



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**QUÍMICA ESTRUCTURAL Y ANÁLISIS QUIRÓPTICO DE TERPENOIDES CITOTÓXICOS A
PARTIR DE ESPECIES SELECTAS DE *CROTON* Y *JATROPHA* (EUPHORBIACEAE)**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. EDGAR ABRAHAM GARCÍA ZEPEDA



TUTOR: DR. GUILLERMO DELGADO LAMAS

AÑO: 2006

JURADO

Presidente	Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo
Primer Vocal	Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez
Segundo Vocal	Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas
Tercer Vocal	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Secretario	Dra. María Luisa Villarreal Ortega
Primer suplente	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Segundo suplente	Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano

Esta tesis fue realizada en el laboratorio 1, edificio C, del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Guillermo Delgado Lamas.

Sustentante:

Tutor:

M. en C. Edgar Abraham García Zepeda

Dr. Guillermo Delgado Lamas

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) y al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) por el financiamiento otorgado durante mi formación académica en el Programa de Doctorado en Ciencias Químicas.

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas, por la dirección y el apoyo en la realización del presente proyecto de investigación.

A los miembros de mi Comité Tutelar, Dr. Francisco J. Espinosa García y Dra. Isabel Aguilar Laurents, por sus observaciones y sugerencias realizadas durante el desarrollo del presente proyecto de investigación.

A la M. en C. Teresa Ramírez Apan del laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM, por la realización de los ensayos de citotoxicidad.

Al Dr. Juan Antonio Cogordán del Instituto de Química de la UNAM, por la asesoría brindada en la realización de los estudios teóricos de dicroísmo circular.

A cada uno de los miembros del jurado por las observaciones y sugerencias realizadas durante la revisión de la presente tesis.

Al personal Técnico Académico del Instituto de Química de la UNAM: M. en C. Héctor Ríos, M. en C. Nieves Zavala, M. en C. Simón Hernández-Ortega, Q. Rocío Patiño, Ing. Luis Velasco, M. en C. Javier Pérez, Dr. Alfredo Toscano, Q. Erendira García, Ing. David Vázquez, Ing. Francisco Márquez. Al personal de la Biblioteca "Jesús Romo Armería": Jesús Martínez y Lupita Anaya.

DEDICATORIAS

A mis padres: José Abraham y Salud

A mis hermanos: Josué de Jesús, Susana, Yaneth y Arleth

A mis sobrinos: Rafael, Hazel Rafsus y Cassandra

A mi cuñado Rafael

Al QFB. Ernesto Rincón Anaya

y

al Dr. Francisco J. Espinosa García

Contenido

Introducción	1
Capítulo 1	
Antecedentes	
1.1 Generalidades de la familia Euphorbiaceae	5
1.1.1 Clasificación taxonómica	5
1.1.2 Importancia biológica	6
1.1.3 Perfil químico	7
1.1.4 Composición química de <i>Jatropha</i>	7
1.1.5 Composición química de <i>Croton</i>	11
Capítulo 2	
2.1 Dicroísmo Circular	16
2.1.1 Cromóforos ópticamente activos	20
2.1.2 <i>Regla de los octantes</i>	21
2.1.3 <i>Regla de helicidad de cetonas β,β-insaturadas</i>	22
2.1.4 <i>Regla de helicidad del dieno</i>	22
2.1.5 <i>Regla del dieno plano</i>	23
2.1.6 <i>Regla del sector benzoato</i>	24
2.2 Método de la Quiralidad del Excitón	25
2.2.1 Generalidades del método	25
2.2.2 Acoplamiento del excitón entre cromóforos	26
2.2.3 <i>Regla de la quiralidad del 1,2-dibenzoato</i>	27

2.2.4	<i>Regla de helicidad del sistema dieno-benzoato</i>	28
2.2.5	<i>Regla de helicidad de benzoatos alílicos</i>	29
2.3	Métodos Computacionales	30
2.3.1	Mecánica Molecular	30
2.3.2	Química Cuántica	32
2.3.3	Método de Hartree-Fock (HF)	33
2.3.4	Teoría del Funcional de la Densidad Dependiente del Tiempo	34
	Capítulo 3	
3.1	Justificación	36
3.2	Hipótesis	37
3.3	Objetivo	37
3.4	Metas	37
	Capítulo 4	
4.1	Sección Experimental	39
4.1.1	Material y equipo	39
4.1.2	Ensayo de citotoxicidad	40
4.1.3	Detalles computacionales	41
	Capítulo 5	
5.1	Resultados y Discusiones	42
5.1.1	Selección del sistema de estudio	42
5.1.2	Determinación de la actividad citotóxica	43
	Capítulo 6	
6.1	Química y evaluación citotóxica de <i>Croton glabellus</i>	46
6.1.1	Material vegetal	46

6.1.2	Antecedentes generales de <i>C. glabellus</i>	46
6.1.3	Extracción y aislamiento de los compuestos de <i>C. glabellus</i>	47
6.1.4	Fraccionamiento biodirigido del extracto de <i>C. glabellus</i>	49
6.2	Propiedades físicas de los compuestos de <i>C. glabellus</i>	52
6.2.1	λ -Sitosterol (115)	52
6.2.2	Austroinulina (117)	52
6.2.3	6- <i>O</i> -Acetilaustroinulina (118)	53
6.2.4	Derivatización química de 6- <i>O</i> -acetilaustroinulina (118)	54
6.2.5	6,7-Diacetilaustroinulina (118a)	54
6.2.6	7- <i>p</i> -Bromobenzoílaustroinulina (118b)	55
6.2.7	7-(<i>E</i>)-Cinamoílaustroinulina (118c)	56
6.2.8	Preparación de los derivados esterificados (<i>R</i>)-MTPA y (<i>S</i>)-MTPA de 117 (118d y 118e)	56
6.2.9	6,7-Isopropilidendioxiaustroinulina (119)	57
6.2.10	<i>trans</i> -Deshidrocrotonina (116)	58
6.2.11	Mezcla de cajucarínólida (122) y 15- <i>epi</i> -cajucarínólida (123)	59
6.2.12	Marrubiagenina (121)	60
6.2.13	5,7,4'-Trihidroxi-3-metoxiflavona o 3- <i>O</i> -metilkaempferol (120)	62
6.2.14	5,7,3',4'-Tetrahidroxi-3-metoxiflavona (124)	62
6.2.15	λ - <i>D</i> -glucopiranosido de λ -sitosterilo (125)	63
6.2.16	Sacarosa (126)	64
6.3	Determinación estructural de los compuestos de <i>C. glabellus</i>	65
6.3.1	6- <i>O</i> -Acetilaustroinulina (118)	65
6.3.2	Austroinulina (117)	71

6.3.4	6,7-Isopropilidendioxiaustroinulina (119)	72
6.3.5	<i>trans</i> -Deshidrocrotonina (116)	73
6.3.6	Mezcla de cajucarínolida (122) y 15- <i>epi</i> -cajucarínolida (123)	74
6.3.7	Marrubiagenina (121)	77
Capítulo 7		
7.1	Química y evaluación citotóxica de <i>Jatropha neopauciflora</i>	82
7.1.1	Material vegetal	82
7.1.2	Antecedentes generales de <i>J. neopauciflora</i>	82
7.1.3	Extracción y aislamiento de los compuestos de <i>J. neopauciflora</i>	83
7.2	Propiedades físicas de los compuestos de <i>J. neopauciflora</i>	88
7.2.1	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-Diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132)	88
7.2.2	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-Dihidroxi-4(15)-cicloaxeno (133)	89
7.2.3	1,2-Bis- <i>trans</i> -cinamoíl-4(15)-cicloaxeno (133a)	89
7.2.4	(2 <i>R</i>)- λ -Cadin-4-en-2,10-diol (134)	90
7.2.5	2- <i>p</i> -Bromobenzoíl- λ -cadin-4-en-10-ol (134a)	91
7.2.6	(2 <i>R</i>)- λ -Cadin-4,9-dien-2-ol (135)	91
7.2.7	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-Dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (136)	91
7.2.8	1,2,14-Tris- <i>p</i> -bromobenzoíl-4-isodauceno (136)	92
7.2.9	1 λ ,2 λ -Isopropilidendioxi-4-isodaucen-14-ol (137)	92
7.2.10	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)*-5- <i>epi</i> -Eudesm-4(15)-eno-1 λ ,2 λ ,6 λ -triol (138)	93
7.2.11	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)*-Ax-4(15)-eno-1 λ ,2 λ -7 λ -triol (139)	94
7.2.12	3 λ - <i>trans-p</i> -Cumaroiloxi-16 λ -hidroxi-20(29)-lupeno (140)	95
7.2.13	3 λ - <i>trans-p</i> -Acetilcumaroiloxi-16 λ -acetoxi-20(29)-lupeno (140a)	96
7.2.14	3 λ - <i>trans-p</i> -Cumaroiloxi-16 λ -hidroxiolean-18-eno (141)	97

7.2.15	5-Hidroxi-6,7-dimetoxicumarina (130)	98
7.2.16	6,7-Dimetoxicumarina (131)	99
7.2.17	19- λ H-lupeol (127)	100
7.2.18	Calenduladiol (128)	100
7.2.19	Germanicol:Lupeol (2:1) (129:127)	101
7.3	Determinación estructural de los compuestos de <i>J. neopauciflora</i>	102
7.3.1	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-Diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132)	102
7.3.2	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-Dihidroxi-4(15)-cicloaxeno (133)	111
7.3.3	(2 <i>R</i>)- λ -Cadin-4-en-2,10-diol (134)	115
7.3.4	(2 <i>R</i>)- λ -Cadin-4,9-dien-2-ol (135)	121
7.3.5	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-Dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (136)	125
7.3.6	1 λ ,2 λ -Isopropilidendioxi-4-isodaucen-14-ol (137)	132
7.3.7	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)*-5- <i>epi</i> -Eudesm-4(15)-eno-1 λ ,2 λ ,6 λ -triol (138)	134
7.3.8	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)*-Ax-4(15)-eno-1 λ ,2 λ -7 λ -triol (139)	138
7.3.9	3 λ - <i>trans-p</i> -Cumaroiloxi-16 λ -hidroxi-20(29)-lupeno (140)	141
7.3.10	3 λ - <i>trans-p</i> -Cumaroiloxi-16 λ -hidroxiolean-18-eno (141)	143
Capítulo 8		
8.1	Química y evaluación citotóxica de <i>Croton alamosanus</i>	174
8.1.1	Material vegetal	147
8.1.2	Antecedentes generales de <i>C. alamosanus</i>	147
8.1.3	Extracción y aislamiento de los compuestos de <i>C. alamosanus</i>	148
8.2	Propiedades físicas de los compuestos de <i>C. alamosanus</i>	150
8.2.1	5-Hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (142)	150
8.2.2	3,5-Dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona (143)	150

8.2.3	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)- <i>p</i> -Ment-1-eno-3,6-diol (144)	151
8.2.4	(2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-Hidroxi-4-metoximetilenilbutanólida (145)	151
8.3	Determinación estructural de los compuestos de <i>C. alamosanus</i>	152
8.3.1	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)- <i>p</i> -Ment-1-eno-3,6-diol (144)	152
8.3.2	(2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-Hidroxi-4-metoximetilenilbutanólida (145)	154
Capítulo 9		
9.1	Resumen y conclusiones	157
9.2	Perspectivas	159
	Referencias	160
	Espectros	169
	Anexos	249

Acrónimos

AcOEt	Acetato de etilo
°C	Grado Celsius
CCPR	Cromatografía en Columna a Presión Reducida
CCDP	Cromatografía de Capa Delgada Preparativa
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CPP	Cromatografía de Placa Preparativa
CCR	Cromatografía en Columna Relámpago
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
(CD ₃) ₂ CO	Acetona deuterada
CD ₃ OD	Metanol deuterado
C ₆ D ₆	Benceno deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
COSY	Correlation Spectroscopy
DC	Dicroísmo Circular
TD-DFT	Time Dependent Density Functional Theory
D ₂ O	Agua deuterada
d	Doblete
dd	Doblete de dobletes
ddd	Doblete de doblete de dobletes
dsept	Doblete de septuplete
dquint	Doblete de quintuplete
dt	Doblete de tripletes
λ	Desplazamiento químico
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO- <i>d</i> ₆	Sulfóxido de dimetilo deuterado
EM	Espectrometría de Masas
eV	Electronvolts
FAB	Bombardeo Rápido de Átomos

g	Gramo
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
IE	Impacto Electrónico
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
λ	Longitud de onda (cm ⁻¹)
M ⁺	Ion Molecular
m	Multiplete
mL	Mililitro
μ M	Micromolar
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MHz	Megahertz
nm	Nanómetro
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
Py- <i>d</i> ₅	Piridina deuterada
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno-1
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
RO	Rotación óptica
<i>R</i>	Fuerza Rotatoria
s	Singulete
SRB	Sulforrodamina B
TMS	Tetrametilsilano
TCA	Ácido Tricloroacético
UV	Espectrofotometría de Ultravioleta

Lista de Figuras

Figura 1. Tipos estructurales de diterpenos aislados de la familia Euphorbiaceae.	7
Figura 2. Luz polarizada linealmente.	16
Figura 3. Luz polarizada circularmente a la izquierda.	16
Figura 4. Sobreposición de los vectores eléctricos E_r de <i>lpcr</i> y E_l de <i>lpcl</i> .	17
Figura 5. Haz de luz polarizada elípticamente. Sobreposición de los vectores eléctricos E_r de <i>lpcr</i> y E_l de <i>lpcl</i> .	17
Figura 6. Luz polarizada elípticamente.	18
Figura 7. Luz polarizada elípticamente. El ángulo de elipticidad λ producido desde la luz polarizada linealmente hasta la luz polarizada elípticamente está dado por el desplazamiento del eje mayor a de la elipse.	18
Figura 8. a) <i>Regla de los octantes</i> de cetonas cíclicas saturadas. b) Plano vertical A de la figura a). c) Plano vertical B de la figura a).	21
Figura 9. Octantes posteriores de la <i>regla de los octantes</i> .	21
Figura 10. Helicidad de cetonas λ, λ -insaturadas.	22
Figura 11. Regla del cuadrante dieno o helicidad del dieno.	23
Figura 12. Regla del dieno plano.	24
Figura 13. Regla del sector benzoato.	25
Figura 14. Método de la quiralidad del excitón dicroico circular.	26
Figura 15. Quiralidad del excitón del 1,2-dibenzoato.	27
Figura 16. Quiralidad del excitón del sistema 1,2-dibenzoato.	28
Figura 17. Regla de helicidad del sistema dieno-benzoato.	29
Figura 18. Regla de helicidad de benzoatos alílicos.	29
Figura 19. De izquierda a derecha: deformación de la longitud del enlace, deformación del ángulo diedro, deformación del ángulo de torsión y efectos recíprocos de no enlace.	31
Figura 20. Diterpenos biodinámicos en la familia Euphorbiaceae.	36
Figura 21. Interacciones NOESY relevantes en 118 .	66
Figura 22. Estereoproyección de 118 .	67
Figura 23. Derivatización química de 146 .	67
Figura 24. Conformación de mínima energía de 146a y aplicación de la <i>regla de</i>	68

los octantes.

Figura 25. Valores de $\lambda_S - \lambda_R$ (en ppm) de hidrógenos selectos de los ésteres (<i>R</i>)-MTPA (118d) y (<i>S</i>)-MTPA (118e).	69
Figura 26. Quiralidad del excitón del sistema <i>benzoato-dieno</i> de 118b .	70
Figura 27. Comparación entre el espectro electrónico de DC experimental (línea azul) y teórico (línea negra) de 118a .	71
Figura 28. Proyección conformacional de 116 .	74
Figura 29. Desplazamientos de RMN ^{13}C e ^1H de la cajucarínólida (122) [10c].	75
Figura 30. Desplazamientos de RMN ^{13}C e ^1H de la isocajucarínólida [10c].	76
Figura 31. Espectro de DC de la mezcla epimérica 122 y 123 .	77
Figura 32. Desplazamientos de RMN ^{13}C e ^1H de la marrubiagenina [43].	78
Figura 33. Desplazamientos de RMN ^{13}C e ^1H del ácido anfiácrico [44].	78
Figura 34. Espectro de dicroísmo circular del compuesto 121 .	80
Figura 35. Derivatización química del producto natural marrubiásido (147) [36].	80
Figura 36. Aplicación de la <i>regla de helicidad del dieno</i> para 121b .	81
Figura 37. Desacoplamiento homonuclear de ^1H . Irradiación de H6 λ (λ 1.18).	106
Figura 38. Desacoplamiento homonuclear de ^1H . Irradiación de H7 λ (λ 0.55) y H8 λ (λ 1.33).	106
Figura 39. NOE diferencial. Irradiación de H1 λ (λ 5.38).	107
Figura 40. NOE diferencial. Irradiación de H5 λ (λ 1.95).	108
Figura 41: Interacciones NOESY relevantes en 132 .	108
Figura 42. Sesquiterpenos de tipo 6,8-cicloeuodesmano.	109
Figura 43. Transformación de (-)-epoxigermacreno D.	109
Figura 44. Interacciones NOESY relevantes para 133 .	113
Figura 45. Derivatización química de 133 .	113
Figura 46. Espectro de dicroísmo circular de 133a .	114
Figura 47. Método de la quiralidad del excitón del 1,2-dibenzoato de 133a .	114
Figura 48. Interacciones NOESY relevantes de 134 .	117
Figura 49. Análogos estructurales de 133 [56].	118
Figura 50. Espectro de dicroísmo circular de 134a .	120
Figura 51. Aplicación de la <i>regla del sector benzoato</i> a 134a (B) y su	121

enantiómero (A).

Figura 52. Interacciones NOESY relevantes para 135.	123
Figura 53. Interacciones NOESY relevantes para 136.	128
Figura 54. Compendio de sesquiterpenos de tipo isodaucano aislados a la fecha.	128
Figura 55. Derivatización química de 136.	129
Figura 56. Espectro de dicroísmo circular de 136a.	129
Figura 57. Método de la quiralidad del excitón del 1,2-dibenzoato para 136a.	130
Figura 58. Aplicación de la regla de la helicidad del benzoato alílico a 136a.	131
Figura 59. Interacciones NOESY relevantes para 137.	133
Figura 60. Interacciones NOESY relevante para 138.	137
Figura 61. Interacciones NOESY relevantes de 139.	140
Figura 62. Estereoproyección de 140.	143
Figura 63. Interacciones NOESY relevantes de 141.	145
Figura 64. Proyección conformacional de 144.	153
Figura 65. Confórmeros tipo sobre E_3 (A) y 3E (B) de 145.	155
Figura 66. Aplicación de la <i>regla de los octantes</i> para 145.	155

Lista de Diagramas

Diagrama 1. Fraccionamiento principal del extracto orgánico de <i>C. glabellus</i> .	48
Diagrama 2. Aislamiento y purificación de los constituyentes de <i>C. glabellus</i> .	50
Diagrama 3. Fraccionamiento principal del extracto orgánico de <i>J. neopauciflora</i> .	84
Diagrama 4. Aislamiento y purificación de los constituyentes de <i>J. neopauciflora</i> .	86
Diagrama 5. Aislamiento y purificación de los constituyentes de <i>C. alamosanus</i> .	149

Lista de Esquemas

Esquema 1. Propuesta biogenética para los sesquiterpenos de tipo 6,8-cicloeudesmano.	110
Esquema 2. Propuesta biogenética para la formación de 132 y 133.	115

Esquema 3. Propuesta biogenética para la formación de 134 y 135 .	125
Esquema 4. Propuesta biogenética para la formación de 136 .	131
Esquema 5. Propuesta biogenética para la formación de 138 .	137
Esquema 6. Propuesta biogenética para la formación de 139 .	141

Lista de Fotografías

Fotografía 1. <i>Croton glabellus</i> .	46
Fotografía 2. <i>Jatropha neopauciflora</i> .	82
Fotografía 3. <i>Croton alamosanus</i> .	147

Lista de Tablas

Tabla 1. Especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae propuestas en este proyecto.	42
Tabla 2. Actividad citotóxica de los extractos orgánicos de las especies de <i>Croton</i> y <i>Jatropha</i> a 50 µg/mL.	43
Tabla 3. Concentraciones inhibitorias medias de los extractos orgánicos más activos.	44
Tabla 4. Rastreo de actividad citotóxica de las fracciones obtenidas de <i>C. glabellus</i> .	49
Tabla 5. Actividad citotóxica de productos naturales y derivados de <i>C. glabellus</i> .	51
Tabla 6. Actividades citotóxicas de los compuestos 117-120 y del derivado 118b .	51
Tabla 7. Rastreo primario de actividad citotóxica de las fracciones principales obtenidas del extracto de <i>Jatropha neopauciflora</i> .	83
Tabla 8. Concentración inhibitoria media del extracto y de 128 y 140 .	85
Tabla 9. Datos de RMN ¹ H tomados en CDCl ₃ para 134 y sus análogos estructurales.	119
Tabla 10: Desplazamientos químicos de RMN ¹ H de 148 y 135 .	124
Tabla 11. Determinación de la actividad citotóxica (a 50 µM) de los metabolitos secundarios aislados de <i>C. alamosanus</i> .	148

Lista de Espectros

Espectro 1. EM-IE (70 eV) de la 6- <i>O</i> -acetilaustronulina (118).	169
Espectro 2. IR (CHCl ₃) de 6- <i>O</i> -acetilaustronulina (118).	170
Espectro 3. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de 6- <i>O</i> -acetilaustronulina (118).	171
Espectro 4. Experimento FLOCK (CDCl ₃) de la 6- <i>O</i> -acetilaustronulina (118).	172
Espectro 5. Experimento COSY (300 MHz, CDCl ₃) de la 6- <i>O</i> -acetilaustronulina (118).	173
Espectro 6. Experimento NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de la 6- <i>O</i> -acetilaustronulina (118).	174
Espectro 7. EM-IE (70 eV) de la austronulina (117).	175
Espectro 8. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la austronulina (117).	176
Espectro 9. RMN ¹ H (300 MHz, (CD ₃) ₂ CO) del 6,7-isopropilidendioxiaustronulina (119).	177
Espectro 10. RMN ¹³ C (75 MHz, (CD ₃) ₂ CO) del 6,7-isopropilidendioxiaustronulina (119).	178
Espectro 11. EM-IE (70 eV) de la <i>trans</i> -deshidrocrotonina (116).	179
Espectro 12. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la <i>trans</i> -deshidrocrotonina (116).	180
Espectro 13. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de la <i>trans</i> -deshidrocrotonina (116).	181
Espectro 14. EM-IE (70 eV) de la mezcla de cajucarinólida y 15- <i>epi</i> -cajucarinólida (122 y 123).	182
Espectro 15. IR (KBr) de la mezcla de cajucarinólida y 15- <i>epi</i> -cajucarinólida (122 y 123).	183
Espectro 16. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ :DMSO- <i>d</i> ₆ , 3:1) de la mezcla de cajucarinólida y 15- <i>epi</i> -cajucarinólida (122 y 123).	184
Espectro 17. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ :DMSO- <i>d</i> ₆ , 3:1) de la mezcla de cajucarinólida y 15- <i>epi</i> -cajucarinólida (122 y 123).	185
Espectro 18. EM-IE (70 eV) de la marrubiagenina (121).	186
Espectro 19. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de la marrubiagenina (121).	187
Espectro 20. IR (CHCl ₃) de la marrubiagenina (121).	188
Espectro 21. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de la marrubiagenina (121).	189
Espectro 22. Experimento NOESY (CDCl ₃) de la marrubiagenina (121).	190

Espectro 23 . RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132).	191
Espectro 24 . Experimento DEPT (CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132).	192
Espectro 25 . IR (CHCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132).	193
Espectro 26 . RMN ¹ H (CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132).	194
Espectro 27 . Experimento COSY (CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132).	195
Espectro 28 . Experimento HSQC (CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132).	196
Espectro 29 . Experimento HMBC (CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132).	197
Espectro 30 . Experimento NOESY (CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132).	198
Espectro 31 . RMN ¹³ C (125 MHz, C ₆ D ₆) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-dihidroxi-4(15)-cicloaxeno (133).	199
Espectro 32 . RMN ¹ H (500 MHz, C ₆ D ₆) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-dihidroxi-4(15)-cicloaxeno (133).	200
Espectro 33 . Experimento COSY (C ₆ D ₆) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-dihidroxi-4(15)-cicloaxeno (133).	201
Espectro 34 . Experimento NOESY (C ₆ D ₆) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-dihidroxi-4(15)-cicloaxeno (133).	202
Espectro 35 . RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) del (2 <i>R</i>)-λ-cadin-4-en-2,10-diol (134).	203
Espectro 36 . IR (CHCl ₃) del (2 <i>R</i>)-λ-cadin-4-en-2,10-diol (134).	204
Espectro 37 . RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) del (2 <i>R</i>)-λ-cadin-4-en-2,10-diol (134).	205
Espectro 38 . Experimento COSY (CDCl ₃) del (2 <i>R</i>)-λ-cadin-4-en-2,10-diol (134).	206
Espectro 39 . Experimento HMBC (CDCl ₃) del (2 <i>R</i>)-λ-cadin-4-en-2,10-diol (134).	207
Espectro 40 . Experimento HSQC (CDCl ₃) del (2 <i>R</i>)-λ-cadin-4-en-2,10-diol (134).	208
Espectro 41 . Experimento NOESY (CDCl ₃) del (2 <i>R</i>)-λ-cadin-4-en-2,10-diol (134).	209

Espectro 42. RMN ¹ H (500 MHz, C ₆ D ₆) del (2 <i>R</i>)-λ-cadin-4,9-dien-2-ol (135).	210
Espectro 43. Experimento NOESY (C ₆ D ₆) del (2 <i>R</i>)-λ-cadin-4,9-dien-2-ol (135).	211
Espectro 44. EM-IE (70 eV) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (136).	212
Espectro 45. RMN ¹³ C (125 MHz, C ₆ D ₆) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (136).	213
Espectro 46. IR (CHCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (136).	214
Espectro 47. RMN ¹ H (500 MHz, C ₆ D ₆) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (136).	215
Espectro 48. Experimento HSQC (C ₆ D ₆) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (136).	216
Espectro 49. Experimento COSY (C ₆ D ₆) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (136).	217
Espectro 50. Experimento NOESY (C ₆ D ₆) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (136).	218
Espectro 51. RMN ¹³ C (125 MHz, C ₆ D ₆) del 1λ,2λ-isopropilidendioxi-4-isodaucen-14-ol (137).	219
Espectro 52. IR (CHCl ₃) del 1λ,2λ-isopropilidendioxi-4-isodaucen-14-ol (137).	220
Espectro 53. RMN ¹ H (500 MHz, C ₆ D ₆) del 1λ,2λ-isopropilidendioxi-4-isodaucen-14-ol (137).	221
Espectro 54. Experimento NOESY (CDCl ₃) del 1λ,2λ-isopropilidendioxi-4-isodaucen-14-ol (137).	222
Espectro 55. EM-IE (70 eV) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)*-5- <i>epi</i> -eudesm-4(15)-eno-1λ,2λ,6λ-triol (138).	223
Espectro 56. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)*-5- <i>epi</i> -eudesm-4(15)-eno-1λ,2λ,6λ-triol (138).	224
Espectro 57. IR (CHCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)*-5- <i>epi</i> -eudesm-4(15)-eno-1λ,2λ,6λ-triol (138).	225
Espectro 58. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)*-5- <i>epi</i> -eudesm-4(15)-eno-1λ,2λ,6λ-triol (138).	226
Espectro 59. Experimento COSY (CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)*-5- <i>epi</i> -eudesm-4(15)-eno-1λ,2λ,6λ-triol (138).	227

Espectro 60. Experimento HMBC (CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)*-5- <i>epi</i> -eudesm-4(15)-eno-1λ,2λ,6λ-triol (138).	228
Espectro 61. Experimento NOESY (CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,10 <i>S</i>)*-5- <i>epi</i> -eudesm-4(15)-eno-1λ,2λ,6λ-triol (138).	229
Espectro 62. EM-IE (70 eV) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)*-ax-4(15)-eno-1λ,2λ-7λ-triol (139).	230
Espectro 63. IR (CHCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)*-ax-4(15)-eno-1λ,2λ-7λ-triol (139).	231
Espectro 64. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)*-ax-4(15)-eno-1λ,2λ-7λ-triol (139).	232
Espectro 65. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)*-ax-4(15)-eno-1λ,2λ-7λ-triol (139).	233
Espectro 66. Experimento COSY (CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)*-ax-4(15)-eno-1λ,2λ-7λ-triol (139).	234
Espectro 67. Experimento HMBC (CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)*-ax-4(15)-eno-1λ,2λ-7λ-triol (139).	235
Espectro 68. Experimento NOESY (CDCl ₃) del (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)*-ax-4(15)-eno-1λ,2λ-7λ-triol (139).	236
Espectro 69. RMN ¹³ C (125 MHz, C ₅ D ₅ N) del 3λ- <i>trans-p</i> -cumaroiloxi-16λ-hidroxi-20(29)-lupeno (140).	237
Espectro 70. RMN ¹ H (500 MHz, C ₅ D ₅ N) del 3λ- <i>trans-p</i> -cumaroiloxi-16λ-hidroxi-20(29)-lupeno (140).	238
Espectro 71. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) del 3λ- <i>trans-p</i> -cumaroiloxi-16λ-hidroxiolean-18-eno (141).	239
Espectro 72. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) del 3λ- <i>trans-p</i> -cumaroiloxi-16λ-hidroxiolean-18-eno (141).	240
Espectro 73. Experimento NOESY (CDCl ₃) del 3λ- <i>trans-p</i> -cumaroiloxi-16λ-hidroxiolean-18-eno (141).	241
Espectro 74. EM-IE (70 eV) del (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)- <i>p</i> -ment-1-eno-3,6-diol (144).	242
Espectro 75. RMN ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) del (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)- <i>p</i> -ment-1-eno-3,6-diol (144).	243

Espectro 76 . RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) del (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)- <i>p</i> -ment-1-eno-3,6-diol (144).	244
Espectro 77 . Experimento NOESY (CD_3OD) del (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)- <i>p</i> -ment-1-eno-3,6-diol (144).	245
Espectro 78 . RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) de la (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-hidroxi-4-metoximetilenilbutanólida (145).	246
Espectro 79 . RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de la (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-hidroxi-4-metoximetilenilbutanólida (145).	247
Espectro 80 . Experimento NOESY (500 MHz, CD_3OD) de la (2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-2-hidroxi-4-metoximetilenilbutanólida (145).	248

Lista de Anexos

Anexo 1 . Datos cristalográficos de 118 .	249
Anexo 2 . Datos cristalográficos de 140 .	251
Anexo 3 . Coordenadas cartesianas de la geometría optimizada de 118a calculados mediante el nivel de teoría TD-DFT/B3LYP/H-W.	253

Abstract

This thesis deals with the search of cytotoxic natural products from selected plants belonging to the Euphorbiaceae family. The bioguided fractionation of the cytotoxic plant extracts from *Croton glabellus*, *C. alamosanus* and *Jatropha neopauciflora* led to the isolation and characterization of the bioactive constituents **117**, **118**, **119**, **120**, **128**, and **140**, being **120** the most active one. On the other hand, the fractionation processes allowed the structural elucidation of the non-bioactive secondary metabolites **116**, **121-124**, **130-139**, **144**, and **145**. Compounds **142** and **143** showed marginal bioactivity and their IC₅₀ values were not determined. The chemical study of plant materials allowed the characterization of three *ent*-labdane- (**117**, **118**, **119**), three *neo*-clerodane- (**116**, **122**, **123**), and one *cis-ent*-clerodane lactone- (**121**) diterpenes, two cycloaxane- (**132**, **133**), two cadinane- (**134**, **135**), two isodaucane- (**136**, **137**), one *cis*-eudesmane- (**138**) and one axane-type (**139**) sesquiterpenes, seven triterpenoids (**140**, **141**, **115**, **127**, **129**, **128** and **125**), one monoterpene (**144**), four flavonoids (**120**, **124**, **142**, **143**), two coumarins (**130**, **131**), one γ -butyrolactone (**145**), and one carbohydrate (**126**). Fourteen substances are new compounds (**119**, **121**, **132-141**, **144**, **145**) and seventeen are known natural products (**115-118**, **120**, **122-131**, **142**, and **143**). Compounds **119**, **135**, and **137** were identified as derivatives from the natural products **117**, **134**, and **136**, respectively. The structures of all compounds were determined by extensive and careful analysis of their spectrometric, spectroscopic (including 1D-NMR and 2D-NMR experiments), spectrophotometric and chiroptic properties. The relative configurations of these compounds were determined or confirmed by NOESY spectrum, 1D NOE-difference spectrum, and X-ray analysis. The absolute configurational assignments of terpenoids **118**, **122-124**, **132-136**, and **145** were done by the experimental and, for **118**, theoretical circular dichroism method, and application of specific rules such as the diene-benzoate chirality rule, the diene helicity rule (the diene quadrant rule), the dibenzoate chirality rule, the benzoate sector rule, the exciton chirality of the allylic benzoate rule, and the octant rule. On the basis of the absolute configuration assignments of sesquiterpenes **132-137**, and considering the proposed biogenesis for related sesquiterpenoids, were hypothesized several biogenetic pathways to explain the biosynthesis of natural products **132-136** considering (-)-germacrene D as the biogenetic precursor. Additionally, the biogenesis of **138** and **139** is proposed.

Resumen

Esta tesis se refiere a la búsqueda de productos naturales con actividad citotóxica a partir de especies de plantas selectas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae. El fraccionamiento bidirigido de los extractos orgánicos citotóxicos de *Croton glabellus*, *C. alamosanus* y *Jatropha neopauciflora* condujo al aislamiento y la caracterización de los constituyentes bioactivos **117-120**, **140** y **128**, siendo **120** el más activo. Por otra parte, los procesos de fraccionamiento y purificación permitieron el aislamiento y la elucidación estructural de los constituyentes inactivos **116**, **121-124**, **130-139**, **144** y **145**. Los compuestos **142** y **143** exhibieron actividades citotóxicas marginales, por lo que no fueron determinados sus valores de CI_{50} . El estudio químico de los materiales vegetales permitió la caracterización de siete diterpenos: tres *ent*-labdanos (**117**, **118**, **119**), tres *neo*-clerodanos (**116**, **122**, **123**) y un *cis-ent*-clerodano (**121**), ocho sesquiterpenos: dos cycloaxanos (**132**, **133**), dos cadinanos (**134**, **135**), dos isodaucanos (**136**, **137**), un *cis*-eudesmano (**138**) y un axano (**139**), siete triterpenoides (**140**, **141**, **115**, **127-129** y **125**), un monoterpenoide (**144**), cuatro flavonoides (**120**, **124**, **142**, **143**), dos cumarinas (**130**, **131**), una \pm butirolactona (**145**), y un carbohidrato (**126**). Catorce sustancias son nuevos compuestos (**119**, **121**, **132-141**, **144**, **145**) y diecisiete son productos naturales conocidos (**115-118**, **120**, **122-131**, **142**, **143**). Los compuestos **119**, **135** y **137** fueron identificados como los derivados de los productos naturales **117**, **134** y **136**, respectivamente. Las estructuras de los compuestos fueron determinadas mediante el análisis minucioso y exhaustivo de sus propiedades espectrométricas, espectroscópicas (incluyendo los experimentos 1D-RMN y 2D-RMN) y quirópticas. Las configuraciones relativas de estos compuestos fueron determinadas y confirmadas mediante el análisis de los espectros NOESY, NOE-diferencial 1D y por difracción de rayos X. La determinación de la configuración absoluta de los terpenoides **118**, **122-124**, **132-136** y **145** fue realizada mediante el método de dicroísmo circular experimental y teórico (para **118**), y la aplicación de reglas específicas tales como la quiralidad del dieno-benzoato, la helicidad del dieno, la quiralidad del dibenzoato, la regla del sector benzoato, la quiralidad del excitón de benzoatos alílicos y la regla del octante. Considerando las configuraciones absolutas asignadas para **132-137**, y con base en ciertas rutas biogénicas propuestas previamente para sesquiterpenos relacionados, se hipotetizaron sus rutas biogénicas a partir del (-)-germacreno D como el precursor biogénico.

Introducción

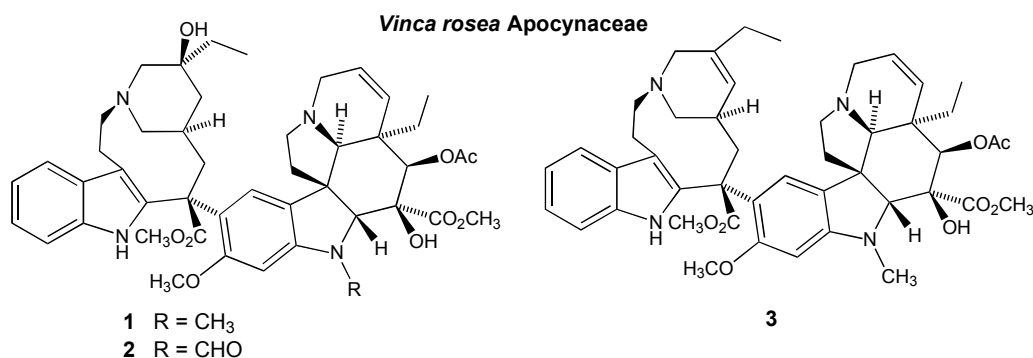
Los productos naturales han sido una fuente invaluable de agentes quimioterapéuticos usados para la prevención, el tratamiento o la cura de las enfermedades que han aquejado a la humanidad a través de su historia. A pesar de que la industria farmacéutica disminuyó su interés en la investigación de productos naturales durante las tres décadas pasadas, los avances tecnológicos en las estrategias seguidas para la generación de moléculas líderes han propiciado un interés renovado en la búsqueda de productos naturales útiles para el diseño de fármacos más potentes, seguros y eficaces. Así, la identificación de moléculas líderes a menudo ha involucrado la evaluación de compuestos puros o de los extractos, como inhibidores o activadores de un blanco biológico específico usando modelos *in vitro* o *in vivo* [1].

El advenimiento de técnicas de rastreo de alta eficiencia de las bibliotecas químicas naturales o sintéticas disponibles contra blancos moleculares específicos, los avances en la biología molecular, celular y genómica, así como la gran diversidad estructural y la alta especificidad bioquímica que muestran los productos naturales, han propiciado que el sector público y privado retomen su interés en la búsqueda de agentes terapéuticos potenciales a partir de fuentes naturales (plantas, animales y microorganismos) o procedimientos sintéticos (mediante química combinatoria, y por diseño asistido por computadora aunado a la síntesis química) [1].

La labor de investigación pública y privada en el sector salud se enfoca principalmente en cinco áreas relacionadas a las enfermedades con mayor mortalidad en el mundo, tales como: a) oncológicas, b) infecciosas c) cardiovasculares y metabólicas, d) inmunológicas, inflamatorias y desórdenes relacionados, y e) neurológicas. De estas enfermedades, el cáncer ocupa la segunda posición en número de decesos por año a nivel mundial, lo cual ha originado una búsqueda intensa de nuevos agentes anticancerígenos más eficaces y no susceptibles a la resistencia creada por las células tumorales. Así, los anticancerígenos más relevantes, no solo por la complejidad estructural sino también por el mecanismo de acción, han sido aislados a partir de plantas [1e].

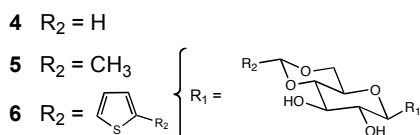
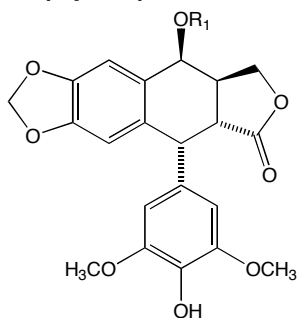
Algunas de las moléculas antineoplásicas obtenidas como productos naturales o sus derivados sintéticos usadas en el tratamiento del cáncer son: vinblastina (Velban, **1**), vincristina (Oncovin, **2**), vinorelbina (Navelbine, **3**), podofilotoxina (**4**), etopósido (VP-16, **5**), tenipósido (VM-26, **6**), paclitaxel (Taxol, **7**), docetaxel (Taxotere, **8**), camptotecina (**9**), 10-hidroxicamptotecina (**10**), topotecano (Hycamtina, **11**) e irinotecano (Camptosar, **12**) [1b]. Los alcaloides **1** y **2** fueron aislados de *Vinca rosea* o *Catharanthus roseus* (Apocinaceae) y son usados para el tratamiento del

linfoma de Hodgkin y la leucemia infantil aguda. A partir de estos alcaloides se han diseñado y sintetizado muchos análogos entre los que se destaca **3**.

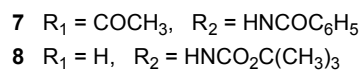
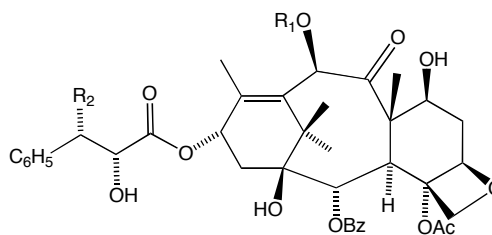


Por otra parte, el lignano podofilotoxina (**4**), aislado de *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae), inhibe el ensamblaje de microtúbulos y por consiguiente inhibe la mitosis en cáncer pulmonar, testicular, leucemias y linfomas. A pesar de que **5** y **6** se obtuvieron como los análogos semisintéticos de **4**, éstos no mostraron el mismo mecanismo de acción sino que inhibieron la topoisomerasa II con la ruptura consecutiva del ADN, en los mismos tipos de neoplasias. Cabe destacar que el paclitaxel (**7**), constituyente de *Taxus brevifolia* (Taxaceae), y su análogo sintético **8**, exhibieron un mecanismo de acción opuesto al de **4**, es decir, promovieron el ensamblaje de microtúbulos y la inhibición de la mitosis en las células de cáncer de mama, cerebro, endometrio y ovario.

Podophyllum peltatum Berberidaceae



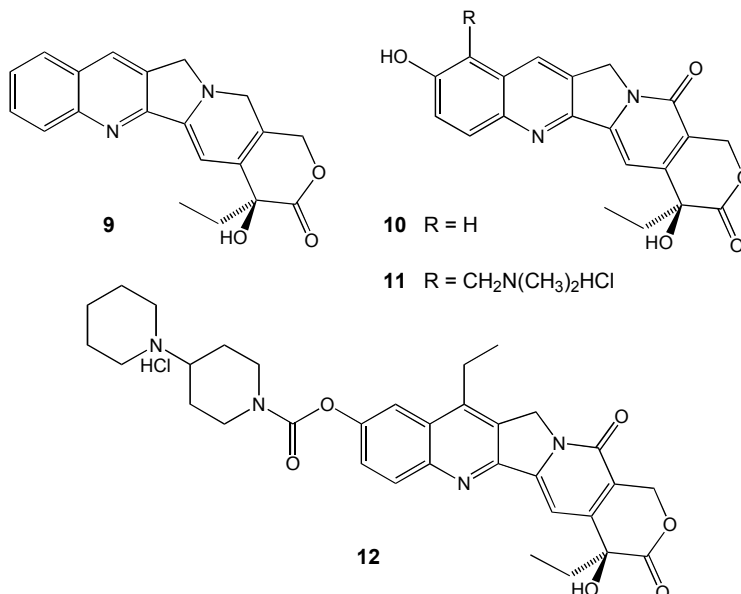
Taxus brevifolia Taxaceae



Por otro lado, los alcaloides **9** y **10**, aislados de *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), inhiben las células de cáncer de estómago, recto, colon, bazo, hígado, cabeza y cuello, mediante la inhibición de la topoisomerasa I y la consecuente fragmentación del ADN. Los compuestos **11** y **12**

fueron sintetizados a partir de la camptotecina (**9**) a fin de mejorar ciertas propiedades de biodisponibilidad y eficacia [1d].

Camptotheca acuminata Nyssaceae



Así, se ha informado que el tratamiento del cáncer, a nivel etnomédico y clínico, involucra el uso de plantas superiores (y sus constituyentes) pertenecientes a las familias Taxaceae, Nyssaceae, Apocinaceae, Berberidaceae, Liliaceae, Podocarpaceae, Annonaceae y Euphorbiaceae. De éstas, los estudios químicos y farmacológicos dirigidos a especies selectas de la familia Euphorbiaceae han revelado la presencia de diterpenos estructuralmente complejos con propiedades citotóxicas y antitumorales relevantes. Por un lado, los estudios químicos comprenden a los diterpenos macrocíclicos (crotofolano, jatrofano, latirano y cembrano) y sus derivados biogénicos (tigliano, ingenano, ramnofolano y dafnano) [2]; y por el otro, los estudios farmacológicos han informado que los diterpenos de tipo jatrofano, aislados de *Jatropha gossypifolia*, poseen propiedades citotóxicas y antineoplásicas notables [2b]; y que los diésteres de forbol (tigliano) y los monoésteres de ingenol actúan generalmente sobre la enzima PKC (proteína-cinasa C). Asimismo, ciertos derivados del forbol, ingenol y resiniferol mostraron actividades antitumorales y antivirales relevantes por lo que fueron considerados como posibles agentes quimioterapéuticos [3]. En consecuencia, los hallazgos sobre este tipo de sustancias han originado una intensa investigación en diferentes líneas: a) investigación química y farmacológica de otras especies de la familia Euphorbiaceae, b) caracterización de la parte farmacofórica (responsable de la actividad) de las moléculas con potencial farmacéutico y sus mecanismos de acción, c) realización de sus síntesis totales, d) obtención de derivados usando moléculas líderes de este tipo de diterpenos [3b].

Considerando que la incidencia de cáncer en México se ha incrementado en los últimos años [4] y que algunos diterpenos aislados de las especies de la familia Euphorbiaceae han mostrado actividades biológicas sobresalientes en este rubro, se planteó un proyecto de investigación que incluyera la evaluación citotóxica de ciertas especies de plantas de esta familia con el propósito de rastrear y caracterizar productos naturales bioactivos de estructura novedosa, los cuales pudieran eventualmente servir como prototipo para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales. Así, la presente investigación se enfocó al estudio químico y biológico de dos especies de *Croton* (*C. glabellus* y *C. alamosanus*) y una de *Jatropha* (*J. neopauciflora*), las cuales mostraron actividades citotóxicas promisorias cuando fueron evaluadas frente a cinco líneas celulares de tumores humanos. Las sustancias bioactivas aisladas comprenden diterpenos de tipo labdano (**117-119**), los flavonoides **120**, **142** y **143**, y los triterpenos **127**, **128** y **140**. Las estructuras de los compuestos bioactivos, incluyendo la de los inactivos (**115**, **116**, **121-126**, **129**, **130**, **131-139**, **144**, **145**), fueron determinadas mediante el análisis exhaustivo de sus propiedades espectroscópicas, espectrométricas, quirópticas y mediante la comparación con los datos informados en la literatura para sus análogos estructurales. La determinación de sus configuraciones absolutas fue realizada mediante el análisis de sus propiedades quirópticas experimentales y teóricas, y mediante la aplicación de reglas derivadas del método de dicroísmo circular. Los resultados derivados del análisis quiróptico permitieron hipotetizar las rutas biogénicas de los sesquiterpenos **132-139** aislados de *J. neopauciflora*, considerando el (-)-germacreno D como el precursor biogénico y el trabajo sobre sesquiterpenoides relacionados de König y Bülow [5]. Adicionalmente, se informan los resultados de las actividades citotóxicas de los compuestos caracterizados en el presente trabajo y de los derivados obtenidos de los mismos.

Capítulo 1

Antecedentes

1.1 Generalidades de la familia Euphorbiaceae

1.1.1 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Euphorbiales

Familia: Euphorbiaceae

Géneros: *Croton*, *Jatropha*, etc.

Especies: *Croton alamosanus*, *Croton glabellus*, *Croton niveus*, *Croton pseudoniveus*, *Croton roxanae*, *Jatropha neopauciflora*, *Jatropha platyphylla*, etc.

La familia Euphorbiaceae ocupa la sexta posición en cuanto a número de especies en el reino de las plantas superiores después de las familias Orchidaceae, Asteraceae, Fabaceae, Poaceae y Rubiaceae. Está constituida por aproximadamente 320 géneros y 8,700 especies distribuidos a través de los dos hemisferios en regiones tropicales, subtropicales y templadas. Se divide en 5 subfamilias: Euphorbioideae, Crotonoideae, Acalyphoideae, Phyllanthoideae, Oldfieldiideae. A su vez, cada una de las 5 subfamilias se dividen en tribus que están integradas principalmente por los siguientes géneros: *Euphorbia* (1,840 especies), *Croton* (1225 especies), *Pedilanthus* (15 especies), *Acalypha* (465 especies), *Glochidon* (280 especies), *Macaranga* (240 especies), *Manihot* (108 especies) y *Jatropha* (188 especies) [2a, 2c].

En México, la familia Euphorbiaceae contribuye a un 3% de la flora vascular nacional, estimada en 22 000 especies, pues se calcula que está integrada por 43 géneros y 782 especies. Entre los géneros nacionales con mayor número de especies se destacan: *Euphorbia* con 241, *Croton* con 124, *Acalypha* con 108, *Jatropha* con 48 y *Phyllanthus* con 41, lo cual representa el 72% de las especies de Euphorbiaceae en México. Así, las subfamilias de territorio nacional están representadas por:

Subfamilias	Géneros	Especies
Euphorbiodeae	10	296
Crotonoideae	7	223
Acalyphoideae	16	203
Phyllantoideae	8	55
Oldfieldiideae	2	5

1.1.2 Importancia biológica

Las propiedades biológicas que han sido informadas para muchas especies de plantas de la familia Euphorbiaceae son consecuencia de la gran diversidad estructural que exhiben. Algunas plantas son conocidas por sus propiedades tóxicas, irritantes a mucosas y piel, inductoras de inflamación, promotoras de cáncer, etc. Otras plantas de esta familia son reconocidas por sus propiedades medicinales, piscicidas, alimenticias y económicas (plantas ornamentales, fuentes de combustible, goma, lubricantes, etc.) [6].

La diversidad química es debida principalmente a la gran cantidad de diterpenos con diferentes arreglos en sus esqueletos, dentro de los que se pueden destacar a los diterpenos macrocíclicos y sus derivados biogénéticos (tigliano, dafnano, ingenano, ramnofolano), diterpenos de tipo labdano, clerodano, pimarano etc. De las especies de plantas que integran la familia Euphorbiaceae (subfamilia Crotonoideae) se han aislado diterpenos altamente tóxicos que promueven procesos de inflamación y formación de tumores, y otro tipo de diterpenos que no exhiben estas propiedades tóxicas y que han mostrado aplicaciones farmacológicas contra ciertos tumores. Algunos diterpenos macrocíclicos han mostrado propiedades antitumorales siendo considerados como agentes potencialmente anticancerígenos. Por otra parte, ciertos diterpenos de tipo tigliano, dafnano e ingenano son bien conocidos por sus propiedades promotoras de cáncer e inflamación. Las investigaciones subsecuentes sobre la química de esta familia han aportado una gran variedad estructural de dichos diterpenos macrocíclicos y sus derivados biogénéticos, algunos de los cuales han mostrado actividad citotóxica, antitumoral y anti-VIH [7]. Por otro lado, se ha informado de la presencia de agentes hipotensores (tetrametilpirazina) en *Jatropha podagrica*; compuestos cianogénicos en *Croton lobatus*, *C. punctatus*, *C. scouleri*; metabolitos secundarios cocarcinogénicos (promueven y potencian tumores en presencia de sustancias cancerígenas) o anticancerígenos en *Croton tiglium*, *Euphorbia ingens* y de compuestos usados en cosméticos aislados a partir de *Euphorbia antisyphilitica*, etc. [6].

1.1.3 Perfil químico

Los diterpenos química- y biológicamente más importantes que han sido aislados de la familia Euphorbiaceae, se clasifican en diterpenos macrocíclicos como los de tipo casbano, jatrofano, latirano, jatrofolano, crotofolano y ramnofolano; así como, en diterpenos de tipo tigliano, dafnano, ingenano, clerodano y labdano, principalmente (figura 1) [2].

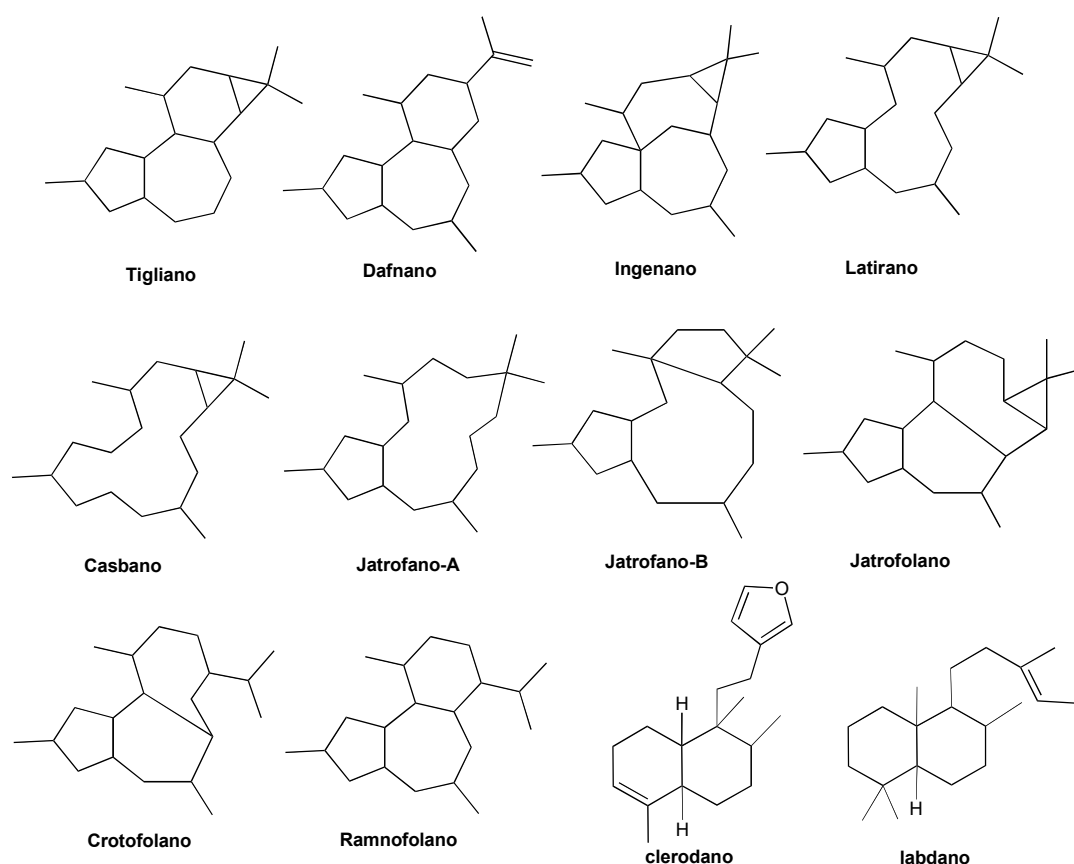
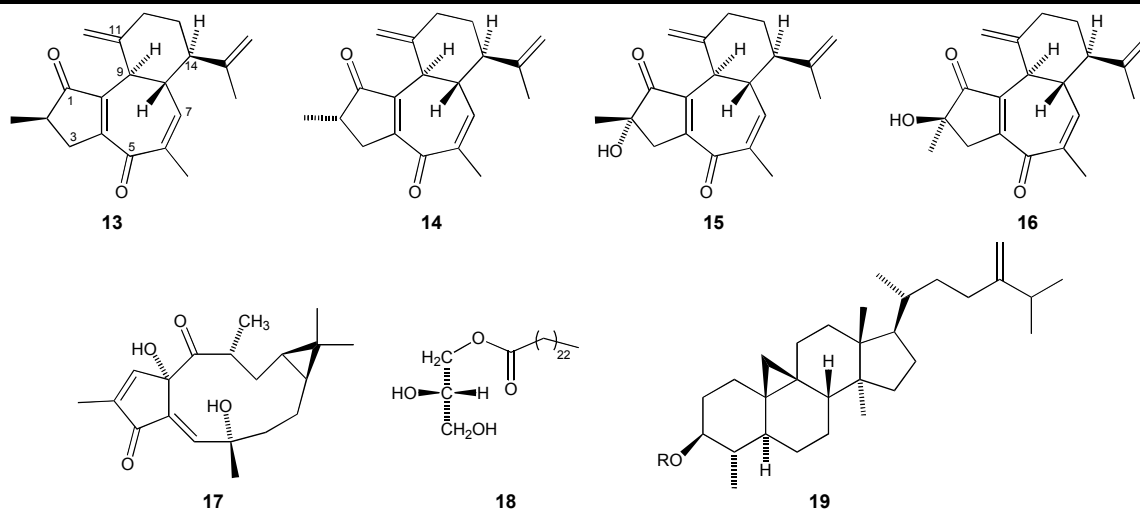


Figura 1. Tipos estructurales de diterpenos aislados de la familia Euphorbiaceae.

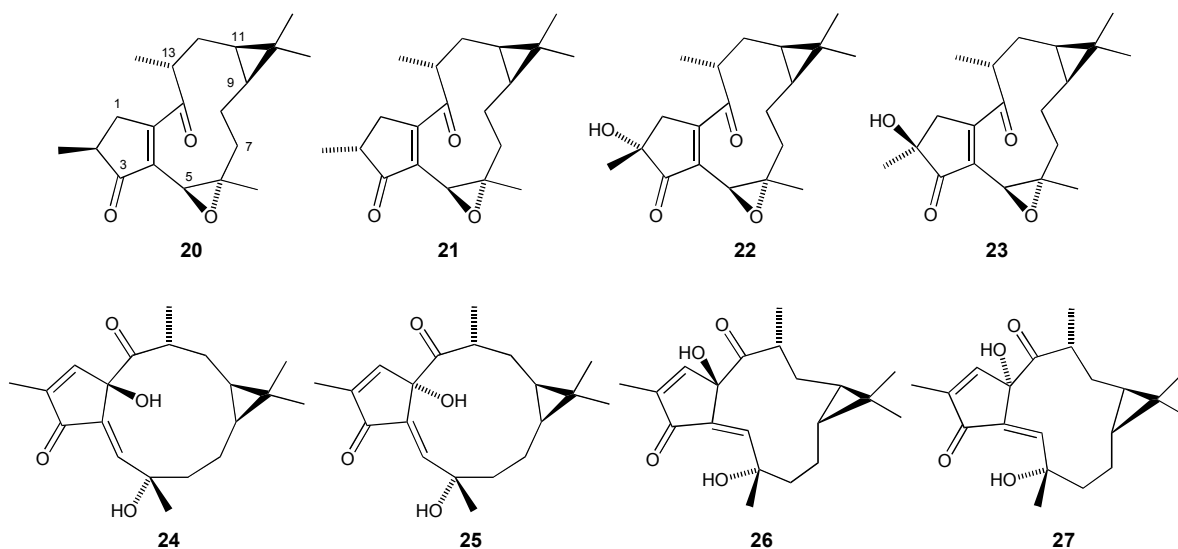
1.1.4 Composición química de *Jatropha*

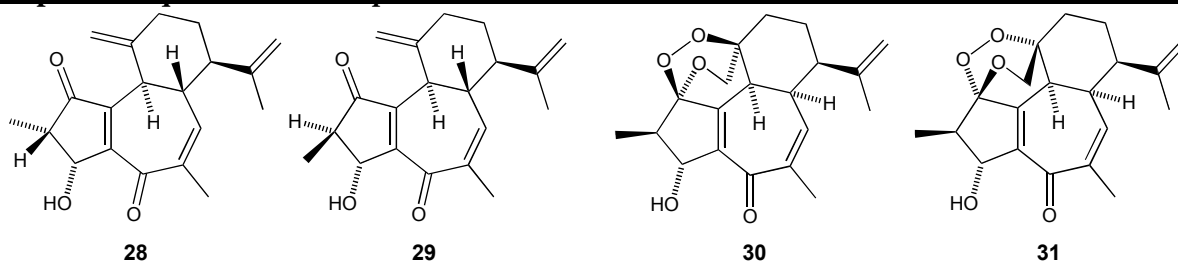
El género *Jatropha* biosintetiza principalmente diterpenos (jatrofinas, jatrofonas, jatrogrossidionas, etc.), péptidos cíclicos (curcasinas y chevalierinas), triterpenos, lignanos, alcaloides, componentes fenólicos, etc. [8 y referencias citadas ahí]. A continuación se describe una sinopsis de los constituyentes químicos de algunas especies del género *Jatropha*.

A partir de las raíces de *J. curcas* se han caracterizado diterpenos de tipo ramnofolano: curcusonas A (13), B (14), C (15) y D (16); diterpenos de tipo latirano: curculatirano A (17) y el glicerol-tetracosanoato (18). De las partes aéreas se ha aislado el triterpeno jatrocúrina (19).

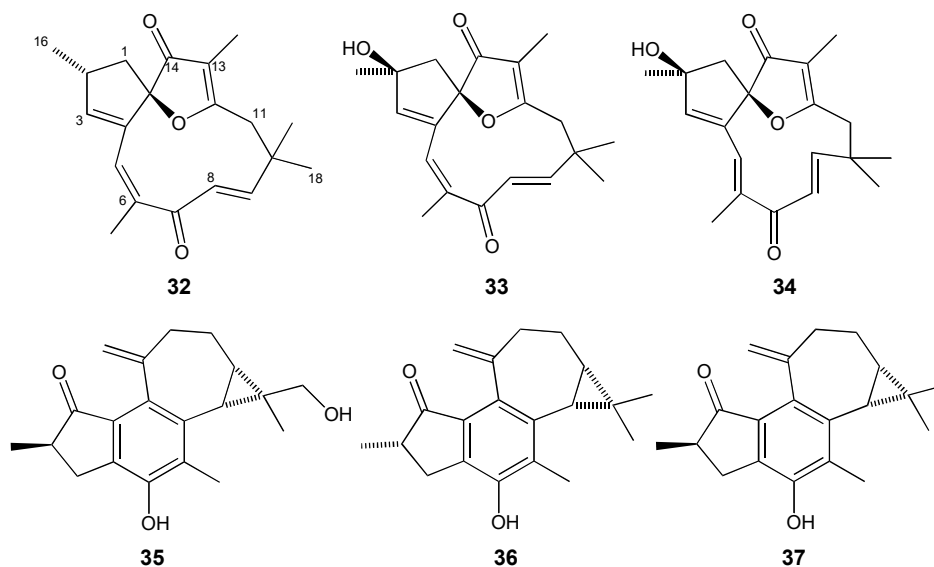


De las raíces de *J. grossidentata* se han caracterizado diterpenos de tipo latirano: isojatrogrossidiona (**20**), 2-*epi*-isojatrogrossidiona (**21**), 2-hidroxi-isojatrogrossidiona (**22**), 2-*epi*-hidroxi-isojatrogrossidiona (**23**), jatrogrossidentadiona (**24**), (4-*E*)-jatrogrossidentadiona (**25**), (4-*E*)-15-*epi*-jatrogrossidentadiona (**26**), (4-*Z*)-jatrogrossidentadiona (**27**); diterpenos de tipo ramnofolano: jatrogrossidiona (**28**) y 2-*epi*-jatrogrossidiona (**29**). De la corteza se han aislado diterpenos de tipo ramnofolano: caniojano (**30**) y 1,11-*bis*-caniojano (**31**), mientras que de las raíces de *J. zeyheri* se caracterizó el 2-*epi*-isojatrogrossidiona (**21**).

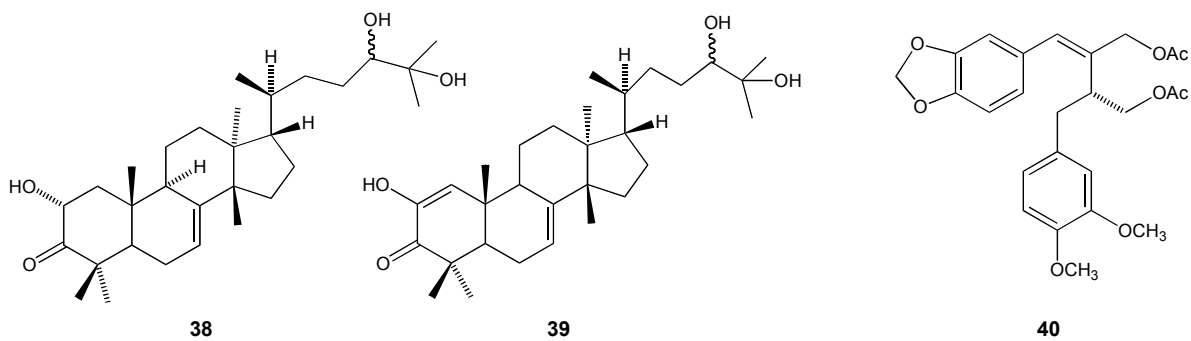


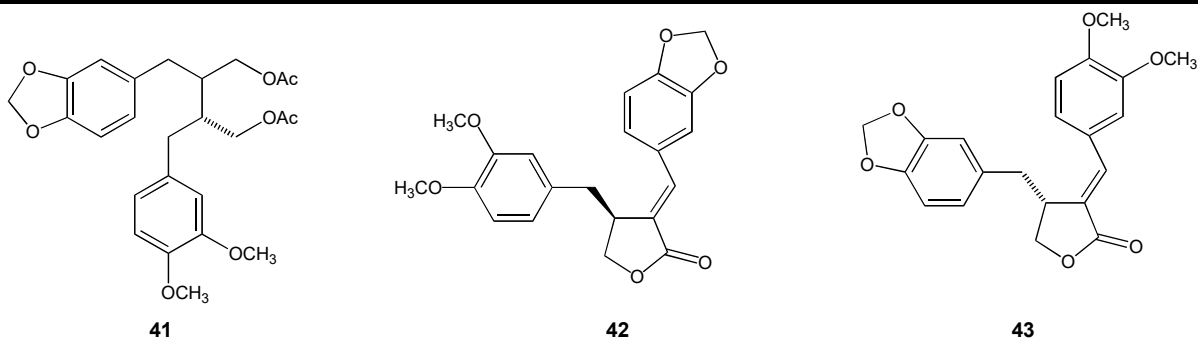


Por otro lado, a partir de las raíces de *J. gossypifolia* se han caracterizado diterpenos macrocíclicos: jatrofona (**32**), 2 Δ -hidroxijatrofona (**33**), 2 Δ -hidroxi-5,6-isojatrofona (**34**), jatrolfona A (**35**) y B (**36**) y jatrolfol (**37**).

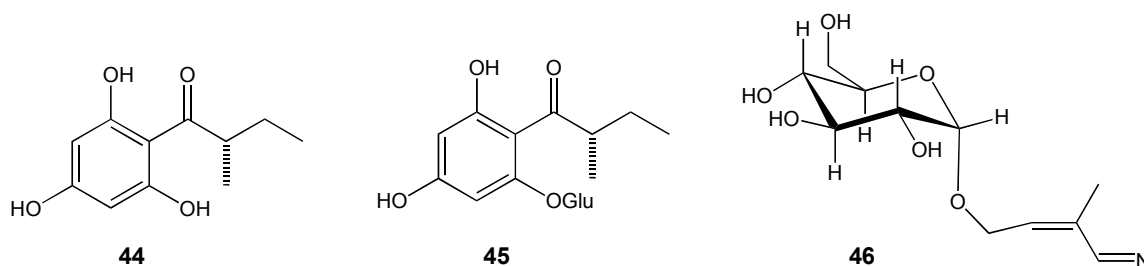


Asimismo, de las partes aéreas de *J. gossypifolia* se han aislado triterpenos y lignanos: 2,24,25-trihidroxitirucal-7-en-3-ona (**38**), 2,24,25-trihidroxitirucal-1,7-dien-3-ona (**39**), prasantalina (**40**), dihidroprasantalina (**41**), sushilactona (**42**) [37] y gossipifano (**43**).

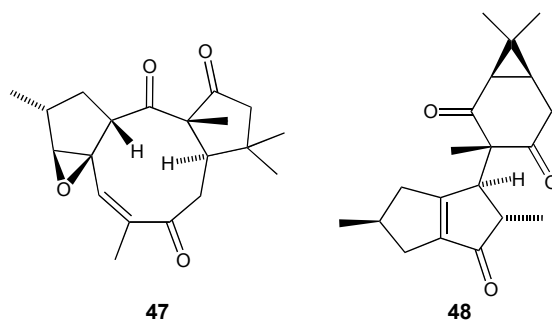




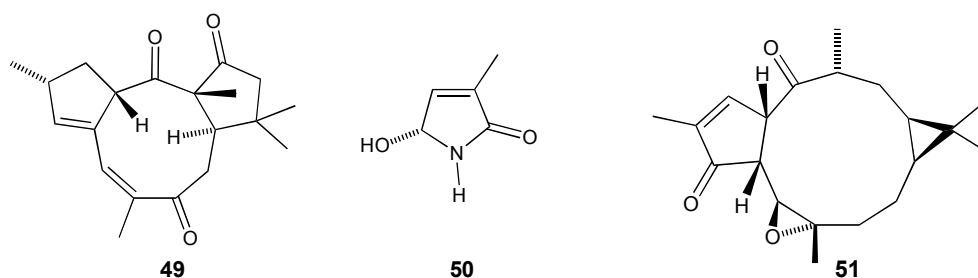
Del látex de *J. multifida* se han caracterizado multifidol (**44**), 2-O- β -glucopiran-multifidol (**45**) y labaditina (**46**).



A partir de las raíces de *J. dioca* se aislaron citlalitriona (**47**) y riolozatriona (**48**).

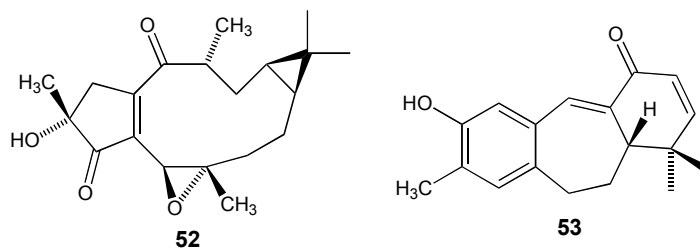


De las raíces de *J. macrorrhiza* se han obtenido el diterpeno macrocíclico jatrofatriona (**49**) y el alcaloide jatrofam (**50**). De las partes aéreas de *J. weddelliana* se aisló el diterpeno jatrowediona (**51**).



De la raíz de *J. podagrica* se aisló el curculatirano A (**17**). Por otra parte, de las raíces de *J. aureus* se obtuvo el diterpeno curculatirano B (**52**).

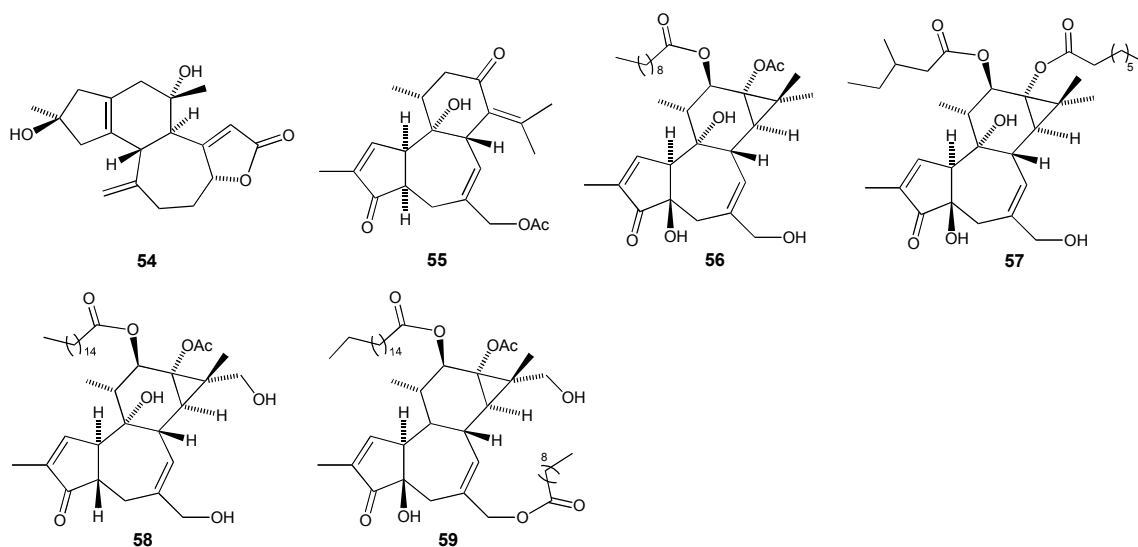
Mientras que, la xochitlolona (**53**) fue aislada de las raíces de *J. multiloba*.



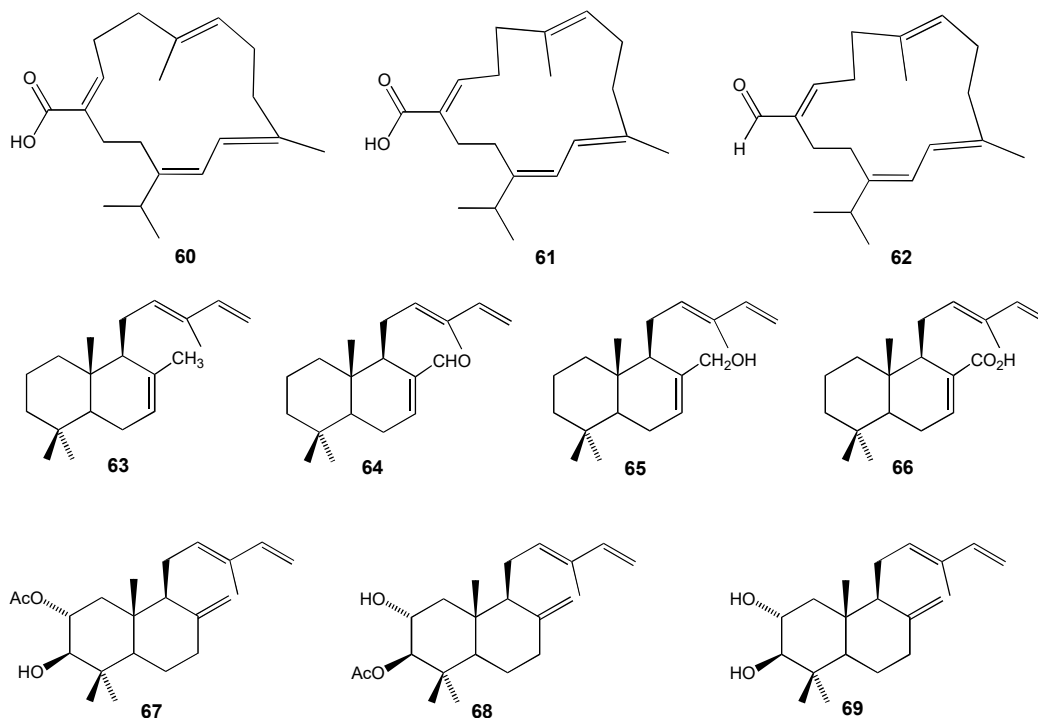
1.1.5 Composición química de *Croton*

El género *Croton* biosintetiza una gran variedad estructural de productos naturales, tales como los diterpenos de tipo crotofolano, tigliano, ramnofolano, cembreno, labdano, clerodano; triterpenos de tipo lupano y oleanano; alcaloides; lignanos, etc. A continuación se describirán sucintamente algunos constituyentes de este grupo de plantas.

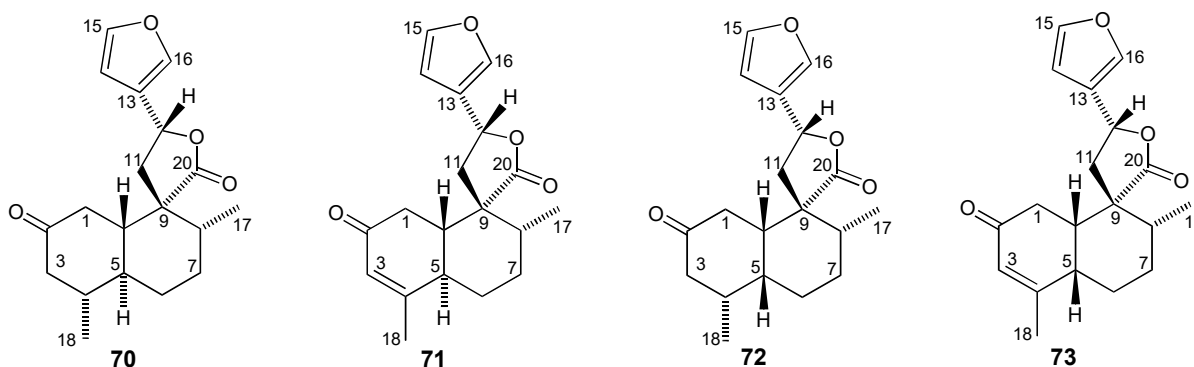
Un ejemplo muy representativo de una especie de *Croton* usada en la medicina tradicional es *C. tiglium*, cuyo aceite de las semillas y la corteza se utilizan para tratar los tumores. El tratamiento comprende la apoplejía, cáncer, verrugas, disentería, esquistosomiasis, también se usan ciertas partes de la planta como purgante, vesicante, catártico, etc. El aceite de las semillas contiene sustancias cocarcinogénicas y sustancias antitumorales como los ésteres de forbol. Adicionalmente, puede destacarse la presencia de diterpenos de tipo crotofolano: crotofolina (**54**), aislada de *C. coryfolius*; de tipo ramnofolano: 13,15-seco-4,12-didesoxi-4 β -forbol-20-acetato (**55**), aislado de *C. rhamnifolius*; de tipo tigliano: 12,13-diésteres de forbol aislados de *C. tiglium* (**56, 57**) y *C. flavens* (**58, 59**) [2a].

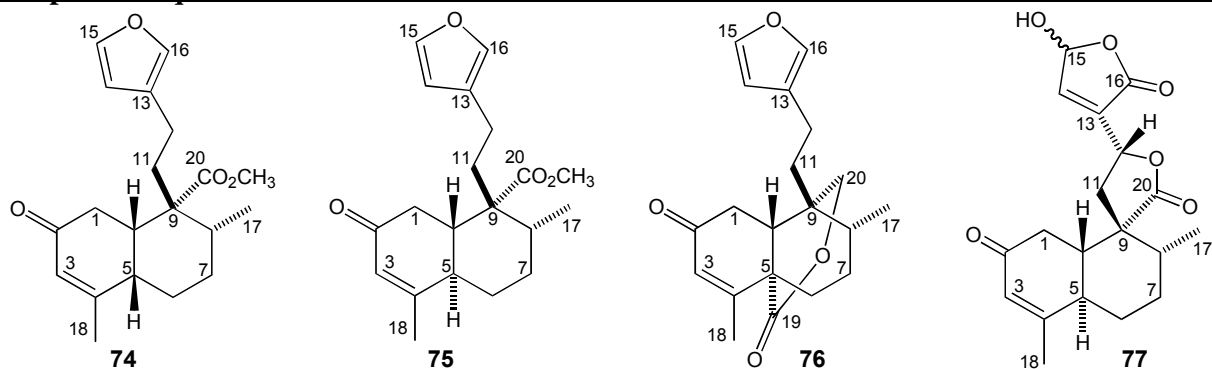


Por otra parte, se ha reportado que *C. oblongifolius* contiene diterpenos de tipo cembreño: ácido crotocembraneico (**60**), el ácido neocrotocembraneico (**61**) neocrotocembranal (**62**); diterpenos de tipo labdano: labda-7,12(*E*),14-trieno (**63**), labda-7,12(*E*),14-trien-17-al (**64**), labda-7,12(*E*),14-trien-17-ol (**65**), ácido labda-7,12(*E*),14-trien-17-oico (**66**), 2-acetoxi-3-hidroxi-labda-8(17),12(*E*),14-trieno (**67**), 3-acetoxi-2-hidroxi-labda-8(17),12(*E*),14-trieno (**68**) y 2,3-dihidroxi-labda-8(17),12(*E*),14-trieno (**69**) [9].

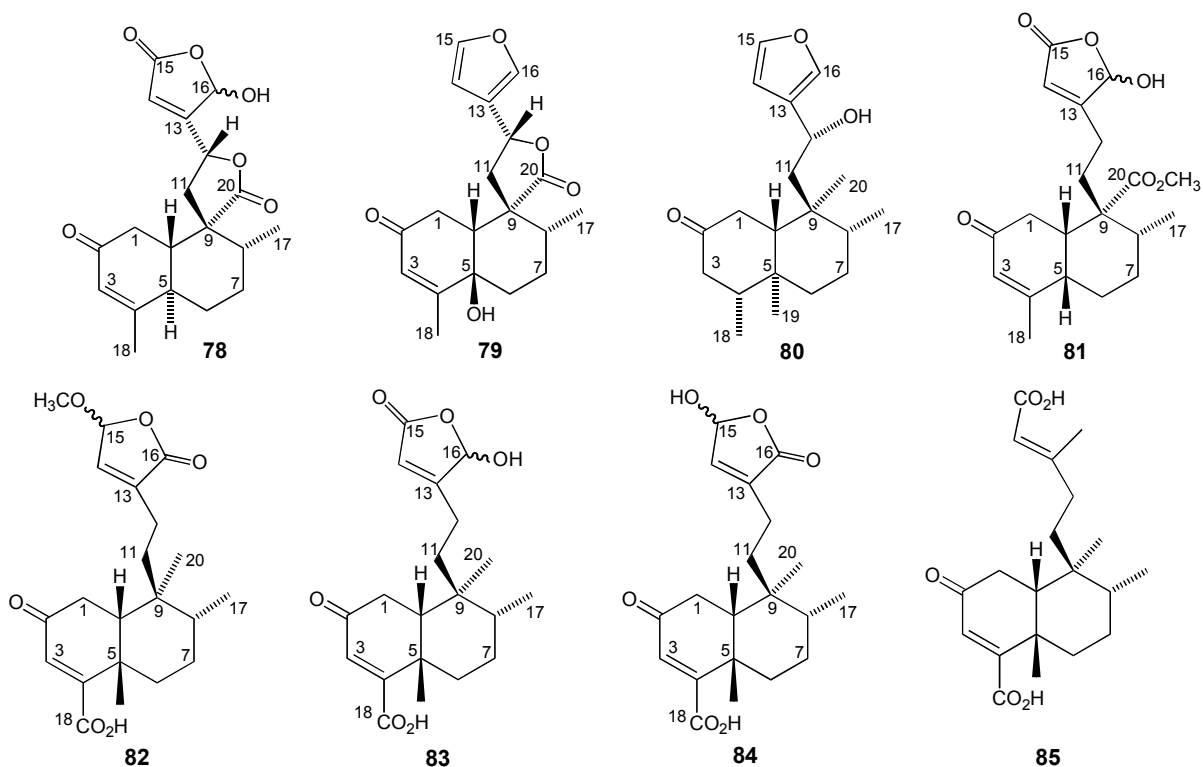


A partir de *C. cajucara* se han aislado diterpenos de tipo clerodano: crotonina (**70**), *cis*-deshidrocrotonina (**71**), *trans*-crotonina (**72**), *trans*-deshidrocrotonina (**73**), *cis*-cajucarina B (**74**), *trans*-cajucarina B (**75**), sacararina (**76**), cajucarinólida (**77**) e isocajucarinólida (**78**) [10].

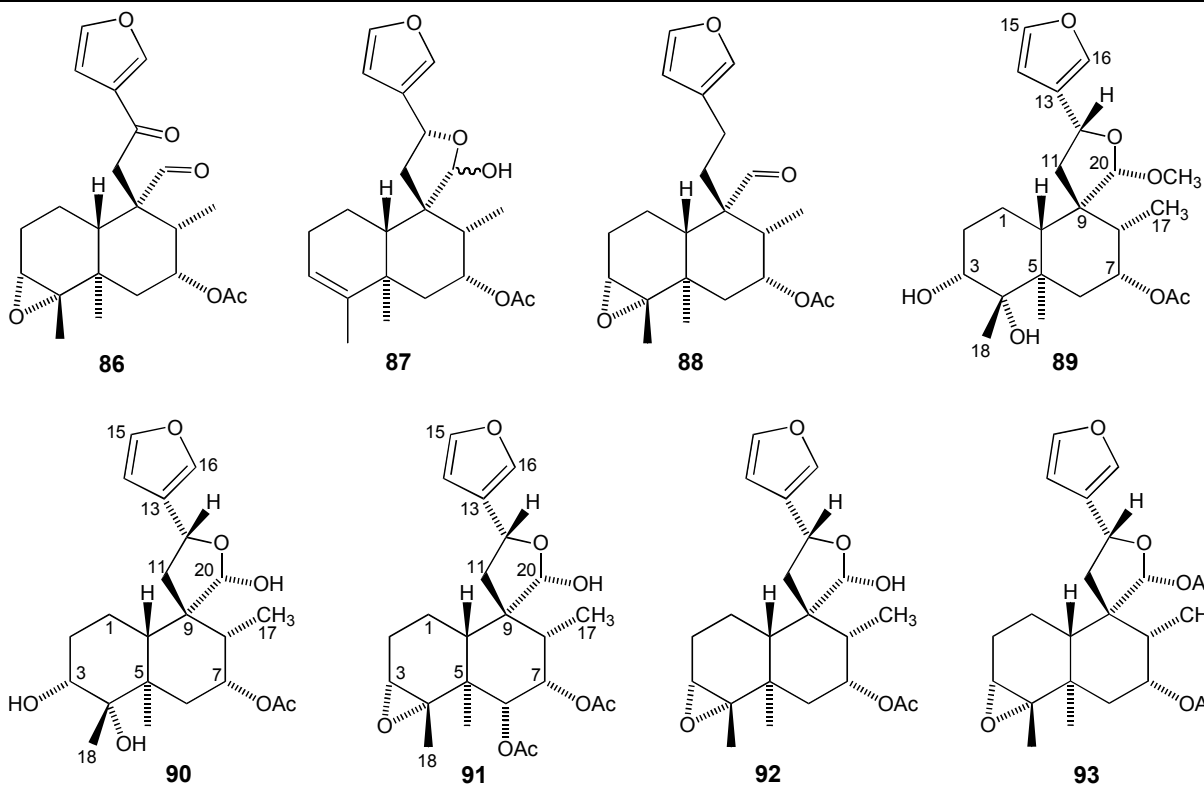




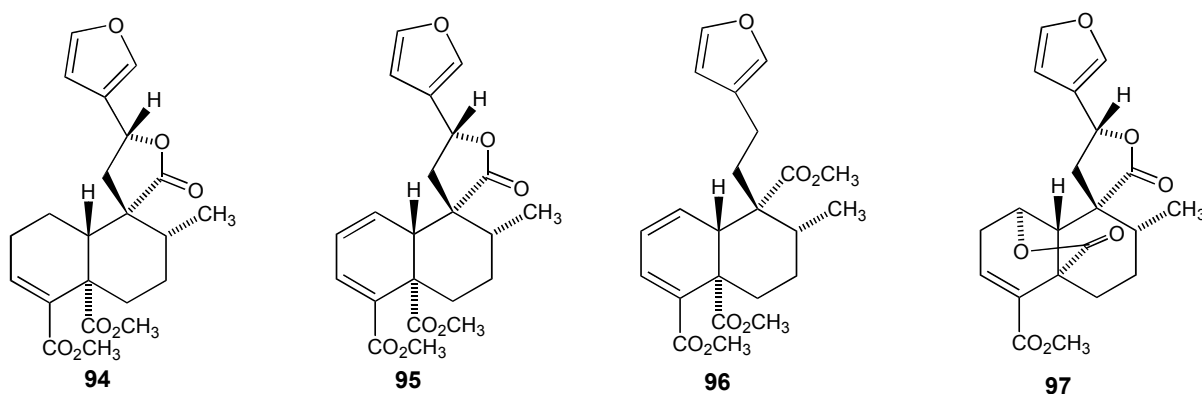
Por otro lado, a partir de *C. schiedeanus* se han reportado diterpenos de tipo clerodano: 5 β -hidroxi-*cis*-dehidrocrotonina (**79**), 12(*R*)-12-hidroxiscascarillona (**80**), (-)-16-hidroxi-19-*nor*-2-oxo-*cis*-cleroda-3,13-dien-15,16-ólida-20-oato de metilo (**81**), (+)-15-metoxifloridólida (**82**), ácido (-)-12,16-dihidroxi-*cis*-clerodane-3,13-dien-15,16-ólida-18-oico (**83**), floridólida A (**84**) y ácido haplopápico (**85**) [11].

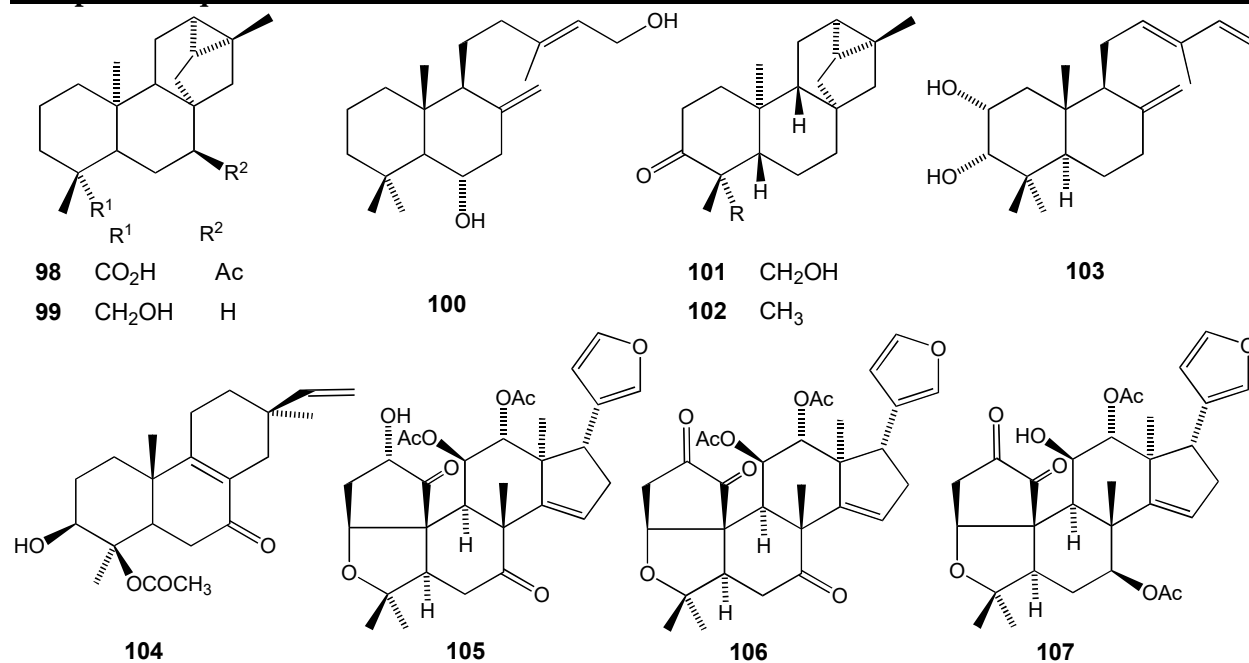


A partir de *C. eluteria* se aislaron diterpenos de tipo *neo*-clerodano: cascarillina B (**86**), C (**87**), D (**88**), E (**89**), F (**90**), G (**91**), H (**92**) e I (**93**) [12].

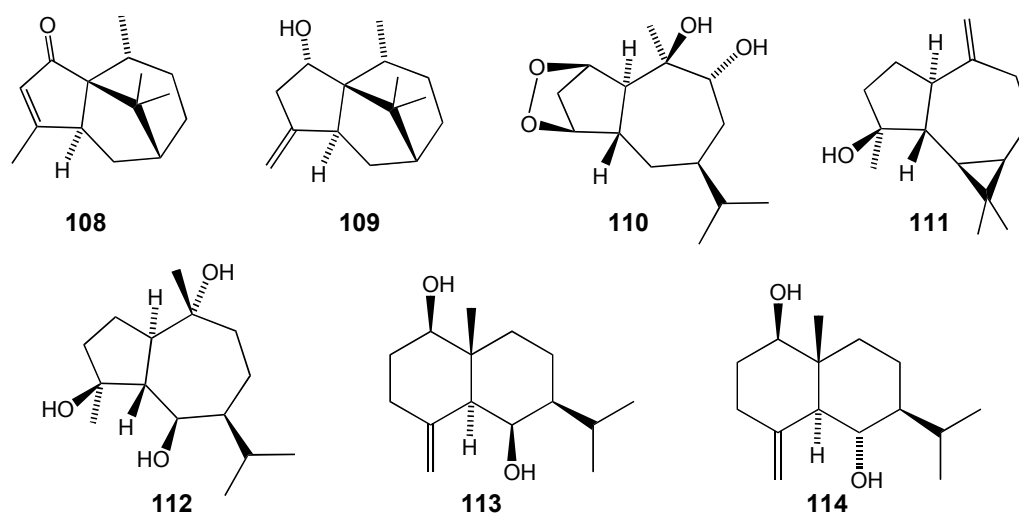


De *C. zambesicus* se aislaron diterpenos de tipo labdano, clerodano, traquilobano: crotoacorilifurano (**94**), crotozambefurano A (**95**), B (**96**) y C (**97**), ácido 7 \perp -acetoxitraquiloban-18-oico (**98**), traquiloban-7 \perp ,18-diol (**99**), crotonodiol (**100**), *ent*-18-hidroxitraquiloban-3-ona (**101**) y *ent*-traquiloban-3-ona (**102**) [13]. Por otro lado, a partir de *C. joufra* se han aislado diterpenos de tipo labdano y pimarano: 2 \perp ,3 \perp -dihidroxiabda-8(17),12(13),14(15)-trieno (**103**) y 3 \perp -hidroxi-19-*O*-acetilpimara-8(9),15(16)-dien-7-ona (**104**) [14]. De *C. jatrophioides* se han aislado tetranorditerpenos: zumketol (**105**), zumsenina (**106**) y zumsenol (**107**) [15].





A partir de *C. arboreous* se aislaron diferentes sesquiterpenos: 5 \downarrow ,7 \downarrow ,10 \downarrow H-3-patchulen-2-ona (**108**), 5 \downarrow ,7 \downarrow ,10 \downarrow H-4-patchulen-2 \downarrow -ol (**109**), 9 \downarrow ,10 \downarrow -dihidroxi-2 \downarrow ,4 \downarrow -peroxi-1 \downarrow ,5 \downarrow ,7 \downarrow H-guayane (**110**), espatulenol (**111**), teucatriol (**112**), 5 \downarrow ,10 \downarrow -4(15)-eudesmen-1 \downarrow ,6 \downarrow -diol (**113**) y 5 \downarrow ,10 \downarrow -4(15)-eudesmen-1 \downarrow ,6 \downarrow -diol (**114**) [16].



Capítulo 2

2.1 Dicroísmo Circular

La actividad óptica es una propiedad que poseen las sustancias de rotar el plano de la luz polarizada transmitida linealmente que incide sobre ellas. Este fenómeno comúnmente se conoce como *rotación óptica* y fue descubierto por Arago en 1811 y por Biot en 1815 cuando trabajaban con sólidos (cuarzo) y líquidos, respectivamente. La luz polarizada linealmente se caracteriza porque su vector eléctrico (\mathbf{E}) se propaga en forma de una vibración coseno plana (onda) siempre en la misma dirección (figura 2).

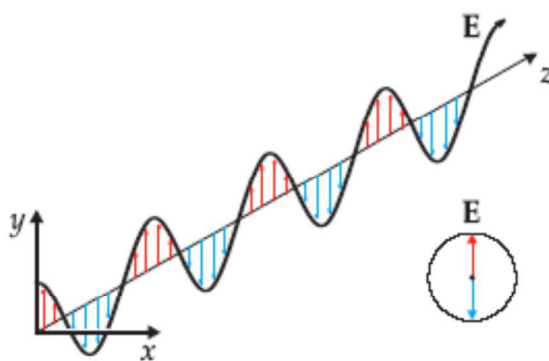


Figura 2. Luz polarizada linealmente.

De acuerdo con Fresnel, un haz de luz polarizada linealmente puede ser expresado por la superposición de dos rayos polarizados circularmente con direcciones opuestas de rotación y con la misma longitud de onda e intensidad. Para un haz de luz polarizada circularmente, el vector eléctrico (\mathbf{E}), de longitud constante, cambia su dirección de manera proporcional al tiempo describiendo una hélice, donde \mathbf{E} se propaga en el sentido de las manecillas del reloj para la luz polarizada girada circularmente a la derecha, o bien, en el sentido opuesto para la luz polarizada girada circularmente a la izquierda (figura 3).

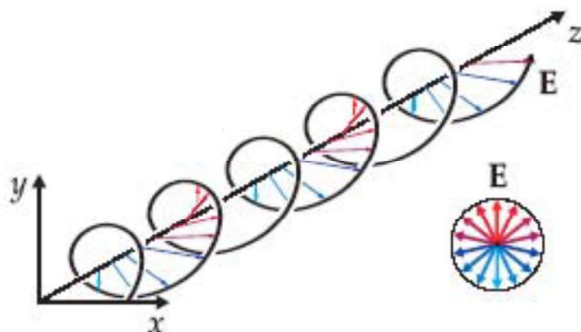


Figura 3. Luz polarizada circularmente a la izquierda.

Entonces, si la fuente de luz emite, simultáneamente y en la misma dirección, haces de luz polarizada de la misma longitud de onda e intensidad pero girados circularmente a la izquierda (*lpcl*) y a la derecha (*lpcr*), la sobreposición de los dos haces produce una vibración polarizada linealmente (figura 4).

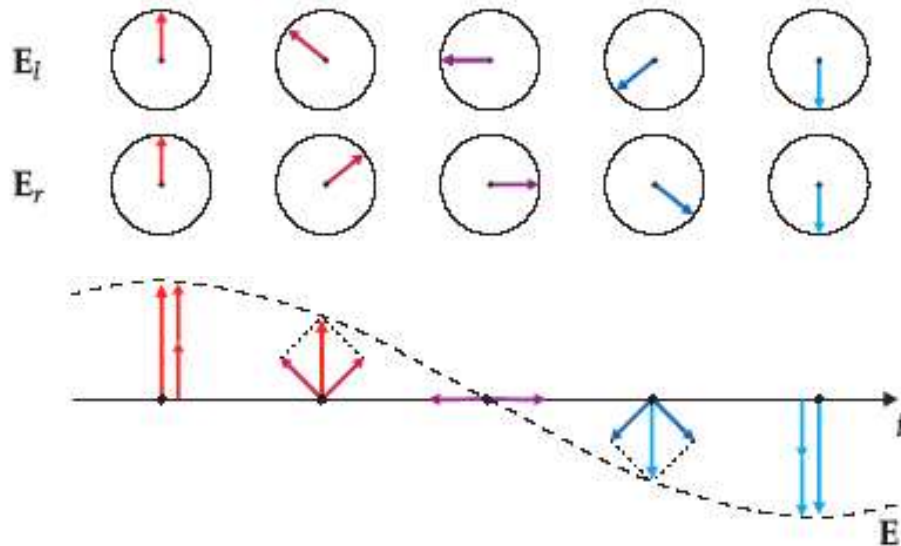


Figura 4. Sobreposición de de los vectores eléctricos E_r de *lpcr* y E_l de *lpcl*.

Por el contrario, la sobreposición de los dos haces (*lpcl* y *lcpr*) propagados con diferentes intensidades y longitudes de onda a través de la sustancia bajo investigación, implica que el vector eléctrico resultante se propague como un haz de luz polarizada elípticamente o una hélice deformada (figura 5) [17].

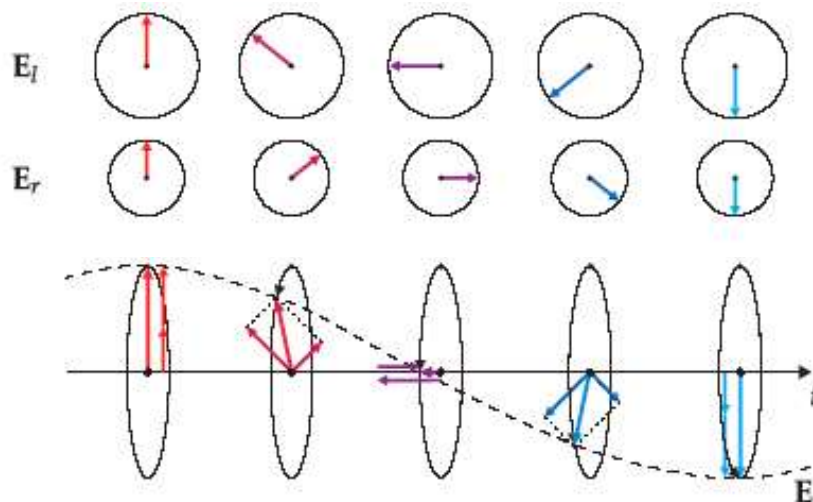


Figura 5. Haz de luz polarizada elípticamente. Sobreposición de los vectores eléctricos E_r de *lpcr* y E_l de *lpcl*.

En la región de una banda de absorción, la luz polarizada girada circularmente a la derecha y a la izquierda se absorbe diferenciadamente y se propaga con diferentes velocidades por un medio ópticamente activo. Así, la luz polarizada linealmente emerge de la muestra quiral como luz polarizada elípticamente con el vector eléctrico resultante trazando una elipse (figura 6).

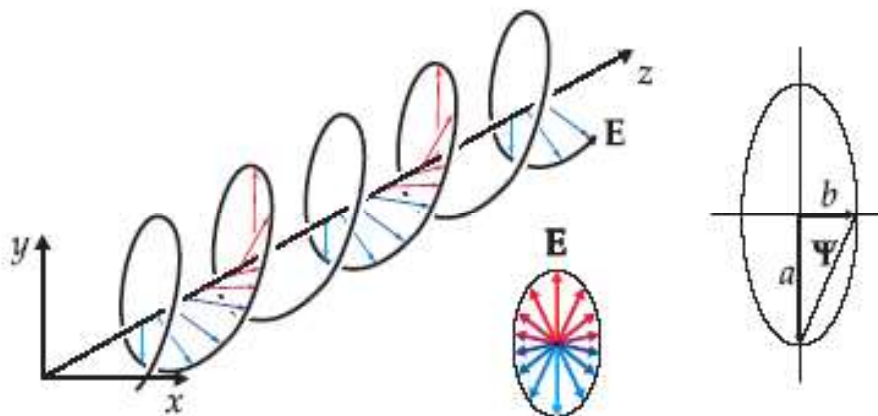


Figura 6. Luz polarizada elípticamente.

En la elipse trazada por el vector eléctrico resultante (línea punteada más elongada, figura 7), la inclinación del eje mayor a representa el ángulo de elipticidad \perp de la luz polarizada linealmente (línea continua más elongada, figura 7).

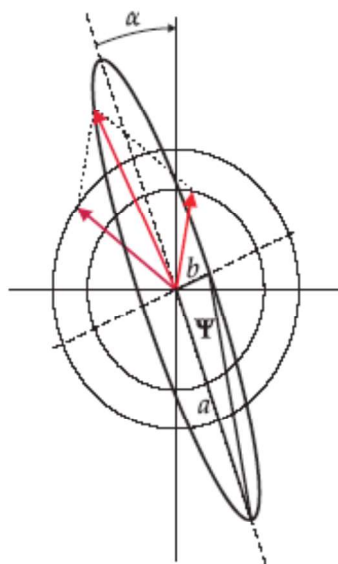


Figura 7. Luz polarizada elípticamente. El ángulo de elipticidad \perp producido desde la luz polarizada linealmente hasta la luz polarizada elípticamente está dado por el desplazamiento del eje mayor a de la elipse.

El cambio desde la luz polarizada linealmente hasta la luz polarizada elípticamente se mide por la elipticidad \perp (figura 7), la cual se define como la tangente del radio del eje menor b al eje mayor a de la elipse.

$$\perp = \arctan(b/a) \quad 2.1)$$

Este comportamiento se conoce como dicroísmo circular (DC) y se describe mediante la absorción dicroica diferencial ($\perp\perp$), la cual proviene de la diferencia de los coeficientes de extinción molar de la luz polarizada girada circularmente a la izquierda (\perp_L) y a la derecha (\perp_R).

$$\perp\perp = \perp_L - \perp_R \quad 2.2)$$

En tanto que, la elipticidad específica se define como:

$$[\perp] = \perp/lc \quad 2.3)$$

donde \perp está expresada en grados, c en g/mL y l en cm.

A partir de la elipticidad específica se puede calcular la elipticidad molar:

$$[\perp] = (\perp\perp) (\text{Peso Molecular})/100 \quad 2.4)$$

la cual está relacionada al $\perp\perp_{\text{max}}$ por la ecuación:

$$[\perp] \perp 3300 \perp\perp_{\text{max}} \quad 2.5)$$

Así, cuando una sustancia ópticamente activa presenta una banda de absorción en determinada región del espectro, se observarán curvas de DC denominadas *curvas efecto Cotton* (positiva o negativa) en honor a A. M. Cotton quien observó este comportamiento anormal. La intensidad de una transición de dicroísmo circular se mide de forma aproximada por el $\perp\perp_{\text{max}}$, pero puede ser medida con mayor exactitud mediante la fuerza rotatoria (R) que expresa el área de una curva de dicroísmo circular en el rango de longitud de onda \perp_1 a \perp_2 (además de que la magnitud de R puede ser positiva o negativa indicando el tipo de efecto Cotton observado o calculado):

$$R = 2.297 \times 10^{-39} \int (\perp\perp_{\text{max}}/\perp) d\perp \quad 2.6)$$

En una molécula bajo excitación con la onda de la luz, la fuerza rotatoria, asociada con la promoción de un electrón desde un orbital molecular en el estado basal hasta un orbital molecular no ocupado, puede ser expresada en términos del momento de transición de dipolo eléctrico (μ_e): $R = \mu_e \times \mu_m$. Así, R depende del momento eléctrico (μ_e) y magnético (μ_m) durante la promoción de una molécula desde su estado basal hasta su estado excitado. Para una molécula quiral que presente actividad óptica fuerte se espera que R sea diferente de cero; es decir, que μ_e y μ_m sean diferentes de cero. Entonces, el fenómeno de la actividad óptica y sus parámetros medibles en dicroísmo circular están directamente relacionados con la presencia de un cromóforo (o más) en la molécula. Además, la condición geométrica necesaria para la existencia de un efecto Cotton es que la molécula sea quiral; es decir, una molécula que no posea eje de reflexión-rotación (S_n , ni plano de reflexión ni centro de inversión).

2.1.1 Cromóforos ópticamente activos

Los cromóforos pueden ser clasificados en tres tipos considerando sus propiedades de simetría, sus naturalezas y sus transiciones electrónicas: 1) Cromóforos Inherentemente Simétricos Perturbados Disimétricamente (cetonas saturadas, cetonas \perp, \perp -insaturadas, enlaces dobles, benzoatos, compuestos aromáticos, etc.). Cuando la simetría de un cromóforo, aislado de perturbaciones por átomos vecinos, es muy alta, el μ_e y μ_m serán iguales a cero ($R = 0$). Por el contrario, cuando el cromóforo es perturbado por los átomos vecinos, el signo positivo o negativo de la fuerza rotatoria permitirá inferir sobre la estereoquímica del ambiente molecular extracromofórico. 2) Cromóforos Inherentemente Disimétricos (dienos conjugados, cetonas \perp, \perp -insaturadas, hexahelicenos). La geometría del cromóforo carece de un eje de rotación-reflexión y por tanto μ_e y μ_m son diferentes de cero. 3) Cromóforos que presentan efectos Cotton debidos a las interacciones dipolo-dipolo entre dos o más de ellos, cuyos orbitales no se sobreponen mutuamente (1,1'-biarilantilos, biopolímeros).

Resumiendo, cuando la luz es absorbida por un cromóforo, un electrón es excitado desde un orbital molecular ocupado a un orbital molecular de antienlace no ocupado y si estos orbitales moleculares son quirales, entonces puede esperarse un efecto Cotton intenso. La presencia de alguno de estos cromóforos en moléculas orgánicas e inorgánicas ha conducido al desarrollo de reglas que permiten correlacionar los signos de sus efectos Cotton con la configuración absoluta de las mismas [18].

2.1.2 Regla de los octantes

Una de las reglas de mayor aplicación en el estudio conformacional y configuracional de moléculas quirales es la *regla de los octantes* de cetonas cíclicas. Las cetonas saturadas exhiben una banda débil en aproximadamente 300 nm atribuida a la transición $n \rightarrow \pi^*$ del grupo carbonilo. La *regla de los octantes* inicialmente aplicada a ciclohexanonas se representa en la figura 8a, en la cual se divide el espacio que rodea al grupo carbonilo en ocho octantes mediante tres planos: un plano vertical A que bisecta al grupo carbonilo (el orbital n tiene un plano nodal, el cual es idéntico con el plano (x, z) ; figura 8b), un plano B que atraviesa el oxígeno y es perpendicular a A, y un plano C que pasa por la mitad del enlace doble C=O y que es perpendicular a A y B (para el orbital π^* , el plano (x, z) y una superficie perpendicular a esta intersectan el enlace C=O por la mitad; figura 8c) [17b, 19].

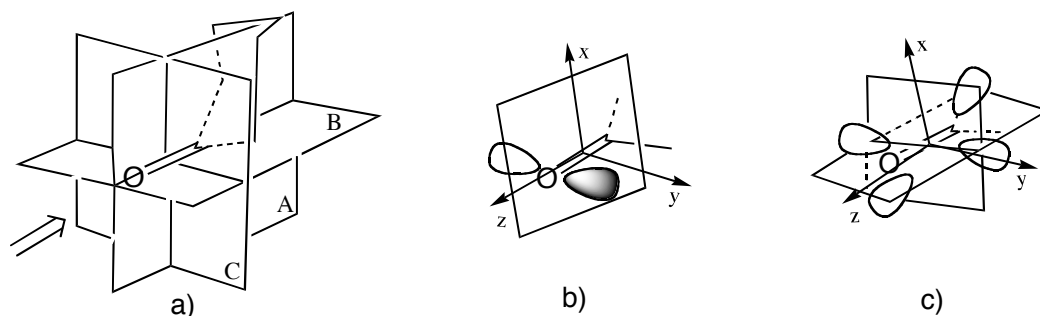


Figura 8. a) Regla de los octantes de cetonas cíclicas saturadas. b) Plano vertical A de la figura a).
c) Plano vertical B de la figura a).

Los sustituyentes de la molécula que se encuentren localizados en los cuatro octantes posteriores (atrás del plano C) son los más importantes en las contribuciones al efecto Cotton, mientras que aquellos que residan sobre los planos A, B o C anteriores no contribuirán (figura 9). Así, los sustituyentes localizados en los octantes posterior-inferior-izquierdo y posterior-superior-derecho contribuyen a un efecto negativo, en tanto que, aquellos sustituyentes en los octantes posterior-inferior-derecho y posterior-superior-izquierdo tienen una contribución negativa.

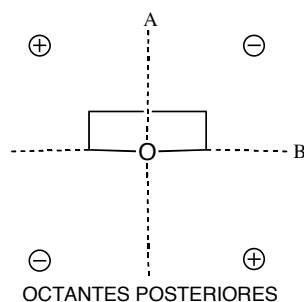


Figura 9. Octantes posteriores de la *regla de los octantes*.

2.1.3 Regla de helicidad de cetonas ρ,ρ -insaturadas

Las cetonas \perp,\perp -insaturadas exhiben una banda débil entre 320 y 350 nm atribuida a la transición $n \perp \perp^\perp$ del grupo carbonilo conjugado a la ligadura doble. A diferencia de la simetría local del cromóforo carbonilo de cetonas saturadas que exhibe dos planos ortogonales de reflexión, las cetonas \perp,\perp -insaturadas pierden uno o ambos planos por lo que la *regla de los octantes* no es aplicable a este cromóforo. La reducción de la simetría local de este cromóforo inherentemente disimétrico permitió analizar la banda de la transición $\perp \perp \perp^\perp$ del grupo $C=C-C=O$ que aparece entre 230 y 260 nm. Considerando esta transición electrónica se establecieron reglas empíricas que permitieran predecir los signos de los efectos Cotton para enonas cíclicas [19].

Ha sido establecido que las helicidad de las cetonas \perp,\perp -insaturadas *s-cis* o *s-trans* están relacionadas con las direcciones relativas de los “orbitales-p” en el carbono \perp al carbonilo y el átomo de carbono del $C=O$ (figura 10). El signo del efecto Cotton para la banda de transición $n \perp \perp^\perp$ en *ca.* 320 nm y el signo opuesto para la transición $\perp \perp \perp^\perp$ en *ca.* 240 nm pueden predecirse para este tipo de enonas (figura 10). Si se considera la conformación preferida de la molécula aunado a la ausencia de heteroátomos en la proximidad del sistema enona, puede establecerse la configuración absoluta de la molécula; de otra forma, la presencia de grupos \perp -donadores \perp al grupo enona pueden ocasionar una inversión de los signos de los efectos Cotton originando interpretaciones erróneas [19a].

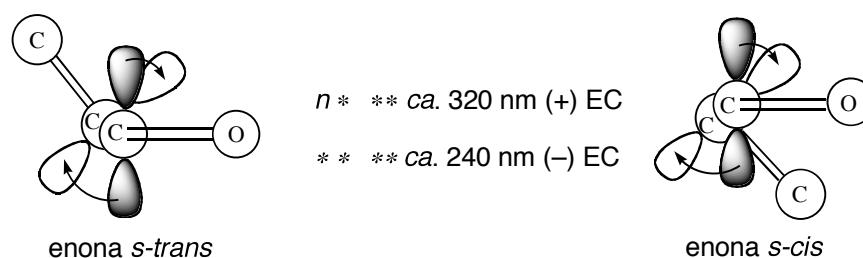


Figura 10. Helicidad de cetonas \perp,\perp -insaturadas.

2.1.4 Regla de helicidad del dieno

En 1961 se propuso la *regla de helicidad del dieno* que permite relacionar el signo del efecto Cotton para la transición $\perp \perp \perp^\perp$ en *ca.* 235 nm y el sentido de la helicidad del cromóforo dieno inherentemente disimétrico [17a, 20]. Así, el efecto Cotton positivo o negativo se propuso como el resultado de la helicidad derecha o izquierda del dieno, respectivamente. Posteriormente, se observó que la helicidad del dieno podía ser afectada por *sustituyentes alílicos axiales*, lo cual originó la *regla del cuadrante del dieno*, en la que se ponderaron las contribuciones ópticas de sustituyentes

alílicos al dieno. Para ello se empleó un diagrama cúbico regional para el 1,3-dimetilciclohexadieno con simetría C_s , donde el enlace alílico C5–C6 es colocado en el eje (z) para fijar el espacio de este cromóforo. Así, el enlace C2–C3 se encuentra detrás del plano (z, x) y su punto medio intersecta el eje (y); de tal manera que, los enlaces dobles C1=C2 y C3=C4 se localizan en cuadrantes con el mismo signo exhibiendo una helicidad derecha (quiralidad positiva (A)), o bien, una helicidad izquierda (quiralidad negativa (B)) (figura 11) [20c].

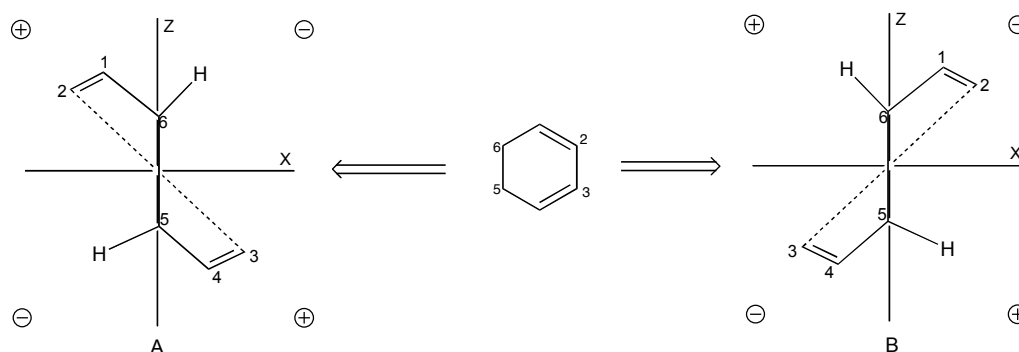


Figura 11. Regla del cuadrante dieno o helicidad del dieno.

El diagrama de cuadrantes muestra el sentido quiral del dieno y la localización de los sustituyentes alílicos quasi-axiales que pueden tener contribuciones rotatorias. La magnitud de estas contribuciones fueron estimadas teóricamente, determinando que el sentido de helicidad del dieno tiene una contribución inherente al efecto Cotton total, que los sustituyentes alílicos tienen una contribución rotatoria opuesta a la helicidad del dieno y que la magnitud de esta contribución depende de la orientación del sustituyente con respecto al enlace doble. El efecto se magnifica si el sustituyente se encuentra *quasi-axial* (ca. 90) y se minimiza si su orientación es *quasi-ecuatorial* (ca. 0-30). Los sustituyentes considerados son el átomo de hidrógeno y el grupo metilo, siendo el hidrógeno alílico axial el que mayor contribución rotatoria ejerce. En la figura 11 se observa que los átomos de hidrógeno ejercen una contribución rotatoria opuesta a la que exhibe el sistema dieno; no obstante, los estudios sistemáticos de dienios cíclicos quirales sustituidos demuestran que la magnitud de esa contribución no es mayor a la ejercida por el dieno. Con base en lo antes descrito es posible determinar la conformación y la configuración absoluta de dienios quirales mediante la *regla de helicidad del dieno* [20c].

2.1.5 Regla del dieno plano

Como una extensión a la *regla de helicidad del dieno* se propuso la *regla del dieno plano*, la cual se aplica para determinar la configuración absoluta de 1,3-dienios planos acíclicos quirales. Las

consideraciones de esta regla indican que todos los átomos que componen el cromóforo 1,3-dieno son colocados en un solo plano para representar la dirección del momento de transición dipolo eléctrico de este sistema conjugado. Así, los átomos o grupos de átomos que residan por arriba del plano ejercerán una contribución positiva al efecto Cotton para la banda de transición $\perp \perp \perp^{\perp}$ del dieno plano en *ca.* 230 nm; mientras que, aquellos átomos que residan por abajo del plano constituirán un efecto Cotton negativo (figura 12) [17a, 21].

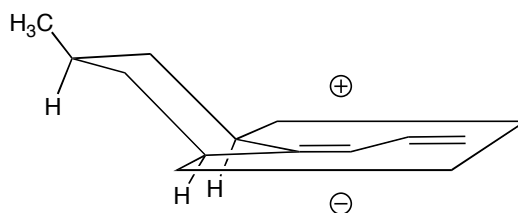


Figura 12. Regla del dieno plano.

2.1.6 Regla del sector benzoato

Ha sido observado que el efecto Cotton de un cromóforo inherentemente simétrico como el benzoato, se incrementa por la perturbación asimétrica del sustituyente. La banda de transición de transferencia de carga intramolecular $\perp \perp \perp^{\perp}$ en *ca.* 230 nm que exhibe el benzoato ha permitido la determinación de la configuración absoluta de una variedad de alcoholes secundarios cíclicos mediante la aplicación de la *regla del sector benzoato* [24]. La regla consiste en dividir el espacio alrededor del benzoato en cuatro sectores mediante dos planos de simetría A y B y posteriormente, en ocho sectores mediante dos planos adicionales, C y D, los cuales pasan a través de los dos átomos de oxígeno del éster (figura 13). En esta regla se asume que los dos átomos de oxígeno son similares (similar longitud del enlace C=O y C-O) debido a los efectos de resonancia. Además, se supone que la conformación preferida del grupo benzoato es aquella en la cual éste se localiza entre el hidrógeno del carbinol y el sustituyente menos voluminoso. Así, el benzoato es visto desde la posición *para* (flecha sobre el plano A) y las contribuciones rotatorias al efecto Cotton de los enlaces \perp, \perp^- y \perp, \perp^+ al carbono asimétrico unido al grupo cromóforo son consideradas. La regla del sector benzoato establece que los enlaces que caen en las zonas sombreadas tendrán contribuciones positivas al signo del efecto Cotton y por el contrario, las contribuciones negativas estarán dadas por aquellos enlaces que residan en las zonas no sombreadas (figura 13). Cabe señalar que, las contribuciones al signo del efecto Cotton de mayor importancia, estarán dadas por las ligaduras

dobles (mayor polarizabilidad) que se encuentren \perp, \perp y \perp, \perp al carbono asimétrico enlazado al benzoato, siendo esta última la que definirá el signo [24].

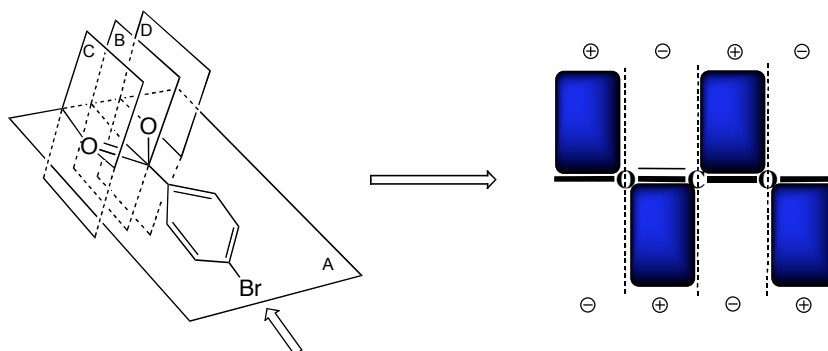


Figura 13. Regla del sector benzoato.

2.2 Método de la Quiralidad del Excitón [17a, 18]

2.2.1 Generalidades del método

- Es un método no empírico porque está basado en la teoría del oscilador acoplado, es decir, en el mecanismo de acoplamiento de los momentos dipolo-dipolo de dos cromóforos idénticos o diferentes.
- La aplicación del método puede ser extendida a cromóforos inherentemente disimétricos y a cromóforos inherentemente simétricos perturbados asimétricamente. Los cromóforos deben tener coeficientes de extinción grandes (\perp) y la dirección del momento dipolo debe ser conocida (μ).
- El signo de la curva de dicroísmo circular está determinado por la quiralidad de los cromóforos que interaccionan.
- Este método guarda una relación lineal con el cuadrado del coeficiente de extinción.
- Los acoplamientos de dos momentos de transición eléctrica dependen de la distancia y el ángulo intercromofórico. Asumiendo que los ángulos intercromofóricos no cambian, la amplitud de los efectos Cotton es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia intercromofórica. En los casos de estudio, puede encontrarse el análisis de esteroides con grupos dibenzoato, en los cuales se ha reportado que la quiralidad del excitón aplica significativamente en distancias de 14 Å. Por otro lado, se ha observado que los sistemas dibenzoato vecinales exhiben un efecto Cotton máximo cuando el ángulo diedro de los dos grupos C–O es *ca.* 70°; mientras que éste no cambia cuando los ángulos intercromofóricos son *ca.* a 0 y 180° [22]. El acoplamiento de los momentos de transición eléctrica de dos cromóforos interactuantes puede ser extendido desde sistemas bicromofóricos

iguales (dibenzoato) hasta sistemas bicromofóricos diferentes (como la enona-benzoato, el dieno-benzoato, etc.).

➤ Este método se aplica ampliamente en la determinación de la configuración absoluta de productos naturales.

2.2.2 Acoplamiento del excitón entre cromóforos

Cuando dos o más cromóforos (idénticos o no) cercanos en el espacio constituyen un sistema quiral intra- o intermolecular, los momentos de transición eléctrica interactuantes exhibirán curvas de dicroísmo circular acopladas. Particularmente, los cromóforos benzoatos *p*-sustituidos exhiben dos transiciones principales; es decir, la banda longitudinal (L_a) y la transversal (L_b), de las cuales la más importante, en sistemas binarios (dibenzoatos), es la banda L_a debido a que L_b tiene coeficientes de extinción en el ultravioleta más bajos. Así, el acoplamiento de las bandas L_a de dos cromóforos (ej. dibenzoato) conducirán a signos opuestos de la transición \perp desplazada al rojo y la transición \perp desplazada al azul (figura 14) [18b].

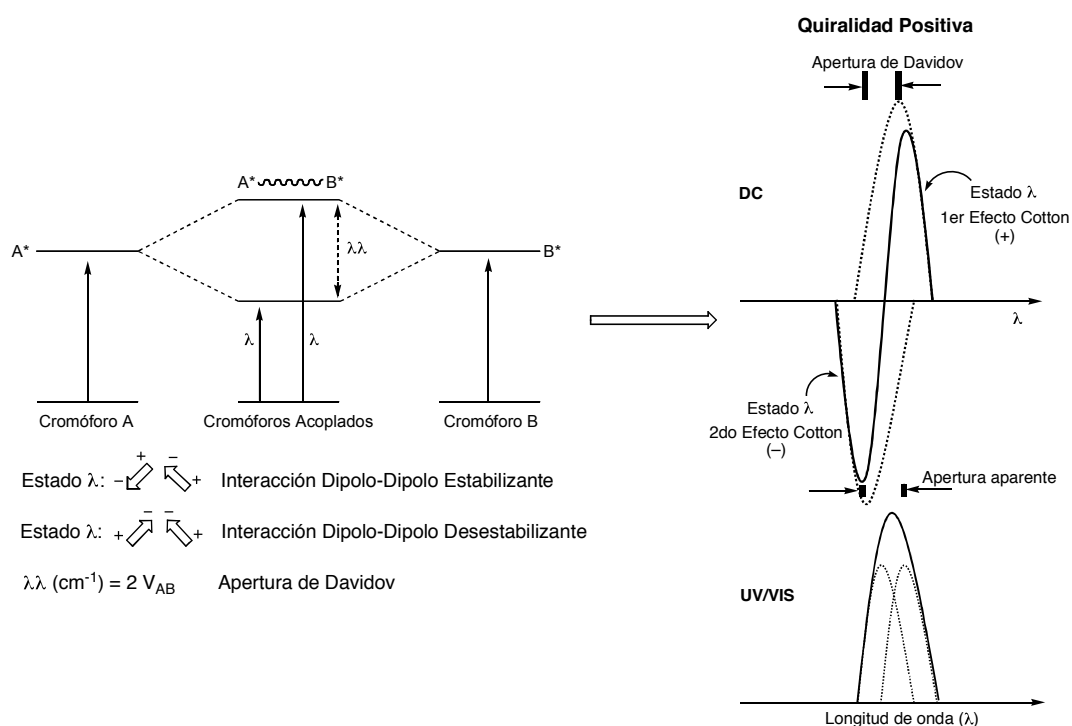


Figura 14. Método de la quiralidad del excitón dicroico circular.

En la espectroscopia de UV/VIS (figura 14), estas transiciones muestran dos componentes espectrales del mismo signo que aparecen como una absorción máxima de doble intensidad. Por el

contrario, en la espectroscopia de dicroísmo circular (DC) se observan efectos Cotton de signo opuesto, es decir, si el sentido absoluto (configuración absoluta) de la quiralidad del excitón se presenta en la dirección de las manecillas del reloj (quiralidad positiva) la curva de DC exhibirá un primer efecto Cotton positivo (\perp larga) y un segundo efecto Cotton negativo (\perp corta) y viceversa (figura 15) [18a, 23].

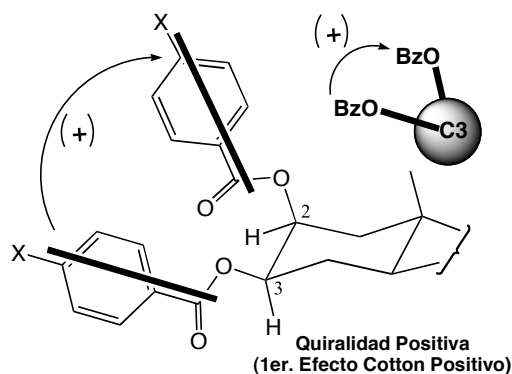


Figura 15. Quiralidad del excitón del 1,2-dibenzoato.

2.2.3 Regla de la quiralidad del 1,2-dibenzoato

Con base en las consideraciones quirópticas establecidas en la regla del sector benzoato se propuso la regla de la quiralidad del dibenzoato, la cual correlaciona la quiralidad de los glicoles con los signos de los efectos Cotton observados para las bandas de transición electrónica $\perp\perp$ \perp^{\perp} de sus correspondientes dibenzoatos. La interacción quiral de los momentos dipolo del sistema dibenzoato fue denominada, por Harada y Nakanishi, como el método de la quiralidad del excitón [18, 23], el cual puede ser extendido a triol-benzoatos y a la quiralidad del excitón de otros cromóforos interactuantes como el sistema enona-benzoato y el dieno-benzoato. La interacción quiral entre estos cromóforos diferentes permitió el establecimiento de la regla de la quiralidad del excitón de benzoatos alílicos y la regla de la quiralidad del excitón del sistema dieno-benzoato para la determinación de la configuración absoluta de moléculas que exhiban dichos grupos funcionales.

La interacción de las bandas de transferencia de la carga intramolecular de diol-dibenzoatos exhibe dos efectos Cotton fuertes, de la misma amplitud pero de signos opuestos, en *ca.* 233 nm (primer efecto Cotton) y 219 nm (segundo efecto Cotton). La apertura resultante indica que los dos efectos Cotton son debidos principalmente a la interacción dipolo-dipolo entre los momentos de transición eléctrica del dibenzoato y que los efectos Cotton están separados uno del otro por la apertura de Davidov ($\perp\perp$). Los signos de los efectos Cotton dependerán de la quiralidad entre los

dos momentos de transición dipolo eléctrico del dibenzoato; mientras que la banda de transición de transferencia de carga intramolecular en 230 nm es dirigida a lo largo del eje del benzoato, es decir, se encuentra más o menos paralelo al enlace del carbinol (C–O). Así, las quiralidades entre los dos momentos de transición eléctrica del dibenzoato pueden exhibir rotación en el sentido de las manecillas del reloj (quiralidad positiva) o en sentido opuesto (quiralidad negativa), lo cual permitirá establecer el signo del primer efecto Cotton en *ca.* 233 nm de acuerdo a la regla de quiralidad del dibenzoato (figura 16). En caso de ser necesario, la banda de la transición electrónica $\perp\perp \perp^{\perp}$ del benzoato puede ser desplazada a longitudes de onda más largas mediante la introducción de sustituyentes favorables (Cl, Br, OMe, N(CH₃)₂) en la posición *para* [18a].

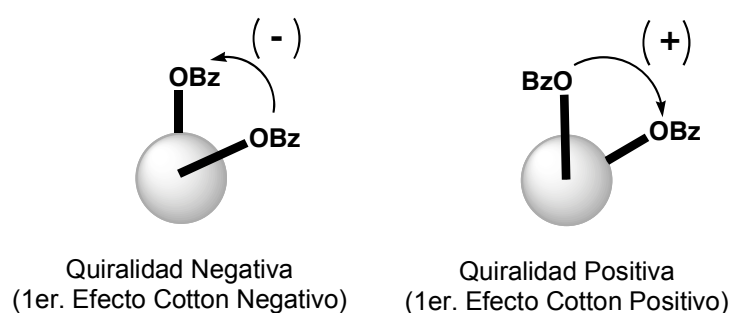


Figura 16. Quiralidad del excitón del sistema 1,2-dibenzoato.

Por otro lado, el método de la quiralidad del excitón de dibenzoatos puede ser extendido a trisbenzoatos vecinos o distantes. En este caso, las quiralidades entre los momentos de transición eléctrica de los sistemas 1,2-, 1,3- y 2,3-dibenzoato exhibirán signos negativos (o positivos) del primer efecto Cotton en una forma acumulativa; es decir, la amplitud de la curva de DC será aproximadamente la suma de los tres pares bicromofóricos interactuantes ($A_t = A_{I,II} + A_{I,III} + A_{II,III}$) [17, 23b].

2.2.4 Regla de helicidad del sistema dieno-benzoato

El método de la quiralidad del excitón fue extendido al análisis de moléculas con sustituyentes cromofóricos diferentes. Por ejemplo, la presencia del cromóforo dieno y de un alcohol secundario fácilmente esterificable con el cromóforo benzoato en la periplanona B, permitió la determinación de su configuración absoluta mediante el método de la quiralidad del excitón considerando la interacción de los momentos de transición eléctrica del sistema *dieno-benzoato* [17a, 25]. Lo ambiguo del análisis anterior es que las bandas de absorción de ambos cromóforos pueden ser esperadas en la misma región; o sea, en 227 nm para el dieno y en 230 nm para el benzoato (figura 17).

Para resolver este inconveniente, es necesario adicionar un sustituyente apropiado en el cromóforo benzoato a fin de que la banda de absorción del benzoato se desplace a longitudes de onda más largas. Por otra parte, el cuadrado de la distancia entre los cromóforos interactuantes es inversamente proporcional al valor de la amplitud de la curva de DC, lo cual clarifica el efecto de la distancia en la aplicación del método de la quiralidad del excitón.

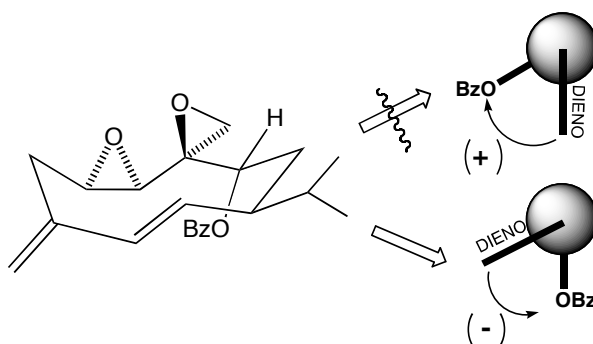


Figura 17. Regla de helicidad del sistema dieno-benzoato.

2.2.5 Regla de helicidad de benzoatos alílicos

Esta regla es otra extensión derivada del método de la quiralidad del excitón, la cual permite analizar la interacción de los momentos dipolo del cromóforo benzoato con la ligadura doble. Como ha sido mencionado previamente, el benzoato exhibe una banda de transición electrónica $\perp\perp\perp^{\perp}$ en 230 nm, mientras que el enlace doble muestra una transición polarizada $\perp\perp\perp^{\perp}$ alrededor de 195 nm. Con base en la teoría del excitón, si los dos ejes de polarización del cromóforo benzoato y de la ligadura doble constituyen una quiralidad positiva, entonces el primer efecto Cotton en *ca.* 230 nm para el benzoato es positivo; en tanto que, el segundo efecto Cotton en la longitud de onda más corta (195 nm del cromóforo C=C) es negativo (figura 18).

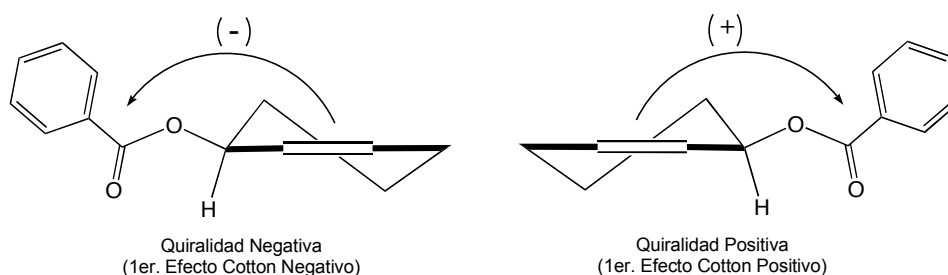


Figura 18. Regla de helicidad de benzoatos alílicos.

Así, si el benzoato alílico constituye una quiralidad negativa del excitón, el efecto Cotton de la banda de transferencia de carga intramolecular del benzoato en 230 nm debe ser negativa [17a, 26].

Por otro lado, el cromóforo olefínico es perturbado asimétricamente por la presencia de sustituyentes alílicos o por la rigidez del esqueleto, lo cual sobrepone efectos Cotton adicionales complicando el análisis de la curva de DC debida al enlace doble. Por el contrario, la transición electrónica en 230 nm del benzoato es afectada principalmente por la transición $\perp \perp \perp^{\perp}$ del doble enlace como resultado del acoplamiento dipolo-dipolo en sistemas no degenerados. Considerando lo anterior, es posible determinar la configuración absoluta de alcoholes alílicos mediante el método de la quiralidad del excitón de benzoatos alílicos [26].

2.3 Métodos Computacionales

Las investigaciones teóricas tendientes al estudio del comportamiento de moléculas que poseen flexibilidad conformacional, se ha basado en el empleo de métodos que incluyen la física clásica (mecánica molecular) o química cuántica (*ab initio*, DFT: teoría del funcional de la densidad). Así, los estudios teóricos de moléculas orgánicas o inorgánicas requieren el uso de expresiones matemáticas, las cuales describan los efectos recíprocos entre las partículas (núcleos atómicos y electrones) del sistema.

2.3.1 Mecánica Molecular [42]

Este método reduce el tiempo de cálculos computacionales pues combina a los núcleos atómicos y a los electrones en partículas parecidas a átomos, las cuales son esféricas con radios medibles y poseen una carga neta computarizada. Los efectos recíprocos entre dichas partículas están basados en el potencial de resorte clásico y estos determinan la distribución espacial de las partículas y sus respectivas energías. Las expresiones matemáticas del movimiento de resorte pueden ser usadas para describir la capacidad de elongamiento, flexión o torsión del enlace. Por otro lado, los átomos no enlazados interactúan en un área determinada mediante interacciones de tipo van der Waals, mediante repulsiones estéricas y mediante atracciones o repulsiones electrostáticas.

El formalismo matemático de mecánica molecular permite calcular geometrías moleculares (y sus energías), las cuales pueden ser comparadas con las experimentales. Así, la energía de mecánica molecular V_{MM} está dada por la expresión denominada campo de fuerza (incluye la descripción del comportamiento de los diferentes tipos atómicos y de enlace):

$$V_{MM} = \sum V_r + \sum V_\theta + \sum V_\phi + \sum V_{nb} \quad 2.7)$$

donde, V_r es la energía potencial resultante de la deformación de la longitud del enlace, V_ρ es la energía potencial generada por la deformación del ángulo diedro, V_ρ la energía potencial de la deformación del ángulo de torsión, y V_{nb} la energía potencial de los efectos recíprocos entre átomos no enlazados (véase arriba), [figura 19].

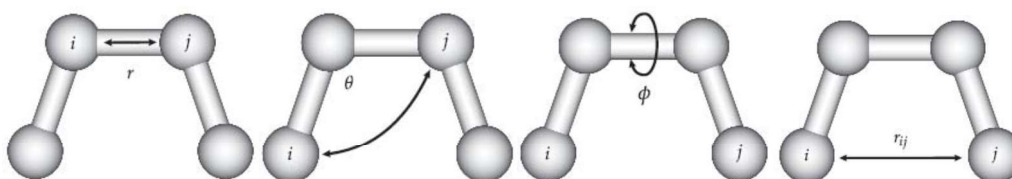


Figura 19. De izquierda a derecha: deformación de la longitud del enlace, deformación del ángulo diedro, deformación del ángulo de torsión y efectos recíprocos de no enlace.

Cada una de las expresiones individuales de energía de la ecuación de campo de fuerza pueden ser descritas de la siguiente manera:

a) El potencial resultante de la elongación del enlace entre dos átomos V_r , que depende de la longitud r del enlace, se calcula por si mismo mediante la ley de Hooke:

$$V_r = \sum_{n_b} k_b (r - r_0)^2 \quad 2.8)$$

donde n_b es el número de enlaces, k_b es la constante del resorte y r_0 la distancia en equilibrio del enlace.

b) En la deformación del ángulo de enlace, el cambio del ángulo entre tres átomos enlazados puede describir la deformación de la longitud del enlace. El potencial de la deformación del ángulo de enlace V_ρ , en dependencia del ángulo de enlace \perp , se calcula por si mismo de forma similar a la ley de Hooke:

$$V_\theta = \sum_{n_w} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad 2.9)$$

donde n_w es el número de ángulos de enlace, k_ρ la constante de elasticidad del ángulo de resorte, y ρ_0 el ángulo en equilibrio.

c) La dinámica de la deformación del ángulo de torsión entre cuatro átomos V_ρ , en dependencia del ángulo de torsión ρ , se calcula por si mismo mediante una función periódica de la forma:

$$V_\phi = \sum_{n_t} A_k [1 + \cos(k\phi - \gamma)] \quad (2.10)$$

donde n_t es el número de ángulos de torsión, k el número simétrico de rotaciones, y A_k el potencial de k veces el número de rotaciones. γ es el desplazamiento del punto nulo del ángulo de torsión ρ (desplaza la curva en función del ángulo de torsión y sincroniza la energía V_ρ con la geometría molecular calculada).

d) Los efectos recíprocos entre átomos no enlazados son debidos a los grados de libertad de movimiento que presentan éstos hasta interactuar mutuamente. La energía de los efectos recíprocos V_{nb} se expresa como una función de la distancia r_{ij} mediante la suma en pares de las energías de todas las posibles interacciones entre los átomos i y j no enlazados:

$$V_{nb} = \sum_i \sum_j \frac{-A_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{12}} + \sum_i \sum_j \frac{q_i \cdot q_j}{r_{ij}} \quad (2.11)$$

donde r_{ij} es la distancia entre el átomo i y el átomo j , A_{ij} es la fuerza de las atracciones de van der Waals (obtenida mediante medidas de polarizabilidad o cálculos de mecánica cuántica), B_{ij} es una medida de la dureza del átomo (obtenido de datos cristalográficos), q_{ij} es la carga parcial de los átomos i y/o j (obtenidos con cálculos *ab initio* o semiempíricos). Los efectos recíprocos de no enlace aumentan si la distancia r_{ij} entre los átomos i y j es más pequeña que la suma de los radios de van der Waals de los dos átomos. Los efectos recíprocos electrostáticos son expresados por un potencial de Coulomb y son inversamente proporcionales a la distancia r_{ij} de los átomos, donde las cargas de diferente signo tienen contribuciones negativas y cargas de signo igual tienen contribuciones positivas.

2.3.2 Química Cuántica [71]

Para llevar a cabo simulaciones de dinámica cuántica es necesaria una descripción energética del sistema molecular en términos de sus eigenestados (vectores cuya dirección no es afectada durante transformaciones del espacio como rotación, reflexión, etc.). La solución de la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo (ESIT) proporciona la energía total E_{tot} de la molécula en un tiempo dado:

$$\hat{\mathbf{H}}_{mol} |\Psi\rangle = E_{tot} |\Psi\rangle \quad 2.12)$$

donde el operador de Hamilton molecular $\hat{\mathbf{H}}_{mol}$ describe todas las interacciones entre los electrones y núcleos del sistema. Sin embargo, para una molécula no existe una solución analítica de la ESIT por lo que se han desarrollado diferentes aproximaciones numéricas como la de Born-Oppenheimer, la cual permite separar el movimiento de los núcleos pesados del movimiento de los electrones ligeros. Así, para una molécula de N_{nuc} núcleos con masas M_n , momentos \vec{P}_n y cargas nucleares Z_n en las coordenadas Cartesianas \vec{R}_n rodeadas por N_{el} electrones con masa m_e , momento \vec{p}_j y carga e en las coordenadas \vec{r}_j , el operador Hamiltoniano molecular completo:

$$\hat{\mathbf{H}}_{mol} = \hat{\mathbf{T}}_{el} + \hat{\mathbf{V}}_{el,nuc} + \hat{\mathbf{V}}_{el,el} + \hat{\mathbf{T}}_{nuc} + \hat{\mathbf{V}}_{nuc,nuc} \quad 2.13)$$

incluye términos para la energía cinética de los electrones $\hat{\mathbf{T}}_{el}$, energía cinética para los núcleos $\hat{\mathbf{T}}_{nuc}$, energía potencial por la interacción par Coulómbica entre electrones $\hat{\mathbf{V}}_{el,el}$, núcleos $\hat{\mathbf{V}}_{nuc,nuc}$, y entre electrones y núcleos $\hat{\mathbf{V}}_{el,nuc}$:

$$\hat{\mathbf{T}}_{el} = \sum_{j=1}^{N_{el}} \frac{\vec{p}_j^2}{2m_e}, \quad \hat{\mathbf{T}}_{nuc} = \sum_{n=1}^{N_{nuc}} \frac{\vec{P}_n^2}{2M_n}, \quad \hat{\mathbf{V}}_{el,el} = \sum_{i<j}^{N_{el}} \frac{e^2}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|}, \quad \hat{\mathbf{V}}_{nuc,nuc} = \sum_{m<n}^{N_{nuc}} \frac{Z_m Z_n e^2}{|\vec{R}_m - \vec{R}_n|}, \quad \hat{\mathbf{V}}_{el,nuc} = - \sum_{n=1}^{N_{nuc}} \sum_{j=1}^{N_{el}} \frac{Z_n e^2}{|\vec{r}_j - \vec{R}_n|}$$

Debido a que los términos del Hamiltoniano molecular dependen de las coordenadas electrónicas \vec{r}_j que actúan sobre la función de onda $|\Psi_{el}\rangle$, es posible escribir la ecuación de Schrödinger electrónica para una geometría molecular estacionaria:

$$\hat{\mathbf{H}}_{el} |\Psi_{el}\rangle = (\hat{\mathbf{T}}_{el} + \hat{\mathbf{V}}_{el,el} + \hat{\mathbf{V}}_{el,nuc}) |\Psi_{el}\rangle = E_{el} |\Psi_{el}\rangle \quad 2.14)$$

cuya solución provee la energía electrónica E_{el} y la función de onda $|\Psi_{el}\rangle$ para una geometría nuclear específica.

2.3.3 Método de Hartree-Fock (HF)

Debido a que la ecuación de Schrödinger (ESIT) presenta un problema con el análisis multi-partículas, se han realizado aproximaciones como el método de Hartree-Fock. La ecuación de Hartree-Fock proporciona una solución para el cálculo de las eigenenergías ρ y el espín-orbital $\rho_i(\vec{x}_i)$ para cada electrón i (el espín-orbital es el producto de un orbital espacial $\rho_i(\vec{r}_i)$ que depende

de la posición del electrón (\vec{r}_i) y un espín orbital $\perp(\perp)$ o $\perp(\perp)$ que depende de la coordenada de su espín):

$$\hat{\mathbf{F}}\chi_i(\vec{x}_i) = \epsilon_i\chi_i(\vec{x}_i), \quad i = 1, \dots, N_{el} \quad 2.15)$$

donde el operador de Fock \hat{F} consiste de un operador de una sola partícula \hat{h} , el cual describe el movimiento de un solo electrón en el campo de la red nuclear, y del potencial de Hartree-Fock \hat{V}^{HF} que describe la interacción de cada electrón con los demás, el cual también se compone del operador de Coulomb \hat{J}_j y el operador de intercambio \hat{K}_j . La ecuación de Hartree-Fock es resuelta calculando \hat{J}_j y \hat{K}_j de forma interactiva generando nuevos espín-orbitales hasta alcanzar la convergencia (denominado entonces como campo de auto consistencia).

$$\hat{\mathbf{F}}(\vec{r}_i) = \hat{\mathbf{h}}(\vec{r}_i) + \hat{\mathbf{V}}^{HF} = \hat{\mathbf{h}}(\vec{r}_i) + \sum_{j=1}^{N_{el}} \left(\hat{\mathbf{J}}_j(\vec{r}_i) - \hat{\mathbf{K}}_j(\vec{r}_i) \right) \quad 2.16)$$

2.3.4 Teoría del Funcional de la Densidad Dependiente del Tiempo (TD-DFT)

La teoría del funcional de la densidad está basado en las densidades de carga $\rho(r)$ de Hohenberg-Kohn, lo cual proporciona suficiente información para calcular las energías moleculares. En el primer teorema de Hohenberg-Kohn se establece que el potencial molecular completo V es un funcional de la densidad de carga $\rho(r)$ y que el potencial molecular es descrito completamente por el operador de Hamilton \hat{H} , por lo que el estado basal total de muchas partículas de la molécula \perp es también un funcional de $\rho(r)$:

$$\rho(r) \leftrightarrow V \leftrightarrow \Psi \quad 2.17)$$

Así, es posible calcular la energía electrónica total del sistema E_{el} mediante la minimización del funcional de la densidad de carga, la cual depende de la densidad del electrón $\rho_{el}(r)$:

Análogamente a la ecuación de Hartree-Fock, el potencial de Hartree-Fock \hat{V}^{HF} es remplazado por el potencial DFT como:

$$\hat{\mathbf{V}}^{DFT}(r) = \int \frac{\rho(r')}{|r - r'|} dr' + \hat{\mathbf{V}}_{XC} \quad 2.18)$$

donde, el primer término describe la interacción Coulómbica electrón-electrón y \hat{V}_{XC} es el potencial debido a la energía de correlación e intercambio no clásica.

La energía calculada por DFT, dependiente de la densidad, es la suma de los funcionales de energía desde la energía cinética de los electrones no interactuantes $T[\rho]$, su interacción con el núcleo $V[\rho]$, la repulsión electrón-electrón $U[\rho]$ y la energía de correlación e intercambio para la correlación no clásica del electrón E_{XC} :

$$E_{DFT}[\rho] = T[\rho] + V[\rho] + U[\rho] + E_{XC}[\rho]. \quad 2.19)$$

La calidad del cálculo por DFT depende de los funcionales usados para la energía de correlación e intercambio. El funcional híbrido B3LYP (Becke3LYP), que es una mezcla de intercambio de Hartree-Fock con el funcional de correlación e intercambio de DFT, es usado comúnmente. En general, el funcional de correlación e intercambio de DFT consiste del funcional de intercambio Becke 1988 (B o B88) y el funcional de correlación de Lee-Yang-Parr (LYP).

Para los cálculos de los estados excitados electrónicos se puede aplicar la teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) en la forma de un híbrido funcional (B3LYP) que mezcla el intercambio de Hartree-Fock con los funcionales de correlación e intercambio de DFT; además, el cálculo energético puede ser más eficiente incluyendo un grupo de bases (doble- ζ) que describa funciones polarizadas.

Capítulo 3

3.1 Justificación

La familia Euphorbiaceae es reconocida por la diversidad estructural de los metabolitos secundarios que se han aislado y caracterizado a partir de las especies que la integran. Como ejemplos pueden mencionarse a los diterpenos de tipo ingenano [ingenol, 3a], jatrofano [2 β -hidroxijatrofano, 2b] y tigliano [prostratina, 7] (figura 20). Además, es pertinente mencionar que los informes en la literatura proporcionan evidencia de que ciertos diterpenos macrocíclicos de tipo latirano y jatrofano inhiben la actividad de la glucoproteína P (GPP), una proteína transmembranal glucosidada que está involucrada en la resistencia de las células tumorales a la quimioterapia anticancerígena mediante la expulsión extracelular del fármaco [3c]. Por otra parte, ciertos diterpenos de tipo ingenano y tigliano han mostrado actividad anticancerígena y antiviral relevantes, pero aun se desconoce su mecanismo de acción. Por ejemplo, un diterpeno de tipo ingenano (ingenol-3,20-dibenzoato) aislado de *Euphorbia esula* mostró actividad antineoplásica relevante, pero su sitio de acción no fue a nivel de proteína-cinasa C como ha sido evidenciado para algunos de sus análogos estructurales [27].

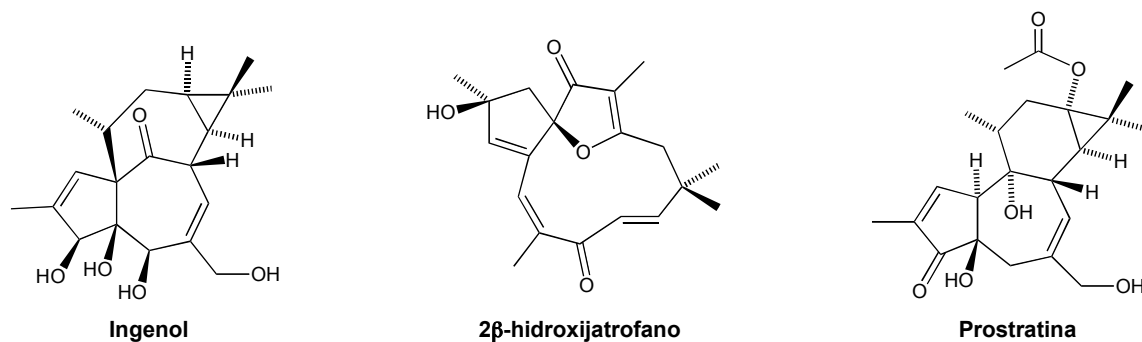


Figura 20. Diterpenos biodinámicos en la familia Euphorbiaceae.

Considerando la complejidad estructural que poseen los diterpenos macrocíclicos y los diterpenos de tipo tigliano e ingenano, así como la actividad anticancerígena que han mostrado a nivel de diferentes sitios celulares, resulta de interés la realización de investigaciones tendientes al descubrimiento de nuevos diterpenos bioactivos que puedan considerarse como moléculas líderes para el desarrollo de agentes antitumorales novedosos.

3.2 Hipótesis

Los antecedentes químicos y farmacológicos informados para las especies de los géneros *Croton* y *Jatropha*, pertenecientes a la familia Euphorbiaceae, han revelado que éstas poseen una gran diversidad estructural de metabolitos secundarios (diterpenoides, triterpenoides, flavonoides, lignanos, péptidos, etc); siendo los diterpenos macrocíclicos y sus derivados biogénicos los de mayor importancia farmacológica por sus propiedades citotóxicas, antitumorales, anti-inflamatorias, etc. Con base en lo antes descrito, es posible suponer la presencia de productos naturales con propiedades citotóxicas en especies selectas, relacionadas taxonómicamente, de la familia Euphorbiaceae.

3.3 Objetivo

Realizar la detección de la actividad citotóxica de los extractos orgánicos obtenidos de ciertas especies de *Croton* y *Jatropha*; así como el aislamiento biodirigido, la caracterización estructural y las evaluaciones citotóxicas de los constituyentes puros que muestren propiedades biológicas importantes frente a un panel de cinco líneas celulares de tumores humanos.

3.4 Metas

- Compilar la información bibliográfica referente a ciertas especies pertenecientes a los géneros *Croton* y *Jatropha*, cuyos criterios taxonómico, etnomédico, farmacológico y químico permitan presuponer la presencia de productos naturales con actividad citotóxica.
- Colectar muestras vegetales, con asesoría de botánicos, de cada una de las especies propuestas en la meta anterior.
- Realizar pruebas de extracción a escala analítica con disolventes de polaridad diversa y preparar los extractos orgánicos correspondientes a escala preparativa.

- Ponderar la bioactividad de los extractos orgánicos mediante el ensayo de citotoxicidad (usando el método colorimétrico de la sulforrodamina B) frente a cinco líneas celulares de tumores humanos: colon (HCT-15), mama (MCF-7), leucemia (K-562 CML), sistema nervioso central (U-251, glías) y próstata (PC-3) [28].

- Realizar el fraccionamiento biodirigido de los extractos que hayan mostrado concentraciones inhibitorias medias del crecimiento celular (CI_{50}) menores o iguales a 20 $\mu\text{g/mL}$ [30]. El aislamiento y la purificación de los constituyentes bioactivos se realizará mediante la aplicación de diversos métodos cromatográficos y químicos convencionales [31].

- Elucidar y caracterizar la estructura molecular de los metabolitos secundarios bioactivos, mediante el análisis de sus propiedades espectroscópicas, espectrométricas, quirópticas y químicas (derivatización).

- Determinar la configuración absoluta de los productos naturales aislados mediante el método de dicroísmo circular y la aplicación de reglas específicas que han derivado de ésta técnica; o bien, mediante el método modificado de Mosher.

- Realizar la simulación teórica del espectro electrónico de dicroísmo circular mediante la Teoría del Funcional de la Densidad Dependiente del Tiempo (TD-DFT) para confirmar la configuración absoluta establecida mediante dicroísmo circular experimental.

- Ponderar la actividad citotóxica de las sustancias purificadas a partir de las fracciones bioactivas mediante el ensayo de citotoxicidad (usando el método colorimétrico de la sulforrodamina B).

- Correlacionar los resultados químicos y farmacológicos obtenidos en el presente trabajo con las relaciones taxonómicas y el uso etnomédico informadas para las especies vegetales estudiadas.

Capítulo 4

4.1 Sección Experimental

4.1.1 Material y equipo

La separación de los constituyentes presentes en los extractos orgánicos vegetales se efectuó mediante diversas técnicas cromatográficas, tales como: cromatografía en columna a presión reducida (CCPR), cromatografía en columna relámpago (CCR), cromatografía de capa delgada preparativa (CCDP), cromatografía de placa preparativa (CPP), cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Las diferentes cromatografías tuvieron como fase estacionaria sílica gel (SiO_2) de 60 o 40 Å, marca Macherey-Nagel, y malla 70/230, 100/200 ASTM. Los disolventes utilizados como fase móvil fueron hexano, acetato de etilo, acetona, diclorometano y metanol en distintas proporciones. Las cromatografías fueron eluidas en fase normal excepto la realizada por CLAR, mientras que la fase móvil comprendió el incremento gradual de polaridad (gradiente) y en otros casos se efectuó de forma isocrática. En el caso de la técnica CLAR, se usó un aparato Waters equipado con un detector de arreglo de diodos; la separación se realizó mediante una columna *Lychnosorb 5 RP-18* (Phenomenex) de 5 μ y de 250 mm de longitud \perp 4 mm de diámetro y con la fase móvil de gradiente de la mezcla $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ a temperatura ambiente. Por otra parte, el análisis por cromatografía en capa fina se efectuó en cromatofolios Alugram SilF/UV₂₅₄. Como reveladores se utilizaron una lámpara de rayos *UV Spectroline ENF-240C* (\perp de 254 y 365 nm), una solución de sulfato cérico amoniacal ($(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$) al 1 % en ácido sulfúrico 2N. Las cromatografías en capa fina preparativas se realizaron en placas Merck de 2 mm de grosor y una superficie de 20 \perp 20 cm, y en algunos casos se emplearon cromatofolios Alugram SilF/UV₂₅₄. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato *Fisher Johns* y no fueron corregidos. Los espectros de espectroscopia de infrarrojo se obtuvieron en un equipo *Nicolet Magna FT-IR 750* en CHCl_3 , o bien, en pastilla de KBr. Los espectros en el UV fueron determinados en un espectrofotómetro *Shimadzu-UV160*. Los espectros de dicroísmo circular fueron determinados en un dicrógrafo *Jasco-J720*. La determinación de la rotación óptica se realizó en un polarímetro *Perkin-Elmer 341*. Los espectros de espectrometría de masas se obtuvieron en un espectrómetro marca *Jeol JMS-AX505HA* utilizando la técnica de impacto electrónico con un potencial de ionización de 70 eV, y una corriente de ionización de 100 μa : y *Jeol JMX-SX102A* para la técnica de ionización por bombardeo rápido de átomos (FAB). Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se obtuvieron en los espectrómetros: *Varian Unity 300* (a 300/75 MHz) y *Varian Unity Plus* (a 500/125 MHz). Se utilizó como disolvente CDCl_3 , y en

algunos casos se usó $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, CD_3OD , $\text{DMSO-}d_6$, C_6D_6 y $\text{Py-}d_5$, siendo el estándar interno tetrametilsilano (TMS) para todos los casos (excepto para piridina deuterada). Los valores de desplazamiento químico de los núcleos observados están registrados en ppm. En algunos casos se recurrió a experimentos bidimensionales de RMN como COSY, NOESY, DEPT, FLOCK, COLOC, HSQC, HMBC, Desacoplamiento Homonuclear Diferencial 1D y NOE-diferencial 1D para la asignación inambigua de las señales. Adicionalmente, el análisis por difracción de rayos X fue realizado mediante un difractómetro automático *Bruker Smart Apex* con un detector de área CCD y usando radiación monocromada de grafito $\text{Mo K}\alpha$ ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$).

4.1.2 Ensayo de citotoxicidad

Las líneas celulares de tumores humanos, colon (HCT-15), mama (MCF-7), leucemia (K-562), sistema nervioso central (U-251, glías) y próstata (PC-3), fueron proporcionadas por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos de América. Las propiedades citotóxicas de las muestras, extractos y compuestos puros frente a dichas células tumorales, fueron determinadas usando el ensayo de crecimiento celular mediante el método colorimétrico de la sulforrodamina B (SRB, un colorante de unión a proteínas) [28]. Las líneas celulares fueron cultivadas en el medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., Ltd., St. Louis, MO, USA), enriquecido con Suero Bovino Fetal al 10%, 2 μM de L-glutamina, 100 IU/mL de penicilina G, 100 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de estreptomicina y 0.25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B (Gibco). Se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO_2 y 95 % de humedad. Para realizar el ensayo, se tomaron suspensiones celulares de 5 ± 10^4 células/mL de K562 y MCF-7; 7.5 ± 10^4 células/mL de U251 y PC-3; y 10 ± 10^4 células/mL de HCT-15. Se sembraron 100 μL de las suspensiones celulares en los pozos de un microplato (96 pozos) y se incubaron para permitir la adhesión de las células a las paredes del pozo. Después de 24 h de incubación se adicionaron 100 μL de cada muestra (las concentraciones probadas son descritas en la sección de resultados y discusiones) y de la sustancia usada como control positivo. Transcurridas 48 h de haber agregado las sustancias a probar, las células adheridas fueron fijadas *in situ* mediante la adición de 50 μL de ácido tricloroacético (TCA) frío al 50 % (*peso/vol*) y se incubaron nuevamente a 4 °C por 60 min. El sobrenadante fue descartado y los platos fueron lavados tres veces con agua destilada y luego secados con aire. Los cultivos fijados con TCA fueron coloreados con 100 μL de una solución de SRB al 0.4% por 30 min. El exceso de colorante fue eliminado mediante lavados con TCA. El colorante unido a proteínas fue extraído con 10 μM de una base tris sin bufer. Las

densidades ópticas de las soluciones coloreadas extraídas fueron leídas en un Lector Ultra de Microplatos (Elx 808, BIO-TEK Instruments, Inc.), a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados fueron expresados como concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) y fueron calculados de acuerdo al protocolo de Monks [28], es decir, la curva dosis-respuesta fue graficada para cada sustancia y la concentración CI₅₀ obtenida fue estimada mediante las ecuaciones de una regresión lineal. Los valores de CI₅₀ para las sustancias son dadas con el error estándar (media ± error estándar) y se muestran en tablas en la sección de resultados y discusiones.

4.1.3 Detalles computacionales

Se generó la estructura de mínima energía de **118b** usando el campo de fuerza MMX implementado en el programa PCmodel v. 6.0 [42]. La estructura minimizada mediante mecánica molecular fue optimizada geoméricamente mediante el nivel de teoría DFT/B3LYP/H-W implementado en el programa *Gaussian 03* [69a]. Los cálculos del espectro electrónico de dicroísmo circular fueron realizados mediante el programa *Gaussian 03* empleando el método TD-DFT, el híbrido funcional B3LYP y los potenciales efectivos del caroso de Hay y Wadt asociados al grupo de bases doble- ζ [69b, 69c]. Las fuerzas rotatorias fueron calculadas en el formalismo de velocidad y de longitud (los valores resultaron muy similares). El espectro de DC fue simulado por la sobreposición de la suma de las funciones Gaussianas para cada estado de excitación de acuerdo con [70]:

$$\Delta \epsilon(E) = \left(\frac{1}{2.297 \cdot 10^{-39}} \right) \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} \right) \sum_a (\Delta E_{0a}) (R_{0a}) \exp \left[- \left(\frac{(E - \Delta E_{0a})}{2\sigma} \right)^2 \right]$$

Donde ζ es el ancho de la banda en la altura $1/e$. ΔE_{0a} y R_{0a} son las energías de excitación y las fuerzas rotatorias para los estados 0 a a , respectivamente. Fue usado un valor de ζ de 0.2 eV.

Capítulo 5

5.1 Resultados y Discusiones

5.1.1 Selección del sistema de estudio

Para los fines planteados en este proyecto de investigación, se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva a fin de elegir el material vegetal para el estudio químico y biológico. Para ello, se consideraron las especies cuyos antecedentes en la literatura denotaran la presencia de diterpenos macrocíclicos o sus derivados biogénéticos y se buscaron aquellas especies que guardaran relaciones taxonómicas con éstas. Además, se eligieron aquellas especies cuyo uso etnomédico reporta el tratamiento de verrugas y otras infecciones virales (virus del papiloma humano), tumores y los síntomas asociados a tumores [29]. Los resultados del análisis bibliohemerográfico permitieron seleccionar 23 especies candidatas para el presente proyecto de investigación (tabla 1).

Tabla 1. Especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae propuestas en este proyecto.

Familia Euphorbiaceae			
Subfamilia	Género	Sección	Especie
<i>Crotonoideae</i>	<i>Croton</i>	<i>Eluteria</i>	<i>C. reflexifolius</i> , <i>C. niveus</i> , <i>C. shiedeanus</i>
		<i>Valamea</i>	<i>C. cortesianus</i> , <i>C. fragilis</i> , <i>C. rhamnifolius</i> , <i>C. miradorensis</i>
		<i>Lasyogine</i>	<i>C. bilbergianus</i>
		<i>Adenophyllum</i>	<i>C. ciliato-glanduliferus</i>
	<i>Jatropha</i>	<i>Peltatae</i>	<i>J. podagrica</i> , <i>J. cathartica</i>
		<i>Platyphyllae</i>	<i>J. platyphylla</i> (<i>J. peltata</i>)
		<i>Curcas</i>	<i>J. pseudocurcas</i> , <i>J. rufescens</i> , <i>J. hintonii</i>
<i>Euphorbiodeae</i>	<i>Euphorbia</i>	<i>Tithymalus</i>	<i>E. campestris</i> , <i>E. furcillata</i> , <i>E. lathyris</i> , <i>E. orizabae</i> , <i>E. pelidion</i> , <i>E. peplus</i>
		<i>Galarrhaei</i>	<i>E. spathulata</i>
		<i>Adenopetalum</i>	<i>E. heterophylla</i>

El trabajo de campo en los Estados de Veracruz, México y Jalisco permitió la colecta de siete especies, de las cuales *Croton niveus* y *Jatropha platyphylla* coincidieron con las propuestas; mientras que las otras fueron identificadas como *Croton glabellus*, *C. alamosanus*, *C. roxanae*, *C. pseudoniveus* y *Jatropha neopauciflora*. No obstante, considerando el criterio taxonómico, se decidió incorporar las últimas cinco especies al protocolo de investigación. Así, todas las muestras vegetales, excepto *J. neopauciflora*, fueron separadas en dos partes: ramas y hojas (los frutos y las flores se incluyeron con las hojas debido a su tamaño pequeño y a su escasez). Respecto de *J. neopauciflora* sólo se procesó la corteza. Los vegetales fueron secados a la sombra, pulverizados y macerados en pequeña escala (ca. 50 g) con disolventes de polaridad diversa: no polar (Hex), polaridad media ((CH₃)₂CO) y polar (mezcla de CH₂Cl₂:CH₃OH, 1:1). Se comparó el perfil químico entre los extractos orgánicos de cada especie mediante cromatografía de capa delgada. Dicho análisis permitió elegir la mezcla polar (CH₂Cl₂:CH₃OH, 1:1) como el mejor sistema de extracción de los constituyentes presentes en las muestras vegetales.

5.1.2 Determinación de la actividad citotóxica

Los extractos de CH₂Cl₂:MeOH, obtenidos de la maceración de las muestras vegetales, fueron concentrados en un rotaevaporador hasta eliminación del disolvente. Los residuos fueron evaluados en el ensayo de citotoxicidad (usando el método colorimétrico de la sulforrodamina B) frente a un panel de cinco líneas celulares de tumores humanos [MCF7 (mama), U251 (glías), HCT15 (colon), K562 (leucemia), PC3 (próstata)]. Los resultados obtenidos del rastreo primario de actividad a una concentración de 50 µg/mL se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Actividad citotóxica* de los extractos orgánicos de las especies de *Croton* y *Jatropha* a 50 µg/mL.

<i>Extractos</i>	U251	PC3	K562	HCT15	MCF7
<i>C. glabellus</i> (HDM/M)	66.15	89.09	75.98	83.97	76.06
<i>C. glabellus</i> (HA)	63.34	80.19	89.87	81.49	61.08
<i>C. glabellus</i> (HH)	56.50	75.71	92.22	71.74	59.89
<i>C. glabellus</i> (RA)	0	41.34	0	20.68	0
<i>C. glabellus</i> (RM)	0	32.80	1.62	12.82	18.95

Continuación de la tabla 2. Actividad citotóxica* de los extractos orgánicos de las especies de *Croton* y *Jatropha* a 50 µg/mL.

<i>Extractos</i>	U251	PC3	K562	HCT15	MCF7
<i>C. alamosanus</i> (HDM/M)	53.05	66.99	83.96	76.88	55.55
<i>C. niveus</i> (HDM/M)	38.13	71.61	61.47	10.13	36.30
<i>C. niveus</i> (RDM/M)	0	0	56.22	0	0
<i>C. roxanae</i> (HDM/M)	22.24	67.93	55.78	17.83	72.94
<i>C. pseudoniveus</i> (HDM/M)	24.19	28.23	48.23	22.89	57.08
<i>J. platiphylla</i> (HDM/M)	19.72	55.62	47.30	17.94	47.57
<i>J. neopauciflora</i> (CDM/M)	94.80	73.50	88.60	71.80	50.60

*Valores expresados en % de inhibición del crecimiento celular. HDM/M: Extracto de diclorometano:metanol de hojas. HA: Extracto acetónico de hojas. HH: Extracto hexánico de hojas. RA: Extracto acetónico de ramas. RM: Extracto metanólico de ramas. CDM/M: Extracto diclorometano:metanol de corteza.

Los resultados mostrados en la tabla 2 permitieron seleccionar los extractos que inhibieron más del 50% del crecimiento celular, a fin de ponderar sus correspondientes concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) (tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones Inhibitorias Medias* de los extractos orgánicos más activos.

<i>Extracto</i>	U251	PC3	K562	HCT15	MCF7
<i>C. niveus</i> (RDM/M)	NP	NP	43.77 ± 1.34	NP	NP
<i>C. niveus</i> (HDM/M)	> 100	71.78 ± 10.5.	46.42 ± 4.03	> 100	> 100
<i>C. alamosanus</i> (HDM/M)	44.73 ± 1.43	45.30 ± 2.59	35.64 ± 3.39	42.95 ± 2.77	40.43 ± 4.64
<i>C. roxanae</i> (HDM/M)	> 100	39.91 ± 3.55	38.34 ± 2.09	> 100	46.96 ± 3.27
<i>J.</i> <i>neopauciflora</i> (CDM/M)	34.29 ± 2.48	71.33 ± 8.3	43.12 ± 3.63	55.64 ± 2.13	34.29 ± 1.63
<i>C. glabellus</i> (HDM/M)	NP	NP	17.79 ± 2.97	31.93 ± 7.3	NP

*Valores expresados en µg/mL ± el error estándar. NP: No Ponderada.

Pezzuto et al. [30] establecieron que el criterio farmacológico para seleccionar un extracto orgánico citotóxico promisorio es aquel donde las muestras exhiben concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) menores a 20 $\mu\text{g/mL}$. Considerando lo anterior, el extracto orgánico de hojas de *C. glabellus* fue seleccionado ya que exhibió una CI_{50} menor a 20 $\mu\text{g/mL}$ contra la línea celular K562 ($17.79 \pm 2.97 \mu\text{g/mL}$, véase tabla 3). Así, el extracto orgánico de *C. glabellus* fue sometido a fraccionamiento biodirigido usando las líneas celulares K562 y HCT15 para monitorear la actividad citotóxica de las fracciones. Por el contrario, los extractos orgánicos de hojas de *C. alamosanus* y el de corteza de *J. neopauciflora* exhibieron CI_{50} comprendidas entre 31-43 $\mu\text{g/mL}$ contra las líneas celulares K562, HCT15 y U251 (véase tabla 3). A pesar de que las CI_{50} que exhibieron *C. alamosanus* y *J. neopauciflora* sobrepasan el criterio establecido por Pezzuto et al. [30], se decidió realizar el estudio químico de sus correspondientes extractos orgánicos con el fin de establecer la identidad de las moléculas responsables de las actividades citotóxicas que mostraron dicho material. Se tomó la decisión anterior ya que los resultados de las actividades citotóxicas pueden resultar falsos positivos o negativos como consecuencia de la presencia de pigmentos, de la baja concentración a la que se encuentran las moléculas en los extractos, o bien debido a las interacciones intermoleculares, por lo que es necesario el fraccionamiento y la evaluación de mezclas menos complejas de compuestos, o bien, de las sustancias puras. Los materiales seleccionados se analizaron de acuerdo al procedimiento fitoquímico convencional [31], usando dos de las líneas celulares más sensibles a cada muestra (K562 y HCT15 para las especies de *Croton*, y U251 y K562 para la especie de *Jatropha*) como las células piloto para realizar el fraccionamiento biodirigido de los extractos orgánicos.

Capítulo 6

6.1 Química y evaluación citotóxica de *Croton glabellus*



Fotografía 1. *Croton glabellus*.

6.1.1 Material vegetal

Croton glabellus fue colectada en Los Tuxtlas, Veracruz, México, en Abril del 2003 y fue identificada y verificada por la M. en C. Verónica Juárez Jaimes del Instituto de Biología de la UNAM. Un espécimen se encuentra depositado en el Herbario Nacional de la UNAM, con el número de registro: MEXU-1104456.

6.1.2 Antecedentes generales de *C. glabellus*

C. glabellus es una planta perenne que se distribuye desde México (Veracruz, Quintana Roo, Tabasco, Chiapas y Nayarit) hasta el Sur de América. Puede ser encontrada como un arbusto o un árbol de 2-3 m en zonas de clima cálido (70 msnm) y tropical como el estado de Veracruz. Presenta hojas ovaladas alternas y lisas de 5-16 cm, inflorescencias blancas con una estípula amarilla en racimos simples o solitarios; fruto capsular trilobado y verde. Es conocida también como *C. nitens* y *C. eleuteria*. Los nombres comunes que se le atribuyen son: canela silvestre, algayubo, almizclillo, quina blanca [32].

En la medicina tradicional de México, las cocciones de hojas y corteza de *C. glabellus* son apreciadas por sus propiedades anticancerígenas, para aliviar cólicos estomacales, infecciones de heridas, detener hemorragias, como cauterizante, como anti-inflamatorio de testículos, para curar abscesos y granos bucales, etc. [32c]. Los antecedentes en la literatura indican que la especie nativa de Colombia contiene compuestos con propiedades hipotensoras. Dichas propiedades fueron atribuidas a la presencia de los flavonoides caracterizados como ayanina y quercetina.

6.1.3 Extracción y aislamiento de los compuestos de *C. glabellus*

Las hojas secas y pulverizadas de *C. glabellus* (5 kg) fueron maceradas en la mezcla de CH₂Cl₂:CH₃OH (1:1) por tres días en tres ocasiones sucesivas. Los macerados obtenidos fueron concentrados a presión reducida lo que condujo a un residuo verde oscuro (270 g). El residuo fue disuelto en 500 mL de la mezcla de CH₂Cl₂:CH₃OH (1:1), adsorbido en 370 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) y procesado mediante cromatografía en columna a presión reducida sobre sílica gel 60 (70-230 mesh) usando como eluyente Hex, mezclas de Hex:AcOEt, AcOEt y AcOEt:CH₃OH en orden creciente de polaridad. Los eluatos colectados (1L) fueron monitoreados mediante cromatografía analítica de placa delgada y reunidos de acuerdo a su similitud cromatográfica, lo que permitió la obtención de 17 fracciones principales (diagrama 1). De manera simultánea al proceso de fraccionamiento, se identificaron algunos constituyentes que son muy comunes en las plantas superiores; es decir, se estableció la presencia de ceras, mezclas de ácidos grasos y de carotenoides, Δ -sitosterol (**115**), Δ -D-glucopiranosido de Δ -sitosterilo (**125**) y sacarosa (**126**) (diagrama 1). Los últimos tres compuestos fueron identificados mediante la comparación de algunas de sus propiedades físicas (punto de fusión y RMN ¹H y de ¹³C) con las informadas en la literatura.

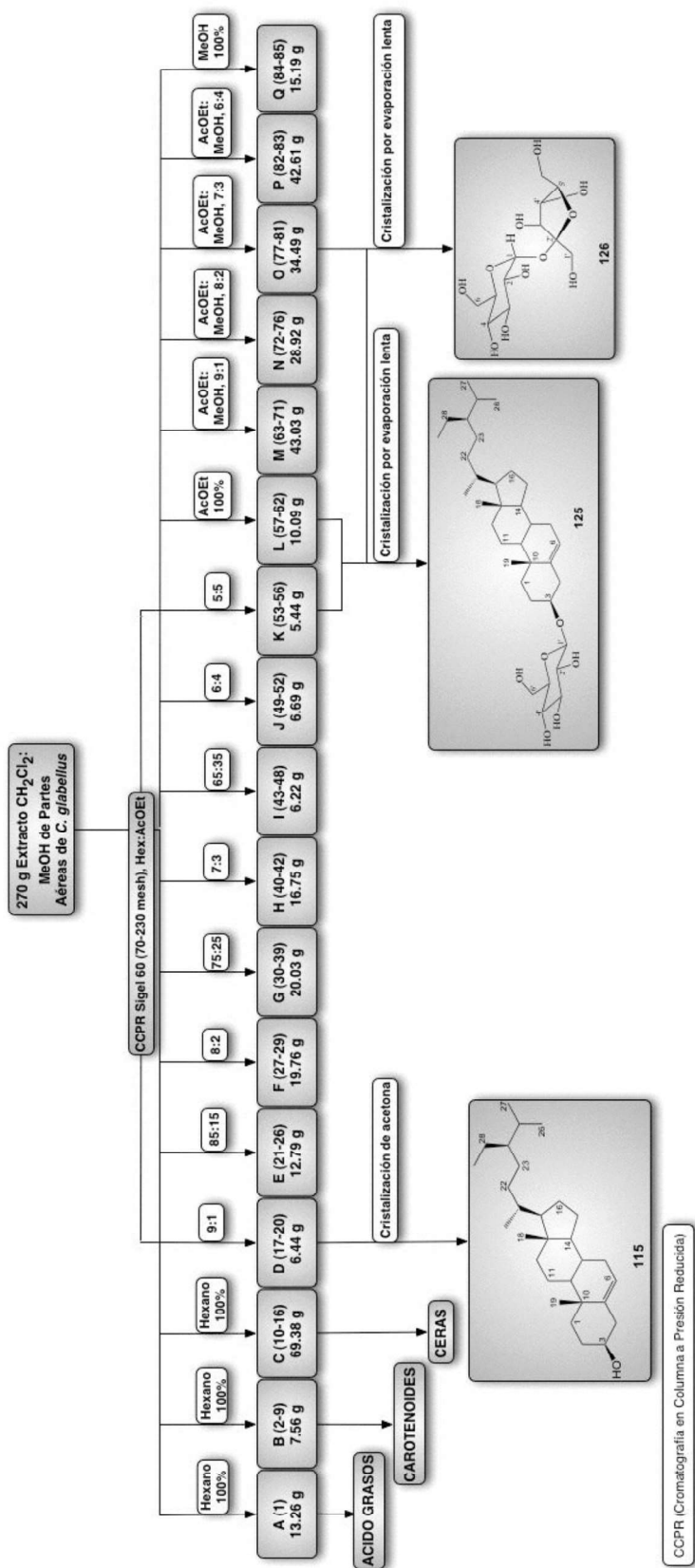


Diagrama I. Fraccionamiento principal del extracto orgánico de *Croton glabellus*.

6.1.4 Fraccionamiento biodirigido del extracto de *C. glabellus*

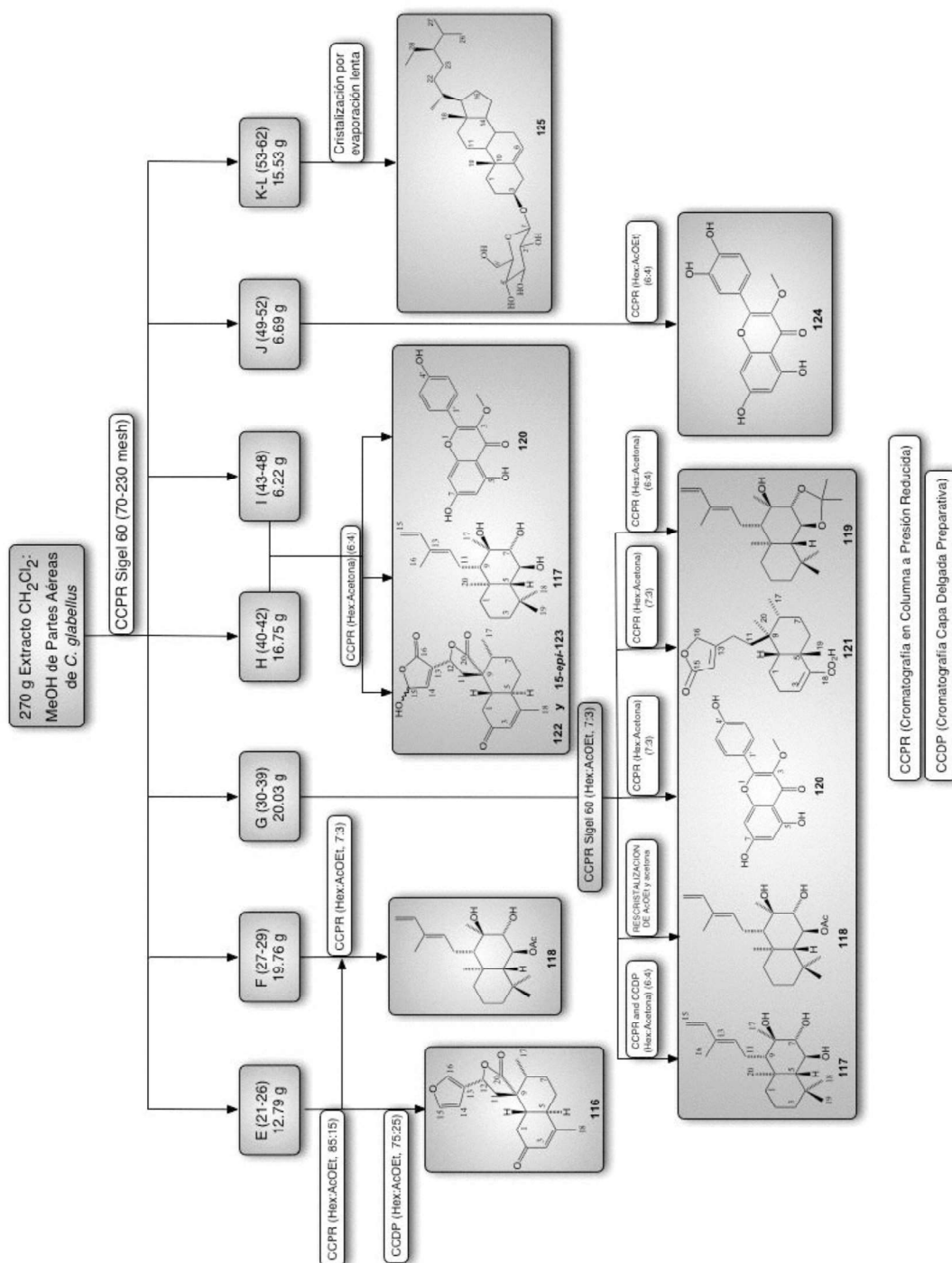
Las fracciones principales fueron evaluadas en el ensayo de citotoxicidad frente a dos líneas celulares de tumores humanos. Los resultados obtenidos del rastreo de actividad a 50 µg/mL, de las fracciones que mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento celular mayores al 70%, son mostrados en la tabla 4.

Tabla 4. Rastreo de actividad citotóxica* de las fracciones obtenidas de *C. glabellus*.

<i>Fracciones Principales</i>	K562 (%)	HCT15 (%)
<i>D</i>	98.8	82.18
<i>E</i>	98.68	70.99
<i>F</i>	98.94	100
<i>G</i>	98.11	100
<i>H</i>	98.33	100
<i>I</i>	98.61	100
<i>J</i>	98.18	97.33
<i>K</i>	98.79	88.21
<i>L</i>	98.67	100
<i>M</i>	98.62	100
<i>N</i>	96.38	38.31
<i>O</i>	100	42.79
<i>P</i>	77.36	46.48

*Los valores están expresados en porcentaje de inhibición del crecimiento

Estas fracciones activas fueron reprocesadas mediante diversas técnicas cromatográficas hasta el aislamiento y la purificación de los constituyentes bioactivos. A partir de la fracción D se aislaron 32.9 mg de Δ -sitosterol (**115**) y no fue determinada su actividad citotóxica, pues es conocido por los informes en la literatura, que es un metabolito secundario con propiedades citotóxicas y antitumorales. Por otra parte, a partir de la fracción E se aislaron 32 mg del diterpeno de tipo *nor*-clerodano **116** y 45 mg del labdano **118**, siendo **118** el metabolito bioactivo (diagrama 2).

Diagrama 2. Aislamiento y purificación de los constituyentes de *C. glabellus*.

Por otra lado, a partir de la fracción F se aislaron 952 mg de **118** como el compuesto activo. De la fracción G se aislaron tres diterpenos de tipo labdano [**117** (16 mg), **118** (4.11 g), **119** (28 mg)], 23 mg del flavonoide **120** y 3.6 mg del diterpeno de tipo *cis-ent*-clerodano **121**, siendo las sustancias **117-120**, las responsables de la actividad. De las fracciones H-I se aislaron 436 mg de **118**, 5.3 mg de la mezcla epimérica de un diterpeno de tipo *nor*-clerodano (**122** y **123**) y 38 mg del

flavonoide **120**. A partir de la fracción J se aislaron 5 mg del flavonoide **124** y 57 mg de **117**. De la fracción K hasta la P se identificaron compuestos ubicuos en la naturaleza, es decir, se estableció la presencia del Δ -D-glucopiranosido de Δ -sitosterilo (**125**) y sacarosa (**126**). Durante el proceso de la caracterización estructural de los metabolitos secundarios aislados, se realizaron derivatizaciones químicas con el fin de completar dicho proceso. Así por ejemplo, se obtuvo el derivado diacetilado **118a** a partir de **117** y de **118**; y el derivado *p*-bromobenzoilado **118b** a partir de **118** mediante previa derivatización a **117**. Cada uno de los compuestos aislados y purificados (excepto **115**, **124-126**) fueron evaluados a 50 μ M a fin de ponderar su potencial citotóxico (tabla 5).

Tabla 5. Actividad citotóxica* de productos naturales y derivados de *C. glabellus*.

Muestra	U251	PC3	K562	HCT15	MCF7
118a	33.89		70.48	64.04	
119	57.2	93.89	65.18	59.46	40.47
117	100		86.26	100	
120	100		70.09	100	
116	29.17		20.05	41.16	
118b	66.99		84.52	77.59	

*Los valores están expresados en porcentaje de inhibición del crecimiento

Los resultados mostrados en la tabla 5 permitieron seleccionar aquellos compuestos que exhibieron porcentajes de inhibición del crecimiento celular mayores al 70%. Así, las actividades citotóxicas (CI₅₀) de los compuestos puros son mostradas en la tabla 6.

Table 6. Actividades citotóxicas* de los compuestos **117-120** y del derivado **118b**.

Compuesto	U251	PC3	K562	HCT15	MCF7
117	34.2 \pm 7.06		18.30 \pm 1.80	33.94 \pm 8.92	
118			19.83 \pm 0.56	31.93 \pm 7.30	
118a		32.13 \pm 1.76	31.34 \pm 3.25		
119		27.93 \pm 2.14	37.56 \pm 10.5		32.95 \pm 5.48
118b		60.77 \pm 5.46	29.82 \pm 1.24	44.12 \pm 5.10	46.82 \pm 6.02
120	18.32 \pm 6.07		16.64 \pm 4.20	20.69 \pm 1.23	
Adriamicina	0.32 \pm 0.02	0.19 \pm 0.01	0.28 \pm 0.01	0.23 \pm 0.02	0.14 \pm 0.01

*Valores de CI₅₀ (μ M) \pm error estándar. La adriamicina fue usada como el control positivo.

6.2 Propiedades físicas de los compuestos de *C. glabellus*

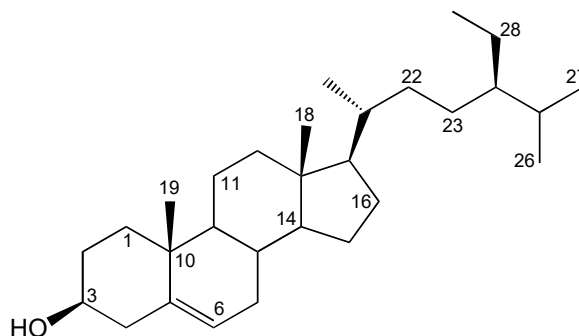
6.2.1 Δ -Sitosterol (115) [33]

Cristales incoloros (32.9 mg)

pf: 146-150 °C

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3), Δ : 5.35 (1H, d, $J = 5.0$, H-6), 5.16 (1H, dd, $J = 8.0, 15.0$, H-22), 5.02 (1H, dd, $J = 8.0, 15.0$, H-23), 3.55 (1H, m, H-3), 1.02 (3H, s, H-19), 0.97 (3H, d, $J = 6.4$, H-21), 0.84 (3H, t, H-29), 0.83 (3H, d, $J = 6.7$, H-26), 0.81 (3H, d, H-27), 0.68 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-C-13}$), 0.68-1.3 (28H, m)

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), Δ : 36.97 (C-1), 29.68 (C-2), 73.97 (C-3), 38.10 (C-4), 139.63 (C-5), 122.63 (C-6), 31.86 (C-7), 27.75 (C-8), 50.01 (C-9), 36.59 (C-10), 21.01 (C-11), 39.69 (C-12), 42.27 (C-13), 56.65 (C-14), 24.28 (C-15), 28.22 (C-16), 56.00 (C-17), 11.85 (C-18), 19.30 (C-19), 36.14 (C-20), 18.76 (C-21), 33.91 (C-22), 138.29 (C-22'), 26.04 (C-23), 129.26 (C-23'), 45.82 (C-24), 29.12 (C-25), 19.80 (C-26), 19.02 (27), 23.04 (C-28), 11.97 (C-29)



115

6.2.2 Austroinulina (117) [34]

Sólido blanco (35 mg)

Rf 0.41 (Hex:(CH_3) $_2$ CO, 65:35)

Pf 76-78°C

IR CHCl_3 Δ_{max} 3415 (OH); 2928, 2872, 1389; 1641, 1008 y 900 cm^{-1} (C=C)

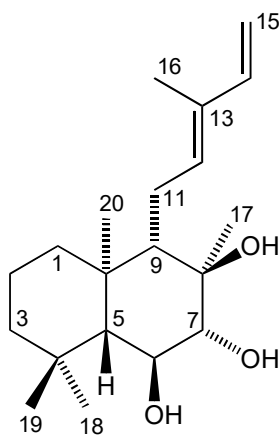
$[\Delta]_{\text{D}}^{25} + 24.77$ ($c = 0.44$, MeOH)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz); Δ 6.86 (dd, $J = 10.8, 17.2$ Hz, H-14); 5.44 (t, $J = 7.0$ Hz, H-12); 5.20 (d, $J = 17.3$ Hz, H-15); 5.11 (d, $J = 10.8$ Hz, H-15); 3.79 (d, $J = 9.3$ Hz, H-7 Δ); 3.63 (dd, $J = 9.6, 10.8$ Hz, H-6 Δ); 2.45 (dt, $J = 15.8, 5.5$ Hz, H-11a); 2.24 (dt, $J = 15.8, 5.8$ Hz, H-11b); 1.79 (d, $J =$

0.8 Hz, H-16); 1.56 (m, H-1a); 1.45-1.30 (5H, m, H₂-2, H₂-3, H-9 \perp); 1.18 (s, H-17); 1.16 (s, H-18); 1.15 (d, $J = 10.8$ Hz, H-5 \perp); 1.05-0.92 (m, H-1b); 1.01 (s, H-20); 0.90 (s, H-19)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz); \perp 133.55 (C-14), 133.29 (C-12), 130.99 (C-13), 113.88 (C-15), 84.99 (C-7), 77.00 (C-8), 71.70 (C-6), 59.57 (C-9), 57.19 (C-5), 43.32 (C-3), 39.84 (C-1), 39.14 (C-10), 36.23 (C-18), 33.74 (C-4), 22.72 (C-11), 22.15 (C-20), 19.87 (C-16), 19.38 (C-17), 18.19 (C-2), 16.93 (C-19)

EM-IE⁺: m/z (% intensidad relativa) 322 (no observado), 304 (9, [M - H₂O]⁺), 286 (8, 304 - H₂O), 81 (94), 69 (90), 55 (73), 43 (100), 41 (82), 29 (19)



117

6.2.3 6-O-Acetilaustroinulina (118) [34, 35]

Sólido blanco y cristales transparentes (5.541g)

Rf 0.50 (Hex:AcOEt, 55:45)

Pf 162-165°C

$[\perp]_D^{25} + 34.2$ ($c = 1.0$, CHCl₃)

IR CHCl₃ \perp_{\max} 3581 (OH); 2932, 2875; 1726 (C=O); 1253 (C-O); 1641, 975 y 909 cm^{-1} (C=C)

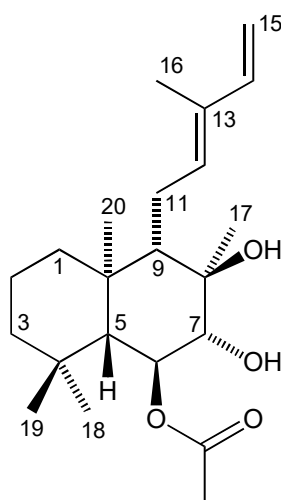
RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz); \perp 6.87 (ddd, $J = 0.9, 10.8, 17.1$ Hz, H-14); 5.44 (t, $J = 7.2$ Hz, H-12); 5.19 (d, $J = 17.4$ Hz, H-15); 5.12 (dd, $J = 9.9, 11.4$ Hz, H-6 \perp); 5.10 (dd, $J = 11.4, 2.1$ Hz, H-15); 3.46 (d, $J = 10.2$ Hz, H-7 \perp); 2.48 (ddd, $J = 1.2, 4.5, 15.9$ Hz, H-11a); 2.25 (dt, $J = 6.0, 16.2$ Hz, H-11b); 2.12 (s, H₃C-Ac); 1.79 (d, $J = 1.2$ Hz, H₃-16); 1.61 (ddt, $J = 13.0, 5.0, 1.5$ Hz, H-1a); 1.56 (ddt, $J = 13.5, 13.0, 4.0$ Hz, H-2a); 1.41 (dt, $J = 14.5, 5.0$ Hz, H-2b); 1.40 (d, $J = 11.0$ Hz, H-5 \perp); 1.39 (t, $J = 5.5$ Hz, H-9 \perp); 1.34 (dtd, $J = 113.5, 5.0, 1.5$ Hz, H-3a); 1.23 (s, H-17); 1.22 (m, H-3b); 1.01 (s, H-18); 0.96 (s, H-20); 0.95-0.97 (m, H-1b); 0.87 (s, H-19)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz); \perp , asignación: 171.81 (C=O-Ac), 133.61 (C-12), 133.16 (C-14), 130.99 (C-13), 113.79 (C-15), 83.67 (C-7), 76.89 (C-8), 73.19 (C-6), 59.15 (C-9), 56.49 (C-5), 43.39 (C-3), 39.81 (C-1), 39.39 (C-10), 35.99 (C-18), 33.33 (C-4), 22.75 (C-11), 22.17 (C-19), 21.79 (CH_3 -Ac), 19.85 (C-16), 19.54 (C-17), 18.03 (C-2), 16.75 (C-20)

EM-IE $^+$: m/z (% intensidad relativa) 364 (no observado), 346 (10, $[M - \text{H}_2\text{O}]^+$), 286 (65, $346 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), 205 (95), 137 (67), 81 (93), 43 (100), 18 (10)

EM-FAB $^+$: m/z (% intensidad relativa) 364 (1, M^+), 347 (17, $[M - \text{H}_2\text{O}]^+$), 287 (55, $347 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), 205 (25), 81 (100), 69 (38), 43 (35), 29 (7)

EM-AR-FAB $^+$: Observado: m/z 347.2589; Calculado: 347.2586 $[M - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$.



118

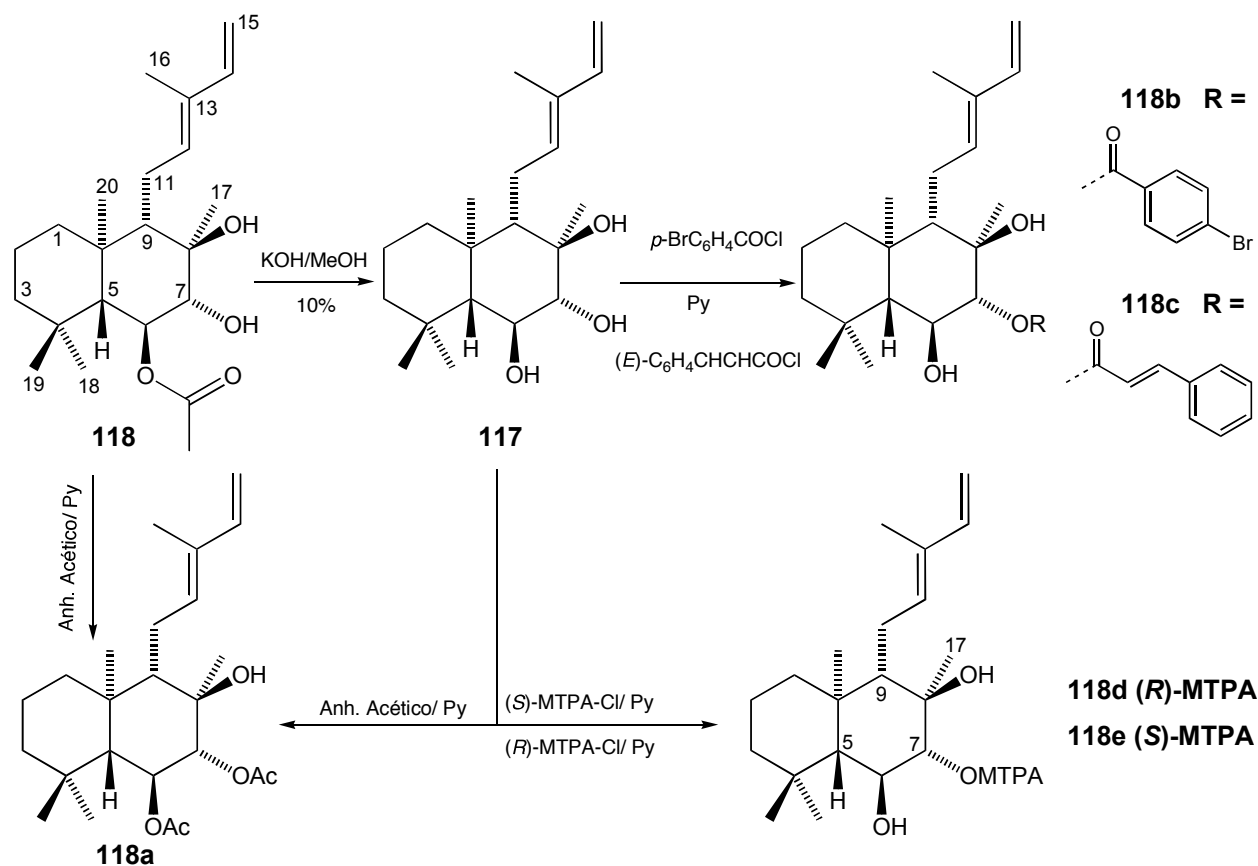
6.2.4 Derivatización química de 6-*O*-acetylaustroinulina (118)

6.2.5 6,7-Diacetylaustroinulina (118a): 62.5 mg de **118** fueron disueltos en 1 mL de piridina anhidra y luego se adicionó 1 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente por 3 h, se detuvo la reacción adicionando hielo y se trató con HCl 10 %, acetato de etilo y disolución saturada de NaHCO_3 de acuerdo al procedimiento convencional. La fase orgánica fue secada (Na_2SO_4), concentrada y el derivado acetilado fue purificado mediante cromatografía preparativa en capa delgada, usando como sistema de elución una mezcla de hexano:acetato de etilo 4:1.

Aceite amarillo (59 mg)

Rf 0.42 (hexano:AcOEt, 7:3)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz); δ 6.85 (ddd, $J = 0.8, 10.8, 17.2$ Hz, H-14); 5.43 (t, $J = 7.4$ Hz, H-12); 5.29 (dd, $J = 9.8, 10$ Hz, H-6 \perp); 5.19 (d, $J = 16.8$ Hz, H-15); 5.10 (dd, $J = 1.5, 10.8$ Hz, H-15); 4.90 (d, $J = 10.0$ Hz, H-7 \perp); 2.45 (m, H-11a); 2.24 (m, H-11b); 2.06 (s, $\text{H}_3\text{C}(2')\text{-Ac}$); 2.01 (s, $\text{H}_3\text{C}(2'')\text{-Ac}$); 1.78 (d, $J = 1.2$ Hz, H-16); 1.70-1.18 (m, H-1a, H-2a, H2b, H-9, H-5, H-3a, H-3b); 1.22 (s, H-17); 0.97 (s, H-18); 0.95 (s, H-20); 0.95-0.97 (m, H-1b); 0.88 (s, H-19)



6.2.6 7-*p*-Bromobenzoílaustroinulina (118b)

60 mg de **118** fueron sometidos a hidrólisis en presencia de KOH 10 % (20 mL) obteniéndose 36 mg de **117**. Posteriormente, **117** fue sometido al proceso de esterificación con cloruro de *p*-bromobenzoílo en piridina anhidra por 24 h y tratado de manera convencional hasta la obtención del derivado *p*-bromobenzoilado **118b** (29 mg). Cabe señalar que, el producto mayoritario se esterificó preferencialmente en la posición 7, mientras que el alcohol de la posición 6 no reacciona, presumiblemente por el impedimento estérico que origina el grupo *p*-bromobenzoato de la posición 7. El producto fue purificado mediante CCDP usando Hex:(CH_3) $_2$ CO (7:3) como eluyente.

Sólido blanco amorfo

UV [c 1.98×10^{-5} , EtOH] 204 (log ρ 4.48), 215 (log ρ 4.17), 241 (log ρ 4.62)

DC [c 1.98×10^{-5} , EtOH] $[\rho]_{247} + 19\,726$, $[\rho]_{231} - 5\,464$, $[\rho]_{208} + 5\,914$

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz); \perp 7.94 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, AA'MM'), 7.58 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, AA'MM'), 6.86 (ddd, $J = 17.4, 10.8, 0.9$ Hz, H-14), 5.45 (t, $J = 7.8$ Hz, H-12), 5.20 (d, $J = 17.1$ Hz, H-15_{trans}), 5.10 (dt, $J = 10.8, 1.8$ Hz, H-15_{cis}), 5.02 (d, $J = 9.9$ Hz, H-7), 3.89 (dd, $J = 11.2, 9.8$ Hz, H-6), 2.50 (dt, $J = 15.6, 5.1$ Hz, H-11a), 2.23 (dt, $J = 16.2, 6.0$ Hz, H-11b), 1.78 (d, $J = 1.2$ Hz, H₃-16), 1.32 (s, H₃-17), 1.27 (d, $J = 11.1$ Hz, H-5), 1.17 (s, H₃-18), 1.01 (s, H₃-20), 0.96 (s, H₃-19)
EM-FAB⁺: m/z (% intensidad relativa) 504 (2, M^+), 505 (3), 507 (2), 487 (7, 505 - H₂O), 489 (3, 507 - H₂O), 183 (100, $[\text{C}_7\text{H}_4\text{OBr}]^+$), 185 (97, $[\text{C}_7\text{H}_4\text{OBr}]^+$), 81 (67, $[\text{C}_6\text{H}_9]^+$).

6.2.7 7-(E)-Cinamoílaustroinulina (118c): **118** (40 mg) fue sometido a una hidrólisis alcalina para obtener **117** (31 mg), el cual fue posteriormente esterificado con cloruro de (*E*)-cinamoílo en piridina anhidra hasta obtener **118c** (23 mg). UV [c 4.42×10^{-5} , MeOH] 238 (log ρ 4.34), 277 (log ρ 4.37); DC [c 4.42×10^{-5} , MeOH] $[\rho]_{276} + 6\,737$, $[\rho]_{266} + 6\,961$, $[\rho]_{237} - 15\,667$, $[\rho]_{217} - 10\,710$; RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) \perp 7.74 (d, $J = 15.9$ Hz, AB), 7.53 (m, 2H), 7.39 (m, 2H), 6.87 (ddd, $J = 17.1, 10.5, 0.6$ Hz, H-14), 6.52 (d, $J = 16.2$ Hz, AB), 5.46 (t, $J = 7.5$ Hz, H-12), 5.19 (dd, $J = 17.1, 0.6$ Hz, H-15_{trans}), 5.10 (dt, $J = 10.8, 1.5$ Hz, H-15_{cis}), 4.90 (d, $J = 9.9$ Hz, H-7 \perp), 3.85 (dd, $J = 11.1, 9.9$ Hz, H-6 \perp), 2.50 (dt, $J = 15.9, 6.0$ Hz, H-11a), 2.23 (dt, $J = 16.2, 5.7$ Hz, H-11b), 1.78 (d, $J = 1.5$ Hz, H₃-16), 1.27 (s, H₃-17), 1.17 (s, H₃-18), 1.02 (s, H₃-19), 0.96 (s, H₃-20)

6.2.8 Preparación de los derivados esterificados (R)-MTPA y (S)-MTPA de 117 (118d y 118e): 35 mg de **118** fueron hidrolizados con KOH/MeOH al 10 % hasta obtención de **117** (16 mg). Luego, 2.0 mg de **117** fueron sometidos a reaccionar *in situ* (en un tubo de RMN) con 6 μL del cloruro (*S*)-(+)- \perp -metoxi- \perp -(trifluorometil)fenilacetilo en 0.5 mL de piridina- d_5 anhidra [41]. El tubo de RMN fue agitado cuidadosamente para mezclar la muestra y posteriormente, el curso de la reacción fue monitoreada cada 2 h, mediante RMN ^1H , hasta que el éster derivado (*R*)-MTPA (**118d**) de **117** fue totalmente formado. RMN ^1H (Piridina- d_5 , 300 MHz) \perp 7.2619 (ddd, $J = 17.31, 10.77, 0.78$ Hz, H-14); 5.7948 (t, $J = 7.64$ Hz, H-12); 5.7794 (d, $J = 9.24$ Hz, H-7 \perp); 5.2552 (dd, $J = 17.46, 2.37$ Hz, H-15_{trans}); 5.1547 (dt, $J = 10.89, 1.59$ Hz, H-15_{cis}); 4.0128 (dd, $J = 10.0, 8.97$ Hz, H-6 \perp); 2.9314 (m, H.11a); 2.4171 (m, H-11b). El procedimiento descrito para **118d**, fue aplicado para la formación del éster derivado (*S*)-MTPA (**118e**) de **117** a partir de la mezcla de

reacción del cloruro (*R*)-(-)-1-metoxi-1-(trifluorometil)fenilacetilo (6 μ L), piridina-*d*₅ anhidra (0.5 mL) y **117** (2.0 mg). RMN ¹H (Piridina-*d*₅, 300 MHz) \perp 7.1784 (ddd, *J* = 17.11, 10.83 Hz, H-14); 5.7429 (t, *J* = 7.6 Hz, H-12); 5.8456 (d, *J* = 9.9 Hz, H-7 \perp); 5.2474 (dd, *J* = 17.13 Hz, H-15_{trans}); 5.1285 (dt, *J* = 10.86 Hz, H-15_{cis}); 4.2793 (dd, *J* = 11.0, 10.83 Hz, H-6 \perp); 2.8732 (m, H-11a); 2.3764 (m, H-11b). El espectro de RMN ¹H proporcionó evidencia sólo de señales debidas a la esterificación preferencial del alcohol de la posición 7. En los espectros de RMN ¹H de **118d** y **118e** se observaron señales debidas al cloruro y al ácido de Mosher.

6.2.9 Isopropilidendioxiaustroinulina (119)

A partir de la fracción G se aisló el artefacto acetónido derivado del producto natural austroinulina (**117**), formado durante el proceso de separación y purificación por cromatografía en columna en la cual se usó (CH₃)₂CO, CHCl₃ y Hex como sistema de elución. Cabe señalar que no se ha reportado previamente en la literatura este tipo de artefacto derivado de diterpenos de tipo labdano.

Sólido blanco (28 mg)

Rf 0.45 (hexano:acetona, 7:3)

Pf 106-108°C

IR CHCl₃ \perp _{max} 3460 (OH); 2985, 2921, 2874; 1230 (C-O); 1642, 1091, 896 cm^{-1} (C=C)

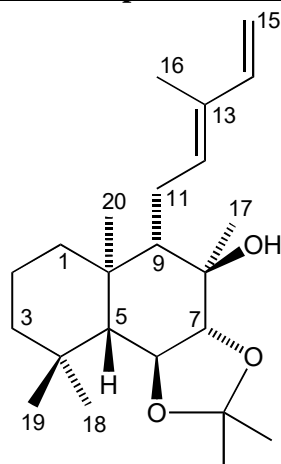
$[\perp]_D^{25} + 40$ (*c* = 0.075, MeOH)

RMN ¹H (CD₃COCD₃, 500 MHz); \perp 6.95 (ddd, *J* = 1.0, 11.0, 17.5 Hz, H-14); 5.48 (t, *J* = 7.0 Hz, H-12); 5.13 (dd, *J* = 1.0, 17.0 Hz, H-15); 5.03 (dt, *J* = 10.8, 1.5 Hz, H-15); 3.61 (dd, *J* = 9.0, 11.0 Hz, H-6 \perp); 3.49 (OH); 3.42 (d, *J* = 9.5 Hz, H-7 \perp); 2.50 (m, H-11a); 2.27 (m, H-11b); 1.74 (d, *J* = 0.5 Hz, H-16); 1.64-1.58 (2H, m, H-1a, H-2a); 1.42-1.34 (3H, m, H-2b, H-9 \perp , H-3a); 1.35 (d, *J* = 0.5 Hz, H₃-2'); 1.33 (d, *J* = 0.5 Hz, H₃-3'); 1.26 (d, *J* = 11.5 Hz, H-5 \perp); 1.16 (m, H-3b); 1.18 (s, H-17); 1.04 (s, H-18); 0.97 (s, H-20); 0.96 (s, H-19); 0.93 (d, H-1b)

RMN ¹³C (CD₃COCD₃, 125 MHz); \perp 135.68 (C-12), 135.04 (C-14), 130.48 (C-13), 113.48 (C-15), 108.89 (C-1'), 90.76 (C-7), 76.62 (C-6), 74.99 (C-8), 61.51 (C-9), 56.69 (C-5), 42.69 (C-3), 41.46 (C-10), 40.84 (C-1), 35.33 (C-18), 34.12 (C-4), 27.58 (C-3'), 27.06 (C-2'), 22.98 (C-11), 22.49 (C-19), 19.97 (C-16), 19.04 (C-2), 18.60 (C-17), 16.98 (C-20)

EM IE: *m/z* (% Intensidad relativa), 362 (1, *M*⁺), 361 (1, [*M* - H]⁺), 344 (10, [*M* - H₂O]⁺), 286 (10), 195 (65), 137 (50), 81 (82), 43 (100), 41 (42), 18 (12)

EM-AR-FAB⁺: Observado: 363.2889; Calculado: 363.2899, [*M* + H]⁺.



119

6.2.10 *trans*-Deshidrocrotolina (116) [10a, 10b]

Sólido blanco amorfo (32 mg)

Rf 0.32 (Hex:AcOEt, 75:25)

Pf: 135 °C

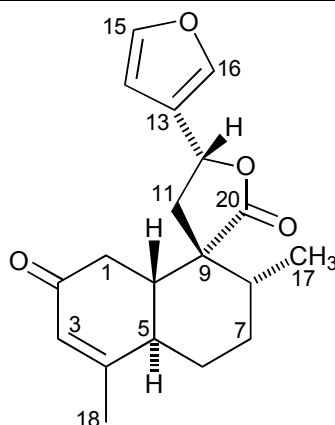
$[\alpha]_D^{25} + 13$ ($c = 0.075$, CHCl₃)

IR CHCl₃ ν_{\max} 2958, 2932, 2863; 1753 (C=O anillo \perp lactona); 1664 (C=O \perp, \perp -insaturado); 1504, 873 (anillo furano); 1154 (C-O); 1622 (C=C); 755 cm^{-1}

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz); \perp 7.45 (2H, m, H-15, H-16); 6.41 (dd, $J = 1.0, 1.7$ Hz, H-14); 5.89 (quint, $J = 1.0$ Hz, H-3); 5.43 (t, $J = 8.6$ Hz, H-12 \perp); 3.18 (t, $J = 1.2, 11.5$ Hz, H-5 \perp); 2.54 (dd, $J = 3.0, 15.6$ Hz, H-1 \perp); 2.43 (dd, $J = 13.9, 8.6$ Hz, H-11a); 2.36 (dd, $J = 13.8, 8.7$ Hz, H-11b); 2.26 (dq, $J = 12.9, 3.0$ Hz, H-6a); 2.19 (dd, $J = 14.1, 15.6$ Hz, H-1 \perp); 1.97 (t, $J = 1.0$ Hz, H₃-18); 1.85 (m, H-7a); 1.80 (ddd, $J = 3.0, 10.4, 13.9$ Hz, H-10 \perp); 1.66-1.69 (m, H-7b); 1.66-1.69 (m, H-8 \perp); 1.17 (m, H-6b); 1.16 (d, $J = 6.6$ Hz, H₃-17)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz); \perp asignación: 197.82 (C-2), 177.00 (C-20), 166.14 (C-4), 144.30 (C-15), 139.32 (C-16), 126.69 (C-3), 125.10 (C-13), 107.97 (C-14), 72.35 (C-12), 51.40 (C-9), 46.20 (C-10), 41.70 (C-8), 40.49 (C-11), 39.72 (C-1), 39.54 (C-5), 30.08 (C-7), 28.15 (C-6), 22.04 (C-18), 17.61 (C-17)

EM-IE⁺: m/z (int. rel. %) 314 (45, M^+); 161 (100); 134 (20); 121 (45); 95 (17); 91 (12); 77 (10); 67 (7); 41 (10)



116

6.2.11 Mezcla de cajucarínólida (122) [10c] y 15-*epi*-cajucarínólida (123)

De las fracciones H-I se aisló y purificó un sólido color beige que se revela como una mancha negra bien definida bajo la lámpara de UV_{254nm} y que revela café tenue con sulfato cérico de amonio.

Sólido color beige (5.3 mg)

Rf 0.25 (Hex:(CH₃)₂CO, 3:2)

Pf 238-240 °C

UV [*c* 5.78 X 10⁻⁵ M, MeOH] 205 (log ρ4.15), 235 (log ρ4.60)

DC [*c* 5.78 X 10⁻⁵ M, MeOH] [ρ]₃₂₄ - 8 399, [ρ]₂₇₁ + 2 506, [ρ]₂₄₃ - 41 300, [ρ]₂₂₂ + 56 754

IR CHCl₃ λ_{max} 3273 (OH); 2962, 2859; 1753 (C=O anillo \perp -lactona); 1661 (C=O \perp , \perp -insaturado); 1213, 1107 (C-O); 1620 (C=C); 755 cm⁻¹

RMN ¹H (CDCl₃:DMSO-*d*₆ 3:1, 300 MHz); \perp 7.08 (2H, t, *J* = 1.2 Hz, H-14', H-14); 6.24 (t, *J* = 1.2 Hz, H-15'); 6.14 (dd, *J* = 1.2, 1.8 Hz, H-15); 5.87 (2H, sa, H-3', H-3); 5.19 (2H, m, H-12', H-12); 3.09 (2H, sa, H-5', H-5); 2.60 (m, H-11a); 2.58 (m, H-1a); 2.51 (m, *J* = 13.8, 8.5 Hz, H-11a'); 2.34 (2H, m, H₂-1'); 2.29 (m, H-11b'); 2.23 (2H, m, H-6a', H-6a); 2.16 (m, H-11b); 2.12 (m, H-1b); 1.97 (6H, d, *J* = 1.0 Hz, H₃-18', H₃-18); 1.82 (2H, m, H-7a', H-7a); 1.77 (2H, m, H-10', H10); 1.70 (2H, m, H-8', H-8); 1.68 (2H, m, H-7b', H-7b); 1.19 (2H, td, *J* = 12.6, 3.3 Hz, H-6b', H6b); 1.13 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H₃-17); 1.12 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H₃-17')

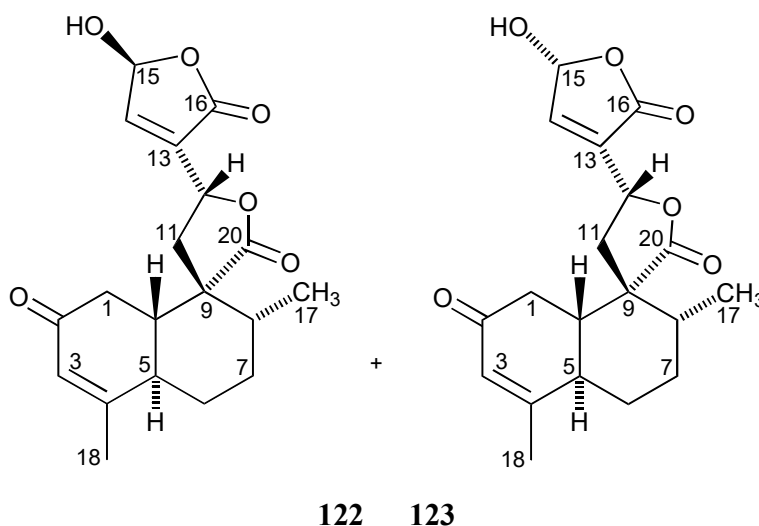
RMN ¹H (CDCl₃:DMSO-*d*₆ 3:1, 500 MHz); \perp 7.09 (t, *J* = 1.0 Hz, H-14') 7.08 (t, *J* = 1.2 Hz, H-14); 6.24 (t, *J* = 1.2 Hz, H-15'); 6.14 (dd, *J* = 2.0, 1.5 Hz, H-15); 5.87 (2H, dsept, *J* = 6.0, 1.5 Hz, H-3', H-3); 5.18 (2H, ddd, *J* = 10.5, 9.0, 2.0 Hz, H-12', H-12); 3.11 (2H, m, H-5', H-5); 2.61(4H, m, H-11a', H-11a, H₂-1); 2.38 (dd, *J* = 15.5, 2.5 Hz, H-1a'); 2.30 (dd, *J* = 14.0, 9.0 Hz, H-11b'); 2.26 (2H, dq, *J* = 13.5, 3.0 Hz, H-6a', H-6a); 2.17 (dd, *J* = 14.5, 9.0 Hz, H-11b); 2.09 (m, H-1b');

1.97 (6H, d, $J = 1.5$ Hz, H₃-18', H₃-18); 1.84 (2H, dt, $J = 13.0, 7.0$ Hz, H-7a', H7a); 1.78 (2H, m, H-10', H-10); 1.72-1.65 (4H, m, H-8', H-8, H-7b', H-7b); 1.19 (2H, m, H-6b', H-6b); 1.13 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H₃-17'); 1.12 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H₃-17)

RMN ¹³C (CDCl₃:DMSO-*d*₆ 3:1, 75 MHz); ⊥ 197.53 (C-2'), 197.29 (C-2), 176.46 (C-20'), 176.40 (C-20), 168.50 (C-16', C-16), 165.85 (C-4'), 165.60 (C-4), 144.56 (C-16'), 144.24 (C-14), 136.24 (C-13'), 135.95 (C-13), 126.62 (C-3'), 126.54 (C-3), 98.37 (C-15'), 98.18 (C-15), 71.54 (C-12', C-12), 50.89 (C-9'), 50.72 (C-9), 45.52 (C-10', C-10), 41.54 (C-8'), 41.33 (C-8), 39.59 (C-1'), 39.41 (C-5', C-5), 39.11 (C-1), 38.56 (C-11'), 38.19 (C-11), 29.92 (C-7'), 29.80 (C-7), 27.93 (C-6'), 27.87 (C-6), 21.81 (C-18', C-18), 17.34 (C-17'), 17.24 (C-17)

RMN ¹³C (CDCl₃:DMSO-*d*₆ 3:1, 125 MHz); ⊥ 197.15 (C-2'), 196.87 (C-2), 176.04 (C-20'), 175.98 (C-20), 168.50 (C-16', C-16), 165.44 (C-4'), 165.25 (C-4), 144.16 (C-16'), 143.82 (C-14), 135.68 (C-13'), 135.56 (C-13), 126.20 (C-3'), 126.13 (C-3), 97.95 (C-15'), 97.76 (C-15), 71.11 (C-12', C-12), 50.49 (C-9'), 50.32 (C-9), 45.10 (C-10', C-10), 41.11 (C-8'), 40.92 (C-8), 39.16 (C-1'), 39.00 (C-5', C-5), 38.94 (C-5), 38.69 (C-1), 38.14 (C-11'), 37.77 (C-11), 29.47 (C-7'), 29.36 (C-7), 27.47 (C-6'), 27.42 (C-6), 21.43 (C-18'), 21.40 (C-18), 16.91 (C-17'), 176.82 (C-17)

EM-FAB⁺: m/z (int. rel. %) 693 (4, [2(*M*) + H]⁺), 347 (82, [*M* + H]⁺), 259 (51), 243 (100), 154 (80), 136 (68), 91 (32), 77 (30), 55 (25), 43 (18), 41 (21)



6.2.12 Marrubiagenina (121) [36a]

Sólido blanco (3.6 mg)

Rf 0.37 (Hex:(CH₃)₂CO, 7:3)

Pf 174-175 °C

$[\alpha]_D^{25} + 54.4$ ($c = 0.18$, CHCl₃), ($[\alpha]_D^{25} - 60.5$, $c 0.9$, CHCl₃, [44]), ($[\alpha]_D^{25} - 58$, $c 2.3$, CHCl₃, [43])

UV (c 9.03×10^{-5} M, MeOH) 225 ($\log \rho$ 4.38); [MeOH, 208 nm, $\log \rho$ 4.30, [44]]; [CH₃CN, 209 nm, $\log \rho$ 4.30, 36a].

DC (MeOH, c 9.03×10^{-5} M) $[\rho]_{210} - 13\,240$; $[\rho]_{216} - 9\,946$; $[\rho]_{242} + 18\,886$; [(MeOH, c 3×10^{-5} M) $[\rho]_{205} + 5,300$; $[\rho]_{215} 0$; $[\rho]_{235} - 14,900$, [44]]; [(MeOH, $\perp\perp$ 243 (+ 6.38) = $[\rho]_{243} + 21,054$; 215 (- 2.16) = $[\rho]_{215} - 7,128$, [36a].

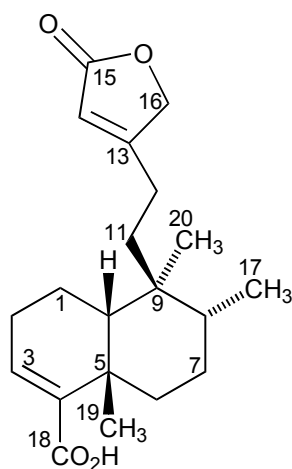
IR CHCl₃ λ_{\max} 3500-2636, 1779 (CO-OH); 1746 (C=O anillo lactona); 1679 (C=O ácido \perp, \perp -insaturado); 1635 (C=C); 1267, 1173 (C-O) cm^{-1}

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz); \perp 6.82 (t, $J = 4.0$ Hz, H-3); 5.86 (quint, $J = 1.5$ Hz, H-14); 4.76 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-16); 2.75 (ddd, $J = 17.0, 11.5, 3.5$ Hz, H-6 \perp); 2.40 (ddd, $J = 13.0, 9.0, 4.0$ Hz, H-2 \perp); 2.27 (3H, m, H-2 \perp , H₂-12); 2.06 (m, H-1 \perp); 1.79 (dd, $J = 15.5, 9.0$ Hz, H-1 \perp); 1.73 (dd, $J = 10.5, 7.3$ Hz, H-11a); 1.55 (dd, $J = 10.5, 7.0$ Hz, H-11b); 1.47 (m, H-8 \perp); 1.40 (dd, $J = 6.5, 1.0$ Hz, H-10 \perp); 1.32 (dddd, $J = 16.0, 13.5, 3.0$ Hz, H-7 \perp); 1.25 (3H, s, H₃-19 \perp); 1.18 (dddd, $J = 16.0, 14.0, 2.0$ Hz, H-7 \perp); 1.11 (ddd, $J = 16.5, 13.5, 3.0$ Hz, H-6 \perp); 0.83 (3H, s, H₃-20 \perp); 0.78 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H₃-17 \perp)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz); \perp asignación: 173.98 (C-15), 171.74 (C-18), 170.88 (C-13), 142.05 (C-3), 137.25 (C-4), 115.13 (C-14), 73.05 (C-16), 45.48 (C-10), 40.26 (C-9), 37.38 (C-8), 36.74 (C-6), 36.33 (C-5), 35.24 (C-11), 33.35 (C-19), 28.47 (C-7), 24.28 (C-2), 22.22 (C-12), 17.88 (C-20), 16.95 (C-1), 15.91 (C-17)

EM-IE⁺: m/z (int. rel. %) 332 (7, M^+), 333 (2, $[M + H]^+$), 314 (67, $[M - H_2O]^+$), 299 (100, $[M - CH_3 - H_2O]^+$), 271 (15), 203 (31), 125 (22), 111 (19, C₆H₇O₂⁺), 98 (16, C₅H₆O₂⁺), 91 (19), 69 (24), 57 (23), 55 (23), 41 (17), 28 (14)

HRFABMS: Observado: 333.2076; Calculado: 333.2066, C₂₀H₂₉O₄, $[M + H]^+$.



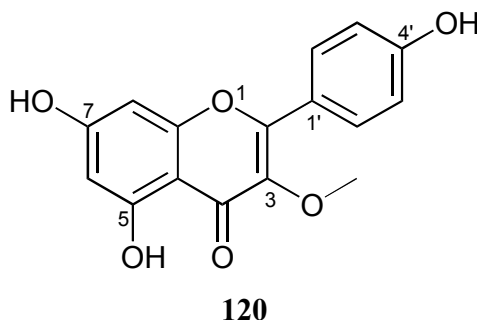
121

6.2.13 5,7,4'-Trihidroxi-3-metoxiflavona o 3-O-metilkaempferol (120) [37]

Sólido amarillo amorfo (61 mg)

Rf 0.35 (Hex:(CH₃)₂CO, 3:2)

Pf 268-270 °C

IR CHCl₃ ν_{\max} 3494, 3125 (OH); 2942, 2732, 2588, 2492, 2378, 2101; 1650 (C=O ν_{\max} , ν_{\max} -insaturado); 1604; 1565, 1490, 1358, 1297, 1220, 1165, 1087, 1016, 837, 804, 717, 637, 576RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz); δ HO-C(5) no fue observado en la región de 11.0-12.0 ppm, 7.93 (dt, $J = 8.79, 2.04$ Hz, H-6', H-2'); 6.88 (dt, $J = 9.09, 2.07$ Hz, H-3', H-5'); 6.33 (d, $J = 2.09$ Hz, H-8); 6.14 (d, $J = 1.77$ Hz, H-6); 3.90 (3H, s, H₃-CO-C(3)), los cuales correlacionaron, en el experimento COLOC, con C-3 (δ 139.42))RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz); δ 179.96 (C-4), 165.83 (C-7), 163.04 (C-5), 161.63 (C-4'), 158.37 (C-9), 157.97 (C-2), 139.42 (C-3), 131.39 (C-2', C-6'), 122.55 (C-1'), 116.53 (C-3', C-5'), 105.87 (C-10), 99.75 (C-6), 94.76 (C-8), 60.49 (CH₃-O)EM-FAB⁺: m/z (int. rel. %) 301 (100, [M + H]⁺), 300 (35, M⁺), 286 (12, [M - CH₃]⁺), 154 (41), 136 (34), 121 (11), 107 (12), 89 (13), 77 (17), 55 (14), 41 (10)**6.2.14 5,7,3',4'-Tetrahidroxi-3-metoxiflavona (124) [38]**

Sólido blanco amorfo (5 mg)

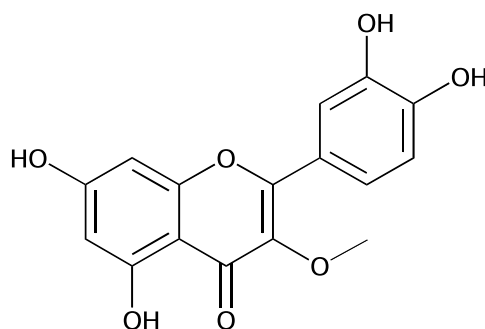
Rf 0.21 (Hex:AcOEt, 1:1)

Pf 254-256 °C

IR CHCl₃ ν_{\max} 3399 (OH); 2918, 2850; 2256, 2128 (*Ar*); 1653 (C=O ν_{\max} , ν_{\max} -insaturado); 1600, 1362, 1302, 1174, 1025, 1002, 823, 762 cm^{-1} RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz); δ 12.58 (s, HO-C(5)); 7.69 (d, $J = 2.2$ Hz, H-2'); 7.56 (dd, $J = 8.4, 2.2$ Hz, H-6'); 6.97 (d, $J = 8.4$ Hz, H-5'); 6.39 (d, $J = 2.0$ Hz, H-8); 6.29 (d, $J = 2.2$ Hz, H-6); 3.83 (3H, s, H₃-CO-C(3))

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz); \perp 177.98 (C-4), 163.38 (C-7), 161.46 (C-5), 156.26 (C-9), 155.17 (C-2), 146.96 (C-4'), 143.85 (C-3'), 137.90 (C-3), 121.07 (C-1'), 120.73 (C-6'), 114.88 (C-2'), 114.61 (C-5'), 104.50 (C-10), 98.43 (C-6), 93.16 (C-8), 59.20 ($\text{CH}_3\text{-O}$)

EM-IE $^+$: m/z (int. rel. %) 316 (21, M^+), 315 (20, $[M - \text{H}]^+$), 111 (36), 97 (58), 83 (62), 71 (64), 69 (73), 57 (100), 55 (67), 43 (62), 28 (72), 18 (63)



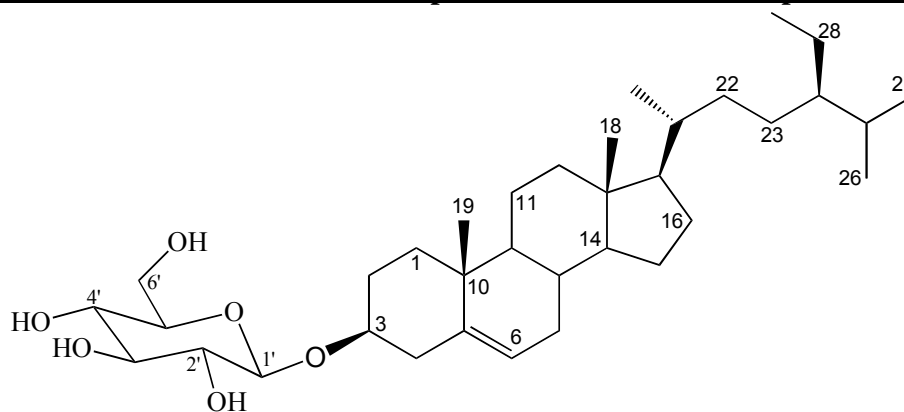
124

6.2.15 \perp -D-glucopiranosido de \perp -sitosterilo (125) [39]

Sólido blanco-verdoso (1.45 g)

RMN ^1H ($\text{Py-}d_5$, 300 MHz); \perp (multiplicidad, J (Hz), asignación): \perp 5.35 (t, $J = 2.5$ Hz, H-6), 5.04 (d, $J = 7.69$ Hz, H-1'), 4.55 (dd, $J = 2.5, 11.77$ Hz, H-6'a), 4.40 (dd, $J = 5.2, 11.77$ Hz, H-6'b), 4.27 (2H, t, $J = 7.50$ Hz, H-3', H-4'), 4.04 (dd, $J = 7.69, 7.50$ Hz, H-2'), 3.98 (m, H-3), 3.96 (m, H-5'), 2.72 (ddd, $J = 1.98, 4.69, 12.94$ Hz, H-4a), 2.49 (ddd, $J = 1.98, 12.94, 12.94$ Hz, H-4b), 2.14 (m, H-2a), 1.98 (dd, $J = 4.3, 12.37$ Hz, H-12), 1.95 (ddd, $J = 16.0, 2.5, 7.0$ Hz, H-7b), 1.85 (m, H-16b), 1.75 (m, 2b), 1.72 (m, H-1a), 1.68 (m, H-25), 1.60 (ddd, $J = 2.5, 7.0, 16.0$ Hz, H-7a), 1.57 (m, H-15b), 1.42 (2H, m, H-11), 1.40 (2H, m, H-20, H-22a), 1.36 (m, H-8), 1.30 (2H, m, H-28), 1.25 (3H, m, H-16a, H-23), 1.10 (3H, m, H-12b, H-17, H-22b), 1.05 (m, H-15a), 1.00 (m, H-24), 0.98 (m, H-1b), 0.98 (d, $J = 6.5$ Hz, H-21), 0.95 (m, H-14), 0.94 (s, H-19), 0.88 (d, $J = 7.5$ Hz, H-29), 0.86 (d, $J = 7.0$ Hz, H-27), 0.85 (m, H-9), 0.84 (d, $J = 7.0$ Hz, H-26), 0.66 (s, H-18)

RMN ^{13}C ($\text{Py-}d_5$, 75 MHz); \perp asignación: \perp 140.95 (C-5), 121.90 (C-6), 102.57 (C-1'), 36.36 (C-20), 12.13 (C-29), 78.54 (C-3'), 78.13 (C-5'), 78.38 (C-3), 75.27 (C-2'), 71.67 (C-4'), 62.82 (C-6'), 50.34 (C-9), 56.25 (C-17), 56.83 (C-14), 46.04 (C-24), 32.04 (C-8), 34.20 (C-22), 39.31 (C-4), 37.46 (C-1), 42.47 (C-13), 36.08 (C-10), 28.50 (C-16), 32.15 (C-7), 18.99 (C-21), 30.21 (C-2), 26.40 (C-23), 24.48 (C-15), 39.95 (C-12), 21.26 (C-11), 19.29 (C-30), 23.28 (C-28), 29.47 (C-25), 11.95 (C-18), 19.39 (C-19), 19.20 (C-26), 19.94 (C-27)



125

6.2.16 Sacarosa (126) [40]

Sólido (400 mg)

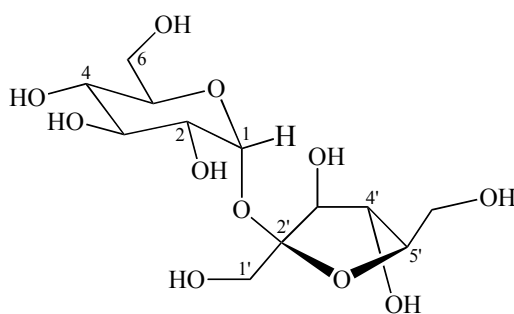
Pf 179-182 °C

IR (KBr), ν_{\max} : 3382, 2921, 1647, 1417, 1145, 1049, 925 cm^{-1}

RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD), δ : 5.38 (d, $J = 3.84$ Hz, H-1), 4.07 (d, $J = 8.3$ Hz, H-3'), 4.01 (t, $J = 8.3$ Hz, H-4'), 3.82 (m, H-5), 3.80 (2H, m, H-6), 3.75 (3H, m, H-1', H-5'), 3.70 (m, H-3), 3.60 (2H, m, H-6), 3.42 (dd, $J = 3.5, 9.5$ Hz, H-2), 3.34 (m, H-4)

RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD), δ : 105.32 (C-2'), 93.65 (C-1), 83.75 (C-5'), 79.36 (C-3'), 75.71 (C-4'), 74.61 (C-3), 74.38 (C-5), 73.19 (C-2), 71.34 (C-4), 64.03 (C-6'), 63.39 (C-1'), 62.219 (C-6)

EM-FAB $^+$ m/z (int. rel.): 365 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (6), 329 (30), 307 (34), 289 (13), 176 (42), 154 (100), 136 (61), 107 (12), 89 (11), 77 (10), 65 (4), 23 (4)



126

6.3 Determinación estructural de los compuestos de *C. glabellus*

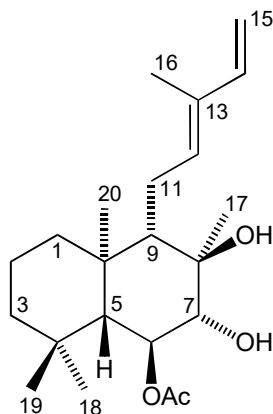
6.3.1 6-*O*-Acetilaustroinulina (118) [34, 35]

El compuesto **118** presentó un punto de fusión de 162-165 °C. Del espectro de masas se dedujo la fórmula molecular $C_{22}H_{34}O_4$ ($M^+ = 364$ (1%), 347.2586 [$M - H_2O + H$] $^+$), la cual integra para 5 insaturaciones (espectro **1**). En el espectro de infrarrojo (espectro **2**) se observan bandas de absorción en 3581 (hidroxilo), 1726 (carbonilo) y 1641, 975, 909 cm^{-1} (ligaduras dobles). Dichos grupos funcionales pueden ser corroborados en el espectro de RMN 1H (espectro **3**). Por un lado, las señales en δ 6.86 (ddd, $J = 0.9, 10.8, 17.1$ Hz, H-14), 5.19 (d, $J = 17.4$ Hz, H-15a) y 5.11 (dd, $J = 1.2, 10.8$ Hz, H-15b) pueden asignarse a un metino y a un metileno de una olefina terminal conjugada a una ligadura doble trisustituida; esta última, caracterizada por las señales en δ 5.44 (t, $J = 7.2$ Hz, H-12) y 1.79 (d, $J = 1.2$ Hz, H-16) correspondientes a un metino (δ 133.60) y a un metilo (δ 19.84), respectivamente. El dieno plano *trans*-conjugado fue confirmado por las correlaciones $^1H-^{13}C$ 3J (espectro **4**) de las señales correspondientes a H₂-15 (δ 5.19 y 5.11) con la señal del carbono cuaternario que aparece en δ 130.9 (C-13), y de la señal asignada a H-14 (δ 6.86) con el carbono metínico que resuena en δ 133.7 (C-12). Por otro lado, la señal de H-12 resonante en δ 5.44 presenta correlaciones $^1H-^1H$ con las señales que aparecen en δ 2.49 (ddd, $J = 1.2, 4.5, 15.9$ Hz, H-11a) y 2.22 (m, H-11b) correspondientes a un metileno alílico, mismas que correlacionan con una señal que resuena entre δ 1.36-1.42 (m) y que puede atribuirse a H-9.

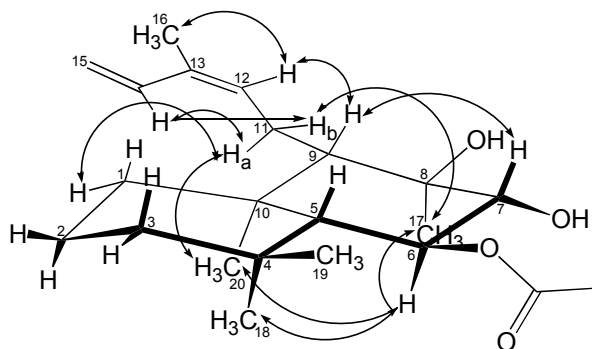
Por otra parte, en el espectro de RMN 1H puede observarse la presencia de una señal doble ($J = 10.2$ Hz) en δ 3.46 la cual correlaciona $^1H-^1H$ (espectro **5**) con la señal doble de dobles en δ 5.09 ($J = 10.0, 10.0$ Hz) que por su desplazamiento químico permite suponer su posición geminal a un éster, el cual fue caracterizado como un acetoxilo debido a la presencia de las señales en δ_H 2.12 y δ_C 21.79 para metilo y en δ_C 171.81 para carbonilo. Además, en el espectro de RMN 1H se observan cuatro singuletes en δ 1.23, 1.01, 0.96 y 0.87, las cuales integran para 3 hidrógenos y pueden ser atribuidas a metilos, uno de ellos (δ 1.23, H₃-17) desplazado a campo bajo por estar unido a un carbinol (δ 76.89, C-8).

Considerando que el fragmento olefinico justifica dos insaturaciones y que en el espectro de IR se observa una banda de absorción característica de carbonilo, se puede deducir que las dos insaturaciones restantes corresponden a una decalina, también deducida con base en las 22 señales observadas en el espectro de RMN ^{13}C . El análisis de los experimentos HECTOR y COSY

permitieron asignar las señales de los hidrógenos restantes y de sus correspondientes carbonos; así, el análisis del experimento FLOCK permitió establecer sus conectividades y la posición de cada grupo funcional, confirmando la presencia de un diterpeno de tipo labdano (**118**). La comparación de las propiedades físicas descritas resultaron idénticas a las informadas para el producto natural denominado 6-*O*-acetilaustronulina [34, 35], por lo cual puede establecerse la identidad de **118**.

**118**

La configuración relativa de **118** fue deducida del espectro NOESY (espectro **6**), en el cual se observan interacciones relevantes entre H-14 y H₂-11; entre H-12 y H-9_⊥ y H₃-16; entre H-11_a y H₃-20 y H-1_⊥; entre H11_b y H₃-17, entre H-6_⊥ y H₃-20, H₃-17 y H₃-18; y entre H-7_⊥ y H-9_⊥ o H-5_⊥, principalmente (figura **21**).

Figura **21**. Interacciones NOESY relevantes en **118**.

La configuración relativa de **118** quedó confirmada mediante el análisis por difracción de rayos X de un cristal de la misma (figura **22**, anexo **1**).

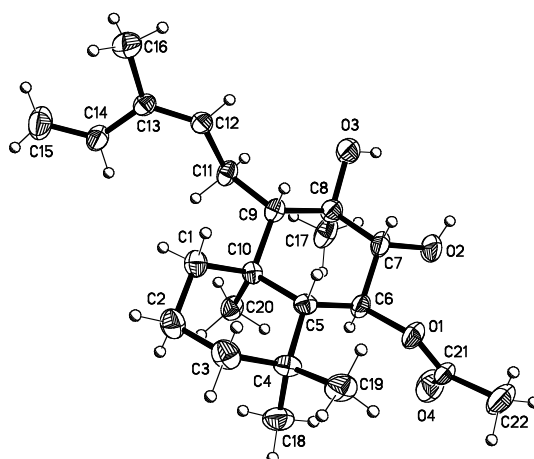


Figura 22. Estereovista ORTEP de **118**.

Las observaciones espectroscópicas descritas confirman la identidad de **118** con la de su homólogo informado en la literatura [34, 35], cuya configuración absoluta permanece indeterminada por las inconsistencias en las conclusiones publicadas en dos informes:

En 1987, Bohlmann y colaboradores determinaron la configuración absoluta de **118** mediante el análisis de su homólogo estructural 7-*O*-acetilaustroulinina (**146**) y mediante el método de dicroísmo circular y la aplicación de la *regla de los octantes* [35c] para su derivado oxidado **146a** (figura 23), el cual exhibió un efecto Cotton negativo en su espectro de dicroísmo circular ($\perp\lambda_{295} = -1.5$, dato tomado de la ref. 35c).

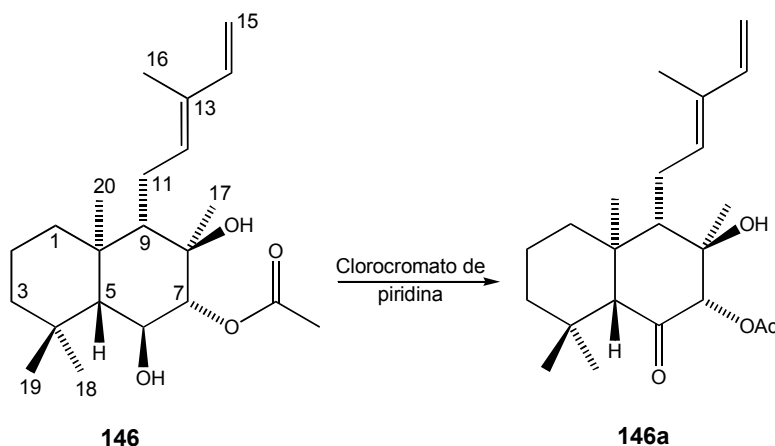


Figura 23. Derivatización química de **146**.

Los autores concluyeron que el efecto Cotton observado se debía principalmente a la contribución de uno de los metilos del fragmento *gem*-dimetilo y concluyeron que **146** pertenece a los diterpenos de la serie *ent*-labdánica, pero no discutieron acerca de la posible contribución positiva o negativa del fragmento *trans*-olefínico o de alguna otra parte de la molécula. Por otro

lado, se informó recientemente sobre la determinación de la configuración absoluta de **117** mediante la aplicación del método modificado de Mosher [35d], donde los autores concluyeron que **117** pertenece a los diterpenos de la serie labdánica normal y sugirieron la revisión de la configuración absoluta asignada a **146** [35c]. Para esclarecer estas inconsistencias, se realizaron dos experimentos tendientes a la aplicación del método de dicroísmo circular experimental y teórico [17, 25, 69, 70] y del método modificado de Mosher para determinar la configuración absoluta de **118** [41].

Primero, un estudio conformacional de **118** y sus análogos estructurales **117**, **118a**, **119**, **118b** y **118c**, condujeron al análisis de los datos de DC del derivado **146a** y permitieron confirmar la configuración absoluta previamente asignada (serie *ent*-) [35c]. Para este propósito, la comparación entre la conformación de **118** en el estado sólido y en disolución (figuras **21** y **22**) permitieron establecer que éstas son muy similares. Adicionalmente, se analizaron los espectros NOESY de **117**, **119** y de los derivados **118b** y **118c**, lo cual proporcionó evidencia de que la orientación del dieno plano *trans*-conjugado no es alterada por la presencia o ausencia de sustituyentes en C-6 y C-7. En este contexto, la mayor parte del volumen molecular (el fragmento olefínico, parte del esqueleto de la decalina, el metilo CH₃-20 y el grupo acetato) de la estructura de mínima energía de **146a** (modelada con el campo de fuerza MMX que está implementado en el programa PCmodel [42]) reside en octantes negativos (figura **24**).

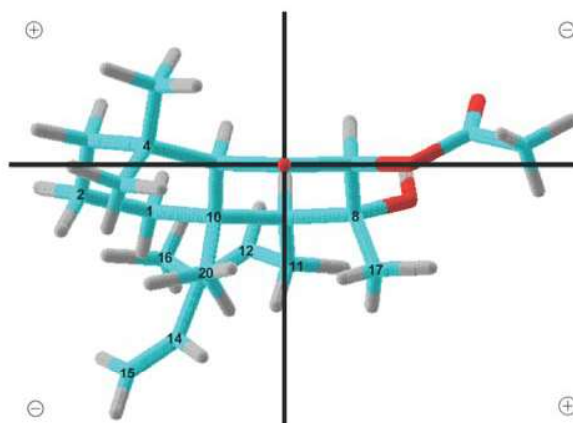


Figura **24**. Conformación de mínima energía **146a** y aplicación de la *regla de los octantes*.

Puede afirmarse que la configuración absoluta de **146a** mostrada en la figura **24** se deduce por el efecto Cotton negativo informado ($\perp\perp_{95} = -1.5$), el cual es debido a la banda de transición eléctrica $n \perp \perp^{\perp}$ del grupo carbonilo. Este análisis permite fundamentar y complementar la

configuración absoluta propuesta para **146** y sugiere que **117** y **118**, informados como constituyentes de la misma fuente que **146** [35c], poseen la misma configuración absoluta (serie *ent*). Para confirmar esto último y para establecer si la revisión de la configuración absoluta de **117** debería ser considerada [35d], **118** fue sometido a hidrólisis alcalina obteniéndose **117**, el cual fue sometido a reacción *in situ* con cloruro de ácido (*S*)- y (*R*)- \perp -metoxi- \perp -(trifluorometil)fenilacético en piridina- d_5 anhidra. Los correspondientes derivados esterificados de Mosher (**118d** y **118e**) fueron registrados en RMN de ^1H y los valores de los desplazamientos químicos de hidrógenos selectos observados para el éster (*S*)-MTPA (**118e**) fueron restados de sus homólogos observados para el éster (*R*)-MTPA (**118d**) (figura 25). Las diferencias obtenidas de los desplazamientos químicos entre los ésteres de Mosher permitieron establecer la configuración absoluta $7R$ para **118**. Este resultado indica que **118** pertenece a la serie de los diterpenos de tipo *ent*-labdano, como había sido propuesto por Bohlmann [35c], y contrapone la propuesta en la revisión de la configuración absoluta de **117** [35d].

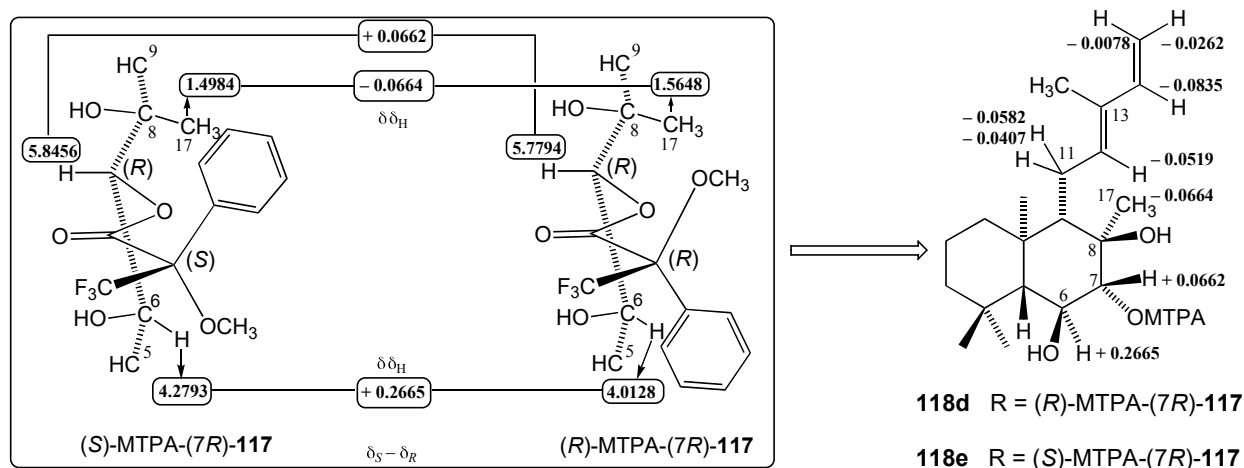


Figura 25. Valores de $\perp_{\text{S}} - \perp_{\text{R}}$ (en ppm) de hidrógenos selectos de los ésteres (*R*)-MTPA (**118d**) y (*S*)-MTPA (**118e**).

Para confirmar esta conclusión, **118** fue hidrolizado y esterificado para producir **118b**, el cual fue sometido a diversas técnicas de cristalización, pero no fue posible obtener cristales adecuados para su análisis por difracción de rayos X. No obstante, considerando que **118b** posee dos cromóforos en su estructura y de acuerdo al método de la quiralidad del excitón aplicado al sistema benzoato-dieno [17a, 18, 22, 25], se decidió analizar a **118b** mediante el método de dicroísmo circular. El espectro de DC de **118b** mostró un primer efecto Cotton positivo en 247 nm y un segundo efecto Cotton negativo en 231 nm, los cuales pueden ser atribuidos a las bandas de transferencia de carga intramolecular $\perp \perp \perp^{\perp}$ del grupo *p*-bromobenzoato y del dieno plano

conjugado *trans*, respectivamente. A pesar de la baja intensidad del efecto Cotton negativo en 231 nm, el espectro de DC de **118b** muestra el patrón característico de curvas de DC del excitón dividido presentando un primer efecto Cotton positivo (figura 27) [17a, 18, 22, 25], lo cual puede ser confirmado mediante el análisis de los datos de DC del derivado 7-(*E*)-cinamoilo **118c** donde se observan curvas efecto Cotton *bisignadas* de igual intensidad ($[\rho]_{276} + 6\,737$ y $[\rho]_{266} + 6\,961$, $[\rho]_{237} - 15\,667$). Así, y de acuerdo con el método de la quiralidad del excitón, la quiralidad positiva observada entre los momentos de transición eléctrica de los cromóforos *p*-bromobenzoato y el dieno plano *trans*-conjugado de **118b** (figura 26), permitieron asignar la configuración absoluta mostrada en la estructura **118**. De esta forma fue posible reafirmar que **118** pertenece a la serie de los diterpenos *ent*-labdánicos.

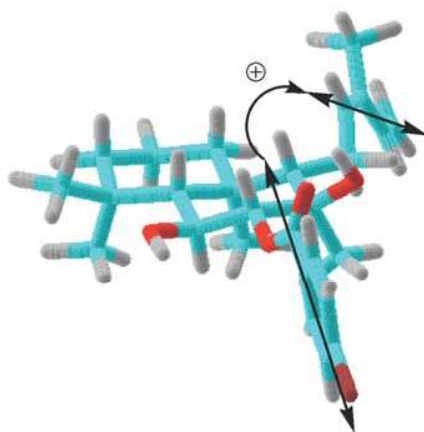


Figura 26. Quiralidad del excitón del sistema *benzoato-dieno* de **118b**.

La configuración absoluta deducida del modelo de la figura 26 fue corroborada en el presente trabajo mediante la simulación teórica del espectro de DC de **118b** [70], y mediante la aplicación del método modificado de Mosher [41]. Así, se generó la estructura de mínima energía de **118b** mediante el campo de fuerza MMX que está implementado en el programa PCmodel. Posteriormente, el conformero minimizado fue sometido a una optimización de geometría mediante la teoría del funcional de la densidad (DFT) empleando el híbrido funcional B3LYP, junto con los Potenciales Efectivos del Caroso (ECP) de Hay y Wadt, y sus grupos de bases doble- \perp asociadas [69b, 69c], como está implementado en el programa *Gaussian 03* [69a]. La geometría optimizada fue tomada para realizar los cálculos del espectro EDC mediante el nivel de teoría TD-DFT/B3LYP/H-W como está implementado en el programa *Gaussian 03*. El espectro de DC experimental y teórico de **118b** de la figura 27, muestra las curvas de DC características del excitón dividido debido a la interacción dipolo eléctrico-dipolo eléctrico de los cromóforos *p*-

bromobenzoato y dieno *trans*-conjugado de **118b**. Las energías de excitación calculadas mostraron un desplazamiento batocrómico de *ca.* 0.4 eV relativo a las transiciones experimentales; mientras que, los efectos Cotton calculados exhibieron intensidades muy similares a las experimentales (figura 27). El espectro de DC experimental fue reproducido adecuadamente por los cálculos, ya que el espectro de DC teórico mostró un primer efecto Cotton positivo en *ca.* 274 nm y un segundo efecto Cotton negativo en *ca.* 256 nm confirmando la quiralidad positiva entre los momentos de transición eléctrica $\perp \perp \perp^{\perp}$ de los cromóforos *p*-bromobenzoato y dieno *trans*-conjugado de **118**.

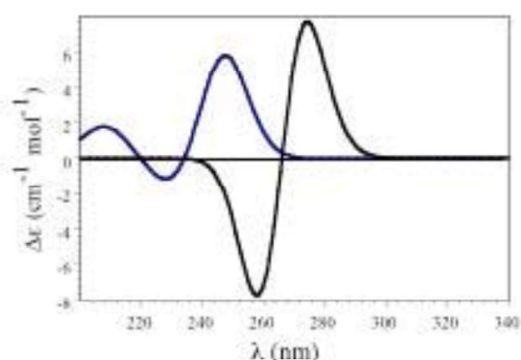
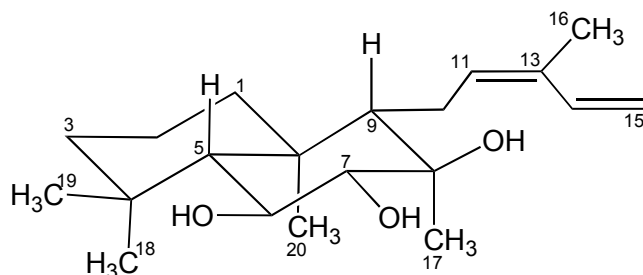


Figura 27. Comparación entre el espectro electrónico de DC experimental (línea azul) y teórico (línea negra) de **118a**.

6.3.2 Austroinulina (117)

El compuesto **117** fue aislado como un sólido blanco amorfo que funde a 76-78 °C. Del espectro de masas (espectro 7), en la modalidad de impacto electrónico, se dedujo la fórmula molecular $C_{19}H_{22}O_4$, la cual integra para cuatro insaturaciones. En el espectro de RMN 1H (espectro 8) se observa un patrón de señales muy similar al mostrado por el compuesto **118**; es decir, se observan las señales características del fragmento *trans*-dieno conjugado en \perp 6.86 (dd, $J = 10.8, 17.2$ Hz, H-14), 5.44 (t, $J = 7.0$ Hz, H-12), 5.20 (d, $J = 17.3$ Hz, H-15) y 5.11 (d, $J = 10.8$ Hz, H-15); señales de dos protones geminales a hidroxilos en \perp 3.79 (d, $J = 9.3$ Hz, H-7 \perp) y 3.63 (dd, $J = 9.6, 10.8$ Hz, H-6 \perp); señales de dos protones alílicos en \perp 2.45 (dt, $J = 15.8, 5.5$ Hz, H-11a) y 2.24 (dt, $J = 15.8, 5.8$ Hz, H-11b); y señales para cinco metilos en \perp 1.79 (d, $J = 0.8$ Hz, H-16), 1.18 (s, H-17), 1.16 (s, H-18), 1.01 (s, H-20) y 0.90 (s, H-19), principalmente. En el espectro de IR se observan las bandas de absorción para hidroxilo (3415 cm^{-1}) y para olefina ($1641, 1008$ y 900 cm^{-1}). Por otro lado, en el espectro de RMN ^{13}C se observan 20 señales, lo cual, en complemento con lo

observado en el espectro de RMN ^1H , permiten establecer la presencia de un diterpeno de tipo labdano (**117**). Los valores de las constantes de acoplamiento observados para H-7 \perp y H-6 \perp indican la misma configuración mostrada en el compuesto **118**. La comparación de las propiedades físicas exhibidas por **117** con las informadas en la literatura para estructuras relacionadas permiten establecer la identidad de **117** como el producto natural denominado austroinulina [34].



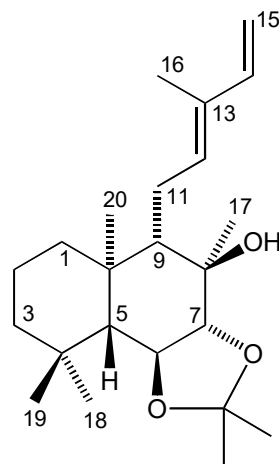
117

Por otra parte, la obtención del derivado acetilado a partir de **117** permitió comparar los datos espectroscópicos experimentales con los informados para el 6,7-diacetilaustroinulina (**118a**) confirmando así su identidad [35b]. La configuración absoluta de **117** se establece como 7*R*, ya que el derivado obtenido de la hidrólisis alcalina de **118** exhibió las mismas propiedades físicas de **117**.

6.3.4 6,7-Isopropilidendioxiaustroinulina (**119**)

Durante el proceso de aislamiento y purificación se aisló un sólido blanco que funde a 106-108 °C. A partir del espectro de masas de alta resolución, en la modalidad FAB, se dedujo la fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{O}_3$ ($[M + \text{H}]^+$: 363.2889, $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{O}_3$), la cual integra para cinco insaturaciones. En el espectro de IR se observan bandas de absorción para hidroxilo (3460 cm^{-1}) y para olefina ($1642, 1091, 896\text{ cm}^{-1}$). En el espectro de RMN ^1H (espectro **9**) se observan las señales características de un diterpeno de tipo labdano, es decir, las señales de un fragmento olefínico [\perp 6.95 (ddd, $J = 1.0, 11.0, 17.5\text{ Hz}$, H-14), 5.48 (t, $J = 7.0\text{ Hz}$, H-12), 5.13 (dd, $J = 1.0, 17.0\text{ Hz}$, H-15), 5.03 (dt, $J = 10.8, 1.5\text{ Hz}$, H-15)], dos protones geminales a función oxigenada [\perp 3.61 (dd, $J = 9.0, 11.0\text{ Hz}$, H-6 \perp); 3.49 (OH), 3.42 (d, $J = 9.5\text{ Hz}$, H-7 \perp)], y siete metilos, principalmente [\perp 1.74 (d, $J = 0.5\text{ Hz}$, H₃-16), 1.35 (d, $J = 0.5\text{ Hz}$, H₃-2'), 1.33 (d, $J = 0.5\text{ Hz}$, H₃-3'), 1.18 (s, H₃-17); 1.04 (s, H₃-18), 0.97 (s, H₃-20), 0.96 (s, H₃-19)]. La presencia de dos metilos adicionales (\perp 1.35 y 1.33) y su desplazamiento químico a campo bajo permiten suponer que estos son parte de un fragmento cetálico. La observación anterior se confirmó en el espectro de RMN ^{13}C (espectro **10**) por la presencia de una señal en \perp 108.89 (C-1'), la cual puede ser atribuida a un carbono cetálico en base

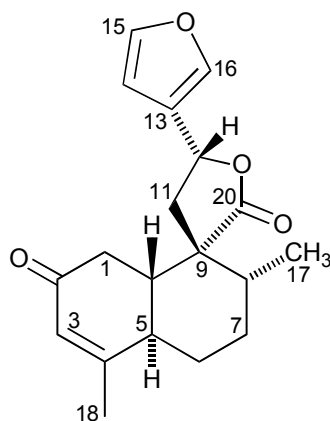
a su desplazamiento químico a campo bajo. La evidencia del fragmento cetálico puede ser atribuida a la reacción de condensación de la acetona, usada como parte del sistema de elución en el proceso de fraccionamiento, con el diol vecinal del compuesto **117** hasta formación del artefacto **119**.

**119**

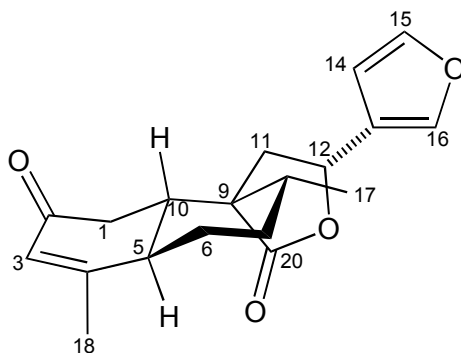
6.3.5 *trans*-Deshidrocrotónina (**116**) [10a, 10b]

A partir de la fracción E se purificó un sólido blanco amorfo (32 mg) con punto de fusión 135 °C. En su espectro de masas, en la modalidad de impacto electrónico (espectro **11**), presenta un ion molecular en m/e 314 consistente con la fórmula molecular $C_{19}H_{22}O_4$ que integra para ocho insaturaciones. En el espectro de IR se observan bandas de absorción en 1753 para carbonilo de una \pm -lactona cíclica, en 1664 para carbonilo \pm, \pm -insaturado, en 1504 y 873 para anillo de furano, y en 1154 cm^{-1} para carbinol. Los datos experimentales observables en los espectros de RMN resultaron casi idénticos con los informados para el diterpeno de tipo clerodano denominado como *trans*-deshidrocrotónina (**116**). Así, en el espectro de RMN ^1H (espectro **12**) se observa una señal múltiple en ± 7.45 (2H, $J = 1.0, 2.0$ Hz, H-15 y H-16) y una señal doble de doble ($J = 1.0, 1.7$ Hz, H-14) en ± 6.41 atribuidas a un anillo de furano cuyos carbonos pueden ser confirmados en el espectro de RMN ^{13}C (espectro **13**) por las señales resonantes en ± 144.3 (C-15), 139.3 (C-16), 125.0 (C-13) y 107.9 (C-14). Además, en el espectro de RMN ^1H se observa una señal triple ancha ($J = 8.6$ Hz, H-12) en ± 5.43 cuyo desplazamiento químico indica que se encuentra geminal a oxígeno de una \pm -espirolactona. Por otra parte, se observa una señal quintuple ancha ($J = 1.0$ Hz) en ± 5.89 y una señal doble ancha ($J = 1.0$ Hz) en 1.97 atribuidas a un metino vinílico (H-3) y a un metilo vinílico (H₃-18), respectivamente. Además, un hidrógeno alílico resonante en ± 3.18 (t, $J = 11.5$ Hz) y atribuido a H-5 mostró correlaciones $^1\text{H}-^1\text{H}$ con las señales que resuenan en ± 2.26 (dq, $J = 3.0, 12.9$ Hz, H-

6a), 1.17 (m, H-6b) y 1.80 (ddd, $J = 3.0, 10.6, 13.7$ Hz, H-10). Adicionalmente, en el espectro de RMN ^1H se observa una señal en δ 2.54 (dd, $J = 3.0, 15.6$ Hz, H-1_{ec}), la cual correlacionó ^1H - ^1H con la señal que resuena en δ 2.19 (dd, $J = 14.1, 15.6$ Hz, H-1_{ax}). Las propiedades físicas descritas previamente para el compuesto **116** permiten confirmar su identidad con la del producto natural denominado *trans*-deshidrocrotónina [10a, 10b].

**116**

Los valores de las constantes de acoplamiento exhibidas por H-1_{ec}, H-1_{ax} y H-5_{ax} permiten confirmar el arreglo conformacional mostrado en la figura 28, el cual puede apoyarse por el desplazamiento químico a campo bajo que presenta el hidrógeno alílico (H-5) ya que se encuentra en el vértice de desprotección del oxígeno del carbonilo de la posición 20, lo que sugiere que este último se encuentra orientado hacia la cara \perp del biciclo. La configuración absoluta de **116** fue establecida mediante el método de DC y aplicación de la *regla de helicidad del benzoato alílico* [26, 10a, 10b].

Figura 28. Proyección conformacional de **116**.

6.3.6 Mezcla de cajucarínólida (122) [10c] y 15-*epi*-cajucarínólida (123)

De las fracciones H-I se aisló y purificó un sólido color beige que funde a 238-240 °C. Del espectro de masas se dedujo la fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6$, la cual integra para nueve

insaturaciones (espectro **14**). En el espectro de IR (espectro **15**) se observan bandas de absorción para hidroxilo (3273 cm^{-1}), para carbonilo de un anillo Δ -lactona (1753 cm^{-1}), para carbonilo Δ,Δ -insaturado (1661 cm^{-1}) y para ligaduras dobles ($1620, 755\text{ cm}^{-1}$), principalmente. En el espectro de RMN ^1H (espectro **16**) se observa el siguiente patrón de señales: dos señales de protones vinílicos que se encuentran Δ a grupo carbonilo, los cuales resuenan en Δ 7.09 (t, $J = 1.0\text{ Hz}$, H-14') y 7.08 (t, $J = 1.2\text{ Hz}$, H-14); y dos protones hemiacetálicos en Δ 6.24 (t, $J = 1.2\text{ Hz}$, H-15') y 6.14 (dd, $J = 2.0, 1.5\text{ Hz}$, H-15), los cuales pueden ser corroborados, mediante correlaciones HETCOR, con sus correspondientes carbonos resonantes en Δ 97.95 (C-15') y 97.76 (C-15). Adicionalmente, puede observarse una señal en Δ 5.87 (2H, dsept, $J = 6.0, 1.5\text{ Hz}$, H-3', H-3) atribuida a dos protones vinílicos; dos protones geminales a función oxigenada de una Δ -espiro-lactona conjugada en Δ 5.18 (2H, ddd, $J = 10.5, 9.0, 2.0\text{ Hz}$, H-12', H-12); y cuatro metilos resonantes en Δ 1.97 (6H, d, $J = 1.5\text{ Hz}$, H3-18', H3-18), 1.13 (3H, d, $J = 6.0\text{ Hz}$, H3-17') y 1.12 (3H, d, $J = 6.5\text{ Hz}$, H3-17). Tanto el espectro de RMN ^1H como el de ^{13}C (espectro **17**) presentaron patrones duplicados de señales, de las cuales un patrón resultó idéntico a lo informado para el producto natural denominado cajucarínólida (figura **29**) [10c].

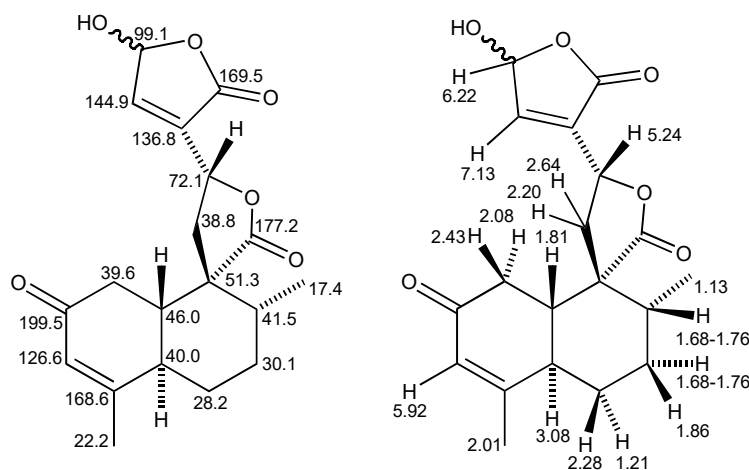


Figura **29**. Desplazamientos de RMN ^{13}C e ^1H de la cajucarínólida (**122**) [10c].

Cabe destacar que la presencia de señales adicionales para otro grupo hemiacetal en Δ 6.14 (H-15) y en Δ 97.76 (C-15) indicaron la presencia del epímero en C-15 de la cajucarínólida y la ausencia de su isómero denominado isocajucarínólida (figura **30**) [10c], el cual exhibe un protón

vinílico \perp a grupo carbonilo en \perp 6.12 (H-14) y un protón hemiacetálico en \perp 6.19 (H-16) [datos tomados de la ref. 10c].

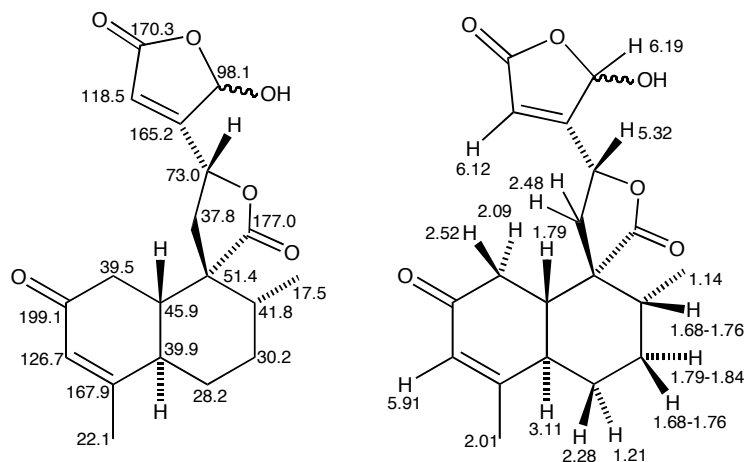
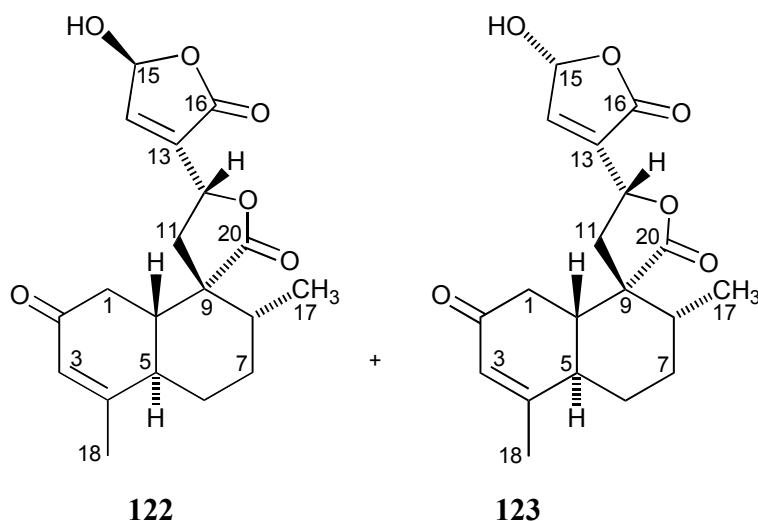


Figura 30. Desplazamientos de RMN ^{13}C e ^1H de la isocajucarinólida [10c].

Así, el protón vinílico H-14 no fue observado en el espectro de RMN ^1H de la mezcla de **122** y **123**, sino más bien, fueron encontrados dos protones vinílicos \perp a grupo carbonilo (\perp 7.09 y 7.08) y dos protones hemiacetálicos (\perp 6.24 y 6.14). Los datos espectroscópicos descritos proporcionan suficiente evidencia de la presencia de la mezcla epimérica (**122** y **123**) en C-15 del compuesto denominado cajucarinólida (figura 29).



El espectro de DC de **122** y **123** exhibió dos efectos Cotton negativos en 324 and 243 nm (figura **31**), los cuales pueden ser atribuidos a las bandas de transición electrónica $n \perp \perp\perp$ y $\perp \perp \perp$, respectivamente.

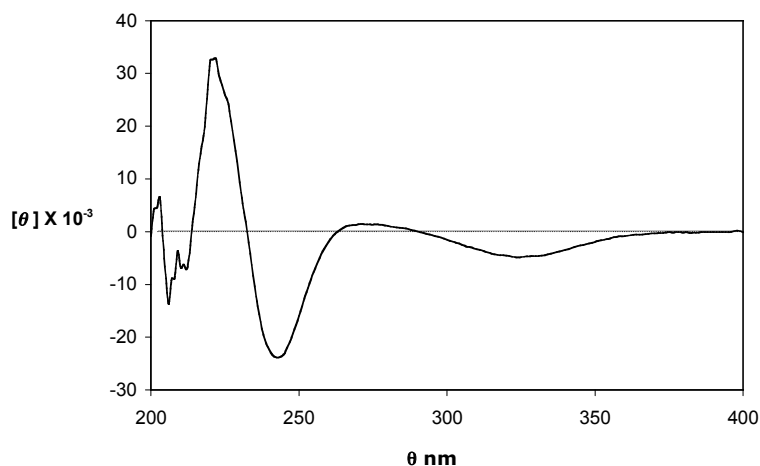


Figura **31**. Espectro de DC de la mezcla epimérica **122** y **123**.

Con base en la *regla de helicidad de enonas* [17, 19], el efecto Cotton negativo observado para la banda de transición $\perp \perp \perp$ en 243 nm está relacionado a la helicidad negativa del sistema enona ($C(4)=C(3)-C(2)=O$), la cual confirma la elipticidad molecular observada en el espectro de DC ($[\rho]_{243} = -41\,300$) estableciendo la configuración absoluta mostrada en las estructuras **122** y **123**.

6.3.7 Marrubiagenina (**121**) [36a]

El compuesto **121** fue aislado como un sólido blanco ópticamente activo ($[\alpha]_D^{25} + 54.4$) con la fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_4$ establecida mediante el análisis de su espectro de masas en la modalidad FAB (espectro **18**) y confirmada por 20 señales observadas en el espectro de RMN ^{13}C (espectro **19**). El espectro de IR (espectro **20**) exhibió bandas de absorción para ácido carboxílico (HO , $3500-2636$ y 1779 cm^{-1} ; $C=O$, 1679 cm^{-1}) y para carbonilo de lactona ($C=O$, 1746 cm^{-1}). En el espectro de RMN 1H (espectro **21**) se observan patrones de espín similares a los descritos para la mezcla epimérica de **122** y **123**; es decir, mostró dos protones vinílicos posicionados \perp y \perp a grupo carbonilo en $\perp 6.82$ (t, $J = 4.0$ Hz, H-3) y $\perp 5.86$ (quint, $J = 1.5$ Hz, H-14), respectivamente; una señal simple con una integral para dos hidrógenos resonante en $\perp 4.76$ (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-16) y se atribuye a dos hidrógenos magnéticamente equivalentes y geminales a una función oxigenada.

Además, el espectro de RMN ^1H exhibió tres señales simples en δ 1.25 (3H, s, H3-19), 0.83 (3H, s, H3-20) y 0.78 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H3-17), las cuales integran para tres hidrógenos y pueden ser atribuidas a metilos. Las propiedades físicas descritas para **121** fueron casi idénticas a las informadas para los diterpenos de tipo *cis*-clerodano denominados marrubiagenina (figura **32**) [43] y ácido anfiácrico (figura **33**) [44].

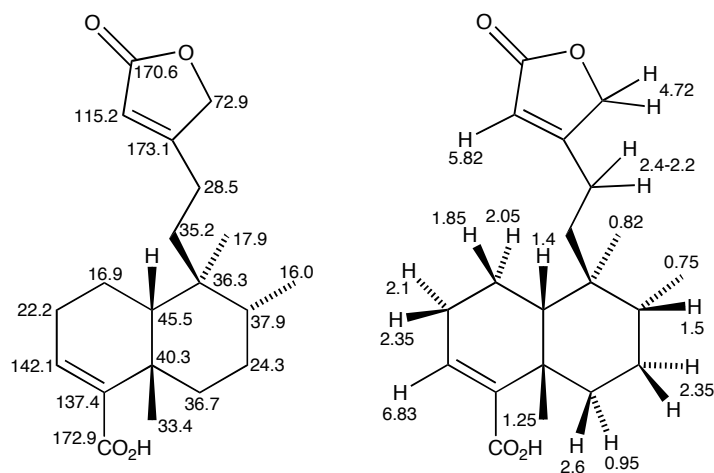


Figura **32**. Desplazamientos de RMN ^{13}C e ^1H de la marrubiagenina [43].

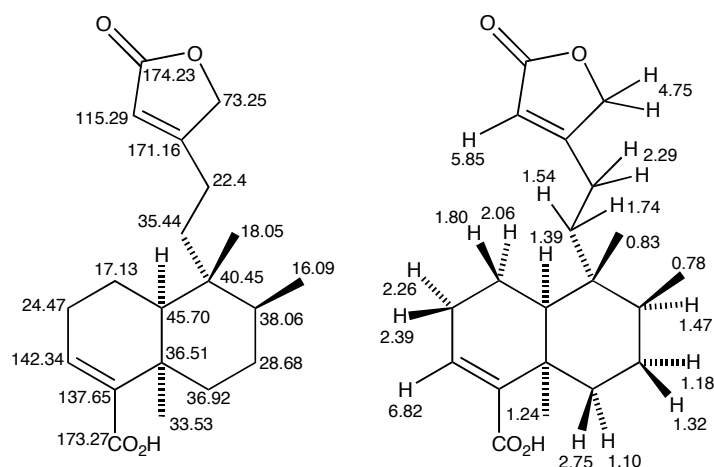
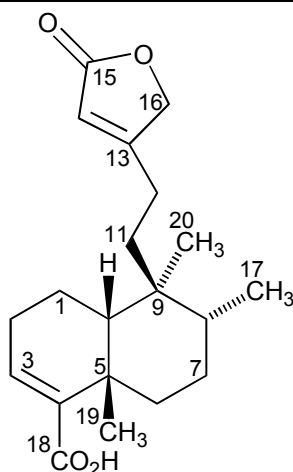


Figura **33**. Desplazamientos de RMN ^{13}C e ^1H del ácido anfiácrico [44].

Así, los valores de los desplazamientos químicos de RMN ^1H y de ^{13}C de las figuras **32** y **33** permitieron confirmar la estructura del compuesto **121** cuya configuración relativa fue confirmada de acuerdo a lo observado en el experimento NOESY (espectro **22**), en el cual H-10 \perp (δ 1.40) interaccionó con H₃C-C5 (δ 1.25), que posee orientación \perp .

**121**

Los informes en la literatura sugieren que las configuraciones absolutas de los diterpenos de tipo *cis*-clerodano se pueden establecer mediante RMN ^1H [36b]; es decir, el desplazamiento químico de H₃-20 a campo alto (± 0.84) define la fusión de un 5 \perp 10 \perp -*cis*-clerodano. El metilo H₃-20 de **121** mostró un desplazamiento químico de ± 0.83 , lo que confirma su configuración absoluta 5 \perp 10 \perp -*cis-ent*-clerodano. La configuración absoluta de **121** se puede confirmar mediante la comparación de sus propiedades de rotación óptica y DC con las informadas para la marrubiagenina y el ácido anfiácrico. Cabe mencionar que la marrubiagenina fue reportada por primera vez como el producto de la hidrólisis ácida del glucósido denominado marrubiásido (véase abajo, **147**) [36a] y posteriormente como un constituyente natural aislado a partir de *Baccaris sagittalis* (figura **33**) [43]. El ácido anfiácrico ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 60.5^\circ$) y el producto natural denominado marrubiagenina ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 58^\circ$) exhibieron signos negativos de rotación óptica, mientras que el compuesto **121** ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 54.4^\circ$) mostró rotación positiva. Los signos negativos de rotación óptica informados para el ácido anfiácrico y para el producto natural denominado marrubiagenina, no son congruentes con sus estereoquímicas relativas informadas; por lo que estas moléculas deben ser referidas como la misma si consideramos el signo observado para **121**. Por otra parte, aun cuando la rotación óptica de la aglicona derivada del marrubiásido no fue informada, sí fueron reportados los datos de su espectro de DC, por lo que la elipticidad molecular observada para dicha molécula puede ser comparada con la informada para el ácido anfiácrico y la encontrada para **121**. Así, la aglicona derivada del marrubiásido ($[\rho]_{243} + 21\ 054$) [36a] y el compuesto **121** ($[\rho]_{242} + 18886$) (figura **34**) exhibieron efectos Cotton positivos, mientras que el ácido anfiácrico mostró un efecto Cotton negativo ($[\rho]_{235} - 14\ 900$) [44], lo cual indica que son enantiómeros.

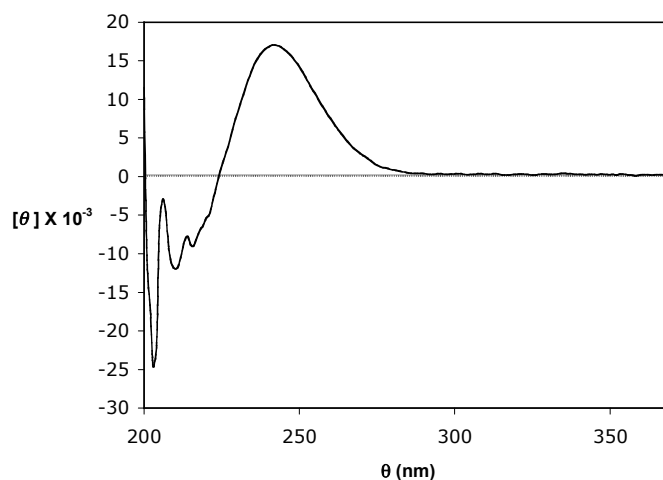


Figura 34. Espectro de dicroísmo circular del compuesto **121**.

Para establecer las correspondientes configuraciones absolutas, se consideraron los datos de DC informados para el dieno derivado **121b** (figura 35), el cual mostró elipticidades positivas en 293 ($\perp\perp + 14.8$) y en 219 nm ($\perp\perp + 2.5$) [datos tomados de la referencia 36a][‡].

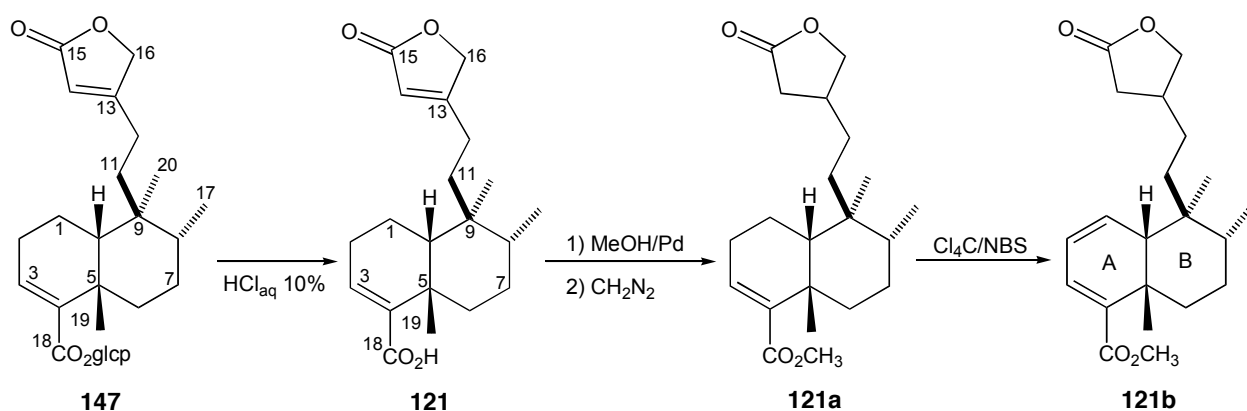


Figura 35. Derivatización química del producto natural marrubiásido (**147**) [36a].

Aplicando la *regla de helicidad del dieno* [20], puede deducirse que el enantiómero del dieno derivado que contribuye al efecto Cotton positivo tiene la configuración absoluta mostrada en la estructura **121**. El cambio conformacional del anillo B (de *silla* a *bote*) o la influencia de la alquil-lactona unida a C-9 no afectan en la aplicación de la *regla de helicidad del dieno*. Así, la aplicación

[‡] Los autores tomaron los datos de DC del derivado **121b** con la finalidad de establecer la fusión *cis* de la decalina del producto natural denominado marrubiásido [36a].

de la *regla del cuadrante-dieno* (figura 36) muestra que el hidrógeno alílico unido a C-10 y la helicidad del sistema dieno constituyen las principales contribuciones positivas al efecto Cotton observado.

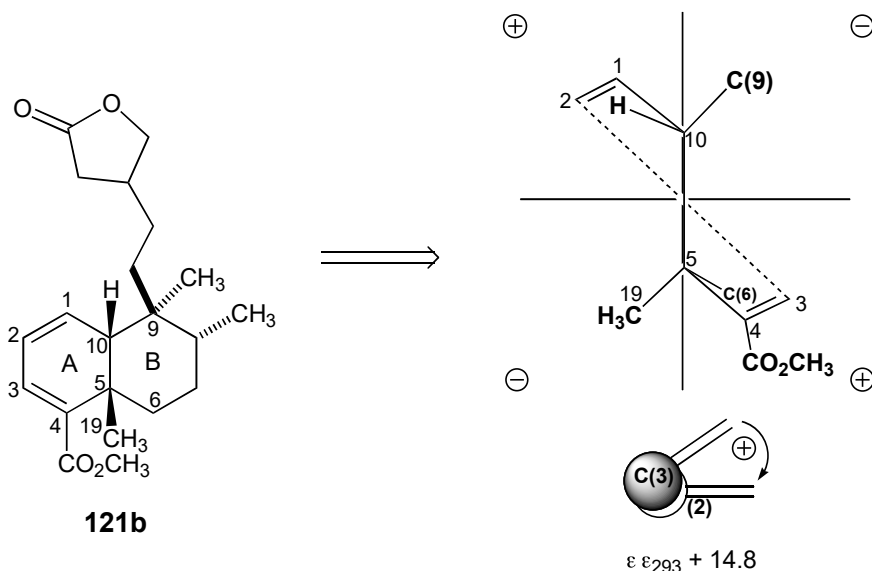


Figura 36. Aplicación de la *regla de helicidad del dieno* para **121b**.

Considerando lo anterior, puede establecerse que **121** y la aglicona derivada de **147** poseen la misma configuración absoluta, mientras que la correspondiente al ácido anfiácrico y al producto natural denominado marrubiagenina deben ser referidas como se muestra en la estructura del ácido anfiácrico (figura 33) [44]. Así, **121** representa un nuevo producto natural cuya configuración absoluta queda determinada como 5*S*,10*R* mediante la aplicación del método de DC retomando e interpretando los datos informados por Tschesche *et al.* [36a]; es decir, se estableció que **121** pertenece a los diterpenos de la serie *cis-ent*-clerodanos.

Por otra parte, los compuestos **115** [33], **120** [37], **124** [38], **125** [39] y **126** [40] fueron identificados mediante la comparación de sus propiedades físicas con las informadas en la literatura para sus homólogos estructurales.

Capítulo 7

7.1 Química y evaluación citotóxica de *Jatropha neopauciflora*



Fotografía 2. *Jatropha neopauciflora*.

7.1.1 Material vegetal

Jatropha neopauciflora fue colectada en Totomúchil, Estado de México, a 13 Km de Coyotepec con dirección a Acatlán, en Abril de 2003. Fue identificada y verificada por el Dr. Jaime Jiménez Ramírez de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Un espécimen de la misma se encuentra depositado en el Herbario Facultad de Ciencias de la UNAM, con el número de registro 089165.

7.1.2 Antecedentes generales de *J. neopauciflora*

J. neopauciflora es un arbusto perenne endémico de México de 2 m de altura. Se le encuentra en ciertas zonas arenosas y en vegetación que va desde matorrales xerófitos hasta selva baja. Presenta flores rosadas.

Los antecedentes etnomédicos informan que el látex de la planta es usado para tratar infecciones cutáneas y bucales. Las propiedades antibacterianas del látex han sido informadas recientemente [45]. En el presente proyecto se consideró el estudio químico de *J. neopauciflora* con el fin de proporcionar evidencia sobre el tipo de compuestos responsables de la actividad citotóxica (determinada en este trabajo) que exhibió el extracto orgánico de la corteza del árbol y presuponer sobre los compuestos responsables de la actividad antibacteriana que mostró el látex extraído de la corteza de la misma planta [45].

7.1.3 Extracción y aislamiento de los compuestos de *J. neopauciflora*

Los tallos de *Jatropha neopauciflora* fueron descortezados y deshidratados a temperatura ambiente. La corteza seca (500.6 g) fue pulverizada y macerada en una mezcla de CH₂Cl₂:CH₃OH (1:1) en tres ocasiones sucesivas. El residuo obtenido de las maceraciones (17.04 g) fue disuelto en metanol caliente. El filtrado metanólico fue concentrado y despigmentado con carbón activado/etanol hasta la obtención de un residuo amarillo (10.19 g). El residuo despigmentado fue evaluado frente cinco líneas celulares de tumor humano (tabla 2 y 3), lo que permitió elegir a las líneas U251 (glías) y K562 (leucemia) para el rastreo de la actividad citotóxica durante el fraccionamiento del residuo despigmentado. Dicho residuo fue adsorbido en 18 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) y fraccionado por cromatografía en columna a presión reducida sobre gel de sílice 60 (70-230 mesh, 200 g) usando como eluyente Hex, mezclas de Hex:AcOEt, AcOEt, (CH₃)₂CO y mezclas de (CH₃)₂CO:CH₃OH en orden creciente de polaridad. Se colectaron eluatos de 200 mL y se monitorearon mediante cromatografía analítica para reunir las de acuerdo a su similitud cromatográfica en 13 fracciones principales. Las fracciones fueron evaluadas en el ensayo de citotoxicidad mediante el método colorimétrico de la sulforrodamina B a 50 µg/mL (tabla 7).

Tabla 7. Rastreo primario de actividad citotóxica* de las fracciones principales obtenidas del extracto de *Jatropha neopauciflora*.

Muestra	U251	PC3	K562	HCT15	MCF7
JNCDMM	94.80	73.50	88.60	71.80	50.60
Fracción 2	100		100		
Fracción 3	100		100		
Fracción 4	100		97.80		
Fracción 5	100		95.70		
Fracción 6	91.81		65.90		
Fracción 7	11.50		100		
Fracción 8	97.50		100		
Fracción 9	100		100		
Fracción 10	44.59		87.70		
Fracción 11	22.32		60.3		

*Los valores están expresados en porcentaje de inhibición del crecimiento

Las fracciones 3-11 fueron procesadas, mediante diversas técnicas cromatográficas y de cristalización, hasta el aislamiento y la purificación de sus constituyentes (diagrama 3).

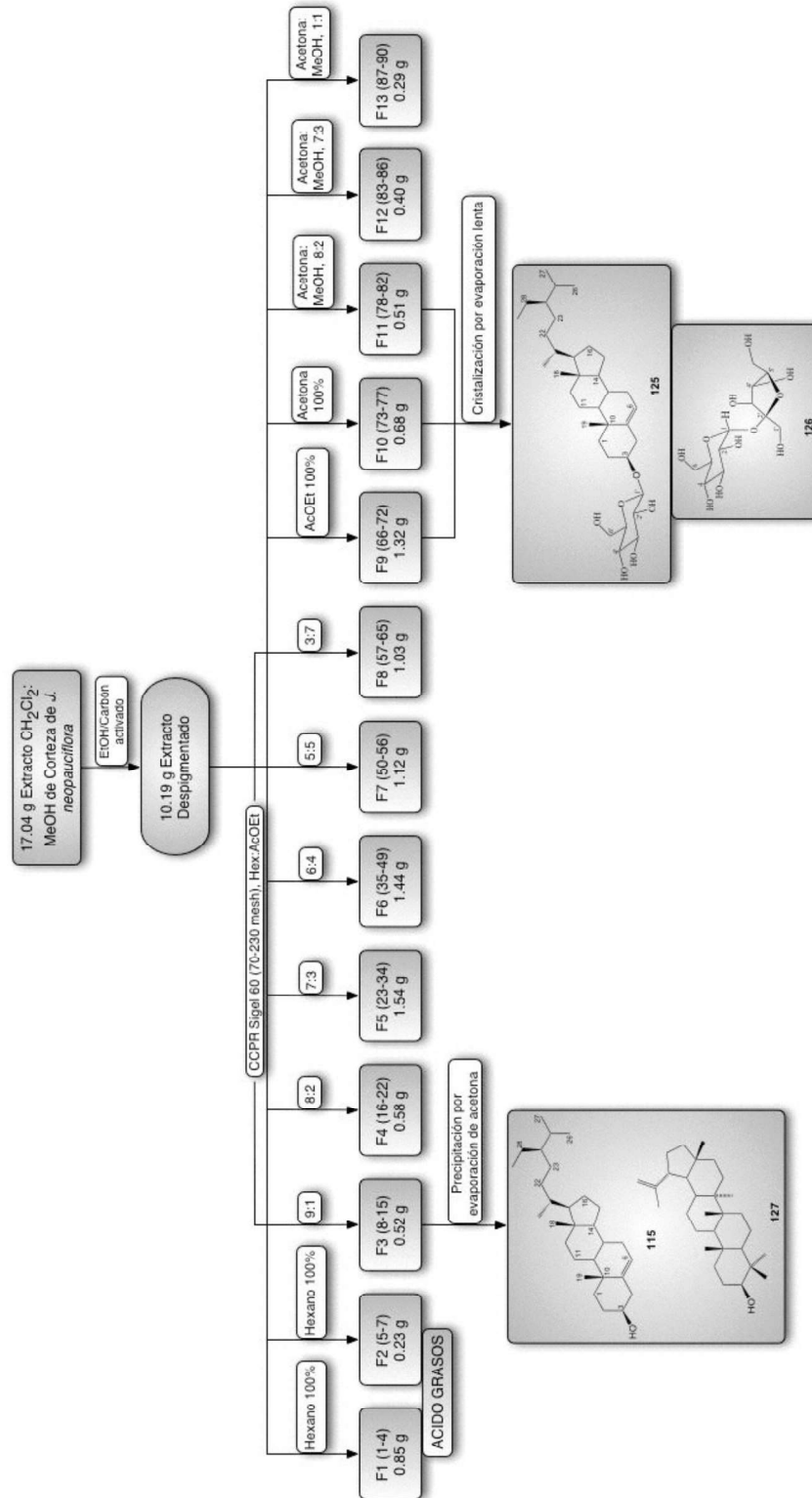


Diagrama 3. Fraccionamiento principal del extracto orgánico de *Jatropha neopauciflora*.

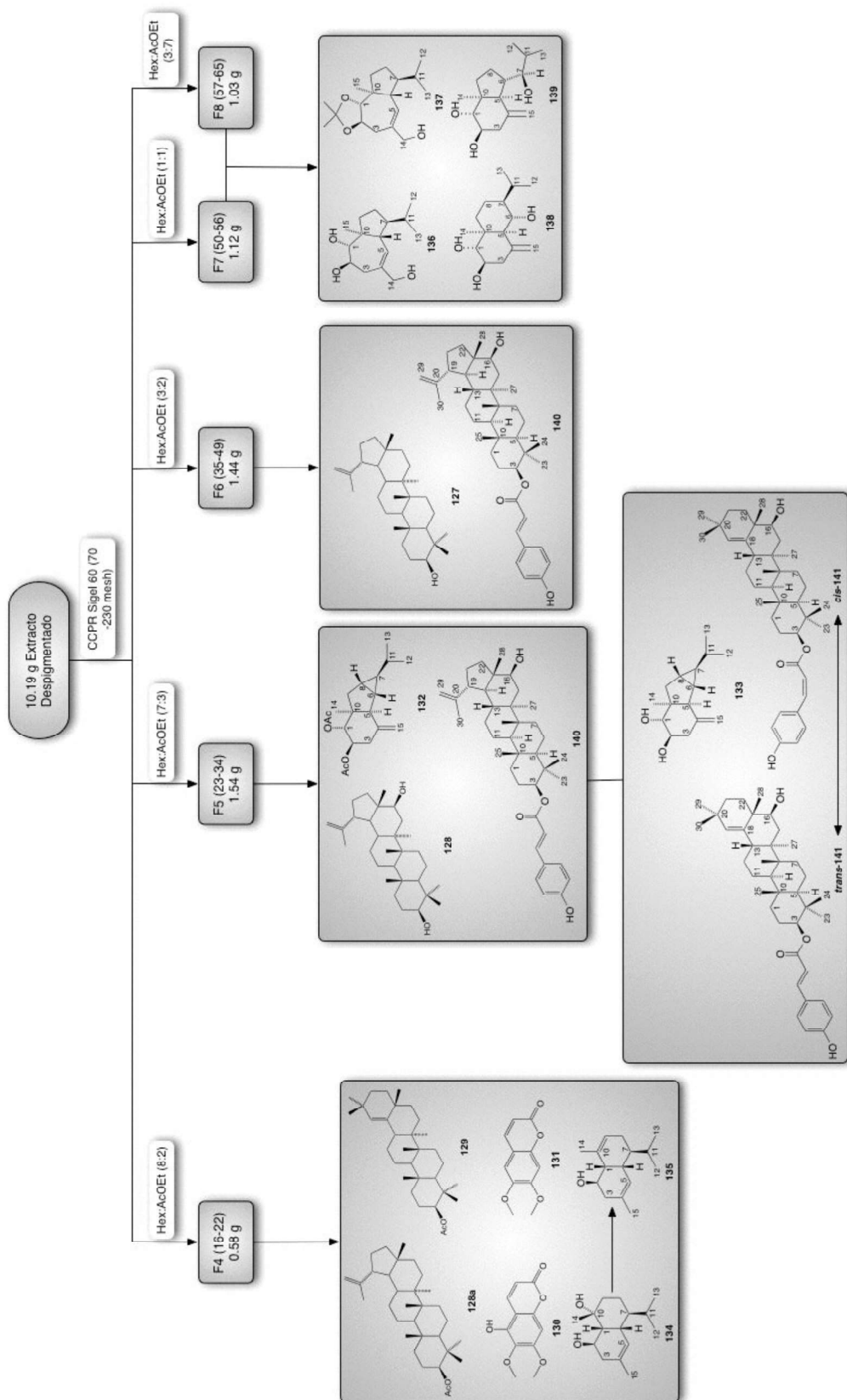
La actividad citotóxica que mostraron las fracciones 3-6 puede ser atribuida a la presencia de dos triterpenos de tipo lupano, los cuales fueron caracterizados como calenduladiol (**128**) y 3 \perp -*trans*-cumaroiloxi-16 \perp -hidroxi-20(29)-lupeno (**140**) (tabla 8). Cabe mencionar que se identificaron otros triterpenos de tipo lupano y taraxano, que no fueron purificados, pero que pudieran estar asociados con la actividad citotóxica que mostraron las fracciones, según los informes en la literatura [46].

Tabla 8. Concentración inhibitoria media del extracto y de **128** y **140**.

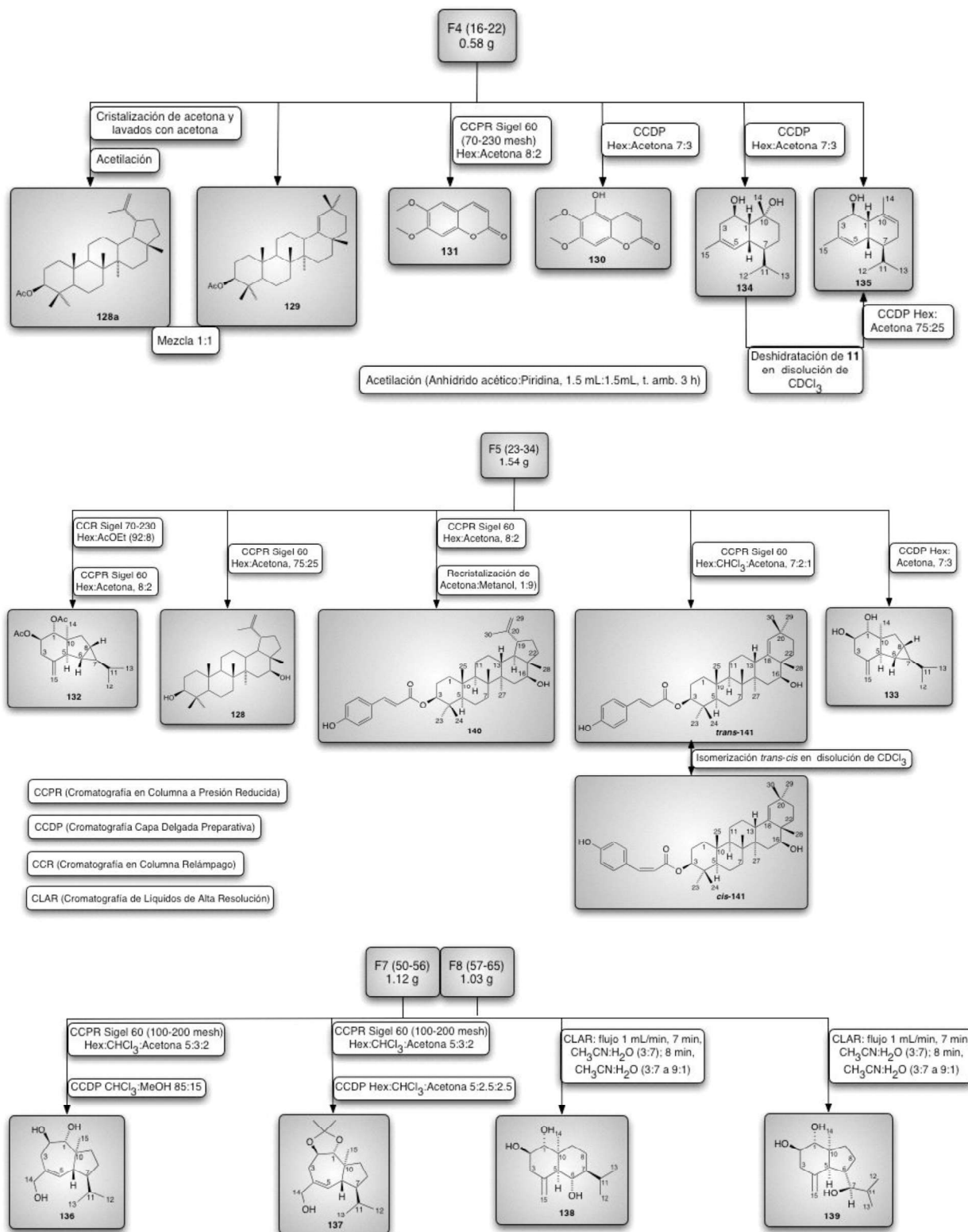
<i>Muestras</i>	U251	PC3	K562	HCT15	MCF7
128	48.44 \pm 4.31	44.16 \pm 1.62	31.41 \pm 3.55	> 100	> 100
140	41.04 \pm 6.91	> 100	> 100	> 100	> 100
Adriamicina	0.32 \pm 0.02	0.19 \pm 0.01	0.28 \pm 0.01	0.23 \pm 0.02	0.14 \pm 0.01

CI₅₀ (μ M) \pm error estándar. Adriamicina usada como control positivo.

Por otra parte, el estudio químico de las fracciones 3-11 permitió el aislamiento, la purificación y la caracterización de compuestos informados en la literatura: lupeol (**127**), calenduladiol (**128**), germanicol (**129**), \perp -sitosterol (**115**), \perp -D-glucopiranosido de \perp -sitosterilo (**125**), sacarosa (**126**), 5-hidroxi-6,7-dimetoxicumarina (**130**) y 6,7-dimetoxicumarina (**131**). Adicionalmente, se caracterizaron sesquiterpenos novedosos: 1*R*,2*R*-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (**132**); 1*R*,2*R*-dihidroxi-4(15)-cicloaxeno (**133**); (2*R*)- \perp -cadin-4-en-2,10-diol (**134**); (2*R*)- \perp -cadin-4,9-dien-2-ol (**135**); 1*R*,2*R*-dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (**136**); 1 \perp ,2 \perp -isopropilidendioxi-4-isodaucen-14-ol (**137**); (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*S*,10*S*)*-5-*epi*-eudesm-4(15)-eno-1 \perp ,2 \perp ,6 \perp -triol (**138**); (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*R*,10*S*)*-ax-4(15)-eno-1 \perp ,2 \perp ,7 \perp -triol (**139**). También, se caracterizaron nuevos triterpenos pentacíclicos como 3 \perp -*trans*-cumaroiloxi-16 \perp -hidroxi-20(29)-lupeno (**140**) y 3 \perp -*trans*-cumaroiloxi-16 \perp -hidroxi-18-oleaneno (**141**) [diagrama 4 y sus subdiagramas (véase pagina 90), en los cuales se explica la metodología empleada para la purificación de cada uno de los compuestos].

Diagrama 4. Aislamiento y purificación de los constituyentes de *Jatropha neopauciflora*.

A continuación se muestra esquemáticamente el proceso empleado en la purificación de cada uno de los constituyentes presentes en las fracciones 4-8 del extracto de *J. neopauciflora*.



7.2 Propiedades físicas de los compuestos de *J. neopauciflora*7.2.1 (1*R*,2*R*)-Diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132)

Aceite Amarillo (14 mg)

Rf 0.60 (Hex:(CH₃)₂CO, 75:25)

$[\alpha]_D^{25} = +23.52^\circ$ (0.085, CHCl₃)

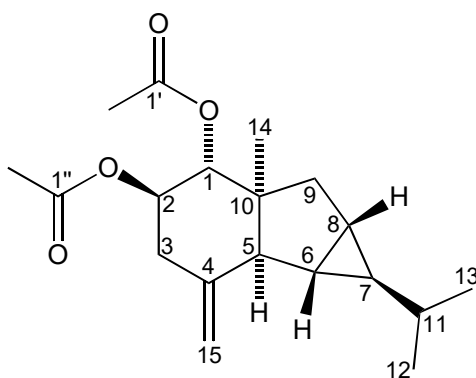
IR (película): 3076, 3017, 2956, 2872, 1746, 1650, 1460, 1368, 1245, 1040, 905 cm⁻¹

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz); Δ (multiplicidad, *J* (Hz), asignación), Δ 5.38 (d, *J* = 10.5 Hz, H-1 Δ); 4.89 (t, *J* = 2.0 Hz, H-15a); 4.86 (t, *J* = 2.0 Hz, H-15b); 4.84 (ddd, *J* = 5.5, 10.5, 11.0 Hz, H-2 Δ); 2.63 (ddd, *J* = 1.0, 5.0, 12.5 Hz, H-3 Δ); 2.46 (ddt, *J* = 13.0, 11.0, 1.5 Hz, H-3 Δ); 1.95 (d, *J* = 3.5 Hz, H-5 Δ); 1.18 (dt, *J* = 7.5, 3.5 Hz, H-6 Δ); 0.55 (dt, *J* = 7.5, 3.0 Hz, H-7 Δ); 1.33 (m, H-8 Δ); 1.88 (dd, *J* = 6.5, 13.5 Hz, H-9 Δ); 0.90 (m, H-9 Δ); 0.90 (m, H-11); 0.91 (6H, sa, H₃-12, H₃-13); 0.86 (s, H₃-14); 2.06 (s, H₃-2'); 2.01 (s, H₃-2'').

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz); Δ asignación: Δ 75.43 (C-1), 72.03 (C-2), 36.46 (C-3), 141.49 (C-4), 60.47 (C-5), 31.24 (C-6), 47.73 (C-7), 24.57 (C-8), 42.33 (C-9), 58.41 (C-10), 32.13 (C-11), 21.85[†] (C-12), 21.65[†] (C-13), 17.98 (C-14), 114.35 (C-15), 171.06 (C-1'), 20.94 (C-2'), 170.32 (C-1''), 21.07 (C-2'').

EM-FAB⁺ *m/e* (int. rel. %) 321 [M + H]⁺ (10), 261 [C₂H₄O₂]⁺ (20), 218 [261-C₂H₃O]⁺ (18), 201 [261-C₂H₄O₂]⁺ (81), 145 [201-C₄H₈]⁺ (100), 43 [C₄H₈]⁺ (55).

EM-AR-FAB: Observado 321.2074 ([M + H]⁺, C₁₉H₂₉O₄; calc. 321.2066).



132

7.2.2 (1R,2R)-Dihidroxi-4(15)-cicloaxeno (133)

Aceite transparente (23 mg)

Rf 0.36 (Hex:(CH₃)₂CO, 75:25)

$[\alpha]_D^{25} + 17.06$ ($c = 0.17$, MeOH)

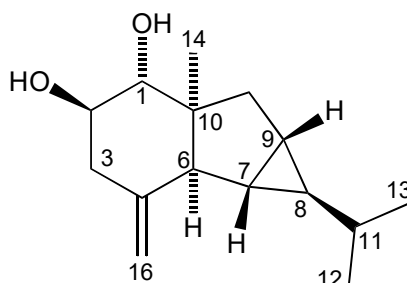
IR (película): 3379, 3073, 3010, 2955, 2929, 2872, 1647, 1462, 1379, 1048, 895, 659 cm^{-1}

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz); Δ (multiplicidad, J (Hz), asignación), Δ 3.63 (d, $J = 9.5$ Hz, H-1 Δ); 3.47 (ddd, $J = 4.5, 9.5, 11.0$ Hz, H-2 Δ); 2.48 (ddd, $J = 13.0, 5.0, 1.5$ Hz, H-3 Δ); 2.36 (ddt, $J = 13.0, 11.0, 1.5$ Hz, H-3 Δ); 1.90 (d, $J = 3.0$ Hz, H-5 Δ); 1.06 (dt, $J = 7.0, 3.5$ Hz, H-6 Δ); 0.41 (dt, $J = 9.0, 3.0$ Hz, H-7 Δ); 1.10 (m, H-8 Δ); 2.45 (dd, $J = 13.5, 6.0$ Hz, H-9 Δ); 0.92 (m, H-9 Δ); 0.74 (dsept, $J = 8.5, 6.5$ Hz, H-11); 0.92 (s, H₃-12); 0.93 (s, H₃-13); 0.91 (s, H₃-14); 4.78 (d, $J = 1.5$ Hz, H-15a); 4.78 (d, $J = 1.5$ Hz, H-15b); 2.72 (sa, OH)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz); Δ , asignación: Δ 77.7 (C-1), 72.1 (C-2), 39.8 (C-3), 144.8 (C-4), 61.2 (C-5), 32.1 (C-6), 48.1 (C-7), 25.1 (C-8), 42.7 (C-9), 58.6 (C-10), 32.5 (C-11), 22.0 (C-12), 21.9 (C-13), 17.8 (C-14), 112.6 (C-15)

EM-IE: m/e (int. rel. %) 236 (32, $[M]^+$), 218 (20), 203 (23), 175 (40), 161 (39), 147 (58), 139 (100), 121 (69), 105 (55), 91 (56), 41 (44)

EM-AR-FAB: Observado 237.1848 ($[M + H]^+$, C₁₅H₂₅O₂; calc. 237.1855)



133

7.2.3 1,2-Bis-trans-cinamoíl-4(15)-cicloaxeno (133a):

7 mg de **133** fueron sometidos a reacción con cloruro de *trans*-cinamoíl en piridina anhidra (en presencia de malla molecular 4 Å) hasta la obtención de un aceite transparente **133a** (1 mg), el cual fue purificado mediante HPLC [Lichrosorb 5 RP-18 column, 250 X 4 mm; elución de gradiente: H₂O:CH₃CN (3:7), flujo: 1 mL/6 min, cambio de proporciones H₂O:CH₃CN (3:7 to 1:9), flujo: 1 mL/14 min]. UV ($c 1.21 \times 10^{-5}$ M, MeOH): 217 (log ρ 4.40), 232 (log ρ 3.69), 278 (log ρ 4.59). DC ($c 1.21 \times 10^{-5}$ M, MeOH): $[\rho]_{267} + 62\ 664$, $[\rho]_{297} - 43\ 986$.

7.2.4 (2*R*)- Δ -Cadin-4-en-2,10-diol (134)

Aceite transparente (10 mg)

Rf 0.34 (Hex:(CH₃)₂CO, 7:3)

$[\alpha]_D^{25} - 34.76$ ($c = 0.07$, CHCl₃)

IR (película): 3413, 2957, 2928, 2870, 1673, 1460, 1377, 1195, 1041 cm^{-1}

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz); Δ (multiplicidad, J (Hz), asignación), Δ 1.61 (m, H-1 Δ); 4.13 (ddd, $J = 10.5, 8.0, 6.5$ Hz, H-2 Δ); 1.93 (m, H-3 Δ); 2.43 (dd, $J = 17.5, 6.5$ Hz, H-3 Δ); 5.50 (dquart, $J = 5.5, 2.0$ Hz, H-5); 2.55 (ddd, $J = 10.5, 5.5, 5.0$ Hz, H-6 Δ); 1.21 (m, H-7 Δ); 1.42 (2H, m, H-8); 1.60 (2H, m, H-9); 1.90 (m, H-11); 0.82 (d, $J = 7.0$ Hz, H₃-12); 0.87 (d, $J = 7.0$ Hz, H₃-13); 1.45 (s, H₃-14); 1.66 (s, H₃-15)

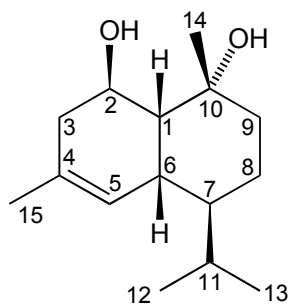
RMN ¹H (C₆D₆, 500 MHz); Δ (multiplicidad, J (Hz), asignación), Δ 1.48 (dd, $J = 9.0, 3.5$, Hz, H-1 Δ); 3.90 (ddd, $J = 11.0, 8.5, 6.5$ Hz, H-2 Δ); 1.66 (m, H-3 Δ); 2.11 (dd, $J = 16.5, 6.0$ Hz, H-3 Δ); 5.38 (dquart, $J = 5.5, 2.0$ Hz, H-5); 2.72 (ddd, $J = 10.5, 5.5, 5.0$ Hz, H-6 Δ); 1.16 (m, H-7 Δ); 1.33 (2H, m, H-8); 1.66 (2H, m, H-9); 1.96 (dsept, $J = 7.0, 3.5$ Hz, H-11); 0.87 (d = 7.0 Hz, H₃-12); 0.86 (d, $J = 7.0$ Hz, H₃-13); 1.42 (s, H₃-14); 1.56 (s, H₃-15); 3.24 (s, OH)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz); Δ , asignación: Δ 52.29 (C-1), 67.33 (C-2), 42.69 (C-3), 131.07 (C-4), 125.06 (C-5), 36.74 (C-6), 44.17 (C-7), 19.68 (C-8), 35.04 (C-9), 72.43 (C-10), 27.10 (C-11), 15.39 (C-12), 21.49 (C-13), 31.32 (C-14), 22.88 (C-15).

RMN ¹³C (C₆D₆, 125 MHz); Δ , asignación: Δ 52.41 (C-1), 66.94 (C-2), 43.14 (C-3), 131.11 (C-4), 125.72 (C-5), 37.02 (C-6), 44.67 (C-7), 19.97 (C-8), 35.19 (C-9), 71.76 (C-10), 27.46 (C-11), 15.52 (C-12), 21.70 (C-13), 32.01 (C-14), 22.98 (C-15).

EM-FAB⁺ m/e (int. rel. %): 239 (3, $[M + H]^+$), 154 (100), 221 (7, 239 – H₂O), 203 (10, 221 – H₂O), 154 (100, $[M - C_{10}H_{18}O]^+$), 136 (90, 154 – C₁₀H₁₆), 55 (98, C₄H₇⁺), 43 (89, C₃H₇⁺).

EM-AR-FAB: Observado: 239.2030 ($[M + H]^+$, C₁₅H₂₇O₂; calc. 239.2011)



134

7.2.5 2-*p*-Bromobenzoil- \perp -cadin-4-en-10-ol (134a): 5 mg de **134** fueron sometidos a reacción con cloruro de *p*-bromobenzoil en piridina anhidra (en presencia de malla molecular 4 Å) hasta obtener 4 mg de un aceite transparente de **134a**. UV (c 4.76 X 10⁻⁵ M, MeOH): 206 (log ρ 4.30), 218 (log ρ 3.94), 244 (log ρ 4.40). DC (c 4.76 X 10⁻⁵ M, MeOH): $[\rho]_{252} - 9$ 489.

7.2.6 (2*R*)- \perp -Cadin-4,9-dien-2-ol (135)

Aceite transparente (5 mg)

Rf 0.45 (Hex:(CH₃)₂CO, 75:25)

$[\perp]_D^{25} - 6.6$ (c = 0.075, MeOH)

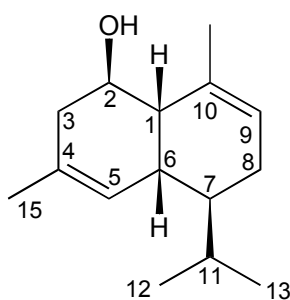
IR (película): 3420, 2957, 2925, 2855, 1672, 1460, 1378, 1052 cm^{-1}

RMN ¹H (C₆D₆, 500 MHz); \perp (multiplicidad, J (Hz), asignación), \perp 2.14 (t, J = 6.0 Hz, H-1 \perp); 3.97 (dd, J = 11.5, 5.0 Hz, H-2 \perp); 1.75 (m, H-3 \perp); 2.06 (d, J = 17.0 Hz, H-3 \perp); 5.24 (dcuart, J = 5.0, 1.5 Hz, H-5); 2.43 (s, H-6 \perp); 1.31 (m, H-7 \perp); 1.97 (m, H-8 \perp); 1.80 (m, H-8 \perp); 5.38 (m, H-9); 1.78 (m, H-11); 0.83 (d, J = 6.5 Hz, H₃-12); 0.90 (d, J = 6.5 Hz, H₃-13); 1.73 (d, J = 1.5 Hz, H₃-14); 1.56 (d, J = 1.5 Hz, H₃-15)

RMN ¹³C (C₆D₆, 125 MHz); \perp , asignación: \perp 43.11 (C-1), 68.97 (C-2), 37.93 (C-3), 131.01 (C-4), 125.46 (C-5), 34.95 (C-6), 43.08 (C-7), 24.91 (C-8), 123.07 (C-9), 133.83 (C-10), 27.15 (C-11), 18.82 (C-12), 21.22 (C-13), 23.43 (C-14), 23.65 (C-15).

EM-IE⁺ m/e (int. rel. %) 220 (5, [M]⁺), 219 (10, [M - H]⁺), 149 (40), 71 (70), 57 (100), 43 (60), 41 (32).

EM-AR-FAB⁺ m/e Observado: 221.1902, [M + H]⁺, C₁₅H₂₅O; Calculado 221.1905



135

7.2.7 (1*R*,2*R*)-Dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (136)

Aceite amarillo (51 mg)

Rf 0.62 (Hex:(CH₃)₂CO, 6:4)

$[\alpha]_D^{25} = -40$ ($c = 0.055$, CHCl₃)

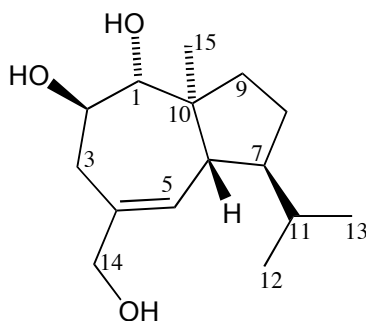
IR (película): 3622, 3457, 2975, 2927, 2895, 1449, 1391, 1046, 877 cm^{-1}

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz); Δ (multiplicidad, J (Hz), asignación), Δ 3.25 (d, $J = 9.0$ Hz, H-1 Δ); 3.57 (ddd, $J = 12.0, 9.0, 3.0$ Hz, H-2 Δ); 2.46 (2H, m, H-3); 5.48 (d, $J = 4.5$ Hz, H-5); 2.11 (dd, $J = 9.5, 5.5$ Hz, H-6 Δ); 1.76 (2H, m, H-7 Δ , H-8); 1.35 (m, H-8); 1.96 (m, H-9); 1.52 (2H, m, H-9 y H-11); 0.88 (d, $J = 6.5$ Hz, H₃-12); 0.84 (d, $J = 7.0$ Hz, H₃-13); 3.95 (2H, s, H₂-14); 0.96 (s, H₃-15)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz); Δ asignación: Δ 87.70 (C-1), 69.52 (C-2), 35.60 (C-3), 137.75 (C-4), 132.15 (C-5), 48.81 (C-6), 50.35 (C-7), 24.83 (C-8), 39.98 (C-9), 49.31 (C-10), 32.11 (C-11), 21.93 (C-12), 19.27 (C-13), 67.82 (C-14), 14.78 (C-15)

EM-IE: 254 (4, [M]⁺), 253 (3, [M - H]⁺), 236 (50, [M - H₂O]⁺), 193 (49), 178 (68), 175 (65), 123 (100), 95 (78), 43 (66), 41 (59)

EM-AR-FAB: 255.1967 ([M + H]⁺, C₁₅H₂₇O₃; calc. 255.1960)



136

7.2.8 1,2,14-Tris-*p*-bromobenzoyl-4-isodauceno (136): 10 mg de **136** fueron sometidos a reacción con cloruro de *p*-bromobenzoyl en piridina anhidra (malla molecular 4 Å) hasta obtención de 8 mg de **136a**. UV ($c 5.50 \times 10^{-6}$ M, MeOH): 207 (log ρ 4.67), 220 (log ρ 4.37), 244 (log ρ 4.75). DC ($c 5.50 \times 10^{-6}$ M, MeOH): $[\rho]_{237} + 73 587$, $[\rho]_{254} - 121 296$.

7.2.9 1 Δ ,2 Δ -Isopropilidendioxi-4-isodaucen-14-ol (137)

Aceite amarillo (15 mg)

Rf 0.25 (Hex:(CH₃)₂CO, 6:4)

$[\alpha]_D^{25} = -47.5$ ($c = 0.12$, MeOH).

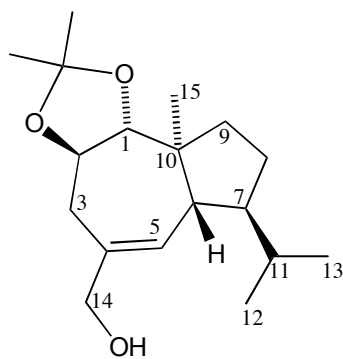
IR (película): 3421, 2956, 2934, 2872, 1688, 1457, 1374, 1170, 1125, 1067, 1046, 797 cm^{-1}

RMN ^1H (C_6D_6 , 500 MHz); \perp (multiplicidad, J (Hz), asignación), \perp 3.30 (d, $J = 9.0$ Hz, H-1 \perp); 3.58 (ddd, $J = 11.0, 8.5, 2.0$ Hz, H-2 \perp); 2.22 (dt, $J = 13.5, 1.5$ Hz, H-3 \perp); 2.51 (ddd, $J = 14.0, 2.0, 1.0$ Hz, H-3 \perp); 5.45 (dd, $J = 3.5, 1.0$ Hz, H-5); 1.91 (m, H-6 \perp); 1.72 (m, H-7 \perp); 1.32 (2H, m, H-8); 1.87 (m, H-9 \perp); 1.42 (m, H-9); 1.55 (m, H-11); 0.80 (d $J = 6.5$ Hz, H₃-12); 0.87 (d, $J = 6.5$ Hz, H₃-13); 3.66 (2H, s, H₂-14); 0.91 (s, H₃-15); 1.49 (s, H₃-3'); 1.42 (s, H₃-2')

RMN ^{13}C (C_6D_6 , 125 MHz); \perp , asignación: \perp 92.77 (C-1), 72.48 (C-2), 30.67 (C-3), 137.76 (C-4), 129.56 (C-5), 49.35 (C-6), 49.30 (C-7), 24.80 (C-8), 38.83 (C-9), 46.41 (C-10), 31.30 (C-11), 18.52 (C-12), 22.13 (C-13), 67.84 (C-14), 14.05 (C-15), 106.67 (C-1'), 27.45 (C-3'), 27.06 (C-2')

EI-MS: 294 (no observado), 279 (13, $[\text{M} - \text{Me}]^+$), 236 (14), 219 (86), 201 (45), 81 (73), 69 (100), 55 (75), 43 (85), 28 (51), 18 (43)

HR-FAB-MS: 295.2268 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{O}_3$; calc. 295.2273)



137

7.2.10 (1R,2R,5S,6S,7S,10S)*-5-epi-Eudesm-4(15)-eno-1,2,6-triol (138)

Aceite transparente (8 mg)

Rf 0.25 (Hex:(CH_3) $_2\text{CO}$, 6:4)

$[\alpha]_D^{25} - 83.52$ ($c = 0.17$, CHCl_3)

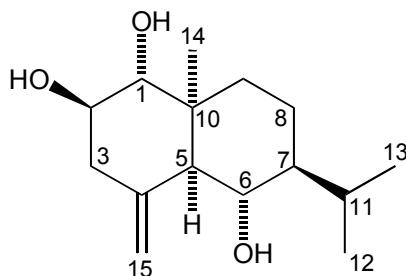
IR (película): 3385, 2958, 2933, 2873, 1648, 1460, 1049, 757 cm^{-1}

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz); \perp (multiplicidad, J (Hz), asignación), \perp 3.65 (d, $J = 9.5$ Hz, H-1 \perp); 3.74 (ddd, $J = 5.0, 9.0, 11.0$ Hz, H-2 \perp); 2.60 (ddd, $J = 13.0, 5.5, 1.0$ Hz, H-3 \perp); 2.30 (ddt, $J = 13.0, 11.0, 2.0$ Hz, H-3 \perp); 1.85 (d, $J = 10.0$ Hz, H-5 \perp); 3.55 (t, $J = 10.0$ Hz, H-6 \perp); 1.31-1.22 (m, H-7 \perp); 1.31-1.22 (m, H-8 \perp); 1.48 (m, H-8 \perp); 2.08 (ddd, $J = 13.5, 3.0, 3.0$ Hz, H-9 \perp); 1.05 (ddd, $J = 13.5, 13.5, 3.5$ Hz, H-9 \perp); 2.20 (septd, $J = 7.0, 2.0$ Hz, H-11); 0.84 (d, $J = 7.0$ Hz, H₃-12); 0.94 (d, $J = 7.0$ Hz, H₃-13); 0.89 (s, H₃-14); 5.07 (d, $J = 2.0$ Hz, H-15a); 4.93 (d, $J = 2.0$ Hz, H-15b); 1.88 (sa, OH)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz); \perp asignación: \perp 73.84 (C-1), 71.91 (C-2), 38.13 (C-3), 143.03 (C-4), 61.32 (C-5), 67.36 (C-6), 49.03 (C-7), 18.08 (C-8), 34.49 (C-9), 39.64 (C-10), 26.42 (C-11), 16.24 (C-12), 20.87 (C-13), 22.54 (C-14), 116.09 (C-15)

EM-IE: 254 (3, M^+), 236 (22, $[M - \text{H}_2\text{O}]^+$), 218 (24, $[236 - \text{H}_2\text{O}]^+$), 123 (100), 107 (42), 95 (77), 43 (26), 41 (31)

EM-AR-FAB: 255.1965 ($[M + \text{H}]^+$, $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{O}_3$; calc. 255.1960)



138

7.2.11 (1R,2R,5S,6S,7R,10S)*-Ax-4(15)-eno-1 \perp ,2 \perp -7 \perp -triol (139)

Aceite transparente (8 mg)

Rf 0.25 (Hex:(CH_3) $_2\text{CO}$, 6:4)

$[\perp]_D^{25} - 29.78$ ($c = 0.235$, CHCl_3)

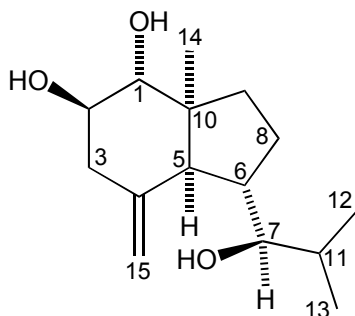
IR (película): 3385, 2956, 2872, 1645, 1465, 1052, 759 cm^{-1}

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz); \perp (multiplicidad, J (Hz), asignación), \perp 3.46 (d, $J = 9.5$ Hz, H-1 \perp); 3.59 (ddd, $J = 5.5, 10.5, 11.5$ Hz, H-2 \perp); 2.56 (ddd, $J = 12.5, 5.0, 1.0$ Hz, H-3 \perp); 2.38 (ddt, $J = 13.0, 11.0, 1.5$ Hz, H-3 \perp); 2.23 (d, $J = 11.0$ Hz, H-5 \perp); 2.33 (dddd, $J = 13.0, 10.0, 8.0, 2.5$ Hz, H-6 \perp); 3.37 (dd, $J = 8.5, 3.5$ Hz, H-7 \perp); 1.91 (m, H-8 \perp); 1.42 (m, H-8 \perp); 2.03 (ddd, $J = 12.0, 8.5, 2.5$ Hz, H-9 \perp); 1.35 (m, H-9 \perp); 1.72 (septd, $J = 7.0, 3.5$ Hz, H-11); 0.94 (d, $J = 7.0$ Hz, H $_3$ -12); 0.84 (d, $J = 7.0$ Hz, H $_3$ -13); 0.94 (s, H $_3$ -14); 5.02 (t, $J = 2.0$ Hz, H-15a); 4.96 (t, $J = 2.0$ Hz, H-15b); 1.95 (sa, OH)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz); \perp asignación: \perp 76.68 (C-1), 72.39 (C-2), 38.76 (C-3), 147.20 (C-4), 61.39 (C-5), 45.09 (C-6), 82.44 (C-7), 25.92 (C-8), 36.30 (C-9), 48.62 (C-10), 31.05 (C-11), 20.21 (C-12), 15.08 (C-13), 19.12 (C-14), 114.24 (C-15)

EM-IE: 254 (2, M^+), 255 (1, $[M + \text{H}]^+$), 236 (8, $[M - \text{H}_2\text{O}]^+$), 218 (7, $[236 - \text{H}_2\text{O}]^+$), 211 (62, $[M - \text{C}_3\text{H}_7]^+$), 200 (9, $[218 - \text{H}_2\text{O}]^+$), 182 (62, $[M + \text{C}_4\text{H}_8\text{O}]^+$), 164 (56, $[236 - \text{C}_4\text{H}_8\text{O}]^+$), 147 (57), 123 (45), 122 (100), 107 (43), 93 (32), 81 (30), 55 (32), 43 (31)

EM-AR-FAB: 255.1971 ($[M + H]^+$, $C_{15}H_{27}O_3$; calc. 255.1960)



139

7.2.12 3 \perp -*trans*-*p*-Cumaroiloxi-16 \perp -hidroxi-20(29)-lupeno (140)

Cristales incoloros (Acetona:Metanol (1:9), 328 mg)

Rf 0.41 (Hex:CHCl₃:(CH₃)₂CO, 0.6:0.1:0.3)

Pf 288-290 °C

$[\alpha]_D^{25} + 33$ (*c* 0.1, Piridina)

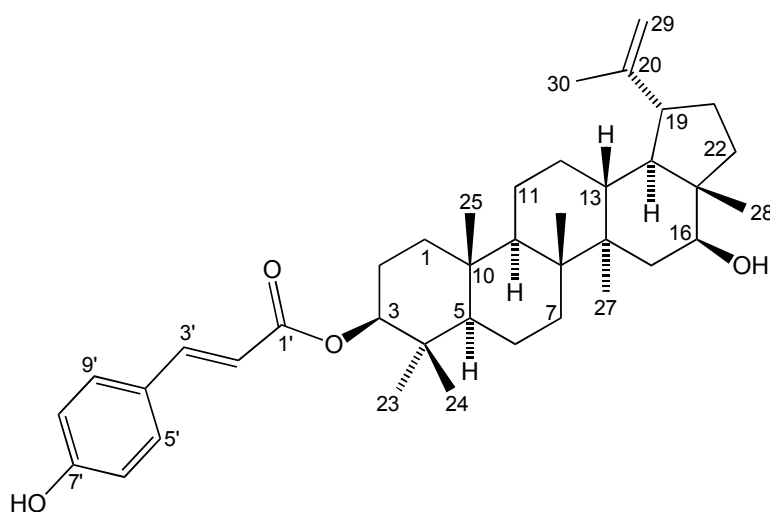
IR (KBr), ν_{\max} 3423 (OH-Ar), 3143 (OH), 1681 (C=O \perp , \perp -insaturado), 1272 (C-O) cm^{-1}

RMN ¹H (Piridina-*d*₅, 500 MHz); \perp (multiplicidad, *J* (Hz), asignación), \perp 12.27 (s, HO-Ar), 8.04 (d, *J* = 16.0 Hz, H-3'); 7.68 (d, *J* = 9.0 Hz, H-5',9'); 7.20 (d, *J* = 9.0 Hz, H-6',8'); 6.73 (d, *J* = 16.0 Hz, H-2'); 5.78 (sa, HO-C16); 4.94 (d, *J* = 2.0 Hz, H-29b); 4.90 (dd, *J* = 5.0, 12.0 Hz, H-3 \perp); 4.78 (d, *J* = 1.0 Hz, H-29a); 3.96 (dd, *J* = 4.5, 11.5 Hz, H-16 \perp); 2.67 (dt, *J* = 11.0, 6.0 Hz, H-19 \perp); 2.09 (m, H-21 \perp); 1.96 (m, H-22 \perp); 1.94 (m, H-15 \perp); 1.83 (m, H-2 \perp); 1.82 (m, H-11 \perp); 1.79 (s, H₃C-30); 1.78 (m, H-2 \perp , H-13 \perp); 1.62 (m, H-1 \perp); 1.60 (m, H-18 \perp); 1.59 (m, H-21 \perp , H-15 \perp); 1.53 (m, H-22 \perp); 1.45 (m, H-6 \perp); 1.43 (m, H₂-7); 1.40 (H-12 \perp); 1.38 (m, H-9 \perp); 1.36 (m, H-6 \perp); 1.18 (ta, *J* = 10.5 Hz, H-11 \perp , H-12 \perp); 1.13 (s, H₃C-28 \perp); 1.12 (s, H₃C-27 \perp); 1.08 (s, H₃C-26 \perp); 1.01 (s, H₃C-24 \perp); 0.98 (s, H₃C-23 \perp , H-1 \perp); 0.87 (s, H₃C-25 \perp); 0.84 (d, *J* = 11.5 Hz, H-5 \perp)

RMN ^{13}C (Piridina-*d*5, 125 MHz); \perp , asignación: \perp 167.41 (C=O), 161.86 (C-7'), 151.09 (C-20), 145.38 (C-3'), 131.11 (C-5',C-9'), 126.66 (C-4'), 117.29 (C-6',C-8'), 116.28 (C-2'), 110.47 (C-29), 80.95 (C-3), 76.43 (C-16), 56.10 (C-5), 50.61 (C-9), 49.97 (C-17), 48.65 (C-18), 48.51 (C-19), 44.58 (C-14), 41.65 (C-8), 39.23 (C-22), 39.08 (C-1), 38.70 (C-4), 38.32 (C-15), 38.11 (C-13), 37.69 (C-10), 34.98 (C-7), 30.79 (C-21), 28.57 (C-23), 25.71 (C-12), 24.73 (C-2), 21.56 (C-11), 19.93 (C-30), 18.89 (C-6), 17.36 (C-24), 16.88 (C-27), 16.75 (C-25), 16.63 (C-26), 12.83 (C-28)

EM-IE $^{+}$ *m/e* (int. rel. %) 588 (17, [M] $^{+}$), 570 (21), 406 (15), 189 (19), 164 (18), 147 (100), 119 (19), 107 (13)

EM-AR-FAB: 588.4187 ([M + H] $^{+}$, C₃₉H₅₄O₄; calc. 588.4179)



140

7.2.13 3 \perp -*trans*-*p*-Acetilcumaroiloxi-16 \perp -acetoxi-20(29)-lupeno (140a)

45 mg de **140** fueron sometidos a la reacción de esterificación con anhídrido acético en piridina anhidra hasta la obtención del derivado diacetilado **140a** (43 mg).

Cristales transparentes (48 mg)

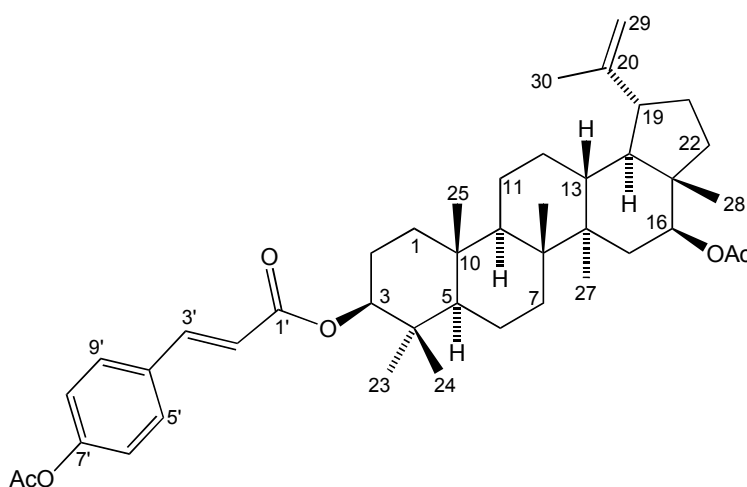
Rf 0.53 (Hex:(CH₃)₂CO, 7:3)

Pf 148-150 °C

RMN ^1H (CDCl₃, 300 MHz); \perp (multiplicidad, *J* (Hz), asignación), \perp 7.63 (d, *J* = 15.9 Hz, H-3'); 7.54 (dt, *J* = 8.7, 2.1 Hz, H-5',9'); 7.12 (dt, *J* = 8.7, 2.1 Hz, H-6',8'); 6.38 (d, *J* = 15.9 Hz, H-2'); 4.87 (dd, *J* = 4.8, 11.4 Hz, H-3 \perp); 4.71 (d, *J* = 2.1 Hz, H-29b); 4.61 (d, *J* = 2.4 Hz, H-29a); 4.61 (dd, *J* = 4.5, 11.7 Hz, H-16 \perp); 2.49 (dt, *J* = 10.5, 3.6 Hz, H-19 \perp); 2.30 (s, H₃-Ac); 2.01 (s, H₃-Ac); 1.98-0.82 (m, H₂-1, H₂-2, H₂-6, H₂-7, H₂-11, H₂-12, H₂-15, H₂-21, H₂-22, H-5, H-8, H-9, H-13, H-18);

1.68 (s, H₃C-30); 1.05 (s, H₃C-28 \perp); 1.05 (s, H₃C-27 \perp); 0.91 (s, H₃C-26 \perp); 0.89 (s, H₃C-24 \perp); 0.89 (s, H₃C-23 \perp , H-1 \perp); 0.85 (s, H₃C-25 \perp)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz); \perp , asignación: \perp 170.67 (C=O), 169.11 (C=O), 166.65 (C=O), 151.98 (C-7'), 149.81 (C-20), 143.14 (C-3'), 129.14 (C-5', C-9'), 132.30 (C-4'), 122.06 (C-6', C-8'), 119.03 (C-2'), 109.95 (C-29), 81.02 (C-3), 79.08 (C-16), 55.39 (C-5), 49.87 (C-9), 47.80 (C-17), 47.54 (C-18), 47.35 (C-19), 44.19 (C-14), 41.01 (C-8), 38.43 (C-22), 38.02 (C-1), 37.63 (C-4), 37.37 (C-15), 37.06 (C-13), 34.22 (C-10), 33.51 (C-7), 29.70 (C-21), 27.99 (C-23), 24.63 (C-12), 23.76 (C-2), 21.36 (CH₃-Ac), 21.11 (CH₃-Ac), 20.85 (C-11), 19.22 (C-30), 18.14 (C-6), 16.64 (C-24), 16.18 (C-27), 16.02 (C-25), 15.92 (C-26), 12.73 (C-28)



140a

7.2.14 3 \perp -*trans*-*p*-Cumaroiloxi-16 \perp -hidroxiolean-18-eno (141)

Película café semitraslúcida (3 mg)

R_f 0.43 (Hex:CHCl₃:(CH₃)₂CO, 0.6:0.1:0.3)

P_f 275-277 °C

[\perp]_D²⁵ = + 32.5 (*c* = 0.04, CHCl₃).

IR (película), CHCl₃ \perp _{max} 3388 (OH-Ar), 2947 (CH-; CH₂), 1684 (C=O \perp , \perp -insaturado), 1604 (C-O), 1169, 757 cm⁻¹

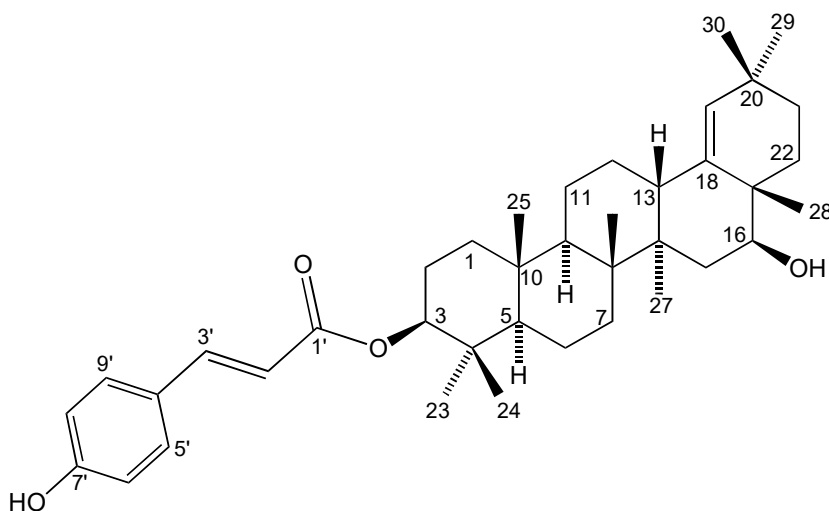
RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz); \perp , (multiplicidad, *J* (Hz), asignación): \perp 7.60 (d, *J* = 16.0 Hz, H-3'), 7.43 (d, *J* = 8.5 Hz, H-5', H-9'), 6.83 (d, *J* = 8.5 Hz, H-6', H-8'), 6.30 (d, *J* = 15.5 Hz, H-2'), 4.98 (d, *J* = 2.0 Hz, H-19), 4.62 (dd, *J* = 5.5, 11.0 Hz, H-3 \perp), 3.47 (dd, *J* = 5.0, 11.5 Hz, H-16 \perp), 2.29 (dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, H-13 \perp), 1.77 (m, H-1 \perp), 1.73 (m, H-2 \perp), 1.70 (m, H-15 \perp), 1.69 (m, H-22 \perp),

1.60 (m, H-22 \perp), 1.58 (2H, m, H-11 \perp), 1.55 (m, H-6 \perp), 1.52 (2H, m, H-12) 1.51 (m, H-7 \perp), 1.39 (4H, m, H-7 \perp , H-15 \perp , H-21 \perp), 1.40 (m, H-6 \perp), 1.30 (m, H-9 \perp), 1.10 (3H, s, H₃-26), 1.08 (m, H-1 \perp), 1.03 (m, H-2 \perp), 0.99 (3H, s, H₃-28), 0.96 (6H, s, H₃-29, H₃-30), 0.93 (3H, s, H₃-25), 0.92 (3H, s, H₃-24), 0.89 (3H, s, H₃-23), 0.85 (m, H-5), 0.79 (3H, s, H₃-27)

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz); \perp asignación: \perp 167.13 (C-1'), 157.35 (C-7'), 143.81 (C-3'), 141.14 (C-18), 132.16 (C-19), 129.88 (C-5', C-9'), 127.58 (C-4'), 116.51 (C-2'), 115.81 (C-6', C-8'), 80.76 (C-3), 76.52 (C-16), 55.63 (C-5), 50.49 (C-9), 42.49 (C-14), 40.71 (C-8), 40.11 (C-17), 38.67 (C-1), 38.09 (C-4), 37.89 (C-13), 37.14 (C-10), 36.69 (C-15), 34.49 (C-7), 33.44 (C-22), 33.02 (C-21), 32.12 (C-20), 31.04 (C-30), 29.12 (C-29), 27.98 (C-23), 25.86 (C-12), 23.81 (C-2), 21.05 (C-11), 18.16 (C-6), 17.99 (C-28), 16.73 (C-24), 16.68 (C-25), 16.06 (C-26), 15.89 (C-27)

EM-IE⁺ *m/e* (int. rel. %) 588 (19, [M]⁺), 570 (18, [M - H₂O]⁺), 424 (13), 189 (26), 175 (19), 147 [C₉H₇O₂]⁺ (100), 95 (18)

EM-AR-FAB: 589.4257 ([M + H]⁺, C₃₉H₅₇O₄; calc. 589.4257)



141

7.2.15 5-Hidroxi-6,7-dimetoxicumarina (130) [47]

Agujas blancas (3 mg)

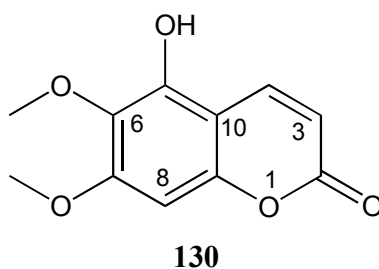
R_f 0.44 (Hex:(CH₃)₂CO, 6:4)

Pf 168-170 °C

IR (película), CHCl₃ \perp_{max} 3517 (OH-Ar), 2941, 1725 (C=O \perp, \perp -insaturado), 1628, 1466 (C=C), 1142, 1027 (C-O) *cm*⁻¹

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz); \perp (multiplicidad, J (Hz), asignación), \perp 7.96 (d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 6.45 (s, H-8), 6.21 (d, $J = 10.0$ Hz, H-3), 6.18 (s, HO-C5), 3.92 (3H, s, $\text{H}_3\text{-O-C7}$), 3.90 (3H, s, $\text{H}_3\text{-O-C6}$)
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz); \perp , asignación: \perp 161.40 (C-2), 155.80 (C-7), 151.84 (C-9), 145.62 (C-5), 138.46 (C-4), 131.80 (C-6), 111.90 (C-3), 102.53 (C-10), 92.45 (C-8), 61.36 (MeO-C6), 56.21 (MeO-C7)

EM-IE $^+$ m/e (int. rel. %) 222 (13, $[M]^+$), 223 (25, $[M + H]^+$), 154 (100), 137 (58), 136 (62), 107 (19), 89 (14), 77 (12), 65 (5)



7.2.16 6,7-Dimetoxicumarina (131) [48]

Sólido blanco (3.9 mg)

Rf 0.25 (Hex:(CH_3) $_2\text{CO}$, 7:3)

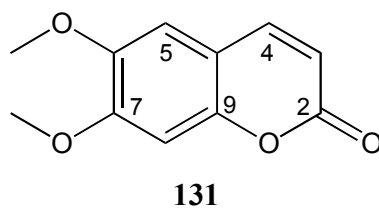
Pf 150 °C

IR (película), CHCl_3 \perp_{max} 2962, 2932, 1719 (C=O \perp,\perp -insaturado), 1618, 1463 (C=C), 1279, 1142 (C-O) cm^{-1}

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz); \perp (multiplicidad, J (Hz), asignación), \perp 7.62 (d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 6.29 (d, $J = 10.0$ Hz, H-3), 6.86 (s, H-5), 6.85 (s, H-8), 3.96 (3H, s, $\text{H}_3\text{-O-C7}$), 3.93 (3H, s, $\text{H}_3\text{-O-C6}$)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz); \perp , asignación: \perp 161.90 (C-2), 152.90 (C-7), 150.10 (C-9), 146.50 (C-6), 143.20 (C-4), 113.60 (C-3), 111.50 (C-10), 108.20 (C-5), 100.14 (C-8), 92.45 (C-8), 61.36 (MeO-C6), 56.21 (MeO-C7)

EM-IE $^+$ m/e (int. rel. %) 206 (5, $[M]^+$), 207 (5, $[M + H]^+$), 167 (20), 149 (100), 113 (21), 105 (5), 77 (5), 71 (24), 57 (33), 43 (23)



7.2.17 19- \perp H-lupeol (127) [49]

Sólido blanco (57 mg)

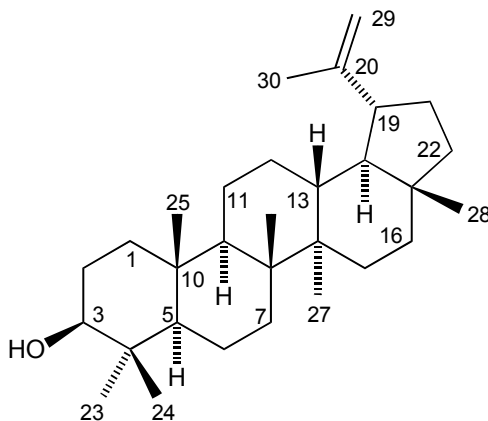
Rf 0.46 (Hex:(CH₃)₂CO, 4:1)

Pf 192-193 °C

IR CHCl₃ \perp _{max} 3356 (OH), 2941 (CH-; CH₂), 1639 (C-O) cm^{-1}

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz); \perp (multiplicidad, *J* (Hz), asignación): \perp 4.68 (d, *J* = 2.4 Hz, H-29a), 4.56 (dd, *J* = 1.5, 2.4 Hz, H-29b), 3.18 (dd, *J* = 5.1, 10.8 Hz, H-3 \perp), 2.37 (dt, *J* = 11.1, 5.7 Hz, H-19 \perp), 1.92 (m, H-21a), 1.68 (d, *J* = 0.6 Hz, H-30), 1.67 (m, H-1a, H-12a), 1.65 (m, H-13), 1.57 (m, H-15a), 1.51 (2H, m, H-6), 1.44 (m, H-11a), 1.43 (2H, m, H-16), 1.39 (3H, m, H-7, H-22a), 1.36 (m, H-18), 1.35 (m, H-21b), 1.29 (2H, m, H-2), 1.26 (m, H-9), 1.17 (2H, m, H-11b, H-22b), 1.06 (m, H-12b), 1.03 (s, H₃-26), 1.01 (m, H-15b), 0.96 (s, H₃-23), 0.94 (s, H₃-27), 0.91 (m, H-1b), 0.83 (s, H₃-25), 0.78 (s, H₃-28), 0.76 (s, H₃-24), 0.69 (m, H-5)

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz); \perp asignación: \perp 150.95 (C-20), 109.31 (C-29), 78.99 (C-3), 55.30 (C-5), 50.44 (C-9), 48.31 (C-18), 47.97 (C-19), 42.98 (C-17), 42.83 (C-14), 40.84 (C-8), 39.99 (C-22), 38.84 (C-4), 38.71 (C-1), 38.05 (C-13), 37.16 (C-10), 35.58 (C-16), 34.28 (C-7), 29.85 (C-21), 29.68 (C-2), 27.97 (C-23), 27.43 (C-15), 25.14 (C-12), 20.92 (C-11), 19.29 (C-30), 18.31 (C-6), 17.98 (C-28), 16.10 (C-25), 15.97 (C-26), 15.35 (C-24), 14.52 (C-27)



127

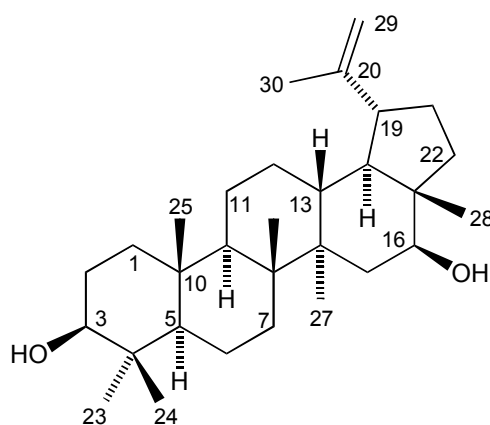
7.2.18 Calenduladiol (128) [50]

Sólido blanco (4 mg)

Rf 0.21 (Hex:(CH₃)₂CO, 4:1)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz); \perp , (multiplicidad, J (Hz), asignación): \perp 4.70 (d, $J = 2.5$ Hz, H-29a), 4.59 (sext, $J = 1.5$ Hz, H-29b), 3.60 (dd, $J = 5.0, 11.5$ Hz, H-16 \perp), 3.18 (dd, $J = 5.0, 11.5$ Hz, H-3 \perp), 2.49 (dt, $J = 11.0, 5.5$ Hz, H-19 \perp), 1.68 (s, H-30), 1.03 (s, H₃-27), 0.99 (s, H₃-25), 0.97 (s, H₃-23), 0.82 (s, H₃-26), 0.79 (s, H₃-24), 0.76 (s, H₃-28)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz); \perp , asignación: \perp 149.96 (C-20), 109.78 (C-29), 78.96 (C-3), 55.35 (C-5), 50.04 (C-9), 47.75 (C-18), 47.61 (C-19), 48.61 (C-17), 44.10 (C-14), 40.96 (C-8), 37.73 (C-22), 38.88 (C-4), 38.77 (C-1), 37.29 (C-13), 37.14 (C-10), 77.12 (C-16), 34.27 (C-7), 29.93 (C-21), 27.40 (C-2), 27.99 (C-23), 36.94 (C-15), 24.81 (C-12), 20.89 (C-11), 19.34 (C-30), 18.31 (C-6), 11.68 (C-28), 16.19 (C-25), 16.12 (C-26), 15.35 (C-24), 16.01 (C-27)



128

7.2.19 Germanicol:Lupeol (2:1) (129:127) [51]

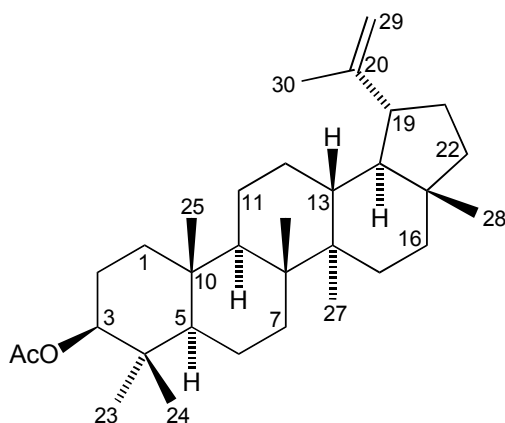
Sólido blanco (66 mg) fue sometido al proceso de acetilación convencional con piridina y anhídrido acético por 6 h a temperatura ambiente.

Rf 0.46 (Hex:(CH_3)₂CO, 4:1)

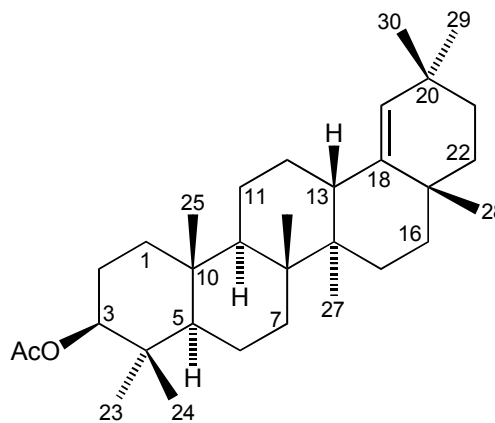
RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz); \perp , (multiplicidad, J (Hz), asignación): Germanicol: \perp 4.86 (s, H-19), 4.47 (dd, $J = 5.0, 10.0$ Hz, H-3 \perp), 2.27 (dsext, $J = 9.9, 1.5$ Hz, H-13 \perp), 2.04 (s, CH_3COO), 1.07 (s, H₃-26), 1.01 (s, H₃-28), 0.94 (s, H₃-29), 0.93 (s, H₃-30), 0.85 (s, H₃-25), 0.84 (s, H₃-24), 0.83 (s, H₃-23), 0.73 (s, H₃-27). Lupeol: \perp 4.68 (d, $J = 2.4$ Hz, H-29a), 4.54 (sext, $J = 1.5$ Hz, H-29b), 4.49 (dd, $J = 5.4, 9.3$ Hz, H-3 \perp), 2.37 (td, $J = 5.7, 10.8$ Hz, H-19 \perp), 2.04 (s, CH_3COO), 1.68 (t, $J = 0.6$ Hz, H-30), 1.03 (s, H₃-27), 0.90 (s, H₃-25), 0.85 (s, H₃-23), 0.84 (s, H₃-26), 0.83 (s, H₃-24), 0.78 (s, H₃-28)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz); \perp , asignación: Germanicol: \perp 170.99 (AcO), 142.67 (C-18), 129.76 (C-19), 80.96 (C-3), 55.58 (C-5), 51.14 (C-9), 43.33 (C-14), 40.78 (C8), 38.39 (C-4), 37.82 (C-1), 37.37

(C-16), 37.15 (C-22), 37.08 (C-10), 34.34 (C-7), 34.21 (C-17), 32.36 (C-21), 31.32 (C-20), 29.84 (C-29), 29.18 (C-30), 27.91 (C-23), 27.51 (C-15), 26.18 (C-2), 25.25 (C-28), 23.70 (C-12), 21.30 (AcO), 21.12 (C-11), 18.20 (C-6), 16.75 (C-26), 16.51 (C-25), 16.08 (C-24), 14.52 (C-27). Lupeol: \perp 170.99 (AcO), 150.95 (C-20), 109.34 (C-29), 80.96 (C-3), 55.39 (C-5), 50.35 (C-9), 48.29 (C-18), 48.00 (C-19), 42.98 (C-17), 42.83 (C-14), 40.85 (C-8), 39.99 (C-22), 38.62 (C-4), 38.04 (C-1), 37.69 (C-13), 35.56 (C-10), 34.53 (C-16), 33.33 (C-7), 29.69 (C-21), 27.91 (C-23), 27.43 (C-2), 25.10 (C-15), 23.70 (C-12), 21.30 (AcO), 20.93 (C-11), 19.27 (C-30), 18.15 (C-6), 17.99 (C-28), 16.51 (C-25), 16.17 (C-26), 15.97 (C-24), 14.49 (C-27).



127



129

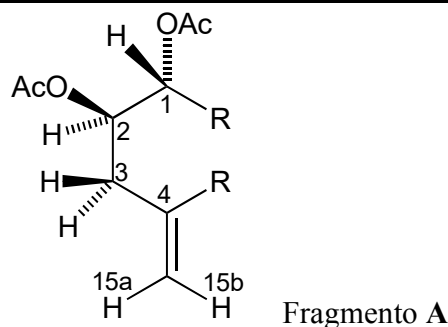
7.3 Determinación estructural de los compuestos de *J. neopauciflora*

7.3.1 (1*R*,2*R*)-Diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132)

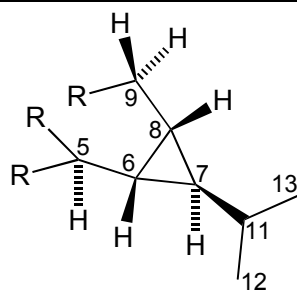
En el espectro de masas de alta resolución, en la modalidad FAB, se observa un ion molecular de 321.2074 *uma*, el cual indica la fórmula molecular $C_{19}H_{29}O_4$ ($[M + H]^+$) que corresponde a seis insaturaciones y puede atribuirse a un sesquiterpeno esterificado. La presencia de un sesquiterpenoide queda evidenciada por las 19 señales observables en el espectro de RMN ^{13}C (espectro **23**), las cuales corresponden, según el experimento DEPT (espectro **24**), a siete carbonos metínicos (dos geminales a éster), tres metilenos (uno vinílico exocíclico), cinco metilos (dos de acetoxilo y dos de isopropilo) y cuatro carbonos cuaternarios (dos carbonilos de acetoxilo y uno vinílico). Por otra parte, en el espectro de IR (espectro **25**) se observan bandas de absorción en 1746 para carbonilo de acetoxilo, en 1650, 1040 y 905 para función olefínica; y en 3076, 3017 y 1650 cm^{-1} para ciclopropano. Adicionalmente, en el espectro de RMN 1H (espectro **26**) se observan señales

para hidrógenos geminales a acetoxilo, metilos de acetoxilo, hidrógenos vinílicos, hidrógenos alílicos, y en la región de campo alto se observa una señal característica de un protón de anillo de ciclopropano. La información espectroscópica y espectrométrica descrita antes, permite inferir la presencia de un sesquiterpeno tricíclico de tipo 6,8-cicloeudesmano [54a].

Así, en el espectro de protón se observan dos señales triples resonantes en δ 4.89 y en δ 4.86 con constantes de acoplamiento *gem* vinilo (2.0 Hz), las cuales permiten establecer la presencia de un metileno vinílico exocíclico (H15a y H15b, respectivamente). En el experimento COSY (espectro **27**) se observa que los hidrógenos vinílicos correlacionan con un doblete de doblete de dobletes ($J = 12.5, 5.0, 1.0$) resonante en δ 2.63, cuyo desplazamiento químico y constante de acoplamiento de 1.5 Hz permiten asignarlo a un hidrógeno alílico (H3 \perp) acoplado a cuatro ligaduras con los hidrógenos vinílicos (H15a y H15b). Además, se observa que la señal atribuida a H3 \perp correlaciona $^1\text{H}-^1\text{H}$ con un doblete de doblete de tripletes ($J = 13.0, 11.0, 1.5$) que resuena en δ 2.46, el cual fue asignado al hidrógeno alílico H3 \perp que se encuentra geminal a H3 \perp según las correlaciones heteronucleares (espectro HSQC, **28**) con el carbono metileno que resuena en δ 36.46. Por otro lado, en el espectro COSY se observa que las señales resonantes en δ 2.63 y 2.46 correlacionan con el doblete de doblete de dobletes ($J = 10.5, 10.5, 5.5$, Hz) de un hidrógeno (H2 \perp) desplazado hacia la zona de hidrógenos geminales a ésteres (δ 4.84) cuyas constantes de acoplamiento sugieren una orientación *transdiaxial* al hidrógeno resonante en δ 2.46 ($J = 11.0$ Hz) y un acoplamiento *axial-ecuatorial* con el hidrógeno que resuena en δ 2.63 ($J = 5.0$ Hz). El hidrógeno (H2 \perp) que resuena en δ 4.84 correlaciona COSY con una señal doble ($J = 10.5$ Hz) ubicada en δ 5.38, también atribuida a un hidrógeno geminal a éster (H1 \perp). La multiplicidad y el valor de la constante de acoplamiento (10.5 Hz) exhibidas por H1 \perp sugieren un acoplamiento *transdiaxial* al hidrógeno que resuena en δ 4.84. Los hidrógenos H1 \perp y H2 \perp se encuentran geminales a acetoxilos, según las correlaciones (espectro HMBC, **29**) que exhibieron con los carbonilos C1' (δ 171.1) y C1'' (δ 170.3), respectivamente, los que a su vez correlacionaron con los metilos resonantes en δ 2.06 (H2') y 2.01 (H2''). La información descrita previamente permite deducir el fragmento **A**, cuya conectividad se confirma por las correlaciones 3J observadas en el experimento HMBC, entre H1 \perp (δ 5.38) y el carbono C3 (δ 36.5) y el carbonilo C1' del acetoxilo (δ 171.1), entre H3 \perp (δ 2.46) y H3 \perp (δ 2.63) y el carbono vinílico C15 (δ 114.4).

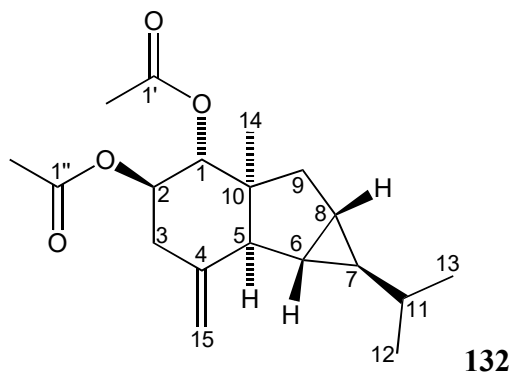


Por otra parte, en el espectro de RMN ^1H se observa una señal doble en $\perp 1.95$ ($J = 3.5$ Hz, H5 \perp), la cual correlaciona ^1H - ^1H con una señal doble de triples (H6 \perp) que resuena en $\perp 1.18$ ($J = 3.5, 7.5$ Hz), cuya constante de acoplamiento de 3.5 Hz confirma el acoplamiento con H5 \perp . Asimismo, la señal en $\perp 1.18$ correlaciona con una señal doble de triples ($J = 3.0, 7.5$ Hz) que resuena en $\perp 0.55$ (H7 \perp) y con un multiplete resonante en $\perp 1.33$ (H8 \perp). Por otra parte, H8 \perp correlaciona, en el espectro COSY, con una señal doble de dobles (H9 \perp , $J = 13.5, 6.5$ Hz) que resuena en $\perp 1.88$ y con un multiplete resonante en $\perp 0.90$ (H9 \perp). Por otro lado, el desplazamiento químico a campo alto del hidrógeno que resuena en $\perp 0.55$ (H7 \perp), sus correlaciones COSY con H6 \perp y H8 \perp , así como la multiplicidad y los valores de las constantes de acoplamiento observados, $J_{7\perp,6\perp} = 3.5$ Hz y $J_{6\perp,8\perp} = 7.5$ Hz, establecen la presencia de un ciclopropano (fragmento **B**). Adicionalmente, H7 \perp correlacionó ^1H - ^1H con un multiplete centrado en $\perp 0.90$ donde también resuenan dos metilos sin multiplicidad definida, pero deducibles del experimento HSQC (espectro **28**); es decir, el carbono metínico que resuena en $\perp 32.1$ (C11) y los metilos que resuenan en $\perp 21.8$ (C13) y $\perp 21.6$ (C12) correlacionan con la señal múltiple en $\perp 0.90$. Con base en la información observada en el experimento HSQC y en el espectro de masas (pérdidas consecutivas de $m/e = 43$ de los 2 acetoxilos y del isopropilo), se establece que los hidrógenos que resuenan en la región de $\perp 0.90$ corresponden a un fragmento de isopropilo. Lo descrito antes permite establecer el fragmento **B**, cuya conectividad quedó confirmada con el experimento HMBC, en el cual se observaron correlaciones 3J entre H5 \perp ($\perp 1.95$) y los carbonos C6 ($\perp 31.2$) y C7 ($\perp 47.9$); correlaciones de H9 \perp ($\perp 1.88$) con C8 ($\perp 24.6$), C6 ($\perp 31.2$), C7 ($\perp 47.9$), y correlaciones de H7 \perp con C5 ($\perp 60.5$), C9 ($\perp 42.3$), C11 ($\perp 32.1$), C12 ($\perp 21.6$) y C13 ($\perp 21.8$).

Fragmento **B**

Las orientaciones relativas de los hidrógenos del fragmento **B** fueron deducidas del experimento NOESY (espectro **30**), tal como será discutido más adelante, y no mediante el criterio establecido en la ecuación de Karplus, ya que no es directamente aplicable a anillos de ciclopropano.

Por otra parte, en el espectro HMBC se observó que los hidrógenos H9 \perp (\perp 1.88) y H3 \perp (\perp 2.46) correlacionaron 3J con C1 (\perp 75.4) y con el carbono cuaternario C10 (\perp 58.4), lo cual permite deducir que el carbono C1 del fragmento **A** está unido al fragmento **B** a través del carbono cuaternario C10. Así también, H5 \perp (\perp 1.95) correlacionó 3J con los carbonos C1 (\perp 75.4), C9 (\perp 42.3), C7 (\perp 47.9), C10 (\perp 58.4), C4 (\perp 141.5), C15 (\perp 114.4) y adicionalmente con el carbono de un metilo (C14, \perp 17.9) el cual mostró una correlación cruzada con C10. La información espectroscópica y espectrométrica descrita anteriormente permite establecer la presencia de un sesquiterpeno de tipo cicloaxano (**132**).

**132**

La conectividad del sistema ciclopentano-ciclopropano se confirmó con el experimento HMBC, en el cual se observaron correlaciones 3J del H5 \perp (\perp 1.90) con los carbonos C6 (\perp 31.2) y C7 (\perp 47.9); correlaciones de H9 \perp (\perp 1.88) con C8 (\perp 24.6), C6 (\perp 31.2), C7 (\perp 47.9) y correlaciones de H7 \perp con C5 (\perp 60.5) y C9 (\perp 42.3). Adicionalmente, se realizó el experimento de desacoplamiento homonuclear de núcleos selectos de hidrógeno para confirmar inambiguamente la conectividad del sistema ciclopentano-ciclopropano (figuras **37** y **38**). El desacoplamiento espín

nuclear de H6 \perp generó un singlete para H5 \perp , un doblete de dobletes para H7 \perp , y un doblete de doblete de dobletes para H8 \perp (figura 37). Similarmente, la irradiación de H5 \perp generó que H6 \perp resonara como un doblete de dobletes.

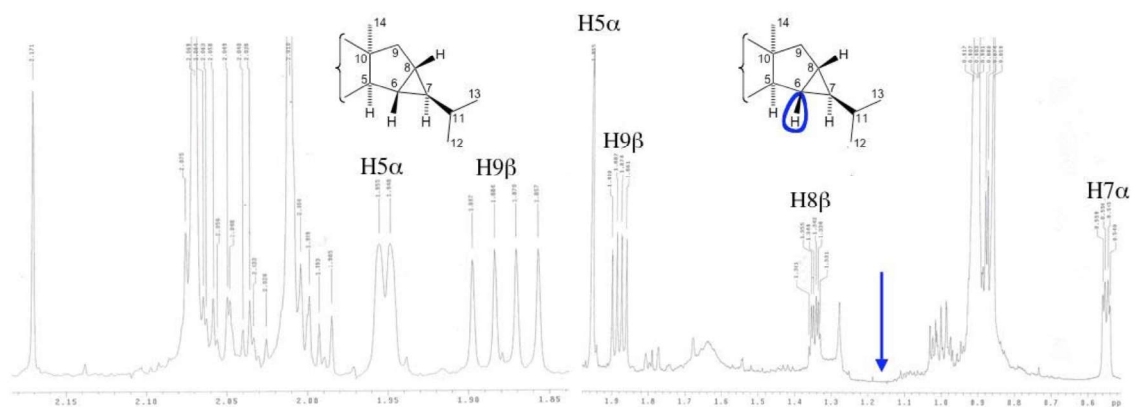


Figura 37. Desacoplamiento homonuclear de ^1H . Irradiación de H6 \perp (\perp 1.18).

Por otro lado, la irradiación de H7 \perp generó un doblete de dobletes para H6 \perp y un doblete de doblete de dobletes para H8 \perp . Además, la irradiación de H8 \perp generó un doblete de dobletes para H7 \perp , un doblete de dobletes para H6 \perp y un doblete para H9 \perp (figura 39).

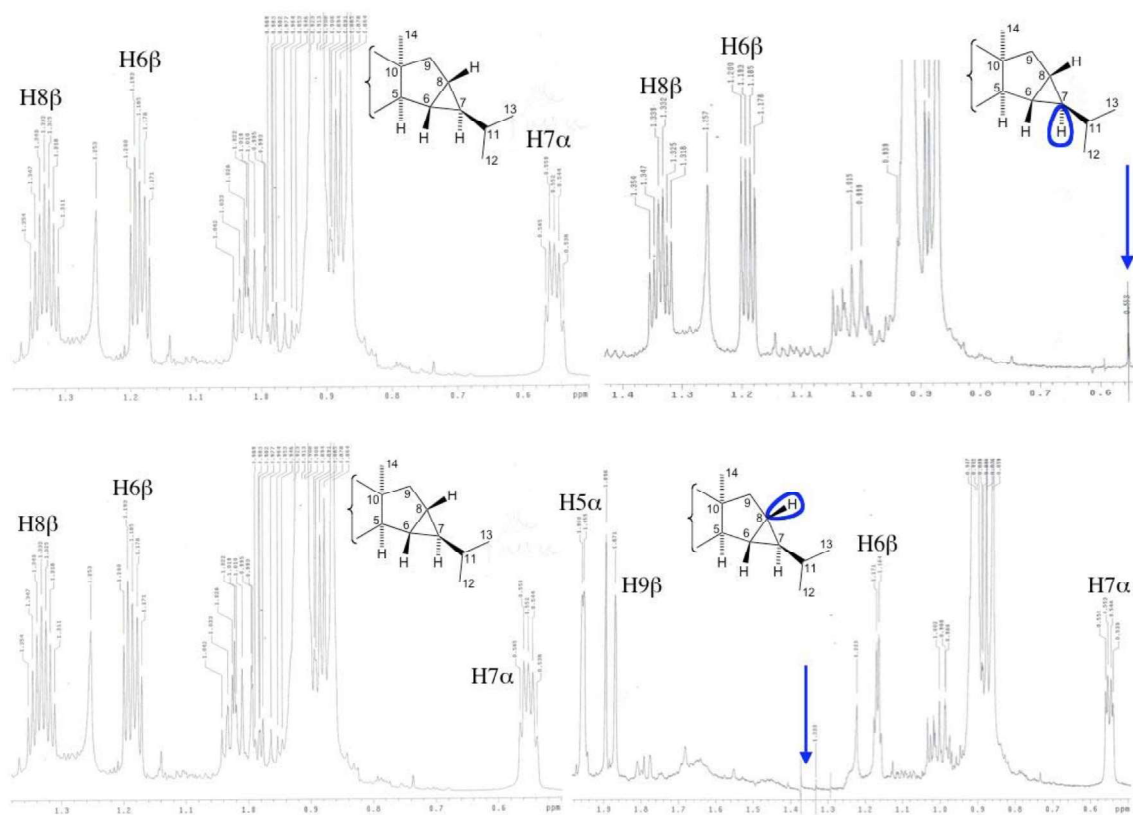


Figura 38. Desacoplamiento homonuclear de ^1H . Irradiación de H7 \perp (\perp 0.55) y H8 \perp (\perp 1.33).

Por otra parte, la configuración relativa mostrada en **132** se dedujo de las interacciones espaciales observadas en el espectro NOESY (espectro **30**), entre H1 \perp y H3 \perp , H9 \perp , H6 \perp , H8 \perp por un lado; y por el otro, H6 \perp y H8 \perp interaccionaron con H11 del isopropilo con orientación \perp . Adicionalmente, se observaron interacciones espaciales importantes entre H5 \perp y H7 \perp y el metilo 14 orientado \perp ; asimismo, el metilo 14 interaccionó con H2 \perp , lo cual permitió establecer la fusión *cis* del anillo perhidroindano. La configuración relativa deducida del experimento NOESY quedó avalada inambiguamente por los resultados observables en el experimento NOE diferencial, en el cual se puede establecer la orientación espacial de los hidrógenos interactuantes mediante irradiación selectiva. Así, la irradiación del doblete producido por H1 \perp permitió observar que las señales atribuidas a H3 \perp , H6 \perp , H8 \perp y H9 \perp experimentaron una interacción NOE importante indicando que se encuentran hacia la cara \perp del triciclo (figura **39**).

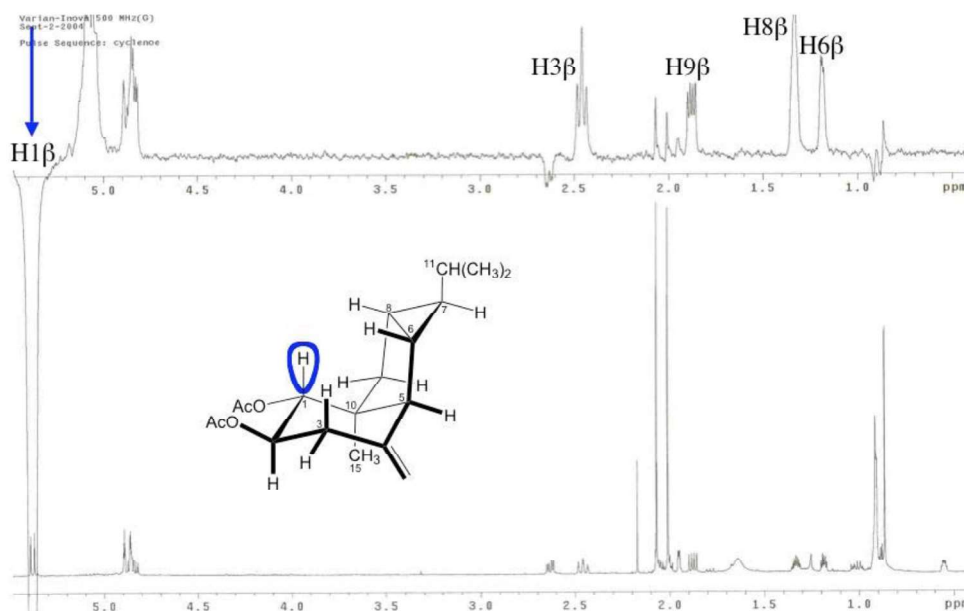


Figura **39**. NOE diferencial. Irradiación de H1 \perp (\perp 5.38).

Adicionalmente, la irradiación del doblete producido por H5 \perp permitió observar interacciones NOE con las señales de H7 \perp , H₃-14 \perp , así como uno de los hidrógenos vinílicos (H15b) (figura **40**).

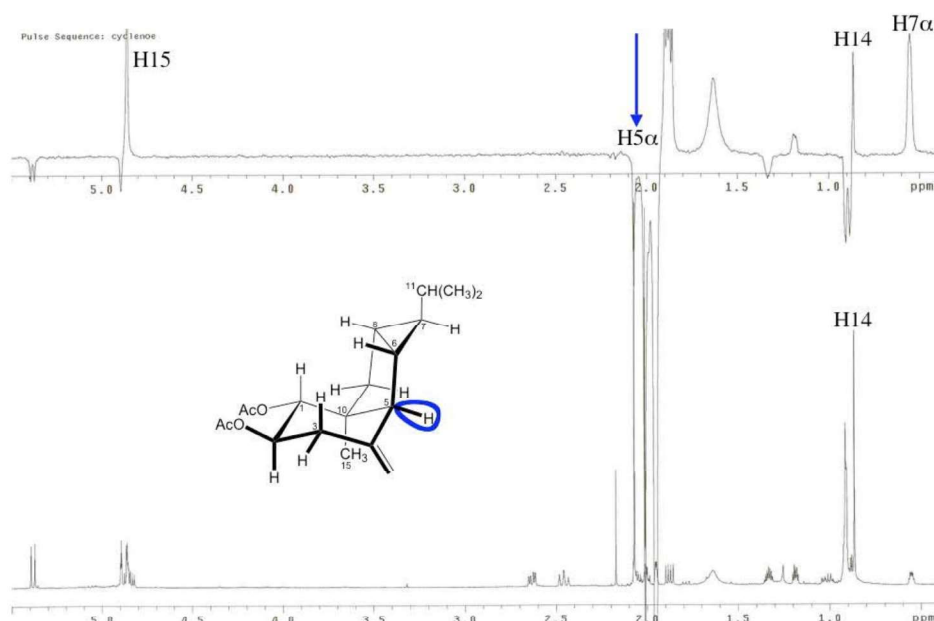


Figura 40. NOE diferencial. Irradiación de H5 α (\perp 1.95).

De esta manera puede establecerse que el arreglo conformacional en solución preferido por **132** es el que se muestra en la figura 41.

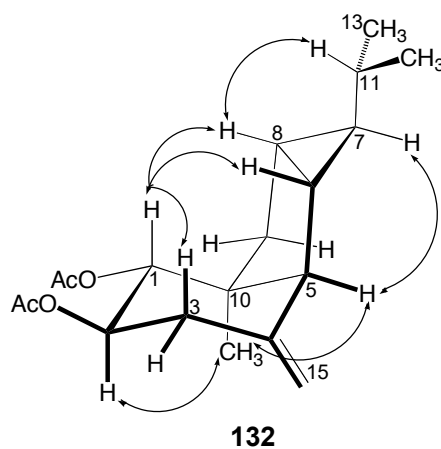


Figura 41: Interacciones NOESY relevantes en **132**.

La información descrita permitió establecer que el sesquiterpeno tricíclico de tipo cicloaxeno presentaba una fusión *cis* del esqueleto perhidroindano, lo cual contrasta con la fusión *trans* informada, hasta la fecha, para los 6,8-cicloeudesmanos mostrados en la figura 42 [54].

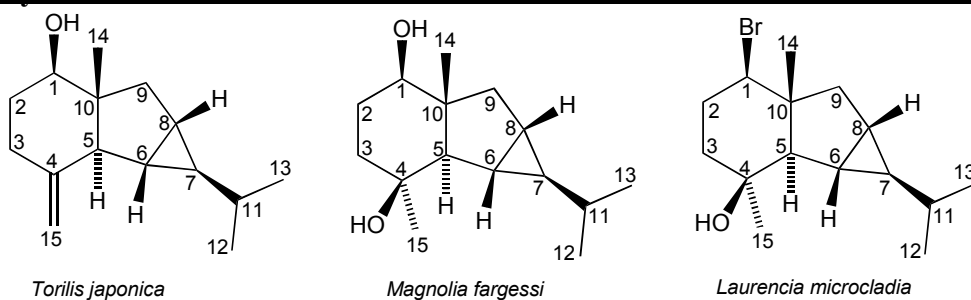


Figura 42. Sesquiterpenos de tipo 6,8-cicloeuodesmano.

Los informes bibliográficos, permitieron encontrar la discusión estructural de los tres sesquiterpenos mostrados en la figura 42, los cuales fueron aislados de las plantas superiores *Torilis japonica* [54a] y *Magnolia fargessi* [54b] y de las algas marinas *Laurencia microcladia* [54c]. La presencia de dichos sesquiterpenos proporciona evidencia de su limitada existencia en la naturaleza; no obstante, se han encaminado investigaciones tendientes a explicar el origen biogénico de este tipo de sesquiterpenos tricíclicos. Yamamura y colaboradores [55] informaron sobre la conversión de (-)-epoxigermacreno D, en presencia de alúmina, en el sesquiterpeno tricíclico aislado de *Torilis japonica*; luego, mediante oxidación con el reactivo de Jones se obtuvo la correspondiente cetona caracterizada mediante difracción de rayos X (figura 43). El análisis cristalográfico confirmó la configuración relativa mostrada para dicho sesquiterpeno.

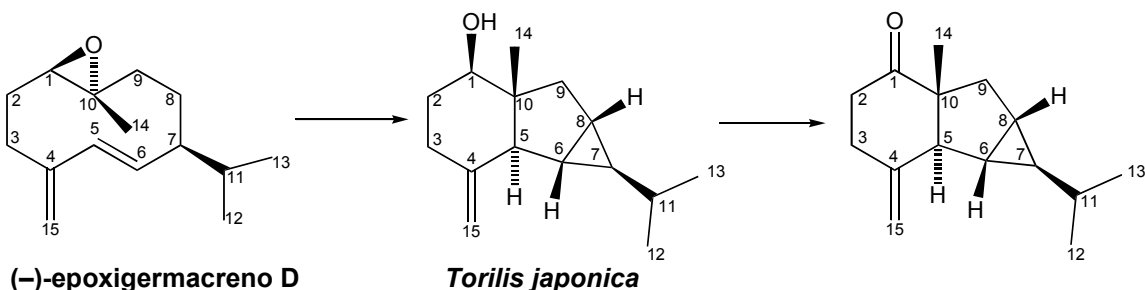
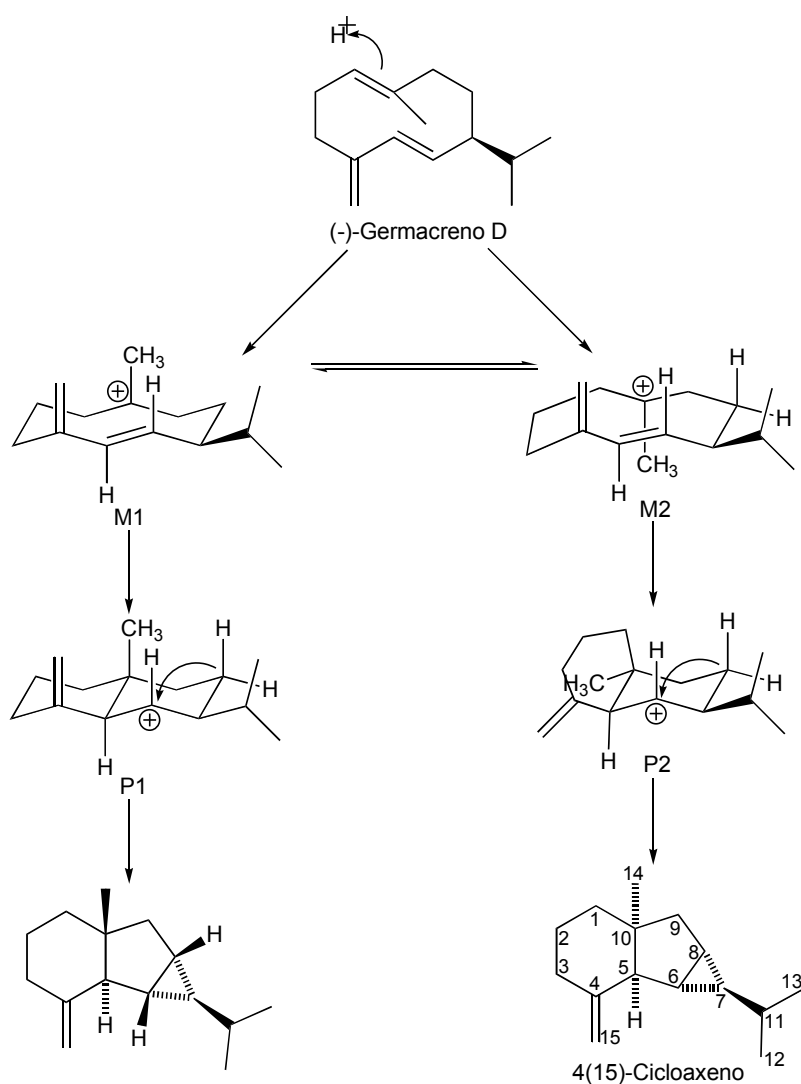


Figura 43. Transformación de (-)-epoxigermacreno D.

Por otra parte, recientemente König y Bülow [5] informaron sobre el origen biogénico de este y otros tipos de sesquiterpenos, usando (-)-germacreno D como el posible precursor. Los resultados informados por König y Bülow tienen sustento por la evidencia experimental derivada de las trasposiciones inducidas en el (-)-germacreno D mediante reacciones térmicas, fotoquímicas o catalizadas por ácido. Es a partir de las reacciones catalizadas por ácido que König y Bülow proponen una ruta biogénica hacia la formación de los sesquiterpenos tricíclicos con fusión *trans* del esqueleto perhidroindano; pero además, dan evidencia de la formación de sesquiterpenos

tricíclicos con fusión *cis* del esqueleto perhidroindano a los cuales denominaron sesquiterpenos de tipo 4(15)-cicloaxeno (esquema 1).

De acuerdo con el diagrama de biosíntesis propuesto por König y Bülow en el esquema 1, se sugiere que el (-)-germacreno D es protonado para generar el catión M1, el cual puede interconvertirse al catión M2 mediante rotación de los enlaces C1–C10–C9. Es a partir del catión M2 que se forma el catión P2, el cual da origen a la fusión *cis* del esqueleto de indano, es decir, a la formación del sesquiterpeno de tipo 4(15)-cicloaxeno. Las observaciones derivadas del trabajo de König y Bülow representan el primer informe sobre un sesquiterpeno de tipo 6,8-cicloeudesmano de origen sintético, el cual posee fusión *cis* del esqueleto perhidroindano.



Esquema 1. Propuesta biogénica para los sesquiterpenos de tipo 6,8-cicloeudesmano [5].

Retomando la elucidación estructural de **132**, su configuración absoluta *1R,2R* se establece por analogía con la configuración absoluta determinada para **133** (véase discusión estructural de **133**), ya que ambas moléculas poseen el mismo esqueleto, la misma configuración relativa, el mismo signo de rotación óptica, y el derivado acetilado de **133** exhibió las mismas propiedades físicas que las descritas para el producto natural **132**.

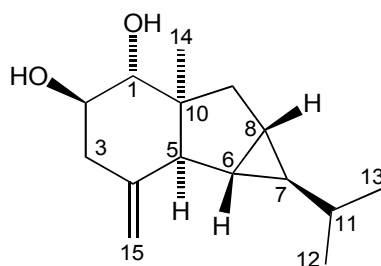
7.3.2 (1*R*,2*R*)-Dihidroxi-4(15)-cicloaxeno (133)

En el espectro de masas de alta resolución, modalidad FAB, se observa un ion molecular de 237.1848 *uma* del cual se deduce la fórmula molecular C₁₅H₂₅O₂ ([M + H]⁺) que indica cuatro insaturaciones. En el espectro de RMN ¹³C (espectro **31**) se observa la presencia de 15 señales, de las cuales siete son metinos (dos geminales a hidroxilo), tres son metilenos (uno de metileno vinílico exocíclico), tres son metilos (dos de isopropilo) y dos son cuaternarios (uno vinílico), según lo observable en el experimento DEPT. En el espectro de infrarrojo se observan bandas de absorción en 3379 para hidroxilo, en 1647 y 1048 para ligadura doble y en 3073, 3010 y 1647 *cm*⁻¹ para anillo de ciclopropano. En el espectro de RMN ¹H (espectro **32**) se observan señales características de protones vinílicos, protones geminales a hidroxilo, protones de isopropilo y protones de un anillo de ciclopropano. La información deducida de los espectros de masas, IR, RMN ¹H, ¹³C y DEPT y la comparación con los datos espectroscópicos descritos para **132**, permite inferir sobre la presencia de un sesquiterpeno de tipo 4(15)-cicloaxeno que en adición a la función olefinica satisface las cuatro insaturaciones deducidas del espectro de masas.

Las bandas de absorción en el IR proporcionan evidencia de la ausencia de carbonilos de ésteres en el compuesto **133**, lo que aunado al análisis del espectro de RMN ¹H confirma la presencia de dos hidroxilos. En el espectro de RMN ¹H se observan señales características de dos hidrógenos geminales a hidroxilos resonantes en δ 3.63 (d, *J* = 9.5 Hz, H1 \perp) y δ 3.47 (ddd, *J* = 4.5, 9.5, 11.0 Hz, H2 \perp). La multiplicidad y constantes de acoplamiento de H1 \perp y H2 \perp indican acoplamientos *trans*diaxiales con H2 \perp y H3 \perp (ddt, *J* = 13.5, 11.5, 1.5 Hz, δ 2.36) y *axial-ecuatorial* (*J* = 5.0 Hz) con H3 \perp (ddd, *J* = 13.0, 5.0, 1.5 Hz, δ 2.48). H3 \perp y H3 \perp mostraron correlaciones COSY (espectro **33**) y HMBC con dos hidrógenos vinílicos homotópicos resonantes en δ 4.78 (d, *J* = 1.5 Hz, H15a y H15b); es decir, H3 \perp (δ 2.36) y H3 \perp (δ 2.48) correlacionaron con el carbono vinílico C15 (δ 112.6) [véase fragmento **A** de **132**]. Asimismo, en el espectro de RMN ¹H se observa una señal doble en δ 1.90 (*J* = 3.0 Hz, H5 \perp), dos señales dobles de triples en δ 1.06 (*J* =

3.0, 7.0 Hz, H6 \perp) y \perp 0.41 ($J = 9.0, 3.0$ Hz, H7 \perp) y un multiplete centrado en \perp 1.10 (H8 \perp), las cuales mostraron correlaciones COSY entre sí indicando la presencia del sistema ciclopentano-ciclopropano exhibido por **132**. Lo anterior queda sustentado por el desplazamiento químico a campo alto de H7 \perp y los valores de las constantes de acoplamiento observados, $J_{7\perp,6\perp; 7\perp,8\perp} = 3.0$ Hz y $J_{6\perp,8\perp} = 7.0$ Hz, al igual que en **132** (véase fragmento **B** de **132**). Adicionalmente, H7 \perp mostró correlaciones $^1\text{H}-^1\text{H}$ y HMBC con el fragmento isopropilo resonantes en \perp 0.74 (H-11), 0.92 (s, H₃-12) y 0.93 (s, H₃-13).

Por otra parte, en el espectro HMBC se observa que H9 \perp (\perp 2.45) y H3 \perp (\perp 2.36) correlacionan 3J con los carbonos C1 (\perp 77.7) y C10 (\perp 58.6), lo que establece la unión del fragmento **A** con el fragmento **B** a través del carbono cuaternario C10. Así también, H5 \perp (\perp 1.9) correlaciona 3J con los carbonos C1 (\perp 77.7), C9 (\perp 42.7), C10 (\perp 58.6), C4 (\perp 144.8), C15 (\perp 112.6) y adicionalmente con el carbono de un metilo (C14, \perp 17.8) que se encuentra unido al carbono cuaternario C10, lo que permite unir los fragmentos **A** y **B** para formar el sesquiterpeno **133**, un análogo estructural de **132**.

**133**

La configuración relativa mostrada en **133** se dedujo de las interacciones espaciales relevantes, observadas en el espectro NOESY (espectro **34**), entre H1 \perp y H3 \perp , H9 \perp , H6 \perp , H8 \perp por un lado; y por el otro, H6 \perp y H8 \perp interaccionan con H11 del fragmento de isopropilo lo que permite orientarlo \perp . Adicionalmente, se observan interacciones espaciales importantes entre H5 \perp y H7 \perp y el metilo 14 orientado \perp ; asimismo, H₃-14 interacciona con H2 \perp . La información deducida del espectro NOESY permite establecer que el arreglo conformacional en solución preferido por **133** es igual al establecido para **132** (figura 44).

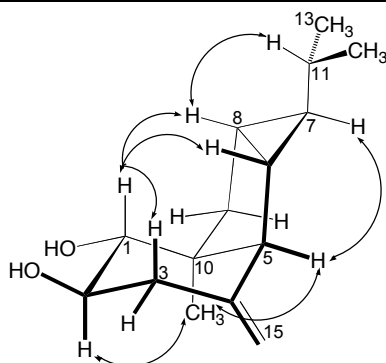


Figura 44. Interacciones NOESY relevantes para **133**.

Considerando que **133** es un análogo estructural de **132**, entonces se decidió preparar el derivado acetilado mediante reacción con anhídrido acético y piridina anhidra. El derivado acetilado exhibió las mismas propiedades físicas descritas para **132**.

Tanto **132** como **133** poseen el mismo esqueleto y la misma configuración relativa, lo que permite inferir que **133** es el precursor biogénico de **132**. Ahora bien, considerando que **133** posee dos hidroxilos secundarios, se decidió aplicar el método de la quiralidad del excitón del 1,2-dibenzoato [17, 18, 23] con el objetivo de establecer la configuración absoluta de **133**. Así, **133** fue sometido a la reacción de esterificación con el cloruro de *trans*-cinamoílo en piridina anhidra hasta la obtención del derivado **133a** (figura 45).

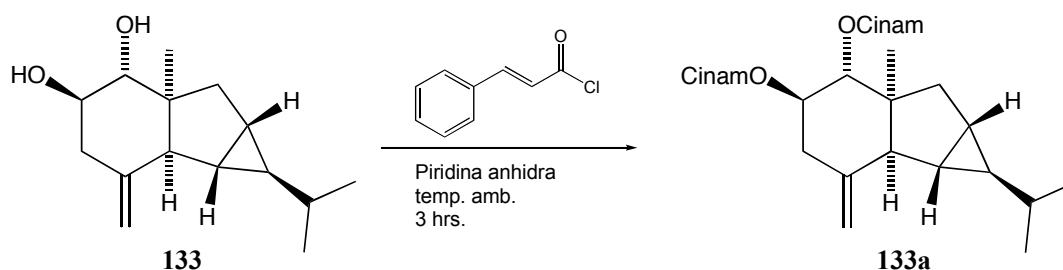


Figura 45. Derivatización química de **133**.

El grupo cromóforo elegido fue el cloruro de *trans*-cinamoílo, ya que el enlace doble \perp, \perp al carbonilo permite que ambos hidroxilos sean esterificados; lo cual no ocurre cuando se usa el cloruro de benzoílo pues el impedimento estérico que origina el grupo benzoato al reaccionar con el alcohol de la posición 2 desfavorece que se esterifique el alcohol de la posición 1. Por otra parte, el efecto Cotton esperado para **133a** exhibirá un alargamiento de la longitud de onda máxima (ca. 297 nm) debida a la banda de transferencia de carga intramolecular \perp, \perp^* del anillo aromático

conjugado a una ligadura doble *trans*. En el espectro de DC de **133a** (figura 46) se observa la curva característica de un efecto Cotton negativo con una longitud de onda máxima en 297 nm. La distancia intercromofórica es pequeña y ésta puede ser deducida debido a que la apertura de Davydov es grande; es decir, la distancia que separa los máximos de absorción entre 267 y 297 nm es inversamente proporcional a la distancia que separa los grupos cromóforos [22].

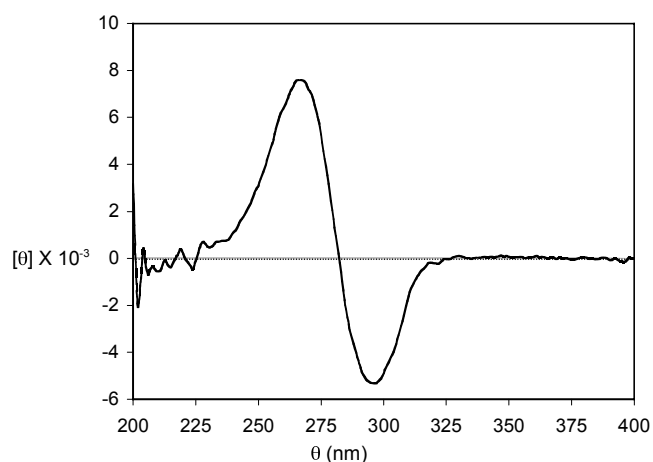


Figura 46. Espectro de dicroísmo circular de **133a**.

Así, el espectro de DC mostrado en la figura 46 proporciona evidencia de un acoplamiento dipolo eléctrico-dipolo eléctrico incrementado porque el ángulo diedro entre los grupos cromóforos es aproximado a 63.7° , siendo un valor muy cercano al ángulo de 70° en el que se alcanza el máximo acoplamiento entre los grupos cromóforos [22]. Así, el efecto Cotton negativo observado en la figura 46 indica que la orientación de los grupos cinamato constituyen una quiralidad negativa entre las transiciones eléctricas de ambos cinamatos y por consiguiente una configuración absoluta *1R,2R* para **133** con base en el método de la quiralidad del excitón acoplado (figura 47).

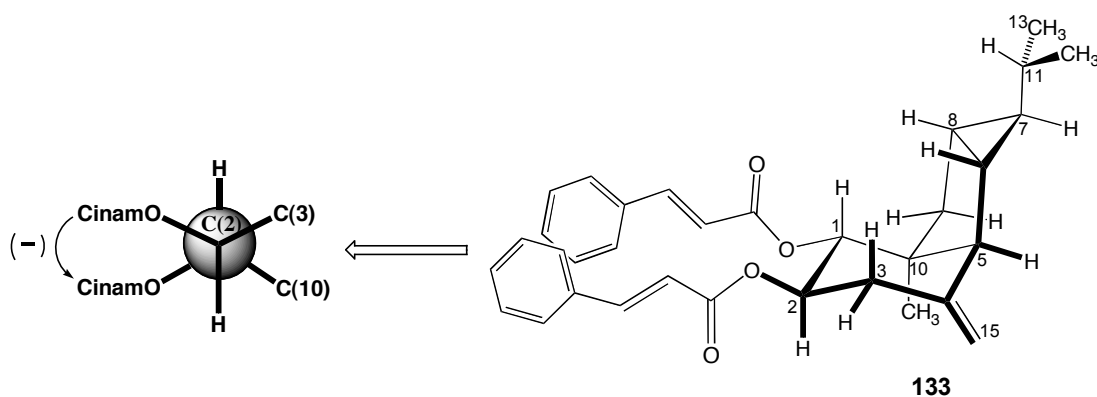
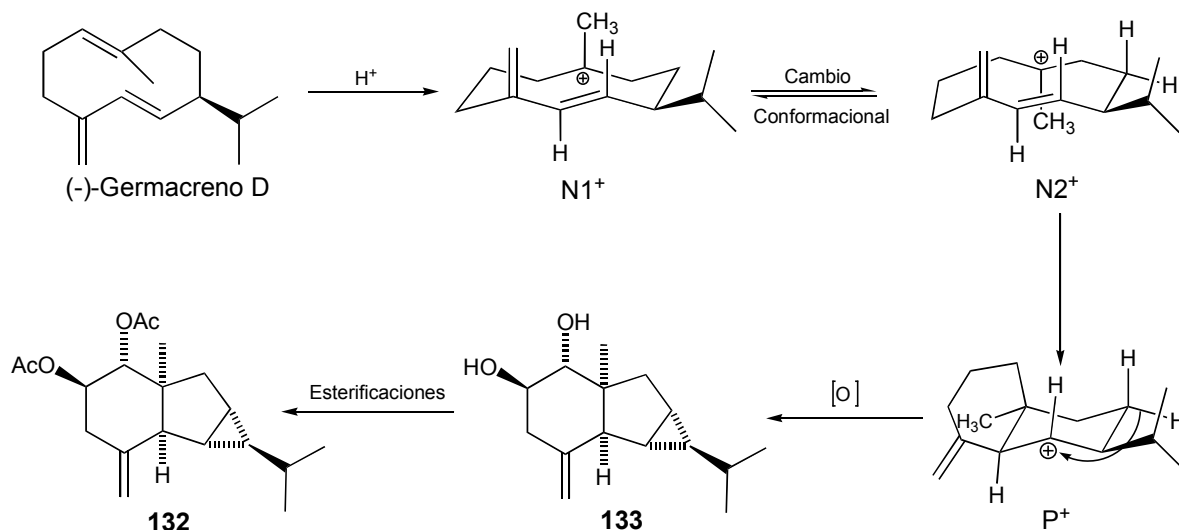


Figura 47. Método de la quiralidad del excitón del 1,2-dibenzoato de **133a**.

La biogénesis de **133** puede ser hipotetizada considerando la propuesta biogenética establecida por König y Bülow (esquema 1) [5], mediante dos oxidaciones sucesivas en el sesquiterpeno de tipo 4(15)-cicloaxeno. Adicionalmente puede hipotetizarse que mediante dos esterificaciones consecutivas, el sesquiterpeno **133** puede dar origen a **132** (esquema 2).



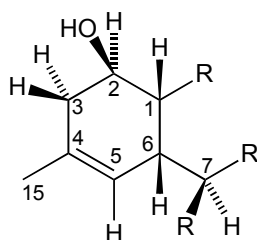
Esquema 2. Propuesta biogenética para la formación de **132** y **133**.

7.3.3 (2R)-L-Cadin-4-en-2,10-diol (**134**)

En el espectro de masas de alta resolución, modalidad FAB, se observa un ion molecular de 239.2030 *uma*, el cual indica la fórmula molecular $C_{15}H_{27}O_2$ ($[M + H]^+$) que integra para tres insaturaciones. En el espectro de RMN ^{13}C (espectro **35**) se observan 15 señales atribuibles, según lo observable en el experimento DEPT, a seis metinos (uno vinílico, uno geminal a hidroxilo, uno alílico), tres metilenos (uno alílico), cuatro metilos (uno vinílico, uno geminal a hidroxilo) y dos carbonos cuaternarios (uno geminal a hidroxilo). La información deducida del espectro de masas, aunado a la obtenida de los espectro de RMN ^{13}C , permiten inferir la presencia de un sesquiterpeno de tipo cadineno con una insaturación en alguno de los anillos de la decalina. En el espectro de infrarrojo (espectro **36**) se observan bandas de absorción en 3413 asignable a hidroxilo, y en 1673, 1460 y 1041 cm^{-1} asignables a olefina.

Por otra parte, en el espectro de RMN 1H (espectro **37**) se observan señales para hidrógeno vinílico, hidrógeno geminal a hidroxilo, hidrógenos alílicos, metilo vinílico, metilo geminal a hidroxilo y metilos característicos de un sistema isopropilo. Así, en el espectro de RMN 1H se observa un doblete de cuartetos ($J = 5.0, 2.0$ Hz) en $\delta 5.50$ correspondiente a un hidrógeno vinílico (H_5) acoplado (espectro COSY **38**) a cuatro enlaces con un metilo vinílico que resuena en $\delta 1.66$

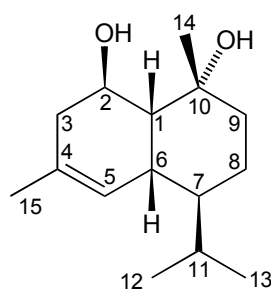
como una señal simple ancha y con un hidrógeno alílico que resuena en δ 2.55 (H6 \perp) como un doblete de doblete de dobletes ($J = 10.5, 5.5, 5.0$ Hz). La señal en δ 2.55 (H6 \perp) correlaciona en el experimento COSY con dos multipletes centrados en δ 1.61 (H1 \perp) y en δ 1.21 (H7 \perp), cuyas orientaciones relativas pueden ser deducidas de las constantes de acoplamiento de 5.0 y 10.5 Hz mostradas por H6 \perp . Esto indica un acoplamiento *pseudoaxial-pseudoaxial* con H1 \perp y un acoplamiento *transdiaxial* con H7 \perp , respectivamente. El hidrógeno que resuena en δ 1.61 (H1 \perp) correlaciona $^1\text{H}-^1\text{H}$ con un doblete de doblete de dobletes ($J = 10.5, 8.0, 6.5$ Hz) que resuena en δ 4.13 atribuida a un hidrógeno geminal a hidroxilo (H2 \perp), por su desplazamiento químico característico. Los valores de las constantes de acoplamientos que exhibió H2 \perp permiten establecer dos acoplamientos de tipo *axial-axial* ($J = 10.5, 8.0$ Hz) y uno *axial-ecuatorial* ($J = 6.5$ Hz), lo cual establece su orientación \perp relativa. El hidrógeno que resuena en δ 4.13 correlaciona $^1\text{H}-^1\text{H}$ con un doblete de dobletes ($J = 17.5, 6.5$ Hz) en δ 2.43 atribuible al hidrógeno alílico H3 \perp , que a su vez correlaciona con su hidrógeno geminal H3 \perp (δ 1.93). De esta manera, es posible establecer el fragmento C cuya conectividad queda confirmada mediante el análisis del experimento HMBC (espectro 39), en el cual se observa que el hidrógeno vinílico (H5) correlaciona con los carbonos C1 (δ 52.3), C3 (δ 42.7), C6 (δ 36.7) y C15 (δ 22.9). Además, el hidrógeno alílico H3 \perp correlaciona con los carbonos C4 (δ 131.1), C5 (δ 125.1), C2 (δ 67.3), C1 (δ 52.3) y C15 (δ 22.9), y el hidrógeno alílico H6 \perp presenta correlaciones con los carbonos C4 (δ 131.1), C5 (δ 125.1), C2 (δ 67.3), C1 (δ 52.3) y C7 (δ 44.2).



Fragmento C

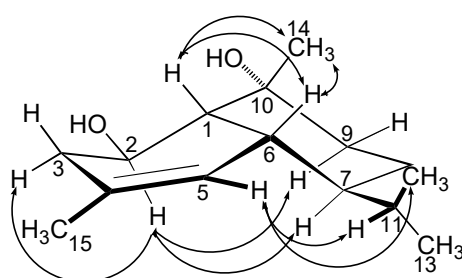
Por otro lado, el hidrógeno que resuena en δ 1.21 (H7 \perp) correlaciona $^1\text{H}-^1\text{H}$ con un hidrógeno que resuena en δ 1.90 (H11) como un multiplete atribuible al metino de isopropilo, pues éste presenta correlaciones $^1\text{H}-^1\text{H}$ con dos señales dobles ($J = 6.5$ Hz) que resuenan en δ 0.87 (H₃-13) y en δ 0.82 (H₃-12). Adicionalmente, se observan correlaciones $^1\text{H}-^1\text{H}$ del hidrógeno que resuena en δ 1.21 (H7 \perp) con un multiplete centrado en δ 1.42 (H8), que a su vez correlaciona con otro multiplete centrado en δ 1.60 (H9). Las señales que resuenan en δ 1.42 y en δ 1.60 corresponden a

dos metilenos (C8, Δ 19.68 y C9, Δ 35.04) según las correlaciones observables en el espectro HSQC (espectro 40). Por otra parte, en el espectro de RMN ^1H se observa una señal simple en Δ 1.45 que integra para tres hidrógenos, y que por su desplazamiento químico corresponde a un metilo que se encuentra geminal a un hidroxilo (H_3 -14), que a su vez muestra correlaciones a larga distancia 3J con los carbonos C-1 (Δ 52.3), C-10 (Δ 72.4) y C-9 (Δ 35.1). La integración de la información espectroscópica y espectrométrica descrita, permite extender el fragmento C hasta la estructura 134, la cual corresponde a un sesquiterpeno de tipo Δ -cadineno.



134

La configuración relativa mostrada en 134 fue deducida de las interacciones observables en el espectro NOESY (espectro 41). Las interacciones más relevantes ocurrieron entre el hidrógeno vinílico H5 y el hidrógeno de metino (H11) del fragmento isopropilo y los hidrógenos de uno de los metilos del isopropilo (H_3 -12). Asimismo, H2 Δ presentó interacciones importantes con el hidrógeno alílico H3 Δ y el hidrógeno de la posición H7 Δ , lo cual permitió establecer que el isopropilo se encuentra orientado hacia la cara Δ del biciclo y que la fusión del anillo de decalina es *cis* (figura 48).



134

Figura 48. Interacciones NOESY relevantes de 134.

Adicionalmente, se observó una interacción entre el metilo de la posición 14 con el hidrógeno alílico H6 Δ , que a su vez interaccionó con H1 Δ reafirmando de manera inequívoca la fusión *cis* del cadineno.

La revisión bibliográfica de estructuras análogas a **134** reveló la existencia de dos isómeros, los cuales poseen fusión *trans* del anillo de decalina (figura 49) [56].

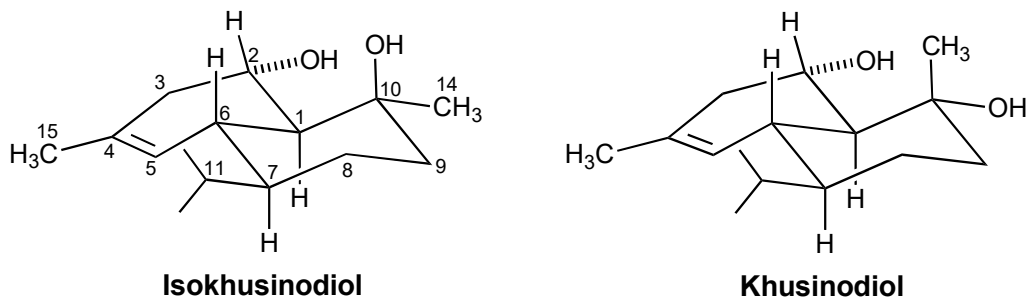


Figura 49. Análogos estructurales de **133** [56].

La orientación \perp relativa de H₃-14 en el isokhusinodiol (figura 49), fue determinada con base en su desplazamiento químico a campo bajo, aunado a su interacción NOESY con el hidrógeno H1 \perp [56a]. Por el contrario, el H₃-14 del khusinodiol fue orientado \perp debido a su desplazamiento químico a campo alto [56a]. Lo antes mencionado puede ser explicado mediante las polarizaciones estéricamente inducidas de los enlaces C–H, las cuales ocasionan los efectos de protección sobre los hidrógenos del metilo, tal como sucede en el khusinodiol. En lo que respecta a **134**, la orientación \perp de H₃-14 fue establecida únicamente por su interacción NOESY con los hidrógenos de las posiciones 1 \perp y 6 \perp ya que la fusión de la decalina es diferente a la de los khusinodiolos. El CH₃-14 de *cis*-9-metildecaldas presenta un desplazamiento químico de ¹³C a campo bajo (\perp 30 ppm).

Por otra parte, la comparación de los datos de RMN ¹H informados para ambos khusinodiolos y los datos obtenidos en la presente investigación para **134**, muestra diferencias notables en los desplazamientos químicos y en los patrones de acoplamiento espín-espín (tabla 9), lo cual permite inferir que **134** posee un arreglo conformacional y configuracional diferente. Así, la fusión *trans* del anillo de decalina en los isómeros Isokhusinodiol y khusinodiol implica que el ángulo diedro H5-C5-C6-H6 sea aproximado a 90° y con base en la ecuación de Karplus [57] se puede predecir que la constante de acoplamiento $J_{5,6}$ sea *ca.* cero; de tal manera que, el espectro de RMN ¹H de ambos isómeros mostrará una señal simple para el hidrógeno vinílico H5 (tabla 9). Por lo tanto, el patrón de acoplamiento espín-espín del hidrógeno vinílico determina la orientación del hidrógeno alílico (H6) en este tipo de sesquiterpenos donde la fusión del anillo de decalina es *trans*.

Tabla 9. Datos de RMN ¹H tomados en CDCl₃ para **134** y sus análogos estructurales.

Posición	Isokhusinodiol [‡]	Khusinodiol [§]	134 [‡]
H-1	1.20 (dd = 10.6, 9.6)		1.61 (m)
H-2 _⊥	4.06 (ddd = 9.6, 9.4, 5.6)	3.85	4.13 (ddd = 10.5, 8.0, 6.5)
H-3 _⊥	2.09 (m)		1.93 (m)
H-3 _⊥	2.43 (dd = 16.6, 5.6)		2.43 (dd = 17.5, 6.5)
H-5	5.47 (s)	5.34	5.50 (dcuart = 5.5, 2.0)
H-6	1.97 (m)		2.55 (ddd = 10.5, 5.5, 5.0)
H-7	1.30 (m)		1.21 (m)
(2) H-8	1.30 y 1.41 (m)		1.42 (m)
(2) H-9	1.42 y 1.62 (m)		1.60 (m)
H-11	2.09 (m)		1.90 (m)
CH ₃ -12	0.90 (d = 7.0)	0.95	0.82 (d = 7.0)
CH ₃ -13	0.75 (d = 7.0)	0.76	0.87 (d = 7.0)
CH ₃ -14	1.46 (s)	1.28	1.45 (s)
CH ₃ -15	1.67 (s)	1.67	1.66 (s)

[‡] Ref. [56a] (400 MHz). [§] Ref. [56b] (100 MHz). [‡] Datos experimentales a 500 MHz. TMS: estándar interno.

Los datos espectroscópicos de **134** (tabla 9) permiten inferir que la diferencia más notable con respecto al khusinodiol e isokhusinodiol radica en la multiplicidad mostrada por el hidrógeno vinílico H5, el cual resuena como un doblete de cuartetos con constantes de acoplamiento de 5.5 y 2.0 Hz. Los acoplamientos espín-espín observados para H5 sugieren que el ángulo diedro H5-C5-C6-H6 es *ca.* 50° ($J_{5,6} = 5.5$ Hz), lo que implica que el hidrógeno alílico de la posición 6 se encuentre orientado \perp o *pseudo-axial* en *cis*-decalinas. Adicionalmente, H6_⊥ presenta una constante de acoplamiento de 5.0 y 10.5 Hz, lo cual indica un acoplamiento *pseudoaxial-pseudoaxial* con H1_⊥ y un acoplamiento *transdi axial* con H7_⊥, respectivamente. Por otra parte, el hidrógeno geminal a grupo hidroxilo (H2_⊥) exhibe constantes de acoplamiento ($J = 10.5, 8.5, 6.5$ Hz) similares a las informadas para el isokhusinodiol ($J = 9.6, 9.4, 5.6$) lo cual indica que difieren en la configuración

de C1 y C2; es decir, H2 \perp presenta dos acoplamientos de tipo *axial-axial* ($J = 10.5, 8.5$ Hz) con H3 \perp y H1 \perp , y uno *axial-ecuatorial* ($J = 6.5$ Hz) con H3 \perp . El patrón de acoplamiento espín-espín mostrado por el hidrógeno vinílico (H5), el hidrógeno alílico (H6 \perp) y el hidrógeno geminal a hidroxilo (H2 \perp) es congruente con la configuración relativa asignada mediante las interacciones NOESY mostradas en la figura 49.

Debido a la existencia de las dos series enantioméricas de este tipo de sesquiterpenos, se realizó la determinación de la configuración absoluta de **134** considerando que posee un hidroxilo secundario esterificable para la aplicación del método de la quiralidad del excitón mediante la *regla del sector benzoato* [24]. Así, **134** fue sometido a la reacción de esterificación con el cloruro de *p*-bromobenzoílo en presencia de piridina anhidra para la obtención del derivado **134a**. Posteriormente, se registró el espectro de DC de **134a**, en el cual se observó un efecto Cotton negativo en 252 nm (figura 50).

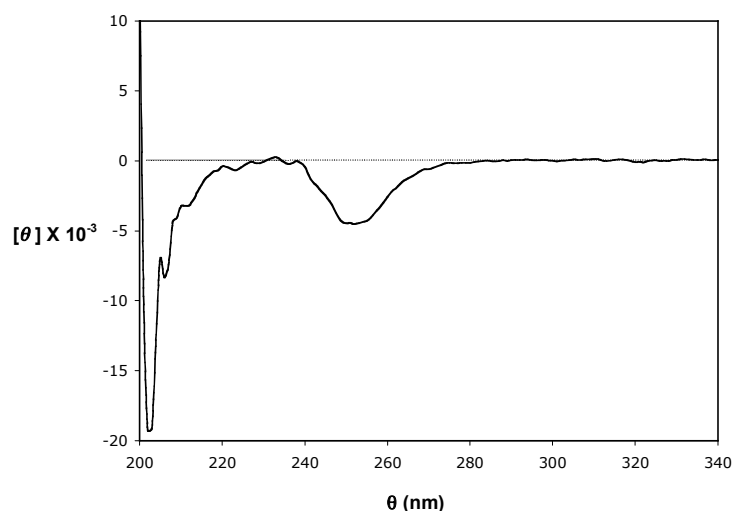


Figura 50. Espectro de dicroísmo circular de **134a**.

De acuerdo al resultado observado en la figura 50, es posible plantear el modelo de la figura 51, en el cual se muestra que las principales contribuciones al efecto Cotton negativo provienen del enlace doble $\perp\perp$ al grupo benzoato y de los grupos metilo e hidroxilo que se encuentran \perp al carbono asimétrico C2 (modelo **B**, figura 51).

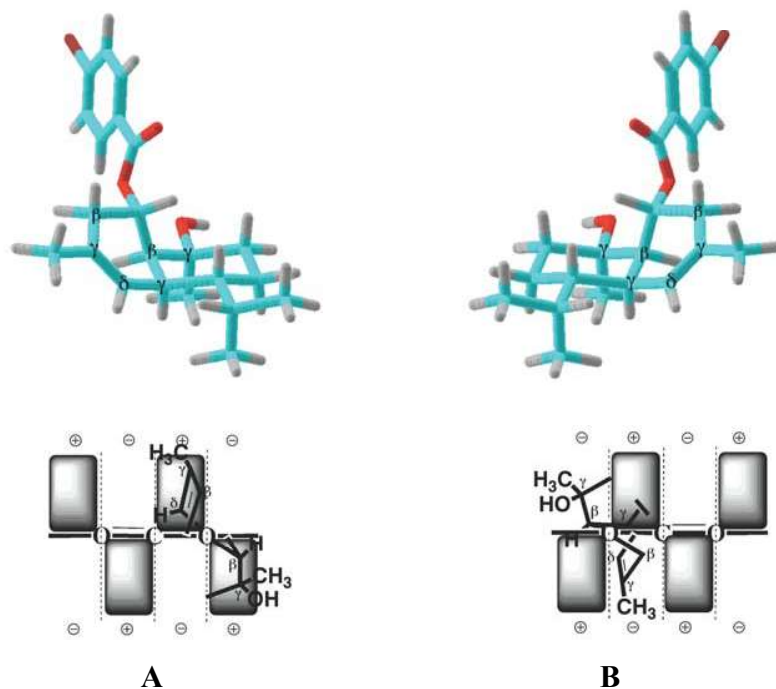
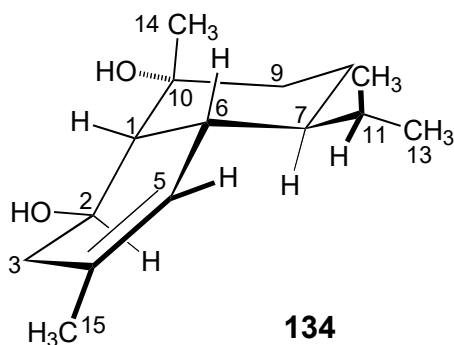


Figura 51. Aplicación de la *regla del sector benzoato* a **134a** (B) y su enantiómero (A).

Por lo anterior, se establece que la configuración absoluta del C2 en **134** es *R*.



7.3.4 (2*R*)-1-Cadin-4,9-dien-2-ol (**135**)

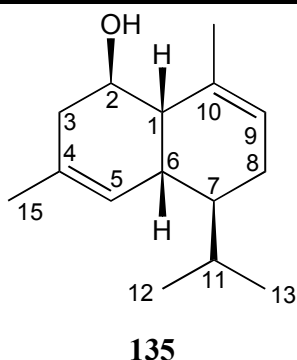
La muestra **134** recuperada de RMN presentó una sustancia adicional, la cual fue atribuida a la transformación de **134** en las condiciones ligeramente ácidas del cloroformo deuterado (conversión *ca.* 50%). Dicha sustancia fue purificada y caracterizada mediante el análisis de sus propiedades espectroscópicas, espectrométricas y ópticas como (2*R*)-hidroxi-amorfa-4,9-dieno (**135**), y se dedujo que proviene de la deshidratación del alcohol terciario de la posición C10 en **134**.

Considerando que **135** representa un compuesto con una conformación y configuración relevante por la fusión *cis* de su esqueleto, se describirá sucintamente su elucidación estructural.

En el espectro de masas de alta resolución, en la modalidad FAB, se observa un ion molecular de 221.1902 *uma*, el cual indica la fórmula molecular C₁₅H₂₅O ([M + H]⁺) de la que se deducen cuatro insaturaciones. En el espectro de RMN ¹³C se observan 15 señales correspondientes, según lo observable en el experimento DEPT, a siete metinos (dos vinílicos, uno geminal a hidroxilo y dos alílicos), dos metilenos (alílicos), cuatro metilos (dos vinílicos) y dos carbonos cuaternarios (dos vinílicos). La evidencia de cuatro carbonos olefinicos permitió inferir la presencia de una olefina trisustituida en **135**, la cual proviene de la deshidratación de **134**. Lo anterior puede ser confirmado en el espectro de RMN ¹H (espectro **42**), ya que se observa una señal (d_{cuart}, *J* = 5.0, 1.5 Hz) en δ 5.24 que corresponde al hidrógeno vinílico H5, el cual se encuentra acoplado a cuatro enlaces con el metilo vinílico H₃-15 que resuena en δ 1.56 (d, *J* = 1.5 Hz); además, se observa otra señal en δ 5.38 (m) que se atribuye al hidrógeno vinílico H9, el cual correlaciona ¹H-¹H con el metilo vinílico H₃-14 que resuena en δ 1.73 (d, *J* = 1.5 Hz). La presencia de un metilo vinílico adicional establece que **134** experimentó una deshidratación del alcohol terciario de la posición C9, lo cual quedó avalado en el espectro de RMN ¹H por el doblete de dobletes ancho (*J* = 11.5, 5.0 Hz) que resuena en δ 3.97 y que fue asignado a un hidrógeno geminal a hidroxilo (H2 \perp) por su desplazamiento químico característico.

La fusión *cis* del compuesto deshidratado **135** quedó establecida inequívocamente por la *J*_{5,6} = 5.0 Hz que mostró H5 (para más detalles, véase discusión estructural de **134**) y por la multiplicidad observada para H1 \perp (t, *J* = 8.0 Hz) que resuena en δ 2.14 y para H3 \perp (d, *J* = 17.0 Hz) resonante en δ 2.06. Por otro lado, el fragmento isopropilo quedó evidenciado por el metino que resuena en δ 1.78 (m, H11), el cual mostró correlaciones ¹H-¹H con dos señales dobles (*J* = 6.5 Hz) centradas en δ 0.83 (H12) y en 0.90 (H13). Así, la conectividad de **135** se confirmó mediante el análisis del espectro HMBC, en el cual los hidrógenos del metilo vinílico H₃-14 exhibieron correlaciones con los carbonos C10 (δ 133.0), C1 (δ 43.1) y C9 (δ 123.1).

El análisis y la integración de la información espectroscópica y espectrométrica observada para la estructura **135** confirma que ésta corresponde al \perp -cadineno derivado de la deshidratación del alcohol terciario del (2*R*)- \perp -cadin-4-en-2,10-diol (**134**).



La configuración relativa mostrada en **135** fue confirmada mediante las interacciones observables en el espectro NOESY (espectro **43**). Las interacciones más relevantes ocurrieron entre el hidrógeno vinílico H5 y H7 \perp y H₃-12. Asimismo, H2 \perp presentó interacciones importantes con el hidrógeno alílico H3 \perp y con H7 \perp , lo cual reafirma que el isopropilo se encuentra orientado hacia la cara \perp del biciclo y que la fusión del anillo de decalina es *cis* (figura **52**). Adicionalmente, se observó una interacción entre el metilo vinílico H₃-14 con H-2 \perp , y por otra parte, H-6 \perp mostró una interacción NOESY con H-1 \perp y con el metilo de isopropilo H₃-12.

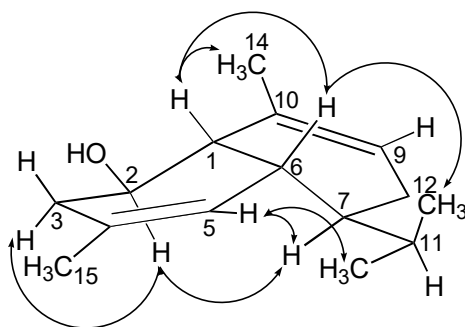
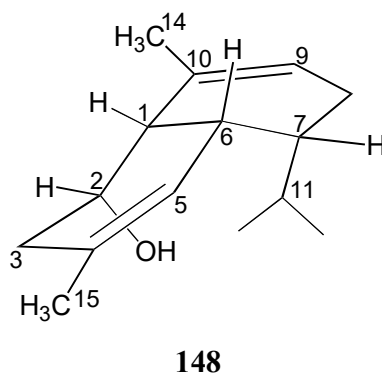


Figura **52**. Interacciones NOESY relevantes para **135**.

Por otra parte, la búsqueda en la literatura de análogos estructurales permitió encontrar un diastereómero denominado (+)-amorfan-4,9-dien-2-ol (**148**) [58].



Los datos de RMN ^1H informados para **148** muestra diferencias notables con los datos espectroscópicos obtenidos en la presente investigación para **135** (tabla 10). Así, los modelos Dreiding revelaron que la orientación relativa de los sustituyentes en C2 y C7 tienen una influencia importante en el ángulo diedro H5-C5-C6-H6 y por consiguiente en el valor de la constante de acoplamiento $J_{5,6}$; es decir, para **148** el ángulo diedro H5-C5-C6-H6 es aproximado a -63° lo que implica que, considerando la ecuación de Karplus [57], la constante de acoplamiento $J_{5,6}$ sea menor o igual a 3.0 Hz (tabla 10).

Tabla 10: Desplazamientos químicos de ^1H de **148** y **135**.

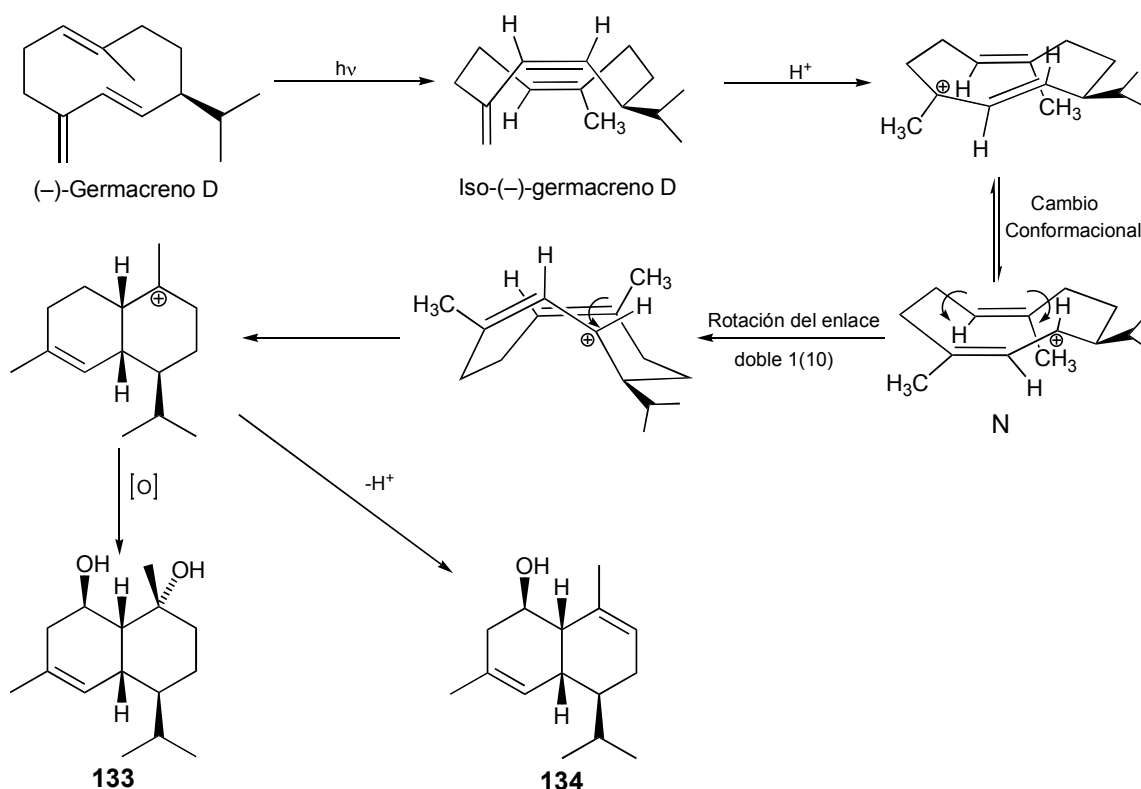
Posición	148 [†]	135 [‡]
H-1 \perp	2.30 (s)	2.14 (t, $J = 6.0$)
H-2	3.82-3.85 (m)	3.97 (dd, $J = 11.5, 5.0$)
H-3	2.12-2.18 (m)	1.75 (m)
H-3	1.85 (dd, $J = 5.0, 16.0$)	2.06 (m)
H-5	5.14 (s)	5.24 (dcuart, $J = 5.0, 1.5$)
H-6 \perp	2.62 (s)	2.43 (s)
H-7	1.05-1.12 (m)	1.31 (m)
H-8	1.93-2.00 (m)	1.97 (m)
H-8	1.57-1.66 (m)	1.80 (m)
H-9	5.49 (d, $J = 4.0$)	5.38 (m)
H-11	1.49 (m)	1.78 (m)
CH ₃ -12	0.87 (d, $J = 7.0$)	0.83 (d, $J = 6.5$)
CH ₃ -13	0.91 (d, $J = 7.0$)	0.90 (d, $J = 6.5$)
CH ₃ -14	2.01 (s)	1.73 (d, $J = 1.5$)
CH ₃ -15	1.57 (s)	1.56 (d, $J = 1.5$)

[†]Datos tomados en CDCl_3 , 300 MHz [58]. [‡]Datos tomados en C_6D_6 , 500 MHz. Se usó TMS como estándar interno.

Por el contrario, el modelo Dreiding de **135**, el cual posee la configuración relativa opuesta en C2 y en C7, reveló que el ángulo diedro H5-C5-C6-H6 es *ca.* -40° y con base en la ecuación de Karplus [57] se espera que la constante de acoplamiento $J_{5,6}$ sea mayor a 3.0 Hz. Así, la constante de acoplamiento $J_{5,6}$ exhibida por **135** (tabla 10) fue de 5.0 Hz, lo cual está de acuerdo con lo predicho en el arreglo conformacional y configuracional modelado para **135**. Por otra parte, la multiplicidad observada para H2 \perp en **135** proporciona evidencia de la orientación \perp relativa del

hidroxilo, es decir, con base en los modelos Dreiding pueden predecirse dos acoplamientos *transdiaxiales* ($\sim 9.0\text{--}12.0$ Hz) y uno *axial-ecuatorial* (~ 5.0 Hz) (tabla 10).

En esta forma, se comprueba la configuración relativa de **134**, en tanto que, la configuración absoluta de **135** puede asignarse como *2R* considerando que **135** proviene de la deshidratación de **134**.



Esquema 3. Propuesta biogénica para la formación de **134** y **135**.

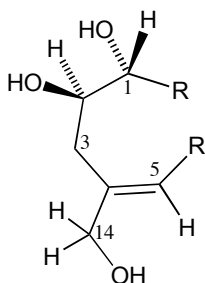
Con base en las configuraciones absolutas mostradas para **134** y **135**, pueden hipotetizarse sus orígenes biogénicos, partiendo de (-)-germacreno D como el precursor biogénico y considerando el trabajo de König y Bülow [5]. Los pasos de reacción biogénico implican una isomerización de (-)-germacreno D a iso(-)-germacreno D, seguida de una protonación y un cambio conformacional del catión N. Este último sufre una rotación del enlace doble 1(10) y posterior ciclización para formar el catión cadinenilo, el cual dará origen a **134** mediante oxidaciones consecutivas y a **135** mediante pérdida de un protón (esquema 3).

7.3.5 (1*R*,2*R*)-Dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (**136**)

En el espectro de masas de alta resolución, en la modalidad FAB, se observa un ion molecular de 255.1967 *uma* que indica la fórmula molecular $C_{15}H_{27}O_3$ ($[M + H]^+$) con una integral

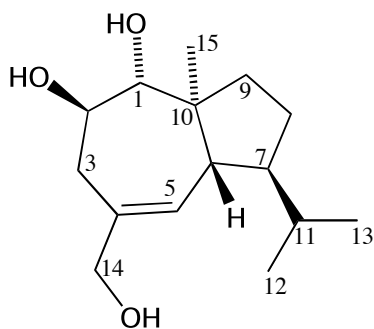
para tres insaturaciones (espectro 44). En el espectro de RMN ^{13}C (espectro 45) y en el experimento DEPT se observan 15 señales de carbonos correspondientes a seis metinos (un vinílico, dos geminales a hidroxilo), cuatro metilenos (uno de alcohol primario), tres metilos y dos carbonos cuaternarios. La combinación de la información obtenida del espectro de masas y de los espectros de RMN ^{13}C permiten deducir la presencia de un sesquiterpeno bicíclico con una insaturación. En el espectro de infrarrojo (espectro 46) se observan bandas de absorción en 3622 y 3457 atribuida a hidroxilo, en 1449 y 1046 asignable a una olefina.

Por otra parte, en el espectro de RMN ^1H (espectro 47) se observan señales para hidrógeno vinílico, hidrógenos geminales a hidroxilo, hidrógenos alílicos y metilos característicos de isopropilo. Así, en el espectro de hidrógeno se observa una señal doble ($J = 9.0$ Hz) en δ 3.25 cuyo desplazamiento químico indica que se trata de un hidrógeno geminal a hidroxilo (H-1 \perp), el cual exhibe un acoplamiento ^1H - ^1H con otro hidrógeno también geminal a hidroxilo que resuena en δ 3.57 (H-2 \perp) como un doblete de dobletes (ddd, $J = 11.5, 8.5, 2.0$ Hz). Entonces, el valor de la constante de acoplamiento mostrada por H-1 \perp ($J = 9.0$ Hz) permite establecer una orientación *trans*axial de ambos hidrógenos que se encuentran geminales a hidroxilo. Por otro lado, la multiplicidad que exhibió H-2 \perp sugiere que también se encuentra acoplado a dos hidrógenos, quedando evidenciado por sus correlaciones COSY con los hidrógenos H-3 \perp y H-3 \perp que resuenan en δ 2.46 como un multiplete. Los hidrógenos del metileno de la posición 3 presentaron correlaciones a larga distancia con los carbonos C-4 (δ 137.75) y C-5 (δ 132.15) correspondientes a una función olefínica y con el carbinol C-1 (δ 87.70). De la función olefínica, el metino C-5 (δ 132.15) presentó correlación HSQC (espectro 48) con su correspondiente hidrógeno vinílico que resuena en δ 5.48 como una señal doble ($J = 4.5$ Hz), el cual mostró una correlación cruzada (HMBC) con un metileno (H_2 -14) de alcohol primario (δ_{H} 3.95, δ_{C} 67.82). Lo descrito hasta el momento permite construir el fragmento **D**.

Fragmento **D**

A partir de la olefina, se observa que el hidrógeno vinílico H-5 presentó un acoplamiento COSY con un hidrógeno alílico (H-6 \perp) resonante en δ 2.11, el cual mostró una multiplicidad de

doblete de dobletes ($J = 9.5, 5.5$ Hz) debido a un acoplamiento ^1H - ^1H adicional con otro hidrógeno (H-7 \perp) que aparece en $\perp 1.76$. La orientación \perp de H-7 fue deducida del valor de la constante de acoplamiento *antiperiplanar* ($J = 9.5$ Hz) que presentó H-6 \perp . Por otra parte, H-7 \perp mostró correlaciones ^1H - ^1H (espectro **49**) y 3J ^1H - ^{13}C con las señales debidas a un isopropilo resonante en $\perp 1.52$ y 32.11 del metino CH-11; en $\perp 0.88$ y 21.93 del metilo CH₃-12 y en $\perp 0.84$ y 19.27 del metilo CH₃-13. Adicionalmente, H-7 \perp exhibió correlaciones ^1H - ^1H con los hidrógenos de un metileno (H₂-8) resonantes en $\perp 1.76$ y 1.35 como multipletes, los que a su vez presentaron correlaciones con dos señales de un metileno (H₂-9), las cuales aparecen en $\perp 1.96$ y 1.52 como multipletes. Aunado a lo anterior, una señal simple ($\perp 0.96$, H₃-15) que integra para tres hidrógenos y que puede ser asignada a un metilo por su correlación HSQC con el carbono C-15 ($\perp 14.78$), presentó correlaciones a larga distancia con los carbonos asignados arbitrariamente a C-9 ($\perp 39.98$), C-10 ($\perp 49.31$) y C-1 ($\perp 87.70$). Las asignaciones correctas de cada uno de los carbonos antes mencionados y de sus correspondientes hidrógenos se definieron por las correlaciones observadas en el espectro HSQC y HMBC. Cabe señalar que las correlaciones más importantes que ayudaron en la asignación inambigua de los hidrógenos que aparecieron con el mismo desplazamiento químico (H-7 y H-8, H-9 y H-11), fueron las exhibidas entre H-5 ($\perp 5.48$), H-9 ($\perp 1.96$), H₃-12 ($\perp 0.88$) y H₃-13 ($\perp 0.84$) con C-7 ($\perp 50.35$), lo cual permitió extender el fragmento **D** hasta el sesquiterpeno de tipo isodaucano **136**.

**136**

La configuración relativa de **136** quedó sustentada por los valores de las constantes de acoplamiento y por las interacciones NOESY más relevantes observadas en el espectro **50**. Así, H-6 \perp exhibió una multiplicidad doblete de dobletes ($J = 9.5, 5.5$ Hz) debida a su acoplamiento con el hidrógeno vinílico H-5 ($J_{5,6} = 5.5$ Hz) y con el metino H-7 \perp ($J_{6,7} = 9.5$ Hz), lo cual determina la orientación *antiperiplanar* de H-7 \perp . De forma similar, H-1 \perp y H-2 \perp se encuentran con orientación *antiperiplanar* según los valores de las constantes de acoplamiento observadas ($J_{1,2} = 9.0$ Hz) para

ambos hidrógenos. Lo anterior queda confirmado por las interacciones espaciales, observadas en el experimento NOESY, entre los hidrógenos H6 \perp y H-1 \perp , entre H-7 \perp y H₃-15 \perp , entre H-2 \perp y H₃-15 \perp ; entre H-6 \perp y H-11, entre H-5 y H₃-12, entre H₃-15 \perp y H-9 \perp (\perp 1.96). Así, la información previamente descrita permite establecer que el sesquiterpeno **136** posee una fusión *trans* del esqueleto de azuleno y la configuración relativa mostrada en la figura 53.

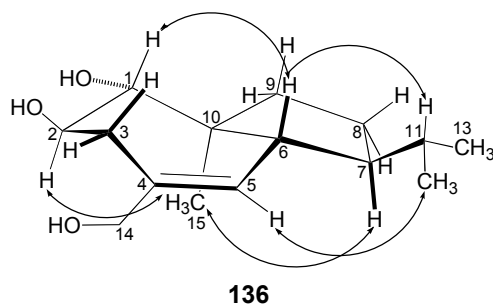


Figura 53. Interacciones NOESY relevantes para **136**.

La revisión bibliográfica de estructuras análogas a **136** reveló la existencia de pocos sesquiterpenos de tipo isodaucano, los cuales fueron aislados de especies de plantas de la familia Compositae y la mayoría poseen fusión *cis* del esqueleto de azuleno (figura 54). Cabe señalar que la configuración absoluta sólo ha sido determinada para los sesquiterpenos que poseen configuración *cis* del azuleno, siendo el (-)-mintsulfuro el primer sesquiterpeno al cual se le determinó la configuración absoluta mediante difracción de rayos X [59]. Por otra parte, a los sesquiterpenos denominados afanamol I y II se les determinó la configuración absoluta mediante síntesis química [60].

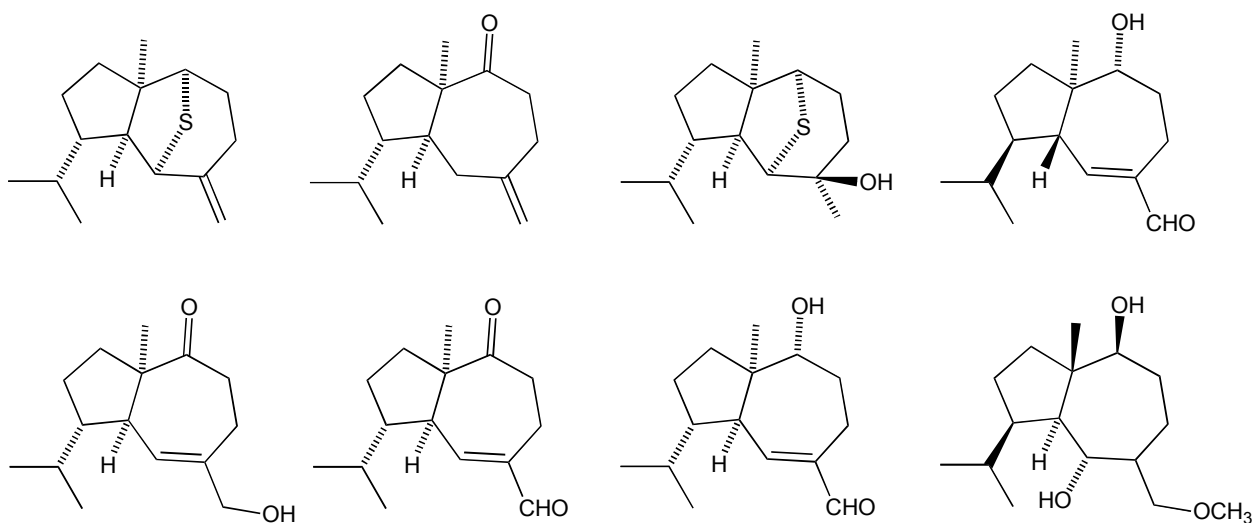


Figura 54. Compendio de sesquiterpenos de tipo isodaucano aislados a la fecha.

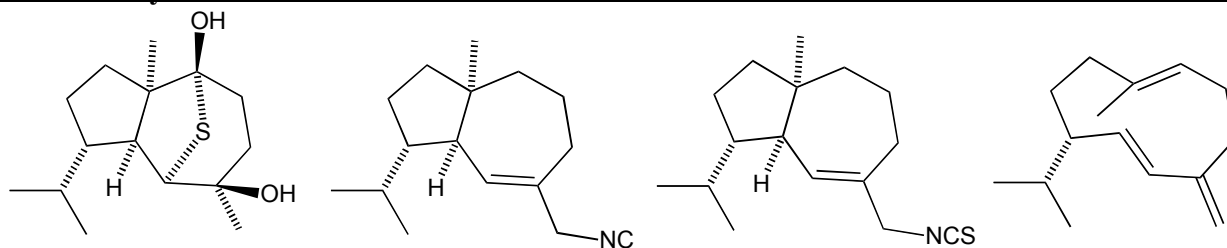


Figura 54. Compendio de sesquiterpenos de tipo isodaucano aislados a la fecha.

Considerando que los antecedentes de este tipo de sesquiterpenos son escasos y que la configuración absoluta de los sesquiterpenos con fusión *trans* del esqueleto de azuleno no se conoce, se procedió a la determinación de la configuración absoluta de **136** mediante el método de la quiralidad del excitón por dicroísmo circular [17, 18, 22, 23, 26]. Así, **136** fue sometido a la reacción de esterificación con el cloruro de *p*-bromobenzoilo en piridina anhidra hasta la obtención de **136a** (figura 55).

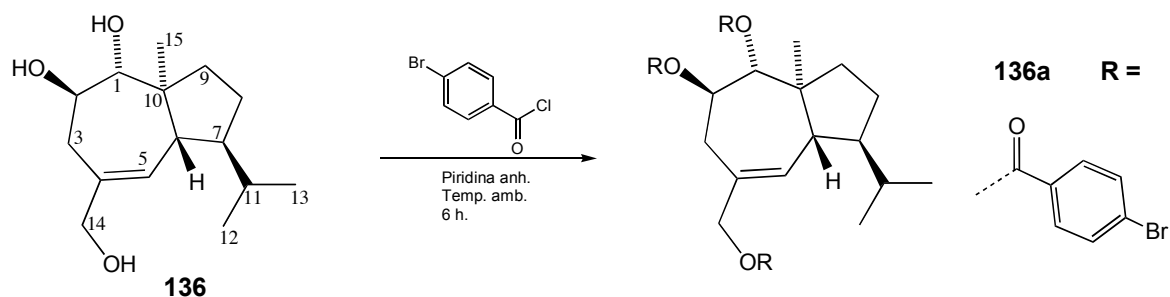


Figura 55. Derivatización química de **136**.

Posteriormente, se procedió al registro del espectro de DC de **136a** y a su interpretación mediante la propuesta de modelos adecuados que permitieran explicar el efecto Cotton negativo observado en la figura 56.

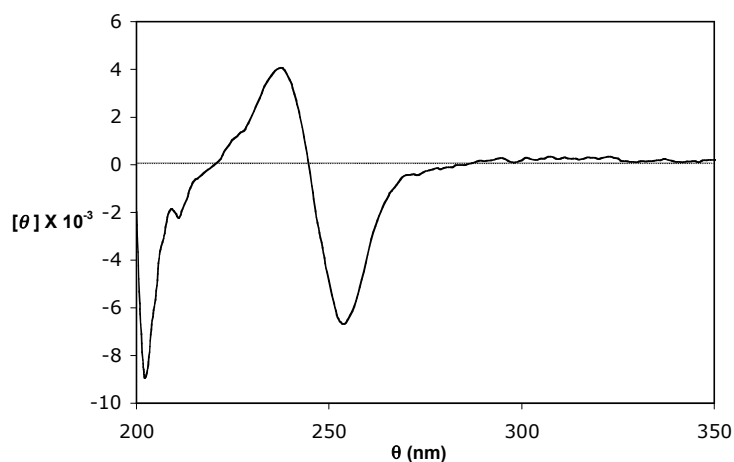


Figura 56. Espectro de dicroísmo circular de **136a**.

El efecto Cotton negativo observado en la figura 56, fue analizado de acuerdo a lo establecido en el método de la quiralidad del excitón de benzoatos alílicos [26] y mediante el método de la quiralidad del excitón del 1,2-dibenzoato [17, 18]. En este último, también se consideraron las contribuciones debidas al acoplamiento dipolo-dipolo a larga distancia, es decir, las contribuciones acumuladas por la presencia de tres grupos cromóforos iguales no equidistantes [23].

De acuerdo al método de la quiralidad del excitón del 1,2-dibenzoato se pueden proponer modelos para el enantiómero **136a**, los cuales explican las contribuciones al efecto Cotton negativo observado en la figura 56. La imagen izquierda representa el conformero de mínima energía del enantiómero **136a** modelado con el programa PCmodel [42] y el modelo **A** muestra una proyección de Newmann vista a través del enlace C(2)-C(3), lo cual proporciona evidencia de la contribución negativa esperada en el efecto Cotton (figura 57). Cabe mencionar que, el ángulo diedro entre los grupos \perp -dibenzoatos es de $\sim 68^\circ$, lo cual permite deducir que el efecto Cotton observado es casi máximo [22].

Adicionalmente, pueden plantearse dos modelos resultantes del acoplamiento de los momentos dipolares a larga distancia y trazando un eje imaginario desde el carbono C-14 hasta el carbono C-1 (modelo **C**), o bien, desde C-14 hasta C-2 (modelo **B**), los cuales tendrán contribuciones nula y positiva al efecto Cotton, respectivamente (figura 57). Posiblemente, el acoplamiento 1,2-dibenzoato observado en el modelo **B** (figura 57) y el acoplamiento intercromofórico del benzoato alílico con el benzoato unido a C-1 (modelo **C**, figura 57) alineados paralelamente, no contribuyen de manera importante al efecto Cotton observado en la figura 56.

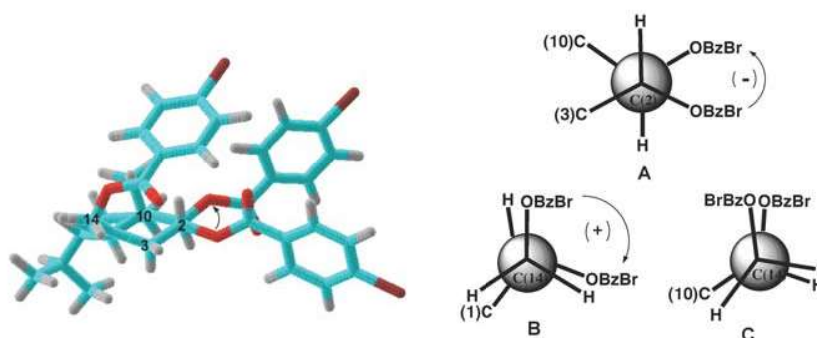


Figura 57. Método de la quiralidad del excitón del 1,2-dibenzoato para **136a**.

Por otra parte, aplicando el método de la quiralidad del excitón de benzoatos alílicos, es posible plantear el modelo **A** (figura 58), en el cual se espera una contribución negativa al efecto Cotton debida al acoplamiento del dipolo eléctrico del grupo benzoato alílico (C-14) con el dipolo eléctrico del enlace doble C(4)-C(5).

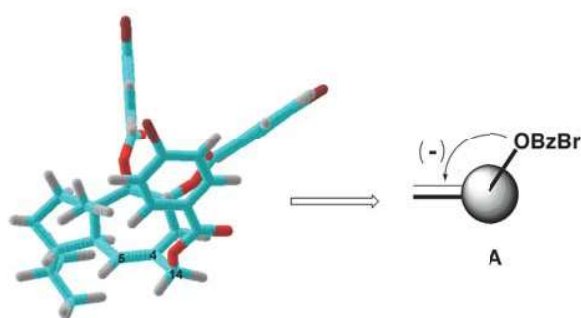
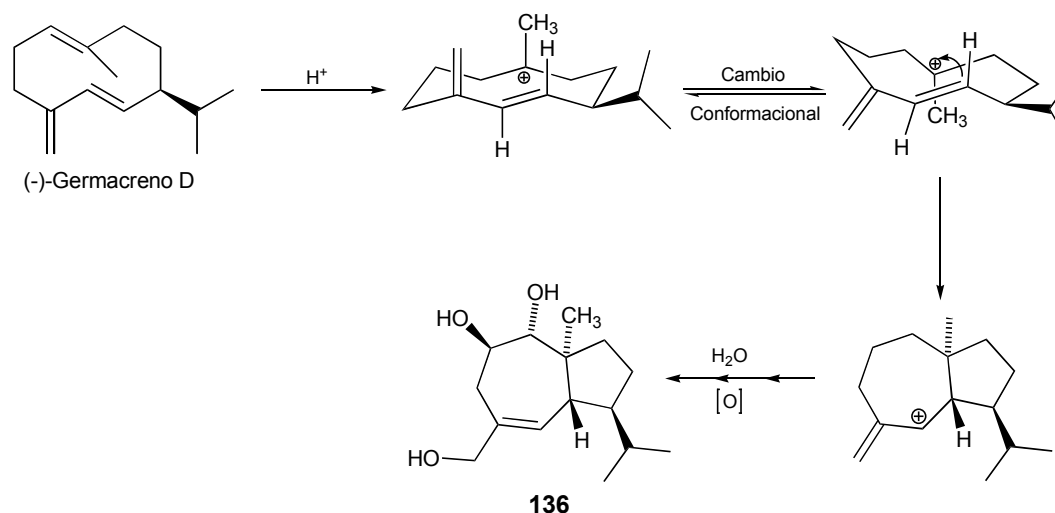


Figura 58. Aplicación de la regla de la helicidad del benzoato alílico a **136a**.

Así, el efecto Cotton negativo observado permite establecer que **136** posee la configuración absoluta *1R,2R*.

Considerando el resultado derivado del análisis quirótico, puede hipotetizarse la formación biogénica de **136** partiendo de la consideración de que el (-)-germacreno D es el precursor más plausible. La ruta biogénica implica la protonación del (-)-germacreno D, seguida de equilibrio conformacional que favorecerá la ciclización para la formación del *trans*-7,5-biciclo fusionado, el cual puede formar a **136** mediante oxidaciones consecutivas (esquema 4).



Esquema 4. Propuesta biogénica para la formación de **136**.

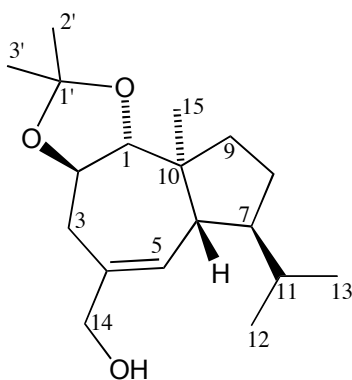
7.3.6 1 \perp ,2 \perp -Isopropilidendioxi-4-isodaucen-14-ol (137)

El compuesto **137** mostró en el espectro de masas de alta resolución, en la modalidad FAB⁺, un ion molecular de 295.2268 *uma* que indica la fórmula molecular C₁₈H₃₁O₃ ([M + H]⁺) e integra para cuatro insaturaciones. En el espectro de RMN ¹³C (espectro **51**) se observan 18 señales de carbonos correspondientes a seis metinos (uno vinílico, dos geminales a hidroxilo, uno alílico), cuatro metilenos (uno geminal a hidroxilo y otro alílico), cinco metilos (dos de isopropilo) y tres carbonos cuaternarios (uno vinílico y otro de grupo hemiacetal) según lo observable en el experimento DEPT. En el espectro de infrarrojo (espectro **52**) se observan bandas de absorción en 3421 para grupo hidroxilo, en 1688, 1457 y 1067 para función olefínica.

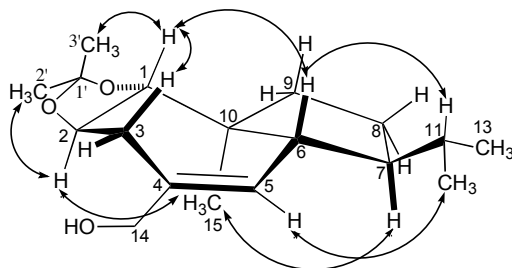
En el espectro de RMN ¹H (espectro **53**) de **137** se observó un doblete ($J = 9.0$ Hz) en $\perp 3.30$ (H-1 \perp) característico de un hidrógeno geminal a oxígeno, el cual se acopla ¹H-¹H, con un doblete de dobletes ($J = 11.5, 8.5, 2.0$ Hz) en $\perp 3.58$ atribuido a otro hidrógeno geminal a oxígeno (H-2 \perp). Asimismo, H-2 \perp se acopla a dos hidrógenos alílicos que resuenan en $\perp 2.51$ (dddd, $J = 14.0, 2.0, 1.0$ Hz) y 2.22 (td, $J = 13.5, 1.5$ Hz) atribuidos a H-3 \perp y a H-3 \perp considerando las constantes de acoplamiento *axial-ecuatorial* ($J = 2.0$ Hz) y *axial-axial* ($J = 13.5$ Hz), respectivamente. Ambos hidrógenos alílicos mostraron correlaciones a larga distancia (³ J) con los carbonos de una función olefínica resonante en $\perp 137.76$ (C-4) y 129.56 (C-5). A su vez, uno de los carbonos vinílicos ($\perp 129.56$) correlacionó con su correspondiente hidrógeno H-5, el cual resuena en $\perp 5.45$ como una señal doble de dobles ($J = 3.5, 1.0$ Hz) debida a su acoplamiento ¹H-¹H con el hidrógeno de metino H-6 \perp ($\perp 1.91$) que aparece como un doblete de doblete de dobletes (ddd, $J = 10.0, 4.5, 2.0$ Hz). La multiplicidad exhibida por H-6 \perp establece su acoplamiento alílico con H5 ($J = 4.5$ Hz) y su orientación *antiperiplanar* con H7 \perp (m, $\perp 1.72$). Adicionalmente, H5 ($\perp 5.45$) mostró correlaciones cruzadas ³ J con el carbinol C14 ($\perp 67.84$) y con C7 ($\perp 49.30$); asimismo, H₂-14 ($\perp 3.66$) presentó una correlación con C5 ($\perp 129.56$). La presencia de un carbono hemiacetal ($\perp_C 106.67$) y de dos metilos desplazados a campo bajo [$\perp_H 1.49$ (s, H₃-3'') y 1.42 (s, H₃-2'')] indicó la presencia de un fragmento acetónido condensado en el sistema 1,2-diol.

Por otra parte, H7 \perp presentó correlaciones COSY con un multiplete centrado en $\perp 1.55$ (H11) y con H₂-8 resonante en $\perp 1.32$; además, presentó una correlación HMBC con el carbono C5 ($\perp 129.56$). A su vez, el metino de la posición 11 exhibió correlaciones COSY con dos señales

dobles que resonaron a campo alto ($J = 6.5$ Hz) en $\Delta 0.87$ y 0.80 , las cuales fueron atribuidas a los metilos de un fragmento de isopropilo, H_3-13 y H_3-12 , respectivamente. Ambos metilos exhibieron correlaciones HMBC con C_7 ($\Delta 49.30$) y con C_{11} ($\Delta 31.30$). Además, H_{11} mostró correlaciones a larga distancia con C_6 ($\Delta 49.35$) y C_7 ($\Delta 49.30$). Por otro lado, $H_{1\perp}$ presentó correlaciones cruzadas con un metileno atribuido a CH_2-9 ($\Delta_H 1.87$ y 1.42 , $\Delta_C 38.83$) y con un metilo atribuido a CH_3-15 ($\Delta_H 0.91$, $\Delta_C 14.05$); aunado a su correlación con el carbono cuaternario que resuena en $\Delta_C 46.41$, el cual se atribuyó a C_{10} pues éste presentó una correlación cruzada con el metilo CH_3-15 ($\Delta_H 0.91$). Las conectividades antes descritas permiten establecer la estructura **137**.

**137**

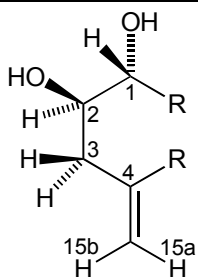
La configuración relativa de **137** fue confirmada mediante el análisis del experimento bidimensional NOESY (espectro **54**). Las interacciones más relevantes ocurrieron entre $H_{1\perp}$ y $H_{6\perp}$, H_3-3' , $H_{3\perp}$; entre $H_{7\perp}$ y $H_3-15\perp$; entre $H_{2\perp}$ y $H_3-15\perp$, H_3-2' ; entre $H_{6\perp}$ y H_3-12 ; entre H_5 y H_3-12 ; entre $H_3-15\perp$ y $H_{9\perp}$ ($\Delta 1.87$) (figura **59**). La información descrita confirma la fusión *trans* del esqueleto de azuleno y la configuración relativa establecida para **136**.

**136**Figura **59**. Interacciones NOESY relevantes para **137**.

7.3.7 (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*S*,10*S*)*-5-*epi*-Eudesm-4(15)-eno-1*L*,2*L*,6*L*-triol (138)

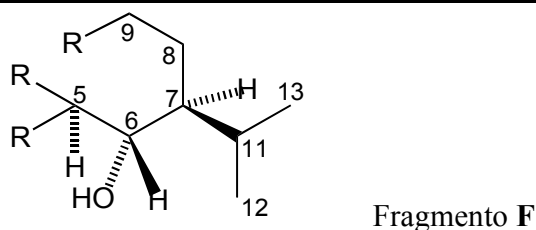
Del espectro de masas de alta resolución, modalidad FAB⁺, se dedujo la fórmula molecular C₁₅H₂₆O₃ (255.1965, [M + H]⁺), la cual integra para tres insaturaciones (espectro **55**). Del espectro de RMN ¹³C (espectro **56**) y del experimento DEPT, se infiere la presencia de 15 carbonos, de los cuales seis corresponden a metinos (tres geminales a hidroxilo), cuatro a metilenos (un metileno vinílico exocíclico), tres a metilos y dos a carbonos cuaternarios (uno vinílico). La información proporcionada por el espectro de RMN ¹³C en conjunto con la obtenida del espectro de masas, permite deducir que la estructura en cuestión corresponde a un sesquiterpeno bicíclico con una olefina exocíclica. En el espectro de infrarrojo (espectro **57**) se observan las bandas de absorción características de hidroxilo en 3385 y para ligadura doble en 1648, 1460 y 1049 cm⁻¹.

Por otra parte, en el espectro de RMN ¹H (espectro **58**) se observan señales características de dos protones vinílicos, tres protones geminales a hidroxilo, y dos dobletes a campo alto que integran para tres hidrógenos cada uno, los cuales son característicos de un isopropilo. Así, el hidrógeno vinílico que resuena en δ 5.07 (H15a) como una señal triple ($J = 2.0$ Hz) correlacionó en el espectro COSY (espectro **59**) con la señal triple ($J = 2.0$ Hz) resonante en δ 4.93 (H15b), cuyas constantes de acoplamiento confirman su acoplamiento geminal vinílico. Ambos hidrógenos olefínicos exhibieron correlaciones COSY a cuatro ligaduras con los hidrógenos de un metileno alílico (C3, δ 38.13), los cuales resonaron en δ 2.60 (H3*L*) como un doblete de doblete de dobletes ($J = 13.0, 5.5, 1.0$ Hz) y en δ 2.30 (H3*L*) como un doblete de doblete de tripletes ($J = 13.0, 11.0, 2.0$ Hz). Por otra parte, los hidrógenos alílicos (H3*L* y H3*L*) mostraron correlaciones, en el experimento COSY, con un doblete de doblete de dobletes ($J = 11.0, 9.0, 5.0$ Hz) centrado en δ 3.74 (H2*L*), cuyo desplazamiento químico sugiere que se encuentra geminal a hidroxilo y cuyas constantes de acoplamiento indican una orientación *antiperiplanar* a H3*L* ($J = 11.0$ Hz) y una orientación *axial-ecuatorial* a H3*L* ($J = 5.5$ Hz). Asimismo, H2*L* mostró correlación COSY con una señal doble ($J = 9.5$ Hz) resonante en δ 3.65 (H1*L*). La multiplicidad y el valor de la constante de acoplamiento (9.5 Hz) de H1*L* (δ 3.65) sugiere un acoplamiento *antiperiplanar* al hidrógeno que resuena en δ 3.74 (H2*L*). Esta información permite integrar el fragmento **E**, cuya conectividad queda confirmada por las correlaciones ³*J* observadas en el experimento HMBC (espectro **60**) de H1*L* (δ 3.65) con el carbono C3 (δ 38.13), y de H3*L* (δ 2.30) y H3*L* (δ 2.60) con el carbono vinílico C15 (δ 116.09).

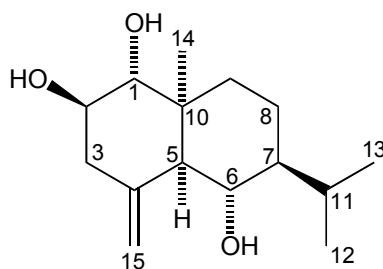


Fragmento E

Por otra parte, en el espectro de RMN ^1H se observa una señal doble ($J = 10.0$ Hz) en δ 1.85 (H5 \perp), la cual correlaciona ^1H - ^1H con una señal triple ($J = 10.0$ Hz) en δ 3.55 (H6 \perp). El valor de la constante de acoplamiento $J_{5,6} = 10.0$ Hz sugiere un acoplamiento *transdiaxial*, lo que permite establecer las orientaciones \perp y \perp relativas de H5 y H6, respectivamente. De forma análoga, H6 \perp exhibió una correlación COSY con un multiplete centrado en δ 1.22-1.33, el cual se atribuyó al hidrógeno del metino, H7, por su correlación HSQC con C-7 (δ 49.03). H7 se encuentra \perp , de acuerdo a la constante de acoplamiento *axial-axial* ($J = 10.0$ Hz) exhibida por H6 \perp . El multiplete en δ 1.22-1.33 incluye uno de los hidrógenos del metileno (δ 18.08) de la posición 8, ya que los hidrógenos del metileno de la posición 9 (δ 2.08 y 1.05) mostraron correlaciones COSY con dicho multiplete. Las correlaciones ^1H - ^1H observadas entre las señales resonantes en δ 2.08 (H9 \perp , ddd, $J = 13.5, 3.0, 3.0$ Hz) y en δ 1.05 (H9 \perp , ddd, $J = 13.5, 3.5$ Hz) con el multiplete en δ 1.22-1.31 (H8 \perp) y con la señal en δ 1.48 (H8 \perp), proporcionan evidencia de la secuencia del esqueleto del fragmento F. Por otro lado, se observó que el carbono C7 (δ 49.03) presenta correlaciones a larga distancia con los hidrógenos de dos metilos que se observan en δ 0.94 (H13) y en δ 0.84 (H12) como dos señales dobles ($J = 7.0$ Hz), las cuales se encuentran acopladas, vía COSY, con un septuplete de dobletes ($J = 7.0, 2.0$ Hz) resonante en δ 2.20 (H11), proporcionando evidencia de que H7 \perp se encuentra geminal a un fragmento isopropilo (m/z 43 una en el espectro de masas). Adicionalmente, H7 \perp mostró una correlación ^1H - ^1H con la señal que resuena en δ 1.48 y la cual se atribuyó a H8 \perp con base en lo observado en el experimento HMBC, donde se observan correlaciones 3J de H5 \perp (δ 1.85) con los carbonos C6 (δ 67.36) y C7 (δ 49.03); correlaciones de H9 \perp (δ 1.05) con C7 (δ 49.03); de H6 \perp con C11 (δ 26.42); de H8 \perp (δ 1.48) con C6 (δ 67.36) y correlaciones de H12 (δ 0.84) y H13 (δ 0.94) con C7 (δ 49.03) [fragmento F].



Adicionalmente, en el espectro HMBC se observa que H9 \perp (\perp 1.05) correlaciona 3J con el carbono C1 (\perp 73.84); que H9 \perp (\perp 2.08) correlaciona 3J con C5 (\perp 61.32) y con un carbono cuaternario en \perp 39.64 asignado a C10 por las correlaciones cruzadas que presentó con H5 \perp (\perp 1.85) y con H9 \perp (\perp 1.05). H5 \perp correlacionó 3J con los carbonos C1 (\perp 73.84), C3 (\perp 38.13), C4 (\perp 143.03), C15 (\perp 116.09) y con el carbono del metilo, CH₃-14, que resuena en \perp 22.54. Por otra parte, CH₃-14 (\perp_{H} 0.89 y \perp_{C} 22.54) mostró correlaciones HMBC con C10 (\perp 39.64), C9 (\perp 34.49) C5 (\perp 61.32) y C1 (\perp 73.84). Así, el carbono C1 del fragmento E se encuentra unido al fragmento F a través del carbono cuaternario C10, y C5 está unido a C4, lo cual permite establecer la estructura molecular de un sesquiterpeno de tipo eudesmano (**138**).

**138**

Tanto la fusión *cis* del anillo de decalina en **138** como la configuración relativa mostrada, fueron establecidas mediante las interacciones espaciales relevantes observadas, en el espectro NOESY (espectro **61**), entre H1 \perp y H3 \perp , H8 \perp y muy importantemente con H6 \perp ; por otro lado, H6 \perp mostró interacciones con H3 \perp y H8 \perp (el cual interaccionó con H13, \perp 0.94). Adicionalmente, se observaron interacciones espaciales importantes entre H5 \perp y H7 \perp , H9 \perp , H15a, y el metilo CH₃-14 permitiendo orientar a éste último hacia la cara \perp del biciclo. La última deducción quedó apoyada por la interacción NOESY observada entre H2 \perp y CH₃-14, el cual a su vez, exhibió interacción NOESY con H9 \perp . La información deducida del espectro NOESY permite establecer que el arreglo conformacional en solución preferido por **138** es el que se muestra en la figura **60**, quedando evidencia de la fusión *cis* del sesquiterpeno de tipo eudesmano.

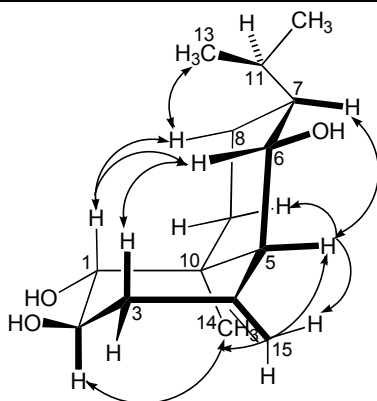
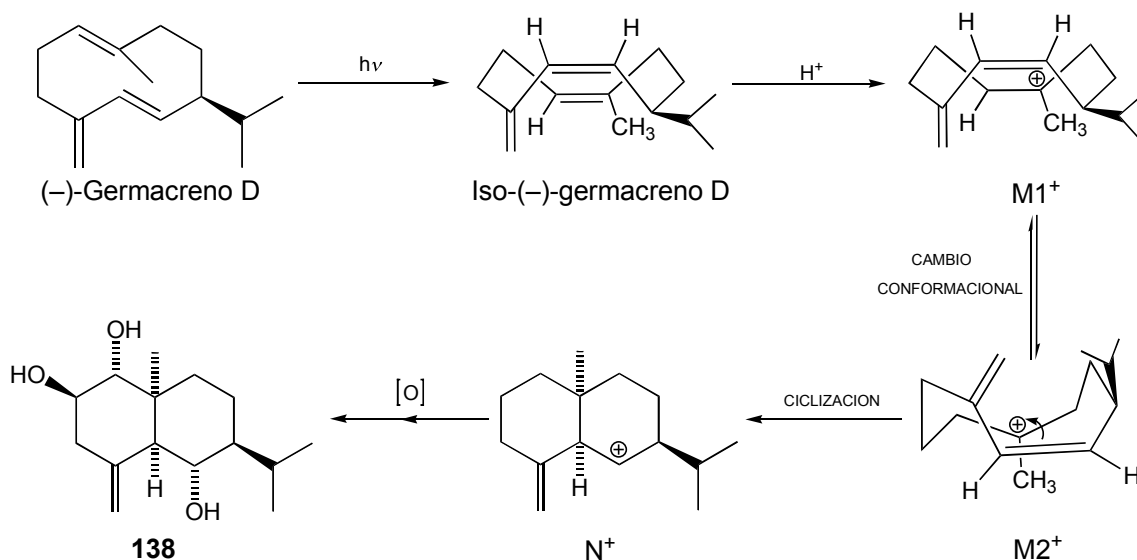


Figura 60. Interacciones NOESY relevantes para **138**.

Los informes en la literatura revelan la existencia de sólo un sesquiterpeno de tipo *cis*-eudesmano sin configuración absoluta determinada [61], lo cual indica que la particularidad de una decalina con fusión *cis* es poco frecuente en la naturaleza. Considerando las configuraciones absolutas establecidas para los sesquiterpenos **132-136** y presuponiendo el mismo precursor biogénico ((-)-germacreno D), es posible hipotetizar el origen biogénico de **138**. La secuencia de reacciones implica la isomerización de (-)-germacreno D a iso(-)-germacreno D, posterior protonación para formar el catión **M1** que mediante un cambio conformacional a **M2** favorecerá la ciclización *cis* para formar el catión *cis*-eudesmilo **N**. Posteriormente, **N** puede formar el compuesto **138** mediante reacciones oxidativas consecutivas (Esquema 5).



Esquema 5. Propuesta biogénica para la formación de **138**.

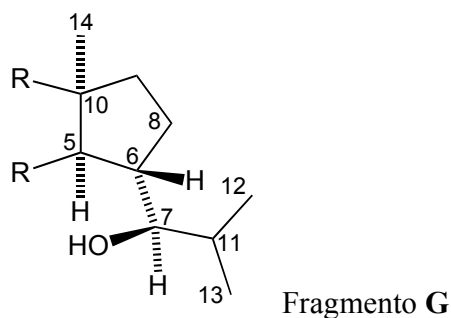
7.3.8 (1R,2R,5S,6S,7R,10S)*-Ax-4(15)-eno-1L,2L-7L-triol (139)

Del espectro de masas, modalidad FAB, se dedujo la fórmula molecular $C_{15}H_{26}O_3$ (255.1971, $[M + H]^+$), la cual integra para tres insaturaciones (espectro **62**). En el espectro de IR (espectro **63**) se observan bandas de absorción en 3385 atribuible a hidroxilo, y en 1645, 1462 y 1048 asignable a ligadura doble. En el espectro de RMN ^{13}C (espectro **64**) y en el experimento DEPT se observa la presencia de 15 señales, de las cuales seis corresponden a metinos (tres geminales a hidroxilo), cuatro a metilenos (un metileno vinílico), tres a metilos (dos de isopropilo) y dos a carbonos cuaternarios (uno vinílico). La información obtenida de los espectros de RMN ^{13}C , masas e infrarrojo, permiten deducir la presencia de un sesquiterpeno bicíclico con una función olefínica, satisfaciendo así las tres insaturaciones.

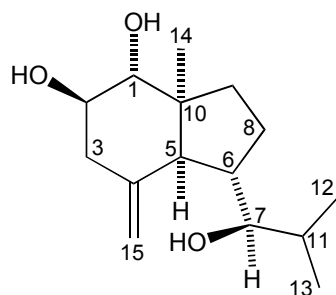
En el espectro de RMN 1H (espectro **65**) se observa un patrón de señales muy similares a las exhibidas por **138**; es decir, se puede deducir la presencia de protones vinílicos, de protones geminales a hidroxilo, y de protones de metilos de un fragmento isopropilo. Así, el hidrógeno vinílico que resuena en δ 5.02 como una señal triple y con una constante de acoplamiento *gem* vinilo de 2.0 Hz (H15a), correlaciona (espectro COSY, **66**) con una señal (t, $J = 2.0$ Hz) que resuena en δ 4.96 atribuible al hidrógeno vinílico geminal H15b. Ambos protones vinílicos exhiben acoplamiento a cuatro enlaces con los hidrógenos que resuenan en δ 2.56 (H3L, ddd, $J = 13.0, 5.0, 1.0$ Hz) y en 2.38 (H3L, ddt, $J = 13.0, 11.0, 1.5$ Hz). H3L y H3L mostraron correlaciones COSY con un hidrógeno geminal a hidroxilo que resuena en δ 3.59 (ddd, $J = 11.5, 10.5, 5.5$ Hz, H2L), el que a su vez exhibió correlación con la señal en δ 3.46 (d, $J = 9.5$ Hz, H1L). Los valores de las constantes de acoplamiento exhibidas por H3L (δ 2.38), H3L (δ 2.56), H2L (δ 3.59) y H1L (δ 3.46) resultaron idénticas a las descritas para el fragmento **E** de **138**, el cual puede confirmarse por las correlaciones HMBC (espectro **67**) de H1L (δ 3.46) con C3 (δ 38.76) y de H3L (δ 2.38) y H3L (δ 2.56) con el carbono vinílico C15 (δ 114.24).

Por otra parte, en el espectro de RMN 1H se observa una señal doble en δ 2.23 ($J = 11.0$ Hz, H-5L), la cual correlaciona 1H - 1H con una señal en δ 2.33 ($J = 10.5, 10.0, 8.5, 7.5$ Hz, H6L), cuyas constante de acoplamiento de 10.5 Hz indica un acoplamiento *transdiaxial* con H5L (δ 2.23). Adicionalmente, la señal de H6L presentó correlaciones COSY con las señales resonantes en δ 3.37 (dd, $J = 8.5, 3.5$ Hz, H7L), 1.42 (m, H8L) y 1.91 (m, H8L), por lo que pueden deducirse otros dos acoplamientos *transdiaxiales* entre H6L y H7L (δ 3.37) y H8L (δ 1.42). El análisis de la señal correspondiente a H8L mostró correlaciones COSY con las señales resonantes en δ 1.91 (m, H8L),

2.03 (ddd, $J = 12.0, 8.5, 2.5$ Hz, H9 \perp) y 1.35 (m, H9 \perp), las cuales exhibieron correlaciones HSQC con dos señales de carbonos metilenos observados en $\perp 25.92$ (C8) y 36.30 (C9). Por otra parte, H7 \perp correlacionó ^1H - ^1H con un hidrógeno que resuena en $\perp 1.72$ (dsept, $J = 7.0, 3.5$ Hz, H11), la cual a su vez correlacionó con dos señales dobles ($J = 7.0$ Hz) que resonaron en $\perp 0.94$ (H₃-12) y 0.84 (H₃-13) con una integral de tres hidrógenos cada una. Lo antes descrito puede ser atribuido a un fragmento isopropilo con base en el valor de las constantes de acoplamiento y las multiplicidades que exhibieron H11, H₃-12 y H₃-13. De esta manera se establece el fragmento **G**, cuya conectividad se confirmó con el experimento HMBC, ya que se observaron correlaciones de H5 \perp ($\perp 2.23$) con C6 ($\perp 45.09$) y C7 ($\perp 82.44$); correlaciones de H9 \perp ($\perp 2.03$) con C8 ($\perp 25.92$), C6 ($\perp 45.09$), C5 ($\perp 61.39$); de H7 \perp con C5 ($\perp 61.39$), C8 ($\perp 25.92$), C11 ($\perp 31.05$), C12 ($\perp 20.21$) y C13 ($\perp 15.08$) y correlaciones de H₃13 ($\perp 0.84$) con C11 ($\perp 31.05$) y C7 ($\perp 82.44$).



Adicionalmente, se observa que H9 \perp ($\perp 2.45$) y H3 \perp correlacionan 3J con los carbonos C1 ($\perp 76.68$) y el carbono cuaternario C10 ($\perp 48.62$), lo que permite deducir que el carbono C1 del fragmento **E** está unido al fragmento **G** a través de C10. Además, H5 \perp ($\perp 2.23$) correlaciona 3J con los carbonos C1 ($\perp 76.68$), C9 ($\perp 36.30$), C10 ($\perp 48.62$), C3 ($\perp 38.76$), C4 ($\perp 147.20$), C15 ($\perp 114.24$) y con CH₃-14 ($\perp 19.12$); a su vez, CH₃-14 presentó correlaciones HMBC con C10. La integración de la información anterior permitió establecer el esqueleto de perhidroindano del sesquiterpeno de tipo axano **139**.



139

La configuración relativa mostrada en **139** se dedujo de las interacciones espaciales relevantes, observadas en el espectro NOESY (espectro **68**), entre H1 \perp y H3 \perp , H9 \perp y H6 \perp ; entre H6 \perp y H8 \perp ; y entre H8 \perp y H11. Adicionalmente, se observaron interacciones espaciales importantes entre H5 \perp y H7 \perp , H9 \perp , CH₃-14 \perp y H15a. Asimismo, CH₃-14 \perp exhibió interacciones con H2 \perp ; mientras que H3 \perp interaccionó con H15b. La información deducida del espectro NOESY permite establecer que el arreglo conformacional en solución preferido por la molécula **139** es el que se muestra en la figura **61**, quedando evidencia del perhidroindano con fusión *cis* en este sesquiterpeno de tipo axano.

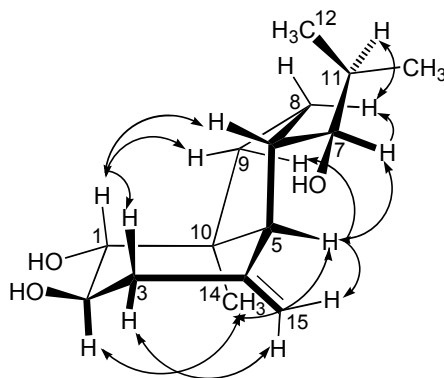
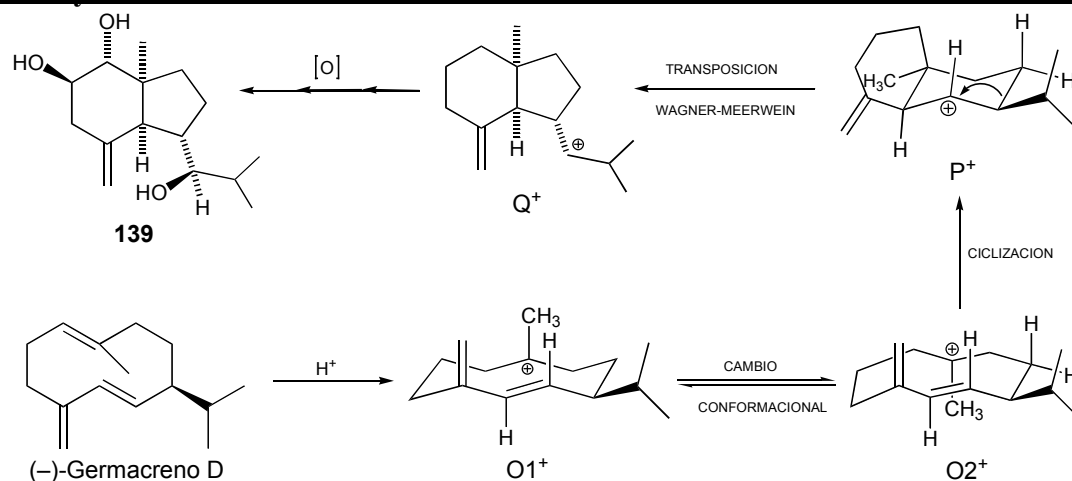


Figura **61**. Interacciones NOESY relevantes de **139**.

Los informes previos sobre sesquiterpenos de tipo axano revelan que éstos son escasos en la naturaleza [62]. A partir de la esponja *Axinella cannabiana* se aislaron algunos sesquiterpenos de tipo axano con fusión *cis*- \perp del anillo de perhidroindano, cuyas configuraciones absolutas fueron determinadas mediante correlación química y experimentos de DC [62a]. Adicionalmente, se ha reportado un sesquiterpeno de tipo axano aislado de la planta *Teclea nobilis*, cuya configuración absoluta permanece indeterminada [62b]. Para el presente trabajo puede considerarse el mismo criterio biogénico descrito para **138** y proponer una ruta biogénica para **139**. La ruta biogénica implica la protonación de (-)-germacreno D para formar el catión **O1**, cuyo cambio conformacional a **O2** permitirá la ciclización *cis* para formar el cation cadinenilo **P**. Es a partir de **P** que puede ocurrir una transposición tipo Wagner-Meerwein para formar el esqueleto de perhidroindano **Q**, el cual puede dar origen a **139** mediante una serie de oxidaciones consecutivas (Esquema **6**).



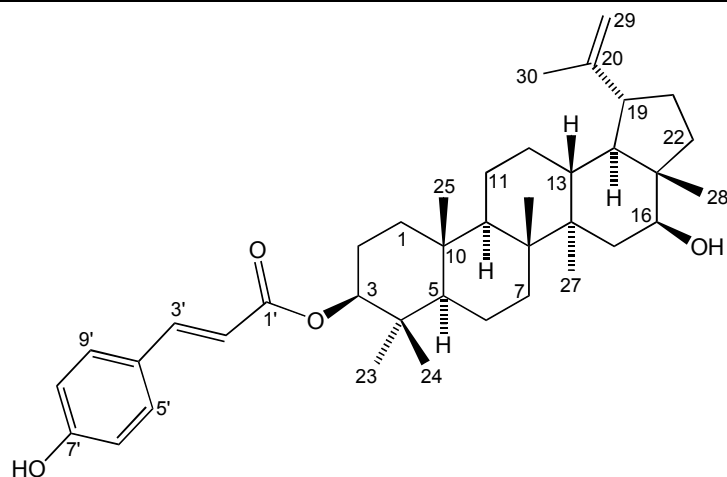
Esquema 6. Propuesta biogénica para la formación de 139.

7.3.9 3L-*trans-p*-Cumaroiloxi-16L-hidroxi-20(29)-lupeno (140)

En el espectro de masas de alta resolución se observa un ion molecular de 588.4187 *uma* que establece la fórmula molecular $C_{39}H_{56}O_4$, la cual integra para 12 insaturaciones y puede ser atribuida a un triterpeno pentacíclico esterificado con un grupo cumaróilo. La deducción anterior, puede apoyarse por el análisis del espectro de IR y de RMN 1H y ^{13}C . Así, en el espectro de RMN ^{13}C se observan 39 señales de carbonos (espectro 69), de las cuales 13 corresponden, según la información obtenida del experimento DEPT, a metinos [seis metinos olefínicos; dos metinos unidos a función oxigenada], 10 a metilenos [uno vinílico] y siete a metilos [uno vinílico]. En tanto que, en el espectro de IR se observan bandas de absorción en 3423 y 3143 asignables a hidroxilos, en 1681 atribuible a carbonilo L,L-insaturado y en 1598 y 1512 cm^{-1} para función aromática. Por otra parte, en el espectro de RMN 1H (espectro 70) se observan seis señales simples para metilos en δ 0.87, 0.98, 1.01, 1.08, 1.12 y 1.13; además, se observa una señal simple para metilo vinílico en δ 1.79 (CH_3-30) y una señal doble en δ 4.94 con integración para dos hidrógenos vinílicos (H29a y H29b), las cuales son características de grupo isopropenilo en un triterpeno de tipo lupano. Adicionalmente, en el espectro de RMN 1H se observan señales características de un grupo *trans-p*-cumaróilo evidenciadas por dos señales dobles en δ 8.02 ($J = 16.0$ Hz, H3') y en 6.70 ($J = 16.0$ Hz, H2') atribuibles a dos hidrógenos vinílicos vecinales de configuración *trans*, aunado a dos señales dobles en δ 7.65 ($J = 9.0$ Hz, H5', H9') y en 7.17 ($J = 9.0$ Hz, H6', H8'), las cuales integran para dos hidrógenos cada una siendo características de un sistema AA'MM' de un anillo aromático *para*-disustituido. El sustituyente en posición *para* es atribuido a un hidroxilo cuyo hidrógeno resuena en

campo bajo ($\perp 12.25$) como una señal simple ancha. Con la información descrita previamente puede inferirse la presencia de un triterpeno de tipo lupano esterificado con un grupo *trans-p*-cumaroilo en alguno de los cinco anillos. Mediante las correlaciones a distancia 3J se establece que el *p*-cumaroiloxilo se encuentra en la posición 3 del triterpeno de tipo lupano pues los carbonos del *gem*-dimetilo (CH₃-23, $\perp 28.6$ y CH₃-24, $\perp 17.4$) y el carbonilo de éster ($\perp 167.4$, C1') correlacionan con el hidrógeno cuyo desplazamiento químico a campo bajo ($\perp 4.90$, H3 \perp) indica que se encuentra geminal a éster. El hidrógeno geminal a éster (H3 \perp) presenta un patrón de acoplamiento espín-espín de doblete de dobletes ($J = 11.5, 4.5$ Hz), cuyas constantes de acoplamiento determinan su orientación \perp . Así, el grupo *gem*-dimetilo fue tomado como el fragmento clave para determinar la conectividad de la molécula con base en las correlaciones 1H - 1H , las correlaciones heteronucleares 1H - ^{13}C y las correlaciones a larga distancia 3J observadas en el experimento HMBC. Por un lado, se observa que los carbonos del *gem*-dimetilo (C23 y C24) correlacionan 3J con el hidrógeno H5 ($\perp 0.84$), el cual presenta una correlación cruzada con el CH₃-25 ($\perp_C 16.75$). De manera similar, se continuó con la determinación de las correlaciones homo y heteronucleares para establecer las asignaciones estructurales del triterpeno pentacíclico de tipo lupano.

Por otra parte, en el espectro de 1H se observa una señal doble de dobles ($J = 11.5, 4.5$ Hz, H16) en $\perp 3.96$, cuyo desplazamiento químico indica que se encuentra geminal a hidroxilo. Las constantes de acoplamiento observadas para H16 permiten deducir su orientación \perp ya que se acopla *axial-axial* a H15 \perp y *axial-ecuatorial* a H15 \perp . Dicho hidrógeno (H16 \perp) fue establecido en la posición 16 pues se observó que éste correlaciona 3J con el CH₃-28 ($\perp_C 12.83$). Asimismo, los hidrógenos de CH₃-28 correlacionaron 3J con el metino C18 que resuena en $\perp 48.7$ y su correspondiente hidrógeno (H18) correlacionó 1H - 1H con el hidrógeno alílico (H19) al isopropenilo, el cual resuena en $\perp 2.67$ ($J = 11.0, 6.0$ Hz) como una señal triple de dobles. H19 correlacionó 3J con los carbonos del isopropenilo; es decir, con el metileno vinílico y con el metilo vinílico que resuenan en $\perp_C 110.5$ y 19.9 , respectivamente. La información antes descrita permite establecer la estructura 3 \perp -*trans-p*-cumaroiloxi-16 \perp -hidroxi-20(29)-lupeno (**140**).



140

El triterpeno, 3 β -*trans*-*p*-cumaroiloxi-16 β -hidroxi-20(29)-lupeno (**140**), fue sometido al proceso de acetilación con piridina anhidra y anhídrido acético obteniéndose el derivado diacetilado **140a**, el cual confirma la presencia de los dos hidroxilos.

La configuración del triterpeno **140** quedó confirmada mediante el análisis por difracción de rayos X de un cristal de esta muestra (anexo 1). En la figura 62 se muestra la imagen computarizada obtenida del análisis cristalográfico.

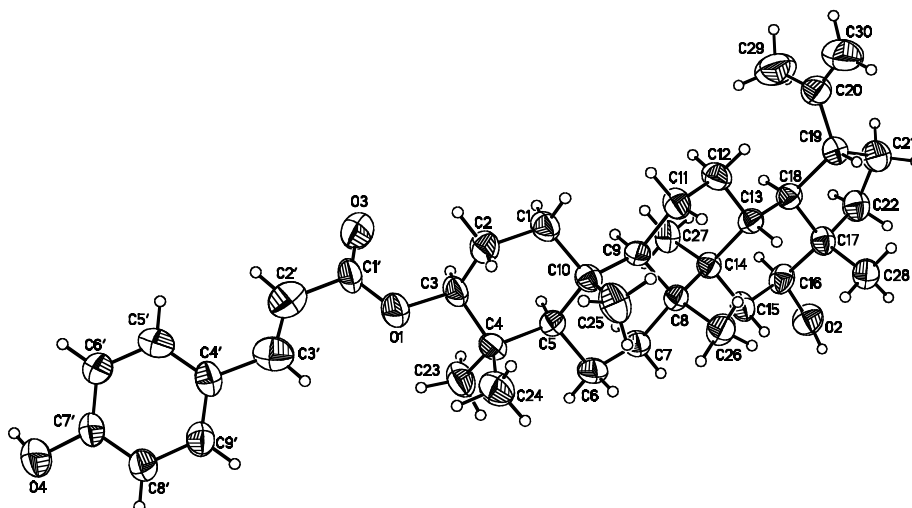


Figura 62. Estereovista ORTEP de 140.

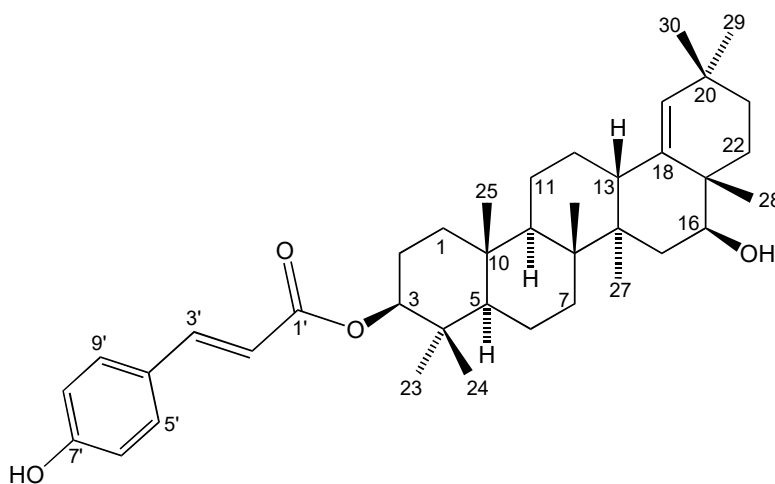
7.3.10 3 β -*trans*-*p*-Cumaroiloxi-16 β -hidroxiolean-18-eno (**141**)

En el espectro de masas de alta resolución se observa un ion molecular de 589.4257 *uma* que permite establecer la fórmula molecular C₃₉H₅₇O₄ ([M + H]⁺) la cual integra para 12 insaturaciones

y puede ser atribuida a un triterpeno pentacíclico esterificado con un grupo *p*-cumaroilo análogamente a **140**. La información deducida del espectro de masas se sustenta por lo observable en el espectro de RMN ^{13}C (espectro **71**) y el experimento DEPT, los cuales exhibieron 39 señales de carbonos correspondientes a 12 metinos (siete olefinicos, dos unidos a función oxigenada), nueve metilenos, ocho metilos y 10 carbonos cuaternarios (tres olefinicos y un carbonilo). Por otra parte, en el espectro de infrarrojo se observan bandas de absorción en 3388 asignable a hidroxilo, en 1684 atribuible a carbonilo \perp, \perp -insaturado, y en 1604 y 1514 cm^{-1} para función aromática. En el espectro de RMN ^1H (espectro **72**) se observan señales características de un anillo de benceno *p*-disustituido y de una olefina de configuración *trans*, lo que sugiere un grupo *p*-cumaroilo. El (*E*)-*p*-cumaroiloxilo se deduce del espectro de RMN ^1H por las señales dobles observadas en $\perp 7.43$ ($J = 8.5$ Hz, H5', H9') y en 6.83 ($J = 8.5$ Hz, H6', H8') características de un sistema AA'MM' de benceno 1,4-disustituido; aunado a las señales dobles en $\perp 6.30$ ($J = 15.5$ Hz, H2') y en 7.60 ($J = 16.0$ Hz, H3') atribuidas a dos hidrógenos vinílicos de configuración *trans* que se encuentran \perp y \perp a carbonilo, respectivamente. La señal del carbonilo ($\perp 167.6$) del cinamato correlaciona 3J con el hidrógeno que resuena en $\perp 4.62$ como una señal doble de dobles ($J = 11.0, 5.5$ Hz, H3 \perp), cuyo desplazamiento químico a campo bajo es debido a su posición geminal a éste éster y cuyos valores de las constantes de acoplamiento permiten deducir un acoplamiento *trans*axial (11.0 Hz) y un acoplamiento *axial-ecuatorial* (5.0 Hz) con los hidrógenos de un metileno ($\perp 1.73$ y 1.03, H₂-2). Por otro lado, el hidrógeno geminal al éster de *p*-cumaroilo presenta correlaciones a larga distancia con los carbonos de un *gem*-dimetilo que resuenan en $\perp 27.98$ (CH₃-23) y 16.73 (CH₃-24), lo cual proporciona evidencia de que el *gem*-dimetilo se encuentra en el C4 y el hidrógeno geminal a éster en el C3, como ha sido informado en muchos triterpenos. Este grupo *gem*-dimetilo fue tomado como el fragmento estructural clave para determinar la conectividad de la molécula mediante la combinación del análisis de las correlaciones observables en los espectros COSY, HSQC y HMBC. Así por ejemplo, los carbonos C-23 y C-24 correlacionaron 3J con el hidrógeno que resuena en $\perp 0.85$ (H5), el cual correlaciona 3J con el carbono C1 ($\perp 38.67$). De esta manera fue posible continuar la secuencia de correlaciones homo y heteronucleares para establecer el esqueleto del triterpeno pentacíclico de tipo oleaneno. La asignación del segundo grupo *gem*-dimetilo (C29 y C30) fue establecido por las correlaciones observadas entre el hidrógeno vinílico H19 ($\perp 4.98$, d, $J = 2.0$ Hz) y los metilos C29 ($\perp 31.04$) y C30 ($\perp 29.12$). Además, H-19 presentó correlaciones 3J con el

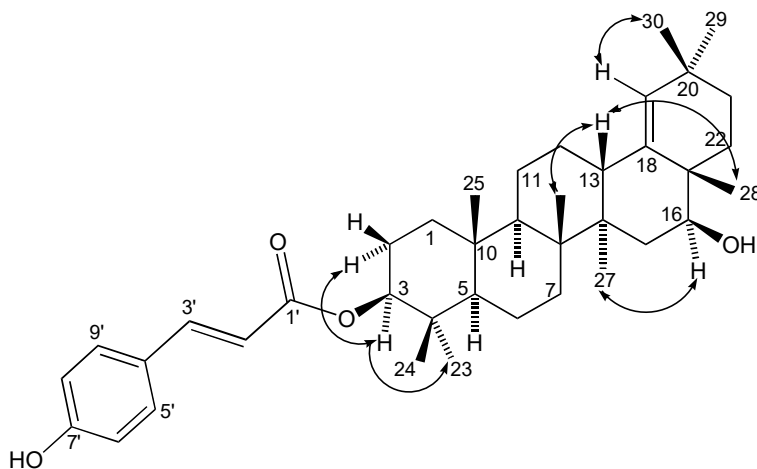
carbono alílico C13 (\perp 37.89), con los carbonos cuaternarios C20 (\perp 32.12) y C17 (\perp 40.11) y con el metileno C21 (\perp 33.02).

Por otra parte, el carbono cuaternario vinílico C18 (\perp 141.14) correlacionó 3J con el grupo metilo H28 (\perp 0.99), el que a su vez mostró correlación a larga distancia con el carbinol C16 (\perp 76.52). El hidrógeno que corresponde al carbinol C16 resuena en \perp 3.47 (H16 \perp) como una señal doble de dobles ($J = 11.5, 5.0$ Hz) y presenta acoplamiento $^1H-^1H$ con los hidrógenos que resuenan en \perp 1.70 y 1.39 correspondientes al metileno H₂-15; además, presenta correlaciones 3J con el carbono metileno C22 (\perp 33.44). Las asignaciones estructurales antes descritas permitió establecer el compuesto 3 \perp -*trans*-*p*-cumaroiloxi-16 \perp -hidroxiolean-18-eno (**141**)



141

La configuración relativa mostrada para **141** se confirmó mediante las interacciones NOESY (espectro **73**) más relevantes que ocurrieron entre H3 \perp y H2 \perp y H₃-23(\perp); entre H₃-26(\perp) y H13 \perp ; entre H13 \perp y H₃-28(\perp); entre H16 \perp y H₃-27(\perp); y entre H19 y H₃-29(\perp) y H12 (figura **63**).

Figura **63**. Interacciones NOESY relevantes de **141**.

Cabe señalar que, transcurrida una hora de haber disuelto la muestra en cloroformo deuterado, ésta experimentó una transformación isomérica *trans-cis* del grupo *p*-cumaroilo, hasta alcanzar una proporción de 3:1, respectivamente. Lo anterior quedó evidenciado en el espectro de RMN ^1H por las dos señales dobles en δ 6.82 ($J = 13.0$ Hz) y 5.83 ($J = 13.0$ Hz) atribuidas a dos hidrógenos vinílicos de configuración *cis*; además, de las dos señales dobles en δ 7.65 ($J = 8.5$ Hz) y 6.80 ($J = 8.5$ Hz) que son características de un sistema AA'MM' de un benceno 1,4-disustituido. Este tipo de isomerización ha sido previamente informado por ocurrir en triterpenos de tipo taraxeno esterificados en la posición 3 con un grupo *p*-hidroxicinamoilo, los cuales fueron aislados de la especie *Bernardia laurentii* Euphorbiaceae [63]. La asignación de las señales espectroscópicas que corresponden al isómero de configuración *cis* no fueron descritas porque la proporción en que se encuentra éste no permite observar todas las señales de ^{13}C y sus correlaciones 1J y 3J homo- y heteronucleares observables en los experimentos COSY, HSQC y HMBC.

Por otra parte, la determinación estructural de los compuestos **127** [49], **128** [50], **129** [51], **115** [33], **125** [39], **126** [40], **130** [47] y **131** [48] quedó confirmada mediante la comparación de sus propiedades físicas con las informadas en la literatura para sus homólogos estructurales.

Capítulo 8

8.1 Química y evaluación citotóxica de *Croton alamosanus*



Fotografía 3. *Croton alamosanus*.

8.1.1 Material vegetal

Croton alamosanus fue colectada 2 Km al norte de Melaque en el municipio La Huerta del estado de Jalisco en Julio de 2004. Fue identificada y autenticada por el Dr. Alfredo Pérez del Instituto de Biología de la UNAM. Un espécimen de la misma se encuentra depositado en el Herbario Nacional de la UNAM, con el número de registro: MEXU-1166941.

8.1.2 Antecedentes generales de *C. alamosanus*

Croton alamosanus Rose: Pertenece a la sección *Anadenocroton* G.L. Webster. Caracterizado como un arbusto monoico o dioco de 1 a 4 m, hojas alternas casi sésiles, enervación pinada, sin glándulas basales, estípulas enteras, inflorescencias sexuales o bisexuales, flores en racimos, sépalos enteros, frutos capsulares trilobados. Se encuentra distribuida en México (Sinaloa, de Sonora a Oaxaca) y Centroamérica [32b].

Los antecedentes etnomédicos en México indican que es apreciada por su propiedad analgésico-bucal, para lo cual se aplican los extractos de hojas y tallos en la zona bucal afectada [32c]. En la presente investigación, *C. alamosanus* fue evaluada en el ensayo de citotoxicidad frente a cinco líneas celulares de tumores humanos exhibiendo propiedades citotóxicas moderadas (tabla 2 y 3), por lo que fue considerada para un estudio químico exploratorio que proporcionara evidencia de sus constituyentes bioactivos.

8.1.3 Extracción y aislamiento de los compuestos de *C. alamosanus*

920.3 g de hojas de *Croton alamosanus* fueron maceradas, 3 veces consecutivas, en una mezcla de CH₂Cl₂:CH₃OH (1:1), lo que permitió obtener 110.8 g de un residuo verde-oscuro después de evaporar los disolventes. Posteriormente, el residuo fue disuelto en 500 mL de la mezcla CH₂Cl₂:CH₃OH (1:1), adsorbido en 140 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) y procesado mediante cromatografía en columna a presión reducida sobre sílica gel 60 (70-230 mesh) usando como eluyente Hex, mezclas de Hex:AcOEt, AcOEt y AcOEt:CH₃OH en orden creciente de polaridad. Los eluatos colectados (600 mL) fueron monitoreados mediante cromatografía analítica de placa delgada y reunidos de acuerdo a su similitud cromatográfica obteniéndose 15 fracciones principales (diagrama 5). El análisis químico de algunas fracciones permitió el aislamiento y la caracterización de dos flavonoides moderadamente bioactivos (**142** y **143**), aunado al aislamiento e identificación de otros constituyentes no activos (**144**, **145** y **126**) [diagrama 5]. La determinación de la actividad citotóxica de los metabolitos secundarios aislados fue realizada a una concentración de 50 µM (tabla 11).

Tabla 11. Determinación de la actividad citotóxica (a 50 µM) de los metabolitos secundarios aislados de *C. alamosanus*.

Compuesto	U251	PC3	K562	HCT15	MCF7
142	67.51	24.47	54.04	0	6.28
143	41.95	23.53	79.03	0	6.23
144	30.06	18.71	24.39	0	0
Adriamicina	0.32 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.14 ± 0.01

Valores en porcentaje de inhibición del crecimiento celular. Adriamicina usado como control positivo.

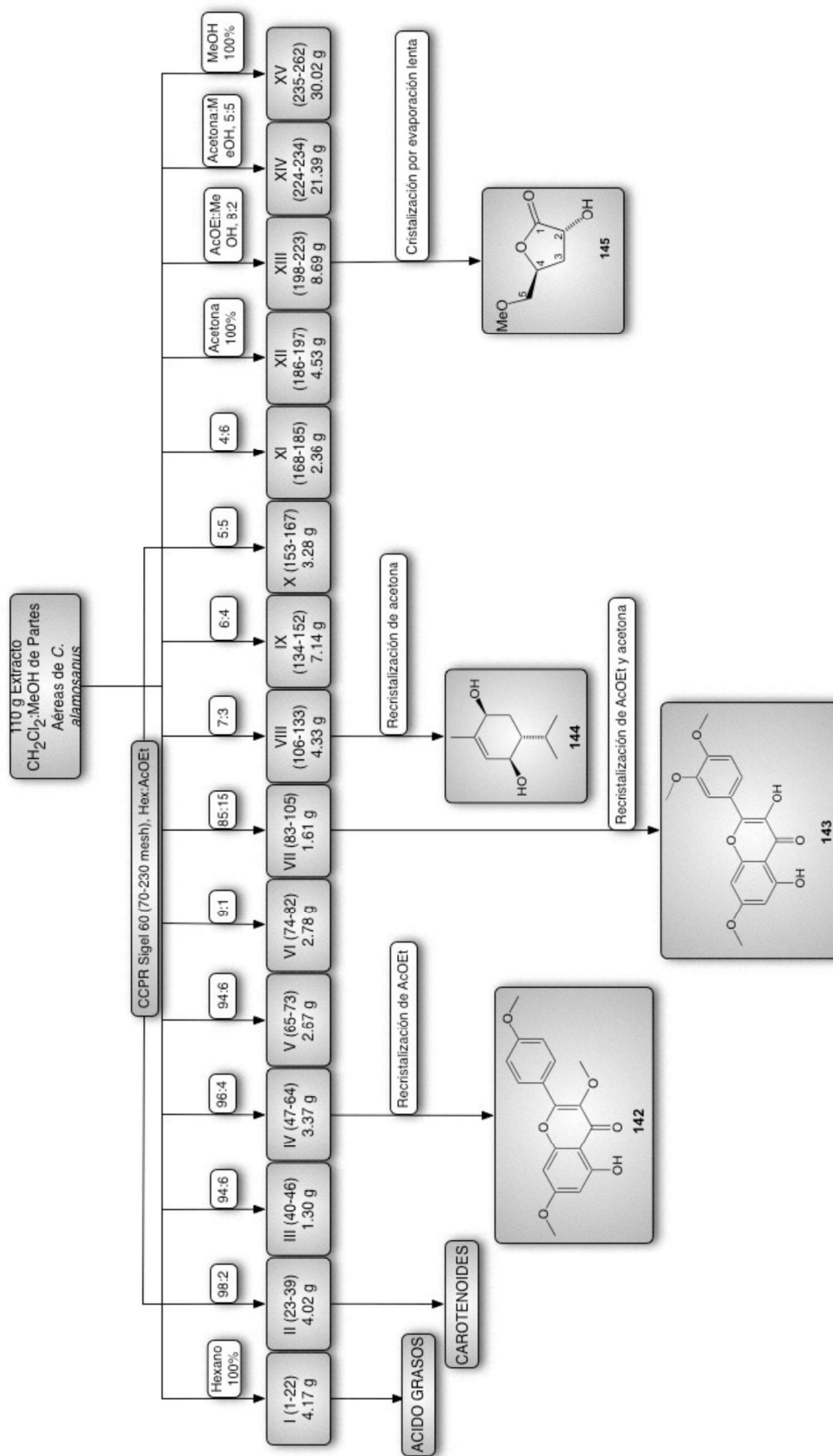


Diagrama 5. Aislamiento y purificación de los constituyentes de *Croton alamosanus*.

8.2 Propiedades físicas de los compuestos de *C. alamosanus*

8.2.1 5-Hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (142) [52]

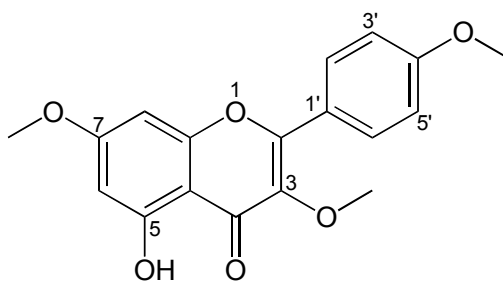
Agujas amarillas

Pf 138-140 °C

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz); δ 12.64 (HO-C(5)), 8.06 (dt, $J = 9.2, 2.2$ Hz, H-6', H-2'); 7.01 (dt, $J = 9.2, 2.2$ Hz, H-3', H-5'); 6.43 (d, $J = 2.3$ Hz, H-8); 6.34 (d, $J = 2.3$ Hz, H-6); 3.89 (3H, s, H₃-CO-C(4')) 3.87 (3H, s, H₃-CO-C(7)) 3.86 (3H, s, H₃-CO-C(3))

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz); δ 178.76 (C-4), 165.38 (C-7), 162.02 (C-5), 161.67 (C-4'), 156.73 (C-9), 155.93 (C-2), 138.84 (C-3), 130.14 (C-2', C-6'), 122.80 (C-1'), 114.04 (C-3', C-5'), 106.03 (C-10), 97.79 (C-6), 92.13 (C-8), 60.11 (CH₃-O-C4'), 55.75 (CH₃-O-C7), 55.40 (CH₃-O-C3)

EM-IE⁺: 328 (100, M^+), 329 (21, $[M + H]^+$), 327 (85, $[M - H]^+$), 313 (8, $[M - CH_3]^+$), 309 (12), 285 (41), 150 (14), 135 (12)



142

8.2.2 3,5-Dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona (143) [53]

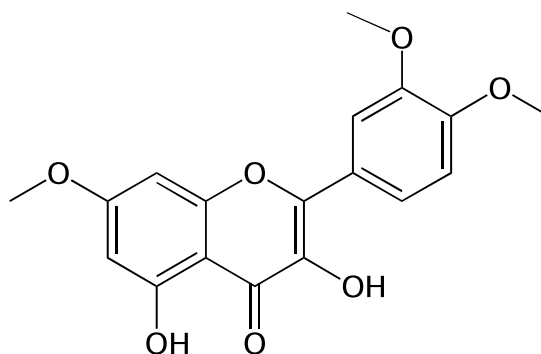
Sólido verde-amarillento

Pf 169-171°C

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz); δ 11.71 (HO-C(5)), 7.84 (dd, $J = 8.56, 2.10$ Hz, H-6'); 7.77 (d, $J = 2.06$ Hz, H-2'); 7.01 (d, $J = 8.61$ Hz, H-5'); 6.63 (s, C(3)-OH); 6.49 (d, $J = 2.19$ Hz, H-8); 6.37 (d, $J = 2.19$ Hz, H-6); 3.98 (3H, s, H₃-CO-C(4')); 3.96 (3H, s, H₃-CO-C(3')); 3.89 (3H, s, H₃-CO-C(7))

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz); δ 175.16 (C-4), 165.79 (C-7), 160.87 (C-5), 156.82 (C-9), 150.87 (C-4'), 148.91 (C-3'), 145.50 (C-2), 135.80 (C-3), 123.38 (C-1'), 121.39 (C-6'), 110.97 (C-5'), 110.64 (C-2'), 103.92 (C-10), 97.90 (C-6), 92.28 (C-8), 56.06 (CH₃-O-C7), 55.99 (CH₃-O-C4'), 55.86 (CH₃-O-C3')

EM-IE⁺: 344 (100, M^+), 345 (22, $[M + H]^+$), 343 (5, $[M - H]^+$), 329 (11, $[M - CH_3]^+$), 301 (10), 273 (5)



143

8.2.3 (3*R*,4*R*,6*S*)-*p*-Ment-1-eno-3,6-diol (144)

Agujas transparentes

Pf 164 °C

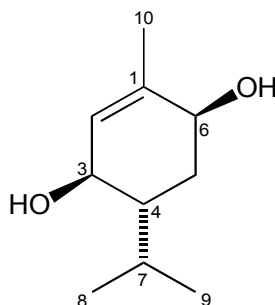
$[\alpha]_D^{25} - 5.45$ ($c = 0.22$, MeOH)

IR (película): 3257 (OH), 2948, 2882; 1465, 1028 (C=C) cm^{-1}

RMN ¹H (CD₃OD, 300 MHz); δ 5.47 (quint, $J = 1.5$, H-2), 3.85 (da, $J = 9.2$, H-3 \perp), 1.60 (dddd, $J = 12.5, 9.2, 5.7, 2.9$, H-4 \perp), 1.39 (ddd, $J = 13.5, 13.2, 4.0$, H-5), 1.72 (dt, $J = 13.5, 2.7$, H-5), 3.92 (t, $J = 3.02$, H-6 \perp), 2.11 (septd, $J = 6.98, 3.1$, H-7), 0.82 (d, $J = 6.99$, H₃-8), 0.97 (d, $J = 6.93$, H₃-9), 1.76 (t, $J = 1.6$, H₃-10)

RMN ¹³C (CD₃OD, 75 MHz); δ 137.62 (C-1), 131.10 (C-2), 70.12 (C-3), 43.06 (C-4), 31.17 (C-5), 68.59 (C-6), 27.28 (C-7), 17.33 (C-8), 21.49 (C-9), 20.76 (C-10)

EM-IE: 170 (3, M^+), 169 (3, $[M - H]^+$), 155 (5, $[M - CH_3]^+$), 127 (25, $[M - C_3H_7]^+$), 111 (80), 100 (100, $[M - C_5H_{10}]^+$), 71 (89, $[M - C_5H_7O_2]^+$), 69 (39), 43 (27), 41 (25)



144

8.2.4 (2*R*,4*S*)-2-Hidroxi-4-metoximetilenilbutanólida (145)

Sólido blanco y cristales transparentes

Pf 240 °C

$[\alpha]_D^{25} - 100.86$ ($c = 0.115$, MeOH)

UV [c 3.76 X 10⁻⁴, MeOH] 244 (log ρ 3.66), 219 (log ρ 3.07), 206 (log ρ 3.65)

DC [c 3.76 X 10⁻⁴, MeOH] $[\rho]_{241} - 2\ 740$, $[\rho]_{208} + 11\ 801$

IR (KBr): 3257, 3037, 2972, 2933, 2690, 2579, 2536, 2479, 2435, 1626, 1404, 1367, 1367, 1309, 1211, 1078, 728, 708, 489, 460 cm^{-1}

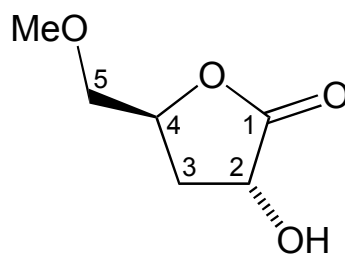
IR (nujol): 3257 (OH), 2923, 2853, 1722 (C=O), 1460, 1264, 1096, 1014, 963, 717 cm^{-1}

RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz); δ 4.05 (dd, $J = 10.5, 7.5$, H-2 \perp), 2.16 (ddd, $J = 14.0, 11.0, 5.0$, H-3 \perp), 2.44 (ddt, $J = 14.0, 7.5, 2.0$, H-3 \perp), 4.48 (sept, $J = 2.0$, H-4 \perp), 3.80 (dd, $J = 12.5, 4.5$, H-5a), 3.07 (dt, $J = 13.0, 2.0$, H-5b), 3.00 (s, H₃-CO)

RMN ¹H (D₂O, 300 MHz); δ 4.22 (dd, $J = 11.0, 7.5$, H-2 \perp), 2.30 (ddd, $J = 14.2, 11.0, 5.0$, H-3 \perp), 2.50 (ddt, $J = 14.2, 7.5, 2.0$, H-3 \perp), 4.67 (sept, $J = 2.2$, H-4 \perp), 3.99 (dd, $J = 13.0, 4.8$, H-5a), 3.23 (dt, $J = 13.0, 2.1$, H-5b), 3.10 (s, H₃-CO)

RMN ¹³C (D₂O, 75 MHz); δ 173.88 (C-1), 71.46 (C-2), 39.39 (C-3), 70.66 (C-4), 63.90 (C-5), 44.36 (C-6)

EM-IE: 146 (no observado), 145 (6, $[M - H]^+$), 100 (100, $[M - C_2H_5O]^+$), 82 (27, $[100 - H_2O]^+$), 73 (4, $[100 - CO]^+$), 18 (22)



145

8.3 Determinación estructural de los compuestos de *C. alamosanus*

8.3.1 (3R,4R,6S)-*p*-Ment-1-eno-3,6-diol (144)

El compuesto **144** fue aislado en la forma de agujas transparentes que funden a 164 °C y con signo negativo de rotación óptica ($[\alpha]_D^{25} - 5.45$). Del espectro de masas de baja resolución, modalidad IE (espectro **74**), se dedujo la fórmula molecular C₁₀H₁₈O₂, corroborada, mediante el espectro de RMN ¹³C (espectro **75**) y el experimento DEPT, por las 10 señales de carbonos

correspondientes a cinco metinos (uno vinílico y dos geminales a hidroxilo), un metileno, tres metilos (uno vinílico) y un carbono cuaternario vinílico. La información proporcionada por los espectros de RMN ^{13}C en conjunto con la obtenida del espectro de masas (dos insaturaciones), permite deducir que la estructura en cuestión corresponde a un monoterpeneo con una insaturación. En el espectro de infrarrojo se observan las bandas de absorción en 3257 asignable a hidroxilo y en 1465 y 1028 cm^{-1} atribuible a una olefina.

Por otra parte, en el espectro de RMN ^1H (espectro 76) se observa una señal quintuple característica de un protón vinílico en δ 5.47 (H2, quint, $J = 1.5\text{Hz}$) el cual mostró correlaciones cruzadas, en el espectro COLOC, con el metilo vinílico CH₃-10 (δ_{H} 1.76 y δ_{C} 20.76). Además, se observan dos señales en δ 3.85 (da, $J = 9.2\text{ Hz}$, H3 \perp) y 3.92 (t, $J = 3.0\text{ Hz}$, H6 \perp), cuyos desplazamientos químicos indican que son protones geminales a hidroxilo. Dichos protones fueron establecidos en las posiciones 3 y 6, considerando las correlaciones $^1\text{H}-^1\text{H}$ que H3 \perp exhibió con las señales atribuidas a H2 (δ 5.47) y a H4 \perp (δ 1.60, dddd, $J = 12.5, 9.2, 5.7, 2.9\text{ Hz}$), y que H6 \perp mostró con las señales asignadas a los hidrógenos H₂-5 (δ 1.39, ddd, $J = 13.5, 13.2, 4.0\text{ Hz}$ y δ 1.72, dt, $J = 13.5, 2.7\text{ Hz}$). Adicionalmente, se observaron dos señales dobles en δ 0.82 (d, $J = 6.93\text{ Hz}$, H₃-8) y 0.97 (d, $J = 6.99\text{ Hz}$, H₃-9), las cuales mostraron correlaciones, en el espectro COSY, con el hidrógeno que resuena en δ 2.11 (dsept, $J = 6.98, 3.1\text{ Hz}$, H7) cuya multiplicidad proporciona evidencia de que se trata de un metino que forma parte de un fragmento isopropilo. El valor de la constante de acoplamiento exhibida por H3 \perp (da, $J = 9.2\text{ Hz}$) indica un acoplamiento *axial-axial* con H4 \perp . Por otra parte, la multiplicidad de H6 \perp (t, $J = 3.02\text{ Hz}$) indica que la conformación preferida del ciclohexeno (figura 64) es aquella en donde los ángulos diedros H-6-H-5 son de aproximadamente 48 a 61°. Dicha conformación puede ser confirmada mediante el análisis del espectro NOESY (espectro 77), en el cual se observan interacciones relevantes entre H3 \perp y H5 \perp y H₃-8.

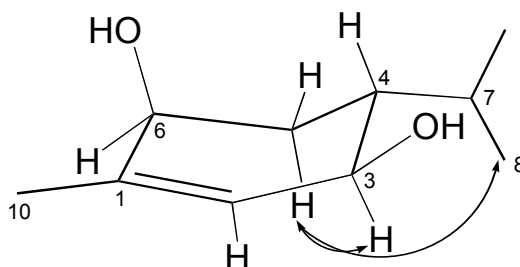
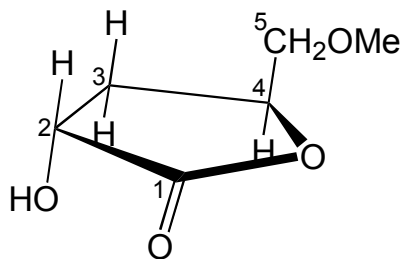


Figura 64. Proyección conformacional de 144.

Los datos espectroscópicos y espectrométricos descritos para **144** resultaron casi idénticos a los informados para el monoterpeno (+)-(3*S*,4*S*,6*R*)-3,6-dihidroxi-1-*p*-menteno [64]. Considerando que los signos de rotación óptica son opuestos, puede establecerse que estos compuestos son enantiómeros. Por lo tanto, **144** tendrá la configuración absoluta (3*R*,4*R*,6*S*). **144** ha sido informado previamente como el derivado de la oxidación del (*R*)-(-)-felandreno presente en el aceite de *Eucalyptus dives* [65]; así que éste es el primer informe de **144** como un producto natural.

8.3.2 (2*R*,4*S*)-2-Hidroxi-4-metoximetilenilbutanólida (**145**)

Del espectro de masas de baja resolución, modalidad IE, se dedujo la fórmula molecular $C_6H_{10}O_4$, sustentada por las seis señales de carbono observadas en el espectro de RMN ^{13}C (espectro **78**) atribuidas, mediante el experimento DEPT, a dos metinos geminales a oxígeno, dos metilenos (uno geminal a hidroxilo), un metilo de metoxilo y un carbono cuaternario de carbonilo. En el espectro de infrarrojo se observa una banda ancha en la región de hidroxilo (3257 cm^{-1}) y una banda en la región de carbonilos de un anillo de lactona (1722 cm^{-1}). En el espectro de RMN 1H (espectro **79**) se observa una señal doble de dobles en δ 4.05 (dd, $J = 10.5, 7.5\text{ Hz}$, H2 \perp), la cual mostró correlaciones 1H - 1H con los hidrógenos de un metileno resonante en δ 2.44 (ddt, $J = 14.0, 7.5, 2.0\text{ Hz}$, H3 \perp) y δ 2.16 (ddd, $J = 14.0, 11.0, 5.0\text{ Hz}$, H3 \perp). Asimismo, los protones H2-3 mostraron correlaciones COSY con el metino resonante en δ 4.48 (sept, $J = 4.5, 2.0\text{ Hz}$, H4 \perp), el cual a su vez correlacionó, vía COSY, con los hidrógenos de un metileno unido a oxígeno resonantes en δ 3.80 (dd, $J = 12.5, 4.5\text{ Hz}$, H5a) y δ 3.07 (dt, $J = 13.0, 2.0\text{ Hz}$, H5b). La información descrita permite inferir que la estructura en cuestión corresponde a una \perp -butirolactona eterificada con un metilo (**145**). La posición del metilo fue establecida en C5 (δ 63.90) debido a su correlación a larga distancia con los hidrógenos del metoxilo resonante en δ 3.00. Dicho grupo funcional puede ser corroborado en el espectro de masas por el pico base de m/e 100 *uma* proveniente de la pérdida del fragmento C_2H_5O (45 *uma*).

**145**

Para establecer la configuración relativa de **145** se consideraron las dos conformaciones de tipo sobre E_3 (**A**) y 3E (**B**) preferidas por la \perp -butirolactona (figura **65**) [66]. Con base en el análisis de los valores de las constantes de acoplamiento observables para H2 \perp (dd, $J = 10.5, 7.5$ Hz), H3 \perp (ddt, $J = 14.0, 7.5, 2.0$ Hz) y H3 \perp (ddd, $J = 14.0, 11.0, 5.0$ Hz) se puede establecer que la conformación **A** es la preferida en disolución. Por otro lado, las interacciones NOESY (espectro **80**) relevantes observables entre H2 \perp y H3 \perp , entre H3 \perp y H4 \perp , y entre H3 \perp y H₃CO-C5 proporcionan evidencia adicional de la preferencia conformacional **A** en disolución.

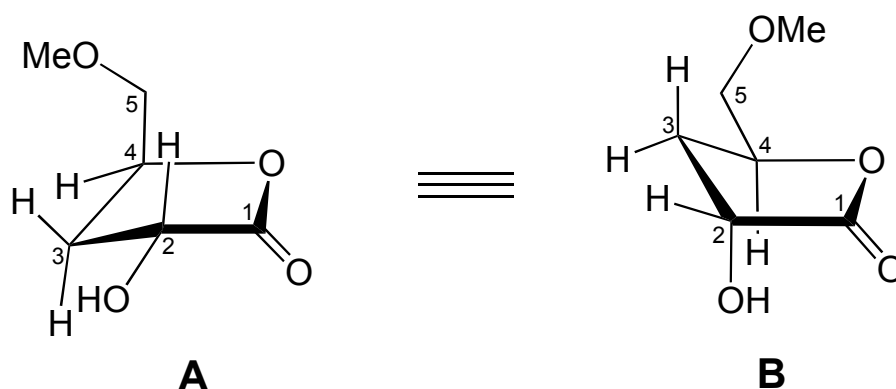


Figura **65**. Confórmeros tipo sobre E_3 (**A**) y 3E (**B**) de **145**.

De acuerdo con Beecham, la configuración absoluta de C-2 en las \perp -butirolactonas puede ser establecida con base en el signo del efecto Cotton observado en el espectro de DC para la transición $n \rightarrow \pi^*$ del carbonilo de la lactona [67]. Se propuso que el signo y la magnitud de la banda de absorción, el cual determina la quiralidad del anillo de la lactona, se debe a la influencia que ejerce el sustituyente en C2. Entonces, la configuración absoluta de la \perp -lactona se puede determinar mediante la aplicación de la regla de los octantes. En el presente trabajo, **145** exhibió un efecto Cotton negativo en 241 nm ($[\rho]_{241} = -2740$) lo que permite establecer que **145** posee la configuración absoluta $2R$ tal como se muestra en la figura **66**.

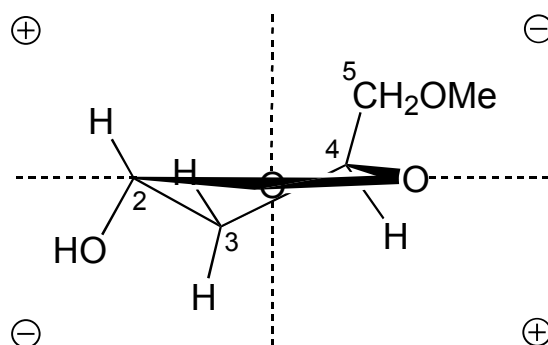
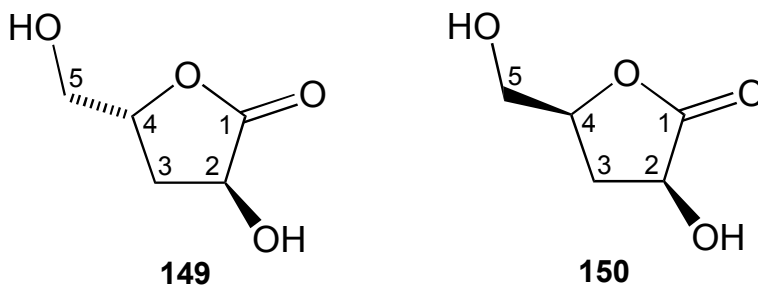


Figura **66**. Aplicación de la regla de los octantes para **145**.

Lo informado en la literatura permitió establecer que **145** es un producto natural nuevo y que es un análogo estructural de **149** y **150**, los cuales presentan una configuración absoluta $2S$ determinada mediante síntesis orgánica [68]. Cabe mencionar que el diastereómero **150** es una sustancia conocida como la “sustancia del hambre” pues es la que desencadena una serie de señales bioquímicas para dar la sensación de hambre o de saciedad [68].



Por otra parte, la determinación estructural de **142** [52] y **143** [53] quedó confirmada mediante la comparación con los datos espectroscópicos y espectrométricos informados en la literatura para sus homólogos estructurales.

Capítulo 9

9.1 Resumen y conclusiones

- El fraccionamiento biodirigido de los extractos, obtenidos de *C. glabellus*, *J. neopauciflora* y *C. alamosanus*, que mostraron propiedades citotóxicas moderadas frente a cinco líneas celulares de tumores humanos, permitió el aislamiento y la caracterización de los metabolitos secundarios bioactivos (**117**, **118**, **120**, **127**, **140**, **142** y **243**), siendo **120** el más bioactivo.
- Las propiedades citotóxicas exhibidas por el extracto orgánico de *C. glabellus* y algunos de sus constituyentes sugieren que el uso etnomédico de dicho vegetal podría ser benéfico en el tratamiento de cáncer de colon y leucemia (es necesario comprobar mediante farmacología).
- Las evaluaciones citotóxicas realizadas a los extractos de *C. niveus* y *J. platyphylla* no correlacionaron con su uso medicinal tradicional reportado. Aunque cabe mencionar que, *C. niveus* exhibió una actividad débil frente a las líneas K562 y PC3.
- Cabe destacar que los diterpenos de tipo clerodano (**116**, **121-123**) no exhibieron actividades citotóxicas, no así los diterpenos de tipo labdano (**117-119**, **118a**, **118b**), los cuales resultaron moderadamente activos sin importar la presencia o ausencia de sustituyentes en las posiciones C6 y C7 del anillo de decalina.
- En la literatura se informa sobre las propiedades citotóxicas y antitumorales (cáncer de pulmón) de los diterpenos de tipo *nor*-clerodano (**116**, **122**, **123**). Cabe destacar que en las líneas celulares ensayadas en el presente estudio, dichos diterpenos no mostraron actividad importante.
- Se aislaron y caracterizaron catorce sustancias nuevas (**121**, **132-139**, **144**, **145**), algunas de las cuales son inusuales en la naturaleza (**132-139**) y otras provienen de la formación de artefactos (**119**, **135**, **137**) obtenidos durante el proceso de aislamiento, purificación y elucidación estructural. Adicionalmente, se aislaron y caracterizaron diecisiete compuestos previamente informados en la literatura (**115-118**, **120**, **122-131**, **142** y **143**).
- Se estableció la configuración relativa y absoluta del diterpeno **118** mediante difracción por rayos X y mediante la aplicación del método modificado de Mosher. Dicho resultado fue sustentado mediante DC de su derivado **118b** y aplicación del método de la quiralidad del excitón del sistema dieno-benzoato. Los resultados experimentales establecieron que **118** pertenece a la serie de diterpenos *ent*-labdánicos, misma conclusión que fue deducida del análisis quiróptico del ceto derivado de **146** aplicando la *regla de los octantes* [35c]. El análisis de DC experimental quedó confirmado por los resultados obtenidos de la simulación teórica del espectro EDC de **118b**

mediante el nivel de teoría TD-DFT/B3LYP/H-W. El espectro de DC experimental fue reproducido adecuadamente por los cálculos, ya que el espectro EDC teórico mostró el patrón característico del excitón dividido debido a la interacción dipolo-dipolo del sistema benzoato-dieno en **118b**. Estas conclusiones contraponen lo informado en la revisión de la configuración absoluta de **117** [35d].

➤ Se caracterizó la mezcla epimérica del producto natural denominado cajucarínólida (**122, 123**) y se determinó su configuración absoluta mediante DC y aplicación de la *regla de helicidad de la cetona ρ,ρ -insaturada*.

➤ Se estableció la configuración absoluta del *cis-ent*-clerodano **121**, previamente informado como derivado de su correspondiente glucósido, mediante DC y la aplicación de la *regla de helicidad del dieno (regla de cuadrante-dieno)* del derivado **121b** obtenido de **121**.

➤ Por otra parte, se determinó la configuración absoluta de los sesquiterpenos **132-136**, mediante el método de la quiralidad del excitón por dicroísmo circular y la aplicación de reglas específicas y confiables como la *regla del sector benzoato*, la *regla de helicidad de benzoatos alílicos*, la *regla de helicidad del sistema 1,2-dibenzoato*, etc.

➤ La aplicación de modelos adecuados para determinar la configuración absoluta de **118, 121-123, 132-136** mediante dicroísmo circular y las reglas originadas del mismo, permitió extender su aplicación a monoles, dioles y trioles cíclicos secundarios; a dienos conjugados cíclicos y acíclicos; así como a cetonas saturadas cíclicas y cetonas \perp,\perp -insaturadas.

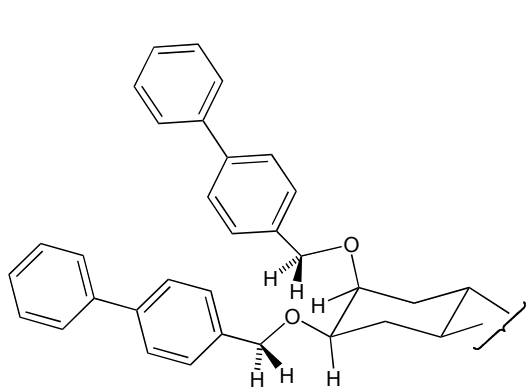
➤ La química de *J. neopauciflora* proporcionó evidencia de su alta especificidad biosintética en la formación de sesquiterpenos con fusión *cis* de sus esqueletos de cicloaxano, cadinano, eudesmano y axano (**132-135, 138, 139**).

➤ Los sesquiterpenos de tipo cicloaxano, axano e isodaucano, que son productos naturales poco frecuentes en la naturaleza, constituyen el primer informe en la química de la familia Euphorbiaceae.

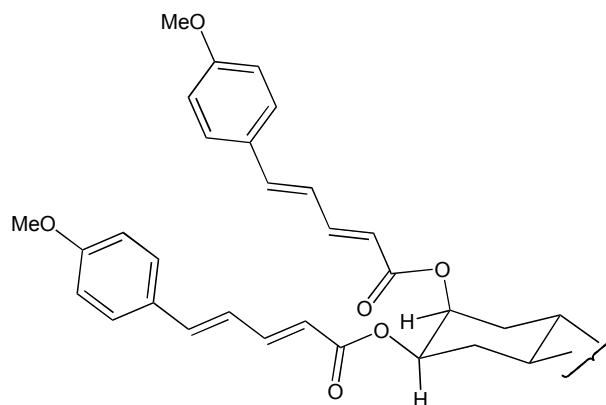
➤ Los informes previos sobre la biogénesis de los sesquiterpenoides sugieren un precursor común, el (–)-germacreno D. Bülow y König reportaron algunas rutas biogénéticas con base en los resultados obtenidos de reacciones fotoquímicas y catalizadas por ácido a partir de (–)-germacreno D [5]. Considerando dicho informe y con base en los resultados obtenidos en la determinación de la configuración absoluta de los sesquiterpenoides aislados de *J. neopauciflora* (**132-139**), se hipotetizaron rutas biogénéticas para explicar la formación de sus esqueletos poco frecuentes en la naturaleza a partir de (–)-germacreno D como el precursor biogénético.

9.2 Perspectivas

- Realizar semisíntesis o biotransformaciones enzimáticas de los metabolitos secundarios mayoritarios que exhibieron propiedades citotóxicas moderadas (**118** y **140**) y el correspondiente estudio QSAR (relación estructura-actividad cuantitativa) que permita evaluar, ponderar y descubrir nuevas moléculas líderes con potencial citotóxico y, eventualmente, antitumoral.
- Considerando el tipo de terpenos encontrados en la presente investigación y los informes en la literatura sobre sus propiedades biológicas, es plausible proponer que los diterpenoides, sesquiterpenoides y monoterpenoides sean sujetos al estudio de su potencial anti-inflamatorio, antimicrobiano, insecticida y herbicida, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* adecuados.
- El método de la quiralidad del excitón por dicroísmo circular puede ser empleado para llevar a cabo un estudio sistemático de algunos de los productos naturales aislados que exhibieron dioles vecinales en los esqueletos bicíclicos de tipo labdano, cicloaxano, eudesmano, isodaucano y axano. Puede considerarse el uso de bis-*p*-fenilbenciléteres o ácido 5-(*p*-metóxi-fenil)-pentadienoico para obtener los derivados 1,2- o 1,3-dicromofóricos.

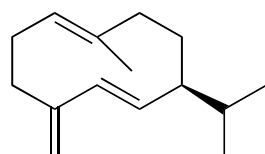


1,2-Bis-*p*-fenilbenciléter

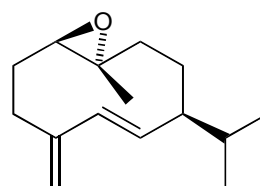


Ácido 5-(*p*-metóxi-fenil)-pentadienoico

- Realizar estudios de reactividad química del (-)-germacreno D, mediante reacciones fotoquímicas y catalizadas por ácido, a fin de obtener evidencia sobre la fusión *cis* del anillo de decalina en **133**, **134**, **138** y **139**, y la fusión *trans* del esqueleto de tipo isodaucano en **136**. Es posible considerar el (-)-epoxigermacreno D como otro intermediario dentro de las rutas de biogénesis.



(-)-Germacreno D



(-)-Epoxigermacreno D

Referencias

- [1] a) Koehn, F. E.; Carter, G. T. The Evolving Role of Natural Products in Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, *4*, 206-220. b) Butler, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2141-2153. c) Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037. d) Lee, K.-H. Current Development in the Discovery and Design of New Drug Candidates from Plant Natural Product Leads. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 273-283. 3. e) Yue-Zhong, S. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1053-1071.
- [2] a) Evans, F. J.; Taylor, S. E. In: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Pro-Inflammatory, Tumor-Promoting and Antitumor Diterpenes of the Plant Families Euphorbiaceae and Thymelaceae. Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G. W., Eds.; Springer: New York, **1983**, *44*, pp 1-99. b) Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Smith, C. R. In: Biosynthetic Products for Cancer Chemoteraphy. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, **1989**, *6*, pp. 12-51.
- [3] a) Appendino, G.; Tron, G. C.; Cravotto, G.; Palmisano, G.; Jakupovic, J. An Expeditious Procedure for the Isolation of Ingenol from the Seeds of *Euphorbia lathyris*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 76-79. 9. b) Appendino, G.; Tron, G. C.; Jarevang, T.; Sterner, O. Unnatural Natural Products from the Transannular Cyclization of Lathyrane Diterpenes. *Org. Lett.* **2001**, *3* (11), 1609-1612. c) Appendino, G.; Porta, C. D.; Conseil, G.; Sterner, O.; Mercalli, E.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. A New P-Glycoprotein Inhibitor from the Caper Spurge (*Euphorbia lathyris*). *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 140-142.
- [4] www.ss.gob.mx
- [5] Bülow, N.; König, W. A. The Role of Germacrene-D as a Precursor in Sesquiterpene Biosynthesis: Investigations of Acid Catalyzed, Photochemically and Termally Induced Rearrangements. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 141-168
- [6] a) Abdel-Fattah, M. R. The Chemical Constituents and Economic Plantas of the Euphorbiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **1987**, *94*, 293-326. 25. b) Evans, F. J.; Soper, C. J. The Tigliane, Daphnane and Ingenane Diterpenes, Their Chemistry, Distribution and Biological Activities. *J. Nat. Prod.* **1978**, *41*, 193.
- [7] a) Cox, P. A.; Balick, M. J. The Ethnobotanical Approach to Drug Discovery. *Scientific American* **1994**, 60-65. b) Houghton, P. J. Roots of Remedies: Plants, People and Pharmaceuticals. *Chemistry and Industry* **1999**, *4*, 15-19.

- [8] García-Zepeda, E. A. Aislamiento e Identificación de los Metabolitos Secundarios de *Acosmium panamense*, *Jatropha curcas* y *Tithonia diversifolia*. **2003**. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [9] a) Roengsumran, S.; Achayindee, S.; Petsom, A.; Pudhom, K.; Singtothong, P.; Surachetapan, C.; Vilaivan, T. Two new cembranoids from *Croton oblongifolius*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1163. b) Roengsumran, S.; Petsom, A.; Vilaivan, S. T. Labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 449-453.
- [10] a) Kubo, I.; Asaka, Y.; Shibata, K. Insect Growth Inhibitory *nor*-Diterpenes, *Cis*-Dehydrocrotonin and *trans*-Dehydrocrotonin, from *Croton cajucara*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2545-2546. b) Maciel, M. A. M.; Ointo, A. C.; Brabo, S. N.; Da Silva, M. N. Terpenoids from *Croton cajucara*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 823-828. c) Ichihara, Y.; Takeya, K.; Hitottsuyanagi, Y.; Morita, H.; Okuyama, S.; Suganuma, M.; Fujiki, H.; Motidome, M.; Itokawa, H. Cajucarinolide and Isocajucarinolide: Anti-Inflammatory Diterpenes from *Croton cajucara*. *Planta Med.* **1992**, *58*, 549-551.
- [11] a) Puebla, P.; López, J. L.; Guerrero, M.; Carrón, R.; Martín, M. L.; Román, L. S.; Feliciano, A. S. *Neo*-Clerodane Diterpenoids from *Croton schiedeanus*. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 551-555. b) Puebla, P.; Correa, S. X.; Guerrero, M.; Carron, R.; Feliciano, A. S. New *cis*-Diterpenoids from *Croton schiedeanus*. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 328-329.
- [12] a) Vigor, C.; Fabre, N.; Fourasté, I.; Moulis, C. Three Clerodane Diterpenoids from *Croton eluteria*. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 1209-1212. b) Vigor, C.; Fabre, N.; Fourasté, I.; Moulis, C. *Neo*-Clerodane Diterpenoids from *Croton eluteria*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1180-1182.
- [13] a) Block, S.; Baccelli, C.; Tinant, B.; Van Meervelt, L.; Rozenberg, R.; Jiwan, J. L. H.; Llabres, G.; Pauw-Gillet, M. C.; Quentin-Leclercq, J. Diterpenes from *Croton zambesicus*. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1165-1171. b) Ngadjui, B. T.; Abegaz, B. M.; Keumedjio, F.; Folefoc, G. N.; Kapche, G. W. F. Diterpenoids from *Croton zambesicus*. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 345-349. c) Ngadjui, B. T.; Folefoc, G. N.; Keumedjio, F.; Dongo, E.; Sondengam, B. L.; Connolly, J. D. Crotonadiol, a Labdane Diterpenoid from the Stem Bark of *Croton zambesicus*. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 171-174.
- [14] Sutthivaiyakit, S.; Nareeboon, P.; Ruangrangi, N.; Ruchirawat, S.; Pisutjaroenpong, S.; Mahidol, C. Labdane and Pimarane Diterpenes from *Croton joufra*. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 811-814.

- [15] Insect Antifeedants from *Croton jatrophoides*: Structures of Zumketol, Zumsenin, and Zumsenol. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 244-247.
- [16] Aguilar-Guadarrama, A. B.; Rios, M. Y. Three New Sesquiterpenes from *Croton arboreous*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 914-917.
- [17] a) Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. In *Circular Dichroism-Principles and Applications*; Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W., Eds.; Wiley-VCH: New York, 2000; Chaps. 10, 11, 13, and 15. b) Sznatke, G. Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion – Principles and Application to the Investigation of the Stereochemistry of Natural Products. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, *7*, 14-25. c) Eyring, H.; Liu, H.-C.; Caldwell, D. Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism. *Chem. Rev.* **1968**, *68*, 525-540. d)
- [18] a) Harada, N.; Nakanishi, K. The Exciton Chirality Method and Its Application to Configurational and Conformational Studies of Natural Products. *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 257-263. b) Chang, M.; Meyers, H. V.; Nakanishi, K.; Ojika, M.; Park, J. H.; Park, M. H.; Takeda, R.; Vázquez, J. T.; Wiesler, W. T. Microscale Structure Determination of Oligosaccharides by the Exciton Chirality Method. *Pure & Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1193-1200.
- [19] a) Kirk, D. N. The Chiroptical Properties of Carbonyl Compounds. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 777-818. b) Gawronski, J. K. Circular Dichroism and Stereochemistry of Chiral Conjugated Cyclohexenones. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 3-26. c) Kirk, D. N.; Klyne, W. Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism. Part LXXXII. An Empirical Analysis of the Circular Dichroism of Decalones and their Analogues. *J. Chem. Soc. Perkin I.* **1974**, 1076-1103. d) Koreeda, M.; Harada, N.; Nakanishi, K. Exciton Chirality Method as Applied to Conjugated Enones, Esters, and Lactones. *J. Amer. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 266-268.
- [20] a) Burgstahler, A. W.; Ziffer, H.; Weiss, U. The Configurations of Levopimaric Acid and γ -Phellandrene; Interpretation of their Rotatory Dispersions. *J. Amer. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4660-4661. b) Moscowitz, A.; Charney, E.; Weiss, U.; Ziffer, H. Optical Activity in Skewed Dienes. *J. Amer. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4661-4663. c) Moriarty, R. M.; Paaren, H. E.; Weiss, U.; Whalley, W. B. A Quadrant Rule for the Prediction of Chiroptical Effects of Optically Active Homoannular Cisoid Dienes. *J. Amer. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6804-6810.
- [21] Gawronski, J. K.; Walborsky, H. M. Circular Dichroism of Linearly Conjugated Chromophores. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2863-2870.
- [22] Harada, N.; Chen, S.-M. L.; Nakanishi, K. Quantitative Definition of the Exciton Chirality and the Distance Effect in the Exciton Chirality Method. *J. Amer. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 5345-5352.

- [23] Nakanishi, K.; Harada, N. A Method for Determining the Chiralities of Optically Active Glycols. *J. Amer. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3989-3991. b) Liu, H.-W.; Nakanishi, K. Additivity Relation Found in the Amplitudes of Exciton-Split Circular Dichroism Curves of Pyranose Benzoates. *J. Amer. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5591-5593.
- [24] a) Harada, N.; Ohashi, Mo.; Nakanishi, K. The Benzoate Sector Rule, a Method for Determining the Absolute Configurations of Cyclic Secondary Alcohols. *J. Amer. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 7349-7351. b) Harada, N.; Ohashi, Mo.; Nakanishi, K. Optical Rotatory Power of Benzoate Group. *J. Amer. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 7351-7353.
- [25] Adams, M. A.; Nakanishi, K.; Still, W. C.; Arnold, E. V.; Clardy, J.; Persoons, C. J. Sex Pheromone of the American Cockroach: Absolute Configuration of Periplanone-B. *J. Amer. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 2495-2498.
- [26] Harada, N.; Iwabuchi, J.; Yokota, Y.; Uda, H. A Chiroptical Method for Determining the Absolute Configuration of Allylic Alcohols. *J. Amer. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5590-5591
- [27] Winkler, J. D.; Hong, B. C.; Bahadar, A.; Kazanietz, M. G.; Blumberg, P. M. Ingenol 3,20-Dibenzoate Has a Negligible Affinity for Protein Kinase C, the Target of Tumor Promoting Phorbol Type Diterpenoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 577-580.
- [28] Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757-766.
- [29] a) Hartwell, J. L. Plants Used Against Cancer. A Survey. *Lloydia* **1969**, *32*, 153-175. b) Steinmann, V. W. Diversidad y Endemismo de la Familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botanica Mexicana* **2002**, *61*, 61-93. c) Pax, F.; Hoffmann, K. Euphorbiaceae. In A. Engler and K. Prantl Eds. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Zweite Auflage. 19c*: p. 11-233. Leipzig; W. Engelmann. d) Seigler, D. S. Phytochemistry and Systematics of the Euphorbiaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **1994**, *81*, 380-401.
- [30] Cordell, G. A.; Kinghorn, A. D.; Pezzuto, J. M. Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structure Determination. Ed. Colegate, S. M.; Molyneux, R. J. CRC Press. Inc. London. **1993**, Cap. 10, p. 195-216.
- [31] a) Hamburguer, M.; Hostettmann, K. Bioactivity in Plants: The Link Between Phytochemistry and Medicine. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3864-3874. b) Cordell, G. A. Changing Strategies in Natural Products Chemistry. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1580-1585.

- [32] a) Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Tomo: I, Instituto Nacional Indigenista. **1994**. b) 23. Martínez, M. Las Plantas Medicinales de México. Ed. Botas. 4ta. edición. México, D.F. **1959**. c) Díaz, J. L. Enciclopedia de las Plantas Medicinales. Monografías Selectas. 1ra. edición, México, D. F., **1976**.
- [33] Aldrich Library of ^{13}C y ^1H FT NMR Spectra. **1993**, 3, 569 A (γ -sitosterol).
- [34] a) Scholichin, M.; Yamasaki, K.; Miyaka, R.; Yahara, S.; Tanaka, O. Labdane Type Diterpenes from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* **1980**, 19, 326-327. b) Bohlmann, F.; Zdero, C.; Grenz, M. Weitere Inhaltsstoffe aus Vertretern der *Eupatorium*-Gruppe. *Chem. Ber.* **1977**, 110, 1034-1041. c) Bohlmann, F.; Fritz, U. Neue Diterpene und Acetylenverbindungen aus *Nidorella* Arten. *Phytochemistry* **1978**, 17, 1769-1772.
- [35] a) Ortega, A.; Martínez, R.; García, L. C. Los diterpenos de *Stevia salicifolia* Cav. Estructura del Stevinsol y Salicifoliol. *Rev. Latinoamer. Quím.* **1980**, 11, 45-48. b) Darise, M.; Kohda, H.; Mizutani, K.; Kasai, R.; Tanaka, O. Chemical Constituents of Flowers of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Agric. Biol. Chem.* **1983**, 47, 133-135. c) Zdero, C.; Bohlmann, F.; Schemeda-Hirschmann, G. Beyerene Derivatives and Other Terpenoids from *Stevia aristata*. *Phytochemistry* **1987**, 26, 463-466. d) Ohtsuki, T.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Yamaguchi, N.; Ishibashi, M. Isolation of Austroinulin Possessing Cell Cycle Inhibition Activity from *Blumea glomerata* and Revision of its Absolute Configuration. *Planta Med.* **2004**, 70, 1170-1173.
- [36] a) Tschesche, R.; Plenio, H. U. Über Marrubiasid und Marrubialacton, zwei Diterpenederivate mit umgelagertem Ladangerüst aus *Leonorus marrubiastrum* L. *Chem. Ber.* **1973**, 106, 2929-42. b) Bläs, B.; Zapp, J.; Becker, H. Ent-Clerodane and other Constituents from the Liverwort *Adelanthus lindenbergianus* (Lehm.) Mitt. *Phytochemistry* **2004**, 65, 127-137.
- [37] a) Wang, Y.; Hamburger, M.; Gucho, J.; Hosttemann, K. Antimicrobial Flavonoids from *Psidia trinervia*, and their Methylated and Acetylated Derivatives. *Phytochemistry* **1989**, 28, 2323-2327. b) Ma, Y. L.; Van der Heuvel, H.; Claeys, M. Characterization of 3-Methoxyflavones Using Fast-Atom Bombardment and Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, 13, 1932-1942.
- [38] a) Grouiller, A.; Pacheco, H. Flavonoids Compounds. VI. Nuclear Magnetic Resonance Spectra of some *O*-glucosylflavonols, their Aglycons, and three Synthetic Mono- and Di-*O*-glucosylflavones. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1967**, 6, 1938-1943. b) Wang, Y.; Hamburger, M.; Gucho, J.; Hosttemann, K. Antimicrobial Flavonoids from *Psidia trinervia*, and their Methylated and Acetylated Derivatives. *Phytochemistry* **1989**, 28, 2323-2327.

- [39] Faizi, S.; Ali, M.; Saleem, R.; Irfanulla; Bibi, S. Complete ^1H and ^{13}C NMR Assignments of Stigma-5en-3-*O*- γ -glucoside and its Acetyl Derivative. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 399-405
- [40] Bruyn, A.; Alvarez, P. A. The Identification by ^1H - y ^{13}C -NMR Spectroscopy of Sucrose, Ketose and Neokestose in Mixtures Present in Plant Extracts. *Carbohydr. Res.* **1992**, *235*, 303-308.
- [41] a) Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. High-Field FT NMR Application of Mosher's Method. The Absolute Configurations of Marine Terpenoids. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092-4096. b) Su, B. N.; Park, E. J.; Mbwambo, Z. H.; Santarsiero, B. D.; Mesecar, A. D.; Fong H. H. S.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. New Chemical Constituents of *Euphorbia quinquecostata* and Absolute Configuration Assignment by a Convenient Mosher Ester Procedure Carried Out in NMR Tubes. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1278-1282.
- [42] Burkert U.; Allinger N. L. *Molecular Mechanics*, ACS Monograph 177; American Chemical Society: Washington, DC. **1982**.
- [43] Cifuentes, D. A.; Borkowski, E. J.; Sosa, M. E.; Gianello, J. C.; Giordano, O. S.; Tonn, C. E. Clerodane Diterpenes from *Baccharis sagittalis*: Insect Antifeedant Activity. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 899-905.
- [44] a) Harraz, F. M.; Pcolinski, M. J.; Doskotch, R. W. *Cis*-Clerodane Diterpene Lactones from *Amphiachryris dracunculoides*. **2**. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 5-14. b) Zdero, C.; Bohlmann, F.; King, R. M. Diterpenes and Norditerpenes from the *Aristeguetia* Group. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2991-3000.
- [45] Canales, M.; Hernández, T.; Caballero, J.; Romo de Vivar, A.; Avila, G.; Duran, A.; Lira, R. Informant Consensus Factor and Antibacterial Activity of the Medicinal Plants Used by the People of San Pedro Coxcatlán, Puebla, México. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 429.
- [46] a) Pettit, G. R. Progress in the Discovery of Biosynthetic Anticancer Drugs. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 812-821. b) Setzer, W. N.; Setzer, M. C. Plant-Derived Triterpenoids as Potential Antineoplastic Agents. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 540-556.
- [47] Kanlayavattanakul, M.; Ruangrunsi, N.; Watanabe, T.; Ishikawa, T. Chemical Constituents of *Pterocaulon redolens*. *Heterocycles* **2003**, *61*, 183-187.
- [48] Günther, H.; Priestien, J.; Joseph-Nathan, P. Carbon-13 NMR Spectra of Coumarins and Methoxycoumarins – A Reinvestigation of Charge Density/Chemical Shift Relations. *Org. Magn. Reson.* **1975**, *7*, 339-344.

- [49] Seger, C.; Jandl, B.; Brader, G.; Robien, W.; Hofer, O.; Greger, H. Case Studies of CSEARCH Supported Structure Elucidation Strategies: Lupeol and a New Germacrane Derivative. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, *359*, 42-45
- [50] Wenkert, E.; Baddeley, G. V.; Burfitt, I. R.; Moreno, L. N. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Naturally-Occurring Substances. LVII. Triterpenes Related to Lupane and Hopane. *Org. Magn. Reson.* **1978**, *11*, 337-343.
- [51] Mahato, S. B.; Kundu, A. P. ¹³C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids- A Compilation and some Salient Features. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517-1575.
- [52] Kumari, G. N. K.; Rao, L. J. M.; Rao, N. S. P. Carbon-13 NMR Data of Flavonol Methyl Ethers of *Solanum pubescens*. *Proceeding-Indian Academy of Sciences, Chemical Sciences* **1986**, *97*, 171-176.
- [53] Dong, H.; Gou, Y.-L.; Cao, S.-G.; Chen, S.-X.; Sim, K.-Y.; Goh, S.-H.; Kini, R. M. Eicosenones and Methylated Flavonols from *Amomum koenigii*. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 899-902.
- [54] a) Itokawa, H.; Matsumoto, H.; Mihashi, S. Isolation of Oppositane- and Cycloodesmane-type Sesquiterpenoids from *Torilis japonica* D. C. *Chem. Lett.* **1983**, 1253-1256. b) Keun, J. Y.; Dong, K. S.; Si-Hyung, P.; Im, S. L.; Sei, O. R.; Jung, L. J.; Eun-Hee, K.; Chaejoon, C.; Hyeong-Kyu, L. 5 γ ,7 γ (H)-6,8-Cycloodesma-1 γ ,4 γ -diol from the Flower Buds of *Magnolia fargesii*. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 1383-1386. c) Guella, G.; Skropeta, D.; Manzini, I.; Pietra, F. The First 6,8-Cycloodesmane Sesquiterpene from a Marine Organism: The Red Seaweed *Laurencia microcladia* from the Baia di Calenzana, Elba Island. *Z. Naturforsch.* **2002**, *57b*, 1147-1151.
- [55] a) Niwa, M.; Iguchi, M.; Yamamura, S. Co-occurrence of (-) and (+)-Germacrene-D in *Solidago altissima* L.: Determination of the Optical Rotation of Optically Pure Germacrene-D. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 997-999. b) Yamamura, S.; Niwa, M.; Ito, M.; Saito, Y. Biomimetic Conversion of Epoxigermacrene-D to a Novel Sesquiterpene of the Plant *Torilis japonica* D.C. *Chem. Lett.* **1982**, 1668-1684
- [56] a) Kuo, Y. H.; Chyu, C. F.; Lin, H. C. Cadinane Type Sesquiterpenes from the Roots of *Taiwania cryptomerioides* Hayata. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 986-989. b) Trivedi, G. K.; Wagh, A. D.; Paknikar, S. K.; Chakravarti, K. K.; Bhattacharyya, S. C. Transformation Products from BF₃-Catalyzed Reaction of Khusinol. *Tetrahedron* **1966**, *22*, 1641-1649
- [57] Haasnoot, C. A. G.; De Leeuw, F. A. A. M.; Altona, C. The Relationship Between Proton-Proton NMR Coupling Constants and Substituent Electronegativities. An Empirical Generalization of the Karplus Equation. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2783-2792.

- [58] Paul, C.; Wilfried, A. K.; Wu, C. L. Sesquiterpenoids Constituents of the Liverworts *Lepidozia fauriana* and *Lepidozia vitrea*. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 789-798.
- [59] Ghisalberti, E. L. The Daucane (Carotane) Class of Sesquiterpenes. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 597-623.
- [60] a) Nishizawa, M.; Inoue, A.; Hayashi, Y.; Kosela, S.; Iwashita, T. Structure of Aphanamol I and II. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3660-3662. b) Hansson, T.; Wicberg, B. A Short Enantiospecific Route to Isodaucane Sesquiterpenes from Limonene. On the Absolute Configuration of (+)-Aphanamol I and II. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5370-5376.
- [61] a) Zhang, H.-J.; Tan, G. T.; Santarsiero, B. D.; Mesecar, A. D.; Hung, N. V.; Cuong, N. M.; Soejarto, D. D.; Pezzuto, J. M.; Fong, H. H. S. New Sesquiterpenes from *Litsea verticillata*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 609-615. b) Sun, Z.; Chen, B.; Zhang, Z.; Hu, C. Four New Eudesmanes from *Caragana intermedia* and Their Biological Activities. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1975-1979.
- [62] a) Adinolfi, M.; De Napoli, L.; Di Blasio, B.; Iengo, A.; Pedone, C.; Santacroce, C. The Absolute Configuration of the Axane Sesquiterpenes from the Sponge *Axinella cannabiana*. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *32*, 2815-2816 (Incluyendo 2 autocitas). b) Al-Rehaily, A. J.; Ahmad, M. S.; Mossa, J. S.; Muhammad, I. New Axane and Oppositane Sesquiterpenoids from *Teclea nobilis*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1374-1376.
- [63] McLean, S.; Reynolds, F. W.; Yang, J.-P.; Jacobs, H.; Jean-Pierre, L. L. Total Assignment of the ^1H and ^{13}C Chemical Shifts for a Mixture of *cis*- and *trans*-*p*-Hydroxycinnamoyl Esters of Taraxerol with the Aid of High-Resolution, ^{13}C -Detected, ^{13}C - ^1H Shift Correlation Spectra. *Magn. Reson. Chem.* **1994**, *32*, 422-428
- [64] Delgado, G.; Ríos, M. Y. Monoterpenes from *Chrisactinia mexicana*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3129-3131.
- [65] a) González, A. G.; Barrera, J. B.; Barrera, J. L. B.; Massanet, G. M. Química de las Compuestas. XI. *Eupatorium macrocephalum* Less. *Ann. Quím.* **1972**, *68*, 319-323. b) Stolow, R. D.; Sachdev, K. The *p*-Menth-1-ene-3,6-diols. Correlation of Absolute Configuration with Optical Rotation. *Tetrahedron* **1965**, *21*, 1889-1895.
- [66] Dinarés, I.; Entrena, A.; Jaime, C.; Segura, C.; Font, J. Vicinal Ring H/H Coupling. Constants of γ -Lactones Containing Two Hydroxyl Groups. *Electr. J. Theor. Chem.* **1997**, *2*, 160-167.
- [67] a) Beecham, A. F. Circular Dichroism in Lactones. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *19*, 2355-2360. b) Okuda, T.; Harigaya, S.; Kiyomoto, A. Studies on Optical Rotatory Dispersion of Five-Membered

Sugar-Lactones: Configuration and the Sign of an Optical Rotatory Dispersion Curve. *Chem. Pharm. Bull.* **1964**, *12*, 504-506.

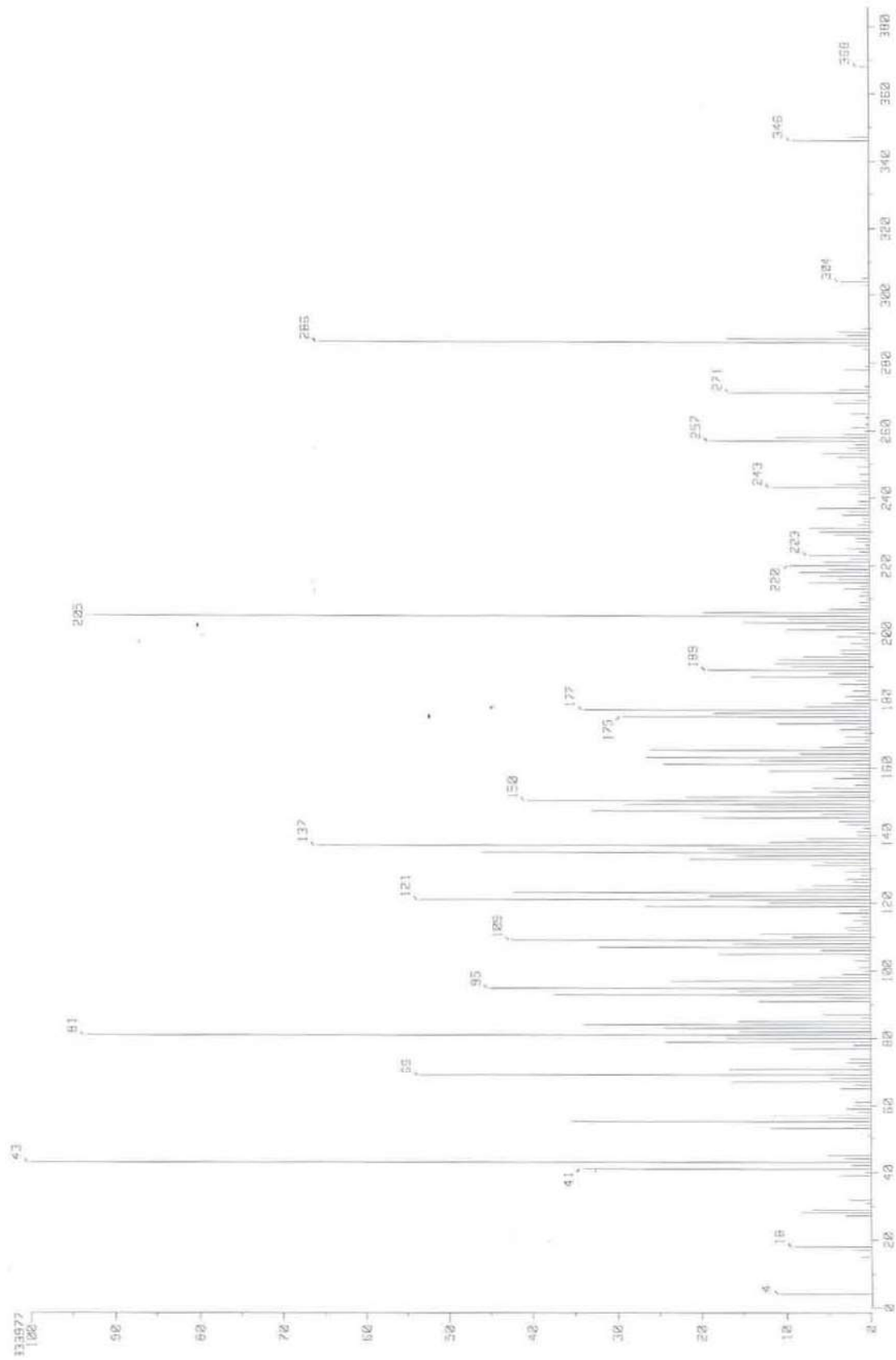
[68] a) Uchikawa, O.; Okukado, N.; Sakata, T.; Arase, K.; Terada, K. Synthesis of (S)- and (R)-3-Hydroxy-4-butanolide and (2S,4S)-, (2R,4S)-, (2S,4R)-, and (2R,4R)-2-Hydroxy-4-hydroxymethyl-4-butanolide and their Satiety and Hunger Modulating Activities. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1988**, *61*, 2025-2029. b) Matsumoto, K.; Ebata, T.; Koseki, K.; Kawakami, H.; Okano, K.; Matsushita, H. Synthesis of (2S,4S)-2-Hydroxy-4-hydroxymethyl-4-butanolide, a Hunger Substance. *Heterocycles* **1992**, *34*, 363-367.

[69] a) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Lyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voht, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B. G.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian 03. Revision B. 05. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **2003**. b) Hay, J.; Wadt, W. R. *Ab initio* Effective Core Potentials for Molecular Calculations. Potentials for the Transition Metal Atoms Sc to Hg. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 270-283. c) Hay, J.; Wadt, W. R. *Ab initio* Effective Core Potentials for Molecular Calculations. Potentials for Main Group Elements Na to Bi. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 284-298.

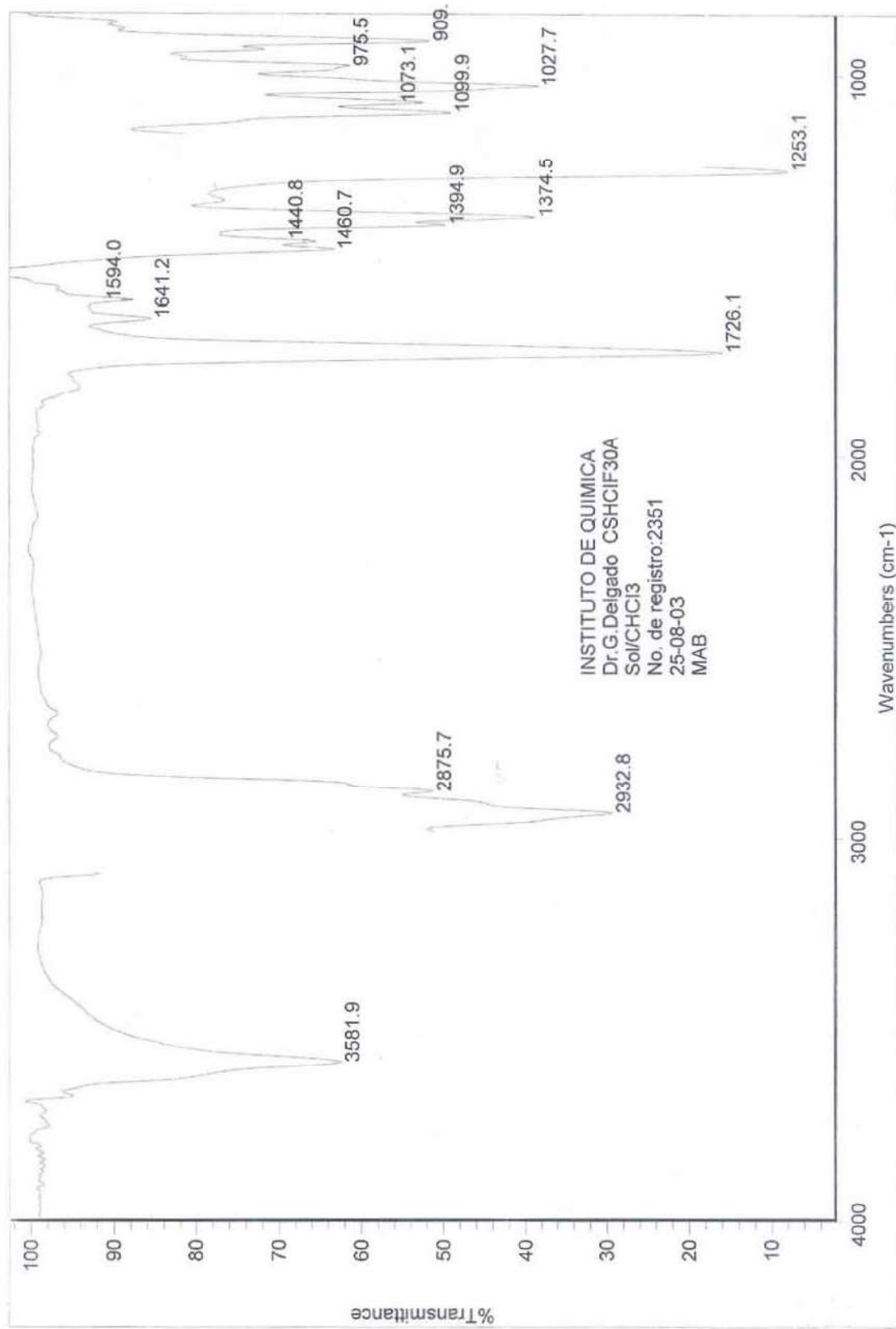
[70] Diedrich, C.; Grimme, S. Systematic Investigation of Modern Quantum Chemical Methods to Predict Electronic Circular Dichroism Spectra. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 2524-2539.

[71] Koch, W.; Holthausen, M. C.; A Chemist's Guide to Density Functional Theory. Wiley, Weinheim. **2000**.

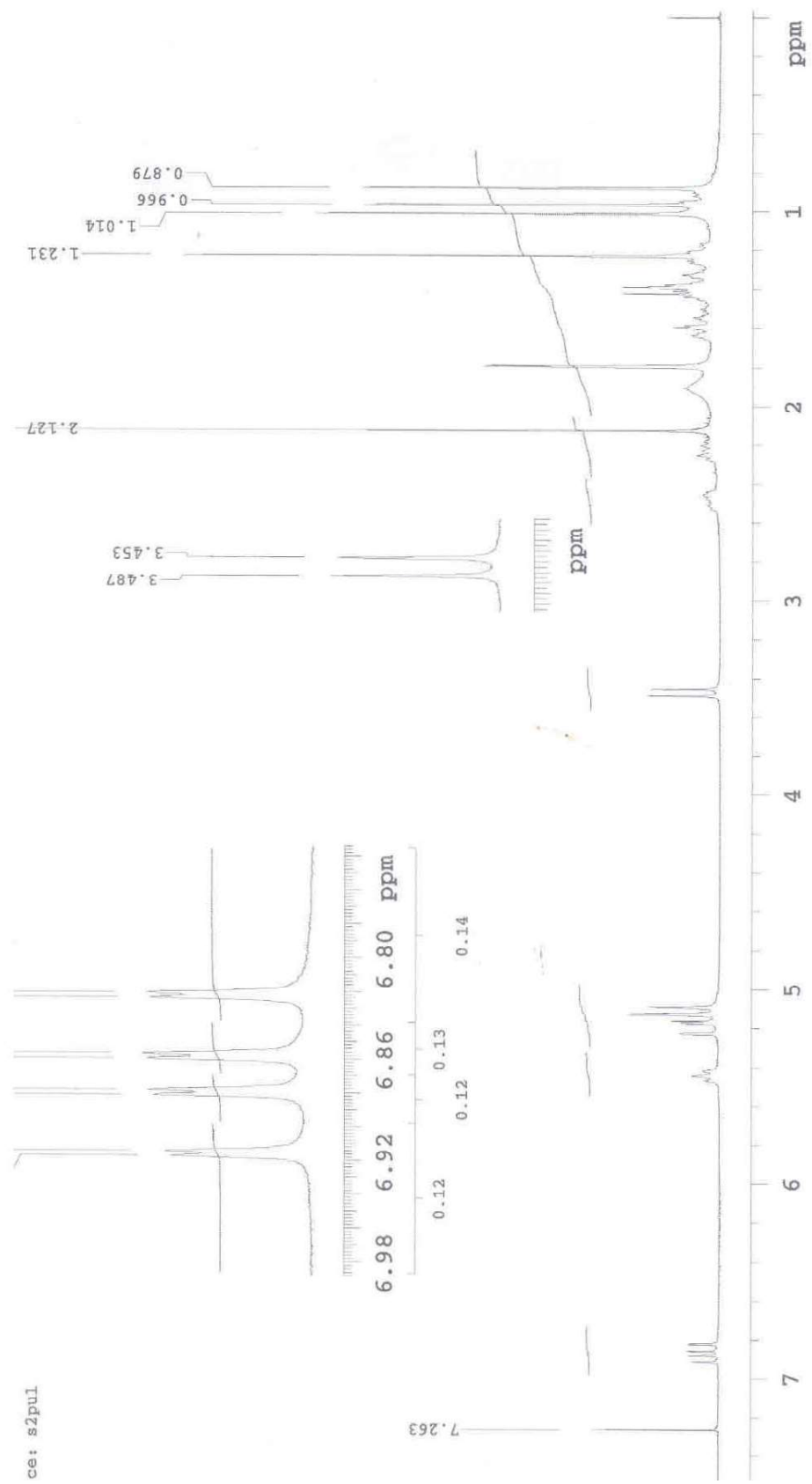
NOTA: Las imágenes que aparecen en las páginas 16-18 fueron tomadas de la tesis: Mühlbacher, J. Molecular Modelling und Chiralität: Aufklärung der absoluten Konfiguration von Natur- und Wirkstoffen mit ungewöhnlichem Circular-Dichroismus. Würzburg, Deutschland. **2003**.



Espectro 1. EM-IE (70 eV) de la 6-O-acetilaustroinulina (118).



Espectro 2. IR (CHCl₃) de 6-O-acetilaustroinulina (**118**).

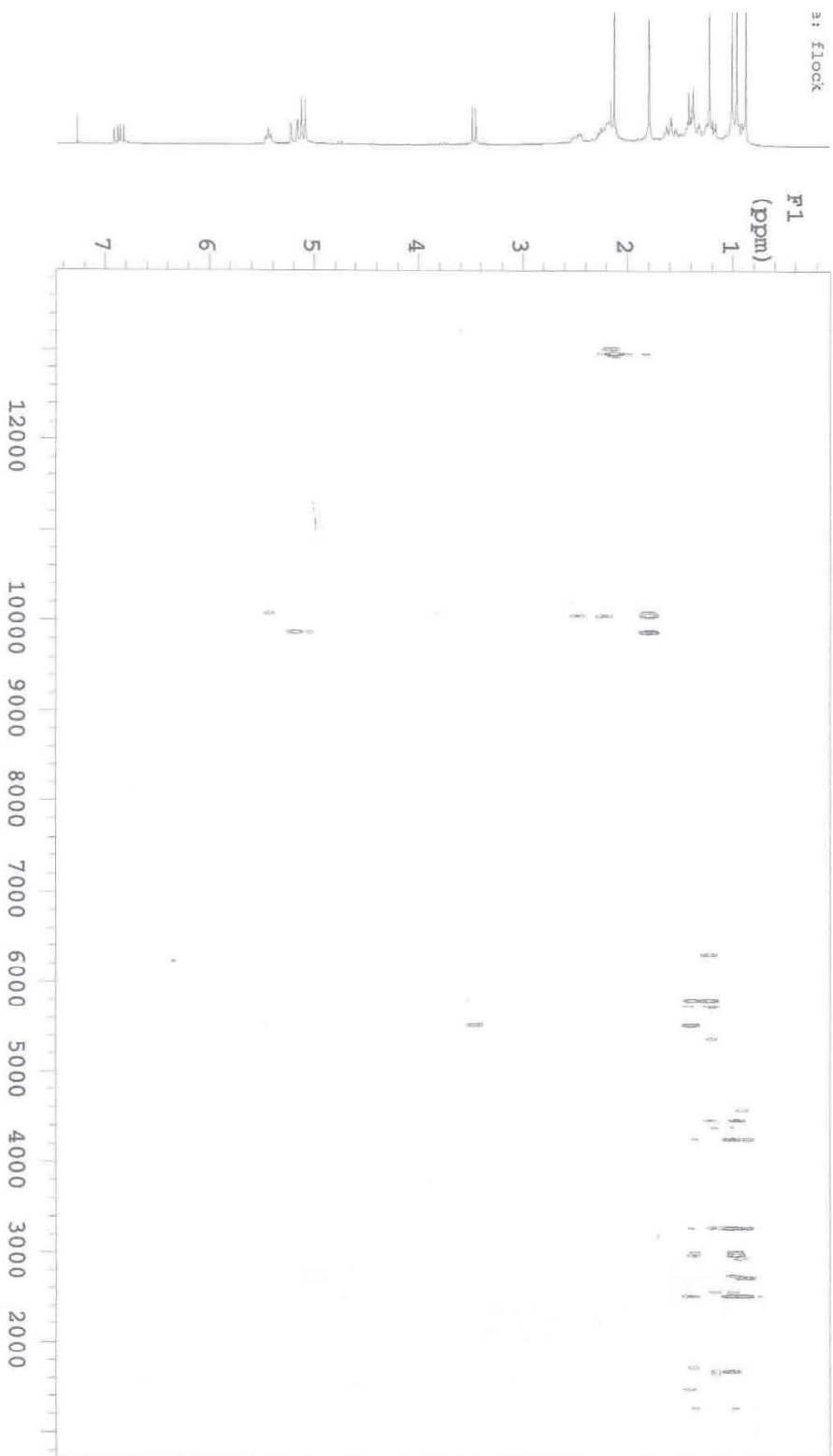


Espectro 3. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de 6-*O*-acetilaustroinulina (**118**).

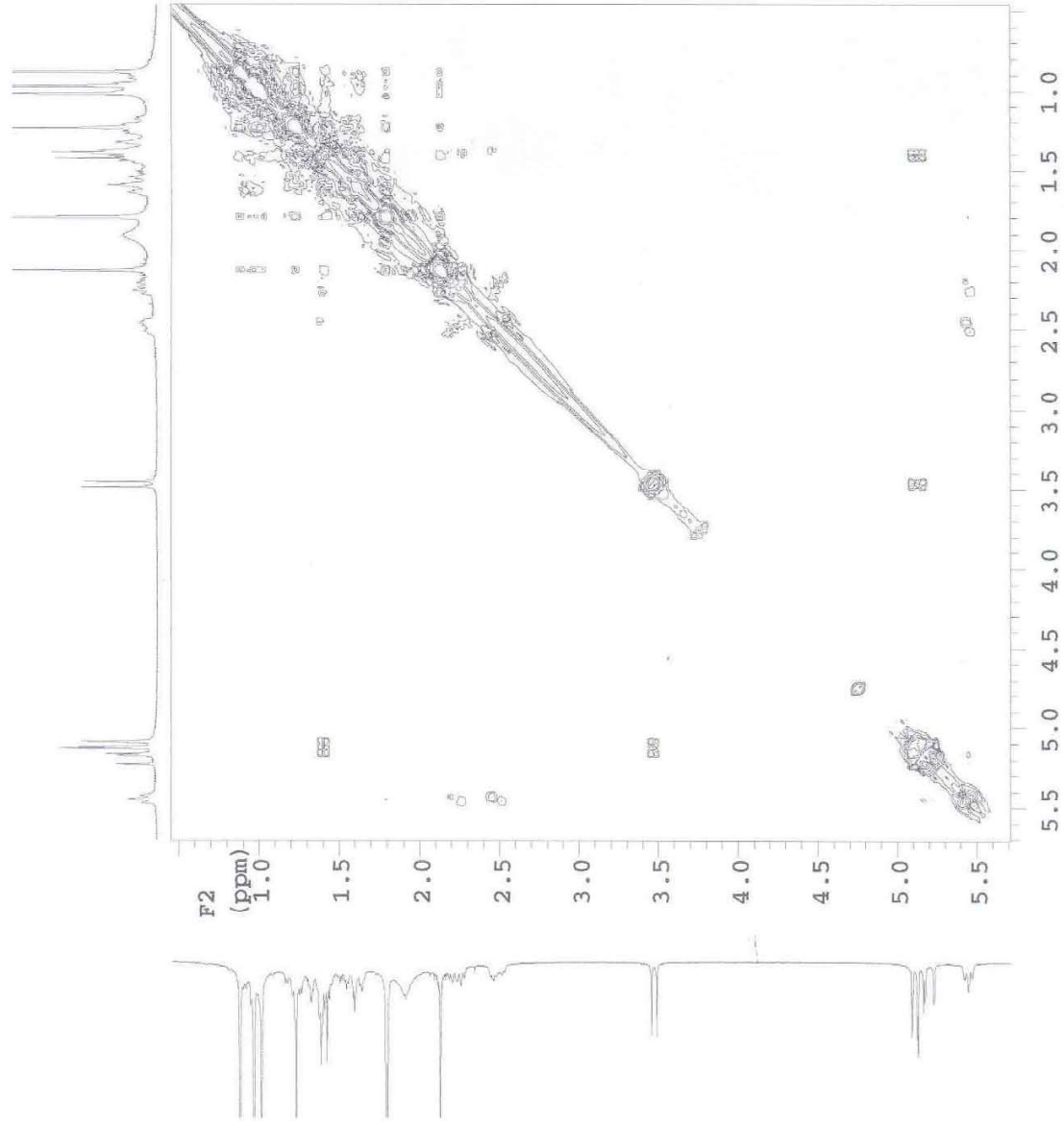
ZULUAGA, GONZALEZ AND
Delgado/Edgar A.
DA

300MHz-C

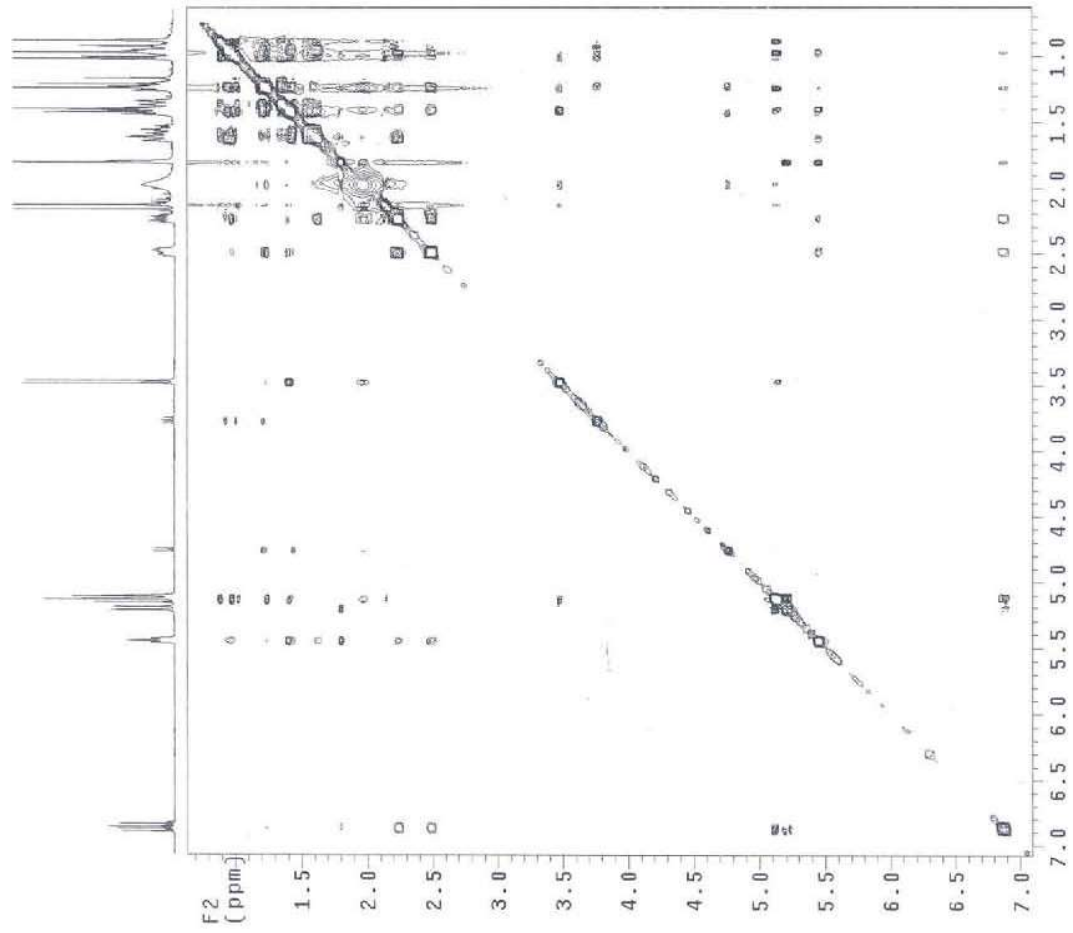
5



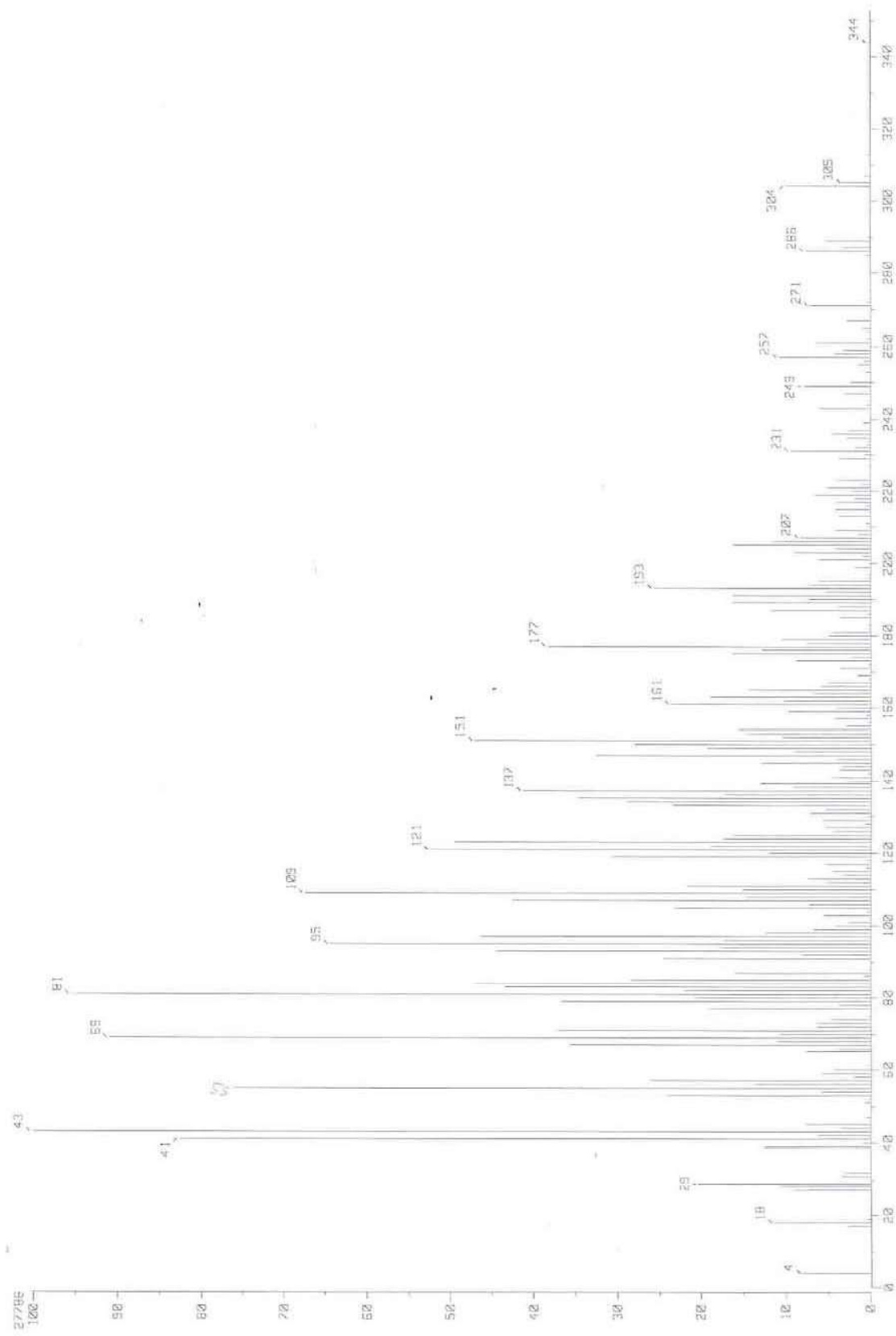
Espectro 4. Experimento FLOCK (CDCl₃) de la 6-*O*-acetilaustrorinulina (**118**).



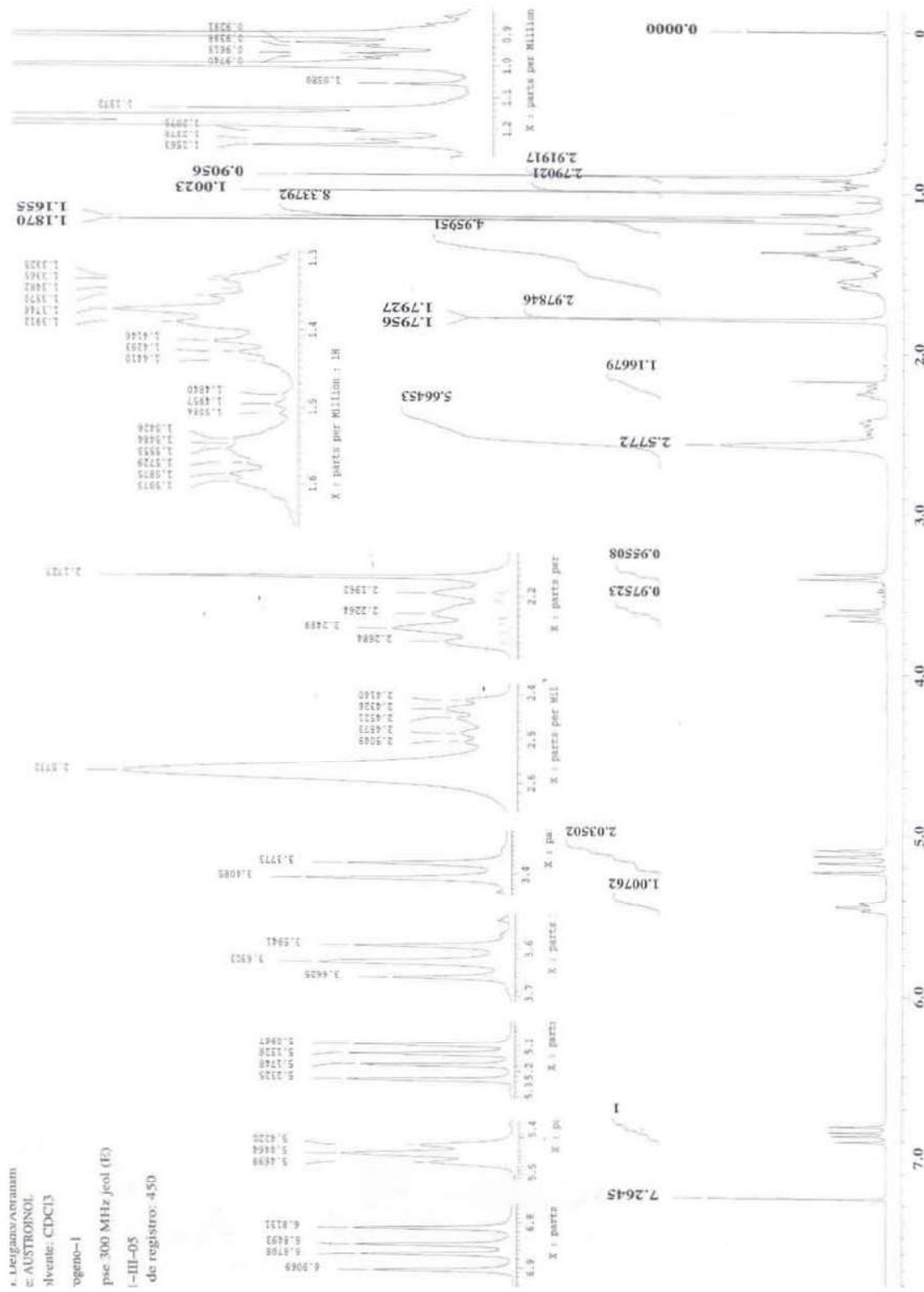
Espectro **5**. Experimento COSY (300 MHz, CDCl_3) de la 6-*O*-acetilaustroulinina (**118**).



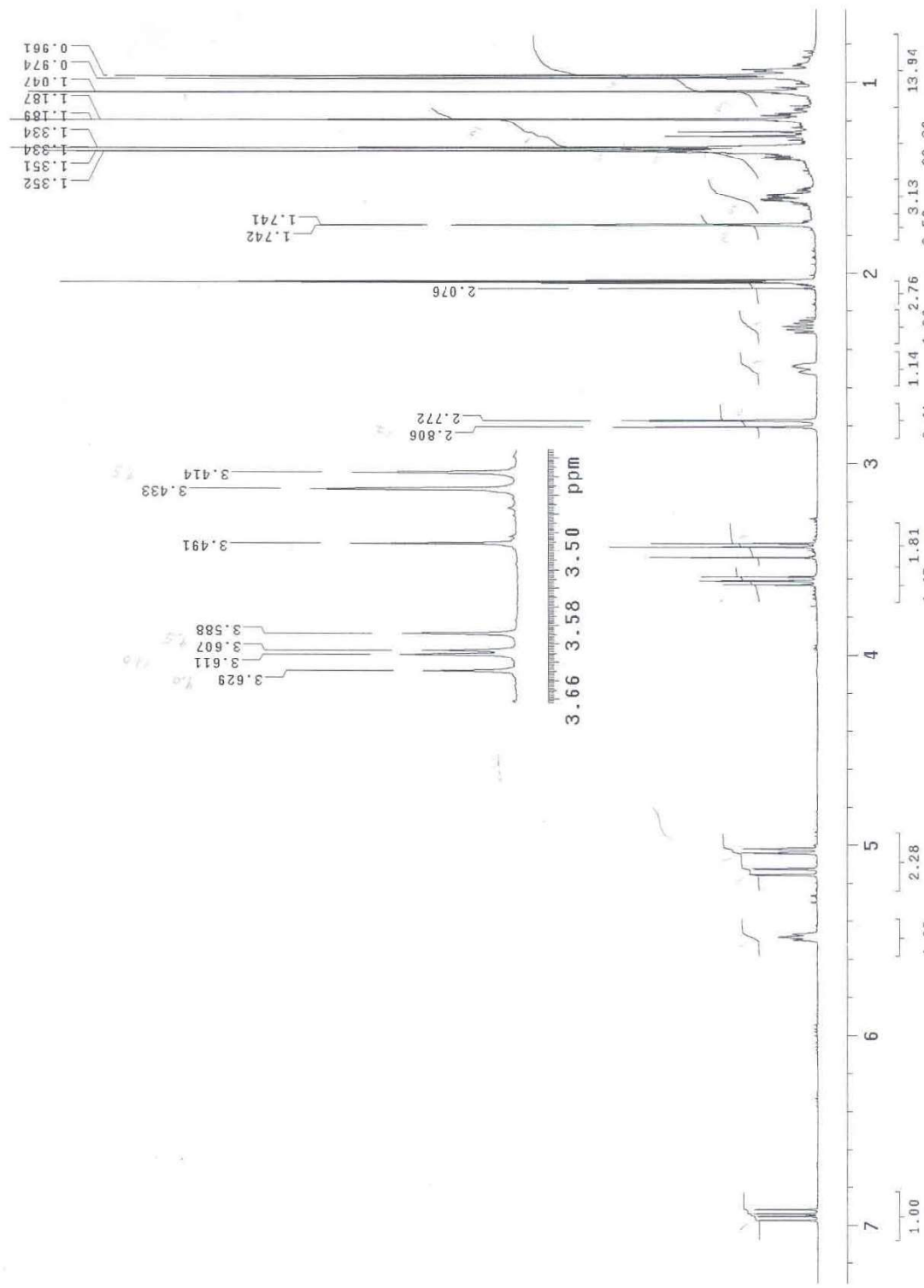
Espectro 6. Experimento NOESY (500 MHz, CDCl_3) de la 6-*O*-acetilaustroinulina (**118**).



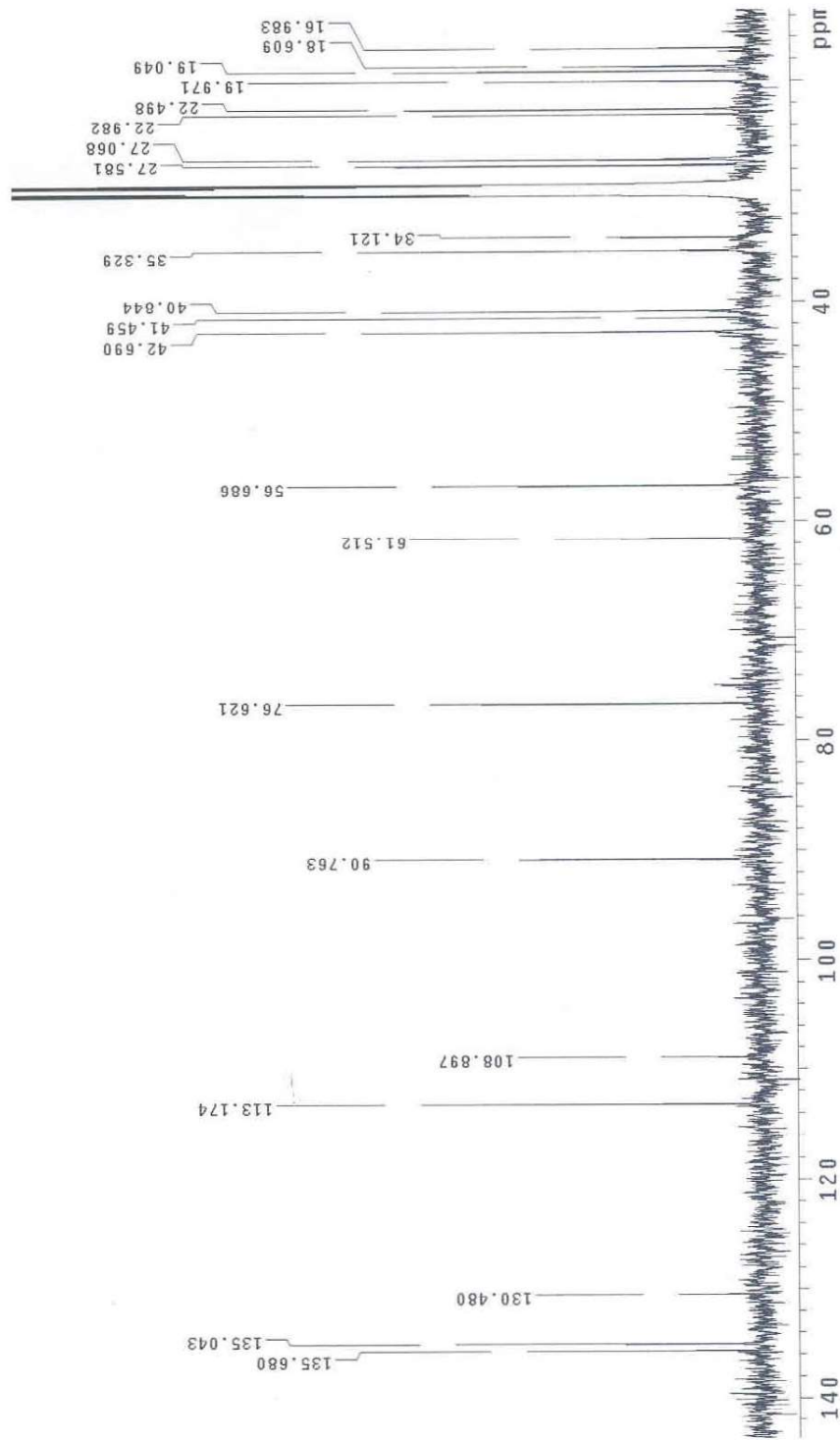
Espectro 7. EM-IE (70 eV) de la austroimulina (117).



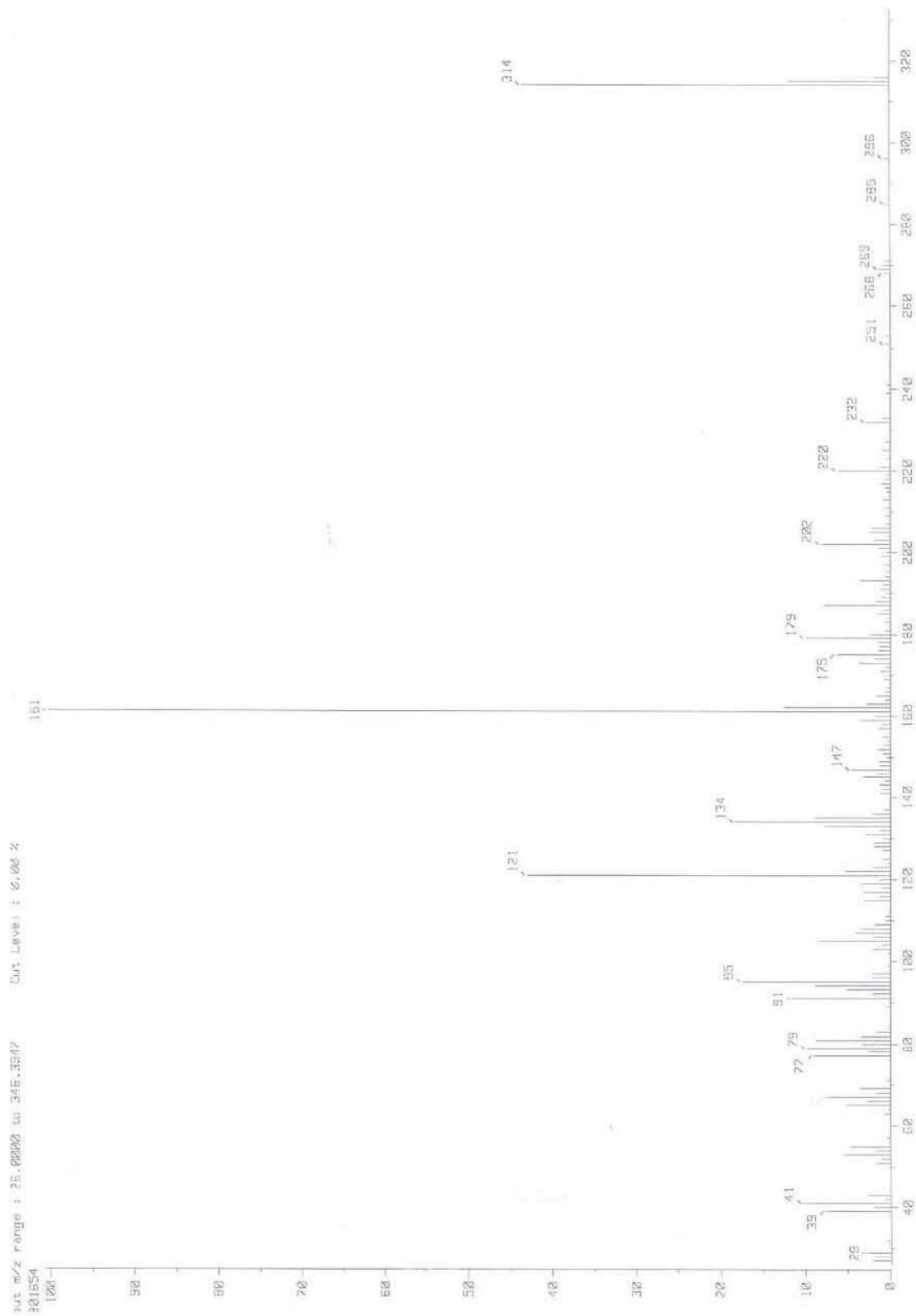
Espectro 8. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de la austroinulina (117).



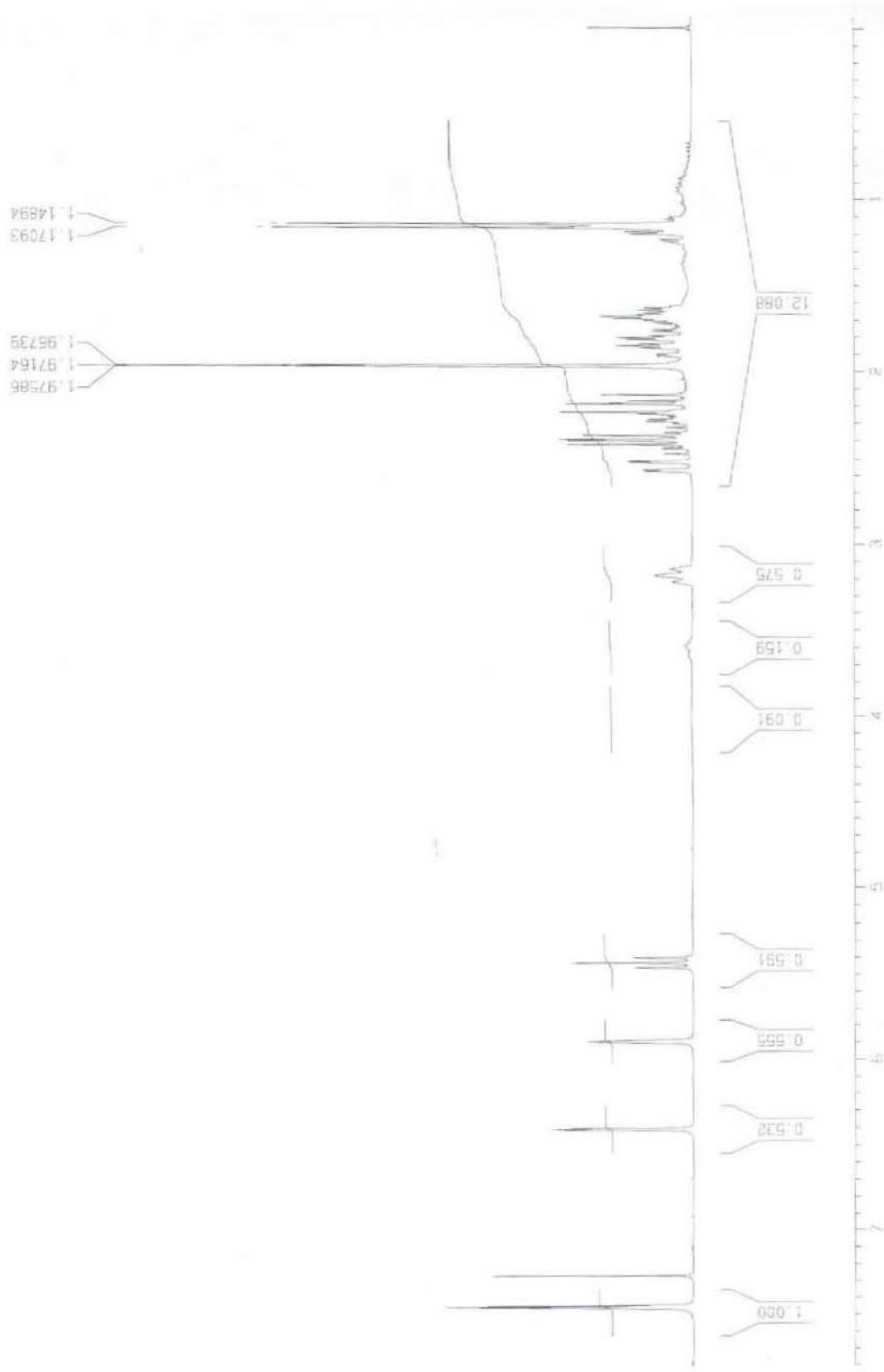
Espectro 9. RMN ¹H (300 MHz, (CD₃)₂CO) del 6,7-isopropilidendioxaustroinulina (119).



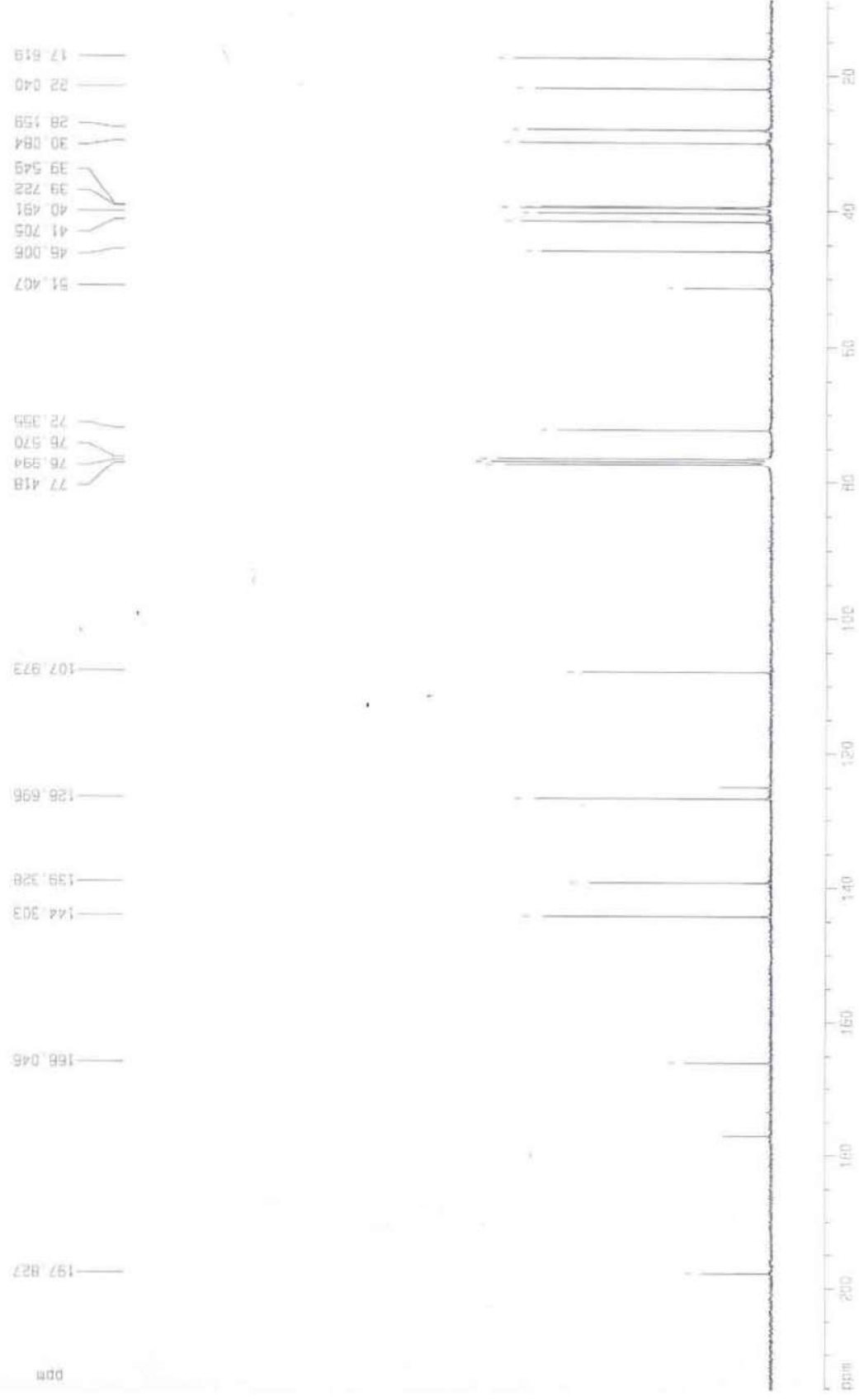
Espectro 10. RMN ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) del 6,7-isopropilidendioxaustroinulina (119).



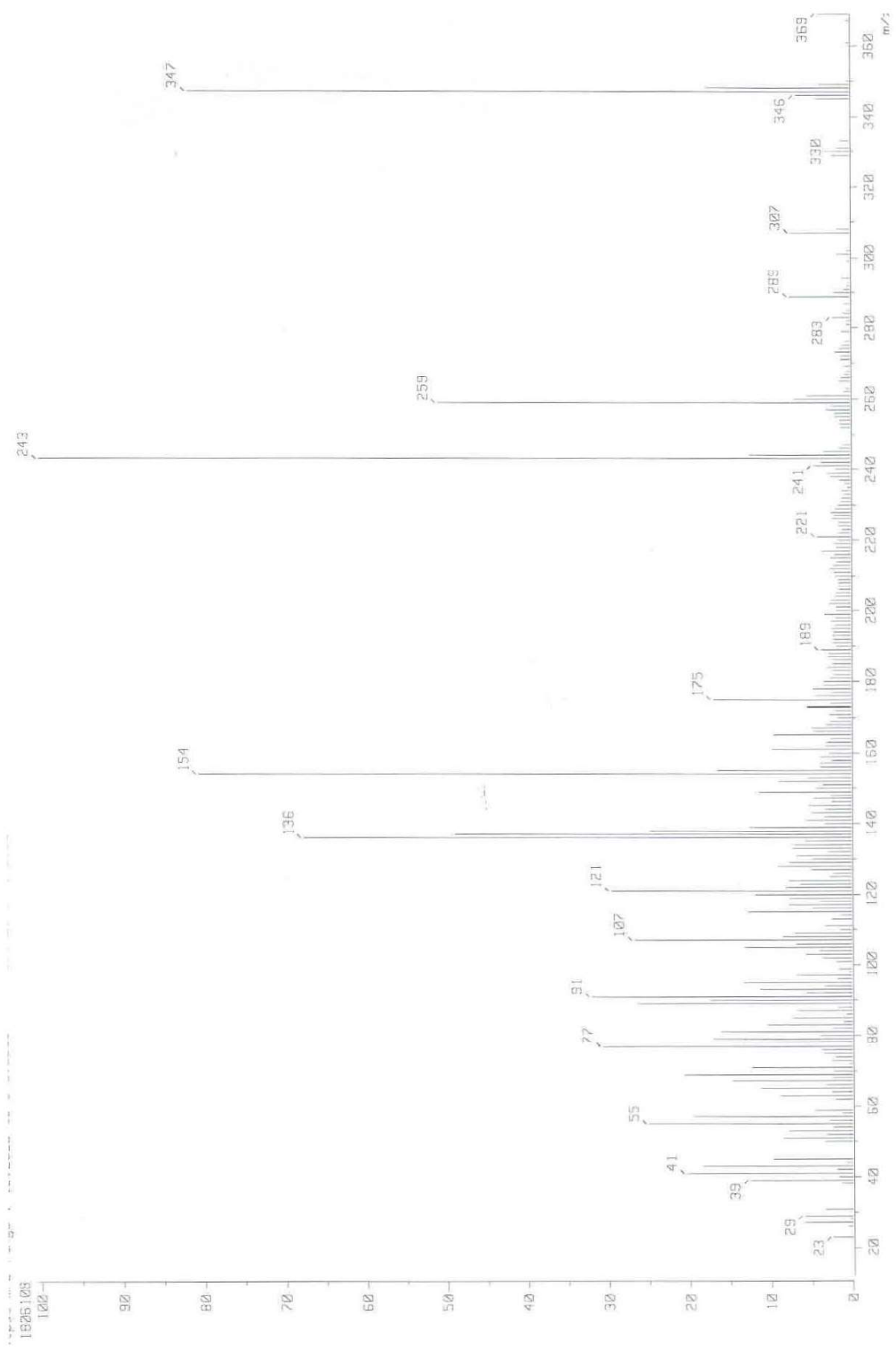
Espectro 11. EM-IE (70 eV) de la *trans*-deshidrocrottonina (116).



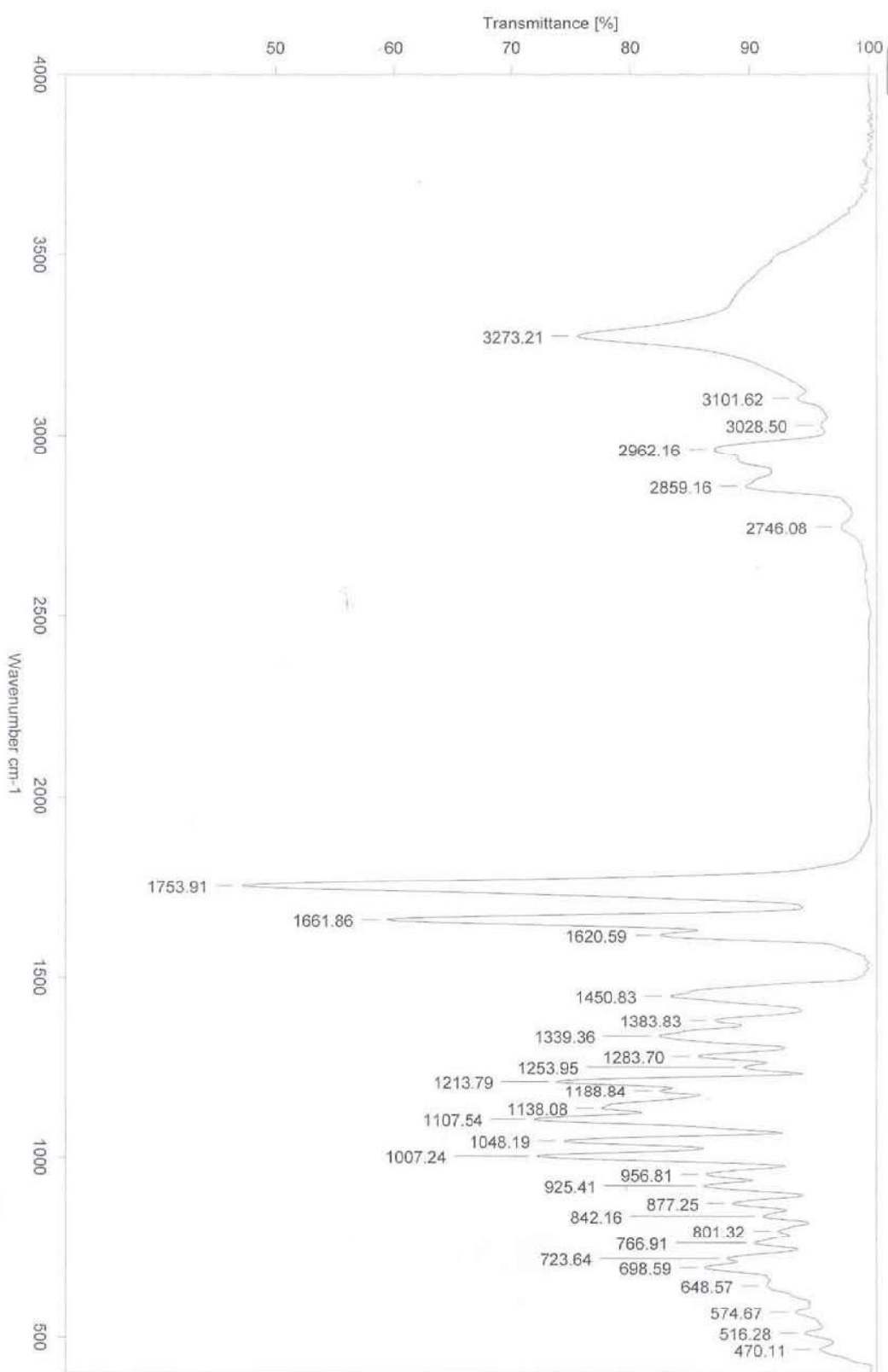
Espectro 12. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de la *trans*-deshidrocrotomina (116).



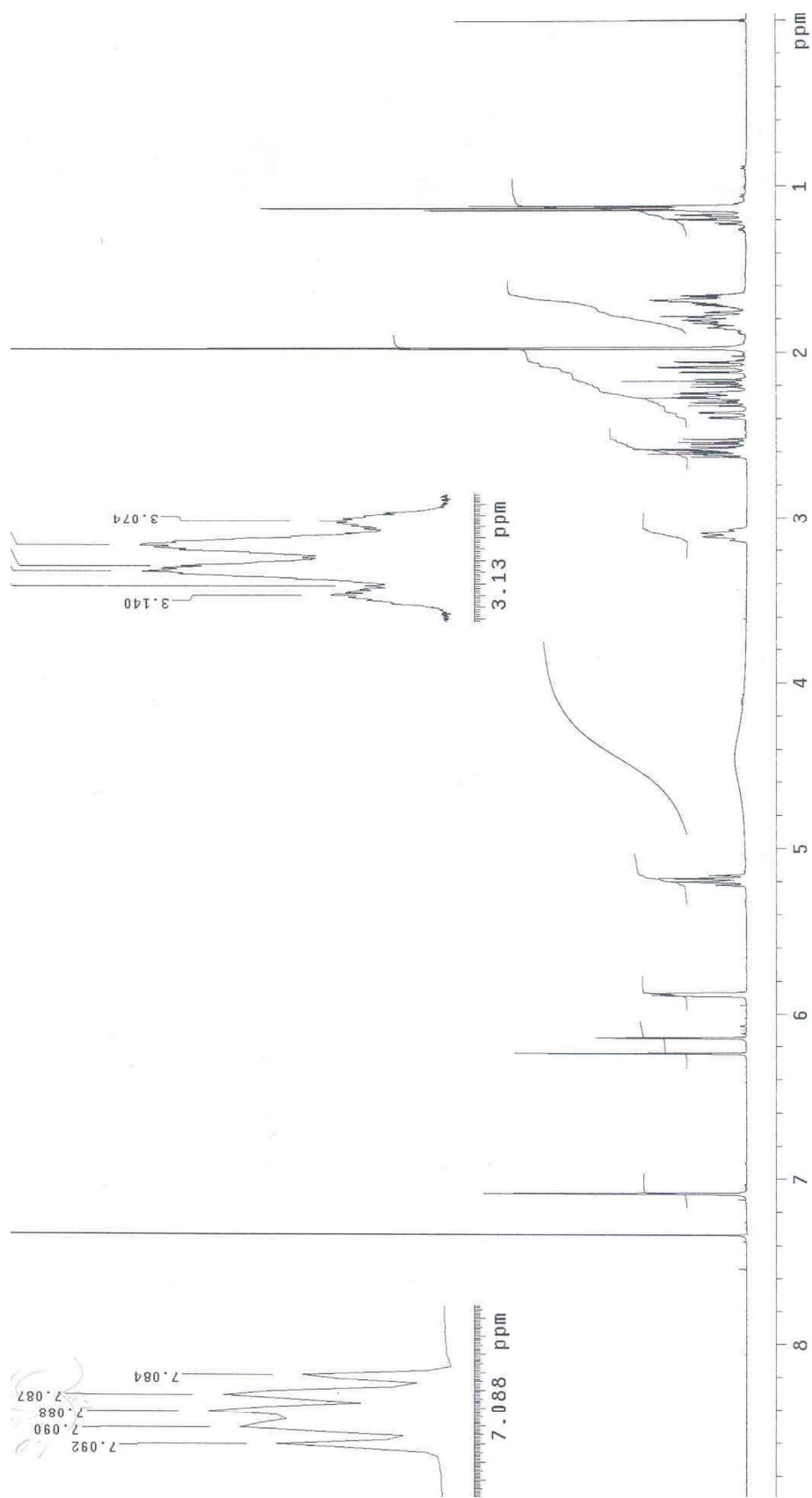
Espectro 13. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de la *trans*-deshidrocrotónica (116).



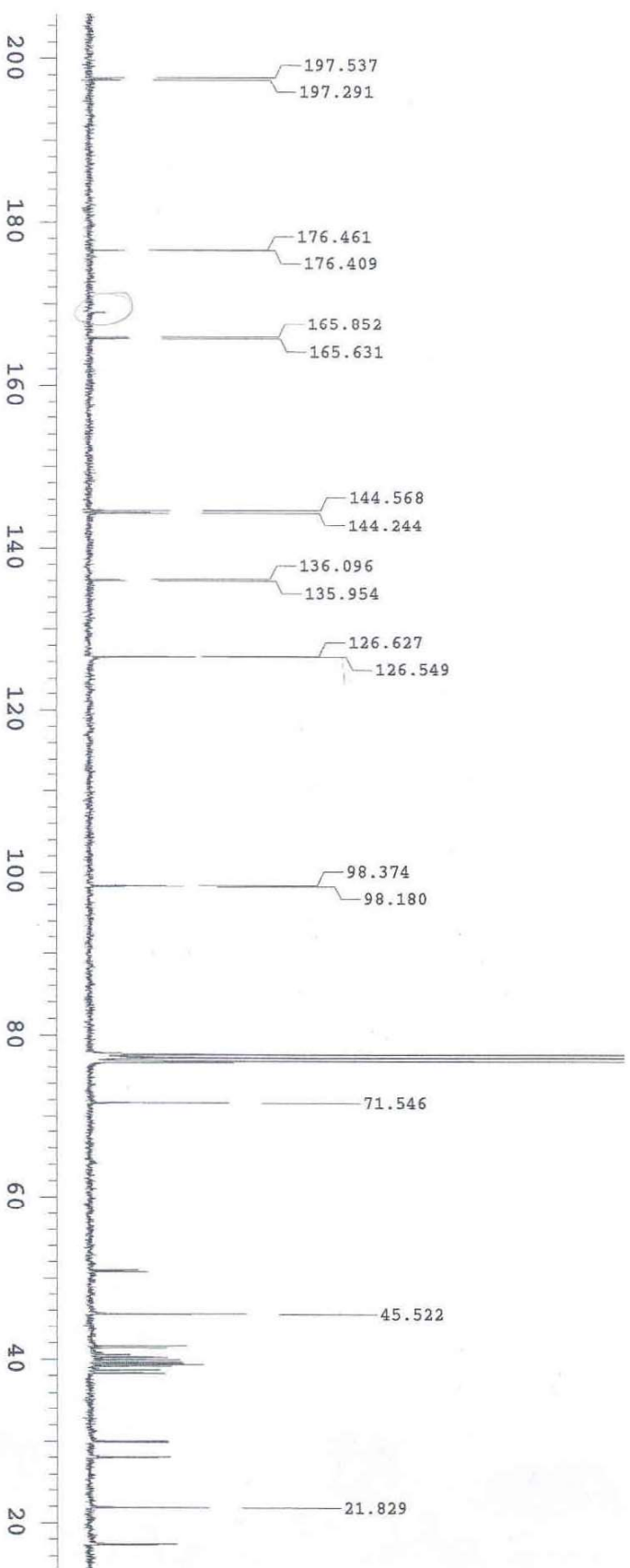
Espectro 14. EM-IE (70 eV) de la mezcla de cajucarínolida y 15-epi-cajucarínolida (122 y 123).



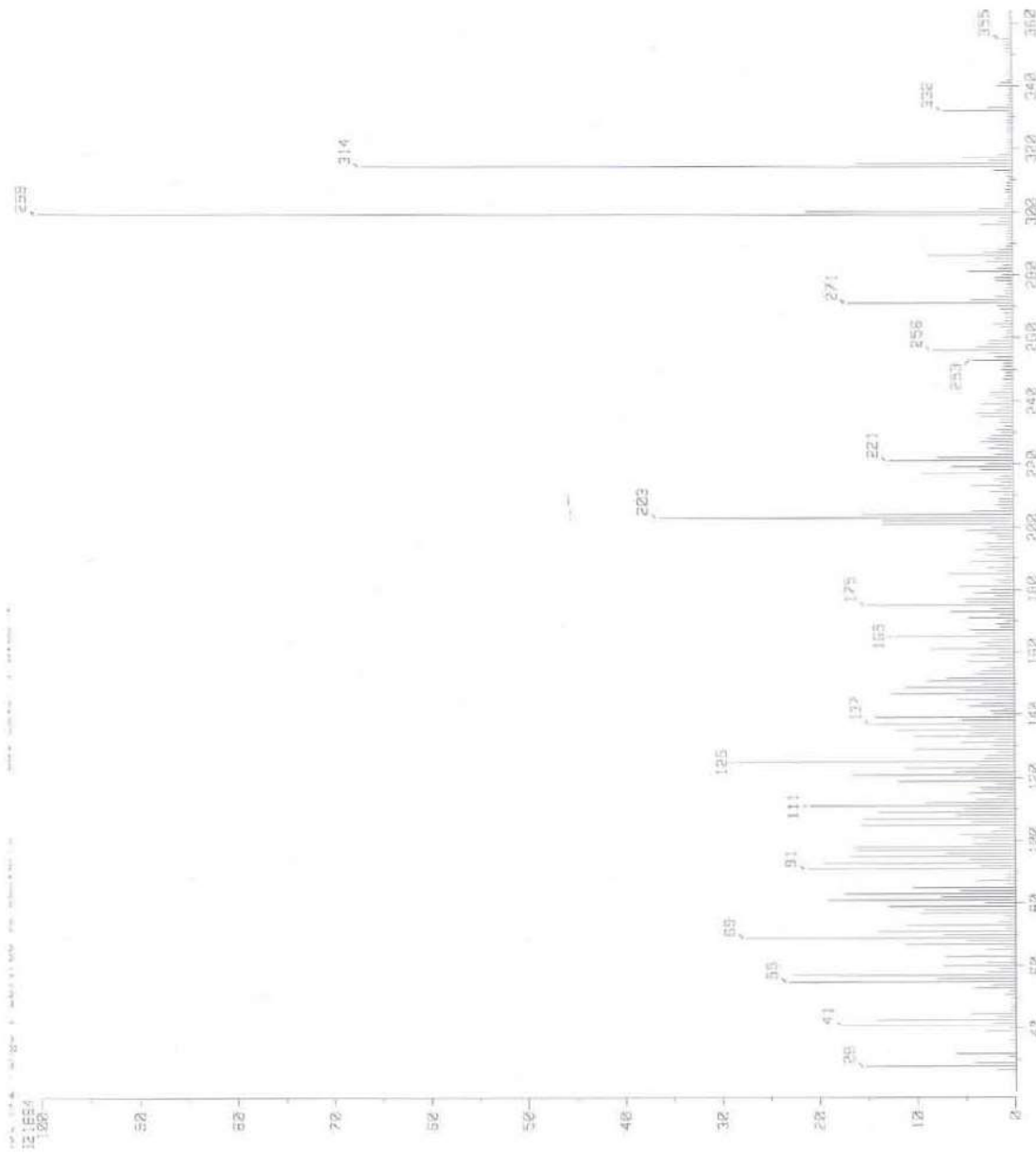
Espectro 15. IR (KBr) de la mezcla de cajucarínólida y 1-5-*epi*-cajucarínólida (122 y 123).



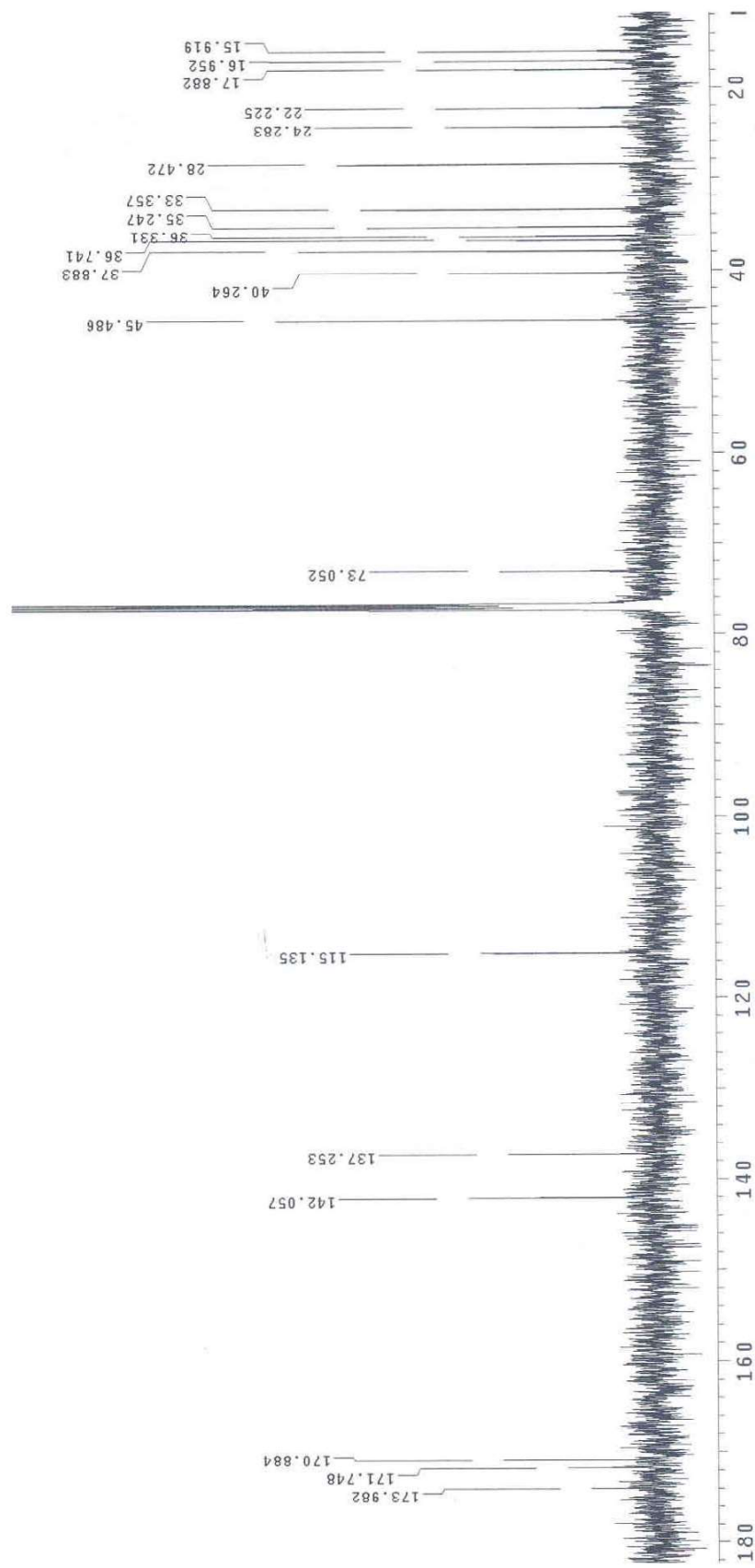
Espectro 16. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 : $\text{DMSO}-d_6$, 3:1) de la mezcla de cajucarínolida y 15-epi-cajucarínolida (**122** y **123**).



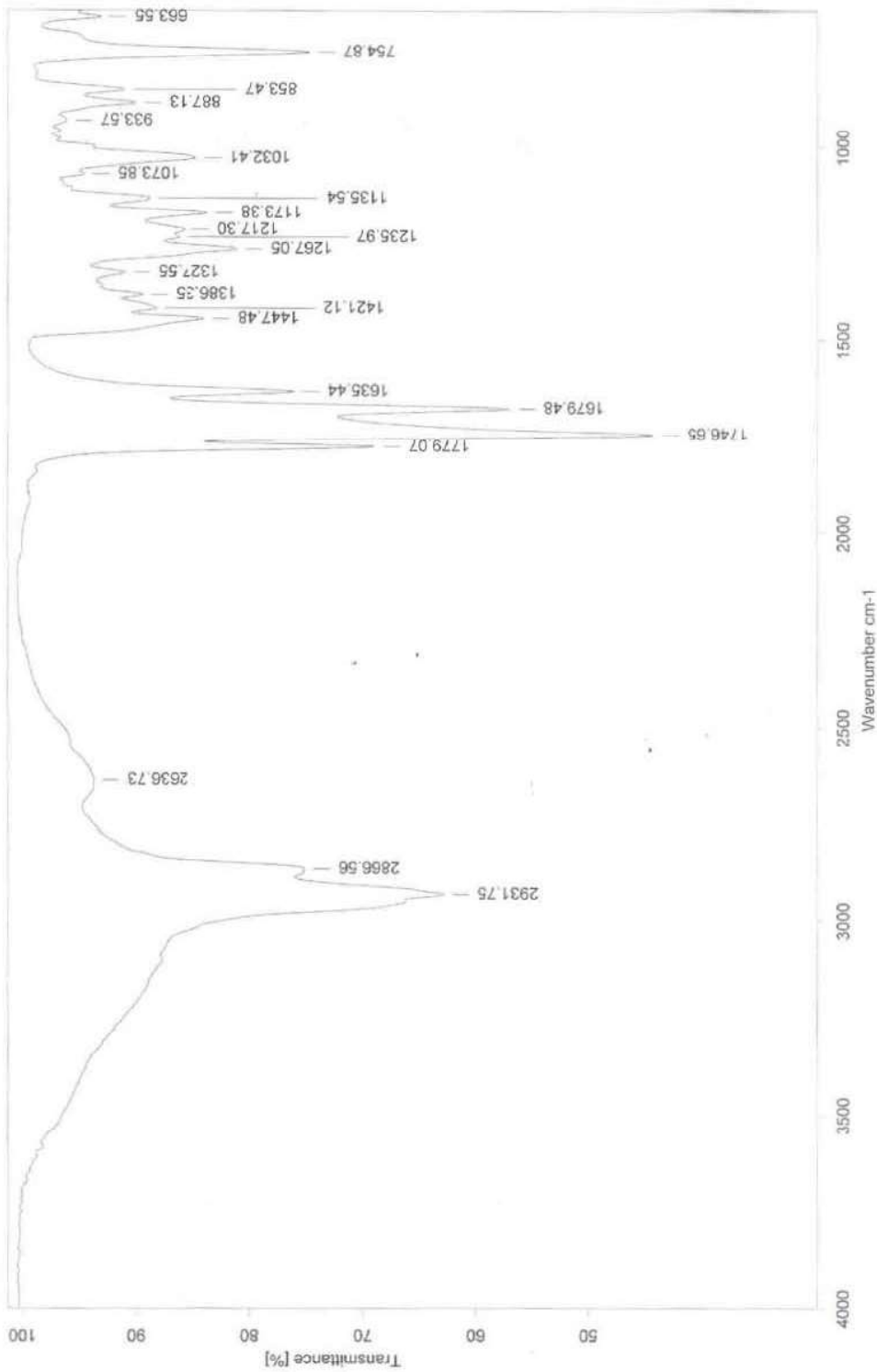
Espectro 17. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 :DMSO- d_6 , 3:1) de la mezcla de cajucarínólida y 15-*epi*-cajucarínólida (**122** y **123**).



Espectro 18. EM-IE (70 eV) de la marrubiagenina (121).



Espectro 19. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de la marrubiagenina (121).

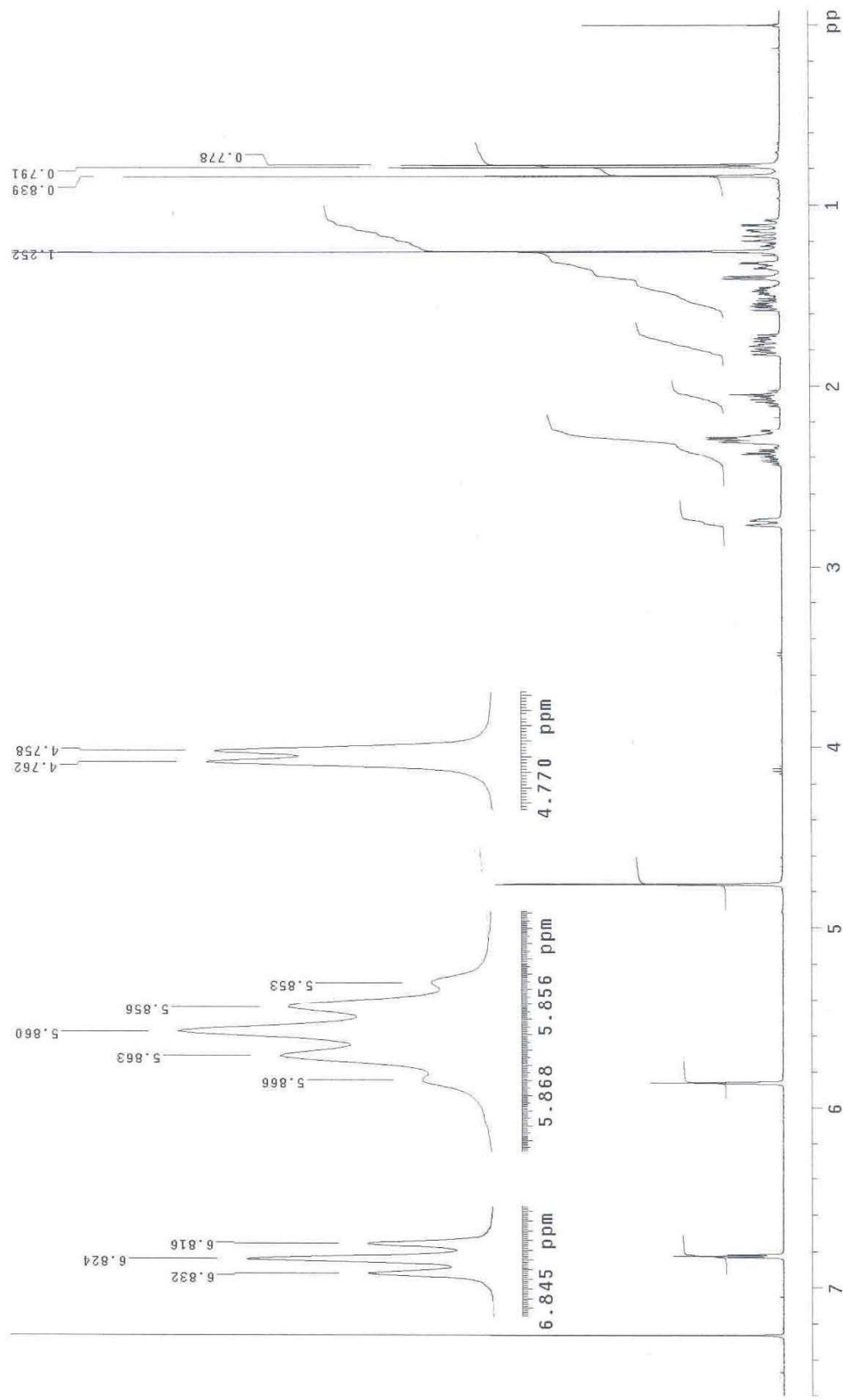


C:\infrarrojo\AIR-2005\7860.0

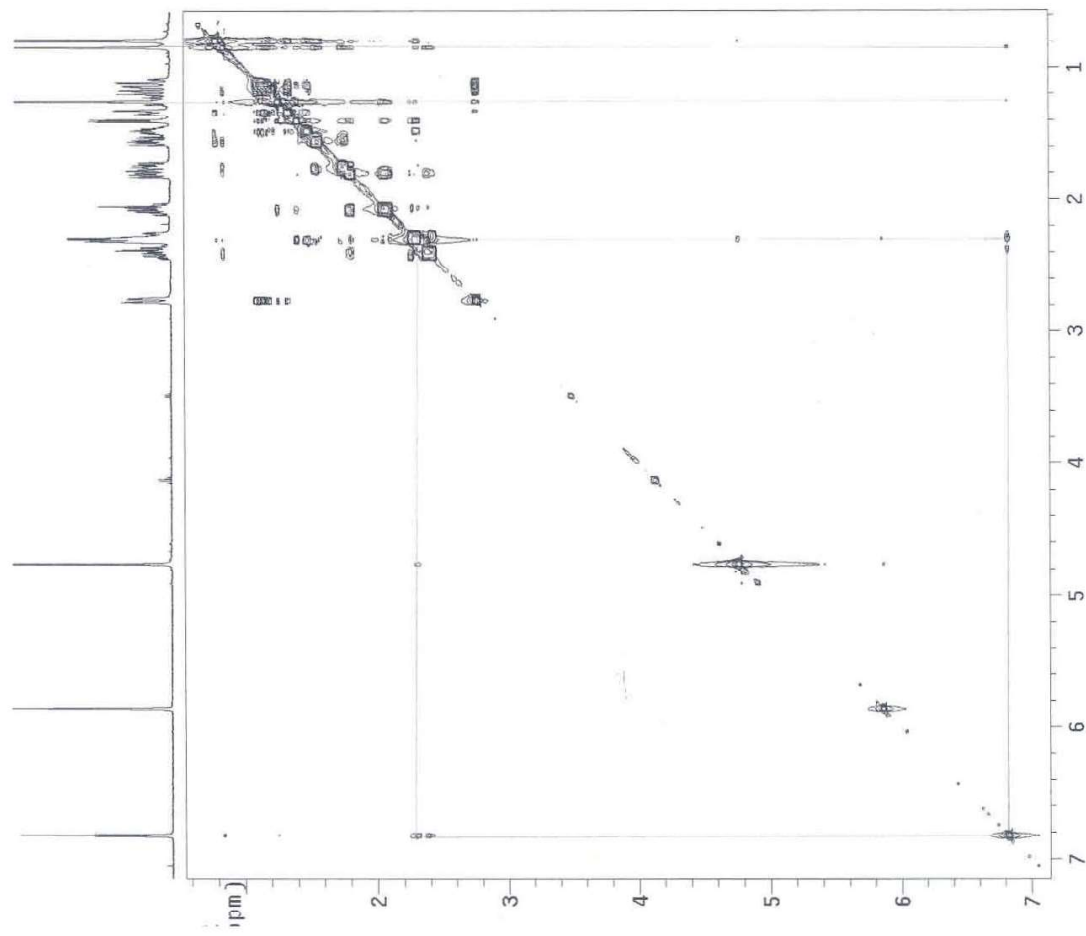
Dr. G. Delgado CSH27a29a6265 Pelicula EGR

16/06/2005

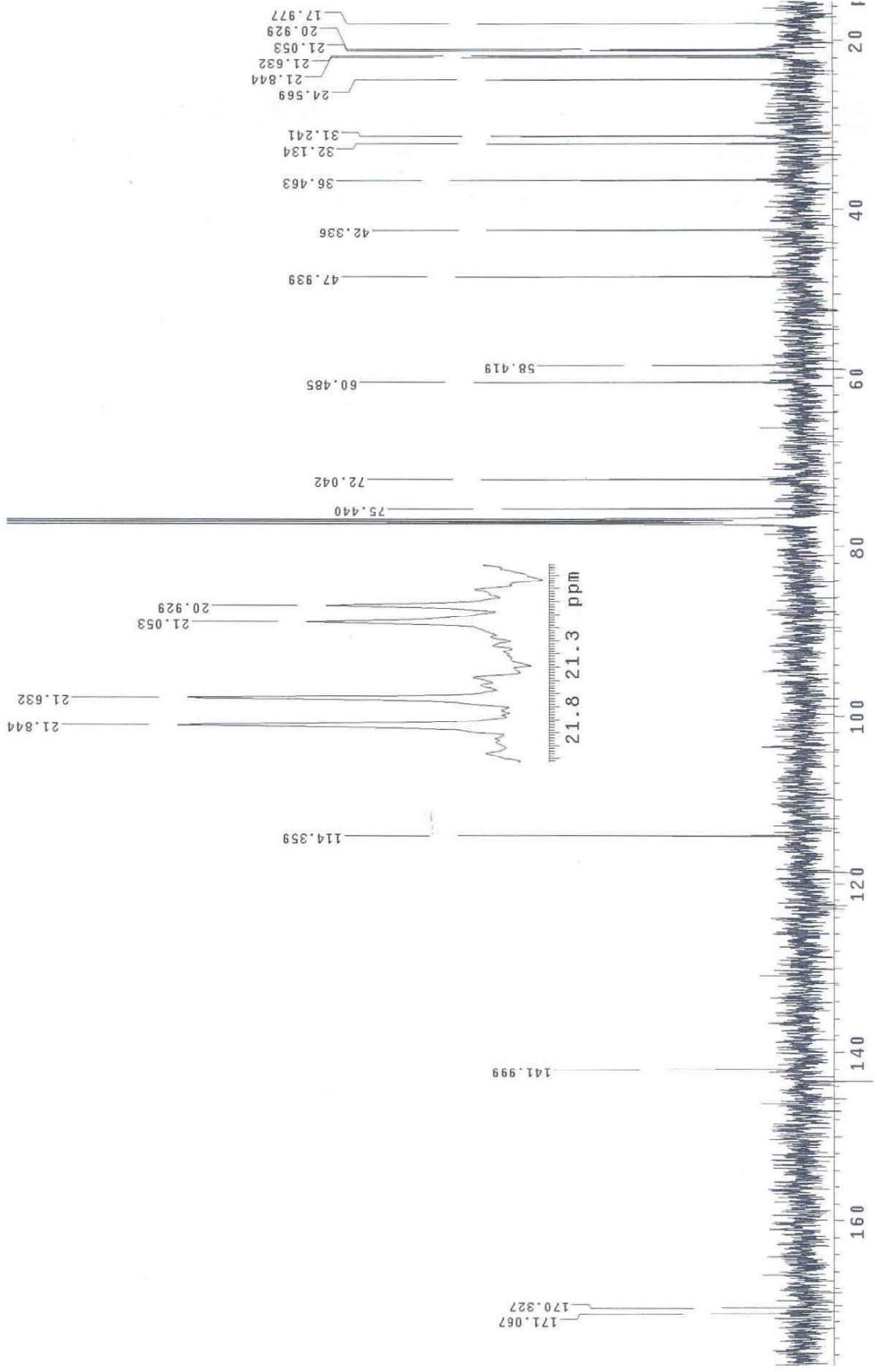
Espectro 20 IR (CHCl₃) de la marrubiagenina (121).



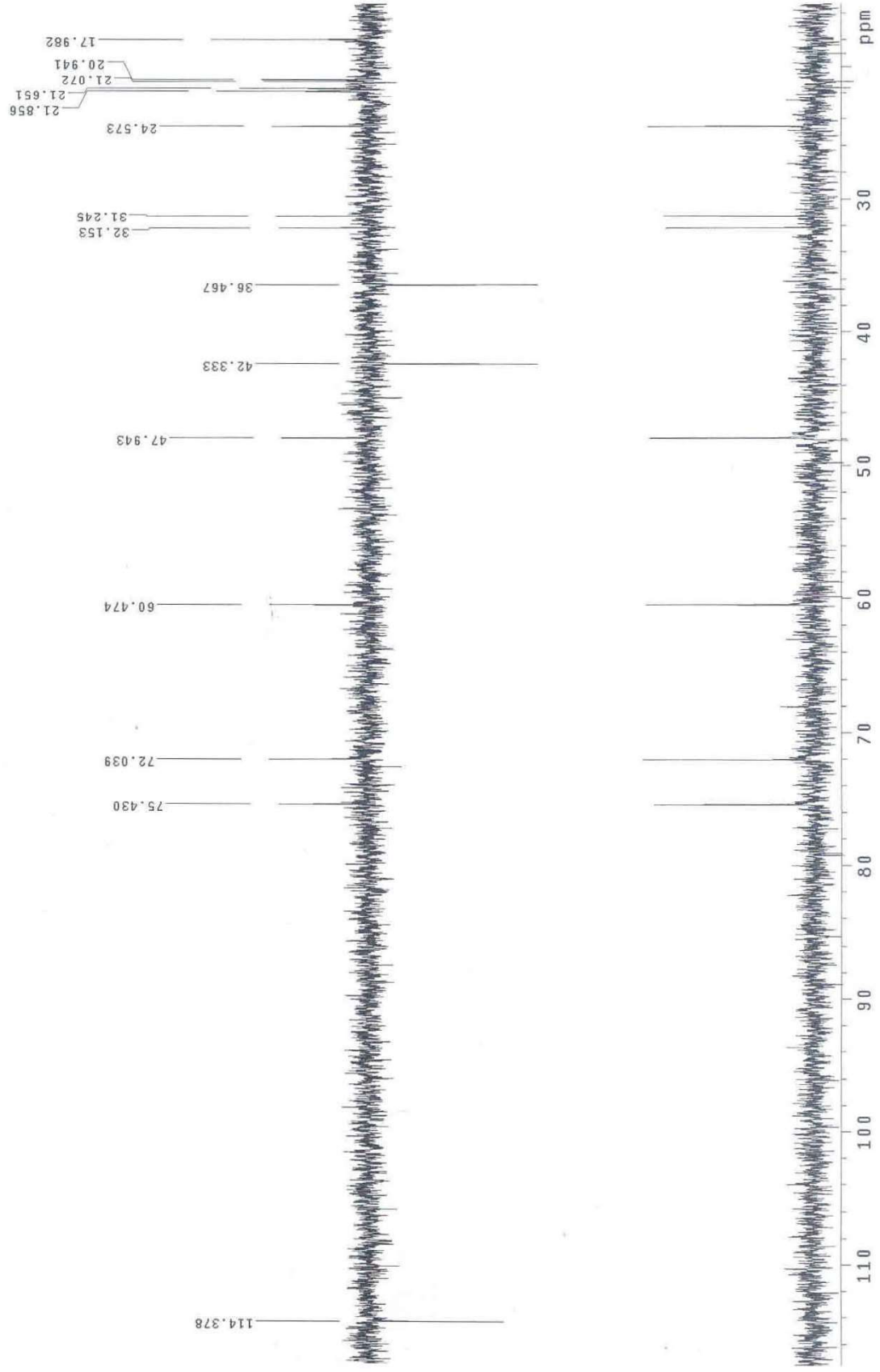
Espectro 21. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de la marrubiagenina (121).



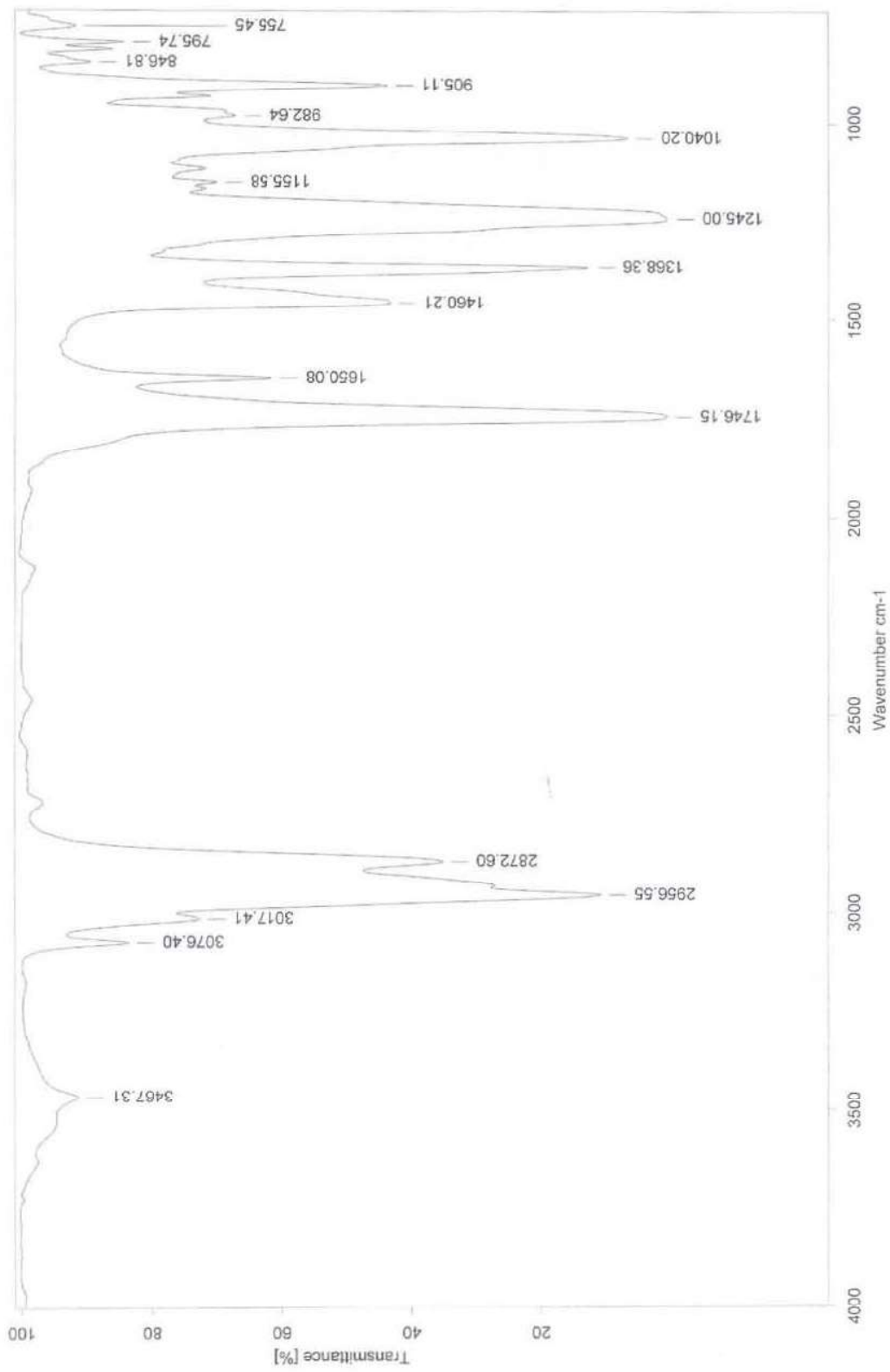
Espectro 22. Experimento NOESY (CDCl_3) de la marrubiagenina (121).



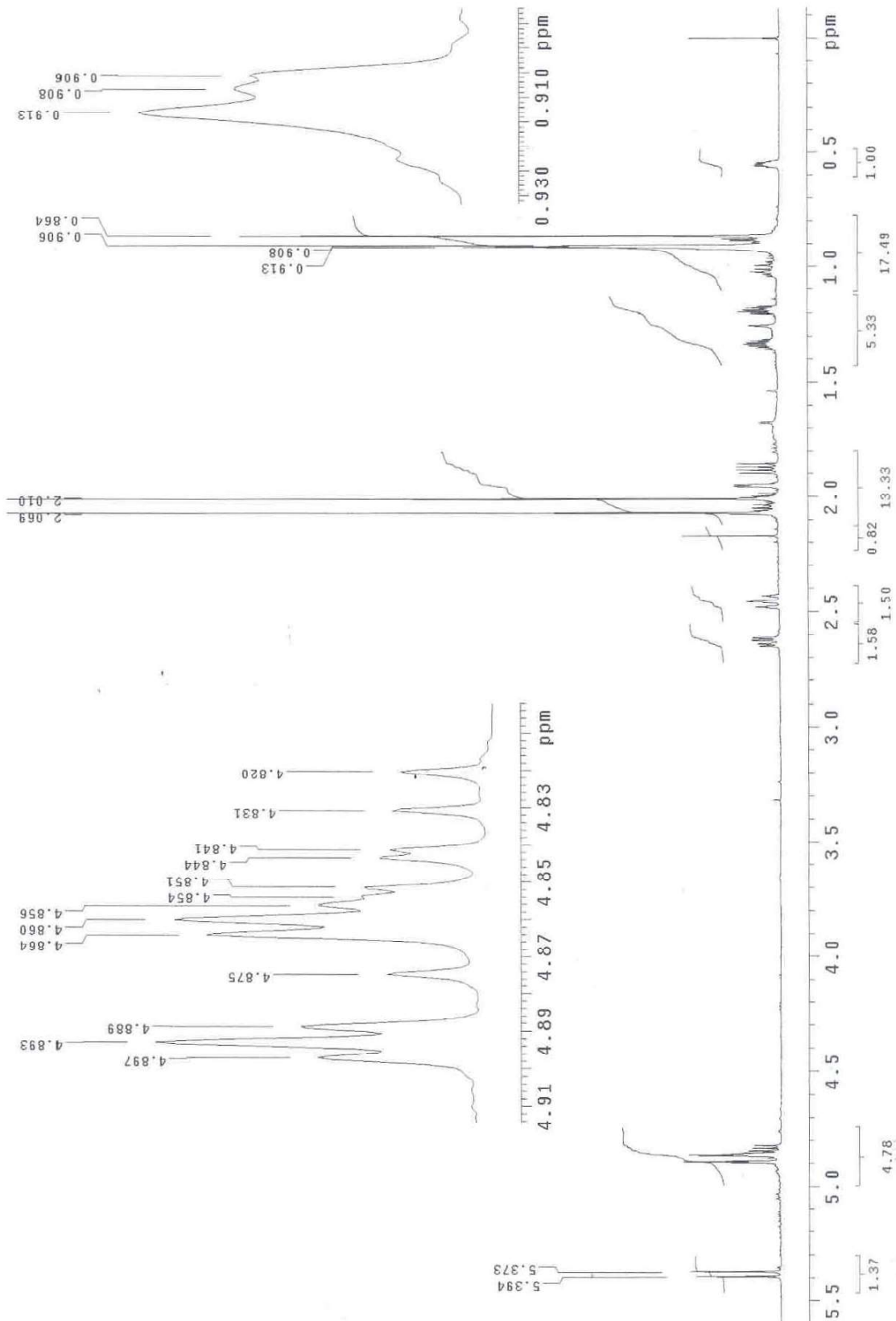
Espectro 23. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del (1R,2R)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132).



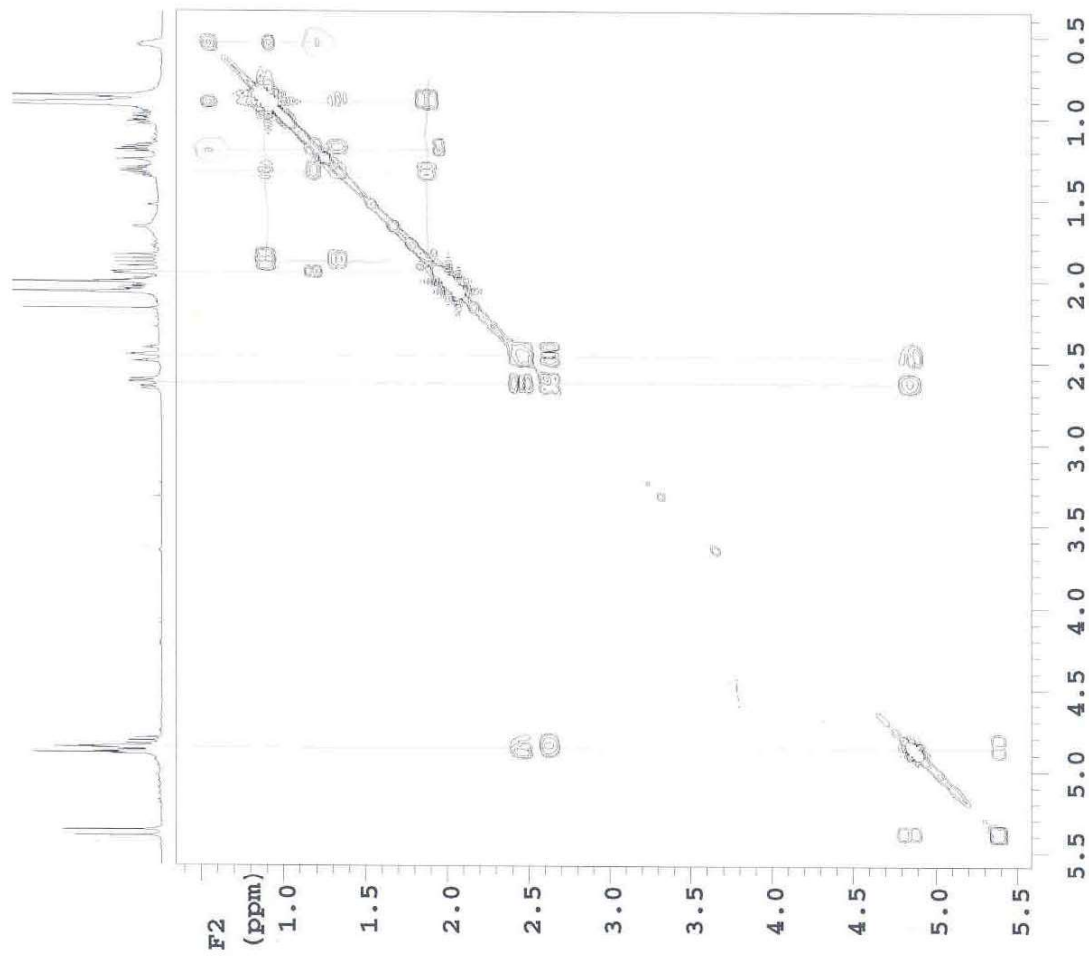
Espectro 24. Experimento DEPT (CDCl₃) del (1R,2R)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132).



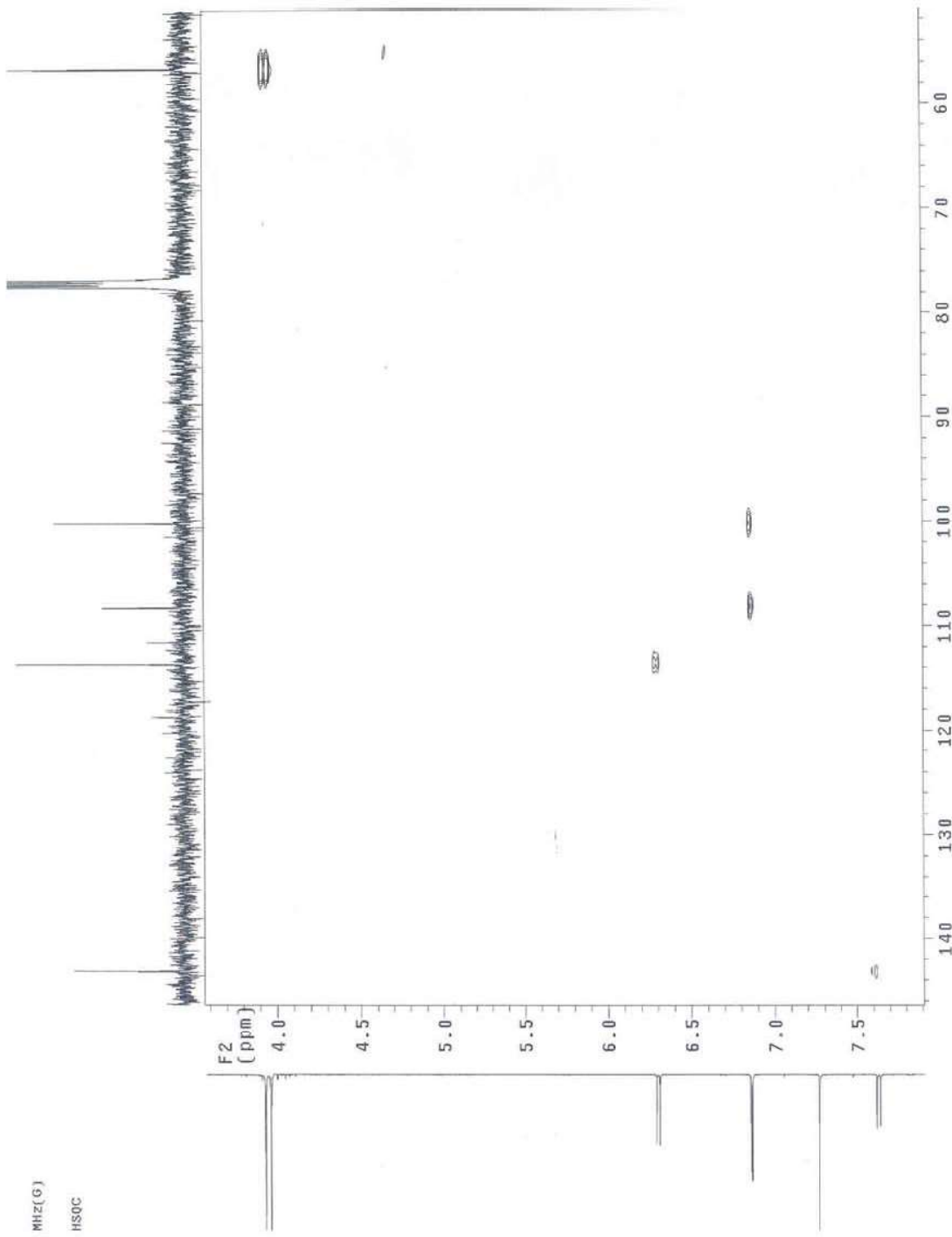
Espectro 25. IR (CHCl₃) del (1R,2R)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132).



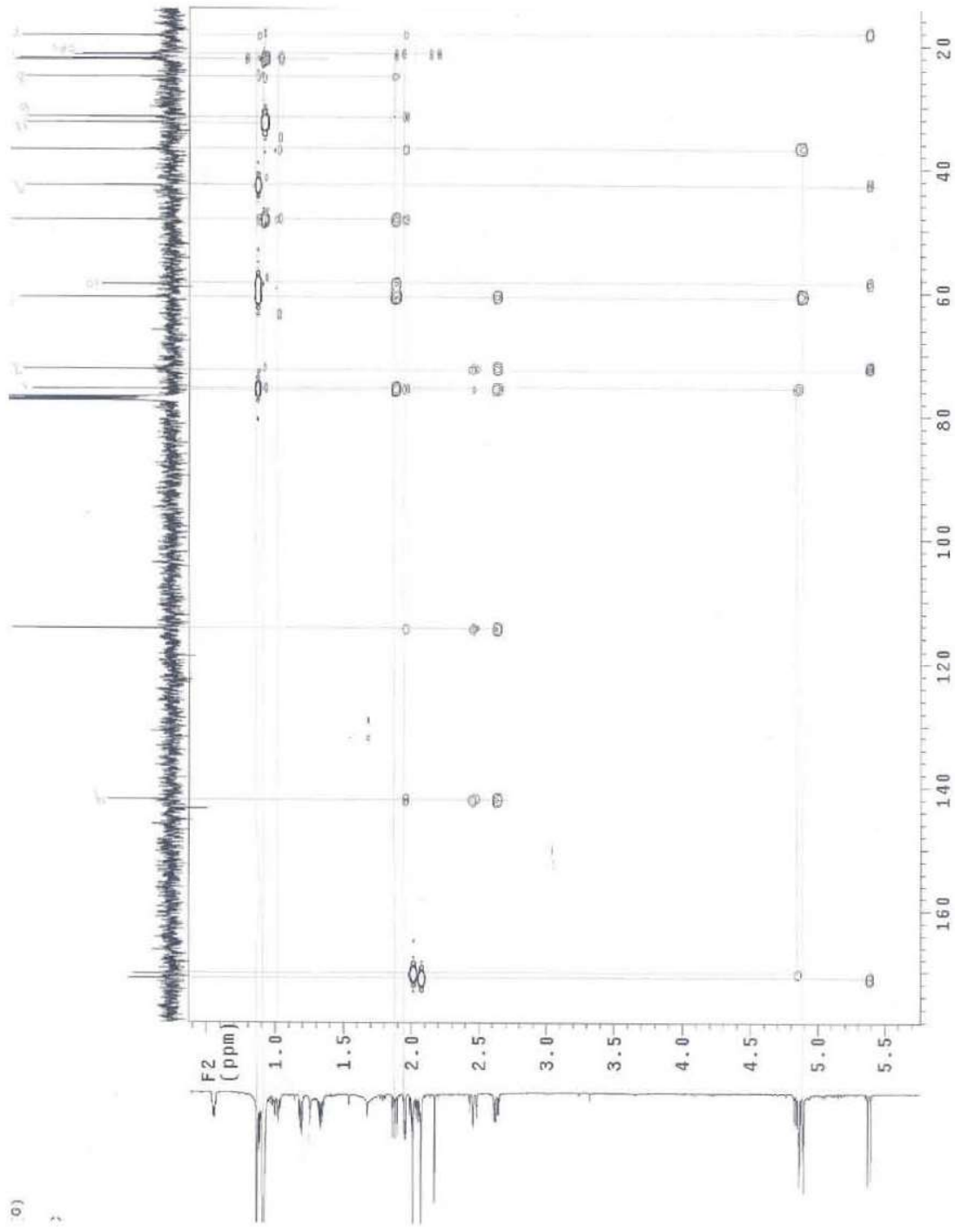
Espectro 26. RMN ^1H (CDCl_3) del (1R,2R)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132).



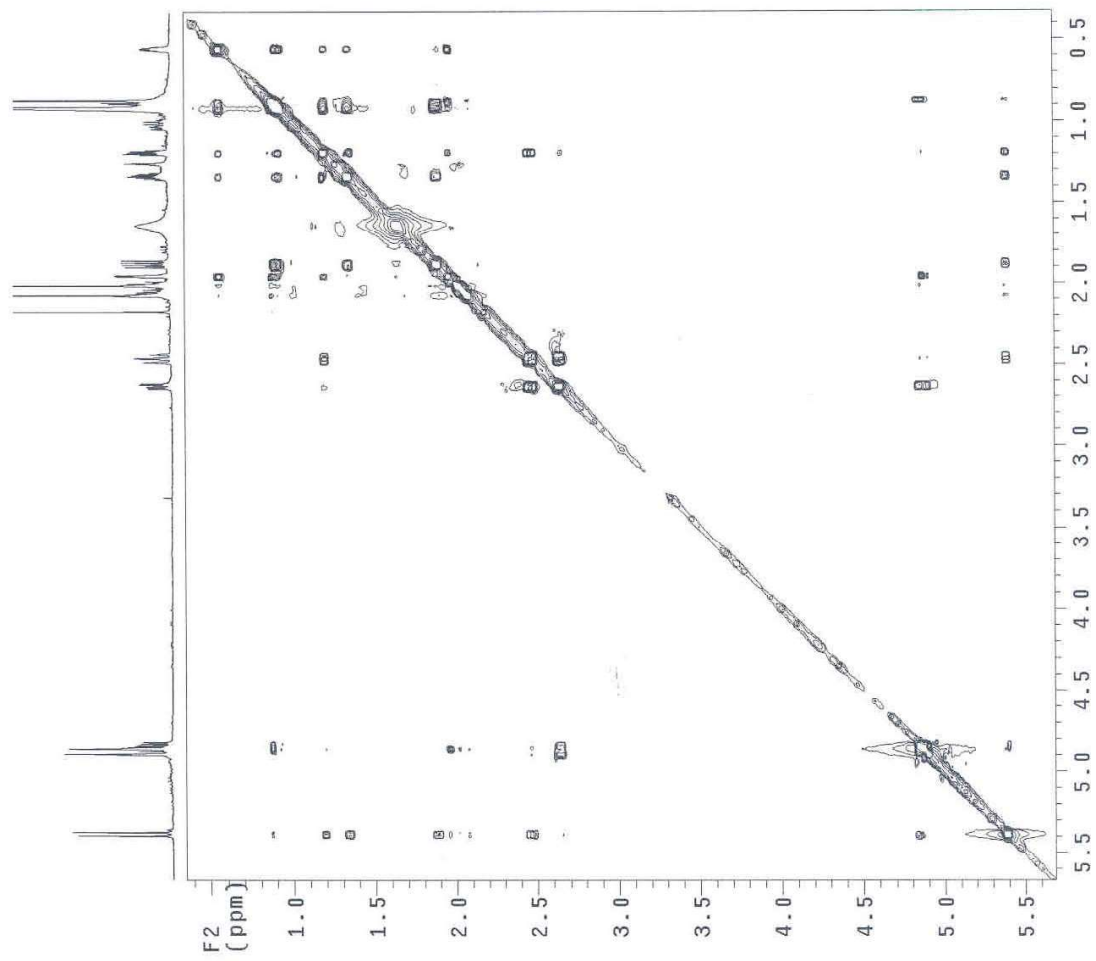
Espectro 27. Experimento COSY (CDCl₃) del (1*R*,2*R*)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132).



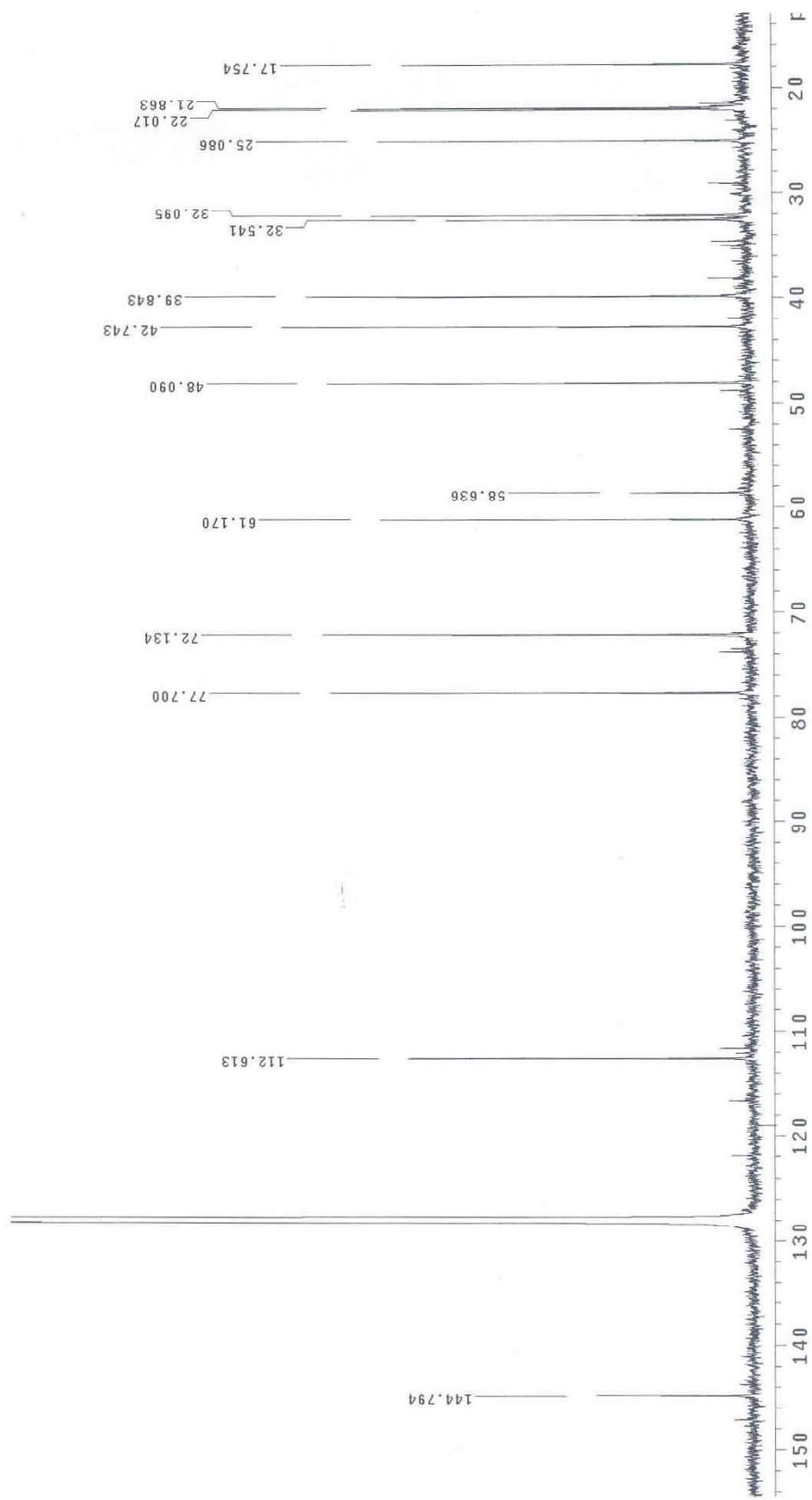
Espectro 28. Experimento HSQC (CDCl₃) del (1*R*,2*R*)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (132).



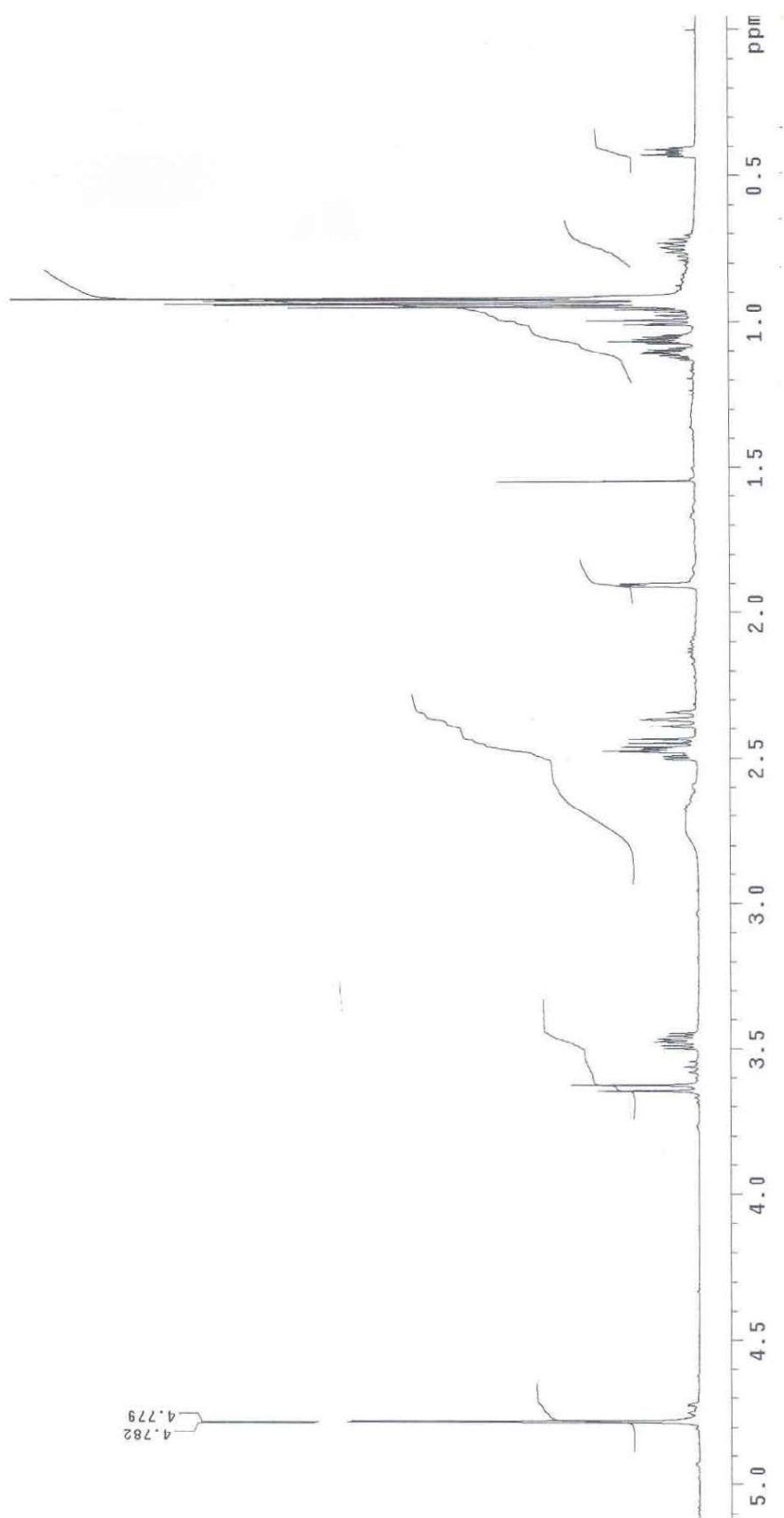
Espectro 29. Experimento HMBC (CDCl₃) del (1*R*,2*R*)-diacetoxi-4(15)-ciclooxeno (132).



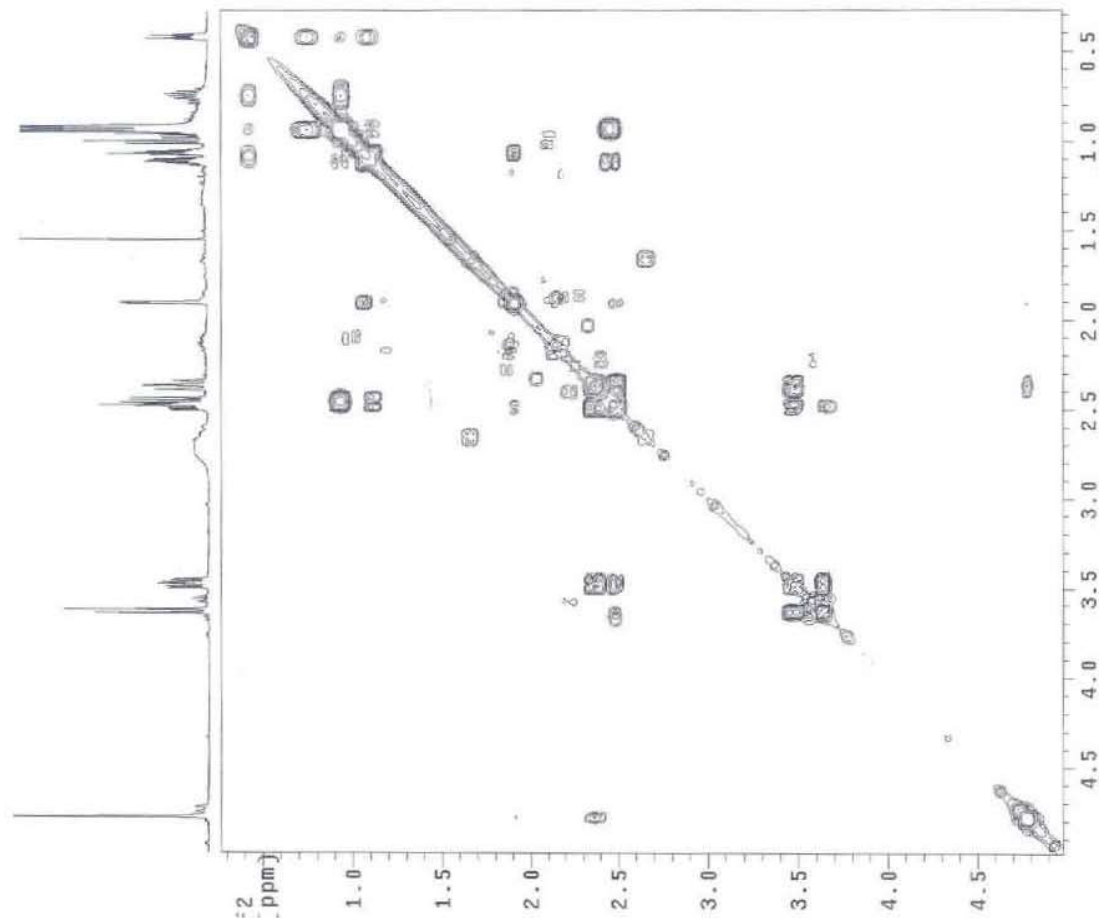
Espectro **30**. Experimento NOESY (CDCl₃) del (1*R*,2*R*)-diacetoxi-4(15)-cicloaxeno (**132**).



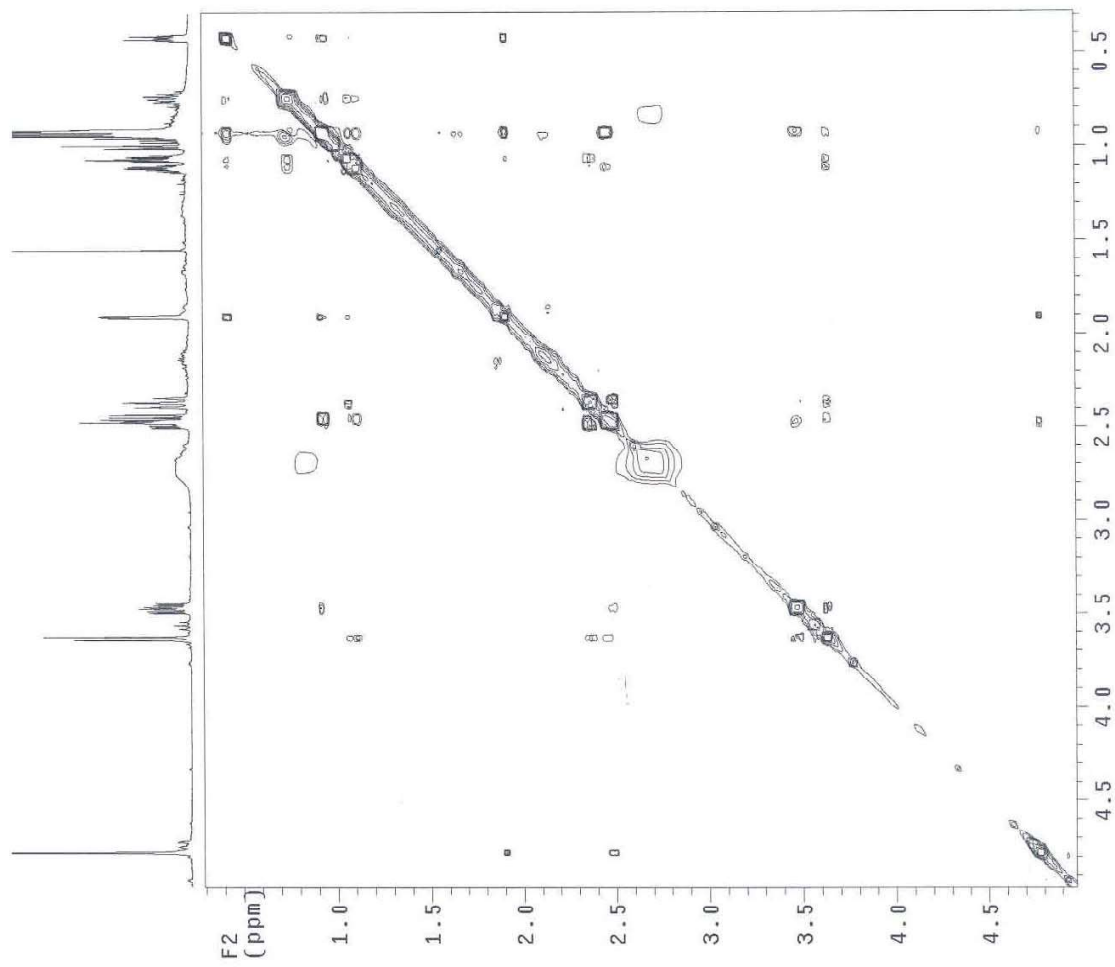
Espectro 31. RMN ^{13}C (125 MHz, C_6D_6) del (1*R*,2*R*)-dihidroxi-4(15)-cicloaxeno (133).



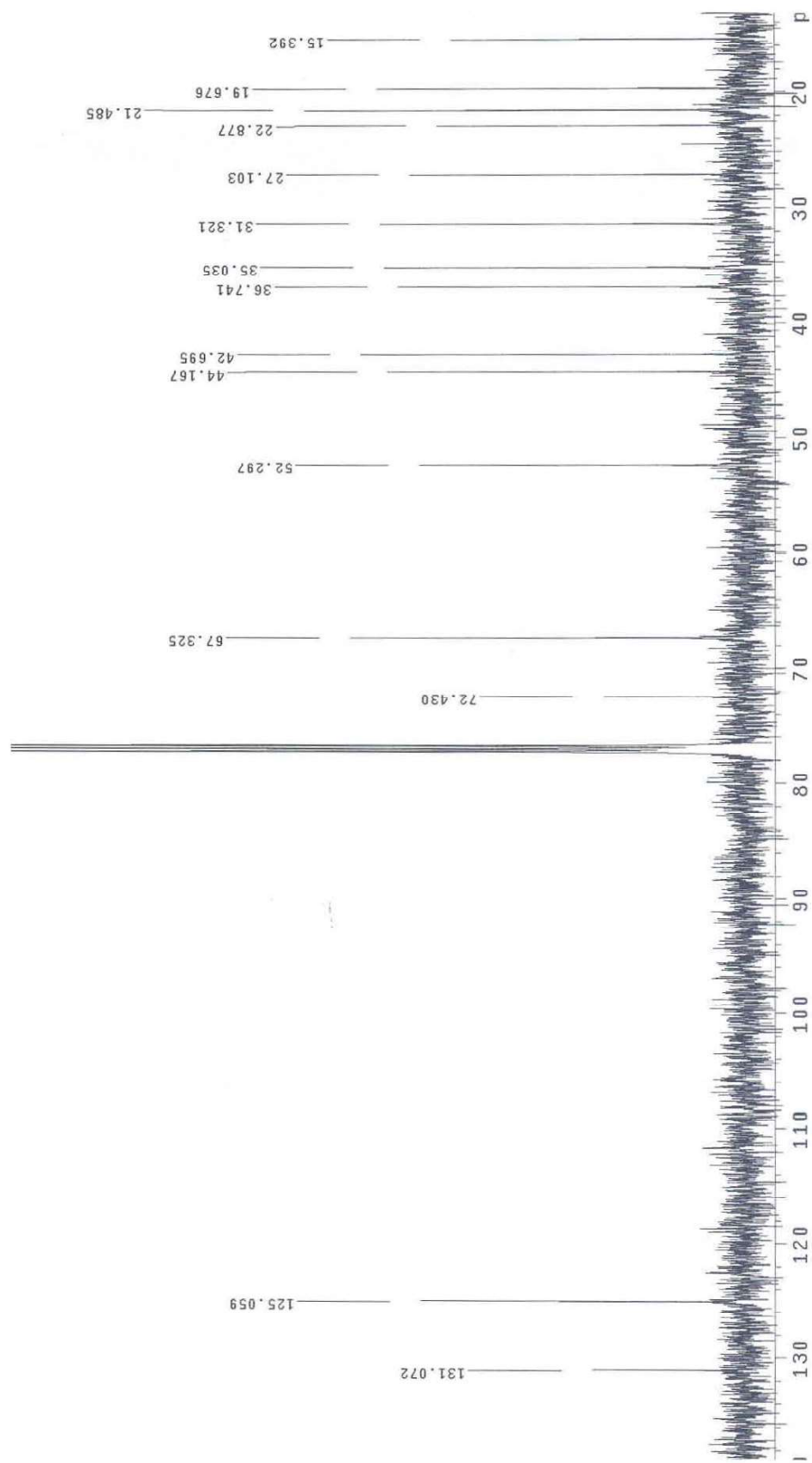
Espectro 32. RMN ^1H (500 MHz, C_6D_6) del (1*R*,2*R*)-dihidroxi-4(15)-cicloaxeno (**133**).



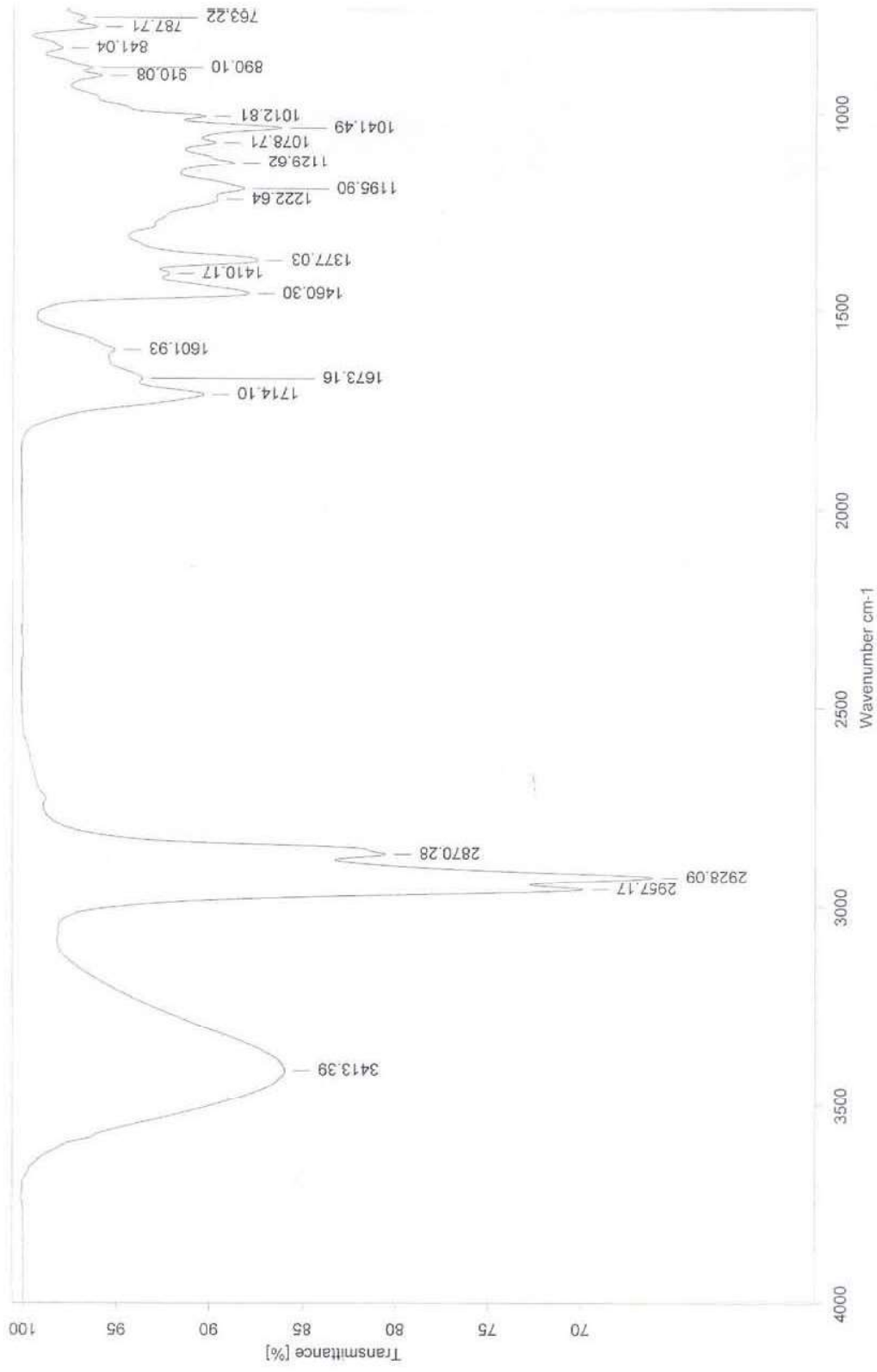
Espectro **33**. Experimento COSY (C_6D_6) del (1*R*,2*R*)-dihidroxi-4(15)-cicloaxeno (**133**).



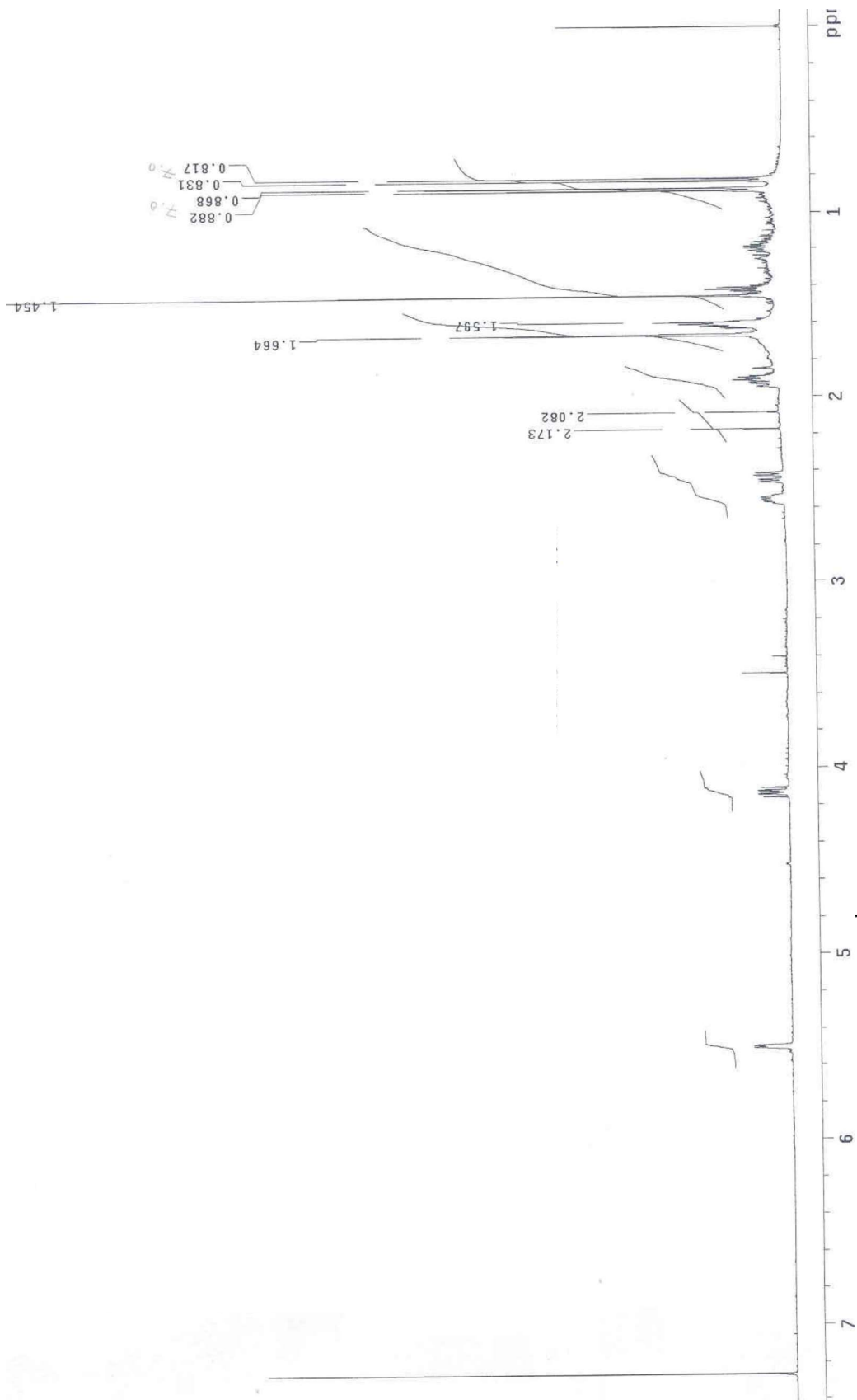
Espectro 34. Experimento NOESY (C_6D_6) del (1*R*,2*R*)-dihidroxi-4(15)-cicloaxeno (133).



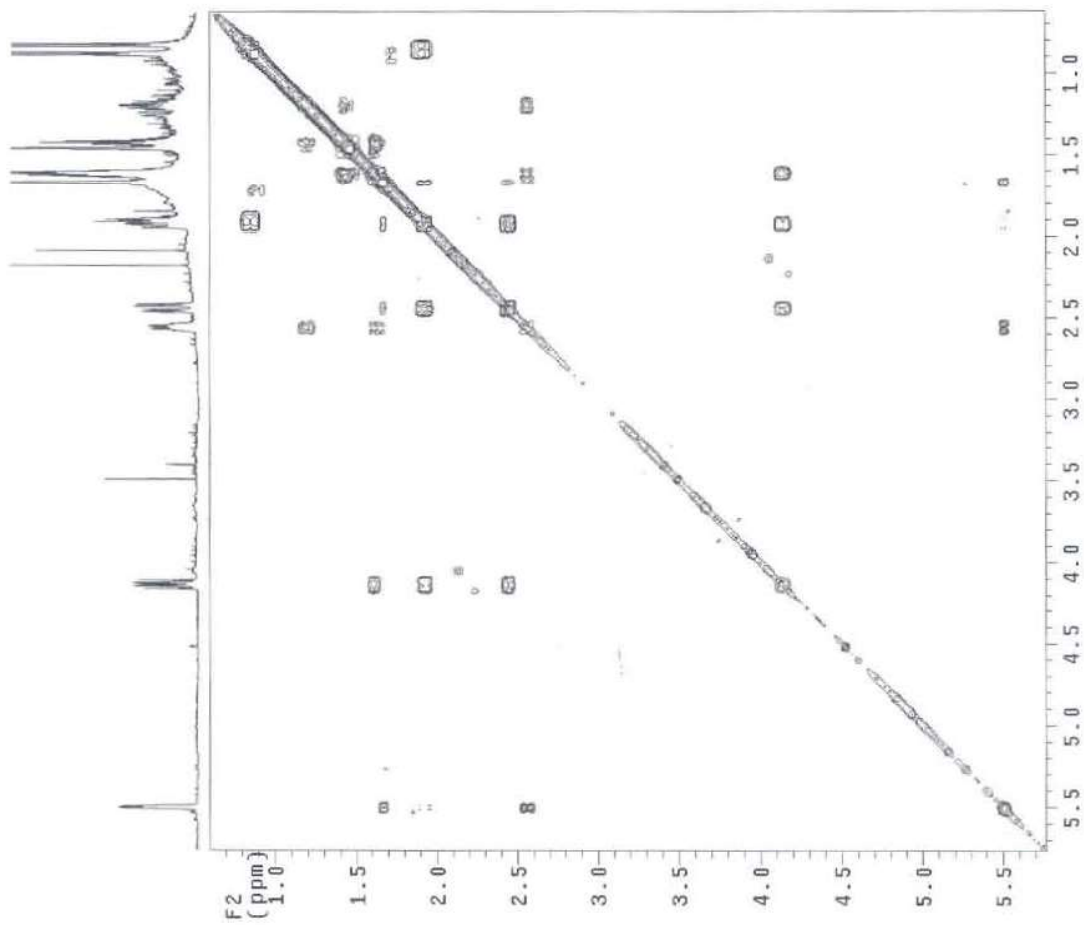
Espectro 35. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del (2R)- β -cadin-4-en-2,10-diol (134).



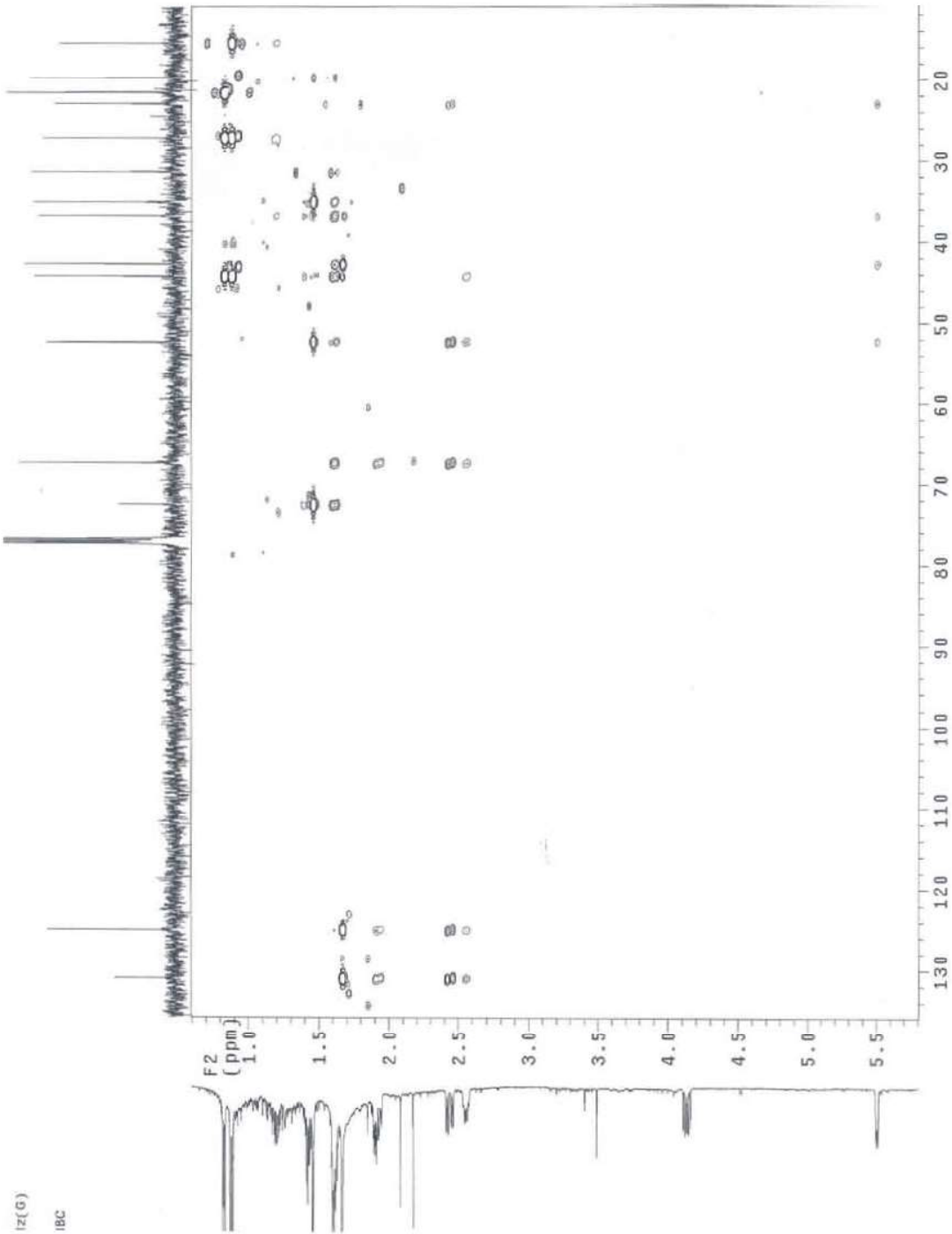
Espectro 36. IR (CHCl₃) del (2R)-β-cadin-4-en-2,10-diol (134).



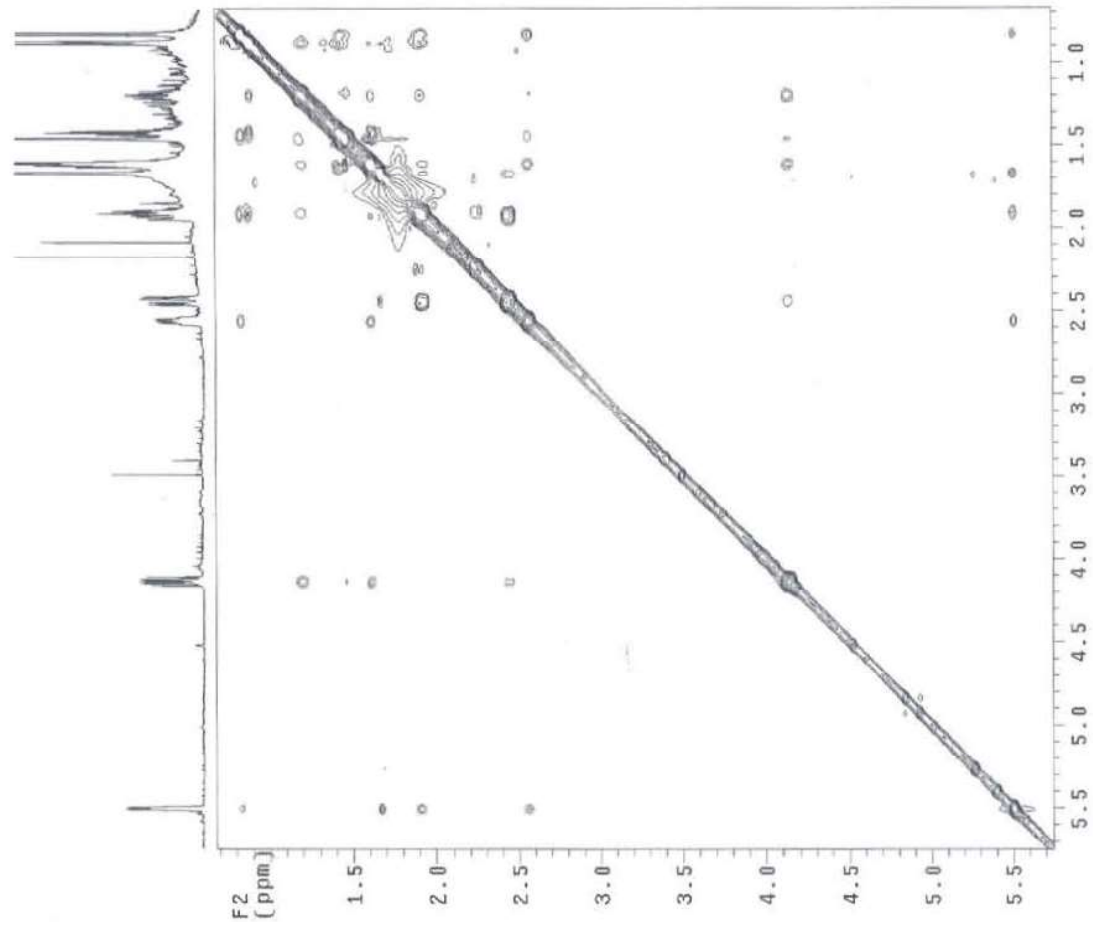
Espectro 37. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) del (2R)-β-cadin-4-en-2,10-diol (134).



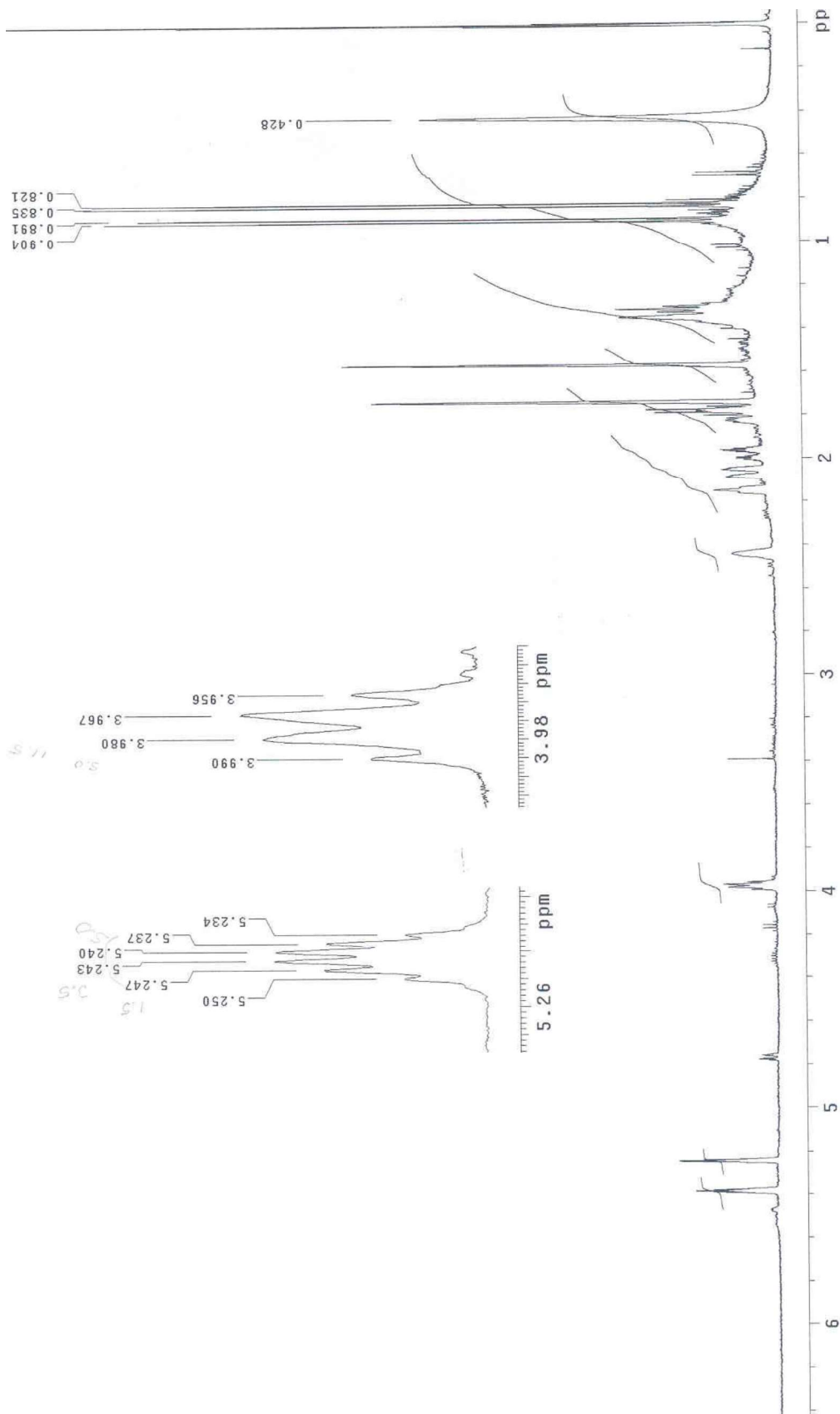
Espectro **38**. Experimento COSY (CDCl₃) del (2*R*)-β-cadin-4-en-2,10-diol (**134**).



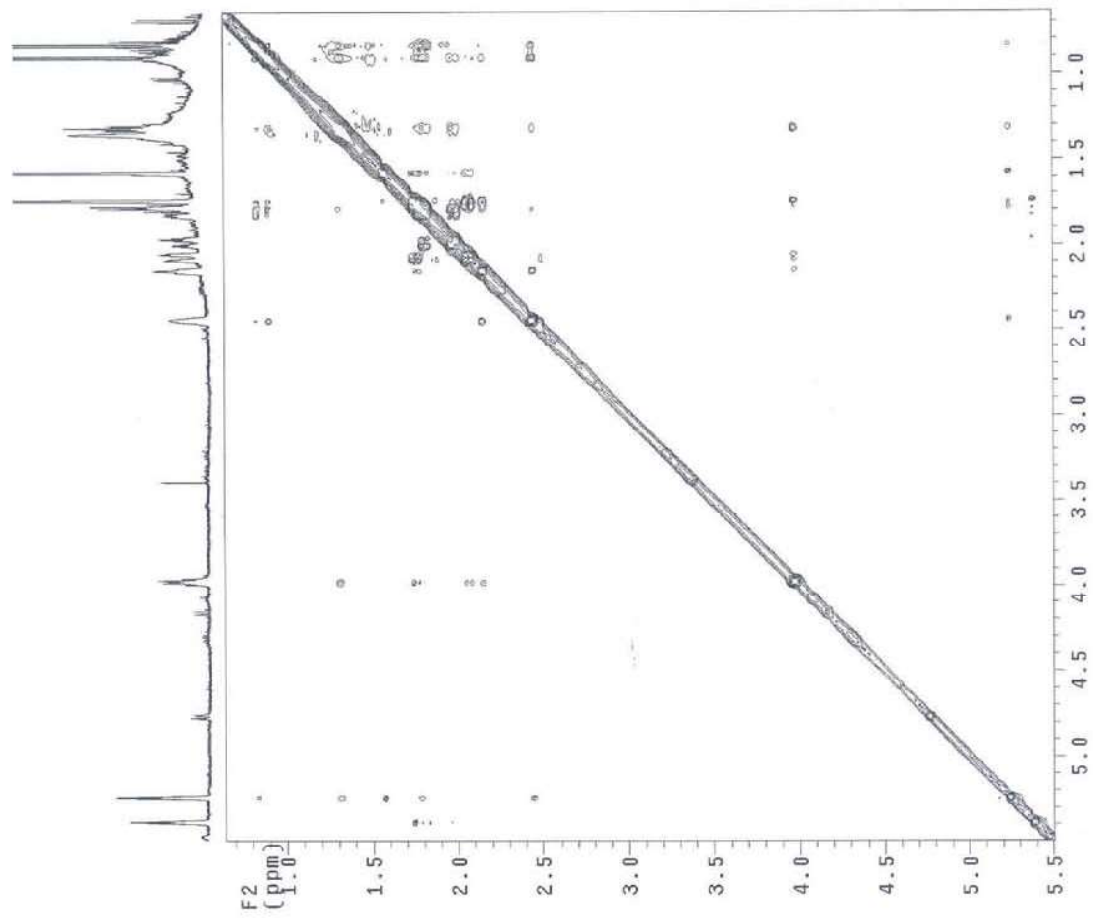
Espectro 39. Experimento HMBC (CDCl₃) del (2*R*)-β-cadin-4-en-2,10-diol (134).



Espectro 41. Experimento NOESY (CDCl₃) del (2*R*)-β-cadin-4-en-2,10-diol (134).



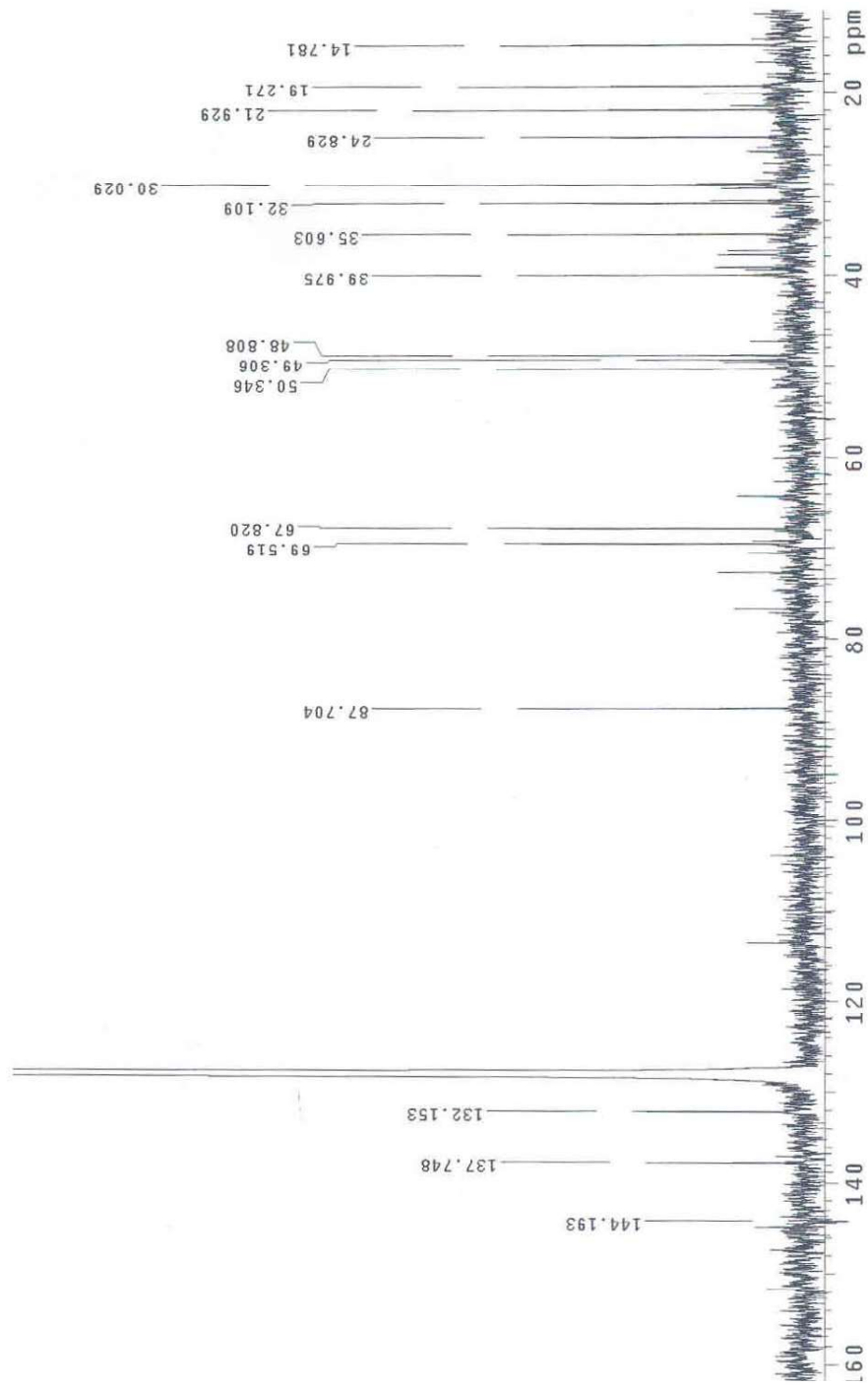
Espectro 42. RMN ^1H (500 MHz, C_6D_6) del (2*R*)- β -cadin-4,9-dien-2-ol (135).



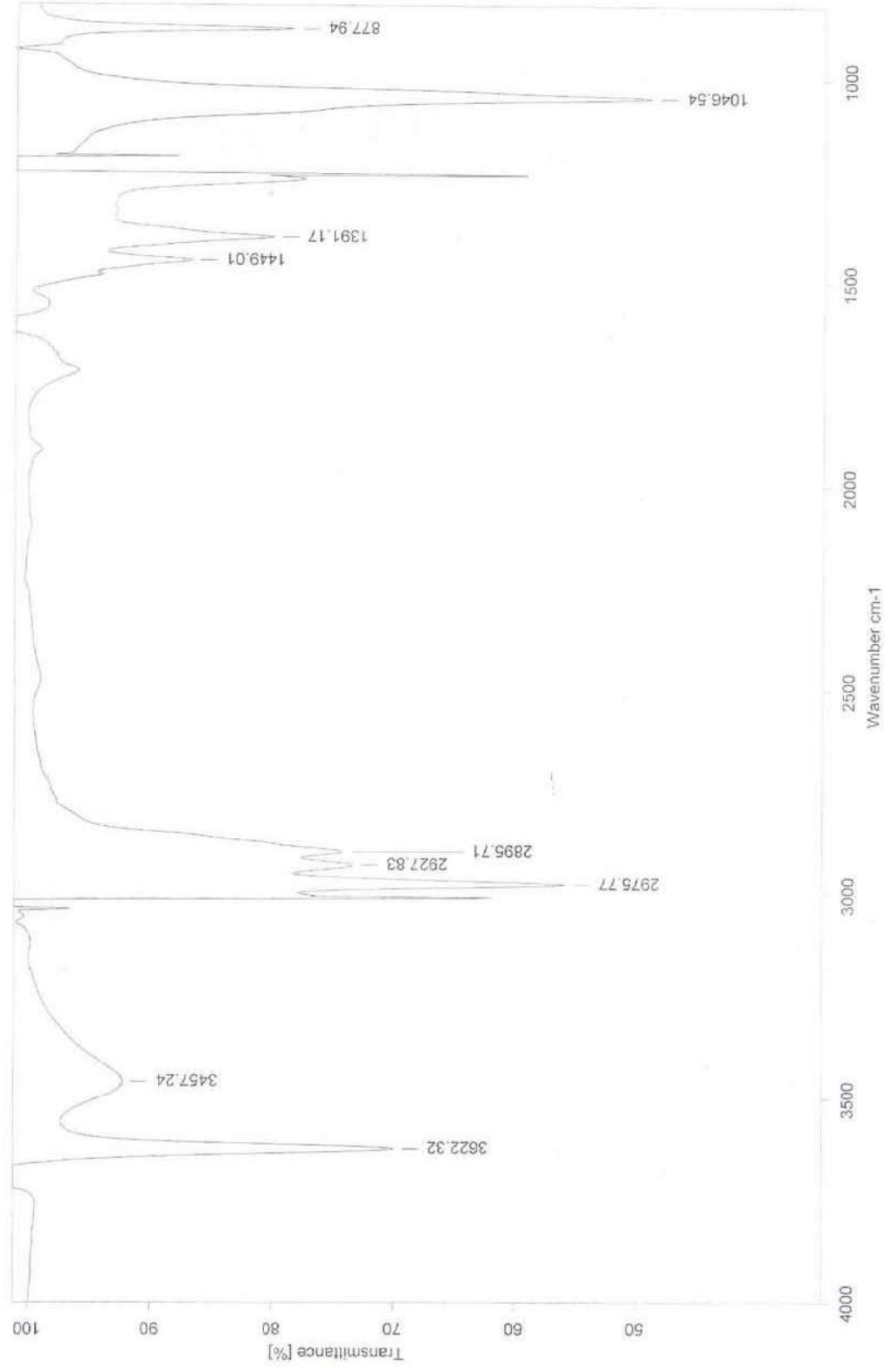
Espectro 43. Experimento NOESY (C_6D_6) del (2*R*)- β -cadin-4,9-dien-2-ol (135).



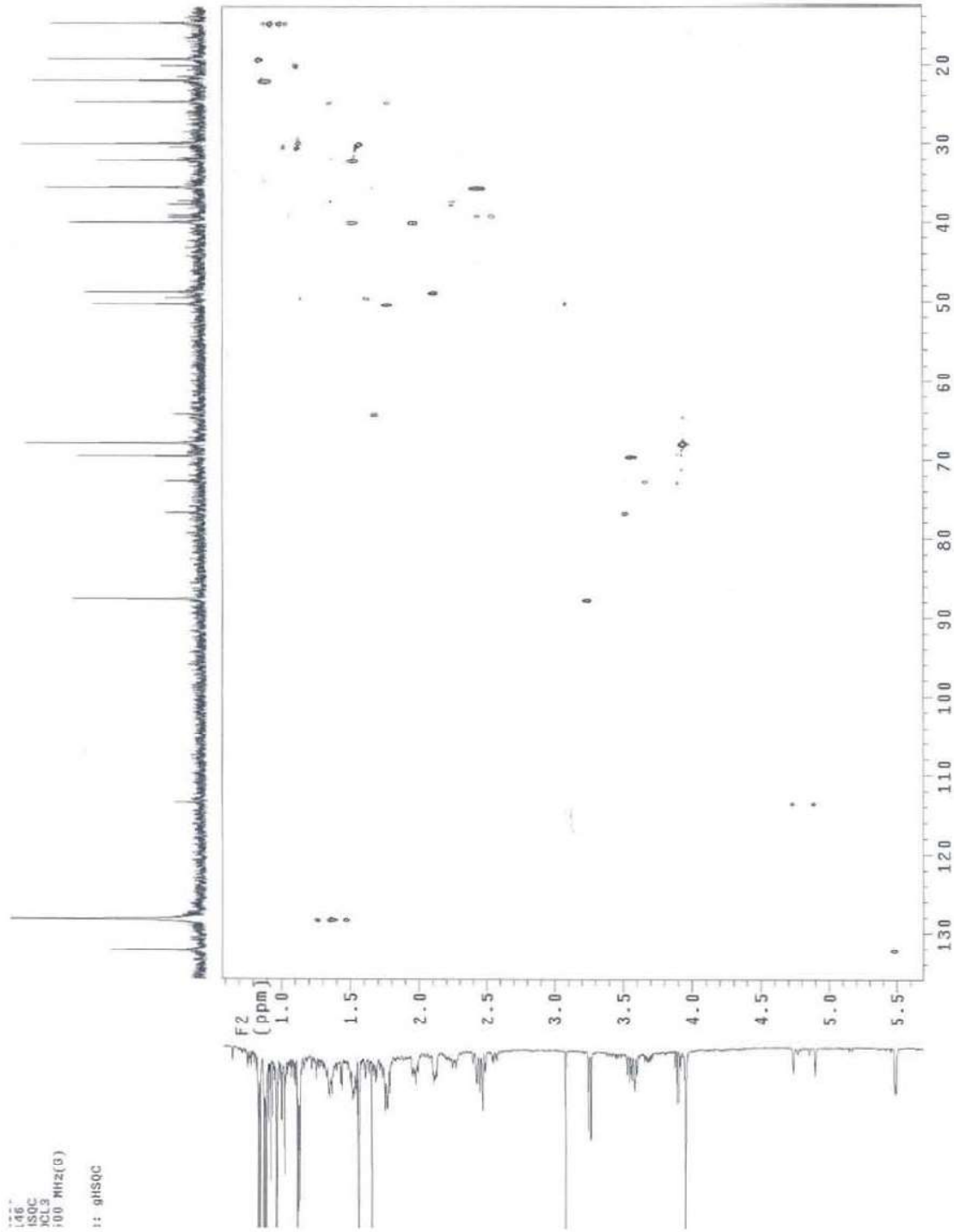
Espectro 44. EM-IE (70 eV) del (1R,2R)-dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (136).



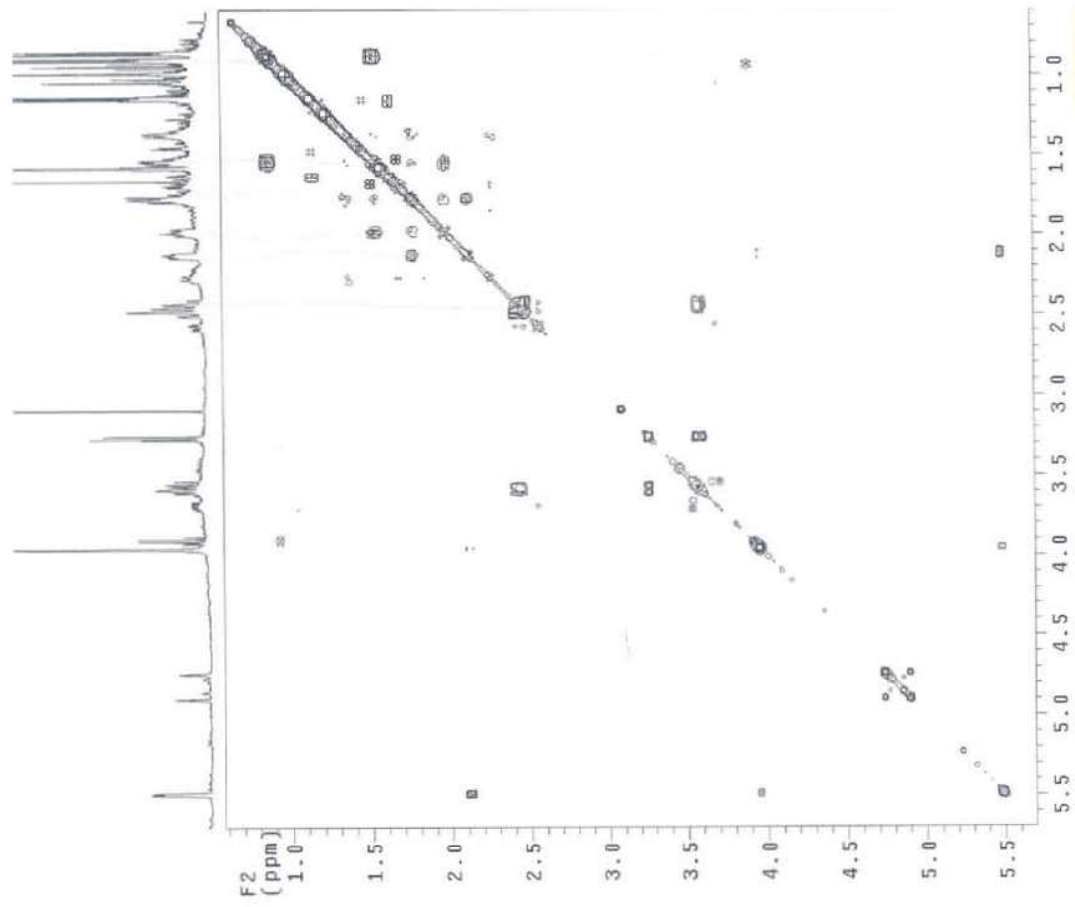
Espectro 45. RMN ^{13}C (125 MHz, C_6D_6) del (1*R*,2*R*)-dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (136).



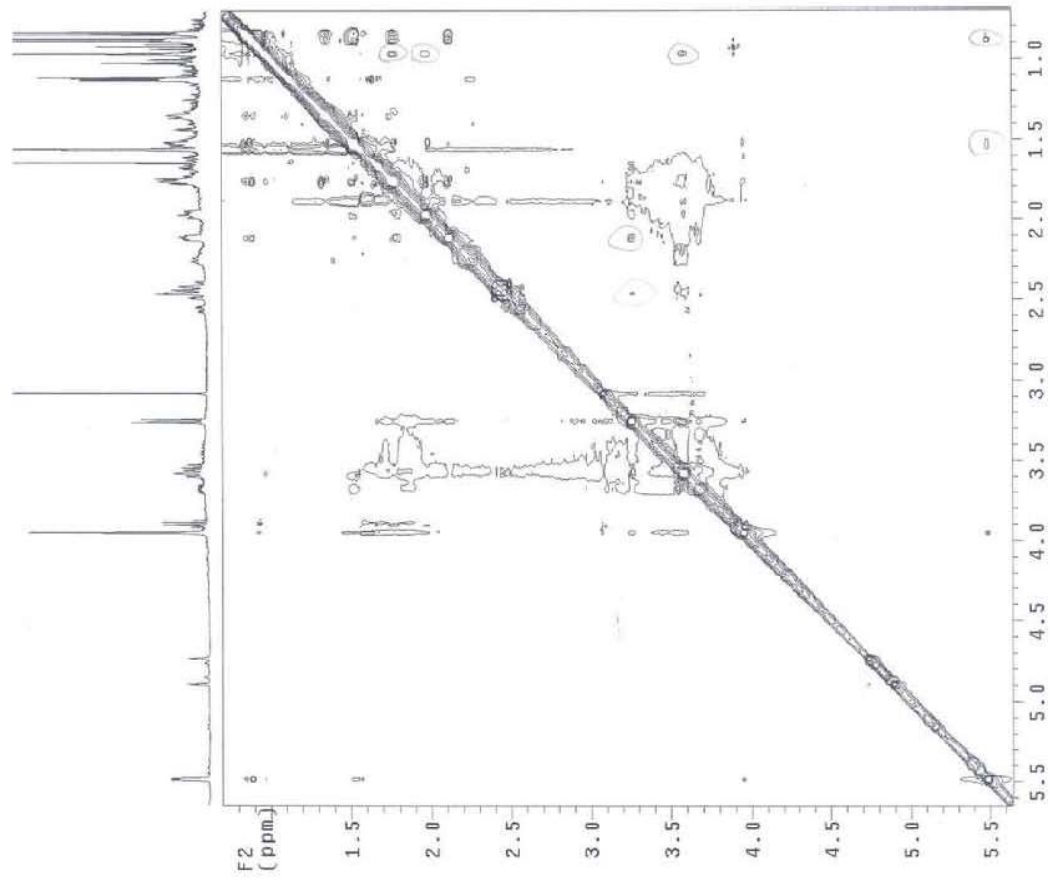
Espectro 46. IR (CHCl₃) del (1*R*,2*R*)-dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (136).



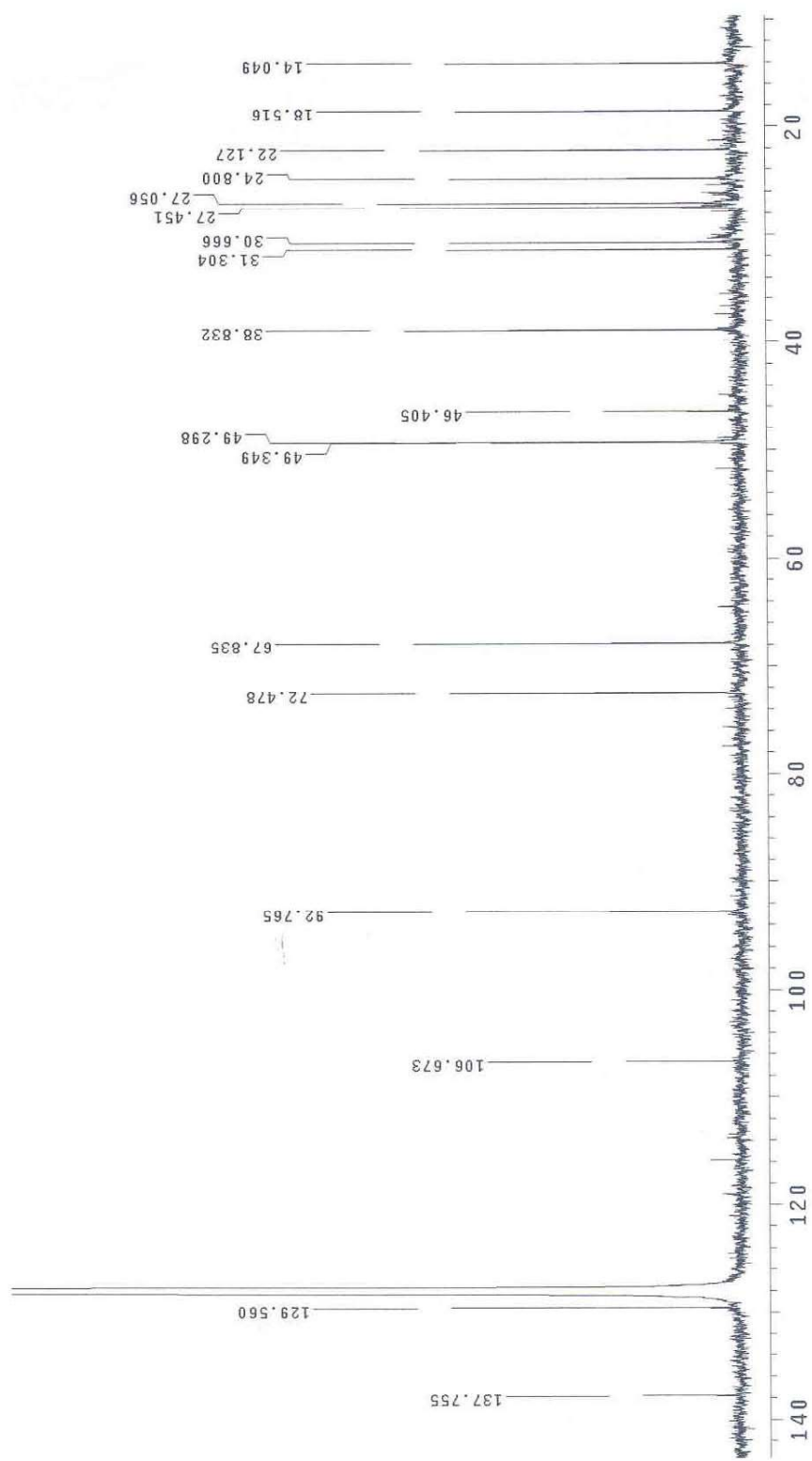
Espectro 48. Experimento HSQC (C_6D_6) del (1*R*,2*R*)-dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (136).



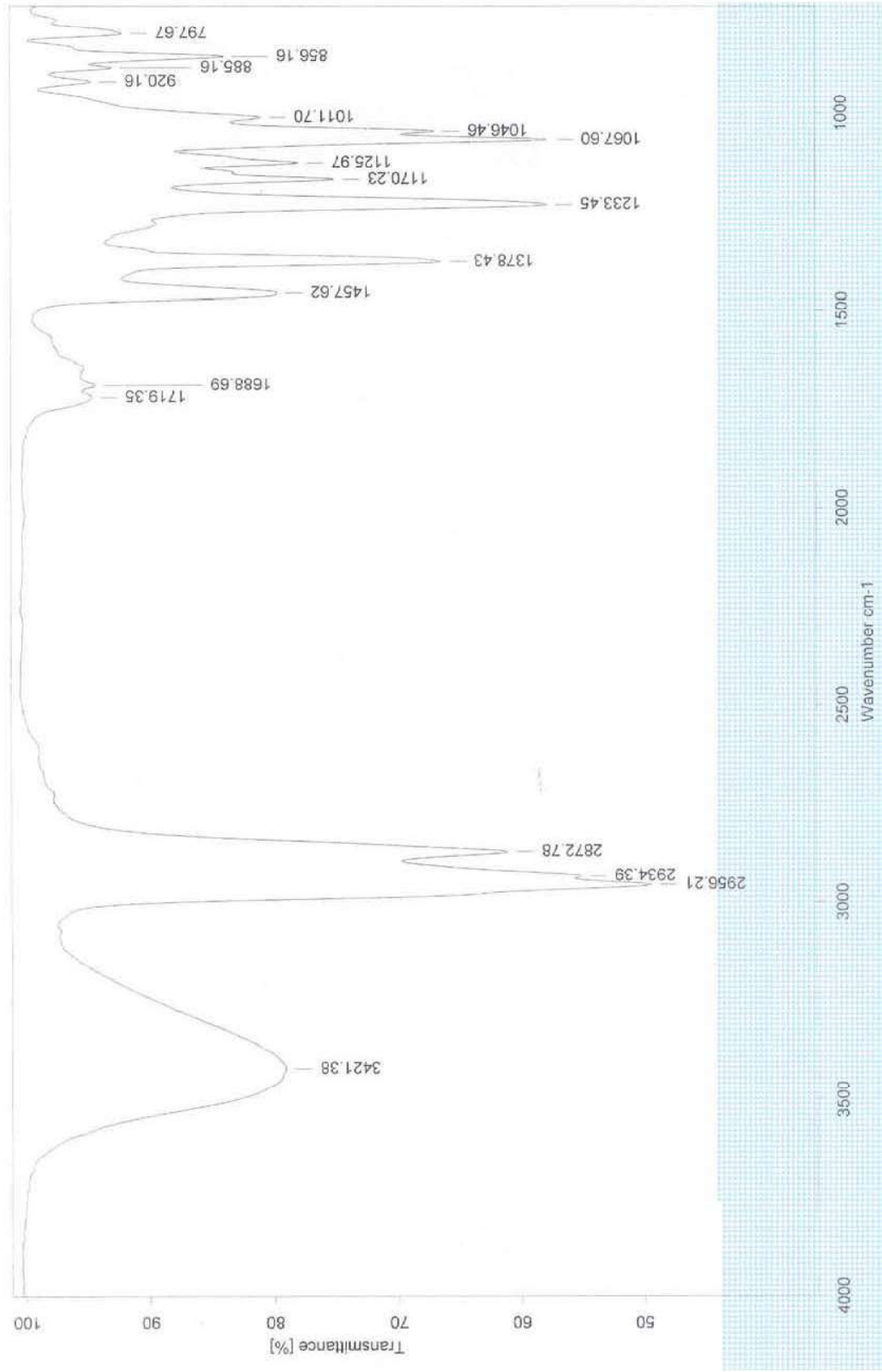
Espectro **49**. Experimento COSY (C_6D_6) del (1*R*,2*R*)-dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (**136**).



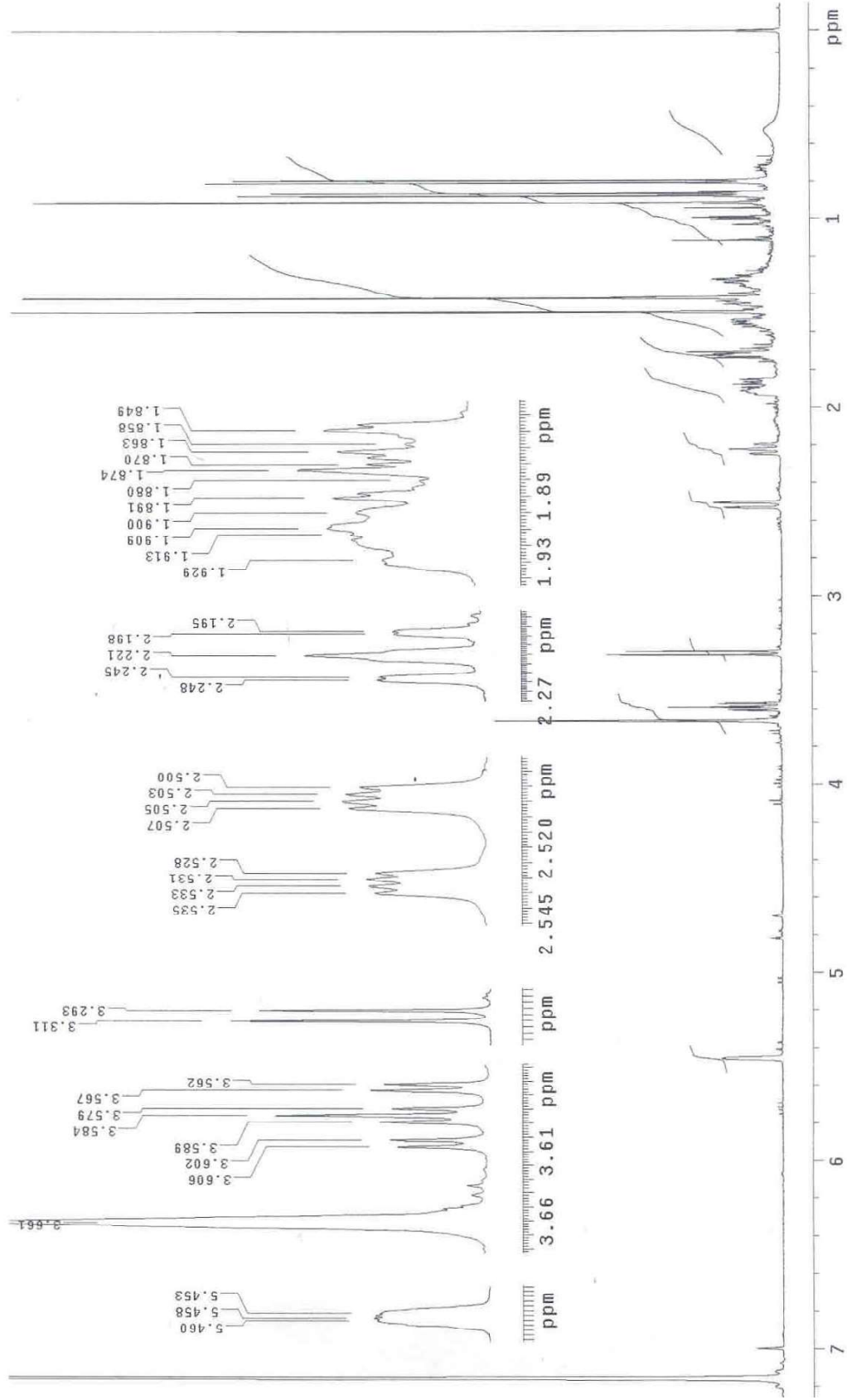
Espectro **50**. Experimento NOESY (C_6D_6) del (1*R*,2*R*)-dihidroxi-4-isodaucen-14-ol (**136**).



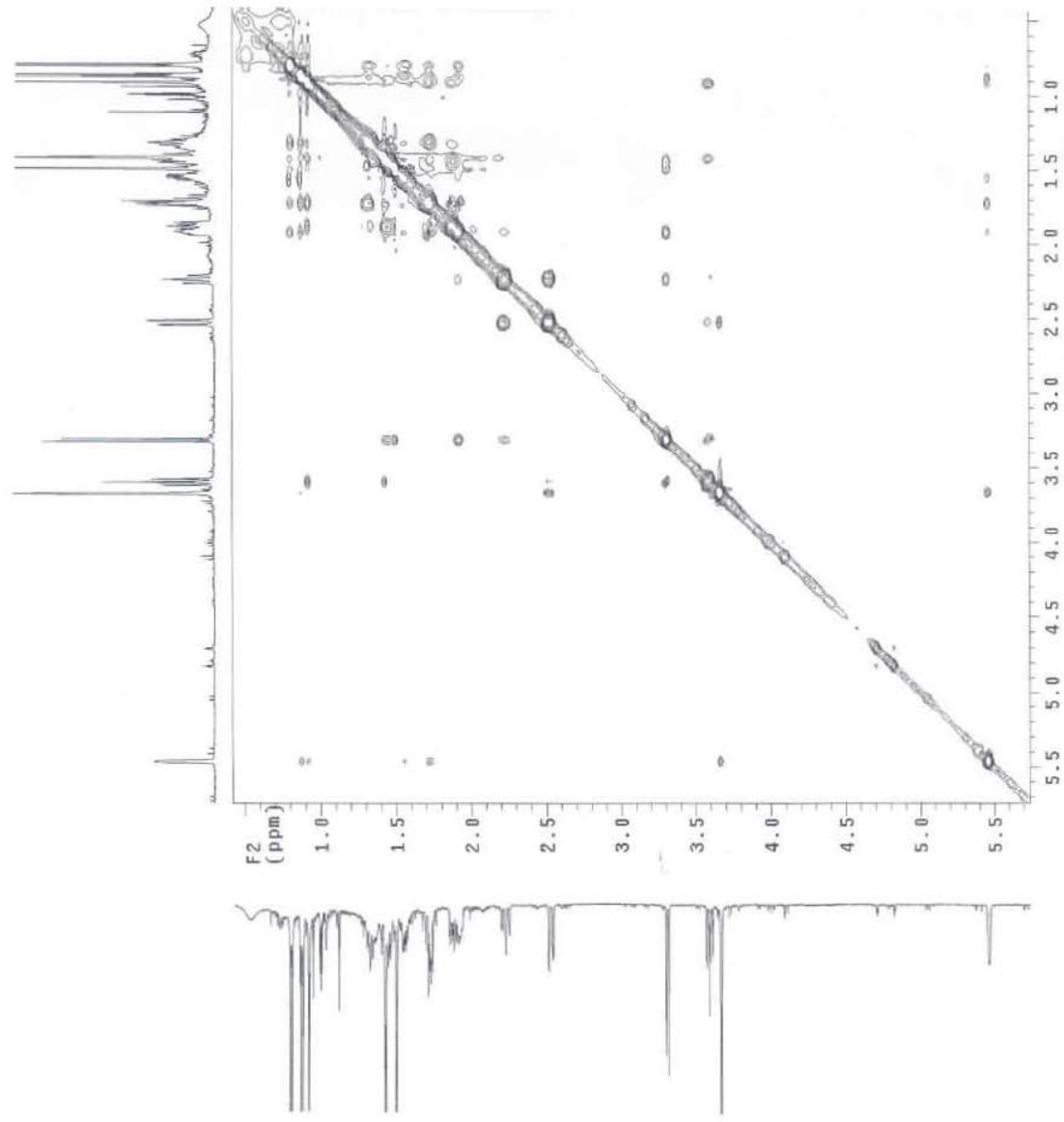
Espectro **51**. RMN ^{13}C (125 MHz, C_6D_6) del $1\beta,2\beta$ -isopropilidendioxi-4-isodaucen-14-ol (**137**).



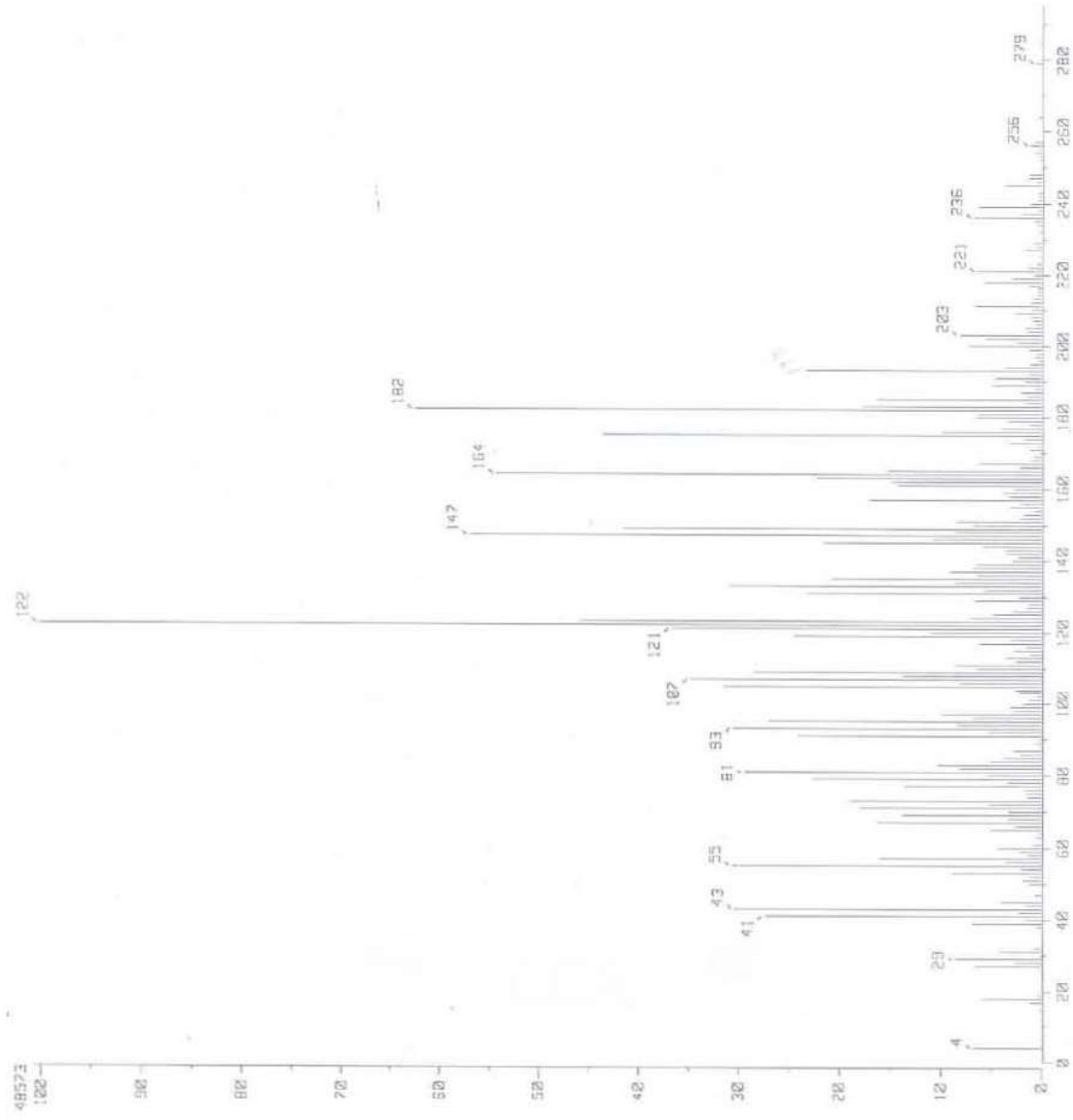
Espectro 52. IR (CHCl₃) del 1β,2β-isopropilidendioxi-4-isodaucen-14-ol (137).



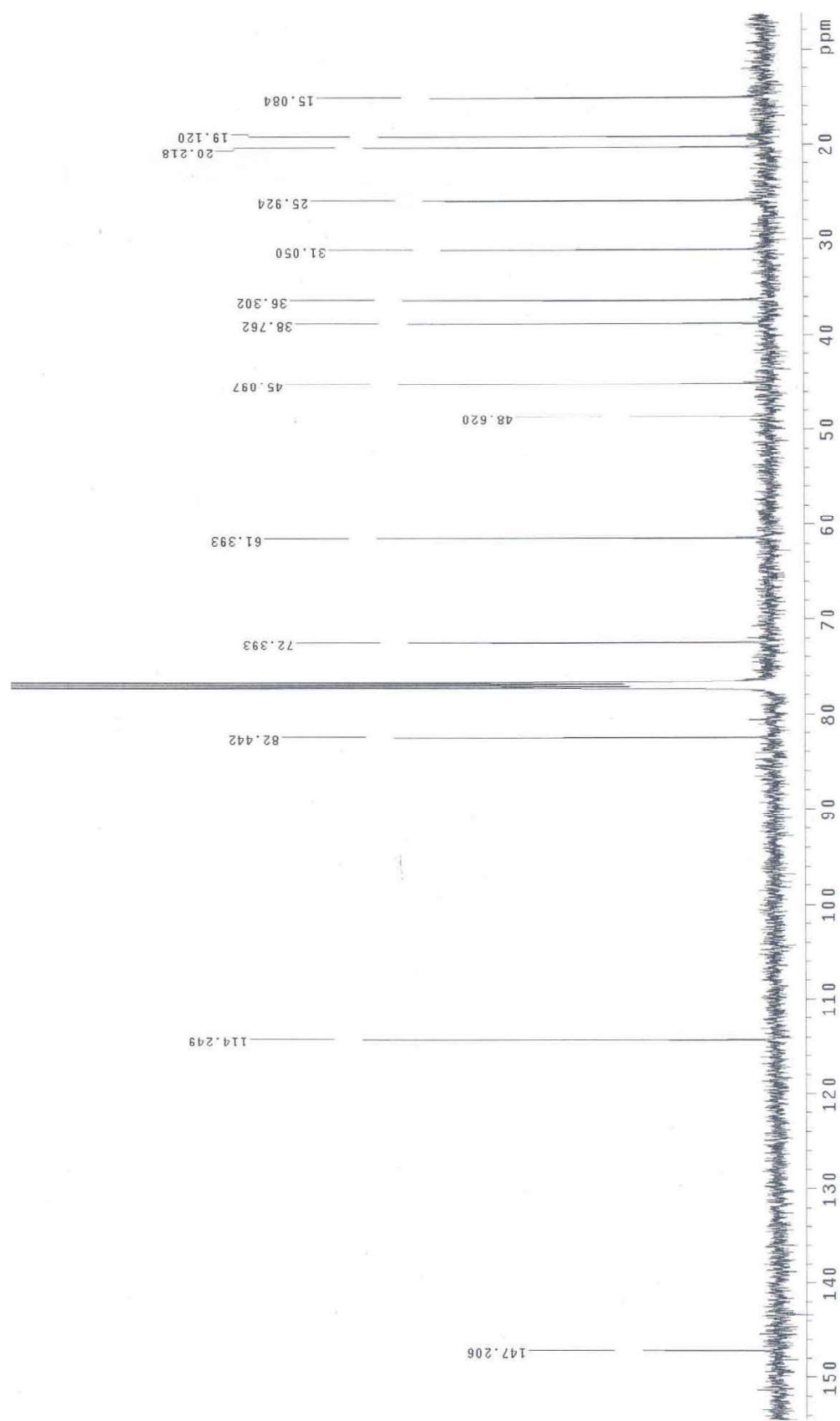
Espectro 53. RMN ^1H (500 MHz, C_6D_6) del 1 β ,2 β -isopropylidendioxi-4-isodaucen-14-ol (137).



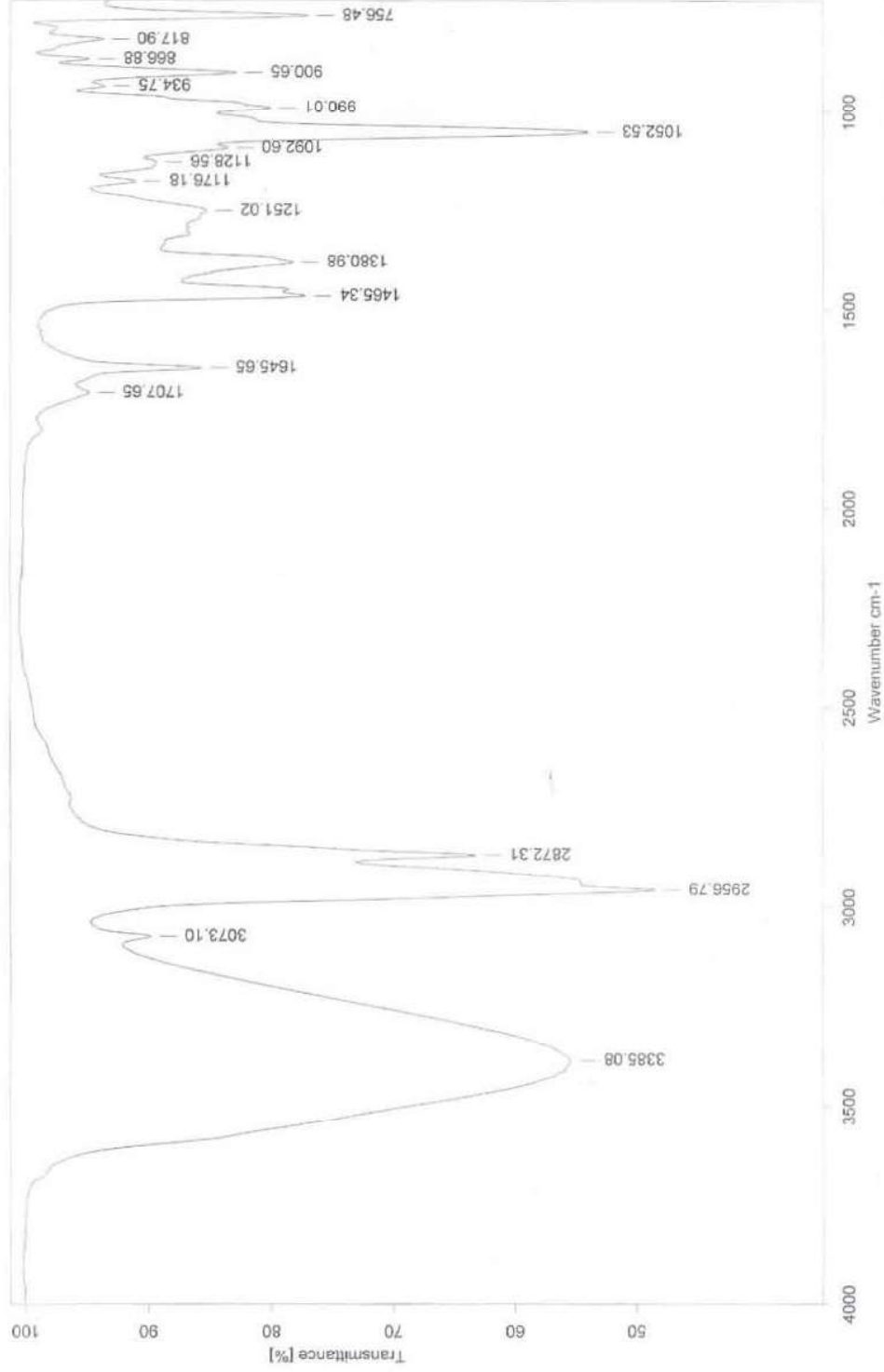
Espectro 54. Experimento NOESY (CDCl_3) del 1 β ,2 β -isopropilidendioxi-4-isodaucen-14-ol (137).



Espectro 55. EM-IE (70 eV) del (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*S*,10*S*)*-5-*epi*-eudesm-4(15)-eno-1 β ,2 β ,6 β -triol (138).

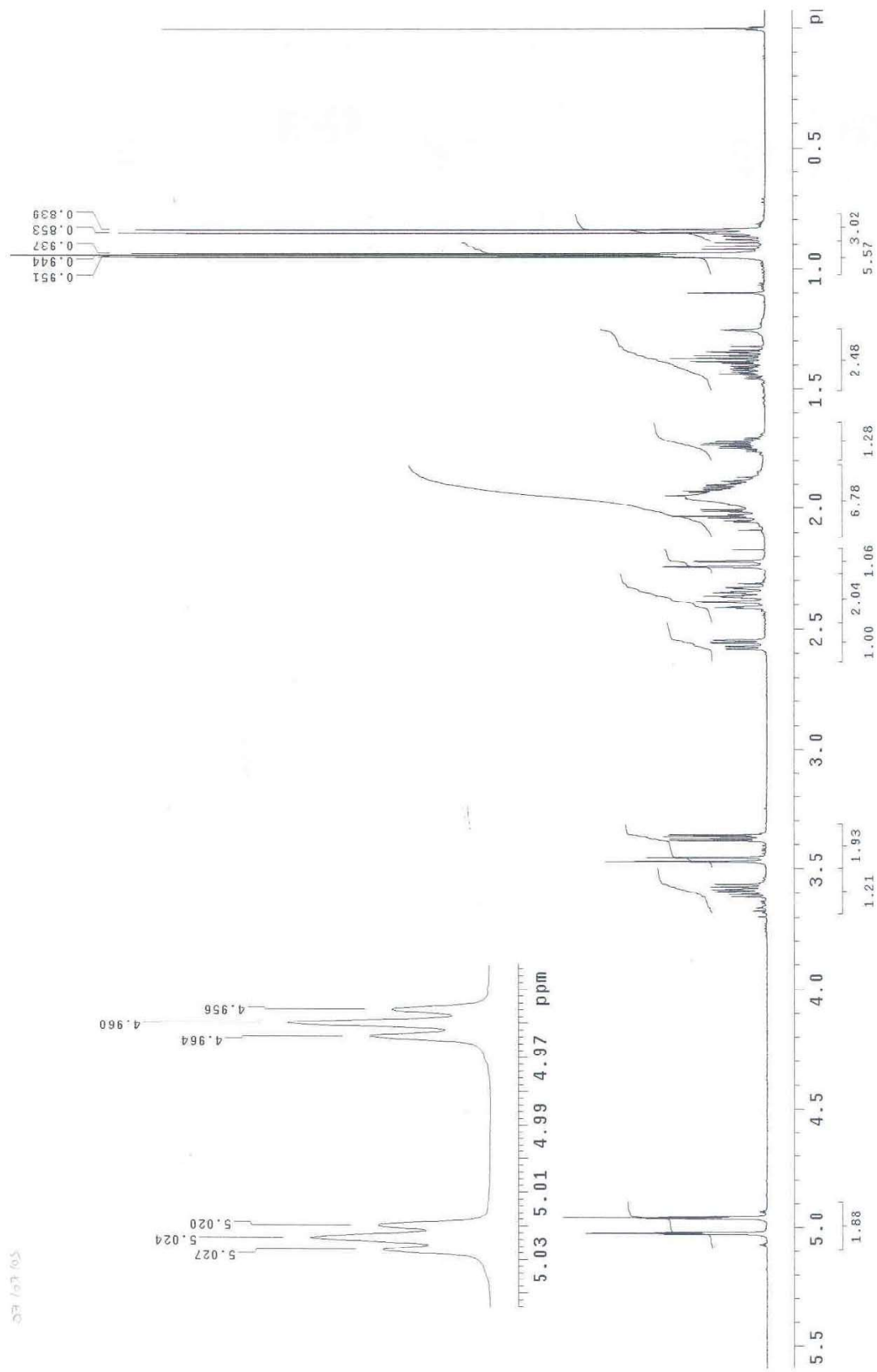


Espectro **56**. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*S*,10*S*)*-5-*epi*-eudesm-4(15)-eno-1 β ,2 β ,6 β -triol (**138**).

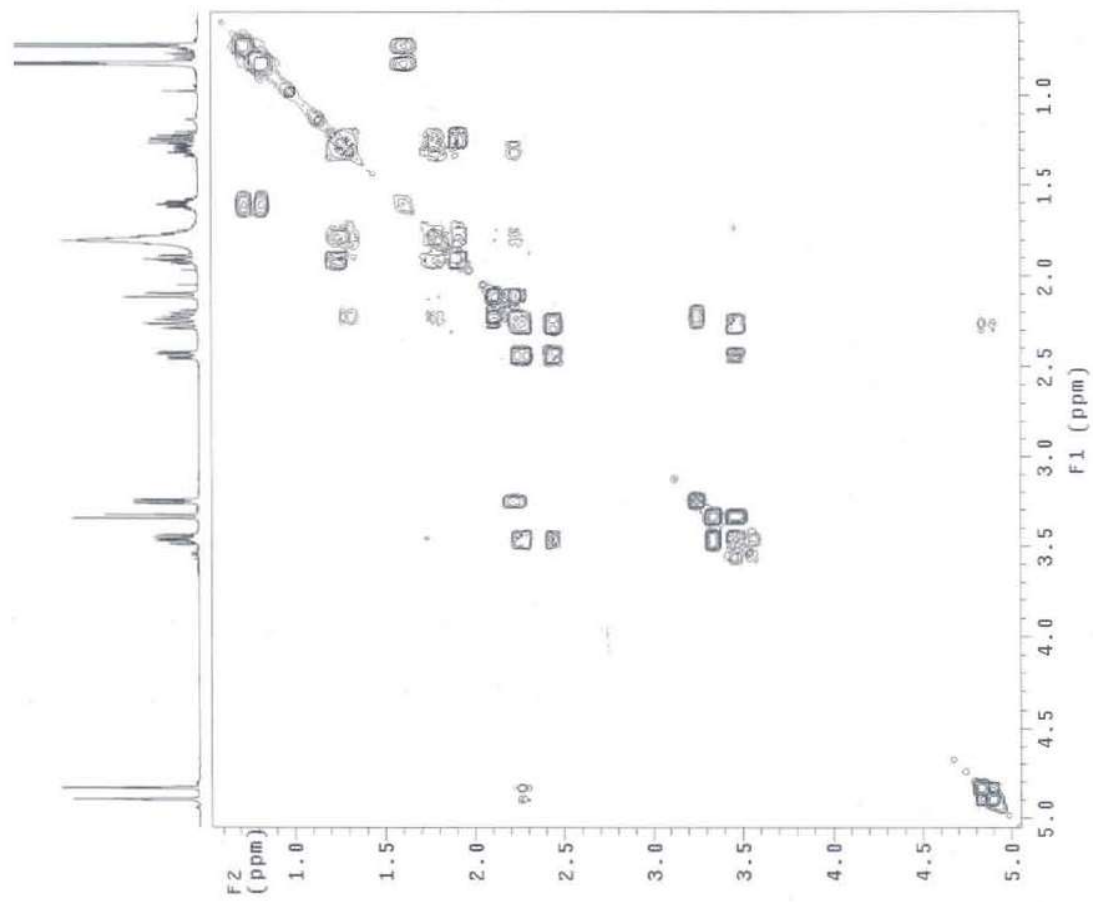


C:\infrarrojo\AIR-2005\8015.1 Dr. G. Delgado 97-101IV/HPLC/3 Pelicula EGR 03/08/2005

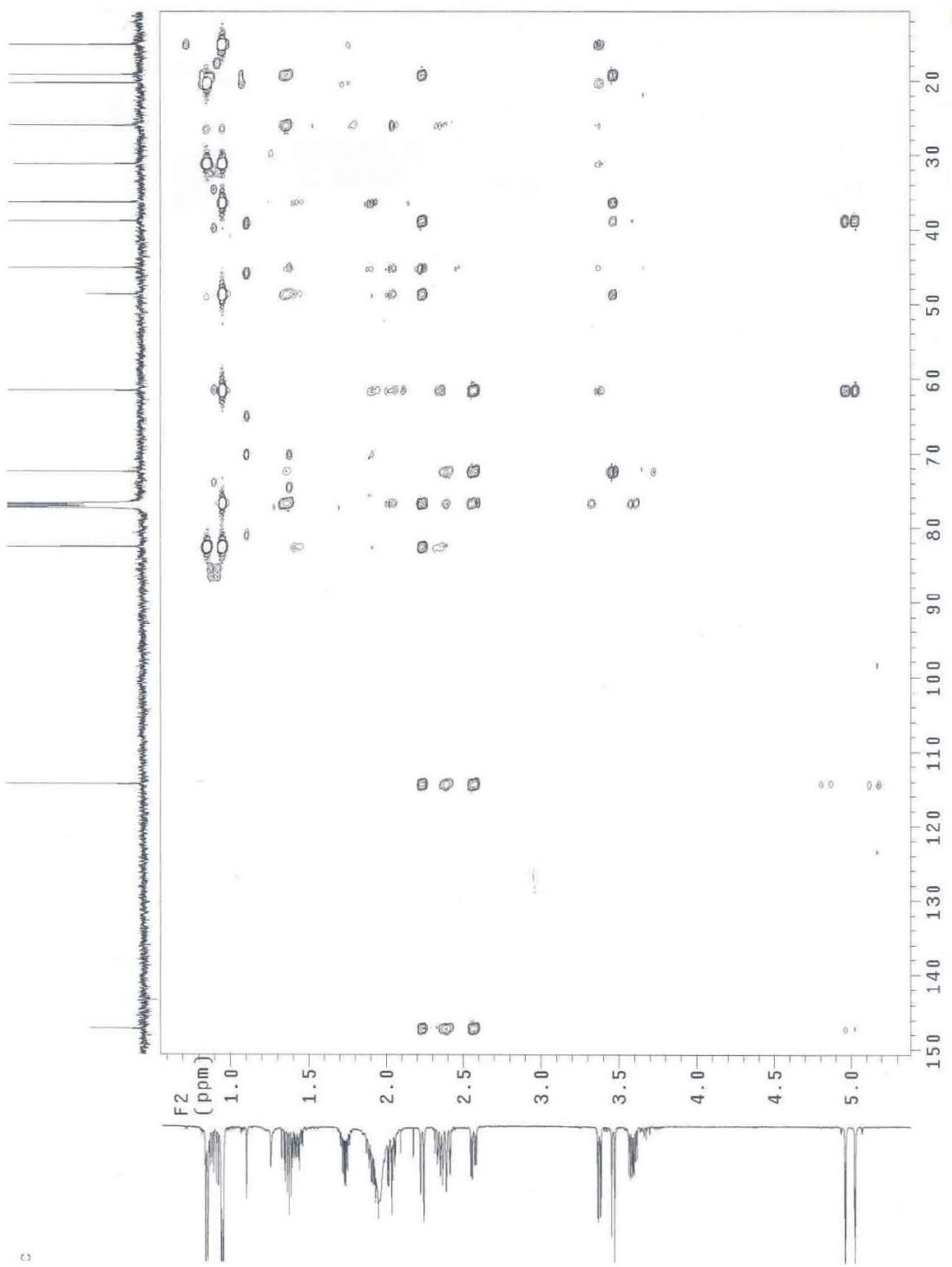
Espectro 57. IR (CHCl₃) del (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*S*,10*S*)*-5-*epi*-eudesm-4(15)-eno-1β,2β,6β-triol (138).



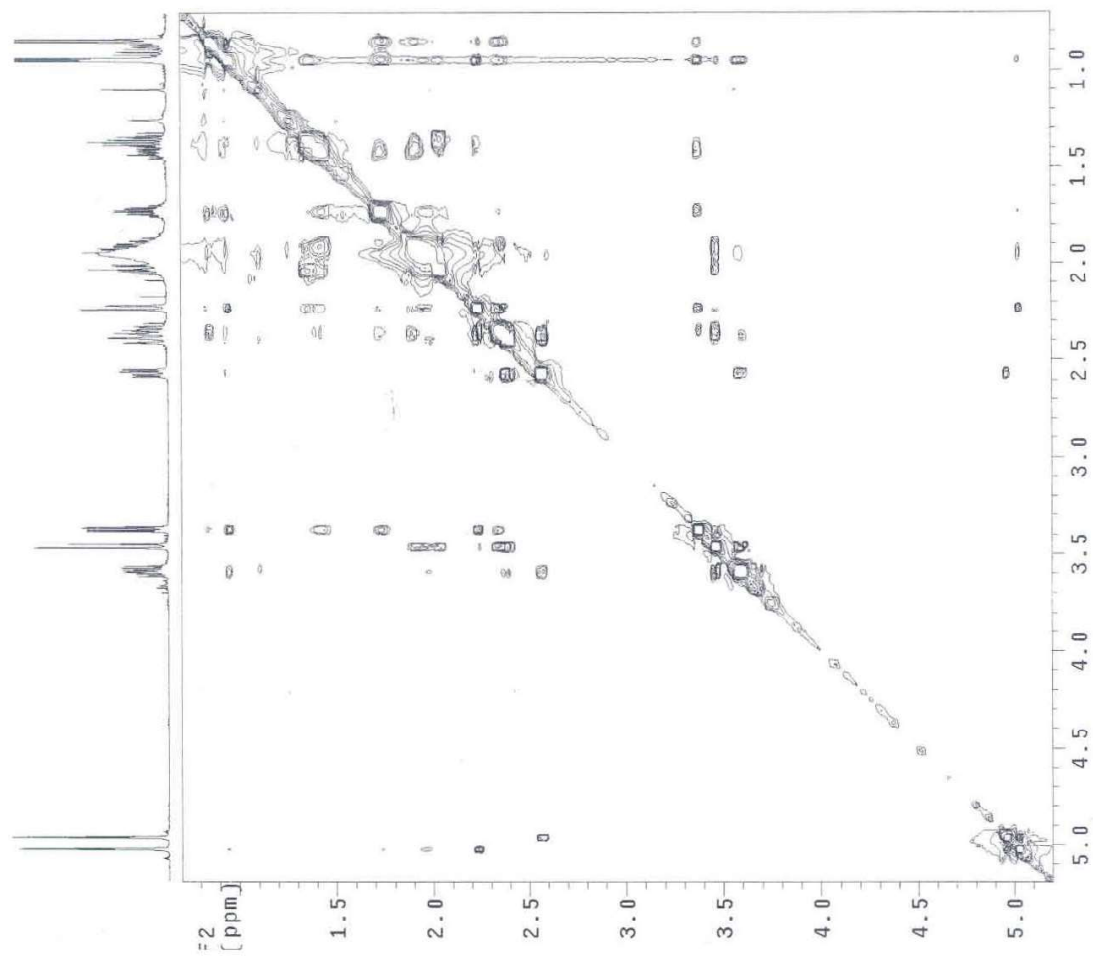
Espectro **58**. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) del (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*S*,10*S*)*-5-epi-eudesm-4(15)-eno-1 β ,2 β ,6 β -trioi (**138**).



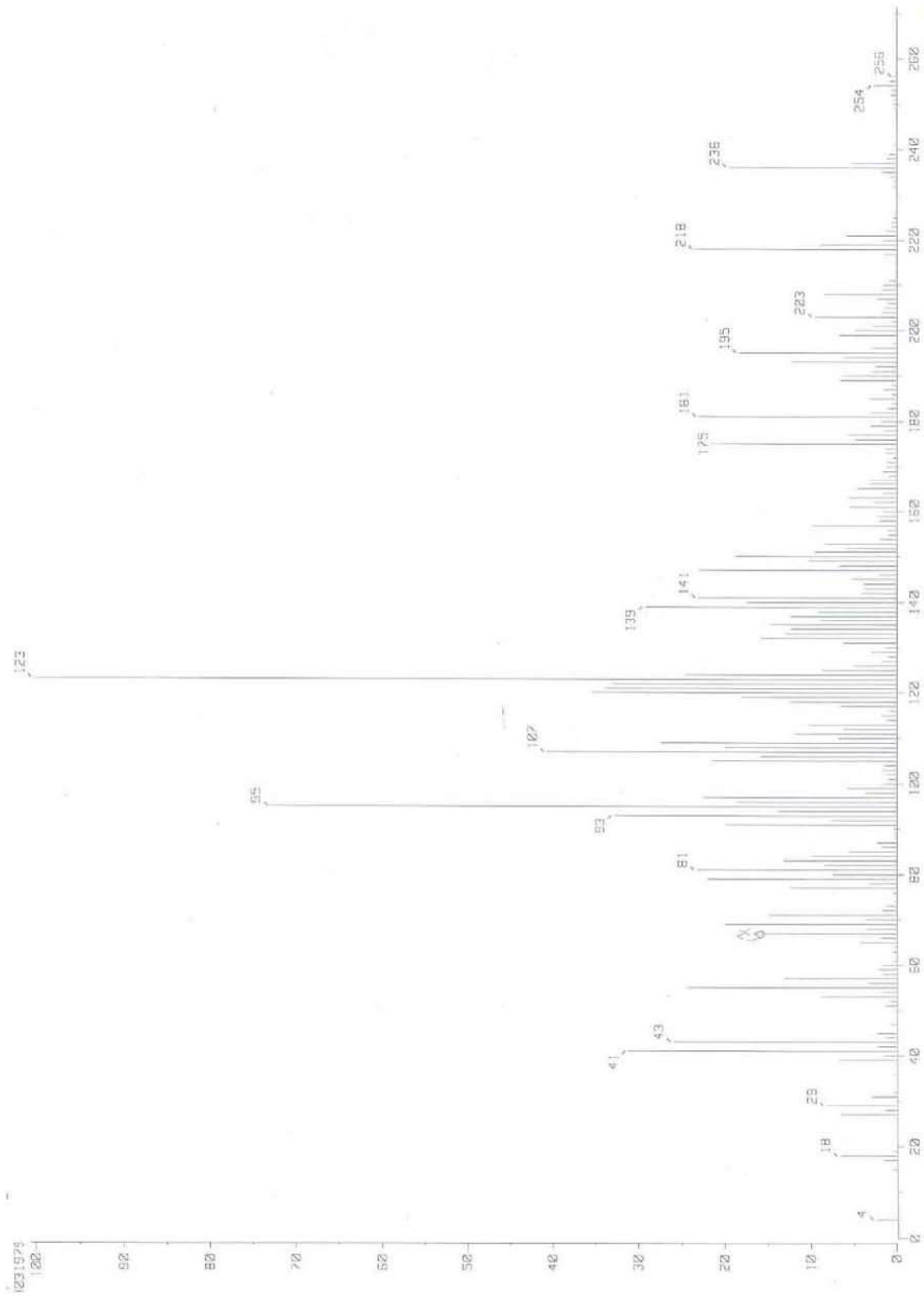
Espectro 59. Experimento COSY (CDCl₃) del (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*S*,10*S*)*-5-*epi*-eudesm-4(15)-eno-1β,2β,6β-triol (138).



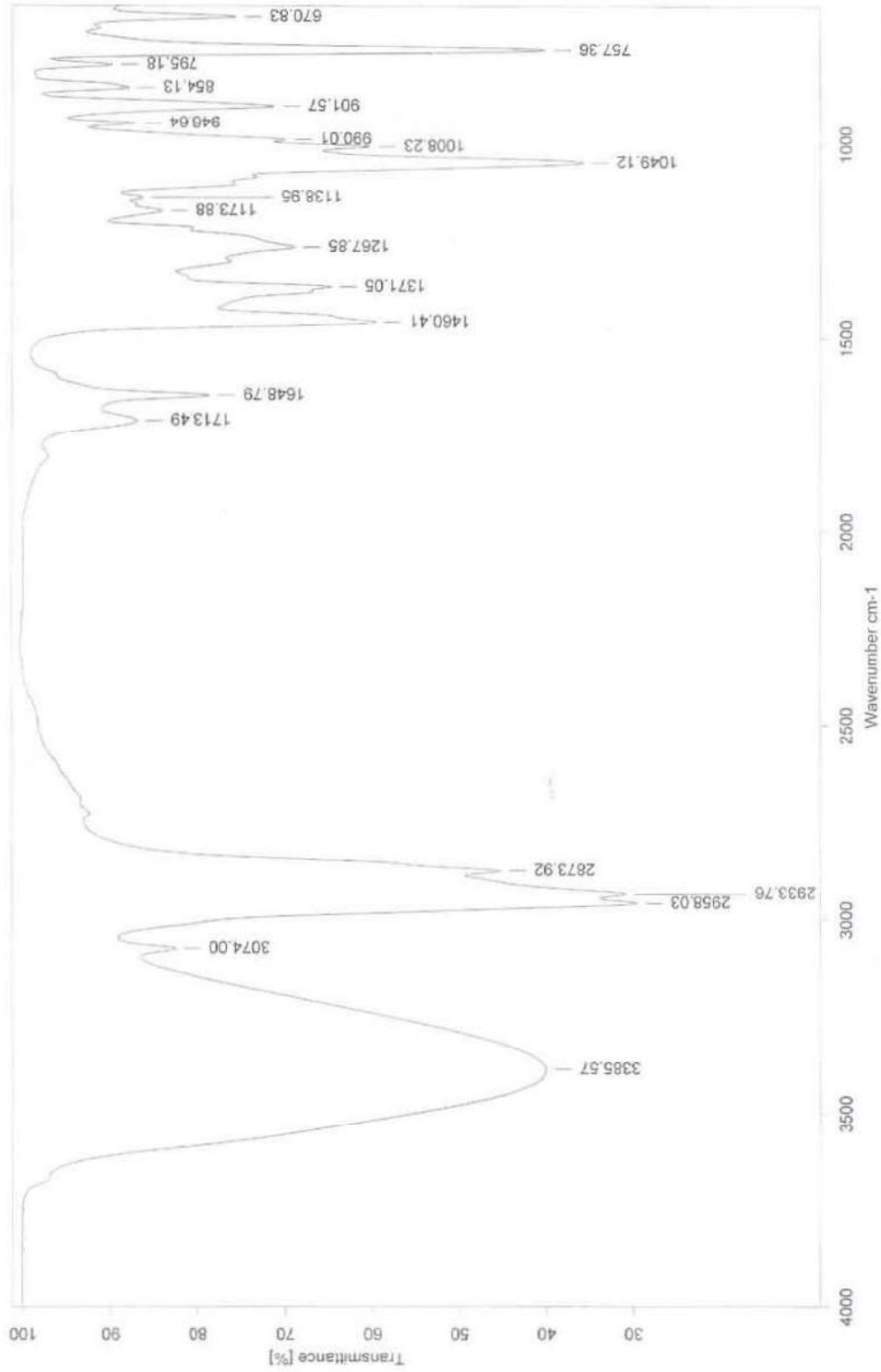
Espectro 60. Experimento HMBC (CDCl₃) del (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*S*,10*S*)*-5-epi-eudesm-4(15)-eno-1β,2β,6β-triol (138).



Espectro 61. Experimento NOESY (CDCl₃) del (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*S*,10*S*)*-5-*epi*-eudesm-4(15)-eno-1β,2β,6β-triol (**138**).

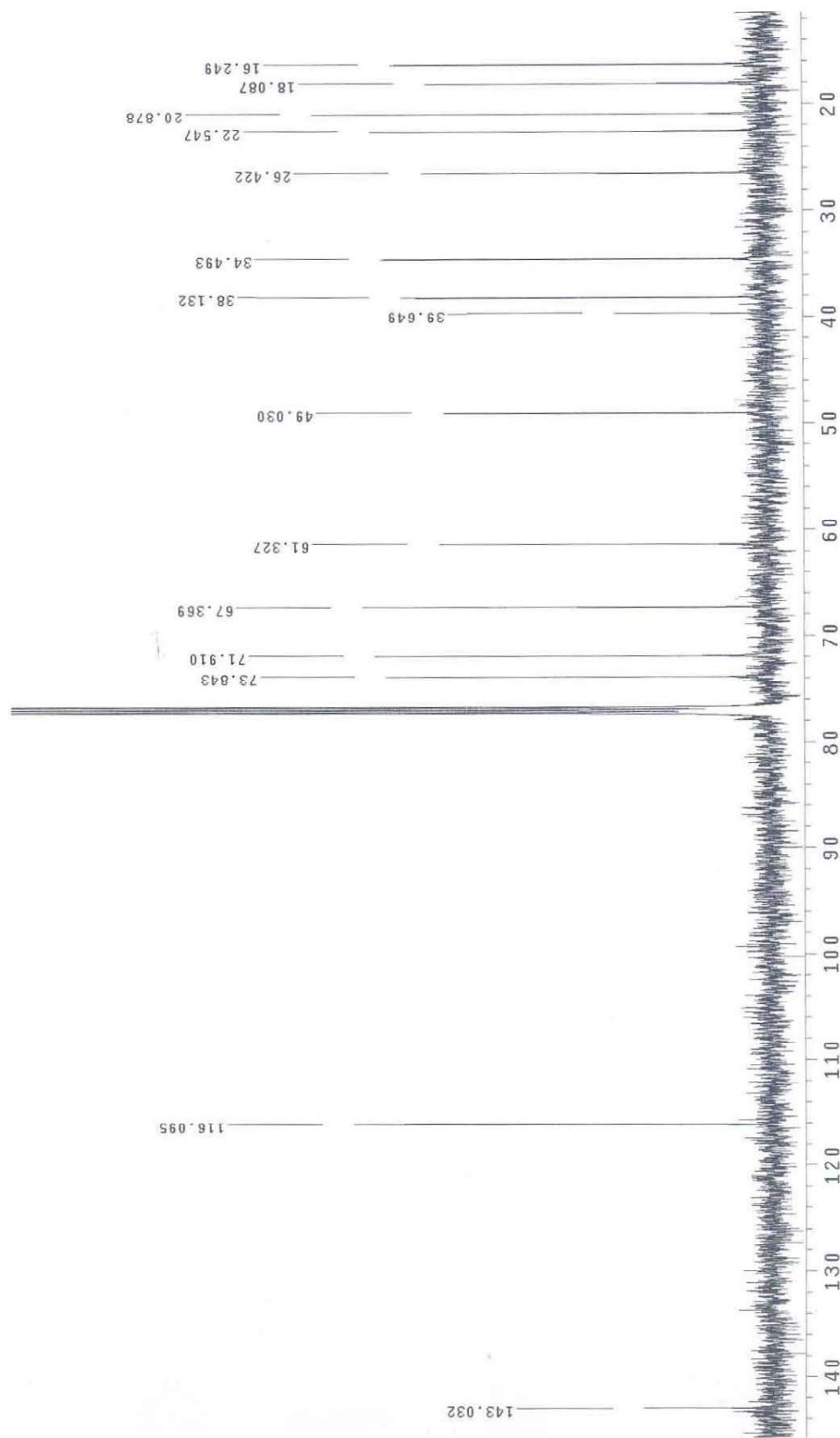


Espectro 62. EM-IE (70 eV) del (1R,2R,5S,6S,7R,10S)*-ax-4(15)-eno-1β,2β-7β-triol (139).

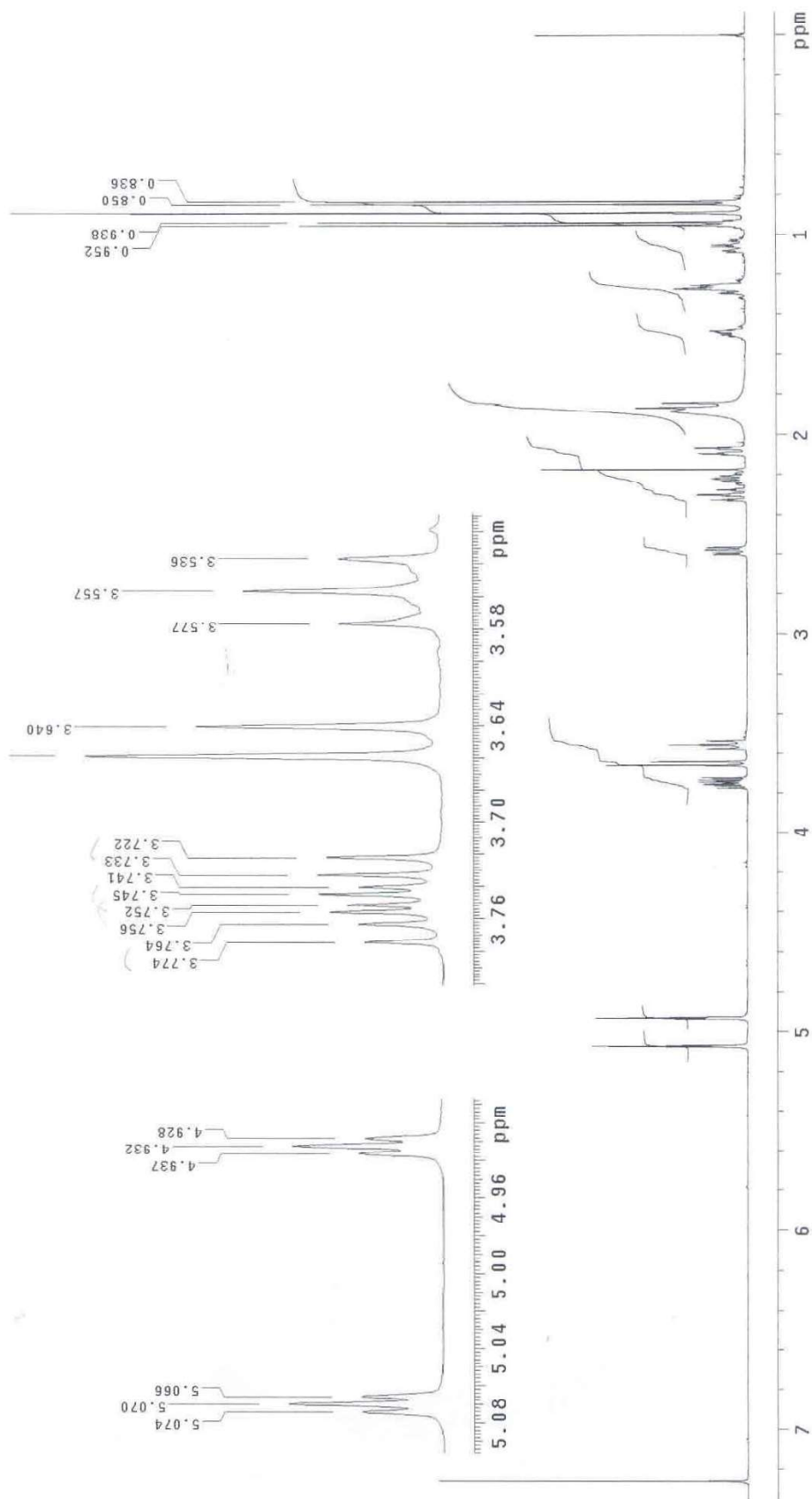


C:\Infrarrojo\AIR-2005\8017.0 Dr. G. Delgado 97-101IV/HPLC/2 Pellicula EGR 03/08/2005

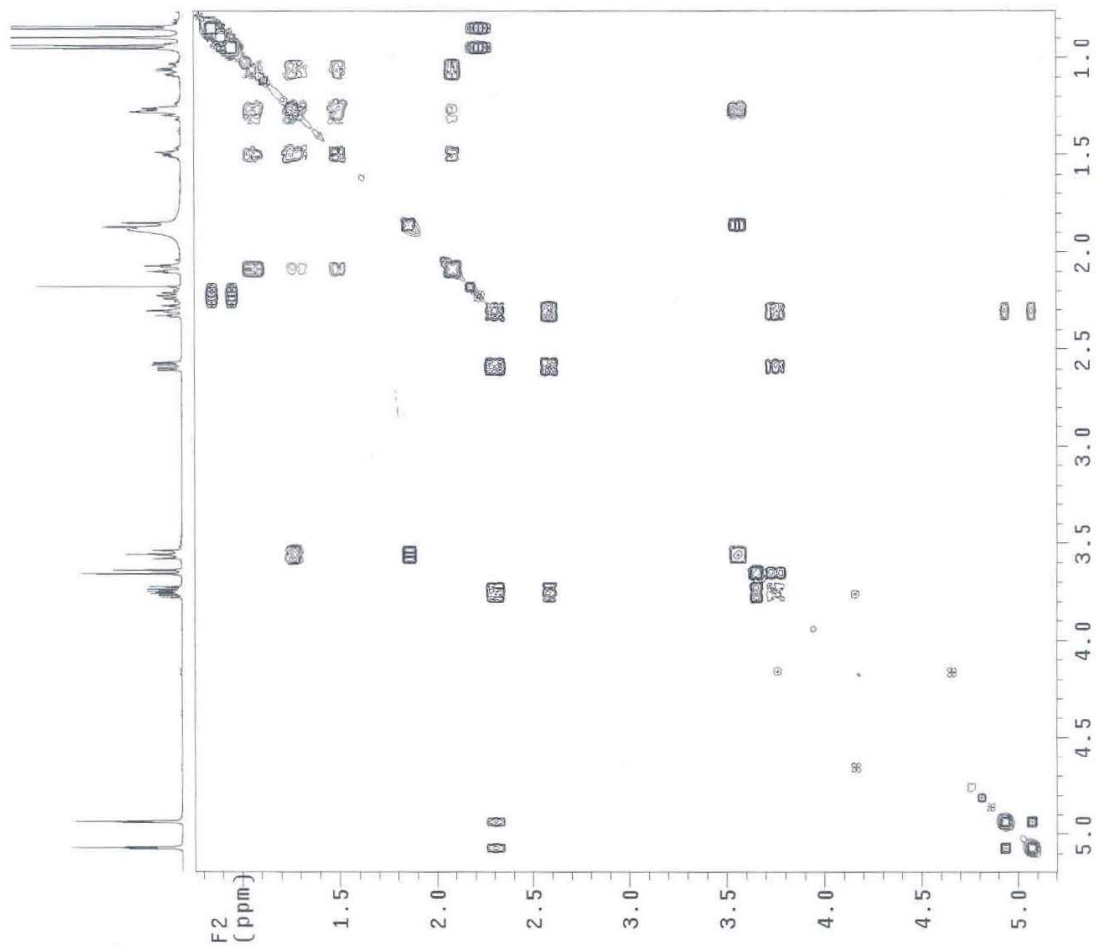
Espectro 63. IR (CHCl₃) del (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*R*,10*S*)*-ax-4(15)-eno-1β,2β,7β-triol (139).



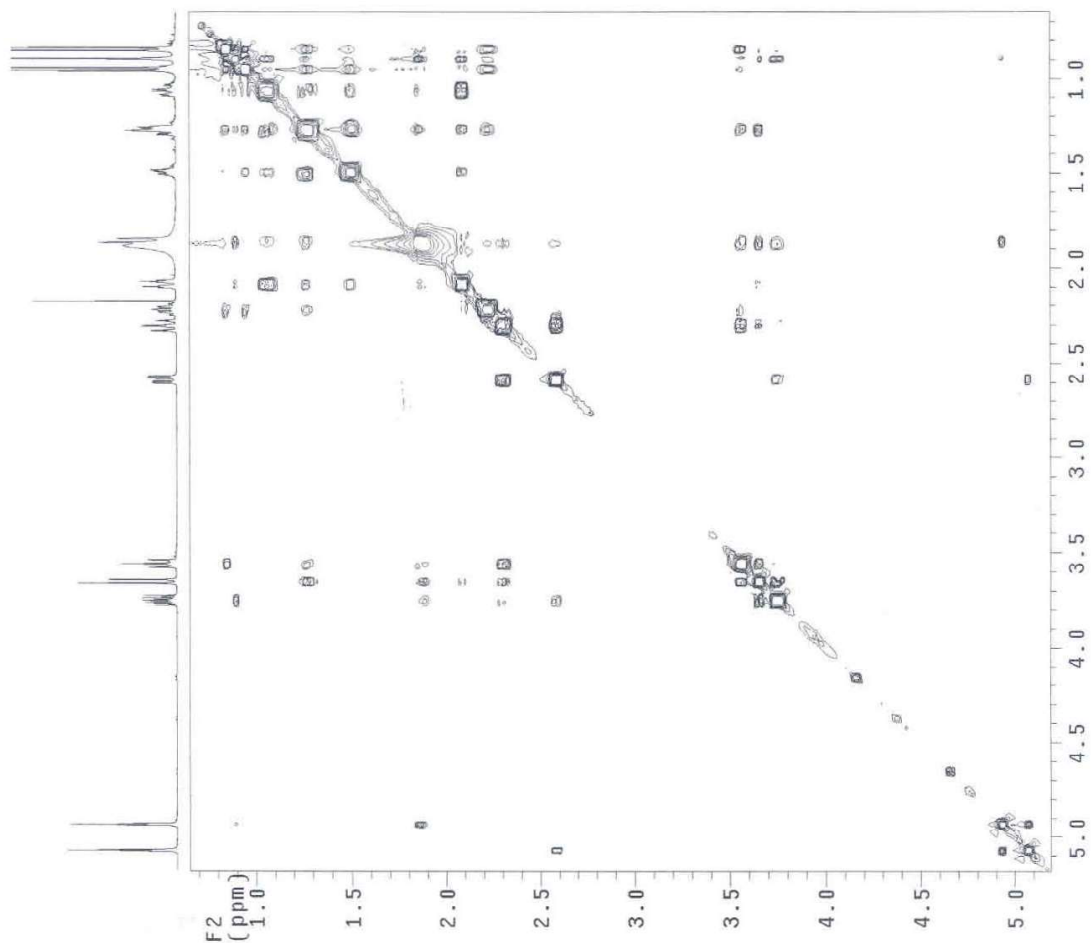
Espectro 64. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*R*,10*S*)*-ax-4(15)-eno-1 β ,2 β -7 β -trioI (139).



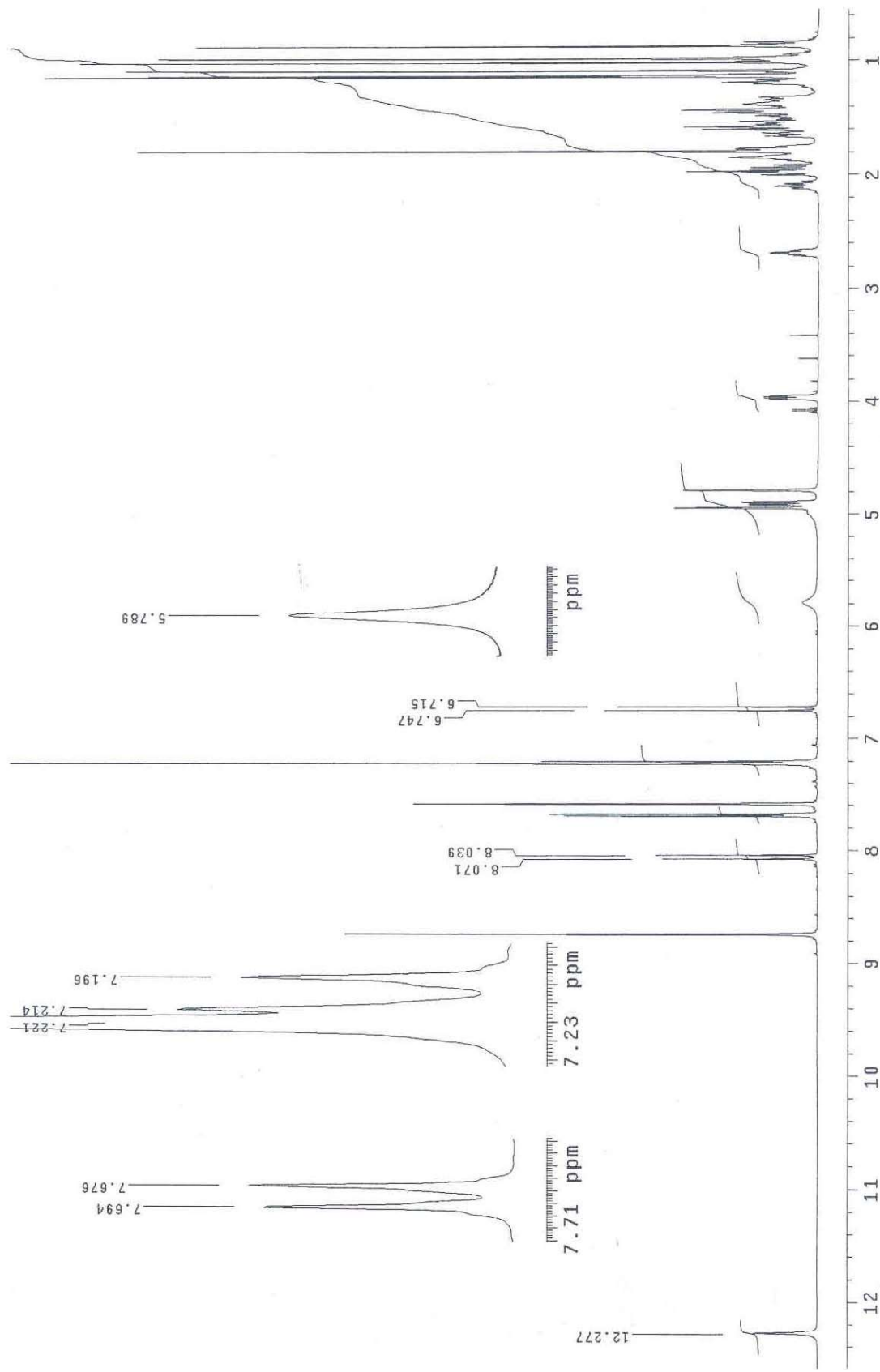
Espectro 65. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) del (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*R*,10*S*)*-ax-4(15)-eno-1 β ,2 β -7 β -triole (139).



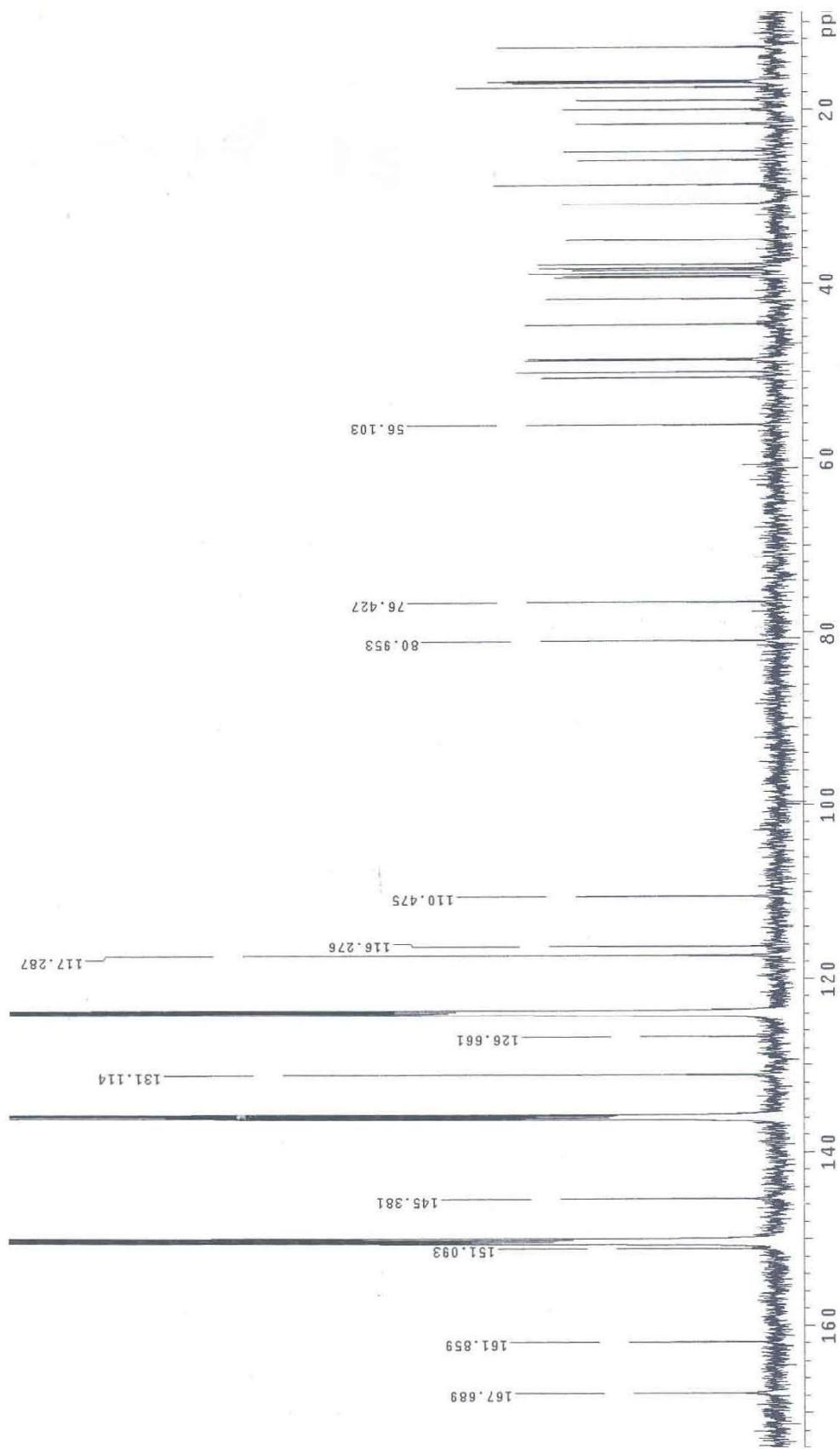
Espectro 66. Experimento COSY (CDCl₃) del (1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*R*,10*S*)*-ax-4(15)-eno-1β,2β-7β-triol (139).



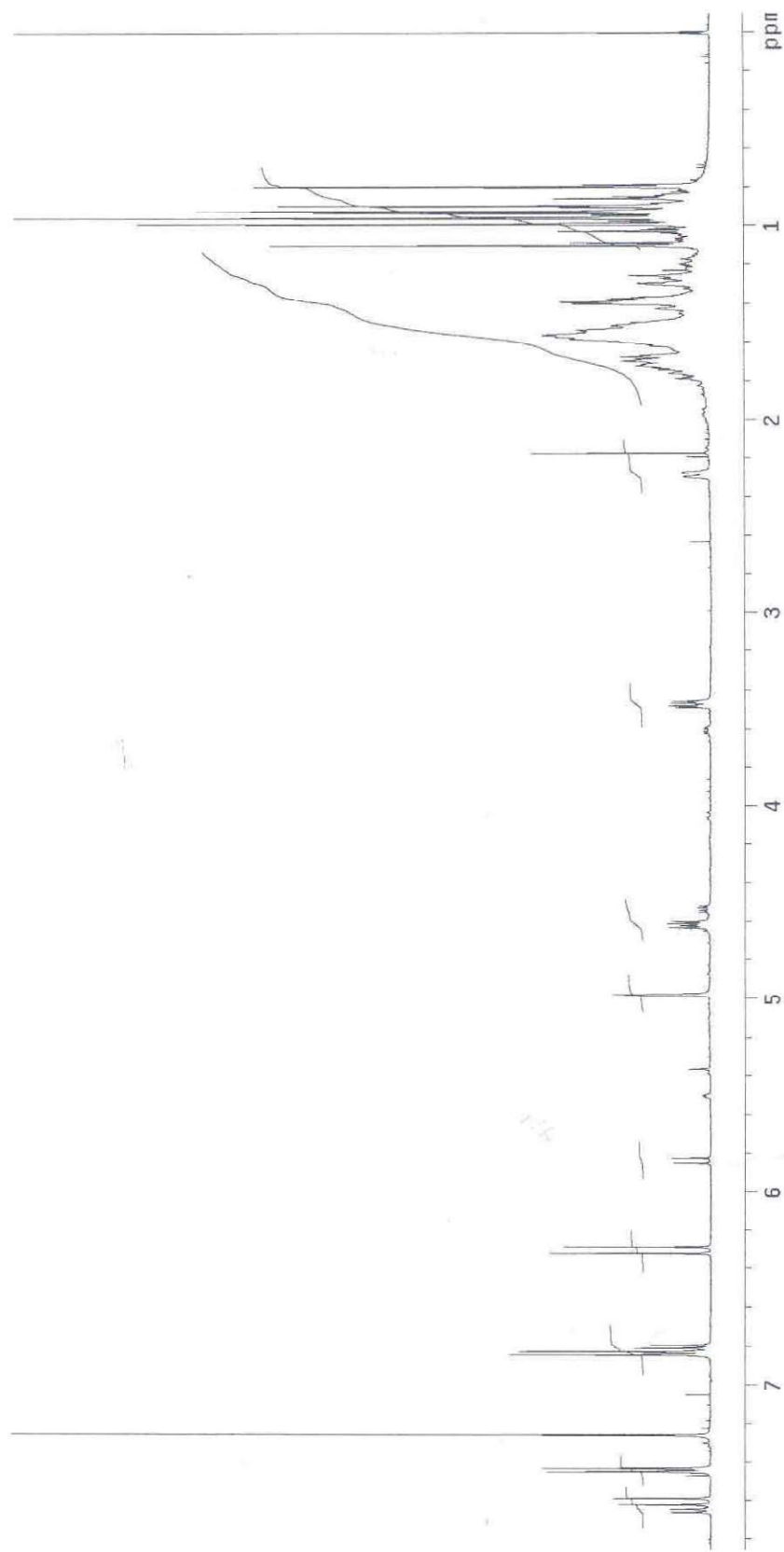
Espectro 68. Experimento NOESY (CDCl₃) del (1R,2R,5S,6S,7R,10S)*-ax-4(15)-eno-1β,2β-7β-triol (139).



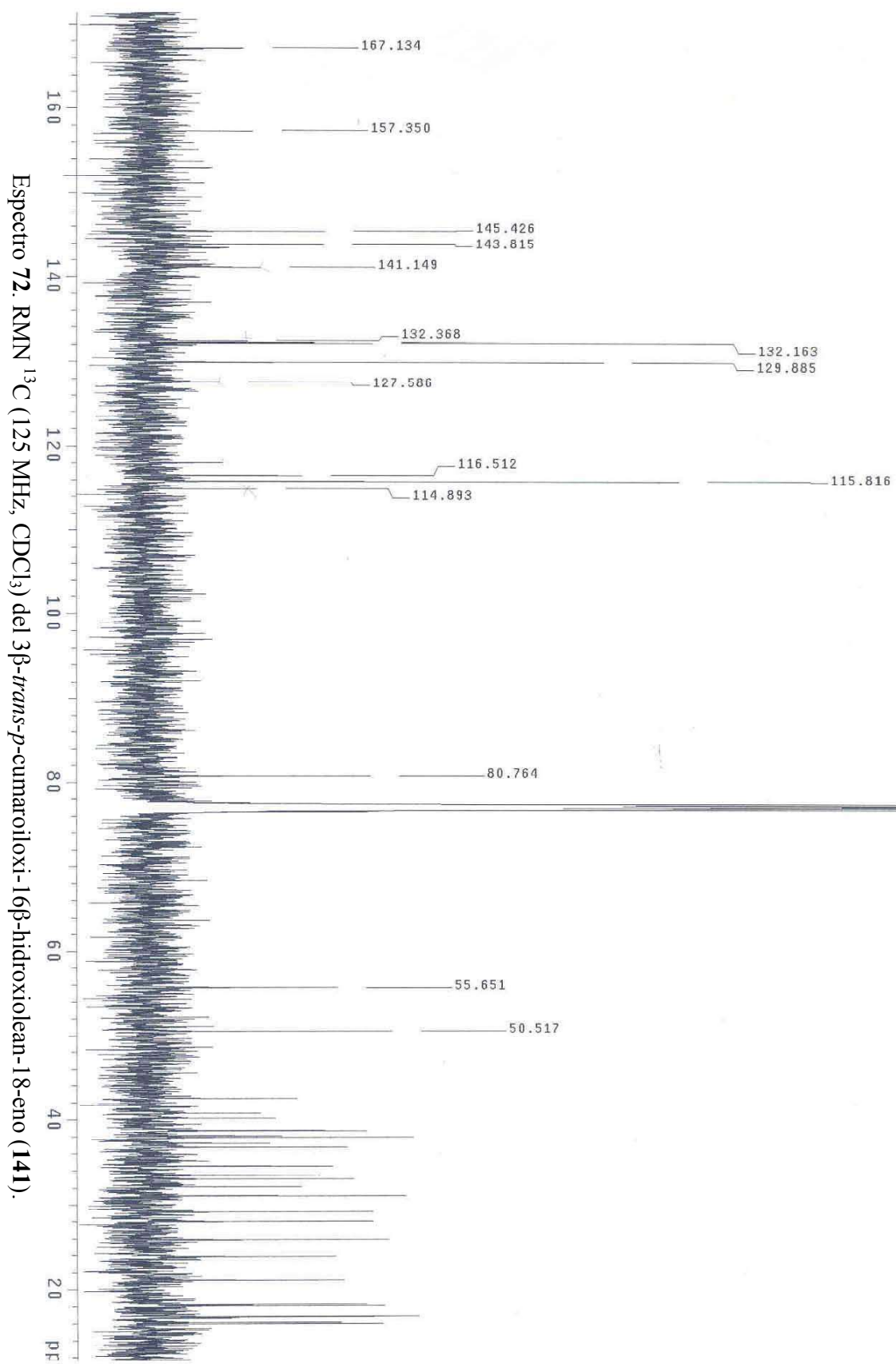
Espectro 69. RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) del 3β-*trans*-p-cumaroiloxi-16β-hidroxi-20(29)-lupeno (140).

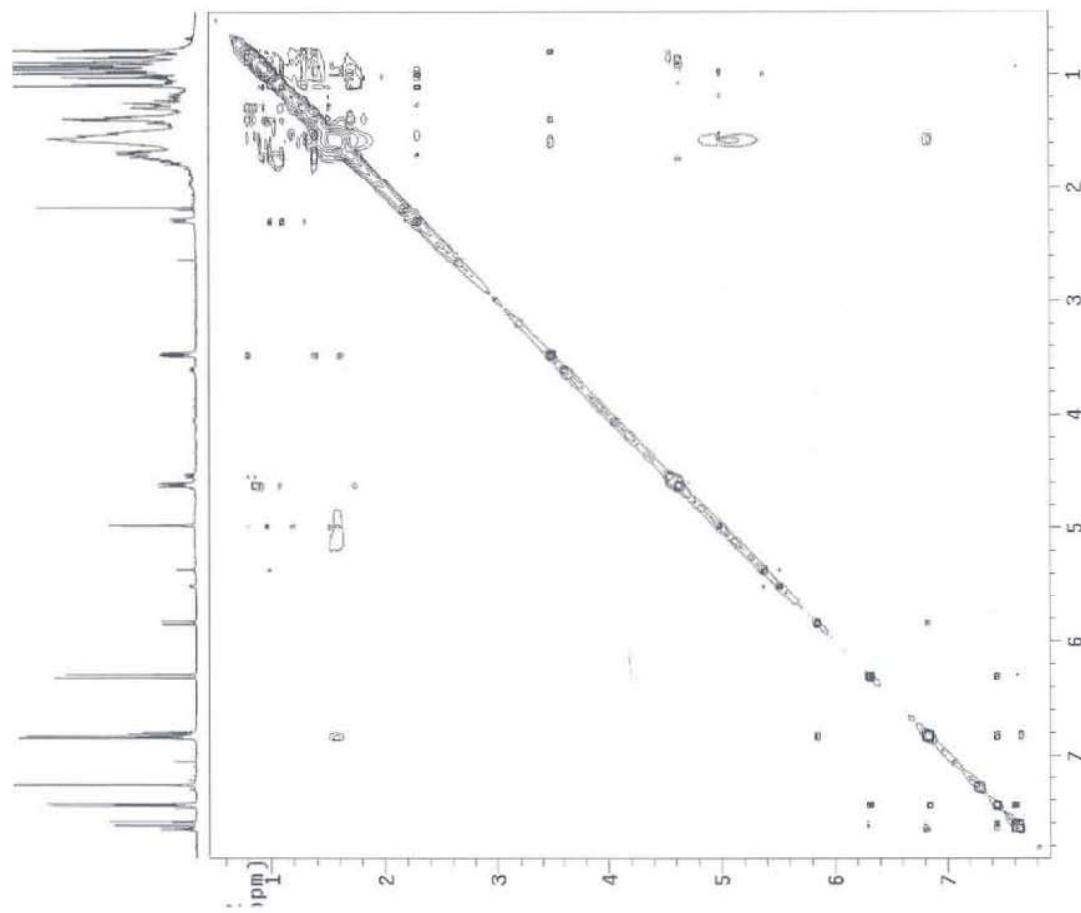


Espectro 70. RMN ¹³C (125 MHz, C₅D₅N) del 3β-*trans*-p-cumaroiloxi-16β-hidroxi-20(29)-lupeno (140).

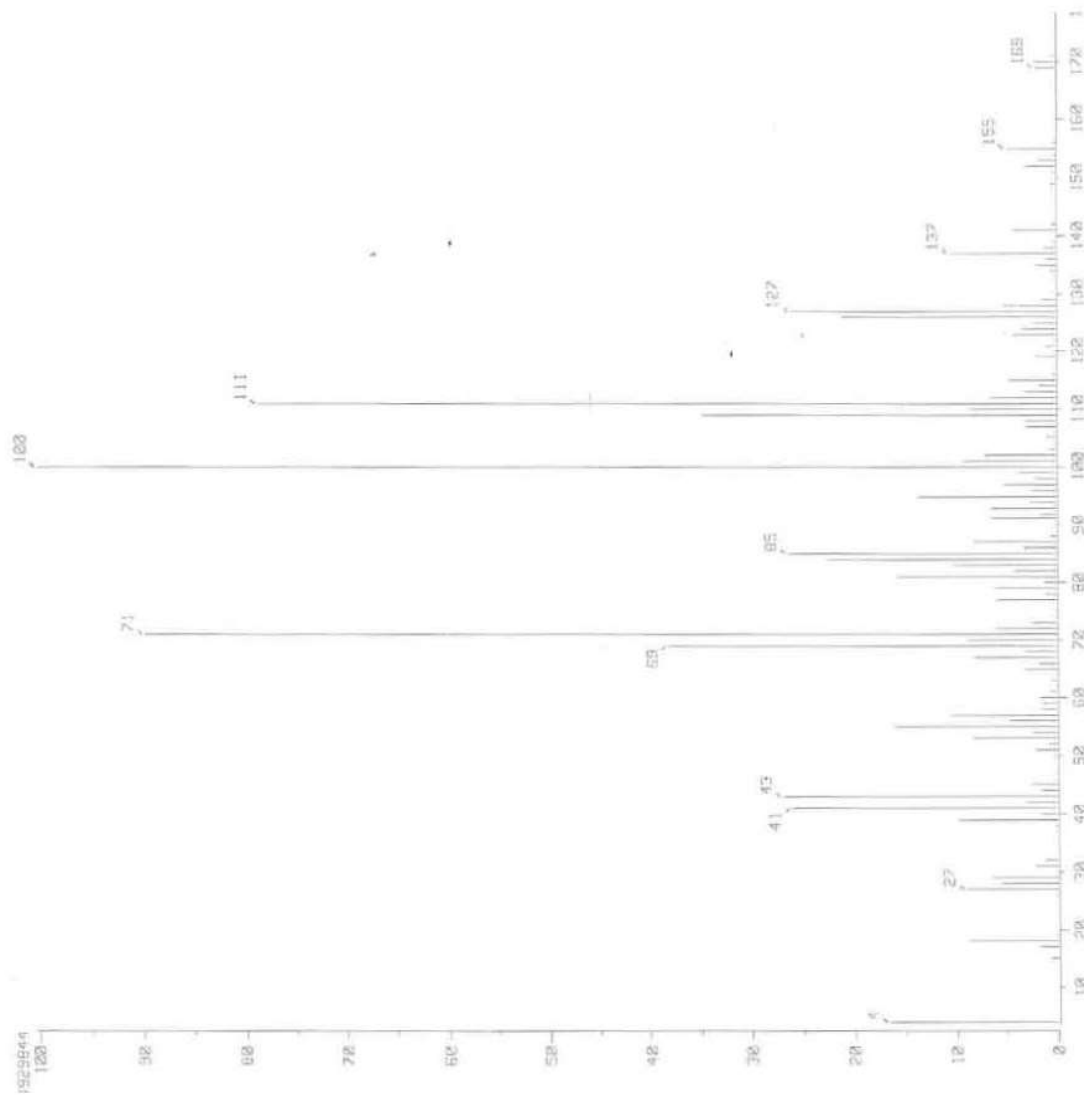


Espectro 71. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) del 3β -*trans*-*p*-cumaroiloxi-16 β -hidroxiolean-18-eno (**141**).

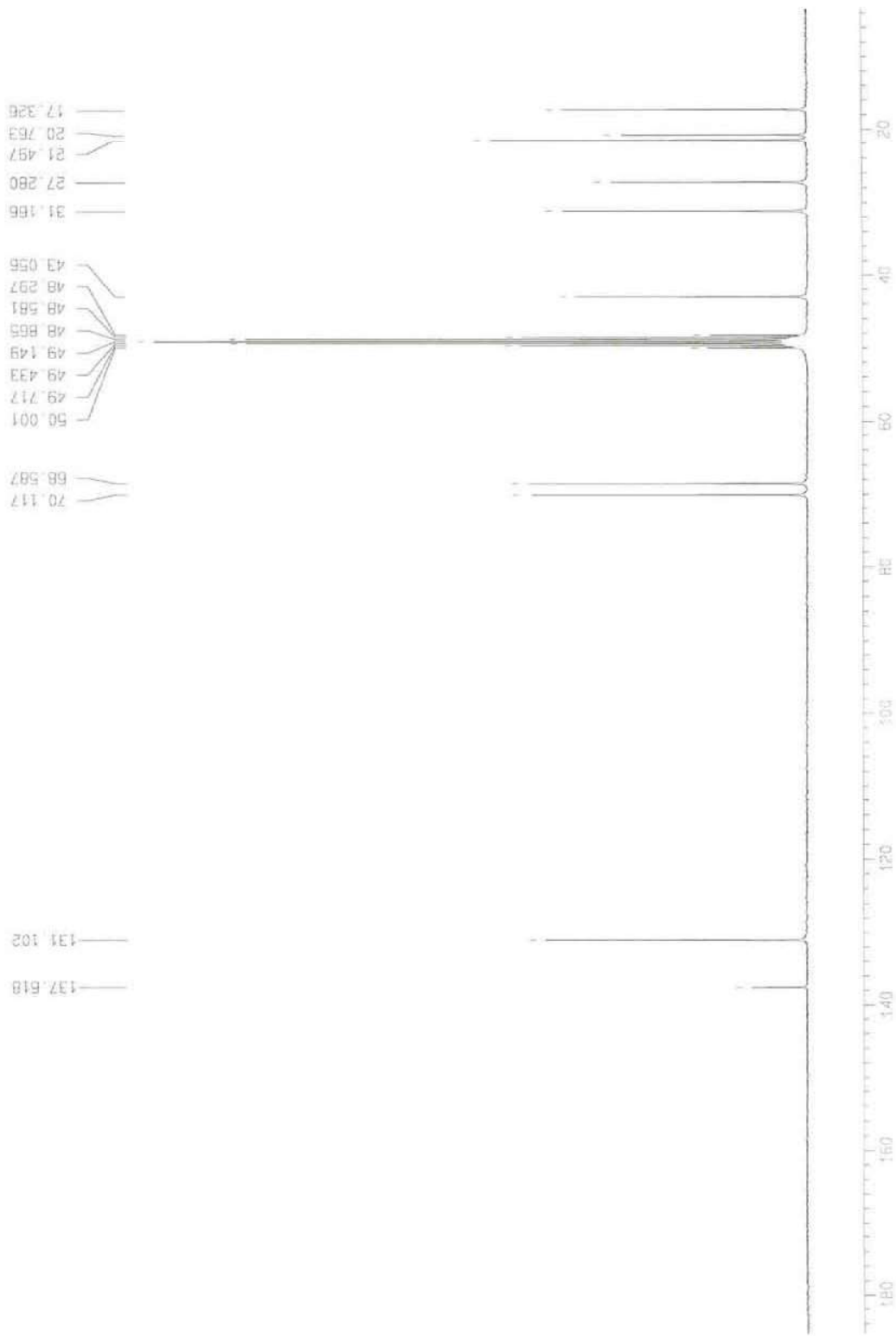




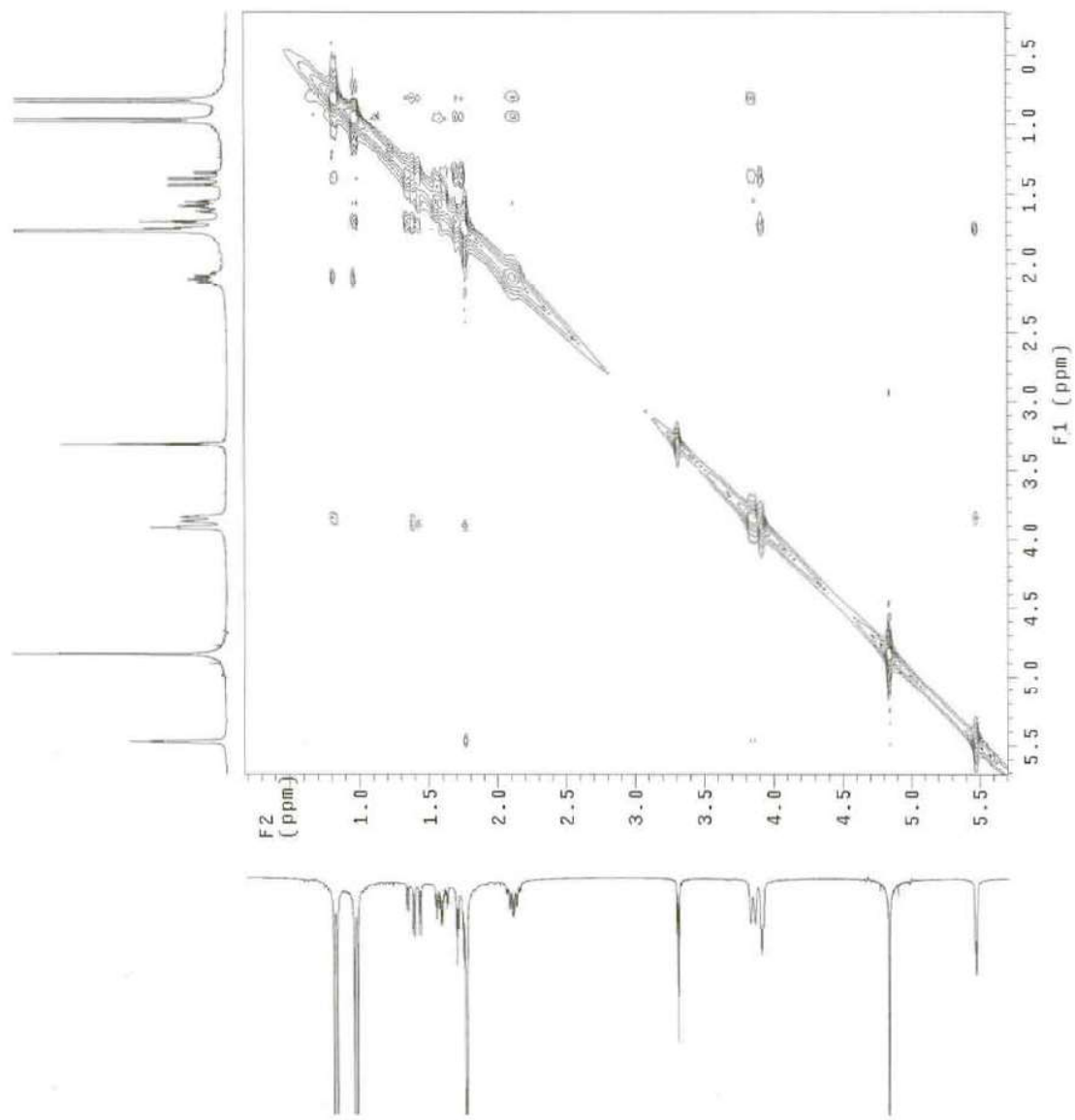
Espectro 73. Experimento NOESY (CDCl_3) del 3 β -*trans*-*p*-cumaroiloxi-16 β -hidroxiolean-18-eno (141).



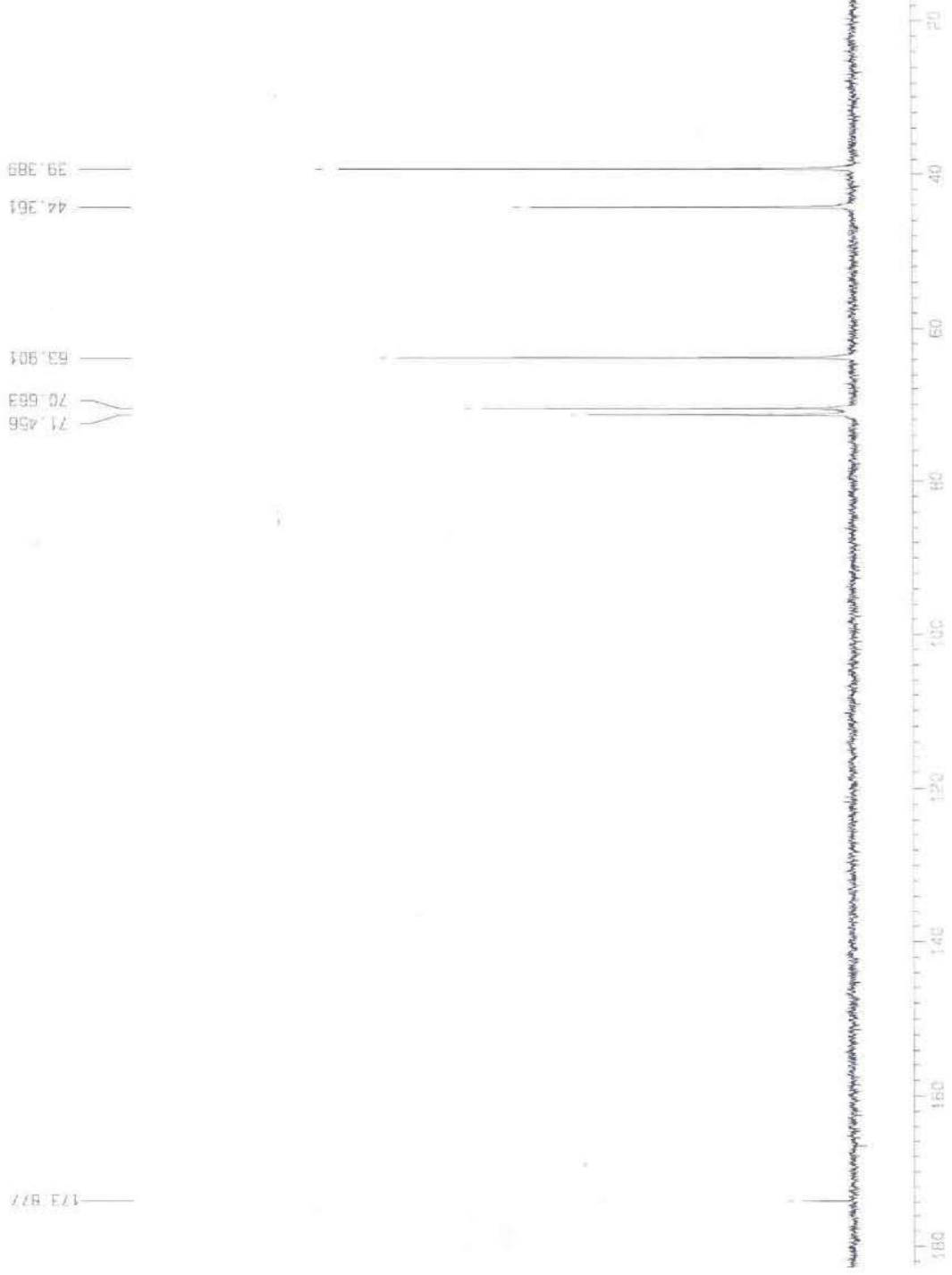
Espectro 74. EM-IE (70 eV) del (3R,4R,6S)-p-ment-1-eno-3,6-diol (144).



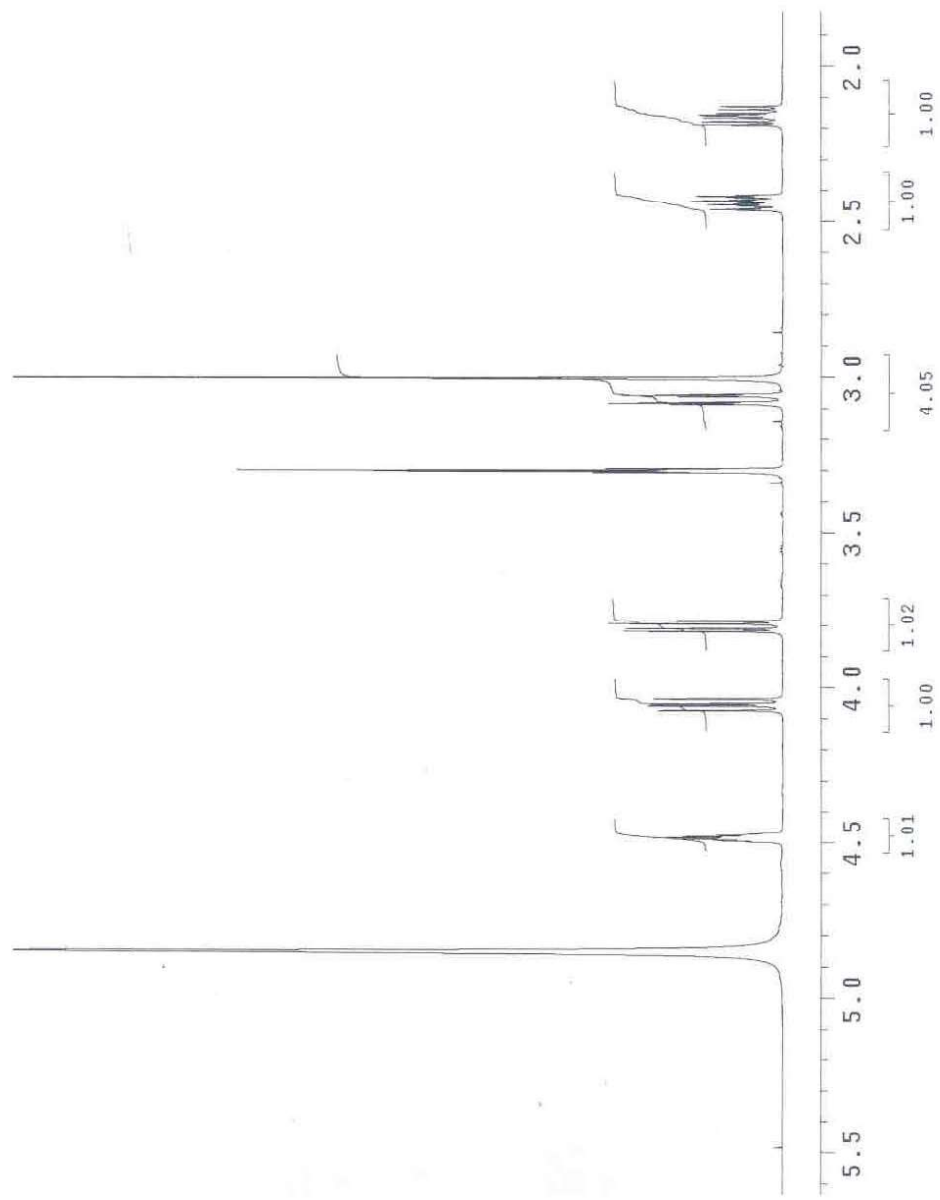
Espectro 75. RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) del (3*R*,4*R*,6*S*)-*p*-ment-1-eno-3,6-diol (144).



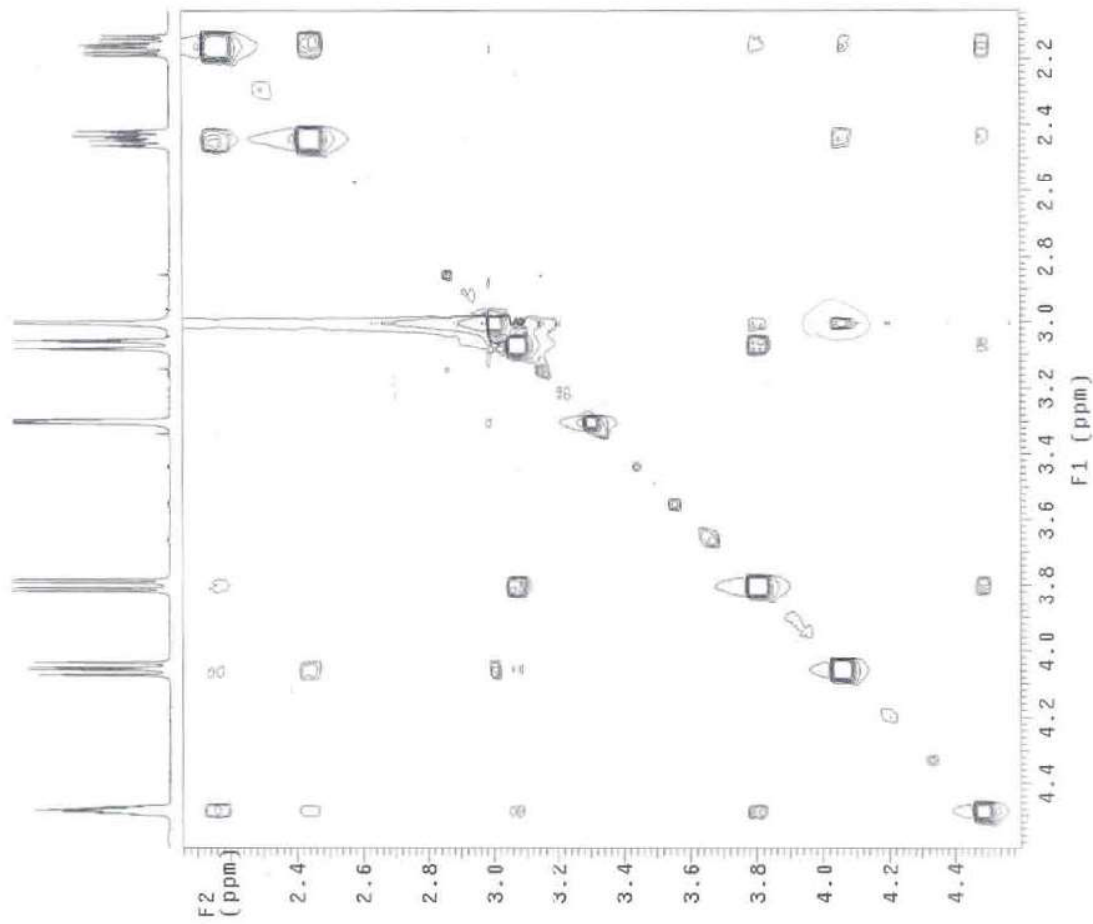
Espectro 77. Experimento NOESY (CD_3OD) del (3*R*,4*R*,6*S*)-*p*-ment-1-eno-3,6-diol (144).



Espectro 78. RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) de la (2*R*,4*S*)-2-hidroxi-4-metoximetilbutanolida (145).



Espectro 79. RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de la (2*R*,4*S*)-2-hidroxi-4-metoximetililbutanolida (145).



Espectro **80**. Experimento NOESY (500 MHz, CD₃OD) de la (2*R*,4*S*)-2-hidroxi-4-metoximetilbutanólida (**145**).

Table 1. Crystal data and structure refinement for **118**.

Identification code	03DLG237 (Solved by: R. A. Toscano)	
Project Title	118	
Empirical formula	C ₂₂ H ₃₆ O ₄	
Formula weight	364.51	
Temperature	294(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Unit cell dimensions	<i>a</i> = 6.0067(4) Å	σ = 90°
	<i>b</i> = 18.178(1) Å	σ = 90°
	<i>c</i> = 19.173(1) Å	σ = 90°
Volume	2093.5(2) Å ³	
<i>Z</i>	4	
Density (calculated)	1.156 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.077 mm ⁻¹	
<i>F</i> (000)	800	
Crystal size / colour / shape	0.488 x 0.144 x 0.114 mm / colorless / prism	
Theta range for data collection	2.12 to 27.50°	
Index ranges	-7 ≤ <i>h</i> ≤ 7, -23 ≤ <i>k</i> ≤ 23, -24 ≤ <i>l</i> ≤ 24	
Reflections collected	21049	
Independent reflections	4806 [<i>R</i> (int) = 0.0766]	
Completeness to theta = 27.50°	100.0 %	
Measurement device	Bruker Smart Apex CCD diffractometer	
Absorption correction	Analytical: face-indexed	
Max. and min. transmission	0.9943 and 0.9742	
Refinement method	Full-matrix least-squares on <i>F</i> ²	
Data / restraints / parameters	4806 / 0 / 247	
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.000	
Final <i>R</i> indices [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	<i>R</i> 1 = 0.0603, <i>wR</i> 2 = 0.0644	
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> 1 = 0.1188, <i>wR</i> 2 = 0.0733	
Absolute structure parameter	0.7(13)	
Largest diff. peak and hole	0.137 and -0.168 e.Å ⁻³	

Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for **118**. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
O(1)	7765(3)	6937(1)	8540(1)	58(1)
O(2)	7257(4)	7246(1)	9918(1)	75(1)
O(3)	8749(4)	6064(1)	10866(1)	73(1)
O(4)	4338(4)	7447(1)	8544(1)	93(1)
C(1)	8255(4)	4263(1)	9045(1)	49(1)
C(2)	7876(5)	4059(1)	8285(1)	60(1)
C(3)	8708(4)	4666(1)	7811(1)	60(1)
C(4)	7717(4)	5430(1)	7949(1)	46(1)
C(5)	7974(4)	5608(1)	8738(1)	37(1)
C(6)	7068(4)	6348(1)	8996(1)	44(1)
C(7)	7999(5)	6528(1)	9712(1)	53(1)
C(8)	7357(5)	5956(1)	10261(1)	48(1)
C(9)	8031(4)	5194(1)	9996(1)	39(1)
C(10)	7152(4)	4994(1)	9256(1)	35(1)
C(11)	7609(4)	4594(1)	10560(1)	46(1)
C(12)	9624(4)	4163(1)	10761(1)	44(1)
C(13)	9840(4)	3441(1)	10859(1)	42(1)
C(14)	8072(5)	2932(1)	10715(1)	54(1)
C(15)	8099(5)	2212(1)	10817(1)	83(1)
C(16)	11970(4)	3127(1)	11142(1)	70(1)
C(17)	4934(5)	6047(1)	10486(1)	70(1)
C(18)	5320(4)	5475(1)	7686(1)	66(1)
C(19)	9106(4)	5962(1)	7493(1)	63(1)
C(20)	4609(4)	4880(1)	9253(1)	50(1)
C(21)	6254(7)	7452(2)	8372(2)	68(1)
C(22)	7311(6)	8023(1)	7918(1)	102(1)

Table 1. Crystal data and structure refinement for **140**.

Identification code	032DLG04	
Project Title	140	
Empirical formula	C ₃₉ H ₅₆ O ₄	
Formula weight	588.84	
Temperature	291(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2 ₁	
Unit cell dimensions	a = 10.4619(8) Å	σ = 90°.
	b = 12.5842(9) Å	σ = 95.183(2)°.
	c = 13.0219(9) Å	σ = 90°.
Volume	1707.4(2) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.145 g/cm ³	
Absorption coefficient	0.072 mm ⁻¹	
F(000)	644	
Crystal size / shape / color	0.30 x 0.18 x 0.18 mm / Prism/ Colorless	
Theta range for data collection	1.95 to 25.00°.	
Diffractionmeter used /Scan Mode scans	Bruker Smart Apex AXS CCD area detector/ omega	
Index ranges	-12 ≤ h ≤ 12, -14 ≤ k ≤ 14, -15 ≤ l ≤ 15	
Reflections collected	14097	
Independent reflections	5987 [R(int) = 0.0414]	
Completeness to theta = 25.00°	100.0 %	
Absorption correction	None	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	5987 / 1 / 401	
Goodness-of-fit on F ²	0.834	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0476, wR2 = 0.0690	
R indices (all data)	R1 = 0.0925, wR2 = 0.0774	
Largest diff. peak and hole	0.178 and -0.112 e.Å ⁻³	
Solved by	Simon Hernández Ortega	

Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for **140**.
 $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
O(1)	6050(2)	-1698(2)	2068(2)	70(1)
O(2)	1786(2)	6599(2)	1276(2)	76(1)
O(3)	4243(3)	-2653(2)	1820(3)	118(1)
O(4)	9685(2)	-6616(2)	-1071(2)	94(1)
C(1)	4140(3)	245(2)	3558(2)	63(1)
C(2)	5006(3)	-707(2)	3383(2)	65(1)
C(3)	5271(3)	-758(2)	2265(2)	55(1)
C(4)	5950(3)	223(2)	1892(2)	52(1)
C(5)	5067(3)	1173(2)	2108(2)	47(1)
C(6)	5485(3)	2228(2)	1665(2)	64(1)
C(7)	4365(3)	3017(2)	1607(2)	56(1)
C(8)	3837(3)	3238(2)	2650(2)	47(1)
C(9)	3602(3)	2159(2)	3192(2)	47(1)
C(10)	4698(3)	1313(2)	3227(2)	48(1)
C(11)	3045(3)	2358(2)	4229(2)	59(1)
C(12)	1865(3)	3079(2)	4148(2)	63(1)
C(13)	2068(3)	4114(2)	3564(2)	48(1)
C(14)	2518(3)	3864(2)	2488(2)	46(1)
C(15)	2684(3)	4907(2)	1888(2)	58(1)
C(16)	1539(3)	5663(2)	1875(2)	60(1)
C(17)	1210(3)	5917(2)	2950(2)	53(1)
C(18)	919(3)	4868(2)	3477(2)	50(1)
C(19)	299(3)	5231(2)	4453(2)	58(1)
C(20)	-588(3)	4483(3)	4933(3)	69(1)
C(21)	-407(3)	6275(2)	4103(3)	76(1)
C(22)	-44(3)	6515(3)	3013(2)	68(1)
C(23)	6005(3)	88(3)	726(2)	79(1)
C(24)	7331(3)	298(3)	2386(2)	83(1)
C(25)	5820(3)	1589(3)	4013(2)	74(1)
C(26)	4856(3)	3911(2)	3297(2)	64(1)
C(27)	1487(3)	3222(2)	1827(2)	62(1)

C(28)	2299(3)	6561(2)	3539(2)	66(1)
C(29)	-1529(4)	3913(3)	4285(3)	111(1)
C(30)	-555(3)	4426(3)	5979(3)	100(1)
C(1')	5364(4)	-2577(3)	1793(3)	78(1)
C(2')	6115(4)	-3482(3)	1410(3)	98(1)
C(3')	7182(4)	-3413(3)	1048(3)	82(1)
C(4')	7836(3)	-4318(3)	529(3)	64(1)
C(5')	7480(3)	-5375(3)	602(3)	80(1)
C(6')	8085(3)	-6161(3)	68(3)	76(1)
C(7')	9044(3)	-5892(2)	-541(3)	65(1)
C(8')	9425(3)	-4855(3)	-584(2)	67(1)
C(9')	8819(3)	-4086(2)	-52(2)	67(1)

Coordenadas cartesianas de la geometría optimizada de 7-*p*-bromobenzoílaustroinulina (**118b**) en el nivel de teoría DFT/B3LYP/H-W.

Coordenadas Cartesianas:

C	-2.560862	-0.697352	-0.132229
C	-1.047449	-1.105893	-0.043623
C	-0.199008	0.043541	-0.652224
C	-0.562626	1.478457	-0.223008
C	-2.066786	1.774379	-0.441474
C	-2.909232	0.738100	0.428525
C	-4.425606	0.996218	0.174327
C	-4.843904	2.455131	0.428846
C	-4.033722	3.407869	-0.462418
C	-2.481046	3.298048	-0.327221
C	-2.663113	0.834775	1.965474
C	-1.911343	4.125034	-1.518616
C	-1.995650	3.969369	0.985154
C	-0.533765	-1.524985	1.352393
C	-3.461626	-1.866397	0.389770
O	-0.986988	-2.275495	-0.935526
O	1.269564	-0.025395	-0.278115
O	0.273032	2.393185	-1.006083
H	-0.054876	-2.432036	-1.225405
C	2.104960	-0.984330	-0.791005
H	1.209899	2.124279	-0.889364
C	-4.622468	-2.197472	-0.527351

C	-5.928113	-2.430619	-0.210785
C	-6.436432	-2.329922	1.170443
C	-7.712790	-2.564361	1.566776
O	1.695945	-1.956140	-1.466442
C	3.534170	-0.758958	-0.451487
C	4.494902	-1.645855	-0.986582
C	3.947540	0.302150	0.384382
C	5.308536	0.479589	0.680966
C	5.857397	-1.474274	-0.698596
C	6.249690	-0.410331	0.133502
Br	8.153390	-0.163060	0.542753
C	-6.918669	-2.812407	-1.299795
H	-2.740916	-0.638338	-1.216863
H	-0.243529	-0.029932	-1.747283
H	-0.298616	1.598225	0.836658
H	-2.288490	1.508707	-1.490115
H	-5.023174	0.323945	0.801288
H	-4.666491	0.739803	-0.868777
H	-5.915358	2.566975	0.208754
H	-4.723576	2.721301	1.488240
H	-4.322131	4.451596	-0.267956
H	-4.300398	3.203458	-1.512261
H	-3.266870	1.626419	2.416657
H	-1.622960	1.037440	2.234557
H	-2.949544	-0.101650	2.458299
H	-2.126750	3.634791	-2.478048
H	-0.831381	4.252132	-1.448043
H	-2.391429	5.114659	-1.532755
H	-2.259957	5.035625	0.970544
H	-0.904275	3.906333	1.075307
H	-2.441012	3.531962	1.884076
H	-0.364265	-0.673760	2.017625
H	0.413479	-2.066539	1.251515
H	-1.245040	-2.205579	1.827802
H	-2.835043	-2.767220	0.424815
H	-3.799361	-1.673088	1.413339
H	-4.328482	-2.306984	-1.573550
H	-5.715196	-2.048810	1.937137
H	-8.005037	-2.468285	2.609758
H	-8.494956	-2.858461	0.871056
H	4.163133	-2.459837	-1.624006
H	3.208658	0.974164	0.807228
H	5.628356	1.292383	1.324934
H	6.595942	-2.153348	-1.111955
H	-7.364479	-3.798334	-1.105530
H	-7.745431	-2.090160	-1.360287
H	-6.429421	-2.851004	-2.279282

Uncommon Sesquiterpenoids and New Triterpenoids from *Jatropha neopauciflora* (Euphorbiaceae)

by Abraham García¹⁾ and Guillermo Delgado*

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, Coyoacán 04510, México, D. F.

(phone: +52-55-5622-4446; fax: +52-55-5616-2217; e-mail: delgado@servidor.unam.mx)

Dedicated to Professor *Albert Eschenmoser* on the occasion of his 80th birthday

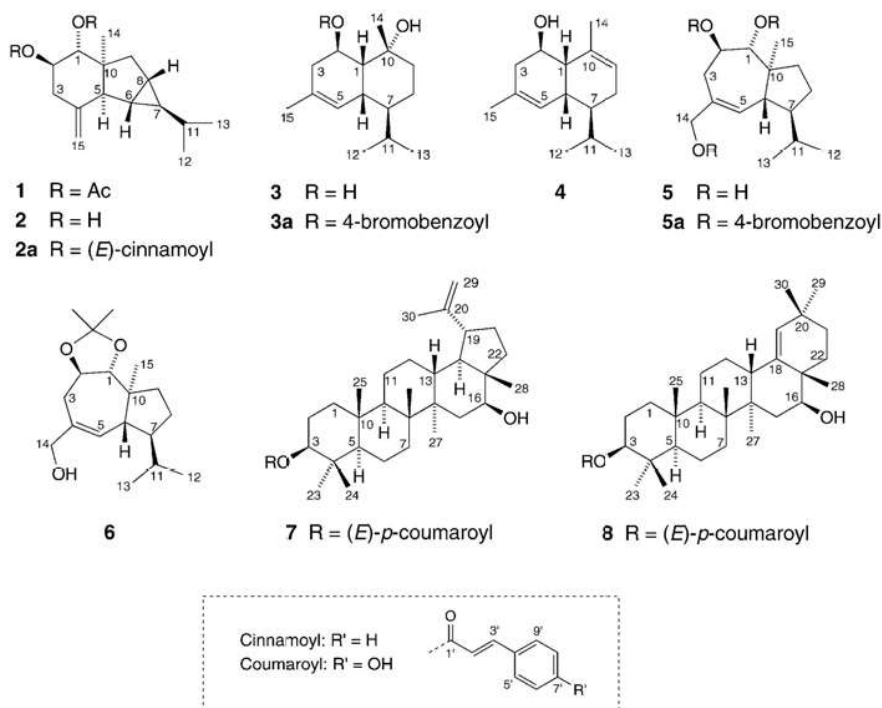
Eight new terpenoids (**1–8**) were isolated from the bark of *Jatropha neopauciflora*, together with eight known compounds. The new isolates include the sesquiterpenoids (1*R*,2*R*)-diacetoxycycloax-4(15)-ene (**1**); (1*R*,2*R*)-dihydroxycycloax-4(15)-ene (**2**), (2*R*)- δ -cadin-4-ene-2,10-diol (**3**), (2*R*)- δ -cadin-4,9-dien-2-ol (**4**), (1*R*,2*R*)-dihydroxyisodauc-4-en-14-ol (**5**) and its acetone **6** (artifact), as well as the two triterpenoids (3 β ,16 β)-16-hydroxylup-20(29)-en-3-yl (*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate (**7**) and (3 β ,16 β)-16-hydroxyolean-18-en-3-yl (*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate (**8**). The structures of these compounds were established by extensive 1D- and 2D-NMR spectroscopic methods, and their *absolute* configurations were determined by circular-dichroism (CD) experiments, and by X-ray crystallographic analysis (compound **7**; Fig. 3). A plausible biosynthesis of the sesquiterpenoids **1–5** is proposed (*Scheme*), starting from (–)-germacrene D as the common biogenetic precursor.

Introduction. – The chemical constituents of *Jatropha* include diterpenoids with jatropane, lathyrane, and ramnopholane skeletons, as well as lignans, cyclic peptides, and triterpenoids [1]. Some jatropane-type diterpenes have shown relevant cytotoxic and antitumoral properties against leukemia and nasopharyngeal cells [2], and other constituents have shown antimicrobial and insecticidal activities [3].

In the course of our systematic research of plants belonging to the Euphorbiaceae family, *J. neopauciflora*, an endemic plant of Mexico, was investigated. Recently, it was reported that some extracts from this plant display antibacterial activities [4]. In search of its chemical constituents, we herein report the isolation of eight new terpenoids from the dried bark of *J. neopauciflora*, the cycloax-4(15)-enes **1** and **2**, the cadinenes **3** and **4**, the isodaucenes **5** and **6**, and the pentacyclic triterpenoids **7** and **8**²⁾, together with eight known compounds. Compound **4** was found to be the dehydration product of **3**, and **6** represents an artifact derived from **5**. This paper deals with the isolation and extensive structure elucidation of these compounds, which represent the first evidence of the unusual sesquiterpenoid chemistry in the Euphorbiaceae family and the high biosynthetic specificity of this species in synthesizing *cis*-fused bicyclic sesquiterpenoids. Additionally, a biosynthetic pathway is hypothesized to rationalize the biogenetic ori-

¹⁾ Taken, in part, from the Ph.D. thesis of A. G.

²⁾ For systematic names, see *Exper. Part*.



gin of the sesquiterpenoids **1–5** according to our results and those previously reported [5].

Results and Discussion. – Compound **1** was obtained as an optically active, yellow oil, with $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +23.5$. The molecular formula was deduced as $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_4$ by HR-FAB-MS (m/z 321.2074 ($[M+H]^+$; calc. 321.2066)). The ^{13}C -NMR (DEPT) spectrum (Table I) showed 19 signals, including seven sp^3 CH, one sp^2 CH_2 , two sp^3 CH_2 , and five Me groups, together with three sp^2 and one sp^3 quaternary C-atom(s). The IR absorptions at 1746 and 1245 cm^{-1} indicated the presence of an AcO group, the absorptions at 1650 and 1040 cm^{-1} suggested an *exo*-methylidene group, and those at 3076, 3017, and 1650 cm^{-1} were attributed to a cyclopropyl unit. The ^1H -NMR spectrum of **1** (Table I) displayed signals for two CH (vicinal to an AcO group) at $\delta(\text{H})$ 5.38 (*d*, $J=10.5$ Hz) and 4.84 (*ddd*, $J=10.5, 10.5, 5.5$ Hz), which were attributed to $\text{H}_\beta\text{-C}(1)$ and $\text{H}_\alpha\text{-C}(2)$, respectively. In turn, $\text{H}_\beta\text{-C}(1)$ and $\text{H}_\alpha\text{-C}(2)$ showed long-range couplings to the C=O groups at $\delta(\text{C})$ 171.1 and 170.3, respectively. These correlated with Me groups at $\delta(\text{H})$ 2.06 and 2.01, establishing the presence of two AcO groups.

Further, $\text{H}_\alpha\text{-C}(2)$ of **1** was $^1\text{H},^1\text{H}$ -correlated with $\text{H}_\alpha\text{-C}(3)$ at $\delta(\text{H})$ 2.63 (*ddd*, $J=13.0, 5.5, 1.5$ Hz) and with $\text{H}_\beta\text{-C}(3)$ at $\delta(\text{H})$ 2.46 (*ddt*, $J=13.0, 11.0, 1.5$ Hz), which exhibited a cross-peak to the sp^2 -hybridized C(15) at $\delta(\text{C})$ 114.4. Thus, the $\text{CH}_2(15)$ H-atoms at $\delta(\text{H})$ 4.89 (*t*, $J=1.5$ Hz) and 4.86 (*t*, $J=1.5$ Hz) exhibited 3J corre-

Table 1. ^1H - and ^{13}C -NMR Data of **1** and **2**. At 500 (^1H) and 125 MHz (^{13}C); δ in ppm, J in Hz. Arbitrary atom numbering (see chemical formulae).

Position	1 (in CDCl_3)		2 (in C_6D_6)	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
$\text{H}_\beta\text{-C}(1)$	5.38 (<i>d</i> , $J=10.5$)	75.4	3.63 (<i>d</i> , $J=9.5$) ^a	77.7
$\text{H}_\alpha\text{-C}(2)$	4.84 (<i>ddd</i> , $J=11.0, 10.5, 5.5$)	72.0	3.47 (<i>ddd</i> , $J=11.0, 9.5, 4.5$) ^a	72.1
$\text{H}_\alpha\text{-C}(3)$	2.63 (<i>ddd</i> , $J=13.0, 5.5, 1.5$)	36.5	2.48 (<i>ddd</i> , $J=13.0, 5.0, 1.5$)	39.8
$\text{H}_\beta\text{-C}(3)$	2.46 (<i>ddt</i> , $J=13.0, 11.0, 1.5$)		2.36 (<i>ddt</i> , $J=13.0, 11.0, 1.5$)	
$\text{C}(4)$		141.4		144.8
$\text{H}_\alpha\text{-C}(5)$	1.95 (<i>d</i> , $J=3.5$)	60.5	1.90 (<i>d</i> , $J=3.0$)	61.2
$\text{H}_\beta\text{-C}(6)$	1.18 (<i>dt</i> , $J=7.5, 3.5$)	31.2	1.06 (<i>dt</i> , $J=7.0, 3.5$)	32.1
$\text{H}_\alpha\text{-C}(7)$	0.55 (<i>dt</i> , $J=7.5, 3.0$)	47.7	0.41 (<i>dt</i> , $J=9.0, 3.0$)	48.1
$\text{H}_\beta\text{-C}(8)$	1.31–1.35 (<i>m</i>)	24.5	1.08–1.13 (<i>m</i>)	25.1
$\text{H}_\beta\text{-C}(9)$	1.88 (<i>dd</i> , $J=13.5, 6.5$)	42.3	2.45 (<i>dd</i> , $J=13.5, 6.0$)	42.7
$\text{H}_\alpha\text{-C}(9)$	0.90–0.93 (<i>m</i>)		0.91–0.94 (<i>m</i>)	
$\text{C}(10)$		58.4		58.6
$\text{H}_\alpha\text{-C}(11)$	0.90–0.93 (<i>m</i>)	32.1	0.74 (<i>d</i> × <i>sept.</i> , $J=8.5, 6.5$)	32.5
Me(12)	0.91 (br. <i>s</i>) ^b	21.8 ^c	0.94 (<i>d</i> , $J=6.5$)	22.0
Me(13)	0.91 (br. <i>s</i>) ^b	21.6 ^c	0.93 (<i>d</i> , $J=6.5$)	21.9
Me(14)	0.86 (<i>s</i>)	17.9	0.91 (<i>s</i>)	17.8
$\text{H}_\alpha\text{-C}(15)$	4.89 (<i>t</i> , $J=1.5$)	114.3	4.78 (<i>d</i> , $J=1.5$)	112.6
$\text{H}_\beta\text{-C}(15)$	4.86 (<i>t</i> , $J=1.5$)		4.78 (<i>d</i> , $J=1.5$)	
1-AcO	2.06 (<i>s</i>)	171.1		
2-AcO	2.01 (<i>s</i>)	170.3		

^a) In the presence of D_2O , these signals collapsed to $\delta(\text{H})$ 2.72 (br. *s*, 2 H). ^b) Signals may be interchanged.

lations with C(3) at $\delta(\text{C})$ 36.5 and C(5) at $\delta(\text{C})$ 60.5. In the HSQC spectrum, $\text{H}_\alpha\text{-C}(5)$ appeared at $\delta(\text{H})$ 1.95 (*d*, $J=3.5$ Hz), and showed an $^1\text{H}, ^1\text{H}$ correlation with $\text{H}_\beta\text{-C}(6)$ at $\delta(\text{H})$ 1.18. Thus, inspection of the $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY spectrum revealed that $\text{H}_\beta\text{-C}(6)$ was part of a cyclopropyl system because of its correlations with $\text{H}_\alpha\text{-C}(7)$ at $\delta(\text{H})$ 0.55 and $\text{H}_\beta\text{-C}(8)$ at 1.33. The latter, in turn, correlated with $\text{H}_\beta\text{-C}(9)$ at $\delta(\text{H})$ 1.88 and with $\text{H}_\alpha\text{-C}(9)$ at 0.90. The uncoupled Me(14) group at $\delta(\text{H})$ 0.86 exhibited cross-peaks with C(9) ($\delta(\text{C})$ 42.3), C(1) (75.4), C(10) (58.4), and C(5) (60.5), establishing the perhydroindane skeleton of **1**.

The analysis of the COSY, HSQC, and HMBC spectra of **1** revealed an *i*-Pr group, based on cross-peaks between $\text{H}_\alpha\text{-C}(7)$ and C(12) ($\delta(\text{C})$ 21.8) and C(13) (21.6), and due to an $^1\text{H}, ^1\text{H}$ correlation with $\text{H}-\text{C}(11)$ ($\delta(\text{C})$ 0.90). This information indicated the presence of a cycloax-4(15)-ene-type sesquiterpenoid, as further corroborated by 1D difference homo-decoupling experiments: irradiation of $\text{H}_\alpha\text{-C}(5)$ resulted in $\text{H}_\beta\text{-C}(6)$ appearing as a *dd* ($J=7.5, 3.0$ Hz), irradiation of $\text{H}_\beta\text{-C}(6)$ induced $\text{H}_\alpha\text{-C}(7)$ to appear similarly as a *dd* ($J=7.0, 3.5$ Hz), and irradiation of $\text{H}_\beta\text{-C}(8)$ gave rise to a *d* and a *dd* for $\text{H}_\beta\text{-C}(9)$ ($J=12.5$ Hz) and $\text{H}_\alpha\text{-C}(7)$ ($J=7.5, 3.0$ Hz), respectively.

The magnitude of the vicinal coupling constants of the cyclopropyl H-atoms did not allow us to assign the configuration of the fused three-membered ring, so the relative configuration of **1** was established with the aid of NOESY and 1D-NOE difference

spectra. Relevant NOE interactions were observed between H_β -C(1) and H_β -C(3), H_β -C(6), H_β -C(8), and H_β -C(9); between H_α -C(5) and Me(14) as well as H_α -C(7); and between H_α -C(2) and H_α -C(3) as well as Me(14), which determined the *cis*-perhydroindane fusion of **1** (Fig. 1). Additionally, the orientation of the *i*-Pr group was established by the observed interactions between H-C(11) and H_β C(6) and H_β -C(8), as shown in Fig. 1. The absolute configuration of **1**, determined chemically, was established as (1*R*,2*R*), since acetylation of **2** afforded **1** (see below).

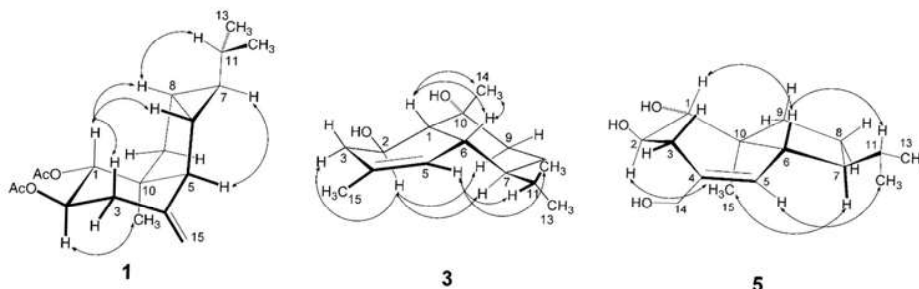


Fig. 1. Preferred solution conformations of **1**, **3**, and **5** according to NOESY experiments

Compound **2** had the molecular formula $C_{15}H_{24}O_2$ based on HR-FAB-MS (m/z 237.1848 ($[M+H]^+$; calc. 237.1855)), which implies four degrees of unsaturation. The ^{13}C -NMR (DEPT) spectrum (Table 1) showed 15 signals, including seven sp^3 CH, one sp^2 CH_2 , two sp^3 CH_2 , and three Me groups, together with one sp^2 and one sp^3 quaternary C-atom each. The IR spectrum indicated the presence of OH groups (3379 cm^{-1}), an olefinic group (1647 and 1048 cm^{-1}), and a cyclopropyl system (3073 , 3010 , and 1647 cm^{-1}). The 1H -NMR spectrum of **2** (Table 1) displayed spin systems similar to those of **1**, except for the two AcO functions.

Inspection of the 1H -NMR spectrum of **2** revealed the presence of two geminal vinyl H-atoms at $\delta(H)$ 4.78 ($CH_2(15)$), two oxygenated CH at $\delta(H)$ 3.63 (d , $J=9.5\text{ Hz}$, H_β -C(1)) and 3.47 (ddd , $J=11.0, 9.5, 4.5\text{ Hz}$, H_α -C(2)), two Me groups ($\delta(H)$ 0.93 and 0.94), one H-C(11) ($\delta(H)$ 0.74) due to an *i*-Pr functionality, and a cyclopropyl system formed by H_β -C(6)/ H_α -C(7)/ H_β -C(8) at $\delta(H)$ 1.06/0.41/1.10, as confirmed by 1H , 1H -COSY and HMBC correlations. Additionally, the uncoupled Me(14) group showed cross-peaks with H_β -C(9) and H_α -C(9) at $\delta(H)$ 2.45 and 0.92, respectively, with HO-C(1) at $\delta(C)$ 77.7, and with C(5) at $\delta(C)$ 61.2, which established the connectivity of the perhydroindane skeleton of **2**.

The relative configuration of **2** was determined by a NOESY experiment, which showed relevant interactions between H_β -C(1) and H_β -C(3), H_β -C(6), H_β -C(8), and H_β -C(9), between H_α -C(2) and Me(14), and between H_α -C(5) and both H_α -C(7) and Me(14), confirming the *cis*-indane fusion, as established before for **1**. The absolute configuration of **2** was derived by circular dichroism (CD), with the aid of the exciton-chirality method of the corresponding 1,2-dibenzoate [6]. Thus, **2** was reacted with (*E*)-cinnamoyl chloride to afford the ester derivative **2a**, which exhibited a negative Cotton effect in the CD spectrum. The associated $\pi \rightarrow \pi^*$ intramolecular charge-transfer band at 297 nm constitutes the negative contribution between the

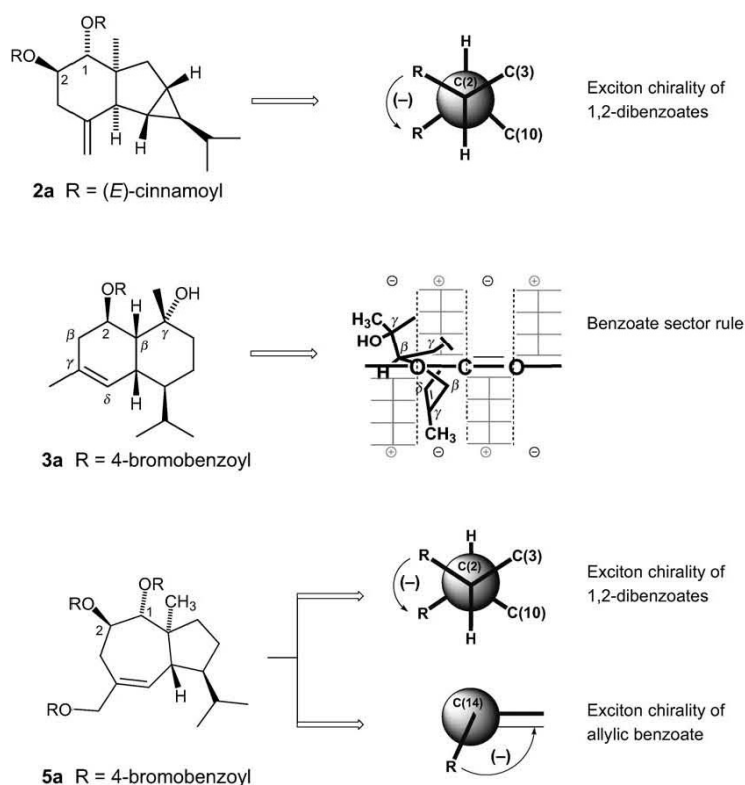


Fig. 2. Circular-dichroism exciton-chirality method for the determination of the absolute configurations of **2a**, **3a**, and **5a**

two coupled electric-dipole transition moments of the dibenzoate system of **2a**, which, according to the ‘dibenzoate chirality rule’ [6], corresponds to the (1*R*,2*R*) absolute configuration (Fig. 2).

Compound **3** had the molecular formula $C_{15}H_{26}O_2$ (m/z 239.2030 ($[M+H]^+$; calc. 239.2011)), as determined by HR-FAB-MS, and confirmed by ^{13}C -NMR (DEPT) analysis. The IR spectrum exhibited absorption bands for OH group (3413 cm^{-1}) and an olefinic function (1673 and 1041 cm^{-1}). The ^{13}C -NMR spectrum (Table 2) revealed 15 signals, which were assigned to four CH, one oxygenated CH, one sp^2 CH, three CH_2 , and four Me groups, including one Me group attached to an aromatic system, together with one sp^2 and one sp^3 quaternary C-atom each. The 1H -NMR spectrum of **3** (Table 2) displayed characteristic signals for an *i*-Pr group [$\delta(H)$ 0.82 (*d*), 0.87 (*d*), 1.90 (*m*)], an oxymethine H-atom at $\delta(H)$ 4.13, and a Me group at $\delta(H)$ 1.45 (*s*) attached to an oxygenated CH ($\delta(C)$ 72.4). A vinylic Me group at $\delta(C)$ 1.66 and a vinylic CH at $\delta(H)$ 5.50 were attributed to a trisubstituted olefin, which pointed to a cadinene-type skeleton for compound **3**. The olefinic H–C(5) exhibited $^1H,^1H$ correlations with H_α –C(6)

Table 2. ^1H - and ^{13}C -NMR Data of **3** and **5**. At 500 (^1H) and 125 MHz (^{13}C), resp., in CDCl_3 ; δ in ppm, J in Hz. Arbitrary atom numbering (see chemical formulae).

Position	3		Position	5	
	^1H	^{13}C		^1H	^{13}C
$\text{H}_\beta\text{-C}(1)$	1.58–1.62 (<i>m</i>)	52.3	$\text{H}_\beta\text{-C}(1)$	3.25 (<i>d</i> , $J=9.0$)	87.7
$\text{H}_\alpha\text{-C}(2)$	4.13 (<i>ddd</i> , $J=10.5, 8.0, 6.5$)	67.3	$\text{H}_\alpha\text{-C}(2)$	3.57 (<i>ddd</i> , $J=12.0, 9.0, 3.0$)	69.5
$\text{H}_\beta\text{-C}(3)$	1.87–1.94 (<i>m</i>)	42.7	$\text{CH}_2(3)$	2.39–2.49 (<i>m</i>)	35.6
$\text{H}_\alpha\text{-C}(3)$	2.43 (<i>dd</i> , $J=17.5, 6.5$)	–	$\text{C}(4)$	–	137.7
$\text{C}(4)$	–	131.1	$\text{H-C}(5)$	5.48 (<i>d</i> , $J=4.5$)	132.1
$\text{H-C}(5)$	5.50 (<i>dt</i> , $J=5.5, 2.0$)	125.1	$\text{H}_\beta\text{-C}(6)$	2.11 (<i>dd</i> , $J=9.5, 5.5$)	48.8
$\text{H}_\beta\text{-C}(6)$	2.55 (<i>ddd</i> , $J=10.5, 5.5, 5.0$)	36.7	$\text{H}_\alpha\text{-C}(7)$	1.72–1.80 (<i>m</i>)	50.3
$\text{H}_\alpha\text{-C}(7)$	1.16–1.22 (<i>m</i>)	44.2	$\text{CH}_2(8)$	1.72–1.80, 1.32–1.38 (<i>2m</i>)	24.8
$\text{CH}_2(8)$	1.39–1.46 (<i>m</i>)	19.7	$\text{CH}_2(9)$	1.94–1.98 (<i>m</i>), 1.49–1.53 (<i>m</i>)	40.0
$\text{CH}_2(9)$	1.58–1.62 (<i>m</i>)	35.1	$\text{C}(10)$	–	49.3
$\text{C}(10)$	–	72.4	$\text{H-C}(11)$	1.49–1.53 (<i>m</i>)	32.1
$\text{H-C}(11)$	1.87–1.94 (<i>m</i>)	27.1	$\text{Me}(12)$	0.88 (<i>d</i> , $J=6.5$)	21.9
$\text{Me}(12)$	0.82 (<i>d</i> , $J=7.0$)	15.4	$\text{Me}(13)$	0.84 (<i>d</i> , $J=7.0$)	19.2
$\text{Me}(13)$	0.87 (<i>d</i> , $J=7.0$)	21.5	$\text{CH}_2(14)$	3.95 (<i>s</i>)	67.8
$\text{Me}(14)$	1.45 (<i>s</i>)	31.3	$\text{Me}(15)$	0.96 (<i>s</i>)	14.8
$\text{Me}(15)$	1.66 (<i>s</i>)	22.9			

($\delta(\text{H})$ 2.55) and long-range couplings with $\text{C}(1)$ ($\delta(\text{C})$ 52.3), $\text{C}(3)$ (42.7), and $\text{C}(15)$ (22.9). In turn, $\text{H}_\beta\text{-C}(6)$ showed HMBC correlations with $\text{C}(1)$ ($\delta(\text{C})$ 52.3), $\text{C}(2)$ (67.3), $\text{C}(4)$ (131.1), and $\text{C}(7)$ (44.2), which established the decalin skeleton of **3**.

The HSQC and HMBC correlations between $\text{Me}(14)$ ($\delta(\text{H})$ 1.45) and $\text{C}(1)$ ($\delta(\text{C})$ 52.3) and $\text{C}(9)$ (35.1) allowed us to position the remaining OH function of **3** at $\text{C}(10)$. On the basis of HMBC and COSY correlations, the signal at $\delta(\text{H})$ 1.21 was assigned to $\text{H}_\alpha\text{-C}(7)$, based on its correlations with the *i*-Pr group. The relative configuration of **3**, determined on the basis of coupling constants and NOESY interactions, was found to be different than in its isomers *khusinodiol* and *isokhusinodiol* [7]. In this context, $\text{H-C}(5)$ exhibited a coupling constant of 5.5 Hz, suggesting a dihedral angle $\text{H-C}(5)\text{-C}(6)\text{-H}$ of *ca.* 50° and establishing the β -orientation of $\text{H-C}(6)$ in a *cis*-decalin skeleton. Additionally, $\text{H}_\beta\text{-C}(6)$ exhibited a pseudoaxial-axial coupling constant (10.5 Hz) with $\text{H}_\alpha\text{-C}(7)$, and a pseudoaxial-equatorial one (5.0 Hz) with $\text{H}_\beta\text{-C}(1)$. Finally, $\text{H}_\alpha\text{-C}(2)$ showed coupling constants of 10.5, 8.5, and 6.5 Hz, indicating two *trans*-diaxial and an axial-equatorial coupling pattern (*s*), which established the β -orientation of $\text{HO-C}(2)$ and of $\text{H}_\beta\text{-C}(1)$. The NOESY interactions between $\text{H}_\alpha\text{-C}(2)$ ($\delta(\text{H})$ 4.13) and $\text{H}_\alpha\text{-C}(3)$ (2.43), $\text{H}_\alpha\text{-C}(7)$ (1.21), and $\text{H}_\alpha\text{-C}(9)$ (1.60), between $\text{H}_\beta\text{-C}(6)$ ($\delta(\text{H})$ 2.55) and $\text{H}_\beta\text{-C}(1)$ (1.61), and between $\text{H}_\beta\text{-C}(1)$ and $\beta\text{-Me}(14)$ ($\delta(\text{H})$ 1.45) further established the *cis*-decalin fusion of **3**. The observed NOESY interactions between $\text{H-C}(5)$ and $\text{H-C}(11)$ ($\delta(\text{H})$ 1.90) and $\text{Me}(12)$ ($\delta(\text{H})$ 0.82) determined the relative orientation of the *i*-Pr group, as shown in *Fig. 1*.

The absolute configuration of **3** was determined by CD as (*2R*) by applying the ‘benzoate sector rule’ [8] on the basis of the observed negative molar ellipticity ($[\theta]_{252} = -9489.27 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) for its 4-bromobenzoyl derivative **3a**. The observed negative *Cotton* effect is due to the dominant contribution of the γ,δ -double bond to

the stereogenic C(2) center, and also due to the rotatory contribution of the β,γ -bond bearing the Me and OH groups (Fig. 2).

A check of the recovered NMR sample of **3** (in CDCl_3 solution) showed that it had undergone spontaneous dehydration to (2*R*)- δ -cadin-4,9-diene-2-ol (**4**). This compound is a diastereoisomer of (+)-amorpha-4,9-diene-2-ol, which has a different relative configuration at C(2) and C(7) [9].

Compound **5** had the molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3$ (m/z 255.1967 ($[M+H]^+$; calc. 255.1960)), as deduced by HR-FAB-MS analysis. The ^{13}C -NMR (DEPT) spectrum (Table 2) revealed 15 signals, including three sp^3 CH, one sp^2 CH, two oxygenated sp^3 CH, one oxygenated sp^3 CH_2 , three sp^3 CH_2 , and three Me groups, together with one sp^3 and one sp^2 quaternary C-atom. The IR spectrum of **5** showed OH absorption bands (3622 and 3457 cm^{-1}) and an olefinic functionality (1449 and 1046 cm^{-1}). The ^1H -NMR spectrum (Table 2) exhibited a vinylic H-atom at $\delta(\text{H})$ 5.48 (H-C(5)), which showed allylic couplings with H_β -C(6) ($\delta(\text{H})$ 2.11) and cross-peaks with both CH_2 (3) at $\delta(\text{H})$ 2.46 and CH_2 (14) at 3.95. In turn, CH_2 (3) was $^1\text{H},^1\text{H}$ -correlated with H_α -C(2) ($\delta(\text{H})$ 3.57), which correlated with H_β -C(1) at $\delta(\text{H})$ 3.25. The oxymethine resonance for H_β -C(1) showed cross-peaks with an uncoupled α -Me group at $\delta(\text{C})$ 14.8 (Me(15)), with C(10) at 49.31, and with C(6) at 48.81, which established a seven-membered ring within the sesquiterpene skeleton. The HMBC spectrum of **5** revealed long-range correlations between C(11) and both H_β -C(6) and H_α -C(7). The characteristic methine H-atom of an *i*-Pr group coupled with Me(12) at $\delta(\text{H})$ 0.88 and Me(13) at 0.84. The C(8)- and C(9) atoms at $\delta(\text{H})$ 24.8 and 40.0, respectively, showed cross-peaks with H-C(11) at $\delta(\text{H})$ 1.52 and H-C(1) at 3.25, respectively, confirming the isodaucane skeleton of **5**.

The relative configuration of **5** was established by analysis of its NOESY spectrum, which showed relevant interactions between H_β -C(1) and both H_β -C(6) and H_β -C(3); between H_α -C(2) and α -Me(15); and between H_α -C(7) and α -Me(15), indicating a *trans*-fused [5.3.0]bicyclodecene. Additionally, the NOE interactions between H_β -C(6) and Me(12), and between H-C(5) and Me(12) indicated the relative orientation of the *i*-Pr group, as shown in Fig. 1. The absolute configuration of **5** was assigned to be (1*R*,2*R*) on the basis of the observed negative Cotton effect in the CD spectrum of its tribenzoyl derivative **5a** (Fig. 2). The dominant negative contributions are due to the exciton chirality of the 1,2-dibenzoate [6] and the allylic benzoate [10], as shown in Fig. 2. The cumulative contributions due to chiral exciton coupling between the allylic benzoate and the 1,2-dibenzoate systems were neglected. This was possible since the interchromophoric coupling angles between the allylic chromophore and the 2- and 1-benzoate, respectively, is *ca.* 35° and 0°, values that constitute only small contributions to the sign of the overall Cotton effect [11].

After the isolation and purification process, another compound, the acetonide **6** (m/z 295.2268 ($[M+H]^+$; calc. 295.2273)) was obtained as an artifact, and characterized by NMR (see *Exper. Part*).

Compound **7** had the molecular formula $\text{C}_{39}\text{H}_{56}\text{O}_4$ (m/z 588.4187 (M^+ ; calc. 588.4179)), as determined by HR-FAB-MS, indicating twelve degrees of unsaturation. The ^{13}C -NMR (DEPT) spectrum (Table 3) showed 39 signals, including 13 CH (with six sp^2 and two sp^3 oxymethines), ten CH_2 (one terminal sp^2), and seven Me groups (one at an olefinic moiety), together with nine quaternary C-atoms (four sp^2 and five sp^3). The

IR spectrum of **7** suggested the presence of an OH group (3423 and 3143 cm^{-1}), an α,β -unsaturated C=O group (1681 cm^{-1}), and an aromatic moiety (1598 and 1512 cm^{-1}). These data were in accord with a pentacyclic triterpenoid and an attached coumaroyl³⁾ group.

The $^1\text{H-NMR}$ spectrum of **7** revealed six Me *singlets*, Me(23)–Me(28), a Me group in vinylic position ($\delta(\text{C})$ 1.79 (Me(30)) coupled with two geminal vinylic H-atoms at $\delta(\text{H})$ 4.78 and 4.94 ($\text{CH}_2(29)$), which indicated an isopropenyl functionality of a lupane-type triterpene. These assignments were inferred from long-range correlations between the vinylic H-atoms and the sp^2 quaternary C(20) atom at $\delta(\text{H})$ 151.1. Inspection of the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of **7** (Table 3) showed two oxygenated CH groups at $\delta(\text{H})$ 3.96 ($\text{H}_\alpha\text{-C}(16)$) and 4.90 ($\text{H}_\alpha\text{-C}(3)$). The low-field region of the spectrum was in accord with a coumaroyloxy function, based on two olefinic H-atoms at $\delta(\text{C})$ 6.70 ($d, J=16.0$ Hz, H–C(2')) and 8.02 ($d, J=16.0$ Hz, H–C(3')), an aromatic $AA'MM'$ system at $\delta(\text{H})$ 7.17 ($d, J=9.0$ Hz, H–C(6',8')) and 7.65 ($d, J=9.0$ Hz, H–C(5',9')), and an exchangeable OH H-atom at $\delta(\text{H})$ 12.3.

The information of COSY, HMQC, and HMBC spectra were combined to ascertain the location of the coumaroyloxy and OH functionalities. The key starting point were the geminal Me(23) Me(24) groups, which showed cross peaks with C(3), suggesting that this fragment was attached to C(4), a feature characteristic for most triterpenes. These two Me groups showed cross-peaks with C(5) at $\delta(\text{C})$ 56.1, which showed a third HMBC correlation with Me(25) at $\delta(\text{C})$ 16.8. In turn, $\text{H}_\alpha\text{-C}(3)$ exhibited a long-range correlation with the Me groups of the $\text{Me}_2\text{C}(4)$ unit, and with the C=O group at $\delta(\text{C})$ 167.4 of the coumaroyl function. The OH function was located at C(16), since $\text{H}_\alpha\text{-C}(16)$ exhibited a long-range coupling with Me(28) at $\delta(\text{H})$ 12.8. Finally, both the constitution and relative configuration of **7** were confirmed by an X-ray crystal-structure analysis (Fig. 3).

The minor component **8** (3 mg), isolated as a colorless film, had the molecular formula $\text{C}_{30}\text{H}_{56}\text{O}_4$ (m/z 589.4257 ($[M+H]^+$; calc. 589.4257)) according to HR-FAB-MS and $^{13}\text{C-NMR}$ (DEPT) experiments. The $^1\text{H-}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra (Table 3) of **8** were very similar to those of **7**. However, in **8**, there was no isopropenyl group present, in contrast to the OH and coumaroyl functions. Surprisingly, we found that **8** was converted into two components, when dissolved in CDCl_3 and stored at room temperature for 24 h. $^1\text{H-NMR}$ Analysis indicated that the major component, the one with an (*E*)-configured coumaroyl group, was in equilibrium with the corresponding (*Z*)-configured compound, giving rise to an (*E/Z*) mixture of 3:1⁴⁾. Due to the low intensity and absence of some H- and C-atom signals of (*Z*)-**8**, it was not possible to assign all of its atoms. Full NMR assignment of (*E*)-**8** was possible through a combination of COSY, HMQC, and HMBC experiments, and by considering the two pairs of geminal Me groups, *i.e.*, Me(23, 24) and Me(29, 30) as starting fragments. The observed homo- and heteronuclear correlations for (*E*)-**8** were similar to those of **7**, with the coumaroyloxy group at position 3. Working in a similar fashion as for **7**, it was possible to determine that **8** had an oleanene skeleton, because the vinylic H–C(19) at $\delta(\text{H})$ 4.98 exhibited long-range couplings with Me(29) and Me(30) at $\delta(\text{C})$ 31.0 and 29.1, respectively,

³⁾ Coumaroyl = (*E*)-4-(hydroxyphenyl)prop-2-enoyl.

⁴⁾ For a similar precedent, see [12].

Table 3. ^1H - and ^{13}C -NMR Data of **7** and **8**. At 500 (^1H) and 125 MHz (^{13}C), resp., δ in ppm, J in Hz.

Position	7 (in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)		Position	8 (in CDCl_3)	
	^1H	^{13}C		^1H	^{13}C
$\text{CH}_2(1)$	1.56–1.68, 0.97–1.01 (2 <i>m</i>)	39.1	$\text{CH}_2(1)$	1.66–1.79, 1.06–1.10 (2 <i>m</i>)	38.7
$\text{CH}_2(2)$	1.81–1.88, 1.74–1.79 (2 <i>m</i>)	24.7	$\text{CH}_2(2)$	1.66–1.79, 1.00–1.04 (2 <i>m</i>)	23.8
$\text{H}_\alpha\text{-C}(3)$	4.90 (<i>dd</i> , $J = 11.5, 4.5$)	81.0	$\text{H}_\alpha\text{-C}(3)$	4.62 (<i>dd</i> , $J = 11.0, 5.5$)	80.8
$\text{C}(4)$	–	38.7	$\text{C}(4)$	–	38.1
$\text{H}_\alpha\text{-C}(5)$	0.83–0.86 (<i>m</i>)	56.1	$\text{H}_\alpha\text{-C}(5)$	0.84–0.86 (<i>m</i>)	55.6
$\text{CH}_2(6)$	1.40–1.47, 1.31–1.39 (2 <i>m</i>)	18.9	$\text{CH}_2(6)$	1.49–1.64, 1.34–1.45 (2 <i>m</i>)	18.2
$\text{CH}_2(7)$	1.40–1.47 (<i>m</i>)	35.0	$\text{CH}_2(7)$	1.49–1.64, 1.34–1.45 (2 <i>m</i>)	34.5
$\text{C}(8)$	–	41.7	$\text{C}(8)$	–	40.7
$\text{H}_\alpha\text{-C}(9)$	1.31–1.39 (<i>m</i>)	50.6	$\text{H}_\alpha\text{-C}(9)$	1.27–1.32 (<i>m</i>)	50.5
$\text{C}(10)$	–	37.7	$\text{C}(10)$	–	37.1
$\text{CH}_2(11)$	1.81–1.88, 1.15–1.20 (2 <i>m</i>)	21.6	$\text{CH}_2(11)$	1.49–1.64 (<i>m</i>)	21.1
$\text{CH}_2(12)$	1.40–1.47, 1.15–1.20 (2 <i>m</i>)	25.7	$\text{CH}_2(12)$	1.49–1.64 (<i>m</i>)	25.9
$\text{H}_\beta\text{-C}(13)$	1.74–1.79 (<i>m</i>)	38.1	$\text{H}_\beta\text{-C}(13)$	2.29 (<i>br. dd</i> , $J = 8.5, 2.0$)	37.9
$\text{C}(14)$	–	44.6	$\text{C}(14)$	–	42.5
$\text{CH}_2(15)$	1.91–2.00, 1.56–1.68 (2 <i>m</i>)	38.3	$\text{CH}_2(15)$	1.66–1.79, 1.34–1.45 (2 <i>m</i>)	36.7
$\text{H}_\alpha\text{-C}(16)$	3.96 (<i>dd</i> , $J = 11.5, 4.5$)	76.4	$\text{H}_\alpha\text{-C}(16)$	3.47 (<i>dd</i> , $J = 11.5, 5.0$)	76.5
$\text{C}(17)$	–	50.0	$\text{C}(17)$	–	40.1
$\text{H}_\alpha\text{-C}(18)$	1.66–1.68 (<i>m</i>)	48.7	$\text{C}(18)$	–	141.1
$\text{H}_\beta\text{-C}(19)$	2.67 (<i>td</i> , $J = 11.0, 6.0$)	48.5	$\text{H-C}(19)$	4.98 (<i>br. d</i> , $J = 2.0$)	132.2
$\text{C}(20)$	–	151.1	$\text{C}(20)$	–	32.1
$\text{CH}_2(21)$	2.05–2.13, 1.56–1.68 (2 <i>m</i>)	30.8	$\text{CH}_2(21)$	1.34–1.45 (<i>m</i>)	33.0
$\text{CH}_2(22)$	1.91–2.00, 1.49–1.53 (2 <i>m</i>)	39.2	$\text{CH}_2(22)$	1.66–1.79, 1.49–1.64 (2 <i>m</i>)	33.4
$\text{Me}(23)$	0.98 (<i>s</i>)	28.6	$\text{Me}(23)$	0.89 (<i>s</i>)	28.0
$\text{Me}(24)$	1.01 (<i>s</i>)	17.4	$\text{Me}(24)$	0.92 (<i>s</i>)	16.7
$\text{Me}(25)$	0.87 (<i>s</i>)	16.8	$\text{Me}(25)$	0.93 (<i>s</i>)	16.7
$\text{Me}(26)$	1.08 (<i>s</i>)	16.6	$\text{Me}(26)$	1.10 (<i>s</i>)	16.1
$\text{Me}(27)$	1.12 (<i>s</i>)	16.9	$\text{Me}(27)$	0.79 (<i>s</i>)	15.9
$\text{Me}(28)$	1.13 (<i>s</i>)	12.8	$\text{Me}(28)$	0.99 (<i>s</i>)	18.0
$\text{H}_\alpha\text{-C}(29)$	4.94 (<i>d</i> , $J = 2.0$)	110.5	$\text{Me}(29)$	0.96 (<i>s</i>)	31.0
$\text{H}_\beta\text{-C}(29)$	4.94 (<i>d</i> , $J = 2.0$)	–	$\text{Me}(30)$	0.96 (<i>s</i>)	29.1
$\text{Me}(30)$	1.79 (<i>s</i>)	19.9	$\text{C}(4')$	–	127.6
$\text{C}(4')$	–	126.7	$\text{H-C}(5',9')$	7.43 (<i>d</i> , $J = 8.5$)	129.9
$\text{H-C}(5',9')$	7.65 (<i>d</i> , $J = 9.0$)	131.1	$\text{H-C}(6',8')$	6.83 (<i>d</i> , $J = 8.5$)	115.8
$\text{H-C}(6',8')$	7.17 (<i>d</i> , $J = 9.0$)	117.3	$\text{C}(7')$	–	157.4
$\text{C}(7')$	–	161.9	$\text{H-C}(3')$	7.60 (<i>d</i> , $J = 16.0$)	143.8
$\text{H-C}(3')$	8.02 (<i>d</i> , $J = 16.0$)	145.5	$\text{H-C}(2')$	6.30 (<i>d</i> , $J = 15.5$)	116.5
$\text{H-C}(2')$	6.70 (<i>d</i> , $J = 16.0$)	116.3	$\text{C}(1')$	–	167.1
$\text{C}(1')$	–	167.4			
16-OH	5.76 (<i>d</i> , $J = 4.0$)				
7'-OH	12.25 (<i>s</i>)				

with C(13) at 37.9, and with C(17) at 40.1. In turn, the HMBC spectrum showed a 2J correlation between C(17) and Me(28) at $\delta(\text{H})$ 0.99, which correlated with C(16) at $\delta(\text{C})$ 76.5. The OH group was placed again at C(16) by considering the last observed correlations and cross-peaks between $\text{H}_\alpha\text{-C}(16)$ at $\delta(\text{H})$ 3.47 and Me(28) at $\delta(\text{C})$ 18.0. The configurations at C(3) and C(16) were found to be β each, and the C=C

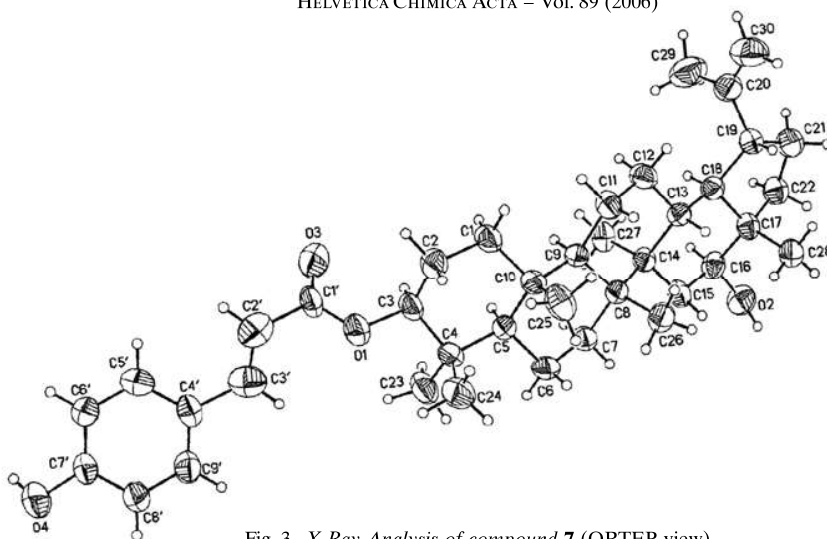


Fig. 3. X-Ray Analysis of compound **7** (ORTEP view)

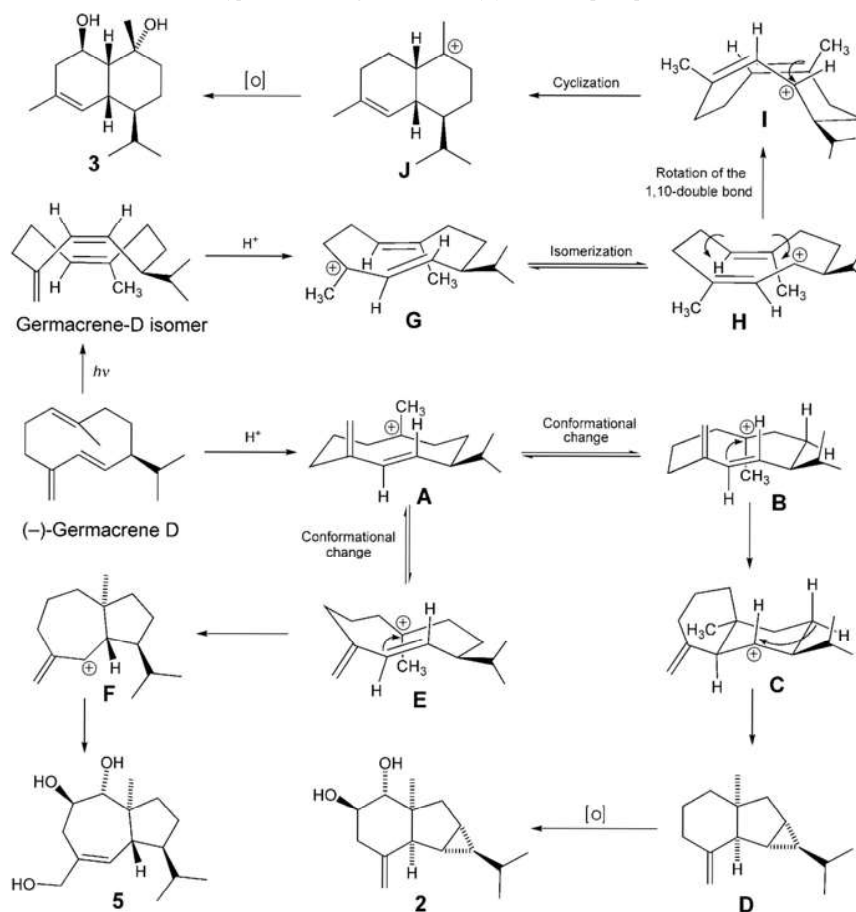
bond was placed at C(18) of the oleane. These assignments were confirmed by NOESY interactions of H_{α} -C(3) with Me(23), H_{α} -C(16) with Me(27), and H_{β} -C(13) with both Me(26) and Me(28).

The following known compounds were also isolated from *J. neopauciflora*, and identified by comparison of their spectroscopic data with those published: β -sitosterol [13], lupeol [14], a lupeol/germanicol mixture [15], calenduladiol [16], 6,7-dimethoxycoumarin [17], 5-hydroxy-6,7-dimethoxycoumarin [18], β -sitosteryl β -D-glucopyranoside [19], and sucrose [20].

With the absolute configurations of the sesquiterpenoids **1–5** being known, and based on earlier considerations by Bülow and König [5], a plausible biosynthetic pathway for these compounds could start from (–)-germacrene D as the biogenetic precursor (*Scheme*). (–)-Germacrene D is first protonated to form the germacrenyl cation **A**, which, after a conformational change to **B**, allows two cyclizations through the cycloaxene cation **C** to the cycloax-4(15)-ene **D**. Then, **D** would be transformed into **1** and **2** through a sequence of hydroxylations and esterifications. Similarly, **A** might also be converted to the conformer **E**, which could cyclize to the isodaucenyl cation **F**, which, after isomerization and several hydroxylations, affords **5**. Finally, **3** and **4** may be formed by the isomerization of (–)-germacrene D. The resulting isomer is protonated to the germacrenyl cation **G**, which then isomerizes to **H**. Then, rotation of the C(1)=C(10) bond in **H** allows the cyclization to the cadinenyl cation **I**, which can be converted to **3** via cyclization to **J**, followed by hydroxylation, or to **4** by loss of H^+ and hydroxylation (not shown).

A. G. acknowledges CONACyT and DGAPA UNAM for Ph.D. scholarships. We are indebted to P. Guevara-Feffler and J. Jiménez-Ramírez, Facultad de Ciencias, UNAM, for providing the plant material, and to H. Ríos, S. Hernández-Ortega, L. Velasco, N. Zavala, R. Patiño, and E. García for technical assistance.

Scheme. Hypothetical Biogenetic Pathway for the Sesquiterpenoids 1–5



Experimental Part

General. Column Chromatography (CC): silica gel (70–230 and 230–400 mesh). Anal. and prep. TLC: silica gel 60 F_{254} (Merck) plates. M.p.: Fisher Johns apparatus; uncorrected. UV Spectra: Shimadzu UV-160 spectrophotometer; λ_{max} (log ϵ) in nm. Optical rotation: Perkin-Elmer 341 polarimeter. CD Spectra: Jasco J720 spectropolarimeter. IR Spectra: Nicolet Magna FT-IR 750 spectrometer; in cm^{-1} . 1H - and ^{13}C -NMR Spectra: Bruker ARX-500 spectrometer, at 500 and 125 MHz, resp.; δ in ppm, J in Hz. EI- and HR-FAB-MS: Jeol JMS-AX505HA and JMX-SX102A mass spectrometers, resp.

Plant Material. *J. neopauciflora* Pax was collected in Totomuchil, Estado de México on April 2003, and authenticated by Dr. Jaime Jiménez Ramírez (Facultad de Ciencias, UNAM). A voucher specimen (No. 089165) was deposited at the Herbario Facultad de Ciencias, UNAM.

Extraction and Isolation. The bark of *Jatropha neopauciflora* (500 g) was dried at r.t. and then repeatedly extracted ($3 \times$) with a mixture of $CH_2Cl_2/MeOH$ 1:1. The crude extract (17.0 g) was dissolved in EtOH, heated at 50° , and treated with activated carbon. The obtained brown residue (10.1 g) was dis-

solved in a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, adsorbed on silica gel, and subjected to CC (petroleum ether (PE), PE/Me₂CO, Me₂CO/MeOH, and MeOH): *Fractions 1–13*. *Fr. 1* and *2* contained lipidic material. *Fr. 3* (0.5 g) afforded lupeol (38 mg) and β -sitosterol (25 mg; PE/AcOEt 8:2). From *Fr. 4* (1.54 g) were obtained: a mixture of lupeol/germanicol 3:4 in the form of the acetylated derivatives (66 mg; PE/AcOEt 9:1), 6,7-dimethoxycoumarin (3.9 mg; prep. TLC, PE/Me₂CO 7:3), 5-hydroxy-6,7-dimethoxycoumarin (3 mg; PE/Me₂CO 6:4), and **3** (10 mg; prep. TLC, PE/Me₂CO 7:3). *Fr. 5* afforded calenduladiol (4 mg; PE/Me₂CO 7:3), **1** (14 mg; PE/Me₂CO 8:2), **8** (3 mg; PE/CHCl₃/Me₂CO 6:1:3), **7** (300 mg; PE/CHCl₃/Me₂CO 6:1:3), and **2** (23 mg; PE/Me₂CO 7:3). From *Fr. 6* were isolated lupeol (12 mg) and **7** (28 mg). *Fr. 7* and *8* afforded **5** (51 mg; prep. TLC, CHCl₃/MeOH 85:15) and **6** (15 mg; prep. TLC, PE/CHCl₃/Me₂CO 5:2.5:2.5). *Fr. 9* and *10* afforded β -sitosteryl β -D-glucopyranoside (120 mg) and sucrose (50 mg).

(*1R,1aR,1bS,4R,5R,5aS,6aR*)-Decahydro-5a-methyl-1-(1-methylethyl)-2-methylidenecyclopropa[*a*]-indene-4,5-diyl Diacetate (**1**). Yellow oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +23.5$ ($c=0.085$, CHCl₃). IR (film): 3076, 3017, 2956, 2872, 1746, 1650, 1460, 1368, 1245, 1040, 905. ¹H- and ¹³C-NMR: see Table 1. FAB-MS: 321 (9, $[M+H]^+$), 261 (20), 218 (17), 201 (79), 145 (100), 43 (53). HR-FAB-MS: 321.2074 ($[M+H]^+$, C₁₉H₂₀O₄⁺; calc. 321.2066).

(*1R,1aR,1bS,4R,5R,5aS,6aR*)-Decahydro-5a-methyl-1-(1-methylethyl)-2-methylidenecyclopropa[*a*]-indene-4,5-diol (**2**). Transparent oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +17.06$ ($c=0.17$, MeOH). IR (film): 3379, 3073, 3010, 2955, 2929, 2872, 1647, 1462, 1379, 1048, 895, 659. ¹H- and ¹³C-NMR: see Table 1. EI-MS: 236 (32, M^+), 218 (20), 203 (23), 175 (40), 161 (39), 147 (58), 139 (100), 121 (69), 105 (55), 91 (56), 41 (44). HR-FAB-MS: 237.1848 ($[M+H]^+$, C₁₅H₂₅O₂⁺; calc. 237.1855).

(*1R,1aR,1bS,4R,5R,5aS,6aR*)-Decahydro-5a-methyl-1-(1-methylethyl)-2-methylidenecyclopropa[*a*]-indene-4,5-diyl Dicinnamate (**2a**). Compound **2** (7 mg) was reacted with (*E*)-cinnamoyl chloride in anhydrous pyridine (dried over 4-Å molecular sieves) to afford crude **2a** (1 mg), which was purified by HPLC (Lichrosorb-5 RP-18 column, 250 × 4.0 mm, 5 μm; gradient elution: 1. H₂O/MeCN 3:7 at a flow rate of 1 ml/6 min, 2. H₂O/MeCN 3:7 → 1:9 at a flow of 1 ml/14 min). Colorless oil. UV ($c=12.1$ μm, MeOH): 217 (4.40), 232 (3.69), 278 (4.59). CD ($c=12.1$ μm, MeOH): $[\theta]_{267} = +62664$, $[\theta]_{297} = -43986$.

(*1R,4S,4aR,8R,8aR*)-1,2,3,4,4a,7,8,8a-Octahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)naphthalene-1,8-diol (**3**). Yellow oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -34.28$ ($c=0.07$, CHCl₃). IR (film): 3413, 2957, 2928, 2870, 1673, 1460, 1377, 1195, 1041. For ¹H- and ¹³C-NMR data in CDCl₃, see Table 2. ¹H-NMR (500 MHz, C₆D₆): 5.38 (*dt*, $J=5.5$, 2.0, H-C(5)); 3.90 (*ddd*, $J=11.0$, 8.5, 6.5, H_α-C(2)); 3.24 (*s*, OH); 2.72 (*ddd*, $J=10.5$, 5.0, 4.5, H_β-C(6)); 2.11 (*dd*, $J=16.5$, 6.0, H_α-C(3)); 1.96 (*d* × *sept.*, $J=7.0$, 3.5, H-C(11)); 1.63–1.68 (*m*, CH₂(9), H-C(3)); 1.56 (*s*, Me(15)); 1.48 (*dd*, $J=9.0$, 3.5, H_β-C(1)); 1.42 (*s*, Me(14)); 1.28–1.34 (*m*, CH₂(8)); 1.14–1.18 (*m*, H-C(7)); 0.87 (*d*, $J=7.0$, Me(12)); 0.86 (*d*, $J=7.0$, Me(13)). ¹³C-NMR (125 MHz, C₆D₆): 131.1 (C(4)); 125.7 (C(5)); 71.8 (C(10)); 66.9 (C(2)); 52.4 (C(1)); 44.7 (C(7)); 43.1 (C(3)); 37.0 (C(6)); 35.2 (C(9)); 32.0 (C(14)); 27.5 (C(11)); 23.0 (C(15)); 21.7 (C(13)); 20.0 (C(8)); 15.5 (C(12)). FAB-MS: 239 (3, $[M+H]^+$), 154 (100), 221 (7, $[M+H-H_2O]^+$), 203 (10), 154 (100, $[M-C_{10}H_{18}O]^+$), 136 (90, $[M-C_{20}H_{34}O]^+$), 55 (98, C₄H₇⁺), 43 (89, C₃H₅⁺). HR-FAB-MS: 239.2030 ($[M+H]^+$, C₁₅H₂₇O₂⁺; calc. 239.2011).

(*1R,4S,4aR,8R,8aR*)-1,2,3,4,4a,7,8,8a-Octahydro-1-hydroxy-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)naphthalen-8-yl 4-Bromobenzoate (**3a**). Compound **3** (5 mg) was reacted with 4-bromobenzoyl chloride in anhydrous pyridine (as above) to afford **3a** (4 mg). Colorless oil. UV ($c=47.6$ μm, MeOH): 206 (4.30), 218 (3.94), 244 (4.40). CD ($c=47.6$ μm, MeOH): $[\theta]_{252} = -9489$.

(*1R,4aR,5S,8aS*)-1,2,4a,5,6,8a-Hexahydro-3,8-dimethyl-5-(1-methylethyl)naphthalen-1-ol (**4**). Yellow oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -6.6$ ($c=0.075$, MeOH). IR (film): 3420, 2957, 2925, 2855, 1460, 1378, 1052. ¹H-NMR (C₆D₆, 500 MHz): 5.38 (*d* × *quint.*, $J=4.5$, 1.5, H-C(9)); 5.24 (*dt*, $J=5.0$, 1.5, H-C(5)); 3.97 (*dd*, $J=11.5$, 5.0, H_α-C(2)); 2.43 (*br. s*, H_β-C(6)); 2.14 (*t*, $J=6.0$, H_β-C(1)); 2.04–2.08 (*m*, H_α-C(3)); 1.94–2.01 (*m*, H_α-C(8)); 1.74–1.83 (*m*, H_β-C(8)); 1.74–1.83 (*m*, H-C(11)); 1.74–1.83 (*m*, H-C(3)); 1.73 (*d*, $J=1.5$, Me(14)); 1.56 (*s*, Me(15)); 1.28–1.33 (*m*, H-C(7)); 0.90 (*d*, $J=6.5$, Me(13)); 0.83 (*d*, $J=6.5$, Me(12)). ¹³C-NMR (C₆D₆, 125 MHz): 133.8 (C(10)); 131.0 (C(4)); 125.5 (C(5)); 123.1 (C(9)); 69.0 (C(2)); 43.1 (C(1)); 43.1 (C(7)); 37.9 (C(3)); 35.0 (C(6)); 27.2 (C(11)); 24.91 (C(8)); 23.7 (C(15)); 23.4 (C(14)); 21.2 (C(13)); 18.8 (C(12)). EI-MS: 220 (5, M^+), 219 (10, $[M-1]^+$), 149 (40), 71 (70), 57 (100), 43 (60), 41 (32). HR-FAB-MS: 221.1902 ($[M+H]^+$, C₁₅H₂₅O⁺; calc. 221.1905).

(*1S,3aS,4R,5R,8aR*)-1,2,3,3a,4,5,6,8a-Octahydro-7-(hydroxymethyl)-3a-methyl-1-(1-methylethyl)azulene-4,5-diol (**5**). Yellow oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -40$ ($c=0.055$, CHCl₃). IR (film): 3622, 3457, 2975, 2927, 2895,

1449, 1391, 1046, 877. ¹H- and ¹³C-NMR: see Table 2. EI-MS: 254 (4, *M*⁺), 253 (3, [*M* – 1]⁺), 236 (50, [*M* – H₂O]⁺), 193 (49), 178 (68), 175 (65), 123 (100), 95 (78), 43 (66), 41 (59). HR-FAB-MS: 255.1967 ([*M* + H]⁺, C₁₅H₂₇O₃⁺; calc. 255.1960).

(1*S*,3*aS*,4*R*,5*R*,8*aR*)-1,2,3,3*a*,4,5,6,8*a*-Octahydro-7-(hydroxymethyl)-3*a*-methyl-1-(1-methylethyl)-azulene-4,5-diyl Bis(4-bromobenzoate) (**5a**). Compound **5** (10 mg) was reacted with 4-bromobenzoyl chloride in anhydrous pyridine (as above) to afford **5a**. Colorless solid (8 mg). UV (*c* = 5.5 μM, MeOH): 207 (4.67), 220 (4.37), 244 (4.75). CD (*c* = 5.5 μM, MeOH): [θ]₂₃₇ = +73587, [θ]₂₅₄ = –121296.

[(3*aR*,6*aR*,7*S*,9*aS*,9*bR*)-3*a*,4,6*a*,7,8,9,9*a*,9*b*-Octahydro-2,2,9*a*-trimethyl-7-(1-methylethyl)azulenof[4,5-*d*][1,3]dioxol-5-yl]methanol (**6**). Yellow oil. [α]_D²⁵ = –47.5 (*c* = 0.12, MeOH). IR (film): 3421, 2956, 2934, 2872, 1457, 1374, 1233, 1170, 1125, 1067, 1046, 856, 797. ¹H-NMR (500 MHz, C₆D₆): 5.45 (*dd*, *J* = 3.5, 1.5, H_α–C(5)); 3.66 (*s*, CH₂(14)); 3.58 (*ddd*, *J* = 11.0, 8.5, 2.0, H_α–C(2)); 3.30 (*d*, *J* = 9.0, H_β–C(1)); 2.51 (*ddd*, *J* = 14.0, 2.0, 1.0, H_α–C(3)); 2.22 (*td*, *J* = 13.5, 1.5, H_β–C(3)); 1.84–1.92 (*m*, H–C(6)); 1.84–1.92 (*m*, H–C(9)); 1.68–1.75 (*m*, H–C(7)); 1.52–1.58 (*m*, H–C(11)); 1.49, 1.42 (2*s*, Me₂C–O); 1.39–1.44 (*m*, H–C(9)); 1.29–1.35 (*m*, CH₂(8)); 0.91 (*s*, Me(15)); 0.87 (*d*, *J* = 6.5, Me(13)); 0.80 (*d*, *J* = 6.5, Me(12)). ¹³C-NMR (125 MHz, C₆D₆): 137.8 (C(4)); 129.7 (C(5)); 106.8 (Me₂C–O); 92.8 (C(1)); 72.5 (C(2)); 67.8 (C(14)); 49.4 (C(6)); 49.3 (C(7)); 46.4 (C(10)); 38.8 (C(9)); 31.3 (C(11)); 30.7 (C(3)); 27.5, 27.1 (Me₂C–O); 24.8 (C(8)); 22.1 (C(13)); 18.5 (C(12)); 14.1 (C(15)). EI-MS: 294 (*M*⁺, not obs.), 279 (13, [*M* – Me]⁺), 236 (14), 219 (86), 201 (45), 81 (73), 69 (100), 55 (75), 43 (85), 28 (51), 18 (43). HR-FAB-MS: 295.2268 ([*M* + H]⁺, C₁₈H₃₁O₃⁺; calc. 295.2273).

(3*β*,16*β*)-16-Hydroxylyup-20(29)-*en*-3-yl (E)-3-(4-Hydroxyphenyl)prop-2-enoate (**7**). Colorless powder. M.p. 288–290°. [α]_D²⁵ = +33 (*c* = 0.1, pyridine). IR (KBr): 3423, 3143, 2941, 2877, 2763, 2695, 2623, 2526, 1681, 1598, 1512, 1455, 1383, 1272, 1173, 1012, 530. ¹H- and ¹³C-NMR: see Table 3. EI-MS: 588 (17, *M*⁺), 570 (21), 406 (15), 147 (100). HR-FAB-MS: 588.4187 (*M*⁺, C₃₉H₅₆O₄⁺; calc. 588.4179).

(3*β*,16*β*)-16-Hydroxyolean-18-*en*-3-yl (E)-3-(4-Hydroxyphenyl)prop-2-enoate (**8**). Colorless film. M.p. 275–277°. [α]_D²⁵ = +32.5 (*c* = 0.04, CHCl₃). IR (film): 3388, 2947, 2869, 1684, 1604, 1514, 1450, 1373, 1276, 1169, 1012, 981, 757. ¹H- and ¹³C-NMR: see Table 3. EI-MS: 588 (19, *M*⁺), 570 (20), 439 (7), 424 (12), 409 (9), 353 (4), 147 (100). HR-FAB-MS: 589.4257 ([*M* + H]⁺, C₃₉H₅₇O₄⁺; calc. 589.4257).

*X-Ray Crystallography*⁵). Crystallographic measurements were made on a Bruker Smart Apex automatic diffractometer with a CCD area detector using graphite-monochromated MoK_α (0.71073 Å) radiation. A clear, colorless prism of **7** (C₃₉H₅₆O₄) was slowly grown from a hot mixture of acetone/MeOH 1:9. A crystal of dimension 0.30 × 0.18 × 0.18 mm was mounted on a glass fiber, fixed on a goniometer head, and then placed in the X-ray diffractometer. The SMART 5.625 program [21] was used for centering, indexing, and data collection. Unit-cell dimensions were obtained by a least-squares fit of 5987 carefully centered reflections in the range of 1.95° ≤ θ ≤ 25.00°. Cell constants corresponded to the monoclinic system *P*2₁, with cell dimensions (at 291(2) K) of *a* = 10.4619(8), *b* = 12.5842(9), *c* = 13.0219(9) Å; *V* = 1707(2) Å³. For *Z* = 2 and *M_r* 588.84, the calculated density was 1.145 g/cm³. Data were collected at 291(2) K using the ω-scan technique. The space group was determined by considering systematic absences, packing, statistical analysis of intensity distributions, and successful solution and refinement of the structure. Data were collected to a maximum θ value of 25.00° (100% completeness to θ), and no significant decay was observed. The structure was solved by direct methods, and refined by full-matrix least squares on *F*² with the SHELXTL97 program [22]. Atomic scattering factors were taken from International Tables for X-ray Crystallography [23]. Non-H-atoms were refined anisotropically. H-Atoms were placed at calculated positions, and refined as riding atoms on their respective attached atom, with the exception of that ligated to O(16), which was located and refined as the non-H-atoms, with a thermal isotropic factor *U* of 1.2 Å² from the attached O-atom. At convergence, the final discrepancy indices on *F* were *R*(*F*) 0.0476, *R*_w(*F*²) 0.0690, and goodness-of-fit on *F*² 0.834 for the 5987 reflections, with *I* = 2σ(*I*) and 401 parameters refined with restraints and constraints of 1 each. The largest difference peak and hole was 0.178 and –0.112 eÅ^{–3}, resp.

⁵) The crystallographic data of **7** have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication number CCDC-281733. Copies of the data can be obtained, free of charge, via the internet (http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

REFERENCES

- [1] 'Dictionary of Natural Products', Vers. 13:2, Chapman & Hall, CRC Press, 2004.
- [2] G. R. Pettit, C. L. Herald, C. R. Smith, 'Biosynthetic Products for Cancer Chemotherapy', Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1989, Vol. 6, p. 12.
- [3] C. Auvin-Guette, C. Baraguey, A. Blond, H. Xavier, H. Pousset, B. Bodo, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 55, 11495; C. M. Chariandy, C. E. Seaforth, R. H. Phelps, G. V. Pollard, B. P. S. Khambay, *J. Ethnopharmacol.* **1999**, 64, 265.
- [4] M. Canales, T. Hernández, J. Caballero, A. Romo de Vivar, G. Avila, A. Duran, R. Lira, *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 97, 429.
- [5] N. Bülow, W. A. König, *Phytochemistry* **2000**, 55, 141.
- [6] N. Harada, K. Nakanishi, *Acc. Chem. Res.* **1972**, 5, 257.
- [7] K. Yueh-Hsiung, C. Chiou-Fung, L. Hsiu-Chuan, *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51, 986.
- [8] N. Harada, M. Ohashi, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 7349.
- [9] C. Paul, W. A. König, C.-L. Wu, *Phytochemistry* **2001**, 58, 789.
- [10] N. Harada, J. Iwabuchi, Y. Yokota, H. Uda, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 5590.
- [11] S. Lai Chen, N. Harada, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 7352; N. Harada, S. Lai Chen, K. Nakanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 5345.
- [12] S. McLean, F. W. Reynolds, J.-P. Yang, H. Jacobs, L. L. Jean-Pierre, *Magn. Reson. Chem.* **1994**, 32, 422.
- [13] 'Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra', Aldrich Chemical Co., 1993, Vol. 3, 569 A.
- [14] C. Seger, B. Jandl, G. Brader, W. Robien, O. Hofer, H. Greger, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1997**, 359, 42.
- [15] S. B. Mahato, A. P. Kundu, *Phytochemistry* **1994**, 37, 1517.
- [16] E. Wenkert, G. V. Baddeley, I. R. Burfitt, L. N. Moreno, *Org. Magn. Reson.* **1978**, 11, 337.
- [17] H. Günter, J. Priestien, P. Joseph-Nathan, *Org. Magn. Reson.* **1975**, 7, 339.
- [18] M. Kanlayavattanakul, N. Ruangrunsi, T. Watanabe, T. Ishikawa, *Heterocycles* **2003**, 61, 183.
- [19] S. Faizi, M. Ali, R. Saleem, S. Bibi, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, 39, 399.
- [20] A. Bruyn, P. A. Alvarez, *Carbohydr. Res.* **1992**, 235, 303.
- [21] SMART (5.625), Bruker AXS, Inc., Madison, WI, 2000.
- [22] G. M. Sheldrick, 'SHELXTL97, An Integrated System for Solving, Refining and Displaying Crystal Structures from Diffraction Data', University of Göttingen, Germany, 1997.
- [23] 'International Tables for X-ray Crystallography', Kynoch Press, Birmingham, 1974, Vol. IV.

Received September 6, 2005