



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

**AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE
NUEVOS PRODUCTOS NATURALES A PARTIR DE
INVERTEBRADOS MARINOS Y DE PLANTAS DEL
GÉNERO *Maytenus*.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Química Orgánica

Maria Tereza Rojo de Almeida

Director de Tesis: **Dr. Jorge A. Palermo**

Lugar de Trabajo: **UMYMFOR – Departamento de Química Orgánica, FCEyN – UBA
Buenos Aires, 2008.**

AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE NUEVOS PRODUCTOS NATURALES A PARTIR DE INVERTEBRADOS MARINOS Y DE PLANTAS DEL GÉNERO *Maytenus*.

Resumen

En este Trabajo de Tesis se describe el aislamiento y la elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos de dos octocorales: *Renilla reniformis* y *Convexella magelhaenica* y de dos plantas de la familia Celastraceae, *Maytenus vitis-idaea* y *Maytenus spinosa*.

Del Pennatulaceo *Renilla reniformis*, recolectado en el Golfo de San Jorge, Chubut, se aislaron dos diterpenos nuevos del tipo briarano (**RP3-22** y **RP3-27**), y un hidroxiácido lineal (**RP3-13**) que presentó actividad antifúngica contra fitopatógenos. De la gorgonia *Convexella magelhaenica*, recolectada en las costas de Argentina, se aislaron dos nuevos diterpenos de tipo dolabellano (**CB2A8** y **CB2D**).

De las raíces de la especie *Maytenus vitis-idaea*, recolectada en La Rioja, se aislaron ocho triterpenos metilénquinonas de los cuales cuatro eran conocidos (**tingenona**, **escutiona**, **pristimerina** y **celastrol**) y cuatro eran nuevos (**MV3-22**, **MV3-24**, **MV5-6-11A** y **MV5-6-11B**).

De las raíces de la especie *Maytenus spinosa*, recolectada en la provincia de Salta, se aislaron dos triterpenos metilénquinonas conocidos (**tingenona**, **escutiona**), un dímero de triterpeno metilénquinona (**7,8-dihidroisoxuxuarina E α**), un derivado del lupano (**3-oxolup-20(29)-en-30-al**) dos nuevos triterpenos, uno derivado del oleanano (**A30-8**) y el otro del ursano (**A30-10**) y seis alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos, de los cuales dos resultaron ser nuevos (**S4-4** y **S5-12**) y cuatro conocidos: **euonina**, **horridina**, **cangorinina E-I** y **ebelnifolina E-II**.

Todos los extractos de las especies estudiadas fueron fraccionados mediante distintas técnicas cromatográficas hasta la obtención de los metabolitos secundarios de interés puros. La elucidación estructural se llevó a cabo utilizando principalmente experimentos de RMN-1D y 2D, junto con espectrometría de masa.

Palabras clave: productos naturales marinos, Pennatulacea, gorgonidae, *Renilla reniformis*, *Convexella magelhaenica*, *Maytenus vitis-idaea*, *Maytenus spinosa*, alcaloides sesquiterpénicos, Celastraceae, triterpenometilénquinonas, briarano, dolabellano.

ISOLATION AND STRUCTURAL ELUCIDATION OF NEW NATURAL PRODUCTS FROM MARINE INVERTEBRATES AND PLANTS OF THE *Maytenus* GENUS.

Abstract

The isolation and structure elucidation of secondary metabolites from the organic extracts of two octocorals: *Renilla reniformis* and *Convexella magelhaenica* and two plants of the family Celastraceae: *Maytenus spinosa* and *Maytenus vitis-idaea* are described.

From the pennatulacean *Renilla reniformis*, collected in the Gulf of San Jorge, Chubut, two new briarane diterpenoids, (**RP3-22** and **RP3-27**) were isolated, together with a new methyl hydroxylated fatty acid (**RP3-13**) which was active against phytopathogenic fungi. From the gorgonian *Convexella magelhaenica*, collected from clam fisheries in Argentina, two new dolabellane diterpenoids (**CB2A** and **CB2D**) were isolated.

From the roots of *Maytenus vitis-idaea*, collected in La Rioja, eight triterpenemethylenequinones were isolated. Four of these compounds (**tingenone**, **scutione**, **pristimerin** and **celastrol**) were known, while the other four (**MV3-22**, **MV3-24**, **MV5-6-11A** and **MV5-6-11D**) were new.

From the roots of *Maytenus spinosa*, collected in the province of Salta, two new triterpenemethylenquinones (**tingenone** and **scutione**) a known triterpenemethylenquinone dimer (**7, 8-dihydroisoxuxuarine E α**) a known lupane derivative (**3-oxolup-20(29)-en-30-al**) together with two new triterpenoids (oleanane and ursane derivatives) were isolated. Six macrocyclic sesquiterpenoid alkaloids were also identified, two of which were new compounds.

All the abovementioned extracts were fractionated by different chromatographic techniques in order to obtain pure compounds. The structural elucidation of the purified compounds was carried on mainly by 1D and 2DNMR techniques together with mass spectrometry.

Key Words: marine natural products, Pennatulacea, gorgonidae, *Renilla reniformis*, *Convexella magelhaenica*, *Maytenus vitis-idaea*, *Maytenus spinosa*, sesquiterpene alkaloids, Celastraceae, briarane, dolabellane.

*A mi mae, a Lara, a Gastón,
porque el amor es el origen...*

De lo que rebosa el corazón, habla la boca.

1 Ching

Agradecimientos

Agradezco a las siguientes personas e Instituciones, cuya ayuda fue fundamental para la realización de este trabajo:

A la CAPES (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Ministério da Educação, Brasil*) por el financiamiento de la beca de investigación. Al UMYMFOR (CONICET–FCEyN), especialmente al Dr. Gerardo Burton por su colaboración y por las determinaciones instrumentales realizadas.

Al Dr. Jorge A. Palermo, por la dirección de mi trabajo de investigación, por todas sus enseñanzas, por ser mi guía, por su apoyo y buena voluntad en ayudarme desde el inicio de mis tiempos en Argentina, por su amistad y carisma.

Al Dr. Eloir P. Schenkel, a la Dra. Marení R. Farias y a la Dra. Cláudia M.O. Simões (*Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil*) por haberme iniciado en la carrera científica y por todo el apoyo en el camino hacia el doctorado.

A la Dra. Laura Schejter del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP - Mar del Plata) por la recolección y el envío de los corales. Al Dr. Carlos D. Pérez (Universidad Federal de Pernambuco, Recife, Brasil) por la clasificación del coral *Convexella Magelhaenica*.

Al personal del Instituto de Biología Marina y Pesquera “Alte. Storni”, por su ayuda con la recolección de las esponjas y por permitirnos la utilización de sus instalaciones como base de operaciones en nuestros viajes de campaña a la localidad de San Antonio Oeste, Río Negro.

Al Dr. Carlos Oberti (UNC, Universidad Nacional de Córdoba) por la recolección de las muestras de *Maytenus*, por el envío de material bibliográfico esencial a este trabajo y por toda su colaboración y atención.

Al Dr. Ángel G. Ravelo (Universidad La Laguna, Tenerife, España) por la realización de los espectros de masa y de los ensayos biológicos sobre los compuestos de *Maytenus*, por la colaboración en ese trabajo.

A la Dra. Gabriela M. Cabrera, por sus consejos y colaboración en muchos momentos durante mi curso.

A mis excelentes profesores del Departamento de Química Orgánica, por todo lo aprendido.

A la Dra. Alicia Couto, a Adriana, a Juliana, a Malena y a Tamara, con quienes compartimos el laboratorio, por contribuir a la creación de un clima de trabajo agradable. A la Dra. Rosa Erra-Balsells, por la toda la ayuda con los trámites del doctorado.

A Maripi, a Olga, a Sérgio y demás personal no docente por la amabilidad y cooperación siempre. A mis colegas de *pasillo* cuyos nombres a menudo desconozco pero cuyas sonrisas me las llevaré.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Gaby, Dani, Ale (*La Maestra*), Vale, Romi, Bren, Chevere, Vick, Neli, Gastón, Flor, Adriana, Chama, Matías, Lucia, por tantas cosas...por toda su ayuda y consejos, por su amistad, por las risas, por los mates compartidos y por haber podido contar siempre con ellos, por los días que se hicieron mucho más lindos en su presencia. ¡Los quiero!

A la *Misteriosa Buenos Aires*, encantadora y asustadora; a sus calles, a sus árboles, a su música, a su gente, a su sol y al viento sur...que siempre fueron afines a mi persona. A toda la Argentina, que es tan linda, por tan especial experiencia y vivencia.

A algunas personas que me “adoptaron”, principalmente a mi querida vecina Noemí y a la familia de Gastón, que me acogieron con tanta ternura.

A Carlota, mi maestra de tai-chi-chuan, por sus enseñanzas sobre el arte del no conocimiento, un balance importantísimo en esos tiempos.

A mis amigos de Brasil, Ana, Thaís, Montanha, Re, Dani, Patricia, Fer, Jose, Gi, entre tantos otros, que desde lejos están siempre presentes velando por mí.

A mi madrecita, a mis hermanos, hermanas y sobrinos, quienes siempre fueron la fuerza y la luz que traigo conmigo. A Elis y Jobin, mis *togas* queridos, compañeros constantes durante la escritura de esta tesis.

A Gastón, mi esposo siempre compañero en todos los momentos, por la fuerza y el amor....la mejor recompensa de este largo viaje.

PRESENTACIÓN

Esta tesis de doctorado tuvo inicio dentro del contexto de un proyecto de colaboración entre distintos grupos de investigación de América Latina (Proyecto Prosul) que incluye, entre otros, la cooperación Brasil-Argentina por medio de los grupos de productos naturales del Dr. Jorge Palermo (UBA) y el grupo del Dr. Eloir Schenkel (UFSC-Brasil). La Beca de doctorado fue concedida por la agencia brasilera CAPES (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior- Ministério da Educação do Brasil*) por un plazo de cuatro años.

En un primer momento se empezó a estudiar muestras de 6 esponjas marinas no identificadas colectadas en las costas de Santa Catarina, Brasil. Luego, por medio de colaboración con el Instituto de Biología Marina y Pesquera Almirante Storni (San Antonio Oeste, Río Negro) fueron recolectadas 22 muestras de esponjas no identificadas en Banco Reparo, en la bahía de San Antonio Oeste.

Fue hecho un *screening* químico (por cromatografía y RMN) y biológico (por actividad antiviral) con todos los extractos de esponjas marinas, los cuales fueron enviados al *Laboratório de Virologia Aplicada* – MIP, UFSC, Brasil. Las muestras promisorias, que presentaban señales de RMN correspondientes a metabolitos secundarios y/o presentaban actividad antiviral fueron seleccionadas para los procesos de aislamiento de compuestos. Entretanto, para la mayoría de las muestras seleccionadas no se pudo alcanzar masa suficiente de compuestos para su elucidación estructural.

A continuación, dentro de un proyecto de investigación de metabolitos secundarios de organismos marinos del Atlántico Sur, se inició el estudio químico de dos especies de corales blandos (Octocorallia) colectados por personal del INIDEP (Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata): *Renilla reniformis* (Pennatulacea), y *Convexella magelhaenica*. Los trabajos de purificación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios están relatados en esta tesis.

También se inició una nueva línea de trabajo en plantas medicinales, en colaboración con el Dr. Juan Carlos Oberti, de la Universidad Nacional de

Córdoba. En esa investigación, incluida en esta tesis, fueron seleccionadas para ser estudiadas químicamente dos especies de plantas autóctonas de Argentina, pertenecientes a la familia Celastraceae: *Maytenus spinosa* y *Maytenus vitis-idaea*.

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	5
AGRADECIMIENTOS	11
PRESENTACIÓN	13
LISTA DE ABREVIATURAS	17
LISTA DE FIGURAS	19
LISTA DE TABLAS	22
CAPÍTULO 1: PRODUCTOS NATURALES	24
INTRODUCCIÓN.....	24
EL ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS NATURALES DE ORIGEN MARINO	29
INTERACCIONES QUÍMICAS DE INVERTEBRADOS MARINOS BENTÓNICOS	33
PRODUCTOS NATURALES MARINOS CON ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA	37
CARACTERÍSTICAS PARTICULARES DEL TRABAJO CON PRODUCTOS NATURALES MARINOS	46
ESTUDIO QUÍMICO DE INVERTEBRADOS MARINOS	49
CAPÍTULO 2: INVERTEBRADOS MARINOS	50
PHYLLUM CNIDARIA	50
LA SUBCLASE OCTOCORALLIA	54
PRODUCTOS NATURALES DE CNIDARIOS	56
<i>Diterpenos del tipo Briarano</i>	70
<i>Diterpenos del tipo Dolabellano</i>	82
<i>La especie Renilla reniformis</i>	94
Antecedentes de metabolitos secundarios aislados de <i>Renilla</i>	96
<i>Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios del octocoral Renilla reniformis</i>	97
Elucidación estructural del compuesto RP3-13	99
Elucidación estructural del compuesto RP3-22	104
Elucidación estructural del compuesto RP3-27	113
<i>La especie Convexella magelhaenica</i>	119
<i>Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios del coral Convexella magelhaenica</i>	120
Elucidación estructural del compuesto CB2A	121
Elucidación estructural del compuesto CB2D	128
ESTUDIO QUÍMICO DE PLANTAS MEDICINALES DEL GÉNERO MAYTENUS	133
CAPÍTULO 3: PLANTAS DEL GÉNERO MAYTENUS	134

FAMILIA CELASTRACEAE	134
<i>Sesquiterpenos</i>	137
<i>Alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos</i>	141
<i>Diterpenos</i>	148
<i>Triterpenos</i>	148
<i>Dímeros de triterpenometilénquinonas</i>	155
<i>Especies de Maytenus encontradas en Argentina</i>	159
LA ESPECIE MAYTENUS VITIS-IDAEA.....	161
<i>Aislamiento de metabolitos secundarios de Maytenus vitis-idaea</i>	163
Elucidación estructural del compuesto MV3-24	165
Elucidación estructural del compuesto MV3-22	171
Elucidación estructural del compuesto MV3-26	173
Elucidación estructural del compuesto MV3-11	176
Elucidación estructural del compuesto MV3-13	177
Elucidación estructural del compuesto MV5-6-11A	179
Elucidación estructural del compuesto MV5-6-11B	184
Elucidación estructural del compuesto MV5-6-38	187
LA ESPECIE MAYTENUS SPINOSA	190
<i>Aislamiento de metabolitos secundarios de Maytenus spinosa</i>	192
Elucidación estructural del compuesto A39-26	194
Elucidación estructural del compuesto A26-7	198
Elucidación estructural del compuesto A30-8	200
Elucidación estructural del compuesto A30-10	205
Elucidación estructural del compuesto S4-4	209
Elucidación estructural del compuesto S5-9	217
Elucidación estructural del compuesto S5-11	220
Elucidación estructural del compuesto S5-12	222
Elucidación estructural del compuesto S5-13	225
Elucidación estructural del compuesto S5-16	227
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	238
CAPÍTULO 4: PARTE EXPERIMENTAL	242
GENERALIDADES	242
PROCEDIMIENTOS DE AISLAMIENTO	243
Aislamiento de compuestos de <i>Renilla reniformis</i>	244
Aislamiento de compuestos del coral <i>Convexella magelhaenica</i>	247
Aislamiento de compuestos de <i>Maytenus vitis-idaea</i>	249
Aislamiento de compuestos de <i>Maytenus spinosa</i>	256
RESUMEN DE ESTRUCTURAS	265

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac acetilo

AcOEt acetato de etilo

CC₅₀ concentración citotóxica al 50%

CE₅₀ concentración efectiva al 50%

CCD cromatografía en capa delgada

COSY *Correlation through long-range coupling*

c cuarteto

d doblete

d. a doblete ancho

dd doble doblete

EM espectrometría de masa

Et etilo

EtOH etanol

eV electrón volt

EI-EM espectrometría de masa por ionización por electrones

ESI-EM espectrometría de masa por ionización por electrospray

HMBC *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HMQC *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*

HPLC cromatografía líquida de alta resolución

HSQC *Heteronuclear Single-quantum Correlation*

Hz hertz

IS índice de selectividad

J constante de acoplamiento

m multiplete

m/z relación masa/carga

Me metilo

MeOH metanol

NOE *Nuclear Overhauser Effect*

NOESY *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

OMe metoxilo

ppm parte por millón

ROESY *Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy*

RMN-¹³C resonancia magnética nuclear de carbono-13

RMN-¹H resonancia magnética nuclear de hidrógeno

s singulete

s. a. singulete ancho

t triplete

t. a. triplete ancho

UV ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático ilustrando las características esenciales de los pólipos de octocorales.	55
Figura 2: Esqueletos terpenoidales frecuentes en los cnidarios.	62
Figura 3: Numeración del esqueleto de los briaranos.	71
Figura 4: Esquema de la biosíntesis de los briaranos.	81
Figura 5: Numeración del esqueleto de los dolabellanos.	83
Figura 6: Ruta biosintética de los dolabellanos.	89
Figura 7: Biosíntesis de neodolabellanos y dolastanos.	91
Figura 8: Clasificación de los octocorales estudiados en esta tesis.	92
Figura 9: <i>Renilla reniformis</i> (A) y <i>Primnoella</i> sp. (B).	93
Figura 10: Esquema del aislamiento de compuestos de <i>Renilla reniformis</i> .	98
Figura 11: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT de RP3-13.	99
Figura 12: Espectro de RMN ^1H de RP3-13.	100
Figura 13: Ampliación del espectro HSQC de RP3-13.	100
Figura 14: Espectro de RMN HMBC de RP3-13.	102
Figura 15: Espectro de RMN ^1H y sus ampliaciones de RP3-22.	106
Figura 16: Ampliaciones del espectro de HSQC de RP3-22.	110
Figura 17: Espectro de RMN ^1H y sus ampliaciones de RP3-27.	115
Figura 18: Ampliaciones del espectro de RMN HMBC de RP3-27.	116
Figura 19: Espectro de RMN COSY de RP3-27.	116
Figura 20: Esquema de aislamiento de los compuestos de <i>Convexella magelhaenica</i> .	120
Figura 21: Espectro de RMN ^1H y DEPT de CB2A.	121
Figura 22: Ampliaciones del espectro de RMN ^1H de CB2A.	123
Figura 23: Espectro de RMN COSY de CB2A.	125
Figura 24: Espectro de RMN HMBC de CB2A.	125
Figura 25: Correlaciones observadas en el espectro ROESY para CB2A.	127
Figura 26: Espectros de RMN ^1H y ^{13}C DEPT de CB2D.	129
Figura 27: Espectro de RMN COSY de CB2D.	130

Figura 28: Biosíntesis de los sesquiterpenos agarofuránicos.	138
Figura 29: Ácidos carboxílicos que esterifican a los sesquiterpenos agarofuránicos.	139
Figura 30: Ácidos dicarboxílicos que esterifican a los sesquiterpenos agarofuránicos entre las posiciones C3-C13.	142
Figura 31: Esqueletos de los tipos de triterpenos encontrados en celastráceas.	149
Figura 32: Numeración del esqueleto 24- <i>nor</i> -D:A-friedoleano.	153
Figura 33: Esquema de la biosíntesis de los triterpenos metilénquinonas (ejemplificado para pristimerina y tingenona).	154
Figura 34: Mecanismo de formación de los dímeros y trímeros de triterpenos.	158
Figura 35: Clasificación de las plantas estudiadas en esta tesis.	159
Figura 36: Esquema de aislamiento de los compuestos de <i>M. vitis-idaea</i>	164
Figura 37: Espectros de RMN ¹ H y ¹³ C de MV3-24.	166
Figura 38: Espectro HMBC de MV3-24.	168
Figura 39: Espectro de RMN ¹ H de MV3-22.	171
Figura 40: Espectro de RMN ¹ H de MV3-26 (51).	174
Figura 41: Espectro de RMN ¹ H de MV3-11 (185).	176
Figura 42: Espectro de RMN ¹ H de MV3-13 (174).	177
Figura 43: Espectros de RMN ¹³ C y ¹ H de MV5-6-11a.	179
Figura 44: Ampliación del espectro de RMN ¹ H de MV5-6-11a.	180
Figura 45: Espectro HSQC de MV5-6-11a.	181
Figura 46: Espectro HSQC de MV5-6-11a.	183
Figura 47: Espectro de COSY) de MV5-6-11a.	183
Figura 48: Espectro de RMN ¹ H de MV5-6-11b.	184
Figura 49: Ampliación del espectro HMBC de MV5-6-11b.	186
Figura 50: Espectro de RMN ¹ H de MV5-6-38.	188
Figura 51: <i>Maytenus spinosa</i> (A); corteza de sus raíces (B); <i>Celastrus sp.</i> (C); <i>Tripterygium wilfordi</i> (D).	191
Figura 52: Esquema de aislamiento de los compuestos de <i>M. spinosa</i> .	193

Figura 53: Espectros de RMN ^{13}C y DEPT 135 de A39-26.	194
Figura 54: Espectro de RMN ^1H de A39-26.	195
Figura 55: Espectro de RMN ^1H de A26-7.	168
Figura 56: Espectro de RMN ^1H de A30-8.	200
Figura 57: Espectro de HMBC de A30-8.	201
Figura 58: Espectro COSY de A30-8.	202
Figura 59: Espectro HMBC de A30-8.	203
Figura 60: Espectro de RMN ^1H de A30-10.	205
Figura 61: Ampliación del espectro de RMN ^1H de A30-10.	207
Figura 62: Espectro HSQC ampliado de A30-10.	207
Figura 63: Espectro de RMN ^1H de S4-4 y ampliación de la región a campos bajos.	209
Figura 64: Ampliación de la zona de δ 4.5 - 6 del espectro de RMN ^1H de S4-4.	213
Figura 65: Ampliación de la zona de δ 1.6 – 2.7 del espectro de RMN ^1H de S4-4.	213
Figura 66: Espectro de RMN HMBC de S4-4.	215
Figura 67: Espectro de RMN HMBC de S4-4	215
Figura 68: Espectro de RMN ^1H con ampliación de la zona a campos altos del de S5-9.	217
Figura 69: Ampliación del espectro de RMN ^1H de S5-9.	218
Figura 70: Ampliación de la zona de campo más alto del espectro de RMN ^1H de S5-9.	218
Figura 71: Espectro de RMN ^1H de S5-11.	220
Figura 72: Espectro de RMN ^1H de S5-12.	222
Figura 73: Ampliación del espectro de RMN ^1H de S5-12.	223
Figura 74: Ampliación del espectro de RMN ^1H de S5-13.	225
Figura 75: Ampliación del espectro de RMN ^1H de S5-16.	227
Figura 76: Ampliación del espectro de RMN ^1H de S5-16.	228
Figura 77: Espectro de RMN ^1H de S5-16.	228

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Grupos sustituyentes encontrados en los briaranos y sus posiciones más frecuentes.	72
Tabla 2: Alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos aislados de raíces de <i>M. spinosa</i> .	230
Tabla 3: Datos de RMN ^1H y ^{13}C para RP3-13	245
Tabla 4: Datos de RMN ^1H y ^{13}C para RP3-22 y RP3-27	246
Tabla 5: Datos de RMN ^1H y ^{13}C para CB2A y CB2D	248
Tabla 6: Datos de RMN ^{13}C para MV3-22 , MV3-24 y MV3-26	252
Tabla 7: Datos de RMN ^1H y para MV3-22 , MV3-24 y MV3-26	253
Tabla 8: Datos de RMN ^{13}C para MV5-6-11a , MV5-6-11b y MV5-6-38	254
Tabla 9: Datos de RMN ^1H para MV5-6-11a , MV5-6-11b y MV5-6-38	255
Tabla 10: Datos de RMN ^{13}C y ^1H para A39-26	260
Tabla 11: Datos de RMN ^{13}C y ^1H para A30-8 y A30-10	261
Tabla 12: Datos de RMN ^{13}C y para S4-4 , S5-9 , S5-11 , S5-12 y S5-13	262
Tabla 13: Datos de RMN ^1H y para S4-4 , S5-9 , S5-11	263
Tabla 14: Datos de RMN ^1H y para S5-12 , S5-13 , S5-16	264

PRODUCTOS NATURALES

*"Me doy al barro,
para crecer en la hierba que amo".*

Walt Whitman

Capítulo 1: Productos Naturales

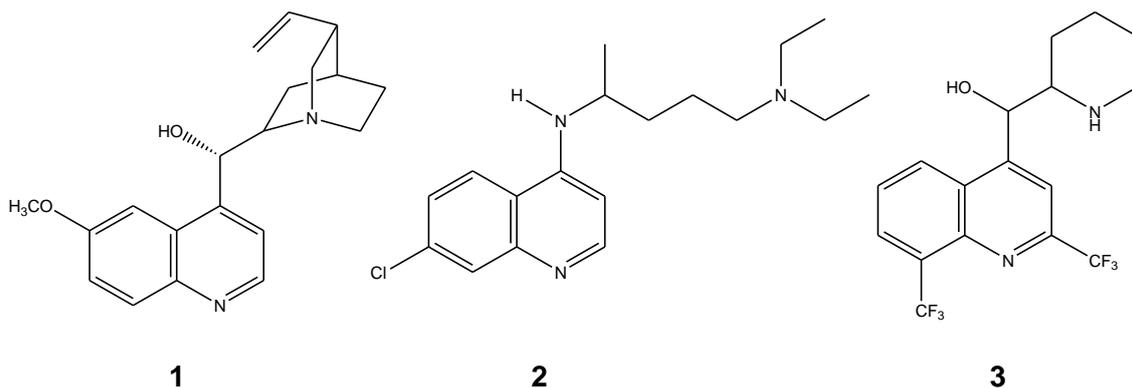
Introducción

Los productos naturales representan una fuente rica de compuestos biológicamente activos y son un ejemplo de diversidad molecular, con reconocido potencial en el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas. Si bien han cambiado las estrategias en la investigación de productos naturales, en la industria farmacéutica el número de productos naturales novedosos descubiertos ha decrecido en las últimas décadas. Algunas de las razones para ello están relacionadas a los altos costos y tiempos consumidos en los programas convencionales de búsqueda de compuestos farmacológicamente activos, lo que hizo que la atención se volviera hacia la química combinatoria como nueva y prometedora herramienta en la búsqueda de nuevas drogas. No obstante, la diversidad estructural de los productos naturales todavía supera en mucho la de los compuestos sintéticos.

Los productos naturales son utilizados por la humanidad desde tiempos inmemoriales. El hombre empezó a utilizar hierbas y otros productos naturales de forma experimental en la búsqueda de alivio y cura a enfermedades, para el control de plagas, en las estrategias de defensa de los pueblos, para la conservación de los alimentos, en el arte y en la comunicación.

El conocimiento empírico acumulado por los pueblos primitivos puede ser considerado un factor fundamental para el descubrimiento de sustancias tóxicas y medicamentosas a lo largo de los años. El aprendizaje con los distintos grupos étnicos trajo contribuciones para el desarrollo de la investigación en productos naturales, del conocimiento de relaciones entre estructura química de un compuesto y sus propiedades biológicas y de la interrelación animal-planta. La naturaleza brindó muchos modelos moleculares que fundamentaron los estudios de relación estructura-actividad e inspiraron el desarrollo de la síntesis orgánica clásica, basta con citar el ejemplo de los alcaloides de los curares (extractos obtenidos de especies de *Strychnos* y *Chondodendron* utilizados por indígenas para producir flechas envenenadas) y los avances en los estudios de procesos de transmisión neuromuscular y de relación estructura actividad de agentes bloqueadores ganglionares.

Haciendo un breve recorrido por la historia y el origen de los medicamentos, conviene citar el descubrimiento de la quinina (1), en 1820, aislada de especies de *Cinchona* que eran utilizadas por los indígenas peruanos para el tratamiento de la malaria. Basados en los estudios sobre la quinina se desarrollaron durante la II Guerra Mundial los antimaláricos sintéticos del grupo de los 4- y 8-aminoquinolínicos: cloroquina (2), y primaquina (3).¹



En 1828 el descubrimiento de la salicina, el compuesto activo de la planta *Salix alba* utilizada como analgésica y antipirética, seguido de la síntesis en 1860 del ácido salicílico y en 1898 la síntesis del ácido acetilsalicílico (AAS), revolucionaron los estudios en el área de la inflamación y del dolor. El descubrimiento del AAS marcó el final del primer período, donde la búsqueda de compuestos naturales terapéuticamente útiles era hecha al azar.

El marco del segundo período de la historia de los medicamentos fue el surgimiento del barbital (hipnótico) en 1903, seguido de otras drogas sintéticas de propiedades anestésicas: epinefrina, procaína y benzocaína, compuestos claves para los estudios y desarrollo de los simpaticomiméticos.

Los primeros estudios entre estructura química y actividad para el desarrollo racional de moléculas bioactivas ganaron importancia durante la II Guerra Mundial, motivados por las necesidades de tratamientos para infecciones, dolor, alergias y depresión. El período posterior a la guerra representó el auge de los fármacos sintéticos: antihistamínicos (ej. mepirazida), antipsicóticos (ej. clorpromazina), antidepresivos (ej. imipramina), antiinflamatorios (ej. Indometacina) y antiinfecciosos (ej. sulfonamina). En ese

¹ Barreiro, E. J.; *Quim. Nova* **1990**, 13, 29

período los productos naturales empezaron a decaer en términos de inversión por parte de la industria farmacéutica, debido a la enorme cantidad de nuevas entidades químicas (NCE) de origen sintético lanzadas al mercado farmacéutico. La fitoquímica en ese momento dio su mayor contribución al estudio de los metabolitos secundarios en cuanto a su función ecológica en las plantas, juntamente con los estudios biosintéticos, lo que generó nuevas áreas del conocimiento, como por ejemplo la quimiotaxonomía.^{2,3}

Desde la década de 1980 la influencia de los productos naturales en los programas de descubrimiento de nuevas drogas ha decaído considerablemente. Los altos costos y el trabajo relativamente lento de la investigación clásica en productos naturales, sumado a las dificultades legales para la recolección de muestras en terceros países, hicieron que la industria farmacéutica invirtiera significativamente en la química combinatoria con la esperanza de que ésta herramienta representara en el futuro la principal fuente de moléculas bioactivas novedosas y líderes para nuevas drogas.

Sin embargo, la química combinatoria no logró su objetivo de ser una fuente primaria de diversidad química, pues la cantidad de nuevos fármacos lanzados al mercado no aumentaron proporcionalmente a las inversiones realizadas en el sector. De hecho, solamente fue aprobada una NCE (sorafenib) obtenida por química combinatoria, para ser utilizada como droga anticancerígena.

Nuevos métodos de ensayos biológicos fueron desarrollados y la biología molecular junto con nuevas técnicas genéticas permitió el aislamiento y la purificación de enzimas y otros blancos moleculares. La creación de bibliotecas de compuestos, así como los métodos de *screening* biológicos automatizados (*high-throughput screening*) permitieron la evaluación *in vitro* de millares de compuestos por experimento a escala nanomolar, en corto tiempo.^{4,5}

La búsqueda de productos naturales bioactivos se orientó hacia otras fuentes, entre las cuales se destacan los microorganismos y los organismos marinos.

² Yunes, R. A.; Pedrosa, R. C.; Cechinel Filho, V.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 147.

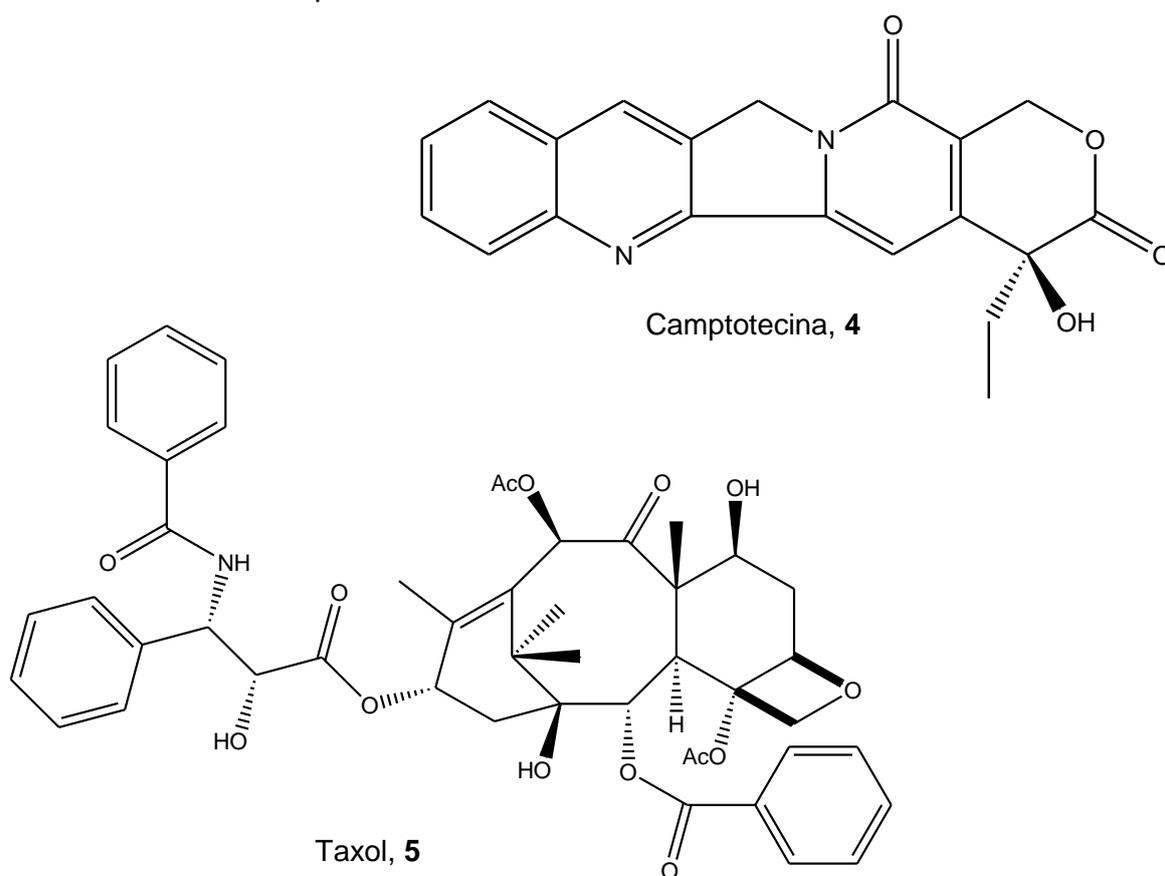
³ Montanari, C. A.; Bolzani, V. S.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 105.

⁴ Newman, D.J. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2589-2599.

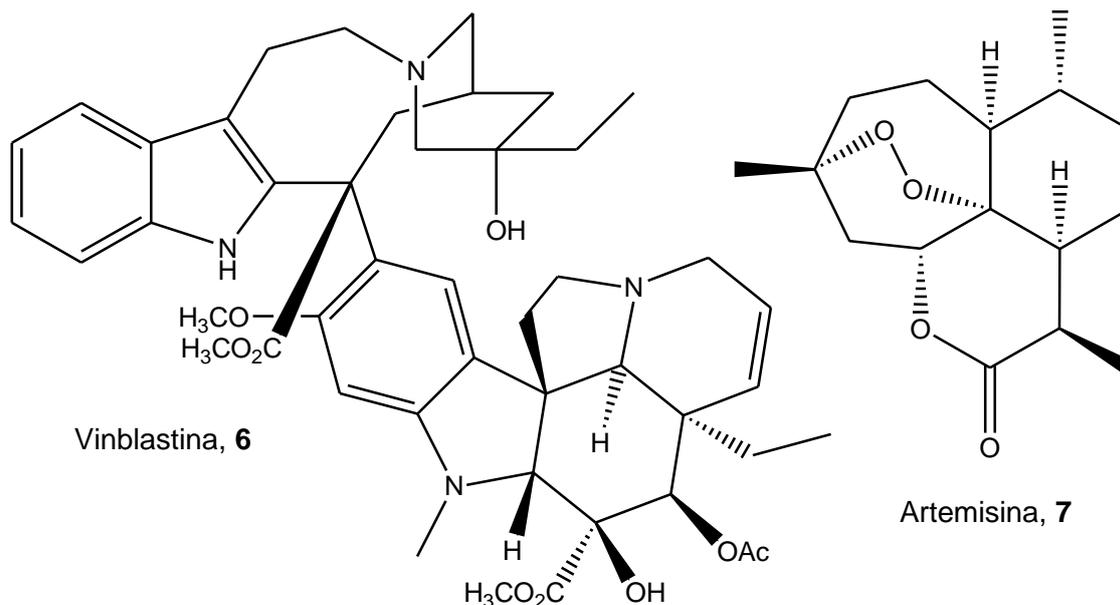
⁵ Butler, M.S. *Nat Prod Rep.* **2005**, *22*, 162-195.

Los nuevos métodos de aislamiento así como las técnicas espectroscópicas modernas que redujeron considerablemente los requerimientos de cantidad de sustancia para llevar a cabo la elucidación estructural, han colaborado, junto con la falta de éxito de la química combinatoria, para la vuelta de los productos naturales al centro de la escena en la industria farmacéutica. La variedad y cantidad de productos que pueden ser aislados e identificados es ahora mucho mayor en menor tiempo, y se puede probar su actividad biológica con muy poca cantidad frente a distintos blancos moleculares.⁶

Algunos ejemplos de estructuras extremadamente complejas y bioactivas aisladas de plantas son la camptotecina (**4**, antineoplásico de *Camptotheca acuminata*), el taxol (**5**, antitumoral de *Taxus brevifolia*), la vinblastina (**6**, antineoplásico de *Catharantus roseus*) y la artemisina (**7**, antimálarico de *Artemisia annua*), los cuales generaron compuestos semi-sintéticos que revolucionaron la terapéutica moderna.



⁶ Ganju, L. et al. *Biomedicina & Pharmacotherapy*, **2008**, 62, 94-98.



Cerca de 25% de las prescripciones médicas en los EUA en los últimos 25 años están relacionadas a medicamentos que contenían compuestos activos de origen natural o semi-sintético. De los nuevos fármacos aprobados por la FDA en dicho periodo, 78% de los antibacterianos y 61% de los antineoplásicos eran de origen natural. Otras comparaciones señaladas en una revisión de 2007 acerca de los nuevos medicamentos actualmente en uso, apuntan al crecimiento de la participación de los productos naturales en el desarrollo y descubrimiento de nuevas drogas.^{7,8,9}

Lamentablemente, la investigación en productos naturales en América Latina todavía está muy lejos de ser exhaustiva, aunque tenga la mayor biodiversidad y sea la fuente principal recursos naturales y proveedora de materia prima para los trabajos del área realizados en el exterior. Baste mencionar que aún después de tantos años cerca del 90 % de la flora latinoamericana aún se encuentra sin estudiar desde el punto de vista químico.

Mientras esto ocurre la tala indiscriminada de bosques pone en peligro de extinción estas especies, de tal forma que muchas sustancias biológicamente activas jamás serán descubiertas.

⁷ Cragg, G. M.; Newmann, D. J.; Snader, K. M.; *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 52.

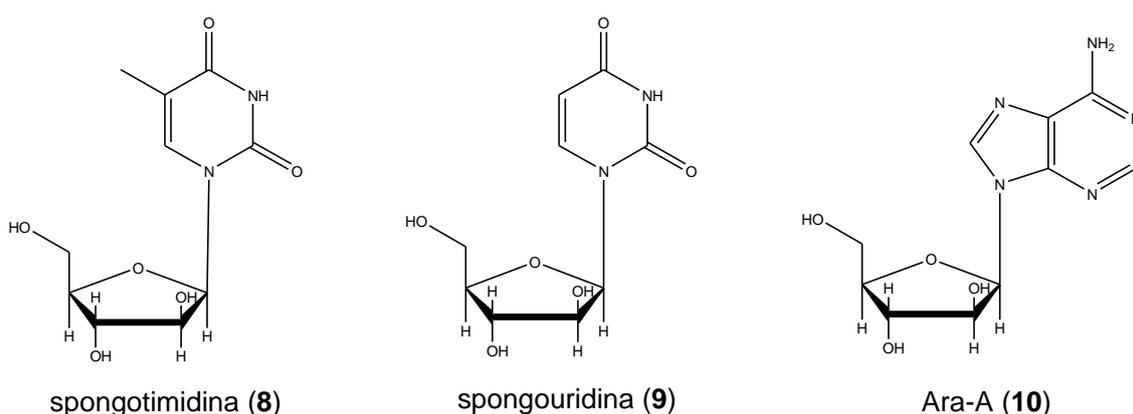
⁸ Cragg, G. M.; Newmann, D. J.; Snader, K. M.; *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022.

⁹ Newmann, D. J.; Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 461-477.

El estudio de los productos naturales de origen marino

La biodiversidad en el ambiente marino es tanto más grande y diversa que en el ambiente terrestre. En el ámbito marino se pueden encontrar 34 de los 36 *phyla* existentes. El océano cubre más de 70% de la superficie terrestre y contiene más de 300.000 especies de plantas y animales descritos. Los organismos marinos se han adaptado a todas las regiones oceánicas: polares, templadas y tropicales.

Se podría decir que la historia de los productos naturales marinos comienza recién en el año 1950 con el aislamiento no buscado de los arabinosil nucleósidos spongotimidina (**8**) y spongouridina (**9**) a partir de la esponja *Tethya cripta*.¹⁰ Este descubrimiento accidental dio origen a fines de los años 50 y principios de los 60 a un estudio más profundo de los nucleósidos de esponjas, y a la evaluación de las propiedades farmacológicas de estos compuestos. Esto finalmente desembocó en la síntesis del Ara-C y el Ara-A (**10**), y el lanzamiento al mercado de este último en 1980. Ambos compuestos se encuentran actualmente en uso como drogas antivirales (contra el herpes) y antitumorales (el Ara C posee actividad antileucémica). La acción del Ara-C proviene de su conversión al trifosfato, incorporación al ADN celular e inhibición subsecuente de la enzima DNA polimerasa.

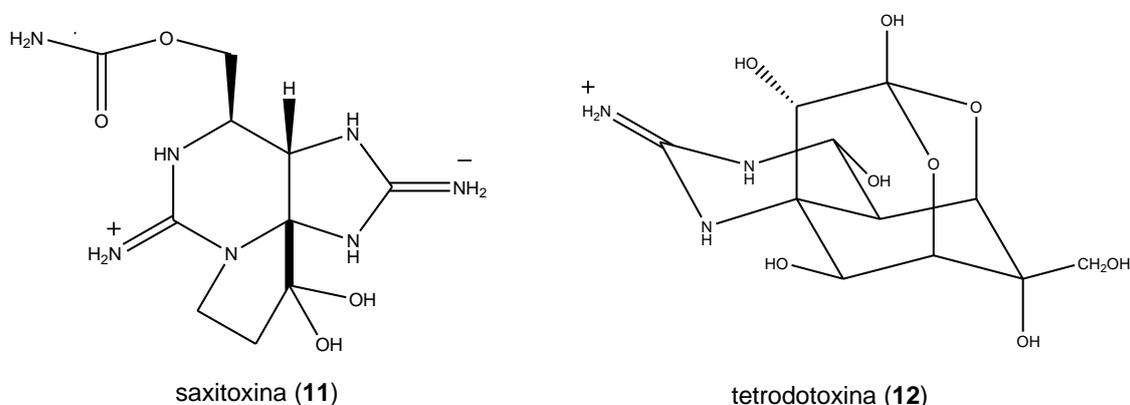


La década de los 60 marcó el auge del estudio de las toxinas de origen marino. Estas toxinas, debido a su potencia y a las frecuentes intoxicaciones de

¹⁰ Bergmann, W.; Burke, D. *J. Org. Chem.*, **1955**, 20, 1501-1507.

origen alimentario que provocaban, atrajeron el interés de los químicos, aún cuando la complejidad estructural de las mismas estaba fuera del alcance de las técnicas espectroscópicas de ese entonces. Esto, sumado al hecho de que normalmente se las detectaba a nivel de trazas, hizo que la identificación de los compuestos activos demorara en algunos casos más de 20 años.

Las toxinas responsables de las intoxicaciones masivas por ingestión de moluscos bivalvos (PSP), son moléculas pequeñas pero extremadamente complejas en su estructura. La saxitoxina (**11**) fue la primera en ser aislada en el año 1957, pero su estructura recién pudo ser elucidada por espectroscopía de difracción de rayos X en 1975. Si bien el fenómeno de la toxicidad estacional de bivalvos se conocía de antaño, no se sabía con certeza el origen de la toxina. En el año 1937, algunos investigadores asociaron esta toxicidad con las eclosiones del dinoflagelado *Gonyaulax catenella*, aunque la producción de la toxina por un cultivo del dinoflagelado recién pudo ser confirmada en 1965. Luego se comprobó que los dinoflagelados producen en general una mezcla de toxinas, y que en realidad son numerosas las especies que los producen.

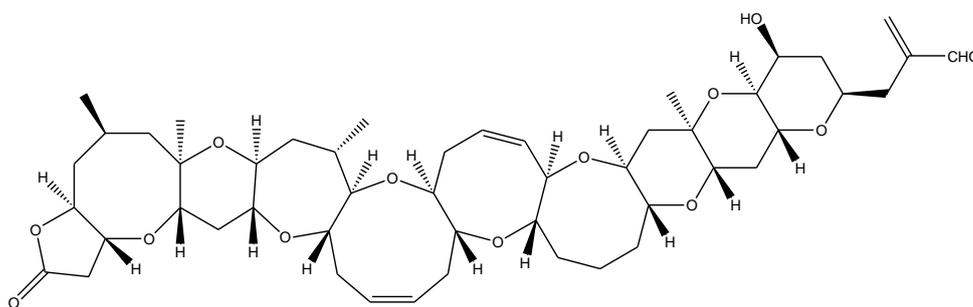


La tetrodotoxina (**12**) es conocida desde hace muchos años como la toxina responsable de la toxicidad del pez globo (“fugu”). Sin embargo estudios recientes han demostrado que su origen es microbiano (una variedad de bacterias marinas unicelulares).

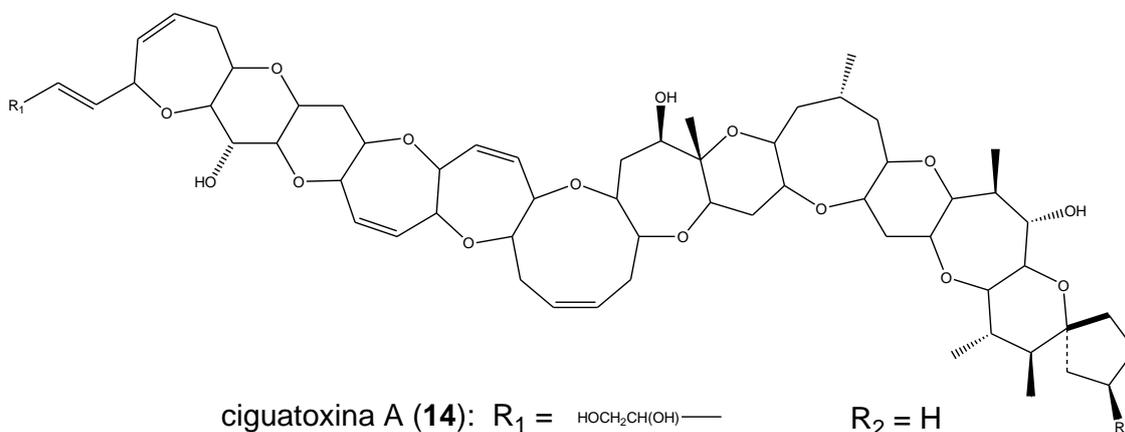
Tanto la tetrodotoxina como la saxitoxina actúan como bloqueadores selectivos de los canales de sodio. De hecho los estudios farmacológicos con estas toxinas sirvieron para desarrollar el concepto de los canales de sodio en particular y de los canales de membrana en general. Estos compuestos

bloquean los canales de sodio, interactuando solamente en la superficie exterior del canal, interrumpiendo el flujo de iones. Estas toxinas demostraron ser herramientas invaluableles para estudios de neurofisiología y neurofarmacología.¹¹

Otro tipo estructural de toxinas producidas por dinoflagelados son los poliéteres cíclicos, moléculas de mayor tamaño que las anteriores y de estructura totalmente diferente, que actúan también bloqueando canales iónicos. Estas toxinas son responsables de una variedad de efectos, como ictiotoxicidad, depresión de las funciones cardíaca y respiratoria, contracciones, espasmos y muerte, todos ellos relacionados con los canales de sodio.



brevetoxina A (13)



Entre las toxinas más famosas de esta clase encontramos las brevetoxinas (13), producidas por el dinoflagelado *Gymnodinium breve*¹² responsable de mareas rojas en el golfo de México, la ciguatera (14)¹³ y la

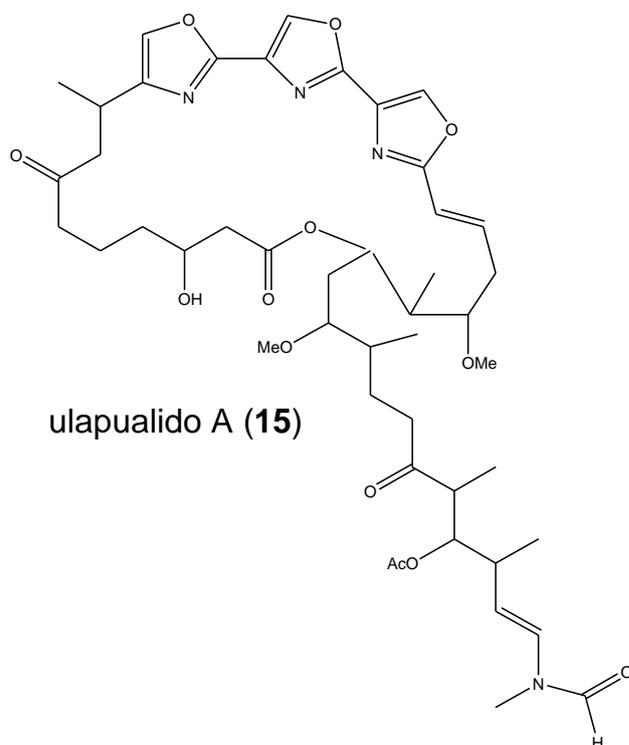
¹¹ Cai, m.; Jorfan P.C. *Biophys.J.* **1990**, 57, 883-891.

¹² Shimizu, Y.; Chou, H.; Bando, H.; Duyne, G.; Clardy, J. *Soc. Chim.Belg.*, **1986**, 108, 514-515.

¹³ Murata, N.; Legrand, A.; Ishibashi, Y.; Fukui, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 111, 8929-8931.

maitotoxina, ambas producidas por *Gambierdiscus toxicus*. Estas dos últimas son responsables de la ciguatera, intoxicación por consumo de ciertos peces en áreas tropicales. Las toxinas, producidas por el dinoflagelado, son transmitidas a través de la cadena trófica hasta los peces “cazadores”, los cuales si son consumidos producen intoxicación. La ciguatoxina es también ionotrópica y despolariza membranas, pero los síntomas y los sitios de acción de esta toxina son más diversos. La maitotoxina a su vez interactúa con los canales de calcio.

Con la popularización del buceo en la década de 1960, fue posible la observación en el ámbito marino de hechos ecológicamente “extraños”, como por ejemplo la ausencia de predación sobre ciertos organismos muy vistosos, lo cual en muchos casos dió la pista para el descubrimiento de sustancias bioactivas. Un ejemplo de esto son las masas gelatinosas de huevos del nudibranquio *Hexabranchus sanguineus* (bailarina española). Estas masas de huevos de un color rojo intenso llamaban la atención ya que no sufrían predación. El análisis de estas masas de huevos permitió el aislamiento de una serie de compuestos macrocíclicos, llamados ulapualidos (**15**)¹⁴ kabiramidas y halichondriamidas que poseen citotoxicidad y actividad antibiótica y se cree que sirven de defensa química.



¹⁴ Roeser, J.; Scheuer, P.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 846-847.

El descubrimiento del potencial biomédico de los productos naturales marinos, junto a su novedad estructural y al desarrollo de bioensayos *in vitro* permitió el *screening* de un número cada vez mayor de muestras e impulsó un desarrollo de numerosos grupos de investigación en todo el mundo, y la implementación de proyectos de muestreo y análisis de organismos marinos en la industria farmacéutica y en instituciones estatales. Al día de hoy se han descubierto más de 17000 compuestos novedosos de origen marino.

Interacciones Químicas de Invertebrados Marinos bentónicos

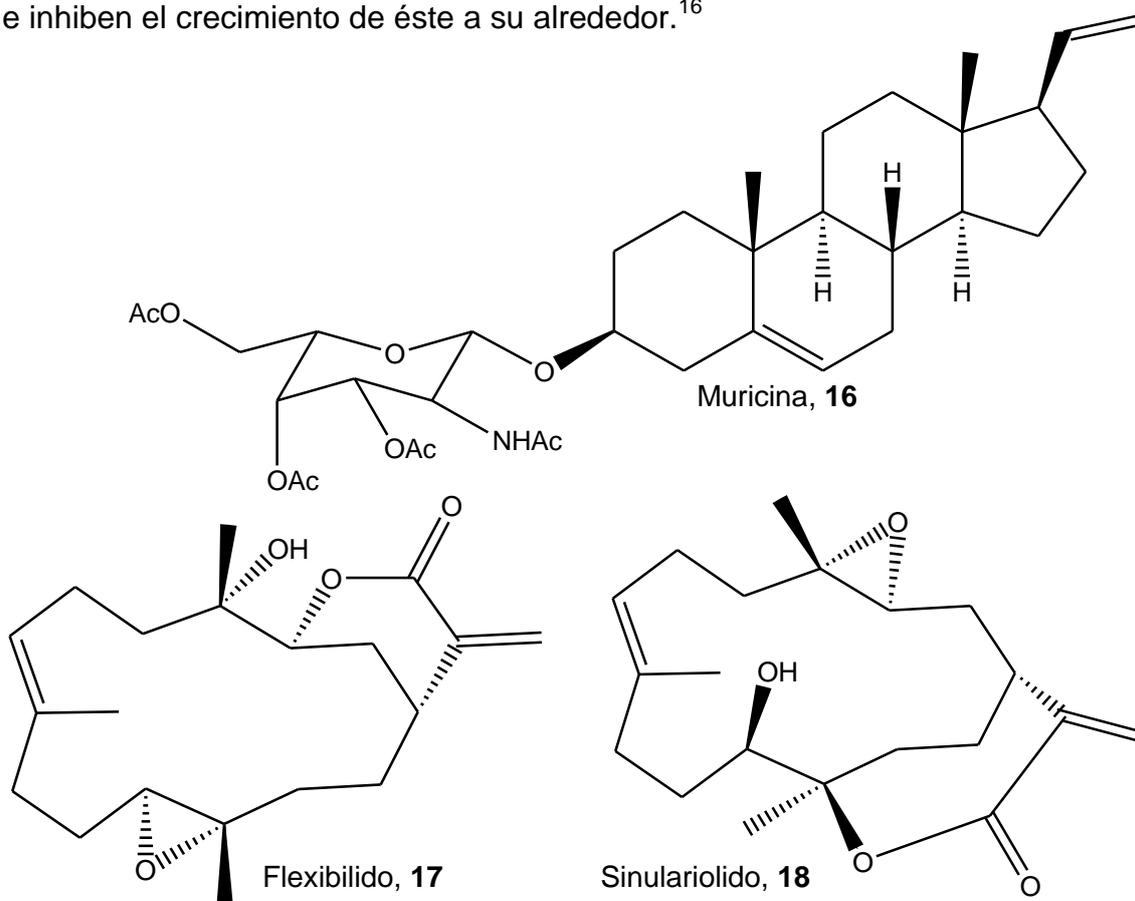
Los invertebrados marinos bentónicos (entre ellos Porifera, Cnidaria, Bryozoa y Tunicata) incluyen a los organismos que se encuentran asentados sobre un sustrato sólido. Están sujetos a presiones ecológicas y deben competir por el espacio, la luz y los nutrientes, defenderse de predadores y de la colonización por competidores y organismos patógenos. Como no tienen posibilidad de escape o lucha, y no poseen sistema inmunológico, y en muchos casos tampoco defensas físicas, se asemejan más a las plantas en sus mecanismos de defensa química, y biosintetizan metabolitos secundarios únicos que muchas veces son tóxicos para los predadores y sirven para su protección. Otras veces se asocian a microorganismos simbiotes que son los responsables por la producción de dichos compuestos o de sus precursores. Además, en el orden evolutivo los invertebrados marinos se encuentran más cerca del reino vegetal y comparten con éste vías biosintéticas de metabolitos secundarios.

El asentamiento (*fouling*) y la colonización de las superficies por los invertebrados marinos les ofrece una ventaja energética, ya que al ser generalmente organismos filtradores, así aprovechan el movimiento del agua para su alimentación, reproducción y excreción. La formación de la bioincrustación está acompañada por una compleja interacción de fenómenos físicos, químicos y biológicos. El proceso comienza con la adhesión de un componente molecular (compuestos orgánicos e inorgánicos), seguido por el establecimiento de *microfouling* (algas unicelulares y bacterias), el cual coloniza la superficie y se consolida mediante la producción de un material

polimérico extracelular. Esta colonización primaria, facilita la fijación y desarrollo de algas y larvas de invertebrados y la incorporación final del *macrofouling*. Una vez asentados, los macroorganismos deben prevenir el asentamiento (“antifouling”) de otras especies sobre su superficie y para ello producen metabolitos secundarios que causan la muerte de las larvas de los competidores o impiden su desarrollo normal.

Al comparar el octocoral *Muricea fruticosa*, que no es recubierto por organismos, con su congénere *M. californica*, el cual es comúnmente sometido al sobrecrecimiento de otras especies, se encontró que la primera especie producía muricinas (**16**), saponinas con residuos de aminogalactosa unidos a una aglicona esterooidal de tipo pregnano. Esos compuestos producen una inhibición del 80% en el crecimiento de diatomeas a 100 ppm.¹⁵

Un caso de alelopatía ocurre entre las especies de corales *Sinularia flexibilis* y *Montipora digitata*. Los diterpenos flexibilido (**17**) y sinulariolido (**18**) producidos por *S. flexibilis* son tóxicos para las larvas del coral duro *M. digitata* e inhiben el crecimiento de éste a su alrededor.¹⁶



¹⁵ Bandurraga, M.M.; Fenical, W. *Tetrahedron* **1985**, 41, 1057-1065.

¹⁶ Maida, M.; Sammarco, P.W., Coll, J.C. *Mar Ecol Prog Ser*, **1995**, 121, 191-202.

Muchas veces, los metabolitos secundarios producidos por una razón ecológica pueden tener actividades farmacológicas importantes y ser útiles para el ser humano. Como ejemplo se puede citar la actividad *antifouling* y su relación con la citotoxicidad y posible empleo como drogas antitumorales, ya que tanto las larvas como los tumores están formados por células que se reproducen rápidamente.

Además del interés farmacológico, la actividad *antifouling* tiene un interés comercial para utilizar estos compuestos como aditivos de pinturas o barnices marinos, a fin de impedir el asentamiento de algas e invertebrados en los cascos de barcos, en muelles y construcciones submarinas, oleoductos, materiales de acuicultura, etc. Para prevenir el *fouling* se usan pinturas y productos que contienen biocidas de largo espectro que causan efectos adversos al ambiente. Hasta fines de 1980 se utilizaba como principal biocida el TBT (tributilestaño), compuesto que causa la muerte, problemas de crecimiento, reproducción (*imposex*) y mala formación en organismos que habitan estuarios y bahías de poca profundidad, afectando a moluscos, crustáceos, algas y peces¹⁷. El TBT fue prohibido por la Organización Marítima Internacional y en la actualidad el principal tipo de recubrimiento empleado por la industria marítima son los antiincrustantes a base de cobre, efectivos contra algas y organismos incrustantes calcáreos como los cirripedios. Estos compuestos presentan menor toxicidad que el TBT, pero tampoco son inocuos, y pueden ser transmitidos a través de la cadena alimentaria.¹⁸

En ese contexto, desde los años 80 ha aumentado el número de publicaciones acerca de productos naturales con propiedades *antifouling*, los cuales incluyen principalmente terpenoides, así como también esteroides, derivados de tirosina, saponinas, compuestos fenólicos y halogenados. Algunos ejemplos de productos naturales *antifouling* que además presentan actividades farmacológicas interesantes son: la bufalina¹⁹ (**19**), inhibidor de ATPasa y potente toxina aislada de esponjas del orden Verongida; la molokaiaamina²⁰ (**20**) también aislada de esponjas del orden Verongida presentó

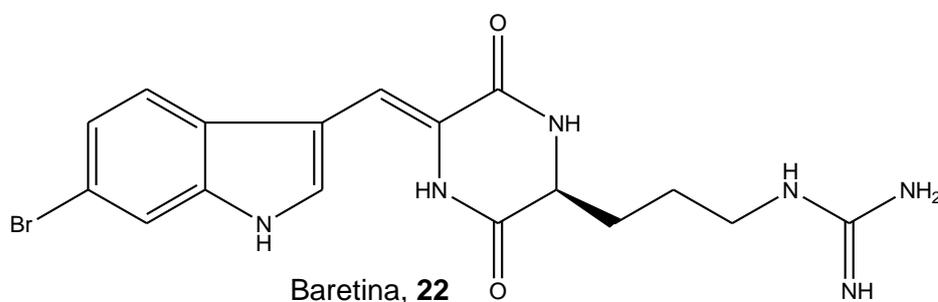
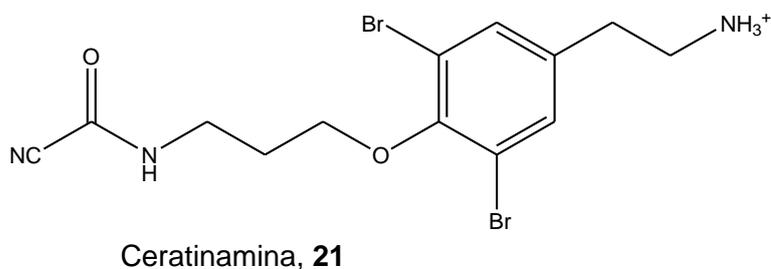
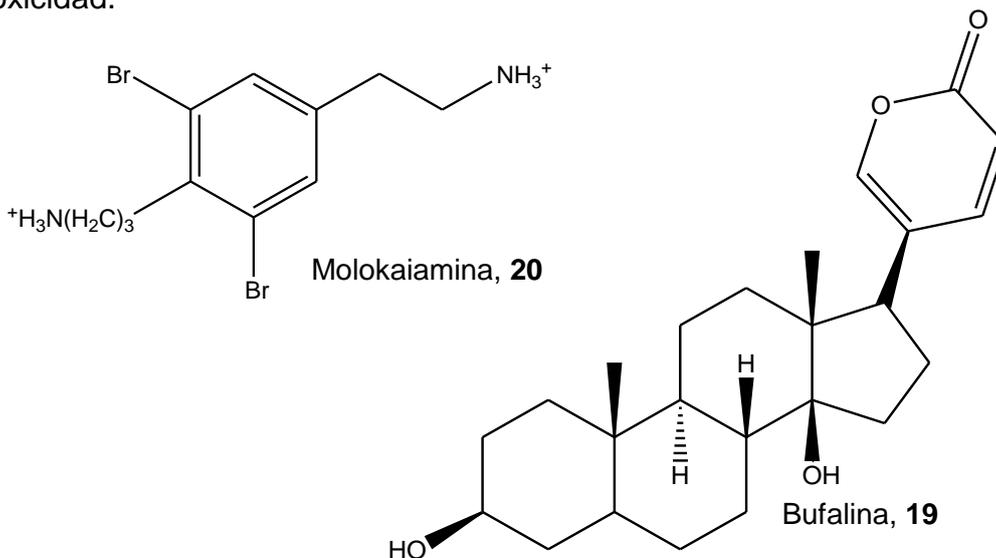
¹⁷ Lopez, E. E. Et al. *Journal of Maritime Research*, **2006**, 3, 73-89.

¹⁸Rittschof, D. *Natural Product Antifoulants and Coatings Development*. En McClintock, J. B.; Baker, B. J. *Marine Chemical Ecology*, CRC, New York, **2001**, 610p.

¹⁹ Jing, Y. et al *Anticancer Res.***1994**, 14, 1193.

²⁰ Ganein, B. et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2002**, 12, 823-825.

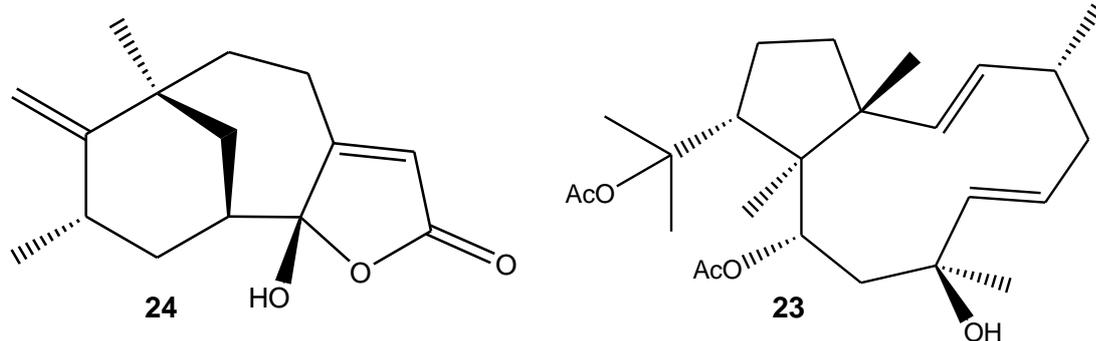
actividad antitumoral y antiplasmodial; la ceratinamina²¹ (**21**) aislada de *Pseudoceratina purpurea* presentan actividad *antifouling* y antileucémica; la dicetopiperazina bromada baretina (**22**) fue aislada de la esponja *Geodia barretti* e interacciona con receptores de la serotonina²²; el dolabellano (**23**) aislado del alga parda *Dictyota paffii* presentó actividades *antifouling* y antiherpética; el furanosesquiterpeno (**24**) aislado de la esponja *Dysidea herbacea* presentó actividad repelente contra encrustamiento de mejillones y citotoxicidad.²³



²¹ Fusetani, N. Et al. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2936-2937.

²² Bohlin, L. *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 330-333.

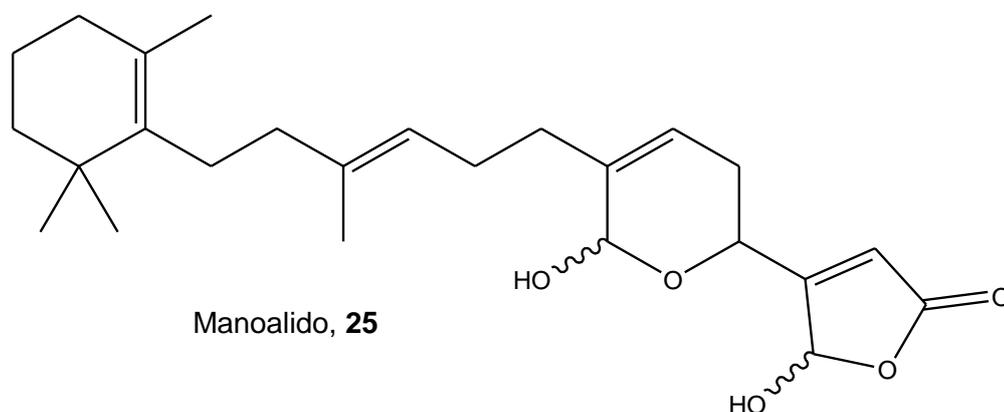
²³ Sera, Y. et al. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 395-396.



Productos Naturales Marinos con Actividad Farmacológica

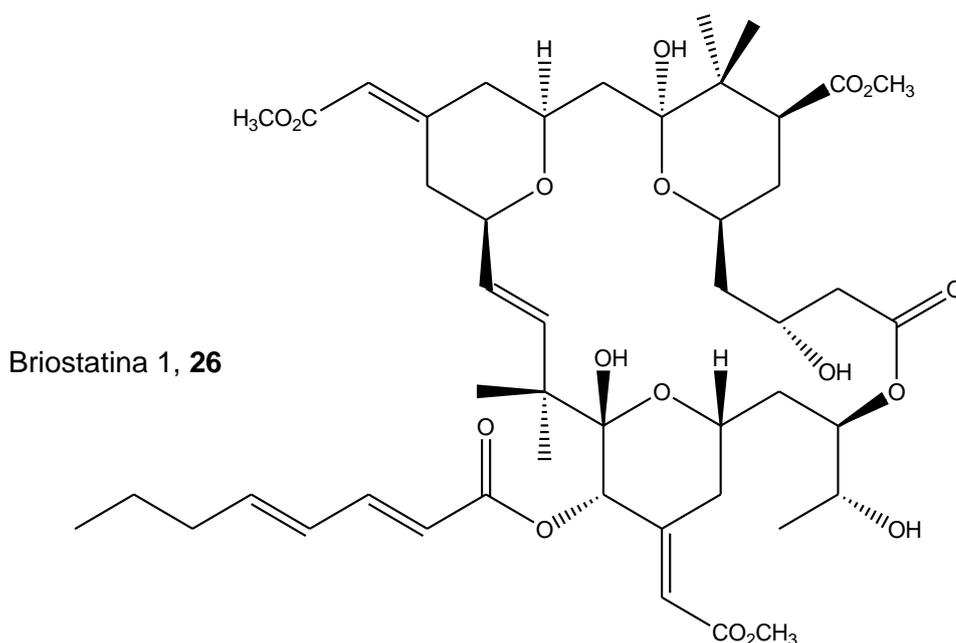
Varios son los metabolitos de organismos marinos que han revelado eficiencia sobre blancos biológicos terapéuticamente importantes y son candidatos para drogas útiles como antiinfecciosos, inmunomoduladores, antiinflamatorios, antivirales y anticancerígenos.

El manoalido (**25**), inhibidor irreversible de fosfolipasa A2 aislado de la esponja *Luffariela sp.*, es un ejemplo de producto de origen marino con actividad antiinflamatoria y empleo en psoriasis.



Entre los metabolitos secundarios de origen marino en etapas avanzadas de estudios clínicos, se encuentran los macrólidos cíclicos de la familia de las briostatinas. Estos compuestos están presentes en el briozoo *Bugula neritina*, un organismo bentónico muy abundante en la costa sur de California (EEUU). Desde su descubrimiento, las briostatinas han despertado un gran interés en la comunidad científica debido a su importante actividad antineoplásica y su baja toxicidad.

La actividad biológica de esta serie de compuestos se debe a su interacción con enzimas de la familia de las proteín-quinasa C. El primer miembro de dicha serie de compuestos, Briostatina 1 (**26**), aislado por primera vez por Pettit en 1982²⁴, presentó interacciones sinérgicas con otros compuestos citotóxicos en ensayos *in vitro* sobre distintas líneas celulares tumorales²⁵. El *Dana-Farber Cancer Institute* (EEUU) se encuentra realizando estudios de fase II en pacientes con cáncer de próstata y de esófago a los que se les administró Briostatina 1 junto con Paclitaxel.²⁶



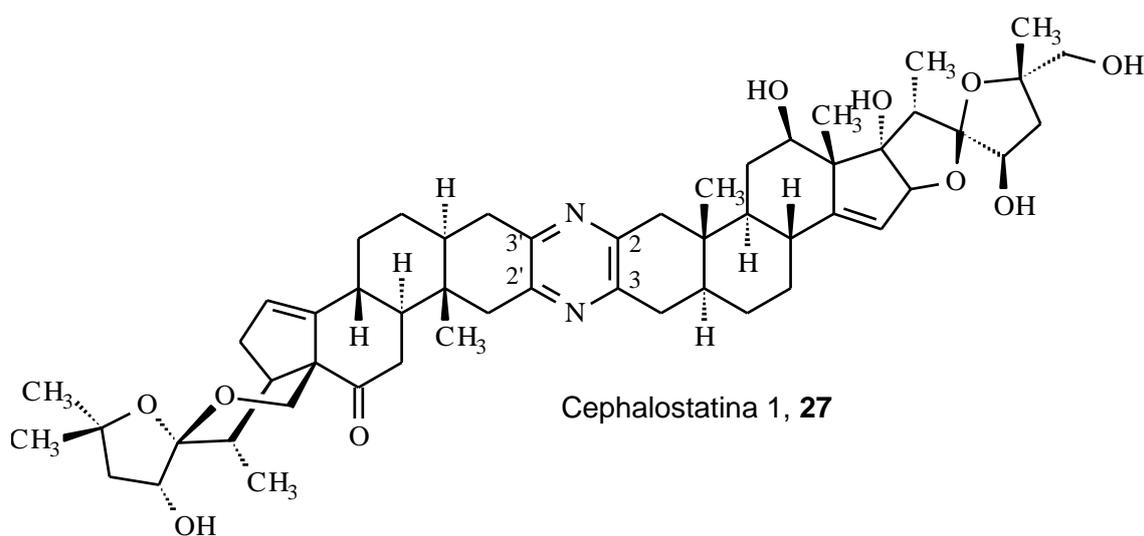
Las cefalostatinas son una familia de compuestos bis-esteroidales con importante actividad antineoplásica en el rango subnanomolar a nanomolar. Se trata de pirazinas bis-esteroidales que contienen nueve anillos fusionados formados por el acoplamiento de dos núcleos esteroidales en C-2 y C-3. Además, poseen dos anillos espirocetálicos en cada extremo del sistema dando un total de 13 ciclos. Esta familia de compuestos está presente en el gusano marino *Cephalodiscus gilchristi* (*phyllum Hemichordata*) habitante del

²⁴ Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Doubek, D. L.; Herald, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 6846-6848.

²⁵ Mutter, R.; Wills, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 1841-1860.

²⁶ Pettit, G. R.; Inoue, M.; Kamano, Y.; Herald, D. L.; Arm, C.; Dufresne, C.; Christie, N. D.; Schmidt, J. M.; Doubek, D. L.; Krupa, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2006-2007.

océano Índico en Sudáfrica. Dicho organismo fue colectado por primera vez en 1972 por Pettit y colaboradores, observándose que el extracto era muy activo frente a células tumorales, sin embargo la elucidación estructural del compuesto responsable de la actividad se completó 15 años después. La estructura del primer miembro de dicha serie de compuestos, la cefalostatina 1 (**27**), fue publicada en 1988²⁷ y es el más activo de la familia según ensayos *in vitro* sobre un panel de 60 líneas celulares tumorales realizados por el *Nacional Cancer Institute* (EEUU) con un valor promedio de GI₅₀ (inhibición de crecimiento del 50%) de 1 nM. La cefalostatina 1 induce la muerte celular por apoptosis en líneas celulares de leucemia y se encuentra en desarrollo preclínico.²⁸



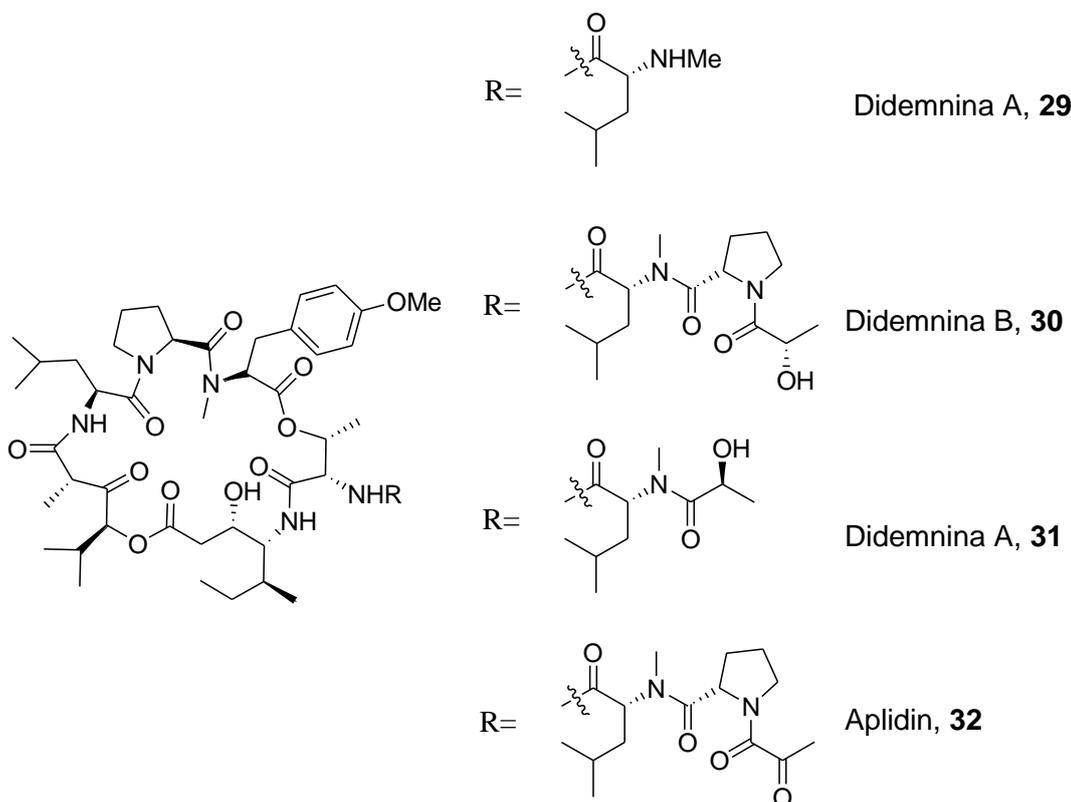
El kahalalido F (**28**) es un depsipéptido cíclico aislado a partir del molusco marino *Elysia rufescens* en las costas de Hawaii. Se trata de un molusco herbívoro que se alimenta del alga verde *Bryopsis sp.*, entre cuyos constituyentes también se encontró el kahalalido F (**28**).^{29,30,31} Este compuesto

²⁷ Dirsch, V. M.; Müller, I. M.; Eichhorst, S. T.; Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Inoue, M.; Xu, Jun-Ping; Ichihara, Y.; Wanner, G.; Vollmar, A. M. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 8869-8876.

²⁸ Hamann, M. T.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5825-5826.

²⁹ Hamann, M. T.; Otto, C. S.; Scheuer, P. J.; Dunbar, D. C. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6594-6600.

Las didemninas son una familia de depsipéptidos cíclicos aislados a partir del tunicado *Trididemnum solidum* (familia *Didemnidae*). Los primeros miembros de dicha familia de compuestos, las didemninas A-C (**29**, **30**, **31**), fueron descubiertos por Rinehart y colaboradores en 1981.³⁴ Las didemninas poseen actividad antiviral, inhiben el crecimiento de células tumorales y tienen actividad inmunosupresora. Debido a su diversa actividad biológica, las didemninas se han convertido en los objetivos sintéticos de diversos grupos de investigación alrededor del mundo. La didemnina B fue el primer metabolito de origen marino evaluado en estudios clínicos por el *National Cancer Institute* (EEUU). Los ensayos clínicos de fase I y II realizados sobre didemnina B para distintos tipos de cánceres mostraron efectos antitumorales moderados con marcados efectos adversos como hepatotoxicidad y daños neuromusculares.³⁵



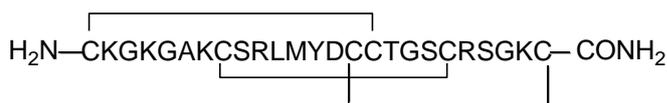
Sin embargo, AplidinTM nombre comercial de dehidrodidemnina B (**32**), un depsipéptido cíclico aislado a partir del tunicado mediterráneo *Aplidium*

³⁴ Vera, M. D., Joullié, M. M. *Med. Res. Rev.* **2002**, 22, 102-145.

³⁵ Rinehart, K. L., Lithgow-Bertelloni, A. M., PCT Int. Pat. Appl. WO 9104985, Apr. 18, **1991**; GB Appl. 89/22,026, Sept. 29, 1989; *Chem. Abstr.* **1991**, 115, 248086q.

*albicans*³⁶, mostró mayor actividad antitumoral que didemnina B en modelos preclínicos y no evidenció toxicidad neuromuscular con riesgo de vida. Cuando se administró a pacientes con tumores sólidos avanzados, se observó una importante actividad antitumoral siendo los efectos adversos más relevantes: náuseas, vómitos, mialgia y un disturbio pasajero de la función hepática.³⁷ Este compuesto induce apoptosis en cáncer de mama en humanos en concentraciones nanomolares.³⁸ Actualmente, la empresa PharmaMar se encuentra realizando estudios clínicos de fase II sobre diversos tumores sólidos y neoplasias malignas hematológicas, que incluyen estudios relacionados con mieloma múltiple (MM), el linfoma no hodgkiniano (LNH) y la leucemia linfoblástica aguda (LLA) en adultos. En febrero de 2005 la empresa comenzó los ensayos clínicos de fase II en cáncer de próstata y vejiga.³⁹

El primer caso de un medicamento aprobado para uso clínico que contiene un metabolito marino no modificado sintéticamente es el Prialt®. Aprobado por el FDA en 2004 para tratamiento del dolor crónico, el zinocotido (**33**) es una ω -conotoxina aislado del caracol marino *Conus magus* cuya estructura es la de un péptido de 25 aminoácidos que pudo ser obtenido por vía sintética.



Zinocotido, **33**

Las ecteinascidinas, presentes en la ascidia colonial *Ecteinascidia turbinata*⁴⁰, mostraron importante actividad antitumoral frente a líneas celulares humanas, observándose que su citotoxicidad se debe a su interacción con el

³⁶ Schwartzmann, G.; Brondani da Rocha, A.; Berlinck, R. G. S.; Jimeno, J. *The Lancet Oncol.* **2001**, 2, 221-225.

³⁷ Cuadrado, A.; García-Fernández, L. F.; González, L.; Suárez, Y.; Losada, A.; Alcaide, V.; Martínez, T.; Fernández-Sousa, J. M.; Sánchez-Puelles, J. M.; Muñoz, A. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 241-250.

³⁸ Newmann, D. J.; Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 461-477.

³⁹ <http://www.pharmamar.es/es/press/index.cfm>

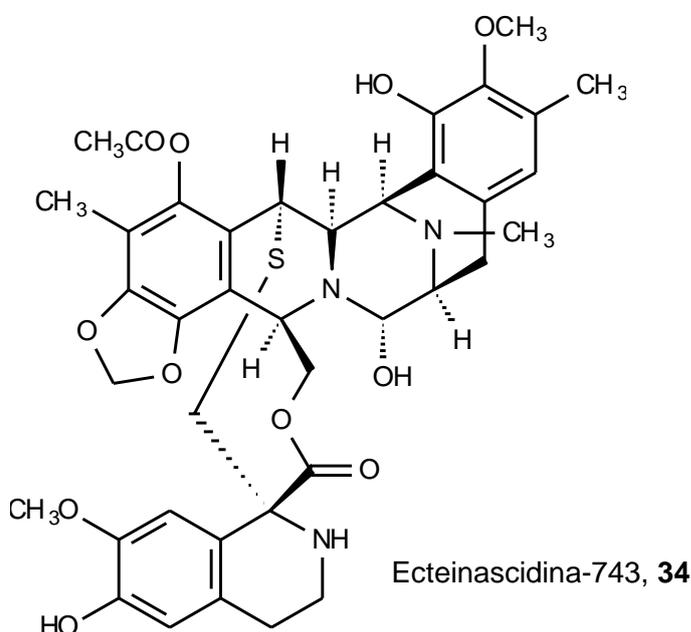
⁴⁰ Rinehart, K. L.; Holt, T. G.; Fregeau, N. L.; Stroh, J. G.; Keifer, P. A.; Sun, F.; Li, L. H.; Martin, D. G. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 1676.

ADN. La ecteinascidina-743 forma un aducto covalente con el ADN a través de un residuo de guanina⁴¹ e induce apoptosis en células de sarcoma de tejidos blandos.⁴²

En julio de 2007 la Agencia Europea del Medicamento aprobó el uso de la ecteinascidina 743 (**34**, Yondelis[®]) para el tratamiento de sarcomas de tejidos blandos, una de las neoplasias más difíciles de tratar con agentes quimioterápicos.

Una de las drogas más efectivas contra este tipo de cáncer es la doxorubicina, aislada del cultivo de *Streptomyces peucetius*, mientras que el paclitaxel, principio activo del medicamento Taxol[®] (Bristol-Myers Squibb), posee actividad moderada frente al mismo tipo de tumor.

Se observó sinergismo en ensayos *in vitro* entre ecteinascidina-743 y doxorubicina y entre ecteinascidina-743 y paclitaxel en células de sarcoma de tejidos blandos.⁴³ Actualmente, Yondelis[®] continúa en ensayos de fase III para el tratamiento de cáncer de ovario y en ensayos de fase I para cáncer de próstata y ovario.

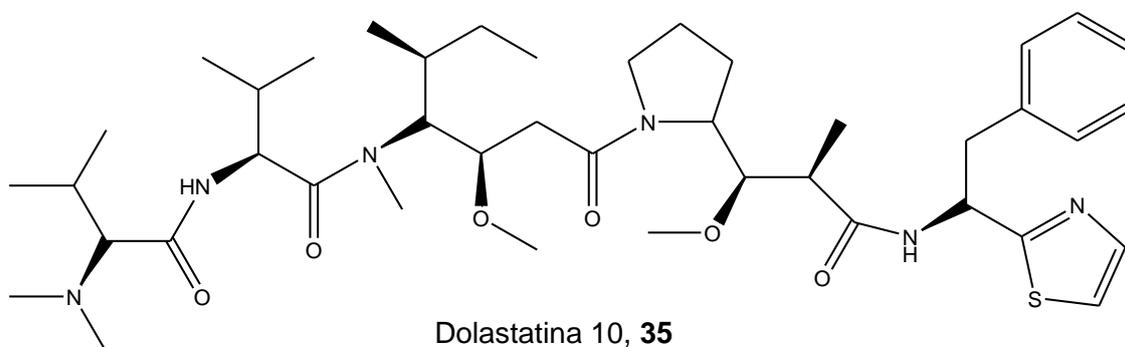


⁴¹ Zewail-Foote, M.; Hurley, L. H. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2493-2497.

⁴² http://www.pharmamar.es/en/prosci/facts_001.cfm

⁴³ Takahashi, N.; Li, W. W.; Banerjee, D.; Scotto, K. W.; Bertino, J. R. *Clin. Cancer Res.* **2001**, 7, 3251-3257.

Otra droga en estudios clínicos avanzados es la dolastatina 10 (**35**), aislada inicialmente del molusco *Dolabella auricularia*, la cual interactúa con la tubulina en un dominio cercano al de los alcaloides de vinca.



Recientemente los productos naturales marinos comenzaron a ser evaluados para otras actividades farmacológicas importantes, como por ejemplo para el tratamiento de las enfermedades tropicales (enfermedades huérfanas), como es el caso de la malaria, que anualmente causa la muerte de cerca de 2.7 millones en el mundo.

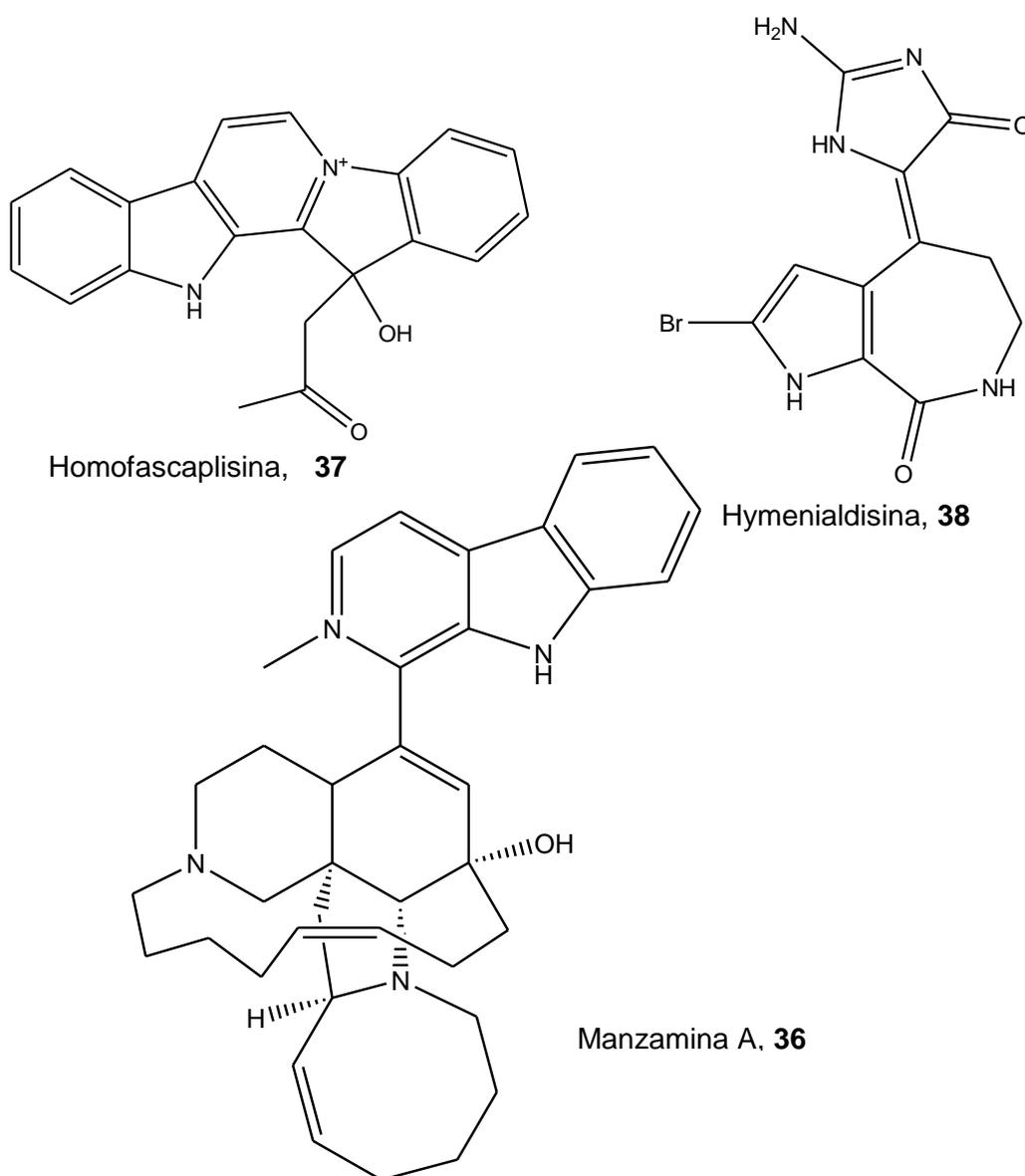
El alcaloide policíclico manzamina A (**36**) encontrado en esponjas de tres ordenes (Haplosclerida, Dictyoceratida y Poecilosclerida) es activo contra distintas cepas de *Plasmodium falciparum* y también contra *Toxoplasma gondii* (agente causante de toxoplasmosis). Además este compuesto pudo ser obtenido por fermentación (desde cultivos de *Micromonospora sp*) y eso lo hace un fuerte candidato al desarrollo de un nuevo medicamento antimalárico. Otra actividad antiinfecciosa que presentó el manzamina A fue antituberculosis, donde se mostró elevada actividad contra varias cepas de *Mycobacterium tuberculosis*⁴⁴.

Otro alcaloide marino muy potente como antimalárico es la homofascaplisina A (**37**) aislado de la esponja *Hyrtios erecta*. Dicho compuesto probó ser más activo que la cloroquina y no presentó citotoxicidad a células humanas.

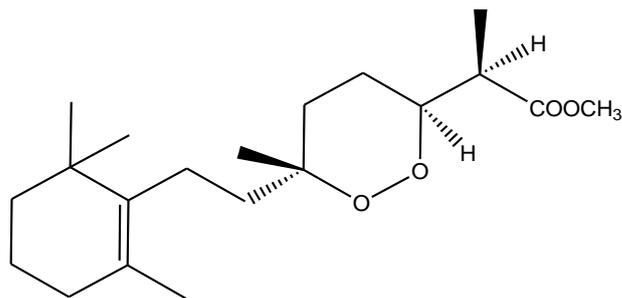
⁴⁴ Donia, M; Hamann, M.T.. *Infectious diseases*, **2003**, 111-121.

Otros alcaloides de origen marino son inhibidores de PfPK7 quinazas, blancos moleculares de drogas antitumorales y también esenciales para el desarrollo de *P. falciparum*. Un ejemplo incluye el alcaloide bromado himenialdisina (**38**), aislado de la esponja *Hymeniacidon aldis* probó ser un potente antimalárico.

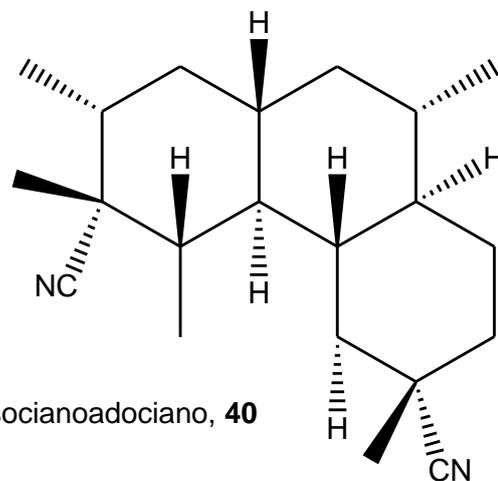
Un norditerpeno aislado de la esponja *Diacarmus levii*, metil-2-epinuapapuanato (**39**) presenta actividad contra cepas de *Plasmodium* resistentes a cloroquina. Los terpenos que presentan grupos isonitrilo e isotiocianato han demostrado poseer actividad antiplasmodial, un ejemplo es el diisocianoadociano (**40**), aislado de la esponja *Cymbastela hooperi*.⁴⁵



⁴⁵ Laurent D., Pietra, F. *Marine Biotechnology*, **2006**, 0, 1-15.



Metil-2-epinuapapuanato, **39**



Diisocianoadociano, **40**

Características Particulares del Trabajo con Productos Naturales Marinos

El trabajo con productos naturales marinos tiene ciertas características que lo diferencian del trabajo con plantas terrestres. Para empezar, desde el punto de vista farmacológico, prácticamente no existe información sobre el uso de extractos de organismos marinos en medicina tradicional, con lo cual todo *screening* farmacológico se hace prácticamente al azar.

Una característica notable de los productos naturales marinos, y que los vuelve potencialmente interesantes para su estudio, es que son estructuralmente muy diferentes a los metabolitos secundarios aislados de fuentes terrestres. Es relativamente frecuente encontrar compuestos con esqueletos carbonados novedosos y combinaciones de grupos funcionales poco habituales en productos naturales de origen marino. Aún en los casos en que se encuentran compuestos de esqueleto carbonado conocido, éstos suelen ser nuevos.

Muchos organismos marinos contienen un elevado número de microorganismos simbioses: algas, bacterias y hongos. En algunos casos, estos microorganismos pueden intervenir directamente en la producción de los metabolitos secundarios, ya sea biosintetizándolos ellos mismos *per se*, o en

combinación con el organismo hospedante en una relación auténticamente simbiótica.

En algunos *phylla*, por ejemplo moluscos, es frecuente encontrar compuestos de origen dietario provenientes de esponjas, algas o celenterados, ya sea con su estructura original, o modificados químicamente por el predador. En esos casos el compuesto transmitido por la cadena trófica suele cumplir un rol ecológico, generalmente de defensa, para el organismo predador.

Puede existir mucha variabilidad en la composición química de una misma especie colectada en diferentes lugares o a diferente profundidad. Esta variabilidad puede deberse a respuesta frente a diferentes factores ecológicos o a diferente composición de la flora microbiana simbiote. Por todo lo expuesto, la quimiotaxonomía, si bien siempre representa una ayuda, en ciertos *phylla* es mucho menos importante de lo que es en el estudio de las plantas terrestres: en muchos casos la taxonomía representa una de las últimas etapas del trabajo en lugar de la primera.

Por las condiciones particulares de las técnicas y los lugares de obtención de muestras, una recolección posterior de las mismas no es siempre factible. Además, es posible que una misma especie colectada en lugares o épocas diferentes, no produzca los mismos compuestos. Por eso se debe considerar cada extracto como una muestra única, teniendo en cuenta que no siempre será posible repetir los procedimientos y resultados.

La maricultura de ciertos invertebrados marinos, especialmente los de crecimiento lento como las esponjas y los corales, es sumamente dificultosa. Además, por lo expuesto precedentemente, es posible que un organismo cultivado fuera de su ambiente natural no produzca los compuestos bioactivos de interés. Por lo tanto, ya que la cosecha de invertebrados a gran escala no es una alternativa química y ecológicamente viable, la síntesis de los compuestos activos o el cultivo de un potencial microorganismo productor representan al día de hoy las únicas opciones para poder contar con los mismos en cantidades comerciales.

En varios de los *phylla* más interesantes, como las esponjas y los tunicados, el porcentaje de muestras químicamente ricas o con actividad farmacológica es relativamente bajo (menos del 10%). Sin embargo este bajo índice de riqueza química está ampliamente compensado por la variedad y novedad estructural de los compuestos aislados, lo cual es uno de los factores de éxito en cualquier programa de *screening* farmacológico.

Objetivos de este Trabajo de Tesis

El objetivo principal de este Trabajo de Tesis fue desde un primer momento, el descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos.

Originalmente se comenzó a trabajar con una colección de seis esponjas marinas colectadas cerca de la Ilha do Javier, Santa Catarina, Brasil. Sin embargo estas muestras no presentaron riqueza química ni tampoco bioactividad. Por lo tanto el trabajo experimental derivó hacia dos líneas principales.

1. El aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios de octocorales del Atlántico Sur, en particular, *Renilla reniformis* y *Convexella magelhaenica*.
2. El aislamiento y elucidación estructural de triterpenoides, celastroides y alcaloides sesquiterpénicos de dos especies de Celastráceas de Argentina: *Maytenus spinosa* y *Maytenus vitis-idaea*.

ESTUDIO QUÍMICO DE INVERTEBRADOS MARINOS

Antes que el sueño (o el terror) tejiera
mitologías y cosmogonías,
antes que el tiempo se acuñara en días,
el mar, el siempre mar, ya estaba y era.
¿Quién es el mar? ¿Quién es aquel violento
y antiguo ser que roe los pilares
de la tierra y es uno y muchos mares
y abismo y resplandor y azar y viento?
Quien lo mira lo ve por vez primera,
siempre. Con el asombro que las cosas
elementales dejan, las hermosas
tardes, la luna, el fuego de una hoguera.
¿Quién es el mar, quién soy yo?

J. L. Borges (del libro *El otro, el mismo*, 1964)

Capítulo 2: Invertebrados Marinos

Phyllum Cnidaria

Características generales de los cnidarios

Los cnidarios (Cnidae, del griego *kníde*, "ortiga") o celenterados (Coelenterae, del griego *koilos*, "cavidad"; *enteron*, "intestino") son un *phyllum* de animales invertebrados que agrupa alrededor de 11.000 especies de tamaño variable, desde 1-2 mm hasta 1 m de diámetro en algunas medusas, o hasta 3 m de diámetro en algunos pólipos, siempre acuáticos y mayoritariamente marinos (99%). Son un grupo antiguo, con una larga historia fósil que se remonta, probablemente, a la fauna de Ediacara, alrededor de unos 600 millones de años atrás, donde aparecieron los primeros organismos pluricelulares con tejidos diferenciados. Son los animales más simples que presentan células nerviosas y órganos de los sentidos (estatocistos, ocelos).⁴⁶

El nombre de este *phyllum* se debe a que todos los miembros del mismo poseen tentáculos que presentan cnidocitos (o cnidoblastos). Se trata de un tipo muy especializado de célula, que tiene un cilio rígido (cnidocilio) que es un receptor de estímulo; en la parte basal tiene prolongaciones que contactan con otras células o con el sistema nervioso (cnidopodios); en el interior de esta célula hay una gran vacuola (cnido o nematocisto), dentro de la cual se encuentra el filamento urticante (el disparo de este filamento es la "picadura" de las medusas, pólipos, anémonas, etc).

Los cnidarios son animales diblásticos con simetría radial primaria. Sus células se organizan en dos capas que actúan como unidades funcionales (tejidos), aunque muchas células todavía guardan cierta independencia y cierta totipotencia (son capaces de formar un organismo entero). Tienen solo dos hojas embrionarias, ectodermo y endodermo, careciendo por tanto de mesodermo, aunque a veces existe un tejido análogo (ectomesodermo) de origen ectodérmico.

⁴⁶ Brusca, R.C., Brusca, G. *Invertebrates*, v II, 2 ed. Sinauer Associates, Massachusetts, 2003.

No poseen aparato excretor, respiratorio, ni circulatorio. Estas funciones se realizan a través de la cavidad gastrovascular o de la ectodermis. Su organización corporal es en forma de saco, correspondiente a una cavidad gastrovascular (celenteron) donde se realiza la digestión y que se utiliza también como sistema de distribución de los nutrientes y del oxígeno, así como sistema excretor. Dicho aparato digestivo tiene un solo orificio que actúa como boca y ano al mismo tiempo. Entre la ectodermis y la endodermis se encuentra la mesoglea, que puede ser muy fina y acelular, o estar bien desarrollada y tener distintos tipos celulares. La gastrodermis presenta células nutritivomusculares o mioepiteliales astrales, que se caracterizan por poseer flagelos responsables de la circulación de líquidos en la cavidad gastrovascular. Además, esas células son capaces de realizar pinocitosis y fagocitosis, recogiendo así los materiales parcialmente digeridos de la cavidad gastrovascular y permitiendo el transporte al resto de células. Otras células presentes en la gastrodermis son las secretoras, en cuyo interior producen varias sustancias, como los mucopolisacáridos, mucoproteínas, y enzimas digestivas.

Los celenterados tienen uno o varios tentáculos alrededor de la boca. El sistema nervioso tiene forma de red o plexo que se localiza bajo la epidermis; en muchos grupos hay protoneuronas no polarizadas, aunque también puede haber neuronas polarizadas, células sensoriales e incluso agrupación de las mismas en órganos sensoriales.

Tienden al polimorfismo, pueden vivir de forma individual o en colonias, fijados al sustrato (pólipos) o libres (medusas). En ocasiones, parte de las fases son planctónicas (móviles, pero arrastrados por las corrientes). El color también es variable aunque muchas formas del plancton son transparentes. Otras son coloreadas, y presentan prácticamente todos los colores.

La forma sésil, consiste de animales de paredes finas y amplia cavidad gastrovascular, con mesoglea muy poco desarrollada y cuerpo más o menos columnar. Por el lado aboral se relaciona con el sustrato.

Clasificación y filogenia

La clasificación tradicional de los cnidarios reconoce cuatro clases:

Hidrozoos (Hydrozoa)

Comprenden los hidropólipos e hidromedusas y son la clase más primitiva y de la que han derivado las demás.

Escifozoos (Scyphozoa)

Tienen forma de pólipo (escifopólipo o escifostoma) y medusa (escifomedusa o medusa medusa sin velo). Presentan cnidocitos en la cavidad gastrovascular y gónadas endodérmicas. Su cavidad gastrovascular está dividida incompletamente por 4 tabiques o septos incompletos en posición inter-radial que separan 4 bolsas gastrales.

Cubozoos (Cubozoa)

Son exclusivamente medusas (cubomedusas), de forma cúbica, con cnidos especiales, muy potentes. Se caracterizan por su división tetrámera, que separa el celenteron en cuatro bolsas. El borde umbrelar no es festoneado y el margen de la subumbrela se pliega al interior para formar un velario.

Antozoos (Anthozoa)

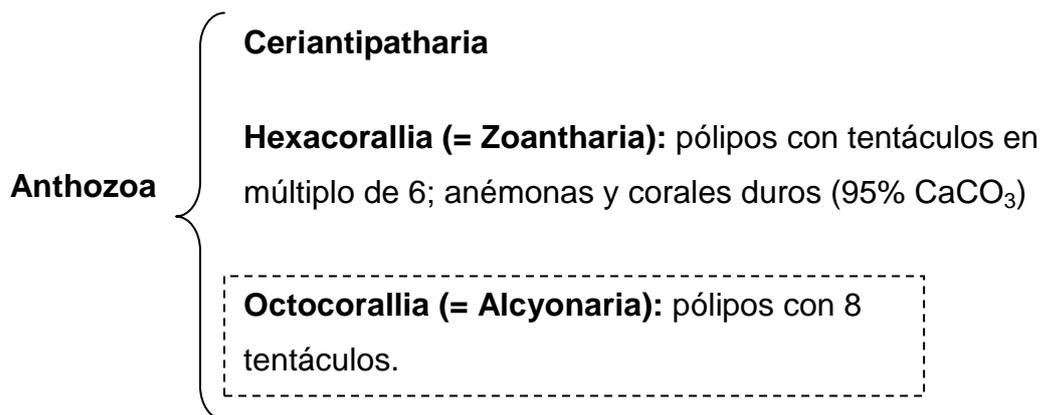
En esta tesis fueron estudiadas dos especies pertenecientes a dicha clase, una del orden Pennatulaceae y la otra del orden Gorgonaceae.

Los Antozoos (Anthozoa, del griego *anthos*, flor, y *zoon*, animal) presentan exclusivamente forma de pólipo, con una estructura tubular terminada en una boca rodeada de un anillo de tentáculos, con simetría radial, e incluyen las anémonas y los corales, que pueden ser solitarios o coloniales. Se conocen más de 10.000 especies, todas marinas. Ciertas especies de coral viven aisladas, pero la mayoría de ellas forman colonias de pólipos genéticamente iguales de pocos milímetros de diámetro, conectados desde la base de cada pólipo por tejido vivo, el conénquima, que forma un complejo y bien desarrollado sistema de canales, y que les permite intercambiar alimento y simbiontes (**Figura 1**).

En la clase Anthozoa, un pólipo siempre origina otros pólipos, por reproducción asexual o sexual, o sea, no hay un estadio medusoide. Hay cnidocitos en la cavidad gastrovascular, a veces muy potentes, incluso en filamentos que salen por la pared del cuerpo. El esqueleto está formado por material calcáreo o proteico (gorgonina).

La boca no se abre directamente a la cavidad gastrovascular, sino que continúa en una faringe ectodérmica que, lateralmente, presenta uno o varios canales ciliados (sifonoglifos) que aseguran la renovación del agua de la cavidad gastrovascular. La región oral adopta forma de disco y la boca tiene forma de hendidura alargada, lo que da a los antozoos una simetría bilateral incipiente. Los tentáculos alrededor de la boca pueden ser 8 o múltiplos de 6.

La clase **Anthozoa** se subdivide en tres subclases:



El animal conocido como coral es en realidad un pequeño pólipo de apenas unos milímetros de diámetro. Los corales calcáreos tienen la capacidad de fijar sobre sus tejidos el calcio disuelto en el mar y formar un esqueleto externo duro. La verdadera colonia se posa en la superficie de un gran marco calcáreo inanimado que fue dejado por sus antecesores.

El coral y su estructura calcárea son blancos, los diferentes colores que presentan se deben a microalgas que viven en simbiosis con los pólipos y reciben el nombre de zooxantelas. Por esta razón el coral necesita aguas límpidas para desarrollarse, para que las zooxantelas puedan ejecutar sus procesos fotosintéticos. En general se asocia la producción de ciertos metabolitos secundarios, sobre todo terpenoides, a estas zooxantelas.

Los corales son animales carnívoros que se alimentan básicamente de zooplancton. En cuanto a la reproducción, existen especies de reproducción sexual y reproducción asexual, incluso hay especies donde se dan ambas formas. Las células sexuales son expulsadas al mar, todas a la vez, siguiendo señales como las fases lunares o las mareas. La fecundación es externa y las puestas son tan numerosas que llegan a teñir las aguas. Muchos huevos son devorados por los peces, pero su número es tan elevado que la mayoría sobrevive.

Los pólipos de coral mueren con el tiempo, pero las estructuras calcáreas se mantienen y pueden ser colonizadas por otros pólipos, que seguirán creando estructuras calcáreas, generación tras generación. A través de millones de años se forman grandes estructuras calcáreas conocidas como arrecifes de coral. En ocasiones el tamaño de los arrecifes es tal que pueden llegar a emerger de la superficie. Así, cuando el coral crece alrededor de una isla volcánica que posteriormente se hunde, se crea una estructura coralina en forma de anillo con una laguna central que recibe el nombre de atolón. El arrecife de mayor longitud es la Gran Barrera de Arrecifes, en la costa de Queensland en Australia: tiene más de 2.000 km² y es una de las construcciones naturales más grandes del mundo. Los arrecifes coralinos forman el hogar de muchos organismos marinos que allí encuentran alimento y protección contra los depredadores. En términos de biodiversidad, sería equivalente a una selva tropical en el mar siendo particularmente diverso en especies de invertebrados sésiles.

La subclase Octocorallia

Los octocorales (orden Octocorallia = Alcyonaria), también conocidos como alcionarios, son siempre coloniales; los pólipos están conectados por hilos o láminas de tejido, llamadas estolones; cada pólipo tiene 8 tentáculos, que generalmente son pinados. Comprenden ocho órdenes: Gorgonacea, Pennatulacea, Alcyonacea, Stolonifera, Gastraxonacea, Helioporacea, Protoalcyonaria y Telestacea⁴⁷.

⁴⁷ Coll, J. C. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 613-631.

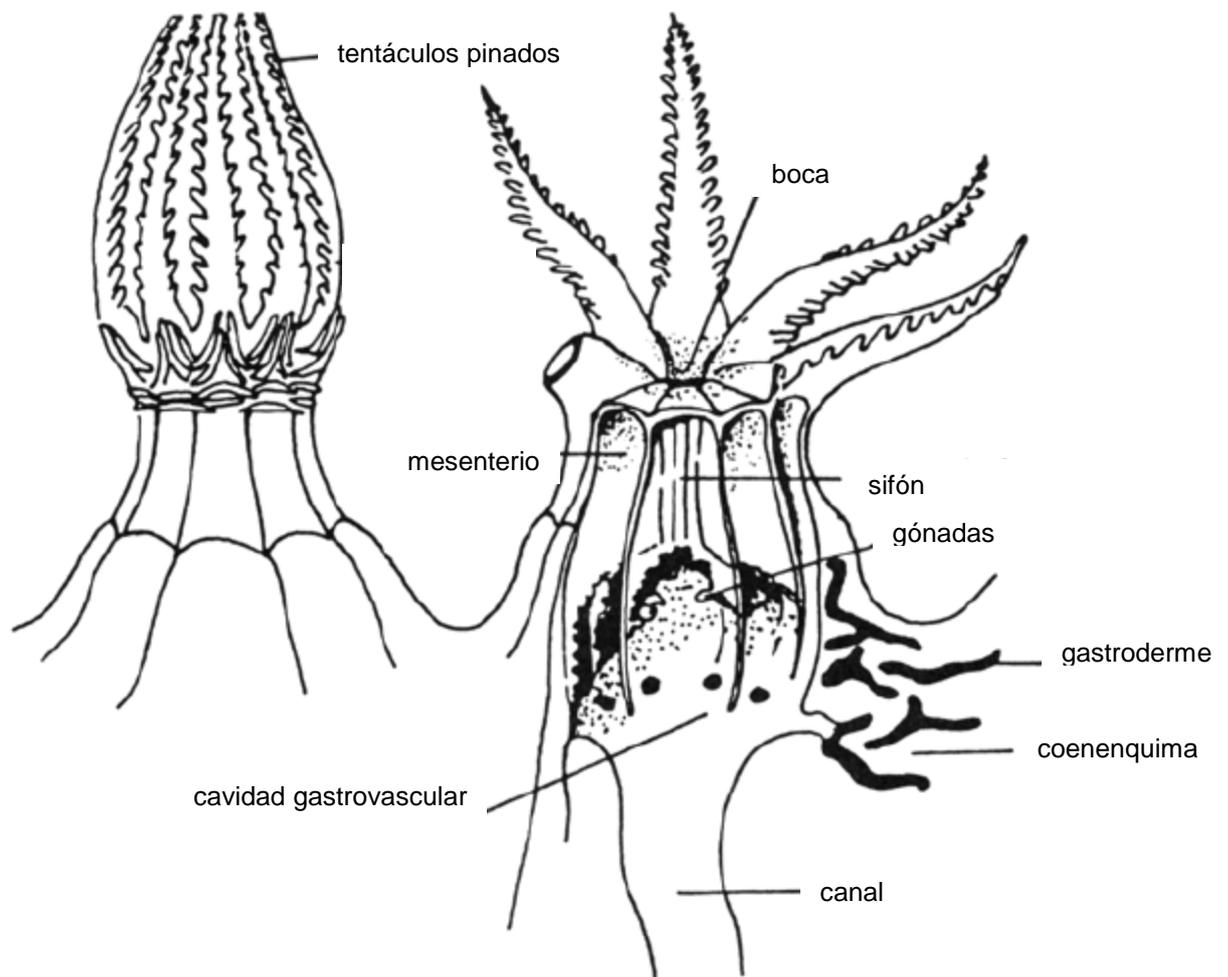


Figura 1: Diagrama esquemático ilustrando las características esenciales de los pólipos de octocorales. (*Chem. Rev.* **1992**, 92, 613-631)

Orden Gorgonaceae

Los gorgonáceos son cnidarios sésiles que forman colonias. El orden Gorgonaceae presenta dos subórdenes: Holaxonia (11 familias) y Scleraxonia (7 familias). Las especies del suborden Holaxonia se caracterizan por tener un esqueleto proteico flexible de gorgonina, mientras que las del suborden Scleraxonia poseen un esqueleto formado por pequeñas espículas calcáreas fuertemente agrupadas. Algunas especies son incluso incrustantes. Morfológicamente se los divide en abanicos de mar (*sea fans*) y látigos de mar (*sea whips*). En general se encuentran anclados a sustratos blandos como arena o sedimento.

Cada pólipo utiliza sus ocho tentáculos para capturar plancton y partículas microscópicas. La forma de abanico suele volver más eficiente este proceso cuando la gorgonia se orienta perpendicular al flujo de la corriente. Algunas especies poseen zooxantelas que colaboran con la nutrición del coral por medio de la fotosíntesis. Se los suele encontrar en aguas poco profundas, aunque también aparecen a profundidades mayores de 1000 m. Las gorgonias en forma de abanico suelen ser típicas de aguas poco profundas, con fuertes corrientes marinas, mientras que las de forma de látigo suelen habitar profundidades mayores con aguas más calmas.

Orden Pennatulacea

Los pennatuláceos (plumas de mar) son un orden cuyo nombre deriva de su aspecto similar a una pluma de escribir antigua. En realidad, no todos tienen forma de pluma, y cada pluma consta de numerosos pólipos interconectados, que se agrupan en colonias. La parte inferior está anclada en la arena o sedimento, mientras que los pólipos situados en la parte superior se encargan de capturar alimentos en suspensión con sus tentáculos. Pueden alcanzar más de 1,5 m de altura, pero la mayoría es más pequeña.

Dentro del orden Pennatulacea, se encuentran dos subórdenes, Subselliflorae (son los que suelen tener forma de pluma), y Sessiliflorae (pueden tener forma de trébol o radial), a la cual pertenece el género *Renilla*.

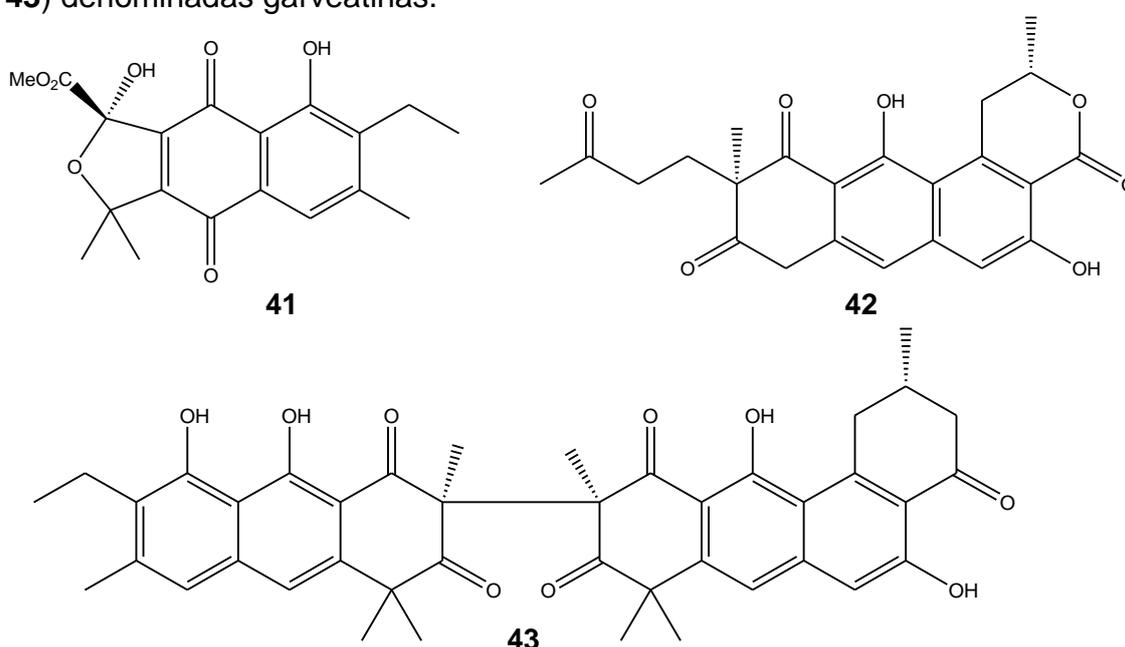
Productos Naturales de Cnidarios

El *phylum* Cnidaria puede ser considerado el más rico químicamente entre los invertebrados marinos, ya que al realizarse un *screening* sobre dichos organismos es relativamente factible encontrar algún metabolito secundario interesante. Por otro lado, muchas de las clases de cnidarios presentan dificultades de recolección en cantidades suficientes para los estudios químicos y por lo tanto se encuentran poco estudiadas. La mayor parte de los compuestos obtenidos proviene de la clase Anthozoa, principalmente de octocorales, que en algunos de los casos pueden llegar a tener más de 10% en peso seco de sustancias extraíbles con solventes orgánicos. Sin embargo,

existen también ejemplos de metabolitos bioactivos aislados de otros organismos, sobre todo en clase Hydrozoa y la subclase Hexacorallia.

Hydrozoa:

Los hidrozooos no suelen ser muy estudiados químicamente debido entre otras causas a que no es sencillo recolectarlos en cantidad suficiente. En los casos en que esto es posible, se han obtenido de algunas especies extractos orgánicos químicamente muy ricos. Un ejemplo de esto es el hidrozoo *Garveia annulata*, que produce una gran cantidad de antracenas citotóxicas (**41**, **42**, **43**) denominadas garveatinas.

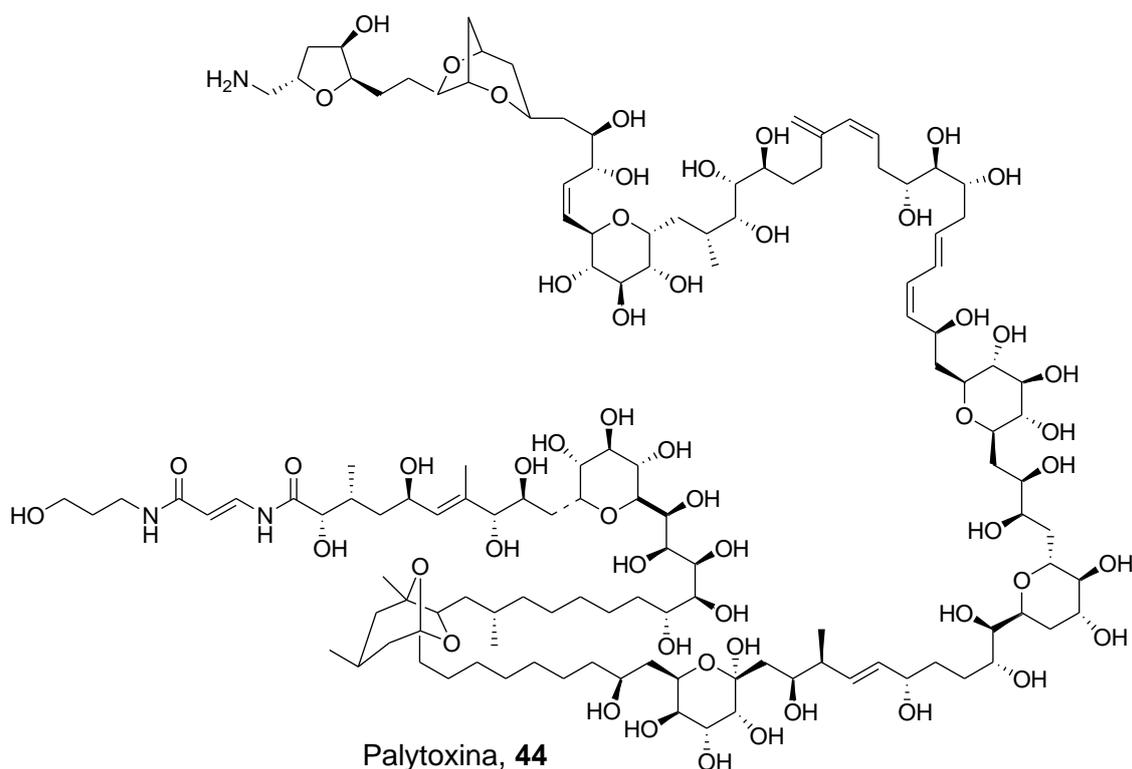


Subclase Zooantharia

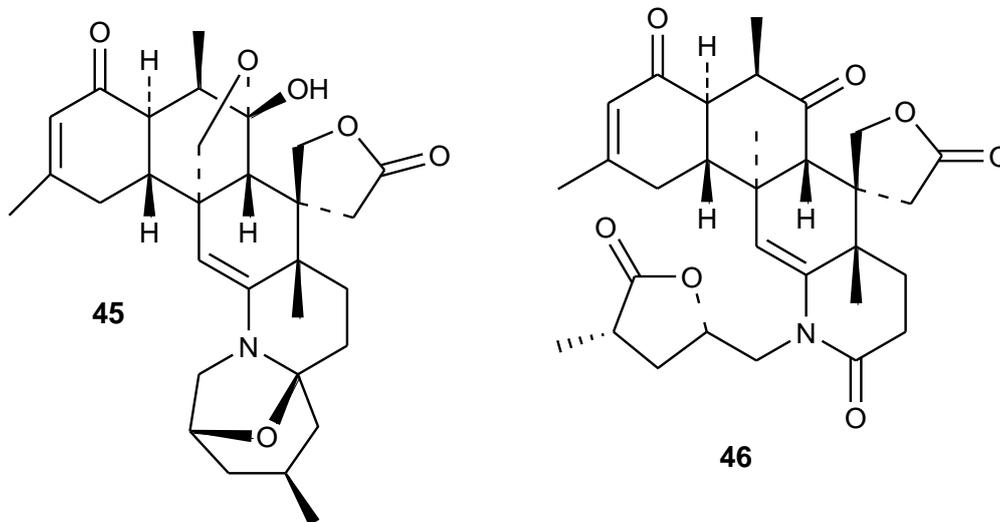
Los zooanthidos son famosos por producir la toxina natural no peptídica de mayor potencia, la palitoxina (**44**), aislada de *Palythoa toxica* (Moore y Bartolini, 1981)⁴⁸. La historia del descubrimiento de este compuesto es notable por varios aspectos. Por un lado se trata de uno de los pocos ejemplos en el ámbito marino del descubrimiento de un compuesto activo basado en la literatura etnográfica. Una antigua leyenda hawaiana llevó a la búsqueda del “alga tóxica de Hana” (que en realidad era el zooanthido *P. toxica*) que los guerreros del lugar utilizaban para envenenar sus flechas. Por otra parte, la

⁴⁸ Moore, R.; Bartolini, G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 2491-2494

elucidación estructural de la palytoxina constituye una de las mayores proezas de la química de productos naturales, si tenemos en cuenta la estructura del compuesto que tiene más de 120 átomos de carbono y más de sesenta centros quirales sin contener “unidades repetitivas” como aminoácidos o azúcares. La mayor parte de este trabajo fue realizado durante las décadas de 1960 y 1970, época en la que aún no se contaba con equipos de RMN de alta resolución y las modernas técnicas de RMN bidimensional utilizadas hoy en día.



La presencia de ésta y otras toxinas de gran tamaño ha desalentado los estudios sobre zooanthidos. Sin embargo, se han informado algunos otros compuestos con actividad antitumoral y estructuras novedosas como las zooanthaminas (**45**, **46**), aisladas de organismos del género *Zooanthus*.



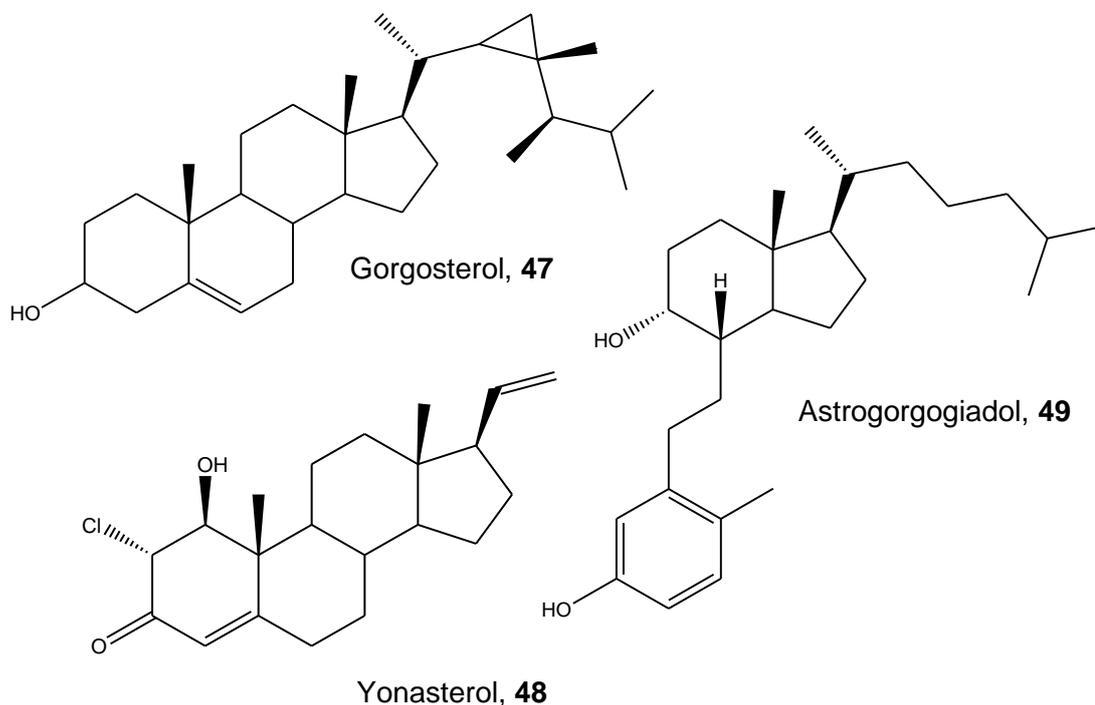
Subclase Octocorallia

En general, los metabolitos secundarios de octocorales pueden clasificarse en cuatro clases principales: sesquiterpenoides, diterpenoides, prostaglandinas (y otros eicosanoides) y esteroides polioxidados y halogenados.

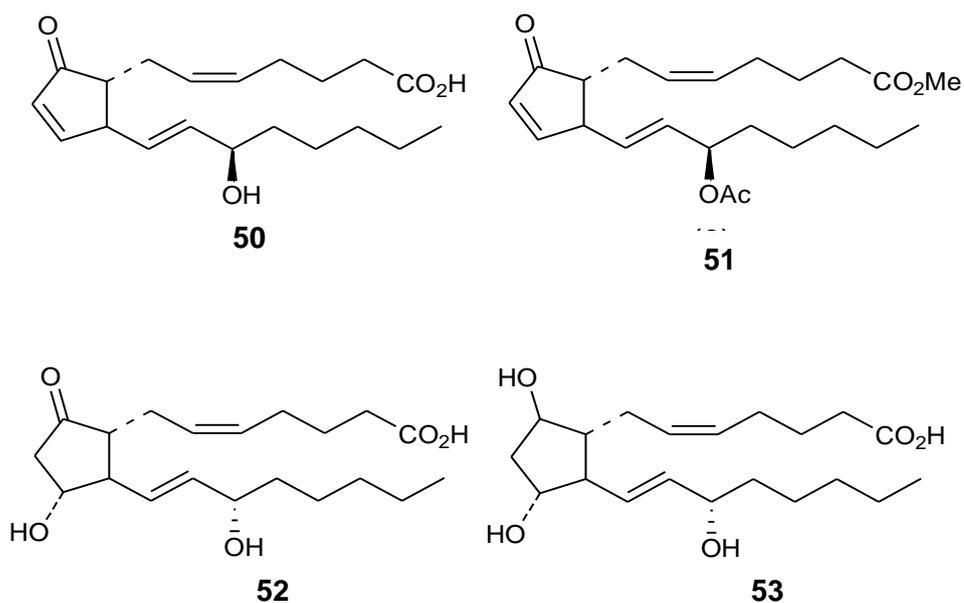
Así como ocurre con las esponjas, los octocorales pueden producir varios tipos de esteroides relacionados con el colesterol y aquellos con cadenas laterales modificadas. Una importante clase son los esteroides que tienen en la cadena lateral un grupo ciclopropilo, como el gorgosterol (**47**)⁴⁹, aunque hay teorías que asocian su producción a los dinoflagelados. El yonarasterol (**48**)⁵⁰ es un ejemplo de esteroide halogenado típico de octocorales, en este caso en la posición C6. Hay muchos esteroides polihidroxiados, a menudo con cadena lateral epoxidada y un número considerable de secoesteroides, algunos raros como el astrogorgiadiol (**49**), aislado de *Astrogorgia sp.*

⁴⁹ Ling, N. C.; Hale, R. L.; Djerassi, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5281-5282

⁵⁰ Marrero, M. C.; D'Croze, L.; Maté, J. L.; San-Martín, A.; Darias, J. *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 915-918



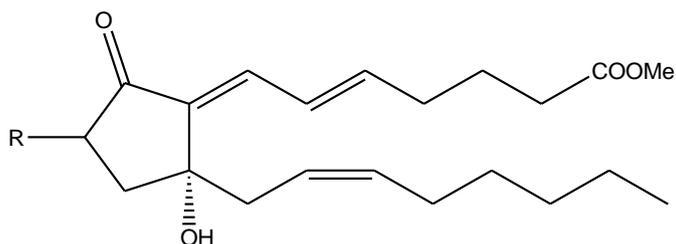
El aislamiento de prostaglandinas a partir de la gorgonia caribeña *Plexaura homomalla* (más de 1 % en peso seco de 15-*epi*-PGA₂ (**50**) y el acetato de su éster metílico (**51**)), en el año 1969 (Weinheimer y Spraggins, 1969) fue un descubrimiento de enorme valor en ese entonces. Ya se conocía para esa época que las prostaglandinas eran sustancias muy importantes en una serie de funciones biológicas. Sin embargo, la investigación del potencial biomédico de estos compuestos estaba frenada por la escasez de sustancia disponible en el caso de los compuestos más activos, PGE₂ (**52**) y PGF_{2α} (**53**), los cuales solo podían ser aislados a nivel de trazas de las fuentes naturales hasta ese momento. El descubrimiento de los compuestos (**50**) y (**51**) en cantidad importante en corales permitió el desarrollo de métodos sintéticos para transformarlos en los compuestos activos (**52**) y (**53**), y brindó nuevo impulso a las investigaciones sobre la actividad biológica de las prostaglandinas. Afortunadamente el desarrollo de rutas de síntesis total de prostaglandinas resolvió definitivamente el problema de abastecimiento de estas sustancias antes de que se produjera un daño ecológico irreparable en los arrecifes de coral, debido a la cosecha indiscriminada de *Plexaura*.



Los prostanooides, presentes en varias especies de octocorales, pueden aparecer halogenados, con Cl, Br o I, como bromovulona (**54**) e iodovulona (**55**) especialmente aisladas de *Clavularia sp.*⁵¹

(R=Br) Bromovulona, **54**

(R=I) Iodovulona, **55**



Los terpenoides son los metabolitos secundarios que predominan en los octocorales, en la **figura 2** están esbozados algunos de los esqueletos carbonados de los principales tipos de terpenoides encontrados en cnidarios. Es notable que aún después de más de treinta años de investigación en el área se sigan descubriendo nuevos esqueletos carbonados en estos organismos. Los sesqui y diterpenos de los octocorales son muy variados, e incluyen algunos esqueletos únicos y exclusivos de ciertas clases y familias. Son abundantes y se cree que cumplen importantes roles ecológicos como la protección de los corales contra la predación y el asentamiento de larvas de organismos competidores.

⁵¹ Shen, Y-C; Cheng, Y-B; Lin, Y-C; Guh, J-H; Teng, C-M *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 542-546.

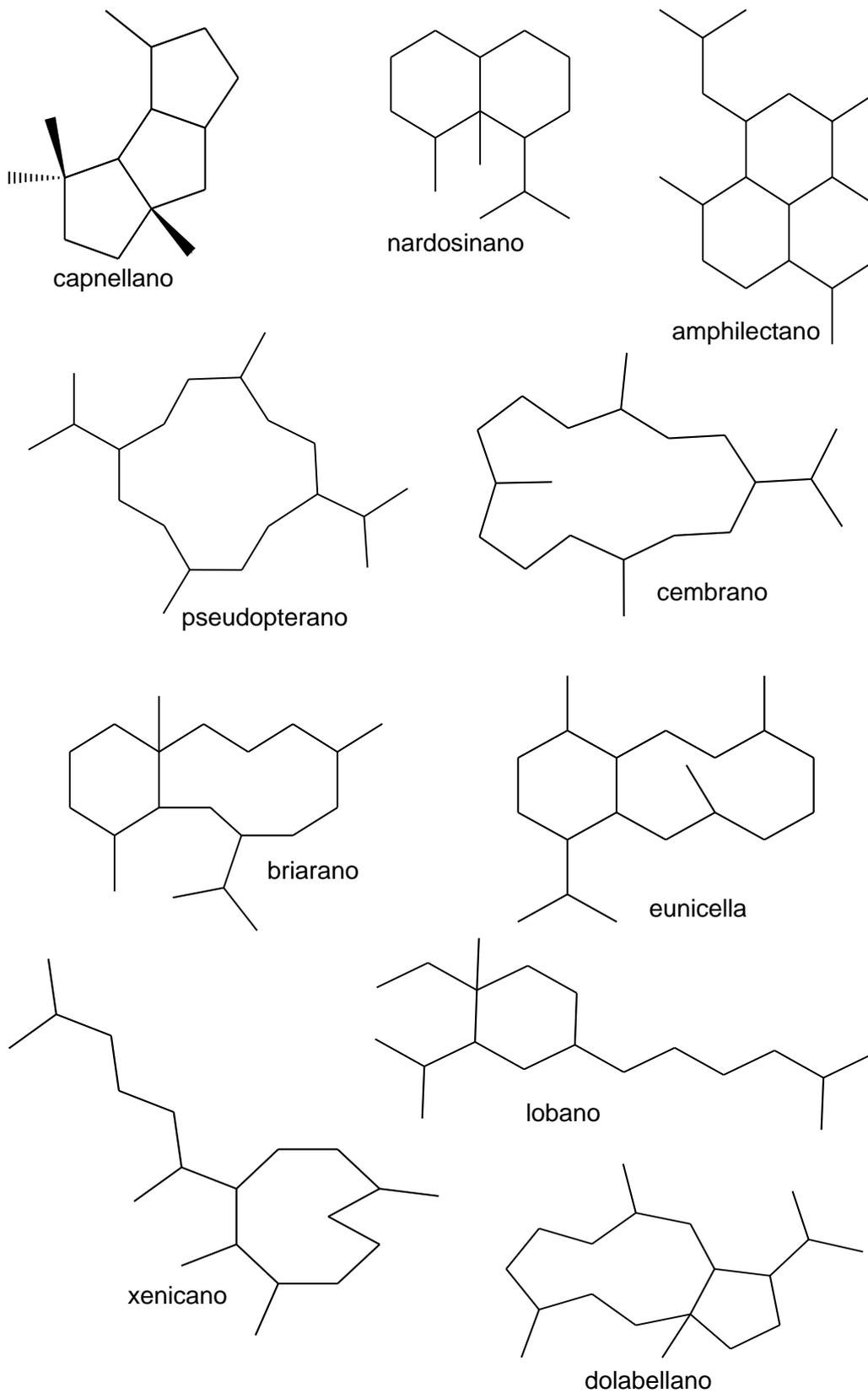
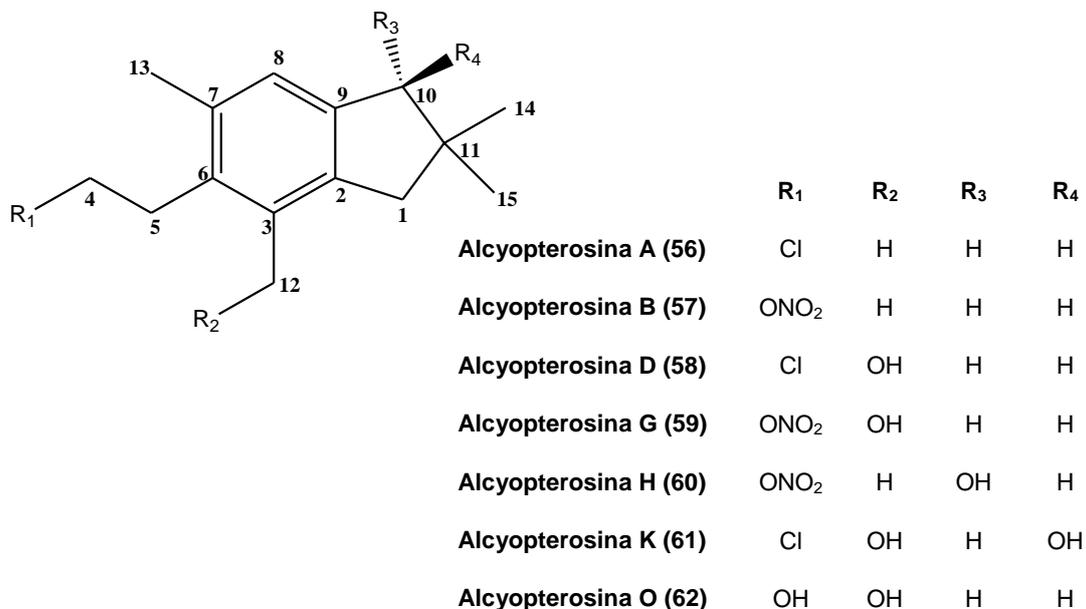


Figura 2: Esqueletos terpenoidales frecuentes en los cnidarios.

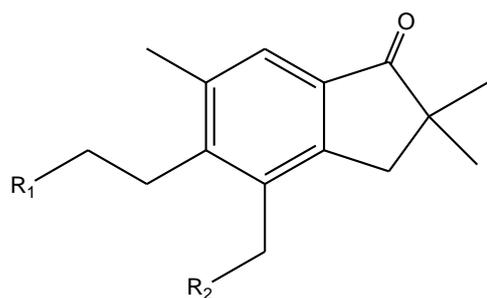
Sesquiterpenoides

Muchas especies de octocorales despiden al ser cortados un fuerte olor terpenoidal, asociado generalmente a la presencia de sesquiterpenos. Dicha observación en ejemplares arrojados a la playa por la marea, fue la que impulsó el estudio de los octocorales en la década de 1960. Además de los compuestos volátiles, los octocorales exhiben una gran variedad de estructuras de sesquiterpenoides con diferente grado de oxidación. Obviamente con los métodos de purificación y análisis con los que se contaba en ese entonces sólo podían identificarse los productos mayoritarios de los extractos (que en algunos casos precipitaban en cantidad de varios gramos). La reinvestigación de esas mismas especies en años posteriores y con técnicas modernas permitió el descubrimiento de una enorme variedad adicional de compuestos. Varios de los esqueletos carbonados de estos compuestos resultaron novedosos.

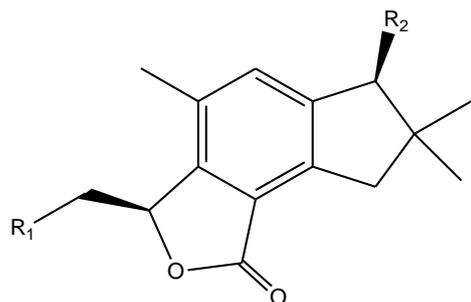
En un trabajo anterior en nuestro laboratorio con el octocoral antártico *Alcyonium paessleri*, se consiguió aislar e identificar una familia de diecisiete sesquiterpenoides, las alcyopterosinas (**56-71**), con esqueleto de iludalano. Entre ellos se encontraban los primeros ésteres orgánicos de nitrato en ser totalmente aislados e identificados⁵².



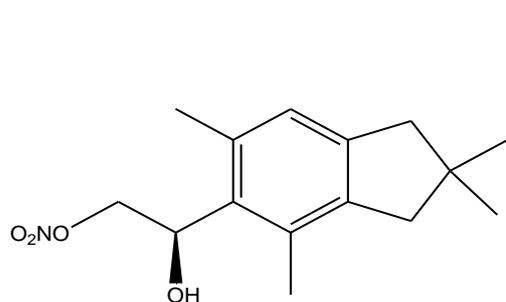
⁵² Palermo, J.A.; Rodríguez Brasco, M.F.; Spagnuolo, C.; Seldes, A.M. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4482-4486



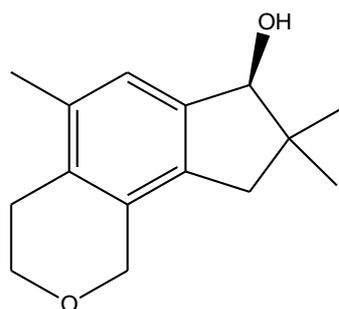
	R ₁	R ₂
Alcyopterosina C (63)	ONO ₂	H
Alcyopterosina J (64)	ONO ₂	OH
Alcyopterosina N (65)	OH	H



	R ₁	R ₂
Alcyopterosina E (66)	ONO ₂	H
Alcyopterosina E' (67)	OH	H
Alcyopterosina L (68)	Cl	OH
Alcyopterosina M (69)	ONO ₂	OH



Alcyopterosina F (70)



Alcyopterosina I (71)

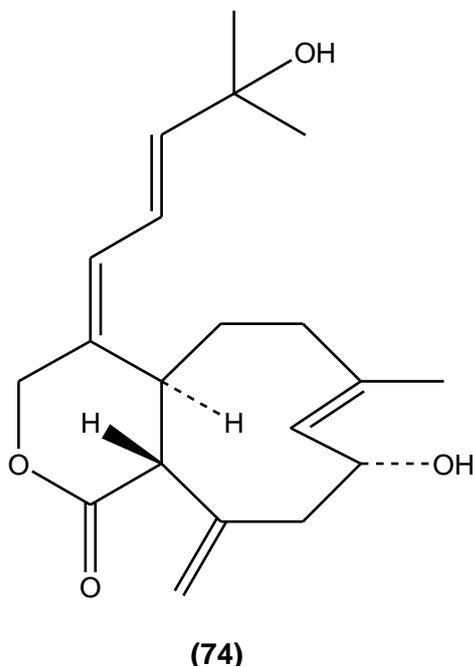
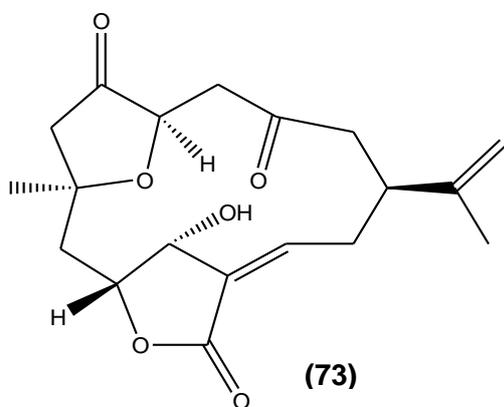
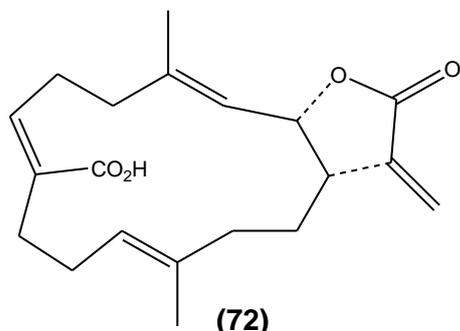
Diterpenoides

Son los compuestos más abundantes y distribuidos producidos por los octocorales, con más de 1500 sustancias informadas, pertenecientes a 50 tipos de esqueleto diferentes. En algunos casos suelen ser los componentes mayoritarios de los extractos orgánicos. En particular son muy comunes los cembranos y cembranólidos (Munro, 1987)⁵³ (**72 – 73**), con diferente grado de oxidación, típicos en varios géneros de corales blandos como *Sarcophyton*, *Nephtea*, *Sinularia* y *Lobophyton*. Los xenicanos (**74**)⁵⁴ son diterpenoides del

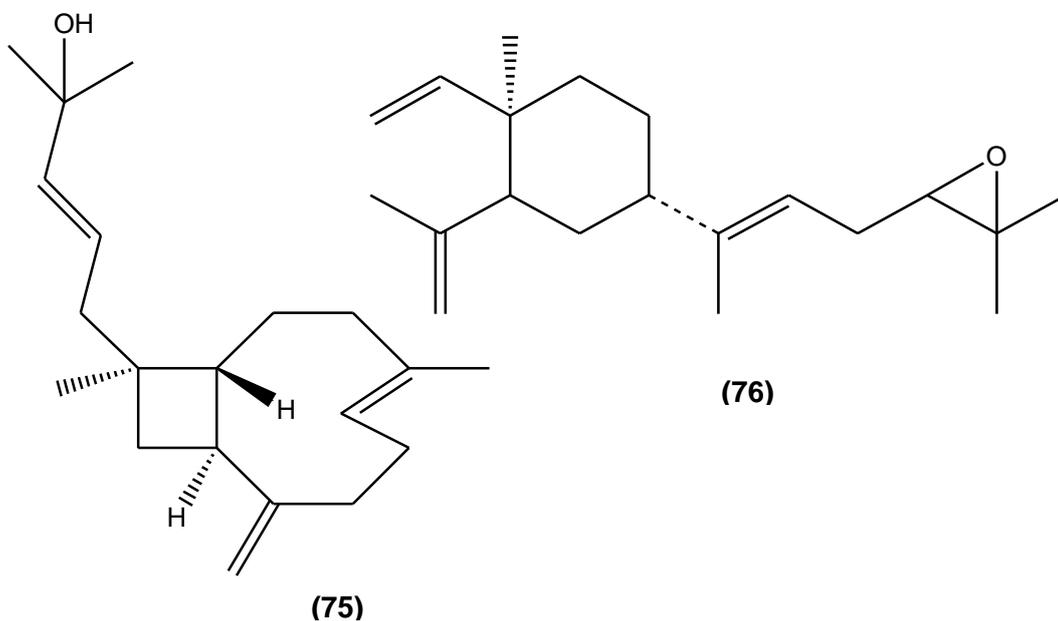
⁵³ Bishara, A. *et al. Tetrahedron* **2006**, 62, 12092- 12097

⁵⁴ Munro, M. *et al Bioorganic marine Chemistry*. New York: Spingler, **1987**, v.1, p93-136

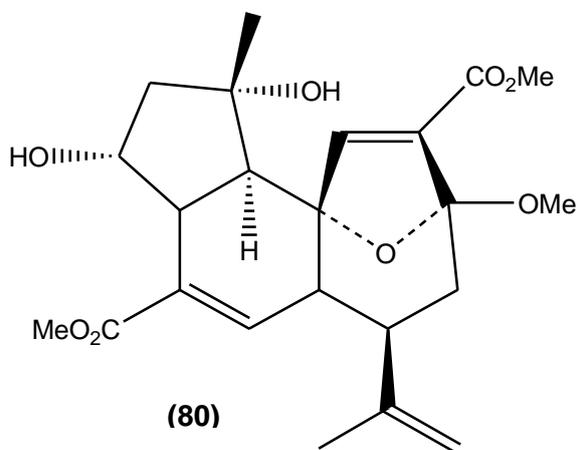
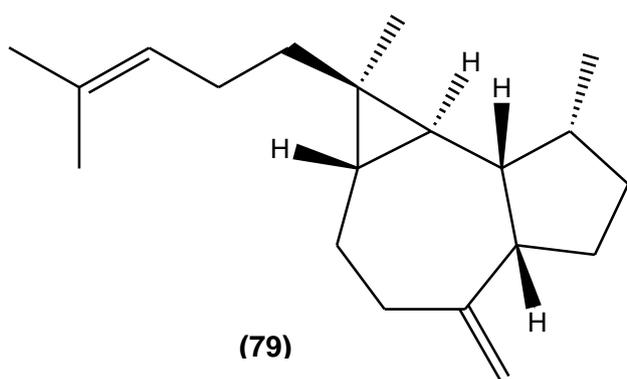
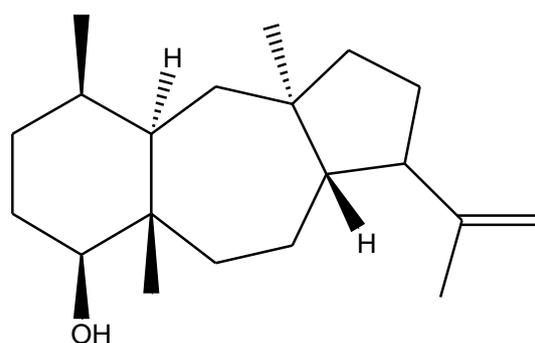
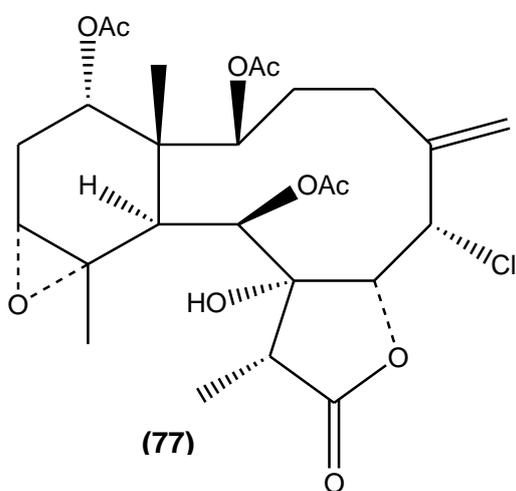
género *Xenia*, y también se los ha detectado en ciertas especies de algas pardas. Se cree que muchos de estos compuestos tienen actividad antipredatoria o *antifouling* (inhibiendo el asentamiento de especies competitivas). En algunos casos esto ha sido comprobado experimentalmente.



Algunas clases de diterpenoides típicos de octocorales son en realidad esqueletos de sesquiterpenoides extendidos en una unidad de isopreno. Por ejemplo, los xeniafilanos (**75**), típicos de los géneros *Xenia* y *Nephtea* son análogos diterpénicos de cariofilanos, y los lobanos (**76**), típicos del género *Lobophyton* son en realidad “elemnanos extendidos”.

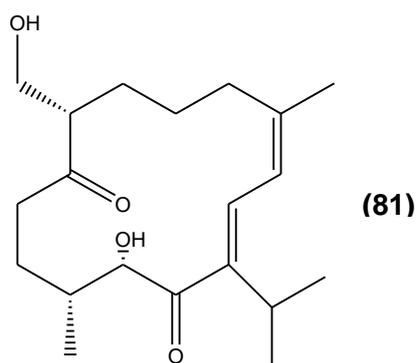


Existen numerosos esqueletos carbonados novedosos de diterpenos aislados de octocorales. Por ejemplo, las gorgonias del género *Briareum* producen diterpenoides con esqueleto de briarano (**77**), que presentan como característica notable un alto grado de funcionalización con grupos oxigenados, y la presencia de átomos de Cl. Se han identificado más de cien compuestos de esta familia, muchos de ellos con actividad citotóxica. Otro esqueleto diterpénico novedoso es el clavularano (**78**) típico en el género *Clavularia*. Con el desarrollo de las nuevas técnicas de RMN ha aumentado en forma notable el número de esqueletos novedosos identificados de diterpenos, como por ejemplo los compuestos **79** y **80**.

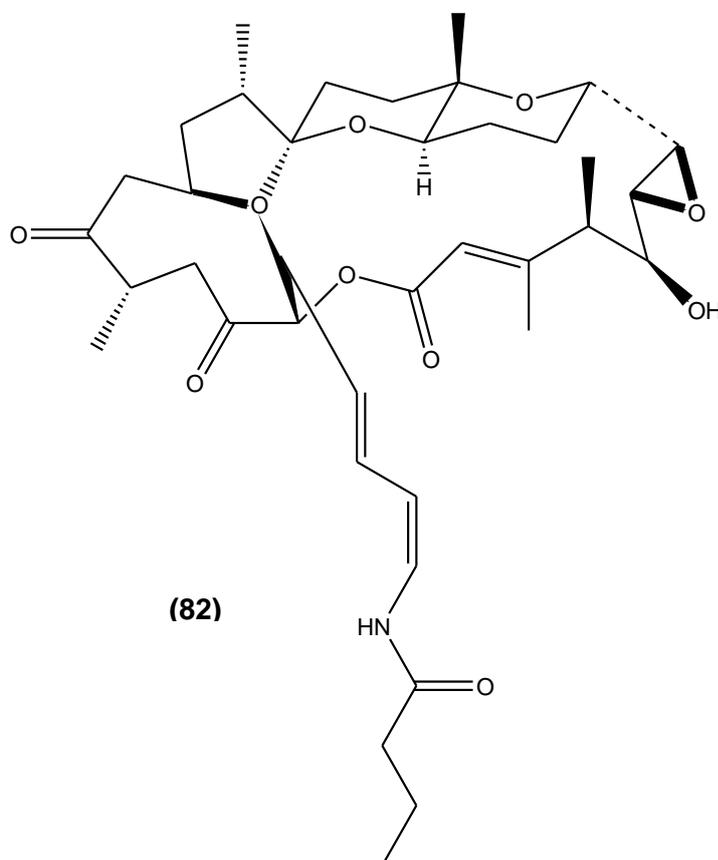


Metabolitos de Pennatulaceae

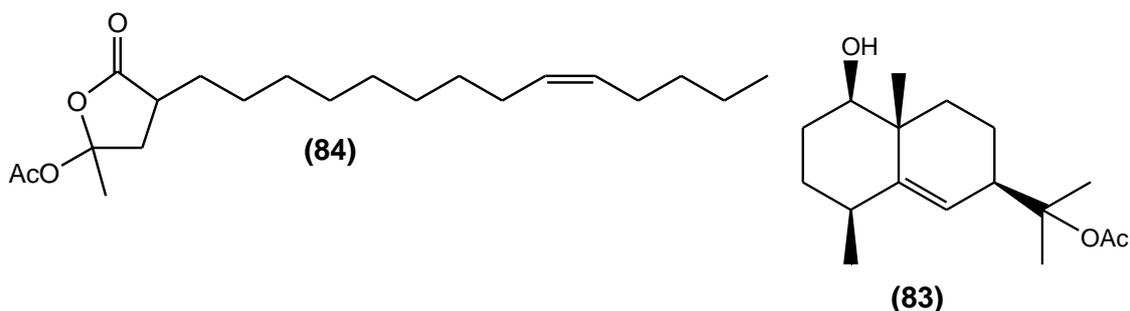
Los pennatuláceos comprenden tanto a las plumas de mar (“sea pens”) y pensamientos de mar (“sea pansys”). En general los metabolitos típicos de pennatuláceos suelen ser esteroides polioxidados y mayoritariamente diterpenoides con esqueleto de briarano (ver pág. 68). Una especie que escapa a la regla es *Gyrophyllum sybogae*, de la cual se aislaron cembranos como **81**.



Un caso extraño es el de *Lituaría australasiae*, ya que en lugar de terpenoides produce una familia de lactonas macrocíclicas, las lituarinas, como la lituarina C, **82**.



Otra especie químicamente fuera de lo común es *Virgularia juncea*, de la cual se aisló el eudesmano junceol (**83**) y una serie de γ -lactonas como (**84**).

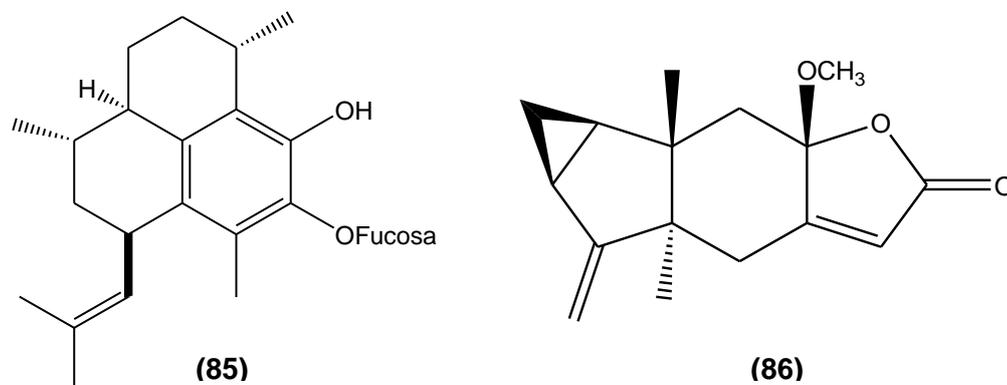


Metabolitos de Gorgonacea

Las gorgonias producen metabolitos secundarios generalmente terpenoides con mucha mayor variedad estructural. Simplemente se citarán algunos ejemplos para ilustrar la gran versatilidad biosintética de estos organismos.

El extracto parcialmente purificado de *Pseudopterogorgia elisabethae*, un octocoral típico del Caribe, se utiliza en la preparación de la crema facial Resilience® (Estée Lauder): Dicha especie produce una familia de diterpenoides glicosidados, las pseudopterosinas (ej. pseudopterosina E, **85**), con actividad antiinflamatoria superior a la de la indometacina⁵⁵.

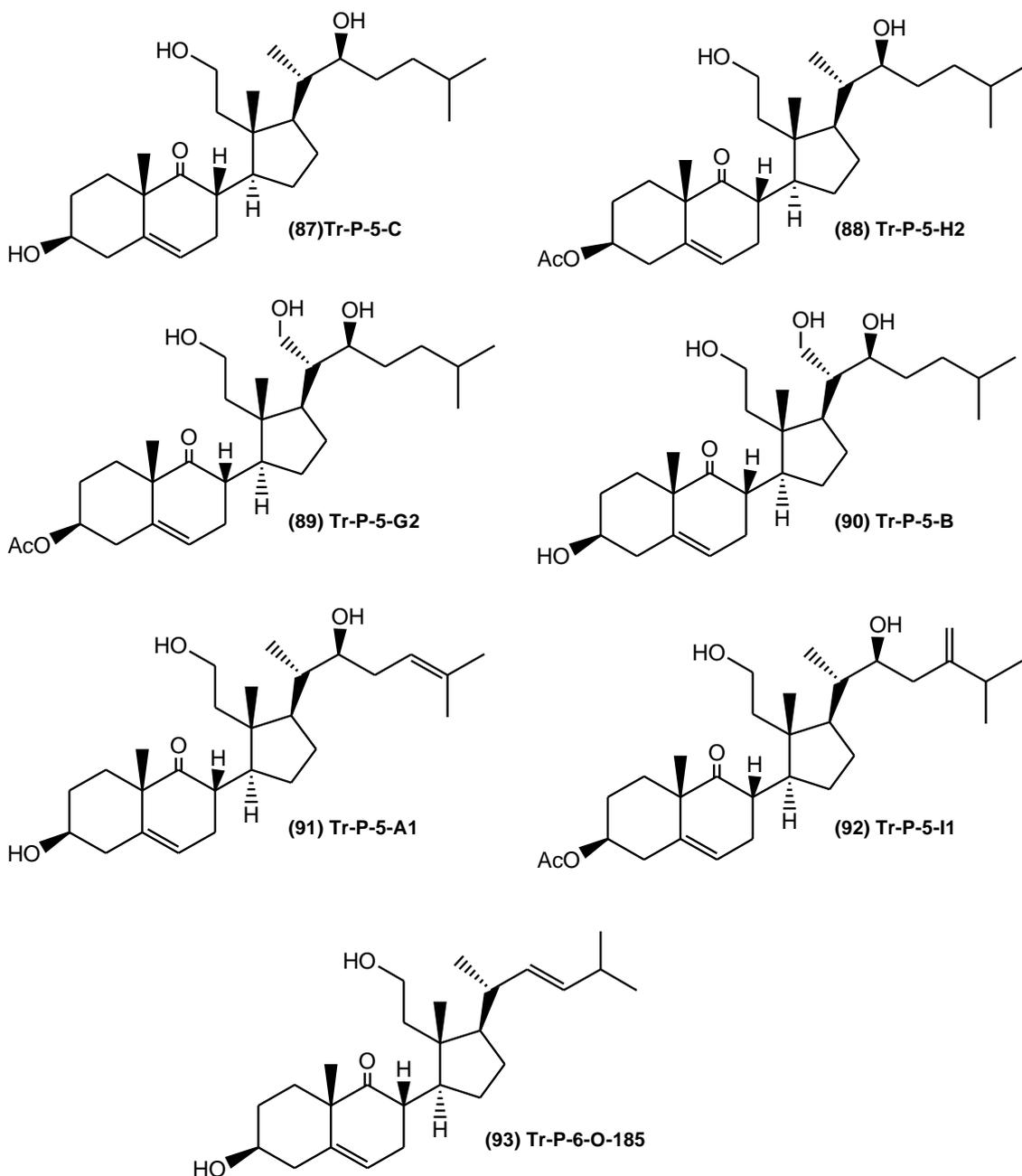
De los extractos de la gorgonia *Heterogorgia uatumani* Castro, recolectada en la bahía de Ilha Grande, en la costa brasilera de Angra dos Reis fue aislado un nuevo sesquiterpenoide bautizado heterogorgiolido (**86**), que posee actividad antipredatoria general contra peces de arrecife en ensayos *in situ*⁵⁶.



⁵⁵ Look, S.A. *et al.* *J. Proc. Natl Acad Sci. USA* **1986**, 83, 6238-6240.

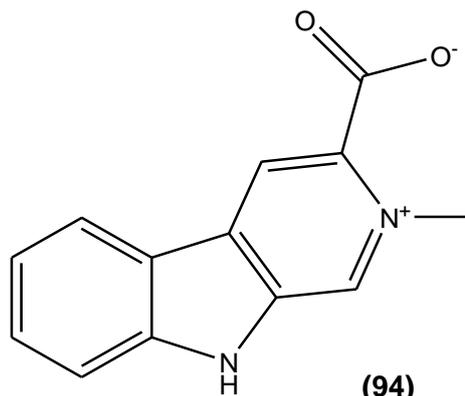
⁵⁶ Maia, L. *et al.* *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1322-1324

El estudio por nuestro grupo de la gorgonia *Tripalea clavaria*, colectada en Punta Mogotes, Mar del Plata, permitió el aislamiento de siete C-secoesteroides nuevos (**87-93**), algunos de los cuales presentaron actividad antifúngica⁵⁷.



⁵⁷ Rodríguez Brasco, M.F.; Palermo, J.A.; Genzano, G. N. *Steroids*. **2007**, 22, 908-913.

Son pocos los ejemplos de metabolitos nitrogenados en gorgonias. Uno de los pocos ejemplos es el alcaloide β -carbólico (94) aislado de la gorgonia *Lignopsis spongiosum*, colectada en las islas Georgias del Sur. Este trabajo, realizado por un grupo del Depto. de Química Orgánica, FCEN-UBA representó además la descripción de un nuevo género y especie de gorgonia.⁵⁸



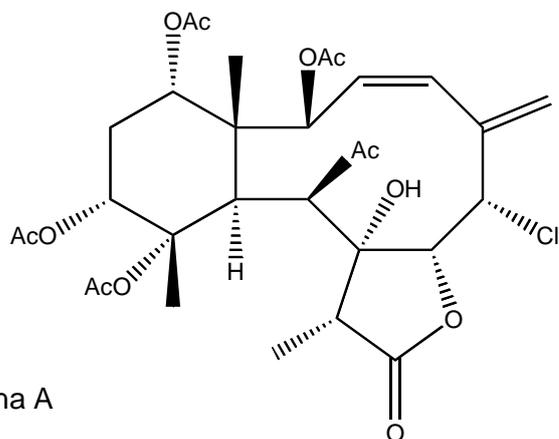
Diterpenos del tipo Briarano

En los últimos 30 años, más de 350 metabolitos secundarios con esqueleto tipo briarano han sido informados en una variedad de organismos marinos incluyendo Gorgonaceae, Alcyonaceae, Stolonifera, Pennatulaceae, Nudibranchios y Poríferos. La briareina A (95) fue el primer compuesto caracterizado con esqueleto tipo briarano. Aislado por primera vez del octocoral indio *Briareum asbestinum* (suborden Scleraxonia, familia Briareidae) a comienzos de los 60, solo fue informado en 1977 (Burks), cuando su estructura pudo ser debidamente caracterizada por rayos-X. Asimismo, los datos espectroscópicos completos y la asignación total tanto de la briareina A como de las briareinas B-L, aisladas posteriormente, fueron informados por

⁵⁸ Cabrera, G.; Seldes, A.M. *J.Nat. Prod.* **1999**, 62, 759-760.

Rodríguez *et al* en 1996, partiendo de una cantidad de muestra mucho mayor (4Kg) de la misma especie, pero esta vez colectada en Puerto Rico.⁵⁹

La novedad y la complejidad estructural, así como las propiedades biológicas de estos compuestos han llamado la atención cuanto a sus potenciales aplicaciones en ecología, agricultura y medicina.



(95) Briareina A

Los diterpenoides de tipo briarano se caracterizan por la presencia de un esqueleto biciclo (8.4.0) tetradecano altamente sustituido, con un anillo de seis y otro de diez miembros. Frecuentemente tienen una γ -lactona en su estructura.

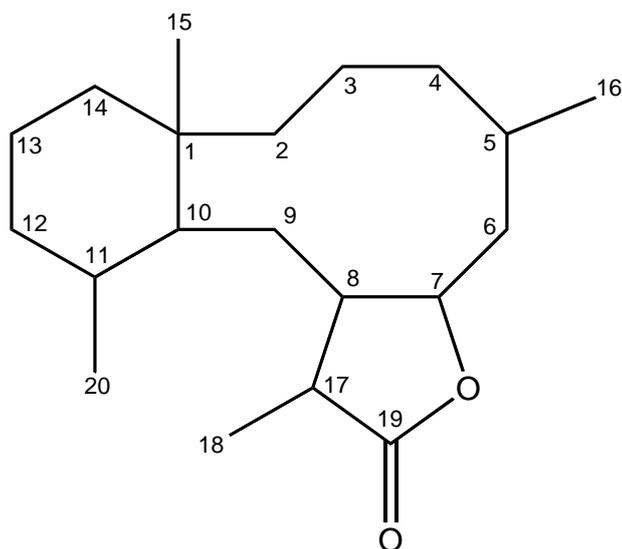


Figura 3: Numeración del esqueleto de los briaranos.

⁵⁹ Rodríguez, A. D.; Amirez, C.; Cobar, O. M. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 15-22.

Los compuestos de ese tipo pueden aparecer oxidados en casi todas las posiciones, sustituidos por hidroxilo, ésteres, epóxidos o halógenos entre otros. Los sustituyentes encontrados y sus respectivas posiciones más frecuentes se presentan organizados en la **tabla 1**.

Tabla 1: Grupos sustituyentes encontrados en los briaranos y sus posiciones más frecuentes.

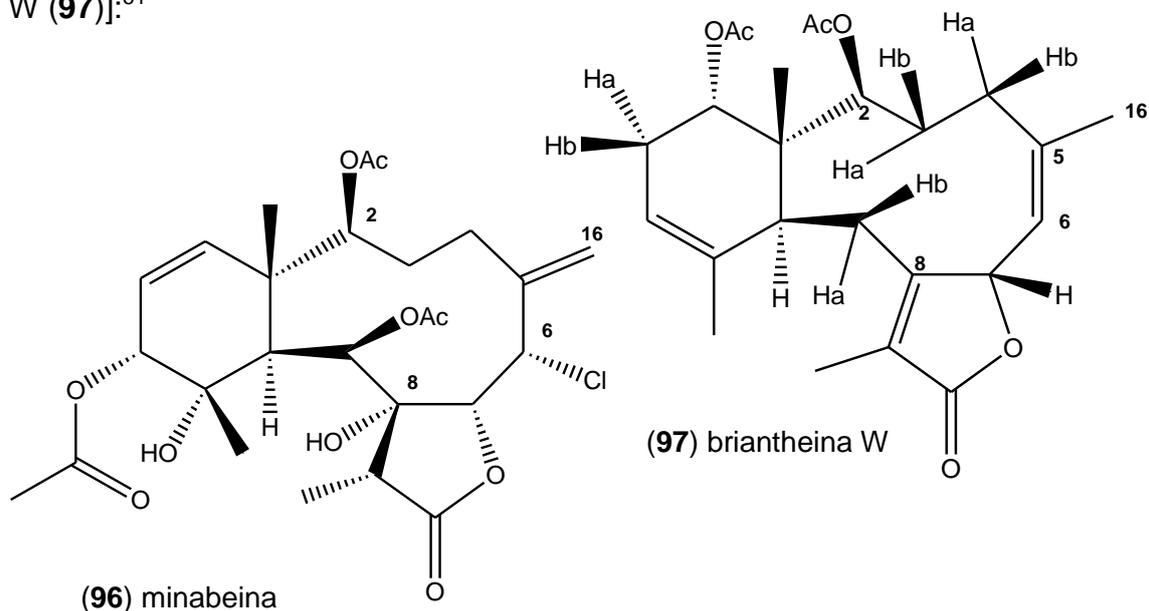
Sustituyente		Posición (C)
Ésteres (OH)	OAc	14, 2, 3, 13, 4, 16, 12, 9
	OCOC ₂ H ₅	14
	OCOC ₃ H ₇	3,2,12,14
	OCOC ₅ H ₁₁	12
	OCOC ₇ H ₁₅	12
	OCOCH ₂ OH	9
	OCOCH ₂ CHCH ₃ (OAc)	4
	OCOCH ₂ OAc	9
	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	13,2,14
	OCOC ₆ H ₅	12
	OCO(CH ₂) ₆ CH ₃	3,4
epóxido, olefina		8-17, 11-12, 13-14, 3-4,2-3,11-20,5-6
Cetona		12,13, 3,14,2
Ácido		12
Éter		4-8, 2-8,11-14, 5-9, 4-7
halógeno (Cl)		7,16,13,20
OH		8,16, 11, 17, 5,14,20,7
OMe		7

Los briaranos generalmente presentan señales de RMN anchas, lo que sugiere un equilibrio conformacional con temperatura de coalescencia cercana a la ambiente, que involucra frecuentemente cambios rotacionales en el anillo de diez miembros⁶⁰. El aumento de la temperatura acelera este equilibrio, provocando el angostamiento de las señales, aunque los cambios son más importantes para los átomos de la parte superior de la molécula. Este ensanchamiento se suele observar en algunos casos a temperaturas muy bajas (– 83° C), si bien en general las señales son anchas a temperatura ambiente y comienza a observarse el angostamiento a T > 60°.

Estudios cinéticos y conformacionales realizados sobre veinte estructuras de briaranos que presentaban señales anchas de RMN permitieron identificar

⁶⁰ Guerriero, A.; D'ambrosio, M.; Pietra, F. *Helv. Chim. Acta*, **1995**, 78, 1465.

algunos tipos de movimiento conformacional para el anillo de 10 miembros, que sugieren conformaciones preferenciales generales para esta clase de compuestos [ejemplificados con los compuestos minabeina (**96**) y briantheina W (**97**)].⁶¹



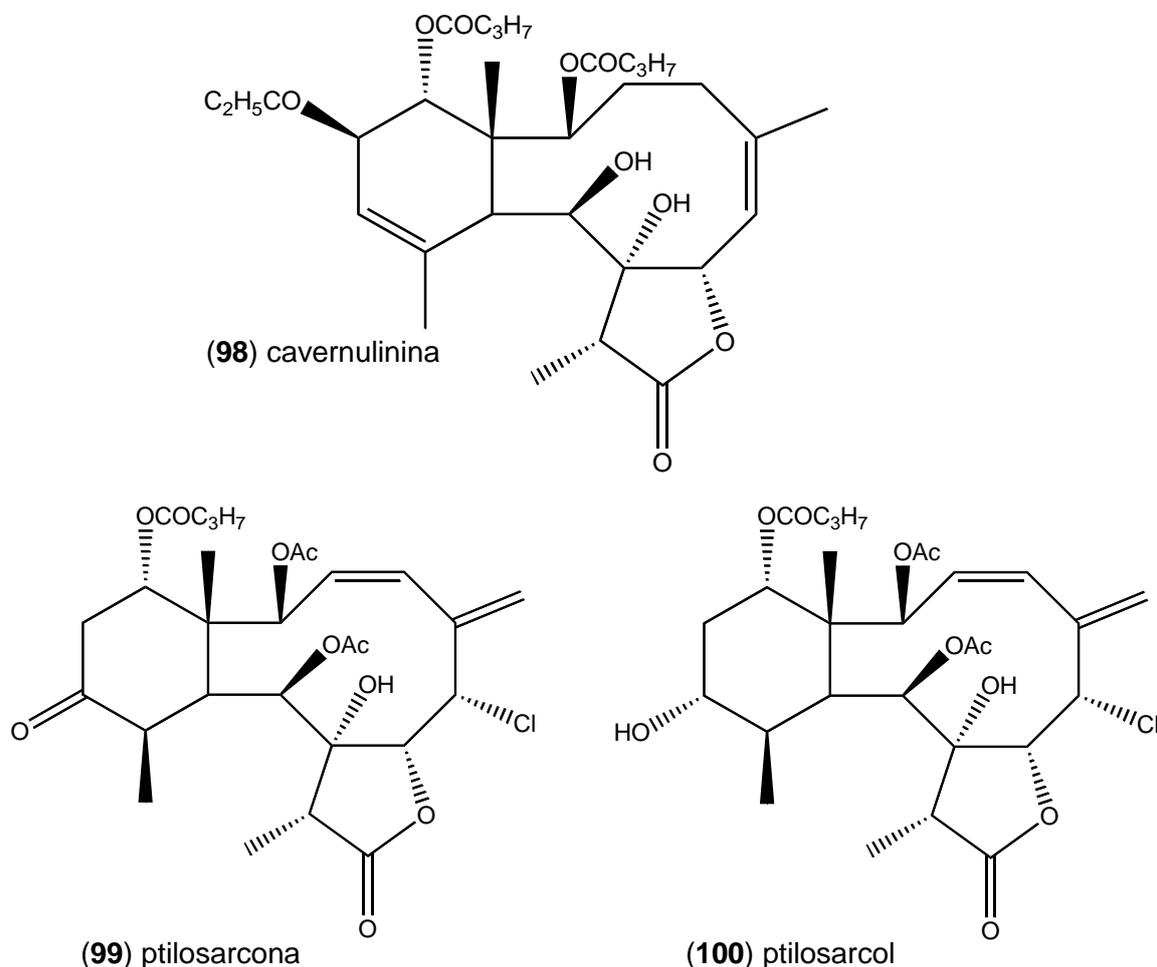
- La rotación lenta de los ángulos diedros C1-C2-C3-C4 resulta en una conformación con C2 ubicado hacia arriba y C3 hacia abajo. Esto lleva el grupo β del C2 a posicionarse de forma pseudoaxial; de otra forma, si ocurre lo contrario (C2 abajo y C3 arriba), dicho grupo se encuentra en posición pseudoecuatorial.
- En el caso de presentar un doble enlace (Z)-C5=C6 se puede observar un movimiento rápido hacia afuera y hacia adentro del anillo del metilo C16.
- En el caso de presentar un doble enlace exocíclico entre C5=C16 y además un átomo de cloro en C6, ocurren movimientos derivados de la rotación rápida de los ángulos diedros C5-C6-C7-C8, y en los conformeros el átomo de Cl puede ubicarse tanto pseudoaxial como pseudoecuatorial.

Los briaranos que poseen como sustituyente en la posición C14 un grupo butirato son raros, en general esa posición se encuentra esterificada con un grupo acetato. El primer caso de presencia de un grupo butirato en dicha

⁶¹ Chiasera, G.; Guerriero, A.; D'ambrosio, M.; Pietra, F. *Helv. Chim. Acta*, **1995**, 78, 1479

posición fue informado para el compuesto cavernulinina (**98**), aislado de la pluma de mar *Cavernulina grandiflora* (Veretillidae).⁶²

Posteriormente fueron informados dos briaranos tóxicos con grupos butirato en C14, la ptilosarcona (**99**) y el ptilosarcol (**100**), aislados de la pluma de mar del pacífico norte *Ptilosarcus gurneyi* (Pennatulidae).⁶³



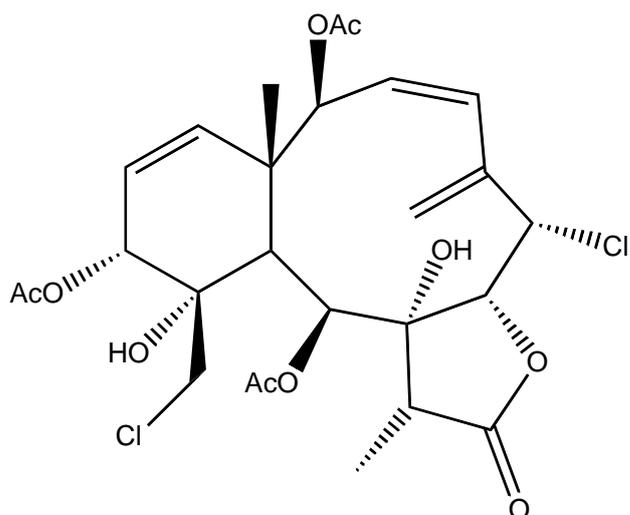
Es relativamente común encontrar briaranos que contienen un grupo halógeno, normalmente ubicado en la posición C6. Sin embargo, un ejemplo con dos grupos halógeno en las posiciones C6 y C20, el robustólido D (**101**), fue aislado de una gorgonia japonesa, *Ellisella robusta*.^{64,65}

⁶² Clastres, A.; Laboute P.; Ahond, A. ; Poupat, C. ; Potier, P.. *J. Nat. Prod.* **1984**, 47, 162.

⁶³ Hendrickson, R. L.; Cardellina, J. H. *Tetrahedron*, **1986**, 42, 6565.

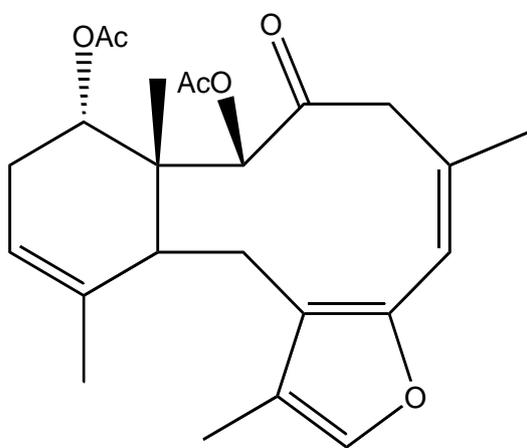
⁶⁴ Tanaka, C. ; Yamamoto, Y.; Otsuka, M.; Tanaka, J.; Ichiba, T.; Marriott, G.; Rachmat, R.; Higa, T. *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, 1368.

⁶⁵ Sung, P.-J.; Chiang, M. Y.; Tsai, T.; Su, J.-H.; Su, Y.-M.; Wu, Y.-C. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 12860.

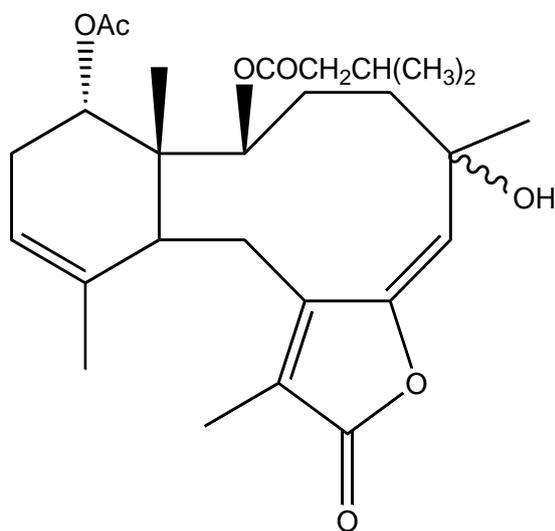


(101) robustolid D

En un caso raro, con un anillo furano en lugar de la lactona, fue un briarano aislado del octocoral *Scytalium tentaculatum* (Virgulariidae) de Australia. Dicho compuesto además presentaba un grupo carbonilo en C3 (102) como característica poco frecuente. También fue aislado de dicho coral otro briarano poco común que presentaba un grupo hidroxilo en C5 y un doble enlace entre C6 y C7 (103).⁶⁶



(102)

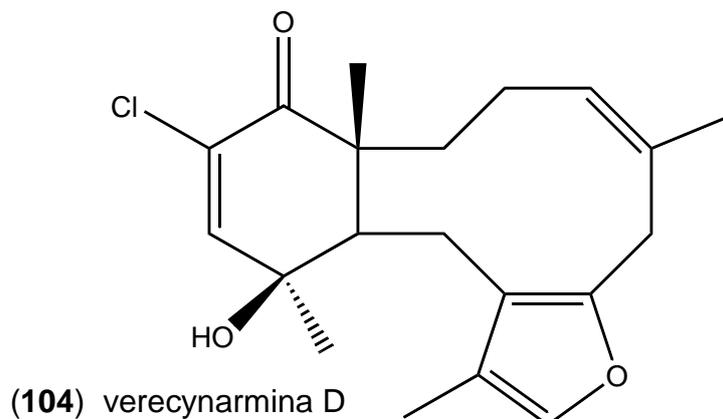


(103)

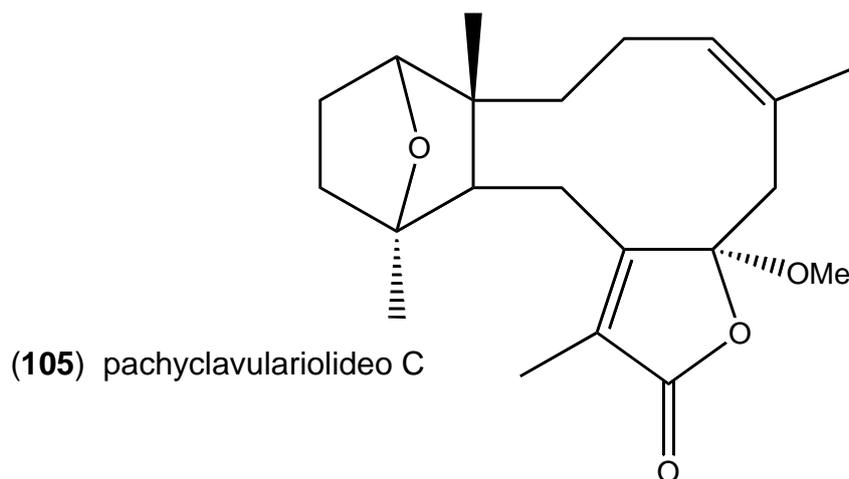
Otro ejemplo relacionado, es el briarano verecinarmina D (104), aislado tanto del nudibranquio mediterráneo *Armina maculata*, como de su presa, la

⁶⁶ Sung, P.-J.; Chiang, M. Y.; Tsai, W.-T.; Wu, Y.-C. *Tetrahedron* **2007**, **63**, 12860.

pluma de mar *Veretillum cynomorium* (Veretillidae). Dicho compuesto presenta un anillo furano, un grupo carbonilo en posición C14 y un cloro en C13.⁶⁷



Entre los Stoloníferos, fue aislado de *Pachyclavularia violacea* el briarano pachyclavulariideo C (105) que presentaba un grupo éter entre C11-C14 y un grupo α -OMe en C7.⁶⁸



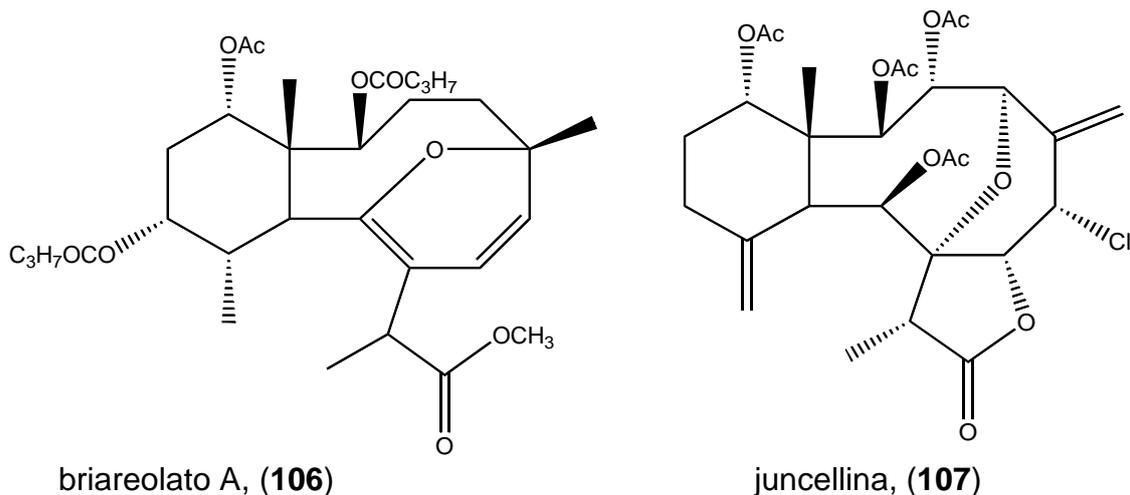
Otros ejemplos de briaranos que poseen grupos éter son el briareolato A (106)⁶⁹ (con éter entre C5-C9) y la juncellina (107)⁷⁰ (con éter entre C4-C8), ambos aislados de *Briareum asbestinum* (Briareidae) y de *Gorgonella umbraculum* (Ellisellidae), respectivamente.

⁶⁷ Sung, P-J; Sheu, J-H; Xu, J-P. *Heterocycles*. **2002**, 57, 535-579.

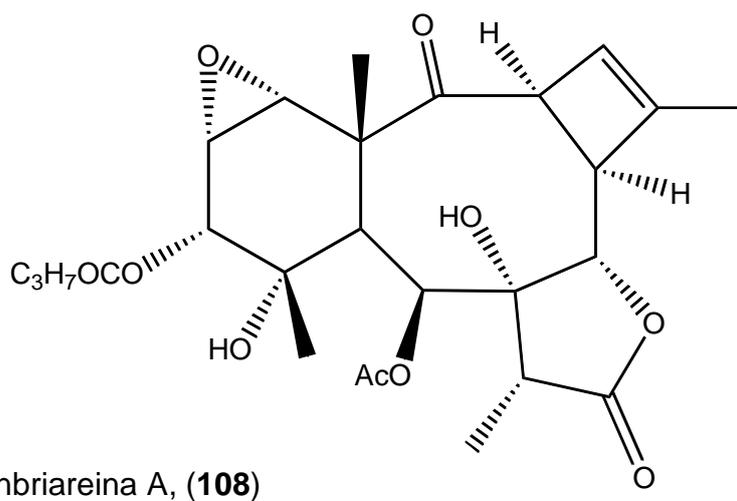
⁶⁸ Sung, P-J; Sheu, J-H; Xu, J-P. *Heterocycles* **2005**, 55, 195-204.

⁶⁹ Subrahmanyam, C.; Kulatheswaran, R.; Ward, R. S. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 1120.

⁷⁰ Maharaj, D.; Mootoo, B. S. ; Lough, A. J.; Mclean, S.; Reynolds, W. F. ; Tinto, W. F. *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 7761.



De una muestra de *B. asbestinum* colectada en caribe fue encontrado un briarano novedoso que presentaba un esqueleto triciclo(8.4.0.0)tetradec-4-eno, la ciclobutenbriareina A (**108**).⁷¹



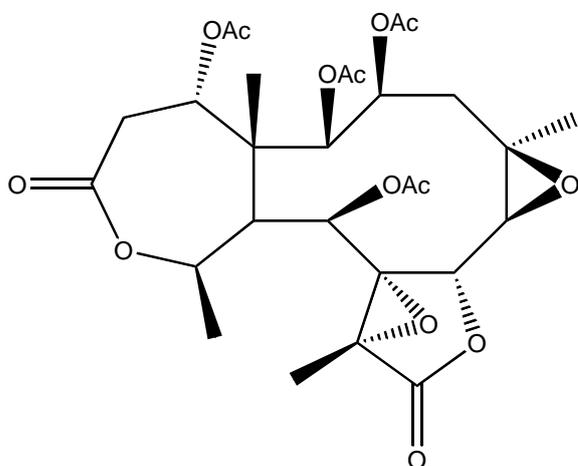
Más recientemente fue reportada la briaexcavatina A (**109**), el primer 11,12-secobriarano con una ϵ -lactona, aislado de la gorgonia *Briareum excavatum* colectada en Taiwan.^{72, 73}

⁷¹ González, N. et al. *J. Org.Chem.*, **2002**, 67, 5117-5123.

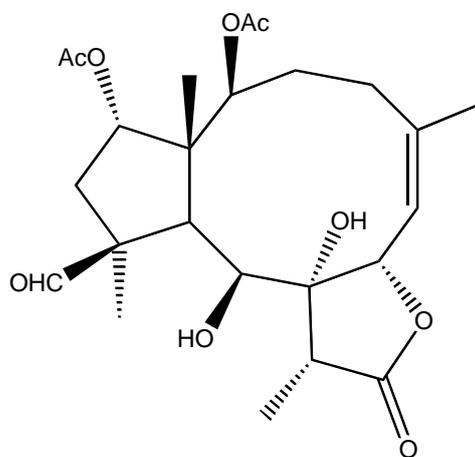
⁷² P.-J. Sung, C.-H. Chao, Y.-P. Chen, J.-H. Su, W.-P. Hu, And J.-H. Sheu, *Tetrahedron Lett.*, 47, 167, 2006.

⁷³ Sung, P.-J.; Chiang, M. Y.; Tsai, T.; Su, J.-H.; Su, Y.-M.; Wu, Y.-C. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 167-170.

Por otro lado, el milolido F (**110**) es un caso particular de briarano, aislado de *Briareum stechei*, ya que presenta una contracción del anillo A, con un sistema biciclo (8.3.0), además de poseer un grupo aldehído.



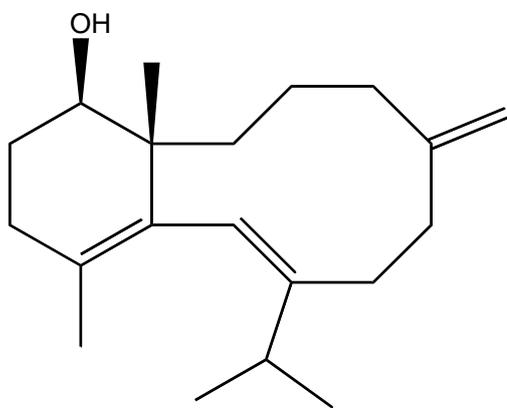
briaexcavatina A, (**109**)



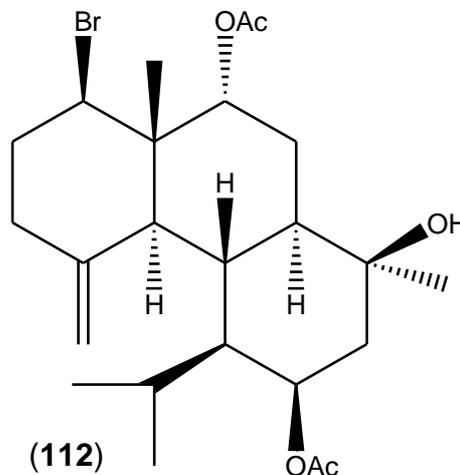
milolido F, (**110**)

Mientras la mayoría de los briaranos posee una variedad de grupos funcionales oxigenados, a partir de una especie de coral blando *Nephthea sp* (Nephtheidae) fue aislado un briarano poco común, ya que dicho compuesto resultaba muy poco funcionalizado, con un grupo β 14-OH y doble enlace entre C10-C11 (**111**).

Recientemente fue encontrado por primera vez un briarano tricíclico y bromado (**112**) en una especie mediterránea de angiosperma marina *Cymodocea nodosa*, el primer ejemplo de briarano encontrado en el reino vegetal.⁷⁴



(**111**)



(**112**)

⁷⁴ Roussis, V. *Tetrahedron* **2008**, 68, 1696-1702.

Las estructuras químicas de los briaranos han sido establecidas principalmente en base a análisis espectroscópicos, sin embargo, la elucidación estereoquímica de los grupos funcionales es problemática debido a la conformación flexible del ciclodecano. De hecho, son escasos los datos acerca de su configuración absoluta.⁷⁵ En los trabajos donde se pudieron elucidar completamente las estructuras, siempre se partió de grandes masas de material animal para obtener los compuestos en mayor cantidad. Esto es una dificultad, ya que la cosecha de grandes cantidades de biomasa para obtener compuestos en cantidad suficiente para su completa caracterización y realización de ensayos biológicos *in vivo* suele ser ecológicamente inviable. Por ejemplo, Hoshino *et al* (2005) para aislar 9 briaranos en cantidades entre 0.5-40g necesitaron extraer 10,5Kg de coral seco, para obtener 580g de extracto crudo.

Muchos de esos compuestos poseen interesantes actividades biológicas, tal como citotoxicidad, actividad antiinflamatoria, antiviral, insecticida, inmunomoduladora, reversión a la resistencia múltiple a drogas y *antifouling*.

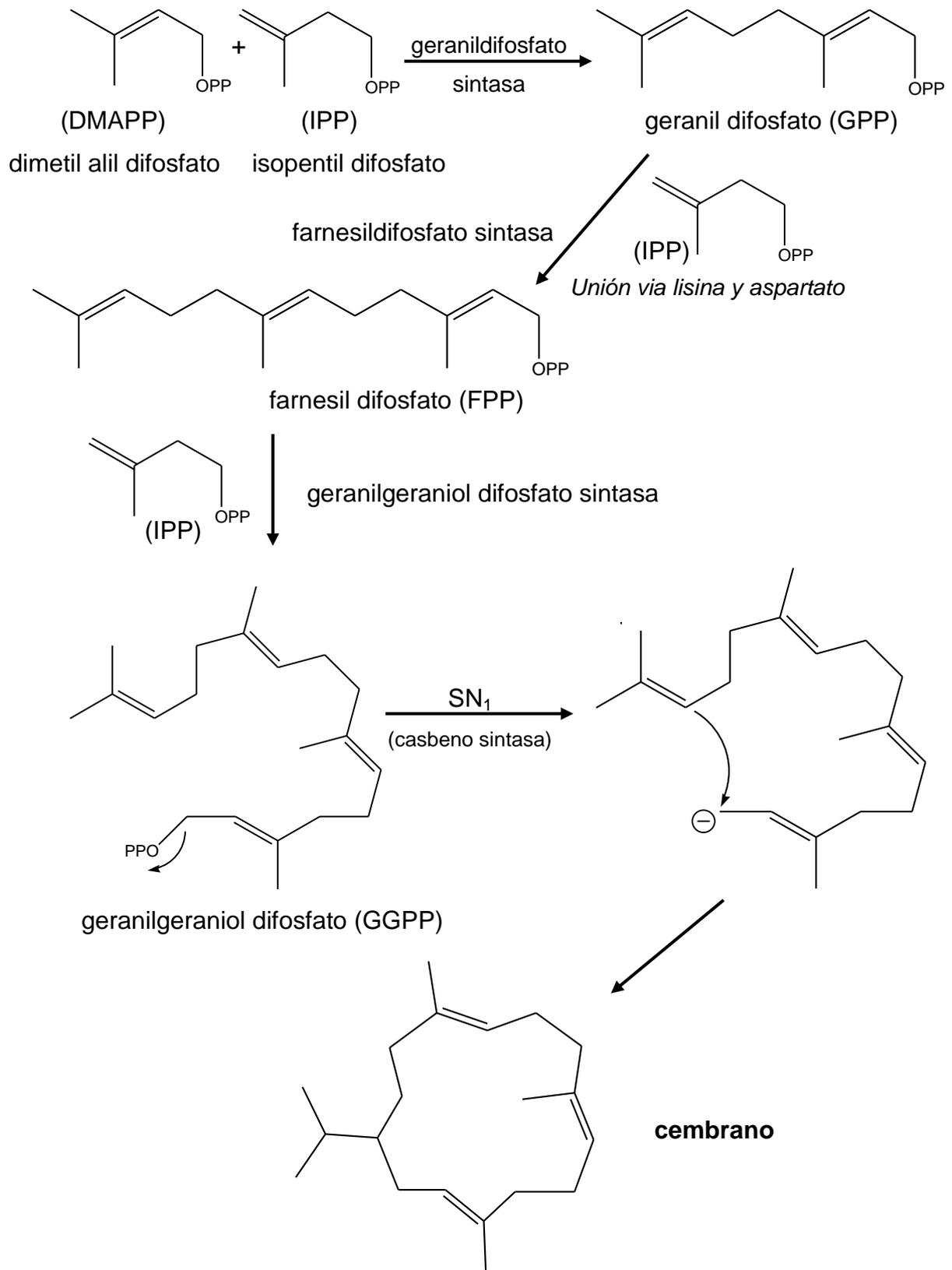
Si bien algunos estudios sintéticos han sido desarrollados, todavía no fue encontrada una ruta eficiente para la síntesis total de los briaranos.^{76, 77}

En cuanto a la biosíntesis de los briaranos, éstos tienen como precursores biosintéticos a los cembranoides, que son formados vía geranilgeranioldifosfato (**Figura 4**).

⁷⁵ Hoshino, A.; Mitome, H.; Tamai, S.; Takiyama, H.; Miyaoka, H.. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1328-1335.

⁷⁶ Hoshino, A. *et al.* *J. Nat. Prod.* **1995**, *36*, 8102-8106.

⁷⁷ Balasubramaniam, R. P.; Moss, D. K.; Wyatt, J. K.; Spence, J. D. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 7429-7444.



No existen trabajos relacionados específicamente a la biosíntesis de los briaranos, pero se puede tener una vía hipotética por medio de la ciclación de una molécula de cembrano entre los carbonos C3 y C8, seguido de diversas oxidaciones según el tipo de estructura molecular:

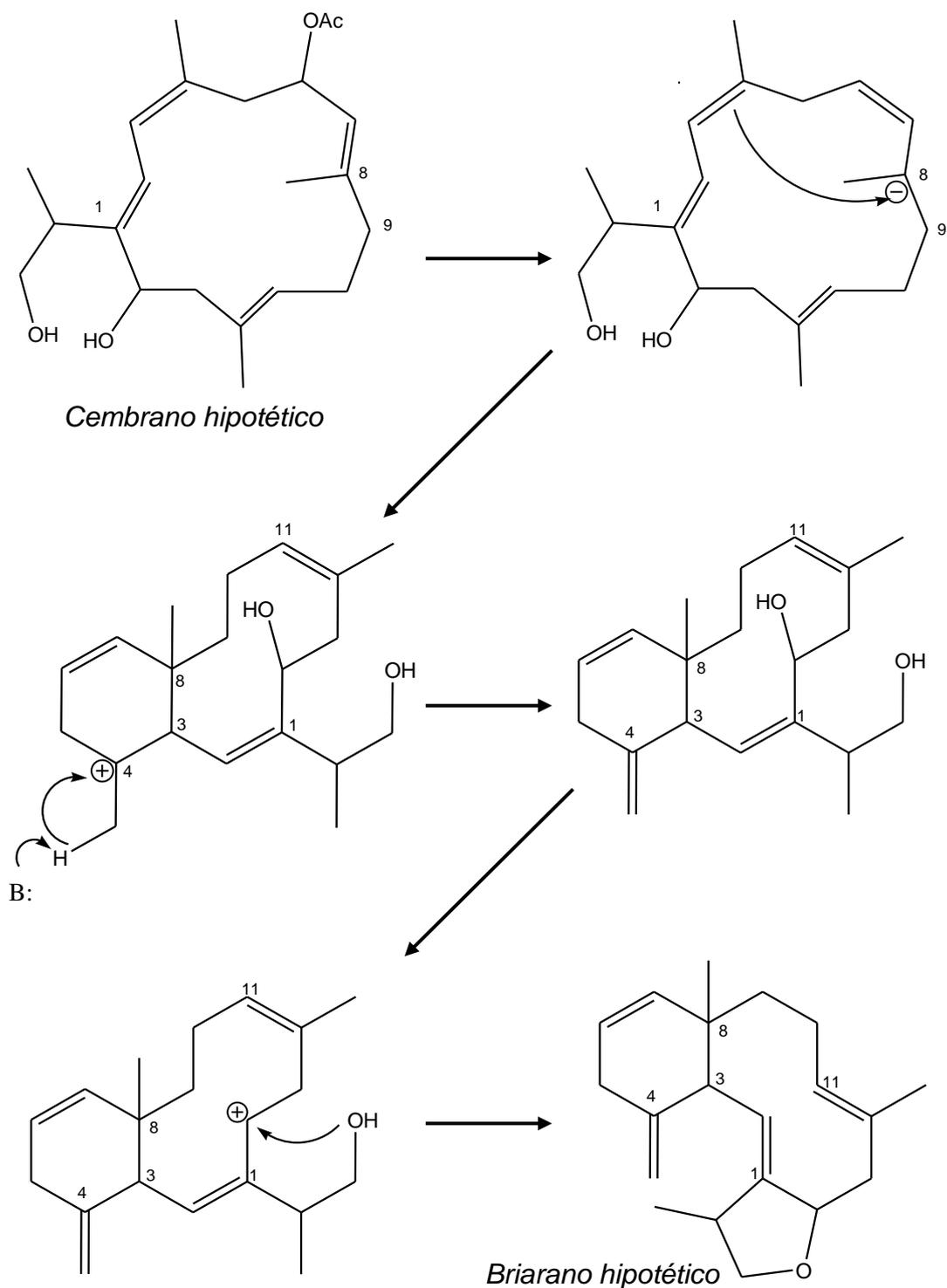


Figura 4: Esquema de la biosíntesis de los briaranos.

Diterpenos del tipo Dolabellano

Un esqueleto de diterpeno típico en metabolitos marinos, también hallado en octocorales es el dolabellano. Los dolabellanos son diterpenos que poseen un esqueleto biciclo[9.3.0] trans-fusionado (**Figura 5**).⁷⁸ Fueron aislados de las glándulas digestivas del molusco marino opisthobranchio *Dolabella californica*. También fueron encontrados en algas pardas de la familia Dictyotaceae,^{79,80} la cual sería probablemente la fuente dietaria de los compuestos hallados en moluscos herbívoros. Posteriormente fueron descritos para otros organismos marinos, como el octocoral *Eunicea caliculata*⁸¹ y el molusco *Aplysia dactylomela*.⁸²

En realidad, la historia de este interesante grupo de metabolitos empezó en 1975 cuando Borschberg describió el aislamiento de un diterpeno novedoso llamado β -araneoseno, del hongo *Sordaria araneosa*.⁸³

En 1976 Ireland encontró el mismo esqueleto en el molusco *Dolabella californica*, renombrando esa clase de diterpenos como dolabellanos. Muchas otras estructuras fueron aisladas con posterioridad, sumando una diversidad de grupos funcionales y actividades biológicas, lo que llevó diversos grupos de investigación a buscar rutas sintéticas para los dolabellanos. El sistema de anillos de los dolabellanos, que es caracterizado por su núcleo *trans*-biciclo [9.3.0] tetradecano, ocupa una posición importante en la biogénesis de una serie de diterpenos como fusicocanos, dolastanos y neodolastanos.

⁷⁸ Tringali, C., Piattelli, M., *J. Nat. Prod.* **1995**, 58, 697-704.

⁷⁹ Amico, V. *et al. Tetrahedron* **1980**, 36, 1409.

⁸⁰ Amico, V *et al. Phytochemistry* **1981**, 20, 848.

⁸¹ Look, S.A.; Fenical, W. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 129.

⁸² Gonzalez, A.G. *et al. Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 1075.

⁸³ Jenny, L; Borschberg, H-J. *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 715-731.

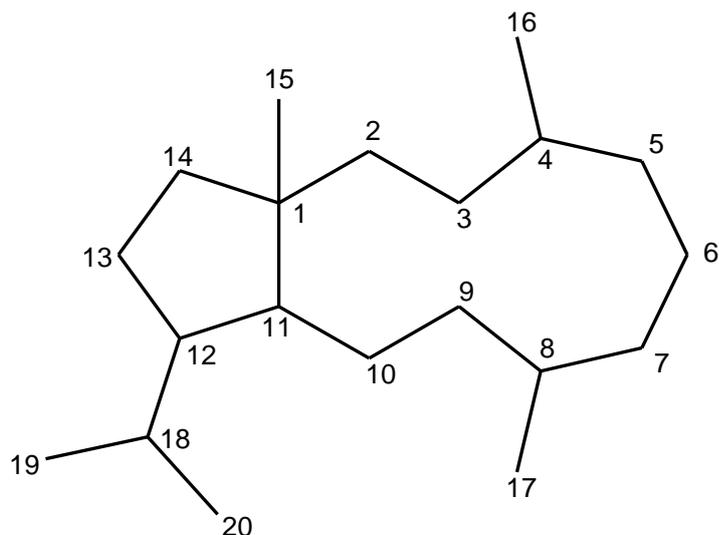


Figura 5: Numeración del esqueleto de los dolabellanos.

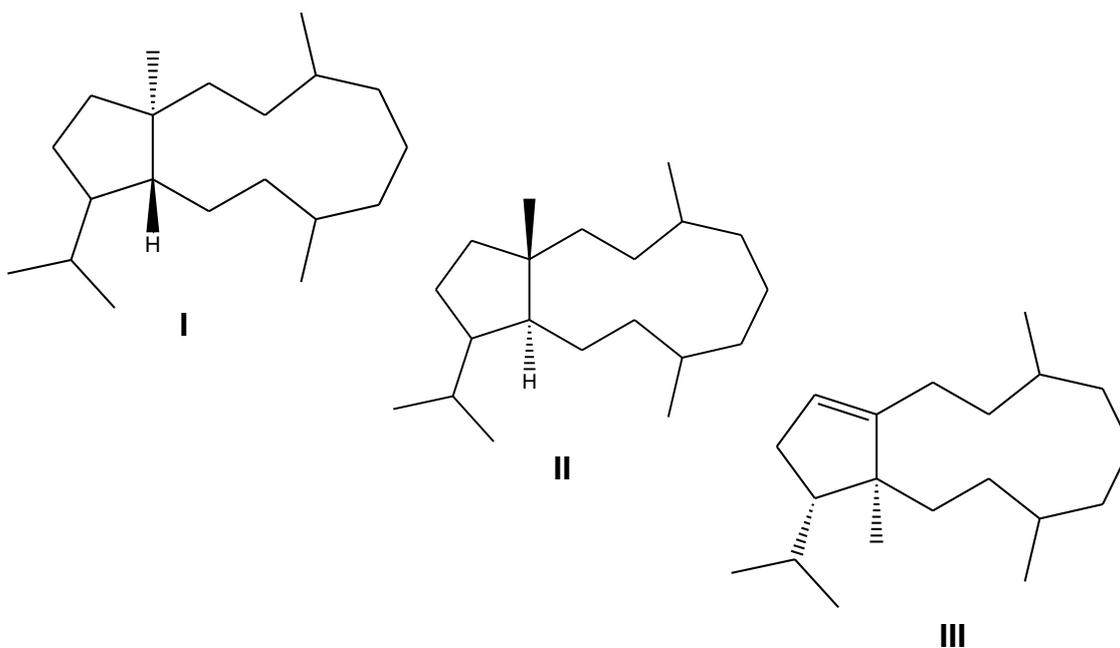
Si bien durante mucho tiempo se pensó que los dolabellanos eran casi exclusivos de organismos marinos, compuestos de este tipo fueron luego encontrados en algunas plantas primitivas de la familia Hepaticae (briófitas) y en algunas especies de plantas vasculares de la familia Meliaceae, como *Aglaia odorata*. Compuestos relacionados biosintéticamente también fueron aislados de hongos endofíticos. Las briofitas (musgos) se encuentran ubicadas taxonómicamente entre las algas y las pteridofitas (helechos) y presentan algunas vías de metabolismo secundario que también fueron encontradas en organismos marinos.⁸⁴

En el caso de los dolabellanos encontrados en plantas terrestres, éstos aparecen principalmente en las familias Hepaceae y Lophoziaceae. Los constituyentes químicos de las lophoziaceas son muy complejos y para algunas especies fueron reportados ciertos esqueletos terpenoidales muy similares a aquellos encontrados en organismos marinos, entre ellos el dolabellano (*Barbilophozia floerkeana*, *B. floerkei*, *B. hatcheri* y *B. lycopodioides*).

⁸⁴ Asakawa, Y. *Phytochemistry* **2004**, 65, 623-669.

Para los dolabellanos fueron descritas importantes actividades biológicas, tales como citotóxica, antibacteriana, antifúngica, antiviral, molusquicida, antiplasmoidal, ictiotóxica y fitotóxica.⁸⁵

Ya fueron descritos más de 150 compuestos relacionados a los dolabellanos, aislados tanto de fuentes marinas como terrestres, de los cuales 44% fueron aislados de algas, 23% de celenterados (corales blandos y gorgonias), 11% de moluscos marinos y 22% de hongos, musgos y plantas superiores. Es interesante notar que los dolabellanos aislados de corales y hongos (I) generalmente poseen la configuración absoluta en C1 y C11 opuesta a aquellos encontrados en esponjas, moluscos, algas, musgos o plantas superiores (II), mientras que los neodolabellanos (III) son más bien raros y se encuentran exclusivamente en los corales^{86,87}



Los primeros dolabellanos encontrados en el molusco *Dolabella californica* presentaban oxidadas las posiciones C-18, C-10 y C-8 y diferían en el número y en las posiciones de los hidroxilos y de los grupos acetato (**113**, **114**, **115**).

^{88,89}

⁸⁵ Garzon, S.P. et al. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1359-1359.

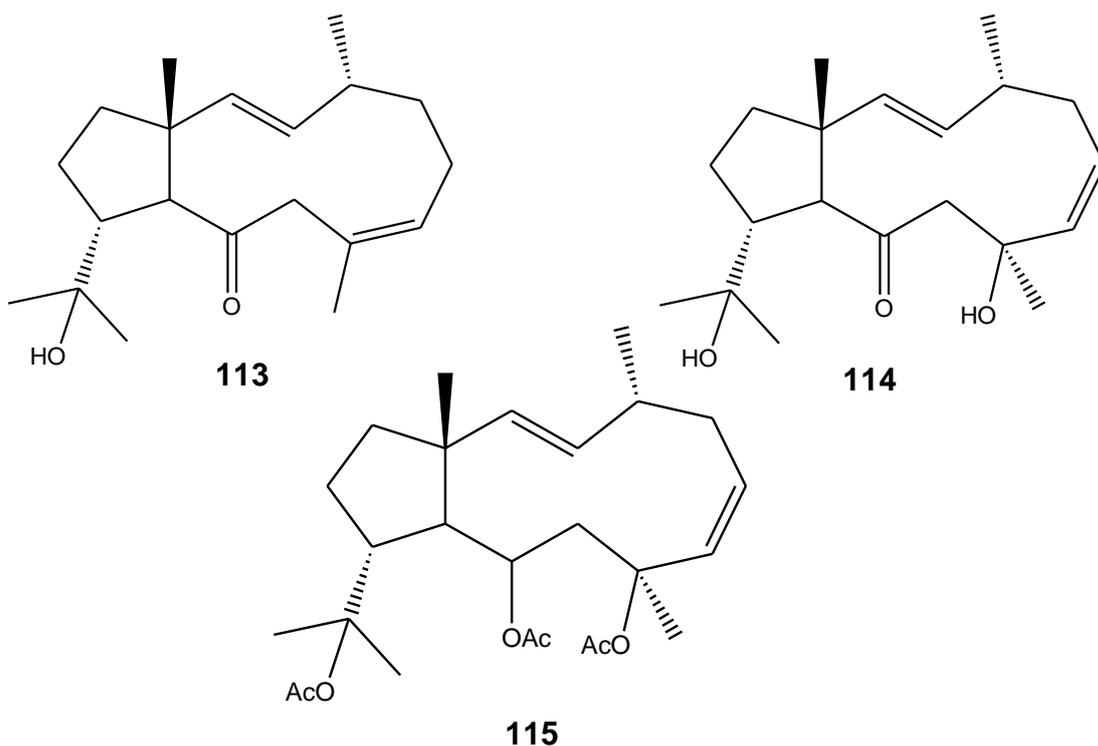
⁸⁶ Rodríguez, A.; González, E.; Ramírez, C. *Tetrahedron* **1998**, 54, 11683.

⁸⁷ Hiersemann, M.; Helmboldt, H. *Top Curr Chem.* **2005**, 243, 73-136.

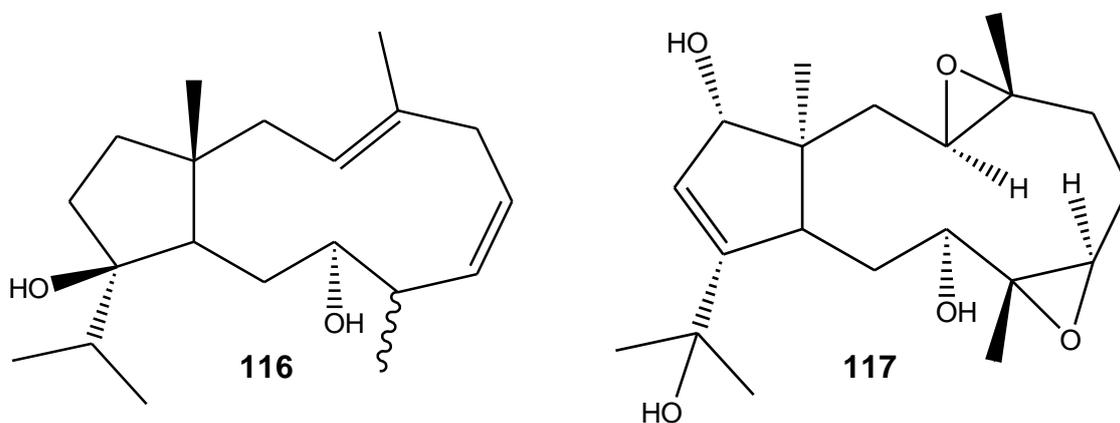
⁸⁸ Ireland, C.; Faulkner, D.; Finer, J.; Clardy, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 4664.

⁸⁸ Ireland, C.; Faulkner, D. *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 3159-3162.

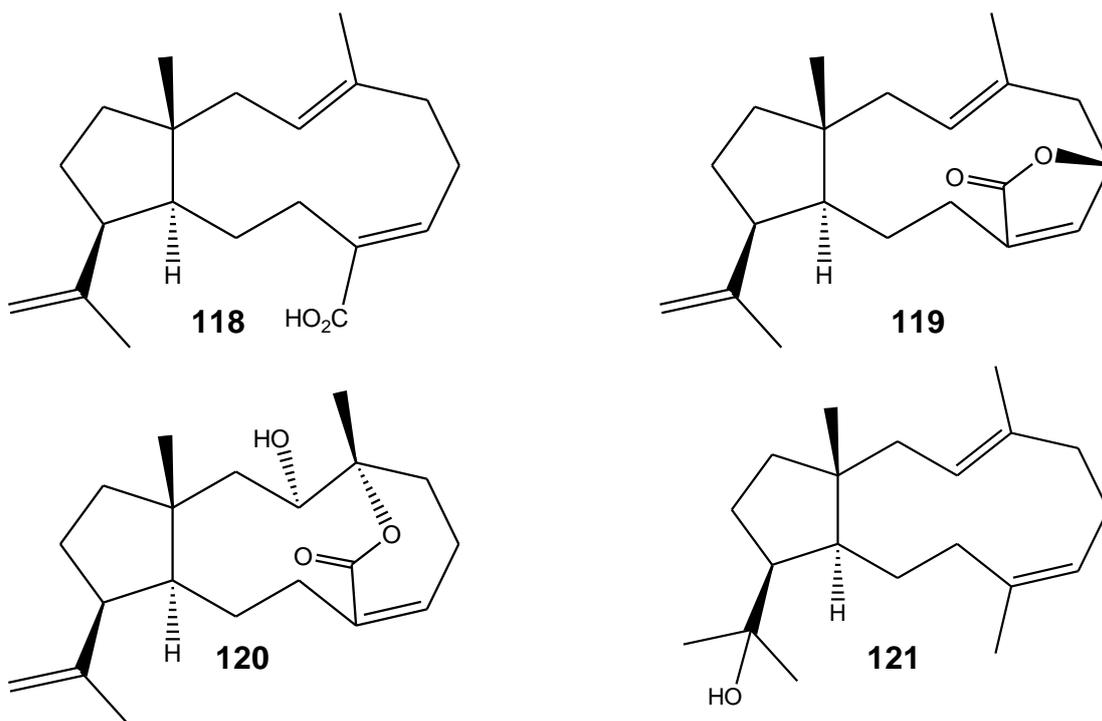
⁸⁹ König, G.; Wright, A. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 1529-1538.



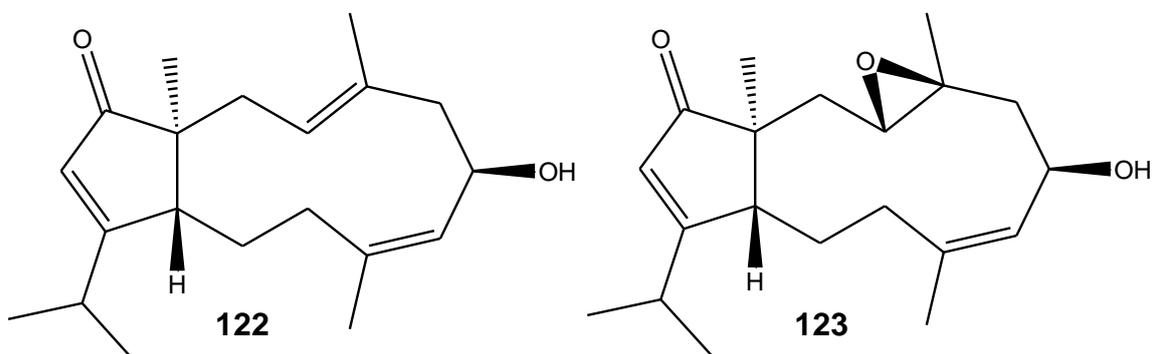
Los dolabellanos reportados para algas pardas del género *Dictyota* suelen presentar oxidación en el C12 (**116**), C9 y C14 (puede ser una cetona, acetato o hidroxilo), o presentar grupo epóxido entre C8-C7 y C3-C4 (**117**). Además presentan variada estereoquímica en los metilos así como en la posición C1.



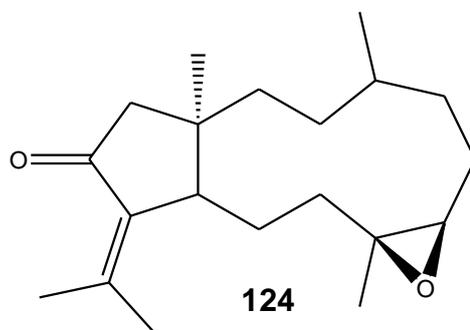
Tres dolabellanos (**118-120**) fueron aislados de la madera de *Trichilia trifolia* (Meliaceae) colectada en México (2000). La conformación *cis* entre el grupo isopropenilo en C12 y el grupo metilo en C15 es poco común y fue encontrada anteriormente en el compuesto (**121**) aislado del musgo *Pleurozia gigantea*.



También fueron informados dolabellanos aislados del hongo *Stachybotrys chartarum* cultivado en arroz. (122-123).⁹⁰



Para las gorgonias del Caribe *Eunicea calyculata* y *E. laciniata* fueron reportados dolabellanos oxidados en las posiciones C13, con epóxido entre C7 y C8 (124).^{91,92}

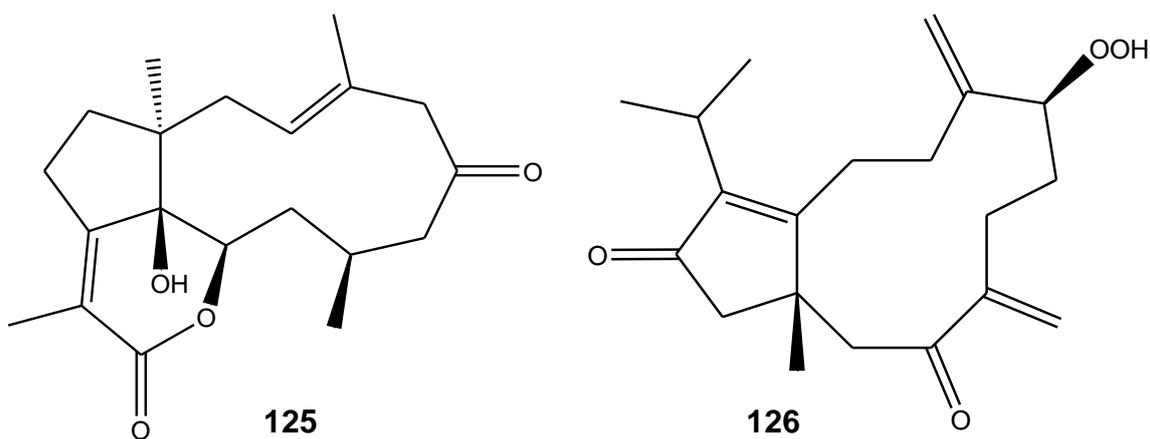


⁹⁰ Jarvis, B.B. et al *Phytochemistry* **2000**, 55, 663-673.

⁹¹ Look, S.A., Fenical, W., *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 4129.

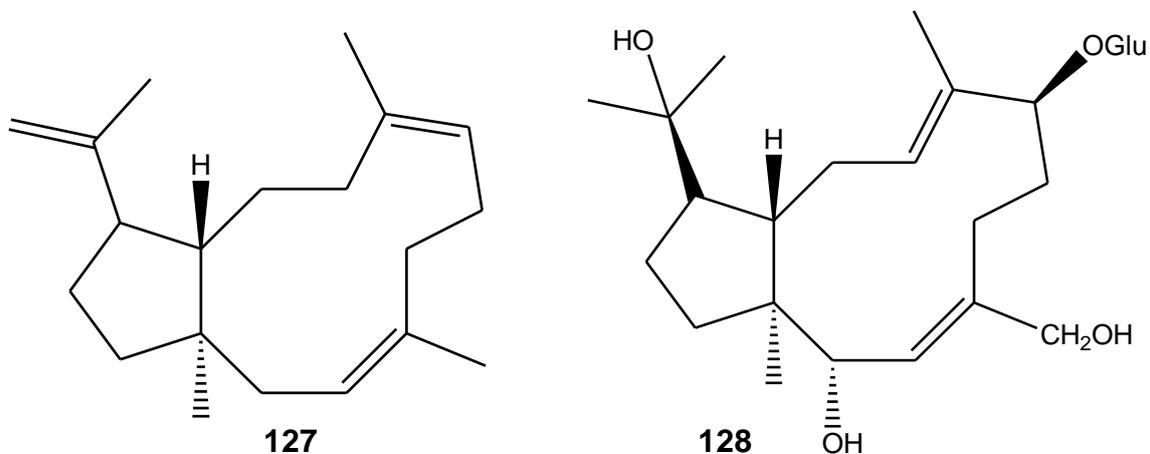
⁹² Shin, J., Fenical, W. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 3392-3398.

Un dolabellano de tres ciclos, clavirolideo A (**125**) fue descrito para el coral blando *Clavularia viridis*. Posteriormente algunas dolabellanolactonas relacionadas, así como un dolabellano con un grupo hidroperóxido (**126**) fueron aislados de *Clavularia sp* colectada en China y de la especie *Clavularia koellikeri* colectada en Japón.^{93, 94}



En una investigación sobre el aceite esencial de la planta *Cyperus alopecuroides* (Cyperaceae) se reveló la existencia del dolabellano (**127**). También fueron encontrados dolabellanos en *Casearia membranacea* (Flacourtiaceae), un árbol originario de Taiwan.

Por otro lado, un glucósido de dolabellanos (**128**) fue aislado de un arbusto egipcio, *Chrozophora oblicua*, cuyo extracto acuoso es utilizado popularmente como hipoglucemiante.⁹⁵



⁹³ Shin, J.; Fenical, W. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 3392-3398

⁹⁴ Su, J.; Zhong, T; Shi, K. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2337-2344

⁹⁵ Rodríguez, A. D. *et. al. Tetrahedron* **1998**, 54, 11683-11729.

Biosíntesis de dolabellanos

La biosíntesis de diterpenoides genera gran diversidad estructural. Varios centenares de diterpenos macrocíclicos, bicíclicos y policíclicos han sido encontrados en microorganismos, plantas y animales marinos y algas. Todos son biosintetizados por una vía anabólica que utiliza un único sustrato aquiral, geranilgeranioldifosfato. La estructura de los diterpenos es a menudo típica de ciertas familias, géneros o especies de plantas o animales.

Muchos estudios han sido llevados a cabo sobre la biología molecular de las diterpeno sintasas (ciclasas), sin embargo, relativamente poco se conoce sobre las ciclasas que producen los dolabellanos y dolastanos. Así, se asume que el geranilgeranioldifosfato (**I**) es inicialmente ionizado por medio de un proceso enzimático, iniciado por un catión (**Figura 6**).

La primera ciclación genera el catión vilsilo (**III**) el cual sufre una segunda ciclación para generar el catión dolabellilo (**IV**). La pérdida de un protón o el ataque nucleofílico por el agua produce el esqueleto dolabellano (**V, VI**), el cual a su vez podrá sufrir modificaciones posteriores, como por ejemplo oxidaciones enzimáticas, etc.

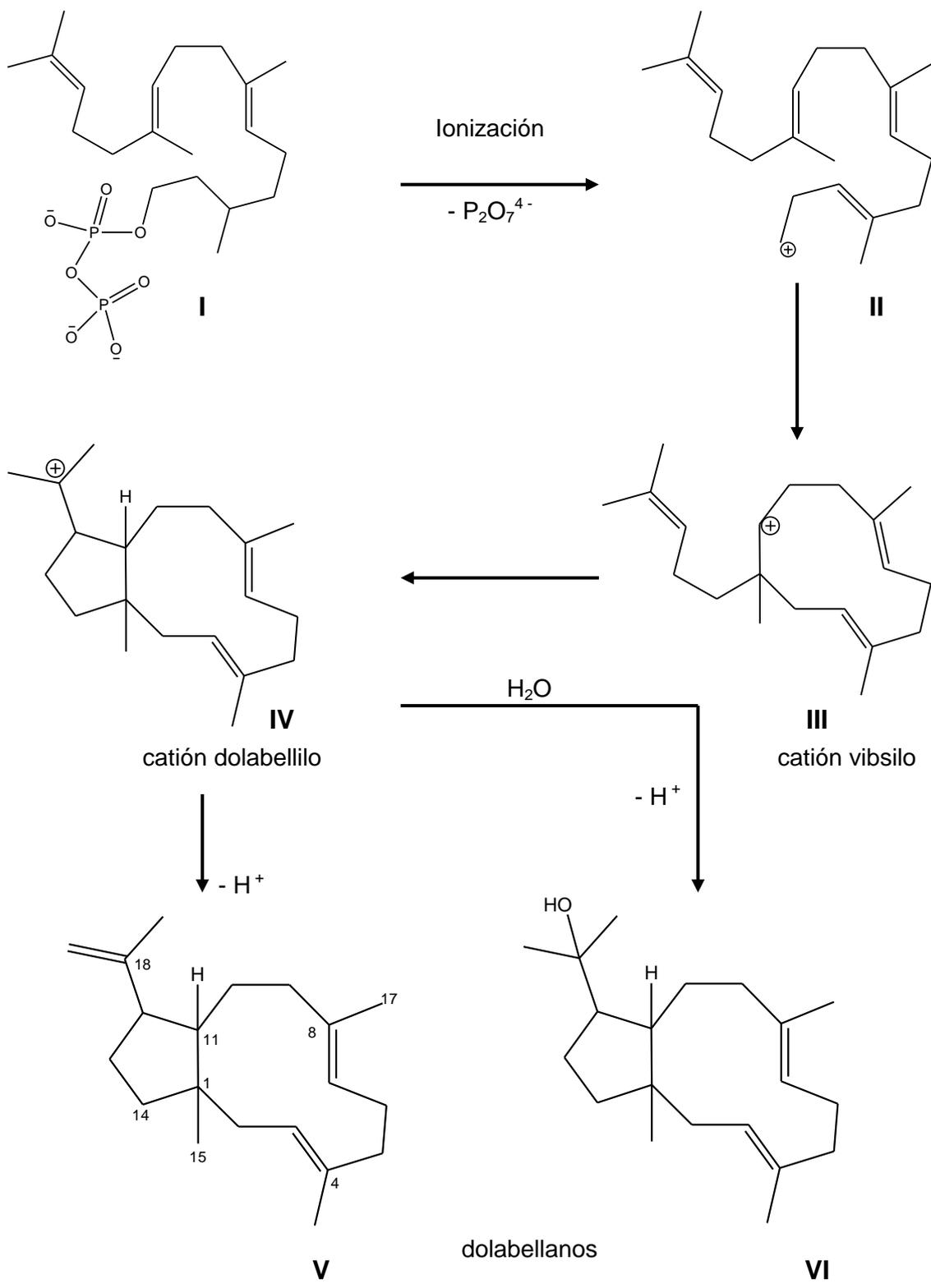


Figura 6: Ruta biosintética de los dolabellanos.

El catión dolabellilo a su vez puede ser transformado a un catión neodolabellilo (**VII**) por medio de una serie de reordenamientos [1,2]-sigmatrópicos (**Figura 7**). La subsiguiente pérdida de un protón a partir del catión neodolabellilo (**IX**) genera el esqueleto neodolabellano (**X**). La pérdida de protón desde los cationes intermedios (**VII, VIII**) lleva a la formación de dolabellanos (**XI-XII**) con un doble enlace en el anillo de ciclopentano.

La secuencia de ciclación inducida por ionización puede ser seguida por una ciclación inducida por protón. En ese caso, la protonación del doble enlace C7-C8 de **XII** genera el catión dolabellilo (**XIV**) que es transformado por medio de una ciclización transanular entre C3 y C8 en un catión dolastilo (**XV**), el cual luego por una desprotonación del C15 originará el esqueleto dolastano.⁹⁶

⁹⁶ Hiersemann, M; Helmboldt, H.. *Top Curr Chem.* **2005**, 243, 73-136.

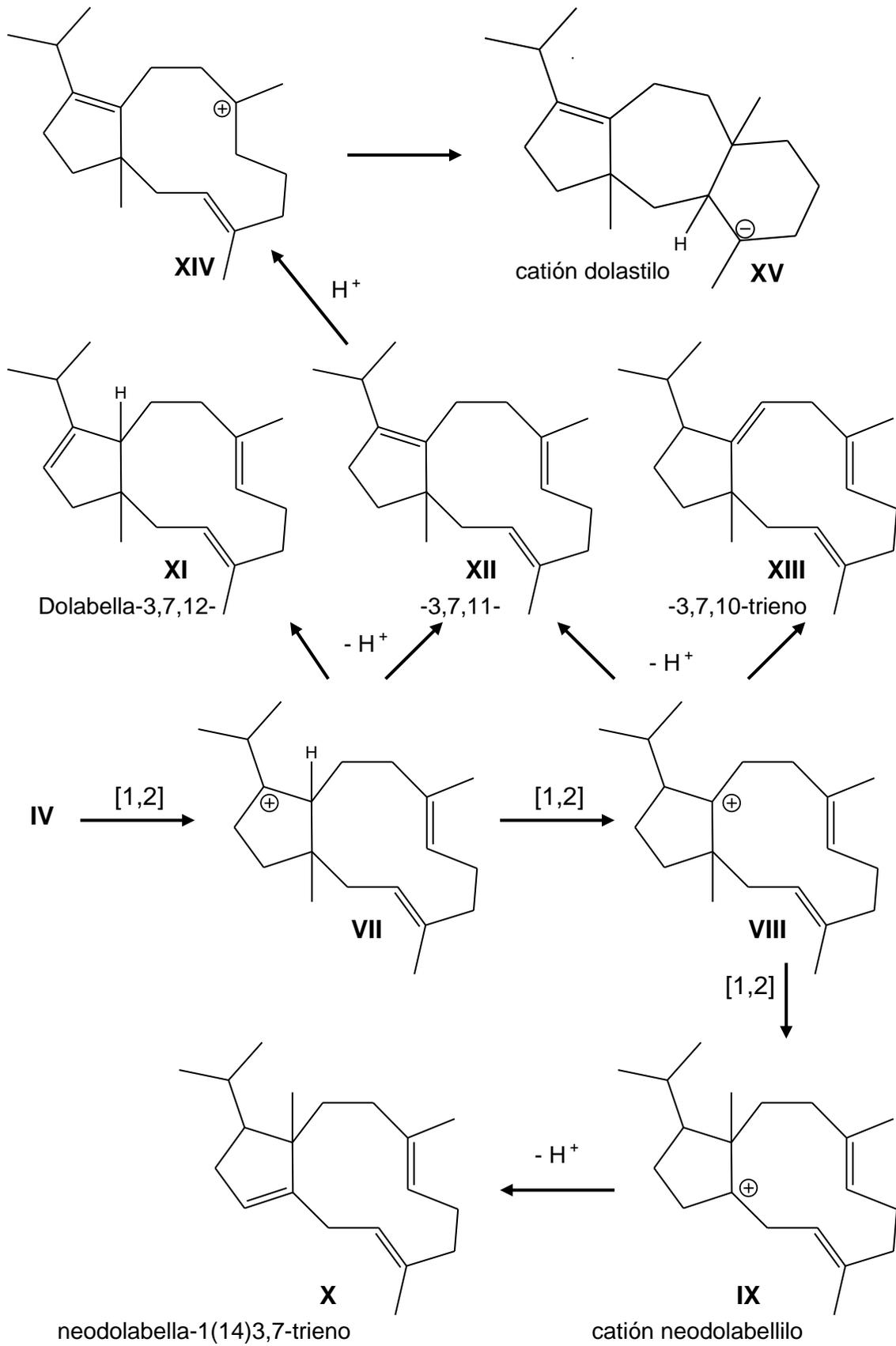


Figura 7: Biosíntesis de neodolabellanos y dolastanos.

Las dos especies de octocorales estudiadas en esta tesis (*Renilla reniformis* y *Convexella magelhaenica*) son clasificadas según el esquema abajo:

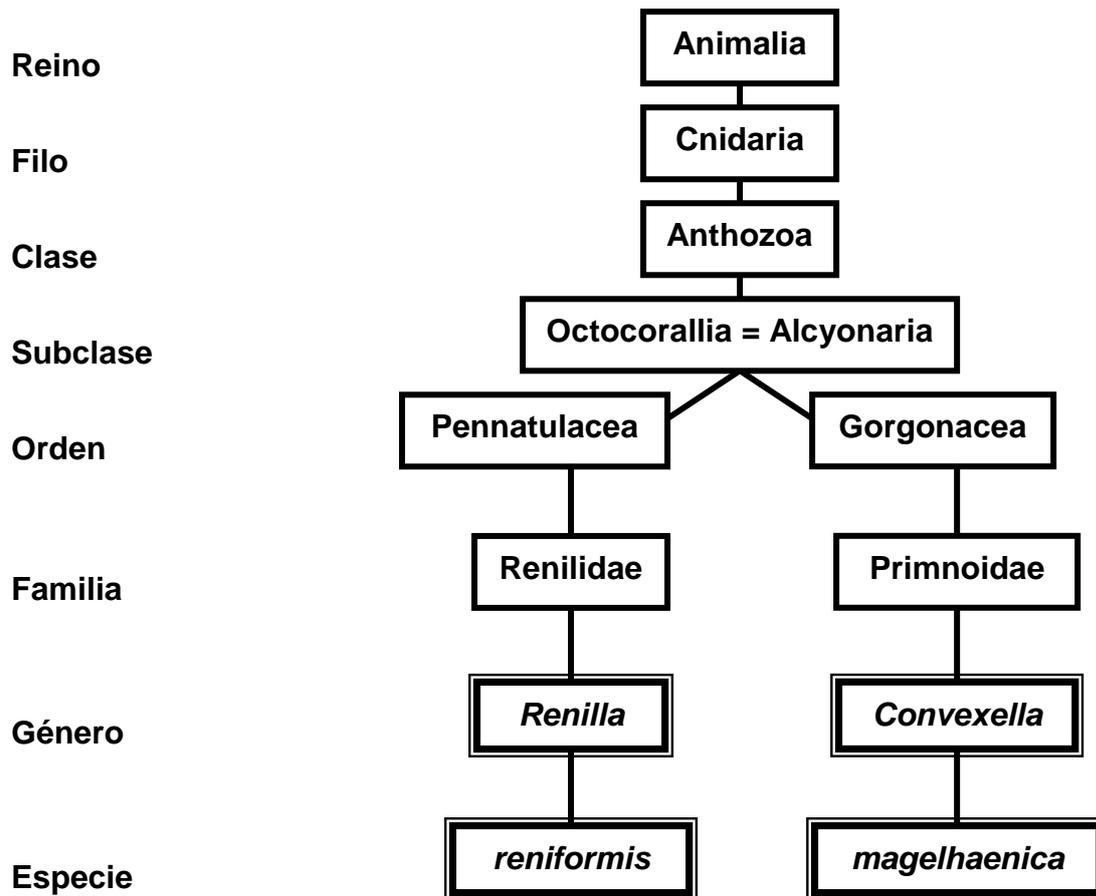
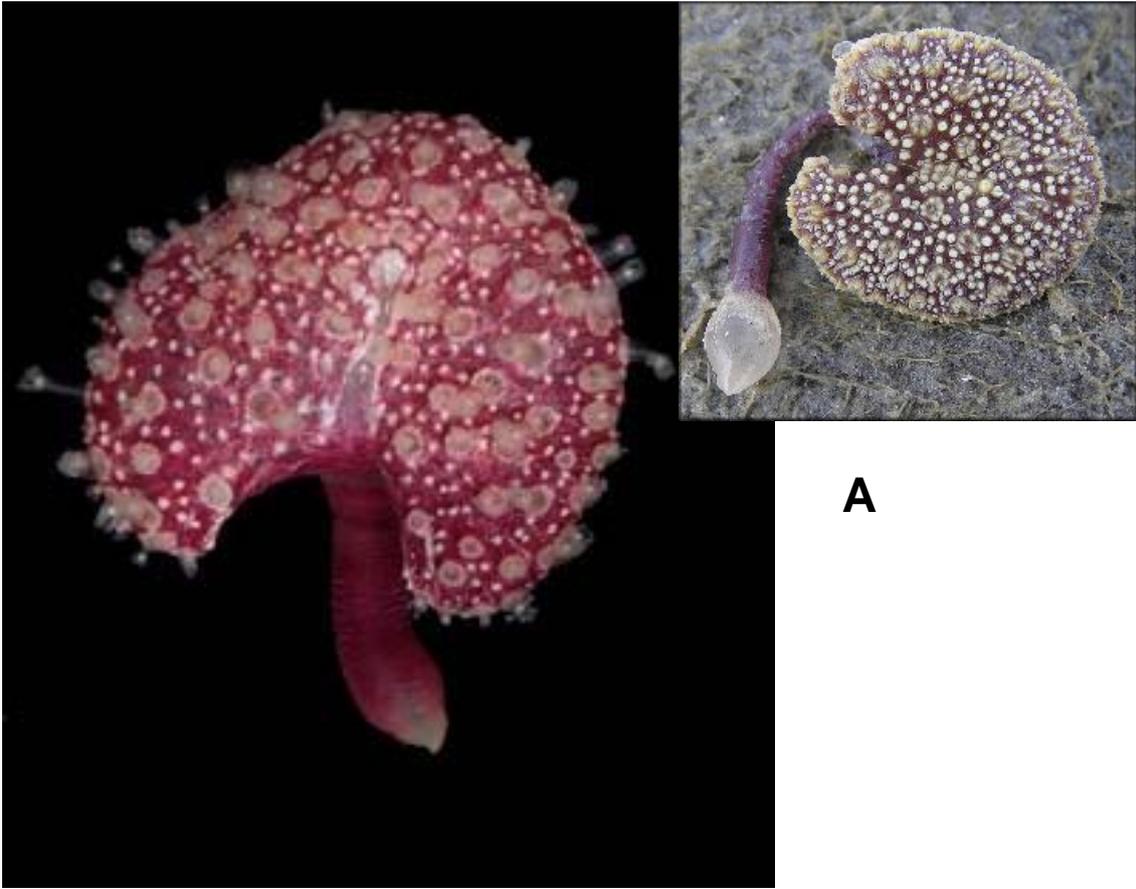
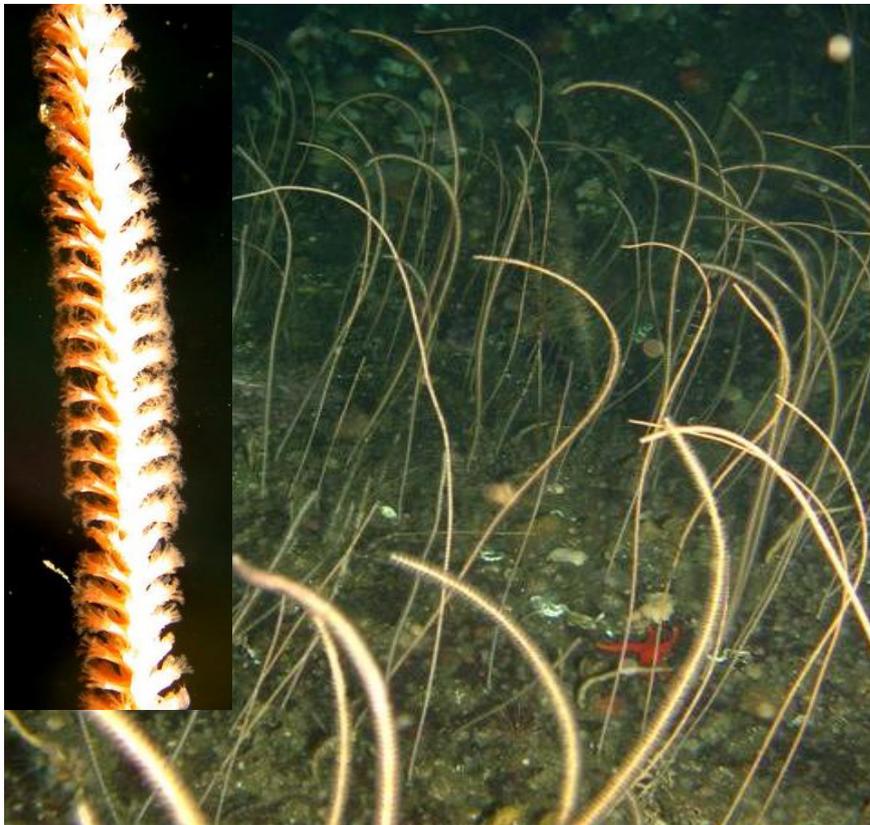


Figura 8: Clasificación de los octocorales estudiados en esta tesis.



A



B

Figura 9: *Renilla reniformis* (A) y *Primnoella* sp. (B).

La especie *Renilla reniformis*

El género *Renilla* incluye seis especies endémicas para el continente americano, distribuidas tanto en el Pacífico como en el Atlántico, *Renilla muelleri*, *R. koellikeri*, *R. musaica*, *R. octodentata*, *R. tentaculata* y *R. reniformis*.⁹⁷

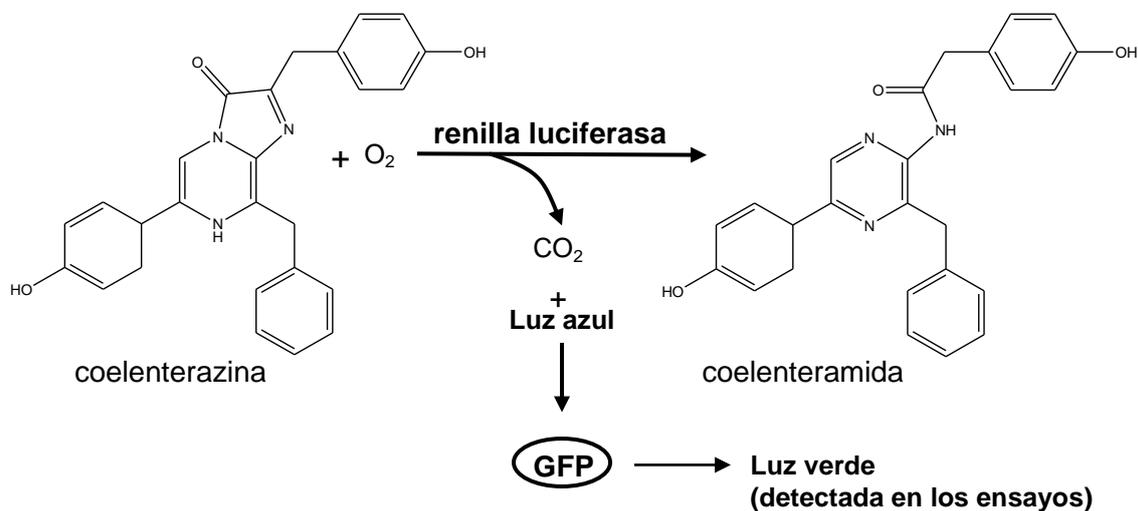
El octocoral *Renilla reniformis* (**Figura 9**) fue identificado por primera vez bajo la sinonimia *Pennatula reniformis* (Pallas) en 1766. Es conocido por el nombre de “sea pansy” o pensamiento de mar, debido a su forma parecida a la de la flor ornamental de mismo nombre.

Morfológicamente *Renilla reniformis* se compone de una colonia con forma de corazón, sin ramificaciones, y se sostiene por un pedúnculo de 1,8 cm de longitud. El color de las colonias incluye varios tonos de rosa y violeta. Las colonias pueden ser encontradas en sistemas intermareales arenosos, así como en hábitats marinos de mayor profundidad con fondos formados por sedimentos blandos.

Renilla reniformis es un octocoral compuesto por un conjunto de pólipos con distintas formas y funciones. Tiene un pólipo gigante que forma el pedúnculo, que puede dilatarse para fijar mejor la colonia al fondo arenoso. Su cuerpo en forma de hoja lleva a su vez muchos pólipos alimentarios pequeños y en forma de anémonas. Tiene además otro grupo de pólipos que forman una válvula externa que elimina agua con la finalidad de “desinflar” la colonia. Esto es útil en los casos en que la colonia se encuentre asentada a baja profundidad. Los pequeños puntos blancos entre los pólipos alimentarios son otros pólipos que actúan como una bomba para expandir la colonia desinflada. Los pólipos alimentarios segregan un mucus que permite atrapar organismos diminutos suspendidos en el agua. La estructura semirígida de las colonias proviene de las espículas de carbonato de calcio presentes a lo largo del tejido.

⁹⁷ Perez, C.D.; Ocampo, F.C. *Journal of Natural History* **2001**, 35, 169-173.

Este coral es bien conocido por su bioluminiscencia; cuando el animal es molestado ocurre una reacción quimioluminiscente que genera una luz azul que en seguida es transformada en una luz verde por acción de dos proteínas: la luciferasa (emisor primario) y la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*). La renilla-luciferasa es una proteína de 36kDa que cataliza la oxidación de la coelenterazina (su cromóforo) para producir una luz azul de 480nm. La luciferasa en su estado excitado transfiere energía no-radioactiva a la GFP (que tiene un fluoróforo interno formado por residuos de ser-tyr-gly) que expresa bioluminiscencia como una luz verde brillante (510nm) muy intensa que aparece por toda la superficie de las colonias del coral.



Por este fenómeno, la GFP es utilizada en ensayos de biología molecular como indicador para observar la expresión de genes y otros eventos celulares en tiempo real, tales como actividad de receptores, transducción intracelular de señales, interacciones entre proteínas, etc.^{98,99}

⁹⁸ Loening, A.; Fenn, T.D.; Gambhir, S.S. *J. Molecular Biology* **2007**, 374, 1017-1028.

⁹⁹ Inouye, S.; Sasaki, S. *Febs Letters* **2006**, 580, 1977-1982.

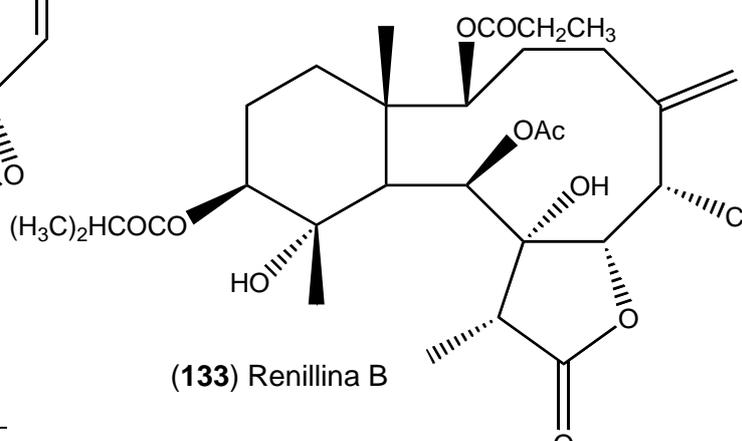
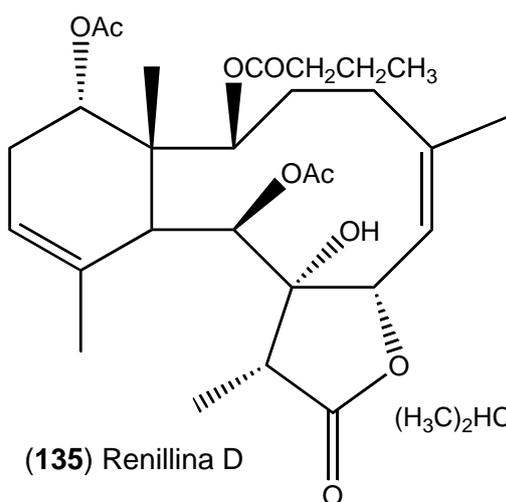
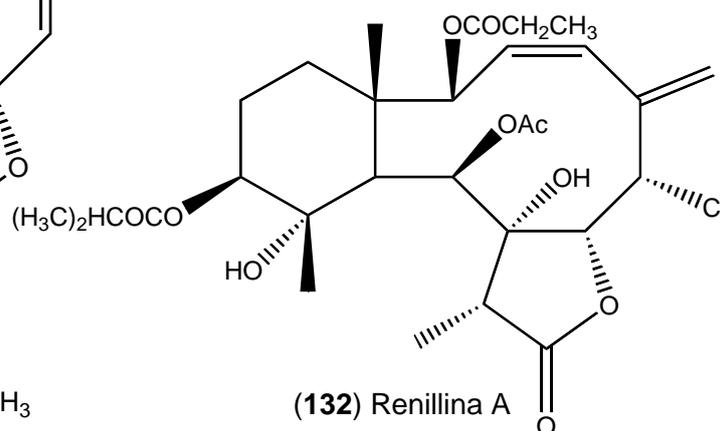
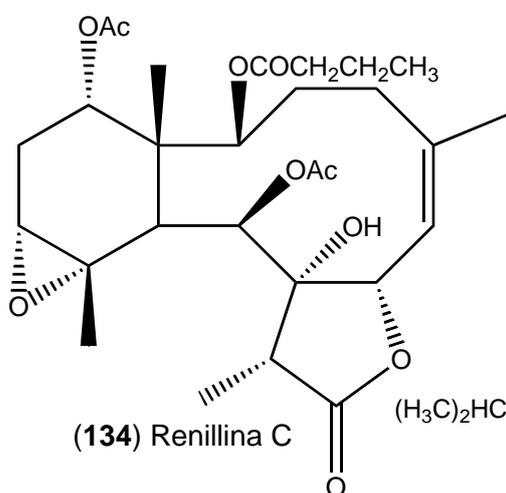
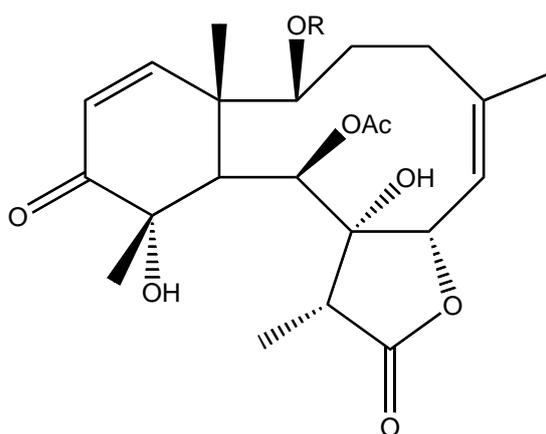
Antecedentes de metabolitos secundarios aislados de *Renilla*

Hay solo dos estudios publicados sobre metabolitos secundarios de *Renilla reniformis*, la única especie del género estudiada químicamente, para la cual fueron informados siete diterpenos tipo briarano, renillafoulinas A-C (**129-131**)¹⁰⁰ y renillinas A-D (**132-135**).¹⁰¹

(**129**) Renillafoulina A: R = Ac

(**130**) Renillafoulina B: R = COC₂H₅

(**131**) Renillafoulina C: R = COC₃H₇



¹⁰⁰ Hooper, I.R.; Keifer, P.A.; Rinehart, K.L. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 4454-4458.

¹⁰¹ Kubanek, J.; Barbet. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 511-516.

Dichos compuestos poseen actividad *antifouling* y funcionan como defensas químicas contra otros predadores naturales de los corales.

Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios del octocoral *Renilla reniformis*

El octocoral *Renilla reniformis* fue recolectado mediante rastras a profundidades de 90 - 100 m, como fauna acompañante de crustáceos durante las campañas de muestreo de langostino en el Golfo de San Jorge, por personal del INIDEP. El material fue clasificado por la Dra. Ana Roux (INIDEP-Mar del Plata) y fue congelado y almacenado a temperatura de -20° C hasta su traslado a nuestro laboratorio.

Se procedió a la liofilización del material y posterior extracción con solventes orgánicos. Con el extracto ya concentrado se realizó una partición entre ciclohexano y metanol acuoso. Los subextractos lipofílico (RL) y polar (RP) fueron analizadas por CCD y por RMN ¹H (200 MHz).

Como el subextracto RP presentó mayor riqueza química, se procedió a su fraccionamiento por cromatografía *flash* en columna seca sobre fase reversa, utilizando solventes de polaridad decreciente. Este método permitió un fraccionamiento rápido del extracto, para obtener una separación de los compuestos en grandes grupos de acuerdo con sus polaridades (**Figura 10**). De esta separación la fracción RP3 fue seleccionada para ser purificada por HPLC, utilizando acetonitrilo/H₂O (40/60) como eluyente. Así se obtuvieron tres compuestos: RP3-13, RP3-22 y RP3-27.

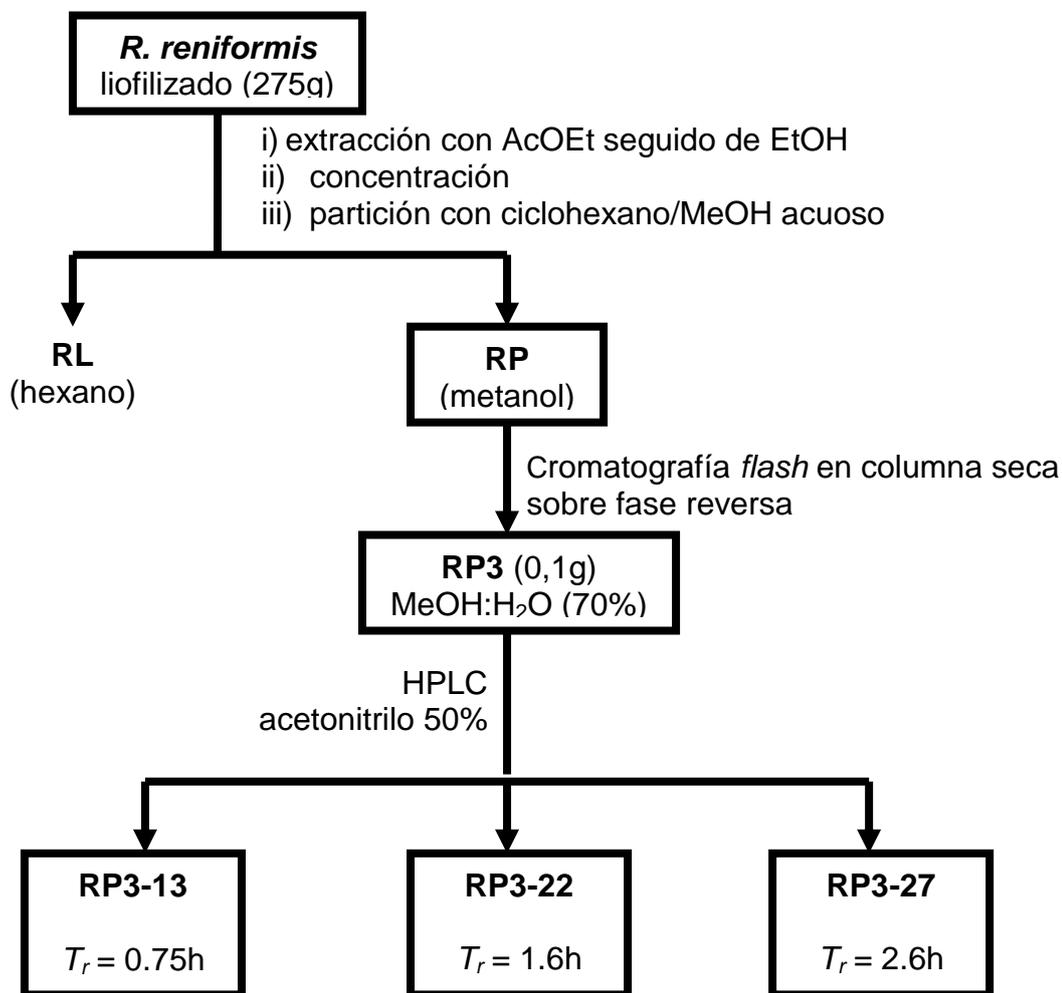


Figura 10: Esquema del aislamiento de compuestos de *Renilla reniformis*.

Elucidación estructural del compuesto RP3-13

El compuesto RP3-13 fue aislado como un aceite incoloro que en CCD desarrollada con CH_2Cl_2 aparecía como una mancha con un R_f de 0.2.

En el espectro de RMN ^{13}C se observaron trece señales entre δ 178.5 y δ 14.0, siendo la de campo más bajo correspondiente a un grupo carboxilo. El análisis del espectro DEPT-135 (juntamente con los espectros 2D) permitía establecer la presencia de dos metinos, uno de los cuales estaba unido a oxígeno, ocho metilenos y dos metilos (**Figura 11**). Las correlaciones entre carbonos y protones fueron obtenidas por análisis del espectro de HSQC.

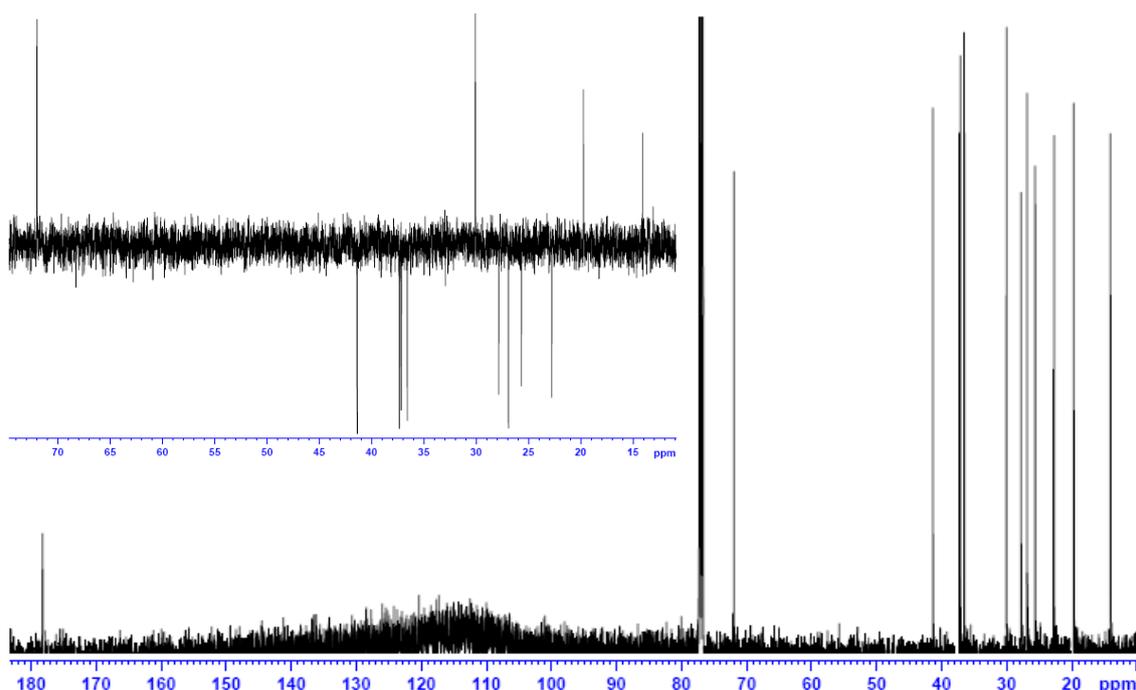


Figura 11: Espectro de RMN ^{13}C y DEPT (500 MHz; en CDCl_3) de RP3-13.

En el espectro de RMN ^1H (**Figura 12**) se observaban señales entre δ 3.6 y δ 0.9. A campo más alto aparecían dos señales de metilos, uno de ellos (δ 0.9, *t*, 7.0 Hz) unido a un metileno y el otro (δ 0.96, *d*, 6.7 Hz) unido a un metino. Además, 14 señales de protones de metilenos se encontraban

superpuestas en una región entre δ 1.22 y δ 1.45. En la ampliación del espectro HSQC (**Figura 13**) fue posible ver con más claridad las correlaciones con los correspondientes carbonos. Siguiendo hacia campos más bajos del espectro protónico se encontraba un multiplete correspondiente a un metino (δ 1.96) seguido de dos dobles dobletes [δ 2.33 (*dd*, 6.0 y 14.5 Hz) y δ 2.14 (*dd*, 8.0 y 14.5 Hz)] correspondientes a un mismo metileno. El valor alto para la constante de acoplamiento geminal (14.5 Hz) sugería que dicho metileno debería ubicarse cercano a un grupo con electrones π , En este caso la única posibilidad era ubicarlo vecino al grupo carboxilo. La señal que aparecía a campo más bajo (δ 3.60, *m*, 1H), correlacionaba en el espectro HSQC con el carbono oxigenado, y en el espectro COSY correlacionaba con señales de metilenos a δ 1.40.

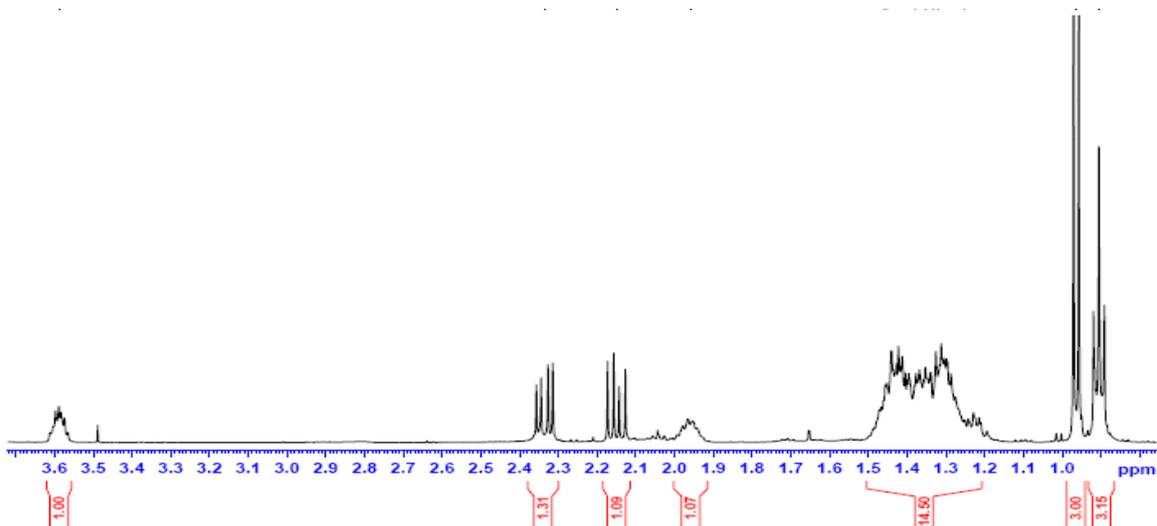


Figura 12: Espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de RP3-13.

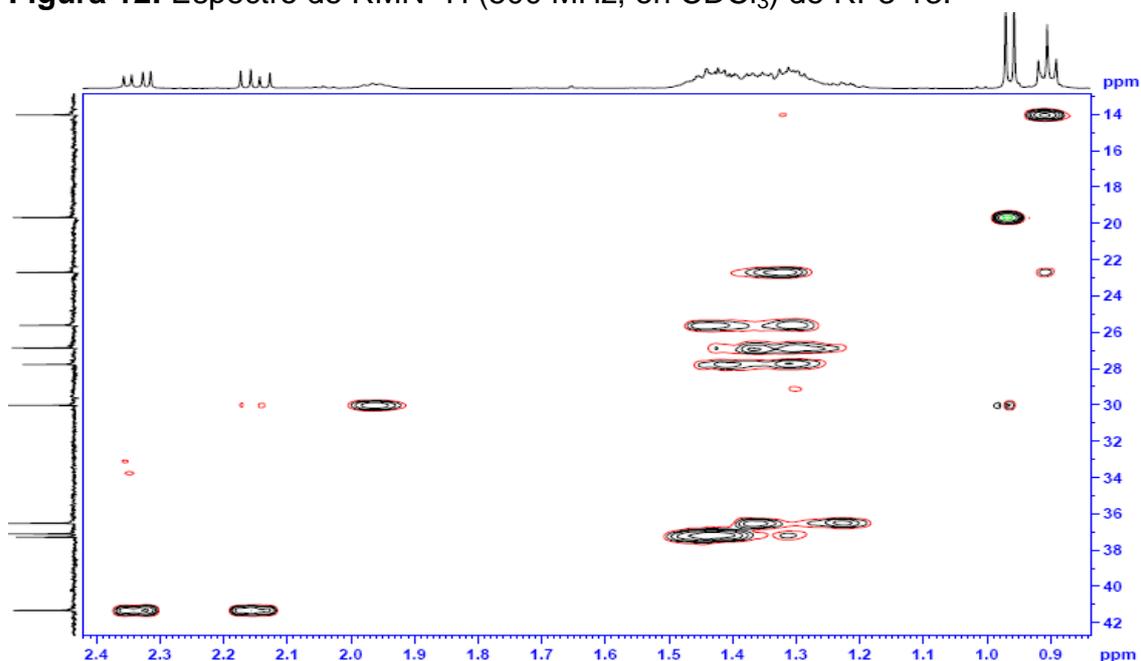
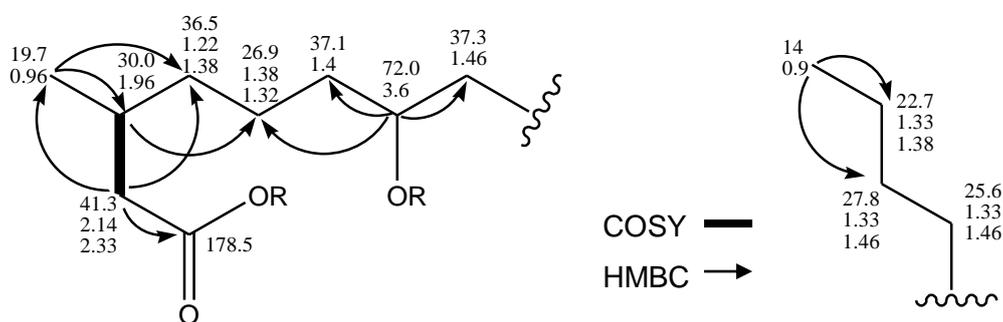


Figura 13: Ampliación del espectro HSQC (500 MHz; en CDCl_3) de RP3-13.

Basándose en los desplazamientos químicos y en las correlaciones observadas en los espectros COSY y HMBC fue posible plantear dos fragmentos de la molécula. La señal del metilo doblete a δ 0.96 correlacionaba (COSY) con el multiplete del metino a δ 1.96. Este último correlacionaba a su vez con señales de tres metilenos: por un lado con las señales (δ 2.14 y δ 2.33) del metileno que se encontraba vecino al carboxilo (δ 178.5); y por otro lado, en el espectro HMBC, con las señales de los metilenos a δ 36.5 y a δ 26.9, respectivamente.

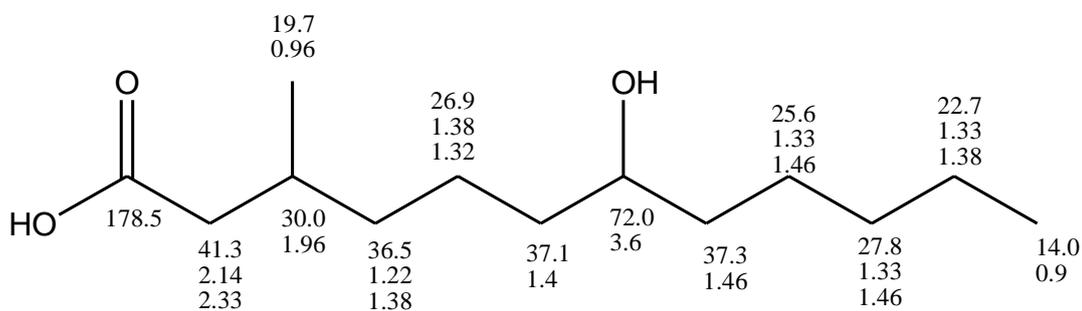


Este último metileno presentaba correlaciones (HMBC) con el metino oxigenado a δ 3.6, ubicado entre los metilenos cuyas señales aparecen a δ 37.1 y δ 37.3, respectivamente.

A pesar de que había muchas señales de ^1H superpuestas, lo que dificultaba distinguir las correlaciones con exactitud, los desplazamientos químicos de ^{13}C permitieron asignar la parte lineal de molécula. Así, el metilo cuya señal correspondía al triplete a δ 0.90 se encontraba vecino al metileno a δ 22.7, seguido del metileno a δ 27.8 y luego el metileno a δ 25.6. Este último metileno a su vez correlacionó en el espectro HMBC con el metino oxigenado a δ 3.6, y así permitió conectar las dos partes de la molécula (asignación completa en la **tabla 3, parte experimental**, pág. 245).

En base a los datos espectroscópicos hasta ese momento, el compuesto podía tratarse de un hidroxiácido (fórmula $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_3$ PM = 230), o una lactona de 8 miembros (fórmula $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_2$ PM = 212). Por la polaridad mostrada en CCD la estructura más probable era la de un hidroxiácido, lo cual fue confirmado mediante el espectro de masa (EI). Si bien no se observó el ión molecular a m/z 230, dicho espectro presentaba un ión a m/z 213 (M -17) que

por su abundancia relativa no podía tratarse del (M + 1) correspondiente a la contribución isotópica de la lactona. Las fragmentaciones observadas permitieron confirmar la estructura de hidroxiaácido propuesta. En particular, el fragmento m/z 173 correspondía a una pérdida de 57 u (C₄H₉) proveniente de los carbonos C9 – C12, grupo butilo terminal de la cadena del ácido. Esta pérdida a su vez era coherente con la presencia del grupo hidroxilo en C-7 tal cual había surgido de interpretar los espectros de RMN. Dicho fragmento era imposible de justificar a partir de la lactona de PM 212. La confirmación definitiva de la estructura se obtuvo a partir de la metilación del ácido con diazometano.



(136)

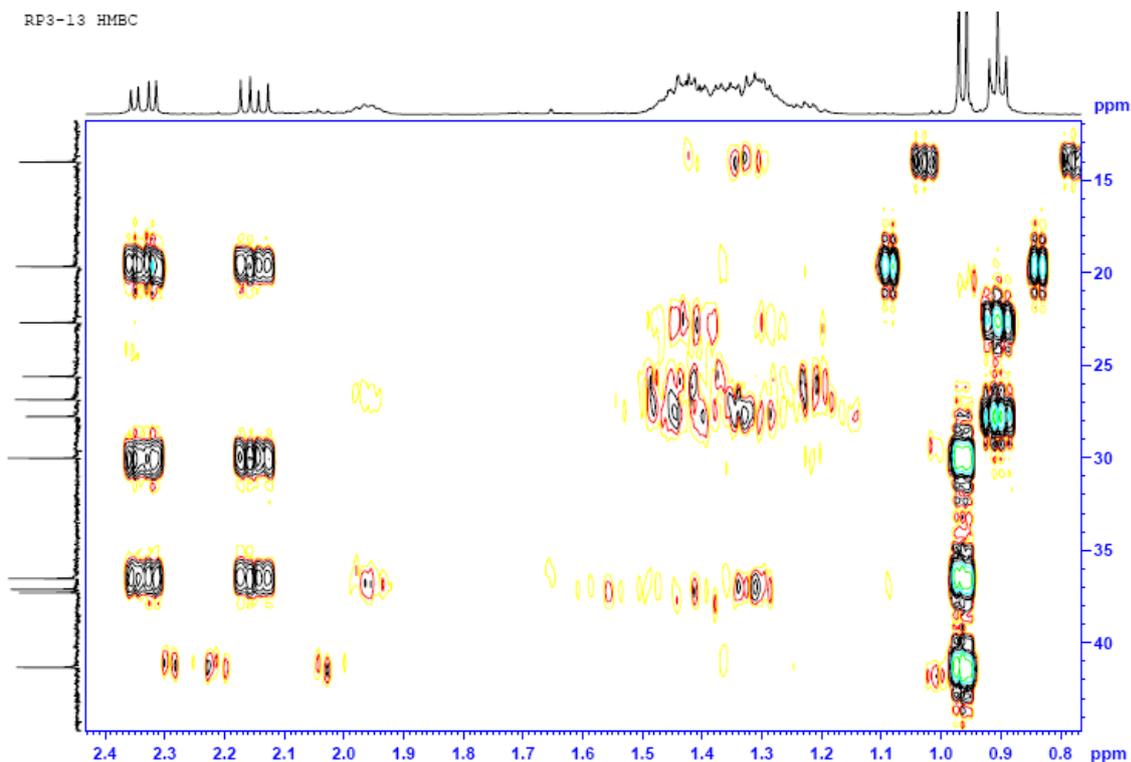


Figura 14: Espectro de RMN HMBC (500 MHz; en CDCl₃) de RP3-13.

No fue posible encontrar referencias en literatura acerca del compuesto RP3-13, por lo cual cabría concluir que se trataría de un nuevo β -metilhidroxiácido. Debido a la escasa cantidad de material aislado no fue posible la determinación de la configuración de los dos centros quirales de la molécula. La escasa diferenciación en desplazamiento químico de los protones correspondientes a los carbonos vecinos al hidroxilo, volvía desaconsejable el uso del método de Mosher modificado para determinación de la configuración en C7. Por otro lado no existe ningún método espectroscópico confiable para determinación de la configuración en el C β de un ácido carboxílico. La única posibilidad sería la síntesis de los cuatro diastereómeros posibles y comparación espectroscópica y cromatográfica con el compuesto natural.

Debido a su estructura es posible que el compuesto RP3-13 sea de origen microbiano. El compuesto **136** presentó actividad antifúngica frente al hongo *Fusarium virguliforme*, un fitopatógeno que promueve la muerte súbita en la soja. Para ello fue aplicada la metodología de bioautografía sobre silicagel¹⁰², donde se encontró un halo de inhibición de 18 mm, lo que significa que es comparable con la actividad de los antifúngicos comerciales utilizados como referencia, benomyl y maxim (diámetro del halo = 20 mm).

¹⁰² Gallardo, L.G.; Butler, M.; Gallo, M. L.; Rodríguez, M. A.; Eberlin, M. N.; Cabrera, G. M.; *Phytochemistry* **2006**, 67, 2403-2410.

Elucidación estructural del compuesto RP3-22

EL compuesto RP3-22 fue aislado como un sólido blanco amorfo que no presentaba absorción en el UV 254nm, sino que era observado en CCD con CH₂Cl₂:MeOH (20:1) como una mancha marrón a R_f ~0.8, al revelar con vainillina sulfúrica.

Tanto en el espectro de RMN ¹H (**Figura 15**) como en el de ¹³C se observaban señales anchas, probablemente debido a la coalescencia a temperatura ambiente. Esto sugería la posibilidad de un anillo grande y flexible en la molécula.

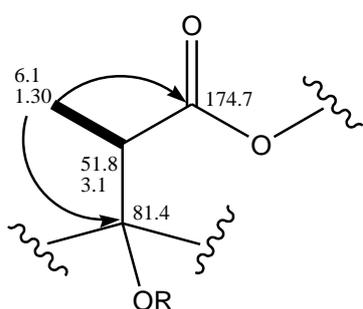
En la zona de campos bajos del espectro de RMN de ¹³C aparecían cuatro señales de carboxilos de éster a δ 169.9, δ 170.0, δ 173.0 y δ 174.7, respectivamente. En el espectro RMN ¹H se observaban dos metilos correspondientes a acetato, además de una cadena correspondiente a un grupo butirato [δ_H 0.90 (*t*, 8.0 Hz); δ_C 36.3, δ_C 17.7, δ_C 13.6]. Por lo tanto era factible pensar que el cuarto grupo éster debía tratarse de una lactona. Algunas señales de carbonos no pudieron ser detectadas por medio del espectro de ¹³C por lo comentado previamente, pero fueron observadas sus correlaciones en el espectro HMBC con protones de la molécula. Por ejemplo, se observó en el espectro de ¹³C una única señal de carbono de doble enlace a δ 121.3, pero el carbono cuaternario de doble enlace faltante no pudo ser detectado.

El espectro de RMN de ¹³C indicó la presencia tres metinos oxigenados a δ 71.8, δ 72.2 y δ 77.0, respectivamente. También aparecían señales para un carbono oxigenado cuaternario a δ 81.4 y dos señales a δ 58.9 y δ 59.4 (C cuaternario), que podían corresponder a un epóxido. También se observó una señal de carbono cuaternario a δ 43.3.

En el espectro de masas de alta resolución el compuesto presentó un ión cuasimolecular [MNa⁺] a m/z 593.2117, consistente con la fórmula molecular C₂₈H₃₉O₁₀Cl. A su vez, el fragmento a m/z 557 era consistente con la pérdida de HCl a partir del ión cuasimolecular y la abundancia relativa del [MNa⁺+2] de 3:1 confirma la presencia de un átomo de cloro en la molécula.

Con la presencia de nueve insaturaciones en la molécula, los cuatro carboxilos y el doble enlace daban cuenta de cinco de ellas, por lo tanto las restantes insaturaciones debían corresponder a cuatro ciclos. Eso requería la presencia del ciclo del epóxido, de una lactona y dos ciclos adicionales del esqueleto de la molécula. Al realizar el balance del número de carbonos de la molécula, restando los correspondientes a los grupos acilo, quedaban veinte carbonos de esqueleto, más un átomo de cloro, lo cual indicaba la estructura de un diterpenoide bicíclico. La presencia de la lactona, el átomo de cloro, la flexibilidad debida a un anillo grande, más los antecedentes previos de compuestos de *Renilla* sugerían fuertemente una estructura de briarano, lo cual fue verificado mediante los espectros de RMN.

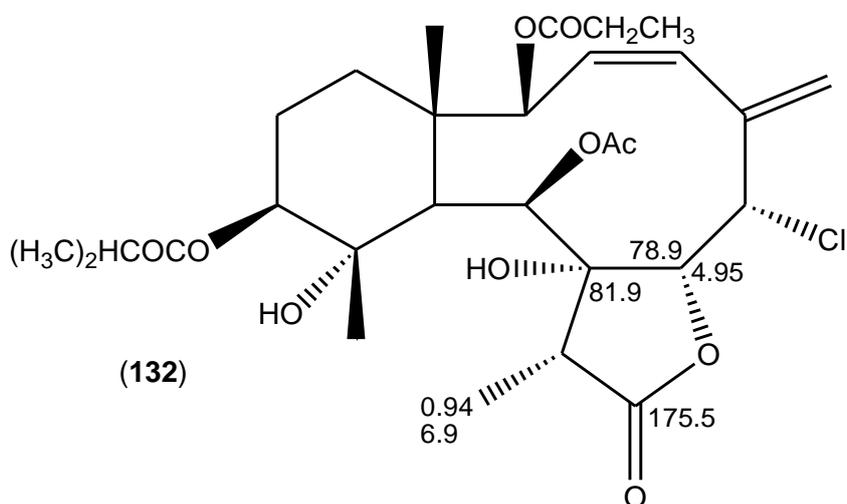
En la zona de campos altos del espectro protónico se observaba la presencia de seis grupos metilos: dos de ellos, δ 2.0(s) y δ 2.28(s) fueron asignados a grupos acetato. Otro de ellos, δ 0.90 (*t*, $J = 7$ Hz) correspondió al butirato. Las señales restantes, δ 1.11 y δ 1.29, ambos singuletes, y δ 1.30 (*d*, $J = 7$ Hz) correspondieron a grupos metilo del esqueleto de la molécula.



COSY —

HMBC →

La señal del metilo doblete aparecía acoplada en el espectro COSY con una señal de metino que se mostraba muy ensanchada a δ 3.10, y en el espectro de HMBC correlacionaba con el carboxilo a δ 174.7 y con el carbono oxigenado a δ 81.4. Estos datos mostraban gran concordancia con los del grupo lactona presentes en briaranos, como es el caso del grupo lactona de la renillina A (**132**).



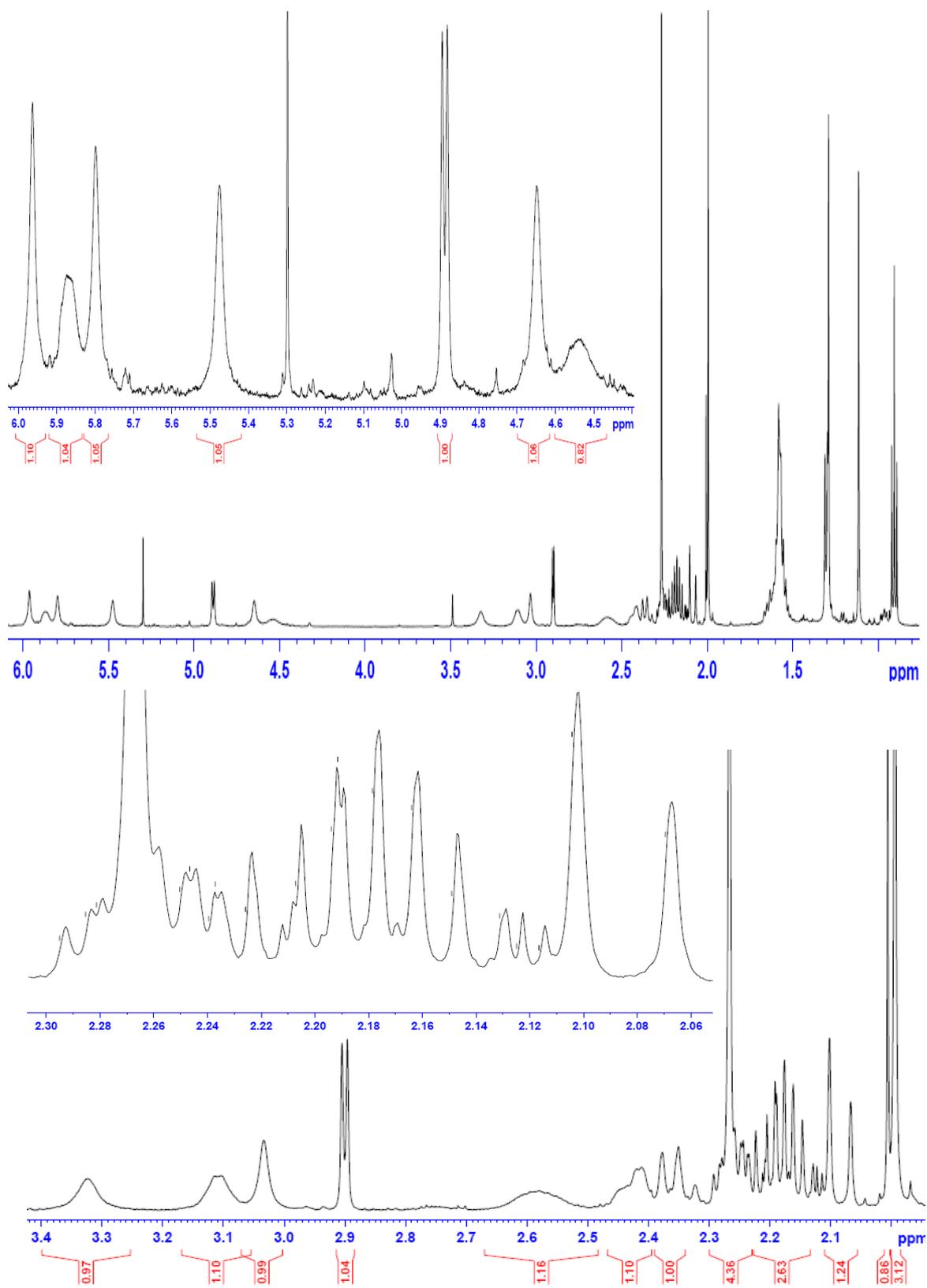
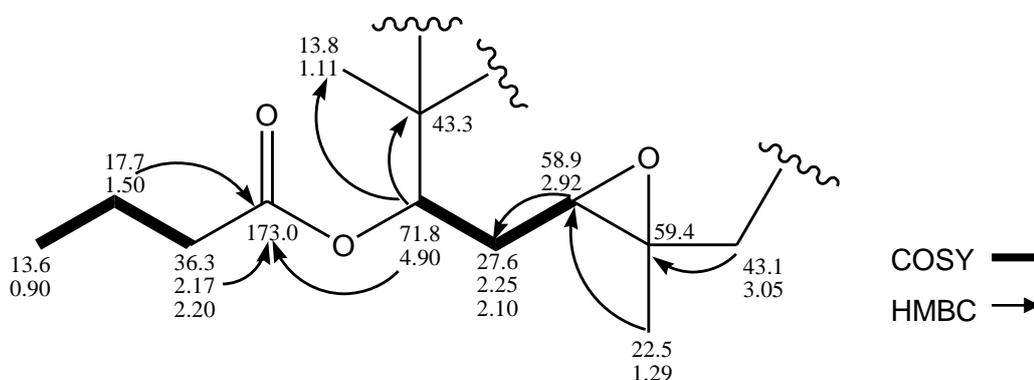


Figura 15: Espectro de RMN ^1H y sus ampliaciones (500 MHz; en CDCl_3) de RP3-22.

En la zona de campos bajos del espectro protónico aparecían dos singuletes de olefina, a δ 5.80 y δ 5.47, que correlacionaban en el espectro HSQC con el carbono a δ 121.3, lo que indicaba la presencia de un metileno sp^2 en la molécula, aunque no fue posible observar la señal del correspondiente carbono tetrasustituído. Esta también es una característica frecuente en los briaranos. Las señales a δ 5.88 (s ancho), δ 5.96 (s ancho) y δ 4.90 (*d*, $J = 7.0$ Hz) correspondían a los metinos oxigenados, probablemente esterificados.

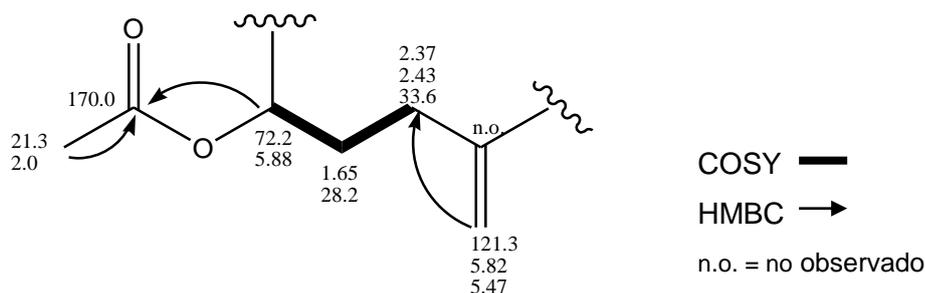
En el espectro HMBC la señal a δ 4.90 correlacionaba con el carboxilo del *n*-butirato a δ 173.0, con el carbono cuaternario a δ 43.3 y con el carbono oxigenado a δ 58.9. Además, en el espectro COSY tanto la señal a δ 4.90 como la señal a δ 2.92 (que correspondía al epóxido) acoplaban con los protones del metileno a δ 27.6, en especial con aquél a δ 2.25. Esto ubicaba al epóxido en el C- β respecto al sustituido con el butirato. Por otro lado se observaba una correlación en el espectro HMBC entre el metino a δ 4.90 y el metilo singulete a δ 13.8, lo cual confirmaba la presencia de un carbono cuaternario vecino a dicho metino.

En cuanto a las dos señales de RMN ^{13}C correspondientes al epóxido, la señal a δ 58.9 correlacionaba en el espectro HMBC tanto con el protón del metino a δ 4.90 como con el metilo singulete a δ 1.29. Ello indicaba que este metilo estaba ubicado sobre el carbono cuaternario del epóxido cuya señal aparece a δ 59.4, la que a su vez correlacionaba en el espectro HMBC con el metino a δ 3.05 (s ancho). Toda esta información permitió ensamblar el siguiente fragmento estructural:



El metilo a δ 1.11 correlacionó (HMBC) con los carbonos a δ 43.3 y 43.1. De esta manera se podía completar el cierre de un anillo de cinco carbonos, y se confirmaba que el metilo a δ 1.11 era el metilo angular ubicado en el punto de unión de los dos anillos.

El acetato cuyo carbonilo aparece a δ 170.0 correlacionaba en el espectro HMBC con el metino de δ ^1H 5.88. Por el espectro COSY se observaba el acoplamiento de esta señal con un metileno a δ 1.65 y de este último con un hidrógeno de un metileno a δ 2.37. El desplazamiento químico de los protones de éste metileno (δ 2.37 y δ 2.43) sugería que debía ubicarse vecino a una insaturación. Ello fue confirmado al ver una correlación del protón del exometileno a δ 5.47 con el carbono del metileno anterior a δ 33.6. Como ya fue expresado nuevamente el carbono cuaternario de la olefina no pudo ser observado en ningún espectro (eso ya fue reportado para otros briaranos)¹⁰³. Esta información permitió armar otro fragmento:



El fragmento anterior pudo conectarse con el punto de unión de los ciclos al observar una correlación (HMBC) entre el metilo a δ 1.11 ya mencionado con el carbono a δ 72.2. De esta manera quedaba determinado que el compuesto presentaba carbonos esterificados (un butirato en el ciclohexano y un acetato en el macrociclo) a ambos lados del carbono puente. Los restantes fragmentos de la molécula fueron más difíciles de elucidar, ya que debido al ancho de las señales, las correlaciones observadas en los espectros COSY y HMBC eran muy débiles, y por lo tanto dudosas.

¹⁰³ Hooper, I.R.; Keifer, P.A.; Rinehart, K.L.. *J.Org.Chem.* **1986**, 51, 4454-4458

En el espectro HSQC (**Figura 16**) se observaban tres correlaciones claras de carbonos que aún no habían sido asignados: metino a δ 77.0 correlacionando con δ ^1H : 5.96 s.a.; metino a δ 81.3 correlacionando con δ ^1H 4.53 s.a.; metino δ 52.6 correlacionando con δ ^1H : 4.65 sa.

Estas señales brindaban poca información en los restantes espectros 2D y sin embargo correspondían a los fragmentos faltantes de la molécula. La primera de ellas, por sus desplazamientos en RMN ^1H y ^{13}C fue asignada como el punto de unión del restante grupo acetilo cuyo carboxilo presenta δC 169.0. Una correlación muy débil en el espectro COSY con la señal a δ 3.05, así como una correlación también muy débil en el espectro HMBC con el carbono cuaternario del epóxido, permitían ubicar a este carbono vecino al punto de unión protonado de los dos anillos del esqueleto. Por su parte, la señal a δ 81.3 debía tratarse indudablemente de un carbono oxigenado, y los valores de los desplazamientos eran típicos para el punto de cierre de la lactona en briaranos. Observando atentamente el espectro COSY se ve una correlación entre los protones a δ 4.53 y 4.65. Esto permitió el cierre de la molécula con el único carbono faltante (δC 52.6). Por su desplazamiento, éste carbono no era oxigenado, pero su señal de protón muy desprotegida (δ 4.65) indicaba la presencia de un sustituyente electronegativo. Teniendo en cuenta que restaba aún ubicar el átomo de cloro, resultó muy lógico situarlo en ésta posición. La comparación de los datos espectroscópicos con otros briaranos halogenados (renillina A (**132**) y B (**133**)) permitió verificar esta asignación. Finalmente una correlación débil en el espectro COSY de ésta señal con uno de los hidrógenos del grupo exometileno (δ 5.47) permitió comprobar el cierre del anillo macrocíclico del briarano (asignación completa en la **tabla 4, parte experimental**, pág. 246).

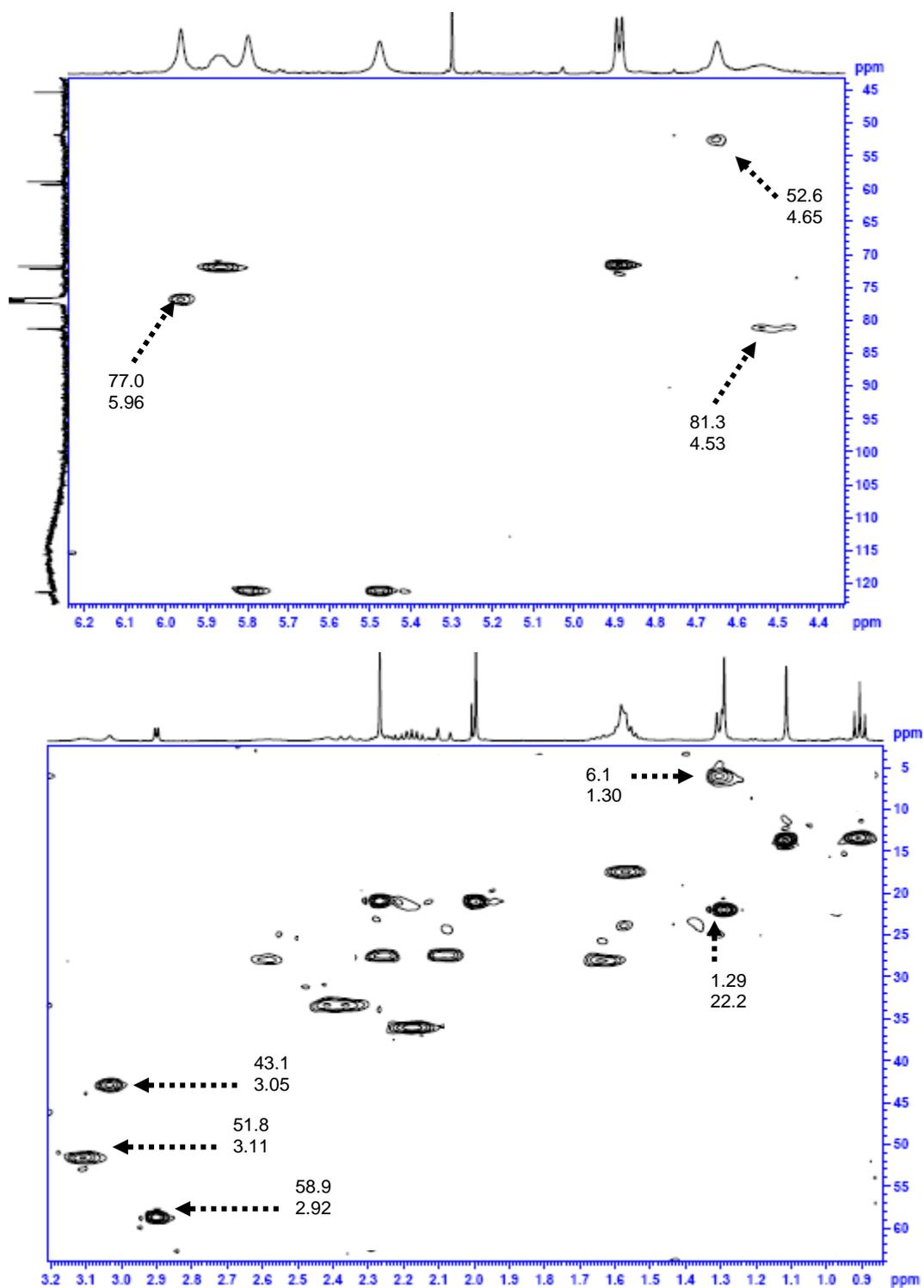
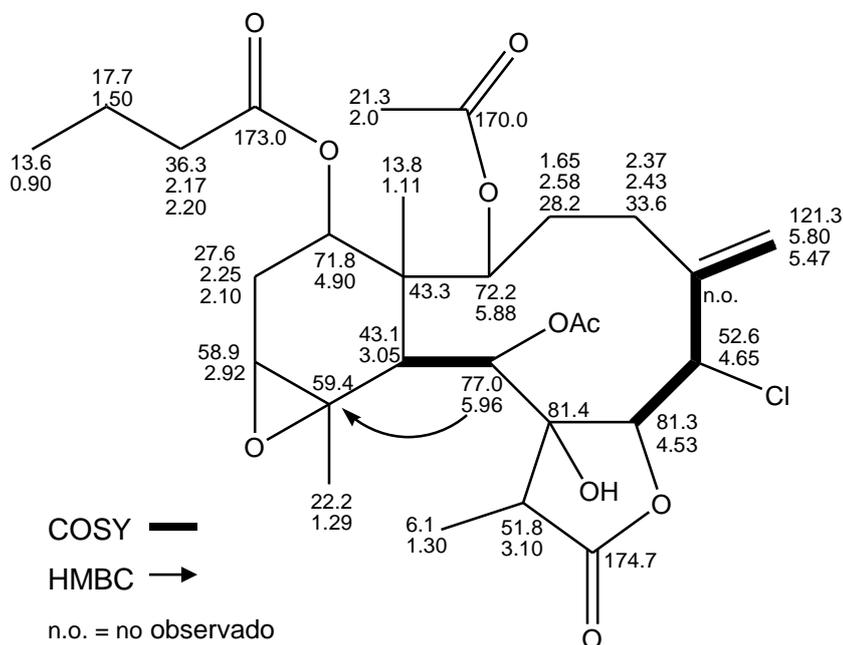
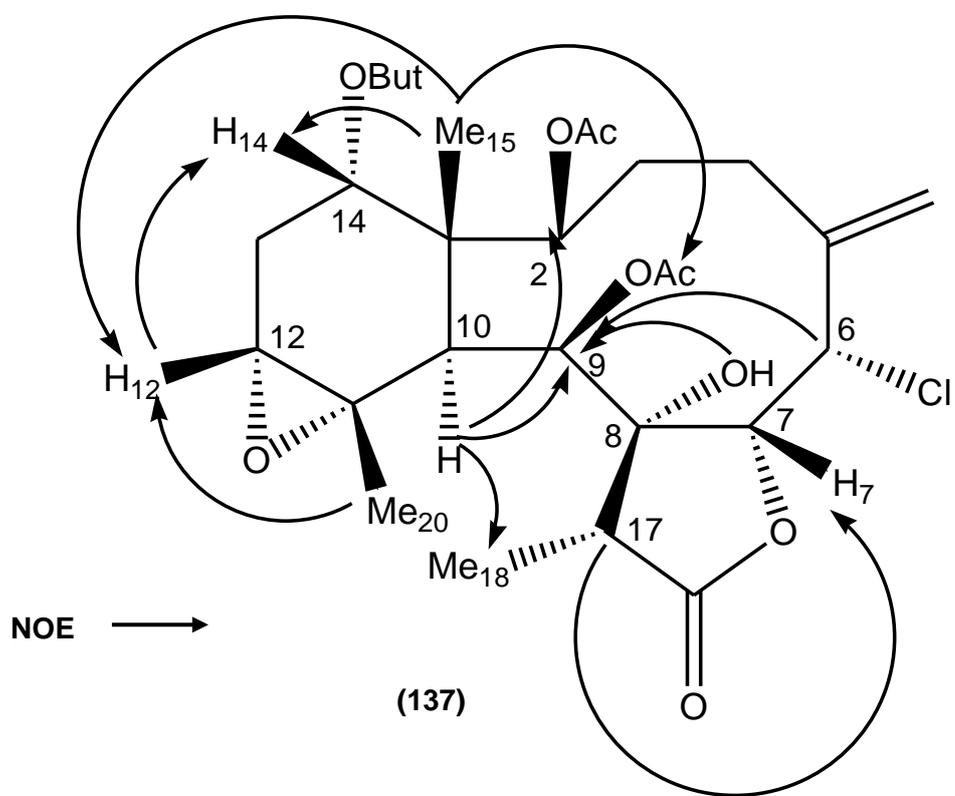


Figura 16: Ampliaciones del espectro de HSQC (500 MHz; en CDCl₃) de RP3-22.



La estereoquímica del compuesto fue obtenida a partir de las correlaciones observadas en el espectro NOESY y comparación con otros compuestos reportados en la literatura. La correlación observada entre el Me-15 y H14 ubicaba al grupo butirato de C14 en la cara α de la molécula. A su vez el NOE entre Me-20 y de H12 con H14, ubicaba al epóxido también en la cara α y, al mismo tiempo confirmaba la conformación tipo bote para el ciclo de seis miembros. Por otro lado, los NOES observados entre H10, H2 y H9 ubicaban a los dos grupos acetato de C2 y C9 en la cara β de la molécula. La correlación entre H10 y Me-18 también definía la estereoquímica en C17. El NOE observado entre H17 y H7 determina, al ubicar ambos protones en la misma cara, la estereoquímica en el anillo de la lactona. Una señal ancha a δ 3.30 que no correlacionaba con ningún carbono en el espectro HSQC fue asignada al hidroxilo en C8. Dicha señal presentó NOE con H9, por lo tanto también fue ubicado el hidroxilo en la cara α de la molécula. La señal a δ 4.65 que había sido asignada a H6, en la posición clorada, presentó NOE con el acetato en C9 que estaba ubicado en la cara β . Por lo tanto el halógeno en C6

fue asignado a la cara α , con la misma estereoquímica que los otros compuestos halogenados aislados de *Renilla*.



El compuesto 137 no ha sido reportado en la literatura.

Elucidación estructural del compuesto RP3-27

EL compuesto RP3-27 pudo ser purificado por medio de HPLC en fase reversa usando acetonitrilo:H₂O (50%) como solvente. Dicho compuesto fue aislado como un sólido blanco amorfo por CCD preparativa sobre sílica utilizando como solvente de elución CH₂Cl₂:MeOH (20:1). En dicho solvente presentaba un $R_f = 0.8$, revelando de color marrón con vainillina sulfúrica.

En el espectro de masas de alta resolución el compuesto RP3-27 presentó un ión cuasimolecular [MNa⁺] 543.2556. Dicho espectro permitió asignar una fórmula molecular C₂₈H₄₀O₉ para el compuesto, determinando al mismo tiempo la presencia de nueve insaturaciones. Comparando con RP3-22, el compuesto RP3-27 presentaba un oxígeno menos y la ausencia del átomo de cloro, y una insaturación de más.

Al igual que en el caso de RP3-27, los espectros presentaban varias señales anchas con pérdida de multiplicidad debido a la coalescencia, lo cual sugería que se podía estar nuevamente en presencia de un diterpenoide de tipo briarano.

El espectro de RMN de ¹³C junto con los experimentos HSQC y HMBC permitieron comprobar la presencia de cuatro metinos oxigenados a δ 70.1, δ 73.1, δ 74.6 y δ 78.4, además de un carbono cuaternario oxigenado a δ 81.6. No se detectaban señales correspondientes a un epóxido.

En la zona de campos bajos del espectro de RMN de ¹³C aparecían cuatro señales de carbonilos de éster a δ 169.8, δ 170.5, δ 173.5 y δ 176.1, correspondientes, al igual que en el compuesto anterior, a dos acetatos, un n-butirato y una γ -lactona, respectivamente. Aparecían también cuatro señales de carbonos vinílicos, a δ 117.0, δ 120.8, δ 134.4 y δ 148.1; a diferencia del compuesto anterior, no se detectaba la presencia de un metileno sp^2 , sino que en este caso había dos dobles enlaces trisustituídos con un grupo metilo en cada uno de ellos. Esto cumplía con el requisito en insaturaciones para un

diterpeno tipo briarano e indicaba que esa molécula tenía un doble enlace que reemplazaba al epóxido del compuesto RP3-22.

Algunas señales no pudieron ser detectadas por medio del espectro de ^{13}C , pero fueron vistas correlaciones en el espectro de HMBC con protones de la molécula. Otras fueron asignadas en base al espectro HSQC, como la del Me-15, que aparecía con poca intensidad en el ^{13}C y como un singlete muy ancho a δ 0.98 en RMN ^1H .

Además del Me-15 mencionado, en el espectro de RMN ^1H se observaba la presencia de otros seis metilos, a saber: δ 0.90 (t), correspondiente al butirato, dos acetatos a δ 2.02(s) y δ 2.17(s), dos metilos sobre doble enlace, muy ensanchados δ 2.01 y δ 1.96. Finalmente, una señal de metilo doblete típica de la lactona de briaranos a δ 1.30 (Me-18), la cual presentaba las típicas correlaciones tanto en el espectro COSY, con el cuarteto a δ 2.50 (H-17), como en el espectro HMBC, con el carbonilo a δ 176.1 (C-19) y con el carbono oxigenado a δ 81.6 (C-8) (ver dibujo en **página 117**).

En la zona de campos bajos del espectro protónico aparecían señales ensanchadas correspondientes a los metinos sustituidos y a los dobles enlaces. El protón a δ 4.79 (H-14) presentaba correlaciones (HMBC) con el metileno a 26.7 (C-13), con el carbono de doble enlace a δ 120.8 (C-12), con el metino a δ 40.4 (C-10), con el carbono cuaternario a δ 44.4 (C-1) y con el metilo que se encuentra sobre este último (Me-15). Esto, juntamente con otros datos de los espectros HMBC y COSY, cerraba las asignaciones para el anillo A del diterpeno, donde aparecía además un metilo a δ 24.4 (Me-20) que estaba ubicado sobre el carbono de doble enlace a δ 134.4. (C-11) (ver dibujo en **página 117**).

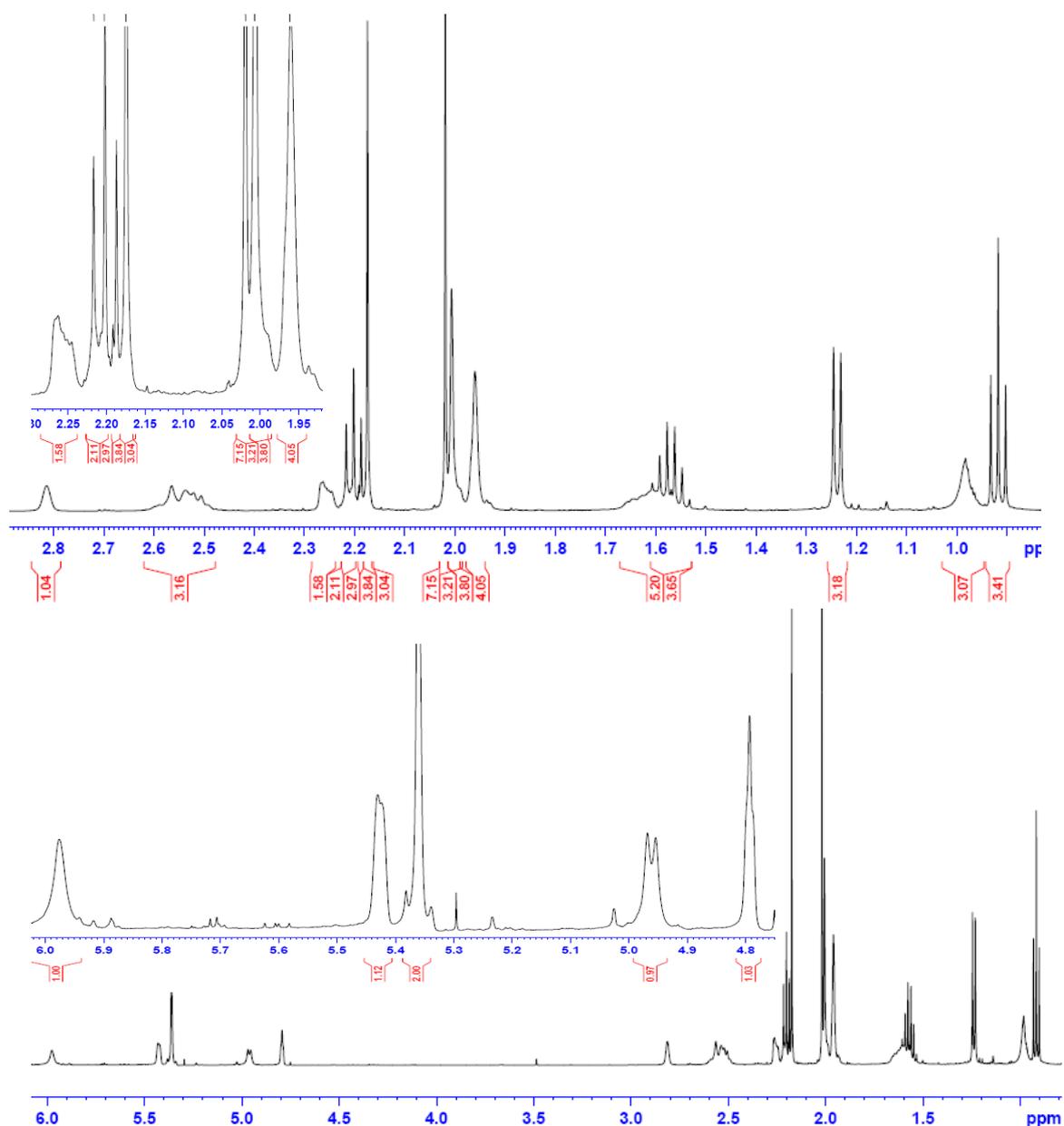


Figura 17: Espectro de RMN ¹H y sus ampliaciones (500 MHz; en CDCl₃) de RP3-27.

El espectro HMBC (**Figura 18**) brindó las correlaciones H-C para el anillo de diez miembros donde se observaba un doble enlace entre los carbonos C-5 (δ 148.1) y C-6 (δ 117.0). El protón de doble enlace a δ 5.36 (H-6) correlacionaba a larga distancia con el carbono oxigenado a δ 81.6 (C-8) y por otro lado con el metilo a δ 27.6 (Me-16) y con el metileno a δ 28.6 (C-4). Por medio del espectro COSY (**Figura 19**) se pudo establecer para el metileno a δ 31.9 la posición C-3 (asignación completa en la **tabla 4, parte experimental**, pág. 246).

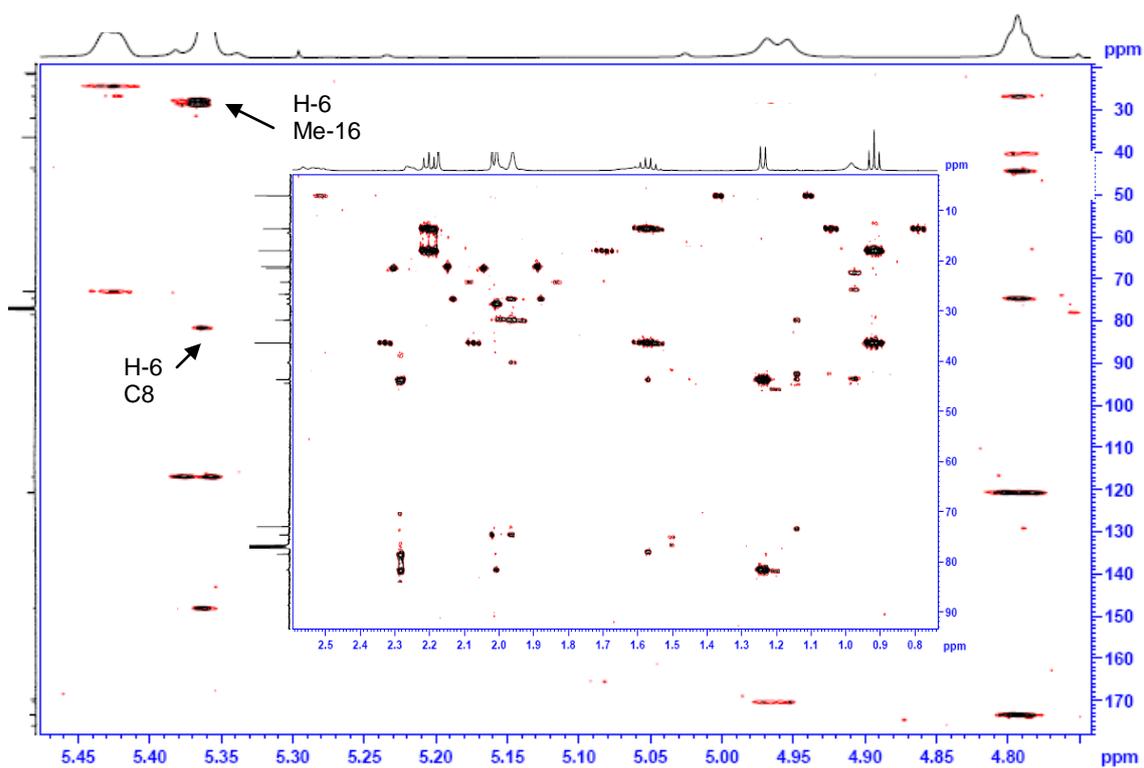


Figura 18: Ampliaciones del espectro de RMN HMBC (500 MHz; en CDCl_3) de RP3-27.

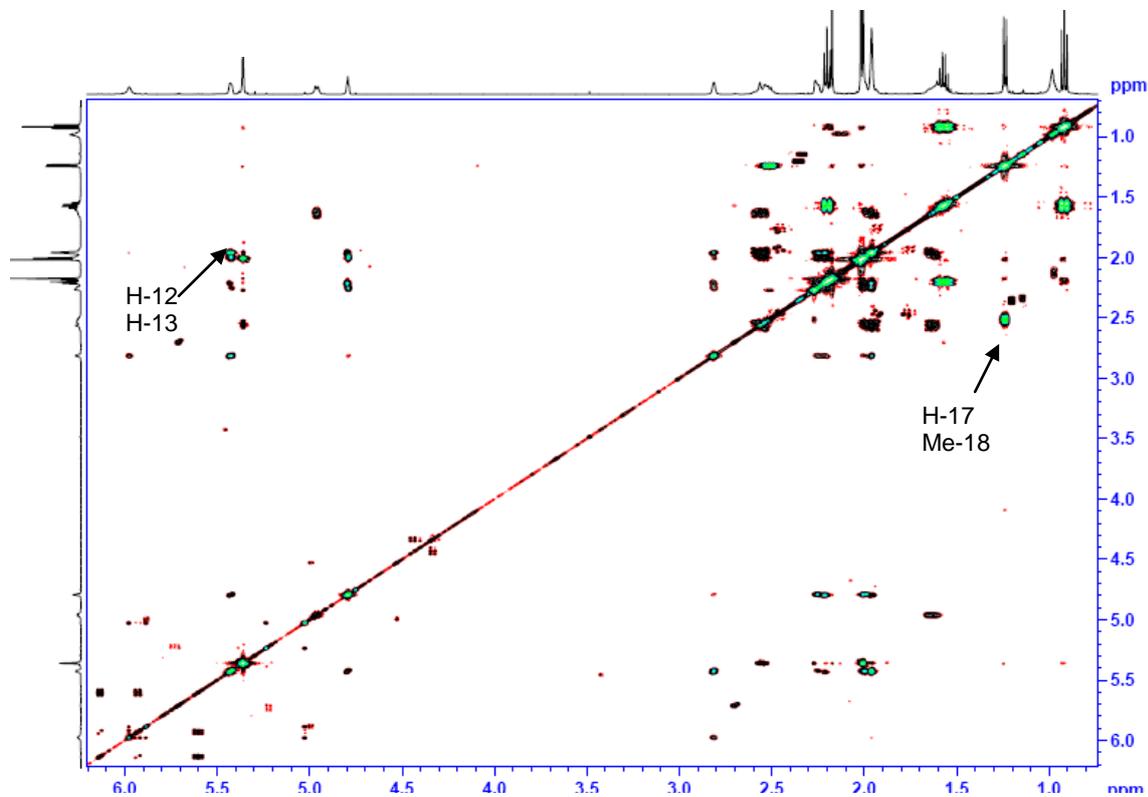
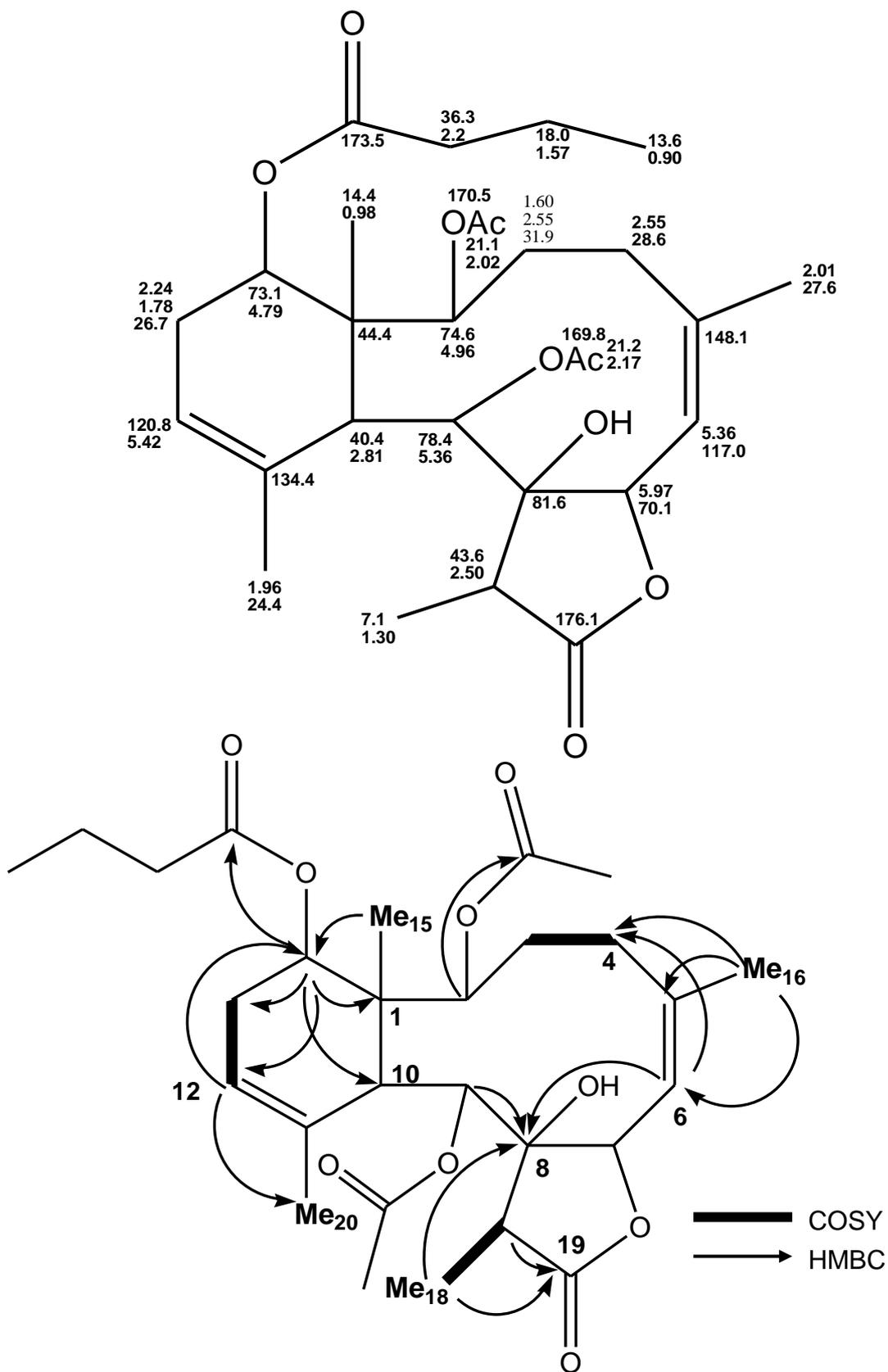
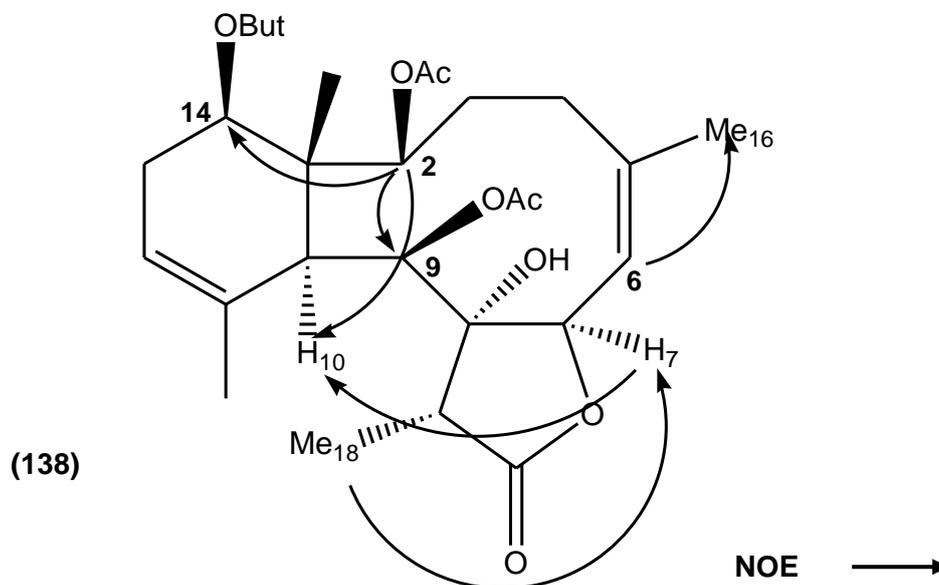


Figura 19: Espectro de RMN COSY (500 MHz; en CDCl_3) de RP3-27.



La estereoquímica fue verificada por medio del espectro ROESY donde se observa efecto NOE entre H7-H18-H10 y entre H1-H2-H9-H10. La

conformación del doble enlace (Z)-C5=C6 a su vez fue comprobada por el NOE observado entre H6 y H16.



El hecho de que las señales de RMN aparecieran ensanchadas se puede explicar por la flexibilidad del ciclo de diez miembros a la temperatura de coalescencia (la cual para varias de las señales es cercana a 25°C) de la molécula, donde los posibles confórmeros se encuentran en un equilibrio lento. Probablemente a una temperatura más elevada (realizando el espectro en DMSO-d₆) las señales se angostaran, pues en un movimiento rápido de interconversión de los confórmeros se obtendría el promedio de los valores de δ , pero debido a la escasa cantidad de muestra disponible se prefirió no arriesgarla calentando a $T > 50^\circ$ en un solvente poco volátil. Igualmente fue posible determinar las estructuras de ambos briaranos trabajando en CDCl₃, aun con el costo en resolución de las señales ensanchadas.

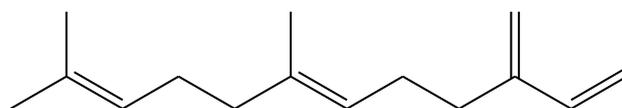
Los compuestos RP3-22 y RP3-27 resultaron ser nuevos entre los briaranos ya aislados y fue ensayada su actividad antifúngica frente al fitopatógeno *Fusarium virguliforme*, la cual resultó negativa para ambos. Asimismo es muy probable que ambos diterpenos cumplan un rol de defensas químicas contra ciertos predadores, lo cual fue demostrado en otros briaranos de *Renilla*.^{100, 101}

La especie *Convexella magelhaenica*

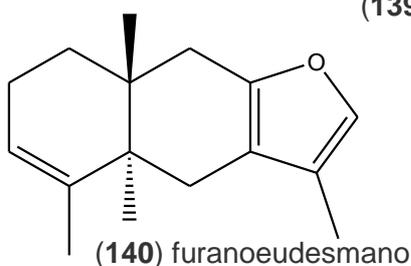
La especie *C. magelhaenica* (Studer, 1879), sinonimia *Primnoella magelhaenica*, es una gorgonacea perteneciente a la familia Primnoidae, de la que ya fueron encontradas algunas especies en la costa sudamericana, tanto chilena como argentina (*Primnoella divergens*, *Primnoella flagellum*, *Primnoella murrayi* y *Primnoella vanhoeffeni*). Estas especies se incluyen morfológicamente tanto entre los abanicos como entre los látigos de mar. En el caso de *C. magelhaenica*, sus colonias de pólipos cilíndricos se organizan alrededor de un eje central largo y flexible, lo que le confiere al animal una forma de látigo.

Son escasos los estudios químicos sobre Primnoidae, quizás porque se encuentran en áreas de difícil acceso, como en los mares antárticos y subantárticos. Un estudio realizado sobre la distribución de especies de dicha familia en las costas de América del Norte muestra que ellas se encuentran en mares de aguas profundas, de bajas temperaturas (entre -2° a 11°C) y fuertes corrientes (cerca 30 cm s^{-1}).¹⁰⁴

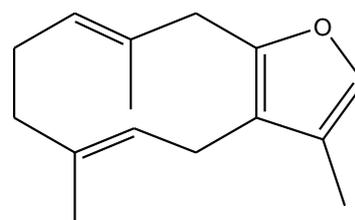
No hay estudios químicos sobre la especie *C. magelhaenica* y para la familia fue encontrada una única publicación relativa a la gorgonia antártica *Dasystenella acanthina*, en la cual fueron encontrados tres sesquiterpenos conocidos: *trans*- β -farneseno (**139**, feromona), isofuranodieno (**141**) y un furanoeudesmano (**140**). La estructura de éste último compuesto está relacionada al atractilon, aislado de la planta terrestre *Atractylodes japonica* y de algunos corales blandos de la familia Xenidiidae.¹⁰⁵



(139) *trans*- β -farneseno



(140) furanoeudesmano



(141) isofuranodieno

¹⁰⁴ Brian, T.L.; Metaxas, A. *Deep-Sea Research I*, **2006**, 53, 1865-1879.

¹⁰⁵ Gavagnin, M et al. *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66, 1517-1519.

Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios del coral *Convexella magelhaenica*

El coral *C. magelhaenica* fue colectado por la Dra. Laura Schejter (INIDEP, Mar del Plata), por medio de rastras, como fauna acompañante en un banco de vieyras situado en las siguientes coordenadas: 38°20,31'S, 55°40,35'W, a una profundidad de 93 metros. El octocoral fue identificado como *Convexella magelhaenica* (Studer, 1879) por el Dr. Carlos D. Pérez (Univ. Federal de Pernambuco, Brasil). El material congelado fue liofilizado y se obtuvo 15 g de coral seco. El coral liofilizado fue macerado primero con EtOH y después con AcOEt, y el extracto obtenido fue concentrado en rotavapor. Con el extracto concentrado se procedió a la separación inicial por medio de cromatografía flash en columna seca de sílica, usando como eluyentes ciclohexano, AcOEt y MeOH, sucesivamente. De las tres fracciones obtenidas se eligió la segunda fracción de acuerdo al perfil observado en CCD y en RMN ¹H. Dicha fracción fue entonces sometida a HPLC con metanol / H₂O 90:10, y de esta manera se pudo aislar dos compuestos mayoritarios, CB2A y CB2D, los cuales fueron posteriormente purificados por CCD preparativa (CH₂Cl₂).

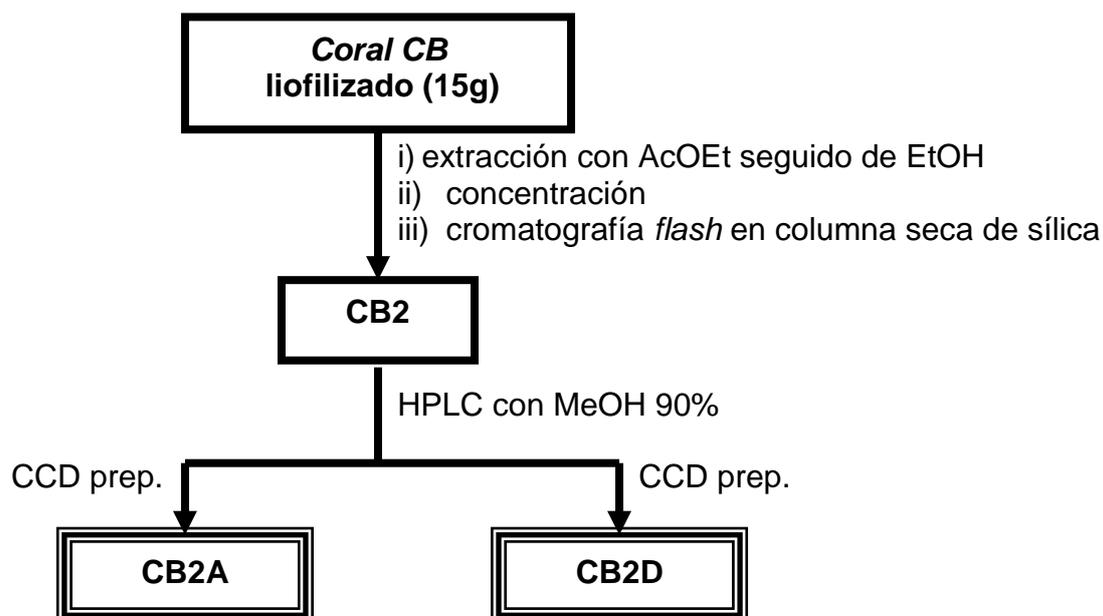


Figura 20: Esquema de aislamiento de los compuestos de *Convexella magelhaenica*.

Elucidación estructural del compuesto CB2A

El compuesto CB2A fue aislado como un aceite incoloro. Presentó en el espectro de masas (ESI) de alta resolución un ión MNa^+ a 425.2298 de donde se obtuvo la fórmula molecular $C_{24}H_{34}O_5$ y se calculó la presencia de ocho insaturaciones.

En el espectro de RMN de ^{13}C se observaba la presencia de 24 carbonos, siendo 3 de ellos carbonos carbonílicos, 6 carbonos vinílicos, 1 carbono cuaternario alifático, 4 metinos (de los cuales dos eran oxigenados), 4 metilenos y 6 metilos (datos corroborados por análisis del espectro DEPT). De ello se dedujo que el esqueleto del compuesto estaría constituido por dos anillos.

El análisis del espectro de RMN 1H (**Figuras 21 y 22**) juntamente con el espectro HSQC mostraba en la zona de campos bajos la presencia 4 protones de doble enlace que no presentaban acoplamiento entre sí. En particular se destacaba la presencia de un grupo exometileno (δ 1H 4.88 (*t*, 1H, $J = 1.5$ Hz); 4.86 (*s.a.*, 1H; δ ^{13}C 114.9). Además, aparecían 2 señales de metinos oxigenados, a δ 5.11 (*td*, 1H, $J = 10.0$ y 7.0 Hz) y δ 5.21 (*d*, 1H, $J = 7.0$ Hz) respectivamente.

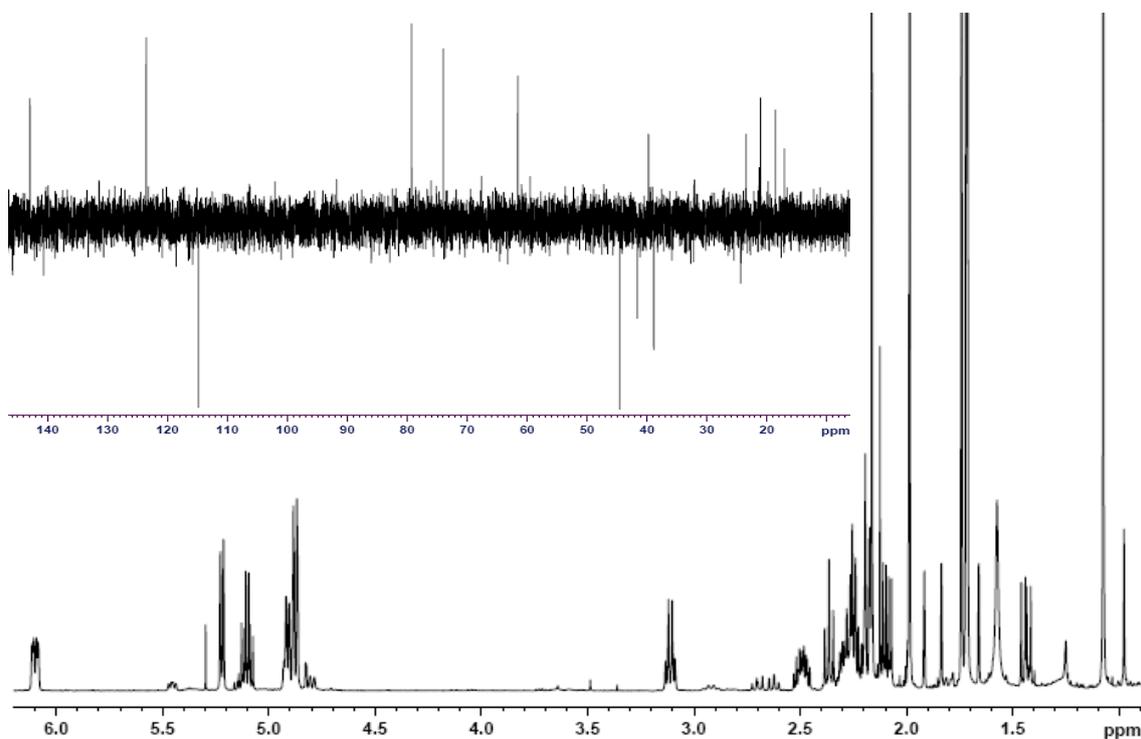
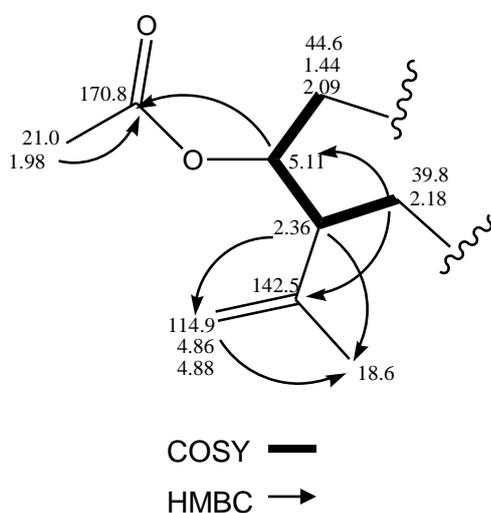


Figura 21: Espectro de RMN 1H (500 MHz; en $CDCl_3$) y DEPT de CB2A.

En la zona de δ menores del espectro protónico se observaban dos señales de metilos típicas de grupos acetato (δ 2.16, s, 3H y δ 1.98, s, 3H), que correlacionaban en el espectro HMBC con los carbonilos correspondientes a δ 170.3 y δ 170.8, respectivamente. En este mismo espectro se veía la correlación de dichos metilos con los carbonos de grupos metino cuyas señales en RMN ^1H aparecían a δ 5.21 (*d*, 1H, $J = 7.0$ Hz) y δ 5.11 (*td*, 1H, $J = 10.0$ y 7.0 Hz), respectivamente, lo cual determinaba las posiciones de sustitución en el esqueleto.

En el espectro COSY (**Figura 23**) se observaban los acoplamientos del protón a δ 5.10 ya mencionado, por un lado con un protón de metileno a δ 1.44 (*dd*, 1H, $J = 13.0$ y 9.0 Hz), y por otro lado con un metino a δ 2.36 (*t*, 1H, $J = 10.0$ Hz). Este último a su vez estaba acoplado con un metino a δ 2.18 (*dd*, $J = 13$ y 9 Hz), además de presentar correlaciones en el espectro HMBC con un metilo sobre doble enlace a δ 18.6 y con el exometileno a δ 114.9. Se observaban además correlaciones en ambos espectros entre estas dos últimas señales, confirmando así la presencia de un grupo isopropenilo.



En δ 2.18 aparecían dos señales superpuestas que integraban para 2H. Una de ellas correlacionaba en el espectro HSQC con un metino a δ 39.8 y la otra correspondía a uno de los protones del metileno a δ 41.6. La localización del metino (y no del metileno) en esa posición fue determinada por el espectro HMBC, donde se observaba solamente la correlación de la señal a δ 2.18 (y no la del protón geminal del metileno a δ 3.11) con el carbono vinílico del grupo isopropilo a δ 142.5.

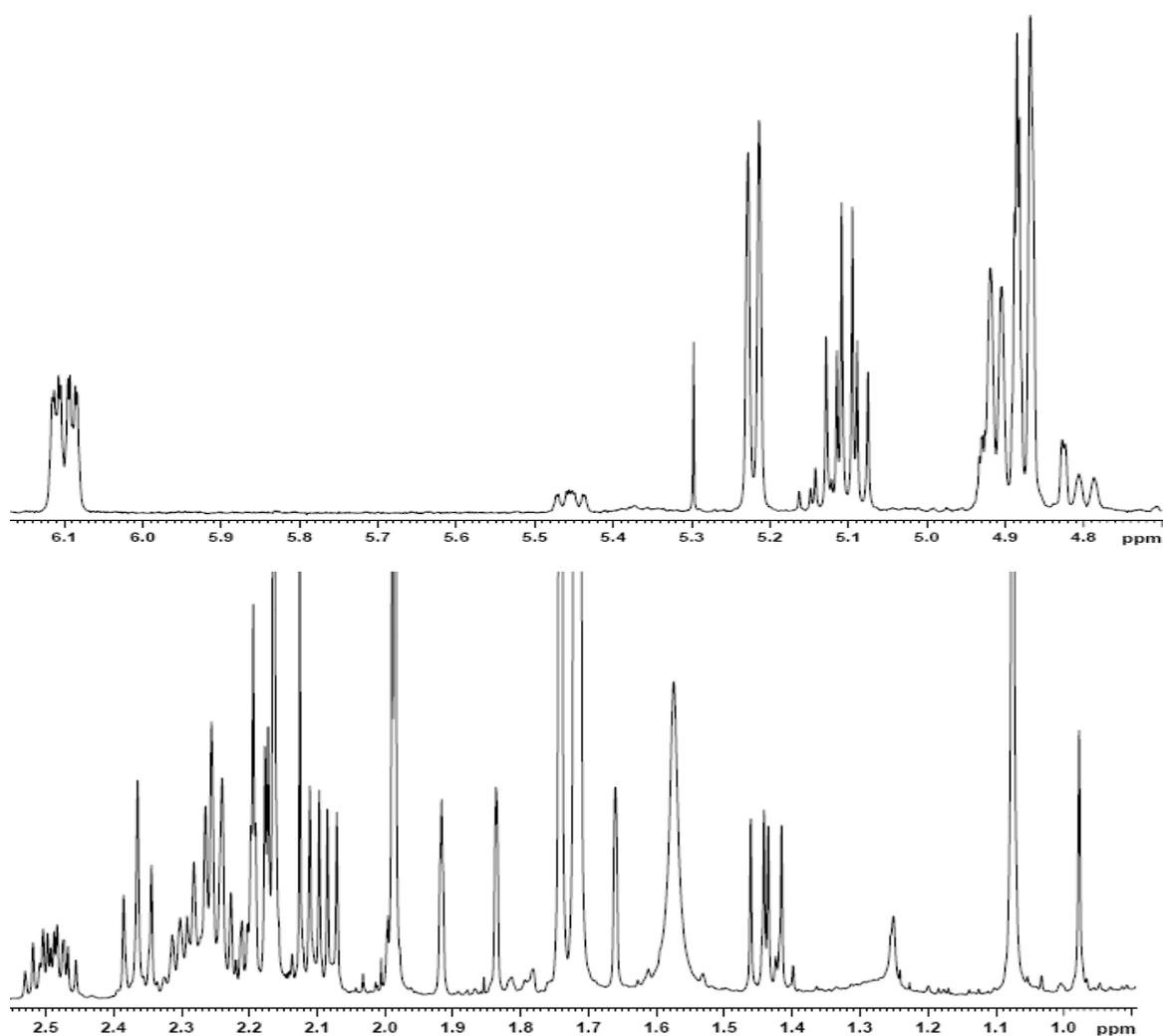
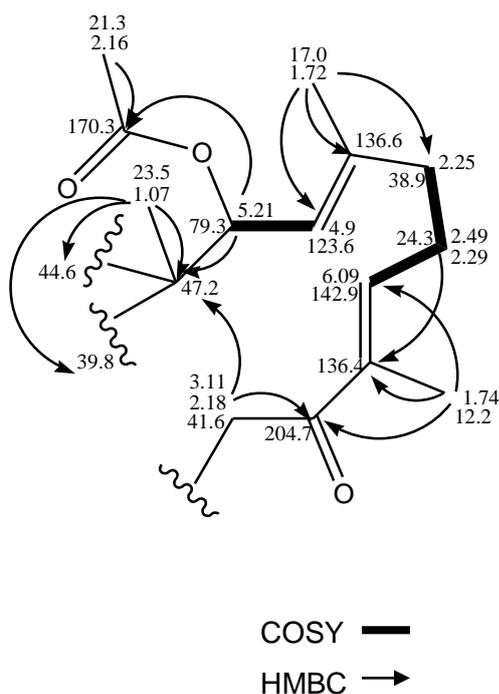


Figura 22: Ampliaciones del espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de CB2A.

El otro acetato, cuyo carbonilo aparecía a δ 170.3 correlacionaba (HMBC) con la señal del protón a δ 5.21 y ésta a su vez correlacionaba (COSY) con una señal a δ 4.9 (doblete, $J = 7.0$ Hz) correspondiente a un protón vinílico (cuyo carbono aparecía a δ 123.6). Este doble enlace estaba constituido por otro lado por el carbono cuaternario a δ 136.6, sobre el cual se encontraba un metilo (δ_{C} 17.0). En el espectro HMBC se observaban correlaciones entre este metilo (singulete a δ 1.72 que en el espectro COSY correlacionaba con el protón de la olefina trisustituída) con los carbonos de dicho doble enlace y con el metileno a δ_{C} 38.9.



Por medio de las correlaciones del espectro COSY se pudo definir al metileno de δ_C 24.3 como vecino al metileno a δ_C 38.9. A su vez, se pudo ubicar a continuación el restante doble enlace por correlación (COSY) de los protones del metileno a δ_C 24.3 con el protón vinílico a δ 6.09 (*dd*, 1H, $J = 11.0$ y 4.5 Hz). Los desplazamientos de esta señal (δ_C 142.9), indicaban que este doble enlace se encontraba conjugado con el carbonilo de la cetona a δ 204.7.

Este protón vinílico correlacionaba (HMBC) con el carbono cuaternario (a δ 136.4) de este mismo doble enlace, así como con el metilo que estaba localizado sobre dicho carbono (a δ_C 12.2 y a δ_H 1.74). Este metilo a su vez correlacionaba en el espectro HMBC con el carbonilo conjugado.

Se dedujo que al otro lado del carbonilo debía estar localizado el metileno a δ_C 41.6, debido al desplazamiento de sus protones (δ 3.11 y δ 2.18) y a sus correlaciones (HMBC) con la señal a δ 204.7.

En el espectro HMBC (**Figura 24**) se observaban correlaciones clave entre la señal del protón a δ 3.11 con el único carbono cuaternario sp^3 de la molécula, a δ 47.2. Dicho carbono cuaternario correlacionaba, por otro lado, con la señal del protón a δ 5.21 ya mencionado, lo cual indicaba una cercanía por cierre de un anillo. El carbono cuaternario a δ 47.2 además presentaba como sustituyente al metilo a δ 1.07. A su vez esta señal correlacionaba (HMBC) con el metileno a δ 44.6 y con el metino a δ 39.8, pertenecientes al fragmento anteriormente planteado. De esta manera se confirma el cierre de un anillo de 11 carbonos.

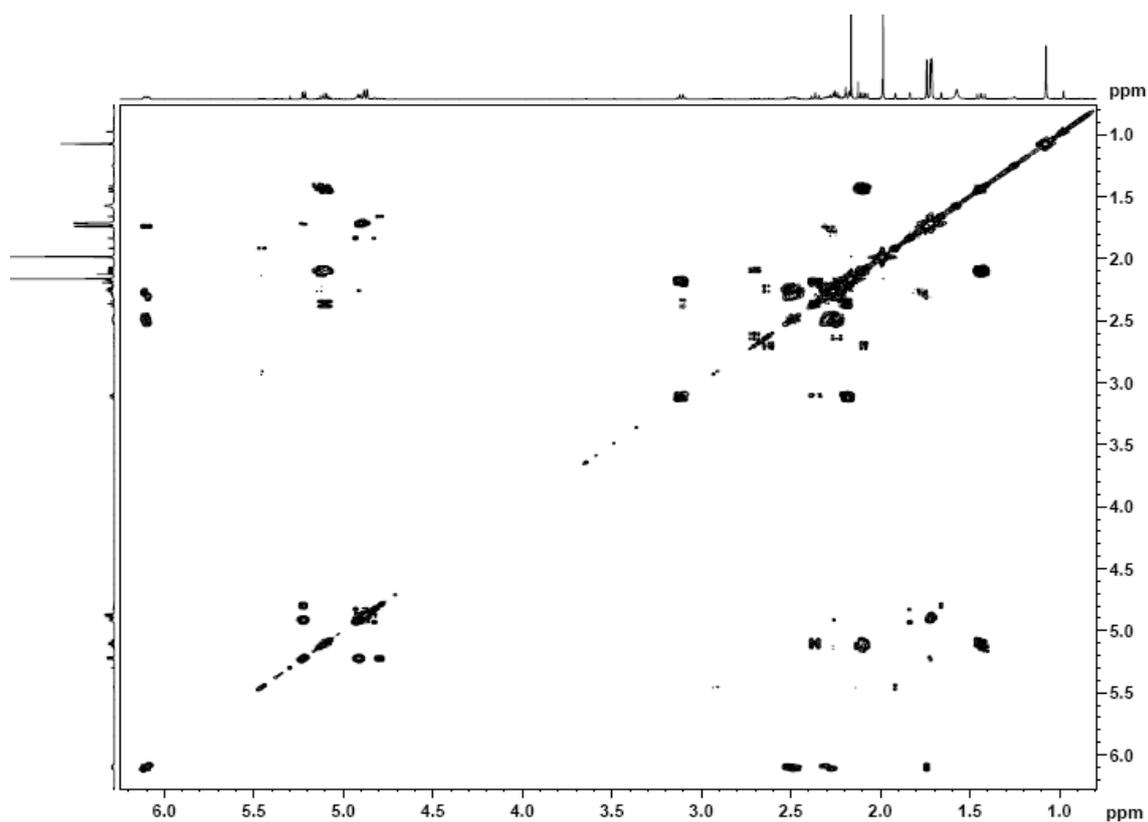


Figura 23: Espectro de RMN COSY (500 MHz; en CDCl_3) de CB2A.

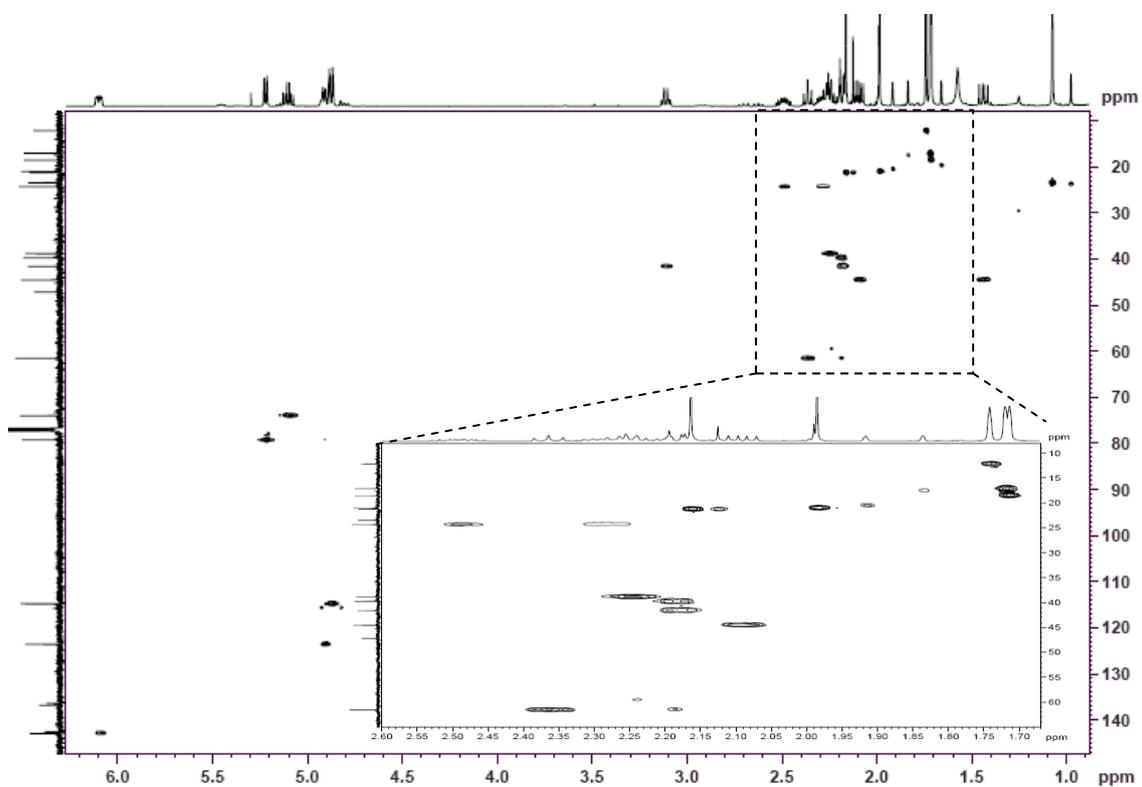
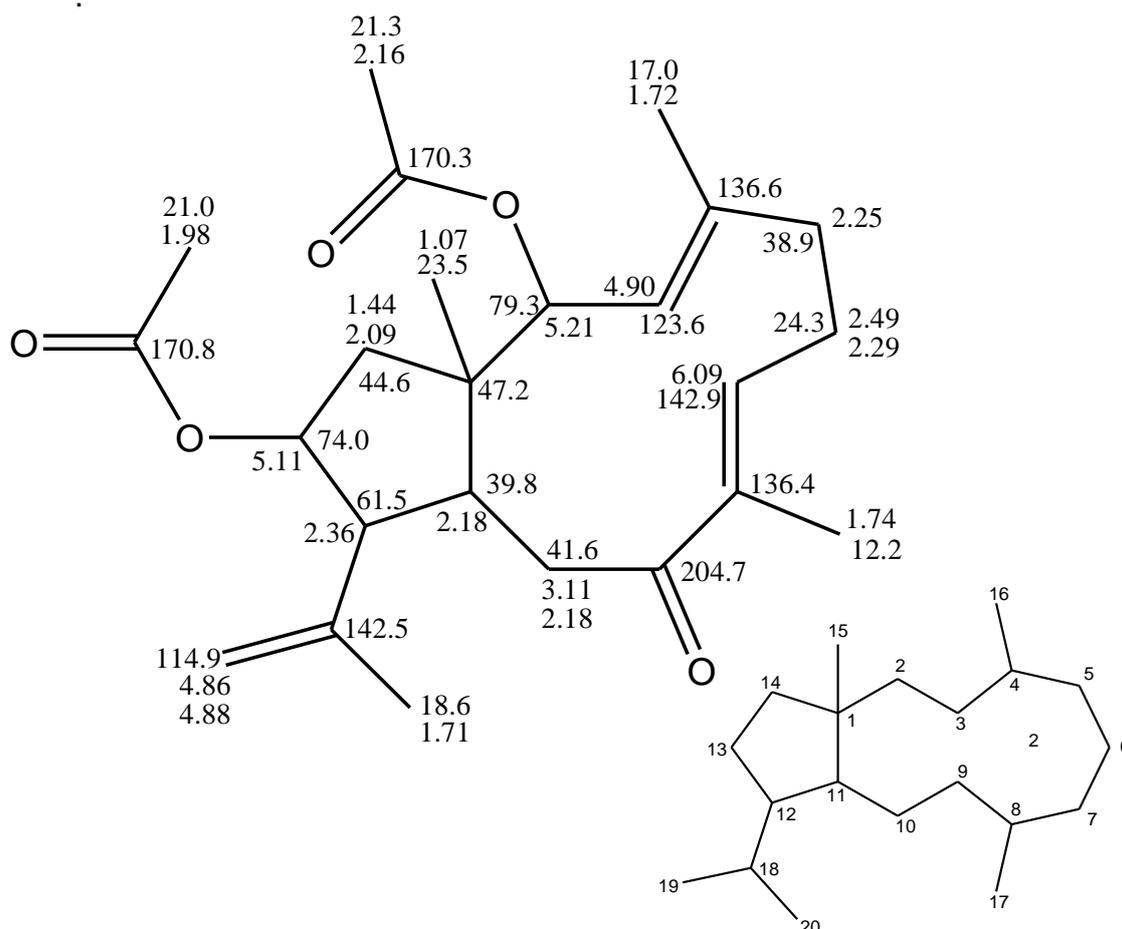


Figura 24: Espectro de RMN HMBC (500 MHz; en CDCl_3) de CB2A.

Así, el carbono cuaternario se ubicaba en el puente de cierre de dos anillos, siendo uno de cinco y el otro de once miembros. Dicha estructura correspondía a un diterpeno de esqueleto tipo dolabellano, donde el cierre de los anillos se daba entre los carbonos C-1 y C-11 (asignación completa en la **tabla 5, parte experimental**, pág. 248).



Al analizar la estereoquímica del compuesto, se observó en el espectro ROESY (**Figura 25**) una correlación espacial entre las señales del metilo angular a δ 1.07 (Me-15), con uno de los protones del metileno vecino (C14) a δ 1.44. El protón geminal a éste, a δ 2.09 a su vez correlacionaba con H13. Por lo tanto en acetato de C13 se encontraba en la misma cara de la molécula que el Me-15. Esta misma señal también correlacionaba con el triplete a δ 2.36 (H12), punto de unión del grupo isopropenilo. Esto ubicaba al isopropenilo en la cara opuesta al metilo angular, completando la estereoquímica del anillo A. Por otro lado, Me-15 presentó NOE con H-2. De esta forma el acetato en C2 quedó ubicado en la cara opuesta a Me-15 y al otro acetato. Finalmente, los NOES

observados entre el Me-17 con el protón de doble enlace H3, así como los $\delta^{13}\text{C}$ de los metilos, sumamente bajos por efecto γ , indicaban una estereoquímica *E* para los dos dobles enlaces, completando de esta forma la asignación estereoquímica de la molécula.

De esta manera el compuesto CB2A quedó identificado como el nuevo dolabellano $2\alpha,13\beta$ -diacetoxi- 12α -dolabella- $3E, 7E, 18$ -trien-9-ona (**142**).

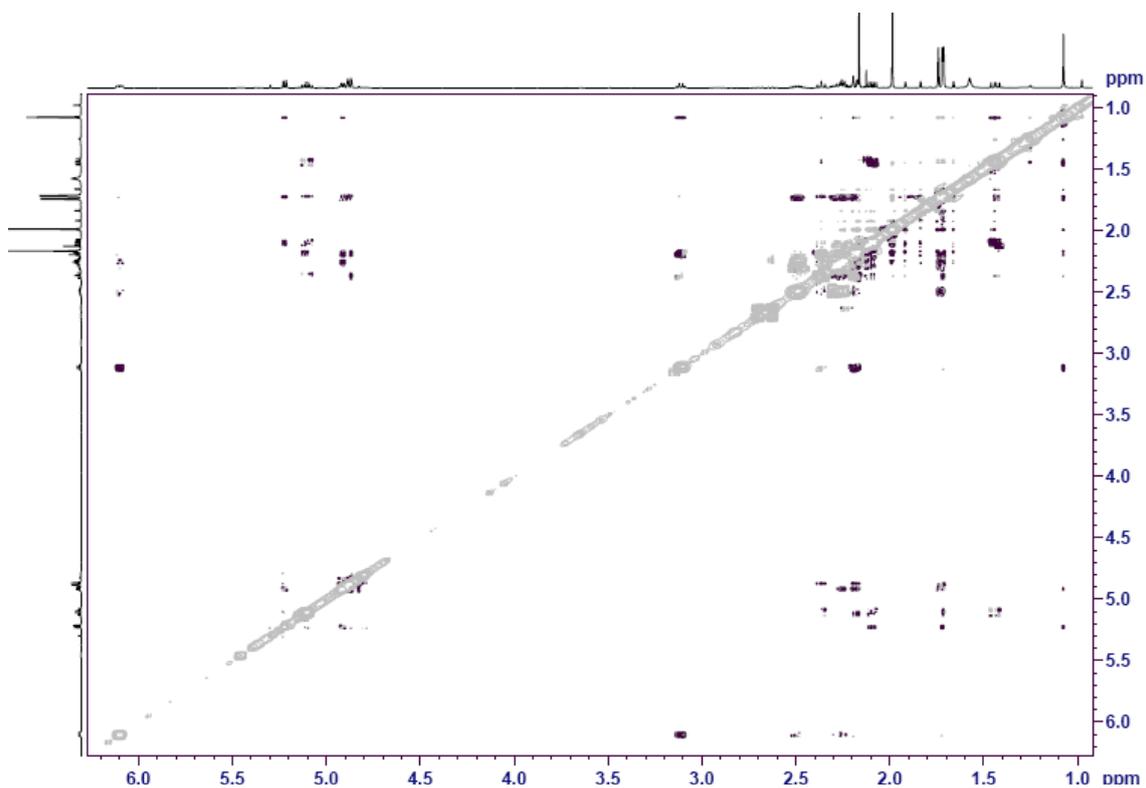
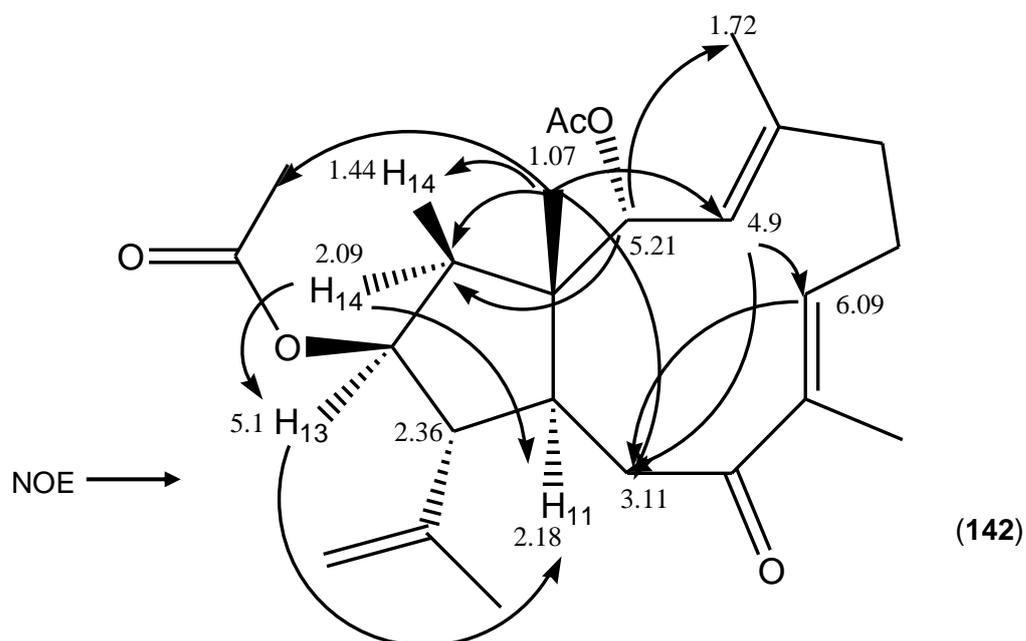


Figura 25: Correlaciones observadas en el espectro ROESY para CB2A.

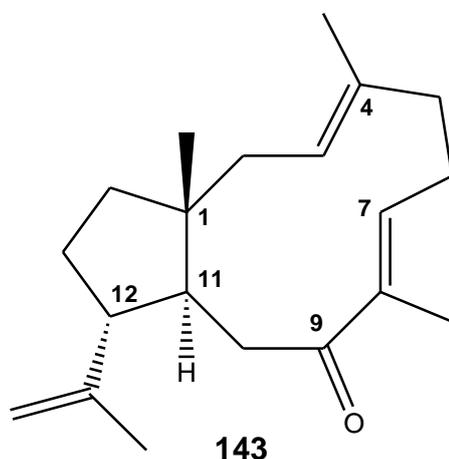


Elucidación estructural del compuesto CB2D

El compuesto CB2D fue aislado como un aceite incoloro que se presenta en gran cantidad en el coral, con un rendimiento total de 0.1% sobre la masa del coral liofilizado.

En el espectro de masa de alta resolución presentó un ión MH^+ 287.2370 y la fórmula molecular $C_{20}H_{30}O$, obtenida a partir de dicho espectro, indicó una diferencia de 116 u.m.a. respecto al CB2A, lo que correspondería a la masa de 2 acetatos.

Los espectros de RMN de ^{13}C y 1H de CB2D (**Figura 26**) eran muy similares a aquellos del compuesto CB2A, y la presencia de 6 insaturaciones correspondientes a un carbonilo (C-9), tres dobles enlaces (C-18, C-7, C-4, C-8, C-3 Y C-19) y dos anillos confirmó la familiaridad de ambos compuestos en cuanto al esqueleto carbonado, con la diferencia de que en este caso el carbonilo de la cetona era el único carbono oxigenado del compuesto. Además se observaban en el espectro de ^{13}C cuatro señales de metilos, dos de metinos y una de carbono cuaternario (DEPT y HSQC). Aunque en el espectro RMN 1H muchas de las señales que se encontraban en campos altos aparecían fuertemente superpuestas, se pudo rastrear adecuadamente la cadena de acoplamiento protónico en el espectro COSY (**Figura 27**). Un análisis cuidadoso de los espectros RMN 2D permitió comprobar que CB2D era idéntico a CB2A, salvo por los acetatos (asignación completa en la **tabla 5, parte experimental**, pág. 248). La configuración de los dobles enlaces fue nuevamente *E*. De esta forma, el compuesto CB2D fue identificado como el nuevo dolabellano 12α -dolabella-3*E*, 7*E*, 18-trien-9-ona (**143**).



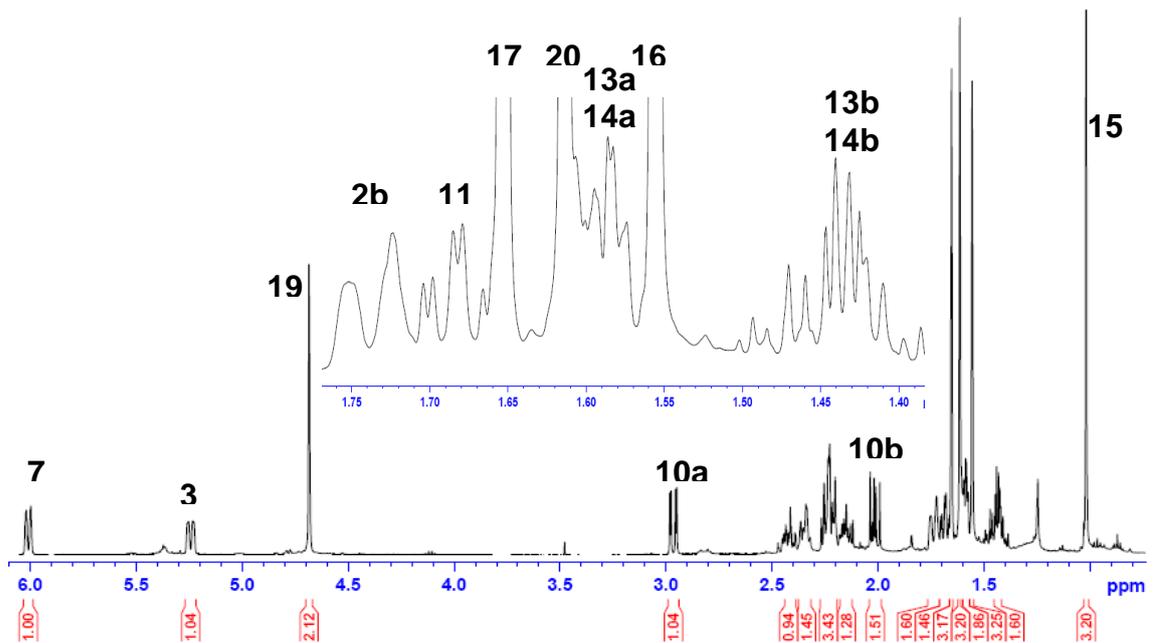
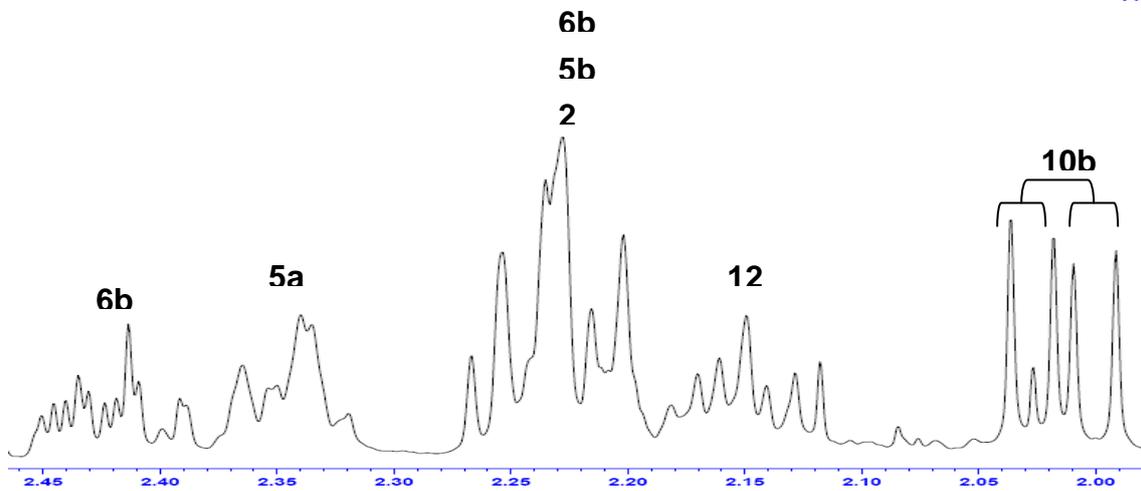
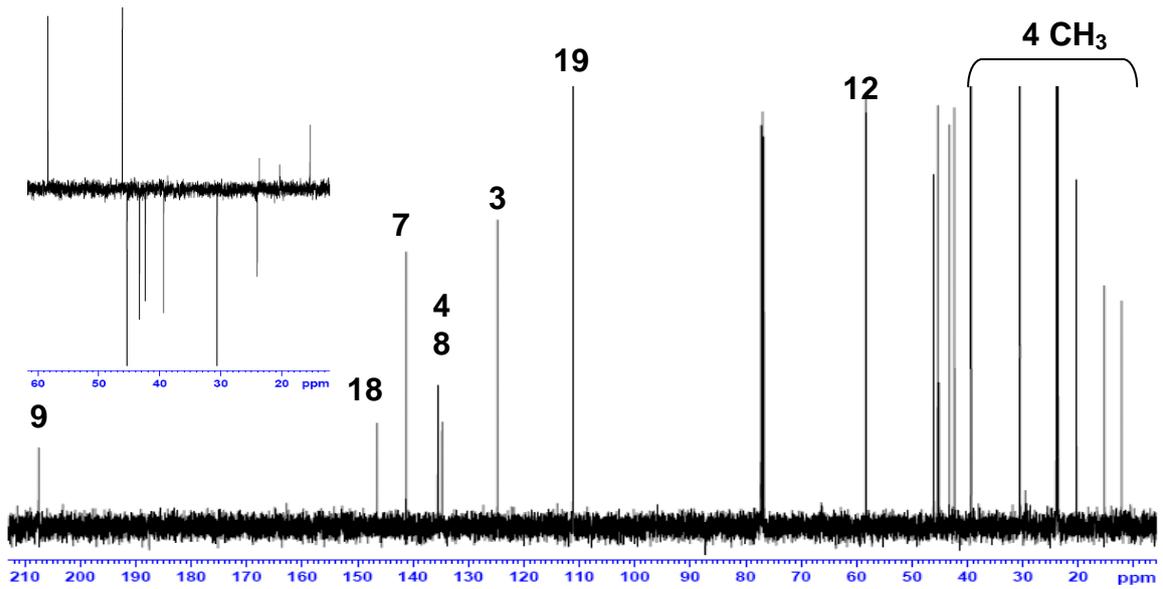


Figura 26: Espectros de RMN ^1H y ^{13}C t DEPT (500 MHz; en CDCl_3) de CB2D.

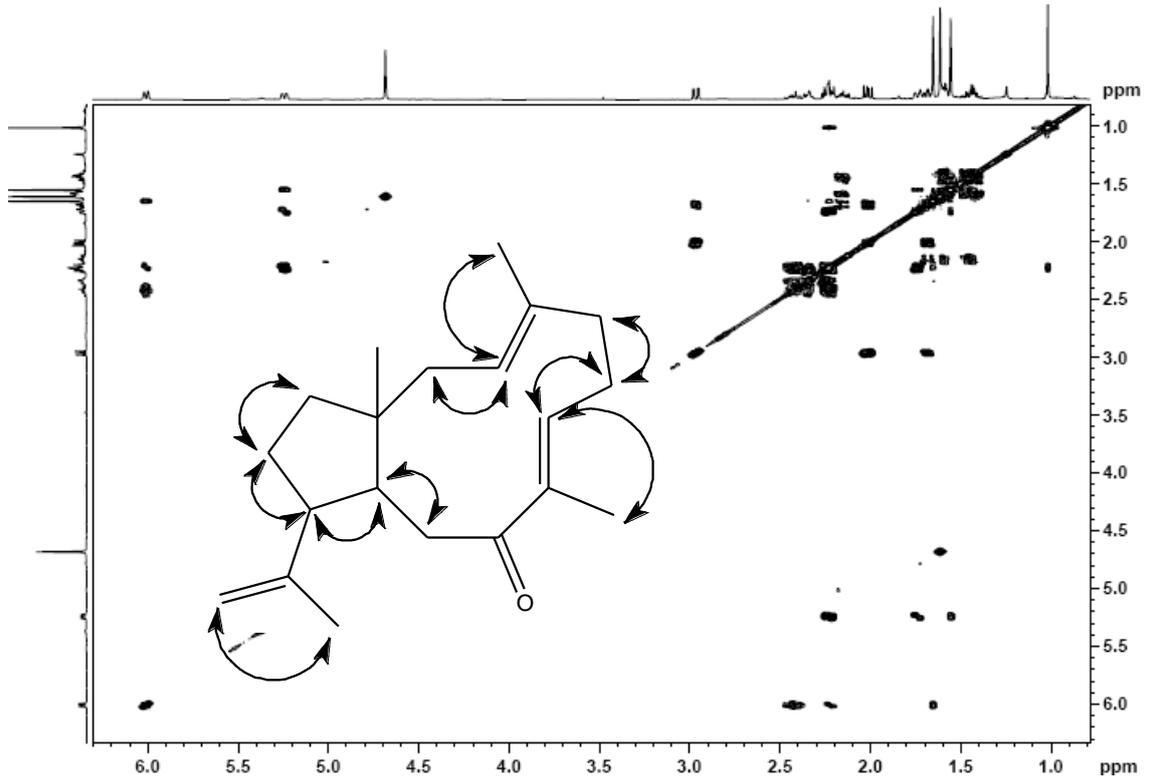
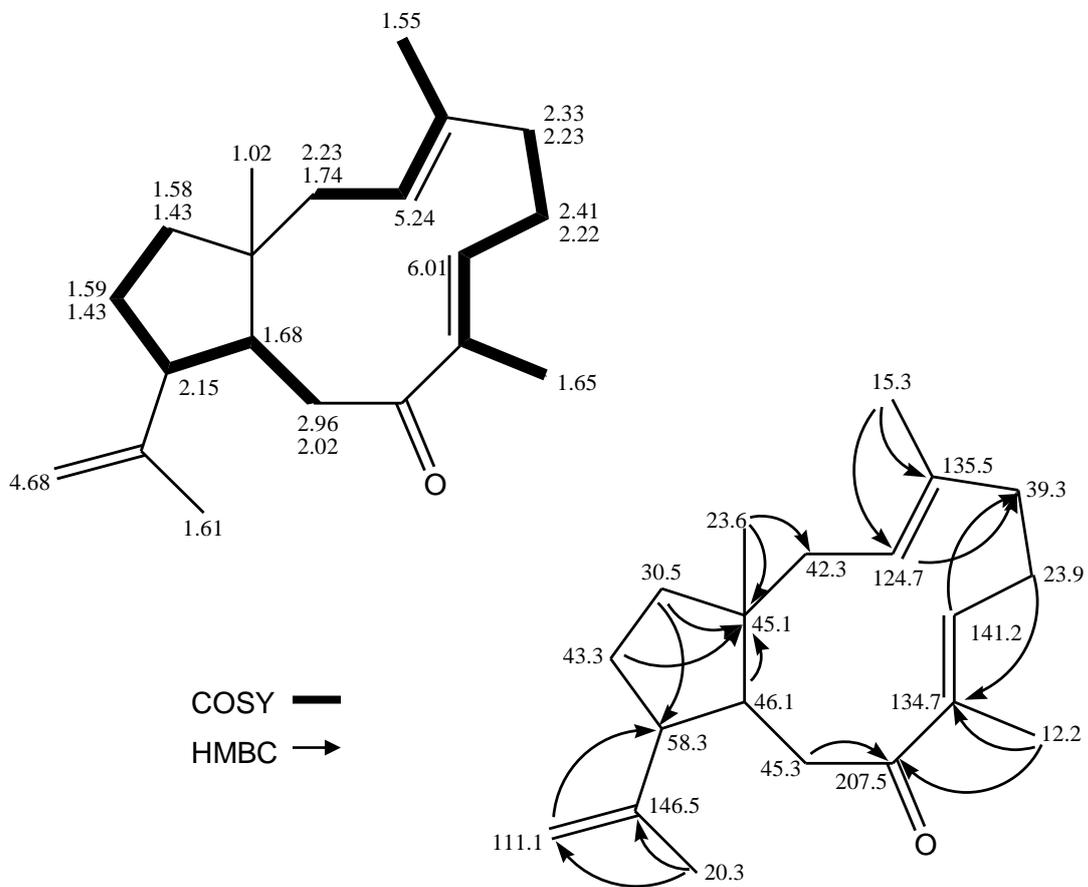


Figura 27: Espectro de RMN COSY (500 MHz; en CDCl₃) de CB2D.



El compuesto CB2D fue probado en ensayo de actividad antifúngica frente a los hongos fitopatógenos *Fusarium virguliforme* y *Botrytis cinerea*, aplicando la metodología de bioautografía sobre silicagel. En ambos los ensayos no demostró tener actividad antifúngica.

También fue probada su citotoxicidad y actividad antiviral sobre el virus herpético (HSV-1, cepa KOS, método MTT)¹⁰⁶, expresada como IS [Índice de selectividad = CC_{50} / CE_{50} (concentración citotóxica/concentración efectiva antiviral)] donde demostró tener pequeña actividad antiviral ($IS < 1.14$) aunque muy citotóxico.

El compuesto será probado cuanto a su citotoxicidad en células tumorales.

¹⁰⁶ Savi, L.A.; Barardi, C.R.M.; Simoes, C.M.O. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 2552-2557.

ESTUDIO QUÍMICO DE PLANTAS MEDICINALES DEL GÉNERO *Maytenus*

Miren las plantitas que dan lindas flores, y miren después sus raicitas apareciendo al aire, al borde de este barranco. Son flojas estas raíces. Son coloraditas, amarillitas y flojas. Con la uña se las corta. Miren después esas matas pardas, con flores que son una pura espina, y miren sus raíces: juertes, bravas. Se precisa mano firme y muchos tirones pa arrancarlas...también he superado cosas tristes admirando vidas heroicas, en los campos y en las ciudades, y me he dicho: "¡Raíz de matas bravas y espinudas!"

Atahualpa Yupanqui (del libro *Aires Indios*)

Capítulo 3: Plantas del género *Maytenus*

Familia Celastraceae

La familia Celastraceae (de *Celastrus*, **figura 51**) comprende entre 90 y 100 géneros y cerca de 1.300 especies, que incluyen plantas trepadoras, arbustos y pequeños árboles pertenecientes al orden de las *celastrales*. La gran mayoría de los géneros son tropicales, excepto *Celastrus* y *Euonymus*, ampliamente extendidos por latitudes de clima templado.

Algunos de los géneros más representativos y sus distribuciones son: *Maytenus* (tropical, 225 especies), *Salacia* (tropical, 200 especies), *Euonymus* (Himalayas y Japón, 176 especies), *Hippocratea* (tropical, América, 120 especies), *Cassine* (tropical, África, Asia y Oceanía, 40 especies), *Celastrus* (tropical, Asia, Australia y América, 30 especies), *Elaeagnus* (tropical y subtropical, 16 especies), *Pachystima* (América del Norte, 5 especies) y *Gyminda* (tropical, América del Norte y Central, 3 especies).

Muchas plantas de la familia Celastraceae han sido estudiadas extensivamente debido a su amplio y antiguo uso por pueblos de todo el mundo, principalmente en agricultura y en medicina popular.

Un ejemplo del uso de especies de celastráceas en agricultura tradicional es *Tripterygium wilfordii*, (**Figura 51**) conocida en China como “Lei Gong Teng”. Las raíces molidas de esta especie se han usado en China durante siglos por sus propiedades insecticidas.^{107,108} Esta es la especie más estudiada de las celastráceas y de la que se han aislado mayor número de sustancias activas. Los extractos crudos y extractos refinados de *T. wilfordii* están siendo usados en clínica para el tratamiento de la artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedades autoinmunes y diversas afecciones dérmicas. Existen diversas patentes sobre el uso de la raíz seca de esta especie como antitumoral, y de la actividad del extracto clorofórmico como inmunosupresor y antiinflamatorio¹⁰⁹.

¹⁰⁷ Beroza, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 2136.

¹⁰⁸ Kupchan, S.M.; Court, W.A.; Dailey, J.R. R.G.; Gilmore, C.J.; Bryan, R.F. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 7194.

¹⁰⁹ Wang, X.W.; Xie, H. *Drugs of the Future.* **1999**, 24, 991-997.

Las hojas y brotes de *Catha edulis*, conocida como “Khat”, son utilizados por la población rural de la costa este de África y de la península Arábiga por sus efectos estimulantes, para combatir la fatiga y el hambre. Su consumo produce una sensación de bienestar y excitación, sin embargo presenta numerosos efectos secundarios como insomnio y falta de concentración. Los compuestos responsables por dichos efectos son la (+)-norpseudoefedrina (catina) y α -aminopropiofenona [(-)-catinona]. El uso abusivo del “Khat” crea grandes problemas de naturaleza social, de salud y económicos.¹¹⁰

Otra planta utilizada con el mismo fin en las Islas Canarias es la especie *Maytenus canariensis*, conocida localmente como “peralillo”. Sus frutos machacados se utilizan externamente para tratar heridas de la piel y la infusión de sus hojas es utilizada contra el reuma. Los agricultores y pastores suelen masticar sus hojas para aliviar la fatiga, lo que recuerda al uso del “khat” en África.

Las plantas del género *Maytenus*, que están distribuidas por todo el mundo, han sido utilizadas para el tratamiento del cáncer en África, como insecticida en Asia o como estimulante para combatir la fatiga en las Islas Canarias. En América Latina muchas especies de *Maytenus* son utilizadas por comunidades andinas y amazónicas y por ello son las más estudiadas en nuestro continente.

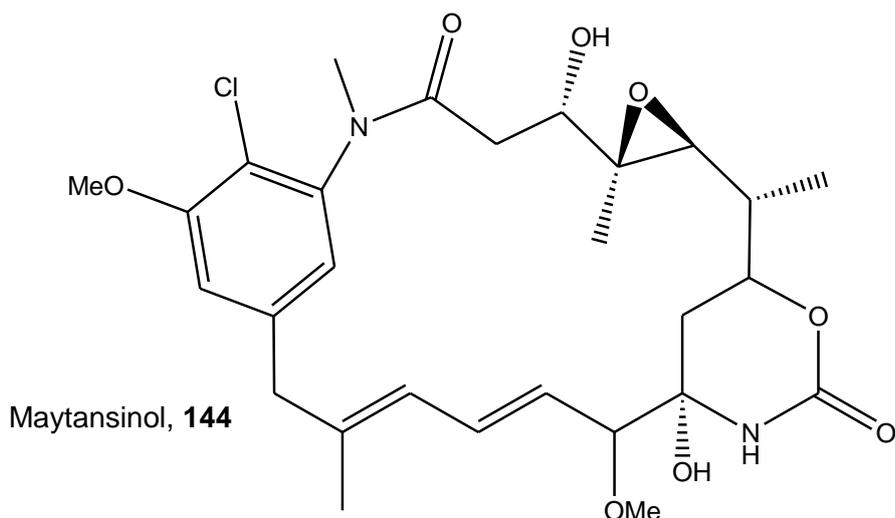
Plantas del género *Maytenus* se volvieron muy conocidas en el ámbito científico cuando en los años 70 fueron descubiertos los maytansinoides (ej. Maytansinol, **144**), compuestos que presentaban una excepcional actividad antitumoral.

Lamentablemente, los maytansinoides no pudieron ser utilizados como medicamento debido a que causaban serios trastornos gastrointestinales.¹¹¹

Desde entonces varios grupos de investigación han estado interesados en estudiar plantas de dicho género, por la amplia variedad y distribución botánica, la naturaleza particular de sus metabolitos secundarios, la complejidad de sus procesos biosintéticos, y principalmente por los distintos tipos de actividades farmacológicas asociadas a preparaciones de esas plantas.

¹¹⁰ Der Krikorian, A. J. *Ethnopharmacol.* **1984**, *12*, 115.

¹¹¹ Gonzalez, A.G. Atta-Ur-Rahman (Ed) *Studies In Natural Products Chemistry*, **1996**, 18.



Algunas especies de *Maytenus* encontradas en la región amazónica (Perú, Ecuador, Colombia y Brasil) son ampliamente utilizadas por la población local para el tratamiento del cáncer, reumatismo y otras afecciones de la piel. En Brasil y en Perú, las especies *Maytenus krukovii*, *Maytenus chuchuhuasca*, *Maytenus colassi*, *M. macrocarpa* y *M. laevis* (todas conocidas popularmente por el nombre “chuchuhuasi”) son utilizadas como antiinflamatorio, y además, con el polvo rojo obtenido de la corteza de las raíces se prepara un licor con alcohol o aguardiente que es sumamente consumido como afrodisíaco¹¹².

Al partir de los datos etnofarmacológicos se encontró que un grupo diverso de metabolitos secundarios que incluye los maytansinoides, alcaloides sesquiterpénicos dihidroagarofuránicos y triterpenoides metilénquinonas son los responsables de las diversas actividades biológicas reportadas para plantas del género *Maytenus*.

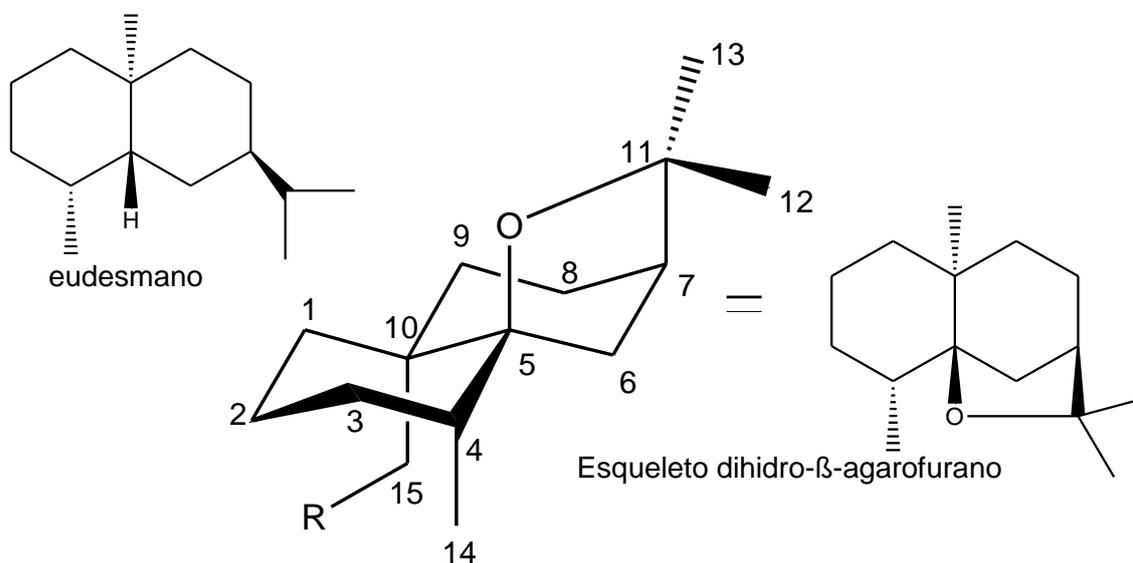
En general, la biosíntesis de los metabolitos pertenecientes a la familia Celastraceae es muy específica, los esqueletos de los sesquiterpenos β -dihidroagarofuránicos altamente oxidados y de los triterpeno-quinonas biosintetizados en las raíces de dichas plantas son exclusivos de celastráceas. El aspecto químico es tan importante que permite utilizar estos compuestos como marcadores quimiotaxonómicos. Recientemente las plantas de la familia Hippocrateaceae fueron agrupadas dentro de la familia Celastraceae al verificar en aquellas la presencia de alcaloides sesquiterpénicos.

¹¹² Kloucek, p.; Polesny, Z. Svobdova, B. *J. Ethnopharmacology*, **2005**, 99, 309-312

Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos característicos de las celastráceas son de tipo dihidro- β -agarofuranos, que son sesquiterpenos tricíclicos de la familia del eudesmano. Su esqueleto base consiste en una *trans*-decalina y un anillo tetrahidrofuránico, entre C5-C7, en posición β con respecto al sistema transdecalínico.

Estudios de Rayos X y conformacionales han demostrado que los anillos A–B con unión *trans* forman una decalina silla-silla, ligeramente distorsionada por la presencia del enlace 1,3-diaxial del anillo tetrahidrofuránico, prácticamente perpendicular al plano formado por los carbonos C 5, C7, C 8 y C 10.¹¹³



En cuanto a su biosíntesis, los agarofuranos provienen del catión *E,E*-farnesilo, con el catión germacrilo como intermedio en la biosíntesis (**Figura 28**)¹¹⁴.

¹¹³ Gao, J-M.; Wu, W-J.; Zhang, J-W.; Konishi, Y. *Nat. Prod. Rep.*, **2007**, 24, 1153-1189.

¹¹⁴ Dewick, P.M. *Medicinal Natural Products*, Ed. Baffins Lane, Chichester, 2nd ed., **2002**.

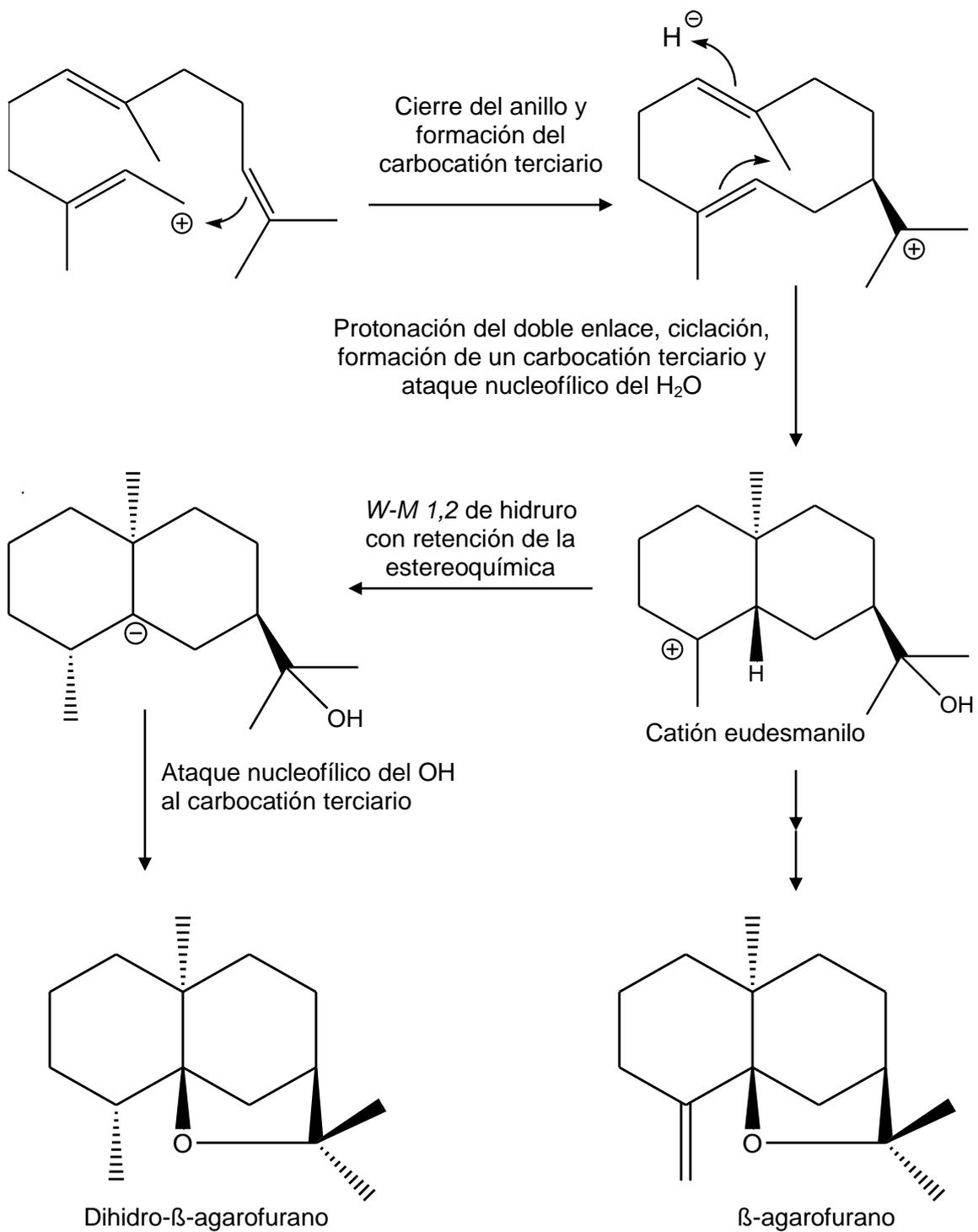
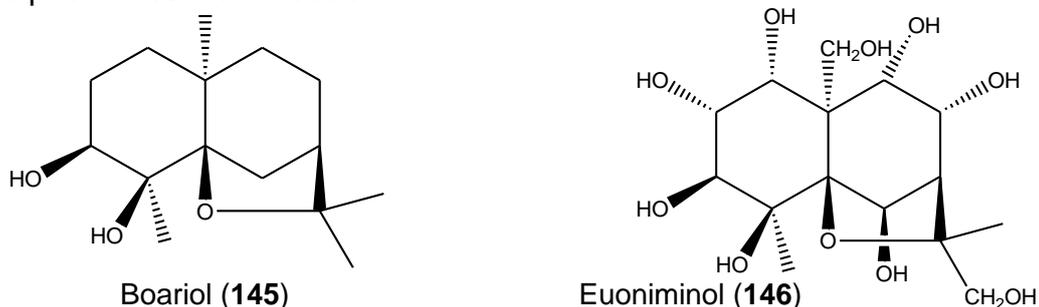


Figura 28: Biosíntesis de los sesquiterpenos agarofuránicos.

Dichos metabolitos varían en el grado de oxidación y van desde el boariol (**145**), que presenta apenas dos hidroxilos, hasta el euoniminol (**146**), con nueve posiciones hidroxiladas.



Los polialcoholes sesquiterpénicos pueden presentarse esterificados con distintos ácidos carboxílicos alifáticos o heterocíclicos (**Figura 29**), siendo los más comunes los ácidos acético y benzoico.

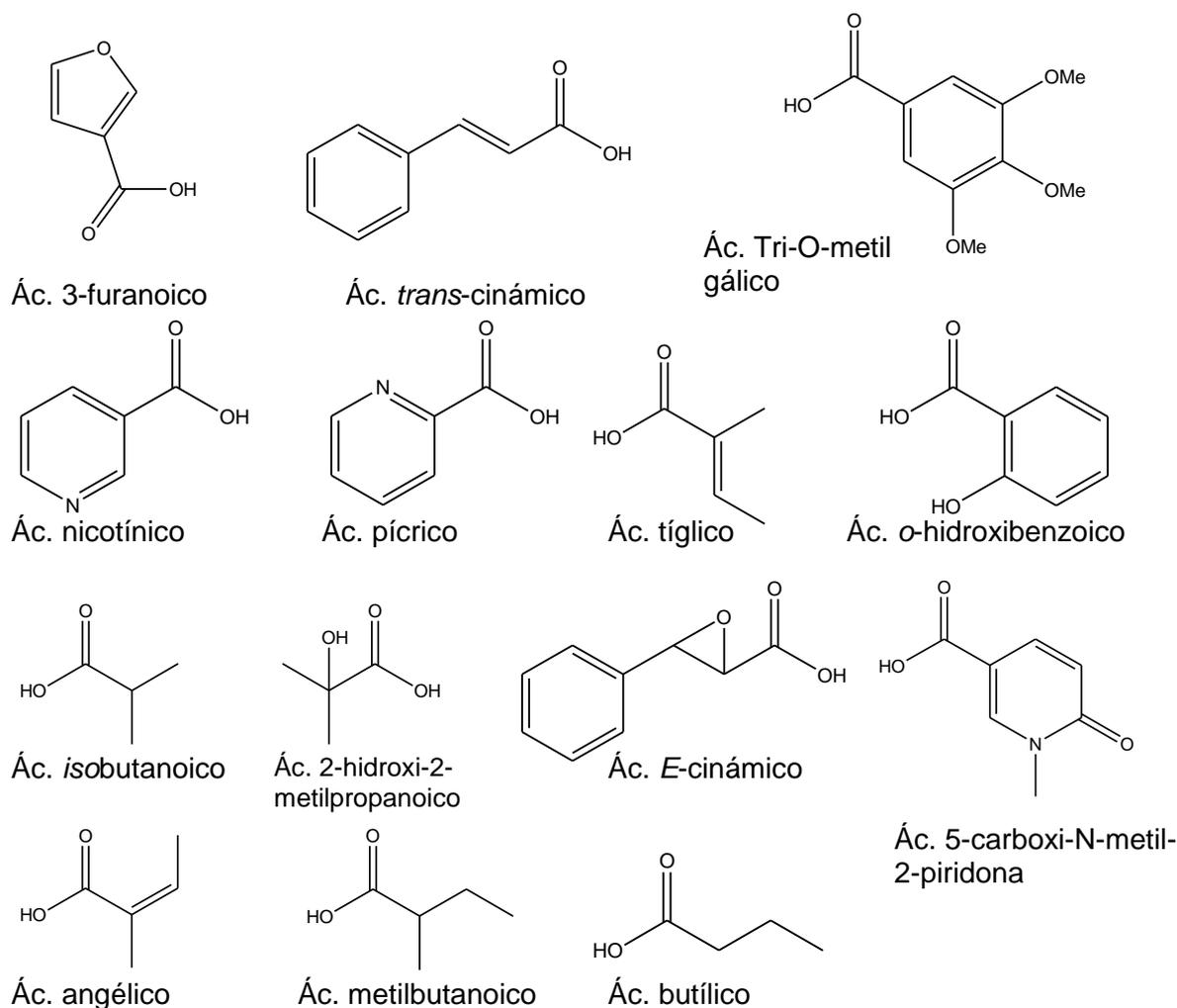
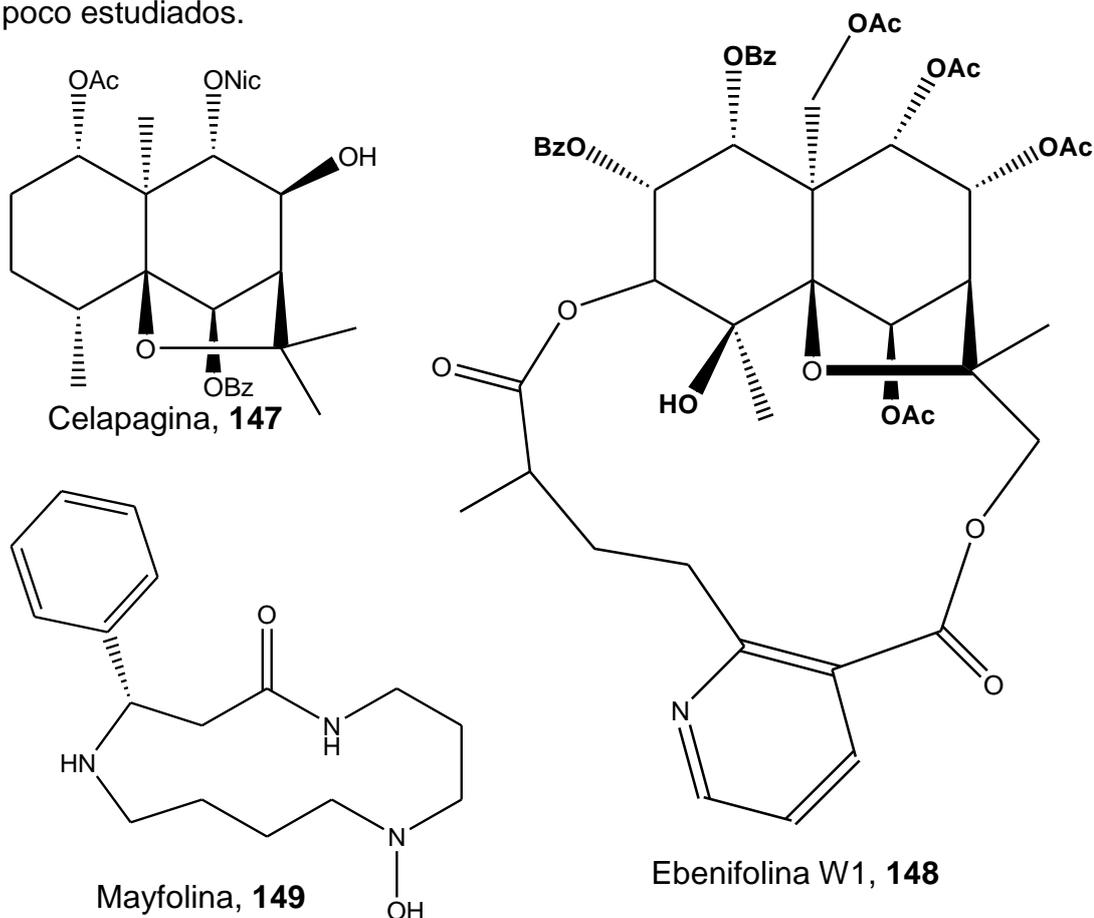


Figura 29: Ácidos carboxílicos que esterifican a los sesquiterpenos agarofuránicos.

Los alcaloides sesquiterpénicos tienen la estructura similar a los sesquiterpenos poliacilados, pero algunas posiciones del esqueleto agarofuránico básico se encuentran esterificados por algún ácido heterocíclico como el ácido nicotínico y sus derivados (ej. Celapagina, **147**).

Otro tipo de alcaloide sesquiterpénico más complejo son los alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos, los cuales son metabolitos secundarios relativamente raros en la naturaleza, aunque característicos de la familia Celastraceae. Son formados por la macrolactonización de un ácido dicarboxílico piridínico con una molécula de sesquiterpeno agarofurano, formando un puente entre las posiciones C3-C13 del esqueleto sesquiterpénico (ej. ebenifolina W-1, **148**). Distintos tipos de ácidos piridínicos dicarboxílicos pueden aparecer formando el macrociclo: ácido evonínico, ácido wilfórdico, ácido cassínico, etc (**Figura 30**).¹¹⁵

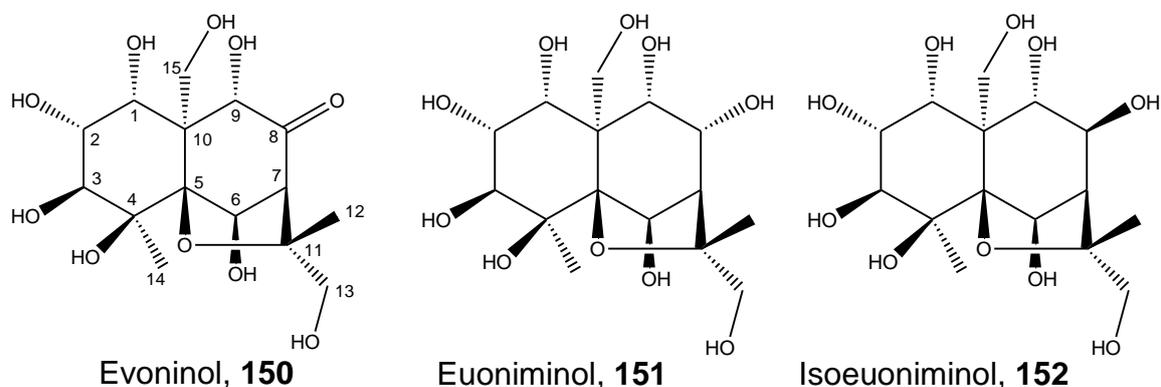
En algunas especies de *Maytenus*, como *M. loesner* y *M. buxifolia* fueron encontrados alcaloides macrocíclicos de tipo espermidina (ej. Mayfolina, **149**), muy poco estudiados.



¹¹⁵ Gao, J-M.; Wu, W-J.; Zhang, J-W.; Konishi, Y. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 1153-1189.

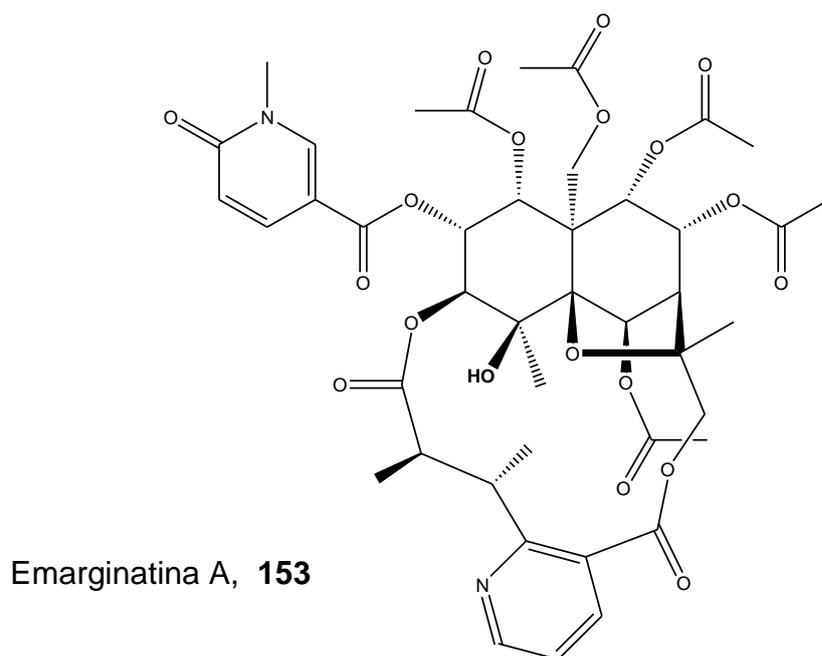
Alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos

Los sesquiterpenos generalmente involucrados en los alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos son los tipos **evoninol (150)**, **euoniminol (151)** e **isoeuoniminol (152)**, esterificados con distintos tipos de ácidos orgánicos:



Los ácidos dicarboxílicos piridínicos que esterifican a los sesquiterpenos entre las posiciones C3-C13 para formar la macrolactona también son variados, y son presentados en la **figura 30**.

Un ejemplo es el compuesto emarginatina A (**153**) aislado de tallos de *Maytenus emarginata*, el cual está formado por una parte sesquiterpénica tipo **euoniminol (151)** y la parte macrocíclica tipo **evoninato**, sustituido en la posición C2 por 5-carboxi-N-metil-2-piridona. La macrolactona está formada por el ácido 8'-epievonínico.¹¹⁶ Dicho compuesto presenta importante actividad citotóxica.



¹¹⁶ Kuo, Y.H. et al. *Heterocycles* **1989**, 29, 1465-1468.

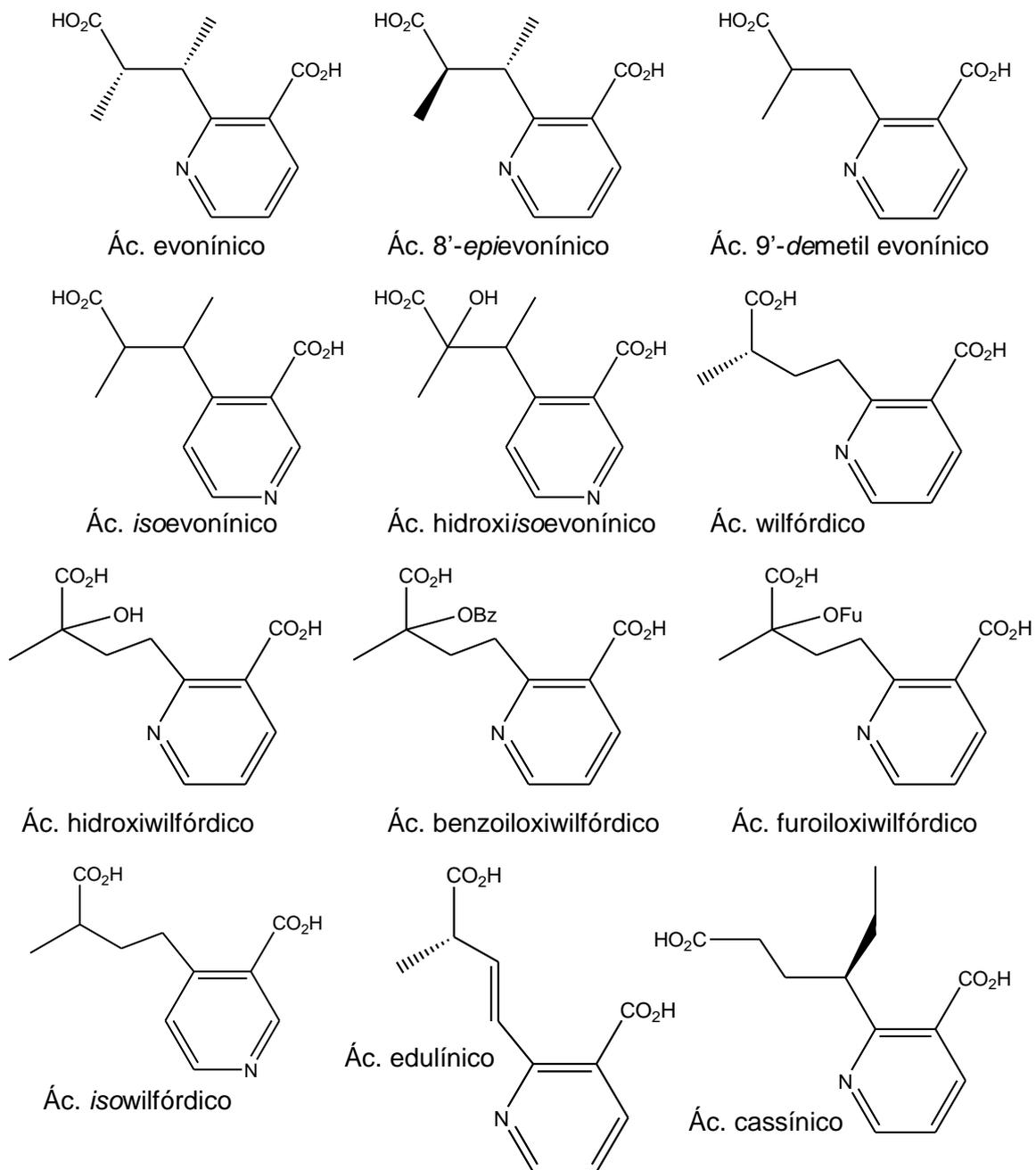
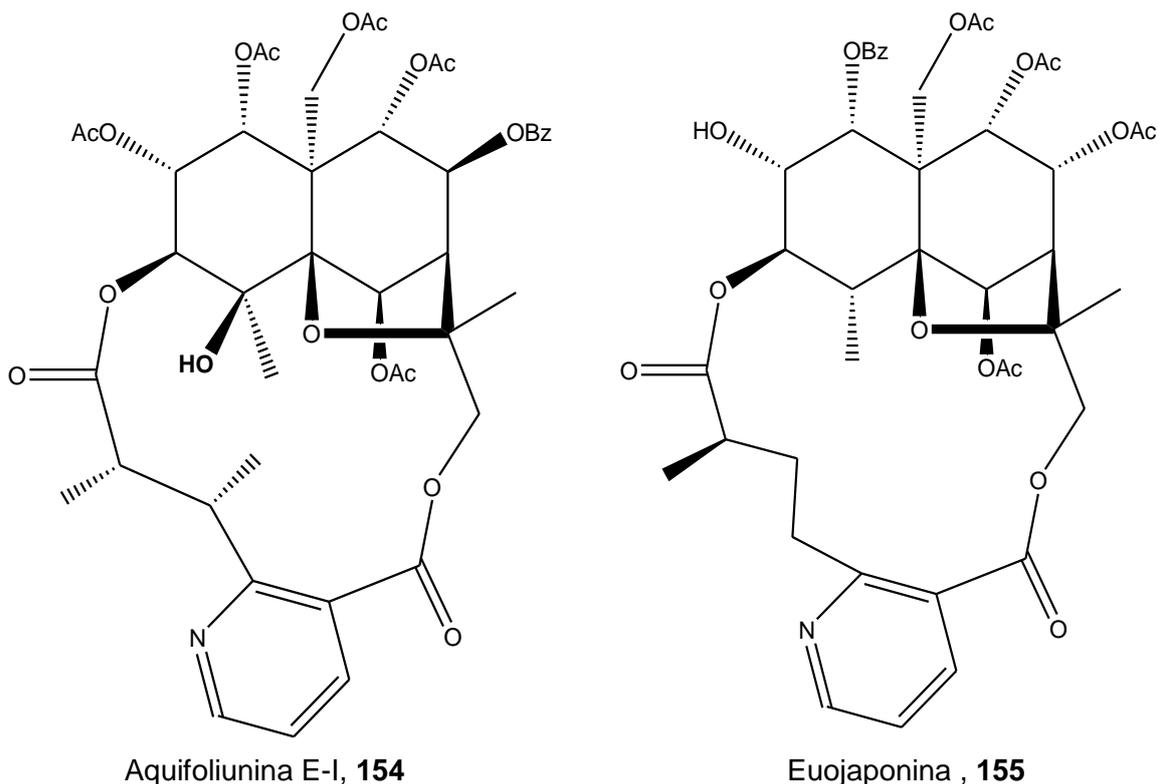


Figura 30: Ácidos dicarboxílicos que esterifican a los sesquiterpenos agarofuránicos entre las posiciones C3-C13.

Un ejemplo de alcaloide macrocíclico aislado de *Maytenus aquifolium* y formado por sesquiterpeno tipo **isoeuoniminol (152)** es la aquifoliunina E-I (**154**), donde el grupo benzoato en la posición C-8 tiene configuración β .¹¹⁷

Otros grupos de alcaloides macrocíclicos menos frecuentes son los que tienen el sesquiterpeno de tipo 4-deoxi, como es el caso de la euojaponina (**155**), aislada de *E. japonica*, posee el sesquiterpeno de tipo 4-deoxieuoniminol formando una macrolactona con el ácido wilfórdico.

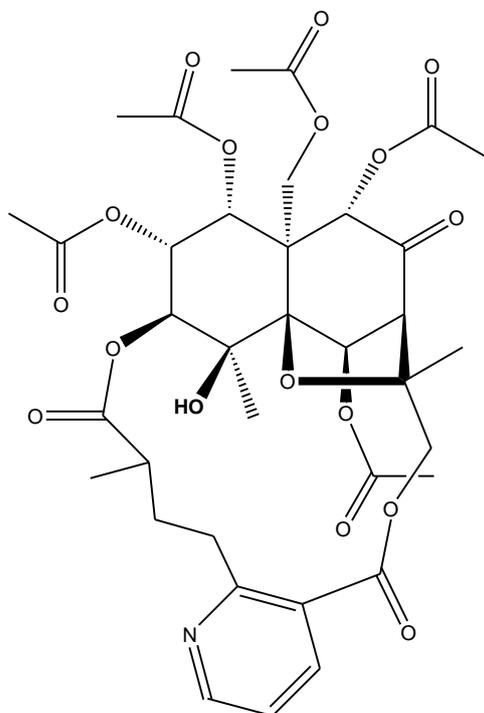


Un ejemplo de alcaloide formado por un sesquiterpeno tipo **evoninol (150)** esterificado con acetatos y con **ácido isowilfórdico** es el alcaloide evonimina (**156**), aislado de la especie *Euonymus sieboldiana*¹¹⁸.

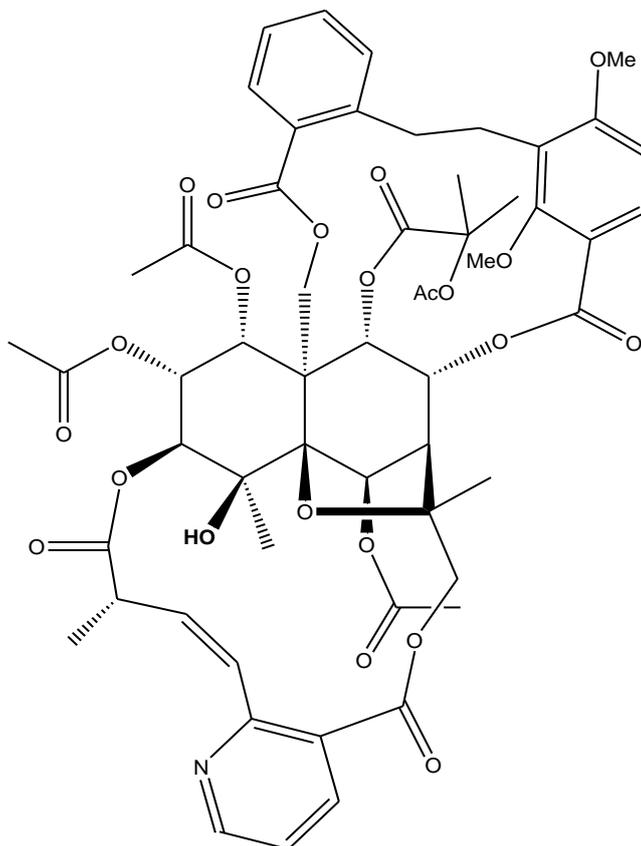
¹¹⁷ Corsino, J. et al. *Phytochemistry* **1998**, 48, 137.

¹¹⁸ Sugiura, K.; Yamada, K.; Hirata, Y. *Tetrahedron Letters* **1973**, 2, 113-116.

Compuestos todavía más complejos fueron encontrados, como es el caso de la cathedulina K (**157**), aislado de *Catha edullis*, una celastrácea consumida en África como narcótico. La cathedulina es una macrolactona derivada del ácido edulínico con una macrolactona extra entre las posiciones C8-C15 formada por el ácido cáthico.¹¹⁹



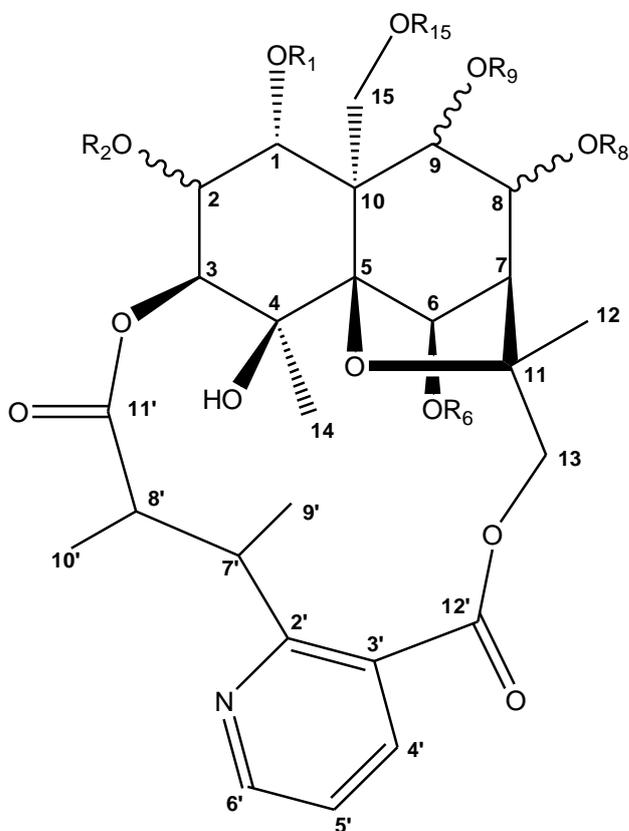
Evonimina, **156**



Cathedulina K, **157**

¹¹⁹ Crombie, L.. et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1986**, 531-534.

La numeración establecida para los alcaloides sesquiterpénicos se presenta abajo:



La estereoquímica varía en las posiciones C2, C8 y C9. El sustituyente sobre la posición C1 siempre es α , y el de la posición C6 siempre es β .

Puede haber un grupo ceto en la posición C8, y más raramente dicho grupo puede ser encontrado en el carbono C6.

Los alcaloides sesquiterpénicos son encontrados normalmente en las partes aéreas de las plantas, y raras veces en las raíces. En este trabajo de tesis dichos metabolitos fueron encontrados en muy pequeña cantidad en las raíces de la especie *Maytenus spinosa* pero no en la especie *M. vitis-idaea*.

Para varios de los sesquiterpénicos agarofuranos y de los alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos aislados de celastráceas ya fueron informadas importantes actividades biológicas, entre ellas, actividad insecticida, antiviral, citotóxica, inhibidora de la resistencia múltiple a drogas, inmunosupresiva, antialimentaria, antitumoral, antiinflamatoria, etc.^{120,121}

¹²⁰ Nuñez, M.J. et al. *J. Nat Prod.* **2004**, 67, 14-18.

¹²¹ Gonzalez, A.G.; Bazzocchi, I. L.; Moujir, L. M.; Jimenez, I. A. In *Studies In Natural Products Chemistry, Bioactive Natural Products (Part D)*; Atta-Ur-Rahman, Ed.; Elsevier Science Publisher: Amsterdam, **2000**; 23, 649-738.

Estudios de relación estructura-actividad indican que la actividad antialimentaria aumenta con el número de grupos acetatos presentes en la molécula sesquiterpénica y disminuye con el número de benzoatos. En general, los productos que tienen ésteres aromáticos en C1 y C9 son poco activos, mientras que la introducción de grupos ésteres en C2 no modifica la actividad. Por otro lado la actividad insecticida está relacionada con la presencia en la molécula de un grupo carbonilo en C8 y el sistema tricíclico es esencial.¹²²

La propiedad de promotores antitumorales (inhibidores sobre la activación del antígeno temprano del virus oncogénico Epstein-Barr) fue atribuida a varios de los sesquiterpenos mientras que los alcaloides macrocíclicos no presentaron inhibición de la promoción de tumores, lo que sugiere que el tamaño de la molécula afecta fuertemente a su actividad inhibidora y los estrictos requerimientos estructurales para tal actividad hacen pensar que existe un blanco específico implicado en el mecanismo de acción de estos sesquiterpenos¹²³. Por otro lado, algunos alcaloides macrocíclicos (ej. emarginatina A, **153**) presentaron actividad citotóxica y antitumoral frente a diversas líneas celulares cancerígenas.¹²⁴

Por otro lado se han descrito alcaloides sesquiterpenos macrocíclicos con actividad inmunosupresora, como es el caso de wilfortrina (**158**) y wilforidina (**159**), aislados de *Trypterygium wilfordii*, cuyos extractos son utilizados en China para el tratamiento de artritis reumatoides, entre otras enfermedades.¹²⁵

También se han descrito recientemente alcaloides macrocíclicos, como la hypoglaunina B (**160**) y la triptonina A (**161**) con actividad anti-VIH.¹²⁶

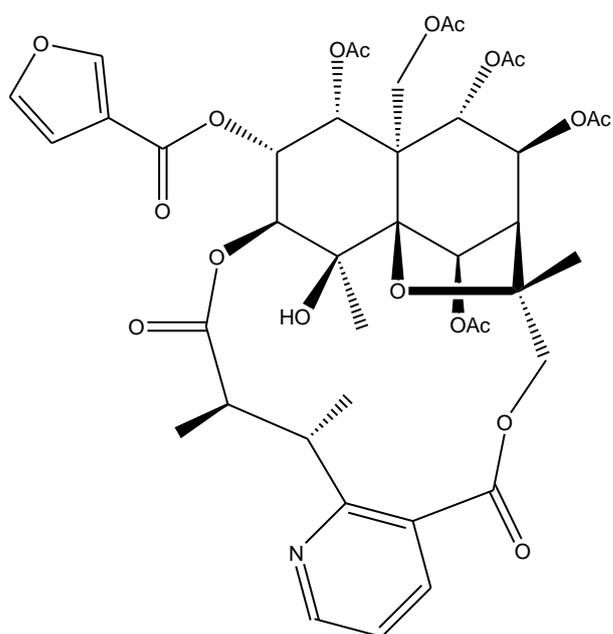
¹²²González, A.G.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A.G.; Coll, J.; González, J. A.; Lloria, J. *Biochem. Syst. and Ecol.* **1997**, *25*, 513-519.

¹²³ González, A.G.; Tincusi, B. M.; Bazzocchi, I. L.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Konoshima, T.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2000**, *8*, 1773-1778.

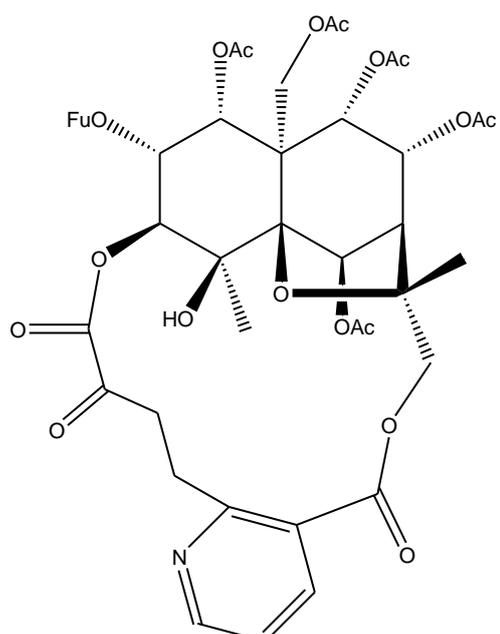
¹²⁴ Liu, H-C.; King, C.H.; Su, M-H. J. *Chin. Chem. Soc.*, **1981**, *28*, 95.

¹²⁵ Zhang, L.H.; Huang, Y.; Wang, L.W.; Xiao, P.G.: *Phytother. Res.*, **1995**, *9*, 315.

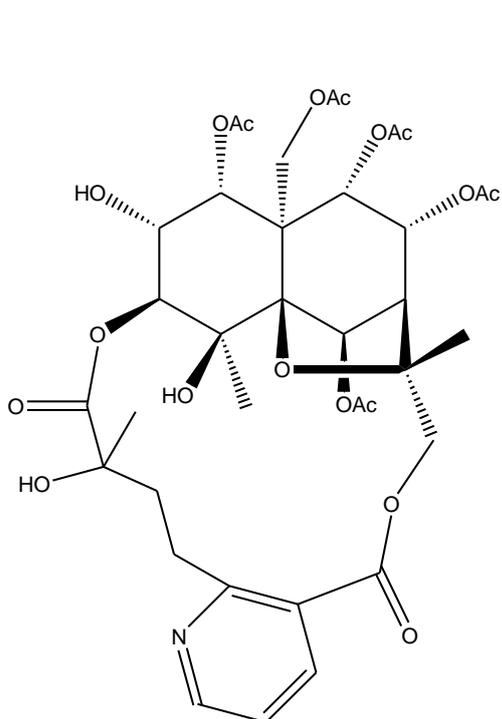
¹²⁶ Duan, H.; Takaishi, Y.; Bando, M.; Kido, M.; Imakura, Y.; Lee, K.: *Ted. Lett.* **1999**, *40*, 2969-2972.



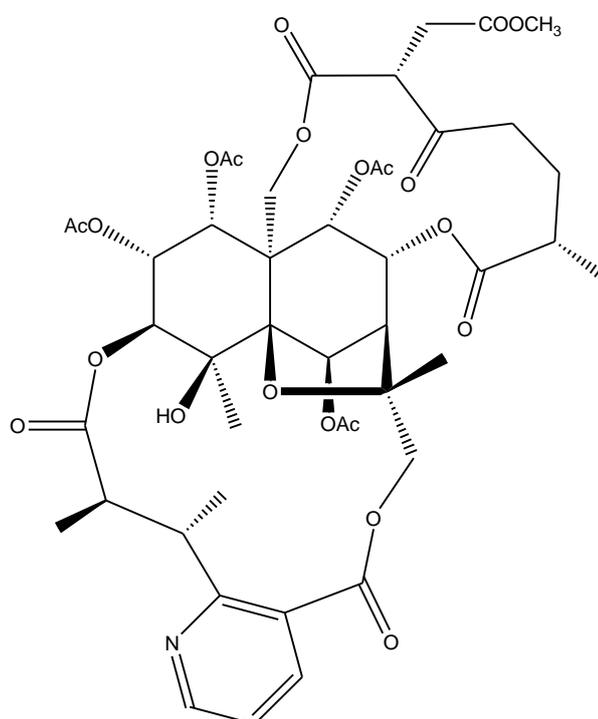
Hypogaunina B, **160**



Wilfortrina, **158**



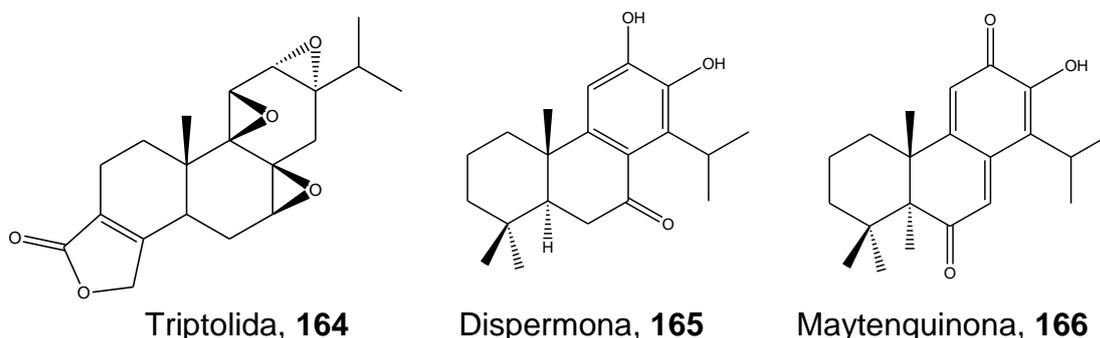
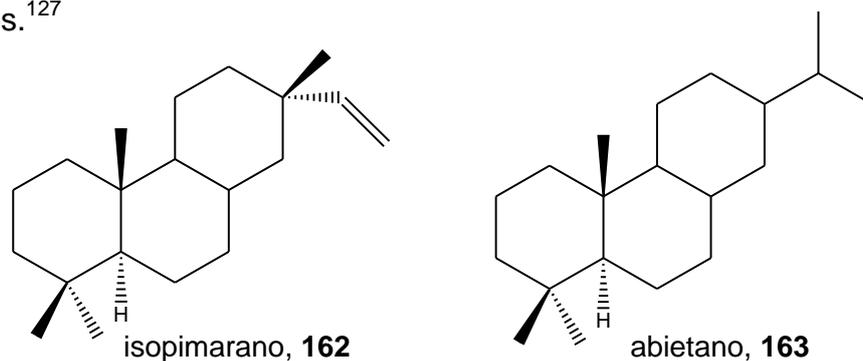
Wilforidina, **159**



Triptonina A, **161**

Diterpenos

Los diterpenos son relativamente poco frecuentes en celastráceas, sin embargo ya fueron aislados algunos diterpenoides con esqueletos de isopimarano (**162**) y abietano (**163**). De las especie *Tripterigium wilfordii* fue aislado la triptolida (**164**), que presentó fuerte actividad antileucémica. De *Maytenus dispermus* se aisló la dispermona (**165**) y la maytenoquinona (**166**) entre otros.¹²⁷



Triterpenos

Los triterpenos descritos para celastráceas pertenecen a las series friedelano (ej. ácido salaspérmico, **167**), oleanano, ursano, dammarano, taraxerano, glutinano y lupano (ej. 28-hidroxiglótida, **168**).¹²⁸

La serie de los friedelanos incluyen a las metilénquinonas y sus derivados fenólicos (ej. tingenona, **174**, y isotingenona, **176**), que son raros en la naturaleza y solo son biosintetizados por plantas de la familia Celastraceae.

¹²⁷ Martin, J. D. *Tetrahedron* **1973**, 29, 2553.

¹²⁸ Nunez, M.J. et al. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1018-1021.

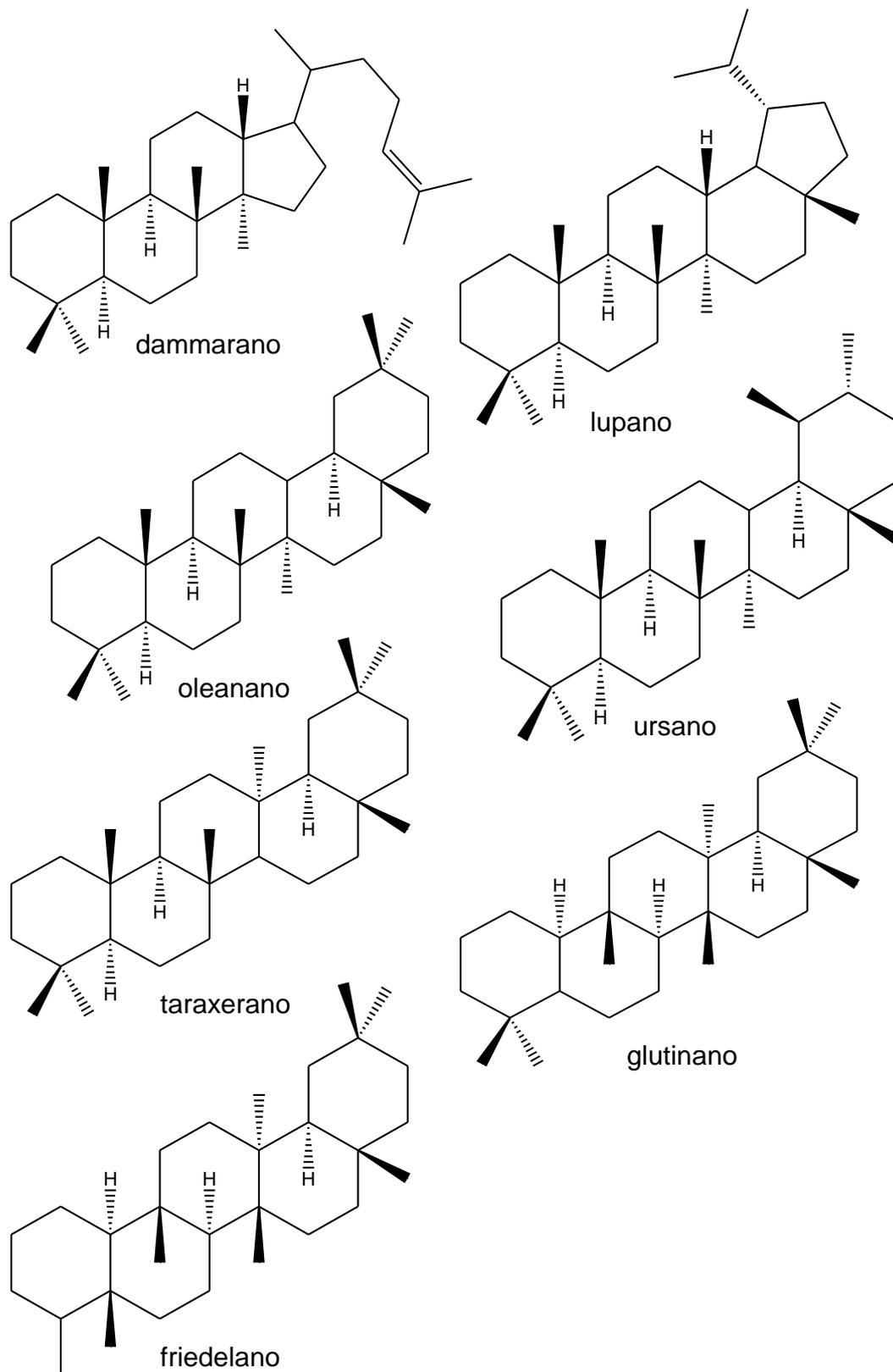
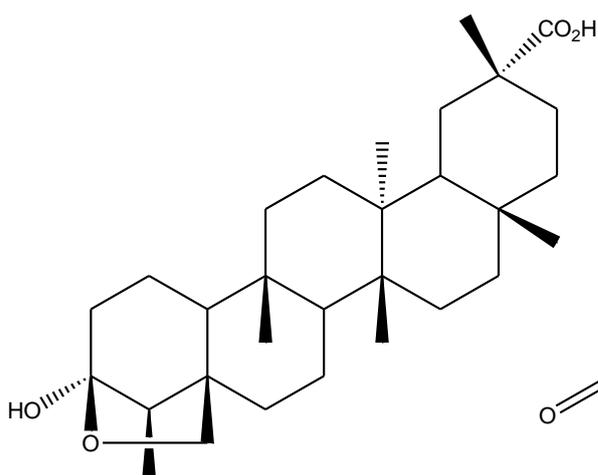
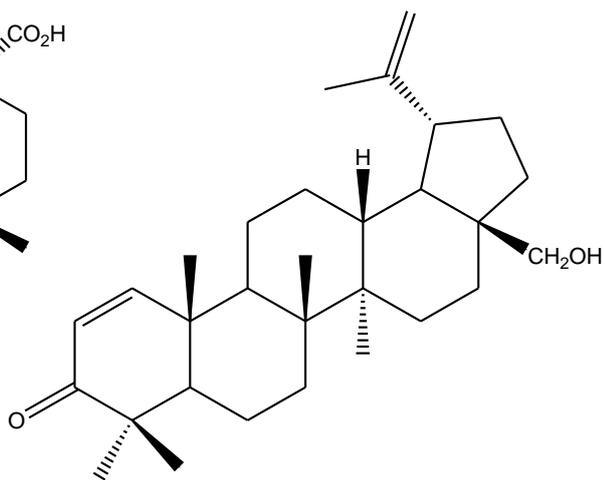


Figura 31: Esqueletos de los tipos de triterpenos encontrados en celastráceas.

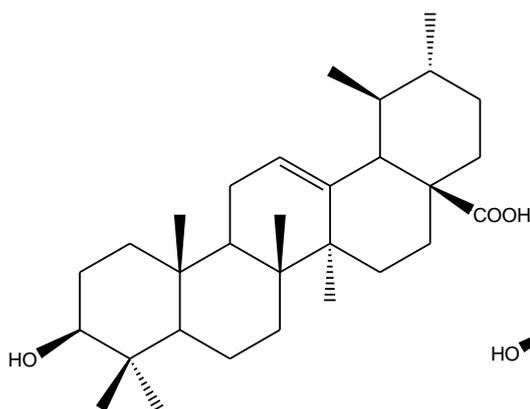


ácido salaspérmico, **167**

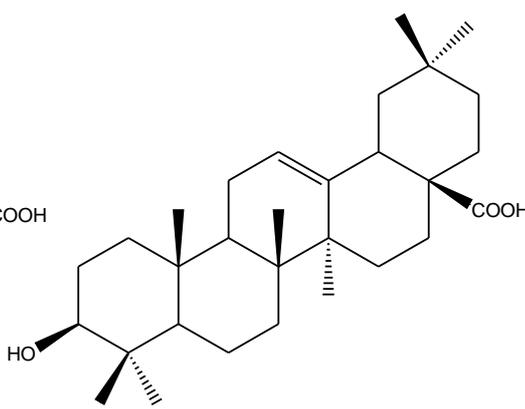


28-hidroxiglotidona, **168**

Los ácidos ursólico (**169**) y oleanólico (**170**) son triterpenos comunes en especies de Celastráceas y en muchas otras plantas. A ellos se atribuyen actividades: antiinflamatoria, antiartrítica, antidiabética, antiulcerosa, así como, hipolipidémica, citotóxica y antiarterioesclerótica, además de ser inhibidores de la activación del virus de Epstein-Barr, con actividad similar a los conocidos inductores antitumorales, ácido retinoico y glicirrético, lo que sugiere que estos ácidos o sus derivados pueden ser valiosos promotores antitumorales¹²⁹.



Ácido ursólico, **169**



Ácido oleanólico, **170**

¹²⁹ Lee, K.H.; Lin, Y.M.; Wu, T.S.; Zhang, D.C.; Yamagishi, T.; Hayashi, T.; Hall, I.H.; Chang, J.J.; Wu, R.Y.; Yang, T.H.: *Planta Med.* **1988**, *54*, 308.

Los triterpenos metilénquinonas, que también pueden presentarse como dímeros o trímeros, son característicos y exclusivos de la familia y son considerados indicadores taxonómicos, además de ser muchas veces los responsables por las actividades farmacológicas atribuidas a esas plantas.¹³⁰

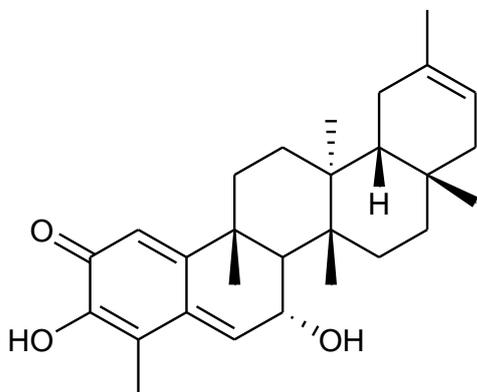
Los estudios de elucidación estructural del celastrol, primer compuesto de éste tipo identificado, llevaron dos décadas a partir de su aislamiento en 1939 desde *Celastrus scandens*. La estructura de la pristimerina (**171**), su éster metílico fue publicada recién en 1963.¹³¹

Son conocidos cuatro tipos de estructuras de notriterpenos metilénquinona presentes en plantas de la familia Celastraceae:

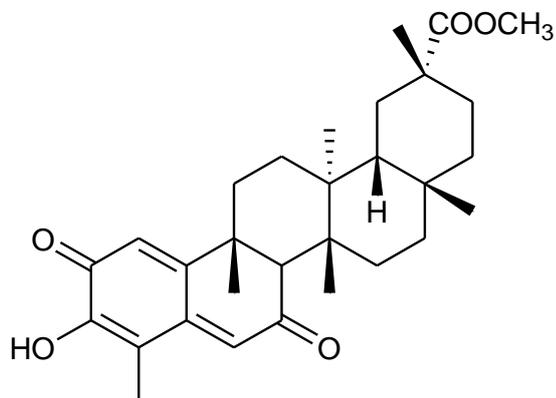
- aquellas sin conjugación extendida entre los anillos A y B, como en 7 α -hidroxi-7,8-dihidro-iguesterina, **172**;
- aquellas con una conjugación extendida de la quinona del anillo A con un grupo carbonilo en el anillo B como en el caso de dispermoquinona, **173**;
- aquellas con un doble enlace conjugado adicional como en la pristimerina y en la tingenona, **174**; también se encuentran las formas aromáticas de dichos compuestos, como la isotingenona, **176**;
- y aquellas quinonas con un sistema diénico adicional en el anillo D como en la netzahualcoyona, **175**.

¹³⁰ Brüning, R.; Wagner, H.: Übersicht über Celastraceen-Inhaltsstoffe: Chemie, Chemotaxonomie, Biosynthese, Pharmakologie. *Phytochem.* **1978**, *17*, 1821.

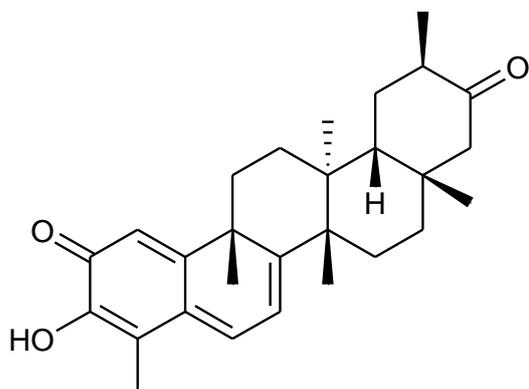
¹³¹ Johnson, A.; Juby, P.; King, T.; Tam, S. *J. Chem. Soc.* **1963**, 2884.



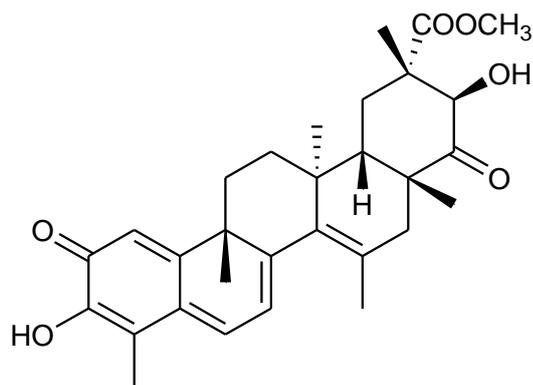
7 α -hidroxi-7,8-dihidro-igueterina, **172**



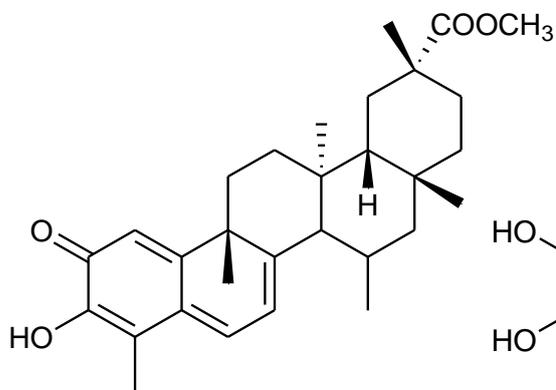
Dispermoquinona, **173**



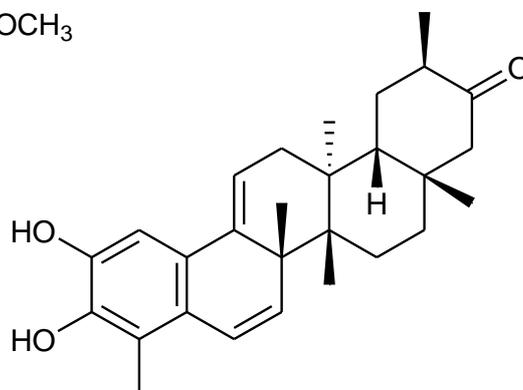
Tingenona, **174**



Netzahualcoyona, **175**



Pristimerina, **171**



Isotingenona, **176**

El esqueleto básico de las triterpenometilénquinonas es el núcleo 24-*nor*-D:A-friedelano con sistema metilenquinónico en el anillo A y con funciones oxigenadas en los carbonos C-2 y C3. Oxidaciones adicionales en los carbonos C4, C7, C15, C20, C21, C22, C28, C29 y C30 e insaturaciones en C5-C6, C7-C8, C9-C11, C14-C15, C20-C21 y C20-C30, dan lugar a los diferentes compuestos presentes en la bibliografía.

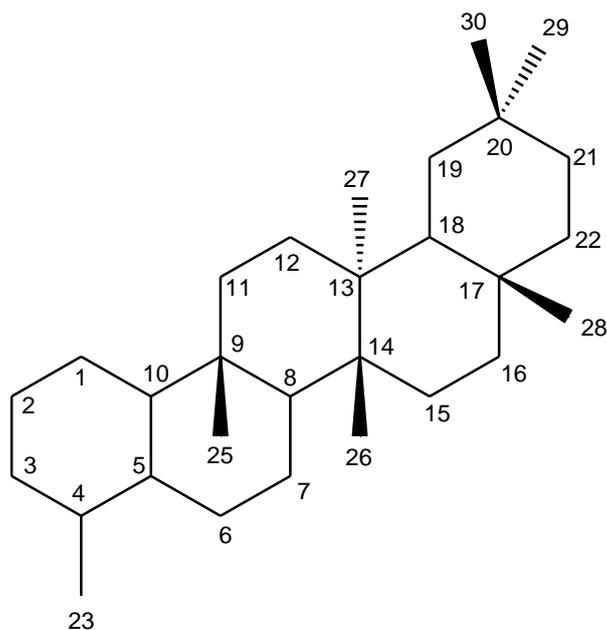


Figura 32: Numeración del esqueleto 24-*nor*-D:A-friedoleano.

La biosíntesis de dichos compuestos parece estar compartimentalizada en las plantas: en las hojas el óxido de escualeno es transformado en 3 β -friedelano por la acción de ciclasas. Luego, por acción de una oxidoreductasa ocurre la transformación de éste en friedelina. La formación de los triterpenos metilénquinonas se da en las raíces, donde son almacenados (**Figura 33**).¹³²

Todos esos tipos de quinonas han demostrado interesantes actividades biológicas, en especial sus propiedades antibióticas y citostáticas han sido intensamente estudiadas.

¹³² Furlan, M. et al. *Phytochemistry*, **2000**, 55, 741-748.

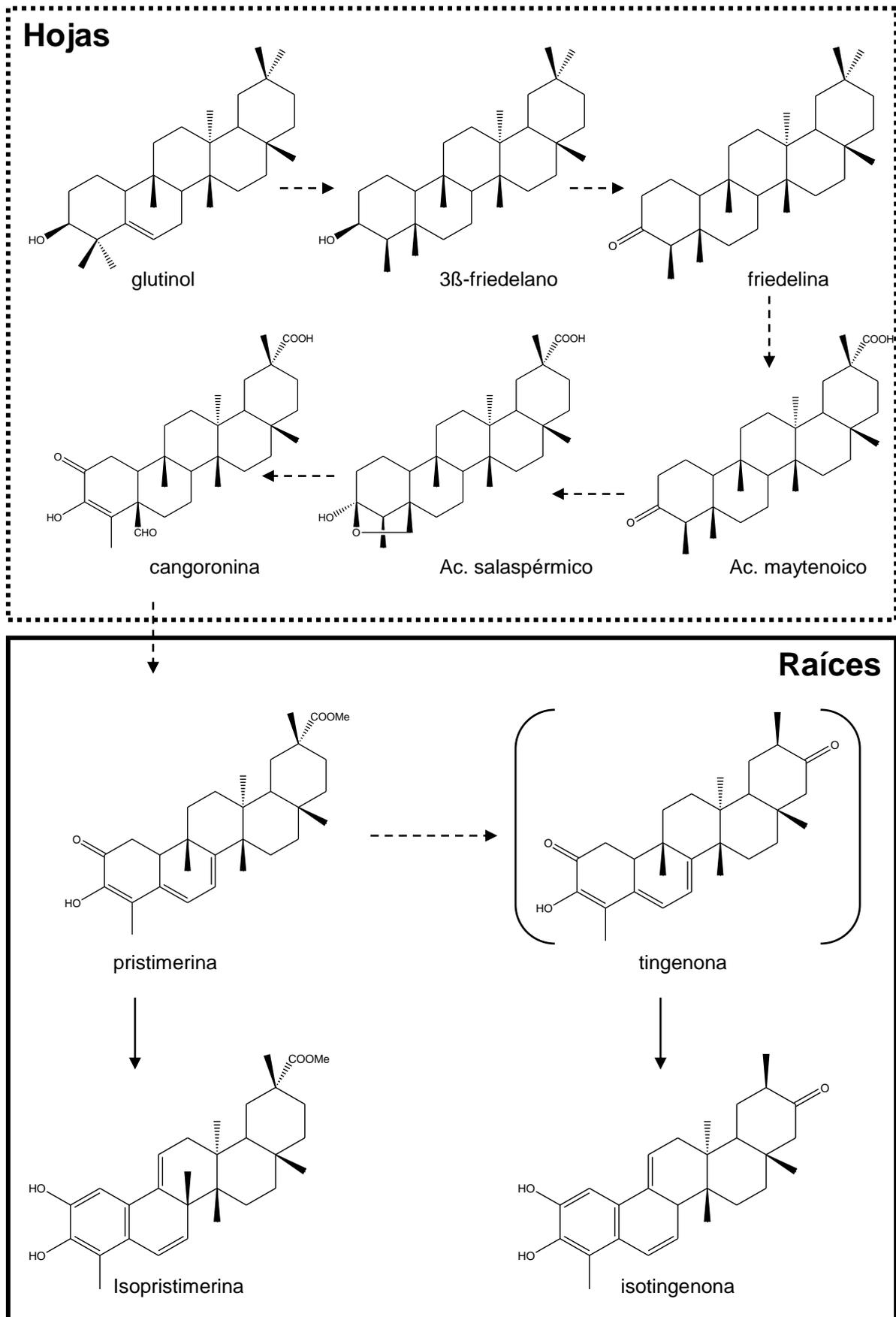
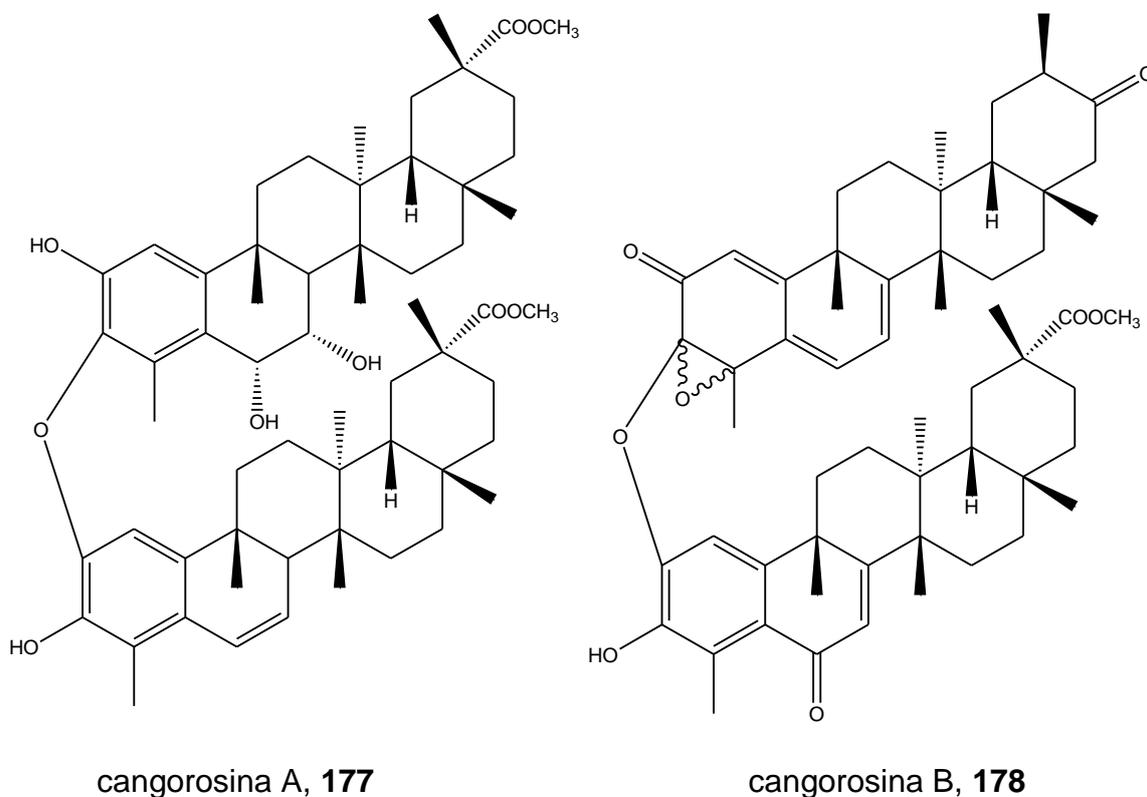


Figura 33: Esquema de la biosíntesis de los triterpenos metilénquinonas (ejemplificado para pristimerina y tingenona).

Dímeros de triterpenometilénquinonas

Los dímeros de triterpenos constituyen una clase única de metabolitos secundarios que se caracterizan por la presencia de unidades monoméricas de triterpenos metilénquinonas modificados. Están constituidos por dos derivados de metilénquinonas que pueden ser del mismo tipo (tingenona-tingenona, pristimerina-pristimerina) o de distintos tipos (tingenona-pristimerina) unidos por enlaces éter formados entre los anillos A o entre los anillos A y B de las formas quinoide y aromática de los triterpenos. La mayoría ha sido aislada de plantas del género *Maytenus*.

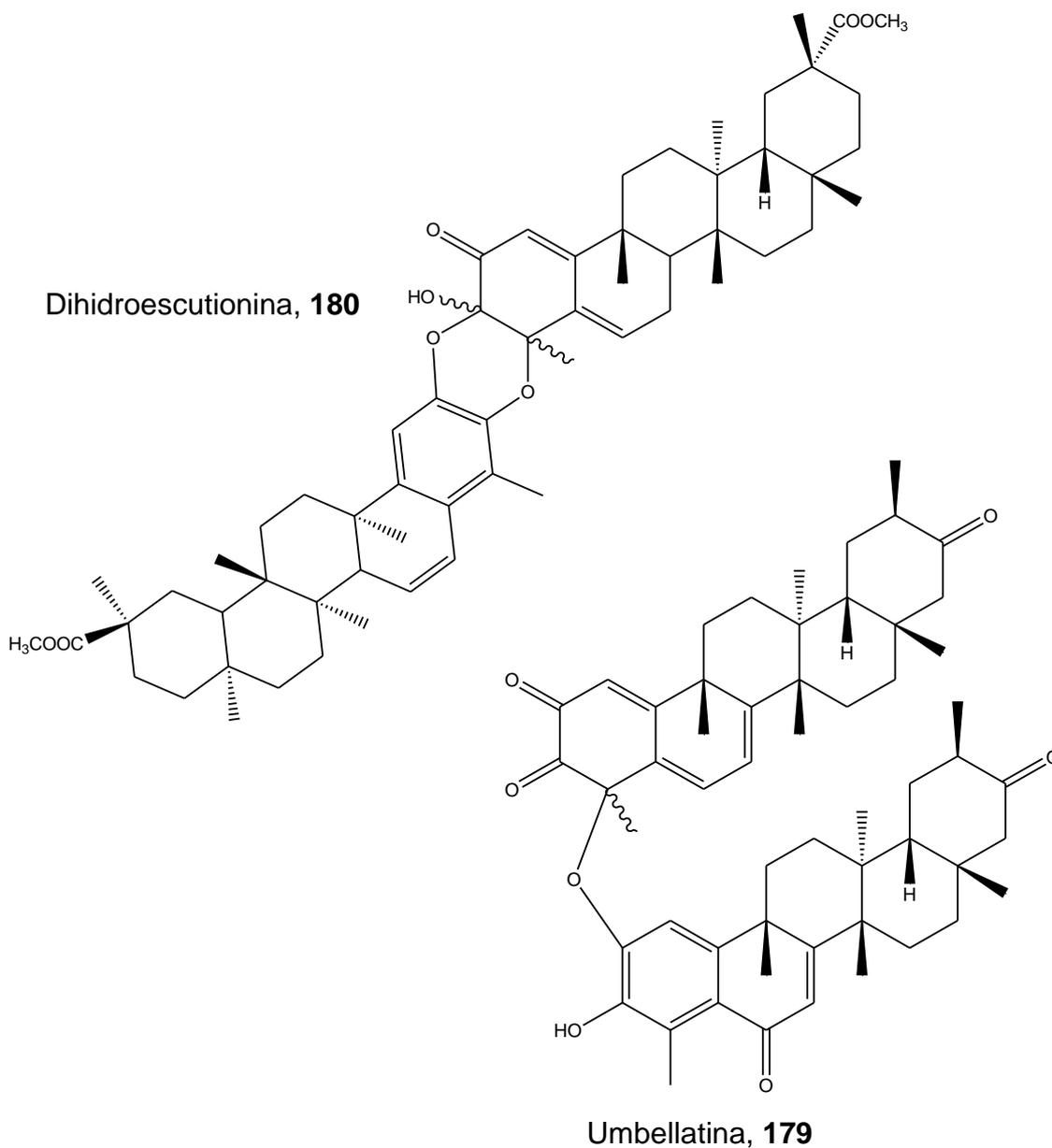
De *M. ilicifolia* se aislaron los dímeros cangorosina A (**177**) y B (**178**), el primero, compuesto por dos unidades de pristimerina unidas por sus anillos A aromáticos. A su vez, la cangorosina B está formada por una unidad de tingenona y una unidad de pristimerina, unidas por el carbonos C3 de la forma quinoide de la tingenona y por el carbono C2' de la forma aromática de la pristimerina. Además, posee un epóxido entre las posiciones C3 y C4, que puede tener configuración α o β ¹³³.



¹³³ Gonzalez, A.G. et al. *Tetrahedron* **1992**, 48, 769-774.

De la especie *M. umbellata* se aislaron las umbellatinas (**179**) α y β , que están formadas por dos unidades de tingenona unidas por el carbono C4 de la forma quinoide y el carbono C2' de la forma aromática.

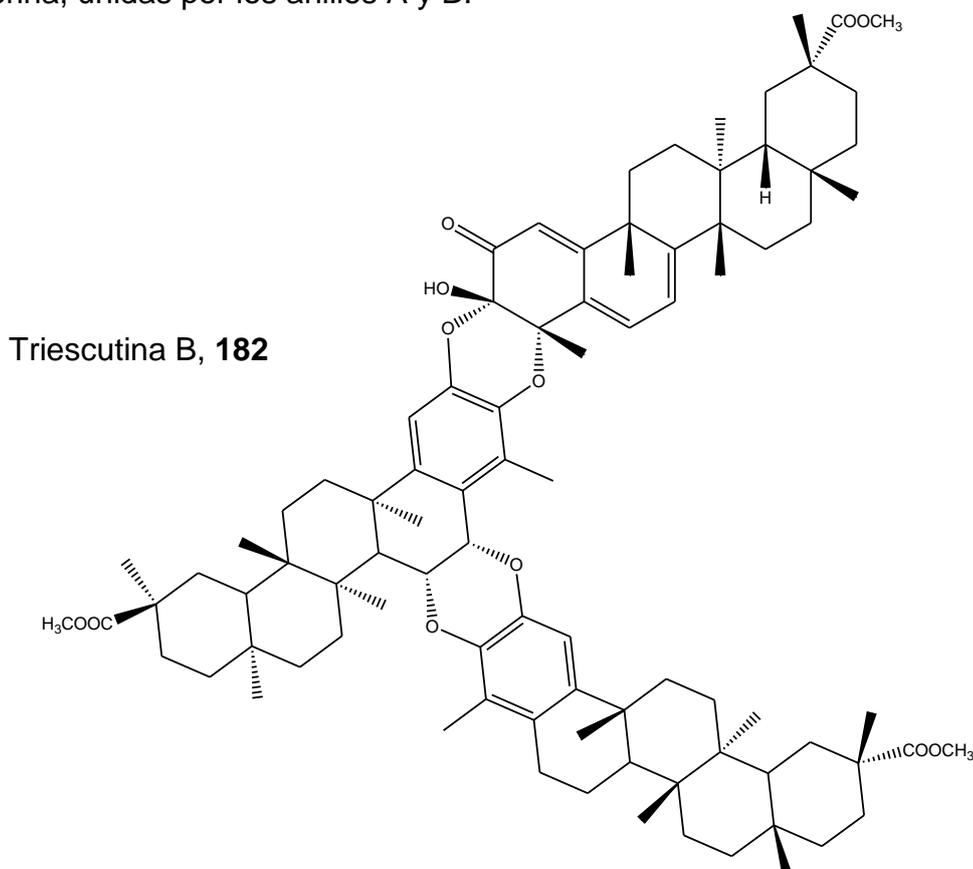
Otros ejemplos de triterpenos diméricos son los compuestos dihidroescutionina (**180**) α B y dihidro-escutionina β B, aislados de las raíces de *M. scutioides*. En este caso las formas quinoide y aromática son unidas por dos enlaces éter de ambos los anillos A. Se postula que dichos compuestos son formados vía un mecanismo hetero Diels-Alder (**Figura 34**).¹³⁴



¹³⁴ González, A.G. et al. *Tetrahedron*, **1996**, 52, 9597-9608.

Según una hipótesis, la polimerización de productos bioactivos como las triterpenoquinonas, está relacionada con una estrategia de detoxificación de la planta. La producción de los metabolitos secundarios de defensa utilizados por las plantas es un proceso lento y demanda un gasto considerable de energía, pero solo son tolerables concentraciones relativamente bajas de estos compuestos, ya que normalmente son tóxicos a altas concentraciones. Así, los dímeros y trímeros de triterpenos son almacenados en las plantas como polímeros, los cuales pueden liberar sus unidades activas de metilénquinonas vía un proceso del tipo retro Diels-Alder, dependiendo de la necesidad de la planta. A eso se suma el hecho de que los aductos de triterpenos tienen menor o ninguna actividad biológica, al compararlos con los respectivos monómeros.^{135,136}

Los trímeros representan un caso más raro y complejo de este tipo de aducto. De la especie *M. scutioides* se aislaron los compuestos triescutina A (181) y B (182). La triescutina B es un trímero formado por tres unidades de pristimerina, unidas por los anillos A y B.



¹³⁵ González, A.G. et al. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1185-1187.

¹³⁶ González, A. G.; *Tetrahedron* **1996**, 52, 9597-9608.

Se postuló que el trímtero es biosintetizado por medio de una cicloadición entre un precursor dimérico con un doble enlace entre C6' y C7' y un triterpeno *orto*-quinona, también vía un mecanismo de Diels-Alder.

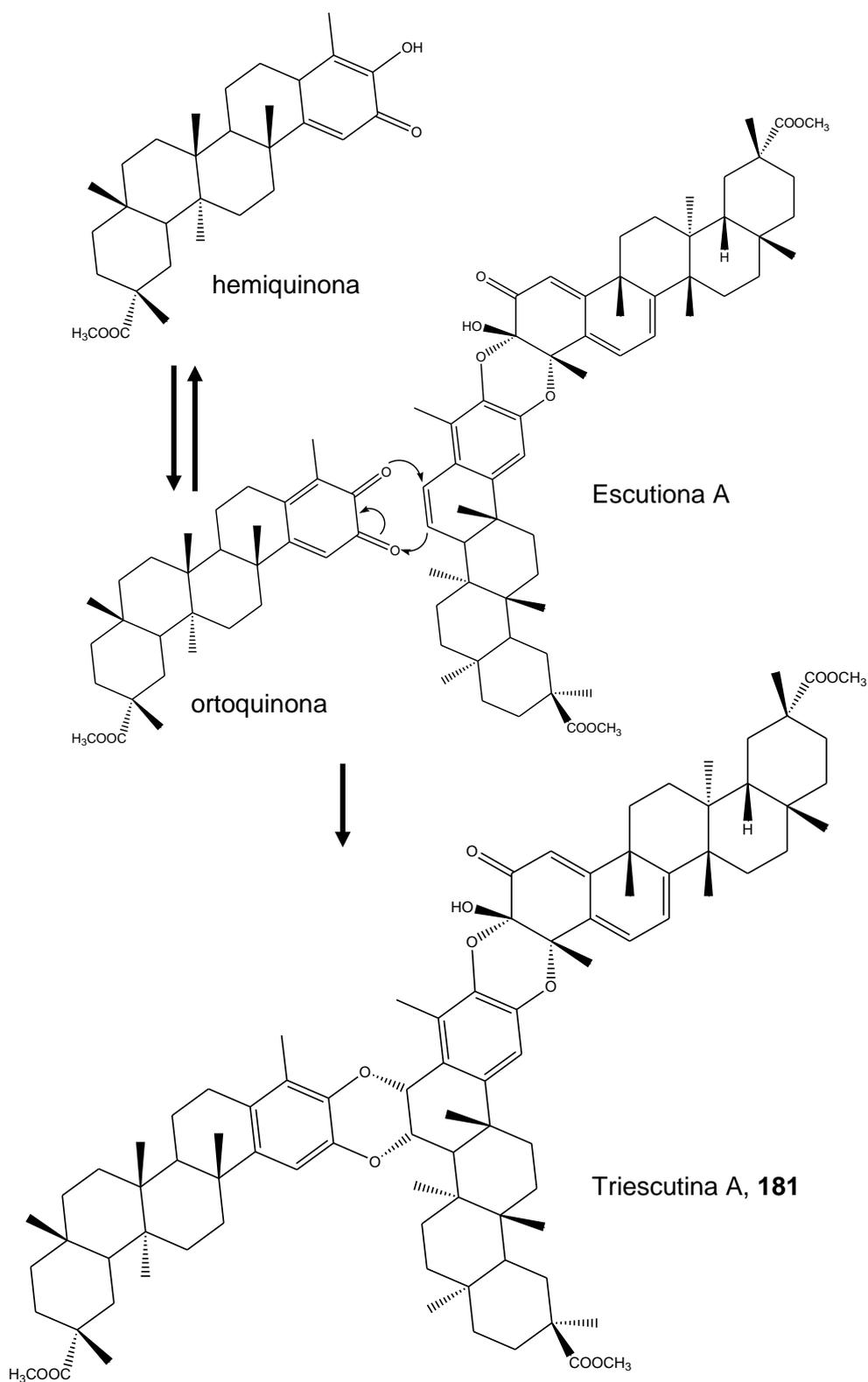


Figura 34: Mecanismo de formación de los dímeros y trímeros de triterpenos.

Especies de *Maytenus* encontradas en Argentina

En Argentina se encuentran doce especies de plantas del género *Maytenus* (del mapuche: *maitén* = leña dura)¹³⁷: *M. boaria*, *M. magellanica*, *M. chubutensis*, *M. ilicifolia*, *M. agustifolia*, *M. cassineformis*, *M. cruezzoi*, *M. disticha*, *M. scutioides*, *M. viscifolia*, *M. spinosa* y *M. vitis-idaea*.

Relativamente pocas especies de *Maytenus* fueron estudiadas en América Latina con respecto a sus propiedades químicas y farmacológicas. De las especies encontradas en Argentina, solamente seis fueron estudiadas, hasta el momento, por grupos del exterior con material colectado en otros países.

En esta tesis fueron elegidas dos especies autóctonas de Argentina, *Maytenus spinosa* y *M. vitis-idaea*, para la caracterización química del extracto de raíces, juntamente con la búsqueda de nuevas estructuras y compuestos activos.

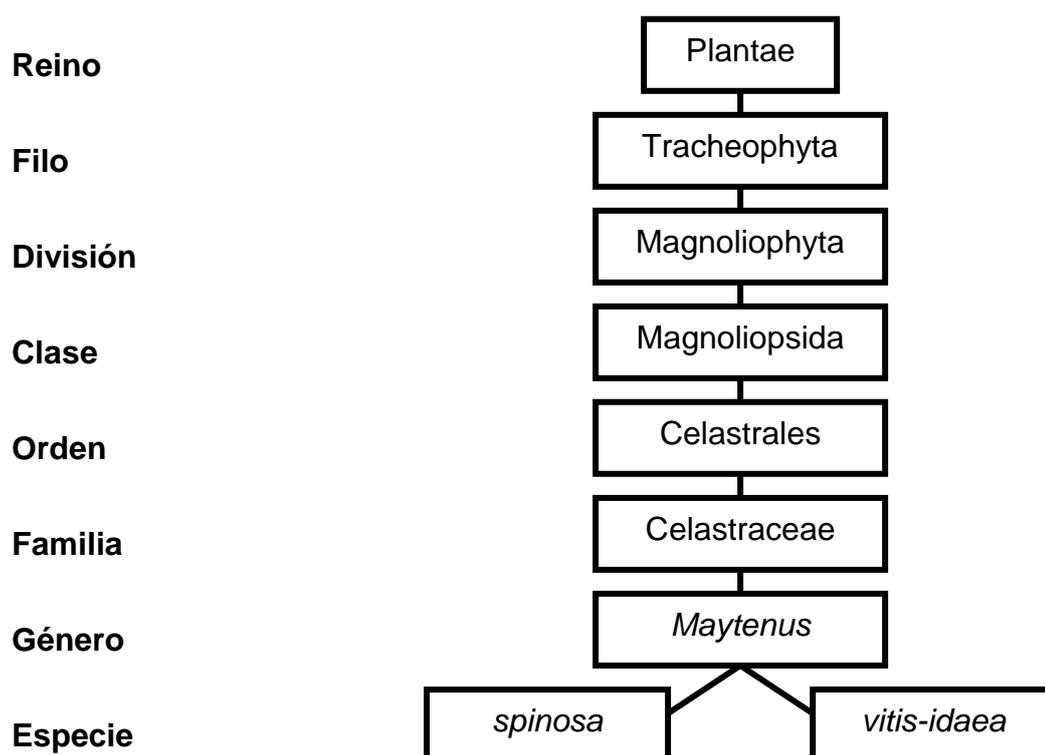


Figura 35: Clasificación de las plantas estudiadas en esta tesis.

¹³⁷ Paginas Wicy , y SIB y otros sites de biodiversidad

Dichas especies se encuentran en el Gran Chaco Americano, la mayor floresta seca en América del Sur y la más extensa en el continente después de la floresta Amazónica. Ocupa territorios en Argentina, Paraguay, Bolivia y Brasil, desde latitudes tropicales (18°S) hasta zonas subtropicales (31°S). El Chaco presenta fuertes gradientes climáticos, lo que genera (junto a características geológicas y topográficas) una amplitud de ecosistemas: planicies, pantanos, sabanas secas o inundables, salares, y selvas. Esa diversidad de ambientes genera a su vez una gran diversidad animal y vegetal, con especies únicas en la región, muchas de las cuales se encuentran en riesgo de extinción. El Chaco, juntamente con otras florestas tropicales, representa un ecosistema clave en los proyectos mundiales de conservación de biodiversidad y se hace urgente la generación de conocimiento en la región como estrategia de valoración y preservación de la biodiversidad de forma sustentable. En ese contexto, el apoyo científico sobre el conocimiento de las plantas medicinales de la región podría servir como estrategia de preservación y como fuente de renta para las poblaciones locales.

La especie *Maytenus vitis-idaea*

M. vitis-idaea Griseb. (1874) es una especie endémica del norte de Argentina, sur de Bolivia y Paraguay. Presenta como sinonimias botánicas *Maytenus lorentzii* Briq., *M. paraguariensis* var. *Genuina* Briq o vr. *Grandifolia* Briq. Tiene muchos nombres vernáculos, entre ellos: carne gorda, tala salada, colquiyuyo, coiqueyuyo, jume blanco, chaplán, chaplean, coique yuyo, colkiyuyo, cosqui yuyo, Ibirá-yuquí, indio auki, ivá-yeguí, ivirá yuquí, mboretí caá, yequí-ra, yuquirá mayor, yerba del tapir, yuqui guaycurú, palta, sal del indio y sol del indio.

Es un arbusto peremnifolio, monoico, siempre verde, de hasta 4 m de alto, inerme y achaparrado. Sus hojas son alternas, simples, elípticas, brevemente pecioladas (pecíolo de 2-6 mm de largo), carnosas, de 1,5-4 cm de largo por 1,5-3,5 cm de ancho, láminas elíptico-lanceoladas de 2-6 x 1,5-3 cm, gruesas y coriáceas, ápice y base atenuados, bordes irregularmente aserrados. Las flores son hermafroditas o unisexuales, pequeñas, verde-amarillentas, en grupos de 2-3 en las axilas; presentan 5 sépalos de 1 mm de largo y 5 pétalos vinosos de 2-3,5 mm, ovario reducido en flores masculinas con 5 estambres; en femeninas, el ovario ovoide termina en un estilo corto y éste a su vez, en un estigma plano bilobulado. Fruto tipo cápsula elipsoide de 6-8 x 5 mm, morada, con 1-3 semillas de casi 1 cm de largo, totalmente cubiertas por una estructura carnosa, rojiza.¹³⁸

La planta habita suelos salobres de bosques xerófilos de la región chaqueña. Florece en primavera y fructifica en verano, cuando las aves consumen las estructuras carnosas que cubren sus semillas, actuando así como agentes dispersantes. Si bien sus hojas poseen un gusto salado, son habitualmente consumidas por el ganado. Desde el punto de vista forrajero puede ser considerada como forrajera de emergencia, siendo consumida preferentemente por las cabras. También es considerada una especie melífera.

La ceniza de su madera ha sido empleada en la fabricación de jabón y también fue utilizada por los indígenas de la región para la producción de sal

¹³⁸ PIARFON, *Proyecto Bosques Nativos y Áreas Protegida*, Argentina Banco Mundial-No. 4085-AR

vegetal para salar carnes. En medicina popular es utilizada como astringente y el “jugo” de sus hojas se emplea en ciertas afecciones de la vista. La masticación de sus hojas es empleada contra las enfermedades de las encías.

Su madera carece de utilidad industrial, es usada como leña y la especie se encuentra en la categoría de especies en vías de extinción.

Escasos estudios han sido publicados sobre esta especie, de los cuales la mayoría son ambientales. Hay un único trabajo realizado sobre la mortalidad, la actividad alimentaria y el desarrollo de larvas de polilla de la manzana (*Cydia pomonella*), donde se comunican los efectos insecticidas de los nortriterpeno metilénquinonas pristimerina, tingenona y 20-β-hidroxitingenona, aislados de la corteza de la raíz de ejemplares de esta especie colectados en Paraguay.¹³⁹

¹³⁹ Alvarenga, N; Velásquez, C. A.; Alvarenga, N. C. *Revista De Ciencia Y Tecnología*, Una, **2001**, 1, 51-55.

Aislamiento de metabolitos secundarios de *Maytenus vitis-idaea*

Las raíces de *M. vitis-idaea* fueron colectadas en la provincia de La Rioja, y fueron extraídas con una mezcla de éter etílico:ciclohexano (1:1). El extracto crudo fue previamente separado de un látex (0.7g) por medio de precipitación en CH₂Cl₂. Dicho látex es un polímero que está ausente en la misma especie encontrada en Paraguay. Existe la teoría de que dicho compuesto puede ayudar a evitar la pérdida de agua de las raíces en zonas áridas.

El extracto crudo resultante (MV) fue concentrado en evaporador rotatorio para realizar posteriormente la separación por medio de cromatografía *flash* en columna seca de sílica con solventes de polaridad creciente (ver **parte experimental**).

La fracción **MV3** fue purificada directamente por HPLC, de donde se aislaron los compuestos **MV3-11**, **MV3-13**, **MV3-22**, **MV3-24** y **MV3-26**.

La fracción más polar **MV5** fue sembrada en una columna se Sephadex LH20 y la subfracción **MV5-6** fue purificada por HPLC, de donde se aislaron los compuestos **MV5-6-11A**, **MV5-6-11B** y **MV5-6-38** (ver **Figura 36**).

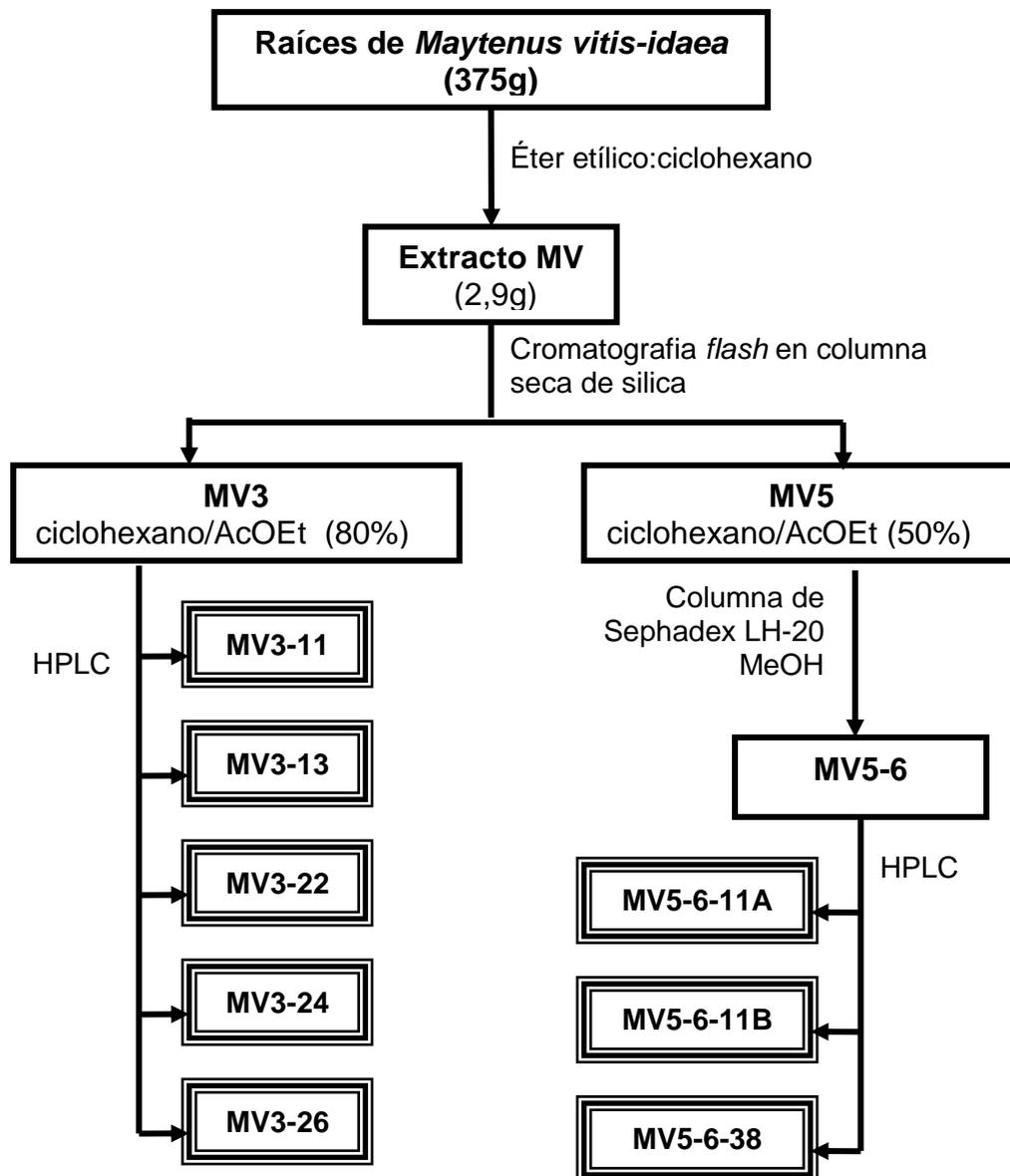


Figura 36: Esquema de aislamiento de los compuestos de *M. vitis-idaea*

Elucidación estructural del compuesto MV3-24

El compuesto denominado MV3-24 fue aislado como un polvo rojo anaranjado amorfo. El color del mismo indicaba un fuerte grado de insaturación y una probable estructura quinoide. El análisis del espectro de masas de alta resolución (EMAR-IE) reveló el pico M^+ a m/z 462.2770, consistente con la fórmula molecular $C_{30}H_{38}O_4$ y con la presencia de doce insaturaciones, lo que estaba de acuerdo con una estructura de triterpeno metilénquinona.

En el espectro de ^{13}C aparecían 30 señales que corresponden a seis señales de metilos (δ 10.2, δ 18.0, δ 27.4, δ 28.8, δ 31.2 y δ 37.2), diez señales de olefinas (δ 165.7, δ 164.6, δ 146.0, δ 135.5, δ 133.7, δ 129.4, δ 127.5, δ 119.7, δ 117.9 y δ 116.9), de las cuales cinco eran carbonos cuaternarios sp^2 , dos señales de carbonilos (δ 178.1 y δ 178.3), una señal de metoxilo (δ 51.5), una señal de metino sp^3 (δ 42.5), cinco señales de carbonos cuaternarios sp^3 (δ 47.2, δ 43.0, δ 33.7, δ 40.2 y δ 40.9) y cinco señales de metilenos. Esos datos fueron corroborados por medio de las correlaciones encontradas en el espectro HSQC. Teniendo en cuenta que una de las señales de ^{13}C correspondía a un grupo metoxilo, el compuesto se trataba probablemente de un nortriterpeno metilénquinona. En base a los datos de RMN ^{13}C dos de los cuatro átomos de oxígeno podían asignarse a grupos carbonilo, mientras que otro estaba formando parte del grupo metoxilo. Esto indicaba que el restante átomo de oxígeno debía corresponder a un grupo hidroxilo. Sin embargo la ausencia de señales en la zona de 60 -80 ppm en RMN ^{13}C sugería que dicho grupo hidroxilo debía estar unido a un carbono sp^2 .

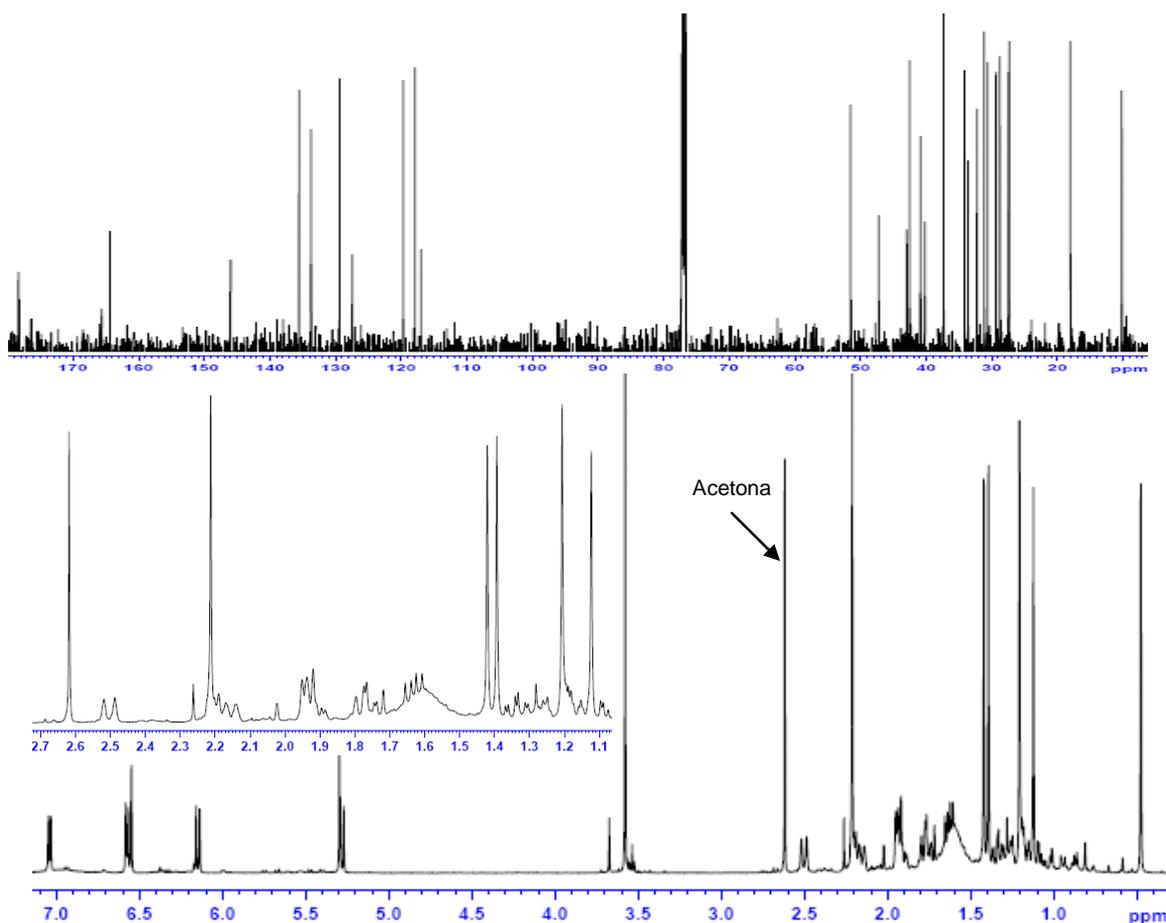


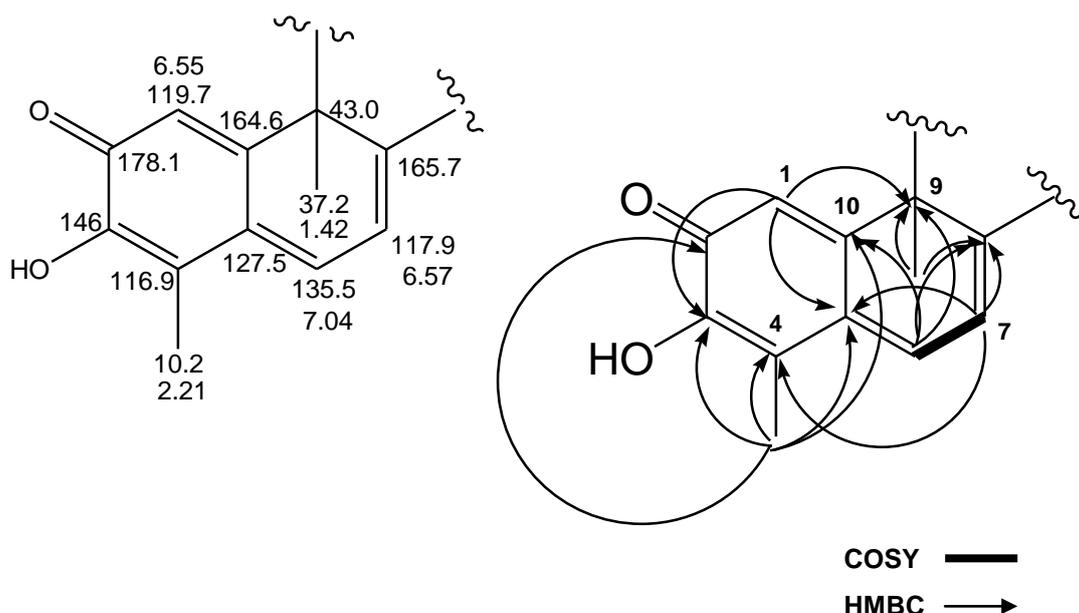
Figura 37: Espectros de RMN ^1H y ^{13}C (500 MHz; en CDCl_3) de MV3-24.

En el espectro de RMN de ^1H se observaban señales típicas de un triterpeno, donde aparecían en la zona de campos altos las señales de cinco metilos angulares (δ 0.48, δ 1.12, δ 1.21, δ 1.40 y δ 1.42), una señal de metilo sobre doble enlace (δ 2.21), y se destacaba la señal poco común de un protón correspondiente a un metileno [δ 2.51 (*d*, $J = 15.0$ Hz)]. La presencia de sólo 6 metilos (más uno oxidado a éster) confirmaba la estructura de nor-triterpeno. En la zona de campos bajos del espectro protónico se podían observar cinco señales correspondientes a protones olefínicos: δ 7.04 (*d*, $J = 7$ Hz), δ 6.57 (*d*, $J = 7.0$ Hz), δ 6.55 (*s*), δ 6.15 (*d*, $J = 10.0$ Hz) y δ 5.28 (*d*, $J = 10.0$ Hz); las primeras tres eran típicas de los anillos A y B en triterpeno metilénquinonas.

El análisis del espectro HMBC (**Figura 38**) reveló las correlaciones a tres enlaces de distancia del singulete a δ 6.55 con las señales de los carbonos olefínicos a δ 146.0 y a δ 127.5, así como con el carbono cuaternario a δ 43.0.

El metilo a δ 2.21 presentó correlaciones fuertes a tres enlaces (3J) con los carbonos a δ 146.0 (por su desplazamiento químico podría estar sustituido con un hidroxilo) y a δ 127.5 y correlaciones más débiles a cuatro enlaces (4J) con el carbonilo a δ 178.1 y con el carbono a δ 164.6. El hecho de poder observar algunas correlaciones a cuatro enlaces en HMBC probablemente se debiera a la alta conjugación del sistema, lo cual hace aumentar el valor de las constantes J^4 heteronucleares. La alta conjugación también explica el valor desplazamiento inusualmente bajo (δ 178.1) del carbonilo de cetona. El carbono a δ 127.5 también correlacionaba con las señales de los protones a δ 6.57 y δ 7.04, las cuales presentaban acoplamiento entre sí (COSY) y correlacionaban además (HMBC) con el carbono a δ 164.6 y con el carbono cuaternario a δ 43.0, punto de unión del metilo que aparece a δ 37.2 (δ 1.42). La correlación (HMBC) del protón a δ 7.04 con los carbonos a δ 116.9 (C4), 164.6 (C10) y 165.7 (C8) definían a éste como H-6. A su vez, la señal a δ 6.57 correlacionaba (HMBC) con los carbonos a δ 43.0 (C9); 47.2 (C14); y 127.5 (C5).

Las correlaciones observadas en el espectro de HMBC definieron las asignaciones para los anillos A y B, que están formados por una quinona altamente conjugada, como se ve en los fragmentos ilustrados abajo:



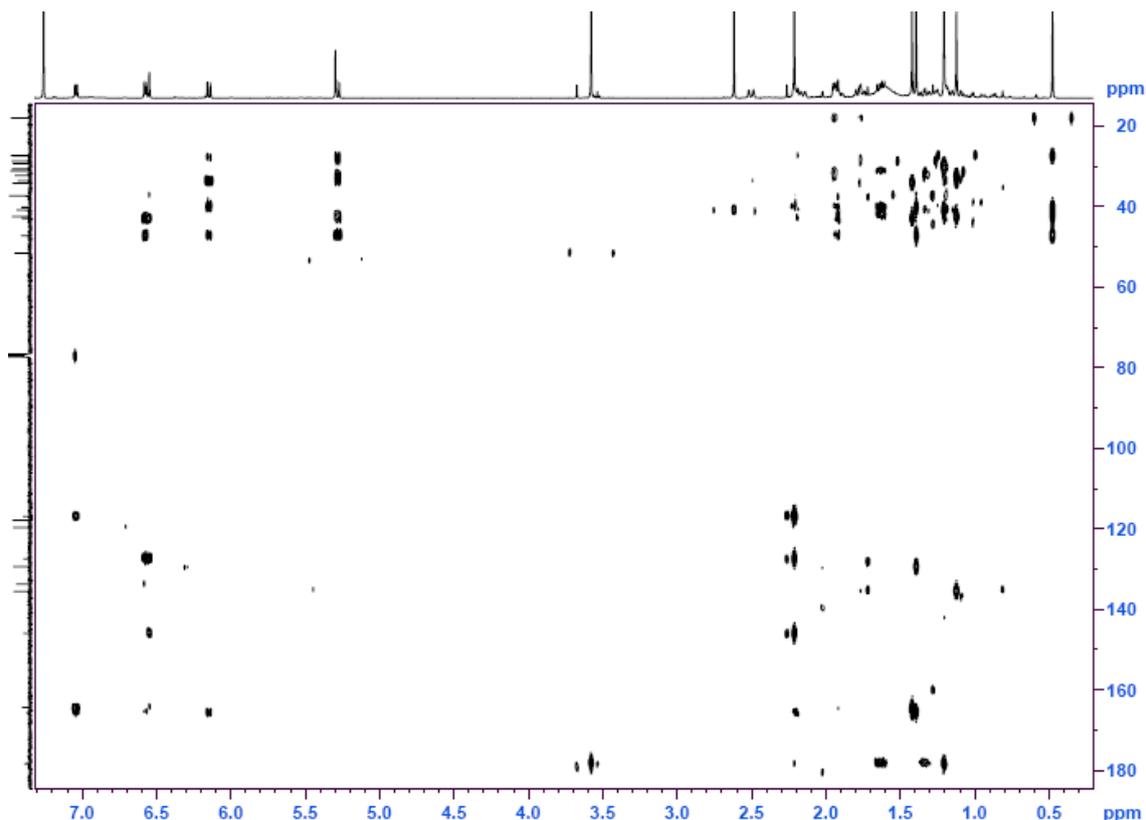


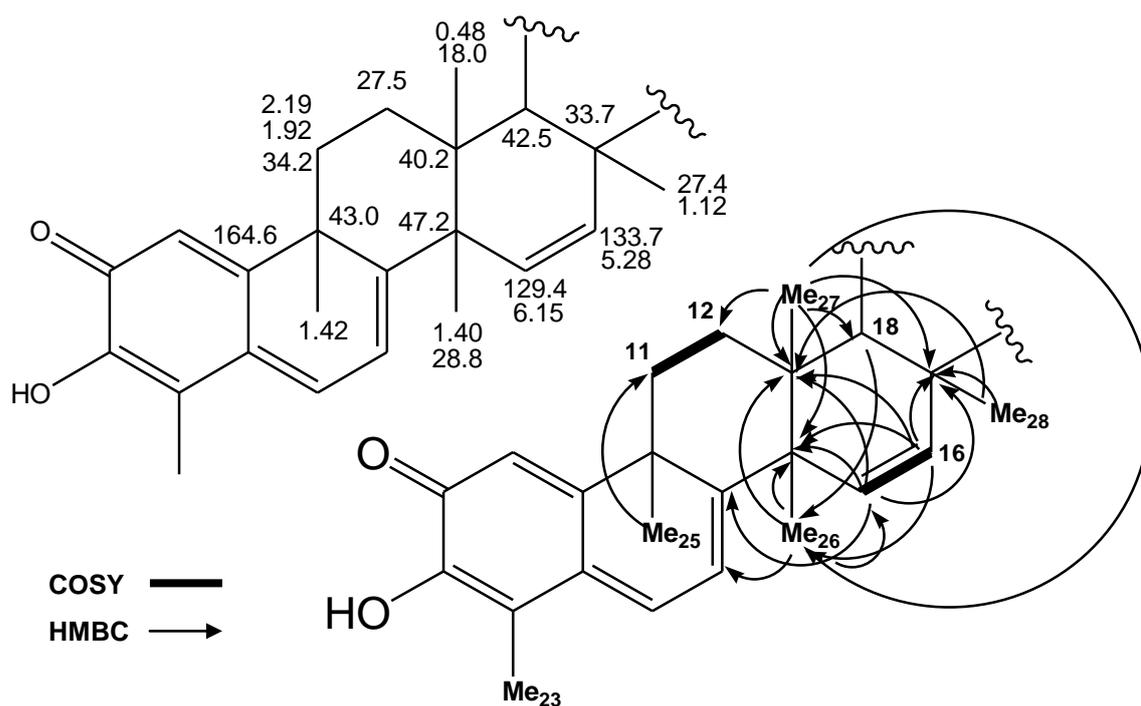
Figura 38: Espectro HMBC (500 MHz; en CDCl_3) de MV3-24.

A partir del metilo a δ 1.42 (Me-25) se continuó con el armado del anillo C. En el espectro HMBC se veía la correlación de ese metilo con el metileno a δ 34.2, cuyos protones correlacionaban en el espectro COSY con los protones del metileno a δ 27.5

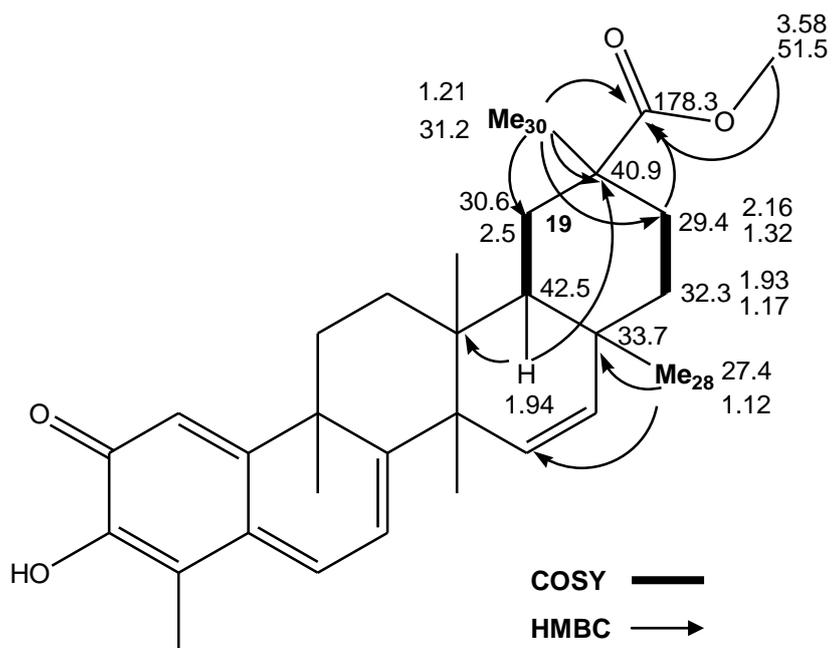
Por otro lado, el metilo a δ ^1H 1.40 correlacionaba (HMBC) con el carbono cuaternario de doble enlace a δ 165.7 (C8). Por lo tanto este metilo (Me-26) debía ubicarse en C14. Las otras correlaciones (HMBC) del metilo Me-26 eran con dos carbonos cuaternarios a δ 40.2 y 47.2 y con el metino sp^2 a δ 129.4. La señal a δ 47.2 ya había sido identificada como C14 por su correlación (HMBC) con H7. Por lo tanto el carbono cuaternario a δ 40.2 debía tratarse de C13. El metilo a δ ^1H 0.48 correlacionaba (HMBC) con éste carbono, también con C14, y con el metileno a δ 27.5 previamente nombrado (C12) por lo tanto debía tratarse del Me-27. De esta forma quedaba completamente armado el anillo C de la molécula.

Las correlaciones de HMBC restantes de los metilos Me-26 y Me-27 permitían el armado del anillo D. El Me-27 correlacionaba con un metino a δ

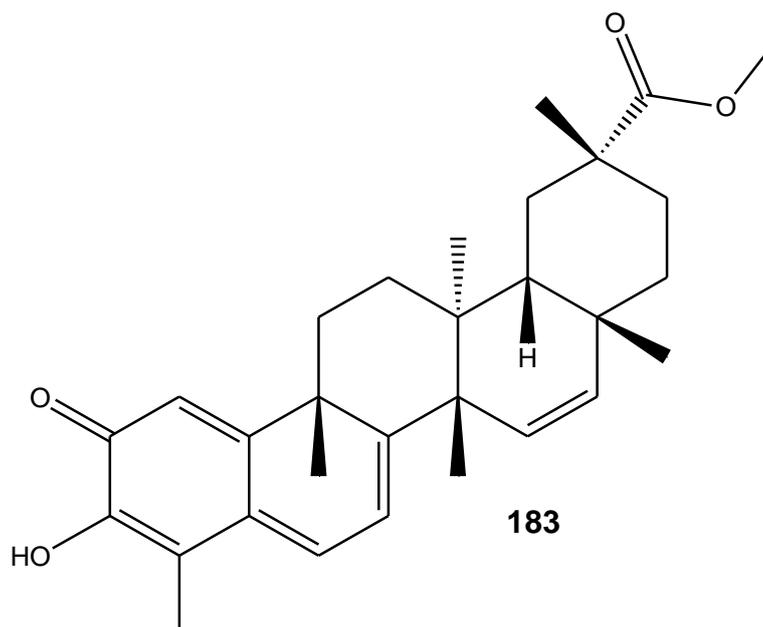
42.5, correspondiente al C18. Por otro lado, el Me-26 correlacionaba con un carbono de doble enlace previamente mencionado (δ 129.4). Esto indicaba la existencia de un doble enlace entre C15 y C16. Tanto H15 como H16 correlacionaban con un carbono cuaternario a δ 33.7, el cual de esta forma quedó caracterizado como C17. El metilo a δ 1.12 (Me-28) correlacionaba con éste carbono cuaternario, y también con el metino C18 y también con un metileno a δ 32.3 (C22), dejando completamente caracterizado el anillo D de la molécula.



Para terminar de armar el anillo E, se partió del metilo restante, Me-30 (δ 1.21). Este metilo presenta correlaciones a larga distancia (HMBC) con el carbonilo del éster metílico a δ 178.3, por lo tanto se encuentran unidos al mismo carbono cuaternario (C20). Las correlaciones de HMBC permitieron identificar a C20 (δ 40.9). Las otras correlaciones del Me-30 fueron con los metilenos a δ 30.6 y 29.4. Uno de los protones correspondientes al carbono de δ 30.6 (δ 2.51) correlacionaba (COSY) con H18 (δ 1.94). Por otro lado, una de las señales (δ 1.17) del carbono a δ 32.3 (C22) correlacionaba claramente (COSY) con los dos protones del carbono a δ 29.4 (δ 2.16 y 1.32). De esta forma se pudo asignar C19 (δ 30.6) y C21 (δ 29.4). Las demás correlaciones de los espectros de HMBC y COSY corroboran las asignaciones para el anillo E del triterpeno.



El espectro ROESY permitió confirmar la ubicación del doble enlace entre las posiciones C15-C16 al observarse efecto NOE entre el protón a δ 6.15 (H-15) con el metilo a δ 1.40 (Me-26). También se observaba NOE entre H16 y Me-28. Los restantes NOEs observados permitieron confirmar la estereoquímica propuesta. El compuesto MV3-24 (**183**) es un nuevo nortriterpeno metilénquinona encontrado en la especie *M. vitis-idaea*, que no ha sido reportado en la literatura. Los datos espectroscópicos se encuentran en las **tablas 6 y 7 (parte experimental, pág. 250 y 251)**.



Elucidación estructural del compuesto MV3-22

El compuesto que MV3-22 fue aislado como un polvo rojo amorfo y presentó mediante espectrometría de masas de alta resolución (EMAR-IE) un ión M^+ a m/z 462.2693, consistente con la fórmula molecular $C_{30}H_{38}O_4$ y doce insaturaciones, con lo cual resultaba un isómero de MV3-24.

En el espectro de ^{13}C se veían 30 señales consistentes con seis señales de metilos (δ 19.7, δ 23.9, δ 29.4, δ 31.4, δ 21.9 y δ 10.3), diez señales de olefinas (δ 160.0, δ 159.7, δ 146.2, δ 135.3, δ 134.8, δ 128.3, δ 127.5, δ 121.5, δ 119.8 y δ 116.7), dos señales de carbonilos (δ 178.0 y δ 179.3), una señal de metoxilo (δ 51.8), una señal de metino (δ 43.9), cuatro señales de carbonos cuaternarios y seis señales de metilenos.

En el espectro de RMN de 1H se veían cuatro singuletes de metilos angulares (δ 1.27, δ 0.80, δ 1.20, δ 1.21) un singulete de metilo ubicado sobre el anillo A (Me-23) de un triterpeno metilénquinona (δ 2.25) y otro sobre doble enlace (δ 1.71), lo que sugería la estructura de un nortriterpeno insaturado. En la zona de campos bajos, las señales de tres protones olefínicos eran típicas de un triterpeno metilénquinona: H1 (δ 6.50), H6 (δ 7.17, d , $J = 7$ Hz), y H7 (δ 6.15, d , $J = 7$ Hz). Esta era una de las principales diferencias con MV3-24, que tenía 5 protones olefínicos. Teniendo en cuenta que ambos compuestos eran isómeros, esto significaba que uno de los dobles enlaces de MV3-22 debía ser tetrasustituído en lugar de disustituído.

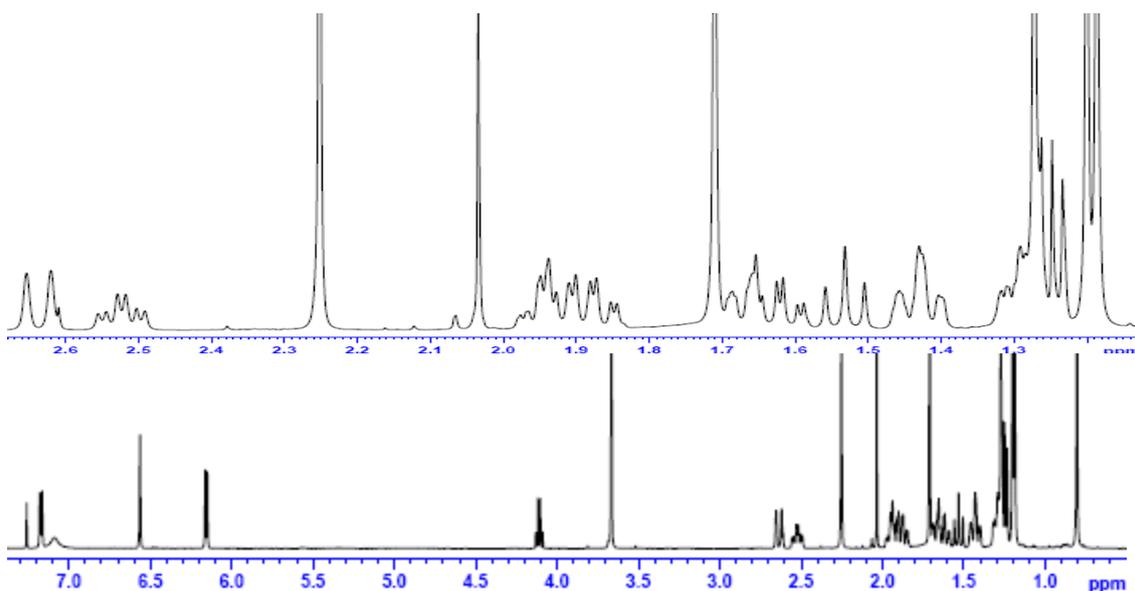


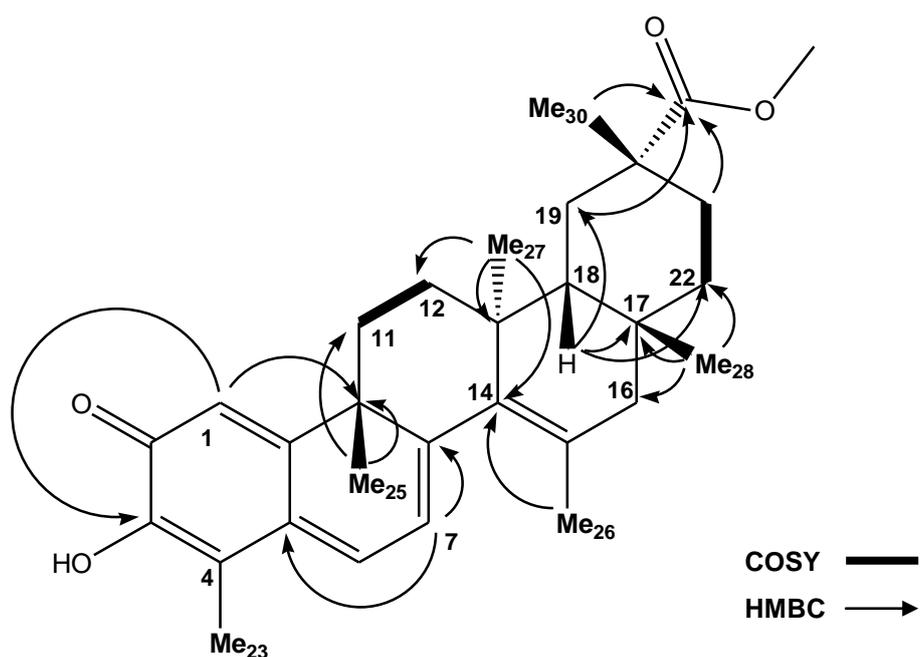
Figura 39: Espectro de RMN 1H (500 MHz; en $CDCl_3$) de MV3-22.

Por medio del espectro HMBC se pudo establecer las asignaciones para los anillos A y B, de forma que la señal de δ 178.0 fue asignada al C2, que correlacionaba con H1 y Me-23 (δ 2.25). De la misma forma se asignaron las señales de los otros carbonos de los dobles enlaces conjugados así como la señal del Me-25 (δ 1.27). Los anillos A y B resultaron ser muy similares a los del compuesto MV3-24 salvo por el desplazamiento de los protones olefínicos. Esta diferencia probablemente se debiera al efecto del doble enlace tetrasustituído adicional.

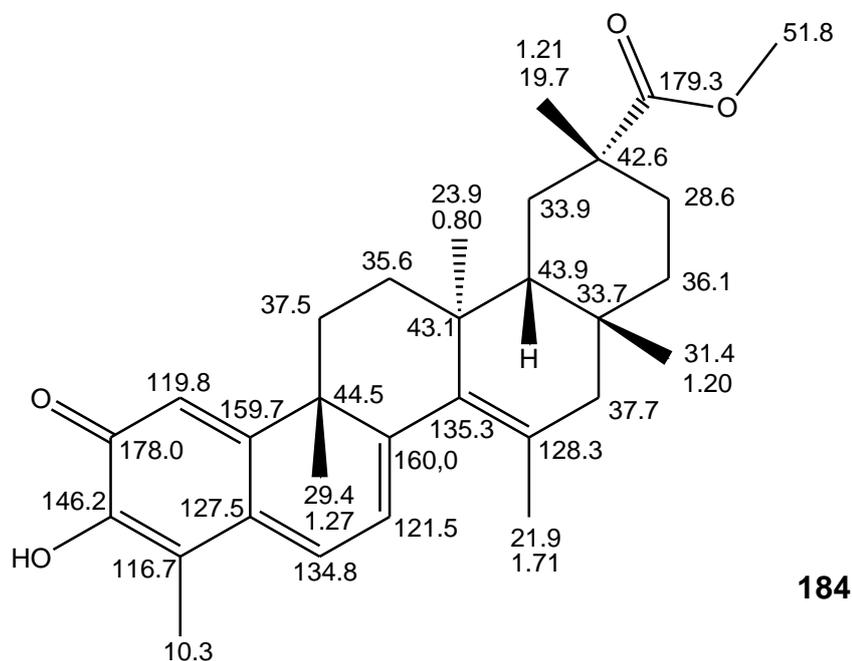
El doble enlace restante fue ubicado en el anillo D, entre los carbonos C14 (δ 135.5), y C15 (δ 128.3), sobre el cual esta posicionado el Me26 (δ 1.70). Ahí es donde el compuesto se difiere del compuesto MV3-24, que presentaba el doble enlace del anillo D ubicado entre los carbonos C15 y C16, y el Me-26 ubicado sobre C14.

La señal de metilo a δ 0.80 correlacionaba con C15, y fue asignada al Me-27, consistente con su desplazamiento químico

El otro metilo de la molécula, Me30 (δ 1.21) correlacionaba (HMBC) con el carbonilo de éster metílico a δ 179.3 que esta ubicado en la posición C-29. La asignación completa se encuentra en las **tablas 6 y 7 (parte experimental, pág. 250 y 251)** y las principales correlaciones vistas en el espectro HMBC se encuentran abajo:



El compuesto MV3-22 (**184**) es un nortriterpeno metilénquinona que no fue encontrado en la literatura.



Elucidación estructural del compuesto MV3-26

El compuesto que MV3-26 fue aislado como un polvo rojizo amorfo y presentó mediante espectrometría de masas de alta resolución (EMAR-IE) un ión molecular a m/z 464.2672 (M^+), consistente con la fórmula molecular $C_{30}H_{40}O_4$ y once insaturaciones. Por comparación de sus espectros de RMN 1D (**figura 40**) y 2D (correlaciones indicadas abajo) con datos de literatura se pudo identificar al compuesto MV3-26 como **pristimerina (171)**. La asignación completa se encuentra en las **tablas 6 y 7 (parte experimental, pág. 250 y 251)**.

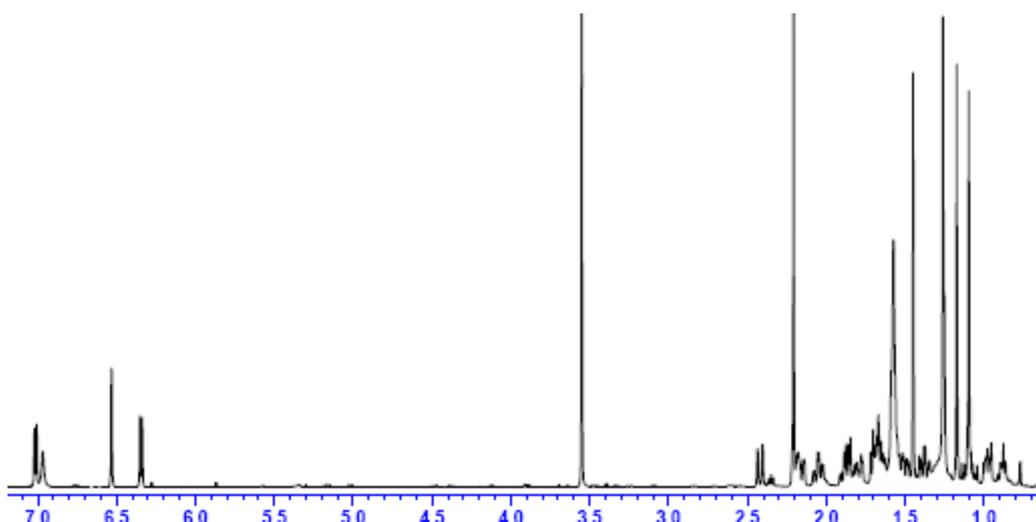
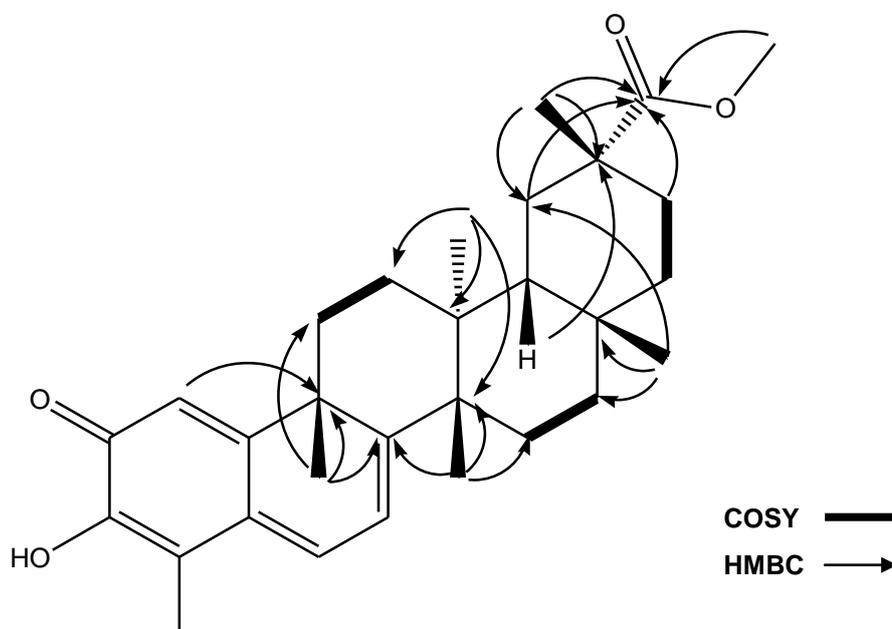


Figura 40: Espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de MV3-26 (**51**).

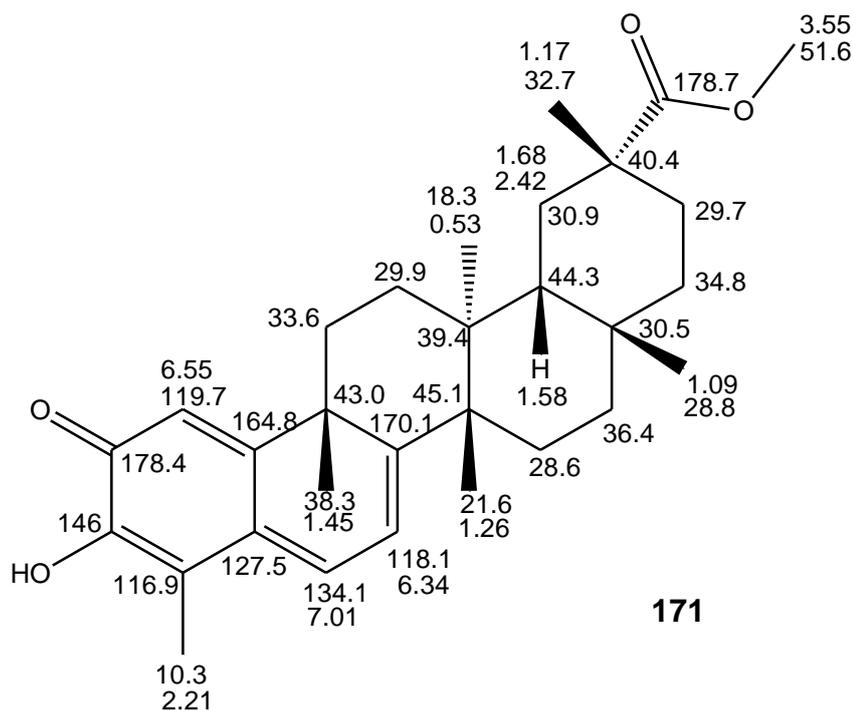
La pristimerina¹⁴⁰, había sido aislada anteriormente de la especie *Maytenus vitis-idaea* colectada en Paraguay. Este compuesto presentó actividad antialimentaria sobre larvas de polilla de la manzana¹⁴¹. También había sido aislada anteriormente de otras especies de *Maytenus* y es bien conocida por su citotoxicidad.¹⁴²



¹⁴⁰ Nakanishi, K.; Miura, V. P.; Govindachari, T.R.; Viswanathan, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 6473.

¹⁴¹ Alvarenga, N.; Velazquez, C.A.; Alvarenga, N.C.. *Revista de Ciencia Y Tecnología, Dirección de Investigaciones – Una*, **2001**, 1, 51-55.

¹⁴² Itokawa, H. *et al. Phytochemistry*, **1991**, 30, 3713-3716.



Los tres triterpenos MV3-22 (**184**), MV3-24 (**183**) y MV3-26 (pristimerina, **171**) que presentaban un grupo éster metílico en la posición C29 se diferenciaban en el anillo D: saturado en pristimerina, insaturado entre C14-C15 (con conjugación) en MV3-22 e insaturado entre C15 y C16 en el MV3-24. Las **tablas 6 y 7** (en la **parte experimental**, pág. 250 y 251) presentan sus datos espectroscópicos de forma comparativa.

Elucidación estructural del compuesto MV3-11

El compuesto que MV3-11 fue aislado como un polvo de color rojo intenso y presentó los espectros de RMN de ^{13}C y de ^1H típicos de un nortriterpeno metilénquinona.

El compuesto fue identificado como escutiona (**185**), ya aislada de *Maytenus vitis-idaea* y presentes en muchas especies de dicho género.¹³⁶ Es uno de los compuestos responsables de las diversas actividades farmacológicas atribuidas a los extractos de *Maytenus*, en especial por las propiedades anticancerígenas y antibióticas.

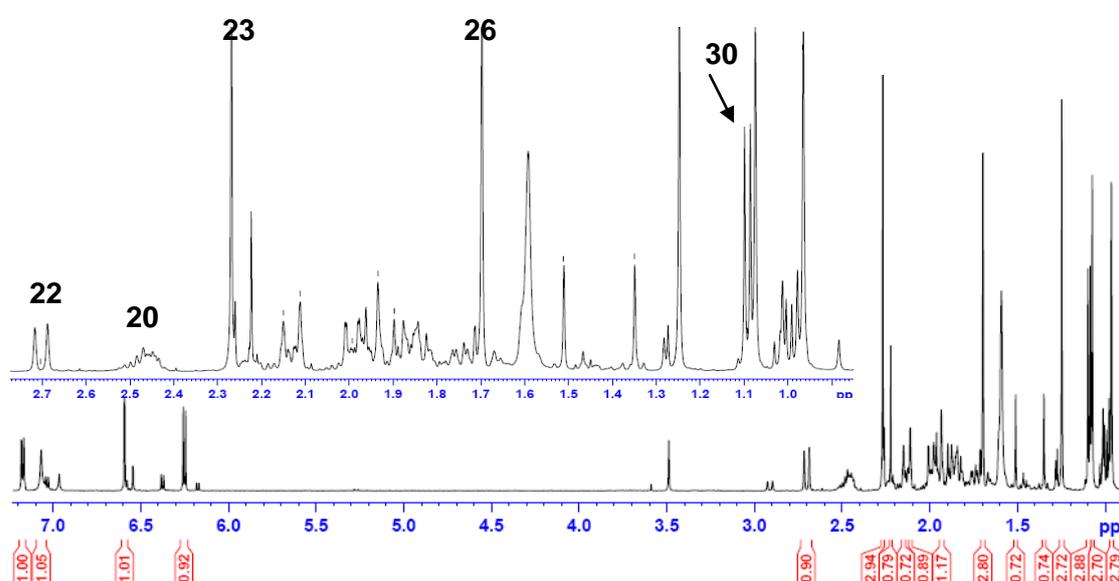
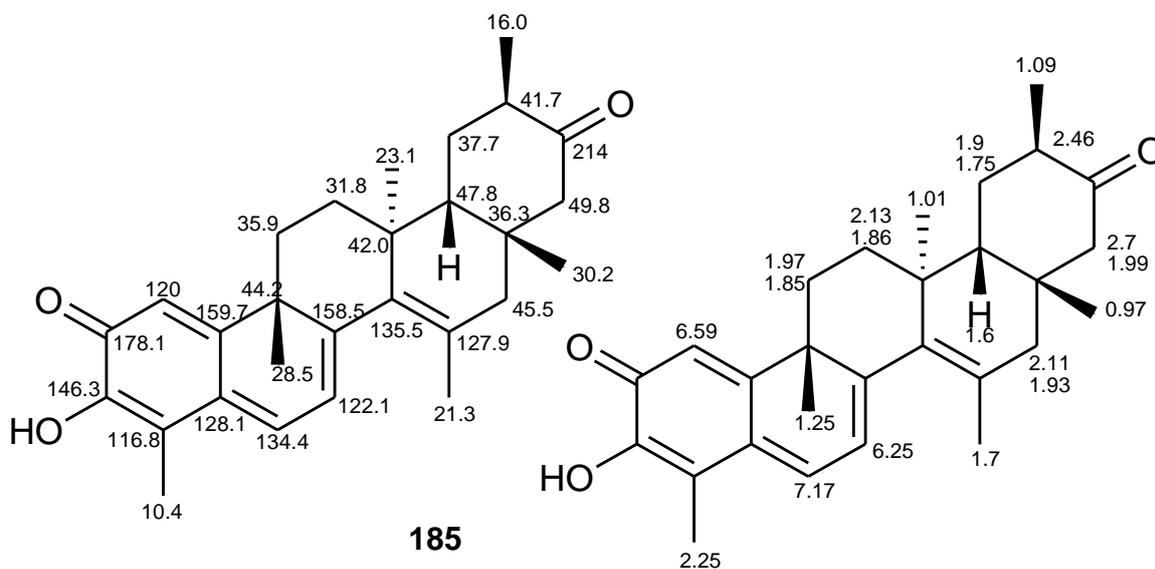


Figura 41: Espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de MV3-11 (**185**).



La escutona fue aislada por primera vez de la especie *Maytenus canariensis*, y presentó actividad contra bacterias *Gram(+)*. En un estudio de estructura-actividad realizado sobre dicho compuesto, se encontró que el doble enlace entre las posiciones C14 y C15, así como la presencia del grupo cetona en la posición C22 son muy relevantes para la actividad antimicrobiana en ese tipo de triterpeno¹⁴³.

Elucidación estructural del compuesto MV3-13

El compuesto que MV3-13 fue aislado como un polvo rojo anaranjado amorfo y presentaba el mismo R_f (~ 0.8) en CCD sobre sílica (CH₂Cl₂:MeOH, 20:1) que la escutona (MV3-11). Si bien sus tiempos de retención fueron muy similares, fue posible su separación por medio del HPLC. Por comparación con datos de literatura, fue posible identificar a MV3-11 como tingenona (**174**), compuesto aislado por primera vez de *Kokoona ochracea*, y posteriormente de diversas especies de celastráceas, funcionando como marcador taxonómico para la familia.

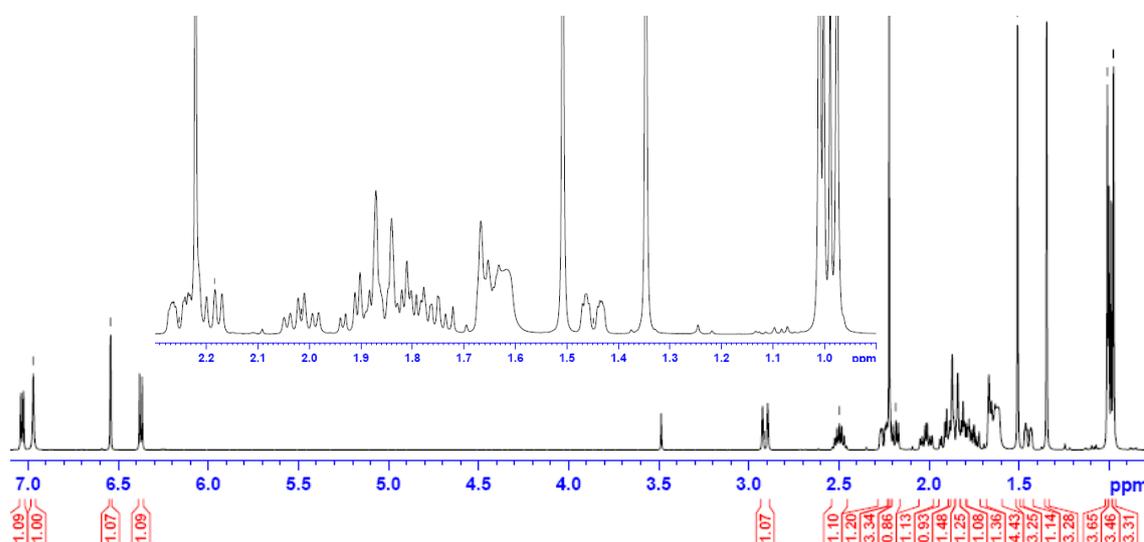
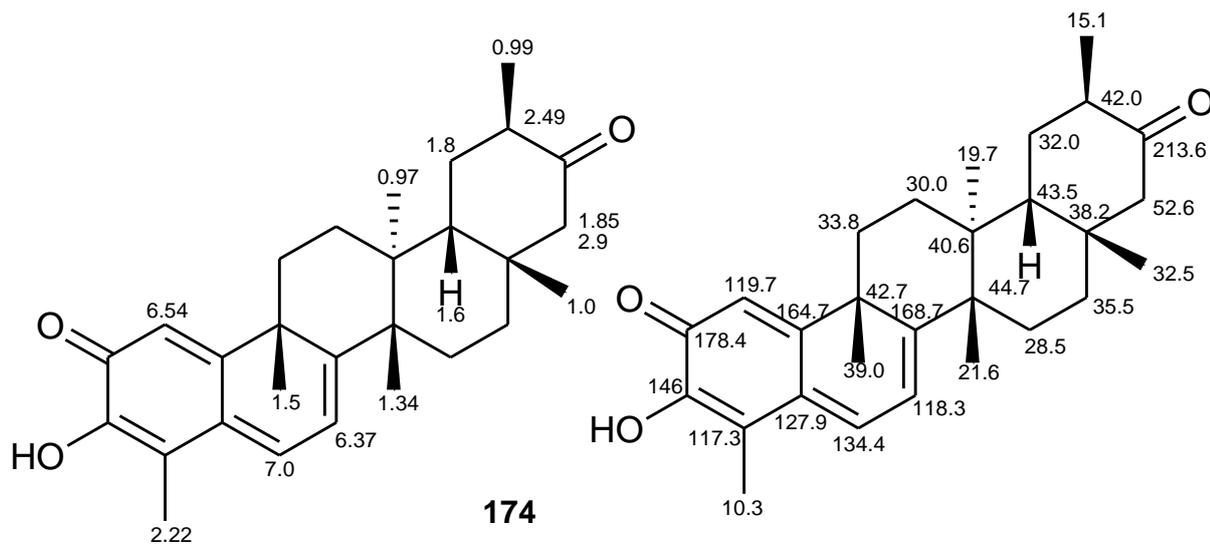


Figura 42: Espectro de RMN ¹H (500 MHz; en CDCl₃) de MV3-13 (**174**).

¹⁴³ González, A. G. *et al Bioorganic and Medicinal Chemistry* **1996**, 4, 815-820.



Para la tingenona fueron reportadas actividad antitumoral y citotóxica, aunque el compuesto no fue selectivo para ninguna línea celular probada, demostrando un amplio espectro de citotoxicidad.^{144,145}

¹⁴⁴ Ngassapa, O. *et al. J. Nat Prod.* **1994**, 57, 1-8.

¹⁴⁵ Sneden, A.T.. *J. Nat. Prod.* **1981**, 44, 503.

Elucidación estructural del compuesto MV5-6-11A

El compuesto que MV5-6-11a fue aislado como un polvo rojo amorfo. En el espectro de ^{13}C presentó 28 señales: seis señales de metilos singuletes (δ 30.3, δ 29.5, δ 24.7, δ 23.6, δ 22.0 y δ 10.3), diez señales de olefinas (δ 159.6, δ 158.5, δ 146.2, δ 136.8, δ 134.3, δ 128.5, δ 127.8, δ 121.8, δ 120.0 y δ 116.7), dos señales de carbonilos (δ 213.0 y δ 178.0), una señal de metino (δ 43.6), tres señales de carbonos cuaternarios alifáticos (δ 44.5, δ 39.7, δ 42.3), una señal de carbono oxigenado cuaternario (δ 75.0) y cinco señales de metilenos, de los cuales uno se encuentra α a una cetona (δ_{C} 50.0 y sus señales protónicas a δ 2.18 y δ 2.81, dobletes de 13 Hz).

En el espectro de RMN de ^1H se veían señales típicas de un triterpeno metilénquinona, donde aparecían en campo más bajo las señales de los únicos protones de olefina H1 (δ 6.58), H6 (δ 7.15), y H7 (δ 6.18), juntamente con una señal ancha de un hidroxilo a δ 7.05.

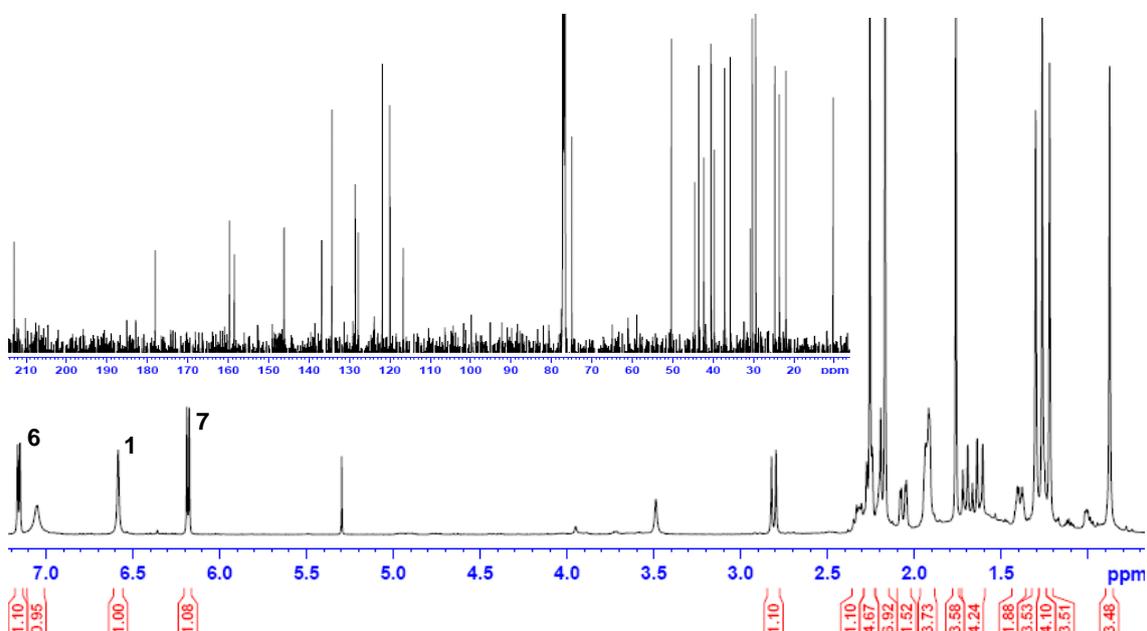


Figura 43: Espectros de RMN ^{13}C y ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de MV5-6-11a.

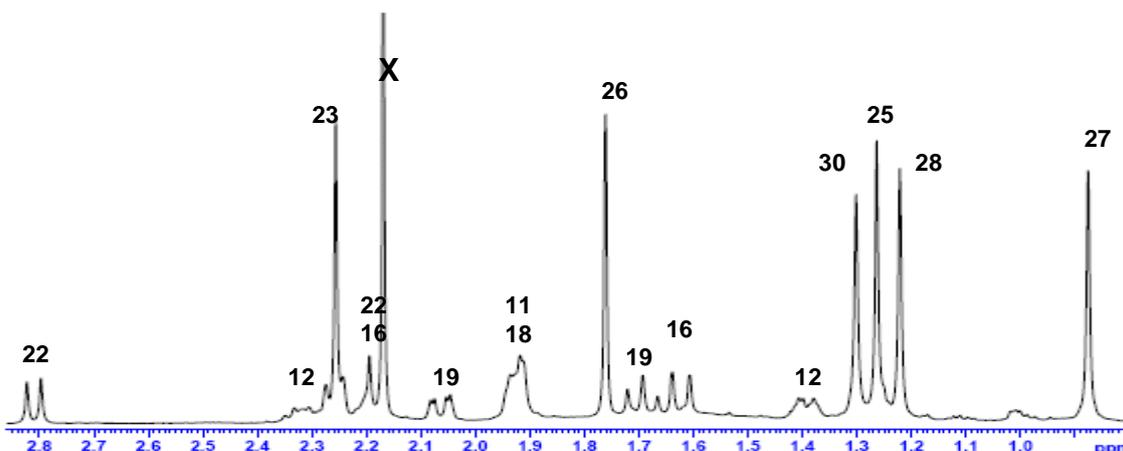


Figura 44: Ampliación del espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de MV5-6-11a.

En el espectro de masas se observaba un ión molecular a m/z 434.2188 consistente con una fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_4$, lo cual teniendo en cuenta la presencia de dos carbonilos y la ausencia de un grupo metoxilo, nos dejaba una estructura de bis-nortriterpeno pentacíclico.

Por medio del espectro de HMBC (**Figura 45**) se pudo establecer las asignaciones para los anillos A y B, de forma que la señal de δ 178.0 fue asignada al C-2, la señal del metilo a campo más bajo (δ 2.25) al Me-23 y de la misma forma se asignaron las señales de los otros carbonos del sistema conjugado, así como la señal del Me-25 (δ 1.26).

El doble enlace restante (tetrasustituído) fue ubicado en el anillo D, entre los carbonos C14 (δ 136.8), y C15 (δ 128.5), sobre el cual esta posicionado el Me-26 (δ 1.76). La señal de metilo a δ 0.87 correlacionaba con el C14 (δ 136.8), y fue asignada al Me-27, consistente con su desplazamiento químico; por otro lado la señal a δ 1.22 correspondía al Me-28, y presentaba una correlación (HMBC) con el metileno a δ 50.0 (C22). Los protones de dicho metileno, muy desprotegidos (δ 2.81 *d*, 13.0 Hz; 2.19 *m*), indicaban la cercanía de un grupo anisotrópico. De hecho ambos protones correlacionaban (HMBC) con el carbonilo a δ 213.0. Los datos espectroscópicos hasta el momento indicaban que MV5-6-11A era un derivado de escutiona.

El otro metilo de la molécula, Me-30 (δ 24.7, δ 1.30) correlacionaba (HMBC) con la cetona a δ 213.0 (C21), con el carbono cuaternario oxigenado a δ 75.0 (C20) y con el metileno a δ 40.6 (C19).

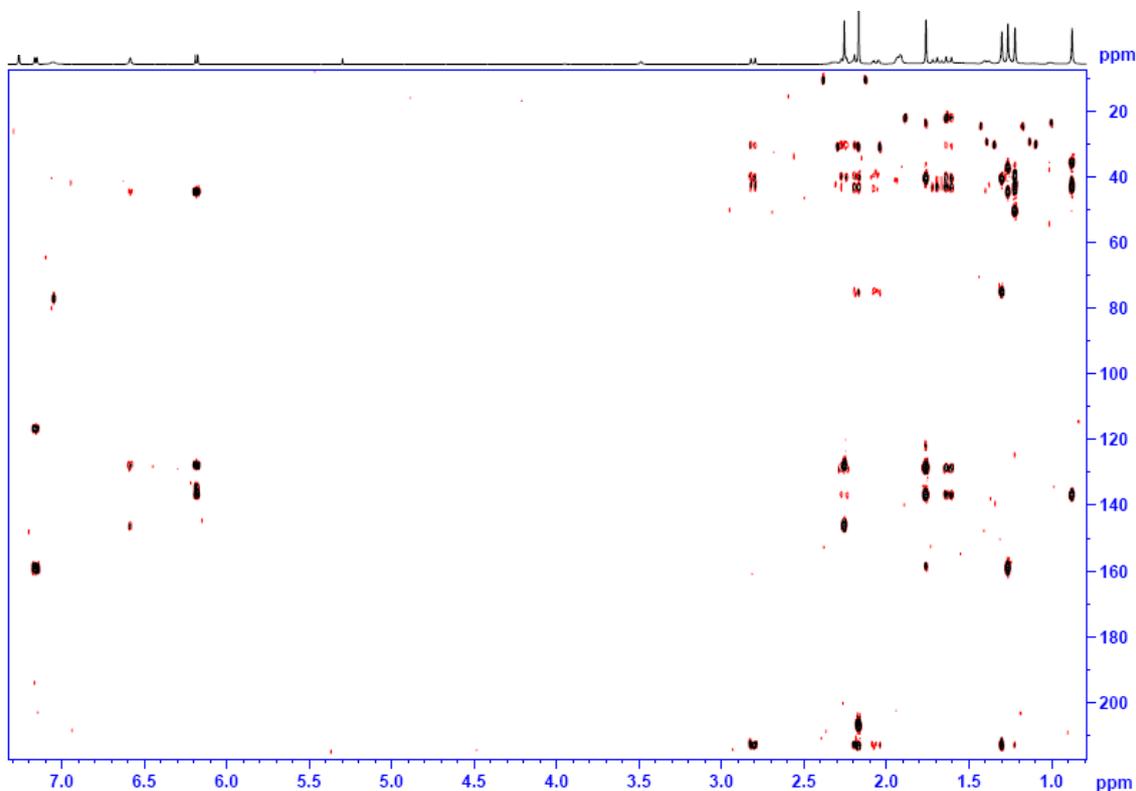
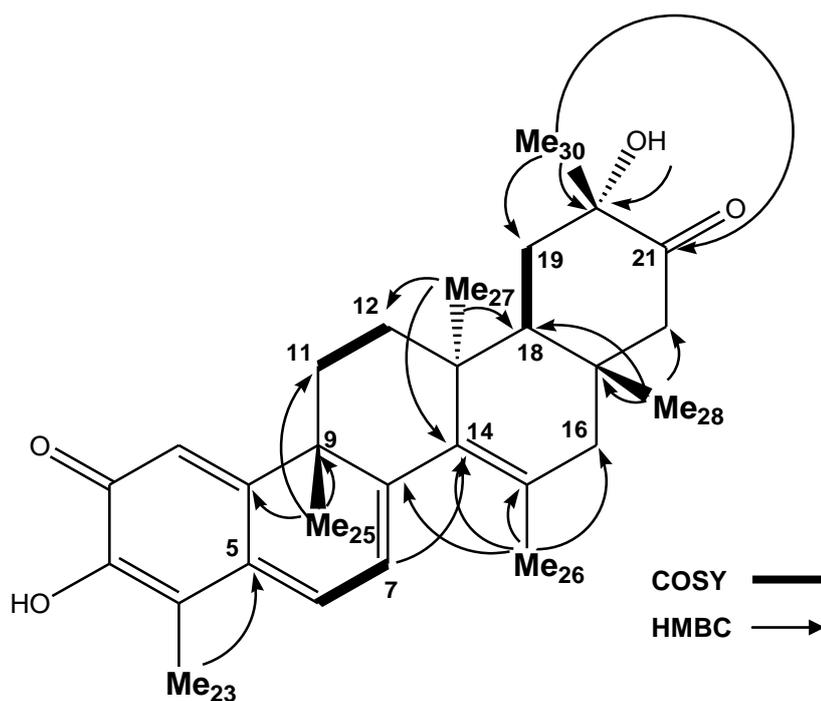


Figura 45: Espectro de HMBC (500 MHz; en CDCl_3) de MV5-6-11a.

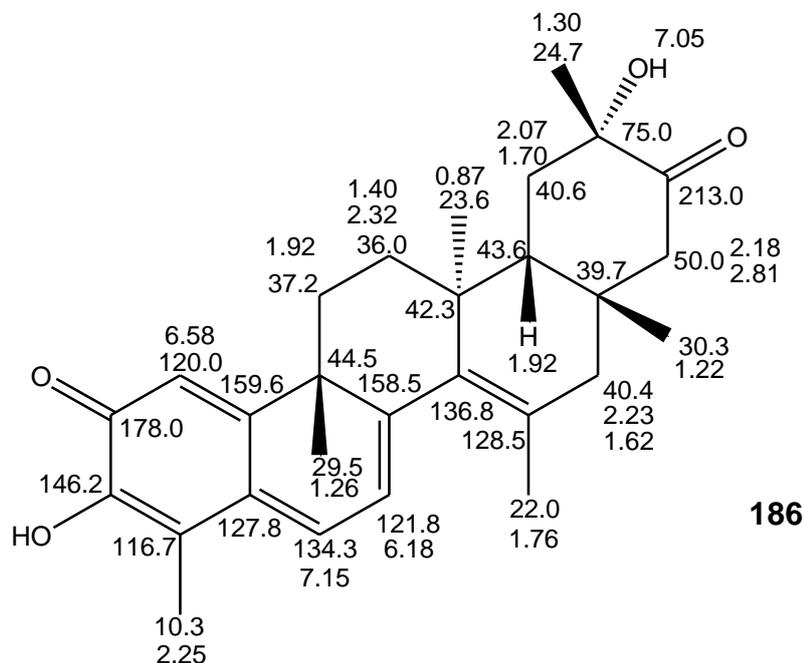


En el espectro COSY (**Figura 47**), la señal a δ 1,92 (H-18) correlacionaba con las señales de los protones de C-19 a δ 1,70 y δ 2.07. La señal de H-18 estaba superpuesta con la del H-11, (HSQC, **figura 46**) pero en el mismo espectro también se veían las dos correlaciones entre H-11 y las señales de C-12 (δ_H 1.40 y δ_H 2.32).

La presencia de cuatro átomos de oxígeno en la fórmula molecular indicaba que un segundo grupo hidroxilo debía estar presente. El desplazamiento químico de C-20 permitió ubicar dicho hidroxilo en esa posición.

El derivado hidroxilado de la tingenona, 20- α -hidroxitingenona, ya fue informado para varias especies de *Maytenus*, mientras que no hay referencias de un derivado de escutona con hidroxilo en la posición C20.

El análisis de espectro ROESY permitió establecer la estereoquímica de dicho hidroxilo y definir el compuesto MV5-6-11a como 20- α -hidroxiescutona (**186**), no reportado en la literatura (asignación completa en las **tablas 8 y 9**, **parte experimental**, pág. 252 y 253).



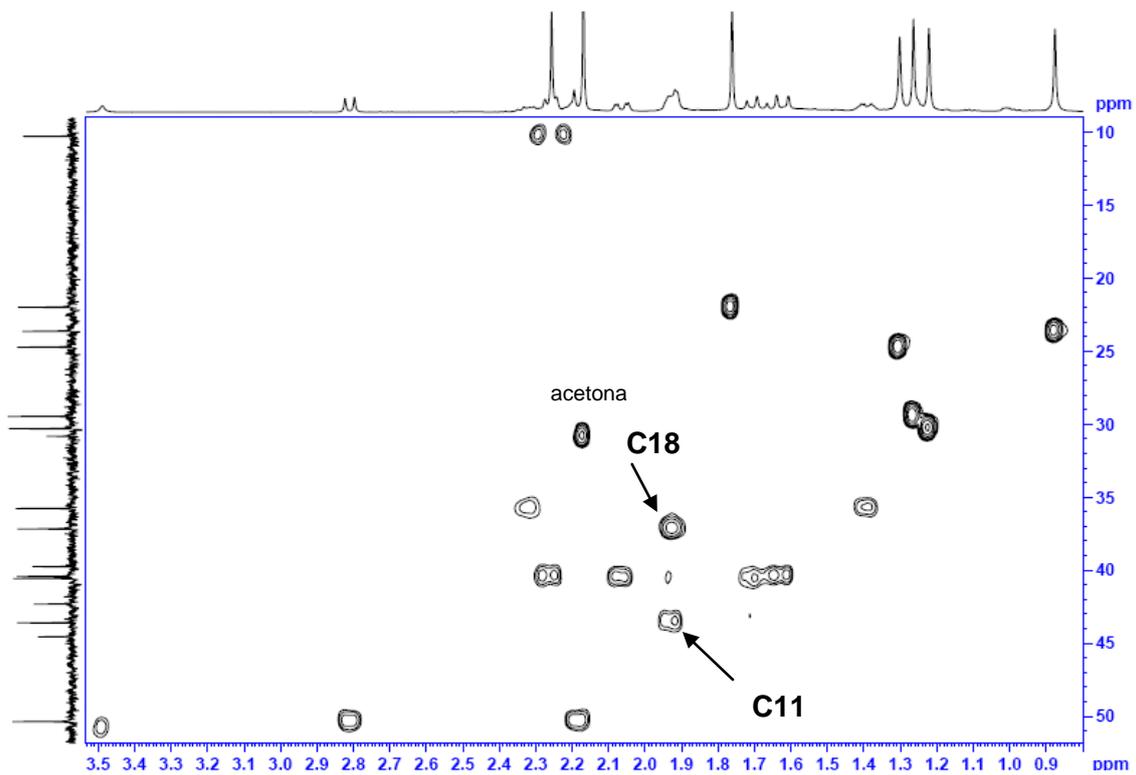


Figura 46: Espectro HSQC (500 MHz; en CDCl_3) de MV5-6-11a.

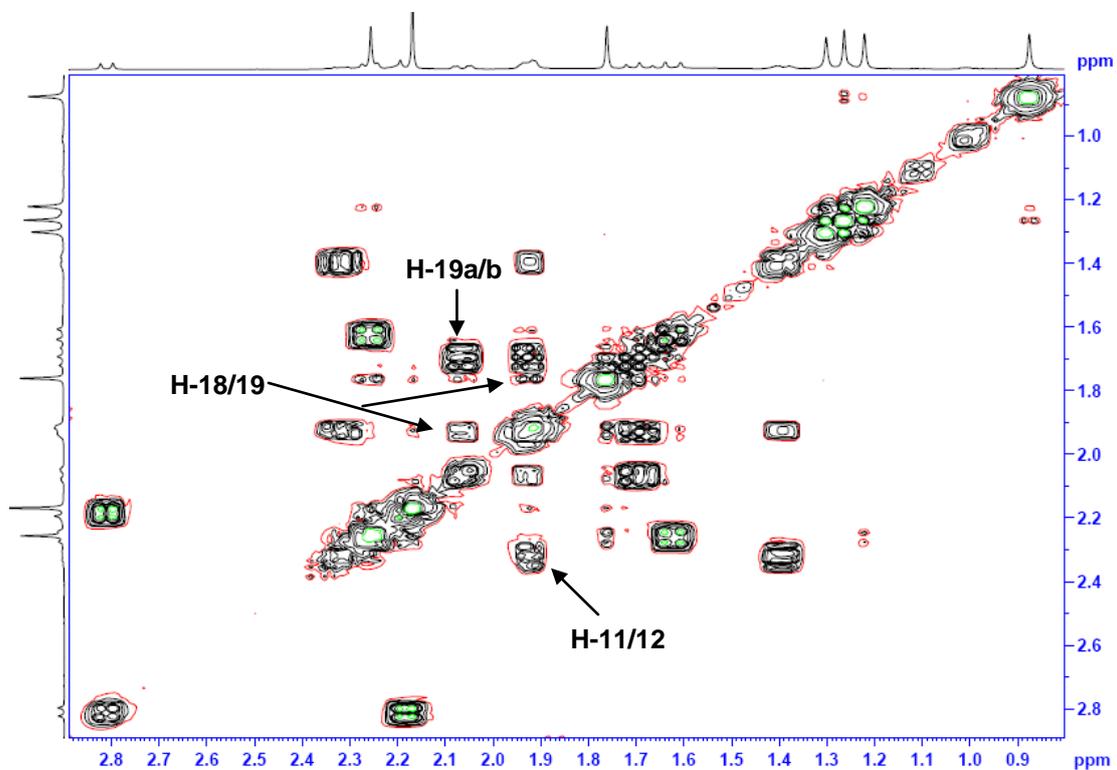


Figura 47: Espectro COSY (500 MHz; en CDCl_3) de MV5-6-11a.

Elucidación estructural del compuesto MV5-6-11B

El compuesto que MV5-6-11B fue aislado como un polvo rojo anaranjado amorfo y presentó mediante espectrometría de masas de alta resolución (EMAR-IE) un ión molecular a m/z 436.2417 (M^+), consistente con la fórmula molecular $C_{28}H_{36}O_4$ y once insaturaciones.

En el espectro de ^{13}C aparecían 28 señales: seis señales de metilos (δ 40.9, δ 32.8, δ 23.5, δ 28.5, δ 15.0 y δ 10.3) ocho señales de olefinas (δ 164.2, δ 164.9, δ 146.1, δ 132.1, δ 128.4, δ 119.8, δ 118.5, δ 117.5), dos señales de carbonilos (δ 213.6 y δ 178.3), dos señales de metinos (δ 43.6 y δ 41.8), cuatro señales de carbonos cuaternarios alifáticos, un metino oxigenado (δ 73.0) y cinco señales de metilenos, de los cuales uno se encontraba en posición α a una cetona (δ_c 54.1 y δ_H 3.46, δ_H 1.97, ambos dobletes de 14.0 Hz).

En el espectro de RMN de 1H se veían señales típicas de un triterpeno metilénquinona, donde aparecían en la zona de campos bajos las señales de los tres protones olefínicos H-1 (δ 6.53), H-6 (δ 7.00), y H-7 (δ 6.51) típicos de un derivado de tingenona.

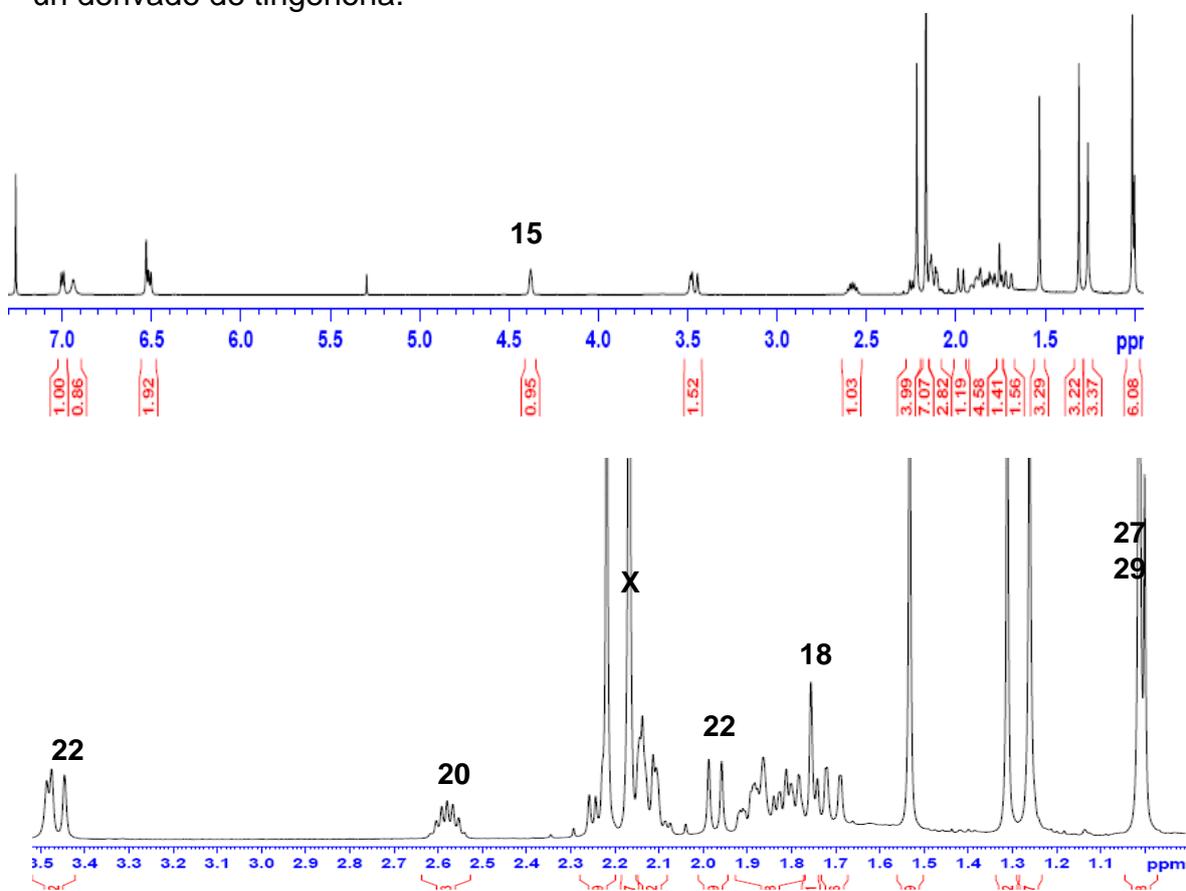


Figura 48: Espectro de RMN 1H (500 MHz; en $CDCl_3$) de MV5-6-11b.

Los metilos angulares de la molécula aparecían como cuatro singuletes a δ 1.53 (Me-25), δ 1.31 (Me-26), δ 1.26 (Me-28) y δ 1.01 (Me-27), esta última superpuesta con un metilo doblete a δ 1.00 (Me-30) que correlacionaba (COSY) con el multiplete a δ 2.58 y en el espectro HMBC con el metileno a δ 31.9, con el carbonilo de la cetona a δ 213.6 (C21) y con el carbono a δ 41.8 (C20). Todas estas características concordaban con el anillo E de la tingenona.

Por medio del espectro de HMBC (**Figura 49**) se pudo establecer las asignaciones para los anillos A y B, de la misma forma que en el compuesto anterior. Establecidos ya los anillos A, B y E similares a la tingenona, restaba ubicar el hidroxilo adicional que determinaba la fórmula molecular.

La señal de metilo singulete a δ 1.26 correlacionaba (HMBC) con el carbono cuaternario a δ 37.5 (C17) y el metileno vecino a la cetona a δ 54.1, y fue asignada al Me-28, mientras que la señal a δ 1.01 (s, 3H) fue asignada al Me-27 al verificarse correlaciones con el metino a δ 43.6 (C18) y con el carbono cuaternario a δ 39.1 (C13). El Me-26 (δ 1.31) a su vez fue asignado en base a su correlación (HMBC) con la señal olefínica a δ 164.9 (C8).

Tanto el Me-26 como el Me-28 correlacionaban con el metino hidroxilado a δ 73.0, cuya señal de protón a δ 4.38 (sa) correlacionaba (COSY) con ambos protones (δ 2.12 (*d*, $J = 15.0$ Hz, H-16), δ 1.70 (*da*, $J = 15.0$ Hz)) del metileno a δ 41.4. A su vez este metileno correlacionaba (HMBC) con el Me-28. Todas estas correlaciones fijaban sin lugar a dudas al grupo hidroxilo en C15. La ausencia de acoplamiento grandes en la señal de RMN ^1H indicaba que H15 se encontraba en posición ecuatorial y por lo tanto el compuesto era el 15 α -hidroxi derivado de la tingenona.

Las correlaciones observadas en el espectro ROESY para la señal a δ 4.38 (H15) con el metilo a δ 1.31 (Me-26) y el protón olefínico a δ 6.51 (H-7) confirman tanto la ubicación como la estereoquímica del hidroxilo en C15. En base a lo expuesto MV5-6-11b fue identificado como 15- α -hidroxitingenona (**187**), compuesto no informado en la literatura (asignación completa en las **tablas 8 y 9, parte experimental**, pág. 252 y 253).

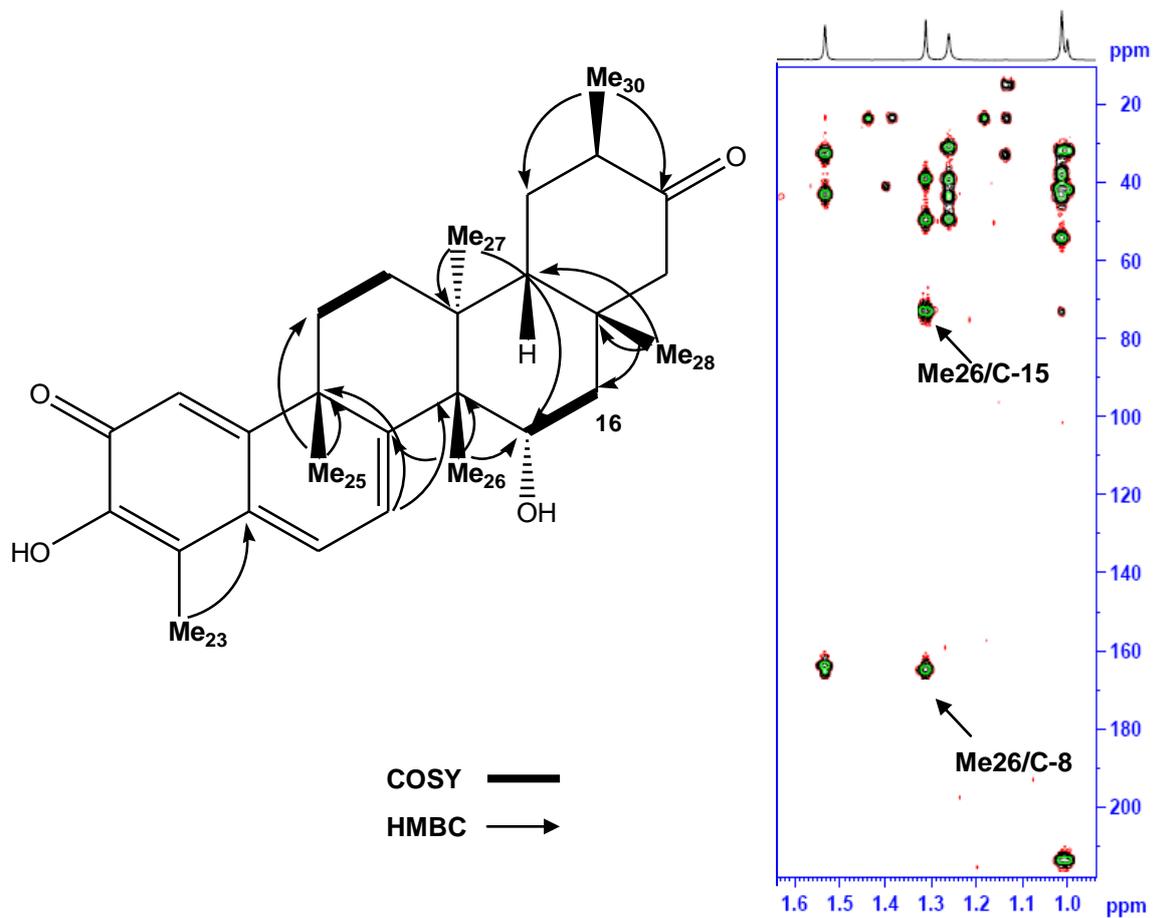
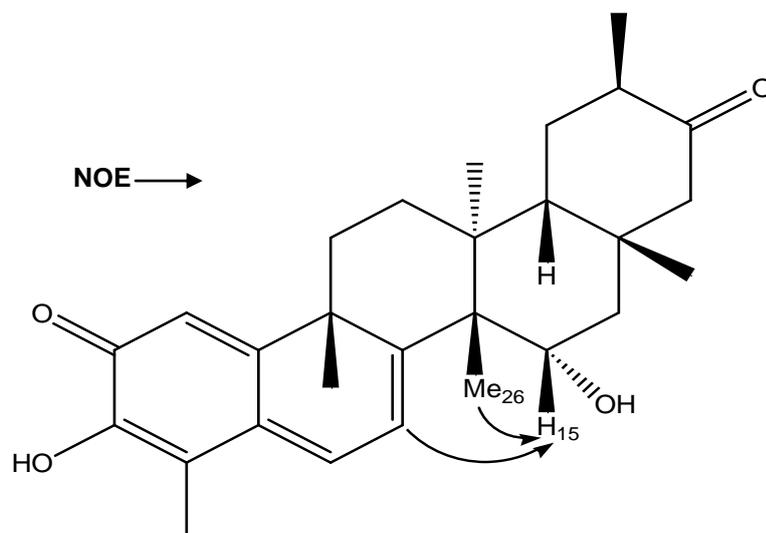
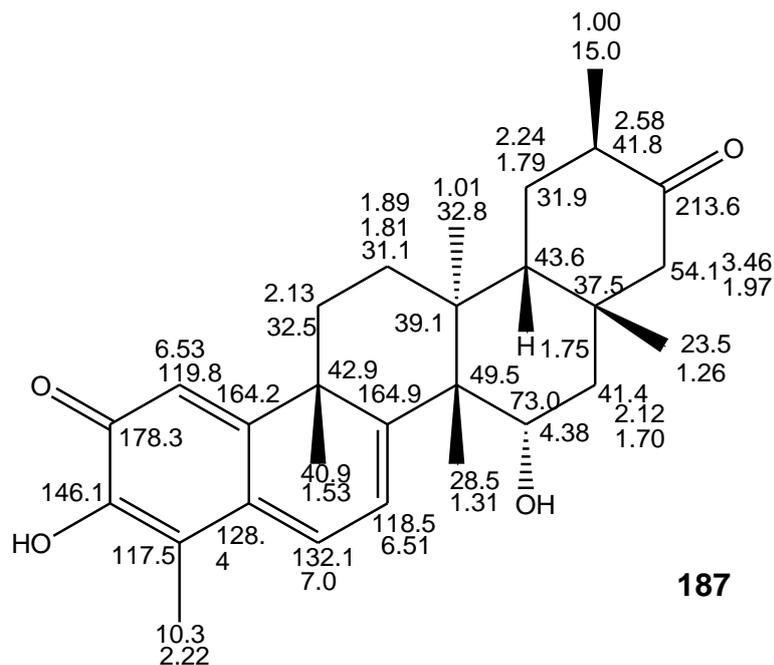


Figura 49: Ampliación del espectro HMBC (500 MHz; en CDCl_3) de MV5-6-11b.





Elucidación estructural del compuesto MV5-6-38

El compuesto que MV5-6-38 fue aislado como un polvo rojo amorfo y presentó mediante espectrometría de masas de alta resolución (EMAR-IE) un ión M^+ a m/z 450.2444, consistente con la fórmula molecular $C_{29}H_{38}O_4$ y once insaturaciones.

Los espectros de RMN de ^{13}C y de 1H son típicos de un triterpeno metilénquinona, muy semejantes aquéllos de la pristimerina, excepto por presentar un grupo ácido (δ 182.5) ubicado en la posición C-29, en lugar de un grupo éster.

Todas las asignaciones de la molécula fueron corroboradas en los espectros bidimensionales HSQ, HMBC y COSY (asignación completa en las **tablas 8 y 9, parte experimental**, pág. 252 y 253).

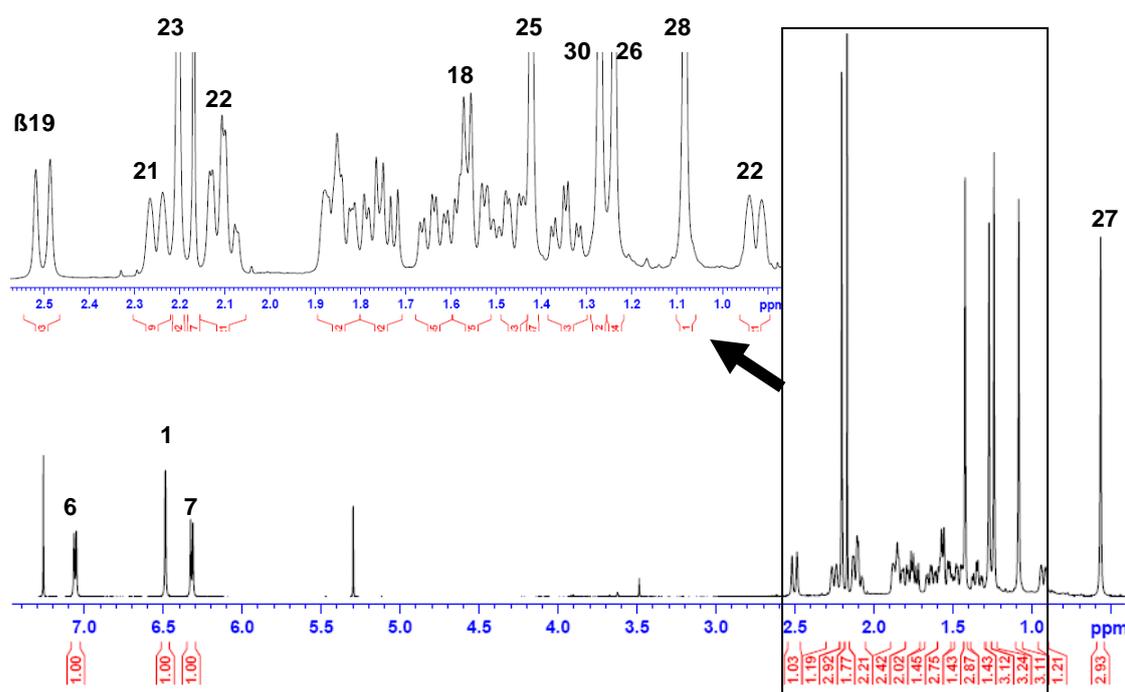
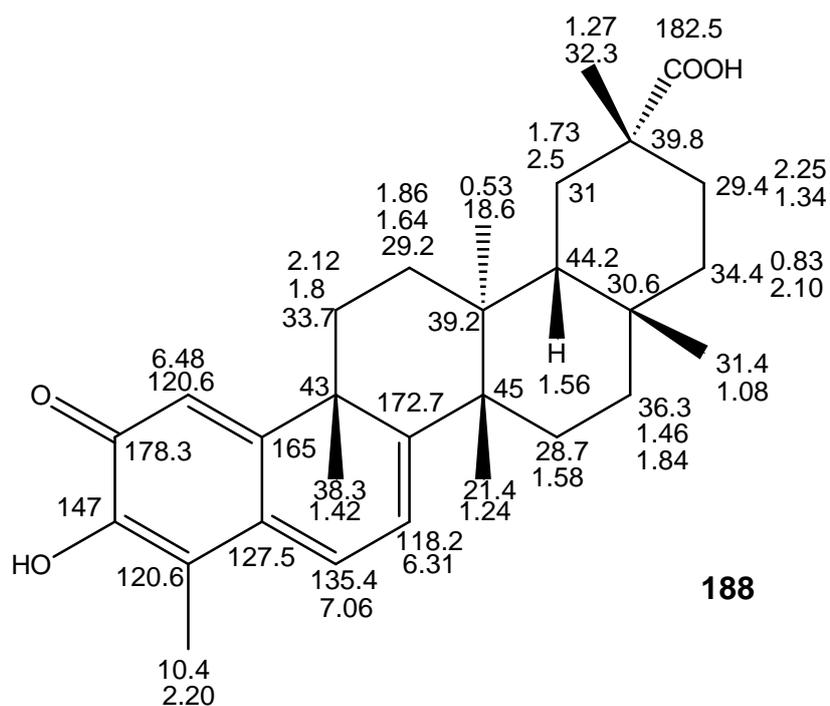


Figura 50: Espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de MV5-6-38.

El compuesto MV5-6-38 fue identificado como celastrol (**188**), que ha sido aislado de varias especies de celastráceas, tales como *Kokoona ochracea*, *Maytenus chuchuhuasca*, *Celastrus hypoleucus* y el arbusto chino *Trypterygium wilfordii*, su principal fuente natural.^{146, 140}



¹⁴⁶ Sneden, A.T. *J. Nat. Prod.* **1981** 44, 503.

Tanto el celastrol (**188**) como su metil éster, la pristimerina (**171**), son citotóxicos y significativamente activos contra diversas líneas de células tumorales, principalmente de cáncer de mama, ovario, pulmón, próstata y leucemia.¹⁴⁷ Además, el celastrol interacciona con distintos blancos moleculares involucrados en los procesos inflamatorios, auto-inmunes, y degenerativos, presentando resultados promisorios *in vivo* en modelos de artritis, lupus y enfermedad de Alzheimer.¹⁴⁸ También presentó actividad antifúngica *in vitro* contra los fitopatógenos *Rhizoctonia solana* y *Glomerella cingulata*.¹⁴⁹

¹⁴⁷ Lee, K-H *et al.* *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1416-1420.

¹⁴⁸ Corson, T.W.; Crews, C.M. *Cell.* **2007**, 130, 769-774.

¹⁴⁹ Lee, D-Q *et al.* *Pest Management Science*, **2005**, 61, 85-90.

La especie *Maytenus spinosa*

Maytenus spinosa (Griseb.) Lourteig & O'Donnell (1955), es un arbusto conocido popularmente como abre-boca, y que tiene como sinonimias botánicas *Celastrus moya*, *Gymnsporia stablei*, *G. spinosa* y *Moya spinosa* (**Figura 51**).

Tiene follaje muy brillante y ramas jóvenes rojizas, tortuosas, muy rígidas y provistas de largas espinas. Las flores son unisexuales, con pétalos; los frutos son tipo cápsula bivalva.¹⁵⁰

Es una especie de la familia Celastraceae autóctona de Argentina, que se distribuye por las eco-regiones denominadas Chaco-Húmedo y Chaco-seco. Es endémica en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, La Rioja, Salta, Santa Fe, San Luis y Tucumán.

La corteza rojiza de su raíz es utilizada en la curtiembre de cuero como colorante natural.

Todos los estudios realizados sobre dicha especie son ambientales y la agrupan entre las especies de la flora Argentina bajo riesgo de extinción.¹⁵¹

Hasta el momento no ha sido publicado ningún estudio químico sobre *M. spinosa*.

¹⁵⁰ Marchesi, E.; Grela, I. A. *Caldasia*, **2004**, 26, 327-332.

¹⁵¹ SIB-Sistema de información de biodiversidad, Admn. de parques nacionales. <http://www.sib.gov.ar/>



Figura 51: *Maytenus spinosa* (A); corteza de sus raíces (B); *Celastrus* sp. (C); plántula de *Tripterygium wilfordii* (D).

Aislamiento de metabolitos secundarios de *Maytenus spinosa*

Las raíces de *M. spinosa* fueron colectadas a 40 km de la ciudad de Salta, camino a Cafayate por el Dr. Juan Carlos Oberti (Universidad Nacional de Córdoba). Los ejemplares fueron identificados por el Prof. Lázaro J. Novara de la Universidad Nacional de Salta. El material vegetal fue secado y extraído con una mezcla éter etílico:ciclohexano (1:1). El extracto crudo fue concentrado en rotavapor y separado por medio de cromatografía *flash* en columna seca de fase reversa con solventes de polaridad decreciente (ver **parte experimental**).

La fracción MAY2, que fue eluída de la columna *flash* con MeOH:H₂O (80:20), fue sembrada en una columna se Sephadex LH20 (MeOH) y sus subfracciones **S4**, **S5** y **S8** fueron luego purificadas por HPLC, de donde fueron aislados ocho compuestos: **S4-4**, **S5-9**, **S5-11**, **S5-12**, **S5-13**, **S-5-16**, **S8A** y **S8B**. Los dos últimos compuestos fueron anteriormente aislados de *Maytenus vitis-idaea* y corresponden a los compuestos MV3-11 y MV3-13, identificados como escutiona y tingenona, respectivamente.

La fracción **MAY3** fue sembrada en una columna se Sephadex LH20 (MeOH) y su subfracción **May3-A** fue aplicada a una columna de sílica, donde se utilizó cloruro de metileno como eluyente. Las fracciones **A26**, **A30** y **A39** de la columna de sílica fueron purificadas por HPLC y así se aislaron los compuestos **A26-7**, **A30-8**, **A30-10** y **A39-26** (ver esquema en **figura 52**).

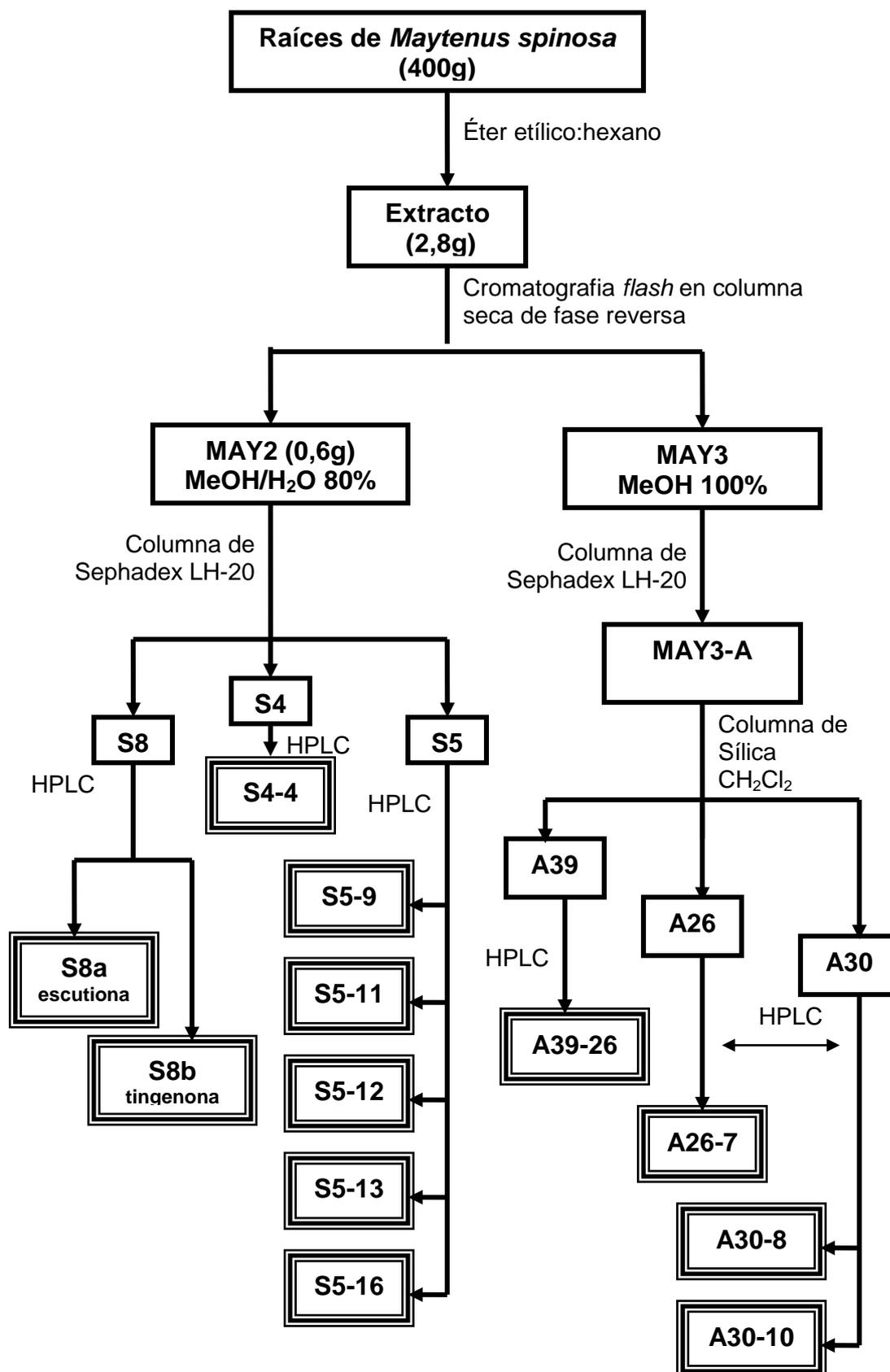


Figura 52: Esquema de aislamiento de los compuestos de *M. spinosa*.

Elucidación estructural del compuesto A39-26

El compuesto A39-26 fue aislado como un polvo amorfo amarillo que presentó 60 señales de carbono en el espectro de RMN ^{13}C . En dicho espectro se observaban dos señales de carbonilos correspondientes a cetonas α,β -insaturadas, (δ 191.5 y δ 187.2) seguidos de dos señales correspondientes a ésteres metílicos (δ 179.0 y δ 179.3). Luego se observaban dos señales de carbonos cuaternarios sp^2 muy desprotegidos (δ 170.1 y δ 171.0), otras diez señales aromáticas (entre δ 110.5 y δ 151.7) y dos señales de carbonos oxigenados, uno de ellos hemiacetálico (δ 79.4 y δ 91.3). El análisis de los espectros DEPT y HSQC reveló la presencia de dos señales de metoxilos (δ 51.7 y δ 51.5), doce señales de metilos, catorce señales de metilenos, once señales de carbonos cuaternarios y tres señales de metinos.

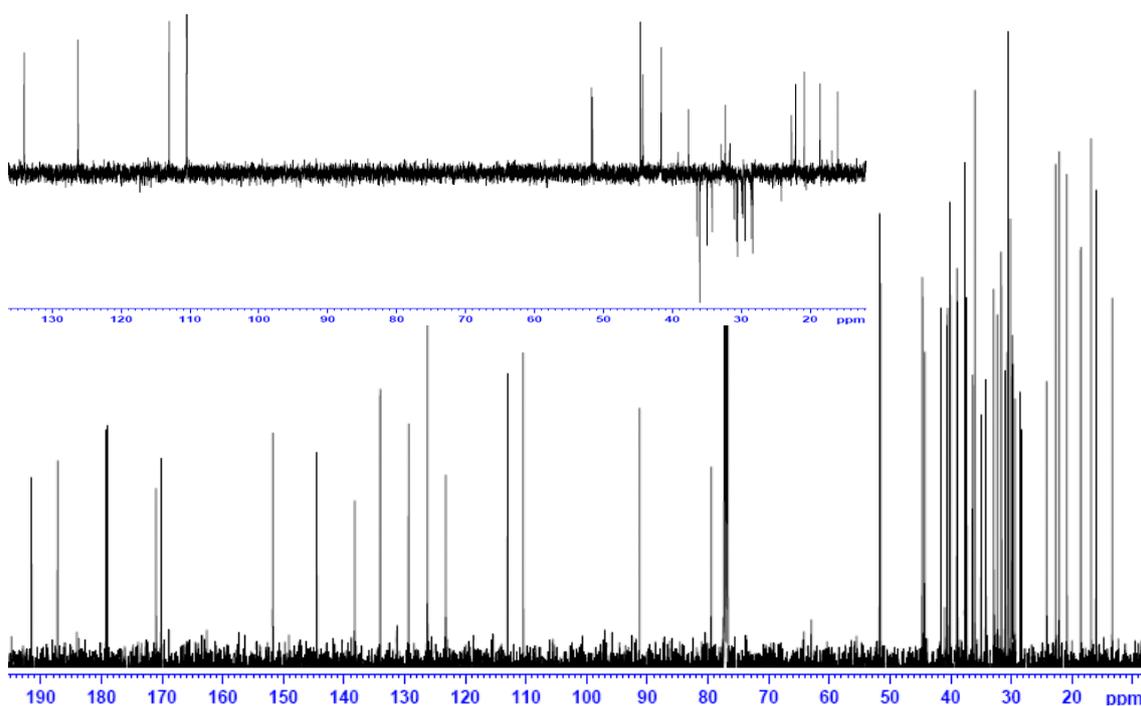


Figura 53: Espectros de RMN ^{13}C y DEPT 135 (500 MHz; en CDCl_3) de A39-26.

En el espectro de RMN ^1H se veía en la zona de campos bajos cuatro señales de protones de olefinas: δ 6.95 (s), δ 6.32 (ancho), δ 6.21 (s) y δ 5.96 (s). Además se veían las señales de los dos metoxilos a δ 3.63 y δ 3.57, una señal de metilo ubicado sobre doble enlace a δ 2.25 y numerosas señales correspondientes a metilenos y metinos superpuestas. En la zona de δ menores del espectro protónico se veían once señales de metilos angulares.: δ 1.52, δ 1.46, δ 1.28, δ 1.17, δ 1.16, δ 1.11, δ 1.09, δ 1.05, δ 0.97, δ 0.73 y δ 0.60.

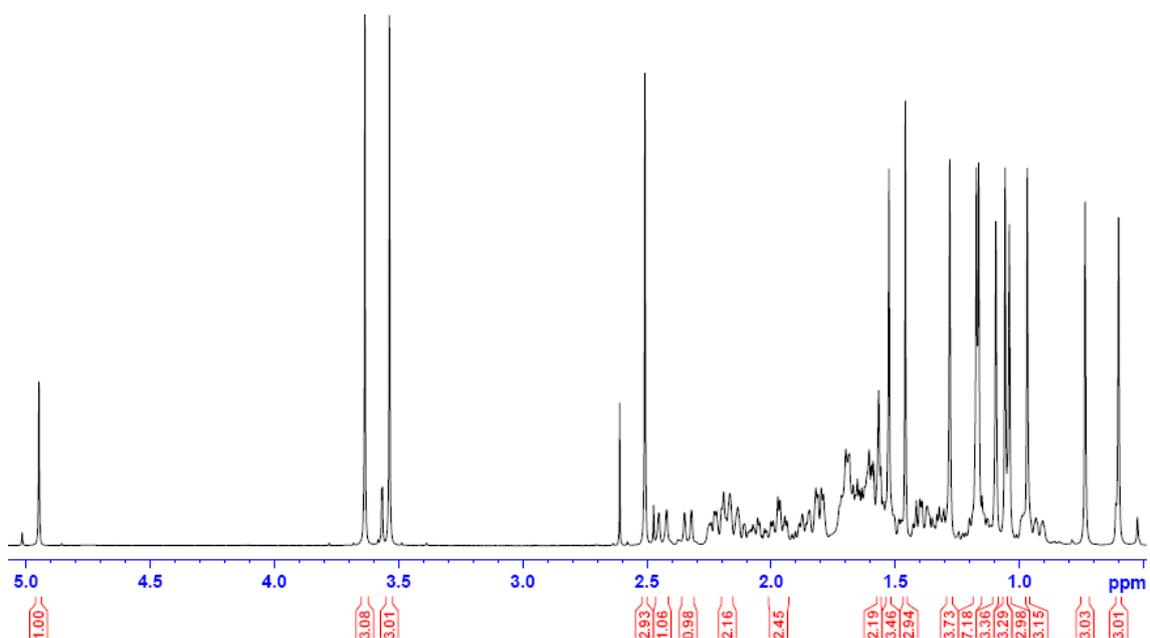
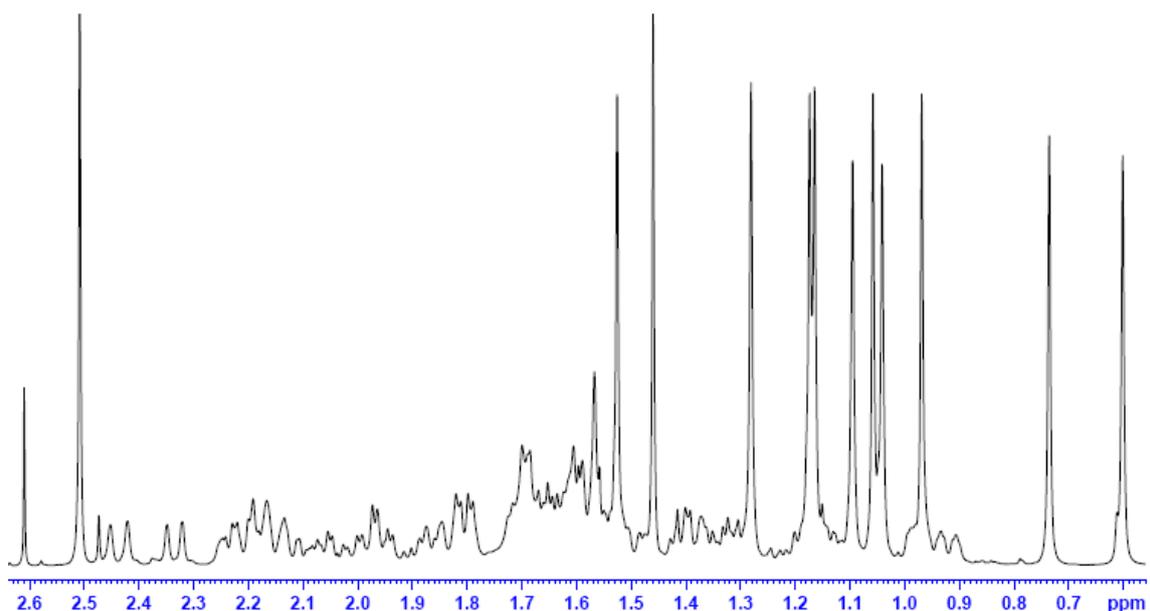
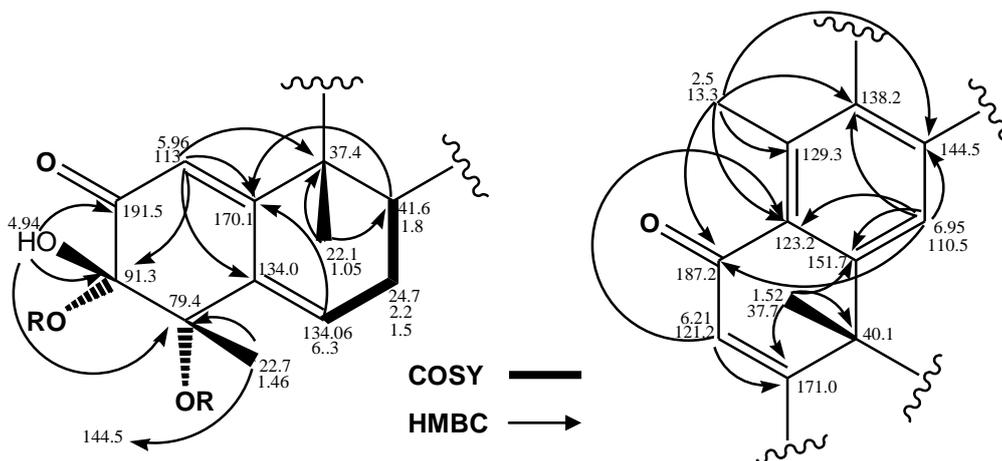


Figura 54: Espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de A39-26.

La cantidad de señales de la molécula llevaba a considerar una estructura de dímero de triterpenos.

Siguiendo un análisis detallado de los espectros HMBC y COSY se pudieron establecer los siguientes fragmentos estructurales:



Los valores de desplazamiento químico de los carbonos a δ 91.3 y δ 79.4 eran típicos de una unión éter en dímeros de celastroides, y ello pudo ser comprobado al observarse la correlación (HMBC) entre el metilo que sustituye el carbono a δ 79.4 (δ_H 1.46, s) con el carbono cuaternario aromático a δ 144.5 perteneciente al otro fragmento. El otro enlace éter fue detectado a través de los carbonos a δ 91.3 y a δ 138.2. Por medio de otras correlaciones observadas en los espectros 2D fue posible asignar las señales para cada extremo de los fragmentos y se verificó que la molécula correspondía a un dímero de triterpeno.

El hecho de presentar dos esteres metílicos sugería la estructura de un dímero formado por dos unidades de pristimerina, donde una de ellas se encontraba en su forma quinoide y la otra en su forma aromática.^{152, 153, 154}

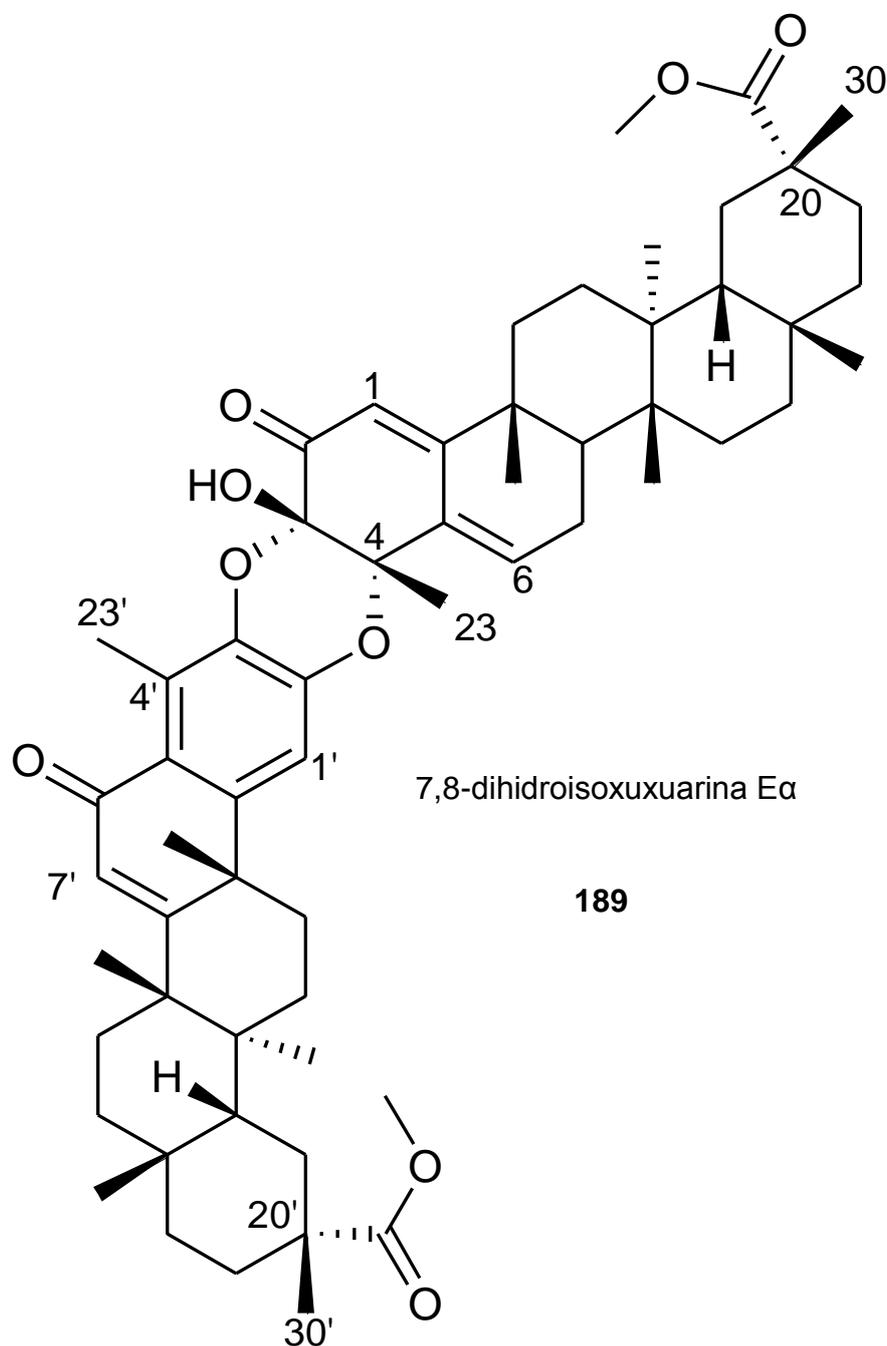
Así, con base en los datos espectroscópicos y en comparación con la literatura, el compuesto A39-26 fue identificado como el 7,8-dihidroisoxuxuarina E α (**189**), aislado anteriormente de *Maytenus chuchhuasca*.¹⁵⁵

¹⁵²González, A. G.; Alvarenga, N. L.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, Á. G.; Moujir, L. *Tetrahedron* **1996**, 52, 9597-9608.

¹⁵³Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 1100-1104.

¹⁵⁴Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. *J. Nat. Prod.*, **1997**, 60, 111-115.

La asignación de sus señales se encuentra en la **tabla 10 (parte experimental, pág. 260)**.



¹⁵⁵Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa H. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 102-106.

Elucidación estructural del compuesto A26-7

El compuesto denominado A26-7 fue aislado como un polvo blanco amorfo y presentó en el espectro de masas de alta resolución (IE) un ión molecular (M^+) m/z 438.3130, consistente con la fórmula molecular $C_{30}H_{46}O_2$.

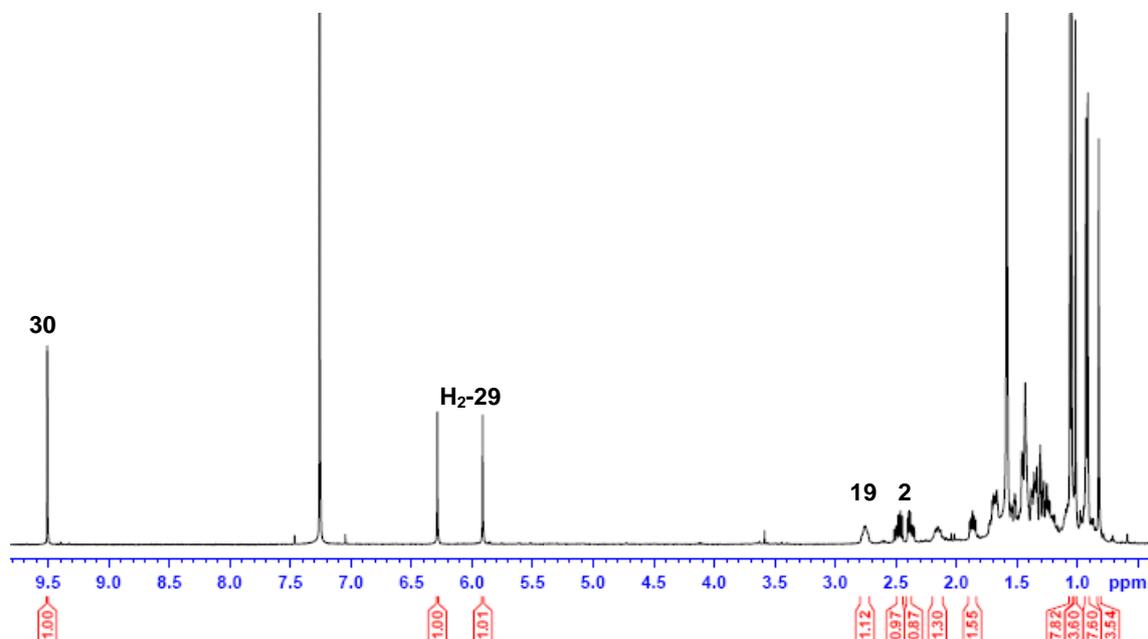
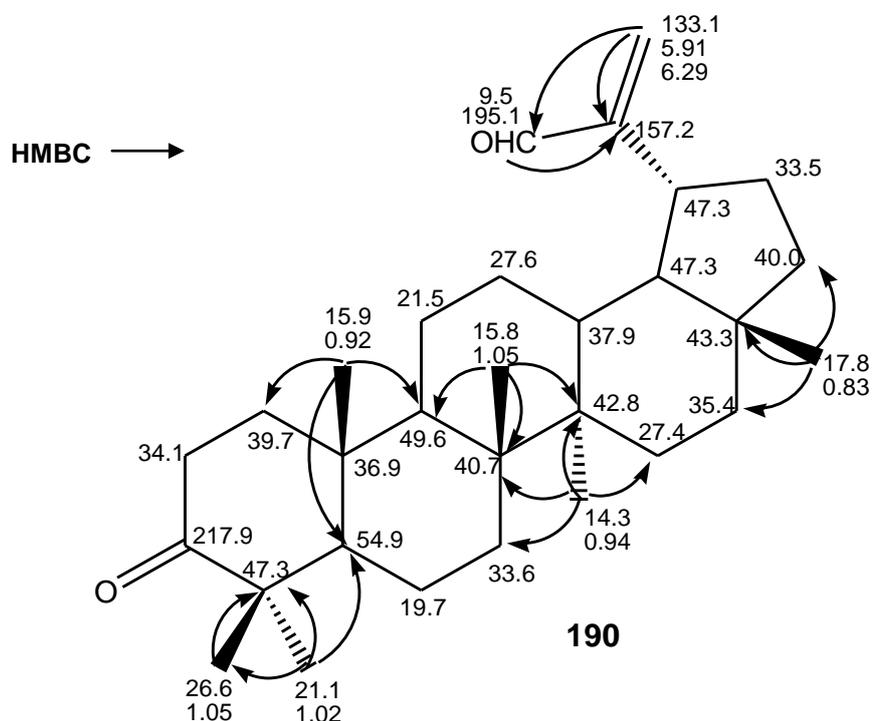


Figura 55: Espectro de RMN 1H (500 MHz; en $CDCl_3$) de A26-7.

Los espectros de RMN ^{13}C y 1H presentaban señales típicas de un triterpeno, y al analizarlas juntamente con los espectros HSQC y HMBC mostraron la presencia de 30 señales de carbonos, atribuidas a seis metilos angulares, diez metilenos, cinco metinos, cinco carbonos cuaternarios, una señal de olefina trisustituída (δ 157.2) y señales atribuidas a un metileno sp^2 (δ_c 133.1, δ_H 6.29 y δ_H 5.91). Estos protones correlacionaban con un grupo aldehído (δ_c 195.1, δ_H 9.52), quedando una subestructura de isopropenilo oxidado. Se observaba además la señal de un carbonilo a δ 217.9, que fue asignada a una cetona en la posición C-3 de un triterpeno tipo lupano. En base a las correlaciones observadas en el espectro HMBC se pudo asignar todas las señales de la molécula y ubicar el aldehído a la posición C-30. El compuesto fue identificado como el 3-oxolup-20(29)-en-30-al (**190**), aislado anteriormente

de la especie brasileña *Maytenus imbricata*, utilizada ampliamente por la población del interior de Brasil como planta medicinal.¹⁵⁶



Varios triterpenos pentacíclicos fueron aislados de algunas especies de celastráceas y demostraron tener diversas propiedades farmacológicas y biológicas, tales como antiséptica, antiasmática, antimicrobiana, antiespermatogénica, antiespasmódica, analgésica, antiulcerativa, insecticida, antitumoral, molusquicida, alelopática y antiinflamatoria.

¹⁵⁶ Souza e Silva, S.R. et al. *Helvetica Chimica*, **2005**, 88,1102-1109.

Elucidación estructural del compuesto A30-8

El compuesto A30-8 fue aislado como un aceite amarillento y presentó 31 señales en el espectro de RMN ^{13}C . El espectro de masas de alta resolución (EMAR-IE) presentó un ión molecular M^+ a m/z 454.3942, lo que sugirió la fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_2$ y siete insaturaciones.

En el espectro de RMN de ^1H se observaban señales típicas de un triterpeno, con ocho singuletes correspondientes a metilos angulares entre δ 0.83 y δ 1.21, una señal de metoxilo a δ 3.24, una señal de olefina a δ 5.35 (d , $J = 3.0$ Hz) y una señal de metino oxigenado a δ 3.96 (dd , $J = 3.0$ y 9.0 Hz). La presencia del metoxilo explicaba la presencia del carbono "extra". En la zona de campos bajos del espectro de RMN ^{13}C aparecían dos señales asignables a un doble enlace trisustituído (δ 121.0 y δ 149.0), y una señal de carbonilo de cetona (δ 219.0). Teniendo en cuenta la fórmula molecular y la presencia de dos insaturaciones asignables al carbonilo y al doble enlace, quedaba establecida una estructura de triterpeno pentacíclico metoxilado.

Mediante el análisis de los espectros HSQC, HMBC y COSY se pudo elucidar completamente la estructura de la molécula. Por medio de los espectros HMBC y COSY se pudo ubicar un metino oxigenado (δ_{H} 3.96 dd , 9.0 y 3.0 Hz; δ_{C} 76.8) vecino al doble enlace, así como definir al grupo metoxilo como su sustituyente (δ_{C} 53.7).

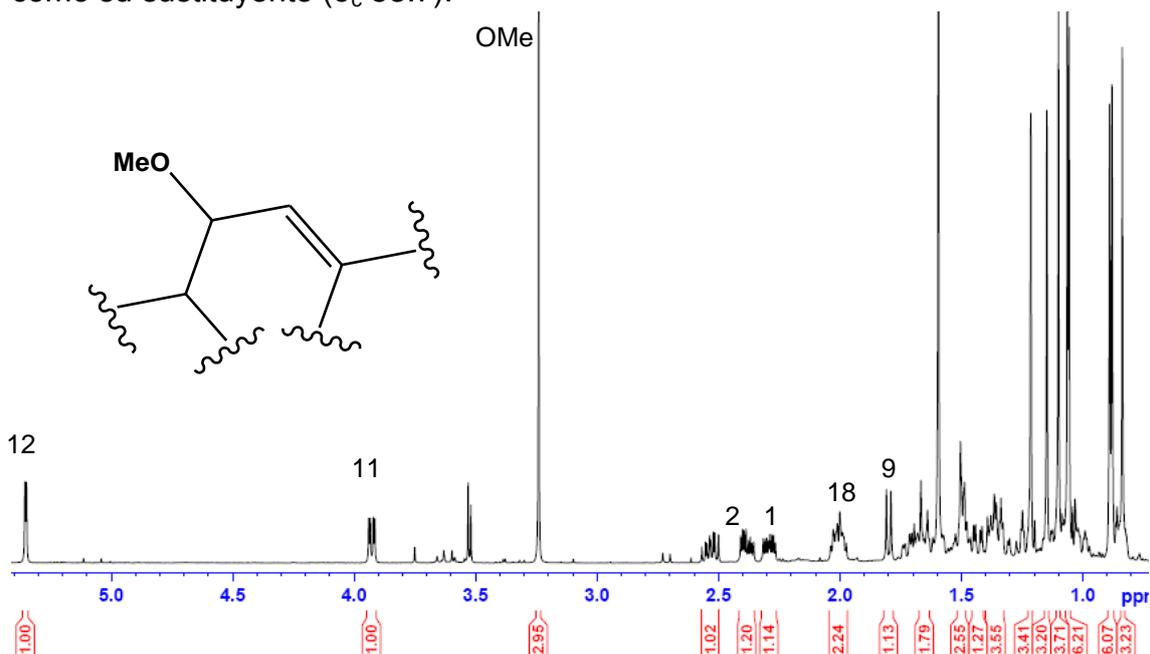


Figura 56: Espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de A30-8.

Las correlaciones observadas permitieron identificar dicho metino oxidado como C11. En particular la constante de acoplamiento observada con H9 (δ 1.80, *d*, 9.0 Hz) permitió definir la orientación β del H11 (pseudoaxial).

El espectro HMBC mostraba la existencia de dos pares de metilos que presentaban las mismas correlaciones. Esto sugería la presencia de un esqueleto carbonado con dos pares de metilos geminales, probablemente del tipo oleanano. Los metilos geminales a δ 1.10 (Me-23), δ 1.06 (Me-24) y los protones de los metilenos a δ 34.4 y a δ 40.3 correlacionaban (HMBC) con la señal del carbonilo de cetona a δ 219.0, confirmando la ubicación de ésta en el anillo A en la posición C3. Las correlaciones entre los protones de Me-23, Me-24 y Me-25 (δ 1.15) con el metino a δ 55.5 (C-5) definieron las asignaciones para el anillo A del triterpeno.

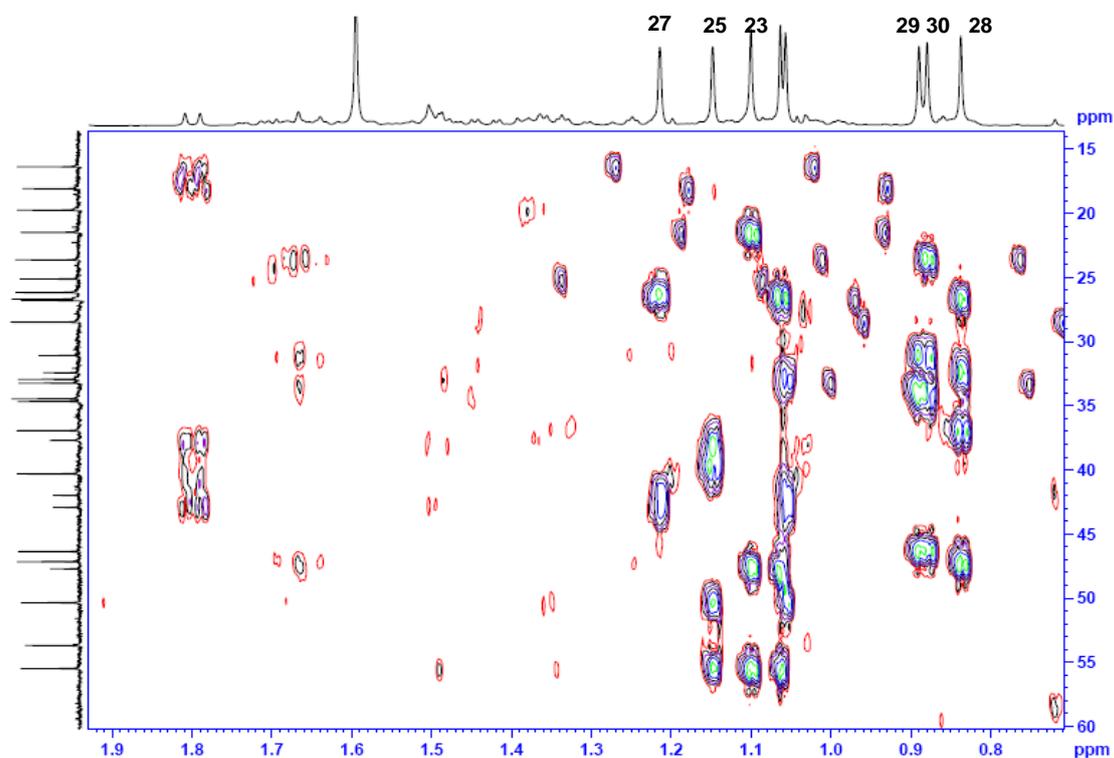


Figura 57: Espectro de HMBC (500 MHz; en CDCl_3) de A30-8.

Las correlaciones a larga distancia entre el Me-27 (δ 1.21) y el carbono cuaternario C-13 (δ 149.0) de la olefina sumadas a las correlaciones del Me-28 (δ 0.83) con el metino C-18 (δ 47.2) permitieron completar las asignaciones de los anillos C y D.

El acoplamiento axial-axial (10.0 Hz) observado en el espectro COSY entre el multiplete del H-18 (δ 2.00) y la señal a δ 1.09 del metileno en la posición C-19 (δ 46.4) indicaba una estereoquímica 19- α . Además de ello, las correlaciones vistas en el espectro HMBC entre los metilos geminales a δ 0.89 (Me-29) y a δ 0.88 (Me-30) con el carbono cuaternario a δ 31.2 (C-20) y con el metileno a δ 46.4 (C-19) confirman las asignaciones del anillo E para completar una estructura de oleanano. Ver asignación completa en la **tabla 11 (parte experimental, pág. 261)**.

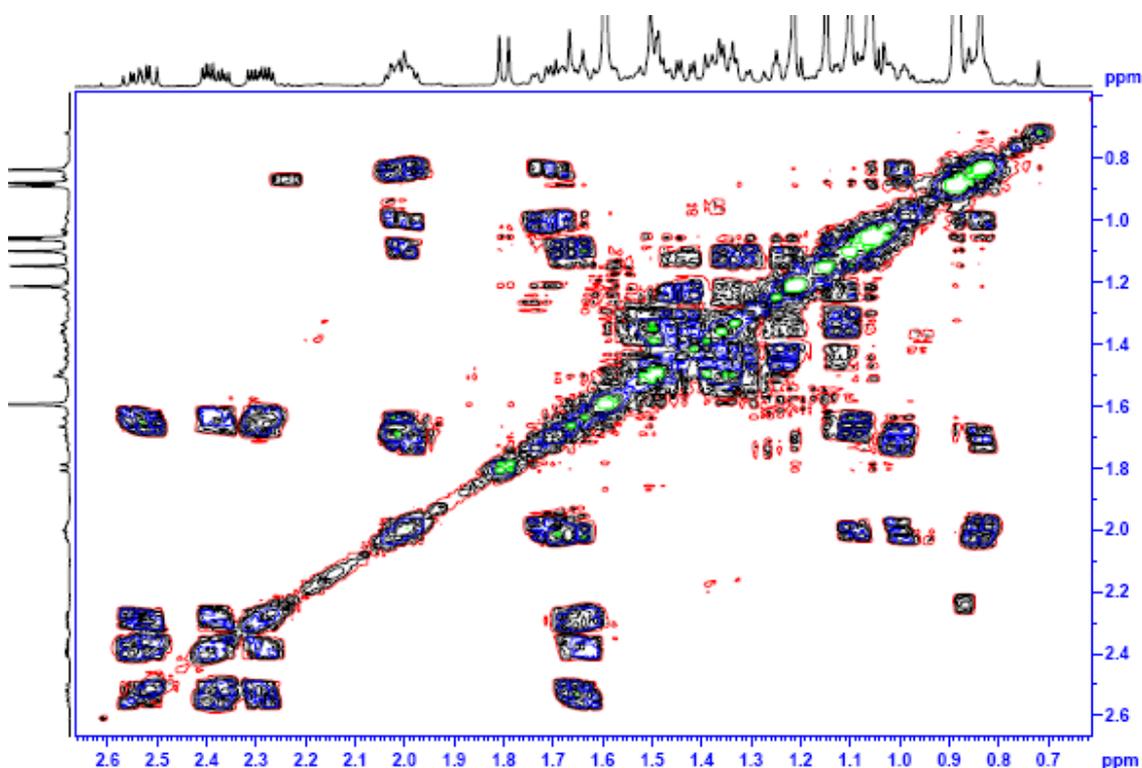


Figura 58: Espectro COSY (500 MHz; en CDCl_3) de A30-8.

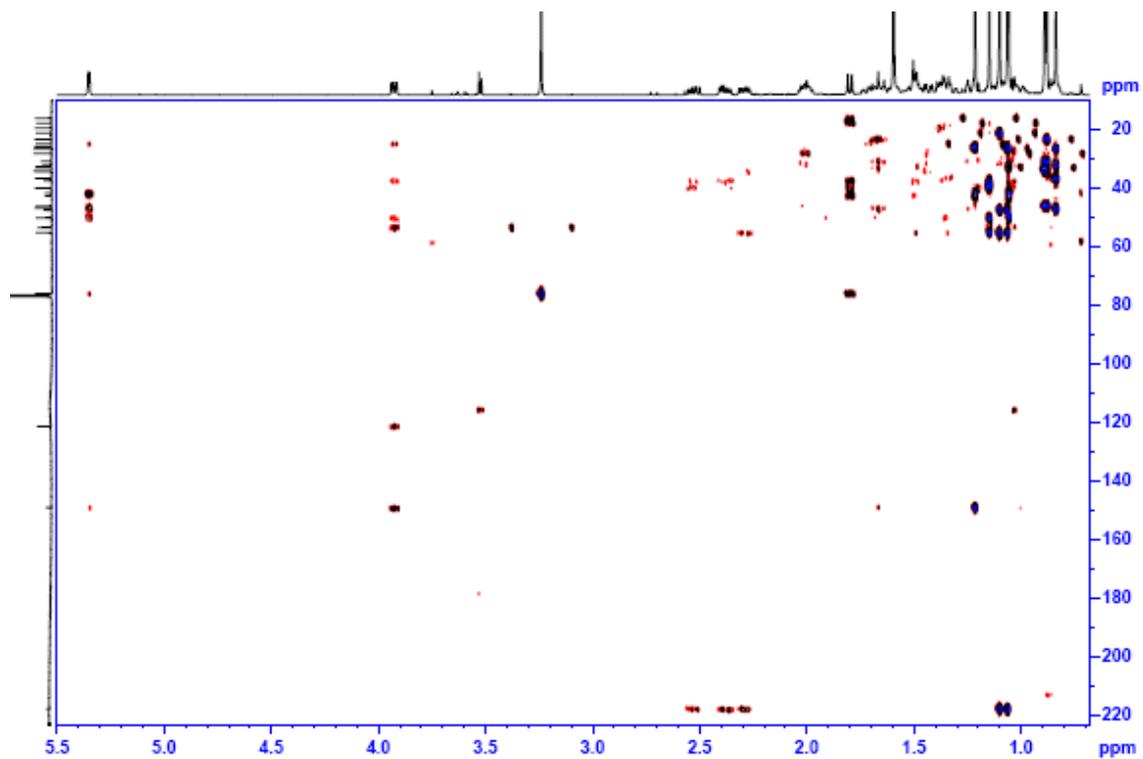
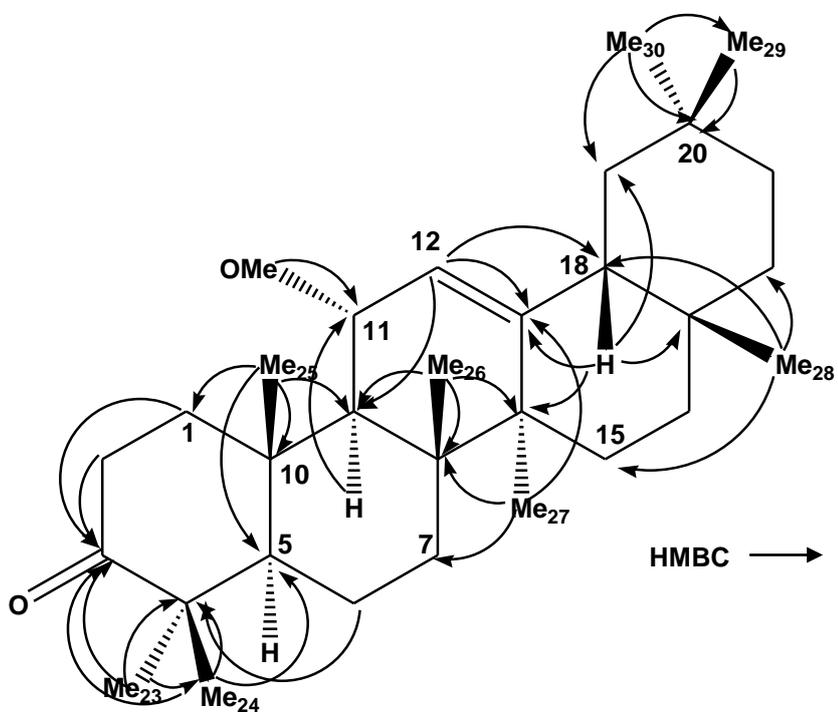
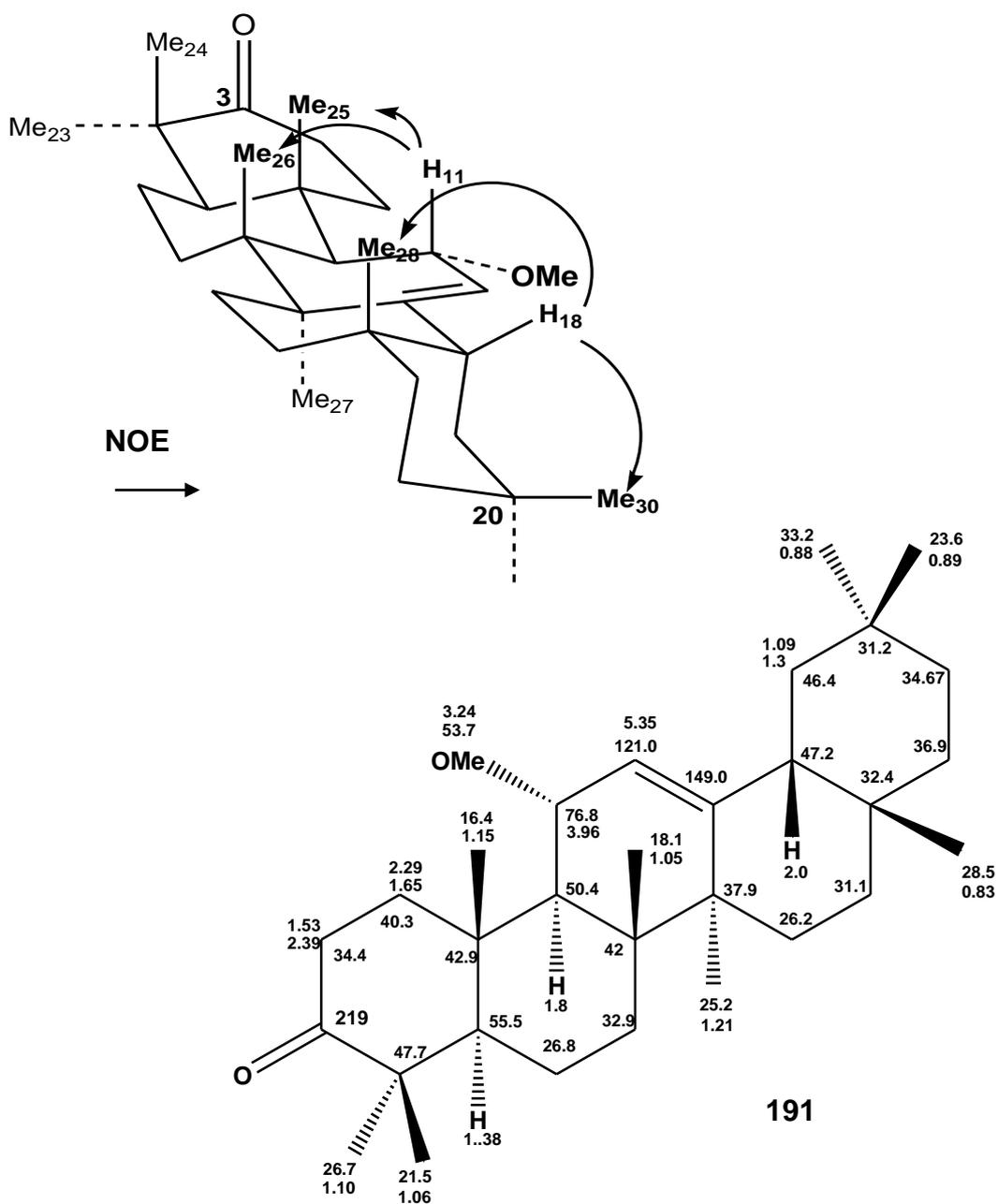


Figura 59: Espectro de HMBC (500 MHz; en CDCl_3) de A30-8.



La estereoquímica relativa del compuesto fue definida en base a las constantes de acoplamiento y a los efectos NOE observados en el espectro ROESY en especial aquél entre el H-11 con Me-25 y Me-26. Por su lado, H-18, presentó NOE con Me-28 y Me-30 y H9 con H5 y Me-27.

De esta manera, el compuesto A30-8 fue identificado como el nuevo triterpeno 3-oxo-11 α -metoxiolean-12-eno (**191**).



Elucidación estructural del compuesto A30-10

El compuesto que se denominó A30-10 fue aislado como un aceite amarillento y presentó fórmula molecular $C_{31}H_{50}O_2$ determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución (EMAR-IE) donde presentó el ión M^+ a m/z 454.3796.

En el espectro de RMN ^{13}C se observaban señales de un doble enlace trisustituído (δ 124.0 y δ 143.3), un carbonilo de cetona (δ 218.2), y un grupo metoxilo (δ 54.6). Haciendo el recuento de señales por multiplicidad y comparando con A30-8, este compuesto presentaba un carbono cuaternario y un metileno de menos y dos metinos de más. El espectro de RMN de 1H era muy semejante al del compuesto A30-8, destacándose las señales de un metoxilo a δ 3.28, una olefina (δ 5.30, d , $J = 3.0$ Hz) y un metino oxigenado a δ 3.80 (dd , $J = 9.0$ y 3.0 Hz). Se observaban las señales correspondientes a 8 metilos: 6 de ellos singuletes, un metilo doblete a δ 0.87 (Me-29) y otro metilo a δ 0.92 (Me-30), cuya multiplicidad estaba enmascarada. Estos datos sugerían una estructura de triterpeno con esqueleto de ursano.

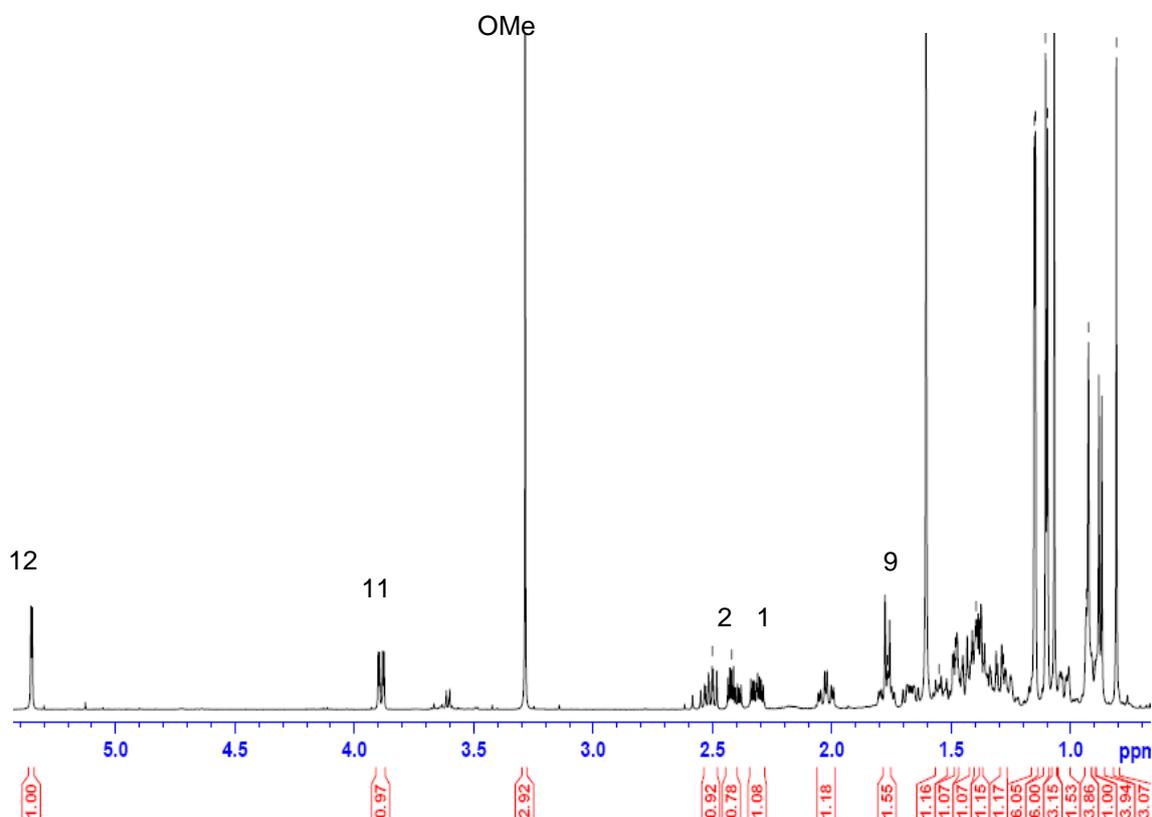
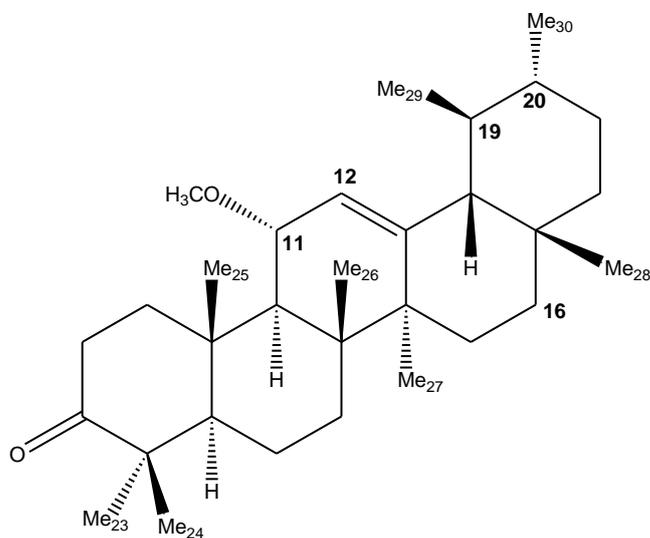


Figura 60: Espectro de RMN 1H (500 MHz; en $CDCl_3$) de A30-10.

El análisis de los espectros de RMN 2D permitió comprobar ésta hipótesis. Al igual que en A30-8, el compuesto también resultó ser un 3-oxo-11 α -metoxi-triterpeno.

El único punto problemático en la asignación resultó el de los metilos del anillo E. Supuestamente debían observarse dos dobletes para los metilos 29 y 30, sin embargo sólo se observaba uno: δ 0.87 (*d*, $J = 6.5$ Hz). Dicho metilo fue asignado como Me-29 en base a su correlación (HMBC) con C18. En la zona del espectro RMN ^1H donde supuestamente debería encontrarse el doblete de Me-30 (δ 0.92), podía observarse una señal ancha que integraba para cinco hidrógenos. Una inspección cuidadosa del espectro HSQC mostró que en la zona entre δ_{H} 0.90 y 0.94 aparecían tres correlaciones H-C. Por su intensidad, la correlación (δ_{H} 0.92 – δ_{C} 21.4) parecía corresponder a un grupo metilo. La correlación (δ_{H} 0.91 – δ_{C} 27.9) a su vez correspondía a uno de los hidrógenos del metileno C16, identificado a su vez por su correlación (HMBC) con Me-28. Finalmente, la correlación (δ_{H} 0.92 – δ_{C} 39.5) correspondía a un grupo metino. El δ_{C} de esa señal era notablemente similar al del metino identificado como C19 (δ_{H} 1.37 – δ_{C} 39.3), por su correlación (COSY) con Me-29. Haciendo el recuento de las asignaciones hasta ese momento, resultaba que sólo restaba por asignar el metino de δ_{C} 39.5. Era lógico suponer entonces de que esta señal se tratara del metino C20. De esta forma se explicaba la supuesta ausencia del doblete de Me-30: al coincidir en δ_{H} tanto el Me-30 como la señal de H20 con la que estaba acoplada, se formaría un sistema fuertemente acoplado y eso distorsionaba las multiplicidades de las señales de tal forma que ya no era observable la forma de doblete de Me-30.



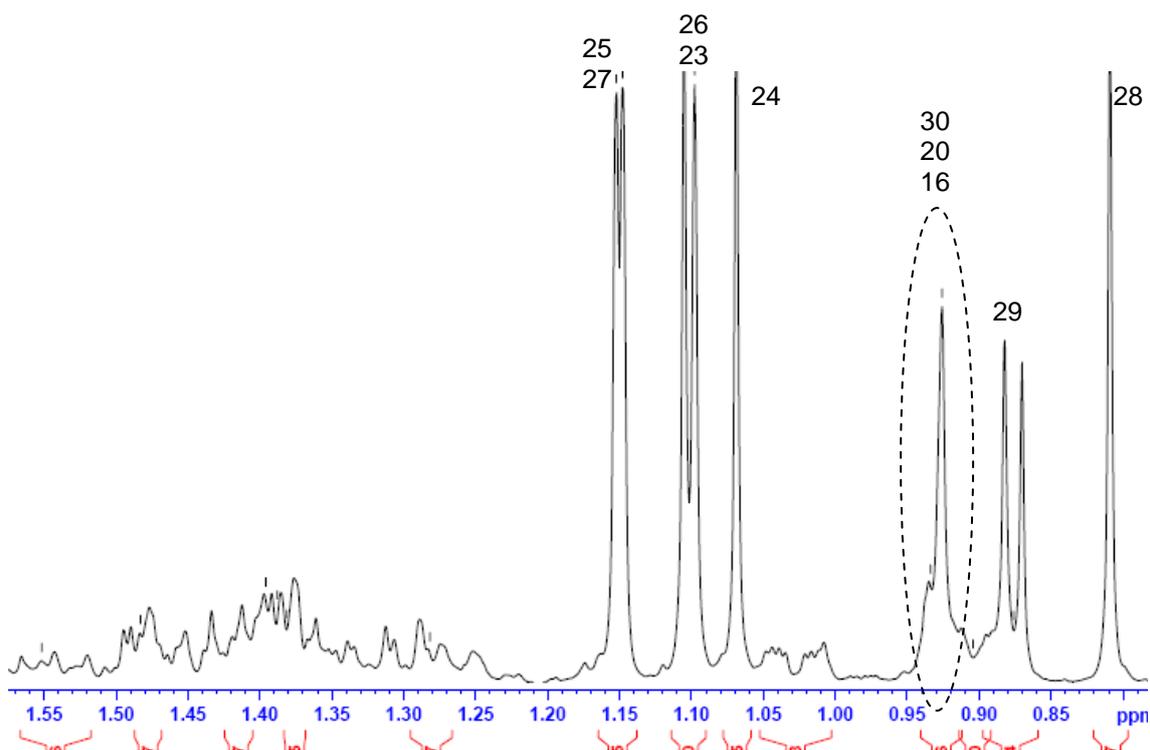


Figura 61: Ampliación del espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de A30-10.

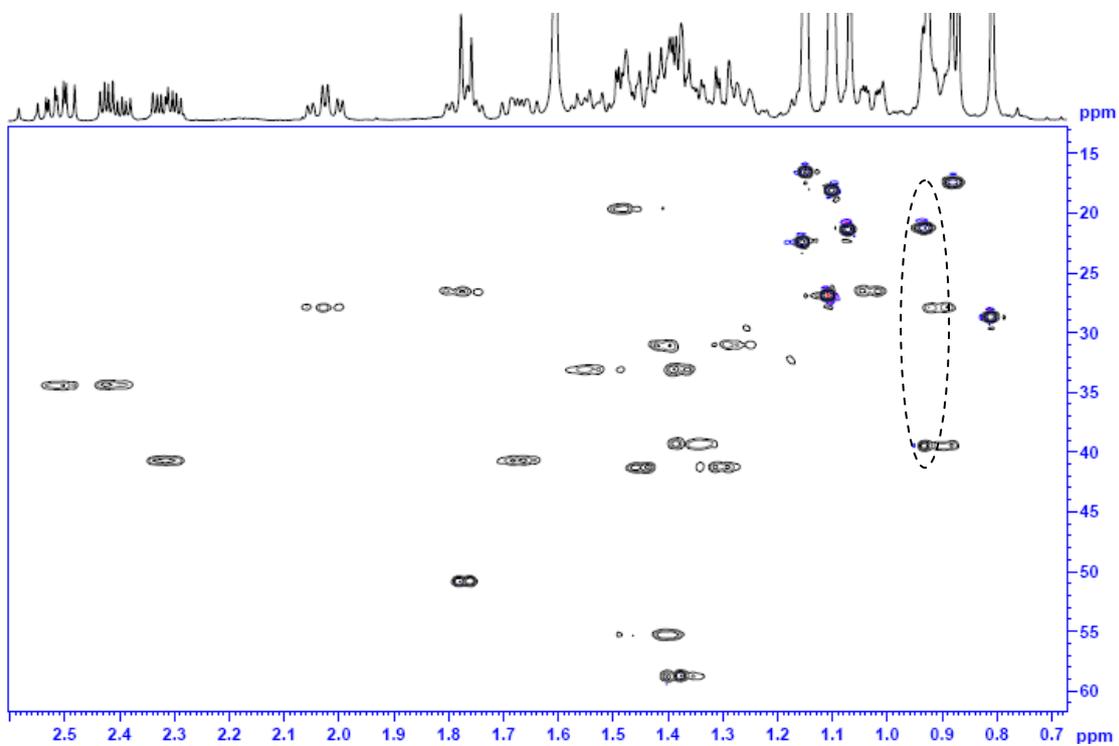
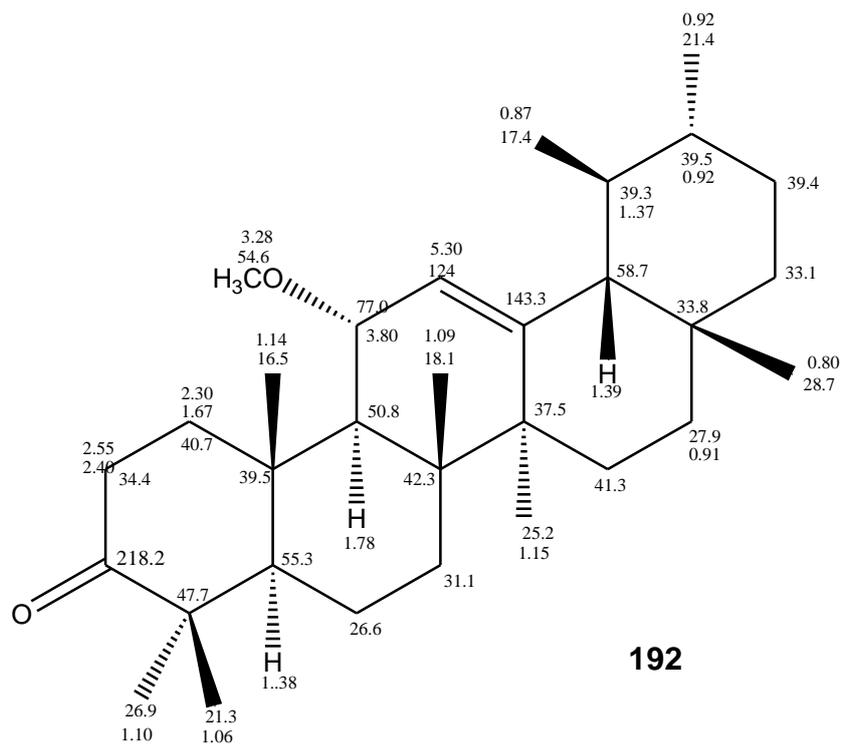


Figura 62: Espectro HSQC ampliado (500 MHz; en CDCl_3) de A30-10.



La asignación completa se encuentra en la **tabla 11** (parte experimental, pág. 261).

La estereoquímica relativa del compuesto fue definida en base a las constantes de acoplamiento y a los efectos NOE observados en el espectro ROESY.

De esta manera, el compuesto A30-10 fue elucidado y definido como el nuevo triterpeno 3-oxo-11 α -metoxiurs-12-eno (**192**).

Elucidación estructural del compuesto S4-4

El compuesto denominado S4-4 fue aislado como un sólido blanco amorfo. En el espectro de RMN ^{13}C aparecían señales de carbonilos de ésteres, olefinas, carbonos oxigenados protonados y no protonados y de metilos. Para el análisis del espectro RMN ^1H se consideraron tres grupos principales de señales: señales aromáticas entre 7.28-8.7 ppm; señales de protones unidos a carbonos oxigenados entre 3.7-6.6 ppm; y a campos más altos, entre 1.25-2.64 ppm se destacaban siete señales de metilos singuletes y dos señales de metilos dobles.

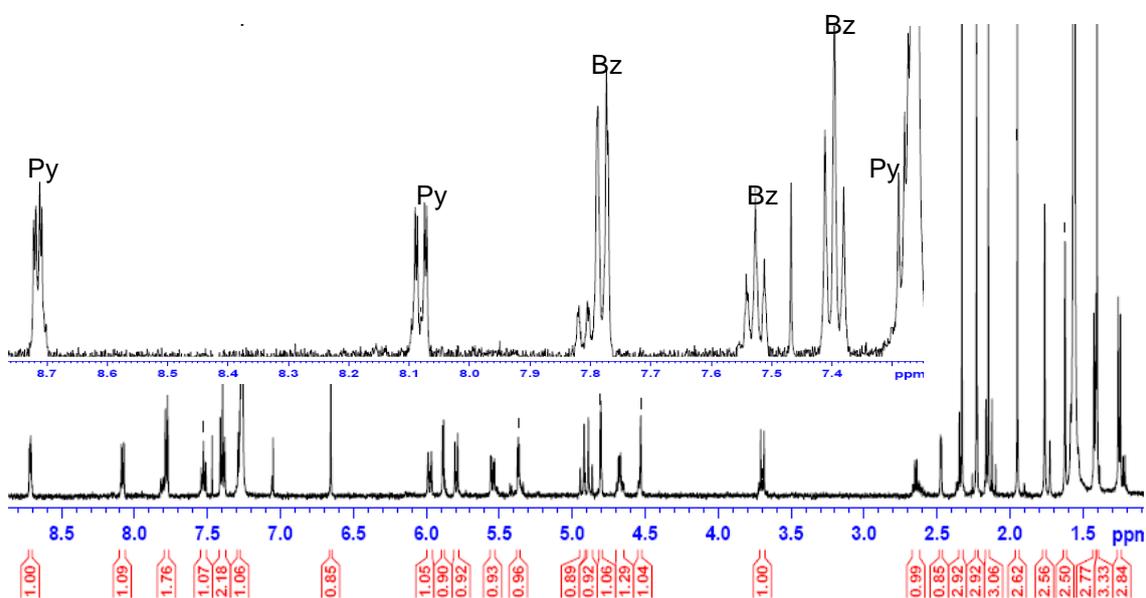
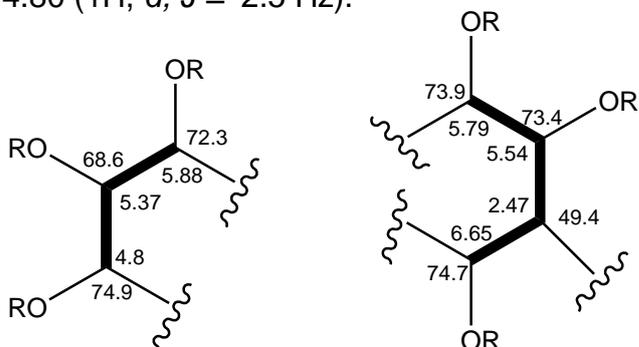


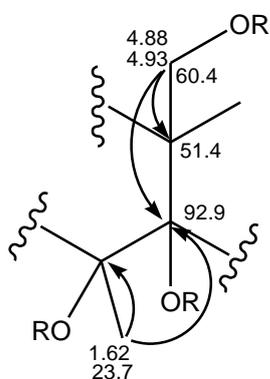
Figura 63: Espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de S4-4 y ampliación de la región a campos bajos.

En la región aromática del espectro protónico se podían analizar dos grupos de señales distintas, de los cuales uno era característico de un grupo benzoato [δ 7.52 (1H, *t*, $J = 7.5$ Hz); δ 7.39 (2H, *t*, $J = 7.8$ Hz); 7.78 (2H, *dd*, $J = 1.0$ y 8.0 Hz)], y el otro era típico de un derivado de piridina sustituido en las posiciones 2 y 3 [δ 8.71 (1H, *dd*, $J = 2.0$ y 5.0 Hz); δ 7.28 (1H, *dd*, $J = 8.0$ y 5.0 Hz); 8.08 (1H, *dd*, $J = 2.0$ y 8.0 Hz)]. Los patrones de acoplamiento entre protones se dedujeron mediante experimentos COSY. La asignación de todas las señales y sus conectividades ^1H - ^{13}C directas y a larga distancia fueron determinadas mediante experimentos HSQC y HMBC (figura 66 y 67), respectivamente. Se observaban en la parte central del espectro protónico dos

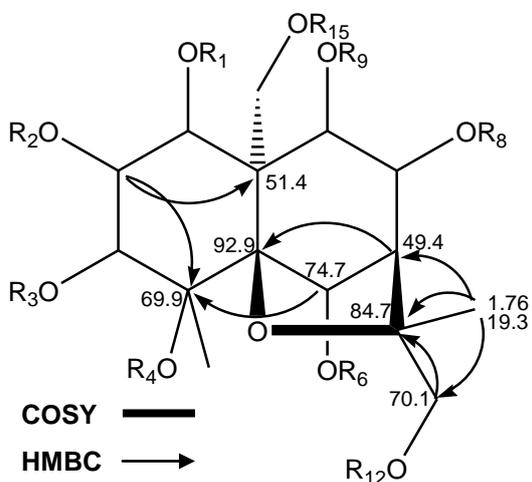
sistemas de metinos oxigenados. A partir de las correlaciones observadas (COSY) se pudo determinar que uno de ellos era un sistema AMX con las señales a δ 5.88 (1 H, *d*, $J = 4.0$ Hz), a δ 5.37 (1 H, *dd*, $J = 3.0$ y 4.0 Hz) y a δ 4.80 (1H, *d*, $J = 2.5$ Hz).



A su vez, el otro sistema estaba compuesto de las señales a δ 5.79 (1 H, *d*, $J = 10.0$ Hz), δ 5.54 (1 H, *dd*, $J = 3.0$ y 10.0 Hz), δ 2.47 (1H, *d*, $J = 1.0$ Hz), y δ 6.65 (s, 1H).



Al analizar el espectro HMBC, se pudo armar un fragmento de la molécula compuesto por un metileno oxigenado, a δ 4.88 (1H, *d*, $J = 11.0$ Hz), y δ 4.93 (1H, *d*, $J = 11.0$ Hz), un carbono cuaternario a δ 51.4, un carbono oxigenado tetrasustituído a δ 92.9 y un metilo δ 1.62 (s, 3H), situado sobre un carbono oxigenado a δ 69.9.

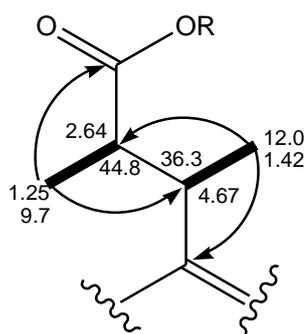


Como el carbono a δ 69.9 también correlacionaba (HMBC) con las señales a δ 6.65 y a δ 5.37, y esta última señal a su vez correlacionaba con el carbono cuaternario a δ 51.4, se pudo unir esos tres fragmentos y así obtener dos anillos que formaban una *trans* decalina.

También se observaron correlaciones en el espectro HMBC entre un metilo singulete a δ 1.76 con el metino a δ 49.4, con un carbono cuaternario oxigenado a δ 84.7 y con un metileno oxigenado a δ 70.1. Las señales de RMN ^1H de dicho metileno aparecían a valores de δ muy separados (δ 5.90 *d*, 11.5 Hz y δ 3.67 *d*, 11.5 Hz). En particular, la señal a δ 5.90 correlacionaba con el carbono cuaternario a δ 84.7 y permitía cerrar una estructura consistente con el esqueleto de un sesquiterpeno del tipo dihidro- β -agarofurano.

El análisis detallado del espectro protónico en la región de campos altos permitió identificar cinco señales de metilos de grupos acetatos (δ 1.95, δ 2.23, δ 2.33, δ 1.40, δ 2.14). Dicha asignación fue confirmada por la observación de sus correlaciones (HMBC) con los respectivos carbonilos. Llamaba la atención el desplazamiento inusualmente bajo de uno de ellos (δ 1.40) probablemente debido a un efecto de anisotropía del grupo benzoato. Dichos acetatos resultaron ser los sustituyentes de los metinos oxigenados C-2, C-6, C-8, C-9 y C-15, respectivamente (**tablas 12, parte experimental**, pág. 262)

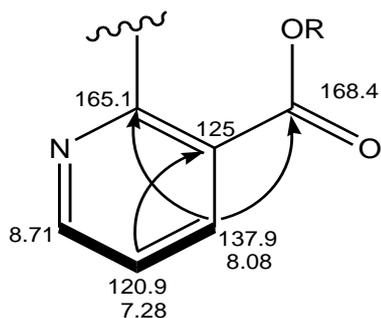
Otras señales que no formaban parte del esqueleto sesquiterpénico eran dos metilos dobles, a δ 1.42 ($J = 7.0$ Hz) y a δ 1.25 ($J = 7.0$ Hz), y dos cuartetos, a δ 4.67 ($J = 7.0$ Hz) y a δ 2.64 ($J = 7.0$ Hz), respectivamente.



COSY **—**
HMBC **→**

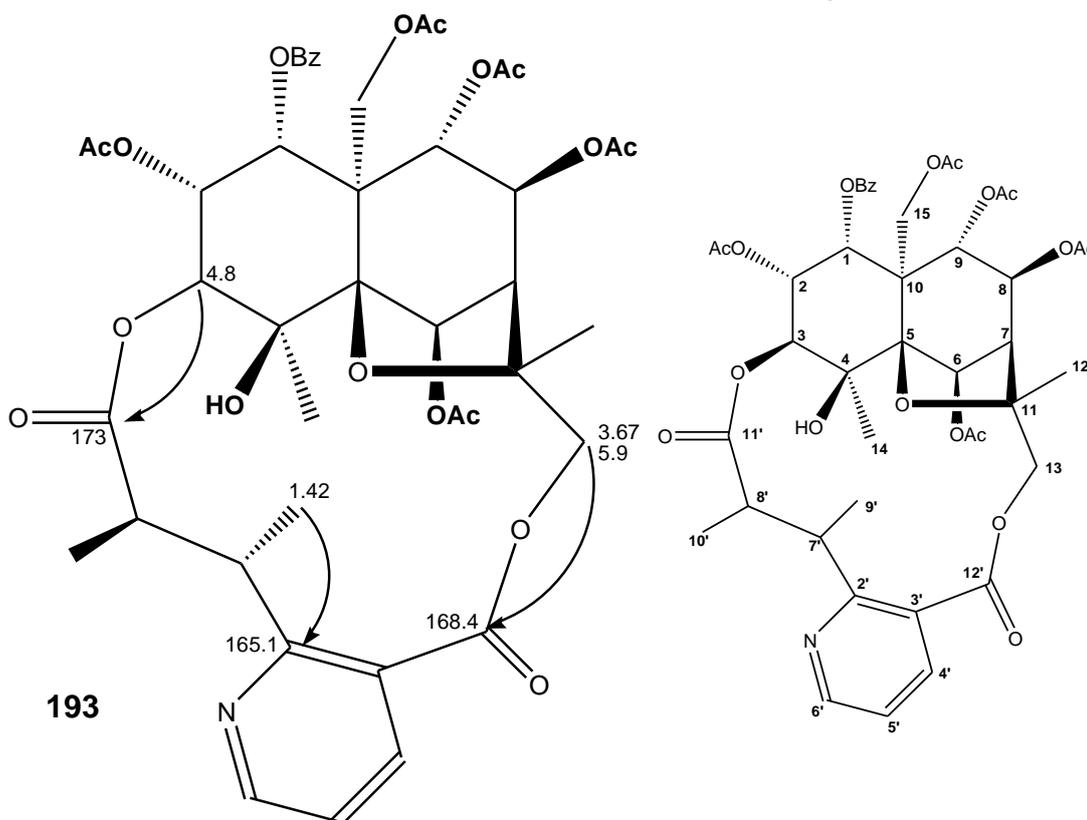
La señal a δ 2.64 correlacionaba (COSY) con el metilo a δ 1.25, así como el metino a δ 4.67 lo hacía con el metilo a δ 1.42. Ambos metilos dobles correlacionaban en el espectro HMBC con los dos metinos. Esto solo era posible si los metinos eran vecinales. Curiosamente los dos metinos presentaban multiplicidad de cuarteto, lo cual indicaba que el acoplamiento escalar entre ellos era cercano a 0 (cero). Esto a su vez sugería que los metilos adoptaban una conformación con un ángulo diedro cercano a 90° . Esta característica es típica en ciertos ácidos piridínicos que suelen formar parte de los alcaloides de celastráceas, como por ejemplo el ácido evonínico (**figura 30**).

Por el análisis del espectro HMBC se podía ver además que el metino a δ 2.64 se encontraba vecino a un carboxilo de éster a δ 173.0, lo que también era consistente con el desplazamiento del carbono del metilo a δ_c 9.7. De la misma forma el metilo a δ 1.42 se relaciona a tres enlaces de distancia con una señal aromática a δ 165.1, perteneciente al anillo de piridina (C2).



También se observaba en el espectro HMBC una correlación a tres enlaces entre el protón a δ 8.08 y una señal adicional de carboxilo de éster a δ 168.4.

De esta manera los dos fragmentos pudieron ser unidos por el carbono α al nitrógeno, lo que daba lugar a un diéster nicotínico. Ese diéster por su vez pudo ser conectado al sesquiterpeno debido a las correlaciones encontradas en el espectro HMBC entre el protón del sesquiterpeno a δ 4.8 (H3) con el carboxilo del diéster a δ 173.0, y por otro lado las correlaciones de los protones a δ 3.67 y δ 5.90 (H13a y b) con el otro carboxilo del diéster a δ 168.4. Así, se verificó que entre las posiciones C3 y C13 del sesquiterpeno se formaba un anillo macrocíclico con un diácido nicotínico del tipo evonínico.



Todos los datos indicaban que el compuesto S4-4 es un alcaloide sesquiterpénico con un esqueleto de tipo dihidro- β -agarofurano esterificado por el ácido evonínico en los carbonos C3 y C13.

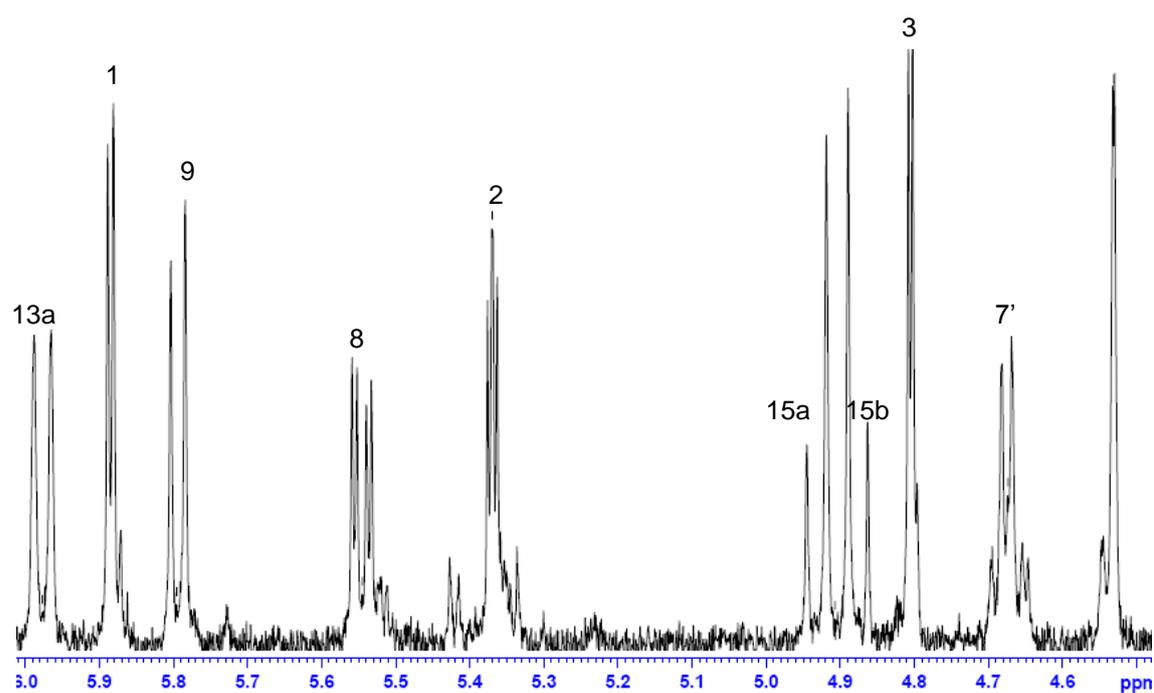


Figura 64: Ampliación de la zona de δ 4.5 - 6 del espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de S4-4.

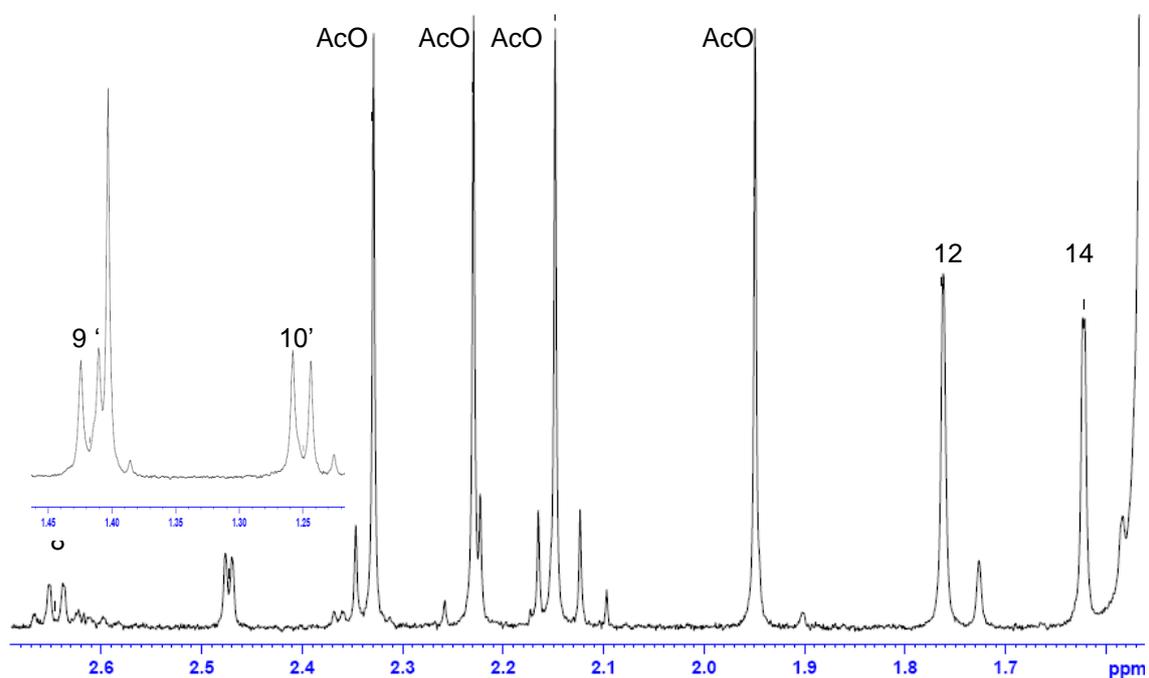
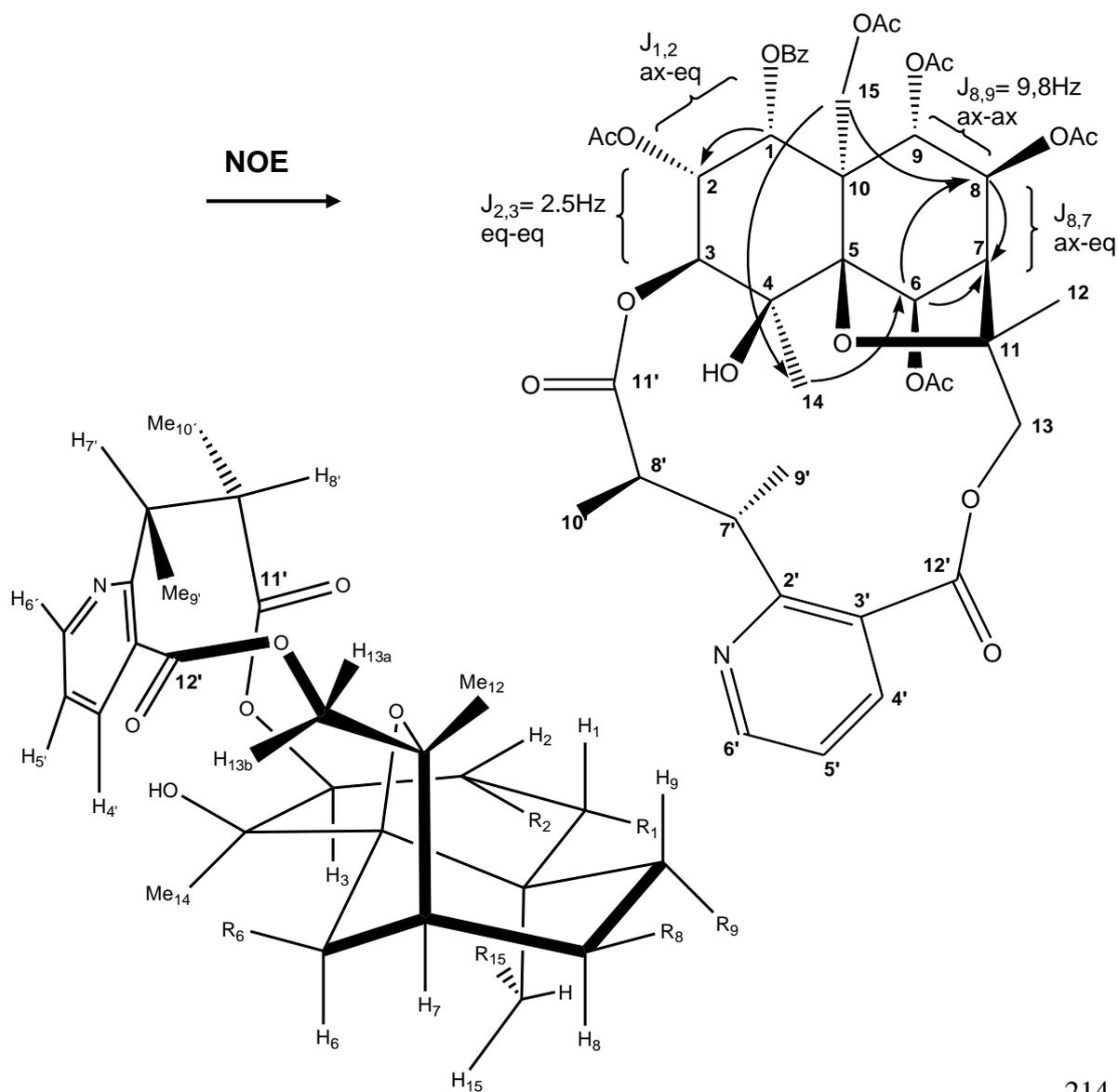


Figura 65: Ampliación de la zona de δ 1.6 – 2.7 del espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de S4-4.

La sustitución por los grupos éster alrededor del esqueleto base fue resuelta mediante análisis de las correlaciones observadas en el espectro HMBC entre los protones de cada metino con los respectivos carbonilos de los sustituyentes. Así, fue establecido que el grupo benzoílo se encontraba situado en la posición C1 del sesquiterpeno, debido a que la señal del carbonilo a δ 164.3 correlacionaba en el espectro HMBC con la señal del protón a δ 5.88 (H1). Los demás sustituyentes eran acetatos y sus respectivas posiciones pueden encontrarse en las **tablas 12 y 13 (parte experimental, pág. 262 y 263)**. La mayor parte de dichas asignaciones se obtuvieron a partir del espectro ROESY.

La estereoquímica fue definida en base a las constantes de acoplamiento y al espectro ROESY. Así, se observaron efectos NOEs entre H-15 y H-8, Me-14 H-7 y H-6, lo que permitió establecer la disposición relativa de los grupos éster en la molécula como 1α , 2α , 6β , 8β , 9α y 10α .



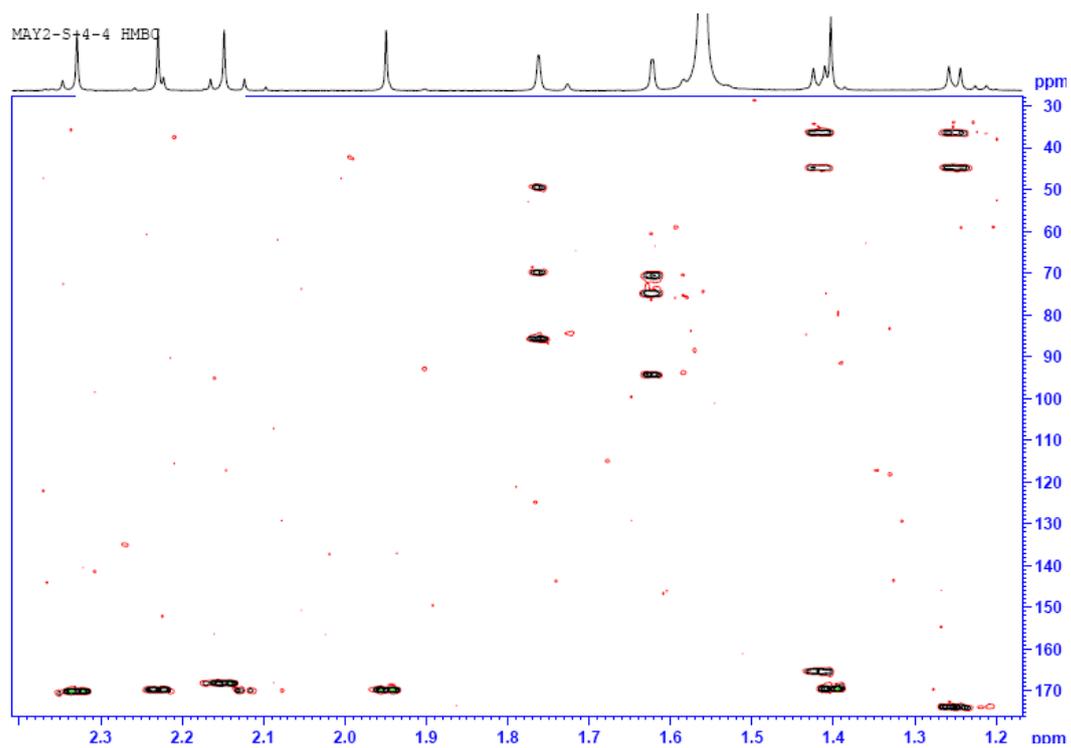


Figura 66: Espectro de RMN HMBC (500 MHz; en CDCl_3) de S4-4.

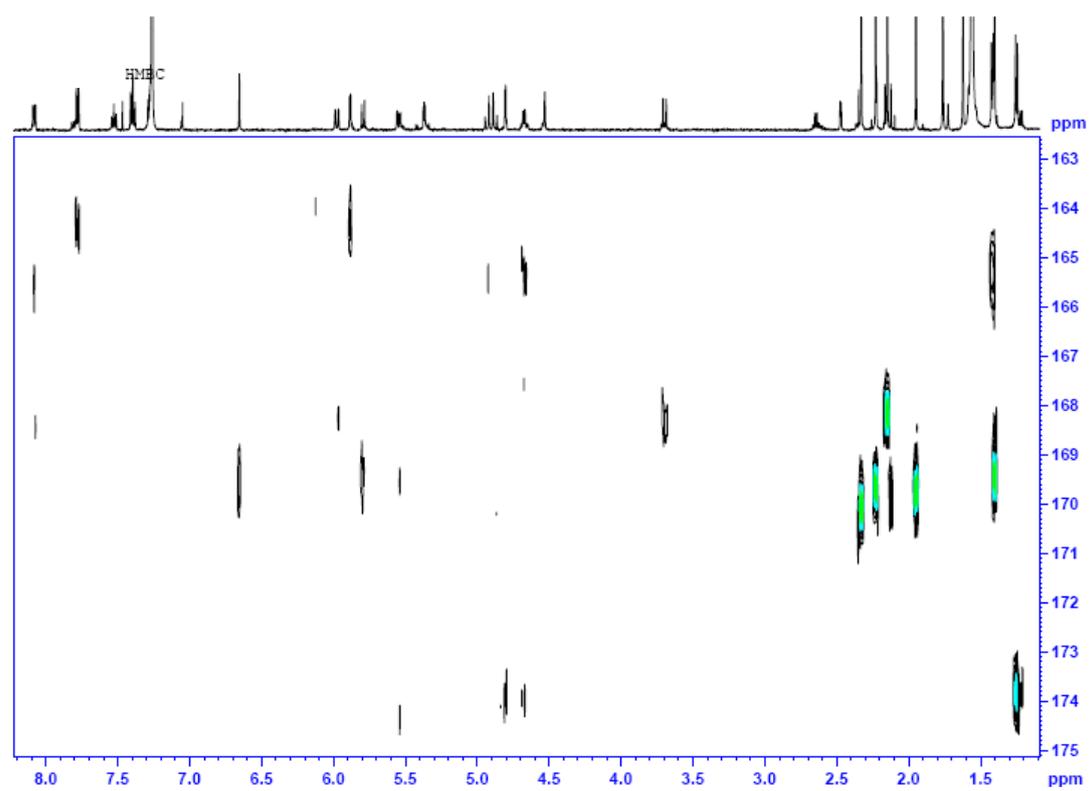
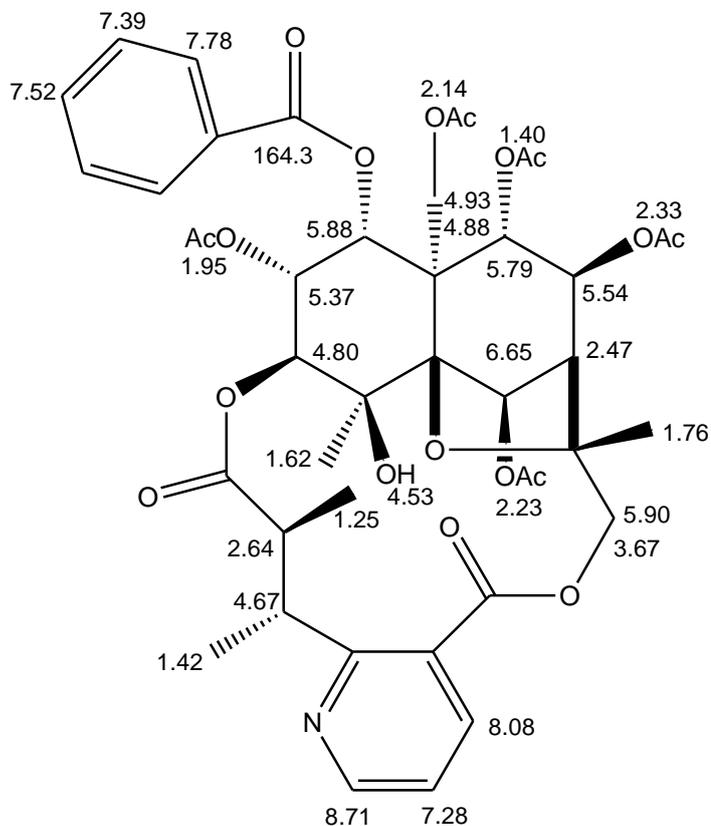
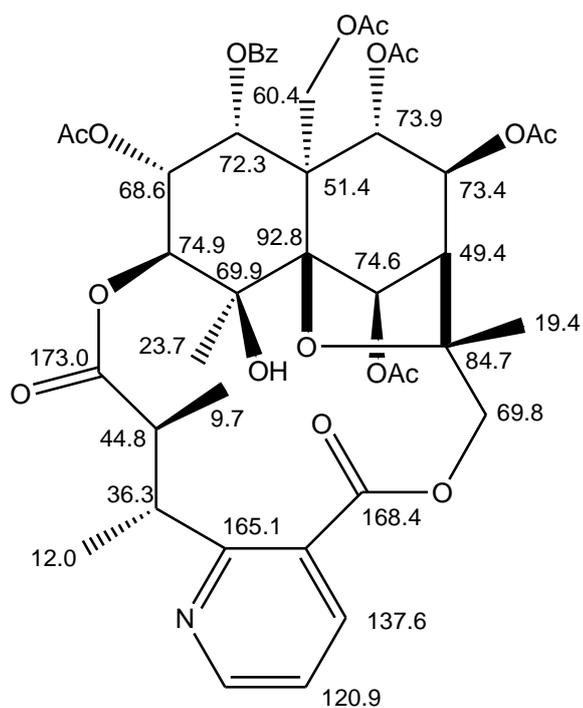


Figura 67: Espectro de RMN HMBC (500 MHz; en CDCl_3) de S4-4.

El compuesto (**193**) es un alcaloide compuesto de esqueleto sesquiterpénico tipo isoeuoniminol y a nuestro mejor saber y entender se trataría de un compuesto nuevo.



193



Elucidación estructural del compuesto S5-9

El análisis de los espectros de RMN del compuesto S5-9 indicó que se trataba de un alcaloide sesquiterpénico con seis grupos acetato sobre el esqueleto sesquiterpénico.

Las correlaciones ^1H - ^{13}C , ^1H - ^1H y ^1H - ^{13}C a larga distancia fueron obtenidas por medio de los espectros bidimensionales HSQC, COSY y HMBC, respectivamente.

El espectro de RMN ^1H , presentó señales características de seis grupos acetato a δ 1.83, δ 2.21, δ 2.15, δ 2.16, δ 1.99 y δ 2.32, además de dos metilos singletes a δ 1.67 y δ 1.54, que fueron atribuidas a los metilos Me-13 y Me-14, respectivamente.

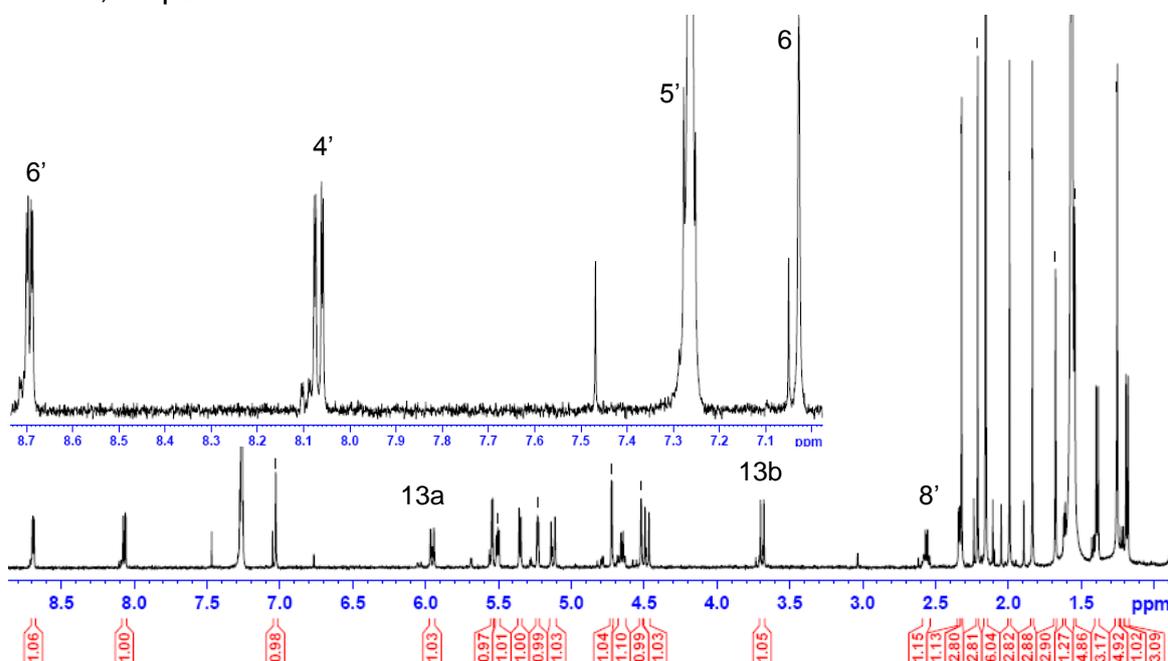


Figura 68: Espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) con ampliación de la zona a campos altos del de S5-9.

La presencia de una unidad de ácido evonínico en la molécula fue determinada por las señales de los tres protones aromáticos a δ 8.69 (1 H, *dd*, $J = 1.0$ y 5.0 Hz), δ 7.28 (*t*, 1 H) y δ 8.06 (1 H, *dd*, $J = 1.0$ y 8.0 Hz), correspondientes a la unidad de piridina 2,3-disustituída. Además, en la zona de campos altos aparecían los dos dobletes típicos de los metilos Me-9' (δ 1.39, $J = 7.0$ Hz) y Me-10' (δ 1.18, $J = 7.0$ Hz), que presentaban acoplamiento

escalar con los cuartetos a δ 4.65 (H7') y δ 2.56 (H8'), respectivamente. En este caso no había señales correspondientes a un grupo benzoílo.

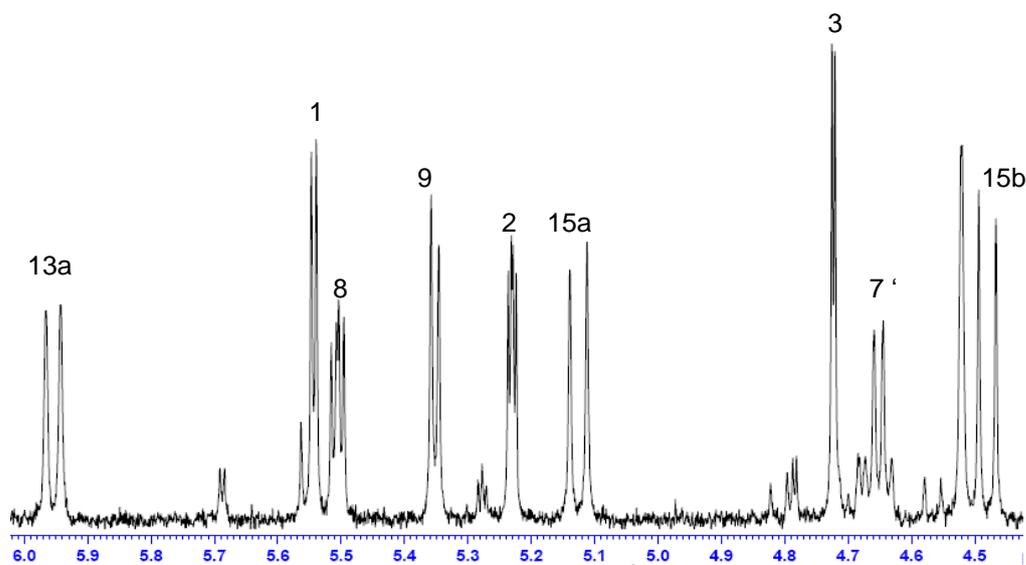


Figura 69: Ampliación del espectro de RMN ¹H (500 MHz; en CDCl₃) de S5-9.

Fueron también observadas señales para siete protones de metinos a δ 5.54 (1 H, *d*, *J* = 4.0 Hz), δ 5.23 (1 H, *dd*, *J* = 2.0 y 4.0 Hz), δ 4.72 (1 H, *d*, *J* = 2.0 Hz), δ 7.02 (*s*, 1 H), δ 2.33 (1 H, *d*, *J* = 4.0 Hz), δ 5.50 (1 H, *dd*, *J* = 4.0 y 6.0 Hz) y δ 5.35 (1 H, *dd*, *J* = 6.0 Hz), que por medio de sus correlaciones (COSY) fueron asignadas a los H1, H2, H3, H6, H7, H8 y H9, respectivamente.

Los dos grupos de metilenos sustituidos, C13 y C15, aparecen en el espectro protónico con sus dobletes a δ 5.95 (H13a), δ 3.69 (H13b), δ 5.12 (H15a) y δ 4.48 (H15b).

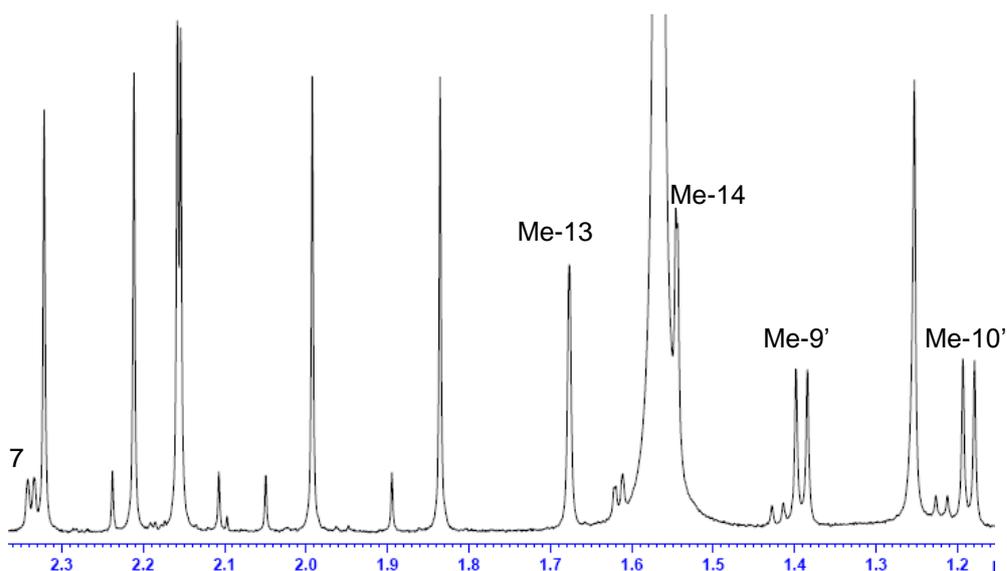
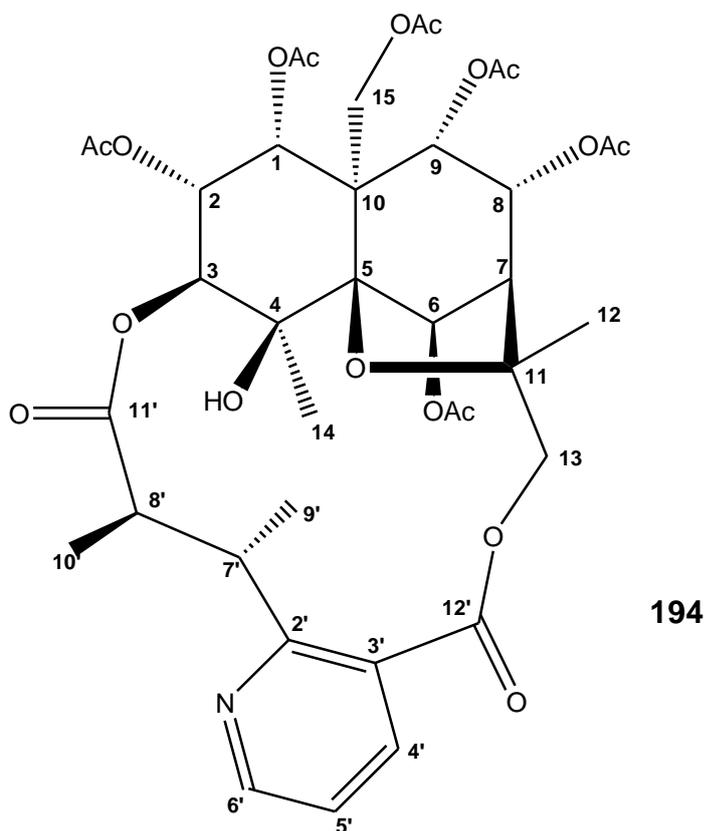


Figura 70: Ampliación de la zona de campo más alto del espectro de RMN ¹H (500 MHz; en CDCl₃) de S5-9.

La interpretación cuidadosa de los espectros de RMN 2D así como medio el análisis de las constantes de acoplamiento, y comparación con datos de literatura permitió establecer la disposición relativa de los grupos ésteres de la molécula como 1 α , 2 α , 6 β , 8 α , 9 α y 10 α . Así el compuesto S4-9 fue identificado como el alcaloide sesquiterpénico euonina, aislado por primera vez de *Euonymus sieboldiana* (Sugiera, 1973).¹⁵⁷

La asignación completa se encuentra en las **tablas 12 y 13 (parte experimental, pág. 262 y 263)**



¹⁵⁷ Sugiura, K.; Yamada, K.; Hirata, Y. *Tetrahedron Letters* **1973**,14, 113-116.

Elucidación estructural del compuesto S5-11

El análisis de los espectros de RMN del compuesto S5-11 indicó que se trataba de un alcaloide sesquiterpénico con cinco grupos acetato y un grupo benzoílo sobre el esqueleto sesquiterpénico, y como en los casos anteriores, una unidad de ácido evonínico para cerrar el macrociclo.

Las correlaciones ^1H - ^{13}C , ^1H - ^1H y ^1H - ^{13}C a larga distancia fueron obtenidas por medio de los espectros bidimensionales HSQC, COSY y HMBC, respectivamente.

Para la elucidación estructural del compuesto fue clave el análisis de las constantes de acoplamiento. En particular las multiplicidades de H9 (δ 6.03 (1 H, *d*, $J = 10.0$ Hz) y H8 (δ 5.72 (1 H, *dd*, $J = 4.0$ y 10.0 Hz)) indicaban una disposición axial-axial entre ambos hidrógenos. El estudio de las constantes de acoplamiento restantes y el análisis del espectro ROESY permitieron establecer la disposición relativa de los grupos éster de la molécula como 1α , 2α , 6β , 8β , 9α y 10α . La correlación en el espectro HMBC entre el grupo carbonilo del benzoato a δ 165.0 y la señal del protón a δ 6.06 permitió situar dicho grupo sobre el C9.

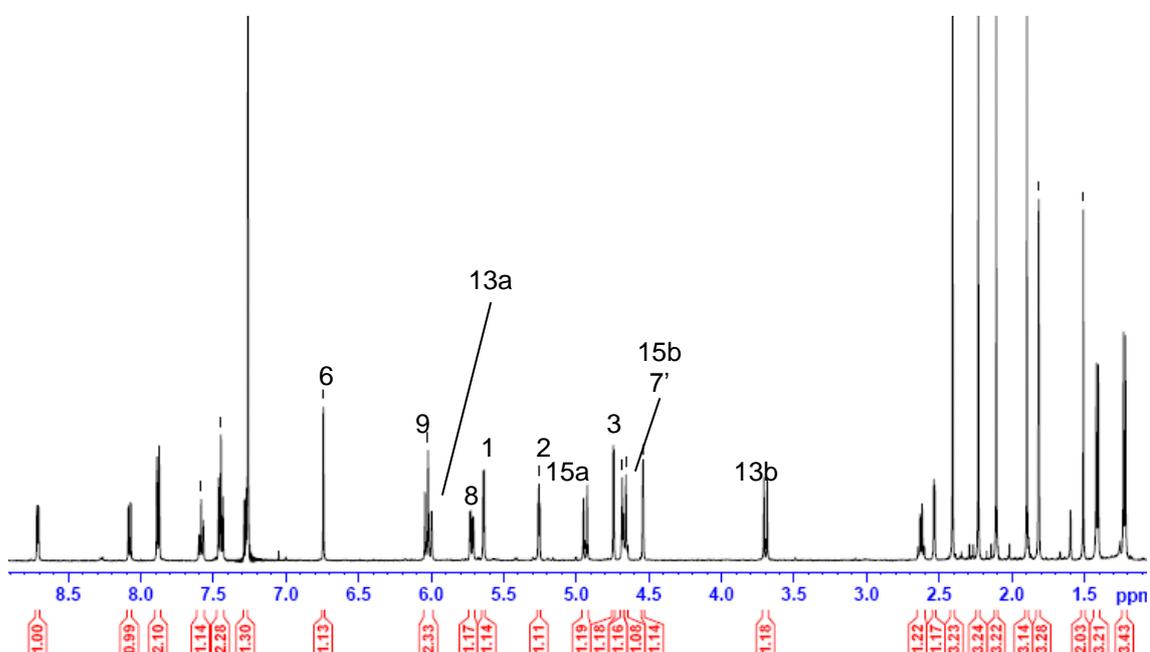
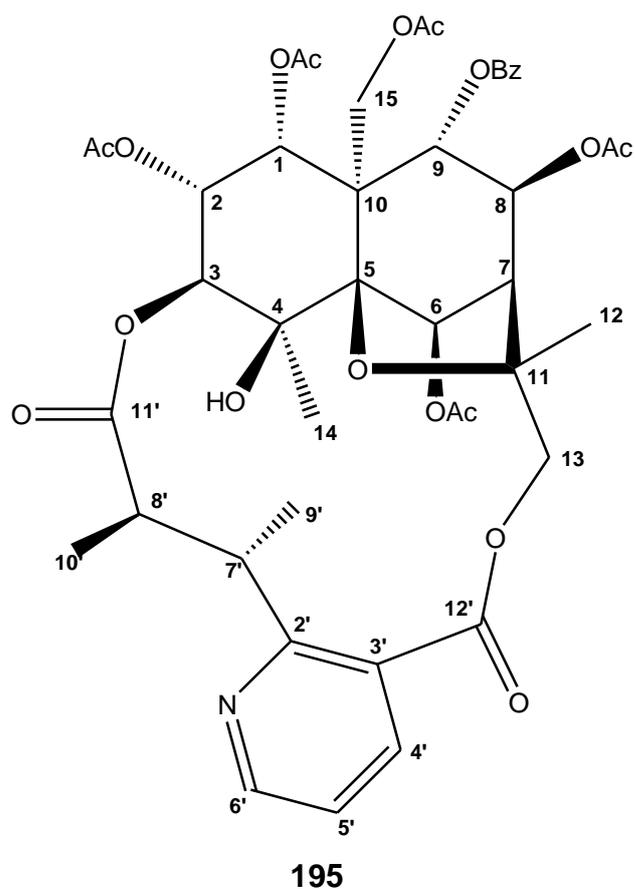


Figura 71: Espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de S5-11.

De esta forma, el compuesto S4-11 fue identificado como el alcaloide sesquiterpénico horridina (**195**), aislado anteriormente de las raíces de *Maytenus horrida* (González, 1986).¹⁵⁸

La asignación completa se encuentra en las **tablas 12 y 13 (parte experimental, pág. 262 y 263)**



¹⁵⁸ González, A.G.; Ferro, E. A.; Ravelo, A.G. *Heterocycles* **1986**, 24, 1295.

Elucidación estructural del compuesto S5-12

El análisis de los espectros de RMN del compuesto S5-12 indicó que se trataba de un alcaloide sesquiterpénico con cuatro grupos acetato y un grupo benzoato sobre el esqueleto sesquiterpénico, con una unidad de ácido evonínico

Debido a la exigua cantidad aislada, no fue posible obtener un buen espectro de RMN ^{13}C , sin embargo se pudo reconstruir el mismo y elucidar la estructura de la molécula a partir de los espectros HSQC y HMBC.

El espectro de RMN ^1H , muy semejante al de los compuestos presentados en los ítems anteriores, presenta señales características de cuatro grupos acetato a δ 2.25, δ 2.17, δ 2.07 y δ 1.47, además de dos metilos singuletes a δ 1.73 y δ 1.65, que fueron atribuidas a los metilos Me-12 y Me-14, respectivamente.

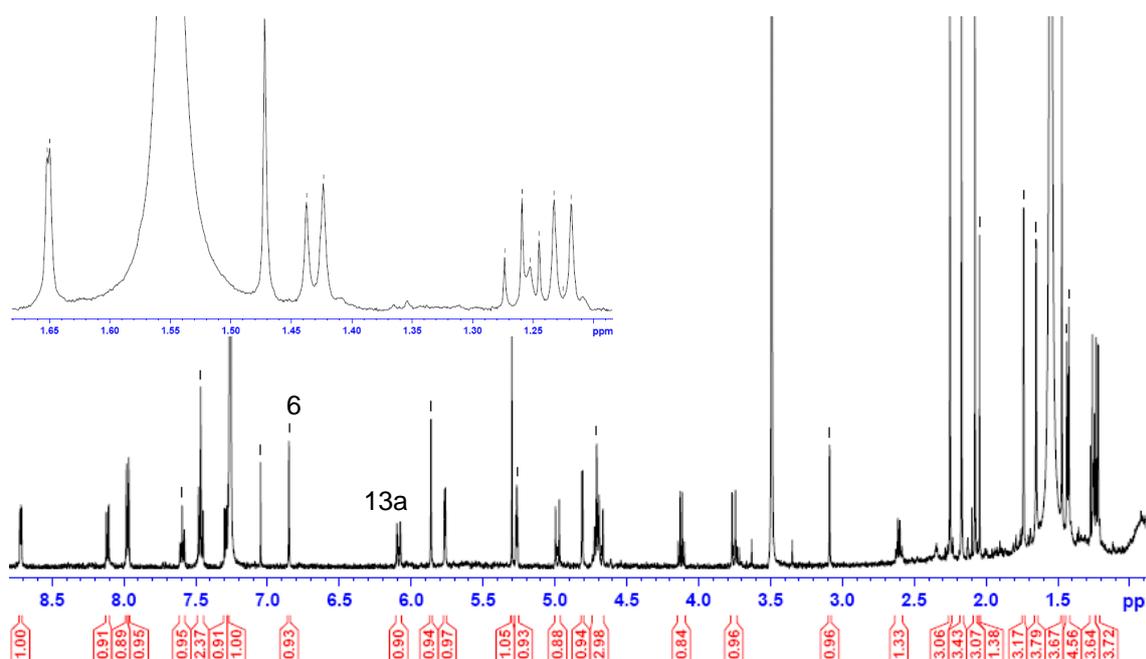


Figura 72: Espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de S5-12.

Fueron también observadas señales para seis protones de metinos oxigenados a δ 5.76 (1 H, *d*, $J = 3.0$ Hz), δ 5.26 (*t*, 1 H, $J = 3.0$ Hz) y δ 4.80 (1 H, *d*, $J = 3.0$ Hz), que por medio de las correlaciones observadas en el espectro COSY fueron asignadas a los protones H1, H2, H3.

Comparando con los tres alcaloides anteriores, se observaban cambios notables en las multiplicidades y desplazamientos químicos de algunas señales. En particular, H9 y H7 aparecían como singuletes y más desprotegidos (δ 5.86 (s, 1 H) y δ 3.08 (s, 1 H) respectivamente) que en los otros ejemplos. Además no se observaba señal para H8. Estos hechos sugerían que H8 se encontraba reemplazado por un grupo que interrumpía la cadena de acoplamientos y al mismo tiempo desprotegía las señales vecinas, probablemente un carbonilo. Esto pudo ser confirmado al observarse en el espectro HMBC correlaciones entre dichos protones y un carbonilo de cetona a δ 195.6.

Los dos metilenos sustituidos, C-13 y C-15, aparecen en el espectro protónico con sus dobletes a δ 6.80 (H-13a), 3.75 δ (H-13b), δ 5.00 (H-15a) y δ 4.68 (H-15b).

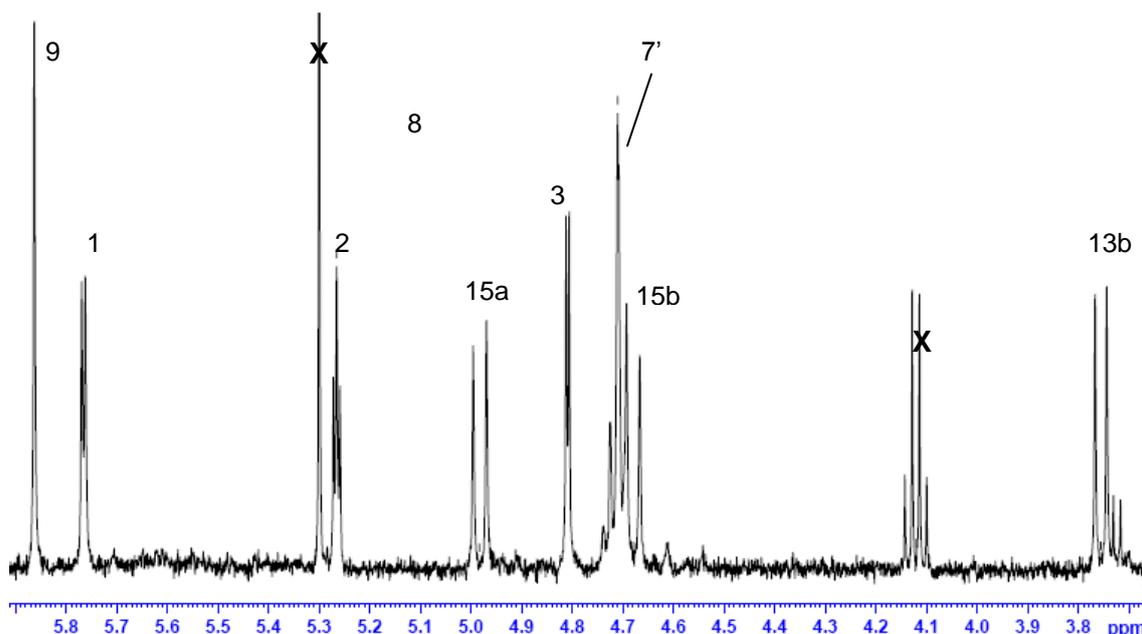
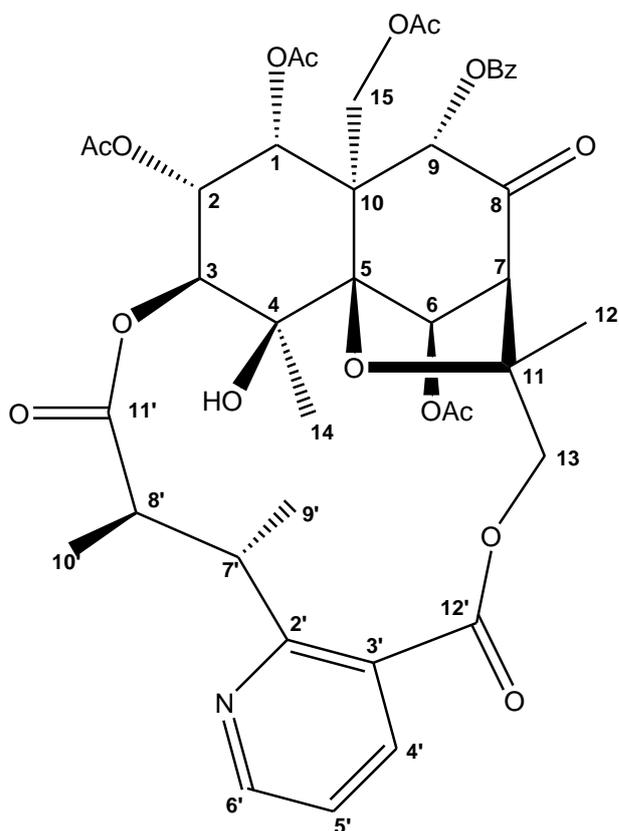


Figura 73: Ampliación del espectro de RMN ¹H (500 MHz; en CDCl₃) de S5-12.

La correlación en el espectro HMBC entre el grupo carbonilo del benzoato a δ 165.6 y la señal del protón a δ 5.86 permitió situar dicho grupo sobre C9. También se pudo explicar el desplazamiento del OAc (δ_H 1.47) ubicado sobre el C15, protegido por efecto anisotrópico debido a la cercanía al grupo benzoato.

La presencia del ácido evonínico en la molécula fue determinada por sus señales características en el espectro RMN 1H al igual que en los casos anteriores. La asignación completa se encuentra en las **tablas 12 y 14 (parte experimental, pág. 262 y 264)**.

El estudio de las constantes de acoplamiento y el análisis del espectro ROESY, permitieron establecer la disposición relativa de los grupos ésteres de la molécula como 1α , 2α , 6β , 9α y 10α .



Todos los datos indicaban que el compuesto S5-12 (**196**) se trataría de un nuevo alcaloide sesquiterpénico, ya que no se encontraron referencias en la literatura.

Elucidación estructural del compuesto S5-13

El análisis de los espectros de RMN del compuesto S5-13 indicó que se trataba nuevamente de un alcaloide sesquiterpénico con cinco grupos acetato, un grupo benzoato y una unidad de ácido evonínico

Comparando con los compuestos anteriores, resultaba notable el desplazamiento químico de H6 hacia campos bajos (7.18, s, 1H). Esto es típico en los casos en que un grupo benzoato se encuentra unido a C6, por lo tanto se ubicó al benzoato en esa posición. La asignación completa se encuentra en las **tablas 12 y 14 (parte experimental, pág. 262 y 264)**.

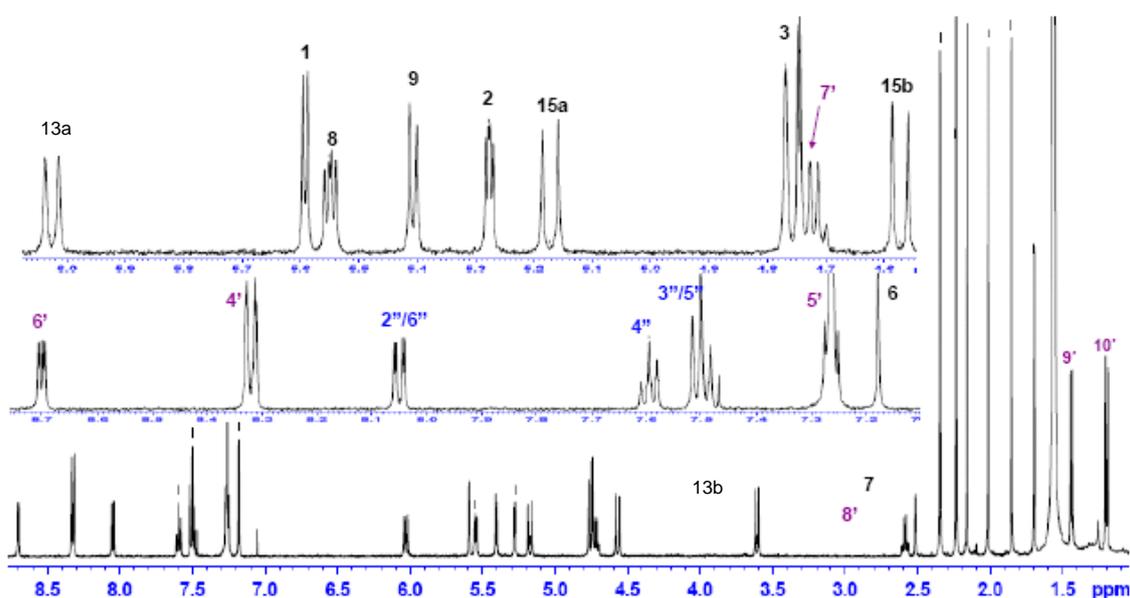
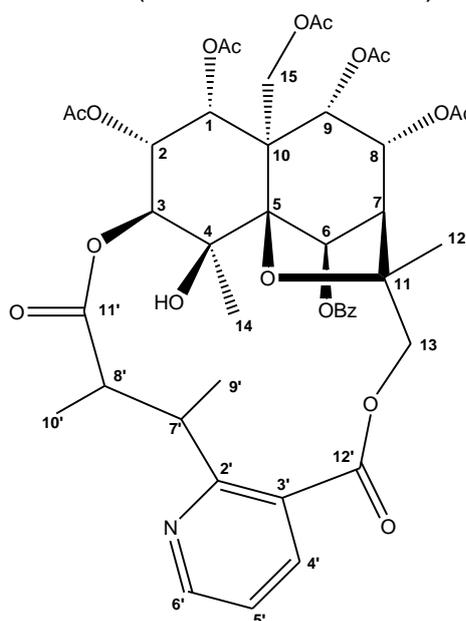
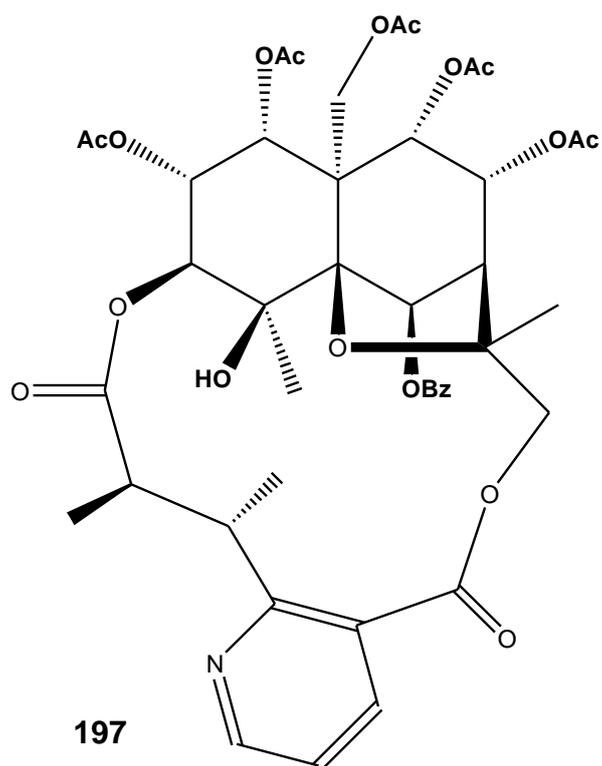


Figura 74: Ampliación del espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de S5-13.

El estudio de las constantes de acoplamiento y el análisis del espectro ROESY permitieron establecer la disposición relativa de los grupos éster de la molécula como 1α , 2α , 6β , 8α , 9α y 10α .





Por comparación con datos de literatura, se pudo determinar que S4-13 era el alcaloide sesquiterpénico cangorinina E-I (**197**) aislado por primera vez de de *Maytenus ilicifolia* (Shirota, 1994).¹⁵⁹

¹⁵⁹ Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa *Heterocycles* **1994**, 38, 383-9.

Elucidación estructural del compuesto S5-16

El análisis de los espectros de RMN del compuesto S5-16 indicó que se trataba de un alcaloide sesquiterpénico del mismo tipo de los anteriores, con cuatro grupos acetato y dos grupos benzoato sobre el esqueleto sesquiterpénico.

Por haber sido aislado en muy pequeña cantidad no fue posible obtener el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto, así mismo se pudo elucidar su estructura con base en los patrones de multiplicidades y desplazamientos químicos presentados en el espectro de RMN ^1H , en comparación con los otros compuestos aislados.

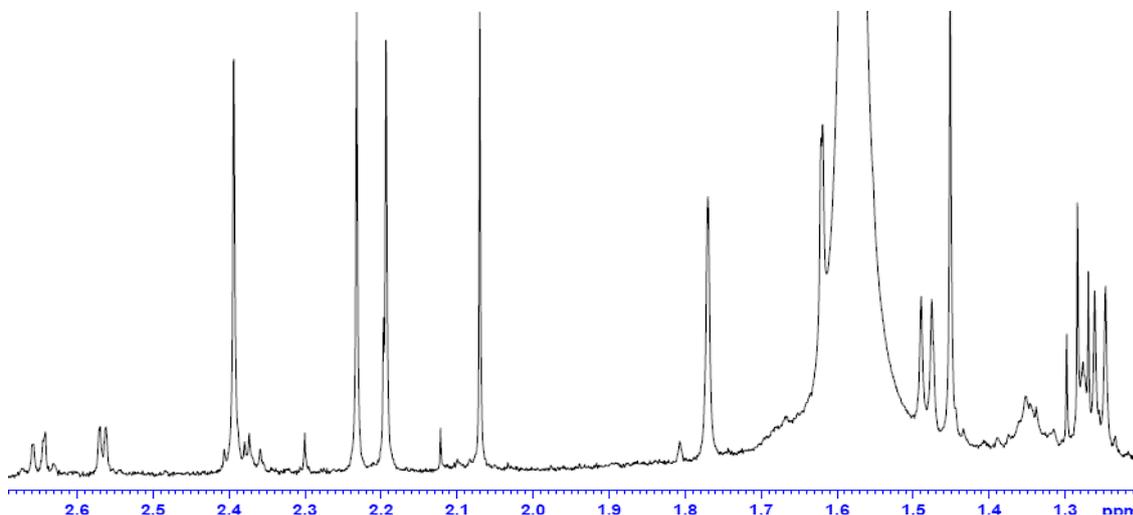
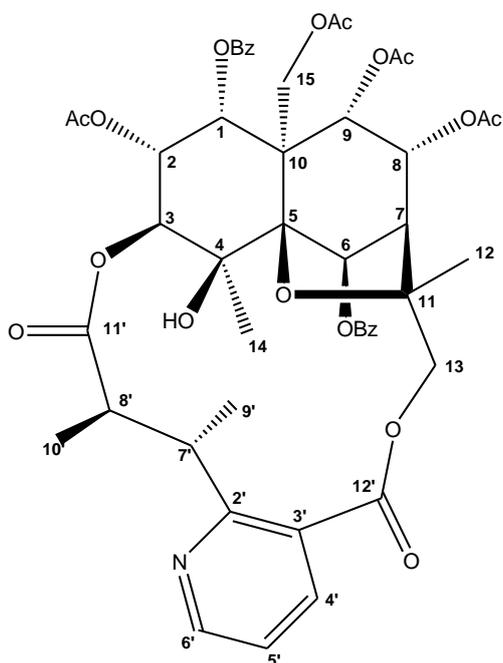


Figura 75: Ampliación del espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de S5-16.



Al analizar cuidadosamente los desplazamientos químicos de la molécula y al compararlos con los de los otros compuestos aislados, se vio que las señales a δ 5.95 (H1) y δ 7.23 (H6) presentaban corrimientos pronunciados a campos bajos. Por tanto, los benzoatos fueron ubicados en las posiciones C1 y C6. La asignación completa se encuentra en la **tablas 14 (parte experimental, 264)**.

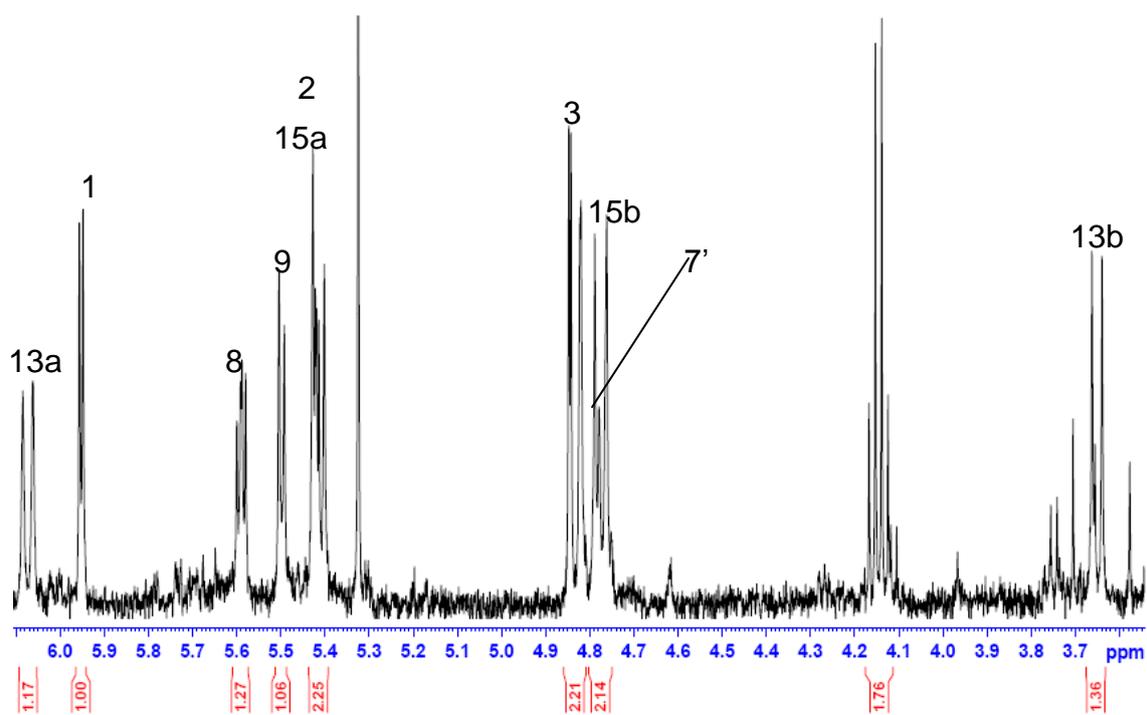


Figura 76: Ampliación del espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de S5-16.

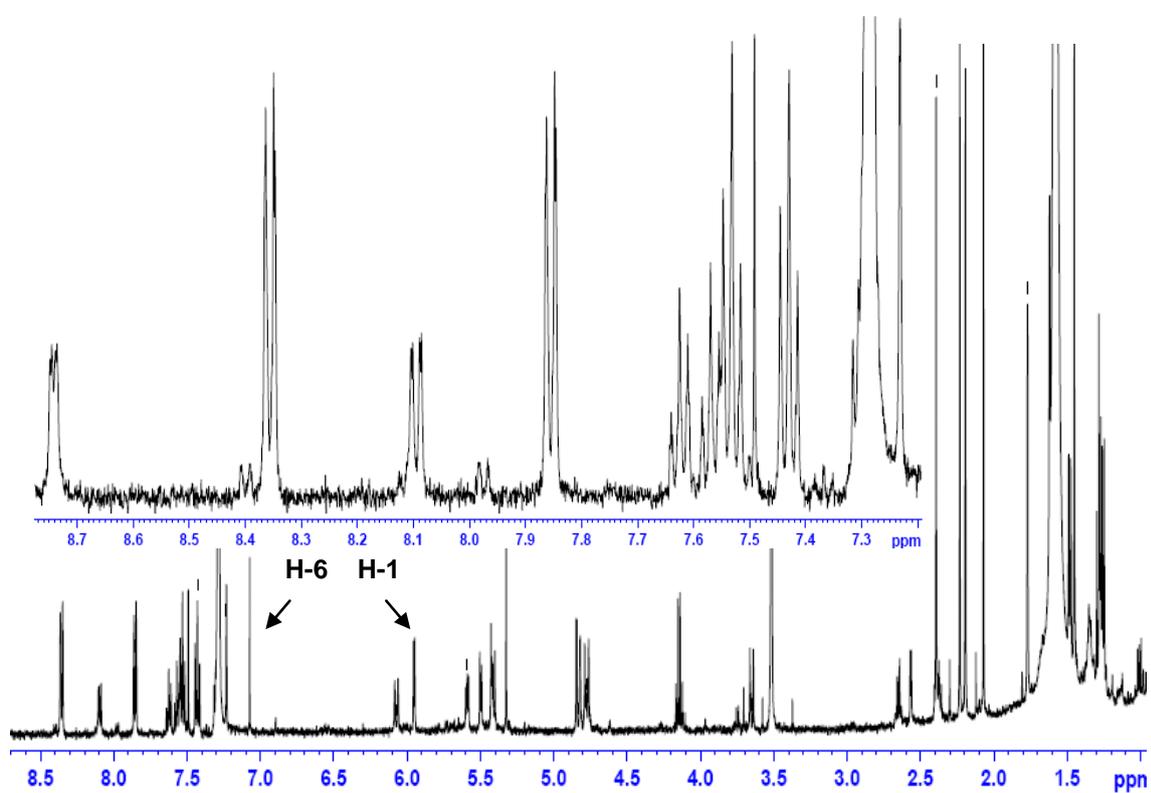
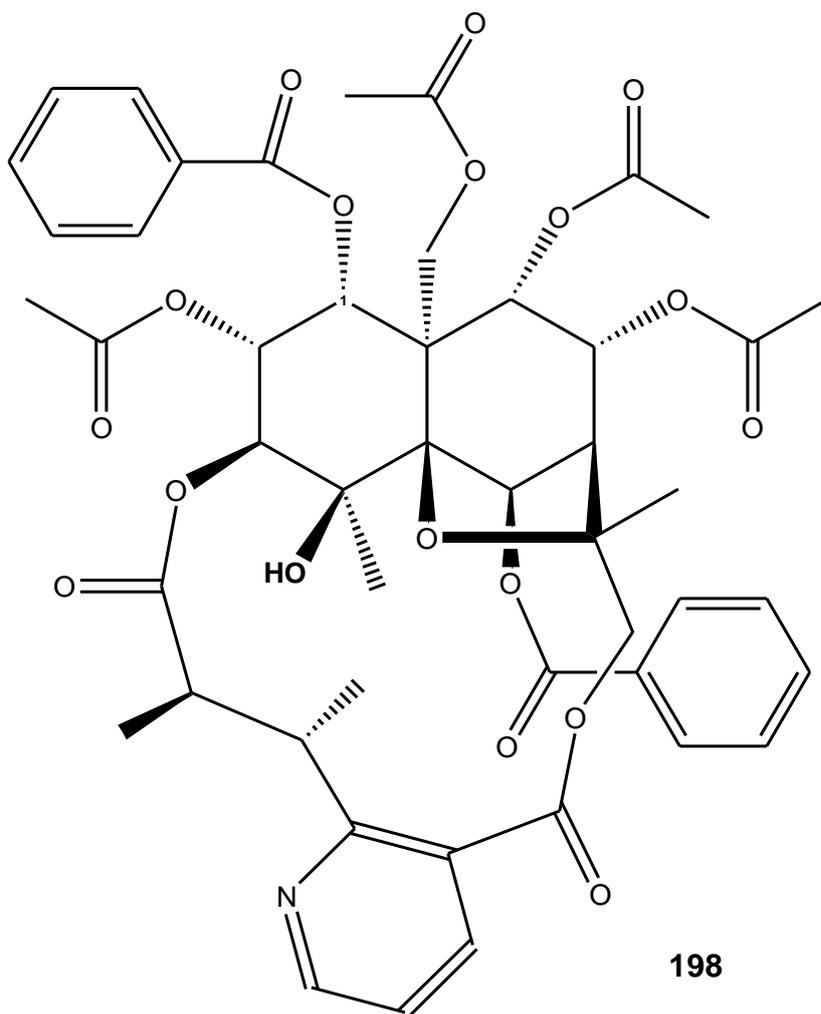


Figura 77: Espectro de RMN ^1H (500 MHz; en CDCl_3) de S5-16.

La estereoquímica fue estudiada a partir de las constantes de acoplamiento, y definida como 1α , 2α , 6β , 8α , 9α y 10α . Todos los datos condujeron a identificar al compuesto S4-16 como el alcaloide sesquiterpénico ebenifolina E-II (**198**). Dicho compuesto había sido aislado previamente de *Euonymus japonica* (Han, 1990).¹⁶⁰

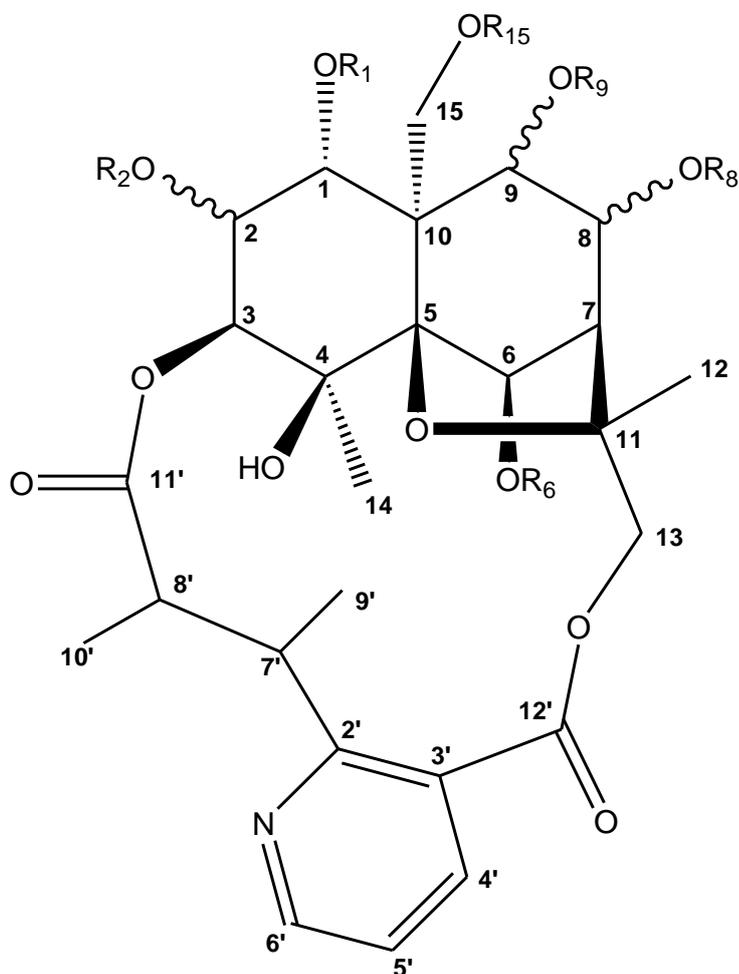


¹⁶⁰ Hoon, H. B.; Park, Ki ,M.; Ryu, J.H.; Hill, P.J.; Naoki, H. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2303-7

Los alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos aislados de las raíces de *M. spinosa* están presentados en la **tabla 2**.

Tabla 2: Alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos aislados de raíces de *M. spinosa*.

alcaloide	R ₁	R ₂	R ₆	R ₈	R ₉	R ₁₅
S4-4	α -OBz	α -OAc	β -OAc	β -OAc	α -OAc	OAc
S5-S9	α -OAc	α -OAc	β -OAc	α -OAc	α -OAc	OAc
S5-S11	α -OAc	α -OAc	β -OAc	β -OAc	α -OBz	OAc
S5-S12	α -OAc	α -OAc	β -OAc	=O	α -OBz	OAc
S5-S13	α -OAc	α -OAc	β -OBz	α -OAc	α -OAc	OAc
S5-S16	α -OBz	α -OAc	β -OBz	α -OAc	α -OAc	OAc



Referencias

- Alvarenga, N.; Velásquez, C.A.; Alvarenga, N.C.. *Revista de Ciencia y Tecnología, Dirección de Investigaciones – Una*, **2001**,1, 51-55.
- Amico, V *et al.* *Phytochemistry*, **1981**, 20, 848.
- Amico, V. *et al*, *Tetrahedron* **1980**, 36, 1409.
- Asakawa, Y. *Phytochemistry* **2004**, 65, 623-669.
- Balasubramaniam,R. P.; Moss, D. K.; Wyatt, J. K.; Spence, J. D. *Tetrahedron* **1997**, 53, 74297444.
- Bandurraga, M, M.; Fenical, W . *Tetrahedron* **1985**, 41, 1057-1065.
- Barreiro, E. J.; *Quim. Nova* **1990**, 13, 29.
- Bergmann, W.; Burke, D. *J. Org. Chem.*, **1955**, 20, 1501-1507.
- Beroza, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 2136.
- Bohlin, L. *J.Nnat. Prod.* **2008**, 71, 330-333.
- Bonnard, I; Manzanares, I; Rinehart, K. L. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1466-1470.
- Brian, T.L.; Metaxas, A. *Deep-Sea Research I*, **2006**, 53, 1865-1879.
- Brüning, R.; Wagner, H.: Übersicht über Celastraceen-Inhaltsstoffe: Chemie, Chemotaxonomie, Biosynthese, Pharmakologie. *Phytochem.* **1978**, 17, 1821.
- Brusca, R.C., Brusca, G. *Invertebrates*, v II, 2 ed. Sinauer Associates, Massachusetts, **2003**.
- Butler, M.S. *Nat Prod Rep.* **2005**, 22,162-195.
- Cabrera G.; Seldes, A.M. *J.Nat. Prod.* **1999**, 62, 759-760.
- Cai, m.; Jorfan P.C.*Biophys. J.* **1990**, 57, 883-891.
- Clastres, A.; Laboute P.; Ahond, A. ; Poupat, C. ; Potier, P. *J. Nat. Prod.* **1984**, 47, 162.
- Corsino, J. *et al.* *Phytochemistry*, **1998**, 48, 137.
- Corson, T.W.; Crews, C.M. *Cell.* **2007**, 130, 769-774.
- Cragg, G. M.; Newmann, D. J.; Snader, K. M.; *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 52.
- Cragg, G. M.; Newmann, D. J.; Snader, K. M.; *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022.
- Crombie, L. *et al.* *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1986**, 531-534.
- Cuadrado, A.; García-Fernández, L. F.; González, L.; Suárez, Y.; Losada, A.; Alcaide, V.; Martínez, T.; Fernández-Sousa, J. M.; Sánchez-Puelles, J. M.;

- Muñoz, A. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 241-250.
- Der Krikorian, A. *J. Ethnopharmacol.* **1984**, 12, 115.
- Dewick, P.M. *Medicinal Natural Products*, Ed. Baffins Lane, Chichester, 2nd ed., **2002**.
- Dirsch, V. M.; Müller, I. M.; Eichhorst, S. T.; Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Inoue, M.; Xu, Jun-Ping; Ichihara, Y.; Wanner, G.; Vollmar, A. M. *Cancer Res.* **2003**, 63, 8869-8876.
- Donia, M; Hamann, M.T. *Infectious diseases*, **2003**, 111-121.
- Duan, H.; Takaishi, Y.; Bando, M.; Kido, M.; Imakura, Y.; Lee, K.: *Tet. Lett.*, **1999**, 40, 2969-2972.
- Furlan, M. et al. *Phytochemistry*, **2000**, 55, 741-748.
- Fusetani, N. et al. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2936-2937.
- Gallardo, L.G.; Butler, M.; Gallo, M.L.; Rodriguez, M.A.;Eberlin, M.N.;Cabrea, G.M.; *Phytochemistry*. **2006**, 67, 2403-2410.
- Ganein, B. et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2002**, 12, 823-825.
- Ganju, L. et al. *Biomedicina & Pharmacotherapy*, **2008**, 62, 94-98.
- Gao, J-M.; Wu, W-J.; Zhang, J-W.; Konishi, Y. *Nat. Prod. Rep.*, **2007**, 24, 1153-1189.
- Gao, J-M.; Wu, W-J.; Zhang, J-W.; Konishi, Y. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 1153-1189.
- Garzon, S.P. et al. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1359-1359.
- Gavagnin, M et al. *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66, 1517-1519.
- González, A. G. et al *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **1996**, 4, 815-820.
- González, A. G.; Alvarenga, N. L.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, Á. G.; Moujir, L. *Tetrahedron* **1996**, 52, 9597-9608.
- González, A. G.; *Tetrahedron* **1996**, 52, 9597-9608.
- González, A.G. Atta-Ur-Rahman (Ed) *Studies in Natural Products Chemistry*, **1996**, 18.
- González, A.G. et al. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1185-1187.
- González, A.G. et al. *Tetrahedron* **1992**, 48, 769-774.
- González, A.G. et al. *Tetrahedron*, **1996**, 52, 9597-9608.
- González, A.G. et al., *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 1075.
- González, A.G.; Bazzocchi, I.L.; Moujir, L.M.; Jimenez, I.A. In *Studies In Natural*

- Products Chemistry, Bioactive Natural Products (Part D)*; Atta-Ur-Rahman, Ed.; Elsevier Science Publisher: Amsterdam, **2000**; 23, 649-738.
- González, A.G.; Ferro, E.A.; Ravelo, A.G. *Heterocycles* **1986**, 24, 1295.
- González, A.G.; Jiménez, I.A.; Ravelo, A.G.; Coll, J.; González, J.A.; Lloria, J. *Biochem. Syst. and Ecol.* **1997**, 25, 513-519.
- González, A.G.; Tincusi, B.M.; Bazzocchi, I.L.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Konoshima, T.; Jiménez, I.A.; Ravelo, A.G. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2000**, 8, 1773-1778.
- González, N. et al. *J. Org.Chem.*, **2002**, 67, 5117-5123.
- Guerriero, A.; D'ambrosio, M.; Pietra, F.. *Helv. Chim. Acta*, **1995**, 78, 1465.
- Hamann, M. T.; Otto, C. S.; Scheuer, P. J.; Dunbar, D. C. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 6594-6600.
- Hamann, M. T.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 5825-5826.
- Hendrickson, R. L.; Cardellina, J. H. *Tetrahedron*, **1986**, 42, 6565.
- Hiersemann, M.; Helmboldt, H. *Top Curr Chem.* **2005**, 243, 73-136.
- Hooper, I.R.; Keifer, P.A.; Rinehart, K.L. *J.Org.Chem.* **1986**, 51, 4454-4458.
- Hoshino, A.; Mitome, H.; Tamai, S.; Takiyama, H.; Miyaoka, H.. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1328-1335.
- http://www.pharmamar.es/en/prosci/facts_001.cfm
- <http://www.pharmamar.es/es/press/index.cfm>
- <http://www.pharmamar.es/es/press/index.cfm>
- Inouye, S.; Sasaki, S. *Febs Letters*, **2006**, 580, 1977-1982.
- Ireland, C., Faulkner, D. *J. Org. Chem*, **1977**, 42, 3159-3162.
- Ireland, C; Faulkner, D.; Finer, J.; Clardy J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 4664.
- Ito, H. et al *Phytochemistry*, 1991, 30, 3713-3716.
- Jarvis, B.B. et al *Phytochemistry* **2000**, 55, 663-673.
- Jenny, L; Borschberg, H-J. *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 715-731.
- Jing, Y. et al *Anticancer Res.* **1994**, 14, 1193.
- Johnson, A.; Juby, P.; King, T.; Tam, S. *J. Chem. Soc.* **1963**, 2884.
- Kloucek, p.; Polesny, Z. Svobdova, B. *J. Ethnopharmacology*, **2005**, 99, 309-312.
- Konig, G., Wright, A., *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 1529-1538.
- Kubaneck, J.; Barsby, T. *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68, 511-516.

Kuo, Y.H. et al. *Heterocycles* **1989**, 29, 1465-1468.

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

Laurent D., Pietra, F. *Marine Biotechnology*, **2006**, 0, 1-15.

Lee, D-Q et al. *Pest Management Science*, **2005**, 61, 85-90.

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

Lee, K-H et al. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1416-1420.

Liu, H-C.; King, C.H.; Su, M-H. *J. Chin. Chem. Soc.*, **1981**, 28, 95.

Loening, A.; Fenn, T.D.; Gambhir, S.S. *J. Molecular Biology*, **2007**, 374, 1017-1028.

Look, S.A. ; Fenical, W. *J. Org. Chem.*, **1982**, 47, 129.

Look, S.A., Fenical, W., *J. Org. Chem.*, **1982**, 47, 4129.

Lopez, E. E. et al. *Journal of Maritime Reserach*, **2006**, 3, 73-89.

Maharaj, D.; Mootoo, B. S. ; Lough, A. J.; Mclean, S.; Reynolds, W. F. ; Tinto, W. F. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 7761.

Maida, M.; Sammarco, P.W., Coll , J.C. *Mar Ecol Prog Ser*, **1995**, 121, 191-202.

Marchesi, E.; Grela, I.A. *Caldasia*, **2004**, 26, 327-332.

Martin, J. D. *Tetrahedron* **1973**, 29, 2553.

Montanari, C. A.; Bolzani, V. S.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 105.

Murata, N.; Legrand, A.; Ishibashi, Y.; Fukui, M.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 111, 8929-8931.

Mutter, R.; Wills, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 1841-1860.

Nakanishi, K.; Miura, V.P.; Govindachari, T.R.; Viswanathan, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 6473.

Newman, D.J. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 2589-2599.

Newmann, D. J.; Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 461-477.

Newmann, D. J.; Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 461-477.

Ngassapa, O. et al *J. Nat Prod.* **1994**, 57, 1-8.

Núñez, M.J. et al. *J. Nat Prod.* **2004**, 67, 14-18.

Núñez, M.J. et al. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1018-1021.

P.-J. Sung, C.-H. Chao, Y.-P. Chen, J.-H. Su, W.-P. Hu, And J.-H. Sheu, *Tetrahedron Lett.* 47, 167, 2006.

Páginas Wicy, y SIB y otros *sites* de biodiversidad.

Perez, C.D.; Ocampo, F.C. *Journal of Natural History*, **2001**, 35, 169-173.

Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Doubek, D. L.; Herald, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 6846-6848.

Pettit, G. R.; Inoue, M.; Kamano, Y.; Herald, D. L.; Arm, C.; Dufresne, C.; Christie, N. D.; Schmidt, J. M.; Doubek, D. L.; Krupa, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2006-2007.

PIARFON, *Proyecto Bosques Nativos y Áreas Protegida*, Argentina Banco Mundial- No. 4085-AR.

Rinehart, K. L., Jr.; Gloer, J. B.; Carter Cook, J. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 1857-1859.

Rinehart, K. L., Lithgow-Bertelloni, A. M., PCT Int. Pat. Appl. WO 9104985, Apr. 18, **1991**; GB Appl. 89/22,026, Sept. 29, 1989; *Chem. Abstr.* **1991**, 115, 248086q.

Rinehart, K. L.; Holt, T. G.; Fregeau, N. L.; Stroh, J. G.; Keifer, P. A.; Sun, F.; Li, L. H.; Martin, D. G. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 1676.

Rittschof, D. *Natural product Antifoulants and Coatings Development*. En MCclintock, J. B.; Baker, B. J. *Marine Chemical Ecology*, CRC, New York, **2001**, 610p.

Rodríguez, A. D. et. al. *Tetrahedron* **1998**, 54, 11683-11729.

Rodríguez, A.; González, E.; Ramírez, C. *Tetrahedron* **1998**, 54, 11683.

Rodríguez, A.D.; Amirez, C.; Cobar, O.M. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 15-22.

Roe, M. B.; Whittaker, M.; Procter, G. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 8102-8106.

Roeser, J.; Scheuer, P.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 846-847.

Roussis, V. *Tetrahedron* **2008**, 68, 1696-1702.

Savi, L.A.; Barardi, C.R.M.; Simoes, C.M.O. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 2552-2557.

Schwartzmann, G.; Brondani da Rocha, A.; Berlinck, R. G. S.; Jimeno, J. *The Lancet Oncol.* **2001**, 2, 221-225.

Sera, Y. et al. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 395-396.

Shen, Y-C; Cheng, Y-B; Lin, Y-C; Guh, J-H; Teng, C-M *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 542-546.

Shimizu, Y.; Chou, H.; Bando, H.; Duyne, G.; Clardy, J. *Soc. Chim. Belg.*, **1986**,

- 108, 514-515.
- Shin, J., Fenical, W. *J. Org. Chem* **1991**, 56, 3392-3398.
- Shin, J.; Fenical, W. *J. Org. Chem* **1991**, 56, 3392-3398
- Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa H. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 102-106.
- Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa H. *J. Nat. Prod.*, **1997**, 60, 111-115.
- Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa *Heterocycles* **1994**, 38, 383-9.
- Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 1100-1104.
- SIB-Sistema de información de biodiversidad, Admn. de parques nacionales.
<http://www.sib.gov.ar/>
- Snedden, A.T. *J. Nat. Prod.* **1981** 44, 503.
- Snedden, A.T.. *J. Nat. Prod.* **1981**, 44, 503.
- Souza E Silva, S.R. et al. *Helvética Chimica*, **2005**, 88,1102-1109.
- Su, J.;Zhong, T; Shi, K. *J. Org. Chem* **1991**, 56, 2337-2344
- Suarez, Y.; González, L.; Cuadrado, A.; Berciano, M.; Lafarga, M.; Muñoz, A. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, 2, 863-872.
- Subrahmanyam, C.; Kulatheswaran, R.; Ward, R. S. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 1120.
- Sugiura, K.; Yamada, K.; Hirata, Y. *Tetrahedron Letters* **1973**,14, 113-116.
- Sugiura, K.; Yamada, K.; Hirata, Y.. *Tetrahedron Letters* **1973**, 2, 113-116.
- Sun, H.H.; Fenical, W. *Phytochemistry*, **1979**, 18, 340.
- Sung, P.-J.; Chiang, M. Y.; Tsai,T.; Su, J.-H.; Su, Y.-M.; Wu, Y.-C. *Tetrahedron*, **2007**, 63, 12860.
- Sung, P.-J.; Chiang, M. Y.; Tsai, T.; Su, J.-H.; Su, Y.-M.; Wu, Y.-C. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 167-170.
- Sung, P-J; Sheu, J-H; Xu, J-P. *Heterocycles*. **2002**, 57, 535-579.
- Sung, P-J; Sheu, J-H; Xu, J-P. *Heterocycles* **2005**, 55, 195-204.
- Takahashi, N. ; Li, W. W.; Banerjee, D.; Scotto, K. W.; Bertino, J. R. *Clin. Cancer Res.* **2001**, 7, 3251-3257.
- Tanaka, C. ; Yamamoto, Y.; Otsuka, M.; Tanaka, J.; Ichiba, T.; Marriott, G.; Rachmat, R.; Higa, T. *J. Nat.Prod.*, **2004**, 67, 1368.
- Tringali, C., Piattelli, M., *J. Nat. Prod.* **1995**, 58, 697-704.

- Vera, M. D., Joullié, M. M. *Med. Res. Rev.* **2002**, 22, 102-145.
- Wang, X.W.; Xie, H. *Drugs of the Future.* **1999**, 24, 991-997.
- Yunes, R. A.; Pedrosa, R. C.; Cechinel Filho, V.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 147.
- Zewail-Foote, M.; Hurley, L. H. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2493-2497.
- Zhang, L.H.; Huang, Y.; Wang, L.W.; Xiao, P.G.: *Phytother. Res.*, **1995**, 9, 315.

Conclusiones y Perspectivas

Se presentó en este trabajo de tesis el aislamiento y la elucidación estructural de metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos de dos octocorales: *Renilla reniformis* y *Convexella magelhaenica* y de dos plantas de la familia Celastraceae, *Maytenus vitis-idaea* y *Maytenus spinosa*.

Este trabajo representa una contribución al estudio químico de la fauna de invertebrados del Mar Argentino y de la flora autóctona de Argentina.

De la Pennatulacea *Renilla reniformis* se aislaron:

- ✓ dos diterpenos nuevos del tipo briarano, **RP3-22 (137)** y **RP3-27 (138)**;
- ✓ También se aisló en escasa cantidad el hidroxiácido lineal **RP3-13 (136)** que presentó actividad antifúngica en un ensayo preliminar contra el fitopatógeno *Fusarium*.

De la gorgonia *Convexella magelhaenica* se aislaron:

- ✓ dos diterpenos de tipo dolabellano nuevos, **CB2A (142)** y **CB2D (143)**.
- ✓ En el ensayo de actividad antiviral el compuesto CB2D presentó elevada citotoxicidad, lo que señala que sería interesante probar su actividad contra células cancerígenas.
- ✓ El coral *C. magelhaenica*, presenta dolabellanos en gran cantidad, lo que en una recolección de mayor masa de coral proporcionaría la posibilidad de obtener otros interesantes compuestos para ser probados en distintos ensayos biológicos.

Se realizó el estudio fitoquímico de los extractos (*n*-hexano-éter etílico 50%) de las raíces de dos plantas del género *Maytenus*.

De las raíces de la especie *Maytenus vitis-idaea* se aislaron:

- ✓ cuatro triterpenos metilénquinonas conocidos: **tingenona (174)**, **escutiona (185)**, **pristimerina (171)** y **celastrol (188)**.
- ✓ También se aislaron cuatro nuevos triterpenos metilénquinonas: **MV3-22 (183)**, **MV3-24 (184)**, **MV5-6-11a (186)** y **MV5-6-11b (187)**.

De las raíces de la especie *Maytenus spinosa* se aislaron:

- ✓ dos triterpenos metilénquinonas presentes en la especie *M. vitis idaea*: **tingenona y escutiona**;
- ✓ un dímero de triterpeno metilénquinona descritos previamente en la bibliografía química: **7,8-dihidroisoxuxuarina E α (189)**;
- ✓ un derivado del lupano: **3-oxolup-20(29)-en-30-al (190)**;
- ✓ dos nuevos triterpenos: uno derivado del oleanano, **A30-8 (191)** y el otro del ursano, **A30-10 (192)**;
- ✓ También se aislaron cuatro alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos conocidos: **euonina (194)**, **horridina (195)**, **cangorinina E-I (197)** y **ebelnifolina E-II (198)**.
- ✓ dos alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos nuevos: **S4-4 (193)** y **S5-12 (196)**.
- ✓ los alcaloides sesquiterpénicos normalmente son encontrados en las hojas de las plantas, asimismo fueron aislados en pequeña cantidad desde las raíces de *M. spinosa*, lo que indica que esos mismos pueden

hallarse en mayor cantidad en las hojas, y eso sería un prometedor indicio para futuros estudios.

- ✓ Este trabajo fue una contribución para el estudio de especies autóctonas de Argentina. Los resultados de este tipo de estudios aportan más datos para la preservación de la biodiversidad

- ✓ La aparición de nuevos tipos de estructuras y agrupamientos funcionales después de 20 años de estudio sobre la familia Celastraceae, renueva el interés por el estudio de los metabolitos secundarios aislados de dicha familia, y permite tener idea acerca del posible uso de estas especies como fuentes de metabolitos secundarios que puedan servir como materia prima para la preparación de derivados semi-sintéticos bioactivos.

PARTE EXPERIMENTAL

Capítulo 4: Parte Experimental

Generalidades

Las rotaciones ópticas fueron determinadas en un polarímetro Perkin-Elmer 141 o Perkin-Elmer 343, empleando una lámpara de sodio ($\lambda = 589 \text{ nm}$), en microceldas de 1 dm de longitud a temperatura ambiente, utilizando el solvente y la concentración que se indica en cada caso.

Los espectros de masas de alta resolución ESI-APCI de los compuestos de *Renilla reniformis* y *Convexella magelhaenica* fueron realizados en UCR *Mass Spectrometry Facility* (Micromass Ultima Global QTOF *high resolution mass spectrometer*) California, EEUU.

Los espectros de masas de alta resolución de los compuestos aislados de *Maytenus* fueron realizados en espectrómetros *VGMicromass ZAB-2F* (a potenciales de ionización de 15-70 eV) y *Fisons Instruments VG Autospec*. (Universidad La Laguna, Tenerife, ES)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C se midieron en un espectrómetro Bruker Avance 2 (500,13 y 125,8 MHz, respectivamente) en UMYMFOR.

Los desplazamientos químicos para RMN en todos los casos se expresaron en la escala δ , en ppm respecto de la resonancia del tetrametilsilano utilizado como referencia interna (0,00 ppm) o el pico central del solvente utilizado según el caso cloroformo- d_1 (7.26 ppm) o metanol- d_4 (3.30 ppm). Las constantes de acoplamiento (J) se expresaron en Hz. Las señales se indicaron en cada caso como singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (c), doble doblete (dd), doble doble doblete (ddd), multiplete (m), singulete ancho (sa), doblete ancho (da) o triplete ancho (ta). Los desplazamientos químicos para RMN- ^{13}C se expresaron en ppm utilizando como referencia el pico central de la señal del cloroformo- d_1 (77.0 ppm) o metanol- d_4 (49.0 ppm).

Los experimentos de RMN-2D fueron adquiridos utilizando secuencias de pulsos estándar.

Todos los solventes empleados fueron purificados por destilación. La evaporación de los mismos fue efectuada a temperaturas menores de 40°C y a

presión reducida en evaporador rotatorio Büchi o en evaporador centrífugo SpeedVac SC210A. Las mezclas de solventes están expresadas en relaciones de volúmenes (v/v).

Procedimientos de Aislamiento

Para las cromatografías en capa delgada se utilizaron las cromatoplasmas de Sílicagel 60 preparadas sobre hojas de aluminio (Merck), espesor 0.2 mm, con indicador de fluorescencia a longitud de onda 254 nm (F254) y cromatoplasmas de Sílicagel modificada de fase reversa C18 preparadas sobre hojas de aluminio (Merck), con indicador de fluorescencia a longitud de onda 254 nm (F254). Esas mismas cromatoplasmas fueron utilizadas para cromatografía en capa preparativa.

Como agentes reveladores se utilizó luz UV ($\lambda = 254$ nm y $\lambda = 366$ nm) y vainillina/H₂SO₄ con posterior calentamiento en estufa a 110°C.

Las cromatografías *flash* en columna seca fueron realizadas en embudos con placa filtrante de vidrio sinterizado de distintos tamaños, con aplicación de succión. Las muestras fueron sembradas en pastillas de sílica gel o sílica RP-18, según el caso. Para extractos lipofílicos se utilizó como fase estacionaria sílicagel 60 G (Merck). Para extractos polares se utilizó como fase estacionaria sílicagel modificada de fase reversa C18 (Aldrich Chemical Co).

Para cromatografía en columna de sílica se usó como adsorbente sílicagel 60 (Merck, 230-400 mesh). Dichas cromatografías fueron realizadas con presión utilizando aire comprimido.

En las cromatografías en gel de Sephadex se utilizó Sephadex LH-20 (Pharmacia, Inc), en columnas de diferentes tamaños, de acuerdo con la cantidad de muestra a sembrar, con MeOH como solvente de armado y eluyente.

Para la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utilizó un cromatógrafo líquido que consta de los siguientes módulos: una bomba Thermo Separations semipreparativa SpectraSeries P100, un detector UV Thermo Separations SpectraSeries UV 100, de longitud de onda variable y un detector de índice de refracción Thermo Separations Refractomonitor IV conectados en serie, con inyector manual del tipo Rheodyne. Las columnas utilizadas para las

separaciones fueron: YMC Rp 18 (20 x 250 mm) acoplada a una precolumna YMC Rp 18 (20 x 50 mm) e YMC Rp 18 (10 x 250 mm) acoplada a una precolumna YMC Rp 18 (10 x 30 mm). El tamaño de partícula de fase estacionaria utilizado en ambas columnas fue de 5 µm. Los solventes utilizados en esta instancia fueron comerciales grado HPLC (Merck o Riedel de Haën) o bidestilados. Todos fueron filtrados a través de membranas de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro. Las muestras fueron filtradas a través de minicolumnas de fase reversa Sep-Pak® C18 (Waters).

Aislamiento de compuestos de *Renilla reniformis*

El coral *Renilla reniformis* fue recolectado mediante redes de profundidad, a una profundidad de 90-100 m en del Golfo de San Jorge por personal del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP- Mar del Plata). El material fue clasificado por la Dra. Ana Roux (INIDEP- Mar del Plata) y fue congelado y almacenado a temperatura de -20°C hasta su transporte al laboratorio de química.

Extracción y fraccionamiento

El coral congelado fue liofilizado rindiendo 275g en peso seco, luego fue extraído con AcOEt (2 x 1L) seguido de EtOH (2 x 1L). Los extractos fueron combinados y concentrados en el rotavapor hasta obtener una suspensión acuosa, con la que se realizó una partición entre ciclohexano y metanol:agua (9:1). De dicha partición se obtuvo un subextracto lipofílico (RL = 7.22g) y un subextracto polar (RP = 5.41g). El subextracto polar fue posteriormente fraccionado por cromatografía flash de columna seca de fase Rp-18 utilizando un gradiente H₂O-MeOH como sistema de elución. Se obtuvieron cinco fracciones de 300 mL cada una (**RP1–RP5**) utilizándose las siguientes composiciones de eluyentes: MeOH:H₂O (50:50) (**RP1** = 0.12g); MeOH:H₂O (60:40) (**RP2** = 0.07g); MeOH:H₂O (70:30) (**RP3** = 0.10g); MeOH:H₂O (80:20) (**RP4** = 0.09g); MeOH (100 %) (**RP5** = 0.22g). La fracción **RP3** fue preparada para ser purificada por cromatografía líquida de alta resolución, mediante una columna de fase reversa Rp-18, en corrida isocrática con mezcla

acetonitrilo:H₂O (50%), con un flujo de elución de 2 mL/min. De dicha columna se aislaron tres compuestos: **RP3-13 (136)**; $T_r = 0.75\text{h}$; 2.1 mg), **RP3-22 (137)**; $T_r = 1.6\text{h}$; 1.1 mg) y **RP3-27 (138)**; $T_r = 2.6\text{h}$; 5.7 mg). Los dos últimos compuestos presentaban $R_f \sim 0.8$ en CCD en CH₂Cl₂:MeOH (20:1), no presentaban fluorescencia en UV y eran visualizados en CCD por revelado con vainillina/ H₂SO₄ (revelaban de color marrón y violeta, respectivamente).

Propiedades físicas de los compuestos aislados de *Renilla*

RP3-13 (136): (0.0021g) C₁₃H₂₄O₃; aceite incoloro. $[\alpha]_D^{25} - 39.07^\circ$ (c= 1.05, CHCl₃); EI-EM⁺ (AR): 213 (7), 195 (1), 173 (8), 154 (98), 144 (39), 126 (11), 113 (10), 109 (50), 86 (84), 68 (93), 54 (77), 40 (100). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) y RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tabla 3**.

Tabla 3: Datos de RMN ¹H y ¹³C para RP3-13 (Cl₃CD; 500 MHz, *J* en Hz)

RP3-13						
C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J)	C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J)	
1	178.5	-	8	37.3	1.46, <i>m</i> , 2H	
2	41.3	2.14, <i>dd</i> (8.0 y 14.5), 1H 2.33, <i>dd</i> (6.0 y 14.5), 1H	9	25.6	1.33, <i>m</i> , 1H 1.46, <i>m</i> , 1H	
3	30.0	1.96, <i>m</i> , 1H	10	27.8	1.33, <i>m</i> , 1H 1.46, <i>m</i> , 1H	
4	36.5	1.22, <i>m</i> , 1H 1.38, <i>m</i> , 1H	11	22.7	1.33, <i>m</i> , 1H 1.38, <i>m</i> , 1H	
5	26.9	1.38, <i>m</i> , 1H 1.32, <i>m</i> , 1H	12	14.0	0.90, <i>t</i> (7.0), 3H	
6	37.1	1.4, <i>m</i> , 2H	13	19.7	0.96, <i>d</i> (6.7), 3H	
7	72.0	3.60, <i>m</i> , 1H				

RP3-22 (137): (0.0011g) sólido blanco amorfo. $[\alpha]_D^{25} - 36.24^\circ$ (c=0.05, CHCl₃); ESI-APCI de alta resolución: [MNa⁺] *m/z* 593.2117 (calculado para C₂₈H₃₉O₁₀Cl 593.2129); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) y RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tabla 4**.

RP3-27 (138): (0.0057g) cristales incoloros. $[\alpha]_D^{25} - 28.17^\circ$ (c=2.85, CHCl₃); ESI-APCI de alta resolución: [MNa⁺] *m/z* 543.2556 (calculado para C₂₈H₄₀O₉ 543.2570); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) y RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tabla 4**.

Tabla 4: Datos de RMN ^1H y ^{13}C para los briaranos RP3-22 y RP3-27 (Cl_3CD ; 500 MHz, J en Hz).

C	RP3-22		RP3-27	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J)
1	43.3	-	44.4	-
2	72.2	5.88, <i>s.a.</i> , 1H	74.6	4.96, <i>d</i> (7.8), 1H
3	28.2	1.65, <i>m</i> , 1H 2.58, <i>m</i> , 1H	31.9	2.55, <i>m</i> , 1H 1.60, <i>m</i> , 1H
4	33.6	2.43, <i>d.a.</i> , 1H 2.37, <i>d</i> (14.0), 1H	28.6	2.55, <i>m</i> , 2 H
5	no	-	148.1	-
6	52.6	4.65, <i>s.a.</i> , 1H	117.0	5.36, <i>s.a.</i> , 1H
7	81.3	4.53 <i>s.a.</i> , 1H	70.1	5.97, <i>s.a.</i> , 1H
8	81.4	-	81.6	-
9	77.0	5.96, <i>s.a.</i> , 1H	78.4	5.36, <i>s.a.</i> , 1H
10	43.1	3.05, <i>s.a.</i> , 1H	40.4	2.81, <i>s.a.</i> , 1H
11	59.4	-	134.4	-
12	58.9	2.92, <i>d</i> (1.0), 1H	120.8	5.42, <i>s</i> , 1H,
13	27.6	2.25, <i>m</i> , 1H 2.10, <i>m</i> , 1H	26.7	2.24, <i>m</i> , 1H 1.78, <i>m</i> , 1H
14	71.8	4.90, <i>d</i> (7.0), 1H	73.1	4.79, <i>s</i> , 1H
15	13.8	1.11, <i>s</i> , 3H	14.4	0.98, <i>s.a.</i> , 3 H
16	121.3	5.80, <i>s.a.</i> , 1H 5.47, <i>s.a.</i> , 1H	27.6	2.01, <i>s.a.</i> , 3 H
17	51.8	3.10, <i>m</i> , 1H	43.6	2.50, <i>m</i> , 1H
18	6.1	1.30, <i>d</i> (7.0), 3H	7.1	1.30, <i>d</i> (7.0), 1H
19	174.7	-	176.1	-
20	22.2	1.29, <i>s</i> , 3H	24.4	1.96, <i>s.a.</i> , 3 H
ButO-14	173.0	-	173.5	-
	36.3	2.17 / 2.2, <i>m</i> , 2H	36.4	2.20, <i>m</i> , 2H
	17.7	1.57, <i>m</i> , 2H	18.0	1.57, <i>m</i> , 2H
	13.6	0.90, <i>t</i> (8.0), 3H	13.6	0.91, <i>t</i> (8.0), 3H
AcO-2	170.0	-	170.5	-
	21.3	2.00, <i>s</i> , 3H	21.2	2.17, <i>s</i> , 3H
AcO-9	169.0	-	169.8	-
	21.2	2.28, <i>s</i> , 3H	21.1	2.02, <i>s</i> , 3H

Aislamiento de compuestos del coral *Convexella magelhaenica*

El coral *Convexella magelhaenica* fue recolectado mediante rastras, como fauna acompañante en el banco de vieyras denominado “Tango 1” con coordenadas: 38°20,31'S, 55°40,35'W, y a una profundidad de 93 m por personal del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP-Mar del Plata). El material fue congelado y almacenado a temperatura de -20° C hasta su transporte al laboratorio de química. Su identificación fue realizada por el Dr. Carlos Daniel Pérez (UFPE, Brasil).

Extracción y fraccionamiento

El coral congelado fue liofilizado rindiendo 15g en peso seco, luego fue extraído con AcOEt (4 x 200mL) seguido de EtOH (2 x 200mL). Los extractos fueron combinados y concentrados en rotavapor hasta obtenerse un aceite amarillento que fue fraccionado por cromatografía flash en columna seca en sílica gel con las siguientes composiciones de eluyentes: ciclohexano 100% (**CB1** = 0.006g), AcOEt 100% (**CB2** = 0.06g), MeOH 100% (**CB3** = 0.15g). La fracción **CB2** fue percolada por un cartucho de fase reversa RP-18 con metanol, para luego ser purificada por cromatografía líquida de alta resolución, en la que se utilizó una columna de fase reversa Rp-18, en corrida isocrática con mezcla MeOH:H₂O (90:10), con un flujo de elución de 2 mL/min. De dicha columna se aislaron dos compuestos **CB2A** (**142**; T_r = 0.08h; 1 mg), **CB2D** (**143**; T_r = 0.4h; 15 mg). Ambas fracciones fueron posteriormente purificadas por CCD preparativa desarrollada con CH₂Cl₂. Los compuestos CB2A y CB2D eran observados en CCD como manchas que presentaban absorción en UV 254nm en los R_f~ 0.2 y R_f~ 0.5 en CH₂Cl₂, respectivamente. No revelaban con vainillina/ H₂SO₄.

Propiedades físicas de los compuestos aislados de *Convexella magelhaenica*

CB2A (142): (0.001g) aceite incoloro; ESI-APCI de alta resolución: [MNa⁺] m/z 425.2298 (calculado para C₂₄H₃₄O₅Na 425.2304); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) y RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tabla 5**.

CB2D (143): (0.015g) aceite incoloro; $[\alpha]_D^{25} - 23.42^\circ$ ($c=7.50$, CHCl_3); ESI-APCI de alta resolución: $[\text{MH}^+]$ m/z 287.2370 (calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$ 287.2375); RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) y RMN ^{13}C (125.8 MHz, CDCl_3): **Tabla 5.**

Tabla 5: Datos de RMN ^1H y ^{13}C para los dolabellanos CB2A y CB2B (Cl_3CD ; 500 MHz, J en Hz).

C	CB2A		CB2D	
	C (δ)	H (δ , J, Int.)	C (δ)	H (δ , J, Int.)
1	47.2	-	45.1	-
2	79.3	5.21, <i>d</i> (7.0), 1H	42.3	2.23, <i>m</i> , 1H 1.74, <i>d</i> (13.0), 1H
3	123.6	4.90, <i>d</i> (7.0), 1H	124.7	5.24, <i>dd</i> (12.0 y 2.0), 1H
4	136.8	-	135.5	-
5	38.9	2.25, <i>m</i> , 2H	39.3	2.33, <i>m</i> , 1H 2.23, <i>m</i> , 1H
6	24.37	2.49, <i>m</i> , 2H 2.29, <i>m</i> , 2H	23.9	2.41, <i>m</i> , 1H 2.22, <i>m</i> , 1H
7	142.9	6.09, <i>dd</i> , (11.0 y 4.5)	141.2	6.01, <i>dt</i> (11.0 y 1.0), 1H
8	136.4	-	134.7	-
9	204.7	-	207.5	-
10	41.6	3.11, <i>dd</i> (13.0 y 9.0) 2.18, <i>d</i> (13.0)	45.3	2.96, <i>dd</i> (13.0 y 3.0), 1H 2.01, <i>dd</i> (13.0 y 9.0), 1H
11	39.8	2.18 <i>dd</i> (10.0 y 9.0)	46.1	1.68, <i>td</i> (9.3 y 6.0), 1H
12	61.5	2.36, <i>t</i> (10)	58.3	2.15, <i>m</i> , 1H
13	74.0	5.11, <i>td</i> (10/7)	43.3	1.59, <i>m</i> , 1H 1.43, <i>m</i> , 1H
14	44.6	2.09, <i>dd</i> (7.0 y 13.0) 1.44, <i>dd</i> (9.0 y 13.0)	30.5	1.58, <i>m</i> , 1H 1.43, <i>m</i> , 1H
15	23.5	1.07, <i>s</i> , 3H	23.6	1.02, <i>s</i> , 3H
16	17.0	1.72, <i>s</i> , 3H	15.3	1.55, <i>s</i> , 3H
17	12.2	1.74, <i>s</i> , 3H	12.2	1.65, <i>s</i> , 3H
18	142.5	-	146.5	-
19	114.9	4.86, <i>s</i> , 1H 4.88, <i>ta</i> (1.5), 1H	111.1	4.68, <i>s</i> , 2H
20	18.6	1.71, <i>s</i> , 3H	20.3	1.61, <i>s</i> , 3H
Ac-2	170.3	-	-	-
	21.3	2.16, <i>s</i> , 3H		
Ac-13	170.8	-	-	-
	21.01	1.98, <i>s</i> , 3H		

Aislamiento de compuestos de *Maytenus vitis-idaea*

El material vegetal de raíces de *M. vitis-idaea* proveniente de la provincia de La Rioja, fue colectado por el Dr. Juan Carlos Oberti (UNC). Fue realizada una extracción con éter etílico:ciclohexano (1:1), partiendo de 375g de raíz seca.

4.2.1.1. Extracción y fraccionamiento

El extracto crudo fue previamente separado de un látex (0.7g) por medio de una precipitación en CH₂Cl₂. El extracto resultante fue concentrado en rotavapor y su extracto seco (2.9 g) fue fraccionado por cromatografía *flash* en columna seca de sílica utilizando un gradiente de solventes de polaridad creciente: ciclohexano 100% (**MV1**), ciclohexano:AcOEt (95:5) (**MV2**), ciclohexano: AcOEt (80:20) (**MV3**), ciclohexano: AcOEt (70:30) (**MV4**), ciclohexano: AcOEt (50:50) (**MV5**), AcOEt 100% (**MV6**), MeOH 100% (**MV7**).

La fracción **MV3** (250 mg) fue filtrada y purificada por cromatografía líquida de alta resolución, en una columna de fase reversa Rp-18, en corrida isocrática con mezcla acetonitrilo:H₂O (85:15) y flujo de elución de 5 mL/min. De dicha columna se aislaron cinco compuestos: **MV3-11** (**185**; $T_r = 0.41\text{h}$; 30 mg), **MV3-13** (**174**; $T_r = 0.42\text{h}$; 24 mg), **MV3-22** (**183**; $T_r = 1\text{h}$; 20 mg), **MV3-24** (**184**; $T_r = 1.2\text{h}$; 5.2 mg), **MV3-26** (**171**; $T_r = 1.6\text{h}$; 11 mg).

La fracción **MV5** (950 mg) fue fraccionada en una columna de Sephadex LH-20 (4 cm x 80 cm, colectando 14 fracciones de 150mL), usando MeOH como solvente de elución. Las fracciones 6 y 7 originadas de la columna de Sephadex fueron combinadas originando la fracción **MV5-6** (280 mg). Dicha fracción fue percolada en un cartucho de fase reversa RP-18 con metanol y posteriormente purificada por cromatografía líquida de alta resolución, en la que se utilizó una columna de fase reversa Rp-18, en corrida isocrática con mezcla MeOH:H₂O (85%), con un flujo de elución de 4 mL/min. De dicha columna se aisló un compuesto puro, **MV5-6-38** (**188**; $T_r = 0.2\text{h}$, 11 mg), y una fracción a $T_r = 0.3\text{h}$ que fue cromatografiada en CCD preparativa (sv. CH₂Cl₂:MeOH, 20:1) de donde se aislaron dos compuestos: **MV5-6-11A** (**186**; 2.3 mg) y **MV5-6-11B** (**187**; 1.7 mg).

Propiedades físicas de los compuestos aislados de *M. vitis-idaea*

MV3-11 = S8A (escutiona, 185): Sólido rojo intenso amorfo, C₂₈H₃₄O₃.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): 7.17 (1H, d, J = 7 Hz, H6), 6.59 (1H, s, H1), 6.25 (1H, d, J = 7 Hz, H7), 2.70 (1H, d, J = 14 Hz, H22), 2.46 (1H, m, H20), 2.25 (3H, s, Me-23), 2.23 (1H, m, H12), 2.11 (1H, m, H16), 1.99 (1H, m, H22), 1.97 (1H, m, H11), 1.93 (1H, m, H16), 1.9 (1H, m, H18), 1.85 (1H, m, H11), 1.75 (1H, m, H18), 1.7 (3H, s, Me-26), 1.25 (3H, s, Me-25), 1.09 (3H, d, J = 7 Hz, Me-30), 1.01 (3H, s, Me-27), 0.97 (3H, s, Me-28).

RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): 214.0 (C21), 178.1 (C2), 159.7 (C10), 158.5 (C8), 146.3 (C3), 134.4 (C6), 128.1 (C5), 120.0 (C1), 122.1 (C7), 116.8 (C4), 49.8 (C22), 135.5 (C14), 47.8 (C18), 44.2 (C9), 41.7 (C20), 42.0 (C13), 28.5 (C25), 36.3 (C17), 45.5 (C16), 35.9 (C11), 30.2 (C28), 37.7 (C19), 31.8 (C12), 127.9 (C15), 21.3 (C26), 23.1 (C27), 16.0 (C30), 10.4 (C23).

MV3-13 = S8B (tingenona, 174): Sólido rojo anaranjado amorfo, C₂₈H₃₆O₃.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): 7.0 (1H, d, J = 7 Hz, H6), 6.54 (1H, s, H1), 6.37 (1H, d, J = 7 Hz, H7), 2.90 (1H, d, J = 14 Hz, H22), 2.49 (1H, m, H20), 2.25 (1H, m, H11), 2.22 (3H, s, Me-23), 2.0 (1H, m, H11), 1.9 (1H, m, H16), 1.85 (1H, m, H22), 1.8 (4H, m, H12, H19), 1.6 (3H, m, H18, H15), 1.50 (3H, s, Me-25), 1.45 (1H, m, H16), 1.34 (3H, s, Me-26), 1.0 (3H, s, Me-28), 0.99 (3H, d, J = 6.1 Hz, Me-30), 0.97 (3H, s, Me-27).

RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): 213.6 (C21), 178.4 (C2), 168.7 (C8), 164.7 (C10), 146.0 (C3), 134.4 (C6), 127.9 (C5), 119.7 (C1), 118.3 (C7), 117.3 (C4), 52.6 (C22), 44.7 (C14), 43.5 (C18), 42.7 (C9), 42.0 (C20), 40.6 (C13), 39.0 (C25), 38.2 (C17), 35.5 (C16), 33.8 (C11), 32.5 (C28), 32.0 (C19), 30.0 (C12), 28.5 (C15), 21.6 (C26), 19.7 (C27), 15.1 (C30), 10.3 (C23).

MV3-22 (183): (0.0208g) Sólido rojo amorfo; HRMS-EI⁺ [M⁺] *m/z*: 462.2693 (calculado para C₃₀H₃₈O₄ 462.2770); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): **Tabla 7**; RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tabla 6**.

MV3-24 (184): (0.0052g) Sólido rojo anaranjado amorfo; [α]_D²⁵ -53.6° (c=2.60, CHCl₃); HRMS-EI⁺ [M⁺] *m/z*: 462.2777 (calculado para C₃₀H₃₈O₄ 462.2770); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): **Tabla 7**; RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tabla 6**.

MV3-26 (171): (0.0110g) Sólido rojo anaranjado amorfo; HRMS-EI⁺ [M⁺] *m/z*: 464.2672 (calculado para C₃₀H₄₀O₄ 464.2926); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): **Tabla 7**; RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tabla 6**.

MV5-6-11A (186): (0.0023g) Sólido rojo amorfo; [α]_D²⁵ -64.78° (c=1.15, CHCl₃); HRMS-EI⁺ [M⁺] *m/z*: 434.2188 (calculado para C₂₈H₃₄O₄ 434.2457); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): **Tabla 9**; RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tabla 8**.

MV5-6-11B (187): (0.0017g) Sólido rojo anaranjado amorfo; [α]_D²⁵ -91.64° (c=0.85, CHCl₃); HRMS-EI⁺ [M⁺] *m/z*: 436.2417 (calculado para C₂₈H₃₄O₄ 436.2613); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): **Tabla 9**; RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tabla 8**.

MV5-6-38 (celastrol, 188): (0.0110g) Sólido rojo amorfo; HRMS-EI⁺ [M⁺] *m/z*: 450.2444 (calculado para C₂₈H₃₄O₄ 450.2770); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): **Tabla 9**; RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tabla 8**.

Tabla 6: Datos de RMN ^{13}C para MV3-22, MV3-24 y MV3-26 (Cl_3CD ; 500 MHz, J en Hz).

Maytenus vitis-idaea

nC	MV3-22 (δ)	MV3-24 (δ)	MV3-26 (δ)
C-1	119.8	119.7	119.7
C-2	178.0	178.1	178.4
C-3	146.2	146.0	146.0
C-4	116.7	116.9	116.9
C-5	127.5	127.5	127.5
C-6	134.8	135.3	134.1
C-7	121.5	117.9	118.1
C-8	160.0	165.7	170.1
C-9	44.5	43.0	43.0
C-10	159.7	164.6	164.8
C-11	37.5	34.2	33.6
C-12	35.6	27.5	29.9
C-13	43.1	40.2	39.4
C-14	135.3	47.2	45.1
C-15	128.3	129.4	28.6
C-16	37.7	133.7	36.4
C-17	33.7	33.7	30.5
C-18	43.9	42.5	44.3
C-19	33.9	30.6	30.9
C-20	42.6	40.9	40.4
C-21	28.6	29.4	29.7
C-22	36.1	32.3	34.8
C-23	10.3	10.3	10.3
C-25	29.4	37.2	38.3
C-26	21.9	28.8	21.6
C-27	23.9	18.0	18.3
C-28	31.4	27.4	28.8
C-29	179.3 / 51.8	178.3 / 51.5	178.7 / 51.6
C-30	19.7	31.2	32.7

Tabla 7: Datos de RMN ^1H y para MV3-22, MV3-24 y MV3-26 (Cl_3CD ; 500 MHz, J en Hz).

Maytenus vitis-idaea

H	MV3-22 δ (J)	MV3-24 δ (J)	MV3-26 δ (J)
H-1	6.5, s, 1H	6.55, s, 1H	6.55, s, 1H
H-6	7.17, d, (7.0), 1H	7.04, d, (7.0), 1H	7.01, d, (7.0), 1H
H-7	6.15, d, (7.0), 1H	6.57, d, (7.0), 1H	6.34, d, (7.0), 1H
H-11	1.92, m, 2H	2.19, m, 1H 1.92, m, 1H	2.16 d (14/3) 1.85 (5) o 1.65
H-12	2.53, td, (9.0 y 15.0), 1H 1.29, m, 1H	1.77, m, 2H	1.78, m, 1H 1.67, m, 1H
H-15	-	6.15, d, (10.0), 1H	1.56, m, 2H
H-16	2.6, d, (15.0), 1H 1.24, m, 1H	5.28, d, (10.0), 1H	1.50, dd, (4.0 y 15.0), 1H 1.86, dd, (5.0 y 15.0), 1H
H-18	1.41, d, (10.0), 1H	1.94, d, (8.0), 1H	1.58, d, (8.0), 1H
H-19	1.65, d, (15.0), 1H 1.53, dd, (10.0 y 15.0), 1H	2.51, d, (15.0), 1H 1.63, dd, (8.8 y 15.0), 1H	2.42, d, (15.0), 1H 1.69, dd, (8.0 y 15.0), 1H
H-21	1.44, d, (15.0), 1H 1.87, m, 1H	2.16, d, (15.0), 1H 1.32, dd, (9.0 y 15Hz), 1H	1.38, m, 2H
H-22	1.6, dd, (7.0 y 15.0), 1H 1.3, m, 1H	1.93, d, (15Hz), 1 H 1.17, dd, (10.0 y 15.0), 1H	2.05, dt, (4.0 y 14.0), 1H 0.97, d, (14.0), 1H
Me-23	2.25, s, 3H	2.21, s, 3H	2.21, s, 3H
Me-25	1.27, s, 3H	1.42, s, 3H	1.45, s, 3H
Me-26	1.71, s, 3H	1.40, s, 3H	1.26, s, 3H
Me-27	0.80, s, 3H	0.48, s, 3H	0.53, s, 3H
Me-28	1.20, s, 3H	1.12, s, 3H	1.09, s, 3H
OMe	3.67, s, 3H	3.58, s, 3H	3.55, s, 3H
Me-30	1.21, s, 3H	1.21, s, 3H	1.17, s, 3H
OH			6.96 s.a.

Tabla 8: Datos de RMN ^{13}C para MV5-6-11a, MV5-6-11b y MV5-6-38 (Cl_3CD ; 500 MHz, J en Hz).

Maytenus vitis-idaea

nC	MV5-6-11a (δ)	MV5-6-11b (δ)	MV5-6-38 (δ)
C-1	120.0	119.8	120.6
C-2	178.0	178.3	178.3
C-3	146.2	146.1	147.0
C-4	116.7	117.5	120.6
C-5	127.8	128.4	127.5
C-6	134.3	132.1	135.4
C-7	121.8	118.5	118.2
C-8	158.5	164.9	172.7
C-9	44.5	42.9	43.0
C-10	159.6	164.2	165.0
C-11	37.2	32.5	33.7
C-12	36.0	31.1	29.2
C-13	42.3	37.5	39.2
C-14	136.8	49.5	45.3
C-15	128.5	73.0	28.7
C-16	40.4	41.4	36.3
C-17	39.7	39.1	30.6
C-18	43.6	43.6	44.2
C-19	40.6	31.9	31.0
C-20	75.0	41.8	39.8
C-21	213.0	213.6	29.4
C-22	50.0	54.1	34.4
C-23	10.3	10.3	10.4
C-25	29.5	40.9	38.3
C-26	22.0	28.5	21.4
C-27	23.6	32.8	18.6
C-28	30.3	23.6	31.4
C-29	-	-	182.5
C-30	24.7	15.0	32.3

Tabla 9: Datos de RMN ^1H para MV5-6-11a, MV5-6-11b y MV5-6-38 (Cl_3CD ; 500 MHz, J en Hz).

Maytenus vitis-idaea

H	MV5-6-11A δ (J)	MV5-6-11B δ (J)	MV5-6-38 δ (J)
H-1	6.58, s, 1H	6.53, s, 1H	6.48, s, 1H
H-6	7.15, d, (7.0), 1H	7.0, d, (7.0), 1H	7.06, d, (7.0), 1H
H-7	6.18, d, (7.0), 1H	6.51, d, (7.0), 1H	6.31, d, (7.0), 1H
H-11	1.92, m, 2H	2.13, m, 2H	2.12, m, 1H 1.80, m, 1H
H-12	2.32, m, 1H 1.40, m, 2H	1.89, m, 1H 1.81, m, 1H	1.64, d, (13.0 y 4.0), 1H 1.86, m, 1H
H-15	-	4.38, s.a, 1H	1.58, m, 1H 1.52, m, 1H
H-16	2.26, d, (15.0), 1H 1.62, d, (15.0), 1H	2.12, d, (15.0), 1H 1.70, d.a., (15.0), 1H	1.84, m, 1H 1.46, m, 1H
H-18	1.92, m, 1H	1.75, s, 1H	1.56, d, (8.0), 1H
H-19	2.07, dd, (15.0 y 9.0), 1H 1.70, dd, (15.0 y 3.0), 1H	2.24, m, 1H 1.79, d, (14.0), 1H	1.73, dt, (15.0 y 7.0), 1H 2.50, d, (15.0), 1H
H-20	-	2.58, m, 1H	-
H-21	-	-	2.25, d, (14.0), 1H 1.34, d, (14.0 y 4.0), 1H
H-22	2.81, d, (13.0), 1H 2.18, m, 1H	3.46, d, (14.0), 1H 1.97, d, (14.0), 1H	2.10, m, 1H 0.93, d, (13.0), 1H
H-23	2.25, s, 3H	2.22, s, 3H	2.20, s, 3H
H-25	1.26, s, 3H	1.53, s, 3H	1.42, s, 3H
H-26	1.76, s, 3H	1.31, s, 3H	1.24, s, 3H
H-27	0.87, s, 3H	1.01, s, 3H	0.56, s, 3H
H-28	1.22, s, 3H	1.26, s, 3H	1.08, s, 3H
H-30	1.30, s, 3H	1.00, s, 3H	1.27, s, 3H
OH	7.05, s.a., 1H	6.94, s.a., 1H	

Aislamiento de compuestos de *Maytenus spinosa*

Las raíces de *Maytenus spinosa* fueron colectadas a 40 km de la ciudad de Salta, camino a Cafayate en diciembre 2006 por el Dr. Juan Carlos Oberti (Universidad Nacional de Córdoba). Los ejemplares fueron identificados por el Prof. Lázaro J. Novara de la Universidad Nacional de Salta. El material vegetal fue secado y extraído con una mezcla éter etílico:ciclohexano (1:1), partiendo de 400g de raíces.

Extracción y fraccionamiento

El extracto obtenido fue concentrado en rotavapor y su extracto seco (2.8g) fue posteriormente fraccionado por cromatografía *flash* en columna seca de fase Rp-18 utilizando un gradiente MeOH-H₂O como sistema de elución. Se obtuvieron tres fracciones de 300 mL cada una, **May1** (0.2 g), **May2** (0.6 g) y **May3** (2.0 g), utilizándose las siguientes composiciones de eluyentes, respectivamente: MeOH:H₂O (60:40), MeOH:H₂O (80:20) y MeOH (100 %).

La fracción **May2** (300 mg) fue fraccionada posteriormente en una columna de Sephadex LH-20 (4 cm x 80 cm, colectando 30 fracciones de 200mL), usando MeOH como solvente de elución. Las fracciones colectadas fueron analizadas por CCD y combinadas según su semejanza, lo que originó un total de 9 subfracciones (**S1-S9**).

La subfracción **S4** fue preparada en una minicolumna de sílica, desarrollada con CH₂Cl₂:AcOEt (10:1), para ser posteriormente purificada por cromatografía líquida de alta resolución, en la que se utilizó una columna de fase reversa Rp-18, en corrida isocrática con mezcla MeOH:H₂O (70%), con un flujo de elución de 2.5 mL/min. De dicha columna se aisló un compuesto, **S4-4 (193; T_r = 0.4h; 1.5 mg)**. La fracción **S5** fue filtrada y purificada por cromatografía líquida de alta resolución, en una columna de fase reversa Rp-18, en corrida isocrática con mezcla MeOH:H₂O (70%) y flujo de elución de 2.5 mL/min. De dicha columna se aislaron cinco compuestos: **S5-9 (194; T_r = 0.43h; 1.1 mg)**, **S5-11 (195; T_r = 0.45h; 1.5 mg)**, **S5-12 (196; T_r = 0.5h; 0.9 mg)**, **S5-13 (197; T_r = 0.6h; 2.8 mg)**, **S5-16 (198; T_r = 1h; 1 mg)**.

La fracción **S8** fue filtrada y purificada por cromatografía líquida de alta resolución, en una columna de fase reversa Rp-18, en corrida isocrática con mezcla MeOH:H₂O (80%) y flujo de elución de 2.5 mL/min y se aislaron los compuestos **S8-A**(**185**; 11 mg) y **S8-B** (**174**; 9 mg), anteriormente aislados de *Maytenus vitis-idaea* (**MV3-11** y **MV3-13**), que corresponden a la escutiona y a la tingenona, respectivamente (**ver página 240**).

La fracción **MAY3** (2.0 g) fue fraccionada en una columna de Sephadex LH-20 (4 cm x 80 cm, colectadas 13 fracciones de 100 mL), usando MeOH como solvente de elución. Las fracciones fueron analizadas por CCD y combinadas según su semejanza, lo que resultó en un total de cuatro subfracciones. (**MAY-A, B, C y D**).

La subfracción de mayor masa, **MAY3-A** (0.84 g) fue fraccionada en una columna de sílica (0.04-0.063 μ m) utilizando un gradiente de solventes: CH₂Cl₂ (fracción 1-13), CH₂Cl₂:AcOEt (20:1) (fracción 13-27), CH₂Cl₂:AcOEt (10:1) (fracción 27-37), CH₂Cl₂:AcOEt (5:1)(fracción 38-50), MeOH (fracción 51). Las fracciones fueron analizadas por CCD de forma que se pudo combinar las fracciones 26-29, 30-36 y 39-45, que fueron denominadas **A26**, **A30** y **A39**, respectivamente.

La fracción **A26** (0.02g) fue preparada para ser purificada por cromatografía líquida de alta resolución, en una columna de fase reversa Rp-18, en corrida isocrática con MeOH y flujo de elución de 2.5 mL/min. Se pudo aislar el compuesto **A26-7** (**190**, $T_r = 1.2$ h; 2.8 mg).

La fracción **A30** (0.03g) fue preparada para ser purificada por cromatografía líquida de alta resolución, en una columna de fase reversa Rp-18, en corrida isocrática con MeOH:H₂O (98%) y flujo de elución de 2.5 mL/min. Se aislaron los compuestos **A30-8** (**191**, $T_r = 0.83$ h; 8 mg) y **A30-10** (**192**, $T_r = 1$ h; 6.2 mg).

La fracción **A39** (0.1g) fue preparada para ser purificada por cromatografía líquida de alta resolución, en una columna de fase reversa Rp-18, (columna de 20 x 250 mm) en corrida isocrática con MeOH:H₂O (98%) y flujo de elución de 6 mL/min. Se aisló el compuesto **A39-26** (**189**, $T_r = 4$ h; 10 mg).

Propiedades físicas de los triterpenos de *M. spinosa*

A39-26 (189): Sólido amarillo amorfo; RMN ^{13}C y ^1H (500 MHz, CDCl_3): **Tabla 10.**

A26-7 (190): (0.0028g) Sólido blanco amorfo; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -17.50^\circ$ ($c=1.40$, CHCl_3); HRMS-EI $^+$ [M $^+$] m/z: 438.3130 (calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_2$ 438.3497); RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) y RMN ^{13}C (125.8 MHz, CDCl_3):

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): 0.83 (3H, s, Me-28), 0.92 (3H, s, Me-25), 0.94 (3H, s, Me-27), 1.02 (3H, s, Me-24), 1.05 (3H, s, Me-26), 1.07 (3H, s, Me-23), 1.89 (1H, *m*, H-1a), 2.39 (1H, *m*, H-2b), 2.46 (1H, *m*, H-2a), 2.75 (1H, *m*, H-19), 5.91 (1H, s, H-29a), 6.29 (1H, s, H-29b), 9.52 (1H, s, H-30).

RMN ^{13}C (125.8 MHz, CDCl_3): 14.3 (CH_3 -27), 15.8 (CH_3 -26), 15.9 (CH_3 -25), 17.8 (CH_3 -28), 19.6 (CH_2 -6), 21.0 (CH_3 -24), 21.4 (CH_2 -11), 26.6 (CH_3 -23), 27.3 (CH_2 -15), 27.6 (CH_2 -12), 33.5 (CH_2 -21), 34.1 (CH_2 -2), 35.3 (CH_2 -16), 36.9 (C-10), 37.9 (C-13), 39.6 (CH_2 -1), 39.9 (CH_2 -22), 40.7 (C-8), 42.7 (C-14), 43.3 (C-4), 47.3 (CH-18,19), 49.6 (CH-9), 54.9 (CH-5), 133.1 (CH_2 -22), 157.2 (C-20), 195.1 (OCH-30), 217.9 (OC-3), .

A30-8 (191): (0.008g) aceite amarillo; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +35.52^\circ$ ($c=4.00$, CHCl_3); HRMS-EI $^+$ [M $^+$] m/z: 454.3942 (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_4$ 454.3811); RMN ^{13}C y ^1H (500 MHz, CDCl_3): **Tabla 11.**

A30-10 (192): (0.0062g) aceite amarillento; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 13.82^\circ$ ($c=3.10$, CHCl_3); HRMS-EI $^+$ [M $^+$] m/z: 454.3796 (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_4$ 454.3811); RMN ^{13}C y ^1H (500 MHz, CDCl_3): **Tabla 11.**

Propiedades físicas de los alcaloides sesquiterpénicos macrocíclicos

S4-4 (193): (0.0015g) sólido blanco amorfo. $[\alpha]_D^{25} -45.3^\circ$ (c= 0.75, CHCl₃);
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) y RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tablas 12 y 13.**

S5-9 (194): (0.0011g) sólido blanco amorfo. $[\alpha]_D^{25} -128.0^\circ$ (c= 0.55, CHCl₃);
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) y RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tablas 12 y 13.**

S5-11 (195): (0.0015g) sólido blanco amorfo. $[\alpha]_D^{25} -57.73^\circ$ (c= 0.75, CHCl₃);
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) y RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tablas 12 y 13.**

S5-12 (196): (0.0009g) sólido blanco amorfo. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) y
RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tablas 12 y 14.**

S5-13 (197): (0.0028g) sólido blanco amorfo. $[\alpha]_D^{25} -31.43^\circ$ (c= 1.4, CHCl₃);
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) y RMN ¹³C (125.8 MHz, CDCl₃): **Tablas 12 y 14.**

S5-16 (198): (0.001g) sólido blanco amorfo. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): **Tablas 14.**

Tabla 10: Datos de RMN ^{13}C y ^1H para A39-26 (Cl_3CD ; 500 MHz, J en Hz).

RMN ^{13}C en CDCl_3				RMN ^1H en CDCl_3			
C	δ_c	C	δ_c	H	δ , (J)	H	δ , (J)
1	113.0	1'	110.5	H-1	5.96, s, 1H	H-1'	6.95, s, 1H
2	191.5	2'	144.5	H-6	6.32, s, 1H	H-6'	-
3	91.3	3'	138.2	H-7	2.06, <i>m</i> , 1H	H-7'	6.21, s, 1H
4	79.4	4'	129.3		2.21, <i>m</i> , 1H		
5	134.0	5'	123.2				
6	134.1	6'	187.2				
7	24.7	7'	121.2	H-19 α	2.34, d (13.0)	H-19' α	2.45, d (15.8)
8	41.6	8'	171.0	Me-23	1.46, s, 3H	Me-23'	2.25, s, 3H
9	37.4	9'	40.1	Me-25	1.09, s, 3H	Me-25'	1.52, s, 3H
10	170.1	10'	151.7	Me-26	0.97, s, 3H	Me-26'	1.28, s, 3H
11	30.6	11'	34.2	Me-27	0.73, s, 3H	Me-27'	0.60, s, 3H
12	29.4	12'	29.9	Me-28	1.05, s, 3H	Me-28'	1.11, s, 3H
13	38.9	13'	39.0	Me-30	1.16, s, 3H	Me-30'	1.17, s, 3H
14	40.1	14'	44.7	OMe	3.63, s, 3H	OMe'	3.57, s, 3H
15	28.3	15'	28.5				
16	36.0	16'	36.4				
17	30.2	17'	30.5				
18	44.6	18'	44.3				
19	30.5	19'	31.0				
20	40.5	20'	40.5				
21	29.7	21'	29.8				
22	36.0	22'	35.0				
23	22.7	23'	13.3				
25	22.1	25'	37.6				
26	16.0	26'	20.8				
27	16.9	27'	18.5				
28	31.7	28'	31.6				
29	179.0	29'	179.3				
30	32.3	30'	32.9				
OMe	51.7	OMe	51.5				

Tabla 11: Datos de RMN ^{13}C y ^1H para A30-8 y A30-10 (Cl_3CD ; 500 MHz, J en Hz).

		A30-8	A30-10	
nC	δ C	δ H (J)	δ C	δ H (J)
1	40.31	2.29, <i>ddd</i> (4.0/7.0/15.0) 1.65, <i>m</i> , 1H	40.7	1.67, <i>m</i> , 1H 2.3,
2	34.46	2.53, <i>m</i> , 1H 2.39, <i>ddd</i> (4.0/7.0/15.0)	34.4	2.42, <i>m</i> , 1H 2.50, <i>m</i> , 1H
3	219.0	-	218.2	-
4	47.7	-	47.6	-
5	55.5	1.49, <i>m</i> , 1H 1.38, <i>m</i> , 1H	55.3	1.4, <i>m</i> , 2H
6	26.8	2.00, <i>m</i> , 1H 0.80, <i>m</i> , 1H	26.6	0.90, <i>m</i> , 1H 1.77, <i>m</i> , 1H
7	32.95	1.35, <i>dd</i> (7/10) 1.51, <i>m</i> , 1H	31.1	1.28, <i>m</i> , 1H 1.41, <i>m</i> , 1H
8	42.0	-	42.3	-
9	50.36	1.80, <i>d</i> (9.0), 1H	50.8	1.78, <i>d</i> (9.0), 1H
10	42.9	-	39.53	-
11	76.8	3.96, <i>dd</i> , (3.0/9.0), 1H	77.0	3.80, <i>dd</i> , (3.0/9.0), 1H
12	121.0	5.35, <i>d</i> (3.0), 1H	124.1	5.30, <i>d</i> , (3.0), 1H
13	149.0	-	143.3	-
14	37.7	-	37.5	-
15	26.2	1.0, <i>m</i> , 1H 1.7, <i>m</i> , 1H	41.3	1.45, <i>m</i> , 1H 1.30, <i>m</i> , 1H
16	31.1	1.06, <i>m</i> , 2H	27.9	2.02, <i>m</i> , 1H 0.91, <i>m</i> , 1H
17	32.45	-	33.7	-
18	47.2	2.0, <i>m</i> , 1H	58.7	1.39, <i>m</i> , 1H
19	46.4	1.3, <i>m</i> , 1H 1.09, <i>m</i> , 1H	39.3	1.37, <i>m</i> , 2H
20	31.1	-	39.5	0.92, <i>m</i> , 1H
21	34.67	1.35, <i>m</i> , 1H 1.11, <i>m</i> , 1H	39.4	1.35, <i>m</i> , 1H
22	36.9	1.44, <i>m</i> , 1H 1.23, <i>m</i> , 1H	33.1	1.38, <i>m</i> , 1H 1.55, <i>m</i> , 1H
23	26.7	1.10, <i>s</i> , 3H	21.3	1.06, <i>s</i> , 3H
24	21.5	1.06, <i>s</i> , 3H	26.9	1.10, <i>s</i> , 3H
25	16.37	1.15, <i>s</i> , 3H	16.5	1.14, <i>s</i> , 3H
26	18.1	1.05, <i>s</i> , 3H	18.1	1.09, <i>s</i> , 3H
27	25.12	1.21, <i>s</i> , 3H	25.2	1.15, <i>s</i> , 3H
28	28.5	0.83, <i>s</i> , 3H	28.7	0.8, <i>s</i> , 3H
29	23.6	0.89, <i>s</i> , 3H	17.4	0.87, <i>d</i> (6.5), 3H
30	33.24	0.88, <i>s</i> , 3H	21.4	0.92, <i>d.a.</i> , 3H
11- β OMe	53.7	3.24, <i>s</i> , 3H	54.5	3.28

Tabla 12: Datos de RMN ^{13}C y para S4-4, S5-9, S5-11, S5-12 y S5-13 (125.8 MHz, CDCl_3).

Datos de RMN ^{13}C para alcaloides sesquiterpénicos S4-S13

nC	S4	S9	S11	S12	S13
1	72.3	70.6	72.4	71.5	73.3
2	68.6	70.4	68.6	68.6	68.7
3	74.9	75.5	75.3	74.8	75.7
4	69.9	70.5	70.7	70.5	n.o.
5	92.9	93.8	94.6	95.2	n.o.
6	74.7	74.8	74.8	73.5	74.7
7	49.4	50.4	49.6	61.8	50.3
8	73.4	73.2	73.6	195.6	69.1
9	73.9	73.9	74.6	79.2	71.0
10	51.4	52.0	51.5	52.5	52.3
11	84.7	84.1	85.9	86.0	84.2
12	19.3	21.6	19.5	19.16	20.3
13	70.1	69.8	70.1	70.0	69.8
14	23.7	n.o.	23.9	23.4	22.7
15	60.4	n.o.	61.3	60.5	60
2'	165.1	165.2	165.5	165.4	n.o.
3'	125.0	n.o.	125.2	n.o.	n.o.
4'	137.9	n.o.	137.9	137.6	137.4
5'	120.9	n.o.	121.2	121.2	120.9
6'	n.o.	n.o.	151.7	151.7	n.o.
7'	36.3	36.1	36.6	35.9	36.2
8'	44.8	44.9	45.0	44.5	45.0
9'	12.0	n.o.	12.2	n.o.	11.7
10'	9.7	n.o.	10.0	n.o.	9.4
11'	173.0	174.0	174.2	173.8	173.2
12'	168.4	n.o.	168.6	n.o.	n.o.
R-1	164.3	168.9	169.3	169.0	169.0
	129.3		20.5	21.0	21.4
	133.2				
	128.9				
R-2	169.7	169.7	168.7	168.2	168.7
	20.7		21.1	20.4	21.0
R-6	169.5	169.9	169.9	169.9	130.2
	21.4		21.7	20.0	128.7
R-8	170.0	168.6	170.3	-	172.7
	21.17		21.3	-	21.0
R-9	165.1	168.7	165.6	164.8	170.0
	20.3		129.1	133.6	20.4
			129.7	128.6	
			129.0		
			133.8		
R-15	168.0	170.1	170.0	170.1	170.2
	20.8		20.9		18.3

n.o. = señales no observadas

Tabla 13: Datos de RMN ^1H y para S4-4, S5-9, S5-11 (Cl_3CD ; 500 MHz, J en Hz).

RMN ^1H para alcaloides sesquiterpénicos S4-S11

H	S4	S9	S11
1	5.88, <i>d</i> (4.0)	5.54, <i>d</i> (4.0)	5.64, <i>d</i> (4.0)
2	5.37, <i>t</i> (3.0/4.0)	5.23, <i>dd</i> (2.0/4.0)	5.26, <i>t</i> (3.0)
3	4.80, <i>d</i> (2.5)	4.72, <i>d</i> (2.0)	4.74, <i>d</i> (3.0)
6	6.65, <i>s</i> , 1H	7.02, <i>s</i> , 1H	6.74, <i>s</i> , 1H
7	2.47, <i>d</i> (1.0)	2.33, <i>d</i> (4.0)	2.53, <i>d</i> (4.0)
8	5.54, <i>dd</i> (3.0/10.0)	5.50, <i>dd</i> (4.0/6.0)	5.72, <i>dd</i> (4.0/10.0)
9	5.79, <i>d</i> (10.0)	5.35, <i>d</i> (6.0)	6.03, <i>d</i> (10.0)
12	1.76, <i>s</i> , 3H	1.67, <i>s</i> , 3H	1.81, <i>s</i> , 3H
13	5.90, <i>d</i> (11.5)	5.95, <i>d</i> (11.0)	3.70, <i>d</i> (11.0)
	3.67, <i>d</i> (11.5)	3.69, <i>d</i> (11.0)	6.00, <i>d</i> (11.0)
14	1.62, <i>s</i> , 3H	1.54, <i>s</i> , 3H	1.60, <i>s</i> , 3H
15	4.90, <i>d</i> (11.0)	5.12, <i>d</i> (11.0)	4.67, <i>d</i> (11.0)
	4.88, <i>d</i> (11.0)	4.48, <i>d</i> (11.0)	4.94, <i>d</i> (11.0)
4'	8.08, <i>dd</i> (2.0/8.0)	8.06, <i>dd</i> (2.0/8.0)	8.08, <i>dd</i> (2.0/8.0)
5'	7.28, <i>dd</i> (8.0/5.0)	7.28, <i>dd</i> (3.0/5.0)	7.28, <i>dd</i> (3.0/5.0)
6'	8.71, <i>dd</i> (2.0/5.0)	8.69, <i>dd</i> (1.0/5.0)	8.71, <i>dd</i> (2.0/4.0)
7'	4.67, <i>c</i> (7.0), 1H	4.65, <i>c</i> (7.0), 1H	4.68, <i>c</i> (7.0), 1H
8'	2.64, <i>c</i> (7.0), 1H	2.56, <i>c</i> (7.0), 1H	2.63, <i>c</i> (7.0), 1H
9'	1.42, <i>d</i> (7.0), 3H	1.39, <i>d</i> (7.0), 3H	1.42, <i>d</i> (7.0), 3H
10'	1.25, <i>d</i> (7.0), 3H	1.18, <i>d</i> (7.0), 3H	1.23, <i>d</i> (7.0), 3H
R-1	7.78, <i>dd</i> (1.0/8.0), 2H	1.83, <i>s</i> , 3H	1.51, <i>s</i> , 3H
	7.52, <i>t</i> (7.5), 1H		
	7.39, <i>t</i> (7.8), 2H		
R-2	1.95, <i>s</i> , 3H	2.21, <i>s</i> , 3H	2.11, <i>s</i> , 3H
R-6	2.23, <i>s</i> , 3H	2.15, <i>s</i> , 3H	2.23, <i>s</i> , 3H
R-8	2.33, <i>s</i> , 3H	2.16, <i>s</i> , 3H	2.41, <i>s</i> , 3H
R-9	1.40, <i>s</i> , 3H	1.99, <i>s</i> , 3H	7.59, <i>t</i> (9.0), 1H
			7.88, <i>dd</i> (1.0/8.0), 2H
			7.45, <i>t</i> (9.0), 2H
R-15	2.14, <i>s</i> , 3H	2.32, <i>s</i> , 3H	1.90, <i>s</i> , 3H
OH		4.52, <i>s</i> , 1H	4.50, <i>s</i> , 1H

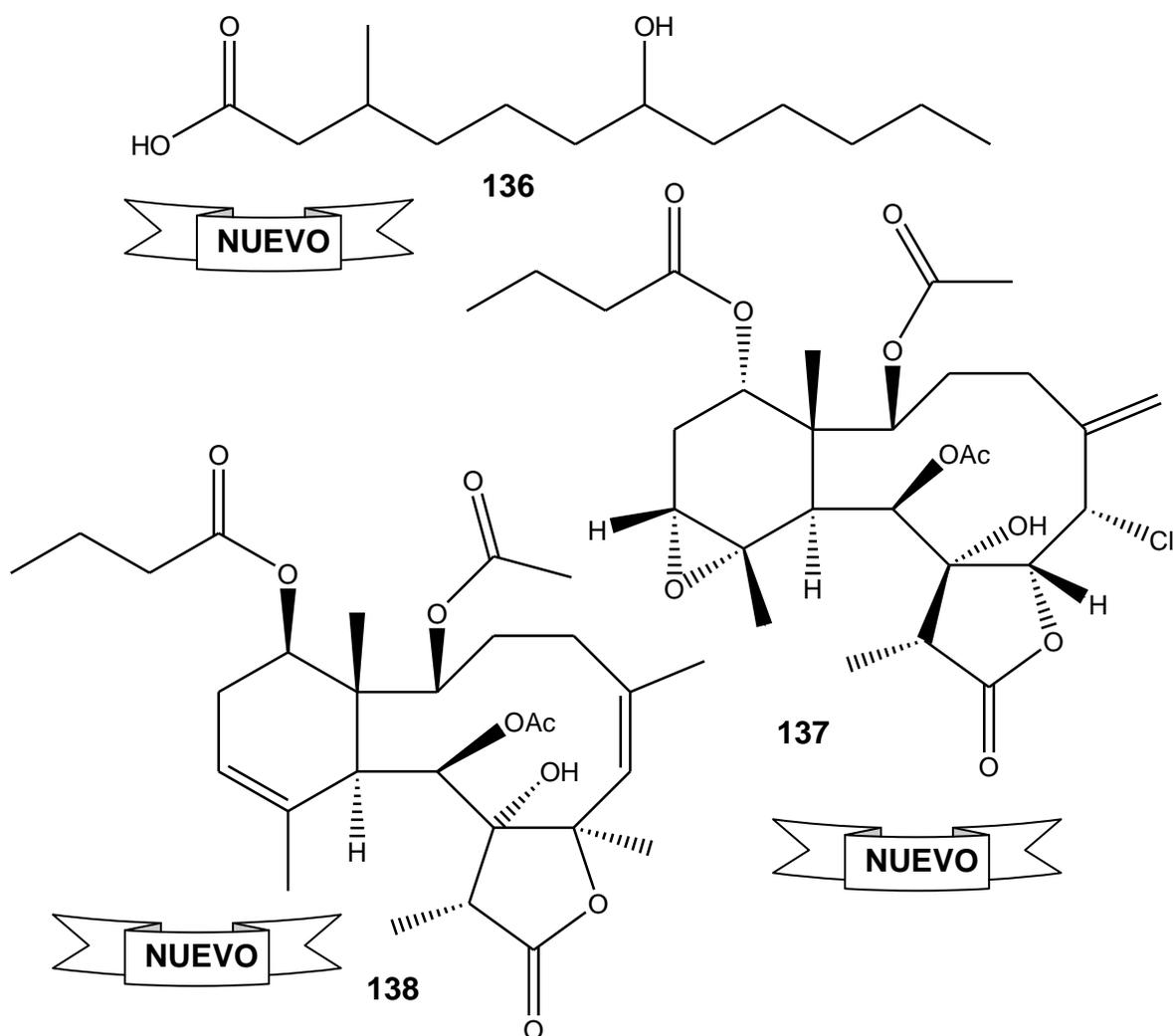
Tabla 14: Datos de RMN ^1H y para S5-12, S5-13, S5-16 (Cl_3CD ; 500 MHz, J en Hz).

RMN ^1H para alcaloides sesquiterpénicos S12-S16

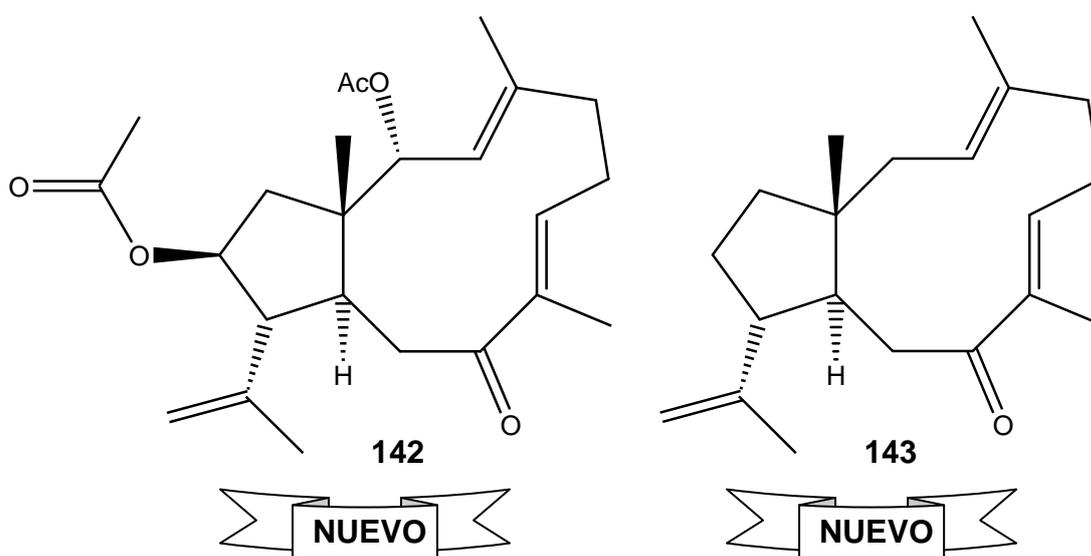
H	S12	S13	S16
1	5.76, <i>d</i> (3.0), 1H	5.59, <i>d</i> (4.0), 1H	5.95, <i>d</i> (4.0), 1H
2	5.26, <i>t</i> (3.0)	5.27, <i>dd</i> (2.0/4.0)	5.42, <i>dd</i> (2.0/4.0)
3	4.8, <i>d</i> (3.0)	4.77, <i>d</i> (1.0)	4.84, <i>d</i> (2.0)
6	6.8, <i>s</i> , 1H	7.18, <i>s</i> , 1H	7.23, <i>s</i> , 1H
7	3.08, <i>s</i> , 1H	2.51, <i>d</i> (4.0)	2.56, <i>d</i> (4.0)
8	-	5.55, <i>dd</i> , (4.0/7.0), 1H	5.59, <i>dd</i> , (4.0/6.0), 1H
9	5.86, <i>s</i> , 1H	5.40, <i>d</i> (7.0)	5.5, <i>d</i> (6.0)
12	1.73, <i>s</i> , 3H	1.85, <i>s</i> , 3H	1.77, <i>s</i> , 3H
13	6.08, <i>d</i> (11.0)	6.02, <i>d</i> (11.0)	3.65, <i>d</i> (11.0)
	3.75, <i>d</i> (11.0)	3.61, <i>d</i> (11.0)	6.07, <i>d</i> (11.0)
14	1.65, <i>s</i> , 3H	1.55, <i>s</i> , 3H	1.63, <i>s</i> , 3H
15	5.00, <i>d</i> (11.0)	5.17, <i>d</i> (11.0)	5.41, <i>d</i> (11.0)
	4.68, <i>d</i> (11.0)	4.57, <i>d</i> (11.0)	4.77, <i>d</i> (11.0)
4'	8.11, <i>dd</i> (2.0/8.0)	8.05, <i>dd</i> (2.0/8.0)	8.09, <i>dd</i> (2.0/8.0)
5'	7.29, <i>dd</i> (3.0/5.0)	7.26, <i>dd</i> (3.0/5.0)	7.28, <i>dd</i> (3.0/5.0)
6'	8.71, <i>dd</i> (2.0/4.0)	8.70, <i>dd</i> (1.0/5.0)	8.74, <i>dd</i> (2.0/4.0)
7'	4.7, <i>c</i> (7.0), 1H	4.74, <i>c</i> (7.0), 1H	4.78, <i>c</i> (7.0), 1H
8'	2.6, <i>c</i> (7.0), 1H	2.58, <i>c</i> (7.0), 1H	2.65, <i>c</i> (7.0), 1H
9'	1.43, <i>d</i> (7.0), 3H	1.44, <i>d</i> (7.0), 3H	1.48, <i>d</i> (7.0), 3H
10'	1.22, <i>d</i> (7.0), 3H	1.20, <i>d</i> (7.0), 3H	1.25, <i>d</i> (7.0), 3H
R-1	2.25, <i>s</i> , 3H	2.34, <i>s</i> , 3H	7.56, <i>t</i> (9.0), 1H
			8.86, <i>dd</i> (1.0/8.0), 2H
			7.42, <i>t</i> (9.0), 2H
R-2	2.17, <i>s</i> , 3H	2.23, <i>s</i> , 3H	2.39, <i>s</i> , 3H
R-6	2.07, <i>s</i> , 3H	8.32, <i>dd</i> (1.0/8.0), 2H	7.63, <i>t</i> (9.0), 2H
		7.59, <i>t</i> (9.0), 2H	8.35, <i>dd</i> (1.0/8.0), 2H
		7.50, <i>t</i> (9.0), 1H	7.53, <i>t</i> (9.0), 1H
R-8	-	2.16, <i>s</i> , 3H	2.23, <i>s</i> , 3H
R-9	7.60, <i>t</i> (9.0), 2H	2.01, <i>s</i> , 3H	2.19, <i>s</i> , 3H
	7.46, <i>t</i> (9.0), 1H		
R-15	1.47, <i>s</i> , 3H	1.70, <i>s</i> , 3H	2.07, <i>s</i> , 3H
OH		4.72, <i>s</i> , 1H	4.8, <i>s</i> , 1H

Resumen de estructuras

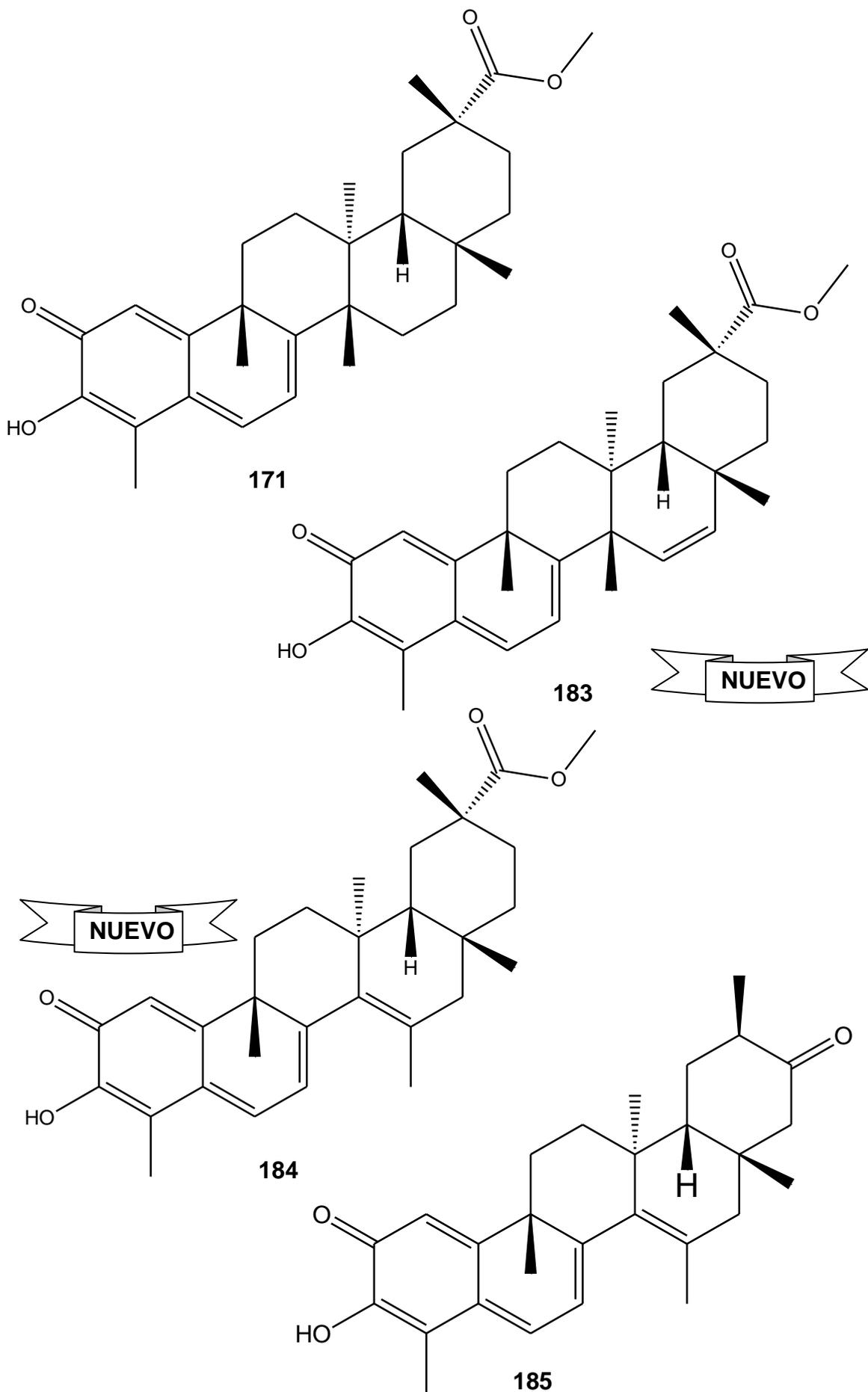
Renilla reniformis

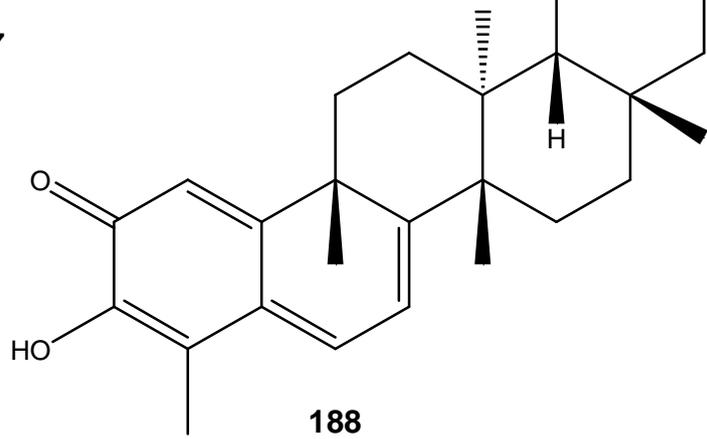
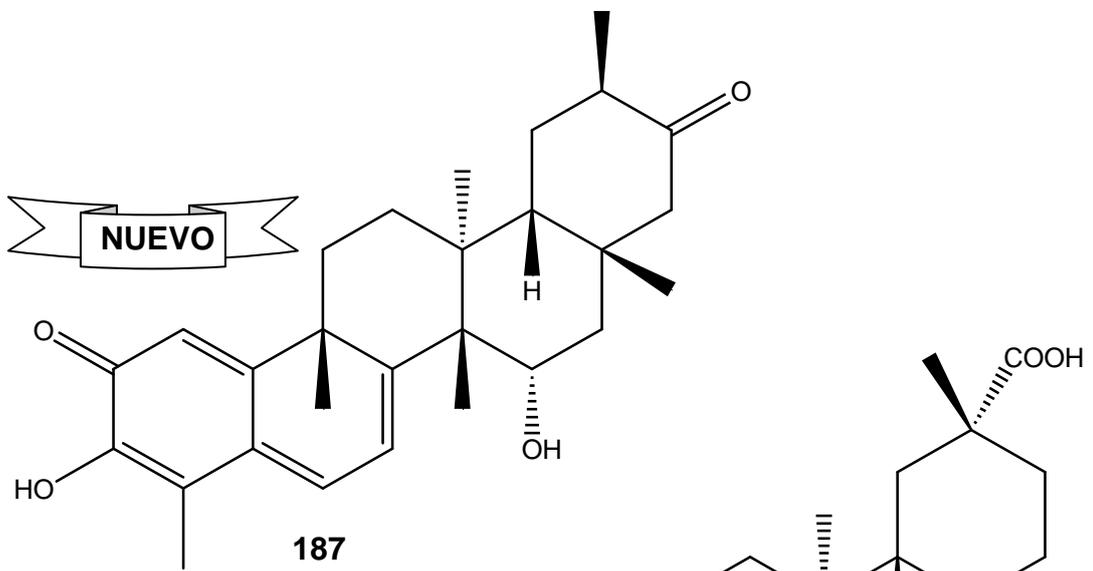
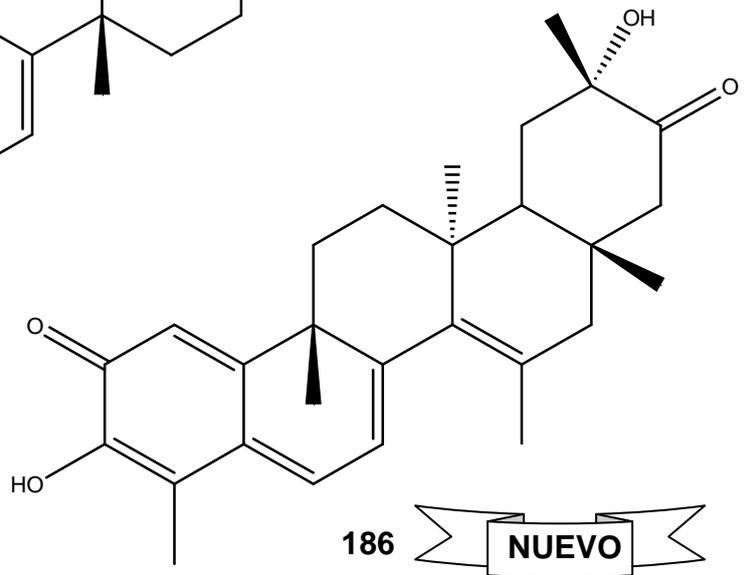
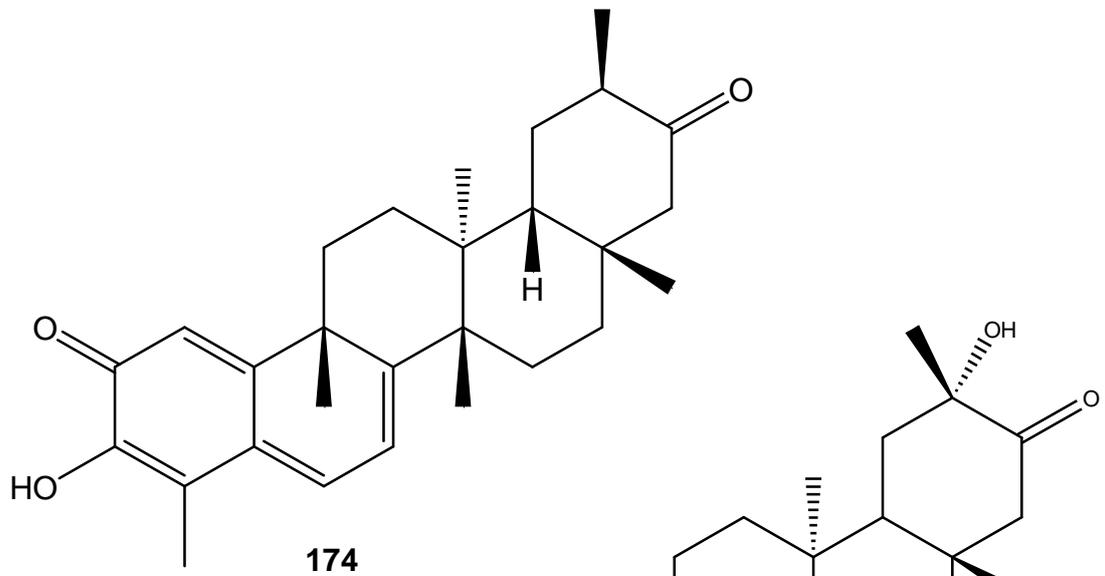


Convexella magelhaenica



Maytenus vitis-idaea





Maytenus spinosa

