

00582



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ELUCIDACION ESTRUCTURAL Y ESTABLECIMIENTO DE LA CONFIGURACION ABSOLUTA DE METABOLITOS SECUNDARIOS BIODINAMICOS AISLADOS DE LA PLANTA MEDICINAL Hyptis spicigera. APLICACION DE LA MECANICA MOLECULAR EN LA ELUCIDACION ESTEREOQUIMICA DE LA ESPICIGEROLIDA, UNA 5,6-DIHI-DRO- $\alpha$ -PIRONA CITOTOXICA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS ( F A R M A C I A ) P R E S E N T A MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO



MEXICO, D.F.

284283

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Jurado asignado**

Presidente: Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo  
Primer vocal: Dr. Alfredo Ortega Hernández  
Segundo vocal: Dra. Rachel Mata Essayag  
Tercer vocal: Dr. Carlos Cerda García Rojas  
Secretario: Dr. Guillermo Delgado Lamas  
Primer suplente: Dr. Rafael Castillo Bocanegra  
Segundo suplente: Dra. María Luisa Villarreal Ortega

Sitios donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123.  
Facultad de Química.  
Universidad Nacional Autónoma de México.

Departamento de Química, Laboratorio 48.  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.  
Instituto Politécnico Nacional.

Asesor:

---

Dr. Rogelio Pereda Miranda  
UNAM

Coasesor:

---

Dr. Carlos Cerda García Rojas  
CINVESTAV

# CONTENIDO.

	Página
RESUMEN .....	vii
ABSTRACT .....	xi
LISTA DE CUADROS .....	xiii
LISTA DE FIGURAS .....	xvi
AGRADECIMIENTOS .....	xxvii
1. INTRODUCCION .....	1
2. ANTECEDENTES .....	5
2.1    Generalidades de la familia .....	5
2.2.    Etnobotánica del género <i>Hyptis</i> .....	8
2.3    Descripción de <i>Hyptis spicigera</i> .....	11
2.3.1. Características botánicas .....	11
2.3.2. Etnobotánica .....	12
2.3.3. Distribución .....	12
2.4.    Fitoquímica del género <i>Hyptis</i> .....	12
2.4.1 Terpenoides .....	13
2.4.2. 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas .....	17
2.4.2.1. 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas C <sub>6</sub> sustituidas aisladas de las labiadas .....	17
2.4.2.2. 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas C <sub>6</sub> sustituidas aisladas del género <i>Hyptis</i> .	21
2.4.3. Flavonoides .....	26
2.4.4 Lignanos .....	28

2.5.	Propiedades espectroscópicas y espectrométricas .....	31
2.5.1.1.	Espectroscopía de infrarrojo y ultravioleta .....	31
2.5.1.2.	Espectroscopía de RMN $^1\text{H}$ y de $^{13}\text{C}$ .....	31
2.5.1.3.	Espectrometría de masas .....	42
2.5.2.	Diterpenoides del grupo labdano .....	45
2.5.2.1.	Espectroscopía de infrarrojo .....	45
2.5.2.2.	Espectroscopía de RMN $^1\text{H}$ y de $^{13}\text{C}$ .....	45
2.5.2.3.	Espectrometría de masas .....	49
2.6.	Métodos empleados para establecer la configuración relativa y absoluta .....	50
2.6.1.	Métodos degradativos .....	50
2.6.2.	Método físicos .....	52
2.6.2.1.	La regla de Snatzke .....	53
2.6.3.	Métodos químicos .....	57
2.6.3.1.	Esteres de Mosher .....	57
2.6.4.	Métodos teóricos .....	61
2.6.4.1.	Mecánica molecular .....	61
2.7.	Biosíntesis .....	64
2.7.1.	5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas .....	64
2.7.2.	Diterpenoides del grupo labdano .....	66
3.	HIPOTESIS .....	69
4.	OBJETIVO GENERAL .....	71

5. PARTE EXPERIMENTAL .....	73
5.1. Procedimientos generales .....	73
5.1.1. Técnicas cromatográficas .....	73
5.1.1.1. Cromatografía en columna abierta .....	73
5.1.1.2. Cromatografía en capa fina .....	73
5.1.1.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución .....	74
5.1.2. Instrumental analítico .....	74
5.2. Material vegetal .....	75
5.3. Extracción del material vegetal .....	75
5.4. Fraccionamiento primario del extracto orgánico total .....	76
5.5. Aislamiento y purificación de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona citotóxica .....	77
5.6. Aislamiento y purificación de los constituyentes diterpénicos con actividad insecticida .....	78
5.7. Obtención de derivados .....	80
5.7.1. Derivatización de L-ramnosa para la obtención del sintón quiral <b>113</b> ....	81
5.7.1.1. Síntesis de la 2,4-dinitrofenilhidrazona de la L-ramnosa ( <b>96</b> ) .....	81
5.7.1.2. Acetilación del compuesto <b>96</b> en condiciones básicas .....	83
5.7.1.3. Acetilación del compuesto <b>96</b> en condiciones ácidas .....	84
5.7.1.4. Síntesis del etilendioacetil de la L-ramnosa ( <b>99</b> ) .....	85
5.7.1.5. Acetilación del compuesto <b>99</b> .....	85
5.7.1.6. Desulfuración del compuesto <b>100</b> .....	86

	Página
5.7.1.6.1. Preparación de níquel Raney .....	86
5.7.1.6.2. Reacción de desulfuración .....	87
5.7.1.7. Síntesis del difenilditioacetal de la L-ramnosa (104) .....	88
5.7.1.8. Acetilación del compuesto 104 .....	89
5.7.1.9. Desprotección del compuesto 107 .....	92
5.7.2. Epimerización de la sinrotólida (29) .....	93
5.7.2.1. Acetilación parcial de la sinrotólida (29) .....	93
5.7.2.2. Oxidación de los compuestos 115 y 116 .....	96
5.7.2.3. Reducción de los compuestos 117-119 .....	97
5.7.2.4. Acetilación de los compuestos 121, 124 y 125 .....	98
5.7.3. Derivatización de los diterpenos .....	100
5.7.3.1. Acetilación total del compuesto 2 .....	102
5.7.3.2. Acetilación parcial del compuesto 2 .....	102
5.7.3.3. Acetilación del compuesto 6 .....	103
5.7.3.4. Acetilación del compuesto 8 .....	103
5.7.3.5. Oxidación del compuesto 2 .....	103
5.7.3.6. Oxidación del compuesto 4 .....	104
5.7.3.7. Preparación de los ésteres C <sub>2</sub> , C <sub>7</sub> -bis-MTPA de 3 y 7 .....	104
5.8. Cálculos de mecánica molecular .....	106
5.9. Ensayos biológicos .....	110
5.9.1. Bioensayo con el gusano barrenador del maíz .....	110
5.9.2. Ensayo de citotoxicidad .....	111

6	RESULTADOS Y DISCUSION .....	113
6.1.	Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico total de las partes aéreas de <i>Hyptis spicigera</i> .....	113
6.2.	Caracterización de la espicigerólida (1) .....	118
6.2.1.	Determinación de la configuración absoluta de la espicigerólida (1) ...	125
6.2.1.1.	Estereoquímica absoluta del centro estereogénico C <sub>6</sub> y C <sub>6'</sub> .....	125
6.2.1.2.	Estereoquímica absoluta de los centros estereogénicos C <sub>3</sub> '-C <sub>5</sub> ' .....	129
6.2.1.3.	Cálculos de mecánica molecular .....	133
6.2.1.3.1.	Minimización energética para los conformeros de la espicigerólida (1) .....	133
6.2.1.3.2.	Cálculo de las constantes de acoplamiento teóricas .....	136
6.2.2.	Obtención del sintón quiral <b>113</b> .....	137
6.2.2.1.	Síntesis de la 2,4-dinitrofenilhidrazona de la L-ramnosa ( <b>96</b> ) ...	138
6.2.2.2.	Síntesis del etilenditioacetal de la L-ramnosa ( <b>99</b> ) .....	148
6.2.2.3.	Síntesis del difenilditioacetal de la L-ramnosa ( <b>104</b> ) .....	156
6.2.3.	Epimerización de la sinrotólida ( <b>29</b> ) .....	179
6.3.	Caracterización de los diterpenos de tipo labdano ( <b>2-8</b> ) .....	199
6.4.	Evaluaciones biológicas .....	219
7.	RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	222
8.	REFERENCIAS .....	224
9.	APENDICE .....	245

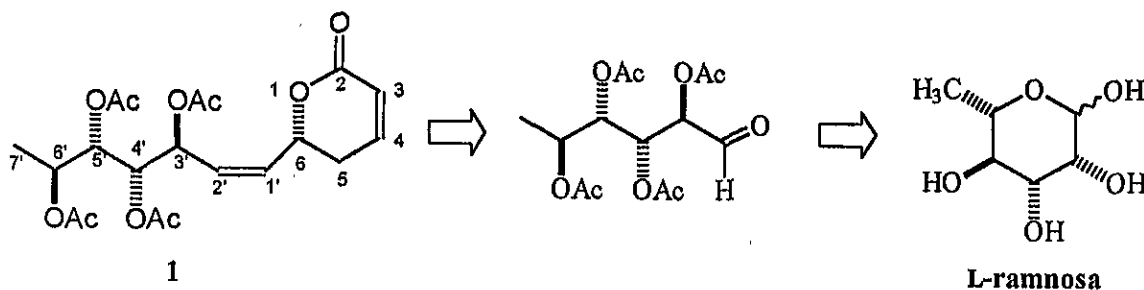


## RESUMEN.

El presente proyecto describe la investigación farmacognóstica que permitió el aislamiento y la caracterización estructural de los principios biodinámicos responsables del potencial citotóxico e insecticida de *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae), una planta que se utiliza principalmente en la agricultura tradicional de las regiones tropicales para evitar la infestación por insectos de los granos almacenados. Esta especie se conoce con el nombre de la hierba del burro en la medicina tradicional mexicana y se utiliza ampliamente en las poblaciones rurales de la costa del Golfo debido a sus bondades antisépticas para el tratamiento de diversas infecciones cutáneas. El estudio fitoquímico biodirigido mediante pruebas de citotoxicidad para la línea celular KB derivada del carcinoma nasofaríngeo humano permitió el aislamiento de una 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona (**1**) como el único principio responsable del potencial antineoplásico de las partes aéreas de esta planta (KB: CE<sub>50</sub> = 1.5  $\mu$ g/mL). Una segunda aproximación que utilizó como modelo biológico la toxicidad para las larvas del gusano barrenador del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae), permitió el aislamiento de los principios insecticidas que correspondieron a siete diterpenos novedosos (**2-8**). La estructura de estos compuestos se elucidó mediante métodos espectroscópicos convencionales y técnicas de RMN de alta resolución (COSY, HMQC y HMBC).

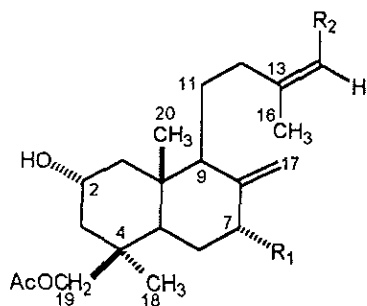
La 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona, denominada con el nombre trivial de espicigerólida (**1**), se elucidó como la 6*R*-[3'*S*,4'*S*,5'*S*,6'*S*-tetracetiloxi-1*Z*-heptenil]-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona. Para el establecimiento de la configuración absoluta de este principio citotóxico se aplicó la siguiente estrategia: a) el efecto Cotton positivo registrado para la transición  $n \rightarrow \pi^*$  (256

nm) en la curva de dicroísmo circular garantizó la configuración  $C_6$  ( $R$ ) para el único centro estereogénico del núcleo de la pirona; b) se estableció la configuración relativa de la cadena lateral mediante la aplicación de cálculos de mecánica molecular. Esta metodología permitió determinar las conformaciones de mínima energía con sus valores correspondientes de  $\Delta H_f$ ,  $E_{MMX}$  y las constantes de acoplamiento  $^1H$ - $^1H$  vecinales para el diastereoisómero correcto ( $3'S,4'S,5'S,6'S$ ) y cuya propuesta estereoquímica se fundamentó en la comparación de los valores  $^3J_{H-H}$  descritos para una serie de peracetatos derivados de hexosas; por último, c) se confirmó la estereoquímica propuesta para la cadena lateral de la espicigerólida (**1**) mediante la correlación química con el sintón quiral 2,3,4,5-tetra-*O*-acetil-L-ramnosa preparado a partir de la L-ramnosa.

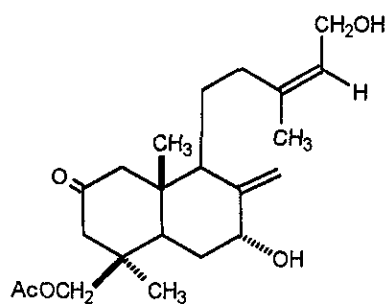


Las estructuras de los diterpenos de tipo labdano se establecieron con base en evidencias espectroscópicas y químicas como: 19-acetoxi-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -15-trihidroxiabda-8(17),13Z-dieno (**2**), 15,19-diacetoxi-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxiabda-8(17),13Z-dieno (**3**), 7 $\alpha$ ,15,19-triacetoxi-2 $\alpha$ -hidroxilabda-8(17),13Z-dieno (**4**), 19-acetoxi-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxiabda-8(17),13Z-dien-15-al (**5**), 19-acetoxi-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona (**6**), 19-acetoxi-7 $\alpha$ ,15-dihidroxiabda-8(17),13Z-dien-2-ona (**7**) y 2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15,19-tetrahidroxi-

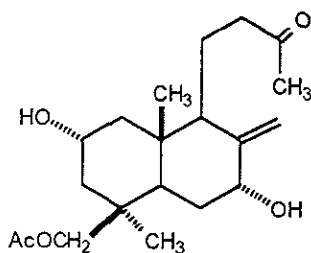
*ent*-labda-8(17),13*Z*-diene (**8**). La configuración absoluta para los esqueletos diterpénicos se estableció mediante la aplicación del método de Mosher. Esta metodología demostró la coexistencia en esta planta medicinal de las dos series labdánicas enantioméricas, i.e., 10-Me $\beta$  para los diterpenos dextrógiros (**2-7**) y 10-Me $\alpha$  para el compuesto levógiro (**8**). Se evaluaron los efectos provocados por cada uno de los diterpenos sobre el crecimiento y la supervivencia de *Ostrinia nubilalis*. De esta manera, se demostró que el compuesto **3** provoca un drástico efecto en el desarrollo larvario de esta plaga del maíz y, por lo tanto, se evidenció el potencial agroquímico para los labdanos del género *Hyptis*.



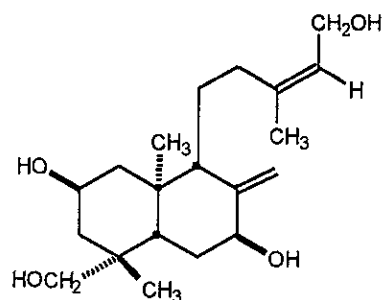
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
2	OH	CH <sub>2</sub> OH
3	OH	CH <sub>2</sub> OAc
4	OAc	CH <sub>2</sub> OAc
5	OH	CHO



**6**



**7**



**8**

## ABSTRACT.

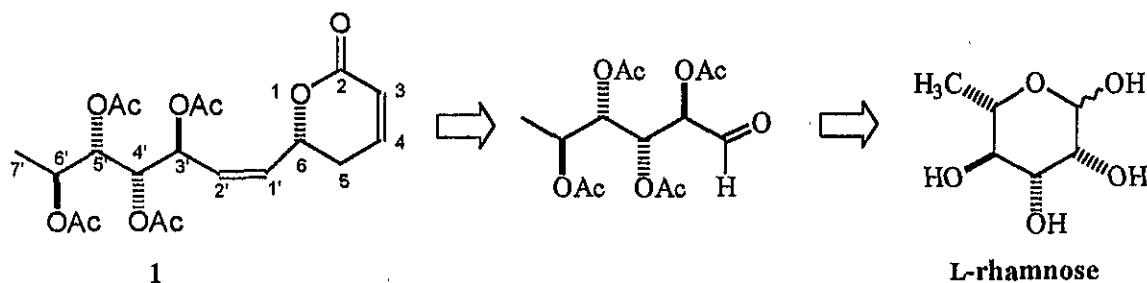
*Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae), a Mexican medicinal plant popularly known as “hierba del burro”, is used by farmers in tropical regions to control insect infestation in stored grains. In the Gulf of Mexico region, this plant is traditionally used as an antiseptic in the treatment of skin infections. Bioactivity-directed fractionation of the extract prepared from this plant tested on KB cells led to the isolation of one 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone (**1**) as the only antineoplastic principle (KB: EC<sub>50</sub> = 1.5  $\mu$ g/mL). Testing the same extract on the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae), led to the isolation of seven new labdane (**2-8**) with insecticidal properties. The structure of these compounds was established on the basis of spectroscopic methods and high-resolution NMR techniques (COSY, HMQC and HMBC).

The cytotoxic 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone, was given the trivial name of spicigerolide (**1**). Its structure was elucidated as 6*R*-[3'*S*,4'*S*,5'*S*,6'*S*-tetraacetyloxy-1*Z*-heptenyl]-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one. The absolute configuration of this active metabolite was determined by using the following methodological sequence:

- a) The positive Cotton effect registered by the transition  $n \rightarrow \pi^*$  (256 nm) in the CD spectra provided evidence for a (*R*)-configuration in the stereogenic center of the pyrone (C<sub>6</sub>);
- b) The relative configuration for the side chain was established by application of molecular mechanics in combination with  $^3J_{\text{H-H}}$  calculations. The comparison with coupling constants of hexa-alditol peracetate models was used as the initial criterion to select the proper diastereoisomer. The minimum energy conformations were found and

their corresponding values of  $\Delta H_f$ ,  $E_{MMX}$  and proton spin-spin coupling constants were established for the correct diastereoisomer (3'S,4'S,5'S,6'S);

- c) The proposed stereochemistry was confirmed by chemical correlation with chiral synthon 2,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-L-rhamnose obtained from L-rhamnose.



The structure of the labdane diterpenes was established on the basis of spectral and chemical evidences as: 19-acetoxy-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15-trihydroxy-17,13Z-diene (2), 15, 19-diacetoxy-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-17,13Z-diene (3), 7 $\alpha$ ,15,19-triacetoxy-2 $\alpha$ -hydroxy-17,13Z-diene (4), 19-acetoxy-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-17,13Z-diene-15-al (5), 19-acetoxy-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy-14,15-dinor-17,13Z-diene-en-13-one (6), 19-acetoxy-7 $\alpha$ ,15-dihydroxy-17,13Z-diene-2-one (7) and 2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15,19-tetrahydroxy-*ent*-17,13Z-diene (8). The absolute configuration of the diterpene skeletons were established by application of Mosher's method. This methodology established the co-occurrence of the normal and enantiomeric series of diterpenes in this medicinal plant, *i.e.* 10-Me $\beta$  for the dextrorotatory diterpenes (2-7) and 10-Me $\alpha$  for the laevorotatory compound (8). Compound 2 significantly inhibited larval growth of the European corn borer. This insecticidal properties represent an evidence for the agrochemical potential of the labdanes from *Hyptis spicigera*.

## LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1.	Secciones del género <i>Hyptis</i> localizadas en México .....	8
Cuadro 2.	Principales triterpenos citotóxicos aislados en el género <i>Hyptis</i> .....	16
Cuadro 3.	Distribución de las C <sub>6</sub> -alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas en el género <i>Hyptis</i> .....	26
Cuadro 4.	Datos de DC para las C <sub>6</sub> -alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas aisladas de las labiadas .....	56
Cuadro 5.	Fraccionamiento primario del extracto total de <i>Hyptis spicigera</i> .....	76
Cuadro 6.	Combinaciones rotaméricas A, B y C para los enlaces C <sub>3</sub> '-C <sub>4</sub> ', C <sub>4</sub> '-C <sub>5</sub> ' y C <sub>5</sub> '-C <sub>6</sub> ' de la espicigerólida (1) .....	108
Cuadro 7.	Desplazamientos químicos en la RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de la espicigerólida (1) .....	124
Cuadro 8.	Comparación de las constantes de acoplamiento de la espicigerólida (1) con la sinrotólida peracetilada (114) y con los desplazamientos químicos de <sup>13</sup> C de la anamarina (42) .....	131
Cuadro 9.	Parámetros registrados para cada uno de los conformeros minimizados de la espicigerólida (1).....	135
Cuadro 10.	Comparación de los valores de las constantes de acoplamiento registradas mediante RMN y las calculadas por la ecuación de Altona para los protones H <sub>3</sub> '-H <sub>6</sub> ' de la cadena lateral de la espicigerólida (1) .....	137
Cuadro 11.	Desplazamientos químicos en la RMN <sup>1</sup> H para los compuestos 96-	

98 .....	143
Cuadro 12. Desplazamientos químicos en la RMN $^{13}\text{C}$ para los compuestos 96-98 .....	144
Cuadro 13. Diferencias en los desplazamientos químicos ( $\Delta\delta$ ) de los valores registrados en $^{13}\text{C}$ para las señales $\text{C}_{3'}$ - $\text{C}_{6'}$ de la cadena lateral de la espigigerólida (1) y la 2,4-dinitrofenilhidrazona 98 .....	145
Cuadro 14. Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ para los compuestos 99-103 .....	155
Cuadro 15. Desplazamientos químicos en la RMN $^{13}\text{C}$ para los compuestos 99-103 .....	156
Cuadro 16. Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ para los compuestos 104, 107 y 108 .....	160
Cuadro 17. Desplazamientos químicos en la RMN $^{13}\text{C}$ para los compuestos 104, 107 y 108 .....	161
Cuadro 18. Comparación de las constantes de acoplamiento registradas por RMN $^1\text{H}$ y calculadas con el programa PCModel. Efectos observados en el espectro NOESY del compuesto 110 .....	164
Cuadro 19. Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para los compuestos 109 y 110 .....	167
Cuadro 20. Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ para los compuestos 105, 106, 111 y 112 .....	171
Cuadro 21. Desplazamientos químicos en la RMN $^{13}\text{C}$ para los compuestos 105, 106, 111 y 112 .....	172

Cuadro 22. Comparación de las constantes de acoplamiento vecinales calculadas y observadas, de las energías mínimas ( $E_{MMX}$ ) y los $\Delta H_f$ de los piranósidos <b>111</b> y <b>112</b> .....	173
Cuadro 23. Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para el compuesto <b>113</b> .....	177
Cuadro 24. Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ para los compuestos <b>114-116</b> .....	184
Cuadro 25. Desplazamientos químicos en la RMN $^{13}\text{C}$ para los compuestos <b>114-116</b> .....	185
Cuadro 26. Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ para los compuestos <b>117-119</b> .....	188
Cuadro 27. Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ para los compuestos <b>121-123</b> .....	191
Cuadro 28. Desplazamientos químicos en la RMN $^{13}\text{C}$ para los compuestos <b>117, 121 y 123</b> .....	192
Cuadro 29. Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ para los compuestos <b>126 y 127</b> .....	195
Cuadro 30. Parámetros registrados para cada uno de los conformeros minimizados de la <i>sinrotólida</i> peracetilada ( <b>114</b> ) .....	198
Cuadro 31. Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ HMQC para el compuesto <b>2</b> . Correlaciones heteronucleares $^{2,3}J_{\text{C-H}}$ (HMBC) .....	203
Cuadro 32. Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ para los compuestos <b>3-6</b> ....	212
Cuadro 33. Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ para los compuestos <b>7, 8,</b>	



128 y 131 .....	215
Cuadro 34. Desplazamientos químicos en la RMN <sup>13</sup> C para los compuestos <b>3</b> , <b>5</b> - <b>8</b> , <b>128</b> y <b>131</b> .....	216
Cuadro 35. Citotoxicidad de los diterpenos aislados de <i>Hyptis spicigera</i> .....	220

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de productos naturales con propiedades antitumorales .....	2
Figura 2. Ejemplos de acetogeninas aisladas de la familia Annonaceae con un alto potencial como agentes antineoplásicos .....	3
Figura 3. Desplazamientos químicos y multiplicidad característicos para los protones olefínicos conjugados del núcleo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona presente en la hiptólida ( <b>40</b> ) .....	33
Figura 4. Multiplicidad observada para el núcleo H <sub>6</sub> de la 5,6-dihidro- $\alpha$ - pirona. Los valores de las constantes de acoplamiento corresponden a la hiptólida ( <b>40</b> ) .....	34
Figura 5. Patrón de multiplicidad ABX para la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona de la pectinólida A ( <b>50</b> ) .....	35
Figura 6. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la 5-desacetiloxi-5'- <i>epi</i> -olguina ( <b>43</b> ) .....	36
Figura 7. Simplificación de las multiplicidades observadas en el espectro de RMN <sup>1</sup> H (A) de la boronólida ( <b>26</b> ) después de la irradiación	

128 y 131 .....	215
Cuadro 34. Desplazamientos químicos en la RMN <sup>13</sup> C para los compuestos 3, 5- 8, 128 y 131 .....	216
Cuadro 35. Citotoxicidad de los diterpenos aislados de <i>Hyptis spicigera</i> .....	220

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de productos naturales con propiedades antitumorales .....	2
Figura 2. Ejemplos de acetogeninas aisladas de la familia Annonaceae con un alto potencial como agentes antineoplásicos .....	3
Figura 3. Desplazamientos químicos y multiplicidad característicos para los protones olefínicos conjugados del núcleo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona presente en la hiptólida (40) .....	33
Figura 4. Multiplicidad observada para el núcleo H <sub>6</sub> de la 5,6-dihidro- $\alpha$ - pirona. Los valores de las constantes de acoplamiento corresponden a la hiptólida (40) .....	34
Figura 5. Patrón de multiplicidad ABX para la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona de la pectinólida A (50) .....	35
Figura 6. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la 5-desacetiloxi-5'- <i>epi</i> -olguina (43) .....	36
Figura 7. Simplificación de las multiplicidades observadas en el espectro de RMN <sup>1</sup> H (A) de la boronólida (26) después de la irradiación	

	selectiva de un protón: B, H <sub>1</sub> , H <sub>2</sub> (δ 5.35); C, H <sub>5ax</sub> (δ 2.28); D, H <sub>5ec</sub> (δ 2.49) .....	38
Figura 8.	Espectro bidimensional <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY de la 5-desacetiloxi-5'- <i>epi</i> -olguina (43) .....	39
Figura 9.	Espectro bidimensional <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HETCOR de la 5-desacetoxi-5'- <i>epi</i> -olguina (43) .....	39
Figura 10.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H bidimensionales COSY de las pectinólidas B (51) y C (52) .....	40
Figura 11.	Espectro de correlación bidimensional heteronuclear <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HETCOR de la pectinólida C (52) .....	41
Figura 12.	Exaltaciones nOe observadas en el acetónido de la sindenólida (30) ...	42
Figura 13.	Patrón de fragmentación de la umuravumbólida (24) inducido mediante impacto electrónico (70 eV) .....	43
Figura 14.	Patrón de fragmentación de la pectinólida A (50) inducido mediante impacto electrónico (20 eV) .....	44
Figura 15.	Promedio de los valores de desplazamiento químico (δ) para el núcleo labdano .....	46
Figura 16.	Porcentaje del incremento de la relajación de las señales producto de los experimentos en la espectroscopía diferencial nOe para el compuesto 86 .....	49
Figura 17.	Curvas de DC (a y b) y de DOR (c y d) con efecto Cotton positivo (a y c) y negativo (b y d) .....	52

Figura 18.	Proyección generada mediante difracción de rayos X de la 5-desacetiloxi-5'- <i>epi</i> -olguina (43) .....	55
Figura 19.	Curvas de DC (MeOH) de las pectinólidas A-C (50-52) .....	57
Figura 20.	Modelo de correlación configuracional para los ésteres ( <i>R</i> )-MTPA (a) y ( <i>S</i> )-MTPA (b), según Dale y Mosher (1973) .....	58
Figura 21.	Conformación de máxima estabilidad y plano del MTPA (a). Modelo para determinar la configuración absoluta en alcoholes secundarios (b) .....	59
Figura 22.	Diferencias en los desplazamientos químicos de los ésteres de Mosher ( $\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$ ) del diterpeno aislado del insecto <i>Ceroplastes pseudocoriferus</i> y de la sinparvólida A (30) .....	60
Figura 23.	La incorporación de <sup>13</sup> C-acetato en la biosíntesis de la aspirona (90) ...	64
Figura 24.	Biosíntesis de psitolina (91) a partir de fenilalanina  .....	65
Figura 25.	Formación de las dos series enantioméricas para el esqueleto de labdano a partir de la unidad isoprenoide .....	67
Figura 26.	Esquema general de estrategias sintéticas para obtener el sintón quiral 113 y subproductos de reacción .....	82
Figura 27.	Secuencia de reacciones para la epimerización de la sinrotólida (29) ...	94
Figura 28.	Reacciones de correlación química de los diterpenos minoritarios (3-6) con el diterpeno principal (2) y obtención de derivados de los productos naturales 6-8 .....	101
Figura 29.	Cromatograma generado mediante CLAR de la subfracción 83-103 que ilustra la separación de los compuestos 2-7 .....	115

Figura 30.	Análisis retrosintético para la obtención de la cadena lateral de la espicigerólida (1) a partir de la L-ramnosa .....	118
Figura 31.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la espicigerólida (1) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	119
Figura 32.	Espectros de RMN <sup>13</sup> C (A) y DEPT (B) de la espicigerólida (1) (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	120
Figura 33.	Espectro de RMN bidimensional COSY de la espicigerólida (1) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	122
Figura 34.	Región de las señales base de oxígeno del espectro de RMN <sup>1</sup> H de la espicigerólida (1) para la asignación de los protones H <sub>3</sub> -H <sub>5</sub> de la cadena lateral .....	123
Figura 35.	Conformaciones enantioméricas alternativas para el núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas .....	126
Figura 36.	Espectro de dicroísmo circular de la espicigerólida (1) .....	127
Figura 37.	Posibilidades diastereoisoméricas y sus carbohidratos de origen para establecer la configuración absoluta de la cadena lateral de la espicigerólida (1) .....	128
Figura 38.	Comparación de los espectros de RMN <sup>1</sup> H de la espicigerólida (1) y la sinrotólida peracetilada (114) .....	130
Figura 39.	Comparación de las constantes de acoplamiento de la cadena lateral de la espicigerólida (1) con aldohexosas y aldonitrilos peracetilados ...	132
Figura 40.	Confórmero de alta inestabilidad energética de la espicigerólida (1) debido a las interacciones 1,3 oxígeno//oxígeno (OAc/OAc) .....	134
Figura 41.	Confórmero de mayor estabilidad energética de la espicigerólida (1) ..	136

Figura 42.	Estrategias sintéticas evaluadas para la obtención del sintón quiral <b>113</b> .....	138
Figura 43.	Productos de acetilación de la 2,4-dinitrofenilhidrazona de la L-ramnosa ( <b>96</b> ) .....	139
Figura 44.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la 2,4-dinitrofenilhidrazona de la L-ramnosa ( <b>96</b> ) (300 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) .....	140
Figura 45.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la 1-(2,3,4-tri- <i>O</i> -acetil-β-L-ramnopiranosil)-2-(2,4-dinitrofenil)hidrazina ( <b>97</b> ) (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	140
Figura 46.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la 2,4-dinitrofenilhidrazona de la 2,3,4,5-tetra- <i>O</i> -acetil-L-ramnosa ( <b>98</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	141
Figura 47.	Proyección generada mediante cristalografía de rayos X de la 1-(2,3,4-tri- <i>O</i> -acetil-β-L-ramnopiranosil)-2-(2,4-dinitrofenil)hidrazina ( <b>97</b> ) .....	142
Figura 48.	Interacción registrada en el espectro NOESY que permitió asignar la estereoquímica ( <i>E</i> ) en el doble enlace del compuesto <b>98</b> .....	142
Figura 49.	Comparación de los espectros de RMN <sup>13</sup> C de la espicigerólida ( <b>1</b> ) y del compuesto <b>98</b> .....	146
Figura 50.	Estrategias de hidrólisis empleadas para recuperar el sintón quiral <b>113</b> .....	147
Figura 51.	Compuestos generados durante la segunda estrategia sintética para obtener el sintón quiral <b>113</b> .....	149
Figura 52.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del etilenditioacetal de la L-ramnosa ( <b>99</b> ) (300 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) .....	150

Figura 53.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del etilenditioacetal de la 2,3,4,5-tetra- <i>O</i> -acetil-L-ramnosa ( <b>100</b> ) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	151
Figura 54.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del etilenditioacetal de la 3,4-di- <i>O</i> -acetil-2,5-anhidro-L-ramnosa ( <b>101</b> ) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	151
Figura 55.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del tetra- <i>O</i> -acetil-1,6-didesoxi-L-manitol ( <b>102</b> ) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	153
Figura 56.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del tri- <i>O</i> -acetil-1,2,6-tridesoxi-L-manitol ( <b>103</b> ) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	153
Figura 57.	Ampliación de las señales geminales a grupos acetoxilo del compuesto <b>102</b> (A); irradiación del $\text{CH}_3$ ( $\delta$ 1.21 d) (B); simulación del espectro con el programa LAOCOÓN PC v. 3.1 (C) .....	154
Figura 58.	Estrategia sintética que permitió la obtención del sintón quiral <b>113</b> y subproductos de reacción .....	157
Figura 59.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del difenilditioacetal de la L-ramnosa ( <b>104</b> ) (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) .....	158
Figura 60.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del difenilditioacetal de la 2,3,4,5-tetra- <i>O</i> -acetil-L-ramnosa ( <b>107</b> ) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	159
Figura 61.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del difenilditioacetal de la 2,5-di- <i>O</i> -acetil-3,4-isopropiliden-L-ramnosa ( <b>108</b> ) (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	159
Figura 62.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del difenilditioacetal de la 3,4-di- <i>O</i> -acetil-2,5-anhidro-L-ramnosa ( <b>109</b> ) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	162
Figura 63.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del difenilditioacetal de la 3,4-di- <i>O</i> -acetil-2,5-anhidro-D-quinovosa ( <b>110</b> ) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	163

Figura 64.	Confórmero energéticamente estable y espectro de RMN $^1\text{H}$ bidimensional homonuclear NOESY del compuesto <b>109</b> .....	165
Figura 65.	Conformación energéticamente estable para el compuesto <b>110</b> .....	166
Figura 66.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del 1-tiofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido ( <b>105</b> ) (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) .....	168
Figura 67.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del 1-tiofenil- $\beta$ -L-ramnopiranosido ( <b>106</b> ) (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) .....	168
Figura 68.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del 2,3,4-tri- <i>O</i> -acetil-1-tiofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido ( <b>111</b> ) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	170
Figura 69.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del 2,3,4-tri- <i>O</i> -acetil-1-tiofenil- $\beta$ -L-ramnopiranosido ( <b>112</b> ) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	170
Figura 70.	Conformación de máxima estabilidad del 2,3,4-tri- <i>O</i> -acetil-1-tiofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido ( <b>111</b> ) .....	174
Figura 71.	Conformación de máxima estabilidad del 2,3,4-tri- <i>O</i> -acetil-1-tiofenil- $\beta$ -L-ramnopiranosido ( <b>112</b> ) .....	175
Figura 72.	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la 2,3,4,5-tetra- <i>O</i> -acetil-L-ramnosa ( <b>113</b> ) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	176
Figura 73.	Comparación de las constantes de acoplamiento para la cadena lateral de la espicigerólida ( <b>1</b> ) con los valores registrados para los derivados acíclicos de la L-ramnosa <b>98</b> , <b>100</b> , <b>107</b> y <b>113</b> y con los valores calculados por Masamune <i>et al.</i> para la manosa .....	178
Figura 74.	Carbohidratos de origen para la sinrotólida peracetilada ( <b>114</b> ), la 5'-	



	<i>epi</i> -acetilsinrotólida ( <b>123</b> ) y la 4'- <i>epi</i> -acetilsinrotólida ( <b>126</b> ) .....	179
Figura 75.	Secuencia sintética para epimerizar los centros estereogénicos C <sub>4</sub> ' y C <sub>5</sub> ' de la sinrotólida ( <b>29</b> ) .....	180
Figura 76.	Cromatograma generado mediante CLAR de la mezcla de reacción obtenida durante la acetilación parcial de la sinrotólida ( <b>29</b> ) .....	181
Figura 77.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la sinrotólida peracetilada ( <b>114</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	182
Figura 78.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la 4'-acetilsinrotólida ( <b>115</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	183
Figura 79.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la 5'-acetilsinrotólida ( <b>116</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	183
Figura 80.	Proyección generada mediante cristalografía de rayos X de la 4'-acetilsinrotólida ( <b>115</b> ) .....	186
Figura 81.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la 4'-acetil-5'-oxosinrotólida ( <b>117</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	187
Figura 82.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la 5'- <i>epi</i> -acetilsinrotólida ( <b>121</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	190
Figura 83.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la 5'- <i>epi</i> -sinrotólida peracetilada ( <b>123</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	190
Figura 84.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la 4'- <i>epi</i> -sinrotólida peracetilada ( <b>126</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	194
Figura 85.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la 3'- <i>epi</i> -sinrotólida peracetilada ( <b>127</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	194

Figura 86.	Comparación de las constantes de acoplamiento de la espicigerólida (1) con los derivados semisintéticos de la sinrotólida (29) y correlación con las constantes de acoplamiento para las aldohexosas reportadas por Masamune <i>et al.</i> (1986) .....	197
Figura 87.	Equilibrio conformacional de la sinrotólida peracetilada (114) .....	200
Figura 88.	Espectros de RMN <sup>13</sup> C (trazo superior) y DEPT del compuesto 2 .....	201
Figura 89.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 2 (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	202
Figura 90.	Espectro de RMN bidimensional homonuclear con filtro de doble coherencia cuántica (DQF-COSY) del compuesto 2 .....	204
Figura 91.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del derivado peracetilado 128 (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	206
Figura 92.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H bidimensional homonuclear NOESY del compuesto 2 .....	207
Figura 93.	Espectro de correlación bidimensional heteronuclear <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H HMBC del compuesto 2 .....	207
Figura 94.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 3 (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	209
Figura 95.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H compuesto 4 (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	209
Figura 96.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 5 (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	211
Figura 97.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 6 (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	211
Figura 98.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 7 (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	213
Figura 99.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 8 (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....	214
Figura 100.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H de los ésteres de Mosher 134 y 135 (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	218

Figura 101	Modelo estereoquímico para los ésteres MTPA en el centro carbinol	
	C <sub>2</sub> del compuesto 7 .....	219
Figura 102.	Evaluación del crecimiento de <i>Ostrinia nubilalis</i> bajo una dieta artificial con el compuesto de prueba 3 a concentraciones de 0 (□), 5(◇), 50(O) y 100(Δ) ppm .....	220

## AGRADECIMIENTOS.

El presente trabajo de investigación se desarrolló mediante el apoyo financiero otorgado a través de las siguientes dependencias: Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA: proyecto IN207300), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT: proyecto 32031N) y Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP: proyectos 005324 y 005381).

A la DGAPA y el CONACyT por las becas otorgadas para la realización de mis estudios de posgrado.

Agradezco al Dr. Carlos Cerda García Rojas, investigador del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) quien fungió como coasesor del presente trabajo, por su diligente colaboración durante la obtención de los derivados de la sinrotólida y la L-ramnosa y por sus valiosos comentarios que enriquecieron sustancialmente la discusión de los resultados experimentales.

A la Dra. Rachel Mata, investigadora de la Facultad de Química, UNAM, por su constante interés y sus acertados comentarios durante el desarrollo del presente proyecto y en la revisión del manuscrito de tesis.

A la Dra. María Luisa Villarreal por su ayuda durante la estandarización de las técnicas básicas de cultivo celular en nuestro laboratorio.

A las Q.F.B. Graciela Chávez y Maricela Gutiérrez por el registro de los espectros de IR y los espectros de rotación óptica de los diterpenos. Al Q.F.B. Oscar Yañez Muñoz, la Q.F.B. Rosa Isela Del Villar Morales y la M. en C. Nuria Esturau Escofet por el registro de algunos espectros de RMN (300 MHz). A la Q. Georgina Duarte por el registro de los

espectros de masas de alta resolución. Todos ellos miembros de la USAI, Facultad de Química, UNAM.

A las M. en C. Isabel Chavéz y Beatriz Quiroz (Instituto de Química, UNAM), por el registro de algunos de los espectros de RMN de los diterpenos (300 y 500 MHz).

Al M. en C. Atilano Gutiérrez (UAM-Iztapalapa) por el registro de los espectros de RMN (500 MHz) de los derivados de la sinrotólida y de la L-ramnosa.

A los miembros del comité tutorial integrado por la Dra. Rachel Mata Essayag y el Dr. Guillermo Delgado Lamas y al jurado asignado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus comentarios y observaciones.

De manera muy especial, al Dr. Rogelio Pereda por su invaluable dirección de la presente investigación, por todo el tiempo dedicado en cada una de las etapas de mi formación académica, por su constante interés y el apoyo brindado desde siempre.

# DEDICATORIAS

A mis hijas:

Karen Sofia y Blanca Mabel

A mi esposo:

Juan Jaime

A mis padres:

Benjamín Fragoso y Antonieta Serrano

A mis hermanos:

Juan

Matilde

Guillermo

Aaron

Sofia

Rafael

Verónica

Benjamín

Mariano

Por el apoyo incondicional que siempre me han brindado.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios 123 y 124, en especial a Moustapha Bah y Daniel Chávez, quienes siempre serán un ejemplo a seguir.

A los profesores del Departamento de Farmacia:

Dra. Isabel Aguilar, Dr. Eugene A. Bratoeff, Dr. Rafael Castillo, Dr. Francisco Hernández y M. en C. Alicia Hernández.

Al Dr. Carlos Cerda, con admiración y respeto.

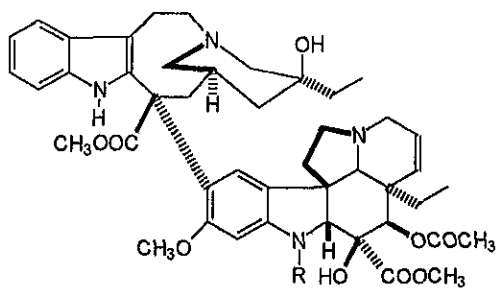
Al Dr. Rogelio Pereda por su amistad y su constante ejemplo de superación académica.

# 1. INTRODUCCION

Las plantas superiores han constituido una fuente asequible de productos naturales bioactivos de utilidad en la medicina y la agricultura. El descubrimiento de compuestos biodinámicos novedosos permite la caracterización química y biológica de entidades susceptibles de comercialización *per se* y, de manera adicional, provee de estructuras prototipo para el desarrollo de derivados sintéticos con una actividad biológica selectiva y una reducida toxicidad (Cordell *et al.*, 1991; Cragg, 1994).

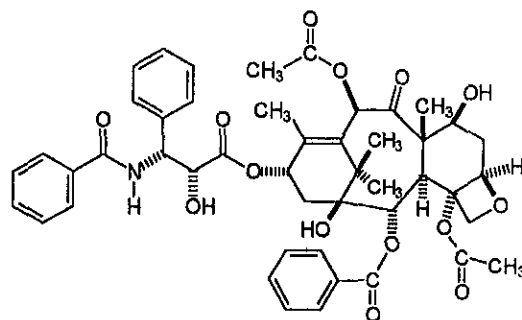
En especial, la evaluación de los extractos provenientes de plantas superiores continúa representando una alternativa para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos de interés clínico en el tratamiento de enfermedades neoplásicas y, sobre todo, para aquellos de tipo refractario como el cáncer de mama, pulmón, colón y próstata (Kinghorn, 1995). Los agentes quimioterapéuticos de mayor uso comprenden un grupo numeroso de compuestos de origen natural y semisintético de gran diversidad estructural que son efectivos en aquellas células cancerosas con un alto ritmo de crecimiento. Así, la mayoría de estos productos naturales con propiedades antitumorales que en la actualidad representan un gran valor en la clínica son de origen vegetal (Cragg, 1993; Nicolau, 1994; Potier, 1992). Algunos ejemplos importantes debido a sus propiedades terapéuticas son los alcaloides de la vinca, la vincristina (Oncovin®) y la vinblastina (Velban®), aislados de *Catharantus roseus* (Apocynaceae); y el plácitaxel (Taxol®), aislado de la corteza de varias especies de *Taxus* (Taxaceae). Las estructuras de estos principios antitumorales se ilustran en la figura 1.





Vincristina R = CHO

Vinblastina R = CH<sub>3</sub>

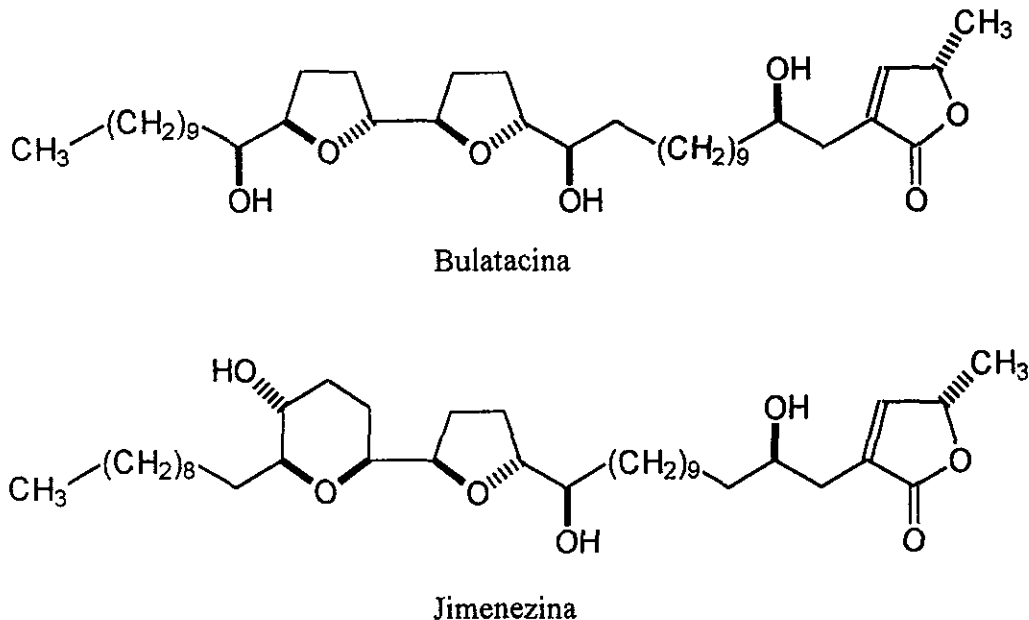


Taxol

**Figura 1.** Ejemplos selectos de productos naturales con propiedades antitumorales.

Una de las principales metas asociadas a todos los programas institucionales enfocados al descubrimiento de agentes antineoplásicos de origen vegetal es el hallazgo de principios activos con una alta selectividad en sus mecanismos de acción. Estos agentes deberán desarrollar una baja toxicidad para los tejidos normales de alta proliferación. Por ejemplo, el descubrimiento reciente de un grupo de compuestos de origen vegetal con un alto potencial como agentes antineoplásicos, las acetogeninas aisladas de la familia de las anonáceas, *e.g.* la bulatacina (fig. 2), ha permitido la exploración biomédica de estos agentes citotóxicos y el establecimiento de su mecanismo de acción. La jimenezina, aislada de la anonácea mexicana *Rollinia mucosa*, constituye una estructura novedosa con actividad citotóxica sobre seis líneas celulares derivadas de tumores humanos (Chávez-Velazco, 1998). Desde el punto de vista bioquímico, las acetogeninas son unos potentes inhibidores de la NADH ubiquinona reductasa, una enzima de gran importancia del proceso de fosforilación oxidativa en las mitocondrias (Ahmmadsahib *et al.*, 1993) y, también,

interrumpen la respiración mitocondrial a través de la inhibición de la oxidoreductasa dependiente de NADH-citocromo C (Oberlies *et al.*, 1997).



**Figura 2.** Ejemplos de acetogeninas aisladas de la familia Annonaceae con un alto potencial como agentes antineoplásicos.

El género *Hyptis*, un miembro de la familia de las labiadas (*Lamiaceae*), se encuentra conformado por un gran número de especies de gran importancia económica y medicinal en la vida diaria de nuestro país. Un programa destinado a establecer el potencial citotóxico de algunas de estas especies útiles en la medicina tradicional mexicana, demostró la presencia de compuestos antineoplásicos potentes ( $CE_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ ) caracterizados como 6-poliaciloxialqueni-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas (Pereda-Miranda, 1995). Estas investigaciones demostraron un efecto citotóxico específico de estos principios para los carcinomas de colon y ovario, *e.g.* las pectinólidas ( $CE_{50} < 0.01 \mu\text{g/mL}$ ) de *Hyptis pectinata* (Pereda-

Miranda, 1993). De tal suerte que las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de las labiadas han sido seleccionadas para su posterior evaluación en modelos murinos *in vivo* con el objetivo de establecer su potencial como agentes antitumorales de posible aplicación terapéutica.

La presente disertación surgió como parte de un programa de investigación titulado "Evaluación del potencial citotóxico de especies selectas del género *Hyptis* (Lamiaceae) como una fuente potencial de agentes terapéuticos". La selección de cada una de las especies que han sido sometidas a investigación fitoquímica se realizó a través de una propuesta fundamentada en criterios quimiotaxonómicos en conjunto con los resultados de las evaluaciones preliminares de su potencial citotóxico (Hernández de Jesús, 1991; Villavicencio González, 1993; Novelo Torres, 1994). La aplicación de este enfoque garantiza la obtención de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas bioactivas a partir de la especie propuesta para el desarrollo del presente estudio, *Hyptis spicigera*.

Los resultados reunidos en esta tesis han quedado integrados en dos partes: la primera incluye el estudio fitoquímico de *Hyptis spicigera* Lam. que permitió el aislamiento de una 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona citotóxica, la espicigerólida (1), y de siete diterpenos labdánicos (2-8) con propiedades insecticidas; la segunda parte discute la aplicación de la mecánica molecular para el cálculo de las constantes de acoplamiento vecinales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  en la elucidación estereoquímica de la espicigerólida (1).

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1. Generalidades de la familia.

La familia Lamiaceae se compone de aproximadamente 224 géneros y 5600 especies. Una de las características anatómicas de la familia es la presencia de glándulas secretoras de aceites esenciales en los tejidos epidérmicos foliares. Los aceites de estas glándulas proporcionan a estas especies su aroma.

Los integrantes de esta familia se distribuyen en los trópicos, subtropicos y en las zonas templadas del mundo, abarcando desde el Mediterráneo hasta el centro de Asia Central, América, las islas del Pacífico, Africa tropical y China.

En México, la familia está representada abundantemente por más de 512 especies y 27 géneros que pertenecen a seis tribus. La tribu más diversa es Mentheae con 11 géneros; sin embargo, la tribu Salviae, representada por dos géneros (*Monarda* y *Salvia*), es la que presenta una mayor riqueza en número de especies, contribuyendo con el 64% del total de las labiadas de México (Ramamoorthy, 1984). Se les encuentra predominantemente en las montañas, aunque son muy numerosas en casi todos los tipos de vegetación en condiciones tan variables como las tierras bajas tropicales, los desiertos y las áreas alpinas (Ramamoorthy *et al.*, 1998).

Las labiadas son de gran importancia económica debido a su utilidad en la gastronomía (*Origanum*), en la medicina tradicional (*Salvia*, *Thymus*), en las industrias farmacéutica (*Mentha*, *Melissa*), de la cosmética (*Ocimum*) y de la perfumería (*Lavandula*), además de que se cultivan en jardines como plantas ornamentales (Pereda-Miranda, 1995).

En la industria farmacéutica, los aceites esenciales de las labiadas se utilizan principalmente para preparar formulaciones galénicas simples, en formas farmacéuticas orales y también se emplean como principios activos en formulaciones antisépticas externas. En el sector químico, se utilizan en la síntesis de fármacos, de vitaminas o de sustancias aromatizantes, entre otras (e.g. pinenos, (+) y (-)-linalol, eugenol). En la perfumería, la cosmetología y en productos para la higiene se aprovechan ampliamente debido a las propiedades aromáticas y antisépticas. En la industria alimentaria, por sus cualidades saborizantes se emplean en la preparación de diferentes productos, por ejemplo, bebidas no alcohólicas, confitería, sopas, salsas, carnes y en alimentos para animales (Bruneton, 1993).

En la medicina tradicional se emplean los extractos y los aceites esenciales de las labiadas por sus actividades antibacterianas, antivirales, antifúngicas, nematocidas, carminativas y espasmolíticas (Bruneton, 1993; Heinrich, 1992; Wagner, 1977). Tal vez, las materias primas de mayor importancia económica obtenidas a partir de las labiadas son la hierbabuena (*Mentha spicata* L.) y la menta (*Mentha piperita* L.), ampliamente utilizadas como agentes saborizantes, especialmente en goma de mascar y para la higiene dental.

Las labiadas de mayor importancia económica en el centro y el sur de América están representadas por *Ocimum basilicum* (la albahaca), *Lavandula angustifolia* L., *Marrubium vulgare* L. (el marrubio blanco), *Melissa officinalis* L., *Mentha* spp., *Rosmarinus officinalis* L. (el romero), *Pongostemon cablin* Benth., *Salvia officinalis* L. (la salvia), *Thymus* spp. (el tomillo) y, *Origanum vulgare* (el orégano) (Heinrich, 1992). Por ejemplo, la utilidad de *Ocimum basilicum* en diferentes industrias se debe a la composición química de sus aceites esenciales, los cuales contienen terpenoides y compuestos aromáticos tales como: el

estragol, el cineol, el linalol y el metil-eugenol, entre otros (Bruneton, 1993; Pereda-Miranda, 1993), y se emplea en la medicina tradicional principalmente por sus propiedades antiespasmódicas, vermífugas, carminativas, antiinflamatorias, digestivas, diuréticas, fungicidas, etc. (Martínez, 1993). De *Lavandula angustifolia* se obtiene el aceite esencial de lavanda, de gran utilidad en la perfumería y la cosmetología, este aceite está constituido principalmente por el linalol, el acetato de linalilo y el cineol (Bruneton, 1993). *Marrubium vulgare* L. se utiliza principalmente en la medicina tradicional contra catarrros, el asma, la tos rebelde, la obesidad, las enfermedades del hígado, la bilis, como vermífugo, febrífugo, antiespasmódico, diurético y astringente (Martínez, 1993).

En particular, el género *Hyptis* comprende varias especies de gran importancia en la medicina tradicional mexicana (e.g. *Hyptis suaveolens*, la chía; *Hyptis albida*, la salvia blanca) (Pereda-Miranda, 1995). Este género, con más de 250 especies, tiene su centro de origen y diversificación en las tierras altas brasileñas siendo el límite en su distribución boreal el sur de los Estados Unidos (Epling, 1949). El género se encuentra dividido en 27 secciones y, en México, se localizan ocho secciones (Cuadro 1) que agrupan a 33 especies, siendo endémicas del país sólo 22 especies (Epling, 1949). Estas especies se distribuyen principalmente en las partes tropicales del sur y a lo largo de ambas costas del territorio nacional. Las secciones *Rhytidea*, *Umbellatae* y *Laniflorae* son las más notables en México y se localizan en el oeste, el occidente y el centro del país. Las secciones *Minthidium*, *Mesosphaeria* (subsecc. *Pectinaria*), *Polydesmia* (subsecc. *Vulgaris*), *Cephalohyptis* (subsecciones *Marrubiastrae* y *Genui*) y *Pusillae* tienen una distribución tropical en el sur de la república mexicana (Ramamoorthy *et al.*, 1998).

**Cuadro 1.** Secciones del género *Hyptis* localizadas en México.

Sección	Número total de especies de la sección	Número de especies de México	Número de especies endémicas de México
<i>Rhytidea</i>	2	2	2
<i>Umbellatae</i>	3	2	2
<i>Laniflorae</i>	6	6	5
<i>Minthidium</i>	11	3	2
<i>Mesosphaeria</i>			
Subsecc. <i>Pectinaria</i>	14	6	5
Subsecc. <i>Spicaria</i>	1	1	
<i>Polydesmia</i>			
Subsecc. <i>Vulgaris</i>	11	2	1
<i>Cephalohyptis</i>			
Subsecc. <i>Marrubiastrae</i>	25	4	1
Subsecc. <i>Genui</i>	20	6	4
<i>Pusillae</i>	4	1	
Total	97	33	22

## 2.2. Etnobotánica del género *Hyptis*.

El género *Hyptis* cuenta con un gran número de especies utilizadas en la medicina tradicional mexicana como remedios caseros para el tratamiento de malestares gastrointestinales e infecciones de la piel, así como, para tratar dolores reumáticos, musculares y calambres. Sin embargo, todas las especies medicinales comparten su uso como agentes carminativos y antisépticos (Pereda-Miranda, 1995). En México, las hojas de *Hyptis albida* se utilizan para tratar infecciones del oído y para dolores reumáticos (Martínez, 1993). *Hyptis capitata* se utiliza como hemostático y para curar heridas en Colombia. En Costa Rica, una infusión de las hojas se utiliza como carminativo y tópicamente para tratar el dolor de muelas. En El Salvador, esta planta se utiliza para tratar

enfermedades gastrointestinales, para infecciones de la piel, la fiebre intermitente y la hinchazón de las piernas. Esta planta se utiliza como remedio para la insolación en Venezuela. *Hyptis mutabilis* se utiliza en Colombia para el tratamiento del paludismo, la infusión de hojas y flores se utiliza contra dolores estomacales y flatulencias. En Argentina, se utilizan las hojas contra parásitos intestinales. La raíz se emplea para detener la menstruación excesiva y en combinación con otras plantas para estimular el apetito. *Hyptis pectinata* se utiliza ampliamente en América Central para el tratamiento del reumatismo y para el tratamiento de problemas estomacales. En México, se utilizan las hojas frescas en inhalaciones en caso de congestión pulmonar y rinosfaringitis, usos que ponen en evidencia las propiedades antibacterianas y antimicóticas de los componentes bioactivos de la planta (Villavicencio González, 1993). *Hyptis suaveolens* se utiliza en Cuba como estimulante y carminativo; en Africa, el humo de la corteza se utiliza como repelente de insectos (Palsson y Jaenson, 1999). En México, se utiliza para curar algunas afecciones intestinales, contra el estreñimiento y contra la bilis (Martínez, 1993). *Hyptis verticillata* se utiliza para tratar desórdenes gastrointestinales, tales como el dolor de estómago, la indigestión, los cólicos y los parásitos gastrointestinales, también se utiliza contra infecciones de la piel y para eliminar las verrugas (Heinrich, 1992).

Un programa de evaluación del potencial antimicrobiano y citotóxico de las especies medicinales mexicanas del género *Hyptis* (*Hyptis albida*, *Hyptis mutabilis*, *Hyptis pectinata*, *Hyptis suaveolens* e *Hyptis verticillata*), que se llevó a cabo en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química en la Universidad Nacional Autónoma de México, demostró una correlación directa entre los extractos bioactivos y la presencia de principios citotóxicos (Pereda-Miranda, 1995). De las cinco especies estudiadas, se observó que los



extractos orgánicos con un mayor potencial de actividad biológica fueron los obtenidos a partir de *Hyptis pectinata* e *Hyptis verticillata*, los cuales demostraron una fuerte actividad inhibitoria contra bacterias gram positivo (7-10 mm de la zona de inhibición del crecimiento) y fueron citotóxicos contra la leucemia linfocítica de mûridos (P-388) a una concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) de 2.2 y 4.6 µg/mL, respectivamente y un panel de ocho líneas celulares derivadas de tumores humanos (CE<sub>50</sub> 0.3-4.6 µg/mL). El fraccionamiento biodirigido del extracto de *Hyptis verticillata* utilizando la línea celular murina P-388 como bioensayo que permitiera detectar la citotoxicidad, permitió el aislamiento de diez lignanos del tipo de la podofilotoxina, con actividades citotóxicas no específicas (CE<sub>50</sub> < 0.01 µg/mL) y algunos de ellos fuertemente inhibitorios sobre el crecimiento de *Candida albicans* (CE<sub>50</sub> 0.2-1.0 µg/mL), resultados que pueden asociarse fácilmente con los atributos medicinales de esta especie (Novelo *et al.*, 1993). El estudio fitoquímico del extracto de *Hyptis pectinata*, evaluando la actividad antimicrobiana para el fraccionamiento biodirigido, permitió el aislamiento de cuatro 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas (las pectinólidas A-C, 50-52 y la hiptólida 40), las cuales presentaron una alta actividad antimicrobiana (concentración mínima inhibitoria, MIC 4-10 µg/mL) y demostraron actividad citotóxica no específica (CE<sub>50</sub> < 4 µg/mL) en contra de un panel de líneas celulares derivadas de tumores humanos y la leucemia P-388 (Pereda-Miranda, 1995).

Otro uso tradicional de estas especies consiste en mezclar las plantas con los alimentos que almacenan los granjeros de diversas regiones del trópico de América y de Africa, para controlar la infestación por insectos de sus cosechas almacenadas. Se han realizado varias investigaciones enfocadas a la evaluación de extractos orgánicos y de compuestos puros de algunas de estas especies las cuales demostraron sus propiedades

repelentes (Palsoon y Jaenson, 1999) y antidegustativas. *Hyptis urticoides* presenta un efecto antidegustativo sobre las larvas del gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*) e *Hyptis suaveolens* demostró un efecto tóxico contra el mosquito doméstico (*Culex quinquefasciatus*) (Rodríguez Hernández, 1982). En México, las especies del género *Hyptis* utilizadas por sus propiedades insecticidas son: *Hyptis capitata*, *Hyptis emoryi*, *Hyptis verticillata* e *Hyptis albida* (Altschul, 1973).

## **2.3. Descripción de *Hyptis spicigera*.**

### **2.3.1. Características botánicas.**

*Hyptis spicigera* Lam., se conoce popularmente como hierba del burro, tiene forma de espigas muy densas, continuas, el cáliz imbricado, de tallos generalmente ramificados y de hojas ovoides. Es una maleza anual comúnmente menor de un metro de alto, llegando a alcanzar hasta 3 m, más o menos ramificada, delicadamente hirsuta con pelos diminutos y escabrosos sobre los ángulos; láminas foliares estrechamente ovadas u ovales, de 3-8 cm de largo, agudos en el ápice, uniformemente estrechados en la base, irregularmente aserrados, ambas superficies semiglabras, menuda y delicadamente hirsutas a lo largo de las venas; pecíolos de 1-3 cm de largo; flores apretadas en espigas densas, hasta de 8 cm de largo a la madurez y de 1.5 cm de diámetro; bracteolas lineares, bastante rígidas para la sección, ciliado pectinadas, de 3.5-4 cm de largo; tubo del cáliz en flor turbinado, levemente hispido de 1.5 mm de largo, los dientes lineares, erectos, casi de 2 mm de largo, el tubo maduro de 5 mm de largo; núculos de 1.3 mm de largo (Epling, 1949).

### **2.3.2. Etnobotánica.**

*Hyptis spicigera* Lam., al igual que otras especies de este género, se emplea en la medicina tradicional mexicana como un remedio para múltiples propósitos, principalmente por sus propiedades antisépticas y carminativas. Las infusiones de toda la planta se utilizan para el tratamiento de enfermedades infecciosas de la piel y como cicatrizante (Martínez, 1993). En Africa, se utiliza ampliamente no sólo en la medicina tradicional, sino para condimentar los alimentos y como insecticida para controlar la infestación de cosechas almacenadas (Kini *et al.*, 1993) o para repeler mosquitos al quemar la planta completa (Aycard *et al.*, 1993).

Los granjeros de las regiones tropicales de América y de Africa controlan la infestación por insectos de los granos almacenados mezclándolos con la planta completa. La evaluación del extracto etanólico de esta planta permitió establecer sus propiedades repelentes y antidegustativas, al observarse una reducción en la oviposición y la eclosión de las larvas del gorgojo del frijol, *Acanthoscelides obtectus* (Lambert *et al.*, 1985).

### **2.3.3. Distribución.**

Esta especie se encuentra extensamente distribuida a través de los trópicos de ambos hemisferios. En América, se distribuye desde el norte de México, Cuba y las Antillas hasta Brasil y el norte de Argentina (Epling, 1949).

## **2.4. Fitoquímica del género *Hyptis*.**

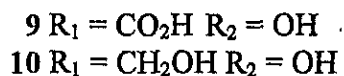
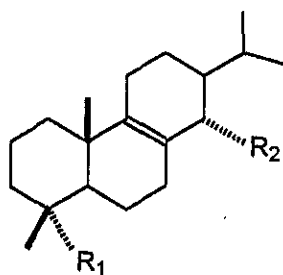
Desde el punto de vista fitoquímico, las plantas del género *Hyptis* poseen una gran diversidad de constituyentes químicos y los usos populares de estas especies son un reflejo

de la amplia diversidad en el metabolismo secundario de estas plantas. Aún cuando las 27 secciones del género se han agrupado con base en la combinación de varios caracteres taxonómicos (Epling, 1949), se ha detectado que estos grupos también se correlacionan desde el punto de vista fitoquímico, como ocurre con la sección *Mesosphaeria*, que se ha caracterizado por la presencia de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas.

#### 2.4.1. Terpenoides.

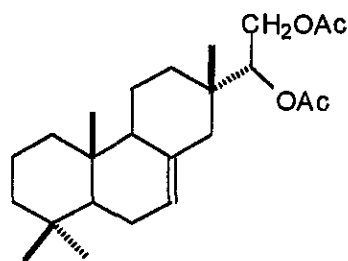
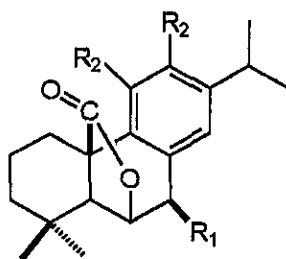
Estas especies se caracterizan por ser ricas en aceites esenciales, cuyos constituyentes de naturaleza terpenoide varían ampliamente no sólo entre las diferentes especies, también se observa una gran variabilidad intraespecífica, es decir, entre las mismas especies colectadas en zonas geográficas diferentes (Iwu *et al.*, 1990). Se han aislado monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos tricíclicos con núcleos de abietano y pimarano y triterpenos pentacíclicos.

Del aceite esencial de las hojas e inflorescencias de *Hyptis spicigera* se aislaron 34 compuestos, encontrándose en un mayor porcentaje a los monoterpenos  $\alpha$ -pineno y sabineno y a los sesquiterpenos  $\beta$ -cariofileno y  $\alpha$ -humuleno (Kini *et al.*, 1993). Por otro lado, se encontró que el aceite esencial de una especie africana de *Hyptis suaveolens* inhibió el crecimiento de bacterias *gram* positivo y *gram* negativo, además de algunas levaduras y hongos; posteriormente, se caracterizaron 32 compuestos, siendo los principales constituyentes los sesquiterpenos, el 4,11,11-trimetil-8-metilenbicyclo[7.2.0]undec-4-eno y el  $\alpha$ -cariofileno (Iwu *et al.*, 1990). A partir de las hojas de una colecta norteamericana de esta especie, se aislaron dos diterpenos, el ácido suaveólico (9) y el suaveolol (10) (Manchand *et al.*, 1974).

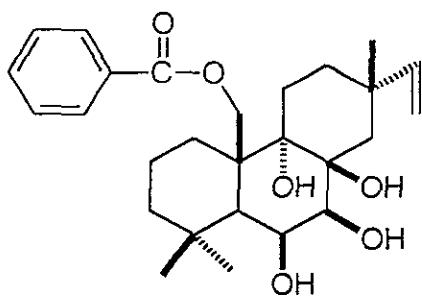


El análisis del aceite esencial de las hojas de *Hyptis pectinata* demostró la presencia del timol como el constituyente mayoritario y, probablemente, este constituyente sea el responsable de las propiedades antisépticas de esta esencia (Pereda-Miranda *et al.*, 1995).

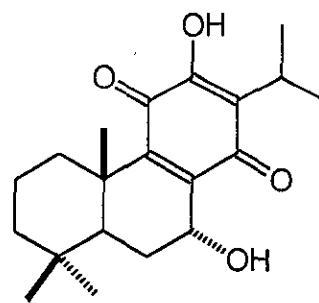
De las hojas de *Hyptis dilatata* se aislaron diterpenos tricíclicos con esqueleto abietano (e.g. compuestos **11** y **12**) y pimarano (e.g. **13**) (Urones *et al.*, 1998). Un diterpeno de tipo isopimarano, el (-) salzol (**14**) se aisló de las hojas de *Hyptis salzmanii*, este compuesto presentó una actividad antimicrobiana marginal contra *Bacillus subtilis* (Messana *et al.*, 1990). De las raíces de *Hyptis fruticosa* se aislaron tres diterpenos de abietano con núcleos aromáticos quinoides, la horminona (**15**), el hiptol (**16**) y la 14-metoxitaxodiona (**17**), este último con actividad citotóxica (Marletti *et al.*, 1976; Delle Monache *et al.*, 1977).



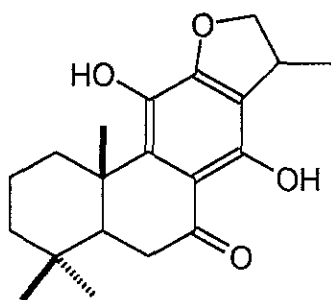
13



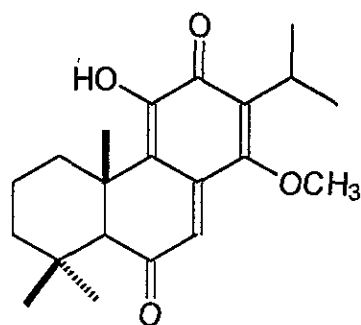
14



15



16



17

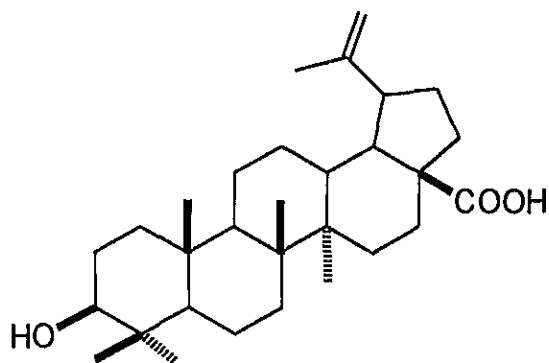
Los triterpenoides constituyen los productos del metabolismo secundario más abundantes y ampliamente distribuidos entre las especies del género *Hyptis* (Cuadro 2) y representan derivados pentacíclicos con diferentes grados de oxidación de los esqueletos básicos de lupano, oleanano y ursano (Pereda-Miranda, 1988).

Se ha sugerido que la actividad citotóxica detectada durante el fraccionamiento biodirigido de los extractos orgánicos derivados de remedios tradicionales pertenecientes a la familia de las labiadas se asocia con la presencia de grandes cantidades de triterpenoides moderadamente citotóxicos, entre los que se encuentran los ácidos betulínico (18), oleanoico (19), ursólico (20), 2 $\alpha$ -hidroxiursólico (21), pomólico (22) y el lupeol (23) (Pereda-Miranda, 1995). Los compuestos 19 y 22 presentan actividad anti-HIV; CE<sub>50</sub> = 1.7  $\mu$ g/mL y 1.4  $\mu$ g/mL, respectivamente (Kashiwada *et al.*, 1998; Palsson y Jaenson, 1999).

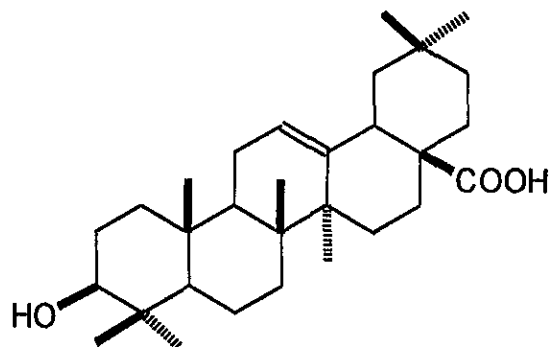
**Cuadro 2.** Principales triterpenos citotóxicos aislados en el género *Hyptis*.

Compuesto	Fuente*	Referencia
19	HA, HE, HS, HT	Pereda-Miranda y Delgado, 1990; Sheth <i>et al.</i> , 1972; Misra <i>et al.</i> , 1981; Kingston <i>et al.</i> , 1979.
20	HA, HC, HV	Pereda-Miranda y Delgado 1990; Almtorp <i>et al.</i> , 1991; Novelo <i>et al.</i> , 1993.
21	HA, HC, HM, HV	Pereda-Miranda y Delgado, 1990; Almtorp <i>et al.</i> , 1991; Pereda-Miranda, 1988; Novelo <i>et al.</i> , 1993.
22	HM	Pereda-Miranda y Gascón-Figueroa, 1988
23	HM	Pereda-Miranda y Gascón-Figueroa, 1988

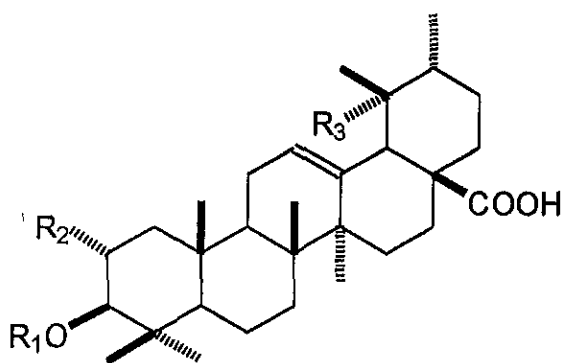
\*HA = *Hyptis albida*, HC = *Hyptis capitata*, HE = *Hyptis emoryi*, HM = *Hyptis mutabilis*, HS = *Hyptis suaveolens*, HT = *Hyptis tomentosa*, HV = *Hyptis verticillata*.



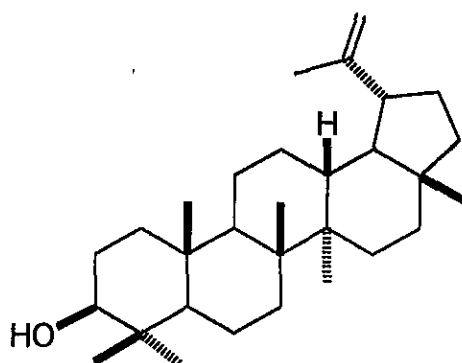
18



19



- 20 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H  
 21 R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH  
 22 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = OH



23

#### 2.4.2. 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas.

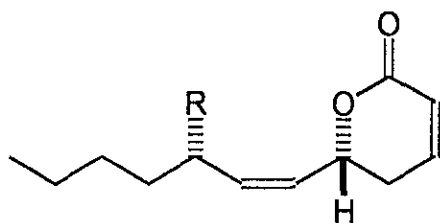
Las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas y en los hongos. En las plantas, estos compuestos se asocian particularmente con las familias Lamiaceae, Piperaceae, Lauraceae y Annonaceae. Se han aislado a partir de todas las partes de la planta (Davies-Coleman y Rivett, 1989). Se encuentran sustituidos en la posición 6 con un alquilo, un alquenilo o un arilo y, ocasionalmente, están sustituidos en otras posiciones del núcleo de  $\alpha$ -pirona, e.g. C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub>. Muchos de estos compuestos poseen actividad biológica, exhibiendo fitotoxicidad, citotoxicidad contra células tumorales además de actividad antimicrobiana y antifúngica (Collet *et al.*, 1998). Estas propiedades se encuentran asociadas al poder alquilante del núcleo de la  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada (Pereda-Miranda, 1995).

##### 2.4.2.1. 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas C<sub>6</sub> sustituidas aisladas de las labiadas.

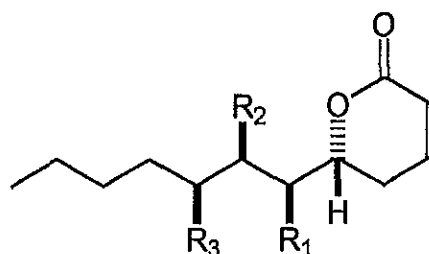
De la familia Lamiaceae se han aislado 29 compuestos con diferentes grados de oxigenación en la cadena lateral. Los compuestos más simples son la umuravumbólida (**24**) y la desacetilumuravumbólida (**25**), aisladas de especies del género *Tetradenia*. La configuración del doble enlace exocíclico se propuso originalmente como *trans* debido a la banda de absorción intensa en el IR a 965 cm<sup>-1</sup> (Van Puyvelde *et al.*, 1979). Sin embargo, el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución permitió establecer que el doble enlace presenta una estereoquímica *cis*. La configuración 3'(S) del centro quiral acíclico se estableció mediante la aplicación del método de Mosher (Davies-Coleman y Rivett, 1995).



La boronólida (26) se ha aislado de *Tetradenia fruticosa* y *Tetradenia barberae*. La configuración (*R*) para el carbono 6 se propuso mediante la aplicación de la regla de Snatzke para lactonas al observarse un efecto Cotton positivo a 256 nm al registrar el dicroísmo circular (DC) y la conformación relativa de los otros centros quirales se estableció mediante cristalografía de rayos X. La configuración absoluta de esto últimos se logró establecer por degradación química hasta el ácido D-málico (Davies-Coleman *et al.*, 1987). Dos compuestos relacionados a la boronólida son sus derivados desacetilados, la desacetilboronólida (27) y la 1,2-didesacetilboronólida (28) aislados de *Tetradenia riparia*, una planta medicinal utilizada en Africa central. La estructura de estos compuestos se estableció por RMN protónica ( $^1\text{H}$ ) y espectrometría de masas (EM) (Van Puyvelde *et al.*, 1979; 1981). Se han reportado tres rutas sintéticas para obtener la (+)-boronólida (26), en la primera estrategia, se sintetizó el racemato al utilizar el dímero acroleína (Jefford y Moulin, 1991). El producto natural (+)-boronólida se logró sintetizar partiendo de la D-glucosa (Nagano y Yasui, 1992) y también por síntesis asimétrica a partir del acetileno  $\text{CH}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{OH}$  (Honda *et al.*, 1996).



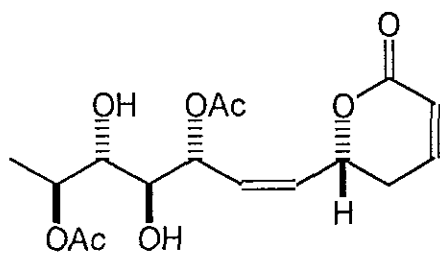
24    R = OAc  
25    R = OH



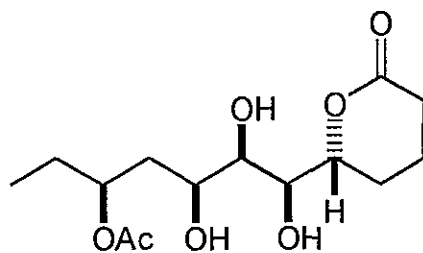
26    R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OAc  
27    R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH  
28    R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = OAc

De las hojas de *Syncolostemon rotundifolius* se aisló la sinrotólida (**29**), su estructura se estableció a través de experimentos de doble resonancia, mientras que la estereoquímica relativa de todos los centros quirales y la conformación *cis* del doble enlace se basó en el análisis cristalográfico de rayos X. La ozonólisis de la sinrotólida rindió la 6-desoxi-L-alosa, permitiendo establecer la estereoquímica absoluta del compuesto (Davies-Coleman y Rivett, 1987).

La sindenólida (**30**) junto con la desacetilboronólida se aislaron de las partes aéreas de *Syncolostemon densiflorus*. La estereoquímica de los centros quirales C<sub>1</sub>'-C<sub>3</sub>' se propuso mediante argumentos biosintéticos y se sustentó a través de la comparación de las constantes de acoplamiento de la boronólida (Davies-Coleman y Rivett, 1994). La estereoquímica del centro estereogénico C<sub>5</sub>' se estableció por un análisis detallado de los espectros de RMN del diacetónido; esto es, se estableció la presencia del acetónido de seis miembros en la posición C<sub>3</sub>' y C<sub>5</sub>' con un metilo ecuatorial ( $\delta_C$  30.0) y uno axial ( $\delta_C$  19.8). La estereoquímica *sin* de H<sub>3</sub>' y H<sub>5</sub>' se confirmó por experimentos diferenciales del efecto nuclear de Overhauser (nOe) (Collet *et al.*, 1997).



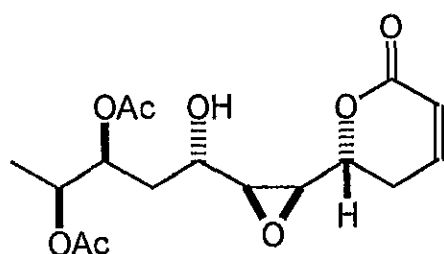
29



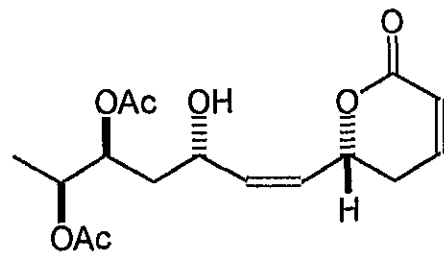
30

Del extracto de acetona de las hojas de *Syncolostemon parviflorus* se aislaron las sinparvólidas A-C (**31-33**). La estructura química y la estereoquímica absoluta de los tres compuestos se basaron en evidencias espectroscópicas, quirópticas y químicas. La estereoquímica absoluta del alcohol secundario en **31** se estableció como (*S*), utilizando el método de Mosher y la estereoquímica de los carbonos C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub> se asignó por argumentos biosintéticos. Tomando en consideración que **32** es un precursor biosintético de **31**, se propuso la misma configuración absoluta para ambos compuestos (Davies-Coleman y Rivett, 1996).

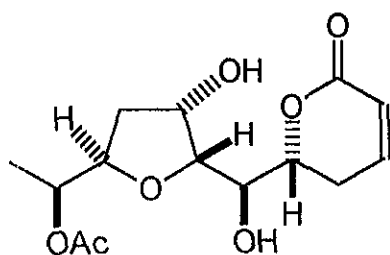
La tetradenólida (**34**) es una 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona aislada recientemente del extracto clorofórmico de las hojas de *Tetradenia riparia*, ni su estereoquímica ni su configuración absoluta se han descrito todavía (Van Puyvelde y Kimpe, 1998).



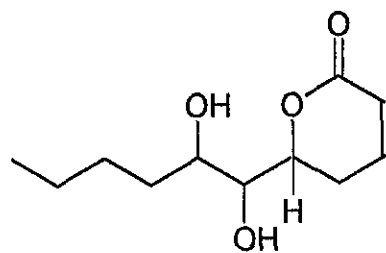
**31**



**32**

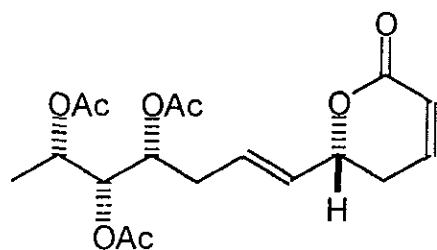


**33**

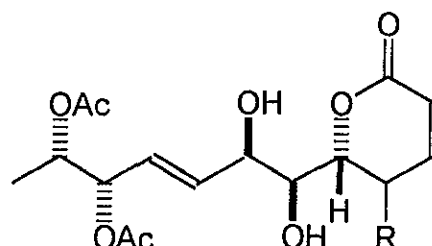


**34**

Las sinargentólidas A-E (35-39) son compuestos relacionados que se aislaron de *Syncolostemon argenteus*, sus estructuras se asignaron utilizando técnicas DC y RMN. La sinargentólida D (38), es térmicamente inestable y debido a su bajo rendimiento no se logró establecer por completo su configuración absoluta (Collet *et al.*, 1998). Por otro lado, la sinargentólida B (36) es un epímero en C<sub>5</sub> del compuesto 44, previamente aislado de *Hyptis oblongifolia* (Pereda-Miranda *et al.*, 1990).

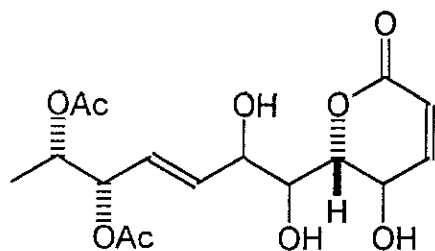


35

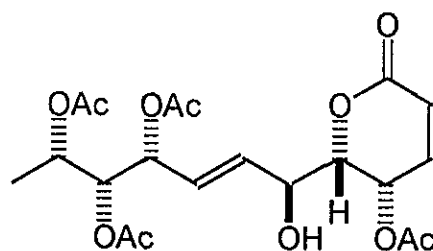


36 R = H

37 R = OAc



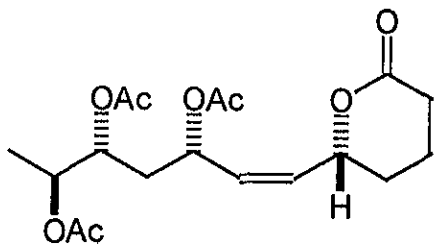
38



39

#### 2.4.2.2. 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas C<sub>6</sub> sustituidas aisladas del género *Hyptis*.

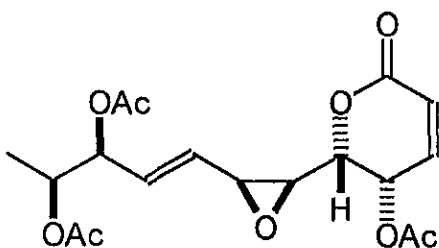
La primera C<sub>6</sub>-alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona aislada en la familia de las labiadas fue la hiptólida (40) de *Hyptis pectinata*, aún cuando el compuesto se había obtenido desde 1920, en los años sesenta se reportó su estructura correcta y sólo hasta el final de la década de los ochenta se estableció su configuración absoluta (Achmad *et al.*, 1987).



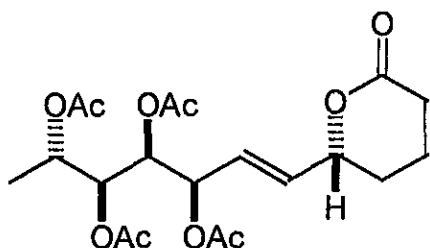
40

En el género *Hyptis*, se han descrito otras doce C<sub>6</sub>-alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas caracterizadas por tener la misma estructura general pero con diferentes grados de oxidación en la cadena lateral y diferente estereoquímica en los centros quirales acíclicos. Todas poseen la misma configuración absoluta para el centro C<sub>6</sub> del núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona y, al parecer, la configuración absoluta C<sub>6</sub>(*S*) constituye un rasgo biogénico común a esta serie de principios biodinámicos.

De una especie sudamericana no identificada de este género, se obtuvieron la olguina (41) (Alemany *et al.*, 1979a) y la anamarina (42) (Alemany *et al.*, 1979b), las estructuras se establecieron mediante métodos espectroscópicos y cristalografía de rayos X.



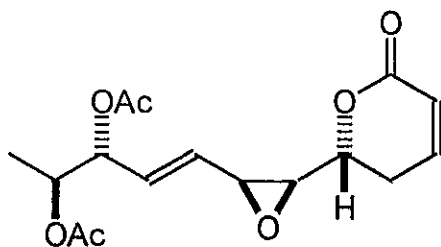
41



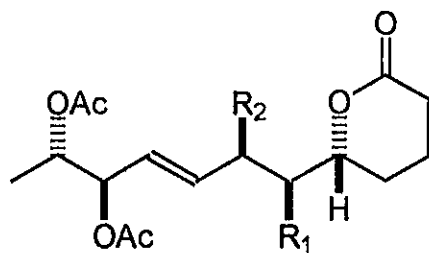
42

Se han realizados diferentes investigaciones conducentes a la síntesis parcial y total de la anamarina (42). Mediante un análisis retrosintético y, a partir de una reacción de Wittig, se planificó la obtención de dos sintones quirales que corresponderían al rompimiento del doble enlace C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> de este compuesto. Se logró la síntesis de la cadena lateral a partir de la D-gulonolactona (Alemayn *et al.*, 1979a; 1983) y la porción correspondiente a la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona a partir de la D-glucosa (Gillard *et al.*, 1988). La síntesis total de la *ent*-anamarina se realizó de manera análoga, utilizando como el sintón quiral a la D-glucosa (Lichtenthaler *et al.*, 1987; Valverde *et al.*, 1987). Por otra parte, la síntesis total del enantiómero natural de la anamarina (42) se logró a partir de la D-gulonolactona y del ácido *R,R*-tartárico (Lorenz y Lichtenthaler, 1987).

Del extracto acetónico de las partes aéreas de la especie mexicana *Hyptis oblongifolia*, se aislaron la 5-desacetiloxi-5'-*epi*-olguina (43) (Delgado *et al.*, 1985), la 6*R*-[5*R*,6*S*-(diacetiloxi)-1*S*,2*R*-(dihidroxi)-3*E*-heptenil]-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona (44), su correspondiente derivado diacetilado (45) y la 6*R*-[5*R*,6*S*-diacetiloxi-1*R*-(hidroxi)-2*R*-(metoxi)-3*E*-heptenil]-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona (46), caracterizadas por evidencias espectroscópicas, quirópticas y químicas (Pereda-Miranda *et al.*, 1990). La 5-desacetiloxi-5'-*epi*-olguina (43) demostró una actividad citotóxica significativa (CE<sub>50</sub> < 4  $\mu$ g/mL) contra las líneas celulares de cáncer de pulmón, colon, carcinoma nasofaríngeo normal y resistente a la vinblastina, el carcinoma epidermoide de humanos y la leucemia linfocítica de mурidos (Pereda-Miranda, 1995).



43



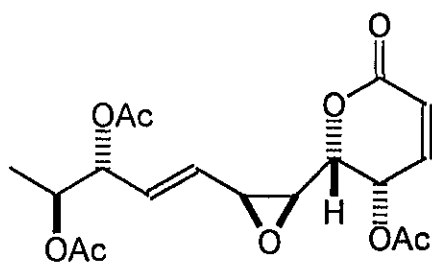
44  $R_1 = R_2 = \text{OH}$

45  $R_1 = R_2 = \text{OAc}$

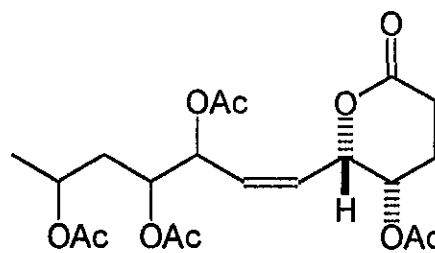
46  $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OMe}$

El estudio químico del extracto orgánico de *Hyptis capitata* condujo al aislamiento de la 5'-*epi*-olguina (47) cuya estructura se determinó por cristalografía de rayos X (Almtorp *et al*, 1991).

A partir del extracto etanólico de las partes aéreas de *Hyptis urticoides* se aisló la hipurticina (48), la estructura se estableció por métodos espectroscópicos. Sin embargo, la estereoquímica de los centros quirales presentes en la cadena lateral C<sub>3'</sub>, C<sub>4'</sub> y C<sub>6'</sub> de este compuesto no se estableció (Romo de Vivar *et al.*, 1991).



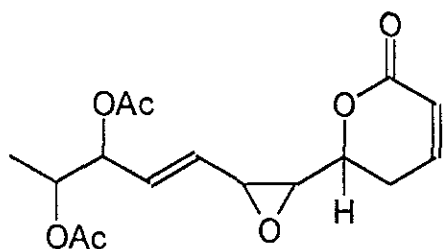
47



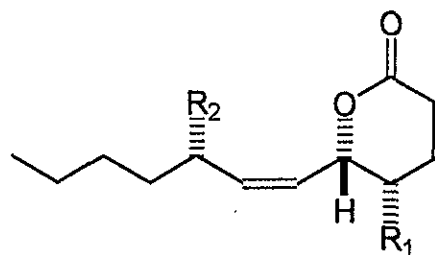
48

De las inflorescencias de una especie africana de *Hyptis spicigera* se aisló la espicigerolactona (49) y, a pesar de no haberse reportado la estereoquímica absoluta de ningún centro quiral (Aycard *et al.*, 1993), por comparación de las constantes espectroscópicas en la resonancia magnética nuclear y del punto de fusión, se ha sugerido que este compuesto corresponde a la 5-desacetiloxi-5'-*epi*-olguina (43) (Collet *et al.*, 1998) previamente aislada de *Hyptis oblongifolia* (Delgado *et al.*, 1985; Pereda-Miranda *et al.*, 1990).

El fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Hyptis pectinata* permitió el aislamiento de las pectinólidas A-C (50-52), compuestos con actividad citotóxica y antimicrobiana. La estereoquímica absoluta se estableció con base en evidencias espectroscópicas, quirópticas y químicas (Pereda-Miranda *et al.*, 1993).



49



50  $R_1 = R_2 = \text{OAc}$

51  $R_1 = \text{OAc}; R_2 = \text{OH}$

52  $R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{OAc}$

Es posible que exista una relación quimiotaxonómica en la sección *Mesosphaeria* del género *Hyptis*, ya que cuatro de las cinco especies donde se han aislado 6-alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas (Cuadro 3) pertenecen a esta sección, lo cual podría confirmarse con el estudio fitoquímico de otras especies pertenecientes a esta sección.



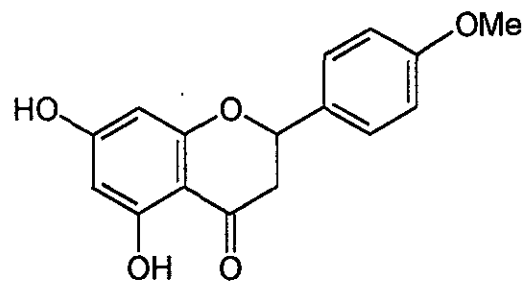
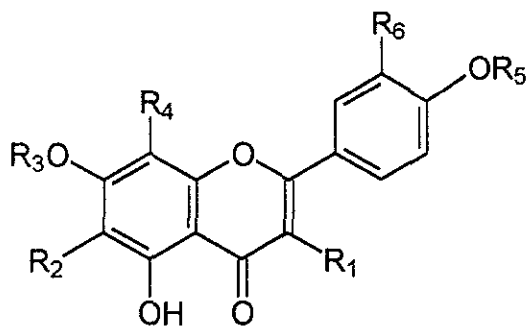
**Cuadro 3.** Distribución de las C<sub>6</sub>-alquencil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas en el género *Hyptis*.

Especie	Sección	Subsección	Lugar de colecta
<i>Hyptis capitata</i>	<i>Muellerohyptis</i>	<i>Genuinae</i>	Ecuador
<i>Hyptis oblongifolia</i>	<i>Mesosphaeria</i>	<i>Pectinaria</i>	México
<i>Hyptis pectinata</i>	<i>Mesosphaeria</i>	<i>Pectinaria</i>	Indonesia y México
<i>Hyptis spicigera</i>	<i>Mesosphaeria</i>	<i>Spicaria</i>	África
<i>Hyptis urticoides</i>	<i>Mesosphaeria</i>	<i>Pectinaria</i>	México

### 2.4.3. Flavonoides.

Varias flavonas se han aislado de especies del género *Hyptis*. De *Hyptis albida* se obtuvieron seis flavonas, la cirsimaritina (53), la ermanina (54), la nevadensina A (55), la gardenina B (56), la apigenina-7,4'-dimetiléter (57) y el kamferol-3,7,4'-trimetiléter (58) y una flavanona, la isosakuranetina (59), caracterizadas por la metoxilación en las posiciones C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub> y C<sub>8</sub>. El compuesto 53 presentó un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Pereda-Miranda, 1990; Rojas *et al.*, 1992). La cirsimaritina también se ha aislado de *Hyptis capitata* (Almtorp *et al.*, 1991). Durante la búsqueda de constituyentes citotóxicos en algunas especies medicinales de *Hyptis*, se han aislado flavonas con una ligera actividad citotóxica; de *Hyptis verticillata* se aisló la sideritoflavona (60) con una CE<sub>50</sub> de 1.6 µg/mL contra el carcinoma nasofaríngeo (KB) (Novelo *et al.*, 1993). Esta flavona inhibe la actividad de la prostaglandina sintetasa y presenta un efecto antiserotoninérgico (Kuhnt *et al.*, 1995). De *Hyptis tomentosa*, se aislaron dos flavonas citotóxicas, la gardenina B (56) y

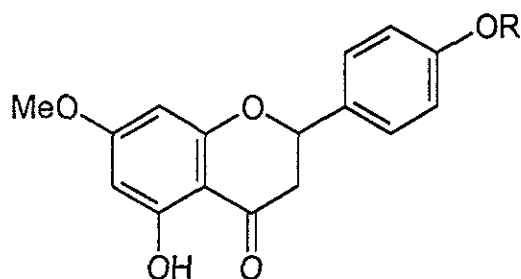
la 5-hidroxi-4',3,6,7,8-pentametoxiflavona (61) con una  $CE_{50}$  de 6.0 y 1.8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, contra la línea celular KB (Kingston *et al.*, 1979).



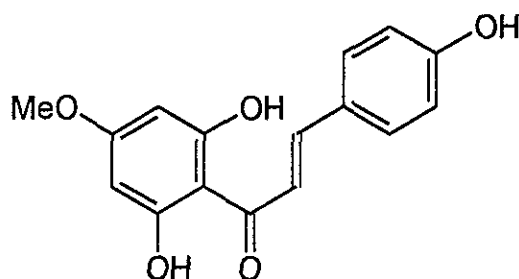
- 53  $R_1 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}; R_2 = \text{OMe}; R_3 = \text{Me}$   
 54  $R_1 = \text{OMe}; R_2 = R_3 = R_4 = R_6 = \text{H}; R_5 = \text{Me}$   
 55  $R_1 = R_3 = R_6 = \text{H}; R_2 = R_4 = \text{OMe}; R_5 = \text{Me}$   
 56  $R_1 = R_6 = \text{H}; R_2 = R_4 = \text{OMe}; R_3 = R_5 = \text{Me}$   
 57  $R_1 = R_2 = R_4 = R_6 = \text{H}; R_3 = R_5 = \text{Me}$   
 58  $R_1 = \text{OMe}; R_2 = R_4 = R_6 = \text{H}; R_3 = R_5 = \text{Me}$   
 60  $R_1 = R_4 = R_5 = \text{H}; R_2 = \text{OMe}; R_3 = \text{Me}; R_6 = \text{OH}$   
 61  $R_1 = R_2 = R_4 = \text{OMe}; R_3 = R_5 = \text{Me}; R_6 = \text{H}$

59

Por otro lado, en las hojas de *Hyptis salzmanii* se encontraron tres flavanonas, la (-)-isosakuranetina (59), la ( $\pm$ )-sakuranetina (62) y la (+)-naringenina-7,4'-dimetiléter (63) y una chalcona, la 4,2',6'-trihidroxi-4'-metoxichalcona (64) (Messana *et al.*, 1990).



- 62  $R = \text{H}$   
 63  $R = \text{Me}$

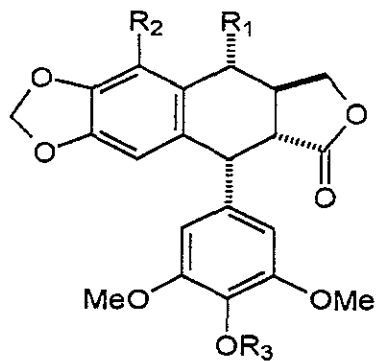


64

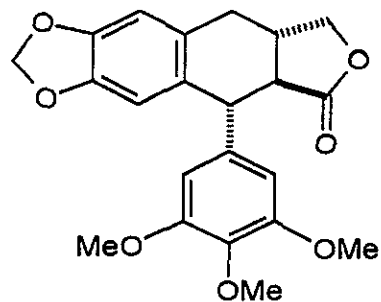
#### 2.4.4. Lignanos.

Los lignanos se han aislado en algunas especies medicinales de *Hyptis* y, posiblemente, este grupo de compuestos contribuye en gran medida al uso en la medicina tradicional de éstas, debido al gran espectro de actividades biológicas que poseen; entre las que destacan las propiedades antimitóticas, antivirales, moduladores de diversas actividades enzimáticas y su toxicidad sobre hongos, insectos y vertebrados, entre otras (Charlton, 1998; MacRae y Towers, 1984).

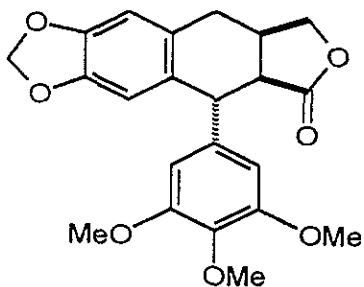
A través del fraccionamiento biodirigido de los extractos citotóxicos de *Hyptis verticillata*, se han aislado siete lignanos con esqueleto de ariltetralina, la 4'-desmetildesoxipodofilotoxina (65), la  $\beta$ -peltatina (66) (Germán, 1971), la podofilotoxina (67) (Heinrich *et al.*, 1994), la  $\beta$ -apopicropodofilina (68), la isodesoxipodofilotoxina (69), la desoxipicropodofilotoxina (70) (Novelo *et al.*, 1993), y la hiptinina (71) (Kuhnt *et al.*, 1994); cuatro lignanos con núcleo arilnaftaleno, el éter metílico de la deshidro- $\beta$ -peltatina (72), la desoxideshidropodofilotoxina (73), la deshidropodofilotoxina (74) y la 5-metoxideshidropodofilotoxina (75) (Novelo *et al.*, 1993) y, tres lignanos con esqueleto de dibencilbutirolactona, la yateína (76) (Novelo *et al.*, 1993), el podorrizol (77) y el *epi*-podorrizol (78) (Kuhnt *et al.*, 1994). De las partes aéreas de *Hyptis tomentosa* se aisló la desoxipodofilotoxina (79) (Kingston *et al.*, 1979). La hierba San Martín, como se conoce en la medicina tradicional oaxaqueña a *Hyptis verticillata*, representa una fuente alternativa a las especies de *Podophyllum* (Berberidaceae) como materia prima para la obtención de lignanos análogos de la podofilotoxina, compuesto que se emplea como un precursor para la semisíntesis del etopósido y tenipósido, agentes quimioterapéuticos de utilidad en el tratamiento de la leucemia y el cáncer testicular (Ruíz-Acevedo, 1996).



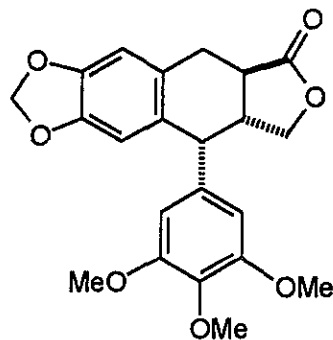
- 65  $R_1 = R_2 = R_3 = H$   
 66  $R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = Me$   
 67  $R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = Me$   
 68  $R_1 = R_2 = H; R_3 = Me; \Delta^2$   
 79  $R_1 = R_2 = H; R_3 = Me$



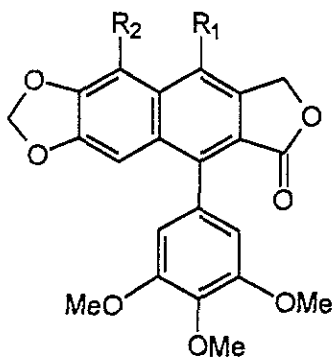
69



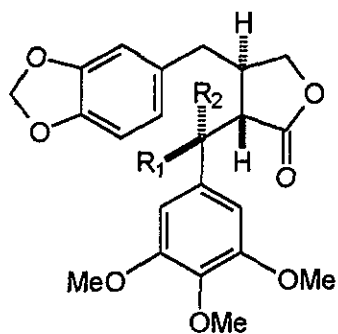
70



71



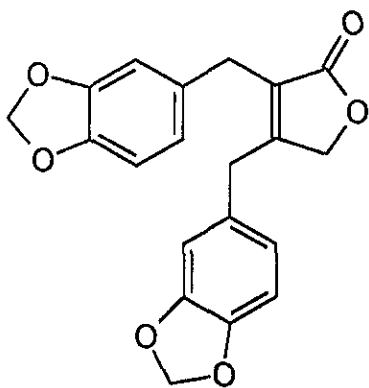
- 72  $R_1 = H; R_2 = OMe$   
 73  $R_1 = R_2 = H$   
 74  $R_1 = OH; R_2 = H$   
 75  $R_1 = OH; R_2 = OMe$



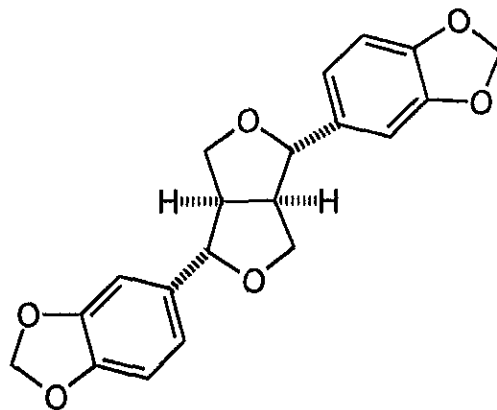
- 76  $R_1 = R_2 = H$   
 77  $R_1 = OH; R_2 = H$   
 78  $R_1 = H; R_2 = OH$

De *Hyptis capitata* se aisló el 2,3-di-(3',4'-metilendioxibenci)-2-buten-4-ólida (**80**), un lignano con actividad fungicida con esqueleto de dibencilbutirolactona (Gunvor *et al.*, 1991).

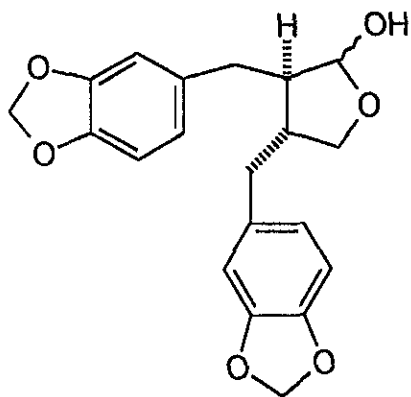
De las hojas de *Hyptis salzmanii* se aislaron tres lignanos, la (+)-sesamina (**81**), la (-)-cubebina (**82**), y la (-)-hinokinina (**83**) (Messana *et al.*, 1990).



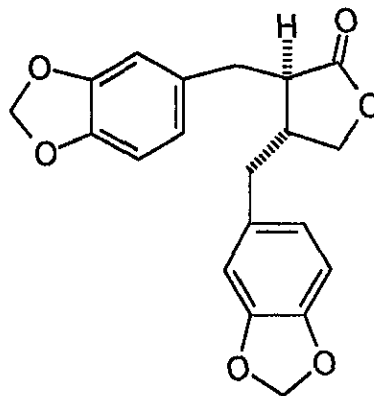
**80**



**81**



**82**



**83**

## 2.5. Propiedades espectroscópicas y espectrométricas.

### 2.5.1. 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas.

#### 2.5.1.1. Espectroscopía de infrarrojo y ultravioleta.

Los espectros en el IR de las C<sub>6</sub> sustituidas 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas presentan una fuerte banda de absorción en 1710-1740 cm<sup>-1</sup> debido al grupo carbonilo  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado. El doble enlace de la lactona absorbe a 1590-1640 cm<sup>-1</sup> y aunque su intensidad es más débil que la del grupo carbonilo, se intensifica por la oxigenación de la posición C<sub>4</sub> ó C<sub>5</sub> (Davies-Coleman y Rivett, 1989). Los sustituyentes en C<sub>6</sub>, en especial los 6-alquenos, generalmente se encuentran sustituidos por hidroxilos o acetatos dando origen a bandas de absorción a 3200-3600 cm<sup>-1</sup>, 1710-1730 cm<sup>-1</sup> y 1240-1250 cm<sup>-1</sup> (Davies-Coleman *et al*, 1987).

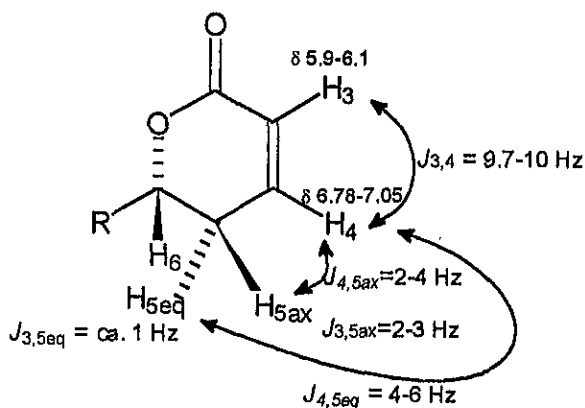
La longitud de onda ( $\lambda$ ) de máxima absorción en el espectro de UV de una C<sub>6</sub>-alquil y C<sub>6</sub>-alquénil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona monosustituida aparece normalmente entre 200-215 nm ( $\epsilon = 8\ 000$ - $12\ 000$ ) (Davies-Coleman y Rivett, 1989).

#### 2.5.1.2. Espectroscopías de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) se ha empleado en la elucidación estructural de más de las dos terceras partes de este tipo de compuestos. Las señales características presentan un patrón de espín de primer orden, con desplazamientos químicos ( $\delta$ ) y constantes de acoplamiento ( $J$ ) definidas. Estas constantes se determinan a través del análisis de los espectros de RMN unidimensionales (protónica, <sup>1</sup>H y carbono-13, <sup>13</sup>C) y bidimensionales (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H y <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C), permitiendo obtener la información necesaria

para la caracterización de este tipo de compuestos (Davies-Coleman y Rivett, 1989; Hernández de Jesús, 1991; Villavicencio González, 1993).

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , las señales correspondientes al anillo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona (**84**) se caracterizan como sigue: el protón en  $\text{C}_3$  ( $\delta$  5.9-6.1) se acopla con el protón de  $\text{C}_4$  ( $J = 9.7\text{-}10.0$  Hz), indicando un grupo olefínico *cis* adyacente a un grupo carbonilo (fig. 3), también se acopla a larga distancia con los dos protones en  $\text{C}_5$  ( $J_{3,5\text{eq}} \cong 1\text{Hz}$ ,  $J_{3,5\text{ax}} = 2\text{-}3$  Hz). La desprotección de  $\text{H}_4$  ( $\delta$  6.78-7.05) respecto a  $\text{H}_3$  es típica para un carbono  $\beta$  enlazado a un cromóforo de carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado. La multiplicidad de la señal para  $\text{H}_4$  aparece como un doble de dobles por su acoplamiento con  $\text{H}_3$  y con  $\text{H}_{5\text{ax}}$  ( $J_{4,5\text{ax}} = 2\text{-}4$  Hz) y  $\text{H}_{5\text{eq}}$  ( $J_{4,5\text{eq}} = 4\text{-}6$  Hz) (fig. 3). Estos valores de  $J$  se han utilizado para determinar la estereoquímica relativa de los sustituyentes en  $\text{C}_5$ ; además, este conjunto de señales es sumamente característico en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas sustituidas en  $\text{C}_6$  y puede utilizarse para identificar la presencia de este tipo de compuestos en extractos o fracciones (fig. 3) (Davies-Coleman y Rivett, 1989; Pereda-Miranda, 1995).



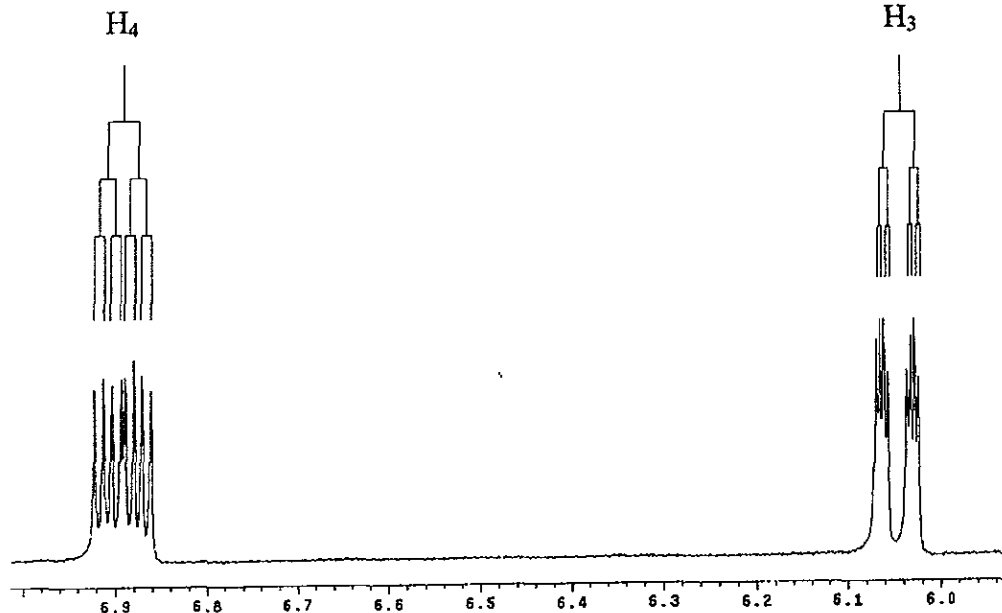
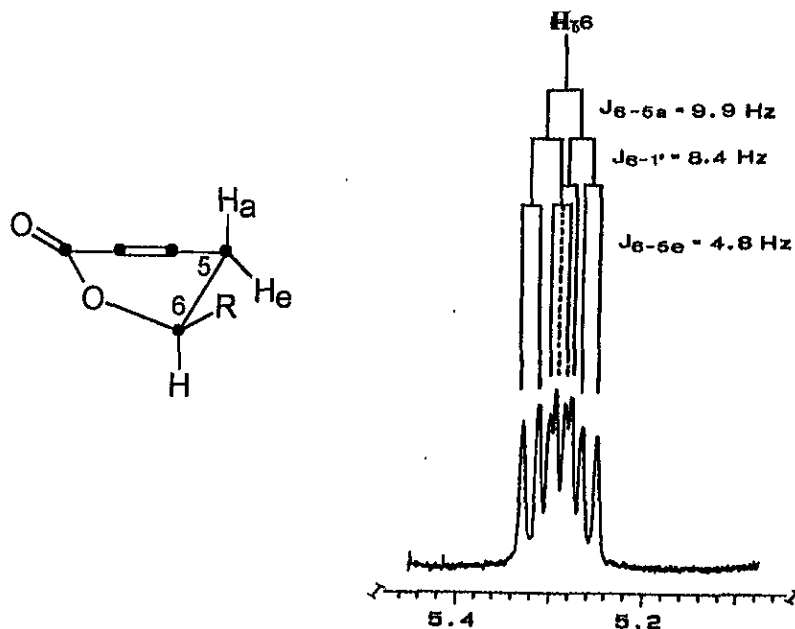


Figura 3. Desplazamientos químicos y multiplicidad característicos para los protones olefínicos conjugados del núcleo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona presente en la hiptólida (40).

Los dos protones alílicos en  $C_5$  son no equivalentes y presentan un acoplamiento geminal típico ( $J_{5ec, 5ax} = 15-19$  Hz) y un acoplamiento con  $H_4$  y  $H_6$  ( $J_{5ec,6} = 9-12$  Hz;  $J_{5ec,6} = 3-6$  Hz). Estos dos protones aparecen como un multiplete complejo en la mayoría de los casos entre  $\delta$  2.3-2.8. La hidroxilación o la acetilación de  $C_5$  provoca un desplazamiento a campo bajo del protón  $H_5$  geminal a esta sustitución ( $\delta$  4.2-5.4). El desplazamiento químico de  $H_6$  ( $\delta$  4.2-5.1) depende de la naturaleza de la cadena olefínica que sustituye al núcleo  $C_6$ . En el caso de la hiptólida (40), los protones metilénicos en  $C_5$  presentan un acoplamiento con el protón geminal a la función etérea de la lactona ( $H_6$ ), cuyo desplazamiento químico se observa en  $\delta$  5.29. El valor observado de 9.9 Hz sugiere una interacción *trans*-diaxial para los protones  $H_{5\beta}$  y  $H_6$ , de esta manera, se establece la configuración relativa *pseudo*-ecuatorial para la cadena lateral (fig. 4).





**Figura 4.** Multiplicidad observada para el núcleo  $H_6$  de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona. Los valores de las constantes de acoplamiento corresponden a la hiptólida (40).

De acuerdo con la multiplicidad observada para el resto de las señales correspondientes al núcleo 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona de la hiptólida (40), se observan los siguientes acoplamientos: la señal centrada en  $\delta$  6.90 ( $H_4$ ) aparece como un doble de doble de dobles (ddd), por acoplamiento olefínico *cis* con el protón en  $\delta$  6.04 ( $H_3$ ,  $J_{3,4} = 9.9$  Hz) y, un acoplamiento vecinal con el multiplete centrado en  $\delta$  2.43, que corresponde al metileno alílico del núcleo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona ( $H_5$ ,  $J_{4-5\beta} = 5.4$  y  $J_{4,5\alpha} = 3.0$  Hz). Este sistema ABXY para los núcleos  $H_3$ ,  $H_4$  y  $H_5$  ha permitido establecer una correlación estructural con la 5-desacetiloxi-5'-*epi*olguina (43) y sus congéneres (44-46) (Pereda-Miranda *et al.*, 1990).

Un segundo ejemplo de las multiplicidades observadas en la RMN  $^1\text{H}$  del anillo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona puede ilustrarse con la pectinólida A (**50**), en donde existe un grupo acetoxilo en la posición  $\text{C}_5$  y, por lo tanto, se observa la presencia de un sistema ABX correspondiente a los protones vinílicos  $\text{H}_3$  ( $\delta$  6.24),  $\text{H}_4$  ( $\delta$  6.96) y al protón alílico  $\text{H}_5$  ( $\delta$  5.19) (fig. 5) (Hernández de Jesús, 1991). Las multiplicidades de cada una de las resonancias para los protones del núcleo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona de la pectinólida A son análogas a las observadas para la olguina (**41**), así como para las pectinólidas B y C (**51** y **52**), diastereoisómeros que corresponden a los dos productos de monodesacetilación de la pectinólida A (**50**) (Villavicencio González, 1993).

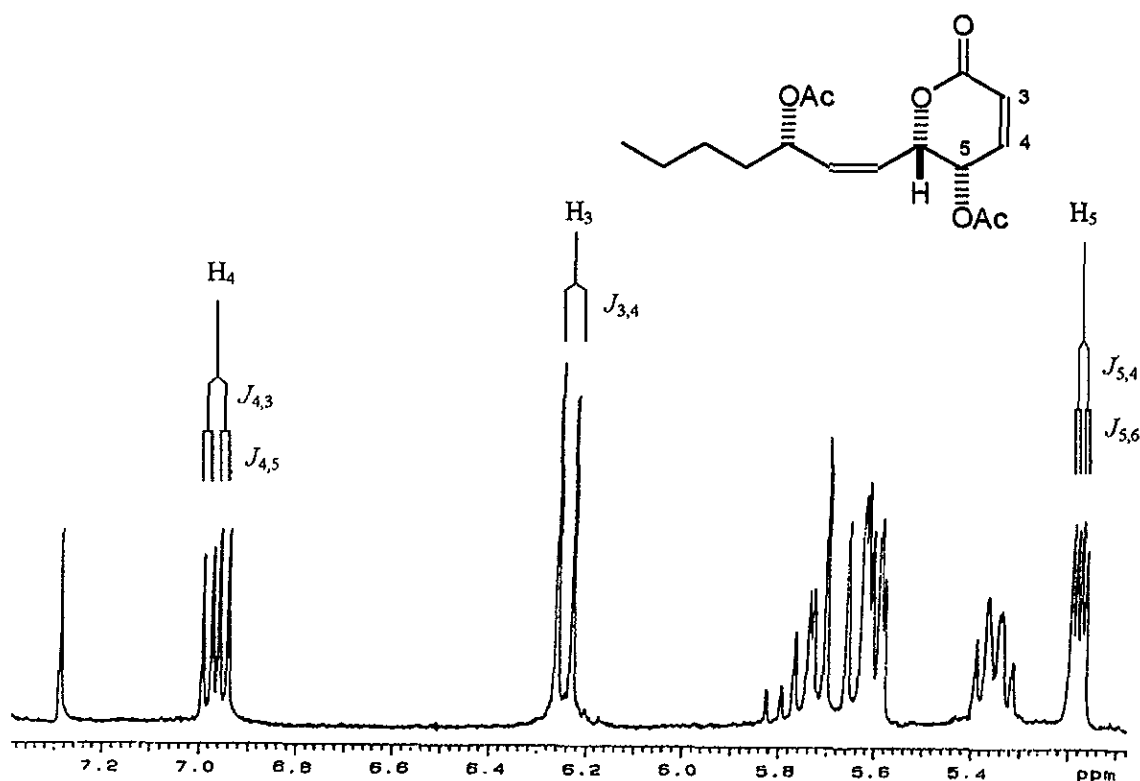


Figura 5. Patrón de multiplicidad ABX observado para la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona de la pectinólida A (**50**).

La oxigenación de la cadena lateral provoca un número contiguo de centros quirales cuya esteoquímica relativa se ha determinado mediante la aplicación del efecto nuclear de Overhauser (nOe) (Davies-Coleman y Rivett, 1989; 1996). Las señales base de oxígeno aparecen entre  $\delta$  3.3-3.8 (protón geminal a grupo hidroxilo y anillo de oxirano) y  $\delta$  4.9-5.9 (protón geminal a grupo acetoxilo), además de las señales correspondientes al protón del hidroxilo ( $\delta$  2.3-2.8) y al metilo del grupo acetoxilo ( $\delta$  1.9-2.1). También, se observa un doblete o un triplete entre  $\delta$  0.9-1.4 que corresponde a un metilo terminal. Los protones vinílicos en la cadena lateral aparecen entre  $\delta$  5.5-6.5. En la figura 6 se presenta el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la 5-desacetiloxi-5'-*epi*-olguina (43), destacándose los desplazamientos químicos de los protones de la cadena lateral.

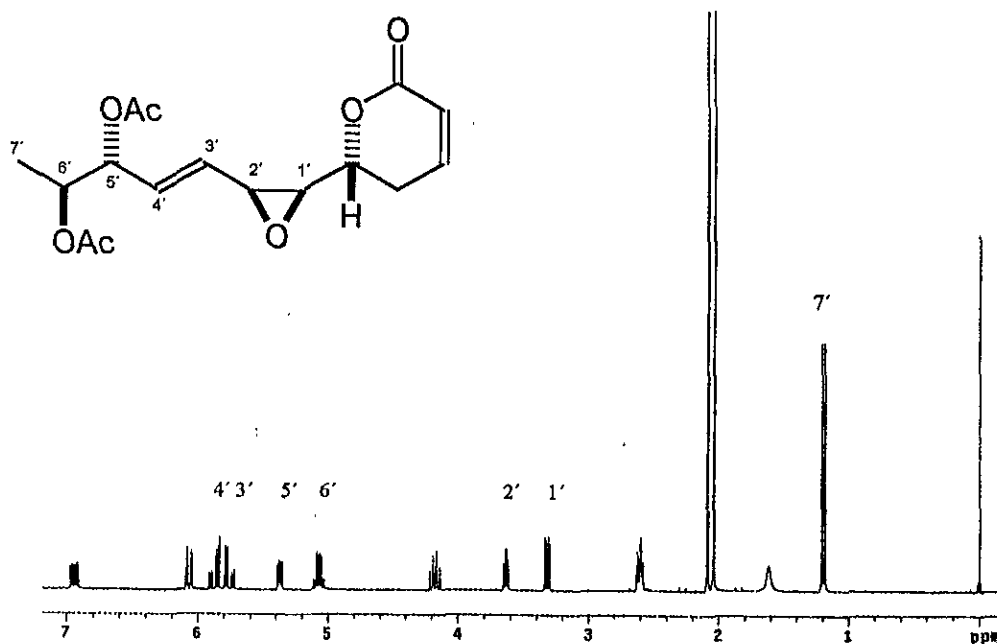


Figura 6. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la 5-desacetiloxi-5'-*epi*-olguina (43).

La simplificación de las señales después de irradiar un protón determinado ha permitido corroborar la asignación de las señales. La figura 7 ilustra el empleo de las irradiaciones selectivas en la asignación de la RMN  $^1\text{H}$  de la boronólida (26). Esta metodología ha sido desplazada en la actualidad por el empleo de las técnicas de correlación bidimensionales ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY).

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , la información de mayor importancia que se obtiene es la siguiente: el desplazamiento químico del átomo del carbonilo  $\text{C}_2$  aparece usualmente centrado en  $\delta$  160-169, el  $\text{C}_3$  entre  $\delta$  120-122 y la señal de  $\text{C}_4$  en  $\delta$  144-148. El átomo de  $\text{C}_5$  aparece a  $\delta$  25-30 y la oxigenación de este núcleo causa un desplazamiento paramagnético de casi 40 ppm y provoca un efecto menor sobre el desplazamiento químico de  $\text{C}_4$ . Sin embargo,  $\text{C}_6$  que normalmente aparece en  $\delta$  72-78, se desliza paramagnéticamente por aproximadamente 35 ppm (Davies-Coleman y Rivett, 1989). Las señales correspondientes a la cadena lateral son las siguientes: la señal a campo alto en el espectro corresponde al grupo metilo terminal ( $\delta$  12.9-16.6). Los metinos enlazados a oxígeno aparecen centrados en  $\delta$  66-81, los protones olefinicos en  $\delta$  121.1-126.3 y  $\delta$  132.9-144.9. Las señales correspondientes a los anillos de oxirano aparecen centrados en  $\delta$  56.5 y 58.9 ppm.

Las correlaciones bidimensionales observadas en la RMN ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY) para cada uno de los núcleos de hidrógeno (fig. 8) con sus respectivos carbonos geminales (HETCOR, fig. 9), permiten establecer la conectividad para los fragmentos estructurales identificados.



**Figura 7.** Simplificación de las multiplicidades observadas en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (A) de la boronólida (**26**) después de la irradiación selectiva de un protón: **B**,  $\text{H}_{1'}$ ,  $\text{H}_{2'}$  ( $\delta$  5.35); **C**,  $\text{H}_{5\text{ax}}$  ( $\delta$  2.28); **D**,  $\text{H}_{5\text{ec}}$  ( $\delta$  2.49).

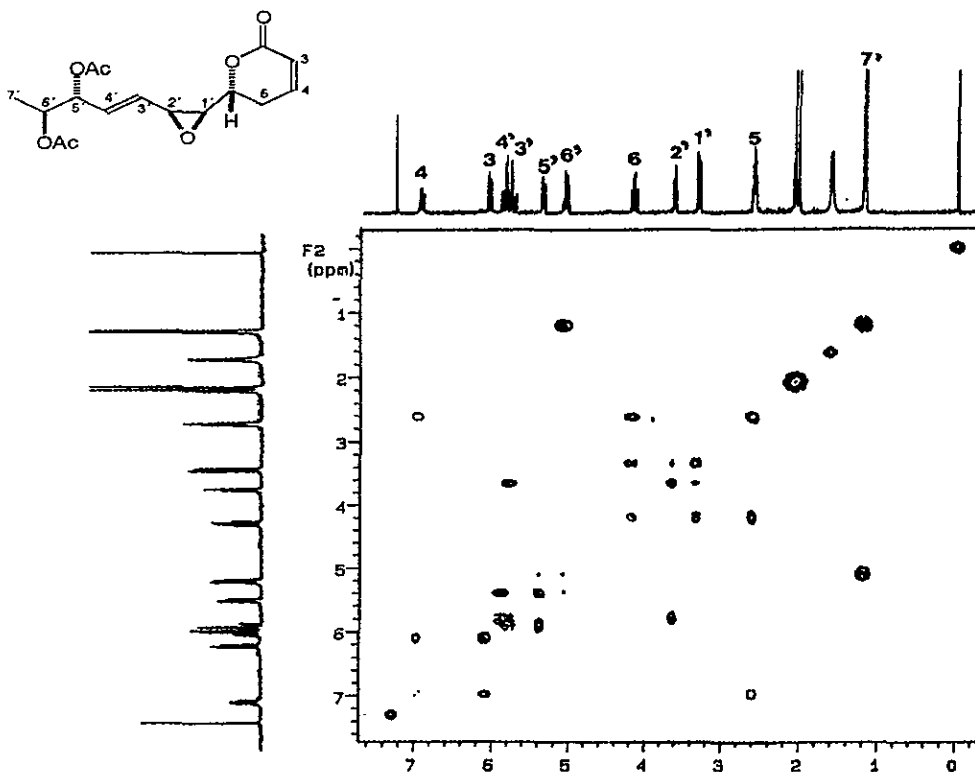


Figura 8. Espectro bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de la 5-desacetiloxi-5'-*epi*-olguina (43).

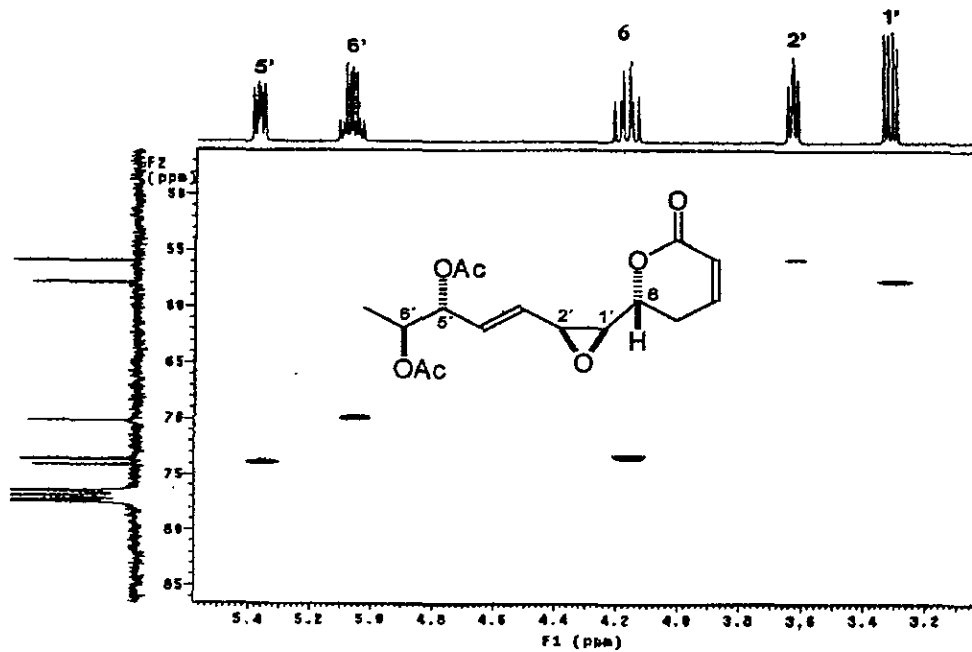


Figura 9. Espectro bidimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HETCOR de la 5-desacetiloxi-5'-*epi*-olguina (43).

La figura 10 ilustra el empleo de la RMN bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY que permitió distinguir entre las dos posibilidades diastereoisoméricas para las pectinólidas B y C (51 y 52) a través de las interacciones entre los protones  $\text{H}_5$  y  $\text{H}_6$  del núcleo de  $\alpha$ -pirona y entre los protones  $\text{H}_2$  y  $\text{H}_3$  de la cadena lateral. La localización del grupo hidroxilo en la posición  $\text{C}_3'$  de la cadena lateral en la pectinólida B (51) se estableció por los cuadros de conectividad que establece el protón  $\text{H}_{3'}$  con el metileno de la cadena lateral  $\text{H}_{4'}$  ( $\delta$  1.60) y con la señal vinílica  $\text{H}_2$  ( $\delta$  5.76) (Villavicencio González, 1993).

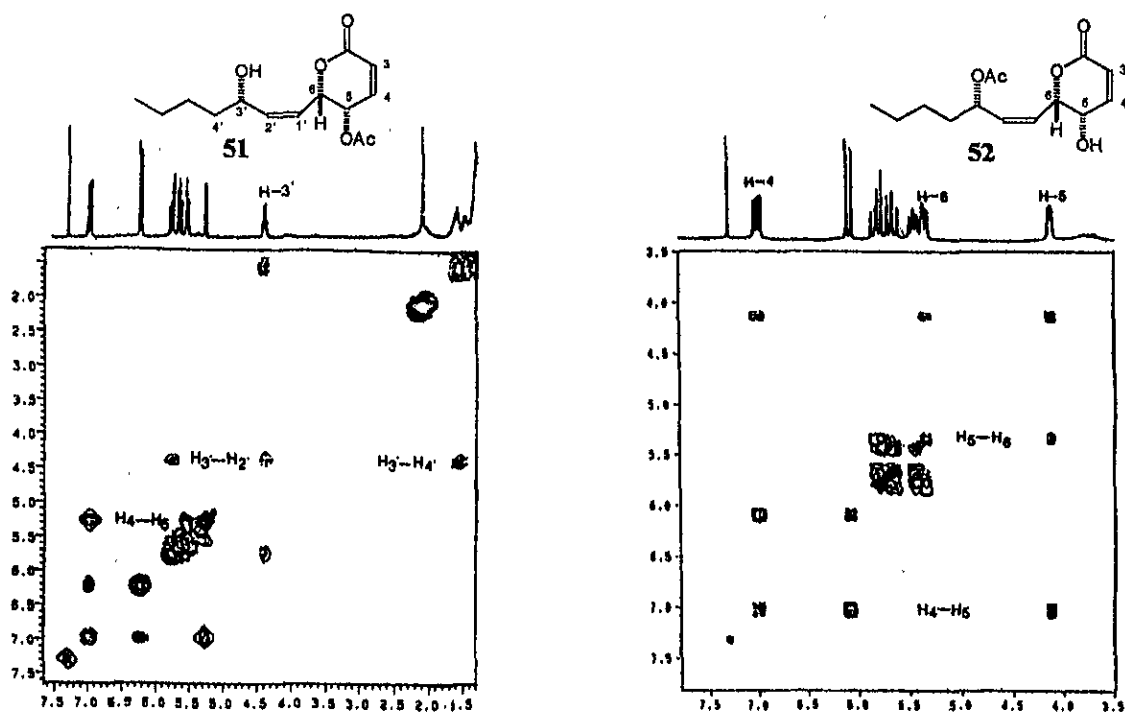


Figura 10. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  bidimensionales COSY de las pectinólidas B (51) y C (52).

Una vez establecida la conectividad inequívoca de cada uno de los fragmentos estructurales identificados en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  bidimensional, estos desplazamientos

químicos se utilizan en experimentos bidimensionales de correlación heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HETCOR, HMQC) para asignar o confirmar los desplazamientos de  $^{13}\text{C}$ , como puede observarse en el espectro de HETCOR de la pectinólida C (52) (fig. 11).

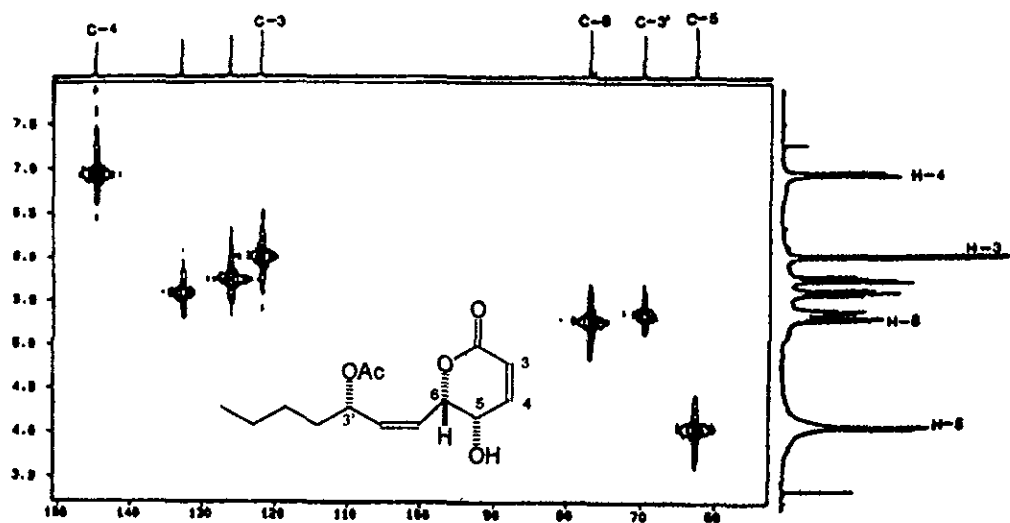
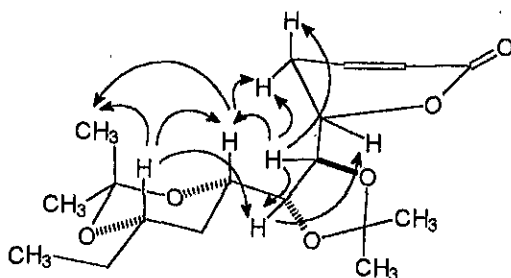


Figura 11. Espectro de correlación bidimensional heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HETCOR de la pectinólida C (52).

Las correlaciones evidentes en los espectros de HMBC entre los hidrógenos de los carbonos de la cadena lateral y los átomos del carbonilo del grupo acetoxilo permiten establecer la posición exacta de los sustituyentes (Davies-Coleman y Rivett, 1996). Por ejemplo, la localización de un grupo acetato en uno de los cuatro átomos de carbono de oximetino ( $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_5$ ) de la sindenólida (30) se realizó por la correlación observada a larga distancia ( $^3J$ ) entre el protón  $\text{C}_5$  y el átomo de carbono del carbonilo del acetato (Davies-Coleman y Rivett, 1994). El análisis de los experimentos de desacoplamiento de RMN  $^1\text{H}$  demostraron que las constantes de acoplamiento ( $J$ ) para los hidrógenos de  $\text{C}_6$ ,



$C_{1'}$ ,  $C_{2'}$  y  $C_{3'}$  del peracetato de la sindenólida (**30**,  $J_{6,1'} = 5.3$  Hz,  $J_{1',2'} = 5.3$  Hz,  $J_{2',3'} = 4.7$  Hz) son similares a los de la boronólida (**26**,  $J_{6,1'} = 5.7$  Hz,  $J_{1',2'} = 5.2$  Hz,  $J_{2',3'} = 5.5$  Hz) proponiéndose la configuración absoluta de  $6R, 1'R, 2'R, 3'S$  para el derivado peracetilado de la sindenólida (**30**). La configuración absoluta de  $C_{5'}$  en el acetónido se realizó mediante el análisis detallado de los experimentos de exaltación nOe, además de confirmarse la configuración de los otros centros quirales. En la figura 12 se ilustran las exaltaciones nOe observadas en el acetónido de la sindenólida (**30**) (Davies-Coleman y Rivett, 1994).

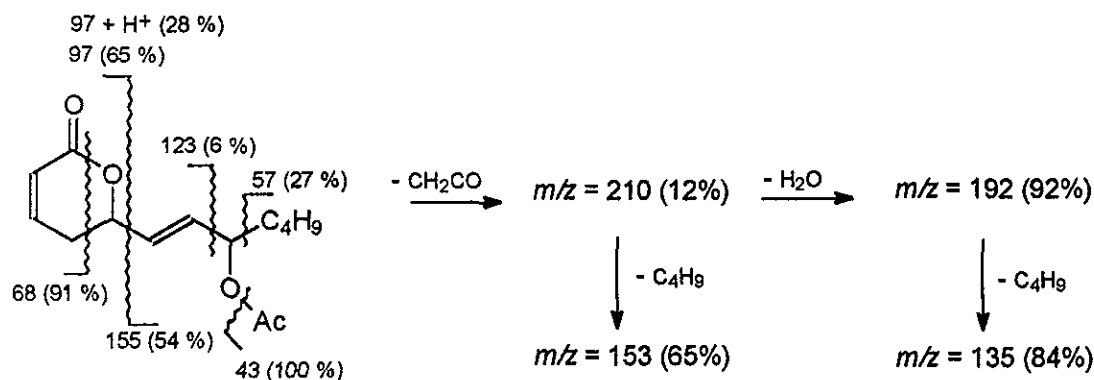


**Figura 12.** Exaltaciones nOe observadas en el acetónido de la sindenólida (**30**).

### 2.5.1.3. Espectrometría de masas.

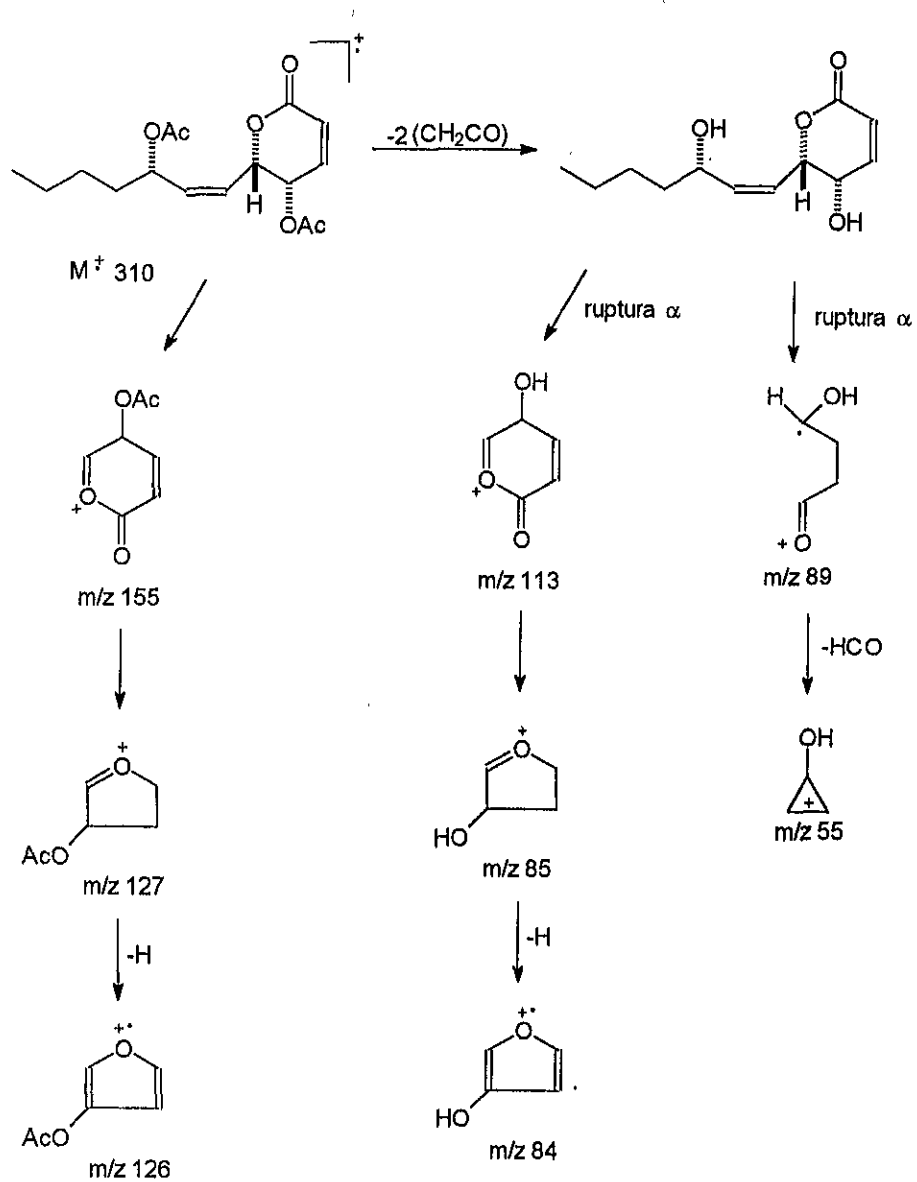
La espectrometría de masas se utiliza principalmente como una técnica suplementaria para la determinación de la estructura química de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas. El anillo de la lactona  $\alpha,\beta$  insaturada sufre una serie de fragmentaciones que da origen a iones de valor diagnóstico sustancial. En general, en las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas se observa el ión molecular en sus espectros de masas, con excepción de algunos compuestos polihidroxilados, los cuales sufren descomposición térmica, pero este problema se puede resolver con la preparación de derivados trimetilsililados. El rompimiento  $\alpha$  de la cadena

lateral en C<sub>6</sub> (pérdida de la lactona α,β-insaturada) corresponde al rompimiento más fácil al ser inducido por el oxígeno heterocíclico y es característico de este grupo de compuestos. De esta forma, los picos de *m/z* 68 y 97 son diagnósticos del grupo lactona. La presencia de los grupos acetoxilo se confirma mediante los picos intensos de *m/z* 43, además de observarse frecuentemente la pérdida de unidades de cetena (-42, -CH<sub>2</sub>=C=O) (Davies-Coleman y Rivett, 1989; Pereda-Miranda *et al.*, 1990). Por ejemplo, los picos característicos en el espectro de masas de la umuravumbólida (24) se presentan en la figura 13 (Van *et al.*, 1979).



**Figura 13.** Patrón de fragmentación de la umuravumbólida (24) inducido mediante impacto electrónico (70 eV).

En el espectro de masas de la pectinólida A (50) obtenido por impacto electrónico a 20 eV se corroboró la presencia de dos grupos acetoxilo en la molécula mediante las pérdidas sucesivas de ácido acético o la eliminación de dos moléculas de cetena. El ión de *m/z* 155 se origina por la ruptura α al oxígeno heterocíclico (fig. 14) (Pereda-Miranda *et al.*, 1993; Villavicencio González, 1993).



**Figura 14.** Patrón de fragmentación de la pectinólida A (50) inducido mediante impacto electrónico (20 eV).

## 2.5.2. Diterpenoides del grupo labdano.

### 2.5.2.1. Espectroscopía de infrarrojo.

En el espectro de infrarrojo de los diterpenos del grupo labdano, se observan con frecuencia bandas de absorción asociadas con la presencia del grupo hidroxilo ( $3520$  y  $3368\text{ cm}^{-1}$ ) o de ácido carboxílico ( $2500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ ), de grupo carbonilo de ácido ( $1700\text{-}1710\text{ cm}^{-1}$ ) o grupo de éster ( $1710\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$  y  $1240\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ ). También son frecuentes las absorciones para grupos carbonilo de cetonas  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturadas ( $1730$ ,  $1660$  y  $850\text{ cm}^{-1}$ ) y aldehído ( $1720\text{-}1740$  y  $2695\text{-}2830\text{ cm}^{-1}$ ) (Van *et al.*, 1979).

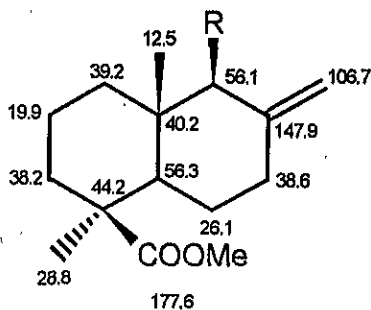
### 2.5.2.2. Espectroscopía de RMN $^1\text{H}$ y RMN $^{13}\text{C}$ .

La elucidación estructural del esqueleto diterpénico que corresponde al núcleo labdano se ha realizado principalmente a través del análisis de las constantes espectroscópicas generadas en la RMN  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  (O'Mathúna y Doskotch, 1995).

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  se caracteriza por la presencia de singuletes finos debido a los metilos angulares  $\text{H}_{18}$ ,  $\text{H}_{19}$  y  $\text{H}_{20}$  ( $\delta$   $0.8\text{-}1.2$ ) y singuletes ligeramente anchos para metilos olefínicos ( $\delta$   $1.6\text{-}1.9$ ), así como señales para protones olefínicos ( $\delta$   $5.3\text{-}5.1$  y  $4.8\text{-}5.0$ ) y protones de metino geminales a hidroxilo ( $\delta$   $3.2\text{-}3.8$ ) o acetoxilo ( $\delta$   $4.9\text{-}5.0$ ) (O'Mathúna y Doskotch, 1995; Toki *et al.*, 1999).

Barrero y Altarejos (1993) realizaron la compilación de las constantes espectroscópicas de RMN  $^{13}\text{C}$  de 91 compuestos de tipo labdano, clasificados en 10 series, para la asignación espectroscópica de compuestos similares. En la serie que incluye labdanos dicarbocíclicos con un doble enlace exocíclico  $\Delta^{8(17)}$  se observa la constancia de los desplazamientos químicos para el sistema decalina incluyendo los carbonos  $\text{C}_{17}$ ,  $\text{C}_{18}$ ,

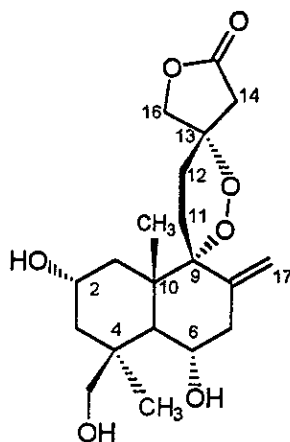
C<sub>19</sub> y C<sub>20</sub>. En la figura 15 se presenta el promedio de los valores observados para los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) del núcleo de decalina de los anillos A y B de los esqueletos de labdano sustituidos con un ácido carboxílico en C<sub>4</sub>.



**Figura 15.** Promedio de los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) para el núcleo labdánico.

La conectividad en el sistema decalina y la asignación total de las señales generadas en los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se ha logrado con el empleo de experimentos de desacoplamiento homonuclear y estudios bidimensionales exhaustivos (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, correlación <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C a dos y tres ligaduras, *e.g.* COLOC o HMBC, entre otros). Los estudios nOe han permitido determinar la configuración relativa del núcleo de decalina (O'Mathúna y Doskotch, 1994a). Por ejemplo, en el espectro COSY de la amenólida K (85) se observaron seis unidades acopladas, al combinar tres de estas unidades se formó el sistema bicíclico correspondiente al anillo A y B con un doble enlace exocíclico: (1) el carbinol a  $\delta$  3.71 (H<sub>2</sub>) se acopla con los metilenos de C<sub>3</sub> ( $\delta$  0.97 y 1.8) y de C<sub>1</sub> ( $\delta$  1.42 y 1.83). También, el protón en  $\delta$  1.42 (H<sub>1 $\alpha$</sub> ) se acopla en W con la señal en  $\delta$  0.93 (Me-20); (2) el metilo 18 también se acopla en W con H<sub>19</sub> ( $\delta$  3.87); (3) el protón carbonílico H<sub>6</sub> ( $\delta$  3.89) se acopla

con H<sub>5</sub> (δ 1.93) y con el metileno C<sub>7</sub> (δ 2.39 y 2.53) y, la señal en 2.53 ppm (H<sub>7α</sub>) se acopla alílicamente a los dos protones olefinicos (δ 4.91 y 5.20) que corresponden a C<sub>17</sub>. Los experimentos de acoplamiento <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C a larga distancia permitieron identificar los cuatro carbonos cuaternarios del sistema de anillos A/B y confirmaron el arreglo de las unidades de los protones acoplados, siendo las interacciones más importantes las siguientes: (1) El metilo 18 (δ 1.28) se acopla con C<sub>3</sub> (δ 48.58), C<sub>4</sub> (δ 41.36), C<sub>5</sub> (δ 51.0) y C<sub>19</sub> (δ 67.80); (2) El metilo 20 se acopla con C<sub>5</sub>, C<sub>9</sub> (δ 86.64) y C<sub>10</sub> (δ 45.68); (3) H<sub>7</sub> se acopla con C<sub>5</sub>, C<sub>8</sub> (δ 145.21) y C<sub>17</sub> (δ 114.72); (4) H<sub>1</sub> se acopla con C<sub>10</sub> y C<sub>20</sub> (δ 19.34); (5) H<sub>17</sub> (δ 5.21) se acopla con C<sub>7</sub> (δ 44.27) y C<sub>9</sub> (O'Mathúna y Doskotch, 1995). La posición de los grupos hidroximetileno y del acetoximetileno en C<sub>19</sub> se confirmó mediante las interacciones a larga distancia <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (<sup>3</sup>J) (Tsichritzis y Jakupovic, 1990).

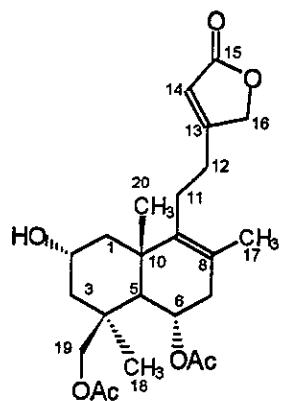


85

La naturaleza de la cadena lateral (C<sub>11</sub>-C<sub>16</sub>) se identificó mediante las señales para los protones 14 y 16. En una cadena saturada se observa la señal de un metilo doblete a δ 0.95 para H<sub>16</sub> y un par de dobles de dobles para H<sub>14</sub>. Al existir una insaturación entre C<sub>13</sub>-

C<sub>14</sub> se observa el metilo sobre doble ligadura ( $\delta$  ca 2.1) y un protón olefinico ( $\delta$  ca 5.6) (Tsichritzis y Jakupovic, 1990). Por ejemplo, si existe una insaturación en C<sub>13</sub>-C<sub>14</sub> y un hidroximetileno en C<sub>15</sub>, en RMN <sup>1</sup>H se observa un sistema ABX constituido por el protón olefinico y los protones del hidroximetileno con  $J_{AX} = 7.5$  Hz (acoplado a tres enlaces) y el metilo sobre doble ligadura aparece como un singulete ligeramente ancho. La orientación del metilo sobre doble ligadura (*cis* o *trans*) con respecto al protón olefinico se ha determinado por estudios nOe: la irradiación de H<sub>14</sub> ( $\delta$  5.34) aumenta la señal del metilo H<sub>16</sub> ( $\delta$  1.70) y los protones olefinicos H<sub>15</sub> ( $\delta$  4.46 y 4.43) en 6 y 3 %, respectivamente. La irradiación del metilo provoca sólo el incremento de la señal del protón olefinico en 8%, por lo tanto, el metilo y el protón olefinico mantienen una relación *cis* (Pcolisnski *et al.*, 1995). Se ha observado que la señal del metilo olefinico H<sub>16</sub> en los compuestos con configuración *Z* (*cis*) aparece a campo más alto ( $\delta$  1.71) y la señal para C<sub>16</sub> aparece a campo más bajo ( $\delta$  23.3) que los análogos con configuración *13E* (*trans*) (Su *et al.*, 1994).

La estereoquímica relativa de los centros quirales se ha asignado por interacciones nOe y mediante el análisis de los patrones de acoplamiento interprotónicos (Pcolisnski *et al.*, 1995; Tasdemir, *et al.*, 1996). Por ejemplo, en la 6,19-diacetilamenólida A (**86**) el protón H<sub>2</sub> presenta dos constantes de acoplamiento grandes ( $J = 11.4$  Hz) y dos pequeñas ( $J = 3.8$  Hz), indicando una orientación axial. El protón H<sub>6</sub> presentó esta misma orientación ( $J = 11.9, 8.8$  y  $6.4$  Hz), evidenciada a través de las interacciones *trans*-diaxiales con H<sub>7ax</sub> ( $J = 8.8$  Hz) y H<sub>5</sub> ( $J = 11.9$  Hz). La configuración relativa se confirmó mediante los nOe, además de permitir establecer la posición de todos los sustituyentes en la cara  $\alpha$  o  $\beta$  del sistema decalina. Esto permite establecer también la naturaleza de la fusión de los anillos como se ilustra en la figura 16 para el diterpeno **86** (O'Mathúna y Doskotch, 1994b).



86

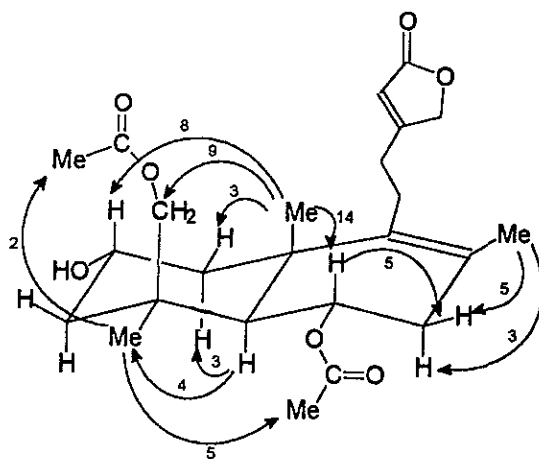


Figura 16. Porcentaje del incremento en la relajación de las señales producto de los experimentos en la espectroscopía diferencial nOe para el compuesto 86.

### 2.5.2.3. Espectrometría de masas.

En la mayoría de los casos, la espectrometría de masas se ha empleado para confirmar la estructura establecida por RMN. Los principales picos de fragmentación se originan mediante fragmentaciones multicéntricas tipo McLafferty de la cadena lateral y la pérdida del anillo B a través de los procesos de retro Diels-Alder en compuestos con insaturación en C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub> (Jefferies *et al.*, 1974).



## 2.6. Métodos empleados para establecer la configuración relativa y absoluta.

El establecimiento de la configuración relativa y absoluta de compuestos con uno o varios centros quirales se realiza a través del empleo de diferentes métodos, que implican la degradación química, la obtención de constantes físicas, la obtención de diastereoisómeros con reactivos quirales o el análisis conformacional mediante mecánica molecular complementado con la difracción de rayos X. El uso de un método o la combinación de varios dependerá de la información disponible en la literatura con relación a compuestos similares, ya que en ocasiones se podrá establecer la configuración absoluta con sólo la obtención de una constante física experimental, *e.g.* la rotación óptica o el dicroísmo circular (DC).

La revisión bibliográfica que se presenta a continuación, únicamente describe el empleo de los métodos utilizados para establecer la configuración relativa y absoluta de los productos naturales aislados en el presente estudio.

### 2.6.1. Métodos degradativos.

Una de las primeras metodologías empleadas para determinar la configuración absoluta de C<sub>6</sub>-alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas fueron los métodos degradativos, debido a que generan compuestos oxigenados cuya estereoquímica puede ser determinada fácilmente.

La degradación química de la boronólida (**26**) se realizó a través de la saponificación, oxidación con peryodato, ozonólisis oxidativa e hidrólisis básica y ácida, para obtener una mezcla de ácidos, entre ellos, el ácido málico que proviene de los átomos de carbono 4, 5, 6 y 1' de la boronólida (**26**); de esta manera, la configuración absoluta de C<sub>6</sub> en el producto natural se relacionó con la configuración absoluta en C<sub>2</sub> del ácido málico,

el cual se esterificó para obtener el derivado 2-(+)-dibutilo y se comparó por cromatografía de gases con los ésteres L-malato de 2-(+)-dibutilo y DL-malato de 2-(+)-dibutilo. Esta metodología permitió establecer la configuración (*R*) para el ácido málico derivatizado de la boronólida (26) y, por lo tanto, la configuración absoluta para el centro estereogénico C<sub>6</sub> del producto se estableció como (*R*). Este resultado se confirmó con el registro del DC del producto natural, observándose un efecto Cotton positivo a 260 nm (Davies-Coleman y Rivett, 1987).

La configuración absoluta de la sinrotólida (29) se estableció también por degradación química. Primero se realizó una ozonólisis reductiva la cual proporcionó dos productos, la saponificación del producto principal que provenía de la cadena lateral generó la 6-desoxialosa y la configuración absoluta de esta hexosa se determinó preparando el derivado 2-(-)-octil-glicósido, que al ser comparado por cromatografía de gases con los glicósidos 2-(-)-octil y 2-(±)-octil de la 6-desoxi-D-alosa, permitió establecer una configuración (*L*) para el derivado 6-desoxialosa de la sinrotólida (22) (Davies-Coleman *et al.*, 1987).

Para las pectinólidas A-C (50-52), también se empleó la técnica de ozonólisis en la determinación de la configuración absoluta de la cadena lateral. La pectinólida A (50) y la C (52) proporcionaron el mismo producto de degradación, el ácido 2-acetiloxihexanoico y, al saponificarse generó el ácido (+)-2*S*-hidroxihexanoico, que fue idéntico al obtenido a través de la ozonólisis de la pectinólida B (51). Con el registro del DC de este ácido se observó un débil efecto Cotton negativo a 244 nm ( $\Delta\epsilon = -0.01$ ) y positivo a 209 nm ( $\Delta\epsilon = +1.58$ ), permitiendo confirmar la configuración absoluta (*S*) para el centro estereogénico C<sub>3</sub>. (Pereda-Miranda *et al.*, 1995).

### 2.6.2. Método físicos.

Una adecuada asignación de la configuración absoluta se logra en numerosas ocasiones mediante el análisis de las propiedades quirópticas de las sustancias quirales. Estas propiedades surgen de la interacción no destructiva de los compuestos en estudio con la radiación anisotrópica (luz circular polarizada) y permiten diferenciar entre los dos enantiómeros de un compuesto quiral. Los métodos quirópticos incluyen la rotación óptica, la dispersión óptica rotatoria (DOR) y el DC. La aplicación de estas técnicas depende, en la mayoría de los casos, de la presencia de un cromóforo en el compuesto en estudio (Eliel y Wilen, 1994). El cromóforo de mayor utilidad hasta ahora es el grupo carbonilo, aunque este grupo es simétrico, un medio ambiente asimétrico (sustituyentes) induce la asimetría en la distribución electrónica y bajo estas condiciones se observa un efecto Cotton, generado por la banda  $n \rightarrow \pi^*$ . En las curvas de DC y DOR, el efecto Cotton podrá ser positivo o negativo (fig. 17) dependiendo de la orientación de los sustituyentes cercanos al grupo cromóforo (Juaristi, 1991).

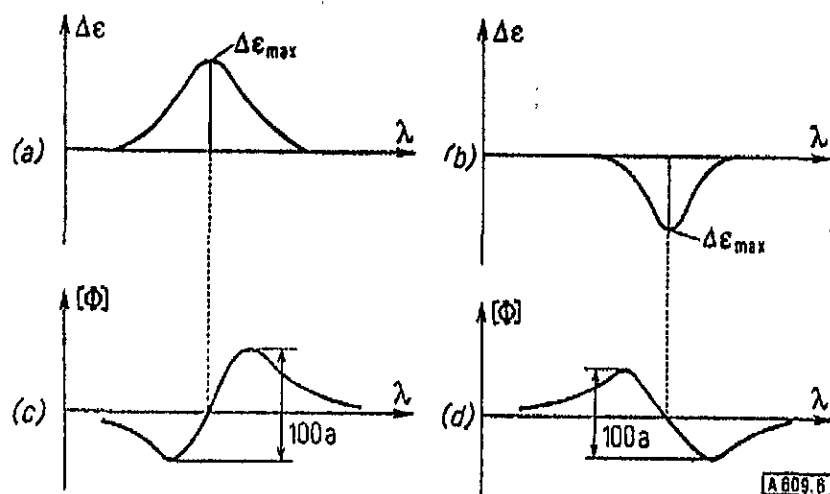
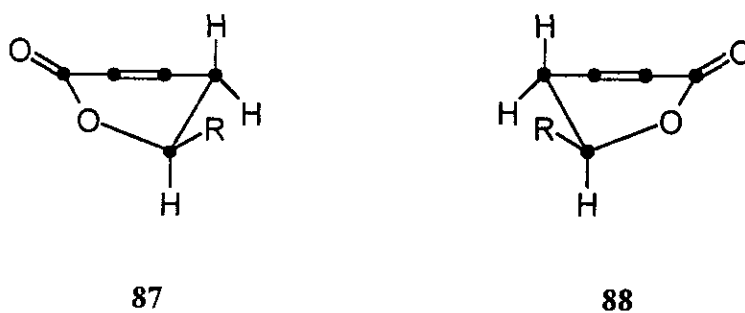


Figura 17. Curvas de DC (a y b) y de DOR (c y d) con efecto Cotton positivo (a y c) y negativo (b y d).

Para encontrar la relación entre el signo del efecto Cotton y la geometría de la molécula, se han realizado estudios empíricos, semiempíricos y teóricos que han llevado a establecer diferentes reglas (*e.g.* la regla del octante) (Minkin *et al.*, 1977; Sneath, 1968).

### 2.6.2.1. La regla de Sneath.

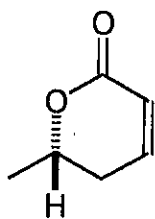
En cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas, uno o ambos de los planos locales simétricos a través del grupo carbonilo se encuentra desviado y, por lo tanto, la regla del octante característica para el cromóforo carbonilo de cetona no se aplica directamente (Juaristi, 1991; Minkin *et al.*, 1977). La regla de Sneath se basa en el signo del efecto Cotton de un compuesto, para asignar la conformación **87** (-) u **88** (+) para una lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada, asumiendo que el grupo éster permanece coplanar y que la orientación de los sustituyentes en C<sub>5</sub> ó C<sub>6</sub> se conoce (Beecham, 1972). Generalmente, la configuración relativa para el centro C<sub>6</sub> se establece a partir de los valores para las constantes de acoplamiento en la RMN <sup>1</sup>H (ver sección 2.5.1.2) o mediante difracción de rayos X.



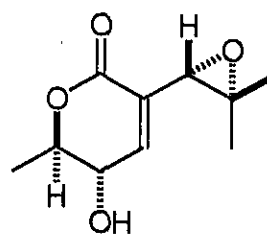
Sneath aplicó esta relación a un compuesto con una estereoquímica absoluta conocida, el ácido (+)-parasórbico (**89**). Se estableció por estudios de RMN que el grupo

metilo presentaba una orientación *pseudo*-ecuatorial y, al registrar un efecto Cotton positivo,  $\Delta\epsilon_{\max} = +2.25$  a 262 nm se asignó la conformación **88** con una configuración absoluta (*S*) para esta 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona (Snatzke, 1968).

En la aspirona (**90**), los resultados de RMN indicaron que los sustituyentes en C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> se encuentran en una orientación *cis* diecuatorial y el signo del efecto Cotton  $n \rightarrow \pi^*$  ( $\Delta\epsilon_{\max} = -4.8263$  nm) permitió determinar la configuración absoluta (*R*) (Beecham, 1972).



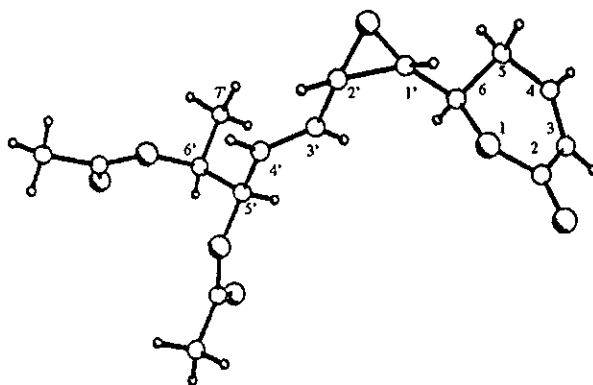
**89**



**90**

Esta regla se ha venido aplicando de manera rutinaria para determinar la configuración absoluta del centro quiral C<sub>6</sub> en diferentes tipos de compuestos que contienen en su estructura una 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona. La estereoquímica establecida mediante el empleo de la regla de Snatzke se ha confirmado con estudios cristalográficos de rayos X, degradación química y síntesis (Davies-Coleman y Rivett, 1989).

La figura 18 ilustra la proyección generada mediante cristalografía de rayos X de la 5-desacetiloxi-5'-*epi*-olguina, en esta proyección se observa que el protón H<sub>6</sub> se encuentra en una conformación  $\alpha$  axial, el anillo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona en *pseudo*-silla, la cadena lateral *pseudo*-ecuatorial, H<sub>6</sub>-H<sub>1'</sub>, H<sub>2'</sub>-H<sub>3'</sub> y H<sub>4'</sub>-H<sub>5'</sub> están en relación *quasi-anti*-periplanar y H<sub>5'</sub>-H<sub>6</sub> *sin*-clinal. Al registrar el DC de esta 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona se observó un efecto Cotton positivo. Esta investigación confirma la propuesta de Snatzke para la conformación de mínima energía del núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona necesaria para la deducción correcta de la configuración absoluta para el centro C<sub>6</sub> (Snatzke, 1968). Además, la conformación en el estado sólido no difiere de la que adopta esta molécula en solución de acuerdo con los datos para las constantes de acoplamiento observados ( $^3J_{H-H}$ ) en la RMN <sup>1</sup>H (Delgado *et al.*, 1985; Pereda-Miranda *et al.*, 1990).



**Figura 18.** Proyección generada mediante difracción de rayos X de la 5-desacetiloxi-5'-*epi*-olguina (43).

En el cuadro 4 se presentan los datos de una serie de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas aisladas en la familia de las labiadas donde el efecto Cotton positivo ha permitido confirmar o

establecer la configuración absoluta del centro estereogénico C<sub>6</sub> (Davies-Coleman y Rivett, 1989). Así, se puede concluir que todas las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de las labiadas presentan la misma configuración absoluta para el carbono asimétrico C<sub>6</sub> del núcleo de  $\gamma$ -lactona.

**Cuadro 4.** Datos de DC para las C<sub>6</sub>-alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas aisladas de las labiadas.

Compuesto	DC $\Delta\epsilon$	n $\rightarrow$ $\pi^*$ $\lambda$ nm	Estereoquímica para C <sub>6</sub>
Anamarina (42)	+	260	(R)
Boronólida (26)	+ 2.48	256	(R)
Desacetilumravumbólida (25)	+ 0.9	255	(R)
5-desacetiloxi-5'- <i>epi</i> -olguina (43)	+ 2.8	256	(R)
Hiptólida (40)	+ 2.3	257	(R)
Olguina (41)	+	270	(R)
Pectinólida A (50)	+ 2.4	265	(S) <sup>1</sup>
Sindenólida (30)	+ 2.35	257	(R)
Sinrotólida (29)	+ 2.45	266	(R)
Sinparvólida A (31)	+ 2.37	255	(R)

<sup>1</sup>El cambio en el descriptor corresponde a la inversión en la prioridad de los sustituyentes según la regla de Crag-Ingold-Prelog.

Un segundo ejemplo que describe la aplicación de la regla de Sneath es la determinación de la estereoquímica del centro estereogénico C<sub>6</sub> en las pectinólidas A-C (50-52). En primer lugar, se consideró una orientación *pseudo*-ecuatorial de la cadena lateral en C<sub>6</sub> y se estableció que el grupo acetoxilo en C<sub>5</sub> tiene una configuración axial de acuerdo al valor de la constante de acoplamiento entre H<sub>5</sub> y H<sub>6</sub> ( $J = 2.9$  Hz). En segundo término, el efecto Cotton positivo observado (fig. 19) estableció la configuración absoluta

(*S*) para el centro quiral C<sub>6</sub> en estas 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas citotóxicas (Pereda-Miranda *et al.*, 1993; 1995).

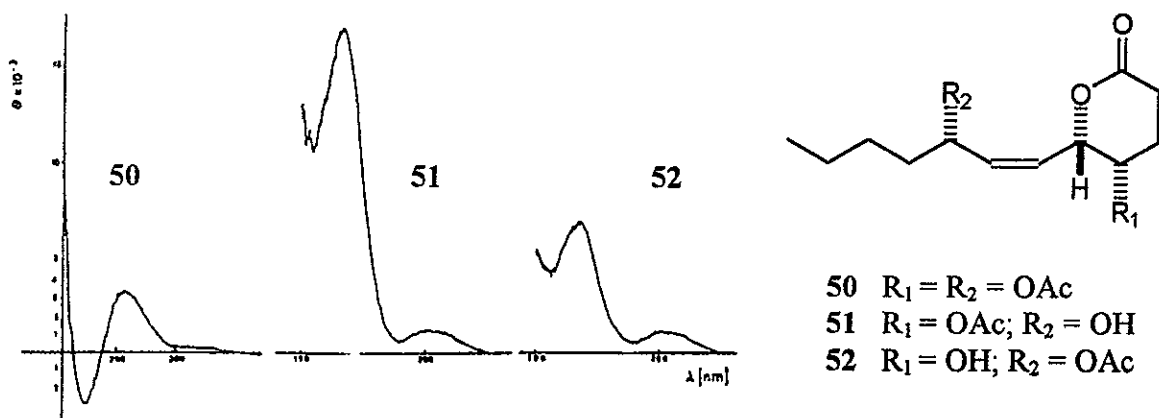


Figura 19. Curvas de DC (MeOH) de las pectinólidas A-C (50-52).

### 2.6.3. Métodos químicos.

#### 2.6.3.1. Esteres de Mosher.

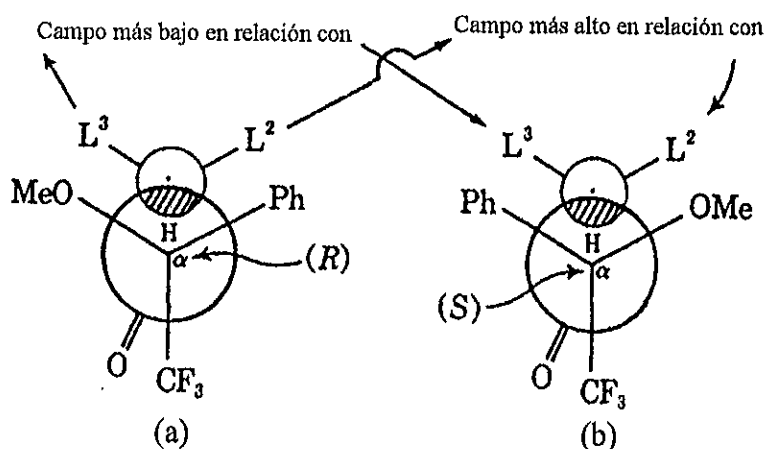
La correlación de la configuración absoluta con los desplazamientos químicos en RMN para los derivados diastereoisoméricos del  $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -trifluorometilfenilacetato (MTPA) de alcoholes y aminas fue desarrollada por Dale y Mosher (Dale *et al.*, 1969).

Inicialmente, el método se utilizó para determinar la composición enantiomérica de alcoholes y aminas, a través de la formación de los ésteres diastereoisoméricos (*R, R*) y (*R, S*) a partir del carbinol con el *R*-(+)-MTPA-Cl enantioméricamente puro. Se obtienen el espectro de RMN de flúor y/o protónica y, con el registro de las áreas bajo las curvas de las señales de los dos diastereoisómeros, se calcula la composición enantiomérica (Dale *et al.*, 1969).



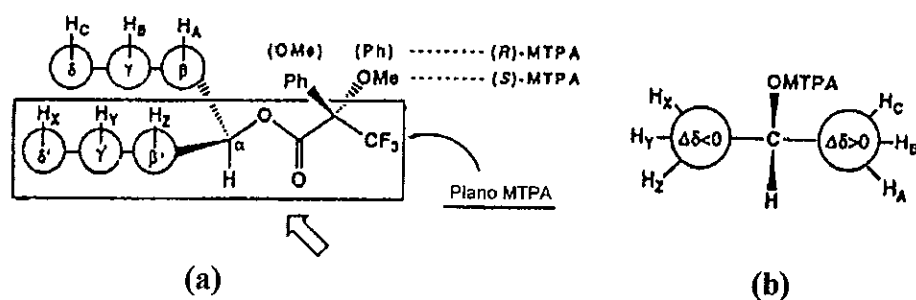
Posteriormente, el método se aplicó para correlacionar la configuración absoluta de estos diastereoisómeros con las diferencias en los desplazamientos químicos en RMN de  $^{19}\text{F}$  y  $^1\text{H}$ . En este caso, se obtienen los ésteres *R*-MTPA y *S*-MTPA a partir del carbinol quiral puro y los cloruros de Mosher correspondientes (Ohtani *et al.*, 1991; Sullivan *et al.*, 1973).

Mosher y colaboradores observaron que al registrar la RMN protónica de los diastereoisómeros preparados a partir de 40 compuestos, los sustituyentes ( $L_2$  y  $L_3$ ) presentaban un patrón no equivalente; esto es, la señal del grupo  $L_3$  en el éster (*R*) se observaba a campo más bajo con respecto a la señal del correspondiente éster (*S*), mientras que con el sustituyente  $L_2$  ocurría lo contrario. De esta manera, propusieron el modelo para la conformación de mínima energía en solución ilustrado en la figura 20. El grupo  $\alpha$ -trifluorometilo se eclipsa con el carbonilo, causando que el grupo  $L_3$  del carbinol quede con una orientación *sin*-periplanar con el fenilo del éster (*S*), mientras que en el éster (*R*) se encuentra eclipsado con el metoxilo. La anisotropía del fenilo resulta entonces la responsable de los desplazamientos de las señales a campos más altos para el grupo  $L_3$  del éster (*S*) (Dale y Mosher, 1973; Sullivan *et al.*, 1973).



**Figura 20.** Modelo de correlación configuracional para los ésteres *R*-MTPA (a) y *S*-MTPA (b) según Dale y Mosher (1973).

Othani y colaboradores (1991) utilizaron el método de Mosher aplicando la espectroscopía de alta resolución FT-NMR. De esta manera, se logró examinar la diferencia en los desplazamientos químicos de un número mayor de protones al incluir técnicas bidimensionales (*e.g.*  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY). El modelo de correlación configuracional de Mosher se localiza en el plano del MTPA (fig. 21a), en donde se ubica al protón del carbinol, el carbonilo del éster y el trifluorometilo de manera eclipsada (conformación de máxima estabilidad). Debido al efecto diamagnético del anillo de benceno, las señales  $H_{A,B,C...}$ -RMN del éster *R*-MTPA aparecen a campo más alto que las correspondientes al éster *S*-MTPA. Lo contrario ocurre con las señales para  $H_{X,Y,Z...}$ . Por lo tanto, al obtener la diferencia de los desplazamientos químicos ( $\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$ ), los protones a la derecha del plano MTPA deben presentar valores positivos ( $\Delta\delta > 0$ ) y los correspondientes a los protones del lado izquierdo del plano deben ser negativos ( $\Delta\delta < 0$ ). Así, se construye el modelo molecular del compuesto en cuestión para confirmar que todos los protones asignados con valores de  $\Delta\delta$  positivos y negativos se localicen del lado derecho e izquierdo del plano MTPA, respectivamente (fig. 21b). Por último, se establece la configuración absoluta del compuesto aplicando la regla de Cahn-Ingold-Prelog.

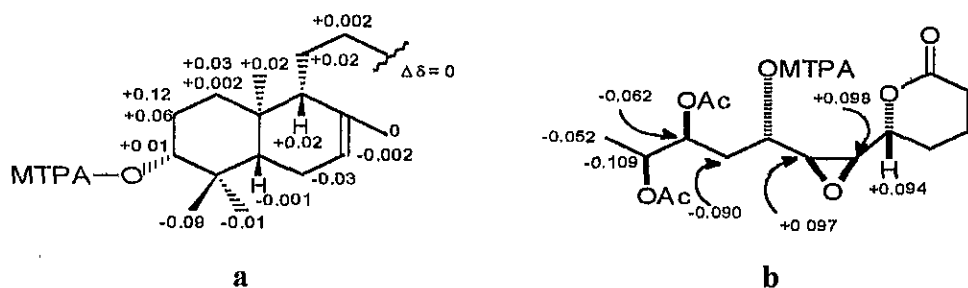


**Figura 21.** Conformación de máxima estabilidad y plano del MTPA (a). Modelo para determinar la configuración absoluta en alcoholes secundarios (b).

Esta metodología se validó con la síntesis de los ésteres de Mosher del (-)-mentol, (-)-borneol, colesterol y ergosterol, cuya estereoquímica absoluta se conocía (Kusumi *et al.*, 1992; Morita *et al.*, 1993; Othani *et al.*, 1991).

El establecimiento de la configuración absoluta por el método de Mosher se ha aplicado a un gran número de compuestos entre los que se incluyen terpenoides, ésteres de ácidos grasos hidroxilados (Ono *et al.*, 1993), carotenoides (Tsushima *et al.*, 1996), alcaloides de la quinolina (McCormick *et al.*, 1996), polihidroxiesteroides (De Riccardis *et al.*, 1996), alcoholes poliacetilénicos (Dai *et al.*, 1996),  $\gamma$ -hidroxibutenólidas (De Rosa *et al.*, 1998) y en numerosas acetogeninas (Chávez y Mata 1998; Chávez *et al.*, 1998; Hui *et al.*, 1989; Rieser *et al.*, 1992; Rieser *et al.*, 1993; Woo *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1996). Recientemente, se describió la determinación de la configuración absoluta de un diterpeno de tipo labdano aislado del insecto *Ceroplastes pseudocoriferus* mediante la aplicación de esta metodología (fig. 22a) (Toki *et al.*, 1999).

El método también se ha aplicado en la determinación de la configuración absoluta de los centros quirales en la cadena lateral de C<sub>6</sub>-alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas. En la sinparvólida A (31) se estableció la estereoquímica absoluta del alcohol secundario en C<sub>3</sub> como (*S*) al aplicar el modelo del plano MTPA (fig. 22b) (Davies-Coleman y Rivett, 1996).



**Figura 22.** Diferencias en los desplazamientos químicos de los ésteres de Mosher ( $\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$ ) del diterpeno aislado del insecto *Ceroplastes pseudocoriferus* (a) y de la sinparvólida A (30) (b).

## 2.6.4. Métodos teóricos.

### 2.6.4.1. Mecánica molecular.

La mecánica molecular se encarga de utilizar métodos de cálculo diseñados para conocer con bastante precisión las estructuras y las energías mínimas de las moléculas y, localizar las conformaciones más estables de una molécula (mínimo energético). Los cálculos de mecánica molecular emplean una serie de ecuaciones derivadas empíricamente de la superficie de energía potencial de la molécula en términos de la posición nuclear. Esta serie de funciones potenciales, llamadas campo de fuerza incluyen al tipo de enlace y los ángulos de valencia y dihédrico, con parámetros ajustables, tales como geometría, energías conformacionales y calores de formación, que al ser optimizados permiten obtener el mejor ajuste entre las propiedades calculadas y experimentales de las moléculas (Burket y Allinger, 1982).

Para correlacionar las constantes de acoplamiento vecinales  $^1\text{H}-^1\text{H}$  ( $J$ ) con la estereoquímica en moléculas flexibles (e.g. derivados acíclicos de azúcares) se requiere la evaluación exacta de la energía relativa de cada posible conformero, debido a que las constantes de acoplamiento registradas experimentalmente equivalen al promedio ponderado de una mezcla en equilibrio de todos los posibles conformeros. Masamune y colaboradores (1986) buscaron reproducir las constantes de acoplamiento vecinales (valores de  $^3J$ ) con la ayuda de mecánica molecular y la ecuación 1, utilizando tetra y hexaalditoles.

$$J_{\text{calc}} = \sum_{i=1}^m n_i J_i \quad (1)$$

Donde, las  $J$  calculadas ( $J_{\text{calc}}$ ) entre un par de protones a través de un enlace C-C es el promedio de todos los conformeros que contribuyen,  $m$  es el número total de conformeros a ser considerados,  $n_i$  es la fracción molar del  $i$ ésimo conformero basado en la energía estérica relativa de este conformero,  $n_1 + n_2 + \dots + n_m = 1$ , y  $J_i$  es la constante de acoplamiento vecinal ( $^3J_{\text{HH}}$ ) del  $i$ ésimo conformero calculada por una ecuación tipo Karplus generalizada cuyos valores se parametrizaron al tomar en consideración la geometría obtenida por mecánica molecular y las constantes de acoplamiento experimentales (ecuación 2) (Haasnoot *et al.*, 1980).

$$^3J_{\text{HH}} = P_1 \cos^2\phi + P_2 \cos\phi + P_3 + \sum \Delta\chi_i \{P_4 + P_5 \cos^2(\epsilon_i\phi + P_6 |\Delta\chi_i|)\} \quad (2)$$

Donde:  $\Delta\chi_i = \Delta\chi_i^\alpha + P_7 \Delta\chi_{ij}^\beta$

y  $\Delta\chi^{(\text{átomo } \alpha \text{ ó } \beta)} = \chi^{(\text{átomo } \alpha \text{ ó } \beta)} - \chi^{\text{hidrógeno}}$

Esta ecuación considera que  $^3J_{\text{HH}}$  depende de tres factores:  $\phi$ , el ángulo dihedral; la electronegatividad ( $\Delta\chi_i$ ) de cada sustituyente enlazado al fragmento H-C-C-H; y la orientación de los sustituyentes ( $\epsilon_i$ ) que tendrá un valor de +1 ó -1 dependiendo de su ubicación con respecto al protón geminal acoplado. Los parámetros  $P_1$ - $P_7$  se determinaron empíricamente con la ayuda de 315 datos de constantes de acoplamiento. Debido a la complejidad de esta ecuación, se ha implementado dentro de programas de cómputo, como el PCModel o el Altona entre otros, este último fue desarrollado durante el análisis conformacional de lactonas sesquiterpénicas y derivados de parvifolina y permite calcular los gráficos del ángulo dihedral contra la constante de acoplamiento del sistema H-C-C-H a

partir de los datos de las constantes de acoplamiento vecinales H-H registradas por RMN (Cerde-García-Rojas *et al.*, 1990).

El cálculo de la población conformacional expresada en fracción molar ( $n$ ) se lleva a cabo utilizando la relación entre la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) y la constante de equilibrio ( $K$ ):  $\Delta G = -RT \ln K$ , donde  $R = 1.98 \times 10^{-3}$  kcal/mol K y  $T = 298$  K. Considerando que  $m$  es el número total de conformeros a ser considerados,  $n_i$  es la fracción del  $i$ ésimo conformero,  $K_{n_1 - n_2} = n_2 / n_1$  y  $K_{n_2 - n_m} = n_m / n_2$  y que  $n_1 + n_2 + \dots + n_m = 1$ , y como  $\Delta S \cong 0$ ,  $\Delta G \cong \Delta H \cong \Delta E_{\text{MMX}}$ , se puede sustituir la constante de equilibrio por las fracciones molares en la ecuación libre de Gibbs para cada conformero en equilibrio y, de esta manera, se obtiene una serie de ecuaciones de acuerdo al número total de conformeros, que al ser despejadas permite calcular la fracción molar de cada uno de éstos. Por ejemplo, considerando tres conformeros en equilibrio, se aplican las siguientes ecuaciones (Arnó *et al.*, 1998):

$$n_2 = 1 / \{ \exp [(E_2 - E_1) / RT] + \exp [(E_2 - E_3) / RT] + 1 \}$$

$$n_3 = n_2 \exp [(E_2 - E_3) / RT], \text{ y}$$

$$n_1 = 1 - n_2 - n_3$$

Esta metodología se ha aplicado para determinar la proporción de los diferentes conformeros de diterpenos tetracíclicos en el sistema biciclo[4.2.0]octano (Arnó, 1998). En proantocianidinas de tipo A se utilizó para conocer las conformaciones de máxima estabilidad y determinar la influencia en las constantes de acoplamiento al derivatizar al producto natural (Calzada *et al.*, 1999). También se ha empleado para establecer el cambio

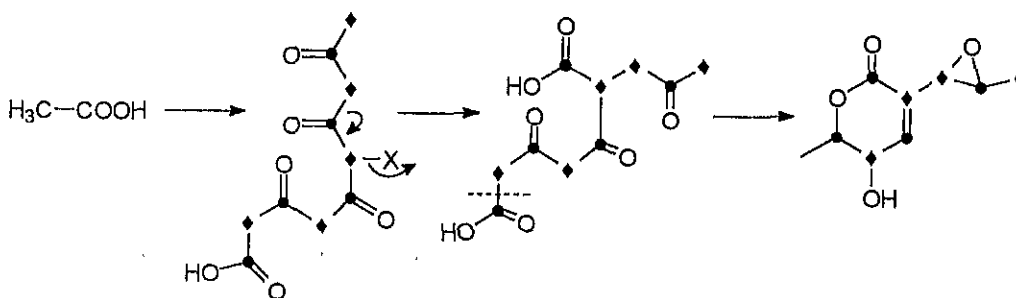
conformacional que sufren los furanósidos al sintetizar oligonucleósidos con un átomo de azufre (Beevers *et al.*, 1999).

## 2.7. Biosíntesis.

### 2.7.1. 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas.

Se han realizado estudios biosintéticos con  $C_6$ -alquil y  $C_6$ -aril-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas. Para el ácido parasorbico (89), se sugiere que la ruta biosintética principal es la vía del acetato malonato, ya que se observó que al utilizar (1- $^{14}C$ )- y (2- $^{14}C$ )-acetato, así como (1- $^{14}C$ )-malonato de sodio, hay una alta incorporación isotópica en  $C_1$ ,  $C_5$  y  $C_6$ .

Se han realizado investigaciones biosintéticas exhaustivas con la aspirona (90), aislada del hongo *Aspergillus melleus*, encontrándose que ésta ocurre a través de un rearrreglo tipo Favorskii de una cadena lineal de policetona (fig. 23). Al utilizar como precursor acetato marcado doblemente con  $^{13}C$  se logró establecer que 90 proviene de tres unidades intactas de acetato y tres carbonos provenientes del rompimiento de unidades de acetato, además de que el enlace entre los  $C_3$  y  $C_7$  se forma por dos unidades de acetato enlazadas cabeza-cabeza.



**Figura 23.** La incorporación de  $^{13}C$ -acetato en la biosíntesis de la aspirona (90).

Por último, la fenilalanina es el principal precursor en la biosíntesis de la psitolina (91), aislada de *Psilotum nudum*. La ruta biosintética se propuso mediante los estudios de incorporación isotópica con  $R,S$ -[2',3'- $^{14}C_2$ ] y  $S$ -[1'- $^{14}C$ ]-fenilalanina (fig. 24), la extensión de la cadena lateral se lleva a cabo por la adición de una unidad de acetato como malonil CoA (Davies-Coleman y Rivett, 1989). Sin embargo, no se han realizado estudios sobre la biosíntesis de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de las labiadas, pero podría realizarse a partir de carbohidratos.

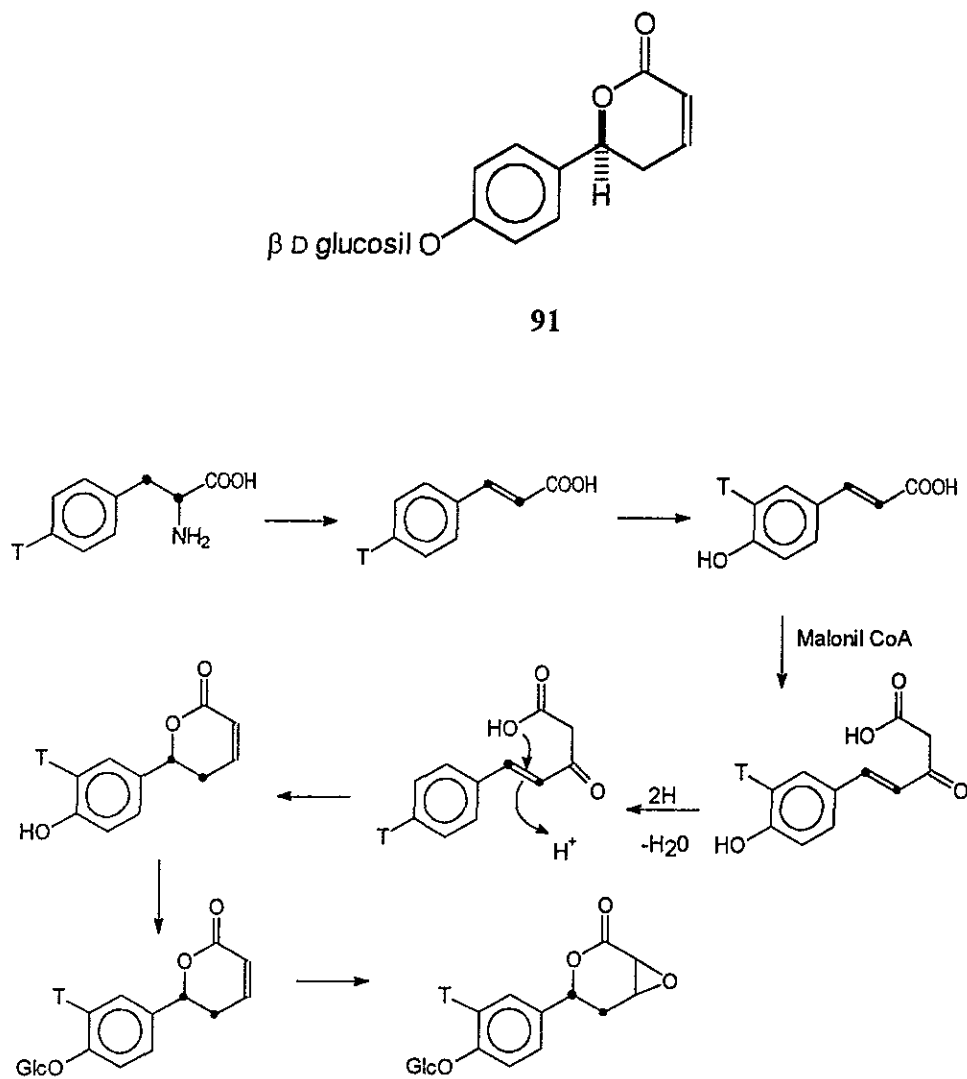


Figura 24. Biosíntesis de psitolina (91) a partir de fenilalanina.

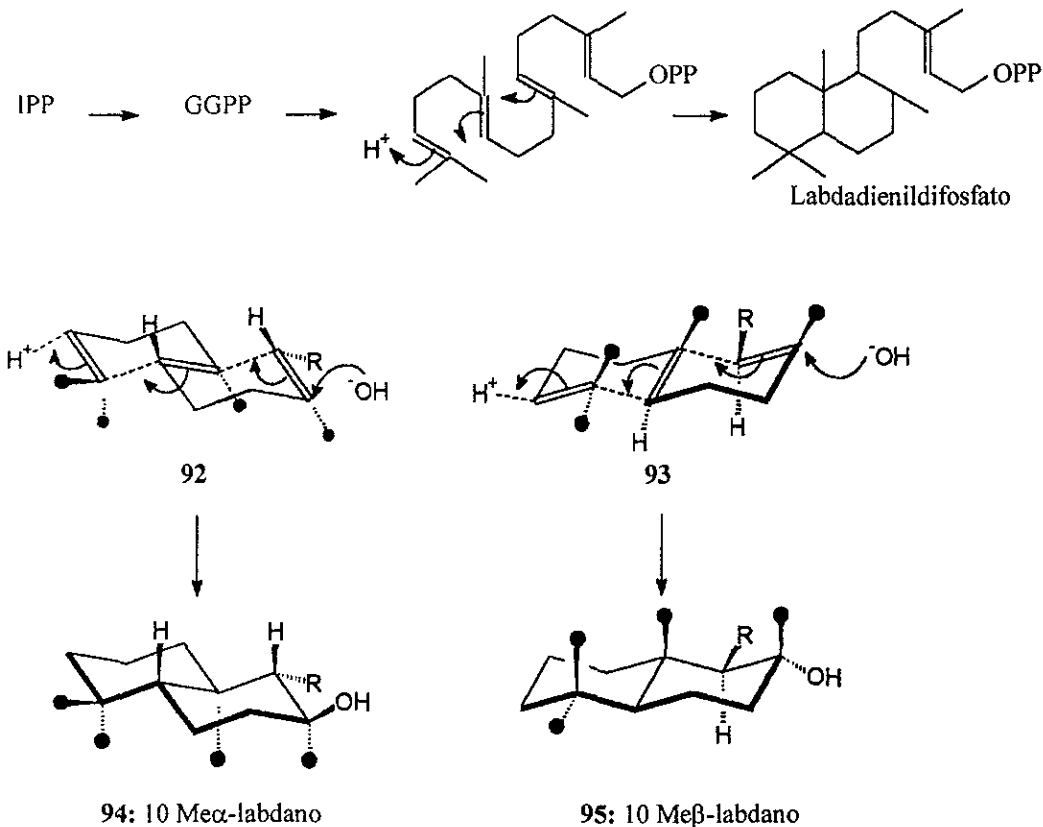


### 2.7.2. Diterpenoides del grupo labdano.

Los terpenoides son compuestos cuyo esqueleto está formado por unidades de isopreno. El isopentenil difosfato (IPP) se forma a partir del ácido mevalónico, que a su vez proviene de la condensación de tres moléculas de la acetil Co A (Cane, 1999). El IPP se isomeriza a 3,3-dimetilalildifosfato (DMAPP) y se condensa a través de enlaces cabeza-cola a otra molécula de IPP para producir geranilpirofosfato (GPP). Esta condensación se repite por reacciones adicionales del producto con IPP para generar una serie de ésteres de pirofosfato llamados prenilogos: farnesilpirofosfato (FPP), geranilgeranilpirofosfato (GGPP) y geranilfarnesilpirofosfato (GFPP) que dan origen a los terpenoides correspondientes (Cane, 1999; Mannito, 1981).

La ciclización del GGPP para la formación de diterpenos bicíclicos, específicamente del grupo labdano, se lleva a cabo a través de la adición de un protón al doble enlace terminal (fig. 25) ocurriendo una unión *trans* entre los anillos A y B mediante un mecanismo concertado, en el cual el doble enlace no conjugado sufre múltiples adiciones. La conformación de la cadena poliénica durante el proceso de ciclización corresponde a la llamada silla-silla y, dependiendo de la conformación del sustrato proquiral (**92** ó **93**) da origen a dos esqueletos de labdano enantioméricos, 10-Me $\alpha$ -labdano (**94**) y 10-Me $\beta$ -labdano (**95**). Estas estructuras tienen la misma configuración relativa en los centros asimétricos C<sub>5</sub>, C<sub>9</sub> y C<sub>10</sub> y, como consecuencia, la determinación de la configuración absoluta de cualquiera de estos carbonos asimétricos es suficiente para determinar la de todos los restantes. La formación enantioespecífica de estos compuestos indica un proceso controlado enzimáticamente y se ha encontrado que pueden coexistir en una misma planta (Cane, 1999; Mannito, 1981). En la literatura existen varios ejemplos de especies vegetales

que biosintetizan ambas series de labdanos pero se ha comprobado la existencia de labdanos ópticamente puros a través de un aislamiento cuidadoso a partir de su fuente natural (Carman y Duffield, 1993). De esta manera, es necesario realizar estudios enzimáticos exhaustivos que permitan detectar la presencia de enzimas específicas en las especies que producen ambas series enantioméricas. Numerosos compuestos de tipo labdánico son transformados en las plantas en diterpenos tri-, tetra-, y pentacíclicos a través de mecanismos que involucran una conformación estereoquímica definida por las ciclasas que controlan estos procesos y, evidentemente, estos compuestos también se presentan en las dos series enantioméricas (Herbert, 1989; Mannito, 1981).



**Figura 25.** Formación de las dos series enantioméricas para el esqueleto de labdano a partir de la unidad isoprenoide.

### 3. HIPOTESIS.

La información etnobotánica relacionada con el empleo de las especies medicinales mexicanas del género *Hyptis* (Lamiaceae) para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales e infecciones de la piel constituye un claro indicador de la presencia de principios biodinámicos cuyo potencial biológico podrá utilizarse en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Al mismo tiempo, el empleo de estas plantas en las prácticas agrícolas debido a sus propiedades insecticidas evidencia de manera adicional su potencial biológico de interés agroquímico. Al considerar criterios de tipo quimiotaxonómico, la presente investigación utilizó como una hipótesis de trabajo la suposición de que las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas citotóxicas características de este género y cuya biosíntesis, al parecer, se limita a las especies incluidas en la sección *Mesosphaeria* del género *Hyptis*, representarían los principios bioactivos de la especie en estudio, *Hyptis spicigera*. Estos principios biodinámicos podrían detectarse utilizando un fraccionamiento biodirigido mediante el monitoreo de la actividad citotóxica sobre líneas celulares derivadas de tumores humanos.

## 4. OBJETIVO GENERAL.

El objetivo general del presente proyecto de investigación doctoral consistió en el aislamiento, la purificación y la caracterización de la estructura molecular de los metabolitos secundarios responsables de la actividad citotóxica e insecticida del extracto cloroformo-metanólico obtenido de las partes aéreas de *Hyptis spicigera* (Lamiaceae). Adicionalmente, se planeó el establecimiento de la configuración absoluta de estos compuestos.

### 4.1. Objetivos específicos.

Para el cumplimiento del objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer el potencial citotóxico e insecticida del extracto orgánico total de *Hyptis spicigera*.
2. Realizar el fraccionamiento primario del extracto orgánico total de las partes aéreas de *Hyptis spicigera* y monitorear las actividades citotóxica e insecticida de las fracciones colectadas.
3. Purificar las fracciones bioactivas mediante métodos cromatográficos convencionales y la cromatografía de líquidos de alta resolución.
4. Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios bioactivos, mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas. La configuración absoluta de los metabolitos secundarios bioactivos se establecerá

empleando correlaciones químicas, estudios de mecánica molecular y aplicando el método de Mosher.

5. Determinar la actividad insecticida de los compuestos bioactivos utilizando el bioensayo del gusano barrenador del maíz *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae).
6. Determinar el potencial citotóxico de los compuestos bioactivos utilizando un panel de tres líneas celulares derivadas de tumores humanos: HCT-15 (carcinoma de colon), SQC-1UISO (carcinoma escamoso de cervix) y KB (carcinoma nasofaríngeo).

## 5. PARTE EXPERIMENTAL.

### 5.1. Procedimientos generales.

#### 5.1.1. Técnicas cromatográficas.

Se emplearon tres diferentes técnicas de cromatografía de adsorción:

- a) Cromatografía en columna abierta (CC).
- b) Cromatografía en capa fina (CCF).
- c) Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

##### 5.1.1.1. Cromatografía en columna abierta.

Esta técnica se desarrolló empacando una columna de vidrio con gel de sílice *flash* (40  $\mu\text{m}$ , J.T. Baker). La fase móvil fue eluida administrando una presión de 7 lb/pulg<sup>2</sup> con una bomba (GE Motors).

##### 5.1.1.2. Cromatografía en capa fina.

Para los análisis cromatográficos se siguieron las técnicas convencionales, utilizando cromatoplasmas de vidrio (5 × 10 cm, espesor 0.25 mm) cubiertas con gel de sílice 60F<sub>254</sub> (Merck) y para detectar los constituyentes en la placa cromatográfica, se empleó luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (365 nm), además de sulfato cérico como agente cromógeno (12 g de sulfato cérico, 22.5 mL de ácido sulfúrico y 350 g de hielo).

### **5.1.1.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución.**

La instrumentación utilizada consistió en dos cromatógrafos marca Waters (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division Milford, MA, EE.UU.) equipados con dos bombas (modelo 600E), dos detectores, uno de índice de refracción (modelo 410) y uno de arreglo de diodos (modelo 996), adaptados a una computadora (Optiflex 466/LE, DELL). El control de los equipos, la adquisición de los datos, así como, el procesamiento y el manejo de la información cromatográfica se realizaron con el programa Millennium 2000 (Waters). La resolución de las fracciones cromatográficas y/o de los crudos de reacción, así como la purificación de los compuestos, se efectuaron empleando columnas de gel de sílice (ISCO, 125 Å, tamaño de partícula 10 µm) en las escalas analítica (µporasil Waters de 3.9 × 300 mm), semipreparativa (ISCO, 10 mm × 250 mm) y preparativa (ISCO, 21.2 x 250 mm).

### **5.1.2. Instrumental analítico.**

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns o en un aparato digital Büchi (modelo 530) y no se encuentran corregidos. Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrómetro Perkin-Elmer (modelo 1699) en película con nujol y en pastilla de KBr. Los espectros de masas (EM) registrados mediante bombardeo rápido de átomos bajo la modalidad positiva (FAB<sup>+</sup>) utilizaron una matriz de glicerol en un espectrómetro Jeol SX (modelo 102-A). Los espectros generados mediante ionización química (CI) se registraron en un espectrómetro Hewlett-Packard (modelo 5985-B). Los espectros por impacto electrónico se registraron a 20 eV y 70 eV en un espectrómetro Hewlett-Packard (modelo 5989-A). Las rotaciones ópticas ( $[\alpha]_D$ ) y los valores de

dispersión óptica rotatoria (DOR) se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer 241. El dicroísmo circular (DC) se registró en un espectropolarímetro Jasco-600 CD a 25°C en CHCl<sub>3</sub>. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución protónica (<sup>1</sup>H; 500 MHz) y de carbono-13 (<sup>13</sup>C; 125.7 MHz), así como los experimentos DEPT, COSY, NOESY, HMQC y HMBC se registraron en un aparato Varian Unity Plus 500 o en un Bruker AMX-500. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) y <sup>13</sup>C (75.5 MHz) se generaron en un aparato Varian Unity Inova 300.

## 5.2. Material vegetal.

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se utilizaron las partes aéreas de una población de *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae) colectadas en Noviembre de 1989 en el Km 16 de la carretera Jalapa-Veracruz, estado de Veracruz, México. Un ejemplar de esta especie se depositó en el Herbario Nacional (Voucher M-21851), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

## 5.3. Extracción del material vegetal.

El material vegetal se dejó secar mediante exposición al aire libre a temperatura ambiente, se pulverizó en un molino de cuchillas modelo Wiley 4, obteniéndose 788 g de material vegetal seco y molido. Se procedió a la extracción a temperatura ambiente vía maceración con *n*-hexano (4 L), en tres ocasiones durante cinco días, filtrando el disolvente y concentrándolo después de cada operación. El material vegetal residual se extrajo con una mezcla de cloroformo-metanol (1:1) siguiendo el mismo procedimiento, resultando 34.5 g de un extracto con una coloración verdusca.



#### 5.4. Fraccionamiento primario del extracto orgánico total.

El extracto clorofórmico-metanólico se adsorbió en gel de sílice *flash* (30 g) y se depositó en una columna empacada con 450 g de la misma fase estacionaria para proceder a la resolución primaria del extracto. Se inició con  $\text{CHCl}_3$  y posteriormente se utilizó un gradiente de cloroformo-acetona y acetona-metanol para finalizar con MeOH, eluyendo un total de 79 fracciones de 200 mL cada una, las cuales se analizaron mediante CCF para reunir los eluatos tomando en cuenta la homogeneidad cromatográfica ( $R_f$ ) de sus constituyentes. De esta forma, se obtuvieron 10 subfracciones combinadas (I-X). Mediante la aplicación de un bioensayo para determinar el potencial insecticida de cada una de las subfracciones (ver sección 5.9.1, Parte experimental), se estableció que esta actividad se concentraba en la subfracción V. El cuadro 5 resume el fraccionamiento primario del extracto clorofórmico-metanólico, así como los sistemas de elución empleados para la obtención de las subfracciones combinadas.

**Cuadro 5.** Fraccionamiento primario del extracto total de *Hyptis spicigera*.

Eluyente	Proporción %	Número de Fracción	Fracciones combinadas	Cantidad	Clave
$\text{CHCl}_3$	100	1-5	1-5		I
$\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}$	60:40	6-22	6-8		II
			9-16		III
			17-22	57 mg	IV
$\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}$	40:60	23-45	23-37	6 g	V
			38-45	59 mg	VI
$\text{Me}_2\text{CO}$	100	46-54	46-54		VII
$\text{Me}_2\text{CO-MeOH}$	70:30	55-62	55-58		VIII
			59-62		IX
MeOH	100	63-70	63-79		X

## 5.5. Aislamiento y purificación de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona citotóxica.

La subfracción número V (6 g) se sometió a un segundo fraccionamiento en columna abierta de gel de sílice (200 g). Se utilizó la técnica *flash* para la elución del mismo sistema de disolventes empleado durante el fraccionamiento primario. Este procedimiento permitió colectar un total de 120 eluatos de 50 mL cada uno. El análisis mediante CCF permitió obtener 8 subfracciones, encontrándose que la subfracción 78-82 (200 mg), eluida con  $\text{CHCl}_3$ - $\text{Me}_2\text{CO}$  7:3 a partir de la fracción primaria V (ver sección anterior), desarrolló una actividad citotóxica significativa (KB:  $\text{CE}_{50}$  2.8  $\mu\text{g/mL}$ ). Esta subfracción se sometió a un procedimiento de purificación mediante CCF a escala preparativa, utilizando como sistema de elución *n*-hexano-AcOEt (75:25). La banda con  $R_f = 0.48$  (*n*-hexano-AcOEt, 6:4) proporcionó 12 mg de una 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona, como el constituyente citotóxico mayoritario. Este compuesto se denominó con el nombre trivial de *espicerólida* (1).

**Compuesto 1.** DC (*c* 0.06, MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) + 2.8 (256), 0 (239), -1.2 (230), -17.7 (204), +24.7 (200). IR (Nujol)  $\nu_{\text{max}}$  1740, 1720, 1630, 1374, 1266, 1238, 1026, 820  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 7, fig. 31; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 7, fig. 32; EM-IE (20 eV)  $m/z$   $[\text{M}]^+$  426 (7.5),  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  366 (27.1),  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$  324 (3.6),  $[\text{M} - 2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$  264 (8.5),  $[\text{M} - 3\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$  204 (18.0),  $[\text{M} - \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_6]^+$  195 (5.0), 178 (30.3), 154 (28.2), 153 (57.7),  $[\text{M} - \text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_6 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  135 (48.0), 134 (39.0), 128 (30.8), 107 (24.5),  $[\text{M} - \text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_8]^+$  97 (30.0), 85 (35.0), 81 (29.3), 71 (37.3), 69 (28.1),  $[\text{C}_4\text{H}_4\text{O}]^+$  68 (27.3), 58 (40.4), 57 (44.1),  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$  43 (100.0).

## 5.6. Aislamiento y purificación de los constituyentes diterpénicos con actividad insecticida.

La subfracción 83-103 (1 g), eluida con  $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}$  (2:3) a partir de la fracción primaria V, presentaba una fuerte absorción en la región que corresponde al alargamiento del grupo carbonilo de éster en el infrarrojo ( $\nu_{\text{max}}$  1730  $\text{cm}^{-1}$ ). Esta fracción representaba una mezcla compleja de metabolitos de tipo terpénico, la cual se analizó mediante CLAR para establecer su composición. Este análisis permitió detectar la presencia de seis compuestos mayoritarios.

Se procedió a resolver esta mezcla por CLAR a escala preparativa, utilizando una elución isocrática con *n*-hexano-AcOEt (1:4), una velocidad de flujo de 6 mL/min y una línea de inyección con un volumen de 500  $\mu\text{L}$ . La concentración de la muestra problema correspondió a 0.1 mg/ $\mu\text{L}$ . Estas condiciones cromatográficas permitieron la purificación de 350 mg del compuesto **2** ( $t_{\text{R}} = 26.2$  min), 6 mg de **6** ( $t_{\text{R}} = 26.8$  min), 20 mg de **7** ( $t_{\text{R}} = 20.6$  min), 30 mg de **5** ( $t_{\text{R}} = 19.1$  min), 15 mg de **3** ( $t_{\text{R}} = 15.3$  min) y 4 mg de **4** ( $t_{\text{R}} = 14.6$  min).

La subfracción 104-109 también se analizó mediante CLAR, permitiendo la obtención de 15 mg del compuesto **8** ( $t_{\text{R}} = 22.0$  min), utilizando como fase móvil una mezcla binaria constituida por AcOEt-MeOH (95:5).

**Compuesto 2.**  $[\alpha]_{\text{D}} +58$  (*c* 0.1, MeOH); IR (Nujol)  $\nu_{\text{max}}$  3368, 1724, 1658, 1456, 1374, 1246, 1034  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 31, fig. 89; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 31, fig. 88; EM-IQ *m/z* (% de int. rel.)  $[\text{M} + \text{H}]^+$  381 (1.3),  $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$  363 (29.9),  $[\text{M} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$  345 (48.7),  $[\text{M} + \text{H} - 3\text{H}_2\text{O}]^+$  327 (58.6),  $[\text{M} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$  303 (27.8),  $[\text{M} + \text{H} - 3\text{H}_2\text{O}]^+$

- C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 285 (89.4), [M + H - 4H<sub>2</sub>O - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 267 (100); EM-FAB<sup>+</sup> alta resolución [M + H]<sup>+</sup> 381.2641 (calculado para C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>O<sub>5</sub>, 381.2640).

**Compuesto 3.** [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +40 (c 0.1, MeOH); IR (Nujol)  $\nu_{\max}$  3380, 1730, 1664, 1374, 1240, 1112, 1058 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H, ver cuadro 32, fig. 94; RMN <sup>13</sup>C, ver cuadro 34; EM-FAB<sup>+</sup> alta resolución *m/z* [M + H]<sup>+</sup> 423.

**Compuesto 4.** [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +25 (c 0.1, MeOH); IR (Nujol)  $\nu_{\max}$  3378, 1730, 1660, 1456, 1372, 1240, 1034 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H, ver cuadro 32, fig. 95; EM-FAB<sup>+</sup> alta resolución *m/z* [M + H]<sup>+</sup> 465.

**Compuesto 5.** [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +10 (c 0.1, MeOH); IR (Nujol)  $\nu_{\max}$  3382, 1732, 1666, 1374, 1246 1128, 1058 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H, ver cuadro 32, fig. 96; RMN <sup>13</sup>C, ver cuadro 34; EM-IQ *m/z* (% de int. rel ) [M + H]<sup>+</sup> 379 (16.8), [M + H - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 361 (47.6), [M + H - 2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 343 (61.0), [M + H - 2H<sub>2</sub>O - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 301 (76.5), [M + H - 3H<sub>2</sub>O - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 283 (100), [M + H - 4H<sub>2</sub>O - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 265 (57.8); EM-FAB<sup>+</sup> alta resolución *m/z* [M + H]<sup>+</sup> 379.2479 (calculado para C<sub>22</sub>H<sub>35</sub>O<sub>5</sub>, 379.2484).

**Compuesto 6.** [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +66 (c 0.1, MeOH); RMN <sup>1</sup>H, ver cuadro 32, fig. 97; RMN <sup>13</sup>C, ver cuadro 34; EM-FAB<sup>+</sup> alta resolución *m/z* [M + Na]<sup>+</sup> 401.2301 (calculado para C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>Na, 401.2303).

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

**Compuesto 7.**  $[\alpha]_D +23$  (*c* 0.1, MeOH); IR (Nujol)  $\nu_{\max}$  3380, 1732, 1658, 1372, 1244, 1034  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 33, fig. 98; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 34; EM-IQ *m/z* (% de int. rel.)  $[\text{M} + \text{H}]^+$  353 (1.4),  $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$  335 (11.7),  $[\text{M} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$  317 (13.8),  $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}]^+$  309 (8.1),  $[\text{M} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$  275 (15.7),  $[\text{M} + \text{H} - 3\text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$  257 (50.2); EM-FAB<sup>+</sup> alta resolución *m/z*  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  375.2146 (calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{Na}$ , 375.2147).

**Compuesto 8.** Sólido blanco: pf 140-141°C;  $[\alpha]_D -30$  (*c* 0.1, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3336, 1698, 1648, 1452, 1372, 1034  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 33, fig. 99; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 34; EM-FAB<sup>+</sup> *m/z*  $[\text{M} + \text{H}]^+$  339,  $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$  321,  $[\text{M} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$  303,  $[\text{M} + \text{H} - 3\text{H}_2\text{O}]^+$  285; EM-FAB<sup>+</sup> alta resolución *m/z*  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  361.2354 (calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{Na}$ , 361.2354).

## 5.7. Obtención de derivados.

A continuación se describe la obtención de los derivados que permitieron establecer la configuración absoluta de los cuatro centros quirales presentes en la cadena lateral de la espicigerólida (**1**). Los derivados incluyen la síntesis del sintón quiral **113** que corresponde al producto de la ozonólisis de la espicigerólida (**1**), este compuesto se obtuvo utilizando L-ramnosa como materia prima. El segundo grupo de derivados comprendió la preparación de tres epímeros de la peracetilsinrotólida (**114**), cuya síntesis a partir del producto natural (**29**) permitió la generación de modelos para la aplicación del método de mecánica molecular en la elucidación de la estereoquímica relativa de los centros quirales de la cadena lateral de

las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas mediante la predicción de las constantes de acoplamiento vecinales en la RMN  $^1\text{H}$ . También, se describen las reacciones químicas que se realizaron con el constituyente mayoritario **2** para la caracterización de su estructura diterpénica y se incluyen aquellas reacciones que permitieron establecer una correlación química entre este labdano y los constituyentes minoritarios **3-6**. Por último, se presenta la metodología utilizada para la obtención de los ésteres de Mosher de los compuestos **3** y **7** que permitió establecer la configuración absoluta de los núcleos labdánicos presentes en *Hyptis spicigera*.

### **5.7.1. Derivatización de la L-ramnosa para la obtención del sintón quiral **113**.**

Para la obtención del sintón quiral (**113**) se evaluaron tres estrategias de síntesis, las cuales se presentan en la figura 26, ilustrando de manera esquemática todas las secuencias de reacciones que se llevaron a cabo y los subproductos de reacción caracterizados.

#### **5.7.1.1. Síntesis de la 2,4-dinitrofenilhidrazona de la L-ramnosa (**96**).**

Se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 300 mg de la 2,4-dinitrofenilhidrazina. También, se adicionó una solución de 2 mL de agua y 7 mL de EtOH. Por otro lado, se disolvieron 500 mg de L-ramnosa en 3 mL de EtOH y se adicionaron a esta solución 9.5 mL de la mezcla de reactivos conteniendo la hidrazina. La reacción se mezcló y se dejó en reposo a temperatura ambiente hasta que se observó un precipitado en forma de agujas de color amarillo claro (aproximadamente a las 3 horas), se refrigeró toda la noche y luego se filtró con vacío. Los sólidos se recrystalizaron de EtOH (90 %) y se obtuvieron 312.5 mg (45.7 %) de la 2,4-dinidrofenilhidrazona de L-ramnosa (**96**).

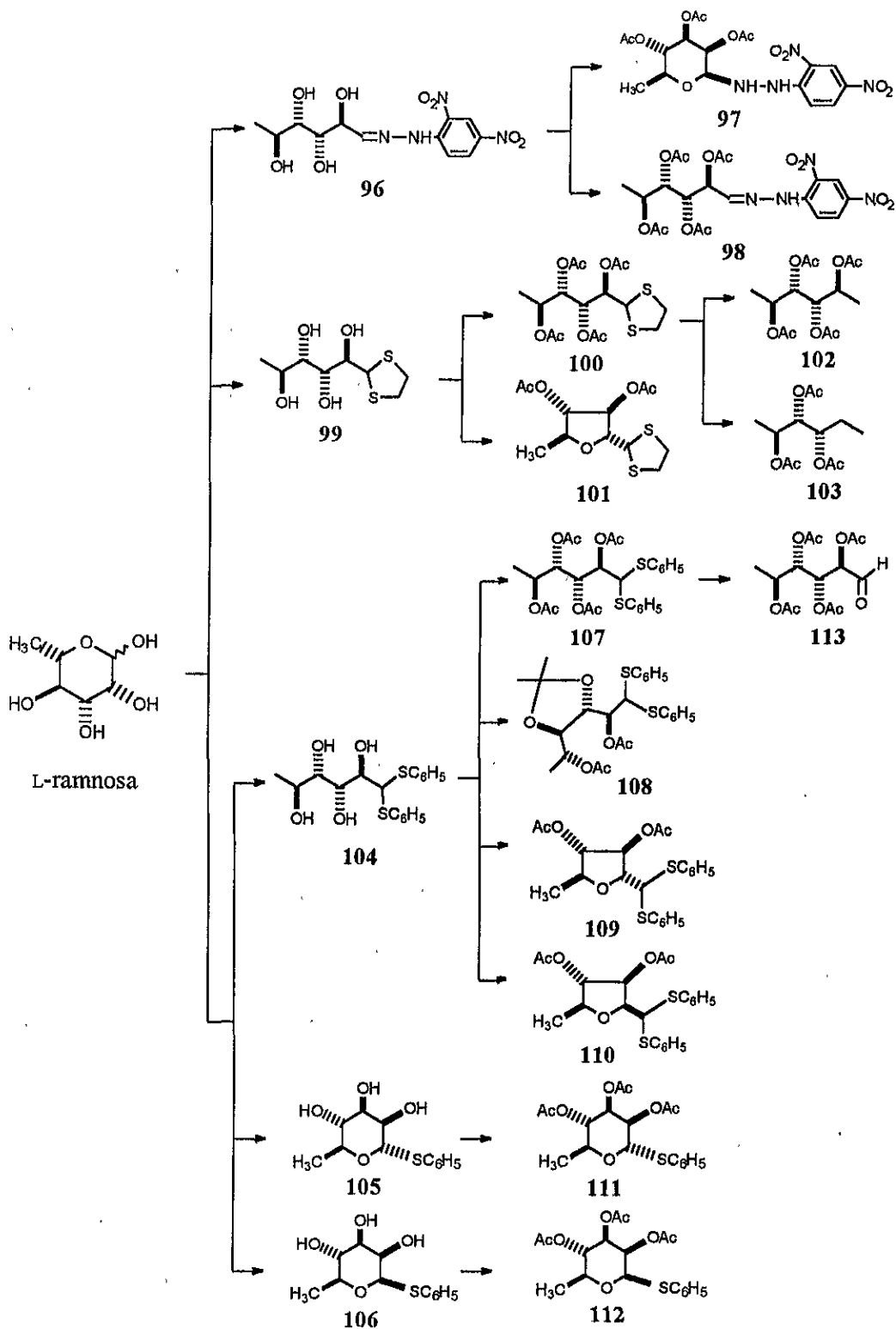


Figura 26. Esquema general de estrategias sintéticas para obtener el sintón quiral 113 y subproductos de reacción.

**Compuesto 96.** Sólido amarillo, pf 155-156°C; DOR (*c* 0.61, MeOH)  $[\alpha]_{589} +34.0$ ,  $[\alpha]_{578} +37.5$ ,  $[\alpha]_{546} +39.1$ ,  $[\alpha]_{436}$  absorbe,  $[\alpha]_{365}$  absorbe; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 11, fig. 44; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 12; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.)  $[\text{M}]^+$  344 (1.2),  $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_9\text{O}_3]^+$  239 (8.2), 194 (11.4),  $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_9\text{O}_3 - \text{NO}_2]^+$  193 (100.0), 184 (28.1),  $[\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_4]^+$  183 (43.3), 177 (21.1), 167 (15.2), 165 (11.0), 164 (21.9), 153 (27.9), 129 (26.1), 91 (20.9), 90 (11.3), 85 (29.4), 79 (29.9), 78 (19.7), 75 (23.7), 73 (25.2), 71 (46.9), 61 (19.1), 60 (37.5),  $[\text{C}_2\text{H}_5\text{O}]^+$  45 (62.9),  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$  43 (38.8), 30 (30.9).

#### 5.7.1.2. Acetilación del compuesto 96 en condiciones básicas.

100 mg del compuesto 96 se disolvieron en 5 mL de una mezcla de  $\text{Ac}_2\text{O}$ -piridina (1:1). La reacción se mantuvo con agitación continua a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, se adicionó agua y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica resultante se extrajo consecutivamente con HCl 1 N y con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró a sequedad. El crudo de reacción se resolvió mediante CLAR a una escala preparativa, utilizando como fase móvil *n*-hexano-AcOEt (3:2) y una velocidad de flujo de 6 mL/min, colectando el pico mayoritario con  $t_{\text{R}} = 25.9$  min, el cual se purificó reinyectándolo en la misma columna, utilizando como fase móvil *n*-hexano-AcOEt (7:3) para obtener 50 mg (36.5 %) del compuesto 97 ( $t_{\text{R}} = 45$  min).

**Compuesto 97.** Sólido amarillo, pf 103-105°C; DOR (*c* 1.29,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} +28.8$ ,  $[\alpha]_{578} +29.5$ ,  $[\alpha]_{546} +31.1$ ,  $[\alpha]_{436}$  absorbe,  $[\alpha]_{365}$  absorbe; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 11, fig. 45; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 12; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.)  $[\text{M}]^+$  470 (3.7), 411 (1.9), 306 (9.1), 291 (10.2), 273 (17.1), 213 (7.7), 193 (8.8), 171 (20.2), 153 (73.5), 129 (11.2), 111 (69.2),



83 (25.1),  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$  43 (100); EM-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  (% de int. rel.)  $[\text{M} + 1]^+$  471 (16.2),  $[\text{M}]^+$  470 (32.3),  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2]^+$  411 (40.52),  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 - 2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  291 (22.57), 273 (54.9), 171 (20.7), 155 (27.3), 154 (100.0), 153 (68.3), 138 (35.7), 137(60.1), 136 (88.59), 111 (68.32), 107 (25.6), 89 (24.2), 83 (25.7), 77 (22.0). EM-IE alta resolución (70 eV)  $m/z$  470.1270  $[\text{M}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_{11}$ , 470.1285).

### 5.7.1.3. Acetilación del compuesto 96 en condiciones ácidas.

Se adicionaron 5 mL de AcCl a 100 mg del compuesto 96 y la mezcla de reacción se mantuvo con agitación continua durante 2 horas a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, la reacción se llevó a sequedad y se adicionó un exceso de  $\text{CHCl}_3$  y se evaporó la solución mediante una corriente de  $\text{N}_2$  para eliminar residuos de AcCl. Estos procedimientos permitieron la obtención de 127 mg de un crudo de reacción, el cual se purificó por CLAR a una escala preparativa con *n*-hexano-AcOEt (7:3), con una velocidad de flujo = 6.5 mL/min, para proporcionar 73 mg (49 %) del compuesto 98 ( $t_R = 30.3$  min).

**Compuesto 98.** DOR (*c* 1.14,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} -14.0$ ,  $[\alpha]_{578} -14.9$ ,  $[\alpha]_{546} -17.5$ ,  $[\alpha]_{436}$  absorbe,  $[\alpha]_{365}$  absorbe; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 11, fig. 46; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 12; EM-IE (20 eV)  $m/z$  (% de int. rel.)  $[\text{M}]^+$  512 (0.1),  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2]^+$  453 (1.1),  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 - 2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  333 (2.1),  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 - 2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$  291 (10.0), 290 (13.9), 251 (15.6), 129 (10.1), 117 (10.3), 111 (11.0),  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$  43 (100.0); EM-FAB<sup>+</sup>  $m/z$  (% de int. rel.)  $[\text{M} + 1]^+$  513 (4.6),  $[\text{M}]^+$  512 (3.8),  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2]^+$  453 (55.5),  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 - 2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  333 (11.0),  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 - 2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$  291 (60.7), 154 (30.3), 137 (22.4), 136 (38.4), 111 (10.6), 107 (13.3), 99 (11.0), 77 (14.3),  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$  43 (100.0).

#### 5.7.1.4. Síntesis del etilenditioacetato de la L-ramnosa (99).

Se disolvió 1 g de L-ramnosa en 7.5 mL de AcOH. A esta mezcla se adicionaron 0.1 mL de BF<sub>3</sub>-eterato y 2.5 mL de 1,2-etanditiol y se mantuvo en agitación continua por 10 min. Posteriormente, se adicionaron 0.2 mL de BF<sub>3</sub>-eterato y la agitación se continuó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se filtró un precipitado al vacío, el cual se lavó con cloroformo para obtener 476.4 mg (36.1 %) del compuesto **99**.

**Compuesto 99.** Sólido blanco, pf 166-168°C; DOR (*c* 1.35, MeOH) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> -4.4, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> -4.4, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> -5.2, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> -9.6, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> -19.3; RMN <sup>1</sup>H, ver cuadro 14, fig. 52; RMN <sup>13</sup>C, ver cuadro 15; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.) [M + 1]<sup>+</sup> 241 (0.4), [M - C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>S<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 147 (68.0), 117 (10.3), 107 (19.7), 106 (74.2), [C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>S<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 105 (100.0), 73 (14.8), 61 (25.5), 57 (13.9), 45 (15.3).

#### 5.7.1.5. Acetilación del compuesto 99.

Se utilizaron las mismas condiciones de reacción descritas en la sección 5.7.1.3 con 370 mg del compuesto **99** y 5 mL de AcCl. El crudo de reacción (650 mg) se purificó por cromatografía en columna, utilizando sílica gel 60 (Merck, 0.040-0.063 mm, malla 230-400) y, como sistema de elución, se utilizó una mezcla de *n*-hexano-AcOEt (85:15 y 80:20). Se colectaron un total de 97 fracciones de 15 mL que permitieron obtener 365 mg (58.1 %) del compuesto **100** (fracciones 55-67, R<sub>f</sub> 0.27) y 72.5 mg del compuesto **101** (fracciones 25-40, R<sub>f</sub> 0.37; *n*-hexano-AcOEt, 3:1). El compuesto **101** se sometió, de nueva cuenta, a un procedimiento de cromatografía en columna con *n*-hexano-AcOEt (95:5),

eluyendo fracciones de 10 mL, las fracciones 24-30 proporcionaron 30.5 mg (6.5 %) de este compuesto completamente puro.

**Compuesto 100.** DOR (*c* 3.0, CHCl<sub>3</sub>) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> -26.7, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> -27.7, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> -32.0, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> -57.1, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> -97.7; RMN <sup>1</sup>H, ver cuadro 14, fig. 53; RMN <sup>13</sup>C, ver cuadro 15; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.) [M - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 348 (0.4), [M - 2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 288 (35.2), 200 (32.9), 189 (27.7), 186 (15.4), 147 (40.4), [C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>S<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 105 (100.0), 99 (10.7), [C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 43 (33.8).

**Compuesto 101.** Sólido blanco, pf 110-112°C; DOR (*c* 3.58, CHCl<sub>3</sub>) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> -14.5, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> -15.1, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> -16.5, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> -24.3, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> -29.3; RMN <sup>1</sup>H, ver cuadro 14, fig. 54; RMN <sup>13</sup>C, ver cuadro 15; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.) [M]<sup>+</sup> 306 (5.8), [M - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 246 (6.5), [M - 2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 186 (34.4), [M - 2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 171 (33.3), 160 (12.2), 158 (46.9), 130 (9.3), 111 (9.0), [C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>S<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 92 (100.0), [C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 43 (53.4). EM-IE alta resolución (70 eV) *m/z* [M]<sup>+</sup> 306.0595 (calculado para C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>, 306.0596).

#### **5.7.1.6. Desulfuración del compuesto 100.**

##### **5.7.1.6.1. Preparación de níquel Raney.**

A 200 mL de una solución de NaOH al 30 % en baño de hielo se adicionaron lentamente, 2.5 g de la aleación níquel-aluminio, agitando suavemente después de cada adición. La suspensión alcalina se dejó reposar 10 min, y se colocó en un baño de vapor hasta que dejó de efervescer, aproximadamente durante 9 horas. La suspensión se dejó en reposo toda la noche y se decantó, lavando el precipitado primero con agua hasta alcanzar

un pH neutro y enseguida con EtOH para eliminar el exceso de agua. Finalmente, el precipitado se dejó en 10 mL de EtOH (Augustine, 1965).

#### 5.7.1.6.2. *Reacción de desulfuración.*

Se adicionaron 2 mL de EtOH y 6 mL de la suspensión etanólica de Ni Raney (aproximadamente 1.5 g de níquel) a 50 mg del compuesto **100**. La mezcla de reacción se dejó en reflujo durante 10 horas. Posteriormente, ésta se filtró sobre celita y se concentró. El crudo de reacción (21.7 mg) se purificó mediante CC sobre gel de sílice (4 g), utilizando como fase móvil *n*-hexano-AcOEt (90:10) y colectando fracciones de 5 mL. Las fracciones 9-14 proporcionaron 10 mg (25.6 %) del compuesto **102** ( $R_f = 0.51$ ) y de la fracción 5-6 se obtuvieron 3 mg (9.4 %) de un subproducto de reacción que corresponde al compuesto **103** ( $R_f = 0.42$ ; *n*-hexano-AcOEt, 3:1). Las constantes de acoplamiento ( $J_{2,3-4,5}$  y  $J_{3,4}$ ) del compuesto **102** se determinaron con la ayuda del programa LAOCOÖN PC (v. 3.1).

**Compuesto 102.** DOR ( $c$  1.08,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} -30.5$ ,  $[\alpha]_{578} -32.4$ ,  $[\alpha]_{546} -37.0$ ,  $[\alpha]_{436} -63.9$ ,  $[\alpha]_{365} -103.7$ ; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 14, fig. 55; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 15; EM-IE (20 eV)  $m/z$  (% de int. rel.)  $[\text{M} - 1]^+$  317 (4),  $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2]^+$  231 (10.0),  $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2 - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$  189 (5.0),  $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2 - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2]^+$  172 (26.0), 149 (14.0),  $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2 - \text{C}_2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2]^+$  130 (61),  $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2 - \text{C}_2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  129 (74), 97 (23), 95 (22.0), 83 (64.0),  $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2 - \text{C}_2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  69 (37.0), 57 (29.0),  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$  43 (100.0).

**Compuesto 103.** RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 14, fig. 56; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 15.

#### 5.7.1.7. Síntesis del difenilditioacetal de la L-ramnosa (104).

Una mezcla de 500 mg de L-ramnosa, 1.5 mL de bencenotiol y 5 mL de ácido trifluoroacético al 90% se sometió a reflujo en un baño de agua a 55°C durante 1 hora (Funabashi *et al.*, 1999). La mezcla de reacción se llevó a sequedad con corriente de argón, se adicionó  $\text{CHCl}_3$ , se evaporó el disolvente y se purificó mediante CC en gel de sílice (100 g). Se colectaron fracciones de 15 mL con un gradiente de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH, iniciando con una relación 98:2 para la mezcla de disolventes hasta alcanzar la polaridad proporcionada por la mezcla 90:10. Las fracciones 39-54 proporcionaron 515.4 mg (51.2 %) del compuesto **104** ( $R_f = 0.43$ ). Este procedimiento permitió, de manera adicional, la obtención de los subproductos de reacción **105** y **106** (235 mg, 36 %,  $R_f = 0.36$ ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH, 9:1). Esta mezcla (100 mg) fue purificada por CLAR a una escala preparativa, utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (98:2) como fase móvil y una velocidad de flujo de 6 mL/min, recuperando 33 mg del compuesto **105** ( $t_R = 17.1$  min) y 58 mg del compuesto **106** ( $t_R = 19.3$  min).

**Compuesto 104.** Sólido blanco; pf 124-126°C; DOR ( $c$  2.91, MeOH)  $[\alpha]_{589} +48.8$ ,  $[\alpha]_{578} +51.6$ ,  $[\alpha]_{546} +59.8$ ,  $[\alpha]_{436} +119.2$ ,  $[\alpha]_{365} +228.9$ ; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 16, fig. 59; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 17; EM-IE (20 eV)  $m/z$  (% de int. rel.)  $[\text{M}]^+$  366 (0.7),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S}]^+$  257(44.6),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_6\text{S}]^+$  256 (60.4),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{H}_2\text{O}]^+$  239 (19.6), 231 (27.9), 177 (19.4), 153 (66.8), 152 (17.2),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{C}_6\text{H}_6\text{S}]^+$  147 (100.0),  $[\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{S}_2]^+$  135 (36.2), 129 (26.2), 123 (37.9), 119 (29.4), 110 (20.6), 109 (12.3), 91 (17.2), 85 (20.0), 79 (23.3), 75 (26.6), 61 (13.4), 45 (37.3). EM-IE alta resolución (70 eV)  $m/z$   $[\text{M}]^+$  366.0960 (calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{S}_2$ , 366.0960).

**Compuesto 105.** DOR (*c* 0.19, MeOH)  $[\alpha]_{589} -232.6$ ,  $[\alpha]_{578} -243.2$ ,  $[\alpha]_{546} -278.4$ ,  $[\alpha]_{436} -493.2$ ,  $[\alpha]_{365} -842.7$ ; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 20, fig. 66; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 21; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.)  $[\text{M}]^+$  256 (25),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S}]^+$  147 (100.0), 146 (13),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{H}_2\text{O}]^+$  129 (68.0), 111 (17.0),  $[\text{C}_6\text{H}_6\text{S}]^+$  110 (60.0),  $[\text{C}_6\text{H}_5\text{S}]^+$  109 (16.0), 87 (15.0),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}]^+$  85 (95.0), 83 (14.0), 75 (17.0), 73 (24.0),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O} - \text{CH}_2]^+$  71 (93.0), 61 (27.0), 60 (10.0), 59 (40.0), 58 (10.0), 57 (40.0), 55 (18.0), 45 (23.0), 43 (37.0), 41 (20.0), 31 (9.0), 29 (14.0). EM-IE alta resolución (70 eV) *m/z*  $[\text{M}]^+$  256.0774 (calculado para  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{S}$ , 256.0769).

**Compuesto 106.** DOR (*c* 0.71, MeOH)  $[\alpha]_{589} +70.1$ ,  $[\alpha]_{578} +73.2$ ,  $[\alpha]_{546} +83.3$ ,  $[\alpha]_{436} +147.3$ ,  $[\alpha]_{365} +245.5$ ; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 20, fig. 67; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 21; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.)  $[\text{M}]^+$  256 (7.8),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S}]^+$  147 (63.9),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{H}_2\text{O}]^+$  129 (49.8), 111 (15.3),  $[\text{C}_6\text{H}_6\text{S}]^+$  110 (47.0),  $[\text{C}_6\text{H}_5\text{S}]^+$  109 (12.4), 87 (14.5),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}]^+$  85 (95.9),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O} - \text{CH}_2]^+$  71 (100.0), 59 (43.9), 58 (11.1), 57 (46.9), 55 (20.5), 45 (28.0), 43 (44.7), 41 (26.2), 31 (12.1), 29 (17.2). EM-IE alta resolución (70 eV) *m/z*  $[\text{M}]^+$  256.0774 (calculado para  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{S}$ , 256.0769).

#### 5.7.1.8. Acetilación del compuesto 104.

Se acetilaron 440 mg del compuesto **104** con 20 mL de AcCl bajo las mismas condiciones de reacción descritas anteriormente (sección 5.7.1.3). La mezcla de reacción se purificó por CC en gel de sílice (75 g), utilizando como fase móvil un gradiente de polaridad creciente de *n*-hexano-AcOEt. La elución se inició con una relación de 9:1 para la mezcla de disolventes hasta alcanzar la polaridad de la mezcla correspondiente a una

proporción de 4:1. Se colectaron fracciones de 15 mL. Las fracciones 67-77 proporcionaron 206.4 mg (32.2 %) del compuesto **107** ( $R_f = 0.46$ ), además de los subproductos de reacción **108** (fracciones 33-38, 19.5 mg, 3.3 %,  $R_f = 0.60$ ), **109** (fracciones 43-50, 67 mg, 12.9 %,  $R_f = 0.53$ ) y **110** (fracciones 54-57, 23.9 mg, 4.6 %,  $R_f = 0.49$ ).

**Compuesto 107.** DOR ( $c$  1.65,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} +20.0$ ,  $[\alpha]_{578} +21.2$ ,  $[\alpha]_{546} +25.5$ ,  $[\alpha]_{436} +53.9$ ,  $[\alpha]_{365} +104.2$ ; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 16, fig. 60; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 17; EM-IE (20 eV)  $m/z$  (% de int. rel.)  $[\text{M}]^+$  534 (0.9),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S}]^+$  425 (77.3),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  365 (26.0), 111 (15.3),  $[\text{C}_6\text{H}_6\text{S}]^+$  110 (47.0),  $[\text{C}_6\text{H}_5\text{S}]^+$  109 (12.4), 87 (14.5),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}]^+$  85 (95.9),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O} - \text{CH}_2]^+$  71 (100.0), 59 (43.9), 58 (11.1), 57 (46.9), 55 (20.5), 45 (28.0), 43 (44.7), 41 (26.2), 31 (12.1), 29 (17.2).

**Compuesto 108.** DOR ( $c$  4.18,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} +31.6$ ,  $[\alpha]_{578} +33.2$ ,  $[\alpha]_{546} +39.2$ ,  $[\alpha]_{436} +82.8$ ,  $[\alpha]_{365} +164.1$ ; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 16, fig. 61; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 17; EM-IE (20 eV)  $m/z$  (% de int. rel.)  $[\text{M}]^+$  490 (0.21),  $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$  475 (0.41), 382 (12.8),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S}]^+$  381 (57.8),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{C}_3\text{H}_6\text{O}]^+$  323 (0.49),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{C}_3\text{H}_6\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  263 (0.57), 221 (10.2),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{C}_3\text{H}_6\text{O} - 2 \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  203 (30.8),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{C}_3\text{H}_6\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 - \text{O}]^+$  187 (64.6),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{C}_3\text{H}_6\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 - \text{C}_6\text{H}_6\text{S}]^+$  153 (29.0),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{C}_3\text{H}_6\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 - \text{C}_8\text{H}_6\text{S}]^+$  129 (100.0), 127 (46.4),  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$  43 (61.2).

**Compuesto 109.** Sólido blanco; pf 97-99°C; DOR ( $c$  3.67,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} +6.0$ ,  $[\alpha]_{578} +6.3$ ,  $[\alpha]_{546} +7.6$ ,  $[\alpha]_{436} +16.9$ ,  $[\alpha]_{365} +36.2$ ; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 19, fig. 62; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 19; EM-IE (20 eV)  $m/z$  (% de int. rel.)  $[\text{M}]^+$  432 (1.1),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S}]^+$  323 (1.0),  $[\text{M} -$

$C_6H_5S - C_2H_4O_2]^+$  263 (9.0), 204 (15.0),  $[M - C_6H_5S - 2 C_2H_4O_2]^+$  203 (100.0), 177 (4.0), 149 (4.0), 139 (7.0), 137 (5.0), 111 (8.0), 110 (7.0), 97 (5.0), 83 (14.0), 71 (6.0), 69 (7.0), 57 (8.0), 44 (6.0),  $[C_2H_3O]^+$  43 (31.0).

**Compuesto 110.** DOR (*c* 2.41,  $CHCl_3$ )  $[\alpha]_{589} +7.0$ ,  $[\alpha]_{578} +7.5$ ,  $[\alpha]_{546} +9.5$ ,  $[\alpha]_{436} +24.1$ ,  $[\alpha]_{365} +54.8$ ; RMN  $^1H$ , ver cuadro 19, fig. 63; RMN  $^{13}C$ , ver cuadro 19; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.)  $[M]^+$  432 (4.0),  $[M - C_6H_5S]^+$  323 (9.6), 264 (17.6),  $[M - C_6H_5S - C_2H_4O_2]^+$  263 (100.0), 221 (34.1),  $[M - C_6H_5S - 2C_2H_4O_2]^+$  203 (13.7), 153 (14.3), 123 (16.4), 111 (36.9), 69 (19.1),  $[C_2H_3O]^+$  43 (54.8).

Por otro lado, la mezcla de los compuestos **105** y **106** (135 mg) se acetiló utilizando las mismas condiciones de reacción y se resolvió a través de CC sobre gel de sílice (20 g), se colectaron fracciones de 10 mL con un gradiente de polaridad creciente de *n*-hexano-AcOEt, iniciando con una relación 95:5 hasta alcanzar una proporción 88:12. Las fracciones 41-50 proporcionaron 45.2 mg (22.5 %) del compuesto **111** ( $R_f = 0.42$ ) (Pozsgay y Jennings, 1988) y las fracciones 53-62 proporcionaron 64.5 mg (32.1 %) del compuesto **112** ( $R_f = 0.35$ ). El sistema de elución utilizado para el registro de los valores de  $R_f$  para los compuestos **107-112** en la CCF correspondió a la mezcla de *n*-hexano-AcOEt (7:3).

**Compuesto 111.** Sólido blanco; pf 114-116°C; DOR (*c* 9.71,  $CHCl_3$ )  $[\alpha]_{589} -89.9$ ,  $[\alpha]_{578} -94.0$ ,  $[\alpha]_{546} -107.4$ ,  $[\alpha]_{436} -185.5$ ,  $[\alpha]_{365} -297.0$ ; RMN  $^1H$ , ver cuadro 20, fig. 68; RMN  $^{13}C$ , ver cuadro 21; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.)  $[M]^+$  382 (0.1), 275 (1.69), 274 (9.2),  $[M - C_6H_5S]^+$  273 (66.7),  $[M - C_6H_5S - C_2H_4O_2]^+$  213 (19.6),  $[M - C_6H_5S - C_2H_4O - C_2H_2O]^+$



171 (27.2), 154 (9.5),  $[M - C_6H_5S - H_2O - C_2H_4O - C_2H_2O - H_2O]^+$  153 (100.0), 129 (9.9),  $[M - C_6H_5S - 2C_2H_4O - C_2H_2O]^+$  111 (92.4),  $[M - C_6H_5S - 2C_2H_4O - C_2H_2O - CO]^+$  83 (31.0),  $[C_2H_3O]^+$  43 (59.2).

**Compuesto 112.** DOR (*c* 6.35,  $CHCl_3$ )  $[\alpha]_{589} +35.5$ ,  $[\alpha]_{578} +37.5$ ,  $[\alpha]_{546} +42.5$ ,  $[\alpha]_{436} +71.6$ ,  $[\alpha]_{365} +110.2$ ; RMN  $^1H$ , ver cuadro 20, fig. 69; RMN  $^{13}C$ , ver cuadro 21; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.)  $[M]^+$  382 (0.27),  $[M - C_6H_5S]^+$  273 (65.4),  $[M - C_6H_5S - C_2H_4O_2]^+$  213 (16.7),  $[M - C_6H_5S - C_2H_4O - C_2H_2O]^+$  171 (26.9),  $[M - C_6H_5S - H_2O - C_2H_4O - C_2H_2O - H_2O]^+$  153 (100.0),  $[M - C_6H_5S - 2 C_2H_4O - C_2H_2O]^+$  111 (84.3),  $[M - C_6H_5S - 2C_2H_4O - C_2H_2O - CO]^+$  83 (43.9),  $[C_2H_3O]^+$  43 (88.3).

#### 5.7.1.9. Desprotección del compuesto 107.

28 mg del compuesto 107 se disolvieron en 2 mL de acetona y se adicionaron a 140 mg de *N*-bromosuccinimida disueltos en 10 mL de acetona acuosa al 97 % a  $-2^\circ C$ . La mezcla de reacción se agitó durante 90 min. Posteriormente, se adicionaron 96 mg de  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  y 33 mg de  $NaHCO_3$  finamente pulverizados a la mezcla de reacción, la cual se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, la mezcla de reacción se filtró con vacío, se evaporó la acetona mediante una corriente de argón y se adicionó un exceso de cloroformo, el cual se lavó 4 veces con agua. La fase orgánica se secó con  $Na_2SO_4$  y se concentró a sequedad con corriente de argón. Esta fase se purificó por CC en gel de sílice (5 g) desactivada con 25 % de agua, utilizando como fase móvil *n*-hexano-AcOEt (7:3) y se colectaron fracciones de 5 mL. El producto de reacción (113) se recuperó en las fracciones 9-14 y se purificó mediante una columna adicional utilizando

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (99:1) para proporcionar 7.7 mg (44.3 %; R<sub>f</sub> = 0.34; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, 19:1) (Miljkovic *et al.*, 1984).

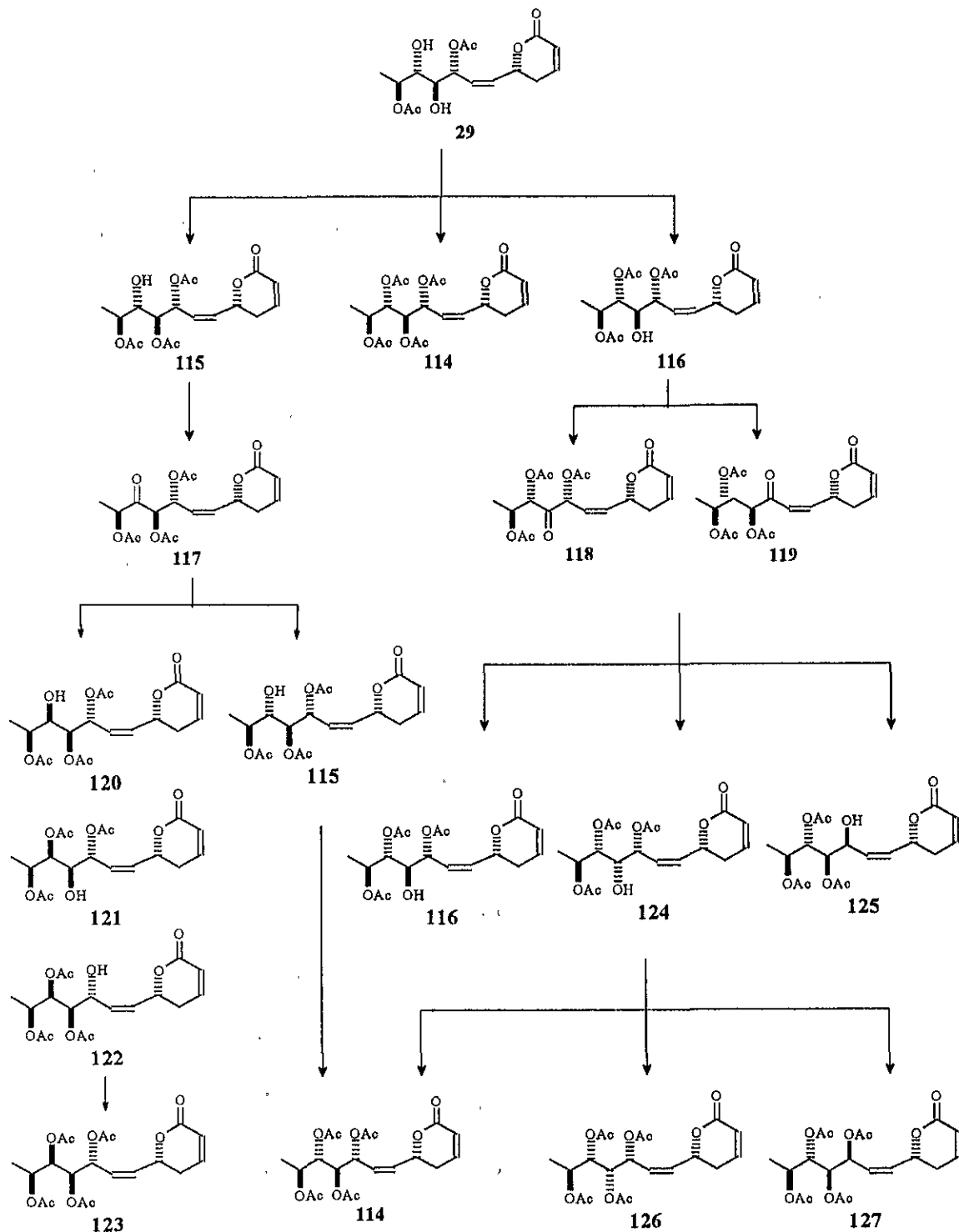
**Compuesto 113.** DOR (*c* 0.47, CHCl<sub>3</sub>) [α]<sub>589</sub> -1.91, [α]<sub>578</sub> -2.12, [α]<sub>546</sub> -2.33, [α]<sub>436</sub> -4.03, [α]<sub>365</sub> -5.52; RMN <sup>1</sup>H, ver cuadro 23, fig. 72; RMN <sup>13</sup>C, ver cuadro 23; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.) [M + 1]<sup>+</sup> 333 (0.32), [M - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 273 (5.3), [M - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - CO]<sup>+</sup> 245 (1.2), [M - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - CO - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O]<sup>+</sup> 201 (19.9), 184 (17.9), [M - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - CO - 2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O]<sup>+</sup> 157 (88.0), 142 (32.6), 129 (14.1), [M - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - CO - 2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 115 (66.8), 99 (39.2), 73 (10.5), 44 (2.9), [C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 43 (100), [CHO]<sup>+</sup> 29 (1.11).

### 5.7.2. Epimerización de la sinrotólida (29).

Con el fin de epimerizar las posiciones C<sub>4</sub>' y C<sub>5</sub>' de la sinrotólida (29) se realizaron las reacciones indicadas en la figura 27, para generar la sinrotólida peracetilada (114) y los correspondientes epímeros en las posiciones C<sub>5</sub>' (123), C<sub>4</sub>' (126) y C<sub>3</sub>' (127).

#### 5.7.2.1. Acetilación parcial de la sinrotólida (29).

La sinrotólida (29, 50 mg) se disolvió en una mezcla de Ac<sub>2</sub>O (7.5 μL) y piridina (250 μL) y se mantuvo con agitación magnética a -10°C durante 1 hora. Al cabo de este tiempo, se adicionó una cantidad igual de la mezcla de Ac<sub>2</sub>O-piridina, dejando la mezcla de reacción con agitación continua, a la misma temperatura, hasta completar 3 horas. La mezcla de reacción se llevó a sequedad con N<sub>2</sub> gaseoso, se adicionó un exceso de CHCl<sub>3</sub> y se evaporó con una corriente de N<sub>2</sub> para eliminar los residuos volátiles.



**Figura 27.** Secuencia de reacciones para la epimerización de la sinrotólida (29).

Posteriormente, se procedió a resolver el crudo de reacción por CLAR a una escala preparativa, utilizando *n*-hexano-AcOEt (1:4) como fase móvil y una velocidad de flujo de 5 mL/min, recuperando 4.9 mg (9.8 %) de sinrotólida (**29**,  $t_R = 35.9$  min), además de obtener los siguientes productos de reacción: 7.5 mg (11.5 %) del peracetato de la sinrotólida (**114**,  $t_R = 20.7$  min), 18.5 mg (31.3 %) de la 4'-acetilsinrotólida (**115**,  $t_R = 26.8$  min) y 4.8 mg (8.1 %) de 5'-acetilsinrotólida (**116**,  $t_R = 25.1$  min).

**Compuesto 114.** Sólido blanco, pf 101-102°C; DOR (*c* 1.62, CHCl<sub>3</sub>)  $[\alpha]_{589} -8.6$ ,  $[\alpha]_{578} -8.6$ ,  $[\alpha]_{546} -9.8$ ,  $[\alpha]_{436} -7.3$ ,  $[\alpha]_{365} +19.0$ ; RMN <sup>1</sup>H, ver cuadro 24, fig. 77; RMN <sup>13</sup>C, ver cuadro 25; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.)  $[M]^+$  426 (18.5), 367 (12.0),  $[M - C_2H_4O_2]^+$  366 (59.8),  $[M - C_2H_4O_2 - C_2H_2O]^+$  324 (6.5),  $[M - 2C_2H_4O_2 - C_2H_2O]^+$  264 (8.5), 230 (23.2),  $[M - 3 C_2H_4O_2 - C_2H_2O]^+$  204 (50.4),  $[M - C_{10}H_{15}O_6]^+$  196 (9.6), 195 (88.0), 179 (18.1), 178 (71.4), 165 (26.8), 154 (19.2), 153 (57.7), 149 (19.3), 137 (23.6), 136 (100.0),  $[M - C_{10}H_{15}O_6 - C_2H_4O_2]^+$  135 (81.0), 130 (22.2), 129 (53.8), 118 (24.1), 108 (25.5), 107 (44.2),  $[M - C_{15}H_{21}O_8]^+$  97 (12.7), 81 (21.1),  $[C_4H_4O]^+$  68 (37.4),  $[C_2H_3O]^+$  43 (61.5).

**Compuesto 115.** Sólido blanco, pf 152-154°C; DOR (*c* 1.26, CHCl<sub>3</sub>)  $[\alpha]_{589} 0$ ,  $[\alpha]_{578} 0$ ,  $[\alpha]_{546} 0$ ,  $[\alpha]_{436} +17.5$ ,  $[\alpha]_{365} +77.1$ ; RMN <sup>1</sup>H, ver cuadro 24, fig. 78; RMN <sup>13</sup>C, ver cuadro 25; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.)  $[M]^+$  384 (0.7),  $[M - H_2O]^+$  366 (3.5),  $[M - C_2H_4O_2]^+$  324 (5.7),  $[M - C_4H_7O_2]^+$  297 (1.6),  $[M - C_4H_7O_2 - C_2H_4O_2]^+$  236 (18.0), 204 (27.5), 178 (38.8), 177 (23.7), 165 (18.2), 154 (22.7), 153 (37.8), 149 (21.5), 148 (23.2), 137 (18.8), 136 (75.8), 135 (57.2), 129 (27.9), 118 (21.4), 108 (25.1), 107 (50.6),  $[M - C_{13}H_{19}O_7]^+$  97 (7.3), 81 (42.1), 79 (11.1),  $[C_4H_4O]^+$  68 (39.5),  $[C_2H_3O]^+$  43 (100.0).

**Compuesto 116.** DOR ( $c$  0.59,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589}$  0,  $[\alpha]_{578}$  0,  $[\alpha]_{546}$  +2,  $[\alpha]_{436}$  +15,  $[\alpha]_{365}$  +64; RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 24, fig. 79; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 25; EM-IE (20 eV)  $m/z$  (% de int. rel.)  $[\text{M}]^+$  384 (0.3),  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$  366 (0.9),  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  324 (2.2),  $[\text{M} - 2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  264 (1.0), 236 (8.1),  $[\text{M} - 3\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  204 (20.6),  $[\text{M} - \text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_5]^+$  195 (18.1),  $[\text{M} - \text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_5 - \text{H}_2\text{O}]^+$  177 (26.6), 165 (20.4), 154 (38.4), 153 (38.6), 148 (19.8), 137 (17.8), 136 (66.8),  $[\text{M} - \text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_5 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  135 (62.1), 129 (40.7), 118 (20.2), 108 (28.3), 107 (47.1),  $[\text{M} - \text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_7]^+$  97 (16.4), 81 (28.2),  $[\text{C}_4\text{H}_4\text{O}]^+$  68 (33.1),  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$  43 (100).

#### 5.7.2.2. Oxidación de los compuestos 115 y 116.

Se disolvieron 18 mg del compuesto **115** en 800  $\mu\text{L}$  de  $\text{AcOH}$  y se adicionó una solución acuosa de  $\text{CrO}_3$  (18 mg/1600  $\mu\text{L}$ ) a  $0^\circ\text{C}$ . La mezcla de reacción se dejó en reposo a temperatura ambiente por 2 horas, y se adicionaron dos porciones de 800  $\mu\text{L}$  de la solución de  $\text{CrO}_3$ , dejando reposar 30 min después de cada adición. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$ . Posteriormente, se lavó la fase orgánica por cuatro ocasiones con solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró a sequedad. El crudo de reacción (14.6 mg) se purificó por CLAR, utilizando las condiciones cromatográficas descritas en la sección 5.7.2.1, obteniendo 6 mg (33.5 %) del 4'-acetil-5'-oxosinrotólida (**117**,  $t_{\text{R}} = 19.4$  min). El compuesto **116** (5 mg) se oxidó utilizando las mismas condiciones experimentales para el compuesto **117**, proporcionando 3 mg del crudo de reacción que contenía una mezcla de la 5'-acetil-4'-oxosinrotólida (**118**) y de 5'-acetil-3'-oxosinrotólida (**119**).

**Compuesto 117.** RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 26, fig. 81; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 28; EM-IE (20 eV)  $m/z$  (% de int. rel.)  $[\text{M}]^+$  382 (0.2),  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$  367 (0.4),  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  322 (0.7), 167 (17.3), 166 (17.1), 165 (39.5), 153 (23.9), 149 (40.1), 148 (52.8), 147 (31.4), 137 (18.4), 136 (20.0), 135 (35.5), 115 (23.1),  $[\text{M} - \text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_7]^+$  97 (29.3), 95 (15.0), 87 (18.2), 85 (19.4), 81 (100.0), 73 (14.9), 71 (35.7), 70 (13.7), 69 (29.0),  $[\text{C}_4\text{H}_4\text{O}]^+$  68 (35.6), 60 (12.8), 57 (43.5), 55 (11.5),  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$  43 (84.7).

**Compuesto 118.** RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 26.

**Compuesto 119.** RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 26.

### 5.7.2.3. Reducción de los compuestos 117-119.

6 mg del compuesto **117** se disolvieron en 500  $\mu\text{L}$  de MeOH y se adicionó gota a gota una solución de  $\text{NaBH}_4$  en MeOH (1 mg/mL) hasta agotar la materia prima, lo cual ocurrió después de adicionar un total de 475  $\mu\text{L}$  de la solución reductora. Se evaporó el MeOH con una corriente de  $\text{N}_2$ , se extrajo con AcOEt para obtener 3.6 mg del crudo de reacción que se purificó mediante CLAR, utilizando las condiciones cromatográficas previamente descritas en la sección 5.7.2.1. Estos procedimientos permitieron la obtención de 0.9 mg (14.9 %) de la 5'-*epi*-acetilsinrotólida (**121**,  $t_{\text{R}} = 29.6$  min), 0.6 mg (10.0 %) de una mezcla de los compuestos **115** y **122** ( $t_{\text{R}} = 26.3$  min), además de 0.4 mg (6.6 %) del compuesto **116** ( $t_{\text{R}} = 24.7$  min). Para la reducción de la mezcla de los compuestos **118** y **119**, se utilizaron las mismas condiciones experimentales, permitiendo la obtención de un

crudo de reacción (1.5 mg) conteniendo a la 5'-acetil-4'-*epi*-sinrotólida (**124**) y la 3'-desacetoxi-4',5'-diacetilsinrotólida (**125**).

**Compuesto 121.** RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 27, fig. 82; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 28; EM-IE (20 eV)  $m/z$  (% de int. rel.)  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$  366 (9.3), 306 (1.0), 231 (28.9), 204 (47.8), 179 (18.2), 178 (59.3), 165 (26.9), 159 (21.0), 154 (19.1), 153 (51.7), 149 (21.3), 137 (26.2), 136 (98.3), 135 (75.8), 130 (22.8), 129 (61.8), 118 (19.2), 108 (30.9), 107 (51.3), 97 (32.3), 81 (33.1), 71 (42.3), 70 (15.5), 69 (25.0),  $[\text{C}_4\text{H}_4\text{O}]^+$  68 (61.6), 57 (44.0),  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$  43 (100.0).

**Compuesto 122.** RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 27; EM-IE (20 eV)  $m/z$  (% de int. rel.)  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$  366 (0.3),  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  324 (1.8),  $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2]^+$  297 (4.3),  $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  236 (2.0), 231 (17.8), 204 (27.5), 178 (8.9), 177 (7.6), 165 (10.9), 154 (13.6), 153 (15.3), 149 (18.4), 148 (5.5), 141 (22.8), 137 (14.4), 136 (19.9), 135 (26.6), 129 (22.7), 127 (27.6), 125 (23.4), 118 (15.1), 117 (20.1), 113 (38.8), 112 (23.7), 111 (34.2), 108 (6.3), 107 (14.3), 99 (41.7),  $[\text{M} - \text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_7]^+$  97 (43.0), 84 (21.2), 81 (22.3), 73 (20.4), 71 (100.0), 70 (28.8), 69 (25.3),  $[\text{C}_4\text{H}_4\text{O}]^+$  68 (11.7), 57 (99.0),  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$  43 (100.0).

#### 5.7.2.4. Acetilación de los compuestos 121, 124 y 125.

Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{AcCl}$  a un vial que contenía 0.9 mg del compuesto **121**. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 90 min a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, se llevó a sequedad utilizando una corriente de  $\text{N}_2$ . Se adicionó un exceso de  $\text{CHCl}_3$  y se evaporó de nueva cuenta con  $\text{N}_2$  para eliminar posibles residuos de  $\text{AcCl}$ . Posteriormente, el crudo de reacción se purificó por CLAR a una escala analítica,

utilizando como fase móvil *n*-hexano-AcOEt (1:1) a una velocidad de flujo = 0.5 mL/min y una línea de inyección con un volumen de 20 µL. De esta manera, se obtuvieron 0.7 mg (70.1 %) del peracetato de la 5'-*epi*-sinrotólida (**123**,  $t_R = 22.3$  min). El crudo de reacción conteniendo a los compuestos **124** y **125** (ver sección anterior) se sometieron al mismo proceso de acetilación y se purificó por CLAR, utilizando las condiciones experimentales descritas anteriormente para obtener 0.5 mg (30.1 %) del peracetato de la 4'-*epi*-sinrotólida (**126**,  $t_R = 23.2$  min) y 0.5 mg (30.1 %) del peracetato de la 3'-*epi*-sinrotólida (**127**,  $t_R = 21.1$  min).

**Compuesto 123.** DOR (*c* 0.06, CHCl<sub>3</sub>) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> +32, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> +33, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> +48, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> +97, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> +210; RMN <sup>1</sup>H, ver cuadro 27, fig. 83; RMN <sup>13</sup>C, ver cuadro 28; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.) [M - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 366 (0.7), [M - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 324 (4.6), [M - 2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 264 (11.7), 230 (39.5), 205 (20.1), [M - 3C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 204 (65.2), [M - C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>6</sub>]<sup>+</sup> 196 (10.9), 195 (11.7), 179 (20.6), 178 (69.2), 165 (29.7), 159 (23.1), 154 (18.9), 153 (54.5), 149 (23.9), 137 (26.9), 136 (100.0), [M - C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>6</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 135 (75.3), 130 (23.0), 129 (65.6), 118 (38.5), 117 (23.1), 108 (30.6), 107 (43.4), 99 (20.4), [M - C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>O<sub>8</sub>]<sup>+</sup> 97 (32.1), 85 (22.8), 81 (29.0), 71 (40.4), 69 (20.1), [C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O]<sup>+</sup> 68 (50.4), 57 (42.3), [C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> 43 (59.8).

**Compuesto 126.** RMN <sup>1</sup>H, ver cuadro 29, fig. 84; EM-IE (20 eV) *m/z* (% de int. rel.) [M - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 366 (0.4), [M - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 324 (1.4), [M - 2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 264 (3.4), 230 (14.1), 205 (9.6), [M - 3C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 204 (16.2), [M - C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>6</sub>]<sup>+</sup> 196 (13.1), 195 (7.3), 179 (10.4), 178 (19.2), 167 (21.5), 165 (10.1), 159 (8.2), 154 (18.5), 153

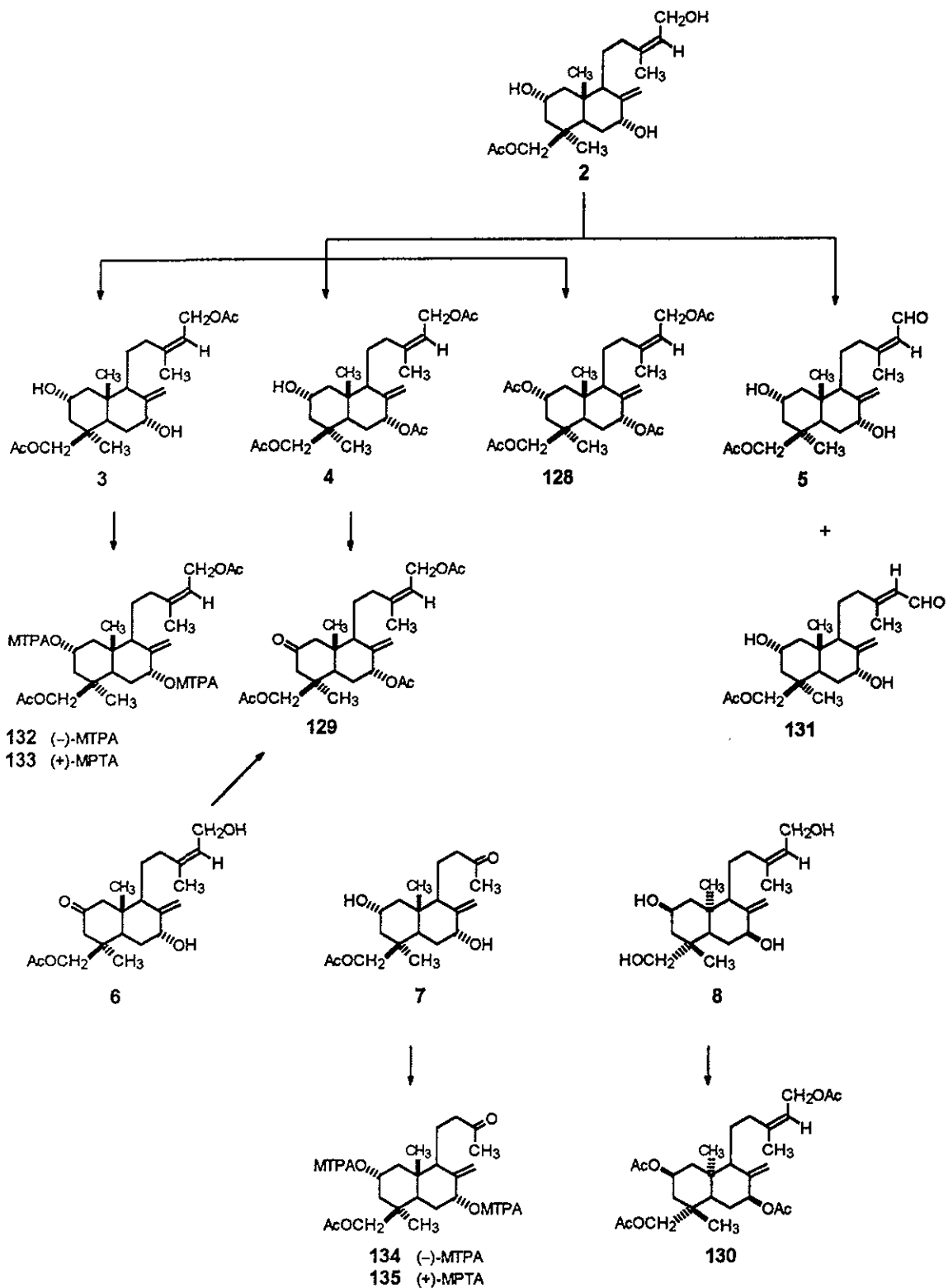


(9.5), 152 (17.9), 149 (20.8), 137 (18.0), 136 (27.8),  $[M - C_{10}H_{15}O_6 - C_2H_4O_2]^+$  135 (9.6), 130 (23.0), 128 (30.0), 118 (12.3), 117 (9.3), 108 (6.8), 107 (10.7), 105 (57.0), 99 (38.0), 98 (21.3),  $[M - C_{15}H_{21}O_8]^+$  97 (32.1), 85 (22.8), 84 (24.4), 83 (43.3), 82 (19.7), 71 (100.0), 70 (32.7), 69 (19.0),  $[M - C_4H_4O]^+$  68 (16.4), 57 (98.7),  $[C_2H_3O]^+$  43 (27.3).

**Compuesto 127.** RMN  $^1H$ , ver cuadro 29, fig. 85; EM-IE (20 eV)  $m/z$  (% de int. rel.)  $[M - C_2H_4O_2]^+$  366 (0.5),  $[M - C_2H_4O_2 - C_2H_2O]^+$  324 (2.6),  $[M - 2C_2H_4O_2 - C_2H_2O]^+$  264 (5.7), 230 (40.0), 205 (29.1),  $[M - 3C_2H_4O_2 - C_2H_2O]^+$  204 (29.6),  $[M - C_{10}H_{15}O_6]^+$  196 (2.0), 179 (8.0), 178 (62.1), 165 (2.7), 153 (42.2), 149 (34.3), 137 (30.0), 136 (100.0),  $[M - C_{10}H_{15}O_6 - C_2H_4O_2]^+$  135 (63.3), 130 (6.0), 129 (91.1), 118 (3.0), 109 (22.0), 108 (15.6), 107 (13.4), 99 (29.0),  $[M - C_{15}H_{21}O_8]^+$  97 (27.1), 85 (21.0), 84 (32.0), 83 (54.1), 82 (32.0), 81 (64.0), 71 (57.2), 69 (70.1),  $[M - C_4H_4O]^+$  68 (25.0), 57 (82.1),  $[C_2H_3O]^+$  43 (63.0).

### 5.7.3. Derivatización de los diterpenos.

Con el fin de establecer la configuración absoluta del esqueleto labdánico de los diterpenos, se realizaron correlaciones químicas de los compuestos minoritarios con el diterpeno principal (**2**) y se sintetizaron los ésteres de Mosher (**132-135**), como se ilustra en la figura 28.



**Figura 28.** Reacciones de correlación química de los diterpenos minoritarios (**3-6**) con el diterpeno principal (**2**) y obtención de derivados de los productos naturales **6-8**.

### 5.7.3.1. Acetilación total del compuesto 2.

El compuesto 2 (178 mg) se disolvió en 2.5 mL de una mezcla de Ac<sub>2</sub>O-piridina (2:1) y se dejó con agitación continua durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con AcOEt, se lavó con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró a sequedad, procediendo a purificar por CC con sílica gel *flash* (25 g). Se colectaron fracciones de 25 mL, utilizando como sistema de elución *n*-hexano-AcOEt (3:1) para obtener 45 mg (19 %) del peracetato 128 (*R<sub>f</sub>* = 0.65; CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO, 1:1) a partir de las fracciones 12-16.

**Compuesto 128.** Aceite: [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +20 (*c* 0.1, MeOH); IR (Nujol)  $\nu_{\max}$  1738, 1658, 1442, 1366, 1240, 1030 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H, ver cuadro 33, fig. 91; RMN <sup>13</sup>C, ver cuadro 34; EM-FAB<sup>+</sup> *m/z* (% de int. rel.) [M + H]<sup>+</sup> 507 (1.6), [M + H - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 447 (1.5), [M + H - 2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 387 (1.3), [M + H - 3C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 327 (4.0).

### 5.7.3.2. Acetilación parcial del compuesto 2.

48 mg del compuesto 2 se disolvieron en Ac<sub>2</sub>O (15  $\mu$ L) y piridina (11  $\mu$ L). La mezcla de reacción se agitó a una temperatura de -5°C durante 10 min y se mantuvieron las mismas condiciones experimentales indicadas anteriormente para la reacción 5.7.3.1. El crudo de reacción se resolvió por CLAR a escala preparativa utilizando *n*-hexano-AcOEt (1:1) como fase móvil, a una velocidad de flujo de 5 mL/min para obtener 6.6 mg (12.4 %) del diacetato 3 (*t<sub>R</sub>* = 20.3 min), 1.5 mg (2.6 %) del triacetato 4 (*t<sub>R</sub>* = 15.6 min) y 3.0 mg (4.8 %) del peracetato 128 (*t<sub>R</sub>* = 13.5 min), además de recuperarse 16 mg (33.3 %) de la materia prima (2, *t<sub>R</sub>* = 51.9 min).

### 5.7.3.3. Acetilación del compuesto 6.

El producto natural **6** (3 mg) se peracetiló utilizando las mismas condiciones de reacción para la acetilación total del compuesto **2** (ver sección 5.7.3.1). El producto se purificó por CLAR a una escala semipreparativa (fase móvil: *n*-hexano-AcOEt, 1:1; velocidad de flujo, 1.0 mL/min), proporcionando 1.2 mg (31.4 %) del peracetato **129** ( $t_R = 14.6$  min).

### 5.7.3.4. Acetilación del compuesto 8.

Se obtuvieron 1.7 mg (28.2 %) del peracetato **130** ( $t_R = 13.5$  min) partiendo de 4 mg del compuesto **8** y utilizando el procedimiento de acetilación total indicado en la sección 5.7.3.1. Este derivado se purificó por CLAR utilizando las condiciones cromatográficas descritas en la sección 5.7.3.3.

**Compuesto 130.** Aceite: Las constantes de IR, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  fueron idénticas a las del compuesto **128**; DOR (*c* 0.80, MeOH)  $[\alpha]_{589} -2.5$ ,  $[\alpha]_{578} -2.5$ ,  $[\alpha]_{546} -3.7$ ,  $[\alpha]_{436} -6.1$ ,  $[\alpha]_{365} -8.6$ .

### 5.7.3.5. Oxidación del compuesto 2.

Se disolvieron 25 mg del compuesto **2** en 2 mL de THF y se adicionaron 250 mg de  $\text{MnO}_2$  activo. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, ésta se filtró sobre celita, se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó por CLAR a una escala semipreparativa (fase móvil: *n*-hexano-AcOEt, 1:4; velocidad de flujo, 1.5 mL/min) para obtener 22.7 mg (91.5 %) del compuesto **5**. Se observó que al mantener el compuesto **5** en solución, se isomeriza al compuesto **131**.

**Compuesto 131.** RMN  $^1\text{H}$ , ver cuadro 33; RMN  $^{13}\text{C}$ , ver cuadro 34.

#### 5.7.3.6. *Oxidación del compuesto 4.*

El producto natural **4** (2 mg) se disolvió en 0.5 mL de acetona. La solución se mantuvo a 0°C y se adicionó gota a gota el reactivo de Jones ( $\text{CrO}_3\text{-AcOH}$ ) hasta que la coloración naranja que adquirió la mezcla de reacción persistió. Después de 5 min, la solución se diluyó con agua y se extrajo con  $\text{CHCl}_3$ , se secó y se eliminó el disolvente para analizar el residuo por CLAR a una escala semipreparativa (fase móvil: *n*-hexano-AcOEt, 1:1; velocidad de flujo, 1.5 mL/min) detectándose un pico principal con  $t_{\text{R}} = 14.6$  min. Este derivado se coeluyó por CLAR con el peracetato **129** y se analizó mediante CG-EM, demostrando que ambos compuestos eran idénticos.

#### 5.7.3.7. *Preparación de los ésteres C<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>-bis-MTPA de 3 y 7.*

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de RMN secos. Se disolvieron 2.8 mg del compuesto **3** ó **7** en 750  $\mu\text{L}$  de  $\text{CDCl}_3$  y se adicionaron 1.6 mg de 4-(dimetilamino)-piridina y 23.6  $\mu\text{L}$  del cloruro de *R*-(-)- $\alpha$ -metoxitri fluorometilfenilacetilo. Las reacciones se dejaron 24 horas en reposo bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . Se registró la RMN  $^1\text{H}$  de las mezclas de reacción, indicando la completa conversión de los productos naturales a los ésteres de Mosher **132** y **134**, respectivamente (Ward y Rhee, 1991). La reacción del producto natural **3** con el cloruro de *S*-(+)- $\alpha$ -metoxitri fluorometilfenilacetilo generó el éster de Mosher **133**. Para el aislamiento del derivado **134** preparado a partir del compuesto **7**, se vertió la mezcla de reacción en solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{Et}_2\text{O}$ , y se agitó vigorosamente por 10 min para hidrolizar el exceso de MTPA-Cl (Rieser, *et al.*, 1992). La fase orgánica se lavó con

HCl 0.5 N, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró a sequedad, quedando un residuo aceitoso de color amarillo, que fue purificado por CLAR a una escala semipreparativa (fase móvil, *n*-hexano-AcOEt (7:3); velocidad de flujo, 3 mL/min) para obtener 1.2 mg (19.2 %) del éster C<sub>2</sub>,C<sub>7</sub>-bis-*S*-MTPA (**134**, t<sub>R</sub> = 7.21 min). El éster C<sub>2</sub>,C<sub>7</sub>-bis-*R*-MTPA (**135**, 1.3 mg, 20.8 %, t<sub>R</sub> = 6.95 min) se obtuvo utilizando el cloruro de *S*-(+)-MTPA y el mismo procedimiento descrito anteriormente para la reacción de esterificación.

**Compuesto 132.** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 7.54 (4 H, m, ArH), 7.43 (6 H, m, ArH), 5.43 (1 H, m, H<sub>14</sub>), 5.29 (1 H, s, H<sub>17</sub>), 5.28-5.25 (2 H, m, H<sub>2</sub> y H<sub>7</sub>), 4.80 (1 H, s, H<sub>17'</sub>), 4.54 (1 H, dd, *J* = 7.5, 11.0 Hz, H<sub>15</sub>), 4.49 (1 H, dd, *J* = 7.5, 11.0 Hz, H<sub>15'</sub>), 4.17 (1 H, d, *J* = 11.0 Hz, H<sub>19</sub>), 3.79 (1 H, d, *J* = 11.0 Hz, H<sub>19'</sub>), 3.56 (3 H, sa, OMe), 3.55 (3 H, sa, OMe), 2.05 (3 H, s, OCOMe), 2.04 (3 H, s, OCOMe), 1.76 (3 H, sa, Me<sub>16</sub>), 1.06 (3 H, s, Me<sub>18</sub>), y 0.74 (3 H, s, Me<sub>20</sub>).

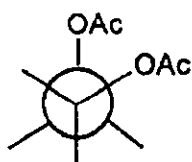
**Compuesto 133.** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 7.55 (4 H, m, ArH), 7.42 (6 H, m, ArH), 5.43 (1 H, m, H<sub>14</sub>), 5.28 (1 H, s, H<sub>17</sub>), 5.25 (2 H, m, H<sub>2</sub> y H<sub>7</sub>), 4.79 (1 H, s, H<sub>17'</sub>), 4.55 (1 H, dd, *J* = 7.6, 11.5 Hz, H<sub>15</sub>), 4.49 (1 H, dd, *J* = 7.6, 11.5 Hz, H<sub>15'</sub>), 4.19 (1 H, d, *J* = 11.1 Hz, H<sub>19</sub>), 3.80 (1 H, d, *J* = 11.1 Hz, H<sub>19'</sub>), 3.60 (3 H, sa, OMe), 3.56 (3 H, sa, OMe), 2.06 (3 H, s, OCOMe), 2.04 (3 H, s, OCOMe), 1.75 (3 H, sa, Me<sub>16</sub>), 1.07 (3 H, s, Me<sub>18</sub>), y 0.72 (3 H, s, Me<sub>20</sub>).

**Compuesto 134.** Aceite,  $t_R = 7.21$  min;  $[\alpha]_D +41$  ( $c$  0.1, MeOH); RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  7.56-7.53 (4 H, m, ArH), 7.43 (6 H, m, ArH), 5.25-5.20 (2 H, m, H<sub>2</sub> y H<sub>7</sub>), 5.09 (1 H, s, H<sub>17</sub>), 4.65 (1 H, s, H<sub>17'</sub>), 4.08 (1 H, d,  $J = 11.2$  Hz, H<sub>19</sub>), 3.88 (1 H, d,  $J = 11.2$  Hz, H<sub>19'</sub>), 3.56 (3 H, sa, OMe), 3.55 (3 H, sa, OMe), 2.12 (3 H, sa, Me<sub>16</sub>), 2.03 (3 H, s, OCOMe), 1.05 (3 H, s, Me<sub>18</sub>), y 0.83 (3 H, s, Me<sub>20</sub>), fig. 100; EM-FAB<sup>+</sup> (% de int. rel.)  $[\text{M} + \text{H}]^+$  785 (2),  $[\text{M} + \text{H} - 234 (\text{MTPA-OH})]^+$  551 (10),  $[\text{MTPA} - \text{OH} - \text{H}_2\text{O}]$ ,  $[\text{533} - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$  491 (4), 409 (7.0), 391 (6.0),  $[\text{M} + \text{H} - 2\text{MTPA-OH}]^+$  317 (20).

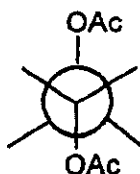
**Compuesto 135.** Aceite,  $t_R = 6.95$  min;  $[\alpha]_D -10$  ( $c$  0.1, MeOH); RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  7.58-7.53 (4 H, m, ArH), 7.42 (6 H, m, ArH), 5.25-5.19 (2 H, m, H<sub>2</sub> y H<sub>7</sub>), 4.86 (1 H, s, H<sub>17</sub>), 4.56 (1 H, s, H<sub>17'</sub>), 4.11 (1 H, d,  $J = 11.2$  Hz, H<sub>19</sub>), 3.92 (1 H, d,  $J = 11.2$  Hz, H<sub>19'</sub>), 3.60 (3 H, sa, OMe), 3.56 (3 H, sa, OMe), 2.10 (3 H, sa, Me<sub>16</sub>), 2.06 (3 H, s, OCOMe), 1.07 (3 H, s, Me<sub>18</sub>), y 0.82 (3 H, s, Me<sub>20</sub>), fig. 100; EM-FAB<sup>+</sup> (% de int. rel.)  $[\text{M} + \text{H}]^+$  785 (1),  $[\text{M} + \text{H} - 234 (\text{MTPA-OH})]^+$  551 (15),  $[\text{551} - \text{H}_2\text{O}]^+$  533 (3),  $[\text{533} - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$  491 (2), 409 (5), 391 (5),  $[\text{M} + \text{H} - 2\text{MTPA-OH}]^+$  317 (25).

### 5.8. Cálculos de mecánica molecular.

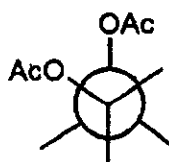
Se realizaron cálculos de mecánica molecular con la espicigerólida (1) y la sinrotólida peracetilada (114). Para el proceso de minimización energética por el método MMX se estableció el número de conformeros a ser analizados por el giro de los grupos acetato de los enlaces C<sub>3</sub>'-C<sub>4</sub>', C<sub>4</sub>'-C<sub>5</sub>' y C<sub>5</sub>'-C<sub>6</sub>' en tres diferentes posiciones: + 60° (A), + 180° (B) y -60° (C):



A



B

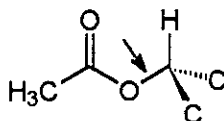


C

Al hacer todas las combinaciones de los tres enlaces a girar en las tres diferentes posiciones, se tenían 27 posibles conformeros los cuales se presentan en el cuadro 6.

Utilizando cálculos de campo de fuerza se generaron las estructuras de mínima energía de las estructuras bajo estudio considerando los siguientes criterios:

- Sólo se consideraron las conformaciones alternadas (A, B y C) para el inicio del procedimiento de minimización, excluyendo los conformeros eclipsados.
- Al inicio del procedimiento de minimización, todos los grupos acetato se orientaron en la conformación de mayor estabilidad, es decir con los sustituyentes del enlace acetoxi-alquilo en posición *anti*-clinal (López-Calahorra *et al.*, 1990; Osawa *et al.*, 1991):



- El núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona se considera como una unidad fija en la conformación de *pseudo*-silla de mayor estabilidad inferida a partir de los estudios de difracción de rayos X utilizando compuestos relacionados, *e.g.* la hiptólida (40) y la 5-desacetiloxi-5'-*epi*-olguina (43).
- Aquellas conformaciones con interacción 1,3-oxígeno-oxígeno se excluyeron de la serie, *i.e.*, los que presentaron las secuencias A-C para el fragmento C<sub>3</sub>'-C<sub>4</sub>'-C<sub>5</sub>' y/o C-A para el fragmento C<sub>4</sub>'-C<sub>5</sub>'-C<sub>6</sub>' (ver Cuadro 6).



**Cuadro 6.** Combinaciones rotaméricas A, B y C para los enlaces C<sub>3'</sub>-C<sub>4'</sub>, C<sub>4'</sub>-C<sub>5'</sub> y C<sub>5'</sub>-C<sub>6'</sub> de la espicigerólida (1).

Número de conformero	Enlace 3'-4'	Enlace 4'-5'	Enlace 5'-6'
1	A	A	A
2	A	A	B
3	A	A	C
4	A	B	A
5	A	B	B
6	A	B	C
7	A	C	A
8	A	C	B
9	A	C	C
10	B	A	A
11	B	A	B
12	B	A	C
13	B	B	A
14	B	B	B
15	B	B	C
16	B	C	A
17	B	C	B
18	B	C	C
19	C	A	A
20	C	A	B
21	C	A	C
22	C	B	A
23	C	B	B
24	C	B	C
25	C	C	A
26	C	C	B
27	C	C	C

De esta manera, el número de conformeros a ser minimizados se redujo de 27 a 22, procediendo a generar las estructuras de mínima energía utilizando el cálculo de campo de fuerza MMX, que es una versión derivada del programa MM2, desarrollado por Allinger e implementado en el programa PCModel v. 6.0 (Serena software, Bloomington, IN. USA). Esta versión utiliza la ecuación de Altona para obtener los valores de las constantes de acoplamiento entre los protones unidos a los enlaces que se giraron de cada uno de los conformeros, además de calcular los valores de  $\Delta H_f$  (entalpía de formación) y  $E_{MMX}$  (energía relativa de acuerdo a mecánica molecular).

Enseguida, se procedió al cálculo de la población conformacional, expresada en fracción molar para los 22 conformeros evaluados, utilizando las siguientes ecuaciones derivadas a partir de la energía libre de Gibbs para cada par de conformeros en equilibrio (Arnó *et al.*, 1998):

$$E_2 - E_1 = -RT \ln n_2/n_1; E_2 - E_3 = -RT \ln n_2/n_3 \dots E_{21} - E_{22} = -RT \ln n_{21}/n_{22}$$

Expresando las ecuaciones en función de  $n_2$  se tiene que:

$$n_1 = n_2 / \exp \{ (E_2 - E_1) / -RT \}$$

$$n_3 = n_2 / \exp \{ (E_2 - E_3) / -RT \}$$

$$n_4 = n_2 / \exp \{ [(E_2 - E_3) / -RT] \cdot [(E_3 - E_4) / -RT] \}$$

$$n_5 = n_2 / \exp \{ [(E_2 - E_3) / -RT] \cdot [(E_3 - E_4) / -RT] \cdot [(E_4 - E_5) / -RT] \}$$

$$n_6 = n_2 / \exp \{ [(E_2 - E_3) / -RT] \cdot [(E_3 - E_4) / -RT] \cdot [(E_4 - E_5) / -RT] \cdot [(E_5 - E_6) / -RT] \}$$

⋮

$$n_{22} = n_2 / \exp \{ [(E_2 - E_3) / -RT] \cdot [(E_3 - E_4) / -RT] \cdot [(E_4 - E_5) / -RT] \cdot [(E_5 - E_6) / -RT] \cdot [(E_6 - E_7) / -RT] \cdot [(E_7 - E_8) / -RT] \cdot [(E_8 - E_9) / -RT] \cdot [(E_9 - E_{10}) / -RT] \cdot [(E_{10} - E_{11}) / -RT] \cdot [(E_{11} - E_{12}) / -RT] \}$$

$$-E_{12}) / -RT] \cdot [(E_{12} - E_{13}) / -RT] \cdot [(E_{13} - E_{14}) / -RT] \cdot [(E_{14} - E_{15}) / -RT] \cdot [(E_{15} - E_{16}) / -RT] \cdot [(E_{16} - E_{17}) / -RT] \cdot [(E_{17} - E_{18}) / -RT] \cdot [(E_{18} - E_{19}) / -RT] \cdot [(E_{19} - E_{20}) / -RT] \cdot [(E_{20} - E_{21}) / -RT] \cdot [(E_{21} - E_{22}) / -RT] \}$$

Considerando que:

$$n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + n_5 + n_6 + \dots + n_{22} = 1$$

entonces:

$$n_2 = 1 / \exp \{ [(E_2 - E_1) / -RT] + [(E_2 - E_3) / -RT] + \{ [(E_2 - E_3) / -RT] \cdot [(E_3 - E_4) / -RT] \} + \{ [(E_2 - E_3) / -RT] \cdot [(E_3 - E_4) / -RT] \cdot [(E_4 - E_5) / -RT] \} + \{ [(E_2 - E_3) / -RT] \cdot [(E_3 - E_4) / -RT] \cdot [(E_4 - E_5) / -RT] \cdot [(E_5 - E_6) / -RT] \} + \dots + \{ [(E_2 - E_3) / -RT] \cdot [(E_3 - E_4) / -RT] \cdot [(E_4 - E_5) / -RT] \cdot [(E_5 - E_6) / -RT] \cdot [(E_6 - E_7) / -RT] \cdot [(E_7 - E_8) / -RT] \cdot [(E_8 - E_9) / -RT] \cdot [(E_9 - E_{10}) / -RT] \cdot [(E_{10} - E_{11}) / -RT] \cdot [(E_{11} - E_{12}) / -RT] \cdot [(E_{12} - E_{13}) / -RT] \cdot [(E_{13} - E_{14}) / -RT] \cdot [(E_{14} - E_{15}) / -RT] \cdot [(E_{15} - E_{16}) / -RT] \cdot [(E_{16} - E_{17}) / -RT] \cdot [(E_{17} - E_{18}) / -RT] \cdot [(E_{18} - E_{19}) / -RT] \cdot [(E_{19} - E_{20}) / -RT] \cdot [(E_{20} - E_{21}) / -RT] \cdot [(E_{21} - E_{22}) / -RT] \} + 1 \}$$

Por último, se calcularon las constantes de acoplamiento teóricas mediante la sumatoria del producto de la constante de acoplamiento calculada por la ecuación de Altona multiplicado por las fracciones molares de cada confórmero (Masamune *et al.*, 1986).

## 5.9. Ensayos biológicos.

### 5.9.1. Bioensayo con el gusano barrenador del maíz.

La actividad insecticida del extracto y de los compuestos puros se determinó empleando como insecto de prueba las larvas del gusano barrenador del maíz (*Ostrinia*

*nubilalis* Hübner; Lepidoptera: Pyralidae). En todos los casos se evaluó el efecto de los compuestos sobre el peso promedio y el porcentaje de mortalidad de las larvas a lo largo de un periodo de 25 días. Estas evaluaciones se realizaron en el laboratorio del Dr. John Thor Arnason (Universidad de Ottawa, Canadá), de acuerdo a los procedimientos descritos en la literatura (Arnason, *et al.*, 1987; Bernard, *et al.*, 1995).

### 5.9.2. Ensayo de citotoxicidad.

Los procedimientos para el establecimiento de los cultivos celulares de las líneas cancerosas se fundamentaron en los protocolos previamente descritos en la literatura (Likhitwitayawuid, 1993; Novelo, *et al.*, 1993). Se utilizaron tres líneas celulares cancerosas humanas: carcinoma nasofaríngeo (KB), carcinoma de colon (HCT-15) y carcinoma de células escamosas de cervix (SQC-1 UISO). Estas líneas se mantuvieron en medio RMPI 1640 (10X), suplementado con 10 % de suero bovino fetal. Todas las líneas se cultivaron a 37°C bajo atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % en aire y 100 % de humedad relativa y se utilizaron para el ensayo cuando se encontraban en la fase logarítmica de crecimiento.

El bioensayo se realizó en microplacas de plástico con 96 cavidades (250 µL) de acuerdo con los procedimientos descritos por Skehan, *et al.* (1990) y Pereda-Miranda (1994). Se depositaron en cada una de las cavidades de la placa 190 µL de las suspensiones celulares y se adicionaron 10 µL de la solución conteniendo la muestra de prueba, las cuales se evaluaron en las concentraciones de prueba correspondientes a 20.0, 4.0, 0.8, 0.16 y 0.032 µg/mL, por triplicado. Paralelamente, se prepararon ensayos de control, utilizando 190 µL de la suspensión celular a evaluar y 10 µL de

DMSO al 10 %. Por otro lado, se depositaron 190  $\mu$ L de la suspensión celular en una placa adicional y se determinó su densidad óptica inicial. Las placas que contenían la muestra de prueba y los controles se incubaron a 37°C durante 72 horas, en tanto que las placas etiquetadas como iniciales se incubaron a 37°C durante 30 min. Al concluir el periodo de incubación, las monocapas celulares se sometieron a un proceso de fijación adicionando 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético al 50 % en cada una de las réplicas del bioensayo y se incubaron a 4°C durante 30 min. Todas las placas se lavaron con agua de hielo por cuatro ocasiones, se tiñeron con 100  $\mu$ L de una solución de sulforodamida B (0.4 %) en ácido acético (1 %) durante 30 minutos. Se eliminó el exceso de tinción lavando con ácido acético al 1 % por cuatro ocasiones y se secaron con una corriente de aire. Posteriormente, el colorante unido a las proteínas se solubilizó agitando moderadamente con 200  $\mu$ L de Tris base 10 mM (tris-hidroximetilaminometano) a un pH de 10 durante 5 min. Se registró la densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 564 nm. El porcentaje de sobrevivencia celular se determinó mediante la fórmula  $(T-Co/C-Co) \times 100$ , donde T representa el promedio de la densidad óptica de las concentraciones de prueba, C es el promedio de la densidad óptica en los ensayos de control y Co es el promedio de la densidad óptica inicial. A través de un análisis de regresión lineal de los gráficos semilogarítmicos obtenidos entre las dosis y el porcentaje de crecimiento celular, se determinó la concentración efectiva del compuesto de prueba necesaria para inhibir el crecimiento celular en un 50 % ( $CE_{50}$   $\mu$ g/mL). Se utilizó la elipticina como un control positivo:  $CE_{50}$  0.10 (KB); 0.17  $\mu$ g/mL (HCT-15); 0.41 (SQC-1 UISO).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1. Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico total de las partes aéreas de *Hyptis spicigera*.

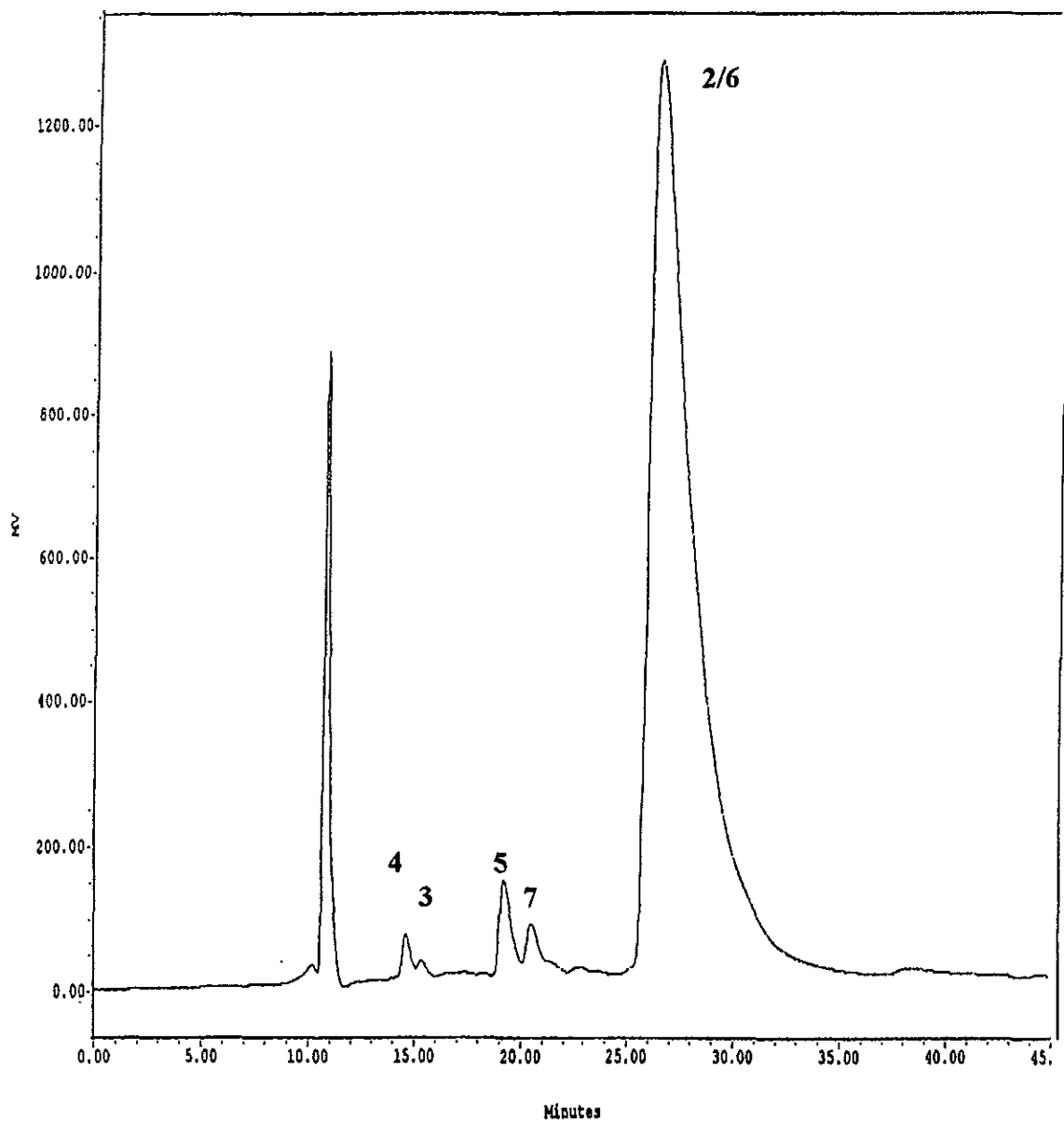
Las pérdidas ocasionadas en los granos almacenados debido a la infestación por insectos han repercutido enormemente en la economía de los pequeños agricultores, quienes no utilizan insecticidas sintéticos debido a sus precios elevados y, en algunos casos a su poca eficiencia (Benner, 1993). Una alternativa de la agricultura tradicional, en numerosas regiones tropicales, consiste en mezclar las semillas almacenadas con una planta local que posea propiedades repelentes contra las plagas. La planta *Hyptis spicigera* se utiliza en algunos países africanos para controlar la infestación de los granos almacenados por larvas del gorgojo *Callosobruchus sp.*

El objetivo de la presente investigación se concentró en el aislamiento de los constituyentes bioactivos presentes en las partes aéreas de *Hyptis spicigera*, tomando en cuenta el uso en la agricultura tradicional de la planta como insecticida y la actividad citotóxica desarrollada por el extracto total ( $CE_{50}$  18.5  $\mu\text{g/mL}$ ). De esta manera, se utilizaron como bioensayos de prueba la toxicidad para el gusano barrenador del maíz, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) (Bernard *et al.*, 1995) y la evaluación de la actividad citotóxica contra líneas celulares derivadas de tumores humanos (Novelo *et al.*, 1993).

En primer lugar, el extracto orgánico total de las partes aéreas de *Hyptis spicigera* se sometió a un fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta utilizando gel de sílice para generar un total de 10 fracciones primarias. Cada una de éstas

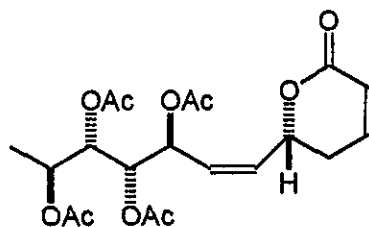
se sometió a la determinación de su potencial insecticida para establecer que esta actividad se concentraba en la fracción V. Un segundo fraccionamiento de esta fracción activa en columna abierta de gel de sílice permitió obtener 8 subfracciones (ver Parte Experimental, sección 5.5). La subfracción 78-82 desarrolló una actividad citotóxica significativa contra la línea celular de carcinoma nasofaríngeo (KB) con una  $CE_{50} = 2.8 \mu\text{g/mL}$  y al someterla a un proceso de purificación mediante cromatografía en capa fina a escala preparativa proporcionó una 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona, denominada con el nombre trivial de espicigerólida (1), como el único principio bioactivo presente en esta subfracción (KB:  $CE_{50} = 1.5 \mu\text{g/mL}$ ). La subfracción 83-103 resultó estar constituida por una mezcla de diterpenos y su purificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) permitió la obtención de seis compuestos mayoritarios (2-7, fig. 29), responsables de las propiedades insecticidas. Por último, la subfracción 104-109 también se purificó por CLAR proporcionando el último labdano de mayor polaridad (8) aislado de la especie vegetal en estudio.

La espicigerólida (1) es el único metabolito con propiedades citotóxicas aislado de las partes aéreas de la planta ( $1.5 \times 10^{-4}$  % peso seco). El compuesto 2 constituye el metabolito mayoritario ( $4.4 \times 10^{-2}$  % peso seco), mientras que los compuestos 3-8 representan constituyentes minoritarios ( $3.8-0.4 \times 10^{-3}$  % peso seco) de la fracción insecticida.

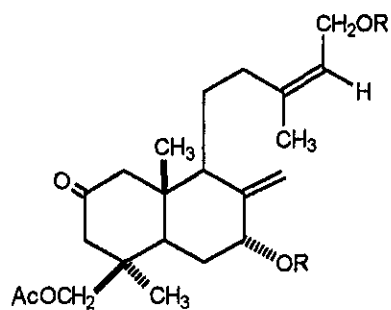
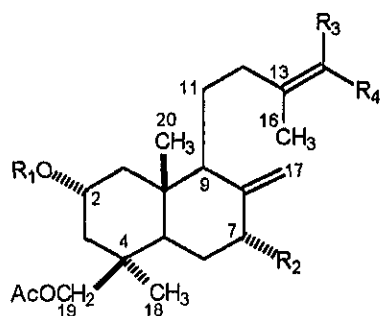


**Figura 29.** Cromatograma generado mediante CLAR de la subfracción 83-103 que ilustra la separación de los compuestos 2-7. Condiciones cromatográficas: columna de fase normal (21.2 x 250 mm, 10 mm), detector de índice de refracción; fase móvil: *n*-hexano-AcOEt (1:4); velocidad de flujo = 5 mL/min.



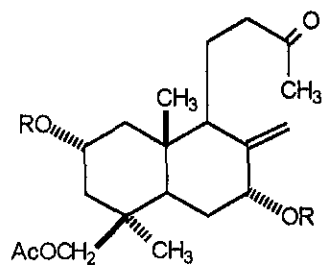


1

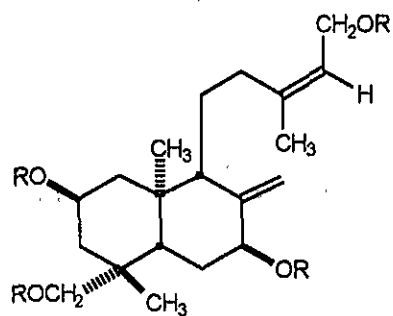


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
2	OH	OH	CH <sub>2</sub> OH	H
3	OH	OH	CH <sub>2</sub> OAc	H
4	OH	OAc	CH <sub>2</sub> OAc	H
5	OH	OH	CHO	H
128	OAc	OAc	CH <sub>2</sub> OAc	H
131	OH	OH	H	CHO
132	O(-)-MTPA	O(-)-MTPA	CH <sub>2</sub> OAc	H
133	O(+)-MTPA	O(+)-MTPA	CH <sub>2</sub> OAc	H

6 R = H  
129 R = Ac



7 R = H  
134 R = (-)-MTPA  
135 R = (+)-MTPA



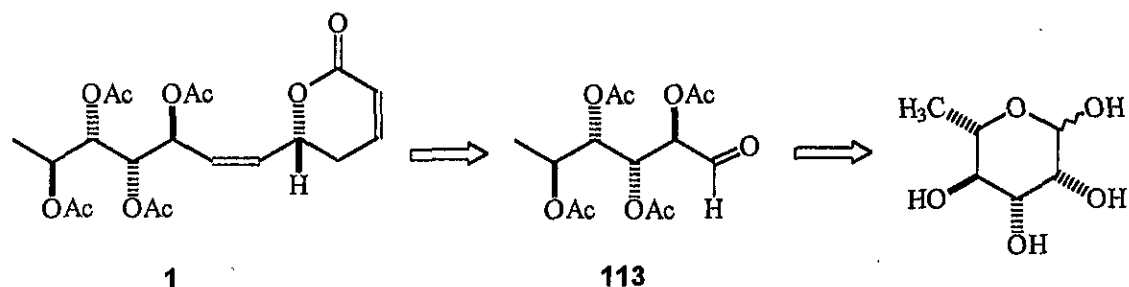
8 R = H  
130 R = Ac

A partir de los productos naturales **2-4**, **6** y **8**, se prepararon los derivados peracetilados **128-130** y con los diterpenos **7** y **3** se sintetizaron los ésteres de Mosher **132-135**. El compuesto **131** representa un producto de isomerización del labdano **5** obtenido durante la oxidación del compuesto **2**.

Debido al bajo rendimiento obtenido de la espicigerólida (**1**) a partir del material vegetal estudiado su elucidación estructural completa representó un reto sin precedente en este grupo de sustancias. Tanto su estructura y configuración relativa se lograron elucidar mediante estudios de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Para establecer la configuración absoluta se combinaron diferentes metodologías de modelaje molecular y correlación química. Este análisis se inició con la comparación de las constantes espectroscópicas del producto natural (**1**) con las descritas en la literatura para la sinrotólida (**29**) y la anamarina (**42**). También, se realizó una comparación de las constantes de acoplamiento ( $^3J_{\text{H-H}}$ ) de los protones en la cadena lateral ( $\text{H}_3\text{-H}_6$ ) con las  $^3J_{\text{H-H}}$  reportadas en la literatura para una serie de aldonitrilos (Velazco *et al.*, 1990) y aldohexosas peracetiladas (Masamune *et al.*, 1986), proponiéndose que la estereoquímica relativa más probable para la cadena lateral de la espicigerólida (**1**) correspondía a la presente en la 6-desoxi-L-manosa. Con el fin de verificar esta hipótesis, se calcularon las conformaciones de mínima energía del diastereoisómero propuesto y para cada una de éstas se establecieron sus valores correspondientes de entalpía de formación ( $\Delta H_f$ ), mínima energía ( $E_{\text{MMX}}$ ), fracción molar ( $m_i$ ) y las constantes de acoplamiento vecinales ( $^3J_{\text{H-H}}$ ) calculadas mediante la ecuación de Altona para los conformeros de mayor estabilidad. Estos parámetros permitieron estimar la constante de acoplamiento poblacional para cada uno de los hidrógenos unidos a los centros

quirales de la cadena lateral ( $H_3$ - $H_6$ ) tal y como se explicó en la Parte Experimental (ver sección 5.8).

Con el fin de confirmar la estereoquímica propuesta para la cadena lateral de la espicigerólida (1) y mediante un análisis retrosintético (fig. 30), se planificó la obtención del sintón quiral (113) a partir de la L-ramnosa (6-desoxi-L-manosa).



**Figura 30.** Análisis retrosintético para la obtención de la cadena lateral de la espicigerólida (1) a partir de la L-ramnosa.

## 6.2. Caracterización de la espicigerólida (1).

El constituyente aislado de la fracción citotóxica de *Hyptis spicigera* presentó la fórmula molecular  $C_{20}H_{26}O_{10}$ , determinada por espectrometría de masas con la técnica de impacto electrónico (EM-IE) a 20 eV. En el espectro de IR se observó una absorción intensa en  $1740\text{ cm}^{-1}$  y bandas de menor intensidad en  $1630$  y  $820\text{ cm}^{-1}$ , absorciones características de un carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado. También, se observaron bandas en  $1720$  y  $1238\text{ cm}^{-1}$  asociadas con la presencia de grupos ésteres (Silverstein *et al.*, 1991).

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (fig. 31) se observaron señales que permitieron la caracterización de una 5,6-dihidropirona  $\alpha,\beta$ -insaturada a través de un sistema de multiplicidades de tipo ABXY para los núcleos  $H_3$ ,  $H_4$ ,  $H_{5ax}$  y  $H_{5ec}$ :

1. Se detectaron un par de resonancias para protones olefinicos centrados en  $\delta$  6.06 (1H, ddd,  $J = 9.7, 2.5$  y  $1.3$  Hz, H<sub>3</sub>) y  $\delta$  6.90 (1H, ddd,  $J = 9.7, 5.2$  y  $2.5$  Hz, H<sub>4</sub>);

2. Dos protones alílicos no equivalentes (H<sub>5</sub>) centrados en  $\delta$  2.35 (1H, dddd,  $J = 18.5, 11.0, 2.5$  y  $2.5$  Hz) y  $\delta$  2.52 (1H, dddd,  $J = 18.5, 5.2, 4.5$  y  $1.3$  Hz), el valor de la constante de  $18.5$  Hz indicó un acoplamiento geminal ( $J_{5ax, 5ec}$ );

3. Un protón geminal a la función etérea de una lactona centrado en  $\delta$  5.35 (1H, dddd,  $J = 11.0, 9.5, 4.5$  y  $1.0$  Hz, H<sub>6</sub>) (Davies-Coleman y Rivett, 1989, Pereda-Miranda, 1995).

Se observaron tres singuletes centrados en  $\delta$  2.12 (6H), 2.04 (3H) y 2.03 (3H) que indicaron cuatro grupos metilo de funciones acetoxilo. El resto de las señales debe corresponder a la cadena lateral y por su desplazamiento químico se asignaron a: (1) un grupo metilo secundario centrado en  $\delta$  1.19 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz, H<sub>7</sub>); (2) cuatro protones base de grupos acetoxilo entre  $\delta$  5.41 y  $\delta$  4.96; y (3) dos protones vinílicos centrados en  $\delta$  5.79 y  $\delta$  5.49.

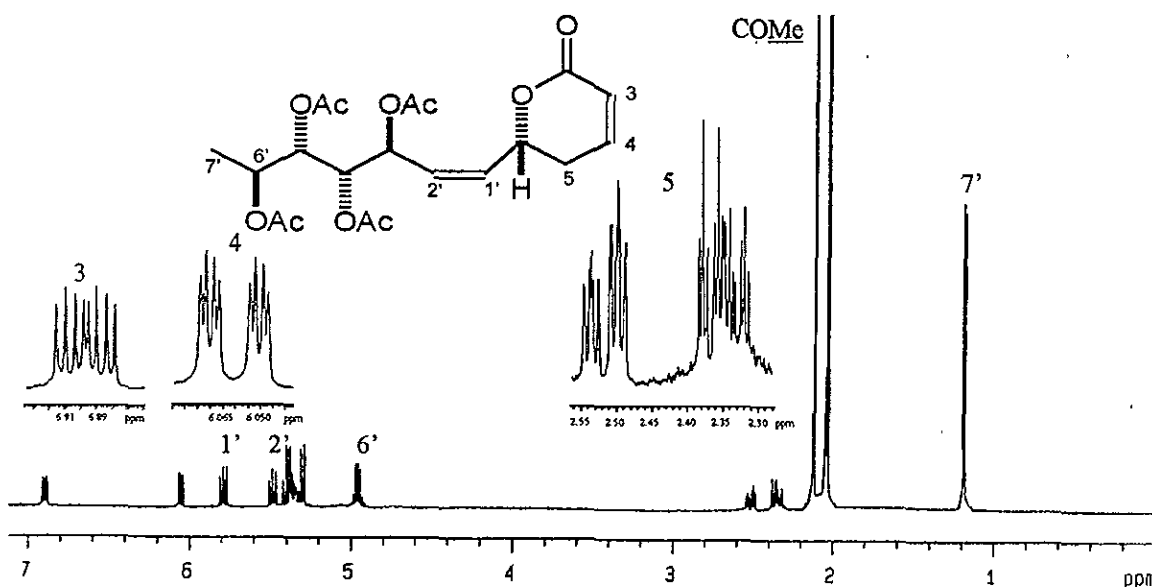


Figura 31. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la spicigerólida (1) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

Los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$ -DEPT (fig. 32) confirmaron la presencia del núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona sustituida, a través de las siguientes resonancias: el desplazamiento químico del carbonilo  $\text{C}_2$  se observó centrado en  $\delta$  163.7; las señales para los carbonos olefinicos conjugados ( $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$ ) se observaron en  $\delta$  121.5 y 144.8; el metileno alílico ( $\text{C}_5$ ) se asignó a la señal centrada en  $\delta$  29.2 y, por último, la señal del metino centrado en  $\delta$  73.7 se asignó al centro estereogénico  $\text{C}_6$ , evidenciando la presencia de una cadena lateral en la posición  $\text{C}_6$  del núcleo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona.

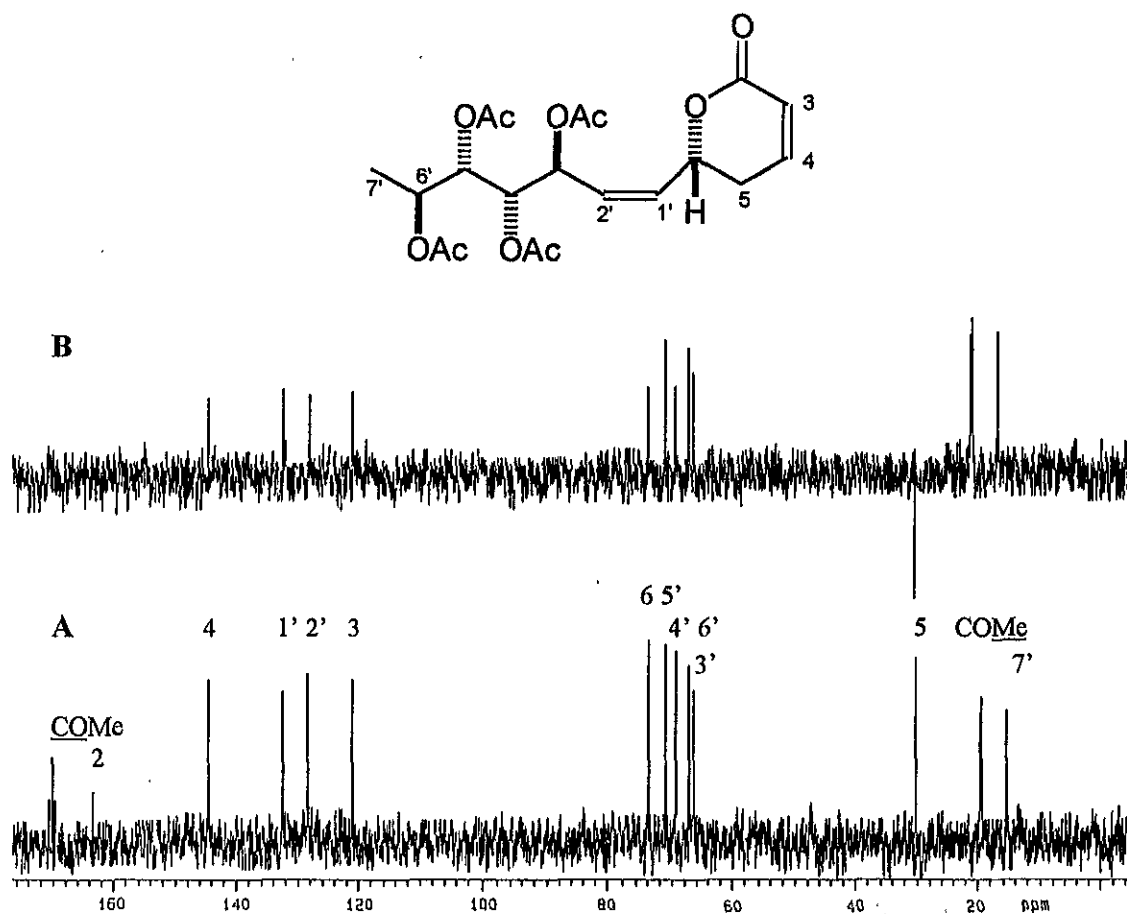
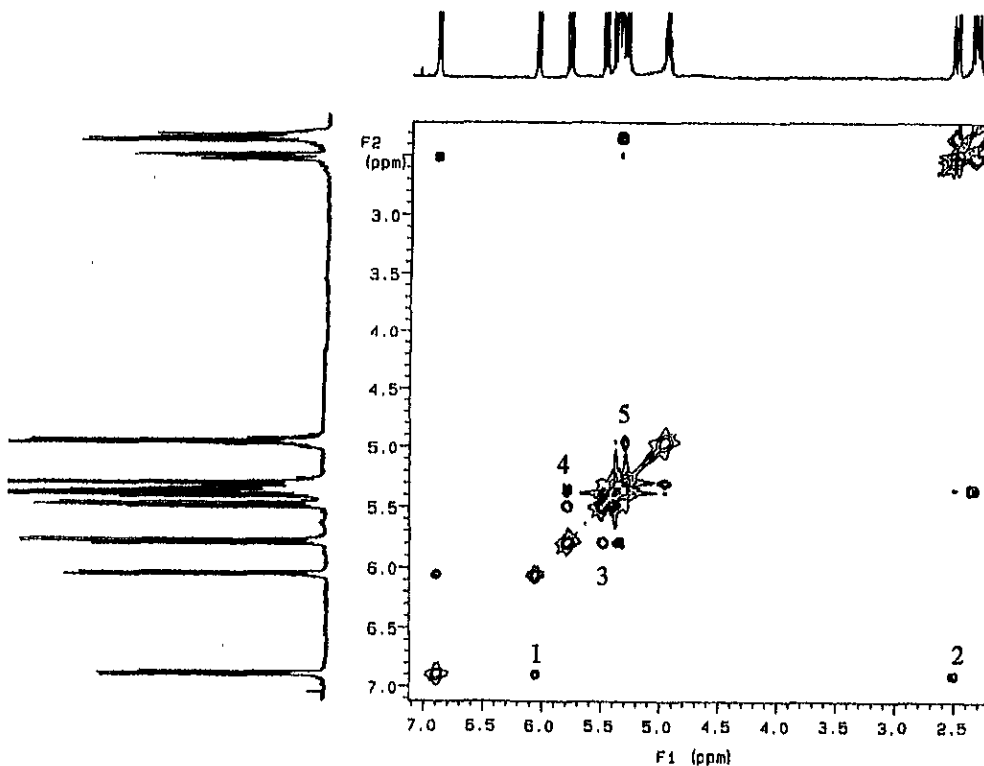


Figura 32. Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (A) y DEPT (B) de la espicigerólida (1) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Con respecto al sustituyente en C<sub>6</sub>, se confirmó que se trataba de una cadena olefínica compuesta de siete átomos de carbono al identificar las siguientes señales: (1) las dos señales centradas en  $\delta$  132.8 y 128.6, adicionales a las señales de C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> del núcleo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona, indicaron la presencia de una insaturación; (2) cuatro carbonos geminales a las funciones acetoxilo en forma de metinos centradas en  $\delta$  66.3, 66.9, 69.2 y 71.0; y (3) la señal a campo más alto del espectro se asignó a un grupo metilo terminal ( $\delta$  16.6).

Con el análisis del espectro bidimensional homonuclear (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, fig. 33) se corroboró la asignación de las resonancias del núcleo 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona y se logró establecer la conectividad de los fragmentos estructurales identificados para la cadena lateral a través de las siguientes observaciones: (1) se presentó un cuadro de correlación entre la señal centrada en  $\delta$  6.90 (H<sub>4</sub>) con el protón centrado en  $\delta$  6.06 (H<sub>3</sub>) y con los dos protones del metileno H<sub>5</sub> centrados en  $\delta$  2.35 y 2.52; (2) las señales para este último (2 H<sub>5</sub>) también presentaron interacciones con el protón geminal a la función etérea de la lactona (H<sub>6</sub>) centrado en  $\delta$  5.35; (3) la señal olefínica centrada en  $\delta$  5.79 (ddd) se asignó al núcleo H<sub>1</sub> mediante la interacción con H<sub>6</sub> y el segundo cuadro de conectividad de esta señal con el protón olefínico centrado en  $\delta$  5.49 permitió la asignación del protón H<sub>2</sub>. De esta manera, se logró establecer que la cadena lateral contenía el doble enlace disustituido en las posiciones 1' y 2', separados por cuatro átomos de carbono portadores de grupos acetoxilo del grupo metilo terminal cuya multiplicidad correspondía a un doblete; (4) la señal base de acetoxilo centrada en  $\delta$  4.96 con una multiplicidad de doblete de cuartetos (dc) se asignó fácilmente al protón H<sub>6</sub> y se corroboró por el cuadro de conectividad en el espectro COSY entre H<sub>6</sub> y H<sub>7</sub>. La asignación de las resonancias para los protones H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> y H<sub>5</sub> no resultó,

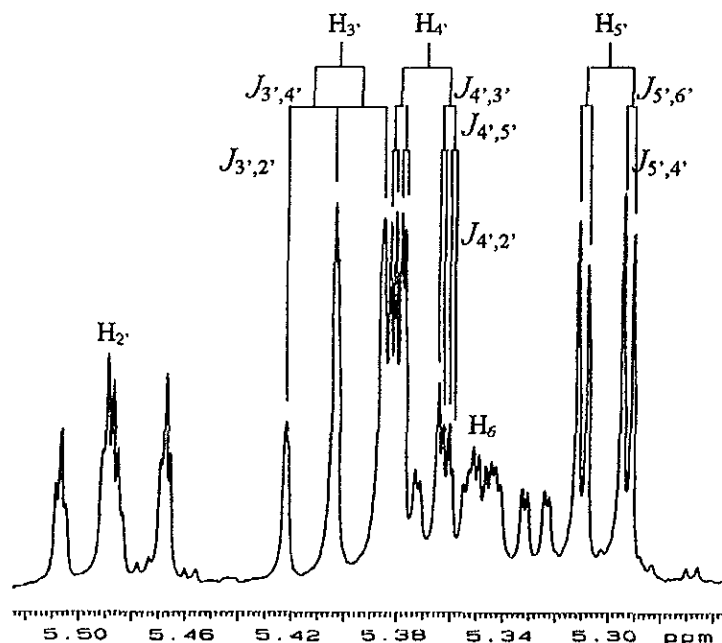
a primera vista, tan evidente en el espectro COSY debido a la proximidad de las señales, pero se logró confirmar cada una de las asignaciones a través de los valores para las constantes de acoplamiento de estos protones:  $\delta$  5.41 (1H, dd,  $J = 9.0$  y  $9.0$  Hz, H<sub>3</sub>), 5.37 (1H, ddd,  $J = 9.0, 2.0$  y  $1.0$  Hz, H<sub>4</sub>) y 5.30 (1H, dd,  $J = 8.5, 2.0$  Hz, H<sub>5</sub>).



**Figura 33.** Espectro de RMN bidimensional COSY de la espicigerólida (1) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>). Principales correlaciones <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (<sup>3</sup>J): 1, H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>; 2, H<sub>4</sub>-H<sub>5</sub>; 3, H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>; 4, H<sub>1</sub>-H<sub>6</sub>; 5, H<sub>5</sub>-H<sub>6</sub>.

La figura 34 ilustra la expansión del espectro de RMN <sup>1</sup>H de la espicigerólida con las asignaciones realizadas para cada una de las señales descritas anteriormente. La constante de acoplamiento de 10.5 Hz para los protones H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> permitió establecer una configuración *cis* para el doble enlace exocíclico, siendo consistente con los valores

reportados en la literatura (Davies-Coleman y Rivett, 1989; Pereda-Miranda *et al.*, 1993) para la hiptólida (**40**,  $J_{1'-2'}$  = 10 Hz), la pectinólida A (**50**,  $J_{1'-2'}$  = 11 Hz) y la umuravumbólida (**24**,  $J_{1'-2'}$  = 11 Hz).



**Figura 34.** Región de las señales base de oxígeno del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la espicigerólida (**1**) para la asignación de los protones  $\text{H}_{3'-}\text{H}_{5'}$  de la cadena lateral.

El conjunto de evidencias espectroscópicas descritas en los párrafos anteriores permitió establecer que la estructura de la espicigerólida (**1**) corresponde a la 6-[3,4,5,6-(tetraacetiloxi)-1*Z*-heptenil]-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona. El cuadro 7 presenta los valores de los desplazamientos químicos para los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , además de las constantes de acoplamiento vecinales registradas ( $^3J_{\text{H-H}}$ ).



Cuadro 7. Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la espigigerólida (1).<sup>a</sup>

Posición	$\delta$ $^1\text{H}$	$^3J_{\text{H-H}}$ <sup>b</sup>	$\delta$ $^{13}\text{C}$
2	-----		163.7
3	6.06 ddd	9.7, 2.5, 1.3	121.5
4	6.90 ddd	9.7, 5.2, 2.5	144.8
5 ax	2.35 dddd	18.5, 11.0, 2.5, 2.5	29.2
5 ec	2.52 dddd	18.5, 5.2, 4.5, 1.3	-----
6	5.35 dddd	11.0, 9.5, 4.5, 1.0	73.7
1'	5.79 ddd	10.5, 9.5, 1.0	132.8
2'	5.49 dddd	10.5, 9.0, 1.0, 1.0	128.6
3'	5.41 dd	9.0, 9.0	66.3
4'	5.37 ddd	9.0, 2.0, 1.0	69.2
5'	5.30 dd	8.5, 2.0	71.0
6'	4.96 dc	8.5, 6.2	66.9
7'	1.19 d	6.2	16.6
<u>COMe</u>	2.12 s		21.0
	2.12 s		21.0
	2.04 s		20.9
	2.03 s		20.7
<u>COMe</u>			170.0
			169.9
			169.9
			169.8

<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ ,  $^1\text{H}$  (500 MHz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY.  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz),  $\delta$  en ppm.

<sup>b</sup>Constantes de acoplamiento en Hz.

### 6.2.1. Determinación de la configuración absoluta de la espicigerólida (1).

Para el establecimiento de la configuración absoluta de la espicigerólida (1) se aplicaron las siguientes metodologías:

1) El registro del dicroísmo circular para establecer el signo del efecto Cotton para la transición  $n \rightarrow \pi^*$  (250 nm) y determinar la configuración absoluta del centro estereogénico  $C_6$  al aplicar la regla de Sneath (Beecham, 1972; Sneath, 1968);

2) La comparación de la configuración absoluta para los diversos centros estereogénicos de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de las labiadas a través de consideraciones de tipo biogénico (Davies-Coleman y Rivett, 1996);

3) La comparación de las constantes de acoplamiento experimentales del producto natural con las reportadas en la literatura para una serie de peracetil derivados de aldohexosas (Masamune *et al.*, 1986; Osawa *et al.*, 1991; Velasco *et al.*, 1990);

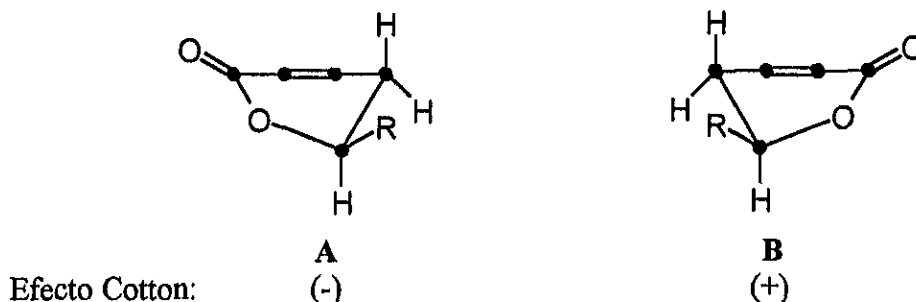
4) El empleo de la mecánica molecular para el cálculo de las conformaciones de mínima energía de los diastereoisómeros probables;

5) El cálculo de las constantes de acoplamiento poblacionales ( $J_{calc}$ ) (Arnó *et al.*, 1998) a través del establecimiento de las constantes de acoplamiento teóricas ( $^3J_{H-H}$ ) para los protones de la cadena lateral mediante la ecuación de Altona (Cerdeña-García-Rojas *et al.*, 1990; Hasnoot *et al.*, 1980) y la determinación de la fracción molar (Höltje y Folkers, 1996) de los conformeros de mayor estabilidad.

#### 6.2.1.1 Estereoquímica absoluta para los centros estereogénicos $C_6$ y $C_6$ .

Para conocer la estereoquímica absoluta del centro estereogénico  $C_6$  se determinó, en primer lugar, una configuración relativa *pseudo*-ecuatorial para la cadena lateral de

acuerdo con los valores observados para las constantes de acoplamiento entre los protones  $H_5$  y  $H_6$  ( $J_{5ax,6} = 11$  Hz y  $J_{5ec,6} = 4.5$  Hz). De esta manera, el anillo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona podría adoptar cualquiera de las dos conformaciones enantioméricas ilustradas en la figura 35.



**Figura 35.** Conformaciones enantioméricas alternativas para el núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona y signo del efecto Cotton establecido por la regla de Sznatzke (1968).

Al aplicar la regla de Sznatzke, se estableció la estereoquímica absoluta ( $R$ ) al centro quiral  $C_6$ , mediante la correlación del efecto Cotton positivo obtenido en la curva de dicroísmo circular ( $\lambda_{max}$  256 nm,  $\Delta\epsilon = + 2.8$ , fig. 36) para la transición  $n \rightarrow \pi^*$  del carbonilo de la pirona, cuya conformación correspondería al enantiómero B (fig. 35).

La estereoquímica absoluta  $C_6(R)$  se fundamenta de manera adicional en consideraciones biogénicas, ya que todas las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas naturales aisladas de las labiadas presentan la misma configuración absoluta, deducida por evidencias adicionales de tipo químico-degradativas y cristalográficas (Davies-Coleman y Rivett, 1987; Van Puyvelde *et al.*, 1981).

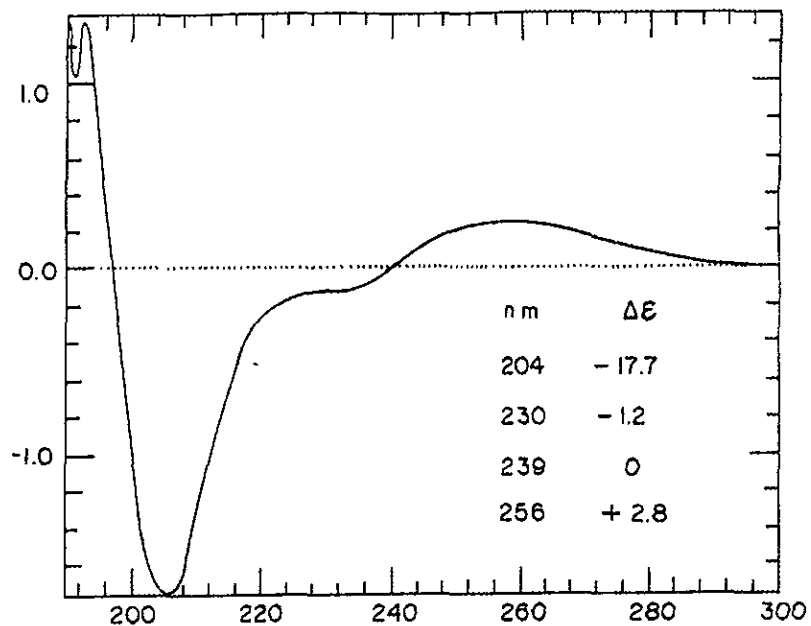
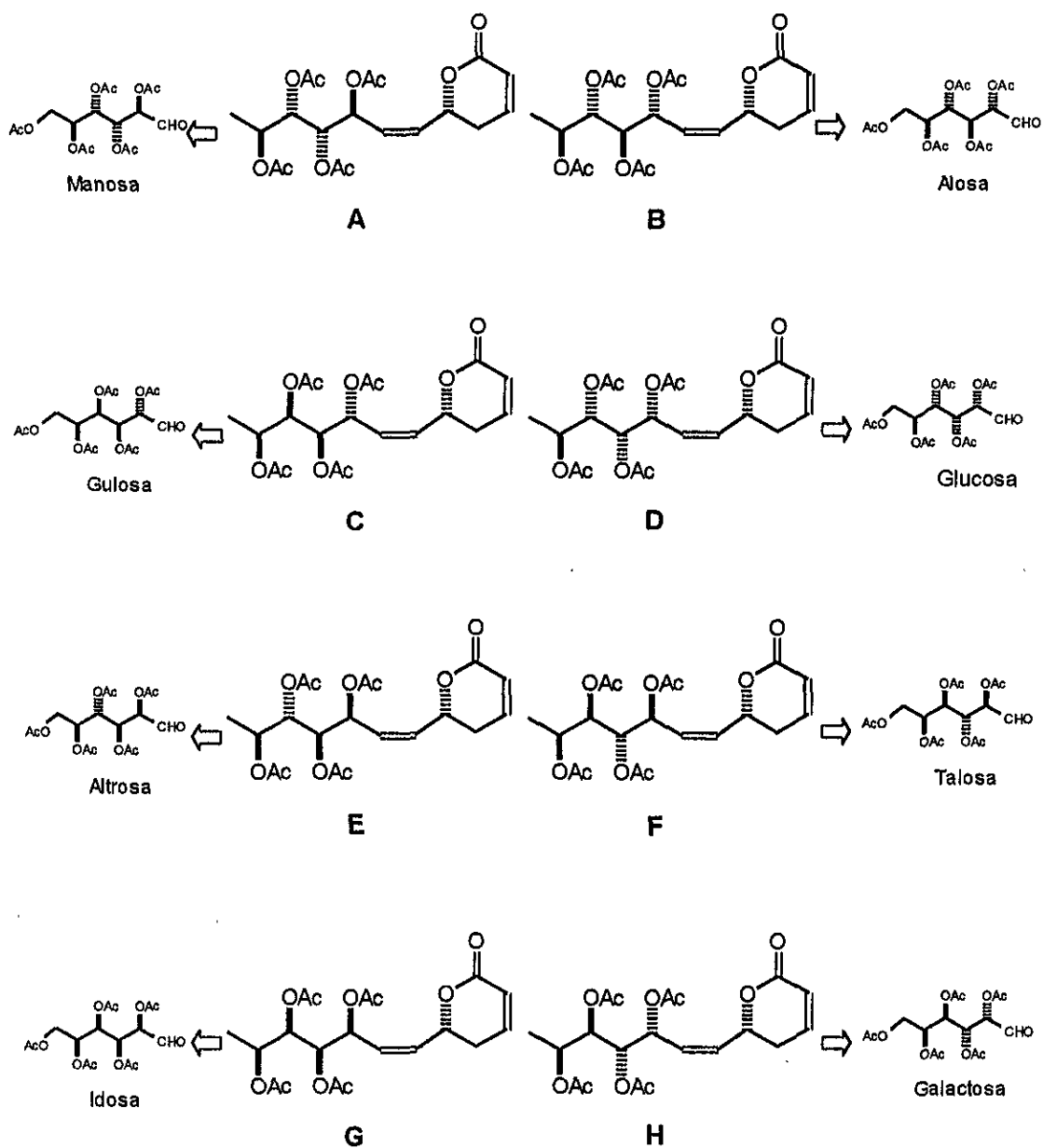


Figura 36. Espectro de dicroísmo circular de la espicigerólida (1).

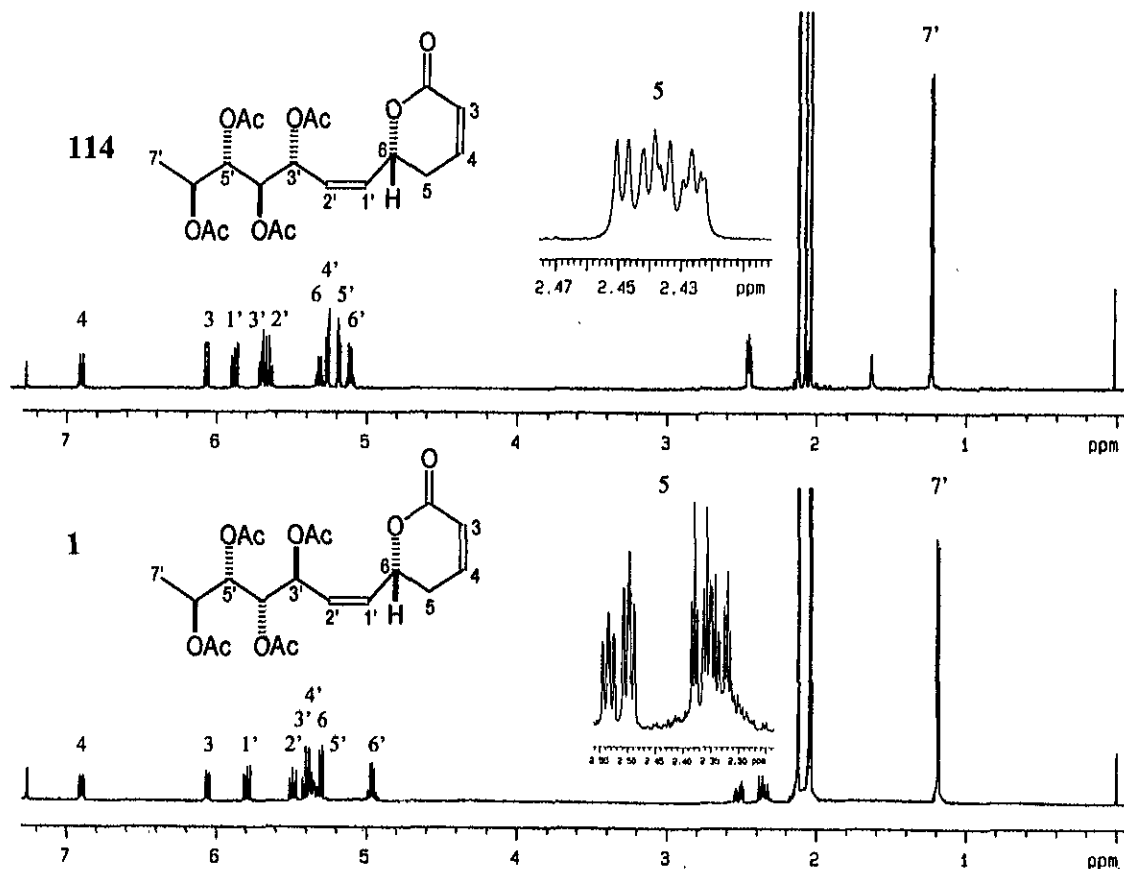
También, resulta importante destacar que el centro estereogénico  $C_6$  presenta una configuración absoluta constante entre todas las 6-heptil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de las labiadas, es decir  $C_6(S)$  (Davies-Coleman y Rivett, 1996). Así, se limitaron las posibilidades diastereoisoméricas a sólo ocho posibles estructuras al considerar la configuración absoluta  $S$  para este centro estereogénico. La figura 37 ilustra cada uno de estos diastereoisómeros y se incluye la configuración de la peracetil aldohexosa con la estereoquímica absoluta correcta que hipotéticamente permitiría establecer una correlación química con la cadena lateral de la espicigerólida (1).



**Figura 37.** Posibilidades diastereoisoméricas y sus carbohidratos peracetilados de origen para establecer la configuración absoluta de la cadena lateral de la espicigerólida (1).

### 6.2.1.2. Estereoquímica absoluta de los centros estereogénicos C<sub>3</sub>'-C<sub>5</sub>'.

El primer paso para el establecimiento de la configuración absoluta de los centros quirales C<sub>3</sub>'-C<sub>5</sub>' consistió en la comparación de las constantes espectroscópicas de la espicigerólida (**1**) con los compuestos descritos en la literatura con una cadena lateral de heptenilo y una tetraoxigenación análoga. De esta manera, los compuestos que fueron comparados con la espicigerólida (**1**) correspondieron al derivado peracetilado de la sinrotólida (**114**) y al isómero geométrico *cis* de la anamarina (**42**), mismos que representaban las posibilidades diasteroisoméricas B y D, respectivamente (fig. 37). La sinrotólida (**29**) es una 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona aislada de las hojas de *Syncolostemon rotundifolius*, cuya estructura se estableció a través de experimentos de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. La configuración absoluta de este producto se estableció mediante dicroísmo circular y cristalografía de rayos X (Davies-Coleman *et al.*, 1987a). En la figura 38, se presenta una comparación entre los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los compuestos **1** y **114**; como puede apreciarse, una de las principales diferencias observadas correspondió al desplazamiento químico para los dos hidrógenos del grupo metileno C<sub>5</sub> del núcleo de la  $\delta$ -lactona. Estas señales se observaron en forma de señales independientes centradas en  $\delta$  2.35 y  $\delta$  2.52 en la espicigerólida (**1**). En tanto que para la sinrotólida peracetilada (**114**), estas señales aparecen en forma de un multiplete complejo centrado en  $\delta$  2.45-2.42. Además, las constantes de acoplamiento vecinales (<sup>3</sup>J<sub>H-H</sub>) para los protones a lo largo de la cadena C<sub>3</sub>'-C<sub>5</sub>' de estos dos compuestos fueron completamente diferentes (Cuadro 8). Así, estas diferencias espectroscópicas descartaban la posibilidad configuracional B para la estereoquímica de la cadena lateral de la espicigerólida (**1**).



**Figura 38.** Comparación de los espectros de RMN <sup>1</sup>H de la espicigerólida (1) y la sinrotólida peracetilada (114).

La anamarina (42) se aisló de una especie sudamericana no identificada del género *Hyptis*, estableciendo su estructura mediante análisis espectroscópico y cristalografía de rayos X (Alemany *et al.*, 1979b). La estereoquímica absoluta se ha confirmado con la síntesis total del producto natural y de su enantiómero (Lorenz y Lichtenthaler, 1987; Valverde *et al.*, 1987). En el cuadro 8, se comparan los desplazamientos químicos generados en la RMN <sup>13</sup>C de la espicigerólida (1) y la anamarina (42), indicando que las principales diferencias entre estos compuestos corresponden a las señales de los carbonos de la cadena lateral (C<sub>1</sub>'-C<sub>7</sub>'). De esta manera, la comparación de los desplazamientos de <sup>13</sup>C permitieron descartar la configuración D derivada de la glucosa.

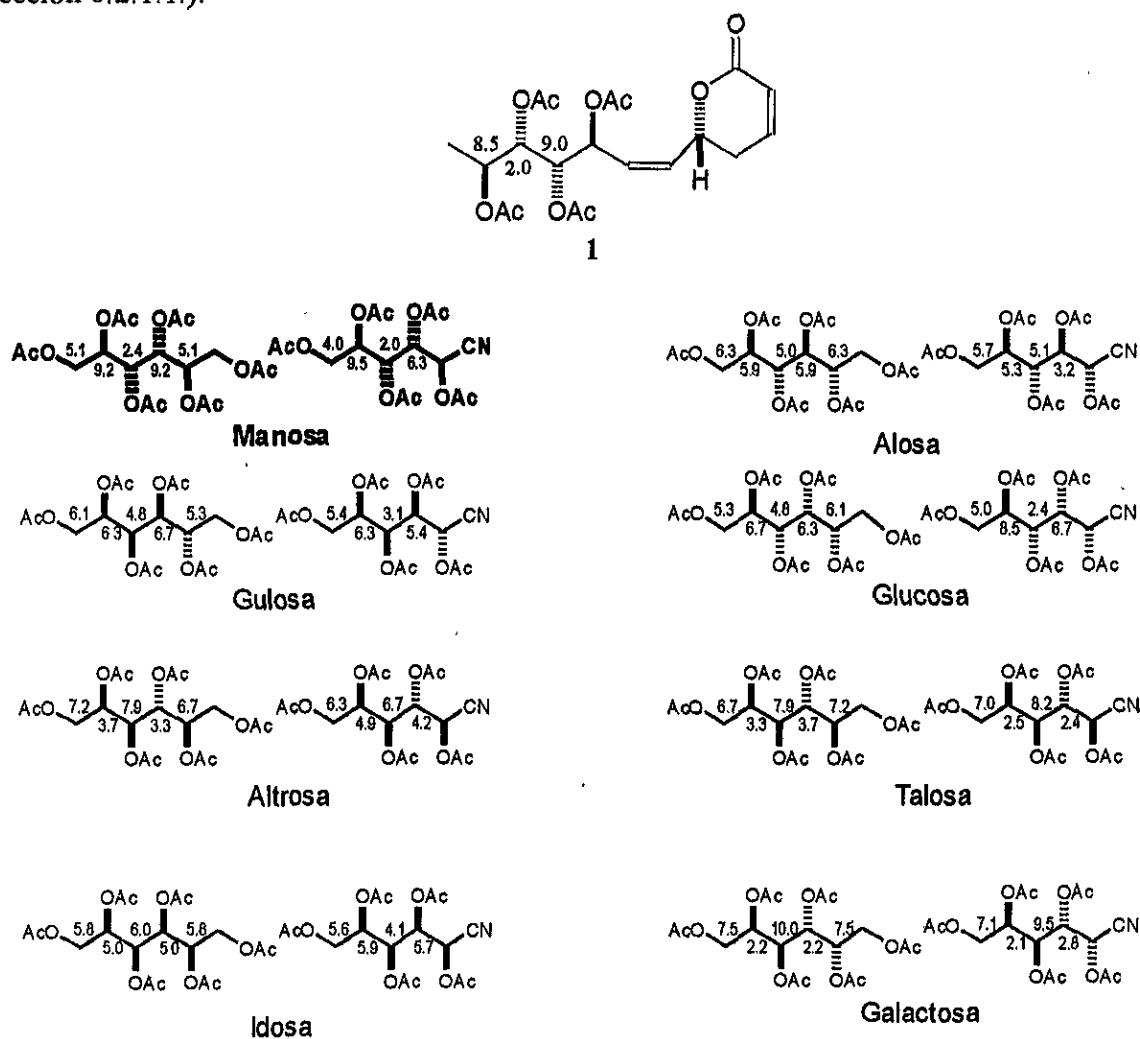
**Cuadro 8.** Constantes de acoplamiento de la espicigerólida (1) y de la sinrotólida peracetilada (114), y desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  de la espicigerólida (1) y de la anamarina (42).

Posición	$^3J_{\text{H-H}}$		$\delta^{13}\text{C}$	
	1	114	1	42
2			163.7	163.1
3	9.7, 2.5, 1.3	10.0, 2.0, 2.0	121.5	121.4
4	9.7, 5.2, 2.5	10.0, 4.5, 4.0	144.8	144.2
5 ax	18.5, 11.0, 2.5, 2.5	m	29.2	29.1
5 ec	18.5, 5.2, 4.5, 1.3	m	-----	-----
6	11.0, 9.5, 4.5, 1.0	8.5, 8.5, 7.5, 1.0	73.7	67.3
1'	10.5, 9.5, 1.0	10.5, 8.5, 0.5	132.8	125.5
2'	10.5, 9.0, 1.0, 1.0	10.5, 9.5, 1.0	128.6	132.8
3'	9.0, 9.0	9.5, 4.0, 0.5	66.3	75.7
4'	9.0, 2.0, 1.0	7.0, 4.0	69.2	71.9
5'	8.5, 2.0	7.0, 4.0	71.0	71.8
6'	8.5, 6.2	6.5, 4.0	66.9	70.4
7'	6.2	6.5	16.6	15.8

Para lograr el establecimiento de la configuración de los centros  $\text{C}_3$ - $\text{C}_5$ , de manera preliminar, se compararon sus constantes de acoplamiento con las constantes de aldohexosas y aldonitrilos peracetilados (fig. 39). Estos compuestos presentan una similitud estructural con la cadena lateral de la espicigerólida (1) y, al mismo tiempo, la elucidación estereoquímica de estas aldohexosas se puede realizar mediante la aplicación de la mecánica molecular (MMX) para el cálculo de las constantes de acoplamiento vecinales ( $^3J_{\text{H-H}}$ ) (Masamune *et al.*, 1986; Osawa *et al.*, 1991; Velasco *et al.*, 1990).



Como se ilustra en la figura 39, el derivado peracetilado de la manosa presenta las constantes de acoplamiento más próximas a las registradas para la espicigerólida (1), por lo cual se procedió a realizar el estudio de mecánica molecular de una 6-[3,4,5,6-tetracetiloxi)-1*Z*-heptenil]-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona con la estereoquímica de la manosa. Evidentemente, el diastereoisómero propuesto (fig. 37, isómero A) debería incluir la configuración absoluta (*S*) para el centro estereogénico C<sub>6'</sub> de la cadena lateral y (*R*) para el núcleo C<sub>6</sub> de la pirona de acuerdo con las postulaciones descritas anteriormente (ver sección 6.2.1.1.).



**Figura 39.** Comparación de las constantes de acoplamiento de la cadena lateral de la espicigerólida (1) con aldohexosas y aldonitrilos peracetilados.

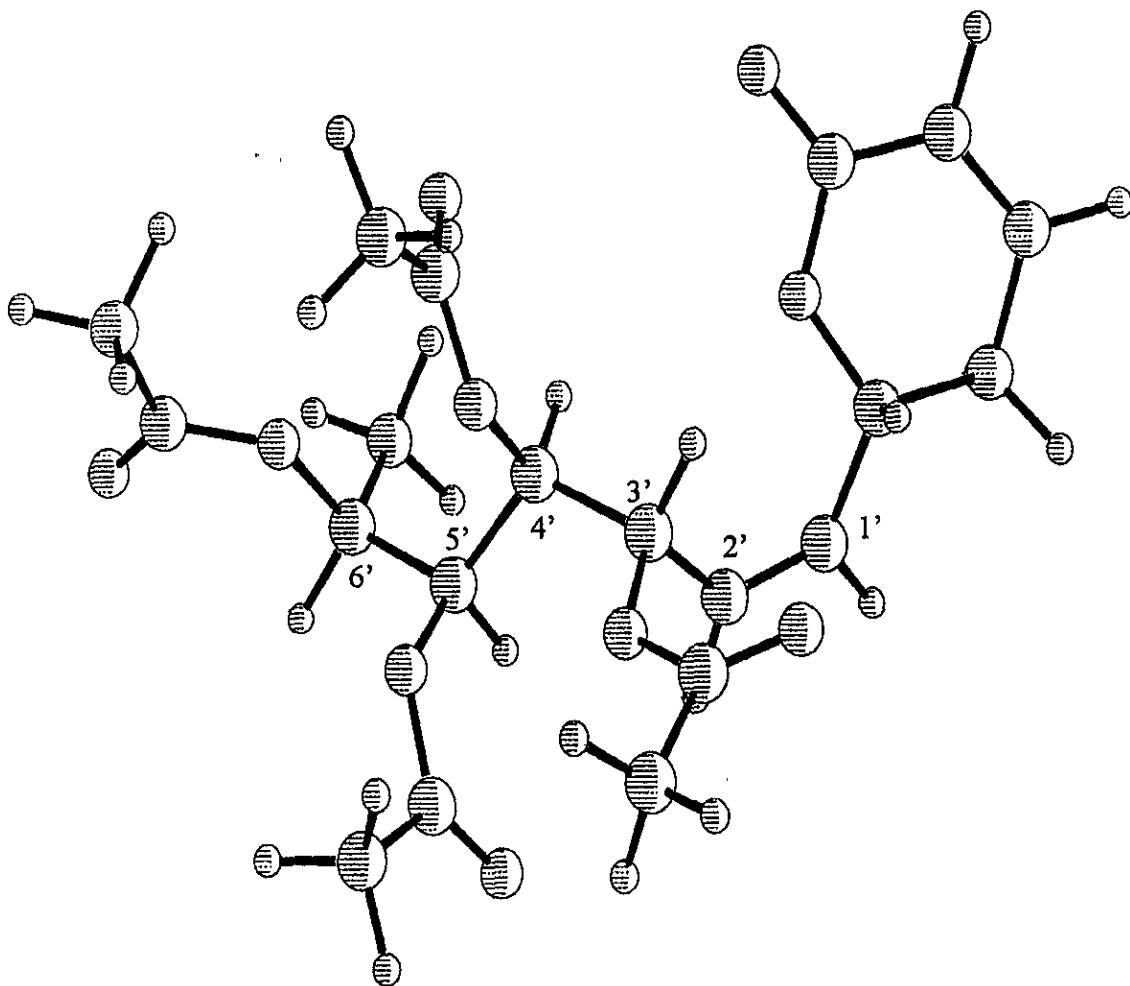
### 6.2.1.3. Cálculos de mecánica molecular.

#### 6.2.1.3.1. Minimización energética para los conformeros de la espicigerólida (1).

Al considerar el número de enlaces susceptibles a rotación, *i.e.* 3'-4', 4'-5' y 5'-6', así como la magnitud de este giro (A: 60°, B: 180° y C: -60°) se obtuvieron 27 conformeros (ver Parte Experimental, sección 5.8). El análisis de las secuencias establecidas para cada conformero, permitió descartar todos aquellos con la secuencia A-C para el fragmento C<sub>3</sub>'-C<sub>4</sub>'-C<sub>5</sub>' y/o C-A para el fragmento C<sub>4</sub>'-C<sub>5</sub>'-C<sub>6</sub>', debido a que en estos casos se presentan interacciones 1,3 oxígeno//oxígeno que corresponden a conformaciones altamente inestables. La figura 40 ilustra el conformero 7 (ACA, Cuadro 6) con una relación *anti*-clinal para todos los grupos acetoxilo. Esta orientación resulta en dos interacciones desestabilizante 1,3-OAc//OAc ( $\Delta G = 2.0$  Kcal/mol) para los sustituyentes en C<sub>4</sub>' y C<sub>6</sub>' (Eliel y Wilen, 1994). Por lo tanto, la minimización energética sólo se realizó con los 22 conformeros que no presentaron este tipo de interacción. Cada conformero se sometió a un proceso de optimización energética exhaustivo con la ayuda del programa PCModel v. 6.0 (Serena Software) obteniendo la energía mínima ( $E_{MMX}$ ), la entalpía de formación ( $\Delta H_f$ ) y las constantes de acoplamiento entre los protones localizados en los enlaces que se rotaron (fragmento C<sub>6</sub>'-C<sub>5</sub>'-C<sub>4</sub>'-C<sub>3</sub>'). Los resultados obtenidos para cada uno de los conformeros minimizados se presentan en el cuadro 9. Los conformeros 14 (BBB) y 17 (BCB) son los de mayor estabilidad ( $n > 4\%$ ) de acuerdo a su fracción molar calculada (0.3165 y 0.6012, respectivamente). Al mismo tiempo, los valores para las constantes de acoplamiento calculadas para estos conformeros son los más cercanos a los registrados experimentalmente para la espicigerólida (1). En la figura 41 se ilustra la conformación de mayor estabilidad (17, BCB) de la espicigerólida (1), en la cual se observa a los grupos

acetoxilo en la posiciones C<sub>3'</sub>-C<sub>4'</sub> y C<sub>5'</sub>-C<sub>6'</sub> con un arreglo *anti*-periplanar y con una disposición *sin*-clinal entre C<sub>4'</sub>-C<sub>5'</sub>.

La fracción molar (*n*) se calculó a través de un programa de cómputo que consideró la contribución de cada una de las 22 ecuaciones indicadas en la parte experimental (ver sección 5.8) (Cerde-García-Rojas y Pereda-Miranda, 1999).



**Figura 40.** Confórmero ACA de alta inestabilidad energética ( $\Delta H_f = -428.10 + 4$  kcal/mol) de la espicigerólida (**1**) debido a las interacciones 1,3 oxígeno//oxígeno (OAc//OAc).

Cuadro 9. Parámetros registrados para cada uno de los conformeros minimizados de la espicigerólida (1).

Conformero	$\Delta H_f$ (kcal/mol)	$J_{3',4'}$	$J_{4',5'}$	$J_{5',6'}$	$n$	$nJ_{3',4'}$	$nJ_{4',5'}$	$nJ_{5',6'}$
1 (AAA)	-424.45	1.31	10.17	1.93	$1.7 \times 10^{-6}$	$1.2 \times 10^{-5}$	0.0001	$1.8 \times 10^{-5}$
2 (AAB)	-425.84	1.82	10.26	8.42	$1.8 \times 10^{-5}$	$3.2 \times 10^{-5}$	0.0002	0.0001
3 (AAC)	-427.57	1.19	9.52	2.35	0.0003	0.0004	0.0031	0.0008
4 (ABA)	-426.60	3.01	3.41	2.73	$6 \times 10^{-5}$	0.0002	0.0002	0.0002
5 (ABB)	-428.78	3.28	3.11	9.28	0.0026	0.0085	0.0080	0.0239
6 (ABC)	-425.03	2.86	4.16	0.88	$4 \times 10^{-6}$	$1.3 \times 10^{-5}$	$1.9 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-6}$
10 (BAA)	-426.49	9.17	9.45	0.90	$5.4 \times 10^{-5}$	0.0005	0.0005	$4.8 \times 10^{-5}$
11 (BAB)	-428.97	8.88	8.18	8.79	0.0035	0.0315	0.0291	0.0312
12 (BAC)	-428.41	9.35	9.24	2.30	0.0013	0.0126	0.0125	0.0031
13 (BBA)	-429.39	9.42	3.50	3.55	0.0072	0.0680	0.0253	0.0256
<b>14 (BBB)</b>	<b>-431.63</b>	<b>9.41</b>	<b>3.47</b>	<b>9.29</b>	<b>0.3091</b>	<b>2.9800</b>	<b>1.1000</b>	<b>2.9400</b>
15 (BBC)	-427.08	9.41	4.21	0.88	0.0001	0.0014	0.0006	0.0001
<b>17 (BCB)</b>	<b>-432.01</b>	<b>9.42</b>	<b>1.20</b>	<b>9.08</b>	<b>0.5871</b>	<b>5.6600</b>	<b>0.7210</b>	<b>5.4600</b>
18 (BCC)	-430.14	9.42	0.26	2.33	0.0249	0.2410	0.0066	0.05960
19 (CAA)	-426.35	2.97	10.03	1.25	$4.1 \times 10^{-5}$	0.0001	0.0004	$5.2 \times 10^{-5}$
20 (CAB)	-429.68	2.23	9.86	9.23	0.0115	0.0256	0.1130	0.1060
21 (CAC)	-429.62	2.21	9.96	1.91	0.0104	0.0230	0.1030	0.0198
22 (CBA)	-424.59	1.43	7.42	1.59	$2 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^{-5}$	$3 \times 10^{-6}$
23 (CBB)	-428.97	1.68	4.54	9.28	0.0035	0.0059	0.0161	0.0330
24 (CBC)	-424.61	1.90	8.18	2.26	$2 \times 10^{-6}$	$4 \times 10^{-6}$	$1.8 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$
26 (CCB)	-430.35	2.76	0.79	9.11	0.0365	0.1010	0.0288	0.3320
27 (CCC)	-428.85	2.84	0.24	2.89	0.0028	0.0082	0.0007	0.0084
Sumatoria					1.00	8.96	2.12	8.83

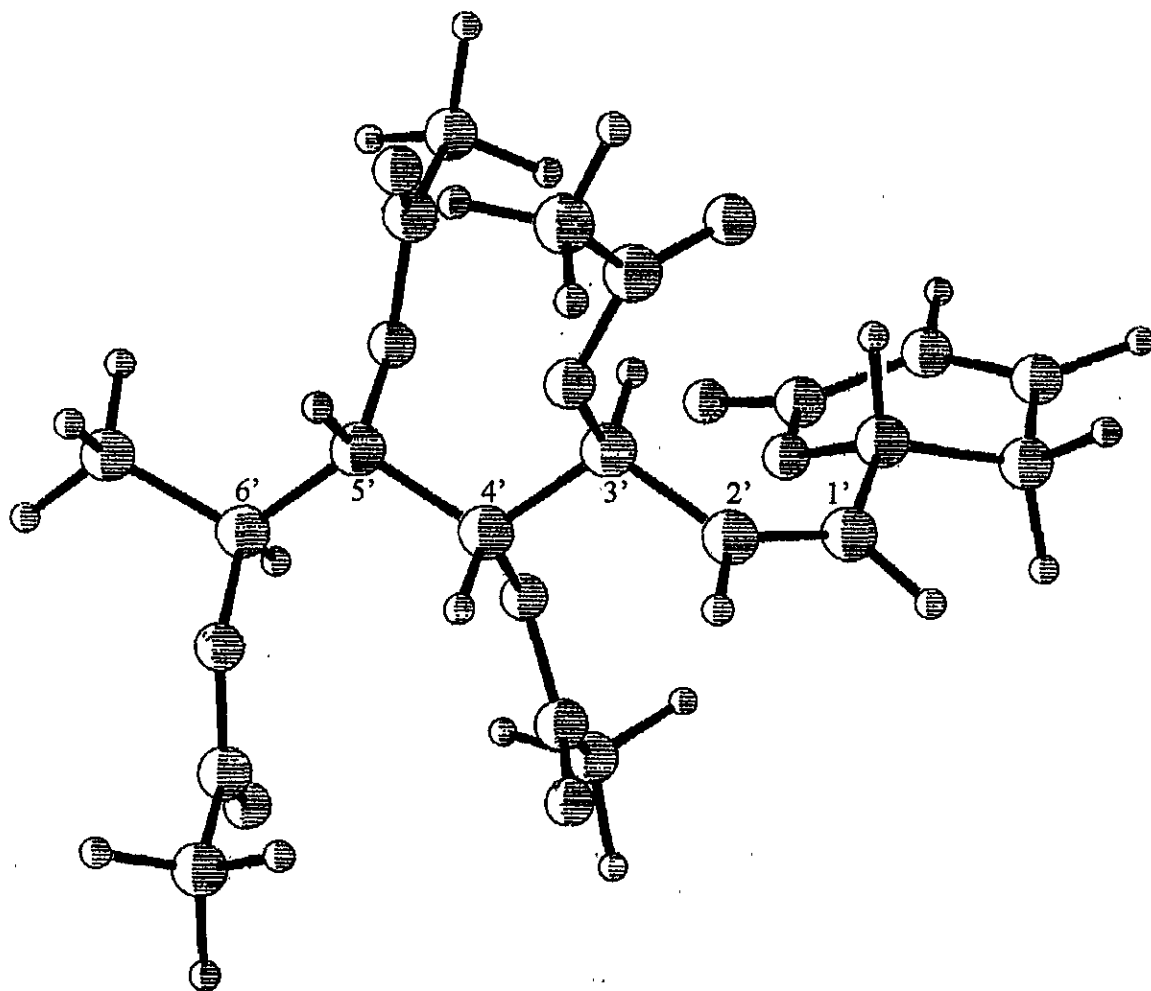


Figura 41. Conformero de mayor estabilidad energética de la espicigerólida (1).

#### 6.2.1.3.2. Cálculo de las constantes de acoplamiento teóricas.

Las constantes de acoplamiento teóricas corresponden a la sumatoria de los valores calculados para cada conformero en función de la fracción molar (Cuadro 9). Así, la comparación de los valores calculados para el diastereoisómero con la estereoquímica  $3'S,4'S,5'S,6'S$  en la cadena lateral (fig. 37, isómero A) con los obtenidos experimentalmente para la espicigerólida (1) indicaron una gran correspondencia (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Comparación de los valores de las constantes de acoplamiento registradas mediante RMN y las calculadas por la ecuación de Altona para los protones H<sub>3'</sub>-H<sub>6'</sub> de la cadena lateral de la espicigerólida (1).

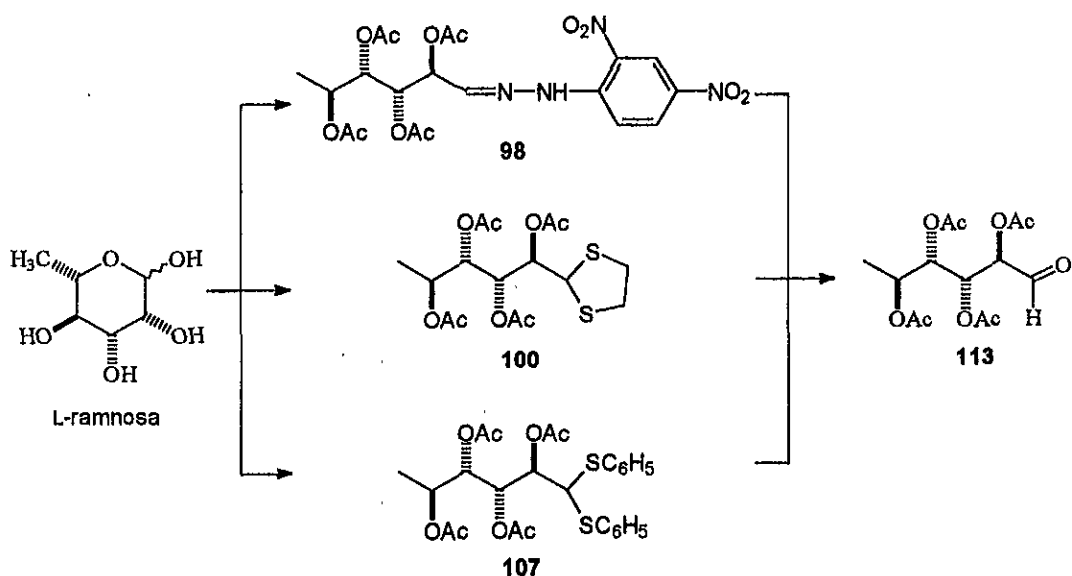
	$J_{3',4'}$	$J_{4',5'}$	$J_{5',6'}$
Experimental	9.0	2.0	8.5
Teórica	9.1	1.9	8.9

Esta aproximación que incluyó los cálculos de mecánica molecular (E<sub>MMX</sub>) para la predicción de los valores de las constantes de acoplamiento ( $^3J_{H-H}$ ) de la cadena lateral de la espicigerólida (1) representa una aplicación del análisis conformacional en solución y, al mismo tiempo, confirma la propuesta hecha por Masamune y Osawa para la identificación de la configuración relativa de compuestos polihidroxilados acíclicos naturales o sintéticos mediante este enfoque (Masamune *et al.*, 1986; Osawa *et al.*, 1991). Por lo tanto, la estructura de la espicigerólida (1) corresponde a la 6*R*-[3'*S*,4'*S*,5'*S*,6'*S*-tetracetiloxi-1-heptenil]-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona.

### 6.2.2. Obtención del sintón quiral 113.

Con el objetivo de confirmar la configuración propuesta en la cadena lateral de la espicigerólida (1) y establecer una correlación química con la L-ramnosa se propuso la preparación del sintón quiral 113. De esta forma, se confirmaría de manera inequívoca la configuración para los centros estereogénicos de la cadena lateral de la espicigerólida (1).

Se evaluaron tres posibles estrategias sintéticas para lograr la obtención del producto deseado (fig. 42). Adicionalmente, se identificaron los subproductos de reacción principales de cada una de las rutas sintéticas. Todos estos compuestos se caracterizaron a través del registro de diferentes experimentos en la RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC, HMBC y NOESY).



**Figura 42.** Estrategias sintéticas evaluadas para la obtención del sintón quiral 113.

#### 6.2.2.1. Síntesis de la 2,4-dinitrofenilhidrazona de la L-ramnosa (96).

La primera estrategia de síntesis para la obtención del sintón quiral 113 contempló la formación de la 2,4-dinitrofenilhidrazona de la L-ramnosa, debido a que este grupo puede fácilmente regenerar el carbonilo del cual se partió; además, el empleo de la 2,4-dinitrofenilhidrazina ha permitido la generación de compuestos cristalinos menos propensos a la oxidación o la ciclización (Buckingham, 1969).

Se sintetizó la 2,4-dinitrofenilhidrazona de la L-ramnosa (96) utilizando el método de Brady's modificado (Behforouz *et al.*, 1985). Se procedió a la acetilación del compuesto 96, observando que al utilizar un medio básico (anhídrido acético/piridina) se generaba un compuesto cíclico, la 2,4-dinitrofenilhidrazina de la 2,3,4-tri-*O*-acetil- $\beta$ -L-ramnopiranososa (97) y al utilizar condiciones ácidas (cloruro de acetilo) se obtiene el tetraacetato de la 2,4-dinitrofenilhidrazona (98) (fig. 43).

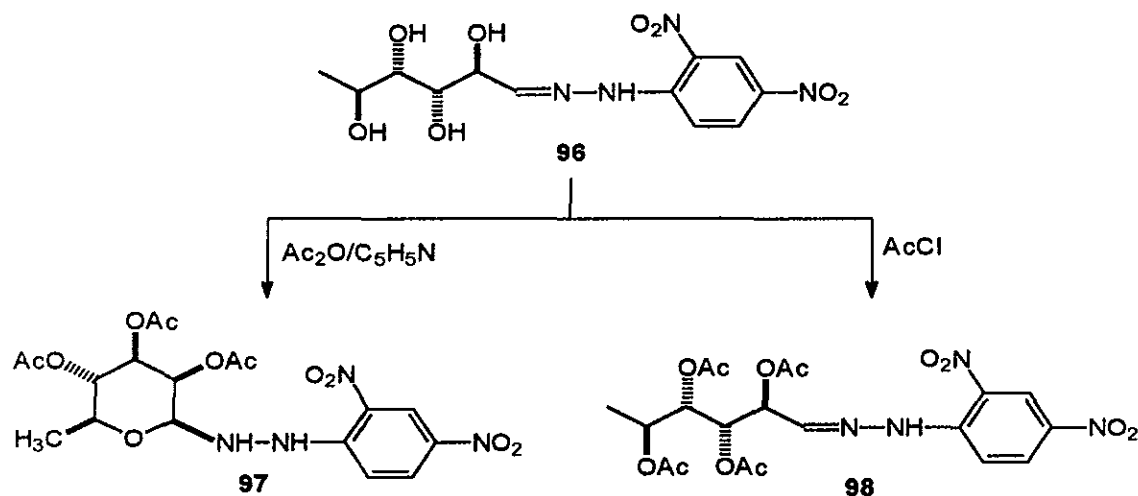


Figura 43. Productos de acetilación de la 2,4-dinitrofenilhidrazona de la L-ramnosa (96).

Estos compuestos se caracterizaron mediante el registro de sus constantes espectroscópicas. Las figuras 44-46 ilustran los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de los compuestos 96-98, éstos son de primer orden, facilitando la asignación de las señales para todos los protones y el registro de las constantes de acoplamiento. Las asignaciones se confirmaron a través del registro del espectro bidimensional homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY. Posteriormente, se asignaron las señales de RMN  $^{13}\text{C}$  utilizando el espectro bidimensional heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HETCOR.



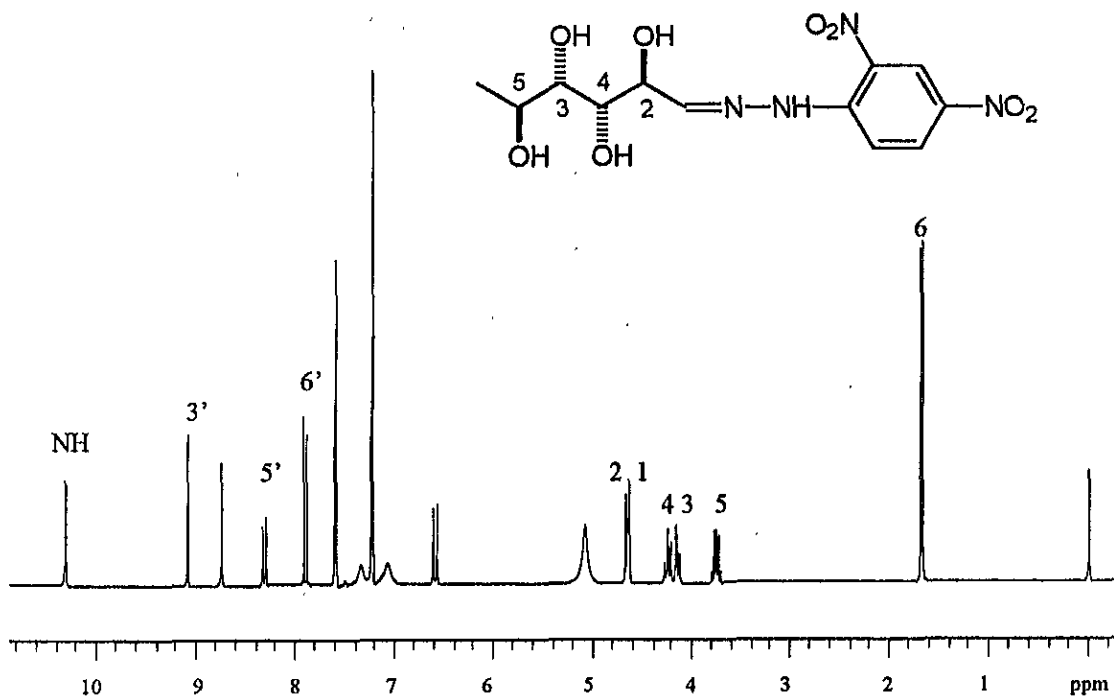


Figura 44. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la 2,4-dinitrofenilhidrazona de la L-ramnosa (96) (300 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N).

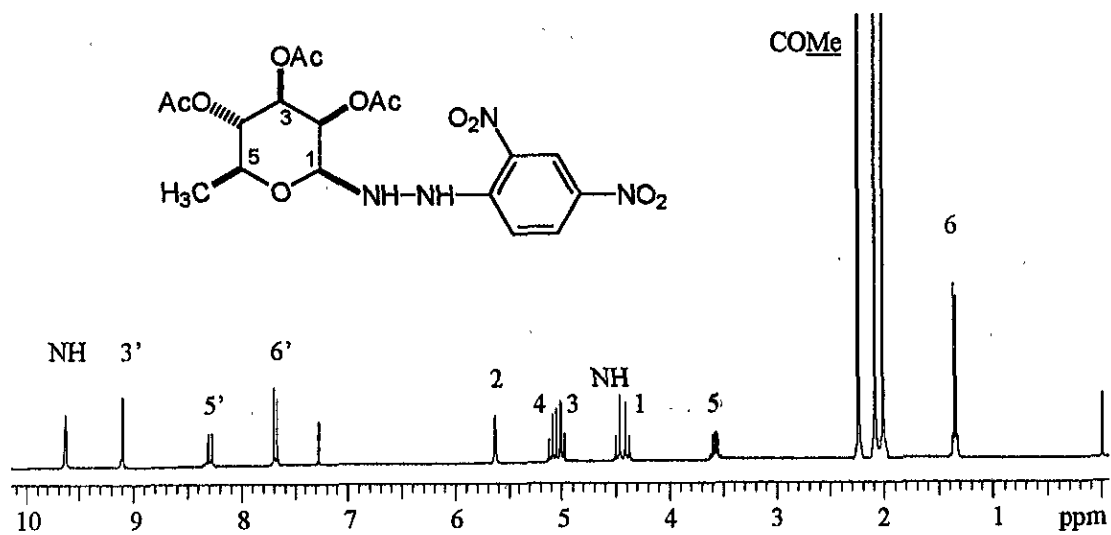


Figura 45. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la 1-(2,3,4-tri-O-acetil-β-L-ramnopiranosil)-2-(2,4-dinitrofenil)hidrazina (97) (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

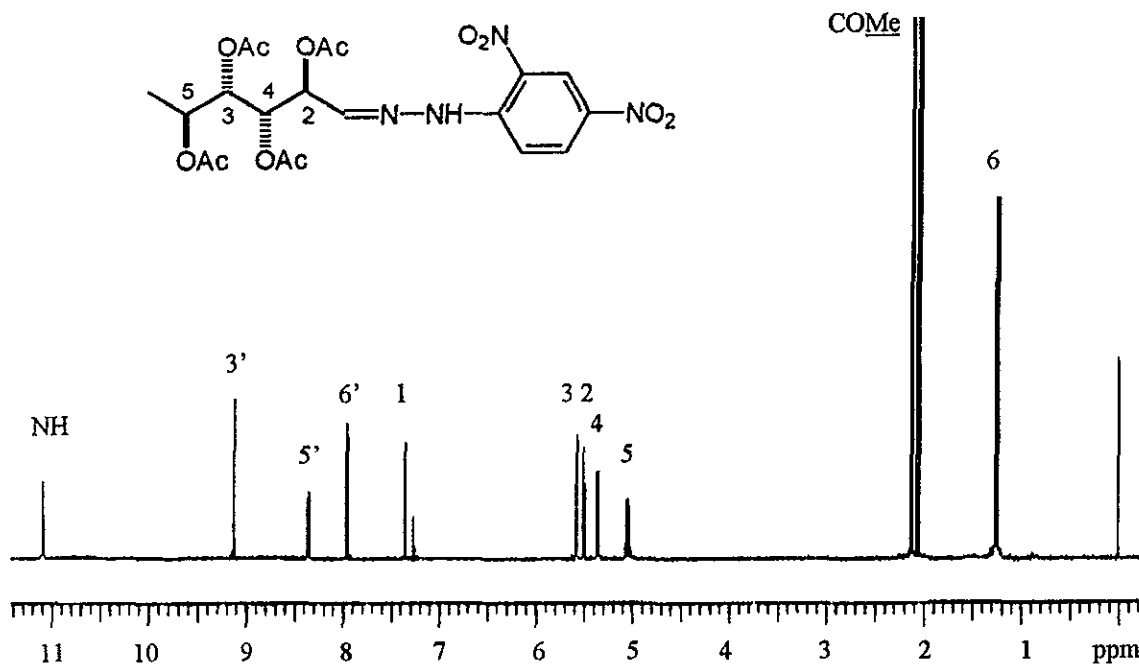
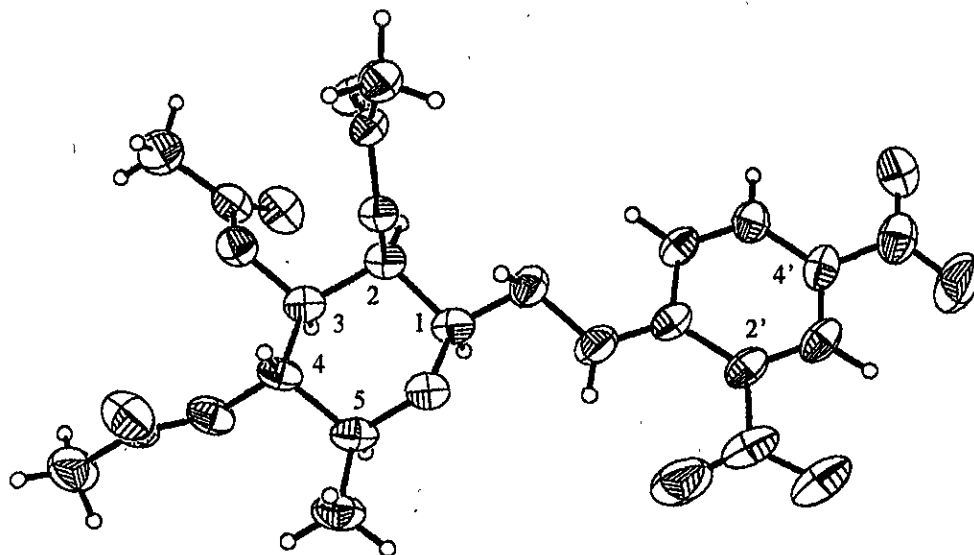


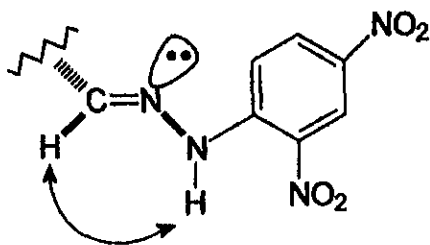
Figura 46. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la 2,4-dinitrofenilhidrazona de la 2,3,4,5-tetra-*O*-acetil-L-ramnosa (**98**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

El núcleo piranósido del compuesto **97** se identificó al realizar las siguientes observaciones en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (fig. 45): (1) el protón vinílico de la 2,4-dinitrofenilhidrazona ( $\text{H}_1$ ) no se observó ( $\delta$  7.3); (2) sólo se registraron señales para tres grupos acetoxilo; (3) la señal para  $\text{H}_5$  (dc) apareció centrada en  $\delta$  3.57, indicando un desplazamiento químico para una señal geminal a una función oxigenada; (4) había una señal adicional a  $\delta$  4.52 (d,  $J = 11.4$  Hz) acoplada con la señal centrada en  $\delta$  4.40 (dd,  $J = 11.4$  y 1.2 Hz,  $\text{H}_1$ ) que desapareció durante el intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$ . El análisis mediante cristalografía de rayos X de la 2,4-dinitrofenilhidrazina de la 2,3,4-tri-*O*-acetil- $\beta$ -L-ramnopiranososa (**97**) permitió demostrar la orientación  $\beta$  ecuatorial en  $\text{C}_1$  de la 2,4-dinitrofenilhidrazina, los protones  $\text{H}_1$ - $\text{H}_2$  y  $\text{H}_2$ - $\text{H}_3$  en relación *sin*-clinal, mientras que  $\text{H}_3$ - $\text{H}_4$  y  $\text{H}_4$ - $\text{H}_5$  adoptan una relación *anti*-periplanar (fig. 47).



**Figura 47.** Proyección generada mediante cristalografía de rayos X de la 1-(2,3,4-tri-*O*-acetil- $\beta$ -L-rannopiranosil)-2-(2,4-dinitrofenil)hidrazina (**97**).

La estereoquímica del doble enlace del compuesto **98** se estableció como *E* mediante el registro del experimento NOESY, que permitió observar la interacción del protón de la hidrazina ( $\delta$  11.08) con el protón vinílico H<sub>1</sub> ( $\delta$  7.35) (fig. 48). En los cuadros 11 y 12 se presentan los valores para los desplazamientos químicos en la RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, respectivamente, de los compuestos **96-98**.



**Figura 48.** Interacción registrada en el espectro NOESY que permitió asignar la estereoquímica (*E*) en el doble enlace del compuesto **98**.

Cuadro 11. Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  para los compuestos 96-98.<sup>a</sup>

Posición	96 <sup>b</sup>	97 <sup>c</sup>	98
1	4.62 d (0.6)	4.40 dd (11.4, 1.2)	7.35 dd (6.0, 1.0)
2	4.66 dd (3.0, 0.6)	5.62 dd (3.3, 1.2)	5.50 dd (8.0, 6.0)
3	4.13 dd (9.3, 3.0)	5.00 dd (10.2, 3.3)	5.58 dd (8.0, 3.0)
4	4.24 dd (t) (9.3, 9.0)	5.08 dd (10.2, 9.3)	5.36 dd (8.0, 3.0)
5	3.74 dc (9.0, 6.0)	3.57 dc (9.3, 6.3)	5.04 dc (8.0, 6.5)
6	1.67 d (6.0)	1.32 d (6.3)	1.24 d (6.5)
NH	10.31 s	9.63 sa, 4.52 d (11.4)	11.08 s
3'	9.07 d (2.7)	9.07 d (2.7)	9.12 dd (2.5, 0.5)
5'	8.30 dd (9.6, 2.7)	8.27 dd (9.6, 2.7)	8.35 ddd (9.5, 2.5, 1.0)
6'	7.89 d (9.6)	7.68 (9.6)	7.96 d (9.5)
OAc	-----	2.23 s 2.08 s 2.00 s	2.12 s 2.12 s 2.06 s 2.04 s

<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, ( $J$  en Hz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup> $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ . <sup>c</sup>500 MHz.

**Cuadro 12.** Desplazamientos químicos en la RMN  $^{13}\text{C}$  para los compuestos **96-98**.<sup>a</sup>

Posición	96 <sup>b</sup>	97	98 <sup>c</sup>
1	71.4	85.7	144.0
2	88.3	68.9	69.9
3	75.9	71.5	68.8
4	73.8	70.1	70.9
5	74.8	72.1	66.9
6	18.6	17.4	16.3
1'	150.1	148.9	144.6
2'	129.9	129.7	129.8
3'	124.0	123.6	123.1
4'	136.5	137.3	138.9
5'	130.0	130.1	130.1
6'	116.3	115.6	116.7
<u>COMe</u>	----	20.7	21.0
	----	20.7	20.7
	----	20.5	20.7
	----	----	20.6
<u>COMe</u>	----	170.1	169.9
	----	170.0	169.9
	----	169.8	169.8
	----	----	169.4

<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz. Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HETCOR o HMQC,  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup> $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ . <sup>c</sup>125.7 MHz.

El compuesto **98** presenta el mismo sistema de multiplicidades que el observado para la cadena lateral de la espicigerólida (**1**) y, por lo tanto, se utilizaron los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  para las señales de la cadena lateral como un modelo de comparación que permitiera evidenciar la estereoquímica relativa propuesta para el producto natural (fig. 49). De esta manera, esta similitud en los desplazamientos químicos ( $\Delta\delta \cong 0$ ) para las señales de los carbonos base de los grupos acetoxilo (Cuadro 13) permitió apoyar la estereoquímica relativa propuesta para la espicigerólida (**1**), ya que los núcleos de carbono serían lo suficientemente sensibles para identificar algunas diferencias en la configuración absoluta de los centros estereogénicos que constituyen la cadena lateral de estos compuestos. El  $\Delta\delta$  negativo para  $\text{C}_{3'}$  se explica al considerar el efecto electronegativo  $\beta$  del nitrógeno de la 2,4-dinitrofenilhidrazona.

**Cuadro 13.** Diferencias en los desplazamientos químicos ( $\Delta\delta$ ) de los valores registrados en  $^{13}\text{C}$  para las señales  $\text{C}_{3'}$ - $\text{C}_{6'}$  de la cadena lateral de la espicigerólida (**1**) y la 2,4-dinitrofenilhidrazona **98**.

C	$\delta^{13}\text{C}$				$\Delta\delta$
	1	C	98		
3'	66.3	2	69.9	-3.6	
4'	69.2	3	68.8	0.4	
5'	71.0	4	70.9	0.1	
6'	66.9	5	66.9	0	

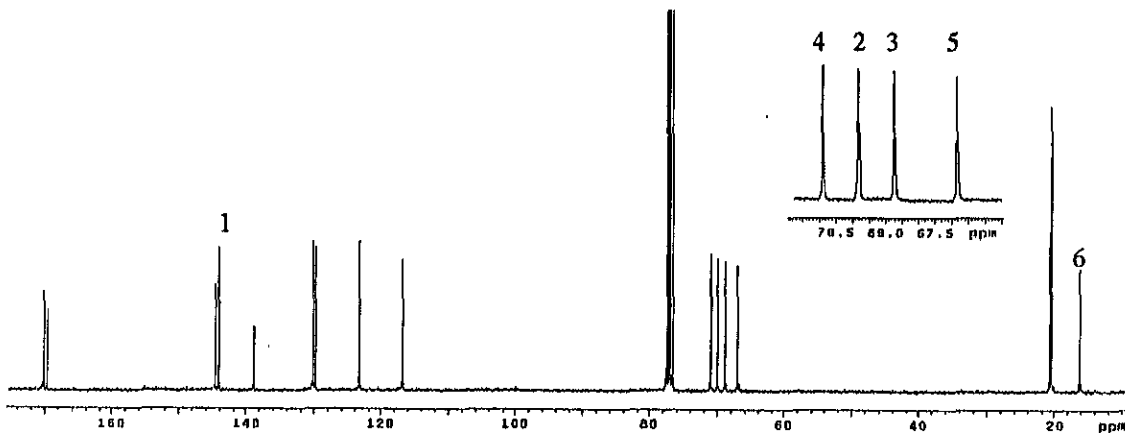
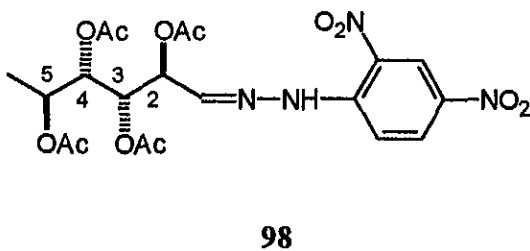
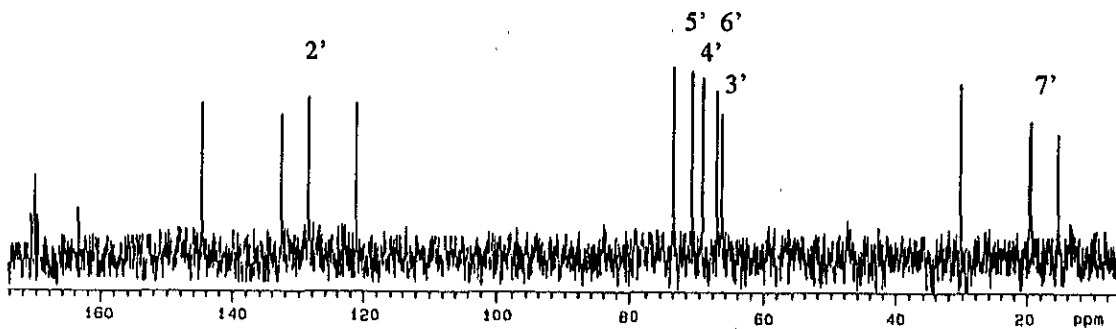
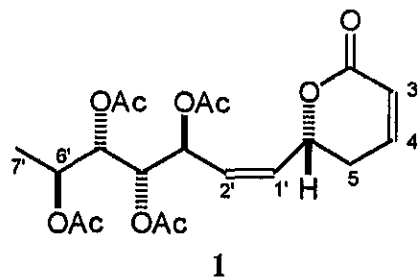


Figura 49. Comparación de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de la espicigerólida (1) y del compuesto 98.

Para hidrolizar la 2,4-dinitrofenilhidrazona y recuperar el compuesto con el grupo carbonilo libre se encuentran descritos en la literatura diferentes metodologías; la más utilizada emplea un ácido inorgánico ( $H_2SO_4$ ) junto con un exceso de un segundo compuesto con grupos carbonílicos que funcione como aceptor de la arilhidrazina, como los aldehidos aromáticos,  $\alpha$ -cetoácidos,  $\alpha$ -dicetonas y  $\beta$ -dicetonas (Harrison y Eisenbraun, 1966). Otras metodologías contemplan la reducción de la 2,4-dinitrofenilhidrazona con cloruro estanoso (Cullinane y Edwards, 1958), cloruro cromoso (Elks y Oughton, 1962) o hiposulfito de sodio para formar la 2,4-diaminofenilhidrazona, la cual fácilmente se hidroliza (Buckingham, 1969). En este proyecto de investigación se evaluaron tres metodologías diferentes para la hidrólisis del compuesto **98**, las cuales se ilustran en la figura 50.

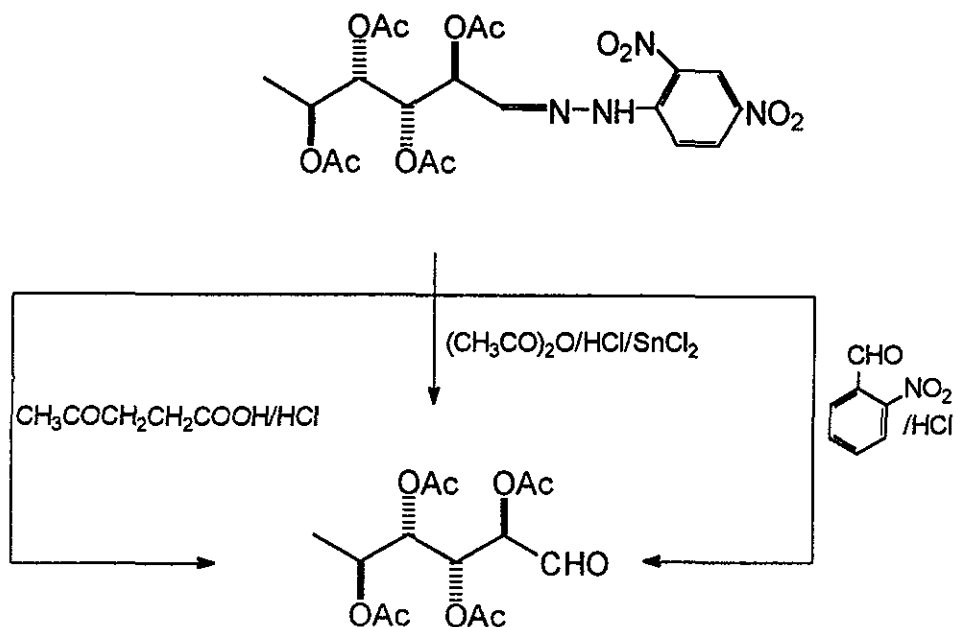


Figura 50. Estrategias de hidrólisis empleadas para recuperar el sintón quiral **113**.

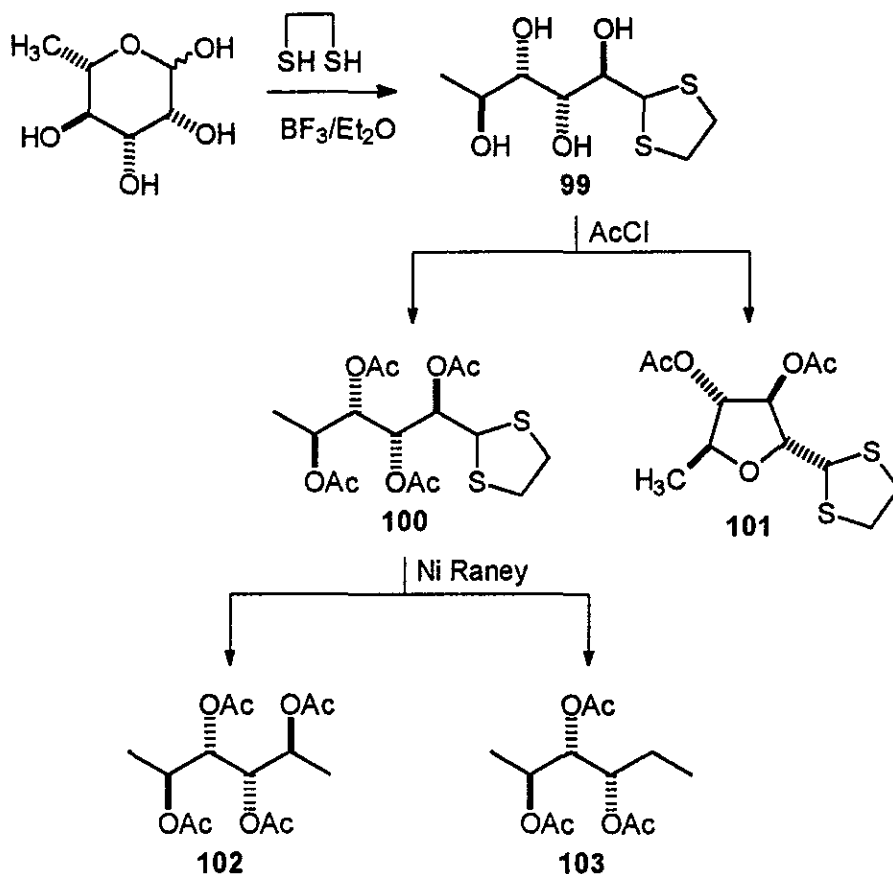


Para hidrolizar con los ácidos levulínico y clorhídrico (Keeney, 1957) se utilizaron diferentes condiciones de reacción observando que aún cuando la materia prima (98) se agotaba, la purificación de la mezcla de reacción generaba únicamente subproductos de color amarillo sin lograr aislar algún producto que sólo absorbiera en UV. El análisis por CCF de la mezcla de reacción obtenida durante la reducción del compuesto 98 con cloruro estanoso indicaba la presencia de un producto amarillo menos polar que la 2,4-dinitrofenilhidrazona original, que debería corresponder a la 2,4-diaminofenilhidrazona. Sin embargo, aún cuando se dejó en reflujo durante un tiempo prolongado no se observó ningún cambio posterior de la mezcla de reacción. Por último, la hidrólisis con 2-nitrobenzaldehído utilizando ácido clorhídrico o ácido sulfúrico como catalizadores proporcionó dos compuestos que sólo absorbían en UV y al revelar con hidrazina generaban un color amarillo, indicativo de la presencia de aldehídos. El registro de sus espectros de RMN  $^1\text{H}$  determinó que correspondían a subproductos del nitrobenzaldehído ya que se observaron señales aromáticas y no las correspondientes a los protones geminales a los grupos acetoxilo. Debido a que ninguna de estas condiciones permitieron obtener el sintón quiral 113, se procedió al desarrollo experimental de la segunda metodología sintética propuesta (fig. 42, sección 6.2.2).

#### **6.2.2.2. Síntesis del etilenditioacetal de la L-ramnosa (99).**

Se evaluó la obtención del ditioacetal de la L-ramnosa utilizando mercaptoetanol y 1,2-etanditiol. Con mercaptoetanol, se utilizó ácido clorhídrico concentrado (Collins y Ferrier, 1995; Wolfrom, 1929) y ácido acético sin tener éxito en la obtención del producto deseado. Al emplear 1,2-etanditiol se utilizó ácido acético y eterato de trifluoruro de boro

(Meléndez Rodríguez, 1992). Los productos generados a partir de la segunda metodología sintética son indicados en la figura 51.



**Figura 51.** Compuestos generados durante la segunda estrategia sintética para obtener el sintón quiral 113.

Después de sintetizar el etilenditioacetal de la L-ramnosa (99; fig. 52) se procedió a la acetilación generándose dos productos principales, el etilenditioacetal de la 2,3,4,5-tetra-O-acetil-L-ramnosa (100; fig. 53) y el etilenditioacetal de la 3,4-di-O-acetil-2,5-anhidro-L-ramnosa (101; fig. 54). Este último, se caracterizó mediante el análisis de su espectro de

RMN  $^1\text{H}$  (fig. 54); en primer lugar, sólo se observaron dos señales para grupos acetato ( $\delta$  2.06 y 2.03) y sus respectivas señales para los hidrógenos geminales a ellos ( $\delta$  4.93, 4.87,  $\text{H}_3$  y  $\text{H}_4$ ). También, se registraron dos señales desplazadas a campo más alto correspondientes a hidrógenos geminales a una función oxigenada cuyos desplazamientos químicos se observaron centrados en  $\delta$  3.20 (dd,  $J = 10.5$  y  $9.5$  Hz,  $\text{H}_2$ ) y  $\delta$  3.66 (dc,  $J = 9.5$  y  $6.5$  Hz,  $\text{H}_5$ ). Las únicas señales cuyo desplazamiento químico no se afectaron con respecto a las observadas para el tetraacetato **100** fueron las correspondientes a la posición  $\text{H}_1$  ( $\delta$  4.61) y al grupo metilo terminal  $\text{H}_6$  ( $\delta$  1.24).

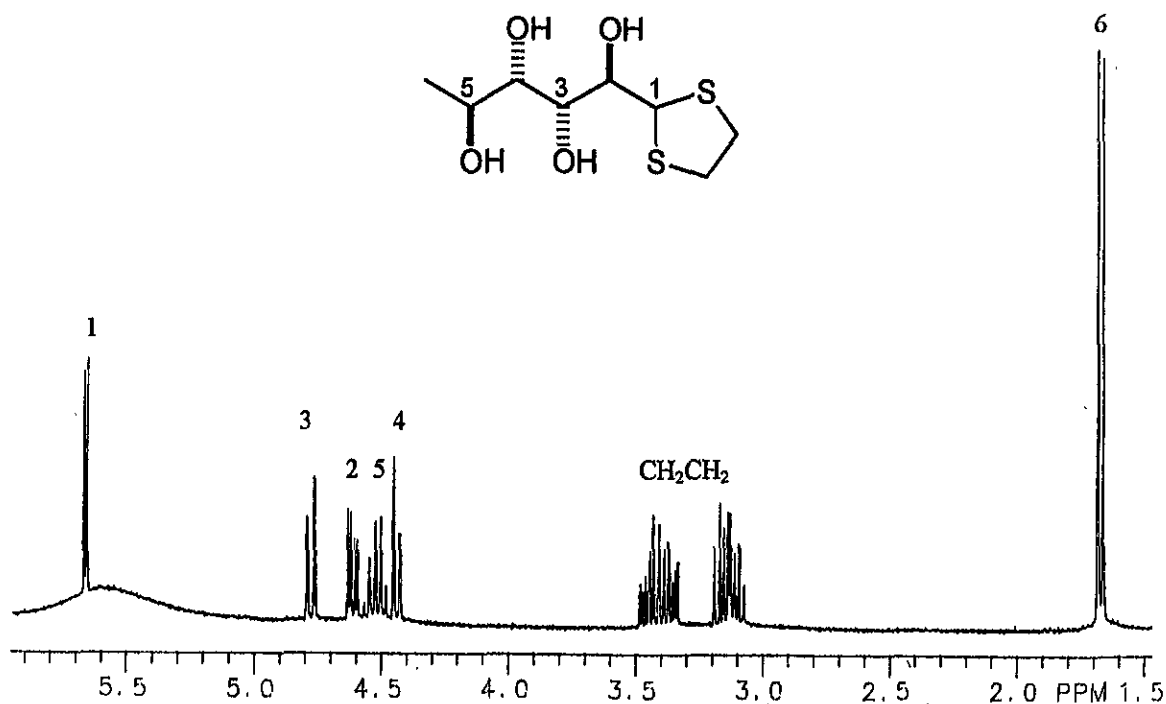


Figura 52. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del etilenditioacetato de la L-ramnosa (**99**) (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

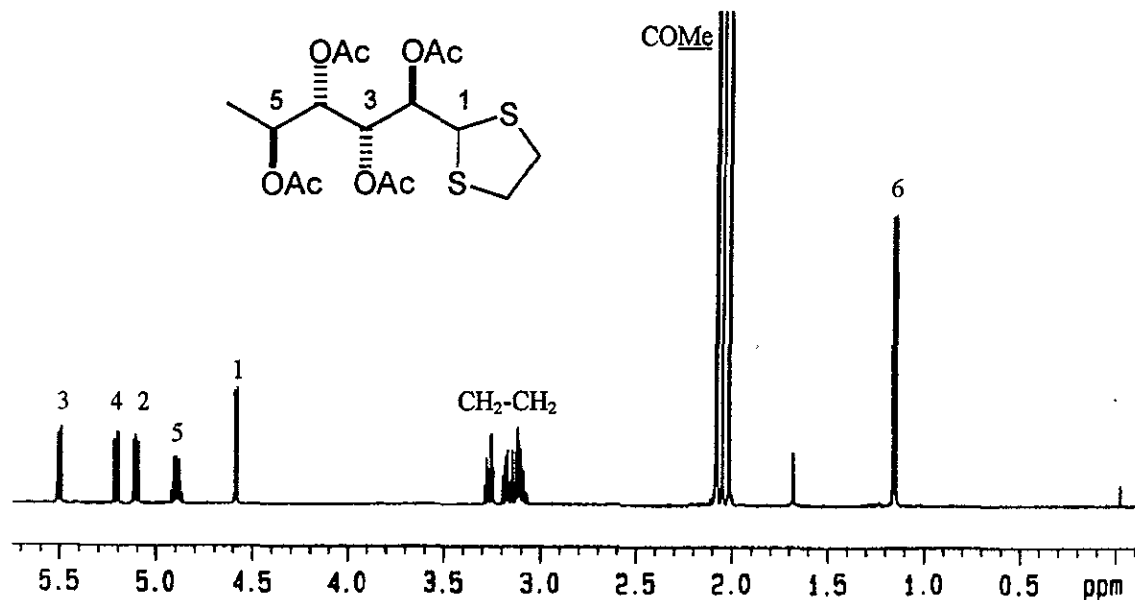


Figura 53. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del etilenditioacetal de la 2,3,4,5-tetra-*O*-acetil-L-ramnosa (100) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

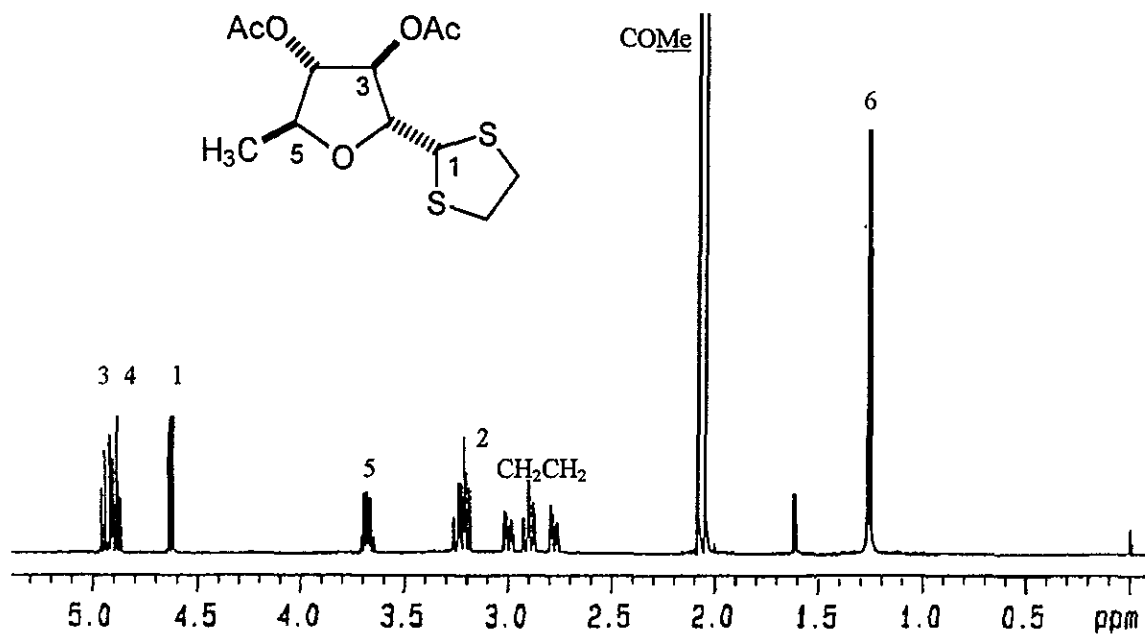


Figura 54. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del etilenditioacetal de la 3,4-di-*O*-acetil-2,5-anhidro-L-ramnosa (101) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

El compuesto **100** se sometió a una desulfuración por hidrogenólisis con níquel Raney para lograr la generación de un grupo metilo en la posición en donde originalmente se encontraba el grupo carbonilo, esta reducción involucra la ruptura del enlace C-S y la formación de un nuevo enlace C-H vía radicales libres (March, 1992). De esta manera, se generaron dos compuestos de menor polaridad que la materia prima y, al registrar sus espectros de RMN  $^1\text{H}$ , se estableció que el producto mayoritario correspondía al tetra-*O*-acetil-1,6-didesoxi-L-manitol (**102**) (fig. 55). El subproducto minoritario (**103**) correspondió a la reducción adicional de la posición  $\text{C}_2$  que involucra la eliminación adicional del grupo acetoxilo de este centro (fig. 56). En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **102** se observa una simplificación de las señales debido a la simetría de la molécula, para generar un patrón de acoplamiento de tipo AA', BB', CC'. De este espectro, únicamente se pudo calcular la constante de acoplamiento de la señal correspondiente al metilo ( $\delta$  0.91, d,  $J = 6.5$  Hz); por lo cual, se irradió esta señal y se observó la simplificación de la señal para los protones  $\text{H}_2$  y  $\text{H}_5$  ( $\delta$  4.93, dc distorsionado) que presentó un sistema de multiplicidad similar a la señal para  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$  ( $\delta$  5.27, dd distorsionado). La simulación del espectro permitió establecer los valores de las constantes de acoplamiento  $J_{2,3-4,5} = 7.2$  Hz y  $J_{3,4} = 2.4$  Hz (fig. 57). En los cuadros 14 y 15 se presentan los valores para los desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los compuestos **99-103**.

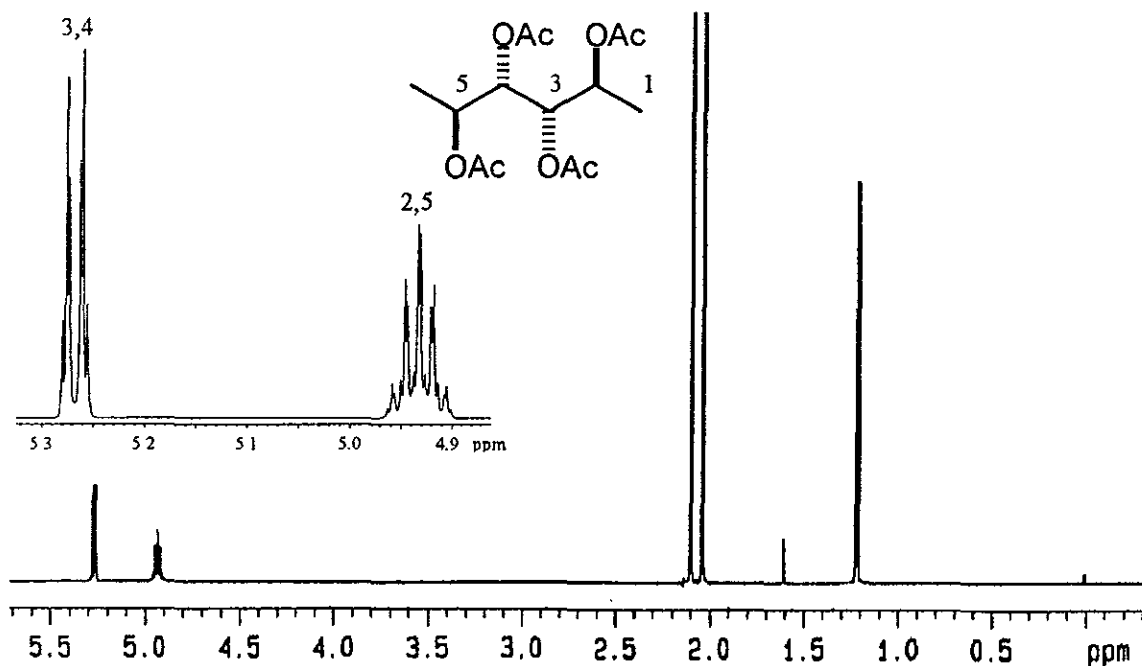


Figura 55. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del tetra-*O*-acetil-1,6-dideoxi-L-manitol (102) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

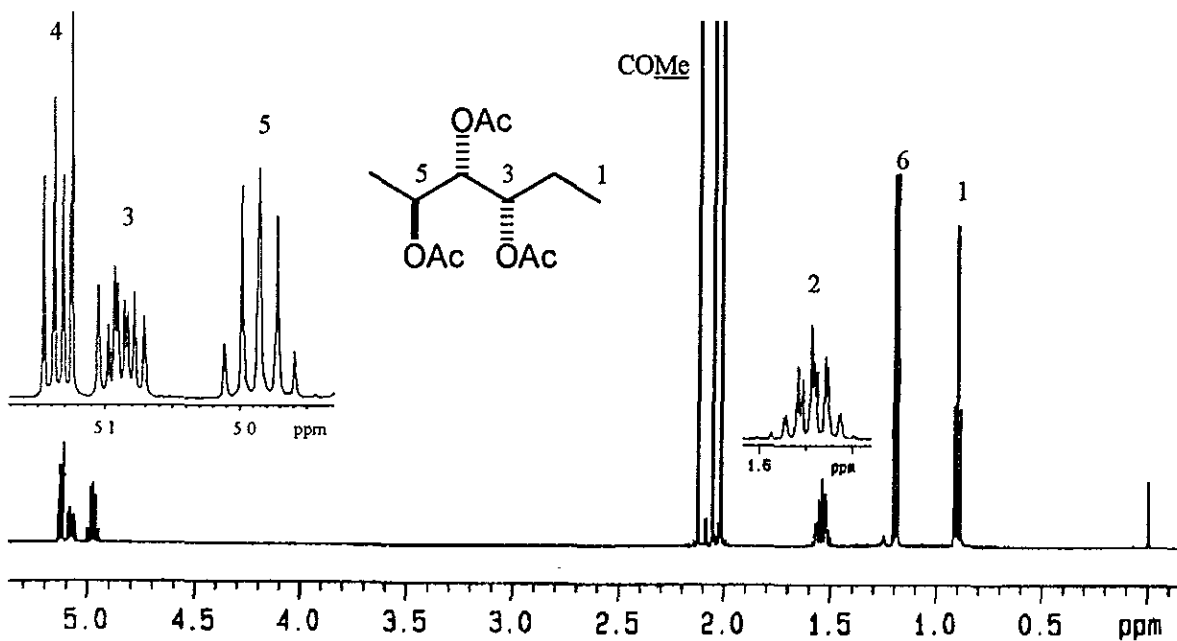
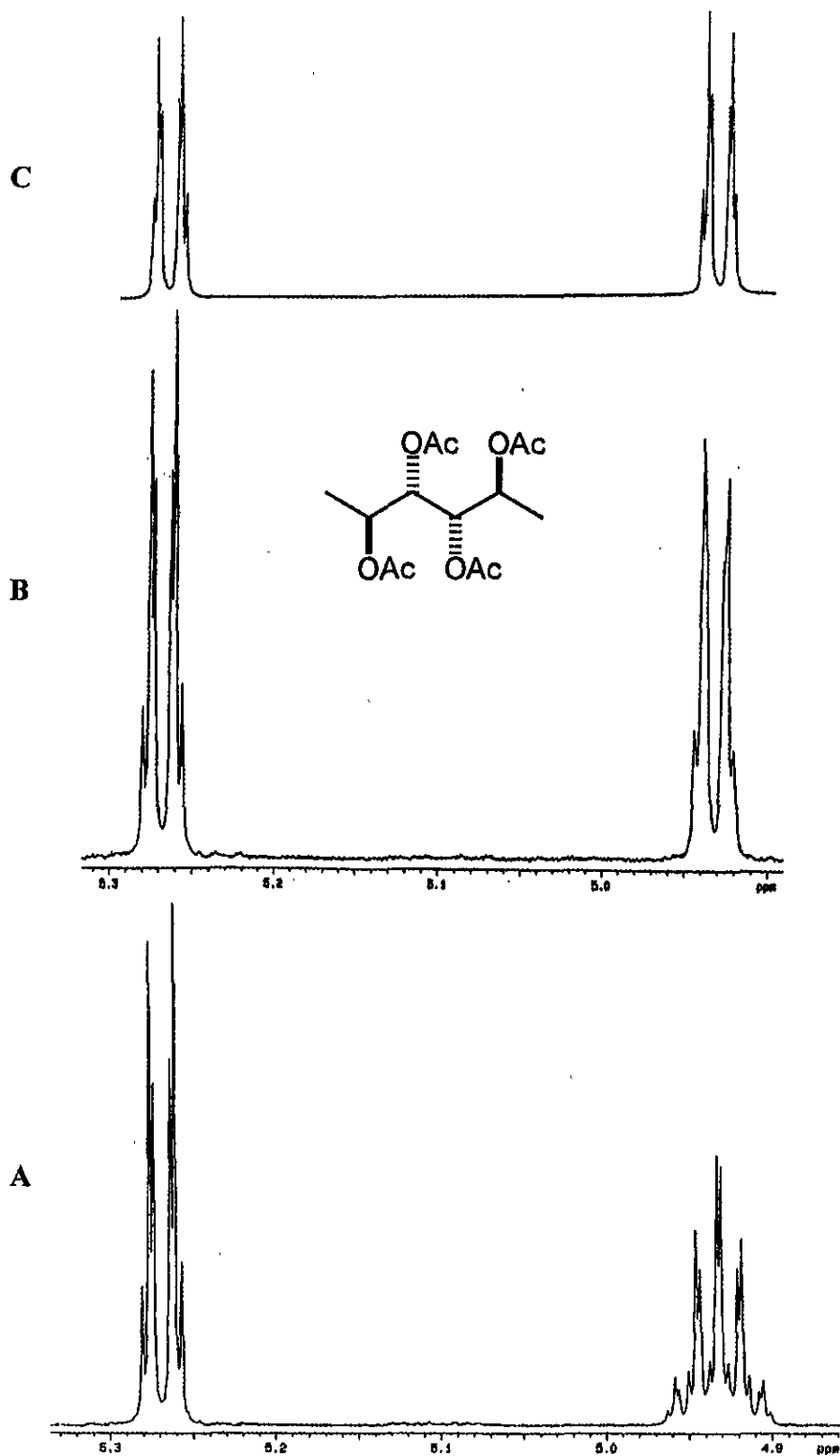


Figura 56. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del tri-*O*-acetil-1,2,6-trideoxi-L-manitol (103) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 57.** Ampliación de las señales geminales a los grupos acetoxilo del compuesto 102 (A); irradiación del grupo CH<sub>3</sub> ( $\delta$  1.21 d) (B); simulación del espectro con el programa LAOCOÓN PC v. 3.1 (C).

Cuadro 14. Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  para los compuestos 99-103.<sup>a</sup>

Posición	99 <sup>b</sup>	100	101	102 <sup>c</sup>	103
1	5.66 d (3.4)	4.62 d (6.0)	4.62 d (9.5)	1.21 d (6.5)	0.91 t (7.5)
2	4.61 (8.4, 3.4)	5.14 dd (7.7, 6.0)	3.20 dd (10.5, 9.5)	4.93 dc (7.2, 6.5)	1.54 ddc (7.5, 7.5, 6.5)
3	4.78 (8.4, 1.1)	5.53 dd (7.7, 2.2)	4.93 dd (10.5, 9.5)	5.27 dd (7.2, 2.4)	5.09 ddd (7.5, 6.5, 3.5)
4	4.43 (7.4, 4.4)	5.24 dd (8.3, 2.2)	4.87 dd (9.5, 9.5)	5.27 dd (7.2, 2.4)	5.13 dd (7.0, 3.5)
5	4.53 (7.4, 6.2)	4.92 dc (8.3, 6.4)	3.66 dc (9.5, 6.5)	4.93 dc (7.2, 6.5)	4.99 dc (7.0, 6.5)
6	1.67 d (6.2)	1.18 d (6.4)	1.24 d (6.5)	1.21 d (6.5)	1.20 d (6.5)
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	3.48-3.34 m 3.19-3.07 m	3.22-3.09 m	3.22 ddd (14.0, 11.5, 2.5) 2.98 ddd (14.0, 4.0, 2.0) 2.89 ddd (14.0, 11.5, 2.5) 2.76 ddd (14.0, 4.0, 2.0)	-----	-----
OAc	----- ----- ----- -----	2.11 s 2.10 s 2.08 s 2.04 s	2.06 s 2.03 s ----- -----	2.09 s 2.09 s 2.03 s 2.03 s	2.13 s 2.06 s 2.02 s -----

<sup>a</sup>CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz (*J* en Hz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $\delta$  en ppm.

<sup>b</sup>DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz.

<sup>c</sup>Las constantes de acoplamiento se calcularon utilizando el programa de cómputo LAOCOÖN PC versión 3.1.



**Cuadro 15.** Desplazamientos químicos en la RMN  $^{13}\text{C}$  para los compuestos 99-103.<sup>a</sup>

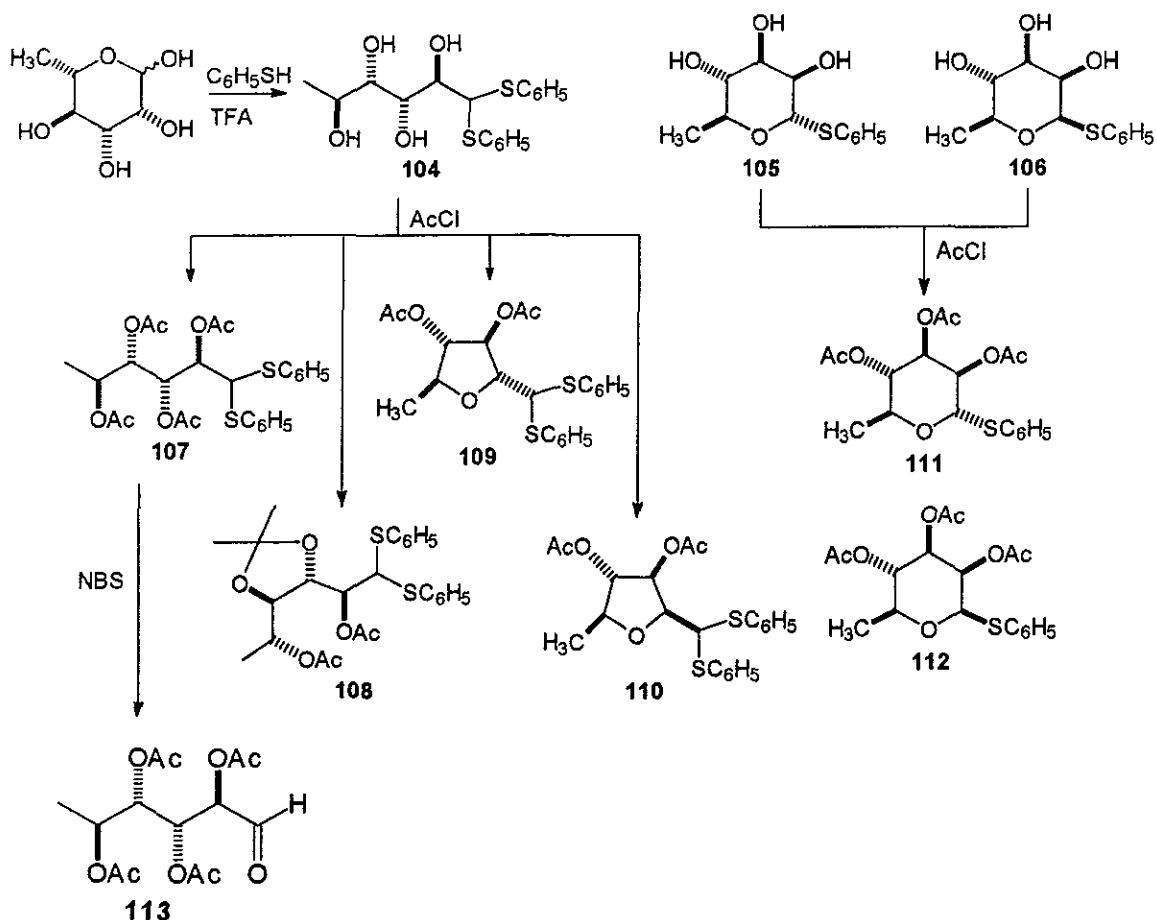
Posición	99 <sup>b</sup>	100	101	102	103
1	56.0	53.1	79.1	16.1	9.4
2	74.9	72.3	49.6	67.1	23.9
3	71.4	70.3	72.3	71.2	72.0
4	73.5	71.1	74.4	71.2	73.8
5	66.3	67.0	75.2	67.1	67.5
6	20.9	16.4	17.6	16.1	16.0
1'	38.3	39.3	33.1	----	----
2'	37.9	37.9	29.9	----	----
COMe	----	21.0	20.6	21.0	21.0
	----	20.9	20.5	21.0	20.8
	----	20.9	----	20.7	20.7
	----	20.7	----	20.7	----
COMe	----	170.2	170.3	170.1	170.4
	----	170.0	169.7	170.1	170.2
	----	169.8	----	170.0	170.1
	----	169.7	----	170.0	----

<sup>a</sup>CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz. Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC,  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup>DMSO<sub>d6</sub>, 75.4 MHz.

Al tratar de reducir el compuesto **100** al aldehído, se observó que se obtenían compuestos muy polares que correspondían a sulfonas (Miljkovic *et al.*, 1984), por lo que se propuso la síntesis de otro ditioacetal que permitiera la desprotección del carbono anomérico, pasando a la tercera estrategia sintética.

### 6.2.2.3. Síntesis del difenilditioacetal de la L-ramnosa (104).

La última ruta sintética evaluada para la obtención del sintón quiral **113** consistió en la síntesis del difenilditioacetal de la L-ramnosa (**104**), su peracetato correspondiente (**107**) y la reducción empleando *N*-bromosuccinimida. De manera adicional, se caracterizaron los cinco subproductos de reacción que proporcionó esta secuencia de reacciones (fig. 58).



**Figura 58.** Estrategia sintética que permitió la obtención del sintón quiral 113 y subproductos de reacción.

El compuesto **104** se obtuvo utilizando la metodología de Funabashi y colaboradores (1999), quienes utilizan ácido trifluoroacético al 90% para condensar azúcares libres con tioles. Esta metodología proporcionó como producto principal al difenilditioacetal de la L-ramnosa (**104**, fig. 59), el cual fue caracterizado mediante el registro de sus constantes espectroscópicas (cuadros 16 y 17) y la comparación de sus constantes físicas descritas en la literatura (Horton y Wander, 1970a).

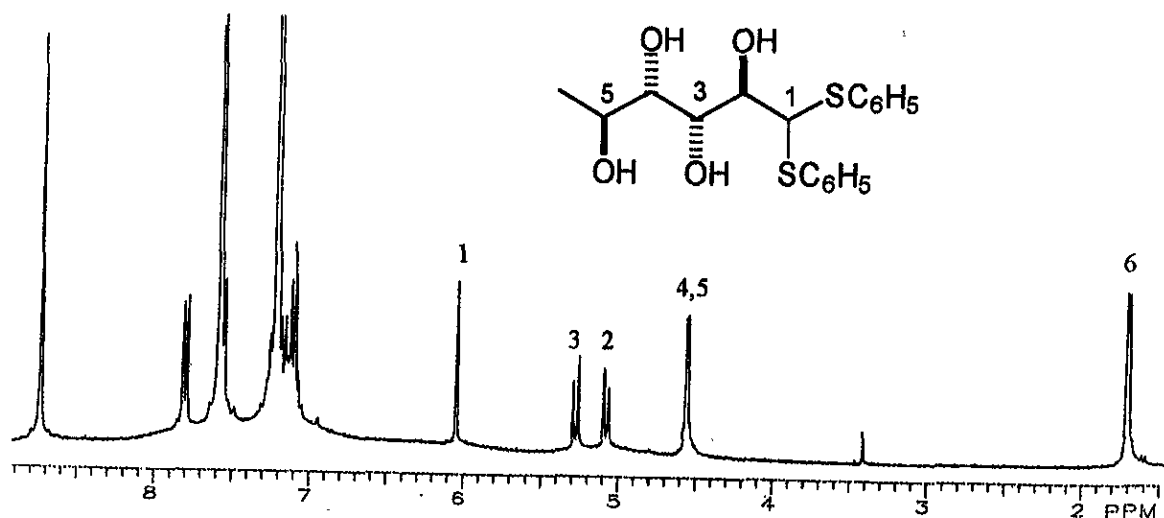


Figura 59. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del difenilditioacetal de la L-ramnosa (**104**) (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

Se acetiló el compuesto **104** con cloruro de acetilo y la mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en columna. Las fracciones 64-77 proporcionaron el difenilditioacetal de la 2,3,4,5-tetra-*O*-acetil-L-ramnosa (**107**, fig. 60) como producto mayoritario, además de los subproductos de reacción **108-110**. El compuesto **108** (fig. 61) se identificó a través del análisis de su espectro de RMN  $^1\text{H}$  como un monoacetónido generado a partir del compuesto **104** durante la manipulación de la muestra en presencia de acetona. Se observaron tres señales para grupo metilo, una correspondió al metilo terminal de la L-ramnosa ( $\delta$  1.25, d,  $J = 6.45$  Hz) y las otras dos señales aparecieron como singuletes ( $\delta$  1.36 y 1.03), sólo había dos señales para grupo acetato ( $\delta$  2.16 y 2.07) y los protones geminales se encontraban centrados en  $\delta$  5.33 dd y 4.98 dc. Estas evidencias permitieron proponer la generación del acetónido a través de la protección de los grupos hidroxilo de las posiciones  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$ , cuyos protones geminales estaban centrados en  $\delta$  4.30 ( $\text{H}_3$ ) y 3.99

(H<sub>4</sub>). Los desplazamientos químicos registrados en la RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C para los compuestos 104, 107 y 108 se presentan en los cuadros 16 y 17.

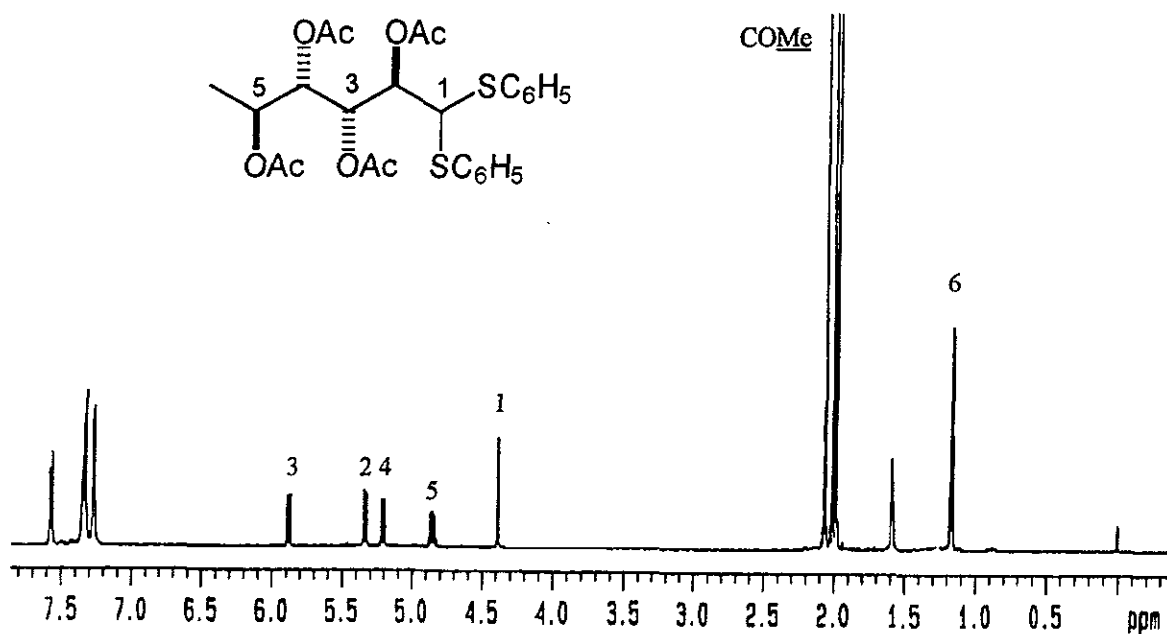


Figura 60. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del difenilditioacetal de la 2,3,4,5-tetra-*O*-acetil-L-ramnosa (107) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

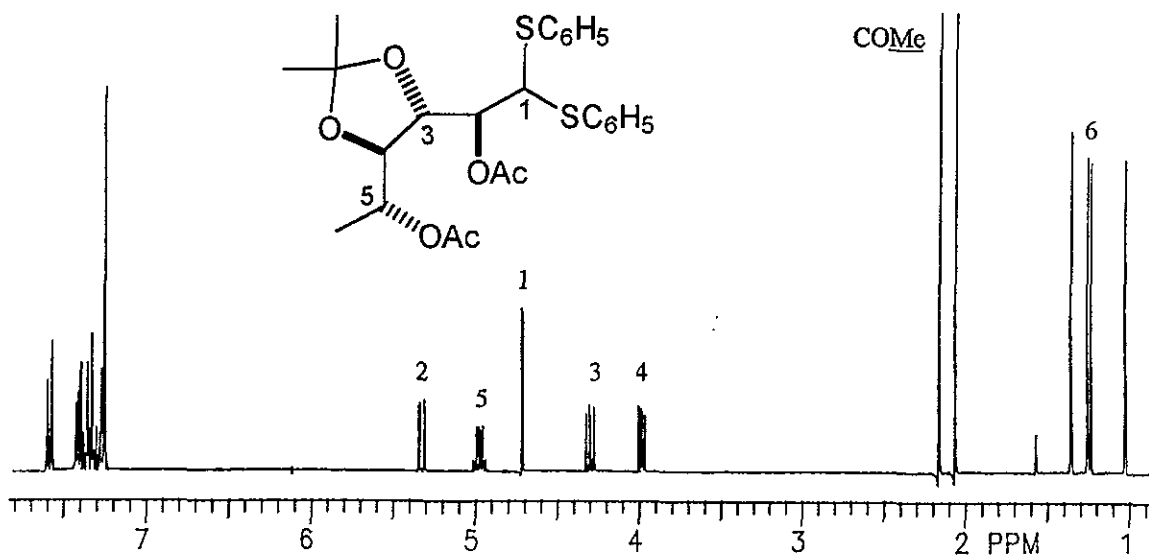


Figura 61. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del 2,5-di-*O*-acetil-3,4-isopropiliden-L-ramnosa (108) (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

Cuadro 16. Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  para los compuestos 104, 107 y 108.<sup>a</sup>

Posición	104 <sup>b</sup>	107 <sup>c</sup>	108
1	6.04 sa	4.38 d (3.0)	4.72 d (1.7)
2	5.07 da (9.3)	5.34 dd (8.5, 3.0)	5.33 dd (9.2, 1.7)
3	5.27 da (9.3)	5.88 dd (8.5, 2.0)	4.30 dd (9.2, 6.1)
4	4.55 m	5.21 dd (8.5, 2.0)	3.99 dd (6.1, 3.8)
5	4.55 m	4.85 dc (8.5, 6.5)	4.98 dc (6.5, 3.8)
6	1.70 d (6.1)	1.17 d (6.5)	1.25 d (6.5)
$\text{C}_6\text{H}_5$	7.81-7.78	7.58-7.56 m	7.61-7.57 m
	7.56-7.54	7.35-7.26 m	7.43-7.25 m
	7.22-7.09		
OAc	-----	2.06 s	2.16 s
	-----	2.01 s	2.07 s
	-----	1.98 s	
	-----	1.98 s	
$\text{CH}_3$	-----	-----	1.36 s
	-----	-----	1.03 s

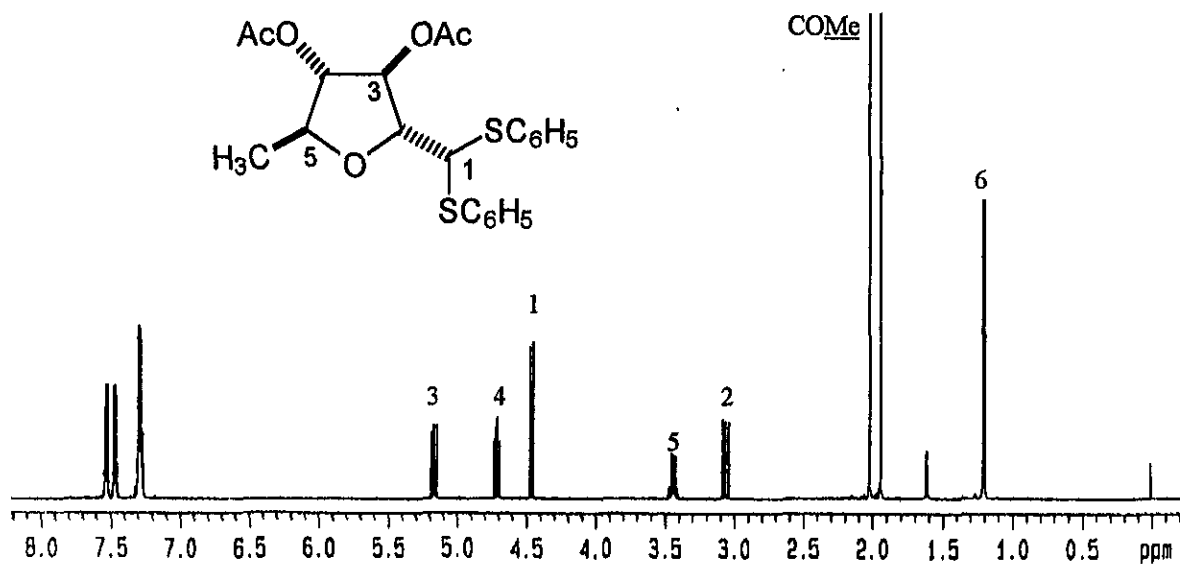
<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz ( $J$  en Hz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup> $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ . <sup>c</sup>500 MHz.

Cuadro 17. Desplazamientos químicos en la RMN  $^{13}\text{C}$  para los compuestos 104, 107 y 108.<sup>a</sup>

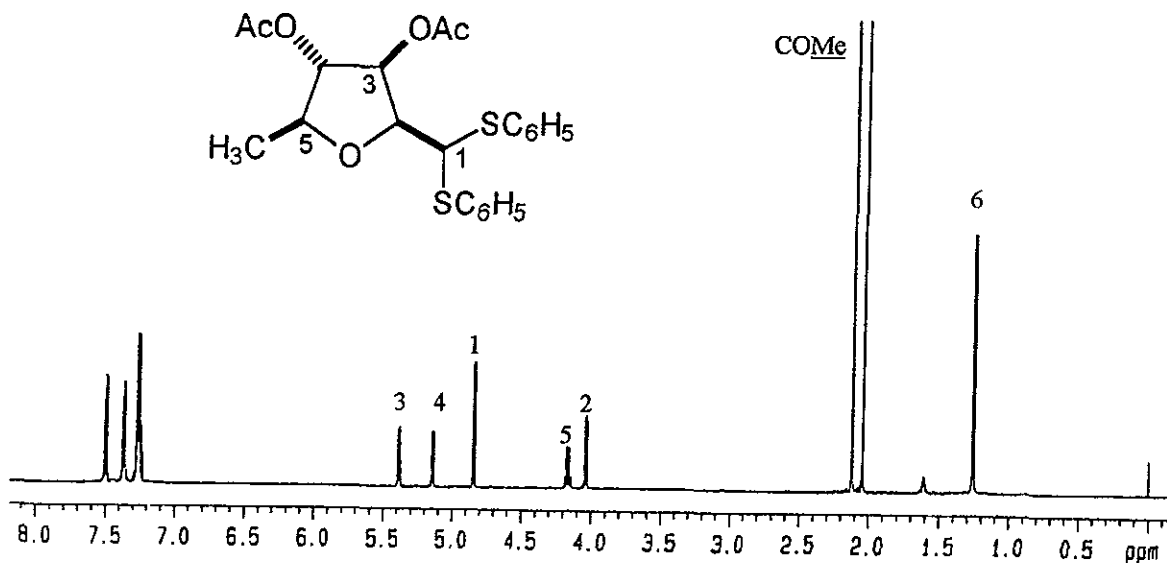
Posición	104 <sup>b</sup>	107 <sup>c</sup>	108
1	61.5	61.4	61.2
2	72.3	71.3	75.0
3	69.4	68.8	76.3
4	73.3	71.2	81.1
5	66.4	67.2	70.3
6	21.0	16.4	14.5
$\text{C}_6\text{H}_5$	136.1	134.0	134.4
	135.6	133.7	133.9
	130.0	133.2	133.8
	130.0	133.2	133.8
	129.6	133.2	132.3
	129.6	133.2	132.3
	129.0	129.0	129.2
	129.0	129.0	129.2
	128.9	129.0	129.1
	128.9	129.0	129.1
	126.5	128.2	128.4
	126.4	128.2	127.9
	<u>COMe</u>	----	21.1
----		20.7	20.8
----		20.6	----
----		20.5	----
<u>COMe</u>	----	170.2	170.3
	----	170.0	170.3
	----	169.6	----
<u>COMe<sub>2</sub></u>	----	169.4	----
	----	----	27.3
<u>COMe<sub>2</sub></u>	----	----	26.9
	----	----	111.2

<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz. Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC o HETCOR,  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup> $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ . <sup>c</sup>125.7 MHz.

Al analizar los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de los subproductos **109** y **110** (fig. 62 y 63) se observó que estos presentaban características muy similares. Sólo, se generaron dos señales para grupos acetoxilo. Las dos señales en forma de dobletes se asignaron en función de sus desplazamientos químicos, una señal correspondía al metilo terminal (*ca.* 1.2) y, la otra señal a campo bajo correspondía al protón geminal a los grupos tiofenilo ( $\delta$  4.4, **109**;  $\delta$  4.8, **110**). Las dos señales restantes desplazadas a campo bajo ( $\delta$  4.7-5.4) debían corresponder a los protones geminales a los grupos acetoxilo. De esta manera, únicamente restaba por asignar las señales localizadas entre  $\delta$  3.0 y 4.2 que por su desplazamiento químico debían corresponder a protones geminales a una función oxigenada etérea. Se propuso que el tetraol **104** sufrió un proceso de ciclización intramolecular a través del ataque nucleofílico del grupo hidroxilo en  $\text{C}_5$  sobre el carbono  $\text{C}_2$  para formar el par de epímeros **109** y **110**, posiblemente a través de un intermediario olefínico  $\Delta^{1,2}$  generado por la deshidratación de la posición  $\text{C}_2$ .



**Figura 62.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del difenilditioacetal de la 3,4-di-*O*-acetil-2,5-anhidro-L-ramnosa (**109**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 63.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del difenilditioacetal de la 3,4-di-*O*-acetil-2,5-anhidro-D-quinovosa (**110**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

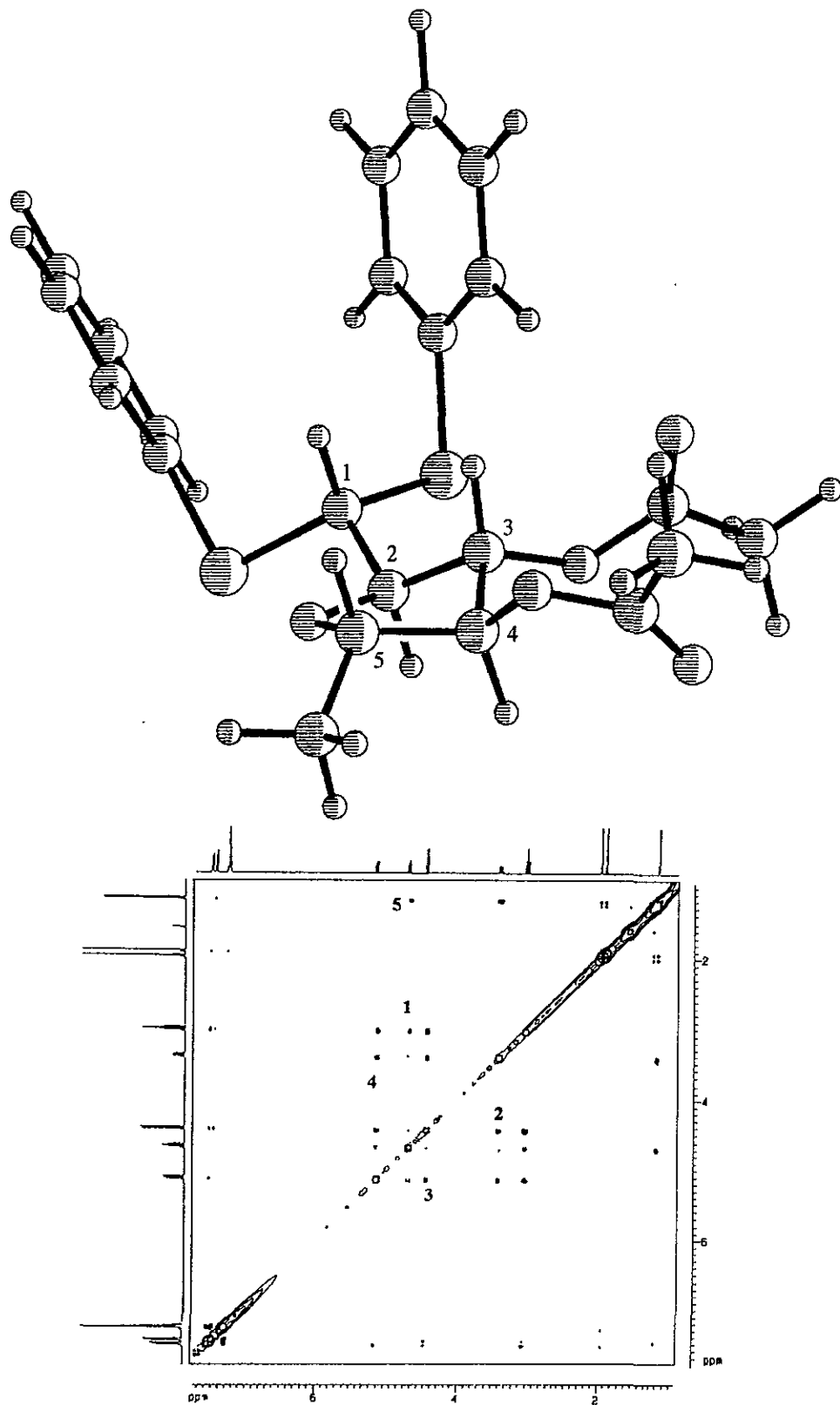
El análisis mediante mecánica molecular de estos derivados permitió establecer la conformación de mínima energía en forma de sobre para los dos epímeros **109** y **110** (Collins y Ferrier, 1995). Se observó una orientación *quasi*-ecuatorial para todos los sustituyentes en **109** cuya conformación de máxima estabilidad (fig. 64;  $E_{\text{MMX}} = 20.90$  y  $\Delta H_f = -195.14$  kcal/mol) corresponde al sobre que presenta al  $\text{C}_4$  fuera del plano ( $^4\text{E}$ ). En el epímero **110** el sustituyente de mayor volumen [ $\text{CH}(\text{SC}_6\text{H}_5)_2$ ] se encuentra en una orientación *quasi*-ecuatorial y los sustituyentes restantes tienen una orientación *quasi*-axial (fig. 65). Esta conformación de mínima energía ( $E_{\text{MMX}} = 21.0$  y  $\Delta H_f = -194.96$  kcal/mol) provoca un cambio en el confórmero de sobre situando al  $\text{C}_5$  fuera del plano formado por los cuatro átomos restantes del anillo de furano ( $^5\text{E}$ ). Las conformaciones establecidas mediante estos cálculos se confirmaron mediante el registro de los efectos nucleares de



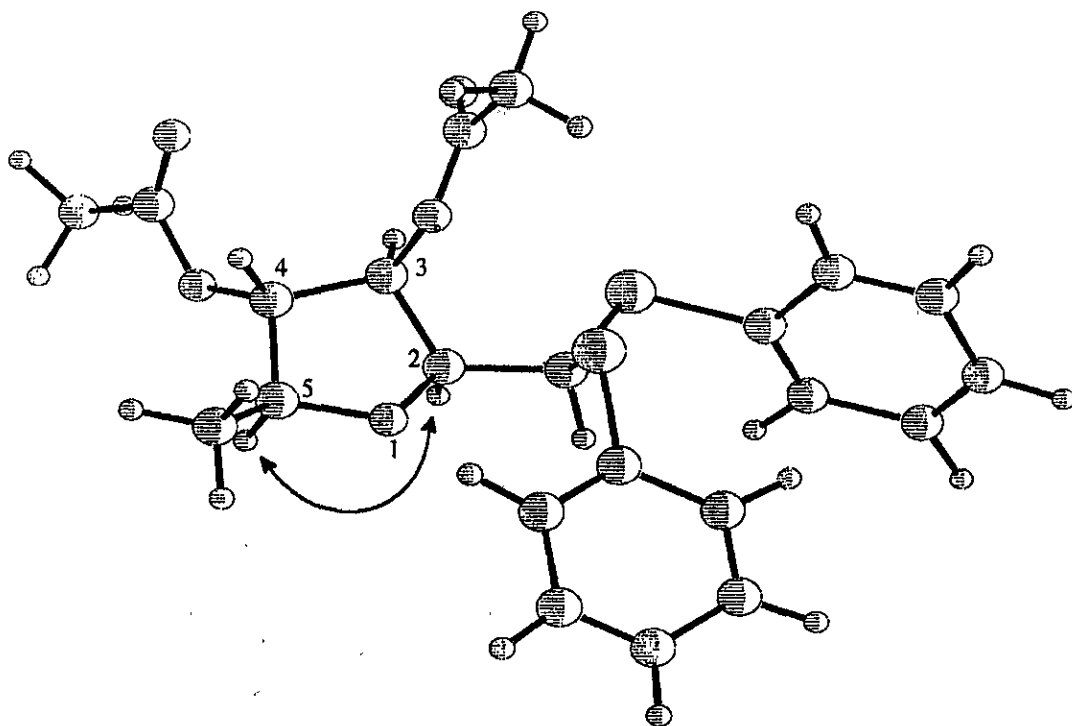
Overhauser. El espectro NOESY del compuesto **109** mostró la interacción esperada entre los protones H<sub>2</sub> (δ 3.05) y H<sub>4</sub> (δ 4.70) cuando se adopta la conformación de sobre <sup>4</sup>E (fig. 64). En tanto que para la conformación <sup>5</sup>E del derivado **110**, la interacción entre H<sub>2</sub> (δ 4.03) y H<sub>5</sub> (δ 4.16) representó la evidencia para sustentar el cambio conformacional observado entre estos dos derivados (fig. 65). El cuadro 18 incluye los nOe observados en el compuesto **110** y las constantes de acoplamiento (teóricas y calculadas) para los protones del anillo tetrahidrofuranósido de ambos derivados. En el cuadro 19 se presentan los desplazamientos químicos en la RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C para los compuestos **109** y **110**.

**Cuadro 18.** Comparación de las constantes de acoplamiento registradas por RMN <sup>1</sup>H y calculadas con el programa PCModel. Efectos observados en el espectro NOESY del compuesto **110**.

Posición	<sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> 109		<sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> 110		nOes 110
	Observada	Calculada	Observada	Calculada	
H <sub>1</sub> -H <sub>2</sub>	11.0	10.8	4.0	4.7	H <sub>5</sub> -H <sub>2</sub>
H <sub>2</sub> -H <sub>3</sub>	11.0	8.9	4.5	3.6	H <sub>4</sub> -H <sub>6</sub>
H <sub>3</sub> -H <sub>4</sub>	9.5	8.6	1.0	0.6	H <sub>1</sub> -H <sub>3</sub>
H <sub>4</sub> -H <sub>5</sub>	9.5	8.3	4.0	4.9	



**Figura 64.** Confórmero energéticamente estable y espectro de RMN  $^1\text{H}$  bidimensional homonuclear NOESY del compuesto 109. Principales efectos nOes: 1,  $\text{H}_2\text{-H}_4$ ; 2,  $\text{H}_1\text{-H}_5$ ; 3,  $\text{H}_1\text{-H}_3$ ; 4,  $\text{H}_5\text{-H}_3$ ; 5,  $\text{H}_4\text{-H}_6$ .



**Figura 65.** Conformación de máxima estabilidad energética para el compuesto 110. La flecha indica el principal efecto nOe observado entre H<sub>2</sub>-H<sub>5</sub> que confirma la orientación β del sustituyente en C<sub>2</sub>.

Durante la síntesis del compuesto 104 se obtuvo una mezcla de dos compuestos de menor polaridad que el producto principal ( $R_f = 0.37$ ), éstos correspondieron a los subproductos cíclicos, el 1-tiofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (105, fig. 66) y el 1-tiofenil- $\beta$ -L-ramnopiranosido (106, fig. 67). La mezcla se resolvió mediante CLAR. En la literatura se describió previamente la formación del 1-tiopiranosido como subproducto minoritario durante la síntesis de ditioacetales de azúcares que pueden generarse como resultado de la exposición de un ditioacetal acíclico a un medio ácido (Zissis *et al.*, 1966). Para establecer la configuración relativa del centro anomérico C<sub>1</sub> de los epímeros 105 y 106, se realizó una comparación de las constantes espectroscópicas con los compuestos 1-tiometil  $\alpha$  y  $\beta$  L-ramnopiranosidos descritos en la literatura (Pozsgay y Jennings, 1988).

**Cuadro 19.** Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para los compuestos **109** y **110**.<sup>a</sup>

Posición	109		110	
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	4.45 d (11.0)	86.3	4.84 d (4.0)	76.7
2	3.05 dd (11.0, 11.0)	52.3	4.03 dd (4.5, 4.0)	60.8
3	5.16 dd (11.0, 9.5)	74.2	5.39 dd (4.5, 1.1)	85.1
4	4.70 dd (9.5, 9.5)	74.5	5.14 dd (4.0, 1.0)	78.8
5	3.43 dc (9.5, 6.0)	73.8	4.16 dc (6.0, 4.0)	80.8
6	1.19 d (6.0)	17.5	1.25 d (6.0)	13.6
$\text{C}_6\text{H}_5$	7.53-7.51 m	134.2	7.51-7.48 m	134.3
	7.48-7.45 m	134.2	7.38-7.35 m	134.2
	7.29-7.26 m	133.3	7.31-7.22 m	132.9
		131.7		132.9
		131.5		132.7
		131.5		132.7
		129.0		129.0
		129.0		129.0
		128.8		127.9
		128.8		127.8
<u>COMe</u>	2.01 s	20.7	2.11 s	20.8
	1.94 s	20.6	2.05 s	20.8
<u>COMe</u>		170.1		170.2
		169.9		170.0

<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ ,  $^1\text{H}$  [500 MHz ( $J$  en Hz)]. Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY.  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz): las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC,  $\delta$  en ppm.

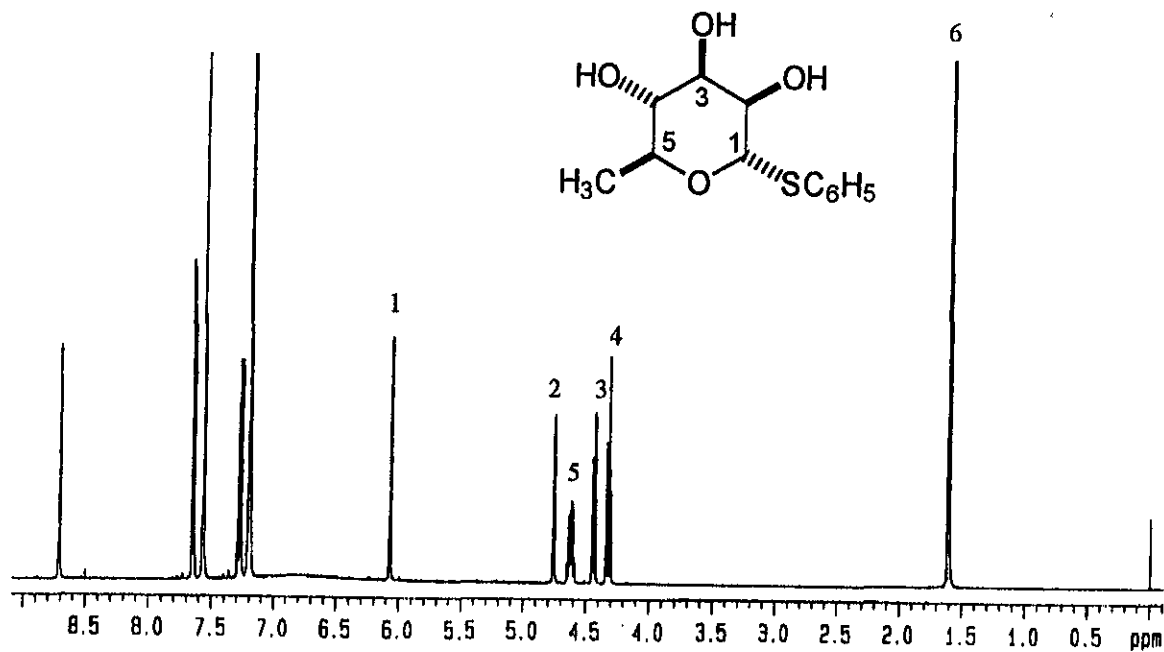


Figura 66. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del 1-tiofenil- $\alpha$ -L-rannopiranosido (105) (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

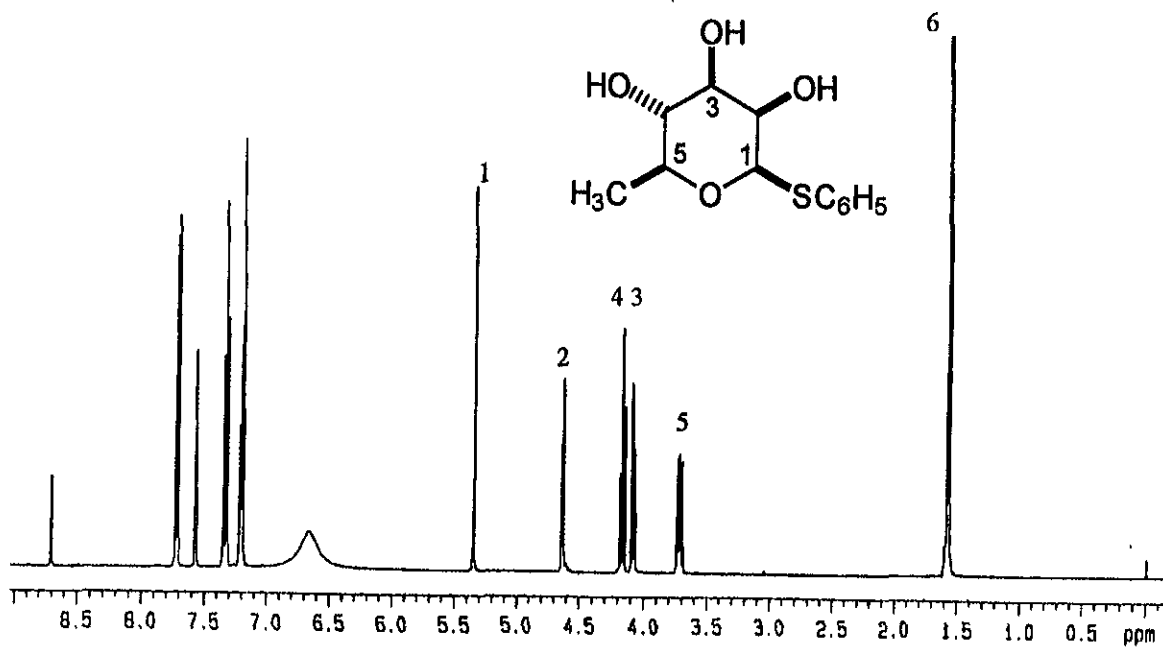
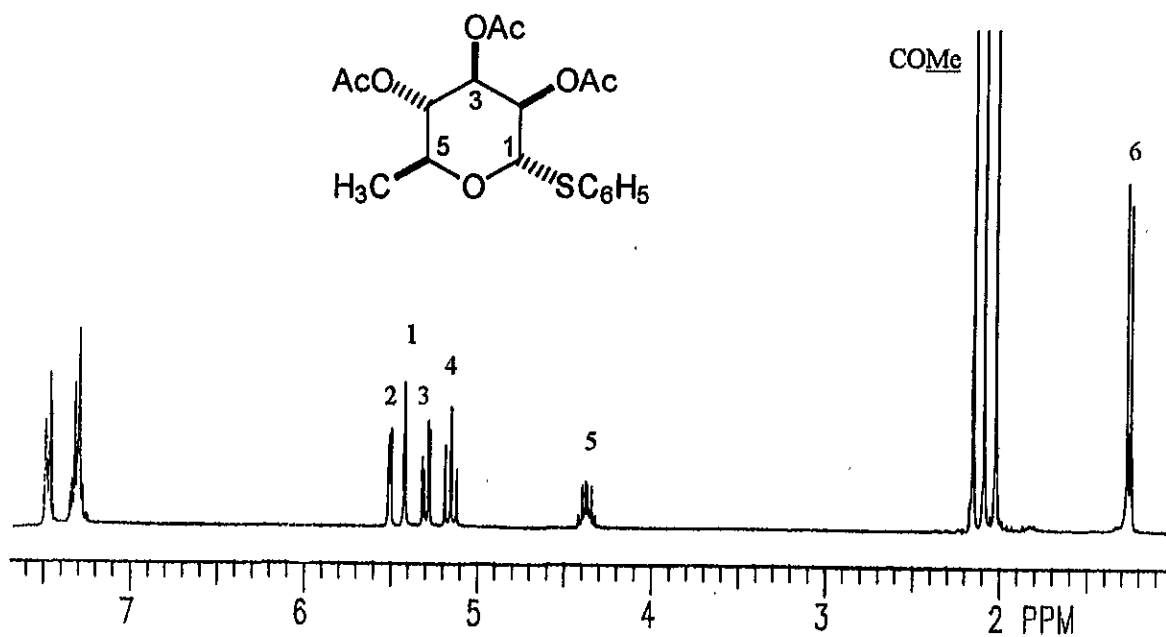
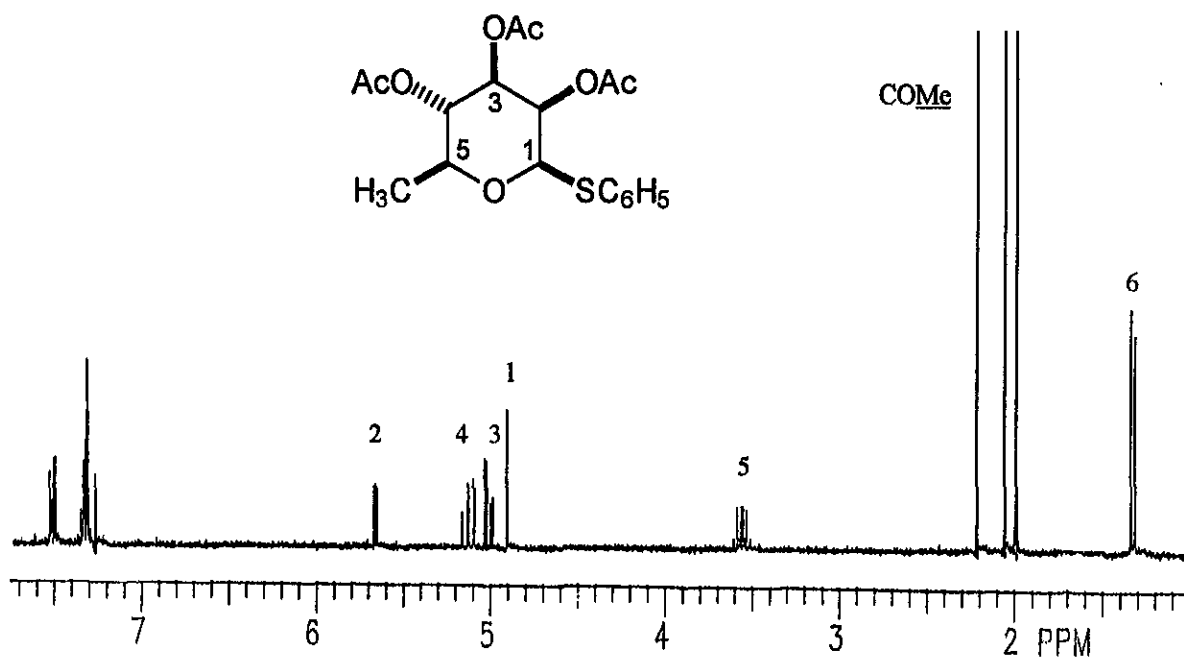


Figura 67. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del 1-tiofenil- $\beta$ -L-rannopiranosido (106) (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

Una fracción de los piranosidos **105** y **106** se acetiló y se purificó mediante cromatografía en columna para generar los peracetatos **111** y **112** (fig. 68 y 69), respectivamente. La comparación de las constantes espectroscópicas de los compuestos **105** y **111** con las constantes descritas en la literatura permitieron ratificar la orientación  $\alpha$  del grupo tiofenilo (Grooneber *et al.*, 1993; Pozsgay y Jennings, 1988). Estos compuestos se utilizan como intermediarios en la síntesis de oligosacáridos naturales de interés biológico, por ejemplo, el tetrasacárido que forma parte del antígeno polisacárido del estreptococo B, el cual podría ser utilizado en la búsqueda de vacunas contra esta bacteria que ocasiona sepsis neonatal bacteriana y meningitis (Pozsgay y Jennings, 1988). También, estos piranosidos se han empleado en la síntesis del fragmento oligosacárido de la calikamicina, una enedina natural con propiedades antibióticas y antitumorales muy potente (Grooneber *et al.*, 1993) y como intermediarios de un ramnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa*, con propiedades antibacteriana, micoplasmicida y antiviral (Duynstee *et al.*, 1998). Los desplazamientos químicos registrados en la RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para los compuestos **105**, **106**, **111** y **112** se presentan en los cuadros 20 y 21, respectivamente.



**Figura 68.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del 2,3,4-tri-*O*-acetil-1-tiofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (111) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 69.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del 2,3,4-tri-*O*-acetil-1-tiofenil- $\beta$ -L-ramnopiranosido (112) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Cuadro 20. Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  para los compuestos 105, 106, 111 y 112.

Posición	105 <sup>a</sup>	106 <sup>a</sup>	111 <sup>b</sup>	112 <sup>b</sup>
1	6.08 dd (1.4, 0.5)	5.35 d (1.2)	5.41 d (1.6)	4.90 d (1.2)
2	4.76 dd (3.3, 1.5)	4.64 dd (3.5, 1.2)	5.50 dd (3.3, 1.6)	5.65 dd (3.4, 1.2)
3	4.44 dd (9.3, 3.3)	4.09 dd (9.2, 3.5)	5.29 dd (3.3, 9.8)	5.00 dd (10.1, 3.4)
4	4.32 dd (9.3, 9.3)	4.17 dd (9.2, 9.2)	5.15 dd (9.8, 9.8)	5.12 dd (10.1, 9.4)
5	4.62 dc (9.3, 6.2)	3.72 dc (9.2, 6.1)	4.36 dc (9.8, 6.1)	3.55 dc (9.4, 6.2)
6	1.61 d (6.2)	1.58 d (6.1)	1.25 d (6.1)	1.31 d (6.2)
2 C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	7.66-7.64 m 7.30-7.18 m	7.74-7.31 m 7.30-7.18 m	7.48-7.45 m 7.34-7.27 m	7.52-7.49 m 7.33-7.30 m
OAc	----- ----- -----	----- ----- -----	2.14 s 2.08 s 2.01 s	2.21 2.05 1.98

<sup>a</sup>C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz (*J* en Hz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup>CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz.



**Cuadro 21.** Desplazamientos químicos en la RMN  $^{13}\text{C}$  para los compuestos 105, 106, 111 y 112.<sup>a</sup>

Posición	105	106	111	112
1	90.0	88.3	85.6	85.5
2	73.8	74.0	71.2	71.9
3	73.3	76.1	69.3	71.1
4	74.0	73.3	71.0	70.4
5	71.2	77.5	67.7	75.0
6	18.4	18.6	17.2	17.8
$\text{C}_6\text{H}_5$	136.1	137.6	133.1	133.4
	131.4	129.7	131.7	132.1
	131.4	129.7	131.7	132.1
	129.4	129.2	129.0	129.2
	129.4	129.2	129.0	129.2
	127.2	126.5	127.7	128.1
	<u>COMe</u>	----	----	20.8
----		----	20.7	20.7
----		----	20.5	20.7
<u>COMe</u>	----	----	169.8	170.3
	----	----	169.8	170.2
	----	----	169.7	169.9

<sup>a</sup> $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125.7 MHz. Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC o HETCOR,  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup> $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz.

Las diferencias observadas en los desplazamientos químicos del espectro de RMN  $^1\text{H}$  entre los piranosidos peracetilados **111** y **112** se explican al analizar las conformaciones de máxima estabilidad. En el cuadro 22 se comparan las constantes de acoplamiento observadas y calculadas junto con los valores de energía mínima ( $E_{\text{MMX}}$ ) y entalpía de formación ( $\Delta H_f$ ) de estos compuestos.

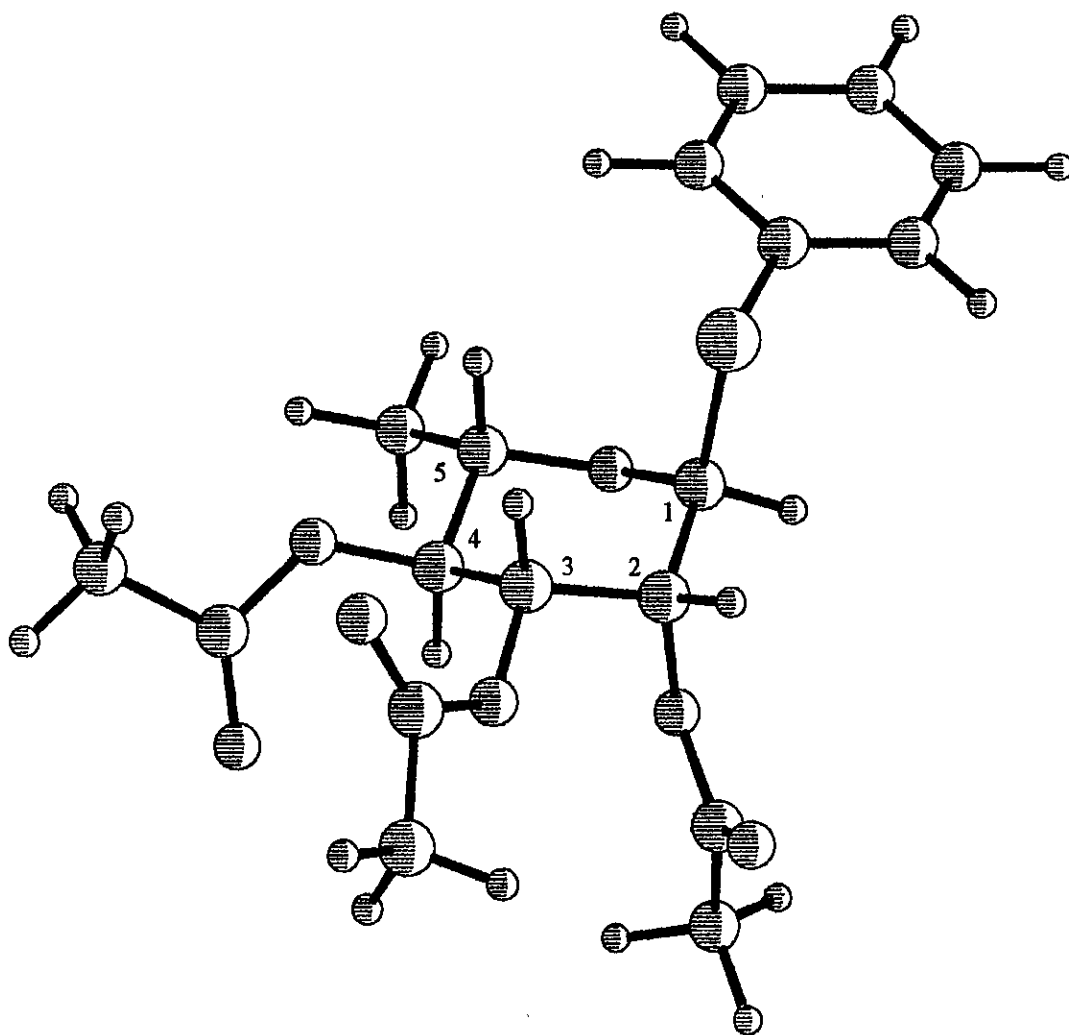
**Cuadro 22.** Comparación de las constantes de acoplamiento vecinales calculadas y observadas<sup>a</sup>, de las energías mínimas ( $E_{\text{MMX}}$ )<sup>b</sup> y los  $\Delta H_f$ <sup>b</sup> de los piranosidos **111** y **112**.

<b>111</b>	<b>1,2</b>	<b>2,3</b>	<b>3,4</b>	<b>4,5</b>	$E_{\text{MMX}}$	$\Delta H_f$
$^3J_{\text{calc}}$	1.6	3.1	9.3	9.2	11.29	-311.62
$^3J_{\text{obs}}$	1.6	3.3	9.8	9.8		
<b>112</b>						
$^3J_{\text{calc}}$	1.2	3.4	9.3	9.2	11.68	-311.24
$^3J_{\text{obs}}$	1.2	3.4	10.1	9.4		

<sup>a</sup>Hz. <sup>b</sup>kcal/mol.

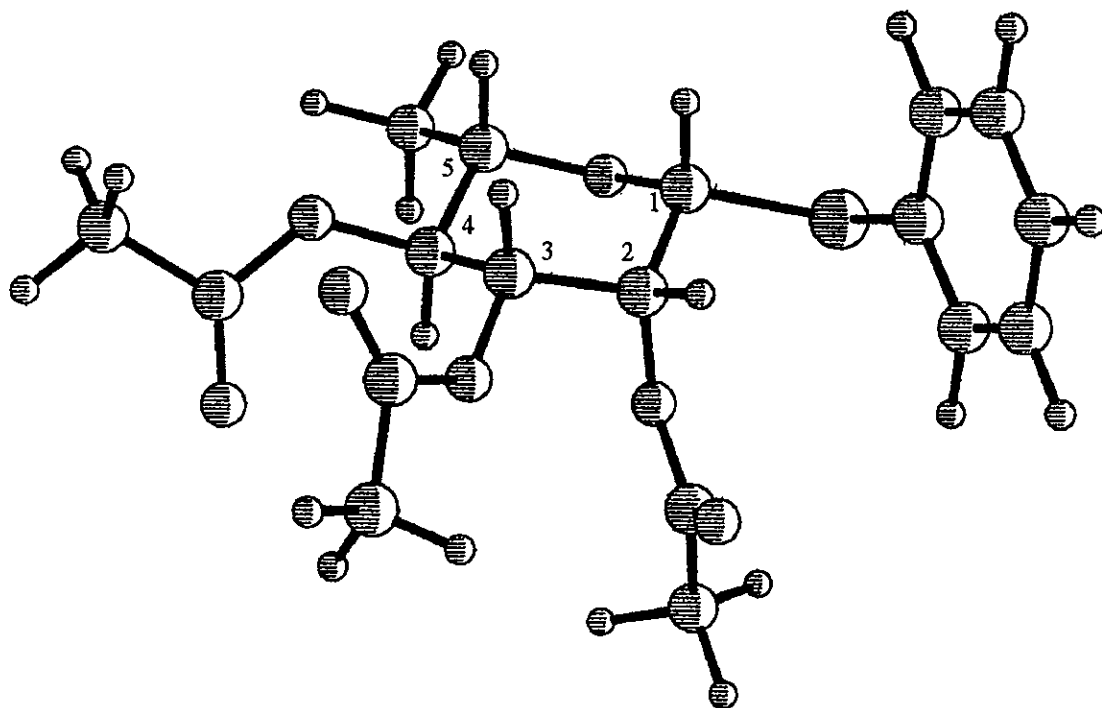
La figura 70 ilustra la conformación de máxima estabilidad para el piranosido **111**. Se observa al grupo tiofenilo con una orientación axial, presentando interacciones 1,3-diaxiales con los protones  $\text{H}_3$  y  $\text{H}_5$  que provocan un efecto paramagnético ( $\delta$  5.29,  $\text{H}_3$  y  $\delta$  4.36,  $\text{H}_5$ ) con respecto al compuesto **112**, donde se encuentra el grupo tiofenilo con una

orientación ecuatorial ( $\delta$  5.00, H<sub>3</sub> y  $\delta$  3.55, H<sub>5</sub>). Este efecto es mayor en H<sub>5</sub> ( $\Delta\delta = 0.81$ ) debido a que la longitud de los enlaces C-O es menor que la del enlace C-C. Evidentemente, esta variación provoca una diferencia en las distancias intramoleculares entre el átomo de azufre y los hidrógenos axiales de las posiciones C<sub>3</sub> (3.02 Å) y C<sub>5</sub> (2.83 Å).



**Figura 70.** Conformación de máxima estabilidad del 2,3,4-tri-*O*-acetil-1-tiofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (111).

El conformero generado para el compuesto **112** permite observar la interacción *anti*-clinal del tiofenilo con H<sub>2</sub>, provocando un efecto paramagnético de menor magnitud ( $\Delta\delta = 0.15$ ) debido a que la distancia entre los sustituyentes 1,2-diecuatoriales es mayor que para los sustituyentes 1,3-*sin*-diaciales (fig. 71). Se esperaría que el epímero de mayor estabilidad en términos estéricos correspondería al compuesto **112** debido a la orientación del grupo tiofenilo ecuatorial. Sin embargo, se observa que el efecto anomérico del grupo tiofenilo en el compuesto **111** permitió el aislamiento de ambos compuestos en una proporción 2:3 aproximadamente (Juaristi, 1991), predominando el compuesto **112** (Cuadro 22).



**Figura 71.** Conformación de máxima estabilidad del 2,3,4-tri-*O*-acetil-1-tiofenil- $\beta$ -L-ranopiranosido (**112**).

Finalmente, se logró obtener el sintón quiral **113** (fig. 72, Cuadro 23) utilizando la metodología desarrollada por Miljkovic y colaboradores (1984). En esta técnica se empleó la oxidación del compuesto **107** con *N*-bromosuccinimida. Previamente, Horton y Wander (1970a) intentaron la obtención de este producto realizando la oxidación con cloruro de mercurio-carbonato de cadmio sin lograr remover por completo los tiofenilos protectores.

En la figura 73 se presenta una comparación de las constantes de acoplamiento entre la espicigerólida (**1**) y todos los derivados acíclicos peracetilados preparados a partir de la L-ramnosa (**98**, **100**, **102**, **107** y **113**). La correlación observada entre las constantes de acoplamiento de la espicigerólida (**1**) con estos derivados confirmó de manera inequívoca la configuración para los centros estereogénicos de la cadena lateral de la espicigerólida (**1**).

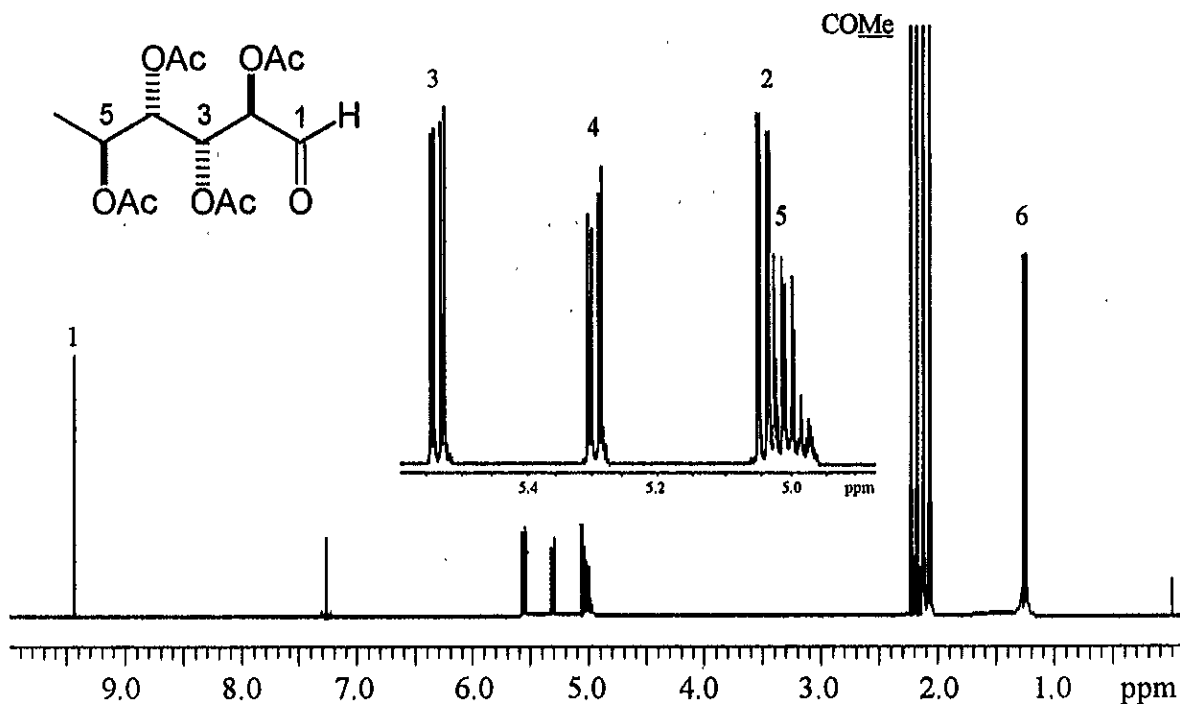


Figura 72. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la 2,3,4,5-tetra-*O*-acetil-L-ramnosa (**113**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

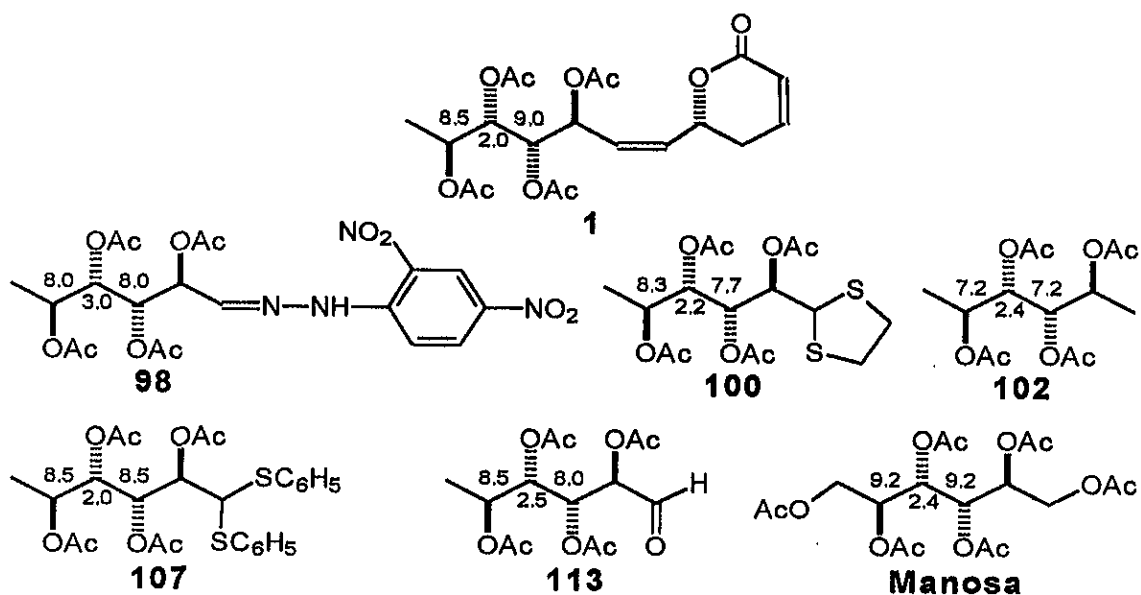
Cuadro 23. Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el compuesto 113.<sup>a</sup>

Posición	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1	9.45 d (1.2)	195.2
2	5.03 dd (8.0, 1.2)	74.2
3	5.54 dd (8.0, 2.5)	67.3
4	5.29 dd (8.5, 2.5)	71.3
5	5.00 dc (8.5, 6.2)	66.6
6	1.21 d (6.2)	16.5
<u>COMe</u>	2.18 s	21.0
	2.13 s	20.6
	2.10 s	20.5
	2.03 s	20.4
<u>COMe</u>	-----	169.9
	-----	169.9
	-----	169.8
	-----	169.6

<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$  500 MHz ( $J$  en Hz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY.  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz): las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC,  $\delta$  en ppm.

Las constantes de acoplamiento de los derivados de la L-ramnosa correlacionaron ampliamente con las constantes descritas por Masamune y colaboradores (1986) para el hexaalditol peracetilado derivado de la manosa. De esta manera, es importante destacar que la aplicación de la mecánica molecular para el cálculo de las constantes de acoplamiento vecinales ( $^3J_{H-H}$ ) para establecer la configuración de productos naturales polihidroxilados acíclicos puede llevarse a cabo con una aproximación muy alta (Osawa *et al.*, 1991).

Por lo tanto, la configuración de la cadena lateral de la espicigerólida (1) corresponde a la de la manosa y, al considerar la postulación biogenética referente a la configuración absoluta para el centro estereogénica C<sub>6</sub>' como (*S*) (Davies-Coleman y Rivett, 1996), la cadena lateral del compuesto 1 posee la misma estereoquímica absoluta que la presente en la 6-desoxi-L-manosa (L-ramnosa).



**Figura 73.** Comparación de las constantes de acoplamiento para la cadena lateral de la espicigerólida (1) con los valores registrados para los derivados acíclicos sintetizados a partir de la L-ramnosa (98, 100, 107 y 113) y los valores calculados por Masamune *et al.* para el hexaalditol peracetilado de la manosa.

### 6.2.3. Epimerización de la sinrotólida (29).

Se logró obtener una donación de la sinrotólida (29) en cantidades suficientes para realizar la epimerización de los centros estereogénicos C<sub>4'</sub> y C<sub>5'</sub> con el propósito de preparar los epímeros correspondientes de la sinrotólida peracetilada (114). De esta manera, se registrarían las constantes de acoplamiento experimentales y se procedería a su correlación con las constantes de acoplamiento descritas para las aldohexosas peracetiladas que darían origen a la cadena lateral de estos derivados (114, 123 y 126; fig. 74) y, de esta manera, evaluar la aproximación de la metodología de Masamune en otras 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas (Masamune *et al.*, 1986; Osawa *et al.*, 1991). Al mismo tiempo, la preparación de uno de estos epímeros permitiría descartar al isómero cuya cadena lateral deriva de la gulosa (fig. 37, isómero C) como un diastereoisómero portador de la stereoquímica absoluta observada en la espicigerólida (1). La figura 75 ilustra la secuencia sintética propuesta para la epimerización de la sinrotólida (29). Finalmente, con el fin de validar la metodología aplicada en la determinación de la configuración de la espicigerólida (1) se calcularon mediante mecánica molecular las constantes de acoplamiento teóricas de la sinrotólida peracetilada (114) para compararlas con las constantes observadas y las constantes reportadas para el hexaalditol peracetilado de la alosa.

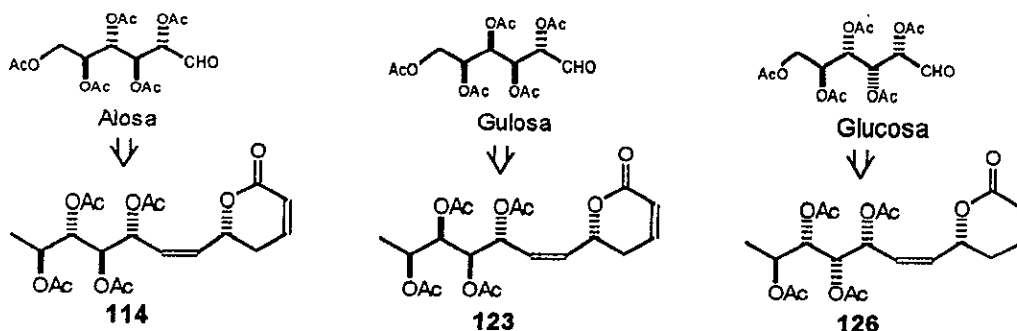
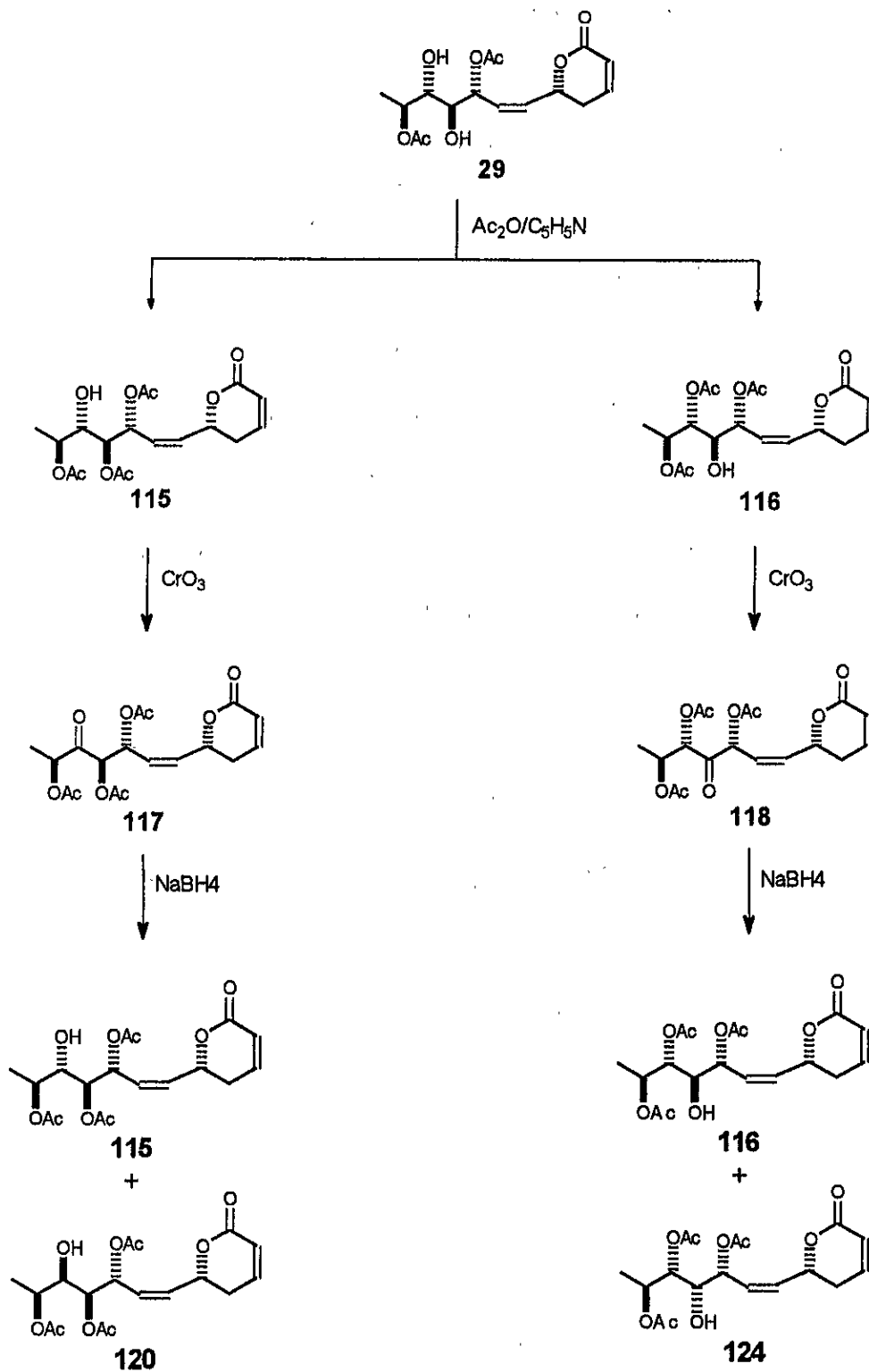


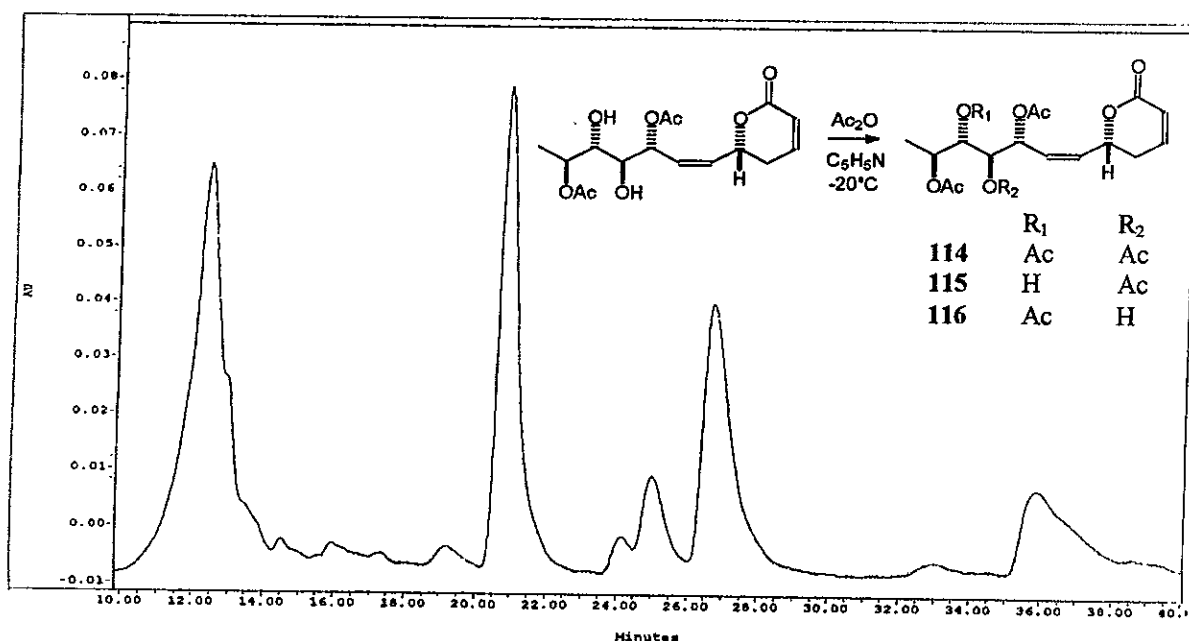
Figura 74. Carbohidratos de origen para la sinrotólida peracetilada (114), la 5'-*epi*-acetilsinrotólida (123) y la 4'-*epi*-acetilsinrotólida (126).





**Figura 75.** Secuencia sintética para epimerizar los centros estereogénicos C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> de la sinrotólida (**29**).

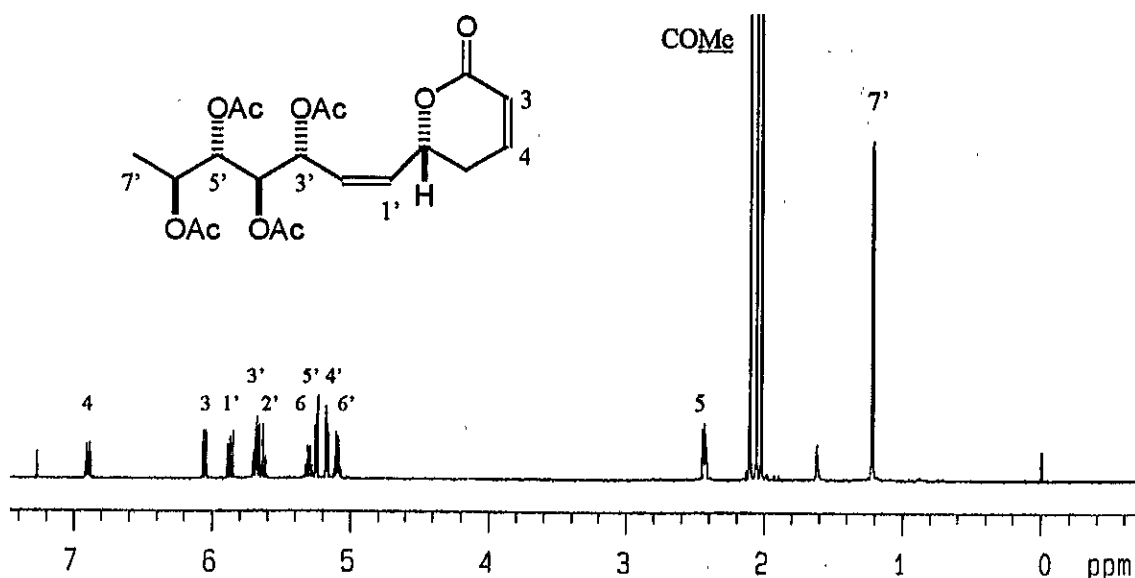
La sinrotólida (**29**) se acetiló parcialmente utilizando cantidades equimolares de anhídrido acético-piridina, la resolución de la mezcla de reacción mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (fig. 76) proporcionó cuatro constituyentes principales: la sinrotólida peracetilada (**114**, fig. 77), la 4'-acetilsinrotólida (**115**, fig. 78), la 5'-acetilsinrotólida (**116**, fig. 79) y la materia prima recuperada (**29**).



**Figura 76.** Cromatograma generado mediante CLAR de la mezcla de reacción obtenida durante la acetilación parcial de la sinrotólida (**29**). Condiciones cromatográficas: columna de sílica gel preparativa (ISCO 250 mm x 21.2 mm, 125 Å, tamaño de partícula 10 µm), fase móvil: *n*-hexano-AcOEt 1:4, velocidad de flujo = 5 mL/min. Asignación de los picos:  $t_R = 20.7$  min, peracetilsinrotólida (**114**);  $t_R = 25.1$  min, 5'-acetilsinrotólida (**116**);  $t_R = 26.8$  min, 4'-acetilsinrotólida (**115**);  $t_R = 35.9$  min, sinrotólida (**29**).

La monoacetilación de los compuestos **115** y **116** se estableció a través del análisis de sus espectros de RMN  $^1\text{H}$  (fig. 78 y 79, respectivamente). En primer lugar, se observaron señales sólo para tres grupos acetoxilo ( $\delta$  2.12, 2.08 y 2.02) y una señal que integraba para un protón, cuyo desplazamiento químico correspondía a un metino geminal a

un grupo hidroxilo centradas en  $\delta$  3.80 (**115**) y 3.92 (**116**), además de las señales para los hidroxilos ( $\delta$  2.82 y 2.62, respectivamente). La posición del grupo acetato en  $C_4'$  o  $C_5'$  se estableció con el registro de los espectros  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY; en el compuesto **115**, la señal centrada en  $\delta$  3.80 (ddd,  $J = 9.3, 5.5$  y  $2.6$ ,  $\text{H}_{5'}$ ) presentó cuadros de conectividad con la señal para  $\text{H}_{6'}$  ( $\delta$  4.90, dc,  $J = 6.6$  y  $2.6$ ) y con la señal centrada en  $\delta$  5.08 (dd,  $J = 9.3$  y  $2.8$ ,  $\text{H}_4$ ). Por lo tanto, el compuesto **115** corresponde a la 4'-acetilsinrotólida. En el compuesto **116**, que debería corresponder a la 5'-acetilsinrotólida, el hidroximetino ( $\delta$  3.92, ddd,  $J = 9.4, 4.5$  y  $1.0$ ) presentó interacciones con las señales centradas en  $\delta$  5.53 (ddd,  $J = 9.4, 4.5, 1.0$ ,  $\text{H}_{3'}$ ) y  $\delta$  5.06 (dd,  $J = 7.2$  y  $3.9$ ,  $\text{H}_{5'}$ ). La interacción de esta última señal centrada en  $\delta$  5.23 (dc,  $J = 6.5$  y  $3.9$ ) permitió asignar el desplazamiento químico del protón  $\text{H}_{6'}$ . Así, se ratificó la posición del acetoxilo adicional en  $C_5'$ . El resto de las señales se asignaron siguiendo los cuadros de conectividad y a través del registro del espectro HMQC se asignaron las señales de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Cuadros 24 y 25).



**Figura 77.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la sinrotólida peracetilada (**114**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

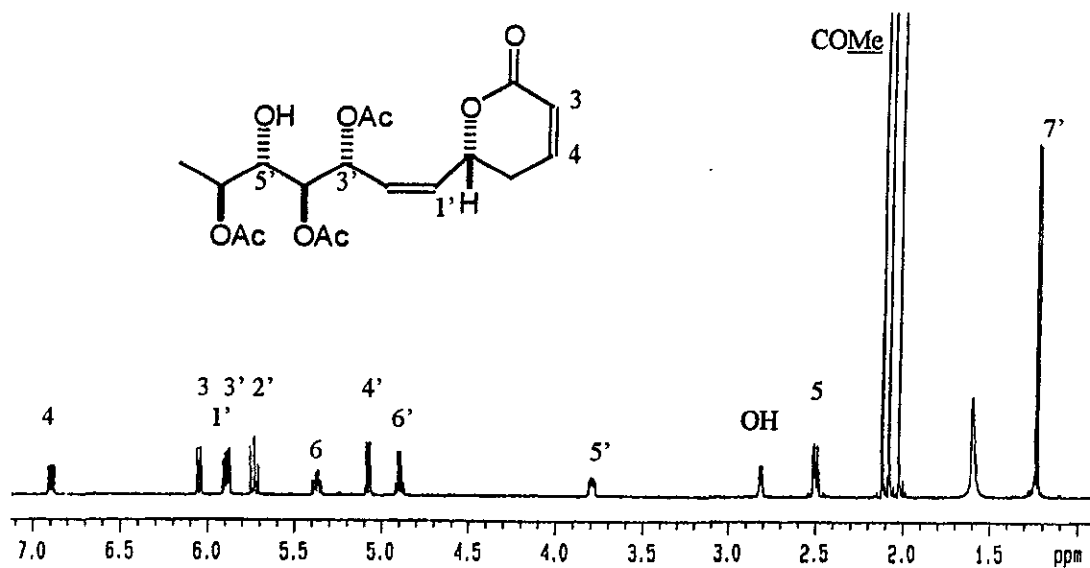


Figura 78. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la 4'-acetilsinrotólida (115) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

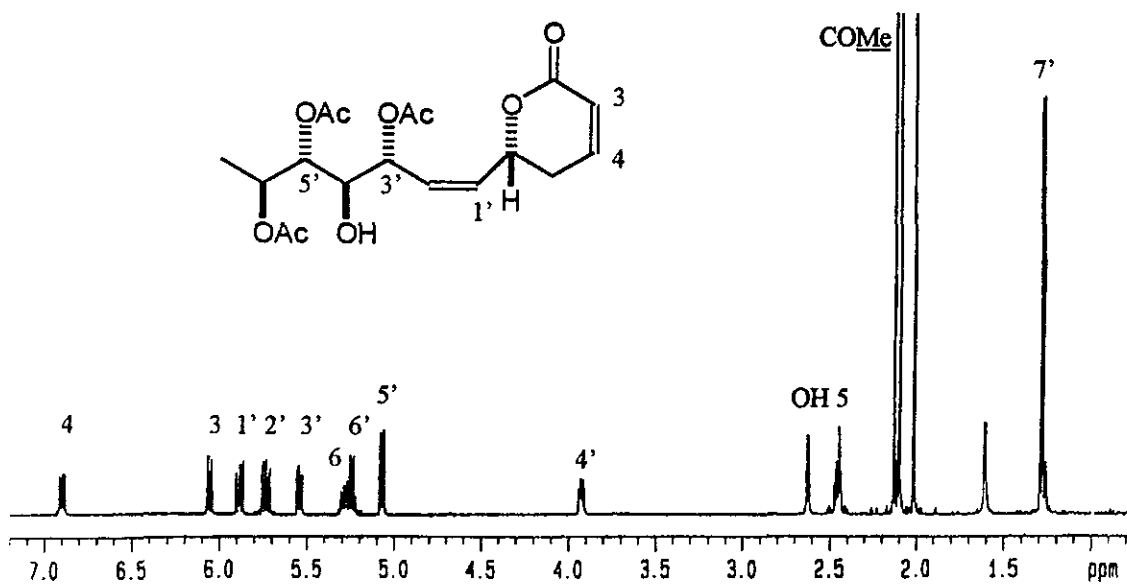


Figura 79. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la 5'-acetilsinrotólida (116) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Cuadro 24.** Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  para los compuestos 114-116.<sup>a</sup>

Posición	114	115	116
3	6.06 ddd (10.0, 2.0, 2.0)	6.04 ddd (9.7, 1.8, 1.8)	6.04 ddd (9.8, 2.2, 1.4)
4	6.90 ddd (10.0, 4.5, 4.0)	6.90 ddd (9.7, 4.8, 3.5)	6.89 ddd (9.8, 5.2, 3.2)
5ax	2.45-2.42 m	2.49-2.40 m	2.48-2.42 m
5ec	2.45-2.42 m	2.49-2.40 m	2.48-2.42 m
6	5.30 dddd (8.5, 8.5, 7.5, 1.0)	5.38 dddd (9.5, 8.1, 7.1, 1.1)	5.27 dddd (9.0, 8.1, 7.5, 1.0)
1'	5.87 ddd (10.5, 8.5, 0.5)	5.90 ddd (11.3, 8.1, 0.7)	5.88 ddd (11.3, 8.1, 1.0)
2'	5.64 ddd (10.5, 9.5, 1.0)	5.73 ddd (11.3, 10.0, 1.1)	5.72 ddd (11.3, 9.4, 1.0)
3'	5.69 ddd (9.5, 4.0, 0.5)	5.80 ddd (10.0, 2.8, 0.7)	5.53 ddd (9.4, 4.5, 1.0)
4'	5.25 dd (7.0, 4.0)	5.08 dd (9.3, 2.8)	3.92 ddd (7.2, 5.5, 4.5)
5'	5.18 dd (7.0, 4.0)	3.80 ddd (9.3, 5.5, 2.6)	5.06 dd (7.2, 3.9)
6'	5.10 dc (6.5, 4.0)	4.90 dc (6.6, 2.6)	5.23 dc (6.5, 3.9)
7'	1.22 d (6.5)	1.24 d (6.6)	1.28 d (6.5)
OAc	2.11 s 2.11 s 2.06 s 2.03 s	2.12 s 2.08 s 2.03 s	2.12 s 2.09 s 2.01 s
OH	-----	2.82 d (5.5)	2.62 d (5.5)

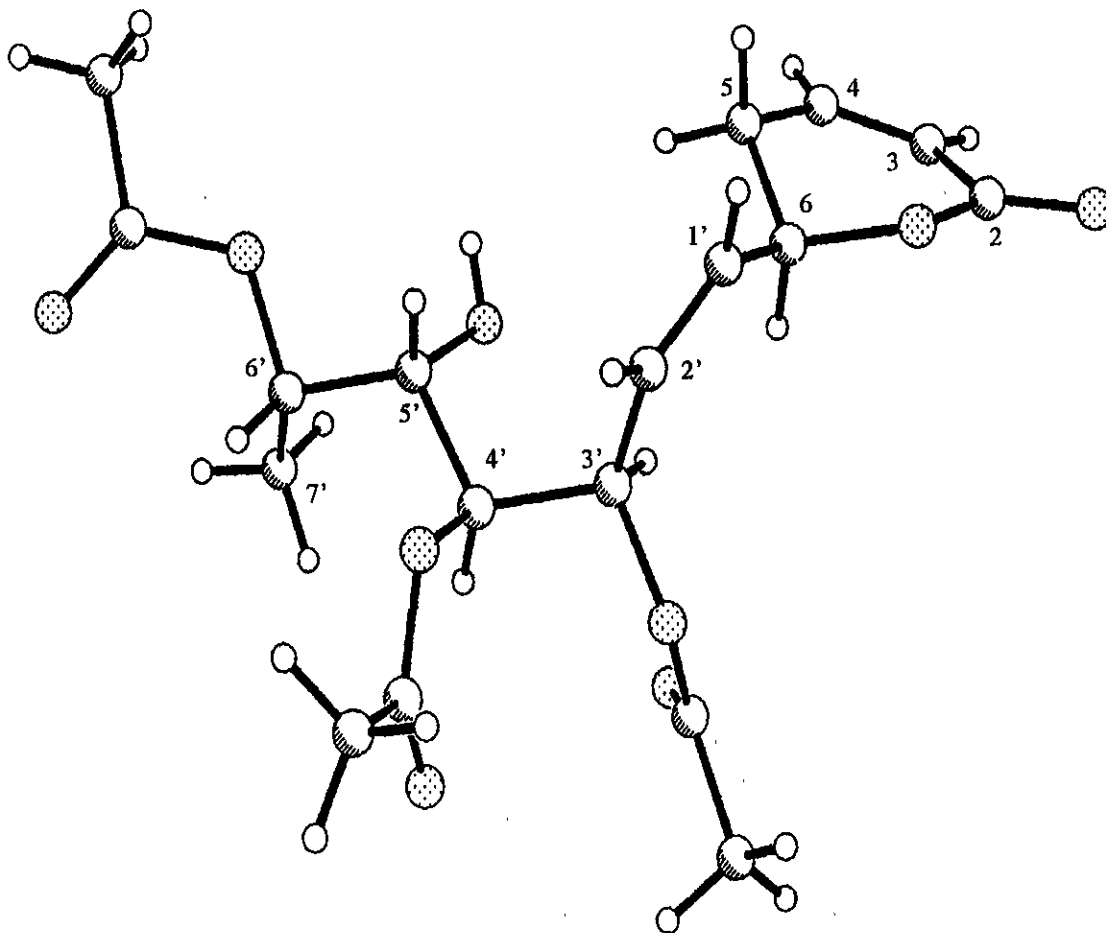
<sup>a</sup>CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz (*J* en Hz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $\delta$  en ppm.

Cuadro 25. Desplazamientos químicos en la RMN  $^{13}\text{C}$  para los compuestos 114-116.<sup>a</sup>

Posición	114	115	116
2	163.1	163.6	163.6
3	121.5	121.3	121.5
4	144.3	144.9	144.6
5	29.7	29.5	29.5
6	73.7	74.2	74.1
1'	133.0	132.8	132.9
2'	126.3	125.8	126.9
3'	67.7	68.5	70.2
4'	71.6	72.3	72.0
5'	71.1	71.2	72.9
6'	66.6	72.0	69.0
7'	15.0	14.2	14.6
<u>COCH<sub>3</sub></u>	21.1	21.2	21.1
	21.0	20.9	21.0
	20.9	20.9	20.9
	20.9		
<u>COCH<sub>3</sub></u>	170.0	170.9	170.2
	169.5	169.7	170.2
	169.5	169.7	169.9
	169.4		

<sup>a</sup> $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC y HMBC,  $\delta$  en ppm.

La figura 80 ilustra la proyección generada mediante cristalografía de rayos X de la 4'-acetilsinrotólida (115). Esta conformación en estado sólido presenta el anillo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona en *pseudo*-silla, al protón  $H_6$  en una orientación  $\alpha$  axial, la cadena lateral adopta una posición *pseudo*-ecuatorial,  $H_{3'}$ - $H_{4'}$  y  $H_{5'}$ - $H_{6'}$  se encuentran en una relación *sinclinal* y  $H_{4'}$ - $H_{5'}$  *anti*-periplanar.



**Figura 80.** Proyección generada mediante cristalografía de rayos X de la 4'-acetilsinrotólida (115).

Se realizó la oxidación de los compuestos **115** y **116** utilizando trióxido de cromo para generar los derivados **117** (fig. 81) y **118**, respectivamente. El derivado **118** se obtuvo formando una mezcla con el compuesto **119** al ocurrir una transesterificación vía un equilibrio ceto-enólico favorecida para la formación de una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Los desplazamientos químicos generados en la RMN  $^1\text{H}$  para estos tres compuestos se presentan en el cuadro 26.

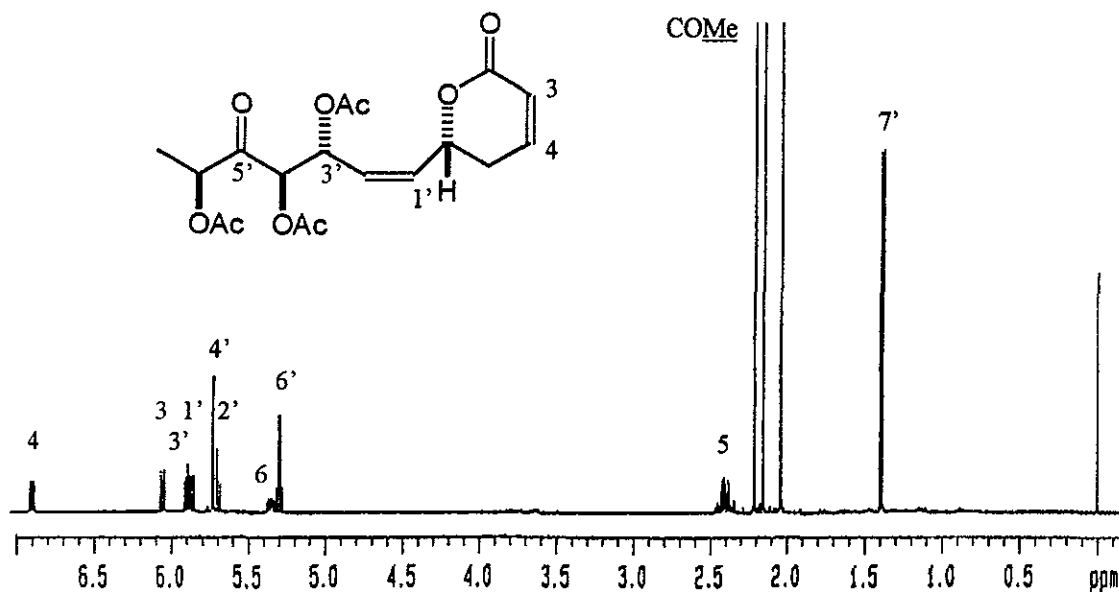
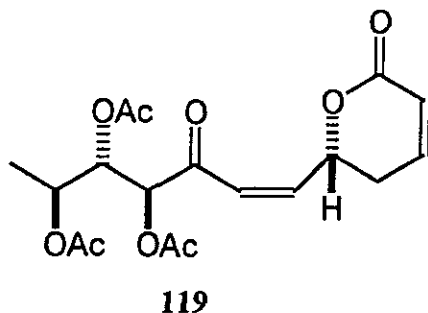


Figura 81. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la 4'-acetil-5'-oxosinrotólida (**117**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

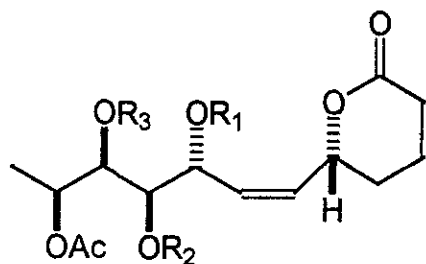


**Cuadro 26.** Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  para los compuestos 117-119.<sup>a</sup>

Posición	117	118	119
3	6.03 ddd (9.5, 2.5, 1.0)	6.07 dd (9.8, 2.6, 1.1)	6.05 ddd (9.5, 2.6, 1.0)
4	6.87 ddd (9.5, 5.5, 2.5)	6.92 ddd (9.8, 5.2, 2.7)	6.91 ddd (9.5, 4.0, 2.8)
5 <sub>ax</sub>	2.34 dddd (18.5, 11.0, 2.5, 2.5)	2.45 dddd (18.5, 11.1, 2.7, 2.6)	2.39 dddd (18.5, 11.7, 2.8, 2.6)
5 <sub>ec</sub>	2.41 dddd (18.5, 5.5, 5.0, 1.0)	2.53 dddd (18.5, 5.2, 5.2, 1.1)	2.75 dddd (18.5, 6.0, 4.0, 1.0)
6	5.32 dddd (11.0, 8.5, 5.0, 1.0)	5.32 dddd (11.1, 8.4, 5.2, 1.2)	5.76 dddd (11.7, 6.9, 6.0, 1.1)
1'	5.85 ddd (11.0, 8.5, 0.5)	5.96 ddd (11.1, 8.4, 1.1)	6.47 dd (11.7, 6.9)
2'	5.68 ddd (11.0, 10.0, 1.0)	5.67 ddd (11.1, 8.8, 1.2)	6.53 dd (11.7, 1.1)
3'	5.87 ddd (10.0, 3.5, 0.5)	5.91 dd (8.8, 1.1)	-----
4'	5.70 d (3.5)	-----	5.74 d (3.8)
5'	-----	5.61 d (3.9)	5.89 dd (3.8, 3.6)
6'	5.27 c (7.0)	5.26 dc (6.6, 3.9)	5.32 dc (7.1, 3.6)
7'	1.36 d (7.0)	1.25 d (6.6)	1.42 d (7.1)
OAc	2.18 s 2.13 s 2.01 s	2.20 s 2.19 s 2.04 s	2.19 s 2.12 s 1.96 s

<sup>a</sup>CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz (*J* en Hz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $\delta$  en ppm.

Se procedió a la reducción del compuesto **117** empleando borohidruro de sodio. Al analizar mediante CLAR esta mezcla de reducción, se observaron tres picos principales que se lograron separar. El registro de RMN  $^1\text{H}$  estableció que el constituyente con  $t_{\text{R}} = 29.6$  min correspondió a la 5'-*epi*-acetilsinrotólida (**121**, fig. 82) generada por la transesterificación del grupo acetato en  $\text{C}_4$  a la posición  $\text{C}_5$  en la 4'-acetil-5'-*epi*-sinrotólida (**120**), uno de los productos de reacción esperado de la reducción del grupo ceto en el derivado **117** (ver fig. 75); el segundo pico ( $t_{\text{R}} = 26.3$  min) correspondió a una mezcla de los compuestos **115** y **122**, este último generado por una transesterificación a partir del compuesto **120** ó **121**; y el pico con  $t_{\text{R}} = 24.7$  min contenía al compuesto **116** generado por una transposición del grupo acetato en el producto de reducción **115**. La acetilación del epímero **121** proporcionó el peracetato de la 5-*epi*-sinrotólida (**123**, fig. 83). Los desplazamientos químicos generados en la RMN  $^1\text{H}$  para los compuestos **121-123** se presentan en el cuadro 27. En el cuadro 28 se indican los desplazamientos químicos generados en la RMN  $^{13}\text{C}$  para los compuestos **117**, **121** y **123**.



	$\text{R}_1$	$\text{R}_2$	$\text{R}_3$
<b>120</b>	Ac	Ac	H
<b>121</b>	Ac	H	Ac
<b>122</b>	H	Ac	Ac
<b>123</b>	Ac	Ac	Ac

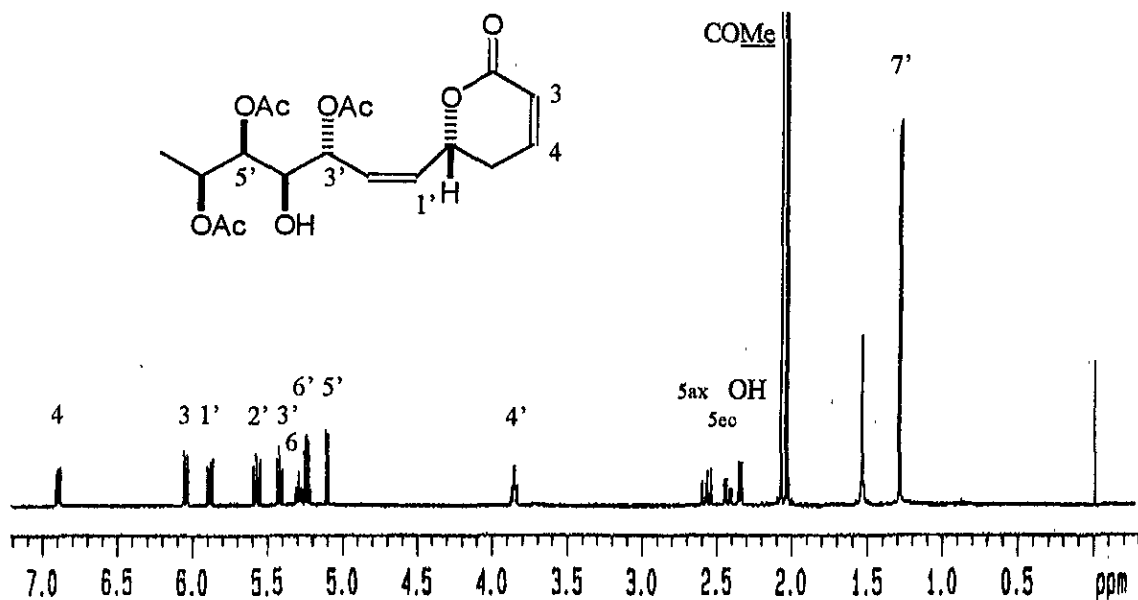


Figura 82. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la 5'-*epi*-acetilsinrotólida (121) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

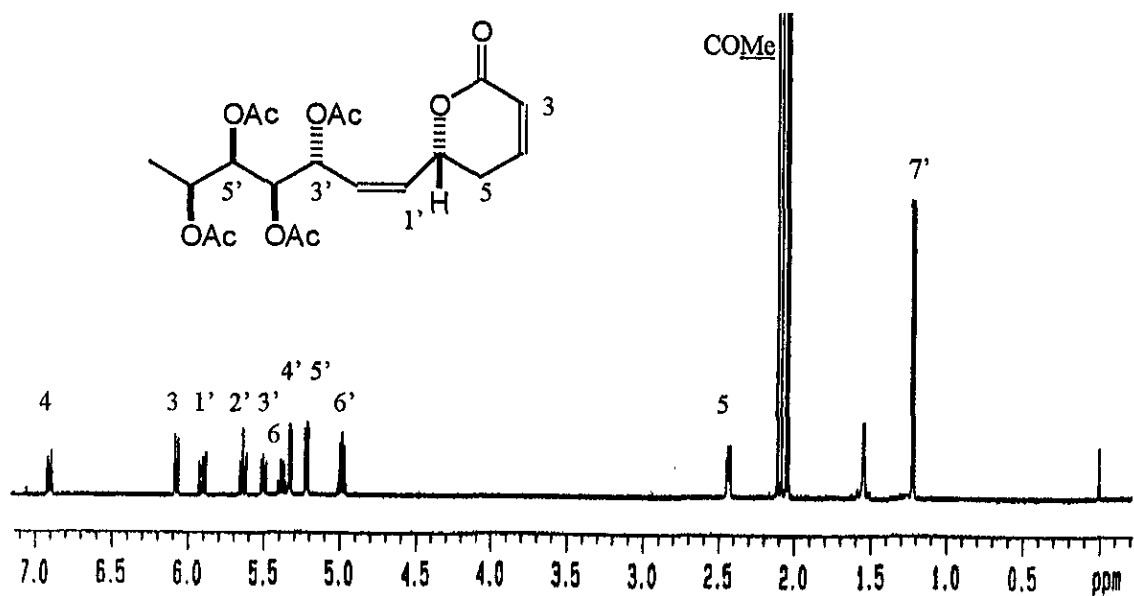


Figura 83. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la 5'-*epi*-sinrotólida peracetilada (123) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Cuadro 27. Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  para los compuestos 121-123.<sup>a</sup>

Posición	121	122	123
3	6.05 ddd (10.0, 2.5, 1.0)	6.06 ddd (10.0, 2.0, 2.0)	6.07 ddd (10.0, 2.0, 2.0)
4	6.90 ddd (10.0, 6.0, 2.5)	6.89 ddd (10.0, 4.5, 3.0)	6.90 ddd (10.0, 4.0, 5.0)
5ax	2.58 dddd (18.5, 11.5, 2.5, 2.5)	2.44-2.41 m	2.44-2.42 m
5ec	2.44 dddd (18.5, 6.0, 4.0, 1.0)	2.44-2.41 m	2.44-2.42 m
6	5.30 dddd (11.5, 7.5, 4.0, 1.0)	5.38 dddd (9.0, 8.0, 7.5, 1.1)	5.37 dddd (8.0, 8.0, 8.0, 1.5)
1'	5.89 ddd (11.5, 7.5, 0.7)	5.76 ddd (11.0, 9.0, 1.0)	5.90 ddd (11.5, 8.0, 1.0)
2'	5.58 ddd (11.5, 9.5, 1.0)	5.68 ddd (11.0, 8.5, 1.0)	5.63 ddd (11.5, 10.0, 1.5)
3'	5.43 ddd (9.5, 8.3, 0.7)	4.45 ddd (8.5, 4.0, 1.0)	5.50 ddd (10.0, 6.5, 1.0)
4'	3.86 ddd (8.3, 8.3, 2.5)	5.08 dd (7.5, 3.0)	5.32 dd (6.5, 4.0)
5'	5.11 dd (7.0, 2.5)	5.17 dd (7.5, 6.5)	5.21 dd (7.0, 4.0)
6'	5.25 dc (7.0, 6.5)	5.03 dc (7.5, 6.5)	4.98 dc (7.0, 6.5)
7'	1.29 d (6.5)	1.25 d (6.5)	1.21 d (6.5)
OAc	2.08 s 2.05 s 2.03 s	2.14 s 2.09 s 2.04 s	2.10 s 2.08 s 2.05 s 2.03 s
OH	2.35 d (8.3)	2.80 d (4.0)	----

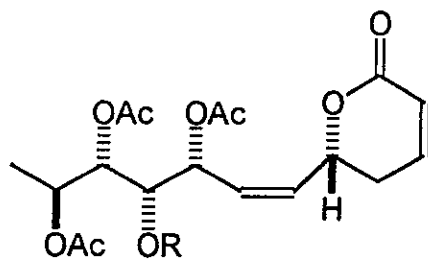
<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz ( $J$  en Hz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $\delta$  en ppm.

**Cuadro 28.** Desplazamientos químicos en la RMN  $^{13}\text{C}$  para los compuestos 117, 121 y 123.<sup>a</sup>

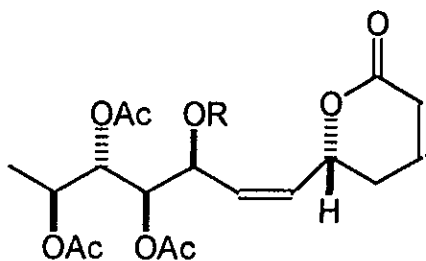
Posición	117	121	123
2	163.6	163.6	163.6
3	121.5	121.4	121.8
4	144.6	144.8	144.0
5	29.2	29.7	29.9
6	73.7	74.6	73.7
1'	133.4	132.9	134.4
2'	125.0	128.3	126.3
3'	67.3	68.4	66.1
4'	75.0	71.3	70.7
5'	205.3	72.8	71.7
6'	73.0	69.9	68.6
7'	16.1	16.6	16.3
<u>COCH<sub>3</sub></u>	20.8	21.1	20.8
	20.7	20.9	20.8
	20.5	20.6	20.6
			21.0
<u>COCH<sub>3</sub></u>	170.5	170.0	170.5
	170.0	170.0	170.3
	169.8	169.8	170.3
			169.4

<sup>13</sup>C (125.7 MHz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC,  $\delta$  en ppm.

La mezcla de oxidación del compuesto **116** se redujo empleando también borohidruro de sodio para generar los epímeros monoacetilados (**124** y **125**) y el compuesto de partida (**116**). Esta mezcla se acetiló y purificó por CLAR para generar los peracetatos **114**, **126** y **127**. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de la 4'-*epi*-sinrotólida (**126**) y de la 3'-*epi*-sinrotólida (**127**) peracetiladas se ilustran en las figuras 84 y 85. En el cuadro 29 se presentan los desplazamientos químicos registrados en la RMN  $^1\text{H}$  de los compuestos **126** y **127**.



	<b>R</b>
<b>124</b>	<b>H</b>
<b>126</b>	<b>Ac</b>



	<b>R</b>
<b>125</b>	<b>H</b>
<b>127</b>	<b>Ac</b>

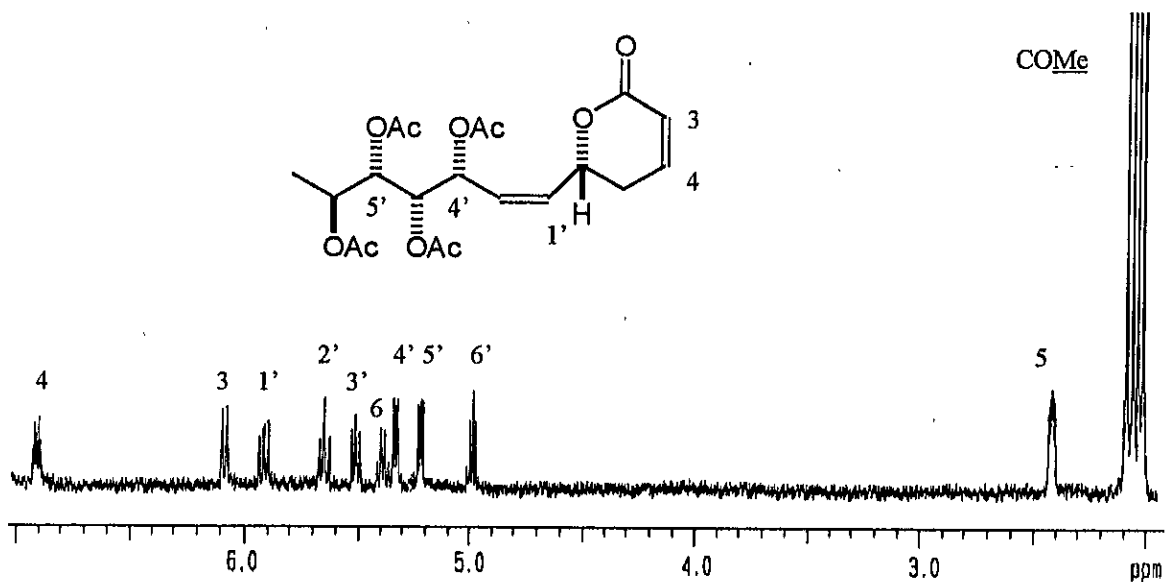


Figura 84. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la 4'-*epi*-sinrotólida peracetilada (126) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

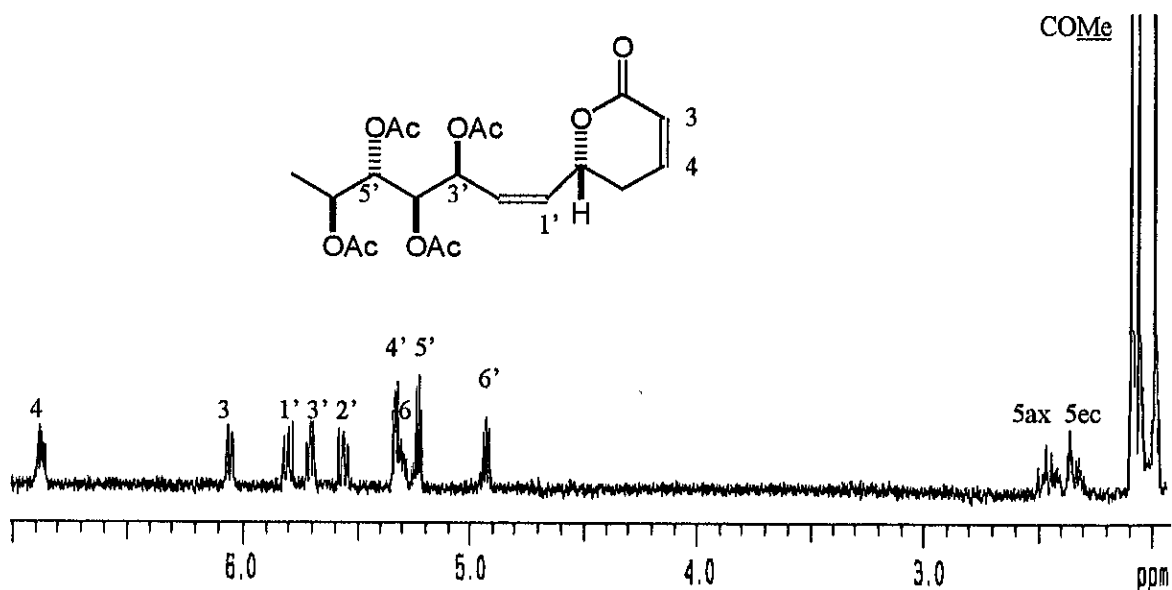


Figura 85. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la 3'-*epi*-sinrotólida peracetilada (127) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

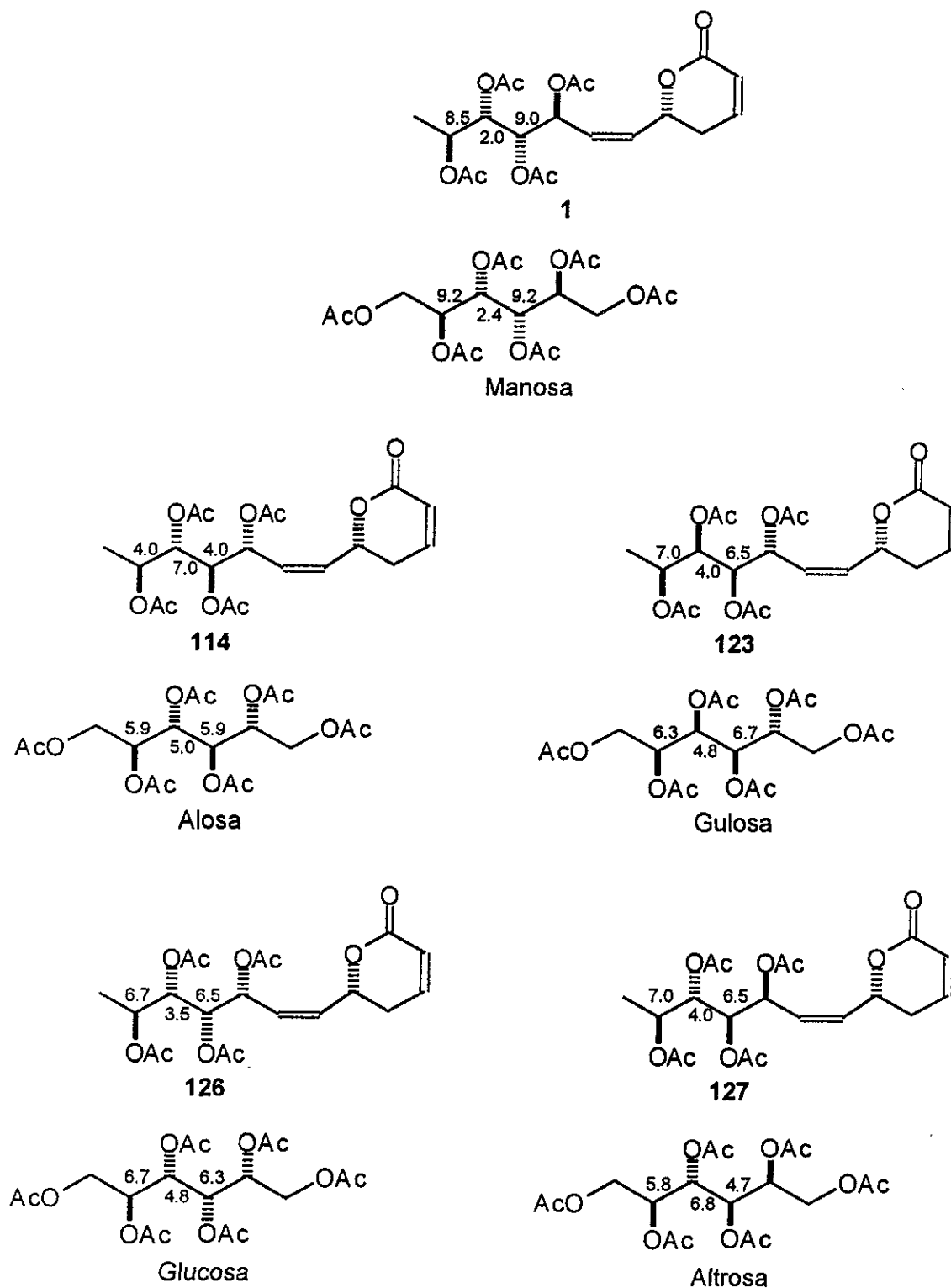
Cuadro 29. Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  para los compuestos 126 y 127.<sup>a</sup>

Posición	126	127
3	6.07 ddd (10.0, 2.0, 1.7)	6.06 ddd (9.5, 2.5, 1.5)
4	6.90 ddd (10.0, 4.5, 4.0)	6.88 ddd (9.5, 5.9, 2.4)
5ax	2.44-2.41 m	2.47 dddd (18.0, 11.5, 2.5, 2.4)
5ec	2.44-2.41 m	2.36 dddd (18.0, 6.0, 6.0, 1.1)
6	5.38 dddd (8.0, 8.0, 8.0, 1.0)	5.29 dddd (11.5, 8.5, 6.0, 1.0)
1'	5.90 ddd (11.0, 8.0, 0.5)	5.80 ddd (11.5, 8.5, 0.5)
2'	5.63 ddd (11.0, 10.0, 1.0)	5.56 ddd (11.5, 8.5, 1.0)
3'	5.49 ddd (10.0, 6.5, 0.5)	5.70 ddd (8.5, 6.5, 0.5)
4'	5.32 dd (6.5, 3.5)	5.33 dd (6.5, 4.5)
5'	5.21 dd (6.7, 3.5)	5.23 dd (5.5, 4.5)
6'	4.98 dc (6.7, 6.5)	4.94 dc (6.5, 5.5)
7'	1.22 d (6.5)	1.22 d (6.5)
OAc	2.11 s 2.08 s 2.05 s 2.03 s	2.12s 2.09 s 2.09 s 2.02 s

<sup>a</sup>CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz (*J* en Hz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $\delta$  en ppm.



En resumen, las secuencias de reacciones descritas anteriormente permitieron la obtención de tres epímeros de la sinrotólida peracetilada (114), *i. e.* los peracetatos de la 5'-*epi*-sinrotólida (123), la 4'-*epi*-sinrotólida (126, *cis*-anamarina) y la 3'-*epi*-sinrotólida (127). De esta manera, se generaron cuatro de las ocho posibilidades diastereoisoméricas para establecer la configuración de la cadena lateral de la espicigerólida (1) (fig. 37, isómeros B, C, D y E, respectivamente). En la figura 86 se ilustra la comparación de las constantes de acoplamiento de la espicigerólida (1) y los derivados de la sinrotólida con los modelos de Masamune y colaboradores (1986). Estos resultados representan una evidencia para descartar los diastereoisómeros C y E. Para los diastereoisómeros 123 y 126, la correlación establecida mediante la comparación de las constantes de acoplamiento vecinales ( $^3J_{H-H}$ ) para las señales de la cadena lateral con las descritas para los modelos de glucosa y alosa permitió verificar la configuración de los centros quirales de la porción acíclica. Sin embargo, la comparación de los diastereoisómeros 114 y 127 con los modelos de alosa y altrosa evidenció una correlación poco eficiente que posiblemente sea una consecuencia de un equilibrio existente entre un gran número de posibilidades conformacionales de energía muy similar, cuya diferencia sea menor que el error existente en los cálculos tanto de mecánica molecular como en la ecuación de Altona. De esta manera, las  $^3J_{H-H}$  en estos diastereoisómeros representan valores promedio a diferencia de las constantes definidas para la espicigerólida (1) que resultan del predominio de dos conformaciones de mínima energía (ver fig. 73) con una contribución importante ( $n > 4\%$ ).



**Figura 86.** Comparación de las constantes de acoplamiento de la espicigerólida (1) con los derivados semisintéticos de la sinrotólida (29) y correlación con las constantes de acoplamiento para las aldohexosas reportadas por Masamune *et al.* (1986).

**Cuadro 30.** Parámetros registrados para cada uno de los confórmeros minimizados de la sinrotólida peracetilada (114).

Confórmero	$\Delta H_f$ (kcal/mol)	$J_{3',4'}$	$J_{4',5'}$	$J_{5',6'}$	$n$	$nJ_{3',4'}$	$nJ_{4',5'}$	$nJ_{5',6'}$
<b>1 (AAA)</b>	<b>-428.53</b>	<b>1.45</b>	<b>0.83</b>	<b>1.53</b>	<b>0.0468</b>	<b>0.0679</b>	<b>0.0389</b>	<b>0.0717</b>
<b>2 (AAB)</b>	<b>-428.93</b>	<b>1.74</b>	<b>1.62</b>	<b>9.28</b>	<b>0.0920</b>	<b>0.1600</b>	<b>0.1490</b>	<b>0.8540</b>
3 (AAC)	-425.29	1.80	0.82	2.75	0.0002	0.0003	0.0002	0.0005
4 (ABA)	-428.15	2.44	9.79	0.97	0.0247	0.0602	0.2410	0.0239
<b>5 (ABB)</b>	<b>-429.24</b>	<b>2.09</b>	<b>9.78</b>	<b>8.88</b>	<b>0.1552</b>	<b>0.3250</b>	<b>1.5200</b>	<b>1.3800</b>
<b>6 (ABC)</b>	<b>-429.13</b>	<b>2.1</b>	<b>9.76</b>	<b>2.46</b>	<b>0.1289</b>	<b>0.2710</b>	<b>1.2600</b>	<b>0.3170</b>
10 (BAA)	-427.88	9.38	1.72	4.61	0.0156	0.1470	0.0269	0.0721
<b>11 (BAB)</b>	<b>-428.89</b>	<b>9.42</b>	<b>1.23</b>	<b>9.14</b>	<b>0.0860</b>	<b>0.8100</b>	<b>0.1060</b>	<b>0.7860</b>
12 (BAC)	-425.99	9.42	1.36	2.08	0.0006	0.0059	0.0008	0.0013
13 (BBA)	-426.65	9.14	9.79	0.9	0.0019	0.0179	0.0192	0.0017
14 (BBB)	-427.36	9.2	9.31	9.29	0.0065	0.0598	0.0605	0.0604
<b>15 (BBC)</b>	<b>-428.75</b>	<b>9.18</b>	<b>9.79</b>	<b>1.56</b>	<b>0.0679</b>	<b>0.6230</b>	<b>0.6650</b>	<b>0.1060</b>
<b>17 (BCB)</b>	<b>-429.38</b>	<b>9.39</b>	<b>1.08</b>	<b>9.28</b>	<b>0.1966</b>	<b>1.8500</b>	<b>0.2120</b>	<b>1.8300</b>
18 (BCC)	-427.46	9.24	2.54	2.22	0.0077	0.0711	0.0195	0.0171
19 (CAA)	-428.14	1.01	2.89	2.14	0.0235	0.0238	0.0681	0.0504
20 (CAB)	-427.18	0.95	3.23	9.28	0.0046	0.0044	0.0150	0.0432
21 (CAC)	-424.73	1.20	3.17	1.08	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001
22 (CBA)	-427.94	1.27	8.85	2.41	0.0173	0.0220	0.1530	0.0417
<b>23 (CBB)</b>	<b>-428.55</b>	<b>1.31</b>	<b>8.62</b>	<b>9.21</b>	<b>0.0485</b>	<b>0.0635</b>	<b>0.4180</b>	<b>0.4460</b>
24 (CBC)	-427.78	1.22	9.24	1.96	0.0132	0.0161	0.1220	0.0259
<b>26 (CCB)</b>	<b>-428.92</b>	<b>3.41</b>	<b>2.91</b>	<b>8.91</b>	<b>0.0905</b>	<b>0.3090</b>	<b>0.2630</b>	<b>0.8060</b>
27 (CCC)	-425.57	2.59	2.39	2.28	0.0003	0.0008	0.0007	0.0001
Sumatoria					1.00	4.76	5.20	6.73

Esta hipótesis se ilustra claramente con el equilibrio conformacional de la sinrotólida peracetilada (114). En el cuadro 30 se presentan los resultados generados mediante la minimización energética de los 22 conformeros de mayor estabilidad. Esta aproximación permitió determinar la existencia de por lo menos nueve rotámeros de mínima energía ( $n > 4\%$ ) (fig. 87). Sin embargo, la diferencia energética entre todos los conformeros presentes en la población de esta 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona no es tan acentuada como en el caso de la espicigerólida (1).

### 6.3. Caracterización de los diterpenos de tipo labdano (2-8).

El labdano mayoritario 2 se aisló como un aceite incoloro con una rotación óptica positiva ( $[\alpha]_D +58$ ). Su espectro de IR presentó absorciones asociadas con la presencia de los grupos hidroxilo ( $\nu_{\max} 3368 \text{ cm}^{-1}$ ) y carbonilo ( $\nu_{\max} 1740 \text{ cm}^{-1}$ ). La acetilación parcial de este diterpeno proporcionó dos derivados idénticos a los productos naturales 3 y 4, que al ser sometidos a una peracetilación proporcionaron el mismo derivado (128;  $[\alpha]_D +20$ ) producido por la acetilación total de 2.

El espectro de masas (ionización química) sugirió la fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_5$ , la cual permitía cinco grados de insaturación. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y el experimento DEPT (fig. 88; Cuadro 31) indicaron 20 carbonos con 30 protones enlazados directamente al núcleo diterpenoide, además de las señales para un grupo acetoxilo, dos dobles enlaces, uno exocíclico y una olefina trisustituída como parte de la cadena lateral.

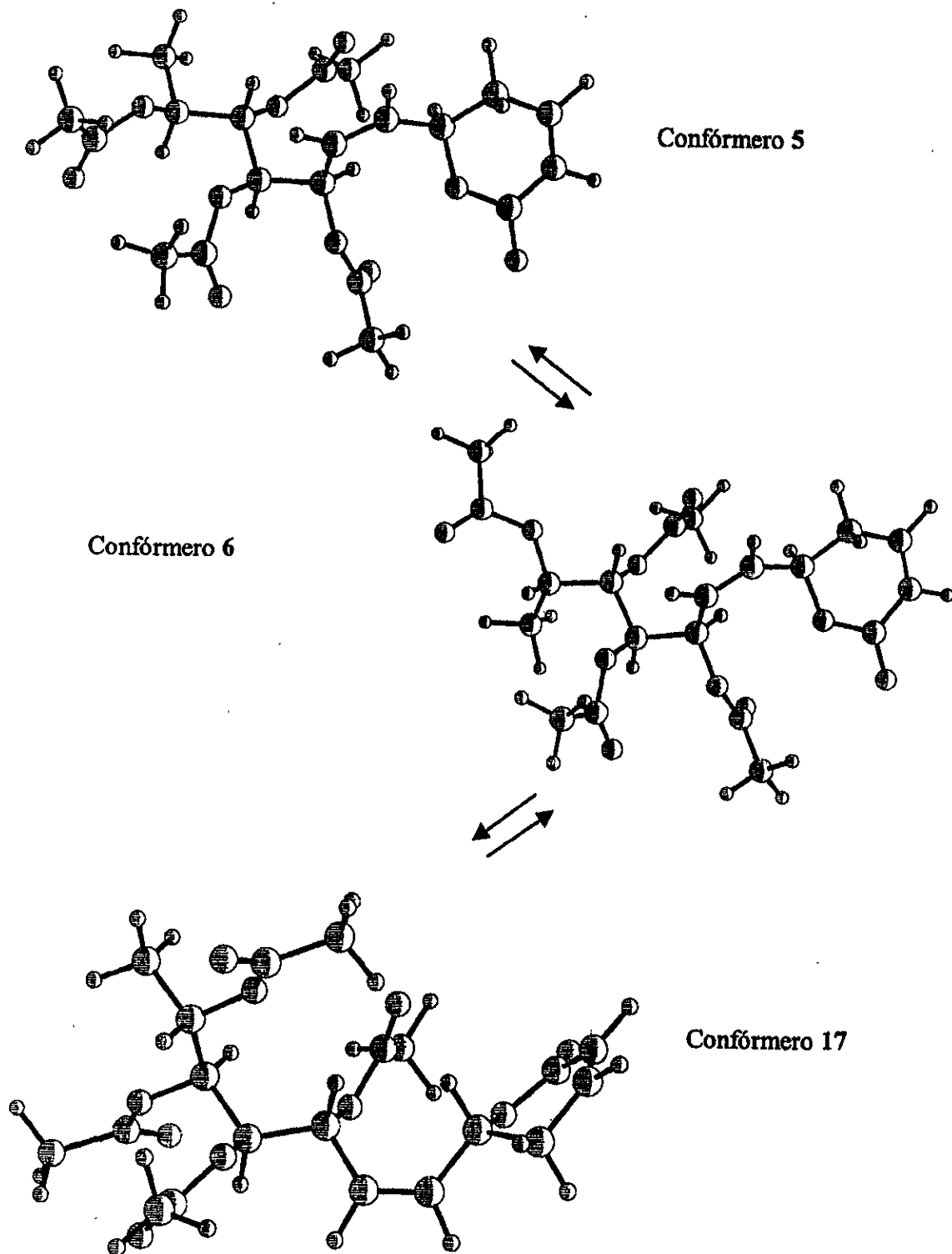


Figura 87. Equilibrio conformacional de la sinrotólida peracetilada (114).

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (fig. 89; Cuadro 31) se observaron las siguientes señales: cuatro singuletes para grupos metilo, correspondiendo uno al desplazamiento químico de un grupo acetato ( $\delta$  2.03), un segundo al de un grupo enlazado a un carbono insaturado ( $\delta$  1.71) y los dos restantes se identificaron como grupos terciarios ( $\delta$  1.03 y 0.70); un grupo hidroximetileno ( $\delta_{\text{H}}$  4.03, da,  $\text{H}_2$ -15;  $\delta_{\text{C}}$  59.0,  $\text{CH}_2$ -15) y dos grupos hidroximetinos ( $\delta_{\text{H}}$  3.90, m, 2H;  $\delta_{\text{C}}$  64.8, CH-2,  $\delta_{\text{C}}$  73.7, CH-7). Estas tres funciones alcohólicas se reconocieron inicialmente mediante los fragmentos de  $m/z$  363, 345 y 327 en el espectro de masas, indicando la pérdida consecutiva de tres moléculas de agua a partir del ión  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (Budzikiewicz *et al.*, 1964; Tschritzis y Jakupovic, 1990).

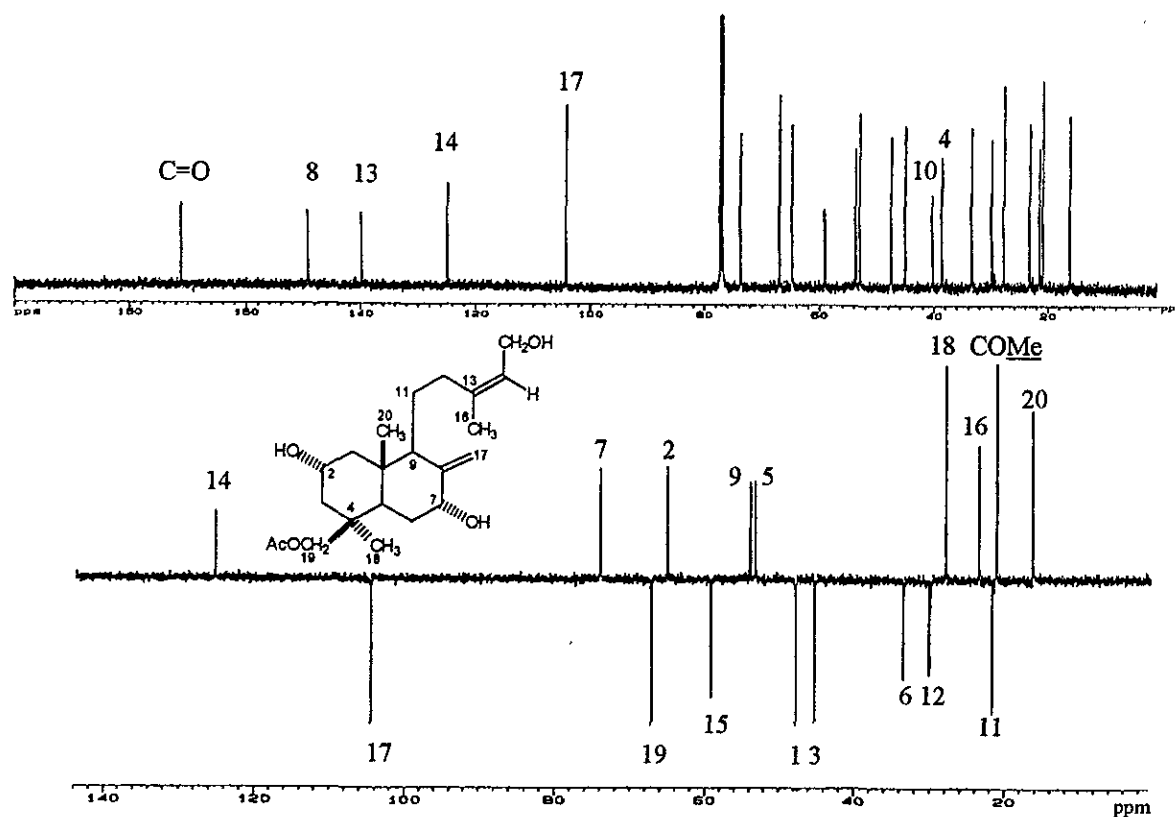


Figura 88. Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (trazo superior) y DEPT del compuesto 2.

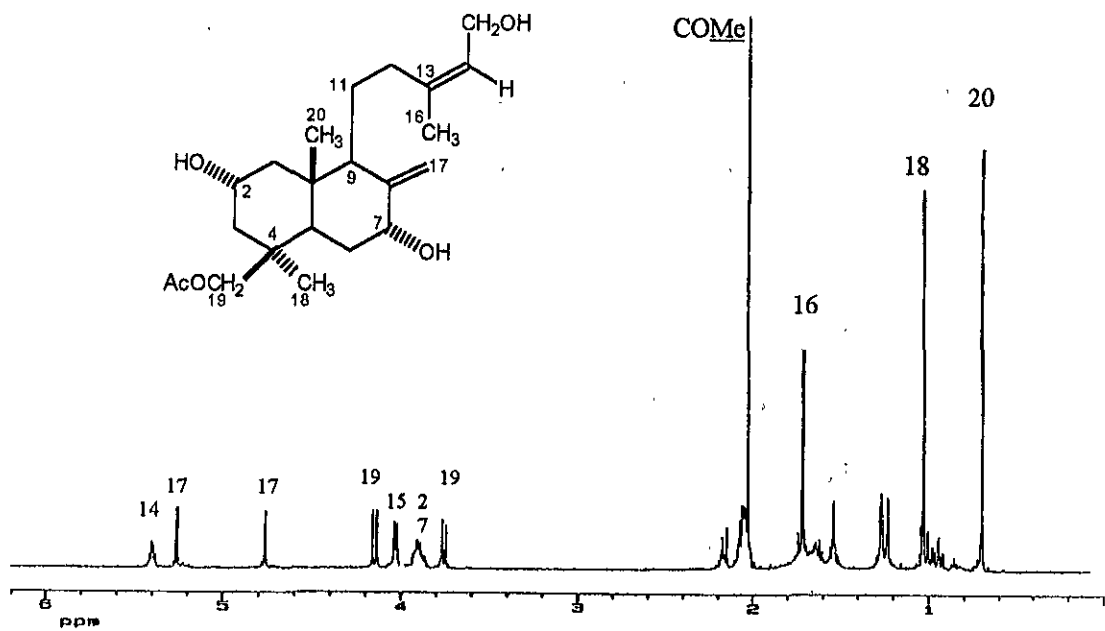


Figura 89. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 2 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

También se observaron las señales para dos protones diastereotópicos a  $\delta$  4.14 y 3.75 (AB, d,  $\text{H}_2$ -19,  $J = 11.1$  Hz), cuyo desplazamiento químico es característico de un grupo acetiloximetileno con una orientación axial ( $\delta_{\text{C}} 66.9$ ,  $\text{CH}_2$ -19) (Pereda-Miranda, 1986; O'Mathúna y Doskotch, 1994b). Esta funcionalidad se corroboró con el espectro de masas a través de la pérdida de una molécula de ceteno ( $-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ ,  $-42$  unidades de masa) a partir de los fragmentos de deshidratación para producir picos de  $m/z$  303, 285 y 267 (Kingston *et al.*, 1983).

**Cuadro 31.** Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (HMQC) para el compuesto 2. Correlaciones heteronucleares  $^2,^3J_{\text{C-H}}$  (HMBC).<sup>a</sup>

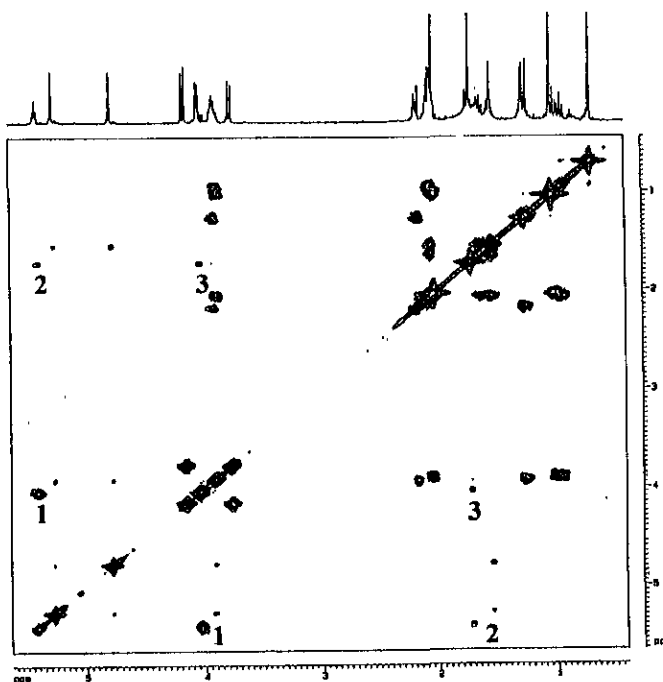
Posición	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ HMQC	Carbón correlacionado	
			HMBC	
			$^2J_{\text{C-H}}$	$^3J_{\text{C-H}}$
1	2.06 m 0.94 dd (11.5) <sup>b</sup>	47.6 t	2	3, 20
2	3.90 m	64.8 d	1, 3	
3	2.03 m 0.99 dd (12.0) <sup>b</sup>	45.1 t	2	1,18,19
4	-----	38.6 s	3, 5, 18, 19	
5	1.27 dd (4.0) <sup>b</sup>	53.0 d	6	1, 18, 20
6	2.16 m 1.28 m	33.4 t	5, 7	
7	3.90 m	73.7 d	6	17
8	-----	149.2 s	9, 17	6
9	1.53 dd (10.1) <sup>b</sup>	53.7 d	11	17, 20
10	-----	40.3 s	1, 5, 9, 20	
11	1.64 m 1.53 m	21.6 t	9, 12	
12	2.06 m 1.23 m	29.9 t		14, 16
13	-----	139.8 s	12, 16	11, 15
14	5.40 t (7.0)	124.9 d	15	12, 16
15	4.03 da (7.0)	59.0 t	14	
16	1.71 sa	23.3 c		12, 14
17	5.26 sa 4.76 sa	104.3 t		9
18	1.03 s	27.7 c		3, 5, 19
19	4.14 d (11.1) 3.75 d (11.1)	66.9 t		3, 5, 18
20	0.70 s	16.1 c		1, 5, 9
Me-CO-	2.03 s	20.9 c		
Me-CO-		171.1 s		

<sup>a</sup> $\text{CDCl}_3$ ,  $^1\text{H}$  [500 MHz ( $J$  en Hz)]. Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQCOSY.  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (optimizado para  $J_{\text{C-H}} = 8$  Hz);  $\delta$  en ppm. Las multiplicidades para los núcleos de  $^{13}\text{C}$  se establecieron mediante experimentos DEPT.

<sup>b</sup>Señal en forma de un triplete aproximado.



La sustitución de la cadena lateral se estableció mediante el acoplamiento observado en el espectro de RMN bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY entre el protón olefínico a  $\delta$  5.40 ( $\text{H}_{14}$ ) y los protones del hidroximetileno ( $\delta$  4.03,2  $\text{H}_{15}$ ), además del acoplamiento alílico con el grupo metilo vinílico ( $\delta$  1.71,  $\text{H}_{16}$ ) (fig. 90).



**Figura 90.** Espectro de RMN bidimensional homonuclear con filtro de doble coherencia cuántica (DQF-COSY) del compuesto **2**. Principales correlaciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ : **1**,  $\text{H}_{14}$ - $\text{H}_{15}$ ; **2**,  $\text{H}_{14}$ - $\text{H}_{16}$  y **3**,  $\text{H}_{15}$ - $\text{H}_{16}$ .

La naturaleza del esqueleto diterpénico se estableció por medio del análisis de los experimentos bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY, HMQC y HMBC, permitiendo la construcción de un sistema de *trans*-decalina con el metileno exocíclico en  $\text{C}_8$ , una cadena lateral enlazada en  $\text{C}_9$  y colocando el grupo acetiloximetileno en  $\text{C}_4$  para completar un esqueleto de labdano normal.

La posición de los dos grupos hidroxilo secundarios en el núcleo bicíclico de labdano se estableció utilizando el registro de RMN  $^1\text{H}$  del producto natural peracetilado (128, fig. 91) debido a que en el producto natural se presentó una sobreposición de las señales correspondientes a los hidrógenos geminales a estas funciones en forma de un multiplete centrado en  $\delta$  3.92-3.86. En el derivado peracetilado se observó una resolución adecuada para las señales en cuestión. La señal centrada en  $\delta$  4.95 (1H, dddd,  $J = 11.8, 4.1$  Hz) indicó dos interacciones vecinales de tipo diaxial ( $\phi \approx 180^\circ$ ,  $J_{1a-2, 2-3a} = 11.8$  Hz) y dos acoplamientos axial-ecuatorial ( $\phi \approx 60^\circ$ ,  $J_{1e-2, 2-3e} = 4.2$  Hz). Por lo tanto, el primer grupo hidroxilo secundario en el esqueleto labdánico correspondió al núcleo  $\text{C}_2$ , ya que esta posición sería la única que permitiría la multiplicidad observada y orientando al grupo hidroxilo  $\alpha$ -ecuatorial. El segundo hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo secundario presentó una multiplicidad en forma de triplete mediante las interacciones vecinales de tipo axial-ecuatorial ( $\phi \approx 60^\circ$ ) y diecuatorial ( $\phi \approx 60^\circ$ ) con un grupo metileno vecinal ( $J_{ae} = J_{ee} = 6$  Hz) y, de esta manera, se ubicó al hidroximetino en  $\text{C}_7$  por ser ésta la única posición restante del núcleo de decalina que proporcionaría esta multiplicidad. En tanto que la combinación de constantes de acoplamiento observada para esta señal permitieron establecer la orientación  $\alpha$ -axial para el grupo hidroxilo sustituyente.

La estereoquímica relativa para el centro estereogénico  $\text{C}_2$  se confirmó mediante las correlaciones observadas en el espectro NOESY (fig. 92). Así, las correlaciones para  $\text{H}_2$  con el grupo metilo  $\text{H}_{20}$  y con la señal para el protón a campo más bajo ( $\delta_{\text{H}} 4.14$ ) del grupo acetiloximetileno ( $\text{H}_2-19$ ) en  $\text{C}_4$  confirmaron su orientación axial en la cara  $\beta$  del sistema decalina. Finalmente, la geometría del doble enlace de la cadena lateral se estableció como (*Z*) a través de las interacciones nOe observadas entre  $\text{H}_{14}$  y el metilo  $\text{H}_{16}$ .

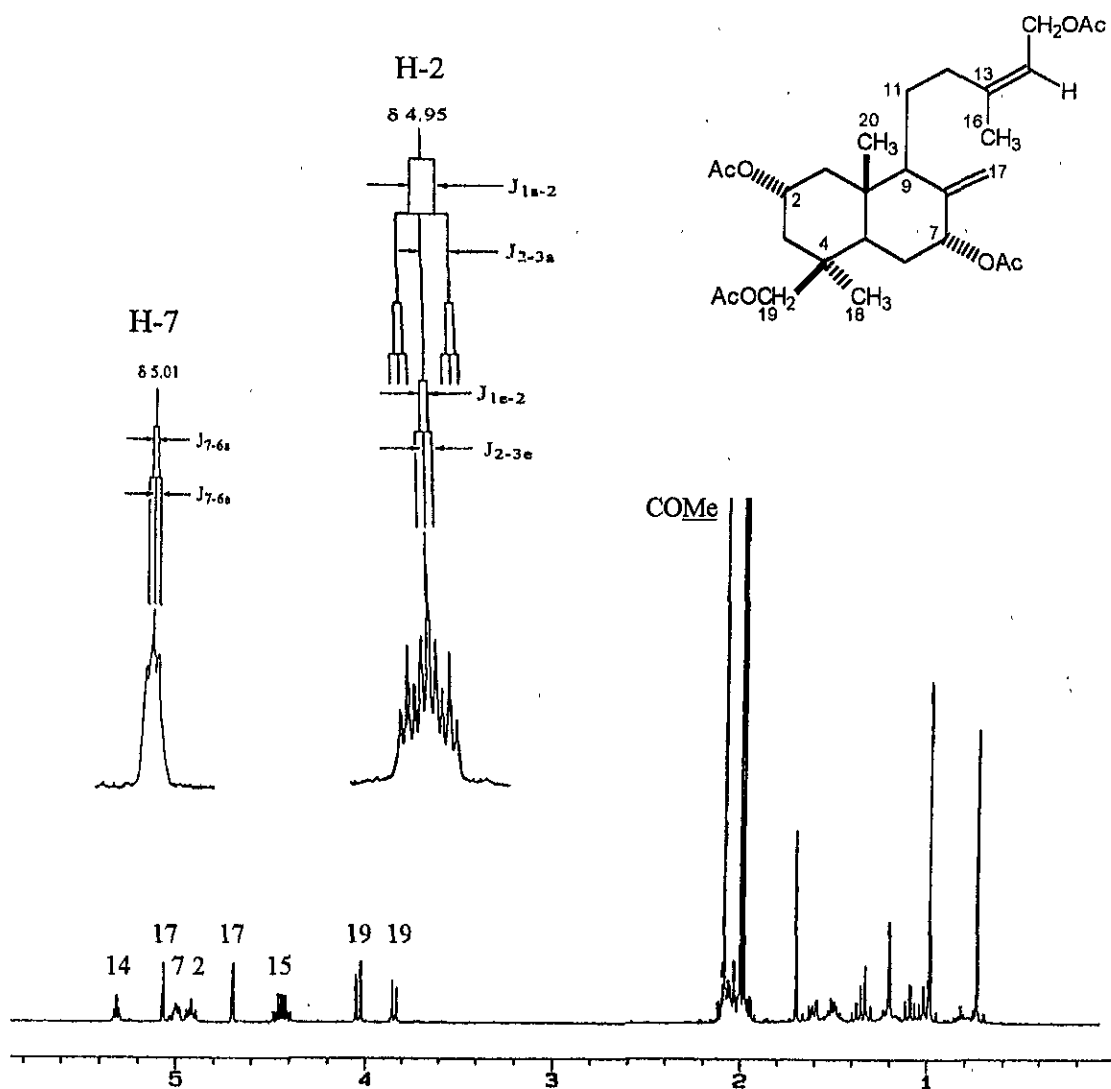


Figura 91. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del derivado peracetilado **128** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

El espectro bidimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (fig. 93, Cuadro 31) permitió verificar las asignaciones de manera inequívoca para los conjuntos de átomos  $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$ - $\text{C}_{10}$  y  $\text{C}_5$ - $\text{C}_9$  cuyas resonancias podrían intercambiarse debido a la proximidad en su desplazamiento químico. Estos datos proporcionaron la evidencia para formular la estructura del compuesto **2** como el 19-acetato del  $2\alpha,7\alpha,15,19$ -tetrahidroxilabda-8(17),(13Z)-dieno.

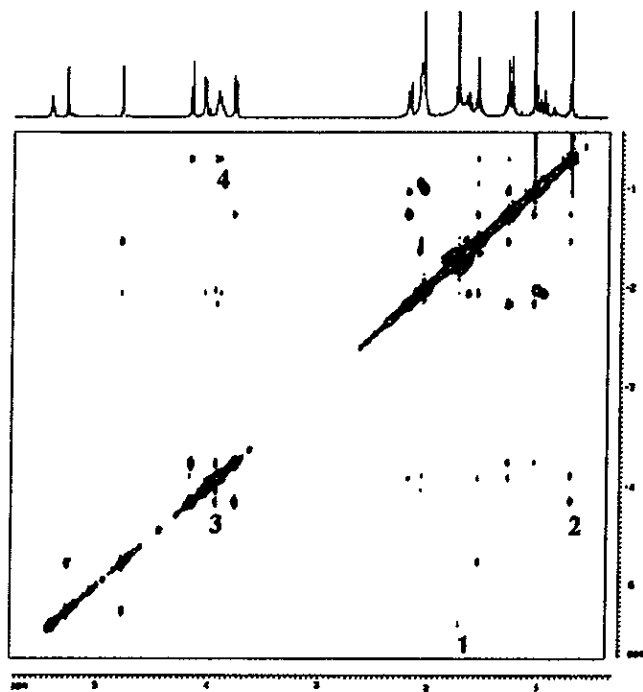


Figura 92. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  bidimensional homonuclear NOESY del compuesto 2. Principales efectos nucleares de Overhauser (nOes): 1,  $\text{H}_{14}\text{-H}_{16}$ ; 2,  $\text{H}_{19}\text{-H}_{20}$ ; 3,  $\text{H}_{19}\text{-H}_2$ ; 4,  $\text{H}_{20}\text{-H}_2$ .

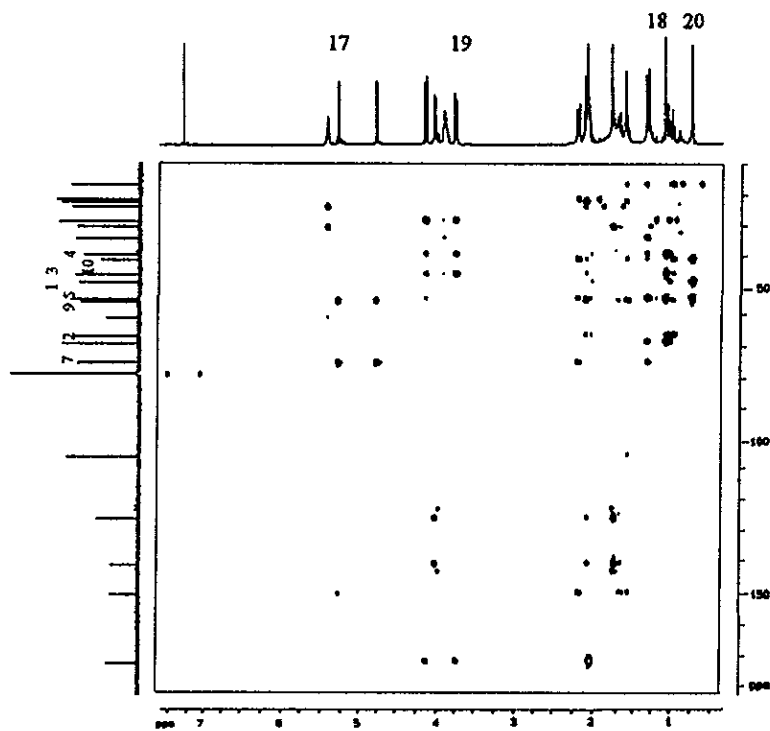


Figura 93. Espectro de correlación bidimensional heteronuclear  $^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}$  HMBC del compuesto 2.

Los productos naturales restantes (2-8) presentaron características espectroscópicas similares a las registradas para el compuesto 2 (fig. 94-99; Cuadros 32-34). Así, en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se observaron siempre las siguientes señales características del núcleo diterpénico labdánico con una sustitución análoga a la descrita anteriormente para el diterpeno 2: (1) tres singuletes correspondientes a los grupos metilo  $\text{H}_{16}$  ( $\delta$  1.78),  $\text{H}_{18}$  ( $\delta$  1.05), y  $\text{H}_{20}$  ( $\delta$  0.75); (2) el doble enlace exocíclico  $\text{H}_{17}$  ( $\delta$  5.25 y 4.75); (3) el grupo acetiloximetileno  $\text{H}_{19}$  con una orientación axial ( $\delta$  4.01-3.70); (4) el protón olefínico  $\text{H}_{14}$  ( $\delta$  5.46); (4) los protones del metileno base de oxígeno  $\text{H}_{2-15}$ , excepto en 5. Las señales para  $\text{H}_{14}$  y  $\text{H}_{15}$  no se observaron en el compuesto 7 proporcionando, de esta manera, la evidencia para proponer un esqueleto norlabdánico para este producto. El resto de las señales correspondieron a la decalina y son compartidas por todos los productos diterpénicos de *Hyptis spicigera*.

La localización de los grupos acetato adicionales en los productos naturales 3 y 4 se estableció de la siguiente manera, en el compuesto 3, este grupo se ubicó en el carbinol primario en  $\text{C}_{15}$  debido a que los protones y el carbono de este metileno sufrieron un desplazamiento paramagnético comparados con las señales equivalentes del diterpeno utilizando como una referencia de comparación (2), e.g.  $\delta(\text{C}_{15})_3$  61.1 -  $\delta(\text{C}_{15})_2$  59.0 = 2.1 (Cuadro 32, fig. 94). En el diterpeno 4, la ubicación del tercer acetoxilo en  $\text{C}_7$  se fundamentó en el desplazamiento a campo más bajo observado (+1.15 ppm) para su protón geminal con respecto a la misma resonancia en los compuestos 2 y 3 (Cuadro 32, fig. 95). Estas asignaciones fueron corroboradas con el registro de los espectros  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y HMQC.

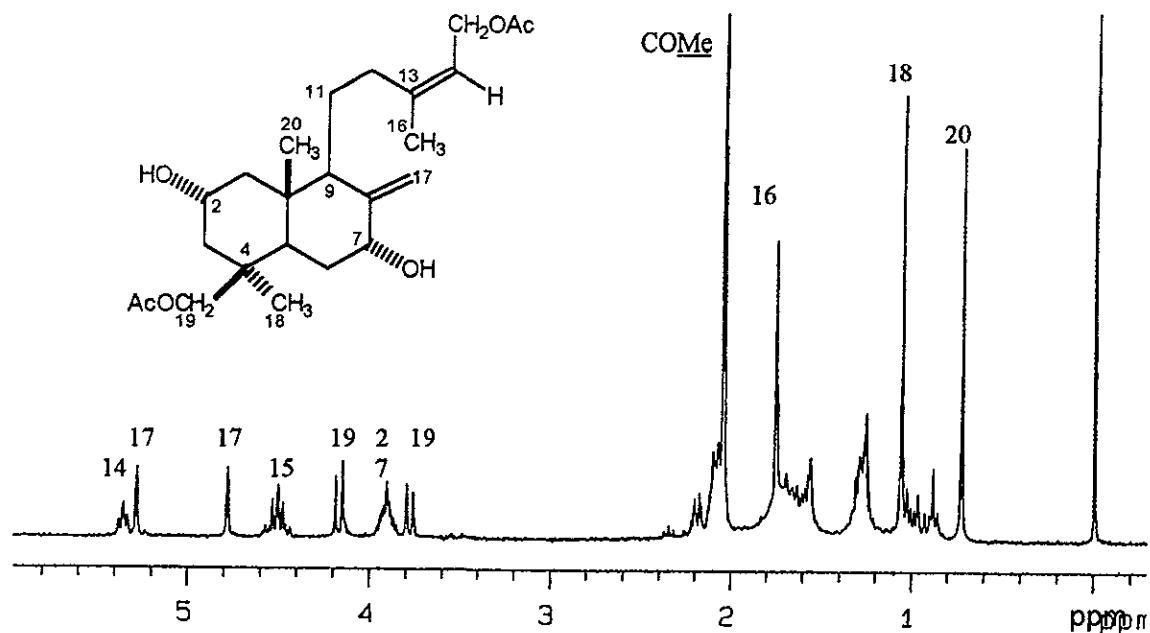


Figura 94. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto 3 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

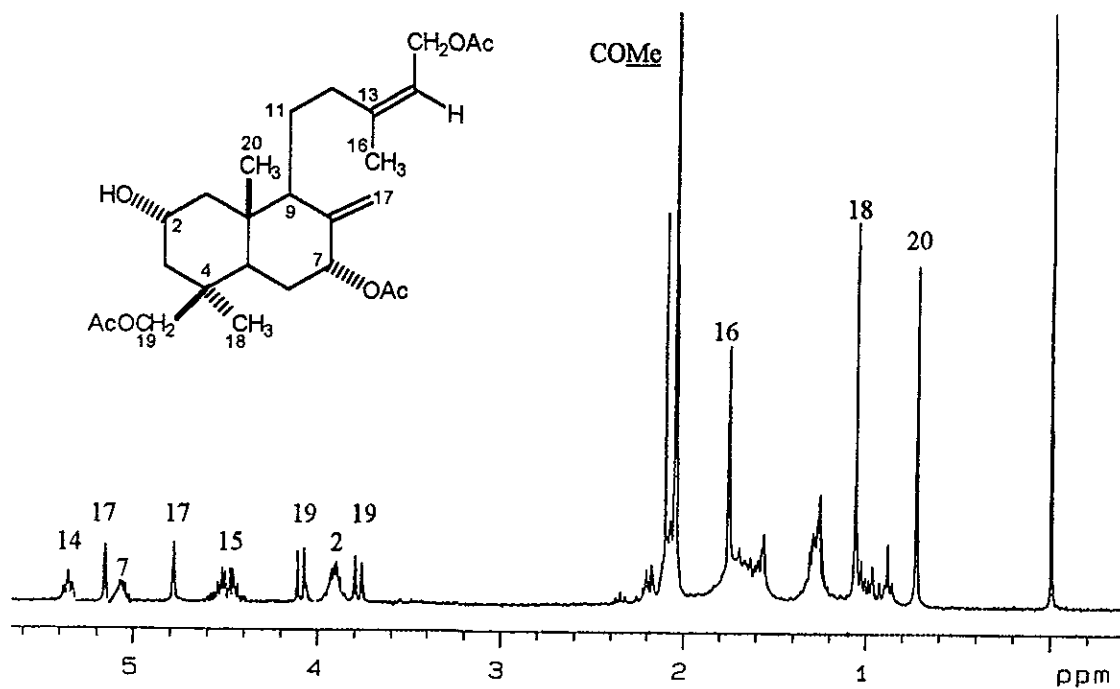


Figura 95. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto 4 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

El espectro de masas generado mediante ionización química del compuesto **5** presentó un pico  $[M + H]^+$  a  $m/z$  379 cuya fórmula molecular corresponde a  $C_{22}H_{34}O_5$ , indicando un grado de insaturación adicional al compuesto **2**. La banda en el espectro de IR a  $1667\text{ cm}^{-1}$  sugirió la presencia de un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado. Esta funcionalidad se confirmó en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  9.78) y  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  190.2) (Cuadro 32 y 34, fig. 96). Se asignó una configuración *Z* a la insaturación de acuerdo a los valores de desplazamiento químicos registrados para el grupo metilo vinílico ( $\delta_{\text{H}}$  1.95 y  $\delta_{\text{C}}$  24.7) (O'Mathúna y Dorskotch, 1995). Estas asignaciones estructurales se corroboraron a través de la correlación química del compuesto **5** con **1**. La oxidación de la posición alílica  $C_{15}$  se llevó a cabo mediante el tratamiento del compuesto **1** con  $\text{MnO}_2$ , sin que ocurriera la reacción del grupo hidroxilo en  $C_7$  a temperatura ambiente, posiblemente por encontrarse sumamente impedido estéricamente debido a su orientación  $\alpha$ -axial. Por otra parte, el compuesto **5** sufre una isomerización del doble enlace en la cadena lateral para dar origen a **131** (Cuadros 33 y 34), al encontrarse en solución de  $\text{CHCl}_3$ . Esta isomerización fue evidente al registrar el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **5** después de mantenerse en solución durante un tiempo prolongado. Se apreciaron señales duplicadas para  $H_{14}$ ,  $H_{15}$ ,  $H_{16}$  y  $H_{17}$ . Los desplazamientos químicos para el grupo metilo vinílico (Me-16,  $\delta_{\text{H}}$  2.14 y  $\delta_{\text{C}}$  17.6) indicaron una configuración *E* para el doble enlace (Su *et al.*, 1994).

El compuesto **6** proporcionó la fórmula molecular  $C_{22}H_{34}O_5$  por EM-FAB<sup>+</sup>. La diferencia observada en el espectro de RMN, en comparación con el compuesto **2**, fue la ausencia de la señal para  $H_2$  (fig. 97, Cuadro 32), sugiriendo la oxidación en  $C_2$  del núcleo diterpénico. La presencia del grupo carbonilo de cetona en  $C_2$  se corroboró mediante la señal en  $\delta$  209.9 en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Cuadro 34) (O'Mathúna y Dorskotch, 1994a).

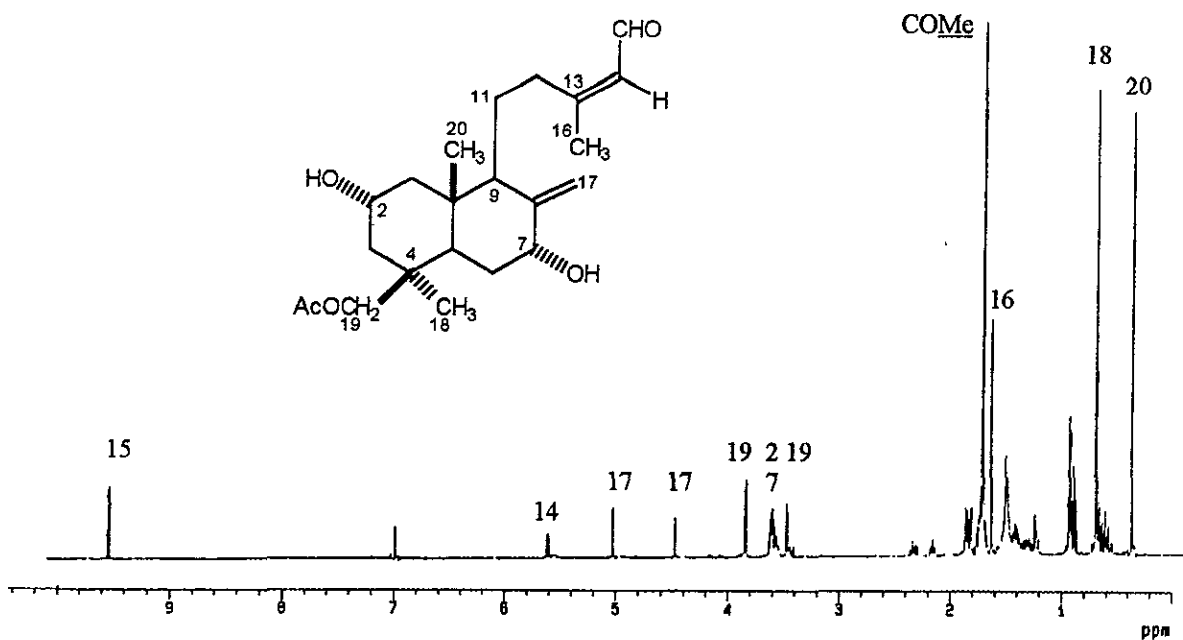


Figura 96. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 5 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

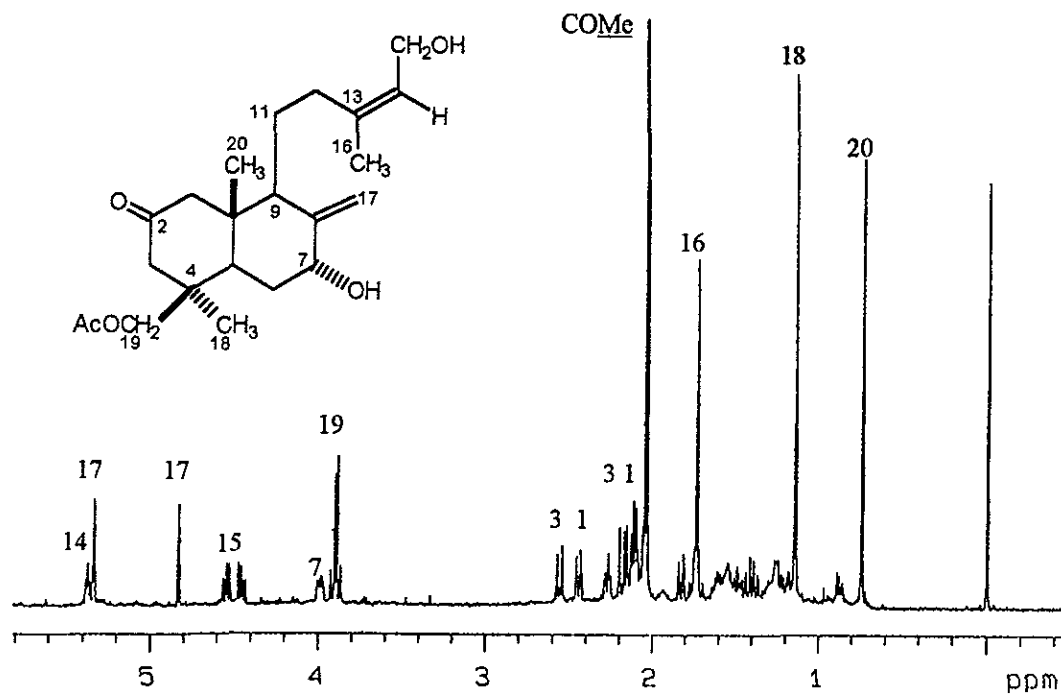


Figura 97. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 6 (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Cuadro 32. Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  para los compuestos 3-6.<sup>a</sup>

Posición	3	4	5	5 <sup>b</sup>	6
1	2.10 m	2.12 m	2.06 m	1.99 m	2.44 d (13.5)
	0.97 dd	0.97 dd	0.93 m	0.74 dd	2.14 d (13.5)
	(9.5, 9.5)	(9.0, 9.0)		(11.0, 11.0)	
2	3.90 m	3.91 m	3.88 m	3.57 m	-----
3	2.07 m	2.06 m	2.04 m	1.95 m	2.56 d (14.0)
	1.02 dd	1.02 dd	0.98 m	0.84 dd	2.19 d (14.0)
	(10.5, 10.5)	(9.5, 9.5)		(10.5, 10.5)	
5	1.29 m	1.36 m	1.22 m	1.14 m	1.83 dd
					(13.5, 3.0)
6	2.21 m	2.22 m	2.17 m	2.03 m	2.27 m
	1.31 m	1.38 m	1.26 m	1.40 m	1.39 m
7	3.90 m	5.05 dd	3.88 m	3.57 m	3.99 dd
		(4.2, 4.2)			(11.0, 5.0)
9	1.56 dd	1.64 dd	1.55 dd	1.29 dd	1.77 dd
	(10.0, 10.0)	(9.5, 9.5)	(10.2, 10.2)	(10.5, 10.5)	(7.0, 1.0)
11	1.67 m	1.56 m	1.75 m	1.39 m	1.60 m
	1.60 m	1.50 m	1.63 m	1.31 m	1.48 m
12	2.09 m	2.10 m	2.65 m	2.41 m	2.10 m
	1.26 m	1.27 m	2.48 m	2.33 m	1.18 m
14	5.36 dd	5.37 dd	5.88 d	5.85 d	5.37 dd
	(7.0, 6.9)	(7.4, 7.4)	(8.1)	(8.1)	(7.5, 7.5)
15	4.54 dd	4.53 dd	9.78 d	9.90 d	4.55 dd
	(12.3, 7.2)	(10.0, 7.2)	(8.1)	(8.1)	(12.5, 7.0)
	4.47 dd	4.47 dd			4.45 dd
	(12.6, 7.5)	(10.0, 7.2)			(12.5, 7.0)
16	1.75 sa	1.75 sa	1.95 sa	1.44 sa	1.74 sa
17	5.28 sa	5.12 sa	5.32 sa	5.45 sa	5.34 sa
	4.78 sa	4.76 sa	4.76 sa	4.58 sa	4.83 sa
18	1.06 s	1.05 s	1.03 s	0.89 s	1.15 s
19	4.18 d	4.13 d	4.15 d	4.19 d	3.92 d
	(11.1)	(11.1)	(11.2)	(11.1)	(11.5)
	3.77 d	3.79 d	3.74 d	3.72 d	3.88 d
	(11.1)	(11.1)	(11.2)	(11.1)	(11.5)
20	0.73 s	0.75 s	0.72 s	0.55 s	0.74 s
19-OAc	2.04 s	2.14 s	2.03 s	1.69 s	2.05 s
15-OAc	2.05 s	2.05 s	-----	-----	-----
7-OAc	-----	2.06 s	-----	-----	-----

<sup>a</sup>CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz (*J* en Hz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQCOASY,  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup>C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>

La oxidación del compuesto 4 con el reactivo de Jones proporcionó el derivado 129, el cual fue idéntico al derivado peracetilado generado a partir del compuesto 6.

El espectro de masas en modalidad de FAB<sup>+</sup> del compuesto 7 permitió calcular la fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>. La comparación de los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los compuestos 2 (ver fig. 89) y 7 (fig. 98) confirmó un núcleo bicíclico *trans*-decalina con la cadena lateral parcialmente degradada para el compuesto 7 (Cuadros 33 y 34). Esta propuesta de un esqueleto bisnorlabdánico se evidenció mediante el desplazamiento significativo a campo bajo observado para la señal del grupo metilo H<sub>16</sub> (δ 2.03). De esta forma, se confirmó la presencia de una funcionalidad de metilcetona (δ<sub>C</sub> 208.7, C<sub>14</sub>; 30.0, Me<sub>16</sub>).

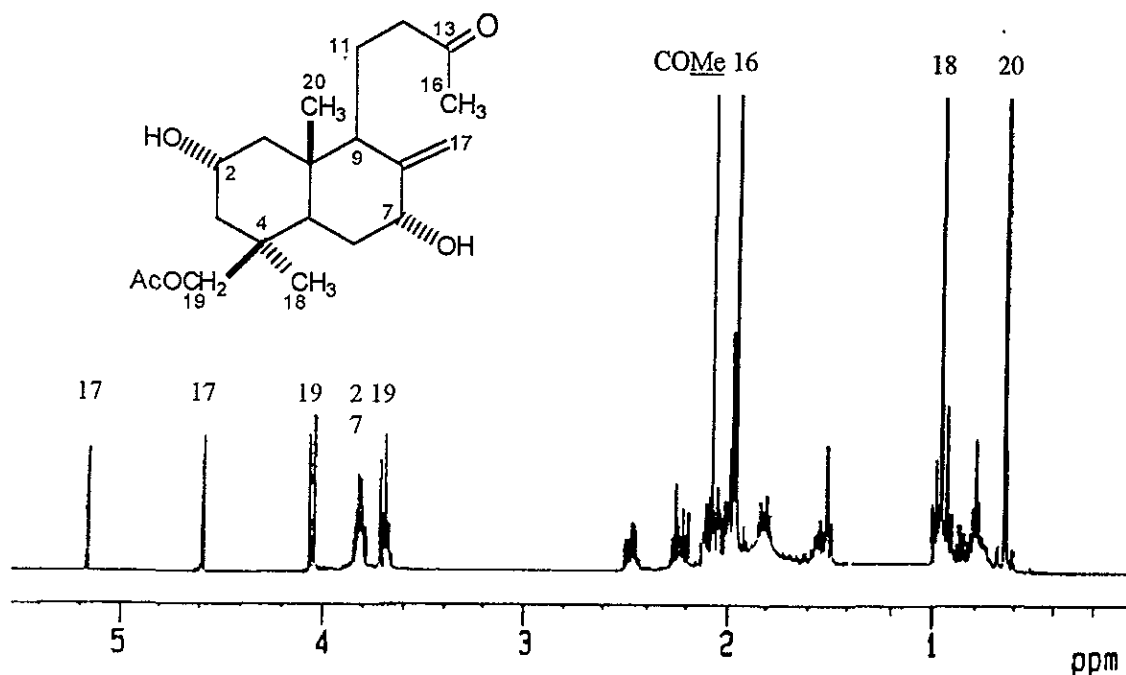


Figura 98. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto 7 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

El compuesto **8** presentó una fórmula molecular de  $C_{20}H_{34}O$  que fue determinada por EM-FAB<sup>+</sup>. Este diterpeno polar presentó una rotación óptica negativa ( $[\alpha]_D -70$ ), en contraste con el valor positivo registrado para el resto de los diterpenos aislados de *Hyptis spicigera*. La principal diferencia encontrada con respecto al producto natural **2** fue la ausencia de la señal para el grupo acetato en el espectro de RMN (fig. 99, Cuadros 33 y 34) y, por lo tanto, se asumió que **8** representaba el producto desacetilado de un compuesto con la misma estereoquímica relativa del diterpeno **2**. Las rotaciones ópticas en forma de dos antípodas en las curvas de dispersión óptica rotatoria registradas para los peracetatos **128** y **130** (ver Parte Experimental, sección 5.7.3) de los productos naturales **2** y **8**, respectivamente, implicaron que las dos series enantioméricas del esqueleto labdánico se encuentran presentes en *Hyptis spicigera*, es decir, 10-Me $\alpha$  y 10-Me $\beta$  (Mannito, 1981).

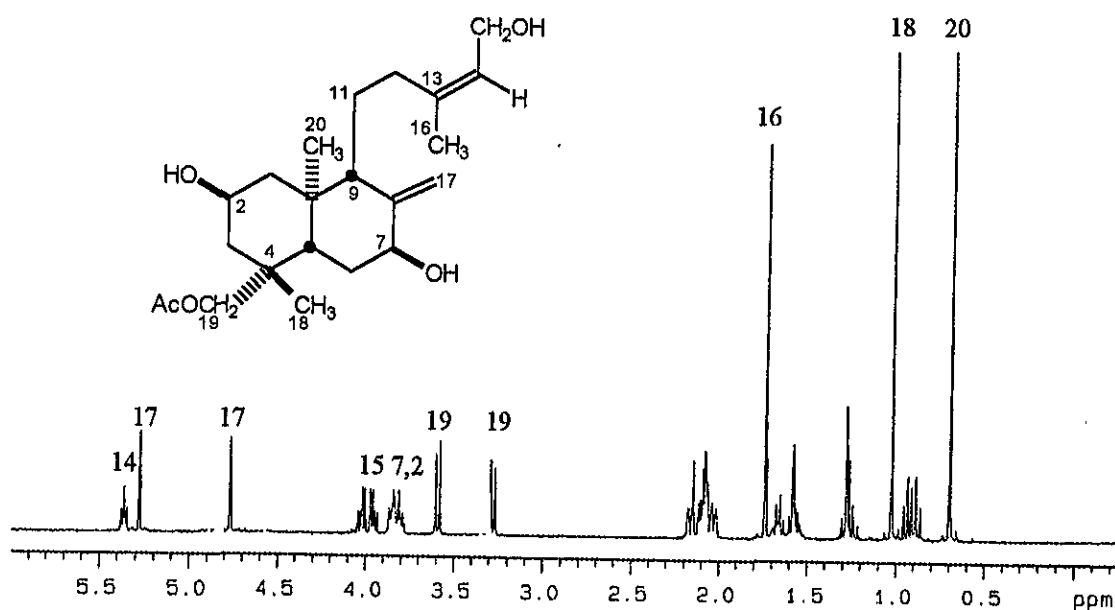


Figura 99. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto **8** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

Cuadro 33. Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  para los compuestos 7, 8, 128 y 131.<sup>a</sup>

Posición	7	8 <sup>b</sup>	128	131
1	2.06 m 1.04 m	2.16 m 0.89 dd (11.0, 11.0)	2.05 m 1.04 dd (11.5, 11.5)	2.06 m 0.93 m
2	3.88 m	3.79 dddd (11.5, 4.0)	4.95 dddd (11.8, 4.1)	3.88 m
3	2.04 m 1.00 m	2.03 ddd (12.0, 4.0, 2.0) 0.93 dd (11.5, 11.5)	2.07 m 1.11 dd (12.4, 12.4)	2.04 m 0.98 m
5	1.26 m	1.28 m	1.4 dd (13.4, 11.1)	1.22 m
6	2.17 m 1.26 m	2.10 m 1.24 m	2.15 m 1.35 m	2.17 m 1.26 m
7	3.88 m	3.84 m	5.01 dd (4.2, 4.2)	3.88 m
9	1.58 dd (10.4, 10.4)	1.58 dd (10.5, 10.5)	1.64 dd (10.0, 10.0)	1.55 dd (10.2, 10.2)
11	1.88 m 1.62 m	1.66 m 1.55 m	1.56 m 1.49 m	1.75 m 1.63 m
12	2.30 m 2.55 m	2.07 m	2.04 m 2.14 m	2.48 m 2.65 m
14	-----	5.36 dd (7.0, 7.0)	5.34 dd (7.3, 7.3)	5.83 d (8.0)
15	-----	4.02 dd (12.5, 7.0) 3.95 dd (12.5, 7.0)	4.50 dd (12.3, 6.6) 4.44 dd (12.2, 6.6)	9.96 d (8.0)
16	2.08 sa	1.73 sa	1.73 sa	2.14 sa
17	5.21 sa 4.65 sa	5.27 sa 4.77 sa	5.10 sa 4.73 sa	5.26 sa 4.70 sa
18	1.03 s	1.02 s	1.02 s	1.04 s
19	4.12 d (11.1) 3.77 d (11.1)	3.59 d (11.2) 3.27 d (11.2)	4.06 d (11.3) 3.87 d (11.3)	4.14 d (11.2) 3.76 d (11.2)
20	0.71 s	0.89 s	0.77 s	0.71 s
19-OAc	2.03 s	-----	2.02 s	2.02 s
15-OAc	-----	-----	2.03 s	-----
7-OAc	-----	-----	2.01 s	-----
2-OAc	-----	-----	2.12 s	-----

<sup>a</sup>CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz (*J* en Hz). Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQCOSY,  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup>CD<sub>3</sub>OD.

**Cuadro 34.** Desplazamientos químicos en la RMN  $^{13}\text{C}$  para los compuestos 3, 5-8, 128 y 131.<sup>a</sup>

Posición	3	5	5 <sup>b</sup>	6	7	8 <sup>c</sup>	128	131
1	47.6	47.5	47.6	53.7	47.7	41.3	43.5	47.7
2	64.8	64.7	64.3	209.9	64.7	65.5	68.1	64.7
3	45.1	45.1	45.3	50.3	45.0	45.1	41.0	45.1
4	38.6	38.9	38.6	41.3	38.6	41.2	38.5	38.6
5	53.0	52.9	53.0	52.6	52.9	54.4	52.8	52.9
6	33.2	33.3	33.6	33.6	33.5	34.2	30.0	33.4
7	73.7	73.4	73.4	73.4	73.7	74.7	74.5	73.6
8	145.7	148.7	149.3	148.6	148.8	151.2	143.9	148.6
9	53.7	53.6	53.4	53.3	54.0	55.2	54.2	54.1
10	40.3	40.4	40.2	43.4	40.5	41.3	40.2	40.5
11	21.5	21.9	21.9	21.5	17.4	22.7	21.8	21.2
12	30.1	30.6	30.4	29.7	42.1	31.1	30.1	30.6
13	142.2	163.8	162.9	141.7	208.7	139.8	142.3	163.8
14	119.9	129.3	129.6	120.3	----	126.3	119.9	127.4
15	61.1	190.8	190.2	61.1	----	59.3	60.9	191.2
16	23.3	24.8	24.2	23.2	29.7	23.5	23.4	17.6
17	104.3	104.8	104.8	104.9	104.3	104.6	105.3	104.5
18	27.7	27.7	27.7	27.7	27.7	28.1	27.7	27.7
19	66.9	66.9	67.0	67.1	66.9	65.5	66.5	66.9
20	16.1	16.2	16.1	15.9	15.9	16.7	15.8	16.1
Me-CO-2	----	----	----	----	----	----	21.0	----
Me-CO-7	----	----	----	----	----	----	20.8	----
Me-CO-15	20.9	----	----	----	----	----	21.1	----
Me-CO-19	20.9	20.9	20.4	21.5	20.9	----	21.4	20.9
Me-CO-2	----	----	----	----	----	----	169.9	----
Me-CO-7	----	----	----	----	----	----	170.4	----
Me-CO-15	170.9	----	----	----	----	----	171.0	----
Me-CO-19	171.1	171.1	170.5	170.7	171.1	----	171.0	171.1

<sup>a</sup>CDCl<sub>3</sub>, 125.7 MHz. Las asignaciones se realizaron mediante  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC y HMBC (optimizado para  $J_{\text{C-H}} = 8$  Hz),  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup>C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. <sup>c</sup>CD<sub>3</sub>OD.

El establecimiento de la configuración absoluta para cada una de las dos series labdánicas enantioméricas y, por lo tanto, su correlación con el signo de la rotación óptica se realizó mediante la caracterización de la estereoquímica del centro asimétrico C<sub>2</sub> para los diterpenos dextrógiros. Para lograr este objetivo, se aplicó la metodología de Mosher en los compuestos **3** y **7**, en conjunto con el análisis empleando la RMN de alta resolución de los ésteres correspondientes (Ohtani *et al.*, 1991 y Kusumi *et al.*, 1992). Se registraron los espectros de RMN <sup>1</sup>H para los ésteres de Mosher **134** y **135** (fig. 100) obtenidos en la reacción de esterificación del norlabdano **7** con los cloruros de *R*-(-)- $\alpha$ -metoxitri fluorometilfenilacetilo (MTPA) y *S*-(+)-MTPA. Posteriormente, se obtuvieron las diferencias en los desplazamientos químicos ( $\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$ ) para los protones H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>, H<sub>18</sub>, H<sub>19</sub> y H<sub>20</sub>. Enseguida se construyeron las proyecciones estereoquímicas (fig. 101) de acuerdo con el Modelo de Kakisawa-Mosher (Ohtani *et al.*, 1991) para la determinación de la configuración absoluta mediante la aplicación de la regla de Cahn, Ingold y Prelog. De esta manera, se estableció una configuración (*R*) para el centro C<sub>2</sub> de los diterpenos 2-7. Por lo tanto, el esqueleto diterpénico dextrógiro pertenece a la serie de labdanos normales (10-Me $\beta$ ). En tanto que la serie enantiomérica (10-Me $\alpha$ ) correspondería a la configuración absoluta para el compuesto levógiro, es decir C<sub>2</sub>(*S*).

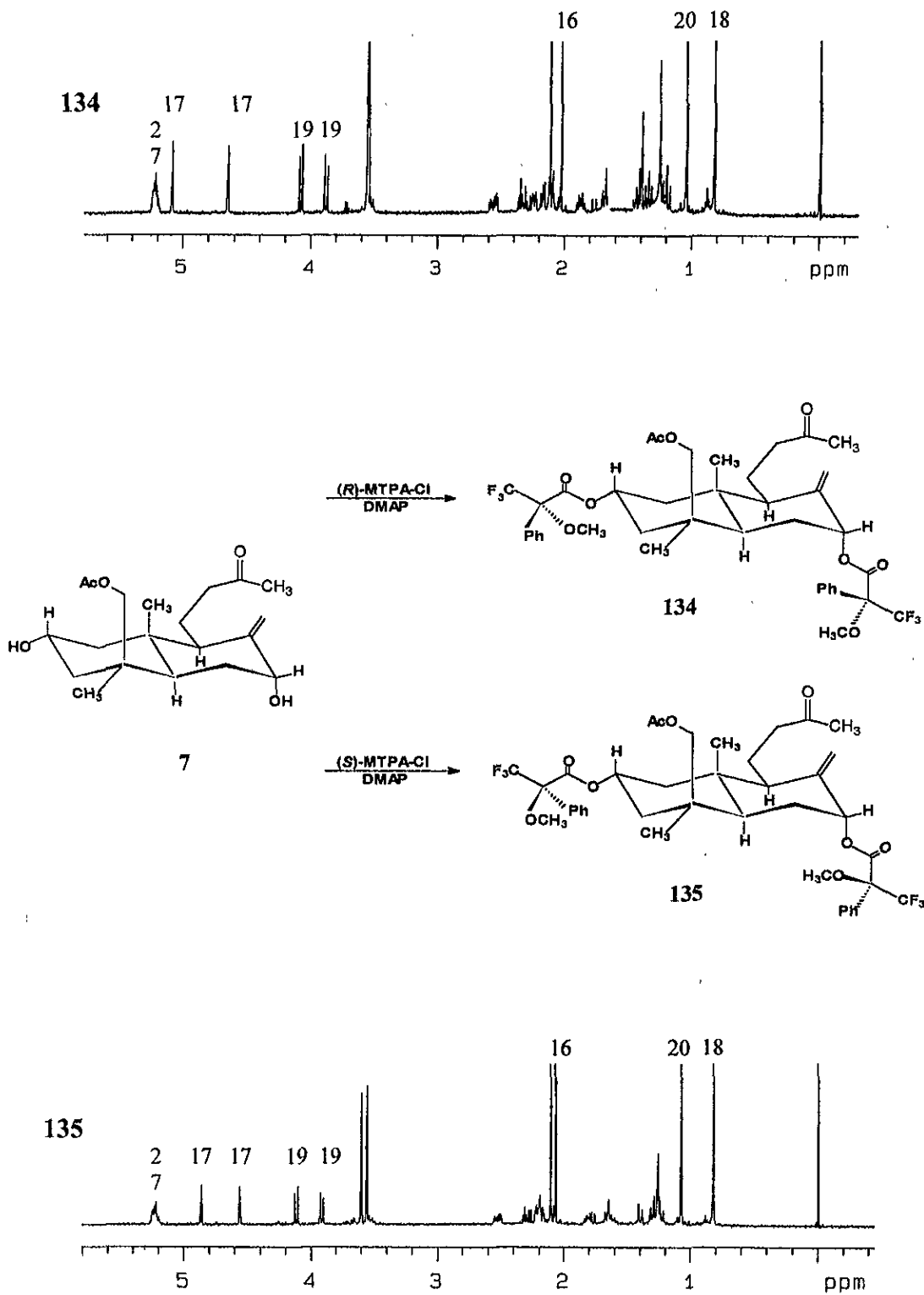


Figura 100. Espectros de RMN <sup>1</sup>H de los ésteres de Mosher 134 y 135 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

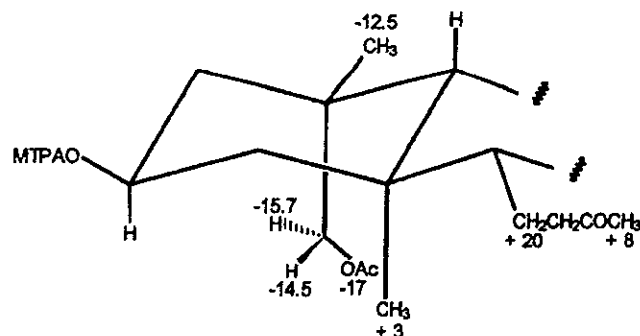


Figura 101. Modelo estereoquímico para los ésteres MTPA en el centro carbinol C<sub>2</sub> del compuesto 7, indicando los valores de  $\Delta\delta$  registrados por las señales en RMN <sup>1</sup>H para establecer el esqueleto normal del labdano (10-Me $\beta$ ).

#### 6.4. Evaluaciones biológicas.

La espicigerólida (1) presentó actividad citotóxica significativa contra la línea celular de carcinoma nasofaríngeo (KB) con una CE<sub>50</sub> = 1.5  $\mu\text{g/mL}$ .

La evaluación de la actividad citotóxica de los diterpenos se llevó a cabo utilizando las líneas celulares de carcinoma de colon (HCT-15), carcinoma escamoso de cervix (SQC-1 UISO) y KB. El compuesto 2 presentó una actividad citotóxica marginal con CE<sub>50</sub> = 8.7  $\mu\text{g/mL}$  (HCT-15) y 19.4  $\mu\text{g/mL}$  (KB). La actividad observada para los diterpenos 5 y 6 fue menor a la desarrollada por el compuesto 2 (CE<sub>50</sub> de 11-19  $\mu\text{g/mL}$ ). El resto de los diterpenos fueron inactivos cuando se evaluaron en niveles de concentración menores a 20  $\mu\text{g/mL}$  (Cuadro 35).

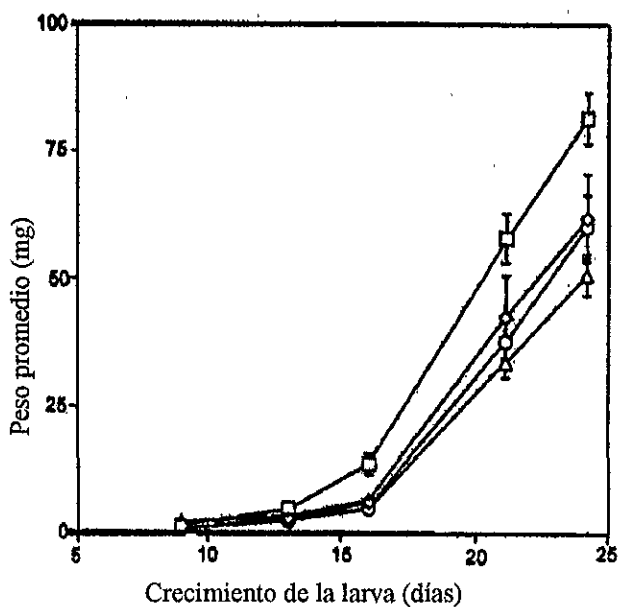


**Cuadro 35.** Citotoxicidad de los diterpenos aislados de *Hyptis spicigera*.

Compuesto	Línea celular, CE <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>a</sup>		
	HCT-15	SQC-1 UISO	KB
2	8.75	>20	19.45
3	>20	>20	>20
5	19.81	>20	11.11
8	>20	>20	>20
127	>20	>20	>20
Elípticina	0.17	0.41	0.10

<sup>a</sup>HCT-15, carcinoma de colón; SQC-1 UISO, carcinoma escamoso de cervix; KB, carcinoma nasofaríngeo.

El compuesto 3 inhibió significativamente el crecimiento de la larva de *Ostrinia nubilalis* (fig. 102), utilizando concentraciones de 5, 50 y 100 ppm. La actividad insecticida de los diterpenos restantes fue similar a la desarrollada por el compuesto 3.



**Figura 102.** Evaluación del crecimiento de *Ostrinia nubilalis* bajo una dieta artificial con el compuesto de prueba 3 a concentraciones de 0 (□), 5 (◇), 50 (O) y 100 (Δ) ppm. Las barras verticales representan las desviaciones estándar para cada lectura.

## 7. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1. La investigación fitoquímica biodirigida de las partes aéreas de la especie *Hyptis spicigera* permitió el aislamiento de una 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona citotóxica, la espicigerólida (1). Se comprobó la hipótesis quimiotaxonómica sobre el aislamiento de este tipo de compuesto como parte del metabolismo secundario de las especies del género *Hyptis* pertenecientes a la sección *Mesosphaeria*. También, se aislaron siete diterpenos novedosos (2-8) con propiedades insecticidas. La presencia de diterpenos de tipo labdánico en el género *Hyptis* no tiene precedente, por lo cual los labdanos aislados representan una contribución a la química de este género.
2. La estructura de la espicigerólida (1), el único constituyente presente en la fracción citotóxica (KB: CE<sub>50</sub> 2.8  $\mu$ g/mL), se elucidó como la 6*R*-[3'*S*,4'*S*,5'*S*,6'*S*-tetracetiloxi-1*Z*-heptenil]-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona. Las estructuras de los diterpenos labdánicos, constituyentes presentes en la fracción tóxica para las larvas del gusano barrenador del maíz (*Ostrinia nubilalis*), se elucidaron como: 19-acetoxi-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -15-trihidroxiadba-8(17),13*Z*-dieno (2), 15,19-diacetoxi-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxiadba-8(17),13*Z*-dieno (3), 7 $\alpha$ ,15,19-triacetoxi-2 $\alpha$ -hidroxiladba-8(17),13*Z*-dieno (4), 19-acetoxi-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxiadba-8(17),13*Z*-dien-15-al (5), 19-acetoxi-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-14,15-dinoradba-8(17)-en-13-ona (6), 19-acetoxi-7 $\alpha$ ,15-dihidroxiadba-8(17),13*Z*-dien-2-ona (7) y 2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15,19-tetrahidroxi-*ent*-labda-8(17),13*Z*-dieno (8). Estas estructuras se establecieron a través de la aplicación de diversos métodos espectroscópicos

convencionales y técnicas de alta resolución en la resonancia magnética nuclear (COSY, NOESY, HMQC y HMBC).

3. La configuración absoluta de la spicigerólida (1) se estableció con base en sus propiedades quirópticas, mediante cálculos de mecánica molecular (MMX) y a través de la correlación química con el sintón quiral 2,3,4,5-tetra-*O*-acetil-*L*-ramnosa preparado a partir de la *L*-ramnosa.
4. La aplicación de la mecánica molecular para el cálculo de las constantes de acoplamiento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  en la elucidación estereoquímica de la cadena lateral de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas se realizó exitosamente al emplear derivados semisintéticos de la sinrotólida, un producto natural con una configuración absoluta conocida.
5. Se determinó la configuración absoluta del esqueleto de labdano mediante el empleo del método de Mosher, logrando establecer que los diterpenos dextrógiros (2-7) pertenecen a la serie labdánica 10-Me $\beta$  y el compuesto levógiro (8) a la serie 10-Me $\alpha$ .
6. Los resultados de la investigación constituyen una contribución al conocimiento fitoquímico de las especies mexicanas de *Hyptis* y ponen en evidencia el potencial medicinal de *Hyptis spicigera* como una fuente de nuevos principios biodinámicos de posible utilidad en la terapéutica y la agroquímica.

## 8. REFERENCIAS.

- Achmad, S.; Hoyer, T.; Kjaer, S.; Makmur, L. y Norrestam, R. (1987) Molecular and crystal structure of Hyptolide, a naturally occurring  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\gamma$ -lactone. *Acta Chemica Scandinavica* **B41**, 599-609.
- Ahammadsahib, K. I.; Hollingworth, R. M.; McGovren, J. P.; Hui, Y. H. y McLaughlin, J. L. (1993) Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin. *Life Sciences* **53**, 1113-1120.
- Alemany, A.; Márquez, C.; Pascual, C.; Valverde, S.; Martínez-Ripoll, M.; Fayos, J. y Perales, A. (1979a) New compounds from *Hyptis*. X-ray crystal and molecular structures of olguine. *Tetrahedron Letters* **37**, 3579-3582.
- Alemany, A.; Márquez, C.; Pascual, C.; Valverde, S.; Martínez-Ripoll, M.; Fayos, J. y Perales, A. (1979b) New compounds from *Hyptis*. X-ray crystal and molecular structures of anamarine. *Tetrahedron Letters* **37**, 3583-3586.
- Almtorp, T. G.; Hazell, C. A. y Torssell, B. G. K. (1991). A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry* **30**, 2753-2756.
- Altschul, S. V. R. (1973) *Drugs and food from little-know plants*. Ed. Harvard University Press, U.S.A., p. 263.
- Arnason, J. T.; Philogene, B. J. R.; Donskov, N. y Kubo, I. (1987) Limonoids from Meliaceae and Rutaceae reduce feeding growth and development of *Ostrinia nubilalis*. *Entomology of Experimental Application* **38**, 29-39.

- Arnó, M.; Marin, M. L. y Zaragoza, J. R. (1998)  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments and conformational analysis of some tetracyclic compounds with a bicyclo[4.2.0]octane ring system. *Magnetic Resonance in Chemistry* **36**, 579-586.
- Augustine, L. R. (1965) *Catalytic hydrogenation. Techniques and Applications in Organic Synthesis*. E. Arnold y M. Dekker (editores), U.S.A., p. 147.
- Aycard, J. P.; Kini, F.; Kam, B.; Gaydou, E. M. y Faure, R. (1993) Isolation and identification of spicigerolactone: complete  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments using two-dimensional NMR experiments. *Journal of Natural Products* **56**, 1171-1173.
- Barrero, F. A. y Altarejos, J. (1993)  $^{13}\text{C}$  NMR Data for labdane diterpenoids. *Magnetic Resonance in Chemistry* **31**, 299-308.
- Beecham, A. F. (1972) The CD of  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactones. *Tetrahedron* **28**, 5543-5554.
- Beevers, G. P. A.; Witch, M. E.; Jones, N. M.; Cosstick, R.; Arnold, R. P. y Fisher, J. (1999) *Magnetic Resonance in Chemistry* **37**, 814-820.
- Behforouz, M.; Bolan, L. J. y Flynt, S. M. (1985) 2,4-dinitrophenylhydrazones: A modified method for the preparation of these derivatives and an explanation of previous conflicting results. *Journal of Organic Chemistry* **50**, 1186-1189.
- Benner, J. P. (1993) Pesticidal compounds from higher plants. *Pesticidal Sciences* **39**, 95-102.
- Bernard, C. B.; Krishnamurty, H. G.; Chauret, D.; Durst, T.; Philogene, B. J. R.; Sánchez-Vindas, P.; Hasbun, C.; Poveda, L.; San Román, L. y Arnason, J. T. (1995) Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *Journal of Chemical Ecology* **21**, 801-814.

- Bruneton, J. (1993) *Pharmacognosie. Phytochimie Plantes médicinales*, 2<sup>a</sup> ed., Paris, pp. 425-440.
- Budzikiewics, H.; Djerassi, C. y Williams, D. H. (1964) *Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds*. Ed. Holden-Day, San Francisco, pp. 39-47.
- Buckingham, J. (1969) The Chemistry of Arylhydrazones. *Chemical Society* **23**, 37-56.
- Calzada Bermejo, F. (2000) Proantocianidinas de tipo A y flavonoles con actividad antiprotozoaria de *Geranium niveum* S. Watson (Geraniaceae) y *Conyza filaginoides* (D.C.) Hieron (Asteraceae). Tesis de Doctorado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, pp. 145-150.
- Cane, E. D. (1999) Isoprenoid Biosynthesis: Overview. En: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, vol. 2, D. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn (editores), Elsevier, New York, pp. 1-13.
- Carman, M. R. y Duffield, R. A. (1993) The Biosynthesis of Labdanoids. The Optical Purity of Naturally Occurring Manool and Abienol. *Austrian Journal of Chemistry* **46**, 1105-1114.
- Cerda-García-Rojas, C. M.<sup>a</sup> y Pereda-Miranda, R.<sup>b</sup> (1999) Programa FRACMOL para el cálculo de fracciones molares. <sup>a</sup>Departamento de Química, CINVESTAV-IPN; <sup>b</sup>Facultad de Química, UNAM, México.
- Cerda-García-Rojas, C. M.; Zepeda, L. G. y Joseph-Nathan, P. (1990) A PC program for calculation of dihedral angles from <sup>1</sup>H NMR data. *Tetrahedron Computer Methodology* **3**, 113-118.
- Charlton, L. J. (1998) Antiviral activity of lignans. *Journal of Natural Products* **61**, 1447-1451.

- Chávez, D. (1998) Acetogeninas de Anonaceas con estructura novedosa y actividad antineoplásica potencial de *Annona purpurea* y *Rollinia mucosa*. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 318 p.
- Chávez, D.; Acevedo, A. L. y Mata, R. (1998) Jimenezin, a novel Annonaceous acetogenin from the seeds of *Rollinia mucosa* containing adjacent tetrahydrofuran-tetrahydropyran ring systems. *Journal of Natural Products* **61**, 419-421.
- Chávez, D. y Mata, R. (1998) Purpurediolin and purpurenin, two new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products* **61**, 580-584.
- Collett, M. T.; Davies-Coleman, T. M. y Rivett, D. E. A. (1998) Naturally occurring 6-substituted 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones. En: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* **75**, W. Herz, H. Falk, G. W. Kirby, Ch. Tamm (editores), Springer Wien New York, Austria, pp. 181-209.
- Collins, P. y Ferrier, R. (1995) *Monosacharides. Their Chemistry and Their Roles in Natural Products*, John Wiley & Sons, Great Britain, pp. 112-115.
- Cordell, G. A.; Beecher, W. C. y Pezzuto, J. M. (1991) Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs?. *Journal of Ethnopharmacology* **32**, 117-133.
- Cragg, M. G.; Boyd, M. R. y Cardellina, J. H. (1993) Role of plants in the National Cancer Institute drug discovery and development program. En: *Human medicinal agents from plants*, A. D. Kinghorn, M. F. Balandrin (editores) American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 80-95.

- Cragg, M. G.; Boyd, M. R.; Cardellina, J. H.; Newman, D. J.; Snader, K. M. y McCloud, T. G. (1994) Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. En: *Ethnobotany and the Search for New Drugs*, Ciba Foundation Symposium 185, John Wiley & Sons, Chichester, England, pp. 178-190.
- Cullinane, N. M. y Edwards, B. F. R. (1958) Preparation of Ketones by cleavage of 2,4-dinitrophenyl-hydrazones. *Journal of Chemical Society*, 1311-1312.
- Dai, J. R.; Hallock, F. Y.; Cardellina, H. J. y Boyd, R. M. (1996) Vascululyne, a new cytotoxic acetylenic alcohol from the marine sponge *Cribrochalina vasculum*. *Journal of Natural Products* **59**, 88-89.
- Dale, A. J.; Dull, L. D. y Mosher, S. H. (1969)  $\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -trifluoromethylphenyl acetic acid, a versatile reagent for the determination of enantiomeric composition of alcohols and amines. *Journal of Organic Chemistry* **34**, 2543-2549.
- Dale, A. J. y Mosher, S. H. (1973) Nuclear magnetic resonance enantiomer reagents. Configurational correlations via nuclear magnetic resonance chemical shifts of diastereomeric mandelate, *O*-methylmandelate, and  $\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -trifluoromethyl phenylacetate (MTPA) esters. *Journal of the American Chemical Society* **95**, 512-519.
- Davies-Coleman, T. M.; English, B. R. y Rivett, D. E. A. (1987) Synrotolide, an  $\alpha$ -pyrone from *Syncolostemon rotundifolius*. *Phytochemistry* **26**, 1497-1499.
- Davies-Coleman, T. M. y Rivett, D. E. A. (1987) Stereochemical studies on Boronolide, an  $\alpha$ -pyrone from *Tetradenia barcerae*. *Phytochemistry* **26**, 3047-3050.
- Davies-Coleman, T. M. y Rivett, D. E. A. (1989) Naturally occurring 6-substituted 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones. En: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*.



*Fortschritte. Der Chemie Organischer Naturstoffe* **55**, W. Herz, H. Grisebach, G. W. Kirby, Ch. Tamm (editores), Springer-Verlag, New York, pp. 1-35.

- Davies-Coleman, T. M. y Rivett, D. E. A. (1994) An  $\alpha$ -pyrone from *Syncolostemon densiflorus*. *Phytochemistry* **35**, 1590-1592.
- Davies-Coleman, T. M. y Rivett, D. E. A. (1995) Structure of the 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone, Umuravumbolide. *Phytochemistry* **38**, 791-792.
- Davies-Coleman, T. M. y Rivett, D. E. A. (1996) 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone from *Syncolostemon parviflorus*. *Phytochemistry* **41**, 1085-1092.
- Davies-Coleman, T. M. y Rivett, D. E. A. (1997) Absolute configuration of  $\alpha$ -pyrones from *Cryptocarya latifolia* and *Syncolostemon densiflorus*. *Phytochemistry* **44**, 935-938.
- Delle Monache, F.; Marletti, F.; Marini-Bettolo, G.; De Mello, F. J. y D'Albuquerque L. I. (1977) Diterpenoids of *Hyptis fruticosa* (Labiatae). *Gazzetta Chimica Italiana* **107**, 319-321.
- De Riccardis, F., Izzo, I.; Iorizzi, M.; Palagiano, E.; Minale, L. y Riccio, R. (1996) Two novel polyhydroxysteroids with a 24-ethyl-25-hydroxi-26-sulfoxy side chain from the deep water starfish *Styracaster caroli*. *Journal of Natural Products* **59**, 386-390.
- De Rosa, S.; Crispino, A.; De Giulio, A.; Iodice, C.; Benrezzouk, R.; Terencio, M. C.; Ferrándiz, M. L.; Alcaraz, M. J. y Payá, M. (1998) A new cacospongionolide inhibitor of human secretory phospholipase A<sub>2</sub> from the tyrrhenina sponge *Fasciospongia cavernosa* and absolute configuration of cacospongionolides. *Journal of Natural Products* **61**, 931-935.

- Delgado, G.; Pereda-Miranda, R. y Romo de Vivar, A. (1985) Structure and stereochemistry of 4-deacetoxy-10-*epi*-olguine, a new  $\gamma$ -lactone from *Hyptis oblongifolia* Betham (Labiatae). *Heterocycles* **23**, 1869-1872.
- Dewik, P. M. (1991) Plantas con inhibidores de tumores. En: *Farmacognosia*, Trease y Evans, 13ª ed., W.C. Evans (editor), Ed. Interamericana McGraw-Hill, pp. 692-713.
- Duynstee, I. H.; Vliet, J. M.; Marel, A. G. y Boom, H. J. (1998) An efficient synthesis of (*R*)-3-[(*R*)-3-[2-*O*-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl] oxydecanoyl] oxydecanoid acid, a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Organic Chemistry*, 303-307.
- Eliel, L. E. y Wilen, H. S. (1994) *Stereochemistry of Organic Compounds*. John Wiley & Sons Inc., New York, USA, pp. 113-147, 991-1023.
- Elks, J. y Oughton, J. F. (1962) Recovery of 3-oxo-steroids from their 2,4-dinidrophenylhydrazones. *Journal of Chemical Society*, 4729-4728.
- Epling, C. (1949) Revisión del Género *Hyptis* (Labiatae). *Revista del Museo de la Plata*. Tomo VII, sec. Botánica, Argentina, pp. 153-497.
- Funabashi, M.; Arai, S. y Shinohara, M. (1999) Novel synthesis of diphenyl and/or trimethylene dithioacetals of mono- and oligosaccharides in 90% trifluoroacetic acid. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **18**, 333-341.
- Germán, V. F. (1971) Isolation and characterization of citotoxic principles from *Hyptis verticillata* Jacq. *Journal of Pharmaceutical Science* **60**, 649-650.
- Gillard, F. y Riehl, J. J. (1983) A synthetic approach to (+)-anamarin. Synthesis of a precursor of the side-chain. *Tetrahedron Letters* **24**, 587-588.

- Gillard, F.; Heissler, D. y Riehl, J. J. (1988) Synthesis of the 5,6-dihydro-2-pyrone moiety of (+)-Anamarin. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions I*, 2291-2295.
- Groneberg, R. D.; Miyazaki, T.; Stylianides, N. A.; Schulze, T. J.; Stahl, W.; Schreiner, E. P.; Suzuki, T.; Iwabuchi, Y.; Smith, A. L. y Nicolaou, K. C. (1993) Total synthesis of Calicheamicin  $\gamma_1^I$ . 1. Synthesis of the oligosaccharide fragment. *Journal of the American Chemical Society* **115**, 7593-7611.
- Gunvor, A. T.; Hazell, B y Torsell, G. (1991) A lignan, an  $\alpha$ -pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry* **30**, 2753-2756.
- Haasnoot, C. A. G.; De Leeuw, F. A. A. M. y Altona, C. (1980) The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities-I. An empirical generalization of the Karplus equation. *Tetrahedron* **36**, 2783-2792.
- Harrison, H. R. y Eisenbraun, E. J. (1966) A procedure for purification of steam-volatile ketones. 2,4-dinitrophenylhydrazone cleavage. *Journal of Organic Chemistry* **31**, 1294-1295.
- Heinrich, M. (1992) Economic botany of American Labiatae. En: *Advances in Labiate Science*, R. M. Harley, T. Reynolds (editores), Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 475-487.
- Hellman, S. y Vokes, E. E. (1997) Advancing current treatments for cancer. En: *What you need know about cancer*, Scientific American a special issue. W. H. Freeman and Company, New York, pp. 77-84.
- Herbert, B. R. (1989) *The Biosynthesis of secondary metabolites*, 2a. edición, Chapman & Hall, New York, pp. 76-89.

- Hernández de Jesús, M. L. (1991) Estructura y estereoquímica de la pectinólida, una nueva 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona con propiedades antimicrobianas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. Tesis de maestría, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 146 p.
- Hóltje, H. D. y Folkers, G. (1996) *Molecular Modeling, Basic principles and applications*, Ed. Board, R. Mannhold; H. Kubinya; Timmermann, H. (editores), New York, pp. 1-17.
- Honda, T.; Horiuchi, S.; Mizutani, H. y Kanai, K. (1996) Enantiocontrolled synthesis of (+)-Boronolide. *Journal of Organic Chemistry* **61**, 4944-4948.
- Horton, D. y Wander, J. D. (1970a) Diphenyl dithioacetals of D-ribose, D-xylose, and D- and L-arabinose. Conformational studies and formation of a ketene diphenyl dithioacetal. *Carbohydrate Research* **13**, 33-47.
- Horton, D. y Wander, J. D. (1970b) Conformation of acyclic derivatives of sugars. Part VI. Conformation of aldehydo-aldose peracetates in solution. *Carbohydrate Research* **15**, 271-284.
- Hui, Y. H.; Ruprecht, J. K.; Liu, Y. M.; Anderson, J. E.; Smith, D. L.; Chang, C. J. y McLaughlin, J. L. (1989) Bullatacin and bullatacinone: two highly potent bioactive acetogenins from *Annona bullata*. *Journal of Natural Products* **52**, 463-477.
- Iwu, M. M.; Esegwu, C. O.; Okunji, C. O.; Sanson, R. D. y Tempesta, M. S. (1990) Antimicrobial activity and terpenoids of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens*. *International Journal of Crude Drug Research* **28**, 73-76.

- Jefferies, P. R.; Knox, J. R. y Scaf, B. (1974) The chemistry of *Dodonaea* spp. VII ent-labdanes from *D. Microzyga* (Sapindaceae). *Austrian of Journal Chemistry* **27**, 1097-1102.
- Jefford, W. C. y Moulin, M. C. (1991) 33. The synthesis of Boronolide. *Helvetica Chimica Acta* **74**, 336-342.
- Juaristi, E. (1991) *Introduction to Stereochemistry and Conformational Analysis*. John Wiley & Sons Inc., USA, pp. 18-35, 58-71 y 237-251.
- Judge, T. M.; Phillips, G.; Morris, J. K.; Lovasz, K. D.; Romines, K. R.; Luke, G. P.; Tulinsky, J.; Tustin, J. M.; Chrusciel, R. A.; Dolak, L. A.; Mizensak, S. A.; Watt, W.; Morris, J.; Vander Velde, S. L.; Strohbach, J. W. y Gammill, R. B. (1997) Asymmetric Syntheses and Absolute Stereochemistry of 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones, a new class of potent HIV protease inhibitors. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 3627-3628.
- Kashiwada, Y.; Wang, H. K.; Nagao, T.; Kitanaka, S.; Yasuda, I.; Fujioka, T.; Yamagishi, T.; Cosentino, M.; Kozuka, M.; Okabe, H.; Ikeshiro, Y.; Hu, C.Q.; Yeh, E. y Lee, K.H. (1998) Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *Journal of Natural Products* **61**, 1090-1095.
- Keeney, M. (1957) Regeneration of carbonyls from 2,4-dinitrophenyl-hydrazones with levulinic acid. *Analytical Chemistry* **29**, 1489-1491.
- Kinghorn, A. D.; Farnsworth, N. R.; Beecher, C. W. W.; Soejarto, D. D.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Wal, M. E.; Wani, M. C.; Brown, D. M.; O'Neill, M. J.; Lewis, J. A. y Besterman, J. M. (1995) Novel strategies for plant-derived anticancer agents. *International Journal of Pharmacognosy* **33**, Supplements, 48-58.

- Kingston, D. G. I.; Rao, M. M. y Zucker, W. V. (1979) Plant Anticancer Agents. IX. Constituents of *Hyptis tomentosa*. *Journal of Natural Products* **42**, 496-499.
- Kingston, E. E.; Shannon, J. S. y Lacey, M. J. (1983) Rearrangements in chemical ionization mass spectra. *Organic Mass Spectrometry* **18**, 183-192.
- Kini, F.; Kam, B.; Ayjard, J. P.; Gaydoi, M. E. y Bombarda, I. (1993) Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyptis spicigera* Lam. from Burkina Faso. *Journal of Essential Oil Research* **5**, 219-221.
- Kuhnt, M.; Rimpler, H. y Heinrich, M. (1994) Lignans and other compounds from the Mixe indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. *Phytochemistry* **36**, 485-489.
- Kuhnt, M.; Pröbstle, A.; Rimpler, H., Bauer, R. y Heinrich, M. (1995) Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. *Planta Medica* **61**, 227-232.
- Kusumi, T.; Hamada, T.; Ishitsuka, O. M; Ohtani, I. y Kakisawa, H. (1992) Elucidation of the relative and absolute stereochemistry of Lobatrine, a marine diterpen, by a modified Mosher method. *Journal of Organic Chemistry* **57**, 1033-1035.
- Lambert, J. D. H.; Gale, J.; Arnason, J. T. y Philogene, J. R. (1985) Bruchid control with traditionally used insecticidal plants *Hyptis spicigera* and *Cassia nigricans*. *Insect Science and its Application* **6**, 167-170.
- Lichtenthaler, F.; Lorenz, K. y Ma W. (1987) A convergent total synthesis of (-)-Anamarine from D-glucose. *Tetrahedron Letters* **28**, 47-50.
- Likhitwitayawuid, K.; Angerhofer, C. K.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M. y Ruangrunsi, N. (1993) Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*. *Journal of Natural Products* **56**, 30-38.

- López-Calahorra, F.; Velasco, D. y Castells, J. (1990) Conformational study of peracetylated aldonitrile. *Journal of Organic Chemistry* **55**, 3530-3536.
- Lorenz, K. y Lichtenthaler, W. F. (1987) A convergent total synthesis of (+)-anamarine from (*R,R*)-tartrate and D-gulonolactone. *Tetrahedron Letters* **28**, 6437-6440.
- MacMillan, J. y Beale, H. M. (1999) Diterpene Biosynthesis. En: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, vol. 2, D. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn (editores), Elsevier, New York, pp. 217-219, 223-225.
- MacRae, W. D. y Towers, G. H. N. (1984) Biological activities of lignans. *Phytochemistry* **23**, 1207-1220.
- Magrath, I. y Livek, J. (1993) Cancer in Developing Countries: Opportunity and Challenge. *Journal of the National Cancer Institute* **85**, 862-874.
- Manchand, P. S.; White, J. D.; Fayos J. y Clardy, J. (1974) Structures of suaveolic acid and suaveolol. *Journal of Organic Chemistry* **39**, 2306-2307.
- Mannito, P. (1981) *Biosynthesis of Natural Products*, John Wiley & Sons, USA, pp. 213-214, 255-256.
- March, J. (1985) *Advanced Organic Chemistry. Reactions Mechanisms and Structure*. 3<sup>a</sup> ed., Wiley Interscience, p. 653.
- Marletti, F.; Monache, D. F. y Marini-Bettolo, G. B. (1976) 12. Diterpenoid quinones of *Hyptis fruticosa* (Labiatae). *Gazzetta Chimica Italiana* **106**, 119-126.
- Martínez, M. (1993) *Las Plantas Medicinales de México*, 6<sup>a</sup> ed., Ed. Botas, México, pp. 216, 412, 488, 508.
- Masamune, S.; Ma, P.; Moore, R.; Fujiyoshi, T.; Jaime, C. y Osawa, E. (1986) Computation of vicinal coupling constants in tetra- and hexa-alditol peracetates using

molecular mechanics. A rational approach to conformational analysis in solution. *Journal of Chemical Society Chemical Communication*, 261-263.

- Matsuse, I. T.; Lim, Y. A.; Hattori, M.; Correa, M. y Gupta, M. P. (1999) A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. *Journal of Ethnopharmacology* **64**, 15-22.
- Meléndez-Rodríguez, M. (1992) Preparación y Reactividad de diacetato de Longipinendiol. Tesis de Licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, p 35.
- Messana, I; Ferrari, F.; Alves, M. y Gács-Baitz, E. (1990) (-)-salzol, an isopimarane diterpene and a chalcone from *Hyptis salzmanii*. *Phytochemistry* **29**, 329-332.
- McCormick, L. J.; McKee, C. T.; Cardellina, H. J. y Boyd, R. M. (1996) HIV inhibitory natural products. 26. Quinoline alkaloids from *Euodia roxburghiana*. *Journal of Natural Products* **59**, 469-471.
- Minkin, V. I. y Legrand, M. (1977) Determination of Configurations by Dipole Moments, CD or ORD. En: *Stereochemistry. Fundamentals and Methods*. vol. 2, H. B. Kagan (editor), Thieme Publishers Stuttgart, Alemania, pp. 34-148.
- Miljkovic, M.; Dropkin, D.; Hagel, P. y Habash-Marino, M. (1984) Removal of sugar dithioacetal group with *N*-bromosuccinimide. *Carbohydrate Research* **128**, 11-20.
- Misra, T. N.; Singh, R. S.; Ojha, T. N. y Opadhayay, J. (1981) Chemical constituents of *Hyptis suaveolens*, part I. Spectral and biological studies on a triterpene acids. *Journal of Natural Products* **44**, 735-738.
- Morita, H.; Kishi, E.; Takeya, K.; Itokawa, H. e Iitaka, Y. (1993) Squalene derivatives from *Eurycoma longifolia* **34**, 765-771.



- Nagano, H. y Yasui, H. (1992) Synthesis of Boronolide from D-glucose. *Chemistry Letters*, 1045-1048.
- Nicolau, K. C.; Dai, W. M. y Guy, R. K. (1994) Chemistry and biology of taxol. *Angewandte Chemie International Edition in English* **33**, 15-44.
- Novelo Torres, A. M. (1994) Aislamiento y caracterización estructural de los principios activos con potencial antineoplásico de *Hyptis verticillata* Jacq. (Lamiaceae). Tesis de Maestría, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 131 p.
- Novelo, M.; Cruz, G. J.; Hernández, L., Pereda-Miranda, R., Chai, H.; Mar, W. y Pezzuto, M. J. (1993) Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. *Journal of Natural Products* **56**, 1728-1736.
- Oberlies, N. H. Chang, C. J. y McLaughlin, J. L. (1997) Structure-activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. *Journal of Medicinal Chemistry* **40**, 2102-2106.
- O'Mathúna, P. D. y Dосkotch, W. R. (1994a) Amoenolide A and related acetylated labdane diterpenes from *Amphiachyris amoena*. *Journal of Natural Products* **57**, 767-775.
- O'Mathúna, P. D. y Dосkotch, W. R. (1994b) Five new labdane diterpenes from *Amprhiachyris amoena*. *Journal of Natural Products* **57**, 1382-1390.
- O'Mathúna, P. D. y Dосkotch, W. R. (1995) Amoenolide K and Amoenolide K 19-acetate, two grindelane peroxides from *Amphiachris amoena*. Isolation, structure determination, and preparation of Amoenolide K from Amoenolide A by photochemical oxygenation. *Journal of Natural Products* **58**, 1407-1418.

- Ono, M.; Yamada, F.; Noda, N.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1993) Resin glycosides. XVIII. Determination by Mosher's method of the absolute configuration of mono- and dihydroxyfatty acids originated from resins glycosides. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **41**, 1023-1026.
- Osawa, E.; Imai, K.; Fujiyoshi-Yoneda, T. y Jaime, C. (1991) On the possibility of determining stereochemistry in acyclic polyhydroxylated compounds by the combined vicinal coupling constant/molecular mechanics method. A test with alditol peracetates. *Tetrahedron* **47**, 4579-4590.
- Othani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y. y Kakisawa, H. (1991) High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configuration of marine terpenoids. *Journal of the American Chemical Society* **113**, 4092-4096.
- Palsson, K. y Jaenson, T. G. T. (1999 ) Comparison of plant products and pyrethroid-treated bed nets for protection against mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Guinea Bissau, west Africa. *Journal of Medical Entomology* **36**, 144-148.
- Pcolinski, J. M.; O'Mathúna, P. D. y Doskotch, W. R. (1995) Modified labdane diterpenes from *Amphiachris amoena*. *Journal of Natural Products* **58**, 209-216.
- Pereda-Miranda, R. (1988) Elucidación estructural y estereoquímica de nuevos metabolitos secundarios aislados de Labiatae (*Salvia* e *Hyptis*). Tesis de Maestría, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, pp. 17-59.
- Pereda-Miranda, R. y Gascón-Figueroa, M. (1988) Chemistry of *Hyptis mutabilis*: New pentacyclic triterpenoids. *Journal of Natural Products* **51**, 996-998.

- Pereda-Miranda, R. y Delgado, G. (1990) Triterpenoids and Flavonoids from *Hyptis albida*. *Journal of Natural Products* **53**, 182-185.
- Pereda-Miranda, R.; García, M. y Delgado, G. (1990) Structure and stereochemistry of four  $\alpha$ -pirones from *Hyptis oblongifolia*. *Phytochemistry* **29**, 2971-2974.
- Pereda-Miranda, R.; Hernández, L.; Villavicencio, M. J.; Novelo, M., Ibarra, P., Chai, H. y Pezzuto, M. J. (1993) Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihidro- $\alpha$ -pyrones from *Hyptis pectinata*. *Journal of Natural Products* **56**, 583-593.
- Pereda-Miranda, R. (1994). Estructura de la tricolorina A, un glicolípido modulador de la actividad moduladora de la proteína cinasa C y principal agente alelopático de *Ipomea tricolor* Car. (Convolvulaceae). Tesis Doctoral, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 164 p.
- Pereda-Miranda, R. (1995) Bioactive natural products from traditionally used mexican plants. En: *Phytochemistry of Medicinal Plants* **29**, J. T. Arnason, R. Mata, J. T. Romeo (editores), Plenum Press, New York, pp. 83-112.
- Pezzuto, M. J. (1995) Natural product cancer chemopreventive agents. En: *Phytochemistry of Medicinal Plants. Recent Advances in Phytochemistry* **29**, T. J. Arnason, R. Mata y T. J. Romeo (editores), Plenum Press, New York, pp. 19-45.
- Potier, P. (1992) Search and discovery of new antitumor compounds. *Chemical Society Reviews*, 113-119.
- Pozsgay, V. y Kennings, J. H. (1988) Synthesis of oligosaccharides corresponding to the common polisaccharide antigen of group B streptococci. *Journal of Organic Chemistry* **53**, 4042-4052.

- Ramamoorthy, T. P.; Bye, R.; Lot, A. y Fa, J. (1998) Lamiaceae de México: diversidad, distribución, endemismo y evolución. En: *Diversidad Biológica de México, Orígenes y distribución*. Instituto de Biología, UNAM, México, pp. 501-526.
- Rieser, J. M.; Hui, Y.; Rupprecht, K. J.; Kozlowski, F. J.; Wood, V. K.; McLaughlin, L. J.; Hanson, R. P.; Zhuang, Z. y Hoyed, R. T. (1992) Determination of absolute configuration of stereogenic carbinol centers in Annonaceos acetogenins by <sup>1</sup>H- and <sup>19</sup>F-NMR analysis of Mosher ester derivatives. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 10203-10213.
- Rieser, J. M.; Fang, X. P.; Anderson, E. J.; Miesbauer, R. L.; Smith, L. D. y McLaughlin, L. J. (1993) 174. Muricatetrocins A and B and Gigantetrocin B: three new cytotoxic monotetrahydrofuran in acetogenins from *Annona muricata*. *Helvetica Chimica Acta* **76**, 2433-2444.
- Rodríguez-Hahn, L.; Esquivel, B. y Cárdenas, J. (1995) Neo-clerodane diterpenoids from American *Salvia* species. En: *Phytochemistry of Medicinal Plants* **29**, J. T. Arnason, R. Mata, J. T. Romeo (editores), Plenum Press, New York, pp. 311-332.
- Rodríguez Hernández, C. (1982) Búsqueda de sustancias con propiedades tóxicas contra gusano cogollero del maíz (*Spodoptero frugiperda* J.E. Smith) y mosquito casero (*Culex quinquefasciatus* Say.). Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Chapingo, México, 89 p.
- Rojas, A.; Hernández, L.; Pereda-Miranda, R. y Mata, R. (1992) Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **35**, 275-283.

- Romo de Vivar, A.; Vidales, P. y Pérez, A. (1991) An aliphatic  $\delta$ -lactone from *Hyptis urticoides*. *Phytochemistry* **30**, 2417-2418.
- Ruíz Acevedo, J. (1996) Determinación cuantitativa y aislamiento mediante cromatografía de líquidos de los constituyentes citotóxicos de *Hyptis verticillata* Jacq. (Lamiaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. México, p. 76.
- Sheth, K.; Jolad, S.; Wiedhopf, R. y Cole, J. R. (1972) Tumor-inhibitory agent from *Hyptis emoryi* (Labiatae). *Journal of Pharmaceutical Science* **61**, 1819-1821
- Silverstein, R. M.; Clayton, B. G. y Morrill, C. T. (1991) *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, New York.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, T. J., Bokesch, J.; Kenney, S. y Boyd, R. M. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of Natural Cancer Institute* **82**, 1107-1112.
- Snatzke, G. (1968) Circular dichroism and optical rotatory dispersion – Principles and application to the investigation of the stereochemistry of natural products. *Angewandte Chemie International Edition* **7**, 15-25.
- Su, C. W.; Fang, M. J. y Cheng, S. Y. (1994) Labdanes from *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* **4**, 1109-1114.
- Sullivan, R. G.; Dale, A. J. y Mosher, S. H. (1973) Correlation for configuration and  $^{19}\text{F}$  chemical shifts of  $\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -trifluoromethylacetate derivatives. *Journal of Organic Chemistry* **38**, 2143-2147.

- Tasdemir, D.; Wright, D. A. y Sticher, O. (1996) New furanoid and *seco*-labdanoid diterpenes from *Leonurus persicus* (Lamiaceae). *Journal of Natural Products* **59**, 131-134.
- Toki, M.; Ooi, T. y Kusumi, T. (1999) Sesterpenoids and diterpenoids of the was excreted by a scale insect, *Ceroplastes pseudoceriferus*. *Journal of Natural Products* **62**, 1504-1509.
- Tsichritzis, F. y Jakupovic, J. (1990) Diterpenes and other constituents from *Relbunium* species. *Phytochemistry* **29**, 3173-3187.
- Tsushima, M.; Fujiwara, Y. y Matsuno, T. (1996) Novel marine *di-Z*-carotenoids: cucumariaxanthins A, B, and C from the sea cucumber *Cucumaria japonica*. *Journal of Natural Products* **59**, 30-34.
- Urones, G. J.; Marcos, S. I.; Diez, D. y Cubilla, R. L. (1998) Tricyclic diterpenes from *Hyptis dilatata*. *Phytochemistry* **48**, 1035-1038.
- Valverde, S.; Hernández, A.; Herradon, B., Rabanal, R. M. y Martín-Lomas M. (1987) The synthesis of (–)-anamarine. *Tetrahedron* **43**, 3499-3504.
- Van Puyvelde, L.; Dube, S.; Uwimana, E.; Uwera, C.; Dommissie, A. R.; Esmans, L. D.; Schoor, V. O. y Vletinck, J. A. (1979) New  $\alpha$ -pyrones from *Iboza riparia*. *Phytochemistry* **18**, 1215-1218.
- Van Puyvelde, L.; Kimpe, N.; Dubé, S.; Chagnon-Dubé, M.; Boily, Y.; Borremans, F.; Schamp, N. y Anteunis, J. O. (1981) 1',2'-dideacetylboronolide, an  $\alpha$ -pyrone from *Iboza riparia*. *Phytochemistry* **20**, 2753-2755.
- Van Puyvelde, L. y Kimpe, N. (1998) Tetradenolide, an  $\alpha$ -pyrone from *Tetradenia riparia*. *Phytochemistry* **49**, 1157-1158.

- Velasco, D.; Castells, J. y López-Calahorra, F. (1990) Stereochemical elucidation from the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of its peracetylated aldonitrile derivatives with the aid of MM2/3JHH calculations. *Journal of Organic Chemistry* **55**, 3526-3530.
- Villavicencio González, J. M. (1993) Purificación y caracterización de las Pectinólidas A-C, principales constituyentes citotóxicos y antimicrobianos de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. Tesis de maestría, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 65 p.
- Wagner, H. (1977) Pharmaceutical and economic use of the Labiatae and Rutaceae families. *Revista Latinoamericana de Química* **8**, 16-25.
- Wall, M. E. y Wani, M. C. (1994) Taxol: discovery to clinic. En: *Economic and Medicinal Plants Research* **6**, H. Wagner, N. R. Farnsworth (editores), Academic Press, New York, pp. 299-322.
- Ward, E. D. y Rhee, K. C. (1991) A simple method for the microscale preparation of Mosher's acid chloride. *Tetrahedron Letters* **32**, 7165-7166.
- Wolfrom, M. L. (1929) The acetate of the free aldehyde form of glucose. *Journal of the American Chemical Society* **51**, 2188-2193.
- Woo, H. M.; Cho, Y. K.; Zhang, Y.; Zeng, L.; Gu, Z. M. y McLaughlin, L. J. (1995) Asimilobin and *cis*- and *trans*-murisolinones, novel bioactive Annonaceous acetogenins from the seeds of *Asimina triloba*. *Journal of Natural Products* **58**, 1533-1542.
- Zhao, G. X.; Chao, J. F.; Zeng, L.; Rieser, J. M. y McLaughlin, L. J. (1996) The absolute configuration of adjacent *bis*-THF acetogenins and asimincin, a novel potent asimincin isomer from *Asimina triloba*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **4**, 25-32.

- Zissis, E.; Clingman, L. A. y Richtmyer, K. N. (1966) D-glucose diphenyl dithioacetal, phenyl 1-thio- $\alpha$ -D-glucopyranoside, phenyl 1-thio- $\alpha$ -D-glucofuranoside, and some related compounds. *Carbohydrate Research* **2**, 461-469.



## APENDICE.

Artículos generados por la presente investigación:

1. Mabel Fragoso-Serrano, Emma González-Chimeo, and Rogelio Pereda-Miranda.  
Novel Labdane Diterpenes from the Insecticidal Plant *Hyptis spicigera*.  
**Journal of Natural Products** **62**, 45-50 (1999).
2. Rogelio Pereda-Miranda, Mabel Fragoso-Serrano, Carlos M. Cerda-García-Rojas.  
Application of Molecular Mechanics in the Total Stereochemical Elucidation of  
Spicigerolide, a Cytotoxic 6-Tetraacetyloxyheptenyl-5,6-Dihydro- $\alpha$ -Pyrona from  
*Hyptis spicigera*.  
Aceptado: 18-October-2000  
**Tetrahedron**  
En prensa.
3. M. Fragoso-Serrano, R. Pereda-Miranda and C. M. Cerda-García-Rojas.  
Conformational study of 3,4-di-*O*-acetyl-2,5-anhydro-L-rhamnose dithioacetals by  
molecular mechanics and NMR spectroscopy.  
**Carbohydrate Research**  
En preparación.

Novel Labdane Diterpenes from the Insecticidal Plant *Hyptis spicigera*<sup>1</sup>

Mabel Fragoso-Serrano, Emma González-Chimeo, and Rogelio Pereda-Miranda\*

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, D.F., Mexico

Received May 28, 1998

Seven new labdane diterpenes with insecticidal properties were isolated from the aerial parts of *Hyptis spicigera*. Their structures were established on the basis of spectral (MS, <sup>1</sup>H NMR, and <sup>13</sup>C NMR) and chemical evidences as: 19-acetoxy-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15-trihydroxylabda-8(17),(13Z)-diene (1); 15,19-diacetoxy-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxylabda-8(17),(13Z)-diene (2); 7 $\alpha$ ,15,19-triacetoxy-2 $\alpha$ -hydroxylabda-8(17),(13Z)-diene (3); 19-acetoxy-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxylabda-8(17),(13Z)-dien-15-al (4); 19-acetoxy-7 $\alpha$ ,15-dihydroxylabda-8(17),(13Z)-dien-2-one (5); 19-acetoxy-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxylabda-14,15-dinorlabd-8(17)-en-13-one (6); and 2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15,19-tetrahydroxy-*ent*-labda-8(17),(13Z)-diene (7). Absolute configurations were established by application of Mosher's method. Compound 2 significantly inhibited larval growth of the European corn borer.

Members of the Lamiaceae (Labiatae) family have provided important resources for the Old and New Worlds, and their uses in medicine, as condiments in regional cuisine, and as pest-control agents are of central importance.<sup>2–4</sup> The genus *Hyptis*, in particular, has yielded a great number of medicinal and economically important species that are frequently used as remedies in the treatment of gastrointestinal disturbances and skin infections, as well as insect repellents.<sup>5</sup> Bioactivity-guided fractionation of selected cytotoxic crude extracts have indicated the importance of flavonoids,<sup>6</sup> lignans (*H. verticillata* and *H. tomentosa*),<sup>7</sup> and 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones (*H. pectinata* and *H. oblongifolia*)<sup>8</sup> as the bioactive principles of this genus.<sup>5</sup>

In the course of our research directed toward the discovery of bioactive constituents from economic and medicinal Mexican plants,<sup>9</sup> we now describe the structure and stereochemistry of seven novel diterpenes, compounds 1–7, from the aerial parts of *H. spicigera* Lam. This plant material, popularly known in Mexico as "hierba del burro", is used by farmers to control insect infestations in stored grains. The whole plant is strongly scented, and it is burned in rooms to repel mosquitoes. The aerial parts of this species are used to flavor foods and for medicinal purposes.<sup>10</sup> It has also been a traditional practice of farmers in many regions of tropical Africa, for example, Burkina Faso (Upper Volta) and Sierra Leona, to mix this local weed with grain, because of some antifeedant and/or repellent components against bruchid beetles (*Callosobruchus* sp.), whose larvae feed on the grain, causing extensive damage and loss.<sup>11</sup>

The efficacy of this traditionally used insecticidal plant was previously demonstrated. Ethanolic extracts derived from this plant material were found to reduce the oviposition and hatching of bean weevils (*Acanthecelides obtectus*) under controlled environmental conditions.<sup>11</sup> Only two previous phytochemical investigations of this plant have been conducted. In a preliminary study of the leaves and inflorescences, the chemical composition of their essential oils was quantified by GC-MS. The oils were characterized by a high content of  $\beta$ -caryophyllene,  $\alpha$ -pinene, and sabinene.<sup>10</sup> Recently, the defatted aerial parts afforded a 6-substituted 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone,<sup>12</sup> closely related to the cytotoxic constituents from *H. oblongifolia*.<sup>5,8</sup>

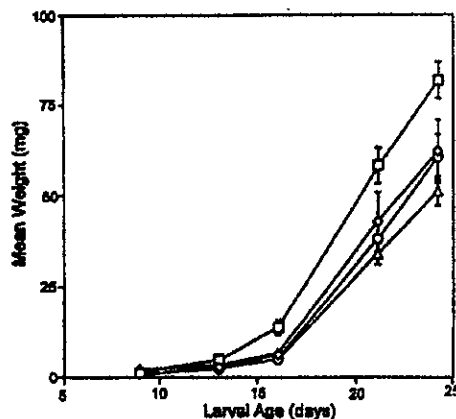


Figure 1. The growth of *Ostrinia nubilalis* reared on artificial mericid diet with test compound 2 at 0 (□), 5 (◇), 50 (○), and 100 (△) ppm. Vertical bars represent standard error deviations of the mean.

## Results and Discussion

Guided by a bioassay that tested for larval toxicity of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae), a CHCl<sub>3</sub>-MeOH extract of the aerial parts of *H. spicigera* was fractionated mainly by column chromatography. The insecticidal activity was traced to a fraction rich in a mixture of diterpenes. HPLC separation furnished seven labdanes. Compound 1 was the major metabolite present in the aerial parts of the plant ( $4.4 \times 10^{-2}$  % w/w), while 2–7 were minor components ( $3.8$ – $0.4 \times 10^{-3}$  % w/w). The plant was also shown to contain ursolic and *ent*-kaur-16-en-19-oic acids. Compound 2 significantly inhibited larval growth of the model insect (Figure 1). Cytotoxicity of the isolated compounds was evaluated with colon and nasopharyngeal carcinoma cell lines. Compound 1 displayed marginal cytotoxicity with HCT-15 (ED<sub>50</sub> 8.7  $\mu$ g/mL) and KB (ED<sub>50</sub> 19.4  $\mu$ g/mL) cultures. The responses displayed by diterpenes 4 and 5 were similar to each other and twofold less intense (ED<sub>50</sub> 11–19  $\mu$ g/mL) than 1. All other diterpenes were inactive at concentrations below 20  $\mu$ g/mL.

Diterpene 1 was obtained as a colorless oil exhibiting a positive optical rotation ( $[\alpha]_D^{25} +58^\circ$ ). It formed two derivatives on partial acetylation, which were identical to natural products 2 and 3. Peracetylation of these compounds gave the same derivative, indistinguishable (HPLC, NMR,  $[\alpha]_D$

\* To whom correspondence should be addressed. Tel.: (525) 622-5288. Fax: (525) 622-5329. E-mail: pereda@servidor.unam.mx.

Table 1.  $^1\text{H}$  NMR, HMQC, and HMBC Data of Compound 1<sup>a</sup>

position	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$ HMQC	correlated carbon	
			$^2J_{\text{C-H}}$	$^3J_{\text{C-H}}$
1	2.06 m	47.6 t	2	8, 20
	0.94 dd (11.5) <sup>b</sup>			
2	3.90 m	64.8 d	1, 3	
	2.03 m	45.1 t		
3	0.99 dd (12) <sup>b</sup>		2	1, 18, 19
4		38.6 s	3, 5, 18, 19	
5	1.27 dd (4) <sup>b</sup>	53.0 d	6	1, 18, 20
6	2.16 m	33.4 t	5, 7	
	1.28 m			
7	3.90 m	73.7 d	6	17
8		149.2 s	9, 17	6
9	1.53 dd (10.1) <sup>b</sup>	58.7 d	11	17, 20
10		40.3 s	1, 5, 9, 20	
11	1.64 m	21.6 t	9, 12	
	1.59 m			
12	2.08 m	29.9 t		14, 16
	1.23 m			
13		139.8 s	12, 16	11, 16
14	5.40 t (7)	124.9 d	15	12, 16
15	4.03 br d (7)	59.0 t	14	
16	1.71 br s	23.3 q		12, 14
17	5.26 br s	104.3 t		9
	4.76 br s			
18	1.03 s	27.7 q		3, 5, 19
19	4.14 d (11.1)	66.9 t		3, 5, 18
20	3.75 d (11.1)			
Me-CO-	0.70 s	16.1 q		1, 5, 9
Me-CO-	2.03 s	20.9 q		
Me-CO-		171.1 s		

<sup>a</sup> Chemical shifts ( $\delta$ ) are in ppm relative to TMS; coupling constants  $J$  (Hz). C-multiplicities were established by DEPT. HMBC optimized for  $J_{\text{C-H}} = 8$  Hz. <sup>b</sup> Approximate triplet-like signals.

+20°) from compound 8 produced by total acetylation of 1, thus showing the carbon skeleton, oxygenation pattern, and stereochemistry to be the same for each natural product.

Chemical ionization MS of the principal component (1) suggested the molecular formula  $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_5$ , allowing five degrees of unsaturation.  $^{13}\text{C}$  NMR (DEPT) indicated 20 carbons, with 90 directly attached protons for the diterpene nucleus, in addition to signals for an acetyl group. This spectrum also indicated the presence of two double bonds, one exocyclic, and a trisubstituted olefin as part of a side chain. The  $^1\text{H}$  NMR spectrum (Table 1) showed four methyl groups as singlets, of which one was part of an acetate ( $\delta$  2.03), one was attached to an unsaturated carbon ( $\delta$  1.71), and two were identified as tertiary groups ( $\delta$  1.03 and 0.70). Other functionalities that were apparent from the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of 1 (Table 1) included an allylic primary alcohol ( $\delta_{\text{H}}$  4.03 br d, H<sub>2</sub>-15;  $\delta_{\text{C}}$  59.0 CH<sub>2</sub>-15) and two secondary hydroxyl groups ( $\delta_{\text{H}}$  3.90 m, 2H;  $\delta_{\text{C}}$  64.8 CH-2, and 73.7 CH-7), which were initially recognized by MS fragments at  $m/z$  363, 345, and 327, indicating consecutive losses of three H<sub>2</sub>O molecules from the  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . The olefinic proton at  $\delta$  5.40 (H-14) was coupled to the hydroxyl methylene protons (H<sub>2</sub>-15) and displayed allylic coupling with the vinylic methyl group (H-16), thus defining the side chain substitution. There were also observed signals for two diastereotopic protons at  $\delta_{\text{H}}$  4.14 and 3.75 (AB, d, H<sub>2</sub>-19,  $J = 11.1$  Hz), whose chemical shifts were characteristic of an acetyloxy methylene group with an axial orientation ( $\delta_{\text{C}}$  66.9 CH<sub>2</sub>-19).<sup>13,14</sup> The presence of this functionality was corroborated in the MS by loss of ketene ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ , 42 mass units) from the dehydration fragments to produce peaks at  $m/z$  303, 285, and 267.

The nature of the diterpene skeleton of 1 was established by means of the 2D NMR experiments  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, NOESY, HMQC ( $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  chemical shift values are given in Table 1), and HMBC (two- and three-bond correlations between  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  are included in Table 1). These results allowed the construction of a *trans*-decalin system with the exocyclic methylene at C-8, attachment of the side chain at C-9, and placement of the acetyloxy methylene group at C-4 to complete a normal labdane skeleton.<sup>14,15</sup> Support for this assignment was obtained from the HMBC, which showed a  $^3J_{\text{C-H}}$ -interaction between C-18 ( $\delta_{\text{C}}$  27.7) and H<sub>2</sub>-19.

The relative stereochemistry was assigned on the basis of the observed NOESY correlations for the peracetyl derivative 8, although the coupling constants ( $^3J_{\text{H-H}}$ ) (Table 2) for the methine signals H-2 and H-7 provided enough evidence for their spatial orientation. Thus, H-2 displayed two large diaxial couplings ( $J_{1-2} = J_{2-3a} = 11.8$  Hz) and two small axial-equatorial interactions ( $J_{1a-2} = J_{2-3a} = 4.1$  Hz). The coupling pattern for the triplet-like signal of H-7 with small values ( $J_{6a-7} = J_{6c-7} = 4.2$  Hz) required an equatorial orientation. NOESY experiments showed correlations between the H-20 methyl group and H-2, which in turn displayed an additional cross peak with the most shielded proton ( $\delta_{\text{H}}$  4.06) of the acetyloxy methylene functionality (H<sub>2</sub>-19) on C-4, confirming their axial orientation on the  $\beta$ -face of the decalin system. Finally, the geometry of the side chain double bond was established as *Z* by virtue of the NOE interactions between H-14 and H-16 methyl group. These data provided conclusive evidence for formulation of 1 as 2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15,19-tetrahydroxylabda-8(17),13*Z*-diene, 19 acetate.

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra (Tables 2 and 3) of natural products 2 and 3 were similar to those of compound 1. After measuring the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMQC, the additional acetate group was placed at the primary carbinol group on C-15, whose methylene protons and carbon ( $\delta_{\text{C-15}}$  61.1 -  $\delta_{\text{C-15H}}$  59.0 = 2.1) were paramagnetically shifted in 2. Similarly, the data obtained for diterpene 3 supported the placement of the third ester substituent at C-7. The signal for H-7 was shifted 1.15 ppm downfield relative to the same resonances in compounds 1 and 2.

The CIMS of compound 4 exhibited a peak at  $m/z$  379  $[\text{M} + \text{H}]^+$  in accordance with the molecular formula  $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_5$ , suggesting an additional degree of unsaturation in relation to compound 1. The presence of an  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde (IR 1667  $\text{cm}^{-1}$ ) was supported by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR (Tables 2 and 3). Chemical shift values registered for this vinylic methyl group ( $\delta_{\text{H}}$  1.95 and  $\delta_{\text{C}}$  24.7) were in agreement with the *Z*-configuration for the 13,14 double bond.<sup>15</sup> Final evidence for the relative stereochemistry of compound 4 was achieved by chemical correlation with 1. Treatment of 1 with  $\text{MnO}_2$  in THF resulted in oxidation of the allylic position C-15. Surprisingly, the hydroxyl group on C-7 remained unreacted under room-temperature conditions. During a prolonged storage in  $\text{CDCl}_3$ , compound 4 suffered isomerization of the side-chain double bond to yield 9. The main differences of this derivative in relation to 4 were observed in the chemical shifts for the vinylic methyl group (Me-16,  $\delta_{\text{H}}$  2.14 and  $\delta_{\text{C}}$  17.6), which indicated an *E* configuration for the double bond.<sup>16</sup>

Compound 5 yielded a formula of  $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_5$  by FABMS. NMR data for 5 were almost identical to those of 1 except for absence of the H-2 signal, suggesting oxidation of the parent diterpene nucleus at this position. The presence of a ketone C-2 function was supported by the  $^{13}\text{C}$  NMR signal

Table 2. <sup>1</sup>H NMR Data for Compounds 2–9 (500 MHz in CDCl<sub>3</sub>)<sup>a</sup>

proton(s)	2	3	4	4 <sup>b</sup>	5	6	7 <sup>c</sup>	8	9
H-1	0.97 dd (9.5, 9.5) 2.10 m	0.97 dd (9, 9) 2.12 m	0.93 m 2.06 m	0.74 dd (11, 11) 1.99 m	2.14 d (13.5) 3.44 d (13.5)	1.04 m 2.06 m	0.89 dd (11,11) 2.16 m	1.04 dd (11.5, 11.5) 2.05 m	0.93 m 2.06 m
H-2	3.90 m	3.91 m	3.88 m	3.57 m		3.88 m	3.79 dddd (4, 11.5)	4.95 dddd (4.1, 11.8)	3.88 m
H-3	1.02 dd (10.5, 10.5) 2.07 m	1.02 dd (9.5, 9.5) 2.06 m	0.98 m 2.04 m	0.84 dd (10.5, 10.5) 1.95 m	2.19 d (14) 2.66 d (14)	1.00 m 2.04 m	0.93 dd (11.5, 11.5) 2.03 ddd (2, 4, 12)	1.11 dd (12.4, 12.4) 2.07 m	0.98 m 2.04 m
H-5	1.29 m	1.36 m	1.22 m	1.14 m	1.83 dd (3, 13.5)	1.26 m	1.28 m	1.4 dd (11.1, 13.4)	1.22 m
H-6	1.31 m 2.21 m	1.38 m 2.22 m	1.26 m 2.17 m	1.40 m 2.03 m	1.39 m 2.27 m	1.26 m 2.17 m	1.24 m 2.10 m	1.35 m 2.15 m	1.26 m 2.17 m
H-7	3.90 m	5.05 dd (4.5, 4.5)	3.88 m	3.57 m	3.89 dd (6, 11)	3.88 m	3.84 m	5.01 dd (4.2, 4.2)	3.88 m
H-9	1.56 dd (10, 10)	1.64 dd (9.5, 9.5)	1.55 dd (10.2, 10.2)	1.29 dd (10.5, 10.5)	1.77 dd (1, 7)	1.58 dd (10.4, 10.4)	1.58 dd (10.5, 10.5)	1.64 dd (10, 10)	1.55 dd (10.2, 10.2)
H-11	1.60 m 1.67 m	1.50 m 1.56 m	1.83 m 1.76 m	1.31 m 1.39 m	1.48 m 1.60 m	1.62 m 1.88 m	1.55 m 1.66 m	1.49 m 1.56 m	1.63 m 1.76 m
H-12	1.26 m 2.09 m	1.27 m 2.10 m	2.48 m 2.65 m	2.33 m 2.41 m	1.18 m 2.10 m	2.30 m 2.55 m	2.07 m	2.04 m 2.14 m	2.48 m 2.65 m
H-14	5.36 dd (6.9, 7.0)	5.37 dd (7.4, 7.4)	5.88 d (8.1)	5.85 d (8.1)	5.37 dd (7.5, 7.5)		5.36 dd (7, 7)	5.34 dd (7.3, 7.3)	5.83 d (8)
H-15	4.47 dd (7.2, 12.3) 4.54 dd (7.5, 12.6)	4.47 dd (7.2, 10) 4.53 dd (7.2, 10)	9.78 d (8.1)	9.90 d (8.1)	4.45 dd (7, 12.5) 4.85 dd (7, 12.5)		3.95 dd (7, 12.5) 4.02 dd (7, 12.5)	4.50 dd (6.6, 12.3) 4.44 dd (6.6, 12.2)	9.96 d (8)
H-16	1.75 br s	1.75 br s	1.95 br s	1.44 br s	1.74 br s	2.03 br s	1.73 br s	1.73 br s	2.14 br s
H-17	4.78 br s 5.28 br s	4.76 br s 5.12 br s	4.76 br s 5.32 br s	4.58 br s 5.45 br s	4.83 br s 5.34 br s	5.21 br s 4.65 br s	4.77 br s 5.27 br s	4.73 br s 5.10 br s	4.70 br s 5.26 br s
H-18	1.06 s	1.05 s	1.03 s	0.89 s	1.15 s	1.03 s	1.02 s	1.02 s	1.04 s
H-19	3.77 d (11.1) 4.18 d (11.1)	3.79 d (11.1) 4.13 d (11.1)	3.74 d (11.2) 4.16 d (11.2)	3.72 d (11.1) 4.19 d (11.1)	3.88 d (11.5) 3.92 d (11.5)	3.77 d (11.1) 4.12 d (11.1)	3.27 d (11.2) 3.69 d (11.2)	3.87 d (11.3) 4.06 d (11.3)	3.76 d (11.2) 4.14 d (11.2)
H-20	0.73 s	0.75 s	0.72 s	0.55 s	0.74 s	0.71 s	0.89 s	0.77 s	0.71 s
19-OAc	2.04 s	2.14 s	2.03 s	1.69 s	2.05 s	2.03 s		2.02	2.02 s
15-OAc	2.05 s	2.05 s						2.03	
7-OAc		2.06 s						2.01	
2-OAc								2.12	

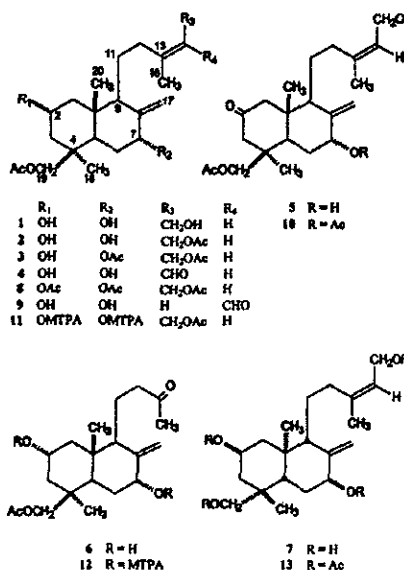
<sup>a</sup> Chemical shifts (δ) are in ppm relative to TMS. Observed splittings *J* (Hz). <sup>b</sup> In C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>. <sup>c</sup> In CD<sub>3</sub>OD.

at δ 209.9 (Table 3).<sup>14</sup> Oxidation of compound 3 with Jones's reagent produced 10, which was identical to the peracetylated derivative of compound 5.

The FABMS of 6 supported a molecular formula of C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>. Examination of the NMR spectra of 1 and 6 confirmed a common bicyclic *trans*-decalin moiety, and the suggestion for a bisnorlabdane skeleton was made evident from the H-16 methyl group signal, which shifted significantly downfield (δ 2.03). This observation indicated the presence of a methyl ketone functionality (δ<sub>C</sub> 208.7 C-14, 30.0 CH<sub>3</sub>-16) in 6 reminiscent of the partially degraded side chain of its biogenetic precursor, diterpene 1.

Compound 7 was found to have a molecular formula of C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub> as determined by FABMS. This polar diterpene displayed a negative specific rotation ([α]<sub>D</sub> -70°), in contrast with the positive values recorded for the rest of the novel compounds isolated from *H. spicigera*. The major difference from 1 in the NMR spectra was the absence of the acetyl moiety. Accordingly, it was assumed that 7 was the deacetylated form of 1 and, as a consequence, both natural products would share the same relative configuration. On acetylation, both compounds afforded peracetates that were identical by NMR and HPLC experiments, but exhibited opposite optical rotations. The observed rotation was positive for peracetate 8 and negative for derivative 13 prepared from natural product 7. These optical activity measurements implied that the two enan-

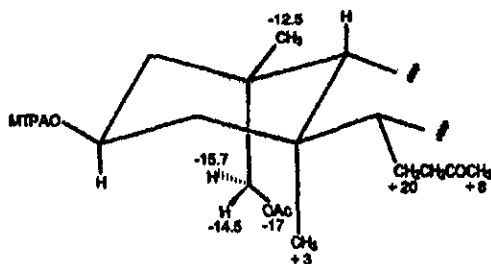
tiomeric labdane skeletons could be present in the plant material, that is, in the 10-Mex and 10-Meβ series.<sup>17</sup>



**Table 3.**  $^{13}\text{C}$  NMR Spectral Data of Compounds 2, 4, and 5–9 (125.7 MHz in  $\text{CDCl}_3$ )<sup>a</sup>

position	2	4	4 <sup>b</sup>	5	6	7 <sup>c</sup>	8	9
1	47.6	47.5	47.6	53.7	47.7	41.3	43.5	47.7
2	64.8	64.7	64.3	209.9	64.7	65.5	68.1	64.7
3	45.1	45.1	45.3	50.3	45.0	45.1	41.0	45.1
4	38.6	38.9	38.6	41.3	38.6	41.2	38.5	38.6
5	53.0	52.9	53.0	52.6	52.9	54.4	52.8	52.9
6	33.2	33.3	33.6	33.6	33.5	34.2	30.0	33.4
7	73.7	73.4	73.4	73.4	73.7	74.7	74.5	73.6
8	145.7	148.7	149.3	148.6	148.8	151.2	149.9	148.6
9	53.7	53.6	53.4	53.3	54.0	55.2	54.2	54.1
10	40.3	40.4	40.2	43.4	40.5	41.8	40.2	40.5
11	21.5	21.9	21.9	21.5	17.4	22.7	21.8	21.2
12	30.1	30.6	30.4	29.7	42.1	31.1	30.1	30.6
13	142.2	163.8	162.9	141.7	208.7	139.9	142.3	163.6
14	119.9	129.3	129.6	120.3		126.3	119.9	127.4
15	61.1	190.8	190.2	61.1		59.3	60.9	191.2
16	23.3	24.8	24.2	23.2	29.7	23.5	23.4	17.6
17	104.3	104.8	104.8	104.9	104.3	104.6	105.3	104.5
18	27.7	27.7	27.7	27.7	27.7	28.2	27.7	27.7
19	66.9	66.9	67.0	67.1	66.9	65.5	66.5	66.9
20	16.1	16.2	16.1	15.9	15.9	16.7	15.8	16.1
Me-CO-2								21.0
Me-CO-7								20.8
Me-CO-15	20.9							21.1
Me-CO-19	20.9	20.9	20.4	21.5	20.9			21.4
Me-CO-2								169.9
Me-CO-7								170.4
Me-CO-15	170.9							171.0
Me-CO-19	171.1	171.1	170.5	170.7	171.1			171.0

<sup>a</sup> Chemical shifts ( $\delta$ ) are in ppm relative to TMS. All assignments are based on HMQC and HMBC experiments. <sup>b</sup> In  $\text{C}_6\text{D}_6$ . <sup>c</sup> In  $\text{CD}_2\text{OD}$ .



**Figure 2.** Stereochemical model for the MTPA ester derivatives at carbinal center C-2 of compound 6 showing  $\Delta\delta$  values for diagnostic  $^1\text{H}$  NMR signals on the normal labdane skeleton.

Determination of the absolute configuration at the asymmetric center C-2 in compounds 2 and 6 by the use of high-field NMR application of Mosher's methodology<sup>13,19</sup> allowed correlation of the carbon framework of the dextrorotatory natural products 1–6 with the normal labdane 10-Me $\beta$ -stereotype. For example, construction of the stereochemical projection for the MTPA ester derivatives of compound 6 according to the Kakisawa–Mosher model<sup>18</sup> is shown in Figure 2, where the arrangement of the  $\Delta\delta$  ( $\Delta S - \Delta R$ ) (ppm) values for diagnostic protons surrounding the C-2 carbinal center confirmed the *R* configuration. The negative curvature of the optical rotatory dispersion displayed by derivative 13 was used as the argument in favor of the enantiomeric absolute configuration for natural product 7 (i.e., 10-Me $\alpha$ -labdane skeleton), in contrast to the positive plain ORD curve showed by paracetate 8.

### Experimental Section

**General Experimental Procedures.** Melting points were obtained on a Büchi 530 apparatus and are uncorrected. The IR spectra were obtained on Perkin–Elmer model 1600. Positive ion FABMS was recorded using a glycerol matrix in

a JEOL SX102A mass spectrometer. CIMS was recorded on a Hewlett–Packard 5985-B spectrometer. The optical rotations were measured on a Perkin–Elmer 241 polarimeter.  $^1\text{H}$  (500 MHz),  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz), DEPT, COSY, NOESY, HMQC, and HMBC NMR spectra were recorded either on a Bruker AMX-500 or a Varian XL-500 instrument. Chemical shifts are in  $\delta$  (ppm) with TMS as internal reference. Preparative column chromatography was performed on Si gel flash (40  $\mu\text{m}$ , J. T. Baker). Analytical and preparative TLC were performed on Si gel 60 F<sub>254</sub> Merck plates, and the spots were visualized by spraying with 10%  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  in 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , followed by heating at 110°. The instrumentation used for HPLC analysis consisted of a Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA) 600E Multisolute Delivery System equipped with a Waters 410 differential refractometer detector and a computer (OptiPlex 466/Le, Dell). Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of chromatographic information were performed by the Millennium 2000 software program (Waters). HPLC separations were performed on ISCO Si gel ( $\mu\text{Parasil}$ , 10  $\mu\text{m}$ ) columns: semipreparative (250 mm  $\times$  10 mm) and preparative (250  $\times$  21.2 mm) scales.

**Plant Material.** The aerial parts of *H. spicigera* were collected in November 1989, Km-18 Xalapa–Puerto de Veracruz Road, state of Veracruz, Mexico. A voucher specimen (M-21851) is deposited at the National Herbarium, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

**Extraction and Bioassay-guided Isolation Procedures.** Dried aerial parts (788 g) were extracted by maceration with hexane followed by  $\text{CHCl}_3$ –MeOH (1:1) at room temperature. After filtration, the solvent was removed under vacuum to yield 37.5 g (hexane) and 54.5 g ( $\text{CHCl}_3$ –MeOH) of dark-green residues. The hexane extract afforded 75 mg of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid.<sup>20</sup> The  $\text{CHCl}_3$ –MeOH extract was chromatographed over Si gel (450 g) in a gravity column using a gradient of Me<sub>2</sub>CO–MeOH in  $\text{CHCl}_3$ . A total of 70 fractions (200 mL each) was collected. Fractions 9–16 contained 100 mg of ursolic acid, which was identified by comparing its physical and spectral data with those of authentic material in our files.<sup>15</sup> Combined fractions 23–37 (6 g), eluted from the original column with  $\text{CHCl}_3$ –Me<sub>2</sub>CO (2:3), were found to concentrate the insecticidal activity. These active eluates were further rechromatographed over Si gel (200 g) using the same solvent system to yield the combined subfractions 89–103 (1 g) abundant in six compounds. The crude mixture was submitted to preparative HPLC. The elution was isocratic with *n*-hexane–EtOAc (1:4) and a flow rate of 6 mL/min. These chromatographic conditions were effective in isolating 350 mg of component 1 ( $t_R$  26.2 min), 6 mg of 5 ( $t_R$  26.8 min), 20 mg of 7 ( $t_R$  20.6 min), 30 mg of 4 ( $t_R$  18.1 min), 15 mg of 2 ( $t_R$  15.3 min), and 4 mg of 3 ( $t_R$  14.6 min). The subfractions 104–109 yielded 15 mg of the compound 6 ( $t_R$  22 min) by preparative HPLC. The mobile phase was EtOAc–MeOH, (95:5; flow rate = 6 mL/min).

**Compound 1:** oil;  $[\alpha]_D +58^\circ$  ( $c$  0.1, MeOH); IR (Nujol)  $\nu_{\text{max}}$  3388, 1724, 1658, 1456, 1374, 1246 and 1034  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, Table 1; CIMS  $m/z$  (rel int)  $[\text{M} + \text{H}]^+$  381 (1.3),  $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$  363 (29.9),  $[\text{M} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$  345 (48.7),  $[\text{M} + \text{H} - 3\text{H}_2\text{O}]^+$  327 (58.6),  $[\text{M} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_5\text{O}]^+$  303 (27.8),  $[\text{M} + \text{H} - 3\text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_5\text{O}]^+$  285 (89.4),  $[\text{M} + \text{H} - 4\text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_5\text{O}]^+$  267 (100); HRFABMS  $[\text{M} + \text{H}]^+$  381.2641 (calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{O}_8$ , 381.2640).

**Compound 2:** oil;  $[\alpha]_D +40^\circ$  ( $c$  0.1, MeOH); IR (Nujol)  $\nu_{\text{max}}$  3380, 1730, 1664, 1374, 1240, 1112, and 1058  $\text{cm}^{-1}$ ; FAB-MS  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  423;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, Tables 2 and 3.

**Compound 3:** oil;  $[\alpha]_D +25^\circ$  ( $c$  0.1, MeOH); IR (Nujol)  $\nu_{\text{max}}$  3378, 1730, 1680, 1456, 1372, 1240, and 1034  $\text{cm}^{-1}$ ; FABMS  $m/z$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  465;  $^1\text{H}$  NMR, Table 2.

**Compound 4:** oil;  $[\alpha]_D +10^\circ$  ( $c$  0.1, MeOH); IR (Nujol)  $\nu_{\text{max}}$  3392, 1732, 1666, 1374, 1246, 1128, and 1058  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, Tables 2 and 3; CIMS  $m/z$  (rel int)  $[\text{M} + \text{H}]^+$  379 (16.8),  $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$  361 (47.6),  $[\text{M} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$  343 (61.0),  $[\text{M} + \text{H} - 2\text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_5\text{O}]^+$  301 (76.5),  $[\text{M} + \text{H} - 3\text{H}_2\text{O} -$

$C_{22}H_{34}O^+$  283 (100),  $[M + H - 4H_2O - C_2H_5O]^+$  265 (57.8); HRFABMS  $[M + H]^+$  379.2479 (calcd for  $C_{22}H_{34}O_6$ , 379.2484).

**Compound 5:** oil;  $[\alpha]_D^{25} +66^\circ$  (c 0.1, MeOH);  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR, Tables 2 and 3; HRFABMS  $m/z$   $[M + Na]^+$  401.2301 (calcd for  $C_{22}H_{34}O_6Na$ , 401.2303).

**Compound 6:** oil;  $[\alpha]_D^{25} +23^\circ$  (c 0.1, MeOH); IR (Nujol)  $\nu_{max}$  3380, 1732, 1658, 1372, 1244, and 1034  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR, Tables 2 and 3; CIMS  $m/z$   $[M + H]^+$  353 (1.4),  $[M + H - H_2O]^+$  335 (11.7),  $[M + H - 2H_2O]^+$  317 (13.8),  $[M + H - C_2H_5O]^+$  309 (8.1),  $[M + H - 2H_2O - C_2H_5O]^+$  275 (15.7),  $[M + H - 3H_2O - C_2H_5O]^+$  257 (50.2); HRFABMS  $m/z$   $[M + Na]^+$  375.2146 (calcd for  $C_{22}H_{34}O_6Na$ , 375.2147).

**Compound 7:** white crystalline solid; mp 140–141  $^\circ C$ ;  $[\alpha]_D^{25} -30^\circ$  (c 0.1, MeOH); IR (KBr)  $\nu_{max}$  3336, 1698, 1648, 1452, 1372, and 1034  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR, Tables 2 and 3; FABMS  $m/z$   $[M + H]^+$  339,  $[M + H - H_2O]^+$  321,  $[M + H - 2H_2O]^+$  303,  $[M + H - 3H_2O]^+$  285; HRFABMS  $m/z$   $[M + Na]^+$  361.2354 (calcd for  $C_{22}H_{34}O_6Na$ , 361.2354).

**Acetylation of 1.** Compound 1 (178 mg) was dissolved in 2.5 mL of  $Ac_2O$ -pyridine (2:1) and maintained at room temperature for 24 h. The reaction mixture was diluted with  $H_2O$ , extracted with EtOAc, washed with saturated aqueous  $NaHCO_3$ , and dried with anhydrous  $Na_2SO_4$ . Column chromatography on Si gel (*n*-hexane-EtOAc 75:25) yielded 45 mg of product 8: oil;  $[\alpha]_D^{25} +20^\circ$  (c 0.1, MeOH); IR (Nujol)  $\nu_{max}$  1738, 1658, 1442, 1366, 1240, and 1030  $cm^{-1}$ ; FABMS  $m/z$   $[M + H]^+$  507,  $[M + H - HOAc]^+$  447,  $[M + H - 2HOAc]^+$  387,  $[M + H - 3HOAc]^+$  327;  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR, Tables 2 and 3.

**Partial Acetylation of 1.** Compound 1 (48 mg) was dissolved in  $Ac_2O$  (15  $\mu L$ ) and pyridine (11  $\mu L$ ). The reaction mixture was stirred at  $-5^\circ C$  for 10 min and treated under the same workup conditions as indicated above. The crude product was resolved by semipreparative HPLC (*n*-hexane-EtOAc, 1:1; flow rate = 1.5 mL/min) to yield 6.6 mg of diacetate 2 ( $t_R$  20.3 min), 1.5 mg of triacetate 3 ( $t_R$  15.6 min), and 3 mg of derivative 8 ( $t_R$  13.5 min), besides 16 mg of unreacted starting material 1 ( $t_R$  51.9 min).

**Acetylation of 7.** The procedures used for paracetylation of compound 1 were applied for derivatization of natural product 7 (4 mg) to yield 3 mg of 13: oil; ORD (c 0.8, MeOH)  $[\alpha]_{500} -2.5^\circ$ ,  $[\alpha]_{578} -2.5^\circ$ ,  $[\alpha]_{648} -3.7^\circ$ ,  $[\alpha]_{688} -6.1^\circ$ ,  $[\alpha]_{885} -8.6^\circ$ ; IR,  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR data were identical to those of compound 8.

**Oxidation of Compound 1.** To 10.8 mg of compound 1 in 2 mL of THF were added 100 mg of  $MnO_2$ . The mixture was stirred at  $25^\circ C$  for 16 h and filtered under Celite. The solvent was removed at reduced pressure. Then the crude product was purified by semipreparative HPLC (*n*-hexane-EtOAc, 1:4; flow rate = 1.5 mL/min) to yield 5.6 mg of compound 4.

**Oxidation of Compound 3.** Natural product 3 (2 mg) was dissolved in 0.5 mL  $Me_2CO$  at  $0^\circ C$  and treated dropwise with Jones's reagent ( $CrO_3$ - $HOAc$ ) until an orange color persisted. After 5 min, the solution was diluted with  $H_2O$  and extracted with  $CHCl_3$ . Removal of the solvent left a residue that was analyzed by HPLC (*n*-hexane-EtOAc, 7:3; flow rate = 1 mL/min) to afford one major peak ( $t_R$  10.2 min). This derivative was identical (GC-MS and HPLC coelution) to paracetate 10, which was prepared by acetylation of 5.

**Preparation of C(2),C(7)-bis-MTPA Esters of 2 and 6.** To a solution of compound 2 or 6 (2.8 mg in 750  $\mu L$  of  $CDCl_3$  in a dry NMR tube) were added 4-(dimethylamino)pyridine (1.9 mg) and (*R*)-(-)- $\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -(trifluoromethyl)-phenylacetyl chloride (23.6  $\mu L$ ). The reactions were allowed to stand overnight under  $N_2$ . After 24 h,  $^1H$  NMR spectra were recorded without further workup<sup>21</sup> of the mixtures and revealed complete conversion of the starting materials 2 and 6 to the MTPA esters (11 and 12, respectively). Isolation of derivatives prepared from compound 6 was as follows: saturated aqueous  $NaHCO_3$  and  $Et_2O$  were added to the mixture and stirred vigorously for 10 min to allow efficient hydrolysis of the excess MTPA-Cl.<sup>22</sup> The organic phase was washed with 0.5 N HCl, dried with anhydrous  $Na_2SO_4$ , and concentrated to a yellow oil. This crude residue was purified by semipreparative HPLC (*n*-hexane-EtOAc, 7:3; flow rate = 3 mL/min) to yield 1.2 mg of the C(2),C(7)-bis-(*S*)-MTPA ester of compound 6. Treatment

with (*S*)-(+)-MTPA-Cl as describe above yielded 1.3 mg of the C(2),C(7)-bis-(*R*)-MTPA ester.

**C(2),C(7)-bis-(*S*)-MTPA ester of 2:**  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$  7.54 (4 H, m, ArH), 7.43 (6 H, m, ArH), 5.43 (1 H, m, H-14), 5.29 (1 H, s, H-17), 5.28–5.25 (2 H, m, H-2 and H-7), 4.80 (1 H, s, H-17'), 4.54 (1 H, dd,  $J = 7.5$ , 11 Hz, H-15), 4.49 (1 H, dd,  $J = 7.5$ , 11 Hz, H-15'), 4.17 (1 H, d,  $J = 11$  Hz, H-19), 3.79 (1 H, d,  $J = 11$  Hz, H-19'), 3.56 (3 H, br s, OMe), 3.55 (3 H, br s, OMe), 2.05 (3 H, s, OCOMe), 2.04 (3 H, s, OCOMe), 1.76 (3 H, br s, Me-16), 1.06 (3 H, s, Me-18), and 0.74 (3 H, s, Me-20).

**C(2),C(7)-bis-(*R*)-MTPA ester of 2:**  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$  7.55 (4 H, m, ArH), 7.42 (6 H, m, ArH), 5.43 (1 H, m, H-14), 5.28 (1 H, s, H-17), 5.25 (2 H, m, H-2 and H-7), 4.79 (1 H, s, H-17'), 4.55 (1 H, dd,  $J = 7.6$ , 11.5 Hz, H-15), 4.49 (1 H, dd,  $J = 7.6$ , 11.5 Hz, H-15'), 4.19 (1 H, d,  $J = 11.1$  Hz, H-19), 3.80 (1 H, d,  $J = 11.1$  Hz, H-19'), 3.60 (3 H, br s, OMe), 3.58 (3 H, br s, OMe), 2.06 (3 H, s, OCOMe), 2.04 (3 H, s, OCOMe), 1.75 (3 H, br s, Me-16), 1.07 (3 H, s, Me-18), and 0.72 (3 H, s, Me-20).

**C(2),C(7)-bis-(*S*)-MTPA ester of 6:** oil,  $t_R$  7.21 min;  $[\alpha]_D^{25} +41^\circ$  (c 0.1, MeOH);  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$  7.56–7.53 (4 H, m, ArH), 7.43 (6 H, m, ArH), 5.25–5.20 (2 H, m, H-2 and H-7), 5.09 (1 H, s, H-17), 4.65 (1 H, s, H-17'), 4.08 (1 H, d,  $J = 11.2$  Hz, H-19), 3.88 (1 H, d,  $J = 11.2$  Hz, H-19'), 3.56 (3 H, br s, OMe), 3.55 (3 H, br s, OMe), 2.12 (3 H, br s, Me-16), 2.03 (3 H, s, OCOMe), 1.05 (3 H, s, Me-18), and 0.83 (3 H, s, Me-20); FABMS  $[M + H]^+$  785,  $[M + H - 234 (MTPA-OH)]^+$  551,  $[551 - H_2O]^+$  533,  $[533 - C_2H_5O]^+$  491,  $[M + H - 2MTPA-OH]^+$  317.

**C(2),C(7)-bis-(*R*)-MTPA ester of 6:** oil,  $t_R$  8.95 min;  $[\alpha]_D^{25} -10^\circ$  (c 0.1, MeOH);  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 500 MHz)  $\delta$  7.58–7.53 (4 H, m, ArH), 7.42 (6 H, m, ArH), 5.25–5.19 (2 H, m, H-2 and H-7), 4.86 (1 H, s, H-17), 4.56 (1 H, s, H-17'), 4.11 (1 H, d,  $J = 11.2$  Hz, H-19), 3.92 (1 H, d,  $J = 11.2$  Hz, H-19'), 3.60 (3 H, br s, OMe), 3.56 (3 H, br s, OMe), 2.10 (3 H, br s, Me-16), 2.06 (3 H, s, OCOMe), 1.07 (3 H, s, Me-18), and 0.82 (3 H, s, Me-20); FABMS  $[M + H]^+$  785,  $[M + H - 234 (MTPA-OH)]^+$  551,  $[551 - H_2O]^+$  533,  $[533 - C_2H_5O]^+$  491,  $[M + H - 2MTPA-OH]^+$  317.

**Biological Screening Procedures.** Larvae of *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) were obtained from a laboratory colony maintained at the University of Ottawa, under previously described conditions.<sup>23</sup> The insecticidal potential of the extract, fractions, and isolates derived from *H. spicigerus* was evaluated by established procedures.<sup>24</sup> In brief, all test materials were dissolved in 95% EtOH and incorporated into an agar-based meric diet at final concentrations of 5, 50, and 100 ppm. Larvae were reared at  $25^\circ C$ , with a relative humidity of approximately 80%, and a 16:8 light-darkness regime. Mortality and larval weights were obtained every 4–6 days during the growth period. The results were analyzed with an ANOVA using Tukey's multiple range test.

**Cytotoxicity Assay.** Nasopharyngeal carcinoma (KB) and colon cancer (HCT-15) cell lines were maintained in RPMI 1640 (10 $\times$ ) medium supplemented with 10% fetal bovine serum. All cell lines were cultured at  $37^\circ C$  in an atmosphere of 5%  $CO_2$  in air (100% humidity). The cells at log phase of their growth cycle were treated in triplicate with various concentrations of the test samples (0.16–20  $\mu g/mL$ ) and incubated for 72 h at  $37^\circ C$  in a humidified atmosphere of 5%  $CO_2$ . The cell concentration was determined by sulforhodamine method.<sup>25</sup> Results were expressed as the dose that inhibits 50% control growth after the incubation period ( $ED_{50}$ ). The values were estimated from a semilog plot of the drug concentration ( $\mu g/mL$ ) against the percent of viable cells.<sup>26</sup> Ellipticine was included as a positive drug control:  $ED_{50}$  0.10 (KB); 0.17  $\mu g/mL$  (HCT-15).

**Acknowledgments.** This research was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN205197) and Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM (PADEP: 5324 and 5381; PAEP-207005). Financial support from CONACYT (400313-5-26118-N) is also acknowl-

edged. M. F.-S. is grateful to DGAPA-UNAM for a 1995-1998 postgraduate scholarship. The authors thank Dr. Thor Arnason (Department of Biology, University of Ottawa, Canada) for provision of the insect bioassay facilities. We wish to thank Isabel Chávez and Beatriz Quiroz (Instituto de Química, UNAM) for recording some of the NMR spectra. Thanks are also due to "Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación" (Facultad de Química, UNAM), especially to Graciela Chávez, Maricela Gutiérrez, Nuria Esturau, Oscar Yáñez, and José Luis Gallegos for the recording of IR, NMR, and MS spectra. We are also grateful to Drs. John Pezzuto, Hee-Byung Chai (University of Illinois at Chicago), and M. Luisa Villarreal (Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS, México) for their active support and help during the standardization of basic cell culture techniques in our laboratory.

#### References and Notes

- (1) Part VI in the series Bioactive Natural Products from Traditionally Used Mexican Plants; taken in part from the Ph.D. dissertation of M. Fragoso-Serrano.
- (2) Wagner, H. *Rev. Latinoamer. Quim.* 1977, 8, 16-25.
- (3) Lawrence, B. M. In *Advances in Labiatae Science*; Harley, R. M., Reynolds, T., Eds.; Royal Botanical Gardens: Kew, 1992; pp 399-438.
- (4) Heinrich, M. In *Advances in Labiatae Science*; Harley, R. M., Reynolds, T., Eds.; Royal Botanical Gardens: Kew, 1992; pp 475-488.
- (5) Pereda-Miranda, R. In *Phytochemistry of Medicinal Plants*; Arnason, J. T., Mata, R., Romeo, J. T., Eds.; Plenum: New York, 1995; pp 83-112.
- (6) Kingston, D. G. I.; Rao, M. M.; Zucker, W. V. *J. Nat. Prod.* 1978, 42, 496-499.
- (7) Novelo, M.; Cruz, J. G.; Hernández, L.; Pereda-Miranda, R.; Chai, H.; Mar, W.; Pezzuto, J. M. *J. Nat. Prod.* 1993, 56, 1728-1736.
- (8) Pereda-Miranda, R.; Hernández, L.; Villavicencio, M. J.; Novelo, M.; Ibarra, P.; Chai, H.; Pezzuto, J. M. *J. Nat. Prod.* 1993, 56, 583-593.
- (9) Bah, M.; Pereda-Miranda, R. *Tetrahedron* 1997, 57, 9007-9022.
- (10) Kini, F.; Kam, B.; Aycard, J.-P.; Gaydou, E. M.; Bombarda, I. *J. Essent. Oil. Res.* 1993, 5, 219-221.
- (11) Lambert, J. D. H.; Gala, J.; Arnason, J. T.; Philogène, J. R. *Insect Sci. Applic.* 1985, 6, 167-170.
- (12) Aycard, J.-P.; Kini, F.; Kam, B.; Gaydou, E. M.; Faure, R. *J. Nat. Prod.* 1993, 56, 1171-1173.
- (13) Pereda-Miranda, R.; Dolgado, G.; Romo de Vivar, A. *J. Nat. Prod.* 1994, 49, 225-230.
- (14) O'Mathúna, D. P.; Doakotch, R. W. *J. Nat. Prod.* 1984, 57, 787-775.
- (15) O'Mathúna, D. P.; Doakotch, R. W. *J. Nat. Prod.* 1985, 58, 1401-1418.
- (16) Su, W.-C.; Fang, J.-M.; Cheng, Y.-S. *Phytochemistry* 1994, 37, 1109-1114.
- (17) Manitto, P. *Biosynthesis of Natural Products*; Ellis Horwood Ltd.: West Sussex, 1981; pp 256-257.
- (18) Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 4092-4096.
- (19) Kusumi, T.; Hamada, T.; Ishitsuka, M. O.; Ohtani, I.; Kakisawa, H. *J. Org. Chem.* 1992, 57, 1033-1035.
- (20) Castellaro, S. J.; Dolan, S. C.; MacMillan, J.; Willis, C. I. *Phytochemistry* 1990, 29, 1829-1831.
- (21) Ward, D. E.; Rhee, C. K. *Tetrahedron Lett.* 1991, 32, 7165-7166.
- (22) Riese, M. J.; Hui, Y.-H.; Rupprecht, J. K.; Koslowaki, J. P.; Wood, K. V.; McLaughlin, J. L.; Hanson, P. R.; Zhuang, Z.; Hoyer, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 10208-10213.
- (23) Arnason, J. T.; Philogène, B. J. R.; Donakov, N.; Kubo, I. *Entomol. Exp. Appl.* 1987, 43, 221-226.
- (24) Bernard, C. B.; Krishnamurthy, H. G.; Chauvet, D.; Durst, T.; Philogène, B. J. R.; Sánchez-Vizdas, P.; Hasbun, C.; Poveda, L.; San Román, L.; Arnason, J. T. *J. Chem. Ecol.* 1993, 21, 601-614.
- (25) Ekahan, P.; Storing, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Boskusch, H.; Kennay, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996, 88, 1107-1112.
- (26) Likhitwitayawuid, K.; Angerhofer, C. K.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Ruangrunsi, N. *J. Nat. Prod.* 1993, 57, 30-38.

NP980222Z

**Application of Molecular Mechanics in the Total Stereochemical  
Elucidation of Spicigerolide, a Cytotoxic 6-Tetraacetyloxyheptenyl-5,6-  
Dihydro- $\alpha$ -Pyrone from *Hyptis spicigera*<sup>\*</sup>**

Rogelio Pereda-Miranda,<sup>a,\*</sup> Mabel Fragoso-Serrano<sup>a</sup> and Carlos M. Cerda-García-Rojas<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico*

<sup>b</sup>*Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 14-740, Mexico City 07000, Mexico*

**Abstract**—Bioactivity-directed fractionation of the crude extract prepared from the medicinal Mexican plant *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) tested on KB cells led to the isolation of spicigerolide (**1**). The structure for this novel cytotoxic compound was elucidated as 6*R*-[3*S*,4*S*,5*S*,6*S*-tetraacetyloxy-1*Z*-heptenyl]-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one. The relative stereochemistry of this flexible molecule was determined by a combination of molecular mechanics calculations and <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H coupling constant data, while the absolute configuration was established according to CD measurements. The MM<sup>3</sup><sub>J<sub>H-H</sub></sub> calculations, as applied to **1**, was validated with model linear compounds prepared from L-rhamnose: 2,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-6-deoxy-L-mannose (**5**) and tetra-*O*-acetyl-1,6-dideoxy-L-mannitol (**8**). Both compounds possess the same stereochemistry predicted to be present in the acyclic moiety of spicigerolide (**1**) but lacking the stereochemical influence of the chiral pyrone.

**Keywords:** pyrones; molecular mechanics; NMR; stereochemistry; configuration; biologically active compounds; plants; *Hyptis spicigera*.

---

<sup>\*</sup>Taken in part from the Ph. D. thesis of Mabel Fragoso Serrano

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel.: +52-5622-5288; fax: +52-5622-5329; e-mail: pereda@servidor.unam.mx.



## Introduction

Polyoxygenated 6-heptenyl-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones occur in several members of the plant family Lamiaceae<sup>1,2</sup> although their distribution among the genus *Hyptis* seems to be restricted<sup>3-6</sup> to species belonging to the *Mesosphaeria* section.<sup>7</sup> Many of these compounds have displayed antimicrobial, antifungal and phytotoxic activities,<sup>1,2</sup> as well as cytotoxicity<sup>8</sup> against human tumor cells.

*Hyptis spicigera*, a herbaceous member of the *Mesosphaeria* section with a pantropical distribution,<sup>7</sup> is used in traditional Mexican medicine for the treatment of gastrointestinal disturbances, skin infections, as well as wounds and insect bites. The insecticidal efficacy of this weed has also been demonstrated in agriculture.<sup>9</sup> Preceding this report, a 1993 chemical study on the aerial parts of this plant<sup>10</sup> described the isolation of a 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone named spicigera lactone whose stereochemistry was not established. After comparing the NMR data and the melting point evidence for 5-deacetoxy-5'-epiolguine, the cytotoxic constituent of *H. oblongifolia*,<sup>3</sup> it would seem that the two compounds are apparently the same. Recently, the chemical investigation of the aerial parts of *H. spicigera* guided by a bioassay that tested for toxicity on the European corn borer larvae allowed us to trace the insecticidal activity to a fraction containing a rich mixture of new labdane diterpenes.<sup>9</sup>

In our ongoing investigations directed toward the discovery of bioactive constituents from traditionally used Mexican plants,<sup>8</sup> it was found that the crude extract of *H. spicigera* was also cytotoxic ( $ED_{50} = 18.5 \mu\text{g/ml}$ ) when tested in the *in vitro* human nasopharyngeal carcinoma (KB) assay system. Subsequent bioactivity-directed fractionation of the active extract tested on KB cells led to the isolation of a new 6-heptenyl-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone as the major cytotoxic principle ( $ED_{50} = 1.5 \mu\text{g/mL}$ ), which was named spicigerolide (1). In this paper, we describe the application of molecular mechanics calculations and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  coupling constant analysis ( $\text{MM}^3 J_{\text{H-H}}$ ) used in the stereochemical elucidation of spicigerolide (1), which resulted in the prediction of the relative configuration for the five stereogenic centers. Two chiral compounds, 2,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-6-deoxy-L-mannose (5) and tetra-*O*-acetyl-1,6-dideoxy-L-mannitol (8), were prepared from L-rhamnose in order to

obtain simple flexible models with the same relative stereochemistry predicted to be present in the acyclic moiety of spicigerolide (1) but lacking the stereochemical influence of the chiral 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone nucleus. The remarkable correlation between the molecular mechanics calculated coupling constants and the experimentally registered values obtained for synthesized models was used to further support the application of this methodology for the stereochemical elucidation of polyoxygenated linear compounds, as 1.

## Results and Discussion

Spicigerolide (1) exhibited a molecular formula of  $C_{20}H_{26}O_{10}$  based on its HREIMS data. The UV ( $\lambda_{\max}$  208 nm) and IR ( $\nu_{\max}$  1740  $cm^{-1}$ ) spectra were in accord with the presence of an  $\alpha,\beta$ -unsaturated- $\delta$ -lactone.<sup>1</sup> The NMR data indicated that compound 1 has a structure similar to those of synrotolide<sup>11</sup> and related 6-heptenyl-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from the Lamiaceae family.<sup>1,2</sup> In particular, the  $^{13}C$  NMR spectrum, assisted by  $^1H, ^1H$ - and  $^1H, ^{13}C$ -COSY techniques, was in full agreement with the presence of a 3,4,5,6-(tetraacetyloxy)-1-heptenyl moiety at C-6. The discernible 10.5 Hz coupling constant for the two olefinic protons at C-1' and C-2' demonstrated the *cis* configuration of the side chain double bond.<sup>1,6</sup> The characteristic coupling constant values between the methylene protons at C-5 and H-6 ( $J_{5ax-6} = 11.0$  Hz;  $J_{5eq-6} = 4.5$  Hz) indicated the pseudo-equatorial orientation of the side chain.<sup>1,12</sup> The stereochemical elucidation of spicigerolide (1) was determined by taking into account the following considerations: (1) The positive sign of the CD curve ( $\Delta\epsilon_{256} = +2.8$ ) provided evidence for an (*R*)-configuration in the stereogenic center of the pyrone nucleus (C-6)<sup>1,2</sup> according to Sneath's rule.<sup>13</sup> (2) The application of molecular mechanics and vicinal coupling constant calculations ( $MM^3J_{H-H}$ ) to establish the relative configuration in the acyclic portion.<sup>14,15</sup>

Due to the fact that the proton spin system attached to C(3')-C(4')-C(5')-C(6') of spicigerolide (1) was not of first order, the spectral simulation method was employed to obtain accurate values for the observed coupling constants with a root mean square error of 0.17 Hz for the fitting of experimental and simulated spectra. The experimental coupling constant data ( $J_{obs}$ ) for the antiparallel ( $J_{3'-4'} = 9.0$  Hz,  $J_{5'-6'} = 8.7$  Hz) and gauche oriented protons ( $J_{4'-5'} = 2.1$  Hz) were in accord with a planar, zigzag arrangement<sup>16</sup> of the side

chain. The comparison of vicinal coupling constants for the side chain (H-3' through H-6') with peracetylated hexa-alditol models was used as the initial criterion to select the proper diastereoisomer from among the eight possible hexose configurations.<sup>17</sup> This approach revealed the close similarity for the  $^3J_{H-H}$  values of spicigerolide (1) and model peracetyl derivatives of mannose,<sup>15,17</sup> e.g. 2*R*,3*R*,4*R*,5*R*-hexitol hexaacetate ( $J_{2-3} = J_{4-5} = 9.2$  Hz;  $J_{3-4} = 2.4$  Hz), which suggested that the 6-deoxy-mannose (rhamnose) configuration must be present in the side chain of spicigerolide. The establishment of an (*R*)-configuration for the C-6 in the pyrone nucleus indicated that the stereochemistry for the side chain in the natural product could be either diastereoisomer 1 (6*R*,3'*S*,4'*S*,5'*S*,6'*S*) or 2 (6*R*,3'*R*,4'*R*,5'*R*,6'*R*). These structures were analyzed by MM calculations and their minimum energy conformers were calculated after considering the following premises:

- (i) The number of possible conformers were established using a systematic search procedure by varying 120° each of the torsion angles around the C(3')-C(4')-C(5')-C(6') fragment in the side chain, and all possible combinations of staggered arrangements<sup>18</sup> were considered, i.e., *gauche*<sup>P</sup> (dihedral angle of +60°), *anti*<sup>A</sup> (180°) and *gauche*<sup>M</sup> (-60°) (Table 1). Conformers with at least one forbidden *gauche*<sup>P</sup>-*gauche*<sup>M</sup> sequence<sup>18</sup> which resulted in O//O 1,3 interactions were excluded,<sup>15</sup> i.e., *P*-*M* for the C(3')-C(4')-C(5') fragment and/or *M*-*P* for the C(4')-C(5')-C(6').
- (ii) The conformation for the acetyloxy moieties was adjusted to the most favorable *antiperiplanar*<sup>15,19</sup> geometry prior to the minimization procedure but was left without any geometry restriction during the calculations.
- (iii) The initial dihedral angles H(6)-C(6)-C(1')-H(1') and H(2')-C(2')-C(3')-H(3') were set at -152° and +147° in agreement with the observed coupling constants  $J_{6,1'} = 9.5$  Hz and  $J_{2,3'} = 9.0$ , respectively.
- (iv) The pseudo-chair conformation with C-6 at the flap was the starting geometry for the 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone moiety according to X-ray analysis of related compounds.<sup>12</sup>

The conformation analysis using the above mentioned systematic search procedure<sup>20</sup> allowed a total number of 22 conformers to be geometry-optimized (Table 1). For diastereoisomer 1 (6*R*,3'*S*,4'*S*,5'*S*,6'*S*), two minimum energy conformers (Fig. 1) represented 90% of the total population in contrast with the previously reported even conformational distribution associated to flexible molecules in solution.<sup>15</sup> The most stable

conformation corresponded to **1a** (*AMA*, 58.7%) with an  $E_{\text{MMX}} = 12.78$  kcal/mol. The second minimum conformation was found to be **1b** (*AAA*, 30.9%) and its calculated  $E_{\text{MMX}} = 13.16$  kcal/mol. Both conformers defined extreme values for the calculated vicinal couplings (among all the protons on the chiral centers of the side chain) which resulted from the antiperiplanar disposition for  $\text{H}_{3'}\text{--H}_{4'}$  ( $J_{\text{calc}} = 9.0$  Hz) and  $\text{H}_{5'}\text{--H}_{6'}$  (8.8 Hz), as well as the synclinal arrangement for  $\text{H}_{4'}\text{--H}_{5'}$  (2.1 Hz). In contrast, the *6R,3'R,4'R,5'R,6'R* configuration in diastereoisomer **2** induced an increment in the conformational dispersion of this molecule (Table 1). In this case, the contribution of the two minimum energy conformers stood only for 82% of the whole population (Fig. 1). Furthermore, *AMA* conformation (**2a**, 37.4%,  $E_{\text{MMX}} = 16.82$  kcal/mol) did not represent the major contributor as calculated for **1** since it shared an almost even distribution with the *MMA* conformer (**2b**, 45%,  $E_{\text{MMX}} = 16.71$  kcal/mol). This situation provoked a decrement in the calculated value for the  $\text{H}_{3'}\text{--H}_{4'}$  coupling constant ( $J_{\text{calc}} = 5.1$  Hz) which deviated significantly from the value obtained for **1** ( $J_{\text{obs}} = 9.0$  Hz) as expected from the stereochemical influence exerted by the chiral pyrone nucleus over the equilibrium among the three C(3)-C(4) rotamers. The biogenetic consideration that all 6-heptenyl-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones isolated from the Lamiaceae possess an (*S*)-configuration<sup>21</sup> for the stereogenic center at C-6' was in agreement with the correspondence between the molecular mechanics calculated coupling constant for diastereoisomer **1** and the measured values for spicigerolide. Therefore, the structure for this biodynamic compound was elucidated as *6R*-[*3S,4S,5S,6S*-tetraacetyloxy-1*Z*-heptenyl]-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one (**1**).

In order to validate this approach, the  $\text{MM}^3 J_{\text{H-H}}$  calculations were applied to the synthesized compounds **5** and **8**. These linear substances were prepared following previously reported procedures<sup>16,22,23</sup> and both represented new derivatives of L-rhamnose. The conformational analysis revealed that the minimum energy conformer for **5** and **8** corresponded to *AMA* which represented 80% of the total population and the same planar zigzag conformation adopted by the side chain of spicigerolide (**1**) was confirmed from the experimentally registered  $^3 J_{\text{H-H}}$  values for both flexible acyclic compounds. Extreme values were recorded for the antiperiplanar oriented  $\text{H}_2\text{--H}_3$  ( $J_{\text{obs}} = 8.0$  Hz;  $J_{\text{calc}} = 8.5$  Hz) and  $\text{H}_4\text{--H}_5$  ( $J_{\text{obs}} = 8.5$  Hz;  $J_{\text{calc}} = 8.7$  Hz), as well as the synclinal disposed  $\text{H}_3\text{--H}_4$  ( $J_{\text{obs}} = 2.5$  Hz;  $J_{\text{calc}} = 1.9$  Hz) in model aldehyde **5** ( $E_{\text{MMX}} = -2.91$  kcal/mol). The same trend was observed

for compound **8** ( $E_{MMX} = -0.51$  kcal/mol) with calculated values of  $J_{2-3} = J_{4-5} = 7.9$  Hz ( $J_{obs} = 7.7$  Hz) and  $J_{3-4} = 3.0$  Hz ( $J_{obs} = 3.4$  Hz). The experimental coupling constant values for this symmetrical linear substance were measured under irradiation of the methyl group signal and employing the spectral simulation method. The high preference for the *AMA* rotamer in the whole population of **8** as opposed to the conformational dispersion previously described for peracetyl alditols (e.g., 2*R*,3*R*,4*R*,5*R*-hexitol hexaacetate)<sup>15</sup> is a result of the conformer equivalence obtained by substitution of the terminal acetyloxy functionality by a methyl group. The correlation between the molecular mechanics calculated vicinal coupling constants and the observed ones for the synthesized models was remarkable, as it was found for the 6-tetraacetyloxyheptenyl-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone **1**. In this way, the application of this approach to the stereochemical elucidation of spicigerolide (**1**) was validated. Finally, this study represents a relevant example of the potentiality associated with this approach for determining the stereochemistry in polyhydroxylated linear natural products where a limited amount of material for an isolated bioactive principle might preclude the availability of suitable crystals for X-ray analysis,<sup>11,12</sup> or the alternative use of chiral chemical methods (e.g. preparation of Mosher's esters)<sup>24,25</sup> and degradative correlations.<sup>6,11</sup>

## EXPERIMENTAL

### General methods

Melting point determinations were performed on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. Optical rotations were taken on a JASCO DIP-360 digital polarimeter. CD spectrum was registered on a JASCO 720 spectropolarimeter at 25°C. NMR spectra including COSY and HMQC experiments<sup>26</sup> were recorded on a Varian Unity Plus 500, a Varian XL300GS, or a Bruker DMX500. Spectral simulation was achieved using the Varian spectrometer software as implemented by the manufacturer. FABMS were recorded on a JEOL DX300 mass spectrometer in the positive mode using NBA as the matrix. EIMS data were obtained on a JEOL JMS-AX505HA mass spectrometer. Open column chromatography: Si gel 60 (70-230 mesh, Merck). TLC: Si gel 60 F<sub>254</sub> (Merck).

## Molecular modeling calculations

An exhaustive minimization procedure using molecular mechanics<sup>27</sup> was achieved for each conformer using the MMX force field as implemented in the PCMODEL program V 6.00 (Serena Software, Bloomington, IN 47402-3076). A cyclic equilibrium at 298 K between the 22 selected conformers included in Table 1 was assumed, which yielded  $K_{1,2} = n_2/n_1$ ,  $K_{2,3} = n_3/n_2$ , ...  $K_{22,1} = n_1/n_{22}$  and  $n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n_{22} = 1$ .

Taking the Gibbs free energy equation  $\Delta G = -RT \ln K$  and considering  $\Delta S \cong 0$  and  $\Delta G \cong \Delta H_f \cong \Delta E_{\text{MMX}}$ ,<sup>28</sup> the molecular mechanic energy  $E_{\text{MMX}}$  was used to obtain the population for each conformer  $n_i$  by solving the following set of equations:

$$n_1 = n_2/\exp[(E_2 - E_1)/-RT]$$

$$n_3 = n_2/\exp[(E_2 - E_3)/-RT]$$

$$n_4 = n_2/\exp\{[(E_2 - E_3)/-RT] [(E_3 - E_4)/-RT]\}$$

$$n_5 = n_2/\exp\{[(E_2 - E_3)/-RT] [(E_3 - E_4)/-RT] [(E_4 - E_5)/-RT]\}$$

⋮

$$n_{22} = n_2/\exp\{[(E_2 - E_3)/-RT] [(E_3 - E_4)/-RT] [(E_4 - E_5)/-RT] \dots [(E_{21} - E_{22})/-RT]\}$$

Conversions from dihedral angles to vicinal coupling constants ( $^3J_{\text{H-H}}$ ) for each conformer were done using the Altona equation.<sup>29</sup> The population-weighted average coupling constant for each H-C-C-H dihedral fragment was calculated with  $^3J_{\text{calc}} = n_1J_1 + n_2J_2 + \dots + n_{22}J_{22}$  (Table 1).

## Cytotoxicity assay

Human nasopharyngeal carcinoma (KB) cells were maintained in RPMI 1640 (10×) medium with 10% fetal bovine serum and cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air (100% humidity). The cells at log phase of their growth cycle were treated in triplicate at various concentrations of the test samples (0.16-20.0 µg/mL), and incubated for 72 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The cell concentration was determined by the sulforhodamine B method.<sup>30</sup> Results were expressed as the dose that inhibits 50% control

growth after the incubation period (ED<sub>50</sub>). Ellipticine was included as a positive drug control: ED<sub>50</sub> 0.4 µg/mL.

### Isolation and purification of spicigerolide (1)

Defatted aerial parts of *H. spicigera* (788 g) were extracted<sup>9</sup> by maceration with CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1) at room temperature. After filtration, the solvent was removed under vacuum to yield 55 g of a dark-green residue (KB, ED<sub>50</sub> 18.5 µg/mL). The extract was fractionated by Si gel column chromatography (450 g) using a gradient of Me<sub>2</sub>CO-MeOH in CHCl<sub>3</sub>. Seventy fractions (200 mL each) were collected. Combined fractions 23-37 (6 g), eluted from the original column with CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO (2:3), were found to concentrate the cytotoxic activity (KB, ED<sub>50</sub> 10.5 µg/mL). The active eluates were further rechromatographed over Si gel (200 g) using the same solvent system and collecting fractions of 50 mL each. Cytotoxic activity was identified with a single compound in subfractions 78-82 (200 mg; KB, ED<sub>50</sub> 2.3 µg/mL) which was purified by preparative TLC on Si gel, using *n*-hexane-EtOAc (3:2) as eluent (R<sub>f</sub> = 0.48). This major TLC band afforded 12 mg of 1 (KB, ED<sub>50</sub> 1.5 µg/mL).

**Spicigerolide (1).** Oil: CD (*c* 0.06, MeOH) Δε (nm) 0 (310) +2.8 (256), +1.2 (246), 0 (239), -1.2 (230), +17.1 (204). IR (CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub> 1740, 1720, 1630, 1374, 1266, 1238, 1026, 820 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.90 (ddd, *J* = 9.7, 5.2, 2.5 Hz, H-4), 6.06 (ddd, *J* = 9.7, 2.5, 1.3 Hz, H-3), 5.79 (ddd, *J* = 10.5, 9.5, 0.5 Hz, H-1'), 5.49 (ddd, *J* = 10.5, 9.0, 1.0 Hz, H-2'), 5.40 (ddd, *J* = 9.0, 9.0, 0.5 Hz, H-3'), 5.37 (dd, *J* = 9.0, 2.1 Hz, H-4'), 5.35 (dddd, *J* = 11.0, 9.5, 4.5, 1.0 Hz, H-6), 5.30 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, H-5'), 4.96 (dq, *J* = 8.7, 6.2 Hz, H-6'), 2.52 (dddd, *J* = 18.5, 5.2, 4.5, 1.3 Hz, H-5eq), 2.35 (dddd, *J* = 18.5, 11.0, 2.5, 2.5 Hz, H-5ax) 2.12 (s, 6H), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.19 (d, *J* = 6.2 Hz, CH<sub>3</sub>-7'); <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.0, 169.9 (× 2), 169.8, 163.7 (C-2), 144.8 (C-4), 132.8 (C-1'), 128.6 (C-2'), 121.5, (C-3), 73.7 (C-6), 71.0 (C-5'), 69.2 (C-4'), 66.9 (C-6'), 66.3 (C-3'), 29.2 (C-5), 21.0 (× 2), 20.9, 20.7; EIMS (20 eV) *m/z* (rel. int.) [M]<sup>+</sup> 426 (7.5), [M - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> 366 (27.1), [M - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 324 (3.6), [M - 2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 264 (8.5), [M - 3C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 204 (18.0), [M - C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>6</sub>]<sup>+</sup> 195 (5.0), 178 (30.3), 154

(28.2), 153 (57.7),  $[M - C_{10}H_{15}O_6 - C_2H_4O_2]^+$  135 (48.0), 134 (39.0), 128 (30.8), 107 (24.5),  $[M - C_{15}H_{21}O_8]^+$  97 (30.0), 85 (35.0), 81 (29.3), 71 (37.3),  $[M - C_{15}H_{21}O_8 - CO]^+$  69 (28.1),  $[C_4H_4O]^+$  68 (27.3), 58 (40.4), 57 (44.1), 43 (100.0); HREIMS  $m/z$  426.1528 (calcd for  $C_{20}H_{26}O_{10}$ , 426.1526).

**6-Deoxy-L-mannose diphenyldithioacetal (3).** A mixture of L-rhamnose (500 mg) and benzenethiol (1.5 mL) in 90% trifluoroacetic acid (5 mL) was refluxed at 55°C for 1 h.<sup>22</sup> The reaction mixture was evaporated to dryness under an Ar flow and the residue was purified by column chromatography on Si gel (100 g). Elution with  $CH_2Cl_2$ -MeOH (9:1) afforded the diphenyldithioacetal derivative **3**<sup>16</sup> ( $R_f$  = 0.43), as the major product (515 mg, 51%). Colorless solid; mp 124–126°C; ORD ( $c$  2.91, MeOH)  $[\alpha]_{589} + 48.8^\circ$ ,  $[\alpha]_{578} + 51.6^\circ$ ,  $[\alpha]_{546} + 59.8^\circ$ ,  $[\alpha]_{436} + 119.2^\circ$ ,  $[\alpha]_{365} + 228.9^\circ$ ; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz,  $C_5D_5N$ )  $\delta$  7.81–7.78, 7.56–7.54, 7.22–7.09, 6.04 (brs, H-1), 5.27 (brd,  $J$  = 9.3 Hz, H-3), 5.07 (brd,  $J$  = 9.3 Hz, H-2), 4.55 (m, H-4 and H-5); 1.70 (d,  $J$  = 6.1 Hz); <sup>13</sup>C NMR (75.5 Hz,  $C_5D_5N$ )  $\delta$  136.1, 135.6, 130.0 ( $\times$  2), 129.6 ( $\times$  2), 129.0 ( $\times$  2), 128.9 ( $\times$  2), 126.5, 126.4, 73.3 (C-4), 72.3 (C-2), 69.4 (C-3), 66.4 (C-5), 61.5 (C-1), 210 (C-6); EIMS (20 eV)  $m/z$  (rel. int.)  $[M]^+$  366 (0.7),  $[M - C_6H_5S]^+$  257(44.6),  $[M - C_6H_6S]^+$  256 (60.4),  $[M - C_6H_5S - H_2O]^+$  239 (19.6), 231 (27.9), 177 (19.4), 153 (66.8), 152 (17.2),  $[M - C_6H_5S - C_6H_6S]^+$  147 (100.0),  $[C_{13}H_{11}S_2]^+$  135 (36.2), 129 (26.2), 123 (37.9), 119 (29.4), 110 (20.6), 109 (12.3), 91 (17.2), 85 (20.0), 79 (23.3), 75 (26.6), 61 (13.4), 45 (37.3). HREIMS (70 eV)  $m/z$  366.0960 (calcd for  $C_{18}H_{22}O_4S_2$ , 366.0960).

**Tetra-O-acetyl-6-deoxy-L-mannose diphenyldithioacetal (4).** Compound **3** (440 mg) was dissolved in AcCl (10 mL), stirred at room temperature for 2 h and evaporated under a  $N_2$  flow. Column chromatography on Si gel (75 g; *n*-hexane-EtOAc, 9:1) yielded 206 mg (32%) of product **4** ( $R_f$  = 0.46),<sup>16</sup> as the major product. Oil; ORD ( $c$  1.65,  $CHCl_3$ )  $[\alpha]_{589} + 20.0^\circ$ ,  $[\alpha]_{578} + 21.2^\circ$ ,  $[\alpha]_{546} + 25.5^\circ$ ,  $[\alpha]_{436} + 53.9^\circ$ ,  $[\alpha]_{365} + 104.2^\circ$  (365); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.58–7.56, 7.35–7.26, 5.88 (dd,  $J$  = 8.5, 2.0 Hz, H-3), 5.34 (dd,  $J$  = 8.5, 3.0 Hz, H-2), 5.21 (dd,  $J$  = 8.5, 2.0 Hz, H-4), 4.85 (dq, 8.5, 6.5 Hz, H-5), 4.38 (d,  $J$  = 3.0 Hz, H-1), 2.06 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.98 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  170.2, 170.0, 169.6, 169.4, 134.0, 133.7, 133.2 ( $\times$  4), 129.0 ( $\times$  4), 128.2 ( $\times$  2), 71.3 (C-2), 71.2 (C-



4), 68.8 (C-3), 67.2 (C-5), 61.4 (C-1), 21.1, 20.7, 20.6, 20.5, 16.4 (C-6); EIMS (20 eV)  $m/z$  (rel. int.)  $[M]^+$  534 (0.9),  $[M - C_6H_5S]^+$  425 (77.3),  $[M - C_6H_5S - C_2H_4O_2]^+$  365 (26.0), 111 (15.3),  $[C_6H_6S]^+$  110 (47.0),  $[C_6H_5S]^+$  109 (12.4), 87 (14.5), 85 (95.9), 71 (100.0), 59 (43.9), 58 (11.1), 57 (46.9), 55 (20.5), 45 (28.0), 43 (44.7), 41 (26.2), 31 (12.1), 29 (17.2). positive FAB-MS  $m/z$  (rel. int.)  $[M + H]^+$  535 (10.0), 534 (8.0),  $[M + H - 60]^+$  475 (4.0), 425 (100), 365 (40), 323 (25), 263 (20), 221 (90), 203 (55); positive HRFAB-MS  $m/z$  535.1468  $[M + H]^+$  (calcd for  $C_{26}H_{31}O_8S_2$ , 535.1460).

**2,3,4,5-Tetra-O-acetyl-6-deoxy-L-mannose (5).** Derivative 4 (28 mg) dissolved in acetone (2 mL) was added to a solution of *N*-bromosuccinimide (140 mg) in ice-cold 97% aqueous acetone (10 mL), and the mixture was stirred for 90 min at  $-2^\circ\text{C}$ .<sup>23</sup> Finely ground  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  (96 mg) and  $NaHCO_3$  (33 mg) were added, and stirring continued for 30 min at room temperature. Salts were filtered off and the filtrate was evaporated under an Ar flow. The residue was dissolved in  $CHCl_3$ , and the solution washed with  $H_2O$ , dried with  $Na_2SO_4$ , and evaporated to dryness. The crude reaction mixture was submitted to column chromatography on Si gel (5 g; *n*-hexane-EtOAc, 7:3) impregnated with 25%  $H_2O$  (w/w), collecting fractions of 5 mL. The reaction product was recovered from fractions 9-14 and further purified by column chromatography on Si gel ( $CH_2Cl_2$ -MeOH, 99:1) to afford 7.7 mg (44%) of aldehyde 5 (*R<sub>f</sub>* 0.34;  $CH_2Cl_2$ -MeOH, 19:1). Oil; ORD (*c* 0.47,  $CHCl_3$ )  $[\alpha]_{589} -1.9$ ,  $[\alpha]_{578} -2.1$ ,  $[\alpha]_{546} -2.3$ ,  $[\alpha]_{436} -4.0$ ,  $[\alpha]_{365} -5.5$ ;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9.45 (d,  $J = 1.2$  Hz, H-1), 5.54 (dd,  $J = 8.0, 2.5$  Hz, H-3), 5.29 (dd,  $J = 8.5, 2.5$  Hz, H-4), 5.03 (dd,  $J = 8.0, 1.2$  Hz, H-2), 5.00 (dq,  $J = 8.5, 6.2$  Hz, H-5), 2.18 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.21 (d,  $J = 6.2$  Hz, H-6);  $^{13}C$  NMR (125.7 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  195.2 (C-1), 169.9 ( $\times 2$ ), 169.8, 169.6, 74.2 (C-2), 71.3 (C-4), 67.3 (C-3), 66.6 (C-5), 21.0, 20.6, 20.5, 20.4, 16.5 (C-6); EIMS (20 eV)  $m/z$  (rel. int.)  $[M]^+$  332 (0.3), 272 (5.3), 201 (19.9), 184 (17.9), 157 (88.0), 142 (32.6), 129 (14.1), 115 (66.8), 99 (39.2), 73 (10.5), 43 (100); positive HRFAB-MS  $m/z$  333.1195  $[M + H]^+$  (calcd for  $C_{14}H_{21}O_9$ , 333.1186).

**6-Deoxy-L-mannose ethylenedithioacetal (6).** L-Rhamnose (1 g) in AcOH (7.5 mL) was treated with a solution of 1,2-ethanedithiol (2.5 mL) and  $Et_2O \cdot BF_3$  (0.3 mL) and stirred during 60 min. The reaction mixture was left overnight at room temperature affording 476 mg of 6 (36%). White solid; mp 166–168  $^\circ\text{C}$ ; ORD (*c* 1.35, MeOH)  $[\alpha]_{589} -4.4$ ,  $[\alpha]_{578} -4.4$ , 262

$[\alpha]_{546} -5.2$ ,  $[\alpha]_{436} -9.6$ ,  $[\alpha]_{365} -19.3$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  5.66 (d,  $J = 3.4$  Hz, H-1), 4.78 (dd,  $J = 8.4$ , 1.1 Hz, H-3), 4.61 (dd,  $J = 8.4$ , 3.4 Hz, H-2), 4.53 (dq,  $J = 7.4$ , 6.2 Hz, H-5), 4.43 (dd,  $J = 7.4$ , 4.4 Hz, H-4), 3.48-3.34 (m, 2H), 3.19-3.07 (m, 2H), 1.67 (d,  $J = 6.2$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C NMR}$  (75.4 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  74.9 (C-2), 73.5 (C-4), 71.4 (C-3), 66.3 (C-5), 56.0 (C-1), 38.3, 37.9, 20.9 (C-6); EIMS (20 eV)  $m/z$  (rel. int.)  $[\text{M}]^+$  240 (0.4), 147 (68.0), 117 (10.3), 107 (19.7), 106 (74.2), 105 (100.0), 73 (14.8), 61 (25.5), 57 (13.9) 45 (15.3).

**Tetra-*O*-acetyl-6-deoxy-L-mannose ethylenedithioacetal (7).** The procedure used for peracetylation of compound 4 was applied for derivatization of product 6 (370 mg). The crude reaction mixture was purified by column chromatography on Si gel (*n*-hexane-EtOAc, 4:1) to yield 365 mg of 7 (58%), as the major reaction product ( $R_f = 0.27$ ). Oil; ORD ( $c$  3.0,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} -26.7$ ,  $[\alpha]_{578} -27.7$ ,  $[\alpha]_{546} -32.0$ ,  $[\alpha]_{436} -57.1$ ,  $[\alpha]_{365} -97.7$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.53 (dd,  $J = 7.7$ , 2.2 Hz, H-3), 5.24 (dd,  $J = 8.3$ , 2.2 Hz, H-4), 5.14 (dd,  $J = 7.7$ , 6.0 Hz, H-2), 4.92 (dq,  $J = 8.3$ , 6.4 Hz, H-5), 4.62 (d,  $J = 6.0$  Hz, H-1), 3.22-3.09 (m, 4H), 2.11 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.18 (d,  $J = 6.4$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C NMR}$  (125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.2, 170.0, 169.8, 169.7, 72.3 (C-2), 71.1 (C-4), 70.3 (C-3), 67.0 (C-5), 53.1 (C-1), 39.3, 37.9, 21.0, 20.9 ( $\times 2$ ), 20.7, 16.4 (C-6); EI-MS (20 eV)  $m/z$  (rel. int.)  $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  348 (0.4),  $[\text{M} - 2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  288 (35.2), 200 (32.9), 189 (27.7), 186 (15.4), 147 (40.4),  $[\text{C}_3\text{H}_5\text{S}_2]^+$  105 (100.0), 99 (10.7), 43 (33.8); positive FAB-MS  $m/z$  (rel. int.)  $[\text{M} + \text{H}]^+$  409 (2.5), 349 (20), 331 (45), 289 (75), 187 (100), 105 (50); positive HRFAB-MS  $m/z$  409.0999  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{O}_8\text{S}_2$ , 409.0991).

**Tetra-*O*-acetyl-1,6-dideoxy-L-mannitol (8).** A solution of 7 (50 mg) in EtOH (2 mL) was treated with Raney-Ni (1.5 g) in EtOH (6 mL). The reaction mixture was refluxed for 10 h and filtered under Celite. The solvent was removed at reduced pressure. Then, the crude product was purified by column chromatography on Si gel (*n*-hexane-EtOAc, 9:1) to afford 10 mg (26%) of 8 ( $R_f = 0.51$ ). Oil; ORD ( $c$  1.08,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} -30.5$ ,  $[\alpha]_{578} -32.4$ ,  $[\alpha]_{546} -37.0$ ,  $[\alpha]_{436} -63.9$ ,  $[\alpha]_{365} -103.7$ ;  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.27 (dd,  $J = 7.7$ , 3.4 Hz, H-3 and H-4), 4.93 (dq,  $J = 7.7$ , 6.5 Hz, H-2 and H-5), 2.09 (s, 6H), 2.03 (s, 6H), 1.21 (d,  $J = 6.5$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.1 ( $\times 2$ ), 170.0 ( $\times 2$ ), 71.2 (C-3 and C-4),

67.1 (C-2 and C-5), 21.0 ( $\times 2$ ), 20.7 ( $\times 2$ ), 16.1 (C-1 and C-6); EI-MS (20 eV)  $m/z$  (rel. int.) 317 (4), 231 (10.0), 189 (5.0), 172 (26.0), 149 (14.0), 130 (61), 129 (74), 97 (23), 95 (22.0), 83 (64.0), 69 (37.0), 57 (29.0), 43 (100); positive FAB-MS  $m/z$  (rel. int.)  $[M + H]^+$  319 (15.0),  $[M + H - C_2H_4O_2]^+$  259 (100); HRFAB-MS  $m/z$  319.1397  $[M + H]^+$  (calcd for  $C_{14}H_{23}O_8$ , 319.1393).

### Acknowledgements

This research was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN207300) and Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM (PAEP-108004). Financial support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (211085-5-32031-N) is acknowledged. We wish to thank Isabel Chávez (Instituto de Química, UNAM) and Atilano Gutiérrez (Universidad Autónoma Metropolitana) for recording the highfield NMR spectra. Also, thanks are due to "Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación" (Facultad de Química, UNAM), in special to Marisela Gutiérrez, Oscar Yáñez and Georgina Duarte for the recording of IR, NMR, and MS spectra. The first draft of this manuscript was prepared during a sabbatical visit of R. Pereda-Miranda at the Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil with partial financial support from CONACyT and CYTED.

### References

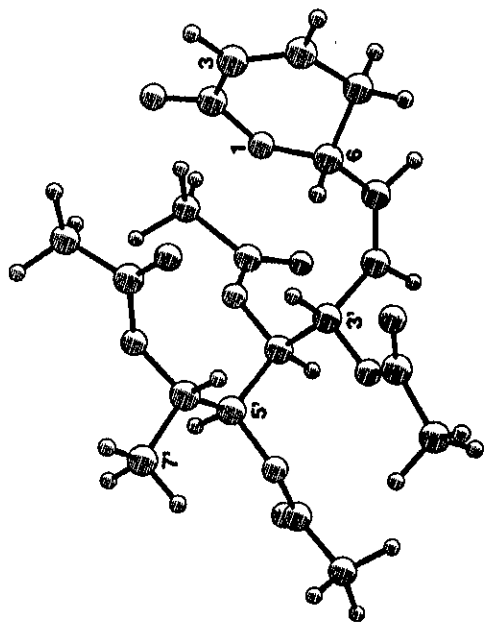
1. Davis-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. In *Naturally Occurring 6-Substituted 5,6-Dihydro- $\alpha$ -pyrones*; Herz, W.; Grisebach, H.; Kirby, G. W.; Tamm, Ch., Eds. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Springer Verlag: New York, 1989; Vol. 55; pp. 1–35.
2. Collett, L. A.; Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. In *Naturally Occurring 6-Substituted 5,6-Dihydro- $\alpha$ -pyrones*; Herz, W.; Falk, H.; Kirby, G. W.; Moore, R. E.; Tamm, Ch., Eds. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Springer Verlag: New York, 1998; Vol. 75; pp. 182–209.
3. Pereda-Miranda, R.; García, M.; Delgado, G. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2971–2974.
4. Romo de Vivar, A.; Vidales, P.; Pérez, A. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2417–2418.

5. Almtorp, T. G.; Hazell, C. A.; Torssell, B. G. K. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2753–2756.
6. Pereda-Miranda, R.; Hernández, L.; Villavivencio, M. J.; Novelo, M.; Ibarra, P.; Chai, H.; Pezzuto, J. M. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 583–593.
7. Epling, C. *Revista del Museo de la Plata* **1949**, *30*, 252-285.
8. Pereda-Miranda, R. In *Bioactive Natural Products from Traditionally Used Mexican Plants*; Arnason, J. T.; Mata, R.; Romeo, J. T.; Eds. *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Plenum: New York, 1995; pp. 83–112.
9. Fragoso-Serrano, M.; González-Chimeo, E.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 45–50.
10. Aycard, J. P.; Kini, F.; Kam, B.; Gaydou, E. M.; Faure, R. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1171–1173.
11. Davies-Coleman, M. T.; English, R. B.; Rivett, D. E. A. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1497–1499.
12. Delgado, G.; Pereda-Miranda, R.; Romo de Vivar, A. *Heterocycles* **1985**, *23*, 1869–1872.
13. Beecham, A. F. *Tetrahedron* **1972**, *28*, 5543-5554.
14. Masamune, S.; Ma, P.; Moore, R. E.; Fujiyoshi, T.; Jaime, C.; Osawa, E. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 261–263.
15. Osawa, E.; Imai, K.; Fujiyoshi-Yoneda, T.; Jaime, C.; Ma, P.; Masamune, S. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 4579–4590.
16. Horton D.; Wander, J. D. *Carbohydr. Res.* **1970**, *15*, 271-284.
17. Velasco, D.; Castells, J.; López-Calahorra, F.; Jaime, C. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3526–3530.
18. Mills, J. A. *Aust. J. Chem.* **1974**, *27*, 1433–1446.
19. López-Calahorra, F.; Velasco, D.; Castells, J., Jaime, C. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3530–3536.
20. Hölftje, H. D.; Folkerts, G. In *Molecular Modeling. Basic Principles and Applications*; Mannhold, R.; Kubinyi, H.; Timmerman, H. Eds. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*. VCH: Weinheim, 1996; Vol. 5, pp.23-36.
21. Davies-Coleman, T. M.; Rivett, D. E. A. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1085–1092.
22. Funabashi, M.; Arai, S.; Shinohara, M. *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 333–341.

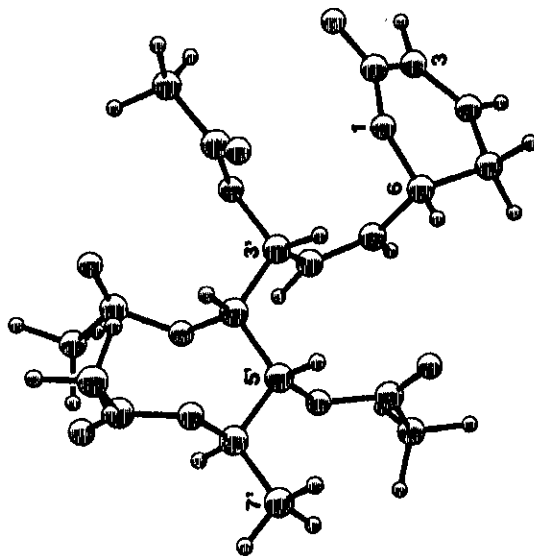
23. Miljkovic, M.; Dropkin, D.; Hagel, P.; Habash-Marino, M. *Carbohydr. Res.* **1984**, *128*, 11–20.
24. Rieser, M. J.; Hui, Y.-H.; Rupprecht, J. K.; Kozlowski, J. F.; Wood, K. V.; McLaughlin, J. L.; Hanson, P. R.; Zhuang, Z.; Hoye, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *114*, 10203–10213.
25. Collett, L. A.; Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 651–656.
26. Bah, M.; Pereda-Miranda, R. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13063–13080.
27. Burket, U.; Allinger, N. L. *Molecular Mechanics*; ACS Monograph 177; American Chemical Society: Washington, DC, 1982.
28. Arnó, M.; Marín, M. L.; Zaragoza, R. J. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 579–586.
29. Haasnoot, C. A. G.; de Leeuw, F. A. A. M.; Altona, C. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2783–2792.
30. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Boskesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112.

## FIGURE CAPTION

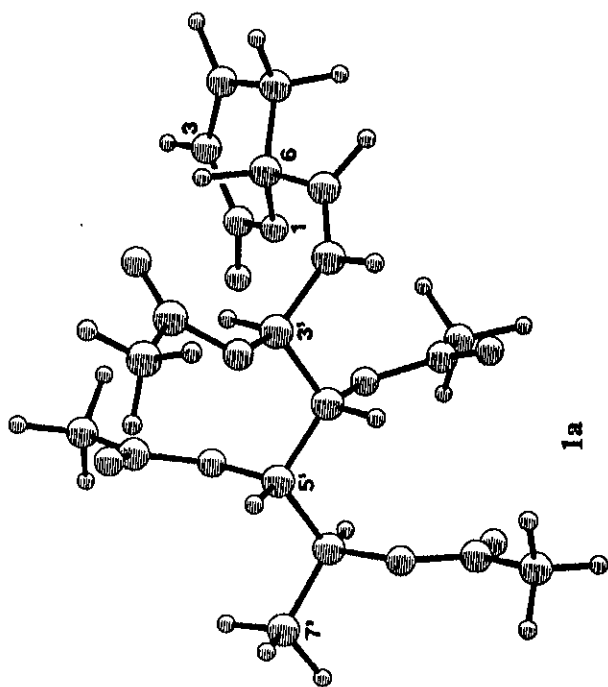
**Figure 1.** Major molecular mechanics minimum energy conformers of spicigerolide (1) vs. its hypothetical diastereoisomer (2).



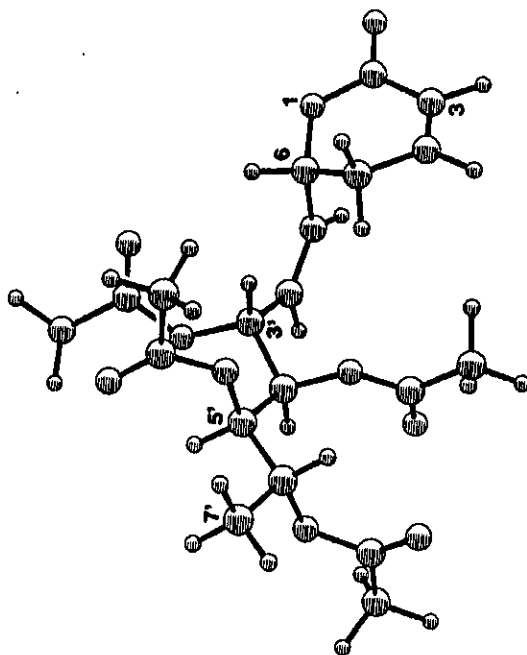
1b



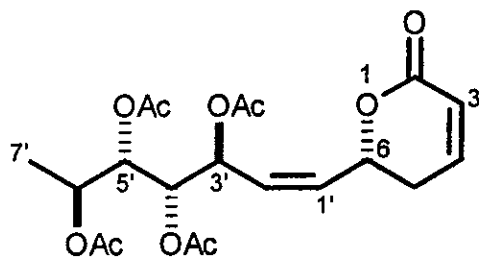
2b



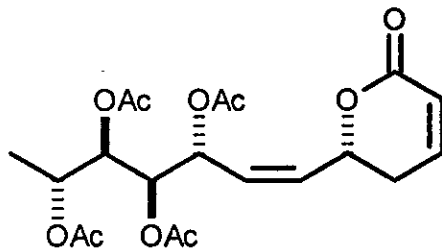
1a



2a

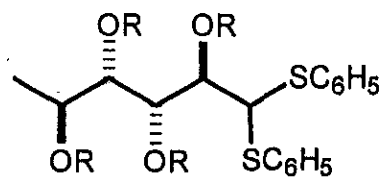


1



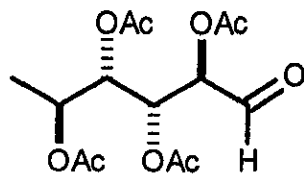
2



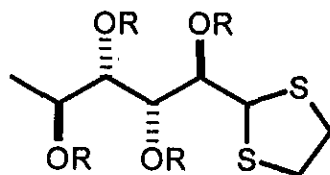


3 : R = H

4 : R = Ac

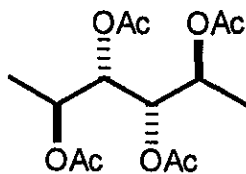


5



6 : R = H

7 : R = Ac



8

**Table 1.** Molecular mechanics energy, molar fraction and contribution to the calculated  ${}^3J_{\text{H-H}}$  values of the minimized conformers of **1** vs. **2**.

Conformer <sup>a</sup>	<b>1</b>					<b>2</b>				
	$E_{\text{MMX}}^b$	$n \times 10^3$	$n J_{3'-4'}^c$	$n J_{4'-5'}^c$	$n J_{5'-6'}^c$	$E_{\text{MMX}}^b$	$n \times 10^3$	$n J_{3'-4'}^c$	$n J_{4'-5'}^c$	$n J_{5'-6'}^c$
<i>PPP</i>	20.34	0.002	0.000002	0.000017	0.000003	21.80	0.082	0.000116	0.000630	0.000174
<i>PPA</i>	18.95	0.018	0.000032	0.000181	0.000148	22.34	0.034	0.000060	0.000344	0.000292
<i>PPM</i>	17.22	0.326	0.000388	0.003110	0.000767	20.48	0.764	0.000817	0.007250	0.001612
<i>PAP</i>	18.19	0.064	0.000191	0.000217	0.000173	21.81	0.082	0.000226	0.000299	0.000241
<i>PAA</i>	16.01	2.520	0.008250	0.007830	0.023400	19.67	3.050	0.009028	0.010523	0.028243
<i>PAM</i>	19.76	0.005	0.000013	0.000019	0.000004	23.44	0.005	0.000014	0.000023	0.000005
<i>APP</i>	18.30	0.053	0.000484	0.000498	0.000048	21.85	0.077	0.000674	0.000725	0.000070
<i>APA</i>	15.82	3.470	0.030800	0.028400	0.030500	18.80	13.244	0.115885	0.107806	0.116150
<i>APM</i>	16.38	1.350	0.012600	0.012500	0.003100	19.70	2.900	0.026651	0.027086	0.006496
<i>AAP</i>	15.40	7.050	0.066400	0.024700	0.025000	19.95	1.900	0.017879	0.007296	0.006270
<i>AAA</i>	13.16	309.104	2.910000	1.070000	2.870000	18.47	23.118	0.208987	0.076058	0.214535
<i>AAM</i>	17.71	0.143	0.001340	0.000601	0.000126	21.78	0.087	0.000816	0.000344	0.000079
<i>AMA</i>	12.78	587.056	5.530000	0.704000	5.330000	16.82	374.563	3.520892	0.644248	3.438488
<i>AMM</i>	14.65	24.993	0.235000	0.006500	0.058200	18.85	12.172	0.105554	0.007067	0.021649
<i>MPP</i>	18.44	0.042	0.000124	0.000418	0.000052	18.82	12.805	0.031243	0.120106	0.011524
<i>MPA</i>	15.11	11.500	0.025600	0.113000	0.106000	17.82	69.254	0.136430	0.700157	0.642676
<i>MPM</i>	15.17	10.400	0.023000	0.103000	0.019800	20.72	0.518	0.000098	0.000529	0.000099
<i>MAP</i>	20.20	0.002	0.000003	0.000016	0.000003	23.76	0.003	0.000004	0.000024	0.000004
<i>MAA</i>	15.82	3.470	0.005830	0.015700	0.032200	18.76	14.169	0.015586	0.055402	0.131348
<i>MAM</i>	20.18	0.002	0.000004	0.000018	0.000005	24.58	0.001	0.000001	0.000006	0.000002
<i>MMA</i>	14.44	35.600	0.098300	0.028100	0.325000	16.71	450.975	0.820776	0.423917	4.144466
<i>MMM</i>	15.94	2.830	0.008040	0.000680	0.008190	18.55	20.197	0.045241	0.003433	0.046857
Total	—	1000.000	8.956401	2.119505	8.832719	—	1000.000	5.056978	2.193273	8.811280

<sup>a</sup>Descriptors are based on initial dihedral angles +60°(*P*), 180°(*A*) and -60°(*M*) for the C(3')-C(4')-C(5')-C(6') fragment.<sup>b</sup>In kcal/mol.<sup>c</sup>Calculated  ${}^3J_{\text{H-H}}$  values in Hz.