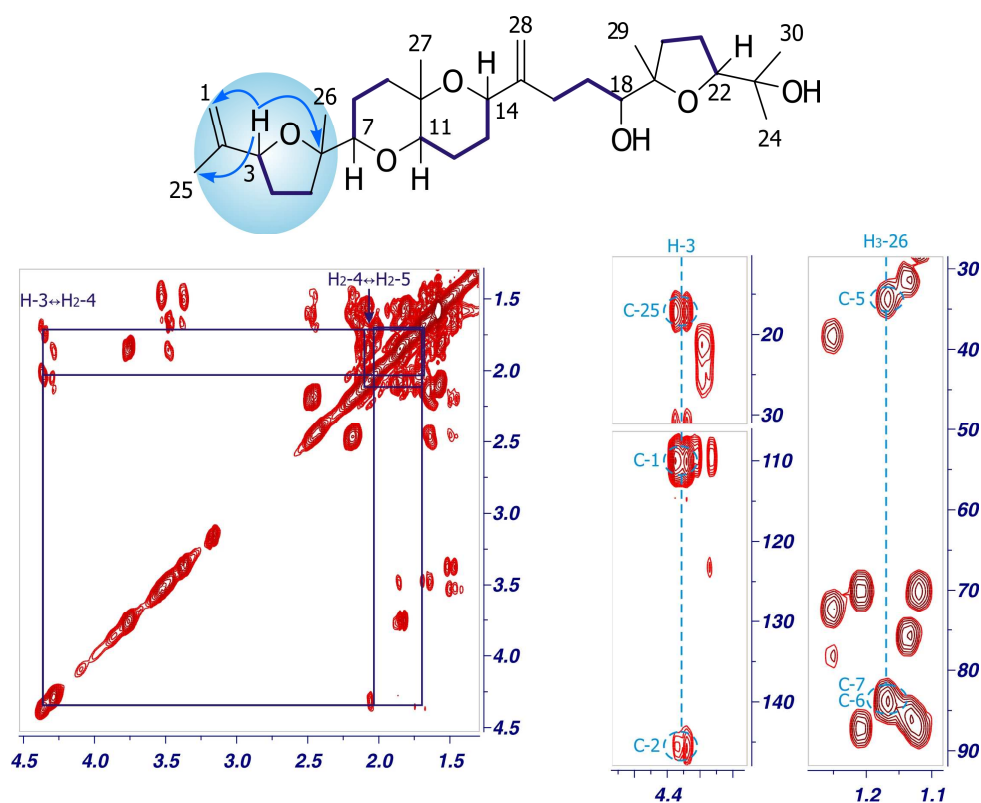


Figura 4. Correlaciones significativas del segmento C-1—C-6 del 1,2-dehidropseudodehidrotirsiferol **54**. Estructura plana del 1,2-dehidropseudodehidrotirsiferol **54** (arriba). Sección más importante del COSY (**abajo izquierda**). Secciones más importantes del HMBC (**abajo derecha**).

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	110.0	4.77/4.99	bs/bs	
2	145.3			
3	83.2	4.36	dd	6.1;8.7
4	30.9	1.70/2.04		
5	34.2	1.62/2.10		
6	84.1			
7	83.7	3.37	dd	2.7;11.6
8	24.6	(β)1.47/1.65(α)		
9	38.4	(α)1.56/1.80(β)		
10	72.4			
11	78.6	3.48	dd	5.5;11.6
12	21.4	(β)1.66/1.82(α)		
13	26.4	(α)1.85/2.09(β)		
14	72.3	4.28	dd	4.0;7.7
15	151.0			
16	29.3	2.18/2.46	ddd/m	5.1;9.3;14.7/m
17	29.7	1.48/1.64		
18	76.0	3.52	d	9.2
19	86.1			
20	31.3	1.57/2.08		
21	26.3	1.84 (2H)		
22	87.4	3.76	dd	5.8;10.2
23	70.3			
24	23.7	1.12 (3H)	s	
25	17.2	1.70 (3H)	s	
26	22.7	1.17 (3H)	s	
27	19.5	1.26 (3H)	s	
28	109.6	4.88/5.05	bs/bs	
29	23.6	1.14 (3H)	s	
30	27.5	1.21 (3H)	s	

Tabla 2. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del 1,2-dehidropseudodehidrotirsiferol **54**. Singulete ancho (**bs**).

En los anillos de cinco miembros, debido a su gran flexibilidad, los NOE entre protones en posiciones relativas *cis*-1,3 son los únicos que dan información fiable acerca de la configuración relativa. Así, el análisis del experimento NOESY permitió localizar los protones H₂-1 y H₃-26 en la misma

cara del anillo **A**, ya que se observó un claro efecto NOE de los protones H₃-26 (δ_{H} 1.17) con uno de los protones H-1 (δ_{H} 4.99). Quedó así establecida la estereoquímica relativa de C-3 y C-6 como *S** en ambos casos (**Figura 5**).

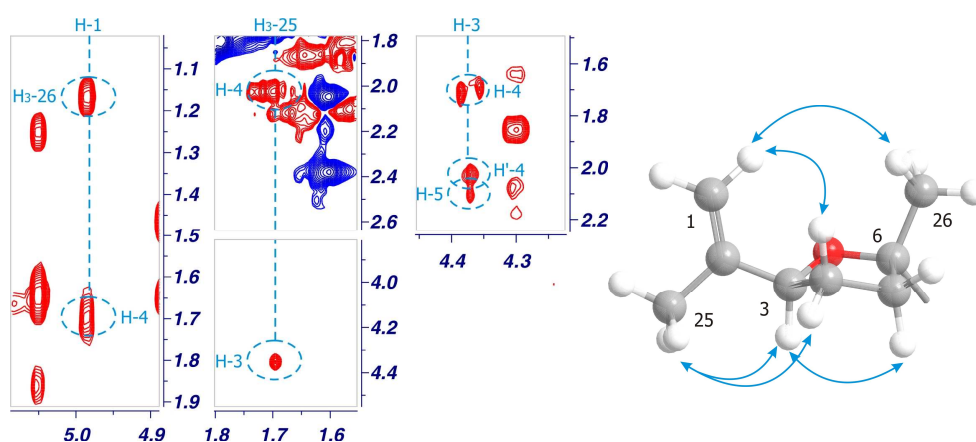
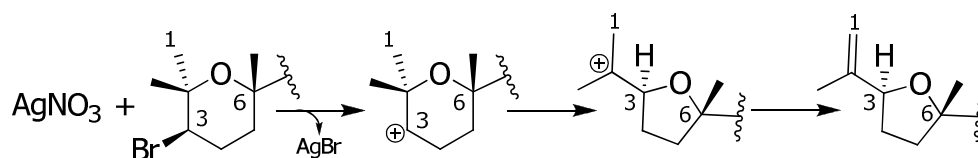


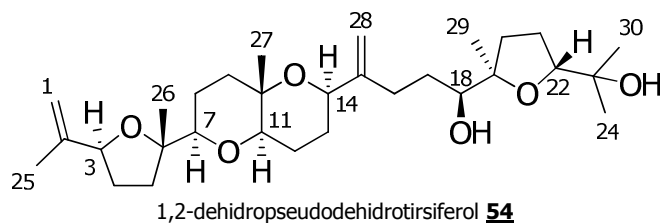
Figura 5. (\leftrightarrow) Correlaciones dipolares más importantes para el anillo **A** del 1,2-dehidropseudodehidrotirsiferol **54**.

Por último el análisis de los datos espectroscópicos fue confirmado por correlación química. Así, el tratamiento de una muestra de dehidrotirsiferol **2** con nitrato de plata (AgNO_3) en acetonitrilo anhidro dió lugar a un compuesto idéntico en todos los aspectos al 1,2-dehidropseudodehidrotirsiferol **54** (**Esquema 5**).



Esquema 5.

Esta transformación además de confirmar la estructura del 1,2-dehidropseudodehidrotirsiferol **54**, fue de gran importancia para proponer su origen biogénico como se verá más adelante.



II.3.2. Secodehidrotirsiferol **55**

La fórmula molecular del secodehidrotirsiferol **55**, $C_{30}H_{50}O_8$, deducida por espectrometría de masas ($[M+Na]^+$ m/z 561.3407) indicó, al igual que el compuesto anterior, que esta molécula no posee el átomo de bromo característico de esta serie de triterpenos. Los datos de RMN 1H y ^{13}C confirmaron la ausencia del metino H-3, así como la de los metilos geminales H₃-1 y H₃-25 característicos de **2**. Asimismo se observó la existencia de dos grupos carbonilos correspondientes a una cetona y a un carboxilo de un acetato (**Figura 6**).

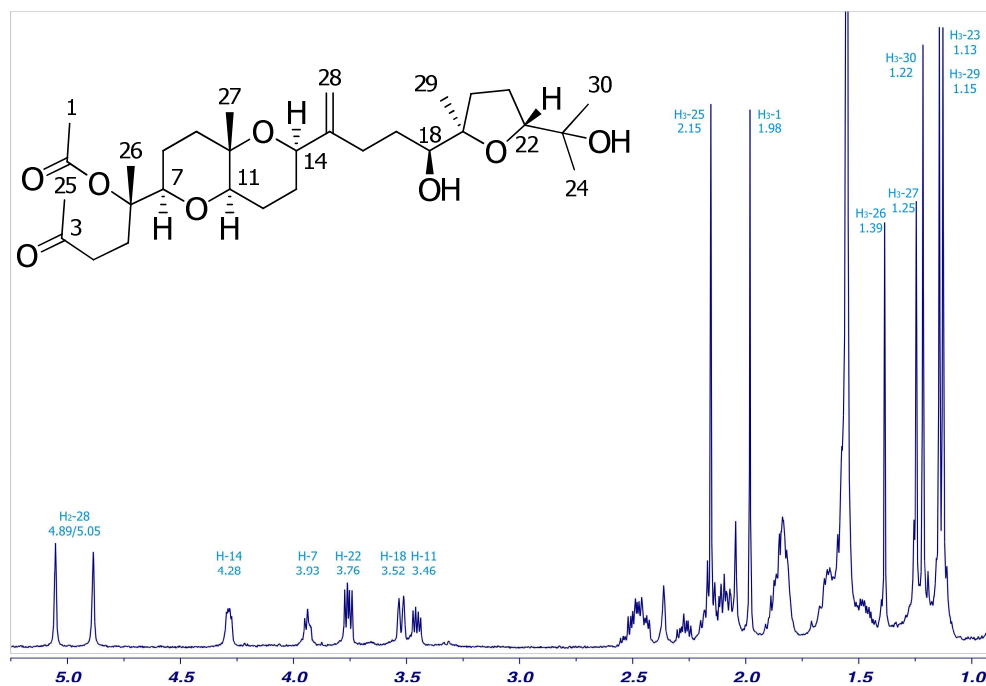


Figura 6. Espectro de RMN 1H del secodehidrotirsiferol **55** en $CDCl_3$ (500 MHz).

El análisis de los espectros de RMN 2D permitió concluir que la porción C-7—C-24 de esta molécula es idéntica a la del compuesto **2**. Sin embargo, se observan claras diferencias en la región C-1—C-6 en la que aparece un sistema aislado de espines A_2BB' propio de dos metilenos.

Las correlaciones observadas en el espectro de HMBC que presentaron los protones H_3 -25 (δ_H 2.15) y H_2 -4 (δ_H 2.50) con el carbonilo C-3 (δ_C 208.5) y las de H_3 -26 (δ_H 1.39) con C-5 (δ_C 29.3), C-6 (δ_C 84.1) y C-7 (δ_C 80.0) permitieron identificar el sistema A_2BB' como C-4 y C-5, tal y como se ve en la **Figura 7**. Finalmente, las correlaciones que presentó el metilo H_3 -1 (δ_H 1.98) con los carbonos C-2 (δ_C 170.1) y C-6 (δ_C 84.1) fijó la posición del grupo acetato sobre el carbono C-6 (**Tabla 3**).

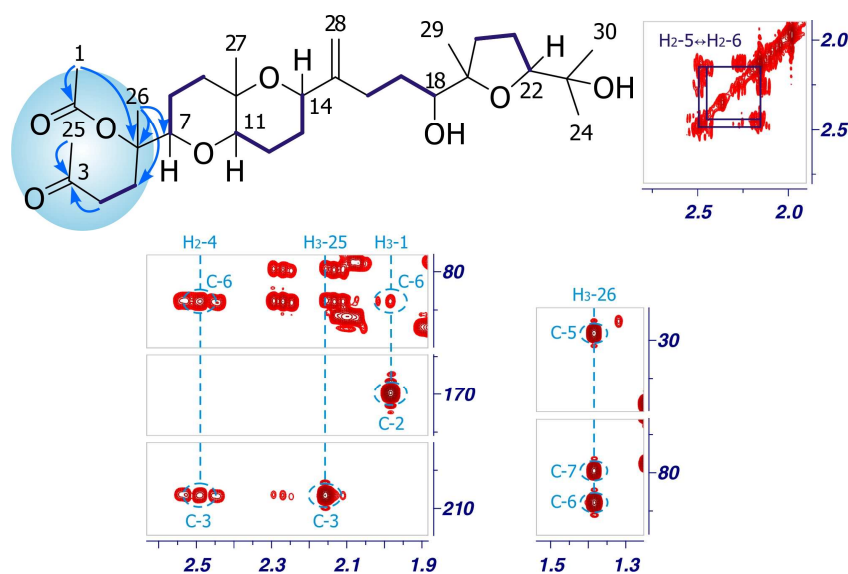
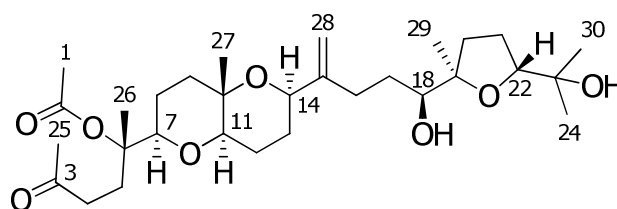


Figura 7. Correlaciones más importantes de la porción C-1—C-6 del secodehidrotirsiferol **55**. Estructura plana de **55** (arriba). Sección más importante del COSY (arriba). Secciones más importantes del HMBC (abajo).

Las correlaciones dipolares observadas en el espectro de NOESY, junto con las consideraciones biogénicas sugieren que el secodehidrotirsiferol **55** posee una estereoquímica relativa equivalente a la del dehidrotirsiferol **2**.

n ^o C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)
1	22.2	1.98	s	
2	170.1			
3	208.5			
4	38.1	2.50 (2H)		
5	29.3	2.16/2.26		
6	84.1			
7	80.0	3.93	dd	3.9;9.9
8	23.6	1.56 (2H)		
9	38.6	(α)1.57/1.81(β)		
10	72.5			
11	79.0	3.46	dd	5.6;11.4
12	21.7	(β)1.63/1.83(α)		
13	26.2	(α)1.84/2.05(β)		
14	72.5	4.28	dd	3.8;7.5
15	151.1			
16	29.5	2.16/2.45		
17	29.9	1.46/1.64		
18	76.2	3.52	dd	1.4;10.4
19	86.1			
20	31.5	1.57/2.10		
21	26.6	1.84 (2H)		
22	87.6	3.76	dd	5.8;10.1
23	70.4			
24	23.9	1.13	s	
25	29.9	2.15	s	
26	20.0	1.39	s	
27	19.5	1.25	s	
28	110.0	4.89/5.05	bs/bs	
29	23.8	1.15	s	
30	27.7	1.22	s	

Tabla 3. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del secodehidrotirsiferol **55**. Singulete ancho (**bs**).



Secodehidrotirsiferol **55**

*Compuestos con modificaciones en el sistema B—C***II.3.3. Espirodehidrovenustatriol 56**

La fórmula molecular del espirodehidrovenustatriol **56** fue establecida como $C_{30}H_{51}O_7Br$ por ESI-HRMS. Estos datos fueron consistentes con el análisis de los espectros de RMN 1H y ^{13}C donde se identificaron siete metilos, once metilenos y cinco grupos metinos, así como seis carbonos cuaternarios, cinco unidos a oxígeno y otro olefínico (**Figura 8**).

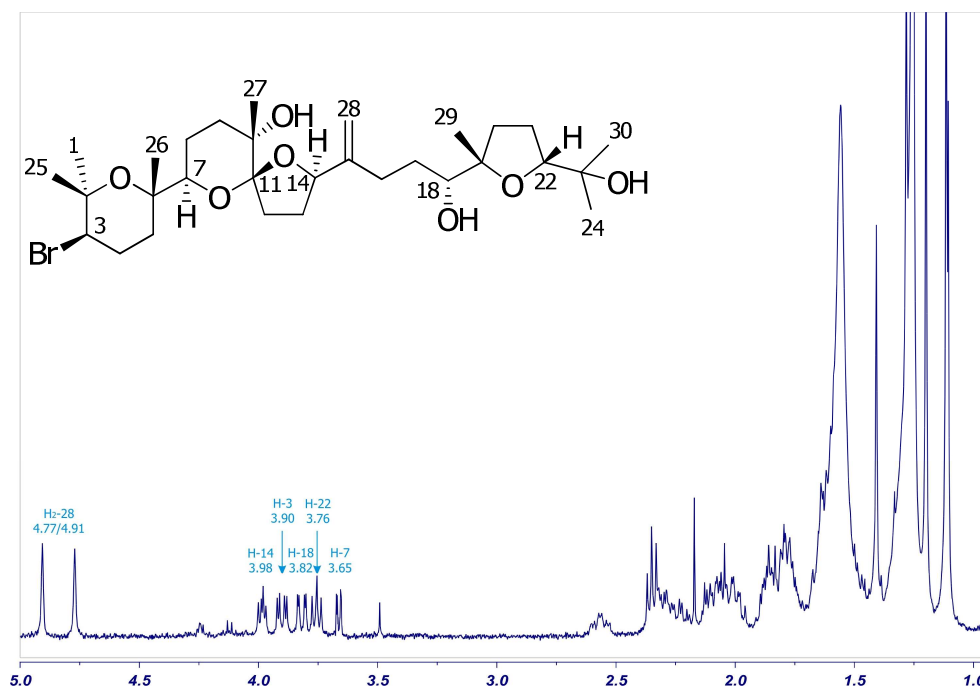


Figura 8. Espectro de RMN 1H del espirodehidrovenustatriol **56** en $CDCl_3$ (400 MHz).

La comparación de los datos espectroscópicos de RMN de **56** con aquellos ya reportados para el dehidrovenustatriol **4** y otros derivados de esta serie,¹⁹ resultaron ser idénticos para los segmentos C-1—C-6 y C-15—C-24 y mostraron algunas diferencias en el segmento C-7—C-14 (**Tabla 4**).

El análisis de los espectros COSY y HSQC permitió establecer las conectividades de cinco sistemas de espines ^1H — ^1H en este compuesto, que se corresponden con los fragmentos que se muestran en la **Figura 9**. La asignación de los desplazamiento químicos de los protones en el segmento C-7—C-14 se inició convenientemente a partir de H-7 (δ_{H} 3.65, d $J= 7.0$ Hz), el cual se correlacionó con H₂-8 (δ_{H} 1.78/1.87), y estos secuencialmente con H₂-9 (δ_{H} 1.59/1.88). La asignación del siguiente sistema de espines comenzó con el acoplamiento que presentó el metileno H₂-12 (δ_{H} 1.87/2.09) con los protones H₂-13 (δ_{H} 1.78/2.07), y estos a su vez con el metino H-14 (δ_{H} 3.98, dd, $J= 5.0, 8.4$ Hz).

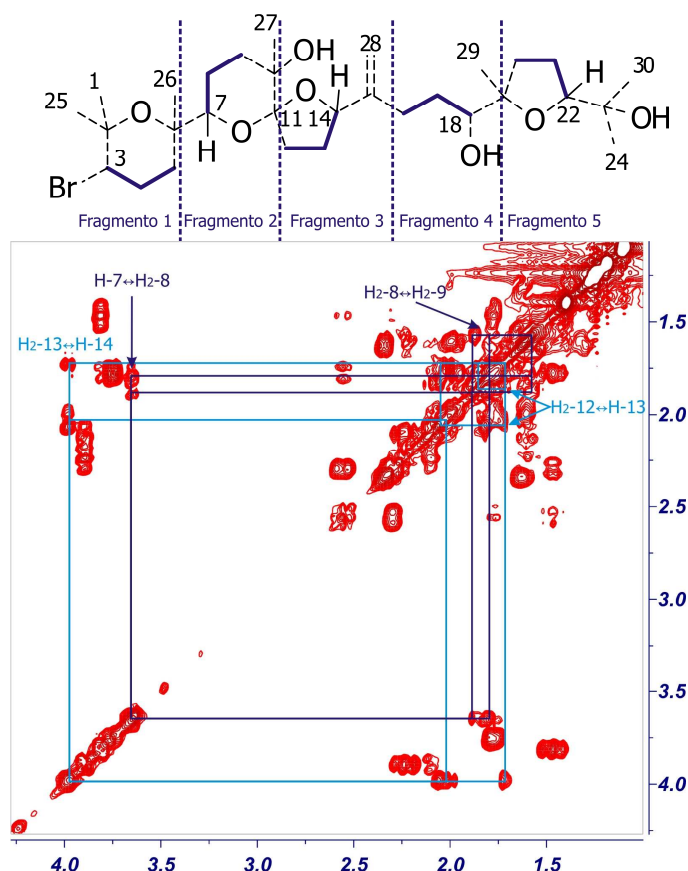


Figura 9. Sección del espectro COSY para los **Fragmentos 3 y 4** del espirodehidovenustatriol **56**.

Elucidación estructural

F.C.P.

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	29.7	1.28 (3H)	s	
2	74.9			
3	59.1	3.90	dd	4.0;12.1
4	29.3	(α)2.12/2.23(β)		
5	36.1	1.64 (2H)		
6	74.8			
7	88.1	3.65	d	7.0
8	27.6	(β)1.78/1.87(α)		
9	34.3	(α)1.59/1.88(β)		
10	72.9			
11	109.9			
12	33.7	1.87/2.09		
13	26.6	1.78/2.07		
14	83.3	3.98	dd	5.0;8.4
15	145.8			
16	30.9	2.32/2.57		
17	29.1	1.50/1.82		
18	75.2	3.82	dd	2.5;11.7
19	84.6			
20	35.0	1.61/2.01		
21	24.7	1.77 (2H)		
22	86.7	3.76	dd	7.0;8.3
23	70.6			
24	25.4	1.11 (3H)	s	
25	24.1	1.41 (3H)	s	
26	21.1	1.20 (3H)	s	
27	22.7	1.11 (3H)	s	
28	107.0	4.77/4.91	bs/bs	
29	23.9	1.12 (3H)	s	
30	28.2	1.20 (3H)	s	

Tabla 4. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del espirodehidrovenustatriol **56**. Singlete ancho (**bs**).

La conexión entre los sistemas de espines H-7—H₂-9 y H₂-12—H-14 se realizó utilizando la información obtenida en el HMBC. Así, las correlaciones de los protones H₂-9 y H₃-27 (δ_{H} 1.11) con el carbono cuaternario C-11 (δ_{C} 109.9), posicionaron el grupo metilo C-27 sobre el carbono C-10 y unieron las dos subestructuras a través del carbono cetálico C-11 estableciendo por tanto un sistema espirocetálico en la porción C-7—C-14 (**Figura 10**).

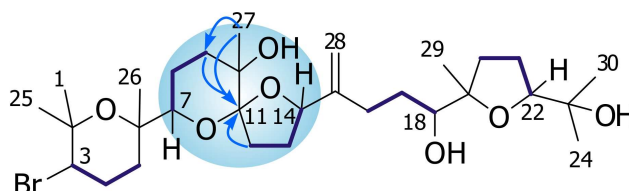


Figura 10. Estructura plana del espirodehidrovenustatriol **56**. (—) Correlaciones COSY. (H→C) Correlaciones HMBC.

Las correlaciones extraídas del experimento ROESY establecieron la configuración relativa de los centros C-3, C-6, C-7, C-10, C-18, C-19 y C-22 como idéntica a la del venustatriol **4**. Además, la estereoquímica relativa de los centros quirales C-11 y C-14 fueron determinadas como *S** y *R**, respectivamente, con base en las correlaciones dipolares observadas para el protón H₃-27 con H _{β} -8 (δ_{H} 1.78) y H-14, y la existente entre H-7 y H-12 (δ_{H} 1.87) que solo se pueden explicar si la molécula tiene la citada configuración y los protones se encuentran en la orientación que se muestra en la **Figura 11**.

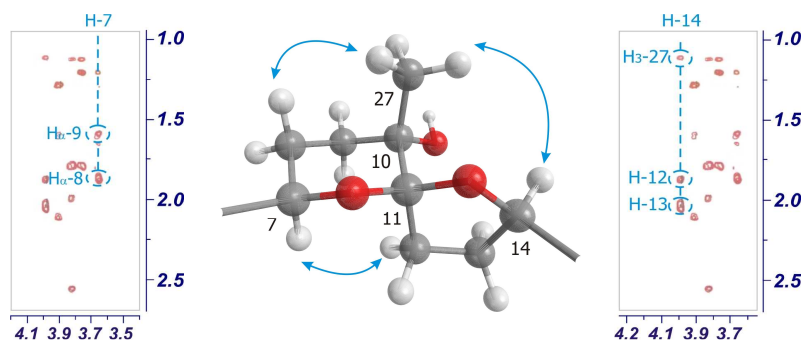
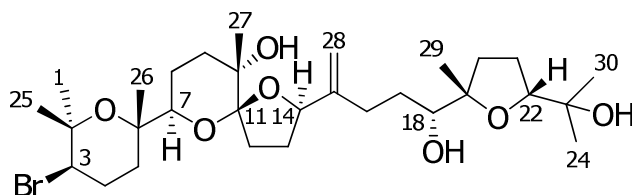


Figura 11. Correlaciones más importantes observadas en el ROESY para el sistema de anillos **B** y **C** del espirodehidrovenustatriol **56**.

Espiodehidovenustatriol **56**

II.3.4. 14-Cetodehidrotirsiferol **57**

El compuesto que denominamos 14-cetodehidrotirsiferol **57** posee la misma fórmula molecular que el espiodehidovenustatriol **56**, $C_{30}H_{51}O_7Br$, basándonos en los datos obtenidos de su espectro de masas. Sin embargo, la comparación de los desplazamientos químicos de RMN ^{13}C entre estos dos compuestos puso de manifiesto la existencia de dos claras diferencias, la primera, que **57** no posee el carbono espirocetálico C-11 (δ_C 109.9) y la segunda, una nueva señal de carbono carbonílico a δ_C 202.3, que junto con el valor de ϵ 1630 (λ_{max} 239.8 nm) que muestra su espectro de UV, nos indicó la presencia de un sistema de cetona α,β -insaturada en la molécula.

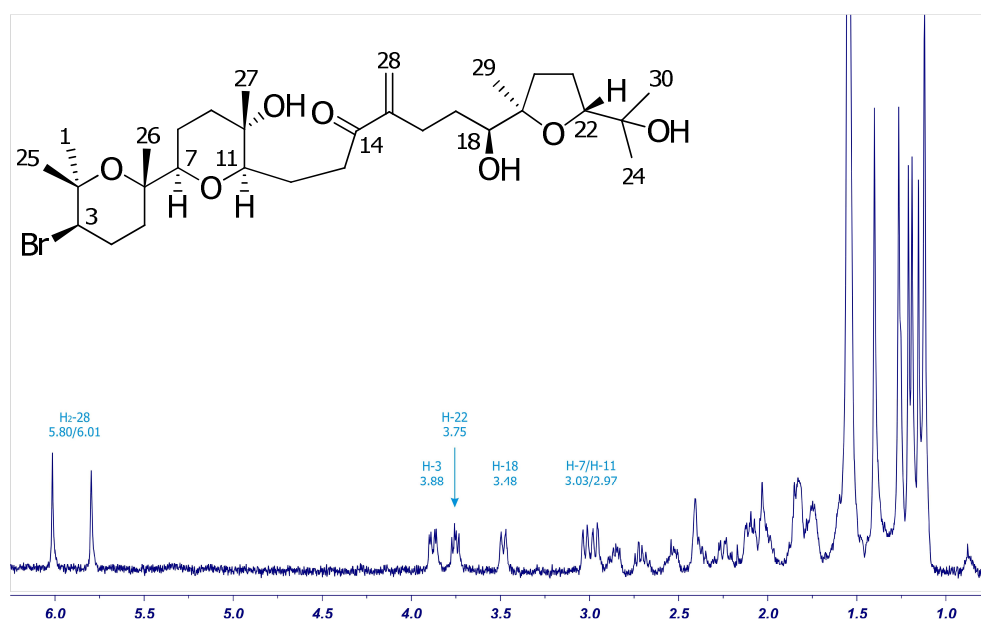


Figura 12. Espectro de RMN 1H del 14-cetodehidrotirsiferol **57** en $CDCl_3$ (400 MHz).

La comparación de los espectros de RMN 2D de este compuesto con los dados para el compuesto anterior, claramente indica que las principales diferencias entre ambos metabolitos se localizan en el segmento C-7—C-14 (**Tabla 5**). Las conectividades observadas en los experimentos COSY y HSQC hicieron posible la asignación de dos sistemas de espines en esta parte de la molécula. La elucidación del primer sistema se inició con el acoplamiento del protón metínico H-7 (δ_{H} 2.97, dd, $J=1.7$ y 11.0 Hz) con los protones H₂-8 (δ_{H} 1.37/1.76), que a su vez se correlacionaron con los protones H₂-9 (δ_{H} 1.48/1.82). El siguiente sistema quedó formado por el protón metínico H-11 (δ_{H} 3.03, dd, $J=1.2$ y 10.3 Hz) que se conecta con los protones H₂-12 (δ_{H} 1.51/2.01), mostrando los últimos una segunda correlación con los protones H₂-13 (δ_{H} 2.71/2.87) (**Figura 13**).

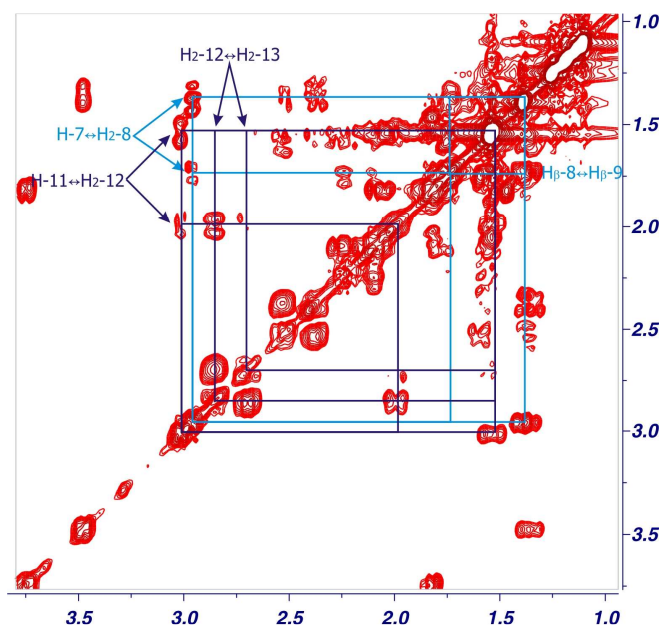


Figura 13. Sección del experimento COSY para los **Fragmentos 2 y 3** del 14-cetodehidrotirsiferol **57**.

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	31.1	1.27 (3H)	s	
2	75.0			
3	58.8	3.88	dd	4.0;12.6
4	28.2	(α)2.10/2.25(β)		
5	36.7	(α)1.55/1.77(β)		
6	74.6			
7	86.1	2.97	dd	1.7;11.0
8	23.5	(β)1.38/1.76(α)		
9	39.8	(α)1.48/1.82(β)		
10	69.9			
11	83.7	3.03	dd	1.2;10.3
12	23.8	1.51/2.01		
13	34.6	2.71/2.87		
14	202.3			
15	148.5			
16	28.2	2.39/2.54		
17	30.7	1.37/1.60		
18	75.9	3.48	dd	1.5;10.5
19	86.0			
20	31.5	1.56/2.09		
21	26.6	1.83 (2H)		
22	87.7	3.75	dd	6.1;10.0
23	70.5			
24	23.9	1.12 (3H)	s	
25	23.5	1.40 (3H)	s	
26	20.3	1.19 (3H)	s	
27	20.1	1.15 (3H)	s	
28	124.5	5.80/6.01	bs/bs	
29	23.9	1.12 (3H)	s	
30	27.7	1.21 (3H)	s	

Tabla 5. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del 14-cetodehidrotirsiferol **5Z**. Singulete ancho (**bs**).

Las subestructuras obtenidas a partir de la interpretación del experimento COSY fueron unidas mediante los acoplamientos carbono—protón a larga distancia que poseen los protones del metilo H₃-26 (δ_{H} 1.19) con los carbonos C-5 (δ_{C} 36.7), C-6 (δ_{C} 74.6) y C-7 (δ_{C} 86.1); así como la del metilo H₃-27 (δ_{H}

1.15) con C-9 (δ_C 39.8), C-10 (δ_C 69.9) y C-11 (δ_C 83.7) y finalmente a partir de las correlaciones de los protones H₂-28 (δ_H 5.80/6.01) con los carbonos C-14 (δ_C 202.3), C-15 (δ_C 148.5) y C-16 (δ_C 28.2) (**Figura 14**).

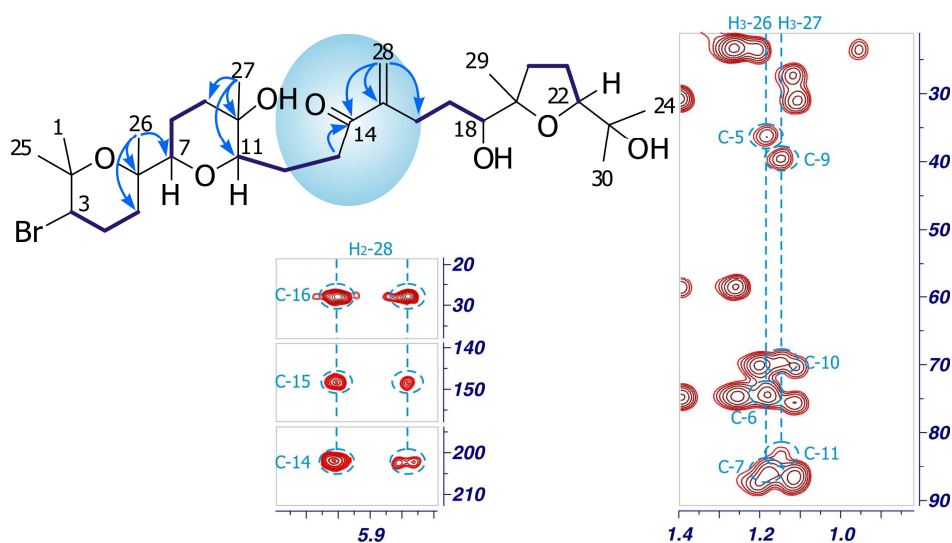
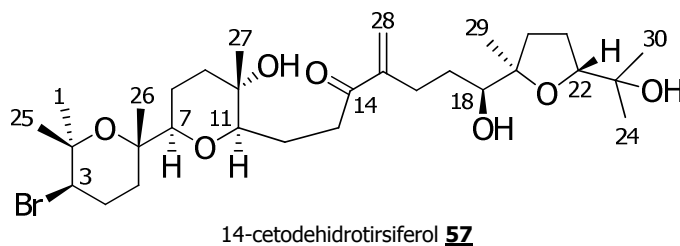


Figura 14. Secciones de los espectro HMBC y estructura plana del 14-cetodehidrotirsiferol **57**. (—) Correlaciones COSY y (H→C) correlaciones HMBC.

Para establecer la configuración relativa del 14-cetodehidrotirsiferol **57**, nuevamente se recurrió a las correlaciones dipolares observadas en el experimento ROESY y a las constantes de acoplamiento. Estos datos resultaron ser similares a los establecidos para el dehidrotirsiferol **2**, lo que nos indicó que la estereoquímica relativa de estos dos compuestos es idéntica.



II.3.5. Pretirsenol A **58**

Los datos obtenidos del espectro de masas del pretirsenol A **58** estableció una fórmula empírica de $C_{30}H_{53}O_9Br$. El análisis del espectro de RMN 1H indicó que se trataba de una molécula muy similar al 14-cetodehidrotirsiferol **57**, aunque no mostró las señales a δ_H 5.80/6.01 asignadas a los protones del metileno C-28 en **57**. Asimismo, se observaron en el nuevo compuesto dos nuevas señales a δ_H 3.55/3.68 (**Figura 15**).

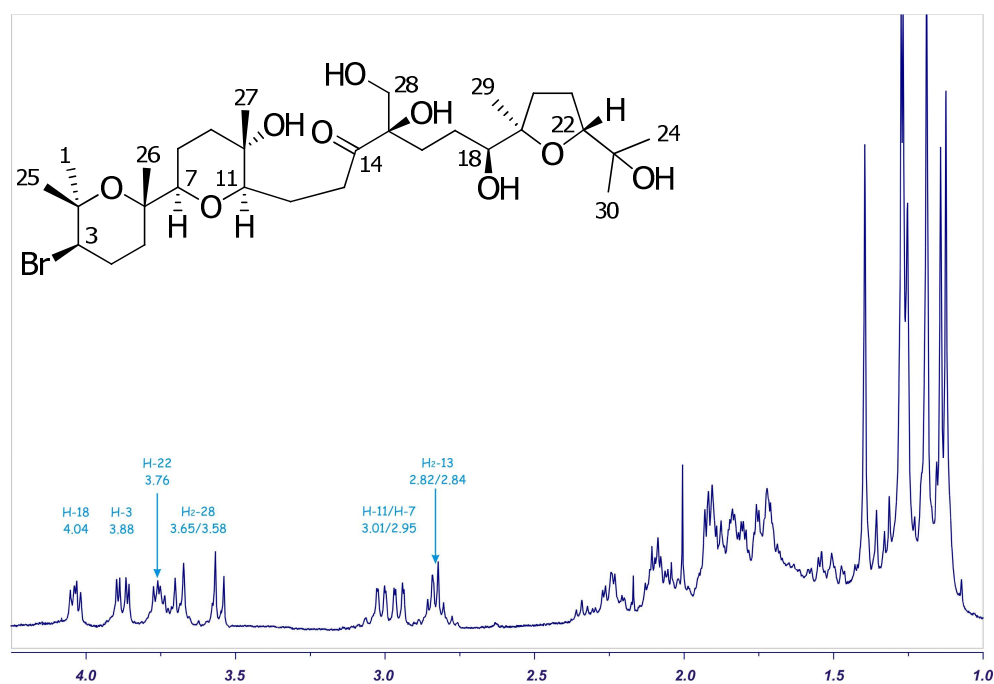


Figura 15. Espectro de RMN 1H del pretirsenol A **58** en $CDCl_3$ (400 MHz).

Las correlaciones carbono—protón observadas en el experimento HMBC que presentan las señales de los dos nuevos protones (δ_H 3.55/3.68) con los carbonos C-14 (δ_C 215.5), C-15 (δ_C 91.6) y C-16 (δ_C 31.4), junto con los datos de espectrometría de masas del pretirsenol A **58**, indicaron que el nuevo metabolito posee un sistema diol en las posiciones C-15 y C-28 (**Figura 16**).

Por otro lado, el análisis de los espectros de RMN 2D confirmó que el resto de la molécula es equivalente al 14-cetodehidrotirsiferol **57** (Tabla 6).

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	31.0	1.26 (3H)	s	
2	74.9			
3	58.8	3.88	dd	4.0;12.4
4	28.2	(α)2.07/2.25(β)		
5	36.9	(α)1.54/1.78(β)		
6	74.5			
7	86.1	2.95	dd	2.1;11.1
8	23.4	(β)1.37/1.74(α)		
9	39.7	(α)1.49/1.82(β)		
10	69.9			
11	83.7	3.01	dd	1.9;10.2
12	22.5	1.44/2.02		
13	36.2	2.82/2.84		
14	215.5			
15	91.6			
16	31.4	1.92/2.11		
17	26.5	1.72/1.91		
18	86.4	4.04	dd	5.7; 8.5
19	84.0			
20	34.5	1.72/1.90		
21	26.1	1.84/1.92		
22	87.7	3.76	dd	6.0;9.2
23	70.4			
24	23.8	1.12 (3H)	s	
25	23.5	1.40 (3H)	s	
26	20.2	1.19 (3H)	s	
27	20.1	1.14 (3H)	s	
28	66.3	3.55/3.68	d/d	11.4/11.4
29	30.9	1.27 (3H)	s	
30	27.7	1.19 (3H)	s	

Tabla 6. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del pretirsenol A **58**.

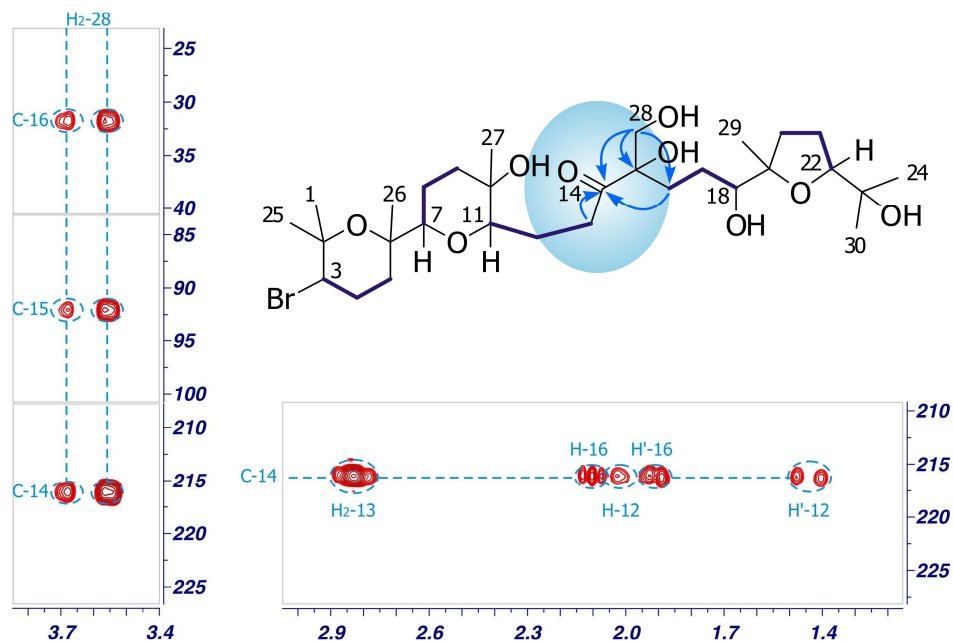
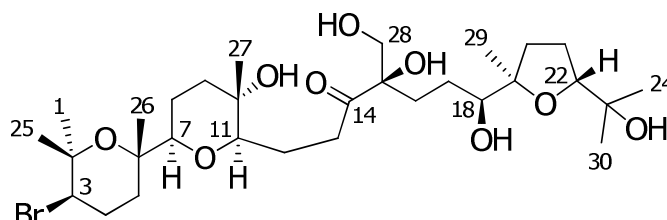


Figura 16. Secciones del espectro HMBC y estructura plana del pretirsanol A **58**. (—) Correlaciones COSY. (H→C) Correlaciones HMBC.

El análisis de los espectros NOESY del pretirsanol A **58**, junto con la interpretación geométrica de los valores de las constantes de acoplamiento nos permitieron establecer que la configuración relativa de los centros asimétricos C-3, C-6, C-7, C-10, C-11, C-18, C-19 y C-22 es equivalente a la del 14-cetodehidrotirsiferol **57**. La confirmación de la estructura, así como su estereoquímica relativa se estableció por correlación química. Así, el tratamiento de una muestra de pretirsanol A **58** con DOWEX-50 en CHCl_3 dio lugar al tirsanol A **13**,¹⁸ en un proceso comparable a la conversión ácida que sufre la eritromicina A y B para dar sus correspondientes enol-éteres.⁴⁰

⁴⁰ P. Kurath, P. H. Jones, R. S. Egan y T. J. Perun. *Experientia*, **1971**, 27, 362.

Pretirsenol A **58**

II.3.6. 13-Hidroxipretirsenol A **59**

El análisis de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C sugirió que este metabolito posee una estructura similar a la del pretirsenol A **58**, aunque muestra algunas diferencias en la porción C-11—C-13 (**Figura 17** y **Tabla 7**). Por otro lado, la fórmula empírica del 13-hidroxipretirsenol A **59**, $\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{O}_{10}\text{Br}$, deducida de su espectro de masas, reveló que **59** contiene un átomo de oxígeno más que el pretirsenol A **58**.

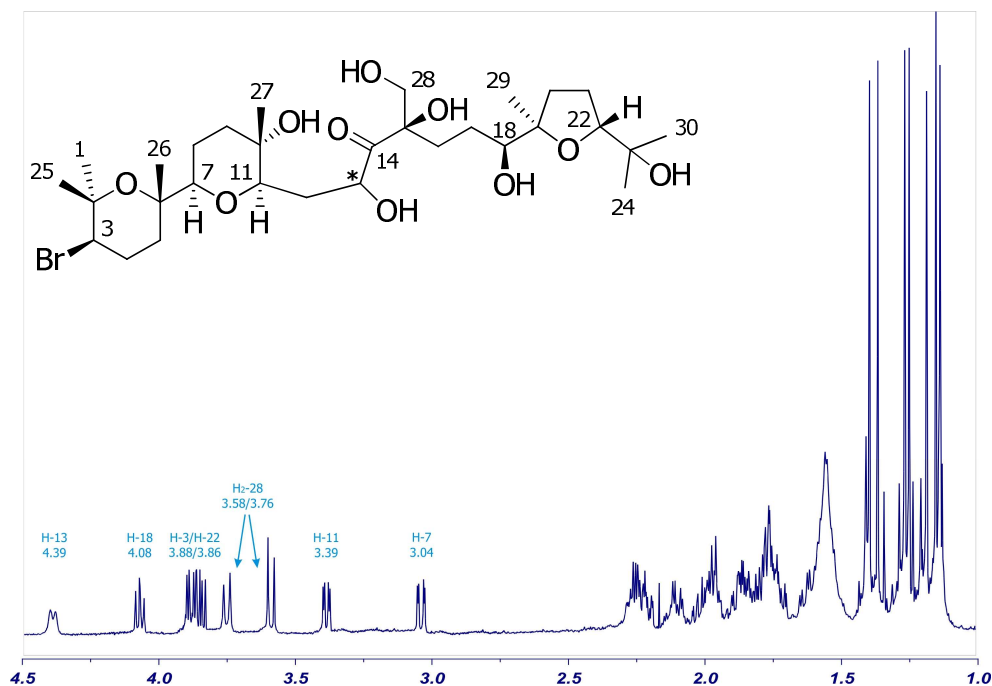


Figura 17. Espectro de RMN ^1H del 13-hidroxipretirsenol A **59** en CDCl_3 (400 MHz).

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	31.0	1.27 (3H)	s	
2	75.0			
3	58.9	3.88	dd	5.0;15.1
4	28.2	(α)2.10/2.24(β)		
5	36.6	(α)1.63/1.76(β)		
6	74.4			
7	86.1	3.04	dd	2.0;11.2
8	23.5	(β)1.39/1.75(α)		
9	39.6	(α)1.56/1.82(β)		
10	69.5			
11	80.8	3.39	dd	2.4;9.6
12	32.8	1.72/2.23		
13	75.8	4.39	bd	9.7
14	214.5			
15	91.1			
16	26.4	1.94 (2H)		
17	32.1	1.98/2.26		
18	86.4	4.08	t	7.6
19	83.9			
20	35.1	1.78/1.87		
21	25.9	1.87 (2H)		
22	88.7	3.86	dd	6.0;10.1
23	70.9			
24	23.6	1.16 (3H)	s	
25	23.3	1.40 (3H)	s	
26	20.3	1.19 (3H)	s	
27	20.3	1.14 (3H)	s	
28	66.1	3.58/3.76	d/d	11.5/11.7
29	25.6	1.37 (3H)	s	
30	27.6	1.25 (3H)	s	

Tabla 7. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del 13-hidroxipretirsenol A **59**. Doblete ancho (**bd**).

El análisis del experimento COSY reveló la presencia de un sistema de espines en el segmento C-11—C-13 que se inicia con la correlación del protón H-11 (δ_{H} 3.39) con los protones del metileno H₂-12 (δ_{H} 1.72/2.23), y estos a su vez con H-13 (δ_{H} 4.13). Las correlaciones HSQC que presentan estas

señales con los carbonos a δ_c 80.8, 32.8 y 75.8, respectivamente, refuerzan los datos observados en el espectro de masas y apuntan a la presencia de un heteroátomo unido al carbono C-13.

Las correlaciones carbono—protón observadas en el espectro HMBC entre el protón H-11 y los carbonos C-9 (δ_c 39.7), C-10 (δ_c 69.9) y C-27 (δ_c 20.1), junto a las del protón H-13 con los carbonos C-14 (δ_c 215.5) y C-15 (δ_c 91.6), fijaron claramente la posición del **Fragmento** C-11—C-13 en la molécula, tal y como se ve en la **Figura 18**.

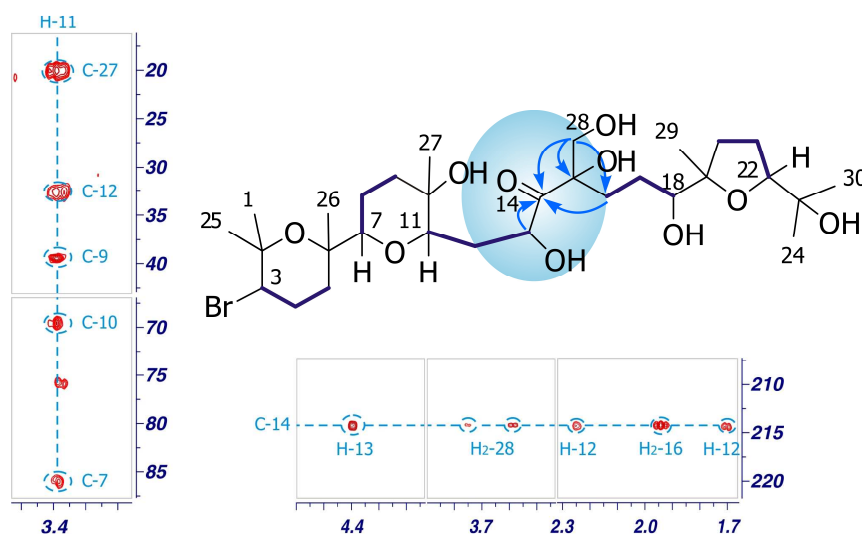
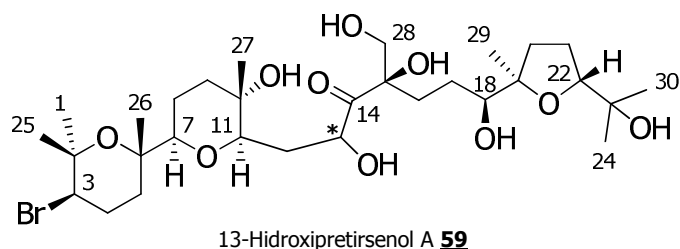


Figura 18. Secciones del espectro HMBC y estructura plana del 13-hidroxipretirsanol A **59**. (—) Correlaciones COSY. (H→C) Correlaciones HMBC.

La estereoquímica relativa del 13-hidroxipretirsanol A **59** fue establecida por transformación química. Así, al tratar una muestra de tirsanol A **13** disuelta en CH_2Cl_2 con cantidades catalíticas de OsO_4 en BuOH, se obtuvo un compuesto idéntico al 13-hidroxipretirsanol A **59**. Estos datos confirman que el nuevo compuesto posee la misma estereoquímica relativa que el tirsanol A **13**. Cabe mencionar que las señales correspondientes a los carbonos C-13 y C-14 presentan duplicidad. Posiblemente por la presencia de un equilibrio ceto-enol.



II.3.7. 15-Dehidroxitirsenol A **60**

El espectro de masas del 15-dehidroxitirsenol A **60** indicó una fórmula molecular de $C_{30}H_{51}O_7Br$ para este compuesto. Por otro lado, el análisis del espectro de RMN 1H del nuevo compuesto sugiere que está estrechamente relacionado con el tirsenol A **13**,¹⁸ aunque a diferencia de aquel la multiplicidad de las señales del metileno H_2 -28 no aparecieron como dos dobletes, sino como dos dobles dobletes (δ_H 3.49; dd; $J = 5.9$ y 11.1 Hz; δ_H 3.63; dd; $J = 6.8$ y 11.1 Hz) (**Figura 19**).

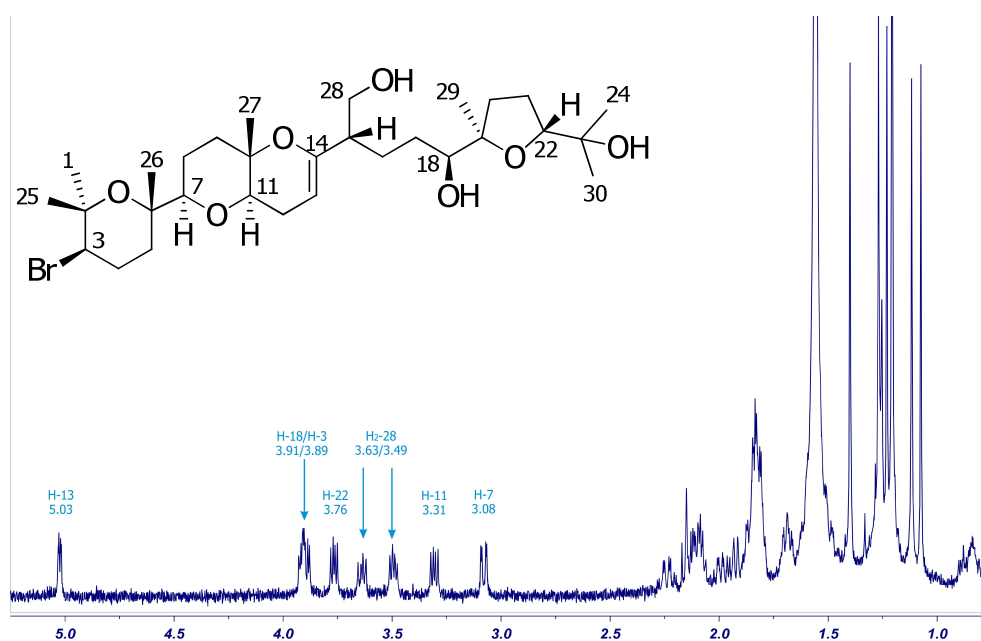


Figura 19. Espectro de RMN 1H del 15-dehidroxitirsenol A **60** en $CDCl_3$ (400 MHz).

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	31.0	1.27 (3H)	s	
2	75.1			
3	59.0	3.89	dd	4.2;12.4
4	28.2	(α)2.12/2.24(β)		
5	37.0	(α)1.52/1.81(β)		
6	74.5			
7	86.4	3.08	dd	2.2;11.1
8	23.6	(β)1.50/1.82(α)		
9	36.4	(α)1.57/1.86(β)		
10	73.6			
11	76.7	3.31	dd	5.9;10.6
12	24.3	(β)1.81/2.11(α)		
13	93.4	5.03	dd	1.9;5.4
14	151.4			
15	28.2	2.07		
16	31.5	1.81/1.91		
17	26.6	1.69/1.82		
18	86.4	3.91	dd	5.1;9.5
19	83.8			
20	34.5	1.66/2.01		
21	26.1	1.85 (2H)		
22	87.4	3.76	dd	5.9;9.5
23	70.4			
24	24.0	1.12 (3H)	s	
25	23.6	1.40 (3H)	s	
26	20.1	1.21 (3H)	s	
27	15.0	1.07 (3H)	s	
28	66.7	3.49/3.63	dd/dd	5.9;11.1/6.8;11.1
29	24.5	1.23 (3H)	s	
30	27.7	1.21 (3H)	s	

Tabla 8. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del 15-dehidroxitirsénol A **60**.

La comparación de los espectros COSY y HSQC del 15-dehidroxitirsénol A **60** con los reportados para el tirsénol A **13**, confirmó que el metileno H₂-28 no aparece como un sistema AB aislado, sino que forma parte del sistema de espín $^1\text{H}-^1\text{H}$ H₂-28 \leftrightarrow H-15 \leftrightarrow H₂-16 \leftrightarrow H₂-17 \leftrightarrow H-18 centrados a δ_{H} 3.49/3.63, 2.07, 1.81/1.91, 1.69/1.82 y 3.91, respectivamente (**Tabla 8** y **Figura 20**).

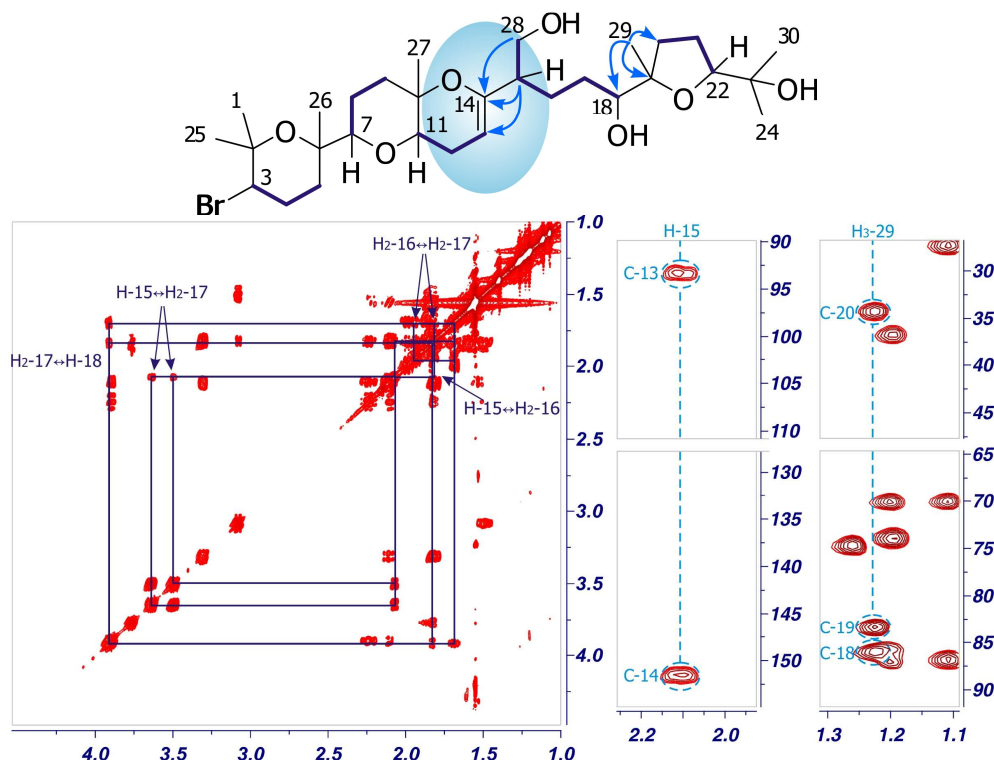


Figura 20. Estructura plana del 15-dehidroxitirsenol A **60** (arriba). Sección del espectro COSY para el Fragmento 4 (abajo izquierda). Secciones del espectro HMBC (abajo derecha).

Las correlaciones carbono—protón observadas en el experimento HMBC entre el protón H-15 (δ_{H} 2.07) y los carbonos C-13 (δ_{C} 93.4) y C-14 (δ_{C} 151.4), junto con las que presentan los protones H₃-29 (δ_{H} 1.23) con los carbonos C-20 (δ_{C} 34.5), C-19 (δ_{C} 83.8) y C-18 (δ_{C} 86.4) confirmaron la presencia del mismo esqueleto carbonado establecido para el tirsenol A **13**, pero carente del grupo hidróxilo sobre C-15.

En una primera aproximación, el estudio comparativo de los desplazamientos químicos de metabolitos previamente aislados de *L. viridis*, especialmente tirsenol A **13** y B **14**, nos sugirió que la estereoquímica relativa del carbono C-15 es *S*^{*} (Figura 21). Lo anterior, está apoyado por las correlaciones observadas en el experimento NOESY del protón H-13 (δ_{H} 5.03) con los protones H-16 (δ_{H} 1.81), H₃-27 (δ_{H} 1.07), H-28 (δ_{H} 3.63) y H₃-29 (δ_{H}

1.23) y la observada entre H₂-28 (δ_{H} 3.49/3.63) y H-16, que se puede explicar si C-15 tiene la citada configuración y los protones se encuentran en la orientación que se muestra en la **Figura 22**. Aun cuando todos los datos apuntan a que este compuesto pertenece a la serie del tirsenol A, no hay que olvidar que esta propuesta se basa en las correlaciones NOE de un sistema acíclico y por tanto la asignación no es inambigua. El análisis del resto de las correlaciones NOESY, junto con las constantes de acoplamiento, nos indicó que el resto de la molécula también posee la misma estereoquímica relativa que el tirsenol A **13**.

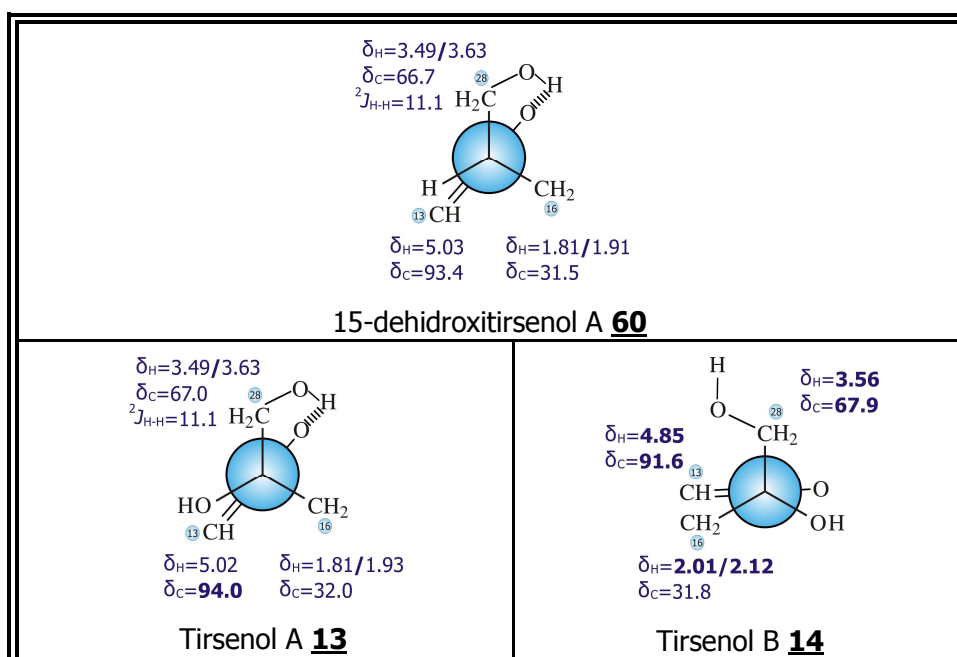


Figura 2. Comparación de los datos espectroscópicos del sistema C-15—C-14 del 15-dehidroxitirsenol A **60** (arriba), tirsenol A **13** (abajo izquierda) y del tirsenol B **14** (abajo derecha).

1. Los desplazamientos de ¹H se dan en negritas cuando el $|\Delta\delta| > 0.04$ ppm.
2. Los desplazamientos de ¹³C se dan en negritas cuando el $|\Delta\delta| > 0.50$ ppm.

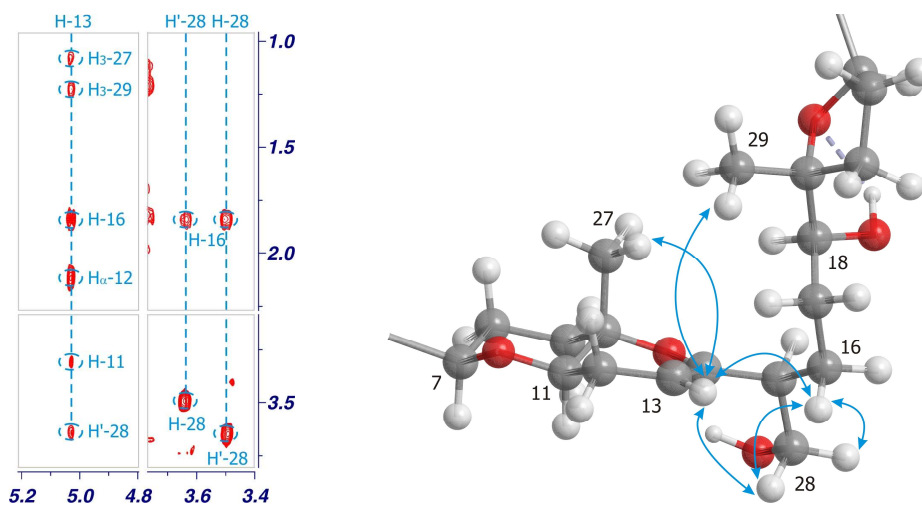
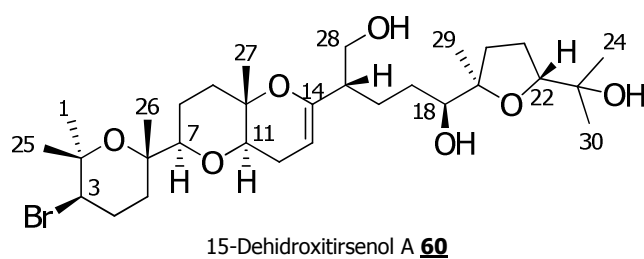


Figura 22. Correlaciones NOE más importantes observadas para el sistema C-15—C-14 del 15-dehidroxitrisenol A **60**.



Compuestos con modificación en la parte acíclica

II.3.8. 14-Hidroxiyucatecol 61

El espectro de masas del 14-hidroxiyucatecol **61** reveló la presencia de dos picos isotópicos a m/z 627.2866/629.2869 que se ajustaron a la fórmula molecular $C_{30}H_{53}O_7Br$. La comparación del espectro de RMN 1H del 14-hidroxiyucatecol **61** con el del dehidrotirsiferol **2** nos indicó que el nuevo compuesto no posee las señales características correspondientes a los protones olefínicos H₂-28 ni el geminal al oxígeno H-14, al tiempo que se observa la existencia de un metilo adicional a δ_H 0.84 (dd $J=6.5$ Hz) (**Figura 23** y **Figura 92**).

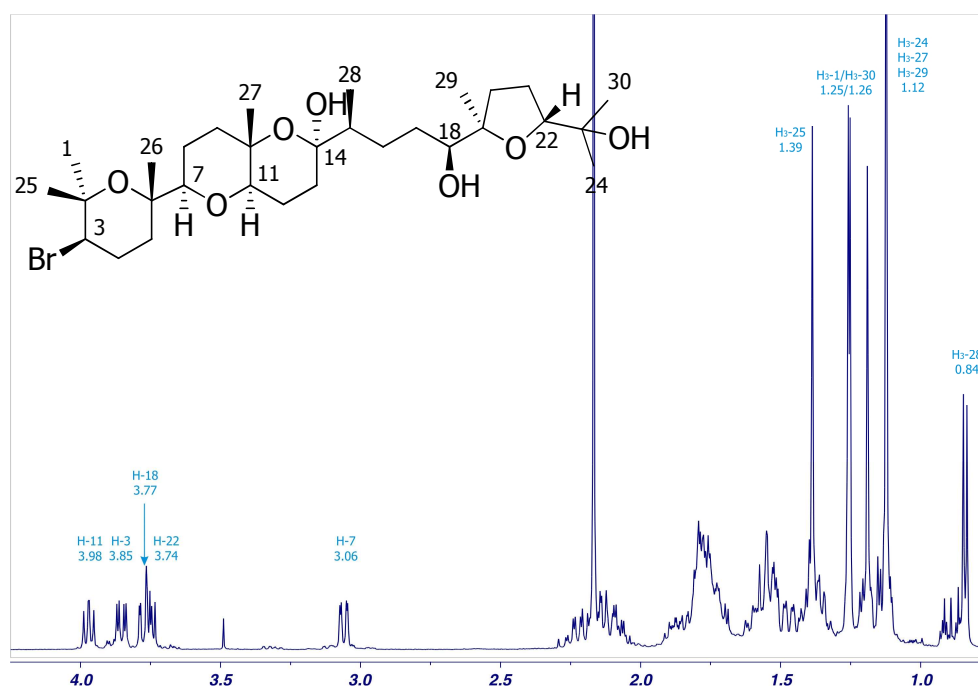


Figura 23. Espectro de RMN 1H del 14-hidroxiyucatecol **61** en $CDCl_3$ (600 MHz).

El análisis de los espectros COSY y TOCSY mostró que los sistemas de espín **1** (H-3—H₂-5), **2** (H-7—H₂-9) y **5** (H₂-20—H-21) son equivalentes a los

observados en **2** en tanto que los cambios más importantes se localizaron en los sistemas **3** (H-11—H₂-13) y **4** (H₃-28—H-18) (**Tabla 9** y **Figura 24**).

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	30.9	1.25	s	
2	74.8			
3	59.1	3.85	dd	4.1;12.3
4	28.2	(α)2.07/2.21(β)		
5	36.9	(α)1.48/1.77(β)		
6	74.6			
7	85.8	3.06	dd	2.4;11.4
8	23.0	(β)1.43/1.73(α)		
9	38.4	(α)1.59/1.78(β)		
10	71.8			
11	75.5	3.98	dd	8.1;9.8
12	20.1	(β)1.35/1.87(α)		
13	32.6	(β)1.55/2.14(α)		
14	98.9			
15	38.6	1.35		
16	27.1	1.38/1.52		
17	26.9	1.18/1.54		
18	74.3	3.77	dd	2.3;12.5
19	84.3			
20	32.7	1.52/2.13		
21	26.3	1.79		
22	86.8	3.74	dd	6.1;9.3
23	70.0			
24	24.5	1.12	s	
25	23.4	1.39	s	
26	19.9	1.19	s	
27	19.5	1.12	s	
28	16.9	0.84	d	6.5
29	24.3	1.12	s	
30	28.4	1.26	s	

Tabla 9. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del 14-hidroxiyucatecol **61**.

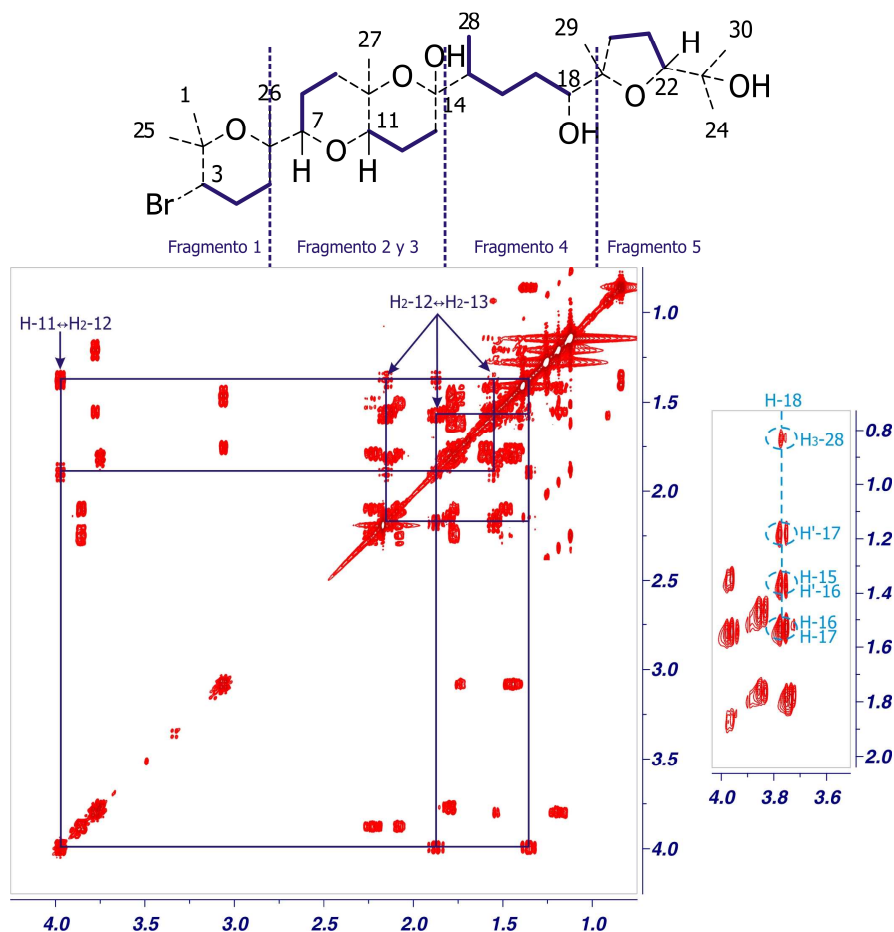


Figura 24. Secciones de los espectros COSY y TOCSY-2D para los sistemas de espines **3** y **4** del 14-hidroxiyucatecol **61**.

Una vez establecida la secuencia de los sistemas de espines se procedió a conectarlos entre sí. Así, las correlaciones observadas en el experimento HMBC nos indicaron que los sistemas **1/2** y **2/3** se conectan con la misma secuencia observada para **2** (**Figura 25** y **Figura 93**). Por otro lado, fueron cruciales las correlaciones que presentan los protones H₃-28 (δ_{H} 0.84), H₂-13 (δ_{H} 1.55/2.14) y H-15 (δ_{H} 1.35) con el carbono con δ_{C} 98.9 ppm, que además de unir los sistemas de espines **3** y **4** establecieron que el cierre del anillo **C** es través del carbono hemiacetalico C-14 (**Figura 25**), ajustándose así a la formula molecular establecida por espectrometría de masas. De este modo, la

estructura plana de **61** quedo asignada, tal y como se ve en la siguiente figura.

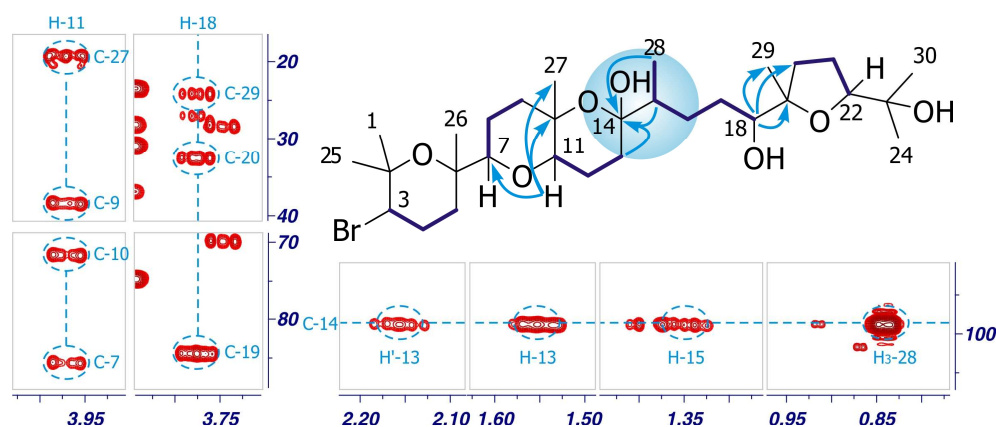


Figura 25. Correlaciones HMBC ($H \rightarrow C$) más significativas del segmento C-11—C-18 del 14-Hidroxiyucatecol **61**.

Las correlaciones observadas en el experimento NOESY junto con las constantes de acoplamiento permitieron establecer que la estereoquímica relativa de los centros C-3, C-6, C-7, C-10, C-11, C-18, C-19 y C-22 del 14-hidroxiyucatecol **61** es idéntica a la de **2** (**Figura 96**). La configuración relativa del centro estereogénico C-14 se estableció como R^* a través de las correlaciones dipolares que poseen los protones H₃-28 (δ_H 0.84) con H _{β} -12 (δ_H 1.35) y H₃-27 (δ_H 1.12), así como la que se observa entre los protones H-15 (δ_H 1.35) y H₃-27 (**Figura 26**). Las correlaciones citadas anteriormente, junto con la existente entre el protón H₃-28 y el protón H _{β} -13 (δ_H 1.55) solo se pueden explicar si C-15 posee una estereoquímica relativa S^* y los protones se encuentran en la orientación que se muestra en la **Figura 26**.

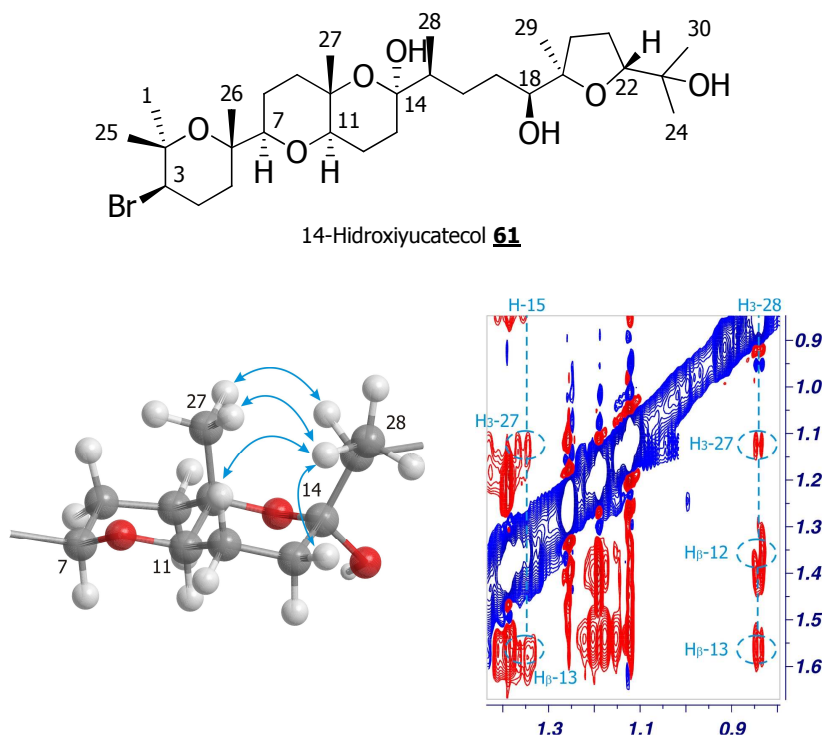


Figura 26. Correlaciones NOESY más importantes del anillo **C** del 14-hidroxiyucatecol **61**.

II.3.9. Yucatecona 62

El espectro de masas de la yucatecona **62** indicó que este compuesto posee la misma fórmula empírica que el dehidrotirsiferol **2** (C₃₀H₅₁O₆Br). Sin embargo, la comparación de sus espectros de RMN ¹H puso de manifiesto la ausencia en este compuesto de los protones olefínicos H₂-28, así como la del protón H-18 (**Figura 27** y **Figura 92**). Además, los datos de RMN ¹³C indicaron la presencia de un nuevo grupo carbonilo (δ_C 215.7). A la vista de estos resultados, pudimos establecer que las principales diferencias se localizan en la porción C-11—C-18.

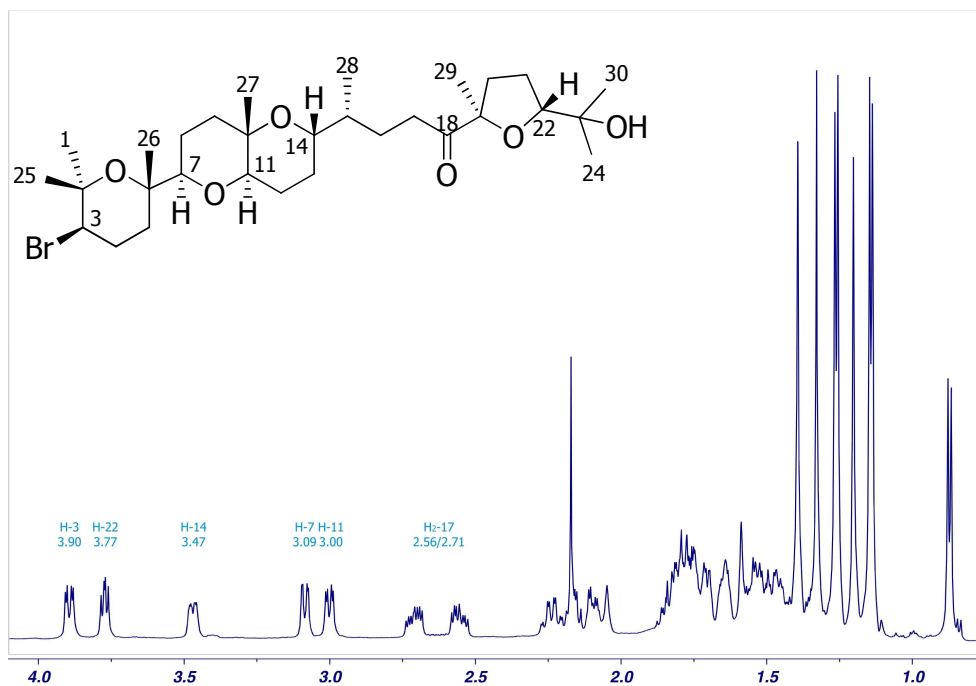


Figura 27. Espectro de RMN ¹H de la yucatecona **62** en CDCl₃ (600 MHz).

El análisis de los experimentos COSY y TOCSY permitió establecer cuatro sistemas de espín en la molécula, dando lugar a las estructuras parciales que se observan en la **Figura 28**. La asignación de los protones de la porción C-11—C-18 se inició convenientemente en H-11 (δ_H 3.00, dd, $J = 3.8$ y 11.8 Hz),

que presenta una clara correlación con los protones H₂-12 (δ_{H} 1.51/1.64). A su vez estos protones se conectaron con H₂-13 (δ_{H} 1.37/1.65). La secuencia de correlaciones continuó con el acoplamiento de los protones H₂-13 con el metino H-14 (δ_{H} 3.47, ddd, $J = 2.1, 4.6$ y 11.7 Hz) y este a su vez con el protón H-15 (δ_{H} 1.44) que se conectó con H₃-28 (δ_{H} 0.88 d, $J = 6.8$ Hz) y H₂-16 (δ_{H} 1.34/1.73). El sistema de espines se cerró con la correlación observada entre H₂-16 y H₂-17 (δ_{H} 2.56/2.71) (**Figura 28** y **Tabla 10**).

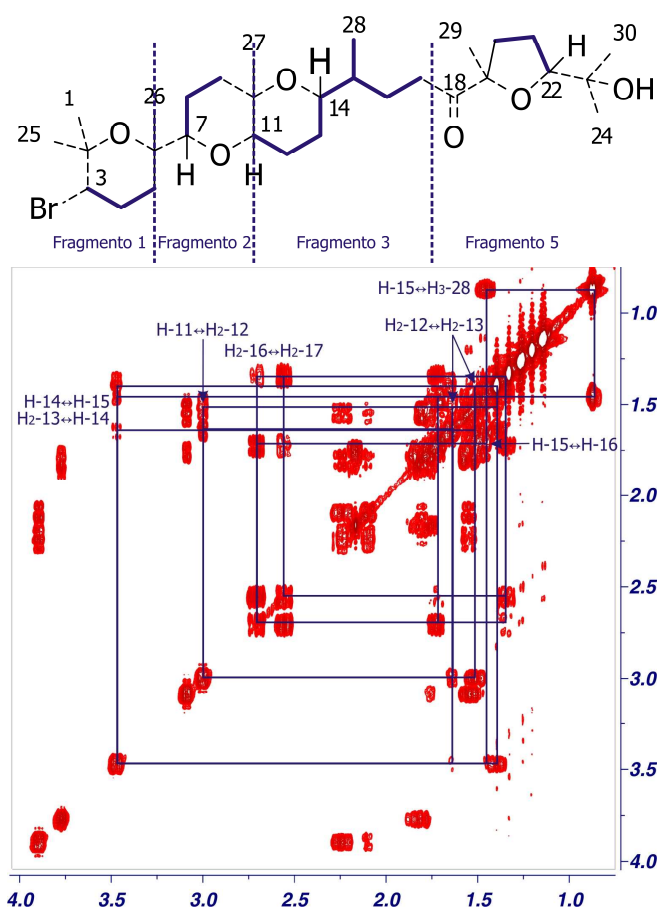


Figura 28. Sección del espectro COSY para el segmento C-11—C-18 de la yucatecona **62**.

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	31.6	1.27		
2	75.1			
3	59.3	3.90	dd	4.0;12.3
4	28.3	(α)2.09/2.25(β)		
5	37.7	(α)1.55/1.80(β)		
6	74.5			
7	87.0	3.09	dd	2.4;11.2
8	23.5	(α)1.53/1.76(β)		
9	38.1	(α)1.50/1.70(β)		
10	72.4			
11	81.3	3.00	dd	3.8;11.8
12	24.9	(β)1.51/1.64(α)		
13	28.5	(α)1.37/1.65(β)		
14	72.8	3.47	ddd	2.1;4.6;11.7
15	37.5	1.44		
16	26.4	1.34/1.73		
17	35.1	2.56/2.71	ddd/ddd	5.8;9.7;17.7/5.3;9.9;17.7
18	215.7			
19	88.8			
20	35.3	1.77/2.16		
21	26.2	1.83		
22	87.6	3.77	dd	6.2;8.7
23	70.7			
24	24.7	1.15		
25	24.3	1.40		
26	20.7	1.21		
27	14.9	1.14		
28	15.6	0.88	d	6.8
29	24.7	1.33		
30	27.6	1.26		

Tabla 10. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C de la yucatecona **62**.

A partir del análisis del experimento HMBC fue posible establecer la estructura plana del compuesto. Así, las correlaciones que posee el protón H-11 (δ_{H} 3.00) con los carbonos C-7 (δ_{C} 87.0), C-9 (δ_{C} 38.1), C-10 (δ_{C} 72.1) y C-27 (δ_{C} 14.9), junto con la que se observa entre el protón H-14 (δ_{H} 3.47) y el carbono C-10 establecieron el sistema dioxabicyclo[4.4.0]decano. Finalmente,

las correlaciones que presentan con el carbono carbonilo (δ_C 215.7) los protones H₂-17 (δ_H 2.56/2.71) y H₃-29 (δ_H 1.33) establecieron la estructura que se muestra en la **Figura 29**.

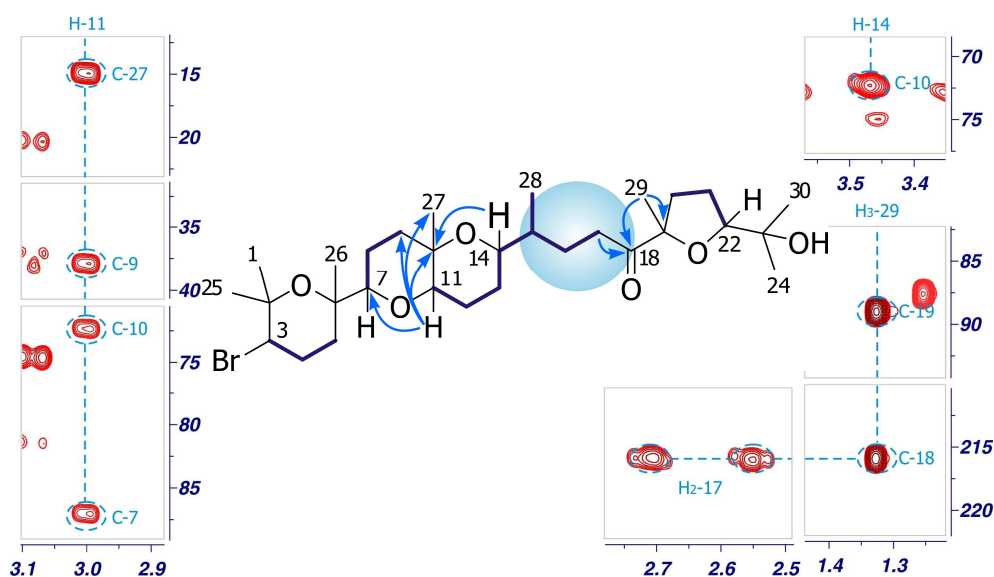


Figura 29. Estructura plana de la yucatecona **62**. Secciones de HMBC (H→C) más importantes del segmento C-11—C-18.

La estereoquímica relativa del centro C-14 se estableció como *S** en función de la correlación observada en el experimento NOESY entre los protones, H₃-27 (δ_H 1.14) y H-14 (δ_H 3.47) (**Figura 30**). Sin embargo, para establecer la configuracional relativa del centro quiral C-15 fue necesario recurrir al *método de estudio configuracional basado en el análisis de constantes de acoplamiento*.

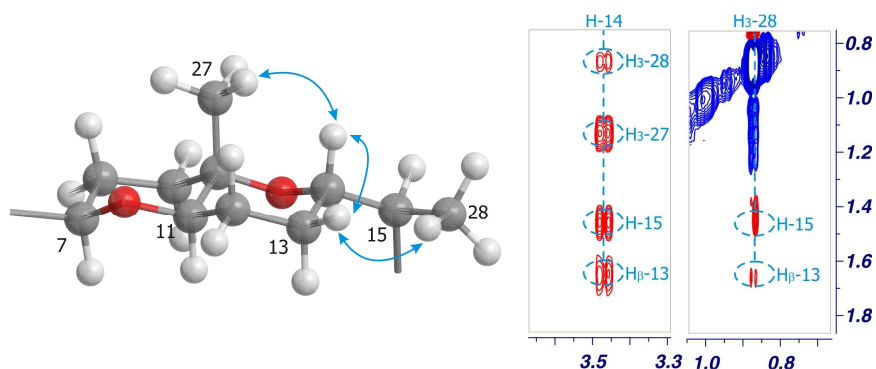


Figura 30. Correlaciones dipolares más importantes del anillo **C** observadas en el experimento NOESY de la yucatecona **62**.

Método de estudio configuracional basado en el análisis de constantes de acoplamiento

Esta aproximación fue desarrollada a mediados de los años noventa por Murata y *col.* El principio de este método se basa en la premisa de que un sistema formado por dos centros asimétricos adyacentes adopta una conformación *gauche-*, *anti* o *gauche+* del diastereoisómero *eritro* o del *treo* (**Figura 31**). El análisis consiste en comparar los valores experimentales de las constantes $^3J_{H-H}$, $^3J_{C-H}$ y $^2J_{C-H}$ con los valores esperados en cada uno de los rotámeros alternados (*gauche-*, *anti* o *gauche+*) de cada serie diastereoisomérica.

Los valores experimentales de las constantes $^3J_{H-H}$, $^3J_{C-H}$ y $^2J_{C-H}$ permiten diferenciar los cuatro conformeros *gauche* (A1, A3, B1 y B3). Sin embargo, y debido a que los conformeros *anti* (A2 y B2) presentan un mismo patrón de valores esperados, no es posible diferenciarlos. En estos casos es necesario recurrir a las correlaciones dipolares entre los sustituyentes C-1 y C-4 para establecer diferencias (**Figura 31**).

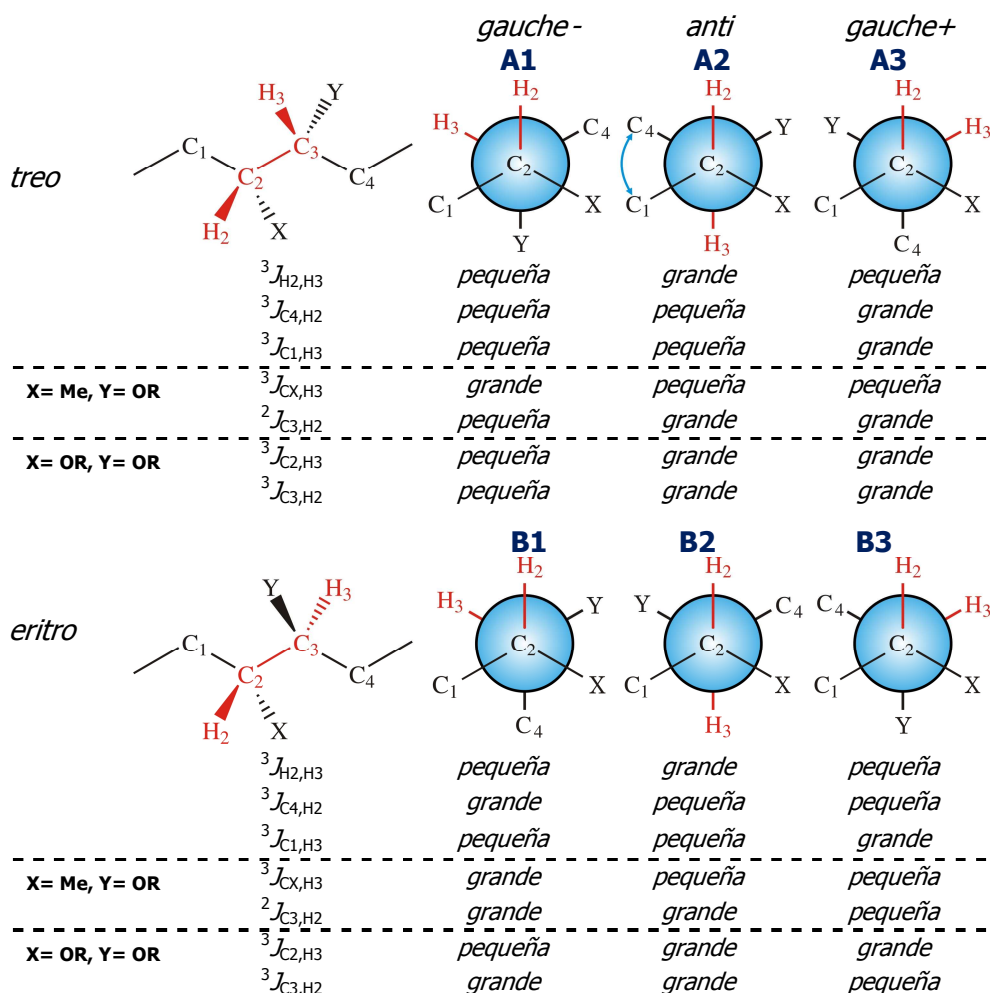


Figura 31. Análisis configuracional del sistema 1,2-dimetino a través de las constantes de acoplamiento. Los cuatro rotámeros H/H-*gauche* pueden ser identificados mediante el uso de las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares. Los dos rotámeros H/H-*anti* pueden distinguirse por las correlaciones dipolares de H1 y H4 (\leftrightarrow). Las orientaciones de los conformeros se construyeron a partir de los ángulos diedros entre H_2 y H_3 .

La comparación de las medidas experimentales con los valores esperados depende fundamentalmente de la correcta definición de las categorías *pequeña* y *grande*. En el caso de las constantes que se relacionan directamente con el ángulo de torsión (ψ) a través de la ecuación de Karplus ($^3J_{H-H}$ y $^3J_{C-H}$), se define *grande* como todos aquellos valores de J que se correspondan al intervalo de ángulos de torsión de $180 \pm 15^\circ$ (disposición *anti*).

De igual forma, todos aquellos valores de J que se correspondan a ángulos de torsión en torno a $60 \pm 15^\circ$ se definen como J pequeñas (disposición *gauche*) (**Figura 32**).

Las constantes ${}^2J_{C-H}$ pueden proveer restricciones geométricas, siempre que el carbono que interviene en el acoplamiento esté unido a un átomo electronegativo. El valor de la J nos daría información del ángulo de torsión que forma el protón y el átomo electronegativo. Un valor de ${}^2J_{C-H}$ correspondiente a ángulos de torsión de $60 \pm 15^\circ$ se define como *grande* (disposición *gauche*), mientras que valores de ${}^2J_{C-H}$ correspondientes a ángulos de torsión de $180 \pm 15^\circ$ se definen como pequeñas (disposición *anti*) (**Figura 32**).

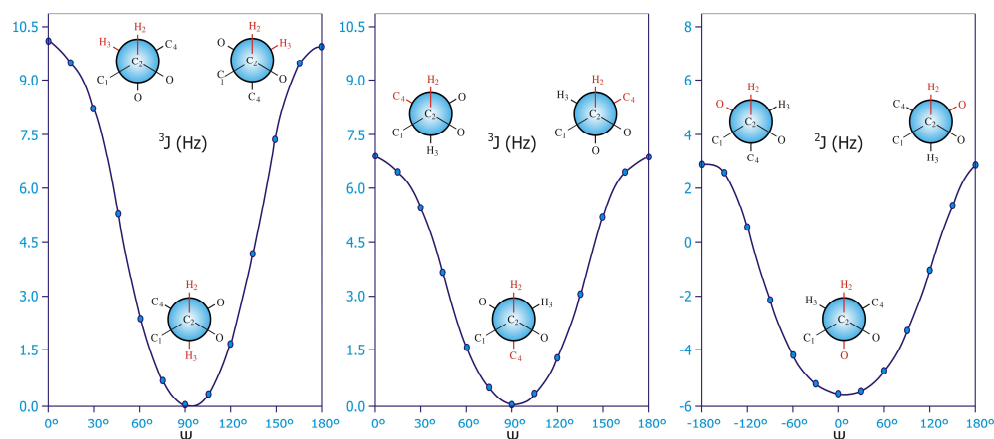


Figura 32. Valores estimados de las constantes de acoplamiento en función del ángulo diedro (ψ) en sistemas 1,2-dioxigenados.

Es importante destacar que aunque el valor de las constantes de acoplamiento depende principalmente del ángulo de torsión, el efecto de los sustituyentes del segmento analizado es relevante para establecer la amplitud de cada intervalo (**Tabla 11**).




SEGMENTO	${}^3J_{H-H}$ (Hz)		${}^3J_{C-H}$ (Hz)		${}^2J_{C-H}$ (Hz)	
	<i>grande</i>	<i>pequeña</i>	<i>grande</i>	<i>pequeña</i>	<i>grande</i>	<i>pequeña</i>
	<i>anti</i>	<i>gauche</i>	<i>anti</i>	<i>gauche</i>	<i>gauche</i>	<i>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 11. Valores estimados de las constantes ${}^3J_{H-H}$, ${}^2J_{C-H}$ y ${}^3J_{C-H}$ en diversos sistemas del tipo 2,3-dimetino quirales.

Es frecuente encontrar en sistema acíclicos la coexistencia de dos o tres rotámeros. Cuando los rotámeros minoritarios contribuyen de una manera importante (≥ 1 Hz) se detectan valores *promedios* de las constantes de acoplamiento que dificultan su clasificación en *pequeña* o *grande*, lo que imposibilita el análisis configuracional por el método original de Murata.

Sin embargo, se ha desarrollado ampliaciones del método de Murata que abordan el análisis de estos sistemas en equilibrio conformacional. Este estudio solamente es aplicable a sistemas con un equilibrio entre dos rotámeros alternados, lo que permite estimar las magnitudes de las constantes de acoplamiento en sistemas tipo *anti-gauche* o *gauche-gauche* (**Figura 33**). Este análisis simplificado permite acceder al estudio de constantes de acoplamiento con valores *medios*. Además, es importante destacar que esta metodología no permite diferenciar entre los equilibrios *gauche+-gauche-* con configuración relativa opuesta.

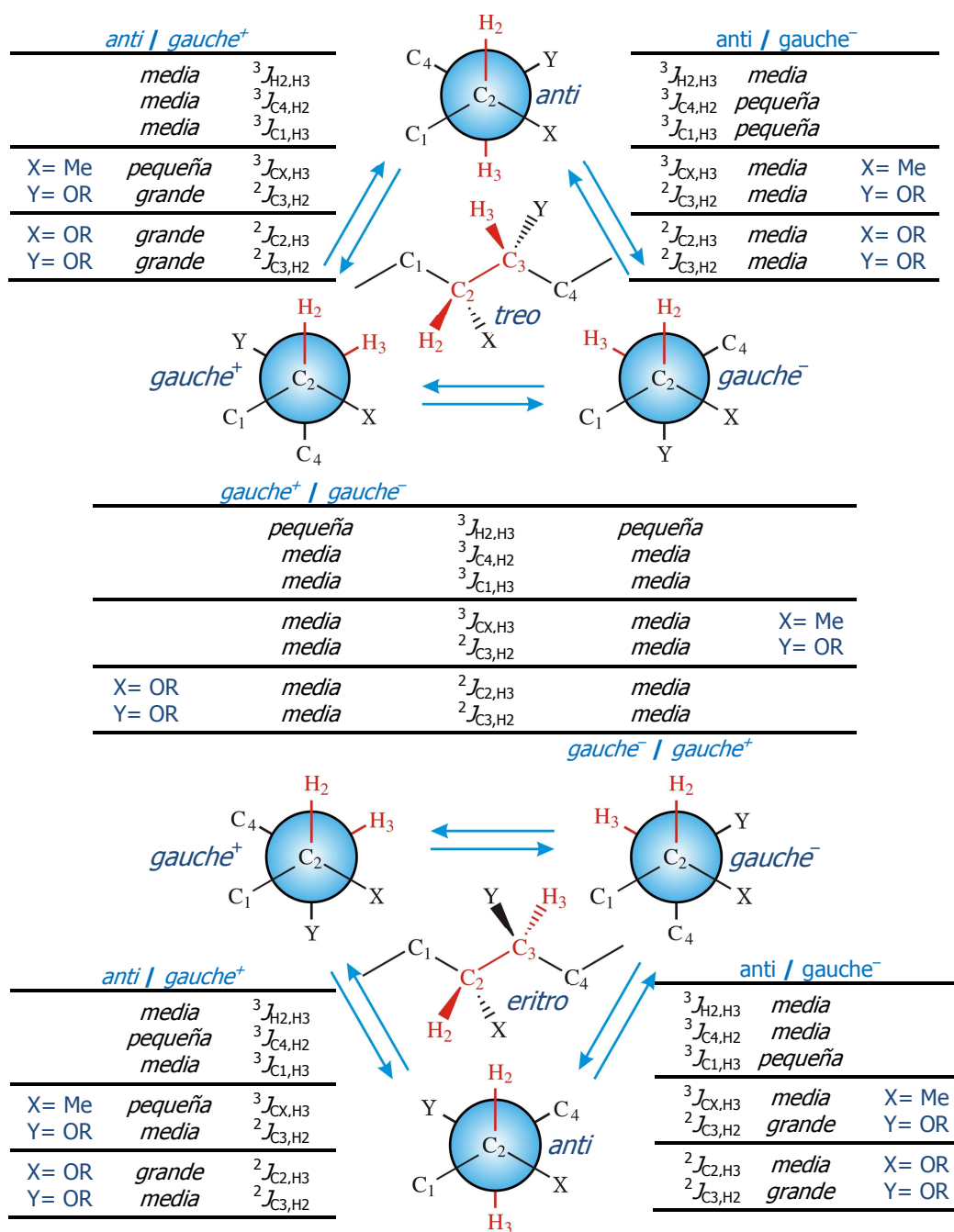


Figura 33. Análisis configuracional de sistemas en equilibrio conformacional a través de las constantes de acoplamiento.

La aplicación del método de Murata requiere una precisa determinación de las constantes de acoplamiento protón—protón y carbono—protón. Aunque las constantes ${}^3J_{\text{H-H}}$ se pueden extraer del espectro de RMN ${}^1\text{H}$, esto puede ser difícil cuando la señal está parcial o totalmente solapada. En estos casos es necesario recurrir a otros experimentos. El J -resuelto es un experimento que incluye los desplazamientos químicos de RMN ${}^1\text{H}$ en la F2 y las constantes de acoplamiento (en Hz) en F1 (**Figura 34**). Otra alternativa para establecer las constantes de acoplamiento protón—protón es el TOCSY-1D, el cual consiste en excitar un núcleo específico, el resultado es un espectro 1D en el cual aparece el sistema de espines al que pertenece el núcleo irradiado. También fueron utilizados experimentos de desacoplamiento homonuclear (desacoplamiento selectivo). Esta metodología se basa en saturar a la frecuencia de un protón para desacoplarlo, esto permite simplificar señales complejas y por tanto ayuda a establecer las constantes de acoplamiento en multipletes.

Por otro lado, el avance de las técnicas bidimensionales de resonancia magnética nuclear y el desarrollo de secuencias de pulsos con gradiente de campo magnético (PFG) han permitido desarrollar varios métodos prácticos para medir las constantes heteronucleares (${}^{2,3}J_{\text{C-H}}$).

Una de las técnicas más utilizadas para determinar los acoplamientos heteronucleares es el HSQC-HECADE. En términos generales, este experimento es muy similar a un espectro de HSQC—TOCSY en el que evoluciona el acoplamiento carbono—protón. Así, la distancia en F2 (δ_{H}) representa la magnitud de las constantes de acoplamiento ${}^{2,3}J_{\text{C-H}}$, mientras que la distancia en F1 es debida al acoplamiento ${}^1J_{\text{C-H}}$. Además, el HECADE aporta información sobre el signo de las constantes de acoplamiento, en este caso 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), esto 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 HSQMBC y J -HMBC; sin embargo, tienen la desventaja de ser menos sensibles y de no informar del signo de la constante (**Figura 34**).

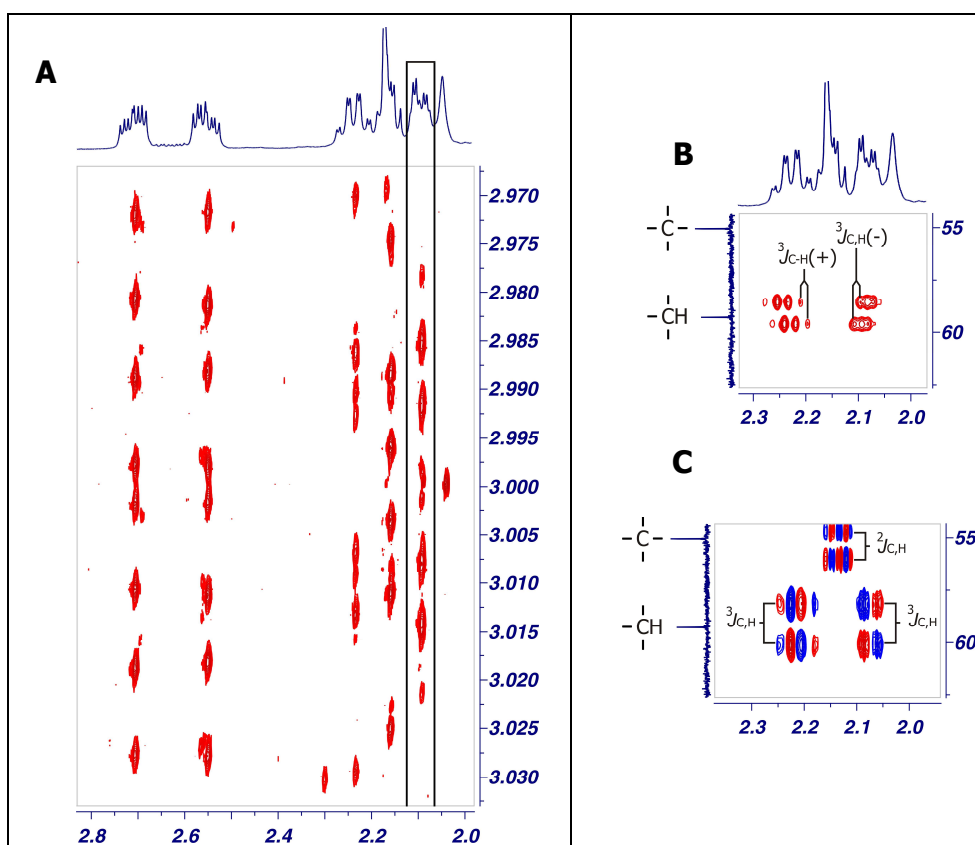


Figura 34. Medición de las constantes de acoplamiento protón—protón y carbono—protón por RMN. (A). ^1H — ^1H J -resuelto. (B). ^{13}C — ^1H HSQC-HECADE. (C). ^{13}C — ^1H JHMBC.

Las medidas de las constantes de acoplamiento del sistema C-14/C-15 de la yucatecona **62** fueron establecidas usando algunos de los experimentos de RMN citados anteriormente (**Figuras 35 y 36**). Así, los valores *medios* de las constante vecinal $^3J_{\text{H-14-H-15}}$ (4.6 Hz), $^3J_{\text{C-28-H-14}}$ (3.8 Hz) y $^3J_{\text{C-13-H-15}}$ (3.3 Hz) sugieren la existencia de un equilibrio conformacional *anti-gauche* con

configuración *eritro*, lo cual es consistente con los valores de las constantes $^3J_{C-16-H-14}$ (2.2 Hz) y $^2J_{C-14-H-15}$ (-4.8 Hz) que indica además que estos diedros se encuentra en disposición *gauche* en los dos rotámeros. De este modo, se concluye que la configuración relativa de este sistema es $14S^*$ y $15R^*$ (**Figura 37**).

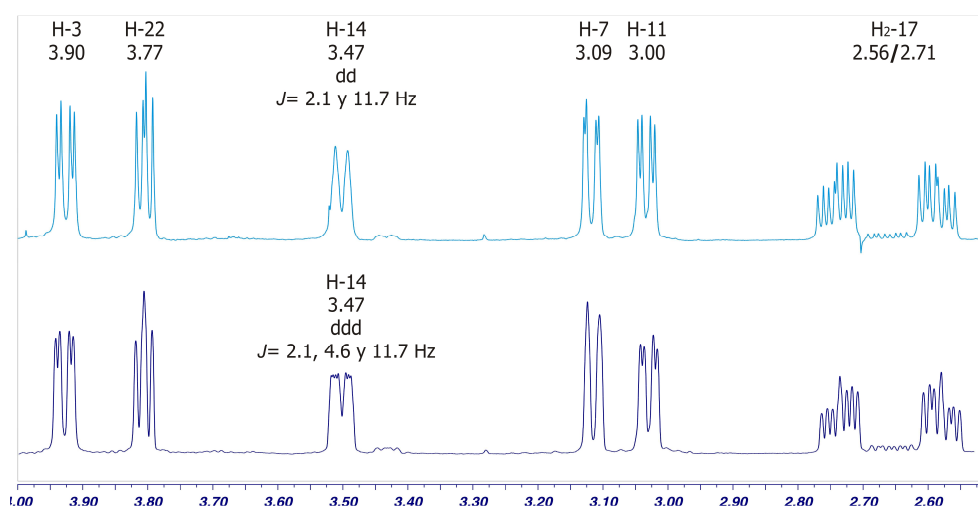


Figura 35. Medición de la constante de acoplamiento $^3J_{H-14-H-15}$ de la yucatecona **62**. Espectro de RMN 1H con desacoplamiento del protón H-15 (**arriba**) y espectro de RMN 1H (**abajo**).

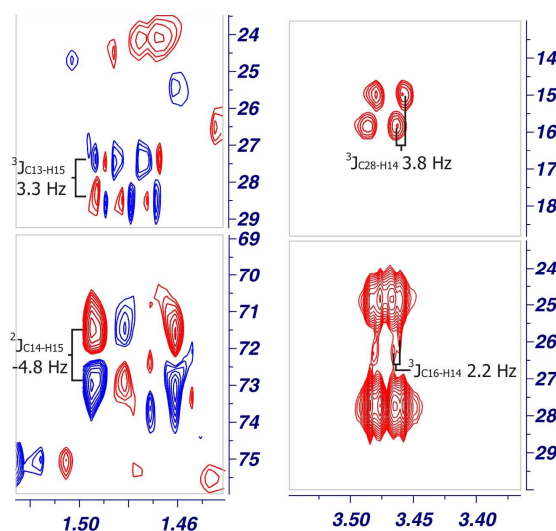


Figura 36. Secciones de los espectros JHMBC (**izquierda**) y HECADÉ (**derecha**) de la yucatecona **62**.

	<i>treo</i>		<i>eritro</i>		
	<i>anti/gauche⁺</i>	<i>anti/gauche⁻</i>	<i>gauche⁺/gauche⁻</i>	<i>anti/gauche⁺</i>	<i>anti/gauche⁻</i>
$^3J_{H14,H15}$	<i>media</i>	<i>media</i>	<i>pequeña</i>	<i>media</i>	<i>media</i>
$^3J_{C13,H15}$	<i>media</i>	<i>pequeña</i>	<i>media</i>	<i>pequeña</i>	<i>media</i>
$^3J_{C16,H14}$	<i>media</i>	<i>pequeña</i>	<i>media</i>	<i>media</i>	<i>pequeña</i>
$^3J_{C28,H14}$	<i>pequeña</i>	<i>media</i>	<i>media</i>	<i>pequeña</i>	<i>media</i>
$^2J_{C14,H15}$	<i>grande</i>	<i>media</i>	<i>media</i>	<i>media</i>	<i>grande</i>

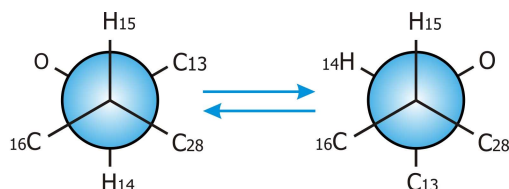
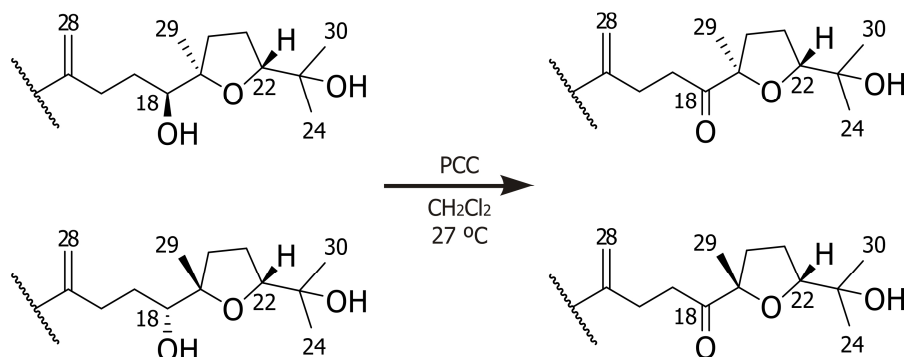


Figura 37. Determinación de la estereoquímica relativa del sistema C-14/C-15 de la yucatecona **62**.

Para establecer si la yucatecona **62** pertenece a la serie del tirsiferol o del venustatriol, se trató una muestra de dehidrotirsiferol **2** y dehidrovenustatriol **15** con clorocromato de piridinio en CH_2Cl_2 anhidro obteniéndose los compuestos 18-cetodehidrotirsiferol **63** y 18-cetodehidrovenustatriol **64**. El análisis de los datos espectroscópicos del segmento C-18—C-24 de la yucatecona **62** resultó ser equivalente al del 18-cetodehidrotirsiferol **63**, quedando así establecida la estereoquímica de los centros C-19 y C-22 como R^* en ambos casos (**Esquema 6**).



Esquema 6. Oxidación del dehidrotirsiferol **2** y dehidrovenustatriol **15**.

11.3.10. Saiyacenol A **65** y B **66**

La fórmula molecular del saiyacenol A **65**, $C_{30}H_{51}O_6Br$ fue establecida por ESI-HRMS. El análisis de su espectro de RMM 1H reveló que este compuesto al igual que los metabolitos anteriores no posee los protones metilénicos H₂-28 característicos de **2** (**Figura 38** y **Figura 92**).

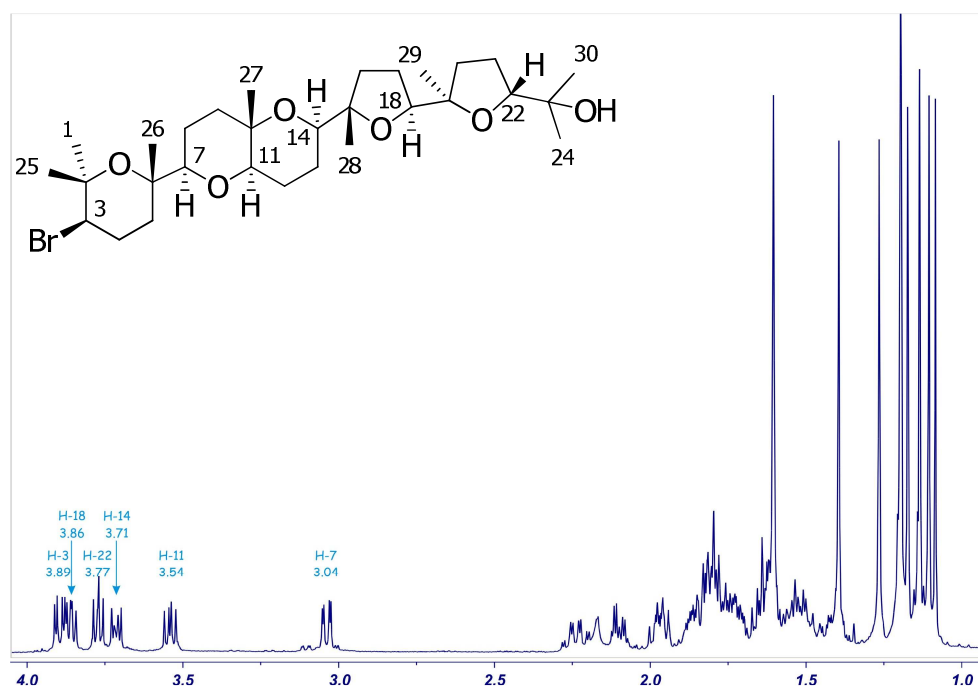


Figura 38. Espectro de RMN 1H del saiyacenol A **65** en $CDCl_3$ (600 MHz).

La comparación de los espectros de RMN 2D del saiyacenol A **65** y del dehidrotirsiferol **2**, nos permitió identificar como equivalentes las porciones C-1—C-14 y C-19—C-24 de estos compuestos (**Figura 39** y **Figura 93**). Además, el saiyacenol A **65** mostró otro grupo de señales, atribuibles a un metilo, dos metilenos, un metino y un carbono cuaternario, cuya localización parecía estar en el segmento C-15—C-18 (**Tabla 12**).

La asignación de los desplazamientos químicos de los protones en el segmento C-15—C-18 se inició convenientemente con el metino H-18 (δ_{H} 3.86, dd, $J = 6.0$ y 8.4 Hz), que se acopla al metileno H₂-17 (δ_{H} 1.66/1.86), y estos a su vez con los protones H₂-16 (δ_{H} 1.64/1.96).

Los sistemas de espines ^1H — ^1H obtenidos del COSY fueron conectados entre sí a través de las correlaciones observadas en el HMBC estableciendo así la secuencia observada en la **Figura 39**. La presencia del anillo oxolano entre C-15 y C-18 se estableció a partir de la correlación que posee el protón H-18 con el carbono C-15 (δ_{C} 84.6) (**Figura 39**).

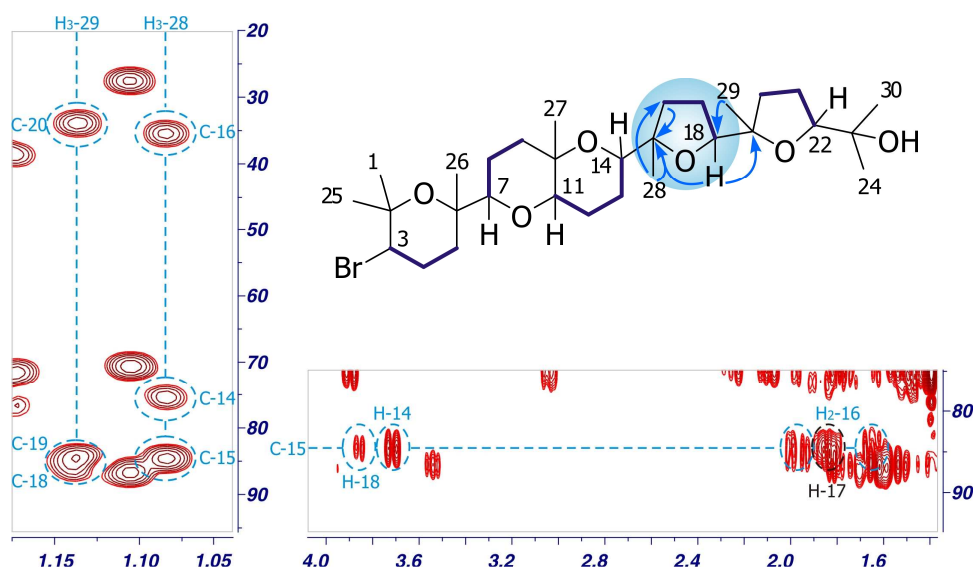


Figura 39. Secciones más importantes del HMBC y estructura plana del saiyacenol A **65**. (—) Correlaciones COSY. (H→C) Correlaciones HMBC.

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	30.9	1.27 (3H)	s	
2	74.9			
3	59.1	3.89	dd	4.1;12.3
4	28.1	(α)2.10/2.24(β)		
5	36.9	(α)1.53/1.81(β)		
6	74.4			
7	86.6	3.04	dd	2.5;11.4
8	23.0	(β)1.41/1.73(α)		
9	38.4	(α)1.55/1.75(β)		
10	71.4			
11	76.6	3.54	dd	7.3;11.1
12	21.3	(β)1.49/1.87(α)		
13	21.5	1.78 (2H)		
14	75.3	3.71	dd	4.3;11.0
15	84.6			
16	35.3	1.64/1.96		
17	27.7	1.66/1.86		
18	85.9	3.86	dd	6.0;8.4
19	84.6			
20	34.0	1.60/1.97		
21	26.6	1.81 (2H)		
22	86.8	3.77	dd	6.8;8.6
23	70.5			
24	24.0	1.11 (3H)	s	
25	23.7	1.39 (3H)	s	
26	20.1	1.20 (3H)	s	
27	21.2	1.17 (3H)	s	
28	21.6	1.09 (3H)	s	
29	23.7	1.14 (3H)	s	
30	27.6	1.21 (3H)	s	

Tabla 12. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del saiyacenol A **65**.

El espectro de masas del saiyaceno B **66** resultó ser idéntico al del saiyaceno A **65**. El análisis de los espectros COSY, HSQC y HMBC, confirmó que estos compuestos comparten la misma estructura plana (**Figura 40**). Sin embargo, se observaron diferencias en los desplazamientos químicos de los átomos que forman el anillo oxolano (C-15—C-18). Así, en el saiyaceno B **66** aparecen los desplazamientos químicos de los carbonos C-16 y C-18 a δ_c 33.5 y 83.9, respectivamente (**Tabla 13**).

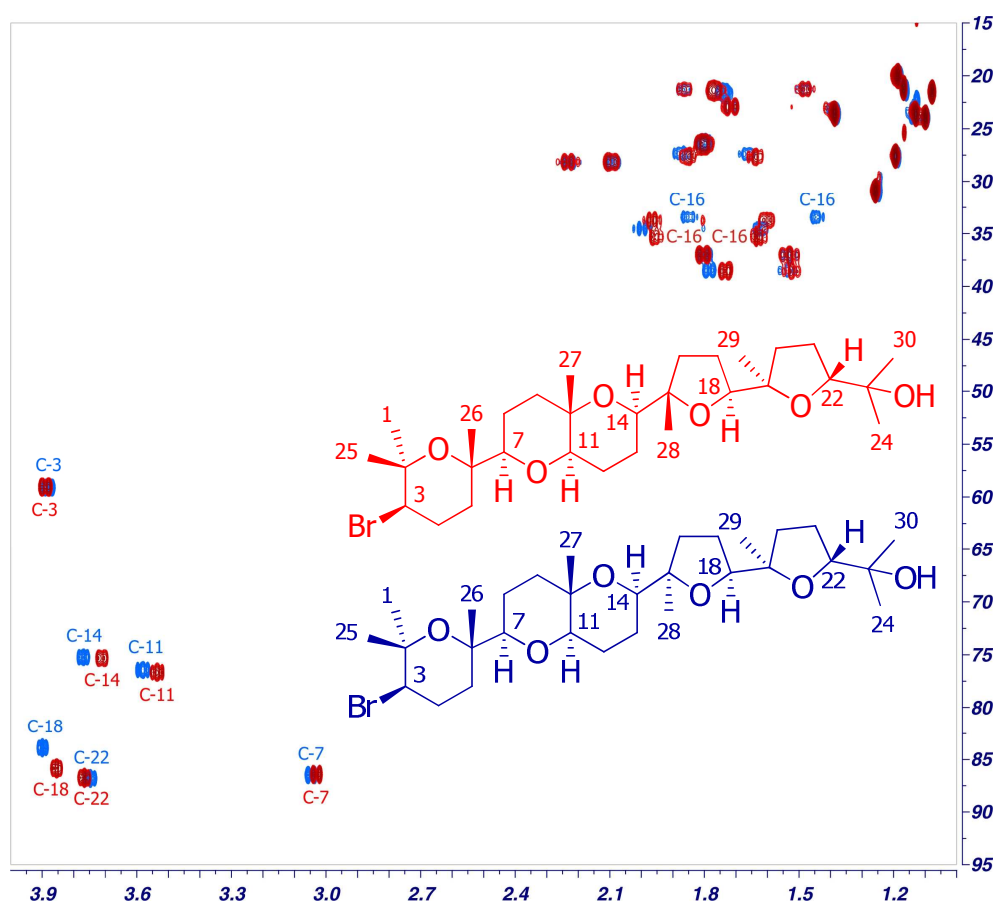


Figura 40. Superposición de los espectros HSQC del saiyaceno A **65** (Rojo) y saiyaceno B **66** (Azul).

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	31.0	1.26 (3H)	s	
2	74.9			
3	59.1	3.88	dd	4.3;12.4
4	28.2	(α)2.10/2.24(β)		
5	37.0	(α)1.54/1.80(β)		
6	74.3			
7	86.4	3.06	dd	2.2;11.3
8	22.9	(β)1.40/1.73(α)		
9	38.5	(α)1.55/1.78(β)		
10	71.4			
11	76.4	3.59	dd	7.4;11.2
12	21.3	(β)1.49/1.88(α)		
13	21.6	1.76 (2H)		
14	75.2	3.78	dd	6.4;9.3
15	84.5			
16	33.5	1.45/1.86		
17	27.4	1.65/1.88		
18	83.9	3.90	dd	5.9;8.0
19	84.7			
20	34.6	1.62/2.02		
21	26.3	1.82 (2H)		
22	86.8	3.76	t	7.9
23	70.5			
24	24.0	1.11 (3H)	s	
25	23.5	1.39 (3H)	s	
26	20.1	1.20 (3H)	s	
27	21.3	1.17 (3H)	s	
28	22.4	1.14 (3H)	s	
29	23.6	1.16 (3H)	s	
30	27.7	1.20 (3H)	s	

Tabla 13. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del saiyacenol B **66**.

El análisis de las correlaciones dipolares que muestran los respectivos espectros NOESY del saiyacenol A **65** y B **66**, permitió establecer que la estereoquímica de los centros C-3, C-6, C-7, C-10, C-11 y C-14 en ambos compuestos es equivalente a la del dehidrotirsiferol **2**.

Como ya se ha mencionado, a diferencia de los anillos saturados de seis miembros que tienen un comportamiento conformacional predecible, los anillos saturados de cinco miembros adoptan un gran número de conformaciones. Este equilibrio conformacional hace que el análisis de las correlaciones dipolares en muchos casos conlleven a errores. Pese a ello, en una primera aproximación las correlaciones dipolares de las parejas de protones H₃-28/H-18 y H₃-29/H-22 de **65** y **66**, indicaron que en el saiyacenol A **65** los dos anillos oxolanos tienen una disposición *trans-trans*, mientras que en el saiyacenol B **66** presenta una disposición *cis-trans*.

Así, los datos espectroscópicos de RMN del segmento C-15—C-24 del saiyacenol A **65** resultaron ser muy similares a los de un triol sintetizado por Morimoto y *col.* en 2007, compuesto **67**.²⁷ Asimismo, los datos del saiyacenol B **66** resultaron ser prácticamente equivalentes a los del compuesto **47**, semisintetizado por el mismo Morimoto en 2008 (pág. 18).²⁵ Esta equivalencia espectroscópica permitió proponer la configuración relativa de los centros 15, 18, 19 y 22 del saiyacenol A **65** como *S*^{*}, *S*^{*}, *R*^{*} y *R*^{*} y del saiyacenol B **66** como *R*^{*}, *S*^{*}, *R*^{*} y *R*^{*} (**Figura 41**).

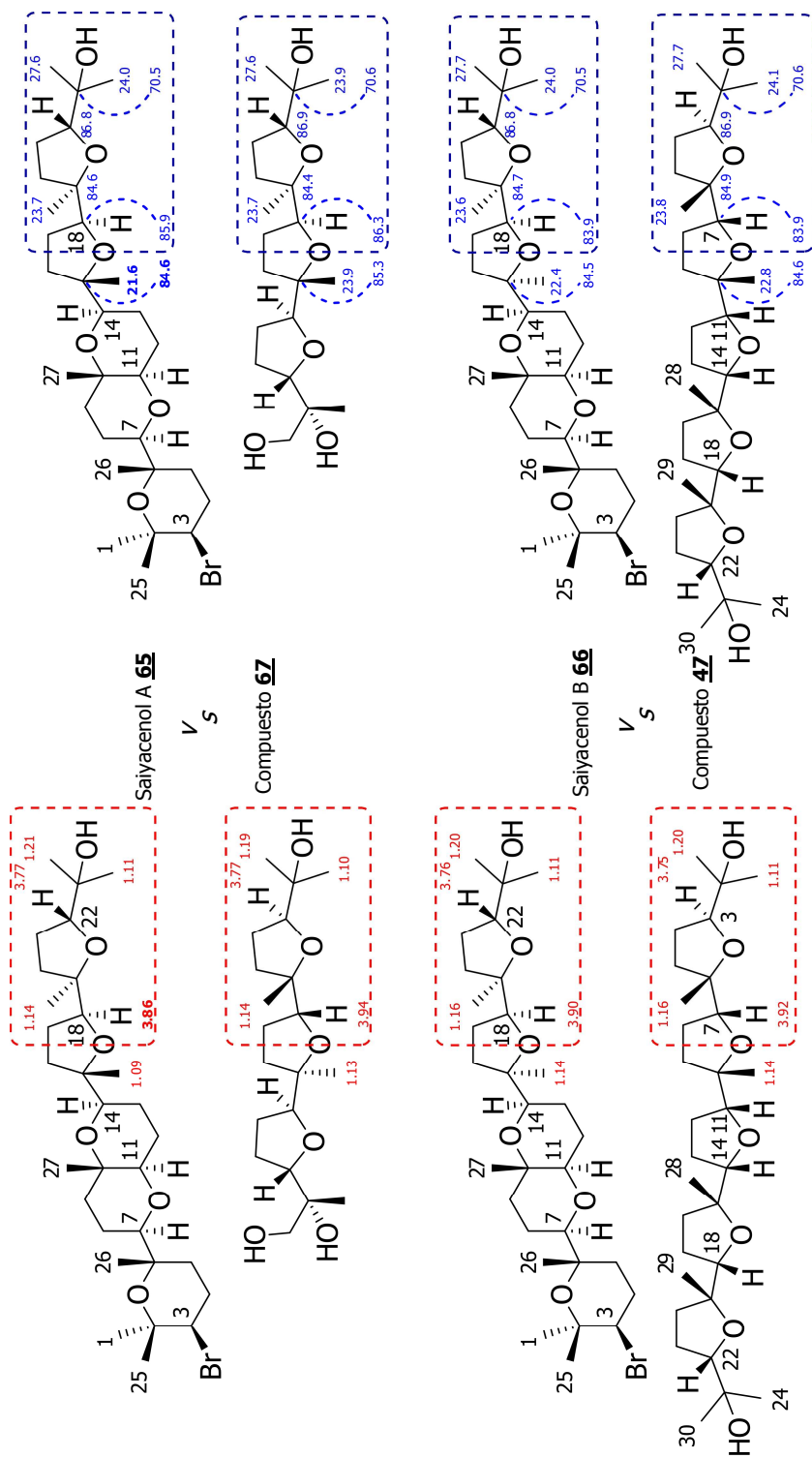


Figura 41. Comparación de los datos espectroscópicos de RMN del saiyacenol A y B **65** y **66** con los compuestos **67** y **47**.

1. Los desplazamientos químicos de RMN ^1H se muestran en color rojo, mientras que los de RMN ^{13}C se muestran en azul.
2. Los desplazamientos de RMN ^1H para los compuestos de origen natural se muestran en negritas cuando $|\Delta\delta| > 0.04$ ppm con respecto a los compuestos de síntesis.
3. Los desplazamientos de RMN ^{13}C para los compuestos de origen natural se muestran en negritas cuando $|\Delta\delta| > 0.50$ ppm con respecto a los compuestos de síntesis.

El segmento C-14/C-15 del saiyacenol A **65** y B **66** es un sistema adecuado para analizar a través de la extensión del método de Murata descrita por Bifulco y *col.*⁴¹ Este método compara los valores experimentales de las constantes de acoplamiento con aquellos obtenidos a partir de cálculos de mecánica cuántica (MC).

Es importante mencionar que el uso de las constantes de acoplamiento en la resolución de problemas estereoquímicos se ha visto restringido al estudio de motivos estructurales en donde los centros estereogénicos poseen una constante de acoplamiento vecinal $^1\text{H}-^1\text{H}$. Sin embargo, en los casos donde uno de los centros es cuaternario se complica el análisis, debido a que los métodos actuales para medir constantes de acoplamiento en sistemas sin espines adyacentes $^1\text{H}-^1\text{H}$ son poco sensibles, y en muchos casos difíciles de interpretar.

Por este motivo, en la literatura encontramos pocos casos que describan el uso de constantes de acoplamiento escalar en el análisis de la estereoquímica de sistemas que contengan un carbono cuaternario sp^3 .⁴²

Así, a partir del análisis de los experimentos HSQMBC y J -HMBC, se establecieron las constantes de acoplamiento de la pareja C-14/C-15 saiyacenol A **65** como $^3J_{\text{C-28-H-14}}$ 3.5, $^3J_{\text{C-16-H-14}}$ 2.2 y $^2J_{\text{C-15-H-14}}$ |3.1| y para el saiyacenol B **66** como $^3J_{\text{C-28-H-14}}$ 3.5, $^3J_{\text{C-16-H-14}}$ 2.0 y $^2J_{\text{C-15-H-14}}$ |3.0| (**Figura 42**).

⁴¹ G. Bifulco, P. Dambruoso, L. Gomez-Paloma y R. Riccio. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 3744.

⁴² S. Di Micco, M. G. Chini, R. Riccio y G. Bifulco, *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, *8*, 1411.

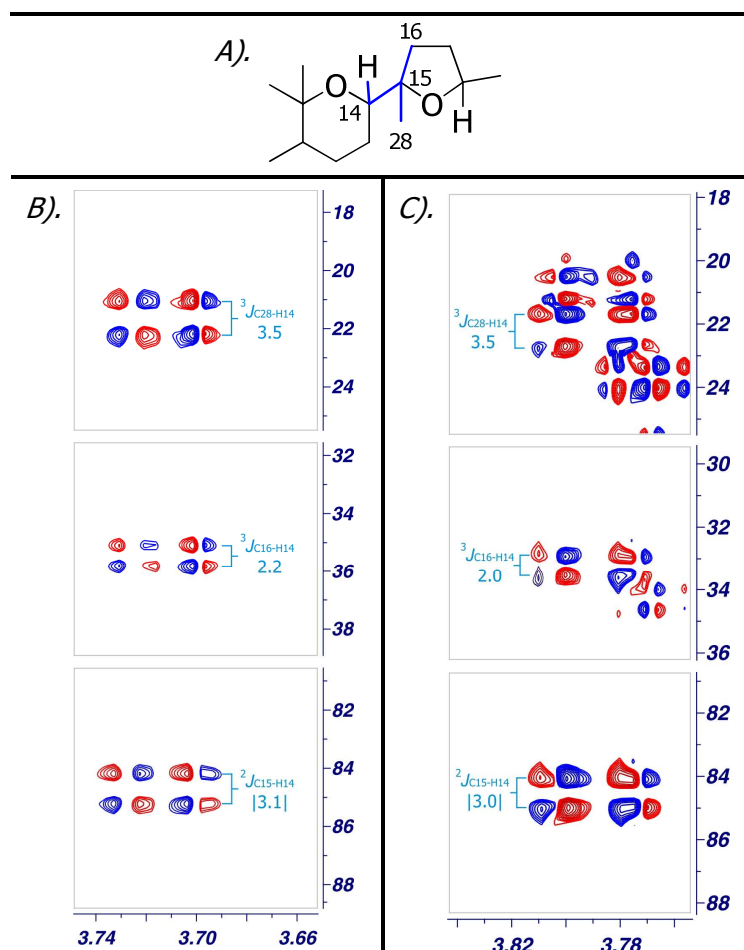


Figura 42. **A).** Modelo simplificado del sistema C-14/C-15. **B).** Sección del espectro JHMBC del saiyacenol A **65**, indicando los valores de las $^{2,3}J_{C-H}$. **C).** Sección del espectro JHMBC del saiyacenol B **66**, indicando los valores de las $^{2,3}J_{C-H}$.

Siguiendo con la estrategia basada en el cálculo de las constantes de acoplamiento por M C para determinar la configuración relativa de centros estereogénicos adyacentes, examinamos las posibles disposiciones relativas de un fragmento de la estructura (anillos **C** y **D**) (**Figura 42**). En dicho fragmento estudiamos los rotámeros *g+*, *anti* y *g-* de los diastereoisómeros *eritro* y *treo*. Cada uno de los seis conformeros, tres para el *eritro* y tres para el *treo*, fueron optimizados con el nivel de teoría MPW1PW91 y la base 6-31G(d,p) (**Tabla 14**).


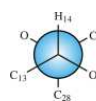
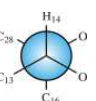
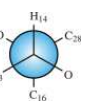
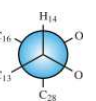
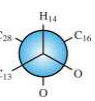
	Calculado						Exp.
	<i>eritro</i>			<i>treo</i>			
	<i>g+</i>	<i>anti</i>	<i>g-</i>	<i>g+</i>	<i>anti</i>	<i>g-</i>	
							
Saiyacenol A							
$^3J_{C28-H14}$	1.2	4.1	1.3	2.5	3.5	0.5	3.5
$^3J_{C16-H14}$	0.6	2.4	3.6	3.3	1.9	1.1	2.2
$^2J_{C15-H14}$	1.8	-1.8	-2.3	-2.2	-1.4	2.4	3.1
TAD	8.8	1.8	4.4	3.0	2.1	9.6	
Saiyacenol B							
$^3J_{C28-H14}$	1.2	4.1	1.3	2.5	3.5	0.5	3.5
$^3J_{C16-H14}$	0.6	2.4	3.6	3.3	1.9	1.1	2.0
$^2J_{C15-H14}$	1.8	-1.8	-2.3	-2.2	-1.4	2.4	3.0
TAD	5.0	5.9	9.3	7.6	4.6	4.6	

Tabla 14. Cálculo de las $^nJ_{C-H}$ para los seis conformeros del saiyacenol A **65** y B **66**. [MPW1PW91/6-31G(d,p) (cloroformo)]. Las orientaciones de los conformeros se basan en los ángulos diedros entre CH_3-28 y $H-14$. En negritas se muestran los valores más bajos del TAD, dichos valores fueron calculados asumiendo que la constante $^2J_{C15-H14}$ tiene un valor negativo en ambos casos.

En la **Tabla 14** se muestran las constantes de acoplamiento calculadas de los seis posibles conformeros en comparación con los datos experimentales. La poca correlación entre las constantes de acoplamiento experimentales y las obtenidas a partir de métodos *ab initio*, según el análisis de los valores de error absoluto $\sum |J_{cal.} - J_{exp.}|$ (Valor de la Desviación Total Absoluta, TAD), nos sugirió que tanto el saiyacenol A **65** como el B **66** podrían estar en un equilibrio conformacional.

Si bien la ampliación del método de Murata que analiza motivos con equilibrio conformacional no fue desarrollada para este tipo de sistemas, es indudable que los motivos estructurales que presentan un carbono cuaternario sp^3 deben mostrar un comportamiento similar. Así, de acuerdo con esta aproximación (ver pág. 72), los valores de las constantes de acoplamiento del saiyacenol A **65** $^3J_{C-28-H-14}$ 3.5, $^3J_{C-16-H-14}$ 2.2 y $^2J_{C-15-H-14}$ -3.1 y del saiyacenol B **66** $^3J_{C-28-H-14}$ 3.5, $^3J_{C-16-H-14}$ 2.0 y $^2J_{C-15-H-14}$ -3.0 sugieren la existencia de un equilibrio conformacional *anti-gauche* (**Figura 43**). Estos equilibrios

conformacionales explican los valores de las constantes de acoplamiento observados en el saiyacenol A **65** y B **66**. Sin embargo, cuando estos sistemas se encuentran en equilibrio, no es posible establecer su estereoquímica relativa debido a que el número de constantes de acoplamiento que se pueden medir en estos motivos (tres constantes) son insuficientes para establecer un patrón de diferenciación (**Figura 43**).

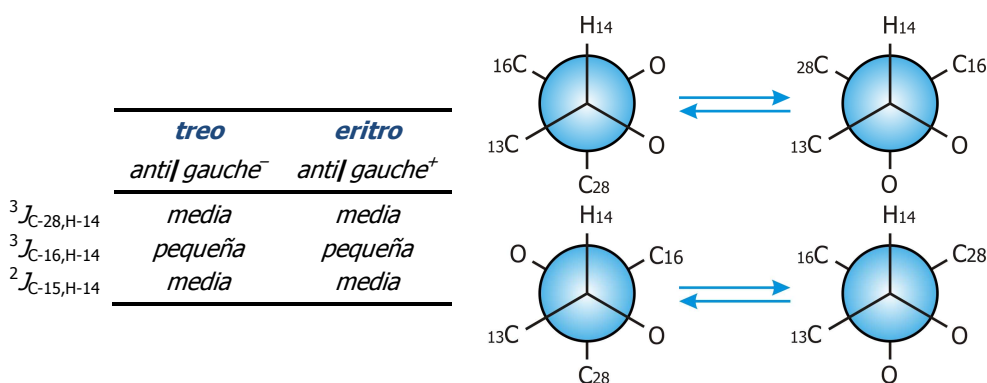


Figura 43. Equilibrio conformacional *treo anti-gauche⁻* (arriba) y *eritro anti-gauche⁺* (abajo).

Por todo lo anterior, se decidió abordar el estudio de la configuración relativa del sistema C-14/C-15 en el saiyacenol A **65** y B **66** por correlación química. Así, al tratar una muestra de dehidrotirsiferol **2** con trazas de ácido trifluoroacético (CF₃CO₂H) en cloroformo dio lugar a dos compuestos isoméricos, cuyos espectros de RMN ¹H y ¹³C resultaron ser respectivamente idénticos a los del saiyacenol A **65** y el saiyacenol B **66** (**Figura 44** y **Esquema 7**). De este modo, al asumir la configuración relativa de C-18 como *S*^{*}, se pudo establecer la configuración relativa de C-15 en el saiyacenol B **66** como *S*^{*} por la correlación dipolar que presentan los protones H₃-28 (δ_H 1.14) y H-18 (δ_H 3.90), mientras que la ausencia de esta correlación en el saiyacenol A **65** estableció la estereoquímica relativa de C-15 como *R*^{*}.

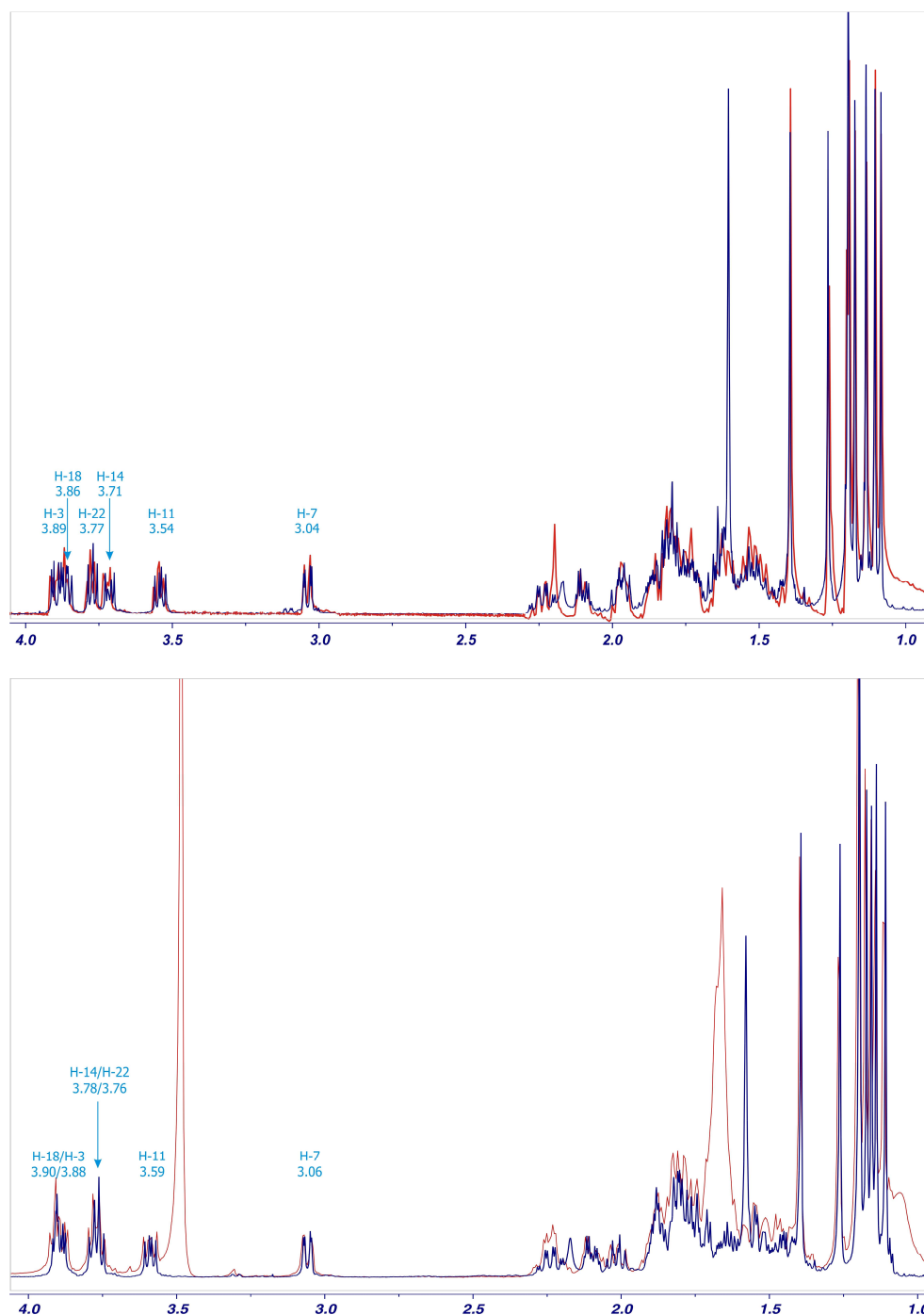
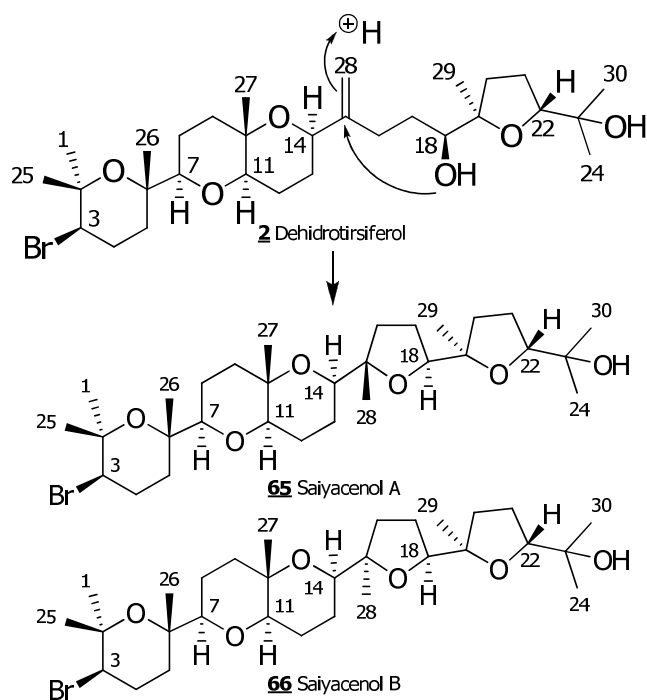


Figura 44. Arriba: Comparación de los espectros de RMN ^1H del saiyaceno A **65**. Abajo: Comparación de los espectros de RMN ^1H del saiyaceno B **66**. En azul se muestra el espectro de origen natural y en rojo el obtenido por semi-síntesis a partir del dehidrotirsiferol **2**.



Esquema 7. Obtención del saiyacenol A **65** y B **66** a partir del dehidrotirsiferol **2**.

II.3.11. Adejeno A 68 y Adejeno B 69

La elucidación estructural de los adejenos A 68 y B 69 fue un poco menos problemática, ya que se trata de dos moléculas que poseen un espectro de RMN ^1H y ^{13}C que nos recuerda a las señales de los sistemas anillos **A**, **B** y **C** del 15-dehidrotirsenol A 60 (**Figura 45** y **46**). Esta observación quedó reforzada por los fraccionamientos observados en sus espectros de masas. Debido a que estos dos compuestos no poseen cadena acíclica, decidimos agruparlos dentro del grupo de compuestos que poseen modificaciones en la parte acíclica respecto al dehidrotirsiferol 2.

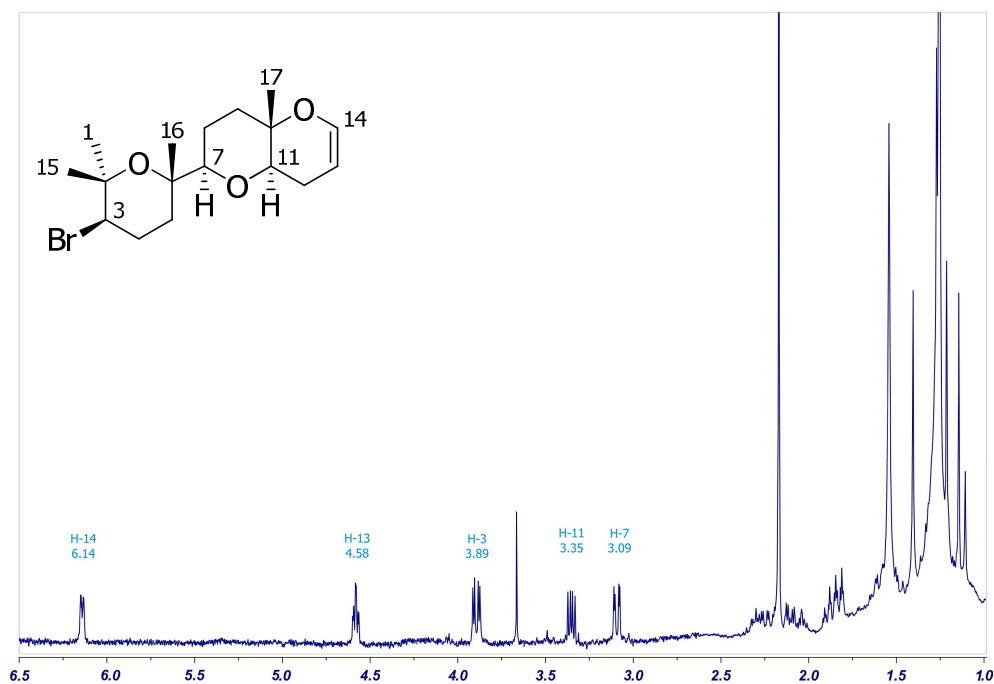


Figura 45. Espectro de RMN ^1H del adejeno A 68 en CDCl_3 (600 MHz).

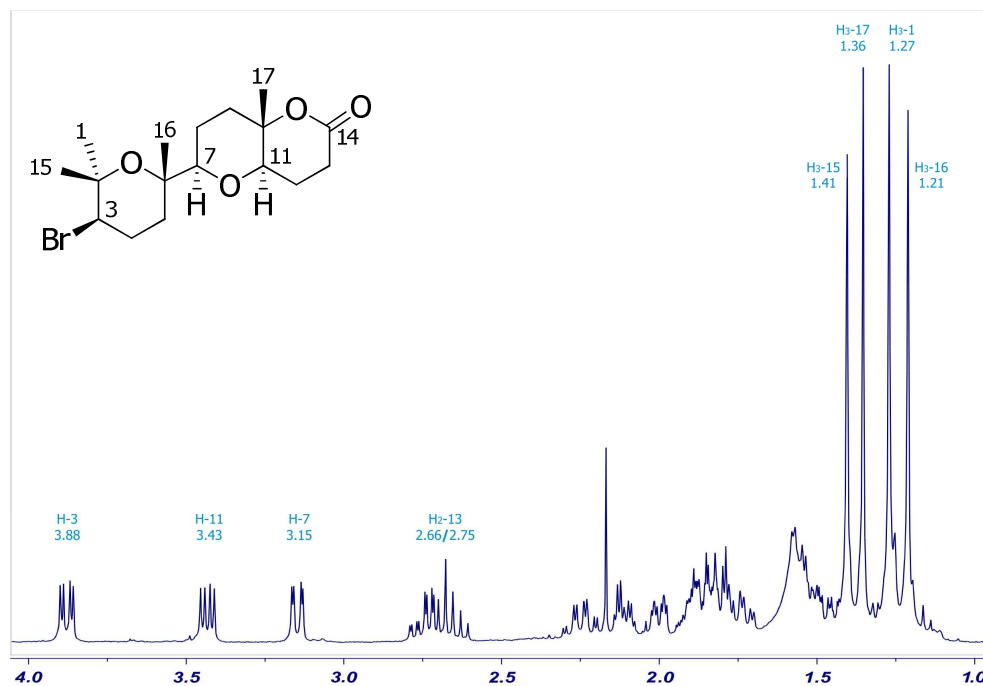


Figura 46. Espectro de RMN ^1H del adejeno B **69** en CDCl_3 (600 MHz).

Ambos compuestos mostraron el mismo sistema de anillos **A** y **B**, mientras que las únicas diferencias destacables comienzan a partir del metino correspondiente al carbono C-12. En el adejeno A **68**, el espectro COSY reveló un acoplamiento entre el protón del metino H-11 (δ_{H} 3.35, dd, $J = 5.8$ y 10.6 Hz) y la señal del metileno alílico H₂-12 (δ_{H} 1.88/2.04), que a su vez se acopló al protón olefínico H-13 (δ_{H} 4.58, ddd, $J = 2.0$, 5.8 y 5.8 Hz), el cual se encuentra formando un sistema *Z* olefínico con H-14 (δ_{H} 6.14, ddd, $J = 1.4$, 2.6 y 5.8 Hz) (**Tabla 15**). Además, el desplazamiento químico característico de C-13 (δ_{C} 98.1) y C-14 (δ_{C} 141.7), sumado a la correlación a través del oxígeno que presenta el protón H-14 con C-10 (δ_{C} 74.3) establecieron que este compuesto finaliza con un sistema de dihidropirano en el anillo **C**.

Elucidación estructural

F.C.P

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.4	1.27 (3H)	s	
2	75.4			
3	59.4	3.89	dd	4.1;12.3
4	28.8	(α)2.11/2.25(β)		
5	37.5	(α)1.53/1.83(β)		
6	74.6			
7	86.8	3.09	dd	2.5;11.4
8	23.3	(β)1.51/1.83(α)		
9	36.9	(α)1.61/1.89(β)	m/ddd	m/3.1;3.9;12.4
10	74.3			
11	77.2	3.35	dd	5.8;10.6
12	24.5	(β)1.88/2.04(α)		
13	98.1	4.58	ddd	2.0;5.8;5.8
14	141.7	6.14	d	1.4;2.6; 5.8
15	24.1	1.41 (3H)	s	
16	20.3	1.21 (3H)	s	
17	15.9	1.14 (3H)	s	

Tabla 15. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del adejeno A **68**.

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	30.9	1.27 (3H)	s	
2	75.1			
3	58.5	3.88	dd	4.1;12.4
4	28.1	(α)2.11/2.25(β)	dddd/dddd	4.1;4.1;4.3;13.6/3.9;12.4;13.4;13.6
5	36.9	(α)1.54/1.81(β)	ddd/ddd	4.3;13.4;13.7/3.9;4.1;13.7
6	74.1			
7	86.7	3.15	dd	2.5;11.6
8	22.4	(β)1.47/1.88(α)	ddd/ddd	2.5;4.1;11.8/11.6;11.8;13.1
9	36.7	(α)1.74/1.99(β)	ddd/ddd	4.7;12.4;13.1/3.0;4.1;12.4
10	78.7			
11	76.5	3.43	dd	5.4;12.1
12	21.6	1.80/1.90	dddd/dddd	9.0;9.2;12.1/2.3;5.4;9.0
13	28.1	2.66/2.75	ddd/ddd	9.2,9.2;19.1/2.3;9.0;19.1
14	170.2			
15	23.6	1.41 (3H)	s	
16	20.0	1.21 (3H)	s	
17	19.3	1.36 (3H)	s	

Tabla 16. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C de la adejeno B **69**.

Un análisis similar para el adejeno B **69** reveló que el protón H-11 (δ_{H} 3.43, dd, $J = 5.4$ y 12.1 Hz) se conecta con los protones H₂-12 (δ_{H} 1.80/1.91) y estos a su vez con los protones metilénicos H₂-13 (δ_{H} 2.66/2.75). Además, los protones H₂-13 mostraron una correlación en el HMBC con la señal carbonilo a δ_{C} 170.2 (C-14). Los datos anteriores sumados a la fuerte banda de absorción a 1739 cm^{-1} observada en su espectro de IR permitieron establecer el cierre del anillo **C** a través de una δ -lactona (**Tabla 16**).

Las correlaciones observadas en los espectros de ROESY fueron consistentes con las estructuras propuestas para los compuestos **68** y **69**. Con la misma estereoquímica relativa encontrada en el tirsiferol **1** y venustatriol **4**, (**Figura 47**).

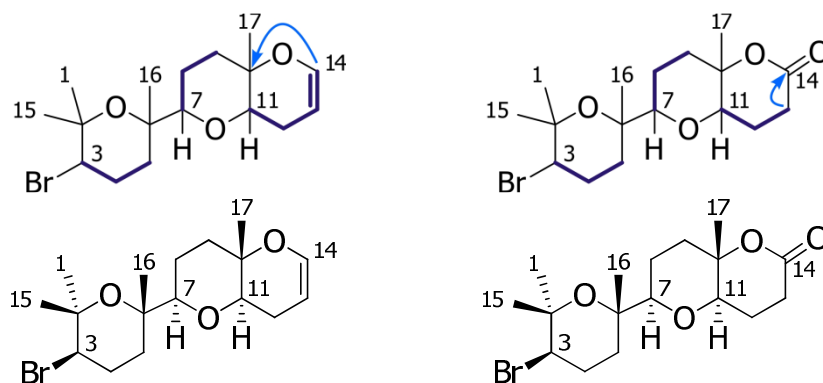


Figura 47. Estructura propuesta para el adejeno A **68** (Izquierda) y adejeno B **69** (Derecha). (—) Correlaciones COSY. (H→C) Correlaciones HMBC.

El hecho de que la estructura propuesta para la adejeno A **68** y B **69**, resultase ser similar a la de los anillos **A** y **B—C** de la series del tirsiferol y venustatriol, sugiere que estos compuestos podrían provenir de la fragmentación oxidativa de alguno de los metabolitos de sus series.

*Compuestos con modificaciones en el anillo D***II.3.12. 22-Hidroxidehidrotirsiferol 70**

La fórmula molecular del 22-hidroxidehidrotirsiferol 70, $C_{30}H_{51}O_7Br$, establecida por espectrometría de masas, indicó la presencia de un átomo más de oxígeno con respecto al dehidrotirsiferol 2. Sus espectros de RMN 1H muestran algunas diferencias que afectan especialmente los desplazamientos químicos de los protones pertenecientes al anillo oxolano terminal (**Figura 48** y **Figura 92**).

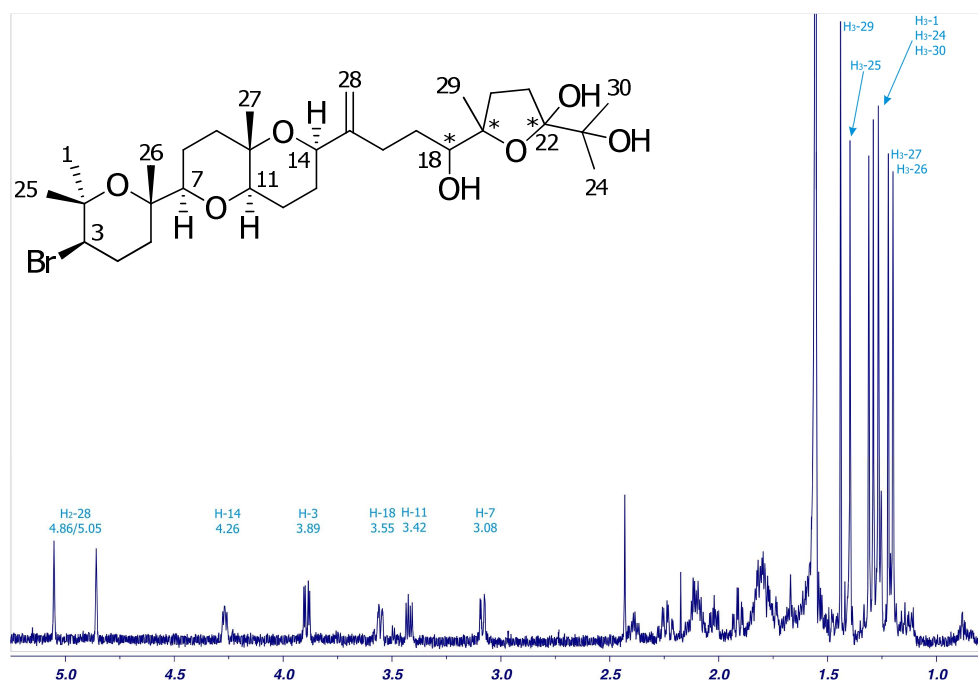


Figura 48. Espectro de RMN 1H del 22-hidroxidehidrotirsiferol 70 en $CDCl_3$ (600 MHz).

El análisis de los experimentos de RMN 2D confirmó que el nuevo compuesto posee los mismos desplazamientos químicos de RMN 1H y ^{13}C observados en los anillos **A**, **B** y **C** del dehidrotirsiferol 2, así como de la porción acíclica C-14—C-19 (**Tabla 17** y **Tabla 31**).

El análisis del experimento COSY indicó que el segmento terminal de este metabolito (anillo **D**) exhibe un sistema aislado de espines del tipo A_2BB' conformado por el acoplamiento entre los protones H₂-20 (δ_H 2.00) y H₂-21 (δ_H 1.80/1.91) (**Figura 49**).

Finalmente, las correlaciones observadas en el experimento HMBC que presentaron los protones H₂-20 (δ_H 2.00), H₃-24 (δ_H 1.29) y H₃-30 (δ_H 1.31) con el carbono C-22 a δ_C 112.5. Establecieron el cierre del anillo **D** a través del carbono hemiacetálico C-22 y localizaron un sistema isopropilo sobre el mismo C-22 (**Figura 49**).

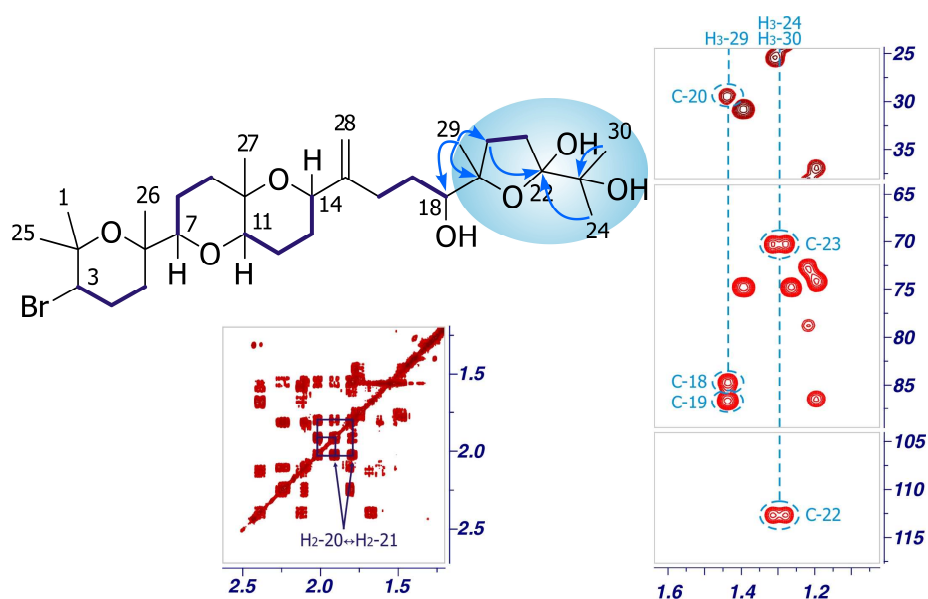


Figura 49. Estructura plana del 22-hidroxi-dehidrotirsiferol **70**. (—) Correlaciones COSY. (H→C) Correlaciones HMBC.

La pequeña diferencia en los desplazamientos químicos de RMN 1H y ^{13}C de la porción C-1—C-17 de **70** y **2**, nos sugirió que la esteoquímica relativa en esta porción es idéntica a la del dehidrotirsiferol **2** (**Tabla 17** y **Tabla 31**) lo cual es consistente con las correlaciones dipolares y las constantes de acoplamiento registradas para el 22-hidroxi-dehidrotirsiferol **70**. Sin embargo,

la estereoquímica relativa de los centros C-18, C-19 y C-22 no pudo ser determinada.

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	31.0	1.27 (3H)	s	
2	74.7			
3	59.0	3.89	dd	3.9;12.5
4	28.2	(α)2.11/2.25(β)		
5	36.9	(α)1.52/1.81(β)		
6	74.3			
7	86.4	3.08	dd	2.2;11.2
8	22.7	(β)1.47/1.75(α)		
9	38.5	(α)1.53/1.78(β)		
10	73.0			
11	78.8	3.42	dd	5.7;11.3
12	21.7	(β)1.61/1.81(α)		
13	26.6	(β)1.85/2.10(α)		
14	72.5	4.26	dd	4.4;7.4
15	151.0			
16	29.9	2.12/2.39		
17	29.5	1.57/1.68		
18	84.8	3.55	m	
19	86.9			
20	29.3	2.00 (2H)		
21	32.0	1.80/1.91		
22	112.5			
23	70.4			
24	25.2	1.29 (3H)	s	
25	23.3	1.40 (3H)	s	
26	19.7	1.20 (3H)	s	
27	19.1	1.22 (3H)	s	
28	109.4	4.86/5.05	bs/bs	
29	17.5	1.44 (3H)	s	
30	23.6	1.31 (3H)	s	

Tabla 17. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del 22-hidroxidehidrotirsiferol **70**. Singulete ancho (**bs**).

II.3.13. Piranodehidrotirsiferol 71

La fórmula molecular del piranodehidrotirsiferol **71**, $C_{30}H_{51}O_6Br$, fue deducida de su espectro de masas. La comparación de los datos de RMN 1H y ^{13}C de **71** y **2** confirmó que ambos compuestos están estrechamente relacionados y de igual forma que en el caso anterior, muestran ciertas diferencias en los desplazamientos químicos del anillo terminal (anillo **D**) (**Figura 50** y **Figura 92**).

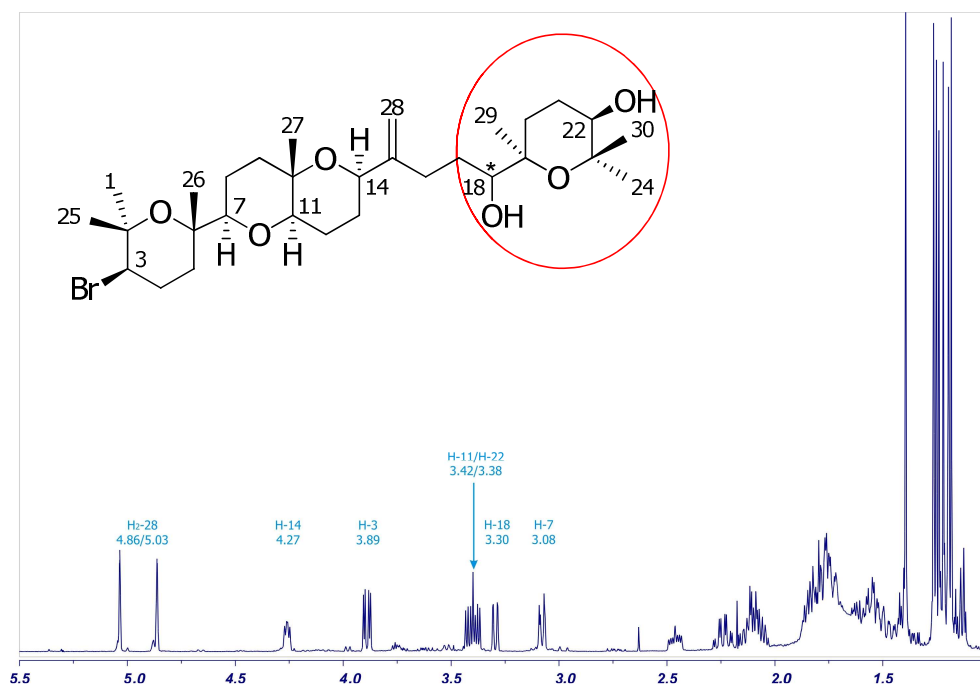


Figura 50. Espectro de RMN 1H del Piranodehidrotirsiferol **71** en $CDCl_3$ (600 MHz).

El análisis de los experimentos de RMN 2D permitió establecer que al igual que el metabolito anterior este compuesto se diferencia del dehidrotirsiferol **2** en el segmento C-19—C-24 (**Figura 51** y **Tabla 18**).

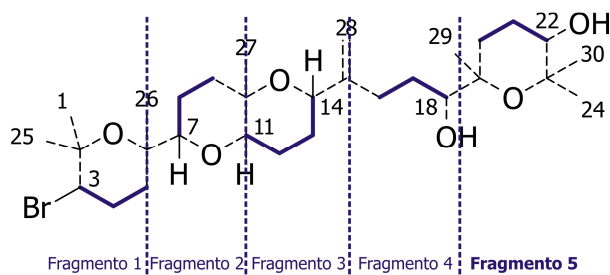


Figura 51. Estructuras parciales del piranodehidrotirsiferol **71** obtenidas a partir del espectro COSY.

El segmento C-19—C-24 se comenzó a estudiar en el espectro COSY (**Figura 52**) a partir de los protones H₂-20 (δ_{H} 1.50/1.79) que se encuentran acoplados a H₂-21 (δ_{H} 1.75) y estos a su vez con H-22 (δ_{H} 3.38). Su ubicación en la estructura fue resuelta mediante las conectividades observadas en el experimento HMBC.

Así, la estructura plana de este compuesto quedó totalmente fijada a través de las correlaciones que poseen los protones H₃-29 (δ_{H} 1.18) con los carbonos C-18 (δ_{C} 77.0), C-19 (δ_{C} 76.1) y C-20 (δ_{C} 27.9) y la que presentan los protones H₃-24 (δ_{H} 1.24) y H₃-30 (δ_{H} 1.25) con C-22 (δ_{C} 75.2) y C-23 (δ_{C} 75.7), tal y como se ve en la **Figura 52**. A la vista de los desplazamientos químicos que presentaron C-19 y C-23, establecimos la presencia de un anillo oxano con el puente de oxígeno entre estos dos carbonos.

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	31.0	1.26 (3H)	s	
2	74.9			
3	59.1	3.89	dd	3.8;12.2
4	28.3	(α)2.10/2.24(β)		
5	37.1	(α)1.53/1.80(β)		
6	74.3			
7	86.6	3.08	dd	2.3;10.8
8	23.0	(β)1.45/1.72(α)		
9	38.7	(β)1.50/1.77(α)		
10	72.9			
11	79.1	3.42	dd	5.71;1.4
12	21.8	(β)1.63/1.78(α)		
13	26.3	(β)1.82/2.03(α)		
14	72.4	4.27	dd	5.0;7.3
15	151.3			
16	29.9	2.12/2.46		
17	28.2	1.38 (2H)		
18	77.0	3.30	d	5.3;10.3
19	76.1			
20	27.9	1.50/1.79		
21	24.7	1.75 (2H)		
22	75.2	3.38	dd	5.1;10.5
23	75.7			
24	21.4	1.24 (3H)	s	
25	23.6	1.39 (3H)	s	
26	20.0	1.20 (3H)	s	
27	19.3	1.22 (3H)	s	
28	109.7	4.86/5.03	s	
29	22.4	1.18 (3H)	s	
30	30.0	1.25 (3H)	s	

Tabla 18. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del piranodehidrotirsiferol **71**.

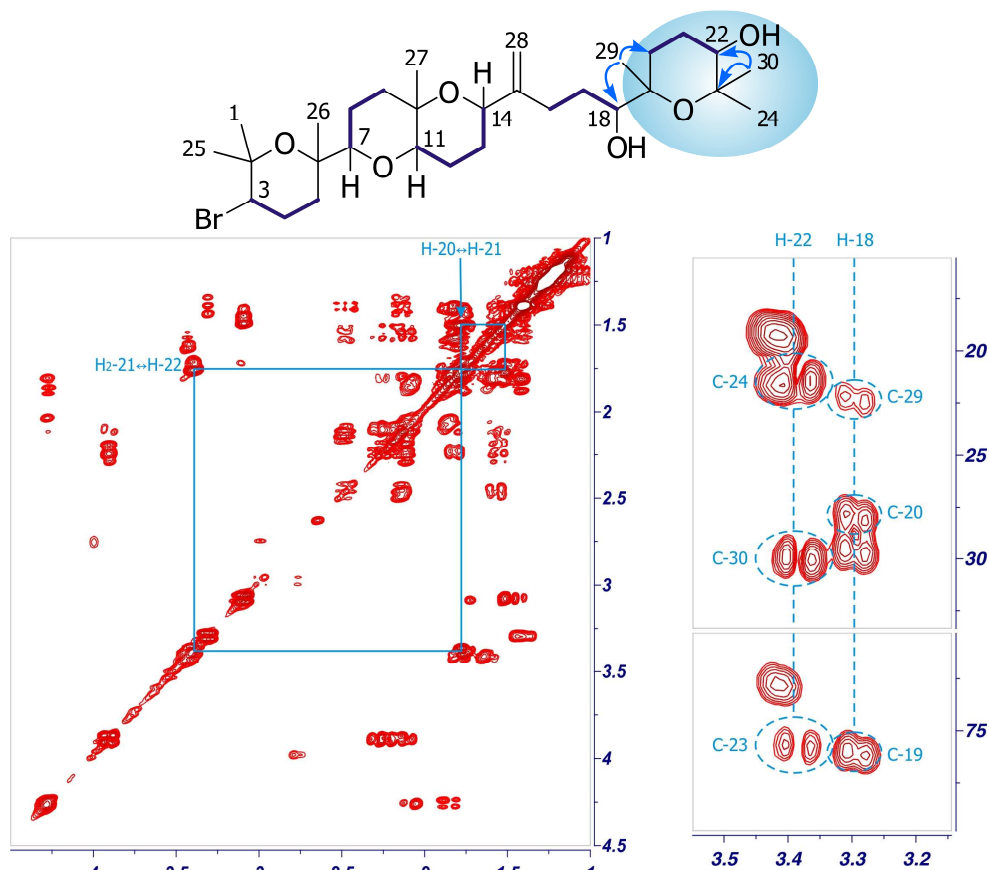


Figura 52. Estructura plana del piranodehidrotirsiferol **71**. (—) Correlaciones más importantes observadas en el COSY. (H→C) Correlaciones más importantes observadas en el HMBC.

La estereoquímica relativa del anillo oxano terminal se estableció mediante el análisis del espectro selectivo de 1D-GOESY. Este experimento se realizó mediante la excitación selectiva del protón H-22 (δ_{H} 3.38), permitiendo de esta forma establecer que el protón H-22 se correlaciona con los protones H₃-29 y H₃-24 (**Figura 53**). Las conectividades anteriores permitieron proponer la estereoquímica relativa de los centros quirales C-19 y C-22 en ambos casos como *R**. Cabe mencionar que la estereoquímica de C-18 no pudo establecerse.

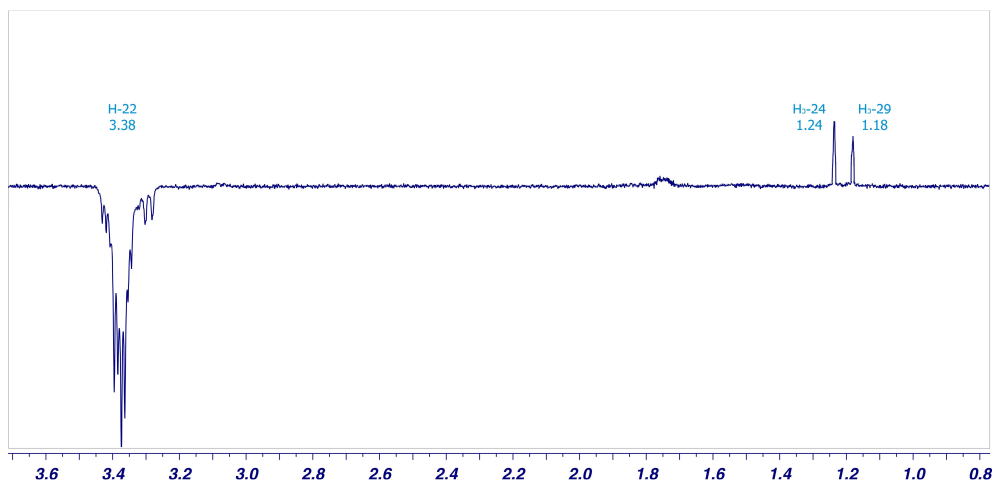
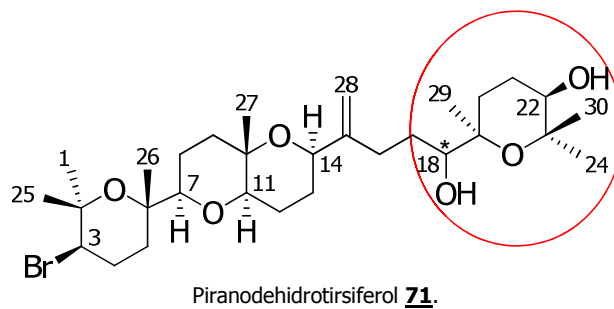


Figura 53. NOE selectivo del piranodehidrotirsiferol **71**, excitando sobre el protón H-22.



*Compuestos Oxaescualenoides***II.3.14. Nivariol A 72**

La fórmula molecular del nivariol A **72**, $C_{30}H_{54}O_8$, fue establecida por espectrometría de masas e indicó la ausencia de bromo en este metabolito. El análisis del experimento RMN 1H mostró seis metilos centrados a δ_H 1.02, 1.10, 1.13, 1.19, 1.29 y 1.35. Cada grupo metilo fue correlacionado en el experimento HSQC, con las señales δ_C 25.6 (C-24), δ_C 23.5 (C-1), δ_C 24.2 (C-26), δ_C 21.6 (C-29), δ_C 22.3 (C-30) y δ_C 25.9 (C-27), respectivamente. Asimismo, se observó una señal centrada a δ_H 1.20 que integra para seis protones y se correlacionó en el HSQC con los metilos C-25 (δ_C 28.3) y C-28 (δ_C 23.8). Por otro lado, se observaron seis señales de metinos a δ_H 3.48, 3.74, 3.77, 3.84, 3.97 y 3.99 que fueron correlacionadas también en el HSQC con los carbonos C-18 (δ_C 78.6), C-22 (δ_C 81.5), C-3 (δ_C 86.9), C-14 (δ_C 86.0), C-11 (δ_C 85.5) y C-7 (87.3), respectivamente (**Figura 54** y **Tabla 19**).

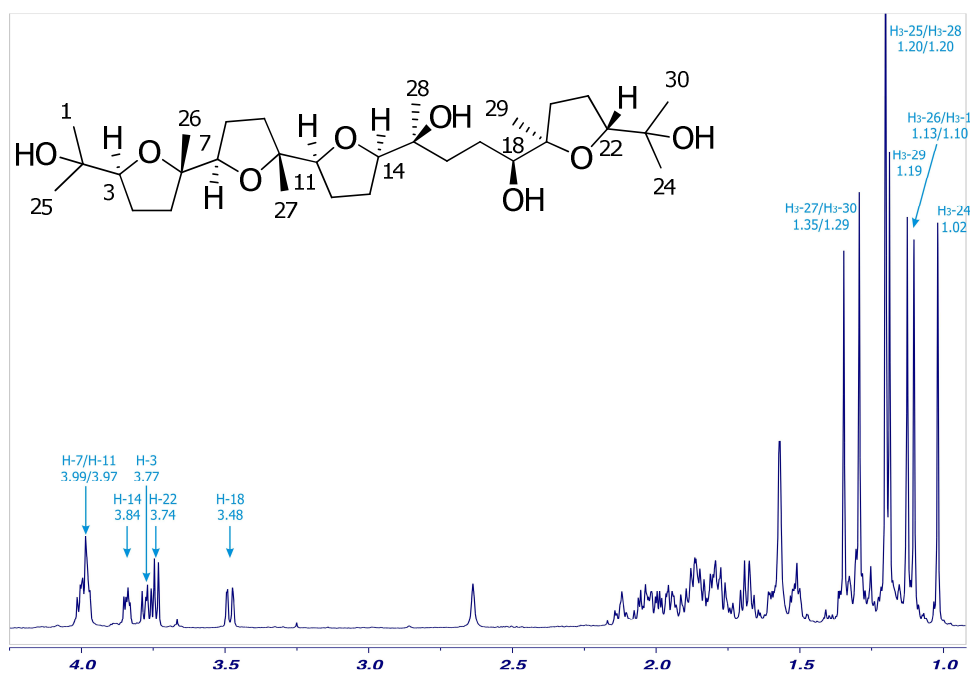


Figura 54. Espectro de RMN 1H del nivariol A **72** en $CDCl_3$ (600 MHz).

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	23.5	1.10	s	
2	70.3			
3	86.9	3.77	dd	6.4;9.3
4	26.9	1.79 (2H)		
5	32.2	1.58/2.04		
6	84.0			
7	87.3	3.99	m	
8	27.4	1.67/1.85		
9	34.3	1.66/1.76		
10	85.2			
11	85.5	3.97	m	
12	26.7	1.93 (2H)		
13	26.2	1.87/2.12		
14	86.0	3.84	dd	3.7;7.4
15	74.0			
16	34.7	1.30 (2H)		
17	24.9	1.15/1.51		
18	78.6	3.48	dd	1.8;10.1
19	82.3			
20	29.2	1.30/1.97		
21	26.0	1.83 (2H)		
22	81.5	3.74	d	7.0
23	73.8			
24	25.6	1.02 (3H)	s	
25	28.3	1.20 (3H)	s	
26	24.2	1.13 (3H)	s	
27	25.9	1.35 (3H)	s	
28	23.8	1.20 (3H)	s	
29	21.6	1.19 (3H)	s	
30	22.3	1.29 (3H)	s	

Tabla 19. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del nivariol A **72**.

Los análisis detallados de los experimentos COSY y TOCSY, claramente indican que la molécula tiene cinco sistemas de espines que se denominan **Fragmento 1** al **5** (**Figura 55**). El **Fragmento 1** se construyó partiendo de la señal del metino H-3 (δ_{H} 3.77) que se encuentra acoplado a los protones metilénicos H₂-4 (δ_{H} 1.79), que a su vez se conectan con los protones H₂-5 (δ_{H}

1.58/2.04). De igual forma, el **Fragmento 2** se inició con la correlación que presenta el metino H-7 (δ_H 3.99) con los protones H₂-8 (δ_H 1.67/1.88), que a su vez, se correlacionaron con uno de los protones de H₂-9 (δ_H 1.76) (**Figura 55**).

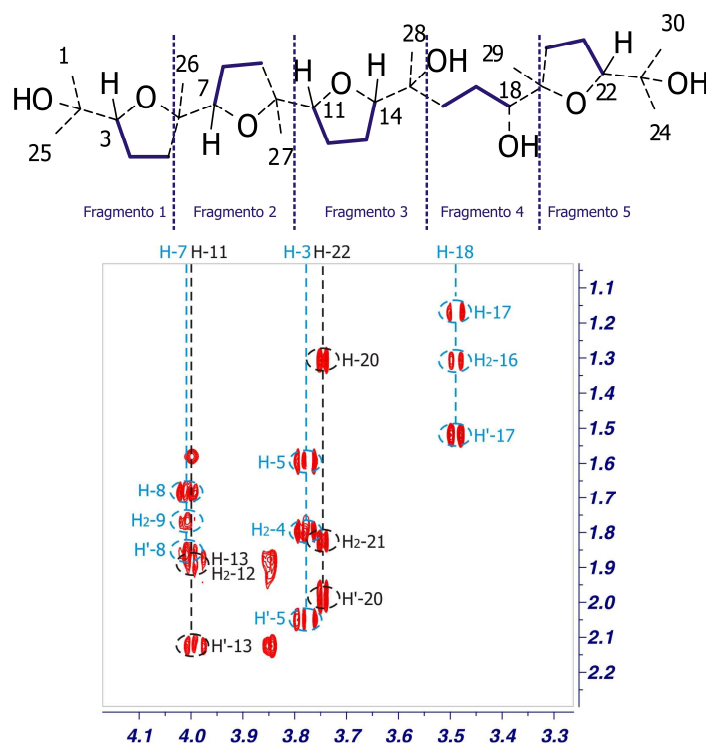


Figura 55. Correlaciones más importantes observadas en el experimento TOCSY del nivarial A **72**.

Por otro lado, la secuencia de correlaciones de los protones H-11 (δ_H 3.97), H₂-12 (δ_H 1.93), H₂-13 (δ_H 1.87/2.12) y H-14 (δ_H 3.84) y la de los protones H₂-16 (δ_H 1.30), H₂-17 (δ_H 1.15/1.51) y H-18 (δ_H 3.48) permitieron establecer los **Fragmentos 3** y **4**, respectivamente. Por último, el **Fragmento 5** se estableció a partir de las correlaciones que poseen los dos protones metilénicos H₂-21 (δ_H 1.83) con los protones H₂-20 (δ_H 1.30/1.97) y estos a su vez con el metino H-22 (δ_H 3.74) (**Figura 55**).

Una vez identificados los cinco fragmentos, procedimos a unirlos mediante las correlaciones protón—carbono observadas en el espectro de HMBC. Así, las correlaciones que presentan la pareja de metilos H₃-1/H₃-25 (δ_{H} 1.10/1.20) con los carbonos C-2/C-3 (δ_{C} 70.3/86.9) y las observadas para H₃-24/H₃-30 (δ_{H} 1.02/1.29) con C-23/C-22 (δ_{C} 73.8/81.5), fijaron los metilos geminales H₃-1/H₃-25 y H₃-24/H₃-30 sobre los carbonos cuaternarios C-2 y C-23, respectivamente (**Figura 56**).

Por otro lado, la señal centrada a δ_{C} 84.0 fue identificada como C-6 por sus correlaciones con el metilo H₃-26 (δ_{H} 1.13) y con el metino H-7 (δ_{H} 3.99). Estas correlaciones junto con las observadas para estos mismos protones con la señal situada a δ_{C} 32.2 (C-5), permitieron unir los **Fragmentos 1** y **2**. Un análisis equivalente permitió unir los **Fragmentos 4** y **5** a través de las correlaciones de H₃-29 (δ_{H} 1.19) con C-18 (δ_{C} 3.48), C-19 (δ_{C} 82.3) y C-20 (δ_{C} 29.2) (**Figura 56**).

La conexión del **Fragmento 3** al resto de la molécula se pudo realizar, apoyándonos fundamentalmente en las correlaciones de los grupos metilos H₃-27 (δ_{H} 1.35) y H₃-28 (δ_{H} 1.20). Así, por un lado la correlación de H₃-27 con los carbonos C-9, C-10 y C-11 centrados a δ_{C} 34.3, 85.2 y 85.5, respectivamente, nos permitió unir los **Fragmentos 2** y **3** a través del carbono cuaternario C-10. De igual forma, las correlaciones de H₃-28 con C-16, C-15 y C-14 centrados a δ_{C} 34.7, 74.0 y 86.0, respectivamente, permitieron unir los **Fragmentos 3** y **4** a través del carbono C-15 (**Figura 56**).

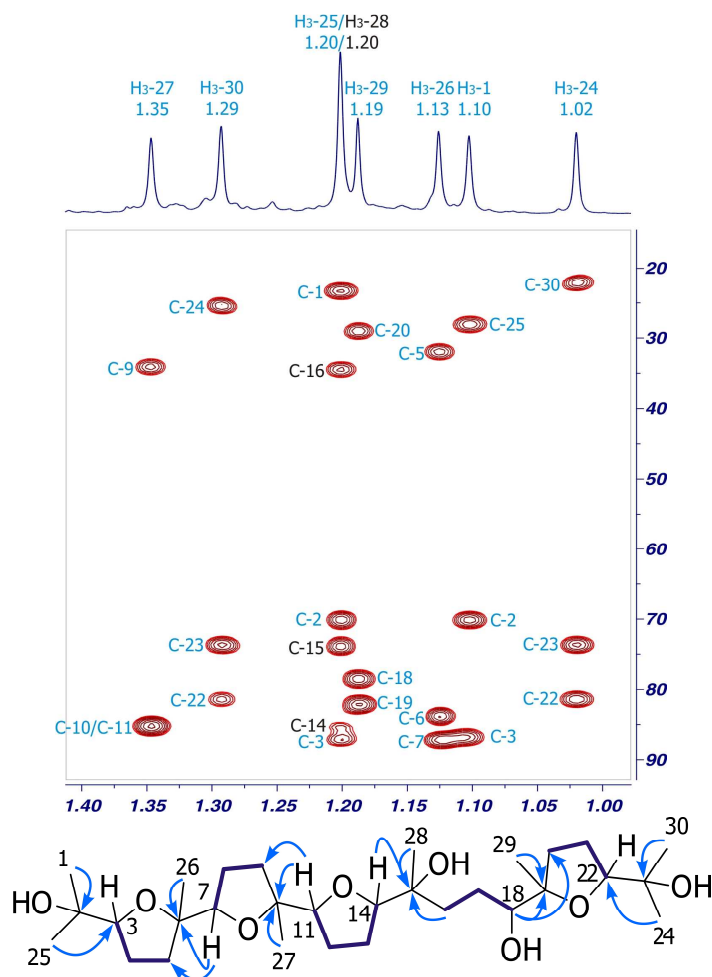


Figura 56. Sección del espectro HMBC y estructura plana del nivariol A **72**. (—) Correlaciones COSY. (H→C) Correlaciones HMBC.

Finalmente, las correlaciones a través del oxígeno que presentan los metinos H-3 (δ_{H} 3.77), H-7 (δ_{H} 3.99) y H-22 (δ_{H} 3.74) con los carbonos C-6 (δ_{C} 84.0), C-10 (δ_{C} 85.2) y C-19 (δ_{C} 82.3), respectivamente, así como la correlación cruzada que muestran los metinos C-11 (δ_{C} 85.5, δ_{H} 3.97) y C-14 (δ_{H} 3.84, δ_{C} 86.0) establecieron la estructura plana del nivariol A **72**, tal y como se muestra en la **Figura 56**.

El equilibrio conformacional que muestran los anillos saturados de cinco miembros hace que el análisis de las correlaciones NOE o ROE de los mismos puedan llevar a resultados ambiguos. Aun así, en una primera aproximación, la ausencia de correlaciones NOE entre las parejas de protones H-3/H₃-26 (δ_H 3.77/1.13) y H-7/H₃-27 (δ_H 3.99/1.35) y la correlación entre los protones H-11 (δ_H 3.97) y H-14 (δ_H 3.84) (**Figura 57**), estableció la estereoquímica relativa de los anillos **A**, **B** y **C** como *trans—trans—cis*, respectivamente.

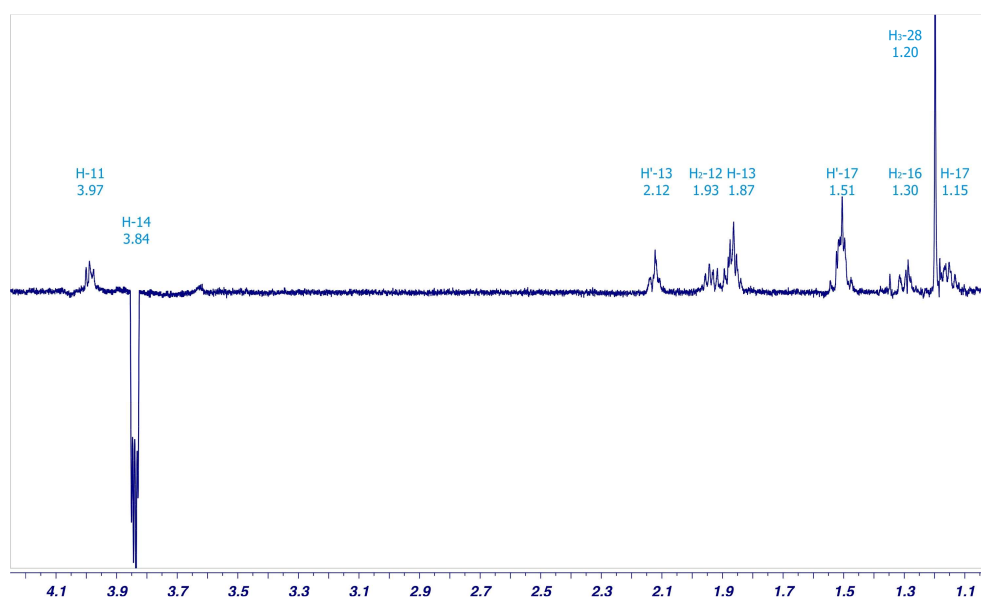


Figura 57. NOE selectivo del nivariol A **72**, excitando sobre el protón H-22.

Teniendo presente lo anterior, el estudio de la estereoquímica se abordó a través de la comparación de los desplazamientos químicos del segmento C-1—C-14 del nivariol A **72**, con los datos publicados para estructuras similares como el enshuol **35** y de diastereoisómeros estructuralmente afines (**46**, **47** y **67**) reportados por Morimoto y *col.*^{25,27,32} Este análisis reveló que existen diferencias significativas con el enshuol **35**. Sin embargo, el segmento C-1—C-11 del nivariol A **72** mostró una importante correlación con uno de los compuestos sintetizados por el grupo del profesor Morimoto (**Figura 58**).

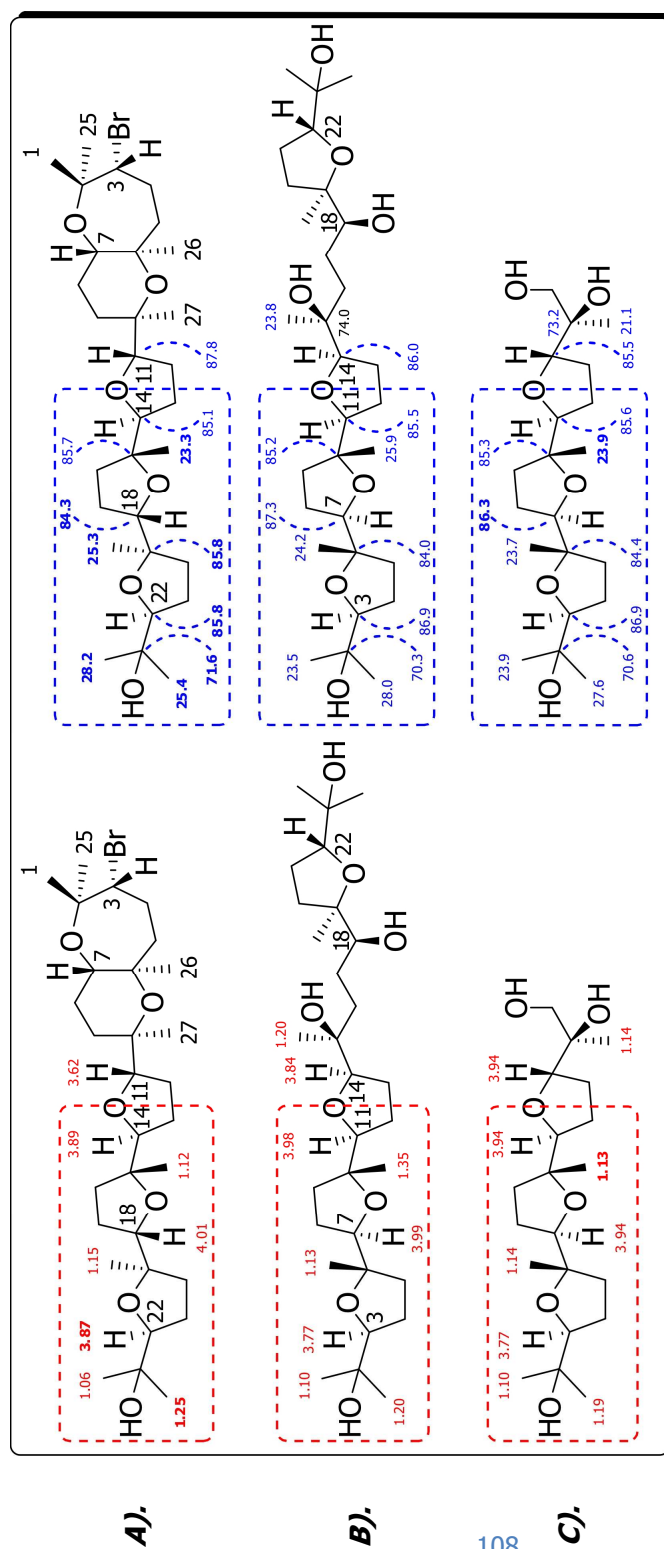


Figura 58. Comparación de los datos espectroscópicos de RMN.

A). Datos espectroscópicos de los anillos oxolanos *cis*, *cis*, *trans* del (+)-enhuol **35**.

B). Datos espectroscópicos de los anillos oxolanos *trans*, *trans*, *trans* del nivarol **72**.

C). Datos espectroscópicos de los anillos oxolanos *trans*, *trans*, *trans* del compuesto **67**.

1. Los desplazamientos químicos de ^1H se muestran en rojo, mientras que los de carbono se muestran en azul.

2. Los desplazamientos de ^1H para los compuestos de origen natural se muestran en negritas cuando $|\Delta\delta| > 0.04 \text{ ppm}$ con respecto a los compuestos de síntesis.

3. Los desplazamientos de ^1H para los compuestos de origen natural se muestran en negritas cuando $|\Delta\delta| > 0.50 \text{ ppm}$ con respecto a los compuestos de síntesis.

El estudio configuracional del motivo C-14—C-15, se abordó siguiendo las mismas pautas utilizadas inicialmente en el análisis de la secuencia C-14—C-15 del saiyacenol A **65** y B **66**. Es decir, a través del análisis conjunto de las constantes de acoplamiento y correlaciones NOESY. Los valores de las constantes de acoplamiento ${}^2J_{C15-H14}$ (\pm)2.8 y ${}^3J_{C28-H14}$ 3.4 establecidas en el J HMBC, redujo el análisis de este segmento a la revisión de dos sistemas: el primero de ellos (${}^2J_{C15-H14}$ -2.8 y ${}^3J_{C28-H14}$ 3.4) consideraría la existencia de un único rotámero que posiciona a C-28 en una disposición *anti* respecto a H-14 con configuración 14*R**/15*S**, mientras que el segundo (${}^2J_{C15-H14}$ 2.8 y ${}^3J_{C28-H14}$ 3.4) plantearía un equilibrio *anti/gauche-* (*eritro*) o *anti/gauche+* (*treo*), que no es posible resolver (**Figura 59**).

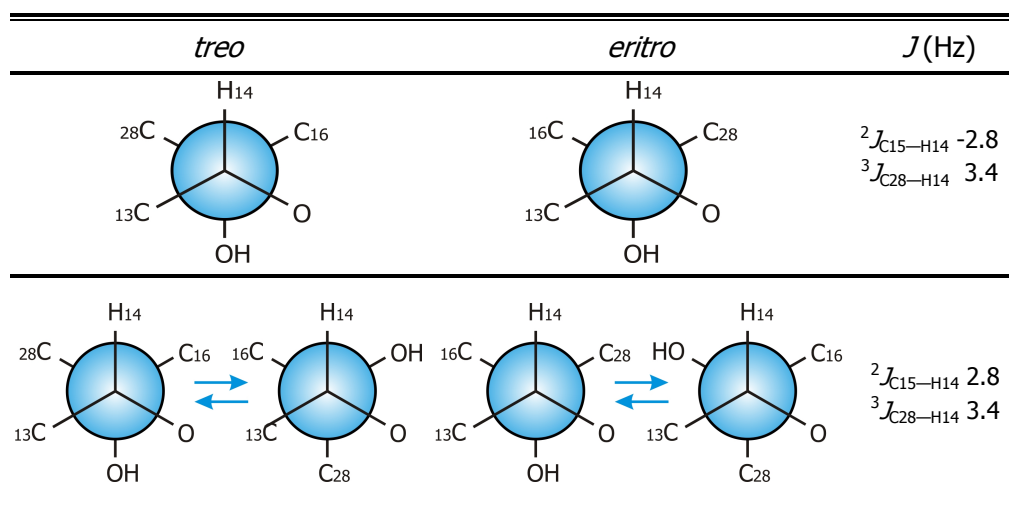


Figura 59. Posibles sistemas obtenidos de los valores de las constantes de acoplamiento del nivariol A **72**. Arriba se muestran los dos posibles rotámeros cuando se considera que el valor de la constante ${}^2J_{C15-H14}$ es negativo. Abajo se muestran los posibles equilibrios conformacionales *anti-gauche* cuando se considera que el valor de la constante ${}^2J_{C15-H14}$ es positivo.

El análisis de los experimentos 1D-NOE para los protones H₂-13 (δ_H 1.87/2.12), permitió establecer que uno de los protones H-13 (δ_H 2.12) se correlaciona con H₂-16 (δ_H 1.30) y no con H₃-28 (δ_H 1.20), lo que descarta la segunda posibilidad (ya que en este caso H₂-13 se correlacionaría con H₂-16 y

H₃-28), permitiendo además la asignación de este segmento como un rotámero *anti* con configuración *eritro* (**Figura 60**).

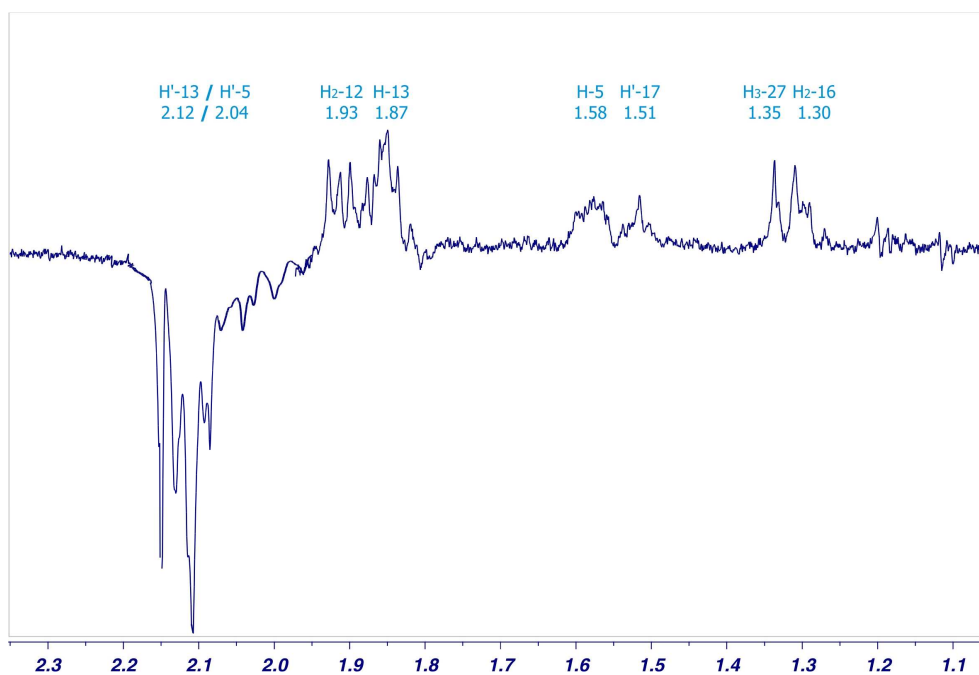
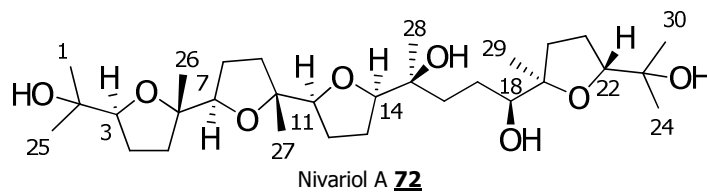


Figura 60. NOE selectivo del nivariol A **72**, excitando sobre el protón H'-13.

Finalmente, el análisis de las correlaciones NOESY, nos sugiere que la estereoquímica relativa de los centros C-18, C-19 y C-22 es idéntica a las encontradas en la serie del tirsiferol.



II.3.15. Nivariol B **73**

La fórmula molecular del nivariol B **73** pudo ser determinada como $C_{30}H_{51}O_6Br$ en función de los datos obtenidos de su espectro de ESI-HRMS. El análisis de los espectros de RMN 1H y ^{13}C reveló que este compuesto posee cierta relación con el nivariol A **72** (Figura 61).

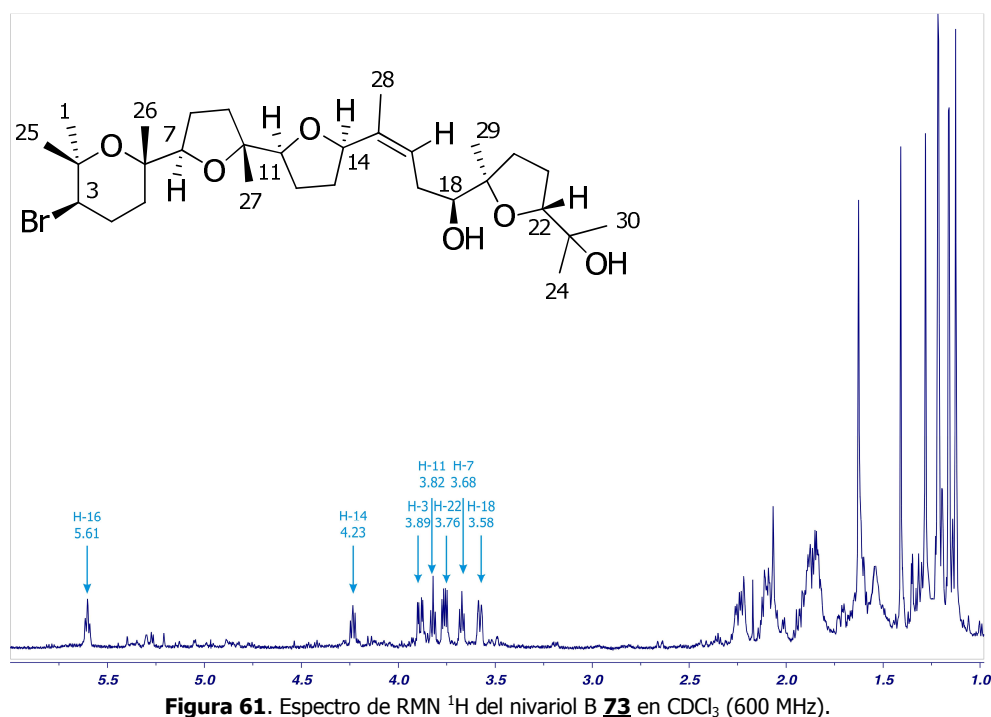


Figura 61. Espectro de RMN 1H del nivariol B **73** en $CDCl_3$ (600 MHz).

Los espectros 2D del nivariol B **73** presentaron confirmaron la relación estructural que posee este compuesto con el nivariol A **72**, encontrándose las diferencias más notorias alrededor del anillo **A** (C-2—C-6) y el segmento C-15—C-18 (Tabla 20). El análisis del fragmento C-2—C-6 a través del experimento COSY reveló correlaciones entre el metino H-3 (δ_H 3.89) y el metileno H_2 -4 (δ_H 2.09/2.24), que a su vez se conectaron con los protones H_2 -5 (δ_H 1.58/1.61). Asimismo, en el análisis del segmento C-15—C-18 se observó una correlación entre el protón olefínico H-16 (δ_H 5.61) y los protones

metilénicos H₂-17 (δ_{H} 2.07/2.24), que a su vez mostraron una segunda correlación con el metino H-18 (δ_{H} 3.58) (**Figura 62**).

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J(Hz)
1	30.9	1.28 (3H)	s	
2	74.7			
3	59.1	3.89	dd	4.0;12.3
4	28.2	(α)2.09/2.24(β)		
5	35.9	(β)1.58/1.61(α)		
6	70.4			
7	88.4	3.68	t	6.7
8	26.6	1.85/1.92		
9	34.0	1.60/1.93		
10	84.9			
11	84.8	3.82	t	6.8
12	27.6	1.69/1.87		
13	30.5	1.64/1.88		
14	84.6	4.23	dd	6.5;7.4
15	137.2			
16	123.1	5.61	t	7.0
17	30.3	2.07/2.24		
18	76.7	3.58	dd	1.8;9.0
19	85.8			
20	32.1	1.59/2.11		
21	26.3	1.84 (2H)		
22	87.6	3.76	dd	5.8;10.2
23	70.4			
24	24.0	1.12 (3H)	s	
25	23.8	1.41 (3H)	s	
26	20.7	1.21 (3H)	s	
27	23.6	1.16 (3H)	s	
28	12.0	1.63 (3H)	s	
29	23.8	1.17 (3H)	s	
30	27.9	1.22 (3H)	s	

Tabla 20. Desplazamientos químicos de RMN ¹H y ¹³C del nivariol B **73**.

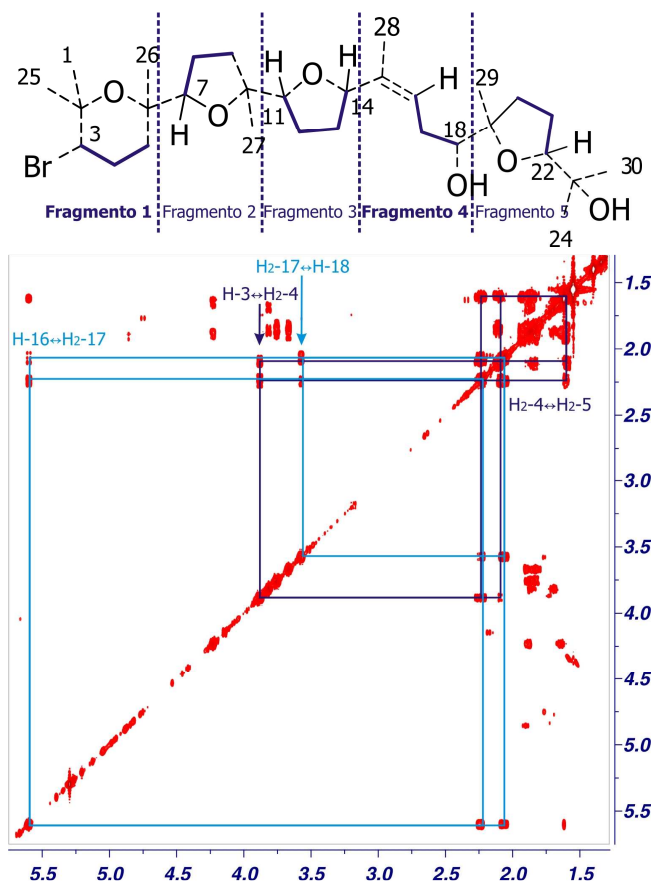


Figura 62. Sección del espectro COSY para los **Fragmentos 1 y 4** del nivariol B **73**.

Los sistemas de espines ^1H — ^1H **Fragmento 1** (C-3—C-5) y **Fragmento 4** (C-16—C-18), fueron conectados al resto de la molécula mediante las correlaciones observadas en el HMBC. Así, para el **Fragmento 1** (C-3—C-5), se observaron las mismas correlaciones que dan lugar al anillo oxolano típico del dehidrotirsiferol **2** (**Figura 95**). Por otra parte, en el **Fragmento 4**, el análisis del experimento HMBC permitió conectar los protones H₃-29 (δ_{H} 1.17) con los carbonos C-18 (δ_{C} 76.7), C-19 (δ_{C} 85.8) y C-20 (δ_{C} 32.1). Además, se observaron conectividades de los protones H₃-28 (δ_{H} 1.63) y H₂-17 con los carbonos C-15 (δ_{C} 137.2) y C-16 (δ_{C} 123.1) que localizaron un doble enlace trisustituido entre los carbonos C-15 y C-16, cuya geometría se estableció

como *Z* con base a la correlación NOE entre H₃-28 (δ_{H} 1.63) y H-16 (δ_{H} 5.61) (**Figura 63**).

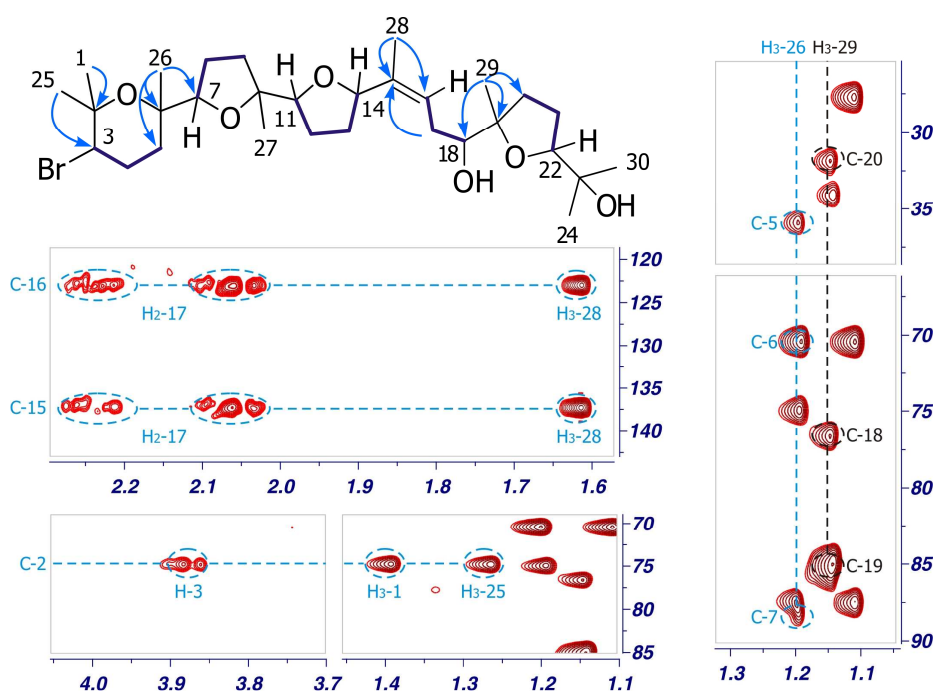
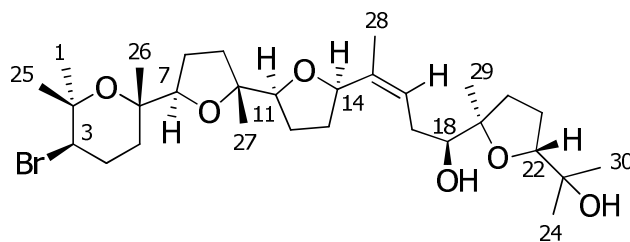


Figura 63. Estructura plana del nivariol B **73**. (—) Correlaciones COSY. (H→C) Correlaciones HMBC.

El análisis de las correlaciones dipolares del espectro NOESY y la interpretación de las constantes de acoplamiento indicaron que la estereoquímica relativa de las porciones C-1—C-6 y C-15—C-24 son equivalentes a la del dehidrotirsiferol **2**. Finalmente, la ausencia de correlaciones entre las parejas de protones H-7/H₃-27 (δ_{H} 3.68/1.16) y H₃-29/H-22 (δ_{H} 1.17/3.76), junto con la correlación dipolar que se observa entre los protones H-11/H-14 (δ_{H} 3.82/4.23), nos sugiere que la estereoquímica relativa de los tres anillos oxolanos (**B**, **C** y **D**) es idéntica a la dada para el compuesto anterior.



Nivariol B **73**

II.3.16. (+)-Peróxido de longileno 50

La fórmula molecular del (+)-peróxido de longileno 50 se estableció como $C_{30}H_{52}O_8$ por espectrometría de masas. El análisis del experimento RMN 1H permitió identificar ocho metilos a δ_H 1.07, 1.09, 1.19, 1.20, 1.27, 1.27, 1.31 y 1.37 que se correlacionaron en el experimento HSQC con los carbonos C-28 (δ_C 23.6), C-27 (δ_C 24.2), C-1 (δ_C 26.9), C-26 (δ_C 24.3), C-24 (δ_C 29.4), C-29 (δ_C 24.3), C-30 (δ_C 29.6) y C-25 (δ_C 24.2), respectivamente. Asimismo, las señales a δ_H 3.72 y 4.09, que integran para dos protones cada una, se correlacionaron respectivamente con las parejas de metinos C-7/C-18 (δ_C 85.1/84.1) y C-11/C-14 (δ_C 85.8/85.4). Además, las señales a δ_H 5.43, 5.61, 5.75 y 5.81 se conectaron con los carbonos olefínicos, C-3 (δ_C 137.0), C-22 (δ_C 141.2), C-21 (δ_C 122.2) y C-4 (δ_C 125.8), respectivamente. Finalmente, las cuatro señales a δ_H 3.29, 5.03, 5.24 y 10.57 que no mostraron conectividades aparentes en el HSQC fueron asignadas a tres alcoholes y a un grupo hidroperóxido en base al experimento de intercambio de deuterio (**Figura 64**).

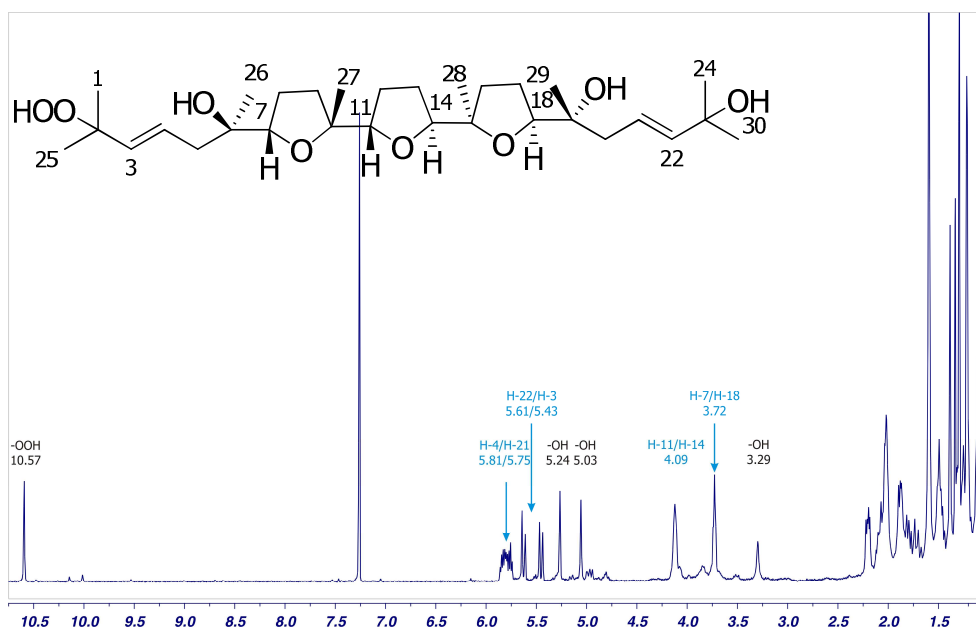


Figura 64. Espectro de RMN 1H del (+)-peróxido de longileno 50 en $CDCl_3$ (600 MHz).

Así, al agregar una gota de MeOD a la muestra se observó un intercambio rápido de estos protones lo que nos confirmó lo mencionado anteriormente (**Figura 65**).

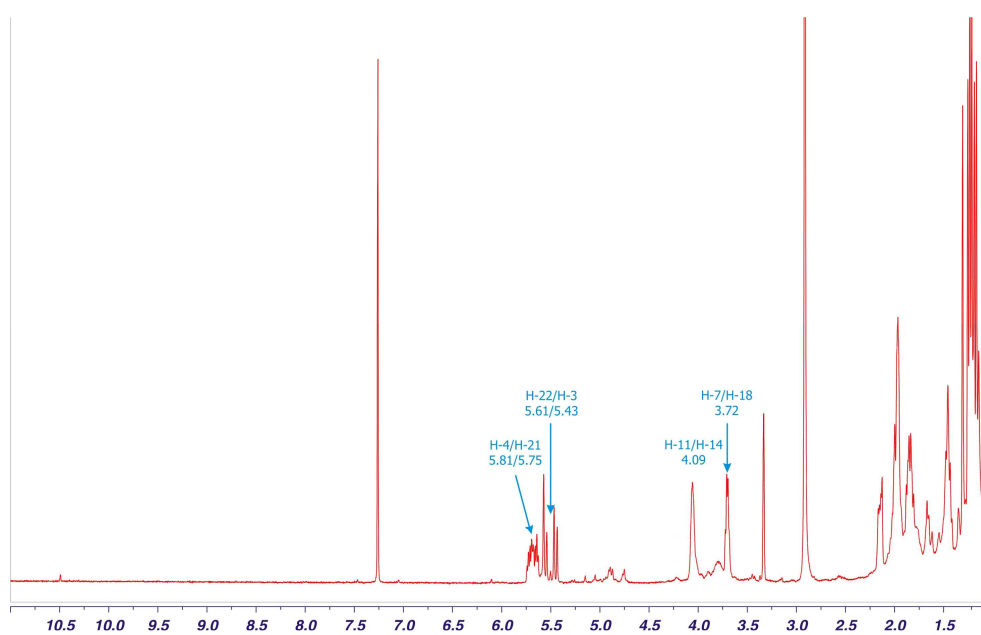


Figura 65. Espectro de RMN ^1H del (+)-peróxido de longileno **50** con una gota de MeOD.

La asignación de los sistemas de espines ^1H — ^1H , se llevo a cabo a través del estudio detallado de los espectros COSY y HSQC. Esto permitió establecer un total de cinco sistemas de espines (**Figura 66**).

Fragmento 1 H-3 (5.43) \leftrightarrow H-4 (5.81) \leftrightarrow H₂-5 (1.78/2.20)

Fragmento 2 H-7 (3.72) \leftrightarrow H₂-8 (1.89/2.06) \leftrightarrow H₂-9 (1.49/2.06)

Fragmento 3 H-11 (4.09) \leftrightarrow H₂-12 (1.50/2.01) \leftrightarrow H₂-13 (1.50/2.01) \leftrightarrow H-14 (4.09)

Fragmento 4 H₂-16 (1.46/2.03) \leftrightarrow H₂-17 (1.89/2.03) \leftrightarrow H-18 (3.72)

Fragmento 5 H₂-20 (1.88/2.20) \leftrightarrow H-21 (5.75) \leftrightarrow H-22 (5.61)

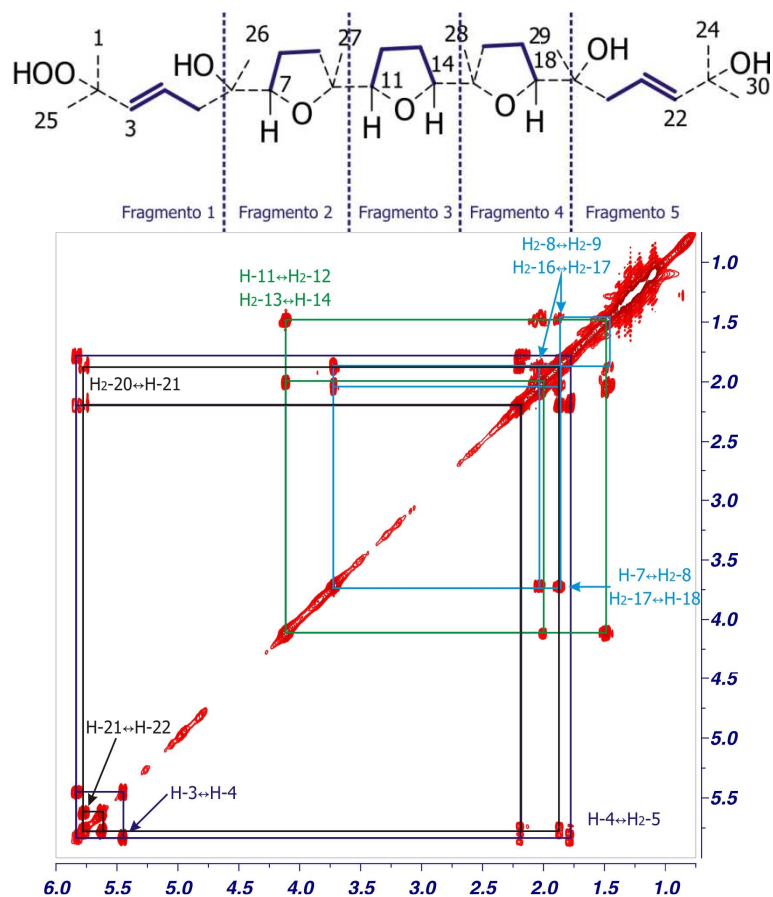


Figura 66. Fragmentos establecidos en el espectro COSY del (+)-peróxido de longileno **50**.

Una vez identificadas las secuencias $^1\text{H}-^1\text{H}$ presentes en la estructura, el análisis de los experimentos HMBC permitió interconectarlos. Así, las conectividades que muestran con el carbono C-10 (δ_{C} 85.8) los protones H₃-27 (δ_{H} 1.09), H₂-9 (δ_{H} 1.49/2.06), H-7 (δ_{H} 3.72) y H-11 (δ_{H} 4.09), junto con la de los protones H₃-28 (δ_{H} 1.07), H₂-16 (δ_{H} 1.46/2.03), H-18 (δ_{H} 3.72) y H-14 (4.09) con C-15 (δ_{C} 85.4) establecieron el segmento C-7—C-18. El cierre del anillo central de oxolano, se estableció a través de las correlaciones cruzadas de metinos C-11 (δ_{H} 4.09, δ_{C} 85.8) y C-14 (δ_{H} 4.09, δ_{C} 85.4) (**Figura 67**).

Asimismo, las correlaciones que muestran con el carbono C-6 (δ_C 73.9) los protones H₃-26 (δ_H 1.20), H₂-5 (δ_H 1.78/2.20) y H-7 (δ_H 3.72) junto con las establecidas para los protones H₃-29 (δ_H 1.27), H₂-20 (δ_H 1.88/2.20) y H-18 (δ_H 3.72) con C-19 (δ_C 73.8) establecieron las partes acíclicas de la molécula (**Figura 67**).

Finalmente, las correlaciones de la pareja de metilos H₃-1/H₃-25 (δ_H 1.19/1.37) con los carbonos C-2/C-3 (δ_C 80.1/137.0) y la de los metilos H₃-24/H₃-30 (δ_H 1.27/1.31) con los carbonos C-22/C-23 (δ_C 141.2/70.0), fijaron los metilos geminales H₃-1/H₃-25 y H₃-24/H₃-30 sobre los carbonos C-2 y C-23, respectivamente (**Figura 67**).

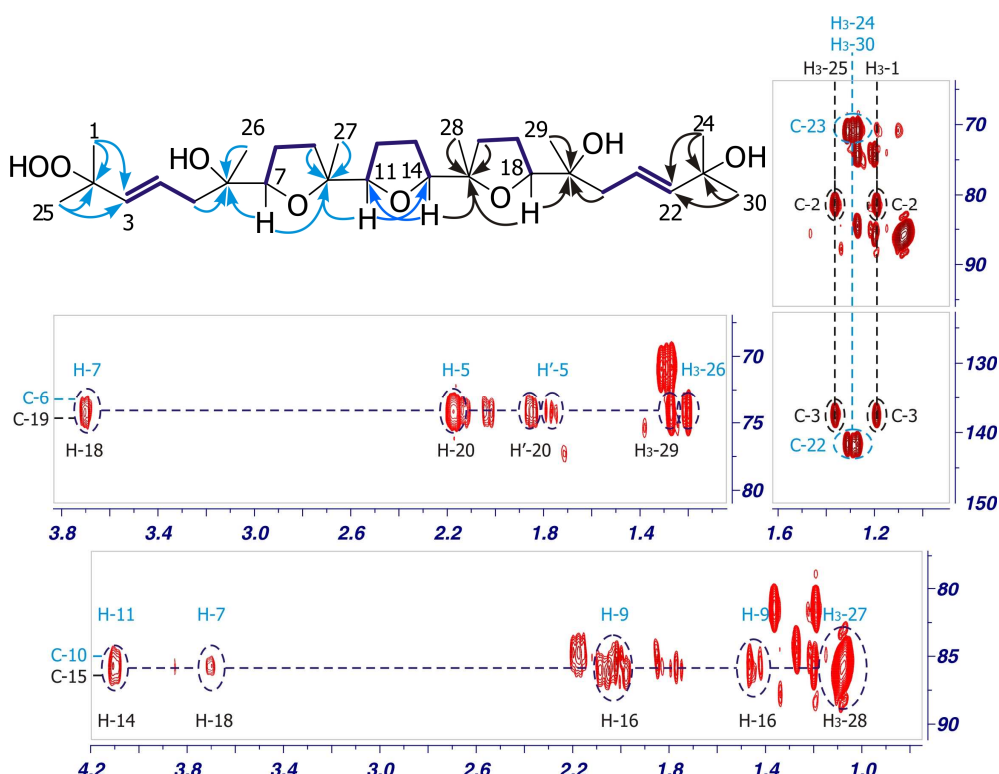


Figura 67. Estructura plana del (+)-peróxido de longileno **50** (—) Correlaciones COSY, (H→C) Correlaciones HMBC. Secciones más importantes del HMBC.

Elucidación estructural

F.C.P

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	26.9	1.19 (3H)	s	
2	80.1			
3	137.0	5.43	d	15.6
4	125.8	5.81	ddd	6.6;8.5;15.6
5	41.3	1.78/2.20	dd/dd	8.5;13.3/6.6;13.3
6	73.9			
7	85.1	3.72	m	
8	25.8	1.89/2.06		
9	29.7	1.49/2.06		
10	85.8			
11	85.8	4.09	m	
12	30.1	1.50/2.01		
13	29.9	1.50/2.01		
14	85.4	4.09	m	
15	85.4			
16	29.3	1.46/2.03		
17	25.2	1.89/2.03		
18	84.1	3.72	m	
19	73.8			
20	40.8	1.88/2.20	dd/dd	6.8;13.4/7.0;13.4
21	122.2	5.75	ddd	6.8;7.0;15.6
22	141.2	5.61	d	15.6
23	70.0			
24	29.4	1.27 (3H)	s	
25	24.2	1.37 (3H)	s	
26	24.3	1.20 (3H)	s	
27	24.2	1.09 (3H)	s	
28	23.6	1.07 (3H)	s	
29	24.3	1.27 (3H)	s	
30	29.6	1.31 (3H)	s	
-OOH		10.57	s	
-OH-6		5.24	s	
-OH-19		5.03	s	
-OH-23		3.29	s	

Tabla 21. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del (+)-peróxido de longileno **50**.

Los datos espectroscópicos del (+)-peróxido de longileno **50** (Tabla 21) resultaron ser idénticos a los establecidos para el (-)-peróxido de longileno **74**, identificado en 1991 por Itokawa y *col.* y posteriormente sintetizado por Morimoto y *col.*,³⁵ determinando este último la estereoquímica absoluta del mismo. Sin embargo, el valor de la actividad óptica de nuestro metabolito ($[\alpha]_{D}^{25} = +46.6$), respecto al compuesto de origen terrestre ($[\alpha]_{D}^{25} = -23.0$) y al sintetizado por Morimoto ($[\alpha]_{D}^{27} = -44.8$), permitió concluir que nuestro compuesto es el enantiomero del (-)-peróxido de longileno **74** (Figura 68).

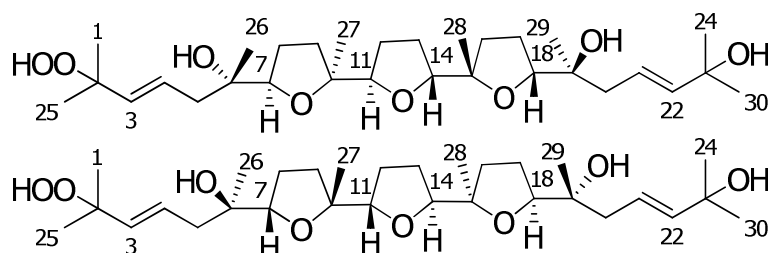


Figura 68. Estructura del (-)-Peróxido de longileno **74** (arriba) y (+)-peróxido de longileno **50** (abajo).

Cabe señalar que aunque el aislamiento y la identificación de (+)-peróxido de longileno **50** y (+)-longileno **51**, ya había sido realizada anteriormente por la Dra. Claudia Pérez,³⁵ en la presente memoria se discutirá detalladamente su elucidación estructural, ya que su caracterización será imprescindible para discutir los aspectos configuracionales y conformacionales de los demás metabolitos que conforman este grupo.

II.3.17. (+)-Longileno 51

Aun cuando el espectro de masas nos indicó que el (+)-longileno 51 tiene una fórmula empírica $C_{30}H_{52}O_7$. El análisis detallado de los espectros de RMN 1H y ^{13}C indicaron que este compuesto posee solamente 15 señales de carbonos. Estos datos claramente sugieren que 51 debe poseer algún tipo de simetría que justifique este hecho (**Figura 69**). Además, los datos del (+)-longileno 51 resultaron ser equivalentes a la porción C-13—C-24 del (+)-peróxido de longileno 50 (**Figura 70** y **Tabla 22**).

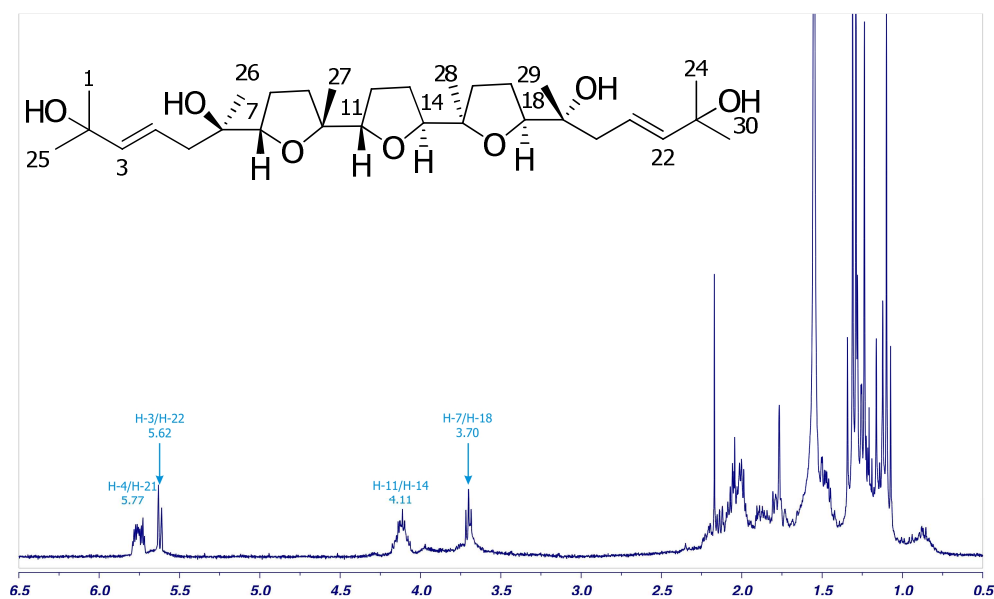


Figura 69. Espectro de RMN 1H del (+)-longileno 51 en $CDCl_3$ (600 MHz).

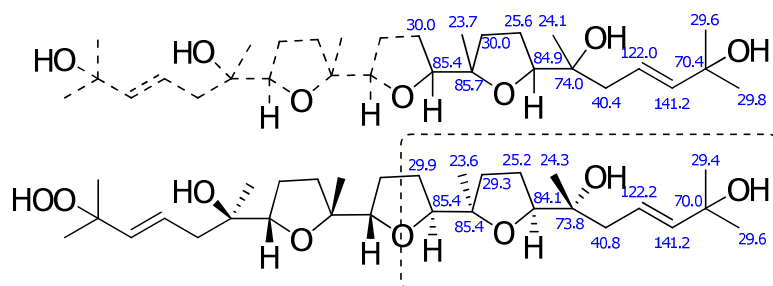
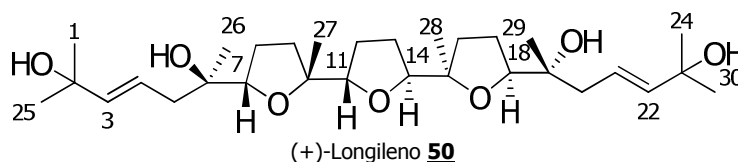


Figura 70. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C del (+)-peróxido de longileno 50 (arriba) y el (+)-longileno 51 (abajo).

n ^o C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	24	29.6	1.29 (3H)	s
2	23	70.4		
3	22	141.2	5.62	d 15.6
4	21	122.0	5.77	ddd 7.0;7.4;15.6
5	20	40.4	1.78/2.15	dd/dd 7.0;13.4/7.4;13.4
6	19	74.0		
7	18	84.9	3.70	dd 6.4;6.6
8	17	25.6	1.91/2.03	
9	16	30.0	1.47/2.06	
10	15	85.7		
11	14	85.4	4.11	dd 5.5;5.6
12	13	30.0	1.49/2.01	
25	30	29.8	1.31 (3H)	s
26	29	24.1	1.24 (3H)	s
27	28	23.7	1.10 (3H)	s

Tabla 22. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del (+)-longileno **51**.

El análisis de los experimentos COSY, HSQC y HMBC permitió la completa asignación de la molécula confirmando así la presencia del mismo esqueleto carbonado observado para el (+)-peróxido de longileno **50**, pero con un grupo –OH sobre C-2 tal y como demuestra el desplazamiento químico a δ_{H} 70.4 y la ausencia de la señal a δ_{H} 10.57 correspondiente al grupo –OOH en **50**. Además, la equivalencia espectroscópica que posee este metabolito con el (+)-peróxido de longileno **50**, sugirió que estos dos compuestos deben compartir la misma estereoquímica relativa.



II.3.18. Prolongileno 75

El espectro de masas del prolongileno **75**, estableció la fórmula molecular de este compuesto como $C_{30}H_{52}O_6$. El espectro de RMN 1H del prolongileno **75** presenta importantes similitudes con el del (+)-peróxido de longileno **50** (**Figura 71**). Las diferencias más notorias fueron las ausencias del protón hidroperóxido y del protón olefínico H-4. Además se observó el desplazamiento hacia campos bajos de las señales correspondientes a los metilos geminales H_3-1 (δ_H 1.60) y H_3-25 (δ_H 1.66) (**Tabla 23**).

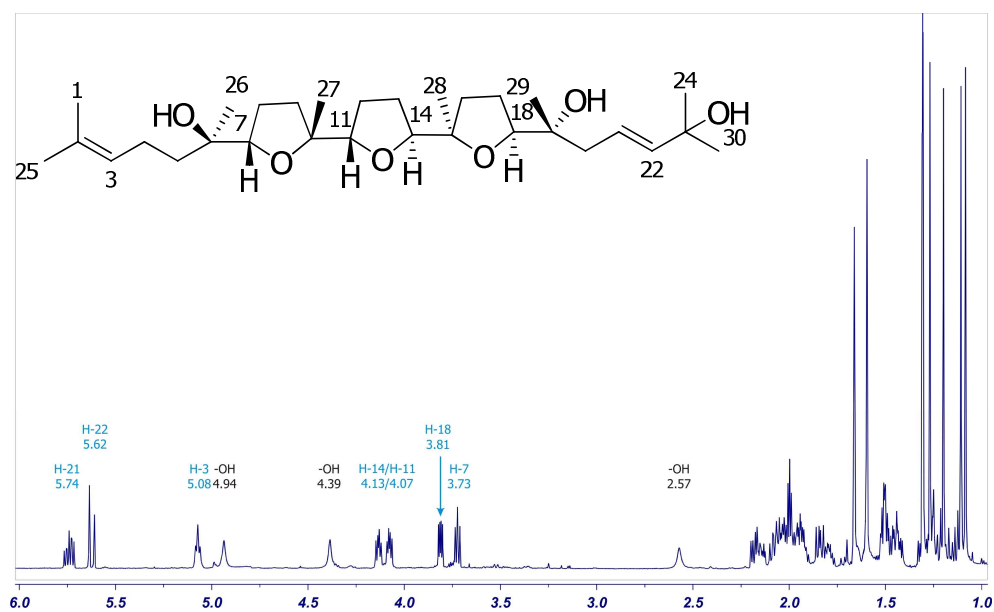


Figura 71. Espectro de RMN 1H del prolongileno **75** en $CDCl_3$ (600 MHz).

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	17.7	1.60 (3H)		
2	131.1			
3	124.8	5.08	t	6.9
4	22.5	1.97/2.04		
5	39.0	1.29/1.43		
6	72.5			
7	83.4	3.73	dd	6.9;7.6
8	25.4	1.80/1.91		
9	30.0	1.46/2.04		
10	84.7			
11	85.0	4.07	dd	5.4;10.3
12	29.5	1.50/1.99		
13	29.5	1.50/1.99		
14	85.7	4.13	dd	5.7;10.3
15	85.8			
16	30.0	1.46/2.06		
17	25.5	1.93/2.14		
18	85.0	3.81	dd	4.4;8.1
19	74.1			
20	40.8	1.83/2.17		
21	122.7	5.74	ddd	6.3;8.6;15.2
22	141.0	5.62	d	15.6
23	70.3			
24	29.8	1.31 (3H)	s	
25	25.7	1.66 (3H)	s	
26	24.9	1.27 (3H)	s	
27	23.5	1.08 (3H)	s	
28	24.0	1.11 (3H)	s	
29	24.1	1.20 (3H)	s	
30	30.1	1.31 (3H)	s	
-OH-6		4.94	s	
-OH-19		4.39	s	
-OH-23		2.57	s	

Tabla 23. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del prelongileno **75**.

El análisis de los experimentos HSQC y HMBC del prelongileno **75**, permitió establecer que la porción C-6—C-24 es idéntica a la del (+)-peróxido de longileno **50**. Además, se identificó otro grupo de señales nuevas atribuibles a dos metilos alílicos, dos metilenos, un metino y un carbono

cuaternario. La asignación de los desplazamientos químicos de los protones en el segmento C-1—C-5 se inició con la correlación que posee el protón olefínico H-3 (δ_{H} 5.08) con los protones alílicos H₂-4 (δ_{H} 1.97/2.04), los cuales a su vez se conectan con los protones H₂-5 (δ_{H} 1.29/1.43).

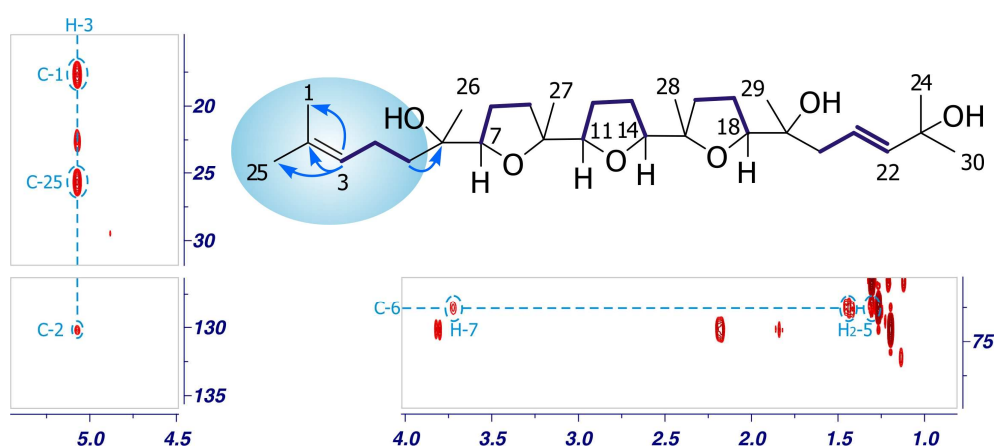
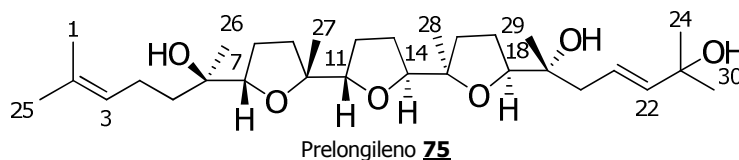


Figura 72. Estructura plana del prelongileno **75**. (—) Correlaciones COSY. (H→C) Correlaciones HMBC.

Las correlaciones HMBC que poseen los carbonos C-1 (δ_{C} 17.7), C-25 (δ_{C} 25.7) y C-2 (δ_{C} 131.1) con la señal del protón H-3 (δ_{H} 5.08) establecieron la estructura de la porción C-1—C-5 como la dada arriba, en la que aparece unido al resto de la molécula a través de la correlación de H₂-5 (δ_{H} 1.29/1.43) con C-6 (δ_{C} 72.5) (**Figura 72**).

Las conectividades observadas en el experimento ROESY del prelongileno **75** entre las parejas de protones H-7/H₃-27 (δ_{H} 3.73/1.08) y H-18/H₃-28 (δ_{H} 3.81/1.11), junto con la equivalencia espectroscópica que presenta con el (+)-peróxido de longileno **50**, nos permitió proponer una configuración relativa equivalente a la del (+)-peróxido de longileno **50**.



II.3.19. 23,24-Dehidroprolongileno **76**

La fórmula molecular del 23,24-dehidroprolongileno **76**, $C_{30}H_{50}O_5$, se dedujo por espectrometría de masas. El espectro de RMN 1H nos recordó parcialmente al respectivo espectro monodimensional del prolongileno **75** (**Figura 73**). El análisis de los espectros 2D localizó las diferencias más importantes en las señales correspondientes a los metinos C-21 (δ_H 5.72; δ_C 126.4) y C-22 (δ_H 6.13; δ_C 135.1). Además se observó la presencia de un nuevo metileno C-24 (δ_H 4.86; δ_C 114.4) que reemplaza al correspondiente metilo observado en **75**.

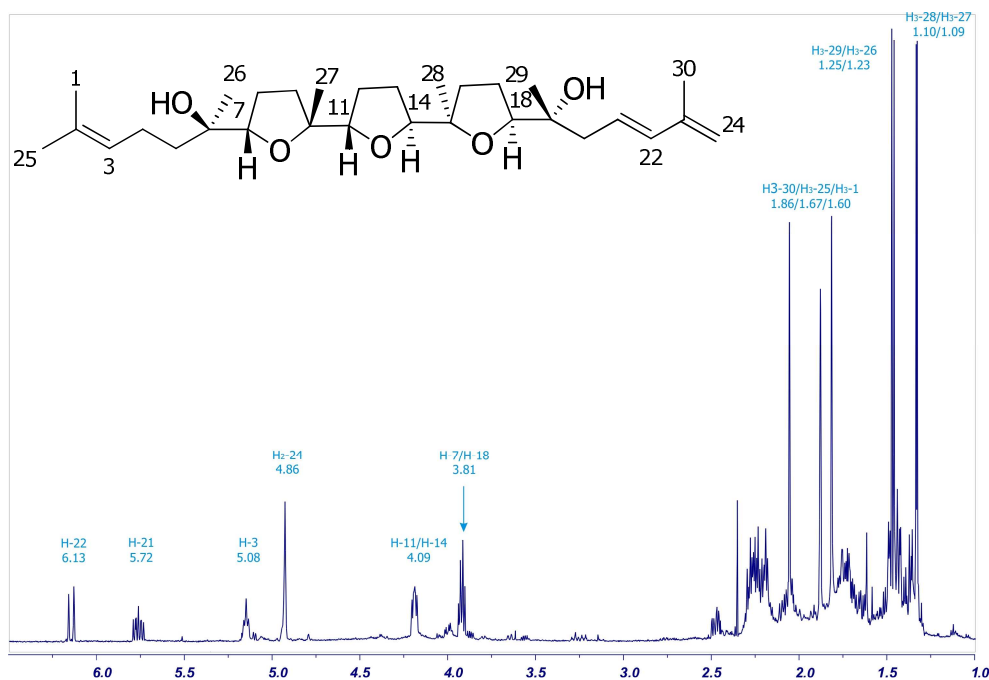


Figura 73. Espectro de RMN 1H del 23,24-dehidroprolongileno **76** en $CDCl_3$ (600 MHz).

Las correlaciones HMBC que muestran los protones H-21 (δ_H 5.72), H-22 (δ_H 6.13) y H₂-24 (δ_H 4.86) con el carbono C-23 (δ_C 142.3) junto con los datos del espectro de UV ($\epsilon = 25340$ [λ_{\max} 222.4 nm]) establecieron la presencia de un dieno conjugado como se muestra en la estructura propuesta para el 23,24-dehidroprelogileno **76** (Figura 74).

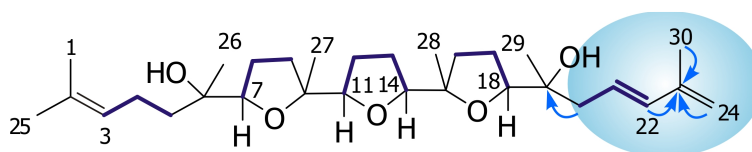
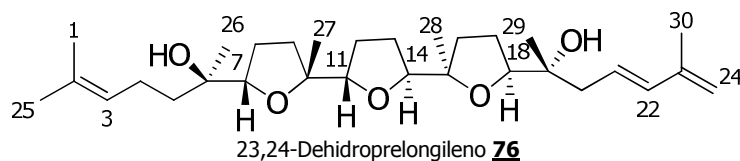


Figura 74. Estructura plana del 23,24-dehidroprelogileno **76**. (—) Correlaciones COSY. (H→C) Correlaciones HMBC.

Es importante destacar que la estereoestructura del 23,24-dehidroprelogileno **76** se confirmó por correlación química. Así, el tratamiento de la muestra de prelogileno **75** con DOWEX-50 en CHCl_3 dio lugar al 23,24-dehidroprelogileno **76** (Tabla 24).



nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	17.7	1.60 (3H)	s	
2	131.2			
3	124.9	5.08	t	6.82
4	22.2	1.99/2.09		
5	38.6	1.27/1.43		
6	73.0			
7	84.1	3.81	dd	6.5;11.7
8	25.3	1.87/2.06		
9	30.4	1.50/2.04		
10	85.3			
11	85.2	4.09	dd	5.2;9.3
12	29.5	1.53/2.03		
13	29.5	1.53/2.03		
14	85.2	4.09	dd	5.2;9.3
15	85.4			
16	30.4	1.50/2.04		
17	25.3	1.85/2.06		
18	84.1	3.81	dd	6.5;11.7
19	73.4			
20	42.5	2.09/2.29		
21	126.4	5.72	ddd	6.7;8.9;15.5
22	135.1	6.13	d	15.6
23	142.3			
24	114.4	4.86 (2H)	s	
25	25.7	1.67 (3H)	s	
26	24.3	1.23 (3H)	s	
27	23.5	1.09 (3H)	s	
28	23.6	1.10 (3H)	s	
29	24.3	1.25 (3H)	s	
30	18.8	1.86 (3H)	s	

Tabla 24. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C del 23,24-dehidroprolongileno **76**.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS NUEVOS METABOLITOS

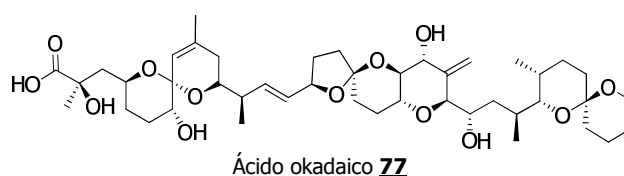
III. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS NUEVOS METABOLITOS

III.1. Actividad inhibitoria de las proteínas fosfatasa PP1 y PP2A

Los procesos de fosforilación y desfosforilación catalizados por enzimas quinasas y fosfatasas están considerados como uno de los mecanismos más importantes en el control de los procesos intracelulares. En particular, las fosfatasas de serina y treonina de tipo 1 (PP1) y 2A (PP2A) que se encuentran implicadas en la regulación de múltiples funciones, incluyendo el metabolismo, control del ciclo celular, diferenciación, transcripción de genes, síntesis de proteínas y apoptosis.⁴³

Además, el hecho de que estas enzimas posean un rol importante en numerosos mecanismos de señalización celular asociados a enfermedades como el cáncer, la diabetes y el mal de Alzheimer, ha motivado a la comunidad científica a diseñar nuevos fármacos contra estas dianas.⁴⁴

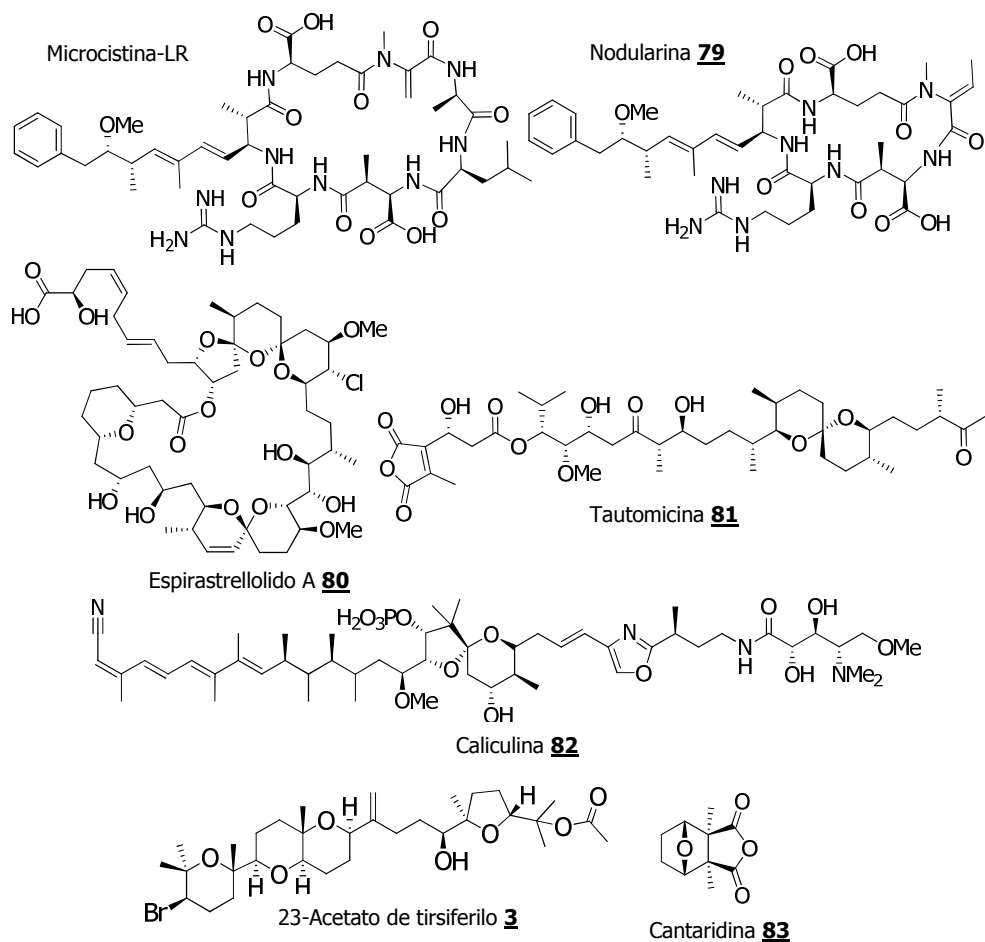
Así, el ácido okadaico **77** fue el primer compuesto de una exclusiva lista de inhibidores de fosfatasas de origen natural,⁴⁵ en la que también destacan péptidos cíclicos como la microcistina-LR **78** y la nodularina **79**; policétidos como el espirastrellolido A **80**, la tautomicina **81** y la caliculina **82**; terpenos como el 23-acetato de tirsiferilo **3** y la cantaridina **83**, entre otros (**Tabla 25**).



⁴³ S. Zolnierowicz. *Biochem. Pharmacol.*, **2000**, *60*, 1225. S. Wera y B. A. Hemmings. *Biochem. J.*, **1995**, *311*, 17. T. Hunter. *Cell*, **1995**, *80*, 225.

⁴⁴ A. McCluskey, A. T. R. Sim y J. A. Sakoff. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 1151. R.E. Honkanen y T. Golden. *Curr. Med. Chem.*, **2002**, *9*, 2055.

⁴⁵ C. Bialojan y A. Takai. *Biochem. J.*, **1988**, *256*, 283.



Compuesto	IC₅₀ [nM]	
	PP1	PP2A
Acido okadaico 77	20–50	0.1–0.3
Microcistina-LR 78	0.3–1	<0.1–1
Nodularina 79	2.4	0.3
Espirastrellolido A 80	50	1
Tautomicina 81	0.23–22	0.94–32
Caliculina 82	0.4	0.25
23-Acetato de tirsiferilo 3	Inactivo	4.7 x 10 ⁻⁷
Cantaridina 83	1100	194

Tabla 25. Valores de IC₅₀ frente a PP1 y PP2A para diferentes inhibidores de origen natural.

Como puede verse en la **Tabla 25**, inhibidores como el 23-acetato de tirsiferilo **3** y el espirastrellolido A **80** presentan una selectividad importante frente a la enzima fosfatasa del tipo 2A. Sin embargo y aun cuando el ácido okadaico **77** posee una elevada toxicidad e incluso está descrita como una sustancia promotora de tumores, continúa siendo el inhibidor más utilizado en estudio de los mecanismos de acción de las fosfatasas, probablemente por su fácil obtención a partir de cultivos de dinoflagelados.⁴⁶

Por todo lo anterior, nuestro grupo ha centrado sus esfuerzos en el desarrollo de inhibidores más asequibles, menos tóxicos y con mayor especificidad. En base a esto, a continuación se procede a determinar la actividad inhibitoria *in vitro* frente a las enzimas PP1 y PP2A de los nuevos compuestos obtenidos de *L. viridis*.

III.1.1. Ensayos *in vitro* de inhibición de fosfatasas

Los ensayos de inhibición *in vitro* con los nuevos metabolitos aislados de *L. viridis* se realizaron sobre las enzimas serina/treonina proteína fosfatasa tipo 1 y 2A. En el caso del enzima PP2A, se utilizó una presentación comercial de la casa Sigma-Aldrich®. Sin embargo, ante las dificultades para obtener el enzima PP1 comercialmente, se desarrolló un procedimiento para la expresión heteróloga y purificación de la subunidad catalítica de PP1 (PP1C) basado en las metodologías descritas previamente por los grupos de investigación de Lee y Holmes.⁴⁷

Los ensayos de inhibición enzimáticos frente a PP1 y PP2A son una adaptación de la técnica publicada por Takai y Mieskes.⁴⁸ El principio del

⁴⁶ H. Fujiki y M. Suganuma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **1999**, *125*, 150

⁴⁷ J. T. Maynes, K. R. Perreault, M. M. Cherney, H. A. Luu, M. N. G. James y C. F. B. Holmes. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 43198. J. F. Dawson, H. A. Luu, J. R. Bagu y C. F. B. Holmes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, *270*, 543. Z. Zhang, G. Bai, S. Deans-Zirattu, M. F. Browner y E. Y. C. Lee. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 1484.

⁴⁸ A. Takai y G. Mieskes. *Biochem. J.*, **1991**, *275*, 233.

ensayo radica en medir la desfosforilación enzimática del sustrato (*p*-Nitrofenil fosfato disódico) a través del registro de absorbancia a 405 nm.

Los compuestos ensayados se prepararon a partir de una disolución "stock" 10 mM en DMSO. A partir de la cual se realizaron diluciones seriadas con agua destilada (Panreac) hasta obtener las concentraciones deseadas que van desde 1 mM hasta 1 μ M. La proporción de estas disoluciones en la mezcla de reacción fue de 1:10 por lo que la concentración final de los metabolitos fue de 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M y 0.1 μ M, al mismo tiempo se garantizó que la concentración final de DMSO no sea mayor del 5%.

Para determinar la fiabilidad del ensayo, todos los análisis fueron acompañados de un control (actividad máxima), un blanco (actividad mínima) y se utilizó ácido okadaico **77** como sustancia de referencia, cuyo comportamiento es perfectamente conocido.

En la **Tabla 26**, se exponen los valores obtenidos del ensayo. Y como puede observarse, el único compuesto que presentó una actividad importante fue el (+)-peróxido de longileno **50** (**Figura 75**).

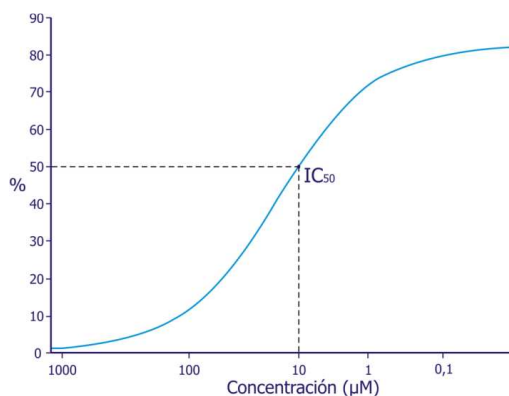


Figura 75. Porcentaje de inhibición de la proteína PP2A por el (+)-peróxido de longileno **50**, usando PNPP como sustrato en una longitud de onda (λ) de 405 nm. Donde se aprecia el valor del IC₅₀ de **50**.

Compuesto	IC₅₀ [μM]	
	PP1	PP2A
1,2-Dehidropseudodeshidrotirsiferol 54	>100	>100
Seco-dehidrotirsiferol 55	>100	>100
14-Cetodehidrotirsiferol 57	>100	>100
Pretirsenol A 58	>100	>100
13-Hidroxipretirsenol A 59	>100	>100
15-dehidroxitirsenol A 60	>100	>100
14-Hidroxiyucatecol 61	>100	>100
Yucatecona 62	>100	>100
Saiyacenol A 65	>100	>100
Saiyacenol B 66	>100	>100
Adejeno B 69	>100	>100
Piranodehidrotirsiferol 71	>100	>100
Nivariol A 72	>100	>100
Nivariol B 73	>100	>100
(+)-Peróxido de longileno 50	>100	10
Prelongileno 75	>100	>100
23,24-Dehidroprelongileno 76	>100	>100
Acido okadaico 77	0.074	2.2 x 10 ⁻³

Tabla 26. Valores de IC₅₀ frente a PP1 y PP2A para los compuestos ensayados.

El conocimiento de la conformación bioactiva que posee una molécula es el primer paso hacia el desarrollo de análogos con mejores propiedades (menos tóxicos y más selectivos, por ejemplo). Con esta finalidad se intentaron establecer los aspectos estructurales que rigen las actividades observadas en el (+)-peróxido de longileno **50** y prelongileno **75**. De este modo, hemos aplicado un modelo computacional de interacción proteína—ligando, intentando así establecer la pérdida de actividad inhibitoria del prelongileno **75** con respecto al (+)-peróxido de longileno **50**. Como paso previo, la conformación más plausible que adoptan estas moléculas en disolución también ha sido determinada, en este caso se aplicó un estudio que combina métodos computacionales de modelización y los datos de RMN.

III.2. Búsqueda conformacional del (+)-peróxido de longileno 50 y prelongileno 75

Las búsquedas conformacionales del (+)-peróxido de longileno **50** y prelongileno **75** se realizaron con el método de *MonteCarlo de Múltiples Mínimos* (MCMM), integrado en el programa MacroModel v8.5, uno de los métodos estocásticos más utilizados para analizar de manera eficiente moléculas con un alto número de grados de libertad. Las estructuras de partida que se utilizaron fueron generadas en el programa ChemBio-3D ultra v 11.0 a partir de la estructura cristalográfica del (-)-peróxido de longileno **74**, realizando las modificaciones pertinentes. El campo de fuerza utilizado fue el MMFFs* y dado que la espectroscopía de RMN se realizó en CDCl₃ las búsquedas se realizaron utilizando el modelo *Generalized Born/Surface Area* (GB/SA) de solvatación continua para dicho disolvente con el fin de simular las condiciones experimentales. Utilizando las condiciones citadas se realizó una búsqueda de 10,000 pasos, variando entre cada uno de ellos entre dos y cinco grados de libertad, y utilizando como estructura de partida en cada paso la generada en el paso anterior. A continuación, cada una de las estructuras generadas fue minimizada utilizando el algoritmo *Truncated Newton Conjugated Gradient* (TNCG) empleando como criterio de convergencia valores de 0.05 KJ/Åmol. Todas aquellas estructuras que mostraron una diferencia de más de 25 KJ sobre la de mínima energía fueron eliminadas.

Una vez terminada la búsqueda conformacional se procedió a la reminimización de los confórmeros obtenidos, manteniendo las condiciones utilizadas anteriormente, pero en este caso con el método *Full Matrix Newton Raphson* (FMNR) con 5000 interacciones y un criterio de convergencia de 0.05 KJ/Åmol. La existencia de estructuras duplicadas se comprobó de acuerdo con un criterio de mínimos cuadrados (RMSD máximo de 0.25 Å). Finalizada la búsqueda conformacional, se procedió a analizar aquellas estructuras dentro

del rango de energía de 13 KJ/mol respecto al mínimo global, lo que permitió considerar un total de 36 conformeros para el (+)-peróxido de longileno **50** y **77** para el prelongileno **75**.

La comparación y superposición de las 36 estructuras del (+)-peróxido de longileno **50** permitió incluir a la mayoría dentro de dos clusters conformacionales, a los que llamamos **Familia I** (15 estructuras) y **Familia II** (16 estructuras). El cálculo de las poblaciones relativas utilizando una distribución de Boltzman a 300 °K, nos indicó que la **Familia I** representaría el 79.8 % y la **Familia II** el 19.6 %, mientras que las cinco estructuras que no se agruparon en ninguna familia representaron el 0.6 % de la población dentro de la ventana estudiada (13 KJ/mol) (**Tabla 27**). Estas dos familias tienen en común diversas características: la región que comprende los tres anillos centrales es superponible, ya que presentaron el mismo plegamiento observado en la estructura cristalográfica del (-)-peróxido de longileno **74**. Sin embargo, la orientación que adopta la cadena acíclica en las dos familias es diferente. Así, mientras que en la **Familia I** observamos un plegamiento de la cadena análogo al observado en el cristal de **74**, en la **Familia II** se observa que el segmento C-19—C-24 adopta una conformación más extendida (**Figura 76 y 77**).

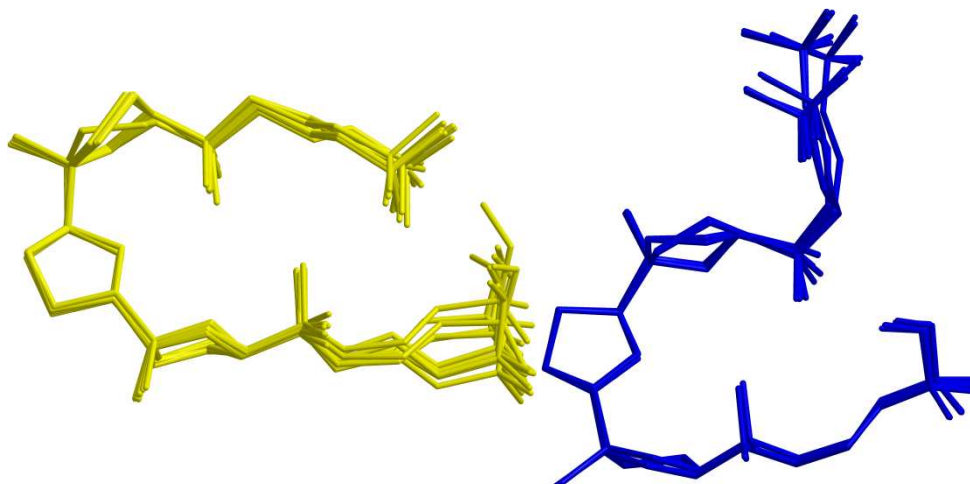


Figura 76. Representación de los diez conformeros de mínima energía de las dos familias conformacionales del (+)-peróxido de longileno **50**. **Familia I** (amarillo) y **Familia II** (azul).

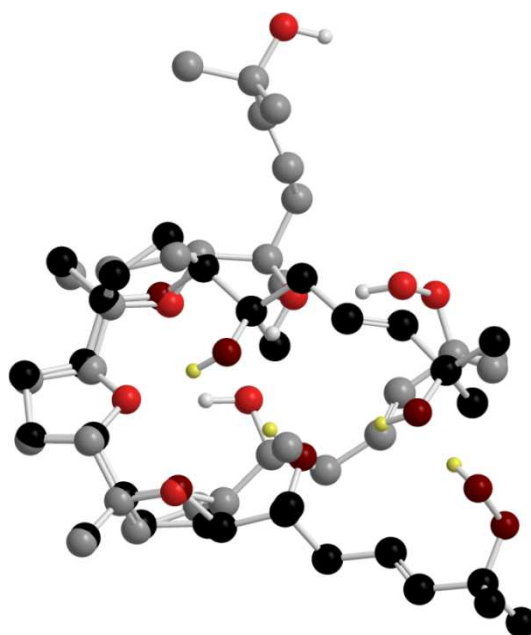


Figura 77. Comparación de los conformeros de mínima energía de las dos familias conformacionales del (+)-peróxido de longileno **50**.
Familia I: Carbono→Negro; Oxígeno→Granate; Hidrógeno→Amarillo.
Familia II: Carbono → Gris; Oxígeno → Rojo; Hidrógeno → Blanco.

Confórmero	Energía potencial (KJ/mol)		Distribución de Boltzman		Familia Conformacional de 50
	Compuesto		Compuesto		
	50	75	50	75	
1	0.0	0.0	34.9	29.5	I
2	2.9	3.2	10.8	8.3	I
3	3.3	4.0	9.3	5.9	I
4	3.4	4.1	9.0	5.7	I
5	5.5	4.6	3.8	4.7	II
6	5.9	4.7	3.2	4.5	I
7	6.0	4.8	3.1	4.4	I
8	6.3	5.3	2.5	3.5	II
9	7.0	5.5	2.1	3.2	II
10	7.2	6.8	2.0	1.9	I

Tabla 27. Resultados del análisis conformacional del (+)-peróxido de longileno **50** y prelongileno **75**.

Por otro lado, el análisis de los resultados obtenidos de la búsqueda conformacional del prelongileno **75**, sugiere la existencia de una única familia conformacional (**Tabla 27** y **Figura 78**). La comparación de estas estructuras con la del cristal del (-)-peróxido de longileno **74** reveló que el segmento C-1—C-18 adopta una conformación similar en ambos casos. Las diferencias observadas en la conformación del (+)-peróxido de longileno **50** y el prelongileno **75** suponemos que se deben a la ausencia del grupo hidroperóxido en este último.

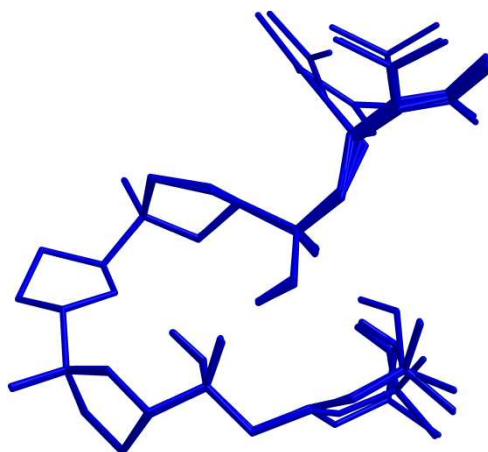


Figura 78. Representación de los diez conformeros de mínima energía de las dos familias conformacionales del prelongileno **75**.

III.2.1. Estudio conformacional por RMN

Teniendo en cuenta que las moléculas objeto de estudio son potencialmente flexibles, nuestra primera opción consistió en la determinación de las restricciones angulares de la molécula a través de la medición de las constantes de acoplamiento del (+)-peróxido de longileno **50** y el prelongileno **75**. Sin embargo, estas moléculas presentan dificultades para realizar dichas medidas. El primer inconveniente es la ausencia de acoplamientos ^1H — ^1H vecinales ($^3J_{\text{H,H}}$) en todos los sistemas de interés, lo cual no solamente nos impidió obtener información relevante acerca de la conformación de la molécula, sino que también nos imposibilitó el uso de experimentos del tipo HSQC—TOCSY para medir las constantes carbono—protón a dos y tres enlaces ($^{2,3}J_{\text{C,H}}$), por lo que se tuvo que recurrir a experimentos tipo HMBC para realizar dichos registros, eligiendo el HSQMBC por su alta sensibilidad.

Otro problema añadido para establecer las constantes de acoplamiento en el (+)-peróxido de longileno **50** fue el solapamiento de señales claves. Un ejemplo de esto se observó en las parejas de metinos H-11/H-14, que al tener desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C casi idénticos ($\delta_{\text{H}} \sim 4.09$; $\delta_{\text{C}} 85.8/85.4$),

no permite obtener información inequívoca de cada uno. Esta situación se vio repetida en casi todas las señales de interés, lo cual no permitió obtener información fiable del valor de las constantes.

Por otro lado, el prelongileno **75** solamente mostró solapamiento significativo en algunas señales de la molécula, por lo que en este caso, si se pudieron registrar algunas constantes de acoplamiento importantes para su análisis conformacional. En efecto, el análisis del experimento HSQMBC del prelongileno **75** permitió establecer los valores de las constantes de acoplamiento para la pareja C-6/C-7 ${}^2J_{C-6-H-7}$ 2.0, (${}^3J_{C-26-H-7} \sim 2.0$) y [${}^3J_{C-5-H-7} \sim 2.0$]; para el sistema C-10/C-11 ${}^3J_{C-9-H-11}$ 3.8, ${}^2J_{C-10-H-11}$ -4.5 y [${}^3J_{C-27-H-11} \sim 2.0$]; para el rotámero C-14/C-15 ${}^3J_{C-16-H-14}$ 4.2, ${}^2J_{C-15-H-14}$ -4.8 y [${}^3J_{C-28-H-14} \sim 2.0$] y para C-18/C-19 ${}^2J_{C-19-H-18}$ 1.8, (${}^3J_{C-29-H-18} \sim 2.0$) y [${}^3J_{C-20-H-18} \sim 2.0$] (**Figura 79**). Cabe mencionar que los valores de las constantes que están dentro de los corchetes se dedujeron del análisis combinado de los experimentos HSQMBC y HMBC de la siguiente manera. La ausencia de conectividad aparente en el HSQMBC sugiere que el valor de estas constantes debe ser cercano cero. Lo anterior, junto con el hecho de que en el experimento HMBC optimizado para $J_{C-H} > 2$ Hz se observase una débil intensidad para estas correlaciones, nos sugiere que el valor de estas constantes es pequeño (~ 2.0 Hz). Por otro lado, el valor de los acoplamientos dentro de los paréntesis, se dedujo a partir de las disposiciones que presentaron los otros dos diedros de cada sistema.

El análisis de las correlaciones dipolares observadas en los experimentos ROESY de estos dos metabolitos permitió establecer restricciones adicionales para los motivos C-6/C-7, C-10/C-11, C-14/C-15 y C-18/C-19 (**Figura 80**).

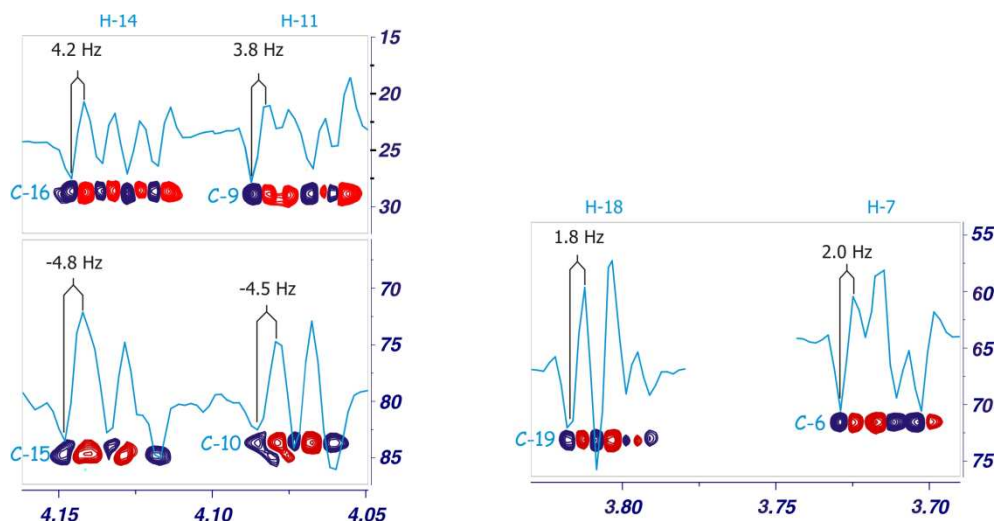


Figura 79. Secciones del espectro HSQMBBC del prelongileno **75**, indicando los valores de algunas de las constantes de acoplamiento heteronucleares ($^2,3J_{C-H}$).

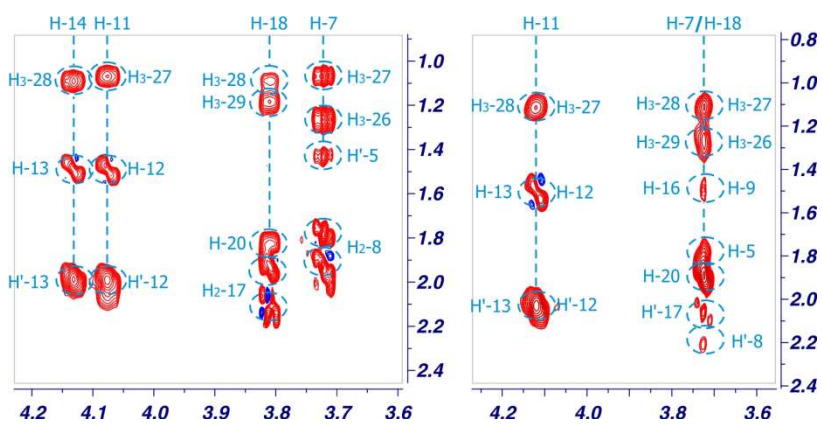


Figura 80. Secciones del espectro ROESY del (+)-peróxido de longileno **50** (Izquierda) y prelongileno **75** (Derecha) donde se muestran las correlaciones más importantes de las moléculas.

Basándonos en los datos anteriores se construyeron los conformeros más plausibles de cada sistema (C-6/C-7, C-10/C-11, C-14/C-15 y C-18/C-19), tal y como se observa en la **Figura 81**.

prelongileno			(+) -peróxido de longileno	
<i>J</i>	ROESY	Confórmero	ROESY	Confórmero
$^3J_{C-26-H-7} \sim 2.0$	H-7 ↔ H ₃ -26 [F]		H-7 ↔ H ₃ -26 [F]	
$^3J_{C-5-H-7} \sim 2.0$	H-7 ↔ H'-5 [M]		H-7 ↔ H ₂ -5 [M]	
$^2J_{C-6-H-7} 2.0$	H ₂ -5 ↔ H ₂ -8 [M]		H ₂ -5 ↔ H ₂ -8 [M]	
$^3J_{C-27-H-11} \sim 2.0$	H-11 ↔ H ₃ -27 [F]		H-11 ↔ H ₃ -27 [F]	
$^3J_{C-9-H-11} 3.8$	H ₃ -27 ↔ H ₂ -12 [M]		H ₃ -27 ↔ H ₂ -12 [M]	
$^2J_{C-10-H-11} -4.5$				
$^3J_{C-28-H-14} \sim 2.0$	H-14 ↔ H ₃ -28 [F]		H-14 ↔ H ₃ -28 [F]	
$^3J_{C-16-H-14} 4.2$	H ₃ -28 ↔ H ₂ -13 [M]		H ₃ -28 ↔ H ₂ -13 [M]	
$^2J_{C-15-H-14} -4.8$				
$^3J_{C-29-H-18} \sim 2.0$	H-18 ↔ H ₃ -29 [F]		H-18 ↔ H ₃ -29 [F]	
$^3J_{C-20-H-18} \sim 2.0$	H-18 ↔ H-20 [M]		H-18 ↔ H ₂ -20 [M]	
$^2J_{C-19-H-18} 1.8$	H ₂ -20 ↔ H ₂ -17 [M]		H ₂ -20 ↔ H ₂ -17 [M]	

Figura 81. Confórmeros obtenidos a partir de los ángulos diedros y correlaciones ROESY del (+)-peróxido de longileno **50** y prelongileno **75**. Las correlaciones dipolares están clasificadas en débil [D], Media [M] y Fuerte [F].

El hecho de que en la estructura cristalográfica del (-)-peróxido de longileno **74** se observaran cuatro enlaces de hidrógeno intramoleculares,³⁵ nos motivó a intentar establecer si estos enlaces se encuentran en el (+)-peróxido de longileno **50** y prelongileno **75** en disolución. Esto es posible de detectar por RMN, ya que el cambio en el desplazamiento químico de los protones de -OH depende de la temperatura de diferente manera según estén enlazados o no. Así, los valores pequeños de los coeficientes de temperatura

($\Delta\delta/\Delta T \leq 4$ ppb/ $^{\circ}\text{K}$ ó lo que es lo mismo ≤ 0.02 ppm/ 5°C) están asociados a protones involucrados en puentes de hidrógenos.⁴⁹

De este modo, el análisis de la correlación directa entre los desplazamientos químicos de los protones hidroxílicos y la temperatura en ambos compuestos, se realizó en CDCl_3 . Las lecturas se realizaron en intervalos de 5°C desde 22°C hasta 37°C (**Figura 82 y 83**). Los resultados de estas medidas se resumen en la **Tabla 28**.

(+)-peróxido de longileno 50				
Temp.	-OOH	-OH-6	-OH-19	-OH-23
22 °C	10.67	5.30	5.07	3.39
27 °C	10.61	5.28	5.06	3.33
32 °C	10.56	5.26	5.05	3.26
37 °C	10.51	5.24	5.04	3.20
$\Delta\delta/\Delta T$	0.05 ppm/5°C	0.02 ppm/5°C	0.01 ppm/5°C	0.06 ppm/5°C
Prelongileno 75				
22 °C	---	4.39	4.95	2.59
27 °C	---	4.37	4.91	2.51
32 °C	---	4.34	4.85	2.44
37 °C	---	4.31	4.80	2.37
$\Delta\delta/\Delta T$	---	0.03 ppm/5°C	0.05 ppm/5°C	0.07 ppm/5°C

Tabla 28. Desplazamientos químicos de los protones de los alcoholes y del hidroperóxido a diferentes temperaturas. En negritas se muestran los valores promedios de los coeficientes de temperatura.

⁴⁹ J. S. Lomas, A. Adenier, C. Cordier y J-C. Lacroix. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, **1998**, 2, 2647.

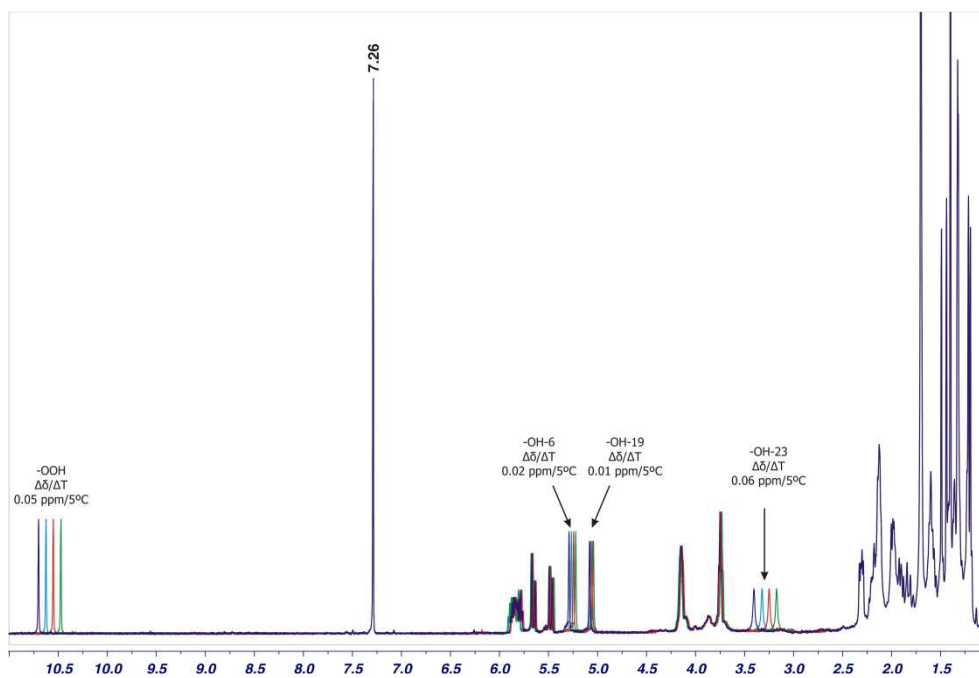


Figura 82. Espectros de RMN ^1H del (+)-peróxido de longileno **50** en CDCl_3 a diferentes temperaturas.

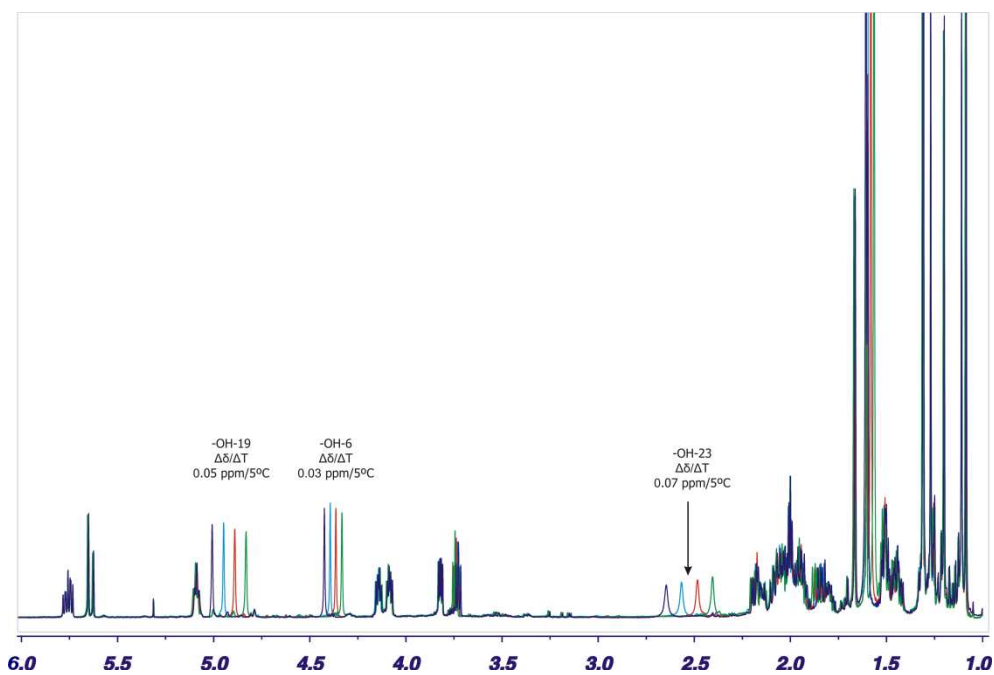


Figura 83. Espectros de RMN ^1H del prelongileno **75** en CDCl_3 a diferentes temperaturas.

III.2.2. Análisis de los resultados de la modelización a partir de los datos de RMN

Al analizar las geometrías de las familias conformacionales del (+)-peróxido de longileno **50** y prelongileno **75** se observó que los tres anillos oxolanos en las tres familias (dos para **50** y una para **75**) adoptan un plegamiento similar. El plegamiento de estos anillos se ajustaron a los rotámeros establecidos (C-6/C-7, C-10/C-11, C-14/C-15 y C-18/C-19) a partir de las constantes de acoplamiento y correlaciones ROESY de **50** y **75** (**Figura 81**).

Como ya se comentó anteriormente, la **Familia I** del (+)-peróxido de longileno **50** presenta un plegamiento de las cadenas acíclicas similar al observado en el cristal de **74**, mientras que en la **Familia II** el segmento C-19—C-24 adopta una conformación extendida. Sin embargo, ninguna de ellas explica por sí sola el coeficiente de temperatura del -OH-23 (0.06 ppm/5°C). Para justificar este valor es necesario considerar la co-existencia de las dos familias conformacionales.

Asimismo los valores de los coeficientes de temperatura se ajustan a la conformación de las cadenas acíclicas del prelongileno **75**, excepto por el valor registrado para el alcohol 23 ($\Delta\delta/\Delta T$ 0.07 ppm/5°C) que es un poco elevado.

Todos estos datos nos sugieren que los tres anillos oxolanos del (+)-peróxido de longileno **50** y prelongileno **75** deben de adoptar una conformación plegada parecida al cristal de **74**, mientras que las cadenas acíclicas tendría una mayor flexibilidad.

III.3. Estudio de interacciones proteína—ligando

El avance de las técnicas biofísicas de elucidación estructural como la cristalografía de rayos X durante los últimos años ha permitido incrementar rápidamente el número de estructuras 3D de proteínas que en muchos casos tienen un potencial terapéutico importante.

Este hecho ha fomentado el desarrollo de modelos computacionales que permiten predecir los aspectos fundamentales en las interacciones proteína—ligando que constituyen una herramienta esencial en el desarrollo de nuevos fármacos.⁵⁰ Las simulaciones de *Docking* representan una de las aproximaciones más comunes para el estudio de estas interacciones, ya que tratan de predecir el sitio de unión con la proteína, la conformación más probable del ligando e incluso la energía de enlace.⁵¹

Para llevar a cabo las simulaciones de *Docking* se suele utilizar un algoritmo de búsqueda que considera únicamente al ligando flexible, mientras que el receptor se mantiene fijo. Los algoritmos que consideran únicamente la flexibilidad del ligando pueden ser de tres tipos.⁵²

Método sistemático: Este método intenta explorar todos los grados de libertad de la molécula. Tiene la desventaja de que al ser un conjunto de pasos secuenciales cada paso introduce uno o más grados de complejidad adicionales lo que deriva en la llamada explosión combinatoria. Dicho de otra manera, este algoritmo es muy útil cuando el ligando posee pocos enlaces con libre rotación. Por ejemplo, las combinaciones de los rotámeros alternados para una molécula con tres enlaces sencillos dan lugar a 216 combinaciones. Si el número de ángulos diedros es de nueve, los posibles ordenamientos generados superan

⁵⁰ W. L. Jorgensen. *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*, 724. W. L. Jorgensen. *Science*, **2004**, *303*, 1813.

⁵¹ B. K. Shoichet, S. L. McGovern, B. Wei y J. J. Irwin. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, *6*, 439.

⁵² D. B. Kitchen, H. Decornez, J. R. Furr y J. Bojorath. *Nature Reviews*, **2004**, *3*, 935.

los diez millones. Para prevenir la explosión combinatoria muchas búsquedas utilizan librerías de confórmeros pre-generadas (bases de datos). Un ejemplo de este tipo de búsqueda es el FLOG, el cual genera las bases de datos de los confórmeros a partir de distancias geométricas.⁵²

Método estocástico: Como su propio nombre lo dice, este algoritmo realiza cambios al azar de uno o más átomos del ligando en un valor de Δx , Δy y Δz . Posteriormente se calcula la energía potencial del sistema modificado y se compara con la que posee el confórmero inicial. Si la energía del confórmero de partida es mayor se acepta esta nueva estructura y se utiliza como nuevo punto de partida para otro desplazamiento aleatorio. Si la energía del nuevo confórmero es mayor o igual a la del confórmero de partida, la nueva estructura se rechaza y se regresa a la estructura anterior para repetir el proceso. Este proceso se repite un número de veces tan grande que permite muestrear de manera eficiente todo el espacio conformacional de moléculas con alto número de grados de libertad y al mismo tiempo permite obtener una colección de confórmeros energéticamente más favorables. Ejemplos de las búsquedas estocásticas son los algoritmos de Monte Carlo (MC) y el algoritmo Genético (GAs). Actualmente se han implementado nuevas variantes del algoritmo de Monte Carlo, incluyendo el utilizado en el ya popular AutoDock.⁵²

Método Determinístico: Los algoritmos de *Dinámica Molecular* (MD) y *Minimización de Energía* son los dos métodos de búsqueda por simulación. El algoritmo de MD es actualmente el método de simulación más popular. Este método consiste en una simulación que permite que átomos y/o moléculas interactúen por un período de tiempo con el fin de intentar emular el comportamiento que tendrían experimentalmente. El principal problema de las simulaciones por MD es que a menudo no pueden superar barreras de alta energía, es decir, que las búsquedas a menudo quedan confinadas en un mínimo local. Con el fin establecer si el sistema ha alcanzado un mínimo global

o simplemente ha caído en bucle local de energía, se realiza un muestreo del complejo proteína—ligando a diferentes temperaturas y se parte de un abanico amplio de conformaciones. Si estos evolucionan hacia el mismo mínimo se considera a éste como el mínimo global. El algoritmo de *Minimización de Energía* se utiliza raramente como método de búsqueda independiente ya que este método únicamente localiza mínimos locales, sin embargo, este método es generalmente utilizado en combinación con los métodos de búsqueda sistemáticos y estocásticos. De esta manera se combinan búsquedas globales con búsquedas locales.⁵²

Una vez generadas las diferentes orientaciones del ligando en el sitio activo, la evaluación y clasificación de dichas estructuras es un aspecto crucial del *Docking*, ya que las orientaciones por si solas, no tiene ningún valor si no se puede diferenciar las correctas de las incorrectos. Para el cálculo de estas energías de afinidad entre la proteína y el ligando, el *Docking* tiene implementado algoritmos de puntuación ("*scoring function*") que se encargan de calcular la energía de afinidad del complejo proteína—ligando. Actualmente existen tres clases de "*scoring function*" que son utilizados en *Docking*:

Force-Field-based scoring: Este sistema de puntuación usualmente cuantifica la suma de dos tipos de energías, la energía de interacción del complejo proteína—ligando y la energía interna del ligando (interacciones de Van der Walls, coulombianas e interacciones por impedimento estérico).⁵²

Empirical scoring function: Este algoritmo es capaz de reproducir datos experimentales, como la energía de afinidad. Se basa en la premisa de que la energía de afinidad se puede estimar a partir de la suma de términos individuales que desempeñan un papel en la interacción proteína—ligando. Estos términos son obtenidos por *análisis de regresión lineal* de datos experimentales como: energía de afinidad, energía potencial e información de

la estructura de rayos X. La desventaja viene definida por el mismo hecho de su dependencia de análisis de regresión lineal de los datos experimentales.⁵²

Knowledge-based scoring functions: En esencia este algoritmo simula los contactos favorables y desfavorables que posee un complejo proteína—ligando. Estos contactos derivan de interacciones atómicas pre-establecidas en bases de datos (Protein Data Bank⁵³), estos conocimientos empíricos permiten emular los contactos que podría tener un conformero con los residuos de la proteína. La energía de afinidad de un modelo estructural, es entonces la suma de todos los contactos (favorables y desfavorables) calculados entre el conformero y los residuos del receptor.⁵²

III.3.1. Establecimiento de un modelo de interacción PP2A—ligando

Es importante destacar que en nuestro caso particular no ha sido posible abordar el estudio de interacciones enzima—ligando a través de métodos experimentales. En efecto, la presencia de iones metálicos paramagnéticos (Mn^{+2}) en el sitio activo de la proteína fosfatasa del tipo 2A, junto con la poca estabilidad de la proteína, ha dificultado el análisis de las interacciones proteína—ligando a través de técnicas de RMN. Por otro lado, la baja afinidad que posee el ligando sobre el sitio activo de la PP2A, ha impedido hasta el momento resolver este problema por técnicas cristalográficas. En este sentido, el estudio computacional de *Docking* representa una alternativa interesante para establecer el posible modo de unión del (+)-peróxido de longileno **50** y el prelongileno **75** con la PP2A.

El primer paso, para llevar a cabo las simulaciones de *Docking*, consiste en la optimización de los parámetros usados. Así, inicialmente se realizó un

⁵³ H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov y P. E. Bourne. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 235.

estudio preliminar de *Docking* del ácido okadaico **77** y la PP2A, ya que se trata de un ligando "similar" y cuya estructura de rayos X es conocida. En primer lugar se tomaron las coordenadas de la proteína, en este caso la subunidad catalítica de la PP2A se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (código PDB 2ie4).⁵⁴ En lo referente al ligando, la estructura utilizada fue el confórmero de mínima energía obtenido de la búsqueda conformacional del ácido okadaico **77**. Las simulaciones de *Docking* fueron realizadas en el programa Autodock v3.0.5 implementados en la interfaz gráfica de AutoDockTools v1.5.2 (ADT).⁵⁵ Es importante destacar que esta versión no incluye los parámetros para la inclusión de átomos de manganeso (Mn^{+2}) en el modelo, por lo que se tuvo que definir manualmente los valores de radio de Van der Waals ($r = 1.3 \text{ \AA}$), energía electrostática ($\epsilon = 0.55 \text{ kcal/mol}$), carga (+2) de los iones manganeso.

Inicialmente, las simulaciones de *Docking* se realizaron usando los parámetros estándar del programa, los cuales utilizan cargas de tipo Kollman para la proteína y cargas Gasteiger para el ligando. Una vez generadas las orientaciones más probables que adopta **77** en el sitio activo de la PP2A, la conformación más favorable debía ser escogida mediante los siguientes criterios de selección:

1. La clasificación de las conformaciones resultantes, de acuerdo con los valores de energía de unión.
2. El número de veces que se repite la orientación generada, estableciendo como estructuras duplicadas a todas aquellas que presentan una desviación cuadrática media (RMSD)⁵⁶ inferior a 2.0 \AA .

⁵⁴ Y. Xing, Y. Xu, Y. Chen, P. D. Jeffrey, Y. Chao, Z. Lin, Z. Li, S. Strack, J. B. Stock e Y. Shi. *Cell*, **2006**, *127*, 341.

⁵⁵ G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew y A. J. Olson. *J. Comput. Chem.*, **1998**, *19*, 1639.

⁵⁶ La desviación cuadrática media (RMSD) es una medida de la distancia promedio que existe entre pares de átomos equivalentes en dos estructuras.

Sin embargo, en estas primeras simulaciones se observó que el ligando se posicionaba demasiado cerca de los iones Mn^{+2} y de acuerdo con una comparación con otras estructuras de rayos X de la PP2A la distancia adecuada entre los iones Mn^{+2} y la estructura debe de ser siempre superior a 4.5 Å. Dedujimos que la asignación de las cargas hechas para el Mn^{+2} no eran correctas, y por lo tanto es posible que el posicionamiento del grupo carboxilato del ácido okadaico **77** cerca de estos iones se debiera a la sobrestimación de estos valores de las cargas. Con el fin de resolver este problema, se decidió realizar un cálculo *ab initio* para asignar las cargas Mulliken de los residuos localizados en la esfera de coordinación de los iones Mn^{+2} , así como para los Mn^{+2} .

De esta forma, los cálculos de las cargas para los átomos de los residuos asp-57, his-59, asp-85, asn-117, his-167, his-241, H₂O-503, así como para los propios iones Mn^{+2} fueron realizados a través del método DFT a nivel teórico B3LYP/6-31G. Como se puede observar en la **Figura 84**, el resultado es que las cargas de los iones Mn^{+2} en el sitio activo de la PP2A es de +0.5, lo cual indica una transferencia importante de carga desde los residuos que se encuentran en la esfera de coordinación hacia los iones metálicos.⁵⁷

Por todo lo anterior, la restricción de distancia entre los iones Mn^{+2} y la estructura de los ligandos (≥ 4.5 Å) fue utilizada como un criterio adicional de selección. De hecho, solamente aquellas estructuras que cumplieron este criterio fueron tomadas en cuenta para posteriores análisis.

⁵⁷ A. Khandelwal, V. Lukacova, D. Comez, D. M. Kroll, S. Raha y S. Balaz. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 5437. A. E. Cho, V. Guallar, B. J. Berne y R. Friesner. *J. Comput. Chem.*, **2005**, *26*, 915. X. Hu, S. Balaz y W. Shelver. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **2004**, *22*, 293.

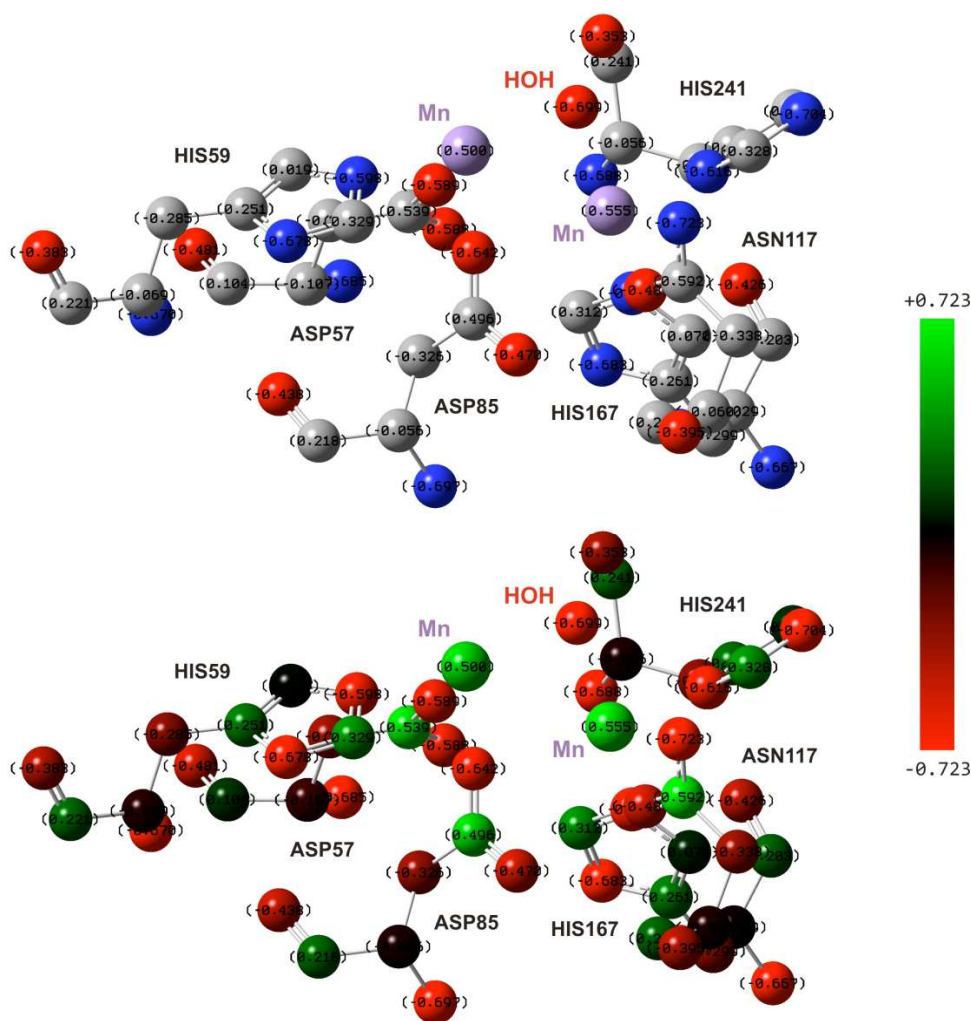


Figura 84. Cargas de Mulliken calculadas para los todos los átomos de los residuos situados a una distancia de 3 Å de los iones manganeso en el sitio catalítico de PP2A.

Las simulaciones de *Docking* del ácido okadaico **77** con los nuevos ficheros que incluyeron las cargas obtenidas de los cálculos *ab initio* permitió obtener una conformación similar a la que adopta el ácido okadaico **77** en el complejo cristalográfico PDB 2ie4. De hecho, la desviación cuadrática media (RMSD) calculada para los átomos pesados del confórmero de mínima energía

del *Docking* con respecto al del ácido okadaico en el cristal fue inferior a 1.0 Å (**Figura 85**).

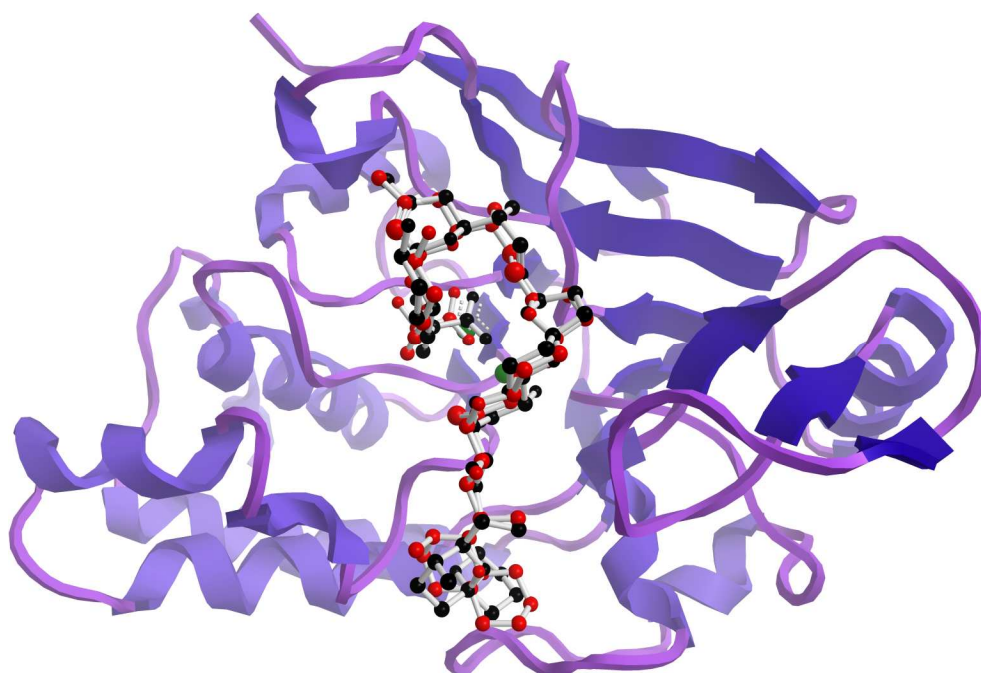


Figura 85. Superposición de la estructura cristalográfica del complejo PP2A—AO (ligando en negro) con el conformero de menor energía obtenida de la simulación del *Docking* (Ligando en naranja).

Debido a que tanto el (+)-peróxido de longileno **50** como el prelongileno **75** poseen respectivamente en su estructura 14 y 13 grados de libertad, se decidió realizar una prueba adicional con un ligando que tuviese una mayor flexibilidad conformacional. Así, siguiendo la metodología anterior, se realizó la simulación de *Docking* entre la caliculina **82** y la proteína fosfatasa del tipo 1 (PP1; código 1it6).⁵⁸ Los resultados de esta simulación lograron reproducir fielmente la conformación observada en la estructura de rayos X, con un RMSD de 0.47 Å (**Figura 86**).

⁵⁸ A. Kita, S. Matsunaga, A. Takai, H. Kataiwa, T. Wakimoto, N. Fusetani, M. Isobe y K. Miki. *Structure*, **2002**, *10*, 715.

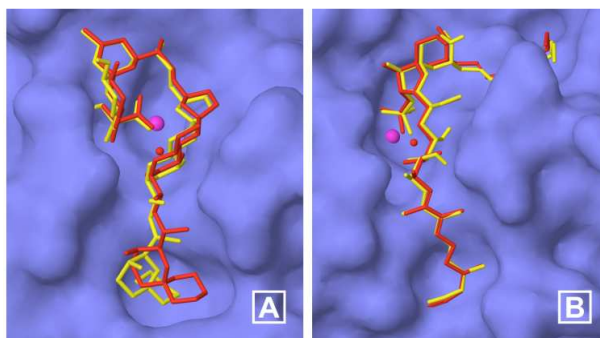


Figura 86. (A) Complejo ácido okadaico–PP2A. (B) Complejo caliculina–PP1. En los dos casos se presenta la estructura cristalográfica en rojo y el resultado de *Docking* en amarillo.

Aunque los resultados preliminares fueron alentadores, cabe destacar que los dos casos analizados hasta el momento presentaron comportamientos distintos (**Figura 87**). Así, en la simulación entre el ácido okadaico y PP2A, se obtuvieron cuatro clusters representativos, siendo el conjunto de menor energía el más poblado (113 de las 200 orientaciones generadas). Sin embargo, en la simulación correspondiente al complejo caliculina–PP1, la simulación arrojó una gran cantidad de clusters poco poblados.

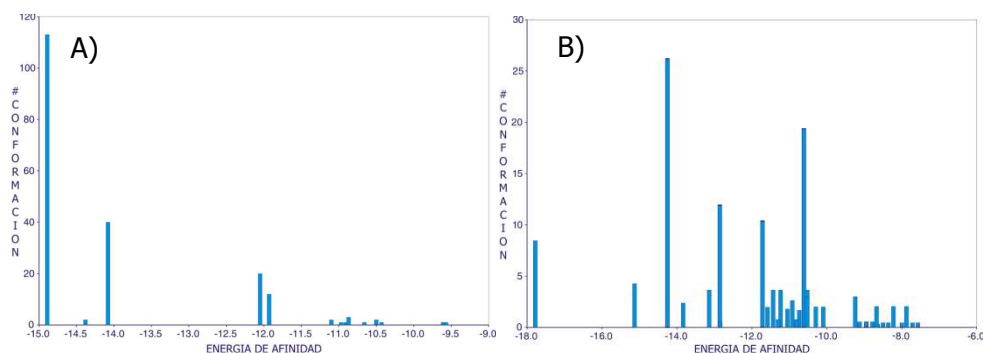


Figura 87. Histogramas de las simulaciones de *Docking* (RMSD de 2,0 Å). (A) Complejo ácido okadaico–PP2A. (B) Complejo caliculina–PP1.

Aun cuando los resultados de las simulaciones son muy diferentes, la aplicación de los criterios de selección descritos anteriormente permitió una sencilla identificación de las conformaciones más favorables en cada uno de los casos analizados. Sin embargo, no hay que olvidar que estos resultados

derivan de simulaciones y deben de ser interpretados con la precaución pertinente, al menos hasta que no se realicen otros estudios.⁵⁹

Una vez desarrollado y verificado el protocolo para el análisis de las interacciones PP2A—inhibidores, a través de las simulaciones de *Docking*, a continuación se procedió a utilizar esta aproximación para predecir la conformación que podrían adoptar en el sitio activo de la PP2A, los compuestos (+)-peróxido de longileno **50** y prelongileno **75**.

III.3.2. Modelos de interacción de los longilenos y la PP2A

Las simulaciones de *Docking* del (+)-peróxido de longileno **50** con la subunidad catalítica de la PP2A (utilizando las cargas resultantes de los cálculos *ab initio* para la proteína y calculando las del ligando en el programa GAMESS con el método DFT a nivel teórico B3LYP/6–31G), dio lugar a tres grupos principales de conformeros, con 56 de las 200 orientaciones generadas concentradas dentro del cluster de mínima energía, tal y como se observa en las **Figura 88**.

Asimismo, la simulaciones de *Docking* del prelongileno **75** y la PP2A, nos sugirió una conformación bastantes probable para este compuesto, ya que de los 200 *Dockings* realizados, un total de 103 se agrupan dentro del cluster de mínima energía (**Figura 88**).

⁵⁹ X. Hu, W. H. Shelver. *J. Mol. Graph. Model.*, **2003**, 22, 115.

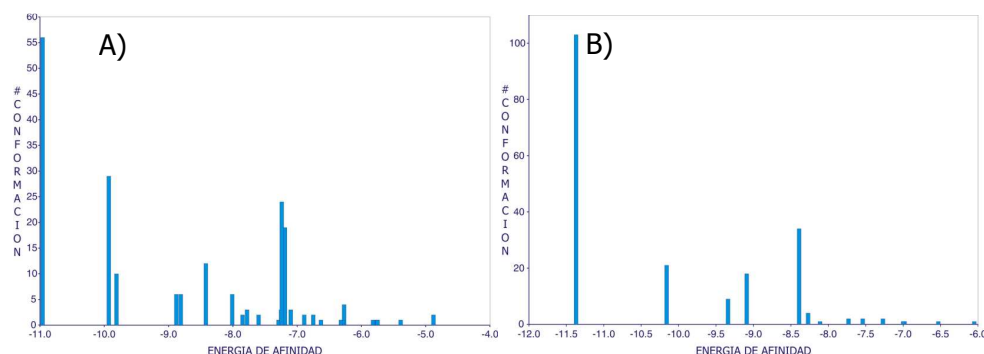


Figura 88. Histogramas de las simulaciones de *Docking* (RMSD de 2,0 Å). **(A)** Complejo (+)-peróxido de longileno-PP2A. **(B)** Complejo prelongileno-PP1.

Una vez utilizados los criterios de selección citados anteriormente, elegimos en los dos casos el conformero que presentó la menor energía de enlace (**Figura 89**) y siguiendo la estrategia marcada para el estudio de las interacciones proteína—ligando, se procedió a calcular mediante el programa *DrugScore*^{ENLÍNEA} los contactos favorables y desfavorables que presentan los conformeros de mínima energía de **50** y **75** en el sitio activo de la PP2A.

DrugScore^{ENLÍNEA} fue desarrollado a partir de la información extraída de más de 1300 estructuras de rayos X de complejos proteína—ligando y su posterior transformación en parámetros de preferencia dependientes de la distancia y la superficie accesible al disolvente, permite discriminar entre modos de unión favorables y desfavorables a través de una descripción cualitativa de las interacciones existentes, convirtiéndose en una poderosa herramienta que complementa las simulaciones de *Docking* y facilita el proceso de selección de la conformación más favorable.^{60,61,62}

⁶⁰ H. Gohlke, M. Hendlich y G. Klebe. *J. Mol. Biol.*, **2000**, 295, 337.

⁶¹ *DrugScore*^{ENLÍNEA} se encuentra disponible en internet a través de <http://www.agklebe.de/drugscore>.

⁶² C. A. Sotriffer, H. Gohlke y G. Klebe. *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1967.

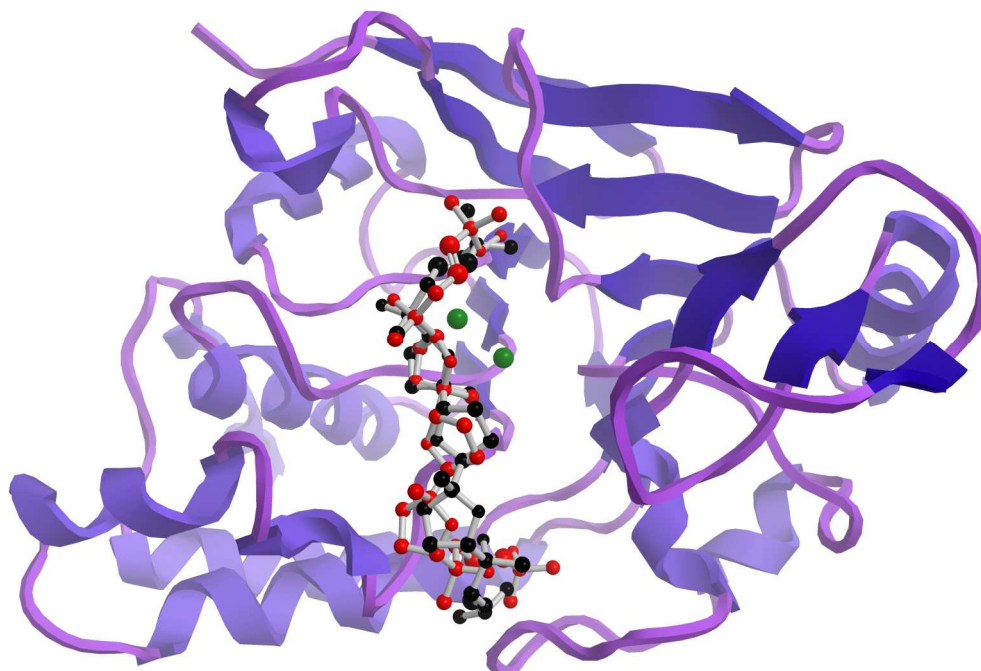


Figura 89. Superposición de los conformeros de menor energía obtenidos del *Docking* del (+)-peróxido de longileno **50** (Ligando en negro) y prelongileno **75** (Ligando en naranja) con la PP2A.

En el caso del complejo (+)-peróxido de longileno—PP2A, los resultados establecieron que el grupo hidroperóxido en **50** presenta dos enlaces de hidrógeno con los residuos arg-214 e his-241, así como otro entre el hidroxilo sobre C-23 y el residuo ile-123. En términos generales, el (+)-peróxido de longileno **50** posee interacciones favorables, excepto por la interacción negativa que se observa en el surco hidrofóbico con el residuo gln-122 (**Figura 90**).

El análisis del complejo entre el prelongileno **75** y PP2A contrasta con los resultados anteriores, ya que como se puede ver en la **Figura 90**, no se observan grandes contribuciones favorables, pero sí pequeñas contribuciones desfavorables con el trp-200, his-118 y leu-243.

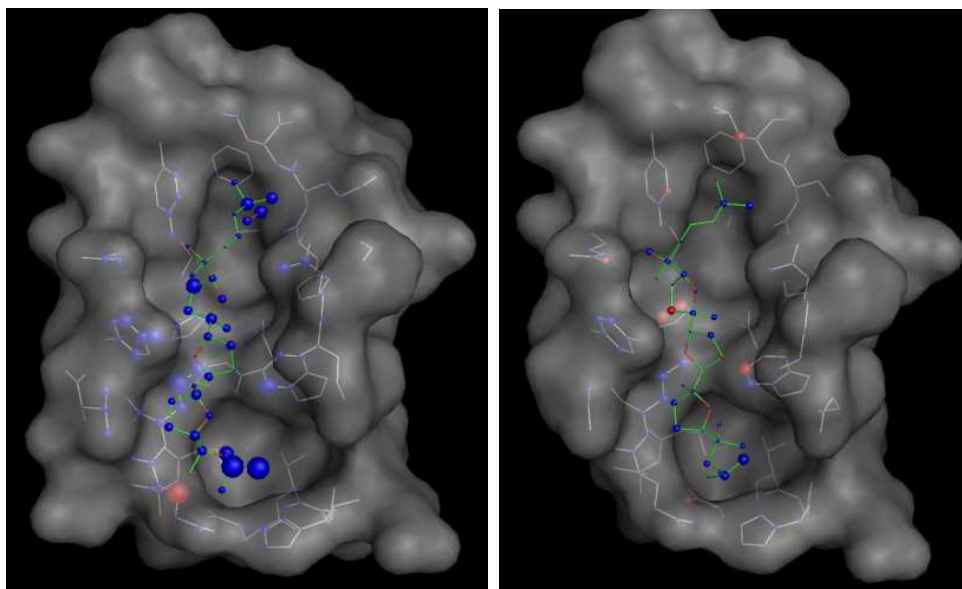


Figura 90. Evaluaciones en el *DrugScore* de las estructuras de mínima energía obtenidas del *Docking* de la PP2A con el (+)-peróxido de longileno **50** (izquierda) y el prelongileno **75** (derecha).

Así, el análisis en el *DrugScore* indica una mayor afinidad del (+)-peróxido de longileno **50** en el sitio activo de la PP2A que el prelongileno **75**, lo cual podría explicar la mayor actividad del (+)-peróxido de longileno **50**.

Por otro lado, los resultados del *Docking* de **50** y **75**, nos indican que ambos compuestos presentan una orientación global similar (**Figura 89 y 90**), si a esto le sumamos que la única diferencia entre ellos es la presencia en **50** de un grupo hidropéroxido alílico sobre C-2 frente a un doble enlace en la posición C-2—C-3 en **75**, puede concluirse que el grupo —OOH del (+)-peróxido de longileno **50** debe tener una función importante en el aumento de la actividad inhibitoria de la PP2A (IC_{50} 10 μ M) con respecto al prelongileno **75** (IC_{50} >100 μ M).

III.4. Actividad citotóxica de los nuevos metabolitos

A fin de evaluar la actividad citotóxica de los nuevos poliéteres de *L. viridis*, se cedieron muestras de los nuevos compuestos al *Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer* ubicado en el *Centro de Investigación del Cáncer (CSIC—Universidad de Salamanca)*, donde se llevaron a cabo ensayos de inhibición del crecimiento celular frente a las líneas celulares *Jurkat* (Células de leucemia linfocítica aguda), *MM144* (Células de mieloma múltiple sensible a doxorubicina), *HeLA* (Células de adenocarcinoma de cérvix) y *CADO ES1* (Sarcoma de ewing's).

El bioensayo de citotoxicidad de los nuevos poliéteres sobre las líneas celulares antes mencionadas se realizó utilizando el método colorimétrico de la sal de tetrazolio (XTT), el cual consiste en la cuantificación mediante técnicas espectrofotométricas del cambio de color del XTT (amarillo) cuando se convierte a formazán (naranja), este cambio se debe a la reducción de la sal por una deshidrogenasa presente en las mitocondrias de los seres vivos. Esta cuantificación nos da idea del porcentaje de células vivas.⁶³

Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 29**, donde se aprecia las concentraciones de IC₅₀ obtenidas de las curvas de dosis-respuesta a la que se produce la inhibición del 50 % del crecimiento celular.

⁶³ R. Álvarez, C. Álvarez, F. Mollinedo, B. G. Sierra, M. Medarde, R. Peláez. *Bioorg. & Med. Chem.*, **2009**, *17*, 6422.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)			
	Jurkat	MM144	HeLA	CADO ES1
Dehidrotirsiferol 2	13.5	21.5	34.5	12.0
1,2-Dehidropseudodeshidrotirsiferol 54	15.5	15.5	24.0	7.6
Secodehidrotirsiferol 55	2.5	12.0	30.0	13.0
Pretirsenol A 58	8.2	10.2	29.0	14.5
13-Hidroxipretirsenol A 59	7.2	15.5	26.0	3.1
15-Dehidroxitirsenol A 60	7.6	7.3	23.0	16.5
14-Hidroxiyucatecol 61	4.6	26.0	30.5	14.5
Yucatecona 62	2.9	16.5	27.0	19.0
Saiyacenol A 65	7.8	27.0	27.5	25.5
Saiyacenol B 66	2.7	11.0	24.5	14.0
Piranodehidrotirsiferol 71	3.2	15.0	25.0	8.3
Nivariol A 72	3.4	5.8	25.5	15.0
Nivariol B 73	15.0	7.5	29.0	13.0
Prelongileno 75	4.6	5.2	38.0	21.5
23,24-Dehidroprelongileno 76	4.1	6.0	28.5	11.5

Tabla 29. Valores de IC₅₀ frente a las líneas celulares tumorales para los compuestos ensayados.

Como se puede ver en la tabla anterior, casi todos los compuestos muestran una ligera selectividad hacia la línea celular de leucemia linfocítica aguda (Jurkat).

ORIGEN BIOGENÉTICO DE LOS NUEVOS METABOLITOS

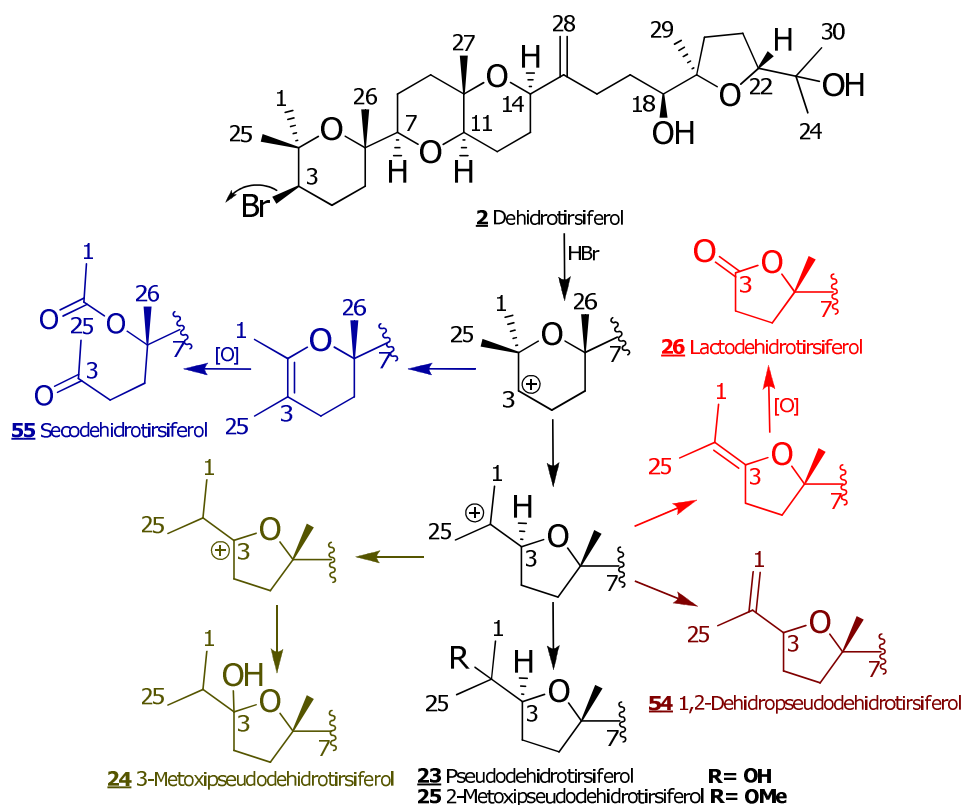
IV. ORIGEN BIOGENÉTICO DE LOS NUEVOS METABOLITOS

Como se señaló en la introducción de esta memoria, la biogénesis de los poliéteres triterpénicos aislados del género de *Laurencia* pueden ser el resultado de la ciclación del (6*S*,7*S*,10*R*,11*R*,14*R*,15*R*,18*S*,19*S*)—tetraepóxido de escualeno **53**. En esta hipótesis, proponemos una ruta general para la biogénesis de los “cabezas de serie”, mientras que los compuestos minoritarios podrían ser el resultado de modificaciones químicas que sufren los intermediarios de la ruta general. Así, una vez establecida la estructura de los nuevos metabolitos, nos encontramos en disposición de pasar a considerar si estos compuestos se ajustan a la propuesta biogenética propuesta para este tipo de compuestos.

Propuestas biogenéticas

IV.1. *1,2-Dehidropseudodehidrotirsiferol* **54** y *secodehidrotirsiferol* **55**

Una característica importante a enfatizar del 1,2-dehidropseudodehidrotirsiferol **54** y secodehidrotirsiferol **55** respecto al dehidrotirsiferol **2** fue el reagrupamiento que presentaron estos en el segmento C-1—C-6. Este reagrupamiento sugiere que la génesis de estos compuestos podría deberse a la formación de un carbocatión en el anillo **A** del dehidrotirsiferol **2** que evolucionaría hacia los compuestos **54** y **55** por un reagrupamiento similar al Wagner—Meerwein (**Esquema 8**).

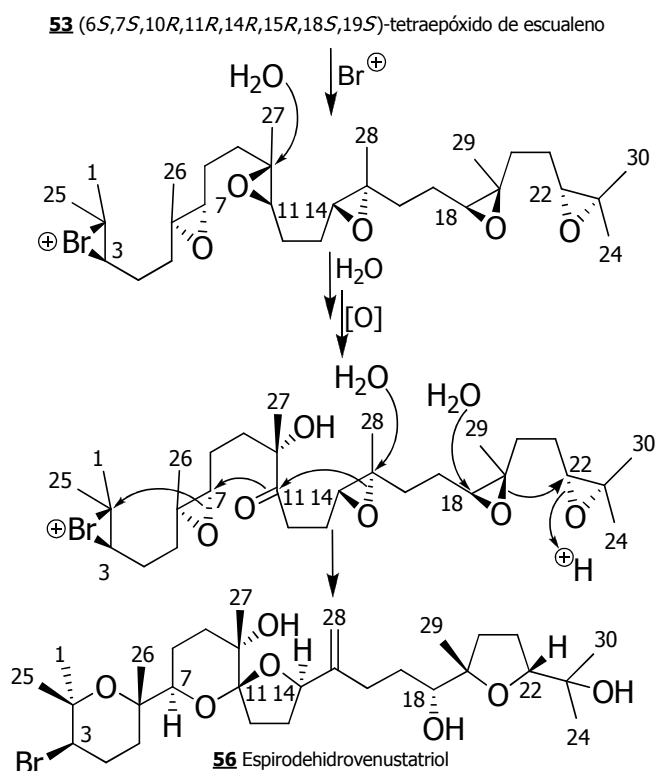


Esquema 8. Rutas biogénicas propuestas para las modificaciones observadas en el anillo **A** de algunos poliéteres triterpénicos.

Con base en la propuesta biogénica mostrada en el esquema anterior, una muestra de dehidrotirsiferol **2** fue tratada con AgNO_3 usando una mezcla metanol:agua (50:50) o acetonitrilo anhidro como disolvente. En el primer caso, la mezcla metanol:agua dió lugar a la formación del pseudodehidrotirsiferol **23** y 2-metoxipseudodehidrotirsiferol **25**. Por otro lado, al utilizar como disolvente acetonitrilo, tres compuestos con una masa a m/z 506 fueron observados por LC-MS, siendo identificado uno de ellos como el compuesto 1,2-dehidropseudodehidrotirsiferol **54**.

IV.2. Espirodehidrovenustatriol 56

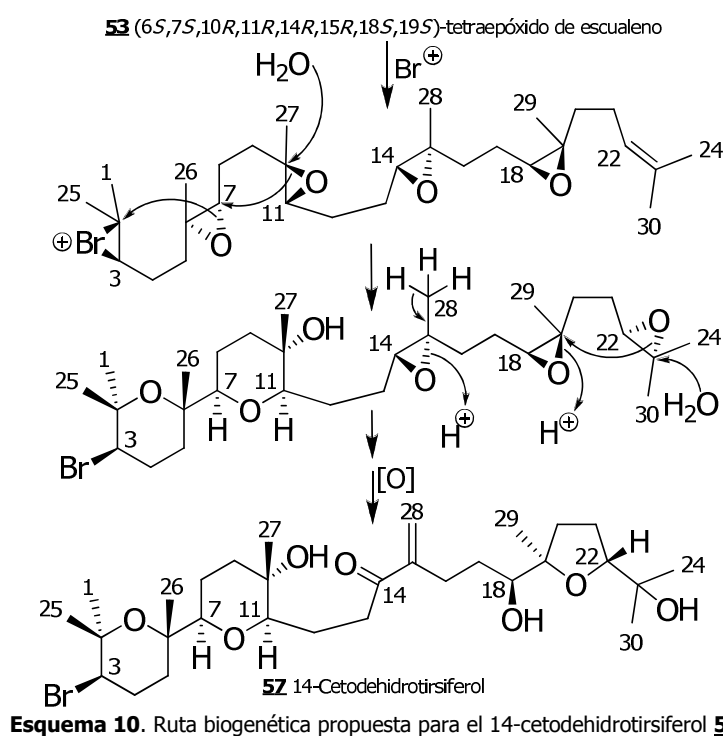
En el caso del espirodehidrovenustatriol 56, proponemos que el tetraepóxido de escualeno 53 podría sufrir una protonación e hidroxilación en el (10*R*,11*R*)-epóxido. Una oxidación posterior del grupo –OH en C-11 originaría un grupo C=O, imprescindible para que en la ciclación en cascada se forme un sistema espirocetálico (anillos **B–C**) en lugar del sistema dioxabicyclo[4.4.0]decano típico de 2. La propuesta biogenética para el cierre del anillo oxolano terminal como se ve abajo es la misma que la establecida para la serie del venustatriol 4 (**Esquema 9**).



Esquema 9. Ruta biogenética propuesta para el espirodehidrovenustatriol 56.

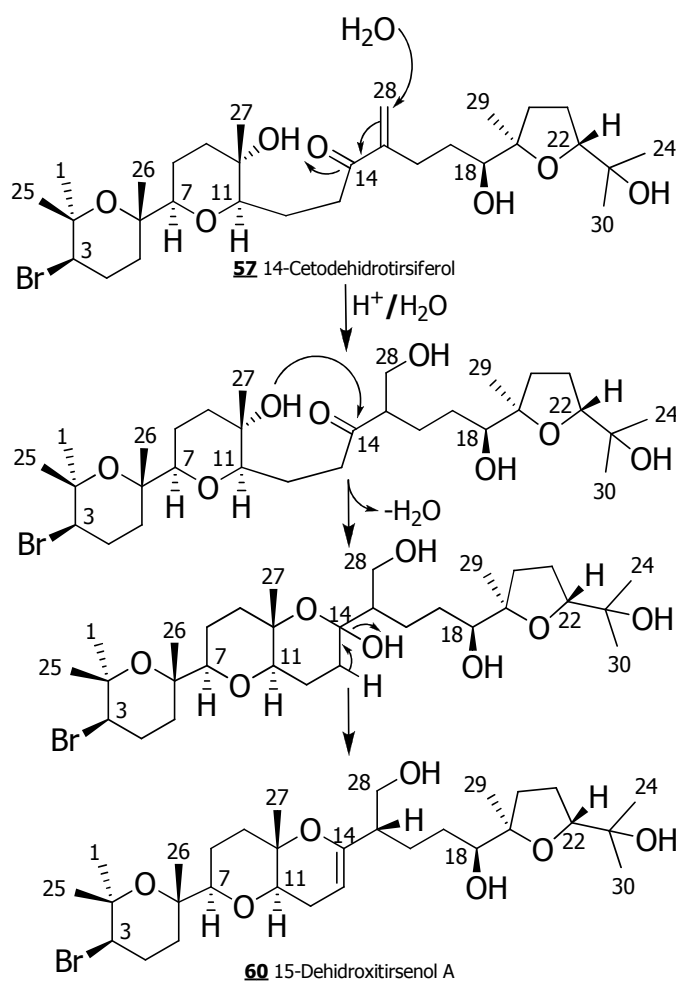
IV.3. 14-Cetodehidrotirsiferol **57**, pretirsenol A **58**, 13-hidroxipretirsenol A **59** y 15-dehidroxitirsenol A **60**

El proceso de génesis del 14-cetodehidrotirsiferol **57** podría iniciarse, con la ciclación en cascada de los epóxidos C-6—C-7 y C-10—C-11 desencadenada por el ion bromonio en C-2—C-3, dando lugar a la formación de los anillos **A** y **B** (**Esquema 10**). Por otro lado, la apertura del (14*R*,15*R*)-epóxido podría generar a un carbocatión terciario, el cual podría estabilizarse con la pérdida de uno de los protones sobre C-28 dando lugar así al doble enlace en C-15—C-28. La posterior oxidación del —OH-14 originaría al grupo C=O. El cierre del anillo oxolano terminal seguiría el mismo proceso que en el tirsiferol **1**.



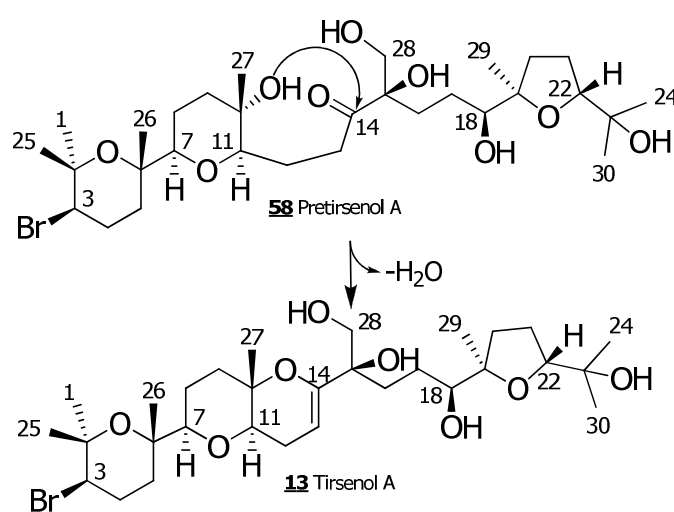
Los metabolitos pretirsenol A **58**, 13-hidroxipretirsenol A **59** y 15-dehidroxitirsenol A **60**, podrían tener como precursor al 14-cetodehidrotirsiferol **57**. En efecto, tanto el pretirsenol A **58** como el 13-

hidroxipretirsenol A **59** podrían originarse a partir de una oxidación del doble enlace presente en **57**, que generaría el sistema diol que poseen. El origen del grupo –OH en la posición 13 de **59** podría deberse a una posterior oxidación. La biosíntesis del 15-dehidroxitirsenol A **60** se iniciaría en el sistema carbonilo α,β -insaturado en **57**, el cual podría sufrir una adición conjugada de H₂O seguido del cierre con la formación del hemiacetal, intermediario que por deshidratación da lugar a **60** (**Esquema 11**).



Esquema 11. Ruta biogénica propuesta para origen del 15-dehidroxitirsenol A **60**.

Cabe destacar que la importancia del aislamiento del pretirsenol A **58**, radica en que este metabolito podría ser el precursor del tirsenol A **13**. Ya que una ciclación similar a la anterior, daría origen al tirsenol A **13** (**Esquema 12**).

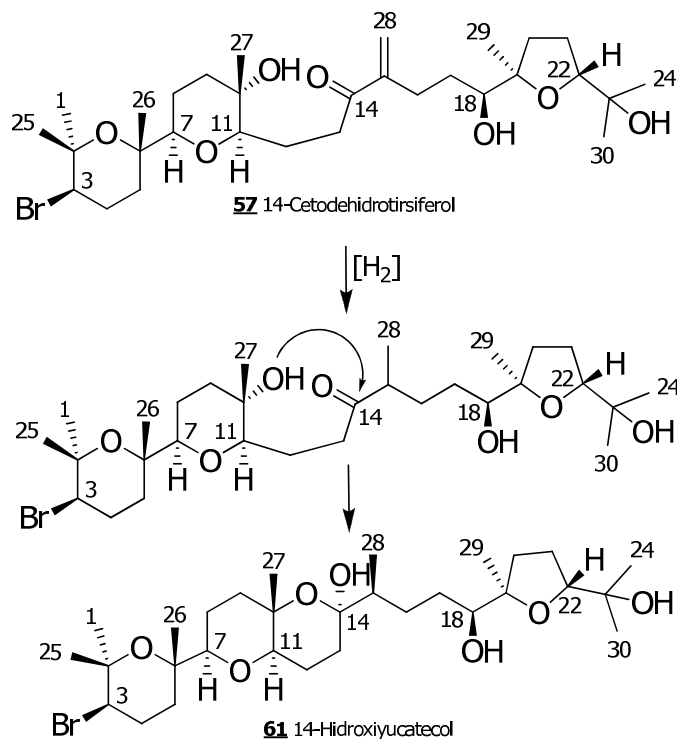


Esquema 12. Ruta biogenética propuesta para el origen del tirsenol A **13**.

IV.4. 14-Hidroxiyucatecol **61 y yucatecona **62****

El 14-hidroxiyucatecol **61**, al igual que los compuestos anteriores, podría tener como precursor al 14-cetodehidrotirsiferol **57**. Este compuesto, podría evolucionar hacia el 14-hidroxiyucatecol **61** mediante la reducción catalítica del doble enlace C-15—C-28 y el ataque del grupo —OH-10 sobre el grupo carbonilo en C-15 originándose así el cierre del anillo **C** mediante un sistema hemiacetalico. (**Esquema 13**).

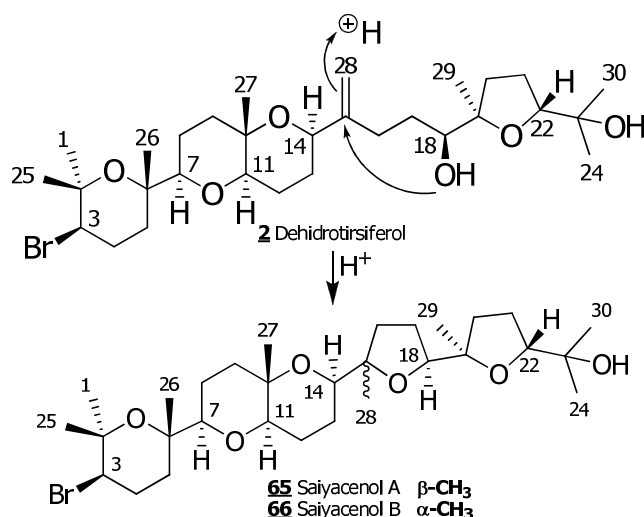
La yucatecona **62** podría formarse a partir del dehidrotirsiferol **2** de la siguiente manera. El grupo —OH-18 del dehidrotirsiferol **2** podría sufrir una oxidación que originaría el grupo C=O y la hidrogenación catalítica del doble enlace C-15—C-28 daría lugar, finalmente, a la yucatecona **62**.



Esquema 13. Ruta biogénica propuesta para el origen del 14-hidroxiyucatecol **61**.

IV.5. Saiyacenol A 65 y saiyacenol B 66

El hecho de que la única diferencia entre estos dos compuestos sea la estereoquímica del nuevo anillo oxolano (C-15—C-18), sugirió que la ciclación de este anillo se forma por una adición intramolecular entre el grupo –OH-18 y el doble enlace en C-15—C-28, lo que explicaría la formación de los dos epímeros en C-15 (**Esquema 14**).



Esquema 14. Ruta biogénica propuesta para el origen del saiyacenol A **65** y B **66**.

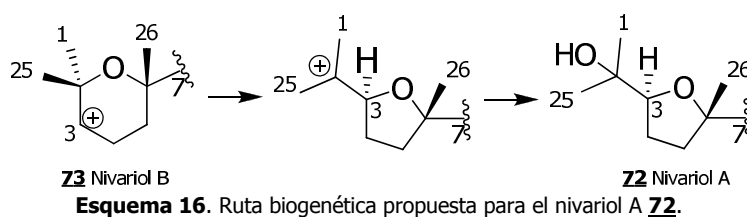
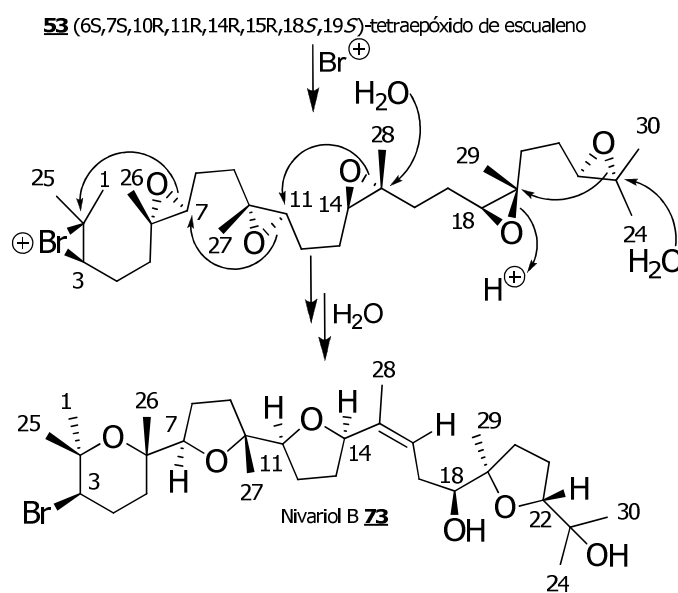
Con el fin de confirmar esta hipótesis, se decidió tratar una muestra de dehidrotirsiferol **2** con trazas de ácido trifluoroacético (CF₃CO₂H) en cloroformo, dando lugar al saiyacenol A **65** y el saiyacenol B **66**.

IV.6. Adejeno A **68 y adejeno B **69****

La biogénesis de los compuestos adejeno A **68** y B **69**, en cuya estructura solo se observa la presencia de 17 átomos de carbono, podrían tener su origen biogénico de la degradación oxidativa del 14-cetodehidrotirsiferol **57** seguida de un proceso de ciclación que originaría el correspondiente enol—éter en **68** o a la lactona **69**.

IV.7. Nivariol A 72 y nivariol B 73

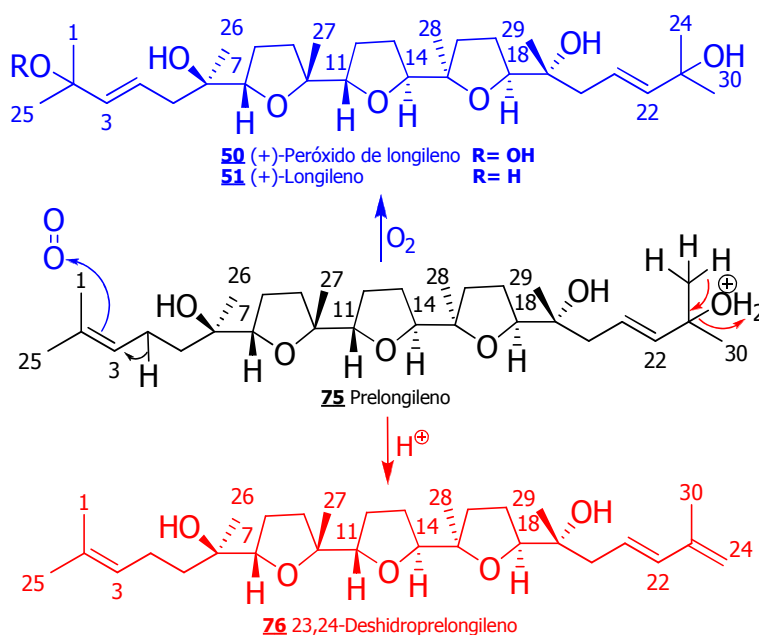
En el caso de la génesis del nivariol B 73, el proceso se podría considerar que comienza con la formación del ion bromonio sobre los carbonos C-2—C-3 del compuesto 53, esto desencadenaría la ciclación de los epóxidos C-6—C-7, C-10—C-11 y C-14—C-15, generándose así, los anillos oxolanos **A**, **B** y **C** según la ruta propuesta en el **Esquema 15**. El anillo **A** del nivariol A 72 podría originarse de la misma manera el anillo **A** del pseudodehidrotirsiferol 23. Finalmente, el proceso de ciclación que da lugar al anillo terminal, en los dos casos, es análoga al propuesto para el dehidrotirsiferol 2 (**Esquemas 15** y **16**).



IV.8. (+)-Peróxido de longileno 50, (+)-longileno 51, prelongileno 75 y 23,24-dehidroprelongileno 76

Los pasos iniciales de la biogénesis de este grupo de compuestos (longilenos) no está del todo clara, ya que si se parte del precursor común (6*S*,7*S*,10*R*,11*R*,14*R*,15*R*,18*S*,19*S*)—tetraepóxido de escualeno 53 se obtiene la serie del (-)-peróxido de longileno 74, descrita por Itokawa y *col.*³⁵ Sin embargo, el origen biogenético del (+)-peróxido de longileno 50, (+)-longileno 51 y 23,24-dehidroprelongileno 76 se puede establecer a partir del prelongileno 75.

Así, el prelongileno 75 podría interaccionar con el oxígeno molecular para dar lugar al (+)-peróxido de longileno 50 y (+)-longileno 51 por acción de una peroxidasa y como ya se comentó anteriormente el 23,24-dehidropretirsenol 76 probablemente tiene su origen por deshidratación de 75 en un medio ligeramente ácido (**Esquema 17**).



Esquema 17. Propuesta biogenética de los metabolitos 50, 51 y 76.

V. PARTE EXPERIMENTAL

V. PARTE EXPERIMENTAL

V.1. Técnicas espectroscópicas

Resonancia Magnética Nuclear.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), se realizaron en espectrómetros Bruker® AMX™ (500 MHz) y Bruker® Avance™ (300, 400, 500 y 600 MHz). El espectrómetro Bruker® Avance 600 MHz está equipado con una criosonda de detección inversa TCI de 5 mm. Los espectros fueron referenciados utilizando la señal residual del CHCl₃ (δ_H 7.26 ppm para ¹H y δ_C 77.0 ppm para el ¹³C) y del MeOH (δ_H 3.31 ppm para ¹H y δ_C 49.0 ppm para el ¹³C). Los desplazamientos químicos de RMN (δ) descritos en la presente memoria se dan en partes por millón (ppm), así mismo, las constantes de acoplamiento (*J*) se dan en Hertz (Hz). Los datos de adquisición obtenidos del espectrómetro fueron procesados en un PC usando los programas Mestre-C 4.8.6.0; Mestrenova 6.0.2 y Topspin 1.3.28.

Espectroscopía Infrarroja

Los espectros de Infrarrojo (IR) fueron registrados en un espectrofotómetro FT-IR Bruker®, modelo IFS 55, utilizando disoluciones de los compuestos en cloroformo sobre una pastilla de cloruro de sodio (NaCl).

Espectrometría de Masas

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se realizaron en un espectrómetro VG AutoSpec VG-FISONS®. Según las necesidades particulares de cada caso se utilizaron las técnicas de impacto electrónico (EI), bombardeo de átomos de sodio (FAB) y electrospray (ESI).

Rotación óptica

Las actividades ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer[®], modelo 241, a una temperatura de 25 °C y usando la línea D de sodio ($\lambda = 589 \text{ nm}$). Los metabolitos fueron disueltos en cloroformo anhidro, y se empleó una celda con un camino óptico de 1 dm.

Espectroscopía de absorción en el Ultravioleta—Visible

Los espectros UV–visible fueron registrados en un espectrofotómetro V–560, de Jasco Inc., utilizando disoluciones de los compuestos de interés en metanol y cubetas de cuarzo con un camino óptico de 1 cm.

V.2. Técnicas cromatográficas

Para los diferentes procesos de extracción y purificación se usaron disolventes destilados de grado técnico y grado analítico de varias marcas. Para el proceso de eliminación de disolventes se usó gas nitrógeno y argón de la marca Air-liquide, evaporadores rotatorios equipados con un baño con agua a una temperatura $\leq 40 \text{ °C}$ y bombas de alto vacío, todos de la marca Büchi.

La monitorización de las cromatografías en columnas se siguió mediante cromatografía de capa fina (TLC). Éstas se llevaron a cabo usando placas cromatográficas (F-1500/LS254) de la casa Merck[®]. 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 aspersion sobre las placas de una solución de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH}$ (4:16:80) 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.

Cromatografía de exclusión

Para la separación de los compuestos por diferencia de sus pesos moleculares, se usó el método de permeación en gel. En este caso, se utilizó como fase estacionaria la resina lipofílica Sephadex[®] (25–100 µm) de la casa Sigma-Aldrich[®]. Las columnas fueron preparadas siguiendo las instrucciones del fabricante, humectando la resina en metanol durante 12 h y empaquetando las columnas por gravedad.

Cromatografía en columnas abiertas

La cromatografía de las fracciones en columnas abiertas se realizaron utilizando como fase estacionaria gel de sílice 60 G y H (Merck[®]), empaquetadas en columnas de cristal de diversos diámetros. La preparación de las columnas se realizó mediante dos procedimientos:

- i. Aplicando vacío por el extremo inferior de la columna, se vierte gel en su interior al tiempo que se somete a vibración. Luego se añade el eluyente hasta que se humedezca totalmente el lecho. Cuando se ha eliminado todo el aire del soporte de sílice, se adiciona la cabeza (mezcla a separar) disuelta en el mismo eluyente (si la mezcla es soluble en el eluyente) o bien impregnada en gel de sílice de tamizado superior al usado para el lecho. Hay que tener en cuenta que la relación entre el peso del producto/peso de la gel de sílice, fue siempre superior a 1/100.

- ii. Se forma una papilla con la gel de sílice y el eluyente a utilizar. Una vez que la mezcla sea homogénea, se vierte en la columna y se deja depositar por gravedad. A continuación se aplica presión con una bomba de embolo RP-SY (Fluid Metering, Inc.). En este procedimiento la relación peso del producto/peso de gel de sílice fue como mínimo de 1/200.

Cromatografía en columnas de media presión

Para estas etapas cromatográficas se utilizaron columnas preempaquetadas Lobar[®] LiChroprep[®] RP-18 (40–63 μm) Gröbe B (\varnothing 310 x 25mm) y Lobar[®] LiChroprep[®] Si 60 (40–63 μm) Gröbe B (\varnothing 310 x 25mm) de la casa Merck[®], aplicando presión con una bomba de émbolo RP-SY (Fluid Metering, Inc.).

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Las purificaciones finales fueron realizadas en un sistema de HPLC, equipado con una bomba LKB[®] Bromma, modelo 2248. Para las separaciones de fase reversa se utilizaron columnas preparativas μ -Bondapak[™] C-18 (\varnothing 1.9 x 15 cm), mientras que para las purificaciones de fase normal se usaron columnas de μ -Porasil[™] (\varnothing 1.9 x 15 cm).

V.3. Recolección y extracción del material vegetal

La recolección de los especímenes del alga *L. viridis* se realizó a mediados del mes de Mayo del 2006 en la zona intermareal de Callao Salvaje, Paraíso Floral, Adeje (Tenerife). La recolección del alga se realizó a mano durante la bajamar y posteriormente se transportó al laboratorio en neveras. Se tomo un ejemplar del alga, el cual fue depositado en el Herbario de la Universidad de La Laguna.

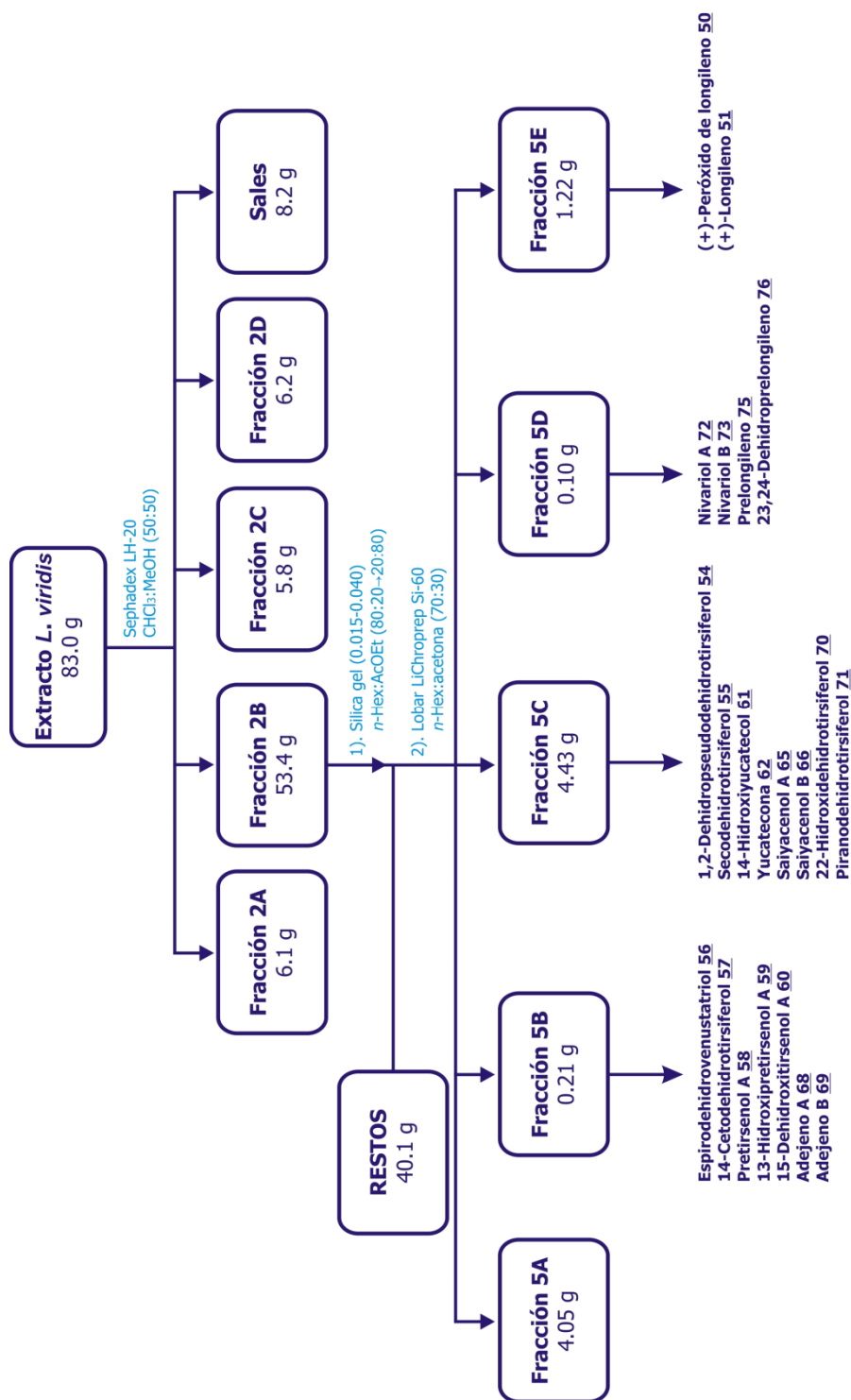
Una vez separada de otros organismos con los que inevitablemente es recogida, los especímenes del alga se maceraron en una mezcla de CHCl_3 :MeOH (50:50) durante cuatro días. Después de evaporar el disolvente, se obtuvo un primer extracto de color verde oscuro (83 g). Posteriormente, el alga se secó a temperatura ambiente y se molió para su extracción en caliente utilizando en primer lugar CH_2Cl_2 y a continuación MeOH hasta agotamiento, empleando un equipo de soxhlet. Estas dos últimas extracciones fueron reunidas y llevadas a sequedad, obteniéndose un segundo extracto de coloración verde oscura que peso 37 g.

V.4. Marcha cromatográfica del extracto de maceración

Fraccionamiento del extracto de maceración

Los 83 g de extracto obtenidos por maceración en frío se cromatografiaron inicialmente en una columna de Sephadex LH-20 (\varnothing 7 x 50 cm) utilizando una mezcla de CHCl_3 :MeOH (50:50). Las fracciones que mostraron un perfil cromatográfico similar en TLC fueron reunidas y el disolvente evaporado. Así, se obtuvieron cinco fracciones principales a las que llamamos: **2A** (tubos 1-14; 6.1 g), **2B** (tubos 15-24; 53.4 g), **2C** (tubos 25-31; 5.8 g), **2D** (tubos 32-42; 6.2 g) y **2E** (43-Lavado; 8.2 g).

La fracción **2B**, enriquecida con los poliéteres triterpénicos según su RMN ^1H , se cromatografió en una columna de silica gel (0.015-0.040) eluida con *n*-Hex:AcOEt de polaridad creciente (80:20→20:80). Las fracciones más interesantes por RMN ^1H fueron sometidas a una posterior cromatografía en una columna preempaquetada Lobar LiChroprep Si-60 usándose como eluyente una mezcla de *n*-Hex:Acetona (70:30). Esta marcha cromatográfica dio lugar las fracciones: **5A** (tubos 1-7; 4.05 g), **5B** (tubos 8-15; 0.21 g), **5C** (16-40; 4.43 g), **5D** (41-46; 0.10 g) y **5E** (47-60; 1.22 g) cuyos espectros de RMN ^1H indicaron que todas las fracciones, excepto la **5A**, contenían señales bien definidas de los poliéteres triterpénicos deseados (**Esquema 18**).

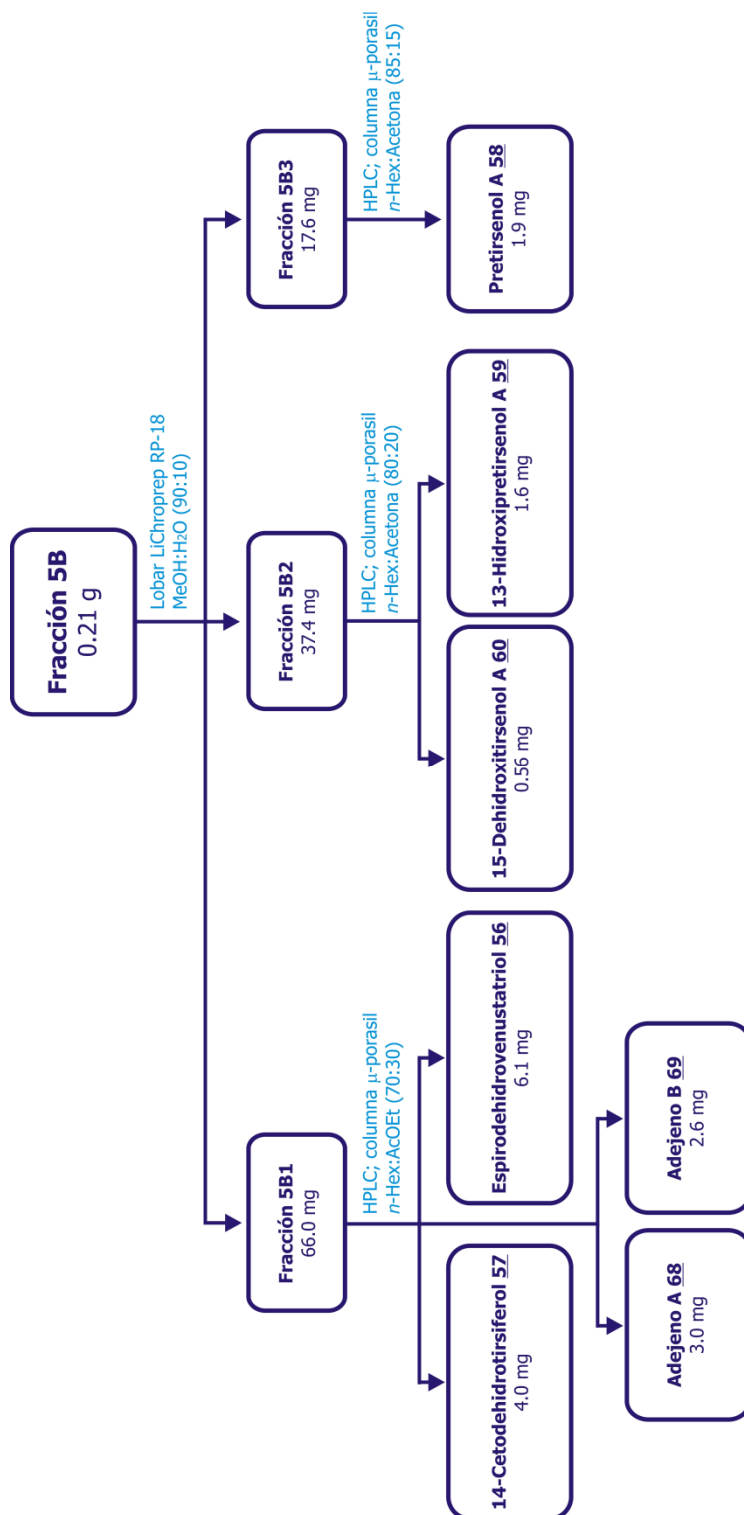


Esquema 18. Marcha cromatográfica del extracto *L. viridis*. Se entiende por RESTOS, todas aquellas fracciones donde no se encontraron poliéteres triterpénicos.

Estudio de la fracción 5B

Inicialmente la fracción **5B** se cromatografió en una columna Lobar LiChroprep RP-18 eluida con una mezcla de MeOH:H₂O (90:10), dio lugar a tres fracciones enriquecidas de poliéteres triterpénicos, a las que llamamos **5B1** (tubos 1-46; 66 mg), **5B2** (tubos 40-70; 37.4 mg) y **5B3** (tubos 71-105; 17.6 mg). La purificación final de cada una de estas fracciones se realizó en un HPLC equipado con una columna preparativa de fase normal (μ -PorasilTM), cambiando la fase móvil según las necesidades particulares de cada fracción.

Así, la fracción **5B1** fue cromatografiada con una mezcla 70:30 de *n*-Hex:AcOEt, purificando los compuestos 14-cetodehidrotirsiferol **57** (4.0 mg), adejeno A **68** (3.0 mg), adejeno B **69** (2.6 mg) y espirodehidrovenustatriol **56** (6.1 mg). El fraccionamiento de **5B2** fue realizado utilizando como fase móvil de *n*-Hex:Acetona (80:20) lo cual permitió el aislamiento de los metabolitos 15-dehidroxitirsenol A **60** (0.56 mg) y 13-hidroxipretirsenol A **59** (1.6 mg). Finalmente, el compuesto pretirsenol A **58** (1.9 mg) pudo ser aislado usando como eluyente una mezcla de *n*-Hex:Acetona (85:15) (**Esquema 19**).

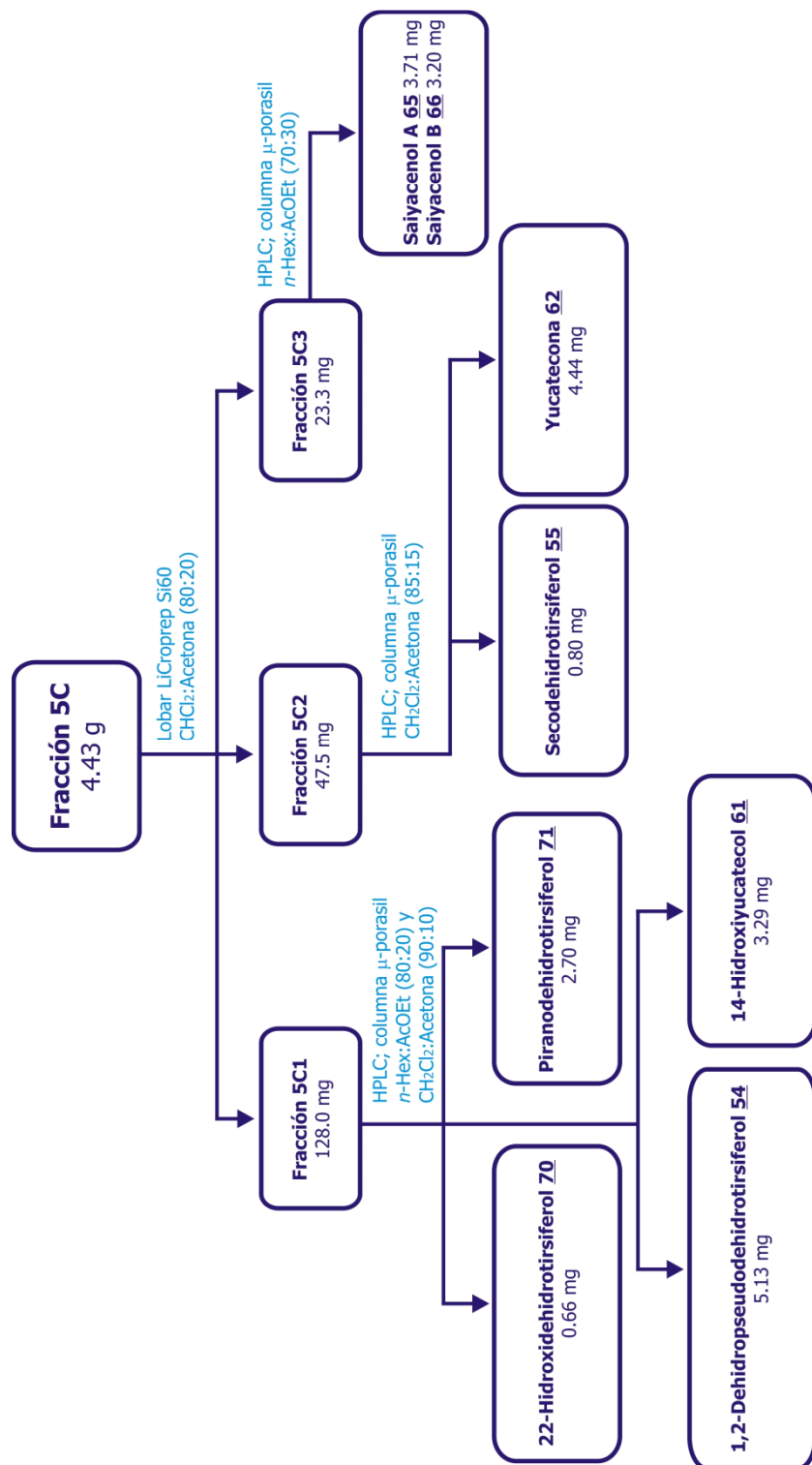


Esquema 19

Estudio de la fracción 5C

La fracción **5C** fue sometida a una cromatografía en una columna Lobar LiChroprep Si-60 usando como fase móvil una mezcla de CH₂Cl₂:Acetona (80:20). Éste fraccionamiento dio lugar a las fracciones **5C1** (tubos 1-22; 128 mg), **5C2** (tubos 23-39; 47.5 mg) y **5C3** (tubos 40-80; 23.3 mg).

La fracción **5C1** se cromatografió a través de una columna de HPLC μ -PorasilTM con mezclas de *n*-Hex:AcOEt (80:20) y CH₂Cl₂:Acetona (90:10) permitiendo el aislamiento del 22-hidroxi-dehidrotirsiferol **70** (0.66 mg), piranodehidrotirsiferol **71** (2.7 mg), 1,2-dehidropseudodehidrotirsiferol **54** (5.13 mg) y 14-hidroxiyucatecol **61** (3.29 mg). Asimismo, la cromatografía de **5C2** con CH₂Cl₂:Acetona (85:15) permitió el aislamiento de secodehidrotirsiferol **55** (0.80 mg) y yucatecona **62** (4.44 mg). Finalmente, los compuestos saiyacenol A **65** (3.71 mg) y saiyacenol B **66** (3.20 mg) se obtuvieron a partir de **5C3** usando una fase móvil *n*-Hex:AcOEt (70:30) (**Esquema 20**).



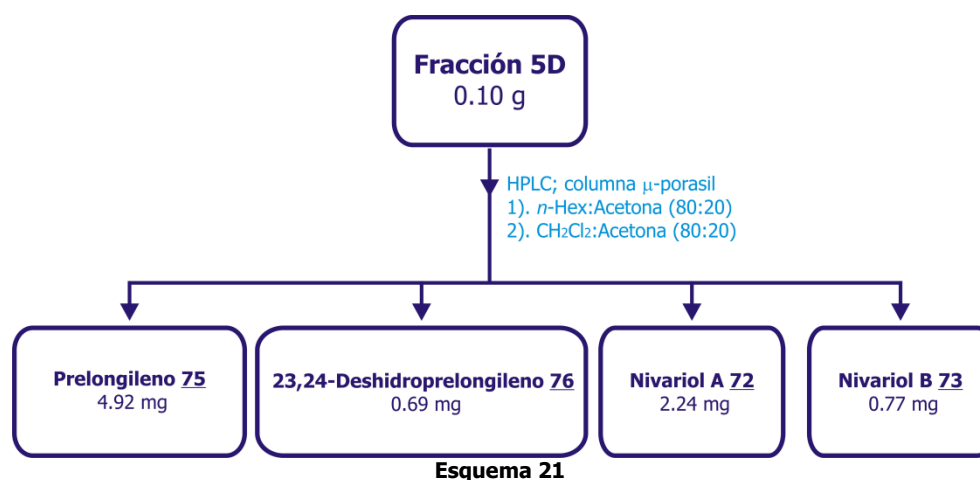
Esquema 20

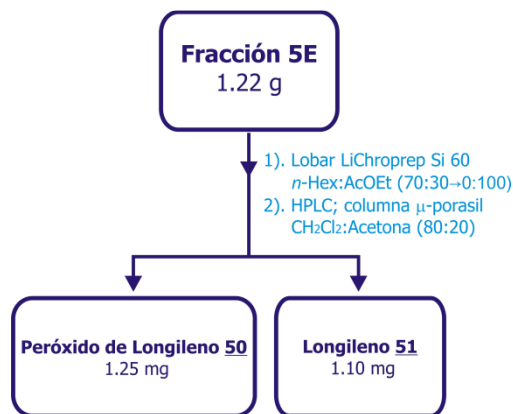
Estudio de la fracción 5D

La fracción **5D** fue sometida a fraccionamientos consecutivos por HPLC equipado con una columna μ -Porasil utilizando como eluyente las mezclas binarias *n*-Hex:Acetona (80:20) y CH_2Cl_2 :Acetona (80:20) obteniéndose así los compuestos nivariol A **72** (2.24 mg), nivariol B **73** (0.77 mg), prelongileno **75** (4.92 mg) y 23,24-dehidroprolongileno **76** (0.69 mg) (**Esquema 21**).

Estudio de la fracción 5E

Finalmente, la fracción **5E** se analizó inicialmente en una columna Lobar LiChroprep Si-60 usando como fase móvil una mezcla de polaridad creciente de *n*-Hex:AcOEt (70:30→0:100). Este fraccionamiento dio lugar a una única fracción enriquecida de los metabolitos deseados. A continuación, ésta fracción fue cromatografiada a través de una columna μ -Porasil en un equipo de HPLC usando como eluyente la mezcla CH_2Cl_2 :Acetona (80:20) permitiéndonos así aislar los compuestos (+)-peróxido de longileno **50** (1.25 mg) y (+)-longileno **51** (1.10 mg) (**Esquemas 21 y 22**).





Esquema 22

V.5. Ensayos *in vitro* de inhibición de la Proteína Fosfatasa PP2A

Preparación de los ligandos

Todos los metabolitos ensayados se prepararon a partir de una disolución patrón 10 mM en DMSO. A partir de la disolución se realizaron diluciones seriadas con agua destilada (Panreac) hasta obtener las concentraciones 1 mM, 100 μ M, 10 μ M y 1 μ M. La proporción de estas disoluciones en el ensayo es de 1:10 por lo que la concentración final de los metabolitos es 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M y 0.1 μ M. Asimismo, nos aseguramos que la concentración final de DMSO en el ensayo sea menor o igual al 5%.

Tampón de reacción

Se preparó una disolución "stock" de buffer de reacción con una concentración 10 \times , 500 mM Trizma (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA (Riedel-deHaën), 50 mM DTT (Sigma-Aldrich), 0.025% (v/v) Tween-20 (Acofarma[®]), pH 7.2. Esta disolución se almacena a -20 $^{\circ}$ C en alícuotas de 1 mL para su uso posterior.

Proteína fosfatasa PP2A

Para llevar a cabo los ensayos de inhibición *in vitro* con los nuevos metabolitos aislados de *L. viridis* fue necesario tener acceso a cantidades suficientes de las fosfatasas. En el caso de la PP2A, la enzima que se utilizó en el ensayo fue de riñón de bovino, de Sigma-Aldrich®. Cada vial contenía 1 mg (2.2 unidades) de proteína fosfatasa del tipo 2A diluida en 50 μ L (50 mM de Tris-HCl (7.0) 14 mM de 2-mercaptoetanol, 1 mM de benzamidina, 0.1 mM de PMSF, 1 mM de EDTA y 50% de glicerol). Ante las dificultades para obtener el enzima PP1 de una fuente comercial, se desarrolló un procedimiento para la expresión heteróloga y purificación de la subunidad catalítica de PP1 (PP1C) basado en las metodologías descritas previamente por los grupos de investigación de Lee y Holmes.⁴⁷

A partir de estas disoluciones se prepararon patrones utilizando el tampón de reacción 0.025 unidades/ μ L (PP1) y 0.004 unidades/ μ L (PP2A). Todas las muestra se almacenaron a -70 °C según las indicaciones del fabricante.

Cloruro de Manganeso

A partir del $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Merck KGaA) se preparo una disolución "stock" 10 mM (10 \times) que se guardo en alícuotas de 100 μ L a -20 °C.

Sustrato

Se preparó una disolución de *p*-NPP (sal disódica hexahidratada, Fluka Biochemika) con concentración de 1,5 mg/ml en la disolución tampón de reacción. La disolución de *p*-NPP se preparó justo antes de realizar los ensayos de inhibición *in vitro*.

Descripción del ensayo

Los ensayos enzimáticos de inhibición de la fosfatasa (PP1 y PP2A) fueron realizados en placas de 96 pocillos traslucidos (Sigma-Aldrich), el volumen final de cada mezcla de reacción fue de 100 μ L. En los pocillos de **control** se sustituyó el ligando por agua, mientras que en los pocillos **blanco** no se añadió ni el ligando ni la proteína, sustituyendo ambos por agua.

A cada pocillo se le añadió 15 μ L de agua, 10 μ L de $MnCl_2$ (10mM), 10 μ L de tampón de reacción y 5 μ L de la enzima. La mezcla se incubó a 37 °C durante 10 minutos. Seguidamente, se añadió 10 μ L de las disoluciones del ligando (1 mM, 100 μ M, 10 μ M y 1 μ M) a ensayar por pocillo y se incubó nuevamente a 37 °C. Posteriormente, se adicionó 50 μ L de la disolución de *p*-NPP (1.5 mg/mL) y se repitió el proceso de incubación, pero esta vez por 60 minutos. Pasado este tiempo se registró la absorbancia en un lector de microplacas PowerWave™ XS (Bio-Tek® Instruments, Inc.) equipado con un filtro de 405 nm. En la **Tabla 30** se puede ver esquematizado este procedimiento.

Reactivo/Concentración final	Volumen por pocillo (µL)		
	Control	Muestra	Blanco
H₂O	25	15	30
MnCl₂ /1mM	10	10	10
Tampón /50 mM Trizma 0.1 mM EDTA 5 mM DTT 0.025% Tween	10	10	10
PP2A /0.004 unidades/µL PP1 /0.025 unidades/µL	5	5	---
Incubar por 10 minutos a 37 °C			
Inhibidor /100 µM—0.01 µM	---	10	---
Incubar por 10 minutos a 37 °C			
PNPP /1.5 mg/mL	50	50	50
Medición de la absorbancia después de 60 minutos de incubación a 37 °C			

Tabla 30. Resumen del procedimiento en los ensayos de inhibición frente a la PP1 y PP2A.

V.6. Evaluación de la actividad citotóxica

Principio del bioensayo

El principio del bioensayo consiste en utilizar colorantes como las sales de tetrazolio. Estas sales al ser reducidas mediante una reacción enzimática producen un color violeta. La enzima responsable de esta transformación es una deshidrogenasa mitocondrial presente solamente en organismos vivos. En este bioensayo se utilizó la sal 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5[(fenilamino) carbonil]-2H tetrazol hidróxido (**XTT**) de la casa Roche[®]. Así, la supervivencia celular fue cuantificada indirectamente a través del registro en un espectrofotómetro del formazán formado.

Cultivos celulares

La evaluación citotóxica de los compuestos fue realizada sobre cultivos *in vitro* de las líneas tumorales:

1. Células de leucemia linfoide aguda (**Jurkat**)
2. Células de mieloma múltiple (**MM144**)
3. Células de adenocarcinoma de cérvix (**HeLA**).
4. Sarcoma de Ewing's (**CADO-ES-1**).

Inicialmente las células se mantuvieron en fase de crecimiento logarítmico en el medio de cultivo RPMI-1640 enriquecido con 10% suero fetal bovino, L-glutamina 2.0 mM y con la presencia de los antibióticos penicilina (100 unidades/mL) y estreptomycinina (100 µg/mL), utilizando un incubador a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Descripción del bioensayo

El número de células mantenidas en fase exponencial fue cuantificado y posteriormente se realizaron las diluciones apropiadas para obtener la densidad celular necesaria para el bioensayo. De este modo, se colocaron en volúmenes de 100 μL 5000 células por pocillo. Las células se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera con 5% de CO_2 y 95% de humedad por 24 horas. Por otro lado, los compuestos ensayados fueron disueltos en DMSO y medio RPMI-1640 enriquecido a una concentración dos veces superior a la deseada (200 μM —200 ηM). Finalizadas las 24 horas de incubación, se agregó por triplicado 100 μL de cada disolución de los compuestos a ensayar y se repitió el proceso de incubación, pero en este caso por 72 horas.

La supervivencia de las células se observó agregando 20 μL de XTT a una concentración de 5 mg/mL. La cuantificación de la reducción del XTT a formazán se determinó mediante el uso de técnicas espectrofotométricas en un lector de ELISA Spectra SLT Rainbow a una longitud de onda de 490 ηm /ref. 630 ηm . Los efectos producidos por los metabolitos sobre las enzimas mitocondriales responsables de disminuir la tintura del XTT se excluyó por comparación de los valores de absorbancia de células tratadas y no tratadas después de tres días de incubación. Los controles con los vehículos usados para las disoluciones a las concentraciones experimentales no revelaron efectos secundarios.

V.7. Métodos computacionales

Cálculos Ab-Initio

Los cálculos de las constantes de acoplamiento fueron realizados usando cálculos de Mecánica Cuántica (MC) con la teoría del funcional de la densidad (DFT). Dichos cálculos se llevaron a cabo con el software Gaussian 03W v.6.0 (Gaussian, Inc.) a través de la interface gráfica GaussView v.3.07 (Semichem, Inc.). El método utilizado fue el GIAO/DFT a los niveles teóricos B3LYP/6-311G(d,p) y mPW1PW91/6-31G(d,p), respectivamente. Ambas aproximaciones condujeron a valores razonables de J , aunque se observó una disminución significativa en el tiempo total de cómputo al utilizar el funcional híbrido mPW1PW91.

Análisis conformacional

Las búsquedas conformacionales fueron llevadas a cabo en el software MacroModel v.8.5 a través de la interface gráfica de Maestro v.6.0 (Schrödinger, LLC) utilizando el campo de fuerza MMFF94 y el modelo de solvatación acuoso GBSA. Como geometría de partida se utilizó la estructura de rayos X del 23 acetato de tirsiferilo **3** o la del venustatriol **4**, realizando las modificaciones pertinentes y una posterior minimización de la estructura resultante.

Así, las búsquedas se realizaron en los campos de fuerza MM3* y MMFFs. Como la espectroscopía de RMN de los compuestos se realizó en CDCl₃ las búsquedas se realizaron utilizando el modelo GB/SA de solvatación continuo para este disolvente con el fin de mimetizar las condiciones experimentales en el estudio conformacional. Utilizando las condiciones anteriores se realizó la búsqueda de 10000 pasos variando en cada uno de ellos entre dos y cinco grados de libertad y usando como estructura de partida en cada paso la

generada en el paso anterior. En todos los casos la estructura se minimizó utilizando el algoritmo TNCG empleando como criterio de convergencia valores de 0.05 kJ/Å mol. Todas las estructuras dentro de un límite de 10 kJ con respecto al conformero de mínima energía fueron almacenadas eliminando las conformaciones duplicadas (con una desviación cuadrática media inferior a 0,25 Å).

Simulaciones de Docking

Las simulaciones fueron llevadas a cabo con el software AutoDock v.3.0.5 (Molecular Graphics Laboratory, The Scripps Research Institute) a través de la interface gráfica AutoDockTools (ADT) v.1.5.2. El fichero correspondiente a la treonina/serina proteína fosfatasa 2A (PP2A) se generó a partir de las coordenadas de la estructura cristalográfica PP2A—AO (PDB 2ie4) obtenida de la base de datos Protein Data Bank. En lo referente al ligando, la estructura 3D de partida fue el conformero de mínima energía obtenido de su búsqueda conformacional.

Debido a que ADT es incapaz de emular correctamente el fenómeno de múltiples geometrías de coordinación que se observa en la esfera de coordinación de metales en estado de transición como el Mn^{+2} , las cargas atómicas de los metales en transición (Mn^{+2}), así como de los residuos localizados en las esferas de coordinación de estos iones (Asp57, His59, Asp85, Asn117, His167, His241 y H₂O-503) fueron calculadas por el método *ab initio*, utilizando el método DFT al nivel teórico B3LYP/631G*. Estas cargas fueron asignadas manualmente a cada átomo dentro de los ficheros del receptor, mientras que las cargas atómicas restantes fueron generadas automáticamente por ADT (cargas de Kollman).

El área de interacción del ligando con la proteína PP2A se restringió al sitio activo de la proteína, utilizando un mapa de *grid* de $60 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA} \times 90 \text{ \AA}$ con un espaciado de 0.375 \AA . En esta área se calcula, mediante el *Autogrid*, la energía de afinidad de la proteína con cada especie atómica que contiene el ligando (**Figura 91**).

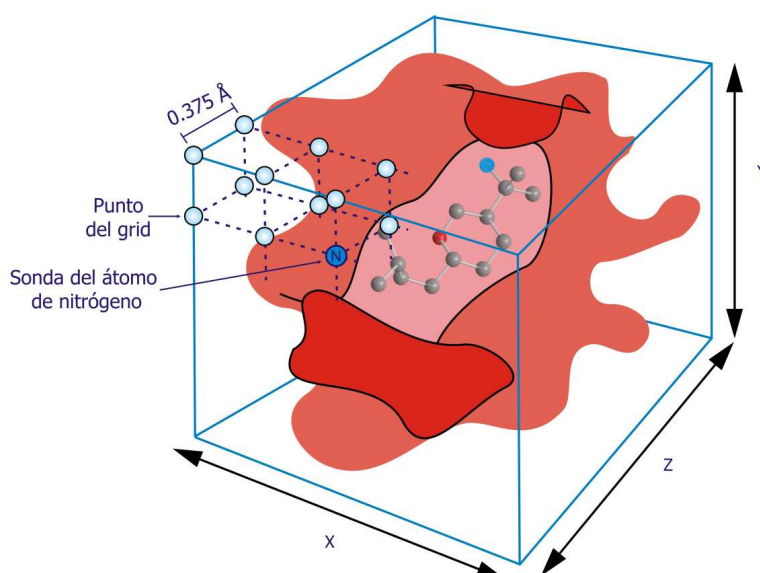


Figura 91. Principales características que posee el grid.

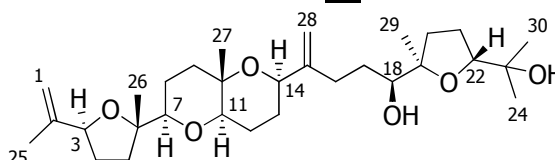
El algoritmo genético Lamarckiano (LGA) fue el método de búsqueda seleccionado para generar las diferentes orientaciones/poses del ligando en el sitio activo. Este método está incluido dentro del grupo búsquedas estocásticas que consideran al ligando flexible, mientras que el receptor mantiene la misma conformación. Así, un total de 200 algoritmos fueron llevados a cabo partiendo de una población de 50 individuos con un total de 50×10^6 evaluaciones de energía y 300 interacciones en búsquedas con el método Solis–Wets (para una probabilidad de 0.06).

Los resultados del *Docking* fueron agrupados de acuerdo con la desviación cuadrática media (RMSD) considerando todos los átomos del inhibidor (para una tolerancia estándar de 2.0 Å). Para cada uno de los inhibidores, la conformación más favorable fue seleccionada de entre las poses generadas por AutoDock utilizando los siguientes criterios de selección:

1. La distancia entre los átomos de manganeso en el sitio catalítico y los grupos ácidos de los ligandos (4.5 Å).
2. La clasificación de las conformaciones generadas por AutoDock de acuerdo con los valores de energía de unión asociados.
3. El número de veces que se repite la pose generada (RMSD 2.0 Å).

Datos físicos del 1,2-dehidropseudodehidrotirsiferol 54

Sólido blanco amorfo

 $[\alpha]_{D}^{25} = -4.9$ (c 0.51, CHCl_3)Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

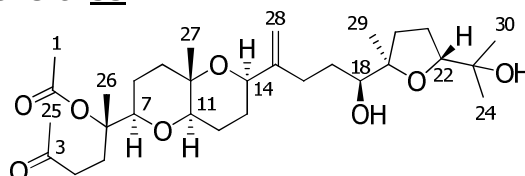
n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	110.0	4.77/4.99	bs/bs	
2	145.3			
3	83.2	4.36	dd	6.1;8.7
4	30.9	1.70/2.04		
5	34.2	1.62/2.10		
6	84.1			
7	83.7	3.37	dd	2.7;11.6
8	24.6	(β)1.47/1.65(α)		
9	38.4	(α)1.56/1.80(β)		
10	72.4			
11	78.6	3.48	dd	5.5;11.6
12	21.4	(β)1.66/1.82(α)		
13	26.4	(α)1.85/2.09(β)		
14	72.3	4.28	dd	4.0;7.7
15	151.0			
16	29.3	2.18/2.46	ddd/m	5.1;9.3;14.7/m
17	29.7	1.48/1.64		
18	76.0	3.52	d	9.2
19	86.1			
20	31.3	1.57/2.08		
21	26.3	1.84 (2H)		
22	87.4	3.76	dd	5.8;10.2
23	70.3			
24	23.7	1.12 (3H)	s	
25	17.2	1.70 (3H)	s	
26	22.7	1.17 (3H)	s	
27	19.5	1.26 (3H)	s	
28	109.6	4.88/5.05	bs/bs	
29	23.6	1.14 (3H)	s	
30	27.5	1.21 (3H)	s	

IR ν_{max} (CHCl_3): 3396, 2971, 2870, 1453, 1375 y 1093 cm^{-1} .ESI-HRMS m/z 506.3627 (Calc. 506.3607, $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_6$, $[\text{M}]^+$).ESI-MS m/z 506, 488, 380, 363, 209, 143 y 125.

Datos físicos del secodehidrotirsiferol 55

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = +2.5$ (c 0.08, CHCl_3)



Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	22.2	1.98 (3H)	s	
2	170.1			
3	208.5			
4	38.1	2.50 (2H)		
5	29.3	2.16/2.26		
6	84.1			
7	80.0	3.93	dd	3.9;9.9
8	23.6	1.56 (2H)		
9	38.6	(α)1.57/1.81(β)		
10	72.5			
11	79.0	3.46	dd	5.6;11.4
12	21.7	(β)1.63/1.83(α)		
13	26.2	(α)1.84/2.05(β)		
14	72.5	4.28	dd	3.8;7.5
15	151.1			
16	29.5	2.16/2.45		
17	29.9	1.46/1.64		
18	76.2	3.52	dd	1.4;10.4
19	86.1			
20	31.5	1.57/2.10		
21	26.6	1.84 (2H)		
22	87.6	3.76	dd	5.8;10.1
23	70.4			
24	23.9	1.13 (3H)	s	
25	29.9	2.15 (3H)	s	
26	20.0	1.39 (3H)	s	
27	19.5	1.25 (3H)	s	
28	110.0	4.89/5.05	bs/bs	
29	23.8	1.15 (3H)	s	
30	27.7	1.22 (3H)	s	

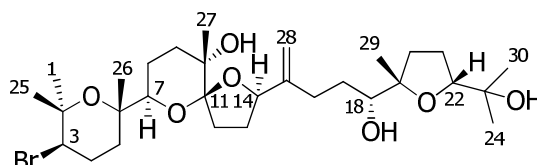
IR ν_{max} (CHCl_3): 2967, 2869, 1724, 1375 y 1096 cm^{-1} .

ESI-HRMS m/z 561.3407 (Calc. 561.3403 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-MS m/z 562, 561, 547, 413, 301 y 236.

Datos físicos del espirodehidrovenustatriol 56

Sólido blanco amorfo

 $[\alpha]_{D}^{25} = +4.3$ (c 0.61, CHCl_3)Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

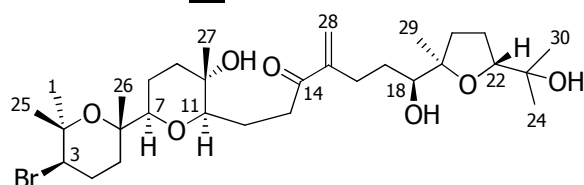
nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	29.7	1.28 (3H)	s	
2	74.9			
3	59.1	3.90	dd	4.0;12.1
4	29.3	(α)2.12/2.23(β)		
5	36.1	1.64 (2H)		
6	74.8			
7	88.1	3.65	d	7.0
8	27.6	(β)1.78/1.87(α)		
9	34.3	(α)1.59/1.88(β)		
10	72.9			
11	109.9			
12	33.7	1.87/2.09		
13	26.6	1.78/2.07		
14	83.3	3.98	dd	5.0;8.4
15	145.8			
16	30.9	2.32/2.57		
17	29.1	1.50/1.82		
18	75.2	3.82	dd	2.5;11.7
19	84.6			
20	35.0	1.61/2.01		
21	24.7	1.77 (2H)		
22	86.7	3.76	dd	7.0;8.3
23	70.6			
24	25.4	1.11 (3H)	s	
25	24.1	1.41 (3H)	s	
26	21.1	1.20 (3H)	s	
27	22.7	1.11 (3H)	s	
28	107.0	4.77/4.91	bs/bs	
29	23.9	1.12 (3H)	s	
30	28.2	1.20 (3H)	s	

IR ν_{max} (CHCl_3): 2928, 2858, 1729, 1590, 1468, 1380 y 1038 cm^{-1} .ESI-HRMS m/z 609.2599 (Calc. 609.2590, $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_6^{81}\text{BrNa}$, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$).ESI-MS m/z 609, 607, 585, 545, 425, 413 y 301.

Datos físicos del 14-cetodehidrotirsiferol 57

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = +3.9$ (c 0.18, CHCl_3)



Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.1	1.27 (3H)	s	
2	75.0			
3	58.8	3.88	dd	4.0;12.6
4	28.2	(α)2.10/2.25(β)		
5	36.7	(α)1.55/1.77(β)		
6	74.6			
7	86.1	2.97	dd	1.7;11.0
8	23.5	(β)1.38/1.76(α)		
9	39.8	(α)1.48/1.82(β)		
10	69.9			
11	83.7	3.03	dd	1.2;10.3
12	23.8	1.51/2.01		
13	34.6	2.71/2.87		
14	202.3			
15	148.5			
16	28.2	2.39/2.54		
17	30.7	1.37/1.60		
18	75.9	3.48	dd	1.5;10.5
19	86.0			
20	31.5	1.56/2.09		
21	26.6	1.83 (2H)		
22	87.7	3.75	dd	6.1;10.0
23	70.5			
24	23.9	1.12 (3H)	s	
25	23.5	1.40 (3H)	s	
26	20.3	1.19 (3H)	s	
27	20.1	1.15 (3H)	s	
28	124.5	5.80/6.01	bs/bs	
29	23.9	1.12 (3H)	s	
30	27.7	1.21 (3H)	s	

UV (CHCl_3) λ_{max} (224 nm) ($\epsilon = 1630$) ($\log \epsilon = 3.2$).

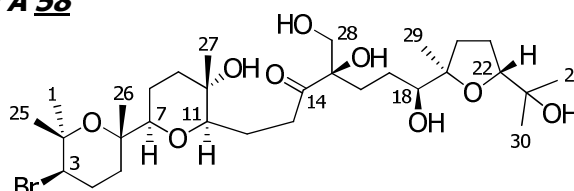
IR ν_{max} (CHCl_3): 3438, 2973, 2865, 1587, 1443, 1379 y 1094 cm^{-1} .

ESI-HRMS m/z 627.2696 (Calc. 627.2695, $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_7$ $^{81}\text{BrNa}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-MS m/z 627, 625, 609, 607, 413, 301 y 172.

Datos físicos del pretirsenol A 58

Sólido blanco amorfo

 $[\alpha]_{D}^{25} = +6.3$ (c 0.19, CHCl_3)Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

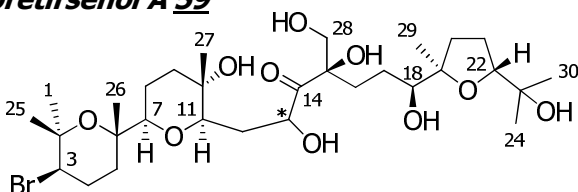
nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.0	1.26 (3H)	s	
2	74.9			
3	58.8	3.88	dd	4.0;12.4
4	28.2	(α)2.07/2.25(β)		
5	36.9	(α)1.54/1.78(β)		
6	74.5			
7	86.1	2.95	dd	2.1;11.1
8	23.4	(β)1.37/1.74(α)		
9	39.7	(α)1.49/1.82(β)		
10	69.9			
11	83.7	3.01	dd	1.9;10.2
12	22.5	1.44/2.02		
13	36.2	2.82/2.84		
14	215.5			
15	91.6			
16	31.4	1.92/2.11		
17	26.5	1.72/1.91		
18	86.4	4.04	dd	5.7; 8.5
19	84.0			
20	34.5	1.72/1.90		
21	26.1	1.84/1.92		
22	87.7	3.76	dd	6.0;9.2
23	70.4			
24	23.8	1.12 (3H)	s	
25	23.5	1.40 (3H)	s	
26	20.2	1.19 (3H)	s	
27	20.1	1.14 (3H)	s	
28	66.3	3.55/3.68	d/d	11.4/11.4
29	30.9	1.27 (3H)	s	
30	27.7	1.19 (3H)	s	

IR ν_{max} (CHCl_3): 3420, 2972, 2860, 1711, 1649, 1378 y 1098 cm^{-1} .ESI-HRMS m/z 661.3314 (Calc. 661.3460, $\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{O}_9$ $^{81}\text{BrNa}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).ESI-MS m/z 661, 659, 643, 641, 532, 531, 413 y 301.

Datos físicos del 13-hidroxipretirsenol A 59

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_{D}^{25} = +27.1$ (c 0.16, CHCl_3)



Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	31.0	1.27 (3H)	s	
2	75.0			
3	58.9	3.88	dd	5.0;15.1
4	28.2	(α)2.10/2.24(β)		
5	36.6	(α)1.63/1.76(β)		
6	74.4			
7	86.1	3.04	dd	2.0;11.2
8	23.5	(β)1.39/1.75(α)		
9	39.6	(α)1.56/1.82(β)		
10	69.5			
11	80.8	3.39	dd	2.4;9.6
12	32.8	1.72/2.23		
13	75.8	4.39	bd	9.7
14	214.5			
15	91.1			
16	26.4	1.94 (2H)		
17	32.1	1.98/2.26		
18	86.4	4.08	t	7.6
19	83.9			
20	35.1	1.78/1.87		
21	25.9	1.87 (2H)		
22	88.7	3.86	dd	6.0;10.1
23	70.9			
24	23.6	1.16 (3H)	s	
25	23.3	1.40 (3H)	s	
26	20.3	1.19 (3H)	s	
27	20.3	1.14 (3H)	s	
28	66.1	3.58/3.76	d/d	11.5/11.7
29	25.6	1.37 (3H)	s	
30	27.6	1.25 (3H)	s	

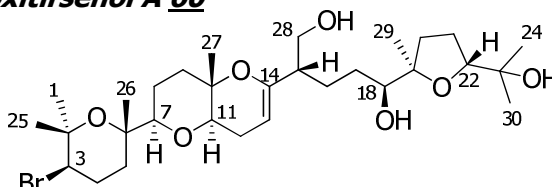
IR ν_{max} (CHCl_3): 3396, 2928, 2868, 1712, 1457, 1377, 1129 y 1060 cm^{-1} .

ESI-HRMS m/z 659.2612 (calc. 659.2594, $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_9^{81}\text{BrNa}$, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$).

ESI-MS (NBA) m/z 659, 657, 606, 605, 577 y 413.

Datos físicos del 15-dehidroxitirsenol A 60

Sólido blanco amorfo

 $[\alpha]_{D}^{25} = +21.4$ (c 0.056, CHCl_3)Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

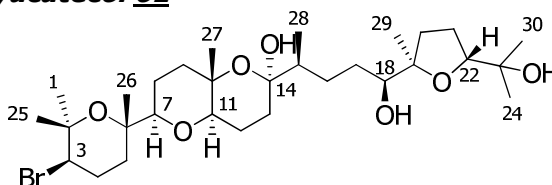
nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.0	1.27 (3H)	s	
2	75.1			
3	59.0	3.89	dd	4.2;12.4
4	28.2	(α)2.12/2.24(β)		
5	37.0	(α)1.52/1.81(β)		
6	74.5			
7	86.4	3.08	dd	2.2;11.1
8	23.6	(β)1.50/1.82(α)		
9	36.4	(α)1.57/1.86(β)		
10	73.6			
11	76.7	3.31	dd	5.9;10.6
12	24.3	(β)1.81/2.11(α)		
13	93.4	5.03	dd	1.9;5.4
14	151.4			
15	28.2	2.07		
16	31.5	1.81/1.91		
17	26.6	1.69/1.82		
18	86.4	3.91	dd	5.1;9.5
19	83.8			
20	34.5	1.66/2.01		
21	26.1	1.85 (2H)		
22	87.4	3.76	dd	5.9;9.5
23	70.4			
24	24.0	1.12 (3H)	s	
25	23.6	1.40 (3H)	s	
26	20.1	1.21 (3H)	s	
27	15.0	1.07 (3H)	s	
28	66.7	3.49/3.63	dd/dd	5.9;11.1/6.8;11.1
29	24.5	1.23 (3H)	s	
30	27.7	1.21 (3H)	s	

IR ν_{max} (CHCl_3): 3437, 2927, 2857, 1677, 1457, 1376 y 1100 cm^{-1} .ESI-HRMS m/z 604.9633 (Calc. 604.9595, $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_7^{81}\text{Br}$, $[\text{M}]^+$).ESI-MS m/z 604, 602, 584, 580, 572, 413 y 301.

Datos físicos del 14-hidroxiyucatecol 61

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_{D}^{25} = +23.4$ (c 0.33, CHCl_3)



Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	30.9	1.25 (3H)	s	
2	74.8			
3	59.1	3.85	dd	4.1;12.3
4	28.2	(α)2.07/2.21(β)		
5	36.9	(α)1.48/1.77(β)		
6	74.6			
7	85.8	3.06	dd	2.4;11.4
8	23.0	(β)1.43/1.73(α)		
9	38.4	(α)1.59/1.78(β)		
10	71.8			
11	75.5	3.98	dd	8.1;9.8
12	20.1	(β)1.35/1.87(α)		
13	32.6	(β)1.55/2.14(α)		
14	98.9			
15	38.6	1.35		
16	27.1	1.38/1.52		
17	26.9	1.18/1.54		
18	74.3	3.77	dd	2.3;12.5
19	84.3			
20	32.7	1.52/2.13		
21	26.3	1.79 (2H)		
22	86.8	3.74	dd	6.1;9.3
23	70.0			
24	24.5	1.12 (3H)	s	
25	23.4	1.39 (3H)	s	
26	19.9	1.19 (3H)	s	
27	19.5	1.12 (3H)	s	
28	16.9	0.84 (3H)	d	6.5
29	24.3	1.12 (3H)	s	
30	28.4	1.26 (3H)	s	

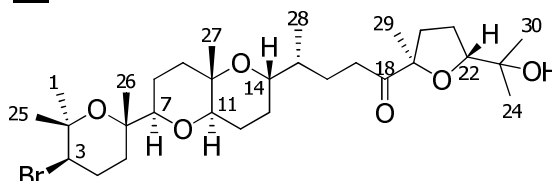
IR ν_{max} (CHCl_3): 2973, 2873, 1462, 1378, 1122 y 1093 cm^{-1} .

ESI-HRMS m/z 629.2869 (Calc. 629.2852 $\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{O}_7^{81}\text{BrNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-MS m/z 629, 627, 611, 609, 547, 413, 342 y 301.

Datos físicos del yucatecona 62

Sólido blanco amorfo

 $[\alpha]_{D}^{25} = +32.0$ (c 0.44, CHCl_3)Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

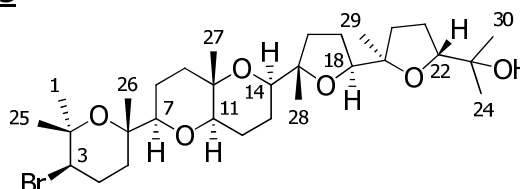
nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.6	1.27 (3H)		
2	75.1			
3	59.3	3.90	dd	4.0;12.3
4	28.3	(α)2.09/2.25(β)		
5	37.7	(α)1.55/1.80(β)		
6	74.5			
7	87.0	3.09	dd	2.4;11.2
8	23.5	(α)1.53/1.76(β)		
9	38.1	(α)1.50/1.70(β)		
10	72.4			
11	81.3	3.00	dd	3.8;11.8
12	24.9	(β)1.51/1.64(α)		
13	28.5	(α)1.37/1.65(β)		
14	72.8	3.47	ddd	2.1;4.6;11.7
15	37.5	1.44		
16	26.4	1.34/1.73		
17	35.1	2.56/2.71	ddd/ddd	5.8;9.7;17.7/5.3;9.9;17.6
18	215.7			
19	88.8			
20	35.3	1.77/2.16		
21	26.2	1.83 (2H)		
22	87.6	3.77	dd	6.2;8.7
23	70.7			
24	24.7	1.15 (3H)		
25	24.3	1.40 (3H)		
26	20.7	1.21 (3H)		
27	14.9	1.14 (3H)		
28	15.6	0.88 (3H)	d	6.8
29	24.7	1.33 (3H)		
30	27.6	1.26 (3H)		

IR ν_{max} (CHCl_3): 2977, 2874, 1714, 1590, 1381, 1129 y 1101 cm^{-1} .ESI-HRMS m/z 611.2760 (Calc. 611.2746 $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_6$ $^{81}\text{BrNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$).ESI-MS m/z 611, 609, 606, 413, 301 y 172.

Datos físicos del saiyacenol A 65

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = +1.53$ (c 0.39, CHCl_3)



Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	$J(\text{Hz})$
1	30.9	1.27 (3H)	s	
2	74.9			
3	59.1	3.89	dd	4.1;12.3
4	28.1	(α)2.10/2.24(β)		
5	36.9	(α)1.53/1.81(β)		
6	74.4			
7	86.6	3.04	dd	2.5;11.4
8	23.0	(β)1.41/1.73(α)		
9	38.4	(α)1.55/1.75(β)		
10	71.4			
11	76.6	3.54	dd	7.3;11.1
12	21.3	(β)1.49/1.87(α)		
13	21.5	1.78 (2H)		
14	75.3	3.71	dd	4.3;11.0
15	84.6			
16	35.3	1.64/1.96		
17	27.7	1.66/1.86		
18	85.9	3.86	dd	6.0;8.4
19	84.6			
20	34.0	1.60/1.97		
21	26.6	1.81 (2H)		
22	86.8	3.77	dd	6.8;8.6
23	70.5			
24	24.0	1.11 (3H)	s	
25	23.7	1.39 (3H)	s	
26	20.1	1.20 (3H)	s	
27	21.2	1.17 (3H)	s	
28	21.6	1.09 (3H)	s	
29	23.7	1.14 (3H)	s	
30	27.6	1.21 (3H)	s	

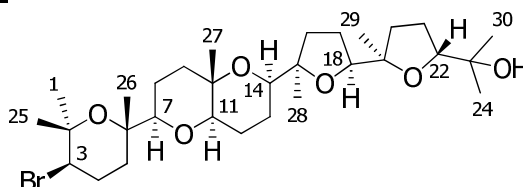
IR ν_{max} (CHCl_3): 2972, 2869, 1462, 1375, 1125, 1098 y 1060 cm^{-1} .

ESI-HRMS m/z 611.2756 (Calc. 611.2746 $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_6^{81}\text{BrNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-MS m/z 611, 609, 571, 569, 413 y 301.

Datos físicos del saiyacenol B 66

Sólido blanco amorfo

 $[\alpha]_{D}^{25} = +4.22$ (c 0.33, CHCl_3)Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.0	1.26 (3H)	s	
2	74.9			
3	59.1	3.88	dd	4.3;12.4
4	28.2	(α)2.10/2.24(β)		
5	37.0	(α)1.54/1.80(β)		
6	74.3			
7	86.4	3.06	dd	2.2;11.3
8	22.9	(β)1.40/1.73(α)		
9	38.5	(α)1.55/1.78(β)		
10	71.4			
11	76.4	3.59	dd	7.4;11.2
12	21.3	(β)1.49/1.88(α)		
13	21.6	1.76 (2H)		
14	75.2	3.78	dd	6.4;9.3
15	84.5			
16	33.5	1.45/1.86		
17	27.4	1.65/1.88		
18	83.9	3.90	dd	5.9;8.0
19	84.7			
20	34.6	1.62/2.02		
21	26.3	1.82 (2H)		
22	86.8	3.76	t	7.9
23	70.5			
24	24.0	1.11 (3H)	s	
25	23.5	1.39 (3H)	s	
26	20.1	1.20 (3H)	s	
27	21.3	1.17 (3H)	s	
28	22.4	1.14 (3H)	s	
29	23.6	1.16 (3H)	s	
30	27.7	1.20 (3H)	s	

IR ν_{max} (CHCl_3): 2972, 2867, 1460, 1374, 1126 y 1088 cm^{-1} .ESI-HRMS m/z 611.2761 (Calc. 611.2746 $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_6^{81}\text{BrNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$).ESI-MS m/z 611, 609, 571, 569, 413 y 301.

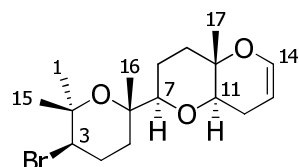
Parte experimental

F.C.P.

Datos físicos del adejeno A 68

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = +1.9$ (c 0.30, CHCl_3)



Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.4	1.27 (3H)	s	
2	75.4			
3	59.4	3.89	dd	4.1;12.3
4	28.8	(α)2.11/2.25(β)		
5	37.5	(α)1.53/1.83(β)		
6	74.6			
7	86.8	3.09	dd	2.5;11.4
8	23.3	(β)1.51/1.83(α)		
9	36.9	(α)1.61/1.89(β)	m/ddd	m/3.1;3.9;12.4
10	74.3			
11	77.2	3.35	dd	5.8;10.6
12	24.5	(β)1.88/2.04(α)		
13	98.1	4.58	ddd	2.0;5.8;5.8
14	141.7	6.14	d	1.4;2.6; 5.8
15	24.1	1.41 (3H)	s	
16	20.3	1.21 (3H)	s	
17	15.9	1.14 (3H)	s	

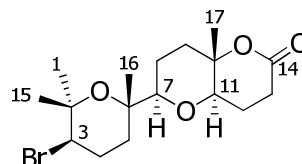
IR ν_{max} (CHCl_3): 2928, 2858, 1728, 1590, 1450 y 1383 cm^{-1} .

FAB-HRMS m/z 360.1160 (Calc. 360.1143, $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_3^{81}\text{Br}$, $[\text{M}]^+$).

FAB-MS m/z 360, 358, 342, 325, 279 y 277.

Datos físicos del adejeno B 69

Sólido blanco amorfo

 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +8.6$ (c 0.26, CHCl_3)Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

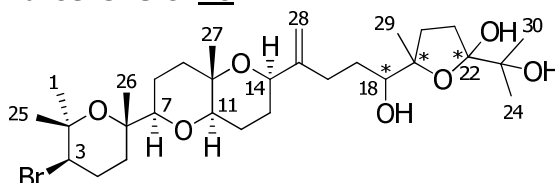
nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	30.9	1.27 (3H)	s	
2	75.1			
3	58.5	3.88	dd	4.1;12.4
4	28.1	(α)2.11/2.25(β)	dddd/dddd	4.1;4.1;4.3;13.6/3.9;12.4;13.4;13.6
5	36.9	(α)1.54/1.81(β)	ddd/ddd	4.3;13.4;13.7/3.9;4.1;13.7
6	74.1			
7	86.7	3.15	dd	2.5;11.6
8	22.4	(β)1.47/1.88(α)	ddd/ddd	2.5;4.1;11.8/11.6;11.8;13.1
9	36.7	(α)1.74/1.99(β)	ddd/ddd	4.7;12.4;13.1/3.0;4.1;12.4
10	78.7			
11	76.5	3.43	dd	5.4;12.1
12	21.6	1.80/1.90	dddd/dddd	9.0;9.2;12.1/2.3;5.4;9.0
13	28.1	2.66/2.75	ddd/ddd	9.2,9.2;19.1/2.3;9.0;19.1
14	170.2			
15	23.6	1.41 (3H)	s	
16	20.0	1.21 (3H)	s	
17	19.3	1.36 (3H)	s	

IR ν_{max} (CHCl_3): 3570, 2951, 2349, 1739, 1584 y 1468 cm^{-1} .FAB-HRMS m/z 374.1190 (Calc. 374.1092, $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_4^{79}\text{Br}$, $[\text{M}]^+$).FAB-MS (NBA) m/z 399, 397, 376, 374, 359, 357, 343 y 307.

Datos físicos del 22-hidroxidehidrotirsiferol 70

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_{D}^{25} = +15.2$ (c 0.07, CHCl_3)



Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.0	1.27 (3H)	s	
2	74.7			
3	59.0	3.89	dd	3.9;12.5
4	28.2	(α)2.11/2.25(β)		
5	36.9	(α)1.52/1.81(β)		
6	74.3			
7	86.4	3.08	dd	2.2;11.2
8	22.7	(β)1.47/1.75(α)		
9	38.5	(α)1.53/1.78(β)		
10	73.0			
11	78.8	3.42	dd	5.7;11.3
12	21.7	(β)1.61/1.81(α)		
13	26.6	(β)1.85/2.10(α)		
14	72.5	4.26	dd	4.4;7.4
15	151.0			
16	29.9	2.12/2.39		
17	29.5	1.57/1.68		
18	84.8	3.55		
19	86.9			
20	29.3	2.00 (2H)		
21	32.0	1.80/1.91		
22	112.5			
23	70.4			
24	25.2	1.29 (3H)	s	
25	23.3	1.40 (3H)	s	
26	19.7	1.20 (3H)	s	
27	19.1	1.22 (3H)	s	
28	109.4	4.86/5.05	bs/bs	
29	17.5	1.44 (3H)	s	
30	23.6	1.31 (3H)	s	

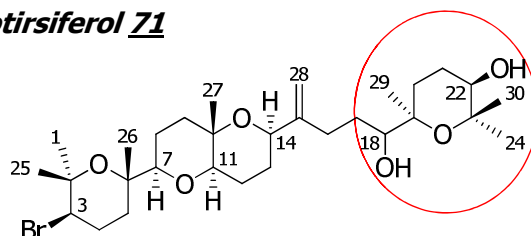
IR ν_{max} (CHCl_3): 3494, 2956, 2872, 1465, 1381 y 1102 cm^{-1} .

ESI-HRMS m/z 627.2715 (Calc. 627.2695, $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_7^{81}\text{BrNa}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-MS m/z 627, 625, 609, 607, 413, 301 y 277.

Datos físicos del piranodehidrotirsiferol 71

Sólido blanco Amorfo

 $[\alpha]_{D}^{25} = +14.8$ (c 0.27, CHCl_3)Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

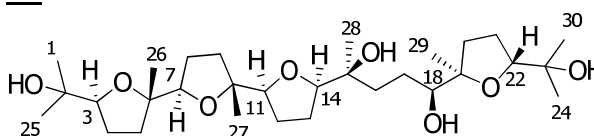
nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.0	1.26 (3H)	s	
2	74.9			
3	59.1	3.89	dd	3.8;12.2
4	28.3	(α)2.10/2.24(β)		
5	37.1	(α)1.53/1.80(β)		
6	74.3			
7	86.6	3.08	dd	2.3;10.8
8	23.0	(β)1.45/1.72(α)		
9	38.7	(β)1.50/1.77(α)		
10	72.9			
11	79.1	3.42	dd	5.71;1.4
12	21.8	(β)1.63/1.78(α)		
13	26.3	(β)1.82/2.03(α)		
14	72.4	4.27	dd	5.0;7.3
15	151.3			
16	29.9	2.12/2.46		
17	28.2	1.38 (2H)		
18	77.0	3.30	d	5.3;10.3
19	76.1			
20	27.9	1.50/1.79		
21	24.7	1.75 (2H)		
22	75.2	3.38	dd	5.1;10.5
23	75.7			
24	21.4	1.24 (3H)	s	
25	23.6	1.39 (3H)	s	
26	20.0	1.20 (3H)	s	
27	19.3	1.22 (3H)	s	
28	109.7	4.86/5.03	s	
29	22.4	1.18 (3H)	s	
30	30.0	1.25 (3H)	s	

IR ν_{max} (CHCl_3): 3422, 2950, 2868, 1649, 1457, 1377 and 1098 cm^{-1} .ESI-HRMS m/z 611.3607 (Calc. 611.3610, $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_6^{81}\text{BrNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$).ESI-MS m/z 611, 609, 507, 506, 445, 443, 207 y 205.

Datos físicos del nivariol A 72

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = +0.9$ (c 0.23, CHCl_3)



Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

nº C	δ ^{13}C	δ ^1H	Multiplicidad	J (Hz)
1	23.5	1.10 (3H)	s	
2	70.3			
3	86.9	3.77	dd	6.4;9.3
4	26.9	1.79 (2H)		
5	32.2	1.58/2.04		
6	84.0			
7	87.3	3.99	m	
8	27.4	1.67/1.85		
9	34.3	1.66/1.76		
10	85.2			
11	85.5	3.97	m	
12	26.7	1.93 (2H)		
13	26.2	1.87/2.12		
14	86.0	3.84	dd	3.7;7.4
15	74.0			
16	34.7	1.30 (2H)		
17	24.9	1.15/1.51		
18	78.6	3.48	dd	1.8;10.1
19	82.3			
20	29.2	1.30/1.97		
21	26.0	1.83 (2H)		
22	81.5	3.74	d	7.0
23	73.8			
24	25.6	1.02 (3H)	s	
25	28.3	1.20 (3H)	s	
26	24.2	1.13 (3H)	s	
27	25.9	1.35 (3H)	s	
28	23.8	1.20 (3H)	s	
29	21.6	1.19 (3H)	s	
30	22.3	1.29 (3H)	s	

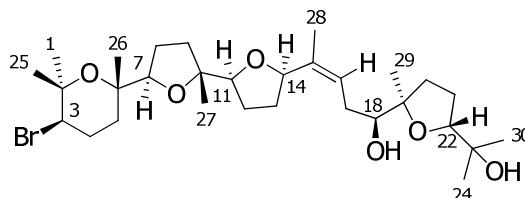
IR ν_{max} (CHCl_3): 3445, 2970, 2900, 2870, 1458, 1374 y 1078 cm^{-1} .

ESI-HRMS m/z 542.2547 (Calc. 5472.3611 $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_8$ $[\text{M}]^+$).

ESI-MS m/z 548, 547, 507, 489, 430, y 301.

Datos físicos del nivariol B 73

Sólido blanco amorfo

 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -3.6$ (c 0.08, CHCl_3)Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

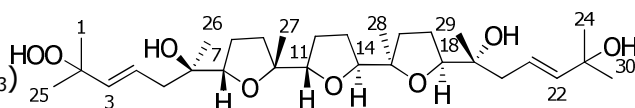
nº C	δ ^{13}C	δ ^1H	Multiplicidad	J (Hz)
1	30.9	1.28 (3H)	s	
2	74.7			
3	59.1	3.89	dd	4.0;12.3
4	28.2	(α)2.09/2.24(β)		
5	35.9	(β)1.58/1.61(α)		
6	70.4			
7	88.4	3.68	t	6.7
8	26.6	1.85/1.92		
9	34.0	1.60/1.93		
10	84.9			
11	84.8	3.82	t	6.8
12	27.6	1.69/1.87		
13	30.5	1.64/1.88		
14	84.6	4.23	dd	6.5;7.4
15	137.2			
16	123.1	5.61	t	7.0
17	30.3	2.07/2.24		
18	76.7	3.58	dd	1.8;9.0
19	85.8			
20	32.1	1.59/2.11		
21	26.3	1.84 (2H)		
22	87.6	3.76	dd	5.8;10.2
23	70.4			
24	24.0	1.12 (3H)	s	
25	23.8	1.41 (3H)	s	
26	20.7	1.21 (3H)	s	
27	23.6	1.16 (3H)	s	
28	12.0	1.63 (3H)	s	
29	23.8	1.17 (3H)	s	
30	27.9	1.22 (3H)	s	

IR ν_{max} (CHCl_3): 2971, 2930, 2870, 1461, 1374 y 1074 cm^{-1} .ESI-HRMS m/z 611.2753 (Calc. 611.2746 $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_6$ $^{81}\text{BrNa}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$).ESI-MS m/z 611, 609, 413, 301 y 236.

Datos físicos del (+)-peróxido de longileno 50

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_{D}^{25} = +46.6$ (c 0.31, CHCl_3)



Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

nº C	δ ^{13}C	δ ^1H	Multiplicidad	J (Hz)
1	26.9	1.19 (3H)	s	
2	80.1			
3	137.0	5.43	d	15.6
4	125.8	5.81	ddd	6.6;8.5;15.6
5	41.3	1.78/2.20	dd/dd	8.5;13.3/6.6;13.3
6	73.9			
7	85.1	3.72		
8	25.8	1.89/2.06		
9	29.7	1.49/2.06		
10	85.8			
11	85.8	4.09		
12	30.1	1.50/2.01		
13	29.9	1.50/2.01		
14	85.4	4.09		
15	85.4			
16	29.3	1.46/2.03		
17	25.2	1.89/2.03		
18	84.1	3.72		
19	73.8			
20	40.8	1.88/2.20	dd/dd	6.8;13.4/7.0;13.4
21	122.2	5.75	ddd	6.8;7.0;15.6
22	141.2	5.61	d	15.6
23	70.0			
24	29.4	1.27 (3H)	s	
25	24.2	1.37 (3H)	s	
26	24.3	1.20 (3H)	s	
27	24.2	1.09 (3H)	s	
28	23.6	1.07 (3H)	s	
29	24.3	1.27 (3H)	s	
30	29.6	1.31 (3H)	s	
-OOH		10.57	s	
-OH-6		5.24	s	
-OH-19		5.03	s	
-OH-23		3.29	s	

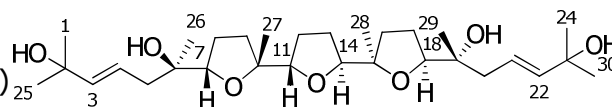
IR ν_{max} (CHCl_3): 3360, 2969, 2926, 1732, 1455, 1373, 1077 y 755 cm^{-1} .

ESI-HRMS m/z 563.3571 (Calc. 563.3559, $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

ESI-MS m/z 563, 547, 532, 531 y 529.

Datos físicos del (+)-longileno 51

Sólido blanco amorfo

 $[\alpha]_{D}^{25} = +21.0$ (c 0.83, CHCl_3)Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

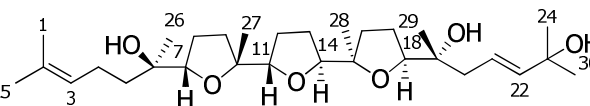
n ^o C	n ^o C	δ ^{13}C	δ ^1H	Multiplicidad	J (Hz)
1	24	29.6	1.29 (3H)	s	
2	23	70.4			
3	22	141.2	5.62	d	15.6
4	21	122.0	5.77	ddd	7.0;7.4;15.6
5	20	40.4	1.78/2.15	dd/dd	7.0;13.4/7.4;13.4
6	19	74.0			
7	18	84.9	3.70	dd	6.4;6.6
8	17	25.6	1.91/2.03		
9	16	30.0	1.47/2.06		
10	15	85.7			
11	14	85.4	4.11	dd	5.5;5.6
12	13	30.0	1.49/2.01		
25	30	29.8	1.31 (3H)	s	
26	29	24.1	1.24 (3H)	s	
27	28	23.7	1.10 (3H)	s	

IR ν_{max} (CHCl_3): 3365, 2971, 2929, 2872, 1455, 1373, 1085, 755 cm^{-1} .EI-HRMS m/z 524.3716 (Calc. 524.3713, $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_7$ $[\text{M}]^+$).EI-MS m/z 524, 391, 347, 279, 227, 211 y 209.

Datos físicos del prelongileno 75

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = +19.2$ (c 0.20, CHCl_3)



Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

n° C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	J (Hz)
1	17.7	1.60 (3H)		
2	131.1			
3	124.8	5.08	t	6.9
4	22.5	1.97/2.04		
5	39.0	1.29/1.43		
6	72.5			
7	83.4	3.73	dd	6.9;7.6
8	25.4	1.80/1.91		
9	30.0	1.46/2.04		
10	84.7			
11	85.0	4.07	dd	5.4;10.3
12	29.5	1.50/1.99		
13	29.5	1.50/1.99		
14	85.7	4.13	dd	5.7;10.3
15	85.8			
16	30.0	1.46/2.06		
17	25.5	1.93/2.14		
18	85.0	3.81	dd	4.4;8.1
19	74.1			
20	40.8	1.83/2.17		
21	122.7	5.74	ddd	6.3;8.6;15.2
22	141.0	5.62	d	15.6
23	70.3			
24	29.8	1.31 (3H)	s	
25	25.7	1.66 (3H)	s	
26	24.9	1.27 (3H)	s	
27	23.5	1.08 (3H)	s	
28	24.0	1.11 (3H)	s	
29	24.1	1.20 (3H)	s	
30	30.1	1.31 (3H)	s	
-OH-6		4.94	s	
-OH-19		4.39	s	
-OH-23		2.57	s	

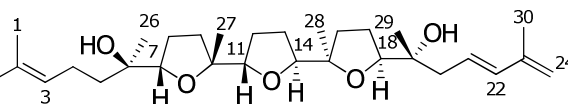
IR ν_{max} (CHCl_3): 3363, 2971, 2931, 2872, 1453, 1372 y 1082 cm^{-1} .

ESI-HRMS m/z 531.3655 (Calc. 531.3662, $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_6\text{Na}$, $[\text{M}^+ + \text{Na}]$).

ESI-MS m/z 609, 563, 547, 532, 531 y 529.

Datos físicos del 23,24-dehidroprelongileno 76

Sólido blanco amorfo

 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +14.5$ (c 0.83, CHCl_3)Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

n° C	δ ^{13}C	δ ^1H	Multiplicidad	J (Hz)
1	17.7	1.60 (3H)	s	
2	131.2			
3	124.9	5.08	t	6.8
4	22.2	1.99/2.09		
5	38.6	1.27/1.43		
6	73.0			
7	84.1	3.81	dd	6.5;11.7
8	25.3	1.87/2.06		
9	30.4	1.50/2.04		
10	85.3			
11	85.2	4.09	dd	5.2;9.3
12	29.5	1.53/2.03		
13	29.5	1.53/2.03		
14	85.2	4.09	dd	5.2;9.3
15	85.4			
16	30.4	1.50/2.04		
17	25.3	1.85/2.06		
18	84.1	3.81	dd	6.5;11.7
19	73.4			
20	42.5	2.09/2.29		
21	126.4	5.72	ddd	6.7;8.9;15.5
22	135.1	6.13	d	15.6
23	142.3			
24	114.4	4.86	s	
25	25.7	1.67 (3H)	s	
26	24.3	1.23 (3H)	s	
27	23.5	1.09 (3H)	s	
28	23.6	1.10 (3H)	s	
29	24.3	1.25 (3H)	s	
30	18.8	1.86 (3H)	s	

UV (CHCl_3) λ_{max} (222.4 nm) ($\epsilon = 25340$) ($\log \epsilon = 4.4$).IR ν_{max} (CHCl_3): 3437, 2972, 2933, 2873, 1456, 1373 y 1075 cm^{-1} .EI-HRMS m/z 490.3338 (Calc. 490.3658, $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_5$, $[\text{M}]^+$).EI-MS m/z 490, 407, 391, 347, 279, 227, 211 y 209.

APÉNDICE

APÉNDICE

Índice

A.I. DEHIDROTIRSIFEROL

A.I.1. Datos Físicos

A.I.2. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz)

A.I.3. Espectro de COSY-DQF (CDCl_3 , 500 MHz)

A.I.4. Espectro de HSQC (CDCl_3 , 500 MHz)

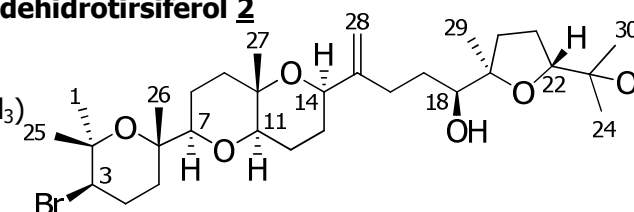
A.I.5. Espectro de HMBC (CDCl_3 , 500 MHz)

A.I.6. Espectro de NOESY (CDCl_3 , 500 MHz)

A.I.1. Datos físicos del dehidrotirsiferol 2

Sólido blanco amorfo

$[\alpha]_D^{25} = -203$ (c 0.64, CHCl_3)

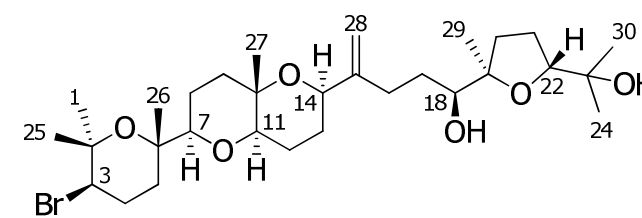
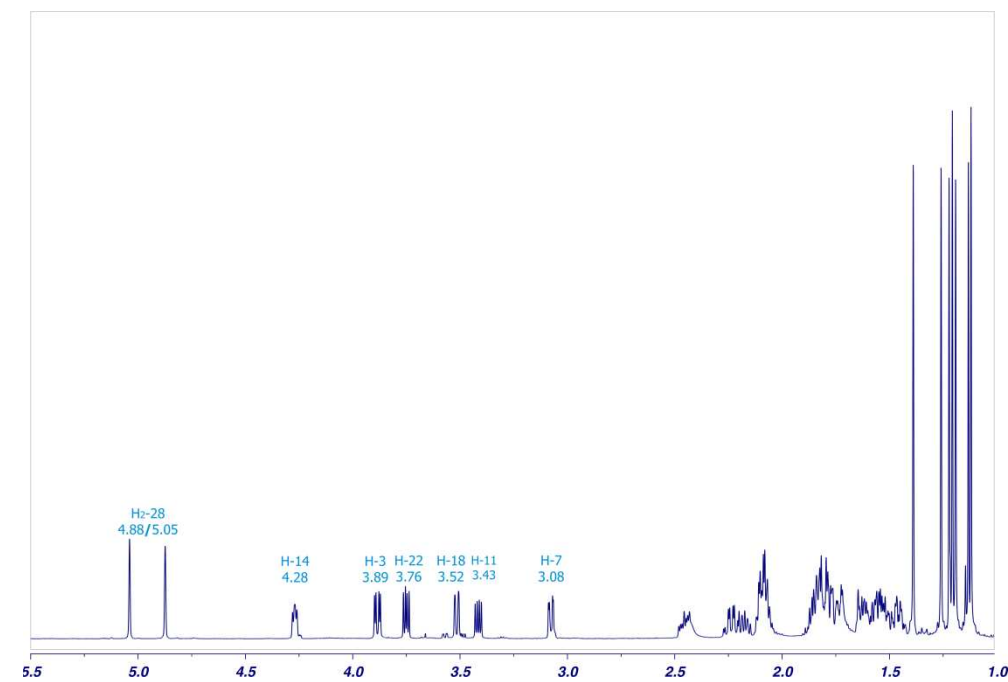


Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3)

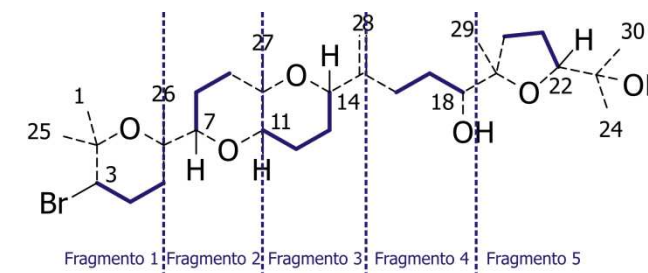
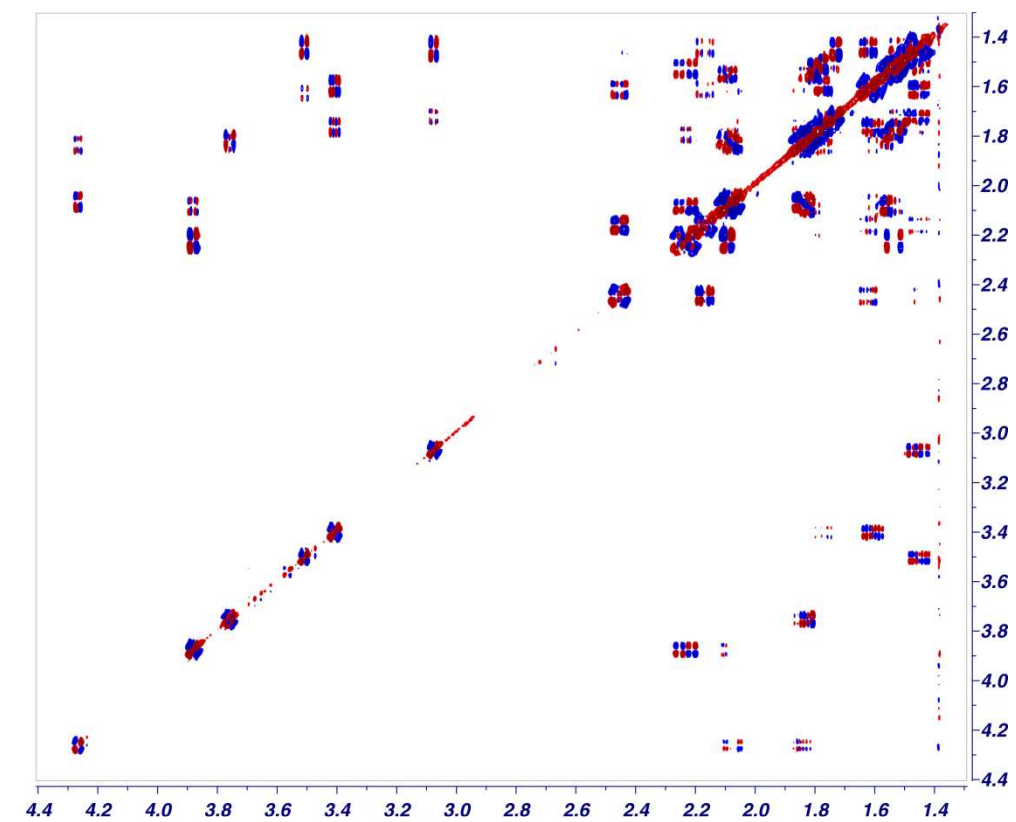
n ^o C	δ ^{13}C	δ ^1H	Multiplicidad	J (Hz)
1	31.0	1.27 (3H)		
2	74.9			
3	59.0	3.89	dd	4.1;12.6
4	28.2	(α)2.13/2.04(β)		
5	37.1	(α)1.52/1.80(β)		
6	74.4			
7	86.7	3.08	dd	2.5;11.0
8	22.9	(β)1.49/1.76(α)		
9	38.7	(α)1.44/1.77(β)		
10	72.9			
11	78.9	3.43	dd	5.7;11.3
12	21.8	(β)1.60/1.81(α)		
13	26.6	(α)1.86/2.11(β)		
14	72.5	4.28	dd	4.0;8.1
15	151.3			
16	29.9	2.12/2.43		
17	30.3	1.45/1.63		
18	76.2	3.52	dd	1.7;10.4
19	86.0			
20	31.7	1.60/2.12		
21	26.3	1.84 (2H)		
22	87.6	3.76	dd	6.0;9.9
23	70.5			
24	24.0	1.12 (3H)	s	
25	23.6	1.39 (3H)	s	
26	20.1	1.20 (3H)	s	
27	19.4	1.23 (3H)	s	
28	109.8	4.88/5.05	bs/bs	
29	23.7	1.14 (3H)	s	
30	27.7	1.21 (3H)	s	

IR ν_{max} (CHCl_3): 3450, 3100, 1640, 1450, 1370 y 1320 cm^{-1} .
 EI-HRMS m/z 506.3606 (Calc. 506.3607 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_6$ $[\text{M}-\text{HBr}]^+$).
 EI-MS m/z 529, 527, 506, 445, 443, 401, 363, 319, 207, 205 y 143.

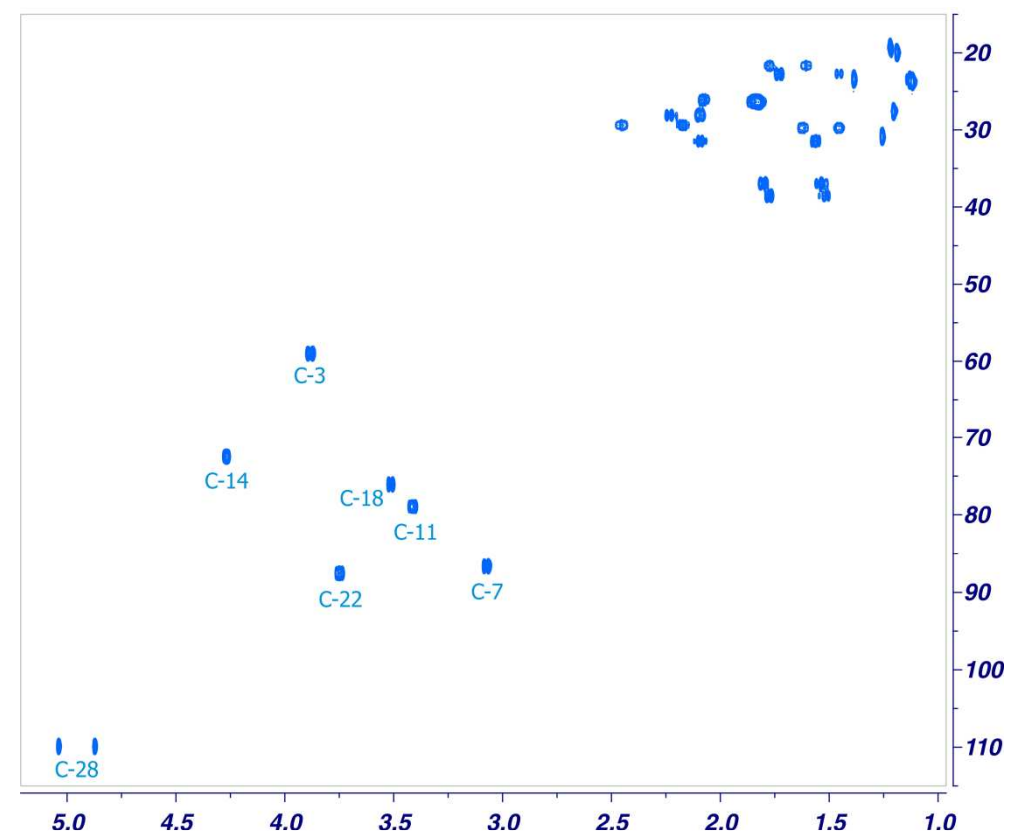
A.I.2. Espectro RMN ¹H del dehidrotirsiferol 2 (CDCl₃, 500 MHz)



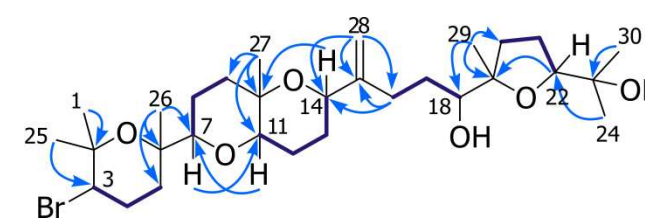
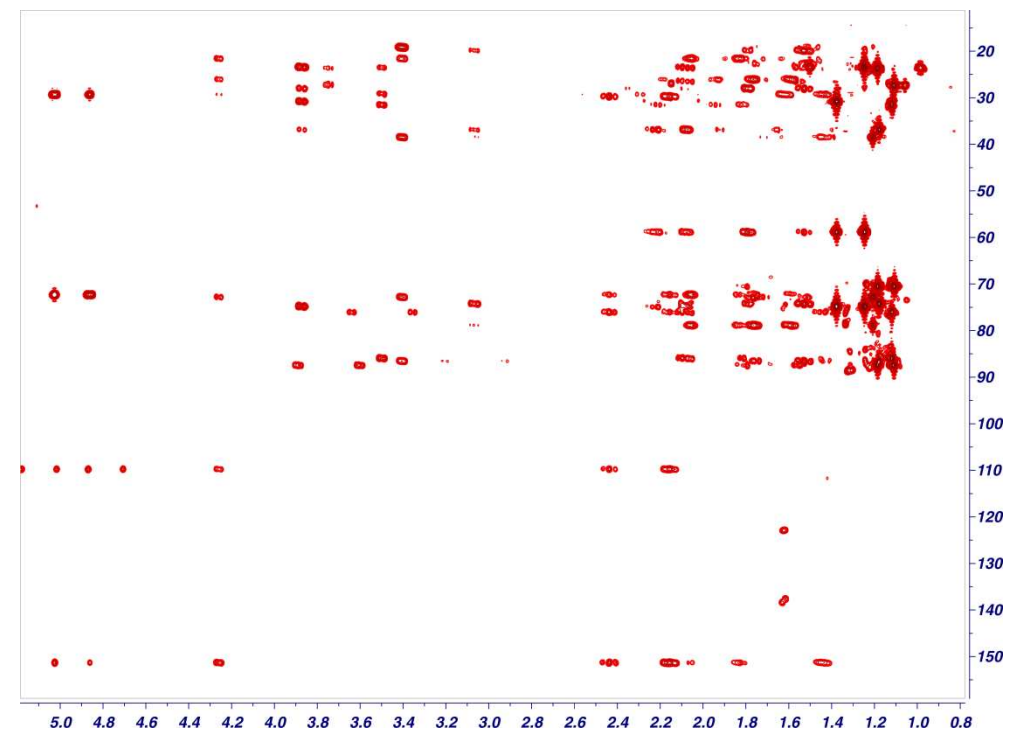
A.I.3. Espectro COSY-DQF del dehidrotirsiferol **2** (CDCl₃, 500 MHz)



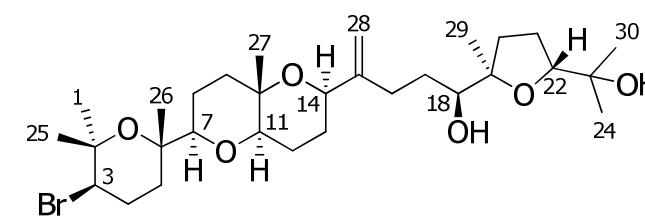
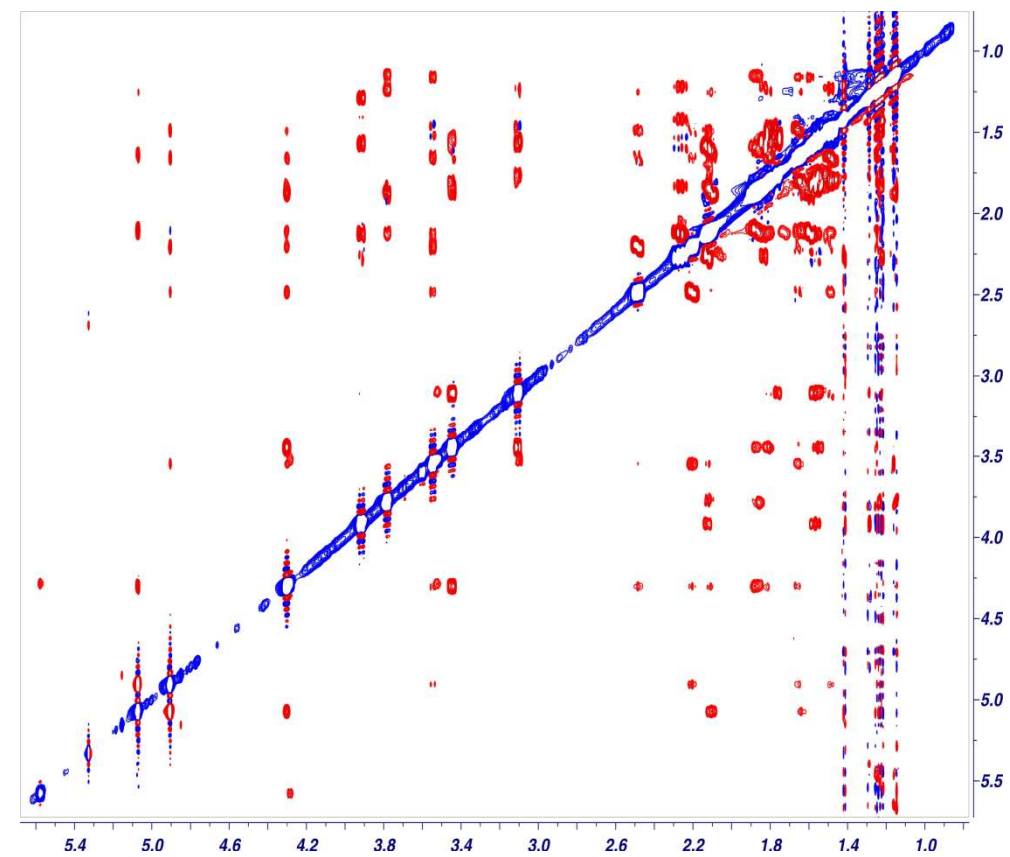
A.I.4. Espectro HSQC del dehidrotirsiferol 2 (CDCl₃, 500 MHz)



A.I.5. Espectro HMBC del dehidrotirsiferol 2 (CDCl₃, 500 MHz)



A.I.5. Espectro ROESY del dehidrotirsiferol 2 (CDCl₃, 500 MHz)



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Con el fin de profundizar en el estudio de los metabolitos secundarios bioactivos producidos por el alga *Laurencia viridis* se realizó un estudio cromatográfico del extracto CHCl₃:MeOH (50:50) de este microorganismo. Dicho estudio, permitió el aislamiento de un total de 19 nuevos poliéteres derivados del escualeno, 1,2-dehidropseudodehidrotirsiferol **54**, secodehidrotirsiferol **55**, espirodehidrovenustatriol **56**, 14-cetodehidrotirsiferol **57**, pretirsenol A **58**, 13-hidroxipretirsenol A **59**, 15-dehidroxitirsenol A **60**, 14-hidroxiyucatecol **61**, yucatecona **62**, saiyacenol A **65**, saiyacenol B **66**, adejeno A **68**, adejeno B **69**, 22-hidroxidehidrotirsiferol **70**, piranodehidrotirsiferol **71**, nivariol A **72**, nivariol B **73**, prelongileno **75** y 23,24-dehidroprelongileno **76**. Junto con estos metabolitos, se aislaron los compuestos (+)-peróxido de longileno **50** y (+)-longileno **51**, que aunque ya habían sido descritos anteriormente, algunos de sus datos espectroscópicos no pudieron ser completados en su momento.

La gran diversidad estructural que presentaron los nuevos compuestos respecto a los poliéteres descritos hasta el momento confirmó el enorme potencial que posee *L. viridis* como productora de este tipo de compuestos. Estas diferencias estructurales, junto con la ya conocida actividad citotóxica que presentan este tipo de compuestos, nos motivó a realizar bioensayos de inhibición del crecimiento celular frente a las líneas celulares *Jurkat* (Células de leucemia linfocítica aguda), *MM144* (Células de mieloma múltiple sensible a doxorubicina), *HeLA* (Células de adenocarcinoma de cérvix) y *CADO ES1* (Sarcoma de ewing's). Los valores de IC₅₀ que se obtuvieron reafirmaron la selectividad de estos compuestos hacia las líneas celulares de leucemia linfocítica aguda.

Debido a la selectiva actividad inhibitoria que presentan algunos de los poliéteres triterpénicos frente a la proteína fosfatasa del tipo 2A, decidimos evaluar la capacidad inhibitoria de los nuevos compuestos frente a las enzimas PP1 y PP2A, observándose que el único compuesto que presentó una actividad importante fue el (+)-peróxido de longileno **50**.

Con el fin de explicar la diferencia de actividad observada entre (+)-peróxido de longileno **50** y los demás longilenos, se desarrolló un modelo computacional (*Docking*). De este modo, pudimos establecer los aspectos estructurales que rigen la unión del (+)-peróxido de longileno **50** y el prelongileno **75** en el sitio activo de la PP2A. Además, la conformación más plausible que adoptan estas moléculas en disolución también ha sido determinada, en este caso se aplicó un estudio que combina métodos computacionales de modelización y los datos de RMN.

El uso combinado de cálculos de mecánica cuántica, simulaciones de *Docking* y métodos de *scoring* demostraron ser una alternativa interesante para el estudio de las interacciones proteína—ligando, especialmente en aquellos casos donde no se pueda abordar el análisis por técnicas de RMN o cristalografía de rayos X.

El estudio de la estereoquímica relativa de los compuestos yucatecona **62**, saiyacenol A **65** y B **66** y nivariol A **72** implicó una revisión detallada de sistemas acíclicos mediante la utilización de diferentes variantes del método de Murata.

En lo que respecta a la génesis de los poliéteres triterpénicos, la gran diversidad estructural de estos compuestos, nos sugiere que existe una ruta general para biogénesis de los compuestos mayoritarios y que los compuestos

minoritarios son el resultado de modificaciones químicas que sufren los intermediarios de dicha ruta general.