

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Orgánica

Programa de Doctorado en Biotecnología



BIOTRANSFORMACIÓN DE DERIVADOS DE
ÁCIDO OLEANÓLICO CON HONGOS
FILAMENTOSOS

TESIS DOCTORAL

Alberto Perojil Jiménez

Granada, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Alberto Perojil Jiménez
D.L.: GR 1016-2014
ISBN: 978-84-9028-992-1

**BIOTRANSFORMACIÓN DE DERIVADOS DE
ÁCIDO OLEANÓLICO CON HONGOS
FILAMENTOSOS**

Por

Alberto Perojil Jiménez

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

MEMORIA presentada para aspirar al Grado de Doctor

Fdo. Alberto Perojil Jiménez

Los Directores de la Memoria,

Fdo. Dr. Andrés García-Granados López de Hierro
**Catedrático del Dpto. de
Química Orgánica de la
Universidad de Granada**

Fdo. Dr. Antonio Martínez Rodríguez
**Profesor Titular del Dpto. de
Química Orgánica de la
Universidad de Granada**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación obtenida en la beca predoctoral asociada al proyecto de investigación:

“Semisíntesis de derivados del ácido maslínico y evaluación biológica de sus actividades frente a serin proteasas Y BCL-2/BAX como moléculas reguladoras de apoptosis” (Ref.: CTQ2009-13898, Ministerio de Ciencia e innovación).

El doctorando Alberto Perojil Jiménez y los directores de la tesis D. Andrés García-Granados López de Hierro y D. Antonio Martínez Rodríguez garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a de de

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.: Andrés García-Granados López de Hierro

Fdo.: Alberto Perojil Jiménez

Fdo.: Antonio Martínez Rodríguez

*A mi madre, Ana
A mis hermanos, Fran e Isabel
con todo mi cariño...*

A Curro y Hugo



*Soy capaz de llevar a cabo una reacción química
en un matraz pero incapaz de controlar
la química de mi propia vida...*

INDICE

CAPÍTULO I	17
1 OBJETO DEL TRABAJO	21
2 TRITERPENOS PENTACÍCLICOS: ÁCIDO OLEANÓLICO Y ÁCIDO MASLÍNICO ..	25
2.1 BIOGÉNESIS DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS	28
2.2 ÁCIDOS OLEANÓLICO Y MASLÍNICO	35
2.2.1 Generalidades	35
2.2.1.1 El olivo (<i>Olea europaea</i>)	38
2.2.2 Biosíntesis de ácido Oleanólico y ácido Maslínico	42
2.3 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS Y APLICACIONES DE LOS ÁCIDOS OLEANÓLICO Y MASLÍNICO 47	
2.3.1 Importancia farmacológica de la relación estructura-actividad en productos naturales y en triterpenos.	52
3 BIOTRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS TRITERPÉNICOS	57
3.1. FUNCIONALIZACIÓN REMOTA POR VÍA QUÍMICA DE ENLACES C-H NO ACTIVADOS. HIDROXILACIÓN QUÍMICA EN PRODUCTOS NATURALES.	59
3.2. BIOTECNOLOGÍA BLANCA Y QUÍMICA VERDE	70
3.3. BIOTRANSFORMACIONES EN SÍNTESIS ORGÁNICA.....	71
3.3.1 Biotransformaciones con enzimas aislados	75
3.3.1.1 Enzimas en disolventes orgánicos	76
3.3.2 Biotransformaciones con microorganismos	79
3.3.2.1 Empleo de hongos filamentosos para bihidroxilar sustratos.	81
3.4 BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOIDES	83
3.5 BIOTRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS TRITERPÉNICOS	86
3.5.1. Triterpenos acíclicos	87
3.5.2 Triterpenos tetracíclicos.....	88
3.5.2.1 Esqueleto de eburicano	88
3.5.2.2 Esqueleto de lanostano	89
3.5.2.3 Esqueleto de cicloartano	90
3.5.2.4 Esqueleto de curcubitano	97
3.5.3 Triterpenos pentacíclicos	105
3.5.3.1 Esqueleto de oleanano	105
3.5.3.3 Esqueleto de lupano	119
3.5.3.4 Esqueleto de Ceanotano	121
3.5.4 Triterpenos modificados	122
3.5.4.1 Esqueleto limonoide	122
3.6 <i>Rhizomucor miehei</i>	124
CAPÍTULO II	127
4 DISCUSIÓN	131
5 DESARROLLO EXPERIMENTAL	197
6 CONCLUSIONES	242
ANEXO I: TABLAS de ¹H RMN, HSQC y HMBC	248
ANEXO II: Tablas de ¹³C RMN	275
ANEXO III: TABLAS DE EFECTOS α, β Y γ	290
ANEXO IV: ESPECTROS MONO Y BIDIMENSIONALES	295

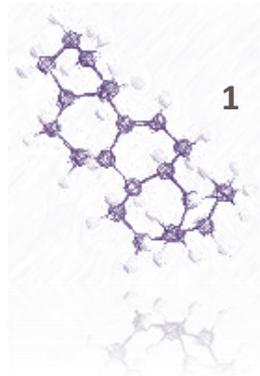
CAPÍTULO I



INTRODUCCIÓN

*La vida, en cierta forma, es un saco
de reacciones químicas...*

George Whitesides



OBJETO

DEL TRABAJO

El trabajo de investigación desarrollado en esta Memoria se encuadra dentro del campo de los Productos Naturales en el área de Química Orgánica, utilizando como materia prima productos procedentes de los desechos de molturación de la aceituna y buscando el aprovechamiento de los mismos. En primer lugar se procederá al aislamiento, purificación, caracterización e identificación de los ácidos oleanólico y maslínico a partir de la mezcla obtenida del alpeorujo. Una vez que estos ácidos han sido purificados se procederá a utilizarlos como productos de partida para la preparación de diversos derivados mediante las apropiadas reacciones químicas. Estos derivados serán utilizados como sustratos en el tercer objetivo del trabajo, abordando diferentes experiencias de biotransformación con hongos filamentosos con la intención de obtener nuevos derivados triterpenicos.

A lo largo del trabajo de investigación desarrollado, el doctorando habrá adquirido las siguientes destrezas:

- Manejo de las principales fuentes bibliográficas usadas en Química Orgánica, sobre todo revistas científicas, bases de datos y páginas web dedicadas a esta disciplina en Internet.

- Uso de las técnicas de separación y purificación que permitan obtener productos con alto grado de pureza.

- Control y realización de transformaciones químicas que conduzcan a derivados con buen rendimiento y pureza.

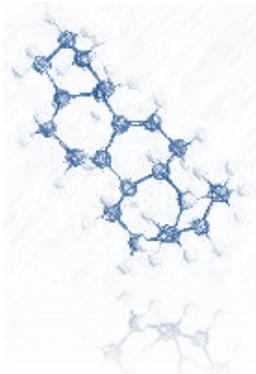
-Utilización de las técnicas espectroscópicas para la determinación estructural de los compuestos obtenidos.



-Manejo de las técnicas de biotransformación con hongos filamentosos en lo que se refiere a la preparación de medios de cultivo, control de las incubaciones con microorganismos y aislamiento e identificación de los productos obtenidos en las mismas.

En el segundo objetivo se aborda la búsqueda de aquellas transformaciones químicas que conduzcan a la obtención de determinados derivados aprovechando la funcionalización existente en el esqueleto triterpénico de los ácidos de partida. Los puntos de actuación serán el anillo C y el grupo carboxilo de C-28. Para ello se utilizarán técnicas tradicionales de reactividad química en disolución con objeto de preparar una amplia gama de derivados que serán usados como sustratos en procesos de biotransformación. En primer lugar se llevará a cabo la obtención de los ésteres metílicos en C-28, así como sus sales sódicas cuando ello sea posible. También se obtendrán derivados hidroximetilénicos en posición 28 por reducción del grupo carboxílico, sistemas diénicos, derivados halogenados en el anillo C así como la preparación de lactonas hidroxiladas C-12.

En el tercer objetivo de esta memoria se centrará en la búsqueda de microorganismos capaces de biotransformar los derivados triterpénicos preparados a partir de los ácidos oleanólico y maslínico. El trabajo realizado se centra en la utilización de hongos filamentosos capaces de introducir funcionalizaciones remotas que puedan conducir a nuevos productos interesantes con el fin de lograr una mayor diversidad estructural en estos compuestos. Tanto el ácido oleanólico como muchos de sus derivados han manifestado numerosas y variadas actividades biológicas. La obtención de nuevos productos combinando métodos químicos y microbiológicos podría ser una buena herramienta para la obtención de productos difíciles de obtener por procedimientos exclusivamente químicos sobre los que podría realizarse estudios de actividad biológica.



**2 TRITERPENOS PENTACÍCLICOS:
ÁCIDO OLEANÓLICO Y ÁCIDO MASLÍNICO**

Aunque en los últimos años ha existido un enorme progreso en el desarrollo de nuevos fármacos, la mayoría de ellos siguen presentando efectos secundarios¹, por lo que la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos más eficaces y seguros sigue siendo una parte importante de la investigación química y farmacéutica. En este sentido, el reino vegetal continúa siendo una fuente interesante de nuevos agentes farmacológicos, ya que existen múltiples plantas medicinales (10.000 de las 300.000 especies de plantas superiores identificadas)² que poseen una gran diversidad de metabolitos secundarios con variadas aplicaciones, de los que hasta el momento sólo han sido investigados una pequeña parte.

De entre las distintas familias de productos naturales, los terpenos constituye la más extensa, con más de 25.000 compuestos perteneciente a esta clase³, que incluyen compuestos con actividades farmacológicas importantes, como son los esteroides, glucósidos cardiacos, saponinas y terpenos modificados. Debido a su extenso campo de aplicación, representan un grupo de suma importancia económica lo que permite que se sigan buscando e identificando nuevas estructuras.⁴

En plantas, los terpenoides intervienen en distintos procesos funcionales, como son reguladores de crecimiento vegetal (giberelinas y ácido abscisico), pigmentos fotosintéticos (carotenoides y fitol), portadores de electrones (ubiquinona y plastoquinona) y componentes estructurales de membrana. Además de estas funciones metabólicas, funcionales y estructurales, muchos terpenoides intervienen en la comunicación y defensa de las plantas, como atrayentes de polinizadores o de dispersores de semillas, fitoalexinas competitivas, antibióticos y toxinas repelentes.⁵

Los terpenoides de origen vegetal representan un recurso natural renovable, y

¹ Mazurek, J.; Jahnz-Rozyk, K. *Int. Rev. Allergol. Clin. Immunol. Family Med.* **2012**, *18*, 34-39.

² McChesney, J. D.; Venkataraman, S. K.; Henri, J. T. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2015-2022.

³ Hill, R.A.; Connolly, J.D. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 780-818.

⁴ a) Devon T. K.; Scott, A. J. En *Handbook of naturally occurring compound. Terpenes*; Devon, T. K.; Scott, A. I., Eds.; Academic Press, New York, US, **1972**; Vol. 2, 125-128; b) Glasby, J. En *Encyclopedia of the terpenoids*; Glasby, J., Ed.; John Wiley & Sons, England, UK, **1982**; Vol. 3, 21-23.

⁵ Harbone, J. En *Recent advances in the ecological chemistry and biochemistry of plants terpenoids. Ecological Chemistry and biochemistry of plants terpenoids*; Harbone, J., Ed.; Oxford Clarendon Press, London, UK, **1991**; 399-426.

proporcionan un amplio rango de productos comerciales útiles, incluyendo, saborizantes, disolventes, fragancias, adhesivos, polímeros industriales (chicle), numerosos fármacos (artemisinina y taxol), compuestos agroalimentarios (piritrinas y azaridactinas) e intermediarios sintéticos.⁶

Los terpenos se clasifican, atendiendo al número de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) que posee su esqueleto hidrocarbonado, en monoterpenos (10 carbonos, 2 unidades), sesquiterpenos (15 carbonos, 3 unidades), diterpenos (20 carbonos, 4 unidades), sesterterpenos (25 carbonos, 5 unidades), triterpenos (30 carbonos, 6 unidades) y tetraterpenos (40 carbonos, 8 unidades).

De esta forma, los triterpenos constituyen el grupo más extenso de terpenoides debido a su gran diversidad estructural y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal en estado libre, como glicósidos o como ésteres, aunque también han sido hallados algunos importantes en el reino animal.⁷ Los triterpenos incluyen el escualeno, aislado por primera vez del aceite de hígado de tiburón y un gran número de compuestos con distinto número de anillos como el lanosterol, presente en la grasa de la lana.

2.1 BIOGÉNESIS DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS

Aunque el trabajo sobre los triterpenos comenzó en el siglo XIX, no fue hasta mediado el siglo pasado, cuando Ruzicka inició el estudio de su estructura. Todos los triterpenos, presentes en la naturaleza en gran variedad, tienen su origen en el escualeno, alcohol triterpénico formado por una condensación cola-cola del farnesol. Basándose en una amplia información estructural, Ruzicka fue capaz de racionalizar la biogénesis de terpenoides y desarrollarla (**regla biogenética del isopreno**)⁸.

Los esquemas de correlación, que serán a continuación comentados, tienen su base esencialmente en esta ruta biogenética, que ha dado lugar a la publicación de un gran número de trabajos.⁹

⁶ a) Dawson, F. A. *Journal of Naval Store Rev.* **1994**, *11*, 6-12; b) Zinkel, D. F.; Russell, J. En *Naval Stores. Production, Chemistry, Utilization*; Zinkel, D. F.; Russell, J., Eds.; Pulp Chemicals Association, New York, US, **1989**; 123-142.

⁷ a) Phillips, D. R.; Rasbery, J. M.; Bartel, B.; Matsuda, S. P. T. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, *9*, 305-314; b) Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. P. T. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 261-295.

⁸ a) Ruzicka, L. *Experientia* **1959**, *9*, 357-367; b) Eschenmoser, A.; Ruzicka, L.; Jeger, O.; Arigoni, D. *Helv. Chim. Acta* **1955**, *38*, 1890-1904.

⁹ a) Simonsen, E. Q. J.; Ross, W. C. J. En *The Terpenes*; Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1957**; Vol. 4-5; b) Devon, T. K.; Scott, A. I. En *Handbook of Naturally Occurring Compounds*; Academic Press, New York, US, **1972**; Vol. 2; c) Coffey, S. En *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds*, 2nd ed.; Coffey, S. Ed.; Elsevier, Amsterdam, NL, **1969**; Vol. 11, Part c, 406; **1971**; Vol. 11, Part e, 93; d) Overton, K. H. En *Terpenoids and Steroids. A Specialist Periodical Report*; Overton, K. H. Ed.; The Chemical Society, London, UK, **1971**, **1972**; Vol. 1-2; e) Revisiones periódicas en la revista *Natural Product Report*, Conolly, J. D.; Hill, R. A. **2003**, *20*, 640-659; **2002**, *19*, 494-514; **2001**, *18*, 131-148; **2001**, *18*, 560-579; **2000**, *17*, 483-505; **1999**, *16*, 221-241; **1997**, *14*, 661-681; **1996**, *13*, 151-171; **1995**, *12*, 609-639.

En plantas, la biosíntesis de los compuestos terpénicos se inicia en el citosol con ácido mevalónico (ácido (*R*)-3,5-dihidroxi-3-metilpentanoico), que se forma por condensación de tres unidades de acetil-CoA.¹⁰ Posteriormente, ocurre una activación por fosforilación y descarboxilación del ácido mevalónico como indica la Fig. 2.1. Se forma de esta manera pirofosfato de 3-isopentenilo, que puede isomerizar a pirofosfato de γ - γ -dimetilalilo (pirofosfato de 2-isopentenilo), y que presenta una gran reactividad en procesos de sustitución nucleofílica.

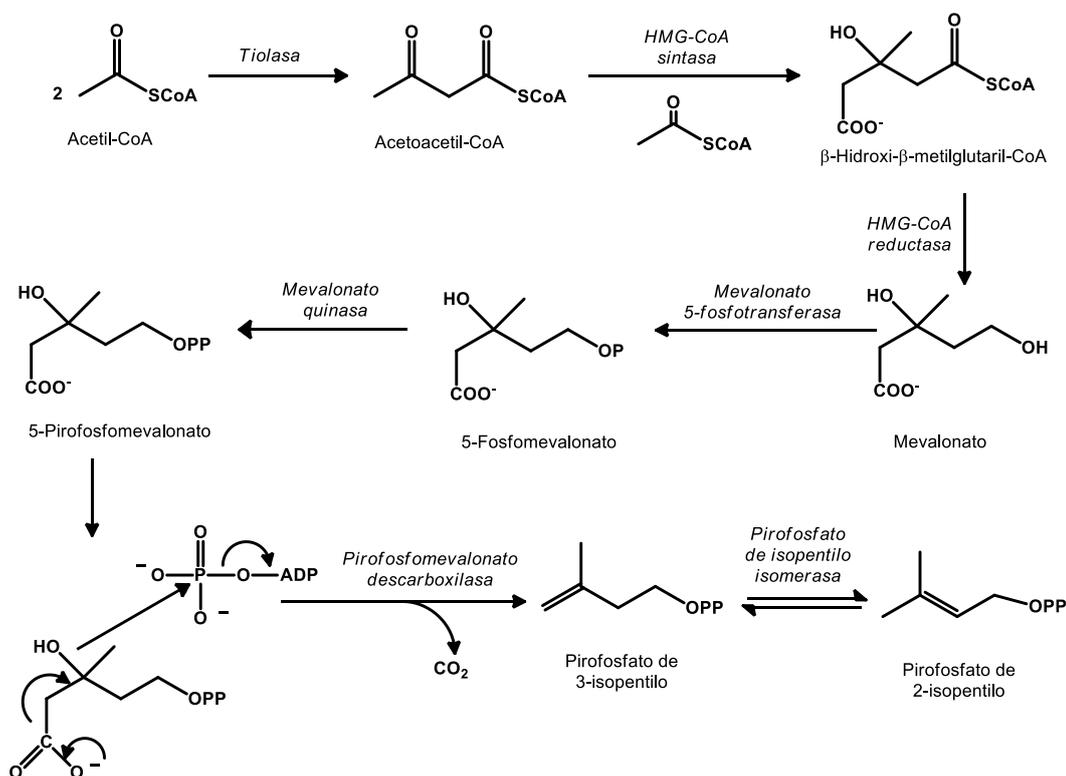


Figura 2.1. Biosíntesis de los precursores biológicos de los terpenos (pirofosfato de 3-isopentenilo y pirofosfato de 2-isopentenilo)

El doble enlace nucleófilo del pirofosfato de 3-isopentenilo, desplaza al grupo pirofosfato de 2-isopentenilo dando lugar, como se ve en la Fig.2.2, tras la pérdida de un protón, por parte del intermedio de reacción carbocatiónico, al monoterpeneo lineal fundamental, denominado pirofosfato de geranilo. Este monoterpeneo lineal, puede transformarse en los más diversos esqueletos de diez carbonos, denominados monoterpeneos (geraniol, limoneno, mentol, etc.), según tenga lugar la acción de las enzimas apropiadas.

Si pirofosfato de geranilo reacciona con una nueva unidad isoprénica en forma de pirofosfato de 3-isopentenilo por la acción de geranil transferasa, se obtiene pirofosfato de farnesilo, que es la base de toda la gama de productos con quince átomos de carbono, sesquiterpenos, que presentan diferentes esqueletos carbonados (germacranos, eudesmanos,

¹⁰ Nakanishi, K.; Goto, T.; Ito, S.; Natori, S.; Nozoe, S. En *Natural Product Chemistry*; Nakanishi, K.; Goto, T.; Ito, S.; Natori, S.; Nozoe, S. Eds.; Kodansha Limited & Tokyo Academic Press Inc., New York, US, **1974**; Vol. 1, 411.

cariofilanos, etc.). Si farnesil pirofosfato reacciona de nuevo con pirofosfato de 3-isopentenilo, da lugar a pirofosfato de geranil-geraniol, intermedio que se supone precursor de los compuestos diterpénicos (kauranos, beyeranos, atisanos, etc.). El acoplamiento cabeza-cabeza de dos unidades de pirofosfato de farnesilo conduce a escualeno, con la ayuda de escualeno sintasa, a partir del que se forman los triterpenos (dammarano, lupano, oleanano, ursano, etc.) (Fig. 2.2).

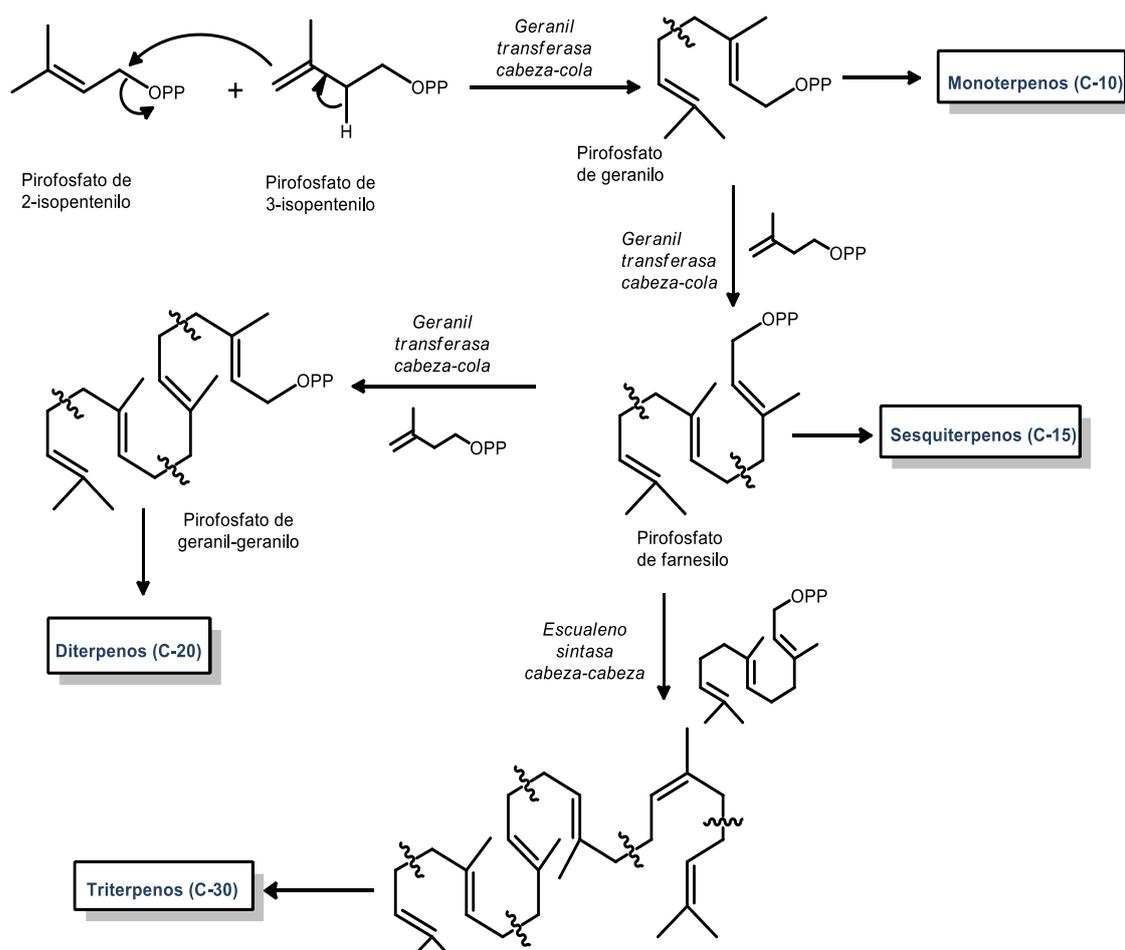


Figura 2.2. Rutas biogénicas hacia mono, sesqui, di y triterpenos a partir de sus precursores (pirofosfato de 2-isopentenilo y pirofosfato de 3-isopentenilo)

De esta forma, y para entender el acoplamiento del pirofosfato de farnesilo, podemos ver en la Figura 2.3, como esta unión tiene lugar de forma reductora con otra molécula, formándose un pirofosfato de ciclopropilmetilo, el pirofosfato del alcohol de preescualeno, que por reordenación y reducción da lugar a escualeno.

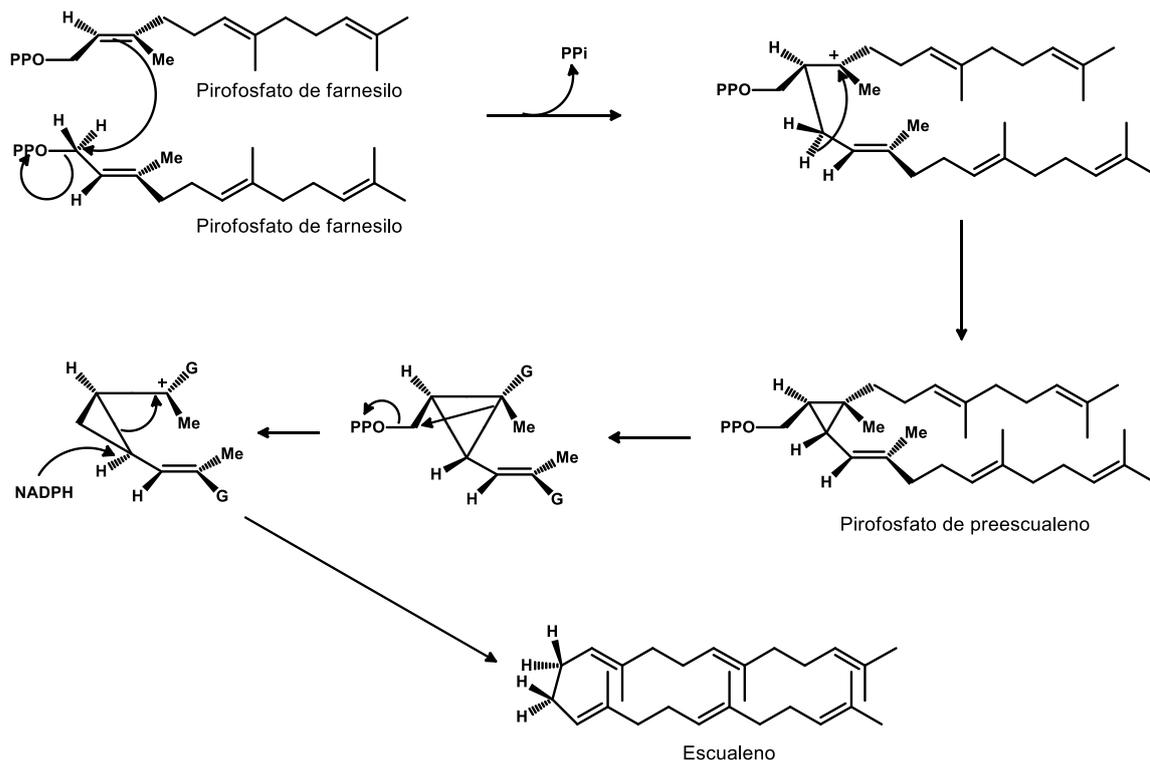


Figura 2.3. Biosíntesis del escualeno a partir de pirofosfato de farnesilo con formación intermedia de pirofosfato de preescualeno

La oxidación de uno de los dobles enlaces terminales de escualeno proporciona óxido de escualeno, que sufre una ciclación controlada por enzimas. En esta compleja reacción la cadena de escualeno debe plegarse de forma precisa como señala la Fig. 2.4, (en conformación silla-silla-silla-bote) formándose un carbocatión tetracíclico con esqueleto de dammarano, que es la molécula de partida para la formación de otros triterpenos tetracíclicos. Además, mediante diferentes carbocationes generados por ciclaciones y migraciones de metilo o hidruro se obtienen también los triterpenos pentacíclicos con esqueleto de lupano, ursano, oleanano, transformaciones que pueden verse en las Figuras 2.4 y 2.5.

Existe un grupo de triterpenos pentacíclicos, donde se incluyen taraxerol, multiflorenol, glutinol y friedelina, que son sumamente interesantes debido a que estos compuestos son capaces de dar un considerable reagrupamiento esquelético en presencia de ácido, que conduce a los compuestos con esqueletos de oleanano (olean-11,13(18)-dieno, 18α -olean-12-eno y 18β -olean-12-eno, olean-13(18)-eno, β -amirina, etc.). En este sentido, se proponen en la Fig. 2.6, desplazamientos de metilo y/o hidruro, protonaciones o desprotonaciones que dan lugar a la interconversión de los esqueletos triterpénicos pentacíclicos mencionados.¹¹

¹¹ a) Brownlie, G.; Spring, F. S.; Stevenson, R.; Strachan, W. S. *J. Chem. Soc.* **1956**, 2419-2427; b) Dutler, H.; Jeger, O.; Ruzicka, L. *Helv. Chim. Acta* **1955**, 38, 1268-1273; c) Corey, E. J.; Ursprung, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 5041-5051;

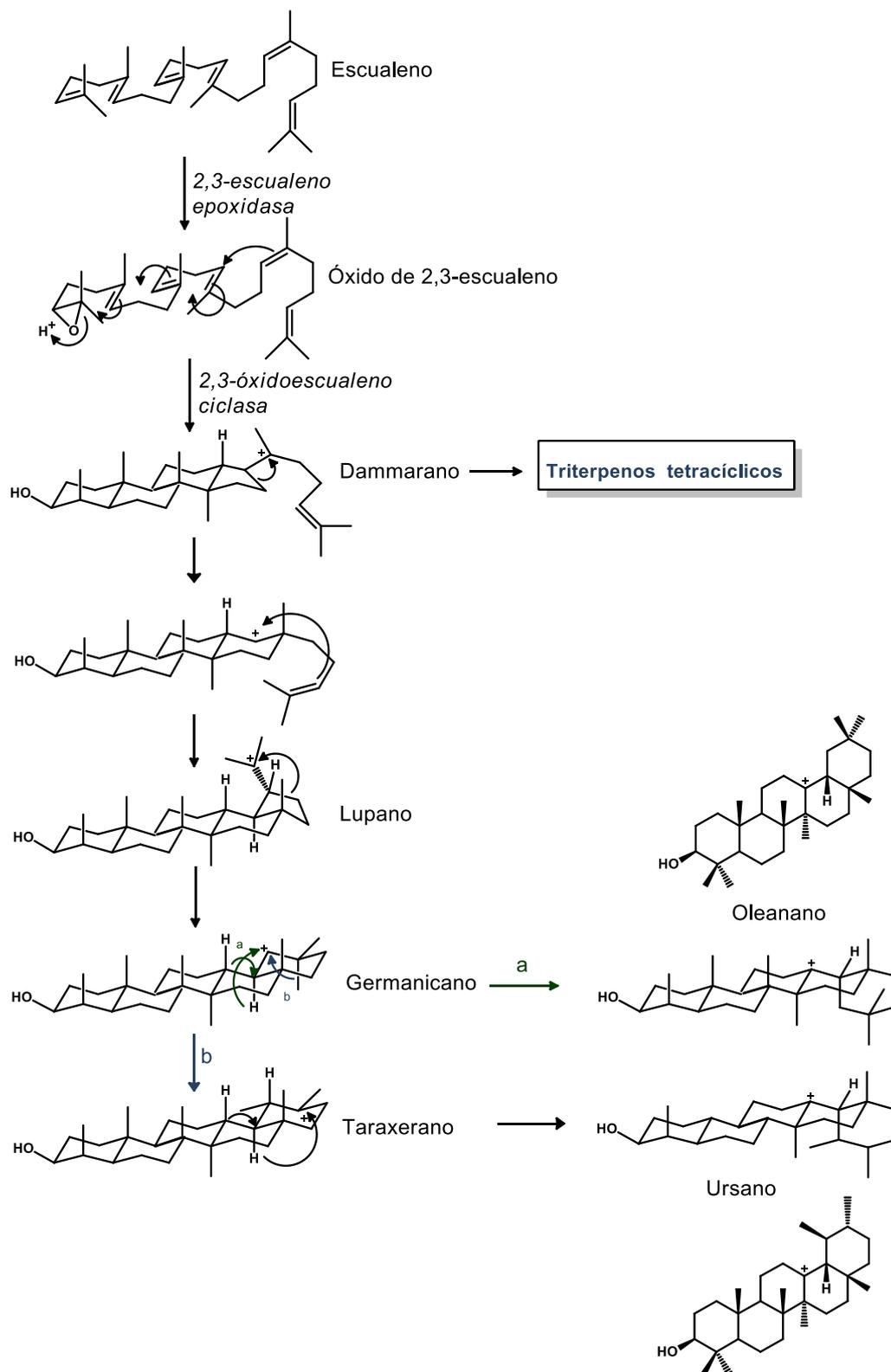


Figura 2.4. Biogénesis de triterpenos a partir de Óxido de Escualeno

d) Lahey, F. N.; Leeding, M. V. *Proc. Chem. Soc.* **1958**, 342-343; e) Khastgir, H. N.; Sengupta, P. *Chem. Ind.* **1961**, 945, 1077; f) Beaton, J. M.; Spring, F. S.; Stevenson, R.; Stewart, J. L. *J. Chem. Soc.* **1955**, 2131-2137.

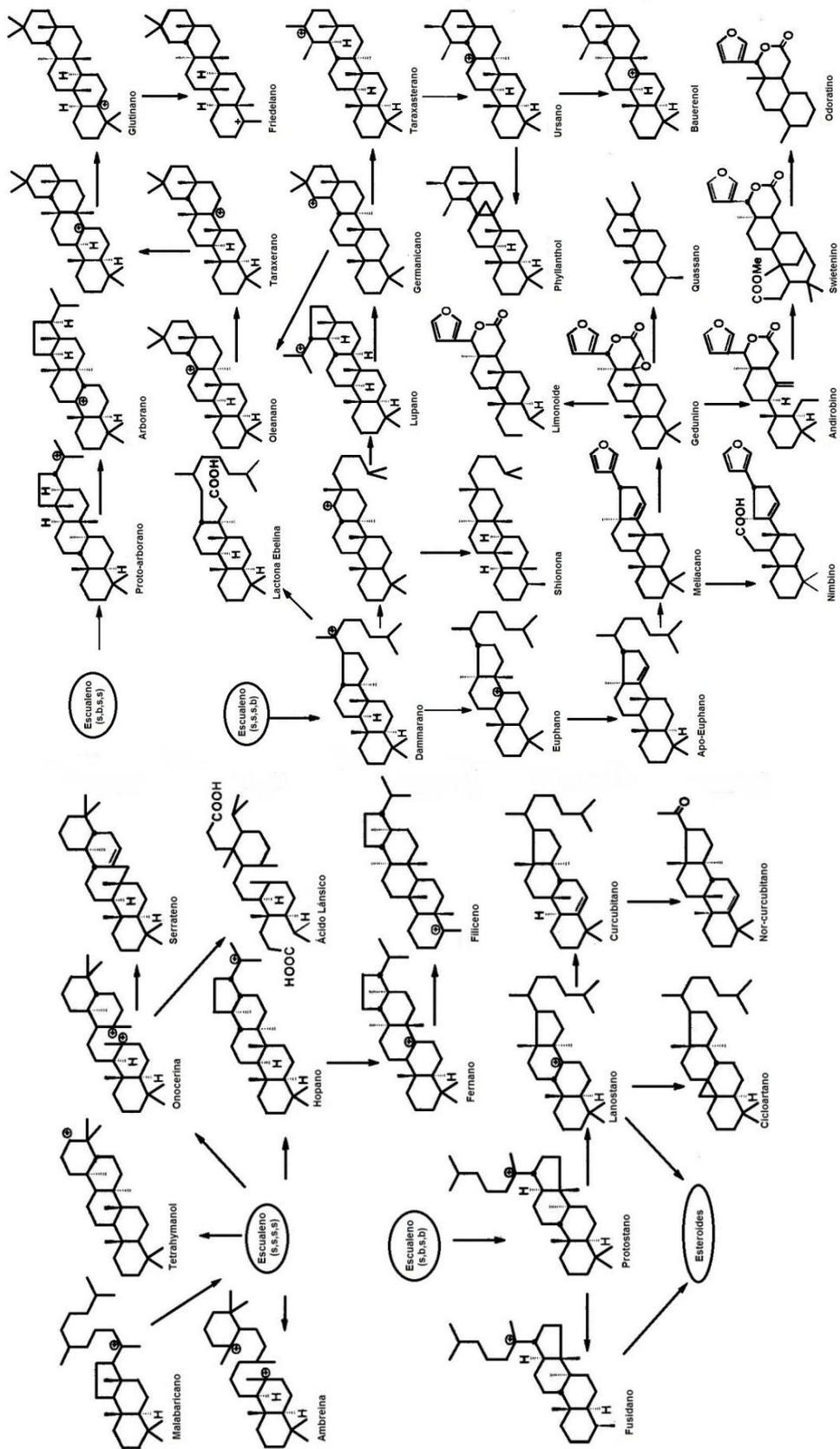


Figura 2.5. Esquema de correlación de esqueletos triterpénicos^{9b}

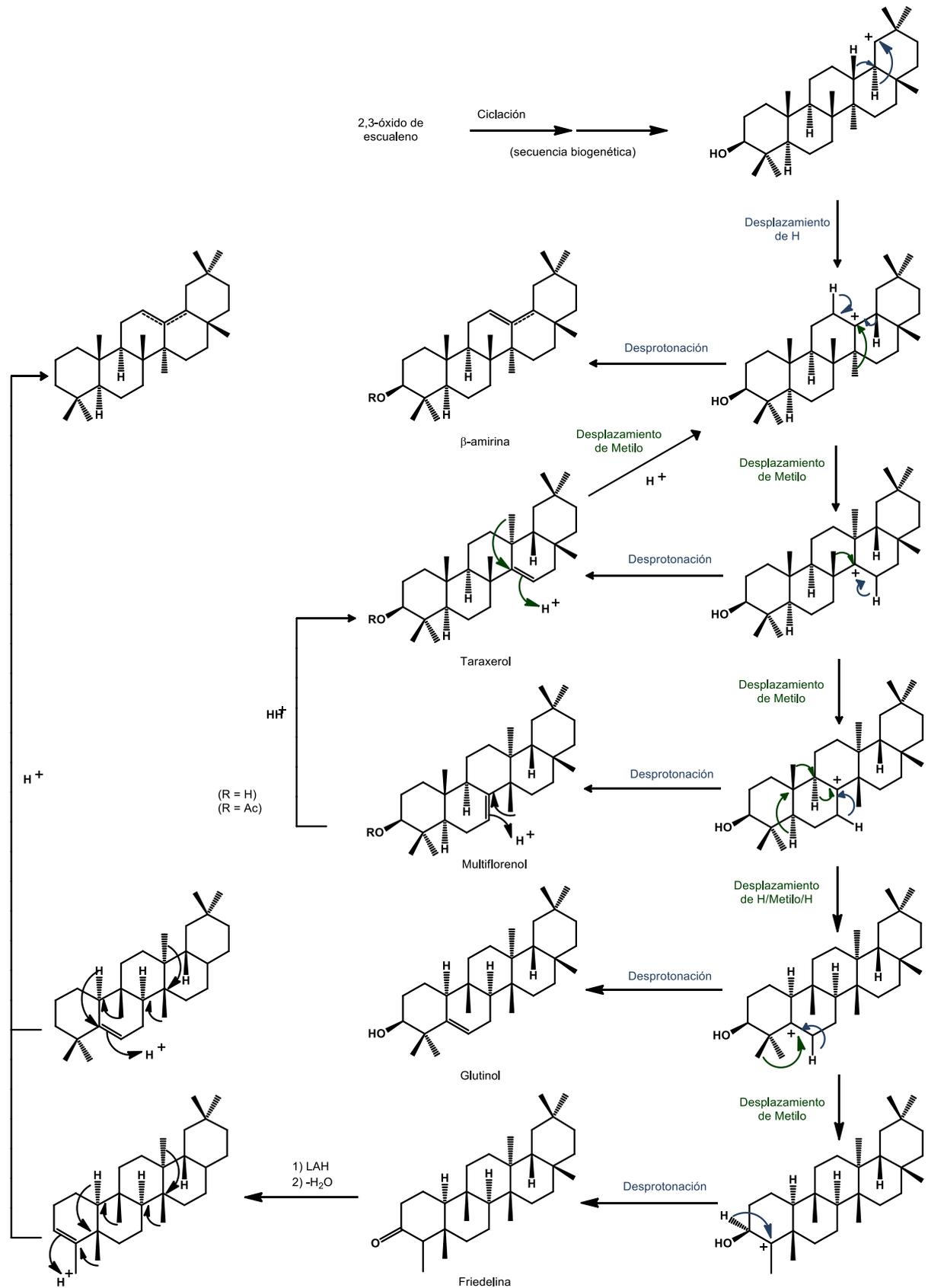


Figura 2.6. Interconversión de triterpenos pentacíclicos.

Hace unos años se publicó una revisión¹² que recoge todos los mecanismos de formación del esqueleto triterpénico a través de la ciclación del escualeno, óxido de escualeno y bis-óxido de escualeno. De esta forma y ampliando lo anteriormente expuesto, puede considerarse que el óxido de escualeno es el precursor de la mayoría de los 3 β -hidroxi-triterpenoides, aunque también es plausible la ciclación del escualeno seguida de la oxidación de C-3. Por el contrario, la serie de 3-deoxi-triterpenos es generada por la ciclación en cascada catiónica del escualeno, que se diferencia del óxido de escualeno en que no intervienen ninguno de sus intermedios que causan la diversidad estructural de la serie.¹¹

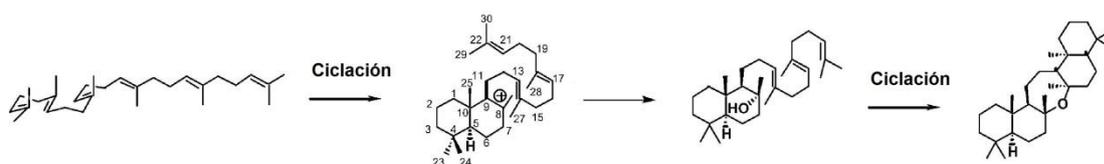


Figura 2.7. Ejemplo de ciclación directa del Escualeno

Muchos triterpenoides en cambio, poseen estructuralmente un grado de oxidación mayor lo que concuerda con una posible derivación procedente de un escualeno doblemente oxidado. Consecuentemente, se ha demostrado experimentalmente que este sustrato, el bis-óxido de escualeno, puede ciclar y dar lugar a la serie de reagrupamientos conocidos en el óxido de escualeno, con la diferencia que se forma un epoxialcohol derivado que por un lado puede estabilizarse o continuar con una segunda ciclación que se inicia en el 22,23-epóxido distal al intentar estabilizar el carbocatión generado en la ciclación inicial.¹²

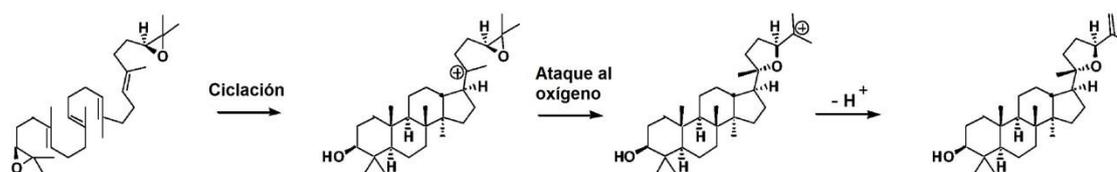


Figura 2.8. Ejemplo de ciclación a través del Bis-óxido de Escualeno

2.2 ÁCIDOS OLEANÓLICO¹³ Y MASLÍNICO

2.2.1 Generalidades

El trabajo que se expone en esta Memoria emplea como materia prima, ácido oleanólico y ácido maslínico, que son aislados de los residuos sólidos de la molturación de la aceituna por cualquiera de los tres procedimientos ahora empleados (prensas, continuo en dos fases y en tres

¹² Xu, R.; Fazio, G. C.; Matsuda, S. P. T. *Phytochemistry* **2004**, 65, 261-265

¹³ Pollier, J.; Goossens, A. *Phytochemistry* **2012**, 77, 10-15.

fases). El método empleado para aislar y purificar estos productos a partir de la fuente natural se detallará en la Parte Experimental y se encuentra protegido por patentes nacional e internacional desarrolladas por nuestro Grupo de Investigación y titularizadas por la Universidad de Granada.¹⁴

Los ácidos oleanólico (ácido 3 β -hidroxi-12-oleanen-28-oico) y maslínico (ácido 2 α ,3 β -dihidroxi-12-oleanen-28-oico) son dos productos naturales triterpénicos pentacíclicos con esqueleto de oleanano ampliamente repartidos en el reino vegetal^{15,16} y presentes en el orujo de la aceituna^{17,18} en cantidad considerable.

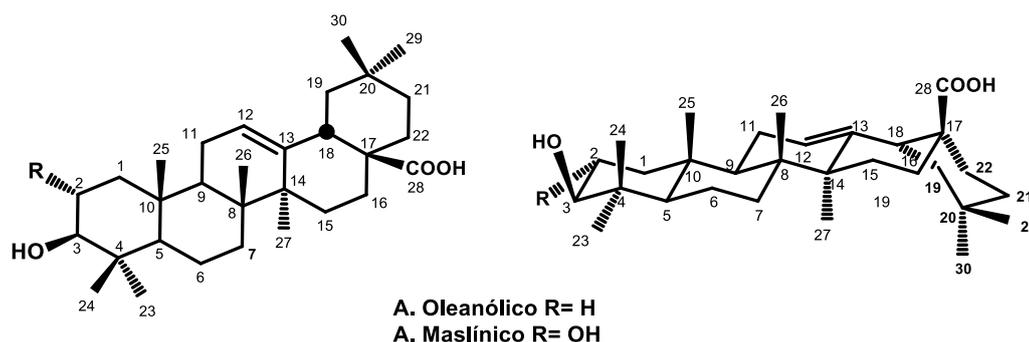


Figura 2.9. Representación estructural y espacial de los ácidos Oleanólico y Maslínico

Aunque el ácido oleanólico se comercializa principalmente procedente de los hidrolizados de ginseng, sin embargo no existen fuentes comerciales de ácido maslínico porque está mucho menos repartido. En nuestro laboratorio de investigación se obtienen en torno al 0.4% de ácido oleanólico y el 0.8% en peso de ácido maslínico a partir de los residuos sólidos secos de la industria olivarera, empleando los clásicos aparatos de extracción continua *Soxhlet* y los procesos que más adelante se detallarán. Esto significa que por cada kilogramo de materia prima procesado se aíslan unos cuatro gramos de ácido oleanólico y unos ocho de ácido maslínico, lo que indica la inhabitual gran disponibilidad de materia prima con que contamos en este caso.

El ácido oleanólico fue aislado por primera vez en 1908 de las hojas de la aceituna por Frederick B. Power¹⁹, denominándolo oleanol. En 1924, van der Haar²⁰ propone el cambio de nombre a ácido oleanólico revisando su estructura. En 1931, Wedekind²¹ aísla un triterpeno de la

¹⁴ Procedimiento de aprovechamiento industrial de los ácidos 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico (ácido oleanólico) y 2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oico (ácido maslínico) contenidos en los subproductos de la molturación de la aceituna. Patente española P9601652. Patente internacional W098/04331.

¹⁵ Dictionary of Natural Products on CD-ROM. Chapman & Hall, ISSN 0966-2146 ver.: 5.1. **1996**; Oleanolic Acid, CAS (508-02-1); Maslinic Acid, CAS (4373-41-5).

¹⁶ a) Phytochemical and Ethnobotanical Database (<http://www.ars-grin.gov/duke/plants.html>) Chemical: Oleanolic Acid; Chemical: Maslinic Acid; b) Phytochemical & Ethnobotanical Search Page (<http://www.leffingwell.com/plants.htm#anchor9>)

¹⁷ Bianchi, G.; Pozzi, N.; Vlahov, G. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 205-207.

¹⁸ Gil, M.; Haidour, A.; Ramos, J. L. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **1997**, *45*, 4490-4494.

¹⁹ Power, F. B.; Tutin, F. J. *Chem. Soc., Trans.* **1908**, *93*, 891-904.

²⁰ van der Haar, A. W. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1924**, *43*, 546-547.

²¹ a) Wedekind, E.; Schicke, W. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* **1931**, *195*, 132-138; b) Wedekind, E.; Schicke, W. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* **1931**, *198*, 181-184.

corteza del guaiac o guayaco (*Guaiacum officinale*), al que denomina guagenina y que Alfred Winterstein²² lo identifica como ácido oleanólico. De esta forma, el ácido oleanólico tiene un gran número de sinónimos (oleanol, guagenina, taragenina, ácido víscico, ácido oleánico, etc.) y se encuentra libre en la naturaleza o bien formando distintos derivados (glicósidos mayoritariamente) y ha sido aislado en más de 1620 especies vegetales²³, que incluyen alimentos o plantas medicinales, entre las que podemos destacar el muérdago (*Viscum álbium*), el clavo (*Syzygium aromaticum*), la remolacha (*Beta vulgaris*), etc. Es especialmente predominante en plantas pertenecientes a la familia *Oleaceae*, como el olivo (*Olea europaea*) debido al cual lleva su nombre²⁴ y aun sigue siendo su principal fuente comercial²⁵.

En cambio, no es hasta 1960 cuando Luciano Caglioti²⁶ aisló un nuevo ácido triterpénico a partir de la pulpa de la aceituna al que denominó ácido maslínico, que resultó ser el ácido cratególico, aislado anteriormente por Rudolf Tschesche²⁷, en 1951 a partir de un extracto de las hojas del espino (*Crataegus oxyacantha*). Aunque de forma menos extendida, se encuentra distribuido en la naturaleza como tal o bien en forma de éster metílico o formando distintos tipos de glicósidos. Puede aislarse además del lúpulo (*Humulus lupulus*), menta (*Mentha x rotundifolia*), el granado (*Punica granatum*), salvia (*Salvia officinalis*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y azufaifo (*Zyziphus jujuba*).

Algunos triterpenos en su forma libre, como es el caso del ácido oleanólico, suele encontrarse a menudo en la cera epicuticular de las plantas y ésta, no solo impermeabiliza la epidermis, sino que repele el agua y evita la adhesión de conidios y esporas de agentes patógenos, es decir que también constituye un medio de defensa.²⁸ De esta forma, en las hojas del olivo, el ácido oleanólico se encuentra formando casi cristales puros que forman una barrera física frente al ataque fúngico²⁹. Sin embargo, no sólo se encuentra como ácido libre sino que también constituye el aglicón de ciertas saponinas triterpénicas uniéndose a una o a varias moléculas de azúcar.³⁰ En plantas, estas moléculas de ácido oleanólico glicoconjugadas pueden actuar como compuestos de defensa frente a herbívoros o patógenos, o como agentes alelopáticos.²²

²² Winterstein, A.; Stein, G. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* **1931**, *199*, 64-74.

²³ a) Liu, J. J. *Ethnopharmacology* **1995**, *49*, 57-68; b) Fai, Y. M.; Tao, C. C. *Natura Proda Medica* **2009**, *2*, 77-290; c) Fukushima, E. O.; Seki, H.; Ohyama, K.; Ono, E.; Umemoto, N.; Mizutani, M.; Saito, K.; Muratana, T. *Plant Cell Physiology* **2011**, *52*, 2050-2061.

²⁴ Simonsen, J. L.; Ross, W. C. J. En *The Terpenes: The Triterpenes and Their Derivatives. Hydroxy acids, Hidroxyl lactones, Hydroxyaldehyde Acids, Hydroxyketo Acids and the stereochemistry of the Triterpenes*; Simonsen, J. L.; Ross, W. C. J. Eds.; Cambridge University Press, Cambridge, UK, **1957**; Vol. 5.

²⁵ Sporn, M. B.; Liby, K. T.; Yore, M. M.; Fu, L.; Lopchuk, J. M.; Gribble, G. W. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 537-545.

²⁶ a) Caglioti, L.; Cainelli, G.; Minutilli, F. *Classe Sci., Fis. Mat.* **1960**, *29*, 544-548; b) Caglioti, L.; Cainelli, G.; Minutilli, F. *Chimica e l'Industria* **1961**, *43*, 278.

²⁷ a) Tschesche, R.; Fugmann, R. *Chemische Berichte* **1951**, *84*, 810-26; b) Tschesche, R.; Heesch, A.; Fugmann, R. *Chemische Berichte* **1953**, *86*, 626-629.

²⁸ Heinzen, H.; de Vries, J. X.; Moyna, P.; Remberg, G.; Martínez, R.; Tietze, L. F. *Phytochem. Anal.* **1996**, *7*, 237-244.

²⁹ a) Kubo, I.; Matsumoto, A. *Cell. Mol. Life Sci.*, **1984**, *40*, 937-938; b) Kubo, I.; Matsumoto, A.; Takase, I. *J. Chem. Ecol.* **1985**, *11*, 251-263.

³⁰ a) Szakiel, A.; Grzelak, A.; Dudek, P.; Janiszowska, W. *Plant Physiol. Biochem.* **2003**, *41*, 271-275; b) Szakiel, A.; Ruszowski, D.; Janiszowska, W. *Phytochemistry Rev.* **2005**, *4*, 151-158.

2.2.1.1 El olivo (*Olea europaea*)

El olivo constituye uno de los cultivos tradicionales más antiguos de la Europa templada y cálida. Resulta muy difícil precisar el sitio exacto de donde se cultivó por vez primera, y, aunque las investigaciones parecen sugerir que sus orígenes habría que buscarlos 4000 años a. C. en la antigua Mesopotamia, que coincide geográficamente con las actuales Irán y Siria, lo cierto es que existen referencias históricas de su cultivo en la mayoría de las culturas del Próximo Oriente y del Mediterráneo Oriental. Actualmente, su cultivo se difunde por toda la cuenca del Mediterráneo y existe también en otras zonas con clima semejante como son California, algunos países de América del Sur y Australia.



Imagen 2.1. Área de extensión del olivo (■) por la cuenca Mediterránea³¹

La etimología nos muestra diversas teorías sobre el origen del olivo. Algunos autores mantienen que los nombres del olivo y por tanto *oliva*, en las lenguas mediterráneas derivan de la palabra cretense *elaiwa* y de la griega *elaia* (ελαια), y el aceite de oliva era *elaialadah*.³² Ambas proceden de la semítica *ulu*, que luego se transformó en la palabra latina *oleum* que evolucionó a *oli* en las lenguas romances. Esta variante da origen a *oil* en inglés, y *öl* en alemán. En cambio, la palabra hebrea *zait* pasó al árabe como *zaitum* y derivó al castellano como *az-zait* o *al-zait*, que significa jugo de la oliva, y posteriormente a *aceite*, siendo el castellano la única lengua procedente del latín que reconoce esta raíz etimológica. Estas dos denominaciones hacen ver que la palabra *oliva* procede de las lenguas de los pueblos del norte del mar mediterráneo, como Grecia e Italia, mientras que la denominación de *aceituna* posee su origen en los idiomas de los pueblos mediterráneos meridionales y orientales como son Magreb, Siria, Egipto, Líbano. La denominación *zait* puede indicar la procedencia de esta fruta de una región al oeste de Egipto, Said o Saït, mientras que *olea* puede hacer mención a una zona al norte del monte del Olimpo.

³¹ Ghedira, K. *Phytothérapie* **2008**, 6, 83–89.

³² March, L.; Ríos, A. En *El libro del aceite de oliva*, 1ª ed.; Alianza Editorial, Madrid, ES, **1989**.

Botánicamente podría describirse como un árbol perennifolio, longevo, que puede alcanzar hasta 15 m de altura, con copa ancha, tronco grueso, retorcido y a menudo muy corto, cuya corteza de color gris plateado se encuentra finamente fisurada, especialmente a medida que se hace mayor, puesto que de joven suele tener la corteza lisa. Sus hojas, normalmente con disposición opuesta de 2 a 8 cm de largo, son lanceoladas con el ápice ligeramente puntiagudo, enteras, coriáceas, glabras y verde gris oscuras por el haz, más pálidas y densamente escamosas por el envés, más o menos sésiles o con un peciolo muy corto. En cuanto a sus flores son bisexuales o polígamas, en panículas axilares multifloras, con corola blanca y su fruto, la aceituna, es una drupa muy oleosa de 1 a 3,5 cm de largo, ovoide, verde al principio, y que precisa de un año para adquirir un color negro-morado en su plena madurez. Su periodo de floración está comprendido entre mayo y julio mientras que su periodo de fructificación comprendido entre los meses de septiembre y diciembre.



Imagen 2.2. *Fotografía de un olivar donde pueden apreciarse hojas, flores y fruto.*

Los componentes químicos mayoritarios de la fruta y la hoja del olivo se resumen en la siguiente tabla³¹,

Parte utilizada	Fracción o Familia química	Constituyentes químicos
Fruto La aceituna es rica en agua (40-45 %), en glucidos (10-20 %) y en lípidos que representa el 30 % del peso del fruto maduro.	Fracción saponificable	Acido palmítico 7,5-20 %, Acido palmítico 0,3-3,5 Acido esteárico 0,5-5,0 % Acido oléico 55-83 % Acido linoleico 3,5-21,0 % Acido α -linoléico > 0,9 %
	Fracción insaponificable	Escualeno 300-700 mg Esteroles como β -sitosterol 70-90 mg Alcoholes triterpénicos 100-300 mg α -tocoferol 4-13 mg β -tocoferol 1-2 mg Compuestos fenólicos 50 mg Hidroxitirosol 0,01-1 mg y tirosol
Hojas	Triterpenos	Acido Oleanólico y Maslínico
	Flavonoides	-Luteolina, camferol, miricetina, quercetina, apigenina -Rutósido, y los glucósidos de apigenina, quercitrina y luteolina
	Secoirridoides	Oleopeina, 11-dimetil-oleopeina, oleósido, Oleósido dimetilester, ligustrosido, oleurosido y oleceína
	Acidos fenólicos	Acido cafeico, acido cafeoquinico, acide p-cumárico, verbascosido.

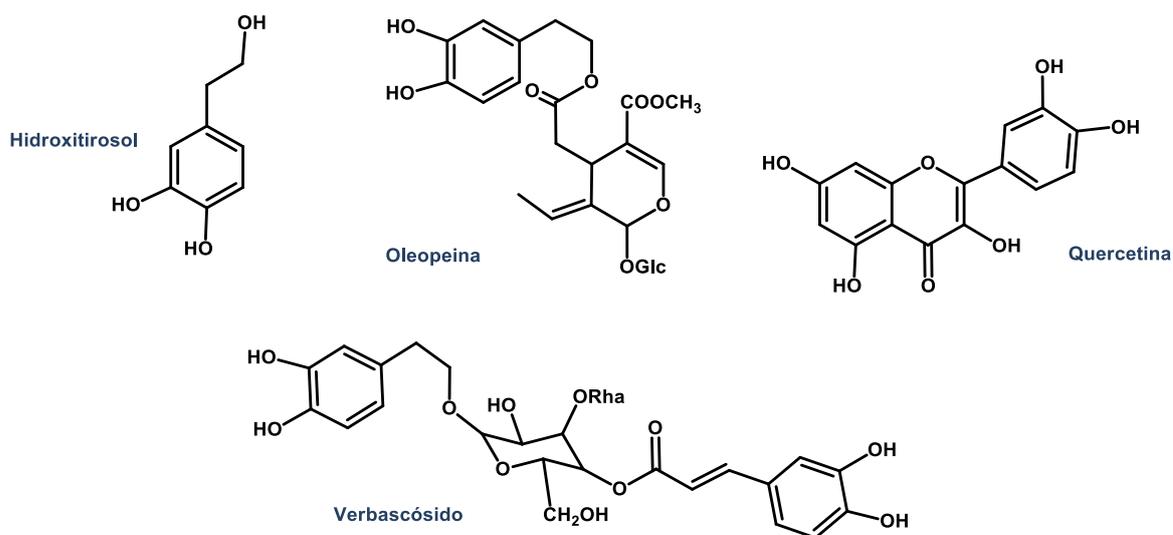


Tabla 2.1. Composición y estructuras de los principales metabolitos secundarios de la aceituna.

Es debido a su composición lo que confiere al aceite de oliva su alto valor añadido en cuanto a propiedades beneficiosas para la salud, ya que reduce el nivel de colesterol, disminuye el riesgo de infarto, reduce las probabilidades de trombosis arteriales, disminuye la acidez gástrica, ofrece una acción eficaz de protección contra úlceras y gastritis, estimula la secreción de la bilis, regula el tránsito intestinal, beneficia nuestro crecimiento óseo y permite una excelente mineralización del hueso, es el más conveniente para prevenir los efectos deterioradores de la

edad sobre las funciones cerebrales y sobre todo el envejecimiento de los tejidos y de los órganos en general. Así, cabe destacar que el hidroxitirosol o 3,4-dihidroxifeniletanol, es considerado como uno de los antioxidantes naturales más potentes. Su coeficiente de capacidad de absorción de radicales del oxígeno (Oxygen Radical Absorbance Capacity), es de 40.000 $\mu\text{molTE/g}$, diez veces mayor que el del té verde, y dos veces mayor que el de la coenzima Q10.³³ Se ha visto que favorece el descenso el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, la prevención frente a la aparición de ciertos tipos de cáncer (especialmente de colon y piel), así como propiedades antiinflamatorias y antiviricas. Por otro lado, el oleuperósido favorece la formación de óxido nítrico, interviene como vasodilatador potente, además de proteger los vasos sanguíneos y actuar como antibacteriano.

Asimismo, se ha descrito que los ácidos triterpénicos oleanólico y maslínico se encuentran sobre todo en el epicarpio de las aceitunas, detectándose en aceite de oliva virgen extra, cantidades menores de 100 ppm, aunque superiores a 300 ppm en aceites de orujo, siendo este incremento causado por su enriquecimiento en la fase oleosa durante el almacenamiento de la pasta al aire durante meses. Debemos tener en cuenta que ambos ácidos quedan mayoritariamente en el residuo sólido, conocido con el nombre de *orujo u orujillo* (si el aceite se extrae por el llamado centrifugado en 3 fases), que es la parte sólida que queda tras moler y prensar las aceitunas y está formada por restos de piel (15-30%), hueso (30-45%) y sólidos finos de pulpa (30-50%).



Imagen 2.3. Fotografía que muestra orujo deshidratado tras prensado de la aceituna.

Se ha estimado que el conjunto de las agroindustrias del sector del olivar en Andalucía, produjeron anualmente y en conjunto 277.063 toneladas de hueso de aceituna (con una humedad media del 13%), 432.984 toneladas de hojín (37% de humedad) y 985.552 toneladas de orujillo (10% de humedad).³⁴ El orujo generalmente se recicla mediante una segunda centrifugación para recuperar parte del aceite residual que contiene, posteriormente se seca para extraer con

³³ Visioli, F.; Bernardini, E. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 786-804.

³⁴ Medias referentes a las cosechas 2006-2007 y 2007-2008. En *Potencial Energético De Los Subproductos De La Industria Olivarrera En Andalucía*. Secretaría General Del Medio Rural Y La Producción Ecológica. Junta de Andalucía, **2010**.

disolventes el llamado aceite de orujo y finalmente suele servir de combustible en diversos procesos térmicos y para la generación de energía eléctrica, ya que posee un porcentaje de humedad que varía entre el 9% y el 12%, y un poder calorífico en torno a 4.100 kcal/kg en base seca, lo que le confiere un elevado valor como combustible. La rentabilidad económica del tal secuencia de procesos se basa, sobre todo, en el generoso subsidio de que disfruta la generación de energías alternativas y en la gratuidad de la materia prima, ya que las almazaras suelen entregar a pie de planta el aperujo, libre de costes. Sin embargo, la reciente detección de hidrocarburos policíclicos aromáticos en el aceite de orujo (benzopirenos³⁵), generados durante el secado del subproducto, junto con el impacto contaminante de los gases generados en los distintos procesos de combustión, está impulsando la aplicación de técnicas alternativas de bajo coste y respetuosas con el ambiente para el aprovechamiento del aperujo, como es el caso del compostaje.

De esta forma, la utilización o reciclaje del residuo para el aislamiento y aplicabilidad de ambos ácidos triterpénicos para fines farmacológicos o químicos, constituye una vía de aprovechamiento del mismo.

2.2.2 Biosíntesis de ácido Oleanólico y ácido Maslínico

Como habíamos visto, la ciclación que conlleva el 2,3-óxido de escualeno forma el punto de ramificación entre la generación de los esteroides primarios y los triterpenos que conduce a la formación del ácido oleanólico. Como muestra la figura 2.10, la biosíntesis de fitoesteroides se genera cuando el 2,3-óxido de escualeno es ciclado por la cicloartenol sintasa (CAS) y da lugar al precursor tetracíclico de todos los esteroides, el cicloartenol. Puede considerarse que la CAS, es la enzima ancestral de todas las oxido de escualeno ciclasas existentes hoy en día involucradas en el metabolismo secundario de las plantas. En la ruta biogénica del ácido oleanólico, el 2,3-óxido de escualeno se cicla al esqueleto pentacíclico de tipo oleanano, gracias a la actuación de la β -amirina sintasa (BAS), formando β -amirina.³⁶ En el paso final de la biosíntesis, β -amirina es oxidada en una secuencia de tres etapas oxidativas sobre C-28 llevadas a cabo por una enzima perteneciente al citocromo P450, identificada como CYP716A12 (ver apartado 3.3.2.1),^{37,18} generando ácido oleanólico a través de un alcohol intermedio conocido como eritrodíol.

³⁵ Los benzopirenos representan un riesgo para la salud encontrándose establecido su contenido máximo permitido en el Reglamento (CE) nº. 466/2001. La Decisión (CE/108/2005) reitera la necesidad de desarrollar líneas de investigación para intentar mitigar los efectos y limitar los niveles de estas sustancias nocivas.

³⁶ a) Corey, E. J.; Matsuda, S. P. T.; Bartel, B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 11628-11632; b) Abe, I. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1311-1331; c) Kushiro, T.; Shibuya, M.; Ebizuka, Y. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *256*, 238-244.

³⁷ a) Carelli, M.; Biazzi, E.; Panara, F.; Tava, A.; Scaramelli, L.; Porceddu, A.; Graham, N.; Odoardi, M.; Piano, E.; Arcioni, S.; May, S.; Scotti, C.; Calderini, O. *Plant Cell* **2011**, *23*, 3070-3081; b) d) Fukushima, E. O.; Seki, H.; Ohshima, K.; Ono, E.; Umemoto, N.; Mizutani, M.; Saito, K.; Muranaka, T. *Plant Cell Physiol.* **2011**, *52*, 2050-2061.

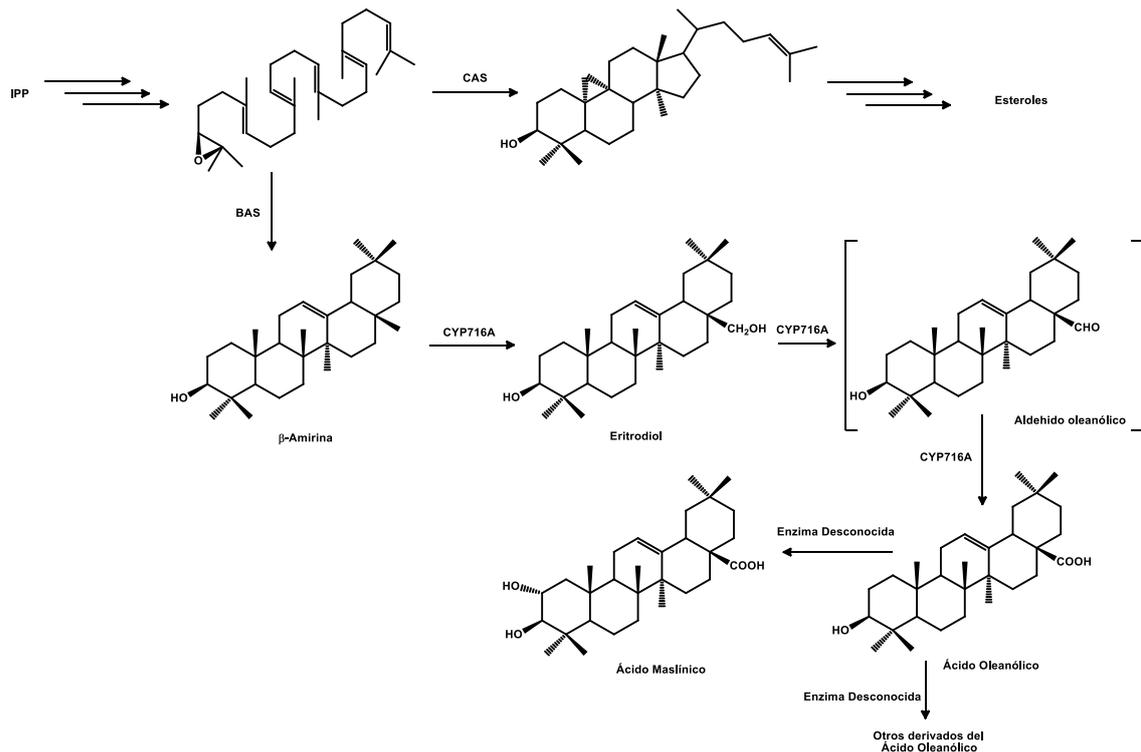


Figura 2.10. Ruta biogénica del ácido Oleanólico y Maslínico.

En cambio, la enzima o enzimas que pueden participar en la formación de otros derivados del propio ácido oleanólico, como es el caso del ácido maslínico, no se han discernido hoy en día.

Si tenemos en cuenta la ontogénesis del fruto, entre 12 y 18 semanas después de la floración, nos encontramos que la aceituna contiene cantidades significativas de α - y β -amirina, aproximadamente con un *ratio* de 3:2, así como varios compuestos más oxigenados con la adición de grupos hidroximetileno o carboxílicos. Además, en el fruto inmaduro, existen únicamente cantidades muy pequeñas de triterpenos no esteroidales acilados, que representa menos del 2% de las formas libres correspondientes. Este resultado indica una metabolización casi total de las recién sintetizadas α - y β -amirina en dioles y ácidos triterpénicos, que podría tener lugar en el verde epicarpio de la aceituna que está directamente expuesto a la intensa luz del sol entre las 21 y 30 semanas de maduración. Es en este momento cuando tiene lugar la acumulación de ácido maslínico en el fruto (60% de triterpenoides totales), lo que ratifica que la hidroxilación en C-2 ocurre después de la oxidación del grupo metileno de C-28. Curiosamente, en conjunto, aunque α -amirina estaba presente en exceso en comparación con β -amirina, los compuestos de tipo oleanano se producen en mayores cantidades que los compuestos ursano. De esta forma, el eritrodio representa alrededor del 60% de los dialcoholes triterpénicos y los ácidos oleanólico y maslínico el 98-99% de los monohidroxi y dihidroxi-triterpenos pentacíclicos. Por lo tanto, el destino metabólico de la α -amirina en la aceituna aun no se ha dilucidado. A partir de las 30 semanas después de la floración, ocurre una disminución en la cantidad de todos los triterpenos

pentacíclicos presentes en el fruto, que indica un metabolismo mayor de los mismos probablemente dirigidos a la formación de saponinas triterpénicas.³⁸

Además de todo esto, los avances en ingeniería genética están permitiendo la obtención de ácido oleanólico y derivados a través de la expresión de los genes biogénicos de plantas en diversas cepas como son *Escherichia coli* o levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*), lo que reduce bastante el inconveniente de la baja concentración *in planta* de estos compuestos.³⁹

2.2.3 Derivados naturales y sintéticos de los ácidos Oleanólico y Maslínico

Debido a sus inherentes actividades farmacológicas, su disponibilidad y su bajo coste de producción, el ácido oleanólico fue y es considerado hoy en día un buen sustrato sobre el que llevar a cabo modificaciones sintéticas.²¹ Las modificaciones químicas sobre este ácido suelen dirigirse a la modificación de tres centros activos de la molécula, el grupo hidroxilo de C-3, el doble enlace existente entre C12-C13 y el grupo carboxílico de C-28, y esto ha resultado en la generación de una serie de nuevos derivados estructurales sintéticos del mismo.^{21,40} Comparados con el ácido oleanólico en sí, muchos de estos derivados mostraron un incremento en la habilidad para bloquear la síntesis de la óxido nítrico sintasa (iNOS), una enzima que juega un papel clave en el proceso inflamatorio.⁴¹

Los derivados de este tipo que han demostrado ser los más potentes son el ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO) y su 28-metiléster derivado (CDDO-Me) (ver figura 2.11). Ambos compuestos poseen funcionalizados los anillos A y C, además de poseer un grupo electrón atrayente en el C-2 del anillo A (grupo nitrilo), hecho que ha resultado ser esencial para la actividad de los triterpenoides sintéticos.⁴² Como consecuencia el grupo nitrilo activa la enona del anillo A y esto permite que se comporte como un cierto aceptor de Michael adicionándose covalentemente, pero de forma reversible a grupos activados de ciertas proteínas, como son los grupos SH- de los residuos de cisteína.⁴⁰

³⁸ Stiti, N.; Triki, S.; Hartmann, M. A. *Lipids* **2007**, *42*, 55-67.

³⁹ a) Pollier, J.; Moses, T.; Goossens, A. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1897-1916; b) Zhang, H.; Boghigian, B. A.; Armando, J.; Pfeifer, B. A. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 125-151.

⁴⁰ a) Honda, T.; Finlay, H. J.; Gribble, G. W.; Suh, N.; Sporn, M. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1623-1628; b) Honda, T.; Rounds, B. V.; Gribble, G. W.; Suh, N.; Wang, Y.; Sporn, M. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2711-2714; c) Honda, T.; Honda, Y.; Favoloro Jr, F. G.; Gribble, G. W.; Suh, N.; Place, A. E.; Rendi, M. H.; Sporn, M. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1027-1030.

⁴¹ a) Suh, N.; Honda, T.; Finlay, H. J.; Barchowsky, A.; Williams, C.; Benoit, N. E.; Xie, Q. W.; Nathan, C.; Gribble, G. W.; Sporn, M. B. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 717-723; b) Suh, N.; Wang, Y.; Honda, T.; Gribble, G. W.; Dmitrovsky, E.; Hickey, W. F.; Maue, R. A.; Place, A. E.; Porter, D. M.; Spinella, M. J.; Williams, C. R.; Wu, G.; Dannenberg, A. J.; Flanders, K. C.; Letterio, J. J.; Mangelsdorf, D. J.; Nathan, C. F.; Nguyen, L.; Porter, W. W.; Ren, R. F.; Roberts, A. B.; Roche, N. S.; Subbaramaiah, K.; Sporn, M. B. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 336-341.

⁴² a) Couch, R. D.; Browning, R. G.; Honda, T.; Gribble, G. W.; Wright, D. L.; Sporn, M. B.; Anderson, A. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2215-2219; b) Dinkova-Kostova, A. T.; Liby, K. T.; Stephenson, K. K.; Holtzclaw, W. D.; Gao, X.; Suh, N.; Williams, C.; Risingsong, R.; Honda, T.; Gribble, G. W.; Sporn, M. B.; Talalay, P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 4584-4589; c) Yates, M. S.; Tsuchi, M.; Katsuo, F.; Flanders, K. C.; Liby, K. T.; Honda, T.; Gribble, G. W.; Johnson, D. A.; Johnson, J. A.; Burton, N. C.; Guilarte, T. R.; Yamamoto, M.; Sporn, M. B.; Kensler, T. W. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 154-162.

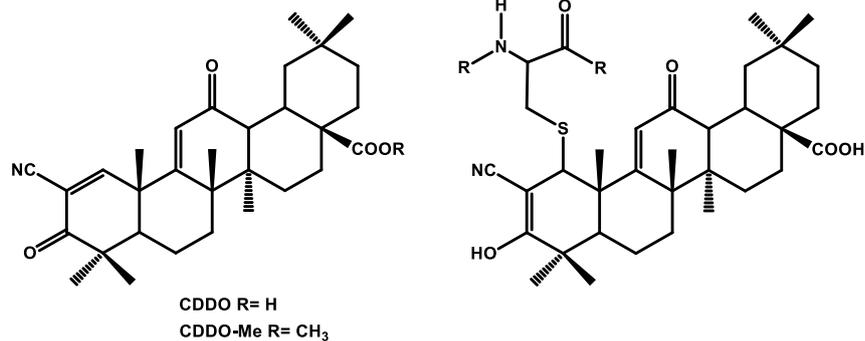


Figura 2.11. Estructuras químicas de CDDO y CDDO-Me y ejemplo de su unión a un residuo de cisteína

La aplicación farmacológica actual de esta serie de compuestos está centrada en el tratamiento de la enfermedad renal crónica (ERC), caracterizada por una progresiva pérdida de las funciones renales que finalmente acaba en un fallo renal. El avance de la enfermedad está directamente correlacionado con un aumento de la inflamación del riñón y el tratamiento de pacientes de ERC con bardoxolona de metilo (comúnmente como se conoce a CDDO-Me) permite mejorar la relación entre el grado de inflamación con la función renal que poseen. En este punto, el fármaco se encuentra en fase clínica para el tratamiento de la ERC.⁴³

Además de todo esto, y aunque hemos comentado que el propio ácido oleanólico posee tres centros activos altamente atacables químicamente, también sabemos que muchas especies de plantas acumulan dicho ácido y derivados con grupos funcionales adicionales debido a un metabolismo mayor del mismo. Es el caso del ácido maslínico, que es generado a través del ácido oleanólico por hidroxilación en α de C-2 en un único paso enzimático. De esta forma, y como en el caso anterior, es usado como molécula de partida para su posterior modificación sintética y dando lugar a derivados mejorados farmacológicamente comparándolos con el propio ácido maslínico en sí.⁴⁴

De igual forma y como podía verse en el apartado 2.2.2, el precursor biogenético de ambos ácidos, conocido antiguamente como oleostanol⁴⁵ y actualmente como eritrodiool, suele aislarse en numerosas plantas naturales⁴⁶ como es la acacia (*Acacia senegal* L.), en las hojas de uva de oso o rastrea (*Arctostaphylos uva-ursi* L.), en las flores de azucena (*Calendula officinalis* L.), centáurea menor (*Centaureum erythraea*), en semillas de tindora (*Coccinia grandis* L.), en el fruto de coca colombiana (*Erythroxylum novogranatense* variedad *novogranatense*), en la corteza del eucalipto

⁴³ a) Pergola, P. E.; Krauth, M.; Huff, J. W.; Ferguson, D. A.; Ruiz, S.; Meyer, C. J.; Warnock, D. G. *Am. J. Nephrol.* **2011**, *33*, 469-476; b) Yore, M. M.; Kettenbach, A. N.; Sporn, M. B.; Gerber, S. A.; Liby, K. T. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22862.

⁴⁴ a) Wen, X.; Zhang, P.; Liu, J.; Zhang, L.; Wu, X.; Ni, P.; Sun, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 722-726; Qiu, W. W.; Shen, Q.; Yang, F.; Yang, B.; Zou, H.; Li, J. Y.; Li, J.; Tang, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6618-6622.

⁴⁵ a) Huneck, S.; Lehn, J. M. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1963**, 321-322; b) Huneck, S. *Naturwissenschaften* **1961**, *48*, 73.

⁴⁶ Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. [Online Database] 11 Junio 2012; <http://sun.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/chemdisp.xsql>.

común (*Eucalyptus globulus*), en los brotes del girasol (*Helianthus annuus* L.), sándalo (*Pterocarpus santalinus* L.) y está presente tanto en el aceite de oliva, aceite de orujo así como en su residuo restante. A este alcohol triterpénico se le atribuyen numerosas actividades biológicas o farmacológicas entre las que podríamos destacar, anticancerígeno⁴⁷, al actuar como compuesto proapoptótico e inhibiendo el crecimiento de células tumorales HT-29 en adenocarcinomas de colon humano⁴⁸, vasorelajante⁴⁹, antidiabético⁵⁰, antiinflamatorio en diferentes modelos animales⁵¹, antioxidante⁵² y modulador de la secreción de citoquinas en células mononucleares humanas⁵³. El correspondiente alcohol derivado del ácido maslínico también se ha aislado de forma natural en el latex de *Picris hieracioides* subsp. *japonica*⁵⁴.

Además, la oleanderólida o 3 β ,12 α -dihidroxiolean-28,13 β -olida, aunque fue obtenida sintéticamente por Barton en 1952, no fue hasta el año 1974 cuando se describió por primera vez como producto natural, al aislarse de *Centaurium erythraea*. Se caracteriza por inhibir α -glucosidasa de tipo IV, lo que le confiere actividad frente a la diabetes⁵⁵. Se ha demostrado que aquellos derivados del ácido oleanólico con una funcionalización γ -lactónica en el anillo C⁵⁶, además de presentar una mejor solubilidad en medios acuosos, lo que implica una mayor biodisponibilidad comparado con el propio ácido en sí, han demostrado ser biológicamente activos frente a las catepsinas y ser muy potente para el tratamiento de la osteoporosis.⁵⁴ Conjuntamente, la presencia del anillo lactónico contribuye significativamente a que los triterpenos de tipo oleanano expresen actividad antibacteriana. Esto se ha observado al aislarse 3 β -hidroxiolean-11-en-28,13 β -olida en las hojas de *Junellia tridens*⁵⁷ y *Carissa macrocarpa*, al compararse en este último caso con el propio ácido oleanólico, su correspondiente éster metílico y con otros triterpenos con esqueleto de ursano que se aislaron de la misma especie vegetal.⁵⁸

Por otro lado existen numerosos saponósidos donde ambos ácidos actúan como heterósidos. Es el caso de los eleuterósidos, que se aíslan del eleuterococo o ginseng siberiano (*Eleutherococcus wuzyi*). Especialmente los eleuterósidos I ó K que son ramno-arabinósidos del ácido oleanólico o los eleuterósidos L ó M, donde se encuentran esterificados por un trisacárido y se caracterizan por ser estimulantes del Sistema Nervioso Central antihipnótico, refuerzan la resistencia a la fatiga, mejoran la reacción al estrés o ejercen un efecto radio protector y antiinflamatorio. Otros derivados del ácido oleanólico, como el ácido equinocístico (ácido 16-

⁴⁷ Chen, H.; Lin, K.; Huang, A.; Tu, H.; Wei, B.; Hour, T.; Yen, M.; Pu, Y.; Lin, C. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3808-3812.

⁴⁸ Juan, M. E.; Wenzel, U.; Daniel, H.; Planas, J. M. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 595-599.

⁴⁹ Rodríguez-Rodríguez, R.; Ruiz-Gutiérrez, V. En *Vasorelaxant Effects of Oleanolic Acid and Erythrodiol in Pomace Olive Oil. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*; Elsevier Inc. ed.; Instituto de la Grasa (CSIC), Sevilla, ES, **2010**; Capítulo 83, 813-820.

⁵⁰ Zhang, Y.; Zhang, W.; Hong, D.; Shi, L.; Shen, Q.; Li, J. Y.; Li, J.; Hua, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8697-8705.

⁵¹ a) Máñez, S.; Recio, M. C.; Giner, R. M.; Ríos, J. L. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *334*, 103-105; b) De la Puerta, R.; Martínez-Domínguez, E.; Ruiz-Gutiérrez, V. *Z. Naturforsch* **2000**, *55*, 814-819.

⁵² Perona, J. S.; Arcemis, C.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Catalá, A. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 730-735.

⁵³ Marquez-Martin, A.; De La Puerta, R.; Fernandez-Arche, A.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Yaqoob, P. *Cytokine* **2006**, *36*, 211-217.

⁵⁴ Shiojima, K.; Suzuki, H.; Ageta, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1340-1642.

⁵⁵ Lai, Y. C.; Chen, C. K.; Tsai, S. F.; Lee, S. S. *Phytochemistry* **2012**, *74*, 206-211.

⁵⁶ Qian, S.; Wu, Y.; He, Y. X.; Wang, Z. Y.; Yang, W. Y.; Chen, X. *Chem. J. Chin. Univer.* **2012**, *33*, 969-975.

⁵⁷ Caldwell, C. G.; Franzblau, S. G.; Suarez, E.; Timmermann, B. N. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1611-1614.

⁵⁸ Moodley, R.; Chenia, H.; Jonnalagadda, S. B.; Koorbanally, N. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 4851-4858.

hidroxioleanólico) han demostrado efectos inhibidores frente a la replicación del HIV en células H-9 cuando se encuentran glicosidados los hidroxilos de C-3 y C-28 formando la llamada saponina gleditsia C.⁵⁹

Aunque como hemos mencionado estos derivados son naturales, muchos de ellos se han logrado obtener por métodos químicos detallándose el procedimiento de formación de los mismos en la correspondiente parte Experimental de esta Memoria.

2.3 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS Y APLICACIONES DE LOS ÁCIDOS OLEANÓLICO Y MASLÍNICO.

Los triterpenos pentacíclicos han tomado relevancia últimamente debido al amplio espectro de sus actividades biológicas. Como se había expuesto en el apartado 2.2, la función fisiológica de estos compuestos en las plantas está relacionada con la defensa frente a distintos patógenos y herbívoros, por lo que se podría esperar que estos triterpenos actúen contra ciertos patógenos causantes de enfermedades en humanos y animales.

Los ácidos maslínico y oleanólico, al igual que otros triterpenos pentacíclicos como los ácidos ursólico, betulínico o lupeol, tienen importantes actividades biológicas que demuestran el importante potencial terapéutico que este compuesto de origen natural puede tener en aplicaciones biomédicas en el cáncer, la inflamación y el SIDA por ejemplo. De hecho, una amplia variedad de nuevos efectos farmacológicos derivados de ácido oleanólico y maslínico han sido descritos incluyendo propiedades beneficiosas sobre el sistema cardiovascular,⁶⁰ actividad antihistamínica,⁶¹ inhibición selectiva de quinasas dependientes de AMP cíclico,⁶² propiedad antagonista del leucotrieno D₄⁶³ (que influye en la contracción del músculo relacionado con el asma) y antimicrobianas. Incluso, los ya mencionados efectos en la liberación de óxido nítrico que provoca el ácido oleanólico,⁶⁴ y sus derivados modificados en el anillo A y C de este ácido.⁶⁵ (consultar apartado 2.2.3 de esta Introducción).

Son muchos los compuestos con esqueleto de oleanano que muestran una potente **actividad hepatoprotectora** frente a diferentes tóxicos del hígado y entre ellos está ácido oleanólico.⁶⁶ De esta forma, es utilizado y vendido sin receta médica en China para paliar enfermedades hepáticas como la hepatitis viral.⁶⁷ Los beneficiosos efectos sobre el hígado se

⁵⁹ Konoshima, T.; Yasuda, I.; Kashiwada, Y.; Cosentino, L. M.; Lee, K-H. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1372-1377.

⁶⁰ Somova, L. O.; Nadar, A.; Rammanan, P.; Shode, F. O. *Phytomedicine* **2003**, *10*, 115-121.

⁶¹ Zhang, L. R.; Ma, T. X. *Acta Pharmacologica Clínica* **1995**, *16*, 527-530.

⁶² Wang, B. H.; Polya, G. M. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 55-63.

⁶³ Morota, T.; Saitoh, K.; Maruno, M.; Yang, C. X.; Qin, W. Z.; Yang, B. H. *Nat. Med.* **1995**, *49*, 468-471.

⁶⁴ Choi, C. Y.; You, H. J.; Jeong, H. G. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, *288*, 49-55.

⁶⁵ a) Honda, T.; Rounds, B. V.; Bore, L.; Finlay, H. J.; Favaloro, F. G. Jr.; Suh, N.; Wang, Y.; Sporn, M.B.; Gribble, G. W. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4233-4246; b) Honda, T.; Rounds, B. V.; Bore, L.; Favaloro, F. G. Jr.; Gribble, G. W.; Suh, N.; Wang, Y.; Sporn, M. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3429-3434.

⁶⁶ a) Liu, J.; Liu, Y.; Mao, Q.; Klaassen, C. D. *Fund. Appl. Toxicol.* **1994**, *22*, 34-40; b) Liu, J.; Liu, Y. P.; Parkinson, A.; Klaassen, C. D. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *275*, 768-774.

⁶⁷ a) Reisman, S. A.; Aleksunes, L. M.; Klaassen, C. D. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 1273-1282; b) Wang, X.; Ye, X. I.; Liu, R.; Chen, H. L.; Bai, H.; Liang, X.; Zhang, X. D.; Wang, Z.; Li, W. I.; Hai, C. X. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *184*, 328-337.

deben a su acción antiinflamatoria y antioxidante, así como a sus efectos sobre enzimas encargadas de metabolizar fármacos.⁶⁸

Ácido oleanólico y maslínico han manifestado que actúan en varios estadios del desarrollo tumoral, así como induciendo **diferenciación celular y apoptosis**. Además, tanto ácido maslínico como ácido oleanólico, presentan actividad citotóxica⁶⁹ y se ha demostrado que son capaces de inhibir la proliferación de células malignas de diferentes tipos de tumores sólidos sin afectar a las sanas (antineoplásicos).⁷⁰ De hecho, en los últimos años estos compuestos han atraído el interés de la medicina por sus efectos sobre distintos tumores combinada con su baja toxicidad. Así, se ha demostrado su actividad sobre distintas líneas celulares de leucemia,⁷¹ y de cáncer de colon.⁷² En cierta forma, la inflamación juega un papel crucial en el desarrollo y progresión del cáncer^{73,70f}. Así, el NF- κ B que constituye un factor de transcripción involucrado en el proceso inflamatorio, es comúnmente sobreexpresado en células tumorales, por lo que actúa suprimiendo la apoptosis de las mismas y el mantiene un microambiente beneficioso para la proliferación del cáncer.

Para el caso concreto de ácido maslínico los mecanismos celulares que inducen su efecto antitumoral no son bien conocidos, aunque dos estudios recientes han mostrado por una parte que este compuesto induce apoptosis en células tumorales mediante la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ROS), lo cual favorece la disminución del potencial transmembrana de la mitocondria y la activación de la caspasa-3,^{70f} y por otra parte este compuesto se ha visto que inhibe la actividad de la DNA topoisomerasa I.⁷⁴ Las DNA topoisomerasas y polimerasas son enzimas que juegan un papel crucial en el metabolismo del ADN (replicación, transcripción, recombinación y separación de los cromosoma durante la mitosis), por lo que la inhibición de la DNA topoisomerasa I ha sido durante muchos años la base del tratamiento de varios tipos de cánceres. Por tanto la actividad antitumoral del ácido maslínico puede ser mediada por diferentes mecanismos de acción.

⁶⁸ a) Liu, Y.; Hartley, D.P.; Liu, J. *Toxicology Letters* **1998**, *95*, 77-85; b) Liu, J.; Liu, Y.P.; Klaassen, C.D.; Waalkes, M.P.; Park, R.T.; Anderson, S.; Corton, C. *Hepatology* **1999**, *30*, 948.

⁶⁹ a) Taniguchi, S.; Imayoshi, Y.; Kobayashi, E.; Takamatsu, Y.; Ito, H.; Hatano, T.; Sakagami, H.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Sugita, D.; Shimura, S.; Yoshida, T. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 315-323; b) Ukiya, M.; Akihisa, T.; Tokuda, H.; Suzuki, H.; Mukainaka, T.; Ichiishi, E.; Yasukawa, K.; Kasahara, Y.; Nishino, H. *Cancer Letters* **2002**, *177*, 7-12; c) Hwang, B. Y.; Chai, H. B.; Kardono, L. B. S.; Riswan, S.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, S. D. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 197-201; d) Lee, H. Y.; Chung, H. Y.; Kin, K. H.; Lee, J. J.; Kim, K. W. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1994**, *120*, 513-518; e) Shon, K. H.; Lee, H. Y.; Chung, H. Y.; Young, H. S.; Yi, S. Y.; Kim, K. W. *Cancer Letters* **1995**, *94*, 213-218; f) Rabi, T. *Curr. Sci.* **1996**, *70*, 80-81; g) Patočka, J. *J. Appl. Biomed.* **2001**, *1*, 7-12.

⁷⁰ a) Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacorti-Passerini, C.; Formelli, F. *Cancer Letters* **2002**, *175*, 17-25; b) He, X.; Liu, R. H. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *11*, 4366-4370; c) Martin, R.; Carvalho, J.; Ibeas, E.; Hernandez, M.; Ruiz-Gutierrez, V.; Nieto, M.L. *Cancer Res.* **2007**, *8*, 3741-3751; d) Juan, M.E.; Wenzel U.; Ruiz-Gutierrez, V.; Daniel, H.; Planas, J. M. *J. Nutr.* **2006**, *10*, 2553-2557; e) Kim, Y. K.; Yoon, S. K.; Ryu, S. Y. *Planta Med.* **2000**, *5*, 485-486; f) Laszczyk, M. N.; *Planta Med.* **2009**, *75*, 91-104.

⁷¹ a) Ovesna, Z.; Kozics, K.; Slaménova, D. *Mutation Research* **2006**, *600*, 131-197; b) Wang, Y. F.; Lai, G. F.; Efferth, T.; Cao, J. X.; Luo, S. D. *Chem. Biodivers.* **2006**, *9*, 1023-1030.

⁷² a) Juan M. E.; Wenzel, U.; Ruiz-Gutierrez, V.; Daniel, H.; Planas J. M. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2553-2557; b) Reyes, F. J.; Centelles, J. J.; Lupiañez, J. A.; Cascanteb, M. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters* **2006**, *580*, 6302-6310.

⁷³ a) Van Waes, C. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 1076-1082; b) Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A.; Balkwill, F. *Nature* **2008**, *454*, 436-444.

⁷⁴ Pungitore, C. R.; Padron, J. M.; Leon, L. G.; Garcia, C.; Ciuffo, G. M.; Martin, V. S.; Tonn, C. E. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, **2007**, *3*, 13-17.

Por otro lado, la **multiresistencia a fármacos** (MDR) es el principal problema en quimioterapia ya que alteran factores farmacocinéticos e incrementan la toxicidad de estos remedios. Aunque MDR es un fenómeno multifactorial, su causa principal es la sobreexpresión de unas proteínas transportadoras de la membrana, P-glicoproteína (ABCB1) y proteína multiresistente (MRP1 o ABCC1). El hecho que ácido oleanólico no incremente la expresión de ABCC1 y no altere la actividad de ABCB1 sugiere que podría ser una buena elección en el tratamiento de tumores MDR tanto como auxiliar o como agente quimioterapéutico.⁷⁵

Además de la actividad antitumoral, ácido maslínico puede tener también **propiedades anti-inflamatorias y moduladoras del sistema inmune**, aunque los estudios publicados sobre este tema son escasos y contradictorios. Así, ácido maslínico inhibe la liberación de IL-6 y TNF α y la producción de NO y del peróxido de hidrogeno (ROS) en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS, lo que disminuye el estrés oxidativo intracelular⁷⁶, un efecto que los mismos autores no encuentran en células mononucleares de sangre periférica humana.⁷⁷ Aunque es posible que las diferencias encontradas sean debidas a que estos estudios se han realizado en diferentes modelos (humano vs ratón). Sin embargo y ya que otros compuestos estructuralmente muy parecidos al ácido maslínico como el ácido ursólico tiene actividad anti-inflamatoria,⁷⁸ es muy probable que el ácido maslínico también posea este tipo de actividad.

Ya que los procesos inflamatorios crónicos están hoy día considerados como una de las causas más importantes en las enfermedades cardiovasculares, en la diabetes tipo II y en el cáncer, el estudio de la actividad anti-inflamatoria del ácido maslínico es de especial relevancia también para la prevención de estas enfermedades. Por ejemplo, se ha visto que el ácido maslínico inhibe la actividad enzimática de la glicógeno fosforilasa⁷⁹ y tiene actividad hipoglucémica por vía oral en ratas diabéticas.⁸⁰ Además, este compuesto puede proteger del daño celular por disminuir la peroxidación lipídica de las membranas celulares.⁸¹

Además, de los mecanismos inflamatorios mencionados con anterioridad, se ha comprobado que en muchos procesos inflamatorios se produce un aumento de la elastasa de neutrófilos, una enzima proteolítica que escinde enlaces adyacentes a aminoácidos neutros en la elastina y sobre la que actúa normalmente como inhibidor natural la α -1-antitripsina (α 1PI). Si el nivel de α 1PI baja por cualquier razón en el organismo, se producen procesos inflamatorios como

⁷⁵ Braga, F.; Ayres-Saraiva, D.; Gattass, C. R.; Capella, M. A. M. *Cancer Letters* **2007**, *248*, 147-152.

⁷⁶ Huang, L.; Guan, T.; Qian, Y.; Huang, M.; Tang, X.; Li, Y.; Sun, H. *Eur. J. Pharm.* **2011**, *672*, 169-174.

⁷⁷ Marquez-Martin, A.; De La Puerta, R.; Fernández-Arche, A.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Yaqoob, P. *Cytokine* **2006**, *36*, 211-217.

⁷⁸ Shishodia, S.; Majumdar, S.; Banerjee, S.; Aggarwal, B. B. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 4375-4383.

⁷⁹ Guan, T.; Li, Y.; Sun, H.; Tang, X.; Qian, Y. *Planta Med.* **2009**, *75*, 1141-1143.

⁸⁰ a) Wen, X.; Sun, H.; Liu, J.; Wu, G.; Zhang, L.; Wu, X.; Ni, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4944-4948; b) Marquez-Martin, A.; de la Puerta Vazquez, R.; Fernandez-Arche, A.; Ruiz-Gutiérrez, V. *Free. Radic. Res.* **2006**, *40*, 295-302.

⁸¹ Montilla, M. P.; Agil, A.; Navarro, M. C.; Jiménez, M. I.; García-Granados, A.; Parra, A.; Cabo, M. M. *Planta Med.* **2003**, *69*, 472-474.

bronquitis, fibrosis quística, asma, etc. El ácido maslínico se presenta como un potente inhibidor de esta enzima actuando con muy buena eficiencia en muchos trastornos inflamatorios.⁸²

En cuanto a la **actividad Anti-Sida**, tanto ácido oleanólico,⁸³ como diferentes derivados sustituidos en C-3 y C-28,⁸⁴ manifiestan actividad contra el virus del sida. Además, hemiésteres glutáricos de ácido oleanólico revelan inhibición de la proteasa HIV-1.⁸⁵ Otros derivados obtenidos por modificaciones en la posición C-3 han resultado fructíferas al inhibir en concentraciones sub-nanomolares esta proteasa, actividad que fue determinada sobre células linfocitos-T H9 y sobre virus HIV-1 III B.⁸⁶

Al igual que el ácido oleanólico, el ácido maslínico posee una potente actividad inhibidora *in vitro* de la proteasa del virus del SIDA⁸⁷ y actividad antiviral (anti-HSV)⁸⁸. Se ha comprobado, además, que esta actividad es más potente en este ácido que en otros triterpenos como ácido ursólico, ácido epipomólico, ácido euscáfico y ácido torméntico. Así, en los últimos años, este triterpeno pentacíclico aislado, purificado y caracterizado por nuestro Grupo de Investigación ha sido objeto de pruebas de actividad biológica sobre parásitos oportunistas asociados al SIDA (*Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma Cruzi*, *Leshmania Donovanii*) en el Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada. Del mismo modo, en el Instituto Carlos III del Ministerio de Sanidad y Consumo se han realizado ensayos para su utilización como inhibidor de proteasas en el tratamiento del SIDA. Los resultados de estas pruebas de actividad biológica se recogen en dos nuevas patentes de la Universidad de Granada.⁸⁹ Dichos resultados son muy prometedores y suponen una sólida base de acción biológica, ya que han demostrado que estos productos no sólo actúan *in vitro* a nivel de enzima, sino que son capaces de penetrar en la célula, impidiendo la acción que el virus del SIDA utiliza para su salida de la célula infectada en su camino hacia el ataque de nuevas células. En consecuencia la actuación de ácido maslínico consiste en ralentizar de forma muy significativa la propagación del SIDA y ayudar a una mayor calidad de vida del enfermo.

Junto con esto, cabe destacar que triterpenos con esqueleto de oleanano como es el propio ácido oleanólico o ácido equinocístico poseen **actividad anti-VHC** (virus de la Hepatitis C).⁹⁰

⁸² *Uso de ácido maslínico y sus derivados para la inhibición de elastasa y para el tratamiento de enfermedades y sintomatologías con ella relacionadas* **P2007008843**.

⁸³ Mengoni, F.; Lichtner, M.; Battinelli, L.; Marzi, M.; Mastroianni, C. M.; Vullo, V.; Mazzanti, G. *Planta Med.* **2002**, *68*, 111-114.

⁸⁴ a) Chao, M.; Nakamura, N.; Hattori, M. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2000**, *48*, 1681-1688; b) Zhu, Y. M.; Shen, J. K.; Wang, H. K.; Cosentino, L. M.; Lee, K. H. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11*, 3115-3118.

⁸⁵ Ma, C. M.; Nakamura, N.; Miyashiro, H.; Hattori, M.; Shimotohno, K. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1999**, *47*, 141-145.

⁸⁶ Kashiwada, Y.; Wang, H.K.; Nagao, T.; Kitanaka, S.; Yasuda, I.; Fujioka, T.; Yamagishi, T.; Cosentino, L. M.; Kozuka, M.; Okabe, H.; Ikeshiro, Y.; Hu, C.Q.; Yeh, E.; Lee, K.H. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1090-1095.

⁸⁷ Xu, H. X.; Zeng, F. Q.; Wan, M.; Sim, K. Y. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 643.

⁸⁸ Serra, C.; Lampis, G.; Pompei, R.; Pinza, M. *Pharmacol Res.* **1994**, *29*, 359.

⁸⁹ a) *Utilización de ácido maslínico como inhibidor de serín proteasas para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos de género Cryptosporidium* **P9701029**; b) *Utilización de ácido maslínico como inhibidor de proteasas para el tratamiento de la enfermedad causada por los virus de inmunodeficiencia adquirida* **P9702528**.

⁹⁰ a) Yu, F.; Wang, Q.; Zhang, Z.; Peng, Y.; Qiu, Y.; Shi, Y.; Zheng, Y.; Xiao, S.; Wang, H.; Huang, X.; Zhu, L.; Chen, K.; Zhao, C.; Zhang, C.; Yu, M.; Sun, D.; Zhang, L.; Zhou, D. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4300-4319; b) Wang, H.; Wang, Q.; Xiao, S. L.; Yu, F.; Ye, M.; Zheng, Y. X.; Zhao, C. K.; Sun, D. A.; Zhang, L. H.; Zhou, D. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*,

Estudios de estructura-actividad muestran que los derivados funcionalizados en C-16 y C-28 potencian dicha actividad, debido al hecho de que estos sustratos bloquean la entrada o reconocimiento del virus al receptor de la célula hospedadora.

Se ha comprobado que el ácido maslínico actúa como **parasitostático**, impidiendo la reproducción de parásitos protozoarios de la familia de *Phyllum apicomplexa*.⁹¹ Concretamente se ha trabajado *in vitro* con cuatro géneros diferentes, *Cryptosporidium*, *Eimeria* (Coccidiosis, también *in vivo*), *Toxoplasma* y *Plasmodium* (Malaria, también *in vivo*).

Por otro lado, la utilización de ácido maslínico como **aditivo alimentario animal** ha dado lugar a resultados destacables, demostrándose que este triterpeno, como inhibidor de serín-proteasas específicas, puede regular las velocidades de recambio proteico a nivel tisular e influye en las velocidades de crecimiento del animal. Así, la adición de ácido maslínico a la dieta estándar de truchas arco iris ha permitido apreciar un mayor contenido total de proteínas y RNA tanto en hígado como en músculo, lo que se refleja en un considerable mayor tamaño/peso de los animales que llegan a conseguir un incremento de hasta el 29 % en peso en menor tiempo.⁹²

Un reciente estudio realizado en doradas (*Sparus aurata*)⁹³ pone de manifiesto que este aumento de peso es debido a que el ácido maslínico actúa interviniendo en la re Regulación de procesos enzimáticos como es la vía de las pentosas fosfato, donde incrementa el NADPH generado en esta vía, el cual interviene en procesos de biosíntesis de lípidos de membrana, influye en el mantenimiento celular además de formar parte en los procesos de crecimiento.

Además, conocidos los contenidos iniciales en ácido maslínico de los aceites naturales, se tienen proyectos inmediatos para obtener aceites recargados en esta sustancia que posean concentraciones similares y que actúen como alimentos funcionales. De igual manera se plantea la obtención de cápsulas oleosas (nutracéutico) con alto contenido en ácido maslínico y hidroxitirosol, antioxidante procedente de la misma fuente, para su ingestión directa.⁹⁴

Otra de las aplicaciones de éste ácido que ha dado lugar a otra patente se centra en la formulación de estos triterpenos naturales y/o sus sales en liposomas. Los triterpenos son incorporados a los liposomas, vesículas esféricas obtenidas por la interacción de fosfolípidos que se utilizan como vehículos transportadores de sustancias para la administración tópica y

160-168.

⁹¹ Utilización de ácido maslínico como antiparasitario frente a protozoos del *Phyllum apicomplexa* **WO 2007034009**.

⁹² a) Fernández-Navarro, M.; Peragón, J.; Esteban, F. J.; de la Higuera, M.; Lupiáñez, J. A. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **2006**, *144*, 130; b) Ácido maslínico como aditivo alimentario en la producción animal, **WO 2006003226**, **WO 2006003225** y **P200600536**

⁹³ Rufino-Palomares, E. E.; Reyes-Zurita, F. J.; García-Salguero, L.; Peragón, J.; de la Higuera, M.; Lupiáñez, J. A. *Aquacult. Nutr.* **2013**, *19*, 709-720.

⁹⁴ a) Composición nutracéutica obtenida de triterpenos naturales de la olea europaea **P200502087**; b) Alimento funcional obtenido por reincorporación de ingredientes naturales de la aceituna al aceite de oliva **P200700555**.

parenteral.⁹⁵ Estos triterpenos son extremadamente hidrofóbicos y se asocian inmediatamente a la parte hidrofóbica de los fosfolípidos con lo que su incorporación es sencilla e inmediata.

Estas amplias y variadas propiedades biológicas reflejan el creciente interés en la investigación de estos productos, quizás la mejor prueba de esto está en las patentes internacionales que sobre estos ácidos existen. Para el caso de ácido oleanólico encontramos: *Use of oleanolic acid as a vasodilator and restorer agent for endothelial dysfunction* (WO2004ES00190 20040430); *Cosmetic and dermopharmaceutical compositions for skin prone to acne* (WO2002fr03344 20021001); *Cosmetic composition for care of sensitive skin includes oleanolic acid or vegetable extract rich in oleanolic acid, and at least one other vegetable extract chosen from shea-butter flower and solanum lycocarpum* (FR20000008758 20000705); *Process for preparing food products fortified with oleanolic acid* (US19990468637 19991222); *Oleanolic acid-based anti-pruritus agent* (JP19970183075 19970623); *Angiogenesis inhibitor composition comprising oleanolic acid* (KR19920021117 19921111).

Igualmente, para ácido maslínico se están registrando un gran número de patentes en las que este ácido actúa como componente activo: *Hyperglucemia inhibitors* (JP 2006317967) *Glucose tolerance-improving agent* (WO2005063228); *Antitumor agent* US20030355201 20030131; *Apoptosis inductor* (WO 2003057224); *Antiobestic foods and drinks* (WO 2003039270); *External agent for the skin and whitening agent* (US20020259323 20020930); *Antiobesity drugs and materials thereof* (WO2002JP07709 20020730); *Drugs for vascular lesion* (WO 2002078685); *Antitumor food or beverage* (WO 2002052956).

2.3.1 Importancia farmacológica de la relación estructura-actividad en productos naturales y en triterpenos.

Durante siglos, la raza humana ha construido ingeniosos dispositivos para resolver problemas y hacer productos adecuados para saciar o solventar sus necesidades. Aunque este progreso ha dado lugar a riqueza y prosperidad, en cierta forma también se han generado problemas secundarios derivados de resolver los primarios. Hoy en día, muchas situaciones sociales han demostrado la necesidad e importancia de la ciencia para lograr un desarrollo sostenible en un futuro a corto y largo plazo. Así, por ejemplo, nos encontramos con los problemas derivados del calentamiento global, tales como la demanda futura de alimentos, desaparición de la biodiversidad en ecosistemas, como es el caso de los arrecifes de coral afectados por un aumento de la temperatura y disminución de pH. Otro hecho importante es el aumento de la

⁹⁵ *Formulación de triterpenos naturales obtenidos del genero Olea en liposomas* **WO 2007020314**.

resistencia por parte de ciertas bacterias patógenas a antibióticos disponibles y utilizados para el tratamiento de enfermedades graves.⁹⁶

Debido a esto, en la sociedad actual se observa un concienciado y renovado interés en la llamada “química verde” y en el uso sostenible de los recursos naturales. Estas tendencias son evidentes también en la búsqueda de nuevos productos o procesos farmacéuticos y biotecnológicos, donde el desarrollo de la investigación multidisciplinaria es básicamente esencial.

Como habíamos comentado, con un número estimado de más de 300.000 especies de plantas y, probablemente, cerca de dos millones de especies de hongos, insectos y diversos organismos marinos organismos, sin tener en cuenta a las bacterias, la biodiversidad de la Naturaleza sigue siendo una reserva sin precedentes de diversidad biológica y química. Sin embargo, la mayoría de esta biodiversidad está aún inexplorada. Diferentes tipos de estrategias, basadas en etnofarmacología, observaciones ecológicas y toxicológicas junto con la selección aleatoria, y con los recientes aspectos filogenéticos, se han utilizado en la prospección de la biodiversidad para la búsqueda de una única relación estructura-actividad, que conlleve una revolución en la medicina moderna.

La biotecnología actual ha desarrollado nuevas herramientas para la elucidación de las vías de biosíntesis de muchos productos naturales donde las enzimas implicadas han sido aisladas y caracterizadas y en algunos casos incluso se han clonado los genes que las codifican. De forma que este desarrollo ha creado nuevas estrategias como la biosíntesis combinatoria. Además de la posibilidad de descubrir nuevos fármacos candidatos para el desarrollo de fármacos, los usos cada vez mayores de remedios herbales, los cuales contienen mezclas complejas de productos naturales, necesitan intensos estudios científicos para establecer la eficacia y la seguridad de estos tipos de productos, así como los correspondientes estudios clínicos.

En 2007, el grupo de Larsson et al⁹⁷, correlacionó toda esta interdisciplinariedad conceptual basándose en que si observamos organismo que muestra una actividad biológica interesante, la comprensión de la relación entre las estructuras químicas responsables para la dicha bioactividad necesitan ser estudiada a nivel molecular utilizando métodos *in vivo*, *in vitro* u *in silico*. Esto puede verse en la siguiente figura,

⁹⁶ Bohlin, L.; Göransson, U.; Alsmark, C.; Wedén, C.; Backlund, A. *Phytochemistry Rev.* **2010**, *9*, 279-301.

⁹⁷ Larsson, S.; Backlund, A.; Bohlin, L. *Phytochem. Lett.* **2008**, *1*, 131-134.

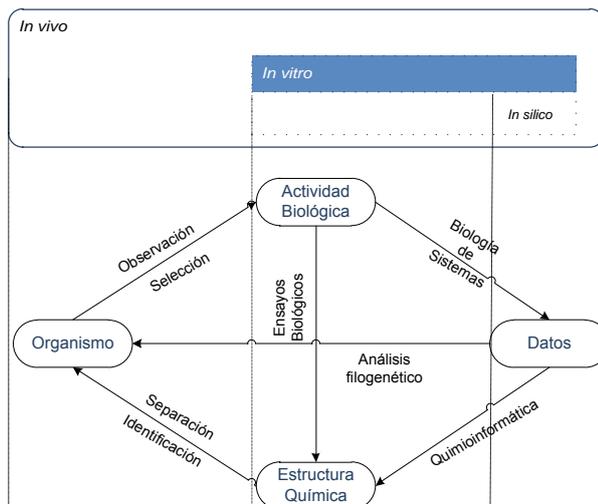


Figura 2.12. Modelo explicativo de la naturaleza interdisciplinaria de la farmacognosia presentado por Larsson⁹⁷

de forma que los cuatro pilares que constituyen la base de la farmacognosia: organismo, estructura química, actividad biológica y datos, están conectados por flechas que representan el flujo de información entre ellos. Por ejemplo, el organismo y la actividad biológica están conectados por una observación (de la actividad) y una selección (del organismo). De forma similar, la estructura química y los datos están conectados por la aplicación de quimioinformática.

Si tenemos en cuenta la metodología expuesta por Larsson, si observamos que un organismo provoca una determinada actividad biológica y ésta, es causada por una disposición estructural precisa a nivel molecular, un pequeño cambio en dicha disposición puede afectar a esa actividad. Esto puede considerarse la base del diseño sintético de fármacos.

Como consecuencia, la síntesis orgánica ha permitido una espectacular evolución química en este campo, que inicialmente puede abastecer de los productos naturales que son escasos o inaccesibles y/o posteriormente permitir su conversión en otros que se adapten mejor medicinalmente hablando.⁹⁸ Un ejemplo de esto, es la evolución de los antibióticos β -lactámicos desde sus estructuras naturales iniciales a las sintéticamente modificadas, cuyo efecto terapéutico es más eficaz.⁹⁹ Los estudios sobre los mecanismos de acción han acelerado en gran medida esta evolución, proporcionando una comprensión cada vez más refinada de las interacciones ligando-receptor y permitiendo no sólo conectar una estructura para una determinada función biológica, sino que ha llegado a conectar las subunidades en una estructura o lo que se conoce como

⁹⁸ a) Szpilman, A. M.; Carreira, E. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9592-9628; b) Brandão, H. N.; David, J. P.; Couto, R. D.; Nascimento, J. A. P.; David, J. M. *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1359-1369; c) Lee, K.-H. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 500-516; d) Bernhardt, P.; O'Connor, S. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 35-42; e) Bohlin, L.; Göransson, U.; Backlund, A. *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 763-774.

⁹⁹ a) Essack, S. Y. *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 1391-1399; b) James, R. C.; Pierce, J. C.; Okano, A.; Xie, J.; Boger, D. L. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 797-804.

elementos farmacofóricos, con una función.¹⁰⁰

Todo esto extrapolado a triterpenos pentacíclicos se ha traducido en un gran número de trabajos¹⁰¹, consiguiéndose mejoras de los agentes farmacológicos frente a enfermedades muy importantes hoy en día como son el SIDA, hepatitis B o cáncer, debido a que podemos conocer de forma más concisa el grupo farmacofórico adecuado para las mismas. Por ejemplo, en el caso del ácido glicirrethínico, los análisis de relación estructura-actividad revelan^{101a} que (i) el hidroxilo libre de C-3, un grupo carbonílico sobre C-11 y el grupo carboxílico de C-30 afectan a la actividad y a la citotoxicidad; (ii) la esterificación del hidroxilo de C-3 o del grupo carboxílico de C-30 puede disminuir la citotoxicidad, pero la esterificación de ambas posiciones podría hacer desaparecer la actividad anti-VHB; (iii) la introducción de un sustituyente adecuado en la posición 30 podría mejorar significativamente la actividad; (iv) la epoxidación de las posiciones C-12(13) puede causar la reducción considerable de la actividad anti-VHB.

Concretamente en el caso del ácido oleanólico^{101b, 101d} y derivados sintéticos modificados en las posiciones activas de la molécula llevados a cabo por el grupo de Sporn et al., y como se esquematiza en la figura 2.13,

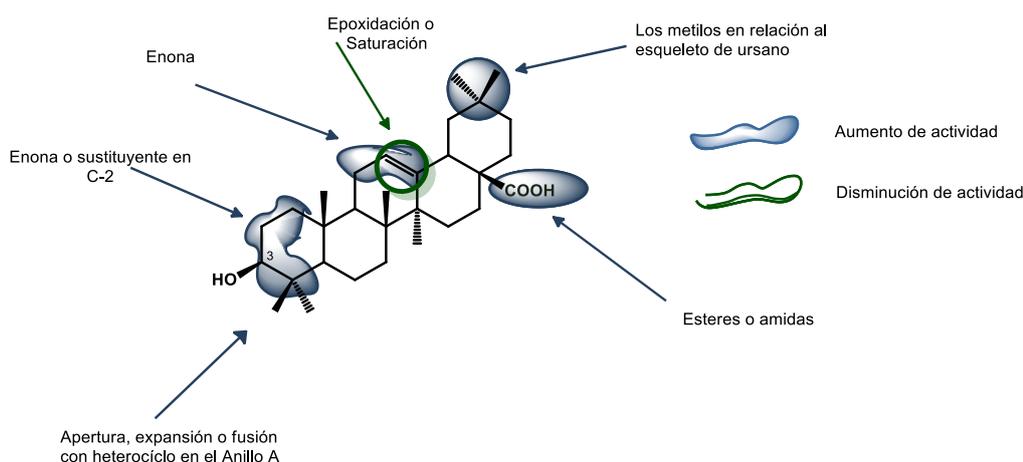


Figura 2.13. Relación estructura-actividad en el ácido oleanólico y derivados en una actividad antiinflamatoria

se ha observado al analizar la actividad inflamatoria que (i) la apertura, expansión o fusión a heterociclos en el anillo A disminuye la actividad; (ii) la presencia de una enona en el anillo A es crítica para poseer una actividad máxima y la presencia de un grupo electrón-atrayente en C-2

¹⁰⁰ Wender, P. A.; Verma, V. A.; Paxton, T. J.; Pillow, T. H *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 40-49.

¹⁰¹ a) Li-Jun Wang, L.-J.; Geng, C.-A.; Maa, Y. B.; Huang, X.-Y.; Luo, J.; Chen, H.; Zhang, X. M.; Chen, J.-J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3473-3479; b) Gutiérrez-Nicolás, F.; Gordillo-Román, B.; Oberti, J. C.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Joseph-Nathan, P. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 669-676; c) Csuk, R.; Schwarz, S.; Kluge, R.; Ströhl, D. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2012**, *345*, 28-32; d) Sporn, M. B.; Liby, K. T.; Yore, M. M.; Fu, L.; Lopchuk, J. M.; Gribble, J. W. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 537-545;

amplifica la actividad; (iii) la presencia de enonas en el anillo C aumenta considerablemente la actividad pero su saturación o epoxidación la disminuyen; (iv) la esterificación o amidación del grupo carboxílico de C-28 confieren a los derivados una excelente actividad y un grupo ciano en dicha posición confiere una actividad a concentraciones pM; (v) La diferencia de posición del metilo entre los ácidos ursólico y oleanólico, provoca que este último sea mucho más potente.

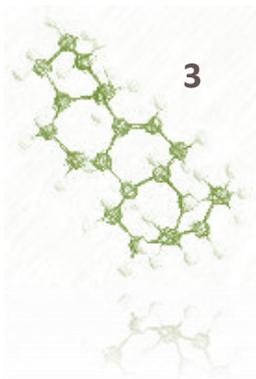
De la misma forma, se ha visto que para la actividad anti-VIH en un esqueleto de olean-18-eno¹⁰², los derivados trihidroxilados son mucho más potentes que los dihidroxilados y estos a su vez mucho más activos que los que presentaban un solo grupo hidroxilo en el esqueleto. Por otro lado, la regiosustitución en el esqueleto se ve favorecida cuando ésta ocurre en el anillo B frente a las que se obtienen cuando tiene lugar en el anillo E ó C. Los resultados indican que la sustitución de las posiciones C-6, C-21 o C-29 del esqueleto son cruciales para la actividad. Es más, el sustituyente en C-3 es esencial para la inhibición del virus, de forma que el que sea un hidroxilo es mucho más favorable para la misma que un grupo ceto. Además, la acetilación de dicha posición provoca un detrimento de la actividad que se observa al comparar los derivados hidroxilados con sus correspondientes acetilados. Estos resultados han demostrado que el mejor grupo funcional es el hidroxilo, el cual podría llegar a actuar como donante de puentes de hidrógeno en la interacción con el receptor, sugiriendo que la hidrofiliidad de la molécula contribuye a la actividad.

Estudios similares se han realizado con actividad antidiabética¹⁰³, antitumoral¹⁰⁴, etc.

¹⁰² Osorio, A. A.; Muñoz, A.; Torres-Romero, D.; Bedoya, L. M.; Perestelo, N. R.; Jiménez, I. A.; Alcamí, J.; Bazzocchi, I. L. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *52*, 295-303.

¹⁰³ Joshi, P.; Tanwar, O.; Rambhade, S.; Bhaisare, M.; Jain, D. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 351-361.

¹⁰⁴ Kaminsky, D.; Bednarczyk-Cwynar, B.; Vasilenko, O.; Kazakova, O.; Zimenkovsky, B.; Zaprutko, L.; Lesyk, R. *Med. Chem. Res.* **2011**, 1-13.



3

**BIOTRANSFORMACIÓN DE
COMPUESTOS TRITERPÉNICOS**

3.1 FUNCIONALIZACIÓN REMOTA POR VÍA QUÍMICA DE ENLACES C-H NO ACTIVADOS. HIDROXILACIÓN QUÍMICA EN PRODUCTOS NATURALES.¹⁰⁵

Las oxidaciones selectivas y catalíticas de moléculas orgánicas se consideran uno de los procesos tecnológicos más importantes de la industria química.¹⁰⁶ Sin embargo, a pesar de los grandes avances en síntesis orgánica desarrollados a lo largo de este siglo, la mayoría de las transformaciones orgánicas aún requieren alguna funcionalidad en los materiales de partida para servir como centro reactivo para su posterior manipulación. Por otro lado, las materias primas químicas son principalmente hidrocarburos, en particular alcanos, obtenidos a partir de gas natural y petróleo crudo.

Debido a su naturaleza intrínsecamente inerte, ya que la energía de disociación del enlace C-H es normalmente alto (por ejemplo 105 Kcal/mol para H-CH₃ y 110 Kcal/mol para H-C₆H₅), y teniendo en cuenta que los enlaces carbono-hidrogeno están omnipresentes en los compuestos orgánicos, la funcionalización selectiva de alcanos es hoy en día una pieza clave en la industria química.¹⁰⁷ De esta forma, la escisión de este enlace generalmente se considera difícil y sigue siendo uno de los principales problemas existentes en la síntesis química. Si estos enlaces pudieran utilizarse como grupos funcionales podrían convertirse en uno de los métodos más poderosos, valiosos y sencillos para la síntesis de moléculas complejas y para la construcción de estructuras con enlace C-C. Por tanto, la activación de los enlaces C-H representa un proceso de un gran potencial sintético.

¹⁰⁵ Tesis Pilar López Rodríguez. Universidad de Granada. 2007

¹⁰⁶ Riley, D.; Stern, M.; Ebner, J. En *The Activation of Dioxygen and Homogeneous Catalytic Oxidation*; Barton, D. H. R.; Martell, A. E.; Sawyer, D. T. Eds.; Plenum, New York, US, **1993**; 31.

¹⁰⁷ Costas, M.; Chen, K.; Que, L. Jr. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 200-202, 517-544.

Aunque la oxidación de alcanos es un proceso termodinámicamente favorecido, es difícil hacerlo de forma controlada y selectiva. Así, oxidantes tradicionales, tales como cromato o permanganato son bastante ineficaces y apenas selectivos. Principalmente, se han desechado debido a sus costes medioambientales y económicos a favor de oxidantes baratos como el aire o peróxidos, pero estos procesos también son extremadamente ineficientes y requieren un permanente reciclado de los sustratos. Por ejemplo, tanto el nailon 6 como el nailon 6,6 se fabrican en una escala de 106 toneladas por año utilizando el proceso de DuPont en el que ciclohexano es inicialmente oxidado a una mezcla de ciclohexanol y ciclohexanona.¹⁰⁸ La conversión del alcano a estos productos se mantiene bajo el 5% para evitar su sobre-oxidación, por lo que el ciclohexano que no ha reaccionado necesita ser extraído y reciclado.

La funcionalización de enlaces C-H sp^2 en arenos y alquenos al igual que en los enlaces activados sp^3 (enlaces adyacentes a un heteroátomo o grupo funcional), se lleva a cabo a través de una gran variedad de modos de reacción, como por ejemplo, sustitución electrófila aromática, adición electrófila a alquenos, orto-metalación, hidroboración, ... Sin embargo, los enlaces C-H inactivados son resistentes en gran parte a esta funcionalización directa, particularmente en el contexto de estructuras complejas orgánicas.¹⁰⁹ Por otra parte, la funcionalización remota convencional llevada a cabo mediante radicales libres requiere condiciones térmicas o fotoquímicas que con frecuencia son incompatibles con los grupos presentes en las moléculas y, además, conllevan rendimientos bajos.¹¹⁰ Pero la utilización de complejos de metales de transición ha posibilitado recientemente la activación de enlaces C-H en arenos y alcanos, iniciando una nueva era en este campo, ya que actúan catalizando dicha activación.¹¹¹

Es bien conocido que los grupos funcionales presentes en los sustratos influyen fuertemente en la reactividad de los enlaces C-H próximos. Además, se ha visto que la reactividad de una cierta posición está afectada por efectos inductivos, conjugaciones, hiperconjugación, impedimento estérico o por la propia energía de enlace.¹¹²

¹⁰⁸ Ingold, K. U. *Aldrichim. Acta* **1989**, 22, 69-73.

¹⁰⁹ a) Corey, E. J.; Hertler, W. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 2903. b) Buchschacher, P.; Kalvoda, J.; Arigoni, D.; Jeger, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 2905. c) Barton, D. H. R.; Beaton, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 4083; d) Taber, D. F.; Stribia, S. E. *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 990; e) Sen, A. *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 550; f) Stahl, S. S.; Labinger, J. A.; Bercaw, J. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2180-2192; g) Jones, W. D. *Top. Organomet. Chem.* **1999**, 3, 9-46; h) Kakiuchi, F.; Murai, S. *Top. Organomet. Chem.* **1999**, 3, 47; i) Sen, A. In *Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds*; Herrmann, W. A., Cornils, B., Eds.; VCH, Weinheim, **1996**; Vol. 2, 1081; j) Crabtree, R. H. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 987; k) Arndtsen, B. A.; Bergman, R. G.; Mobley, T. A.; Peterson, T. H. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 154.

¹¹⁰ a) Majetich, G.; Wheless, K. *Tetrahedron* **1995**, 36, 7095; b) Jones, A. J.; Alewood, P. F.; Benn, M.; Wong, J. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 20, 1655; c) Desai, M. C.; Singh, C.; Chawla, H. P. S.; Dev, S. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 22, 5047; d) Barrero, A. F.; Oltra, J. E.; Alvarez, M.; Rosales, A. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 5461.

¹¹¹ a) Arndtsen, B. A.; Bergman, R. G.; Mobley, T. A.; Peterson, T. H. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 154. b) Crabtree, R. H. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 987. c) Shilov, A. E.; Shul'pin, G. B. En *Activación and Catalytic reactions of Saturated Hydrocarbons in the Presence of Metal Complexes. Catalysis by Metal Complexes*; James, B. R. Ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2000**; Vol. 21.

¹¹² Newhouse, T.; Baran, P. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 3362-3374.

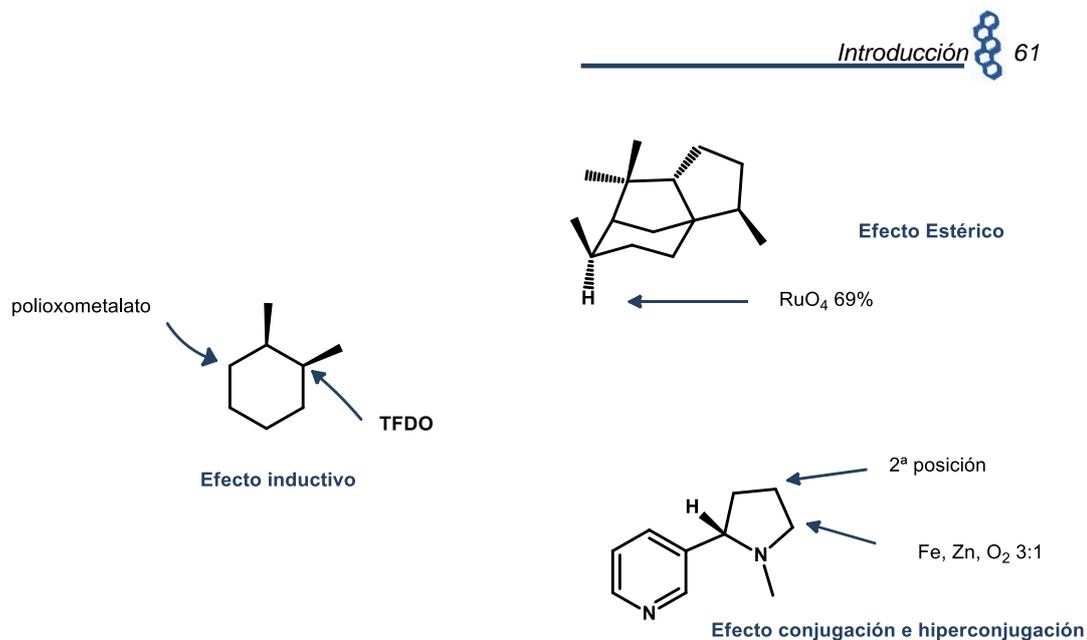


Figura 3.1. Estructuras donde pueden apreciarse efectos estéricos, inductivos o de hiperconjugación.

Tal y como muestra la figura anterior, en el caso del *cis*-1,2-dimetilciclohexano, dependiendo del sistema oxidante empleado puede dirigirse la selectividad de la oxidación hacia uno de los metinos o hacia uno de los grupos metilo de la molécula. Mientras que las posiciones terciarias son las más ricas en electrones, las posiciones secundarias son menos impedidas estéricamente. Con oxidantes pequeños como el metil(trifluorometil)dioxirano (TFDO) tiene lugar selectivamente en el carbono terciario, mientras que con oxidantes más grandes como el polioxometalato la oxidación tiende a disminuir en dicha posición.¹¹³ Por otro lado, la oxidación de la nicotina a cotinina puede variar en función del reactivo, debido a la hiperconjugación del nitrógeno del anillo de pirrolidina hacia el par de electrones del enlace C-H vecino.¹¹⁴ Finalmente, en la oxidación de cedrano con rutenio se observa que aunque existen posiciones terciarias en la estructura, solo una es la que se ve afectada por dicho complejo, resultado de que las otras dos posiciones son neopentil y bis(neopentil).¹¹⁵

Así, los enlaces C-H sp^3 adyacentes a un heteroátomo o grupo funcional son con frecuencia más reactivos. Además, se ha constatado que los grupos funcionales afectan también a la reactividad de los catalizadores metálicos. Siguiendo estas aproximaciones, un grupo funcional adecuado puede ser utilizado para dirigir a un complejo metálico a una región deseable facilitando así la formación de un ciclo metálico y la consiguiente funcionalización.¹¹⁶ De hecho, estos métodos de oxidación de enlaces C-H sp^3 encuentran una amplia aplicación en síntesis química.¹¹⁷ En este

¹¹³ Mello, R.; Fiorentino, M.; Fusco, C.; Curci, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6749-6757.

¹¹⁴ a) Barton, D. H. R.; Boivin, J.; Gaudin, D.; Jankowski, K. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1381-1382; b) Moriarty, R. M.; Vaid, R. K.; Duncan, M. P.; Ochiai, M.; Inenaga, M.; Nagao, Y. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6913-6916.

¹¹⁵ a) Tenaglia, A.; Terranova, E.; Waegell, B. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 5271-5274; b) Tenaglia, A.; Terranova, E.; Waegell, B. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5523-5524.

¹¹⁶ Johnson, J. A.; Li, N.; Sames, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6900.

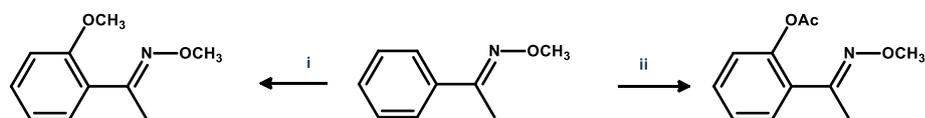
¹¹⁷ a) Kakiuchi, F.; Chatani, N. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 1077; b) Labinger, J. A.; Bercaw, J. E. *Nature*, **2002**, *417*, 507; c) Shilov, A. E.; Shul'pin, G. B. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2879.

sentido, distintos autores han descrito la activación/oxidación de alcanos mediante química de organometálicos.¹¹⁸

De esta forma, la **paladaciclación** es una herramienta para funcionalización de enlaces C-H y es que particularmente, los compuestos organopaladados tienen una química muy rica y son uno de los más fácilmente disponibles, preparados y manejables de los complejos metálicos de transición conocidos. El fácil intercambio redox entre los dos estados estables de transición Pd (II) – Pd (0) es el principal responsable de su comportamiento químico para este tipo de compuestos. Sin duda, estas afirmaciones junto con su compatibilidad con la mayoría de los grupos funcionales lo diferencian de muchos otros complejos metálicos de transición.¹¹⁹ Los compuestos de paladio que contienen al menos un enlace metal-carbono estabilizado intramolecularmente por al menos un átomo donador, compuestos ciclopaladados o paladaciclos, son una de las clases más populares de derivados organopaladados.¹²⁰

De hecho, Sanford et al.¹²¹ demostraron que la activación regioselectiva de los enlaces C-H catalizados con Pd puede ser usada para la conversión de enlaces sp^2 en ésteres, éteres y haluros arílicos, donde la reacción implica un intermedio ciclopaladado, normalmente de 5 ó 6 miembros como resultado de la formación de un enlace estable Pd-C asistido por la coordinación de un par electrónico del grupo donador.

Aunque más interesante es la oxidación de enlaces inactivados C-H sp^3 que llevaron a cabo simultáneamente sobre varias o-metiloximas y distintas piridinas, fácilmente logrado vía intermedio ciclopaladado de 5 miembros utilizando como oxidante $PhI(OAc)_2$. Estas reacciones¹²² tienen una potencial utilidad sintética, concretamente por su alta selectividad. Al mismo tiempo, estos mismos autores¹²³ desarrollaron este último método utilizando como oxidante oxone, que es más barato, seguro y menos tóxico que $PhI(OAc)_2$. Por tanto, el oxone en ácido acético o metanol se convierte en una adecuada técnica para la acetoxilación y eterificación, respectivamente, de enlaces C-H en arenos y alcanos (Figura 3.2).



(i) Pd(II), oxone, MeOH; (ii) Pd(II), oxone, AcOH

Figura 3.2. Oxidación de enlaces inactivados con oxone

¹¹⁸ a) Dunina, V. V.; Zalevskaya, O. A.; Potapov, V. M. *Russ. Chem. Rev.* **1988**, *57*, 250; b) Constable, A. G.; McDonald, W. S.; Sawkins, L. C.; Shaw, B. L. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1980**, 1992.

¹¹⁹ a) Tsuji, J. En *Palladium Reagents and Catalysts: Innovations in Organic Synthesis*; Wiley, Chichester, U.K. **1995**; b) Hegedns, L. S. En *Organometallics in Synthesis: A Manual*; Schlosser, Ed.; Wiley, Chichester, U. K.; **1994**; Capítulo 5.

¹²⁰ Dupont, J.; Consorti, C. S.; Spencer, J. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2527-2571.

¹²¹ Dick, A. R.; Hull, K. L.; Sanford, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2300-2301.

¹²² Desai, L. V.; Hull, K. L.; Sanford, M.S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9542-9543.

¹²³ Desai, L. V.; Malik, H. A.; Sanford, M. S. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1141-1144.

La viabilidad de que un adecuado grupo funcional pueda ser utilizado para dirigir a un complejo metálico a un específica zona de un sustrato y por tanto activar un enlace C-H específico sin la interferencia de otros grupos funcionales fue demostrada por Dalibor Sames et al.,¹²⁴ en la síntesis del agente antitumoral (-)-rhazinilam. El paso clave envuelve una funcionalización selectiva de un segmento dietil, vía ataque de un complejo de Pt. La proximidad del grupo amino al grupo etilo augura una adecuada activación del enlace C-H.

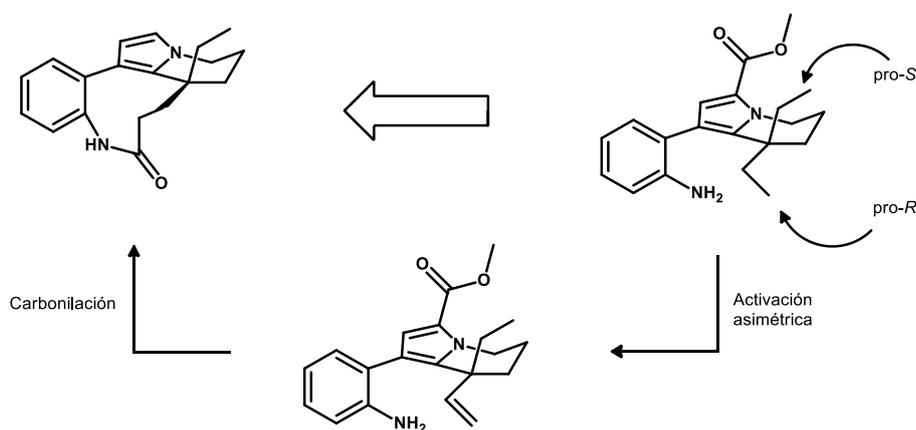


Figura 3.3. Síntesis de (-)-rhazinilam vía activación selectiva C-H (deshidrogenación)

Teniendo demostrada la viabilidad de activación dirigida en alcanos, estos mismos autores desarrollaron este método para otros productos naturales, como son las teleocidinas¹²⁵. El segmento central de la teleocidina B-4, es un fragmento complejo que contiene dos estereocentros cuaternarios y un anillo bencénico pentasustituido, que podría ser construido a partir de una *o-tert*-butilanilina mediante la formación de cuatro enlaces C-C donde es necesario dos funcionalizaciones dirigidas en el grupo *tert*-butilo para dar los dos ciclos necesarios. Para ello se lleva a cabo una alquenilación y una carbonilación oxidativa de dos grupos metilos. Se encontró, para este caso, que sales de Pd (II) como es el PdCl₂ eran las únicas capaces de conducir a los intermedios cíclicos deseados.

Una aproximación inicial a la activación-funcionalización regioselectiva del metilo ecuatorial sobre C-4 de triterpenos fue llevada a cabo por Sutherland et al.¹²⁶, que aplicando los resultados previos de Shaw y colaboradores,¹²⁷ en el que la oxima de la pinacolona reaccionaba con Na₂PdCl₄ para dar un dímero (Fig. 3.4 I), lograron monodeuterar y iodar el metilo ecuatorial de la lanost-8-en-3-ona. (Fig. 3.4 II). Esta aplicación es de gran interés al ser paralela a la conversión biosintética de lanosterol a colesterol que ocurre en la naturaleza.¹²⁸

¹²⁴ Johnson, J. A.; Li, N.; Sames, D.; Dangel, B. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6900-6903.

¹²⁵ Dangel, B. D.; Godula, K.; Youn, S. W.; Sezen, B.; Sames, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11856-11857.

¹²⁶ Carr, K.; Sutherland, J. K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1984**, 1227.

¹²⁷ Constable, A. G.; McDonald, W.S.; Sawkins, L. C.; Shaw, B. L. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1978**, 1061.

¹²⁸ a) Miller, W. L.; Gaylor, J. L. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 5375-5381; b) Hornby, G. M.; Boyd, G. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *40*, 1452-1454.

En distintos esqueletos de tipo ursano, oleanano y lupano, al igual que en otros terpenos, se llevó a cabo la oxidación de este metilo ecuatorial a través de un compuesto organopaladado intermedio vía oxima en C-3. La elección de la oxima se debe a que es fácilmente reconvertible en el compuestos carbonilos de partida y, además, el nitrógeno de este grupo puede coordinar al Pd (II) lo que permite el proceso de ciclopaladación.

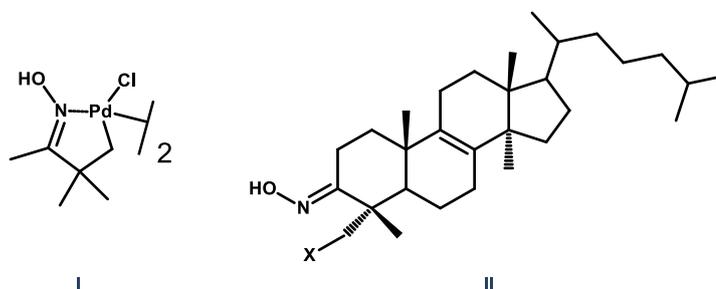
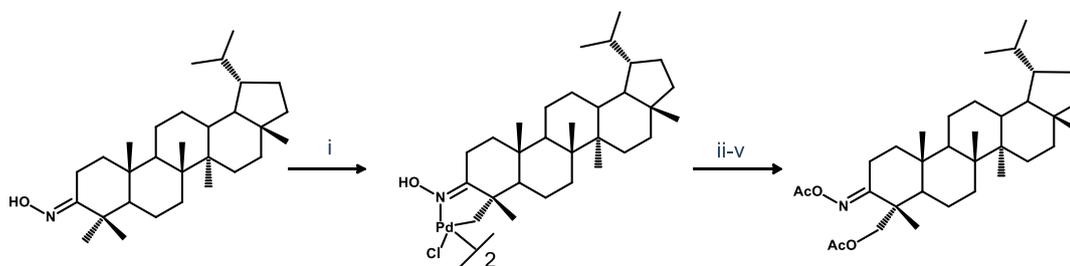


Figura 3.4. I. Paladacilo de la oxima de pinacolona;
II. Oxima lanost-8-en-3-ona funcionalizada

Así, Baldwin et al.¹²⁹ fueron los primeros en oxidar pinacolona, distintas 2,2-dimetil y tetrametilciclohexanonas. Los complejos obtenidos con Na_2PdCl_4 se sometieron al proceso de funcionalización que consiste primero en el tratamiento del complejo con piridina y Ac_2O , a continuación la oxidación con $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, seguido de un proceso de reducción que condujo a las acetoxi-oximas funcionalizadas. Además se inicia con esta aplicación la oxidación en esqueletos terpénicos del metilo ecuatorial inactivado de C-4 (Fig. 3.5). Así, el metilo del lupeol es oxidado a través de la correspondiente oxima en C-3. El compuesto organopaladado dimérico se oxidó con tetracetato de plomo a través del complejo monomérico O-acetilpiridinio generado *in situ*. La reducción posterior con borohidruro sódico condujo al esperado 23-acetoxi derivado. La estereoquímica en la paladación se confirma mediante experiencias NOE, lo que ratifica la regioespecificidad de este proceso. Esta funcionalización exclusiva del metilo ecuatorial (C-23) se puede explicar porque la ciclopaladación se facilita por una disposición coplanar de la oxima y el grupo metilo C-23 (Fig. 3.6).



(i) $\text{Na}_2\text{PdCl}_4/\text{NaOAc}$; (ii) Ac_2O ; (iii) piridina; (iv) $\text{Pb}(\text{OAc})_4$; (v) NaBH_4

Figura 3.5. Oxidación del metilo ecuatorial (C-23) del lupeol

¹²⁹ Baldwin, J. E.; Jones, R. H.; Najera, C.; Yus, M. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 699-711.

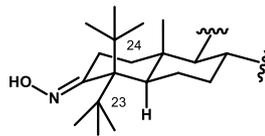


Figura 3.6. Disposición espacial de los anillos A y B en la hidroxima derivada del lupeol

Este método ha sido aplicado ampliamente, por ejemplo, en la síntesis de distintas series de 24-*nor*-triterpenoides, como son 24-*nor*-urs-12-eno, 24-*nor*-olean-12-eno y 24-*nor*-lupano.¹³⁰ La hidroxilación del metilo C-23 posibilitó la posterior pérdida de un carbono en forma de formaldehído conduciendo a las 24-*nor*-3-onas. En estas se redujo el carbonilo de C-3 y se formó los derivados tosilados con la intención de desoxigenar completamente el anillo A (Fig. 3.7).

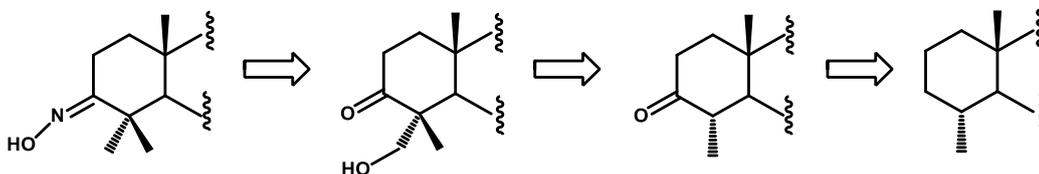


Figura 3.7. Síntesis de 24-*nor*-triterpenoides

La síntesis de derivados en C-23 del ácido 3-*epi*-ursólico llevada a cabo por Gribble et al.¹³¹, se desarrolló igualmente por este procedimiento, a partir del ácido ursólico (disponible comercialmente), con la intención de comprobar si la actividad biológica de estos análogos se incrementaba con respecto al no funcionalizado. Estos mismos autores¹³² sintetizaron además el ácido 23-hidroxiursólico (Fig. 3.8), que previamente había sido aislado de dos plantas medicinales diferentes de la familia *Rubiaceae*, a partir del ursólico mediante ciclopaladación de la oxima intermedia. Esta síntesis permitió además confirmar la estructura que había sido propuesta inicialmente para este compuesto.

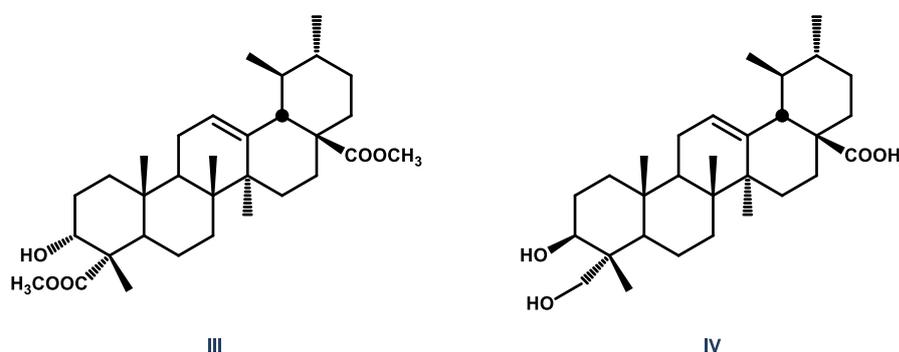


Figura 3.8. Derivados en C-23 de ácido 3-*epi*ursólico (III) y ursólico (IV)

¹³⁰ Peakman, T. M.; ten Haven, H. L.; Rullkötter, J. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3779.

¹³¹ Bore, L.; Honda, T.; Gribble, G. W. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6278-6282.

¹³² Bore, L.; Honda, T.; Gribble, G. W. *Nat. Prod. Lett.* **2002**, *16*, 273-276.

En esta misma línea se desarrolló la síntesis de nuevos derivados del ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico (CDDO),¹³³ agente con actividad potencialmente anti-inflamatoria, quimiopreventiva y quimioterapéutica (ver apartado 2.2.3. de la presente Introducción). La síntesis del derivado 23-hidroxi-CDDO-Me, se consiguió por el protocolo oxidativo comentado a partir del ácido oleanólico (Fig. 3.9).

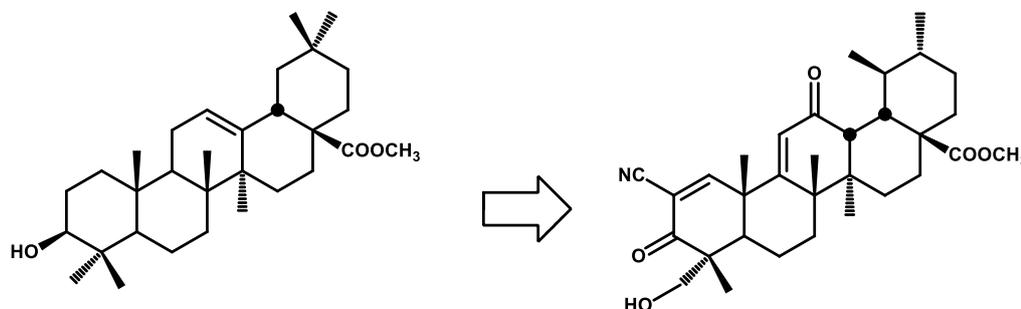
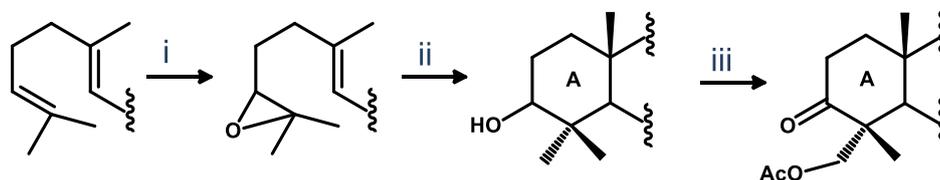


Figura 3.9. Síntesis de 23-hidroxi-CDDO

La funcionalización remota del metilo ecuatorial situado en C-4 de distintos esqueletos terpenoides, igualmente, se describe como uno de los pasos para la síntesis de terpenos tras la ciclación previa de epoxipolipropenos con titanoceno¹³⁴ (Fig. 3.10). Esta estrategia es utilizada en particular para la síntesis del diterpeno natural rostratono y otros terpenos con actividades farmacológicas, como son la afidicolina y piriropeno A (Fig. 3.11).



(i) epoxidación selectiva; (ii) ciclación catalizada con titanoceno; (iii) oxidación remota con Pd

Figura 3.10. Síntesis de terpenos cíclicos

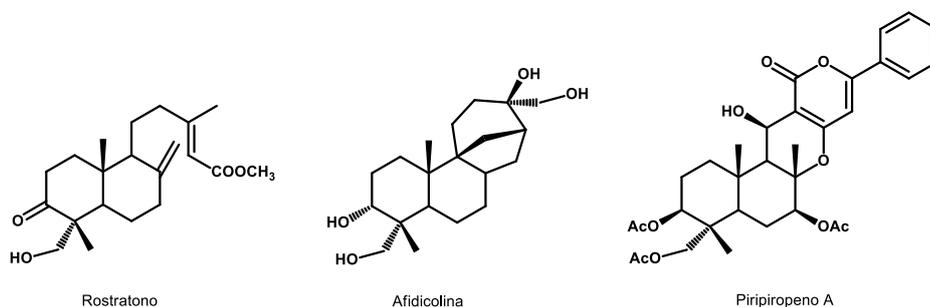


Figura 3.11. Estructuras de rostratono, afidicolina y piriropeno A

¹³³ Honda, T.; Janosik, T.; Honda, Y.; Han, J.; Liby, K. T.; Williams, C. R.; Couch, R. D.; Anderson, A. C.; Sporn, M. B.; Gribble, G. W. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4923-4932.

¹³⁴ a) Justicia, J.; Oltra, J. E.; Cuerva, J. M. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8265-8272; b) Justicia, J.; Oltra, J. E.; Cuerva, J. M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4293-4296.

Como consecuencia y basándose en la metodología de Baldwin¹²⁹, nuestro Grupo de Investigación llevó a cabo en 2007 la ciclopaladación del grupo metilo de C-4 existente en los ésteres metílicos de los ácidos oleanólico y masílico, observándose regioselectividad hacia el metilo C-23 o C-24, determinada en función de la presencia o ausencia del sustituyente de C-2.¹³⁵ De esta forma, la diferencia de reactividad de ambos ésteres en el proceso de ciclopaladación, es sin duda debido al impedimento estérico que provoca la función oxigenada de C-2, la cual provoca una disposición conformacional distinta del anillo A que implica un acercamiento del par de electrones de la oxima hacia C-23 o C-24 y por tanto, su posterior hidroxilación.

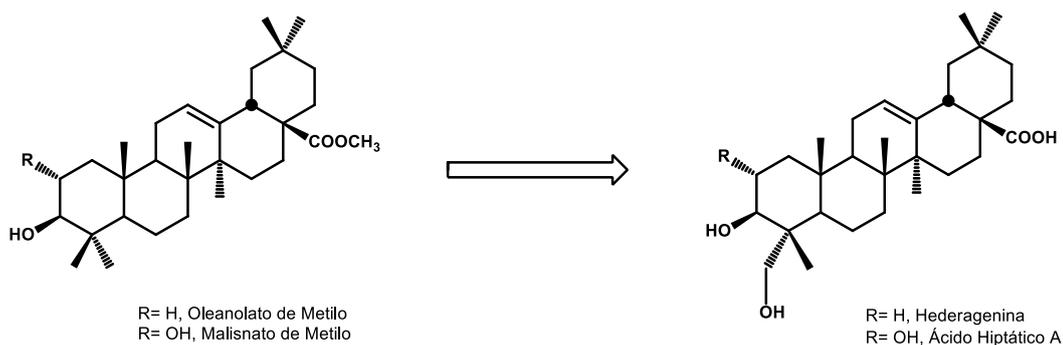


Figura 3.12. Ciclopaladación sobre los ácidos oleanólico y masílico

Además de estos métodos que emplean Pd como catalizador, existen multitud de referencias en las que se utilizan **complejos de Fe** para llevar a cabo tal oxidación, basados en la utilización del Método de Fenton¹³⁶, por la cual un átomo de Fe^{3+} es tratado con H_2O_2 generándose por vía fotoradicalaria la correspondiente especie $Fe^V=O$. (Figura 3.13). Esta especie es capaz de provocar hidroxilaciones remotas en sustratos que ya están previamente hidroxilados, como es el caso del ciclohexanol, donde la oxidación a temperatura ambiente tiende mayoritariamente al derivado 1,3.¹³⁷

¹³⁵ García-Granados, A.; López, P. E.; Melguizo, E.; Parra, A.; Simeo, Y. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3500-3509.

¹³⁶ Fenton, H. J. *Proc. Chem. Soc., London*, **1893**, *9*, 113.

¹³⁷ Groves, J. T.; Swanson, W. W. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *24*, 1953-1956; b) Groves, J. T.; van der Puy, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 5274-5275; c) Prat, I.; Mathieson, J. S.; Güell, M.; Ribas, X.; Luis, J. M.; Cronin, L.; Costas, M. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 788-793.

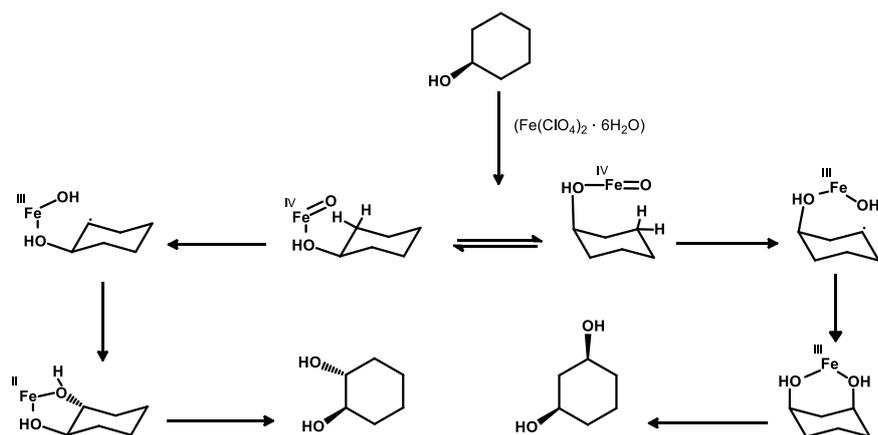


Figura 3.13. Tratamiento de ciclohexanol con perclorato férrico hexahidratado

Actualmente, se han logrado sintetizar especies mucho más sofisticadas desde un punto de vista sintético que emplean ligandos coordinados al átomo de Fe, las cuales mimetizan las enzimas no hemínicas como son la metano monooxigenasa y las dioxigenasas de Rieske implicadas en la oxidación de enlaces C=C o C-H vía transporte bioquímico de oxígeno y reacciones de transferencia de electrones (ver apartado 3.1.2.1).¹³⁸ Es el caso del complejo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPA})(\text{CH}_3\text{-CN})_2]^{2+}$ que es capaz de realizar una oxidación sobre un enlace C-H empleando H_2O_2 como oxidante¹³⁹, o el complejo $\text{LFe}^{\text{III}}\text{Cl}$ (donde L = 3-{2-[2-(3-hidroxi-1,3-difenil-alilidenamino)-etilamino]-etilimino}-1,3-difenil-propen-1-ol) que usando *t*-BuOOH o H_2O_2 es capaz de transformar un alqueno o alcano en su correspondiente epóxido, alcohol o cetona.¹³⁴

Junto a estos complejos metálicos, existen otras referencias que aluden a la hidroxilación regioselectiva de alquenos o alcanos y que emplean para ello **complejos de Cu**¹⁴⁰ o **V**¹⁴¹.

Si tenemos en cuenta la propia estructura del sustrato, la reactividad intrínseca de la misma junto con los factores anteriormente mencionados, puede extrapolarse que la hidroxilación química en esqueletos triterpénicos es extremadamente compleja, aunque en ciertos casos se ha logrado funcionalizar ciertas posiciones cercanas a los grupos reactivos presentes en la molécula como es el caso de la ya comentada hidroxilación en C-23 o C-24 conseguida mediante ciclopaladación. Esto se manifiesta en la escasa cantidad de publicaciones y trabajos hasta la fecha.

Sin embargo, es en el campo de los esteroides donde si se ha logrado dicho avance, teniendo su mayor esplendor en la década de los 60 y continuándose hasta día de hoy.¹⁴² De esta

¹³⁸ Billis, G.; Louloudi, M. *Bioinorganic Chemistry and Applications* **2010**, 2010, 1-9.

¹³⁹ Kim, C.; Chen, K.; Kim, J.; Que, L. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5964-5965; b) Chen, K.; Que, L. Jr. *Chem. Commun.* **1999**, 1375-1376; c) Chen, K.; Que, L. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6327-6337.

¹⁴⁰ A. Puzari, A.; Baruah, J. B. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2002**, 187, 149-162.

¹⁴¹ Kamata, K.; Yonehara, K.; Nakagawa, Y.; Uehara, K.; Mizuno, N. *Nat. Chem.* **2010**, 2, 478-483.

¹⁴² a) Bégué, J.-P.; Lefort, D.; Thac, T. D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, 20, 1086-1087; b) Bégué, J.-P. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 4268-4271; c) Kaufman, M. D.; Grieco, P. A.; Bougie, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11648-11649; d) Reese, P. B. *Steroids* **2001**, 66, 481-497; e) Kakiyama, G.; Lida, T.; Goto, T.; Mano, N.; Goto, J.; Nambara, T. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, **2004**, 52, 371-374; f) Fortner, K. C.; Kato, D.; Tanaka, Y.; Shair, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132,

forma, el esqueleto esteroide se ha logrado hidroxilar por multitud de vías^{142d}, entre las que podríamos destacar la llevada a cabo por Breslow¹⁴³ et al., que da lugar a la llamada la reacción de Breslow, que genera un radical terciario en la cara α del núcleo esteroide preferiblemente en las posiciones C-5, C-9, C-14, C-17, C-20 y C-25 en el esqueleto de colestano que es estabilizado normalmente con cloro (ver figura 3.14).

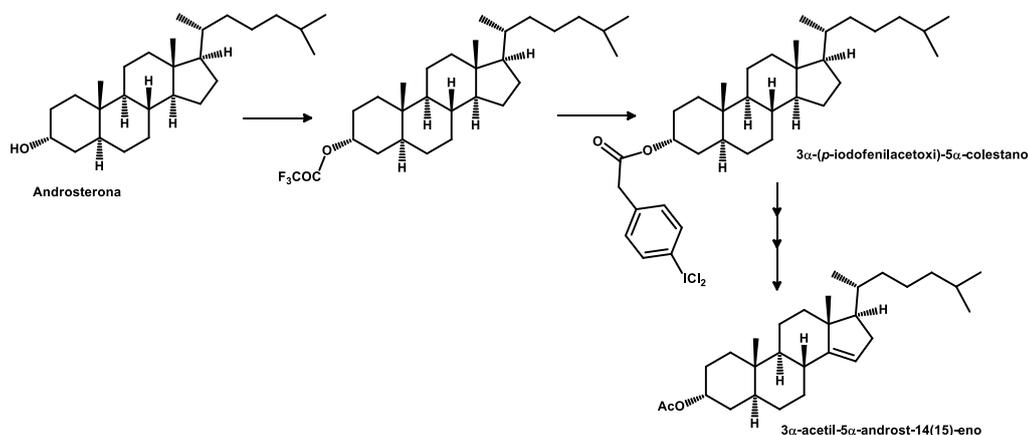


Figura 3.14. Ejemplo^{143b} de funcionalización de esteroides por el Método de Breslow

Otros métodos de funcionalización remota de esteroides los constituyen la reacción del hipohalito¹⁴⁴, reacción de Barton o fotólisis de nitritos¹⁴⁵, irradiación de cetonas¹⁴⁶, reacción de nitrenos¹⁴⁷, oxidación anódica¹⁴⁸, etc.

Como habíamos comentado, la regioselectividad en síntesis orgánica se consigue normalmente a través de la manipulación de los grupos funcionales del sustrato, ya que las reacciones se producen en la posición del sustrato que tiene la mayor reactividad intrínseca y es a veces modificada por los grupos vecinos a dicha posición. Si esta reactividad no es deseada, la posición más reactiva puede ser bloqueada con un grupo protector o favorecer la actividad de otra posición cambiando el grupo funcional. Por el contrario, en bioquímica es atribuida a la geometría del complejo enzima-sustrato y dicha regioselectividad puede anular por completo el patrón de reactividad normal del sustrato. Esto puede observarse claramente en la oxidación selectiva del lanosterol por una enzima P450 en la biosíntesis de colesterol, donde ocurre una oxidación selectiva de tres grupos metílicos inactivos mientras que las dos insaturaciones y el grupo hidroxilo

275-280; g) Kille, S.; Zilly, F. E.; Acevedo, J. P.; Reetz, M. T. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 738-743.

¹⁴³ a) Breslow, R.; Cocoran, R. J.; Snider, B. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 6791-6792; b) Breslow, R.; Cocoran, R.; Dale, J. A.; Liu, S.; Kalicky, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 1973-1974; c) Breslow, R.; Cocoran, R. J.; Snider, B. B.; Doll, R. J.; Khanna, P. L.; Kaley, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 905-915; d) Breslow, R. *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 170-177; e) Breslow, R.; Link, T. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4145-4148; f) Breslow, R.; Gabriele, B.; Yang, J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2887-2890.

¹⁴⁴ Shoppee, C. W.; Hughes, N. W.; Lack, R. E. *J. Chem. Soc.* **1966**, 2359-2365.

¹⁴⁵ Batten, P. L.; Bentley, T. J.; Boar, R.B.; Draper, R.W.; McChie, J. F.; Barton, D. H. R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1972**, 739-748.

¹⁴⁶ Breslow, R.; Baldwin, S. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 732-734.

¹⁴⁷ Edwards, O. E.; Paryzek, Z. *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 3866-3873.

¹⁴⁸ a) Breslow, R.; Goodin, R. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 2675-2676; b) Shibuya, H.; Murakami, N.; Shimada, F.; Yoshikawa, M.; Kitagawa, I. *Chem. Pharm. Bull., Japan*, **1992**, *40*, 1143-1147.

secundario quedan inalterados.¹⁴⁹ O incluso en la hidroxilación del anillo C en los esteroides a través de enzimas P-450 para dar lugar a corticosteroides.¹⁵⁰

De esta forma, actualmente y desde hace unos años, se están desarrollando métodos químicos que usando como modelo los citocromos P450, imitan dicho control geométrico logrando el tipo de regioselectividad hasta ahora únicamente posible con enzimas. Para ello, se están sintetizando metaloporfirinas de Fe (III) o Mn (III) a las que se les une dos o cuatro β -ciclodextrinas (oligómero cíclico de siete unidades de glucosa), de forma que el núcleo catalítico porfirínico se conserva y los restos de azúcar conforman un centro activo artificial.¹⁵¹

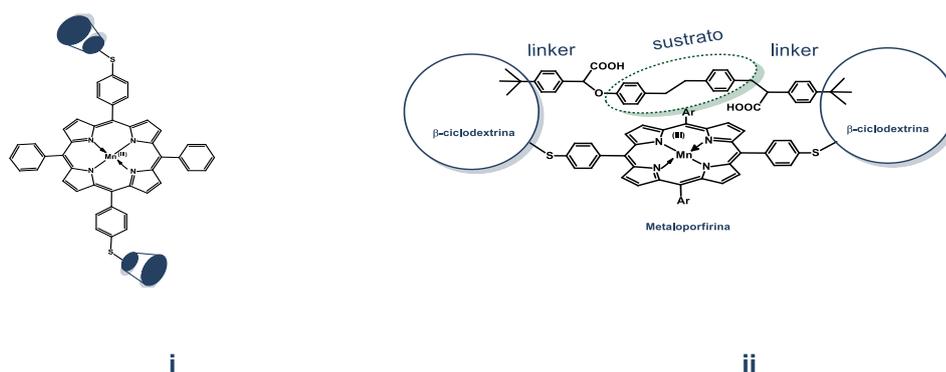


Figura 3.15. i *Citocromo P450 artificial*; ii *Ejemplo de su fijación a un sustrato*

3.2. BIOTECNOLOGÍA BLANCA Y QUÍMICA VERDE

En las últimas décadas, las industrias químicas o biotecnológicas han adquirido una profunda concienciación con el medio ambiente, intentando llevar a cabo sus procesos de una forma más limpia. Esta tendencia hacia lo que se conoce como tecnologías sostenibles se puede definir como **Química verde** y **Biotecnología blanca**, cuando el énfasis se centra en procesos químicos o biotecnológicos, respectivamente. La definición y concepto de química verde se formuló por primera vez a principios de la década de 1990,¹⁵² y adoptado en el Programa de Química Verde estadounidense a través de la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPA) en 1993. Por otro lado, la Asociación Europea de Bioindustrias (EuropaBio) definió la biotecnología blanca como un campo emergente dentro de biotecnología moderna que sirve a la industria, de hecho, el concepto biotecnología blanca es comúnmente aceptado en el sector industrial como la aplicación de herramientas biotecnológicas (organismos genéticamente modificados (OGM), enzimas de organismos extremófilos, etc) para producir sustancias de interés, teniendo en la cuenta los

¹⁴⁹ Shackleton, C. H. L. *Lipids* **2012**, *47*, 1-12.

¹⁵⁰ a) Dawson, J. H.; Sono, M. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1255-1276; b) Woggon, W. D. *Top. Curr. Chem.* **1996**, *184*, 39-96.

¹⁵¹ a) Yang, J.; Gabriele, B.; Belvedere, S.; Huang, Y.; Breslow, R. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5057-5067; b) Breslow, R.; Yang, J.; Yan, J. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 653-659.

¹⁵² Anastas, P. T.; Eghbali, N. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312.

principios de la química verde. Por lo tanto, biotecnología blanca puede ayudar a obtener ganancias sustanciales para los consumidores, el medio ambiente y la industria¹⁵³.

Según Anastas y Horváth, esta nueva filosofía tecnológica estaba basada en el seguimiento de los 12 principios de la Química verde¹⁵⁴ que podrían resumirse en (i) La prevención de residuos en lugar de su remedación; (ii) Eficiencia atómica, que implica menos subproductos al final del proceso; (iii) Metodologías químicas menos peligrosas o tóxicas tanto para el hombre como para el medioambiente; (iv) Generar productos mas eficaces y menos tóxicos; (v) Reducir el uso de sustancias auxiliares como disolventes, reactivos para llevar a cabo separaciones, etc. y en el caso de que se utilicen que sean lo más inocuos posible; (vi) Disminuir el consumo energético llevando a cabo los procesos a temperatura y presión ambiental; (vii) Utilización de materias primas renovables; (viii) Síntesis más corta (la reducción de pasos innecesarios de protección-desprotección); (ix) Empleo de procesos biocatalíticos o catalíticos en lugar de procesos térmicos; (x) Generar productos biodegradables; (xi) Desarrollar metodologías analíticas para la monitorización en tiempo real; (xii) Minimizar el potencial de accidentes químicos.

Como puede deducirse de los principios ii, viii y ix, la biocatálisis es fundamental para llevar a cabo procesos limpios o verdes y que proporciona una alternativa a la síntesis orgánica clásica.

3.3. BIOTRANSFORMACIONES EN SÍNTESIS ORGÁNICA

A lo largo de la historia de la humanidad, los microorganismos han tenido una gran importancia, tanto social como económica. Incluso antes de tener constancia de su existencia, el hombre los había utilizado en la producción de comida y bebida¹⁵⁵. Así, sumerios y babilonios preparaban ya cerveza antes del año 6000 a.C., el vino aparece mencionado en el libro del Génesis y los antiguos egipcios usaban levadura para cocer pan.^{156,157}

La transformación microbiana más antigua y mejor conocida es probablemente la producción del vinagre, que se remonta hasta el año 2000 a.C. Un prototipo de biorreactor con bacterias inmovilizadas apareció en Francia en el siglo XVII. Incluso hoy día, el ácido acético producido por fermentación oxidante de disoluciones de etanol por bacterias se conoce como vinagre.

¹⁵³ Tao, J.; Xu, J.-H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 43-50.

¹⁵⁴ a) Horváth, I. T.; Anastas, P. T. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2167-2168; b) Horváth, I. T.; Anastas, P. T. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2169-2173.

¹⁵⁵ Ghisalba, O.; Meyer, H. P.; Wohlgemuth, R. En *Industrial Biotransformation. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*; Flickinger, M. C., Ed.; John Wiley & Sons, Inc., New York, US, **2010**; 1-18.

¹⁵⁶ Vasic-Racki, D. En *History of Industrial Biotransformations. Dreams and realities. Industrial Biotransformations*; Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C. Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, DE, **2000**; 3-29.

¹⁵⁷ Tesis Juan Manuel Rodríguez Dehli. Universidad de Oviedo. **2002**

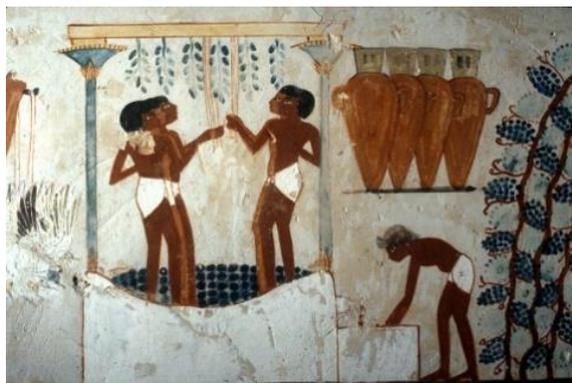


Imagen 3.1. *Pintura egipcia que representa el proceso de vendimia, pisado de uva, recolección del mosto y almacenado en vasijas de arcilla.*¹⁵⁸

Con el paso del tiempo, se descubrió que los microorganismos podían modificar ciertos compuestos a través de reacciones químicas bien definidas. De esta forma, los procesos de biotransformación se definen como la utilización de sistemas biológicos completos (organismos superiores, microorganismos, plantas, algas, etc.) o sus partes (órganos, enzimas o células) para realizar modificaciones estructurales sobre compuestos exógenos.¹⁵⁹ En todos los casos, las reacciones son llevadas a cabo por enzimas. La fermentación es un proceso en el que el microorganismo se desarrolla a partir de los nutrientes, produciendo metabolitos primarios y secundarios mediante un proceso multietapa fruto de un complejo proceso metabólico.

Las biotransformaciones pueden dividirse en dos grandes grupos. Por un lado están las transformaciones xenobióticas, en las que el sustrato es completamente ajeno al sistema enzimático. El segundo grupo de biotransformaciones lo constituyen aquellas que tienen interés desde el punto de vista biosintético, y son conocidas como biosintéticas. En estas biotransformaciones el sustrato es un análogo de un intermedio biosintético. Las transformaciones xenobióticas incluyen solamente uno o dos pasos enzimáticos. Al contrario, las biosintéticas pueden incluir una serie de pasos y el rendimiento total del proceso puede ser menor. Desde el punto de vista de síntesis orgánica, las transformaciones más utilizadas son las xenobióticas.

En las tres últimas décadas, las biotransformaciones han conseguido consolidarse como una herramienta más del químico orgánico sintético, y es considerada hoy en día una técnica biotecnológica económica y ecológica aplicada a la obtención de nuevos compuestos de alto valor

¹⁵⁸ Tumbas funerarias de Kakht. Dinastía XVIII. Año 1495 a.C.

¹⁵⁹ Borges, K. B.; Borges, S. W.; Pupo, M. T.; Bonato, P. S. *Journal Pharmacology Biomedical Analysis* **2008**, *46*, 945-952.

añadido, farmacéuticos o agroquímicos,¹⁶⁰ debido a una serie de ventajas, entre las que cabe citar:¹⁶¹

- Los enzimas son catalizadores muy eficientes. En general, aceleran la reacción por un factor de 10^8 - 10^{10} , muy por encima de la capacidad de los catalizadores químicos.
- Los enzimas son biodegradables, al contrario que los catalizadores que utilizan metales pesados.
- Los enzimas actúan bajo condiciones suaves. En la mayoría de los casos, se trabaja en intervalos de pH entre 5 y 8, y temperaturas entre 20 y 40 °C. Esto minimiza reacciones laterales como descomposición, isomerización, racemización, etc.
- Los enzimas catalizan un amplio espectro de reacciones (hidrólisis, redox, adición, etc.)
- Los enzimas presentan una elevada quimio-, regio- y estereoselectividad. Es precisamente esta última propiedad la que ha hecho más atractiva la utilización de enzimas en síntesis orgánica.

Sin embargo, no conviene olvidar algunos de los inconvenientes¹⁶¹ que supone la utilización de un biocatalizador:

- Los enzimas sólo existen en una de sus formas enantioméricas. Al estar compuestos de L-aminoácidos, no es posible invertir la inducción quiral, al contrario de lo que ocurre con catalizadores no enzimáticos.
- Los enzimas requieren condiciones de trabajo suaves. La ventaja comentada más arriba puede convertirse en inconveniente, si se necesitan temperaturas o pH extremos.
- Los enzimas pueden mostrar una actividad insuficiente, sobre todo si se trabaja en condiciones distintas de las naturales (p. ej., en disolventes orgánicos).

Además de su alto coste, fácil desactivación en condiciones no favorables y la posible inhibición del sustrato y/o de la reacción por los productos que se van generando. Los avances en tecnología enzimática¹⁶² han permitido minimizar en numerosos casos estos inconvenientes, reduciendo el coste de los biocatalizadores y mejorando los rendimientos. Así, hoy en día, pueden modificarse aminoácidos de enzimas naturales con el objeto de mejorar sus propiedades como biocatalizador. En este campo, una de las estrategias más prometedoras es sin duda la

¹⁶⁰ a) McCoy, M. *Chem. Eng. News* **1999**, January 4, 10-13; b) Pantaleone D. P. En *Biotransformation: "Green" Processes for the Synthesis of Chiral Fine Chemicals. Handbook of Chiral Chemicals*, 2ª ed.; Ager, D. J. Ed.; CRC Press, Boca Raton, US, **2006**; 359-403; c) Panke, S.; Held, M.; Wubbolts, M. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 272-279; d) Patel, R. N. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 659-701; e) Aleu, J.; Bustillo, A. J.; Hernandez-Galan, R.; Collado, I. G. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 2037-2054; f) Koeller, K. M.; Wong, C.-H. *Nature* **2001**, *409*, 232-240; g) Zarevúcka, M.; Wimmer, Z. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 2447-2473; h) Pollard, D. J.; Woodley, J. M. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 66-73.

¹⁶¹ a) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6ª ed.; Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K, Berlin, DE, **2011**; 1-28; b) Hernáiz, M. J.; Alcántara, A. R.; García, J. I.; Sinisterra, J. V. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9422-9437.

¹⁶² Illanes, A.; Cauerhff, A.; Wilson, L.; Castro, G. R. *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 48-57.

evolución dirigida,¹⁶³ que permite mejoras sensibles de selectividad en plazos razonables de tiempo, gracias al acoplamiento con una técnica de análisis veloz. Además, ha contribuido la evolución a gran escala de la secuenciación del ADN, junto con la biología estructural, expresión de proteínas, selección de alto rendimiento de diferentes microorganismos de colecciones o de fuentes naturales, bancos de clones y el avance de la metagenómica¹⁶⁴, o incluso la promiscuidad enzimática^{159b, 165}, la evolución enzimática directa y la ingeniería metabólica¹⁶⁶. Por el otro lado, las técnicas de inmovilización eficaces pueden ayudar a la estabilización de las enzimas.

Las biotransformaciones se pueden dividir en dos grandes grupos, según se utilicen enzimas aislados (total o parcialmente) o células enteras. El utilizar unos u otros dependerá del proceso concreto que se vaya a realizar¹⁶⁰. El primero de los casos es generalmente el preferido por el químico orgánico convencional, puesto que no requiere de equipamiento especial distinto al que se encuentra habitualmente en su laboratorio, las reacciones son generalmente muy limpias y puede trabajarse con concentraciones de sustrato elevadas. Además si se usa un enzima inmovilizado, su recuperación es sencilla y admite la utilización de disolventes orgánicos.

Sin embargo, como habíamos comentado, las enzimas puras son escasas y tienen un alto valor económico, por lo cual se presenta una gran preferencia por los sistemas biológicos completos con lo que se favorece el crecimiento rápido y la formación de sistemas multienzimáticos.¹⁶⁰

Las aplicaciones de las biotransformaciones en síntesis orgánica pueden desarrollarse de dos formas¹⁶⁰:

1.- Seleccionar un sustrato y someterlo a transformación con una determinada enzima o microorganismo par realizar una determinada transformación. En este sentido puede explotarse la capacidad del enzima para discriminar entre varios hechos estructurales y esteroquímicos, originándose transformaciones selectivas de compuestos polifuncionalizados, diferenciación de enantiómeros y lo que es mas importante, la distinción de grupos enantiotópicos y caras de una molécula proquiral, presentando la ventaja de que no es necesaria la protección de otros grupos funcionales presentes en la molécula. Esta regio y estereoselectividad se aplica a la síntesis de fragmentos de quiralidad definida que pueden ser utilizados en la síntesis de otros productos difíciles de obtener por vía química.

¹⁶³ a) Reetz, M. T.; Jaeger, K. E.; *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 407-411; b) Powell, K. A.; Ramer, S. W.; del Cardayré, S. B.; Stemmer, W. P. C.; Tobin, M. B.; Longchamp, P. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3948-3959; c) Reetz, M. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 138-174.

¹⁶⁴ a) Koonin, E. V. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 540-542; b) Cowan, D.; Meyer, Q.; Stafford, W.; Muyanga, S.; Cameron, R.; Wittwer, P. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 321-329.

¹⁶⁵ a) Hult, K.; Berglund, P. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231-238; b) Khersonsky, O.; Roodveldt, C.; Tawfik, D. S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 498-508; c) Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6156-6165; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032-3040.

¹⁶⁶ a) van Kampen, M. D.; Egmond, M. R. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, *102*, 717-726; b) Wintrode, P. L.; Miyazaki, K.; Arnold, F. H. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 31635-31640; c) Reetz, M. T.; Carballeira, J-D. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 891-903.

2.- Estudiar el efecto de pequeñas modificaciones estructurales y ver el alcance y limitaciones de las mismas en la biotransformación con un determinado enzima. En este sentido pueden señalarse los estudios del curso estereoquímico de ciertas transformaciones enzimáticas en relación con la estructura del sustrato.

3.3.1 Biotransformaciones con enzimas aislados

La manipulación de enzimas aislados es comparable a la de los catalizadores clásicos y esa es su mayor ventaja en síntesis orgánica, especialmente desde que se descubrió que conservan su actividad en disolventes orgánicos.¹⁶⁷ De los enzimas disponibles en el mercado, lo más útiles son las hidrolasas ya que éstas no necesitan cofactor para su mecanismo de acción, siendo las lipasas/esterasas, epóxido hidrolasas, nitrilasas, y glicosidasas las más empleadas en reacciones biohidrolíticas.^{167c,168}

Sin embargo las oxidoreductasas^{167c,168}, responsables de los procesos de oxidación y reducción sólo actúan en presencia de determinados cofactores (frecuentemente NADP o NADP(H)), reactivos caros que hay que reciclar, para lo que se necesita un segundo enzima. Este hecho hace que estos procesos redox con enzimas aislados no sean muy atractivos desde el punto de vista de síntesis, sobre todo si añadimos que las transformaciones con estos enzimas transcurren con un alto grado de estereoespecificidad, por lo que su uso está limitado al sustrato natural o derivados del mismo íntimamente relacionados estructuralmente.

Como consecuencia, los procesos de bio-reducción son llevados a cabo utilizando células completas ya que la regeneración del cofactor tiene lugar *in situ*. Es el caso del uso de la alcohol deshidrogenasa (ADH) que puede obtenerse de multitud de fuentes naturales¹⁶⁹. El extracto de levadura (*S. cerevisiae*) es el biocatalizador más frecuentemente utilizado en la reducción¹⁷⁰ de aldehídos y cetonas debido a su fácil disponibilidad y su bajo coste. Su ADH mostró varios rangos de enantioselectividad hacia compuestos carbonílicos diferentes, que van desde cetonas alifáticas a compuestos carbonílicos funcionalizados complejos, tales como cetonas cíclicas ó aromáticas y β -cetoésteres, que lo convierten en un buen biocatalizador para la obtención de compuestos con alcoholes quirales¹⁷¹.(Fig. 3.16)

¹⁶⁷ a) Zaks, A.; Klivanov, A. M. *Science* **1985**, *228*, 1280-1284; b) Zaks, A.; Klivanov, A. M. *Prod. Nat. Acad. Sci. USA*, **1985**, *82*, 3192-3196; c) Pan, J.; Yu, H.-L.; Xu, J.-H.; Lin, G.-Q. *Top. Organomet. Chem.* **2011**, *36*, 67-104.

¹⁶⁸ Grogan, G. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. B*, **2011**, *107*, 199-225.

¹⁶⁹ Asano, Y. *J. Biotechnol.* **2002**, *94*, 65-72.

¹⁷⁰ De Wildeman, S.; Sereinig, N. En *Enzymatic Reduction of Carbonyl Groups. Science of Synthesis. Stereoselective Synthesis*; Molander, G. A., Ed.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, DE, **2011**; Vol. 2, Capítulo 2.3, 133-208.

¹⁷¹ a) Csuk, R.; Glaenger, B. I. *Chem. Rev.* **2002**, *91*, 49-97; b) Stewart, J. D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 120-129.

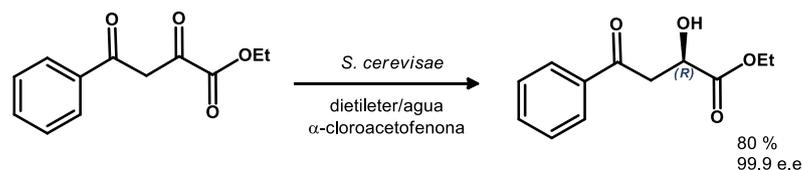


Figura 3.16. Reducción enzimática selectiva de un grupo cetónico¹⁵².

3.3.1.1 Enzimas en disolventes orgánicos

La oportunidad de usar enzimas hidrolíticas en disolventes orgánicos ha sido muy apreciada en los últimos años.^{167c,172} En la mayoría de los casos, los métodos convencionales de hidrólisis son limitados debido a que los ésteres usados como sustratos son poco solubles en agua. La adición de codisolventes miscibles con agua (10-40% v/v, acetona, acetonitrilo, DMSO, DMF, dioxano, terc-butanol, etc.) a veces es suficiente para disolver los sustratos y mejorar el rendimiento de la hidrólisis con esterasas.

En el caso de las lipasas, que actúan en la interfase agua/lípido, es preferible utilizar reacciones bifásicas, disolviendo el sustrato en disolventes inmiscibles con agua (tolueno, hexano, dietil éter) y lograr la separación espacial del biocatalizador disuelto en agua de la fase orgánica que contiene el sustrato. Aunque durante bastantes años se han utilizado estas reacciones bifásicas agua/disolvente orgánico, los mejores resultados se han obtenido en los últimos años al poder realizar la transformación en un disolvente orgánico sin agua. Prácticamente todos los enzimas hidrolíticos han mostrado ser eficientemente activos en disolventes orgánicos (proteasas, amidasas, lipasas, etc.) y particularmente las lipasas¹⁷³ son las mas seguras porque son relativamente estables en medios no polares y pueden catalizar la reacción en la interfase lípido/agua.

La utilización de un disolvente orgánico¹⁷⁴, proporciona grandes ventajas, como (i) Aumento de la solubilidad de la mayoría de los sustratos; (ii) Catálisis de reacciones que serían imposibles en agua; (iii) Incremento de la estabilidad de la enzima; (iv) Insolubilidad de las enzimas; (v) Fácil recuperación de los productos y del biocatalizador; (vi) Posibilidad de reutilización del enzima; (vii) Ausencia de reacciones secundarias que en agua si se darían; (viii) Reducción de la contaminación microbiana; (ix) Modificación de la selectividad del enzima en función del disolvente utilizado.

¹⁷² a) Natarajan, K. R. *J. Chem. Ed.* **1991**, *68*, 13-16; b) Boland, W.; Fröbl, C.; Lorenz, M. *Synthesis* **1991**, 1049-1072; c) Koshinen, A. M. P.; Klivanov, A. M. En *Enzymatic Reactions in Organic Media*; Koshinen, A. M. P.; Klivanov, A. M. Eds.; Blackie Academic & Professional Chapman & Hall, Glasgow, UK, **1996**; 1-16; c) Klivanov, A. M. *Nature* **2001**, *409*, 241-246.

¹⁷³ Wells, A. *Org. Proc. Res. Dev.* **2006**, *10*, 678-681.

¹⁷⁴ Hudson, E. P.; Eppler, R. K.; Clark, D. S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 637-643; b) Carrea, G.; Riva, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2226-2254.

Los procesos en los que intervienen enzimas hidrolíticas y que son aplicación en síntesis orgánica, son comúnmente la hidrólisis de amidas, ésteres o nitrilos, esterificaciones de ácidos y alcoholes o transesterificación de alcoholes.

La metodología preferida es la que usa la reversibilidad de las reacciones con lipasas, a través de la formación del intermedio acil-enzima, en esterificaciones o transesterificaciones enantioselectivas usando enzimas en polvo o inmovilizados que retienen el agua residual necesaria para que permanezcan catalíticamente activos en presencia de acildonores y en un disolvente orgánico completamente inmiscible en agua con objeto de evitar la eliminación de agua desde el enzima. Uno de los graves problemas que pueden presentarse en estos procesos es que el enzima cataliza también la reacción contraria, disminuyendo los rendimientos. Por este motivo se han utilizado dadores de acilo activados (casi irreversibles) que generan débiles alcoholes nucleófilos como los ésteres de oxima. Sin embargo los mas útiles son los denominados irreversibles (ésteres de vinilo o isopropenilo que isomerizan a acetaldehído o acetona) evitando así la reacción inversa, siendo el más utilizado el acetato de vinilo, cuya reacción general puede verse en la fig. 3.17,

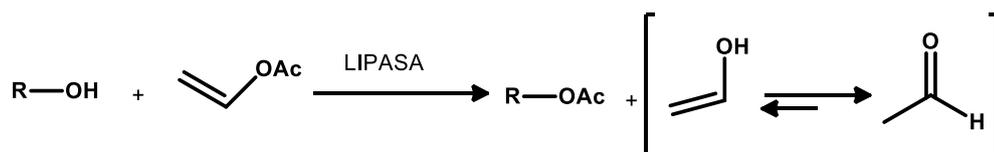


Figura 3.17. Reacción general de acetilación con Lipasas

La enantioselectividad de estos enzimas puede aprovecharse en varios sentidos:¹⁷⁵

1. Diferenciación de enantiómeros (alcoholes, ácidos o ésteres), lo que permite su aplicación a la resolución de mezclas racémicas de los mismos, siendo preciso establecer las condiciones experimentales idóneas para conseguir los mayores excesos enantioméricos debido a que la mayoría de las resoluciones son cinéticas.

2. Diferenciación de grupos enantiotópicos en moléculas proquirales, obteniéndose moléculas con una determinada quiralidad que pueden ser utilizadas para la síntesis de moléculas más complejas.

3. La regioselectividad de estos enzimas puede se explotada en sustratos polifuncionalizados. La modificación de sólo uno de los varios grupos funcionales idénticos en una molécula es un hecho importante para el químico orgánico pudiendo actuar sobre una posición u otra sin necesidad de utilizar grupos protectores, lo que supone una gran ventaja con respecto a los procedimientos químicos. Sustratos polifuncionalizados sobre los que este hecho es clave son los azúcares. Los enzimas hidrolíticos pueden ser útiles en acilaciones selectivas de hidroxilos

¹⁷⁵ a) Rodríguez, R. C.; Fernández-Lafuente, R. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, *64*, 1-22; b) Mugford, P. F.; Wagner, U. G.; Jiang, Y.; Faber, K.; Kazlauskas, R. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8782-8793.

secundarios o desprotecciones selectivas. Incluso estas acilaciones pueden ser controladas dependiendo del disolvente usado: con ciclohexano se obtienen derivados de la glucosa acetilados en C-2, mientras que en acetona se obtienen los 3-acetoxiderivados¹⁷⁶. Esto puede demostrarse en la figura 3.18., donde puede intuirse como el disolvente afecta a la disposición espacial de la glucosa en el centro activo de la enzima,

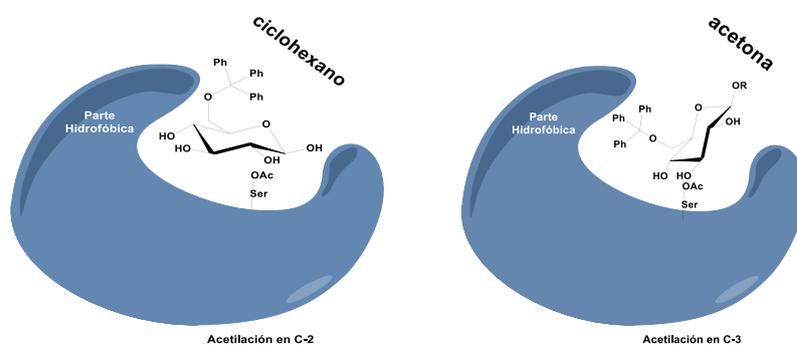


Figura 3.18. Acetilación selectiva de glucosa

Otra opción a tener en cuenta, es centrarse en el descubrimiento de los biocatalizadores de organismos extremófilos, ya que las enzimas que son sintetizadas por termófilos o hipertermófilos son termoestables trabajando entre 60 y 125 °C, y son altamente estables en presencia de concentraciones altas de disolventes orgánicos. Por lo tanto, estos microorganismos ofrecen enzimas útiles para ampliar las condiciones de reacción idóneas para la biocatálisis representando un punto adicional de estabilidad. Aunque existen diversos mecanismos de termoestabilidad que dependen de la propia enzima en sí, sin embargo, pueden identificarse ciertos rasgos comunes en todos estos mecanismos, ya que suelen caracterizarse por poseer un gran número de enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, elevado número de enlaces disulfuro, etc.¹⁷⁷ Por ejemplo, se han aislado de *Thermus thermophiles*¹⁷⁸ interesantes enzimas como esterasas, lipasas, proteasas, alcohol deshidrogenasas.¹⁷⁹

Además actualmente en industrias tanto químicas o farmacéuticas los disolventes se utilizan en grandes cantidades en relación con el producto (la relación disolvente/producto varía entre 100 y 1000). Por lo tanto, los disolventes se consideran como la principal causa de los daños ambientales atribuidos a un proceso industrial.¹⁸⁰ La idea de un *disolvente verde* expresa el objetivo de minimizar el impacto ambiental derivado del uso de disolventes en el proceso químico, por lo que debe estar asociado con una baja toxicidad, biodegradabilidad, baja presión de vapor, aunque

¹⁷⁶ MacManus, D. A.; Vulfson, E. N. *Enzyme and Microbial Technology* **1997**, *20*, 225-228.

¹⁷⁷ Li, W. F.; Zhou, X. X.; Lu, P. *Biotechnol. Adv.* **2005**, *2*, 271-281.

¹⁷⁸ Almendros, M.; Sinisterra, J. V.; Berenguer, J. *Molecules* **2009**, *14*, 1279-1287.

¹⁷⁹ a) Pérez, M.; Sinisterra, J. V.; Hernáiz, M. *J. Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 2366-2383; b) Atomi, H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 166-173; c) Domínguez, A.; Fuciños, P.; Rua, M. L.; Pastrana, L.; Longo, M. A.; Sanromón, M. A. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 187-194.

¹⁸⁰ Tanaka, K. En *Solvent-free Organic Synthesis*; Tanaka, K. Ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, DE, **2003**.

esto es complicado debido a que es sumamente difícil cumplir todos los objetivos.^{179b} Tanto (i) el agua, (ii) fluidos supercríticos (el más utilizado es el CO₂, ya que no es tóxico, no es inflamable y es barato, y puede separarse del producto por despresurización. Su temperatura y presión crítica es muy accesible, siendo 31.1 °C y 74 bar respectivamente), (iii) disolventes fluorados (a temperatura elevada son miscibles con disolventes orgánicos, pero a temperatura ambiente son inmiscibles con agua y disolventes orgánicos. De esta manera, pueden realizarse reacciones bi- o trifásicas donde el producto permanezca en una fase y el catalizador en otra. Así se elimina la necesidad de separaciones cromatográficas, destilaciones, etc., que son costosas, tanto por el empleo de disolventes como por el consumo energético y (iv) disolventes obtenidos a partir de fuentes renovables (el 2-metiltetrahidrofurano obtenido del azúcar de caña presenta por ejemplo una alternativa al THF) se consideran disolventes verdes.^{179b}

Por otro lado, la viabilidad de los líquidos iónicos (ILS) está en discusión.^{179b} Son disolventes muy polares formados por un catión orgánico, frecuentemente un ion imidazolio, piridinio o amonio cuaternario alquil sustituido, y un anión inorgánico, que pueden dar lugar a reacciones nuevas no conocidas previamente. Estos pueden diseñarse específicamente para variar sus propiedades o como disolventes funcionales que participen en la reacción y su característica medioambiental principal es que tienen una presión de vapor despreciable, es decir, no son volátiles siendo su principal inconveniente que su toxicidad no es conocida y debe ser tenida en cuenta. Aún así, hoy en día se están llevando a cabo multitud de reacciones enzimáticas en dichos disolventes,¹⁸¹ debido a que permiten la solubilización de sustratos no solubles en disolventes orgánicos; estabilizan a la enzima, lo que se traduce en poder trabajar a mayor temperatura y debido a su polaridad, permite cristalizar y renaturalizar proteínas evitando agregados proteicos; mantienen la selectividad enzimática que incluye regio- y enantioselectividad.

3.3.2 Biotransformaciones con microorganismos

Desde el punto de vista sintético, en las transformaciones microbiológicas o microbianas el microorganismo es empleado como un reactivo complejo para la transformación de sustratos no necesariamente naturales, sin importarnos si las células están vivas o no. La utilización de células completas presenta una serie de desventajas,

- Puede ser efectivo o no, por lo que debemos realizar pruebas previas para determinar si origina transformación con los sustratos de interés.
- Es preciso trabajar en condiciones estériles, siendo imprescindibles para evitar el desarrollo de otros microorganismos que podrían alterar la biotransformación.
- Las cantidades a incubar son pequeñas, limitadas bien por la tolerancia baja de los microorganismos frente a sustratos o metabolitos, o quizás más importante por la solubilidad de los sustratos en el medio acuoso en el que se ha desarrollado. Esto hace que se utilice un gran

¹⁸¹ a) Moniruzzaman, M.; Nakashima, K.; Kamiyaa, N.; Gotoa, M. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *48*, 295-314; b) Roosen, C.; Müller, P.; Greiner, L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 607-614.

número de recipientes con el medio de cultivo apropiado con el objeto de obtener cantidad suficiente de productos para caracterizarlos, lo que se traduce en la necesidad de trabajar con un mayor volumen de medio acuoso y recipientes donde realizar la biotransformación.

- Debido a que en el microorganismo existen gran cantidad de enzimas, el sustrato puede sufrir distintos procesos que conducen a mezclas a veces bastante complejas de metabolitos. En el caso de reacciones estereoselectivas, los excesos enantioméricos suelen ser mas bajo que los obtenidos con el uso de enzimas aislados ya que en el microorganismo pueden existir enzimas con estereoselectividades contrarias que actúan independientemente sobre el sustrato.
- La extracción de los productos de la biotransformación a partir de un volumen acuoso relativamente grande no es fácil, pero puede resolverse con sistemas de extracción en continuo.

A pesar de los inconvenientes indicados anteriormente, el uso de microorganismos puede ser de gran utilidad ya que son biocatalizadores baratos, fáciles de conseguir y pueden aceptar gran variedad de sustratos.

Aunque también están descritos procesos que utilizan células vegetales¹⁸² o animales¹⁸³, la mayoría de las transformaciones se realizan con microorganismos debido a su disponibilidad, además de que aún es necesario realizar más estudios a nivel metabólico, genes implicados, enzimas expresadas, etc. para discernir el funcionamiento de la célula en sí de forma que actúe como un pequeño biorreactor celular.

La utilización de microorganismos en síntesis orgánica puede realizarse de varias formas¹⁶⁰. Desde células en crecimiento donde el sustrato es adicionado directamente al medio de cultivo, bien durante la fase de inoculación o en una fase apropiada del crecimiento, así como células en fase estacionaria, las cuales no se encuentran en desarrollo pero mantienen la mayoría de sus actividades enzimáticas.¹⁸⁴ De igual forma pueden emplearse células secas, a las que se les ha sometido a un tratamiento de secado como puede ser la liofilización, obteniendo un pulverizado apto como catalizador; extractos celulares obtenidos por ruptura de las células para liberar su contenido, en un estado activo, al medio de reacción, incluso células inmovilizadas¹⁸⁵ en la matriz de un polímero o células en suspensión¹⁸⁶.

¹⁸² a) Bock, G.; Marsh, J. En *Applications of Plants Cells and Tissues Cultures. Ciba Foundations Symposium*; Bock, G.; Marsh, J. Eds.; J. Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, **1988**; Vol. 137, 228-238; b) Siahpar, B.; Rahimi, M.; Tavassoli, A.; Raissi, A. *Am-Euras. J. Agric. & Environ. Sci.* **2011**, *11*, 439-444; c) Caretto, S.; Nisi, R.; Paradiso, A.; De Gara, L. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 726-730; d) Karg, S. R.; Kallio, P. T. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 879-894.

¹⁸³ a) Arathoon, W. R.; Birch, J. R. *Science* **1986**, *232*, 1390-1395; b) Samuelsen, J. T.; Holme, J. A.; Låg, M.; Schwarze, P. E.; Dahl, J. E.; Becher, R. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2012**, *100*, 462-469; c) Rasoul-Amini, S.; Fotooh-Abadi, E.; Ghasemi, Y. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 975-981; d) Zehentgruber, D.; Drăgan, C. A.; Bureik, M.; Lutz, S. *J. Biotechnol.* **2010**, *146*, 179-185.

¹⁸⁴ Yamada, H.; Shimizu, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 622-642.

¹⁸⁵ a) Fischer, T.; Pietruszka, J. *Top. Curr. Chem.* **2010**, *297*, 1-43; b) Zhua, X.; Zhoua, T.; Wua, X.; Caia, Y.; Yaoa, D.; Xiea, C.; Liu, D. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2011**, *72*, 145-149.

¹⁸⁶ Zhang, X.; Ye, M.; Dong, Y.-H.; Hub, H.-B.; Tao, S.-J.; Yin, J.; Guo, D.-A. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1779-1785.



3.3.2.1 Empleo de hongos filamentosos para biohidroxilar sustratos.

Los hongos filamentosos son capaces de catalizar hidroxilaciones regio- y estereoselectivamente, en una gran variedad de sustratos hidrófobos orgánicos naturales y sintéticos. Uno de sus beneficios es la funcionalización de centros no activos, no fácilmente accesibles sintéticamente.

Estos hongos poseen el citocromo P450, que constituye una familia de hemoproteínas que catalizan hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, así como desalquilaciones de nitrógeno, oxígeno y azufre. Además de catalizar biotransformación de xenobióticos, contribuyen a bioconvertir drogas, bioactivan químicos carcinogénicos, llevan a cabo la biosíntesis de compuestos fisiológicamente importantes tales como esteroides, ácidos grasos, eicosanoides, vitaminas liposolubles y ácidos biliares, convierten terpenos y compuestos aromáticos así como degradan herbicidas e insecticidas. Estos citocromos pertenecen al grupo de monooxigenasas externas y por tanto, pueden recibir los electrones necesarios para la escisión de oxígeno y la hidroxilación del sustrato gracias a la participación de diferentes sistemas asociados redox.¹⁸⁷

Como se muestra en la figura 3.19, se ha comprobado que el sitio activo del citocromo P450 posee un grupo prostético hemo y que el átomo de Fe está coordinado ecuatorialmente por cuatro ligandos proporcionados por las protoporfirinas (Hemo), mientras que los dos ligandos axiales proceden de la proteína, un sulfuro de un residuo de cisteína y bien una molécula de agua o un nitrógeno de imidazol de un residuo de histidina, siendo este último desplazado por oxígeno durante el proceso catalítico.

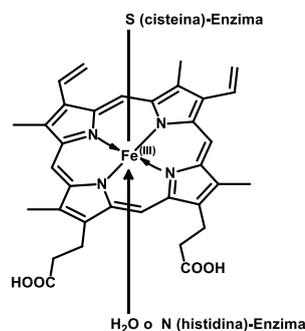


Figura 3.19. Centro activo del citocromo P450

En general, el citocromo P450 participa en reacciones de tipo:

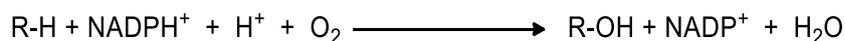


Figura 3.20. Reacción general del citocromo P450

¹⁸⁷ Hannemann, F.; Bichet, A.; Kerstin, M. E.; Bernhardt, R. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1170, 330-344.

3.4 BIOTRANSFORMACIÓN DE TERPENOIDES

Como ya hemos indicado en el apartado precedente, en los últimos años se ha prestado bastante atención a los procesos de biotransformación en síntesis orgánica, siendo en el campo de los productos naturales donde se han conseguido interesantes aplicaciones, sobre todo en la obtención de sintones quirales útiles para la síntesis de productos naturales. En el campo de los terpenoides, los procesos más estudiados han sido las transformaciones microbiológicas que originan hidroxilaciones en posiciones no activadas de los sustratos, lo que permite acceder a posiciones de la molécula que por vía química resultan problemáticas. Esto hace que mediante el uso de estos sistemas, puedan obtenerse con buen rendimiento y algo grado de pureza, con procedimientos sencillos, una serie de productos que no son fácilmente asequibles.

Los estudios de biotransformación de terpenoides se encuentran íntimamente ligados a los estudios de biotransformación realizados sobre los esteroides¹⁸⁹, ya que muchas han sido las transformaciones realizadas utilizando microorganismos y muchos los sustratos empleados obteniendo valiosa información que posteriormente se ha aplicado a la biotransformación de otros compuestos.

Por ejemplo, cualquier posición de esqueletos androstánicos y pregnánicos puede hidroxilarse con el microorganismo apropiado obteniendo buen rendimiento. Algunos de los procedimientos de hidroxilación se han desarrollado a escala industrial^{189f}, como son la obtención de 7 α -,9 α -, 11 α - y 16 α -hidroxiderivados.

Se ha comprobado que la posición y eficacia de la hidroxilación por un determinado microorganismo, está fuertemente influenciada por la estructura del sustrato, observándose que mediante el uso de sustratos con sustituyentes adecuados y situados en determinadas posiciones se puede dirigir la hidroxilación hacia las posiciones deseadas. En base a las numerosas experiencias realizadas, y como explicación de los resultados obtenidos, se ha postulado un modelo de acción enzimática para las transformaciones microbiológicas de esteroides¹⁹⁰. Según este modelo, existen tres centros activos con capacidad de fijación y/o acción que se disponen triangularmente sobre la superficie del enzima, capaces de fijarse y/o actuar sobre el sistema esteroidal. Dependiendo de cuales sean las posiciones de estos centros activos, van a existir dos modos de acción enzimática, modo normal y modo inverso. En el llamado modo normal, las posiciones del sustrato esteroidal que intervienen son C-3, C-11 y C-16. En el modo inverso los carbonos implicados son C-3, C-7 y C-16. Dos de estos centros, situados en la superficie del enzima, se unen a dos sustituyentes oxigenados del sustrato esteroidal, produciéndose la

¹⁸⁹ a) Mahato, S. B.; Mukherjee, A. *Phytochemistry* **1984**, 23, 2131; b) Mahato, S. B.; Banerjee, S. *Phytochemistry* **1985**, 24, 1403; c) Mahato, S. B.; Banerjee, S.; Podder, S. *Phytochemistry* **1989**, 28, 7; d) Mahato, S. B.; Majumdar, I. *Phytochemistry* **1993**, 34, 883; e) Kristan, K.; Rižner, T. L. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2012**, 129, 79-91; f) Faramarzi, M. A.; Adrangi, S.; Yazdi, M. T. *J. Phycol.* **2008**, 44, 27-37; g) Donova, M. V.; Egorova, O. V. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 94, 1423-1447.

¹⁹⁰ Chambers, V. E. M. *J. Chem. Soc. Perkin I* **1973**, 1500-1511.

hidroxilación en la tercera posición. La actuación de la mayoría de los microorganismos utilizados se puede explicar con este modelo de acción enzimática.

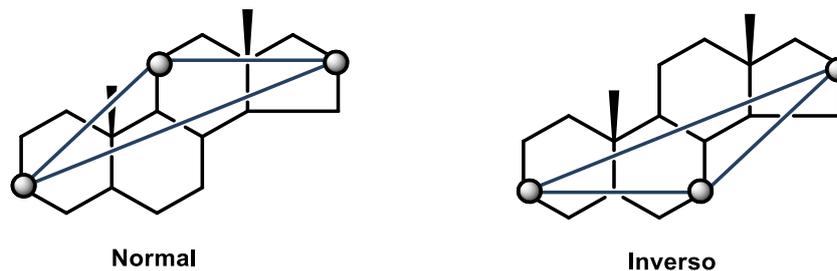


Figura 3.22. Modelo de acción enzimática de esteroides¹⁹⁰

De las experiencias realizadas con un determinado microorganismo frente a distintos sustratos, se pueden obtener conclusiones interesantes acerca de su acción. Por ejemplo, se ha observado la tendencia de *Calonectria decora*¹⁹¹ por la monohidroxilación de sustratos dioxigenados y la dioxigenación de sustratos monooxigenados, produciendo hidroxilaciones ecuatoriales, o las hidroxilaciones producidas por *Aspergillus ochraceous*, que solo tienen lugar en los anillos intermedios, generalmente en las posiciones 6 y 11, sin depender de la posición de los sustituyentes en el anillo esteroidal¹⁹². De esta forma, se sabe que enzimas bacterianas hay que emplear para hidroxilar una determinada posición del anillo esteroidal¹⁹³.

Debido a los excelentes resultados obtenidos en la biotransformación de esteroides, en los últimos años se han realizado numerosos trabajos de biotransformación de terpenoides con objeto de utilizar estos procesos en la búsqueda de nuevos productos que posean actividad biológica, en la mejora de esta actividad e incluso para la obtención de productos que puedan tener interés desde el punto de vista industrial, particularmente en la industria de perfumería o para la obtención de moléculas olorosas o colorantes¹⁹⁴. La primera bioconversión de un terpenoide fue publicada por Mayer y Neuberg en 1915, quienes realizaron la conversión de (+)-citronelal a (+)-citronelol¹⁹⁵. Desde entonces muchos han sido los trabajos realizados y muestra de ello son las numerosas revisiones que se han realizado de estos procesos de biotransformación sobre terpenoides¹⁹⁶.

¹⁹¹ Jones, E. R. H. *Pure Appl. Chem.* **1973**, *33*, 39-52.

¹⁹² Bell, A. M.; Browne, J. W.; Denny, W. A. *J. Chem. Soc. Perkin I* **1972**, 2930-2936.

¹⁹³ a) Lehman, L. R.; Stewart, J. D. *Curr. Org. Chem.* **2001**, *5*, 439-470; b) Bernhardt, R. *J. Biotechnol.* **2006**, *24*, 128-145; c) Bureik, M.; Bernhardt, R. En *Steroid Hydroxylation: Microbial Steroid Biotransformations Using Cytochrome P450 Enzymes. Modern biooxidation: enzymes, reactions and applications*; Schmid, R. D.; Urlacher, V. B., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, DE, **2007**; d) Hannemann, F.; Bichet, A.; Ewen, K. M.; Bernhardt, R. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1770*, 330-344; e) Novikova, L. A.; Faletrov, Y. V.; Kovaleva, I. E.; Mauersberger, S.; Luzikov, V. N.; Shkumatov, V. M. *Biochem. Mosc.* **2009**, *74*, 1482-1504.

¹⁹⁴ Gabelman, A. E. En *Bioprocess Production of Flavor, Fragrance and Color Ingredients*; Gabelman, A. E. Ed.; John Wiley & Sons Inc., New York, US, **1994**; 239-275.

¹⁹⁵ Mayer, P.; Neuberg, C. *Biochemische Zeitschrift* **1915**, *71*, 174-175.

¹⁹⁶ a) Kieslich, K. En *Terpenoid. Microbial transformatives of Nonsteroid Cyclic Compounds*; Georg Thieme Publishers, Stuttgart, DE, **1976**; 56-84 b) Sebek, O. K.; Kieslich, K. En *Microbial transformation of Organic Compounds. Annual Reports for Fermentation Processes*; Perlman, D. Ed.; Academic Press, New York, US, **1977**; Vol. 1, 267-297; c) Johnson, R. A. En *Oxygenation with microorganisms. Oxidation in Organic Chemistry*; Trahanousky, W. S. Ed.; Academic Press, New York, US, **1978**; Parte C, 131-210; d) Krasnobajew, V. En *Terpenoids. Biotechnology*; Kieslich, K. Ed.; Verlag Chemie, Weinheim, DE, **1984**; Vol. 6, Parte a, 97-125; e) García-Granados, A.; Martínez, A.; Parra, A.; Rivas, F. *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11*, 679-692; f) Arantes, S. F.; Hanson, J. R. *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11*, 657-663; g) Demyttenaere, J. C. R. En

Los sistemas monoterpénicos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo los principales constituyentes de los aceites esenciales. Los estudios de biotransformación de sistemas monoterpénicos¹⁹⁷ se han realizado con objeto de obtener nuevos productos de interés en la industria de perfumería. Así, varios monoterpenos como el citral, citronelal, limoneno, β -mirreno, linalool, mentol, 1,4-cineol y pineno, han sido utilizados como sustratos en esas biotransformaciones con el fin de obtener otros derivados más valiosos.

Al igual que los anteriores, los sistemas sesquiterpénicos también se encuentran distribuidos en los aceites esenciales. Algunos de ellos son de considerable valor industrial en la industria de perfumería y farmacéutica. La síntesis total de estos compuestos es a menudo bastante difícil. Por otro lado, los métodos alternativos se basan en su obtención a partir de precursores naturales, lo que requiere funcionalizaciones difíciles de lograr por métodos químicos. En este sentido, los procedimientos de bioconversión están conduciendo a mejores resultados, y prueba de ello ha sido el gran número de estudios realizados que han sido también recogidos en sucesivas revisiones^{196,198}. Nuestro Grupo de Investigación también ha abordado la biotransformación de diversos sistemas sesquiterpénicos eudesmínicos¹⁹⁹, así como sistemas eudesmínicos aislados de *Sideritis*²⁰⁰. También se realizaron biotransformaciones de algunas lactonas sesquiterpénicas²⁰¹, así como la síntesis químico-microbiológica de 6β -lactonas eudesmínicas y 6β -lactonas germacránicas²⁰².

Los estudios sistemáticos de hidroxilaciones microbiológicas de esteroides, han servido de base para aplicar los procesos de biotransformación sobre sustratos diterpénicos, debido a la similitud estructural. De esta forma, existe una gran cantidad de información en lo que a biotransformación de diterpenoides se refiere, encontrándonos que la mayoría de las publicaciones estaban centradas en la actuación del hongo *Giberella fujikuroi* para la establecer la vía biogénica de formación de las giberelinas²⁰³, aunque posteriormente se ha realizado reviews²⁰⁴ que muestran la multitud de especies utilizadas (*Curvularia lunata*, *Cunninghamella elegans*, *Fusarium*

Biotransformation of Terpenoids by Microorganisms. Studies in Natural Products Chemistry; Attar-ur-Rahman, H. E. J. Ed.; Elsevier Science Ltd, New York, US, **2001**; vol. 25, Parte F, 125-178; h) Simeo, Y.; Sinisterra, J. V. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2009**, *6*, 128-134; h) Grudniewska, A.; Wawrzeńczyk, C. *Molecules* **2013**, *18*, 2778-2787.

¹⁹⁷ a) Schrader, J. *Biospektrum* **2010**, *16*, 555-557; b) Khor, G. K.; Uzir, M. H. *Yeast* **2011**, *28*, 93-107.

¹⁹⁸ a) Lamare, V.; Furtoss, R. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 4109-4132; b) García-Granados, A.; Martínez, A.; Parra, A.; Rivas, F. *Curr. Org. Chem.* **2009**, *13*, 1182-1193; c) García-Granados, A. *Rev. Latinoam. Quim.* **1995**, *23*, 50-59.

¹⁹⁹ a) García-Granados, A.; Gutiérrez, M. C.; Martínez, A.; Rivas, F. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 338-341; b) García-Granados, A.; Gutiérrez, M. C.; Rivas, F. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2004**, *27*, 133-138; c) García-Granados, A.; Melguizo, E.; Parra, A.; Pérez, F. L.; Simeó, Y.; Viseras, B.; Arias, J. M. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6517-6526.

²⁰⁰ a) García-Granados, A.; Martínez, A.; Rivas, F.; Onorato, M. E.; Arias, J. M. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 436-440; b) García-Granados, A.; Martínez, A.; Rivas, F.; Onorato, M. E.; Arias, J. M. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 91-102.

²⁰¹ a) Arias, J. M.; Bretón, J. L.; Gavin, J. H.; García-Granados, A.; Martínez, A.; Onorato, M. E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1987**, 471-474; b) Amate, Y.; Bretón, J. L.; García-Granados, A.; Martínez, A.; Onorato, M. E.; Sáenz de Buruaga, A. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 6939-6950; c) Amate, Y.; García-Granados, A.; Sáenz de Buruaga, A.; Bretón, J. L.; Onorato, M. E.; Arias, J. M. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5811-5818.

²⁰² García-Granados, A.; Gutiérrez, M. C.; Martínez, A.; Rivas, F.; Arias, J. M. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3311-3320.

²⁰³ a) Cross, B. E.; Galt, R. H. B.; Hanson, J. R. *J. Chem. Soc.* **1964**, 295; b) Geissman, T. A.; Verbixcar, A. J.; Cragg, G. *Phytochemistry* **1966**, *5*, 933; c) Cross, B. E.; Norton, K.; Stewart, J. C. *J. Chem. Soc.* **1968**, 1054; d) Hedden, P.; McMillan, J.; Phynney, B. O. *J. Chem. Soc. Perkin I* **1974**, 587; e) Bearder, J. R.; McMillan, J.; Phynney, B. O. *J. Chem. Soc. Perkin I* **1975**, 721.

²⁰⁴ a) Hanson, J. R. *Nat. Prod. Rep.* **1992**, 139-151; b) García-Granados, A.; Martínez, A.; Parra, A.; Rivas, F. *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11*, 679-692.

moniliforme, *Gliocladium roseum*, *Mucor plumbeus*, *Rhizopus nigricans* and *Neurospora crassa*) para biotransformar esqueletos de tipo labdano²⁰⁵, por ejemplo.

3.5 BIOTRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS TRITERPÉNICOS

Existen cerca de 200 esqueletos triterpénicos conocidos, siendo la mayoría tetraciclos 6-6-6-5 y pentaciclos 6-6-6-6-5 o 6-6-6-6-6, aunque también se han aislado de fuentes naturales triterpenoides acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y hexacíclicos.²⁰⁶

Han sido muy estudiados en la última década por sus efectos biológicos entre los que podemos destacar, antitumorales²⁰⁷, antiinflamatorios²⁰⁸, antiulcerosos²⁰⁹, antimicrobianos²¹⁰, antiplasmodicos, antivirales (anti VIH)²¹¹, cardioprotectores y hepatoprotectores²¹², analgésicos²¹³, antimicóticos, e inmunomoduladores. Además, debido a sus propiedades citostáticas²¹⁴, se usan para la prevención y tratamiento de hepatitis o de infecciones parasitarias o protozoarias.

La transformación microbiana es un enfoque muy útil para ampliar la diversidad química de productos naturales, además proporciona modificaciones estructurales en los mismos, siendo utilizadas para predecir e imitar *in vitro* el metabolismo biológico de triterpenoides de mamíferos y así obtener metabolitos de interés para su estudio *in vivo*. En las últimas décadas se ha demostrado que la biotransformación es una herramienta muy versátil para aumentar la diversidad estructural de triterpenoides.

El desarrollo de las biotransformaciones de triterpenos ha tenido lugar en los últimos 15 años y se resumirá en los puntos siguientes, atendiendo al número de anillos presentes en el esqueleto triterpénico.²¹⁵

²⁰⁵ a) García-Granados, A.; Fernández, A.; Gutiérrez, M. C.; Martínez, A.; Quirós, R.; Rivas, F.; Arias, J. M. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 107-115; b) García-Granados, A.; Martínez, A.; Quirós, R.; Extremera, A. L. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 8567-8578.

²⁰⁶ Connolly, J. D.; Hill, R. A. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 465-486.

²⁰⁷ a) Liby, K. T.; Yore, M. M.; Sporn, M. B. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 357-369; b) Setzer, W. N.; Setzer, M. C. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 540-556.

²⁰⁸ a) Akihisa, T.; Yasukawa, K. En *Anti-inflammatory and anti-allergic properties of triterpenoids from plants. Biomaterial from Aquatic and Terrestrial Organisms*; Fingerman M.; Nagabhushanam, R. Eds.; Science Publishers Inc., Enfield, UK, **2006**; 63-114; b) Rios, J. L.; Recio, M. C.; Manez, S.; Giner, R. M. *Stud. Nat. Products Chem. Bioactive Nat. Products (Parte C)*, **2000**, *22*, 93-143.

²⁰⁹ Ovesna, Z.; Vachalkova, A.; Horvathova, K.; Tothova, D. *Neoplasma* **2004**, *51*, 327-333.

²¹⁰ Horiuchi, K.; Shiota, S.; Hatano, T.; Yosliida, T.; Kuroda, T.; Tsuchiya, T. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 1147-1149.

²¹¹ a) Goncalves, R. S. B.; Ferreira, M. L.; Ventura, M. T.; Peralta, M. A.; De Souza, M. V. N. *Revista Fitos* **2006**, *2*, 74-81; b) Huang, L.; Chen, C. H. *Curr. Drug Targets: Infect. Disorders* **2002**, *2*, 33-36; c) Huang, L.; Chen, C. H. *Med. Chem. Rev. Online* **2005**, *2*, 423-427.

²¹² a) Saravanan, R.; Viswanathan, P.; Pugalendi, K. V. *Life Sci.* **2006**, *78*, 713-718; b) Oh, S.; Choi, J.; Lim, S. *Toxicology* **2006**, *220*, 1-12; c) Senthil, S.; Sridevi, M.; Pugalendi, K. V. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 418-423.

²¹³ Vasconcelos, M. A. L.; Royo, V. A.; Ferreira, D. S.; Miller Crotti, A. E. M.; Andrade e Silva, M. L.; Carvalho, J. C. T.; Bastos, J. K.; Cunha, W. R. Z. *Naturforsch. C. Biosci.* **2006**, *61*, 477-482.

²¹⁴ Patocka, J.; Stiborova, M. *Chem. Listy* **2004**, *98*, 185-187.

²¹⁵ a) Zhang, J.; Yu, B. *Zhongguo Tianran Yaowu* **2007**, *5*, 457-462; b) Parra, A.; Rivas, F.; García-Granados, A.; Martínez, A. *Mini-rev. Org. Chem.* **2009**, *6*, 307-320.

3.5.1. Triterpenos acíclicos

El triterpeno más simple con respecto a la complejidad del esqueleto carbonado es el escualeno (1), formado por una cadena de 24 átomos de carbono y que posee 6 grupos metilos y 6 dobles enlaces,

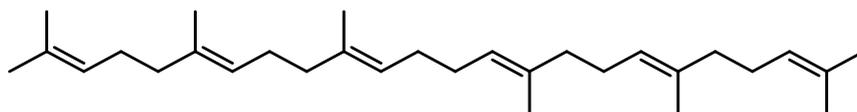


Figura 3.23. Estructura molecular del escualeno (1)

Varios microorganismos son capaces de degradar escualeno (1) a sustratos útiles en síntesis química. Así, *Corynebacterium sp. (S-401)* da lugar a cinco metabolitos (2-6) que poseen desde uno a cinco grupos hidroxilo²¹⁶,

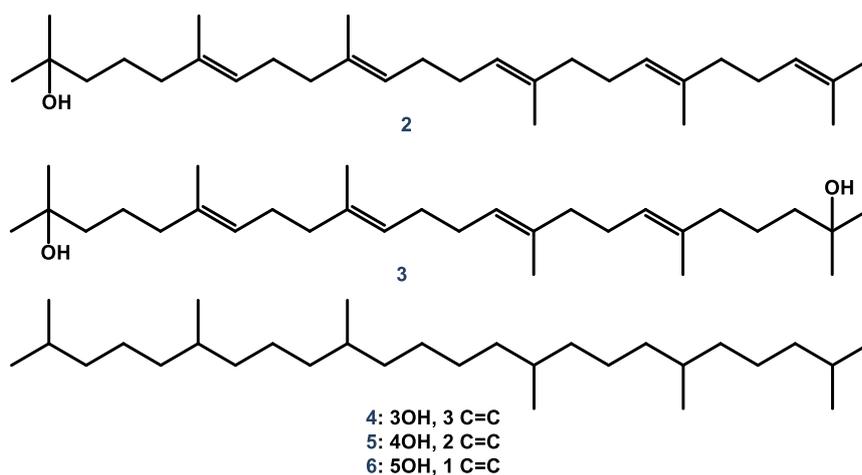


Figura 3.24. Metabolitos de biotransformación de 1 con *Corynebacterium sp. (S-401)*

Con otra cepa de este mismo microorganismo (*SY-79*) se consiguió obtener el ácido escualendíico²¹⁷ (7) como metabolito mayoritario,

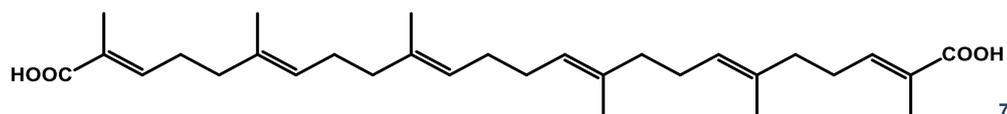


Figura 3.25. Esqueleto de ácido escualendíico (7)

²¹⁶ Seo, C. W.; Yamada, Y.; Takada, N.; Okada, H. *Agric. Biol. Chem.*, **1981**, *45*, 2025-2030.

²¹⁷ Seo, C. W.; Yamada, Y.; Takada, N.; Okada, H. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *45*, 522-525.

El microorganismo *Rhodococcus sp.* aislado del suelo es capaz de oxidar escualeno a escualen-12-ona²¹⁸ (**8**),

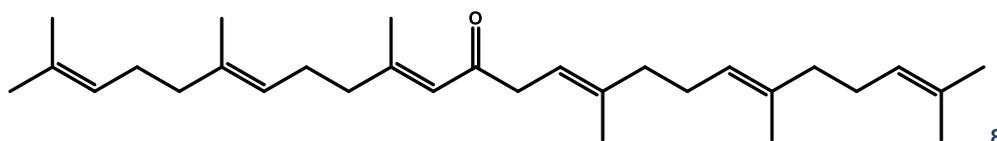


Figura 3.26. Esqueleto de escualen-12-ona (**8**)

3.5.2 Triterpenos tetracíclicos

Los triterpenos tetracíclicos forman un grupo amplio dentro del cual se encuentran gran variedad de estructuras y actividad biológica: esteroides, ácidos cólicos, glicósidos cardiotónicos y saponinas. Las variaciones son tanto en la cadena lateral como en el sistema anular. La posición C-3 casi siempre está oxigenada y principalmente la estereoquímica en la fusión de los anillos y de la cadena lateral, depende fundamentalmente de como se pliega la cadena del escualeno para llevar a cabo la consecuente ciclación (ver figura 2.5 de la presente memoria).

Generalmente, los 3 β -alcoholes de los triterpenos tetracíclicos se aíslan de vegetales superiores. Algunos, como lanosterol y sus productos de desmetilación se encuentran en animales (lana de oveja, hígado y otros tejidos, aunque también se ha localizado en compuestos aislados de helechos (*Andiantum venustum*)).

3.5.2.1 Esqueleto de eburicano

Se ha descrito la biotransformación del ácido eburicoico (**9**) con *Glomerella fusarioides* (ATCC 9552), obteniendo como único metabolito el ácido 4-hidroxi-3,4-seco-eburica-8,24(28)-dien-3,21-dioco (**10**), a través de una apertura oxidativa del anillo A²¹⁹ análoga a una reacción de Baeyer-Villiger, como puede observarse en la figura 3.27,

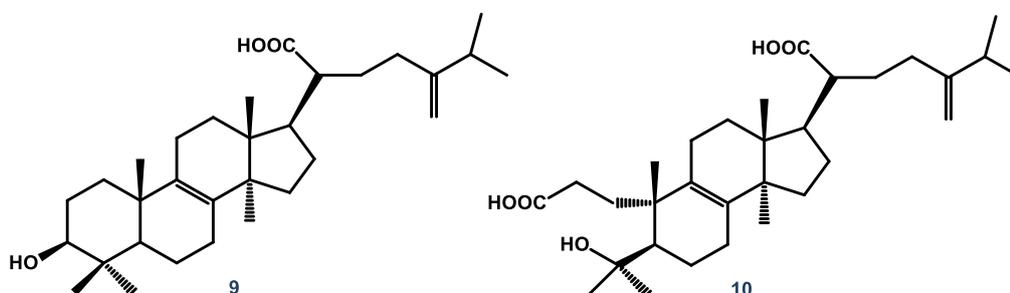


Figura 3.27. Metabolito **10** de biotransformación del ácido eburicoico (**9**)

²¹⁸ Setchell, C. H.; Bonner, J. F.; Wright, S. J.; Caunt, P.; Baker, P. B. *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, *21*, 255-257.

²¹⁹ Laskin, A. I.; Grabowich, P.; Meyers, C. D. L.; Fried, J. J. *Med. Chem.* **1964**, *7*, 406-409.

3.5.2.2 Esqueleto de lanostano

Algunos esteroides derivan de los esqueletos de terpenos tetracíclicos de lanosterol (**11**), cicloartenol y 24-metilencicloartenol (el esqueleto de cicloartano se detallará en el punto 3.5.2.3). El empleo de *Mycobacterium sp.* (NRRL B-3805) en estos terpenos ha proporcionado una serie de cambios químicos complejos como son la escisión de la cadena de C17, desmetilación en las posiciones 4 α , 4 β y 14 α y la eliminación del doble enlace $\Delta^{8(9)}$ y la aparición de uno nuevo en las posiciones $\Delta^{8(14)}$. Con estos cambios químicos se consiguió obtener esteroides C19. Como metabolito mayoritario obtuvieron androsta-4,8(14)-dien-3,17-diona (**12**) con un rendimiento del 30%²²⁰, aunque también se obtuvieron otros cuatro metabolitos minoritarios (**13-16**)²²¹ tal y como se muestran en la figura 3.28.

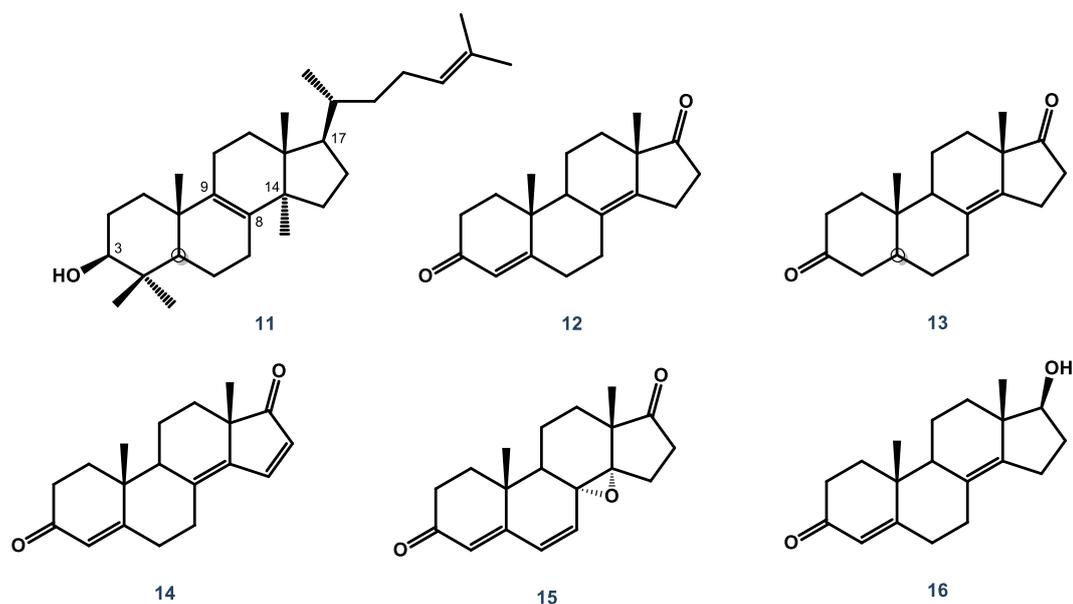


Figura 3.28. Esteroides C₁₉ obtenidos en la biotransformación de lanosterol (**11**) con *Mycobacterium sp.* (NRRL B-3805)

Debido a la particularidad del cambio de posición del doble enlace, el grupo de Wang. et al., llevó a cabo la preparación de diversos derivados modificados en C-8 y C-9 que fueron sometidos posteriormente a una nueva biotransformación con este microorganismo²²². De esta forma y como se muestra en la figura 3.29, la incubación de 8 α ,9 α -epoxi-tetrahidrolanosterol (**17**) dio lugar a dos esteroides C₂₁, el 20(S)-hidroximetil-12 α -hidroxipregna-4-en-3-ona (**18**) y 20(S)-hidroximetil-4 α ,4 β ,14 α -trihidroximetilpregna-7,9(11)-dien-3 β -ol (**19**). Del mismo modo, al incubar lanosta-7,9(11)-dien-3 β -ol (**20**) se aislaron los metabolitos **12** y **13** también producidos en la biotransformación de lanosterol (**11**) junto con lanosta-7,9(11)-dien-3-ona (**21**) y 12 α -hidroxibisnorcola-4,17(20)-dien-22-oato de metilo (**22**).

²²⁰ Wang, K. C.; Young, L. H.; Wang, Y.; Lee, S. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1283-1286.

²²¹ Lee, S. S.; Young, L. H.; Wang, K. C. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 178-183.

²²² Wang, K. C.; You, B.; Yan, J.; Lee, S. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1222-1227.

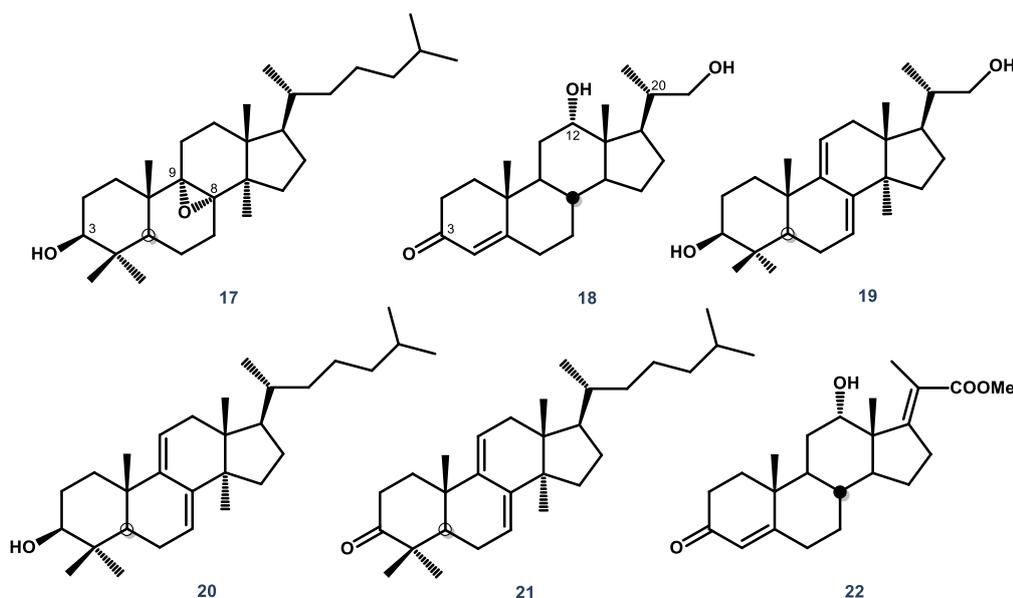


Figura 3.29. Metabolitos de biotransformación de derivados de lanosterol (11)

3.5.2.3 Esqueleto de cicloartano

Cicloartenol (23) y 24-metilencicloartanol (24), son dos alcoholes triterpénicos mayoritarios en el aceite de fibra de arroz o en la pulpa del plátano (*Musa paradisiaca*), que además de ayudar a la excreción fecal de colesterol al aumentar la secreción de ácidos biliares, también poseen propiedades antitumorales y antiinflamatorias importantes. Al igual que ocurre con el lanosterol (11), la biotransformación de 23 y 24 con *Mycobacterium sp.* (NRRL B-3805)^{220,221} dio lugar a formación de los mismos esteroides C₁₉, aislándose de nuevo los metabolitos 12, 13, 14, 16, y a dos metabolitos minoritarios, 3 α -hidroxi-5 α -androst-8(14)-en-17-ona (25) y 3 α ,17 β -dihidroxi-5 α -androst-8(14)-eno (26).

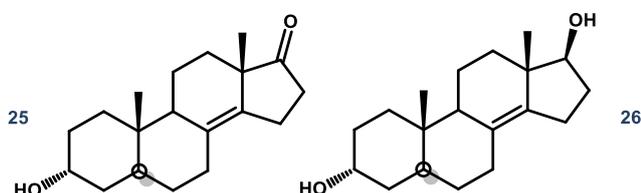


Figura 3.30. Esteroides C₁₉ minoritarios aislados de la biotransformación de 23 y 24.

En la búsqueda de moléculas con potencial antitumoral, Akihisa et al.²²³, biotransformaron 23, 24 y cicloartenona (27) utilizando el hongo *Glomerella fusarioides* (IFO 8831). En la

²²³ Akihisa, T.; Watanabe, K.; Yoneima, R.; Suzuki, T.; Kimura, Y. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 604-607.

bioconversión se obtuvo, a partir de **23**, cicloartenona (**27**), cicloart-25-en-3 β ,24-diol (**28**), y cicloartano-3 β ,24,25-triol (**29**). A partir de **24** se obtuvo, cicloeucalenol (**30**), 24-metilcicloartano-3 β ,24,24¹-triol (**31**), y 24¹-metoxi-24-metilcicloartano-3 β ,24-diol (**32**) y a partir de **27** 4 α ,4 β ,14 α -trimetil-9 β ,19-ciclopregnano-3,20-diona (**33**), cicloartano-3,24-diona (**34**), 24-hidroxicicloart-25-en-3-ona (**35**), (23*E*)-25-hidroxicicloart-23-en-3-ona (**36**), 24,25-dihidroxicicloartan-3-ona (**37**), y 25-hidroxi-24-metoxicicloartan-3-ona (**38**).

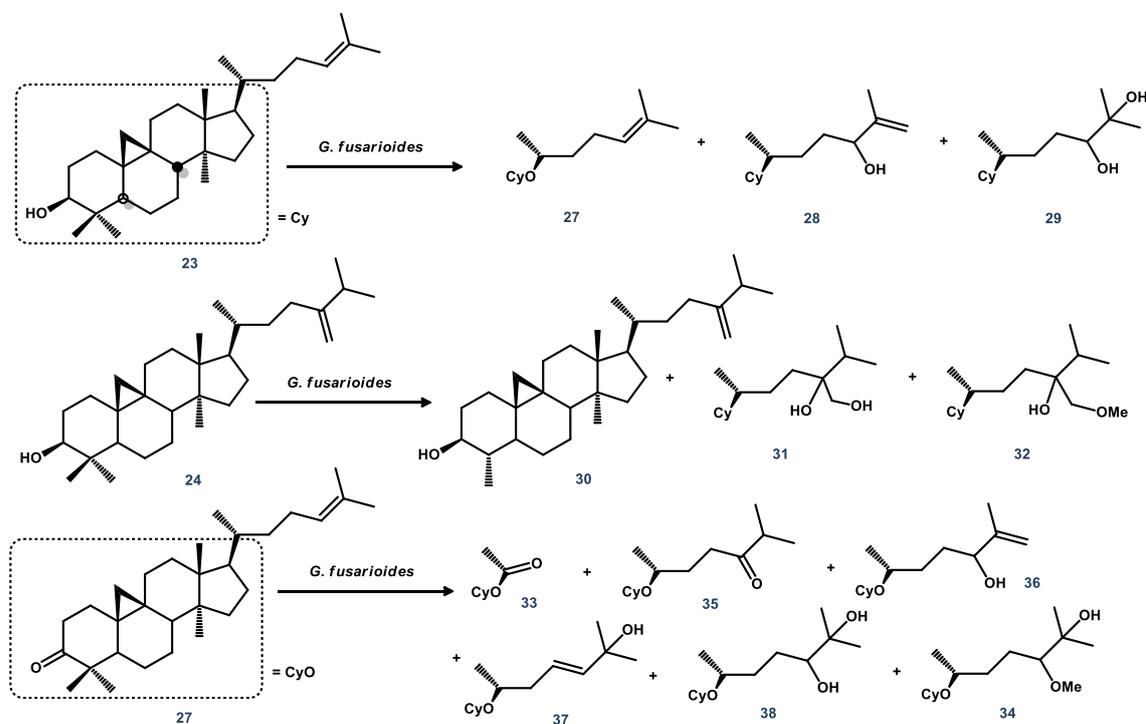


Figura 3.31. Biotransformación de cicloartanos con *Glomerella fusarioides*

Como se observa en la figura 3.31, en la biotransformación de los tres cicloartanos se formaron metabolitos con diversas modificaciones estructurales, tales como: oxidación del grupo alcohólico del carbono C-3, hidroxilaciones de las cadenas laterales y escisión de la cadena carbonada, desmetilación en C-4, hidroxilaciones en C-24 y metoxilaciones en este mismo carbono. Los productos con modificaciones en C-24 están constituidos por mezclas de los esteroisómeros en igual proporción. La transformación de **27** en **33** constituyó la primera notificación de una modificación estructural de un compuesto tipo cicloartano, en uno con cadena lateral tipo pregnano.

El látex de ciertas plantas, como el caucho, tiene gran importancia económica, ya que da origen al caucho natural, de alto valor comercial. Aparte del árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*), existen ciertas plantas laticíferas como el caucho (*Ficus elastica*) y el guayule (*Parthenium argentatum*), que también son fuente de caucho natural; De esta última, se aíslan también dos triterpenos con esqueleto de cicloartano, argentatina A (**39**) e incanilina (**40**) en gran cantidad. La biotransformación de una mezcla 1:4 de ambos compuestos por *Gibberella saubineti* (ATCC

20193) y *Septomyxa affinis* (ATCC 6737) dio lugar a un único metabolito (**41**) a través de la reducción del grupo cetónico de C-3, apertura del anillo tetrahydrofuránico y formación de 2 nuevos dobles enlaces sobre C2-C3 y C23-C24,²²⁴

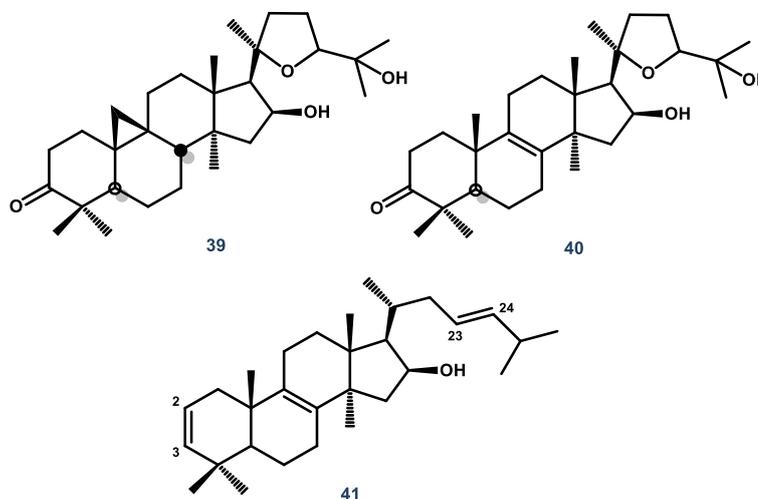


Figura 3.32. Metabolito de biotransformación **41** de Argentatina A (**39**) e Incanilina (**40**)

La acetilación de la misma mezcla y posterior biotransformación con *S. affinis*, generó peculiarmente 4 metabolitos distintos al obtenido anteriormente,

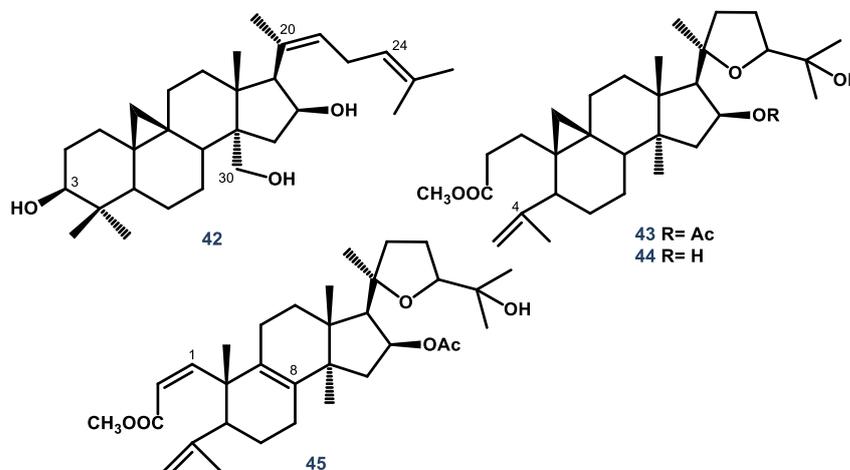


Figura 3.33. Metabolitos biotransformados por *S. affinis*

Como puede verse en la figura 3.33, el derivado acetilado de Argentatina A fue biotransformado en 3β,16β,30-trihidroxicicloart-20,24-dieno (**42**), 16β-acetoxi-20*R*,24*R*-epoxy-25-hidroxi-3,4-seco-cicloart-4(28)-en-3-oato de metilo (**43**) y 20*R*,24*R*-epoxy-16β,25-dihidroxi-3,4-seco-cicloart-4(28)-en-3-oato de metilo (**44**); Mientras que el acetato de incanilina dio lugar de nuevo al metabolito **41** y a 16β-acetoxi-20*R*,24*R*-epoxy-25-hidroxi-3,4-seco-lanosta-1,4(28),8-trien-3-oato de metilo (**45**). La apertura oxidativa del anillo A en los metabolitos **43**, **44** y **45**, pueden explicarse mediante una reacción de oxidación de Baeyer-Villiger, teniendo en cuenta la inserción

de una función oxigenada entre C3 y C4 que da lugar a la generación de un éster seguido de hidrólisis y deshidratación en las posiciones 4(28).²²⁴

Además de esta misma planta, *Parthenium argentatum*, se aísla de su resina Argentatina B (**46**), otro triterpeno tetracíclico capaz de inhibir el desarrollo celular. En 2003, el grupo de Maatooq et. al., eligió veinticinco microorganismos para su biotransformación de los cuales seleccionó solo tres, *Nocardia corallina* var. *taoka* (ATCC 31338), *Mycobacterium* sp. (NRRL B3683) y *Septomyxa affinis* (ATCC 6737).²²⁵ Así, la biotransformación de **46** con estos microorganismos dio lugar a isoargentatina D (**47**) aunque con *S. affinis* se obtuvo además argentatina D (**48**) y 1,2-didehidroargentatina B (**49**),

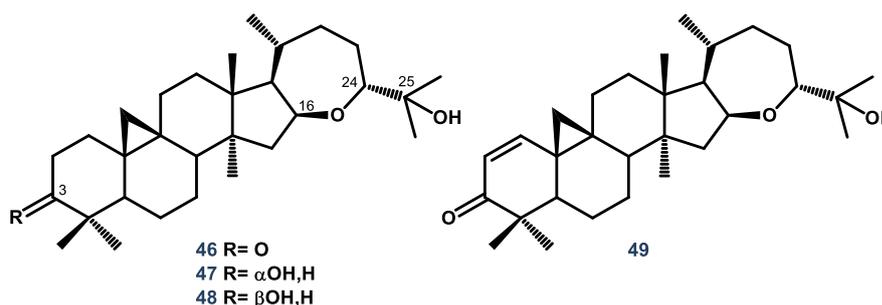


Figura 3.34. Metabolitos de biotransformación de Argentatina B (**46**)

Astragalus es un gran género pertenecientes a la familia de las leguminosas con cerca de 2.000 especies de hierbas y pequeños arbustos. La raíz de estas especies ha sido muy utilizada en la medicina tradicional china, especialmente en el tratamiento de la leucemia y del cáncer uterino y en el trastorno del sistema inmunológico. Uno de los metabolitos minoritarios aislados en este género, es el cicloastragenol (**50**) el cual favorece la proliferación de células T por el aumento de actividad de la telomerasa lo que implica que también puede ayudar a retrasar el inicio del envejecimiento celular. La incubación de **50** con *Cunninghamella blakesleeana* (NRRL 1369) generó el metabolito **51**, que posee un nuevo esqueleto resultado de la apertura del anillo de ciclopropano y posterior migración del grupo metilo,²²⁶

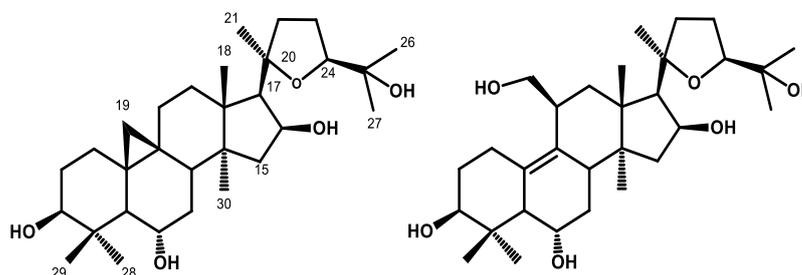


Figura 3.35. Metabolito **51** obtenido en la biotransformación de Cicloastragenol (**50**) con *Cunninghamella blakesleeana*

²²⁴ Maatooq, G.; Hoffman, J. J. Z. *Naturforschung C. J. Biosci.* **2002**, *57*, 489-495.

²²⁵ Maatooq, G. Z. *Naturforschung C. J. Biosci.* **2003**, *58*, 249-255.

²²⁶ Kuban, M.; Öngen, G.; Bedir, E. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4252-4255.

Recientemente se ha descrito la biotransformación de **50** con los hongos *Cunninghamella elegans* (AS 3.1207), *Syncephalastrum racemosum* (AS 3.264), y *Doratomyces stemonitis* (AS 3.1411).²²⁷ De esta forma, y tras seis días de incubación se aislaron quince nuevos metabolitos de los cuales trece se identificaron como nuevos. Como puede verse en la figura 3.36, *C. elegans* generó a partir de **50** los metabolitos identificados como (20*R*,24*S*)-2 α ,3 β ,6 α ,16 β ,25-pentahidroxi-20,24-epoxicicloartano (**52**), (20*R*,24*S*)-3 β ,6 α ,12 α ,16 β ,25-pentahidroxi-20,24-epoxi-cicloartano (**53**), (20*R*,24*S*)-3 β ,6 α ,16 β ,25,28-pentahidroxi-20,24-epoxi-cicloartano (**54**), (20*R*,24*S*)-3 β ,6 α ,16 β ,25,29-pentahidroxi-20,24-epoxi-cicloartano (**55**), (20*R*,24*S*)-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahidroxi-20,24-epoxi-cicloartano-28-carbaldehído (**56**), un 16,24-epoxiderivado (**61**) y el ya conocido metabolito (**51**). Mientras que los compuestos **53**, (20*R*,24*S*)-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahidroxi-20,24-epoxi-cicloartano-11-ona (**59**), (20*R*,24*S*)-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahidroxi-20,24-epoxi-cycloartano-11(12)-eno (**60**), **51**, (20*R*,24*S*)-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahidroxi-19-butoxi-ranunculan-9(10)-eno (**52**), (20*R*,24*S*)-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahidroxi-19-isopenteniloxi-ranunculan-9(10)-eno (**53**), (20*R*,24*S*)-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahidroxi-19-acetoxi-ranunculan-9(10)-eno (**64**) y (20*R*,24*S*)-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahidroxi-20,24-epoxi-9(10) α -homo-19-nor-cicloartano (**65**) se aislaron de *S. racemosum*, y el ya conocido ciclopentanogenina (**67**), junto con (20*R*,24*S*)-6 α ,16 β ,25,30-tetrahidroxi-20,24-epoxi-cicloartano-3-ona (**58**) y **51** en el caso de *D. stemonitis*.

Según estos datos, puede observarse que los 3 hongos poseen preferencias catalíticas significantes. *C. elegans* tiende a provocar hidroxilaciones sobre los grupos metílicos de C-28 y C-29; *S. racemosum* cataliza eficientemente un complicado reagrupamiento hacia el esqueleto de ranunculano y por otro lado la expansión del esqueleto a un 9(10) α -homo-19-nor-cicloartano; *D. stemonitis* permite principalmente que ocurra una reacción de carbonilación, especialmente sobre el grupo alcohólico de C-3.²²⁷

²²⁷ Yang, W.-Z.; Ye, M.; Huang, F.-X.; He, W.-N.; Guo, D.-A. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 527-539.

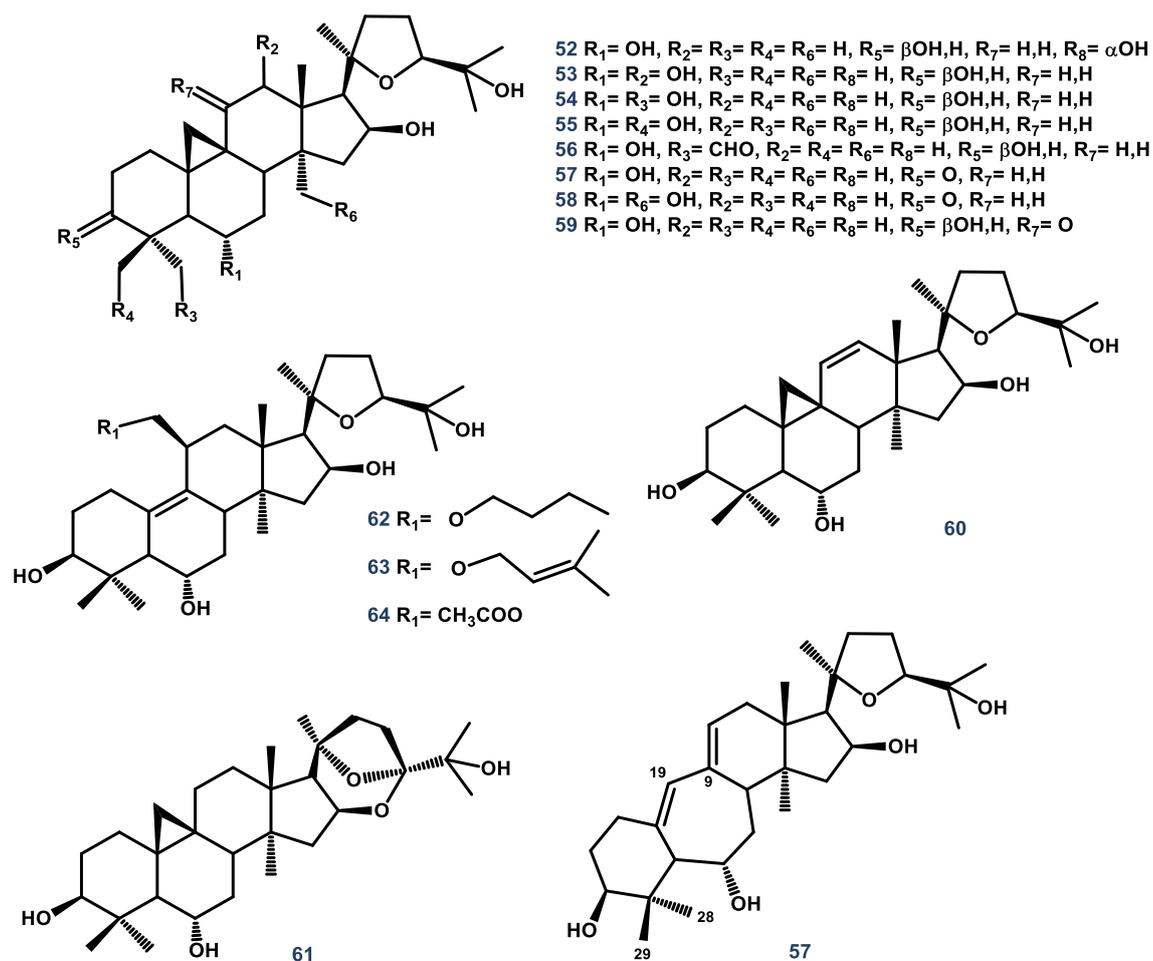


Figura 3.36. Metabolitos de biotransformación de **50** con *C. elegans* (AS 3.1207), *S. racemosum* (AS 3.264), y *D. stemonitis* (AS 3.1411)

El ácido nigranico (**65**) es un seco-cicloarteno derivado en el anillo A aislado de plantas del género *Schisandra*, al cual se le atribuyen una gran cantidad de actividades biológicas, entre las que destacan citotoxicidad sobre linfoblastos y células HeLa e inhibición de la retrotranscriptasa del VIH. La biotransformación de **65** con *Caryospora carlicarpa* (YMF 1.01026) generó un nuevo metabolito hidroxilado en C6, ácido 6β-hidroxinigranico (**66**).²²⁸ La biotransformación del mismo sustrato con *Gliocladium roseum* (YMF 1.00133) permitió la obtención de tres nuevos metabolitos polares, ácido 15β-hidroxinigranico (**67**), ácido 6α,15β-dihidroxinigranico (**68**) y ácido 7β,15β-dihidroxinigranico (**69**).²²⁹

²²⁸ Don, J. Y.; Chen, Y. G.; Song, H. C.; He, Y. P.; Li, L.; Zhong, Y. P.; Zhu, Y. H.; Cao, J.; Wang, L.; Zhang, K. Q. *Chin. Chem. Lett.* **2007**, *18*, 165-167.

²²⁹ Don, J. Y.; Chen, Y. G.; Song, H.; Zhu, Y.; Zhou, Y.; Li, L.; He, Y.; Cao, J.; Zhang, K. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 112-117.

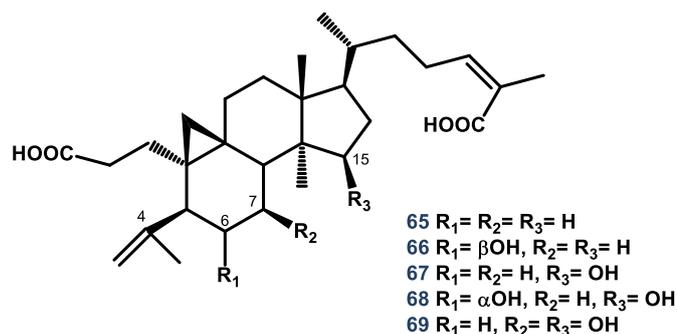


Figura 3.37. Sustratos obtenidos en la biotransformación del ácido Nigranoico (**65**)

Por otro lado, la incubación de **65** con *Trichoderma sp.* (JY-1)²³⁰, da lugar a la obtención de ácido 15 α ,16 α -dihidroxi-3,4-secocicloarta-4(28),17(20),17(*E*),24(*E*)-trien-3,26-dioico (**70**) y ácido 16 α ,20 α -dihidroxi-18(13 \rightarrow 17 β)abeo-3,4-secocicloarta-4(28),12(13),24(*Z*)-trien-3,26-dioico (**71**). Biogenéticamente pueden explicarse si suponemos que en ambos casos ocurre primero la hidroxilación y después tiene lugar la deshidratación (**70**) y la migración del metilo (**71**).

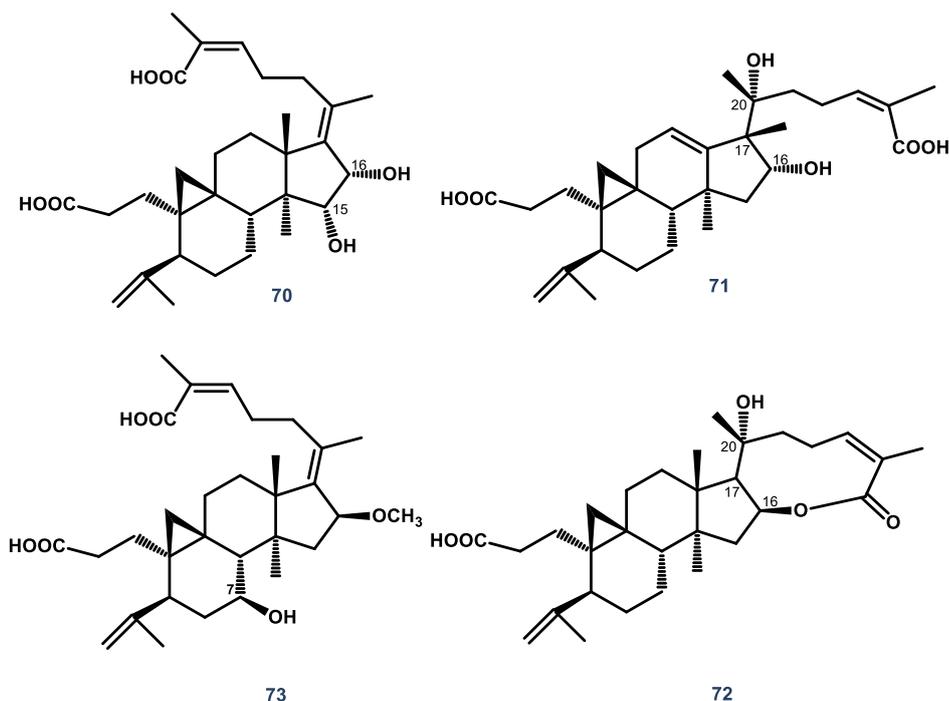


Figura 3.38. Biotransformación de ácido Nigranoico (**65**) con *Trichoderma sp.*

Recientemente se ha puesto de manifiesto la biotransformación de **65** con un hongo de agua dulce, *Dictyosporium heptasporum* YMF1.01213²³¹ que provoca oxidaciones en las posiciones C-7, C-16, C-17 y C-20, aislándose como consecuencia ácido 3,4-secocicloarta-

²³⁰ Yang, Y.; Sun, R.; Song, H.; Xu, Y.; Yang, P.; Yang, D.; Shen, Z.; Wang, A.; Chen, Y.; Dong, J. *Phytochem. Lett.* **2012**, *5*, 123-127.

²³¹ Sunab, R.; Songb, H. C.; Yanga, Y. H.; Yanga, P.; Yanga, D. Y.; Shena, K. Z.; Xua, Y. B.; Gaoa, Y. X.; Chenc, Y. G.; Donga, J. Y. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2013**, *15*, 433-440.

4(28),17(20),24(Z)-trien-7 β -hidroxi-16 β ,26-lactona-3-oico (**72**) y ácido 3,4-secocicloarta-4(28),17(20)(Z),24(Z)-trien-7 β -hidroxi-16 β -metoxi-3,26-dioico (**73**).

3.5.2.4 Esqueleto de curcubitano

Las cucurbitáceas (*Cucurbitaceae*) son una familia de plantas originarias en su mayor parte de América, normalmente herbáceas, de las cuales muchas poseen gran importancia etnobotánica; incluye los zapallos (*Cucurbita*), el melón (*Cucumis melo*), el pepino (*Cucumis sativus*), la sandía (*Citrullus lanatus*) y la calabaza vinatera o porongo (*Lagenaria siceraria*). Todas las cucurbitáceas contienen cucurbitacinas, que dan a sus frutos un sabor extremadamente amargo, y los hace tóxicos a mamíferos, provocando vómitos, cólicos, diarreas. Las cucurbitacinas son, por definición, triterpenos altamente oxigenados, con un esqueleto biogénicamente común 19(10 \rightarrow 9 β)-abeo-10 α -lanostano (cucurbitano), que se puede encontrar libre o glicosilado. Las primeras agliconas aisladas con esqueleto cucurbitano recibieron como nombre la palabra cucurbitacina seguida de una letra, de acuerdo con la cronología del aislamiento o elucidación estructural de la misma.

De esta forma y como puede observarse en la figura 3.39, la biotransformación del 2-O- β -D-glucosido de cucurbitacina E (**74**) por *Curvularia lunata* (NRRL 2178) dio lugar a cucurbitacina E (**75**) y a otros tres nuevos metabolitos, los isómeros (24R)- y (24S)-hidroxi-23,24-dihidro-cucurbitacina E (**76**, **77**) y un derivado 3-acetoxi-3-metilbutilester del ácido (23,27)-penta-nor-cucurbitacina I-22-oico (**78**). Esto puede sugerir que la primera etapa en la secuencia de biotransformación es una glucólisis, seguida de biotransformaciones secundarias únicamente en la ramificación existente en el esqueleto de cucurbitano.²³²

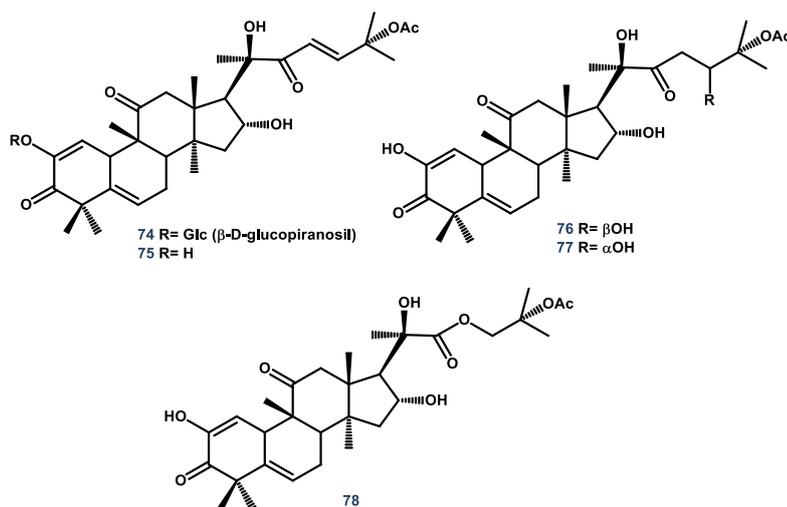


Figura 3.39. Metabolitos de biotransformación de 2-O- β -D-glucosido de Cucurbitacina E (**74**)

²³² Maatoq, G.; El-Sharkawy, S.; Affi, M. S.; Rosazza, J. P. N. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 165-171.

3.5.2.5 Esqueleto de dammarano

La hidroxilasa esteroideal bacteriana CYP106A2 aislada de *Bacillus megaterium* (ATCC 13368) es capaz de hidroxilar una gran variedad de 3-oxo- Δ^4 -esteroides y recientemente se ha demostrado su capacidad para hidroxilar regioselectivamente diterpenos como el ácido abiético, así como triterpenos pentacíclicos como es el ácido 11-ceto- β -boswélico dando lugar a su derivado 15 α -hidroxilado²³³. Debido a que no se conoce el sustrato natural de esta enzima, el grupo de Schmitz et al.²³⁴ llevó a cabo un *screening* sobre 502 productos, de los cuales únicamente 12 fueron hidroxilados por la enzima, entre ellos los triterpenos dipterocarpol (**79**) y betulina. El sustrato **79** que al presentar similitudes estructurales con los compuestos activos del ginseng tiene una aplicabilidad biotecnológica importante, fue hidroxilado por la enzima obteniéndose un 7 β -hidroxiderivado (**80**) y un 7 β ,11 α -dihidroxiderivado (**81**), tal como puede verse en la figura 3.40.

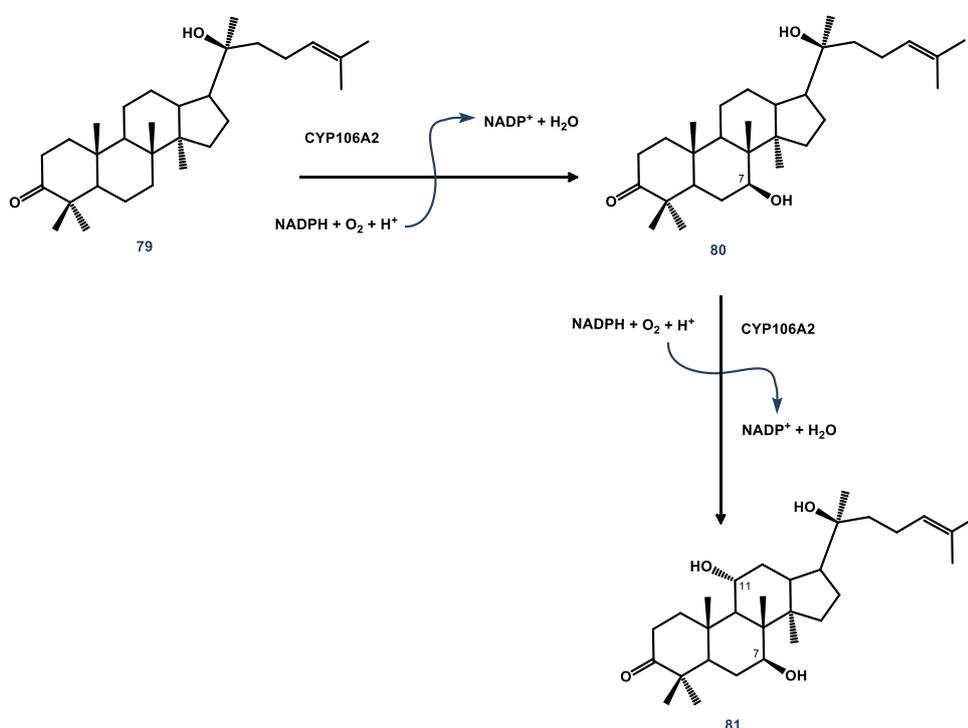


Figura 3.40. Hidroxilación de Dipterocarpol (**79**) catalizada por la enzima CYP106A2 aislada de *B. megaterium*

Los ginsenósidos o panaxósidos, son unos de los metabolitos secundarios más importantes aislados de *Panax ginseng* (Ginseng), que se caracterizan por tener actividades farmacológicas como antitumorales, hepatoprotectores, estimulantes vasomotores y del sistema nervioso, etc. Los principales ginsenósidos son glicósidos cuyo aglicón posee esqueleto de dammarano. En los últimos años, la aplicabilidad de las biotransformaciones sobre estos sustratos se ha dirigido a estudiar sus rutas biogénicas de los mismos, así como tratar de degradar las saponinas existentes en otras más pequeñas que pueden ser a su vez mucho más potentes

²³³ Bleif, S.; Hannemann, F.; Zapp J.; Hartmann, D.; Jauch, J.; Bernhardt, R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 1135-1146.

²³⁴ Schmitz, D.; Zapp, J.; Bernhardt, R. *FEBS J.* **2012**, *279*, 1663-1674.

Así, *Rhizopus stolonifer* (AS 3.822) generó los ginsenósidos Rd (**83**), Rg₃ (**84**) y Rh₂ (**85**) a través de las sucesivas deglicosidaciones en C20 y C3,²³⁵ mientras que *Microbacterium sp.* (GS514) generó únicamente los ginsenósidos Rd (**83**) y Rg₃ (**84**) en un periodo corto de tiempo (8h).²³⁶ La misma incubación de **82** con *Curvularia lunata* (AS 3.1109) produjo un buen rendimiento del metabolito **83** y un nuevo ginsenósido **86** como resultado de una reacción de hidratación del doble enlace.²³⁵

Si biotransformamos ginsenósido Rb₁ con *Bifidobacterium sp.* (Int57), *Bifidobacterium sp.* (SJ32), *Aspergillus niger* o *Aspergillus usami*²³⁷, *Caulobacter leidyia* (GP45)²³⁸, y *Leuconostoc mesenteroides* (DC102)²³⁹ se forma ginsenósido K (**87**) vía ginsenósidos Rd (**83**) y F₂ (**88**). Sin embargo, *Lactobacillus delbrueckii* y *Leuconostoc paramesenteroides* transformaron ginsenósido Rb₁ en Rh₂ (**85**) a través de los intermedios Rd (**83**) y F₂ (**88**).²³⁹ Asimismo, *Bifidobacterium sp.* (SH5) transformó el mismo sustrato en ginsenósido F₂ (**88**) vía ginsenósido Rd (**83**), mientras que *Intrasporangium sp.* (GS603) generó ginsenósido F₂ vía gipenósido XVII (**89**).²⁴⁰ Además, la biotransformación de **83** con las cepas *Burkholderia pyrrocinia* (GP16), *Bacillus megaterium* (GP27) y *Sphingomonas echinoides* (GP50) dan lugar al metabolito **84**, farmacológicamente menos activo y con una conversión máxima en 48 horas.²⁴¹

La fermentación de ginsenósido Rb₁ (**82**) con *Acremonium strictum* (AS 3.2058) además de generar los ya mencionados Rd (**83**), Rg₃ (**84**), F₂ (**88**), K (**87**), y gipenósido XVII (**89**), generó tres nuevos metabolitos, 12β-hidroxi-dammar-3-ona-20(S)-O-β-D-glucopiranosido (**90**), 12β,25-dihidroxi-dammar-(E)-20(22)-en-3-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosido (**91**) y 12β,20(R)-trihidroxi-dammar-3-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosido (**92**).²⁴²

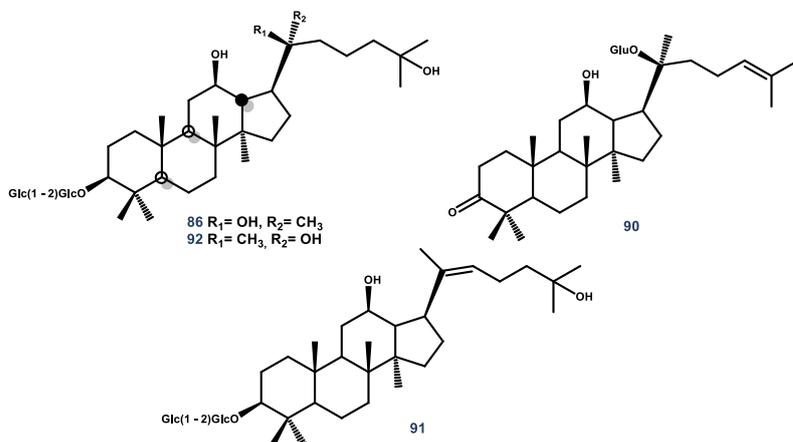


Figura 3.42. Metabolitos de biotransformación de Ginsenosido Rb₁ (**82**)

²³⁵ Dong, A.; Ye, M.; Guo, H.; Zheng, J.; Guo, D. *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 339-344.

²³⁶ Chem, L.; Na, J. R.; Bang, M. H.; Kim, M. K.; Yang, D. *Phytochemistry* **2007**, *69*, 218-224.

²³⁷ Chi, H.; Ji, G. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 218-224.

²³⁸ Cheng, L.; Kim, M. K.; Bang, M.; Yang, D. *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 1121-1127.

²³⁹ Quan, L.-H.; Piao, J.-Y.; Min, J.-W.; Kim, H.-B.; Kim, S.-R.; Yang, D.-U.; Yang, D. C. *J. Ginseng Res.* **2011**, *35*, 344-351.

²⁴⁰ Cheng, L.; Na, J.; Kim, M. K.; Bang, M.; Yang, D. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *17*, 1937-1943.

²⁴¹ Kim, M. K.; Lee, J. W.; Lee, K. Y.; Yang, D. *J. Microbiol. (Seoul, Republic of Korea)*, **2005**, *43*, 456-462.

²⁴² Chen, G.; Yang, M.; Song, Y.; Lu, Z.; Zhang, J.; Huang, H.; Wu, L.; Guo, D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *77*, 1345-1350.

En cuanto a las saponinas derivadas del protopanaxatriol (su esqueleto posee cuatro grupos hidroxilo), las más representativas son los ginsenósidos Re (**93**) y Rg₁ (**94**) cuyas vías de transformación más usuales, pueden observarse en la figura 3.43,

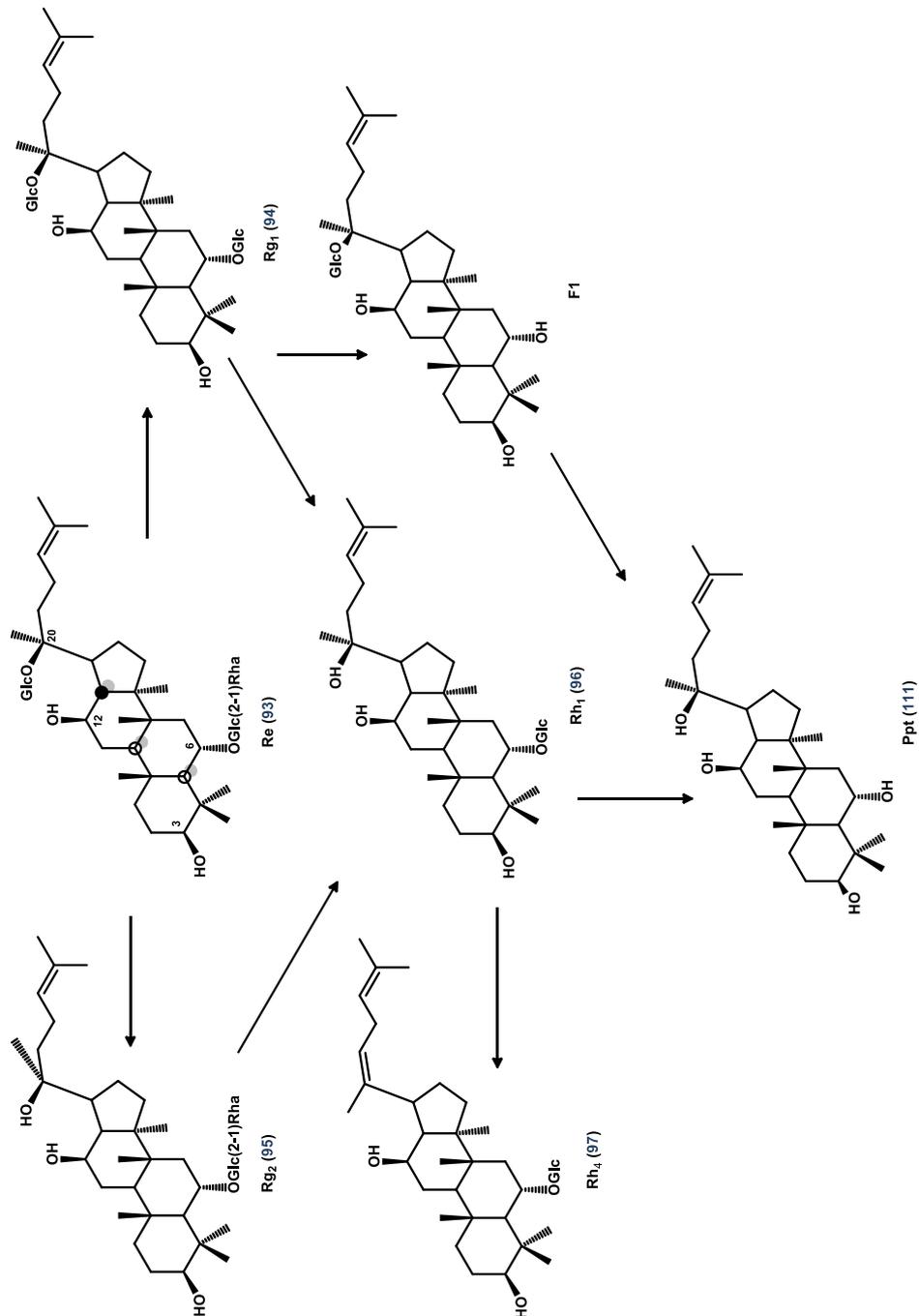


Figura 3.43. Vías de biotransformación de ginsenósidos derivados del Protopanaxatriol

De esta forma, *Bifidobacterium* sp. (Int57) y *Bifidobacterium* sp. (SJ32) actúan sobre ginsenósido Re (**93**) hidrolizando primero el enlace β -glicosídico existente en C-20 dando lugar al ginsenósido Rg₂ (**95**), el cuál es posteriormente transformado en Rh₁ (**96**) por una sucesiva pérdida de ramnosa en C6. Sin embargo, la cepa *Aspergillus usamii* únicamente es capaz de llevar a cabo la conversión de ginsenósido Re (**93**) en ginsenósido Rg₂ (**95**). A su vez, *Aspergillus niger* efectúa

la conversión de **93** en **96** pero a diferencia que lo que ocurría con *Bifidobacterium sp.*, existe una inversión en el orden de deglicosidación, hidrolizando primero el azúcar existente en C-6 produciendo ginsenosido Rg₁ (**94**).²³⁷

Por otro lado, la incubación de **93** con *Absidia coerulea* (AS 3.3389) da lugar a ginsenosido Rh₄ (**95**), 3 β ,12 β ,25-trihydroxidammar-(*E*)-20(22)-en-6-O- β -D-glucopiranosido (**98**), 20(*S*)-ginsenosido Rh₁ (**96**), 20(*R*)-ginsenosido Rh₁ (**97**), una mezcla de 25-hidroxi-20(*S*)-ginsenosido Rh₁ y su epímero C20 (*R*) (**98**), 20(*S*)-ginsenosido Rg₂ (**89**), 20(*R*)-ginsenosido Rg₂ (**100**), 3 β ,12 β ,25-trihydroxidammar-(*E*)-20(22)-en-6-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosido (**101**) y 3 β ,12 β ,20,25-tetrahydroxidammaran-6-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosido (**102**).²⁴³

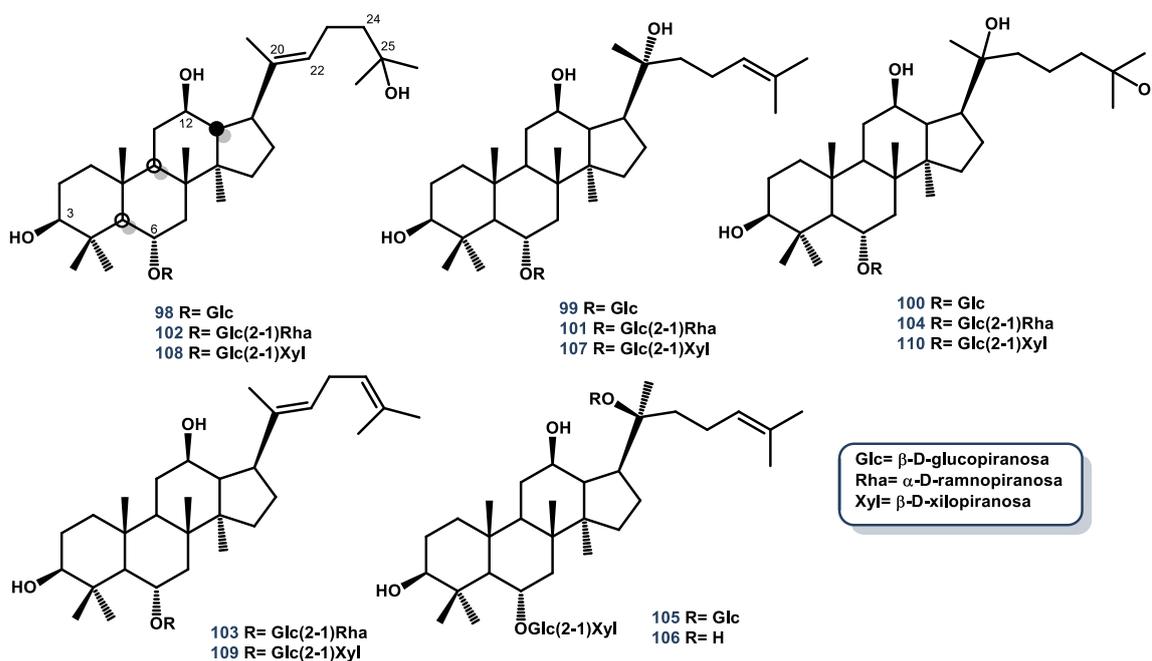


Figura 3.44. Metabolitos obtenidos en la biotransformación de Ginsenosido Re (**93**) y Notoginsenosido R₁ (**105**)

Aspergillus niger (AS 3.1858) y *Absidia coerulea* (AS 3.3538) transforman eficientemente ginsenosido Re (**93**) a ginsenosido Rh₁ (**97**).²⁴⁴

El grupo de Chen, G. et al.²⁴³, profundizó más exhaustivamente de la biotransformación de ginsenosido Rg₁ (**94**) con *Absidia coerulea* (AS 3.3389) y completó su estudio obteniendo cinco metabolitos (**96-100**) ya aislados en la incubación de ginsenosido Re (**93**).

El notoginsenosido R₁ (**105**) es una de las saponinas derivadas del 20(*S*)-protopanaxatriol que se aíslan de forma abundante en *Panax notoginseng*, otra especie del género *Panax*. También

²⁴³ Chen, G.; Yang, M.; Lu, Z.; Zhang, J.; Huang, H.; Liang, Y.; Guan, S.; Song, Y.; Wu, L.; Guo, D. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1203-1206.

²⁴⁴ Dong, A.; Cui, Y.; Guo, H.; Zheng, J.; Guo, D. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1203-1206.

fue incubado con *Absidia Coerulea* (AS 3.3389), dando lugar a diez metabolitos de los cuales cinco de ellos (**96-100**) fueron aislados en la biotransformación de los ginsenósidos Re (**93**) y Rg₁ (**94**) con el mismo microorganismo. Los otros cinco restantes fueron identificados como 20(*S*)-notoginsenósido R₂ (**106**), 20(*R*)-notoginsenósido R₂ (**107**), 3 β ,12 β ,25-trihidroxidammar-(*E*)-20(22)-en-6-O- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosido (**108**), 3 β ,12 β -dihidroxidammar-(*E*)-20(22),24-dien-6-O- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosido (**109**) y 3 β ,12 β ,20,25-tetrahidroxidammar-(*E*)-6-O- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosido (**110**).²⁴³

Como habíamos comentado, protopanaxatriol (Ppt) y protopanaxadiol (Ppd) son los correspondientes aglicones con esqueleto de dammarano de muchos ginsenósidos, siendo similares a los lanostanos exceptuando que existe un metilo en C-8 en lugar de en C-13. Si llevamos a cabo la biotransformación del 20(*S*)-protopanaxatriol (**111**) con el hongo *Mucor spinosus* (AS 3.3450), se generan diez metabolitos representados en la figura 3.45 e identificados como 12-oxo-15 α -hidroxi-20(*S*)-protopanaxatriol (**112**), 27-hidroxi-20(*S*)-protopanaxatriol (**113**), 12-oxo-26-hidroxi-20(*S*)-protopanaxatriol (**114**), 12-oxo-27-hidroxi-20(*S*)-protopanaxatriol (**115**), 12-oxo-23 β -hidroxi-20(*S*)-protopanaxatriol (**116**), 20*S*,24*R*-epoxi-dammaran-3 β ,6 α ,25-triol-12-ona (**117**), 29-hidroxi-20(*S*)-protopanaxatriol (**118**), 12-oxo-11 β -hidroxi-20(*S*)-protopanaxatriol (**119**), 28-hidroxi-20(*S*)-protopanaxatriol (**120**) y 12-oxo-20(*S*)-protopanaxatriol (**121**).²⁴⁵

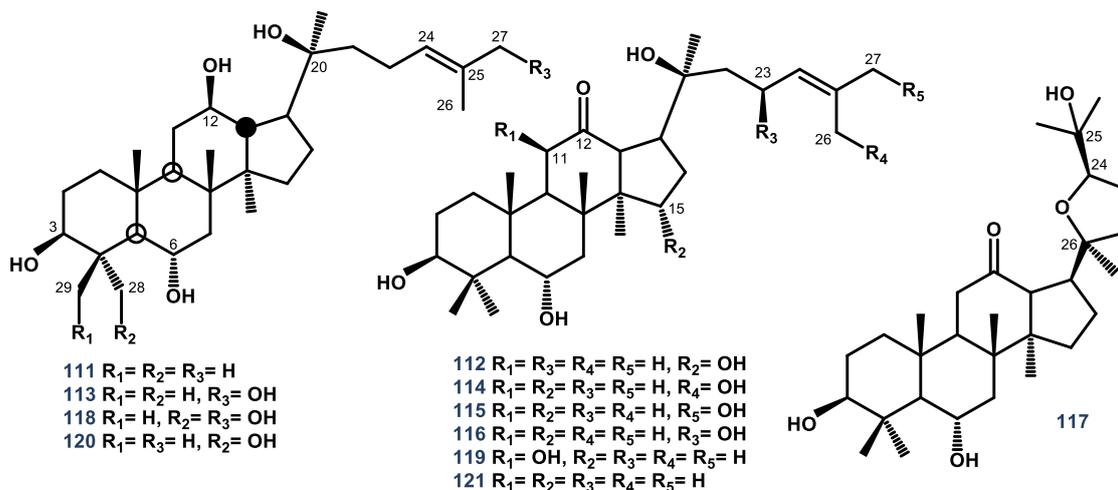


Figura 3.45. Metabolitos de biotransformación del 20(*S*)-protopanaxatriol (**111**)

Los estudios in vitro de estos metabolitos han demostrado que la carbonilación en C-12 y la hidroxilación en C-28 y C-29 incrementan la actividad citotóxica de los mismos, mientras que la hidroxilación en C-11, C-15, C-23, C-27 o C-28 la reducen considerablemente.

La transformación microbiológica con *Mycobacterium sp.* (NRRL B-3805) de 20(*R*)-dihidroprotopanaxadiol (**122**), obtenido a partir del ginsenósido Rb₁ (**82**) generó un 24.7% de 3-oxo-20(*R*)-dihidroprotopanaxadiol (**123**) y un 1.4% de 3-oxo-25-hidroxi-20(*R*)-

²⁴⁵ a) Tian, Y.; Guo, H.; Han, J.; Guo, D. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 678-680; b) Zhang, J.; Guo, H.; Tian, Y.; Liu, P.; Li, N.; Zhou, J.; Guo, D. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2523-2530.

dihidroprotopanaxadiol (**124**). De la misma forma, la biotransformación de la mezcla 20(*S*)- (**127**) y 20(*R*)-dihidroxi-protopanaxatriol (**126**), obtenidos a partir del ginsenósido Rg₁ (**94**) con el mismo microorganismo produjo también los correspondientes 3-oxo- (**127**) y 3-oxo-25-hidroxi- (**128**) derivados. Finalmente, la incubación de 20(*R*)-hidroxidammaran-3,12-diona (**129**) resultado de la oxidación de **122** con la misma cepa, resultó en tres nuevos metabolitos, 3 β ,20(*R*)-dihydroxidammaran-12-ona (**130**), 20(*R*),24-dihidroxi-propaquisnordammaran-3,12-diona (**131**) y 3 β ,20(*R*),24-trihidroxi-propaquisnordammaran-12-ona (**132**),²⁴⁶ siendo los dos últimos resultado de la escisión parcial de la cadena lateral y a diferencia de lo que ocurría con el lanosterol (**11**) que tendía a formar esteroides C₁₉,²²⁰ no existe degradación de los metilos de los anillos.

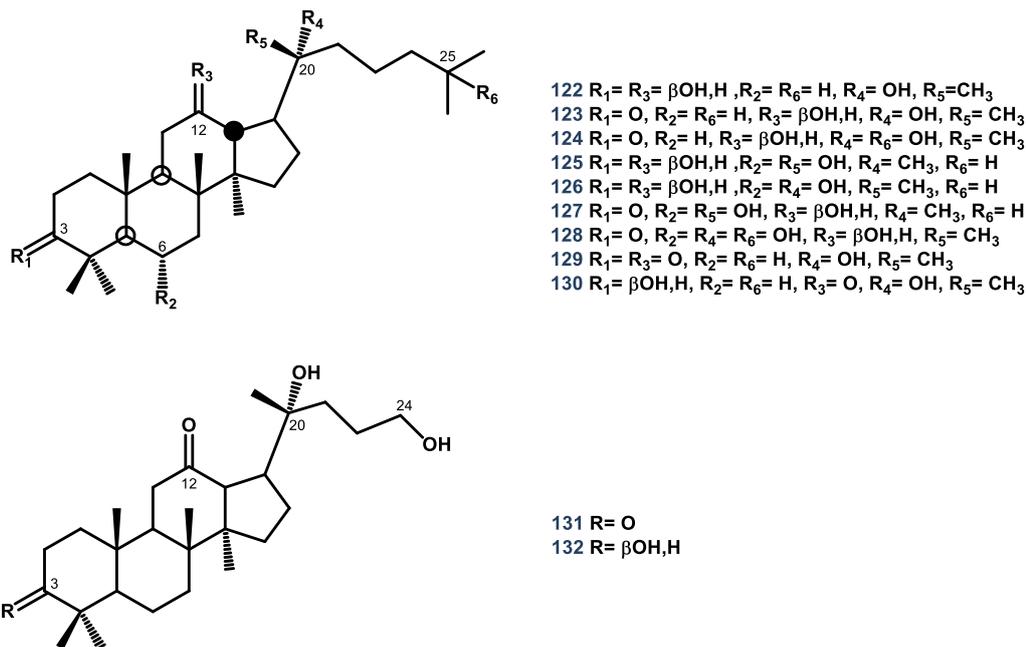


Figura 3.47. Metabolitos obtenidos en la biotransformación de derivados de Protopanaxadiol y Protopanaxatriol

3.5.2.6 Esqueleto de sifolano

Muchos sesqui-, di-, y sesterpenos interesantes habían sido caracterizados de esponjas marinas pero hasta el aislamiento de los sifolanos en 1981 en una esponja del Mar Rojo, *Siphonochalina siphonella*, no habían sido publicados otros triterpenos aparte del escualeno.²⁴⁷ Los sifolanos poseen dos sistemas bicíclicos atípicos, un octahidroazuleno y una *trans*-decahidrobenzooxepina, enlazados entre sí por un puente etileno. De la especie *Callyspongia siphonella*, se aíslan en gran cantidad sifolenol A (**133**) y sifolenona A (**134**) los cuales exhiben actividades biológicas importantes.

La cepa *Mucor ramannianus* (ATCC 9628) es capaz de biotransformar sifolenol A (**133**) en cuatro metabolitos, 9 β -hidroxisifolenol A (**135**), 16-oxosifolenol A (**136**), sifolenol G (**137**) y 28-

²⁴⁶ Wang, K. C.; Wang, P.; Lee, S. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1236-1241.

²⁴⁷ Shmueli, U.; Carmely, S.; Groweiss, A.; Kashman, Y. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 709.

hidroxisifolenol A (**138**). Por otro lado, *Cunninghamella elegans* (ATTC 7929) transforma sifolenona A (**134**) en 22-hidroxi-16-oxo-sifolenona A (**139**) y 15 β ,16 β -epoxi-22-hidroxisifolenona A (**140**).²⁴⁸

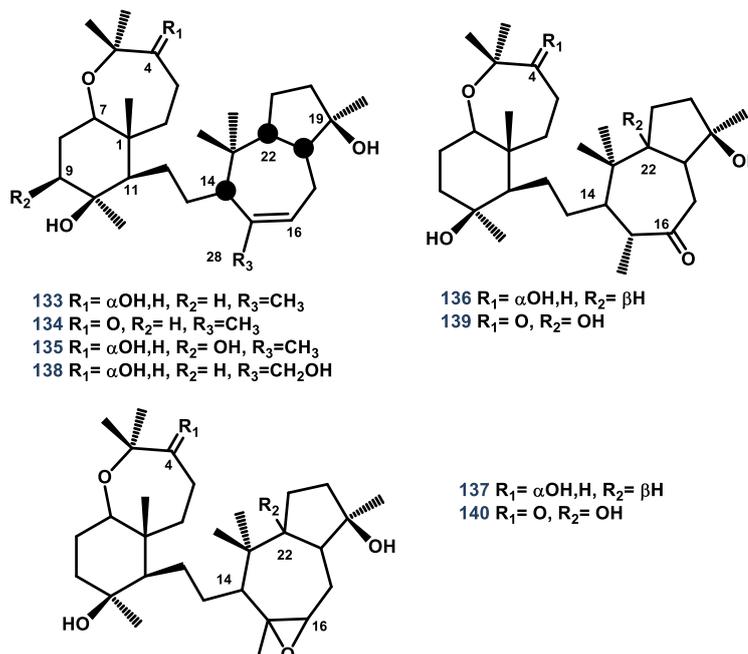


Figura 3.48. Metabolitos de biotransformación de Sifolenol A (**133**) y Sifolenona A (**134**)

3.5.3 Triterpenos pentacíclicos

3.5.3.1 Esqueleto de oleanano

La diversidad estructural de los triterpenos pentacíclicos de tipo oleanano se atribuye principalmente a la sustitución de grupos hidroxilo o carbonilo de los carbonos metílicos y metilénicos del esqueleto y la formación de los glicósidos correspondientes²⁴⁹ y además, la presencia de ciertos grupos funcionales especialmente en C-3, C-28 y C-30 es esencial para la actividad biológica de los mismos.²⁵⁰

El ácido glicirretínico (**141**), también conocido como ácido glicirrético o ácido 18 β -glicirretínico, es el aglicón de muchas saponinas aisladas del regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) y otras especies del género *Glycyrrhiza*. Dicho ácido y sus correspondientes derivados presentan un gran número de actividades farmacológicas entre las que cabe destacar actividad antiinflamatoria, antiulceroso y anticancerígeno. Además es conocido como expectorante al aumentar la producción de secreciones bronquiales por irritación de la mucosa bronquial y por actuar como mineralocorticoide, ya que inhibe de forma temporal en un primer momento a la 11- β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa renal, disminuyendo la degradación de cortisol a cortisona. El

²⁴⁸ Jain, S.; Shirole, A.; Yacoub, S.; Barbo, A.; Sylvester, P. W.; Huntimer, E.; Halaweish, F.; El Sayed, K. A. *Planta Med.* **2007**, *73*, 591-596.

²⁴⁹ Joseph, D. C.; Robert, A. H. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 79-132.

²⁵⁰ a) Nick, A.; Wright, A. D.; Rali, T.; Sticher, O. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1691-1695; b) Recio, M. C.; Giner, R. M.; Manez, S.; Rios, J. L. *Planta Med.* **1995**, *61*, 182-185; c) Sakurawi, K.; Yasuda, F.; Tozjo, T.; Nakamura, M.; Sato, T.; Kikuchi, J.; Terui, Y.; Ikenishi, Y.; Iwata, T.; Takahashi, K.; Konoike, T.; Mihara, S.; Fujimoto, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 343-351.

cortisol se une a los receptores de aldosterona ejerciendo efectos similares. Parece que tras un periodo de tiempo, el ácido glicirrético se une directamente a los receptores de aldosterona, continuando la acción.

La biotransformación de **141** con *Curvularia lunata* (ATCC 13432)²⁵¹ y *Mucor spinosus* (AS 3.3450)²⁵² dio lugar a la obtención del ácido 7 β -hidroxiglicirretínico (**142**) como producto mayoritario (figura 3.49). De la misma forma, *Mucor polymorphosporus* también generó mayoritariamente **142** en un 26.8% junto con ácido 15 α -hidroxiglicirretínico (**143**, 18.2%), ácido 24-hidroxiglicirretínico (**144**, 2.7%), ácido 6 β -hidroxiglicirretínico (**145**, 1.3%), ácido 7 α -hidroxiglicirretínico (**146**, 1.4%), ácido 3-oxo-7 β -hidroxiglicirretínico (**147**, 1.1%), ácido 3-oxo-15 α -hidroxiglicirretínico (**148**, 0.9%).²⁵³ Por otro lado, la incubación con *Trichothecium roseum* (ATCC 8685) además de generar de nuevo la hidroxilación en C-7 y C-15 dando los correspondientes 7 β -hidroxi- (**149**), 15 α -hidroxi- (**150**) y 7 β ,15 α -dihidroxi- (**151**) derivados, asimismo la cepa llevó a cabo la metilación del grupo carboxílico.²⁵⁴ Igualmente, la actuación de *Nocardia* sp. (NRRL 5346) sobre **141** provocó la misma esterificación aislándose glicirretinato de metilo (**152**).²⁵⁵

El tratamiento de ácido glicirretínico (**141**) con *Streptomyces* sp. (G-20) provoca la conversión del mismo en tres nuevos metabolitos, de los cuales el mayoritario se identificó como un 22 α -hidroxi derivado (**153**) y los otros dos minoritarios, como 22 α ,23-dihidroxi- (**154**) y 22 α ,24-dihidroxi- (**155**) derivados.²⁵⁶ Sin embargo, *Chainia antibiótica* (IFO 12.246) convierte el ácido **141** y **153** en tres nuevos 3,4-seco-oleananos, identificados como puede verse en la figura 2.49 como los derivados **156**, **157** y **158**.

²⁵¹ Canonica, L.; Jommi, G.; Pagnoni, U. M.; Pelizzoni, F.; Ranzi, B. M.; Scolastico, C. *Gazz. Chim. Ital.* **1966**, *96*, 820-831.

²⁵² Ma, J.; Xin, X. L.; Zhang, W.; Lan, R.; Liu, J. Y. *Beijing Huagong Daxue Xuebao, Ziran Kexueban*, **2008**, *35*, 79-82.

²⁵³ Xin, X.; Liu, Y.; Ye, M.; Guo, H.; Guo, D. *Planta Med.* **2006**, *72*, 156-161.

²⁵⁴ Canonica, L.; Ferrari, M.; Jommi, G.; Pagnoni, U. M.; Pelizzoni, F.; Ranzi, B. M.; Maroni, S.; Nencini, G.; Salvatori, T. *Gazz. Chim. Ital.* **1967**, *97*, 1032-1051.

²⁵⁵ Zhang, J.; Cheng, Z.; Yu, B.; Cordell, G. A.; Qiu, S. X. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2337-2340.

²⁵⁶ Sakano, K.; Ohshima, M. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 763-766.

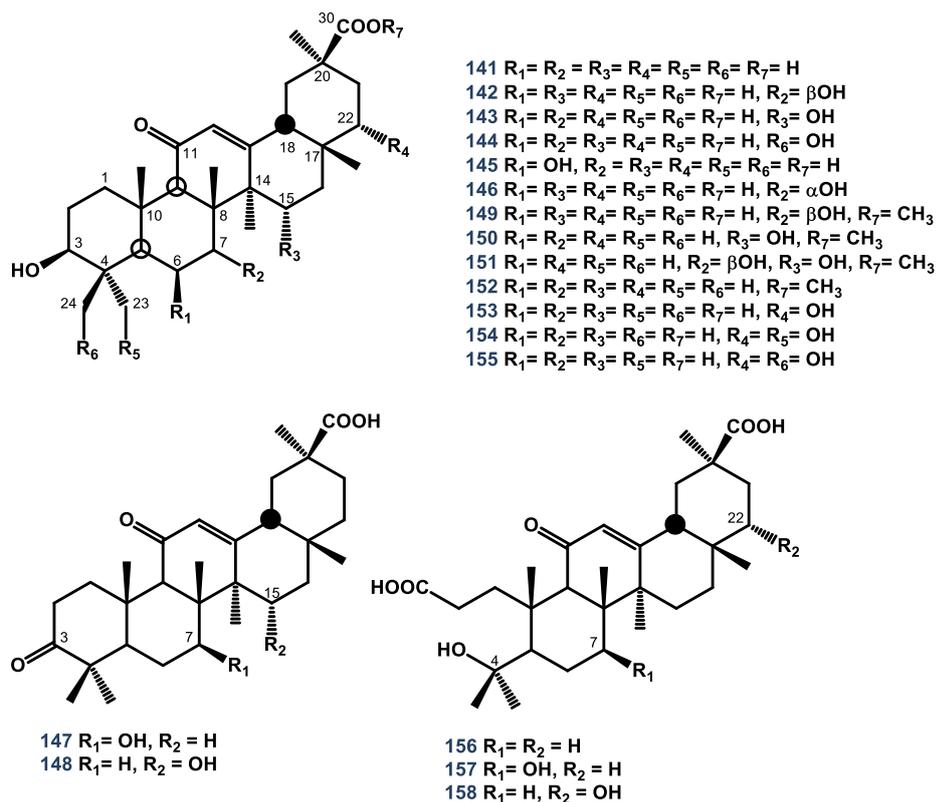


Figura 3.49. Metabolitos de biotransformación del ácido Glicirretínico (**141**)

Para explicar esto, se ha propuesto como vía, la conversión de ácido glicirretínico (**141**) y ácido 22 α -hidroxiciclicirretínico (**148**) en sus correspondientes 3-oxo derivados y su posterior oxidación de los mismos a través de una reacción de Baeyer-Villiger. La consecuente hidrólisis conlleva a la ruptura y formación de las lactonas **156-158**.²⁵⁷

Si biotransformamos ácido glicirretínico (**141**) con *Sphingomonas paucimobilis* (cepa G5) e inducimos la misma adicionando inhibidores de oxigenasas, la consecuencia es la obtención de un nuevo metabolito identificado como ácido 3 β -hidroxi-11-oxoolean-12-en-23,30-dioico (**159**).²⁵⁸ En condiciones normales la cepa provoca la conversión de **141** en ácido 3,4-seco-4,23,24-trinor-11-oxoolean-12-en-3,28,30-trioico (**160**) y podría explicarse a través de la formación de **159** y posterior oxidación y metabolización del mismo hasta **160**.²⁵⁹

²⁵⁷ Sakano, K.; Ohshima, M. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 1239-1245.

²⁵⁸ Yoshida, K.; Furihata, K.; Habe, H.; Yamane, H.; Omori, T. *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1619-1624.

²⁵⁹ Yoshida, K.; Furihata, K.; Yamane, H.; Omori, T. *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 253-258.

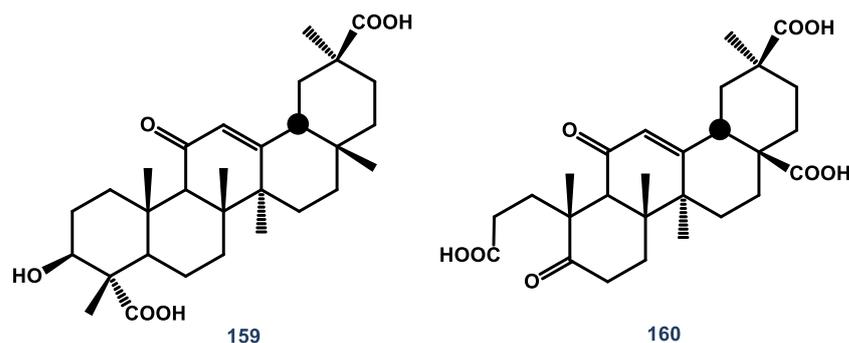


Figura 3.50. Metabolitos de biotransformación de **141** con *Sphingomonas paucimobilis* (cepa G5)

Se han descrito las biotransformaciones parciales de ácido 18 α -glicirretínico (**161**), ácido liquirrítico (**162**), que se corresponden a los epímeros en C-18 y/o C-20 del ácido glicirretínico (**141**), con las cepas *Curvularia lunata* (ATCC 13432), *Trichothecium roseum* (ATCC 8685), *Cunninghamella* (ATCC 3229), *Mucor griseo-cyanus* (ATCC 1207-a) y *Helicostylum piriforme* (ATCC 8992) en sus correspondientes 7 β -hidroxi derivados (**163** y **164** respectivamente), 15 α -hidroxi derivados (**165-166** respectivamente) así como sus 7 β ,15 α -dihidroxi derivados (**167** y **168** respectivamente). Además la conversión del epímero en C-18 de **162**, el ácido 18 α -liquirrítico (**169**) por *H. piriforme* y *Cunninghamella* dio también su correspondiente 7 β -hidroxi derivado (**170**), mientras que con *T. roseum* se obtuvo su 7 β ,15 α -dihidroxi derivado (**171**).²⁶⁰

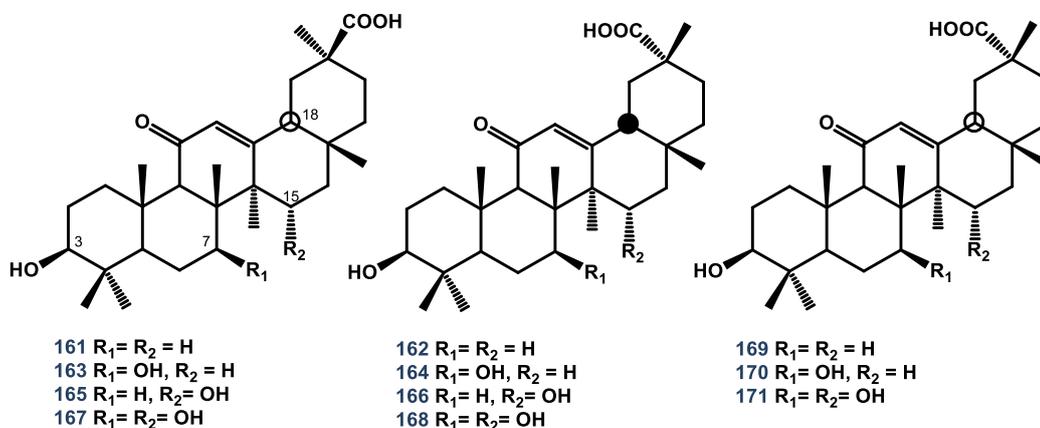


Figura 3.51. Metabolitos de biotransformación de epímeros de ácido Glicirretínico (**141**)

Además del ácido **141** anteriormente descrito, se aísla mayoritariamente de la especie *Glycyrrhiza glabra* una saponina triterpénica conocida como glicirricina (**172**) que tiene propiedades edulcorantes, antiinflamatorias, expectorantes y aumenta la secreción de mucus originando así a nivel gastrointestinal una acción antiácida y antiulcerosa. Conjuntamente tiene efectos mineralocorticoides indirectos y es este su principal efecto secundario. También inhibe el metabolismo del cortisol, y tiene cierta acción bacteriostática y antiviral y es utilizado en la industria

²⁶⁰ Ferrari, M.; Pagnoni, U. M.; Pelizzoni, F.; Ranzi, B. M.; Salvatori, T. *Gazz. Chim. Ital.* **1969**, 99, 848-862.

del tabaco como saborizante. Como muestra la figura 2.51, *Cryptococcus magnus* (MG-27) es capaz de hidrolizar selectivamente el enlace β terminal que une ambas moléculas de ácido glucurónico en **172** dando como consecuencia en un 95% al ácido 3-O-mono- β -D-glucuronil-glicirretínico (**173**) que es un potente edulcorante.²⁶¹ Por otro lado, si biotransformamos glicirrinato de amonio (**174**) con *Aspergillus terreus* inmovilizado obtenemos ácido glicirretínico como tal (**141**, 21.71%) y un porcentaje mínimo del mismo con el grupo alcohólico oxidado en C3 (**175**, 4.06%).²⁶²

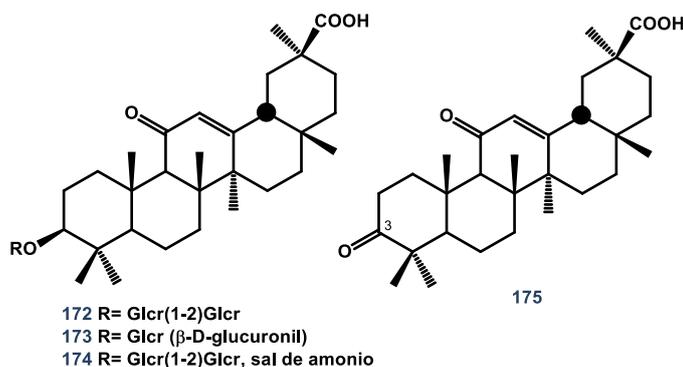


Figura 3.52. Metabolitos de biotransformación de Glicirricina (**172**) y otros derivados

Como se ha detallado en el apartado 2 de la Introducción de la presente Memoria, el ácido oleanólico (**176**) es un triterpenoide que existe ampliamente en el reino vegetal como ácido libre o como aglicón de ciertas saponinas triterpénicas. Debido a su multitud de propiedades biológicas ha sido muy estudiado y consecuentemente biotransformado. La incubación de este ácido (**176**) con *Cunninghamella blakesleeana* dio lugar al aislamiento de seis metabolitos diferentes identificados como ácido 3 β -hidroxiolean-11,13(18)-dien-28-oico (**177**), ácido 3 β ,7 β -dihidroxiolean-12-en-28-oico (**178**), ácido 3 β -hidroxi-11-oxoolean-12-en-28-oico (**179**), ácido 3 β ,7 β -dihidroxiolean-11,13(18)-dien-28-oico (**180**), 3 β ,7 β ,13 β -trihidroxiolean-12-en-28,13-lactona (**181**) y ácido 1 β ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oico (**182**).²⁶³ La biotransformación del mismo sustrato (**176**) con *Fusarium lini*, además de generar los metabolitos **177** y **179**, produjo la formación de un derivado α -hidroxilado en C-15 (**183**) y una lactona (oleanderolida, **184**).²⁶⁴ Por otro lado, la incubación de **176** con *Penicillium chrysogenum* dio lugar a los correspondientes 21 β -hidroxi (**185**), 21-oxo (**186**), 3-oxo-21 β -hidroxi (**187**), 3,21-dioxo (**188**) derivados.²⁶⁵ Cuando es llevada a cabo con *Colletotrichum phomoides*, se obtiene el metabolito 21 β -hidroxi (**185**) junto con los 6 β -hidroxi (**189**) y 6 β ,21 β -dihidroxi (**190**) derivados.²⁶⁶

²⁶¹ Kuramoto, T.; Ito, Y.; Oda, M.; Tamura, Y.; Kitahata, S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 455-458.

²⁶² El-Minofi, H. A. *Afr. J. Mycol. Biotechnol.* **2005**, *13*, 49-58.

²⁶³ Hikino, H.; Nabetani, S.; Takemoto, T. *Yakugaku Zashi* **1969**, *89*, 809-813.

²⁶⁴ Hikino, H.; Nabetani, S.; Takemoto, T. *Yakugaku Zashi* **1972**, *92*, 1528-1533.

²⁶⁵ Hikino, H.; Nabetani, S.; Takemoto, T. *Yakugaku Zashi* **1971**, *91*, 637-640.

²⁶⁶ Hikino, H.; Nabetani, S.; Takemoto, T. *Yakugaku Zashi* **1972**, *92*, 891-895.

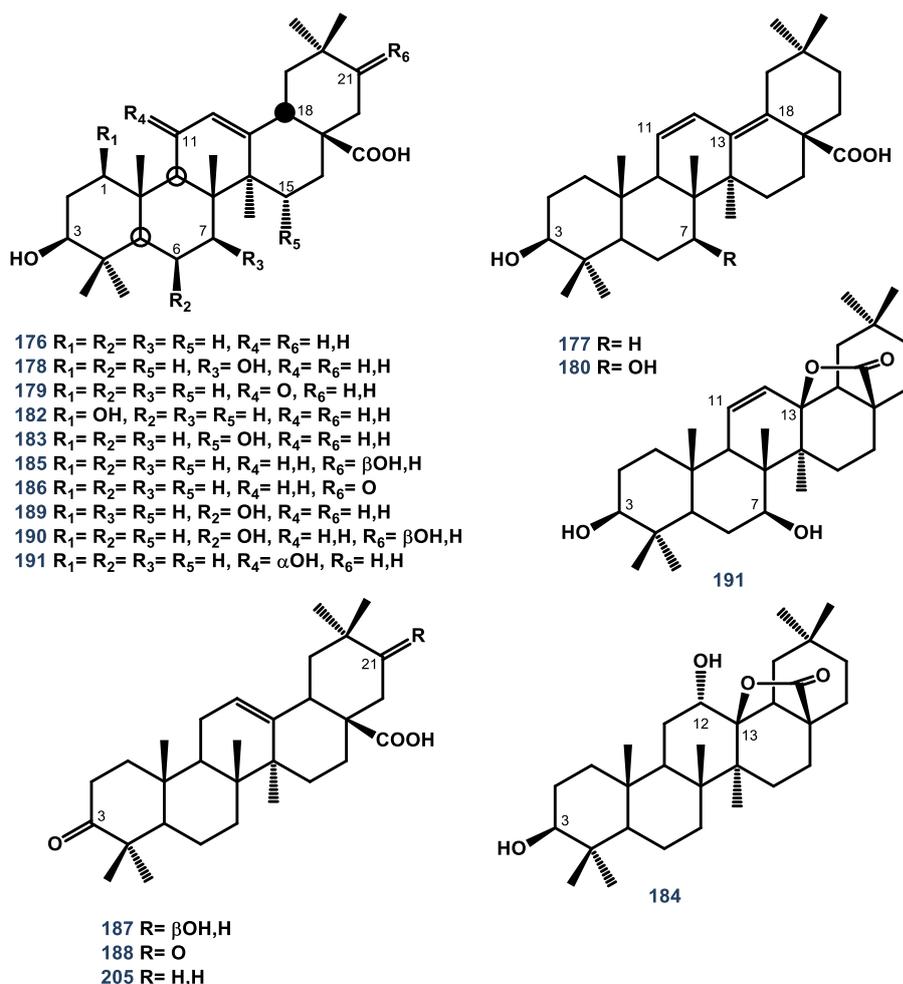


Figura 3.53. Metabolitos de biotransformación del ácido Oleanólico (176)

Como puede verse en la figura 3.53, *Aspergillus ochraceus* (NG1203) en cambio, sólo es capaz de generar un 11 α -hidroxi (191) derivado a partir de 176.²⁶⁷

Por otro lado la transformación microbiológica de 176 con *Alternaria longipes*²⁶⁸ generó seis metabolitos identificados como ácido 28-O-(β -D-glucopyranosil)-2 α ,3 α ,19 α -trihidroxiursólico (192), ácido 28-O-(β -D-glucopiranosil)-2 α ,3 β ,19 α -trihidroxiursólico (193), oleanato de 28-O- β -D-glucopiranosilo (194), ácido 3-O-(β -D-glucopyranosil)-oleanólico (195), ácido 3,28-O-di-(β -D-glucopiranosil)-oleanólico (196), ácido 28-O-(β -D-glucopiranosil)-2 α ,3 β ,19 α -trihidroxioleanólico (197) mientras que la misma biotransformación con *Penicillium adametz*²⁶⁸ únicamente dio lugar a ácido 28-O- β -D-glucopiranosil-21 β -hidroxioleanólico (198), ácido 21 β -hidroxioleanólico (199), y un nuevo compuesto, ácido 7 α ,21 β -dihidroxioleanólico (200). Además se ha comprobado que los metabolitos obtenidos 195, 198 y 200 poseen una fuerte actividad citotóxica frente a células tumorales HeLa.²⁶⁸

²⁶⁷ Wang, J.; Ouyang, J.; Shen, F.; Fan, W. *Shengwu Jiangong Guocheng* **2006**, 4, 51-55.

²⁶⁸ Liu, D.L.; Liu, Y.; Qiu, F.; Gao, Y.; Zhang, J.Z. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2011**, 13, 160-167.

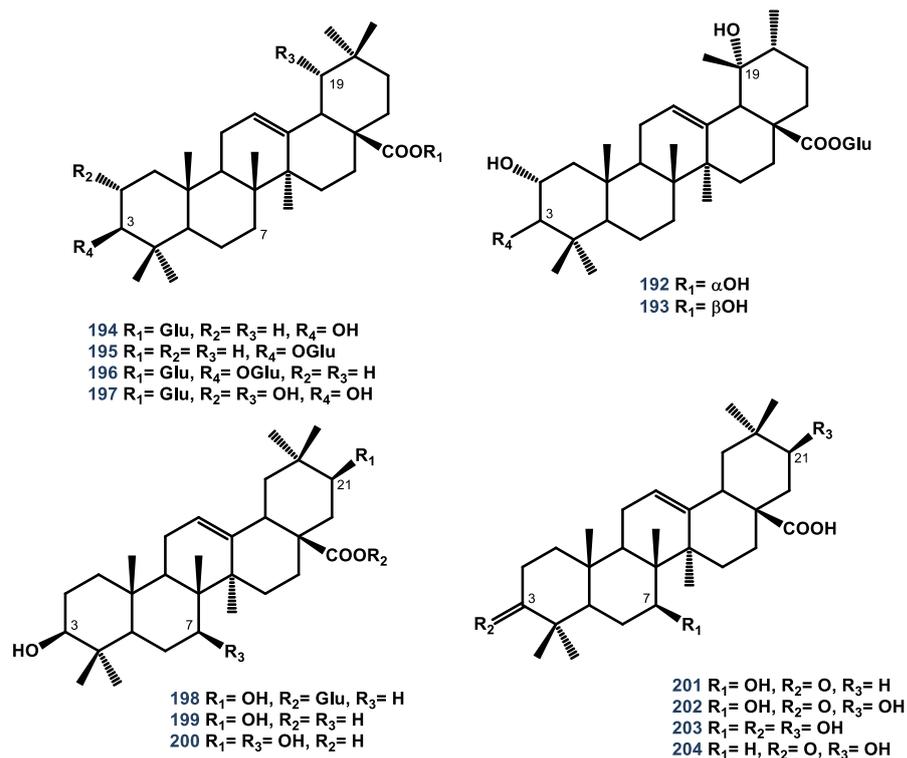


Figura 3.54. Metabolitos de biotransformación de **176** con *A. longipes*, *P. adametzi* y *M. rouxii*

De la misma forma, cuando se incubaba **176** con *Mucor rouxii* (NRRL 1894)²⁶⁹ se obtienen 4 nuevos metabolitos identificados como ácido 7 β -hidroxi-3-oxo-olean-12-en-28-oico (**201**), ácido 7 β ,21 β -dihidroxi-3-oxo-olean-12-en-28-oico (**202**), ácido 3 β ,7 β ,21 β -trihidroxi-olean-12-en-28-oico (**203**), y ácido 21 β -hidroxi-3-oxo-olean-12-en-28-oico (**204**), resultado de la mono-, di- y trihidroxilación por la cara β del sustrato acompañada en algunos casos de la oxidación del grupo alcoholístico de C-3. Esto puede apreciarse en la figura 3.54.

Además de las biotransformaciones con el propio ácido oleanólico (**176**) que hemos descrito, se ha realizado la biotransformación de su derivado oxidado en C-3, el correspondiente ácido 3-oxoolean-12-en-28-oico (**205**) con el hongo *Chaetominium longirostre* (RF-1095) que es capaz de transformarlo por apertura del anillo A en el ácido 4-hidroxi-3,4-seco-olean-12-en-3,28-dioico (**206**) y su correspondiente 21 β -hidroxi (**207**) derivado, tal y como muestra la figura 3.55.²⁷⁰

²⁶⁹ Capel, C. S.; de Souza, A. C. D.; de Carvalho, T. C.; de Sousa, J. P. B.; Ambrósio, S. R.; Martins, C. H. G.; Cunha, W. R.; Galán, R. H.; Furtado, N. A. J. C. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 1493-1498.

²⁷⁰ Shirane, N.; Hashimoto, Y.; Ueda, K.; Takenata, H.; Katoh, K. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 99-104.

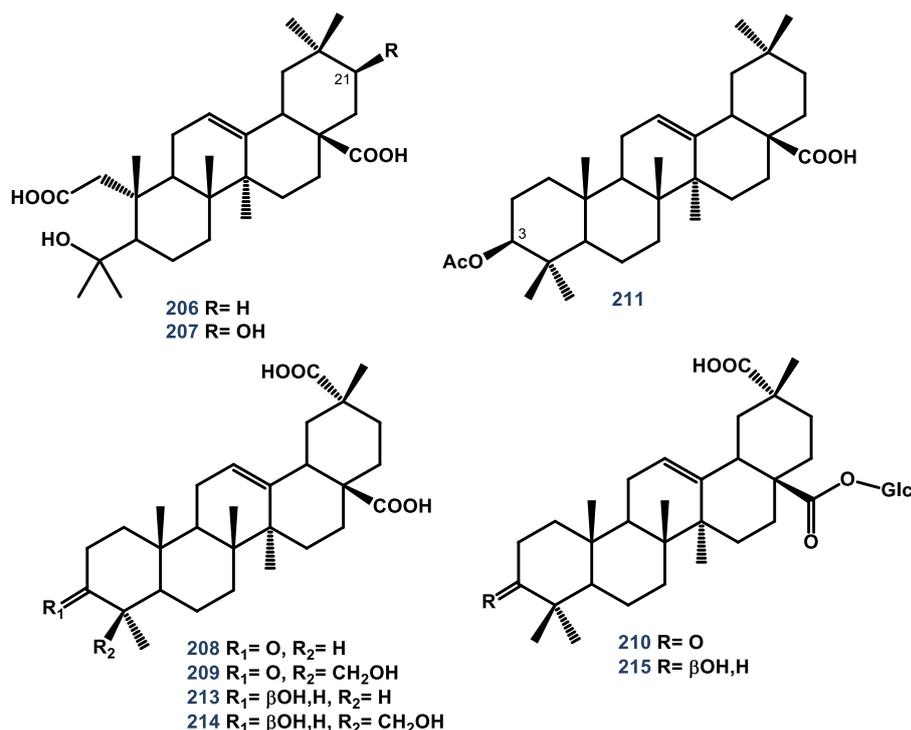


Figura 3.55. Metabolitos de biotransformación de ácido 3-oxoolean-12-en-28-oico (**205**) y derivados

Recientemente, el grupo de Zhu et al., ha llevado a cabo la biotransformación de **205** con *Streptomyces griseus* (ATCC 13273) y con *Aspergillus ochraceus* (CICC 40330), detectando en el primer caso los ácidos 3-oxo-olean-12-en-28,29-dioico (**208**) y 24-hidroxi-3-oxo-olean-12-en-28,29-dioico (**209**) y en el segundo, un único metabolito polar identificado como 28-O- β -D-glucopiranosil-3-oxo-olean-12-en-28-oato (**210**).²⁷¹ Después de observar la oxidación regioselectiva del grupo metílico de C-29 y la glicosidación del grupo carboxílico que soporta C-28, decidieron incubar con ambos hongos distintos derivados modificados y así ver la influencia de la sustitución en C-3 y C-20. De esta forma, ácido 3-acetil-oleanólico (**211**), ácido oleanólico (**176**) y escualentósido A (**212**) fueron biotransformados.²⁷¹ (Figuras 3.55 y 3.56). Sorprendentemente el derivado acetilado en C-3 no mostró signos de biotransformación, mientras que la incubación de **174** dio los tres metabolitos esperados, ácido sarratagénico (**213**) y ácido 3 β ,24-dihidroxi-olean-12-en-28,29-dioico (**214**) con *S. griseus* y 28-O- β -D-glucopiranosil-3 β -hidroxi-olean-12-en-28-oato (**215**) con *A. ochraceus*. Esto indica que un sustituyente polar en C-3 es crucial para la biotransformación. En cuanto al escualentósido A (**212**), caracterizado por contener un azúcar en C-3, un metilcarboxilato en C-30 y un grupo hidroxilo en C-23, la biotransformación con *S. griseus* dio dos metabolitos polares, escualentósido B (**216**) y fitolacagenina (**217**) respectivamente, mientras que la incubación con *A. ochraceus* sólo generó el metabolito **216**. La posterior conversión de **217** con *S. griseus* generó ácido 30-metil-éster 2 β ,3 β ,23,29-tetrahidroxi-olean-12-en-28,30-dioico (**218**) y fitolacagenin-28-O- β -D-glucopiranosido (**219**) con *A. ochraceus*. (Figura 3.56)

²⁷¹ Zhu, Y.; Qian, L.; Zhang, J.; Liu, J.; Yu, B. *Tetrahedron* **2011**, 67, 4206-4211.

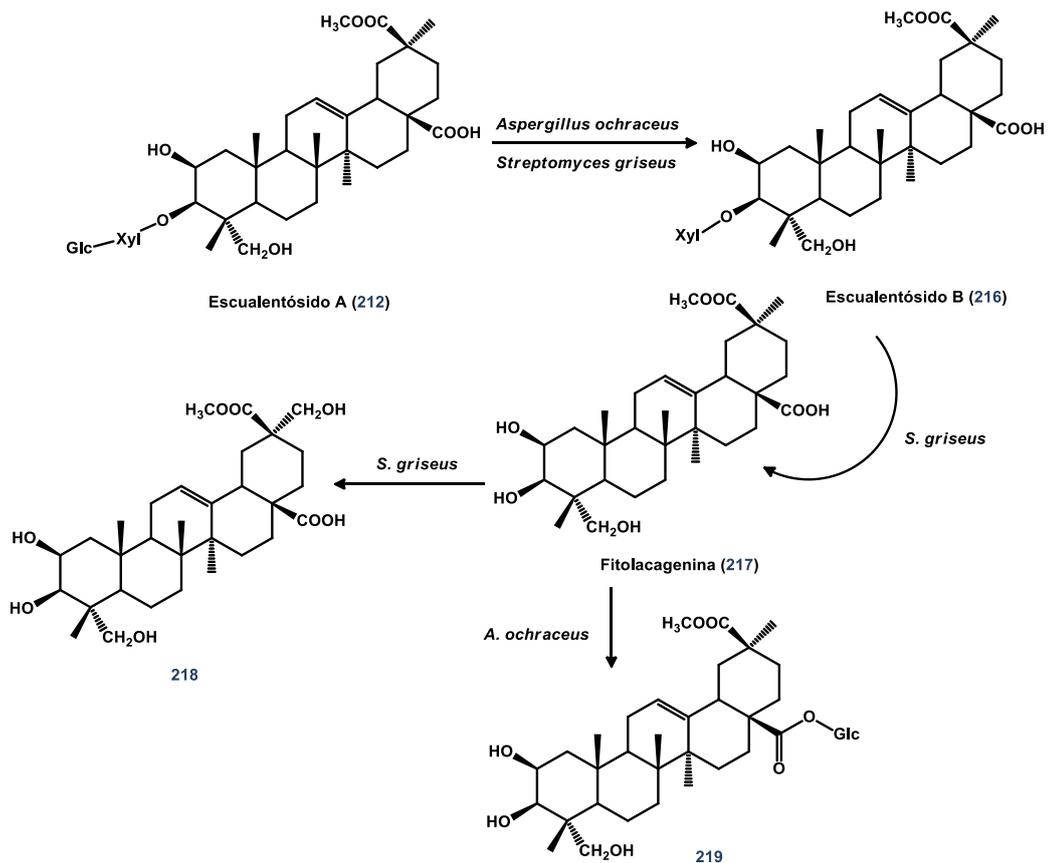


Figura 3.56. Vías de biotransformación de Escualentósido A (212)

En cambio, se ha visto que si se incuba **205** con *Absidia glauca* Hagem (3.67)²⁷² se obtienen como productos de biotransformación hidroxilados en las posiciones C-1, C-11 y C-21, identificándose por RMN como 1 β -hidroxi-3-oxo-olean-11-en-28,13-lactona (**220**), ácido 1 β ,11 α -dihidroxi-3-oxo-olean-12-en-28-oico (**221**) y ácido 1 β ,11 α ,21 β -trihidroxi-3-oxo-olean-12-en-28-oico (**222**).

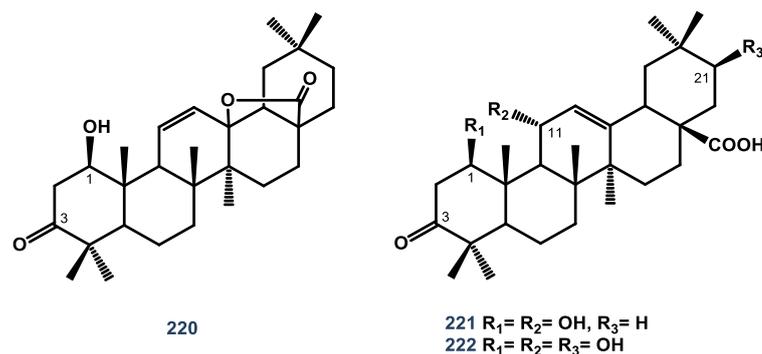


Figura 3.57. Metabolitos de biotransformación de **205** con *A. glauca*

Polygala senega es una planta herbácea pequeña originaria de América del Norte. Precisamente el nombre de la especie se debe a los indios "Seneca" que la utilizaban contra la

²⁷² Na Guo, N.; Zhao, Y.; Fang, W.-S. *Planta Med.* **2010**, 76, 1904-1907.

mordedura de serpientes y en afecciones de la garganta. La raíz de polígala contiene azúcares, mucílago, ácidos fenólicos libres y esterificados, entre ellos el ácido salicílico, resina, esteroides y como principios activos saponósidos triterpénicos (5-10%) conocidos en conjunto con el nombre de senegina, entre los que se puede citar como mayoritaria la senegina II acompañada de seneginas I, III y IV, entre otras. La genina de la mayor parte de estos heterósidos es la presenegenina; otras geninas son hidroxisenegenina, senegenina, etc. Es precisamente esta última, la senegenina (**223**) que se obtiene por hidrólisis hidroetanólica de su saponina, la que ha sido convertida en un *nor*-triterpeno (**224**) por *Nocardia* sp. (NRRL 5646) a través de la inusual ruptura de un enlace C-C y metilación selectiva del grupo carboxilo de C-28.²⁵⁵ (Figura 3.58)

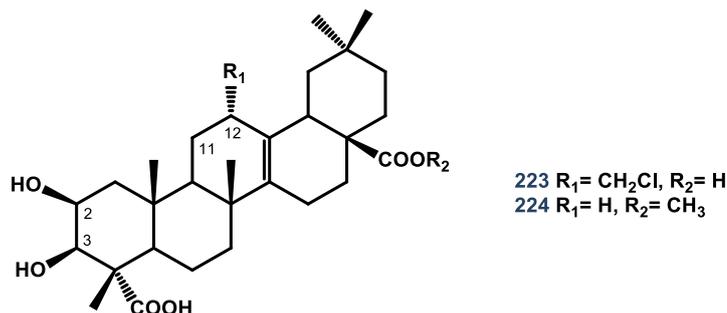


Figura 3.58. Metabolito de biotransformación de Senegenina (**223**)

Existe una planta semiparásita que crece sobre las ramas de diversos árboles que se conoce popularmente como muérdago. El extracto de una de sus especies, *Viscum coloratum*, es utilizada en la medicina tradicional china frente a hemorragias, hipertensión y trastornos inflamatorios,²⁷³ y cuyo extracto es altamente rico en β -amirina (**225**). La transformación microbiológica de su forma acetilada (**224**) llevada a cabo con *Rhodobacter sphaeroides* produce tres metabolitos. Estos fueron purificados e identificados como β -amirina (**225**), olean-12-ene-3 β ,23-diol (**227**), y eritrodio (**228**).

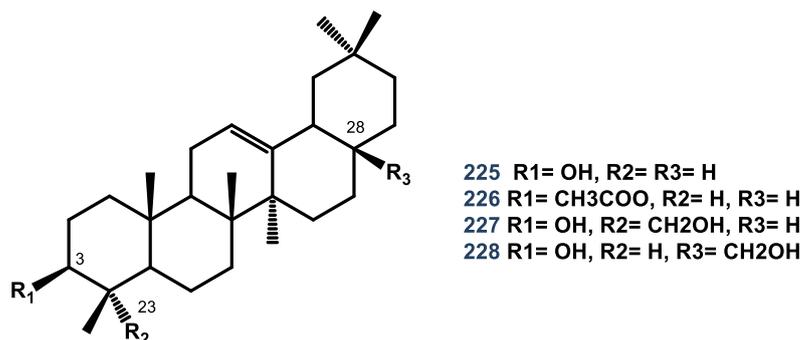


Figura 3.59. Biotransformación de β -amirina (**225**) con *R. sphaeroides*

Hace poco, el grupo de Feng X. et al. ha descrito la primera biotransformación de ácido máslico (**229**) con *Cunninghamella blakesleana* (CGMCC 3.910),²⁷⁴ aisándose cuatro nuevos

²⁷³ Shen, J.-J.; Chiang, M.-S.; Kuo, M.-L.; Leu, Y.-L.; Hwang, T.-L.; Liou, C.-J.; Huang, W. C. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *135*, 646-653.

²⁷⁴ Feng, X.; Luan, J.; Guo, F. F.; Li, D. P.; Chu, Z. Y. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *82*, 127-130.

metabolitos identificados como ácido 2 α ,3 β ,7 β -trihidroiolean-12-en-28-oico (**230**), ácido 2 α ,3 β ,15 α -trihidroiolean-12-en-28-oico (**231**), ácido 2 α ,3 β ,7 β ,15 α -tetrahidroiolean-12-en-28-oico (**232**), y ácido 2 α ,3 β ,7 β ,13 β -tetrahidroiolean-11-en-28-oico (**233**).

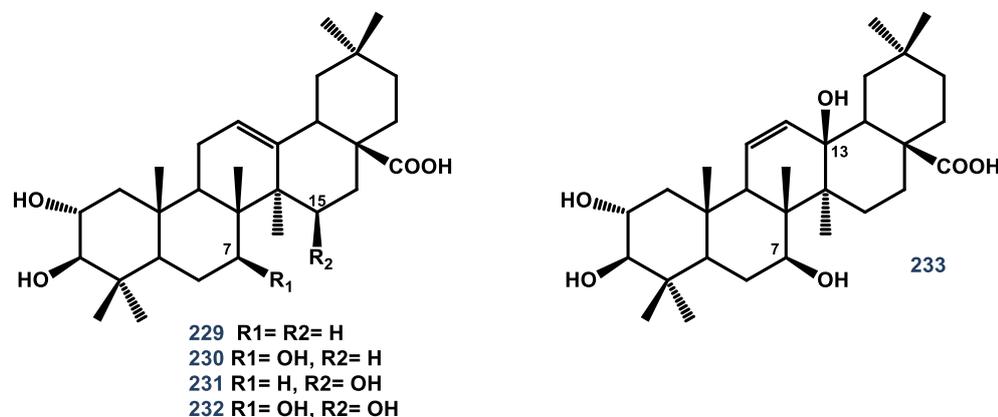


Figura 3.60. Biotransformación de ácido maslínico (**229**) con *C. blakesleana*

Por todo esto, las investigaciones en las modificaciones estructurales de los triterpenos pentacíclicos con esqueleto de oleanano se han centrado en como introducir grupos funcionales en el esqueleto con el fin de enriquecer la diversidad estructural de los mismos y evaluar si aumenta o disminuye la toxicidad de los derivados formados. En este punto, y en vista de la complejidad del esqueleto y de las posiciones menos activas, puede verse que las biotransformaciones generadas son un eficiente método para modificar este tipo de compuestos hoy en día.²⁷⁵

3.5.3.2 Esqueleto de ursano

El ácido ursólico (**234**) es un compuesto triterpénico ampliamente distribuido en el reino vegetal²⁷⁶, fundamentalmente en la familia de las labiadas, que ha mostrado tener un amplio rango de actividades biológicas entre las que se incluyen, actividad antiinflamatoria²⁷⁷, antibacteriano²⁷⁸, antiviral²⁷⁹ o anticancerígeno.

Nocardia sp. (NRRL 5646) es capaz de convertir ácido ursólico (**234**) en oleanato de metilo (**235**) a través de una vía de conversión en la cual participan el ácido oleanólico (**176**) y ursolato de metilo (**236**), cuyas estructuras pueden verse en la figura 3.61. La reacción de metilación que tiene lugar sobre el grupo carboxílico de C-28, es llevado a cabo por el sistema enzimático de la

²⁷⁵ a) Honda, T.; Rounds, B. V.; Bore, L.; Finlay, H. J.; Favaloro, F. G. Jr.; Suh, N.; Wang, Y.; Sporn, M. B.; Gribbl, G. W. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4233-4246; b) Wen, X.; Sun, H.; Liu, J.; Cheng, K.; Zhang, P.; Zhang, L.; Hao, J.; Ni, P.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Alexacou, K. M.; Gimisis, T.; Hayes, J. M.; Oikonomakos, N. G. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3540-3554.

²⁷⁶ <http://www.ursolicacid.com/botanical.htm>

²⁷⁷ Baricevic, D.; Sosa, S.; Della Loggia, R.; Tubaro, A.; Simonovska, B.; Krasna, A.; Zupancic, A. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *75*, 125-132.

²⁷⁸ Fontanay, S.; Grare, M.; Mayer, J.; Finance, C.; Duval, R. E. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 272-276.

²⁷⁹ Novotny, L.; Vachálková, A.; Biggs, D. *Neoplasma* **2001**, *48*, 241-246.

bacteria de la misma forma que actuaba biotransformando senegenina (**223**) (ver esqueleto de oleanano). Esto demuestra la capacidad única de esta bacteria para catalizar una conversión “retro-biosintética” del esqueleto de ursano al de oleanano por migración del metilo de C-19 a C-20.²⁵⁵

Por otro lado, ursolato de metilo (**236**), 3 β ,28-dihidroxiurs-12-eno (uvaol, **237**) y 3 β ,28-bis(dimetilcarbamoxi)urs-12-eno (**238**) fueron incubados con *Mucor plumbeus* (ATCC 4740). Mientras que los sustratos **237** y **238** se obtuvieron como tales después de la biotransformación, el compuesto **236** fue convertido en 3 β ,7 β ,21 β -trihidroxiursa-9(11),12-dien-28-oato de metilo (**239**). El doble enlace entre C-9 y C-11 puede explicarse si se tiene en cuenta la previa hidroxilación de C-11 y posterior eliminación para dar lugar al dieno conjugado.²⁸⁰ (Figura 3.61)

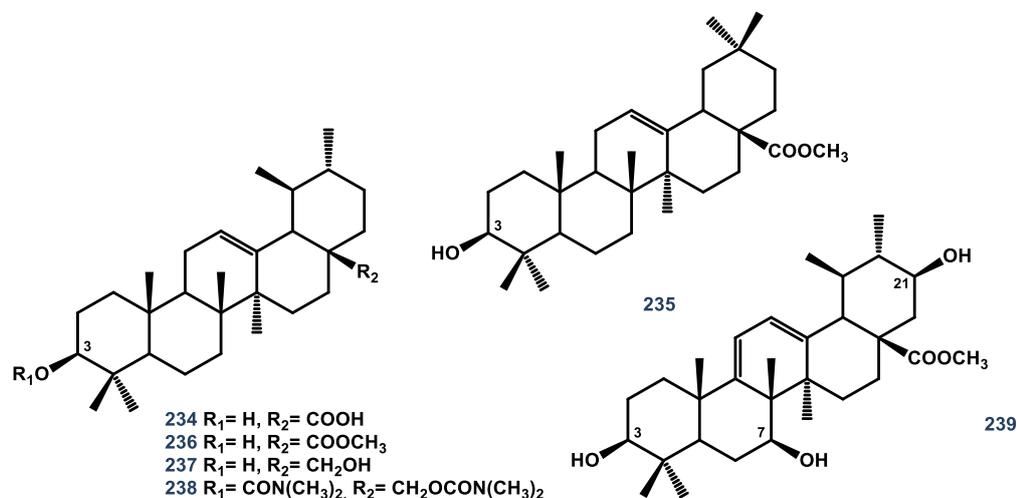


Figura 3.61. Metabolitos de biotransformación de ácido Ursólico (**234**) y Ursolato de metilo (**236**)

Los organismos endófitos son hongos o bacterias que colonizan un tejido vegetal sano de forma inter- y/o intracelular y son no agresivos para la planta en sí, de forma que permanecen asintómicamente en la planta durante su ciclo de vida o parte de él. Estos hongos son capaces de producir sustancias bioactivas tales como paclitaxel (antitumoral)²⁸¹ o podofilotoxina (antiviral)²⁸², y además tienen la habilidad para biotransformar productos naturales.

De esta forma, se ha llevado a cabo la biotransformación de ácido ursólico (**234**) con el hongo endofítico *Umbelopsis isabellina* aislado de la planta medicinal *Huperzia serrata* (*Lycopodium*

²⁸⁰ Collins, D. O.; Ruddock, P. L. D.; Chiverton de Grasse, J.; Reynolds, W. F.; Reese, P. B. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 479-488.

²⁸¹ a) Shrestha, K.; Strobel, G. A.; Shrivastava, S. P.; Gewali, M. B. *Planta Med.* **2001**, *67*, 374-376; b) Chakravarthi, B. V.; Das, P.; Surendranath, K.; Karande, A. A.; Jayabaskaran, C. *J. Biosci.* **2008**, *33*, 259-267.

²⁸² a) Puri, S. C.; Nazir, A.; Chawla, R.; Arora, R.; Riyaz-Ul-Hasan, S.; Amna, T.; Ahmed, B.; Verma, V.; Singh, S.; Sagar, R.; Sharma, A.; Kumar, R.; Rakesh, K. S.; Ghulam, N. Q. *J. Biotechnol.* **2006**, *122*, 494-510; b) Kour, A.; Shawl, A. S.; Rehman, S.; Sultan, P.; Parvaitz, H. Q.; Qazi, P. H.; Suden, P.; Khajuria, R. K.; Verma, V. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1115-1121.

chino).²⁸³ Como muestra la figura 3.62, el resultado fue la obtención de tres metabolitos, uno de ellos ya conocido, 3 β -hidroxi-urs-11-en-28,13-lactona (**240**) y los otros dos identificados como nuevos metabolitos, 3 β ,7 β -dihidroxi-urs-11-en-28,13-lactona (**241**) y 1 β ,3 β -dihidroxi-urs-11-en-28,13-lactona (**242**). Así, además de introducir grupos hidroxilo en las posiciones C-1 y C-7, los tres metabolitos poseen el doble enlace migrado de C-12-C-13 a C-11-C-12 y un ciclo lactónico formado entre C-28 y C-13. Esta migración puede explicarse ya que la cepa es capaz de generar la esterasa y transferasa necesarias para llevar a cabo el cambio de posición del doble enlace en este tipo de estructura.²⁸³

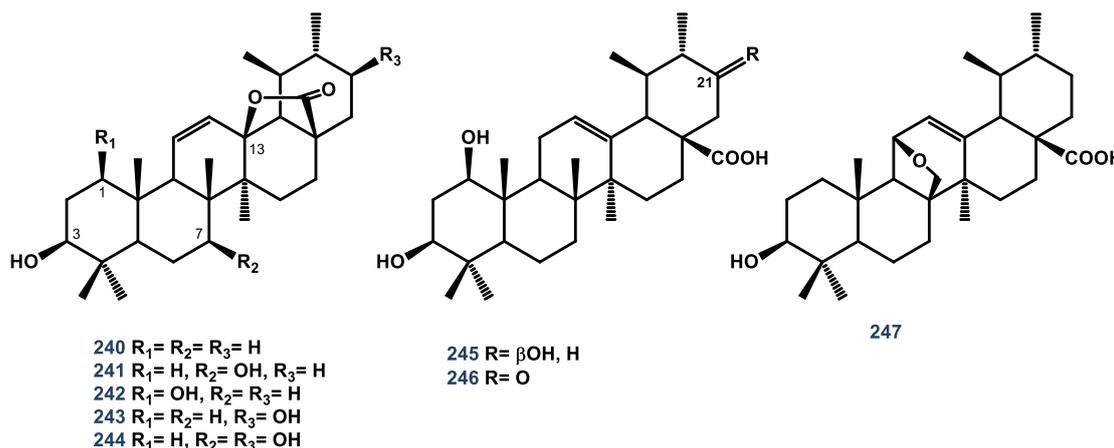


Figura 3.62. Metabolitos de biotransformación de ácido Ursólico (**234**) por *U. isabellina* y *S. racemosum*.

Por otro lado, la incubación de **234** con *Syncephalastrum racemosum* (Cohn) Schroter (AS 3.264)²⁸⁴ da lugar a cinco metabolitos identificados como ácido 3 β ,21 β -dihidroxi-urs-11-en-13-lactona-28-oico (**243**), ácido 3 β ,7 β ,21 β -trihidroxi-urs-11-en-13-lactona-28-oico (**244**), ácido 1 β ,3 β -dihidroxi-urs-12-en-21-ona-28-oico (**245**), ácido 1 β ,3 β ,21 β -trihidroxi-urs-12-en-28-oico (**246**) y ácido 11,26-epoxi-3 β ,21 β -dihidroxiurs-12-en-28-oico (**247**). Así, la biotransformación del sustrato implica reacciones de hidroxilación, carbonilación y condensación. Cabe destacar que la deshidratación para formar el grupo lactónico (**243** y **244**) o la generación del epóxido (**247**) no son reacciones frecuentes en incubaciones de triterpenos.

El ácido asiático (**248**) cuya estructura deriva del esqueleto de ursano, es uno de los triterpenoides aislados de *Centella asiatica*²⁸⁵, y posee una moderada actividad hepatoprotectora. Puede obtenerse fácilmente por hidrólisis del asiacósido (glicósido en C-28 de dicho ácido **248** que posee un trisacárido formado por dos moléculas de glucosa y una de ramnosa). Previamente, se habían llevado a cabo modificaciones en los grupos funcionales existentes sobre C-2, C-3, C-11, C-23 y C-28 y evaluado los correspondientes efectos hepatoprotectores. Como consecuencia de

²⁸³ Fu, S.; Yang, J.; Cui, J.; Feng, X.; Sun, D. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 1180-1182.

²⁸⁴ Huang, F. X.; Yang, W.Z.; Ye, F.; Tian, J. Y.; Hu, H. B.; Feng, L. M.; Guo, D. A.; Ye, M. *Phytochemistry* **2012**, *82*, 56-60.

²⁸⁵ a) Sastri, B. N. En *The Wealth of India, Raw Materials*; Sastri, B. N. Ed.; C.S.I.R., New Delhi, IN, **1950**; vol. 2, 116; b) Qin, L. P.; Zhuang, W. G.; Zheng, H. C.; Ding, R. X. *World Notes: Phytomed.* **1997**, *12*, 154.

estas modificaciones y junto a los estudios previos de la relación estructura-actividad, se pudo ver que una simple modificación en esos grupos funcionales afectaba de forma considerable a la actividad hepatoprotectora.²⁸⁶ Recientemente se ha realizado una biotransformación de **248** con el hongo *Alternaria longipes* (AS 3.2875), aislándose tres nuevos metabolitos identificados como ácido 2 α ,3 β ,23,30-tetrahidroxiurs-12-eno-28-oico (**249**), ácido 2 α ,3 β ,22 β ,23-tetrahidroxiurs-12-eno-28-oico (**250**) y ácido 2 α ,3 β ,22 β ,23,30-pentahidroxiurs-12-eno-28-oico (**251**).²⁸⁷

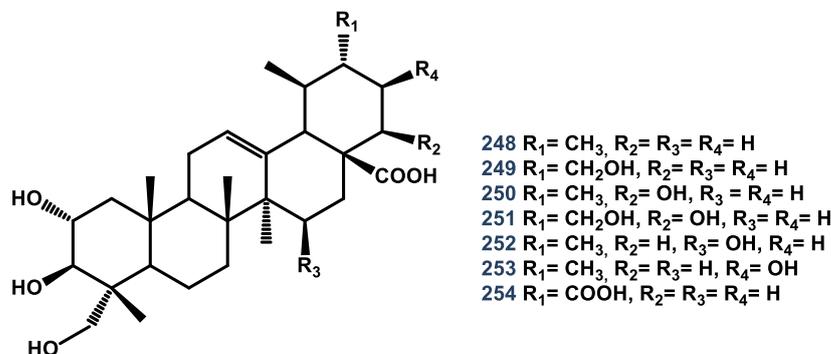


Figura 3.63. Metabolitos de biotransformación de ácido Asiático (**248**)

Sin embargo, cuando **248** se biotransforma con *Penicillium lilacinum* (ATCC 31890) y *Fusarium equiseti* (CGMCC 3.3658) se obtiene un único producto, el ácido 2 α ,3 β ,15 α ,23-tetrahidroxiurs-12-en-28-oico (**252**). Por otro lado, la biotransformación de ácido asiático (**236**) con *Streptomyces griseus* (CGMCC 4.18) da lugar a ácido 2 α ,3 β ,21 β ,23-tetrahidroxiurs-12-en-28-oico (**253**), ácido 2 α ,3 β ,23-trihidroxiurs-12-en-28,30-dioico (**254**) y al anteriormente citado **249**.²⁸⁸

El ácido 3-O- β -6-deoxi-D-glucopiranosilquinóico (**255**) es el principal constituyente de la corteza de *Mitragyna inermis*, una de las plantas medicinales más conocidas y utilizadas en el occidente africano para el tratamiento estomacal, trastornos intestinales y enfermedades hepáticas. Dicho sustrato (**255**) es desglicosilado por *Nocardia* sp. (NRRL 5646) dando lugar a su aglicón, el ácido quinóico (**256**, 40%)²⁸⁹ y a su homólogo biogénico, el ácido cincólico (**257**, 20%) a través de un reagrupamiento en el esqueleto por migración del grupo metilo al igual que se observaba en la conversión de ácido ursólico (**234**) a ácido oleanólico (**176**) por el mismo microorganismo.²²⁰ En cambio, la biotransformación de **255** con *Streptomyces griseus* (ATCC 13273) generó un nuevo metabolito oxidado (**258**) resultado de la hidroxilación del grupo metilo que soporta C-30.²⁹⁰

²⁸⁶ a) Jeong, B. S.; Lee, M. K.; Kim, Y. C.; Lee, E.-S. *Arch. Pharm. Res.* **2007**, *30*, 282; b) Zhao, L. X.; Park, H.; Jew, S. S.; Kim, M. K.; Kim, Y. C.; Thapa, P.; Karki, R.; Jahng, Y.; Jeong, B. S.; Lee, E. S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, *28*, 977-982.

²⁸⁷ He, W.; Dai, J.; Ye, M.; Wu, L.; Guo, D. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2010**, *12*, 760-764.

²⁸⁸ Guo, F. F.; Feng, X.; Chu, Z. Y.; Li, D. P.; Zhang, L.; Zhang, Z. S. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2013**, *15*, 15-21.

²⁸⁹ Cheng, Z.; Yu, B.; Cordell, G. A.; Qiu, S. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3163-3165.

²⁹⁰ Cheng, Z.; Yu, B.; Guo, Y.; Qiu, S. *Chin. J. Chem.* **2006**, *24*, 95-98.

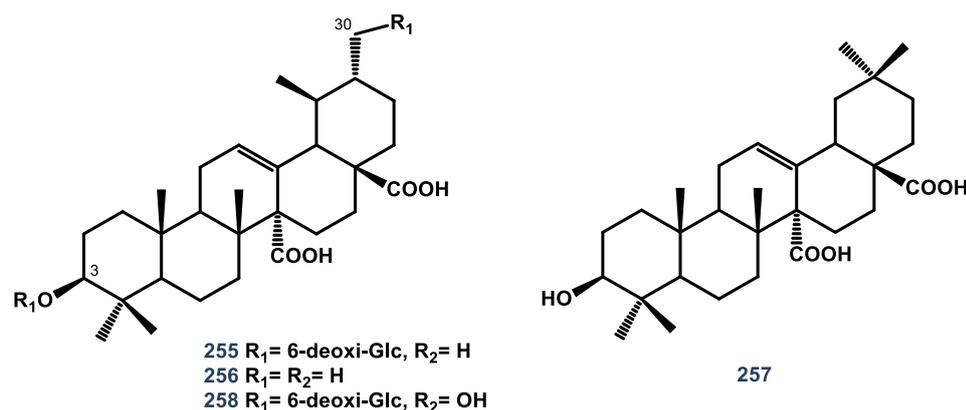


Figura 3.64. Metabolitos de biotransformación de ácido 3-O-β-6-deoxi-D-glucopiranosilquinovico (255)

3.5.3.3 Esqueleto de lupano

El ácido betulínico (259), es un triterpeno con esqueleto de lupano que se encuentra ampliamente repartido en el reino vegetal, siendo el abedul (que pertenece al género *Betula*) una de sus fuentes más importantes. Se ha visto que dicho ácido (259) posee actividad como antimelanoma, anti-neuroblastoma, antileucémico, anti-VIH y antimalárico.

La biotransformación del ácido betulínico (259) con *Cunninghamella* sp. (NRRL 5695) resultó en la producción de un nuevo metabolito (260, 0.77%) en el que sus datos espectroscópicos muestran que el hongo ha insertado una molécula de glucosa en el grupo alcoholico de C-3 (ver figura 3.65).²⁹¹ La incubación del ácido 259 con *Bacillus megaterium* (ATCC 14581) resultó en la obtención del 3-oxo derivado, conocido como ácido betulónico (261) junto con el 7β-hidroxi (262) y 6α,7β-dihidroxi (263) derivado. De la misma forma, *Mucor mucedo* (UI-4605) también generó el mismo 7β-hidroxi derivado (262), mientras que *Cunninghamella elegans* (ATCC 9244) produjo ácido 1β,7β-dihidroxibetulínico (264).²⁹² Otra cepa de *Bacillus megaterium* (ATCC 13368) fue utilizada para biotransformar ácido betulínico (259) aislándose en la incubación ácido betulónico (261), ácido 11α-hidroxibetulínico (265), ácido 1β-hidroxibetulínico (266) y ácido 3β,7β,15α-trihidroxilup-20(29)-en-28-oico (267).²⁹³ El ácido betulónico (261) es de la misma forma obtenido cuando incubamos ácido betulínico (259) tanto con *Chaetophoma* (DBP125) y *Dematiium* (DBP157), mientras que *Colletotrichum* (DBP136) transformaba el ácido 259 a ácido 15α-hidroxibetulínico (268).²⁹⁴ La incubación de ácido betulínico (259) y ácido 23-hidroxibetulínico (269) con *Nocardia* sp. (NRRL 5646) produjo los correspondientes 28-metilésteres (270) y (271) respectivamente²²⁰ y también se aisló otro metabolito en la incubación de 259, el 2α-acetoxi-3-oxo-lup-20-en-28-oato de metilo (272), que se obtiene por la introducción de un grupo hidroxilo en C-2 de 270 y posterior acetilación de dicho grupo.²⁹⁵ (Figura 3.65)

²⁹¹ Chatterjee, P.; Pezzuto, J.; Kouzi, S. A. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 761-763.

²⁹² Kouzi, S. A.; Chatterjee, P.; Pezzuto, J. M.; Hamann, M. T. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1653-1657.

²⁹³ Chatterjee, P.; Kouzi, S. A.; Pezzuto, J. M.; Hamann, M. T. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3850-3855.

²⁹⁴ Bastos, D. Z. L.; Pimentel, I. C.; De Jesús, D. A.; De Oliveira, B. H. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 834-839.

²⁹⁵ Qian, L. W.; Zhang, J.; Liu, J. H.; Yu, B. Y. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2193-2195.

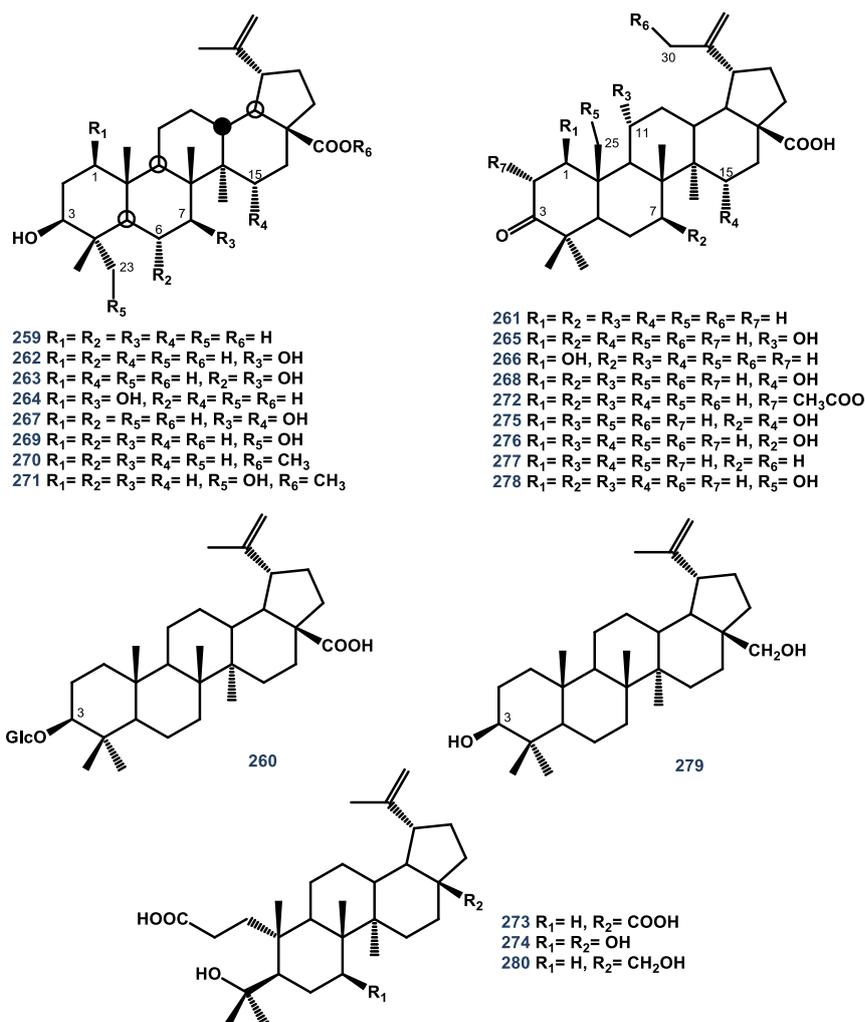


Figura 3.65. Metabolitos de biotransformación de los ácidos Betulínico (259) y Betulónico (261)

El ácido betulónico (261) es también un triterpeno natural que además de encontrarse en multitud de plantas puede obtenerse por oxidación del ácido betulínico (259), y presenta actividades antiinflamatorias, antimelanoma y anti-viral. Tal y como se muestra en la figura 3.65, se han llevado a cabo multitud de biotransformaciones sobre este sustrato. Así, la transformación microbiológica de 261 por el hongo *Chaetomium longirostre* (IFO 9873) resultó en la obtención de los ácidos 4-hidroxi-3,4-seco-lup-20(29)-eno-3,28-dióico (273, 6%), 4,7 β ,17-trihidroxi-3,4-seco-28-nor-lup-20(29)-en-3-oico (274, 12%) y 7 β ,15 α -dihidroxibetulónico (275, 4%) respectivamente. De forma que el hongo actúa provocando la apertura del anillo A, hidroxilando y descarboxilando el sustrato.²⁹⁶

Por otro lado, la biotransformación de dicho ácido 261 con *Arthrobotrys* (DPB134) y *Colletotrichum* (DPB136) generaron el ya aislado metabolito 7 β ,15 α -dihidroxilado (275) junto con

²⁹⁶ Akihisa, T.; Takamine, Y.; Yoshizumi, K.; Tokuda, H.; Kimura, Y.; Ukiya, M.; Nakahara, T.; Yokochi, T.; Ichiishi, E.; Nishino, H. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 278-282.

los ácidos 7 β -hidroxibetulónico (**276**) y 7 β ,30-dihidroxibetulónico (**277**) en la biotransformación con *Arthrotrrys* (DPB134), y el ácido 15 α -hidroxibetulónico (**268**) en el caso de *Collectotrichum* (DPB136).²⁹⁴ En cambio, *Chaetophoma* (DPB125) hidroxiló en C-25 al ácido betulónico (**261**) dando lugar al ácido 25-hidroxibetulónico (**278**).²⁹⁴

Si llevamos a cabo la reducción del grupo carboxílico de C-28 presente en el ácido betulínico (**259**) obtenemos un alcohol triterpénico conocido como betulina (**279**) que también es aislado de forma natural del abedul y especies afines.²⁹⁷ La incubación del alcohol **279** con *Chaetomium longirostre* (IFO 9873) produjo la formación del ácido 4,28-dihidroxi-3,4-seco-lup-20(29)-en-3-oico (**280**, 3%).²⁹⁶ (ver figura 3.65). Por otro lado, cuando el alcohol **279** se incubaba con *Cunninghamella blaskeleeana* se obtiene ácido betulínico (**259**) en un solo paso.²⁹⁸ Sin embargo, la incubación de betulina (**279**) y de betulinato de metilo (**270**) con *Rhizopus oryzae* (ATCC 11145), no generó ningún metabolito de biotransformación.²⁹⁹

3.5.3.4 Esqueleto de Ceanotano

El ácido ceanótico (**281**) es un triterpeno pentacíclico con dos ácidos carboxílicos y cuatro grupos metilo (ver figura 3.66) que se aísla en gran cantidad de *Ceanothus americanus* o de *Paliurus ramosissimus*³⁰⁰ y ha demostrado actividad antimicrobiana³⁰¹, al presentar efectos inhibidores sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*, y *Porphyromonas gingivalis*.

Fue convertido en su correspondiente dimetiléster (**282**) derivado por *Mycobacterium sp.* (NRRL B-3805) y sin embargo, este ceanotato de dimetilo (**282**) fue recuperado de forma inalterable en una posterior biotransformación con la misma cepa. Por otro lado, la biotransformación con el mismo microorganismo del 3-dehidroceanotato de dimetilo (**283**), conllevó a la epimeración de C-1 en el sustrato, dando como consecuencia al 3-dehidro-1-*epi*-ceanotato de dimetilo (**284**).³⁰²

²⁹⁷ O'Connell, M. M.; Bentley, M. D.; Campbell, C. S.; Cole, B. J. W. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2175-2176.

²⁹⁸ Feng, Y.; Li, M.; Liu, J.; Xu, T. Y.; Fang, R. S.; Chen, Q. H.; He, G. Q. *Food Chem.* **2013**, *136*, 73-79.

²⁹⁹ Martín, G. D. A.; Reynolds, W. F.; Reese, P. B. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 701-710.

³⁰⁰ Lee S.; Lin, C.; Liu, K. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 602-606.

³⁰¹ Li, X.; Cai, L.; Wu, C. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 97-102.

³⁰² Lee, S. S.; You, B. J.; Wang, K. C. *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei, Taiwan)*, **1993**, *40*, 213-216.

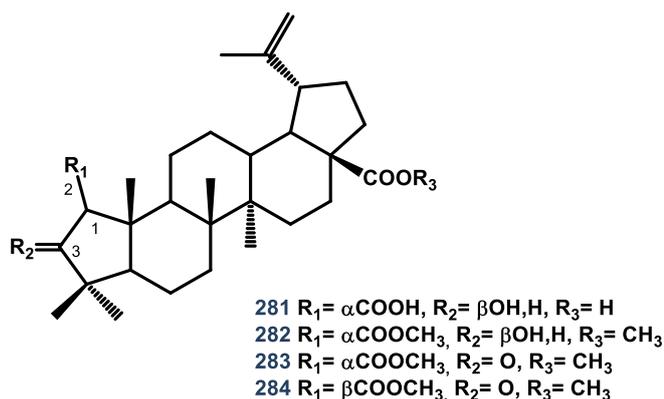


Figura 3.66. Metabolitos de biotransformación de ácido Ceanótico (281) y un derivado (283)

3.5.4 Triterpenos modificados

3.5.4.1 Esqueleto limonoide

Los limonoides se clasifican químicamente como tetranortriterpenoides, es decir, son triterpenos modificados metabólicamente que conservan el esqueleto 4,4,8-trimetil-17-furanilesteroides, aunque más reordenado y con una construcción oxigenada mayor. Suelen abundar en plantas de la familia Meliaceae y Rutaceae como pueden ser *Azadirachta indica* (Lila india o árbol de neem) y todo el género *Citrus* (limonero, limas, pomelos, etc.) respectivamente. Se caracterizan por tener propiedades antivirales, antifúngicas, antibacterianas, antineoplásicas y antimaláricas. Ciertos limonoides son insecticidas tales como la azadiractina del árbol de neem.

La biotransformación realizada por *Mucor sp.* (M881) sobre azadiradiona (285), epoxiazadiradiona (286), gedunina (287), da lugar al correspondiente 17 β -hidroxiderivado (288) de 285 y a los correspondientes 12 β -hidroxiderivados 289-291, tal y como muestra la figura 3.67.³⁰³

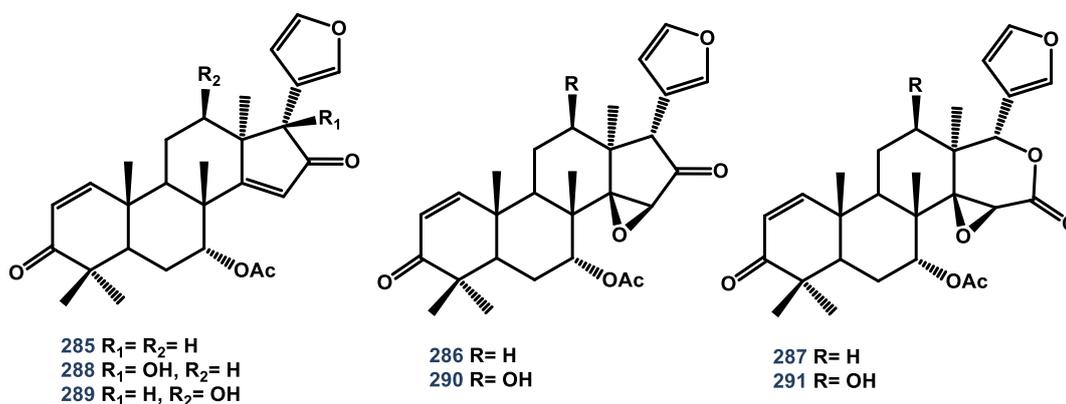


Figura 3.67. Biotransformación con *Mucor sp.* de varios sustratos limonoides

³⁰³ Haldar, S.; Kolet, S. P.; Thulasiram, H. V. *Green Chem.* **2013**, *15*, 1311-1317.

El resumen expuesto en este punto del trabajo pone de manifiesto que muchos microorganismos son versátiles biocatalizadores para realizar funcionalizaciones interesantes en compuestos triterpénicos, de forma que han demostrado ser capaces de hidroxilar posiciones no activadas del esqueleto triterpénico, sin importar su disposición estructural o número de anillos.

En este contexto, la transformación microbiana de productos naturales, es una poderosa herramienta semisintética, siendo una de las líneas en la que el Grupo de investigación de Biotransformación y Química de Productos Naturales del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada lleva trabajando más de 20 años (ver apartado 3.4). Durante este tiempo, se han empleado diversos hongos filamentosos para realizar estas transformaciones como son, *Curvularia lunata*, *Cunninghamella elegans*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizopus nigricans*, *Gliocladium roseum* y *Aspergillus niger*, entre otros. En este trabajo, los estudios de biotransformación realizados se han centrado en la búsqueda de nuevos derivados de triterpenoides cíclicos con actividad biológica, y siguiendo la línea anterior hemos utilizado un hongo filamentosos conocido con el nombre de *Rhizomucor miehei*.

3.6 *Rhizomucor miehei*

Rhizomucor miehei es un hongo fitomiceto que en un principio se incluyó en el género *Mucor*. Tras un estudio exhaustivo de sus estructura y propiedades se observaron algunas diferencias importantes en cuanto a morfología y requerimientos térmicos, por lo que se reclasificó dentro del género *Rhizomucor* (ver figura 2.65), que fue definido como taxón por Lucet y Constantin en 1899.

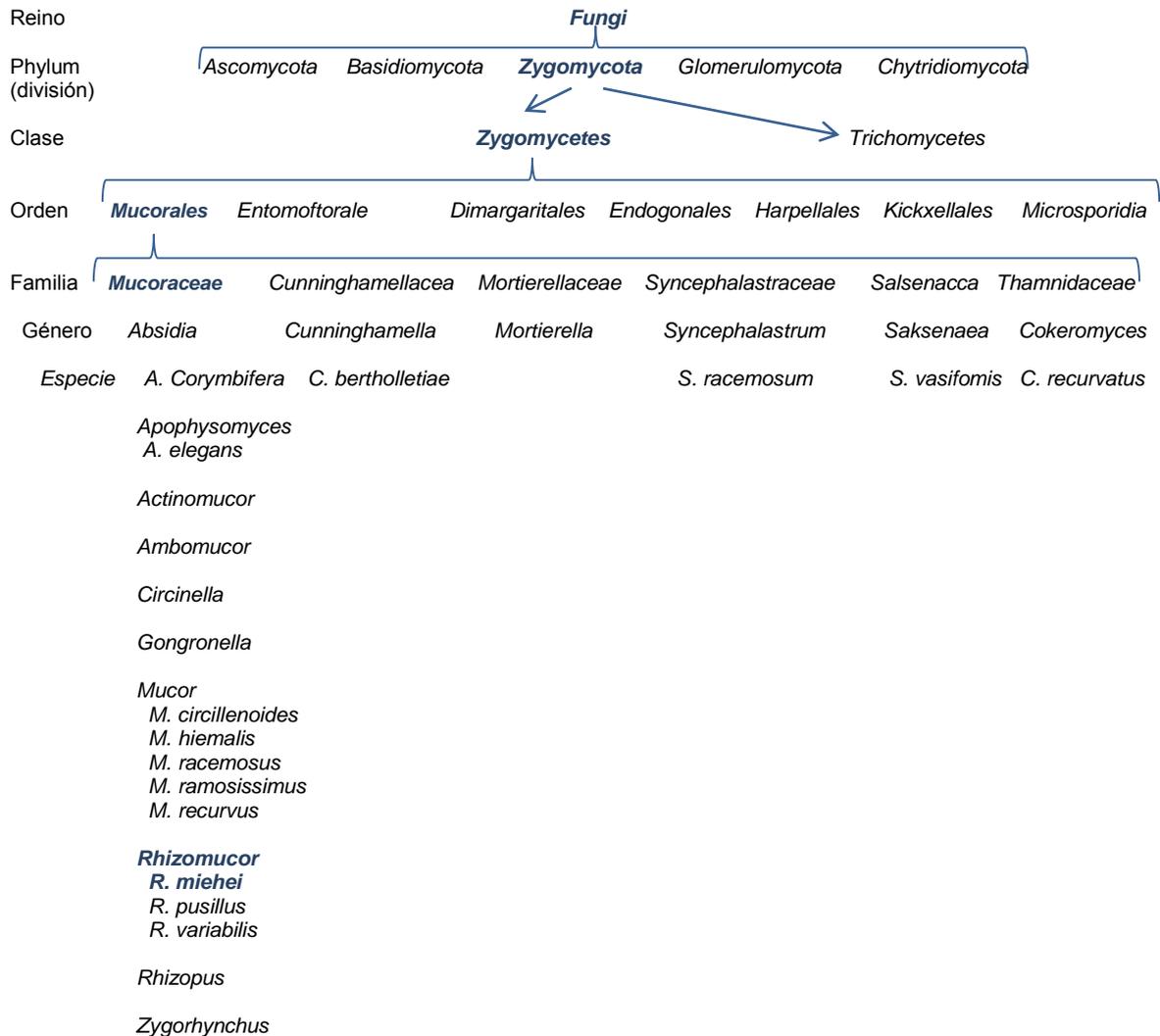


Figura 3.68. Clasificación taxonómica de los hongos pertenecientes a la clase *Zygomycetes*

Los hongos pertenecientes a género *Rhizomucor* son termófilos. A principios del siglo XX se determinó que la temperatura óptima para el desarrollo de las cepas de estos hongos es de 37-

40 °C y su temperatura de crecimiento se sitúa desde 22-24°C hasta 50°C, muy diferentes de las temperaturas óptimas para desarrollo de los hongos del género *Mucor*.³⁰⁴

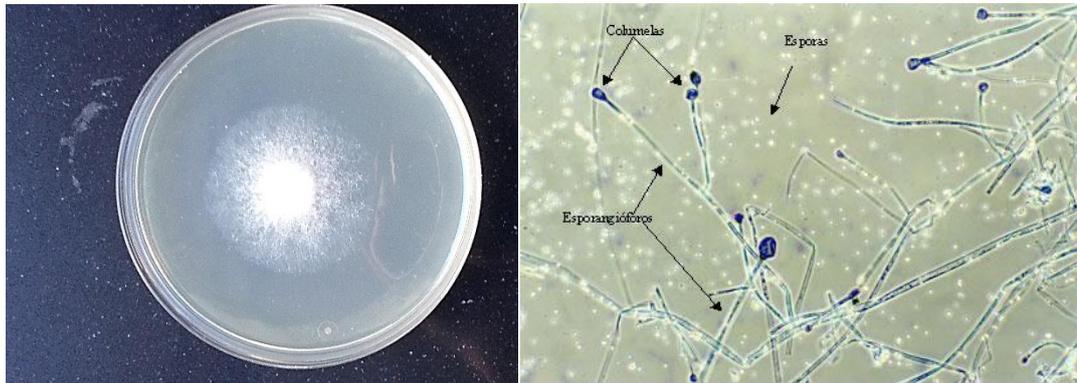


Imagen 3.2. Cultivo de *Rhizomucor miehei* CECT 2749 y ampliación de las hifas donde pueden observarse esporangios, esporangioforos y esporas.³⁰⁵

En la fabricación de quesos industriale-s se utilizan habitualmente proteinasas obtenidas a partir de microorganismos en lugar del cuajo animal. Una de las más utilizadas comercialmente es la proteinasa de *Rhizomucor miehei* (HANNILASE®), que es también una aspartil-proteinasa, como la quimosina. Por otro lado su lipasa es utilizada en industrias alimentarias, en la modificación de aceites, grasas y ácidos grasos, así como en la obtención de Biodiesel.^{175a}

Además, según Hoog et. al., los hongos pertenecientes a la orden *Mucoraceae* son patógenos.³⁰⁶ Los daños que suelen provocar consisten en micosis pulmonares, rinocerebrales, cutáneas y subcutáneas, infecciones en enfermos de sida, queratitis, infecciones oportunistas a través de heridas o quemaduras, necrosis, infecciones genitales, peritonitis graves en alcohólicos, invasores oportunistas en casos de leucemia y diabetes, infecciones de gravedad en niños prematuros, etc. Todo esto podría resumirse en que pueden causar graves problemas a pacientes inmunodeprimidos. También afectan a animales como diversos mamíferos (hasta ornitorrincos), anfibios, etc.³⁰⁷ De esta forma, *R. miehei* causa enfermedades del grupo de las zigomicosis ya sean cutáneas, pulmonares, rinofaciales, en pacientes neutropénicos, diabéticos o con enfermedades hematológicas. La anfotericina B es el antifúngico más usado en este tipo de infecciones.³⁰⁸

³⁰⁴ Schipper, M. A. A. *Stud. Mycol.* **1978**, 17, 53-71.

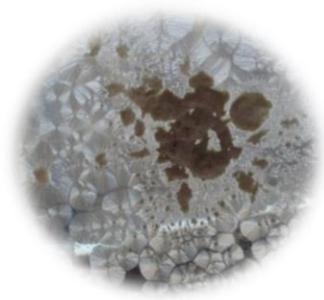
³⁰⁵ Imagen tomada de http://www.ucm.es/info/btg/album/Varios/pages/BTG-Rh_%20miehei%2048_jpg.htm

³⁰⁶ Hoog, D.; Guarro, S.; Gene, J.; Figueras, M. J. En *Zygomycota: Mucorales y Mortierellales. Atlas of Clinical Fungi*; Centraal bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, NL, **2000**; 60-124.

³⁰⁷ Torres-Narbona, M.; Guinea, J.; Muñoz, P.; Bouza, E. *Rev. Esp. Quimioterap.* **2007**, 20, 375-386.

³⁰⁸ Amabile Cuevas, C. F. *Diccionario de Infectología y Microbiología Clínica*; Bayer de México S.A., México, MX, **2008**.

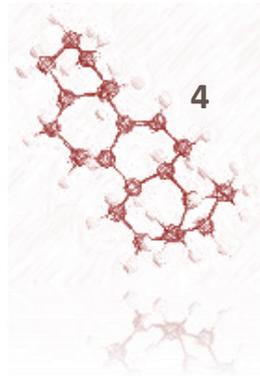
CAPÍTULO II



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*La frase más excitante que se puede oír en ciencia,
la que anuncia nuevos descubrimientos,
no es “¡Eureka!” sino “Es extraño...”*

Isaac Asimov



DISCUSIÓN

4.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDO OLEANÓLICO Y ÁCIDO MASLÍNICO

Ácido oleanólico (**1**) y ácido maslínico (**2**) son dos ácidos triterpénicos que se aíslan en cantidades apreciables a partir de los desechos de molturación de la aceituna según el procedimiento que ha sido desarrollado por el Grupo de investigación “Biotransformaciones y Química de Productos Naturales”, encontrándose perfectamente detallado en sendas patentes nacional (P96061652) e internacional (W098/04331) titularizadas por la Universidad de Granada. En la figura 4.1 se resume el procedimiento de aislamiento de estos ácidos. Ambos ácidos triterpénicos poseen esqueleto de olean-12-eno con un grupo carboxilo β en C-17.

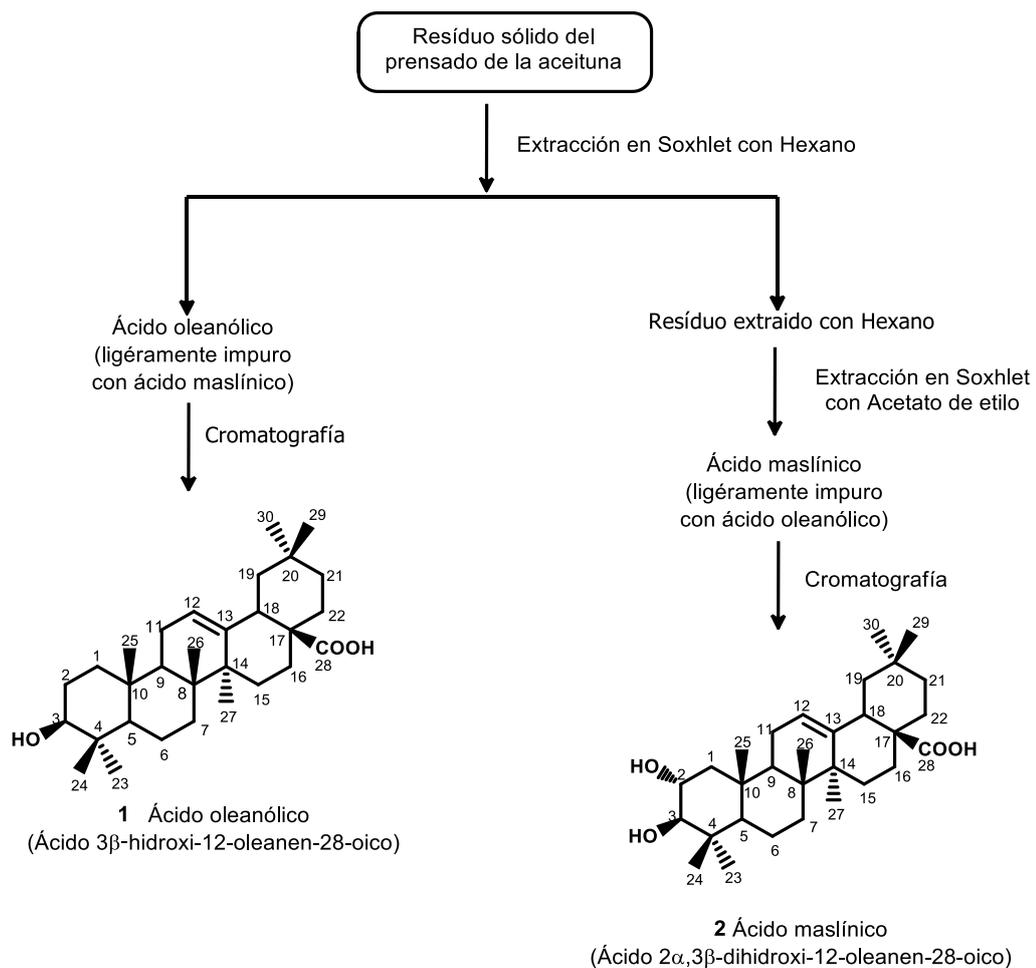


Figura 2.1. Aislamiento de los ácidos oleanólico (**1**) y maslínico (**2**)

El ácido oleanólico (**1**) presenta un espectro de masas que indica una fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$ siendo, por tanto, su peso molecular de 456 u.m.a. En su espectro de 1H RMN se observa a δ 5.25 ppm un doble doblete ($J_1 = J_2 = 3.6$ Hz) que, por desplazamiento y tipo de señal, debe corresponder al protón etilénico de C-12 acoplado con los dos hidrógenos de C-11. A δ 3.16 ppm se localiza un doble doblete ($J_1 = 11.2$ Hz y $J_2 = 4.8$ Hz), que se atribuye al protón axial geminal al hidroxilo 3β ecuatorial y a 2.84 ppm se sitúa el protón alílico de C-18 como doble doblete por su acoplamiento con los dos protones de C-19 ($J_1 = 13.6$ Hz y $J_2 = 3.7$ Hz). Por último, se observan las señales de siete metilos singletes a δ 1.15 (3H-27), 0.97 (3H-23), 0.93 (3H-25 y 3H-30), 0.90 (3H-29), 0.80 (3H-26) y 0.77 (3H-24). La estructura de ácido 3β -hidroxiolean-12-en-28-oico para el ácido oleanólico **1** queda completamente confirmada mediante el estudio de los espectros de ^{13}C RMN, COSY, HMBC y HMQC y por comparación de estos datos con los publicados^{22,23}.

El ácido maslínico (**2**) presenta características físicas y espectroscópicas similares a las de ácido oleanólico (**1**), pero posee mayor polaridad como consecuencia de la presencia de otro hidroxilo en C-2. Su peso molecular es de 472 u.m.a. y su fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_4$. El espectro de 1H RMN de ácido maslínico muestra similitudes con el de ácido oleanólico, pero aparece una nueva señal a δ 3.62 (1H, ddd, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz, $J_3 = 4.5$ Hz) atribuible a un protón axial geminal al grupo hidroxilo en C-2, que se acopla con el protón axial sobre C-3 (δ 2.91, 1H, d, $J = 9.6$ Hz). En cuanto al espectro de ^{13}C RMN, se comprueba con respecto al ácido oleanólico (**1**) la desaparición de un carbono metilénico (C-2) y la aparición de un nuevo carbono metínico oxigenado a 69.6 ppm. La estructura de ácido $2\alpha,3\beta$ -dihidroxiolean-12-en-28-oico para el ácido maslínico **2** queda completamente confirmada mediante el estudio de los espectros de ^{13}C RMN, COSY, HMBC y HMQC y por comparación de estos datos con los publicados²⁶.

4.2. OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE LOS ÁCIDOS OLEANÓLICO Y MASLÍNICO

Los ácidos oleanólico (1) y maslínico (2) se han utilizado como productos de partida en diferentes reacciones químicas con objeto de seleccionar aquellas en las que se obtengan derivados con buen rendimiento y así aumentar la diversidad estructural con el fin de generar diferentes funcionalizaciones en el esqueleto de oleanano. De esta forma, se obtienen cambios en las características físicas y químicas de los ácidos de partida y se dispone de una amplia gama de sustratos para biotransformarlos con hongos filamentosos, lo que nos permitirá sacar conclusiones acerca de la relación entre la estructura del sustrato y la acción del microorganismo. Debido a la poca solubilidad que poseen estos compuestos en medios acuosos, se decidió llevar a cabo la formación de la sal sódica de ambos ácidos, con la intención de facilitar su solubilidad a la hora de realizar su biotransformación. El tratamiento de los ácidos 1 y 2 con una disolución acuosa de NaOH origina las correspondientes sales sódicas 3 y 4 respectivamente, como puede apreciarse en la figura 2.2. Los espectros de ^1H RMN de dichas sales son similares a los de los ácidos de partida, si bien pueden observarse ligeras diferencias en los desplazamientos químicos de algunas señales, principalmente en los grupos metilo.

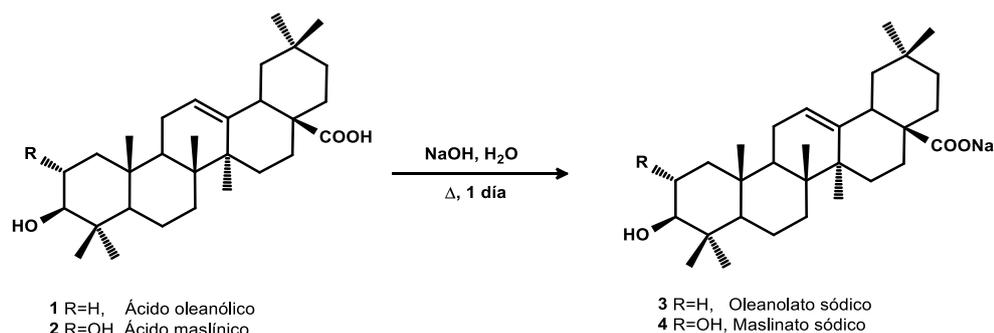


Figura 4.2. Formación de las sales sódicas de 1 y 2

4.2.1. Acetilación de los ácidos oleanólico (1) y maslínico (2)

La acetilación de los ácidos 1 y 2 origina los derivados más apolares 5 y 6 en los que los grupos hidroxilo de los ácidos de partida han sido acetilados. En el espectro de ^1H RMN para el producto 5 puede observarse una señal que aparece como doblete a δ 4.49 ppm originada por un protón de C-3 geminal a un grupo acetoxilo ecuatorial. En el espectro de ^1H RMN del producto 6 la señal del protón axial geminal a grupo acetoxilo en C-3 aparece como un doblete a 4.74 ppm mientras que la señal del protón axial en C-2 geminal a grupo acetoxilo aparece como un doblete a δ 5.09. El estudio de los espectros de ^{13}C RMN, COSY, HMBC y HMQC confirman la estructuras de ácido 3 β -acetoxiolean-12-en-28-oico para el derivado 5 y ácido 2 α ,3 β -diacetoxiolean-12-en-28-oico para el derivado 6.

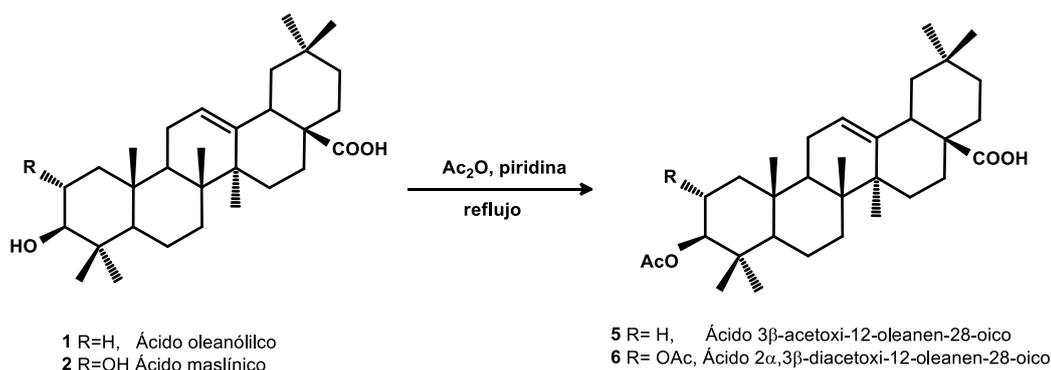


Figura 4.3. Acetilación de 1 y 2 con Ac_2O en piridina

4.2.2 Reacción de esterificación de los ácidos oleanólico (1) y maslínico (2) con CH_3I

Una vez aislados y purificados ambos ácidos se procedió a la protección del grupo carboxílico mediante esterificación del mismo para obtener los correspondientes metil ésteres, lo que permitió un mejor manejo de estos ácidos sobretodo en su comportamiento cromatográfico. Para ello, los ácidos oleanólico (1) y ácido maslínico (2) se disuelven en THF y se añade NaOH 5N, manteniendo la reacción a reflujo durante 3 horas. El tratamiento posterior con CH_3I origina con alto rendimiento los productos 7 y 8, respectivamente. En la esterificación del ácido maslínico además se obtiene el producto 9 como se muestra en la figura 4.4.

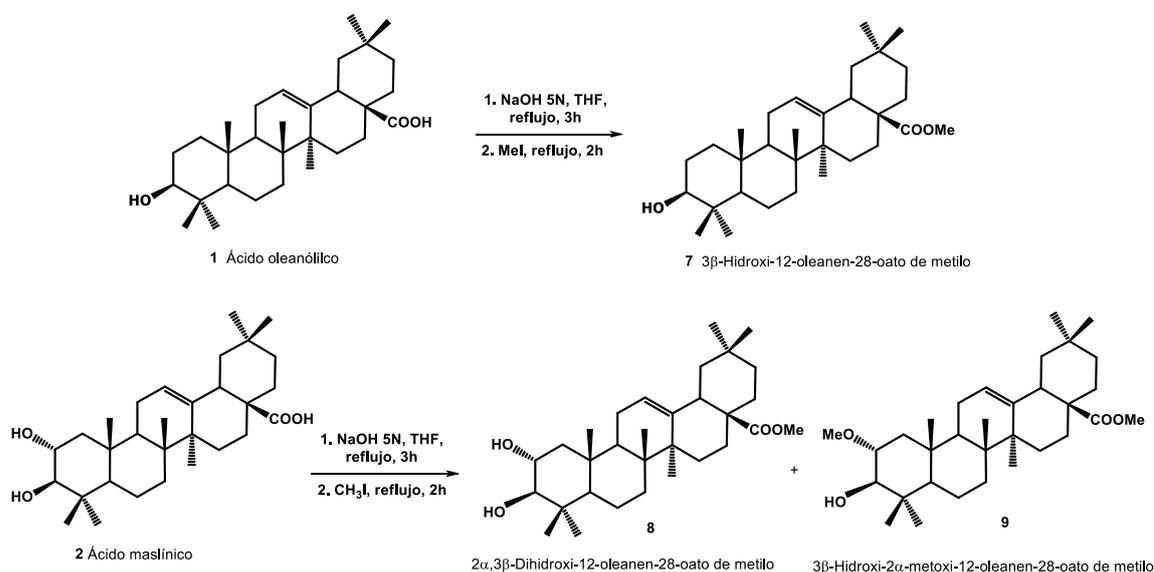


Figura 4.4. Esterificación de los ácidos oleanólico (1) y maslínico (2)

El producto 7 posee un peso molecular de 470 u.m.a. acorde con la fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3$ y en su espectro de ^1H RMN se aprecia la aparición de un singlete a δ 3.61 (3H) y en el espectro de ^{13}C RMN aparece una nueva señal a δ 51.66 debida a un metilo oxigenado, lo que nos confirma que el producto 7 se trata del éster metílico del ácido oleanólico (1). Todos los datos espectroscópicos del producto 7 son compatibles con la estructura de 3β-hidroxiolean-12-en-28-oato de metilo (oleanolato de metilo).

El espectro de masas del producto **8** indica un peso molecular de 486 u.m.a. compatible con la fórmula molecular $C_{31}H_{50}O_4$. Al igual que en el metil éster **7**, en el espectro de 1H RMN del producto **8** aparece la señal del grupo metoxilo a δ 3.61 y en su correspondiente espectro de ^{13}C RMN puede observarse a δ 51.66 la señal del carbono del grupo metoxi sobre C-28. Todos los datos espectroscópicos del producto **8** son compatibles con la estructura de $2\alpha,3\beta$ -dihidroiolean-12-en-28-oato de metilo (maslinato de metilo).

El espectro de masas del producto **9** indica un peso molecular de 500 u.m.a. compatible con la fórmula molecular $C_{32}H_{52}O_4$. En el espectro de 1H RMN del producto **9** aparecen dos señales del grupo metoxilo a 3.62 y 3.37 ppm respectivamente. En el espectro de ^{13}C RMN puede observarse a δ 51.66 y a 56.59 dos señales de metilos oxigenados. En el espectro HSQC, la señal a 51.66 ppm se encuentra correlacionada con la señal del protón a 3.62 ppm mientras que el carbono que aparece a δ 56.59 lo está con el protón que aparece a 3.37 ppm. En el espectro HMBC podemos observar que existe correlación entre los protones del grupo metoxilo que aparece a δ 3.62 con el carbono 28, mientras que los protones del grupo metoxilo que aparece a δ 3.37 presentan correlación con C-2. Estos datos nos indican que el producto **9** se trata del 3β -hidroxi- 2α -metoxiolean-12-en-28-oato de metilo, siendo un subproducto de la metilación con CH_3I del grupo hidroxilo en C-2 de maslinato de metilo (**8**).

4.2.3 Bromación alílica de oleanolato de metilo (**7**) con NBS/AIBN

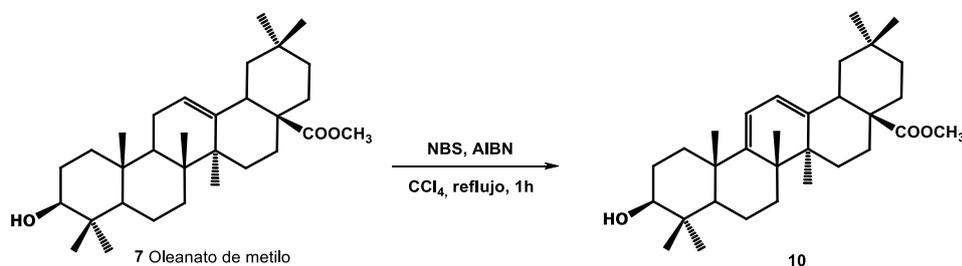


Figura 4.5. Bromación del oleanolato de metilo (**7**) con NBS/AIBN.

La bromación alílica de oleanolato de metilo (**7**) tiene lugar con N-bromosuccinimida (NBS) en presencia de azobisisobutironitrilo (AIBN) siguiendo un mecanismo radicalario originando un 11-bromoolean-12-en derivado que evolucionaría hacia la formación de un sistema diénico (**10**) en el anillo C por pérdida de una molécula de HBr debido a la disposición transperiplanar de los enlaces C_9-H_9 y $C_{11}-Br$. La formación del dieno **10** se confirma mediante la comparación de sus propiedades espectroscópicas con las descritas en bibliografía. En su espectro de 1H RMN aparece un sistema AB de dos protones vinílicos a δ 5.58 (1H, d, $J=5.9$ Hz, H-12) y δ 5.55 (1H, d, $J=5.9$ Hz, H-11) atribuibles a los hidrógenos H-11 y H-12, respectivamente. En el espectro de ^{13}C RMN se aprecian dos carbonos etilénicos que son metinos, C-11 a 115.80 ppm y C-12 a 120.66 ppm y dos carbonos etilénicos cuaternarios, uno a δ 154.73 (C-9) y otro a δ 145.23, que se asigna a C-13. La asignaciones realizadas son compatibles con las correlaciones observadas en el

espectro HMBC, en el que puede destacarse la correlación entre H-12 con C-11, C-13 y C-14, la de H-11 con C-9, C-10 y C-12 y la de C-9 con H-11, H-12, H-25 y H-26. Estos datos confirman la estructura de 3 β -hidroxioleana-9,12-dien-28-oato de metilo para el producto **10**.

4.2.4 Bromación del ácido oleanólico (1) con Br₂/CCl₄

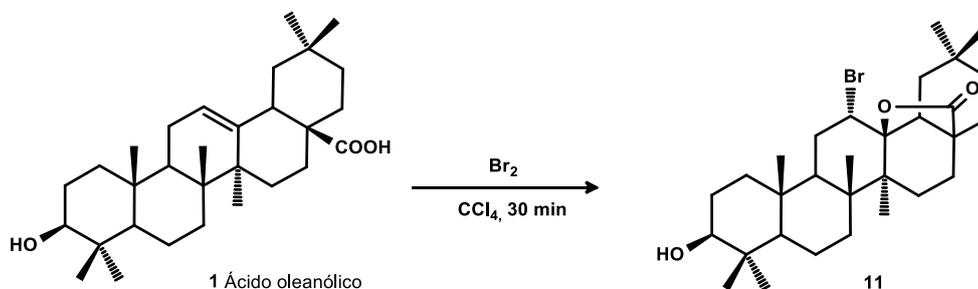


Figura 4.6. Bromación de ácido oleanólico (1) con Br₂/CCl₄ durante 30 minutos

La bromación de ácido oleanólico (1) con una disolución de bromo en tetracloruro de carbono durante 30 minutos da lugar a un producto en cuyo espectro de masas se aprecia la existencia de un átomo de bromo, presentando un pico molecular compatible con la fórmula molecular C₃₀H₄₇BrO₃. En su espectro de ¹H RMN no se observa la señal del protón vinílico sobre C-12 y sin embargo a δ 4.28 aparece una señal como doble doblete ($J_1 = 3.7$, $J_2 = 2.3$ Hz) originada por un protón ecuatorial geminal a átomo electronegativo, que en nuestro caso se trata de un átomo de bromo en C-12. En el espectro de ¹³C RMN aparece una señal a δ 56.58 originada por un carbono unido al átomo de bromo ya que esta señal se encuentra correlacionada con el protón que aparece a 4.28 ppm cuando se analiza el espectro HSQC. También en el espectro de ¹³C RMN se observa una señal de carbono oxigenado totalmente sustituido a 91.72 ppm. Cuando estudiamos el espectro HMBC observamos que la señal a δ 4.28 presenta correlación con C-9, C-11, C-13 y C-14. Estos datos nos indican que el producto **11** se trata de 12 α -bromo-3 β -hidroxiolean-28,13 β -olida³⁰⁹ y su formación podría explicarse mediante una adición electrofílica de bromo al doble enlace del ácido oleanólico (1) que generaría el ión bromonio por la cara α de la molécula y que posteriormente sería atacado por el grupo hidroxilo del carboxilato originando un anillo lactónico entre C-13 y C-28 y la apertura del ión bromonio para originar un derivado con un bromo axial sobre C-12 (figura 4.7)

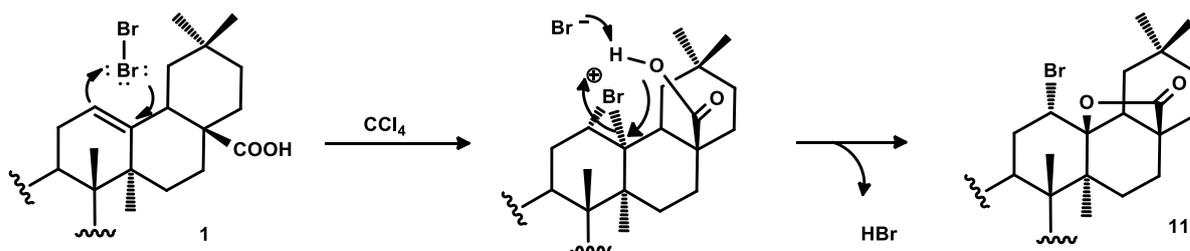


Figura 4.7. Mecanismo de formación del bromoderivado **11**

Cuando la reacción de bromación se deja evolucionar durante 12 horas, además del bromoderivado **11**, se obtiene una mezcla de productos de la que se han podido caracterizar los derivados **12-15** (figura 4.8).

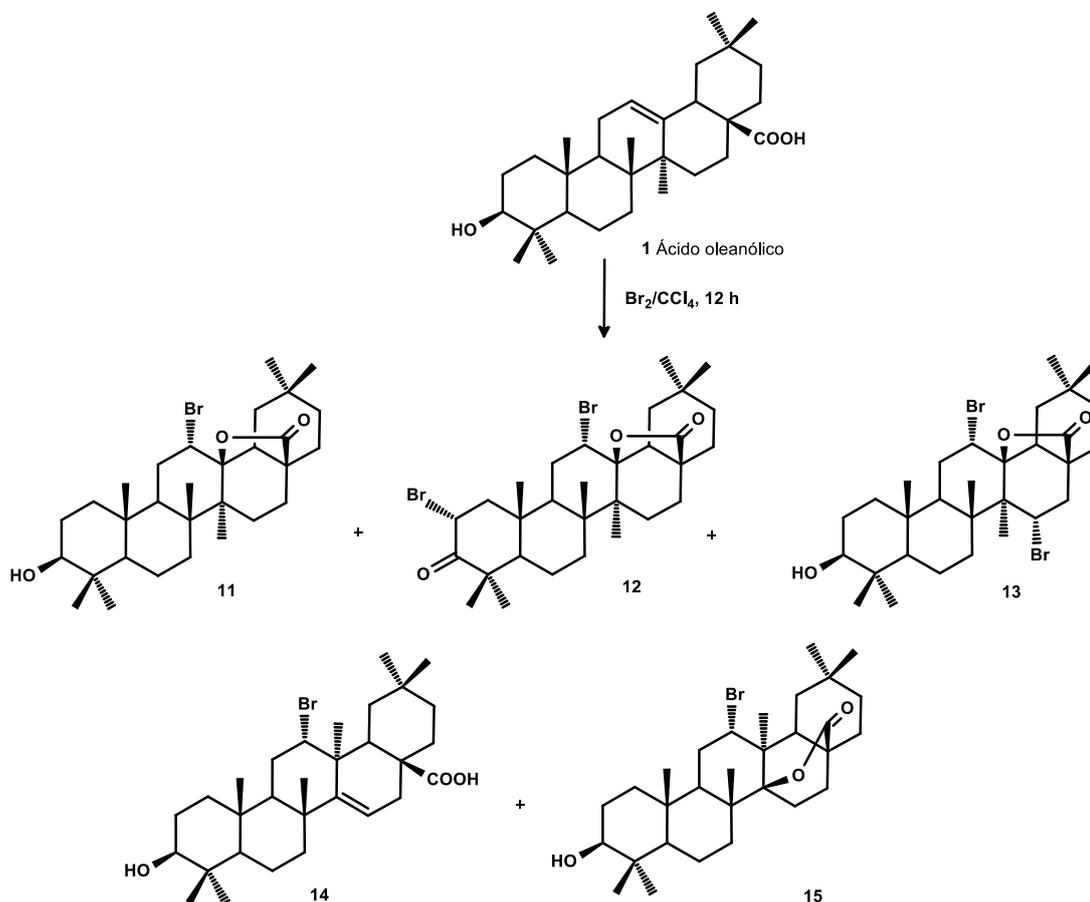


Figura 4.8. Bromación de **1** con Br_2/CCl_4 durante 12 horas

El producto **12** presenta en su espectro de masas un pico molecular compatible con la fórmula $C_{30}H_{45}Br_2O_3$. En su espectro de 1H RMN pueden observarse además de la señal del protón gemina a bromo axial en C-12 (δ 4.27, dd, $J_1=3.7$ Hz, $J_2=2.4$ Hz), una señal a δ 5.14 que aparece como doble doblete ($J_1=9.5$ Hz, $J_2=11.2$ Hz) originada por un protón axial geminal al segundo átomo de bromo presente en la molécula. No se observa la señal del protón axial geminal a grupo

hidroxilo en C-3 del producto de partida, por lo que, en principio, podría pensarse en una sustitución del grupo hidroxilo en C-3 por bromo. Sin embargo, en el espectro de ^{13}C RMN del producto **12** aparece una señal de grupo carbonilo a δ 208.67 y dado que esta señal se encuentra correlacionada con los protones de los grupos metilo de C-23 y C-24 cuando se analiza el espectro de HMBC, consideramos que se ha producido la oxidación del grupo hidroxilo en C-3 presente en el producto mayoritario en la reacción de bromación (**11**). Además, la correlación entre el protón que aparece a δ 5.14 con C-3 y C-1 nos indica que el segundo átomo de bromo se encuentra localizado en C-2. Así, consideramos que el producto **11** se trata de 2 α ,12 α -dibromo-3-oxoolean-28,13 β -olida.

En el espectro de masas del producto **13** observamos que aparece un pico molecular que nos indica, al igual que el producto **12**, que se trata de un derivado dibromado ($\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{Br}_2\text{O}_3$). El estudio del espectro de ^1H RMN del producto **13** nos indica que, al igual que en el producto **11**, existe la señal del protón ecuatorial geminal a bromo en C-12 a δ 4.30 ($J_1= 3.7$, $J_2= 2.4$ Hz). Sin embargo, se observa otra señal a δ 5.49 ppm que aparece como doble doblete originada por un protón axial ($J_1= 12.54$, $J_2= 6.60$ Hz) geminal al segundo átomo de bromo. Esta señal se encuentra correlacionada con C-8, C-14, C-16 y C-27 cuando se analiza el espectro HMBC, lo que es indicativo de que un átomo de bromo se encuentra en C-15. La estereoquímica de los carbonos bromados se determinó mediante experimentos NOE, donde el protón situado en C-12 presenta NOE con los protones de C-11 y C-18, lo que nos indica una disposición 12 β para dicho hidrógeno. El protón situado sobre C-15 origina NOE con los protones de C-16 y los protones del grupo metilo en C-26, compatible con una disposición 15 β para dicho protón (figura 4.9). Los demás datos espectroscópicos también confirman que el producto **13** se trata de 12 α ,15 α -dibromo-3 β -hidroxiolean-28,13 β -olida.

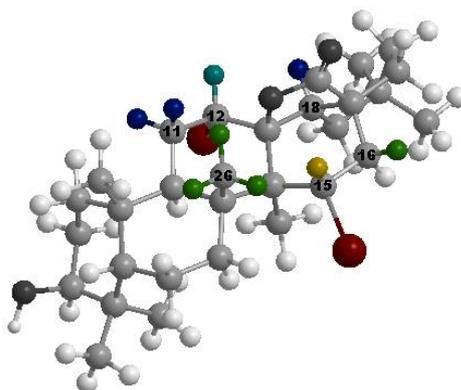


Figura 4.9. NOE del producto **13** en H-15 (amarillo) y H-12 (azul claro)

El espectro de masas del producto **14** presenta un pico molecular compatible con la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{BrO}_3$. En su espectro de ^1H RMN puede observarse la señal del protón ecuatorial geminal a bromo en C-12 a 4.48 ppm ($J_1= 9.1$ Hz, $J_2= 3.6$ Hz), existiendo además una señal más desapantallada que aparece como doble doblete (δ 5.79, 1H, $J_1= 7.1$ Hz, $J_2= 1.8$ Hz) y que en el espectro COSY se encuentra correlacionada con los protones que aparecen a 2.69 y

1.93 ppm. En el espectro de ^{13}C RMN pueden observarse dos señales de carbonos etilénicos, uno de ellos totalmente sustituido (δ 146.93) y otro metínico (δ 125.17). En el espectro HMBC podemos observar que el protón que aparece a 5.79 ppm se encuentra correlacionado con C-13, C-14, C-16 y C-17, mientras que el protón geminal a bromo en C-12 (δ 4.48) se encuentra correlacionado con C-14 y C-27 y los protones del grupo metilo en C-27 (δ 1.39) presentan correlación con C-12, C-13, C-14 y C-18. Estos datos nos sugieren que el grupo metilo de C-27 no se encuentra sobre C-14, como estaría en un esqueleto de oleanano, sino que se encuentra sobre C-13, existiendo un doble enlace entre C-14 y C-15 constituyendo una estructura de taraxerano. Así, en base a los datos espectroscópicos del producto **14**, consideramos que su estructura es de ácido 12 α -bromo-3 β -hidroxitaraxer-14-eno.

En el espectro de masas del producto **15** nos indica que se trata de un derivado monobromado isómero del compuesto **14**, presentando por lo tanto una fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{BrO}_3$. En su espectro de ^1H RMN no se observan señales de protones etilénicos y sólo se observan las señales de los protones geminal a bromo en C-12 a δ 4.40 ($J_1 = J_2 = 7.3$ Hz), y el protón axial geminal a grupo hidroxilo en C-3 (δ 3.19, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 5.0$ Hz). En su espectro de ^{13}C RMN pueden observarse dos carbonos totalmente sustituidos de los que uno de ellos se encuentra oxigenado (δ 45.96 y 91.28). El estudio del espectro HMBC nos permite asignar la posición de estos carbonos ya que la señal que aparece a 45.96 ppm presenta correlación con los protones situados en C-11, C-18 y C-27, lo que nos indica que el producto **15** posee una estructura de taraxerano. La existencia de correlación de los protones de C-27 con C-12, C-13, C-14 y C-18 confirma esta suposición. La señal que atribuimos a C-14 (δ 91.28) presenta correlación con los protones situados en C-16, C-18, C-26 y C-27, lo que nos sugiere la existencia de un anillo lactónico entre C-28 y C-14. La existencia de NOE entre el protón de C-12 (figura 2.10), geminal al átomo de bromo con los protones situados en C-11 β , C-18 y C-26 nos indica claramente una disposición 12 β para este protón. En base a estos datos, consideramos que la estructura para el producto **15** es 12 α -bromo-3 β -hidroxitaraxer-28,14 β -olida.

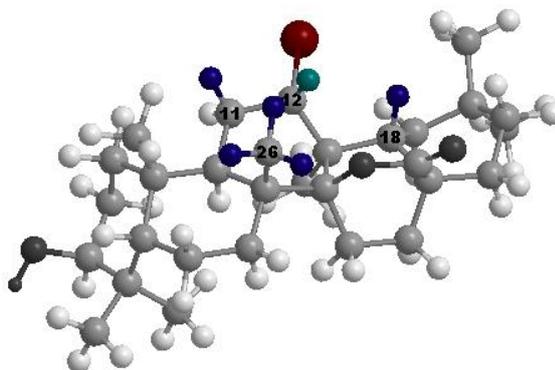


Figura 4.10. NOE existente en H-12 (azul claro) para el producto **15**

La formación de los productos **14** y **15** con esqueleto de taraxerano podría explicarse considerando que en primer lugar tiene lugar una sustracción de un protón axial de C-15 en el

producto **11** por medio de bromuro presente en el medio, para dar lugar al doble enlace entre C-14 y C-15 con migración del grupo metilo de C-27 situado en C-14 hacia C-13 por la cara α y apertura del anillo lactónico por la cara β . Esta transformación del esqueleto de oleanano a taraxerano se ve favorecida ya que todos los enlaces implicados se encuentran en posición *trans*-periplanar (figura 4.11, ruta a). A partir del taraxer-14-eno (**14**) generado, podríamos explicar la formación del dibromoderivado **13**, ya que el ataque de bromo al doble enlace del producto **14** originaría un 14 β ,15 α -dibromoderivado que evolucionaría hacia el producto **13** por ataque del grupo carboxilo a C-13 por la cara β y migración del enlace entre el grupo metilo de C-27 con C-13 hacia C-14 por la cara α y salida de bromuro (figura 4.11 ruta b). También podríamos pensar que el grupo carboxilo podría asistir produciendo la apertura del ión bromonio formando una lactona sobre C-14 produciéndose un posterior reordenamiento de la lactona hacia C-13 y migración del metilode C-27 hacia C-14 por la cara α para dar el dibromoderivado **13** (figura 4.11, ruta c). La existencia de trazas de HBr en el medio, podría explicar la formación de la lactona **15** mediante catálisis ácida por adición del protón al doble enlace formándose un carbocatión terciario en C-14 que se estabilizaría por ataque del carboxilo de C-28 para formar la lactona sobre C-14 por la cara β (figura 4.11, ruta d).

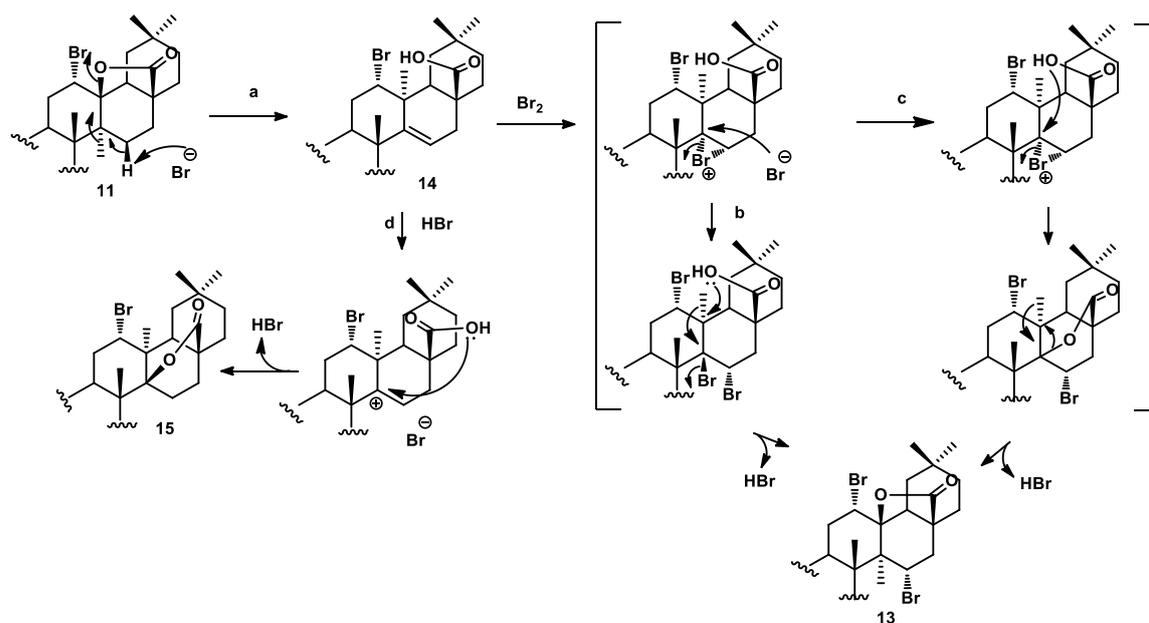


Figura 4.11. Propuesta mecanística para la formación de los productos **13**, **14** y **15** a partir del bromoderivado **11**.

4.2.5 Bromación de ácido oleanólico (1) con NBS/AIBN

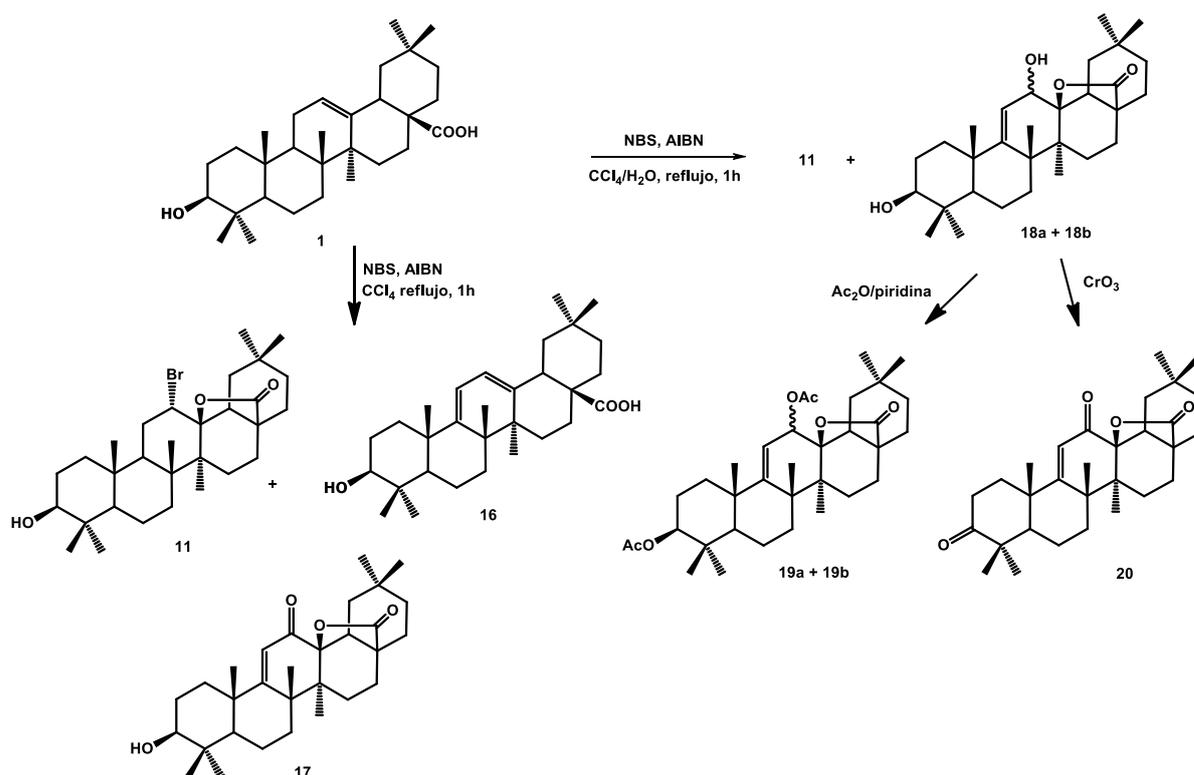


Figura 4.12. Tratamiento de 1 con NBS/ CCl_4 y NBS/ $\text{CCl}_4/\text{H}_2\text{O}$

Cuando la bromación del ácido oleanólico (1) se realiza con NBS y trazas de AIBN durante una hora, se observa la aparición del derivado monobromado 11 obtenido en la reacción con Br_2/CCl_4 junto con los productos 16 y 17. El espectro de masas del producto 16 nos indica que no se trata de un derivado bromado, presentando un pico molecular compatible con una fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_3$. En el espectro de ^1H RMN para el producto 16 podemos observar la existencia de un sistema AB originado por dos protones vinílicos a δ 5.57 (1H, d, $J = 5.8$ Hz) y δ 5.55 (1H, d, $J = 5.8$ Hz) similar al observado en el dieno 10. El estudio de los espectros de RMN nos confirma que el producto 16 se trata del ácido 3 β -hidroxioleana-9,12-dien-28-oico, obtenido por una bromación alílica en C-11 del ácido oleanólico (1) y posterior deshidrobromación para generar el doble enlace entre C-9 y C-11. Además de los productos mayoritarios, se obtiene un producto minoritario (17) en cuyo espectro de masas no se observa la existencia de bromo y su pico molecular presenta 14 u.m.a. más que el producto 16, indicativo de que el producto 17 presenta un átomo de oxígeno más y dos hidrógenos menos que el producto 16. Por otro lado, en el espectro de ^1H RMN del producto 17 se observa una señal singlete a δ 5.99 ppm y en su espectro de ^{13}C RMN aparece una señal a δ 192.48 ppm debida a un carbono carbonílico junto con dos señales de carbonos etilénicos, uno unido a hidrógeno (δ 121.73) y otro totalmente sustituido (δ 184.14). En el espectro HMBC se observa correlación entre el protón unido a carbono etilénico (δ 5.99) con

las posiciones C-8, C-10 y C-13, mientras que el carbono etilénico totalmente sustituido (δ 184.14) presenta correlación con los metilos de C-25 y C-26. Estos datos nos indican que el producto **17** posee un sistema α,β -insaturado en el anillo C con estructura de 3 β -hidroxi-12-oxoolean-9-en-28,13 β -olida. Probablemente este producto se forme por ataque de agua presente en el medio produciendo la sustitución del bromo en C-12 por un grupo hidroxilo que posteriormente se oxida al sistema α,β -insaturado. Cuando esta reacción se realiza en condiciones anhidras, sólo se obtienen los productos **11** y **16** mientras que si se realiza con adición de agua a la mezcla de reacción, entonces se obtiene el producto **11** y no se obtiene el dieno **16** sino que se obtienen una mezcla de alcoholes diastereómeros **18a** + **18b** de difícil purificación, probablemente debido al ataque del reactivo al dieno **16** conforme éste se va formando ya que cuando se realiza la bromación del dieno **16** en las mismas condiciones que las descritas para el ácido oleanólico (**1**) con NBS y adición de agua, sólo se obtienen la mezcla de alcoholes (**18a** + **18b**). Con objeto de intentar la purificación de esta mezcla de alcoholes se procedió a la acetilación de los mismos, obteniéndose una mezcla de diacetoxiderivados **19a** + **19b**, también de difícil separación cromatográfica. La confirmación de las estructuras de los alcoholes **18a** + **18b** se realizó mediante correlación química con el producto de oxidación de dicha mezcla generado con el reactivo de Jones originándose un único producto **20** en cuyo espectro de ^1H RMN aparece un singlete a δ 6.03 originado por el protón de C-11 y en su espectro de ^{13}C RMN pueden observarse dos grupos carbonilo en C-3 (δ 214.60) y C-12 (δ 201.87) así como los carbonos insaturados en C-9 (δ 167.50) y C-11 (δ 119.93).

A la vista de estos resultados podemos comprobar que cuando la reacción de bromación con NBS se realiza en condiciones anhidras, el producto mayoritario es el dieno **16**, procedente de la bromación alílica radicalaria en C-11 y posterior deshidrobromación. El producto minoritario **11** procede de la adición de bromo al doble enlace tal como hemos visto en el apartado anterior. Cuando la reacción no se realiza en condiciones anhidras, ambas reacciones compiten generando similares cantidades de los productos **11** y **16**, apareciendo un derivado α,β -insaturado en el anillo C (**17**) que nos indica que el agua puede participar en la reacción para dar un derivado hidroxilado en C-12 que posteriormente es oxidado. Cuando se añade agua a la mezcla de reacción, el dieno **16** reacciona, probablemente con el ácido hipobromoso generado a partir de NBS y agua para dar un 12-bromoderivado alílico con participación del grupo carboxilo que generaría la lactona entre C-28 y C-13. Este derivado podría generar un carbocatión alílico que reaccionaría con agua para dar la mezcla de alcoholes (**18a** + **18b**).

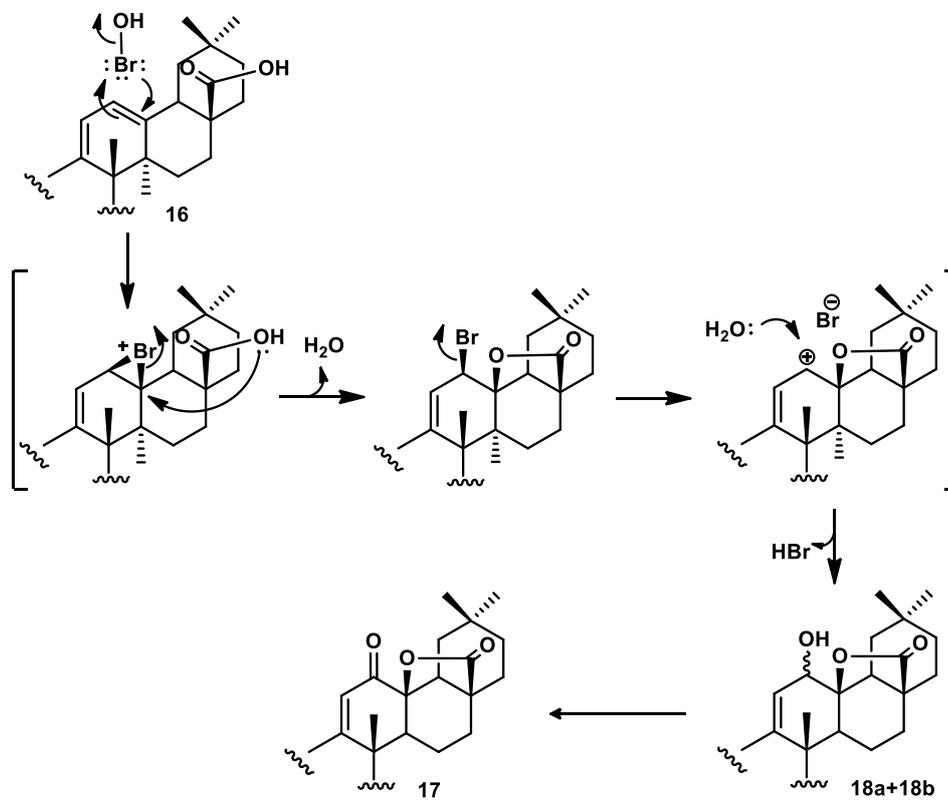


Figura 4.13. Mecanismo propuesto para la formación de los alcoholes **18a+18b**

4.2.6 Tratamiento del bromoderivado **11** con MeONa/MeOH

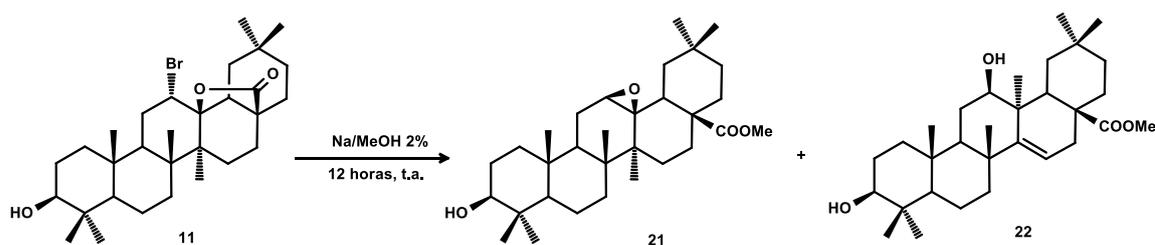


Figura 2.14. Productos de reacción de **11** tras tratamiento con Na/MeOH

El tratamiento del bromoderivado **11** con una disolución de Na en metanol (2%) origina los productos **21** y **22**. El producto mayoritario **21** presenta en su espectro de masas un pico molecular compatible con una fórmula molecular $C_{31}H_{51}O_4$, lo que nos indica que el átomo de bromo del producto de partida no está presente en dicho producto. En el espectro de 1H RMN del producto **21** podemos confirmar la desaparición de la señal del protón geminal al átomo de bromo en C-12, que el caso del producto **11** aparecía a 4.28 ppm. Sin embargo, en dicho espectro aparece una

señal singlete a 3.68 ppm debida a un grupo metoxilo y una señal a δ 2.75 originada por un protón geminal a función oxigenada. El estudio del espectro COSY nos revela acoplamiento entre el protón a δ 2.75 y los protones que aparecen a 1.83 y 1.68 ppm que según el espectro HMQC se encuentran en C-11 (δ 21.53). En el espectro de ^{13}C RMN aparece las señales de carbono carbonílico (δ 178.36) y metilo unido a oxígeno (δ 51.78), lo que nos sugiere que el producto **21** se trata de un éster metílico. También se observan dos señales de carbonos oxigenados a δ 67.18 y 56.13, siendo la más desapantallada originada por un carbono oxigenado totalmente sustituido. Esta señal se encuentra correlacionada en el espectro HMBC con la señal del protón unido al otro carbono oxigenado que aparece a δ 2.75 y con los protones situados en C-11, C-18 y C-27 lo que nos sugiere que en el producto **27** existe un epóxido entre C-12 y C-13. También, se observa que la señal del protón en C-12 se encuentra correlacionada con C-9, C-11, C-13 y C-18 y se confirma la presencia de éster metílico en C-28 al existir correlación del metoxilo a 3.68 ppm con el carbonilo de C-28.

La formación del epoxidado **21** puede explicarse mediante un mecanismo en el que el ión metóxido se adiciona al carbonilo del ciclo lactónico del bromoderivado **11** produciéndose a continuación la formación del carbonilo y eliminación del alcóxido sobre C-13 que ataca a C-12 por la cara β produciendo la salida de un bromuro y formando un 12 β ,13 β -epoxidado (figura 2.15) obtenido también a partir del ácido oleanólico por tratamiento con KOH/MeOH pero con menor rendimiento³¹⁰. De esta forma se puede confirmar que el producto **21** se trata de 3 β -hidroxi-12 β ,13 β -epoxiolean-28-oato de metilo.

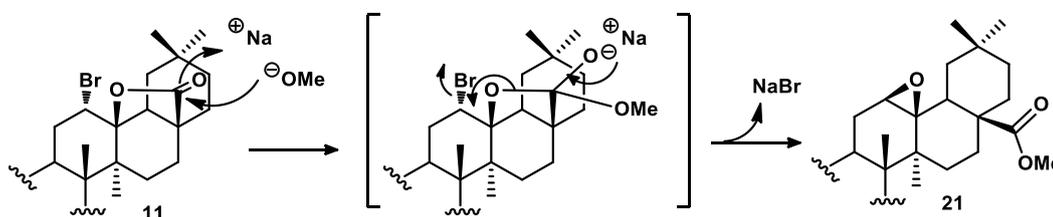


Figura 4.15. Mecanismo de formación del producto **21**

El segundo producto **22** aislado en la reacción del bromoderivado **11** con Na en metanol tampoco contiene átomo de bromo como se desprende del estudio de su espectro de masas en el que se observa un pico molecular compatible con la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$. En su espectro de ^1H RMN se observa, al igual que en el producto **21**, una señal de grupo metoxilo (δ 3.60, s) junto con una señal de un protón unido a un doble enlace a δ 5.56 que en el espectro COSY se encuentra correlacionada con las señales de los protones que aparecen a 2.22 y 1.99 ppm. También se observa un doblete a δ 3.70 ($J = 6.7$ Hz) originado por un protón geminal a grupo hidroxilo que se encuentra acoplado con uno de los protones de C-11, por lo que dicho protón deberá estar situado en C-12. En el espectro de ^{13}C RMN podemos observar la existencia de dos

³¹⁰ Farina, C; Pinza, M. *Gazz. Chim. Ital.* **1987**, *117*, 561-562.

carbonos etilénicos, uno de ellos (δ 120.06) correlacionado según el espectro HMQC con el protón que aparece a δ 3.70 ppm y el otro totalmente sustituido (δ 158.84). En el espectro HMBC se observa que estos carbonos etilénicos se encuentran correlacionados con los protones de C-16, lo que nos indica que el doble enlace se encuentra entre C-14 y C-15. La señal de H-12 se encuentra correlacionada con dos carbonos metínicos (C-9 y C-18), dos carbonos totalmente sustituidos (C-13 y C-18) y con un grupo metilo (C-27). La correlación de los protones de C-27 (δ 0.96) con C-12, C-13, C-14 y C-18 nos indica que la estructura del producto **22** no es del tipo oleanano sino del tipo taraxerano en el que dicho grupo metilo se encuentra sobre C-13 y no sobre C-14. La estereoquímica en C-12 se establece en base al efecto NOE observado entre el protón de C-12 con H-11, H-18 y el grupo metilo en C-27, lo que nos indica una estereoquímica 12β para el grupo hidroxilo. En base a estos datos consideramos que el producto **22** se trata de $3\beta,12\beta$ -dihidroxitaraxer-14-en-28-oato de metilo.

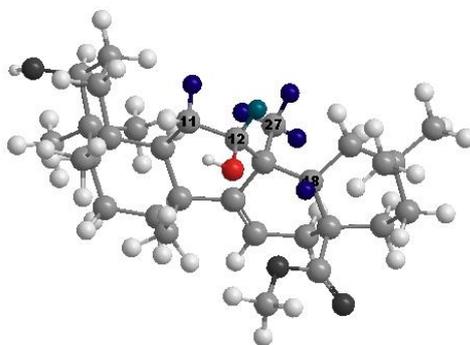


Figura 4.16. NOE encontrado en el producto **22** en el protón de C-12 (azul claro) que implican una disposición β del grupo hidroxilo del mismo.

La formación del producto **22** podría explicarse mediante un mecanismo de eliminación concertada por ataque del metóxido al protón 15β , que al estar *trans*-periplanar con el enlace entre el metilo de C-27 con C-14 promovería la formación del doble enlace entre C-14 y C-15 y migración del metilo de C-27 por la cara α hacia C-13 con la consiguiente apertura del grupo epoxi hacia C-12 obteniéndose el 12β -hidroxiderivado **22**.

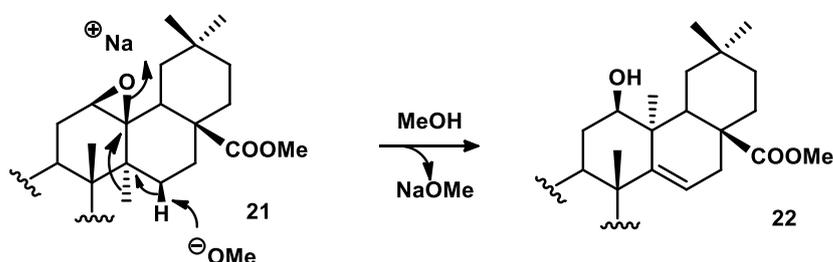


Figura 4.17. Eliminación concertada y reagrupación propuesta para la formación del producto **22**.

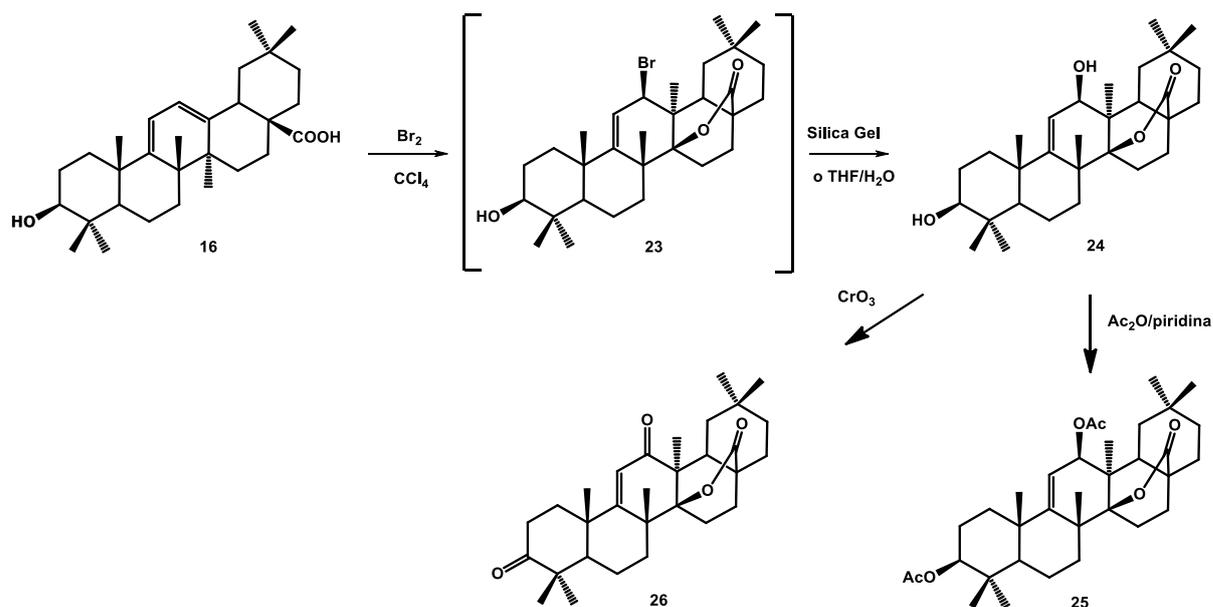
4.2.7 Tratamiento del dieno **16** con Br₂

Figura 4.18. Bromación de **16** con Br₂ durante 30 minutos

El tratamiento del ácido 3β-hidroxiolleana-9,12-dien-28-oico (**16**) con una disolución de Br₂ en CCl₄ durante 30 minutos origina un producto **23** que cuando se purifica en columna con gel de sílice da lugar a un producto **24** cuyo espectro de masas nos indica que tiene una fórmula molecular de C₃₀H₄₄O₄. En su espectro de ¹H RMN pueden observarse dos señales que aparecen como dobletes a δ 5.80 (J= 7.0 Hz) y δ 3.46 (J= 7.0 Hz) y que en el espectro COSY se encuentran correlacionadas. El protón que aparece a δ 5.80 se localiza sobre un carbono olefínico (118.37 ppm) y el protón que aparece a 3.46 ppm se localiza sobre un carbono oxigenado a δ 72.82 según nos indica su espectro HMQC. En el espectro de ¹³C RMN se observa también la señal de un carbono olefínico totalmente sustituido a 152.29 ppm que en el espectro HMBC presenta correlación con los metilos de C-25 y C-26. Estos datos nos sugieren que el producto **24** presenta un doble enlace entre C-9 y C-11 y un alcohol alílico en C-12. En el espectro HMBC puede observarse que el protón geminal al grupo hidroxilo en C-12 presenta correlación con C-9, C-11, C-13, C-14 y C-27. El desplazamiento químico de C-13 corresponde a un carbono totalmente sustituido (δ 41.99) y se encuentra correlacionado con H-11, H-12, H-15, H18 y los protones de C-27. El desplazamiento químico de C-14 (δ 90.93) corresponde a un carbono oxigenado totalmente sustituido y se encuentra correlacionado con H-12, H-15, 3H-26 y 3H-27. Los protones del grupo metilo en C-27 presentan correlación con C-12, C-13, C-14 y C-18. Todos estos datos nos indican que el producto **24** presenta una estructura de taraxer-9-en-28,14β-olida. La formación del alcohol alílico en C-12 queda confirmada ya que la acetilación del compuesto **24** origina el diacetoxidarivado **25** mientras que su oxidación con el reactivo de Jones conduce al 3,12-dioxodarivado **26**. En cuanto a la estereoquímica del carbono 12, la existencia de NOE entre el protón de C-12 con H-11, H-18 y los tres protones del grupo metilo de C-27, nos indica claramente

que dicho protón tiene una disposición α . Así la estructura del producto **24** sería 3 β ,12 β -dihidroxiotaraxer-9-en-28,14 β -olida.

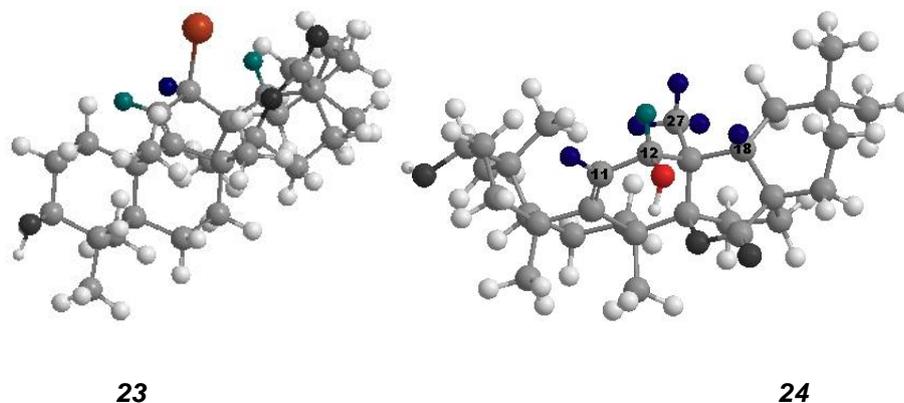


Figura 4.19. NOE que presentan el bromoderivado **23** y el hidroxiderivado **24**

El tratamiento del dieno **16** con Br_2 origina, al igual que en el ácido oleanólico (**1**), la bromación del doble enlace por la cara β entre C-12 y C-13 para dar 12 β -bromotaraxer-9-en-28,14 β -olida (**23**), algo que es confirmado por el NOE de dicho producto (Figura 4.19). Este compuesto **23**, al tratarse de un bromoderivado alílico no se pudo purificar en columna, aislándose en la purificación cromatográfica el diol **24** probablemente por ataque al derivado **23** de trazas de agua presente en la gel de sílice o en los disolventes utilizados. Para comprobar esto, disolvimos el bruto con el producto **23** obtenido de la bromación del dieno **16** en una mezcla tetrahidrofurano/agua y mantenemos la reacción a reflujo, obteniéndose el dihidroxiderivado **24**. La formación del producto **24** podría justificarse considerando que el grupo carboxilo de C-28 participa en la apertura del ión bromonio originado en la adición de bromo al doble enlace entre C-12 y C-13 por la cara β del dieno **16**. El ataque del grupo hidroxilo del carboxilo a C-14 por la cara β seguido de migración del enlace entre el grupo metilo de C-27 con C-14 por la cara α hacia C-13 produciría la apertura del ión bromonio hacia C-12 generando un 12 β -bromoderivado (**23**) en el que el esqueleto de oleanano se ha transformado a esqueleto de taraxerano (figura 4.20). Este bromoderivado alílico podría generar un carbocatión por pérdida de bromuro que sufriría el posterior ataque de agua por la cara β para dar el hidroxiderivado **24**.

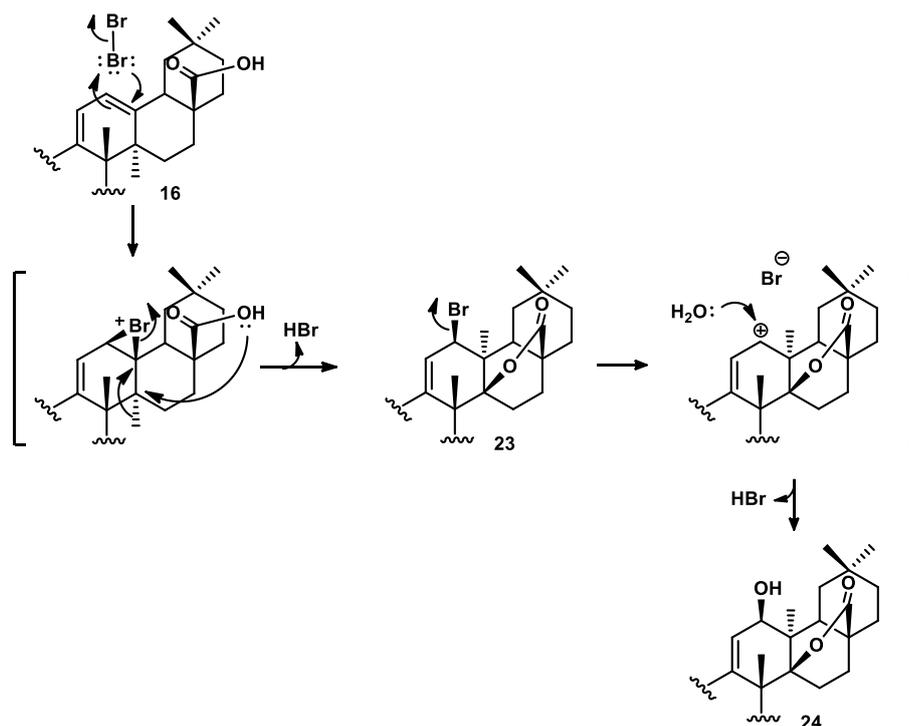


Figura 4.20. Mecanismo propuesto para la conversión del producto **16** en los derivados **23** y **24**

4.2.8. Bromación de ácido maslínico (**2**)

La bromación del ácido maslínico (**2**) en las mismas condiciones que las utilizadas para el ácido oleanólico (**1**), genera un derivado monobromado **27** en cuyo espectro de ^1H RMN se observa una señal a 4.28 ppm debida al protón axial geminal al bromo en C-12. En su espectro de ^{13}C RMN puede observarse un carbono metínico a δ 56.3 asignado a C-12 junto con un carbono oxigenado totalmente sustituido a δ 91.8, que nos indica la existencia de una lactona entre C-28 y C-13. Estos datos, junto con los obtenidos mediante el análisis de los espectros COSY, HMBC y HMQC nos indican que el producto **27** obtenido se trata de 12 α -bromo-2 α ,3 β -dihidroiolean-28,13 β -olida³¹¹. La formación de este producto puede explicarse, al igual que en el caso del bromoderivado **11**, por adición de bromo al doble enlace del ácido maslínico para dar un ión bromonio por la cara α que posteriormente es atacado por el grupo carboxilo por la cara contraria, produciéndose la formación del ciclo lactónico entre C-13 y C-28, quedando en C-12 un átomo de bromo en posición axial (figura 4.7).

³¹¹ Pereda-Miranda, A; Hernández, L.; López, R. *Planta Med.* **1992**, *58*, 223-224.

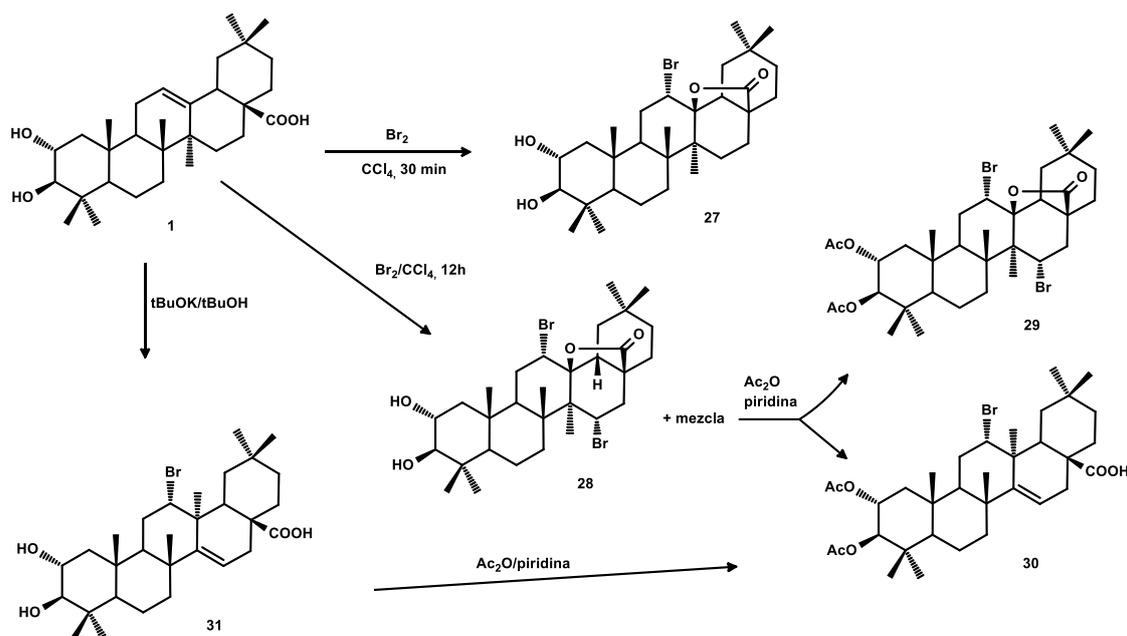


Figura 4.21. Tratamiento de **2** con Br_2 a 30 min y 12 horas

Como muestra la figura 4.21, cuando la reacción de bromación se prolonga hasta las 12 horas a temperatura ambiente se aísla un producto mayoritario **28** en cuyo espectro de masas aparece un pico molecular que nos indica que se trata de un derivado dibromado con una fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{Br}_2\text{O}_4$. En su espectro de ^1H RMN pueden observarse señales similares a las observadas en el espectro del dibromoderivado **13**: protones geminales a átomos de bromo en C-15 (δ 4.58, dd, $J_1 = 12.1$ Hz, $J_2 = 6.1$ Hz) y C-12 (δ 4.30). Cuando se comparan los espectros de ^{13}C RMN de los productos **27** y **28** se observan efectos α , β y γ similares a los observados al comparar los espectros de ^{13}C RMN de los productos **11** y **13** (ver tabla 7, anexo III). El estudio de los espectros COSY, HMQC y HMBC es compatible con la estructura de 12 α ,15 β -dibromo-2 α ,3 β -dihidroiolean-28,13 β -olida para el producto **28**.

La acetilación de una mezcla de productos obtenida esta reacción de bromación, origina dos diacetoxiderivados (**29** y **30**). El producto **29** se trata del diacetoxiderivado del producto **28**, mientras que el producto **30** se trata de un producto idéntico al obtenido en la acetilación de un producto **31** obtenido en el tratamiento del bromoderivado **27** con *t*-butóxido potásico en un intento de deshidrobromar dicho producto para generar el doble enlace entre C-11 y C-12. En el espectro de ^1H RMN del producto **30** puede observarse una señal de un protón etilénico a 5.81 ppm similar a la observada en el espectro del producto **14** y que era debida al protón de C-15 en un sistema de tarax-14-eno. La correlación existente entre los protones del grupo metilo de C-27 con C-12, C-13, C-14 y C-18 es indicativa de que el producto **30** se trata del 2 α ,3 β -diacetoxi-12 α -bromotaraxer-14-eno.

4.2.9. Tratamiento del bromoderivado **27** con MeONa/MeOH

El tratamiento del bromoderivado **27** con metóxido sódico en metanol da lugar a un producto **32** en cuyo espectro de ^1H RMN se observa una señal a δ 2.77 que aparece como doblete debida a un protón geminal a función oxigenada y un grupo metoxilo a δ 3.69. En su espectro de ^{13}C RMN se observan dos señales de carbonos oxigenados que corresponden a un carbono metínico (δ 56.1) y un carbono totalmente sustituido (δ 67.3). El estudio del espectro COSY nos revela acoplamientos entre el protón a 2.77 ppm y los protones que aparecen a δ 1.88 y 1.65 que según el espectro HMQC se encuentran en C-11 (δ 21.7). Estos datos son similares a los observados los espectros del epoxiderivado **21**. El estudio de los espectros COSY, HMBC Y HSQC para el producto **32** nos indica que el producto obtenido se trata de 2 α ,3 β -dihidroxi-12 β ,13 β -epoxiolean-28-oato de metilo y su formación a partir del bromoderivado **27** seguiría un mecanismo similar al descrito para la formación del epoxiderivado **21** a partir del bromoderivado **11** (figura 4.15).

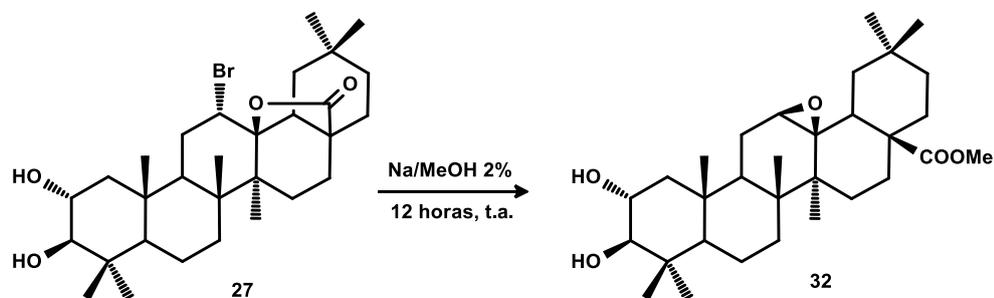


Figura 4.22. Epoxidación de **27** con MeONa/MeOH

4.2.10. Cloración de los ácidos oleanólico (**1**) y maslínico (**2**)

El tratamiento de una mezcla de los ácidos oleanólico (**1**) y maslínico (**2**) con lejía comercial permitió obtener los correspondientes derivados clorados **33** y **34**. En los espectros de ^1H RMN de ambos productos se observa la señal del protón geminal a un átomo de cloro con stereoquímica α en C-12 a 4.18 ppm.

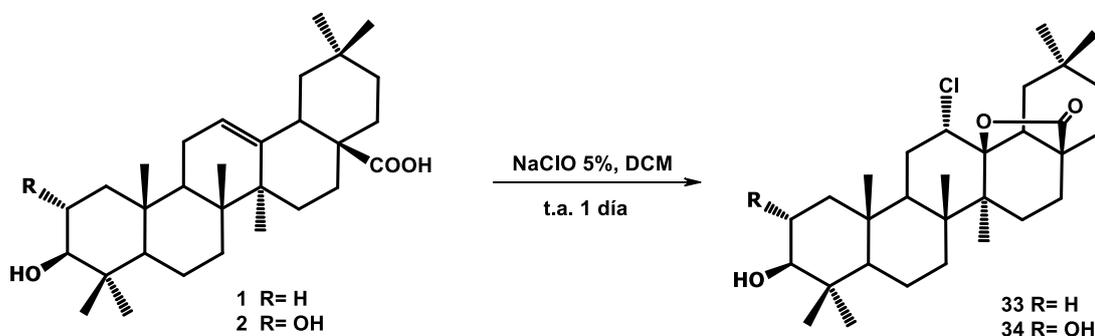


Figura 4.23. Cloración de **1** y **2** con NaClO al 5%

4.2.11. Tratamiento de ácido oleanólico (1) con ozono

El tratamiento de ácido oleanólico (1) con ozono da lugar a la formación de cuatro productos (35-38) como indica la figura 2.25. El estudio de los datos espectroscópicos del producto mayoritario 35 nos indica que existe un ciclo lactónico entre C-28 y C-13, dejando una función oxigenada en C-12, como se deduce del análisis de sus espectros de RMN: cuando se comparan los espectros de ^1H RMN del producto 35 y del ácido oleanólico (1), se observa la aparición de un doblete estrecho a δ 3.87 debido a la señal de un protón ecuatorial geminal a grupo hidroxilo axial y la desaparición de la señal de protón etilénico a 5.17 ppm. En el espectro de ^{13}C RMN puede observarse que no existen señales de carbonos etilénicos y, sin embargo, aparece una señal de carbono metínico oxigenado a δ 76.6 y otra señal de carbono oxigenado totalmente sustituido a 90.8 ppm. La existencia de NOE entre la señal de H-12 (δ 3.89) con H-11 y H-18 (δ 2.02) nos indica que estos protones tienen disposición β (figura 4.25). Estos datos junto con los obtenidos en los espectros COSY, HMBC y HMQC nos permiten asignar la estructura de $3\beta,12\alpha$ -dihidroxiolean-28,13 β -olida para el producto 35 (oleanderolida).

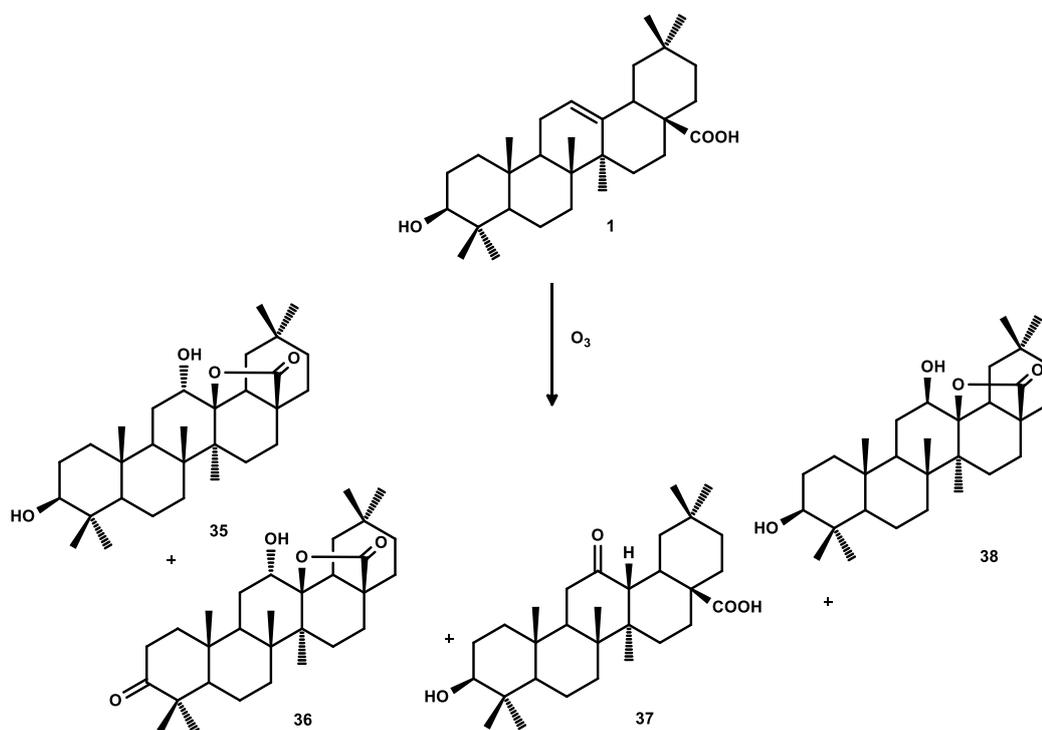


Figura 4.24. Productos del tratamiento del ácido oleanólico 1 con ozono

Otro de los productos (36) obtenido en esta reacción de ozonización presenta una fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$, dos unidades menor que el producto 35, lo que nos hace pensar que se trata de un producto de oxidación de dicho producto. Efectivamente, en el espectro de ^{13}C RMN podemos observar la existencia de un grupo carbonilo (δ 217.8) junto con la señal del protón ecuatorial geminal al grupo hidroxilo en C-12 (δ 76.4). En el espectro de ^1H RMN del producto 36 observamos la desaparición de la señal protón geminal al grupo hidroxilo de C-3 y aparición de las

señales de los protones en α en C-3 a 2.55-2.35 ppm. Todos los datos espectroscópicos coinciden en que el producto **36** se trata 12 α -hidroxi-3-oxo-olean-28,13 β -olida, producto resultante de la oxidación del grupo hidroxilo en C-3 de la oleanderolida **35**.

El producto **37** presenta una fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_4$. En su espectro de ^{13}C RMN aparece una señal de grupo carbonilo a δ 211.71 y a diferencia de lo observado en el espectro del producto **36**, no aparece señales de carbono oxigenado totalmente sustituido, apareciendo, sin embargo 4 señales de carbonos metínicos no oxigenados (δ 55.21, 51.99, 49.89 y 32.00). En su espectro de 1H RMN se observan señales de protones vecinales a grupo carbonilo a δ 2.25 y 2.13 que en el espectro COSY se encuentra correlacionadas con una señal a 1.6 ppm debida al protón sobre C-9 (δ 49.89). Otra señal de un protón vecinal a grupo carbonilo aparece a δ 2.68 ppm y en el espectro COSY se encuentra correlacionada con la señal a δ 2.76 debida al protón situado en C-18 (δ 32.00), lo que nos indica que dicho protón debe de encontrarse sobre C-13 (δ 51.99). En el espectro HMBC podemos observar que el protón que aparece a 2.68 ppm se encuentra correlacionado con C-12, C-14, C-18, C-19 y C-27 lo que nos confirma la localización de dicho protón en C-13. La estereoquímica de C-13 la hemos deducido considerando el NOE existente entre la señal del protón situado en este carbono y el grupo metilo de C-26, lo que nos indica que ambos se encuentran con una disposición β (figura 4.26). Así, asignamos al producto **37** la estructura de ácido 3 β -hidroxi-12-oxo-13 β -olean-28-oico.

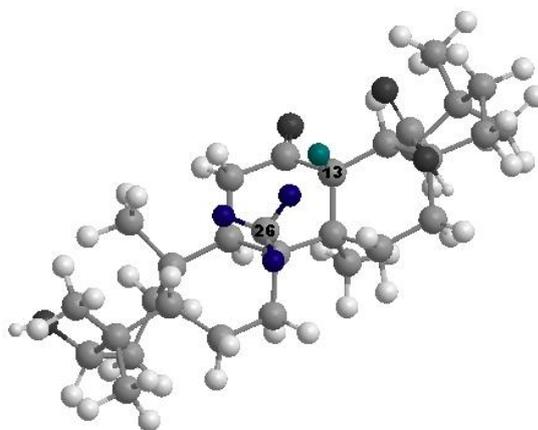


Figura 4.25. NOE del producto **37** donde se muestra la interacción de H-13 (azul claro) con los protones situados en C-26 (azul oscuro).

El último producto (**38**) aislado en el tratamiento de ácido oleanólico (**1**) con ozono presenta unos datos espectroscópicos similares a los de su isómero **35**. En su espectro de 1H RMN observamos, sin embargo que la señal de un protón geminal a grupo hidroxilo que aparece a 3.74 ppm aparece como un doble doblete con mayores constantes de acoplamiento ($J_1= 5.8$ Hz, $J_2= 11.6$ Hz) que las observadas en el caso del producto **35** ($J_1= J_2= 2.9$ Hz), lo que nos hace pensar que el producto **38** se trata del epímero en C-12 del producto **35**. El NOE observado entre el protón de H-12 (δ 3.74) con los protones del grupo metilo de C-27 nos indica una disposición β del grupo hidroxilo en C-12 (figura 4.26). Para confirmar que los productos **35** y **38** son epímeros en C-12,

se procedió a la correlación química de ambos mediante oxidación de cada uno de ellos con el reactivo de Jones. En ambos casos se obtiene el mismo 3,12-dioxoderivado (**39**), por lo que el producto **38** se trata de 3 β ,12 β -dihidroiolean-28,13 β -olida.

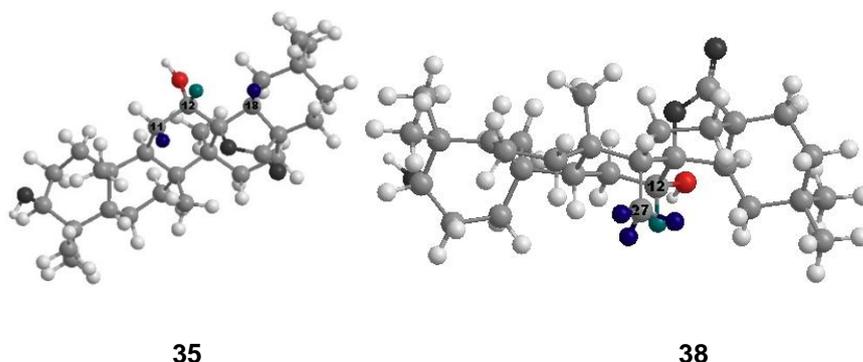


Figura 4.26. NOE que se observa entre H-12 α en (**35**) y entre H-12 β en (**38**)

Aunque se ha descrito que la formación de la oleanderolida **35** a partir del tratamiento del ácido oleanólico (**1**) con ozono podría transcurrir por formación de un 12 α ,13 α -epóxido³¹², la formación del producto mayoritario **35**, también podría explicarse considerando la formación del molozónido correspondiente por la cara α menos impedida y posterior ataque del grupo carboxilo de C-28 originando la lactonización sobre C-13, aparición de un grupo hidroxilo axial en C-12 y liberación de oxígeno (figura 4.27). De igual forma, el epímero **38** podría formarse por ataque del ozono por la cara β para evolucionar hacia un grupo hidroxilo ecuatorial en C-12 por pérdida de oxígeno y generación de un carbocatión terciario que sería estabilizado por el grupo carboxílico.

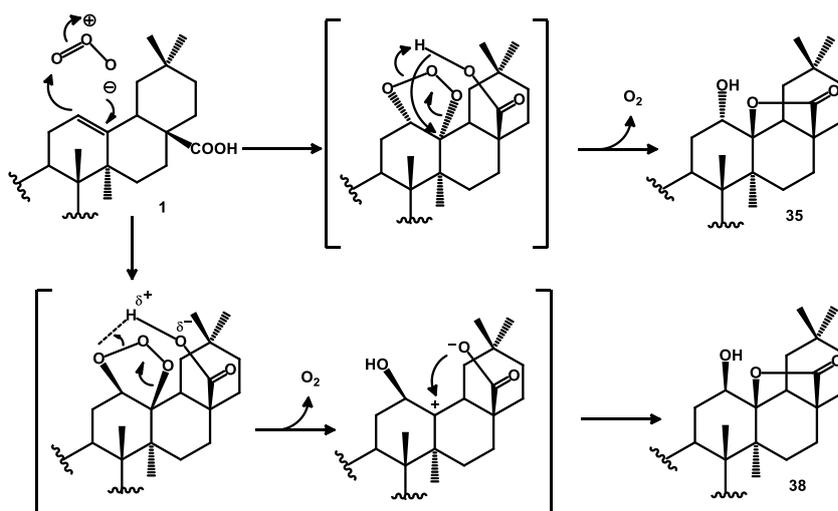


Figura 4.27. Posible mecanismo de formación del producto **35** y **38**

³¹² Shaiq Ali, M.; Jahangir, M.; Shazad ul Hussan, S.; Choudhary, M. I. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 295-299.

La formación del producto **37** podría explicarse considerando que el molozónido formado evoluciona de manera que se forma un doble enlace entre el oxígeno y C-12 con migración por la cara β de un hidruro hacia C-13 y liberación de oxígeno molecular sin participación del grupo carboxilo en C-28, como puede apreciarse en la figura 4.30.

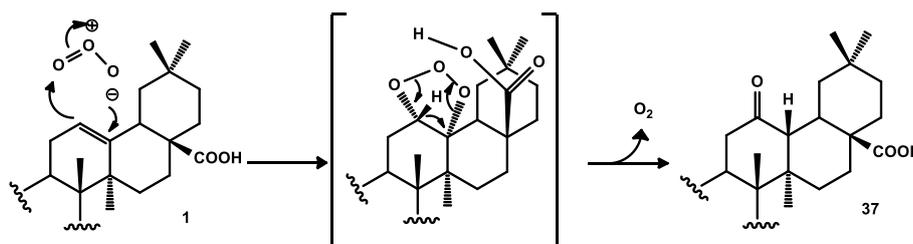


Figura 4.30. Mecanismo de formación del producto **37**

4.2.12. Tratamiento de ácido maslínico (**2**) con ozono

Del tratamiento de ácido maslínico (**2**) con ozono se han aislado dos productos (**40** y **41**). El producto más apolar **40**, presenta una fórmula molecular $C_{30}H_{46}O_5$. En su espectro de ^{13}C RMN se observa una señal de carbono carbonílico a 205.81 ppm junto con una señal de carbono oxigenado totalmente sustituido a 91.15 ppm, lo que nos sugiere que dicho producto **40** presenta un grupo lactónico entre C-28 y C-13. En el espectro de 1H RMN se observan señales de protones vecinales a grupo carbonilo a δ 2.74 y 2.39 que en el espectro COSY se encuentran correlacionadas entre sí y a su vez con un protón a δ 1.58 que según el espectro HSQC se encuentra en C-9, por lo que estos protones deben encontrarse en C-11 vecinales al grupo carbonilo sobre C-12. En el espectro HMBC podemos observar que existe correlación de estos protones con C-9 y C-12, y del protón sobre C-18 (δ 2.53) con los carbonos C-12, C-13, C-16, C-17, C-19 y C-28 lo que nos confirma que el producto **40** se trata de 2 α ,3 β -dihidroxi-12-oxo-olean-28,13 β -olida.

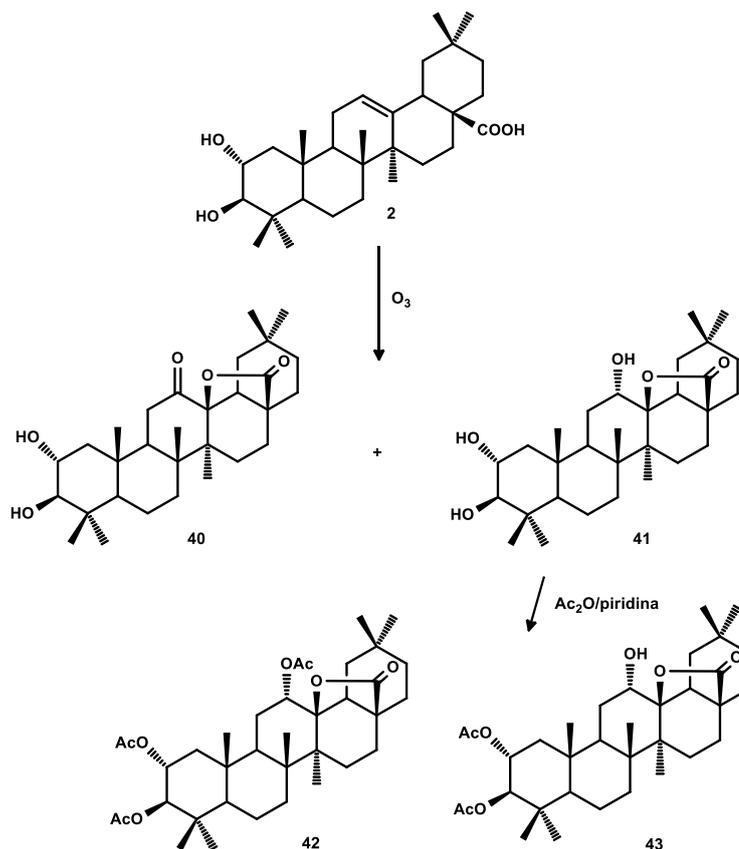


Figura 4.31. Productos aislados tras tratamiento de **2** con ozono

El producto mayoritario **41** presenta en sus espectros de RMN señales similares a las observadas en el producto **35** originadas por la formación de un ciclo lactónico entre C-28 y C-13, dejando una función oxigenada en C-12: aparición de un doble doblete a δ 3.86 debido a la señal de un protón geminal a grupo hidroxilo axial. Por otra parte, en su espectro de ^{13}C RMN, claramente se observa que no existen señales debidas a carbonos con doble enlace y sí se observan las señales de dos carbonos oxigenados, uno metino a 75.81 ppm y otro totalmente sustituido a 91.01 ppm. Todos sus datos espectroscópicos concuerdan con la estructura de $2\alpha,3\beta,12\alpha$ -trihidroiolean-28,13 β -olida para el producto **41**, cuya formación puede explicarse, al igual que en el producto **35**, por el mecanismo de adición de ozono al ácido maslínico (**2**) indicado en la figura 4.27.

La acetilación de la lactona **41** con Ac_2O en piridina origina dos derivados **42** y **43**. El derivado **42**, más apolar corresponde al triacetoxiderivado de la lactona **41** en la que todos sus grupos acetoxilo han sido acetilados. El derivado **43** muestra en su espectro de ^1H RMN que se han acetilado los grupos hidroxilo situados en C-2 y C-3, quedando el grupo hidroxilo axial en C-12 sin acetilar, como claramente puede observarse al aparecer la señal de su protón geminal a 3.89 ppm similar a la observada en el espectros de la lactona **41**.

El tratamiento del derivado diacetilado **6** de ácido maslínico (**2**) con ozono en similares condiciones a las realizadas con el ácido **2** conduce a la formación de dos productos, uno de ellos

con propiedades espectroscópicas similares a las observadas en el producto **43**, obtenido en la acetilación parcial de la lactona **41** (Figura 4.32). El segundo producto **44** obtenido en la reacción corresponde presenta una fórmula molecular $C_{34}H_{50}O_7$. En su espectro de 1H RMN puede observarse que se trata de un 2,3-diacetoxiderivado, observándose señales similares a las que aparecen en el espectro del producto **40** y que eran debidas a los protones de C-11 (δ 2.72 y 2.32) vecinales a grupo carbonilo sobre C-12. La existencia en el espectro de ^{13}C RMN de la señal de carbono oxigenado totalmente sustituido a 91.01 ppm nos confirma junto con los demás datos espectroscópicos que el producto **44** se trata del 2 α ,3 β -diacetoxi-12oxoolean-28,13 β -olida.

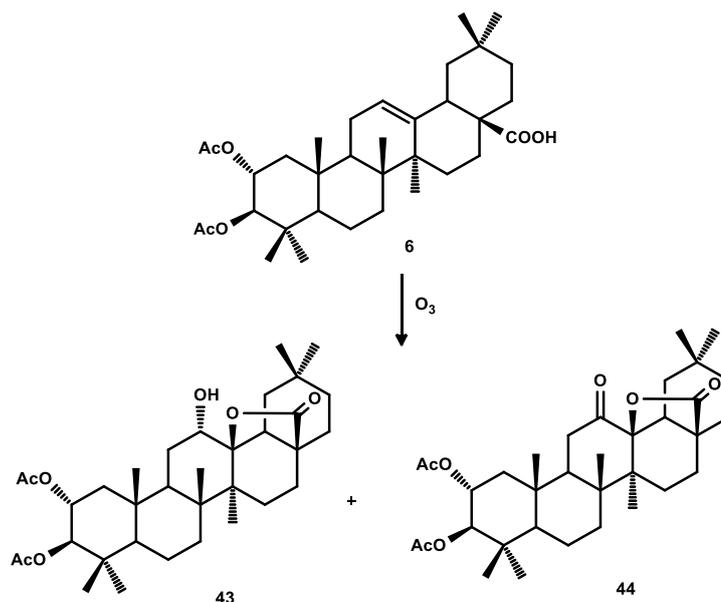


Figura 4.32. Tratamiento del derivado **6** con ozono

4.2.13. Reacción de reducción con $LiAlH_4$

Otra posible transformación química era convertir ambos ácidos en sus correspondientes alcoholes. Para ello, ácido oleanólico (**1**) y ácido maslínico (**2**) se disuelven en THF y se tratan con $LiAlH_4$ a reflujo durante 1 hora, obteniéndose los compuestos **45** y **46** respectivamente (figura 4.33). Estos hidroxiderivados también pueden obtenerse por reducción de los ésteres metílicos **7** y **8** por el mismo procedimiento. El compuesto **45** presenta posee un espectro de masas un pico molecular compatible con la fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_2$, lo que nos indica que la reducción de ácido carboxílico se ha producido al tener un átomo de oxígeno menos y dos hidrógenos más que el ácido oleanólico. En su espectro de 1H RMN se observa la aparición de dos dobletes a 3.19 y 3.52 ppm correspondientes a un sistema AB originado por los hidrógenos que ahora hay en C-28. En el espectro de ^{13}C RMN no se observa la señal del grupo carboxílico y sí una señal de un carbono metilénico oxigenado a δ 69.8. El estudio de los espectros COSY, HSQC y HMBC nos permiten confirmar la estructura de 3 β ,28-dihidroxiolean-12-eno (eritrodio) para el producto **45**. El espectro de masas para el compuesto **46** presenta un pico molecular que nos indica que presenta un átomo de oxígeno más que el producto **45**. En sus espectros de 1H RMN y ^{13}C RMN se observan señales

similares a las observadas en el espectro del producto **45** que eran originadas por un grupo hidroximetilénico en C-28, originado en la reducción del grupo carboxilo del ácido maslínico (**2**). Todos los datos espectroscópicos confirman la estructura de 2 α ,3 β ,28-trihidroiolean-12-eno para el producto **46**. Además y como se muestra en la figura 2.32, la reducción de los ésteres metílicos de los correspondientes ácidos oleanólico y maslínico (**7** y **8**) también origina los respectivos alcoholes **45** y **46**. La acetilación de estos alcoholes **45** y **46** con Ac₂O en piridina origina los derivados acetilados **47** y **48** respectivamente.

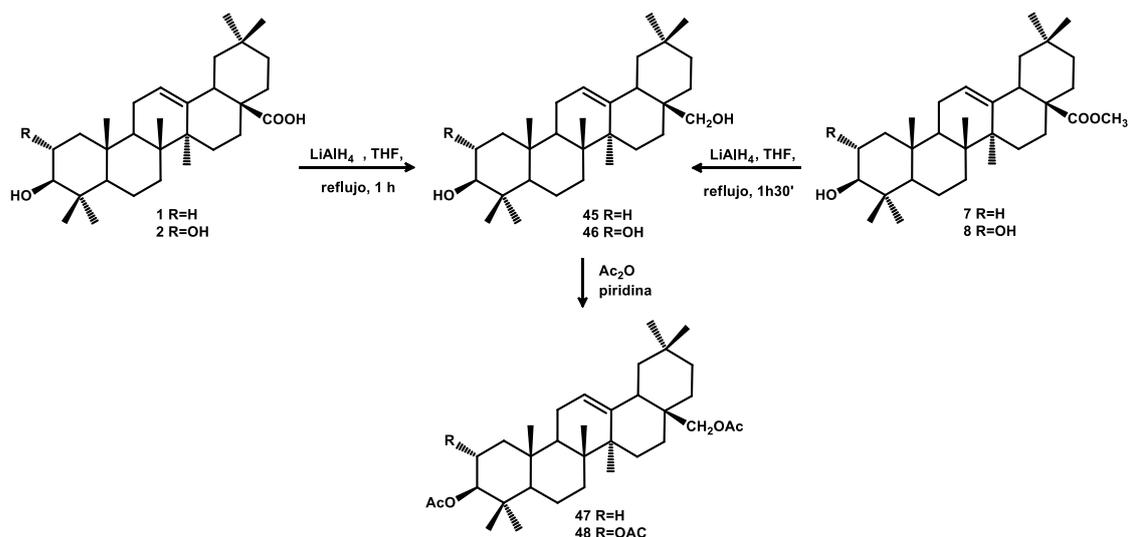


Figura 4.33. Síntesis de los alcoholes (**45**) y (**46**)

4.2.14. Tratamiento del trihidroderivado **46** con ozono

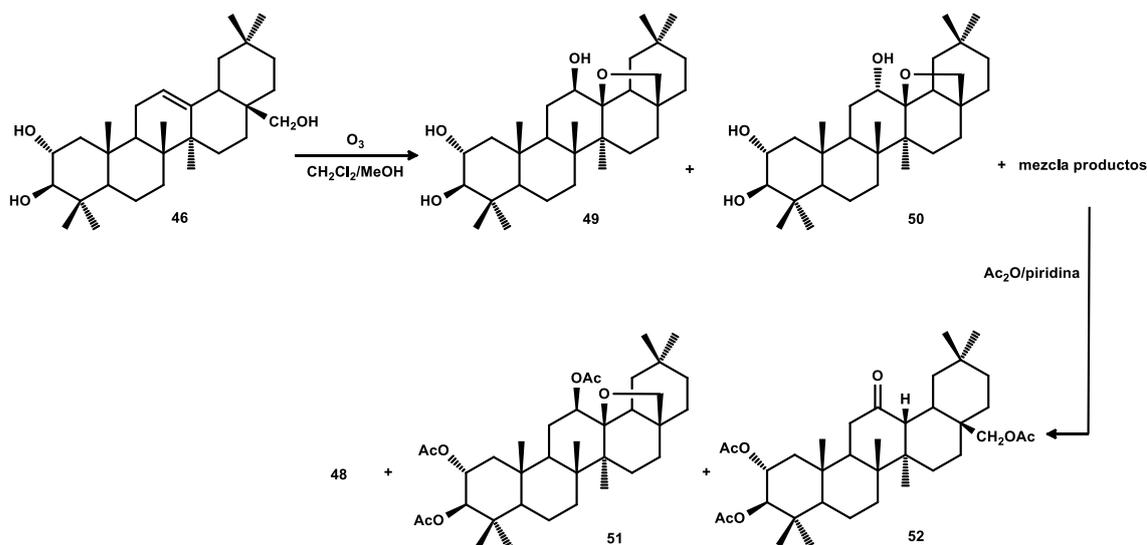


Figura 4.34. Tratamiento del producto **46** con ozono

El tratamiento del producto **46** con ozono origina una mezcla de productos de la que se aíslan dos productos isómeros **49** y **50** ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_4$) cuyos espectros de ^1H RMN son similares salvo en una señal que en el espectro del producto **49** aparece como un doble doblete originado por un

protón axial geminal a grupo hidroxilo (δ 3.64, dd, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz), mientras que en el espectro del producto **50** la señal del protón geminal a grupo hidroxilo es debida a un protón ecuatorial (δ 3.73, sa). En los correspondientes espectros COSY, ambas señales están correlacionadas con las señales de los protones sobre C-11 y en sus espectros de ^{13}C RMN ambos productos presentan una señal debida a un carbono oxigenado totalmente sustituido que en sus espectros HMBC se encuentra correlacionada con las señales del sistema AB originado por los protones de C-28, esto nos sugiere la existencia de un puente de oxígeno entre C-28 y C-13. Al igual que sucedía en la ozonolisis del ácido oleanólico, el ataque del ozono puede tener lugar por ambas caras del doble enlace para dar un molozónido que evolucionaría hacia los epímeros **49** y **50** por participación del grupo hidroxilo en C-28 que atacaría a C-13, produciéndose la liberación de oxígeno y la formación de un grupo epoxi entre C-28 y C-13. La estereoquímica de C-12 en cada producto se ha determinado por mediante experimentos NOE entre las señales de los protones situados en este carbono y los protones C-11 y C-18 para el producto **49** y los protones del grupo metilo de C-26 en el caso del producto **50** (figura 4.34). Por lo tanto consideramos que los productos **49** y **50** poseen la estructura de $13\beta,28$ -epoxi- $2\alpha,3\beta,12$ -trihidroioleanano con una configuración 12β para el producto **49** y 12α para el producto **50**.

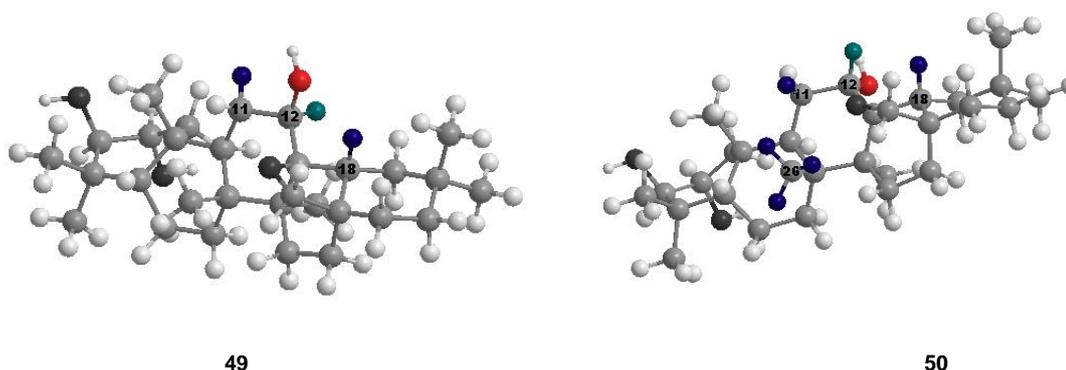


Figura 4.35. NOE en H-12 (azul claro) de los productos **49** (izquierda) y **50** (derecha)

Como se aprecia en la figura 2.35, de la reacción de **46** con ozono también se aísla una mezcla de productos que es acetilada con Ac_2O en piridina aislándose, después de su purificación cromatográfica un producto cuyas propiedades espectroscópicas son idénticas a las del triacetato del eritrotriol **48** y dos productos **51** y **52**. El producto **51** posee una fórmula molecular $\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_7$, lo que supone un aumento de $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$ que correspondería con el producto de acetilación de uno de los epímeros (**49** o **50**) aislados anteriormente. El espectro de ^1H RMN nos indica claramente que se trata del derivado triacetilado del producto **49** ya que aparece una señal como doblete a δ 5.16 originada por un protones axial a grupo acetoxilo ($J_1 = 11.8$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, H-12). Todos los datos espectroscópicos nos confirman que el producto **51** se trata del $13\beta,28$ -epoxi- $2\alpha,3\beta,12\beta$ -triacetoxioleanano.

El último producto **52** aislado en la ozonización presenta una fórmula molecular $\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_7$. En su espectro de ^1H RMN se observa que se trata de un derivado triacetilado procedente de la

acetilación de los grupos hidroxilos existentes en C-2, C-3 y C-28 ya que aparecen señales similares a las observadas en el triacetato del eritrotriol **48**. Sin embargo, cuando se comparan ambos espectros puede verse que en el espectro del producto **52** no aparece la señal del protón etilénico de C-12, sino que aparece una señal como doblete a δ 2.70 ($J= 3.7$ Hz), que en el espectro COSY se encuentra correlacionada con el protón situado en C-18 (δ 2.16). En el espectro de ^{13}C RMN puede observarse una señal de grupo carbonilo a δ 211.30 que se encuentra correlacionada, en el espectro HMBC, con los protones vecinales a 2.20 y 2.70 ppm. Estos datos nos indica que sobre C-12 existe un grupo carbonilo y el protón que aparece a δ 2.70 debe encontrarse sobre C-13, lo que se confirma por su correlación con C-12, C-14, C-18, C-19 y C-27 cuando se estudia su espectro HMBC. La estereoquímica de C-13 se determinó considerando el NOE existente entre el protón de C-13 y los protones de C-26 y C-18, que nos permite asignar una disposición β para el hidrógeno de C-13 (figura 4.35). Así la estructura del producto **51** será $2\alpha,3\beta,28$ -triacetoxi-13 β -olean-12-ona, cuya formación podría explicarse de forma similar a la indicada para la cetona **37** obtenida en la ozonización de ácido oleanólico (**1**) (figura 4.26).

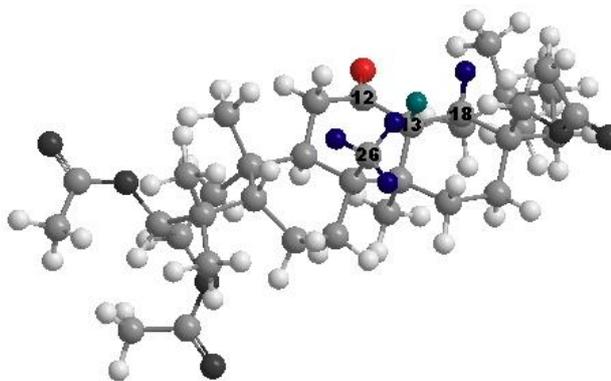


Figura 4.36. NOE del producto **52** donde se aprecia la configuración β de H-13 (azul claro)

A la vista de los resultados obtenidos en las anteriores reacciones, se seleccionaron los correspondientes sustratos para poder realizar los primeros ensayos de biotransformación con hongos filamentosos atendiendo a la disponibilidad de los mismos considerando aquellas reacciones que conducen a un determinado producto con buen rendimiento, fácil purificación y cantidades suficientes para afrontar las correspondientes biotransformaciones. En este sentido, para el estudio que se comentará en la siguiente parte de la Discusión de esta Memoria, se seleccionaron los productos que se muestran en la figura siguiente,

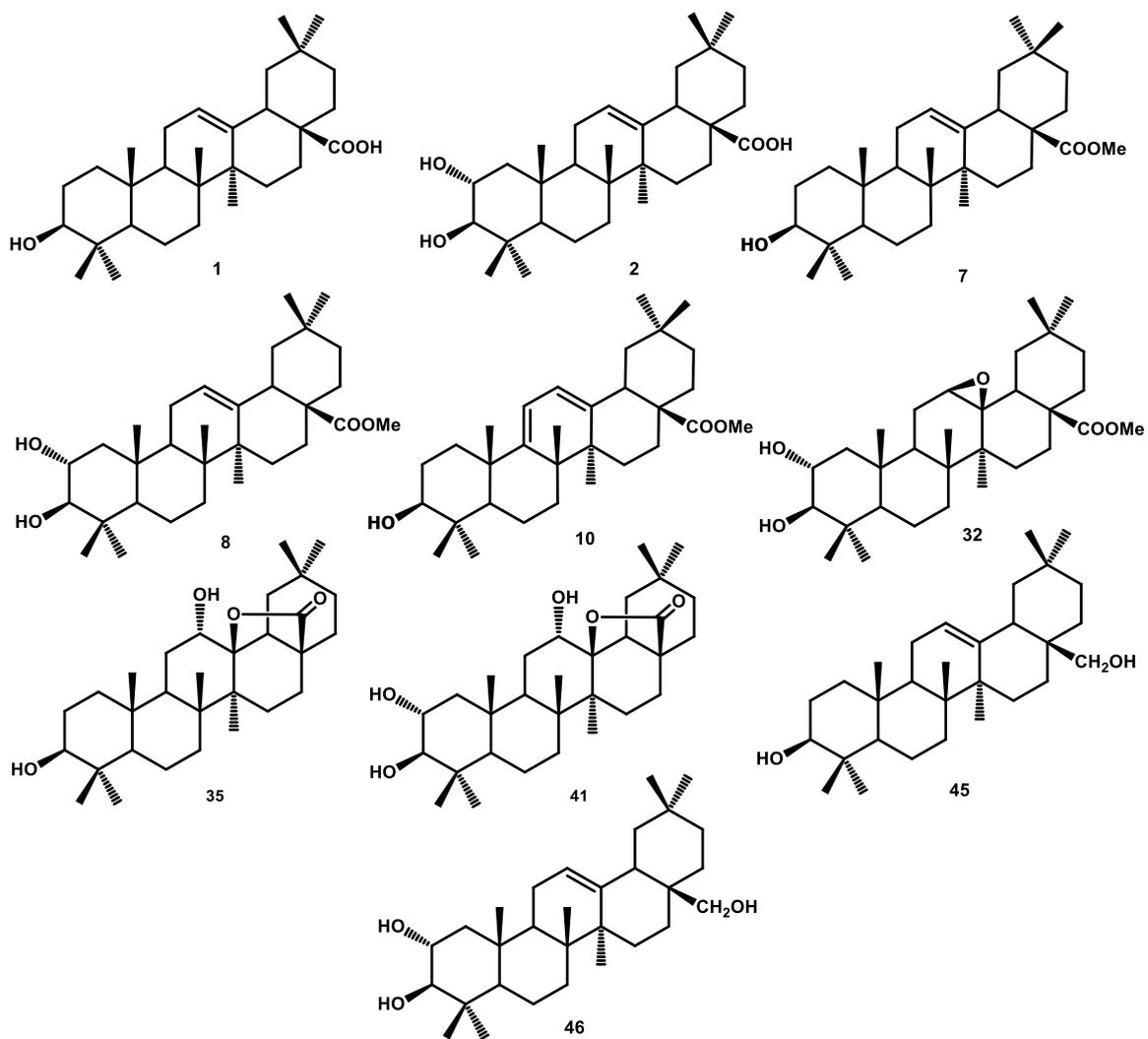


Figura 4.37. *Sustratos seleccionados para las pruebas preliminares de biotransformación*

4.3. BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS ÁCIDOS CON *R. miehei*

4.3.1 Incubación de ácido oleanólico con *R. miehei*

La biotransformación del ácido oleanólico (**1**) se realizó utilizando su sal sódica (**3**, 500 mg) con objeto de mejorar su solubilidad en el medio en el que se había desarrollado *Rhizomucor miehei*. La biotransformación se mantuvo durante trece días originando una mezcla de metabolitos de la que se aislaron 320 mg de ácido oleanólico **1** (64%) y tres metabolitos (**53-55**).

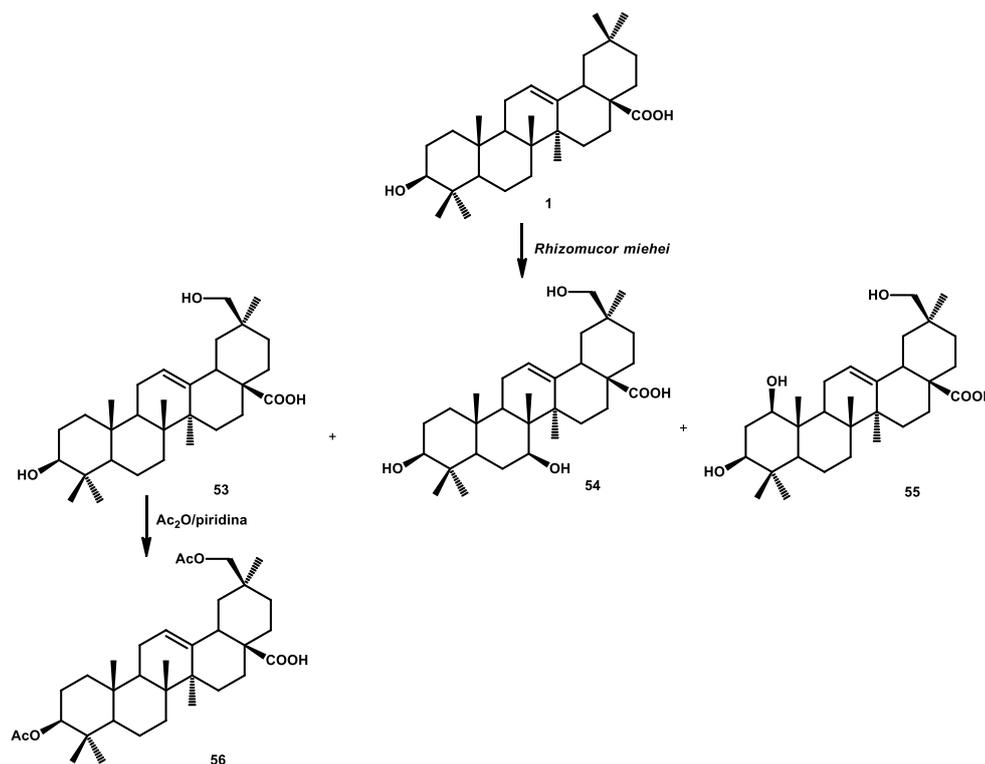


Figura 4.38. Biotransformación del ácido oleanólico (**1**) con *Rhizomucor miehei*

El metabolito **53** presenta en su espectro de masas un pico molecular a 473,3622 u.m.a. compatible con una fórmula molecular de $C_{30}H_{48}O_4$, que nos indica que un átomo de oxígeno ha sido introducido por el microorganismo en el sustrato **1**. Su espectro de 1H RMN se diferencia con respecto al del sustrato **1** en la aparición de un sistema AB con dobletes centrados a 3.55 y 3.43 ppm originado por dos protones geminales a grupo hidroxilo sobre carbono primario. Esto nos sugiere que uno de los siete grupos metilo del sustrato **1** ha sido hidroxilado por el microorganismo, lo que es compatible con la aparición de seis señales de grupo metilo en los espectros de 1H y ^{13}C RMN del metabolito **53** y el nuevo grupo hidroximetilénico ya comentado anteriormente. Estos protones están correlacionadas con la señal a 66.5 ppm en el espectro HSQC y la localización de la nueva hidroxilación la realizamos comparando los espectros de ^{13}C RMN del metabolito **53** y sustrato **1** y mediante el estudio del espectro HMBC del metabolito **53**. La hidroxilación sobre los grupos metilo sobre C-4 (C-23 y C-24) puede descartarse ya que los protones en C-3 (δ 3.15) y C-5 (δ 0.74) se encuentran correlacionados con estos grupos metilo al analizar el espectro HMBC.

La correlación observada entre H-9 con C-25 y C-26 nos indica que estos carbonos tampoco han sido hidroxilados. El grupo metilo que aparece en el espectro de ^1H RMN a 1.18 ppm (δ 26.6) presenta correlación con los carbonos 8, 13, 14 y 15, lo que nos indica que este grupo metilo corresponde a C-27. Así, la nueva hidroxilación solo puede estar localizada en C-29 o C-30, lo que se confirma analizando el espectro HMBC en el que los protones del grupo hidroximetilénico (δ 3.56 y 3.43) se encuentran correlacionados con C-19 (δ 42.7), C-20 (δ 36.3), C-21 (δ 30.0) y un grupo metilo (δ 28.2). La diferencia de desplazamientos químicos entre C-29 y C-30 en el espectro de ^{13}C RMN del sustrato **1** (δ 32.9 y 23.4 respectivamente) facilita la localización de la nueva hidroxilación, teniendo en cuenta que el grupo metilo geminal no hidroxilado debe experimentar un efecto γ originado por el nuevo grupo hidroximetilénico. Una hidroxilación en C-30 originaría un efecto γ sobre C-29 apareciendo la señal de C-30 a δ 28.8,³¹³ mientras que la hidroxilación sobre C-29 originaría un efecto γ en C-30 y la señal aparecería a 19.8 ppm³¹⁴. Teniendo en cuenta el desplazamiento químico observado en el espectro del metabolito **53** (δ 28.2), localizamos la nueva hidroxilación sobre C-30, por lo que el metabolito **3** se trataría del ácido 3 β ,30-dihidroiolean-12-en-28-oico, un producto natural denominado ácido queretaroico presente en cactus mejicanos como el pitayo (*Lemaireocereus queretaroensis* L. *beneckeii*)³¹⁵ o la chirinola (*Machaerocereus eruca*)³. La comparación de los datos espectroscópicos del metabolito **3** con los publicados en bibliografía para el ácido queretaroico nos indican que se tratan del mismo producto³¹⁶. La acetilación del metabolito **53** origina un derivado diacetilado (**56**) cuyos datos espectroscópicos concuerdan con la estructura de ácido 3 β ,30-diacetoxiolean-12-en-28-oico.

El metabolito **54** presenta un su espectro de masas un pico molecular compatible con una fórmula molecular de $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$, que nos indica que dos átomos de oxígeno han sido introducido por el microorganismo en el sustrato **1** ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$). Si comparamos el espectro de ^1H RMN del metabolito **4** con el del sustrato **1** observamos la existencia de una nueva señal a 3.86 ppm (1H, dd, $J_1= 11.2$ Hz, $J_2= 5.0$ Hz) debida a un protón geminal a un grupo hidroxilo ecuatorial y un nuevo sistema AB con dobletes centrados a 3.56 y 3.44 ppm ($J= 10.8$ Hz) y sólo seis señales de metilo singlete, lo que nos sugiere que, al igual que en el metabolito **53**, uno de los metilos del sustrato **1** ha sido hidroxilado. La correlación existente entre las señales de los protones del grupo hidroximetilénico con C-19 (δ 42.8), C-20 (δ 36.3), C-21 (δ 30.1) y C-29 (δ 28.2) nos indica que el metabolito **54** se trata de un 30-hidroxiderivado, lo que también se confirma al comparar los espectros de ^{13}C RMN del metabolito **54** y el sustrato **1**, observándose que existe un efecto β sobre C-20 ($\Delta\delta= +5.8$) y efectos γ sobre C-19 ($\Delta\delta= -3.1$), C-21 ($\Delta\delta= -3.7$) y C-29 ($\Delta\delta= -4.7$) similares a los observados en el caso del metabolito **53**. Asumiendo la estructura del metabolito **53**, la segunda hidroxilación introducida por el microorganismo sobre carbono secundario puede estar localizada en C-1, C-7, C-15, C-16, C-21 o C-22. Las correlaciones observadas en el espectro

³¹³ Shao, C. J.; Kasai, R.; Xu, J. D.; Tanaka, O. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 42-45.

³¹⁴ Yang, Y.; Kinoshita, K.; Koyama, K.; Takahashi, K.; Kondo, N.; Yuasa, H. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 456-460.

³¹⁵ Djerassi, C.; Henry, J. A.; Lemin, A. J.; Rios, T.; Thomas, G. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 3783-3787.

³¹⁶ a) Jung, D. Y.; Ha, H. K.; Lee, H. Y.; Kim, C.; Lee, J.-H.; Bae, K. H.; Kim, J. S.; Kang, S. S. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 203-206; b) Fujii, Y.; Luan, J.; Guo, F. F.; Li, D. P.; Chu, Z. Y. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2006**, *82*, 127-130.



HMBC del protón geminal al nuevo grupo hidroxilo (δ 3.86) con C6 (δ 30.6), C-8 (δ 46.4), C14 (δ 44.5) y C29 (δ 28.2) nos indican que debe estar localizado en C-7. La comparación de los espectros ^{13}C RMN de los metabolitos **53** y **54** nos indica un efecto α sobre C-7 ($\Delta\delta = +40.7$), efectos β sobre C-6 ($\Delta\delta = +11.6$) y C-8 ($\Delta\delta = +6.9$) y efectos γ sobre C-5 ($\Delta\delta = -1.9$) y C-26 ($\Delta\delta = -6.8$). Estos datos son compatibles con la dihidroxilación del sustrato **1** por la cara β para dar el ácido $3\beta,7\beta,30$ -trihidroxi-olean-12-en-28-oico (**54**).

La fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$ del último metabolito **55** aislado nos confirma que, al igual que en el metabolito **54**, el microorganismo ha introducido dos átomos de oxígeno en el sustrato **1**. El estudio de los espectros de RMN para el metabolito **55** nos indica que al igual que en el metabolito **54** se trata de un derivado dihidroxilado del sustrato **1**. Uno de los grupos hidroxilo introducido por el microorganismo está situado en C-30 ya que en el espectro de ^1H RMN aparece un sistema AB con dobletes centrados a 3.55 y 3.42 ppm ($J = 11.5$ Hz) y sólo seis señales de metilo simplete. Esta hidroxilación en C-30 se confirma al comparar los espectros de ^{13}C RMN de los metabolitos **55** y el sustrato **1**, existiendo idénticos efectos α , β y γ a los observados en el caso de los metabolitos **53** y **54** (tabla 2). También aparecen las mismas correlaciones entre los protones del grupo hidroximetilénico a las observadas en los espectros HMBC de los metabolitos **53** y **54**. En lo que respecta a la hidroxilación en el carbono secundario la señal debida al protón geminal a dicha hidroxilación aparece como un doblete a 3.37 ppm. La magnitud de las constantes de acoplamiento ($J_1 = 10.8$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz) nos indica que se trata de un protón axial geminal a grupo hidroxilo ecuatorial. Considerando que en el metabolito **54**, el grupo hidroxilo ecuatorial se encontraba en C-7, en el metabolito **55** las posiciones posibles serían C-1, C-15, C-16, C-21 o C-22. Al estudiar su espectro HMBC, podemos observar la existencia de correlaciones entre protón geminal al nuevo grupo hidroxilo (δ 3.34) con C2 (δ 38.4), C-9 (δ 49.9), C10 (δ 44.4) y C25 (δ 28.8) que nos indican que la hidroxilación se encuentra localizada en C-1. La comparación de los espectros ^{13}C RMN de los metabolitos **53** y **55** nos indica la existencia de efectos β sobre C-2 ($\Delta\delta = +10.4$) y C-10 ($\Delta\delta = +6.1$) y efectos γ sobre C-3 ($\Delta\delta = -3.0$), C-5 ($\Delta\delta = -2.2$) y C-25 ($\Delta\delta = -4.0$). Estos datos son compatibles con la dihidroxilación del sustrato **1** por la cara β para dar el ácido $1\beta,7\beta,30$ -trihidroxi-12-oleanen-28-oico (**5**).

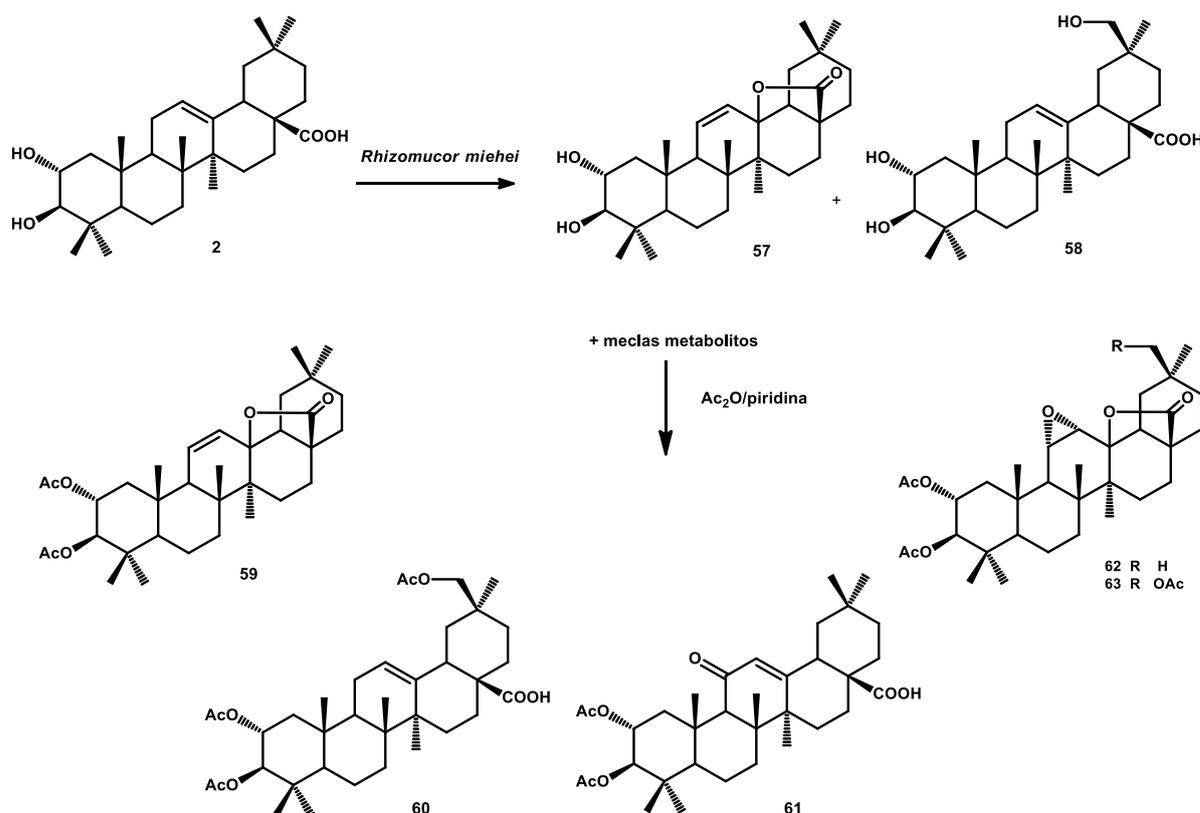
4.3.2 INCUBACIÓN DE ÁCIDO MASLÍNICO CON *R. miehei*

Figura 4.39. Metabolitos de biotransformación de ácido maslínico (2) con *R. miehei*

La biotransformación del ácido maslínico (2) como sal sódica (4) con *Rhizomucor miehei* durante trece días, dio lugar a una mezcla de metabolitos de la que se pudieron aislar los metabolitos 57 y 58. Debido a la dificultad de la separación del resto de metabolitos, se procedió a la acetilación de las fracciones impuras, aislándose después de su purificación los acetoxiderivados 59-63.

El metabolito 57 presenta en su espectro de masas un pico molecular compatible con una fórmula molecular C₃₀H₄₆O₄, que nos indica que dicho metabolito tiene dos átomos de hidrógeno menos que el sustrato 2 (C₃₀H₄₈O₄). En su espectro de ¹H RMN se observan dos dobles dobles (δ 6.03 y 5.40) debido a las señales de dos protones olefinicos, que se encuentran correlacionados en su espectro HSQC con los carbonos a 135.2 y 127.7 ppm respectivamente. Cuando se estudia su espectro COSY, se observa que estos protones se encuentran correlacionados entre sí y a su vez con un protón que aparece a 1.92 ppm (δ 53.2). En su espectro de ¹³C RMN también se observa una señal de carbono oxigenado totalmente sustituido a 89.7 ppm. Estos datos nos hacen pensar que en el metabolito 57 se trata de una 28,13β-oleanolida con un doble enlace entre los carbonos 11 y 12. Todos los datos espectroscópicos están de acuerdo con esta suposición, que puede confirmarse mediante el estudio de su espectro HMBC al existir correlación de H-11 con C-

9 y H-12 con C-9 y C-13. Por lo tanto proponemos para el metabolito **57** la estructura de 2 α ,3 β -dihidroxiolean-11-en-28,13 β -olida. Un posible mecanismo para explicar la formación de este metabolito **57** podría ser la introducción de un grupo hidroperoxi en la posición alílica de C-11 por parte del microorganismo. La pérdida de una molécula de peróxido de hidrógeno y el ataque del grupo carboxilo de C-28 a C-13 por la cara β originaría una estructura de 28,13 β -olida con un doble enlace en C-11 (figura 4.38).

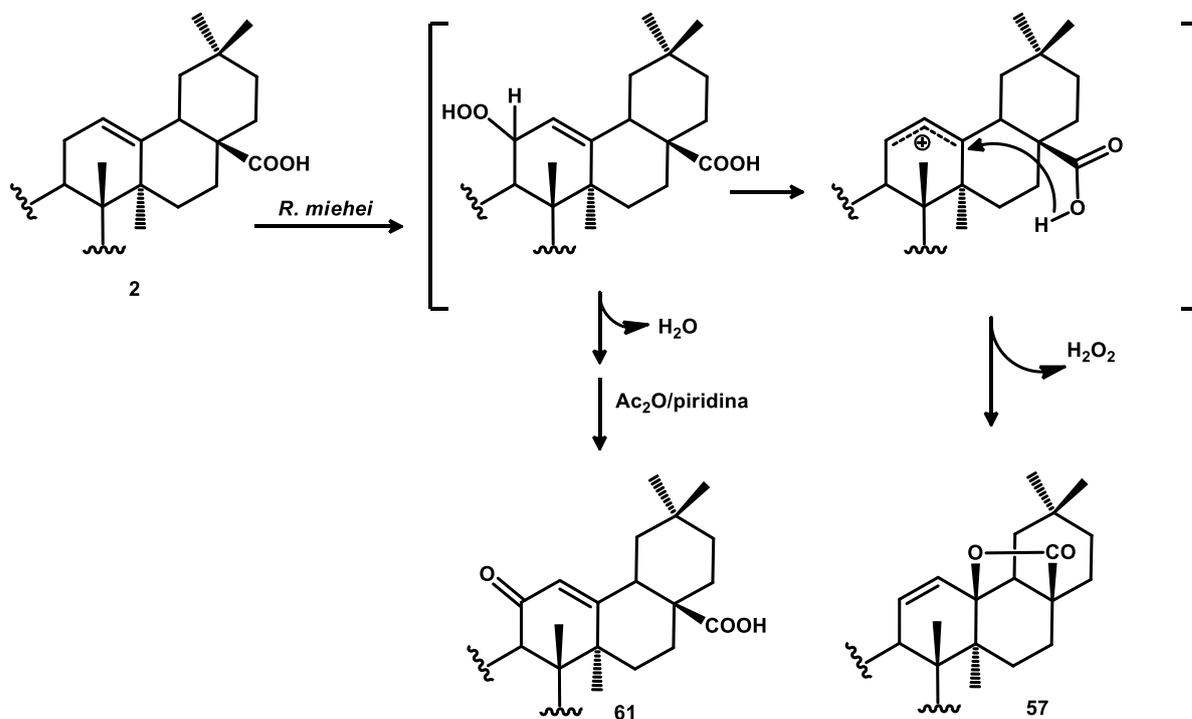


Figura 4.40. Posible mecanismo de formación del metabolito **57** y **61** a través de peroxidación del metabolito **2**.

El metabolito **58** presenta una fórmula molecular de $C_{30}H_{48}O_5$ con un átomo de oxígeno más que el sustrato **2**. Su espectro de 1H RMN se diferencia con respecto al del sustrato **2** en la aparición de un sistema AB con dobletes centrados a 3.55 y 3.43 ppm originado por dos protones geminales a grupo hidroxilo sobre carbono primario. Estos protones, al igual que se observó en los metabolitos **53-55**, están correlacionadas con la señal a 67.9 ppm en el espectro HSQC y en espectro HMBC se encuentran correlacionados con C-19, C-20, C-21 y C-29. Esto nos sugiere que, al igual que en dicho metabolitos, el carbono 30 del sustrato **2** ha sido hidroxilado, por lo que el metabolito **58** se trata del ácido 2 α ,3 β ,30-trihidroxiolean-12-en-28-oico.

Las fracciones impuras obtenidas en la separación cromatográfica de los metabolitos de la biotransformación del sustrato **2** con *R. miehei* se juntan y se acetilan, obteniéndose los derivados **59-63**. El derivado **59** presenta una fórmula molecular $C_{34}H_{50}O_6$ que nos indica que posee dos grupos acetoxilo con respecto al metabolito **57**. En el espectro de 1H RMN también se

observan, al igual que en el metabolito **57**, dos señales de protones olefínicos a 5.98 y 5.41 ppm que aparecen como dobles dobles. Dichos protones se encuentran correlacionados entre sí y a su vez con un protón que aparece a 1.94 ppm cuando se analiza su espectro COSY. El estudio de sus espectros de ^{13}C RMN, HSQC y HMBC nos indican que el derivado **59** se trata de 2 α ,3 β -diacetoxiolean-11-en-28,13 β -olida, obtenido por acetilación del metabolito **57**.

El segundo acetoxiderivado obtenido (**60**) presenta un pico molecular compatible con una fórmula molecular $\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{O}_8$, lo que nos sugiere que se trata de un triacetoxiderivado del sustrato **2**. En su espectro de ^1H RMN además de las señales de los protones geminales a los grupos acetoxilo en C-2 y C-3 (δ 5.20 y 4.69 respectivamente), aparece un sistema AB con dobles centrados a 4.04 y 3.96 ppm ($J= 11.0$ Hz) originado por un grupo acetoximetilénico situado sobre un grupo metilo del sustrato **2**. Cuando comparamos su espectro de ^{13}C RMN con el del diacetoxiderivado **6** obtenido por acetilación del ácido maslínico **2** podemos observar que existen efectos α , β y γ que nos indican la existencia de un grupo acetoxilo sobre C-30. El estudio de los espectros de HSQC y HMBC confirman que el triacetoxiderivado **60** es el ácido 2 α ,3 β ,30-triacetoxiolean-12-en-28-oico obtenido por acetilación del metabolito **58**.

El tercer derivado **61** posee una fórmula molecular $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{O}_7$. En su espectro de ^1H RMN se observan además de las señales de los protones geminales a grupo acetoxilo en C-2 y C-3, dos señales singulete a 5.63 y 2.37 ppm. En su espectro de ^{13}C RMN aparece una señal de grupo carbonilo a 199.7 ppm, dos señales de carbonos etilénicos (168.8 y 128.1 ppm) y una señal de carbono metínico a 61.6 ppm. La señal a δ 128.1 está correlacionada con la señal a δ 5.63 en el espectro HSQC y la señal a 2.37 ppm muestra correlación con la señal a δ 61.6. Estos datos sugieren la presencia de un sistema α,β -insaturado en el anillo D con un grupo carbonilo en C-11 y doble enlace entre los carbonos 12 y 13, lo que puede confirmarse analizando el espectro HMBC en donde aparece correlación entre la señal de H-9 (δ 2.37) con C-11 (δ 199.7) y C-12 (δ 128.1). Por lo tanto, asignamos al metabolito **61** la estructura de ácido 2 α ,3 β -diacetoxi-11-oxoolean-12-en-28-oico. Un mecanismo que explicaría la formación del metabolito **61** podría ser, al igual que para el metabolito **57**, la introducción de un grupo hidroperóxido en C-11 por parte del microorganismo. La posterior pérdida de agua originaría un grupo carbonilo en C-11 (figura 4.38).

El cuarto derivado aislado (**62**) presenta una fórmula molecular $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{O}_7$ lo que nos indica que posee un oxígeno más que el diacetato del ácido maslínico. En su espectro de IR no se observan señales de grupo hidroxilo y en su espectro de ^1H RMN no se observan señales de protones etilénicos y sí señales de protones geminales a oxígeno a 3.02 ppm que en el espectro HSQC se encuentran correlacionadas con dos señales de carbonos oxigenados a 57.2 y 52.5 ppm. En el espectro de ^{13}C RMN también se observa una señal a 87.4 ppm debida a un carbono oxigenado totalmente sustituido y que nos indica que dicho producto se encuentra con una estructura de 28,13 β -olida. Cuando se estudia el espectro HMBC se observa que los protones que aparecen a δ 3.02 se encuentran correlacionados con C-9, C-10, C-13 y C-14 compatibles con la



existencia de un 11,12-epoxiderivado. Se ha descrito que la epoxidación de un derivado olean-11-en-28,13 β -olida con estructura similar al metabolito **57** origina un 11 α ,12 α -epoxiderivado³¹⁷.

El último derivado **63** obtenido presenta una fórmula molecular C₃₆H₅₂O₉. En su espectro de IR no se observan bandas de grupo hidroxilo. En su espectro de ¹H RMN se observan señales parecidas a las observadas en el derivado **62** a 3.01 ppm originadas por un grupo 11 α ,12 α -epoxi junto con un nuevo sistema AB con dobletes centrados a 4.20 y 3.78 ppm y seis señales de grupo metilo. El espectro HSQC nos confirma que las señales de los protones a 3.01 ppm se encuentran correlacionadas con los carbonos oxigenados a δ 57.1 y 52.5. En el espectro HMBC se observa que los protones que aparecen a 3.01 ppm presentan correlaciones similares a las observadas en el espectro del derivado **62**. Además los protones del grupo hidroximetilénico a 4.20 y 3.78 ppm se encuentran correlacionados con C-19, C-20, C-21 y C-29 lo que nos confirma que al igual que en el triacetoxiderivado **59** existe un grupo acetoxilo sobre C-30. Estos datos nos indican que el derivado **63** posee una estructura de 2 α ,3 β ,30-triacetoxi-11 α ,12 α -epoxioleanen-28,13 β -olida.

4.3.2.1. Correlación química de los metabolitos **57** y **62** con ácido maslínico (**2**)

Con objeto de confirmar las estructuras de los metabolitos **57** y su acetoxiderivado **59** se abordó su obtención a partir del ácido maslínico (**2**). Los primeros intentos de formación del derivado **57** se realizaron con t-butóxido potásico en t-butanol, con objeto de evitar el ataque de la base al grupo carbonilo de la lactona como sucedía cuando se utilizaba metóxido sódico en metanol, que se obtenía el éster metílico **32**. El objetivo era utilizar una base más voluminosa que atacara al protón de C-9. Sin embargo la reacción no transcurría con buenos rendimientos y sólo se pudo aislar en pequeña cantidad el compuesto **31**, procedente del ataque de la base al protón de C-15 en lugar de a C-9. Así, se decidió realizar la reacción de eliminación con DBU. Como ya hemos visto anteriormente, la bromación del ácido maslínico (**2**) con Br₂/CCl₄ durante 30 minutos origina un derivado monobromado (**27**), que tras acetilación conduce al diacetoxiderivado **64**. Los primeros intentos de formación del producto **59** con DBU no transcurrieron de la forma esperada, probablemente por el mal estado del reactivo o del disolvente utilizados originando una mezcla de varios productos (figura 4.39). Así además del derivado **59** que se obtenía con bajo rendimientos, se obtuvo un producto cuyas propiedades espectroscópicas coincidían con las del taraxer-14-eno **30** probablemente por ataque del DBU al protón axial en C-15 para generar un doble enlace entre C-14 y C-15 con migración del metilo de C-27 hacia C-13 por la cara α y apertura del anillo lactónico por la cara β (figura 4.41)

³¹⁷ Pereda-Miranda, R.; Delgado, G. *J. Nat. Prod.* **1990**, 53, 182-185.

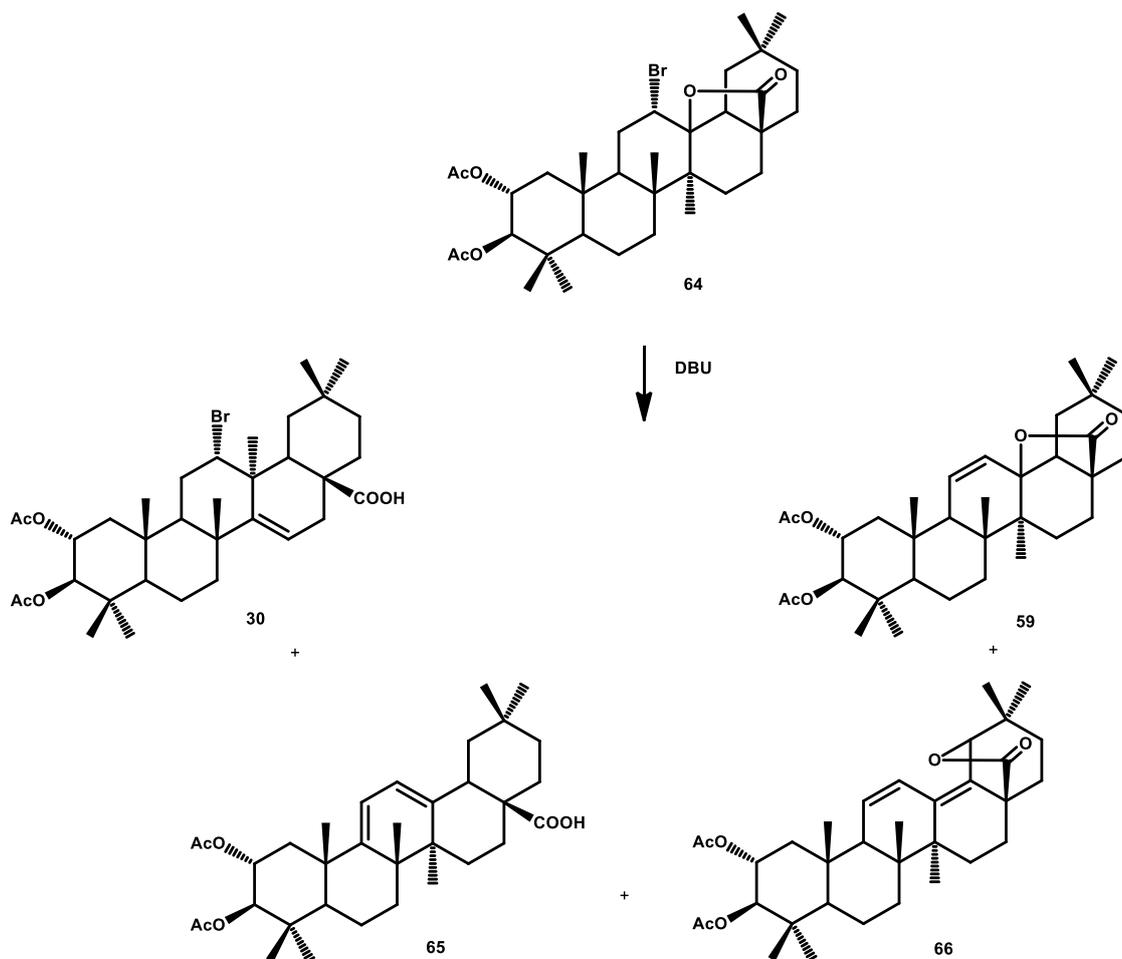


Figura 4.41. Productos obtenidos tras tratamiento del derivado **64** con DBU

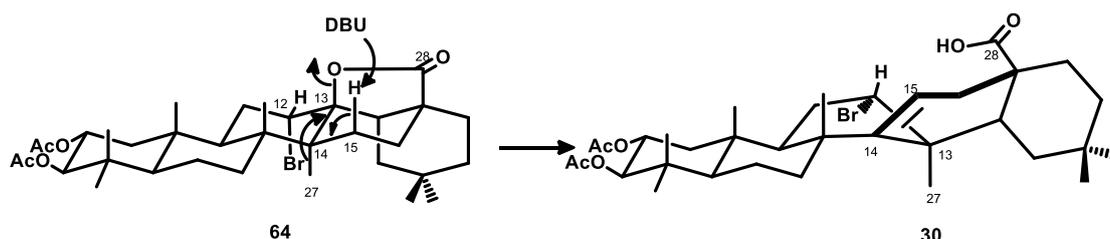


Figura 4.42. Posible reagrupamiento con migración del metilo 27 del sustrato **64**.

Otro de los productos obtenidos (**65**) en la reacción con DBU presentaba una fórmula molecular ($C_{34}H_{51}O_6$) que posee dos hidrógenos menos que el diacetato del ácido maslínico (**6**). En su espectro de 1H RMN aparece un sistema AB de protones olefinicos (δ 5.58 y 5.55, $J= 6.4$ Hz), similar al observado en el espectro del dieno **16**. Los demás datos espectroscópicos nos indican que el producto **65** se trata del ácido $2\alpha,3\beta$ -diacetoxioleana-9,12-dien-28-oico, probablemente formado por ataque del DBU al protón sobre C-9 del producto **59** con formación del sistema diénico conjugado con dobles enlaces entre C-9-C-11 y C-12-C-13 y apertura del anillo lactónico (figura 4.41).

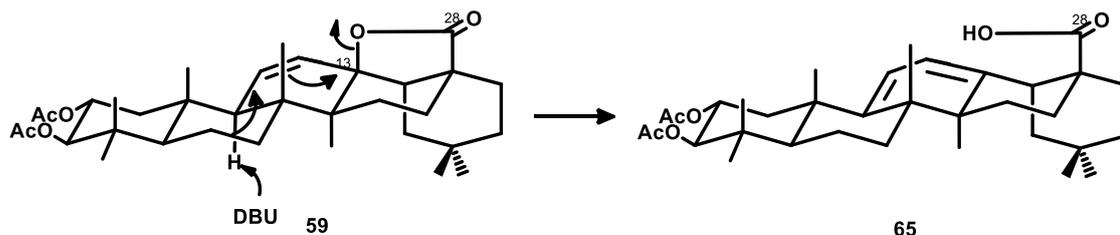


Figura 4.43. Posible mecanismo de formación del sustrato **65**.

El último producto (**66**) aislado de la reacción con DBU presenta una fórmula molecular $C_{34}H_{49}O_6$ con dos hidrógenos menos que el producto **59**. En su espectro de 1H RMN aparecen señales de protones olefinicos a δ 6.14 y 5.72, algo más desapantalladas que las observadas en el espectro del producto **59** y que se encuentran acopladas entre sí y con el protón H-9. También aparece una señal singlete de protón geminal a función oxigenada a 4.73 ppm. En su espectro de ^{13}C RMN aparecen cuatro señales de carbonos olefinicos, dos de ellos totalmente sustituidos. Estos datos nos sugieren que existe un sistema diénico conjugado con dobles enlaces entre C-11-C-12, y C-13-C-14, lo que se confirma con el estudio del espectro HMBC al existir correlación entre H-9 con C-11 y C-12 y H-27 con C13 y C-18. Además la correlación del protón geminal a función oxigenada (δ 4.73) con C-18, C-19, C-20, C-29 y C-30, nos indica que dicho protón se encuentra en C-19. En base a estos datos consideramos que el producto **65** tiene una estructura de 2 α ,3 β -diacetoxioleana-11,13(18)-dien-28,19 β -olida, el diacetoxiderivado de un producto natural recientemente aislado de las raíces de *Rhaphiolepis indica* var. *tashiro*³¹⁸, un arbusto muy popular en China que se emplea en la cultura del bonsái.

Cuando el diacetoxiderivado **64** es tratado con DBU/xileno usando estos reactivos recién abiertos, se obtiene un único producto cuyas propiedades espectroscópicas coinciden con las del diacetoxiderivado **59**. La saponificación del derivado **59** con metanol/agua al 70% y KOH (5%) origina el metabolito **57** (figura 2.44). La epoxidación de una mezcla obtenida en los primeros intentos de reacción con DBU formada por los productos **30** y **59** se realizó con AMCPB, obteniéndose con bajos rendimientos el epoxiderivado **62** y el epoxiderivado **67** procedente del ataque del reactivo al doble enlace C14-C15 del producto **59**.

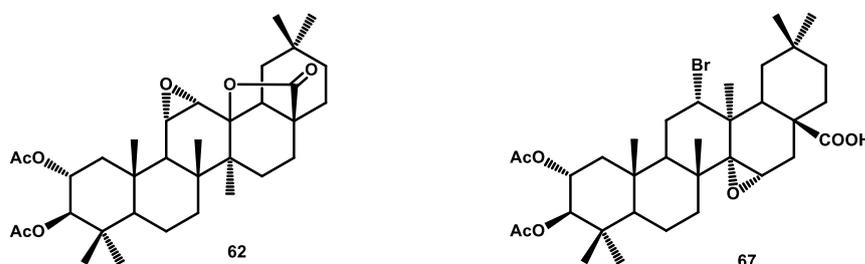


Figura 4.44. Productos **62** y **67** obtenidos en la epoxidación con AMCPB

³¹⁸ Chu-Hung, L.; Hsun-Shuo, C.; Hsiang-Ruei, L.; Ih-Sheng, C.; Ian-Lih, T. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 8890-8898.

Con objeto de mejorar los rendimientos de esta transformación se procedió a realizar la epoxidación del diacetoxiderivado **59** con ácido peracético³¹⁰, obteniéndose en este caso un epoxidado con propiedades espectroscópicas idénticas a las observadas en el derivado **62** (figura 4.44).

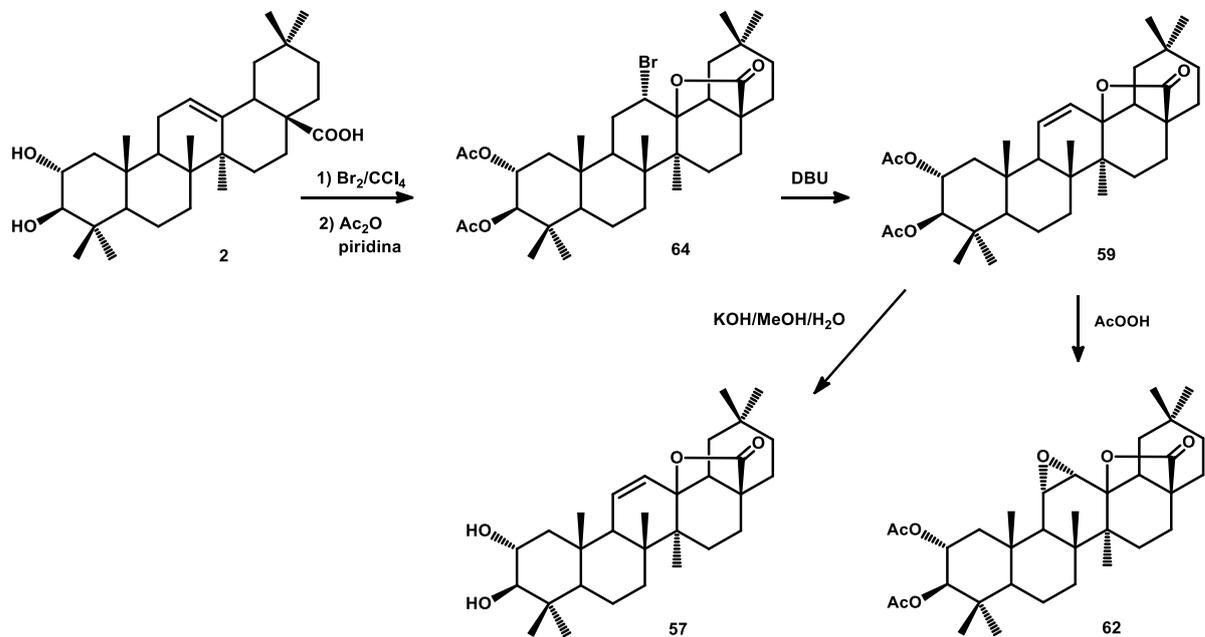


Figura 4.45. Esquema general de correlación química de los sustratos **62** y **57** a través de ácido maslínico (**2**)

4.4 INCUBACION DE LOS ÉSTERES METÁLICOS

4.4.1 Incubación de oleanolato de metilo (**7**) con *R. miehei*

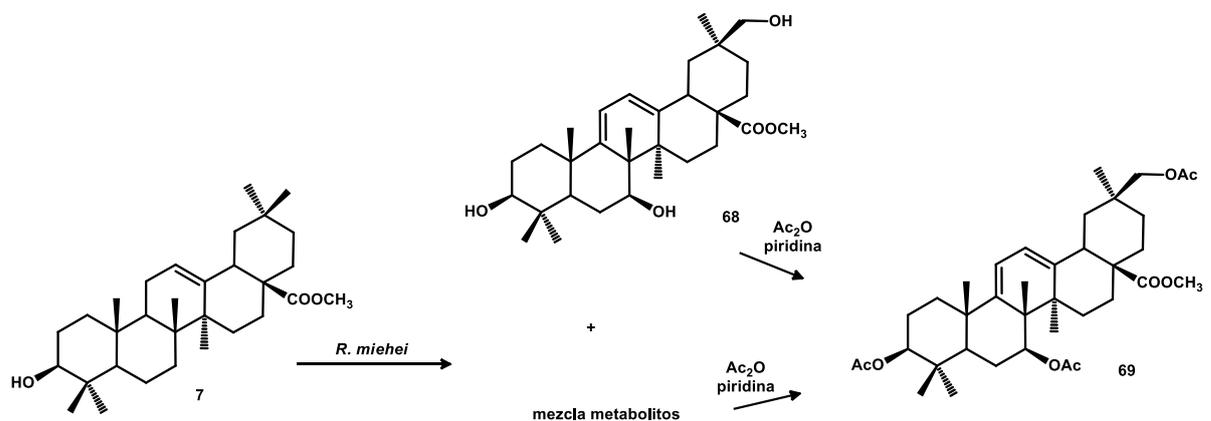


Figura 4.46. Biotransformación de oleanolato de metilo (**7**)



La incubación de oleanolato de metilo (**7**) con *Rhizomucor miehei* proporciona una mezcla de metabolitos de la que se aíslan 6 mg del producto de partida **7** (5%), 12 mg del metabolito **68** (10%), y una mezcla de metabolitos polares (18 mg), que tras ser acetilada da lugar a la obtención de 9 mg del producto **68** (8%) (figura 2.45). Si comparamos el espectro de ^1H RMN del metabolito **68** con el del sustrato **1** observamos la existencia de una nueva señal a 4.03 ppm (1H, dd, $J_1= 11.3$ Hz, $J_2= 5.4$ Hz) debida a un protón geminal a grupo hidroxilo ecuatorial y un nuevo sistema AB con dobletes centrados a 3.59 y 3.53 ppm ($J= 10.8$ Hz) y sólo seis señales de metilo singlete. Esto nos sugiere, al igual que en la incubación del ácido oleanólico (**1**), *R. miehei* ha dihidroxilado el ester **3** en las posiciones 7 y 30, lo que puede confirmarse por la comparación de los espectros de ^{13}C RMN de los metabolitos **7** y **68** al observarse efecto α sobre C-7 ($\Delta\delta= +42$), efectos β sobre C-6 ($\Delta\delta= +10.7$) y C-8 ($\Delta\delta= +7.7$) y efectos γ sobre C-5 ($\Delta\delta= -1.6$) y C-26 ($\Delta\delta= -5.2$). La posición de la hidroxilación sobre uno de los grupos metilo puede determinarse considerando que existe un efecto β sobre C-20 ($\Delta\delta= +12.2$) y efectos γ sobre C-19 ($\Delta\delta= -3.4$), C-21 ($\Delta\delta= -4.8$) y C-29 ($\Delta\delta= -4.8$). Además, se observa la desaparición del protón de C-11 y la aparición de un sistema AB de protones unidos a dobles enlaces con dobletes centrados a 5.61 y 5.55 ppm ($J= 5.9$ Hz), señal que es característica de un sistema diénico conjugado en el anillo C.

El producto **69** corresponde con el triacetoxiderivado del metabolito **68** como nos indica el estudio de su espectro de ^1H RMN al existir tres señales de grupos acetoxilo (2.06, 2.04 y 2.00 ppm). Uno de estos grupos acetilo procede de la acetilación del grupo hidroxilo original existente en C-3 (δ 4.49, dd, $J_1= 11.7$ Hz, $J_2= 4.6$ Hz). Los otros dos grupos acetoxilo se encuentran sobre un carbono primario observándose, un sistema AB con dobletes centrados a 4.05 y 4.00 ppm ($J= 11.1$ Hz) y sobre un carbono secundario (δ 5.19, dd, $J_1= 11.3$ Hz, $J_2= 5.5$ Hz). También aparecen sólo 6 señales de grupos metilo frente a las siete señales que se observan en el espectro del sustrato **3** y la desaparición de la señal del protón unido al doble enlace en C-11 junto con la aparición de un sistema AB de protones unidos a dobles enlaces con dobletes centrados a 5.61 y 5.55 ppm ($J= 5.9$ Hz), señal que es característica de un sistema diénico conjugado en el anillo C. El estudio del espectro HMBC del producto **69** nos permite confirmar su estructura y por lo tanto la de su precursor **68**, ya que se observan correlaciones de H-7 con C-6, C-8 y C-26 y 2H-30 con C-19, -C-20, C-21 y C-29. También se confirma la existencia del sistema diénico al observarse correlaciones de H-11 con C-8, C-9 y C-12 y H-12 con C-11, C-12 y C-13. Así, el producto **69** corresponde al derivado acetilado del metabolito **68** o a lo que es lo mismo, al 3 β ,7 β ,30-triacetoxioleana-9,12-dien-28-oato de metilo.

La formación del metabolito **68** podría ser debida a una hidroperoxidación alílica de C-11, al igual que postulamos en la incubación del ácido maslínico (**2**) (figura 4.38) y posterior pérdida de una molécula de peróxido de hidrogeno favorecida por la desprotonación de C-9 para generar el dieno conjugado en el anillo C. En este caso al existir un grupo éster en C-28, no puede tener lugar la lactonización sobre C-13 como ocurría cuando existía un grupo carboxilo en C-28 (figura 4.46).

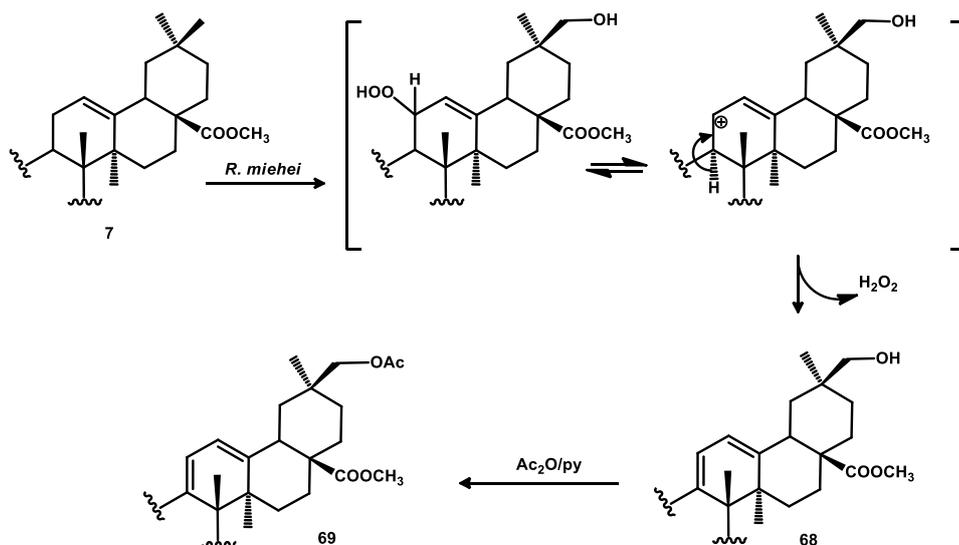


Figura 4.47. Mecanismo propuesto para la obtención del metabolito **68**

4.4.2 Biotransformación del dienoderivado **10**

Debido a que en la biotransformación del éster metílico **7**, se obtenían el derivados diénico **69** se decidió incubar el dieno (**10**) con *R. miehei*, de forma que tras 21 días se recuperó el sustrato **10** (56%) junto con el metabolito **70** (7.2%).

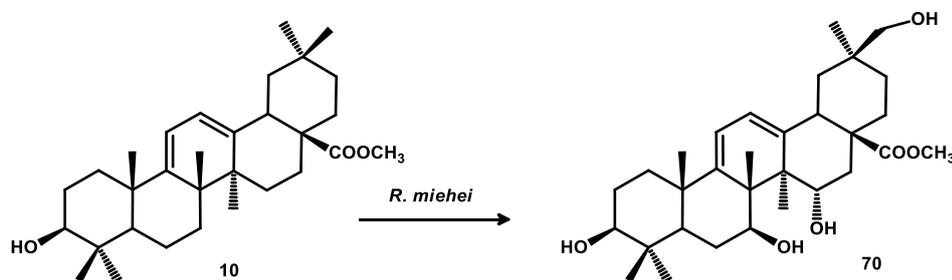


Figura 4.48. Biotransformación del dieno **10** con *R. miehei*

El espectro de masas del metabolito **70** es compatible con la fórmula molecular C₃₁H₄₈O₆, que implica que el microorganismo ha introducido tres átomos de oxígeno en el sustrato **11** (C₃₁H₄₈O₃). El espectro de ¹H RMN de dicho metabolito muestra además de las señales características correspondientes al sustrato de partida tres nuevas señales debidas a la funcionalización realizada por el hongo. De esta forma, se observan dos señales diferenciadas como doble doblete a δ 4.20 (1H, dd, J₁ = 4.8 Hz, J₂ = 7.2 Hz) y 4.09 ppm (1H, dd, J₁ = 5.1 Hz, J₂ = 6.5 Hz), producidas por protones geminales a hidroxilos ecuatoriales en posiciones secundarias. El estudio de los espectros bidimensionales HMBC y HSQC junto con la comparación de los espectros de ¹³C RMN del sustrato **11** y el metabolito **70** hacen ver que estas hidroxilaciones han tenido lugar en C-7 y C-15 ya que se encuentran efectos α, β y γ en dichas posiciones ((Δδ_{C-7} = +39.2), (Δδ_{C-6} = +9.7), (Δδ_{C-8} = +6.8), (Δδ_{C-5} = -2.8), (Δδ_{C-26} = -7.4); (Δδ_{C-15} = +39.6), (Δδ_{C-14} = +6.8),

($\Delta\delta_{C-16} = +9.0$), ($\Delta\delta_{C-17} = -0.6$), ($\Delta\delta_{C-27} = -7.0$). Por otro lado, aparece también un nuevo sistema AB con dobletes centrados a δ 3.57 y 3.53 (2H, $J = 10.81$ Hz) y sólo existen seis señales de metilo singlete, que denota que una hidroxilación primaria ha ocurrido en uno de los grupos metilo del sustrato. Los efectos α ($\Delta\delta_{C-30} = +42.3$), β ($\Delta\delta_{C-20} = +4.3$) y γ ($\Delta\delta_{C-20} = -5.2$), ($\Delta\delta_{C-21} = -5.2$), ($\Delta\delta_{C-19} = -5.7$) encontrados así como los espectros de HMBC y HSQC confirman que se ha hidroxilado en C-30. Todos estos datos espectroscópicos confirman que el metabolito **70** puede identificarse como 3 β ,7 β ,15 α ,30-tetrahidroxioleana-9,12-dien-28-oato de metilo.

4.4.3 Biotransformación de malisnato de metilo (**8**)

La incubación de malisnato de metilo (**8**) con *R. miehei* durante 25 días originó los metabolitos (**71**) y (**72**) junto con una mezcla que se acetiló con Ac₂O en piridina de la que se aislaron los acetoxiderivados **73-76**.

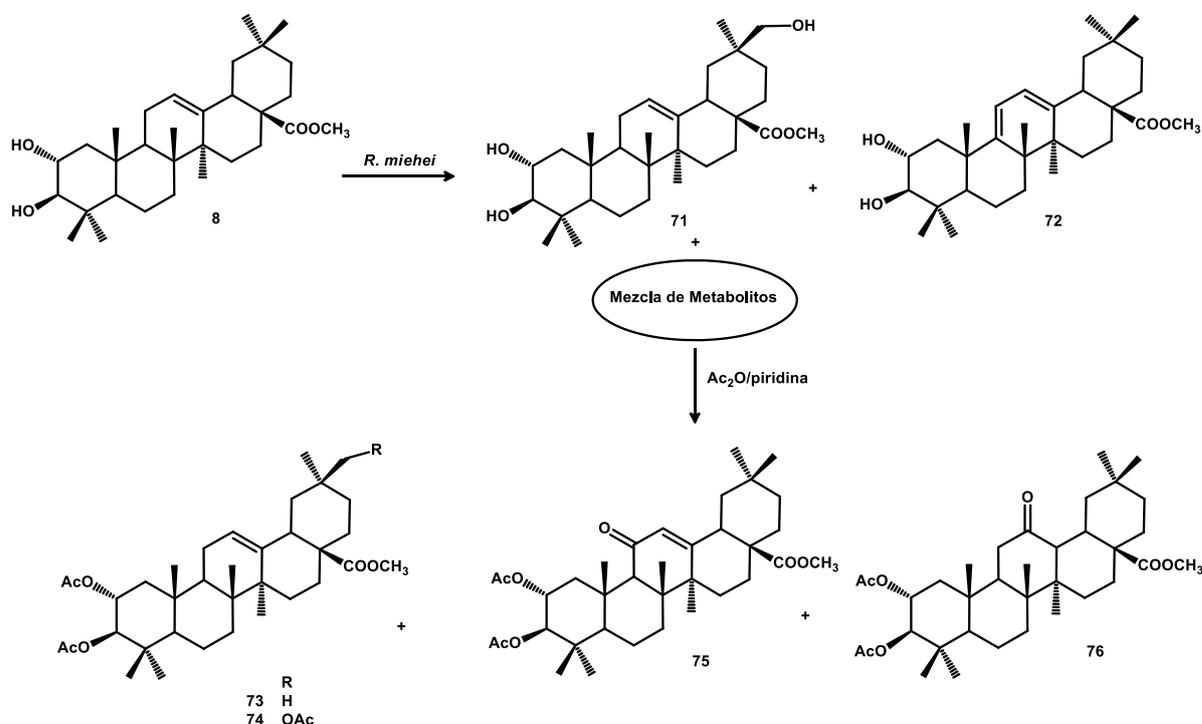


Figura 4.49. Biotransformación del éster **8** con *R. miehei*

El espectro de masas del producto **71** nos indicó que su fórmula molecular era C₃₁H₅₀O₅, lo que implica que el microorganismo ha introducido un átomo de oxígeno al sustrato **8** (C₃₁H₅₀O₄). El espectro de ¹H RMN del metabolito **71** mantiene las señales características del sustrato **8** aunque aparece un nuevo sistema AB a δ 3.91 y 3.84 ppm (2H, $J = 10.6$ Hz) y únicamente solo seis señales de metilo singlete. La posición de ésta hidroxilación de la misma puede confirmarse si observamos los efectos encontrados al comparar los espectros de ¹³C RMN de **8** y **71**. De esta forma se obtienen efectos α sobre C-30 ($\Delta\delta = +42$), β sobre C-20 ($\Delta\delta = +5.1$) y efectos γ sobre C-19 ($\Delta\delta = -4.0$), C-21 ($\Delta\delta = -4.2$) y C-29 ($\Delta\delta = -4.5$). Igualmente, en su espectro HMBC se observa

correlación de los protones geminales al grupo hidroximetilénico con C-19, C-20, C-21 y C-30. Estos datos nos indican que el microorganismo ha hidroxilado el sustrato **8** en C-30 dando lugar al 2 α ,3 β ,30-trihidroiolean-12-en-28-oato de metilo (**71**).

Si nos fijamos en la fórmula molecular dada por su espectro de masas para el metabolito **72** C₃₁H₄₈O₄ vemos que tiene dos protones menos que el sustrato de partida **8** (C₃₁H₅₀O₄). Su espectro de ¹H RMN muestra la aparición de un sistema AB de protones unidos a dobles enlaces con dobletes centrados a δ 5.61 y 5.56 (J= 5.8 Hz), señales que son características de un sistema diénico conjugado en el anillo C similar a lo que ocurría con el metabolito **68**. Todos los datos espectroscópicos nos indican que el metabolito **72** se trata del 2 α ,3 β -dihidroioleana-9,12-dien-28-oato de metilo. La formación de este metabolito sería similar al mecanismo descrito para el metabolito (**68**) donde la peroxidación generaría un carbocatión alílico que se estabilizaría por la consecuente pérdida de H-9 para generar el dieno conjugado (figura 4.46).

Los dos primeros productos (**73** y **74**), aislados de la acetilación de las fracciones con mezclas de productos obtenidas en la biotransformación del dieno **8** con *R. miehei* se tratan de los derivados acetilados del sustrato **8** y del metabolito **71** respectivamente. De la acetilación de la mezcla de metabolitos polares también se aislaron los acetoxiderivados **75** y **76** cuyas fórmulas moleculares (C₃₅H₅₄O₇ y C₃₅H₅₂O₇ respectivamente) nos indica que en ambos sustratos el microorganismo ha insertado un átomo de oxígeno. Si nos centramos en el espectro de ¹H RMN del metabolito **75** vemos que se trata de un derivado diacetilado, apareciendo una señal singlete a δ 5.63 que suele ser característica de un protón que forma parte de un sistema α,β -insaturado, como ya observamos en los espectros del producto **61**. El espectro de ¹³C RMN del metabolito **74** muestra la señal correspondiente a la cetona en 200.43 ppm y sólo dos señales de carbonos olefínicos, uno de ellos totalmente sustituido (δ 126.24). El espectro HMBC nos confirma que el grupo carbonilo se encuentra en C-11 y que se encuentra conjugado con el doble enlace existente entre C-12 y C-13 al observarse correlación entre H-12 con C-11 y C-13 y H-9 con C-11 y C-12. De esta forma podemos concluir que la estructura del derivado **75** se corresponde con 2 α ,3 β -diacetoxi-11-oxo-olean-12-en-28-oato de metilo. En el espectro de ¹H RMN del derivado **76** observamos que no existen señales de protones olefínicos y sin embargo a δ 2.60 se observa una señal que aparece como doblete debida a un protón vecinal a grupo carbonilo que se encuentra acoplada con H-18. Al estudiar el espectro de ¹³C RMN vemos que existe una señal a 211.91 ppm correspondiente a un grupo carbonilo y una nueva señal de un carbono metínico a δ 52.0 que en el espectro HSQC se encuentra correlacionada con el protón que aparece a δ 2.60. Este protón se encuentra correlacionado con C-12, C-14, C-18 al analizar el espectro HMBC, lo que nos indica que se encuentra sobre C-13. Todos los datos espectroscópicos nos indican que el derivado **76** se trata de 2 α ,3 β -diacetoxi-12-oxo-13 β -olean-28-oato de metilo.

Según las estructuras obtenidas podría pensarse que, como se ha visto anteriormente, la formación del sistema α,β insaturado en el metabolito **74**, podría deberse a la peroxidación de la posición C-11 que sufriría posteriormente deshidratación para formar la cetona correspondiente

(figura 4.38). El metabolito **76** podría provenir de la epoxidación del doble enlace por el microorganismo, que tras reordenamiento del mismo daría lugar al grupo cetónico en C-12.

4.4.4 Biotransformación del epóxido **32**

La incubación del epóxido **32** con *R. miehei* durante 25 días origina un producto **77** en cuyo espectro de ^1H RMN se observa la existencia de una señal que aparece como doble doblete a 3.86 ppm debida a un protón geminal a grupo hidroxilo ecuatorial. En su espectro de ^{13}C RMN, comparado con el del sustrato **33** se pueden observar efectos α , β y γ similares a los observados en los metabolitos **8** y **9** y que eran debidos a la existencia de un grupo hidroxilo ecuatorial en C-7. Así podemos observar los efectos γ sobre C-5 y C-26 característicos de esta funcionalización (tabla 5). También se observa en el espectro de ^1H RMN que no aparece la señal debida a un protón geminal a grupo epoxi, lo que nos indica que el metabolito **77** ha sufrido también algún tipo de transformación además de la hidroxilación en C-7 comentada anteriormente. En el espectro de ^{13}C RMN se observa una señal de grupo carbonilo a 205.9 ppm y una señal de carbono oxigenado totalmente sustituido a 91.6 ppm, que nos indica la existencia de una lactona entre C-28 y C-13. En el espectro de ^1H RMN existen dos señales que aparecen como dobles dobletes a 2.83 y 2.33 ppm. Estas señales se correlacionan entre sí y con otra señal a 1.42 ppm al analizar el espectro COSY. Estos datos nos sugieren que en el grupo carbonilo se encuentra en C-12 de forma que las señales antes indicadas corresponden a las señales de los protones sobre C-11 que se acoplan geminalmente entre sí y a su vez con el protón sobre C-9. Estos datos junto con el estudio de los espectros HMBC y HMQC para este producto nos sugiere que el metabolito **77** presenta la estructura de $2\alpha,3\beta,7\beta$ -trihidroxi-12-oxo-oleanan-28,13 β -olida.

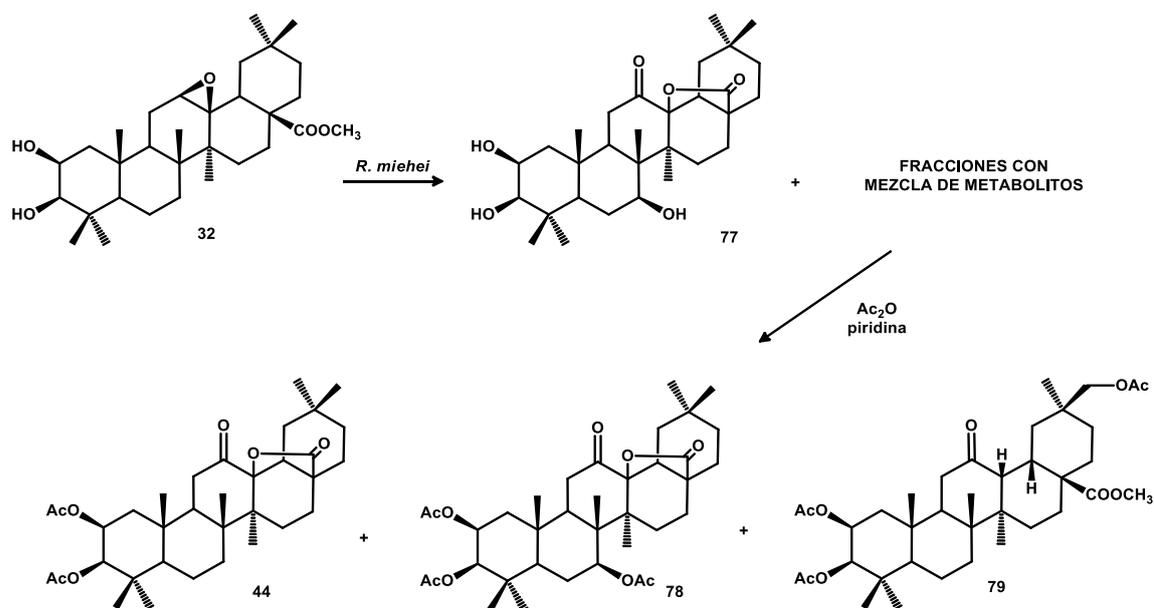


Figura 4.50. Biotransformación del epóxido **32** con *R. miehei*

En la biotransformación del epóxido **32**, además del metabolito **77**, se obtienen otras fracciones de difícil separación cromatográfica, por lo que se decide proceder a su acetilación. Una vez acetiladas se procede a su separación cromatográfica, en primer lugar se aísla un diacetoxiderivado cuyas propiedades espectroscópicas son idénticas a las del derivado **44** obtenido a partir del diacetato del ácido maslínico (**6**) cuando se trata con una corriente de ozono. (Figura 4.31). De las fracciones acetiladas también se aislaron los derivados **78** y **79**. El derivado **78** presenta un espectro de ^1H RMN que cuando se compara con el del diacetato **44** nos indica que existe una nueva señal a δ 5.11 debida a un grupo hidroxilo ecuatorial (dd, $J_1 = 10.7$ Hz, $J_2 = 5.1$ Hz). La comparación de los espectros de ^{13}C RMN de los derivados **45** y **78** nos indica que el grupo hidroxilo se encuentra en C-7, por lo que el derivado **78** se trata del triacetoxiderivado del metabolito **45**, por lo que proponemos la estructura de $2\alpha,3\beta,7\beta$ -triacetoxiolean-12-oxo-28,13 β -olida. El último derivado (**79**) se trata de un derivado triacetilado ya que en su espectro de ^1H RMN se observan tres señales de grupos acetoxilo (δ 2.10, 2.02 y 1.94). Dos de estos tres grupos acetoxilo se encuentran sobre C-2 y C-3. El tercer grupo acetoxilo se encuentra en un carbono primario ya que solo se observan seis señales de grupo metilo y la aparición de un sistema AB con dobletes centrados a δ 4.17 y 3.94 ($J = 11.1$ Hz). Los datos de ^{13}C RMN también confirman la existencia de un carbono primario oxigenado (δ 67.5 ppm) y seis señales de grupos metilo y una señal de grupo carbonilo a δ 210.7. En el espectro de ^1H RMN se observa una señal que aparece como doblete a 2.56 ppm ($J = 4.4$ Hz). En el espectro COSY podemos apreciar el acoplamiento de esta señal con el multiplete que aparece a 2.66 ppm debido al protón sobre C-18, lo que nos indica que sobre C-13 existe un hidrógeno que se acopla con H-18. También podemos observar la existencia del grupo metoxicarbonil sobre C-17 (singlete a 3.64 ppm y carbono oxigenado a 51.8 ppm). Estos datos nos sugieren que el derivado **79** se trata de un 12-oxo derivado con una configuración β en C-13. Este tipo de compuestos se ha observado en reagrupamientos de 12 β ,13 β -epoxiderivados de triterpenos.³¹⁰ Asumiendo esta estructura, podemos determinar la posición de la nueva hidroxilación introducida por el microorganismo sobre uno de los metilos. Comparando los espectros de ^{13}C RMN del sustrato **32** y del derivado **79** podemos ver que la nueva posición hidroxilada es C-30 ya que en el espectro de ^{13}C RMN del derivado **79** ha desaparecido la señal de este carbono (δ 23.5 ppm), observándose además efectos β sobre C-20 ($\Delta\delta = +3.3$), y efectos γ sobre C-19 ($\Delta\delta = -8.4$), C-21 ($\Delta\delta = -2.3$) y C-29 ($\Delta\delta = -4.8$). Con estos datos podemos sugerir la estructura de $2\alpha,3\beta,30$ -triacetoxi-12-oxo-13 β -olean-28-oato de metilo para el derivado **79**.

La formación de los productos obtenidos en la biotransformación del epóxido **32** con *Rhizomucor miehei* podría explicarse asumiendo que el grupo 12 β ,13 β -epoxi sufre una serie de transformaciones originando productos que posteriormente son biotransformados por el microorganismo. Se ha descrito que estos epoxiderivados sufren reagrupamientos en condiciones fuertemente ácidas ($\text{BF}_3/\text{Et}_2\text{O}$ o $\text{HBr}/\text{ácido acético}$)³¹⁹. Debido a las suaves condiciones en las que se realizan las biotransformaciones cabe pensar que el microorganismo podría participar en la

³¹⁹ Chengalur, R. N.; Arvind, A. N. *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 2639-2641.

apertura del epóxido y así iniciar la transformación hacia los 12-oxoderivados. Teniendo en cuenta que estas biotransformaciones se realizan en medio acuoso, también podríamos suponer que el agua del medio puede intervenir en estas transformaciones haciendo que se favorezca la lactonización hacia C-13 y la eliminación de metanol. Lo cierto es que cuando se produce la hidrólisis del éster metílico la acción del microorganismo va encaminada a la formación de una 12-oxo-28,13 β -olida que es hidroxilada en C-7 para originar derivados con un grupo hidroxilo ecuatorial en C-7 (figura 4.50). Sin embargo cuando no se produce la hidrólisis del éster, se obtienen 12-oxo-derivados con una configuración β en C-13 y la acción del microorganismo hidroxila C-30 (figura 4.50).

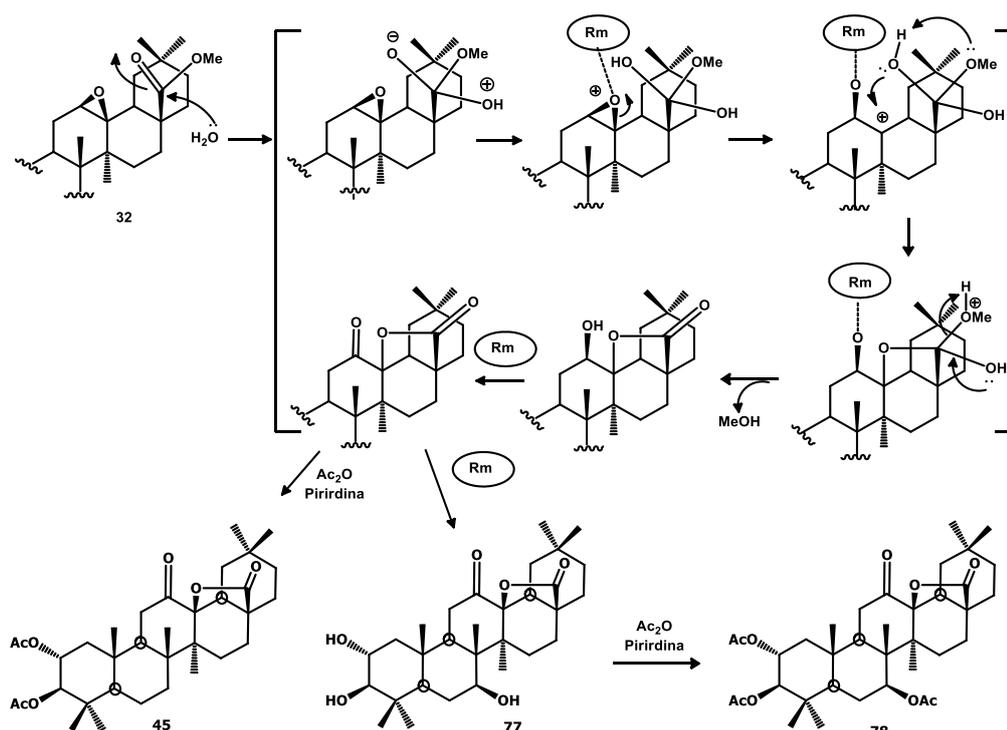


Figura 4.51. Posible mecanismo de formación de metabolitos de biotransformación de **32**

La acción conjunta del microorganismo y del agua del medio podría explicar la formación de los productos **45**, **77** y **78** aislados en la biotransformación del epóxido **32**. Por un lado el agua atacaría al grupo carbonilo del carboxilato y el microorganismo favorecería la apertura del epóxido hacia una carbocatión terciario en C-13 que se estabilizaría por ataque de un grupo hidroxilo en C-28 por la cara β . La eliminación de metanol originaría de nuevo el grupo carbonilo en C-28, obteniéndose la correspondiente 28,13 β -olida con un grupo 12 β -hidroxi que sería oxidado hacia el 12-oxoderivado por la acción de una oxidoreductasa presente en el microorganismo. La posterior acetilación química generaría el derivado **45** aislado en la biotransformación. La 12-oxo-28,13 β -olida obtenida mediante el proceso descrito sería también transformada por el microorganismo que introduciría un grupo hidroxilo por la cara β en C-7 para dar el β -hidroxiderivado **77**. La acetilación química de la mezcla que contenía el derivado **76** produce el correspondiente derivado acetilado **78**

En el caso de la obtención del derivado **79**, podríamos pensar que el microorganismo participa en la apertura del epóxido del sustrato para dar un carbocatión terciario estabilizado. Posteriormente se produciría la formación del doble enlace entre C-12 y el oxígeno con la consiguiente migración de hidruro por la cara α hacia C-13. De esta forma se obtendría una 12-oxo-cetona con una configuración α en el carbono 13, lo que supondría una unión *cis* entre los anillos C y D que es menos estable (figura 4.51). La tautomería cetoenólica originaría el correspondiente enol que se transformaría al 12-oxo-derivado con una configuración β en C-13, que es más estable ya que correspondería a una unión *trans* entre los ciclos C y D. La acción del microorganismo daría lugar al 30-hidroxiderivado que tras acetilación química conduce al producto **79**.

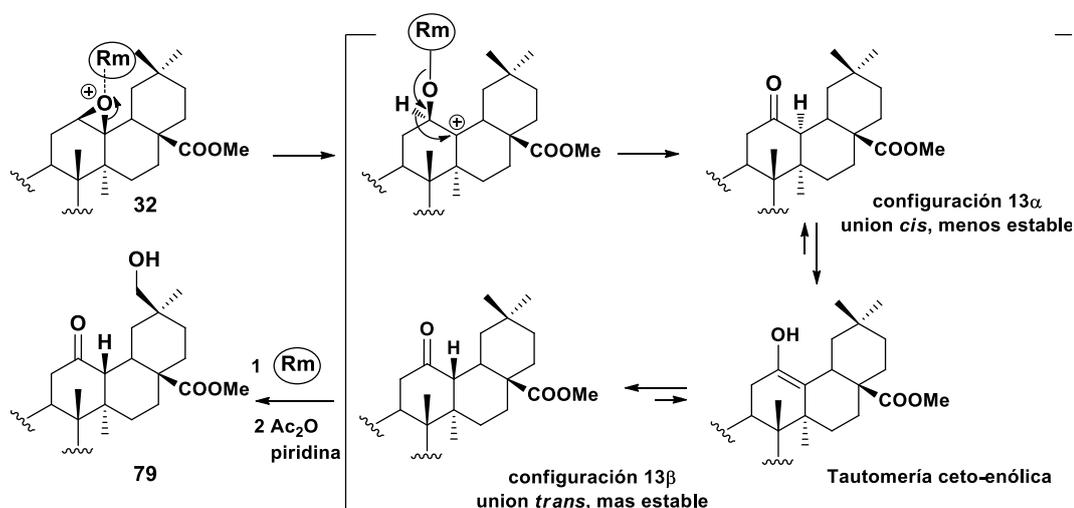


Figura 4.52. Mecanismo propuesto para la formación del metabolito **79**

4.5. INCUBACIÓN DE LAS LACTONAS

4.5.1. Incubación de oleanderolida (**35**)

La biotransformación de 500 mg de oleanderolida (**35**) con *Rhizomucor miehei* durante veinticinco días conllevó como muestra la figura 4.52, a la recuperación de 295 mg del sustrato inalterado **35** (59%) y al aislamiento de 86 mg de $3\beta,7\beta,12\alpha$ -trihidroxiolean-28,13 β -olida (**80**, 16.6%). Además, tras acetilación de una fracción polar se obtuvo 6 mg de $3\beta,7\beta,12\alpha,15\beta$ -tetraacetoxiolean-28,13 β -olida (**81**, 1.1%).

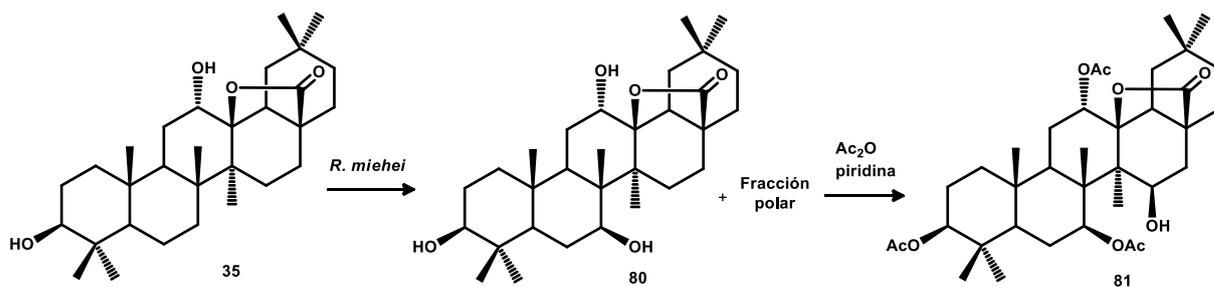


Figura 4.53. Biotransformación de oleanderolida (**35**) con *R. miehei*

El espectro de masas del metabolito **80** presenta un pico molecular compatible con la fórmula molecular de C₃₀H₄₈O₅, que nos indica que un átomo de oxígeno ha sido introducido en el sustrato **35** (C₃₀H₄₈O₄). Esto se confirma cuando comparamos el espectro de ¹H RMN del metabolito **80** con el del sustrato **35**, observándose una nueva señal a δ 3.91 (1H, dd, J₁= 10.8 Hz, J₂= 4.8 Hz) debida a un protón geminal a grupo hidroxilo ecuatorial. Asumiendo la estructura del sustrato esta hidroxilación solo puede estar en C-1, C-7, C-15, C-16, C-21 o C-22. La comparación de los espectros ¹³C RMN del sustrato **35** y el metabolito **90** nos indica la existencia de un efecto α sobre C-7 (Δδ= +41.3), efectos β sobre C-6 (Δδ= +11) y C-8 (Δδ= +5.4) y efectos γ sobre C-5 (Δδ= -2.3) y C-26 (Δδ= -0.3). Analizando el espectro HMBC del metabolito **80** podemos observar la existencia de correlación entre el protón que aparece a δ 3.91 con C-6, C-8 y C-26, lo que nos confirma que la hidroxilación del sustrato **35** ha tenido lugar en C-7 para dar 3β,7β-dihidroiolean-28,13β-olida (**80**).

El espectro de ¹H RMN y ¹³C RMN del acetoxiderivado **81** muestra tres señales correspondientes a grupos acetoxilo junto con una señal que aparece como doblete a δ 4.97 correspondiente a un protón geminal a un grupo acetoxilo ecuatorial similar a lo que ocurriría con el metabolito **80** lo que nos sugiere la presencia de un grupo 7β-acetoxilo que es confirmada mediante la correlación de esta señal con las posiciones C-6, C-8, C-26 y su propio grupo acetato en el espectro HMBC. Además, en el espectro de ¹H RMN de dicho metabolito **81** aparece otra señal a δ 4.11 que en este caso es debida a un protón geminal a un grupo hidroxilo ecuatorial. Esta segunda hidroxilación introducida por el microorganismo sobre un carbono secundario podría estar únicamente en las posiciones C-1, C-15, C-16, C-21 o C-22. Las correlaciones de HMBC observadas entre esta señal (4.11 ppm) y C-14, C-16 y C-27 nos indica que esta nueva hidroxilación ha tenido lugar sobre C-15, algo que también se confirma al comparar los espectros de ¹³C RMN del derivado **81** y el metabolito **80**, observándose efectos α sobre C-15 (Δδ= +38.7), β sobre C-14 (Δδ= +10.4) y C-16 (Δδ= +6.4) y efecto γ sobre C-17 (Δδ= -2) y C-27 (Δδ= -7). Estos datos son consistentes con la estructura 3β,7β-diacetoxi-15β-hidroiolean-28,13β-olida para el acetoxiderivado **81**.

4.5.2. Incubación de la lactona **41**

Como se muestra en la figura 4.53, la biotransformación de 350 mg de la lactona **41** con *R. miehei* durante trece días nos permitió recuperar 20 mg del producto de partida **41** (5.7%) y

obtener el metabolito **82** (22%) junto con una mezcla de metabolitos de la que tras acetilación se aislaron los acetoxiderivados **83-87**.

El espectro de masas del metabolito **82** nos indica que posee una fórmula molecular de $C_{30}H_{48}O_6$, con un átomo de oxígeno ha sido introducido en el sustrato **41** ($C_{30}H_{48}O_5$). Al comparar el espectro de 1H RMN del metabolito **82** con el del sustrato **41** observamos una nueva señal a 3.99 ppm (1H, dd, $J_1= 10.7$ Hz, $J_2= 4.9$ Hz) debida a un protón geminal a grupo hidroxilo ecuatorial. Esta señal es similar a la observada en el espectro del metabolito **80** debida a un grupo hidroxilo sobre C-7. Igualmente, existen efectos α , β y γ similares cuando se comparan los espectros de ^{13}C RMN del metabolito **82** con el del sustrato **41** y en su espectro HMBC también se observa la correlación del protón que aparece a δ 3.99 con C-6, C-8 y C-26. Según estos datos el metabolito **82** tendrá la estructura de $2\alpha,3\beta,7\beta,12\alpha$ -tetrahidroxiolean-28,13 β -olida.

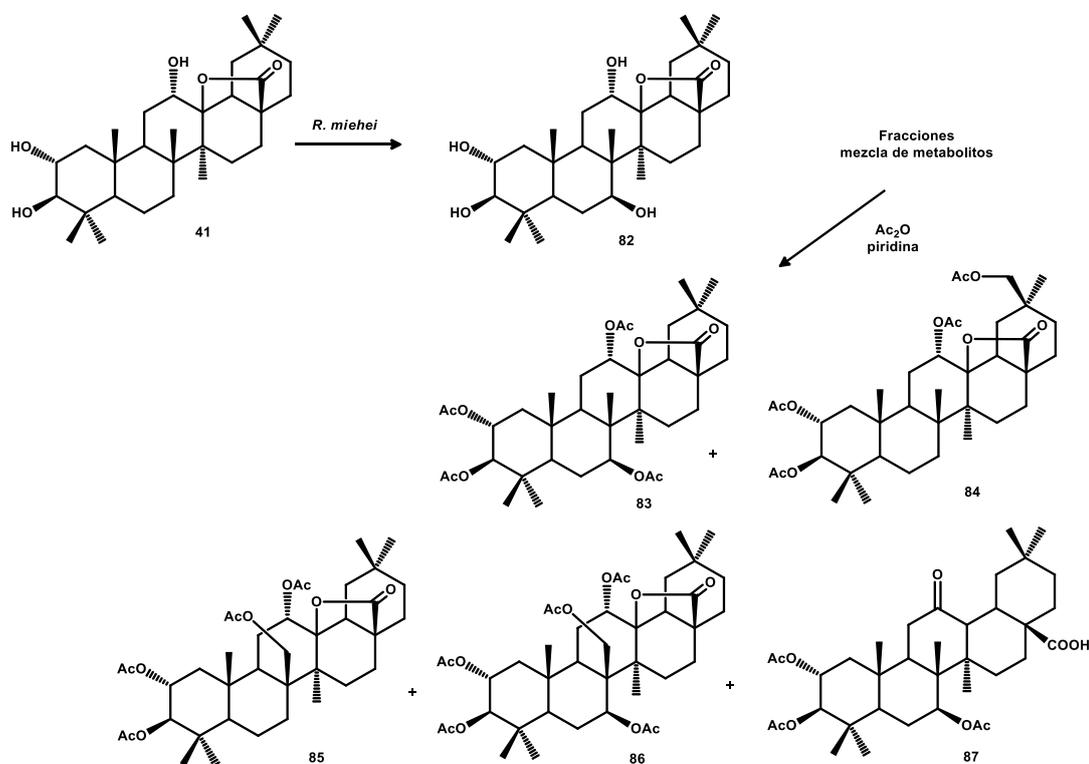


Figura 4.54. Metabolitos de biotransformación de la lactona **41** con *Rhizomucor miehei*

Los acetoxiderivados **83-85** son isómeros de fórmula molecular $C_{38}H_{56}O_{10}$ que nos indican que son derivados tetraacetilados del sustrato **41** y todos ellos presentan un oxígeno más con respecto al sustrato de partida (**41**). La diferencia entre ellos puede observarse al comparar entre sí y con el sustrato **41** los correspondientes espectros de 1H RMN, ya que el metabolito **83** muestra una señal a 5.16 (1H, dd, $J_1= 11.1$ Hz, $J_2= 4.60$ Hz) debida al protón geminal a grupo acetoxilo en C-7, mientras que en los acetoxiderivados **84** y **85** aparecen sistemas AB originados por un grupo acetoximetilénico (δ 4.00 y 3.75 (2H, sistema AB, $J= 11.4$ Hz) y δ 4.91 y 4.75 (2H, sistema AB, $J= 12.78$ Hz) respectivamente) y poseen seis señales de grupo metilo. El acetoxiderivado **83** se trata



de 2 α ,3 β ,7 β ,12 α -tetraacetoxiolean-28,13 β -olida, derivado tetraacetilado del metabolito **82**. Sin embargo los acetoxiderivados **84** y **85** difieren en la posición del grupo acetoxilo en carbono primario. Al comparar los espectros de ^{13}C RMN de dichos derivados con los del triacetoxiderivado del sustrato **41** (producto **42**) observamos que en el caso del derivado **84** existe un efecto α sobre C-30 ($\Delta\delta = +43.2$), efectos β sobre C-20 ($\Delta\delta = +3.1$) y efectos γ sobre C-29 ($\Delta\delta = -5.1$), C-19 ($\Delta\delta = -5.9$) y C-21 ($\Delta\delta = -3.1$), mientras que el metabolito **85** presenta efecto α sobre C-26 ($\Delta\delta = +44.8$), efectos β sobre C-8 ($\Delta\delta = +3.8$) y efectos γ sobre C-7 ($\Delta\delta = -6.2$), C-9 ($\Delta\delta = -0.4$) y C-14 ($\Delta\delta = -1.5$). El estudio de estos efectos nos indica que el grupo acetoxilo se encuentra en C-30 en el caso del derivado **84** y en C-26 en el caso del derivado **85**. Estas localizaciones también se confirma al estudiar el espectro HMBC de ambos derivados, observándose que en el caso del derivado **84** los protones del grupo acetoximetilénico se encuentran correlacionados con C-19, C-20, C-21 y el grupo metilo en C-29, mientras que en el caso del derivado **85**, se observa correlación con C-7, C-8 y C-14. Así, asignamos la estructuras de 2 α ,3 β ,12 α ,30-tetraacetoxiolean-28,13 β -olida al derivado **84** y 2 α ,3 β ,12 α ,26-tetraacetoxiolean-28,13 β -olida para el derivado **85**.

La fórmula molecular del acetoxiderivado **86** ($\text{C}_{40}\text{H}_{58}\text{O}_{12}$) nos indica que tenemos un derivado pentaacetilado del sustrato **41** en el que *R. miehei* ha introducido además dos átomos de oxígeno. El espectro de ^1H RMN de dicho metabolito muestra una señal a 5.20 ppm similar a la observada en el derivado **83** (1H, dd, $J_1 = 10.72$, $J_2 = 4.63$ Hz) originada por un protón geminal a un grupo hidroxilo ecuatorial en C-7 y un sistema AB con dobletes centrados a desplazamientos químicos similares a los observados en el espectro del derivado **85** y que era debido a un grupo acetoximetilénico en C-26. Tanto los efectos α , β y γ observados al comparar los espectros de ^{13}C RMN del derivado **86** con el tetraacetoxiderivado **83** y las correlaciones existentes en el espectro HMBC de dicho derivado **86** de 2H-26 con C-7 y H-7 con H-26 y de ambas señales con C-8 y C-14. Así el derivado **86** se trata del 2 α ,3 β ,7 β ,12 α ,26-pentaacetoxiolean-28,13 β -olida.

La fórmula molecular del último acetoxiderivado **87** ($\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{O}_9$) nos confirma que además de estar triacetilado posee un oxígeno más que el sustrato de partida **41**. Si observamos su espectro de ^{13}C RMN vemos que aparece una nueva señal a 209.89 ppm, indicándonos la existencia de un grupo carbonilo en su estructura. En su espectro de ^1H RMN se observa que la señal correspondiente a H-12 en el sustrato **41** ha desaparecido, existiendo una señal a δ 5.07 (1H, dd, $J_1 = 11.1$, $J_2 = 4.60$ Hz) producida por un protón axial geminal a un grupo acetoxilo en C-7 y una señal que aparece como doblete a δ 2.66 ($J = 5.0$ Hz) que en el espectro COSY se encuentra acoplada con el protón que aparece a δ 2.76 situado en C-18, por lo que consideramos que dicha señal es debida a un protón situado en C-13, vecinal al grupo carbonilo de C-12. El estudio del espectro HMBC nos confirma la posición del grupo carbonilo y la del protón situado en C-13 al observarse correlaciones de dicho protón con C-12, C-14 y C-18. La estereoquímica de C-13 se determinó a partir de experiencias NOE, observándose que la señal que aparece a δ 2.66. Presenta NOE con C-18 y C-26, compatible con una orientación β para el hidrógeno situado en C-13. Por lo tanto consideramos que el acetoxiderivado **87** se trata del ácido 2 α ,3 β ,7 β -triacetoxi-12-oxo-13 β -olean-28-oico.

4.6. INCUBACIÓN DE LOS 28-HIDROXIDERIVADOS

4.6.1 incubación de eritrodinol (**45**) con *R. miehei*

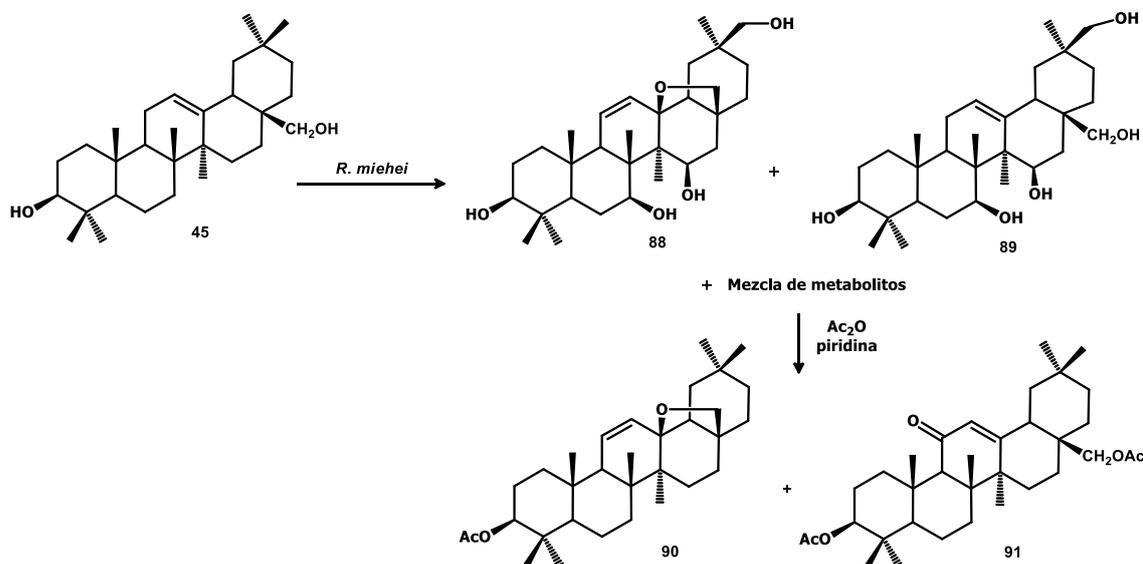


Figura 4.55. Metabolitos de biotransformación de eritrodinol (**45**) con *R. miehei*

La biotransformación de 200 mg de eritrodinol (**45**) con *R. miehei* durante quince días dio lugar a la obtención de los metabolitos **88** (11.8%) y **89** (19%) junto con mezclas de metabolitos que tras su acetilación con Ac_2O en piridina originaron los acetoxiderivados **90** (2.6%) y **91** (5.3%) (Figura 4.54).

El espectro de masas del metabolito **88** nos da como fórmula $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$, lo que implica que el microorganismo ha introducido tres oxígenos en el sustrato **45**. La comparación del espectro de ^1H RMN del metabolito **88** con el del sustrato **45** nos indica que ha desaparecido la señal del protón unido al doble enlace en C-12 del sustrato **45** y sin embargo aparecen dos señales de protones olefínicos a δ 5.80 y δ 5.40 que aparecen como dobles dobles y que en el espectro COSY se encuentran acopladas con una señal a δ 1.69 debida al protón axial de C-9. Esto nos sugiere que el doble enlace se encuentra entre C-11 y C-12. También se observan las señales de los protones geminales a un grupo hidroxilo en C-7 (δ 4.24 dd, $J_1 = 10.5$ Hz, $J_2 = 5.8$ Hz) y en C-30 (sistema AB con dobles centrados a 3.55 y 3.42 ppm, $J = 10.8$ Hz). Además, podemos observar otra señal a δ 3.88 originada por un protón geminal a un grupo hidroxilo ecuatorial (dd, $J_1 = 10.8$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz) que en el espectro COSY se encuentra correlacionada con la señales de los protones de C-16, por lo que el grupo hidroxilo debe encontrarse sobre C-15. En el espectro HMBC pueden observarse la correlación entre el protón de C-15 con C-14, C-16 y C-27, lo que confirma que C-15 se encuentra hidroxilado. Este protón presenta NOE con H-16 y con el grupo metilo de C-27, lo que es compatible con una disposición 15β para el grupo hidroxilo. Además de las señales anteriormente comentadas, también aparece un segundo sistema AB debido a los protones geminales a función oxigenada en C-28 y que forman parte de una anillo tetrahidrofuránico



(dobletes centrados a 3.68 y 3.23 ppm $J = 6.7$ Hz). Si comparamos los espectros de ^{13}C RMN del metabolito **88** con el sustrato **45** podemos observar efectos α , β y γ en las posiciones próximas a las nuevas funciones oxigenadas en las posiciones indicadas, por lo que consideramos que el metabolito **88** es el 13 β ,28-epoxi-3 β ,7 β ,15 β ,30-tetrahidroxiolean-11-eno.

El espectro de masas del metabolito **89** ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_5$) indica como en el caso anterior que el microorganismo ha introducido tres átomos de oxígeno. Los datos espectroscópicos del metabolito **88** nos informan de la existencia de señales con desplazamientos químicos y multiplicidad similares a las observados en el espectro del metabolito **88** y que eran originadas por los protones geminales a grupos hidroxilo en C-7, C-15 y C-30. Sin embargo, en el caso del metabolito **89** sí se observa a δ 5.49 la señal del protón olefínico de C-12, existente en el espectro del sustrato **45**, lo que nos indica que en este caso no ha tenido lugar la ciclación hacia C-13, teniendo el metabolito **89** la estructura de 3 β ,7 β ,15 β ,28,30-pentahidroxiolean-12-eno.

La fórmula molecular del metabolito **90** ($\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_3$) nos indica que posee dos protones menos que el sustrato **45**, considerando que se trata de un derivado monoacetilado. Si observamos su espectro de ^1H RMN, se observa la desaparición de la señal del protón unido al doble enlace en C-12 y la aparición de dos señales de protones olefínicos similares con desplazamiento químico y multiplicidad similares a los observados en el espectro del metabolito **88** y que eran debidos a los protones del doble enlace entre C-11 y C-12 (δ 5.83, dd, $J = 10.4$ Hz y δ 5.41, dd, $J_1 = 10.4$ Hz, $J_2 = 2.9$ Hz). Al igual que en el espectro del metabolito **88** también aparece un sistema AB debido a los protones geminales a función oxigenada en C-28 y que forman parte de un anillo tetrahidrofuránico (dobletes centrados a δ 3.70 y 3.25, $J = 6.7$ Hz). Estos datos nos indican que la estructura del derivado **90** es de 3 β -acetoxi-13 β ,28-epoxiolean-11-eno.

El espectro de masas del acetoxiderivado **91** nos da como fórmula molecular ($\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_5$) lo que implica que posee un nuevo átomo de oxígeno más y dos hidrógenos menos con respecto al derivado diacetilado (**47**) ($\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_4$). El espectro de ^1H RMN del metabolito **91** muestra una señal singlete a δ 5.58 correspondiente a H-12 lo que nos hace pensar que en C-11 existe un grupo carbonilo ya que en su espectro de ^{13}C RMN aparece una señal a 200.8 ppm y en el espectro HMBC se observa correlación entre H-11 con C-12 y C-13. Asimismo si comparamos dicho espectro de carbono del metabolito **89** con el sustrato diacetilado (**47**) vemos que aparecen efectos α sobre C-11 ($\Delta\delta = +107.34$), efecto β sobre C-12 ($\Delta\delta = +9.2$), C-9 ($\Delta\delta = +3.48$), y efecto γ sobre C-13, C-10 y C-8. Todo esto nos indica que la estructura del metabolito **91** se corresponde con 3 β ,28-diacetoxiolean-12-en-11-ona.

Los productos **88**, **90** y **91** aislados de esta biotransformación podrían haberse formado por inserción de un grupo hidroperóxido en C-11, seguido de la pérdida de una molécula de peróxido de hidrógeno y ataque del grupo hidroxilo de C-28 sobre C-13 para formar un nuevo anillo tetrahidrofuránico, quedando el doble enlace situado sobre C-11 y C-12, obteniéndose los productos **88** y **90** (figura 2.55). Las hidroxilaciones introducidas por el microorganismo podrían ocurrir antes o después de la ciclación ya que también se obtiene el derivado **89** cuya ciclación

originaría **88** y el aislamiento del derivado **90** nos indicaría que las hidroxilaciones podrían ocurrir después de la ciclación. Considerando la propuesta anterior, también podría considerarse la pérdida de una molécula de agua para generar un grupo carbonilo sobre C-11 dando lugar al derivado **91** (figura 4.55).

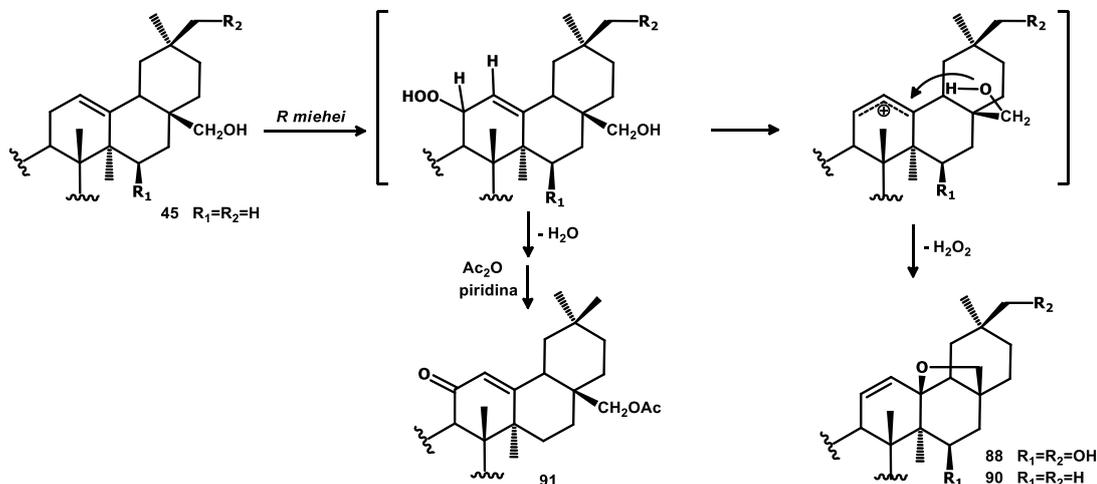


Figura 4.56. Mecanismo propuesto para la formación de los derivados **88**, **90**, **91**.

4.6.2 Incubación del trihidroderivado **46** con *R. miehei*

La incubación de 100 mg del producto **46** con *R. miehei* durante 15 días dio lugar a la recuperación de 20 mg del sustrato **46** (20%) y una mezcla polar que se acetiló con Ac₂O en piridina obteniéndose 35 mg del derivado triacetilado del sustrato (**48**, 27.2%) y 15 mg del acetoxiderivado **92** (11.4%), como puede verse en la figura 4.56.

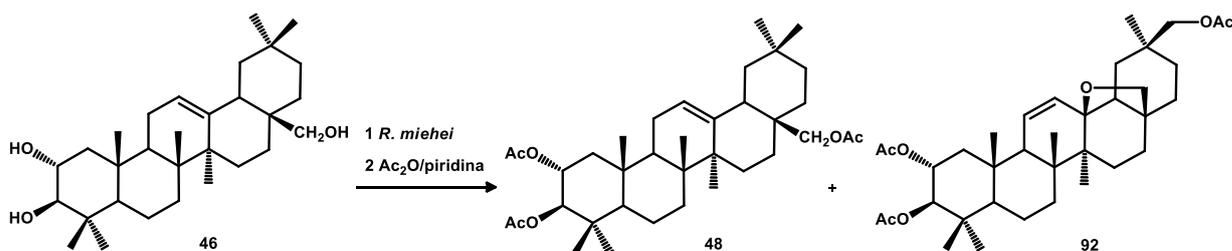


Figura 4.57. Biotransformación de eritriol **46** con *R. miehei*

La fórmula molecular para el metabolito **92** (C₃₆H₅₄O₇) indica que el hongo ha introducido un átomo de oxígeno con respecto al derivado triacetilado **48** (C₃₆H₅₆O₆) y la pérdida de dos protones puede implicar la migración del doble enlace por formación del anillo tetrahidrofuránico anteriormente visto en los productos **88** y **90** (figura 2.55). Si observamos el espectro de ¹H RMN del metabolito **92** vemos que contiene señales similares a las observadas en los espectros de ¹H RMN de los productos **88** y **90** debidas a los protones olefínicos en C-11 y C-12 y a los protones



de C-28, geminales a función oxigenada que se encuentra ciclada sobre C-13. Por otro lado, aparece un nuevo sistema AB con dobletes centrados a 4.02 y 3.91 ppm resultado de la hidroxilación en uno de los grupos metilo sustrato **46** realizada por el microorganismo. Los efectos α , β y γ encontrados cuando se comparan los espectros de ^{13}C RMN de los derivados **92** y **48** son concordantes con la hidroxilación en C-13 así como las correlaciones observadas en su espectro HMBC. De esta forma la estructura del metabolito **92** es consistente con 2 α ,3 β ,30-triacetoxi-13 β ,28-epoxiolean-11-eno.

4.7 RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTAS BIOTRANSFORMACIONES

En el estudio de estas biotransformaciones pertenece al primer estudio realizado en nuestro Grupo de Investigación para evaluar la aplicación de los hongos filamentosos a la obtención de nuevos derivados, principalmente hidroxilados, de los ácidos triterpénicos aislados de los residuos de la industria olivarera. En cuanto a los hongos filamentosos ensayados en estos estudios se seleccionaron considerando la acción de los mismos en anteriores experiencias con sustratos sesquiterpénicos y diterpénicos realizadas en nuestro Grupo de Investigación. Así las experiencias se realizaron con los hongos *Rhizopus nigricans* CECT 2672 (ATCC 10404), *Neurospora crassa* CECT 2261 (ATCC 10336), *Rhizomucor miehei* CECT 2749, *Cunninghamella elegans* CECT 2123, *Curvularia lunata* CECT 2131 y *Rhizopus oryzae* CECT 2339. A la vista de los resultados obtenidos podemos indicar que sólo el hongo *Rhizomucor miehei* actuaba sobre dichos sustratos originando distintas funcionalizaciones de los mismos. Este microorganismo ha logrado introducir grupos hidroxilo en posiciones no activadas de la molécula, o en dobles enlaces con formación de un nuevo ciclo por participación del grupo carboxilo o del grupo hidroximetilo presente en algunos de los sustratos.

La acción de *R. miehei* sobre el ácido oleanólico (**1**) origina en todos los casos biohidroxilaciones en C-30 (17%) y posteriormente introduce un segundo grupo hidroxilo en C-1 (6%) o en C-7 (5%) en ambos casos por la cara β . La acción de *R. miehei* sobre el ácido maslínico (**2**) tiene lugar al igual que en el ácido oleanólico principalmente sobre C-30 (13.1%). En este caso no se producen posteriores hidroxilaciones aislándose, sin embargo, otros productos que proceden de la acción del microorganismo sobre C-11 (2.9%) y posterior evolución hacia el 11-oxo derivado (1%) o bien la participación del grupo carboxilo de C-28 puede generar un anillo lactónico sobre C-13 y doble enlace entre C-11 y C-12 (0.8%). Además, *R. miehei* también puede epoxidar el doble enlace C-11-C-12 de algunos de los metabolitos (1.1%).

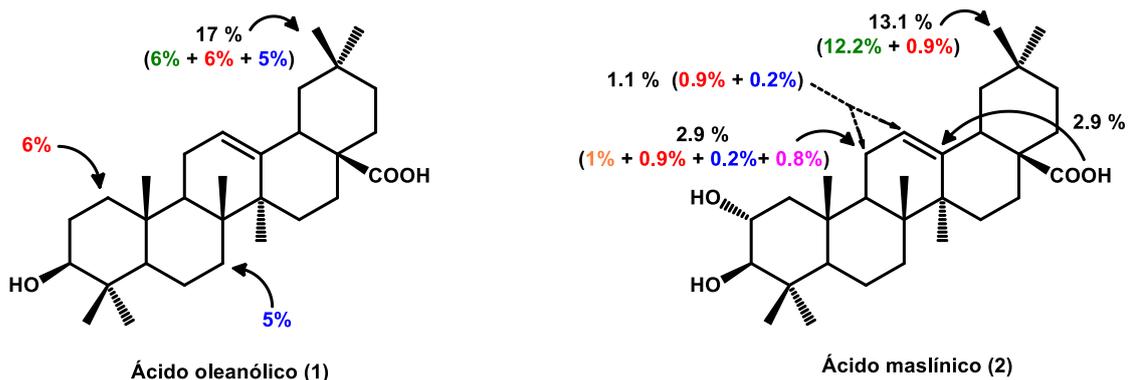


Figura 4.58. Acción porcentual de *R. miehei* sobre los sustratos 1 y 2

La acción de *R. miehei* sobre el oleanolato de metilo (7) sólo origina un derivado con un sistema diénico conjugado en el anillo C que se encuentra dihidroxilado en C-30 y C-7 β (12%). Cuando se utiliza como sustrato el sistema diénico (10), la acción se dirige a 30, 7 y 15 (7.3%), destacando que las hidroxilaciones en posiciones secundarias tienen lugar por caras diferentes: β -hidroxilación en C-7 y α -hidroxilación en C-15.

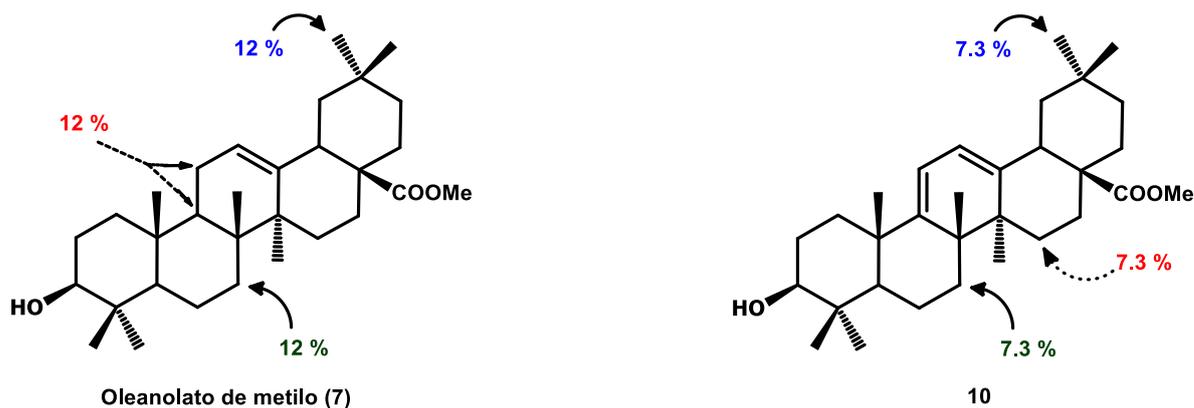


Figura 4.59. Acción del microorganismo sobre los ésteres 7 y 10

La presencia del grupo hidroxilo en C-2 como sucede en el caso del maslinato de metilo (8) parece influir en la acción del microorganismo hacia la monohidroxilación en C-30 (9.9%: 7.3% + 2.6%) al igual que ocurría con el ácido maslínico. Es este caso al no existir el grupo carboxilo sobre C-28, no se aíslan derivados ciclados y de nuevo se observa la actuación de *R. miehei* sobre C-11 que puede evolucionar hacia el sistema α,β -insaturado (1.4%) o el dieno conjugado (2.5%). El aislamiento del 12-oxoderivado (0.8%) nos sugiere una posible acción del hongo hacia el doble enlace del sustrato que por epoxidación podría evolucionar hacia el metabolito aislado.

La acción del microorganismo sobre el epoxiderivado 32 origina mayoritariamente la 7 β -hidroxilación (24.5%: 21.3% + 3.2%) frente a la hidroxilación en C-30 (10.4%), pero en todos los casos los productos proceden de la apertura del epóxido para dar 12-oxoderivados (30.4%: 21.3%

+ 3.2% + 5.9%) y lactonización sobre C-13 que implicaría hidrólisis del éster metílico y participación del ácido formado que origina la ciclación sobre C-13. Si no se produce la hidrólisis, el epóxido evoluciona hacia un 12-oxoderivado con migración del hidrógeno en C-12 hacia C-13 (10.4%) e hidroxilación en C-30.

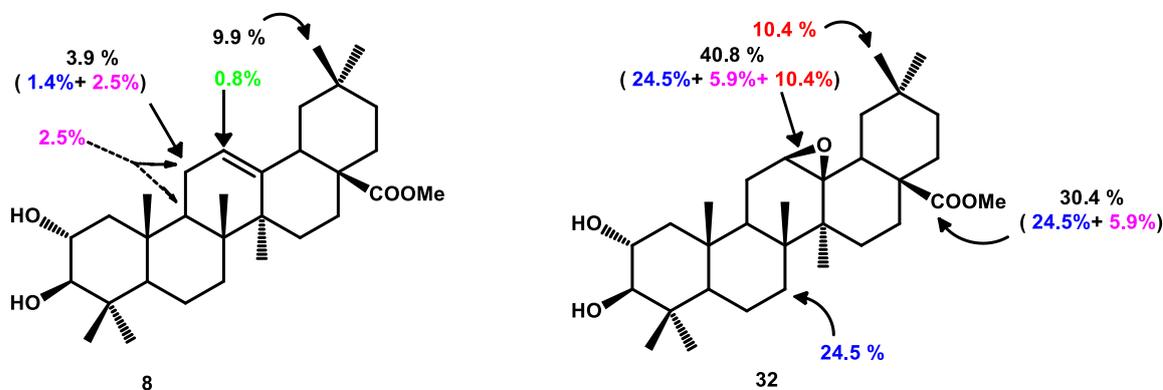


Figura 4.60. Actuación de *R. miehei* sobre los ésteres **2** y **32**

Cuando existe un anillo lactónico entre C-28 y C-13 la acción del microorganismo tiene lugar mayoritariamente hacia C-7 por la cara β (17.7%: 16.6% + 1.1%) como en el caso de la oleanderolida (**35**), obteniéndose una segunda hidroxilación en C-15 por la cara α (1.1%). Cuando además en C-2 existe un grupo hidroxilo como en el caso de la dihidroxilactona **41**, además de los productos 7 β -hidroxilados (43.6%: 22%+4.4%+1%+16.2%) se obtienen productos procedentes de la acción del microorganismo sobre C-30 (9.3%) o sobre C-26 (3.7%: 2.7% + 1%) y de la oxidación del grupo hidroxilo en C-12 con migración del protón de H-11 hacia C-13 y apertura del anillo lactónico (16.2%).

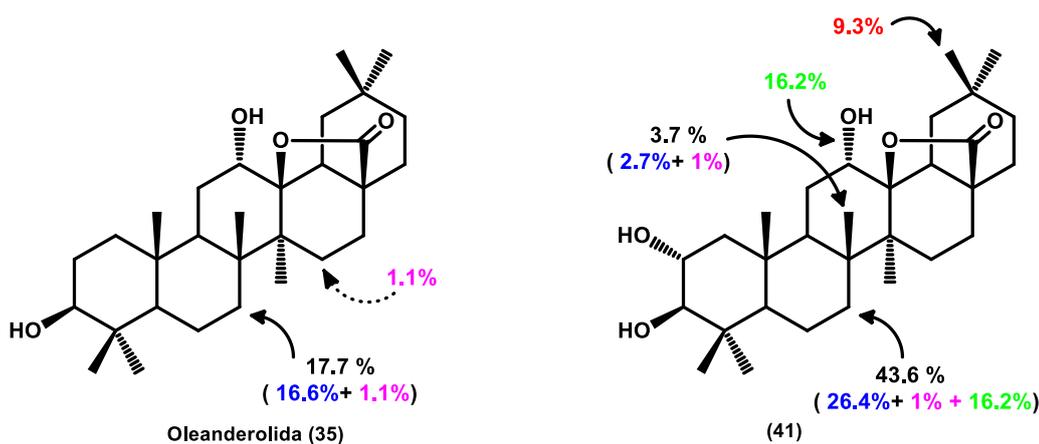


Figura 4.61. Porcentajes de hidroxilación sobre los sustratos lactónicos **35** y **41**

Cuando en C-28 existe un grupo hidroxilo como en el caso del eritrodio (**45**) la acción mayoritaria del microorganismo es hacia C-30, C-7 y C15 (31.2%: 11.8% + 19.4%) y al igual que

en el caso del dieno **10** y la lactona **41** las hidroxilaciones en posiciones secundarias tienen lugar por caras contrarias: cara β en C-7 y cara α en C-15. También se observa que un grupo nucleófilo como el grupo hidroxilo puede participar en la ciclación hacia C-13 a partir de un derivado funcionalizado en C-11 para dar el doble enlace C-11 y C-12 (14.4%: 11.8% + 2.6 %) o el grupo carbonilo en C-11 (5.3%), lo que también ocurría en la acción del *R. miehei* sobre el ácido maslínico (**2**) que posee un grupo carboxilo en C-28. En el caso del trihidroxiderivado **46** el microorganismo origina la monohidroxilación en C-30 (11.5%).

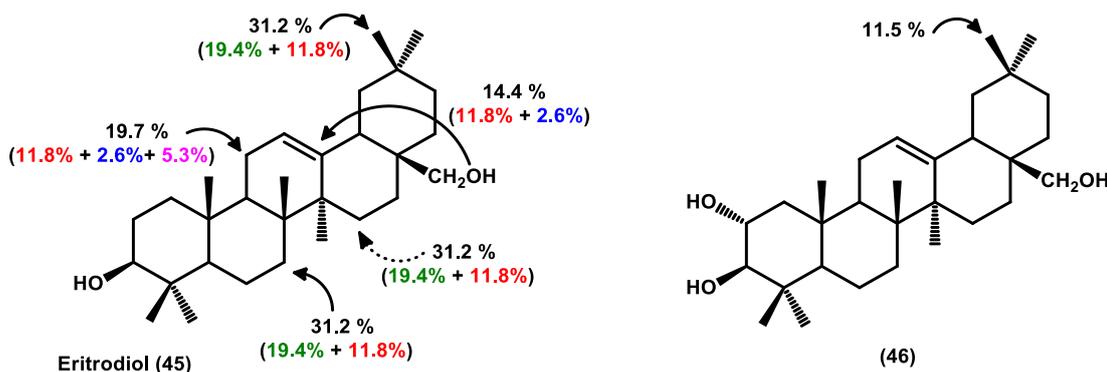


Figura 4.62. Acción del microorganismo sobre los hidroxiderivados **45** y **46**

Algunos de estos metabolitos aislados presentan notables propiedades biológicas, como el ácido queretaroico (**53**), o tienen estructuras muy similares de compuestos que tienen actividades biológicas destacadas. El ácido queretaroico (**53**) también ha sido obtenido mediante biohidroxilación de ácido oleanólico (**1**) con una cepa de *Escherichia coli* modificada con un gen del citocromo P450 procedente de *Nonomuraea recticatena*.⁵ Este compuesto (**53**) posee propiedades anti tumorales inhibiendo la incorporación de ^{32}P i en fosfolípidos de células HeLa mediadas por TPA,³²⁰ ya que se asocia a la membrana y bloquea el acceso del fósforo.

Un 7β -hidroxiderivado del ácido oleanólico denominado ácido cántico fue ensayado como antimicrobiano *in vitro* frente a seis especies de bacterias Gram-positivas y doce especies de bacterias Gram-negativas así como con tres levaduras de especies *Candida*, siendo activo frente al 95% de todas ellas³²¹. Moodley et al.³²² han publicado que derivados con una estructura de olean-11-en-28,13 β -olida, con una estructura similar a la del metabolito **57**, presentaba buena actividad antibacteriana para todas las cepas bacterianas estudiadas y consideran que el anillo lactónico contribuye significativamente a la actividad antibacteriana en este tipo de triterpenos.

³²⁰ Kinoshita, K.; Yang, Y.; Koyama, K.; Takahashi, K.; Nishino, H. *Phytomedicine* **1999**, *6*, 73-77.

³²¹ Kuete, V.; Eyong, K. O.; Folefoc, G. N.; Beng, V. P.; Hussain, H.; Krohn, K.; Nkengfack, A. E. *Pharmazie* **2007**, *62*, 552-556.

³²² Moodley, R.; Chenia, H.; Jonnalagadda, S. B.; Koorbanally, N. *J. Med. Plant Res.* **2011**, *5*, 4851-4858.



Similar agrupación α,β -insaturada en el anillo C a la obtenida en estas biotransformaciones ha sido previamente descrita en la biotransformación de ácido oleanólico (**1**) con *Cunninghamella blakesleeana*³²³, aislándose también en cultivos de tejidos de callos de plantas del género *Paeonia*³²⁴ (peonias) o a partir de los conos de liquidambar (*Liquidamber styraciflua*)³²⁵ y de *Salvia syriaca* L.³²⁶. Además se ha evaluado su actividad como osteoblásticos³²⁷ y su aplicación como antiosteoporóticos³²⁸.

Por otro lado, se han aislado $11\alpha,12\alpha$ -epoxiolean-28, 13β -olidas naturales a partir de *Lepechinia glomerata*³²⁹, de la salvia (*Hyptis albida*)³³⁰ y también en plantas del género *Paeonia*¹⁴. También se ha descrito su obtención mediante oxidación fotoquímica a partir de ácido oleanólico (**1**).³³¹

³²³ Hikino, H.; Nabetani, S.; Takemoto, T. *Yakugaku Zasshi* **1969**, *89*, 809-813.

³²⁴ Ikuta, A.; Kamiya, K.; Satake, T.; Saiki, Y. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1203-1207.

³²⁵ Yuko, F.; Takeshi, Y.; Shun-ich, W.; Kuniyoshi, S.; Shunyo, M.; Reiko T. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 142-144.

³²⁶ Al-Jaber, H. I.; Abrouni, K. K.; Al-Qudah, M. A.; Abu Zarga, M. H. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2012**, *14*, 618-625.

³²⁷ [Yuan Zhang]

³²⁸ Li, J. Patent Information: Jan 25, **2006**, **CN 1724556**.

³²⁹ Delgado, G.; Cardenas, X.; Alvarez, L.; Romo de Vivar, A.; Pereda-Miranda, R. *J. Chem. Research* **1986**, *8*, 286-287.

³³⁰ Pereda-Miranda, R.; Delgado, G. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 182-185.

³³¹ Kitagawa, I.; Kitazawa, K.; Yoshikawa, I. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *4*, 509-512; *Tetrahedron* **1972**, *28*, 907-921.

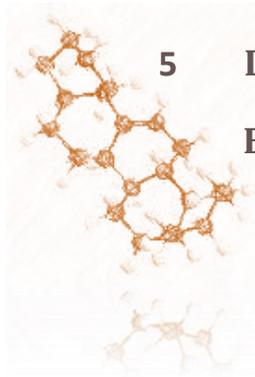
CAPÍTULO III



PARTE
EXPERIMENTAL

*Si supiese qué es lo que estoy haciendo,
no le llamaría investigación,
¿verdad?*

Albert Einstein



5

DESARROLLO

EXPERIMENTAL



5.1 INSTRUMENTACIÓN GENERAL BÁSICA

La evaporación de disolventes se ha realizado en un rotavapor Buchi Heating Bath B-491 con baño termostático unido a un sistema de vacío con resistencia química MZ 2C NT +AK+EK y refrigerado mediante chiller o recirculador de frío PolyScience.

Los puntos de fusión microscópicos han sido determinados en un aparato tipo Kofler, de la casa Reichert y no están corregidos.

La esterilización de los medios de cultivo así como todo el material empleado para llevar a cabo las biotransformaciones se efectuó en un esterilizador Presoclave 75 a la temperatura especificada en cada caso.

Las biotransformaciones se incubaron en agitadores orbitales Cetomat R con capacidad para 20 matraces Erlenmeyer de 250 mL.

Las extracciones de los medios de cultivo incubados se realizaron a través de un aparato de vidrio de extracción líquido-líquido en continuo para el disolvente especificado en cada caso y está formado por un matraz esférico, cuerpo del extractor y condensador.

Las reacciones de tratamiento con ozono se han realizado mediante Ozonizador O. Elettronica I. Mod. TP2/2 O2 con una corriente de oxígeno a 1 atm de presión, proporcionando una riqueza de ozono del 75% a una temperatura de -78 °C conseguida en un vaso Dewar con metanol y un sistema de enfriamiento Thermo Haake EK90.

5.2 TÉCNICAS GENERALES CROMATOGRÁFICAS

5.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina se ha llevado a cabo con gel de sílice Merck 7747, en capas de 0.25 mm de espesor de vidrio o en cromatoplasmas Merck TLC Sílica Gel 60 de 5 x10 cm preparadas para su uso. El pinchado de los productos sobre las mismas se realizó utilizando micropipetas Blaubrand intraMARK de 1 a 5 μL visualizándolos con la mezcla usualmente denominada "óleum" ($\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{SO}_4-\text{AcOH}$, 4:1:20 mL) y calefacción a 120°C hasta aparición de manchas. Además, para mejorar la visualización de las manchas, se emplea una lámpara UV CAMAG después del revelado con $\lambda = 254 \text{ nm}$ y $\lambda = 366 \text{ nm}$. Como eluyentes de la fase móvil correspondiente se ha utilizado disolventes como CH_2Cl_2 , *n*-hexano, acetato de etilo, cloroformo, metanol y acetona, bien solos o mezclados, todo ello en función de la polaridad del compuesto de interés a visualizar.

5.2.2 Cromatografía flash a media presión

Difiere de la cromatografía tradicional en columna básicamente por el tamaño de las partículas del soporte, que es menor, y en la mayor contrapresión causada por las mismas que obliga al uso de una fuente de presión para generar el caudal de fase móvil necesario en columna.

Las cromatografías en columna se han realizado con gel de sílice como adsorbente (gel de sílice Scharlau 60, 40-60 μm) soportadas en columnas de vidrio de diámetro variable en función de la cantidad de muestra a separar, trabajando con una presión de entre 0.5 y 1 atmósfera. Se ha utilizado un gradiente de polaridad creciente con disolventes o mezclas de disolventes, generalmente, *n*-hexano-AcOEt, CH_2Cl_2 -acetona, CHCl_3 -MeOH y se sigue la composición de las fracciones eluidas por CCF.

5.3 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL

5.3.1 Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR)

Los espectros de masas se han llevado a cabo por ionización a presión atmosférica por electro spray (ESI) en un sistema con analizador de tiempo de vuelo (TOF) WATERS modelo LCT Premier XE, con jeringa de infusión para muestras líquidas y con UPLC Acquity Binary Solvent manager como cromatógrafo. El volumen inoculado de muestra fue de 2 μL $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ y se empleó una columna en fase reversa Acquity UPLC BECH C18 130 Å $1.7 \mu\text{m}$ 2.1 mm x 50 mm. Los datos se expresan en unidades de masa (m/z).

5.3.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

^1H RMN y ^{13}C RMN

Se han realizado en un espectrómetro BRUKER AVANCE 400 MHz ^1H y 100 MHz ^{13}C , equipado con una sonda de detección inversa con bobina de gradientes y una sonda $^1\text{H}/^{13}\text{C}$. Los espectros se realizaron en CDCl_3 como disolvente habitual y se referencian con respecto al disolvente residual CHCl_3 (7.26 ppm en ^1H y 77.16 ppm en ^{13}C), aunque también se han realizado en CD_3OD y $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. La multiplicidad de los carbonos se determina utilizando la secuencia de pulsos DEPT (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer).

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

Los experimentos de correlación heteronuclear $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ a un enlace se adquieren utilizando la secuencia Agilent hc2hsqcse, con selección de la secuencia de cuanto y simple con una serie de pulsos de gradientes.

HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity)

Para las correlaciones a larga distancia, 2 ó 3 enlaces, se utiliza la secuencia gc2hmbc, que utiliza un filtro de paso largo para la eliminación de la correlación directa en función de la constante de acoplamiento para $^1J_{\text{H,C}} = 145$ Hz.

COSY (COrrelation SpectroscopY)

Los experimentos de correlación homonuclear $^1\text{H}/^1\text{H}$ se adquieren empleando la secuencia básica del COSY, gDQCOSY, que tiene dos pulsos de 90° y un tiempo de evolución. En general se utiliza la secuencia con filtro de doble cuanto, que permite la eliminación o disminución de las señales intensas, ya sea de disolvente o singuletes en la diagonal y sus correspondientes artefactos.

NOE (Nuclear Overhauser Effect)

La inversión de una señal de protón seleccionada, causa variaciones a uno o varios protones. Se adquiere irradiando con baja potencia y de manera continua la señal que interesa con la secuencia NOESY2D o NOESY1D.

5.3.3 Espectroscopía de infrarrojo (IR)

Los espectros de infrarrojo se han realizado en forma de películas sobre cristales de NaCl o con pastillas de KBr en un espectrómetro MATTSON SATELLITE FTIR. Las frecuencias de los máximos de absorción se expresan en cm^{-1} .

5.3.4 Rotaciones específicas ($[\alpha]_D$)

Las rotaciones específicas o $[\alpha]_D$, se midieron en CHCl_3 o MeOH a la temperatura del laboratorio en dos polarímetros automáticos PERKIN-ELMER 141 y 341, en una célula de 1 dm de longitud y a las concentraciones para que se indican en cada caso.

5.3.5 Disolventes y reactivos

Todos los disolventes y reactivos utilizados han sido de calidad de síntesis y procedentes de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Fisher Chemical y Panreac.

5.4. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE SÍNTESIS EN DISOLUCIÓN

5.4.1 Formación de las sales sódicas

A 20 mL de H_2O se le añaden 0.35 g de NaOH y se calienta con agitación constante hasta total disolución. Lentamente se va añadiendo 3.61 g de ácido y se deja evolucionar 24 horas en agitación. Para favorecer el proceso se le agrega una porción de una disolución de NaCl al 5%. Finalmente se filtra por succión y se lava el sólido en primer lugar, con la disolución de NaCl y después con agua. Secar a temperatura ambiente y pesar.

5.4.2 Reacción de acetilación

Se disuelven 100 mg de producto en 4 mL de piridina y se añaden 2 mL de anhídrido acético, llevándose a cabo la reacción en las condiciones particulares que se indican en cada caso. Una vez finalizada, se añade agua fría y se extrae varias veces con CH_2Cl_2 . A continuación se lava la fase orgánica con HCl, posteriormente con una disolución de NaHCO_3 hasta pH neutro, se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a vacío. Por último, se purifica en columna.

5.4.3 Reacción de esterificación

Se disuelven 11 mmol de producto a esterificar en 50 mL de tetrahidrofurano, se añaden 10 mL de NaOH 5N y se mantiene a reflujo durante 3 horas, tras las cuales se agregan 2 mL de CH_3I . Transcurridas 2 horas más, la mezcla de reacción se lleva a sequedad, se lava con agua, se neutraliza con una disolución de HCl y se extrae con CH_2Cl_2 . Finalmente, las fases orgánicas se secan con Na_2SO_4 , se evaporan a presión reducida y se cromatografía en columna.

5.4.4 Reducción con hidruro de aluminio y litio

Se disuelven 0.3 mmol del sustrato a reducir en 3 mL de THF seco y se añade 1 mL de disolución 1 M de AlLiH_4 en THF, manteniéndose la reacción a la temperatura y durante el tiempo indicados en cada caso. Transcurrido el cual se agrega metanol para destruir el exceso de reactivo, se lava con agua, se extrae varias veces con CH_2Cl_2 , se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío. Finalmente, se purifica en columna.

5.4.5 Tratamiento con ozono

Se disuelven 0.5 mmol de material de partida en 15 mL de disolvente indicado en cada caso y se pasa una corriente de ozono de caudal determinado en las condiciones de tiempo y temperatura estipuladas, agregándose a continuación 1.5 mL de Me_2S como reductor. Esta mezcla de reacción se mantiene en agitación hasta que alcanza la temperatura ambiente. Finalmente, se evapora el disolvente a vacío y se purifica en columna.

5.4.6 Cloración con NaClO

Se disuelven 500 mg de material de partida en 20 mL de diclorometano y se agregan 10 mL de una disolución de NaClO comercial al 5% (0.4% de Cl_2 activo), manteniéndose en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Tras ese tiempo, se mezcla con gel y el disolvente es evaporado a vacío. La papilla obtenida se purifica en columna.

5.4.7 Tratamiento con Br_2

100 mg de producto se disuelven en la cantidad mínima de CCl_4 y sobre él se agregan 3 mL de una disolución de Br_2/CCl_4 ($8.7 \cdot 10^{-2}$ M). Se deja evolucionar sin agitación a temperatura ambiente el tiempo estipulado en cada caso, tras el cual el disolvente es evaporado a vacío y procesado mediante cromatografía en columna.

5.4.8 Reacción de epoxidación con MeONa/MeOH

100 mg de producto bromado es disuelto en 15 mL de una disolución de NaOMe/MeOH al 2% y se mantiene a reflujo durante 1 hora. Agotado este tiempo, la mezcla es extraída con diclorometano, se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente. Finalmente se purifica en columna.

5.4.9 Tratamiento con 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU)

El producto bromado (500 mg) es agregado a una disolución de DBU (350mg) y 5 mL de *o*-xileno y la reacción se mantiene a reflujo durante 13 horas. La mezcla se extrae con acetato de etilo, es acidificada con una disolución acuosa de HCl al 5% y lavada con una disolución acuosa de Na_2CO_3 . Finalmente es secada con Na_2SO_4 anhidro, se concentra a vacío y se purifica en columna.

5.4.10 Reacción de epoxidación con ácido peracético

Se disuelven 100 mg de producto en 10 mL de diclorometano y se agregan 2.5 mL de ácido peracético. Para favorecer la miscibilidad de las fases se añaden un par de gotas de etanol y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Agotado el tiempo, la mezcla es extraída con diclorometano, secada con Na_2SO_4 anhidro, se concentra a vacío y se purifica en columna.

5.4.11 Bromación alílica con NBS

1 g de material de partida se disuelve en 30 mL de CCl_4 y se añade 1.2 eq. de NBS y AIBN en cantidad catalítica. La reacción se mantiene a reflujo durante 1 hora. A continuación se lava con una disolución de NaHCO_3 , se extrae con CH_2Cl_2 , se seca con Na_2SO_4 anhidro, la disolución se filtra, se elimina el disolvente concentrando y se purifica en columna.

5.4.12 Bromación alílica con NBS/ H_2O

1 g de material de partida se disuelve en 25 mL de CCl_4 y se añade 1.2 eq. de NBS, AIBN en cantidad catalítica y 10 mL de agua. La reacción se mantiene a reflujo durante 1 hora. A continuación se lava con una disolución de NaHCO_3 , se extrae con CH_2Cl_2 , se seca con Na_2SO_4 anhidro, la disolución se filtra, se elimina el disolvente concentrando y se purifica en columna.

5.4.13 Tratamiento con $\text{Br}_2/\text{H}_2\text{O}$

A 100 mg de ácido se le adicionan 2,5 mL de una disolución de Br_2/CCl_4 ($8.7 \cdot 10^{-2}$ M). A la mezcla se le añaden 5 mL de agua. Se deja evolucionar sin agitación a temperatura ambiente el tiempo estipulado en cada caso, tras el cual, la mezcla se lava con agua y se extrae con DCM y el extracto es procesado mediante cromatografía en columna.

5.4.14 Tratamiento con THF/ H_2O

100 mg de dieno se disuelven en 6 mL de THF y gota a gota se le agregan 4 mL de agua. Se deja evolucionar sin agitación a temperatura ambiente el tiempo estipulado en cada caso, tras el cual, la mezcla se concentra para eliminar el THF. Posteriormente se lava con agua y se extrae con DCM y el concentrado es procesado mediante cromatografía en columna.

5.4.15 Oxidación con reactivo de Jones

El producto a oxidar se disuelve en la mínima cantidad posible de acetona. A la temperatura indicada en cada caso, se va añadiendo poco a poco reactivo de Jones hasta persistencia del color anaranjado de la solución, tras lo cual se añaden unas gotas de metanol y agua. Se extrae con DCM y se lava con una solución de Na_2CO_3 . Se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a vacío. El bruto obtenido se cromatografía en columna.

5.4.16 Tratamiento con terbutóxido potásico

A 100 mg de producto a tratar se le adicionan 10 mL de una disolución de tBuOK al 10% (1 g de tBuOK en 100 mL de terbutanol). La mezcla se deja evolucionar un día con agitación magnética tras la cual se concentra al rotavapor y se purifica en columna.

5.4.17 Reacción de saponificación

A 0.1 mmol del producto a saponificar disueltos en 5 mL de MeOH se añaden 5 mL de KOH (20%) hidrometanólica (al 70%) y se mantiene a reflujo durante 30 min, transcurridos los cuales se enfría la reacción y se adiciona HCl diluido con el fin de neutralizar el medio básico de la reacción. A continuación se extrae con DCM, se seca con Na₂SO₄ anhidro y se concentra a vacío. Por último se purifica en columna.

5.5 AISLAMIENTO DE LOS ÁCIDOS OLEANÓLICO Y MASLÍNICO

Los ácidos oleanólico (**1**) y maslínico (**2**) se aíslan de los desechos de molturación de la aceituna según el procedimiento que ha sido desarrollado por el Grupo de investigación de Biotransformaciones y Química Productos Naturales, encontrándose perfectamente detallado en sendas patentes nacional (P96061652) e internacional (W098/04331) titularizada por la Universidad de Granada. El alpeorajo industrial se introduce en cartuchos de papel de filtro y es extraído en un Soxhlet con hexano. Cuando se considera agotada la extracción con este disolvente, se hace una nueva extracción con acetato de etilo. Estos extractos se concentran hasta evaporación del disolvente, obteniéndose un residuo (120 g) con el que se prepara una papilla con gel de sílice (50 g) que se coloca en cabeza de una columna de cromatografía y se procede a su separación cromatográfica con mezclas de diclorometano/acetona de polaridad creciente (40/1 hasta 2/1 en fracciones de 300 ml) recogiendo fracciones de 100 mL. El control de la separación cromatográfica se realiza mediante cromatografía en capa fina agrupando aquellas fracciones que presentan una composición similar, que se concentran y posteriormente se lleva a cabo la identificación de los productos de las mismas mediante el estudio de sus propiedades espectroscópicas. En la tabla 5.1 se indica el fraccionamiento obtenido. De forma que por cada 170 g de la mezcla (extracto + gel de sílice) se obtiene un 68.7% de ambos ácidos, 23.67 g de ácido oleanólico (19.7%) y 80.04 g de ácido maslínico (66.7%).

Ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico (ácido oleanólico, **1**). Sólido blanco, p.f. 306-308 °C. $[\alpha]_D^{25} = +80$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 3438, 2930, 2869 y 1690 cm⁻¹. ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 5.25 (1H, dd, J₁= J₂= 3.6 Hz, H-12), 3.16 (1H, dd, J₁= 11.2 Hz, J₂= 4.8 Hz, H-3), 2.84 (1H, dd, J₁= 13.6 Hz, J₂= 3.7 Hz, H-18), 1.99 (1H, ddd, J₁= J₂= 13.4 Hz, J₃= 3.6 Hz, H-16), 1.15 (3H, s, 3H-27), 0.97 (3H, s, 3H-23), 0.93 (6H, s, 3H-25 y 3H-30), 0.90 (3H, s, 3H-29), 0.80 (3H, s, 3H-26); 0.77 (3H, s, 3H-24) y 0.74 (1H, d, J=11.5 Hz, H-5). ¹³C RMN (125 MHz, CD₃OD): ver tabla 1. HSQC y HMBC: ver tabla 1. EMAR, (m/z): [M+Na]⁺ 479.3504 (C₃₀H₄₈O₃Na, calc. 479.3501).

Ácido 2 α ,3 β -dihroxiolean12-en-28-oico (ácido maslínico, **2**). Sólido blanco, p.f. 267-269°C. $[\alpha]_D^{25} = +54$ (c 1, CHCl₃:MeOH, 2:1). IR (KBr) ν_{max} : 3386, 2936, 2867 y 1690 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 5.26 (1H, dd, J₁= J₂= 3.5 Hz, H-12), 3.62 (1H, ddd, J₁= 11.3 Hz, J₂= 9.6 Hz, J₃= 4.5 Hz, H-2), 2.91 (1H, d, J= 9.6 Hz, H-3), 2.86 (1H, dd, J₁= 14.1 Hz, J₂= 3.9 Hz, H-18), 2.02 (1H, ddd, J₁= J₂= 13.3 Hz, J₃= 3.9 Hz, H-16), 1.70 (1H, dd, J₁= J₂= 14.0 Hz, H-9) 1.17 (3H, s, 3H-27), 1.02 (3H, s, 3H-23), 1.01 (3H, s, 3H-25), 0.95 (3H, s, 3H-30), 0.91 (3H, s, 3H-29), 0.82 (3H, s, 3H-26) y 0.81 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): ver tabla 1. HSQC y HMBC: ver tabla 1. EMAR, (m/z): [M+Na]⁺ 495.3458 (C₃₀H₄₈O₄Na, calc. 495.3450).

5.5.1 Formación de las sales sódicas de los ácidos oleanólico y maslínico

El ácido oleanólico (**1**, 3 g, 6.5 mmol) se adiciona en pequeñas fracciones a una disolución acuosa de NaOH en caliente (0.26 g en 20 mL de agua). La reacción se mantiene con agitación durante 24 h. El precipitado obtenido se filtra y se lava con una disolución de NaOH 4% (1 g NaOH en 25 mL de agua), obteniéndose 2.7 g de oleanoato sódico (**3**, 86%). El tratamiento del ácido maslínico (**2**, 3.61 g) con una disolución de NaOH (0.35 g en 20 mL de agua) en las mismas condiciones que las utilizadas para el ácido oleanólico **1** origina 3.2 g de maslinato sódico (**4**, 85%).

3 β -Hidroxiolean-12-en-28-oato sódico (Oleanolato sódico, **3**). Sólido blanco. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 5.21 (1H, dd, J₁= J₂= 3.6 Hz, H-12), 3.14 (1H, dd, J₁= 11.2 Hz, J₂= 4.8 Hz, H-3), 2.91 (1H, dd, J₁= 13.6 Hz, J₂= 3.7 Hz, H-18), 1.14, 0.97 (3H cada uno, s), 0.95 (6H, s), 0.94, 0.88, 0.87 y 0.77 (3H cada uno, s).

2 α ,3 β -Dihidroxiolean-12-en-28-oato sódico (Malisnato sódico, **4**). Sólido blanco. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 5.22 (1H, dd, J₁= J₂= 3.6 Hz, H-12), 3.62 (1H, ddd, J₁= 11.3 Hz, J₂= 9.6 Hz, J₃= 4.5 Hz, H-2), 2.90 (1H, d, J= 9.6 Hz, H-3), 1.15, 1.01 (3H cada uno, s), 1.00 (6H, s), 0.95, 0.88, 0.87 y, 0.81 (3H cada uno s).

5.5.2 Acetilación de ácido oleanólico

El ácido oleanólico (**1**, 2g, 4.4 mmol) se disuelve en 20 mL de piridina y 10 mL de Ac₂O, la mezcla se refluje durante una hora. Siguiendo el procedimiento general antes descrito y tras cromatografía en columna sobre silica gel se obtienen 2.15 g (98%) de ácido 3 β -acetoxiolean-12-en-28-oico (**5**): Sólido blanco, p.f. 260-262 °C. [α]_D= +74 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{\max} : 2940, 2857, 1735 y 1694 cm⁻¹. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.27 (1H, dd, J₁= J₂= 3.4 Hz, H-12), 4.49 (1H, dd, J₁= 8.2 Hz, J₂= 7.7 Hz, H-3), 2.81 (1H, dd, J₁= 14.0 Hz, J₂= 4.5 Hz, H-18), 2.04 (3H, s, COCH₃), 1.12 (3H, s, Me), 0.94 (3H, s, Me), 0.92 (3H, s, Me), 0.90 (3H, s, Me), 0.88 (3H, s, Me), 0.85 (3H, s, Me) y 0.74 (3H, s, Me). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): ver tabla 1. HSQC y HMBC: ver tabla 1. ESI-EMAR, (m/z): [M+1]⁺ 499,3788 (C₃₂H₅₁O₄, calc. 499,3787 ppm 0.2).

5.5.3 Acetilación de ácido maslínico

Se disuelven 2 g de ácido maslínico (**2**, 4.2 mmol) en 20 mL de piridina y se le añaden 10 mL de Ac₂O. La reacción se mantiene a reflujo durante 1 hora y se sigue el procedimiento general antes descrito. A continuación se purifica en columna el bruto resultante obteniendo 2.24 gr (96%) del ácido 2 α ,3 β -diacetoxiolean-12-en-28-oico (**6**): Sólido blanco, p.f. 220-222 °C. [α]_D= +26 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{\max} : 2945, 1741 y 1695 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.25 (1H, dd, J₁= J₂= 3.4 Hz, H-12), 5.09 (1H, ddd, J₁= 11.2 Hz, J₂= 10.3 Hz, J₃= 4.8 Hz, H-2), 4.74 (1H, d, J= 10.3 Hz, H-3), 2.81 (1H, dd, J₁= 13.8 Hz, J₂= 4.3 Hz, H-18), 2.04 y 1.97 (3H cada uno, s grupos AcO), 1.11 (3H, s, 3H-27), 1.04 (3H, s, 3H-25), 0.92 (3H, s, 3H-30), 0.90 (3H, s, 3H-29), 0.89 (6H, s, 3H-23 y

3H-24) y 0.73 (3H, s, 3H-26). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): ver tabla 1. HSQC y HMBC: ver tabla 1. EMAR, (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 579.3649 ($\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_6\text{Na}$, calc. 579.3661).

5.6. PREPARACIÓN DE SUSTRATOS

5.6.1 Esterificación de ácido oleanólico

Se disuelven 7.1 g (15.6 mmol) de ácido oleanólico (**1**) en 25 mL de THF y a continuación se añaden 14.2 mL de NaOH 5N (2.84 g NaOH en 14.2 mL H_2O). La reacción se mantiene a reflujo durante 3 h, tras las cuales se agregan 2.84 mL de CH_3I . Transcurridas 2 horas más se procesa la reacción siguiendo el método descrito y el bruto obtenido se cromatografía en columna, obteniéndose 6.5 g de 3β -hidroxiolean-12-en-28-oato de metilo (oleanolato de metilo, **7**, 90%): Sólido blanco, p.f. 203-205 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = +70$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3351, 2945, 2865 y 1727 cm^{-1} . ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 5.27 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 3.61$ Hz, H-12), 3.61 (3H, s, COOMe), 3.20 (1H, dd, $J_1 = 10.1$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-3), 2.84 (1H, dd, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz, H-18), 1.12 (3H, s, 3H-27), 0.97 (3H, s, 3H-23), 0.91 (3H, s, 3H-30), 0.89 (3H, s, 3H-25), 0.88 (3H, s, 3H-29), 0.76 (3H, s, 3H-24) y 0.70 (3H, s, 3H-26). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): ver tabla 1. HSQC y HMBC: ver tabla 2. EMAR, (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 493.3660 ($\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3\text{Na}$, calc. 493.3658).

5.6.2 Esterificación de ácido maslínico

Se disuelve 12.3 g (26 mmol) de ácido maslínico (**2**) en 25 mL de THF, se añaden 24.6 mL de NaOH 5N (4.92 g NaOH en 24.6 mL H_2O) y se mantiene a reflujo durante 3 horas, tras las cuales se agrega 4.92 mL de CH_3I . Transcurridas 2 horas más se procesa la reacción siguiendo el método descrito y se cromatografía en columna el bruto de reacción obteniéndose 11.4 g de $2\alpha,3\beta$ -dihroxiolean-12-en-28-oato de metilo (maslinato de metilo, **8**, 90%) y 467 mg de 3β -hidroxi- 2α -metoxiolean-12-en-28-oato de metilo (**9**, 3.6 %).

$2\alpha,3\beta$ -Dihroxiolean-12-en-28-oato de metilo (maslinato de metilo, **8**). Sólido blanco, p.f. 231-233 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = +60$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3389, 2946, 2867 y 1726 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5.27 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 3.67 (1H, ddd, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 9.5$ Hz, $J_3 = 4.5$ Hz, H-2), 3.61 (3H, s, COOCH_3), 2.98 (1H, d, $J_1 = 9.5$ Hz, H-3), 2.85 (1H, dd, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz, H-18), 1.12 (3H, s, 3H-27), 1.01 (3H, s, 3H-23), 0.96 (3H, s, 3H-25), 0.92 (3H, s, 3H-30), 0.89 (3H, s, 3H-29), 0.81 (3H, s, 3H-24) y 0.71 (3H, s, 3H-26). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): ver tabla 1. HSQC y HMBC: ver tabla 2. EMAR, (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 509.3607 ($\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_4\text{Na}$, calc. 509.3607).

3β -Hidroxi- 2α -metoxiolean-12-en-28-oato de metilo (**9**). Sólido blanco, p.f. 74-76 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = +14$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2945, 2863, 1724, 1387, 755 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5.28 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 3.62 (3H, s, COOCH_3), 3.37 (3H, s, OCH_3), 3.23 (1H, ddd, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 9.5$ Hz, $J_3 = 4.5$ Hz, H-2), 3.04 (1H, d, $J_1 = 9.5$ Hz, H-3), 2.86 (1H, dd, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz, H-18), 1.12 (3H, s, 3H-27), 1.04 (3H, s, 3H-23), 0.96 (3H, s, 3H-25), 0.92 (3H, s, 3H-30), 0.89 (3H, s, 3H-29), 0.82 (3H, s, 3H-24) y 0.71 (3H, s, 3H-26). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): ver tabla

1. HSQC y HMBC: ver tabla 2. ESI-EMAR, m/z : $[M+1]^+$ 501.3941 ($C_{32}H_{53}O_4$, calc. 501.3944, ppm - 0.6).

5.6.3 Bromación alílica con NBS del oleanolato de metilo (7)

Se disuelve 1 g (2.12 mmol) de oleanolato de metilo (7) en 25 mL de CCl_4 y se añaden 378 mg (2.12 mmol) de NBS y trazas de AIBN, manteniendo la reacción a reflujo durante una hora. Una vez transcurrido ese tiempo se sigue el procedimiento general descrito y se separan los productos mediante cromatografía en columna, obteniéndose 785 mg de 3 β -hidroxioleana-9,12-dien-28-oato de metilo (10, 78.5%): Sólido blanco, p.f. 133-135 °C. $[\alpha]_D = +258$ (c 1, $CHCl_3$). IR (KBr) ν_{max} : 3457, 2947, 1723 cm^{-1} . 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 5.58 (1H, d, $J = 5.9$ Hz, H-11), 5.55 (1H, d, $J = 5.9$ Hz, H-12), 3.64 (3H, s, $COOCH_3$), 3.22 (1H, dd, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, H-3), 3.01 (1H, dd, $J_1 = 13.2$ Hz, $J_2 = 3.7$ Hz, H-18), 1.16 (3H, s, 3H-25), 1.01 (3H, s, 3H-23), 1.01 (3H, s, 3H-27), 0.94 (3H, s, 3H-30), 0.93 (3H, s, 3H-26), 0.89 (3H, s, 3H-29), 0.79 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$): ver tabla 1. HSQC y HMBC: ver tabla 3. EMAR, m/z : $[M+Na]^+$ 491.3500 ($C_{31}H_{48}O_3Na$, calc. 491.3501).

5.6.4 Bromación de ácido oleanólico

Se disuelven 500 mg (1.10 mmol) de ácido oleanólico (1) en 5 mL de tetracloruro de carbono y se le añaden 15 mL de una disolución de bromo disuelto en tetracloruro de carbono ($8.7 \cdot 10^{-2}$ M). La mezcla se mantiene durante 30 minutos a temperatura ambiente, realizando pruebas de cromatografía en capa fina para seguir su evolución. Transcurrido ese tiempo se evapora el disolvente y se purifica en columna, obteniéndose 470 mg de 12 α -bromo-3 β -hidroxiolean-28,13 β -olida (11, 80%): Sólido blanco, p.f. 217-219 °C. $[\alpha]_D = 171$ (c 1, $CHCl_3$). IR (KBr) ν_{max} : 2938, 2869, 1767, 1359, 754 cm^{-1} . 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 4.28 (1H, dd, $J_1 = 3.7$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz, H-12), 3.23 (1H, dd, $J_1 = 11.2$, $J_2 = 4.7$ Hz, H-3), 1.42 (3H, s, 3H-27), 1.20 (3H, s, 3H-26), 0.98 (6H, s, 3H-23 y 3H-29), 0.88 (3H, s, 3H-30), 0.87 (3H, s, 3H-25) y 0.76 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN ($CDCl_3$): ver tabla 2. HSQC y HMBC: ver tabla 3. ESI-EMAR, (m/z): $[M+1]^+$ 535.2783 ($C_{30}H_{48}BrO_3$, calc. 535.2787, ppm = -0.7).

Se disuelven 500 mg (1.10 mmol) de ácido oleanólico (1) en 5 mL de tetracloruro de carbono y se le añaden 15 mL de una disolución de Br_2 disuelto en tetracloruro de carbono ($8.7 \cdot 10^{-2}$ M). La mezcla se mantiene durante 12 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se evapora el disolvente y se purifica en columna, obteniéndose además 275 mg del compuesto 11 (47%), 117 mg de 2 α ,12 α -dibromo-3-oxoolean-28,13 β -olida (12, 19.9%), 23 mg de 12 α ,15-dibromo-3 β -hidroxiolean-28,13 β -olida (13, 5.4%), 30 mg de ácido 12 α -bromo-3 β -hidroxitaraxer-14-en-28-oico (14, 5.1%) y 76 mg de 12 β -bromo-3 β -hidroxitaraxer-28,14 β -olida (15, 13%).

2 α ,12 α -Dibromo-3-oxoolean-28,13 β -olida (12). Sólido blanco, p.f. 191-193 °C. $[\alpha]_D = +20$ (c 1, $CHCl_3$). IR (KBr) ν_{max} : 3363, 2947, 2360, 2341, 1771, 1386 y 753 cm^{-1} . 1H RMN (500 MHz,

CDCl₃): δ 5.14 (1H, dd, J₁= 11.2 Hz, J₂= 9.5 Hz, H-2), 4.27 (1H, dd, J₁= 3.7 Hz, J₂= 2.4 Hz, H-12), 2.57 (1H, dd, J₁= 13.3 Hz, J₂= 11.2 Hz) y 2.03 (1H, dd, J₁= 13.3 Hz, J₂= 9.5 Hz, 2H-1), 2.38 (1H, ddd, J₁= 15.0 Hz, J₂= 12.5 Hz, J₃= 3.7 Hz) y 1.69 (1H, ddd, J₁= 15.0 Hz, J₂= J₃= 2.4 Hz) (2H-11), 2.31 (1H, dd, J₁= 10.1 Hz, J₂= 1.1 Hz, H-19), 2.15 (1H, ddd, J₁= J₂= 13.5 Hz, J₃= 5.9 Hz, H-16), 1.83 (1H, dd, J₁= 7.0 Hz, J₂= 8.2 Hz, H-5), 1.46 (3H, s, 3H-27), 1.18 (3H, s, 3H-26), 1.13 (3H, s, 3H-23), 1.12 (3H, s, 3H-24), 0.99 (3H, s, 3H-29), 0.89 (3H, s, 3H-30) y 0.84 (3H, s, 3H-25). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): ver tabla 2. HSQC y HMBC: ver tabla 3. ESI-EMAR, (*m/z*): [M+1]⁺ 611,1725 (C₃₀H₄₅ Br₂O₃ calc. 611,1735, ppm= -1.6).

12α,15β-dibromo-3β-hidroxiolean-28,13β-olida (**13**). Sirupo. [α]_D= +12 (c 1, CHCl₃). IR (NaCl) ν_{max}: 3471, 2946, 2360, 1385, 1215 y 756 cm⁻¹. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 4.59 (1H, dd, J₁= 12.54 Hz, J₂= 6.60 Hz, H-15), 4.30 (1 H, dd, J₁= 3.7 Hz, J₂= 2.4 Hz, H-12), 3.25 (H, dd, J₁= 11.36 Hz, J₂= 4.3 Hz, H-3), 2.57 (1H, dd, J₁= J₂= 12.54 Hz, H-16), 1.60 (1H, s, H-27), 1.31 (3H, s, 3H-26), 1.02 (3H, s, 3H-29), 1.00 (3H, s, 3H-23), 0.90 (3H, s, 3H-30), 0.89 (3H, s, 3H-25) y 0.77 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): ver tabla 2. HSQC y HMBC: ver tabla 3. ESI-EMAR, (*m/z*): [M+1]⁺ 613.1895 (C₃₀H₄₃O₄ calc. 613.1892, ppm= 0.5).

Ácido 12α-Bromo-3β-hidroxitaxer-14-eno (**14**). Sólido blanco, p.f. 246-248 °C. [α]_D= -18 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max}: 3448, 2943, 1710, 1231 y 771 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.79 (1H, dd, J₁= 7.1 Hz, J₂= 1.8 Hz, H-15), 4.48 (1H, dd, J₁= 9.1 Hz, J₂= 3.6 Hz, H-12), 3.21 (1H, dd, J₁= 11.0 Hz, J₂= 4.9 Hz, H-3), 2.69 (1H, dd, J₁= 18.3 Hz, J₂= 1.8 Hz, H-16), 2.26 (1H, dd, J₁= 14.1 Hz, J₂= 3.4 Hz, H-9), 2.14 (1H, ddd, J₁= 14.9 Hz, J₂= 9.1 Hz, J₃= 3.4 Hz, H-11), 1.93 (1H, ddd, J₁= 18.3 Hz, J₂= 7.1 Hz, J₃= 1.1 Hz, H-16), 1.39 (3H, s, 3H-27), 1.14 (3H, s, 3H-26), 0.95 (6H, s, 3H-23 y 3H-29), 0.90 (3H, s, 3H-30), 0.87 (3H, s, 3H-25) y 0.77 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): ver tabla 2. HSQC y HMBC: ver tabla 4. ESI-EMAR, (*m/z*): [M+1]⁺ 535.2781 (C₃₀H₄₈BrO₃, calc. 535.2787, ppm -1.1).

12α-bromo-3β-hidroxitaxer-28,14β-olida (**15**). Sólido blanco, p.f. 196-198 °C. [α]_D= +53 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max}: 3219, 2939, 1764, 1378, 1296 y 755 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 4.40 (1H, dd, J₁= J₂= 7.3 Hz, H-12), 3.19 (1H, dd, J₁= 10.9 Hz, J₂= 5.0 Hz, H-3), 1.87 (1H, dd, J₁= 12.1 Hz, J₂= 5.7 Hz, H-9), 1.32 (3H, s, 3H-27), 1.16 (3H, s, 3H-26), 0.95 (6H, s, 3H-23 y 3H-29), 0.92 (3H, s, 3H-25), 0.88 (3H, s, 3H-30) y 0.77 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): ver tabla 2. HSQC y HMBC: ver tabla 4. ESI-EMAR, (*m/z*): [M+1]⁺ 535,2783 (C₃₀H₄₈BrO₃ calc. 535,2787 ppm -0.7).

5.6.5 Tratamiento de ácido oleanólico con NBS

Se disuelven 1 g (2.2 mmol) de ácido oleanólico (**1**) en 25 mL de tetracloruro de carbono y se añaden 420 mg (2.36 mmol) de NBS y trazas de AIBN, manteniéndose la reacción a reflujo durante 1 hora, a continuación se sigue el procedimiento general descrito y se separan los productos mediante columna cromatográfica. De esta forma se obtienen 405 mg de 12α-bromo-3β-hidroxiolean-28,13β-olida (**11**, 34.5%), 410 mg de ácido 3β-hidroxiolean-9,12-dien-28-oico (**16**,

41%) y 24 mg de 3 β -hidroxi-12-oxoolean-9,11-en-28,13 β olida (**17**, 2.3%). Cuando 1 g de ácido oleanólico (**1**) se disuelve en 25 mL de CCl₄ previamente secado y a continuación se añaden 420 mg de NBS y trazas de AIBN y se calienta a reflujo durante 1 h, se obtienen 104 mg del bromoderivado (**11**, 8.6%) y 870 mg de dieno (**16**, 87.9%).

Ácido 3 β -hidroxiolean-9,12-dien-28-oico (**16**). Sólido blanco, p.f. 231-233 °C. [α]_D= +96 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{\max} : 3413, 2943, 2360, 1373, 1269 y 756 cm⁻¹. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 5.57 (1H, d, J= 5.83 Hz, H-11), 5.55 (1H, d, J= 5.83 Hz, H-12), 3.22 (1H, dd, J₁= 11.6 Hz, J₂= 4.5 Hz, H-3), 2.96 (1H, dd, J₁= 13.5 Hz, J₂= 4.1 Hz, H-18), 1.15 (3H, s, 3H-25), 1.01 (3H, s, 3H-27), 1.00 (3H, s, 3H-23), 0.96 (3H, s, 3H-26), 0.93 (3H, s, 3H-30), 0.89 (3H, s, 3H-29) y 0.79 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (CDCl₃): ver tabla 2. HSQC y HMBC: ver tabla 4. ESI-EMAR, (m/z): [M+1]⁺ 455,3532 (C₃₀H₄₇O₃, calc. 455.3525, ppm 1.5).

3 β -hidroxi-12-oxoolean-9(11)-en-28,13 β -olida (**17**). Sirupo. [α]_D= 37 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{\max} : 3503, 2361, 1774, 1387, 1366, 1243 y 771 cm⁻¹. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 5.99 (1H, s, H-11), 3.20 (1H, dd, J₁= 11.7 Hz, J₂= 4.5 Hz, H-3), 2.95 (1H, dd, J₁= 13.5 Hz, J₂= 2.5 Hz, H-18), 1.45 (3H, s, 3H-26), 1.25 (3H, s, 3H-25), 1.04 (3H, s, 3H-23), 0.99 (3H, s, 3H-27), 0.96 (3H, s, 3H-30), 0.96 (3H, s, 3H-29) y 0.84 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (CDCl₃): ver tabla 2. HSQC y HMBC: ver tabla 4. ESI-EMAR, (m/z): [M+1]⁺ 469,3237 (C₃₀H₄₅O₄, calc. 469,3241, ppm 1.3).

5.6.6 Tratamiento de ácido oleanólico con NBS/H₂O

Se disuelven 1 g (2.2 mmol) de ácido oleanólico (**1**) en 25 mL de CCl₄ y se añaden 10 mL de H₂O y 420 mg (2.4 mmol) de NBS y trazas de AIBN, manteniéndose la reacción con fuerte agitación a reflujo durante 1 hora. La separación cromatográfica de la mezcla de productos obtenidos origina 12 α -bromo-3 β -hidroxiolean-28,13 β -olida (**11**, 660 mg, 54.5%) y una mezcla (203 mg, 19.5%) de 3 β ,12 α -dihidroxiolean-9(11)-en-28,13 β -olida (**18a**) + 3 β ,12 β -dihidroxiolean-9(11)-en-28,13 β -olida (**18b**) de difícil separación por cromatografía en columna.

5.6.7 Tratamiento del dieno **16** con NBS/H₂O

Se disuelven 618 mg (1.36 mmol) de ácido 3 β -hidroxiolean-9,12-dien-28-oico (**16**) en 25 mL de CCl₄ y se añaden 10 mL de H₂O y 268 mg (1.50 mmol) de NBS y trazas de AIBN, manteniéndose la reacción con fuerte agitación a reflujo durante 1 hora. La separación cromatográfica de la mezcla de productos obtenidos origina 467 mg de la mezcla dihidroxiderivados (**18a,18b**, 73,4%).

5.6.7.1 Acetilación de la mezcla de alcoholes alílicos **18a** y **18b**

La acetilación de 80 mg (0.17 mmol) de la mezcla de alcoholes **18a + 18b** con Ac₂O/piridina (2:4 mL) durante 24 h a temperatura ambiente origina una mezcla de 3 β ,12 α -diacetoxiolean-9(11)-en-28,13 β -olida (**19a**) + 3 β ,12 β -diacetoxiolean-9(11)-en-28,13 β -olida (**19b**) (**23**, 60mg, 63.7%) de difícil separación cromatográfica: Sólido blanco. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃):

δ 5.67 y 5.57 (1H, d, J = 3.61 Hz, H-11 y 1H, d, J = 2.56 Hz, H-11), 5.18 y 5.16 (1H, d, J = 3.62 Hz, H-12 y 1H, d, J = 2.58 Hz, H-12), 4.47 y 4.75 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 4.71$ Hz, H-3 y 1H, dd, $J_1 = J_2 = 4.75$ Hz, H-3), 2.11 y 2.10 (6H, s, grupo AcO), 2.05 y 2.04 (6H, s, grupo AcO), 1.40, 1.22, 1.21, 1.18, 1.04, 0.96, 0.90, 0.89, 0.87 y 0.81 (grupos metilo).

5.6.7.2 Oxidación de la mezcla de alcoholes alílicos **18a** y **18b**

30 mg (0.05 mmol) de la mezcla de $3\beta,12$ -dihidroxi-olean-9(11)-en-28, 13β -olida (**18a** + **18b**) se disuelven en 2 mL de acetona y se mantienen en baño de hielo y con agitación magnética. Se adiciona el reactivo de Jones poco a poco hasta persistencia del color anaranjado. Después de 30 minutos de reacción se añaden unas gotas de metanol y agua y se lava con una disolución de NaHCO_3 y posteriormente con agua. Se extrae con CH_2Cl_2 , se seca con MgSO_4 anhidro y se evapora a vacío aislándose tras la purificación cromatográfica 20 mg de $3,12$ -dioxiolean-9(11)-en-28, 13β -olida (**20**, 85.6%): Sólido blanco, p.f. 220-222 °C. $[\alpha]_D^{25} = +53$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3081, 2360, 1777, 1387, 1295 y 755 cm^{-1} . ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 6.03 (1H, s, H-11), 2.97 (1H, dd, $J_1 = 13.5$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, H-18), 2.68 (1H, ddd, $J_1 = 14.1$ Hz, $J_2 = 8.9$ Hz, $J_3 = 6.9$ Hz, H-2), 2.51 (1H, ddd, $J_1 = 6.9$ Hz, $J_2 = 3.8$ Hz, H-2), 2.24 (1H, ddd, $J_1 = 10.2$ Hz, $J_2 = 6.9$ Hz, $J_3 = 3.8$ Hz, H-1), 2.09 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 13.2$ Hz, $J_3 = 5.98$ Hz, H-16), 1.50 (3H, s, 3H-26), 1.38 (3H, s, 3H-25), 1.14 (3H, s, 3H-23), 1.11 (3H, s, 3H-24), 1.01 (3H, s, 3H-27), 0.96 (6H, s, 3H-29 y 3H-30). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 3. HSQC y HMBC: ver tabla 5. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 467.3161 ($\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{O}_4$, calc. 467.3161, ppm 0).

5.6.8 Tratamiento del 12α -bromoderivado **11** con MeONa

El bromoderivado **11** (300 mg, 0.56 mmol) se disuelve en 25 mL de una disolución de Na en MeOH al 2%, manteniendo la mezcla con agitación durante 12 h. Una vez pasado ese tiempo se lleva a cabo la extracción del producto con embudo de decantación, añadiendo 200 mL de agua y se extrae cinco veces con 50 mL de diclorometano. La disolución orgánica se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se evapora el disolvente en el rotavapor. Después de purificar mediante cromatografía en columna se obtienen 250 mg de 3β -hidroxi- $12\beta,13\beta$ -epoxiolean-28-oato de metilo (**21**, 91.8%) y 17 mg de $3\beta,12\beta$ -dihidroxitax-14-en-28-oato de metilo (**22**, 6.2%).

3β -Hidroxi- $12\beta,13\beta$ -epoxiolean-28-oato de metilo (**21**). Sólido blanco, p.f. 204-206°C. $[\alpha]_D^{25} = +89$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3442, 2947, 1721, 1388, 1248, 873 y 755 cm^{-1} . ^1H RMN (400 MHz) (CDCl_3): δ 3.68 (3H, s, OMe), 3.15 (1H, dd, $J_1 = 9.5$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-3), 2.75 (1H, d, J = 4.2 Hz, H-12), 2.22 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 13.0$ Hz, $J_3 = 4.7$ Hz, H-15), 1.15 (3H, s, 3H-27), 0.95 (3H, s, 3H-26), 0.94 (3H, s, 3H-23), 0.91 (3H, s, 3H-29), 0.87 (3H, s, 3H-30), 0.82 (3H, s, 3H-25) y 0.74 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): ver tabla 3. HSQC y HMBC: ver tabla 5. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 487.3795 ($\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{O}_4$, calc. 487.3787 ppm 1.6).

$3\beta,12\beta$ -Dihidroxitax-14-en-28-oato de metilo (**22**). Sólido blanco, p.f. 104-106°C. $[\alpha]_D^{25} = -17$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3435, 2948, 1703, 1647, 1215, 759 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz) (CDCl_3):

δ 5.66 (1H, dd, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, H-15), 3.70 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-12), 3.60 (3H, s, MeO), 3.17 (1H, dd, $J_1 = 10.4$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, H-3), 2.79 (1H, dd, $J_1 = 10.8$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, H-18), 2.22 (1H, m, H-22), 1.88 (1H, m, H-11), 1.13 (3H, s, 3H-26), 0.96 (6H, s, 3H-23 y 3H-27), 0.95 (3H, s, 3H-29), 0.93 (6H, s, 3H-25 y 3H-30) y 0.78 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): ver tabla 3. HSQC y HMBC: ver tabla 5. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 489.3580 ($\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_5$, calc. 489.3580, ppm 0.4).

5.6.9 Tratamiento del dieno **16** con Br_2

Se disuelven 250 mg (0.55 mmol) de ácido 3 β -hidroxiolean-9,12-dien-28-oico (**16**) en 3 mL de tetracloruro de carbono y se le añadió 6 mL de una disolución de bromo disuelto en tetracloruro de carbono ($8.7 \cdot 10^{-2}$ M). La mezcla se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se evapora el disolvente obteniéndose un bruto formado por el ácido 12 α -bromo-3 β -hidroxiolean-9,11-en-28,13 β -olida (**23**). Después de la purificación cromatográfica de 150 mg del bruto anterior se obtienen 90 mg de 3 β ,12 α -dihioxiolean-9,11-en-28,14 β -olida (**24**, 68%).

12 α -Bromo-3 β -hidroxiolean-9,11-en-28,13 β -olida (**23**). Sirupo. $[\alpha]_D = +23$ (c 1, CHCl_3). IR (NaCl) ν_{max} : 2937, 2869, 1766, 1715, 1358 y 754 cm^{-1} . ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 5.65 (1H, s, H-11), 4.86 (1H, s, H-12), 3.24 (1H, dd, $J_1 = 11.37$ $J_2 = 4.4$ Hz, H-3), 2.29 (1H, m, H-16), 1.30 (1H, s, H-26), 1.16 (3H, s, 3H-25), 1.11 (3H, s, 3H-27), 0.98 (3H, s, 3H-29), 0.97 (3H, s, 3H-23), 0.92 (3H, s, 3H-30), y 0.82 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 3. HSQC y HMBC: ver tabla 5.

3 β ,12 α -Dihioxiotarax-9(11)-en-28,14 β -olida (**24**). Sólido blanco, p.f. 239-241 $^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D = -5$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3490, 2944, 2359, 1717 y 754 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5.80 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-11), 3.46 (1H, d, $J_1 = 7.0$ Hz, H-12), 3.19 (1H, dd, $J_1 = 10.8$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-3), 2.66 (1H, dd, $J_1 = 13.4$ Hz, $J_2 = 3.7$ Hz, H-18), 2.33 (1H, ddd, $J_1 = 13.7$ Hz, $J_2 = 10.0$ Hz, $J_3 = 6.0$ Hz, H-16), 2.05 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 13.4$ Hz, $J_3 = 6.4$ Hz, H-22), 1.33 (3H, s, 3H-26), 1.19 (3H, s, 3H-25), 0.98 (3H, s, 3H-29), 0.96 (3H, s, 3H-23), 0.94 (3H, s, 3H-30), 0.93 (3H, s, 3H-27) y 0.83 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 3. HSQC y HMBC: ver tabla 6. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 471.3474 ($\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_4$, calc. 471.3474, ppm -1.7).

El tratamiento de 100 mg (0.19 mmol) del bruto **23** con una mezcla de $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$ (4 mL:6 mL) durante 1 hora a reflujo y tras evaporación del disolvente a vacío, da lugar a la formación de 55 mg del dihidroxiderivado **24** (62%).

5.6.9.1 Acetilación del dihidroxiderivado **24**

20 mg (0.042 mmol) del dihidroxiderivado **24** se disuelven en 1 mL de piridina y se añaden 0.5 mL de Ac_2O . La reacción se mantiene durante 24 h a temperatura ambiente. Después de la purificación cromatográfica del bruto obtenido se aísla 15 mg de 3 β ,12 β -diacetoxitarax-9(11)-en-28,14 β -olida (**25**, 64.5%): Sirupo. $[\alpha]_D = -52$ (c 1, CHCl_3). IR (NaCl) ν_{max} : 3440, 2948, 2341, 1372, 1244, 953 y 753 cm^{-1} . ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 5.64 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, H-11), 4.88 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, H-12), 4.46 (1H, dd, $J_1 = 10.6$ Hz, $J_2 = 5.1$ Hz, H-3), 2.05 (6H, s, 3H cada AcO), 1.36 (3H, s,

3H-26), 1.22 (3H, s, 3H-25), 1.03 (3H, s, 3H-27), 0.97 (3H, s, 3H-29), 0.91 (3H, s, 3H-24), 0.84 (6H, s, 3H-23 y 3H-30). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 3. HSQC y HMBC: ver tabla 6. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 555.3670 ($\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{O}_6$, calc. 555.3686, ppm -1.6).

5.6.9.2 Oxidación de dihidroxiderivado 24

100 mg (0.21 mmol) del dihidroxiderivado **24** se disuelven en 2 mL de acetona y se mantienen en baño de hielo y con agitación magnética. Se adiciona el reactivo de Jones poco a poco hasta persistencia del color anaranjado. Después de 30 minutos de reacción se añaden unas gotas de metanol y agua y se lava con una disolución de NaHCO_3 y posteriormente con agua. Se extrae con CH_2Cl_2 , se seca con MgSO_4 anhidro y se evapora a vacío aislándose tras la purificación cromatográfica 65 mg de 3,12-dioxotarax-9(11)-en-28,14 β -olida (**26**, 66.4%): Sólido blanco, p.f. 233-235 °C. $[\alpha]_D = -54$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2947, 2360, 1747, 1677, 1385, 1237 y 753 cm^{-1} . ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 5.89 (1H, s, H-11), 3.02 (1H, dd, $J_1 = 11.7$ Hz, $J_2 = 5.7$ Hz, H-18), 2.80 (1H, ddd, $J_1 = 13.6$, $J_2 = 10.1$ Hz, $J_3 = 6.8$ Hz, H-2), 2.45 (1H, ddd, $J_1 = 13.6$, $J_2 = 6.8$ Hz, $J_3 = 2.5$ Hz, H-2), 2.34 (1H, ddd, $J_1 = 13.8$ Hz, $J_2 = 10.8$ Hz, $J_3 = 4.7$ Hz, H-16), 1.48 (3H, s, 3H-25), 1.48 (3H, s, 3H-26), 1.14 (3H, s, 3H-27), 1.12 (3H, s, 3H-24), 1.10 (3H, s, 3H-23), 1.02 (3H, s, 3H-30) y 0.96 (3H, s, 3H-29). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): ver tabla 3. HSQC y HMBC: ver tabla 6. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 467.3161 ($\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{O}_4$, calc. 467.3161 ppm 0).

5.6.10 Bromación de ácido maslínico (2)

Se disuelven 500 mg (1.06 mmol) de ácido maslínico (**2**) en 5 mL de tetracloruro de carbono y se le añaden 15 mL de una disolución de Br_2 disuelto en tetracloruro de carbono ($8.7 \cdot 10^{-2}$ M). La mezcla se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se evapora el disolvente y se purifica en columna, obteniéndose 480 mg de 12 α -Bromo-2 α ,3 β -dihidroiolean-28,13 β -olida (**27**, 82%): Sólido blanco, p.f. 265-267 °C. $[\alpha]_D = +49$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3327, 1751, 1465, 1216, 1048, 927, 754 y 674 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz) (CDCl_3): δ 4.30 (1H, dd, $J_1 = 3.9$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz, H-12), 3.73 (1H, ddd, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 9.5$ Hz, $J_3 = 4.6$ Hz, H-2), 3.04 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 2.41 (1H, ddd, $J_1 = 15.0$ Hz, $J_2 = 12.4$ Hz, $J_3 = 3.9$ Hz, H-11), 2.17 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 13.0$ Hz, $J_3 = 5.4$ Hz, H-16), 2.06 (1H, dd, $J_1 = 12.4$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, H-1), 1.45 (3H, s, 3H-27), 1.22 (3H, s, 3H-26), 1.04 (3H, s, 3H-24), 1.00 (3H, s, 3H-29), 0.96 (3H, s, 3H-25), 0.90 (3H, s, 3H-30) y 0.82 (3H, s, 3H-23). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 4. HSQC y HMBC: ver tabla 6. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 551.2743 ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{BrO}_4$, calc. 551.2736, ppm -0.4).

Cuando la reacción de bromación del ácido maslínico (**2**, 500 mg, 1.06 mmol) disuelto en 5 mL de tetracloruro de carbono y con 15 mL de una disolución de Br_2/CCl_4 ($8.7 \cdot 10^{-2}$ M) se mantiene durante 12 horas a temperatura ambiente se aíslan 338 mg de 12 α ,15 β -dibromo-2 α ,3 β -dihidroiolean-28,13 β -olida (**28**, 60%) junto con una mezcla de la que tras acetilación con Ac_2O en piridina (1mL:2 mL) a temperatura ambiente durante 12 horas se aíslan 53 mg 2 α ,3 β -diacetoxi-12 α ,15 α -dibromoolean-28,13 β -olida (**29**, 7%) y 23 mg del ácido 2 α ,3 β -diacetoxi-12 α -bromotarax-14-eno (**30**, 4%).

12 α ,15 β -Dibromo-2 α ,3 β -dihidroxiolean-28,13 β -olida (**28**). Sólido blanco, p.f. 259-261 °C. $[\alpha]_D = +40$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{\max} : 2949, 2360, 1776, 1256 y 755 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 4.58 (1H, dd, J₁= 12.1 Hz, J₂= 6.1 Hz, H-15), 4.30 (1H, dd, J₁= 3.7 Hz, J₂= 2.5 Hz, H-12), 3.71 (1H, ddd, J₁= 11.0 Hz, J₂= 9.5 Hz, J₃= 4.6 Hz, H-2), 3.04 (1H, d, J= 9.5 Hz, H-3), 2.57 (1H, dd, J₁= J₂= 16.8 Hz, H-16), 2.05 (1H, dd, J₁= 12.4 Hz, J₂= 4.6 Hz, H-1), 1.60 (3H, s, 3H-27), 1.30 (3H, s, 3H-26), 1.04 (3H, s, 3H-23), 1.02 (3H, s, 3H-29), 0.96 (3H, s, 3H-25), 0.90 (3H, s, 3H-30) y 0.81 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (CDCl₃): ver tabla 4. HSQC y HMBC: ver tabla 7. ESI-EMAR, (m/z): [M+Na]⁺ 651.1674 (C₃₀H₄₆Br₂O₄Na, 651.1661 ppm 2.0).

2 α ,3 β -diacetoxi-12 α ,15 β -dibromoolean-28,13 β -olida (**29**). Sólido blanco, p.f. 161-163 °C. $[\alpha]_D = +20$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{\max} : 2952, 2360, 1781, 1251 y 757 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.10 (1H, ddd, J₁= 11.5 Hz, J₂= 10.4 Hz, J₃= 4.7 Hz, H-2), 4.78 (1H, d, J= 10.4 Hz, H-3), 4.57 (1H, dd, J₁= 12.2 Hz, J₂= 6.2 Hz, H-15), 4.29 (1H, dd, J₁= 3.7, J₂= 2.4 Hz, H-12), 2.57 (1H, dd, J₁= 13.5 Hz, J₂= 12.2 Hz, H-16), 2.05 y 1.99 (3H cada uno, s, grupos AcO), 1.92 (1H, dd, J₁= 13.5 Hz, J₂= 6.2 Hz, H-16), 1.59 (3H, s, 3H-27), 1.30 (3H, s, 3H-26), 1.03 (3H, s, 3H-25), 1.02 (3H, s, 3H-29), 0.90 (6H, s, 3H-23 y 3H-30) y 0.89 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (CDCl₃): ver tabla 4. HSQC y HMBC: ver tabla 7. ESI-EMAR, (m/z): [M+Na]⁺ 735.1872 (C₃₄H₅₀Br₂O₆Na, calc. 735.1876, ppm= -0.9).

Ácido 2 α ,3 β -diacetoxi-12 α -bromotarax-14-eno (**30**). Sólido blanco, p.f. 117-119 °C. $[\alpha]_D = -68.4$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{\max} : 3463, 2945, 1738, 1367, 1249 y 755 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.81 (1H, dd, J₁= 7.1 Hz, J₂= 1.8 Hz, H-15), 5.16 (1H, ddd, J₁= 12.4 Hz, J₂= 9.6 Hz, J₃= 4.9 Hz, H-2), 4.75 (1H, d, J= 9.6 Hz, H-3), 4.49 (1H, dd, J₁= 9.1 Hz, J₂= 3.5 Hz, H-12), 2.70 (1H, dd, J₁= 18.3 Hz, J₂= 1.8 Hz, H-16), 2.36 (1H, dd, J₁= 14.1, J₂= 3.4 Hz, H-9), 2.19 (1H, ddd, J₁= 14.8, J₂= 9.1 Hz, J₃= 3.4 Hz, H-11), 2.08 (1H, dd, J₁= 12.4, J₂= 4.9, Hz, H-1), 1.94 (1H, ddd, J₁= 18.3 Hz, J₂= 7.1 Hz, J₃= 1.3 Hz, H-16), 2.08 y 1.99 (3H cada uno, s grupos AcO), 1.38 (3H, s, 3H-27), 1.14 (3H, s, 3H-26), 1.03 (3H, s, 3H-25), 0.96 (3H, s, 3H-29), 0.91 (6H, s, 3H-24 y 3H-30) y 0.87 (3H, s, 3H-23). ¹³C RMN (CDCl₃): ver tabla 4. HSQC y HMBC: ver tabla 7. ESI-EMAR, (m/z): (M+1) 635,3683 (C₃₄H₅₂BrO₆ 635,3686, ppm -0,5).

5.6.11 Tratamiento de la bromolactona **27** con t-BuOK

A 100 mg (0.18 mmol) de la bromolactona (**27**) se le adicionan 10 mL de una disolución de tBuOK/tBuOH al 10% (1 g de tBuOK en 100 mL de t-butanol) previamente filtrada. La mezcla se deja evolucionar un día con agitación magnética tras la cual se concentra al rotavapor y tras purificación cromatográfica se recuperan 70 mg del producto de partida **27** junto con 20 mg del ácido 12 α -bromo-2 α ,3 β -dihidroxitax-14-eno (**31**): ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.80 (1H, dd, J₁= 7.1 Hz, J₂= 1.8 Hz, H-15), 4.49 (1H, dd, J₁= 3.5 Hz, J₂= 9.1 Hz, H-12), 3.74 (1H, ddd, J₁= 4.6 Hz, J₂= 9.6 Hz, J₃= 12.7 Hz, H-2), 3.02 (1H, d, J= 9.6 Hz, H-3), 2.70 (1H, dd, J₁= 18.3 Hz, J₂= 1.6 Hz, H-16), 2.35 (1H, dd, J₁= 14.1 Hz, J₂= 3.4 Hz, H-9), 2.19 (1H, ddd, J₁= 14.8 Hz, J₂= 9.2 Hz, J₃= 3.5 Hz, H-11), 2.07 (1H, dd, J₁= 12.4 Hz, J₂= 4.8 Hz, H-1), 1.95 (1H, ddd, J₁= 18.3 Hz, J₂= 7.1 Hz, J₃=

1.3 Hz, H-16), 1.39 (3H, s, 3H-27), 1.14 (3H, s, 3H-26), 1.01 (3H, s, 3H-23), 0.96 (3H, s, 3H-29), 0.95 (3H, s, 3H-25), 0.91 (3H, s, 3H-30) y 0.82 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 4. HSQC y HMBC: ver tabla 7. La acetilación del producto **31** (20 mg) con Ac_2O en piridina (0.5 mL:1 mL) y posterior purificación cromatográfica de lugar a 16 mg del diacetoxiderivado **30** (70%).

5.6.12 Tratamiento de la 12 α -bromolactona **27** con metóxido sódico

La bromolactona **27** (300 mg, 0.54 mmol) se disuelve en 25 mL de una disolución de NaOMe/MeOH al 2%, manteniendo la mezcla con agitación durante 12 h. Una vez pasado ese tiempo se lleva a cabo la extracción del producto con embudo de decantación, añadiendo 200 ml de agua y se extrae 5 veces con 50 mL de diclorometano. La disolución orgánica se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se evapora el disolvente en el rotavapor. Después de purificar mediante cromatografía en columna se obtienen 250 mg de 2 α ,3 β -dihidroxi-12 β ,13 β -epoxiolean-28-oato de metilo (**32**, 92%): Sólido blanco, p.f. 216-218 °C. $[\alpha]_D = +28$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2947, 1719, 1367, 1241, 863 y 759 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz) (CDCl_3): δ 3.69 (3H, s, OMe), 3.66 (1H, ddd, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 9.5$ Hz, $J_3 = 4.5$ Hz, H-2), 2.95 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 2.77 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-12), 2.22 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 13.0$ Hz, $J_3 = 4.7$ Hz, H-15), 1.16 (3H, s, 3H-27), 0.99 (3H, s, 3H-23), 0.96 (3H, s, 3H-26), 0.92 (3H, s, 3H-29), 0.90 (3H, s, 3H-25), 0.88 (3H, s, 3H-30) y 0.79 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 4. HSQC y HMBC: ver tabla 8. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 503.3720 ($\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{O}_5$, calc. 503.3736 ppm -3.2).

5.6.13 Cloración de los ácidos oleanólico (**1**) y maslínico (**2**)

500 mg (1.2 mmol) de una mezcla de los ácidos oleanólico (**1**) y maslínico (**2**) se disuelven en 20 mL de DCM y se le adicionan 10 mL de una disolución comercial de NaClO al 5% (0.4% de Cl_2 activo), manteniéndose en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Tras ese tiempo, se mezcla con gel de sílice y el disolvente es evaporado a vacío. La mezcla sólida obtenida se purifica en columna, obteniéndose 25 mg de 12 α -cloro-3 β -hidroxiolean-28,13 β -olida (**33**, 4.2%) y 375 mg de 12 α -cloro-2 α ,3 β -dihroxiolean-28,13 β -olida (**34**, 61.7%).

12 α -Cloro-3 β -hidroxiolean-28,13 β -olida (**33**). Sólido blanco, p.f. 211-213 °C. $[\alpha]_D = +48$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3445, 2918, 1734, 1279 y 772 cm^{-1} . ^1H RMN (500 MHz) (CDCl_3): δ 4.18 (1H, dd, $J_1 = 3.6$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, H-12), 3.24 (1H, dd, $J_1 = 11.5$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, H-3), 1.39 (3H, s, 3H-26), 1.20 (3H, s, 3H-27), 1.00 (3H, s, 3H-23), 1.00 (3H, s, 3H-29), 0.90 (3H, s, 3H-30), 0.89 (3H, s, 3H-25) y 0.78 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 4. HSQC y HMBC: ver tabla 8. ESI-EMAR, m/z : $[\text{M}+1]^+$ 491.3274 ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{ClO}_3$, calc. 491.3292, ppm -3.7).

12 α -Cloro-2 α ,3 β -dihroxiolean-28,13 β -olida (**34**). Sólido blanco, p.f. 263-265 °C. $[\alpha]_D = +39$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3326, 2946, 1765 y 756 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz) (CDCl_3): δ 4.18 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 2.4$ Hz, H-12), 3.72 (1H, ddd, $J_1 = 11.7$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz, $J_3 = 4.8$ Hz, H-2), 3.03 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3), 1.39 (3H, s, 3H-27), 1.20 (3H, s, 3H-26), 1.04 (3H, s, 3H-23), 0.99 (3H, s, 3H-29),

0.96 (3H, s, 3H-25), 0.90 (3H, s, 3H-30) y 0.82 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 4. HSQC y HMBC: ver tabla 8. ESI-EMAR, m/z : $[\text{M}+1]^+$ 507.3245 ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{ClO}_4$, calc. 507.3241, ppm 0.8).

5.6.14 TRATAMIENTO DE ÁCIDO OLEANÓLICO CON OZONO

Se disuelven 2 g (4.38 mmol) de ácido oleanólico (1) en 25 mL de una mezcla 1:1 de CH_2Cl_2 :MeOH, y se enfrían a $-78\text{ }^\circ\text{C}$. Una vez enfriado, se le pasa una corriente de ozono al $75\text{ }^\circ\text{C}$ de caudal 0.1 L/min durante 90 minutos hasta conseguir un color azulado. Posteriormente la disolución se deja hasta alcanzar la temperatura ambiente y se evapora el disolvente en el rotavapor. La purificación cromatográfica de la mezcla obtenida origina varias fracciones de las que se obtienen 1.5 g de $3\beta,12\alpha$ -dihidroioleanan-28,13 β -olida (oleanderolida **35**, 72%), 250 mg de 12α -hidroxi-3-oxo-oleanan-28,13 β -olida (**36**, 12%), 65 mg de ácido 3β -hidroxi-12-oxo-13 β -oleanan-28-oico (**37**, 3%) y 25 mg $3\beta,12\beta$ -dihidroioleanan-28,13 β -olida (**38**, 1.2 %).

$3\beta,12\alpha$ -Dihidroioleanan-28,13 β -olida (oleanderolida, **35**). Sólido blanco, p.f. $247\text{-}249\text{ }^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D = +26$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3472, 2949, 1751 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 3.88 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 2.9$ Hz, H-12), 3.22 (1H, dd, $J_1 = 11.0$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, H-3), 2.13 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 13.2$ Hz, $J_3 = 6.0$ Hz, H-16), 1.30 (3H, s, 3H-27), 1.15 (3H, s, 3H-26), 0.99 (3H, s, 3H-23), 0.98 (3H, s, 3H-29), 0.90 (3H, s, 3H-30), 0.88 (3H, s, 3H-25), 0.78 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 5. HSQC y HMBC: ver tabla 8. EMAR (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 495.3454 ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4\text{Na}$).

12α -Hidroxi-3-oxo-oleanan-28,13 β -olida (**36**). Sólido blanco, p.f. $284\text{-}286\text{ }^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D = +36$ (c 0.5, MeOH). IR (KBr) ν_{max} : 3507, 2930, 1744, 1253, 755 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz) (CDCl_3): δ 3.90 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 2.8$ Hz, H-12), 2.58-2.38 (3H, m, 2H-2 y H-18), 2.12 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 13.3$ Hz, $J_3 = 5.9$ Hz, H-15), 1.72 (1H, dd, $J_1 = 13.1$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, H-9), 1.31 (3H, s, 3H-27), 1.19 (3H, s, 3H-26), 1.09 (3H, s, 3H-23), 1.04 (3H, s, 3H-24), 0.98 (6H, s, 3H-25 y 3H-29) y 0.90 (3H, s, 3H-30). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 5. HSQC y HMBC: ver tabla 9. EMAR (m/z) $[\text{M}+1]^+$ 471.3459 ($\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_4$, calc. 471.3474, ppm -3.2).

Ácido 3β -hidroxi-12-oxo-13 β -oleanan-28-oico (**37**). Sólido blanco, p.f. $175\text{-}177\text{ }^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D = +22$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3445, 2944, 1748, 1216 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 3.20 (1H, dd, $J_1 = 11.0$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-3), 2.76 (1H, ddd $J_1 = J_2 = 13.3$ Hz, $J_3 = 3.8$ Hz, H-18), 2.68 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-13), 2.25 (1H, dd, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz, H-11), 2.14 (1H, dd, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz, H-11), 0.99 (6H, s, 3H-23 y 3H-29), 0.97 (3H, s, 3H-26), 0.94 (3H, s, 3H-27), 0.90 (3H, s, 3H-30), 0.86 (3H, s, 3H-25) y 0.77 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 5. HSQC y HMBC: ver tabla 9. ESI-EMAR (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 473.3611 ($\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_4$, calc. 473.3631, ppm -4.2).

$3\beta,12\beta$ -Dihidroioleanan-28,13 β -olida (**38**). Sólido blanco, p.f. $240\text{-}242\text{ }^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D = +24$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3472, 2949, 1751 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 3.74 (1H, dd, $J_1 = 11.6$ Hz, $J_2 = 5.8$ Hz, H-12), 3.20 (1H, dd, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, H-3), 2.70 (1H, dd, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz, H-18), 2.10 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 13.2$ Hz, $J_3 = 5.9$ Hz, H-16), 1.14 (3H, s, 3H-26), 1.05 (3H, s,

3H-27), 0.98 (6H, s, 3H-23 y 3H-29), 0.90 (3H, s, 3H-30), 0.87 (3H, s, 3H-25), 0.76 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 5. HSQC y HMBC: ver tabla 9. ESI-EMAR (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 473.3628 ($\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_4$, calc. 473.3631, ppm -0.6).

5.6.14.1 Oxidación de oleanderolida (35)

La oleanderolida **35** (25 mg, 0.05 mmol) se disuelven en 5 ml de acetona y se oxida con el reactivo de Jones. Después de la purificación cromatográfica se obtienen 20 mg de 3,12-dioxooleanan-28,13 β -olida (**39**, 80%): Sólido blanco, p.f. 200-202 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = +15$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2946, 2869, 1369, 1289, 934, 756 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 2.77 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 14.2$ Hz, H-11), 2.56-2.30 (4H, m, 2H-2, H-11 y H-18), 1.36 (3H, s, 3H-26), 1.09 (3H, s, 3H-23), 1.05 (3H, s, 3H-24), 1.03 (3H, s, 3H-25), 0.97 (6H, s, 3H-27 y 3H-29) y 0.95 (3H, s, 3H-30). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 5. HSQC y HMBC: ver tabla 9. ESI-EMAR (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 469.3319 ($\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{O}_4$, calc. 469.3318, ppm 0.2).

5.6.14.2 Oxidación de 12-epioleanderolida (38)

La 12-epioleanderolida **38** (10 mg, 0.02 mmol) se disuelven en 5 ml de acetona y se oxida con el reactivo de Jones. Después de la purificación cromatográfica se obtienen 8 mg del 3,12-dioxoderivado (**39**, 81%).

5.6.15 Tratamiento de ácido maslínico (2) con ozono

Se disuelven 2 g (4.24 mmol) de ácido maslínico (**2**) en 25 mL de una mezcla 1:1 de CH_2Cl_2 :MeOH, y se enfrían a -78°C. Una vez enfriado, se le pasa una corriente de ozono al 75 °C de caudal 0.1 L/min durante 90 minutos hasta conseguir un color azulado. Posteriormente la disolución se deja hasta alcanzar la temperatura ambiente y se evapora el disolvente en el rotavapor. La purificación cromatográfica de la mezcla origina varias fracciones de las que se obtienen 80 mg de 2 α ,3 β -dihidroxi-12-oxo-oleanan-28,13 β -olida (**40**, 4%) y 1.6 g de 2 α ,3 β ,12 α -trihidroxioleanan-28,13 β -olida (**41**, 74%).

2 α ,3 β -Dihidroxi-12-oxo-oleanan-28,13 β -olida (**40**). Sólido blanco, p.f. 242-244 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = +15$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2935, 1772, 1219 y 771 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 3.70 (1H, ddd, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 10.3$ Hz, $J_3 = 4.6$ Hz, H-2), 2.99 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 2.74 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 14.3$ Hz) y 2.39 (1H, dd, $J_1 = 14.3$ Hz, $J_2 = 3.1$ Hz) (2H-11), 2.53 (1H, t, $J = 8.3$ Hz, H-18), 1.31 (3H, s, 3H-26), 1.04 (3H, s, 3H-23), 0.98 (3H, s, 3H-25), 0.97 (6H, s, 3H-27 y 3H-29), 0.96 (3H, s, 3H-30) y 0.83 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 5. HSQC y HMBC: ver tabla 10. ESI-EMAR, (m/z) $[\text{M}+1]^+$ 487.3400 ($\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_5$, calc. 487.3423, ppm -4.7).

2 α ,3 β ,12 α -Trihidroxioleanan-28,13 β -olida (**41**). Sólido blanco, p.f. 250-252 °C. $[\alpha]_D^{25} = +33$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{\max} : 3460, 2948, 1752 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz) (CDCl₃): δ 3.86 (1H, sa, H-12), 3.70 (1H, ddd, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 9.1$ Hz, $J_3 = 4.4$ Hz, H-2), 2.98 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H-3), 1.29 (3H, s, 3H-27), 1.11 (3H, s, 3H-26), 1.00 (3H, s, 3H-23), 0.96 (3H, s, 3H-29), 0.92 (3H, s, 3H-25), 0.88 (3H, s, 3H-30) y 0.79 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (CDCl₃): ver tabla 5. HSQC y HMBC: ver tabla 10. EMAR, (m/z) [M+Na]⁺ 511.3407 (C₃₀H₄₈O₅Na).

5.6.16 Acetilación de la lactona **41**

La acetilación de 90 mg (0.18 mmol) de 2 α ,3 β ,12 α -trihidroxioleanan-28,13 β -olida (**41**) con piridina (2 mL) y Ac₂O (1 mL) durante un día a temperatura ambiente, conlleva a la obtención tras procesado por el procedimiento descrito y purificación en columna de 38 mg de 2 α ,3 β ,12 α -triacetoxiolean-28,13 β -olida (**42**, 33.2%) y 35 mg de 2 α ,3 β -diacetoxi-12 α -hidroxiolean-28,13 β -olida (**43**, 25.8%).

2 α ,3 β ,12 α -Triacetoxiolean-28,13 β -olida (**42**). Sólido blanco, p.f. 253-255 °C. $[\alpha]_D^{25} = +29$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{\max} : 2928, 1743 y 1250 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.11 (1H, ddd, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 10.9$ Hz, $J_3 = 4.5$ Hz, H-2), 5.04 (1H, sa, H-12), 4.72 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-3), 2.10 (3H, s, COCH₃), 2.04 (3H, s, COCH₃), 1.98 (3H, s, COCH₃), 1.26 (3H, s, Me), 1.15 (3H, s, Me), 1.00 (3H, s, Me), 0.96 (3H, s, Me), 0.89 (3H, s, Me), 0.89 (3H, s, Me) y 0.81 (3H, s, Me). ¹³C RMN (CDCl₃): ver tabla 5. HSQC y HMBC: ver tabla 10. EMAR, (m/z) [M+Na]⁺ 637.3718 (C₃₆H₅₄O₈Na, calc. 637.3716).

2 α ,3 β -Diacetoxi-12 α -hidroxiolean-28,13 β -olida (**43**). Sólido blanco, p.f. descompone por encima de 310 °C. $[\alpha]_D^{25} = +10$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{\max} : 2957, 1746, 1368 y 764 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.11 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 10.7$ Hz, $J_3 = 4.5$ Hz, H-2), 4.75 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-3), 3.89 (1H, sa, H-12), 2.05 (3H, s, COCH₃), 1.99 (3H, s, COCH₃), 1.30 (3H, s, Me), 1.14 (3H, s, Me), 1.02 (3H, s, Me), 0.99 (3H, s, Me), 0.90 (3H, s, Me), 0.90 (3H, s, Me) y 0.90 (3H, s, Me). ¹³C RMN (CDCl₃): ver tabla 5. HSQC y HMBC: ver tabla 10. ESI-EMAR, (m/z) [M+1]⁺ 573.3787 (C₃₄H₅₃O₇, calc. 573.3791, ppm -0.7).

5.6.17 Tratamiento con O₃ del diacetoxiderivado (**6**)

El diacetoxiderivado **6** (150 mg, 0.26 mmol) se disuelve en 20 mL de una mezcla 1:1 de CH₂Cl₂:MeOH, y se enfría a -78 °C. Una vez enfriado, se le pasa una corriente de ozono al 75%, de caudal 0.1 L/min durante 30 minutos hasta conseguir un color azulado. Posteriormente la disolución se deja hasta alcanzar la temperatura ambiente y se evapora el disolvente en el rotavapor. La purificación cromatográfica de la mezcla origina 35 mg del diacetoxiderivado (**43**, 24%) y 64 mg del 2 α ,3 β -diacetoxi-12-oxoolean-28,13 β -olida (**44**, 43%): Sirupo. $[\alpha]_D^{25} = -31$ (c 1, CHCl₃). IR (NaCl) ν_{\max} : 3431, 2951, 2359, 1368, 1253 y 755 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.06 (1H, ddd, $J_1 = 10.4$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-2), 4.71 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-3), 2.72 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 14.3$

Hz) y 2.32 (1H, dd, $J_1= 14.3$ Hz, $J_2= 3.1$ Hz) (2H-11), 2.51 (1H, t, $J= 8.3$ Hz, H-18), 2.03 y 1.96 (3H cada uno, s, grupos AcO), 1.30 (3H, s, 3H-26), 1.04 (3H, s, 3H-25), 0.96 (3H, s, 3H-29), 0.94 (6H, s, 3H-27 y 3H-30), 0.90 (3H, s, 3H-24) y 0.88 (3H, s, 3H-23). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 5. HSQC y HMBC: ver tabla 11. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 571.3638 ($\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{O}_7$, calc. 571.3635 ppm 0.5).

5.6.18 Reducción del ácido oleanólico (1) con LiAlH_4

Se disuelven 1 g (2.2 mmol) de ácido oleanólico (1) en 25 mL de THF seco y se añaden 8 mL de LiAlH_4 (exceso) y se mantiene a reflujo durante 1 hora. A continuación, se lleva a sequedad y se purifica en columna el bruto obtenido, aislándose 940 mg (97%) de $3\beta,28$ -dihidroiolean-12-eno (eritrodiol, **45**): Sólido blanco, p.f. 141-143 °C. $[\alpha]_{\text{D}}= +59$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3401, 2946, 1462 y 1124 cm^{-1} . ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 5.18 (1H, dd, $J_1= J_2= 3.8$ Hz, H-12), 3.54 y 3.20 (2H, sistema AB, $J= 10.9$ Hz, 2H-28), 3.21 (1H, parcialmente solapada con H-28, H-3), 1.15 (3H, s, 3H-27), 0.98 (3H, s, 3H-23), 0.93 (3H, s, 3H-26), 0.92 (3H, s, 3H-25), 0.88 (3H, s, 3H-29), 0.86 (3H, s, 3H-30) y 0.78 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 6. HSQC y HMBC: ver tabla 11. ESI-EMAR (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 443.3886 ($\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_2$, calc. 443.3889, ppm -0.7).

5.6.19 Reducción de oleanolato de metilo (7) con LiAlH_4

Se disuelve 1 g (2.12 mmol) de oleanolato de metilo (7) en 25 mL de THF seco y se añaden 8 mL de LiAlH_4 (exceso) y se mantiene a reflujo durante una hora y media, tras la cual se deja evolucionar en agitación y se mezcla con gel. La mezcla es concentrada y purificada con DCM/acetona, dando 685 mg de eritrodiol (**45**, 73%).

5.6.20 Reducción del ácido maslínico (2) con LiAlH_4

Se disuelven 1g (2.12 mmol) de ácido maslínico (2) en 25 mL de THF seco y se añaden 8 mL de LiAlH_4 (exceso) y se mantiene a reflujo durante 1 hora. Procesando igual que para la obtención del derivado **45**, se obtienen 785 mg de $2\alpha,3\beta,28$ -trihidroiolean-12-eno (**46**, 81%): Sólido blanco, p.f. 142-144 °C. $[\alpha]_{\text{D}}= +16$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3389, 2946, 1461 y 1046 cm^{-1} . ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 5.19 (1H, dd, $J_1= J_2= 3.6$ Hz, H-12), 3.67 (1H, ddd, $J_1= 11.3$ Hz, $J_2= 9.5$ Hz, $J_3= 4.5$ Hz, H-2), 3.54 y 3.20 (2H, sistema AB, $J= 10.8$ Hz, 2H-28), 3.00 (1H, d, $J= 9.2$ Hz, H-3), 1.15 (3H, s, 3H-27), 1.03 (3H, s, 3H-23), 0.99 (3H, s, 3H-25), 0.93 (3H, s, 3H-26), 0.88 (3H, s, 3H-29), 0.87 (3H, s, 3H-30) y 0.82 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (CDCl_3): ver tabla 6. HSQC y HMBC: ver tabla 11. EMAR, (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 481.3658 ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3\text{Na}$, calc. 481.3658).

5.6.21 Reducción de maslinato de metilo (8) con LiAlH_4

Se disuelven 1g (2.05 mmol) de maslinato de metilo (8) en 25 mL de THF seco y se añaden 8 mL de LiAlH_4 (exceso) y se mantiene a reflujo durante una hora y media. Después de la purificación cromatográfica se obtienen 650 mg de trihidroderivado **46** (69%).

5.6.22 Acetilación de eritrodio (45)

El eritrodio (**45**, 102 mg, 0.23 mmol) se disuelve en 2 mL de piridina y 1 mL de Ac₂O a temperatura ambiente durante 18 horas. El bruto obtenido tras procesado es purificado en columna obteniendo 97 mg de 2 α ,3 β ,28-triacetoxiolean-12-eno (diaceteritrodio, **47**, 80.2%): Sólido blanco, p.f. 154-156 °C. $[\alpha]_D^{25}$ +45 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 2947, 1734, 1463, 1363, 1242 y 755 cm⁻¹. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.18 (1H, dd, H-12), 4.48 (1H, dd, J₁= 8.1 Hz, J₂= 7.7 Hz, H-3), 4.01 y 3.68 (2H, sistemas AB, J= 11.08 Hz, 2H-28), 2.03 (6H, s, 2 grupo AcO), 1.14 (3H, s, 3H-27), 0.94 (3H, s, 3H-29), 0.87 (3H, s, 3H-25), 0.86 (6H, s, 3H-26 y 3H-30) y 0.85 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): ver tabla 6. HSQC y HMBC: ver tabla 11. ESI-EMAR (m/z): [M+1]⁺ 527.4100 (C₃₄H₅₅O₄, calc. 527.4100, ppm 0.0).

5.6.23 Acetilación del trihidroderivado 46

El trihidroderivado **46** (100 mg, 0.22 mmol) se disuelve en 2 mL de piridina y 1 mL de Ac₂O y se mantiene la reacción a temperatura ambiente durante 15 horas. El bruto obtenido tras procesado es purificado en columna obteniendo 97 mg de 2 α ,3 β ,28-triacetoxiolean-12-eno (**48**, 76%). Sólido blanco, p.f. 96-98 °C. $[\alpha]_D^{25}$ +13 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 2947, 1738, 1365, 1230, 962 y 754 cm⁻¹. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.17 (1H, dd, H-12), 5.07 (1H, ddd, J₁= J₂= 10.6 Hz, J₃= 4.3 Hz, H-2), 4.72 (1H, d, J= 10.6 Hz, H-3), 4.00 y 3.66 (2H, sistemas AB, J= 11 Hz, 2H-28), 2.03 (3H, s, grupo AcO), 2.02 (3H, s, grupo AcO), 1.95 (3H, s, grupo AcO), 1.13 (3H, s, 3H-27), 1.05 (3H, s, 3H-25), 0.92 (3H, s, 3H-26), 0.88 (3H, s, 3H-24), 0.87 (3H, s, 3H-23), 0.86 (3H, s, 3H-29) y 0.85 (3H, s, 3H-30). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): ver tabla 6. HSQC y HMBC: ver tabla 12. ESI-EMAR (m/z): [M+1]⁺ 585.4128 (C₃₆H₅₇O₆, calc. 585.4142, ppm -2.4).

5.6.24 Tratamiento del trihidroderivado 46 con ozono

El trihidroderivado **46** (500 mg, 1.09 mmol) se disuelve en una mezcla CH₂Cl₂:MeOH (2:1) y se le pasa una corriente de O₃ a -78 °C durante media hora, tras la cual la mezcla obtenida es concentrada y purificada por cromatografía en columna obteniéndose 62 mg de 13 β ,28-epoxi-2 α ,3 β ,12 β -trihidroioleanano (**49**, 12%), 130 mg de 13 β ,28-epoxi-2 α ,3 β ,12 α -trihidroioleanano (**50**, 25%) y una mezcla que tras acetilación con Ac₂O en piridina da lugar a 115 mg del triacetoxiderivado **48** (18%), 26 mg de 13 β ,28-epoxi-2 α ,3 β ,12 α -triacetoxioleanano (**51**, 4%) y 140 mg de 2 α ,3 β ,28-triacetoxi-12-oxo-13 β -ioleanano (**52**, 21%).

13 β ,28-Epoxi-2 α ,3 β ,12 β -trihidroioleanano (**49**). Sólido blanco, p.f. 75-77 °C. $[\alpha]_D^{25}$ +21 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 3397, 2947, 1733, 1389, 1044 y 754 cm⁻¹. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 3.81 y 3.26 (2H cada uno, sistema AB, J= 10.9 Hz, 2H-28), 3.69 (1H, ddd, J₁= 11.3 Hz, J₂= 9.5 Hz, J₃= 4.5 Hz, H-2), 3.64 (1H, dd, J₁= 11.4 Hz, J₂= 6.0 Hz, H-12), 2.99 (1H, d, J=9.5 Hz, H-3), 2.14-2.10 (2H, m, H-1 y H-18), 1.98 (1H, ddd, J₁= J₂= 13.1 Hz, J₃= 5.5 Hz, H-16), 1.87 (1H, ddd, J₁= J₂= 13.1 Hz, J₃= 5.5 Hz, H-15), 1.81 (1H, ddd, J₁= 12.4 Hz, J₂= 6.4 Hz, J₃= 2.0 Hz, H-11), 1.65 (1H, dd, J₁= J₂= 13.3 Hz, H-19), 1.17 (1H, dd, J₁= 12.4 Hz, J₂= 2.0 Hz, H-9), 1.15 (3H, s, 3H-26), 1.02

(3H, s, 3H-23), 0.97 (3H, s, 3H-29), 0.92 (3H, s, 3H-25), 0.89 (6H, s, 3H-27 y 3H-30), y 0.80 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): ver tabla 6. HSQC y HMBC: ver tabla 12. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 475.3775 ($\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_4$, calc. 475.3787, ppm -2.5).

13 β ,28-Epoxi-2 α ,3 β ,12 α -trihidroioleanano (**50**). Sólido blanco, p.f. 81-83 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = +33$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3395, 2921, 1363, 1047 y 755 cm^{-1} . ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 3.74 y 3.25 (2H, sistema AB, $J = 10.9$ Hz, 2H-28), 3.73 (1H, sa, H-12), 3.68 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 9.5$ Hz, $J_3 = 4.7$ Hz, H-2), 2.99 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 1.18 (3H, s, 3H-27), 1.17 (3H, s, 3H-26), 1.01 (3H, s, 3H-23), 0.96 (3H, s, 3H-29), 0.93 (3H, s, 3H-25), 0.90 (3H, s, 3H-30) y 0.80 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): ver tabla 6. HSQC y HMBC: ver tabla 12. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 475.3775 ($\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_4$, calc. 475.3787, ppm -2.5).

13 β ,28-Epoxi-2 α ,3 β ,12 α -triacetoxioleanano (**51**). Sólido blanco, p.f. 134-136 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = +6$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2950, 1740, 1368, 1248, 1036 y 755 cm^{-1} . ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 5.16 (1H, dd, $J_1 = 11.8$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, H-12), 5.08 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 10.4$ Hz, $J_3 = 4.6$ Hz, H-2), 4.73 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-3), 3.82 y 3.29 (2H, sistema AB, $J = 7.4$ Hz, 2H-28), 2.07, 2.04 y 1.98 (3H cada uno, s, grupos AcO), 1.21 (3H, s, 3H-26), 1.00 (3H, s, 3H-25), 0.96 (3H, s, 3H-27), 0.95 (3H, s, 3H-29), 0.88 (6H, s, 3H-23 y 3H-24) y 0.79 (3H, s, 3H-30). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 ver tabla 6. HSQC y HMBC: ver tabla 13. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 601.4075 ($\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{O}_7$, calc. 601.4104, ppm -4.8).

2 α ,3 β ,28-triacetoxi-12-oxo-13 β -oleanano (**52**). Sólido blanco, p.f. 102-106 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = -12$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2946, 1739, 1367, 1231, 1038 y 755 cm^{-1} . ^1H RMN (400 MHz) (CDCl_3): δ 5.07 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 10.2$ Hz, $J_3 = 4.3$ Hz, H-2), 4.72 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-3), 4.07 y 3.89 (2H, sistema AB, $J = 11.1$ Hz, 2H-28), 2.70 (1H, d, $J_1 = 3.7$ Hz, H-13), 2.06, 2.05 y 1.98 (3H cada uno, s, grupos AcO), 1.15 (3H, s, 3H-26), 1.02 (3H, s, 3H-25), 0.95 (3H, s, 3H-27), 0.92 (6H, s, 3H-24 y 3H-30), 0.90 (3H, s, 3H-23) y 0.89 (3H, s, 3H-29). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): ver tabla 6. HSQC y HMBC: ver tabla 13. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 601.4083 ($\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{O}_7$, calc. 601.4104, ppm -3.5).

5.7 ETAPAS DE BIOTRANSFORMACIÓN

Una vez sintetizados y purificados cada uno de los sustratos, se llevaron a cabo diversas pruebas de biotransformación y su correspondiente puesta a punto. Durante el transcurso de esta fase de la investigación, podemos distinguir varias etapas,

5.7.1 ELECCIÓN DEL MICROORGANISMO

Todos los hongos filamentosos utilizados en los procesos de biotransformación, proceden de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y fueron aportados por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada.

La elección de los hongos filamentosos se hizo considerando la acción de los mismos en anteriores experiencias con sustratos sesquiterpénicos y diterpénicos realizadas en nuestro Grupo de Investigación así como los microorganismos que se encontraban disponibles en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada. Para un primer estudio se escogieron los siguientes hongos filamentosos: *Rhizopus nigricans* CECT 2672 (ATCC 10404), *Neurospora crassa* CECT 2261 y *Rhizomucor miehei* (CECT 2749). Posteriormente se ensayaron algunos sustratos con los siguientes hongos: *Cunninghamella elegans* CECT 2123, *Curvularia lunata* CECT 2131 y *Rhizopus oryzae* CECT 2339.

5.7.2 CULTIVO Y CRECIMIENTO DEL HONGO

Al inicio de la investigación, *Neurospora crassa* y *Rhizopus nigricans* se cultivaron en medios de patata y de malta respectivamente con el objeto de determinar el medio en el que crecían mejor, aunque al observarse diferencias en el crecimiento de los microorganismos, se decidió invertir los medios. Como consecuencia, se percibió que ambos hongos crecían de forma elevada (tanto de tamaño como en cantidad) en el medio de patata, no ocurriendo lo mismo con el de malta. Debido a esto, todos los microorganismos se cultivaron en el medio de patata tal y como se detalla a continuación.

A partir de una suspensión del hongo en solución salina al 9 % (9 g de NaCl en 1 L de H₂O), se inoculan placas petri de Agar-patata dextrosado anteriormente preparadas disolviendo para ello 24 g de extracto de patata dextrosado (Scharlau) y 2 g de agar en 1 L de H₂O (de forma que por cada litro tendremos 4 g de peptona de patata, 20 g de glucosa y 2 g de agar a pH 5.6) y se depositan en cada una, 20 gotas de 75 µl de la suspensión salina anterior. De esta forma, se llega a utilizar 4 placas petri por cada 10 mL de suspensión. En este punto, se incuban a 28°C durante 48 horas, tras el cual se recoge el micelio aéreo y se resuspende en solución salina al 9%.

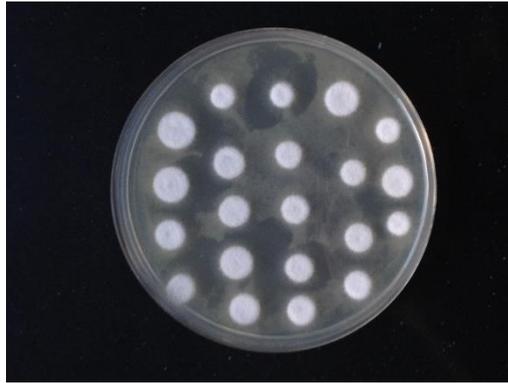


Imagen 5.1. *Placa Petri de Agar-patata sembrada con R. miehei*

El medio líquido donde tendrán lugar las biotransformaciones se preparó disolviendo 48 g de extracto de patata dextrosado en 2 L de agua destilada y se repartió en fracciones de 90 mL que se adicionaron a los diversos matraces Erlenmeyer de 250 mL y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos en autoclave. Posteriormente cada uno de los hongos que se encontraban resuspendidos en solución salina al 9% se inocularon en condiciones de esterilidad en los matraces Erlenmeyer añadiendo para ello 1 mL de la misma y se dejaron crecer en agitación orbital (150 r.p.m.) a 28 °C durante una semana, tras la cual, se adicionaron los sustratos.



Imagen 5.2. *Esterilización de los medio de cultivo en autoclave*

5.7.3 Adición de los sustratos y biotransformación

La cantidad de sustrato a incubar se disuelve con la mínima cantidad de EtOH (1-2%). El sustrato disuelto se distribuye en los diferentes matraces Erlenmeyer con el medio en el que ha crecido el microorganismo durante 7 días. La biotransformación se mantiene en agitación orbital constante a 150 r.p.m. y a 28 °C y se controla mediante cromatografía en capa fina cada 24 horas.



Imagen 5.3. Cultivo de *R. miehei* biotransformando un sustrato

5.7.4 Extracción y purificación de los productos de biotransformación

Una vez agotado el tiempo de biotransformación (variable en función de la transformación del tipo de sustrato por el hongo que es observado mediante cromatografía en capa fina), los hongos fueron filtrados por succión (Büchner) para separar el micelio del medio del cultivo y lavados con la mínima cantidad de agua destilada. Estos medios se saturaron con NaCl para favorecer por efecto de ion común la posterior extracción de los sustratos con disolventes orgánicos que se realizaría mediante el uso de embudos de decantación o con sistemas de extracción en continuo líquido-líquido. La extracción se realiza cada 7 u 8 horas y tras secado con Na₂SO₄ anhidro, el extracto orgánico obtenido se concentra a vacío y se mantiene hasta que no se observa aumento de masa en el residuo o concentrado. Esto posee el inconveniente de que al extraer al máximo el extracto tanto pigmentos, grasas y otros componentes orgánicos que posee el microorganismo son extraídos e impurifica el concentrado.

Además, la poca cantidad recuperada en los concentrados de los extractos nos hizo suponer que los micelios retenían los sustratos ya que se adhieren a la superficie del mismo, por lo que se llevaron a cabo sucesivas extracciones de los micelios. Así, éstos una vez secos también fueron extraídos directamente con disolventes tanto apolares (DCM) como polares (EtOH), filtrados, secados y concentrados.

De esta forma, por cada sustrato incubado se obtuvieron dos fracciones, la del medio y la del micelio y cada una de ellas fue purificada por cromatografía en columna con el objeto de aislar un posible metabolito.

Con el objeto de descartar la posible extracción de algún producto interferente se realizaron blancos de los medios (patata y malta) y de los disolventes (CH₂Cl₂, acetona, hexano y acetato de etilo) y a cada uno de ellos se le hizo un espectro de ¹H RMN.



Imagen 5.4. *Filtrado en buchner del cultivo y extracción líquido-líquido del extracto*

5.7.5. BIOTRANSFORMACIONES PRELIMINARES.

Para establecer las biotransformaciones útiles se realizaron biotransformaciones preliminares con distintos hongos filamentosos con el fin de determinar si se producía biotransformación. En todas estas incubaciones se tomaron 150 mg de sustrato y se disolvieron en etanol (10 mL). Posteriormente se distribuyeron en 5 matraces Erlenmeyer que contenían el medio con el correspondiente microorganismo desarrollado durante 7 días. Cada una de las incubaciones se controló por cromatografía en capa fina cada 24 horas. A los 4 días se procesan 2 matraces Erlenmeyer de cada biotransformación, recuperándose los productos de la misma y realizándose un fraccionamiento por cromatografía en columna. A cada una de las fracciones obtenidas se realiza el espectro de ^1H RMN para determinar el tipo de productos obtenidos. A los 10 días se procesan el resto de matraces Erlenmeyer de cada incubación y se procede de la misma forma que la indicada anteriormente. En la tabla 5.2 se indican los resultados obtenidos en las biotransformaciones de los sustratos indicados con los correspondientes hongos filamentosos. En los casos en los que se observó biotransformación se procedió a realizar nuevas biotransformaciones con mayor cantidad de sustrato.

Sustrato	Microorganismo	Resultados 4 días	Resultados 10 días	Sustrato	Microorganismo	Resultados 4 días	Resultados 10 días
1 como sal sódica 3	<i>Neurospora crassa</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado	8	<i>Rhizopus nigricans</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado
1 como sal sódica 3	<i>Rhizopus nigricans</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado	8	<i>Rhizomucor miehei</i>	Biotransformación	Biotransformación
1 como sal sódica 3	<i>Rhizomucor miehei</i>	Biotransformación	Biotransformación	33	<i>Rhizomucor miehei</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado
1 como sal sódica 3	<i>Cunnimghamella elegans</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado	34	<i>Rhizomucor miehei</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado
1 como sal sódica 3	<i>Curvularia lunata</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado	35	<i>Neurospora crassa</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado
1 como sal sódica 3	<i>Rhizopus oryzae</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado	35	<i>Rhizopus nigricans</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado
2 como sal sódica 4	<i>Neurospora crassa</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado	35	<i>Rhizomucor miehei</i>	Biotransformación	Biotransformación
2 como sal sódica 4	<i>Rhizopus nigricans</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado	36	<i>Rhizomucor miehei</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado
2 como sal sódica 4	<i>Rhizomucor miehei</i>	Biotransformación	Biotransformación	41	<i>Neurospora crassa</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado
2 como sal sódica 4	<i>Cunnimghamella elegans</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado	41	<i>Rhizopus nigricans</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado
2 como sal sódica 4	<i>Curvularia lunata</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado	41	<i>Rhizomucor miehei</i>	Biotransformación	Biotransformación
2 como sal sódica 4	<i>Rhizopus oryzae</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado	45	<i>Neurospora crassa</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado
7	<i>Neurospora crassa</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado	45	<i>Rhizopus nigricans</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado
7	<i>Rhizopus nigricans</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado	45	<i>Rhizomucor miehei</i>	Biotransformación	Biotransformación
7	<i>Rhizomucor mieheii</i>	Biotransformación	Biotransformación	46	<i>Neurospora crassa</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado
8	<i>Neurospora crassa</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado	46	<i>Rhizopus nigricans</i>	Sustrato inalterado	Sustrato inalterado
				46	<i>Rhizomucor mieheii</i>	Biotransformación	Biotransformación

Tabla 5.2. Biotransformaciones preliminares realizadas

5.8 BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS ÁCIDOS

5.8.1 Incubación de ácido oleanólico con *R. miehei*

El ácido oleanólico (**1**) se incubó como su sal sódica (**3**, 500 mg, 1.10 mmol) disuelta en EtOH (24 mL) que se distribuyeron en 12 matraces Erlenmeyer que contenían el cultivo de *Rhizomucor miehei*. La incubación se mantuvo durante 13 días. Una vez recuperados los productos y purificada la mezcla mediante cromatografía en columna se obtienen 320 mg del ácido oleanólico **1** (64%), 25 mg de ácido 3 β ,30-dihidroxi-12-oleanen-28-oico (ácido queretaroico, **53**, 6%), 28 mg de ácido 3 β ,7 β ,30-trihidroxi-12-oleanen-28-oico (**54**, 6%), 28 mg de ácido 1 β ,3 β ,30-trihidroxi-12-oleanen-28-oico (**55**, 5%).

Ácido 3 β ,30-dihidroxiolean-12-en-28-oico (ácido queretaroico, **53**). Sólido blanco, p.f. 158-160 °C. $[\alpha]_D^{25} = +10$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{\max} : 3386, 1689, 1460, 1034 y 668 cm⁻¹. ¹H RMN (600 MHz, CD₃OD): δ 5.27 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 3.55 y 3.43 (2H, sistema AB, $J = 10.9$ Hz, 2H-30), 3.15 (1H, dd, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, H-3), 2.82 (1H, dd, $J_1 = 13.8$ Hz, $J_2 = 3.8$ Hz, H-18), 1.18 (3H, s, 3H-27), 0.97 (3H, s, 3H-23), 0.94 (3H, s, 3H-25), 0.89 (3H, s, 3H-29), 0.82 (3H, s, 3H-26), y 0.78 (3H, s, 3H-24). ¹H RMN (500 MHz, C₅D₅N): δ 5.53 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 4.03 y 3.95 (2H, sistema AB, $J = 10.9$ Hz, 2H-30), 3.48 (2H, m, H-3 y H-18), 1.36 (3H, s, 3H-27), 1.27 (3H, s, 3H-29), 1.25 (3H, s, 3H-23), 1.05 (6H, s, 3H-24 y 3H-26) y 0.91 (3H, s, 3H-25). ¹³C RMN (150 MHz, CD₃OD o 125 MHz, C₅D₅N): ver tabla 7. HSQC y HMBC: ver tabla 14. ESI-EMAR, (m/z): [M+1]⁺ 473.3627 (C₃₀H₄₉O₄, calc. 473.3631, ppm 0.8).

Ácido 3 β ,7 β ,30-trihidroxiolean-12-en-28-oico (**54**). Sólido blanco, p.f. 160-162 °C. $[\alpha]_D^{25} = +41$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{\max} : 3356, 1694, 1461, 1036, 996, 756 y 668 cm⁻¹. ¹H RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 5.34 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 3.6$ Hz, H-12), 3.86 (1H, dd, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 5.0$ Hz, H-7), 3.56 y 3.44 (2H, sistema AB, $J = 10.8$ Hz, 2H-30), 3.18 (1H, dd, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, H-3), 2.83 (1H, dd, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-18), 1.27 (3H, s, 3H-27), 1.01 (3H, s, 3H-23), 0.96 (3H, s, 3H-25), 0.92 (3H, s, 3H-29), 0.85 (3H, s, 3H-26) y 0.80 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (125 MHz, CD₃OD): ver tabla 7. HSQC y HMBC: ver tabla 14. ESI-EMAR, (m/z): [M+1]⁺ 489.3586 (C₃₀H₄₉O₅, calc. 489.3580, ppm 1.2).

Ácido 1 β ,3 β ,30-trihidroxiolean-12-en-28-oico (**55**). Sólido blanco, p.f. 170-172 °C. $[\alpha]_D^{25} = +43$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{\max} : 3375, 1693, 1460, 1040, 995, 756 y 668 cm⁻¹. ¹H RMN (600 MHz, CD₃OD): δ 5.27 (1H, m, $J_1 = J_2 = 3.5$ Hz, H-12), 3.55 y 3.42 (2H, sistema AB, $J = 10.5$ Hz, 2H-30), 3.34 (1H, dd, $J_1 = 10.8$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, H-1), 3.18 (1H, dd, $J_1 = 11.5$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, H-3), 2.79 (1H, dd, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-18), 2.44 (1H, ddd, $J_1 = 19.3$ Hz, $J_2 = J_3 = 3.5$ Hz, H-11), 2.09 (1H, ddd, $J_1 = 19.3$ Hz, $J_2 = 11$ Hz, $J_3 = 3.5$ Hz, H-11) 1.18 (3H, s, 3H-27), 0.97 (3H, s, 3H-25), 0.95 (3H, s, 3H-23), 0.89 (3H, s, 3H-29), 0.81 (3H, s, 3H-26), 0.76 (3H, s, 3H-24) y 0.61 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-5). ¹³C RMN (150 MHz, CD₃OD): ver tabla 7. HSQC y HMBC: ver tabla 14. ESI-EMAR, (m/z): [M+1]⁺ 489.3578 (C₃₀H₄₉O₅, calc. 489.3580, ppm -0.4).

5.8.1.1 Acetilación del ácido queretaroico (53)

La acetilación del ácido queretaroico (**53**, 25 mg, 0.05 mmol) con Ac₂O (0.5 mL) en piridina (1 mL) durante 12 horas a temperatura ambiente da lugar a 18 mg de ácido 3β,30-diacetoxiolean-12-en-28-oico (**56**, 61%): Sólido blanco, p.f. 114-116 °C. [α]_D = +47 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max}: 3421, 2937, 1722, 1367, 862 y 743 cm⁻¹. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ 5.27 (1H, dd, J₁ = J₂ = 3.5 Hz, H-12), 4.49 (1H, dd, J₁ = 10.9 Hz, J₂ = 4.9 Hz, H-3), 4.06 y 4.00 (2H, sistema AB, J = 10.9 Hz, 2H-30), 2.80 (1H, dd, J₁ = 13.8 Hz, J₂ = 3.8 Hz, H-18), 2.06 y 2.04 (3H cada s, grupo AcO), 1.14 (3H, s, 3H-27), 0.94 (3H, s, 3H-25), 0.93 (3H, s, 3H-29), 0.87 (3H, s, 3H-23), 0.85 (3H, s, 3H-24) y 0.75 (3H, s, 3H-26). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃): ver tabla 7. HSQC y HMBC: ver tabla 14. ESI-EMAR, (m/z): [M+Na]⁺ 579.3668 (C₃₄H₅₂O₆Na, calc. 579.3662, ppm 1.0).

5.8.2 Incubación de ácido maslínico con *R. miehei*

El ácido maslínico (**2**) se biotransformó disolviendo su sal sódica (**4**, 2 g, 4.24 mmol) en 100 mL de EtOH que se distribuyeron en 50 Erlenmeyer que contenían el cultivo de *Rhizomucor miehei*. La incubación se mantuvo en agitación orbital a 28 °C durante 13 días. Una vez recuperados los productos y purificada la mezcla mediante cromatografía en columna se obtienen 845 mg del sustrato **2** (42%), 10 mg de 2α,3β-dihidroiolean-11-en-28,13β-olida (**57**, 0.5%), 225 mg de ácido 2α,3β,30-trihidroiolean-12-en-28-oico (**58**, 11%) y varias fracciones impuras (200 mg) que fueron juntadas y acetiladas con Ac₂O (4 mL) en piridina (2 mL) a temperatura ambiente durante 24 h, aislándose 3.5 mg de 2α,3β-diacetoxiolean-11-en-28,13β-olida (**59**, 0.3%), 30 mg de ácido 2α,3β,30-triacetoxiolean-12-en-28-oico (**60**, 1.2%), 26 mg de ácido 2α,3β-diacetoxi-11-oxoolean-12-en-28-oico (**61**, 1%), 6 mg 2α,3β-diacetoxi-11α,12α-epoxiolean-28,13β-olida (**62**, 0.2%) y 23 mg de 2α,3β,30-triacetoxi-11α,12α-epoxiolean-28,13β-olida (**63**, 0.9%).

2α,3β-Dihidroiolean-11-en-28,13β-olida (**57**). Sólido blanco, p.f. 186-188 °C. [α]_D = +26 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max}: 3407, 2940, 1757, 1463, 1388, 1218, 1058, 755 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 6.04 (1H, dd, J₁ = 10.3 Hz, J₂ = 1.4 Hz, H-12), 5.42 (1H, dd, J₁ = 10.3 Hz, J₂ = 3.2 Hz, H-11), 3.74 (1H, ddd, J₁ = 11.2 Hz, J₂ = 9.5 Hz, J₃ = 4.5, H-2), 2.99 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-3), 2.18 (1H, dd, J₁ = 12.3 Hz, J₂ = 4.5 Hz, H-1), 1.94 (1H, sa, H-9), 1.79 (1H, dd, J₁ = J₂ = 13.5 Hz, H-19), 1.04 (6H, s, 3H-26 y 3H-27), 1.01 (3H, s, 3H-23), 0.96 (6H, s, 3H-25 y 3H-29), 0.87 (3H, s, 3H-30) y 0.81 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): ver tabla 8. HSQC y HMBC: ver tabla 15. ESI-EMAR, (m/z): [M+1]⁺ 471.3454 (C₃₀H₄₇O₄, calc. 471.3474, ppm -4.2).

Ácido 2α,3β,30-trihidroiolean-12-en-28-oico (**58**): Sólido blanco, p.f. 182-184 °C. [α]_D = +31 (c 1, MeOD). IR (KBr) ν_{max}: 3355, 1685, 1388, 1047 y 752 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 5.28 (1H, dd, J₁ = J₂ = 3.3 Hz, H-12), 3.61 (1H, ddd, J₁ = 10.1 Hz, J₂ = 9.6 Hz, J₃ = 4.4, H-2); 3.55 y 3.43 (2H, sistema AB, J = 10.9 Hz, 2H-30), 2.91 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-3), 2.82 (1H, dd, J₁ = 13.6 Hz, J₂ = 4.1 Hz, H-18), 2.05 (1H, ddd, J₁ = J₂ = 13.4 Hz, J₃ = 3.8 Hz, H-16) 1.18 (3H, s, 3H-27), 1.01 (3H, s, 3H-23), 1.00 (3H, s, 3H-25), 0.89 (3H, s, 3H-29), 0.80 (6H, s, 3H-24 y 3H-26). ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD):

ver tabla 8. HSQC y HMBC: ver tabla 15. ESI-EMAR, (m/z): $[M+1]^+$ 489,3576 ($C_{30}H_{49}O_5$, calc. 489.3580, ppm -0.8).

2 α ,3 β -Diacetoxiolean-11-en-28,13 β -olida (**59**): Sólido blanco, p.f. 221-223 °C. $[\alpha]_D = +12$ (c 1, $CHCl_3$). IR (KBr) ν_{max} : 1765, 1743, 1368, 1253, 1030, 896 y 755 cm^{-1} . 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.00 (1H, dd, $J_1 = 10.3$ Hz, $J_2 = 1.4$ Hz, H-12), 5.43 (1H, dd, $J_1 = 10.3$ Hz, $J_2 = 3.2$ Hz, H-11), 5.14 (1H, ddd, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 9.5$ Hz, $J_3 = 4.5$, H-2), 4.74 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 2.24 (1H, dd, $J_1 = 12.3$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz, H-1), 2.05 y 1.98 (3H cada uno, s, grupos AcO), 1.79 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 13.5$ Hz, H-19), 1.05 (9H, s, 3H-25, 3H-26 y 3H-27), 0.97 (3H, s, 3H-29), 0.91 (3H, s, 3H-24), 0.89 (3H, s, 3H-23) y 0.87 (3H, s, 3H-30). ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): ver tabla 8. HSQC y HMBC: ver tabla 15. ESI-EMAR, (m/z): $[M+1]^+$ 555.3683 ($C_{34}H_{51}O_6$, calc. 555.3686, ppm -0.5).

Ácido 2 α ,3 β ,30-triacetoxiolean-12-en-28-oico (**60**): Sólido blanco, p.f. 191-193 °C. $[\alpha]_D = +28$ (c 1, $CHCl_3$). IR (KBr) ν_{max} : 1740, 1370, 1247 y 756 cm^{-1} . 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 5.26 (1H, $J_1 = J_2 = 3.1$ Hz, H-12), 5.10 (1H, ddd, $J_1 = 11.6$ Hz, $J_2 = 10.3$ Hz, $J_3 = 4.2$, H-2), 4.74 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-3), 4.06 y 3.99 (2H, sistema AB, $J = 11.0$ Hz, 2H-30), 2.80 (1H, dd, $J_1 = 13.7$ Hz, $J_2 = 4.2$ Hz, H-18), 2.06, 2.05 y 1.97 (3H cada uno, s, grupos AcO), 1.13 (3H, s, 3H-27), 1.05 (3H, s, 3H-25), 0.92 (3H, s, 3H-29), 0.89 (6H, s, 3H-23 y 3H-24) y 0.73 (3H, s, 3H-26). ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): ver tabla 8. HSQC y HMBC: ver tabla 15. ESI-EMAR, (m/z): $[M+1]^+$ 615.3893 ($C_{36}H_{55}O_8$, calc. 615.3897, ppm -0.6).

Ácido 2 α ,3 β -diacetoxiolean-11-oxo-12-en-28-oico (**61**). Sólido blanco, p.f. 130-132 °C. $[\alpha]_D = +20$ (c 1, $CHCl_3$). IR (KBr) ν_{max} : 1740, 1658, 1370, 1246, 1042 y 756 cm^{-1} . 1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 5.63 (1H, s, H-12), 5.22 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 10.3$ Hz, $J_3 = 4.7$ Hz, H-2), 4.71 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-3), 3.20 (1H, dd, $J_1 = 12.9$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-1), 2.97 (1H, dd, $J_1 = 13.8$ Hz, $J_2 = 4.0$ Hz, H-18), 2.37 (1H, s, H-9), 2.04 y 1.95 (3H cada uno, s, grupos AcO), 1.35 (3H, s, 3H-27), 1.23 (3H, s, 3H-25), 0.94 (6H, s, 3H-29 y 3H-30), 0.91 (6H, s, 3H-29 y 3H-30), 0.89 (3H, s, 3H-23). ^{13}C RMN ($CDCl_3$): ver tabla 8. HSQC y HMBC: ver tabla 15. ESI-EMAR, (m/z): $[M+1]^+$ 571.3634 ($C_{34}H_{51}O_7$, calc. 571.3635, ppm -0.1).

2 α ,3 β -Diacetoxi-11 α ,12 α -epoxiolean-28,13 β -olida (**62**). Sólido blanco, p.f. 151-153 °C. $[\alpha]_D = +19$ (c 1, $CHCl_3$). IR (KBr) ν_{max} : 1776, 1742, 1368, 1253, 1037, 931 y 756 cm^{-1} . 1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 5.15 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 10.3$ Hz, $J_3 = 4.5$ Hz, H-2), 4.77 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-3), 3.02 (2H, m, H-11 y H-12), 2.30 (2H, m, H-18 y H-1), 2.12 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 13.1$ Hz, $J_3 = 5.6$ Hz, H-16), 2.05 y 1.98 (3H cada uno, s, grupos AcO), 1.85 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 13.5$ Hz, H-19), 1.15 (3H, s, 3H-25), 1.08 (3H, s, 3H-27), 1.05 (3H, s, 3H-26), 0.99 (3H, s, 3H-29), 0.91 (6H, s, 3H-24 y 3H-30) y 0.89 (3H, s, 3H-23). ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): ver tabla 8. HSQC y HMBC: ver tabla 16. ESI-EMAR, (m/z): $[M+1]^+$ 571.3641 ($C_{34}H_{51}O_7$, calc. 571.3635, ppm 1.1).

2 α ,3 β ,30-Triacetoxi-11 α ,12 α -epoxiolean-28,13 β -olida (**63**): Sirupo. $[\alpha]_D = +14$ (c 1, $CHCl_3$). IR (NaCl) ν_{max} : 1774, 1741, 1370, 1242, 1036, 878 y 755 cm^{-1} . 1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 5.15

(1H, ddd, $J_1 = J_2 = 10.3$ Hz, $J_3 = 4.5$, H-2), 4.77 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-3), 4.20 y 3.78 (2H, sistema AB, $J = 10.5$ Hz, 2H-30), 3.03 (2H, m, H-11 y H-12), 2.32 (2H, m, H-18 y H-1), 2.06 (6H, s, grupos AcO), 1.98 (3H, s, grupo AcO), 1.82 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 13.7$ Hz, H-19), 1.16 (3H, s, 3H-25), 1.10 (3H, s, 3H-27), 1.06 (3H, s, 3H-26), 1.02 (3H, s, 3H-29), 0.92 (3H, s, 3H-24) y 0.89 (3H, s, 3H-23). ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): ver tabla 8. HSQC y HMBC: ver tabla 16. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 629.3693 ($\text{C}_{36}\text{H}_{53}\text{O}_9$, calc. 629.3690, ppm 0.5).

5.8.2.1 Acetilación del bromoderivado 27

El bromoderivado **27** (300 mg, 0.54 mmol) se acetiló con Ac_2O /Piridina (3 mL/3 mL) durante 24 horas. Una vez finalizada la reacción, se añadió agua y se extrajo varias veces con CH_2Cl_2 , lavando la fase orgánica con una disolución de KHCO_3 . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente a vacío. Por último, se purificó en columna aislandose 268 mg del ácido $2\alpha,3\beta$ -diacetoxi- 12α -Bromoolean- $28,13\beta$ -olida (**64**, 78%): Sólido blanco, p.f. 256-258 °C. $[\alpha]_D^{25} = +24$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 1773, 1741, 1368, 1253 y 756 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5.11 (1H, ddd, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 10.4$ Hz, $J_3 = 4.7$ Hz, H-2), 4.77 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-3), 4.28 (1H, dd, $J_1 = 3.8$ Hz, $J_2 = 2.2$ Hz, H-12), 2.40 (1H, ddd, $J_1 = 15.4$ Hz, $J_2 = 12.5$ Hz, $J_3 = 3.8$ Hz, H-11), 2.16 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 11.2$ Hz, $J_3 = 5.5$ Hz, H-16), 2.08 (1H, dd, $J_1 = 13.1$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H-1), 2.05 y 1.99 (3H cada uno, s grupos AcO), 1.44 (3H, s, 3H-27), 1.21 (3H, s, 3H-26), 1.03 (3H, s, 3H-25), 0.99 (3H, s, 3H-29) y 0.90 (9H, s, 3H-23, 3H-24 y 3H-30). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): ver tabla 8. HSQC y HMBC: ver tabla 16. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 635.2941 ($\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{BrO}_6$, calc. 635.2947, ppm -0,9).

5.8.2.2 Deshidrohalogenación de 64 con DBU

El producto **64** (300 mg, 0.48 mmol) se disuelve en *o*-xileno (15 mL) y después se agrega a una disolución de DBU (3.8 mL) y se mantiene a reflujo durante 13 horas. Una vez finalizada la reacción, se añadió acetato de etilo y se extrae con una disolución acuosa de HCl (5%). La fase orgánica se trata con una disolución acuosa de Na_2CO_3 (5%), se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora a vacío. Después de purificación cromatográfica se obtienen 67 mg del producto de partida **64** (22%), 29 mg del ácido $2\alpha,3\beta$ -diacetoxi- 12α -bromotaraxer-14-eno (**30**, 11%), 46 mg del diacetoxiderivado **59** (18%), 14 mg de ácido $2\alpha,3\beta$ -diacetoxioleana-9,12-dien-28-oico (**65**, 5%) y 15 mg de $2\alpha,3\beta$ -diacetoxioleana-11,13(18)-dien-28,19 β -olida (**66**, 6%). Cuando el diacetato **64** (200 mg, 0.32 mmol) se disolvió en *o*-xileno (10 mL) y se añadieron 2.5 mL de (DBU) (reactivos de primer uso) y la reacción se mantiene durante 13 horas a reflujo, se aíslan 170 mg del diacetoxiderivado **59** (97%).

Ácido $2\alpha,3\beta$ -diacetoxiolean-9,12-dien-28-oico (**65**). Sólido blanco, p.f. 130-132 °C. $[\alpha]_D^{25} = +19$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2937, 2360, 1741, 1368, 1249 y 757 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5.58 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-11), 5.55 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-12), 5.05 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 10.7$ Hz, $J_3 = 4.12$ Hz, H-2), 4.75 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-3), 2.05 y 1.99 (3H cada s, grupo AcO), 1.29 (3H, s, 3H-27), 1.00 (3H, s, 3H-26), 0.96 (3H, s, 3H-25), 0.94 (3H, s, 3H-30), 0.93 (3H, s, 3H-23), 0.92 (3H, s,

3H-24) y 0.91 (3H, s, 3H-29). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): ver tabla 8. HSQC y HMBC: ver tabla 17. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 555.3685 ($\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{O}_6$, calc. 555.3686, ppm -0.2).

2 α ,3 β -Diacetoxioleana-11,13(18)-dien-28,19 β -olida (**66**). Sólido blanco, p.f. 242-244 °C. $[\alpha]_D^{25} = +18$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2939, 2869, 1772, 1741, 1367, 770 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 6.14 (1H, dd, $J_1 = 10.2$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz, H-12), 5.72 (1H, dd, $J_1 = 10.2$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, H-11), 5.17 (1H, ddd, $J_1 = 11.6$ Hz, $J_2 = 10.3$ Hz, $J_3 = 4.5$ Hz, H-2), 4.78 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-3), 2.07 y 1.99 (3H cada s, grupo AcO), 1.10 (3H, s, 3H-29), 1.09 (3H, s, 3H-27), 1.02 (3H, s, 3H-25), 0.93 (3H, s, 3H-30), 0.91 (6H, s, 3H-23 y 3H-24), 0.77 (3H, s, 3H-26). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): ver tabla 8. HSQC y HMBC: ver tabla 17. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 553,3536 ($\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{O}_6$ calc. 553,3529 ppm 1,3).

5.8.2.3 Saponificación del diacetoxiderivado 59

El producto **59** (20 mg, 0.04 mmol) se disuelven en una mezcla de metanol/agua/KOH 100:70:5 y se mantiene la reacción durante 12 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción se diluye con agua la mezcla se extrae repetidamente con diclorometano, aislándose 15 mg del dihidroxiderivado **57** (80%).

5.8.2.4 Epoxidación de la mezcla de productos 30 y 59 con AMCPB

Una mezcla de los productos **30** y **59** (40 mg) disuelta en cloroformo, se trata con AMCPB (20 mg) durante 12 horas a temperatura ambiente. Después del procesar los productos y separarlos por cromatografía en columna se obtienen 16 mg la mezcla de partida (40%), 9 mg del epoxiderivado **62** (22%) y 13 mg del ácido 2 α ,3 β -diacetoxi-12 α -bromo-14 α ,15 α -epoxiolean-28-oico (**67**, 32%): Sólido blanco, p.f. 122-124 °C. $[\alpha]_D^{25} = +19$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2946, 1775, 1741, 1253, 871, 755 cm^{-1} . ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3): δ 5.13 (1H, ddd, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 10.5$ Hz, $J_3 = 4.4$ Hz, H-2), 4.75 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-3), 4.55 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-12), 3.20 (1H, d, $J = 6.2$ Hz, H-15), 2.50 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-16), 2.17 (1H, dd, $J_1 = 13.3$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, H-9), 2.06 y 1.99 (3H cada s, grupo AcO), 1.85 (1H, d, $J = 6.2$ Hz, H-16), 1.26 (3H, s, 3H-27), 1.06 (6H, s, 3H-25 y 3H-26), 0.92 (3H, s, 3H-29), 0.90 (3H, s, 3H-24), 0.89 (3H, s, 3H-23), 0.84 (3H, s, 3H-30). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): ver tabla 8. HSQC y HMBC: ver tabla 17. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 651.2891 ($\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_7\text{Br}$, calc. 651.2896 ppm -0.8).

5.8.2.5 Epoxidación del diacetoxiderivado 59

El producto **59** (70 mg, 0.13 mmol) se disuelve en cloruro de metileno (10 mL) y se añaden 2.5 mL de ácido peracético y unas gotas de etanol hasta desaparición de la turbidez, manteniendo la reacción con agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción se añaden 20 mL de agua, 30 mL de cloruro de metileno y se trata varias veces con una disolución saturada de NaHCO_3 hasta cese de burbujeo de CO_2 . La fase orgánica se seca con Na_2SO_4

anhidro y se evapora a vacío. Después de purificación cromatográfica se aíslan 40 mg del epóxiderivado **62** (54%).

5.9 BIOTRANSFORMACIÓN DE LOS ÉSTERES METÍLICOS

5.9.1 Incubación de oleanolato de metilo con *R. miehei*

El oleanolato de metilo (**7**, 150 mg, 0.32 mmol) se disolvió en 5 mL de EtOH y se adicionó a 5 Erlenmeyer que contenían el hongo *R. miehei*. Siguiendo los controles de biotransformación, la mezcla se filtró a los trece días y se extrajo en CH₂Cl₂. Posteriormente, el concentrado fue purificado por cromatografía en columna dando lugar a 80 mg del sustrato **7** (53%), 12 mg de 3β,7β,30-trihidroioleana-9,12-dien-28-oato de metilo **68** (7.5%), y una mezcla de metabolitos polares (18 mg), que tras su acetilación con Ac₂O (0.5 mL) en piridina (1 mL) durante 24 horas a temperatura ambiente da lugar a la obtención de 9 mg de 3β,7β,30-triacetoxioleana-9,12-dien-28-oato de metilo (**69**, 4.5%). La acetilación del metabolito **68** (12 mg) en las mismas condiciones que las utilizadas anteriormente origina 12 mg del triacetoxiderivado **69** (80%).

3β,7β,30-Trihidroioleana-9,12-dien-28-oato de metilo (**68**). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.60 (2H, s, sistema AB colapsado, H-11 y H-12), 4.04 (1H, dd, J₁= 11.3 Hz, J₂= 5.4 Hz, H-7), 3.65 (3H, s, COOCH₃), 3.60 y 3.54 (2H, sistema AB, J= 10.8 Hz, 2H-30), 3.23 (1H, dd, J₁= 11.6 Hz, J₂= 4.6 Hz, H-3), 2.97 (1H, dd, J₁= 14.0 Hz, J₂= 4.3 Hz, H-18), 1.15 (3H, s, 3H-25), 1.08 (3H, s, Me), 1.03 (3H, s, Me), 0.98 (3H, s, Me), 0.91 (3H, s, Me), y 0.80 (3H, s, Me). ¹³C RMN (500 MHz, CDCl₃): Ver tabla 9.

3β,7β,30-Triacetoxioleana-9,12-dien-28-oato de metilo (**69**). Sólido blanco, p.f. 154-156 °C. [α]_D²⁰ = +76 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max}: 3439, 1719, 1374, 1241 y 754 cm⁻¹. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.61 y 5.55 (2H, sistema AB, J= 5.9 Hz, H-11 y H-12), 5.20 (1H, dd, J₁= 11.3 Hz, J₂= 5.5 Hz, H-7), 4.50 (1H, dd, J₁= 11.7 Hz, J₂= 4.6 Hz, H-3), 4.05 y 4.00 (2H, sistema AB, J= 11.1 Hz, 2H-30), 3.65 (3H, s, COOCH₃), 2.98 (1H, dd, J₁= 13.2 Hz, J₂= 4.7 Hz, H-18), 2.07, 2.04 y 1.99 (3H cada uno, s, grupos acetato), 1.19 (3H, s, 3H-25), 1.06 (3H, s, 3H-27), 1.05 (3H, s, 3H-26), 0.93 (3H, s, 3H-29), 0.92 (3H, s, 3H-23) y 0.85 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): ver tabla 9. HSQC y HMBC: ver tabla 18. ESI-EMAR, (m/z): [M+1]⁺ 627.3146 (C₃₇H₅₅O₈, calc. 627.3165 ppm - 3.6).

5.9.2 Biotransformación del dieno **10** con *R. miehei*

El dieno **10** (500 mg, 1.07 mmol) se disolvió en 16 mL de EtOH y se distribuyó en 8 matraces Erlenmeyer con un cultivo de *R. miehei* previamente crecido durante 7 días. La mezcla se dejó en incubación durante 21 días, tras la cual se extrajo en continuo con diclorometano y el extracto concentrado se purificó en columna recuperándose 280 mg de producto de partida (**10**, 56%) y obteniéndose 40 mg de 3β,7β,15α,30-tetrahidroioleana-9,12-dien-28-oato de metilo (**70**, 7.2%). Sólido blanco, p.f. 133-135 °C. [α]_D²⁰ = +5 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max}: 3360, 1722, 1374, 1243,

756 cm^{-1} . ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 5.66 (1H, d, J = 6.2 Hz, H-11), 5.62 (1H, d, J = 6.2 Hz, H-12), 4.20 (1H, dd, J_1 = 7.3 Hz, J_2 = 4.8 Hz, H-15), 4.09 (1H, dd, J_1 = 6.5 Hz, J_2 = 5.1 Hz, H-7), 3.65 (3H, s, COOCH_3), 3.57 y 3.53 (2H, sistema AB, J = 10.8 Hz, 2H-30), 3.23 (1H, dd, J_1 = 7.2 Hz, J_2 = 4.6 Hz, H-3), 2.91 (1H, dd, J_1 = 9.2 Hz, J_2 = 4.4 Hz, H-18), 1.15 (3H, s, 3H-25), 1.08 (3H, s, 3H-27), 1.03 (3H, s, 3H-23), 1.01 (3H, s, 3H-26), 0.91 (3H, s, 3H-29) y 0.80 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): δ ver tabla. HSQC y HMBC: ver tabla 9. HSQC y HMBC: ver tabla 18. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 517.3521 ($\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{O}_6$ calc. 517.3527 ppm -1.1).

5.9.3 Biotransformación de malisnato de metilo (8)

El malisnato de metilo (**8**, 600 mg, 1.27 mmol), se disolvió en 40 mL de EtOH y se distribuyó en 20 matraces Erlenmeyer, manteniendo la incubación durante 25 días. Tras esto, la mezcla se filtró y se extrajo en continuo con CH_2Cl_2 . Posteriormente, el concentrado fue purificado por cromatografía en columna, recuperándose 258 mg de producto de partida (**8**, 43.2%), 45 mg de 2 α ,3 β ,30-trihidroxiolean-12-en-28-oato de metilo (**71**, 7.1%), 15 mg de 2 α ,3 β -dihidroxioleana-9,12-dien-28-oato de metilo (**72**, 2.3%) y una mezcla de productos que se acetiló con Ac_2O (3 mL) y piridina (1.5 mL) durante 24 horas a temperatura ambiente, aislándose 134 mg de 2 α ,3 β -diacetoxi-12-oleanen-28-oato de metilo (**73**, 17.8%), 20 mg de 2 α ,3 β ,30-triacetoxiolean-12-en-28-oato de metilo (**74**, 2.5%), 10 mg de 2 α ,3 β -diacetoxiolean-11-oxo-olean-12-en-28-oato de metilo (**75**, 1.4%) y 6 mg de 2 α ,3 β -diacetoxio-12-oxoolean-28-oato de metilo (**76**, 0.8%).

2 α ,3 β ,30-Trihidroxiolean-12-en-28-oato de metilo (**71**). Sólido blanco, p.f. descompone a 223 °C. $[\alpha]_D = +19$ (c 1, CHCl_3 :MeOH 2:1). IR (KBr) ν_{max} : 3454, 2980, 2873, 2342, 1387, 1219 y 772 cm^{-1} . ^1H RMN (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 5.39 (1H, dd, J_1 = 3.7 Hz, J_2 = 3.3 Hz, H-12), 4.12 (1H, ddd, J_1 = 11.1 Hz, J_2 = 9.4 Hz, J_3 = 4.3 Hz, H-2), 3.70 (3H, s, COOCH_3), 3.91 y 3.84 (2H, sistema AB, J = 10.6 Hz, 2H-30), 3.41 (1H, d, J = 9.4 Hz, H-3), 3.25 (1H, dd, J_1 = 12.4 Hz, J_2 = 6.2 Hz, H-18), 1.30 (3H, s, 3H-23), 1.27 (3H, s, 3H-27), 1.20 (3H, s, 3H-29), 1.12 (3H, s, 3H-24), 1.03 (3H, s, 3H-25) y 0.87 (3H, s, 3H-26). ^{13}C RMN (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): ver tabla 9. HSQC y HMBC: ver tabla 19. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 503.3720 ($\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{O}_5$ calc. 503.3736 ppm -3.2).

2 α ,3 β -Dihidroxioleana-9,12-dien-28-oato de metilo (**72**). Sólido blanco, p.f. 221–223 °C. $[\alpha]_D = +107$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 3433, 2946 y 1727 cm^{-1} . ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 5.61 (1H, d, J = 5.8 Hz, H-11), 5.56 (1H, d, J = 5.8 Hz, H-12), 3.74 (1H, ddd, J_1 = 11.6 Hz, J_2 = 9.6 Hz, J_3 = 4.3 Hz, H-2), 3.63 (3H, s, COOCH_3), 3.01 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-3), 2.32 (1H, dd, J_1 = 12.5 Hz, J_2 = 4.4 Hz, H-18), 1.21 (3H, s, 3H-25), 1.05 (3H, s, 3H-23), 0.99 (3H, s, 3H-27), 0.93 (3H, s, 3H-26), 0.92 (3H, s, 3H-30), 0.89 (3H, s, 3H-29) y 0.83 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): ver tabla 9. HSQC y HMBC: ver tabla 19. EMAR, (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 507.3446 ($\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_4\text{Na}$, calc. 507.3450).

2 α ,3 β -Diacetoxiolean-12-en-28-oato de metilo (**73**). Sólido blanco, p.f. 172-174 °C. $[\alpha]_D = +34$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2947, 2870 y 1741 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5.26 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 3.7$ Hz, H-12), 5.09 (1H, ddd, $J_1 = 11.6$ Hz, $J_2 = 10.3$ Hz, $J_3 = 4.9$ Hz, H-2), 4.73 (1H, d, $J = 10.3$

Hz, H-3), 3.60 (3H, s, COOCH₃), 2.85 (1H, dd, J₁= 14.0 Hz, J₂= 4.2 Hz, H-18), 2.03 y 1.96 (3H cada s, grupo AcO), 1.10 (3H, s, 3H-27), 1.03 (3H, s, 3H-25), 0.91 (3H, s, 3H-30), 0.89 (3H, s, 3H-24), 0.88 (6H, s, 3H-23 y 3H-29) y 0.70 (3H, s, 3H-26). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): ver tabla 9. HSQC y HMBC: ver tabla 19. EMAR, (*m/z*): [M+Na]⁺ 593.3823 (C₃₅H₅₄O₆Na, calc. 593.3818).

2α,3β,30-Triacetoxiolean-12-en-28-oato de metilo (**74**). Sólido blanco, p.f. 144-146 °C. [α]_D= +54 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max}: 3463, 2949, 2871, 1740, 1389, 1246, 823 y 755 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.25 (1H, dd, J₁= J₂= 3.4 Hz, H-12), 5.09 (1H, ddd, J₁= 11.0, J₂= 10.7 Hz, J₃= 4.7 Hz, H-2), 4.73 (1H, d, J= 10.7 Hz, H-3), 4.06 y 3.98 (2H, sistema AB, J= 11.0 Hz, 2H-30), 3.60 (3H, s, COOCH₃), 2.82 (1H, dd, J₁= 13.8 Hz, J₂= 4.2 Hz, H-18), 2.06, 2.04 y 1.97 (3H cada s, grupo AcO), 1.12 (3H, s, 3H-27), 1.05 (3H, s, 3H-25), 0.92 (3H, s, 3H-29), 0.90 (3H, s, 3H-24), 0.89 (3H, s, 3H-23) y 0.71 (3H, s, 3H-26). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): ver tabla 9. HSQC y HMBC: ver tabla 19. ESI-EMAR, (*m/z*): [M+1]⁺ 629.4058 (C₃₇H₅₇O₈ calc. 629.4053 ppm 0.8).

2α,3β-Diacetoxi-11-oxoolean-12-en-28-oato de metilo (**75**). Sólido blanco, p.f. 82-84 °C. [α]_D= +34 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max}: 2925, 1739, 1367, 1246 y 756 cm⁻¹. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 5.63 (1H, s, H-12), 5.21 (1H, ddd, J₁= J₂= 10.6 Hz, J₃= 4.5 Hz, H-2), 4.71 (1H, d, J= 10.6 Hz, H-3), 3.48 (3H, s, AcO), 3.19 (1H, dd, J₁= 12.9 Hz, J₂= 4.5 Hz, H-1), 2.96 (1H, dd, J₁= 13.78 Hz, J₂= 3.9 Hz, H-18), 2.06, 2.04 y 1.97 (3H cada s, grupo AcO), 1.35 (3H, s, 3H-27), 1.22 (3H, s, 3H-25), 0.94 (3H, s, 3H-30), 0.93 (3H, s, 3H-29), 0.91 (3H, s, 3H-26), 0.90 (3H, s, 3H-24) y 0.89 (3H, s, 3H-23). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): ver tabla 9. HSQC y HMBC: ver tabla 20. ESI-EMAR, (*m/z*): [M+1]⁺ 585.3792 (C₃₅H₅₃O₇ calc. 585.3791 ppm 0.2).

2α,3β-Diacetoxi-12-oxo-13β-olean-28-oato de metilo (**76**). Sólido blanco, p.f. 78-80 °C. [α]_D= +27 (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max}: 2925, 1738, 1368, 1246 y 755 cm⁻¹. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ 5.06 (1H, ddd, J₁= J₂= 10.7 Hz, J₃= 4.7 Hz, H-2), 4.73 (1H, d, J= 10.7 Hz, H-3), 4.06 y 3.98 (2H, sistema AB, J= 11.0 Hz, 2H-30), 3.68 (3H, s, COOCH₃), 2.78 (1H, dd, J₁= 10.1 Hz, J₂= 3.4 Hz, H-18), 2.60 (1H, d, J= 4.3 Hz, H-11), 2.05 y 1.98 (3H cada s, grupo AcO), 0.99 (3H, s, 3H-25), 0.97 (3H, s, 3H-30), 0.96 (3H, s, 3H-26), 0.93 (3H, s, 3H-27), 0.91 (3H, s, 3H-24), 0.90 (3H, s, 3H-29) y 0.89 (3H, s, 3H-23). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃): ver tabla 10. HSQC y HMBC: ver tabla 20. ESI-EMAR, (*m/z*): [M+1]⁺ 587.3932 (C₃₅H₅₅O₇ calc. 587.3948 ppm -2.7).

5.9.4 Biotransformación del epóxiderivado 32.

El epóxiderivado **32** (150 mg, 0.30 mmol) se disolvió en 10 mL de etanol y se introdujo en 5 matraces Erlenmeyer que contenían el medio con *R. miehei*, añadiendo para ello, 1 mL de sustrato disuelto por cada Erlenmeyer. La incubación se mantuvo durante 25 días. Una vez recuperado los productos por extracción, se separaron mediante cromatografía en columna obteniendo 32 mg de 2α,3β,7β-trihidroxi-12-oxo-olean-28,13β-olida (**77**, 21.3%) y una serie de fracciones con mezclas de metabolitos que se juntaron y se disolvieron en 2 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético. Después de la purificación por cromatografía en columna se aislaron 10 mg de 2α,3β-diacetoxi-12-oxoolean-28,13β-olida (**44**, 5.9%), 6 mg de 2α,3β,7β-triacetoxi-12-oxo-

olean-28,13 β -olida (**78**, 3.2%) y 20 mg de 2 α ,3 β ,30-triacetoxi-12-oxoolean-28-oato de metilo (**79**, 10.4%).

2 α ,3 β ,7 β -Trihidroxi-12-oxoolean-28,13 β -olida (**77**). Sólido blanco, p.f. 133-135 °C. $[\alpha]_D^{+2}$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 2926, 2359, 1716, 1373, 1219 y 772 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 3.86 (1H, dd, J₁= 10.6 Hz, J₂= 5.0 Hz, H-7), 3.64 (1H, m, H-2), 2.94 (1H, d, J= 9.5 Hz, H-3), 2.72 (1H, dd, J₁= J₂= 14.1 Hz, H-11), 2.47 (1H, dd, J₁= J₂= 8.2 Hz, H-18), 2.32 (1H, dd, J₁= 14.1 Hz, J₂= 2.7 Hz, H-11), 1.96 (1H, dd, J₁= 12.4 Hz, J₂= 4.5 Hz, H-1), 1.42 (1H, dd, J₁= 14.1 Hz, J₂= 2.7 Hz, H-9), 1.34 (3H, s, 3H-26), 1.05 (3H, s, 3H-27), 1.02 (3H, s, 3H-23), 0.97 (3H, s, 3H-29), 0.96 (3H, s, 3H-25), 0.94 (3H, s, 3H-30) y 0.81 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): ver tabla 10. HSQC y HMBC: ver tabla 20. ESI-EMAR, (*m/z*): [M+1]⁺ 503.3320 (C₃₀H₄₇O₆, calc. 503.3303 ppm 2.6).

2 α ,3 β ,7 β -Triacetoxi-12-oxoolean-28,13 β -olida (**78**). Sólido blanco, p.f. 209-211 °C. $[\alpha]_D^{+35}$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 2949, 2866, 1735, 1370, 1246 y 769 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.11 (1H, dd, J₁= 10.7 Hz, J₂= 5.1, H-7), 5.05 (1H, ddd, J₁= J₂= 10.4 Hz, J₃= 4.3 Hz, H-2), 4.72 (1H, d, J= 10.4 Hz, H-3) 2.85 (1H, dd, J₁= J₂= 14.3 Hz, H-11), 2.49 (1H, dd, J₁= 11.2 Hz, J₂= 4.8 Hz, H-18), 2.31 (1H, dd, J₁= 14.3 Hz, J₂= 2.9 Hz, H-11), 2.02 (3H, s) y 1.97 (6H, s) (grupos AcO), 1.44 (3H, s, 3H-26), 1.06 (3H, s, 3H-25), 1.03 (3H, s, 3H-27), 0.96 (6H, s, 3H-29) 0.93 (3H, s, 3H-30), 0.89 (3H, s, 3H-24) y 0.88 (3H, s, 3H-23). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ Ver tabla 4. HSQC y HMBC: ver tabla. ESI-EMAR, (*m/z*): [M+1]⁺ 629.3699 (C₃₆H₅₃O₉, calc. 629.3690 ppm 1.4).

2 α ,3 β ,30-Triacetoxi-12-oxoolean-28-oato de metilo (**79**). Sólido blanco, p.f. 150-152 °C. $[\alpha]_D^{-5}$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 2958, 2359, 1790, 1735, 1372, 1240, 772 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.05 (1H, ddd, J₁= J₂= 10.4 Hz, J₃= 4.6 Hz, H-2), 4.71 (1H, d, J= 10.4 Hz, H-3), 4.18 y 3.96 (2H, sistema AB, J= 11.1 Hz, 2H-30), 3.66 (3H, s, grupo MeO), 2.68 (1H, m, H-18), 2.58 (1H, d, J= 4.4 Hz, H-13), 2.12, 2.04 y 1.96 (3H cada uno, s, grupos AcO), 0.98 (3H, s, 3H-26), 0.95 (3H, s, 3H-25), 0.93 (6H, s, 3H-27 y 3H-30), 0.90 (3H, s, 3H-24) y 0.89 (3H, s, 3H-23). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): ver tabla 10. HSQC y HMBC: ver tabla 21. ESI-EMAR, (*m/z*): [M+1]⁺ 645.4011 (C₃₇H₅₇O₉, calc. 645.4003 ppm 1.2).

5.10 BIOTRANSFORMACIÓN DE LAS LACTONAS

5.10.1 Incubación de oleanderolida (**35**) con *R. miehei*

500 mg de oleanderolida (**35**, 1.06 mmol) se disuelve en 35 mL de etanol y se introduce en 17 matraces Erlenmeyer que contienen el medio con *R. miehei* añadiendo 2 mL de sustrato disuelto por cada Erlenmeyer. La incubación se mantiene durante 25 días. Una vez recuperado los productos se separan mediante cromatografía en columna obteniéndose 295 mg del sustrato **35** inalterado (59%) y 86 mg de 3 β ,7 β -dihidroiolean-28,13 β -olida (**80**, 16.6%) y una fracción polar que tras acetilación con Ac₂O (0.5 mL) en piridina (1 mL) a temperatura ambiente durante 24 horas aislándose 8 mg de 3 β ,7 β ,12 α ,15 β -tetraacetoxiolean-28,13 β -olida (**81**, 1.1%).

3 β ,7 β ,12 α -Trihidroxiolean-28,13 β -olida (**80**). Sólido blanco, p.f. 253-255 °C. $[\alpha]_D = +14$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 3480, 1750, 1388, 947 y 756 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 3.92 (1H, dd, $J_1 = 10.8$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-7), 3.83 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 2.7$ Hz, H-12), 3.23 (1H, dd, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-3), 2.14 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 13.3$ Hz, $J_3 = 5.7$ Hz, H-16), 1.88 (1H, dd, $J_1 = 9.6$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz, H-19), 1.39 (3H, s, 3H-27), 1.17 (3H, s, 3H-26), 1.00 (3H, s, 3H-23), 0.99 (3H, s, 3H-29), 0.90 (3H, s, 3H-30), 0.87 (3H, s, 3H-25), 0.78 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃): ver tabla 10. HSQC y HMBC: ver tabla 21. ESI-EMAR, (m/z): $[M+1]^+$ 489.3668 (C₃₀H₄₉O₅, calc. 489.3580 ppm -2.5).

15 β -hidroxi-3 β ,7 β ,12 α -Triacetoxiolean-28,13 β -olida (**81**). Sólido blanco, p.f. 131-133 °C. $[\alpha]_D = +20$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 2931, 1732, 1369, 1241, 755 cm⁻¹. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ 4.98 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 2.8$ Hz, H-12), 4.97 (1H, dd, $J_1 = 10.8$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-7), 4.48 (1H, dd, $J_1 = 11.0$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, H-3), 4.11 (1H, dd, $J_1 = 10.6$ Hz, $J_2 = 6.8$ Hz, H-15), 2.13, 2.05 y 1.99 (3H cada s, grupo acetato), 1.31 (3H, s, 3H-26), 1.22 (3H, s, 3H-27), 0.97 (3H, s, 3H-29), 0.91 (3H, s, 3H-25), 0.90 (3H, s, 3H-23), 0.83 (3H, s, 3H-24), 0.81 (3H, s, 3H-30). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃): ver tabla 10. HSQC y HMBC: ver tabla 21. ESI-EMAR, (m/z): $[M+1]^+$ 673.3944 (C₃₈H₅₇O₁₀, calc. 673.3952 ppm -1.2).

5.10.2 Incubación de la lactona **41** con *R. miehei*

La lactona **41** (350 mg, 0.72 mmol) se disolvió en 24 mL de etanol y se adicionó a 12 cultivos de *Rhizomucor miehei*. La incubación se mantuvo durante 13 días. Una vez procesada, la mezcla obtenida se separó mediante cromatografía en columna, aislándose 20 mg del producto de partida **41** (5.7%), 80 mg del metabolito 2 α ,3 β ,7 β ,12 α -tetrahidroxiolean-28,13 β -olida (**82**, 22%), y una mezcla de metabolitos que se acetiló con Ac₂O en piridina para dar lugar a 21 mg de 2 α ,3 β ,7 β ,12 α -tetraacetoxiolean-28,13 β -olida (**83**, 4.3%), 45 mg de 2 α ,3 β ,12 α ,30-tetraacetoxiolean-28,13 β -olida (**84**, 9.3%), 13 mg de 2 α ,3 β ,12 α ,26-tetraacetoxiolean-28,13 β -olida (2.7%, **85**), 5 mg de 2 α ,3 β ,7 β ,12 α ,26-pentaacetoxiolean-28,13 β -olida (1%, **86**) y 73 mg del ácido 2 α ,3 β ,7 β -triacetoxi-12-oxo-13 β -olean-28-oico (**87**, 16.1%).

2 α ,3 β ,7 β ,12 α -Tetrahidroxiolean-28,13 β -olida (**82**). Sólido blanco, p.f. 149-151 °C. $[\alpha]_D = +10$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 3382, 2365, 1749, 1317, 756 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 3.99 (1H, dd, $J_1 = 10.7$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, H-7), 3.86 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 2.7$ Hz, H-12), 3.75 (1H, ddd, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz, $J_3 = 4.6$ Hz, H-2), 3.04 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 1.48 (3H, s, 3H-27), 1.23 (3H, s, 3H-26), 1.11 (3H, s, 3H-23), 1.01 (3H, s, 3H-25), 1.07 (3H, s, 3H-29), 0.99 (3H, s, 3H-30), 0.89 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): ver tabla 11. HSQC y HMBC: ver tabla 22. ESI-EMAR, (m/z): $[M+1]^+$ 505.33499 (C₃₀H₄₉O₆, calc. 505.3529 ppm -5.9).

2 α ,3 β ,7 β ,12 α -Tetraacetoxiolean-28,13 β -olida (**83**). Sólido blanco, p.f. 161-163 °C. $[\alpha]_D = -10$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 2956, 2360, 1776, 1371, 1245 y 757 cm⁻¹. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.16 (1H, dd, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, H-7), 5.13 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 10.8$ Hz, $J_3 = 5.0$ Hz, H-2), 5.00 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 2.8$ Hz, H-12), 4.74 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-3), 2.12 (3H, s, grupo AcO), 2.05 (3H, s,

grupo AcO), 1.99 (3H, s, grupo AcO), 1.98 (3H, s, grupo AcO), 1.34 (3H, s, 3H-27), 1.30 (3H, s, 3H-26), 1.03 (3H, s, 3H-25), 0.96 (3H, s, 3H-29), 0.91 (3H, s, 3H-23), 0.89 (3H, s, 3H-24), 0.82 (3H, s, 3H-30). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): ver tabla 11. HSQC y HMBC: ver tabla 22. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 673,3964 ($\text{C}_{38}\text{H}_{57}\text{O}_{10}$, calc. 673,3952 ppm 1,8).

2 α ,3 β ,12 α ,30-Tetraacetoxiolean-28,13 β -olida (**84**). Sólido blanco, pf. 195-197 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = +17$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2936, 2362, 1742, 1371, 1250, 969 y 769 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5.13 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 10.9$ Hz, $J_3 = 4.5$ Hz, H-2), 5.00 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 2.8$ Hz, H-12), 4.73 (1H, d, $J = 10.41$ Hz, H-3), 4.00 y 3.75 (2H, sistema AB, $J = 11.4$ Hz, 2H-30), 2.13 (3H, s, grupo AcO), 2.06 (6H, s, grupo AcO), 1.99 (3H, s, grupo AcO), 1.30 (3H, s, 3H-27), 1.16 (3H, s, 3H-26), 1.01 (3H, s, 3H-25), 0.99 (3H, s, 3H-29), 0.90 (6H, s, 3H-23 y 3H-24). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): ver tabla 11. HSQC y HMBC: ver tabla 22. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 673.3949 ($\text{C}_{38}\text{H}_{57}\text{O}_{10}$, calc. 673.3952 ppm -0.4).

2 α ,3 β ,12 α ,26-Tetraacetoxiolean-28,13 β -olida (**85**). Sólido blanco, p.f. 142-144 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = -49$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2937, 2867, 1779, 1370, 1234 y 771 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5.14 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 10.6$ Hz, $J_3 = 4.5$ Hz, H-2), 5.09 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 2.8$ Hz, H-12), 4.91 y 4.75 (2H, sistema AB, $J = 12.8$ Hz, 2H-26), 4.73 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-3), 2.11 (3H, s, grupo AcO), 2.05 (3H, s, grupo AcO), 2.02 (3H, s, grupo AcO), 1.99 (3H, s, grupo AcO), 1.28 (3H, s, 3H-27), 1.14 (3H, s, 3H-25), 0.97 (3H, s, 3H-29), 0.89 (6H, s, 3H-23 y 3H-24), 0.82 (3H, s, 3H-30). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): ver tabla 11. HSQC y HMBC: ver tabla 23. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 673.3961 ($\text{C}_{38}\text{H}_{57}\text{O}_{10}$, calc. 673.3952 ppm 1.3).

2 α ,3 β ,7 β ,12 α ,26-Pentaacetoxiolean-28,13 β -olida (**86**). Sólido blanco, p.f. 125-127 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = -36$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2963, 2342, 1741, 1368, 1231 y 771 cm^{-1} . ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ 5.20 (1H, dd, $J_1 = 10.7$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, H-7), 5.14 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 10.7$ Hz, $J_3 = 4.2$ Hz, H-2), 5.04 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 2.8$ Hz, H-12), 4.90 y 4.83 (2H, sistema AB, $J = 13.59$ Hz, 2H-26), 4.76 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, H-3), 2.13 (3H, s, grupo AcO), 2.06 (6H, s, grupo AcO), 2.00 (3H, s, grupo AcO), 1.97 (3H, s, grupo AcO), 1.37 (3H, s, 3H-29), 1.15 (3H, s, 3H-25), 0.97 (3H, s, 3H-29), 0.92 (3H, s, 3H-24), 0.91 (3H, s, 3H-23), 0.82 (3H, s, 3H-30). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): ver tabla 11. HSQC y HMBC: ver tabla 23. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 731.4028 ($\text{C}_{40}\text{H}_{59}\text{O}_{12}$, calc. 731.4007 ppm 2.9).

Ácido 2 α ,3 β ,7 β -triacetoxi-12-oxo-13 β -olean-28-oico (**87**). Sólido blanco, p.f. 133-135 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = +2$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2926, 2359, 1716, 1373, 1219 y 772 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 5.06 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 10.6$ Hz, $J_3 = 5.0$ Hz, H-2), 5.07 (1H, dd, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, H-7), 4.73 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-3), 2.76 (1H, dd, $J_1 = 13.2$ Hz, $J_2 = 5.0$ Hz, H-18), 2.66 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, H-13), 2.04 (3H, s, grupo AcO), 2.00 (3H, s, grupo AcO), 1.97 (3H, s, grupo AcO), 1.12 (3H, s, 3H-26), 1.01 (6H, s, 3H-25, 3H-27), 0.95 (3H, s, 3H-30), 0.90 (6H, s, 3H-23, 3H-29), 0.89 (3H, s, 3H-24). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): ver tabla 11. HSQC y HMBC: ver tabla 23. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 631.3699 ($\text{C}_{36}\text{H}_{55}\text{O}_9$, calc. 631.3690 ppm 1.4).

5.11. INCUBACIÓN DE LOS 28-HIDROXIDERIVADOS

5.11.1 Incubación de eritrodíol (**45**) con *R. miehei*

El eritrodíol (**45**, 200 mg, 0.45 mmol) disuelto en 14 mL de EtOH se distribuye en 7 Erlenmeyer con cultivo de *R. miehei* y se incubó durante quince días. Después de la purificación cromatográfica de la mezcla obtenida se obtuvieron 80 mg del producto de partida **45** (40%), 26 mg de 13 β ,28-epoxi-3 β ,7 β ,15 β ,30-tetrahidroxiolean-11-eno (**88**, 11.8%), 43 mg 3 β ,7 β ,15 β ,30-tetrahidroxiolean-12-eno (**89**, 19%) y una mezcla polar de metabolitos que se acetiló con Ac₂O (0.5 mL) en piridina (1 mL), aislándose 6 mg de 3 β -acetoxi-13 β ,28-epoxiolean-11-eno (**90**, 2.6%) y 13 mg de 3 β ,28-diacetoxiolean-12-en-11-ona (**91**, 5.3%).

13 β ,28-Epoxi-3 β ,7 β ,15 β ,30-tetrahidroxiolean-11-eno (**88**). Sólido blanco, p.f. 163-165 °C. $[\alpha]_D^{25} = +41$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 3347, 2360, 1389, 1216, 756 y 668 cm⁻¹. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ 5.80 (1H, dd, J₁= 10.3 Hz, J₂= 1.1 Hz, H-11), 5.42 (1H, dd, J₁= 10.3 Hz, J₂= 3.1 Hz, H-12), 4.26 (1H, dd, J₁= 11.2 Hz, J₂= 6.0 Hz, H-15), 3.89 (1H, dd, J₁= 10.8 Hz, J₂= 4.8 Hz, H-7), 3.70 y 3.23 (2H, sistema AB, J= 7.0 Hz, 2H-28), 3.55 y 3.42 (2H, sistema AB, J= 10.9 Hz, 2H-30), 3.21 (1H, dd, J₁= 11.3 Hz, J₂= 4.7 Hz, H-3), 1.98 (1H, dd, J₁= J₂= 11.2 Hz, H-16), 1.15 (3H, s, 3H-26), 1.00 (3H, s, 3H-23), 0.97 (3H, s, 3H-29), 0.96 (3H, s, 3H-27), 0.88 (3H, s, 3H-25) y 0.78 (3H, s, 3H-24). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃): ver tabla 12. HSQC y HMBC: ver tabla 23. ESI-EMAR, (*m/z*): [M+1]⁺ 489.3707 (C₃₀H₄₉O₅, calc. 489.3736 ppm -5.9).

3 β ,7 β ,15 β ,28,30-Tetrahidroxiolean-12-eno (**89**). Sólido blanco, p.f. 144-146 °C. $[\alpha]_D^{25} = +46$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 3315, 2360, 1736, 1365, 1240 y 754 cm⁻¹. ¹H RMN (600 MHz, C₅D₅N): δ 5.49 (1H, dd, J₁= J₂= 3.5 Hz, H-12), 4.85 (1H, dd, J₁= 12.2 Hz, J₂= 5.0 Hz, H-15), 4.38 (1H, dd, J₁= 11.1 Hz, J₂= 4.7 Hz, H-7), 3.96 y 3.72 (2H, sistema AB, J= 10.6 Hz, 2H-28), 3.97 y 3.92 (2H, sistema AB, J= 10.6 Hz, 2H-30), 3.49 (1H, dd, J₁= 10.0 Hz, J₂= 6.0 Hz, H-3), 2.57 (1H, dd, J₁= 13.7 Hz, J₂= 3.8 Hz, H-18), 2.51 (1H, dd, J₁= J₂= 12.2 Hz, H-16), 2.07 (1H, dd, J₁= J₂= 13.7 Hz, H-19), 1.67 (3H, s, 3H-27), 1.27 (6H, s, 3H-23 y 3H-26), 1.22 (3H, s, 3H-29), 1.07 (3H, s, 3H-24) y 0.99 (3H, s, 3H-25). ¹³C RMN (150 MHz, C₅D₅N): ver tabla 12. HSQC y HMBC: ver tabla 24. ESI-EMAR, (*m/z*): [M+1]⁺ 491.3726 (C₃₀H₅₁O₅ calc. 491.3736 ppm -2.0).

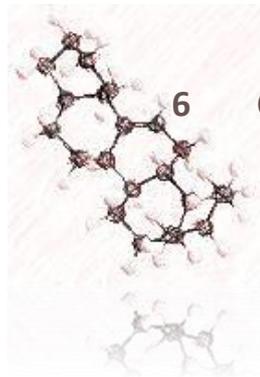
3 β -Acetoxi-13 β ,28-epoxiolean-11-eno. (**90**). Sólido blanco, p.f. 205-207 °C. $[\alpha]_D^{25} = +74$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 2925, 1737 y 1244 cm⁻¹. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 5.83 (1H, d, J= 10.6 Hz, H-12), 5.36 (1H, dd, J₁= 10.6, J₂= 3.1 Hz, H-11), 4.48 (1H, dd, J₁= 10.2 Hz, J₂= 6.3 Hz, H-3), 3.70 y 3.25 (2H, sistema AB, J= 6.7 Hz, 2H-28), 2.04 (3H, s, AcO), 1.08 (3H, s, 3H-26), 0.96 (3H, s, 3H-29), 0.93 (3H, s, 3H-27), 0.92 (3H, s, 3H-25), 0.87 (3H, s, 3H-30) y 0.85 (6H, s, 3H-23 y 3H-24). ¹³C RMN (150 MHz, CDCl₃): ver tabla 12. HSQC y HMBC: ver tabla 24. EMAR, (*m/z*): [M+1]⁺ 505.3669 (C₃₂H₅₀O₃Na, calc. 505.3658).

3 β ,28-Diacetoxiolean-12-en-11-ona (**91**). Sólido blanco, p.f. 85-87 °C. $[\alpha]_D^{25} = +16$ (c 1, CHCl₃). IR (KBr) ν_{max} : 2951, 2874, 1733, 1364, 771 cm⁻¹. ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃): δ 5.58 (1H, s,

H-12), 4.51 (1H, dd, $J_1 = 11.9$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, H-3), 3.95 y 3.69 (2H, sistemas AB, $J = 11.2$ Hz, 2H-28), 2.78 (1H, ddd, $J_1 = 13.7$ Hz, $J_2 = J_3 = 3.5$ Hz, H-1), 2.34 (1H, s, H-9), 2.25 (1H, dd, $J_1 = 13.4$ Hz, $J_2 = 3.9$ Hz, H-18), 2.06 (3H, s, grupo AcO), 2.05 (3H, s, grupo AcO), 1.38 (3H, s, 3H-27), 1.14 (3H, s, 3H-25), 1.12 (3H, s, 3H-26), 0.92 (3H, s, 3H-29), 0.89 (3H, s, 3H-30) y 0.87 (6H, s, 3H-23 y 3H-24). ^{13}C RMN (150 MHz, CDCl_3): ver tabla 12. HSQC y HMBC: ver tabla 24. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 541.3899 ($\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_5$, calc. 541.3893 ppm -5.9).

3.11.2 Biotransformación del trihidroxiderivado 46

El derivado **46** (100 mg, 0.22 mmol) se disolvió en 6 mL de EtOH y se distribuyó en 3 matraces Erlenmeyer añadiendo 2 mL por cada uno de ellos, dejándolos en incubación durante 15 días. Tras esto, tanto el extracto como el micelio se extrajeron con disolventes y después de la purificación cromatográfica se recuperan 20 mg del sustrato **46** (20%) y una mezcla de metabolitos polares que se acetilaron con Ac_2O (0.5 mL) en piridina (1 mL), obteniéndose 35 mg del $2\alpha,3\beta,28$ -triacetoxiolean-12-eno (**48**, 27.2%) y 15 mg de $2\alpha,3\beta,30$ -triacetoxi-13 β ,28-epoxiolean-11-eno (**92**, 11.4%): Sólido blanco, p.f. 198-200 °C. $[\alpha]_D = +23$ (c 1, CHCl_3). IR (KBr) ν_{max} : 2947, 1736, 1367, 1230, 1040 y 754 cm^{-1} . ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3): δ 5.82 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-11), 5.36 (1H, dd, $J_1 = 10.3$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz, H-12), 5.14 (1H, ddd, $J_1 = 10.8$ Hz, $J_2 = J_3 = 4.5$ Hz, H-2), 4.74 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-3), 4.02 y 3.91 (2H, sistema AB, $J = 11.1$ Hz, 2H-30), 3.70 y 3.25 (2H, sistema AB, $J = 6.7$ Hz, 2H-28), 2.23 (1H, dd, $J_1 = 12.4$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz, H-1), 2.06 (6H, s, 2 grupos AcO), 1.98 (3H, s, grupo AcO), 1.78 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 12.6$ Hz, $J_3 = 5.7$ Hz, H-15), 1.72 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 14.4$ Hz, H-21), 1.57 (1H, s, H-6), 1.13 (1H, dd, $J_1 = 13.8$ Hz, $J_2 = 5.7$ Hz, H-16) 1.07 (3H, s, 3H-26), 1.03 (3H, s, 3H-25), 0.98 (3H, s, 3H-29), 0.94 (3H, s, 3H-27), 0.90 (3H, s, 3H-24) y 0.88 (3H, s, 3H-23). ^{13}C RMN (150 MHz, CDCl_3): ver tabla 12. HSQC y HMBC: ver tabla 24. ESI-EMAR, (m/z): $[\text{M}+1]^+$ 599.3940 ($\text{C}_{36}\text{H}_{55}\text{O}_7$, calc. 599.3948 ppm -1.3).



CONCLUSIONES

1. Se han preparado derivados por vía química de los ácidos oleanólico y máslnico con buen rendimiento para ser utilizados como sustratos en procesos de biotransformación: Ésteres metílicos en C-28, hidroxiderivados en C-28, 12-hidroxi-28,13 β -olidas, 9,12-dienoderivados.

2. El tratamiento de ácido oleanólico y maslnico con Br₂ origina diversos derivados dependiendo del tiempo de reacción. A 30 minutos se obtiene las correspondientes 12 α -bromoolean-28,13 β -olidas con buen rendimiento mientras que a tiempo de reacción mayores se obtienen mezclas de productos en el caso del ácido oleanólico, destacando el reagrupamiento de oleanano a taraxerano y en el caso del ácido maslnico se obtiene un 12 α ,15 β -dibromoolean-28,13 β -olida. Por otro lado, la reacción de bromación del ácido oleanólico con NBS en condiciones anhidras origina mayoritariamente el oleana-9,12-dieno procedente de la bromación alílica radicalaria en C-11 y posterior deshidrobromación. En condiciones no anhidras la anterior reacción compite con la formación de un sistema α,β -insaturado en el anillo C que implica una participación del agua existente en el medio para dar un derivado hidroxilado en C-12 que posteriormente es oxidado.

3. Se ha establecido un procedimiento para la obtención de nuevos derivados con estructura de 3 β ,12 β -dihidroxiotaraxer-9-en-28,14 β -olidas a partir del ácido oleanólico .

4. El tratamiento con ozono del ácido oleanólico y del ácido maslnico y su 2,3,28-trihidroxiderivado da lugar a la participación del grupo carboxilo o del grupo hidroxilo en C-28 en dicha reacción para dar las correspondientes olean-28,13 β -olidas o los olean-28,13 β -epoxioleananos funcionalizados en C-12.

5. Se han realizado pruebas de biotransformación de derivados estructuralmente relacionados con el ácido oleanólico con los hongos filamentosos *Rhizopus nigricans*, *Neurospora*

crassa, *Rhizomucor miehei*, *Cunninghamella elegans*, *Curvularia lunata* y *Rhizopus oryzae*, siendo el hongo *R. miehei* el único que ha originado productos de biotransformación en casi todos los sustratos ensayados.

6. La acción de *R. miehei* sobre el ácido oleanólico origina en todos los casos biohidroxilaciones en C-30 y posteriormente introduce un segundo grupo hidroxilo en C-1 o en C-7 en ambos casos por la cara β .

7. La acción de *R. miehei* sobre el ácido maslínico tiene lugar principalmente sobre C-30, no produciéndose posteriores hidroxilaciones aislándose, sin embargo, otros productos como resultado de la acción del microorganismo sobre C-11 y posterior evolución hacia el 11-oxo derivado o bien la participación del grupo carboxilo de C-28 puede generar un anillo lactónico sobre C-13 y doble enlace entre C-11 y C-12. Además, *R. miehei* también puede generar 11 α ,12 α -epóxiderivados, que se han correlacionado químicamente con el ácido maslínico.

8. La acción de *R. miehei* sobre el oleanolato de metilo sólo origina un derivado con un sistema diénico conjugado en el anillo C que se encuentra dihidroxilado en C-30 y C-7 β . Cuando se utiliza como sustrato el derivado diénico, la acción se dirige a 30, 7 y 15, destacando que las hidroxilaciones en posiciones secundarias tienen lugar por caras diferentes: β -hidroxilación en C-7 y α -hidroxilación en C-15.

9. En el caso del maslinato de metilo, sólo se obtiene la monohidroxilación de C-30. Al no existir el grupo carboxilo sobre C-28, no se aíslan derivados ciclados y de nuevo se observa la actuación de *R. miehei* sobre C-11 que puede evolucionar hacia el sistema α,β -insaturado o el dieno conjugado. El aislamiento del 12-oxoderivado nos sugiere una posible acción del hongo hacia el doble enlace del sustrato que por epoxidación podría evolucionar hacia el metabolito aislado.

10. Cuando se incuba el 12 β ,13 β -epóxiderivado del maslinato de metilo se origina mayoritariamente la 7 β -hidroxilación frente a la hidroxilación en C-30, pero en todos los casos los productos proceden de la apertura del epóxido para dar 12-oxoderivados y lactonización sobre C-13 que implicaría hidrólisis del éster metílico y participación del ácido formado que origina la ciclación sobre C-13.

11. Cuando existe un anillo lactónico entre C-28 y C-13 la acción del microorganismo tiene lugar mayoritariamente hacia C-7 por la cara β , obteniéndose un producto minoritario con una segunda hidroxilación en C-15 por la cara α . Cuando además en C-2 existe un grupo hidroxilo además de los 7 β -hidroxiderivados se obtienen productos procedentes de la acción del microorganismo sobre C-30 o sobre C-26 y de la oxidación del grupo hidroxilo en C-12 con migración del protón de H-11 hacia C-13 y apertura del anillo lactónico.

12. Cuando se incuban el correspondiente 3 β ,28-dihidroxiderivado la acción del hongo se dirige hacia C-30, C-7 y C-15, siendo las hidroxilaciones que tienen lugar en posiciones secundarias por la cara β en C-7 y por la cara α en C-15. También se observa que un grupo nucleófilo como el grupo hidroxilo puede participar en la ciclación hacia C-13 a partir de un derivado funcionalizado en C-11 para dar el doble enlace C-11 y C-12 o el grupo carbonilo en C-11. En cambio la incubación del 2 α ,3 β ,28-trihidroxiderivado el microorganismo origina la monohidroxilación en C-30.

13. Aunque las biotransformaciones realizadas con *R. miehei* origina diferentes derivados biohidroxilados con bajo rendimiento en comparación con los procesos químicos, los productos obtenidos son difíciles de obtener por procedimientos exclusivamente químicos. Así, la combinación de procedimientos químicos y microbiológicos es un método útil para la obtención de nuevos derivados con esqueleto de oleanano relacionados estructuralmente con el ácido oleanólico.

ANEXO I:
TABLAS de ^1H RMN, HSQC y HMBC

Tabla 1. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos 1-6

Producto Posición	1	1	2	2	5	5	6	6
	HSQC ^b	HMBC ^a	HSQC ^b	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	1.64 y 1.01		1.92 y 0.90	2, 3, 5, 10, 25	1.62 y 1.05	2, 3, 10	2.00 y 1.05	2, 3, 5, 10, 25
H-2	1.63 y 1.57		3.62, ddd	3	1.62	3	5.09, ddd	3
H-3	3.15, dd	23, 24	2.91, d	2, 4, 23, 24	4.49, dd	AcO, 2, 4, 23, 24	4.74, d	2, 4, 23, 24
H-5	0.74,	4, 6, 23, 24	0.85,		0.84	4, 6, 23, 24	0.93	
2H-6	1.56 y 1.44		1.56 y 1.42		1.52 y 1.38	5, 7	1.53 y 1.27	
2H-7	1.77 y 1.56		1.50 y 1.31	5, 8, 9,	1.77 y 1.56	6, 8, 26	1.40 y 1.26	
H-9	1.59, dd	8, 10, 11, 25	1.64		1.57	8, 10, 11, 25, 26	1.58	
2H-11	1.90	9, 12,13	1.92	9, 12,13	1.88	8, 9, 12, 13	1.85	9, 12, 13
H-12	5.25 dd		5.26 dd	9, 11, 18,	5.27, dd	9, 11, 13, 14	5.25 dd	9, 18
2H-15	1.79 y 1.10	17	1.76	14, 17, 27	1.71 y 1.06	8, 14, 27	1.69 y 1.05	
2H-16	2.02, ddd y 1.62	15	2.02, ddd 1.61	14, 15, 18, 28	1.97 y 1.62	15, 17, 28	1.98 y 1.59	
H-18	2.85 dd	12,13,16,19,	2.86 dd	12, 13, 14, 16, 17,19, 28	2.81, dd	12, 13, 16, 17,19, 28	2.81 dd	12, 13, 14, 16, 17,19
2H-19	1.70, dd y 1.16	13, 18,	1.70 y 1.14	13, 16, 17, 18, 20, 21, 29, 30	1.61 y 1.15	17,18, 20, 21, 29, 30	1.57 y 1.11	13, 17, 18, 20, 29, 30
2H-21	1.39 y 1.22		1.42 y 1.20		1.34 y 1.22	20, 22, 29, 30	1.35 y 1.18	
2H-22	1.48 y 1.33		1.78 y 1.55	15, 17, 28, 21	1.44 y 1.30	17,16, 21, 28	1.78 y 1.50	
3H-23	0.98, s	3, 4, 5, 24	1.02, s	3,4, 5, 24	0.86, s	3, 4, 5, 24	0.89, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.78, s	3, 4, 5, 23	0.81, s	3, 4, 5, 23	0.85, s	3, 4, 5, 23	0.89, s	3, 4, 5, 23
3H-25	0.95, s	1, 5, 9, 10	1.01, s	1, 5, 9, 10	0.94, s	1, 5, 9, 10	1.04, s	1, 5, 9, 10
3H-26	0.82, s	7, 8, 9, 14	0.82, s	7, 8, 9, 14	0.74, s	7, 8, 9, 14	0.73, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.16, s	8, 13, 14, 15	1.17, s	8, 13, 14, 15	1.12, s	8, 13, 14, 15	1.11, s	8, 13, 14, 15
3H-29	0.91, s	19, 20, 21, 30	0.91, s	19, 20, 21, 30	0.90, s	19, 20, 21, 30	0.90, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.95, s	19, 20, 21, 29	0.95, s	19, 20, 21, 29	0.92, s	19, 20, 21, 29	0.92, s	19, 20, 21, 29
AcO					2.04, s		2.04, s	
AcO							1.97, s	

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.^b Desplazamientos químicos referenciados al CD₃OD.

Tabla 2. Desplazamientos químicos (δ , CDCl_3) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos 7-9

Producto Posición	7	7	8	8	9	9
	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	1.59 y 0.95	3, 4, 5, 8, 10, 25	1.97 y 0.90	2, 3, 5, 9, 10, 25	2.07 y 0.73	2, 3, 5, 10, 25
H-2	1.59	1, 3, 4, 10	3.67, ddd	3	3.23, ddd	3, CH ₃ O-
H-3	3.21, dd	1, 4, 10, 23, 24	2.99, d	1, 2, 4, 23, 24	3.05, d	2, 4, 23, 24
H-5	0.72		0.82	6, 7, 25	0.82	6, 7, 25
2H-6	1.53 y 1.37	5, 7, 8, 25, 10	1.53 y 1.39	4, 5, 10, 7	1.55 y 1.39	
2H-7	1.42 y 1.26	5, 6, 8, 14	1.43 y 1.29	5, 6, 8, 9, 26	1.45 y 1.29	6, 8, 9
H-9	1.53	10, 11, 25, 26	1.60	1, 5, 8, 10, 11, 25, 26	1.59	8, 10, 11, 25, 26
2H-11	1.86	8, 9, 12, 13, 14	1.93 y 1.90	9, 10, 12, 13	1.93 y 1.90	9
H-12	5.27, dd	9, 14, 11, 18	5.27, dd	9, 11, 14, 18	5.28, d	9, 11, 14,
2H-15	1.57 y 1.04	8, 14, 16, 27	1.60 y 1.04	13, 14, 16, 17, 27	1.60 y 1.04	13, 14, 17, 27
2H-16	1.95 y 1.60	15, 17, 22, 27, 28	1.96 y 1.61	14, 15, 17, 22, 28	1.97 y 1.62	28, 15, 17
H-18	2.85, dd	12, 13, 14, 16, 17, 19, 28	2.85, dd	12, 13, 17, 19, 14, 16, 28	2.86, dd	12, 13, 14, 16, 17, 19, 28
2H-19	1.62 y 1.12	13, 18, 20, 29, 30	1.62 y 1.14	17, 18, 20, 21, 29, 30	1.62 y 1.14	13, 14, 17, 18, 20, 29, 30
2H-21	1.32 y 1.17	28	1.32 y 1.18	19, 20, 22, 29, 30	1.33 y 1.18	
2H-22	1.68 y 1.50	18, 21	1.68 y 1.50	16, 17, 18, 22, 28	1.68 y 1.51	16, 21, 28
3H-23	0.98, s	3, 4, 5, 24	1.02, s	3, 4, 5, 24	1.04, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.77, s	3, 4, 5, 23	0.81, s	3, 4, 5, 23	0.83, s	3, 4, 5, 23
3H-25	0.90, s	1, 5, 9, 10	0.97, s	1, 5, 9, 10	0.96, s	1, 5, 9, 10
3H-26	0.71, s	7, 8, 9, 14	0.71, s	7, 8, 9, 14	0.72, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.12, s	8, 13, 14, 15	1.12, s	8, 13, 14, 15	1.12, s	8, 13, 14, 15
3H-29	0.89, s	19, 20, 21, 30	0.89, s	19, 20, 21, 30	0.89, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.92, s	19, 20, 21, 29	0.92, s	19, 20, 21, 29	0.92, s	19, 20, 21, 29
CH ₃ -O	3.61, s	28	3.61, s	28	3.62, s	
CH ₃ -O					3.37, s	2

*Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 3. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos 10-13

Producto Posición	10	10	11	11	12	12	13	13
	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	1.98 y 1.35	2, 3, 5, 10, 25	1.68 y 1.06	2, 3, 5, 9, 10, 25	2.57 dd y 2.03 dd	2, 3, 5, 9, 10, 25	1.70 y 1.07	2, 3, 9, 10, 25
2H-2	1.70 y 1.62	3	1.62	3, 9	5, 13, dd	1, 3	1.68 y 1.58	3
H-3	3.22, dd	4, 23, 24	3.23, dd	2, 4, 23, 24			3.26, dd	4, 23, 24
H-5	0.83	4, 6, 10, 23, 24, 25	0.78	6, 7, 9, 25	1.83, dd	1, 4, 9, 10, 23, 24, 25	0.78	4, 6, 9, 10, 23, 24, 25
2H-6	1.59 y 1.46		1.56 y 1.34	5, 8, 7	1.46 y 1.59		1.58 y 1.41	
2H-7	1.67 y 1.32	5, 6, 8, 26	1.59 y 1.28		1.62 y 1.34	5, 8, 9	2.19 y 1.60	6
H-9			1.74, dd	1, 5, 8, 10, 11, 12, 25, 26	1.96, dd	1, 8, 10, 11, 12, 25, 26	1.73	1, 5, 8, 10, 11, 12, 14, 25, 26
2H-11	5.58, d	8, 9, 10, 12, 13, 25	2.35 y 1.84	8, 9, 10, 12, 13	2.38 ddd y 1.69, ddd	8, 9, 12, 13	2.34 y 1.87	8, 9, 10, 12, 13
H-12	5.55, d	9, 11, 13, 14, 18, 27	4.28 dd	9, 11, 13, 14	4.27, dd	9, 11, 13, 18	4.30, dd	9, 11, 13, 14,
2H-15	1.74 y 1.11	14, 16, 17, 27	2.03 y 1.19		1.93 y 1.27	13, 14, 16, 17	4.59 dd	8, 14, 16, 27
2H-16	1.96 y 1.67	14, 15, 17, 18, 28	2.15, ddd 1.26	15, 17, 18, 28	2.15, dd y 1.23,	15, 17, 18, 28	2.58, dd 1.93	15, 17, 18, 28
H-18	3.01, dd	12, 13, 14, 16, 17, 28	1.96	12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 28	1.96	13, 14, 17, 28	2.00	12, 13, 14, 16, 17
2H-19	1.60 y 1.18	17, 18, 20, 21, 29, 30	2.32 y 2.03	13, 17, 18, 20, 21, 29, 30	1.31 dd y 1.99	17, 18, 20, 21, 29, 30	2.38 y 2.00	18, 20, 29, 30
2H-21	1.34 y 1.21	20, 22	1.36 y 1.24	20, 22, 29	1.26		1.30	
2H-22	1.69 y 1.60	16, 17, 21, 28	1.62	16, 17, 18, 19, 20, 21, 28	1.62	16, 17, 18, 20, 21, 28	1.64	16, 17, 18, 20, 21, 28
3H-23	1.01, s	3, 4, 5, 24	0.96, s	3, 4, 5, 24	1.13, s	3, 4, 5, 24	1.00, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.80, s	3, 4, 5, 23	0.76, s	3, 4, 5, 23	1.12, s	3, 4, 5, 23	0.77, s	3, 4, 5, 23
3H-25	1.16, s	1, 5, 9, 10	0.87, s	1, 5, 9, 10	0.84, s	1, 5, 9, 10	0.89, s	1, 5, 9, 10
3H-26	0.93, s	7, 8, 9, 14	1.20, s	7, 8, 9, 13, 14	1.18, s	7, 8, 9, 14	1.31, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.01, s	8, 13, 14, 15	1.42, s	8, 13, 14, 15	1.46, s	8, 13, 14, 15	1.60, s	8, 13, 14, 15
3H-29	0.89, s	19, 20, 21, 30	0.96, s	19, 20, 21, 30	0.95 s	19, 20, 21, 30	1.02, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.94, s	19, 20, 21, 29	0.88, s	19, 20, 21, 29	0.90, s	19, 20, 21, 29	0.90, s	19, 20, 21, 29
CH ₃ -O	3.64, s	28						

*Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 4. Desplazamientos químicos (δ , $CDCl_3$) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos 14-17

Producto Posición	14	14	15	15	16	16	17	17
	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	1.67 y 0.95	3,5,9,10	1.60 y 0.98	2,3,5,10	1.98 y 1.35	2,3,5,10,25	1.98 y 1.34	3, 5, 10
H-2	1.66 y 1.57	1, 3, 4, 10	1.65 y 1.57	1, 3, 4, 10	1.70 y 1.63	3,4	1.77 y 1.69	
H-3	3.21, dd	23, 24	3.19, dd	4, 23, 24	3.22 dd	1,4,23,24	3.21, dd	4, 23, 24
H-5	0.84	6, 7, 10, 24, 25	0.75	6, 7, 9, 10, 24, 25	0.83	4,6,23,24,25	0.91	4, 6, 7, 24
2H-6	1.63 y 1.50	5, 8, 7	1.67 y 1.50	5, 8, 7, 10	1.60 y 1.46	4, 5, 7	1.71 y 1.64	
2H-7	1.70 y 1.51	5, 6, 8, 9, 26	1.66 y 1.38	5, 6, 8, 9, 26	1.65 y 1.32	5, 6, 8, 14, 16	1.61 y 1.36	
H-9	2.26, dd	1, 8, 10, 11, 25, 26	1.87, dd	1, 5, 8, 10, 11, 12, 14, 25, 26				
2H-11	2.14 ddd y 1.36	8, 9,12,13	2.27 y 2.06	8, 9, 10, 12, 13	5.57 d	8, 9, 10, 12, 13, 25, 26	5.99, s	8, 10, 13
H-12	4.48, dd	14, 27	4.40, dd	9, 11, 14, 18, 27	5.55 d	9, 11, 14, 18, 27		
2H-15	5.79 dd	13, 14, 16, 17	1.98 y 1.70		1.81 y 1.14	8, 14, 17, 27	1.88 y 1.39	8, 14, 16, 27
2H-16	2.69, dd 1.93, ddd	12, 13, 14, 15, 17, 18, 22, 28	2.18 y 1.24	14, 17, 18, 22, 28	1.97 y 1.65	15, 17, 28	2.08 y 1.36	15, 17, 28
H-18	1.67	12, 14, 17, 19, 20	1.65	12, 13, 14, 17, 28	2.96 dd	12, 13, 14, 16, 19, 28	2.95, dd	13, 16, 17, 19
2H-19	1.37 y 1.15	18, 20, 29, 30	1.60 y 1.31	20, 29, 30	1.60 y 1.18	17, 18, 20, 21, 29, 30	1.60 y 1.28	18, 20, 29, 30
2H-21	1.47 y 1.28	22, 30	1.25 y 1.16	20, 30	1.34 y 1.22		1.54 y 1.33	
2H-22	1.89 y 1.54	16, 17, 18, 21, 28	2.10 y 1.37	14, 16, 28	1.77 y 1.32	16, 17, 21, 28	1.74 y 1.59	16, 17, 20, 21, 28
3H-23	0.95, s	3, 4, 5, 24	0.95, s	3, 4, 5, 24	1.00, s	3, 4, 5, 24	1.04, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.77, s	3, 4, 5, 23	0.77, s	3, 4, 5, 23	0.79, s	3, 4, 5, 23	0.84, s	3, 4, 5, 23
3H-25	0.87, s	1, 5, 9, 10	0.92, s	1, 5, 9, 10	1.15, s	1, 5, 9, 10	1.25, s	1, 5, 9, 10
3H-26	1.14, s	7, 8, 9, 14	1.16, s	7, 8, 9, 14	0.97, s	7, 8, 9, 14	1.45, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.39, s	12, 13, 14, 18	1.32, s	12, 13, 14, 18	1.01, s	12, 13, 14, 18	0.99, s	12, 13, 14, 18
3H-29	0.95 s	19, 20, 21, 30	0.95 s	19, 20, 21, 30	0.90, s	19, 20, 21, 30	0.95, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.90, s	19, 20, 21, 29	0.88, s	19, 20, 21, 29	0.94, s	19, 20, 21, 29	0.96, s	19, 20, 21, 29

*Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 5. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los 20-23

Producto Posición	20	20	21	21	22	22	23	23
	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	2.24, ddd y 1.79	2, 3, 5, 10, 25	1.50 y 0.87	3, 5, 10, 25	1.58 y 0.91	3, 10, 25	1.67 y 1.56	2, 3, 5, 10, 25
H-2	2.68, ddd y 2.51, ddd	1, 3, 10	1.60 y 1.58	1, 4, 3, 10	1.61		1.80 y 1.69	1, 3
H-3			3.15, dd	4, 23, 24	3.17, dd	4, 23, 24	3.24, dd	1, 2, 4, 23, 24
H-5	1.53	3, 4, 6, 10	0.63, dd	3, 4, 6, 7, 9, 10, 23, 24, 25	0.77		0.85	3, 4, 6, 24, 25
2H-6	1.78 y 1.66	5, 7, 10	1.46 y 1.40	7, 10	1.58 y 1.47	5, 9	1.70	5, 7, 10
2H-7	1.67 y 1.58		1.31 y 1.13	5, 8, 9	2.02 y 1.19		1.56	5, 6, 8, 26
H-9			1.30	1, 5, 8, 10, 11, 25, 26	1.58,			
2H-11	6.03, s	8, 9, 10, 13	1.83 y 1.68	8, 9, 10, 12, 13	1.88, m y 1.72	8, 9	5.65, s	8, 9, 10, 13
H-12			2.75, d	9, 11, 13, 18	3.70, d	9, 13, 14, 18, 27	4.86, s	9, 11, 13, 18, 27
2H-15	1.90 y 1.41	8, 14, 16, 27	2.22, ddd y 1.08	14, 16, 27	5.66, dd	8, 13, 16, 17	1.91	13, 14, 16, 17
2H-16	2.09, ddd y 1.36	15, 17, 28	1.88 y 1.79	15, 17, 18, 28	2.22, m y 1.99	14, 15, 17, 18, 22, 28	2.29, m y 1.24	15, 17, 18, 28
H-18	2.97, dd	12, 13, 14, 16, 17, 19	1.86	13, 14, 17, 28	2.79, dd	12, 13, 16, 17, 19, 28	1.78	12, 13, 16, 17, 19, 28
2H-19	1.61 y 1.29	17, 20, 29, 30	1.72 y 1.22	17, 18, 20, 21, 29, 30	1.28	17, 18, 20, 30	1.42 y 1.31	18, 20, 29, 30
2H-21	1.36 y 1.33	19, 20, 30, 22	1.34 y 1.23	17, 19, 20, 22, 29, 30	1.25 y 1.11	17, 19, 20, 29, 30	1.28 y 1.24	
2H-22	1.75 y 1.70	16, 17, 21, 28	1.91 y 1.36	16, 17, 28	1.73 y 1.50	16, 17, 20, 28	1.99 y 1.49	16, 17, 21, 28
3H-23	1.14, s	3, 4, 5, 24	0.94, s	3, 4, 5, 24	0.96, s,	3, 4, 5, 24	0.97, s	3, 4, 5, 24
3H-24	1.11, s	3, 4, 5, 23	0.74, s	3, 4, 5, 23	0.78, s	3, 4, 5, 23	0.82, s	3, 4, 5, 23
3H-25	1.38, s	1, 5, 9, 10	0.82, s	1, 5, 9, 10	0.93, s	1, 5, 9, 10	1.16, s	1, 5, 9, 10
3H-26	1.50, s	7, 8, 9, 14	0.95, s	7, 8, 9, 14	1.13, s	7, 8, 9, 14	1.30, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.01, s	8, 13, 14, 15	1.15, s	8, 13, 14, 15	0.96, s	12, 13, 14, 18	1.11, s	12, 13, 14, 18
3H-29	0.96, s	19, 20, 21, 30	0.91, s	19, 20, 21, 30	0.95, s	19, 20, 21, 30	0.98, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.96, s	19, 20, 21, 29	0.87, s	19, 20, 21, 29	0.93, s	19, 20, 21, 29	0.92, s	19, 20, 21, 29
OMe			3.68, s		3.60, s			

*Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 6. Desplazamientos químicos (δ , CDCl_3) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos 24-27

Producto Posición	24	24	25	25	26	26	27	27
	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	1.72 y 1.56	3, 5, 10	1.69	2, 3, 5, 10, 25	2.09 y 1.90	2, 3, 5, 10, 25	2.06, dd y 1.02	2, 3, 5, 10
H-2	1.78 y 1.70	1, 3, 10	1.77 y 1.69	1, 3, 10	2.81,ddd y 2.46, ddd	1, 3, 4, 10	3.73, ddd	
H-3	3.19, dd	2, 4, 23, 24	4.46, dd	AcO, 2, 4, 23, 24			3.04, dd	
H-5	0.80	24, 25	0.90	6, 10, 24, 25	1.39	1, 4, 10, 23, 24, 25	0.90	6, 10, 24, 25
2H-6	1.76 y 1.68		1.76 y 1.66	5, 10	2.00 y 1.72	5, 7	1.55 y 1.44	5, 7, 8
2H-7	1.53	5, 26	1.55	5, 6, 8, 9, 26	1.76	5, 6, 8, 9, 26	1.55 y 1.31	
H-9							1.82, m	1, 5, 8, 10, 11, 25
2H-11	5.80, d	8, 10, 12, 13	5.64, d	8, 9, 10, 12	5.89, s	8, 9, 10, 12, 13	2.41, ddd y 1.88	9, 12, 13
H-12	3.46, d	9, 11, 13, 14, 27	4.88, d	AcO, 9, 11, 13, 14, 27			4.30, dd	
2H-15	1.85	13, 14, 16	1.85	8, 13, 14, 16	1.96	8, 13, 14, 16	1.95 y 1.20	14, 16
2H-16	2.33, ddd y 1.22	15, 17, 18, 28	2.30 y 1.23	14,15, 17, 18, 28	2.35, ddd y 1.27	14, 15, 17, 18, 28	2.17, ddd 1.28	15, 17, 18, 28
H-18	2.66, dd	12, 13, 16, 17, 19	1.87	12, 13, 17, 19, 28	3.02 dd	12, 13, 17, 19, 27, 28	1.99	12, 13, 16, 17
2H-19	1.38 y 1.25	17, 18, 20, 21, 29, 30	1.37 y 1.26	18, 20, 29, 30	1.28	18, 20, 29, 30	2.32 y 1.99	17, 18, 20, 29, 30
2H-21	1.28	17, 20, 22, 29, 30	1.28	17, 20, 22, 29, 30	1.32 y 1.26	17, 20, 22, 29, 30	1.39 y 1.26	
2H-22	2.05, ddd y 1.47	16, 17, 21, 28	1.94 y 1.49	16, 17, 21, 28	2.01 y 1.48	16, 17, 21, 28	1.64	17, 18, 20, 29, 30
3H-23	0.96, s	3, 4, 5, 24	0.84, s	3, 4, 5, 24	1.10, s	3, 4, 5, 24	0.82, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.83, s	3, 4, 5, 23	0.91, s	3, 4, 5, 23	1.12, s	3, 4, 5, 23	1.04, s	3, 4, 5, 23
3H-25	1.19, s	1, 5, 9, 10	1.22, s	1, 5, 9, 10	1.48, s	1, 5, 9, 10	0.96, s	1, 5, 9, 10
3H-26	1.33, s	7, 8, 9, 14	1.36, s	7, 8, 9, 14	1.48, s	7, 8, 9, 14	1.22, s	7, 8, 9, 14
3H-27	0.93, s	12, 13, 14,18	1.03, s	12, 13, 14, 18	1.14, s	12,13,14,18	1.45, s	8, 13,14,15
3H-29	0.98, s	19, 20, 21, 30	0.97, s	19, 20, 21, 30	0.98, s	19,20,21,30	1.00, s	19,20,21,30
3H-30	0.94, s	19, 20,21,29	0.84, s	19, 20,21,29	1.02, s	19, 20,21,29	0.90, s	19, 20,21,29
AcO			2.05, s					
AcO			2.05, s					

*Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 7. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos **28-31**

Producto Posición	28	28	29	29	30	30	31	31
	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	2.06, dd y 1.02	2, 3, 5, 10, 25	2.08 y 1.16	2, 3, 5, 10, 25	2.08, dd y 1.05	2, 3, 5, 10, 25	2.07, dd y 0.92	2, 3, 5, 10, 25
H-2	3.71, ddd	3	5.10, ddd	3, AcO	5.16, ddd	3, AcO	3.74, ddd	
H-3	3.04, d	2, 4, 23, 24	4.78, d	2, 4, 23, 24, AcO	4.75, d	2, 4, 23, 24, AcO	3.02, d	2, 4, 23, 24
H-5	0.89	3, 6, 25	1.02		1.10	6, 7, 24	0.96	
2H-6	1.58 y 1.42		1.57 y 1.49		1.66 y 1.54		1.66 y 1.50	
2H-7	2.18 y 1.61	5, 6, 8, 9	2.19 y 1.61		1.74 y 1.54	5, 8, 9	1.74 y 1.57	6, 5, 9
H-9	1.78	1, 8, 10, 11, 12, 25, 26	1.80	1, 8, 10, 11, 12, 25, 26	2.36, dd		2.35, dd	8, 10, 11, 25, 26
2H-11	2.38 y 1.89	9, 12, 13	2.37 y 1.82	9, 12, 13	2.19, ddd y 1.42		2.19, ddd y 1.42	
H-12	4.30 dd	9, 11, 13, 14, 18	4.29, dd	9, 13,	4.49, dd		4.49 dd	9, 14
2H-15	4.58, dd	8, 14, 16, 27	4.57, dd	8, 14, 16, 27	5.81, dd	13, 16, 17	5.80, dd	13, 14, 16, 17,
2H-16	2.57, dd y 1.92	15, 17, 28	2.57, dd y 1.91, dd	15, 17, 28	2.70, dd y 1.94, ddd	14, 15, 17, 28	2.70, dd y 1.95, ddd	12, 14, 15, 17, 22, 28
H-18	1.99	12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 28	1.98	12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 28	1.68	13, 17	1.70	14, 17, 19
2H-19	2.38 y 1.98	16, 18, 20, 21, 30	2.37 y 1.98	17, 20, 21, 29, 30	1.37, dd y 1.15	20, 29, 30	1.39, dd y 1.16	18, 20, 29, 30
2H-21	1.29		1.29		1.48 y 1.29		1.50 y 1.29	
2H-22	1.63		1.62		1.90 y 1.57		1.90 y 1.55	
3H-23	1.04 s	3, 4, 5, 24	0.90, s	3, 4, 5, 24	0.87, s	3, 4, 5, 24	1.01, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.81, s	3, 4, 5, 23	0.89, s	3, 4, 5, 23	0.91, s	3, 4, 5, 23	0.82, s	3, 4, 5, 23
3H-25	0.96, s	1, 5, 9, 10	1.03, s	1, 5, 9, 10	1.03, s	1, 5, 9, 10	0.95, s	1, 5, 9, 10
3H-26	1.30 s	7, 8, 9, 14	1.30, s	7, 8, 9, 14	1.14, s	7, 8, 9, 14	1.14, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.60 s	8, 13, 14, 15	1.59, s	8, 13, 14, 15	1.38, s	12, 13, 14, 18	1.39, s	12, 13, 14, 18
3H-29	1.02, s	19, 20, 21, 30	1.02, s	19, 20, 21, 30	0.96, s	19, 20, 21, 30	0.96, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.90, s	19, 20, 21, 29	0.90, s	19, 20, 21, 29	0.91, s	19, 20, 21, 29	0.91, s	19, 20, 21, 29
Ac			2.05, s		2.08, s			
Ac			1.99, s		1.99, s			

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 8. Desplazamientos químicos (δ , $CDCl_3$) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos **32-35**

Producto Posición	32	32	33	33	34	34	35	35
	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	1.88 y 0.83	2, 3, 5, 9, 10, 25	1.72 y 1.05	5, 10, 25	2.01 y 2.17		1.72 y 0.98	2, 5, 10
H-2	3.66, ddd		1.66 y 1.59		3.72, ddd		1.64 y 1.58	1, 10, 25
H-3	2.96, d	2, 4, 23, 24	3.25, dd	23, 24	3.03, d	2, 4, 23, 24	3.22, dd	4, 23, 24
H-5	0.74		0.78	4, 6, 9, 10, 24	0.91	1	0.74	4, 7, 9, 10, 23, 24, 25
2H-6	1.49 y 1.43		1.56 y 1.43		1.54	10	1.54 y 1.44	5, 8
2H-7	1.41 y 1.23		1.57 y 1.30		1.32 y 0.99	8, 11, 13, 14	1.56 y 1.26	8, 26
H-9	1.38	5, 8, 10, 11, 25, 26	1.72	1, 8, 10, 11, 25, 26	1.80	10, 12, 13, 14, 25, 26	1.59	7, 11, 12, 25
2H-11	1.89 y 1.71	8, 9, 12, 13	2.25 y 1.74	8, 9, 10, 12, 13	1.63	7, 8, 18	2.01 y 1.47	9, 12, 13
H-12	2.78, d	9, 11, 13	4.18, dd		4.18 dd		3.88 dd	9, 13, 14
2H-15	2.22, ddd y 1.10	8, 14, 16, 27	1.95 y 1.21	14, 16, 27	1.22 y 1.94	14, 16, 17, 27	1.87 y 1.16	14, 16, 17, 18, 27
2H-16	1.92 y 1.78	14, 15, 17, 28	2.15 y 1.28	15, 17, 18, 28	1.46 y 1.53	13, 14, 17, 22	2.13, ddd 1.27	15, 17, 18, 28
H-18	1.88	13, 16, 17, 19, 28	2.02	12, 13, 14, 16, 17	2.00	14, 16, 17, 27	2.02	13, 14, 16, 19, 20
2H-19	1.76 y 1.24	18, 20, 29, 30	2.16 y 2.02	18, 20, 29, 30	0.98, 2.04	12, 13, 14, 16, 18, 20, 30	2.00 y 1.89	17, 18, 20, 29, 30
2H-21	1.34 y 1.12		1.37 y 1.29	20, 22	1.56 y 1.31	17, 18, 20, 22	1.38 y 1.27	17, 20, 22, 29, 30
2H-22	1.94 y 1.38	16, 17, 21, 28	1.64	16, 17, 18	2.33 y 1.74	16, 20	1.63	16, 17, 18, 20, 21, 28
3H-23	1.01, s	3, 4, 5, 24	1.00, s	3, 4, 5, 24	1.04, s	2, 3, 4, 5, 24	0.99, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.80, s	3, 4, 5, 23	0.78, s	3, 4, 5, 23	0.82, s	3, 4, 5, 23	0.78, s	3, 4, 5, 23
3H-25	0.91, s	1, 5, 9, 10	0.89, s	1, 5, 9, 10	0.96, s	1, 10, 11, 9	0.88, s	1, 5, 9, 10
3H-26	0.97, s	7, 8, 9, 14	1.20, s	7, 8, 9, 14	1.20, s	8, 11, 13, 14	1.15, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.17, s	8, 13, 14, 15	1.39, s	8, 13, 14, 15	1.39, s	13, 14, 15	1.30, s	8, 13, 14, 15
3H-29	0.93, s	19, 20, 21, 30	1.00, s	19, 20, 21, 30	0.99, s	18, 19, 20, 21, 22, 30	0.98, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.89, s	19, 20, 21, 29	0.90, s	19, 20, 21, 29	0.90, s	20, 21, 29	0.90, s	19, 20, 21, 29
MeO	3.69							

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 9. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos **36-39**

Producto Posición	36	36	37	37	38	38	39	39
	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	1.95 y 1.48	2, 3, 5, 9, 10, 25	1.55 y 0.91	3, 5, 10	1.77 y 0.95		1.89 y 1.39	2, 3, 5, 10, 25
H-2	2.47, m y 1.40	3, 9	1.61 y 1.53	1, 3, 4, 10	1.65 y 1.57	1, 3, 10	2.54, m y 2.41, m	1, 3, 10
H-3			3.20, dd	23, 24	3.20, dd	4, 23, 24		
H-5	1.38	4, 6, 7, 25	0.73	6, 7	0.67	4, 6, 10, 24	1.30	1, 4, 6, 7, 10, 23, 24, 25
2H-6	1.56 y 1.46		1.64 y 1.44	4, 5, 7, 8, 10	1.54 y 1.47		1.64 y 1.55	5, 8, 7
2H-7	1.60 y 1.30		1.39	5, 8, 9, 26	1.45 y 1.26	5, 9	1.53 y 1.38	5, 6, 8, 9, 26
H-9	1.72, dd	8, 10, 11, 12, 25, 26	1.62	1, 8, 10, 11, 25, 26	1.21	1, 5, 10, 11, 12, 25, 26	1.60	8, 10, 11, 25, 26
2H-11	2.05 y 1.47	12, 13	2.25, dd y 2.14, dd	8, 9, 12	1.91 y 1.51	9, 12, 13	2.77, dd y 2.36, m	8, 9, 10, 12
H-12	3.90, dd	9, 13, 14			3.74, dd	11, 13, 14, 18, 27		
H-13			2.68, d	11, 14, 18, 19, 27				
2H-15	1.88 y 1.19	13, 16, 17, 27	1.74 y 1.11		1.89 y 1.22	13, 14, 16, 17, 27	2.01 y 1.32	8, 14, 16, 27
2H-16	2.14, ddd 1.30	15, 17, 18, 28	1.90 y 1.64	17, 18	2.10, ddd y 1.32	14, 15, 17, 28	2.09 y 1.34	15, 17, 28
H-18	2.05	12, 13, 14, 16	2.76, ddd		2.70, dd		2.52, m	12, 13, 16, 17, 19
2H-19	2.32, m y 2.03	13, 17, 18, 20, 21, 29, 30	1.95 y 1.20	18, 20, 29, 30	1.76 y 1.41	17, 18, 20, 29, 30	1.66	18, 20, 29, 30
2H-21	1.36 y 1.24	20, 29, 20, 22	1.34 y 1.24	20, 29, 30	1.34		1.31	22, 30
2H-22	1.62	16, 17, 18, 19, 20, 21, 28	1.87 y 1.53	16, 17, 18, 21, 28	1.63	16, 17, 21	1.64	16, 17, 18, 21, 28
3H-23	1.09, s	3, 4, 5, 24	0.99, s	3, 4, 5, 24	0.98, s	3, 4, 5, 24	1.09, s	3, 4, 5, 24
3H-24	1.04, s	3, 4, 5, 23	0.77, s	3, 4, 5, 23	0.76, s	3, 4, 5, 23	1.05, s	3, 4, 5, 23
3H-25	0.98, s	1, 5, 9, 10	0.86, s	1, 5, 9, 10	0.87, s	1, 5, 9, 10	1.03, s	1, 5, 9, 10
3H-26	1.19, s	7, 8, 9, 13, 14	0.99, s	7, 8, 9, 14	1.14, s	7, 8, 9, 14	1.36, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.31, s	8, 13, 14, 15	0.94, s	12, 13, 14, 18	1.05, s	13, 8, 14, 15	0.97, s	12, 13, 14, 18
3H-29	0.98, s	19, 20, 21, 30	0.90, s	19, 20, 21, 30	0.98 s	19, 20, 21, 30	0.97, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.90, s	19, 20, 21, 29	0.97, s	19, 20, 21, 29	0.90, s	19, 20, 21, 29	0.95, s	19, 20, 21, 29

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 10. Desplazamientos químicos (δ , $CDCl_3$) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos 40-43

Producto Posición	40	40	41	41	42	42	43	43
	HSQC	HMBC ^a	HSQC ^b	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	2.00 y 0.89	2, 3, 5, 10, 25	2.07 y 0.93	2, 3, 5, 9, 10, 25	2.02 y 0.97	2, 3, 5, 10, 25	2.11 y 1.06	2, 3, 5, 9, 10, 25
H-2	3.70, ddd		3.70, ddd	3	5.11, ddd	AcO, 3	5.11, ddd	3
H-3	2.99, d	2, 4, 23, 24	3.01, d	1, 2, 4, 23, 24	4.72, d	AcO, 2, 4, 23, 24	4.75, d	AcO, 2, 4, 23, 24
H-5	0.81		0.85	1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 23, 24	0.96		0.99	
2H-6	160 y 1.52		1.54 y 1.46	5, 7	1.53 y 1.45		1.53 y 1.46	5, 8, 10
2H-7	150 y 1.35	5, 8, 9, 14, 26	1.56 y 1.26	5, 6, 8, 9, 26	1.57 y 1.28		1.57 y 1.28	
H-9	1.58	8, 10, 25, 26	1.65	1, 5, 8, 10, 11, 12, 25, 26	1.55	8, 10, 11, 25, 26	1.69	8, 10, 11, 12, 25, 26
2H-11	2.74, dd y 2.39, dd	8, 9, 10, 12	2.03 y 1.48	8, 9, 10, 12, 13	1.97 y 1.51	8, 9, 10, 12, 13	2.03 y 1.41	8, 9, 12, 13
H-12			3.89, sa	8, 9, 12, 13	5.04, sa	AcO, 9, 13, 14	3.89, sa	9, 13, 14
2H-15	2.01 y 1.30	8, 13, 14, 16, 27	1.86 y 1.15	13, 14, 16, 17, 27	1.90 y 1.19	14, 16, 27	1.87 y 1.15	14, 16, 17, 18, 27
2H-16	2.10 y 1.34	15, 17, 28	2.13 y 1.27	15, 17, 18, 22, 28	2.10 y 1.28	15, 17, 18, 28	2.14 y 1.26	15, 17, 18, 28
H-18	2.53, t	12, 13, 16, 17, 19, 28	2.02	13, 16, 17, 19	1.98	12, 13, 14, 17	2.03	19
2H-19	1.65	18, 20, 29, 30	1.97 y 1.90	18, 20, 29, 30	1.98 y 1.38	18, 20, 29, 30	2.00 y 1.91	18, 20, 29, 30
2H-21	1.31		1.36 y 1.27	20, 22, 29, 30	1.35 y 1.28		1.39 y 1.28	
2H-22	1.64	16, 17, 21, 28	1.62	16, 17, 18, 21, 28	1.61		1.62	16, 17, 20, 21
3H-23	1.04, s	3, 4, 5, 24	1.03, s	3, 4, 5, 24	0.89, s	3, 4, 5, 24	0.90, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.83, s	3, 4, 5, 23	0.81, s	3, 4, 5, 23	0.89, s	3, 4, 5, 23	0.90, s	3, 4, 5, 23
3H-25	0.98, s	1, 5, 9, 10	0.95, s	1, 5, 9, 10	1.00, s	1, 5, 9, 10	1.02, s	1, 5, 9, 10
3H-26	1.31, s	7, 8, 9, 14	1.14, s	7, 8, 9, 14	1.15, s	7, 8, 9, 14	1.14, s	7, 8, 9, 14
3H-27	0.97, s	8, 13, 14, 15	1.30, s	8, 13, 14, 15	1.26, s	8, 13, 14, 15	1.30, s	8, 13, 14, 15
3H-29	0.97, s	19, 20, 21, 30	0.98, s	19, 20, 21, 30	0.96, s	19, 20, 21, 30	0.99, s	19, 20, 22, 30
3H-30	0.96, s	19, 20, 21, 29	0.90, s	19, 20, 21, 29	0.81, s	19, 20, 21, 29	0.90, s	19, 20, 22, 29
AcO					2.10		1.99	
AcO					2.04		2.05	
AcO					1.98			

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

^b Desplazamientos químicos referenciados al CD_3OD ;

Tabla 11. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos 44-47

Producto Posición	44	44	45	45	46	46	47	47
	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	2.04 y 1.01	2, 3, 5, 10, 25	1.61 y 0.95	3, 5, 10	1.98 y 0.90	2, 3, 5, 10, 25	1.05 y 1.63	2, 3, 5, 9, 10, 25
H-2	5.06, ddd	AcO, 3	1.60	1, 3	3.67, ddd	1, 3	1.62 y 1.89	3, 4
H-3	4.71, d	AcO, 2, 4, 23, 24	3.21	2, 4, 23, 24	3.00, d	2, 4, 23, 24	4.48, dd	AcO, 2, 4, 23, 24
H-5	0.93		0.73	1, 6, 7, 9, 10, 23, 24, 25	0.83	6	0.82	4, 6, 23, 24, 25
2H-6	1.61 y 1.52		1.53 y 1.40	5, 7, 8, 10	1.54 y 1.43	5, 7, 8, 10	1.52 y 1.39	5, 7, 8
2H-7	1.51 y 1.34	5, 8, 9, 14, 26	1.50 y 1.33	5, 6, 8, 26	1.50 y 1.36	5, 6, 8, 9, 26	1.54 y 1.33	5, 6, 14
H-9	1.57	1, 5, 10, 11, 25, 26	1.55	5, 8, 10, 11, 25, 26	1.60	1, 8, 10, 11, 25, 26	1.56 dd	8, 10, 25, 26
2H-11	2.72, dd y 2.32, dd	8, 9, 10, 12	1.86	8, 9, 12, 13	1.89	8, 9, 12, 13	1.86 y 1.63	8, 9, 12, 13
H-12			5.18 dd	9, 11, 18	5.19, dd	9, 11, 18	5.18 dd	9, 11, 18
2H-15	2.01 y 1.29	8, 14, 16, 27	1.70 y 0.99	8, 13, 14, 16, 27	1.72 y 0.98	13, 14, 16, 17	1.67 y 0.98	13, 16, 17, 22, 27
2H-16	2.12 y 1.32	15, 17, 28	1.89 y 1.17	15, 17, 28	1.88 y 1.17	15, 17, 18, 28	1.93, ddd y 1.15	15, 17, 18
H-18	2.51, t	12, 13, 14, 16, 17, 19, 28	1.97	12, 13, 14, 16, 17, 19, 28	1.97	12, 13, 14, 16, 17, 19, 28	2.03	12, 13, 14, 16, 17
2H-19	1.64	18, 20, 29, 30	1.72 y 1.06	18, 20, 29, 30	1.71 y 1.07	18, 20, 29, 30	1.74 y 1.07	13, 18, 20, 29, 30
2H-21	1.32	20, 30	1.29 y 1.18		1.29 y 1.18	20, 22, 30	1.29 y 1.17	20, 22, 29, 30
2H-22	1.63	16, 17, 21, 28	1.52 y 1.34	16, 17, 21, 28	1.50 y 1.35	16, 17, 18, 20, 21, 28	1.52 y 1.33	16, 17, 28
3H-23	0.88, s	3, 4, 5, 24	0.98, s	3, 4, 5, 24	1.03, s	3, 4, 5, 24	0.94, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.90, s	3, 4, 5, 23	0.78, s	3, 4, 5, 23	0.82, s	3, 4, 5, 23	0.85, s	3, 4, 5, 23
3H-25	1.04, s	1, 5, 9, 10	0.92, s	1, 5, 9, 10	0.99, s	1, 5, 9, 10	0.87, s	1, 2, 5, 9, 10
3H-26	1.30, s	7, 8, 9, 14	0.93, s	7, 8, 9, 14	0.93, s	7, 8, 9, 14	0.86, s	7, 8, 9
3H-27	0.94, s	8, 13, 14, 15	1.15, s	8, 13, 14, 15	1.15, s	8, 13, 14, 15	1.14, s	8, 13, 14
3H-28			3.54 y 3.20, AB	16, 18, 17, 22	3.54 y 3.20, AB	16, 17, 18, 22	4.02 y 3.69, AB	16, 17, 18, 22
3H-29	0.96, s	19, 20, 21, 30	0.88, s	19, 20, 21, 30	0.88 s	19, 20, 21, 30	0.94, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.94, s	19, 20, 21, 29	0.86, s	19, 20, 21, 29	0.87, s	19, 20, 21, 29	0.86, s	19, 20, 21, 29
AcO	2.03						2.02, s	
AcO	1.96						2.03, s	

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 12. Desplazamientos químicos (δ , $CDCl_3$) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos **48-50**

Producto Posición	48	48	49	49	50	50
	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	2.00 y 1.04	2, 3, 5, 9, 10, 25	2.11, m y 0.87	2, 3, 5, 10, 25	2.07 y 0.92	2, 3, 5, 10, 25
H-2	5.08, ddd	AcO, 1, 3	3.69, ddd	3	3.65, ddd	3
H-3	4.72, dd	Ac, 1, 2, 4, 23, 24	2.99, d	2, 4, 23, 24	2.99, d	1, 2, 4, 23, 24
H-5	0.96	6, 9, 25	0.75	4, 6, 7, 10, 23, 24	0.83	4, 6, 7, 10, 23, 24
2H-6	1.54 y 1.43	5, 8	1.50 y 1.44	5, 7, 8, 10	1.49 y 1.43	7, 8
2H-7	1.33 y 1.24	6, 8, 14, 26	1.43 y 1.24	5, 6, 8, 9, 26	1.55 y 1.24	5, 6, 8, 9, 26
H-9	1.60, dd	1, 8, 10, 11, 26	1.17, dd	1, 8, 10, 11, 12, 25, 26	1.60	1, 8, 10, 11, 25, 26
2H-11	1.90 y 1.80	8, 9, 12, 13	1.81, ddd y 1.46	8, 9, 12, 13	1.95 y 1.41	8, 9, 12, 13
H-12	5.17, dd	9, 14	3.64, dd	11, 18	3.73, sa	13, 14
2H-15	1.66 y 0.98	13, 16	1.87, ddd y 0.99	8, 13, 14, 16, 27	1.93 y 0.92	14, 16, 17, 27
2H-16	1.91 y 1.16	15, 17, 18	1.98, ddd y 1.04	15, 17, 28	2.02 y 1.00	15, 17, 28
H-18	2.02	12, 13, 14, 16, 17, 19, 28	2.12, m	12, 13, 14, 16, 17	1.62	12, 13
2H-19	1.70 y 1.04	18, 20	1.65 dd y 1.28	18, 20, 29, 30	1.91 y 1.80	18, 20, 29, 30
2H-21	1.27 y 1.15	17, 20, 29, 30	1.36 y 1.19	20, 22, 29, 30	1.39 y 1.17	20, 22, 29, 30
2H-22	1.50 y 1.44	17	1.43	16, 17, 21	1.42	16, 17, 21
3H-23	0.87, s	3, 4, 5, 24	1.02	3, 4, 5, 24	1.01	3, 4, 5, 24
3H-24	0.88, s	3, 4, 5, 23	0.80, s	3, 4, 5, 23	0.80, s	3, 4, 5, 23
3H-25	1.05, s	1, 5, 9, 10	0.92, s	1, 5, 9, 10	0.93, s	1, 5, 9, 10
3H-26	0.92, s	7, 8, 9, 14	1.15, s	7, 8, 9, 14	1.17, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.13, s	8, 13, 14, 15	0.89, s	8, 13, 14, 15	1.18, s	8, 13, 14, 15
3H-28	4.00 y 3.67, AB	AcO, 16, 17, 18, 22	3.81 y 3.26, AB	13, 16, 17, 18, 22	3.74 y 3.25, AB	13, 16, 17, 22
3H-29	0.86, s	19, 20, 21, 30	0.97, s	19, 20, 21, 30	0.96, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.85, s	19, 20, 21, 29	0.89, s	19, 20, 21, 29	0.90, s	19, 20, 21, 29
AcO	2.03					
AcO	2.02					
AcO	1.95					

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 13. Desplazamientos químicos (δ , CDCl_3) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos 51-52

Producto	51	51	52	52
Posición	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	2.10 y 1.04	2, 3, 5, 10, 25	1.94 y 1.00	2, 3, 5, 10, 25
H-2	5.08, ddd	AcO, 1, 3	5.07, ddd	Ac, 1, 3
H-3	4.73, d	AcO, 2, 4, 23, 24	4.73, d	AcO, 2, 4, 23, 24
H-5	0.91		0.96	
2H-6	1.48	5, 7, 8, 10	1.64 y 1.50	5, 7, 8, 10
2H-7	1.45 y 1.26	5, 6, 8, 9, 26	1.48 y 1.39	5, 6, 8, 9, 26
H-9	1.29	1, 8, 10, 11, 12, 25, 26	1.71	1, 8, 10, 25, 26
2H-11	1.75 y 1.62	8, 9, 12, 13	2.20	8, 9, 12
H-12	5.16, dd	AcO, 11, 18		
H-13			2.70, d	12, 14, 18, 19, 27
2H-15	1.93 y 0.98	8, 14, 16, 27	1.74 y 0.99	14, 16, 17, 27
2H-16	1.95 y 1.05	15, 18, 28	1.91 y 1.02	15, 17, 28
H-18	1.69	12, 13, 14, 16, 17, 19	2.16	12, 13, 19
2H-19	1.63 y 1.28	17, 18, 29, 20, 30	1.82 y 1.22	18, 39, 20, 30
2H-21	1.36 y 1.19	20, 22, 29, 30	1.29 y 1.18	19, 20, 22, 29, 30,
2H-22	1.44	16, 17, 21	1.76 y 1.17	16, 17, 21, 28
3H-23	0.88, s	3, 4, 5, 24	0.90, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.88, s	3, 4, 5, 23	0.92, s	3, 4, 5, 23
3H-25	1.00, s	1, 5, 9, 10	1.02, s	1, 5, 9, 10
3H-26	1.21, s	7, 8, 9, 14	1.15, s	7, 8, 9, 14
3H-27	0.96, s	8, 13, 14, 15	0.95, s	8, 13, 14, 15
3H-28	3.82 y 3.29, AB	13, 16, 17, 18, 22	4.07 y 3.89, AB	AcO, 16, 17, 22
3H-29	0.95, s	19, 20, 21, 30	0.89, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.79, s	19, 20, 21, 29	0.92, s	19, 20, 21, 29
AcO	2.07		2.06	
AcO	2.04		2.05	
AcO	1.98		1.98	

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 14. Desplazamientos químicos (δ , $CDCl_3$) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos **53-56**

Producto Posición	53	53	53	54	54	55	55	56	56
	HSQC ^b	¹ H RMN ^c	HMBC ^a	HSQC ^b	HMBC ^a	HSQC ^b	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	1.64 y 0.99		3,5,9	1.65 y 0.96	3	3.34, dd	2, 9,10, 25	1.62 y 1.05	3,5,9,10,25
H-2	1.64 y 1.57		1,3,10	1.63 y 1.59	3	1.72	1,3,4,10	1.62	
H-3	3.15, dd	3.48, m	4,23, 24	3.18,dd	4, 23, 24	3.18, dd	2, 4, 23, 24	4.49, dd	AcO, 2,4,23,24
H-5	0.76		4, 6,7,10 23,24	0.84,	1,6,7,8,9,10,23,24,25	0.61, d	1,3,4,6,7,9,10,23,24,25	0.84	6,7,9,24,25
2H-6	1.57 y 1.42		7,8	1.68 y 1.55	5,7,8,10	1.59 y 1.49	5,7	1.54 y 1.38	7
2H-7	1.53 y 1.31		6,26	3.86, dd	6,8,14,26	1.45 y 1.30	6,5,8,9,26	1.45 y 1.30	5,6,8,14,26
H-9	1.60		8, 10, 11,25,26	1.52	1,8,10,11,14,25,26	1.74	1,5,8,10,11,14,25,26	1.57	8,10,11,25,26
2H-11	1.90			1.94	8,9,12,13	2.44, ddd y 2.09, ddd	9, 12, 13	1.89	8,9,12,13
H-12	5.27, dd	5.53, dd	9,11,14	5.34, dd	9, 11, 14, 18,	5.27 dd	8,9, 10,12,13,14d	5.27	9,11,14,13d,14
2H-15	1.78 y 1.09		8,14,16,27	1.98 y 1.53	13, 14, 27	1.74 y 1.07	13,17,27	1.71 y 1.10	8,27
2H-16	2.02, ddd 1.64			2.03 y 1.63	15, 17, 28	2.02 y 1.61	15,17,28	1.99 y 1.67	15,17,28
H-18	2.82, dd	3.48, m	12,13,16,17,19	2.83 dd	12, 13, 14, 16, 17,19, 28	2.79, dd	12, 13, 16, 17,19,28	2.80, dd	12,13,16,17,19,28
2H-19	1.61 y 1.35		18,20,21,29,30	1.65 y 1.37	17,18,20, 21, 29, 30	1.58 y 1.33	13, 18, 20,21 29, 30	1.62 y 1.42	13,17,18,20,21,29,30
2H-21	1.49 y 1.33		17,20	1.50 y 1.31	30	1.48 y 1.29	17,30	1.50 y 1.33	20,22,29,30
2H-22	1.71 y 1.53		16,17,21	1.69 y 1.54		1.70 y 1.50	17,20	1.74 y 1.60	16,17,21,28
3H-23	0.97, s	1.25, s	3,4, 5, 24	1.01, s	3,4, 5, 24	0.95, s	3,4, 5, 24	0.87, s	3,4, 5, 24
3H-24	0.78, s	1.05, s	3,4, 5, 23	0.80, s	3,4, 5, 23	0.76, s	3,4, 5, 23	0.85, s	3,4, 5, 23
3H-25	0.94, s	0.91, s	1,5,9, 10	0.96, s	1,5,9, 10	0.97, s	1,5,9, 10	0.94	1,5,9, 10
3H-26	0.82, s	1.05, s	7, 8,9,14	0.85, s	7, 8,9,14	0.81, s	7, 8,9,14	0.74	7, 8,9,14
3H-27	1.18, s	1.36, s	8, 13,14,15	1.27, s	8, 13,14,15	1.18, s	8, 13,14,15	1.14	8, 13,14,15
3H-29	0.89, s	1.27, s	19,20,21,30	0.92, s	19,20,21,30	0.89, s	19,20,21,30	0.93	19,20,21,30
3H-30	3.55 y 3.43, AB	4.03 y 3.95, AB	19, 20,21,29	3.56 y 3.44, AB	19, 20,21,29	3.55 y 3.42, AB	19, 20,21,29	4.06 y 4.00, AB	AcO, 19, 20,21,29
AcO								2.06	
AcO								2.04	

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

^b Desplazamientos químicos referenciados a CD_3OD ; ^c Desplazamientos químicos referenciados a C_5D_5N .

Tabla 15. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos 57-61

Producto Posición	57	57	58	58	59	59	60	60	61	61
	HSQC	HMBC ^a	HSQC ^b	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	2.18, dd y 0.89	2, 3, 5, 10, 25	1.93 y 0.88	2, 3, 5, 10, 25	2.24, dd y 1.04	2, 3, 5, 10, 25	2.00 y 1.05	2, 3, 5, 9, 10, 25	3.20, dd y 1.13	2, 3, 5, 9, 10, 25
H-2	3.74, ddd	3	3.61, ddd	3	5.14, ddd	Ac, 3	5.09, ddd	AcO	5.22, ddd	AcO, 3
H-3	2.99, d	2, 4, 23, 24	2.91, d	2, 4, 23, 24	4.74, dd	AcO, 2, 4, 23, 24	4.74, d	Ac, 2, 4, 23, 24	4.71, d	AcO, 2, 4, 23, 24
H-5	0.82		0.86	6, 7	0.94		0.99	2	0.90	
2H-6	1.57	7	1.55	5, 7, 8, 10	1.59	7	1.56 y 1.06	5, 10	1.59 y 1.39	4, 8, 10
2H-7	1.37 y 1.26	6	1.54 y 1.29	5, 6, 10	1.39 y 1.29	5, 9, 26	1.28	7, 8, 26	1.60 y 1.36	
H-9	1.94, sa	8, 10, 11, 12, 26	1.63	1, 8, 10, 11	1.96	8, 10, 11, 12, 25, 26	1.59		2.37, s	8, 10, 11, 14, 25, 26
2H-11	5.42, dd	8, 9	1.92 y 1.65	8, 9, 10, 12, 13, 25, 26	5.43, dd	9, 14	1.88 y 0.93	9		
H-12	6.04, dd	9, 13, 14	5.28, dd	9, 11, 14, 18	5.99, dd	9, 10, 13, 14	5.26, dd	9, 14	5.63, s	9, 14, 18
2H-15	1.70 y 1.19	13, 14, 16, 17, 27	1.77 y 1.10	16, 17, 28	1.71 y 1.17	13, 14, 16, 17, 27	1.70 y 1.04	14	1.72 y 1.25	
2H-16	2.10 y 1.31	14, 15, 17, 18, 28	2.05, ddd y 1.61	18	2.11 y 1.31	14, 15, 17, 18, 28	1.69 y 1.62	15, 17, 18	2.06 y 1.74	17
H-18	2.04, dd	13, 16, 19	2.82, dd	12, 13, 16, 17, 19, 28	2.05, dd	16, 17, 19	2.80, dd	12, 13, 17, 19	2.97, dd	12, 13, 14, 16, 17, 28
2H-19	1.79, dd y 1.34	17, 18, 20, 29, 30	1.62 y 1.35	18, 29, 30	1.79, dd y 1.31	17, 18, 20, 29, 30	1.63 y 1.38	17, 18, 20, 21	1.62 y 1.20	13, 18, 20, 29, 30
2H-21	1.31	30	1.48 y 1.28	17, 19, 20, 22	1.35 y 1.31	17, 20, 22, 30	1.52 y 1.25	17	1.38 y 1.29	
2H-22	1.63	16, 17	1.73 y 1.51	16, 17	1.63	16, 17, 21	1.73 y 1.54	17, 30	1.77 y 1.66	16, 17, 18, 21
3H-23	1.01, s	3, 4, 5, 24	1.01, s	3, 4, 5, 24	0.89, s	3, 4, 5, 24	0.89, s	3, 4, 5, 24	0.89, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.81, s	3, 4, 5, 23	0.80, s	3, 4, 5, 23	0.91, s	3, 4, 5, 23	0.89, s	3, 4, 5, 23	0.91, s	3, 4, 5, 23
3H-25	0.96, s	1, 9, 10	1.00, s	1, 5, 9, 10	1.05, s	1, 5, 9, 10	1.05, s	1, 5, 9, 10	1.23, s	1, 5, 9, 10
3H-26	1.04, s	8, 9, 14	0.80, s	7, 8, 9, 14	1.05, s	7, 9, 14	0.73, s	7, 8, 9, 14	0.91, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.04, s	8, 13, 14, 15	1.18, s	8, 13, 14, 15	1.05, s	13, 14, 15	1.13, s	8, 13, 14, 15	1.35, s	8, 13, 14, 15
3H-29	0.96, s	19, 20, 21, 30	0.89, s	19, 20, 21, 30	0.97, s	19, 20, 21, 30	0.92, s	19, 20, 30	0.94, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.87, s	19, 20, 21, 29	3.55 y 3.43, AB	19, 20, 21, 29	0.87, s	19, 20, 21, 29	4.07 y 3.97, AB	AcO, 19, 20, 29	0.94, s	19, 20, 21, 29
AcO					2.05, s		2.06, s		2.04, s	
AcO					1.98, s		2.05, s		1.95, s	
AcO							1.97 s			

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.^b Desplazamientos químicos referenciados al CD₃OD;

Tabla 16. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos 62-64

Producto Posición	62	62	63	63	64	64
	HSQC ^b	HMBC ^a	HSQC ^b	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	2.30 y 1.26	2, 3, 5, 10, 25	2.32, m y 1.25	2, 3, 5, 9, 10, 25	2.08, dd y 1.16	2, 3, 5, 10, 25
H-2	5.15, ddd	AcO, 3	5.15, ddd	AcO, 3	5.11, ddd	AcO, 1, 3
H-3	4.77, d	AcO, 2, 4, 23, 24	4.77, d	AcO, 2, 4, 23, 24	4.77, d	AcO, 1, 2, 4, 23, 24
H-5	0.92		0.93		1.03,	6, 10, 24, 25
2H-6	1.55		1.59	5, 25	1.55 y 1.47	7
2H-7	1.30 y 1.17		1,33 y 1.18		1.59 y 1.32	
H-9	1.60	1, 5, 8, 10, 11, 25, 26	1.60	1, 8, 10, 11, 25, 26	1.83	1, 5, 8, 10, 11, 25, 26
2H-11	3.02, m	9, 10, 13	3.03, m	9, 10, 14	2.40, ddd y 1.81	9, 10, 12, 13
H-12	3.02, m	9, 13, 14	3.03, m	9, 10, 14	4.28, dd	9, 11, 13, 14
2H-15	1.62 y 1.06		1.65 y 1.07		1.95 y 1.20	14, 16
2H-16	2.12, ddd y 1.30	14, 15, 17, 18, 28	2.07 y 1.35	14, 15, 17, 18, 22	2.16, ddd 1.27	15, 17, 18, 28
H-18	2.30	13, 16, 19	2.32, m	13, 14, 16, 17	1.99	12, 13, 14, 16, 17, 19, 22
2H-19	1.85, dd y 1.60	17,18, 20, 29, 30	1.89 y 1.82, dd	17, 20, 21, 29, 30	2.33 y 2.00	13, 17, 18, 20, 29, 30
2H-21	1.33		1.57		1.37 y 1.26	
2H-22	1.65		1.65	16, 17, 18, 20, 21	1.62	16, 17, 18, 20, 29, 30
3H-23	0.89, s	3, 4, 5, 24	0.89, s	3, 4, 5, 24	0.90, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.91, s	3, 4, 5, 23	0.92, s	3, 4, 5, 23	0.90, s	3, 4, 5, 23
3H-25	1.15, s	1, 5, 9, 10	1.16, s	1, 5, 9, 25	1.03, s	1, 5, 9, 10
3H-26	1.05, s	7, 8, 9, 14	1.06, s	7, 8, 9	1.21, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.08, s	8, 13, 14, 15	1.10, s	8, 9, 13, 15, 16	1.44, s	8, 13, 14, 15
3H-29	0.99, s	19, 20, 21, 30	1.02, s	19, 20, 21, 30	0.99, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.91, s	19, 20, 21, 29	4.20 y 3.78 AB	AcO, 20, 21, 29	0.90, s	19, 20, 21, 29
AcO	2.05		2.06		2.05,s	
AcO	1.98		1.98		1.99,s	

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

^b Desplazamientos químicos referenciados al CD₃OD.

Tabla 17. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos **65-67**

Producto Posición	65	65	66	66	67	67
	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	2.34 y 1.48	AcO, 2, 3, 4, 5, 9, 25	2.29 y 1.09	2, 3, 5, 10, 25	2.10 y 1.07	2, 3, 5, 10, 25
H-2	5.15, ddd	AcO, 1, 3	5.16, ddd		5.13, ddd	AcO, 1, 3, 4, 23, 24
H-3	4.75, d	AcO, 2, 3, 4, 23, 24	4.78, d	1, 2, 4, 23, 25	4.75, d	AcO, 1, 2
H-5	1.05		1.04		1.05	6, 10
2H-6	1.59 y 1.47	9	1.63 y 1.45		1.60 y 1.36	5, 7, 8
2H-7	1.80 y 1.63	4, 5, 9	1.48		1.31	5, 6, 9
H-9			2.15	2, 5, 10	2.17, dd	1, 5, 8, 10, 14
2H-11	5.55, d	8, 9	5.72, dd		2.12 y 1.85	8, 9, 10, 12, 13
H-12	5.57, d	13, 14, 18	6.14, dd		4.55, d	9, 14, 13, 18, 27
2H-15	1.78 y 1.13	17, 28	1.39 y 1.26		3.20, d	8, 14, 16, 17
2H-16	1.97 y 1.66	17, 18, 28	2.34 y 1.58	15	2.51, d y 1.85, d	14, 15, 17, 18, 22, 28
H-18	2.96				1.59	12, 13, 14, 19
2H-19	1.55 y 1.17	13, 18, 30, 22, 29	4.73	17, 18, 21, 28, 29	1.40 y 1.25	18, 20
2H-21	1.34 y 1.23		1.64 y 1.41		1.38 y 1.25	20, 28
2H-22	1.68 y 1.34	16, 17, 18, 20, 21	1.84 y 1.62		1.85 y 1.57	17, 18, 21, 28
3H-23	0.93, s	3, 4, 5, 10, 24	0.91, s	3, 4, 5, 24	0.89, s	3, 4, 5, 23
3H-24	0.92, s	3, 4, 5, 10, 23	0.91, s	3, 4, 5, 23	0.90, s	3, 4, 5, 24
3H-25	0.96, s	1, 9, 10	1.02, s	1, 5, 7	1.06, s	1, 5, 9, 10
3H-26	1.00, s	8, 9, 14	0.77, s	7, 8, 9, 14	1.06, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.29, s	13, 14, 15	1.09, s	8, 13, 14, 15	1.26, s	12, 13, 14, 18
3H-29	0.91, s	19, 20, 21, 22, 30	1.10, s	19, 20, 21, 30	0.92, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.94, s	19, 20, 21, 22, 29	0.93, s	19, 20, 22	0.84, s	19, 20, 21, 29
AcO	2.05, s		2.07, s		2.06, s	
AcO	1.99, s		1.99, s		1.99, s	

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 18. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos 69-70

Producto Posición	68	69	69	70	70
	¹ H RMN	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1		1.98 y 1.40		1.96 y 1.28	3, 10, 25
H-2		1.76 y 1.66		1.72 y 1.62	
H-3	3.23, dd	4.50, dd	AcO, 4, 23, 24	3.24, dd	4, 23, 24
H-5		1.01	4, 6, 7, 10, 24	0.87	3, 4, 6, 7, 10, 23, 24, 25
2H-6		1.82 y 1.54	4, 5, 7, 10	1.78 y 1.60	7, 8, 10
2H-7	4.04, dd	5.20, dd	AcO, 6, 8, 14, 26	4.10, dd	6, 8, 14, 26
H-9					
H-11	5.60, s	5.62, d	8, 10, 13, 25, 26	5.63, d	10, 13, 18, 25, 26
H-12	5.60, s	5.56, d	9, 11, 14, 18	5.67, d	9, 11, 14, 18, 27
2H-15		1.86 y 0.94		4.20, dd	14, 16, 27
2H-16		1.92 y 1.66		2.10 y 1.90	14, 15, 17, 18, 22, 28
H-18	2.97, dd	2.98, dd	12, 13, 16, 17, 19	2.91, dd	12, 13, 14, 16, 17, 19, 28
2H-19		1.56 y 1.43	17, 18, 20, 21, 29, 30	1.55 y 1.44	13, 17, 18, 20, 21, 29, 30
2H-21		1.47 y 1.34		1.51 y 1.30	18, 20, 29, 30
2H-22		1.61		1.62	16, 17, 18, 21, 28
3H-23	0.91	0.92, s	3, 4, 5, 24	1.03, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.80	0.86, s	3, 4, 5, 23	0.80, s	3, 4, 5, 23
3H-25	1.15	1.20, s	4, 5, 9, 10	1.15, s	1, 5, 9, 10
3H-26	1.03	1.06, s	7, 8, 9, 14	1.01, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.08	1.07, s	8, 13, 14, 15	1.08, s	8, 13, 14, 15
3H-29	0.98	0.93, s	19, 20, 21, 30	0.91, s	19, 20, 21, 30
3H-30	3.60 y 3.54, AB	4.06 y 4.01, AB	AcO, 19, 20, 21, 29	3.57 y 3.53, AB	19, 20, 21, 29
CH ₃ -O	3.65, s	3.65, s	28	3.65, s	28
AcO		2.08, s			
AcO		2.05, s			
AcO		2.00, s			

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 19. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos 71-74

Producto Posición	71	71	72	72	73	73	74	74
	HSQC ^b	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	2.26 y 1.30	2, 3, 5, 10, 25	2.32 y 1.30	2, 3, 5, 10, 25	2.00 y 1.05	2, 3, 4, 5, 25	2.02 y 1.05	2, 3, 5, 9, 10, 25
H-2	4.12, ddd		3.74, ddd		5.09, ddd	AcO, 1, 3	5.09, ddd	3
H-3	3.41, d	2, 4, 23, 24	3.02, d	1, 2, 4, 23, 24	4.73, d	AcO, 1, 2, 4, 23, 24	4.74, d	2, 4, 23, 24
H-5	1.05		0.91		0.95		0.96	
2H-6	1.62 y 1.49	3, 4, 5, 7	1.58 y 1.46	4	1.55 y 1.38		1.55 y 1.42	4, 7, 8, 25, 26
2H-7	1.51 y 1.31	4, 5, 6	1.59 y 1.32	8, 9	1.45 y 1.27		1.44, 1.31	5, 9
H-9	1.80	8, 10			1.60	1, 8, 10, 11, 13, 25, 26	1.60	
2H-11	1.96	9, 12, 13	5.61, d	8, 13, 14	1.88 y 1.77	12, 13	1.88	8, 9, 12, 13
H-12	5.39, dd	14	5.56, d	8, 9, 11	5.26, dd	9, 11, 14, 18	5.25, dd	9, 11, 14
2H-15	1.85 y 1.15	14, 16, 17	1.71 y 1.08	8, 14, 16, 27	1.59 y 1.03		1.62 y 1.06	8, 13, 14, 16, 17
2H-16	2.15 y 1.82	14, 15, 17, 18, 21, 28	1.95 y 1.64	15, 17	2.00 y 1.62		1.96 y 1.66	14, 15, 17
H-18	3.25, dd	12, 13, 14, 17, 19	2.99, dd	12, 13, 16, 28	2.85, dd	12, 13, 14, 16, 17, 19, 28	2.83, dd	12, 13, 14, 16, 17, 19
2H-19	1.76	17, 20, 21, 30	1.31 y 1.29		1.61 y 1.14	17, 18, 20, 29, 30	1.62 y 1.40	20, 30
2H-21	1.76 y 1.40	17, 19, 20, 29, 30	1.20 y 1.18		1.35 y 1.17	20, 29, 30	1.47 y 1.33	19, 20, 22, 29, 30
2H-22	1.94 y 1.65	16, 17, 21, 28	1.58 y 1.17	16, 18, 20, 21	1.68 y 1.51	16, 17, 21, 28	1.65 y 1.55	16, 17, 18, 20, 30
3H-23	1.30, s	2, 3, 4, 5, 24	1.05, s	3, 4, 5, 24	0.88, s	3, 4, 5, 24	0.89, s	2, 3, 4, 5, 24
3H-24	1.12, s	3, 4, 5, 23	0.83, s	3, 4, 5, 23	0.89, s	3, 4, 5, 23	0.90, s	2, 3, 4, 5, 23
3H-25	1.03, s	1, 4, 5, 9, 10	1.21, s	1, 5, 9, 10	1.04, s	1, 5, 9, 10	1.05, s	1, 2, 5, 9, 10
3H-26	0.87, s	7, 8, 9, 14	0.93, s	8, 9, 14	0.71, s	7, 8, 9, 14	0.71, s	7, 8, 9, 14, 25, 27
3H-27	1.26, s	8, 13, 14, 15	0.99, s	13, 14, 15, 17	1.11, s	8, 13, 14, 15	1.13, s	8, 13, 14, 15
3H-29	1.20, s	19, 20, 21, 30	0.89, s	19, 20, 21, 30	0.88, s	19, 20, 21, 30	0.92, s	19, 20, 21
3H-30	3.85 y 3.91, AB	19, 20, 21, 29	0.92, s	19, 20, 21, 29	0.91, s	19, 20, 21, 29	4.06 y 3.99, AB	19, 20, 21, 29
CH3-O	3.70, s	28	3.63, s		3.60, s	28	3.61, s	
AcO					2.03, s	AcO	2.06, s	
AcO					1.96, s	AcO	2.05, s	
AcO							1.97, s	

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.^b Desplazamientos químicos referenciados a C₅D₅N.

Tabla 20. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos 75-78

Producto Posición	75	75	76	76	77	77	78	78
	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	3.19, dd y 1.12	2, 3, 5, 9, 10, 25	1.95 y 1.01	2, 3, 5, 9, 10, 25	1.97, dd y 0.82	2, 3, 5, 10, 25	2.05 y 0.99	2, 3, 5, 10, 25
H-2	5.22, ddd	AcO, 1, 3	5.07, ddd	AcO, 1, 3	3.66, m	3	5.07, ddd	
H-3	4.71, d	AcO, 1, 2, 4, 23, 24	4.73, d	AcO, 2, 4, 23, 24	2.96, d	2, 4, 23, 24	4.74, d	AcO, 2, 4, 23, 24
H-5	0.92	4, 23	0.97		0.86	7, 25	1.05	
2H-6	1.60 y 1.39	5	1.64 y 1.46	7, 10	1.73 y 1.58	5, 7, 8, 10	1.80 y 1.60	5, 7, 8, 10
2H-7	1.60 y 1.37	5, 9	1.45 y 1.36		3.87, dd	6, 8, 14, 26	5.13, dd	AcO, 8, 14, 26
H-9	2.36	5, 8, 10, 11, 25, 26	1.69	8, 10, 11, 14, 25, 26	1.44, dd	1, 5, 8, 10, 11, 25, 26	1.51	1, 5, 8, 10, 25, 26
H-11			2.60, d	9, 12, 14	2.84, dd y 2.35, dd	8, 9, 10, 12	2.87, dd y 2.33, dd	8, 9, 10, 12
H-12	5.63, s	9, 13, 14, 18, 27						
2H-15	1.72 y 1.26	13, 14, 17, 22	1.66 y 1.08	14, 16	2.17 y 1.73	8, 13, 14, 16, 27	2.15 y 1.14	14, 16, 27
2H-16	2.05 y 1.74	14, 15, 17, 18, 22, 28	1.90 y 1.66	28	2.07 y 1.30	15, 17, 28	2.09 y 1.29	14, 15, 17, 28
H-18	2.97, dd	12, 13, 14, 17, 20, 28	2.79, dd	13, 14, 17, 27, 31	2.48, dd	12, 13, 14, 16, 17, 19, 28	2.51, dd	13, 14, 16, 17, 19
2H-19	1.62 y 1.20	13, 18, 20, 21, 30	1.93 y 1.20	18, 29, 28, 30	1.70	18, 20, 29, 30	1.68	18, 20, 30
2H-21	1.37 y 1.30	19	1.33 y 1.20	20, 29, 30	1.30	19, 20, 29, 30	1.31	19, 20, 22, 30
2H-22	1.78 y 1.66	16, 17, 21, 28	1.80 y 1.47	16, 17, 21	1.62	16, 17, 21, 28	1.63	16, 17, 21, 28
3H-23	0.89, s	3, 4, 5, 24	0.89, s	3, 4, 5, 24	1.02, s	3, 4, 5, 24	0.90, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.90, s	3, 4, 5, 23	0.91, s	3, 4, 5, 23	0.81, s	3, 4, 5, 23	0.90, s	3, 4, 5, 23
3H-25	1.22, s	1, 5, 9, 10	0.99, s	1, 2, 3, 5, 9, 10	0.96, s	1, 5, 9, 10	1.08, s	1, 5, 9, 10
3H-26	0.91, s	7, 8, 9, 14	0.96, s	9, 14	1.34, s	7, 8, 9, 14	1.46, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.35, s	13, 14, 15	0.93, s	13, 14, 15	1.05, s	8, 13, 14, 15	1.05, s	8, 13, 14, 15
3H-29	0.93, s	19, 20, 21, 30	0.90, s	19, 20, 21, 30	0.97, s	19, 20, 21, 30	0.98, s	19, 20, 21, 30
3H-30	0.94, s	19, 20, 21, 29	0.97, s	19, 20, 21, 29	0.94, s	19, 20, 21, 29	0.95, s	19, 20, 21, 29
CH ₃ -O	3.48, s		3.68, s				3.66, s	
AcO	2.06, s		2.06, s				2.02, s	
AcO	2.04, s		1.99, s				1.97, s	
AcO	1.95, s						1.97, s	

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 21. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos **79-81**

Producto Posición	79	79	80	80	81	81
	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	1.93 y 0.98	2, 3, 5, 10, 25	1.70 y 0.93	2, 3, 5, 10, 25	1.67 y 0.93	2, 3, 5, 10
H-2	5.05, ddd	AcO, 3	1.67 y 1.60	1, 3	1.69 y 1.61	1, 3
H-3	4.71, d	AcO, 2, 4, 23, 24	3.23, dd	4, 23, 24	4.48, dd	AcO, 2, 4, 23, 24
H-5	0.95		0.85	4, 5, 6, 7, 9, 10	0.96	
2H-6	1.66 y 1.43	7, 8	1.66 y 1.53	5, 7, 8	1.95 y 1.50	5, 7, 8, 9
2H-7	1.48 y 1.34		3.91, dd	5, 6, 8, 14, 26	4.97, dd	AcO, 6, 8, 26
H-9	1.67	8, 10	1.54	5, 8, 10, 11, 25	1.48	5, 8, 10, 11, 12, 25, 26
2H-11	2.20	12	2.06 y 1.48	8, 9, 10, 12, 13	2.09 y 1.62	8, 9
H-12			3.83, dd	9, 13, 14, 18	4.98, dd	AcO, 9, 13, 14, 18
H-13	2.59					
2H-15	1.67 y 1.08	12, 14, 18, 27	2.02 y 1.66	14, 16, 17, 27	4.11, dd	14, 16, 27
2H-16	1.89 y 1.70		2.14, ddd y 1.26	15, 17, 18, 28	1.89 y 1.70	14, 15, 17, 18, 28
H-18	2.68, m	17	2.03	12, 13, 17, 19	1.95	13, 15, 17, 28
2H-19	2.24 y 1.18	13	2.06, dd y 1.88	18, 19, 20, 29, 30	1.94 y 1.42	12, 13, 14
2H-21	1.48 y 1.26	18, 22, 30	1.28 y 1.39		1.35 y 1.31	
2H-22	1.81 y 1.46		1.65	16, 17, 18, 20, 21, 28	1.63	17, 20, 21, 28
3H-23	0.89, s	3, 4, 5, 24	1.00, s	3, 4, 5, 24	0.90, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.90, s	3, 4, 5, 23	0.78, s	3, 4, 5, 23	0.83, s	3, 4, 5, 23
3H-25	0.98, s	1, 5, 9, 10	0.87, s	1, 5, 9, 10	0.91, s	1, 5, 9, 10
3H-26	0.95, s	8, 9, 14	1.17, s	7, 8, 9, 14	1.31, s	7, 8, 9, 14
3H-27	0.93, s	8, 13, 14	1.39, s	8, 13, 14, 15	1.22, s	8, 13, 14, 15
3H-29	0.93, s	19, 20, 21, 30	0.99, s	19, 20, 21, 30	0.97, s	19, 20, 21, 30
3H-30	4.18 y 3.96, AB	AcO, 19, 20, 21, 29	0.90, s	19, 20, 21, 29	0.81, s	19, 20, 21, 29
CH3-O	3.66, s					
AcO	2.12, s				2.13, s	
AcO	2.04, s				2.05, s	
AcO	1.96, s				1.99, s	

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 22. Desplazamientos químicos (δ , $CDCl_3$) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos **82-84**

Producto Posición	82	82	82	83	83	84	84
	¹ H RMN	HSQC ^b	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1		2.09 y 0.94	2, 3, 5, 9, 10, 25	2.02 y 0.94	2, 3, 5, 10, 25	2.02 y 0.97	2, 3, 5, 10
H-2	3.71, ddd	3.75, ddd		5.13, ddd	AcO, 3	5.13, ddd	3
H-3	3.02, d	3.04, d	2, 4, 23, 24	4.75, d	AcO, 2, 4, 23, 24	4.73, d	AcO, 2, 4, 23, 24
H-5		1.02		1.10	4, 6, 7, 10, 23, 25	0.96	
2H-6		1.70 y 1.61	7, 8	1.75 y 1.58	5, 7, 8, 10	1.53	5, 7
2H-7	3.93, dd	3.99, dd		5.16, dd	AcO, 8, 14, 26	1.58 y 1.30	
H-9		1.71	5, 13, 25, 26	1.57	1, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 25, 26	1.55	8, 10, 11, 12, 25, 26
2H-11		2.10 y 1.61	9, 10, 13	2.08 y 1.56	12, 13	1.97 y 1.54	9, 12, 13
H-12	3.84, dd	3.86, dd	9, 13	5.00, dd	AcO, 9, 13, 14	5.00, dd	9, 13, 14
2H-15		2.08 y 1.73	7, 17	2.10 y 1.10	13, 14, 16	1.93 y 1.22	13, 14, 16, 27
2H-16		2.25 y 1.32	14, 17, 18, 28	2.13 y 1.27	14, 15, 17, 18, 22	2.16 y 1.34	15, 17, 28
H-18		2.12	17	2.01	13, 14, 16, 19	1.92	
2H-19		2.09	18, 20, 30	2.01 y 1.39	18, 20, 29, 30	1.92 y 1.87	18, 20, 30
2H-21		1.46 y 1.37		1.31	19, 20, 21, 30	1.45	17, 20, 30
2H-22		1.69		1.62	16, 17, 20, 21, 28	1.64	16, 17, 21
3H-23	1.04, s	1.11, s	3, 4, 5, 24	0.91, s	3, 4, 5, 24	0.90	3, 4, 5, 24
3H-24	0.82, s	0.89, s	3, 4, 5, 23	0.89, s	3, 4, 5, 23	0.90	3, 4, 5, 23
3H-25	0.94, s	1.01, s	1, 5, 9, 10	1.03, s	1, 5, 9, 10	1.01	1, 5, 9, 10
3H-26	1.16, s	1.23, s	7, 8, 9, 14	1.30, s	7, 8, 9, 14	1.16	7, 8, 9, 14
3H-27	1.39, s	1.48, s	8, 13, 14, 15	1.34, s	8, 13, 14, 15	1.30	8, 13, 14, 15
3H-29	0.99, s	1.07, s	19, 20, 21, 30	0.96, s	19, 20, 21, 30	0.99	19, 20, 21, 30
3H-30	0.90, s	0.99, s	19, 20, 21, 29	0.82, s	19, 20, 21, 29	4.00 y 3.75, AB	AcO, 20, 29
AcO				2.12, s		2.13, s	
AcO				2.05, s		2.06, s	
AcO				1.99, s		2.06, s	
AcO				1.98, s		1.99, s	

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

^b Desplazamientos químicos referenciados al CD_3OD ;

Tabla 23. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos **85-88**

Producto Posición	85	85	86	86	87	87	88	88
	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	2.04 y 0.97	2, 3, 5, 10	2.03 y 0.94	2, 3, 5, 10	1.95 y 0.98	2,3,5,10,25	1.82 y 0.89	
H-2	5.14, ddd	AcO, 3	4.76, ddd		5.05, ddd		1.68 y 1.62	1, 3
H-3	4.73, d	AcO, 2, 4, 23, 24	5.14, d	AcO, 2, 4, 23, 24	4.73, d	Ac,2,4,23,24	3.21, dd	4, 23, 24
H-5	1.01		1.15	4, 6, 7, 23, 24	1.08	4,10,23,25,26	0.80	4, 6, 7, 10, 23, 24, 25
2H-6	1.51 y 1.27	7	1.89 y 1.77	5, 7, 10	1.87 y 1.51	5,7,8,10	1.80 y 1.61	4, 5, 7, 8, 9, 10
2H-7	1.82 y 1.42	8, 14, 28	5.20, dd	AcO, 6, 14, 26	5.07	Ac,8,14,26	3.89, dd	5, 6, 8, 14, 26
H-9	1.66	8, 10, 11, 12, 26	1.65	10, 11, 25, 26	1.68	8,10,25,26	1.69, dd	1, 8, 10, 11, 25, 26
2H-11	1.83 y 1.53	8, 9, 12, 13	2.14 y 1.59	9	2.24	8,12	5.80, dd	8, 9, 10,13
H-12	5.09, dd	9, 13, 14	5.04, dd				5.42, dd	9, 13, 14, 18
H-13					2.66, d	8,12,14,18,19,27		
2H-15	2.21 y 1.31	8, 14, 18, 27	2.60 y 1.23	13, 16, 17, 27	1.90 y 0.87		4.26, dd	8, 14, 16, 27
2H-16	2.07 y 1.27	15, 18, 22	2.14 y 1.32	15, 17, 28	1.87 y 1.60		1.98 dd y 1.51	14, 15, 17, 18, 28
H-18	2.02	12, 13, 14, 16, 28	2.01		2.76, dd		1.49	12, 13, 14, 16, 17, 19, 22, 28
2H-19	2.01 y 1.40	20	2.01 y 1.40		1.88 y 1.17		1.62	17, 18, 20, 21, 29, 30
2H-21	1.31		2.33 y 1.31		1.32 y 1.22		1.45 y 1.35	17, 20, 22, 29, 30
2H-22	1.63	16, 17, 18, 20, 21, 28	1.63		1.84 y 1.50		1.47 y 1.41	16, 17, 21, 28
3H-23	0.89, s	3, 4, 5, 24	0.91, s	3, 4, 5, 24	0.90, s	3,4,5,24	1.00, s	3, 4, 5, 24
3H-24	0.89, s	3, 4, 5, 23	0.92, s	3, 4, 5, 23	0.89, s	3,4,5,23	0.78, s	3, 4, 5, 23
3H-25	1.14, s	1, 5, 8, 9, 10, 26	1.15, s	1, 5, 8, 9, 10, 26	1.01, s	1,5,9,10	0.88, s	1, 5, 9, 10
3H-26	4.91 y 4.75, AB	AcO, 9, 14	4.90 y 4.83, AB	AcO, 7, 8, 14	1.12, s	7,8,9,14	1.15, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.28, s	13, 14, 15	1.37, s	13, 14, 15	1.01, s	8,13,14,15	0.96, s	8, 13, 14, 15
3H-29	0.97, s	19, 20, 21, 30	0.97, s	19, 20, 21, 30	0.90, s	19,20,21,30	3.70 y 3.23 AB	13, 16, 17, 18, 22
3H-30	0.82, s	19, 20, 21, 29	0.82, s	19, 20, 21, 29	0.95, s	19,20,21,29	0.97, s	19, 20, 21, 30
AcO	2.11, s		2.13, s		2.04, s		3.55 y 3.42 AB	19, 20, 21, 29
AcO	2.05, s		2.06, s		2.00, s			
AcO	2.02, s		2.06, s		1.97, s			
AcO	1.99, s		2.00, s					
AcO			1.97, s					

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

Tabla 24. Desplazamientos químicos (δ , CDCl₃) de los protones deducidos a partir del espectro HSQC y correlación en el espectro HMBC de los productos 89-92

Producto Posición	89	89	90	90	91	91	92	92
	HSQC ^b	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a	HSQC	HMBC ^a
2H-1	1.62 y 1.03	2, 3, 9, 10, 25	1.83 y 1.01	2, 3, 5, 9, 10, 25	2.79, ddd y 1.04	2, 3, 5, 10, 25	2.23, dd y 1.02	2, 3, 5, 10, 25
H-2	1.87	1, 3	1.68	1, 3, 10	1.69 y 1.61	1, 3	5.14, ddd	AcO, 1, 3
H-3	3.49, dd	4, 23, 24	4.49, dd	2, 4, 23, 24	4.51, dd	AcO, 2, 4, 23, 24	4.74, d	AcO, 1, 2, 4, 23, 24
H-5	1.09	4, 6, 7, 9, 23, 24, 25	0.82	3, 4, 6, 7, 9, 10, 23, 24, 25	0.80	3, 4, 6, 7, 10, 23, 24, 25	0.95	4, 6, 23, 24
2H-6	2.16 y 1.88	5, 7, 8, 10	1.55	7, 5, 10	1.58 y 1.44		1.57	5, 7, 8, 10
2H-7	4.38, dd	5, 6, 8, 14, 26	1.37 y 1.24	5, 6, 8, 9, 26	1.64 y 1.39	5, 6, 8, 9, 14, 26	1.38 y 1.26	
H-9	1.69	1, 5, 8, 10, 11, 25, 26	1.85	5, 8, 10, 11, 12, 25, 26	2.34, s	1, 5, 8, 10, 11, 25, 26	1.89	1, 8, 10, 11, 25, 26
2H-11	1.97	8, 9, 12, 13	5.83, dd	8, 9, 10, 13			5.82, d	8, 9, 10, 13
H-12	5.49, dd	9, 11, 14, 18	5.37, dd	9, 14, 18	5.58, s	9, 10, 13, 14, 18	5.36, dd	9, 14, 18
2H-15	4.85, dd	8, 14, 16, 27	1.79 y 1.09	14, 16, 17, 18, 27	1.73 y 1.17	8, 13, 14, 16, 17	1.78, ddd y 0.98	14, 16, 17, 27
2H-16	2.51, dd y 2.15	14, 15, 17, 18, 22, 28	2.02 y 0.98	15, 17, 18	2.02, ddd y 1.27	15, 17, 18, 28	2.02 y 1.13, dd	14, 15, 17, 18, 22, 28
H-18	2.56, dd	12, 13, 14, 16, 17, 19, 28	1.64	12, 13, 14, 16, 17, 19	2.25, dd	12, 13, 14, 16, 17, 19, 28	1.58	12, 13, 14, 16, 17, 19
2H-19	2.07, dd y 1.81	13, 18, 20, 29, 30	1.74 y 1.29	18, 20, 29, 30	1.72 y 1.15	18, 20, 21, 29, 30	1.72 y 1.58	13, 17, 18, 20, 29, 30
2H-21	1.82 y 1.48	19, 20, 21, 30	1.36 y 1.20	20, 22, 29, 30	1.32 y 1.22	20, 22, 30	1.45, dd y 1.38	19, 20, 22, 30
2H-22	2.16 y 1.76	16, 17, 21, 28	1.44	16, 17, 20, 21, 28	1.59 y 1.38	16, 17, 21, 28	1.45 y 1.25	16, 17, 18, 21, 28
3H-23	1.27, s	3, 4, 5, 24	0.85, s	3, 4, 5, 24	0.87, s	3, 4, 5, 24	0.88, s	3, 4, 5, 24
3H-24	1.07, s	3, 4, 5, 23	0.85, s	3, 4, 5, 23	0.87, s	3, 4, 5, 23	0.90, s	3, 4, 5, 23
3H-25	0.99, s	1, 5, 9, 10	0.92, s	1, 5, 9, 10	1.14, s	1, 5, 9, 10	1.03, s	1, 5, 9, 10
3H-26	1.27, s	7, 8, 9, 14	1.08, s	7, 8, 9, 14	1.12, s	7, 8, 9, 14	1.07, s	7, 8, 9, 14
3H-27	1.67, s	8, 13, 14, 15	0.93, s	8, 13, 14, 15	1.38, s	8, 13, 14, 15	0.94, s	8, 13, 14, 15
3H-28	3.95 y 3.72, AB	16, 17, 18, 22	3.71 y 3.26, AB	13, 14, 16, 17, 18, 22	3.95 y 3.69, AB	AcO, 16, 17, 18, 22	3.71 y 3.26, AB	13, 14, 16, 17, 18, 22
3H-29	1.22, s	19, 20, 21, 30	0.96, s	19, 20, 21, 30	0.92, s	19, 20, 21, 30	0.98, s	19, 20, 21, 30
3H-30	3.97 y 3.92, AB	19, 20, 21, 29	0.87, s	19, 20, 21, 29	0.89, s	19, 20, 21, 29	4.02 y 3.91, AB	AcO, 19, 20, 21, 29
AcO			2.04, s		2.06, s		2.06, s	
AcO					2.05, s		2.06, s	
AcO							1.98, s	

^a Las posiciones mostradas se refieren a carbonos que dan correlación con el proton o protones de la fila indicada.

^b Desplazamientos químicos referenciados al C₅D₅N.

ANEXO II

Tablas de ^{13}C RMN

Tabla 1. Desplazamientos químicos (δ , CDCl_3) de ^{13}C RMN de los productos 1-10

Producto \ C	1 ^a	2 ^a	5	6	7	8	9	10
1	39.85	48.13	38.23	44.00	38.61	46.53	42.08	37.24
2	27.88	69.48	23.68	70.17	27.31	69.07	78.91	28.03
3	79.72	84.44	81.08	80.77	79.20	84.02	81.74	78.81
4	39.85	40.50	37.85	39.47	38.89	39.33	38.99	38.96
5	56.78	56.69	55.46	55.03	55.40	55.44	55.27	51.33
6	19.52	19.57	18.33	18.32	18.49	18.49	18.32	18.43
7	33.83	33.80	32.69	32.56	32.84	32.70	32.72	32.29
8	40.58	40.59	39.45	39.49	39.44	39.49	39.54	42.51
9	49.08	49.03	47.72	47.68	47.80	47.74	47.79	154.73
10	38.19	39.25	37.16	38.34	37.19	38.43	38.24	39.05
11	24.53	24.61	23.55	23.70	23.56	23.61	23.68	115.80
12	123.65	123.46	122.70	122.35	122.51	122.31	122.22	120.66
13	145.20	145.30	143.75	143.81	143.92	143.95	144.10	145.23
14	42.91	42.94	41.47	41.74	41.80	41.82	41.86	40.83
15	28.86	28.79	27.83	27.76	27.86	27.79	27.80	27.11
16	24.08	24.04	23.03	22.97	23.24	23.19	23.19	23.90
17	47.64	47.60	46.71	46.64	46.88	46.84	46.85	46.03
18	42.75	42.71	41.07	41.06	41.47	41.40	41.44	39.82
19	47.27	47.22	46.00	45.95	46.05	45.99	46.00	46.25
20	31.61	31.61	30.81	30.83	30.82	30.82	30.83	30.82
21	34.92	34.90	33.95	33.94	34.02	34.00	34.01	33.92
22	34.04	33.91	32.61	32.56	32.54	32.52	32.52	32.35
23	28.75	29.31	28.20	28.55	28.25	28.76	28.83	28.39
24	16.31	17.09	16.81	17.75	15.71	16.89	17.03	15.80
25	15.90	17.47	15.53	16.55	15.44	16.72	16.70	25.22
26	17.74	17.74	17.35	17.27	16.99	17.02	17.06	20.33
27	26.41	26.45	26.06	26.01	26.08	26.10	26.09	20.33
28	180.80	181.76	184.38	183.72	178.42	178.42	178.38	178.39
29	33.56	33.58	33.20	33.19	33.24	33.24	33.24	33.11
30	23.99	23.99	23.73	23.70	23.78	23.77	23.78	23.78
COOMe					51.64	51.66	51.66	51.79
OCH ₃							56.58	
OCOCH ₃			171.14	170.96				
OCOCH ₃				170.69				
OCOCH ₃			21.43	21.27				
OCOCH ₃				21.02				

^a Desplazamientos químicos (δ) referenciados a CD_3OD

Tabla 2. Desplazamientos químicos (δ , CDCl_3) de ^{13}C RMN de los productos 11-17

Producto C	11	12	13	14	15	16	16 ^a	17
1	38.46	53.33	38.86	39.57	38.82	37.20	38.52	37.20
2	27.26	51.00	27.36	27.40	27.25	23.73	28.53	23.73
3	78.74	208.67	78.75	78.91	78.76	78.87	79.41	78.87
4	39.00	47.43	38.92	39.23	38.97	39.05	40.00	39.05
5	55.32	52.07	54.68	56.81	55.91	52.35	52.68	52.35
6	17.81	19.39	18.22	19.81	19.20	18.37	19.45	18.37
7	34.74	33.40	37.68	41.53	37.92	32.31	33.59	32.31
8	42.53	42.18	45.03	42.67	43.89	42.55	43.55	42.55
9	45.66	44.75	46.16	49.61	49.87	154.86	156.02	154.86
10	36.65	38.73	37.29	37.39	37.84	38.97	39.96	38.97
11	30.55	31.17	29.74	27.56	32.08	115.77	116.93	115.77
12	56.58	55.95	57.44	87.87	63.84	120.81	121.79	120.81
13	91.72	91.48	92.56	38.49	45.96	145.01	146.52	145.01
14	43.50	43.60	49.22	146.93	91.28	40.84	41.92	40.84
15	29.27	29.22	53.30	125.17	26.36	27.11	28.09	27.11
16	21.44	21.37	35.43	30.46	22.34	23.73	24.67	23.73
17	45.62	45.53	46.88	42.74	39.78	46.06	46.95	46.06
18	52.43	52.51	52.31	43.26	44.98	39.54	41.08	39.54
19	40.03	40.11	39.92	34.71	37.19	46.00	47.23	46.00
20	31.96	31.98	32.01	30.40	30.83	30.79	31.58	30.79
21	33.98	33.93	33.70	34.05	33.60	33.89	34.84	33.89
22	27.64	27.58	26.62	29.10	26.90	32.31	33.47	32.31
23	28.09	29.33	28.08	27.29	27.96	28.40	28.89	28.40
24	15.53	20.14	15.53	15.30	15.39	15.79	16.38	15.79
25	17.04	20.03	16.99	17.78	17.29	25.25	25.71	25.25
26	19.17	18.22	19.19	25.51	19.72	20.55	20.73	20.55
27	21.20	20.87	17.03	23.82	19.41	20.30	21.20	20.30
28	178.90	178.55	176.83	178.24	178.17	183.80	181.70	183.80
29	33.37	33.34	33.23	33.37	33.07	33.07	33.45	33.07
30	23.67	23.60	23.58	25.61	23.98	23.71	23.98	23.71
COOMe	51.86							

^a Desplazamientos químicos (δ) referenciados a CD_3OD

Tabla 3. Desplazamientos químicos (δ) ^{13}C RMN de los productos **20-26**

Producto C	20	21	22	23	24	25	26
1	37.12	38.19	38.09	38.33	38.40	38.19	38.63
2	34.22	27.23	27.39	27.86	28.08	24.32	34.69
3	215.52	78.97	79.15	78.63	78.65	80.26	214.60
4	47.75	38.88	39.12	39.68	39.80	38.74	48.49
5	51.01	55.50	56.02	53.33	53.78	53.78	54.34
6	18.49	17.86	19.09	19.24	19.32	19.11	19.96
7	33.25	34.21	42.72	35.26	35.37	34.98	34.69
8	46.25	41.18	38.99	43.88	43.55	43.57	44.97
9	182.25	46.53	49.41	152.25	152.29	154.63	167.50
10	40.00	37.28	37.98	40.62	41.06	41.14	41.43
11	123.02	21.53	27.58	121.02	118.37	114.41	119.93
12	192.19	56.13	71.89	66.95	72.82	73.69	201.87
13	87.95	67.18	43.78	44.91	41.99	41.37	51.69
14	41.89	40.23	158.84	90.47	90.93	88.50	89.20
15	26.02	25.51	120.06	22.01	22.01	21.53	20.47
16	20.34	23.87	29.83	20.83	20.81	20.96	20.94
17	43.67	46.03	50.48	39.90	40.38	40.05	39.75
18	44.14	44.39	35.50	42.57	34.56	35.85	33.62
19	36.82	40.50	36.59	36.81	36.55	36.41	36.54
20	31.78	30.63	30.24	31.16	31.11	31.11	31.30
21	34.20	34.21	34.02	33.26	33.36	33.28	33.36
22	27.31	32.88	31.24	26.82	26.68	26.72	26.57
23	26.46	28.14	28.01	28.04	28.06	27.97	25.44
24	21.52	15.49	15.41	15.23	15.22	16.35	21.67
25	24.45	15.12	16.07	22.18	22.31	22.16	20.55
26	30.10	20.26	26.85	23.19	23.77	23.63	23.62
27	23.21	22.04	23.47	15.61	19.28	19.48	20.55
28	178.65	178.36	180.19	178.08	178.96	178.49	177.44
29	33.31	33.14	32.12	33.44	33.63	33.48	33.52
30	23.93	23.47	26.85	24.04	24.65	24.30	24.50
COOCH ₃		51.78	52.34				
OCOCH ₃						171.60	
OCOCH ₃						171.01	
OCOCH ₃						21.40	
OCOCH ₃						21.26	

Tabla 4. Desplazamientos químicos (δ) ^{13}C RMN de los productos 27-34

Producto	27	28	29	30	31	32	33	34
C								
1	46.38	46.43	43.90	44.97	47.35	46.09	38.64	39.93
2	69.14	69.10	69.97	70.11	69.21	68.92	27.34	69.15
3	83.89	83.76	80.37	80.68	84.02	83.93	78.87	83.90
4	39.40	39.26	39.38	39.69	39.52	39.32	39.05	39.40
5	55.46	54.76	54.42	56.58	56.96	55.60	55.36	55.48
6	17.86	18.20	18.08	19.69	19.80	17.88	17.84	17.86
7	34.66	37.56	37.43	41.37	41.46	34.24	34.60	34.08
8	42.69	45.08	45.04	42.64	42.72	41.26	42.51	45.46
9	45.68	46.05	46.04	49.53	49.58	46.53	44.93	44.96
10	38.07	38.55	38.39	38.40	38.50	38.53	36.65	38.03
11	30.73	29.85	29.82	27.63	27.69	21.66	29.47	27.55
12	56.20	57.00	56.85	87.43	87.68	56.03	65.24	64.98
13	91.69	92.47	92.36	38.50	38.50	67.23	91.77	91.65
14	43.63	49.23	49.23	146.55	146.74	40.32	43.15	43.25
15	29.32	53.17	53.10	125.57	125.42	25.49	29.14	29.13
16	21.48	35.39	35.34	30.50	30.49	23.84	21.44	21.45
17	45.68	46.85	46.83	42.81	42.79	46.06	45.46	42.62
18	52.48	52.26	52.23	43.34	43.28	44.37	52.09	52.09
19	40.08	39.88	39.87	34.74	34.73	40.49	39.92	46.55
20	32.03	31.99	31.99	30.44	30.44	30.68	31.97	31.97
21	34.04	33.66	33.64	34.05	34.06	34.15	34.05	34.51
22	27.69	26.59	26.58	29.07	29.10	32.88	27.63	29.62
23	28.61	28.55	28.33	28.28	28.49	28.66	28.12	28.61
24	16.71	16.68	17.50	17.32	16.45	16.69	15.55	16.70
25	18.32	18.25	18.11	18.90	19.08	16.46	16.91	18.04
26	19.28	19.24	19.18	25.49	25.54	20.41	19.00	19.07
27	21.29	17.00	16.96	23.68	23.74	22.10	20.36	20.38
28	178.94	176.81	176.69	178.07	178.22	178.44	179.22	179.10
29	33.42	33.21	33.19	33.38	33.38	33.18	33.39	33.39
30	23.72	23.57	23.58	25.64	25.64	23.47	23.78	23.77
COOCH₃						51.84		
OCOCH₃			170.92	171.01				
OCOCH₃			170.65	170.52				
OCOCH₃			21.29	21.24				
OCOCH₃			21.02	21.03				

Tabla 5. Desplazamientos químicos (δ) ^{13}C RMN de los productos **35-44**

Producto C	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
1	38.98	39.63	38.08	39.03	39.22	46.48	46.69	44.18	44.35	43.94
2	27.62	34.14	27.17	27.58	33.92	68.83	69.14	69.73	70.25	69.62
3	78.98	217.75	78.81	78.94	216.52	83.63	83.94	80.57	80.61	80.19
4	39.05	47.49	38.96	39.02	47.54	39.39	39.46	39.50	39.59	39.50
5	55.33	54.98	55.21	55.13	54.85	55.18	55.42	55.06	55.07	54.75
6	17.89	19.24	18.42	17.81	18.95	17.68	17.90	17.76	17.80	17.53
7	34.11	33.53	31.96	33.57	32.49	33.04	33.99	33.96	33.91	32.89
8	42.44	42.34	41.43	42.50	42.60	42.74	42.26	42.36	42.30	42.68
9	44.85	43.96	49.89	49.01	50.64	51.15	44.70	45.41	44.62	51.02
10	36.59	36.35	37.12	36.93	37.14	38.67	37.88	37.82	37.83	38.42
11	28.93	29.30	38.66	29.16	37.65	37.54	29.11	25.46	29.18	37.50
12	76.49	76.30	211.71	67.36	205.70	205.81	76.28	76.53	76.32	205.49
13	90.75	90.75	51.99	93.18	91.21	91.15	91.70	89.35	90.53	91.01
14	42.20	42.32	42.06	42.59	44.35	44.18	42.50	42.40	42.52	44.12
15	28.18	28.17	27.73	27.36	26.04	26.01	28.13	27.92	28.13	25.95
16	21.35	21.35	22.74	20.83	20.82	20.85	21.32	21.16	21.32	20.78
17	44.72	44.85	47.33	44.12	43.83	43.85	44.84	44.63	44.83	43.77
18	51.25	51.34	32.01	42.62	44.14	44.12	51.23	50.24	51.24	44.06
19	39.54	39.73	36.25	37.33	37.50	37.45	39.44	39.58	39.53	37.38
20	31.71	31.73	30.77	31.79	31.71	31.73	31.71	31.64	31.74	31.68
21	34.28	34.28	34.58	34.43	34.29	34.32	34.29	33.81	34.30	34.26
22	27.38	27.62	33.21	27.40	27.38	27.40	27.62	27.44	27.64	27.35
23	28.13	26.83	28.11	28.12	26.49	28.59	28.62	28.35	28.46	28.35
24	15.50	21.20	15.46	15.44	21.25	16.59	16.68	17.41	17.57	17.44
25	16.44	16.39	15.37	16.25	15.67	17.24	17.72	17.41	17.53	17.01
26	18.68	18.35	16.57	18.58	18.33	18.74	18.75	18.63	18.70	18.62
27	18.77	18.56	20.64	19.36	18.10	18.32	18.76	18.45	18.67	18.20
28	180.07	179.94	183.77	180.12	178.41	178.57	180.10	178.95	179.87	178.36
29	33.41	33.41	33.49	33.43	33.30	33.33	33.42	33.45	33.42	33.28
30	24.04	24.20	23.26	24.00	23.88	23.91	24.05	23.88	24.08	23.88
OCOCH ₃								171.05	170.95	178.36
OCOCH ₃								170.35	170.64	170.48
OCOCH ₃								169.38		
OCOCH ₃								21.62	21.30	21.15
OCOCH ₃								21.24	21.04	20.96
OCOCH ₃								21.00		

Tabla 6. Desplazamientos químicos (δ) ^{13}C RMN de los productos 45-52

Producto C	45	46	47	48	49	50	51	52
1	38.72	46.54	38.40	44.14	46.99	46.80	44.43	43.60
2	27.31	69.05	23.66	70.10	69.17	69.28	70.16	69.76
3	79.12	83.98	80.99	80.69	83.88	83.92	80.57	80.39
4	38.90	39.34	37.83	39.44	39.33	39.44	39.53	39.50
5	55.29	55.34	55.37	54.93	55.21	55.53	54.85	54.94
6	18.48	18.49	18.32	18.29	17.80	17.93	17.68	18.32
7	32.69	31.18	32.59	31.43	33.66	34.30	33.47	31.73
8	39.90	39.97	39.89	39.90	42.58	42.73	42.73	41.74
9	47.70	47.65	47.62	47.57	48.69	45.03	49.31	49.54
10	37.05	38.29	36.93	38.11	38.22	37.98	38.17	38.11
11	23.65	23.71	23.66	23.72	29.70	29.18	25.38	38.70
12	122.46	122.27	122.90	122.55	67.35	78.39	69.89	211.30
13	144.33	144.37	143.72	143.78	88.45	86.79	87.43	50.01
14	41.84	41.87	41.74	41.74	44.76	44.63	45.52	42.16
15	25.67	25.63	25.68	25.60	27.25	28.33	27.38	25.69
16	22.12	22.06	22.34	22.28	24.46	25.08	24.28	22.96
17	37.05	37.04	35.90	35.86	40.74	42.14	40.29	36.27
18	42.46	42.44	42.64	42.54	43.21	51.84	43.80	31.45
19	46.59	46.63	46.32	46.29	37.45	39.46	37.09	36.50
20	31.08	31.08	31.00	30.97	31.88	31.88	31.81	30.89
21	34.21	34.21	34.10	34.06	34.84	34.70	34.74	34.54
22	31.16	32.58	31.50	32.40	31.17	31.20	31.18	31.66
23	28.22	28.73	28.14	28.49	28.64	28.65	28.43	28.42
24	15.65	16.90	16.81	17.73	16.66	16.72	17.53	17.56
25	15.72	16.94	16.81	16.69	17.39	17.76	17.41	16.50
26	16.86	16.91	15.68	16.73	18.64	18.95	18.63	16.34
27	26.07	26.08	26.05	26.01	20.21	19.58	20.12	21.24
28	69.78	69.79	70.87	70.75	77.74	77.30	77.61	68.92
29	33.33	33.32	33.26	33.24	33.79	33.79	33.52	33.53
30	23.72	23.71	23.66	23.61	24.03	24.11	23.42	23.13
OCOCH ₃			171.39	171.31			170.89	171.51
OCOCH ₃			171.09	170.89			170.81	170.92
OCOCH ₃				170.55			170.73	170.61
OCOCH ₃			21.42	21.21			21.29	21.15
OCOCH ₃			21.08	21.04			21.20	21.13
OCOCH ₃				20.99			21.04	21.03

Tabla 7. Desplazamientos químicos (δ) ^{13}C RMN de los productos **53-58**

Producto c	53 ^a	53 ^b	54	55	56	57	58 ^a
1	39.84	39.32	39.72	80.45	38.27	46.20	48.10
2	27.88	28.51	27.91	38.23	23.69	68.83	69.47
3	79.75	78.46	79.47	76.78	81.05	83.88	84.43
4	39.84	40.17	39.58	39.82	37.86	39.39	40.58
5	56.79	56.21	53.98	54.54	55.48	55.00	56.67
6	19.51	19.20	30.42	19.15	18.35	17.78	19.56
7	34.03	33.68	73.94	34.06	32.74	31.23	33.88
8	40.59	39.78	46.23	41.04	39.48	41.81	40.48
9	49.06	48.52	49.85	49.71	47.70	53.24	49.00
10	38.19	37.78	38.23	44.25	37.14	37.65	39.24
11	24.52	24.19	24.63	28.08	23.59	127.31	24.30
12	123.88	123.05	124.14	125.00	123.35	135.54	123.68
13	144.96	145.17	144.54	143.64	143.06	89.93	144.99
14	42.91	42.63	44.32	42.67	41.75	41.54	42.92
15	28.87	28.78	32.27	28.87	27.76	25.48	28.78
16	24.39	24.48	24.80	24.28	23.33	21.41	24.59
17	47.39	47.09	47.49	47.42	47.70	44.17	47.47
18	42.21	42.04	42.79	41.94	40.72	50.65	42.11
19	42.58	42.44	42.68	42.45	41.54	37.42	42.50
20	36.14	36.31	36.16	36.09	33.96	31.56	36.12
21	29.90	30.04	29.94	29.82	29.42	34.48	29.83
22	33.42	33.39	33.21	33.32	32.02	27.26	33.34
23	28.75	28.82	28.68	28.65	28.21	28.35	29.31
24	16.30	16.93	16.36	16.05	16.82	16.21	17.47
25	15.89	15.93	15.86	11.86	15.56	19.27	17.09
26	17.76	17.87	10.67	17.98	17.24	19.16	17.74
27	26.44	26.62	26.37	26.48	26.08	18.39	26.50
28	181.70	180.67	181.74	181.66	181.70	180.24	181.75
29	28.08	29.17	28.06	28.15	27.95	33.38	28.11
30	66.34	65.95	66.31	66.25	67.85	23.65	66.27

^a Desplazamientos químicos (δ) referenciados al CD_3OD .

^b Desplazamientos químicos (δ) referenciados al $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Tabla 8. Desplazamientos químicos (δ) ^{13}C RMN de los productos **59-67**

Producto C	59	60	61	62 ^a	63 ^a	64	65	65	66	67
1	43.84	44.03	44.64	43.67	43.75	43.78	42.66	42.8	44.1	44.22
2	69.90	70.13	69.18	69.48	69.49	69.97	70.52	70.6	70.1	70.02
3	80.56	80.76	80.83	80.43	80.43	80.50	80.51	80.6	80.7	80.47
4	39.55	39.49	39.52	39.52	39.56	39.53	39.4	39.4	39.6	39.52
5	54.64	55.03	54.80	54.41	54.45	55.09	51.11	51.2	54.8	55.97
6	17.69	18.31	17.45	17.59	17.61	17.74	18.22	18.3	18.2	17.88
7	31.14	32.55	32.79	31.07	31.08	34.54	32,13	32,2	33.1	36.14
8	41.83	39.49	45.16	41.49	41.53	42.65	40.0	40.0	41.3	43.04
9	53.14	47.67	61.55	50.73	50.79	45.64	152.96	153.1	52.9	50.06
10	37.54	38.32	38.25	37.60	37.61	37.88	41.0	41.0	38.0	38.49
11	127.61	23.62	199.65	52.42	52.44	30.69	120.61	120.7	123.7	26.04
12	135.10	122.95	128.06	57.09	57.01	56.05	116.37	116.5	129.0	85.67
13	89.60	143.16	168.75	87.43	87.29	91.54	145.64	145.7	134.7	38.37
14	41.54	41.72	43.63	40.66	40.69	43.60	42.47	42.6	40.9	69.12
15	25.50	27.70	27.89	26.79	26.84	29.31	27.01	27.1	25.7	58.01
16	21.41	23.18	22.71	21.35	21.44	21.43	23.29	23.7	24.5	29.14
17	44.11	46.36	46.10	43.93	43.69	45.63	46.02	46.1	44.3	37.13
18	50.64	40.58	41.53	49.69	48.88	52.43	39.7	39.7	133.5	43.56
19	37.45	41.54	44.26	37.83	32.85	40.04	45.89	46.0	85.2	34.86
20	31.58	33.95	30.83	31.57	34.91	32.01	30.79	30.9	36.1	30.59
21	34.49	29.35	31.76	34.41	30.49	34.00	33.86	34.0	32.9	33.78
22	27.28	32.00	33.78	27.11	26.84	27.66	32.25	32.4	34.8	26.94
23	28.20	28.55	28.57	28.22	28.24	28.38	28.69	28.8	28.4	28.39
24	17.12	17.75	17.74	17.27	17.30	17.54	17.84	17.9	17.5	17.53
25	19.09	16.57	17.48	18.31	18.32	18.16	20.62	20.7	19.4	18.26
26	19.06	17.23	19.42	20.14	20.14	19.21	20.25	20.3	17.1	20.40
27	18.35	26.05	23.73	18.88	19.00	21.27	26.05	26.1	19.4	25.23
28	179.93	183.15	182.50	179.26	178.68	178.80	183.63	182.5	178.2	177.39
29	33.41	27.93	32.98	33.31	28.37	33.39	33.05	33.1	28.0	33.20
30	23.69	67.81	23.54	23.73	66.88	23.70	23.66	23.8	23.5	22.85
OCOCH ₃	170.93	171.36	171.06	170.82	171.23	170.93	171.00	171.1	171.0	170.93
OCOCH ₃	170.57	170.98	170.32	170.61	170.88	170.63	170.72	170.8	170.8	170.56
OCOCH ₃		170.66			170.59					
OCOCH ₃	21.23	21.36	21.21	21.20	21.19	21.27	21.29	21.4	21.3	21.25
OCOCH ₃	21.02	21.02	21.03	20.98	21.01	21.01	21.05	21.1	21.1	21.02
OCOCH ₃		21.02			20.92					

^a Desplazamientos químicos (δ) referenciados al CD₃OD.

Tabla 9. Desplazamientos químicos (δ) ^{13}C RMN de los productos **68-75**

Producto C	68	69	70	71 ^a	72	73	74	75
1	37.47	37.06	37.55	48.11	45.00	44.03	44.08	44.58
2	28.94	24.21	27.91	68.93	69.53	70.14	70.14	69.18
3	78.58	80.29	78.45	84.18	83.76	80.77	80.79	80.81
4	38.82	37.80	38.81	40.23	39.60	39.47	39.50	39.49
5	48.03	47.72	48.50	56.24	51.22	55.04	55.07	54.76
6	29.37	25.10	28.16	19.22	18.07	18.36	18.37	17.43
7	71.80	73.84	71.45	33.42	32.07	32.58	32.58	32.77
8	48.51	47.23	49.28	40.12	38.95	39.47	39.52	42.15
9	154.65	153.70	154.71	48.42	153.84	47.68	47.70	61.53
10	39.19	38.94	39.41	38.88	40.66	38.28	38.30	38.21
11	117.17	117.35	117.35	24.21	116.29	23.61	23.66	199.76
12	121.15	121.08	122.36	123.27	120.80	122.07	122.69	127.96
13	145.11	145.12	145.14	144.48	146.02	144.01	143.42	168.94
14	41.86	41.74	47.68	42.41	42.24	41.80	41.79	43.63
15	27.92	28.02	66.67	28.46	26.76	27.76	27.69	27.85
16	24.31	24.24	32.95	24.10	23.56	23.15	23.41	22.71
17	45.97	45.75	45.39	47.31	46.05	46.82	46.59	46.06
18	39.48	39.43	40.06	41.78	39.94	41.39	40.89	41.54
19	41.46	41.60	41.06	41.94	45.79	45.97	41.58	44.23
20	35.26	33.95	35.17	36.11	30.58	30.82	33.96	30.82
21	30.09	29.33	28.76	29.71	33.66	33.99	29.41	33.76
22	31.64	31.62	31.40	32.95	31.90	32.48	31.95	31.71
23	28.29	28.15	28.32	29.72	28.62	28.55	28.57	28.54
24	15.70	16.79	15.80	18.07	16.33	17.75	17.77	17.73
25	24.97	25.03	25.42	17.24	25.80	16.53	16.56	17.46
26	13.36	14.78	12.90	17.61	19.95	16.93	16.92	19.31
27	20.56	20.65	13.30	26.57	19.86	26.01	26.10	23.70
28	178.06	177.81	177.74	178.43	188.96	178.30	177.86	182.54
29	27.39	27.81	27.41	28.70	32.87	33.20	27.97	32.97
30	66.33	67.79	66.13	65.74	23.47	23.75	67.89	23.53
COOCH ₃	51.96	51.90	52.15	51.96	51.70	51.64	51.79	50.96
OCOCH ₃		171.52				170.90	171.43	171.11
OCOCH ₃		171.07				170.60	170.97	170.38
OCOCH ₃		170.52					170.62	
OCOCH ₃		21.90				21.25	21.27	21.22
OCOCH ₃		21.43				21.01	21.04	21.04
OCOCH ₃		21.08					21.04	

^a Desplazamientos químicos (δ) referenciados al C₅D₅N

Tabla 10. Desplazamientos químicos (δ) ^{13}C RMN de los productos **76-81**

Producto c	76	77	78	79	80	81
1	43.56	46.32	43.69	43.60	38.98	38.45
2	69.76	68.73	69.49	69.71	27.62	23.55
3	80.37	83.25	79.79	80.36	78.98	80.34
4	39.49	39.07	39.28	39.48	39.05	37.68
5	54.93	52.44	51.65	54.95	55.33	51.74
6	18.32	28.91	24.54	18.30	17.89	24.16
7	31.78	74.22	75.55	31.79	34.11	76.76
8	42.03	48.20	47.14	41.50	42.44	48.01
9	49.75	51.33	51.20	49.85	44.85	46.22
10	38.13	38.66	38.52	38.13	36.59	36.76
11	38.68	36.74	36.54	38.67	28.93	24.57
12	211.07	205.83	204.82	210.64	76.49	76.70
13	52.00	91.53	91.00	51.77	90.75	90.50
14	41.44	46.00	45.66	42.08	42.20	48.66
15	27.65	29.57	28.26	27.59	28.18	66.93
16	22.83	20.98	20.95	23.14	21.35	31.78
17	47.48	43.82	43.59	47.15	44.72	42.88
18	32.11	44.26	44.11	31.66	51.25	50.09
19	36.30	37.60	37.45	32.14	39.54	39.23
20	30.80	31.73	31.76	34.04	31.71	31.59
21	34.61	34.23	34.21	29.99	34.28	33.64
22	33.07	27.26	27.22	32.45	27.38	26.49
23	28.42	28.56	28.26	28.40	28.13	27.83
24	17.55	16.66	17.47	17.52	15.50	16.45
25	16.47	17.21	16.95	16.45	16.44	16.07
26	16.27	13.06	14.46	16.21	18.68	14.26
27	20.68	17.78	18.03	20.60	18.77	11.85
28	178.49	178.66	178.23	177.88	180.07	177.76
29	33.54	33.28	33.30	28.35	33.41	33.35
30	23.28	23.82	23.86	67.44	24.04	23.90
COOCH₃	51.96			52.08		
OCOCH₃	170.93		170.68	171.55		171.17
OCOCH₃	170.64		170.54	170.87		170.51
OCOCH₃			170.28	170.53		169.39
OCOCH₃	21.25		21.82	21.17		21.81
OCOCH₃	21.05		21.17	21.09		21.58
OCOCH₃			20.95	20.99		21.42

Tabla 11. Desplazamientos químicos (δ) ^{13}C RMN de los productos **82-87**

Producto C	82	82 ^a	83	84	85	86	87
1	46.52	46.35	43.95	44.23	44.24	44.08	43.21
2	69.14	69.12	69.58	69.69	69.68	69.61	69.52
3	83.59	83.55	80.15	80.61	80.51	80.02	79.93
4	39.18	39.32	39.27	39.54	39.47	39.28	39.22
5	53.02	53.19	52.11	55.13	55.54	52.59	51.63
6	28.83	28.75	24.44	17.78	17.70	25.30	25.40
7	75.25	75.22	76.43	33.83	27.80	76.19	74.05
8	47.93	49.09	46.87	42.55	46.13	49.54	45.60
9	44.64	44.77	45.63	45.48	45.85	46.22	49.11
10	38.08	38.13	37.94	37.85	38.10	38.00	37.96
11	28.19	28.08	24.62	25.40	24.85	24.90	37.83
12	76.14	75.97	76.66	76.70	76.25	76.12	209.83
13	91.10	92.00	89.20	89.22	89.43	88.47	51.73
14	43.57	43.74	43.66	42.46	43.54	45.14	43.38
15	31.75	31.84	30.52	28.01	29.66	31.28	29.46
16	21.55	21.76	21.40	21.44	21.15	21.53	23.00
17	44.85	45.15	44.44	44.43	44.72	44.35	46.98
18	51.79	52.04	50.64	49.82	50.58	50.64	32.01
19	39.56	39.57	39.58	33.70	39.85	39.59	36.33
20	31.75	31.84	31.71	34.70	31.73	31.75	30.81
21	34.23	34.46	33.91	30.73	33.99	33.87	34.58
22	27.48	27.64	27.28	27.21	27.46	27.30	33.21
23	28.65	28.64	28.33	28.37	28.40	28.24	28.24
24	16.82	16.88	17.47	17.44	17.52	17.55	17.45
25	17.85	17.88	17.45	17.48	18.00	16.97	16.09
26	12.07	12.07	13.53	18.65	63.43	62.38	12.61
27	18.50	18.55	18.25	18.49	19.16	19.04	21.38
28	180.4	181.32	178.77	178.38	178.41	178.34	183.24
29	33.41	33.50	33.45	28.37	33.46	33.45	33.45
30	23.93	23.94	23.79	67.05	23.75	23.78	23.21
OCOCH₃			170.91	171.13	171.13	170.96	
OCOCH₃			170.38	171.07	170.78	170.43	170.71
OCOCH₃			170.31	170.37	170.32	170.39	170.59
OCOCH₃			169.38	168.94	169.26	170.08	170.43
OCOCH₃						169.29	
OCOCH₃			21.93	21.72	21.59	21.79	21.90
OCOCH₃			21.63	21.27	21.37	21.69	21.16
OCOCH₃			21.23	21.04	21.24	21.64	20.94
OCOCH₃			20.98	20.87	21.02	21.25	
OCOCH₃						21.00	

^a Desplazamientos químicos (δ) referenciados al $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

Tabla 12. Desplazamientos químicos (δ) ^{13}C RMN de los productos 88-92

Producto C	88	89 ^a	90	91	92
1	38.01	39.43	38.06	38.94	43.89
2	27.15	28.57	23.55	23.70	70.09
3	78.66	78.21	80.97	80.75	80.72
4	38.80	39.53	38.01	38.19	39.56
5	52.53	53.13	55.05	55.16	54.67
6	27.86	29.19	17.69	17.48	17.69
7	72.83	72.31	31.44	32.71	31.28
8	47.51	47.32	41.65	45.52	41.85
9	52.35	48.71	53.26	61.85	53.16
10	36.45	37.95	36.44	37.07	37.57
11	131.01	24.47	132.15	200.03	131.71
12	130.99	124.62	131.08	128.61	131.19
13	85.42	146.46	84.92	168.70	84.69
14	49.30	49.74	43.91	43.44	43.90
15	67.00	66.44	25.39	25.97	25.34
16	35.08	33.48	25.79	22.14	25.79
17	41.69	38.59	41.74	35.93	41.43
18	50.72	44.04	51.15	42.71	50.51
19	31.67	42.57	37.24	44.86	32.51
20	36.13	36.55	31.83	31.10	34.89
21	30.13	30.40	35.00	33.88	30.77
22	29.56	31.35	30.95	30.95	30.53
23	27.86	29.07	27.89	28.18	28.23
24	15.10	17.01	16.21	16.83	17.14
25	17.60	16.08	18.05	16.56	18.98
26	14.79	11.35	19.52	18.72	19.47
27	15.62	21.07	19.58	23.58	19.62
28	77.25	69.36	77.13	70.35	76.89
29	28.11	28.84	33.78	33.02	28.62
30	66.04	66.17	23.71	23.47	67.50
OCOCH₃			171.14	171.20	171.45
OCOCH₃				171.20	171.04
OCOCH₃					170.64
OCOCH₃			21.46	21.48	21.28
OCOCH₃				21.04	21.09
OCOCH₃					21.06

^a Desplazamientos químicos (δ) referenciados al $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

ANEXO III
TABLAS DE EFECTOS
 α , β Y γ

Tabla 1. Efectos de la hidroxilación en C-30

Carbono	$\delta(53)-\delta(1)$	$\delta(53)-\delta(1)$	$\delta(54)-\delta(1)$	$\delta(55)-\delta(1)$	$\delta(58)-\delta(2)$
19	-4.69	-4.83	-4.59	-4.82	-4.72
20	+4.53	+4.70	+4.55	+4.48	+4.51
21	-5.02	-4.88	-4.98	-5.10	-5.07
29	-5.48	-4.39	-5.50	-5.41	-5.47
30	+42.35	+41.96	+42.32	+42.26	+42.28

Tabla 2. Efectos de la hidroxilación en C-30

Carbono	$\delta(68)-\delta(10)$	$\delta(70)-\delta(10)$	$\delta(71)-\delta(8)$	$\delta(88)-\delta(90)$	$\delta(89)-\delta(45)$
19	-4.79	-5.19	-4.05	-5.57	-4.37
20	+4.44	+4.35	+5.29	+4.30	+5.00
21	-3.83	-5.16	-4.29	-4.87	-4.23
29	-5.72	-5.70	-4.54	-5.67	-4.70
30	+42.55	+42.35	+41.97	+42.33	+42.18

Tabla 3. Efectos de un grupo acetoxilo en C-30

Carbono	$\delta(56)-\delta(5)$	$\delta(60)-\delta(6)$	$\delta(63)-\delta(62)$	$\delta(74)-\delta(73)$	$\delta(84)-\delta(42)$	$\delta(92)-\delta(90)$
19	-4.46	-4.41	-4.98	-4.39	-5.88	-4.73
20	+3.15	+3.12	+3.34	+3.14	+3.06	+3.06
21	-4.53	-4.59	-3.92	-4.58	-3.08	-4.23
29	-5.25	-5.26	-4.94	-5.23	-5.08	-5.16
30	+44.12	+44.11	+43.15	+44.14	+43.17	+43.79

Tabla 4. Efectos α , β y γ de la hidroxilación en C-7.
*Efectos de un grupo acetoxilo en C-7.

Carbono	$\delta(54)-\delta(1)$	$\delta(68)-\delta(10)$	$\delta(77)-\delta(40)$	$\delta(78)-\delta(44)^*$	$\delta(80)-\delta(35)$	$\delta(82)-\delta(41)$	$\delta(83)-\delta(42)^*$
5	-2.8	-3.30	-2.74	-3.12	-2.36	-2.4	-2.95
6	+10.90	+10.94	+11.23	+7.87	+11.06	+10.93	+6.68
7	+40.11	+39.51	+41.18	+41.16	+41.31	-41.26	+42.47
8	+5.65	+6.00	+5.73	+2.92	+5.39	-5.67	+4.51
9	+0.77	+0.08	+0.18	-1.91	-0.2	-0.06	+0.22
14	-1.41	+1.03	+1.82	-0.74	+1.31	+1.07	+1.26
26	-7.07	-6.97	-5.68	-6.01	-6.79	-6.68	-5.10

Tabla 5. Efectos de un grupo acetoxilo en C-26

Carbono	$\delta(85)-\delta(42)$	$\delta(86)-\delta(83)$
7	-6.16	-0.24
8	+3.77	+2.67
9	+0.44	+0.59
14	+1.14	+1.48
26	+44.8	+48.85

Tabla 6. Efectos de la dihidroxilación en C-7 y C-15

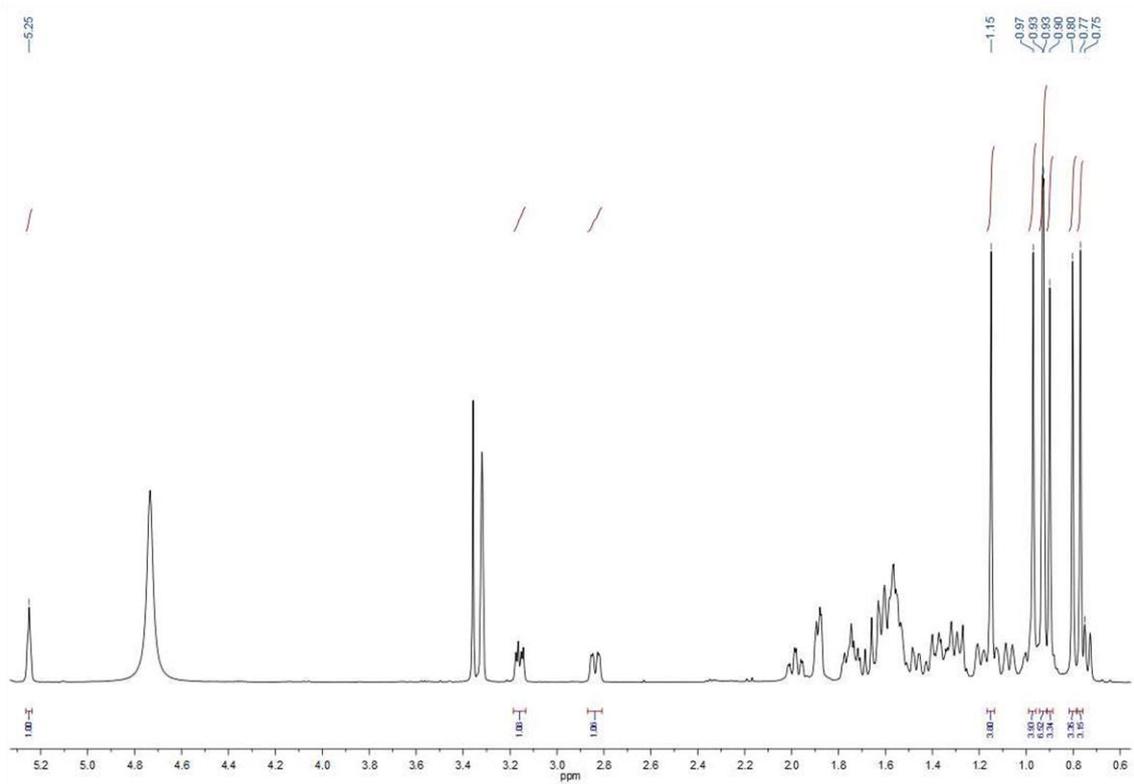
Carbono	$\delta(70)-\delta(10)$	$\delta(81)-\delta(35)$	$\delta(88)-\delta(90)$	$\delta(89)-\delta(45)$
5	-2.83	-3.59	-2.52	-2.16
6	+9.73	+6.27	+10.17	+10.71
7	+39.16	+42.65	-41.39	+39.62
8	+6.77	+5.57	-5.86	+7.42
9	-0.02	+1.37	-0.91	+1.01
13	-0.09	-0.25	+0.5	+2.13
14	+6.85	+6.46	+5.39	+7.9
15	+27.11	38.75	+41.61	+40.77
16	+9.05	+10.43	+9.29	+11.36
17	-0.64	-1.84	-0.05	+1.54
26	-7.43	-4.42	-4.73	-5.51
27	-7.00	-6.92	-3.96	-5.0

Tabla 7. Efectos de un bromo en C-15 α

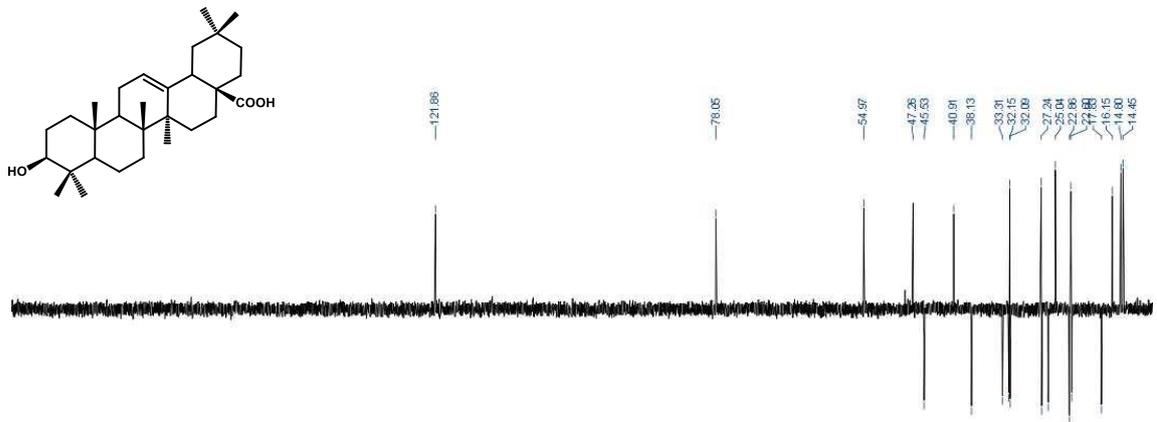
Carbono	$\delta(28)-\delta(27)$	$\delta(13)-\delta(11)$
8	+2.39	+2.50
13	+0.78	+0.84
14	+5.60	+5.72
15	+23.85	+24.03
16	+13.91	+13.99
17	+1.17	+1.26
27	-4.29	-4.17

ANEXO IV

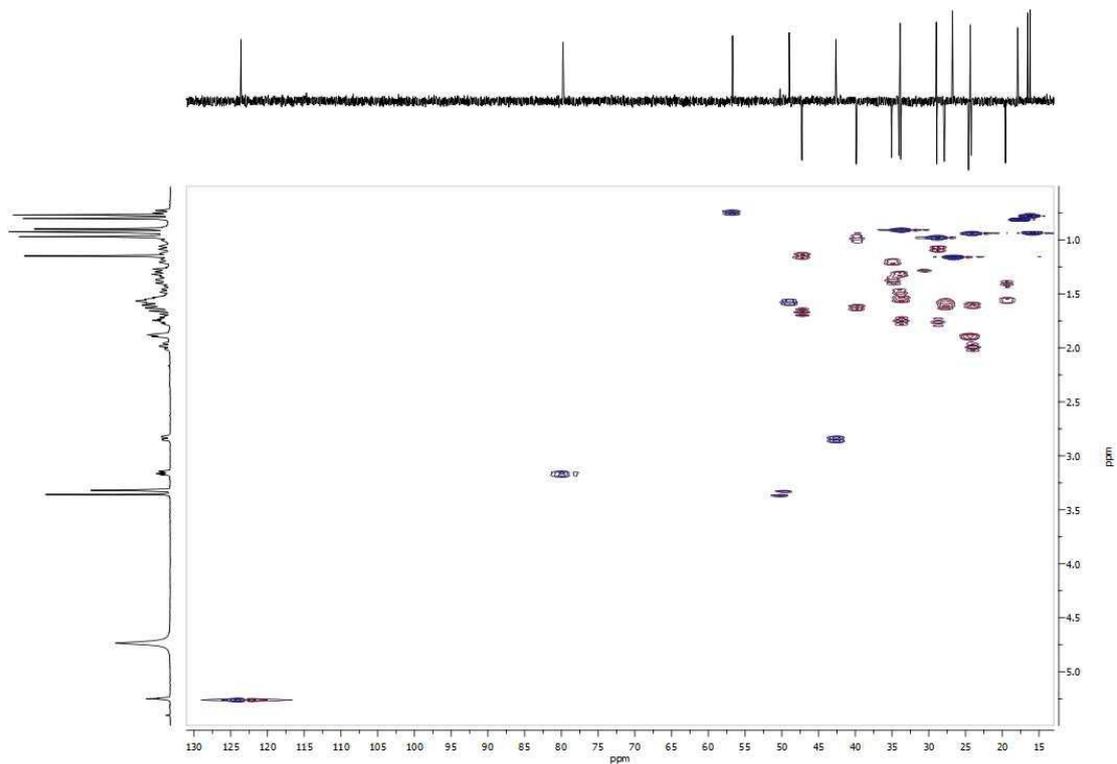
**ESPECTROS
MONO Y BIDIMENSIONALES**



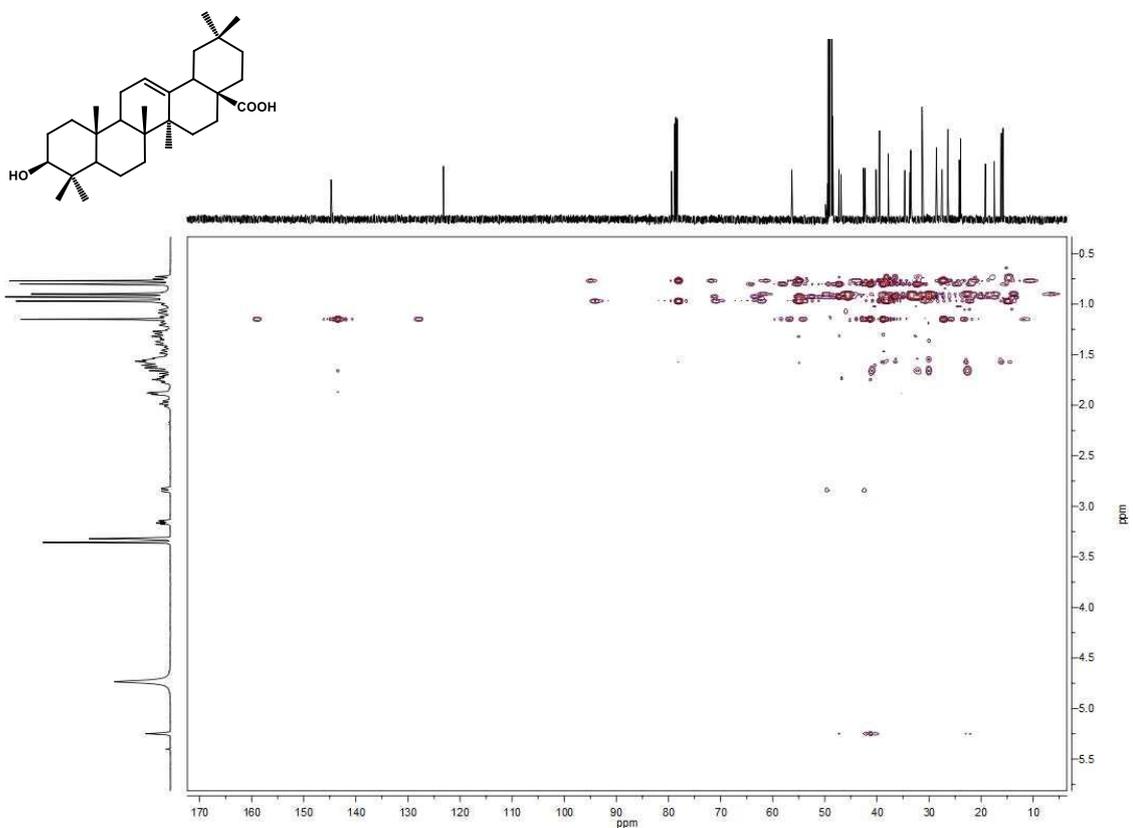
Espectro de ^1H RMN del producto 1



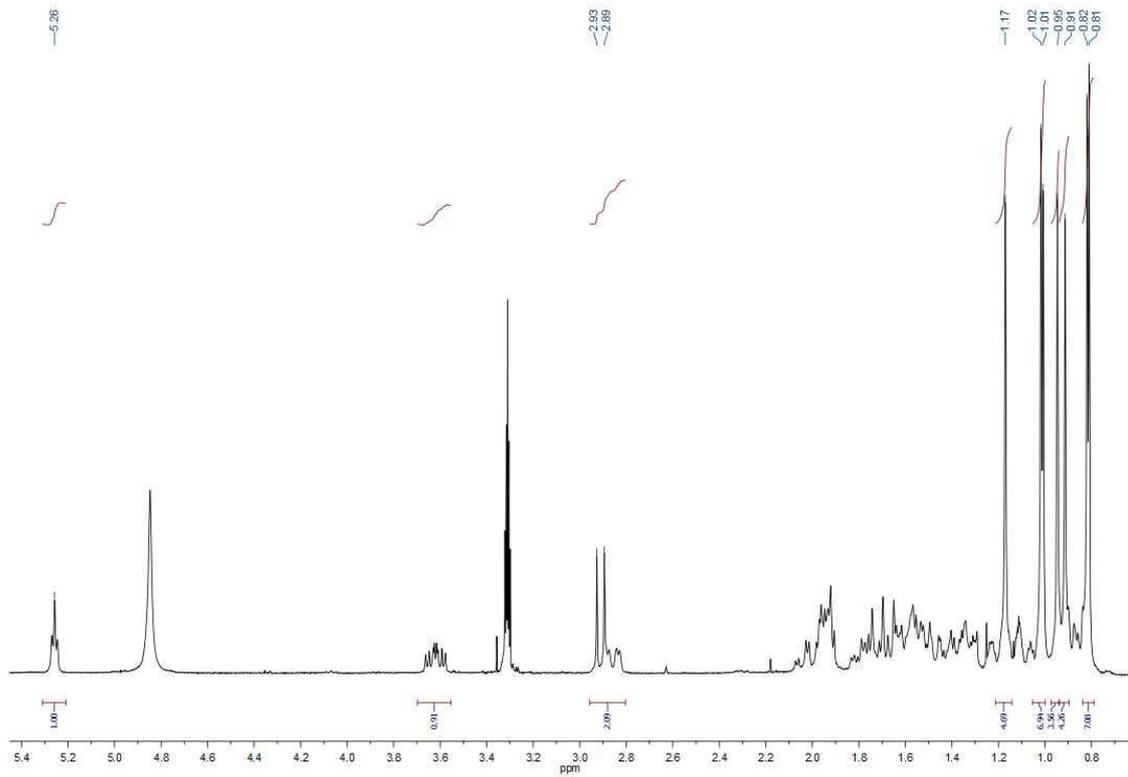
Espectro de ^{13}C RMN del producto 1



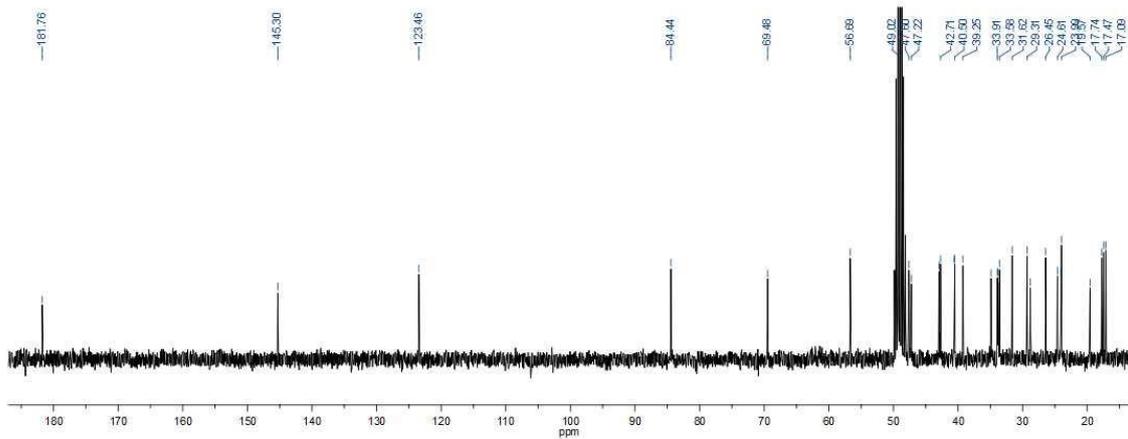
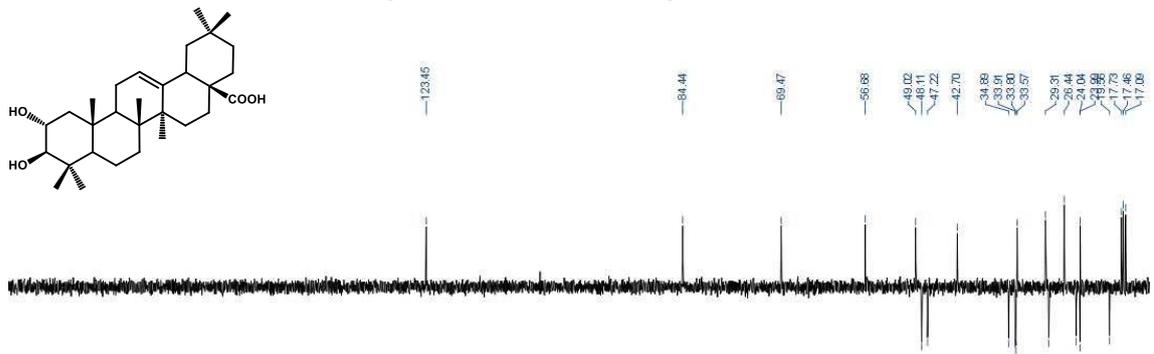
Espectro HSQC del producto 1



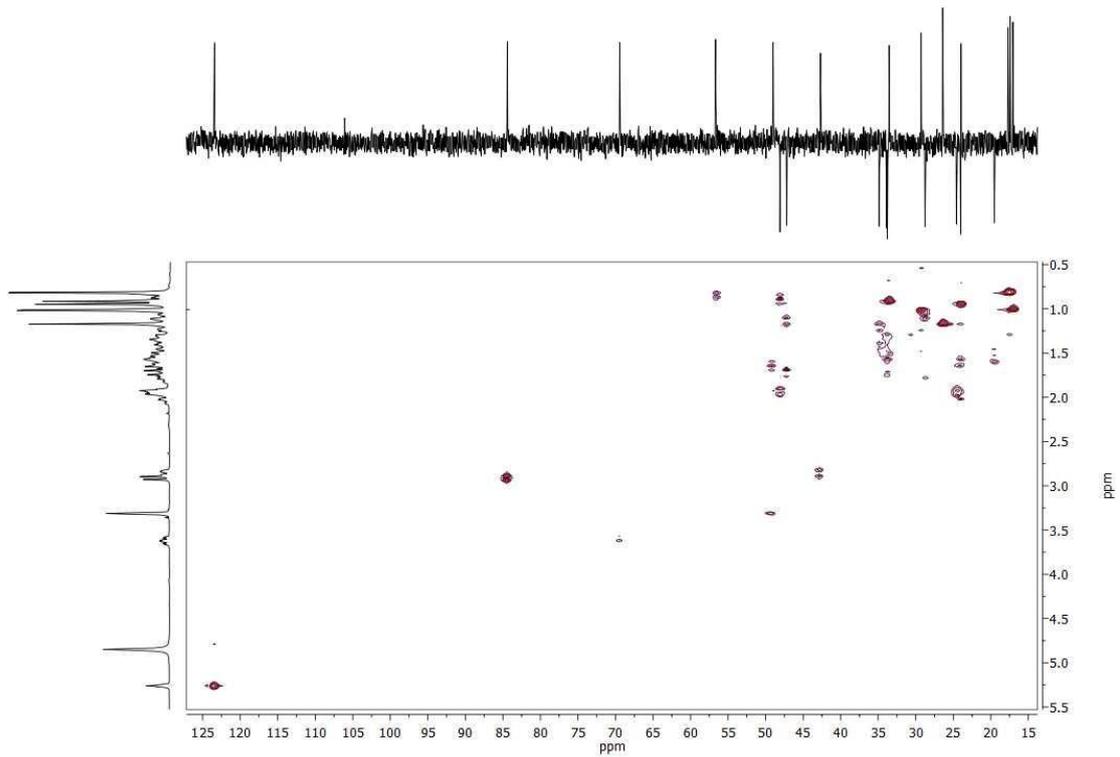
Espectro HMBC del producto 1



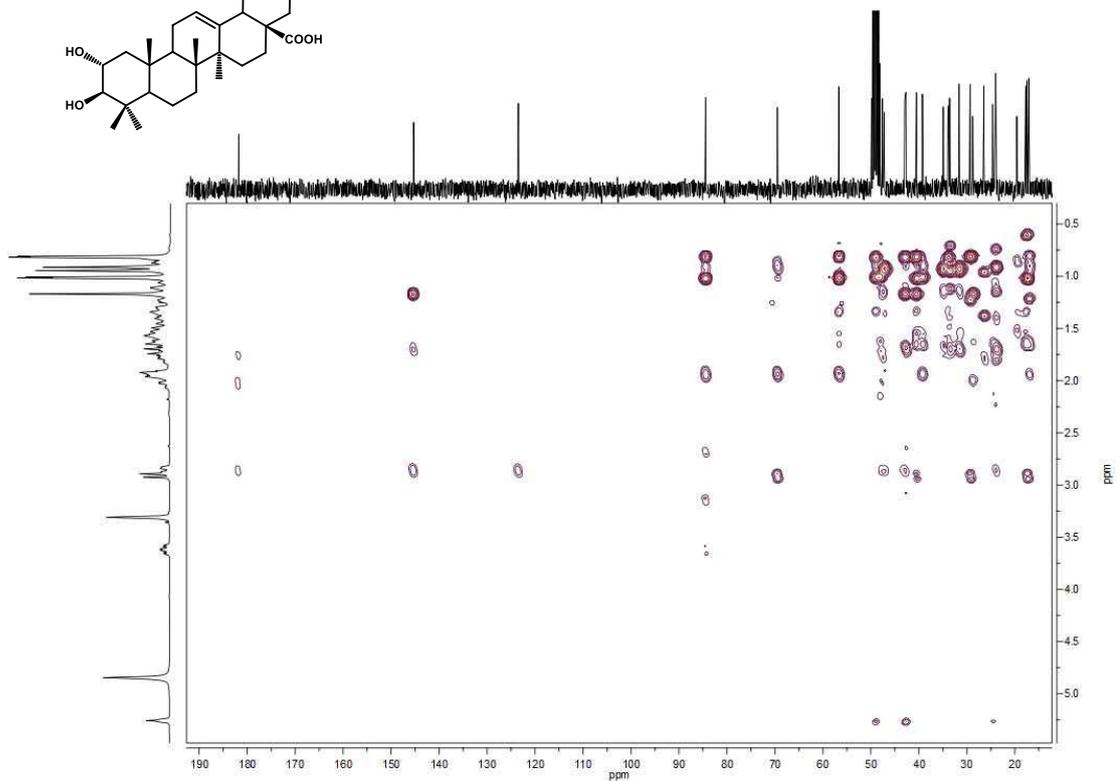
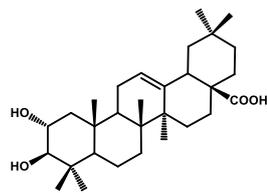
Espectro de ^1H RMN del producto 2



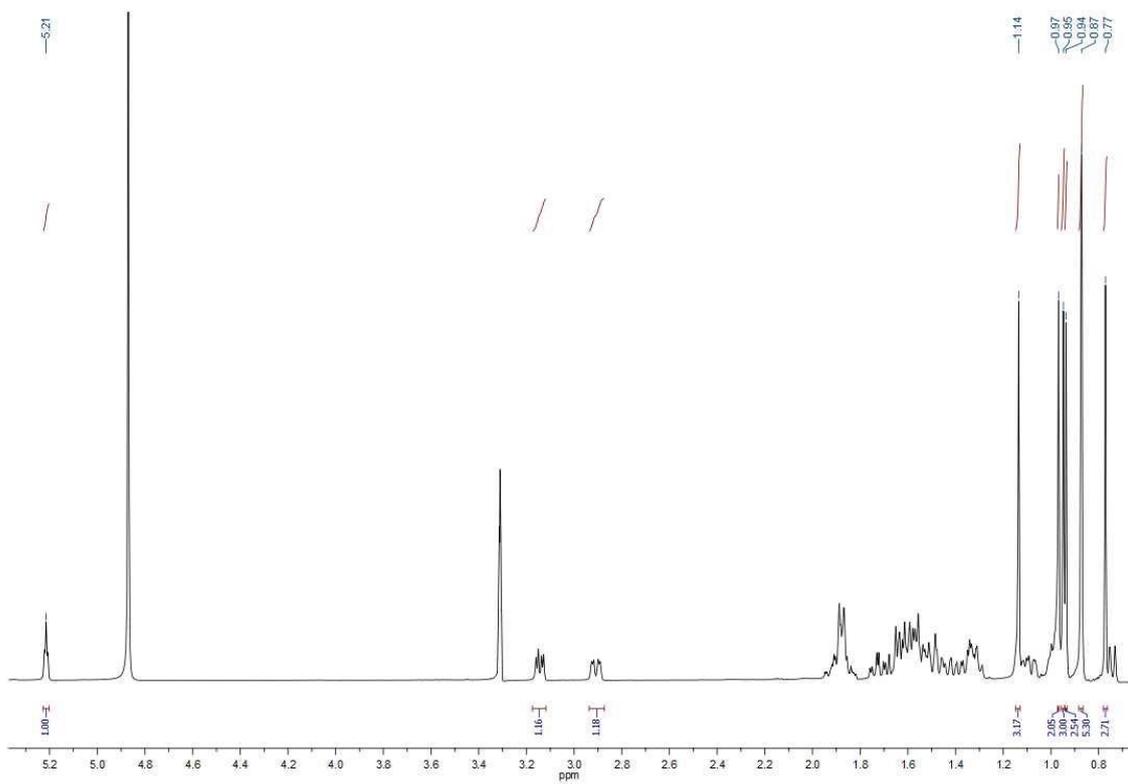
Espectro de ^{13}C RMN del producto 2



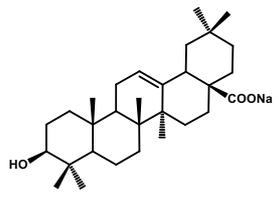
Espectro HMQC del producto 2

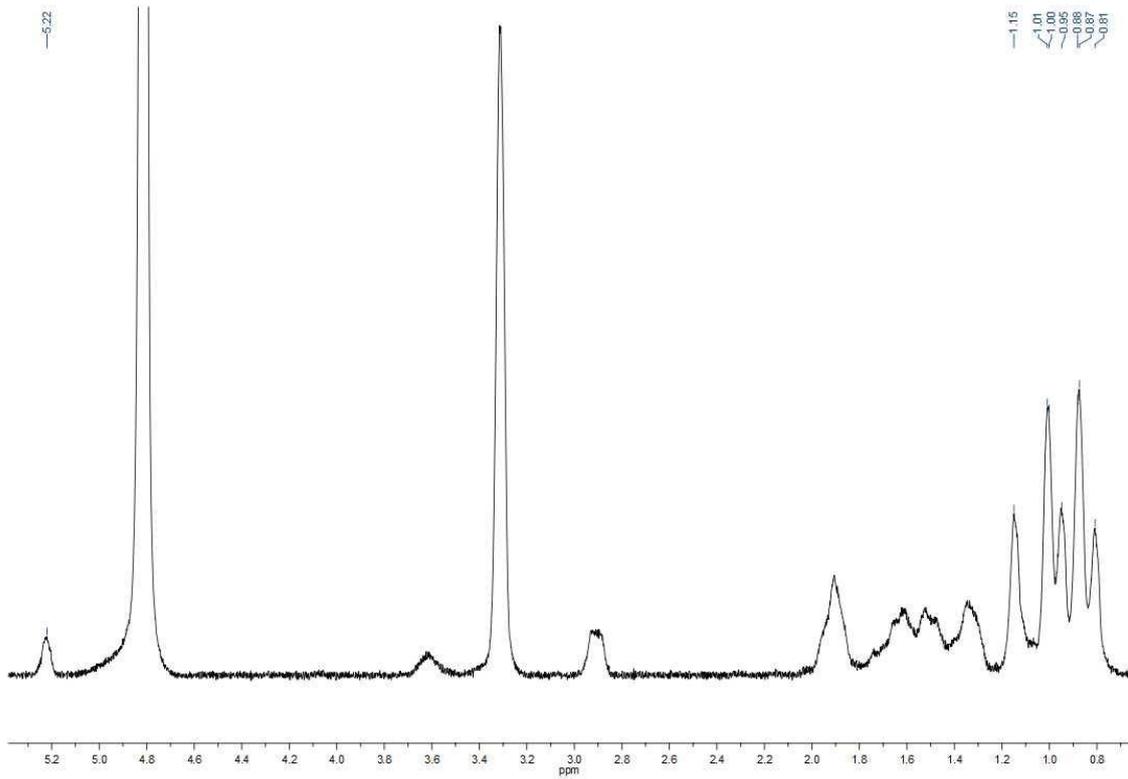


Espectro HMBC del producto 2

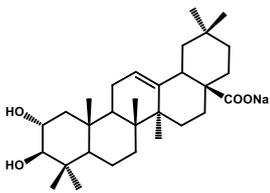


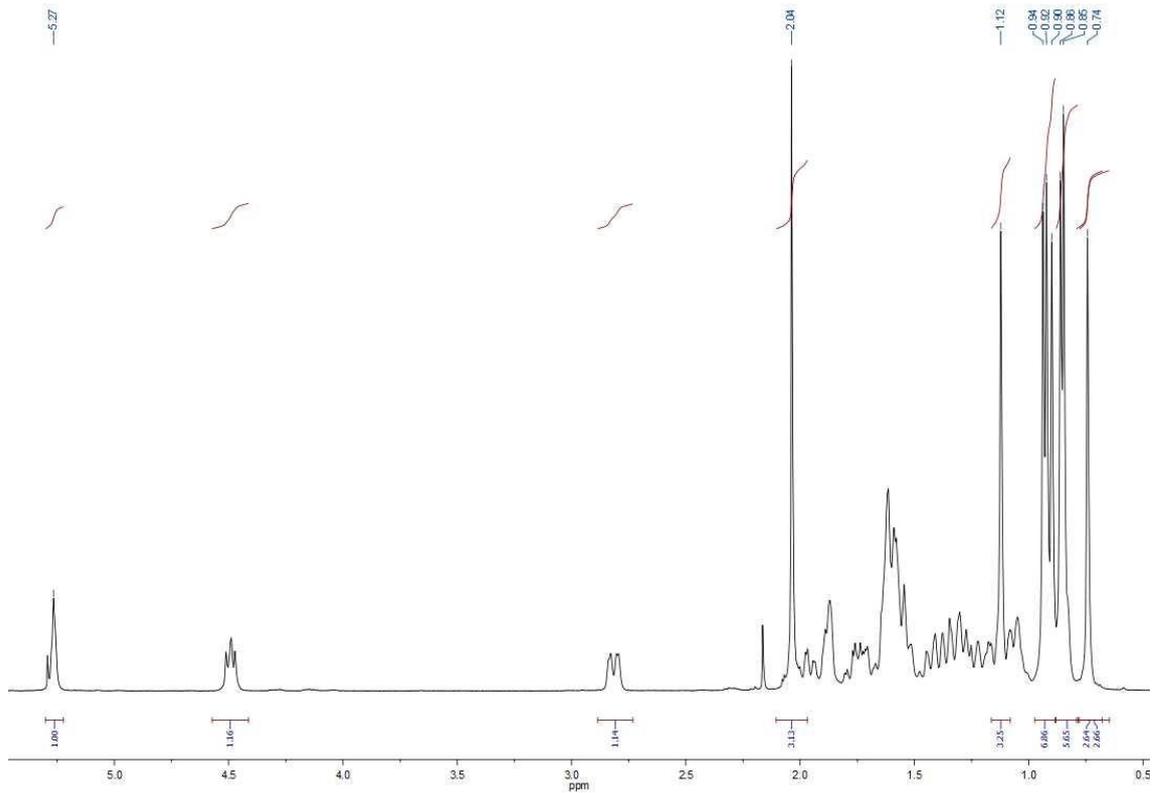
Espectro de ¹H RMN del producto 3



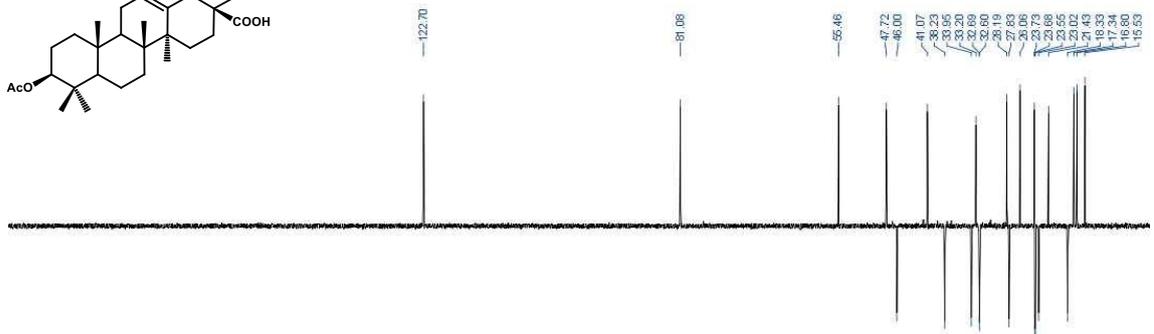
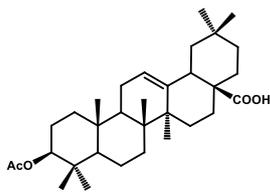


Espectro ^1H RMN del producto 4

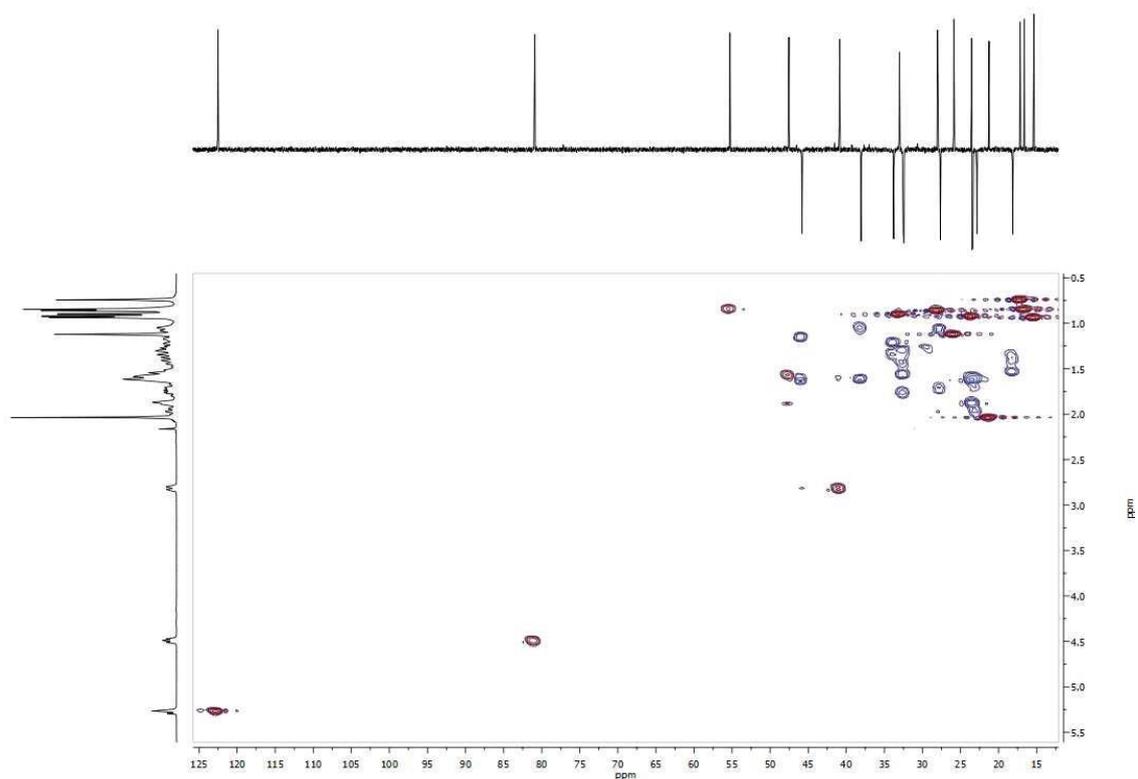




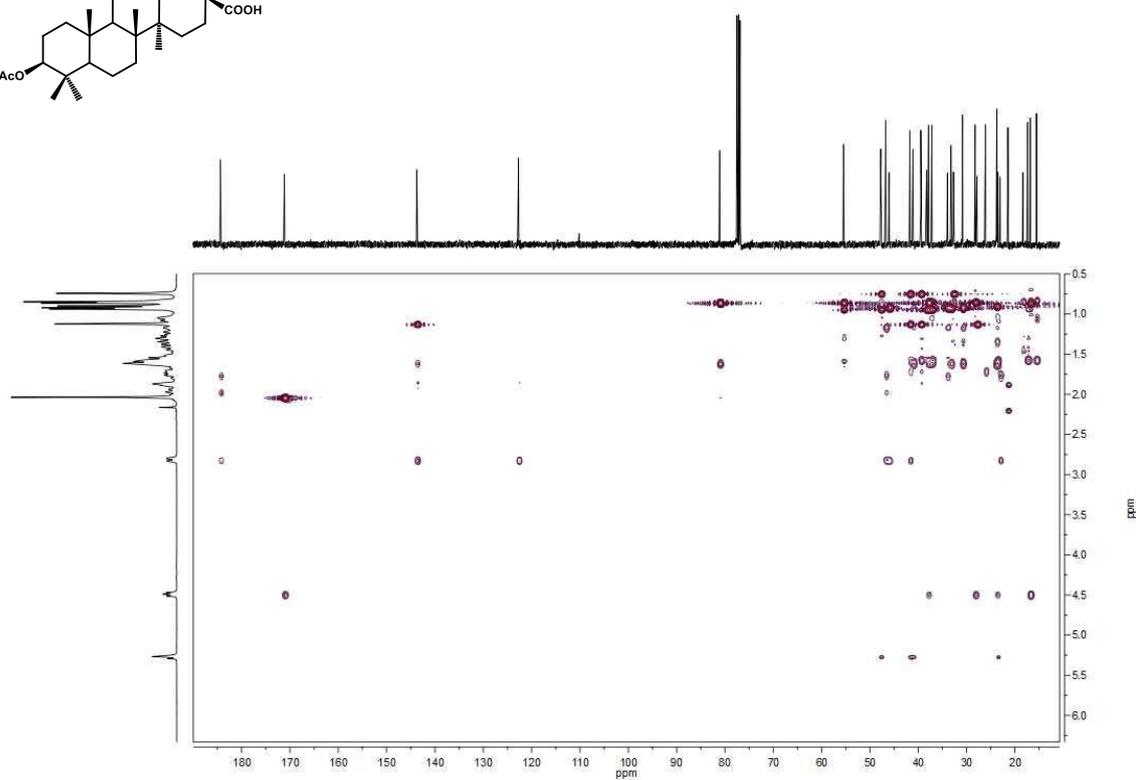
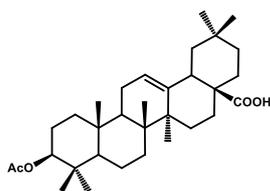
Espectro de ^1H RMN del producto 5



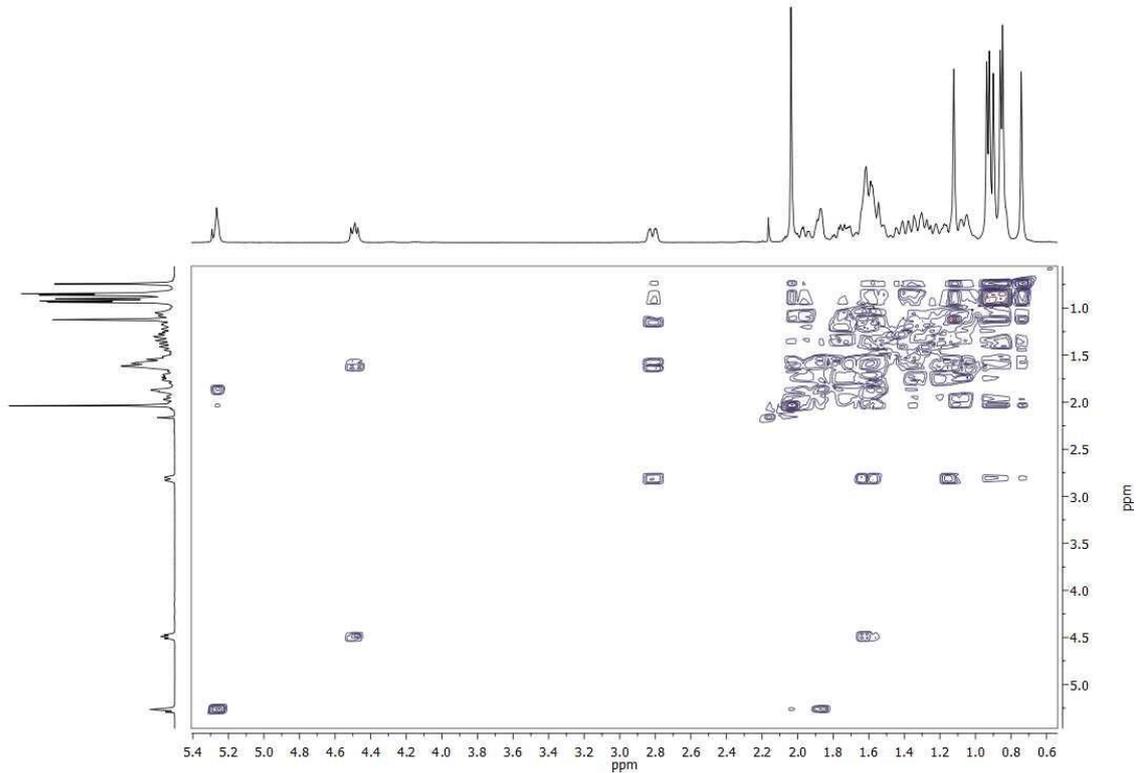
Espectro ^{13}C RMN del producto 5



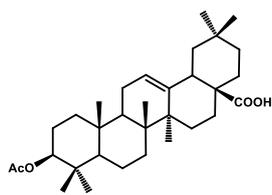
Espectro HSQC del producto 5

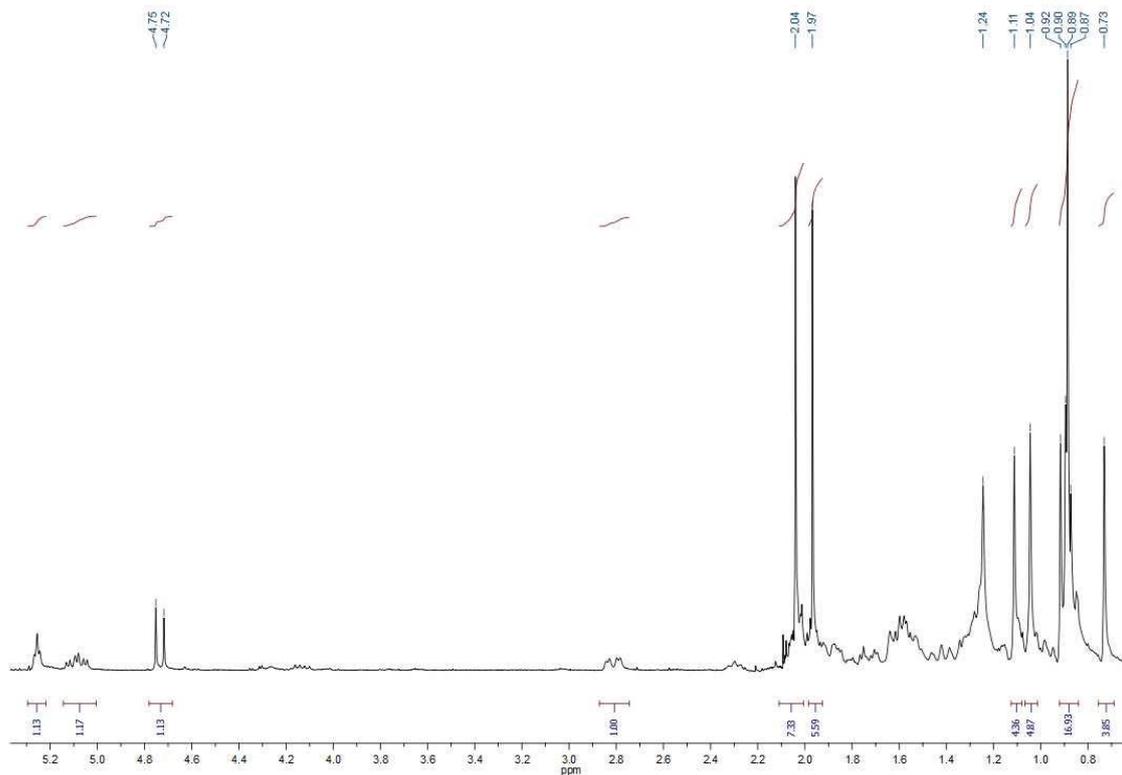


Espectro HMBC del producto 5

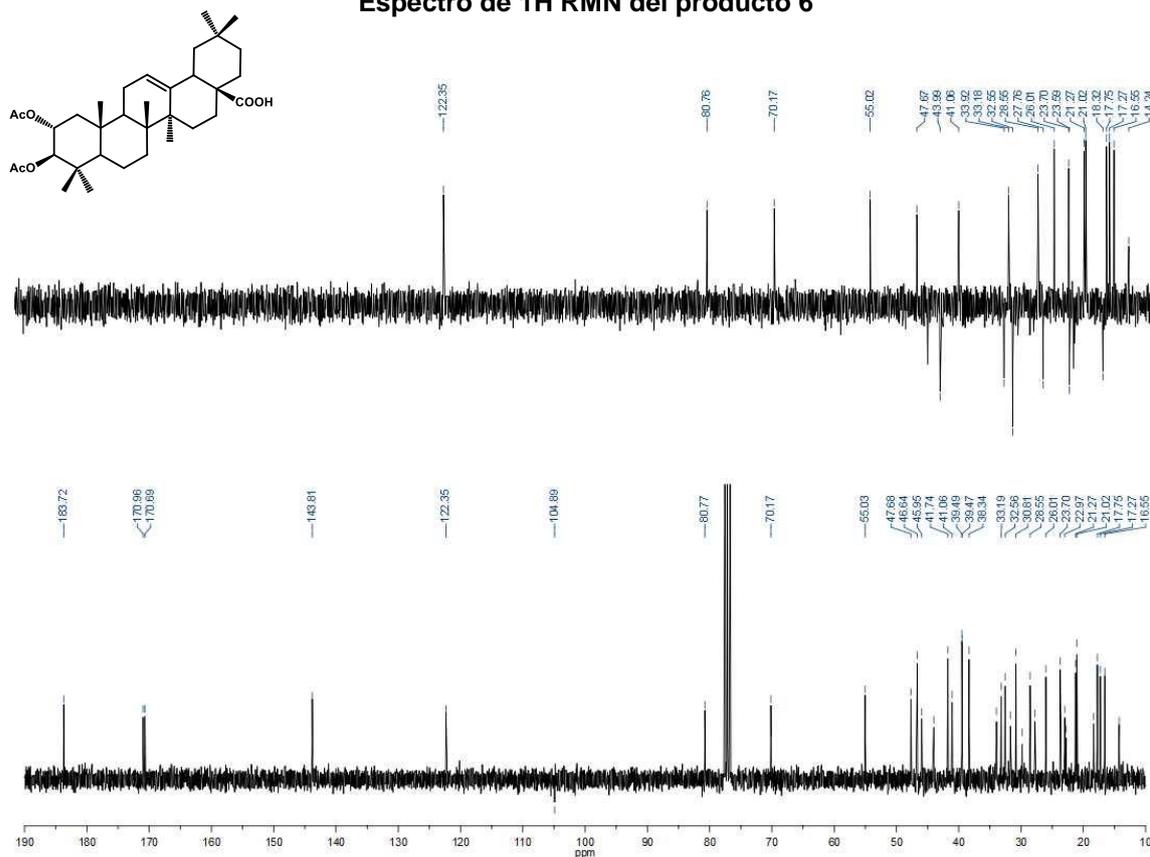


COSY del producto 5

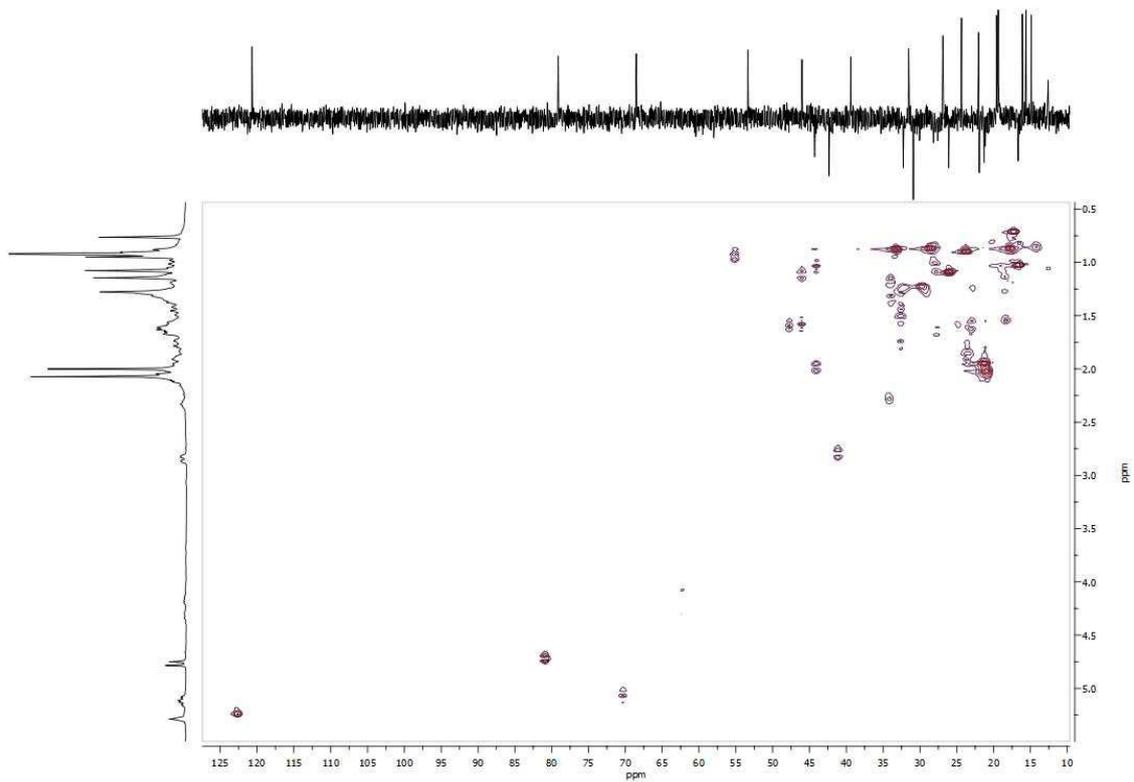




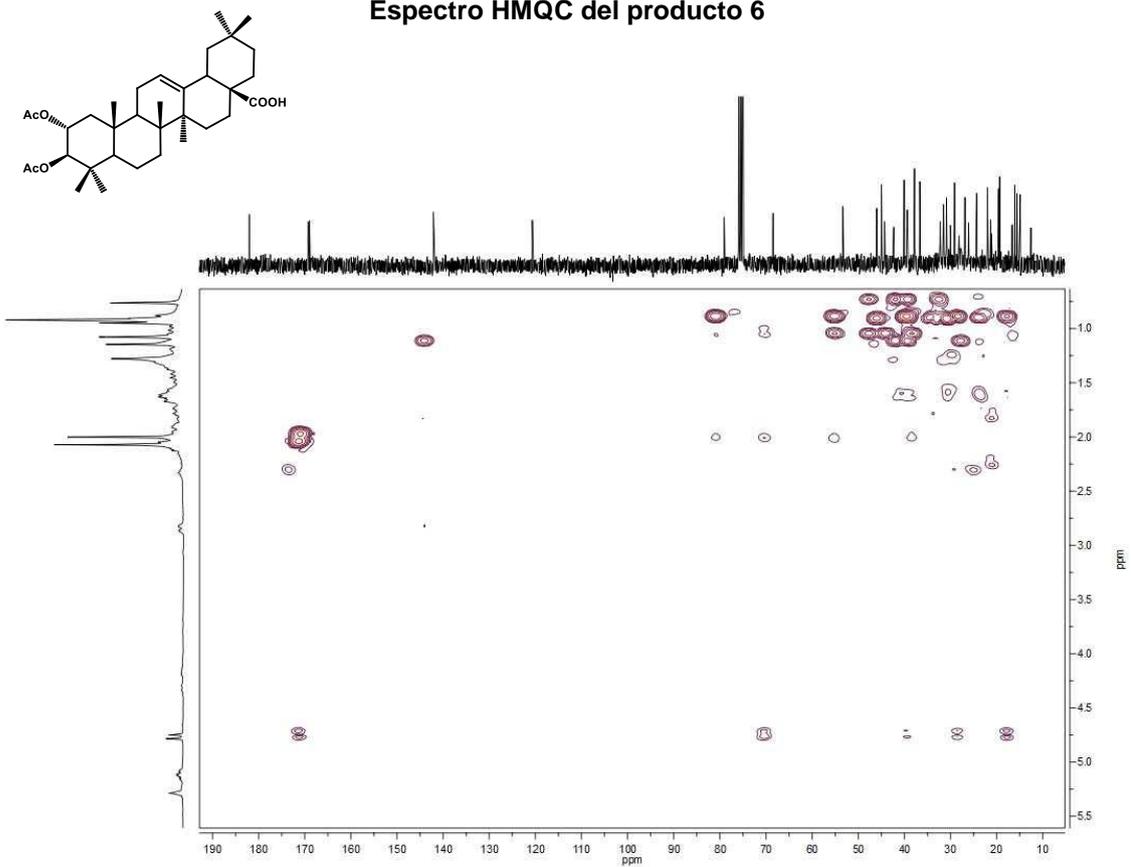
Espectro de ^1H RMN del producto 6



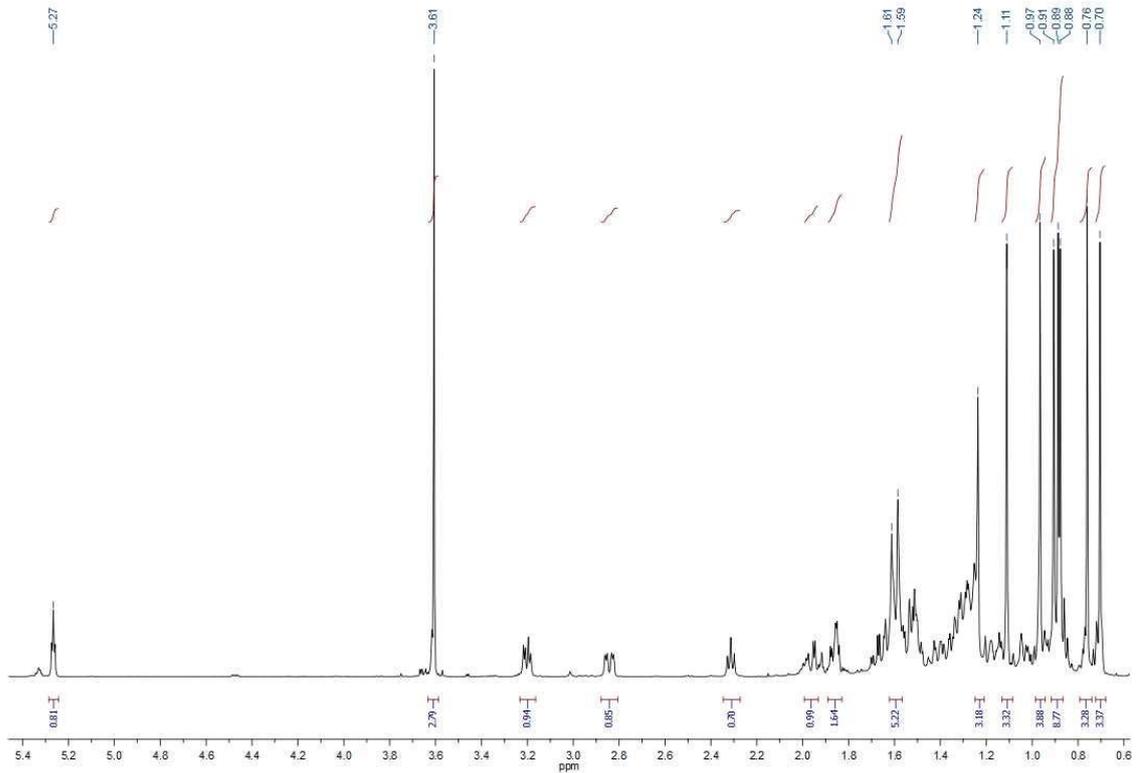
Espectro ^{13}C RMN del producto 6



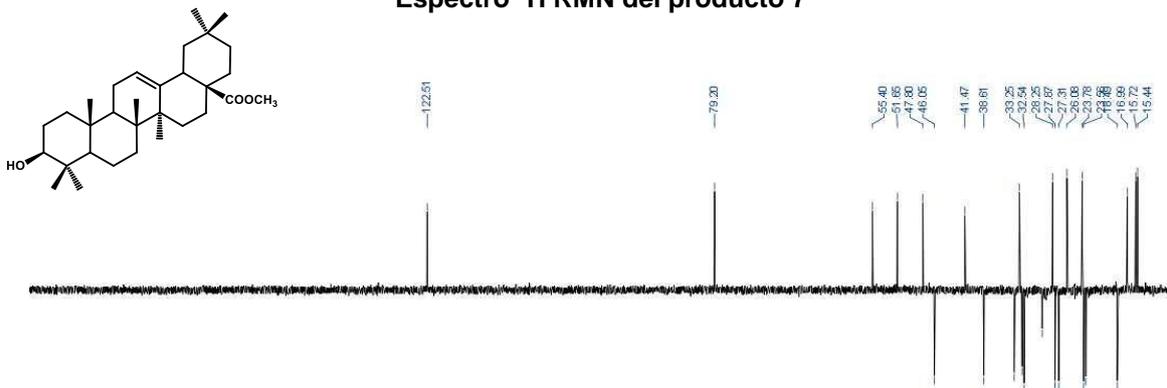
Espectro HMBC del producto 6



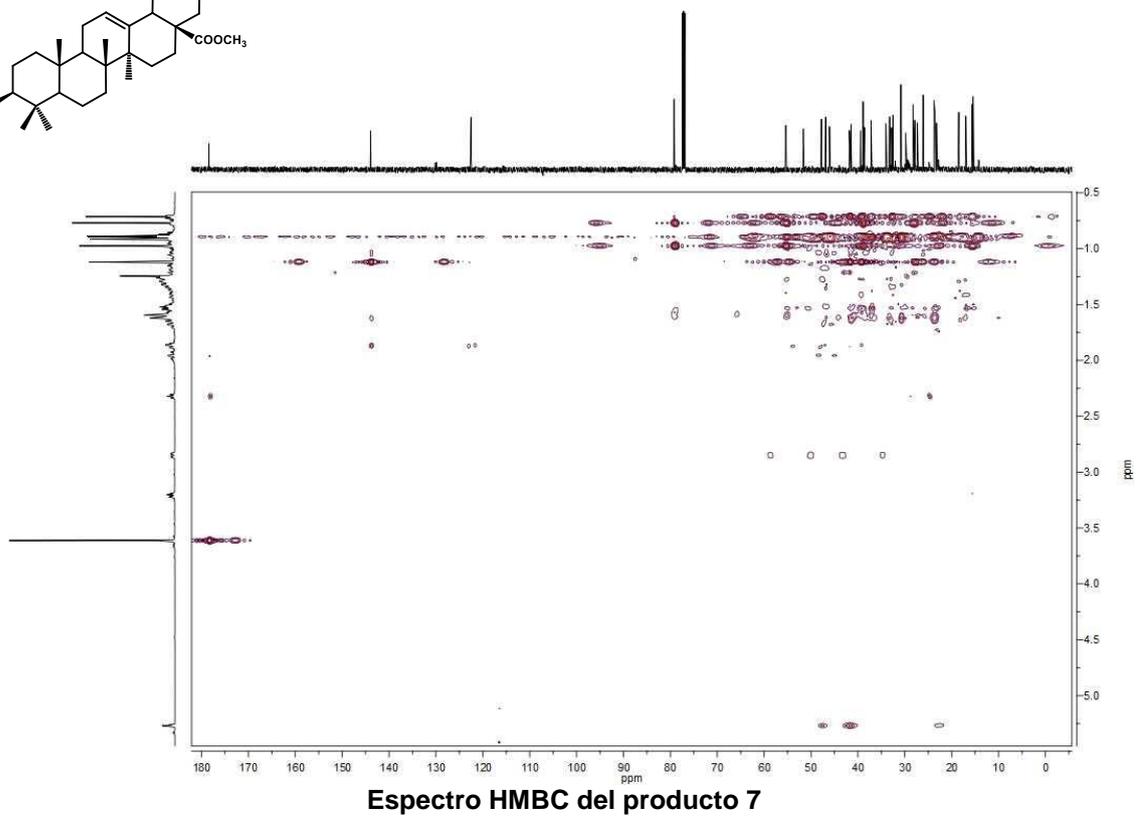
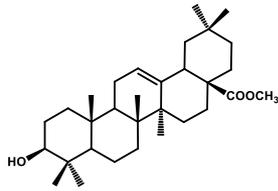
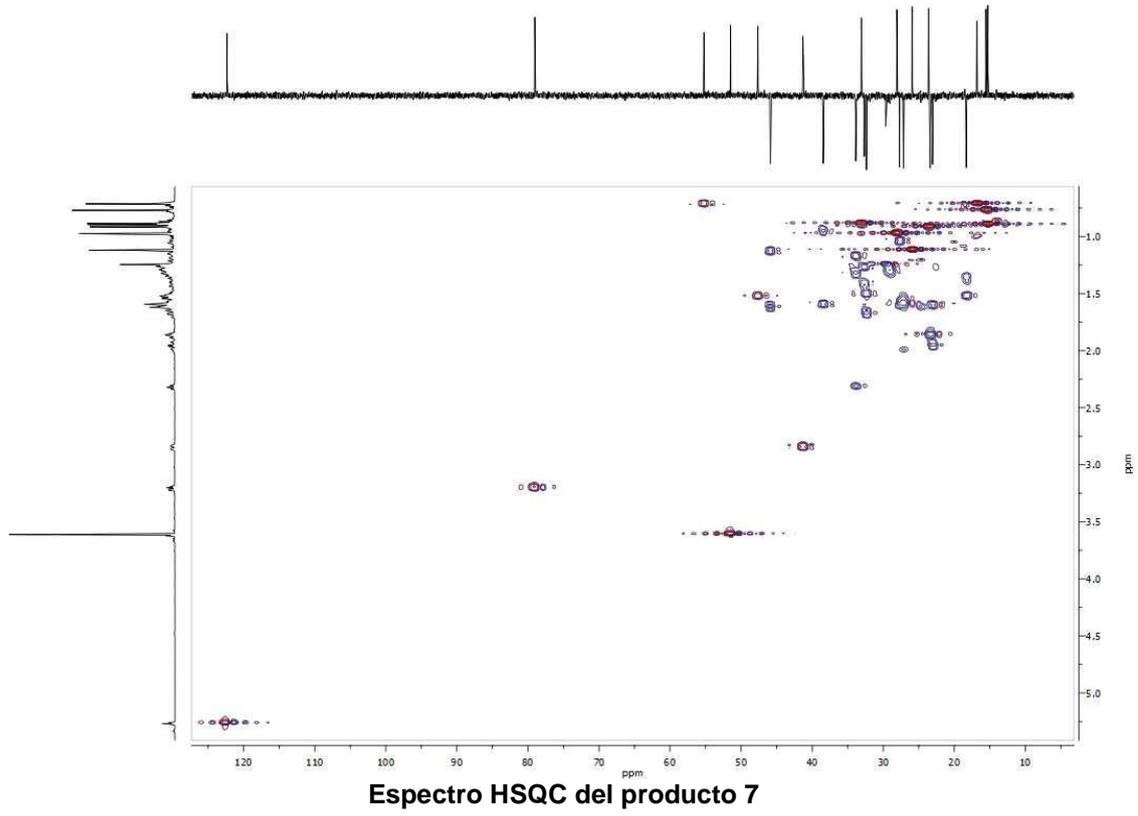
Espectro HMBC del producto 6

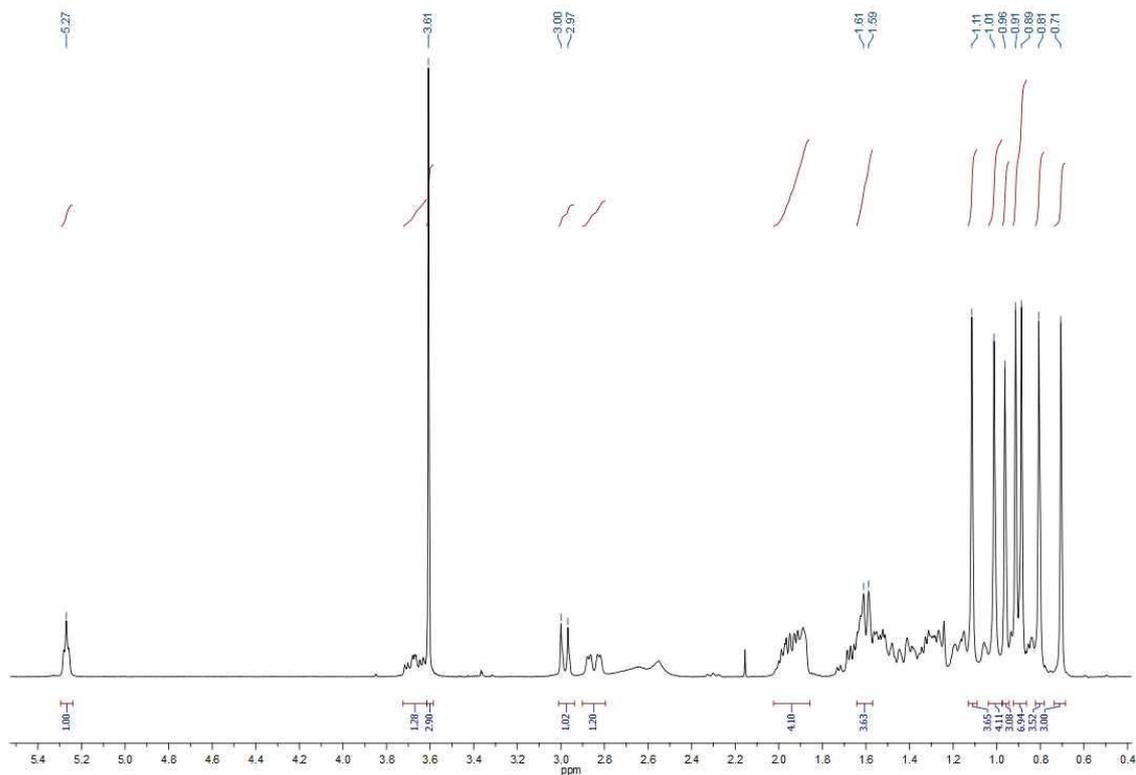


Espectro ^1H RMN del producto 7

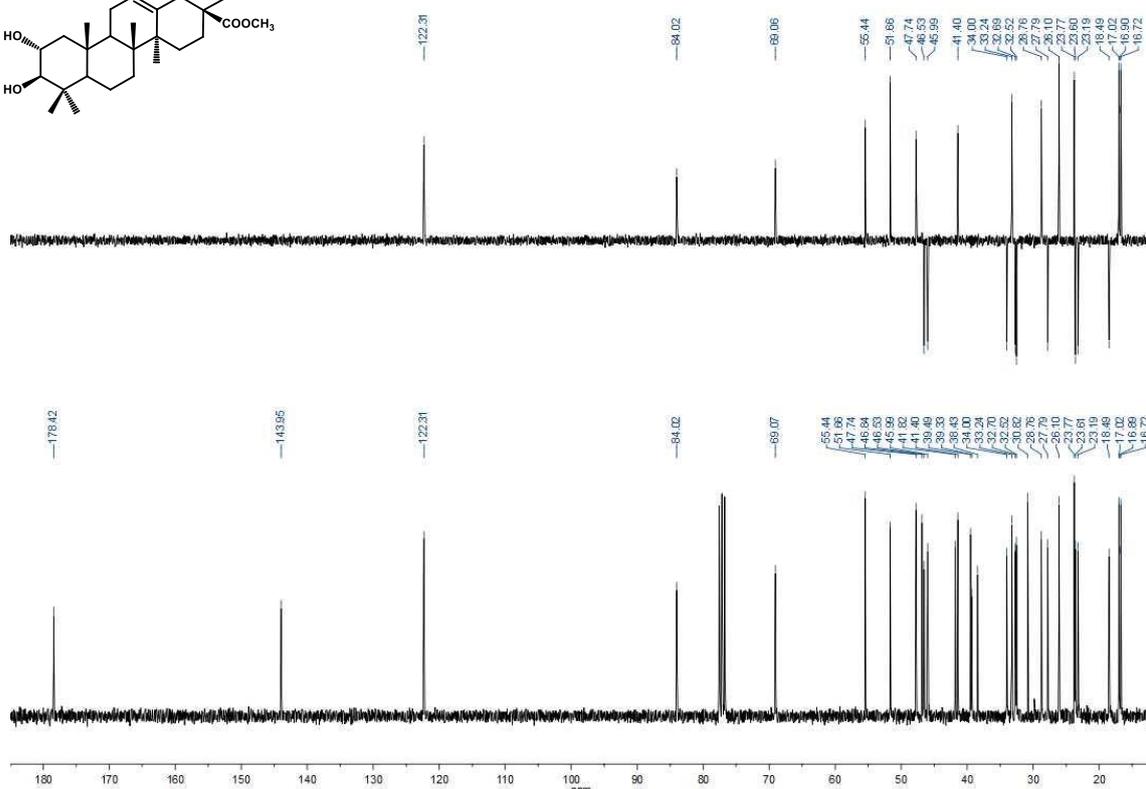
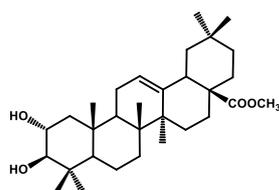


Espectro ^{13}C RMN del producto 7

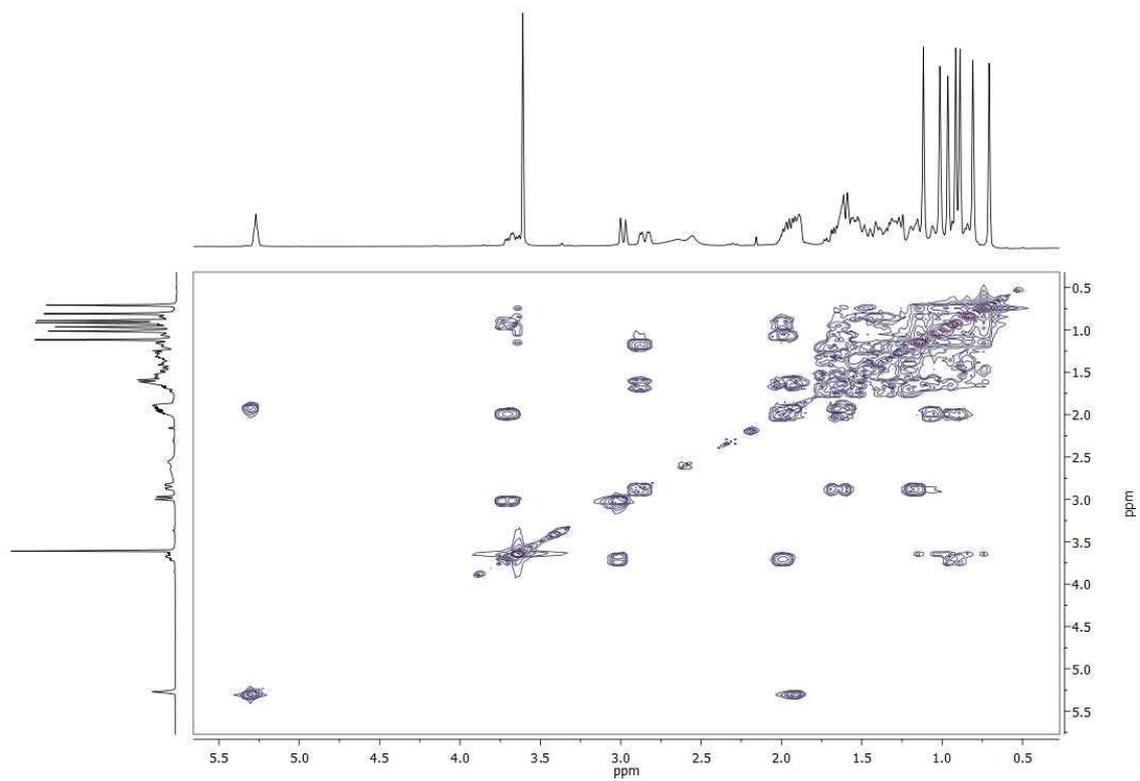




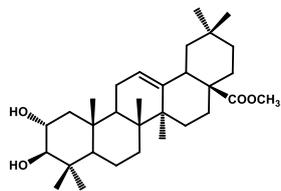
Espectro ^1H RMN del producto 8

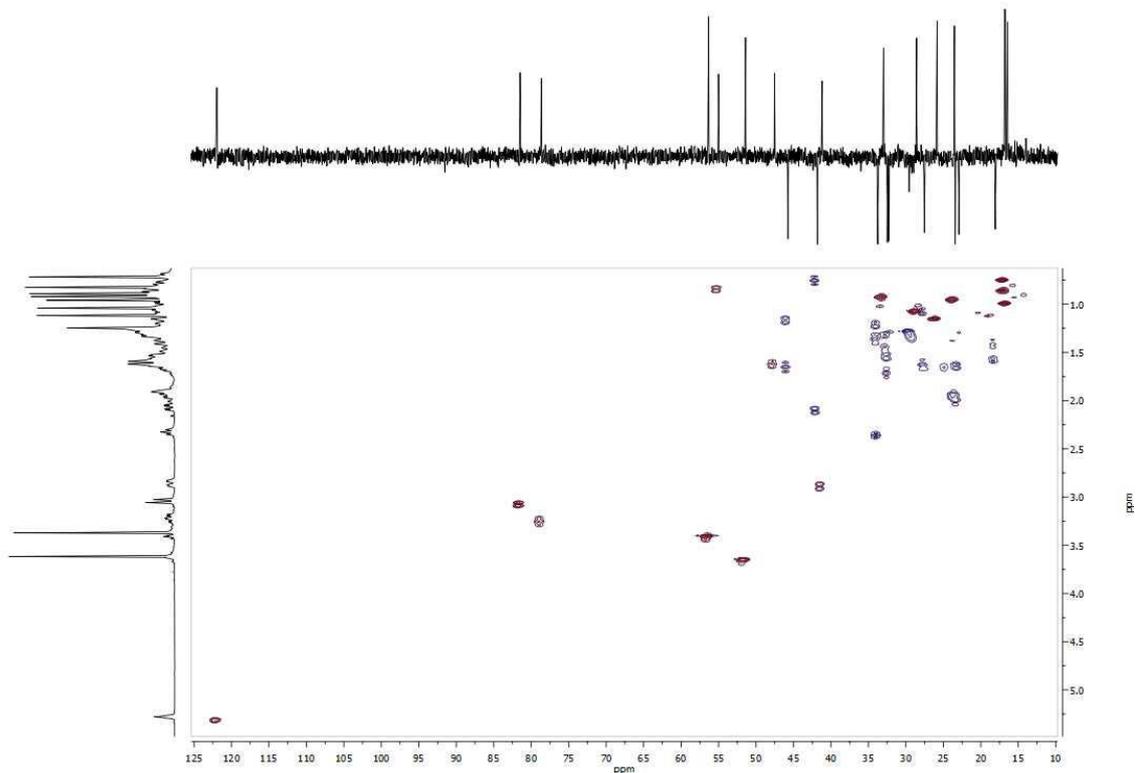


Espectro de ^{13}C RMN del producto 8

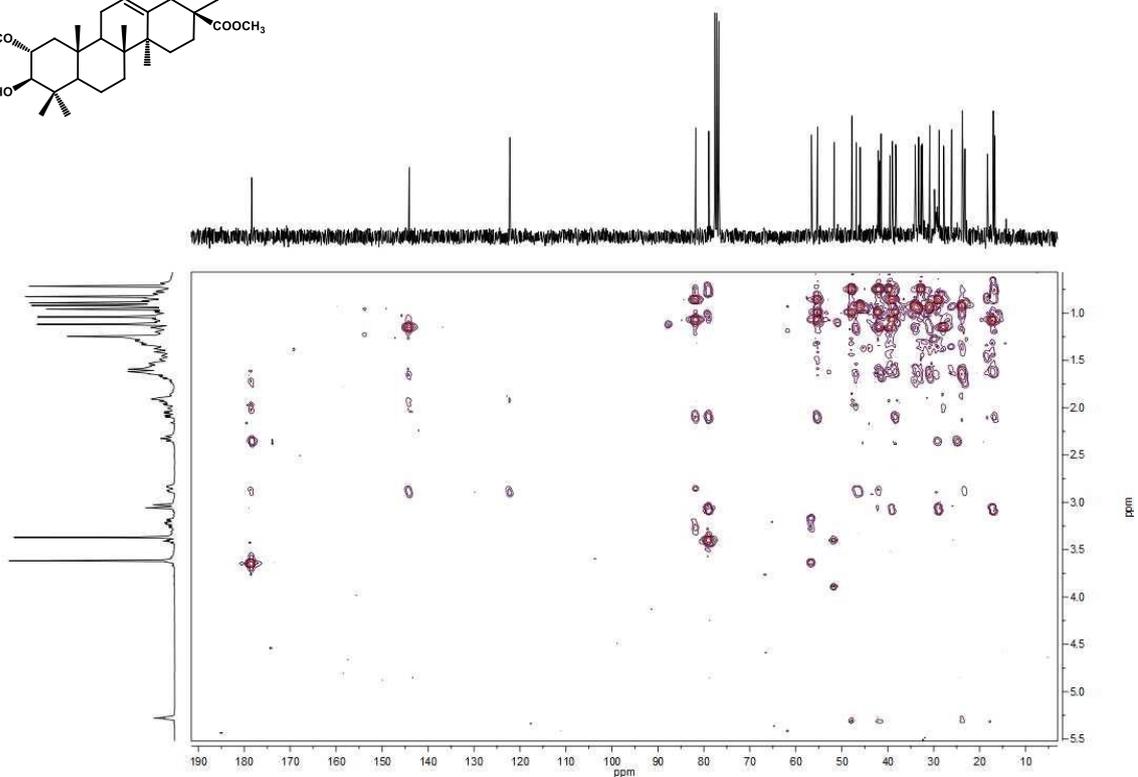
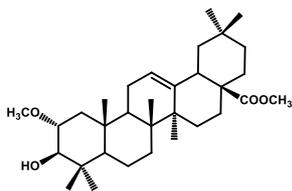


COSY del producto 8

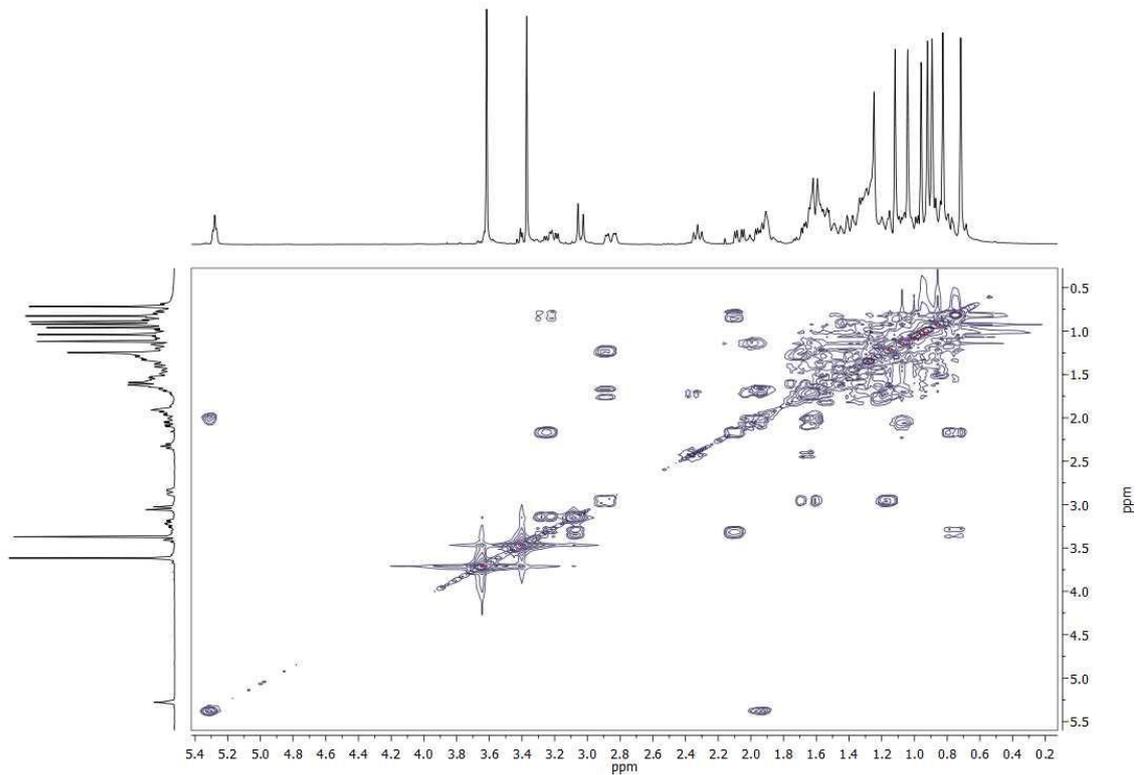




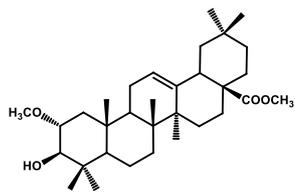
Espectro HSQC del producto 9

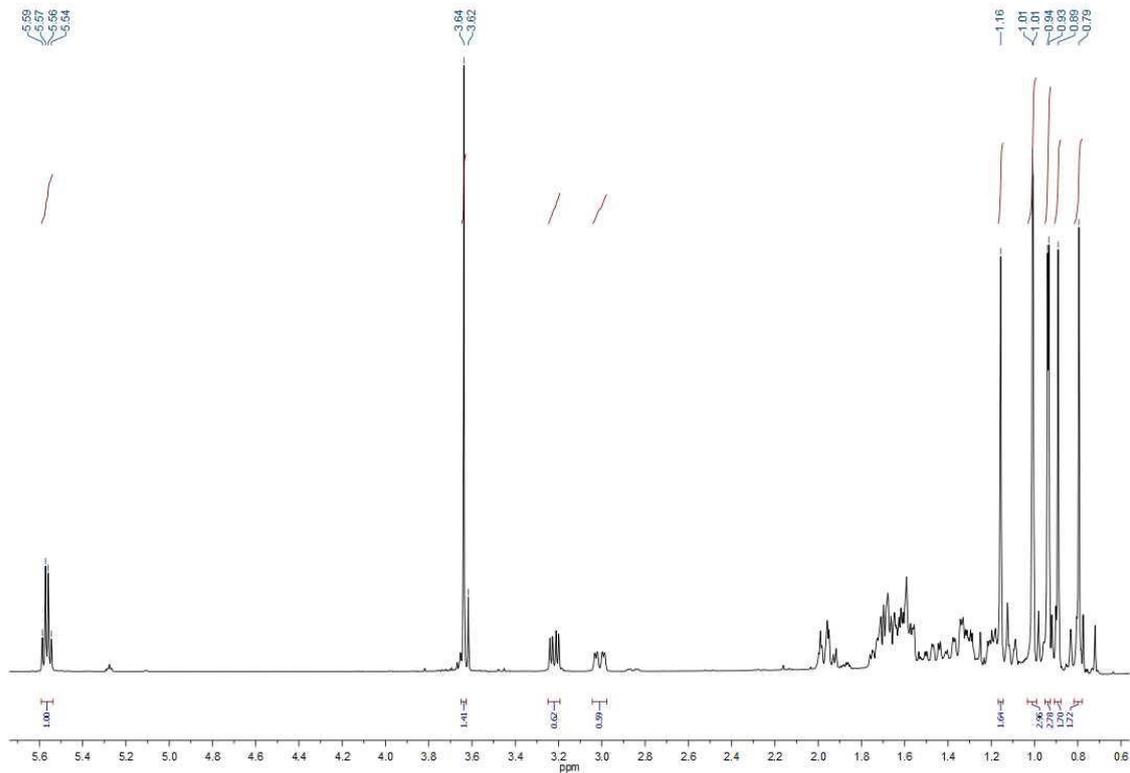


Espectro HMBC del producto 9

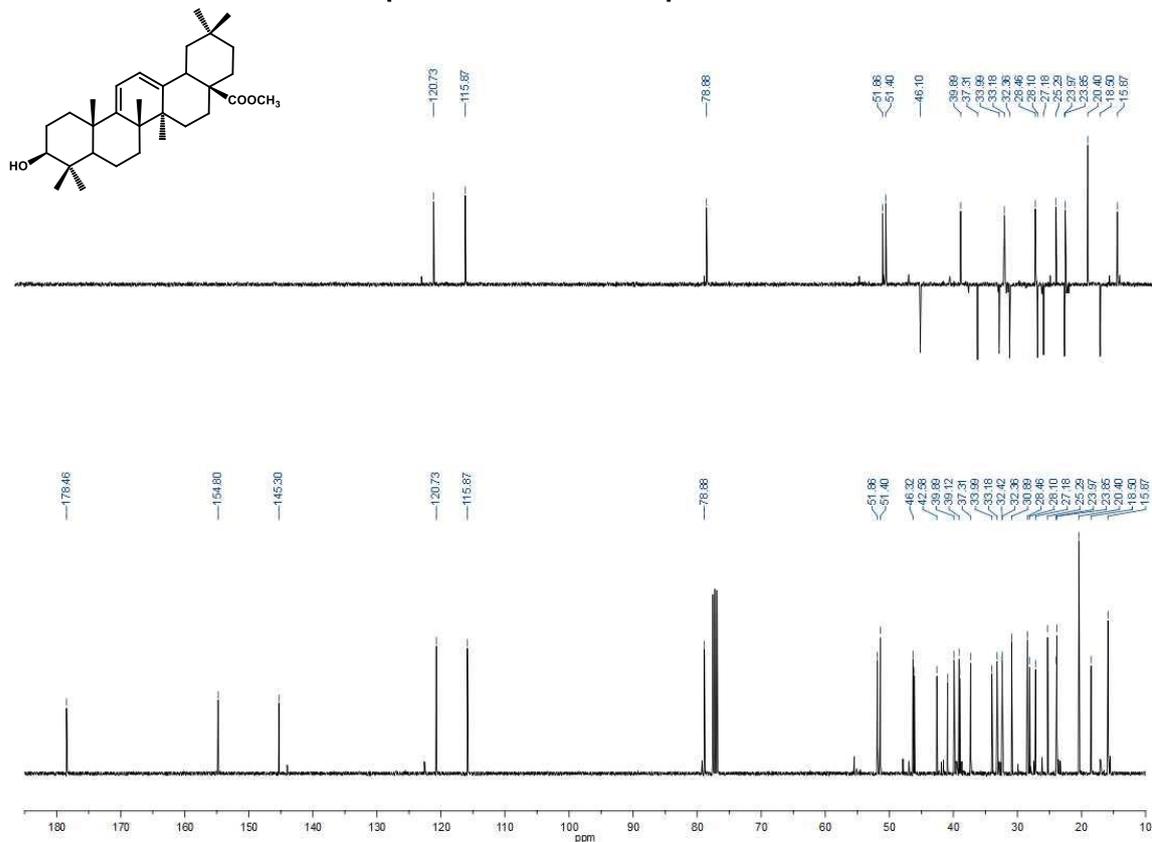


COSY del producto 9

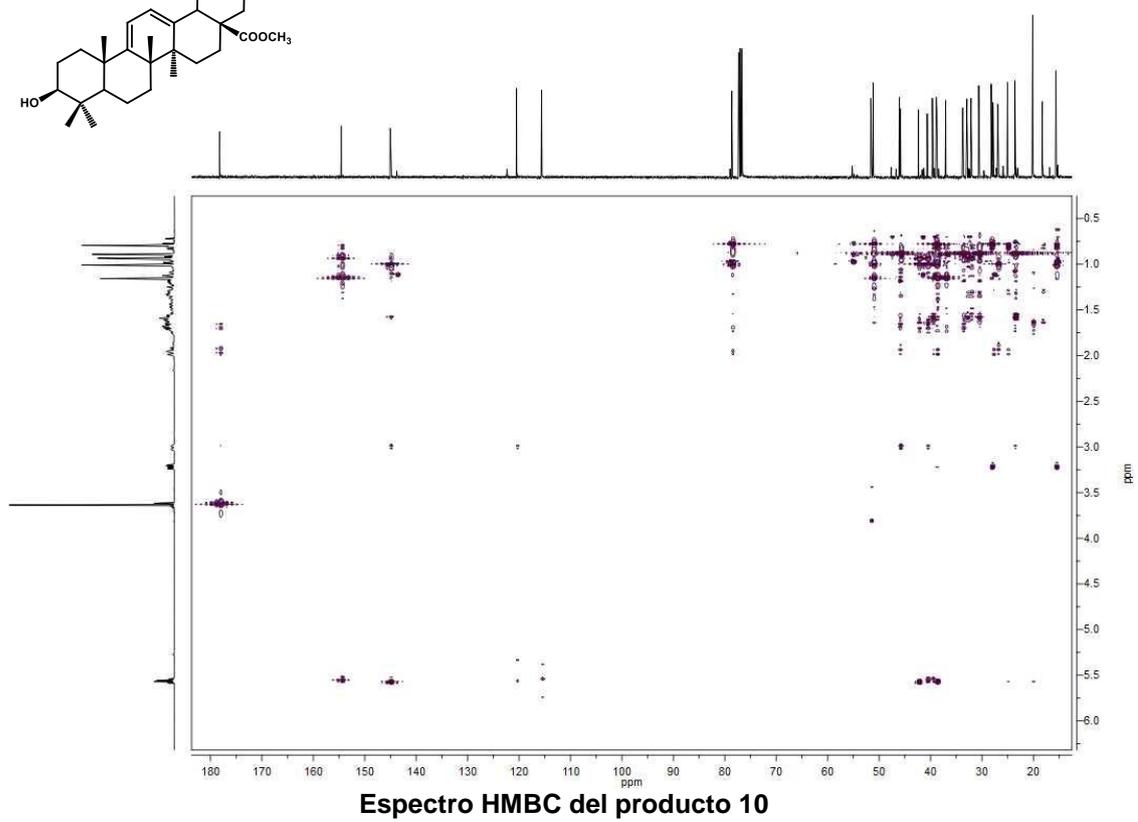
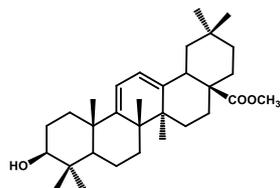
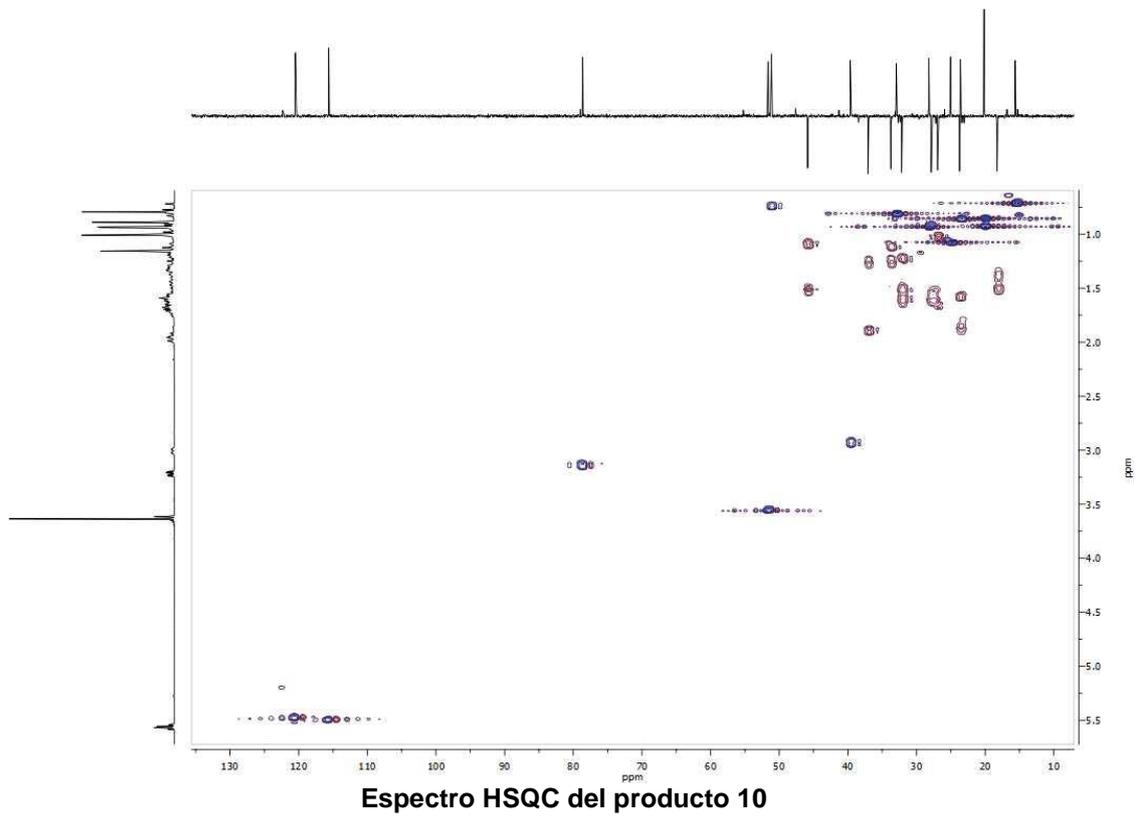


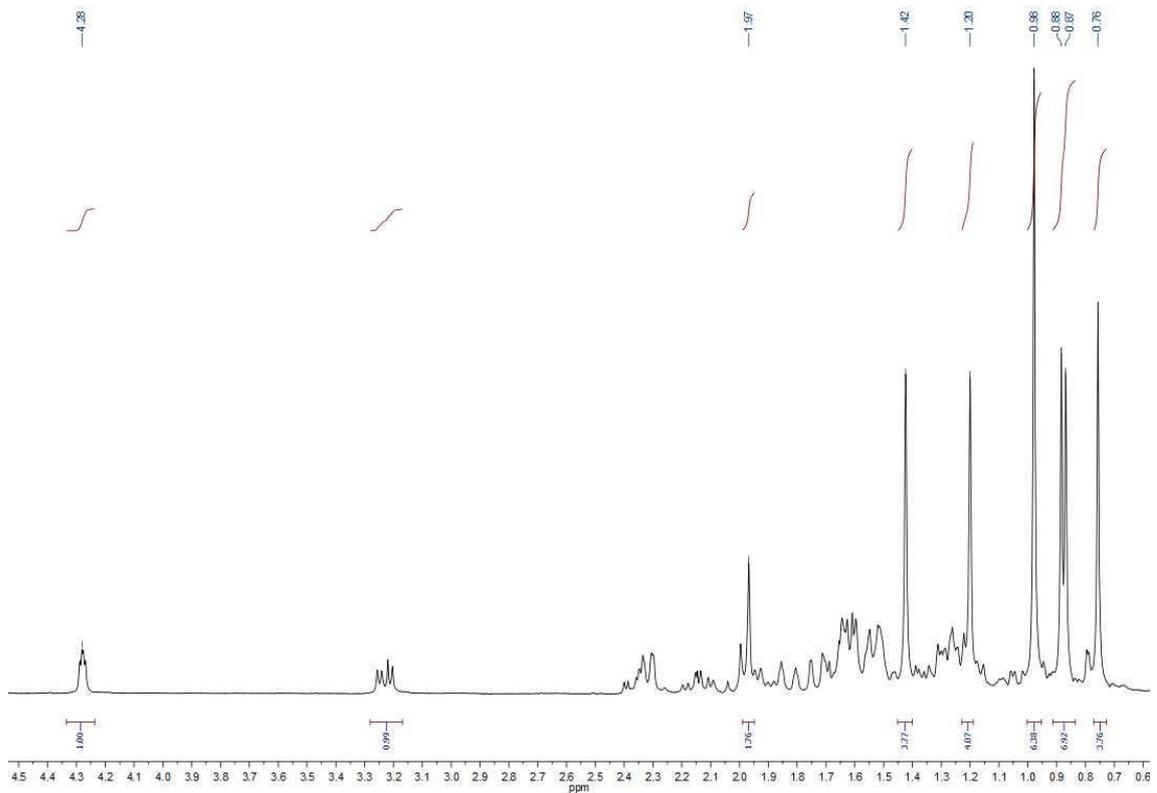


Espectro de ^1H RMN del producto 10

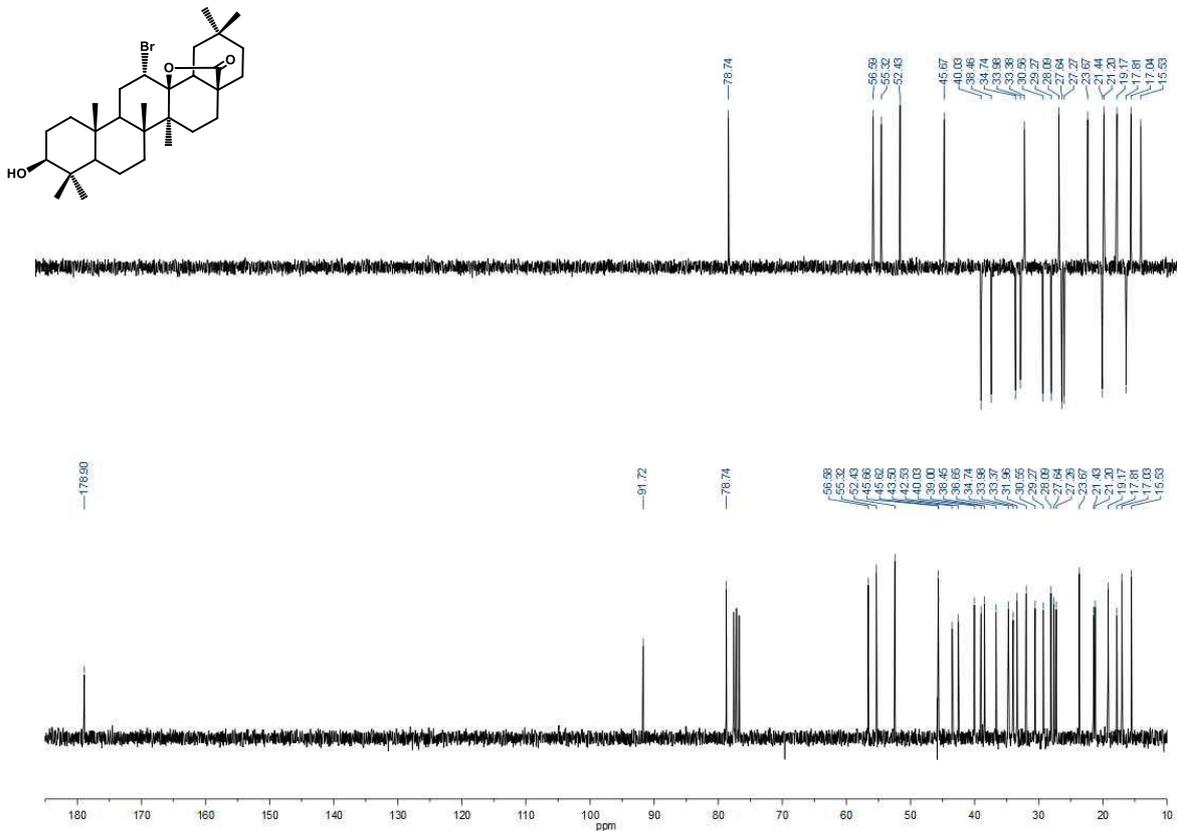


Espectro de ^{13}C RMN del producto 10

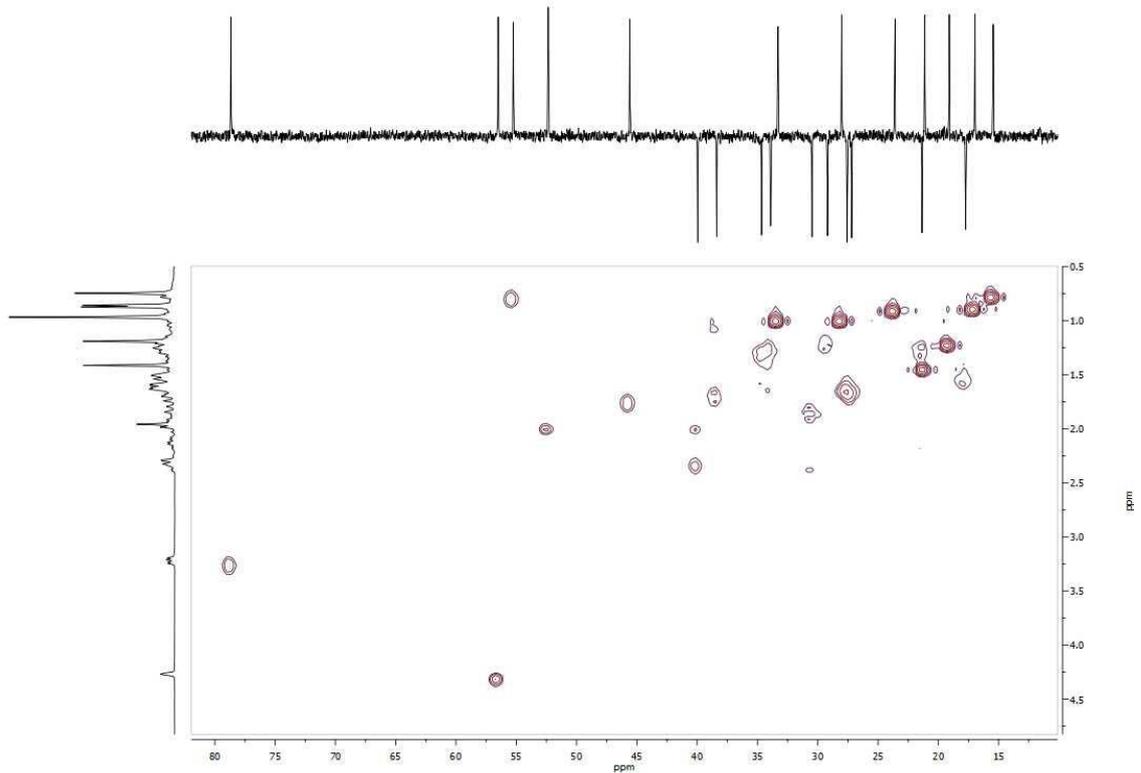




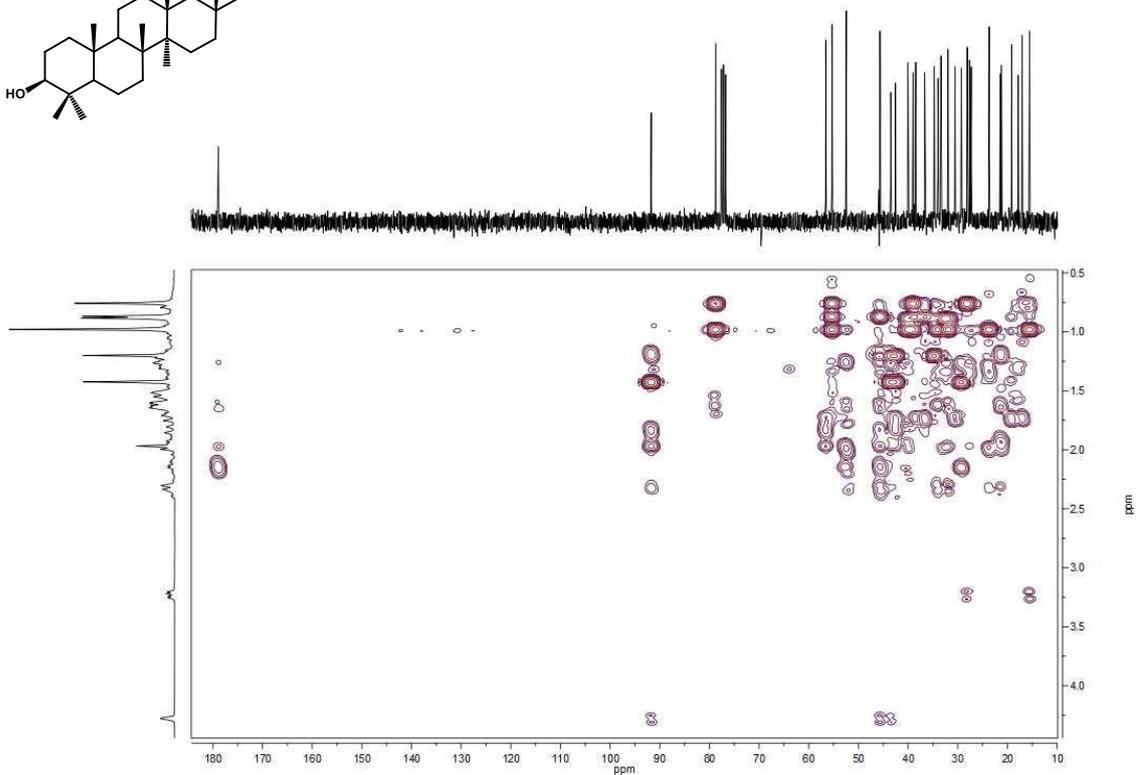
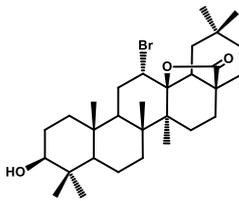
Espectro de ^1H RMN del producto 11



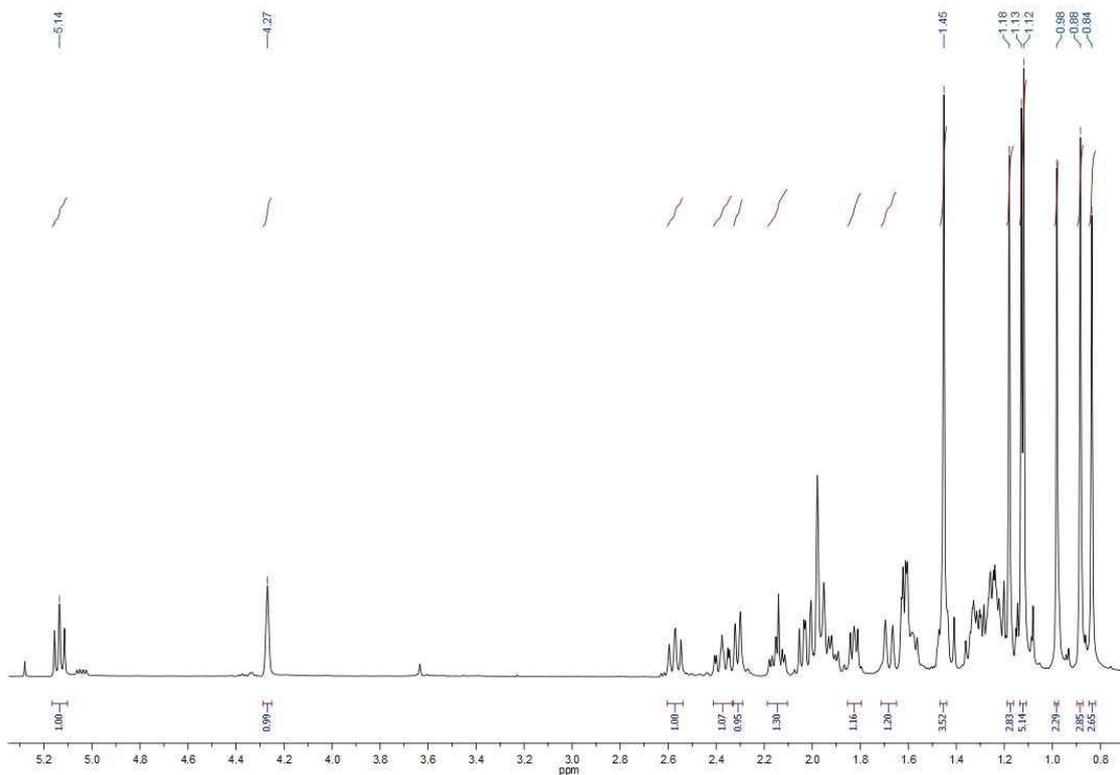
Espectro de ^{13}C RMN del producto 11



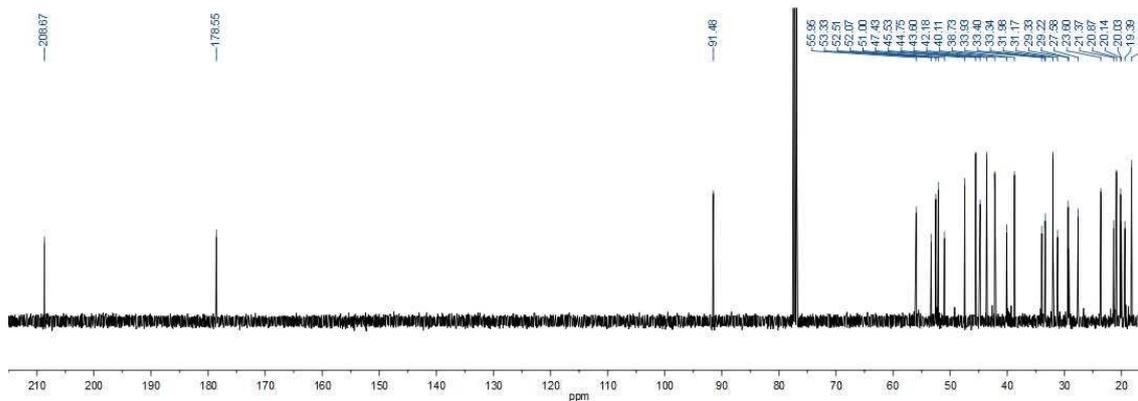
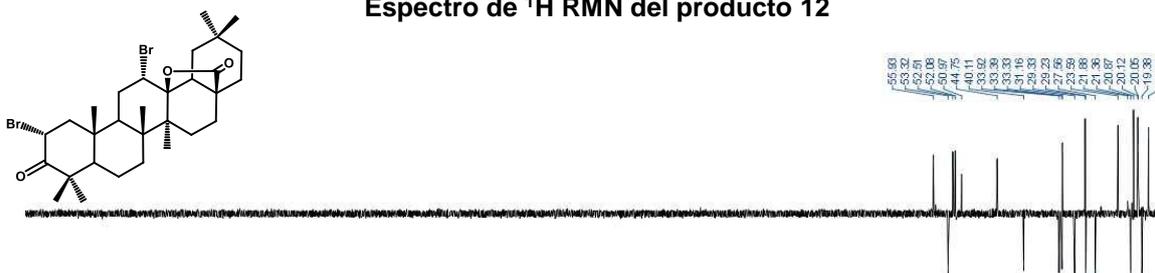
Espectro HSQC del producto 11



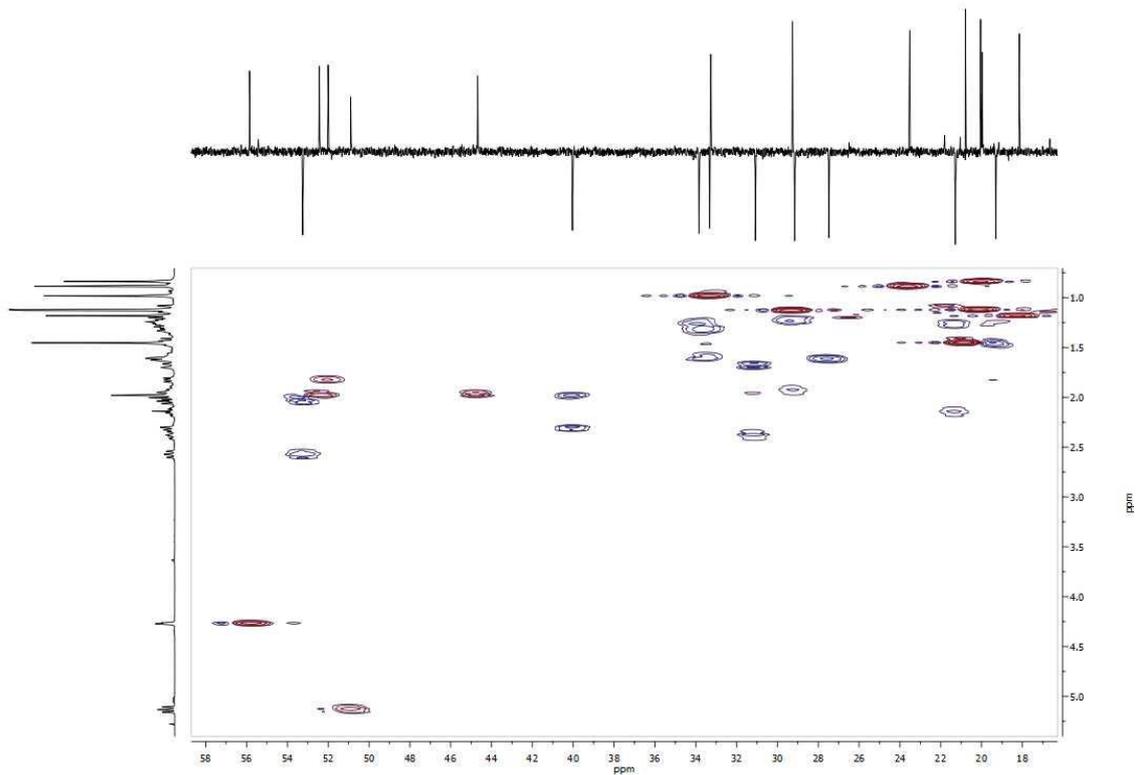
Espectro HMBC del producto 11



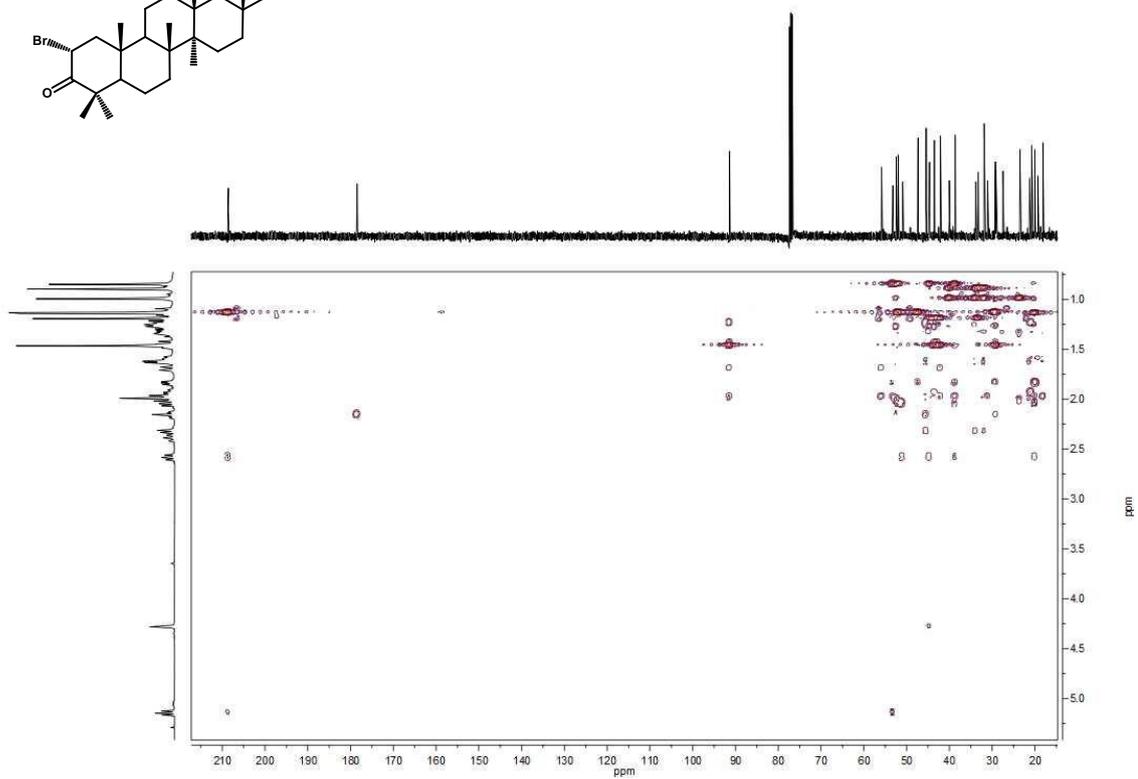
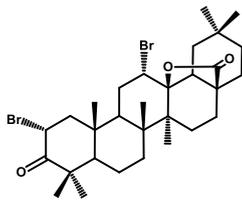
Espectro de ^1H RMN del producto 12



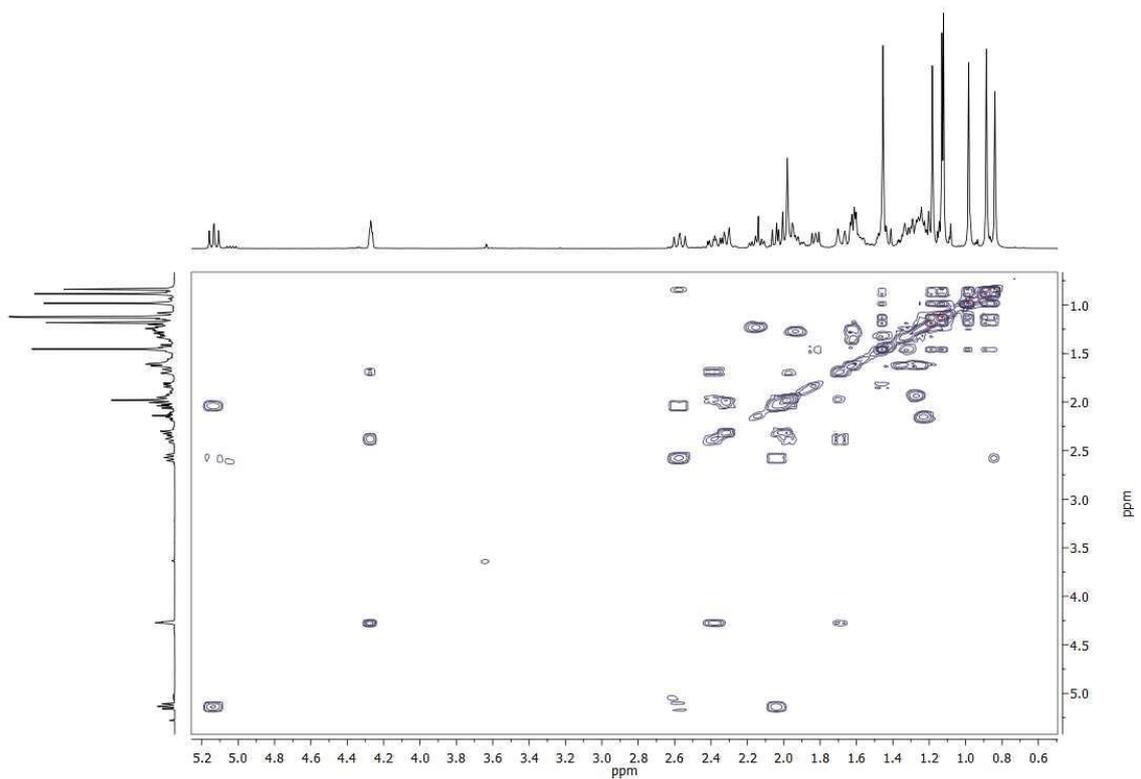
Espectro de ^{13}C RMN del producto 12



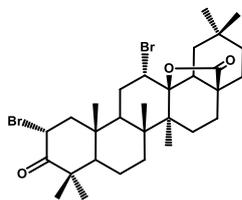
Espectro HSQC del producto 12

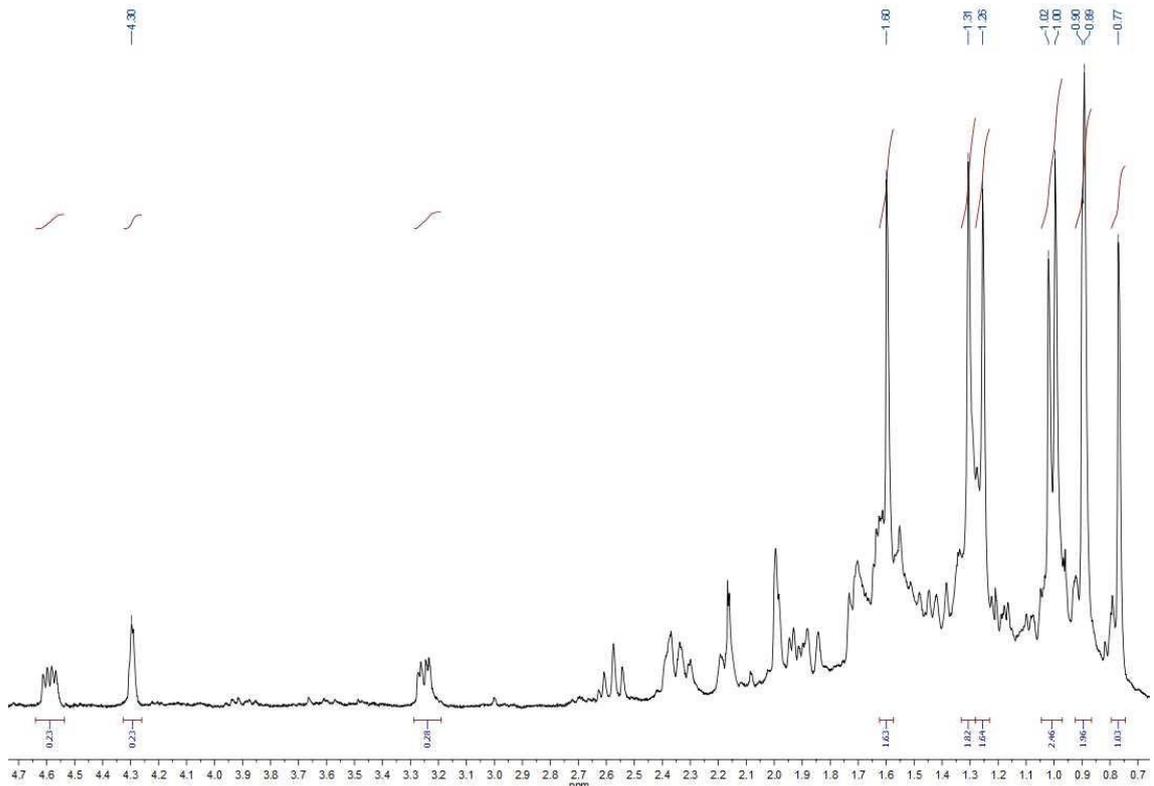


Espectro HMBC del producto 12

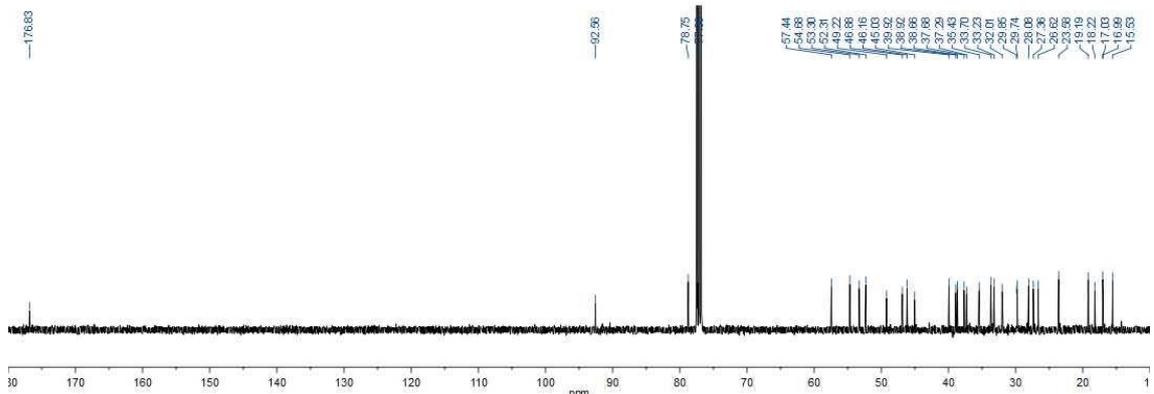
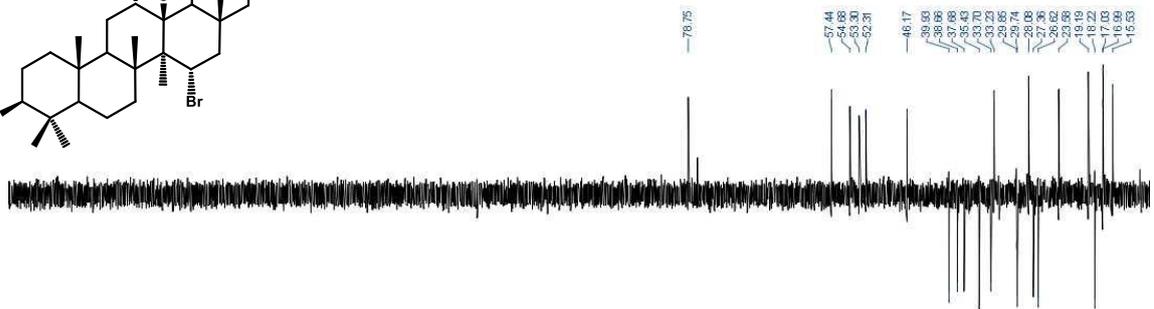
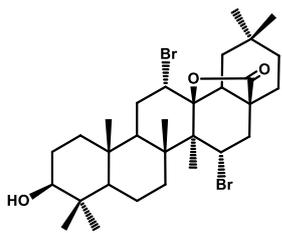


COSY del producto 12

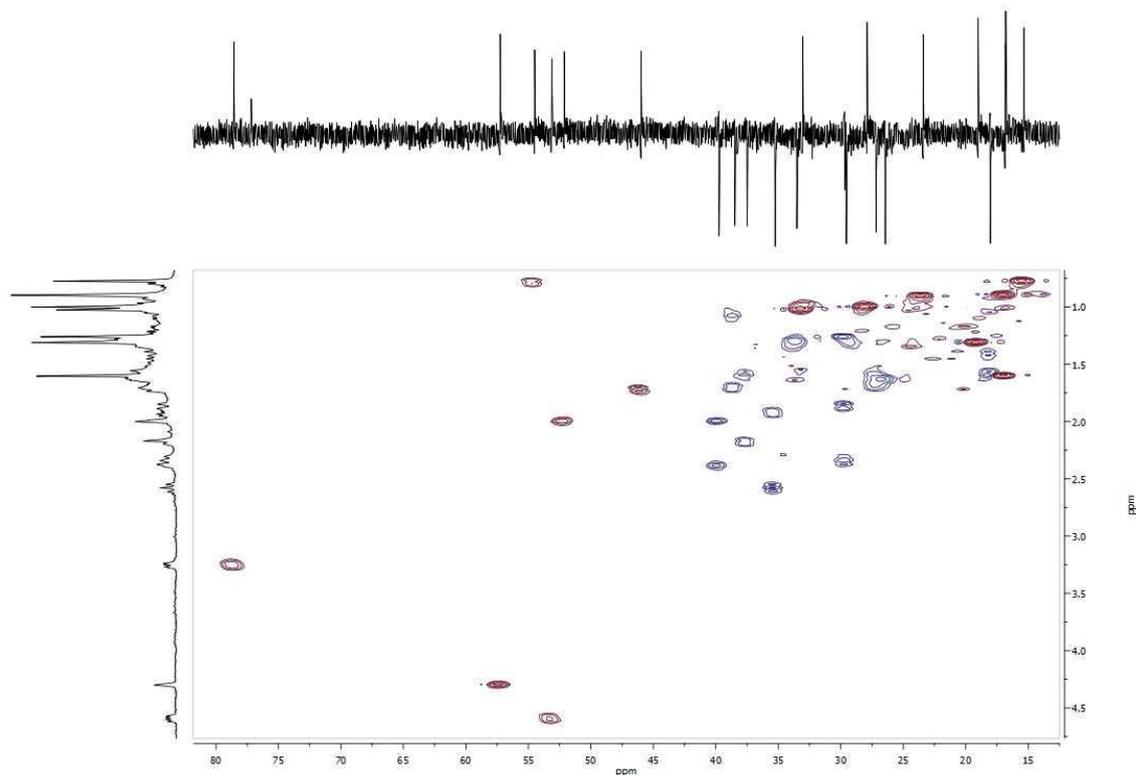




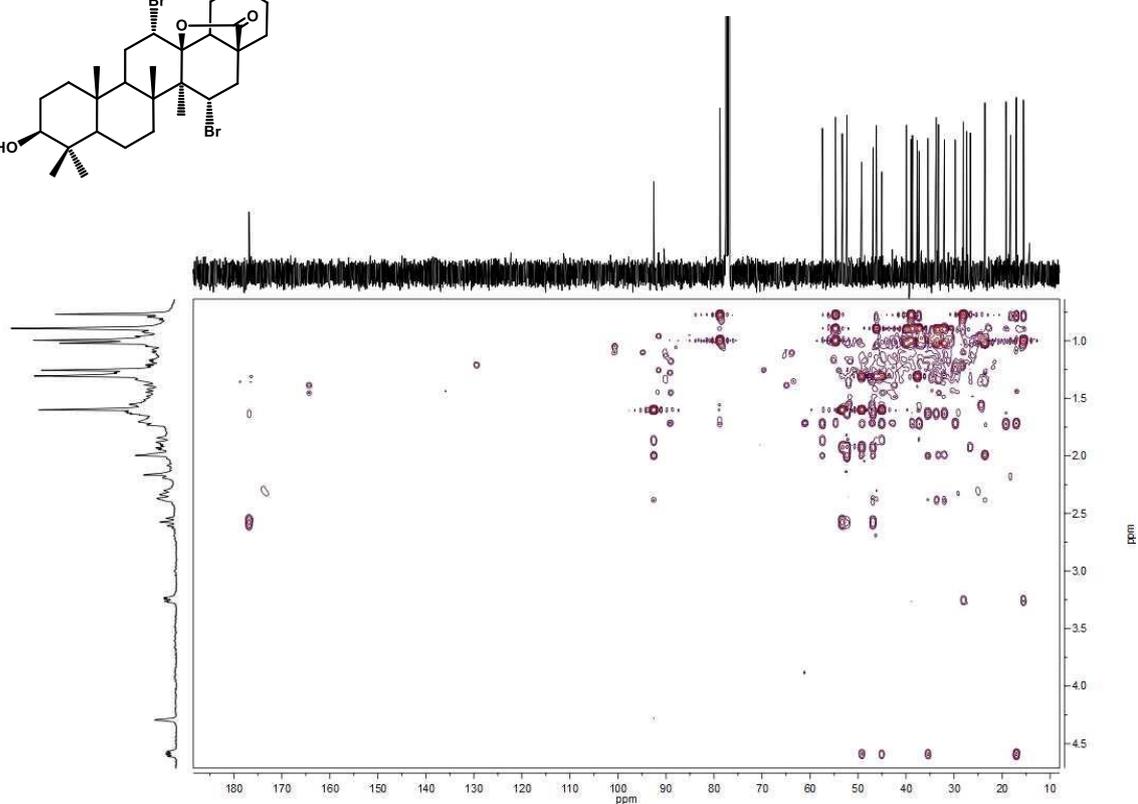
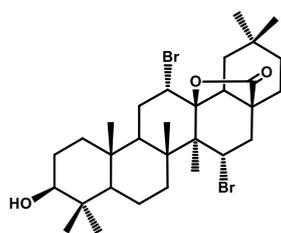
Espectro de ^1H RMN del producto 13



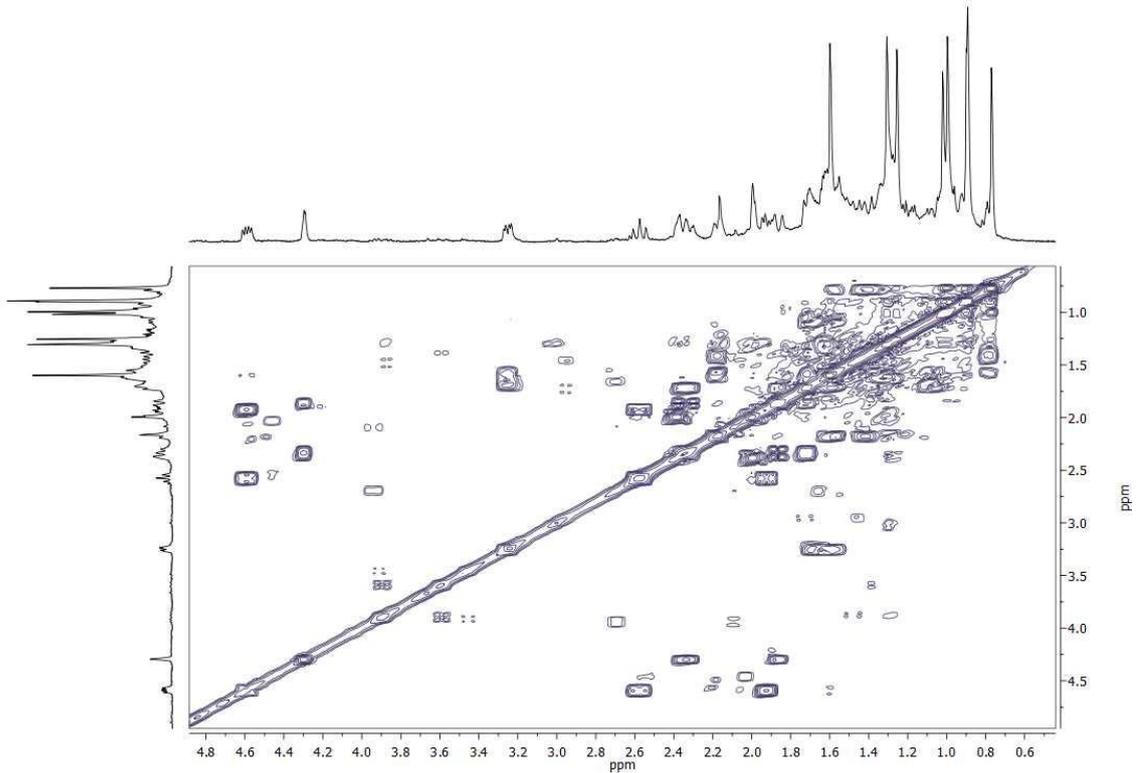
Espectro de ^{13}C RMN del producto 13



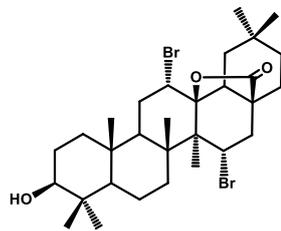
Espectro HSQC del producto 13

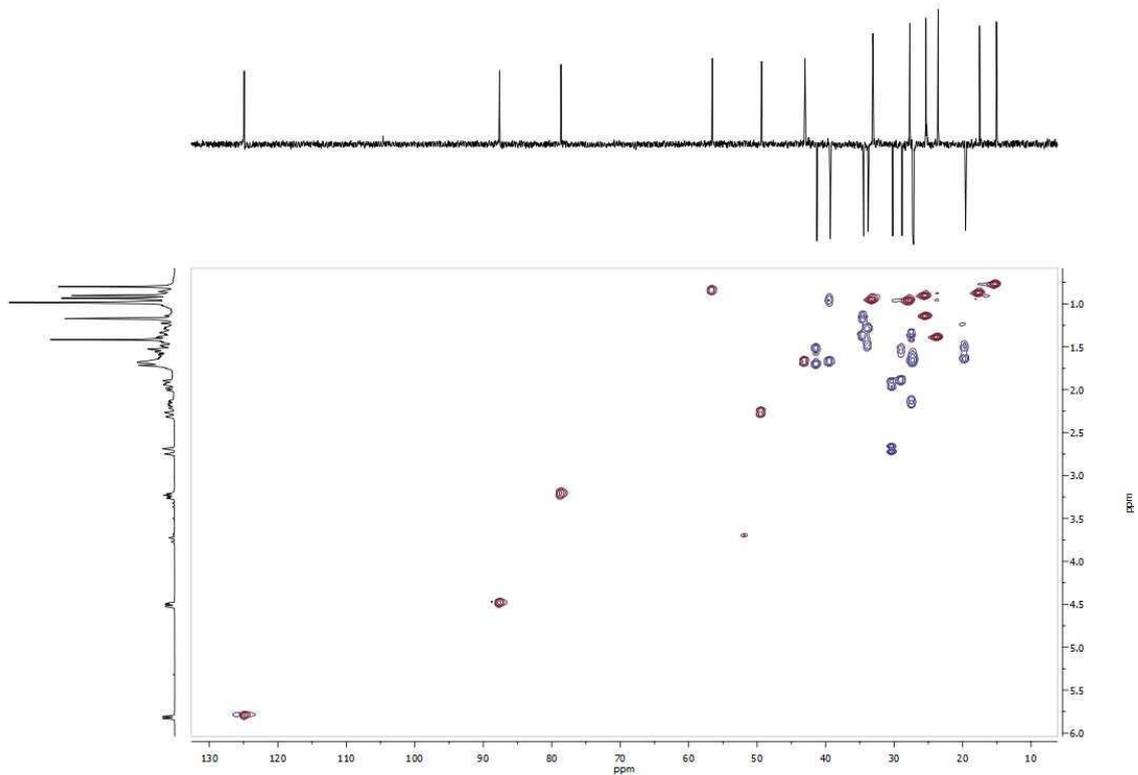


Espectro HMBC del producto 13

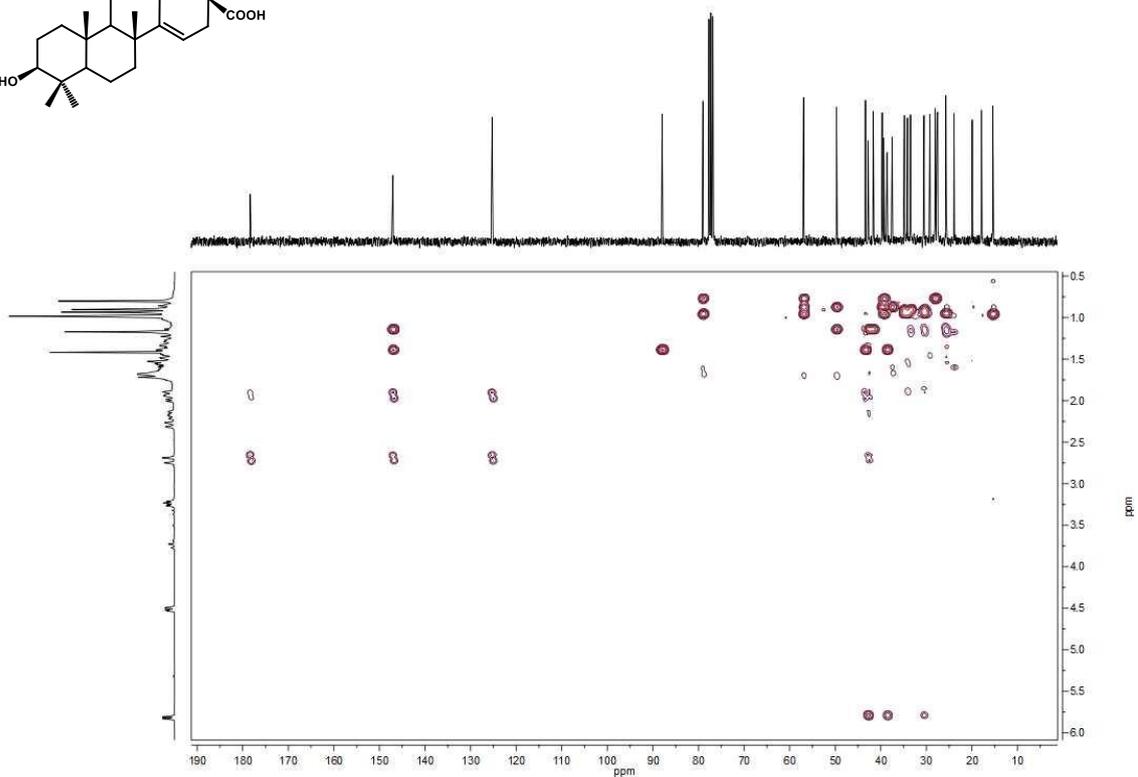
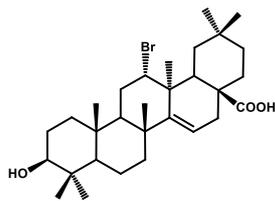


COSY del producto 13

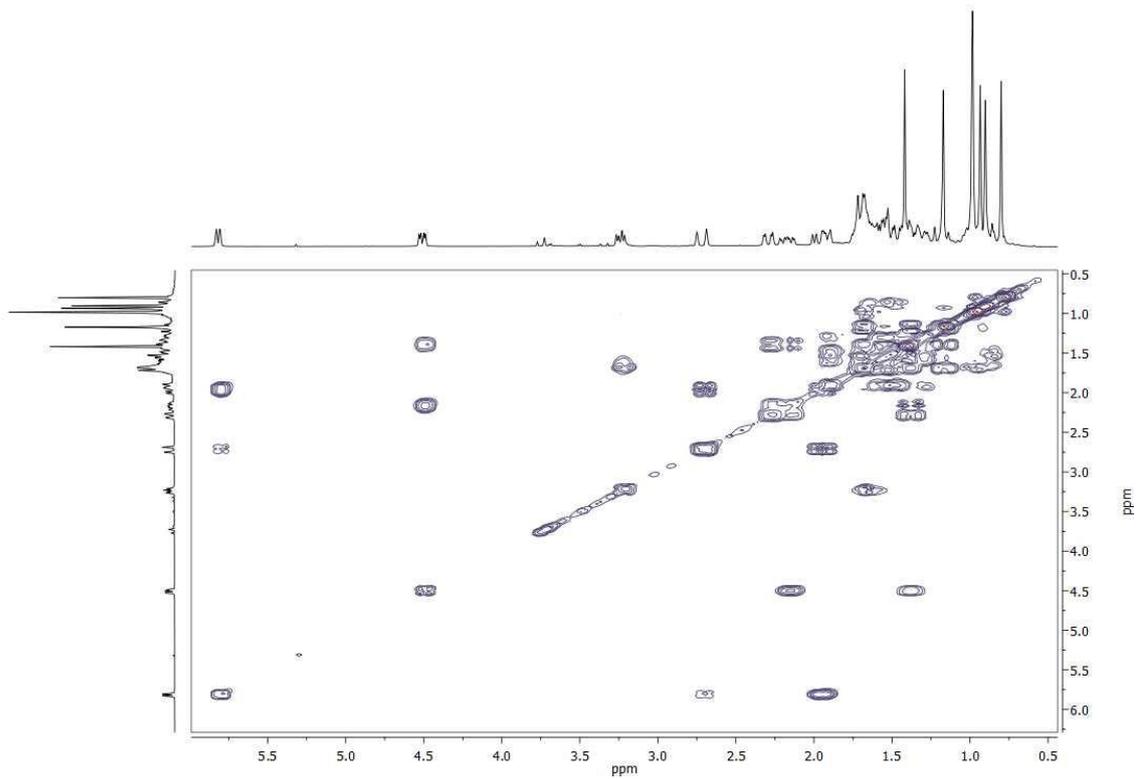




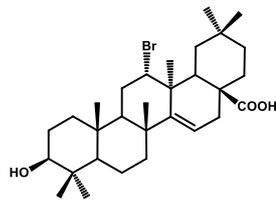
Espectro HSQC del producto 14

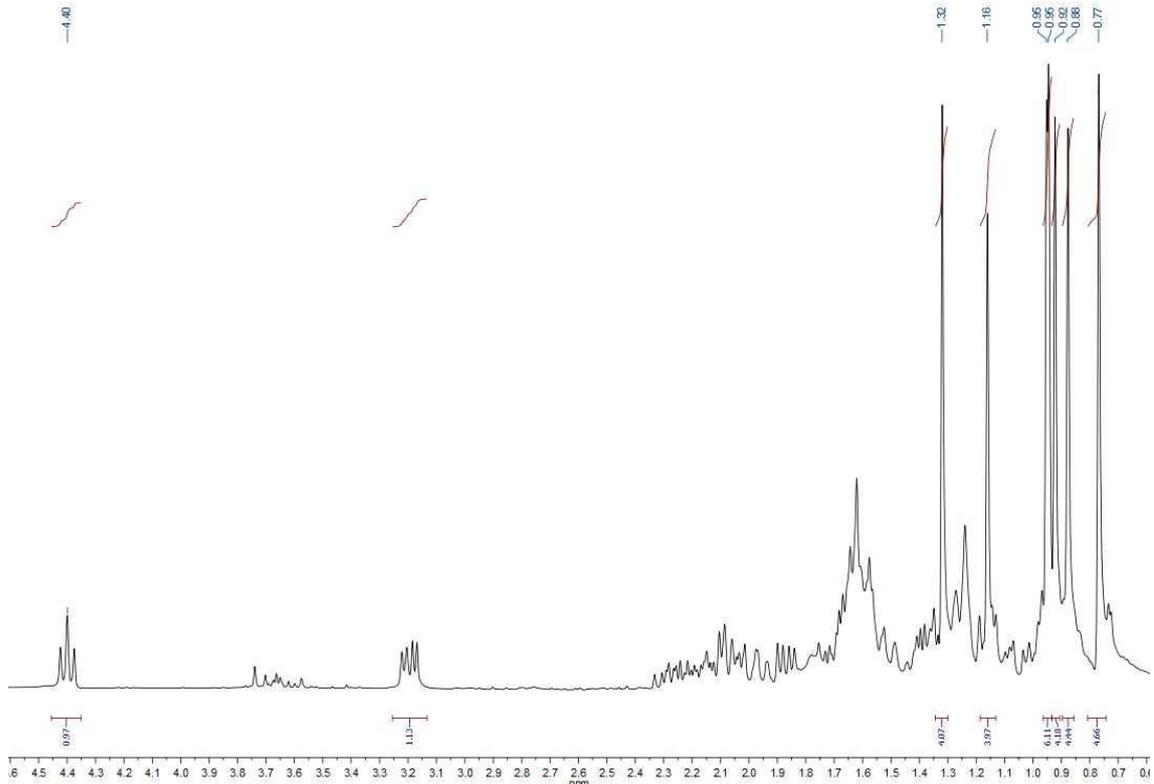


Espectro HMBC del producto 14

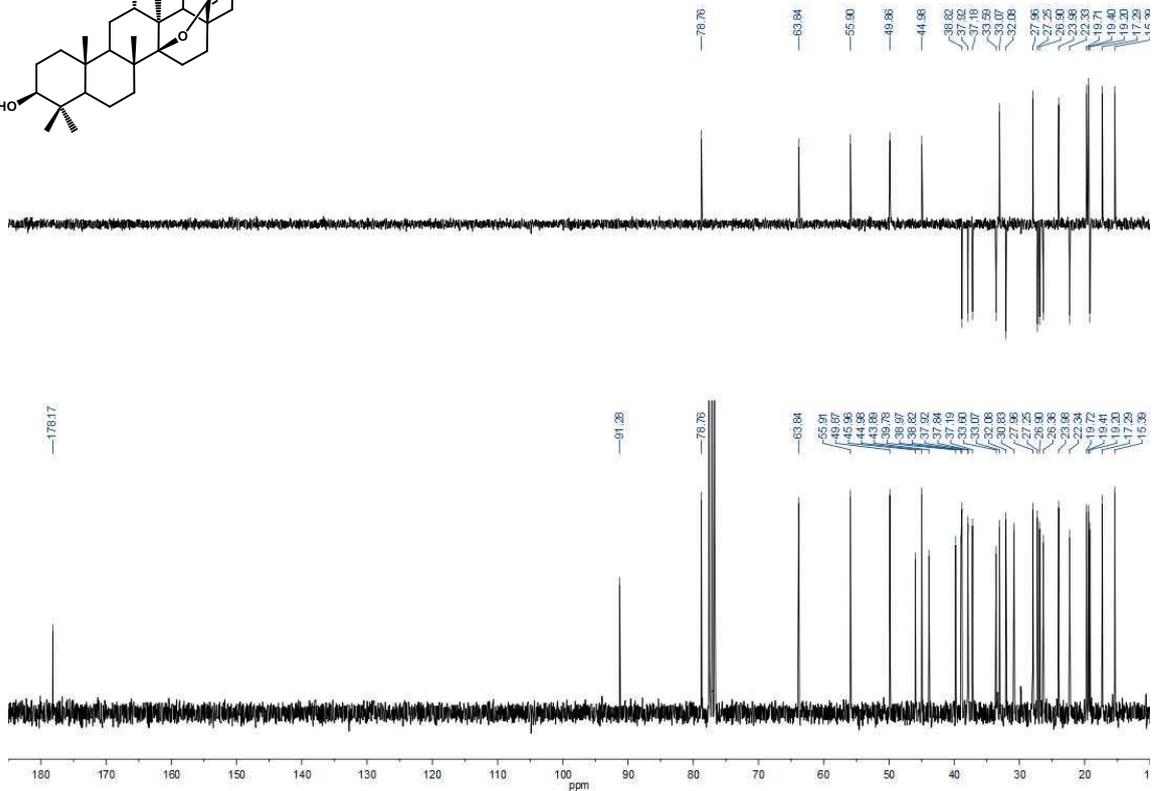
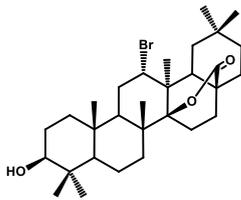


COSY del producto 14

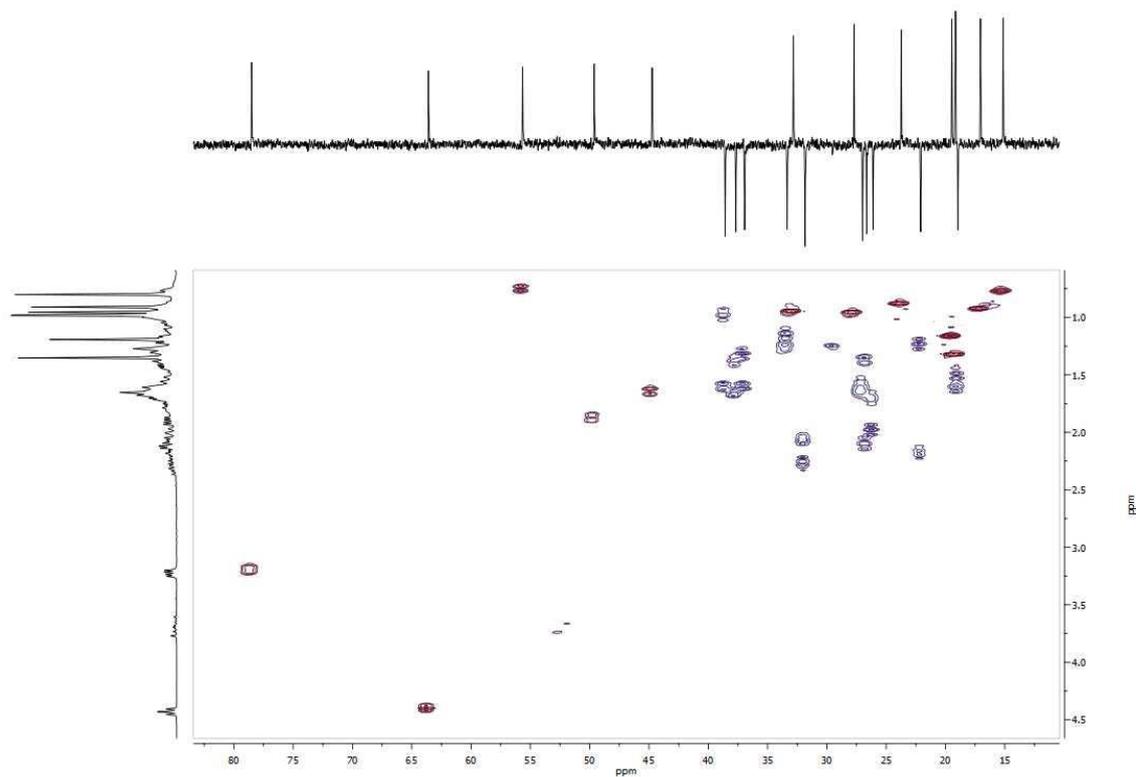




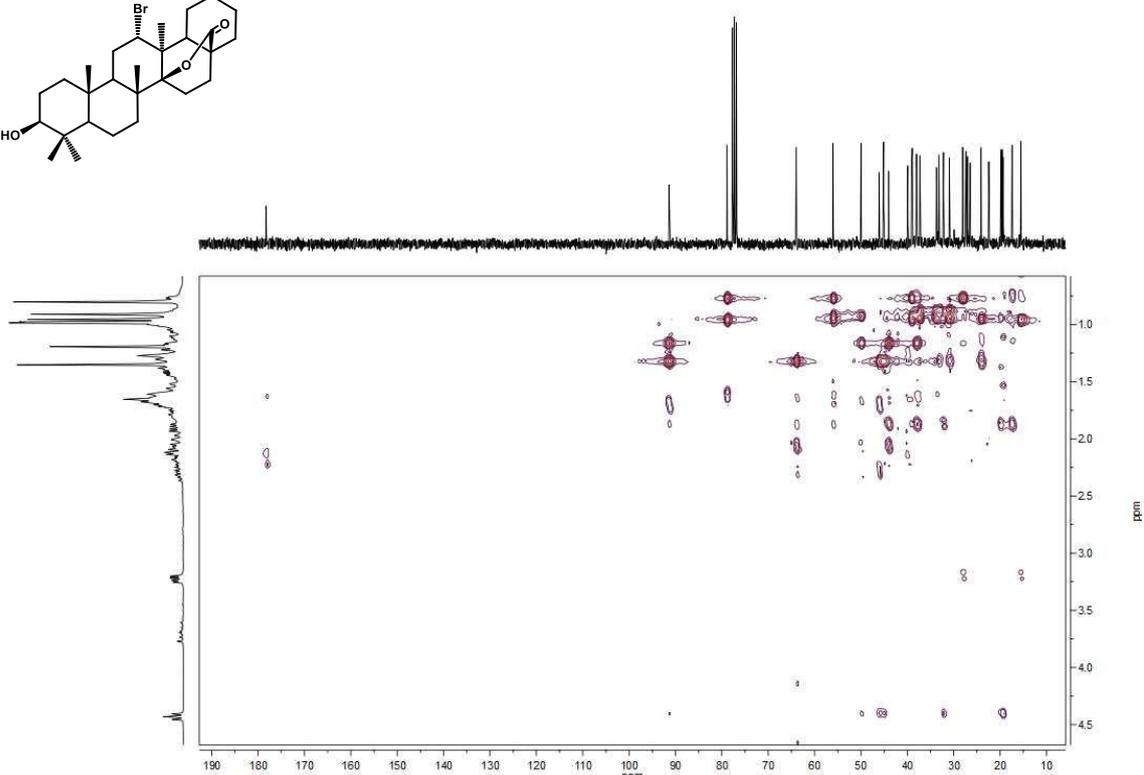
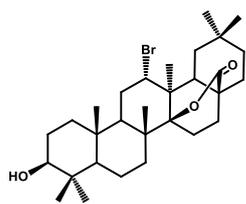
Espectro de ^1H RMN del producto 15



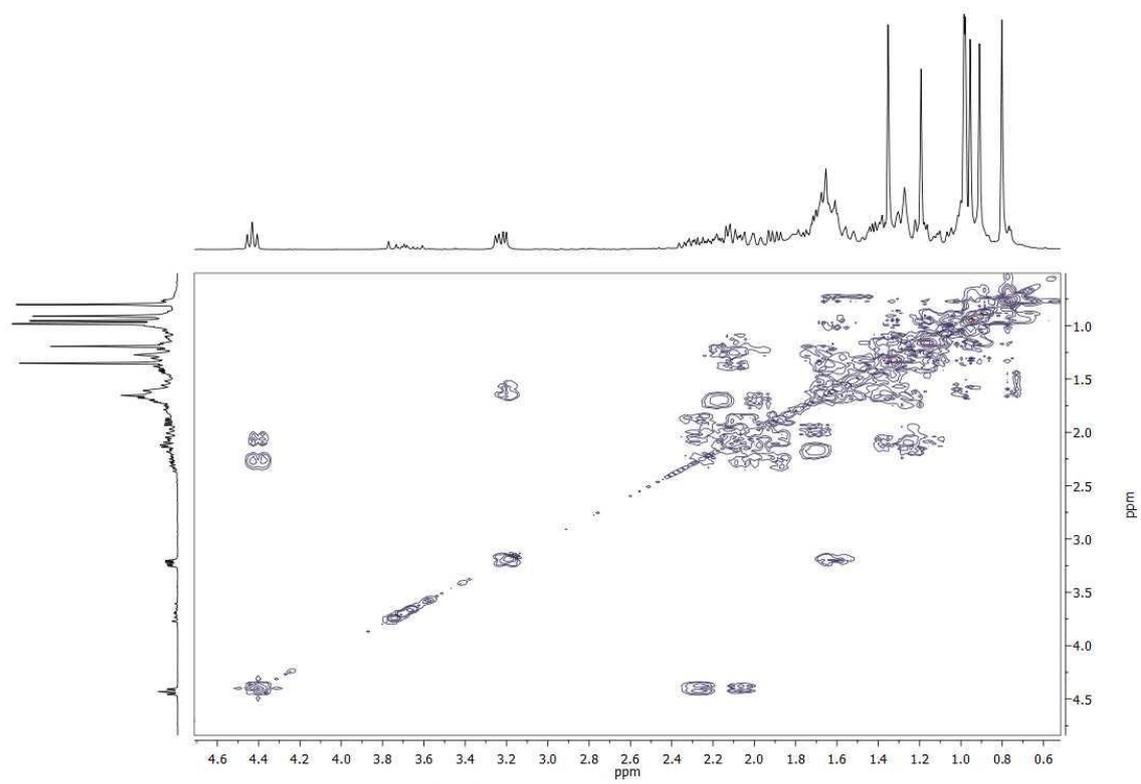
Espectro de ^{13}C RMN del producto 15



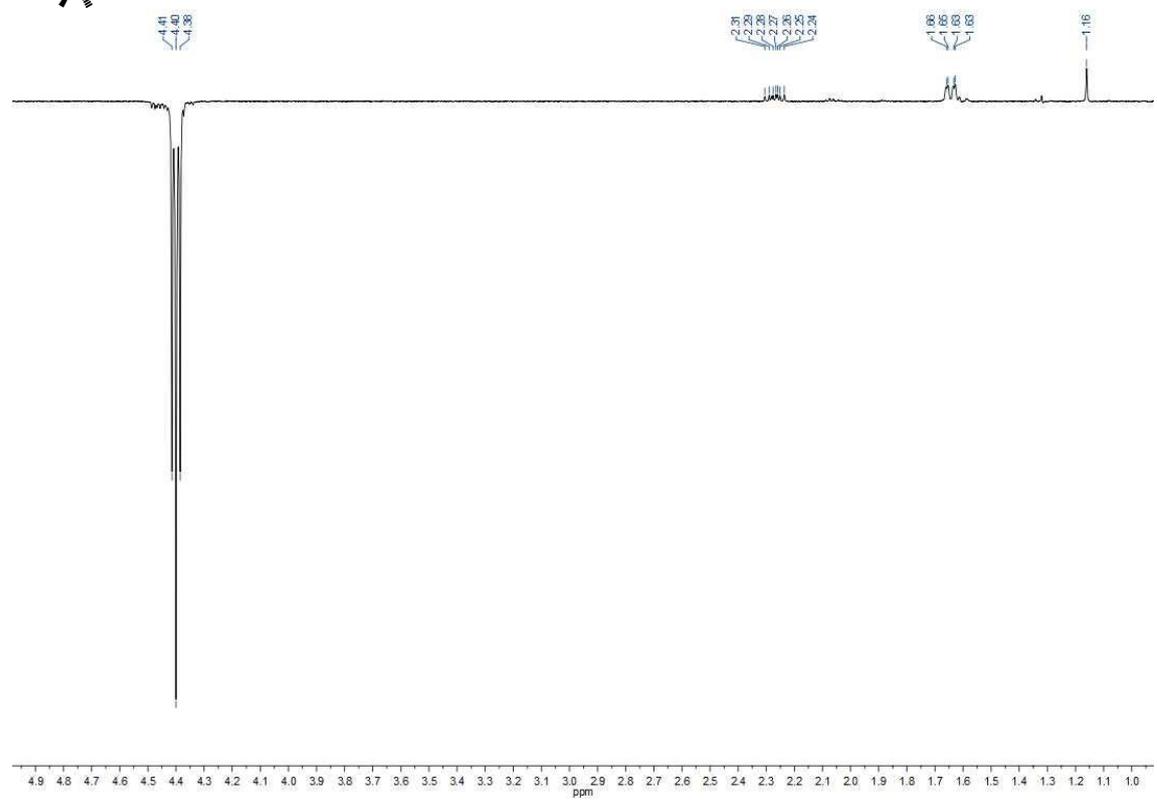
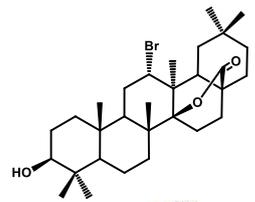
Espectro HSQC del producto 15



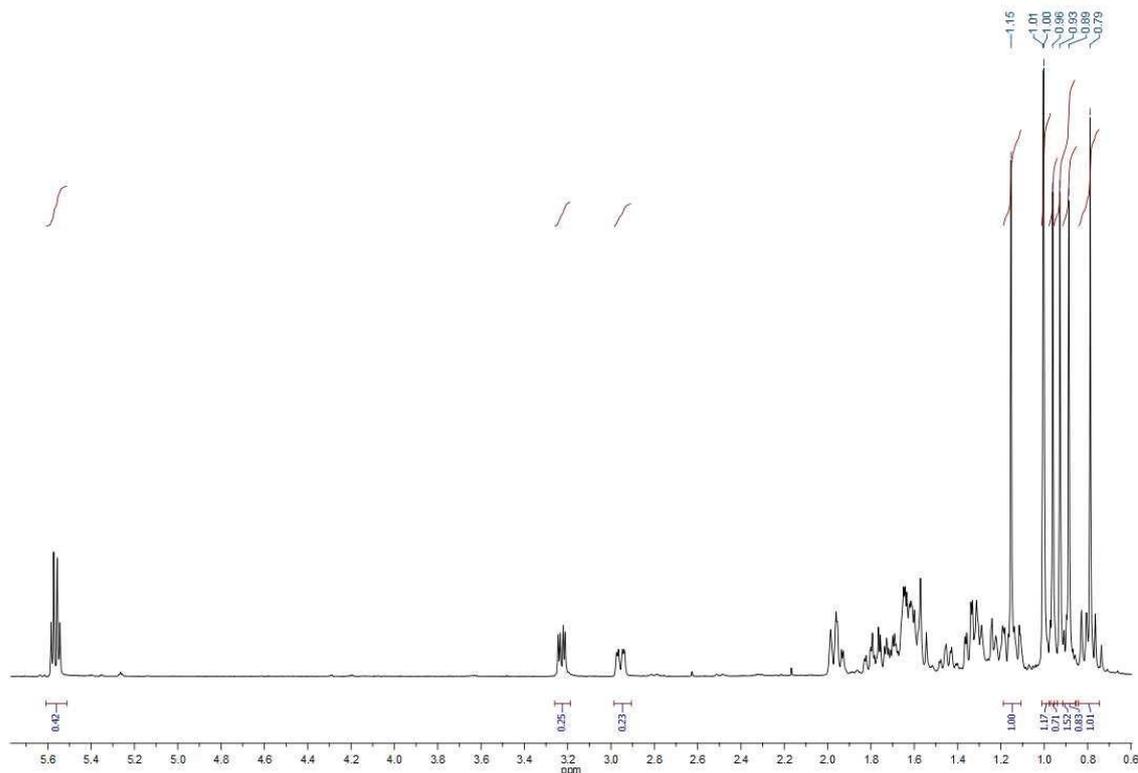
Espectro HMBC del producto 15



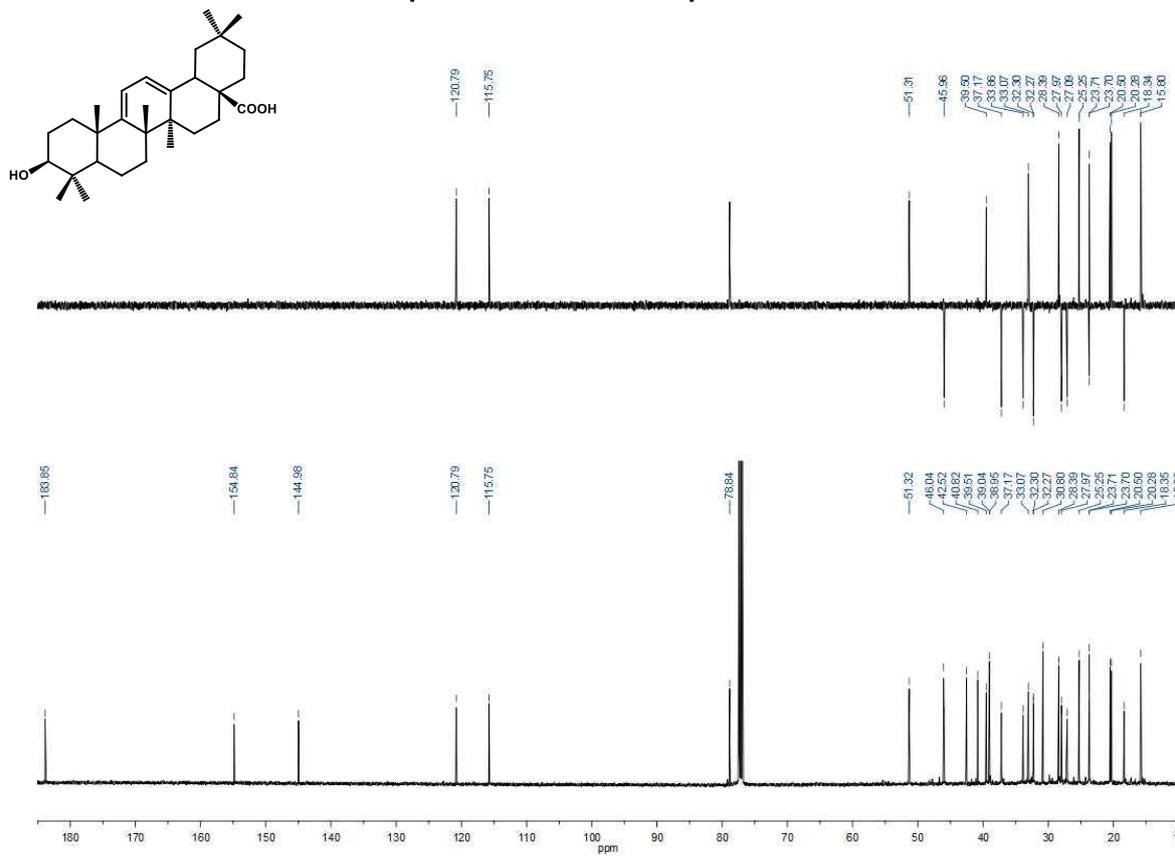
COSY del producto 15



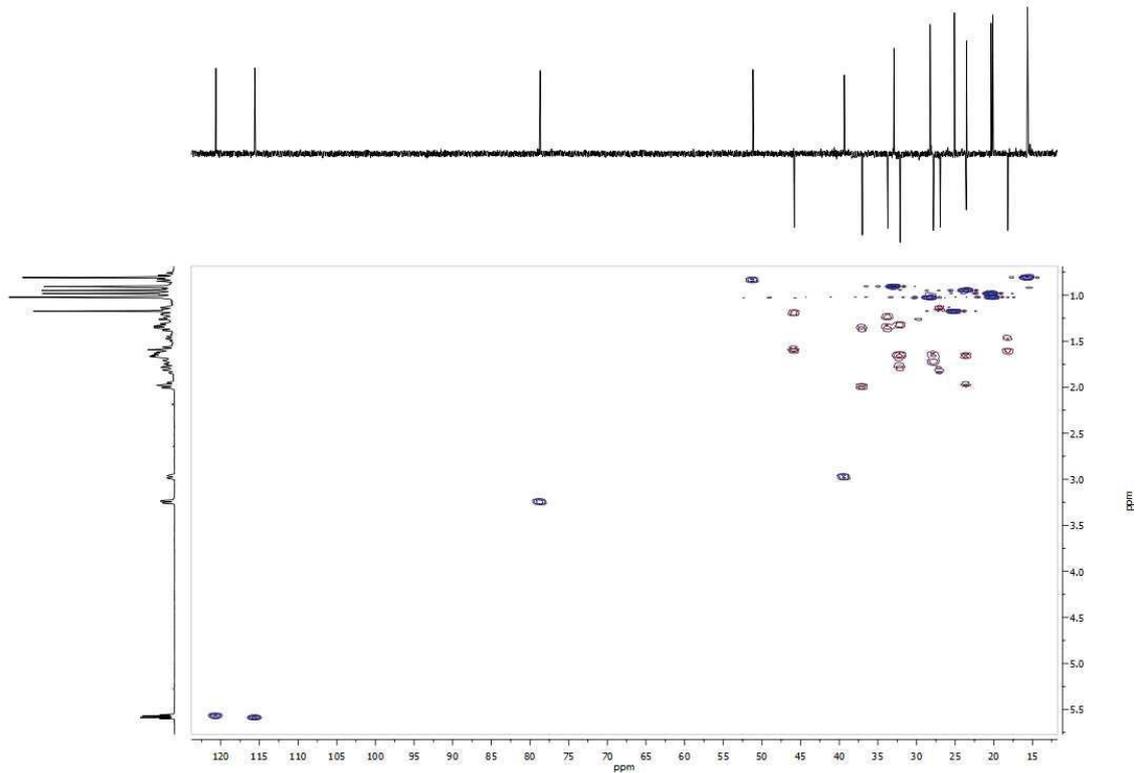
1d-NOESY del producto 15 a 4.40 ppm



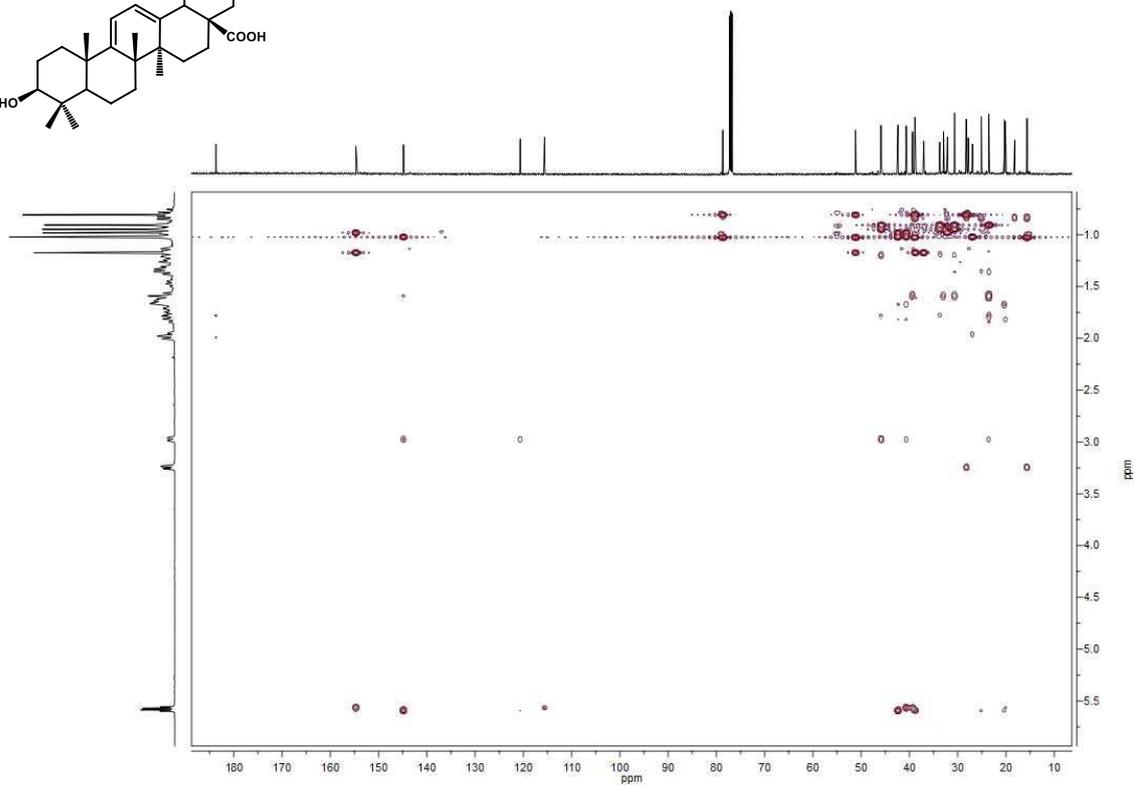
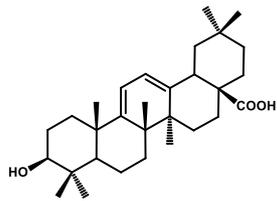
Espectro de ^1H RMN del producto 16



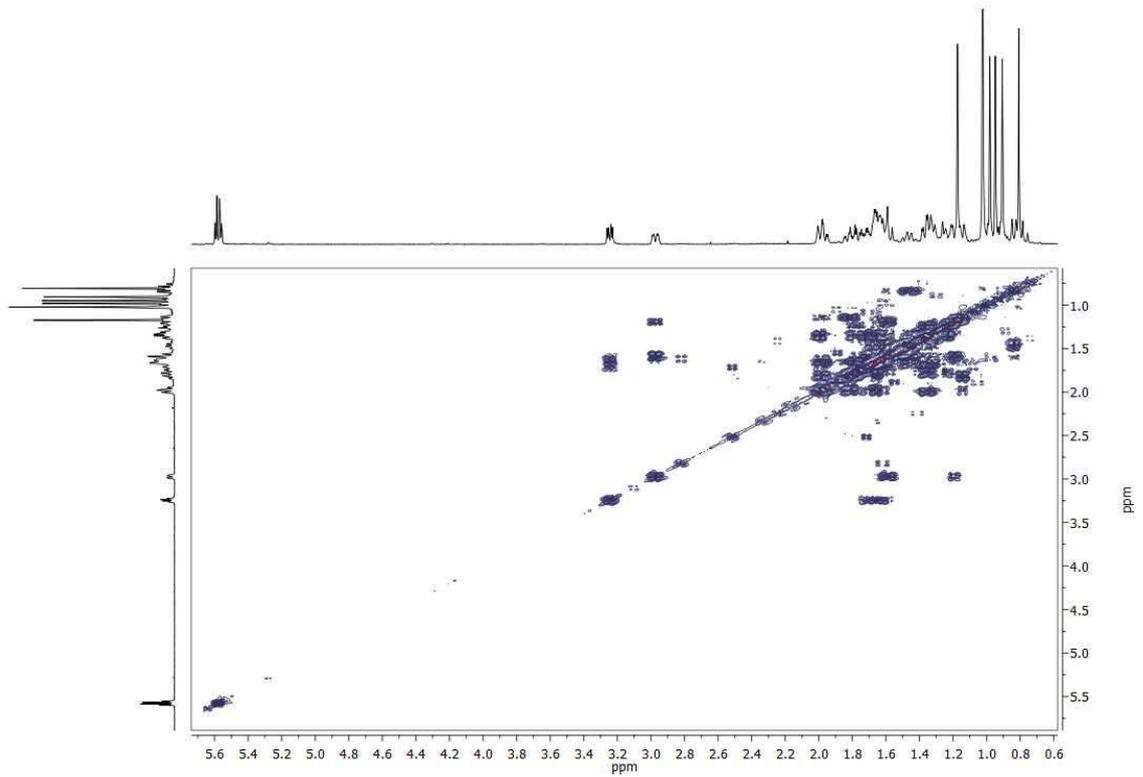
Espectro de ^{13}C RMN del producto 16



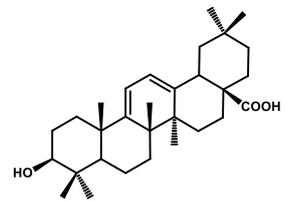
Espectro HSQC del producto 16

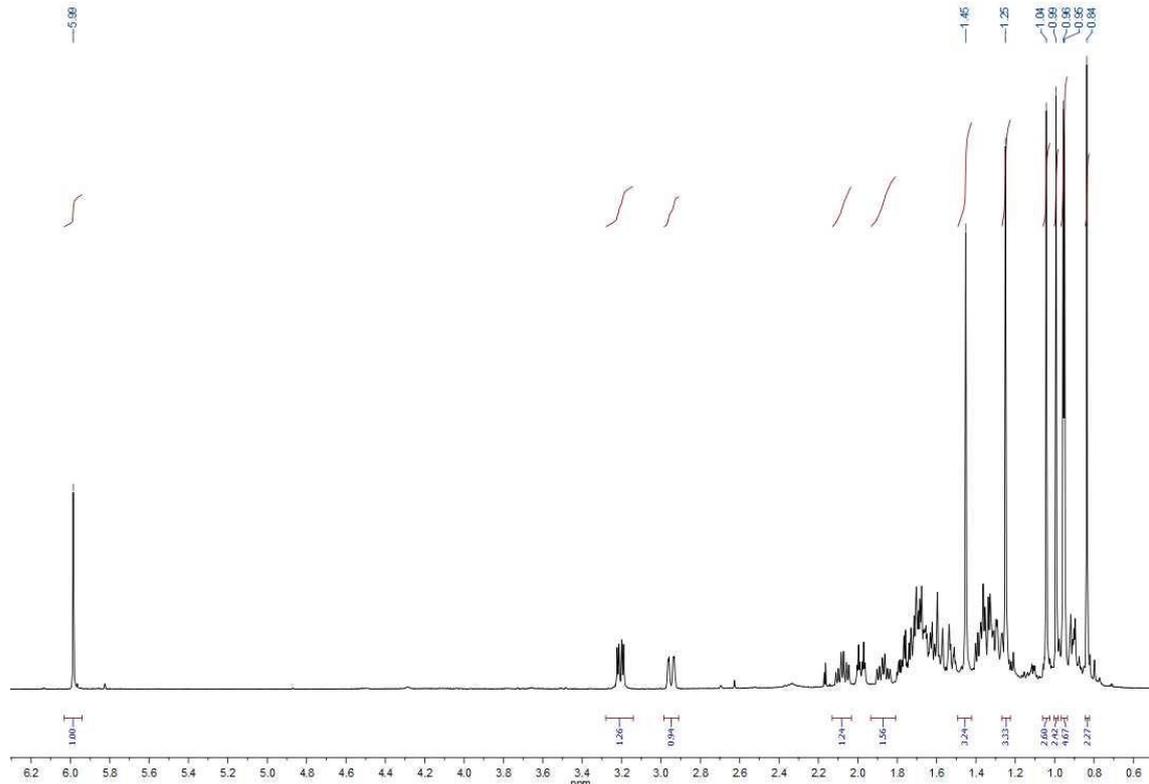


Espectro HMBC del producto 16

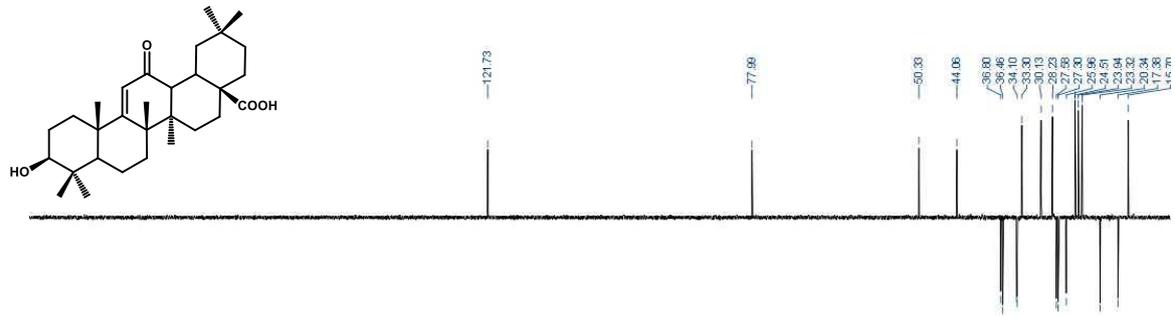


COSY del producto 16

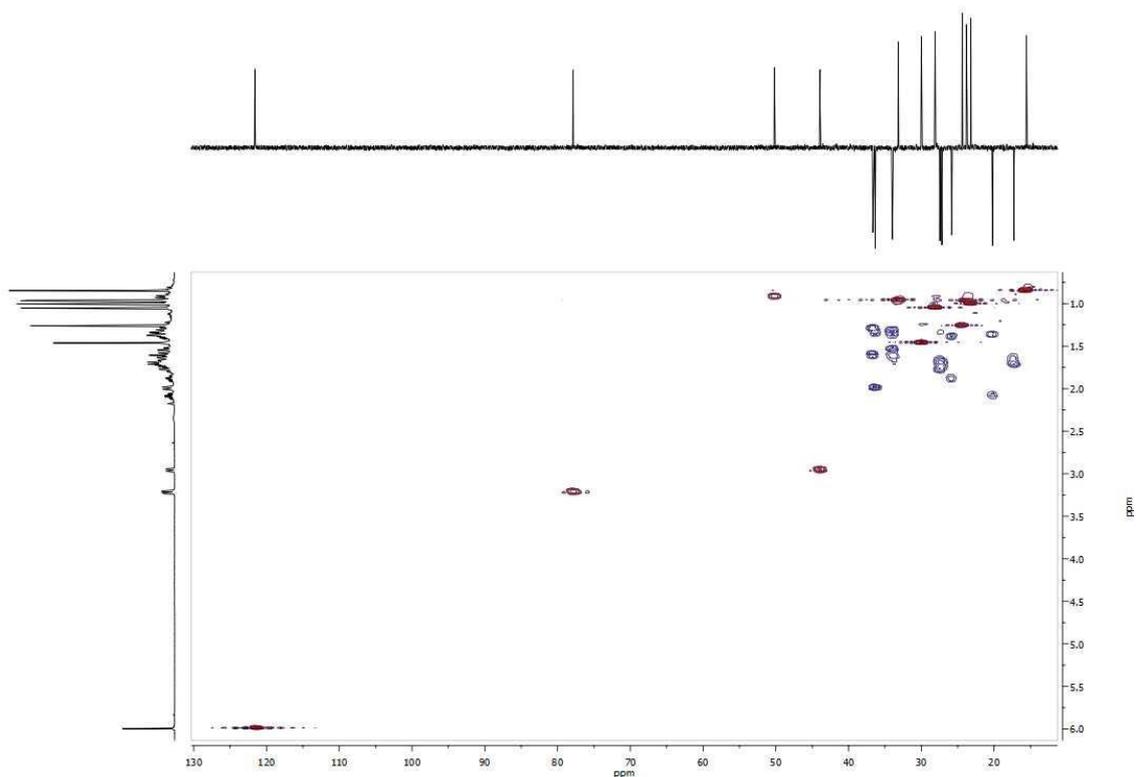




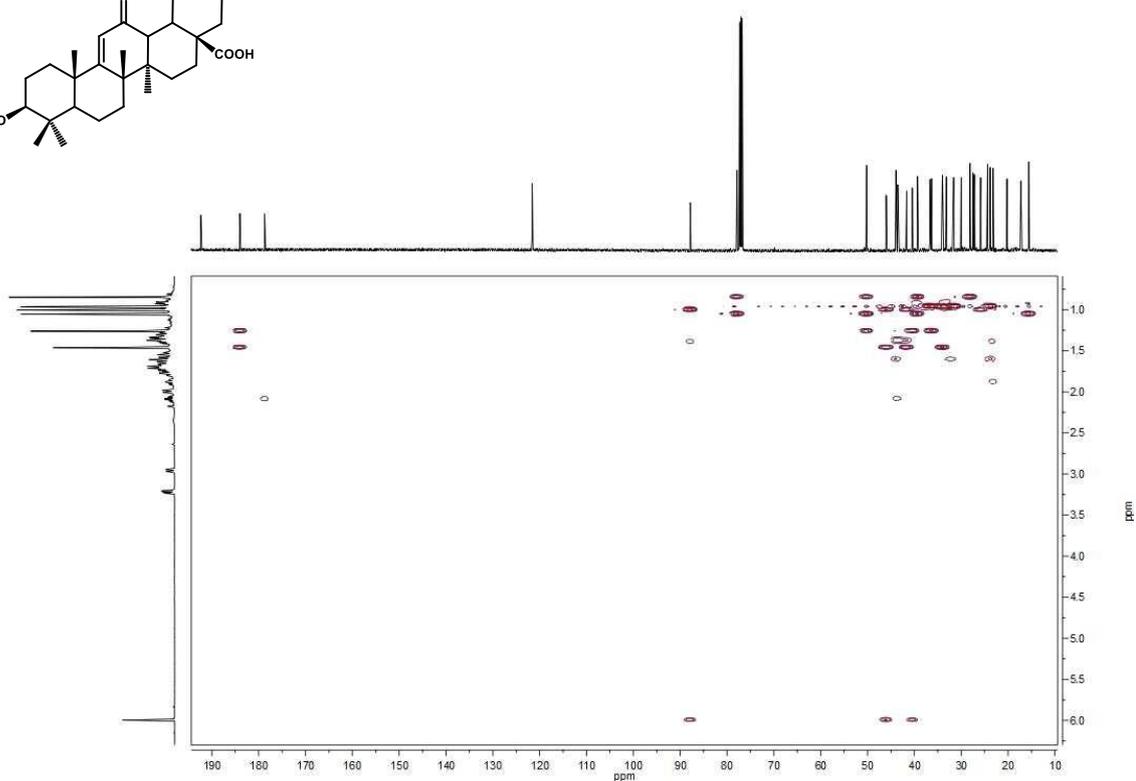
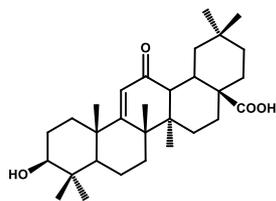
Espectro de ¹H RMN del producto 17



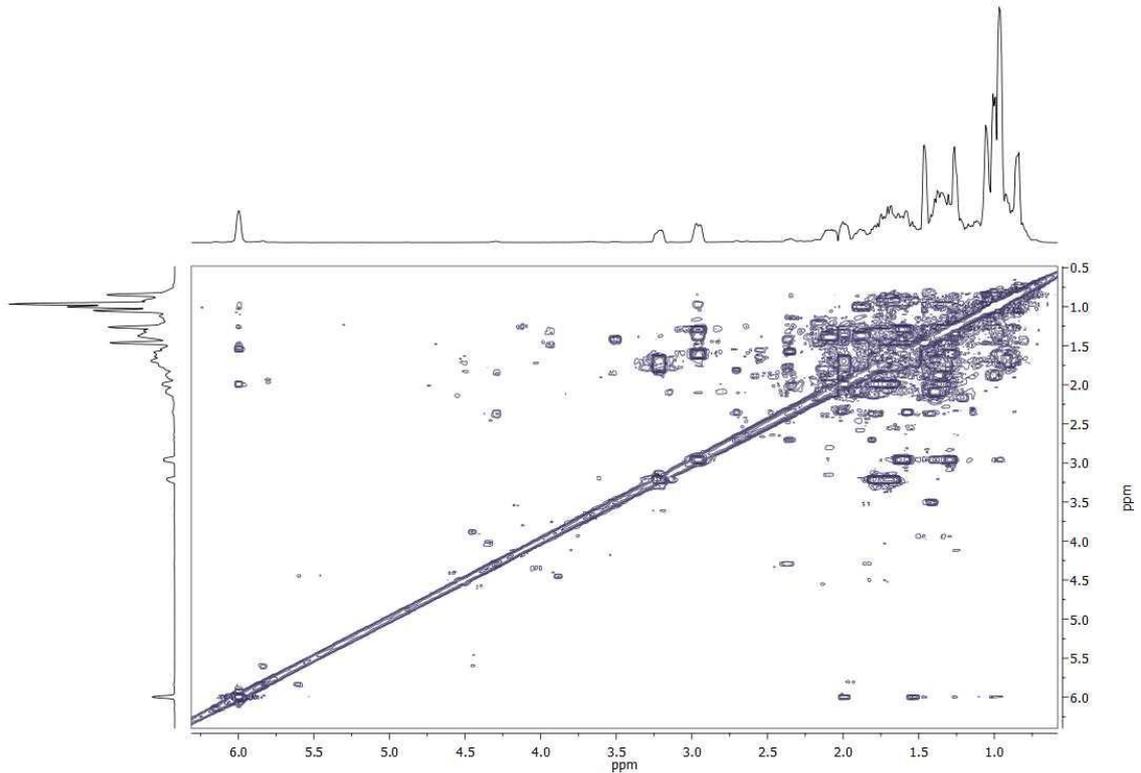
Espectro de ¹³C RMN del producto 17



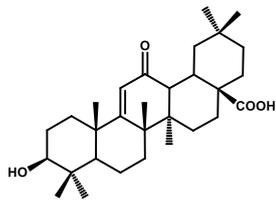
Espectro HSQC del producto 17

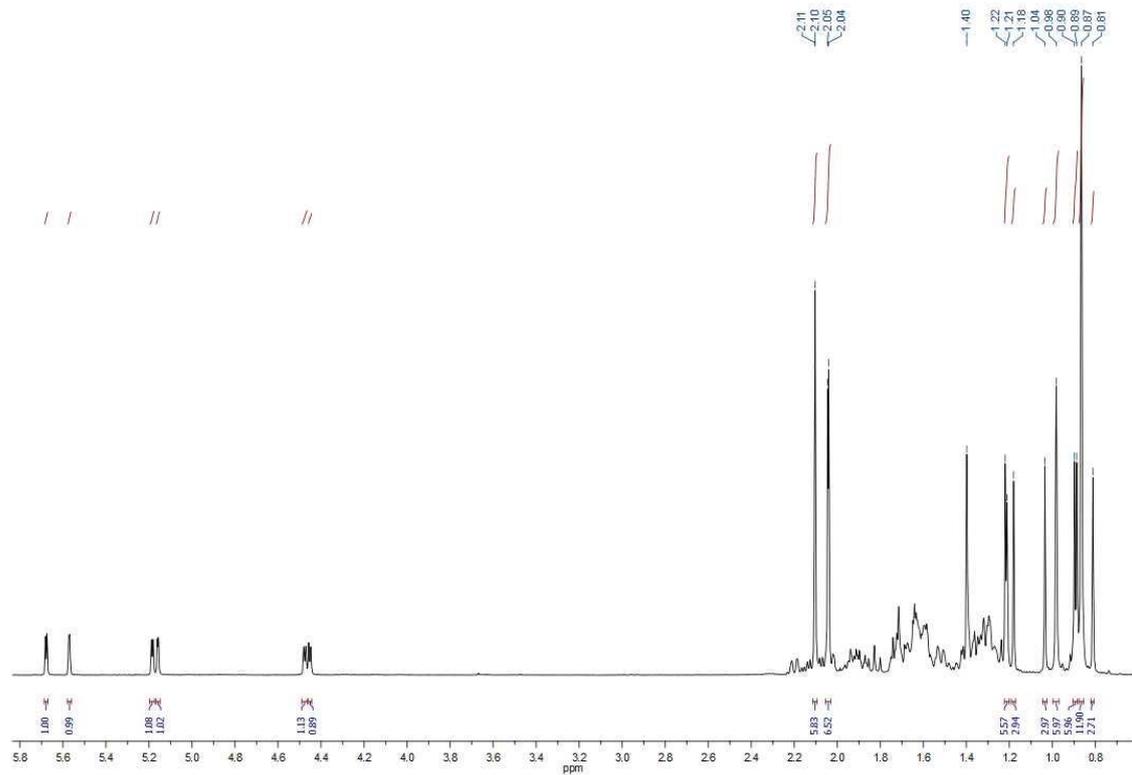


Espectro HMBC del producto 17

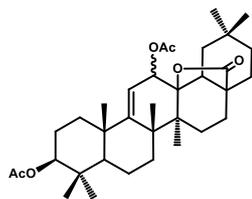


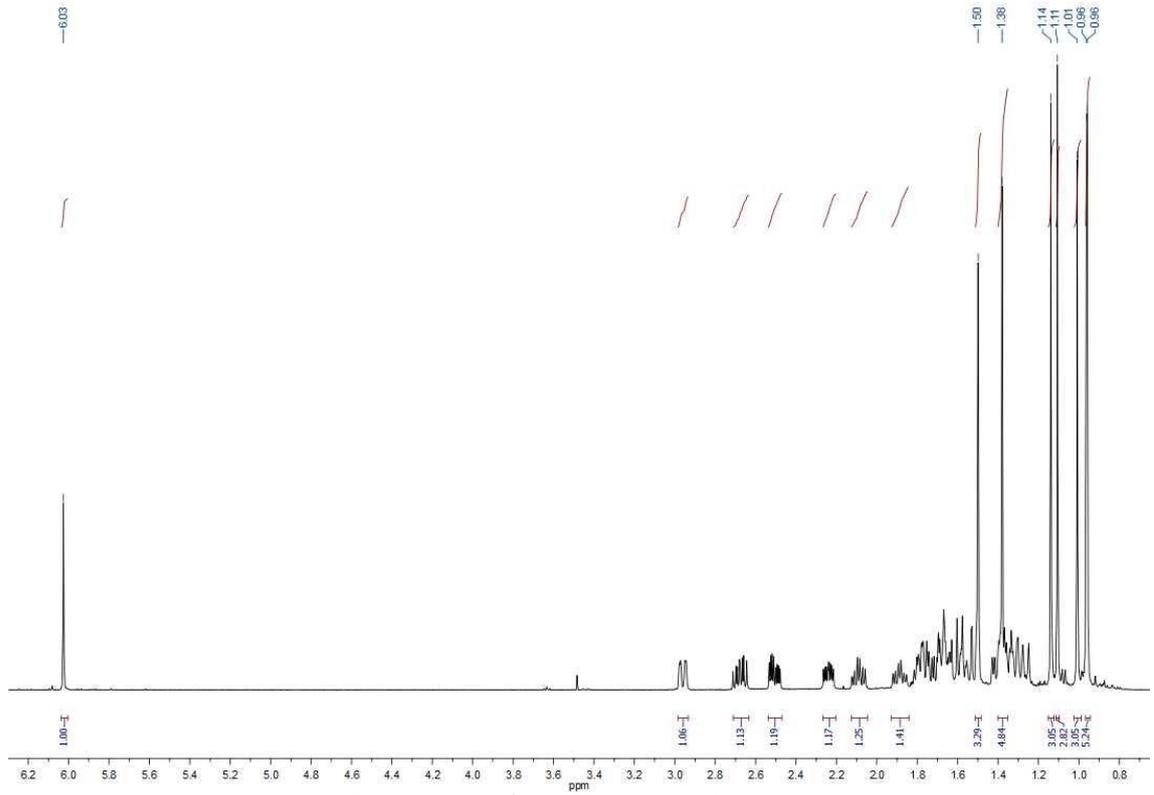
Espectro COSY del producto 17



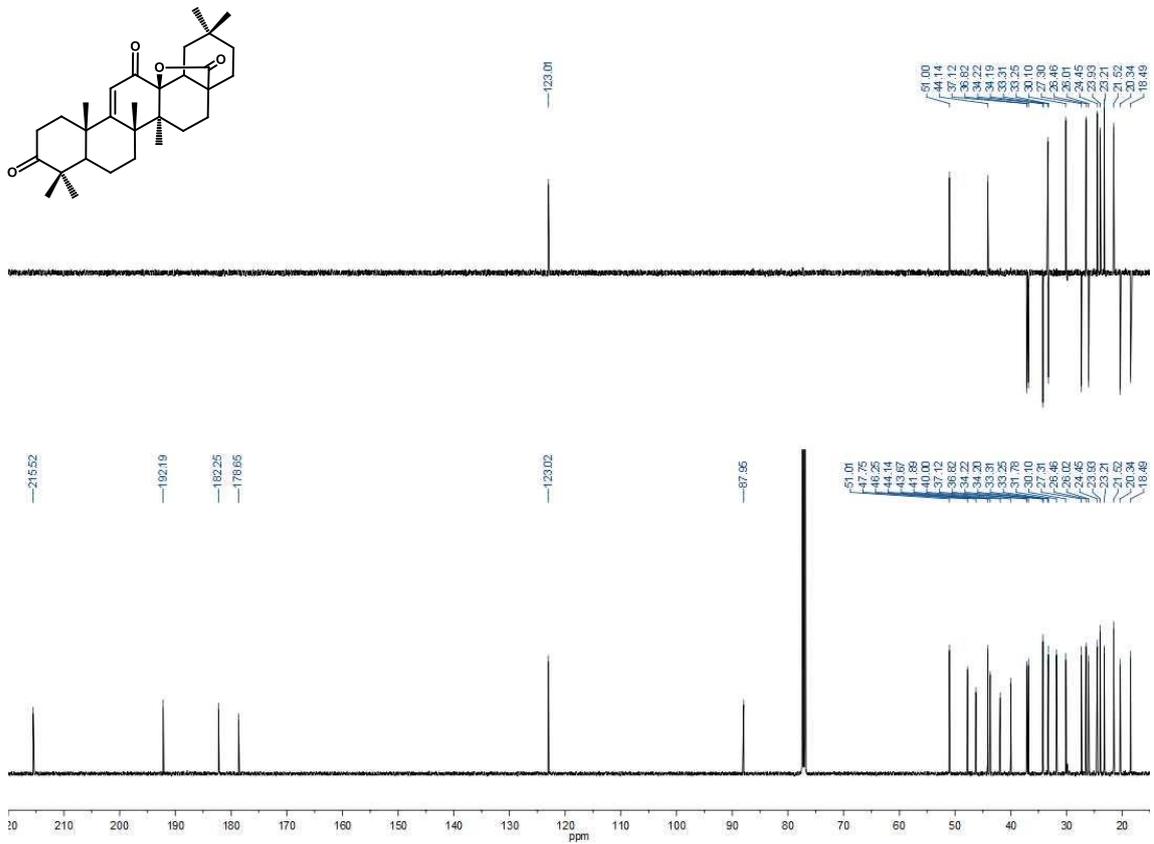


Espectro de ^1H RMN del producto 19a+19b

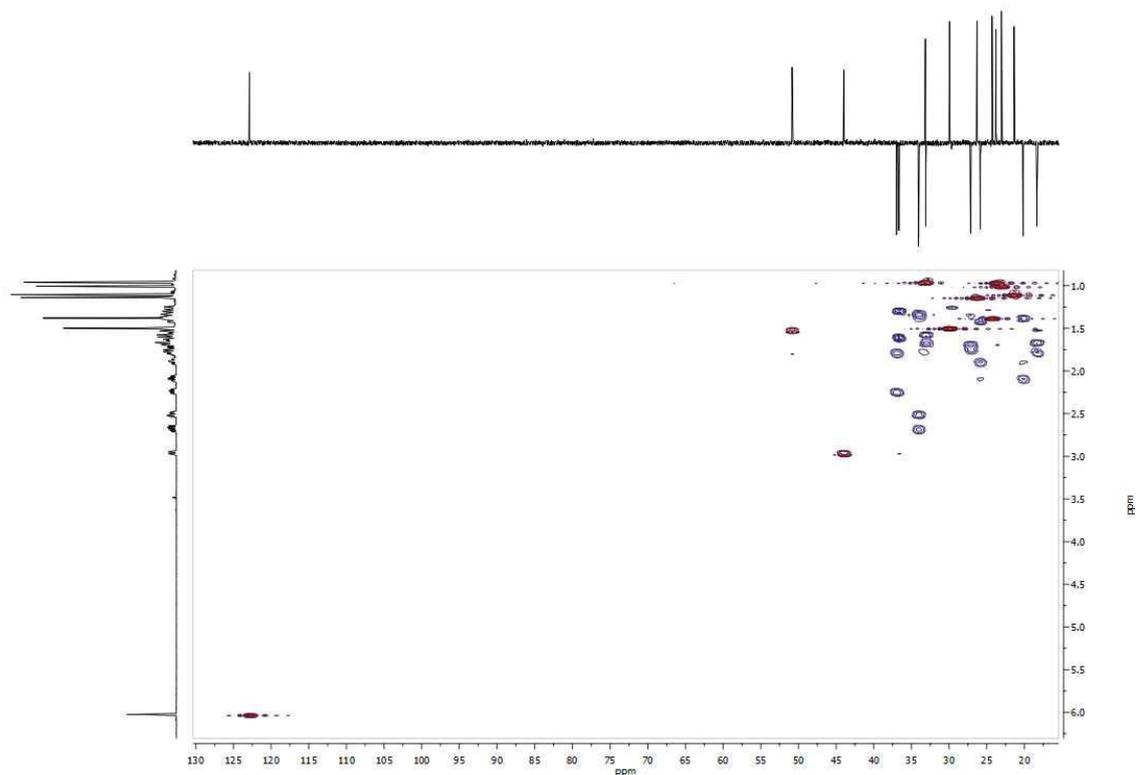




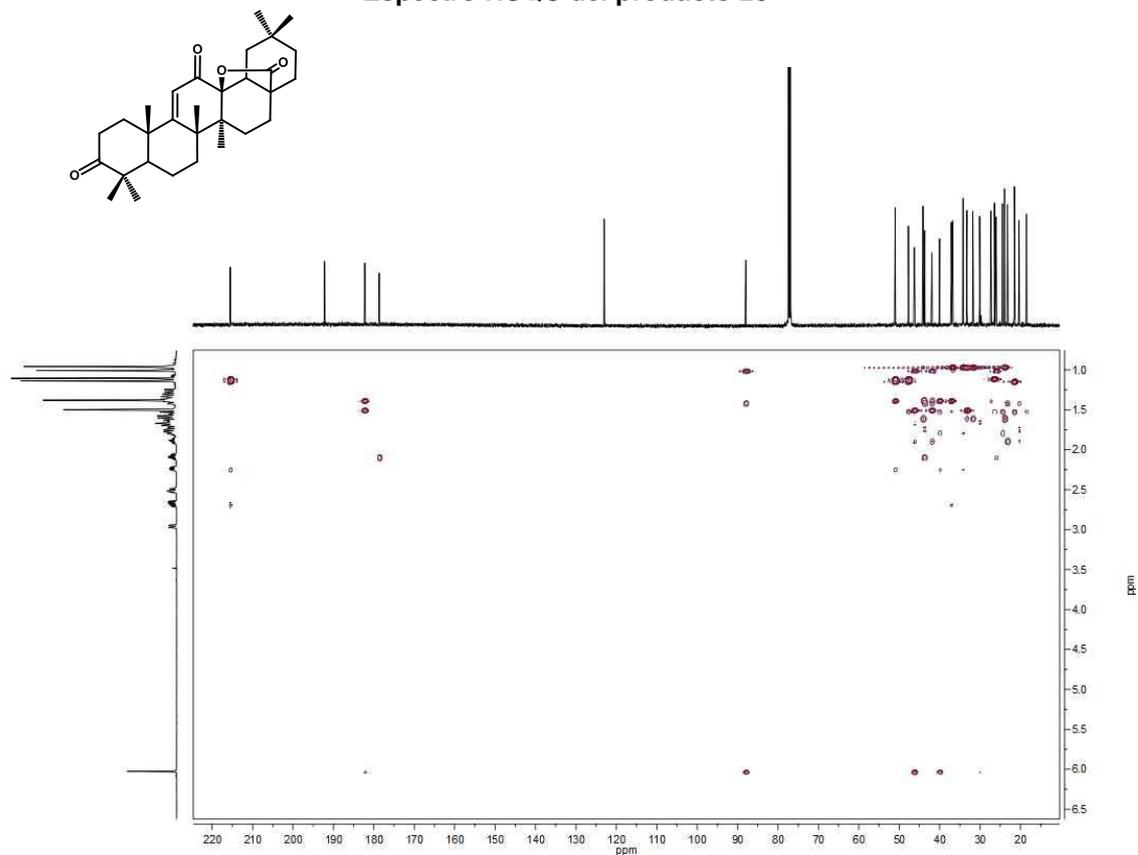
Espectro de ^1H RMN del producto 20



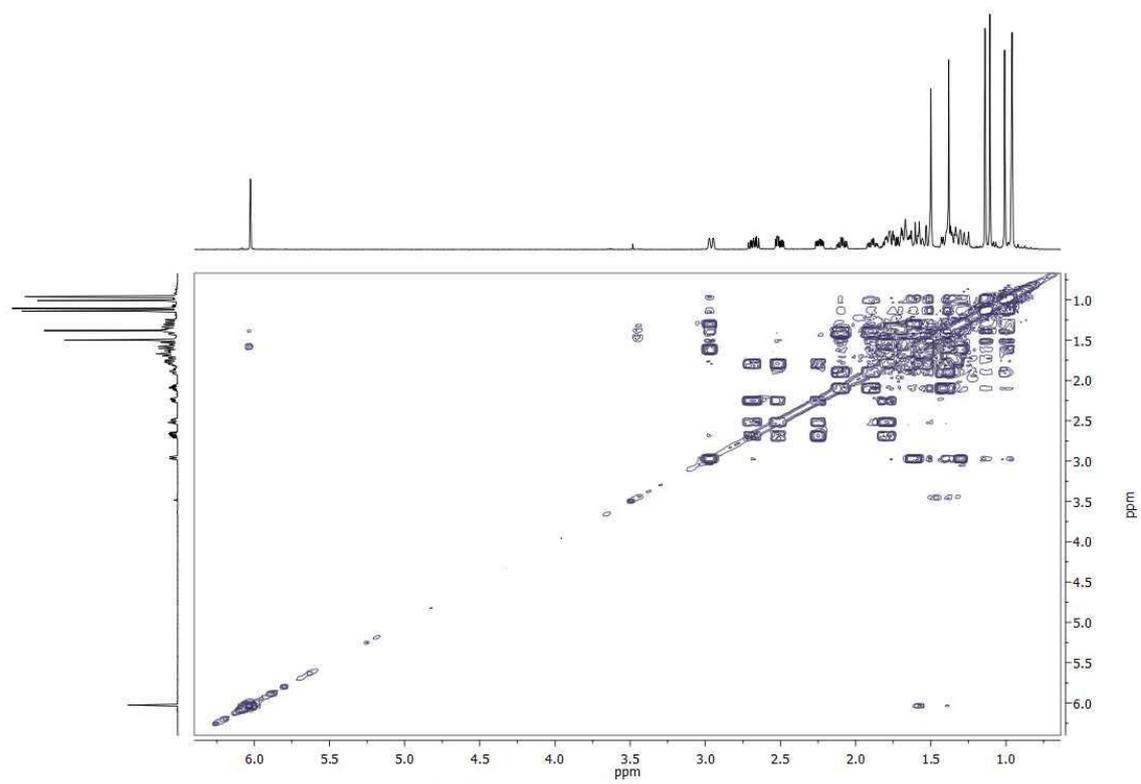
Espectro de ^{13}C RMN del producto 20



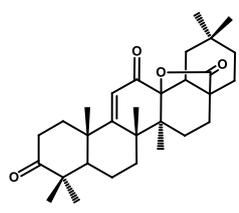
Espectro HSQC del producto 20

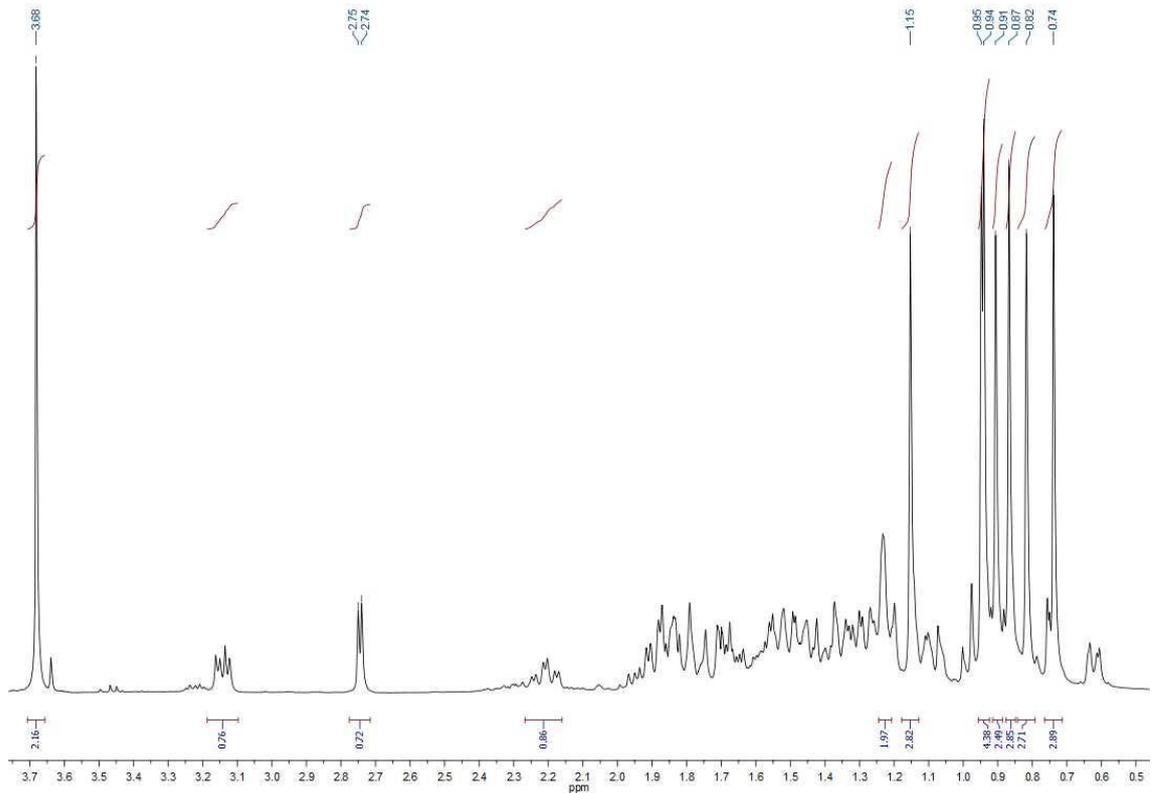


Espectro HMBC del producto 20

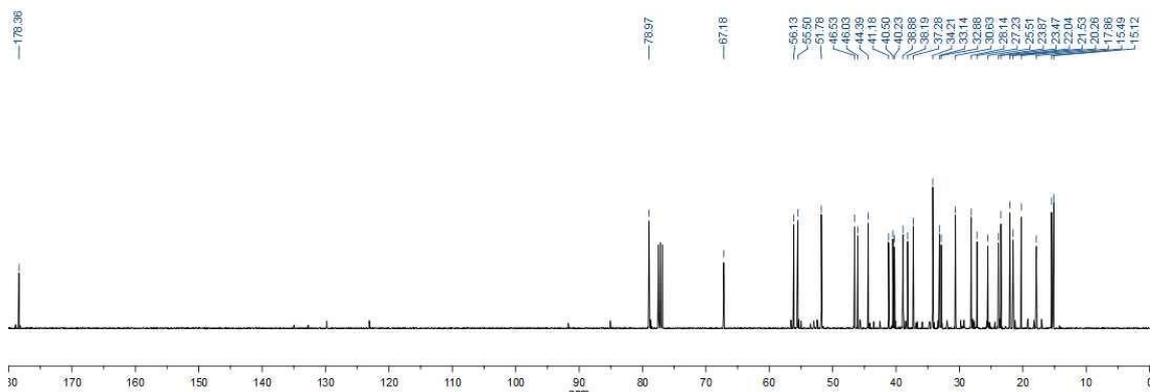
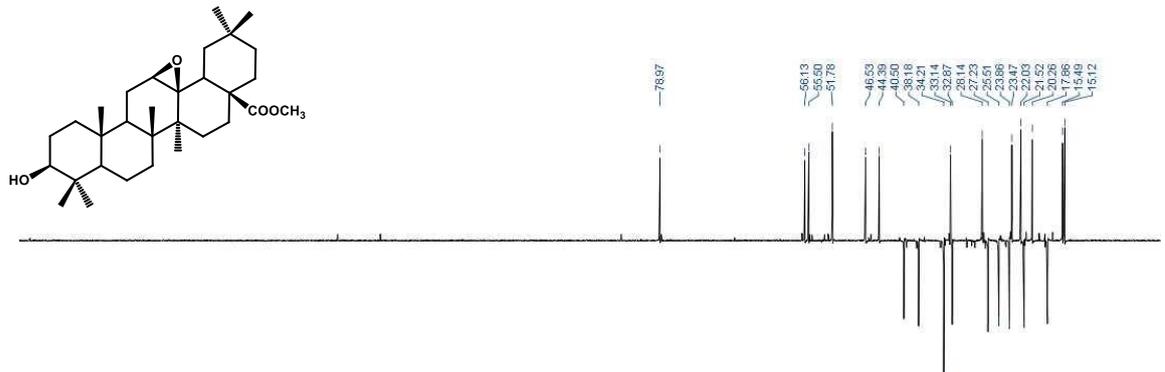


COSY del producto 20

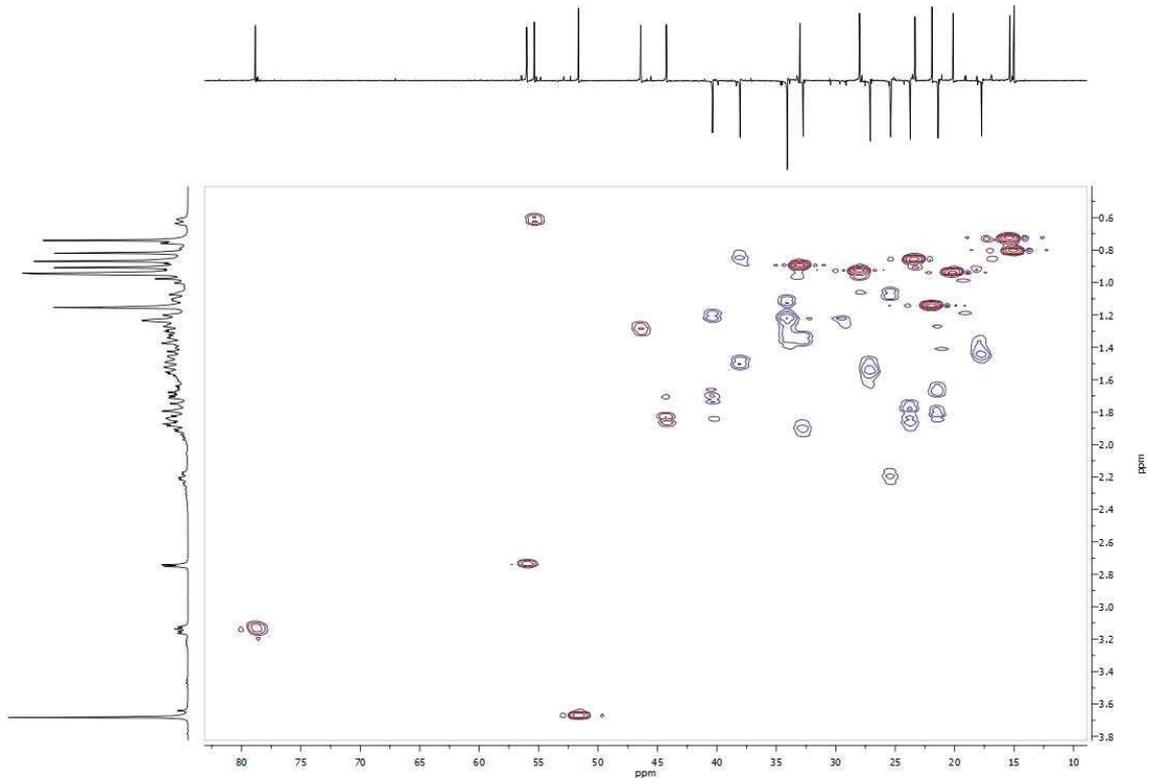




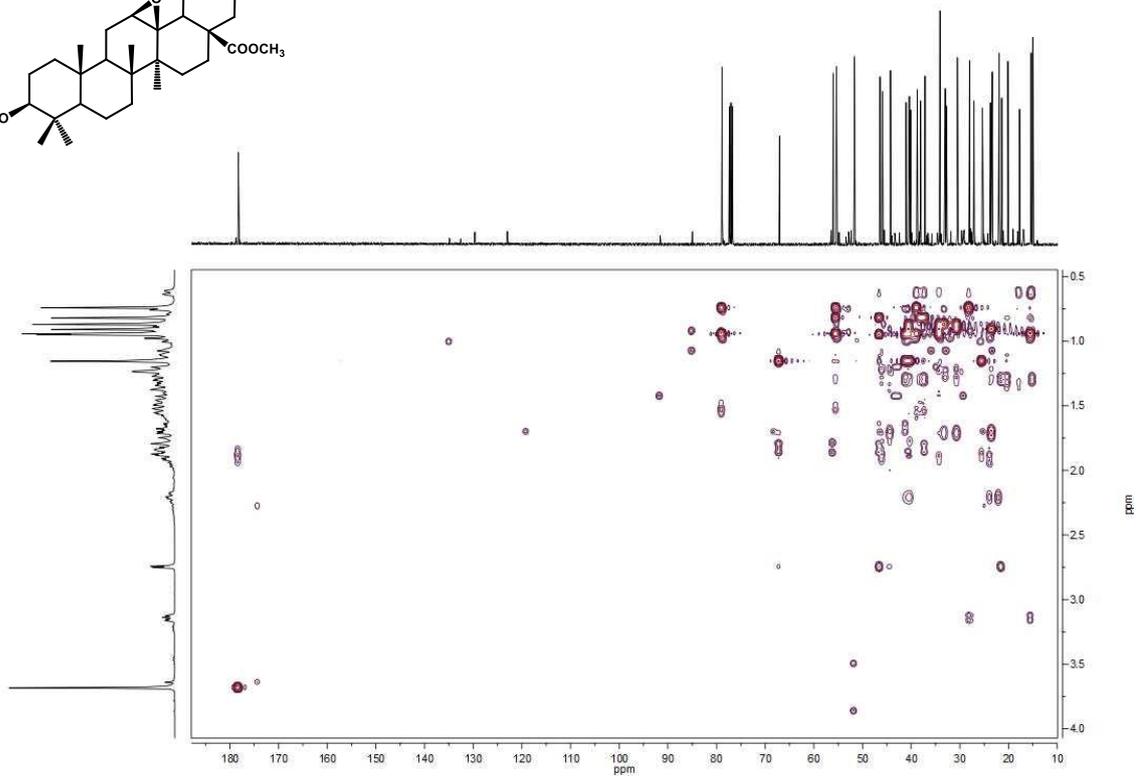
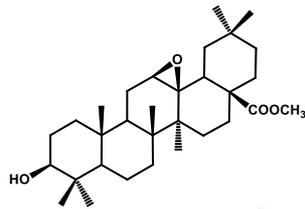
Espectro de ^1H RMN del producto 21



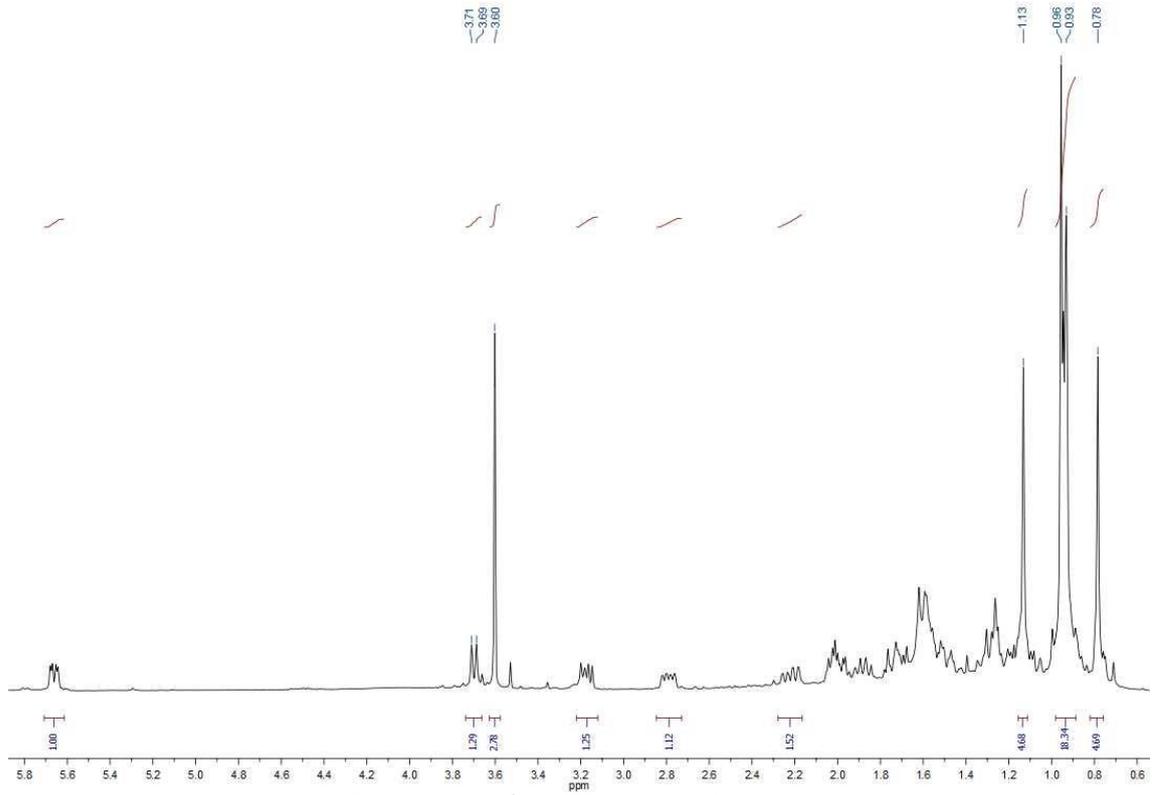
Espectro de ^{13}C RMN del producto 21



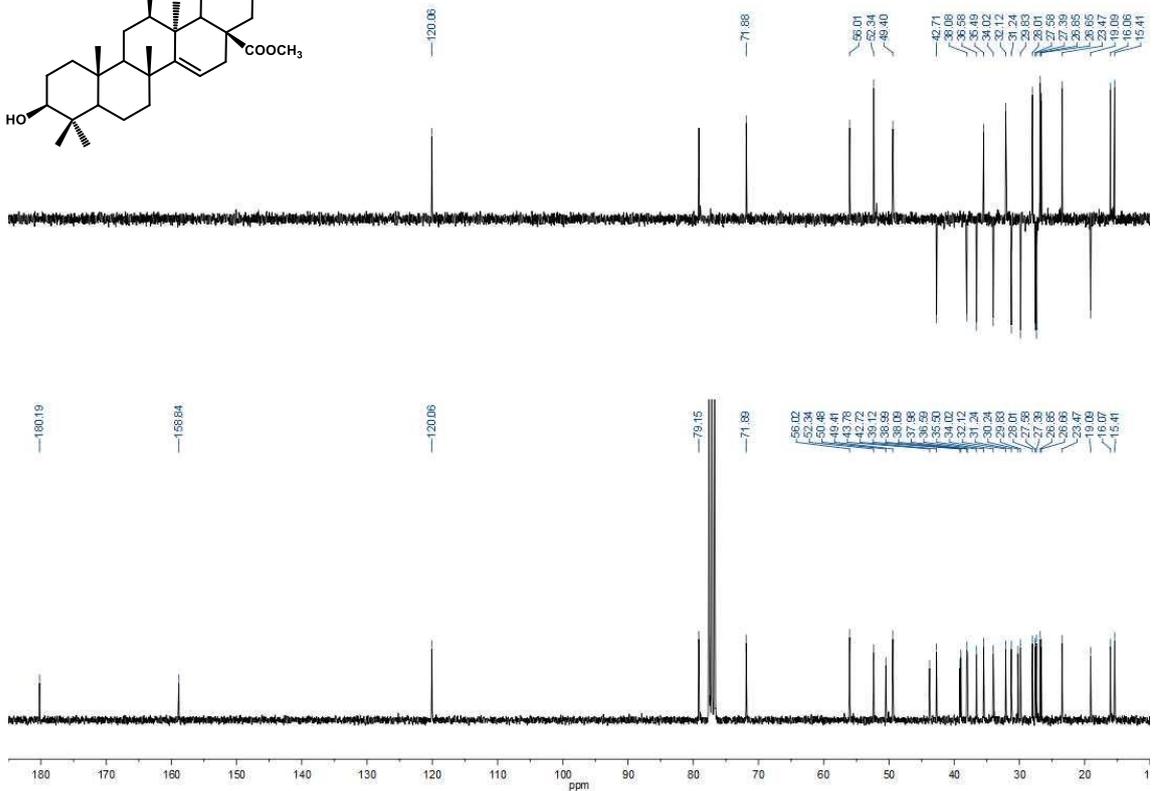
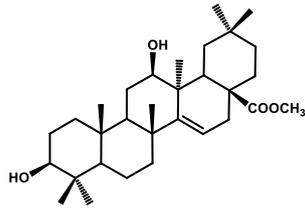
Espectro HSQC del producto 21



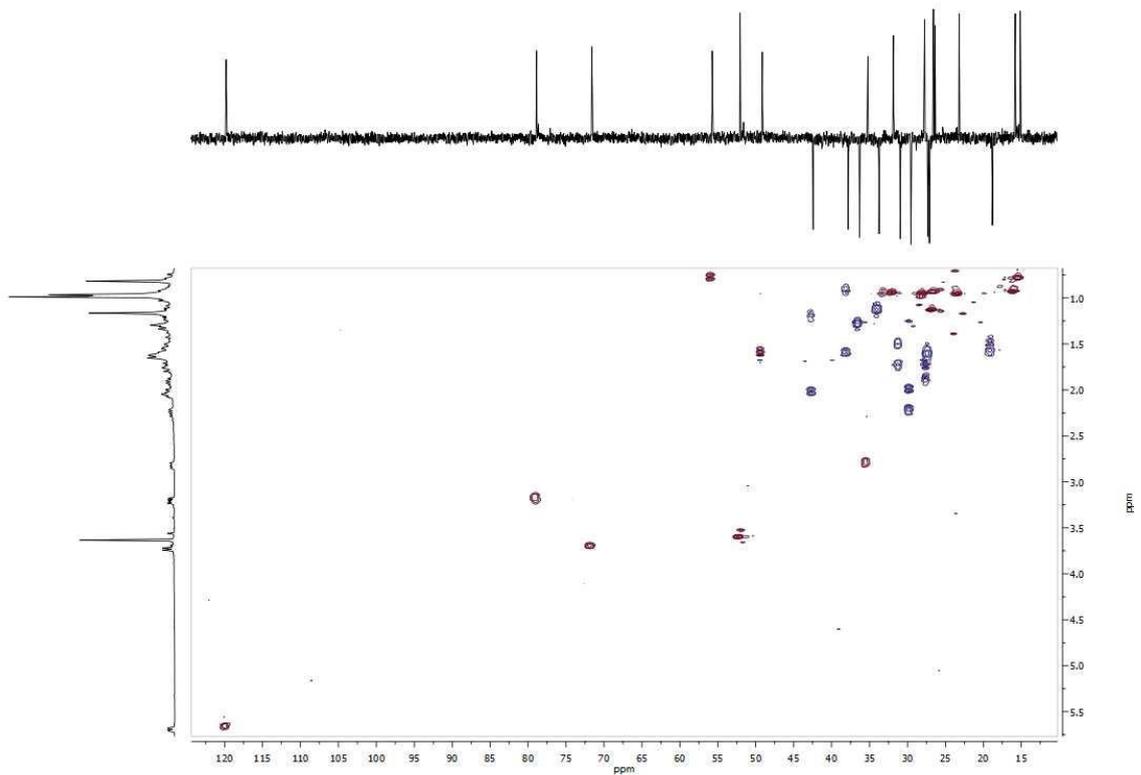
Espectro HMBC del producto 21



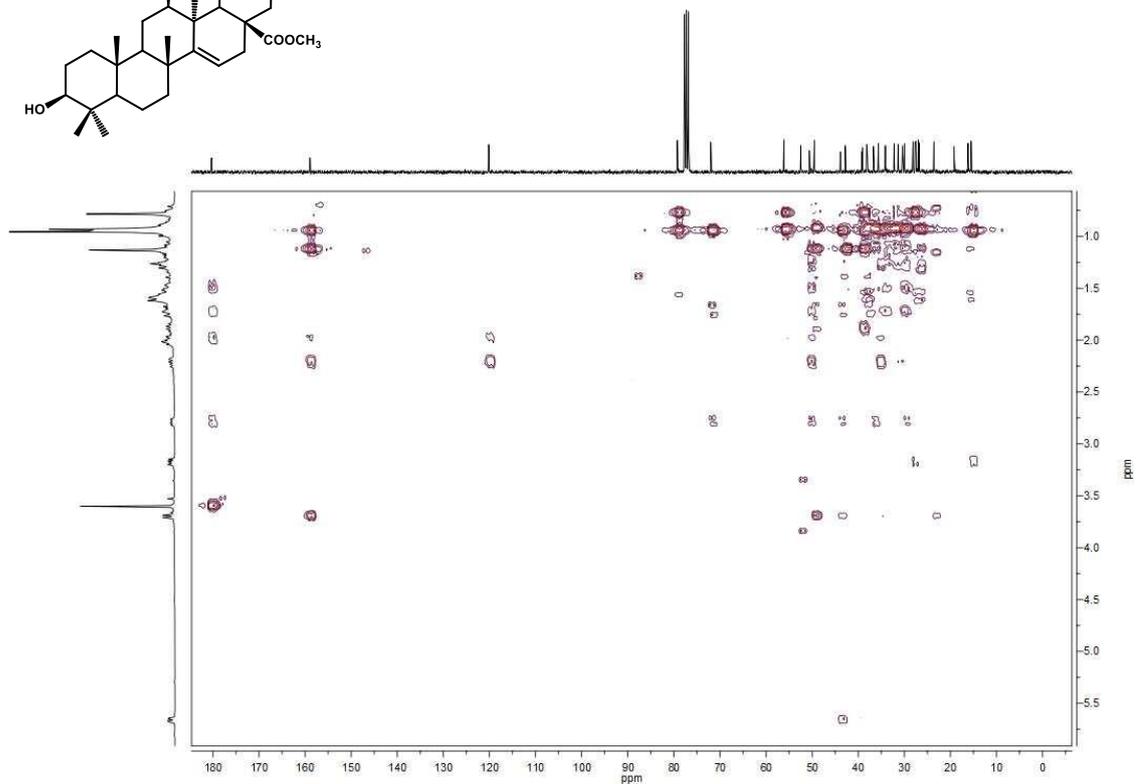
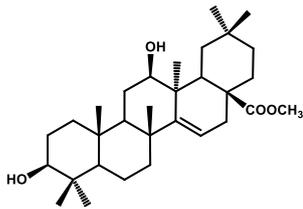
Espectro de ^1H RMN del producto 22



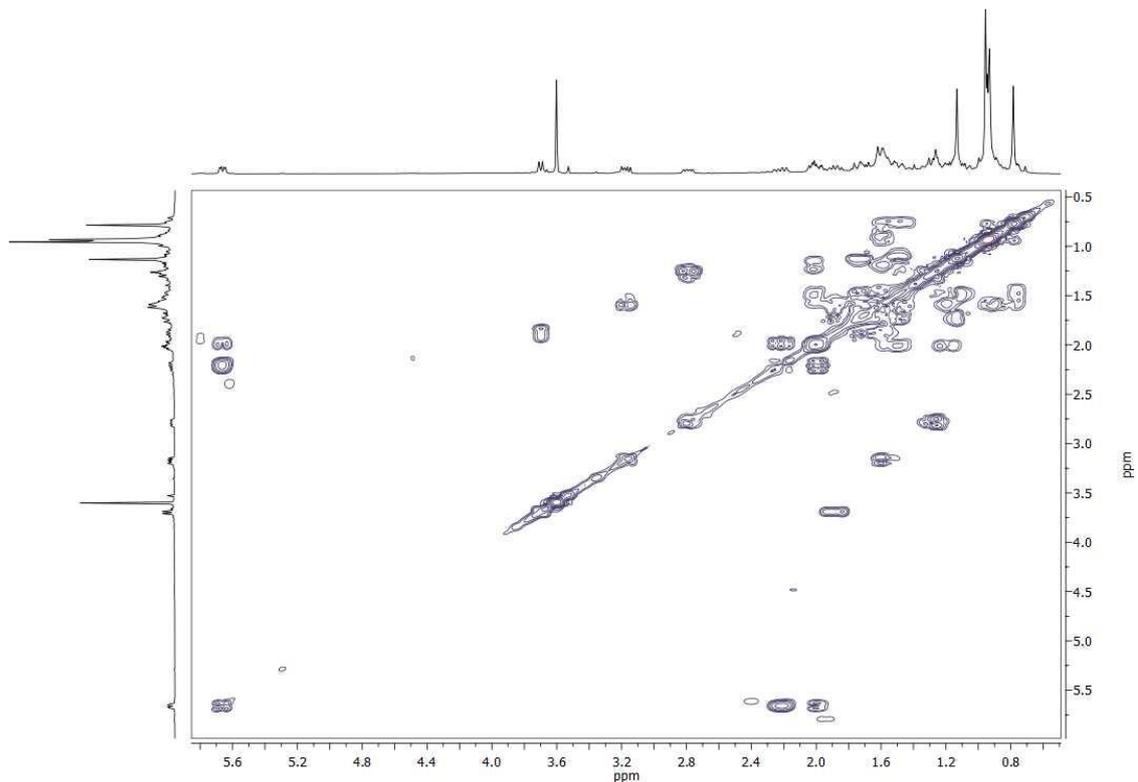
Espectro de ^{13}C RMN del producto 22



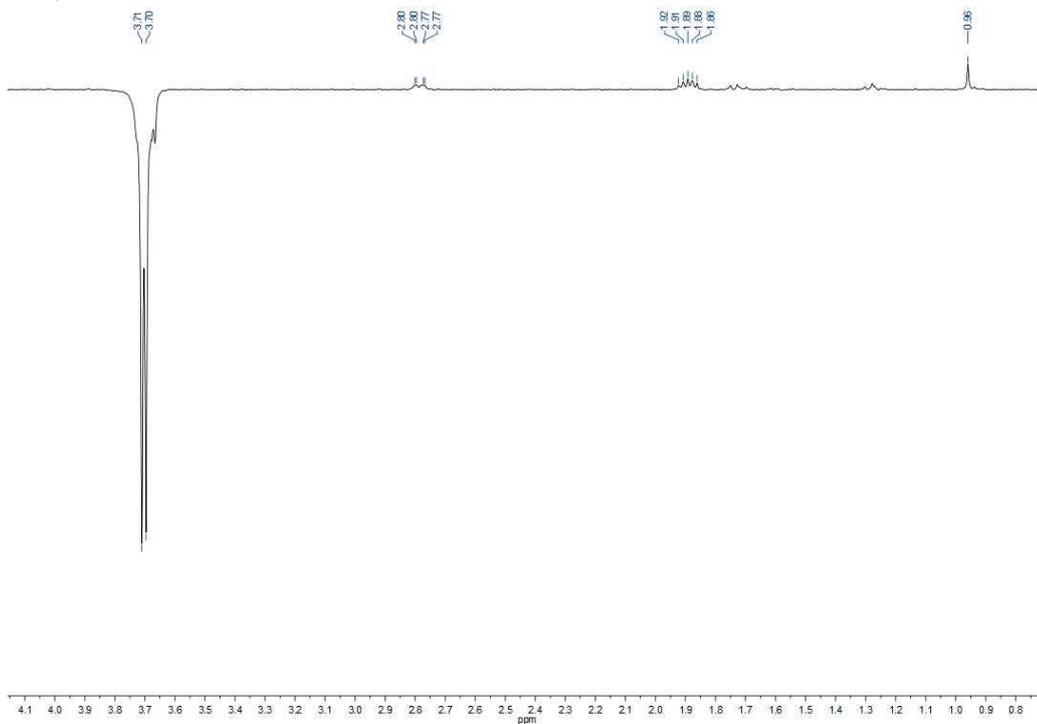
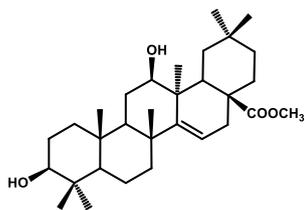
Espectro HSQC del producto 22



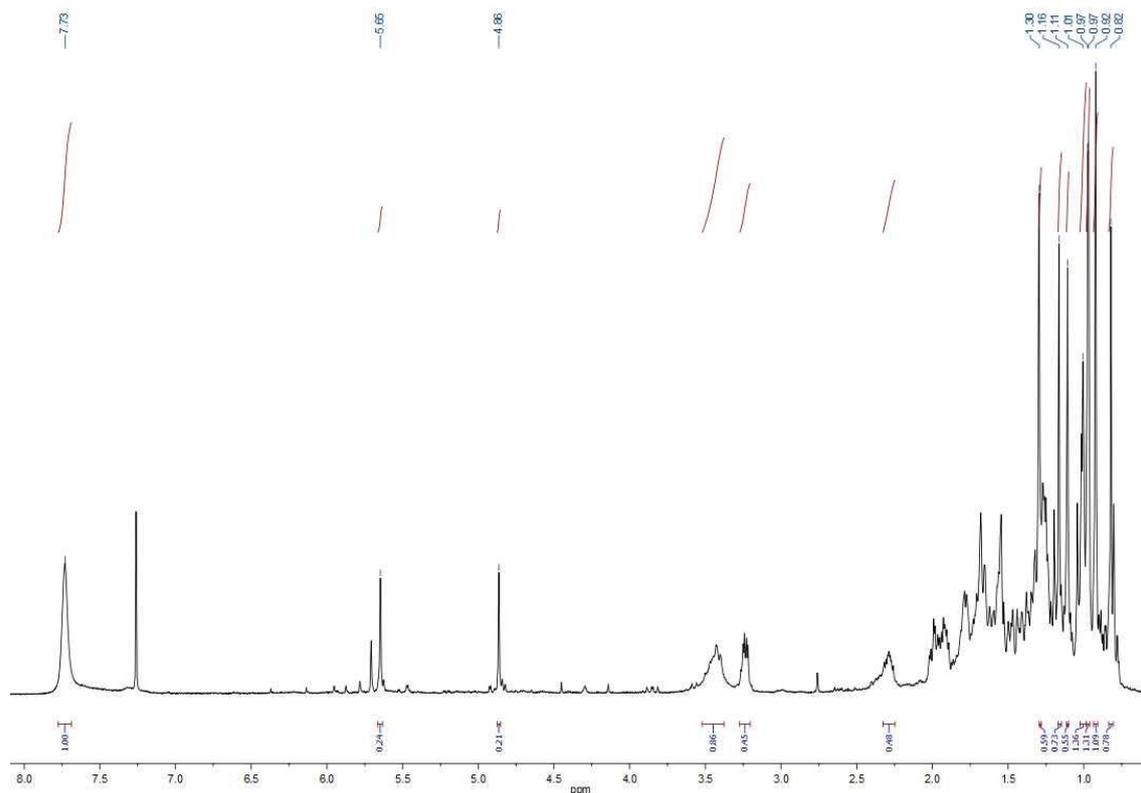
Espectro HMBC del producto 22



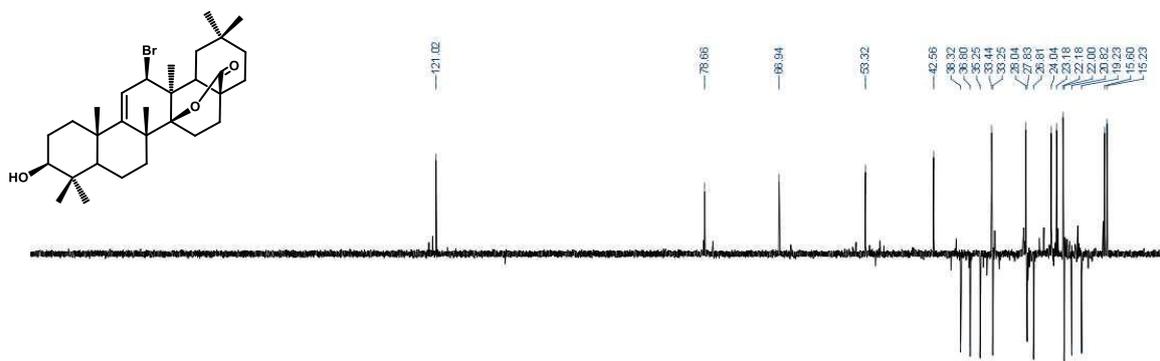
COSY del producto 22



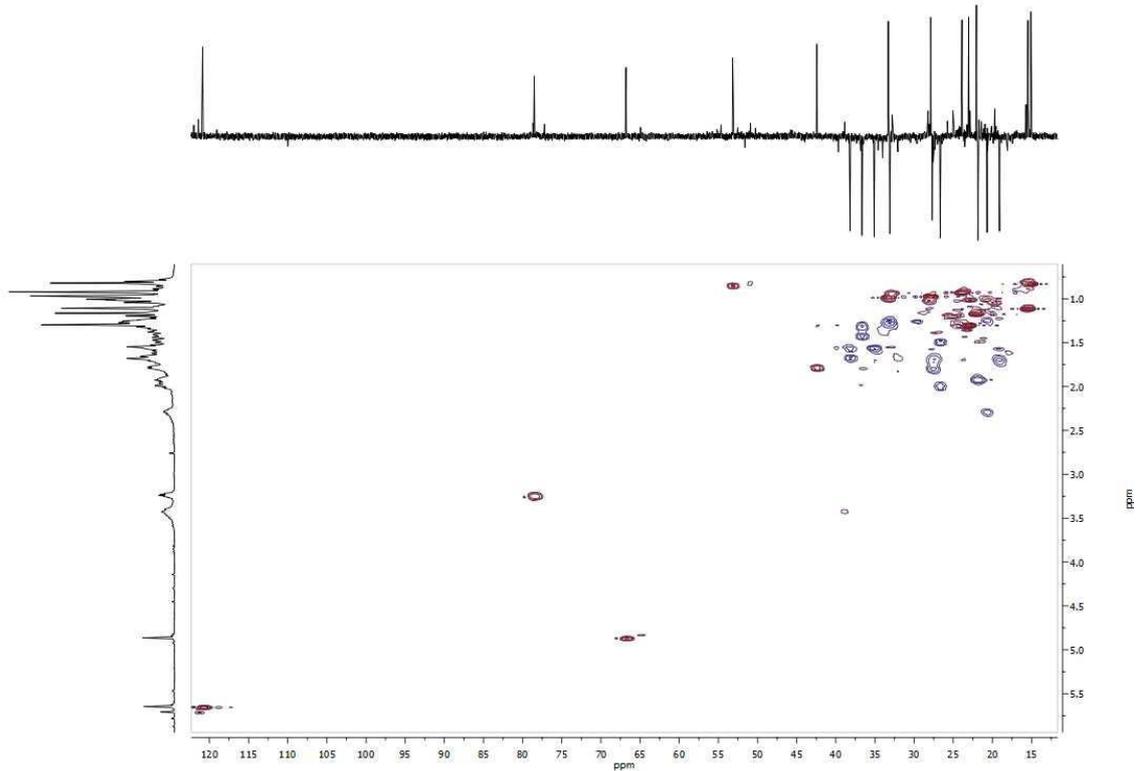
1d-NOESY del producto 22 a 3.71 ppm



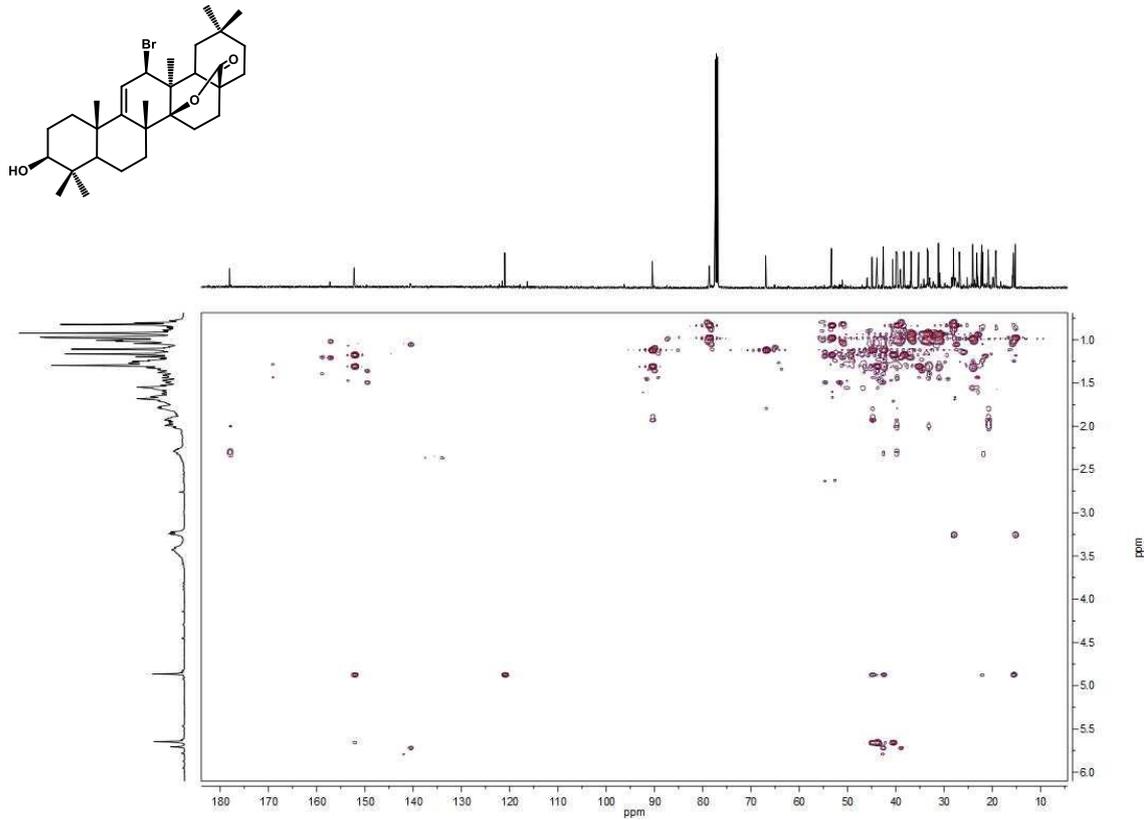
Espectro de ^1H RMN del producto 23



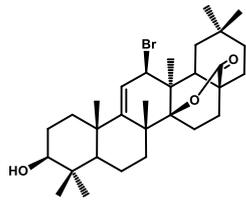
Espectro de ^{13}C RMN del producto 23

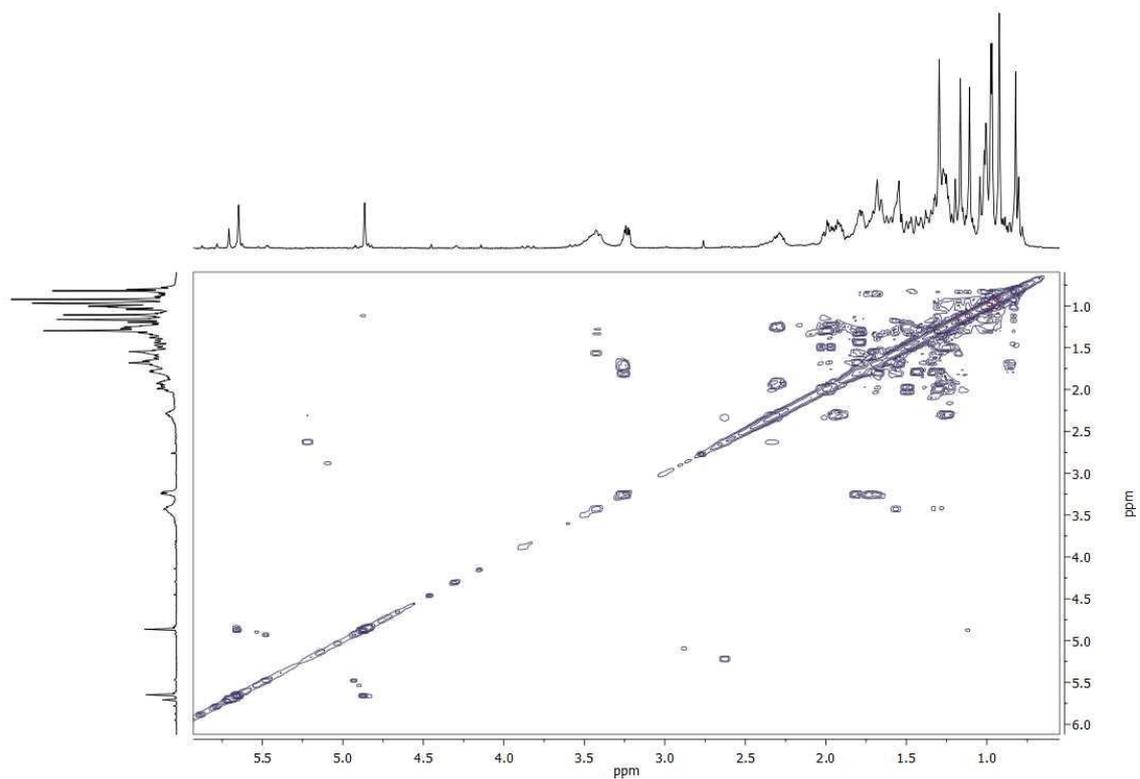


Espectro HSQC del producto 23

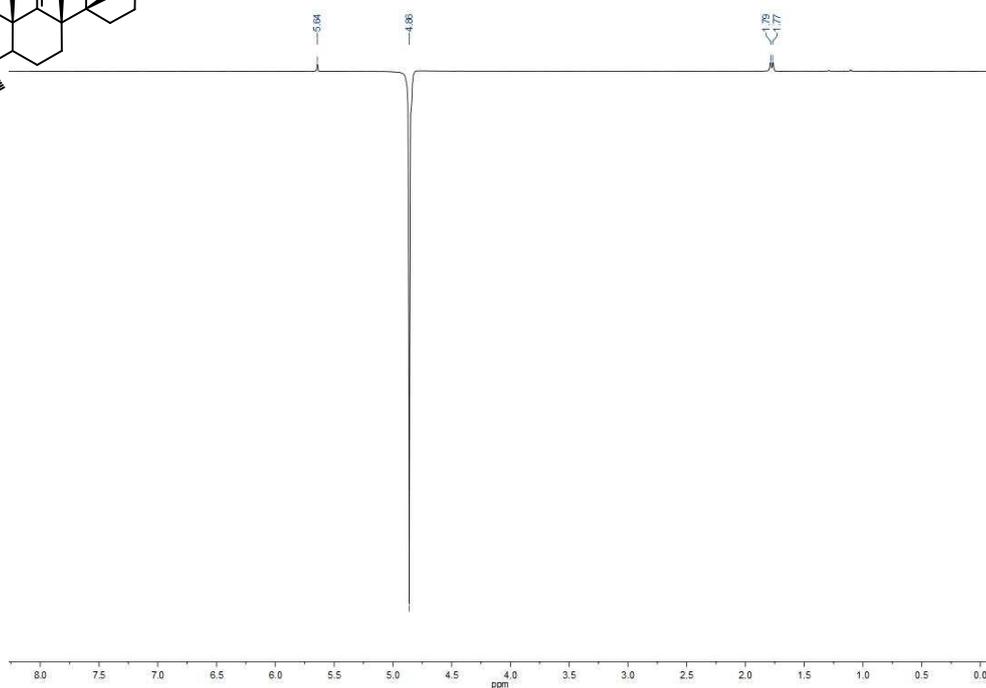
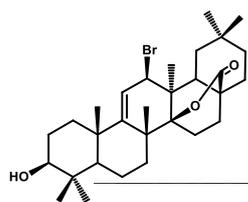


Espectro HMBC del producto 23

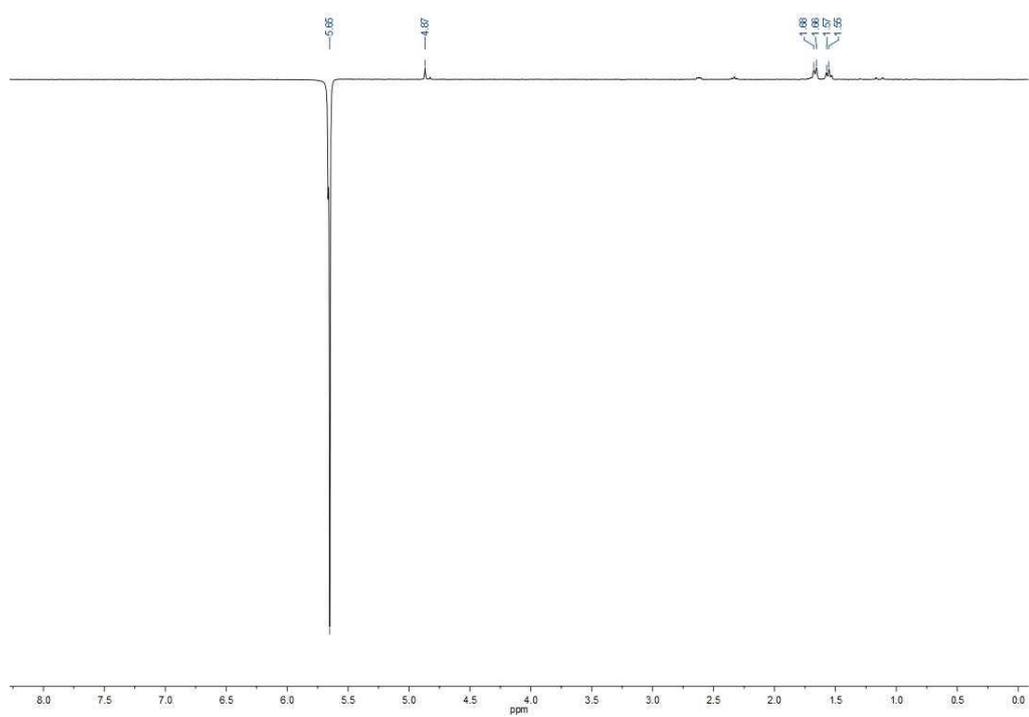




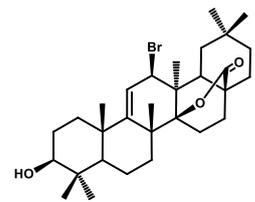
COSY del producto 23

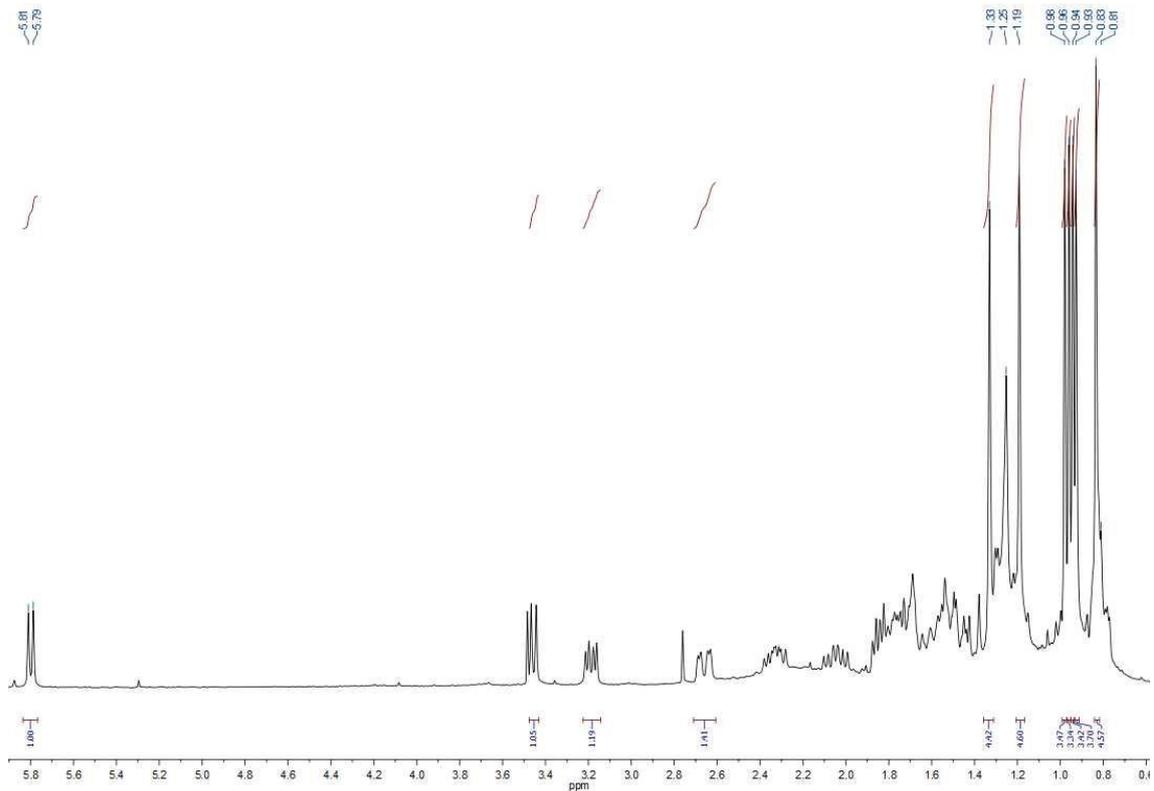


1d-NOESY del producto 23 a 4.86 ppm

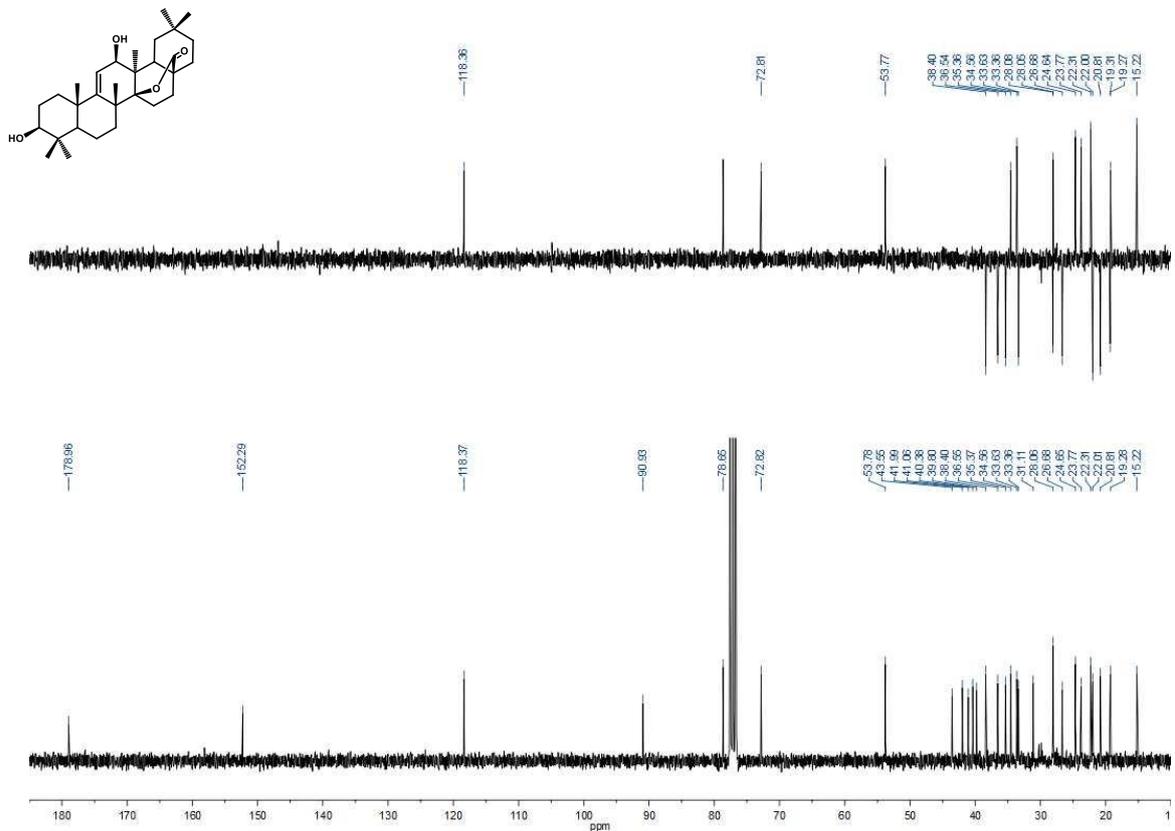


1d-NOESY del producto 23 a 5.65 ppm

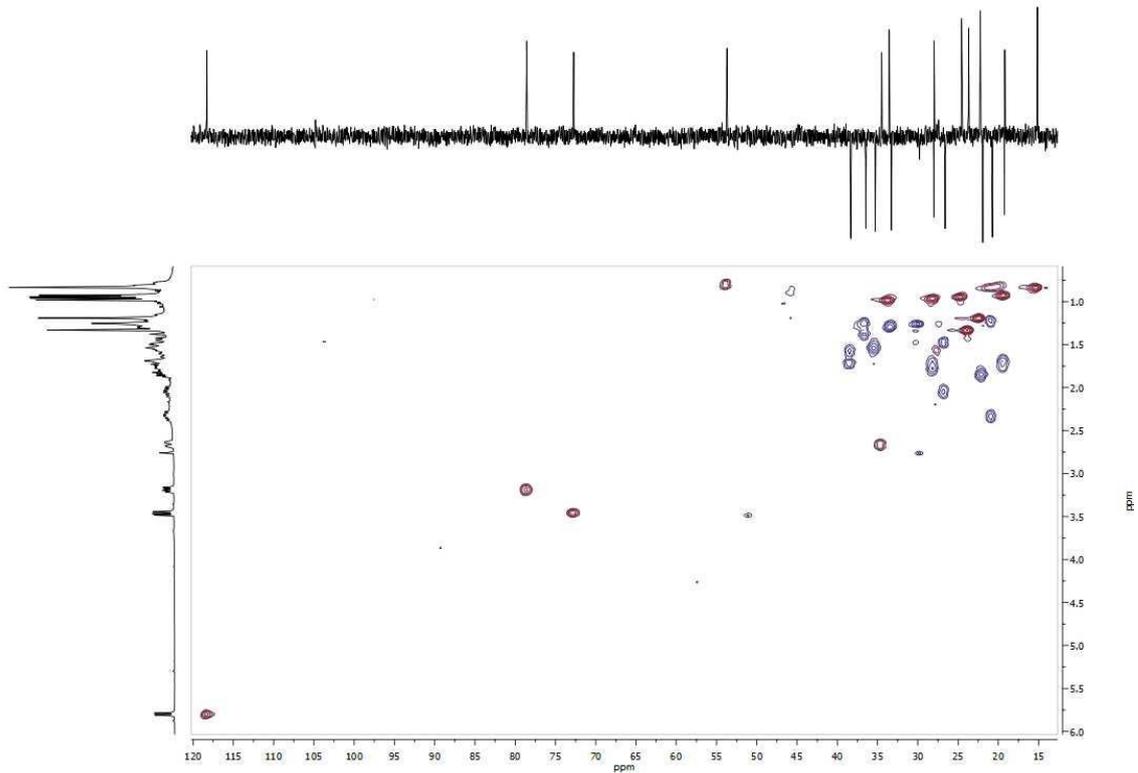




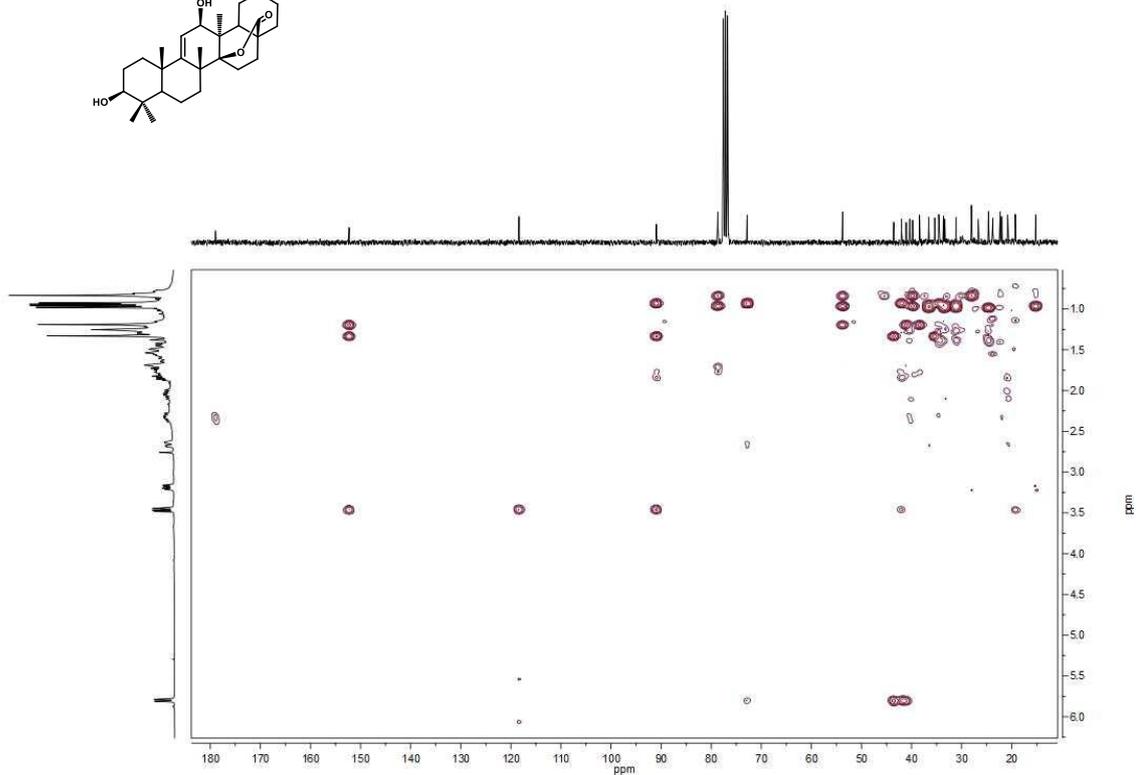
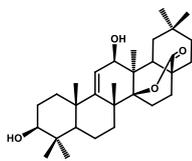
Espectro de ^1H RMN del producto 24



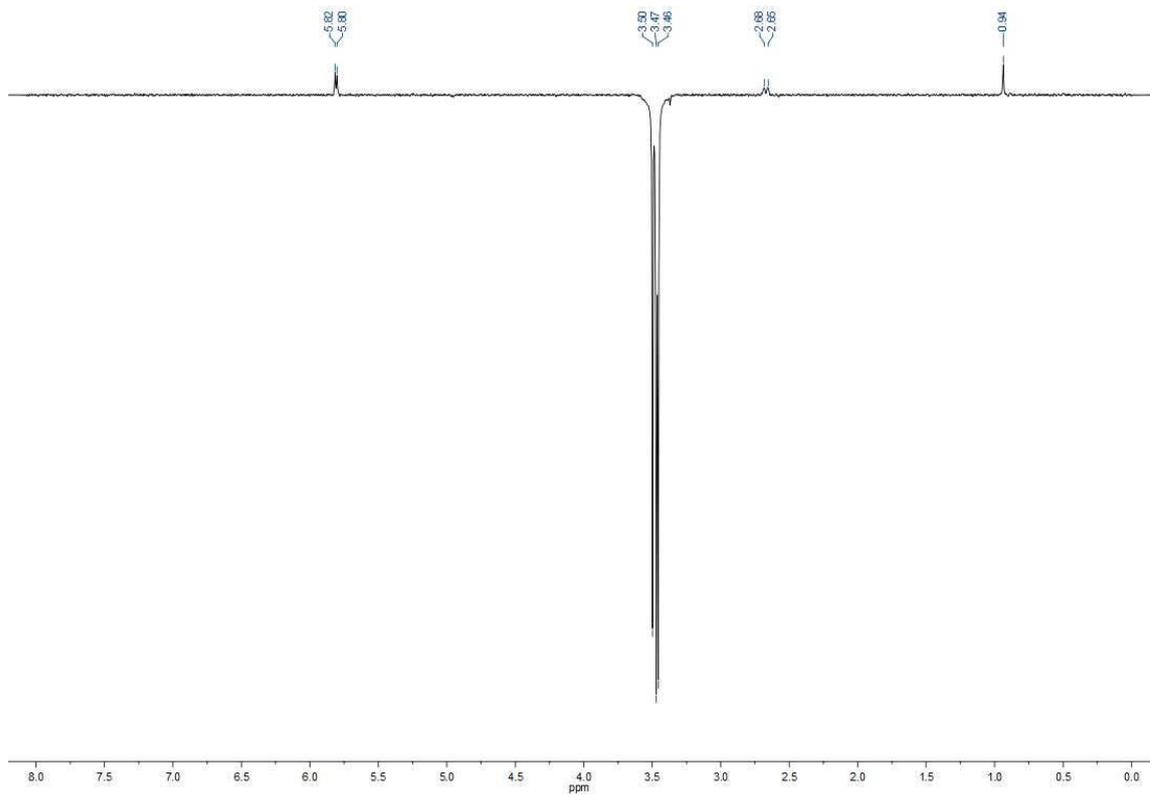
Espectro de ^{13}C RMN del producto 24



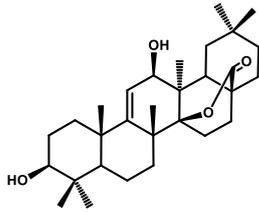
Espectro HSQC del producto 24

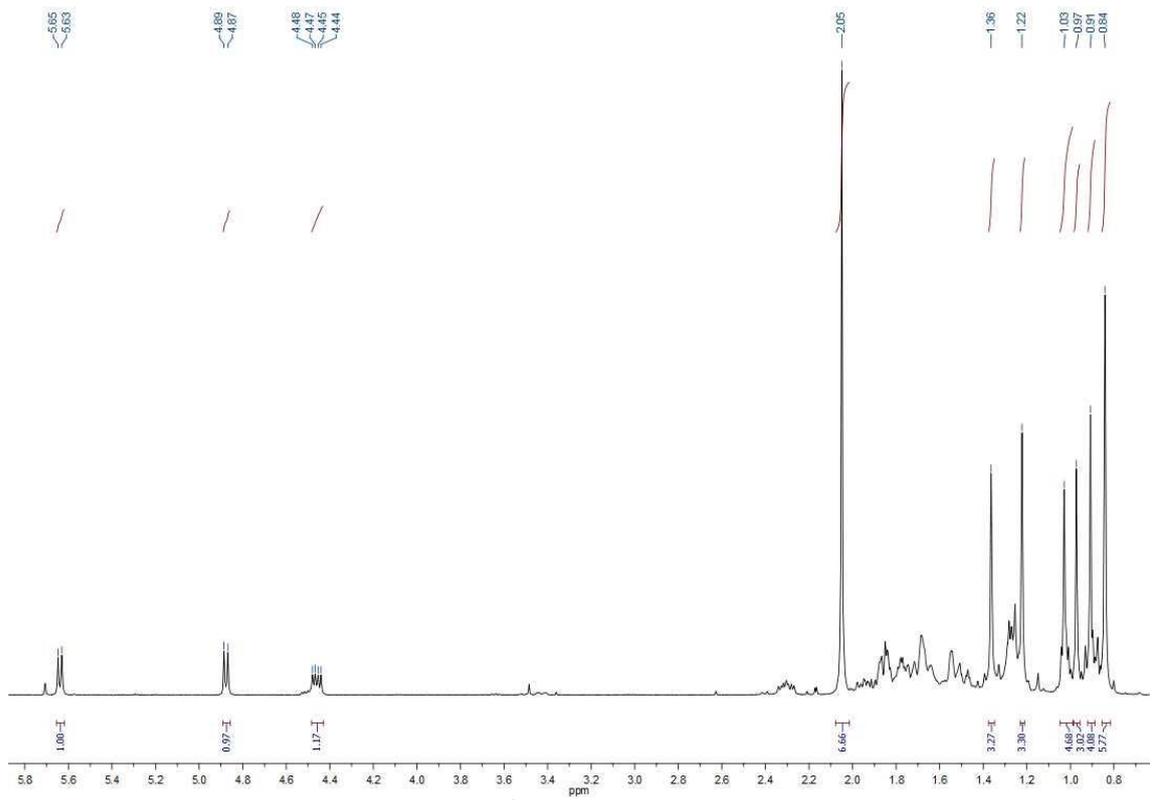


Espectro HMBC del producto 24

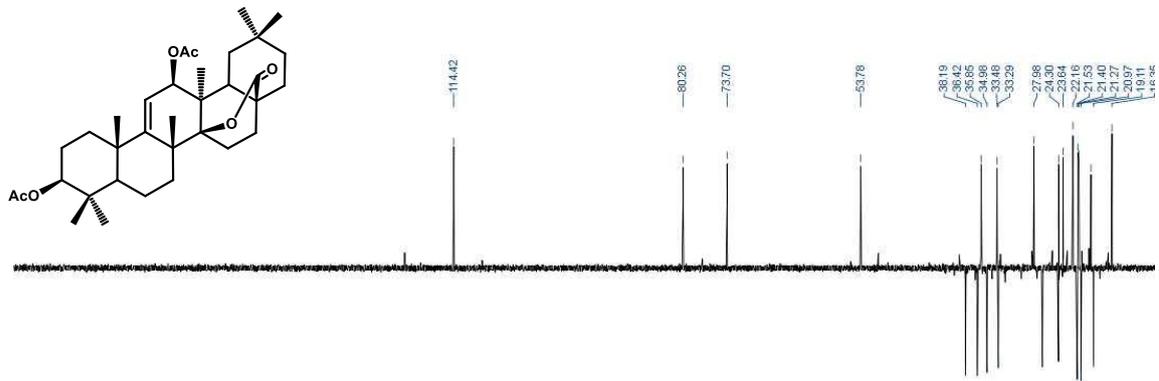


1d-NOESY del producto 24 a 3.47 ppm

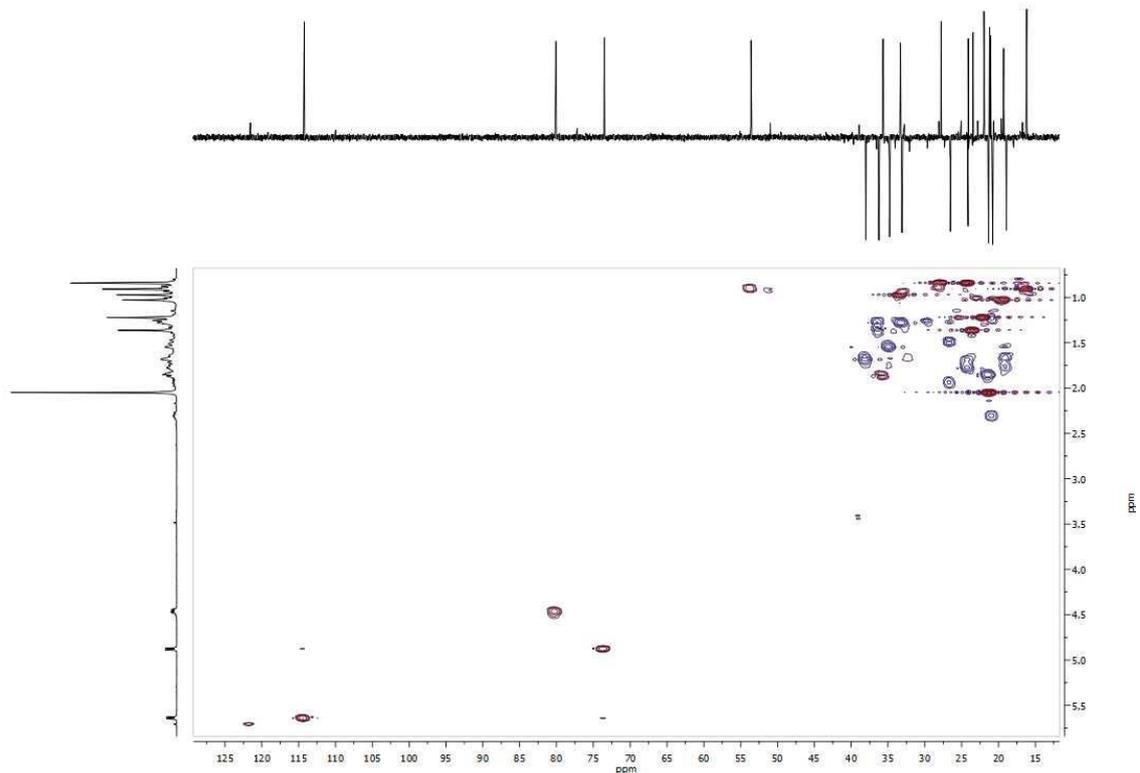




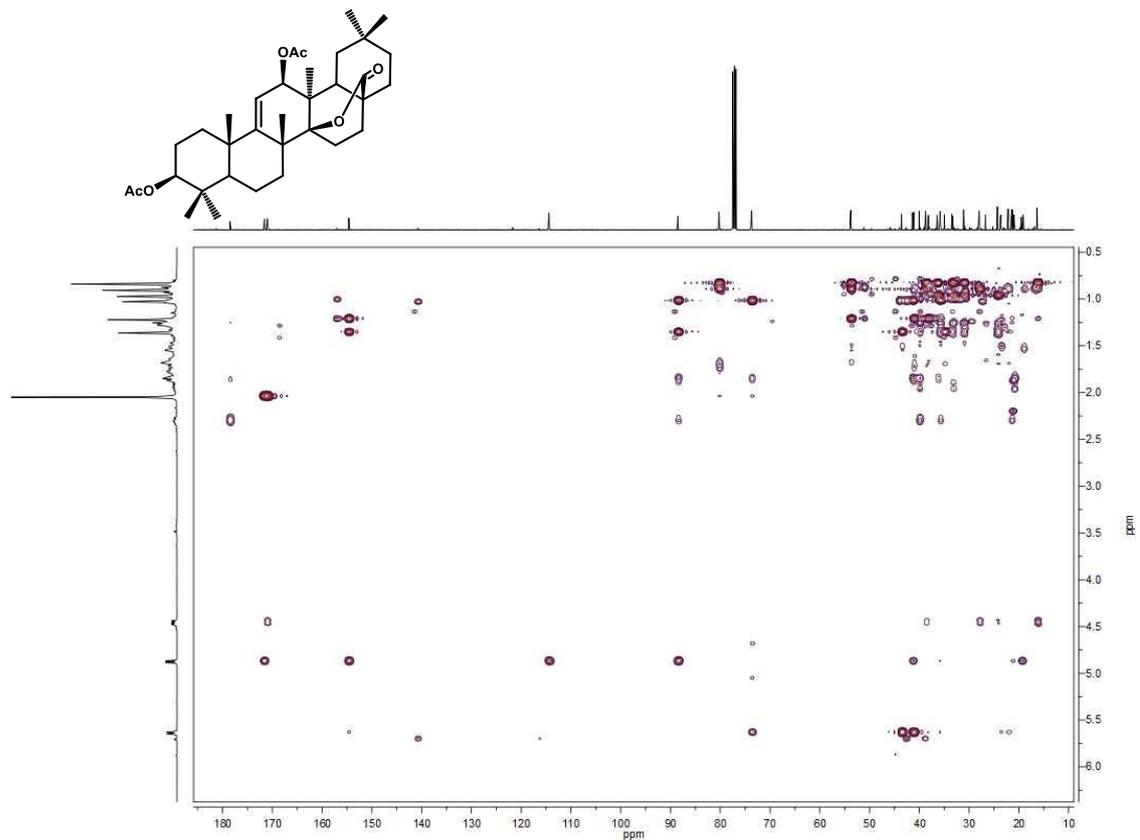
Espectro de ¹H RMN del producto 25



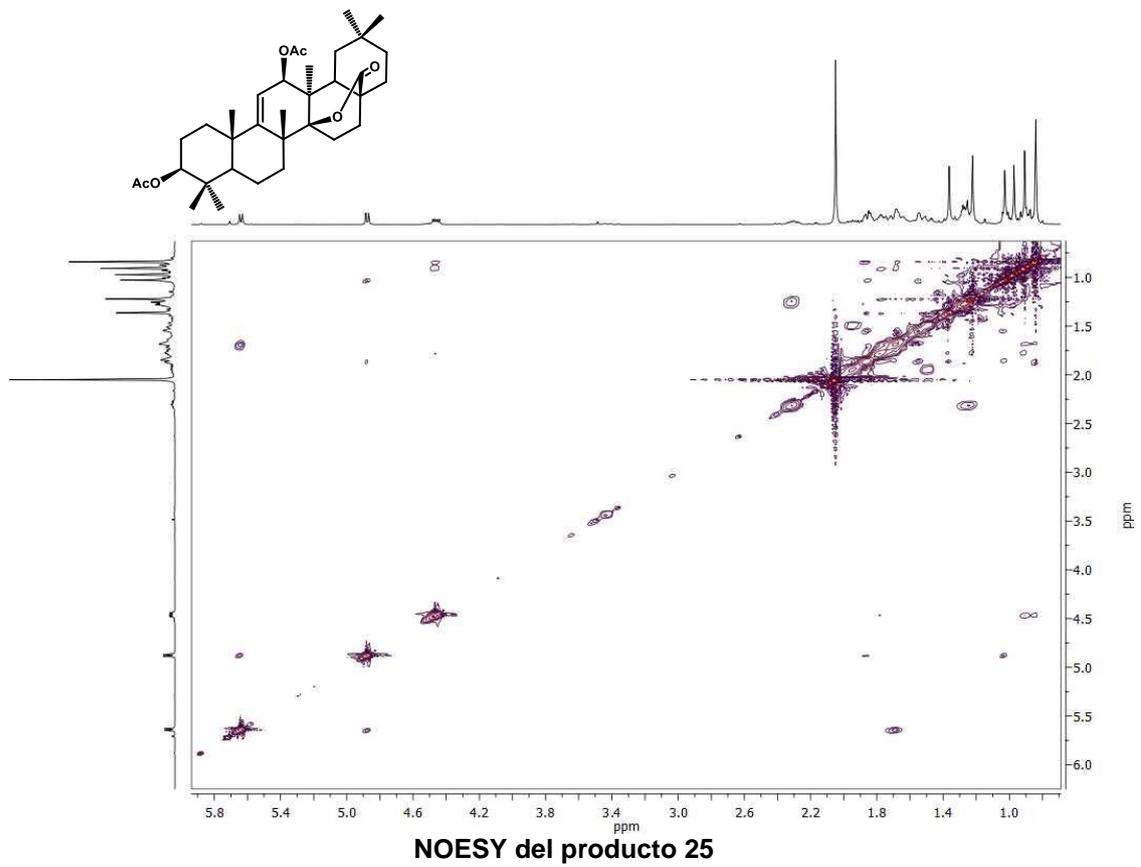
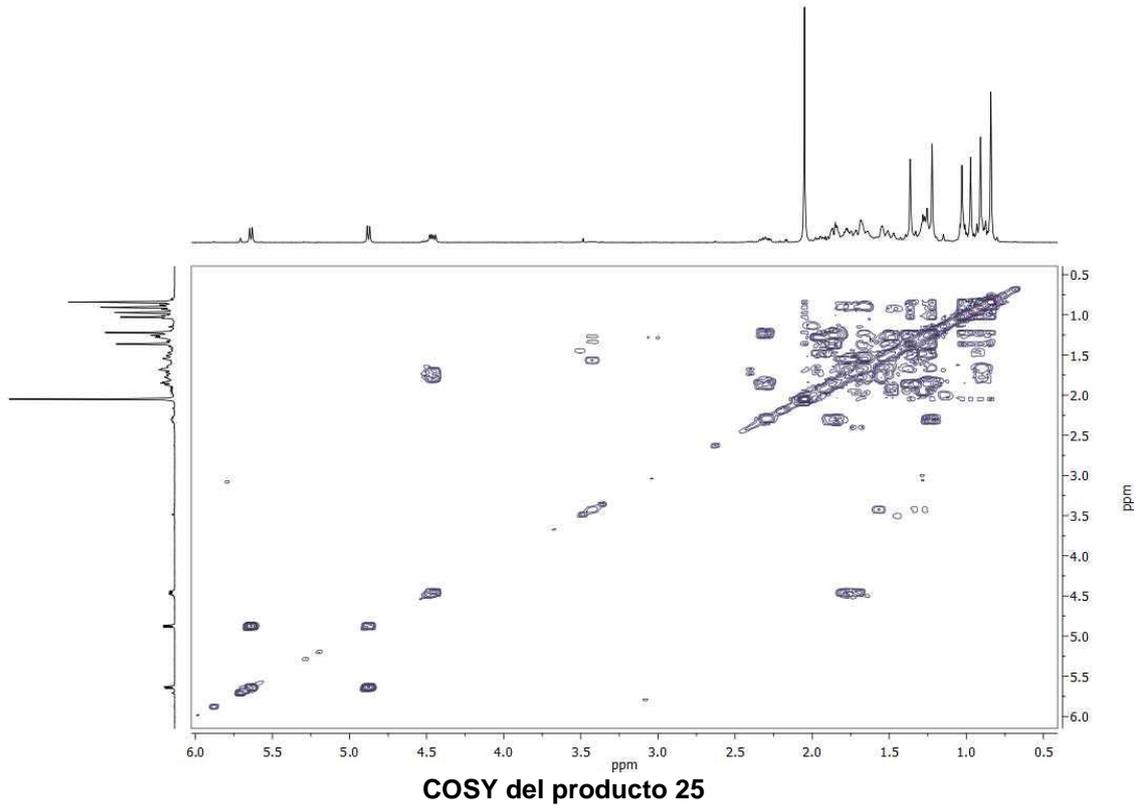
Espectro de ¹³C RMN del producto 25

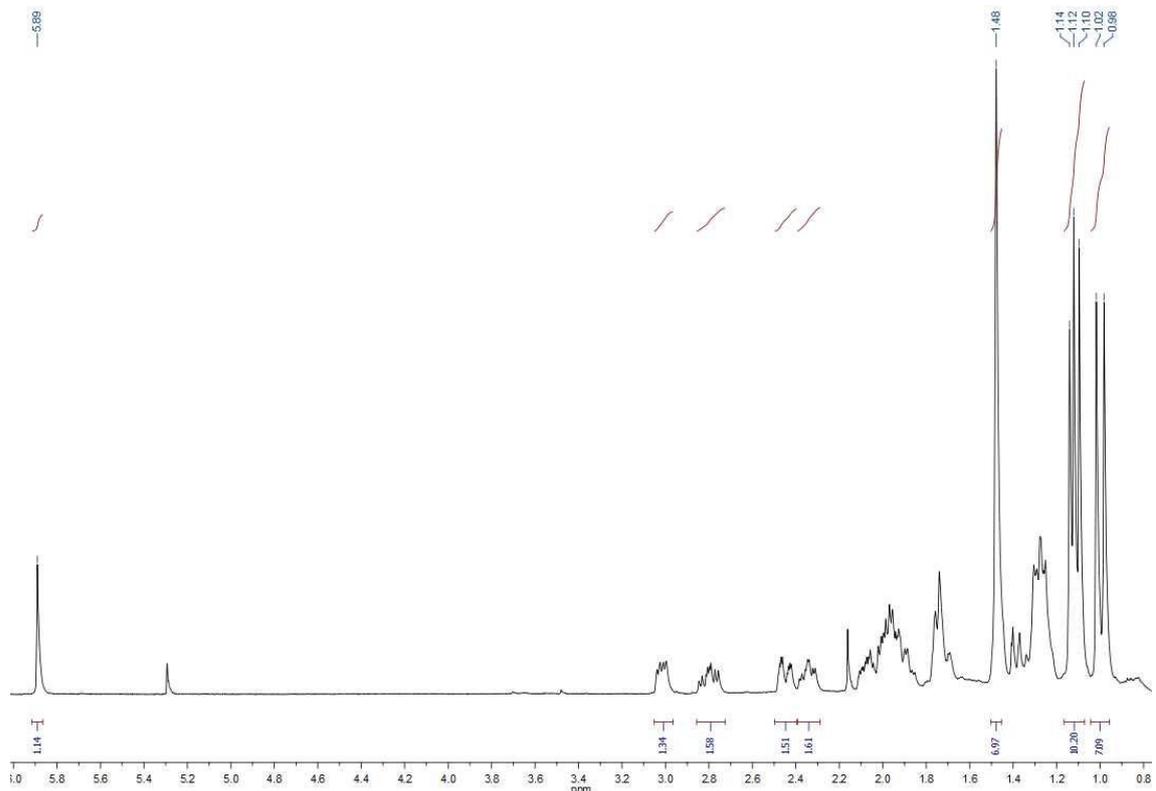


Espectro HSQC del producto 25

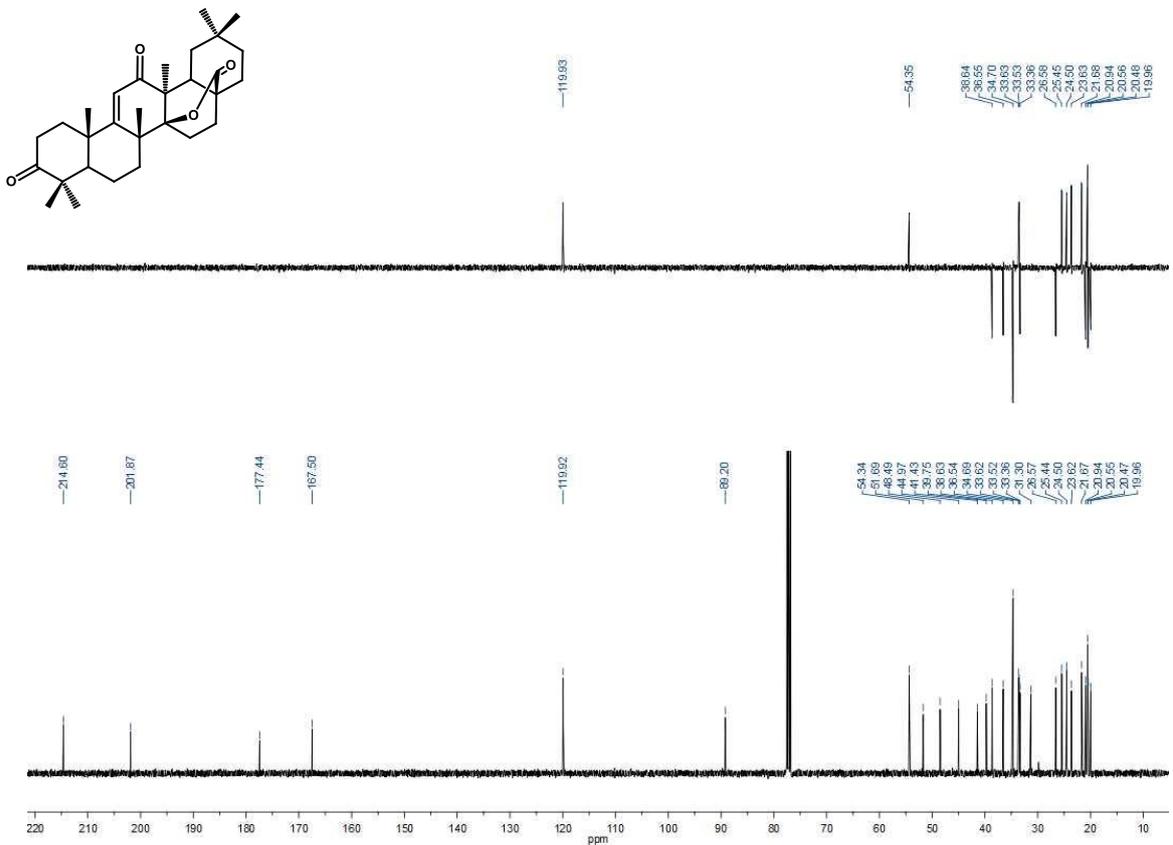


Espectro HMBC del producto 25

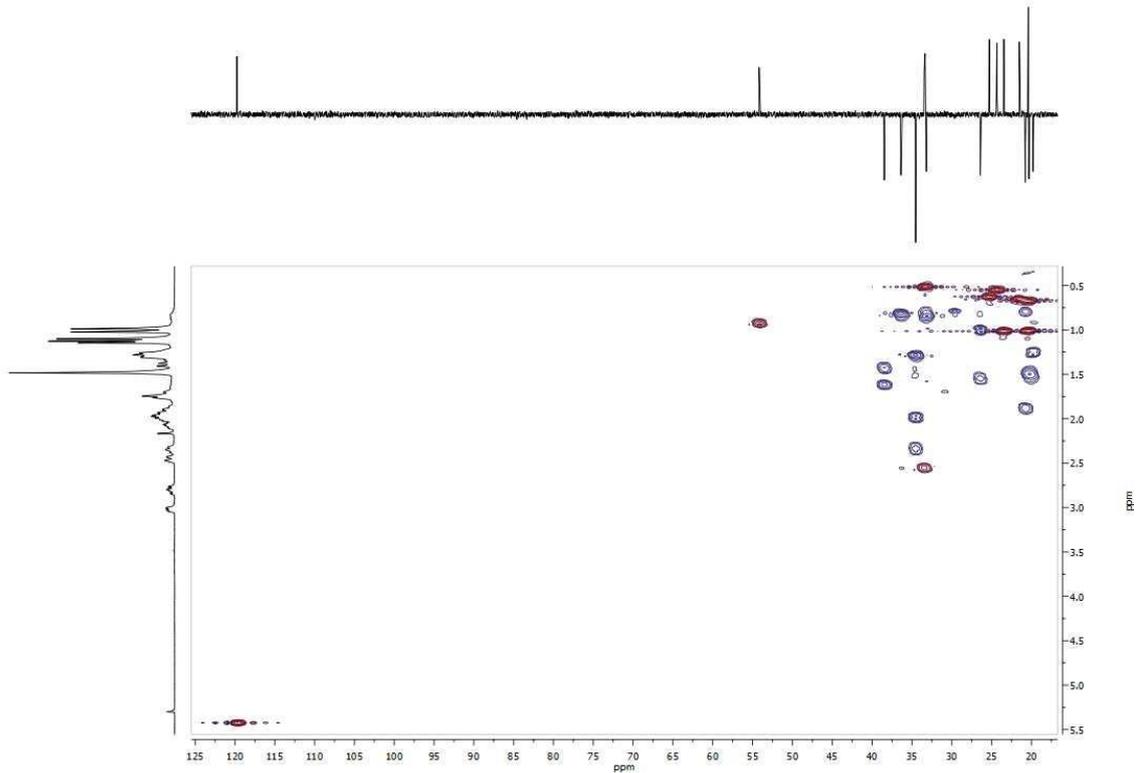




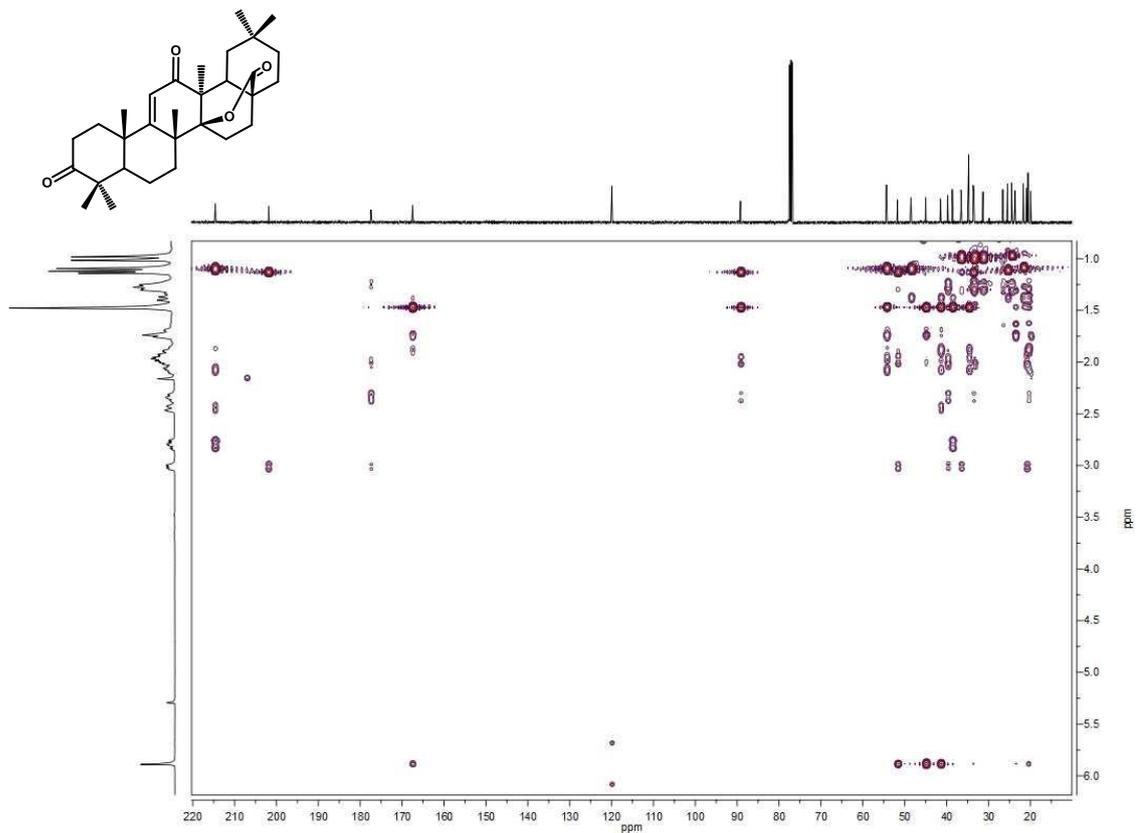
Espectro de ^1H RMN del producto 26



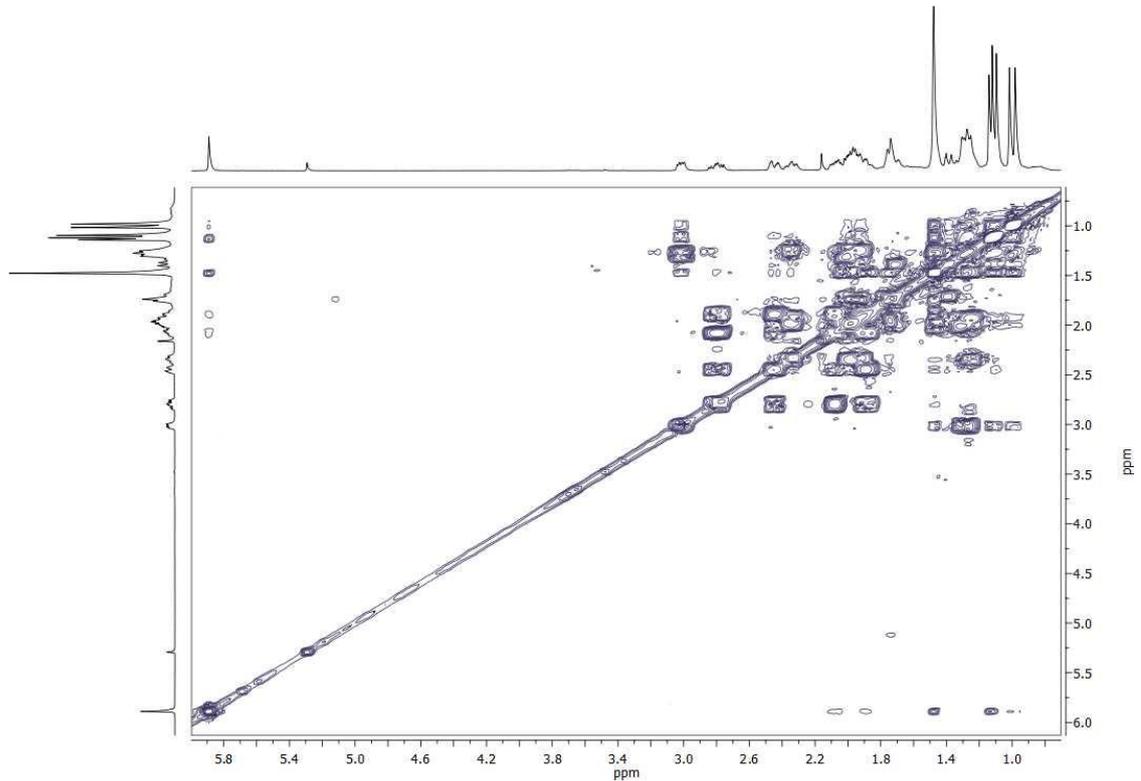
Espectro de ^{13}C RMN del producto 26



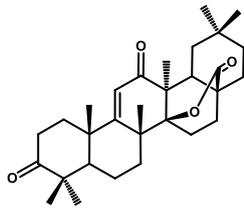
Espectro HSQC del producto 26

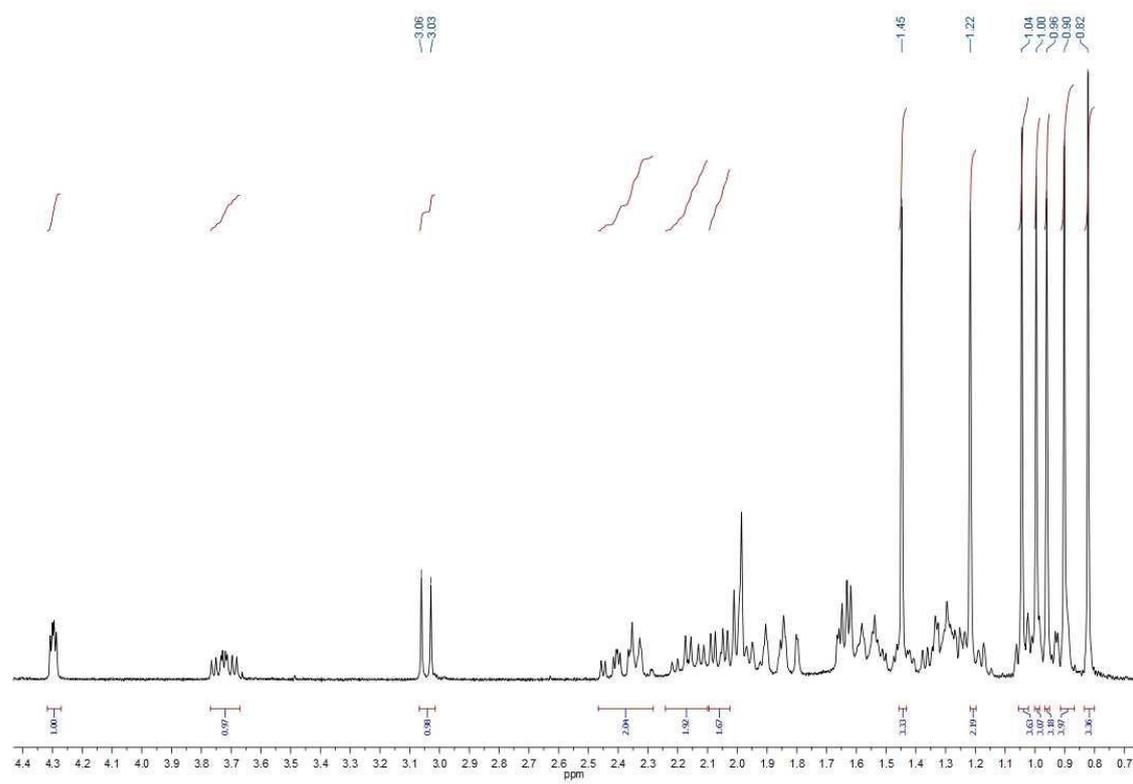


Espectro HMBC del producto 26

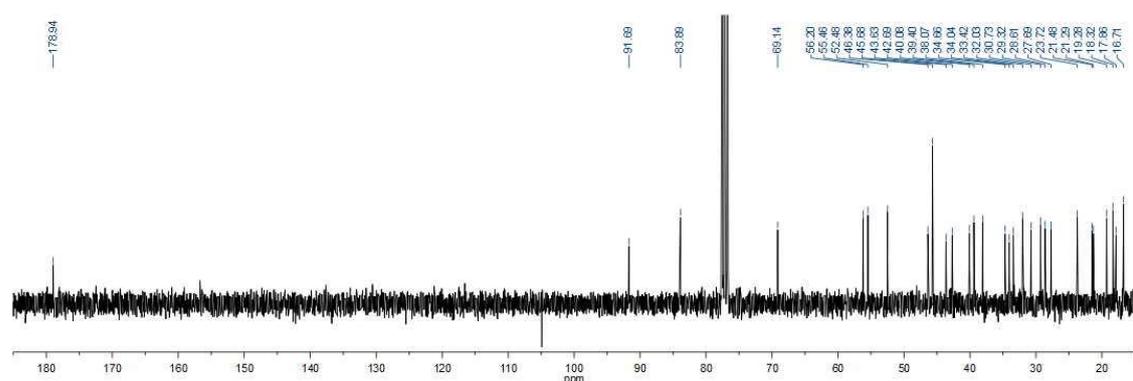
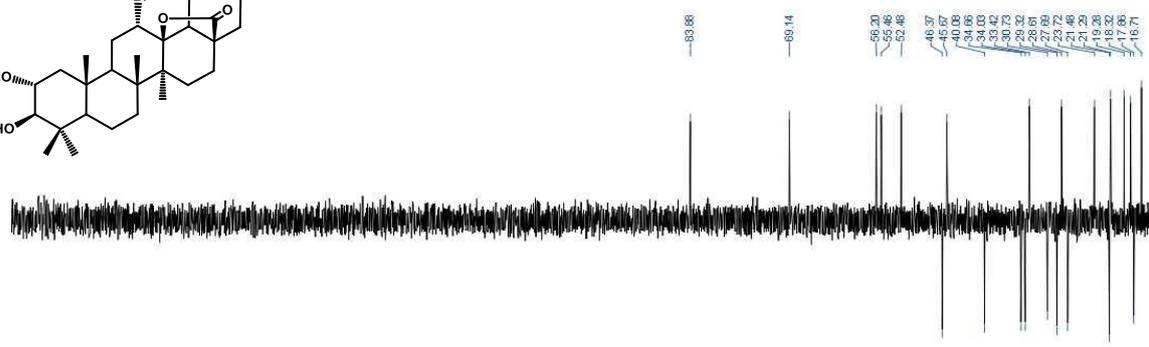
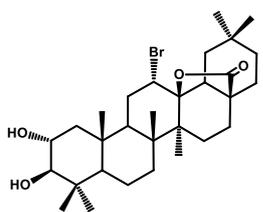


COSY del producto 26

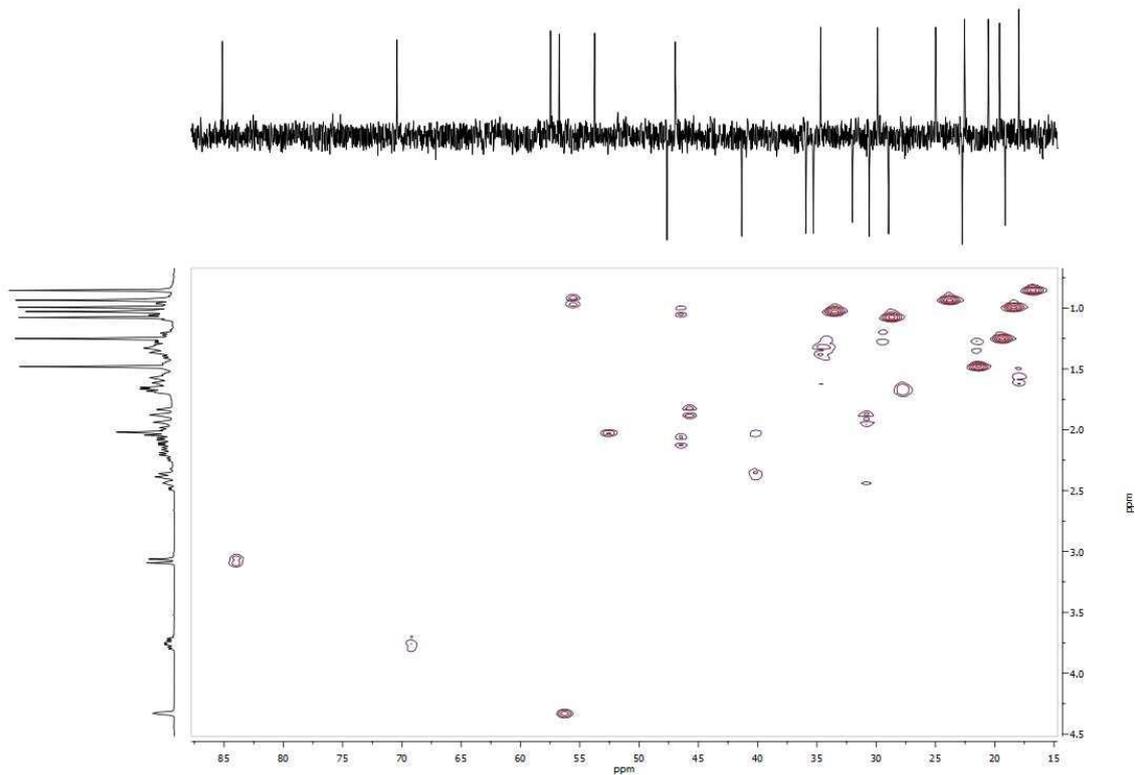




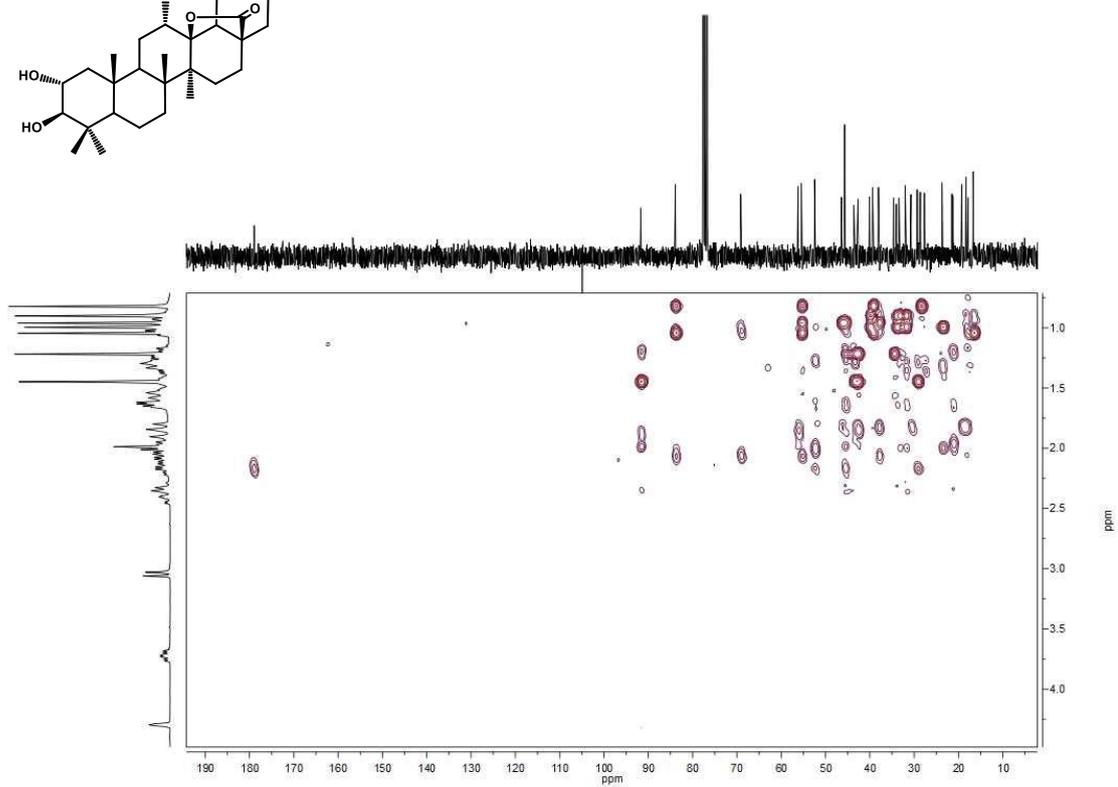
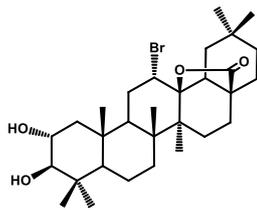
Espectro de ¹H RMN del producto 27



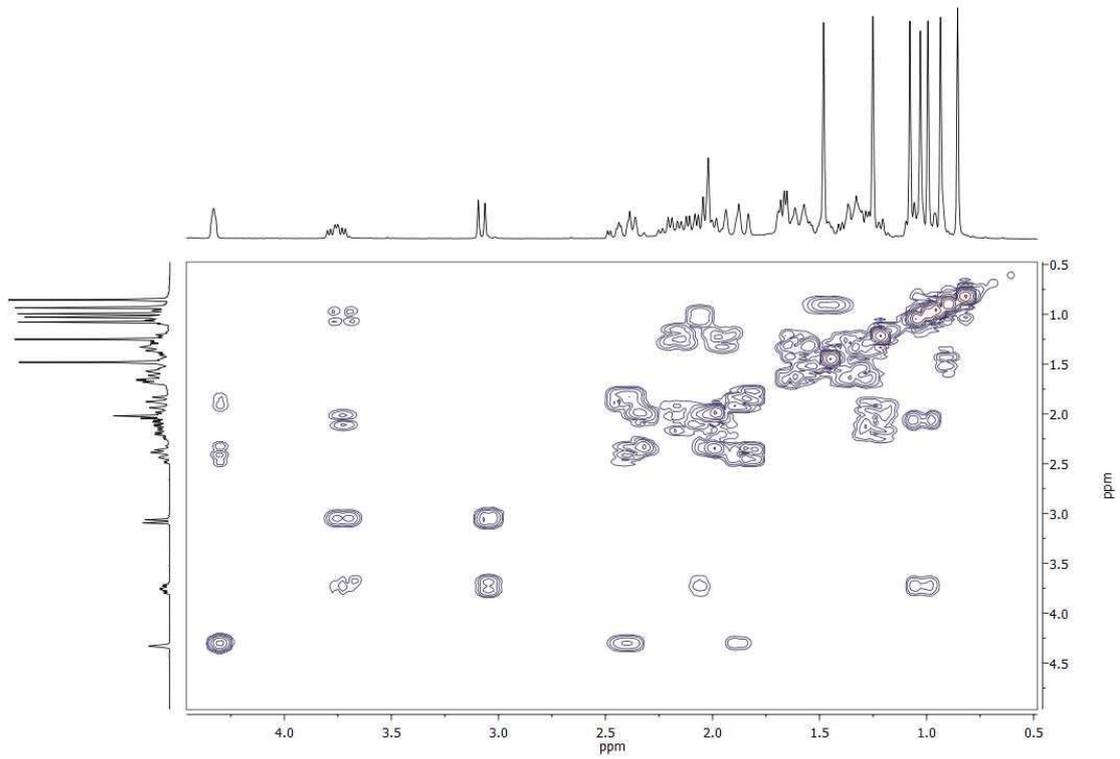
Espectro de ¹³C RMN del producto 27



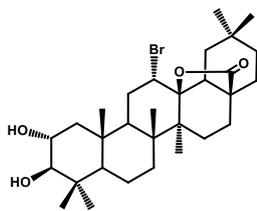
Espectro HSQC del producto 27

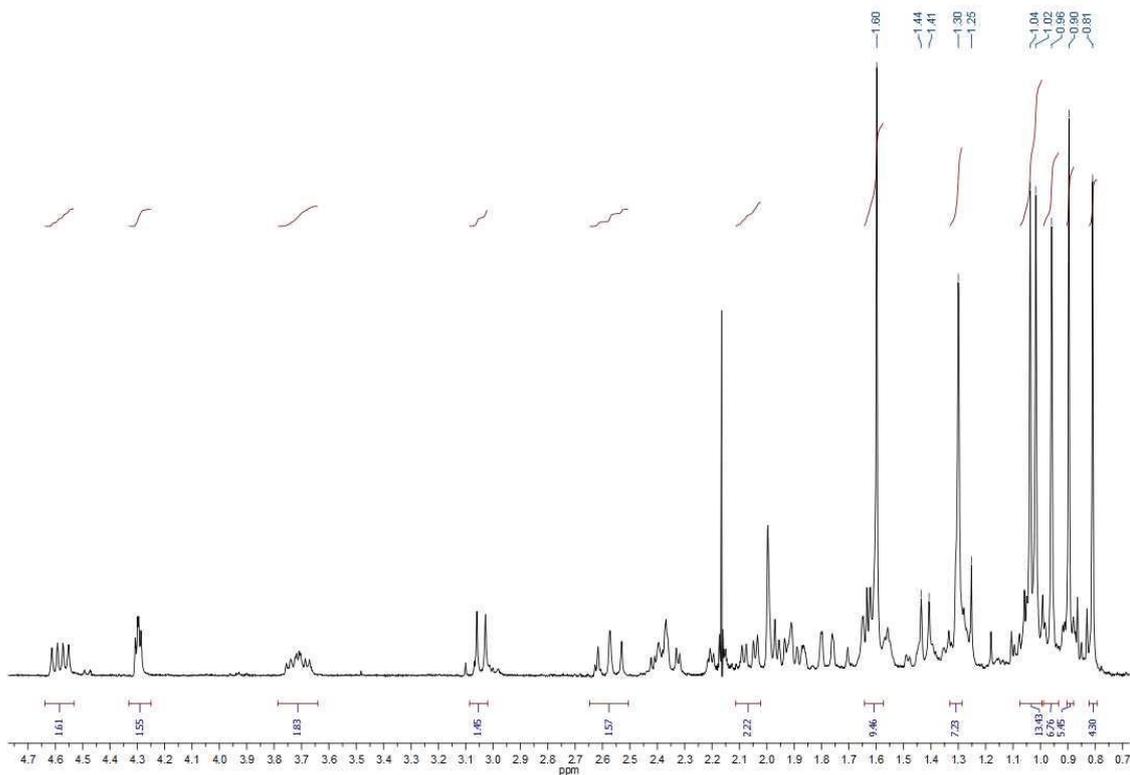


Espectro HMBC del producto 27

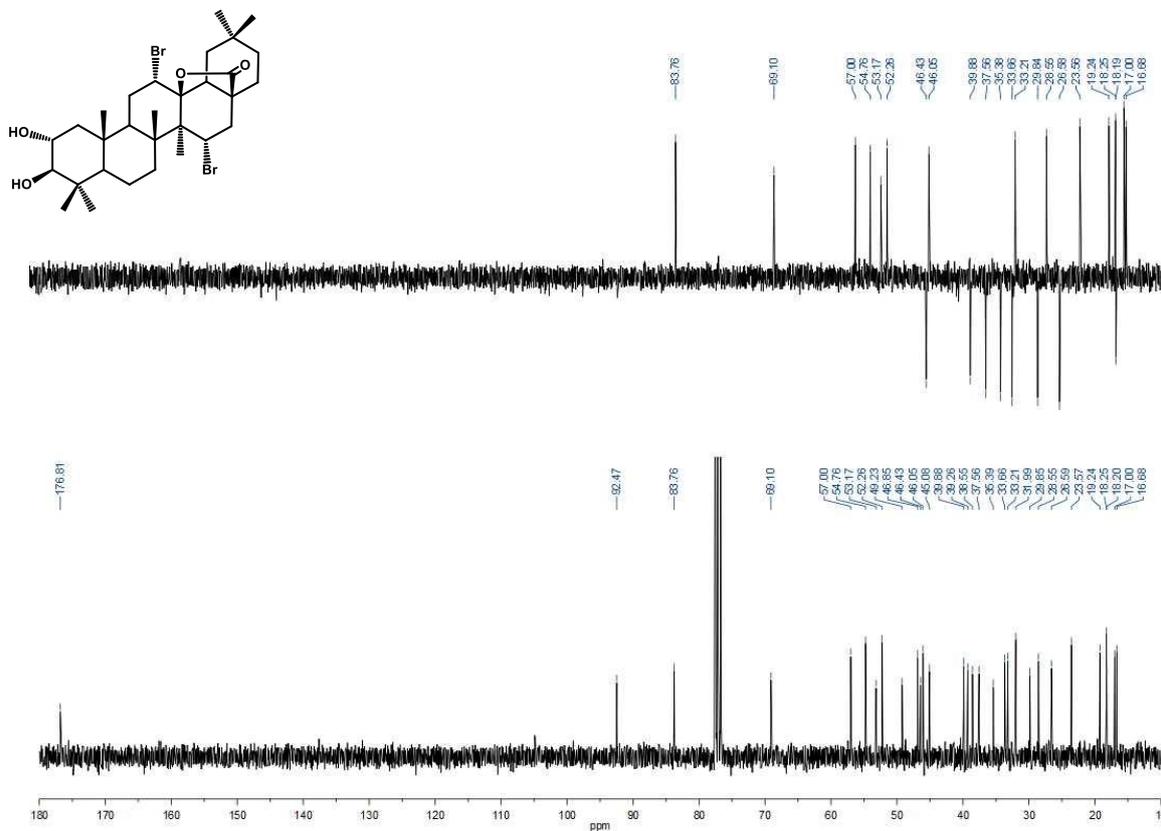


COSY del producto 27

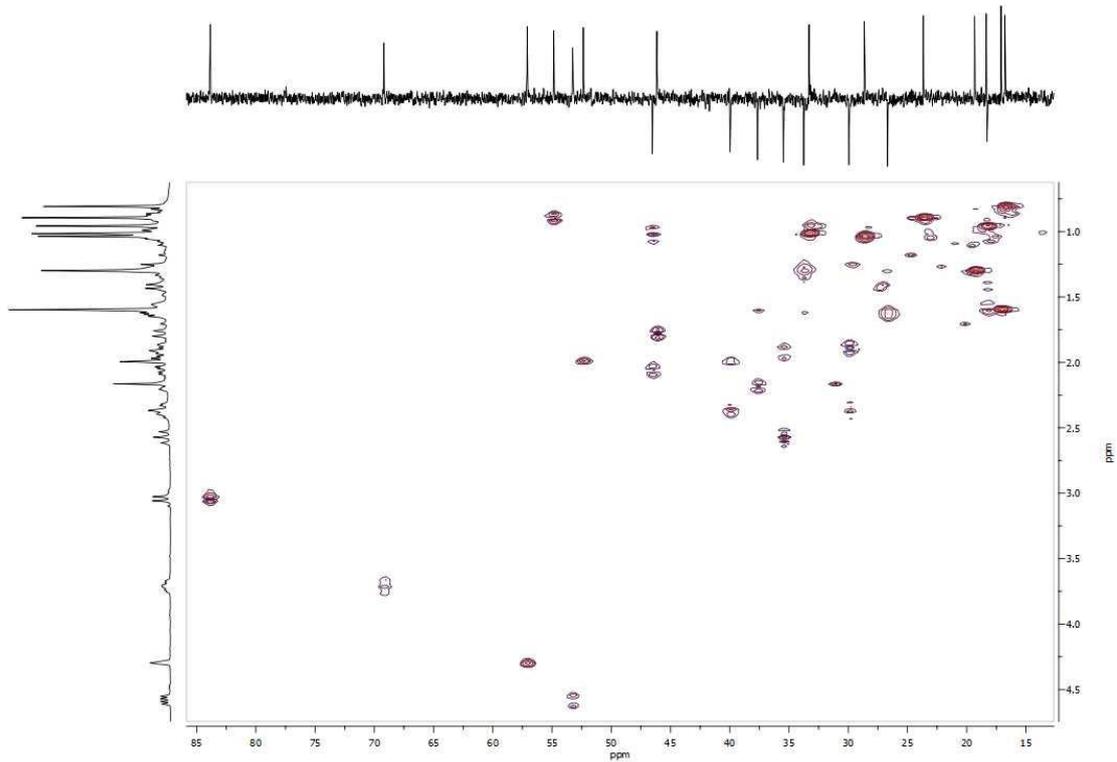




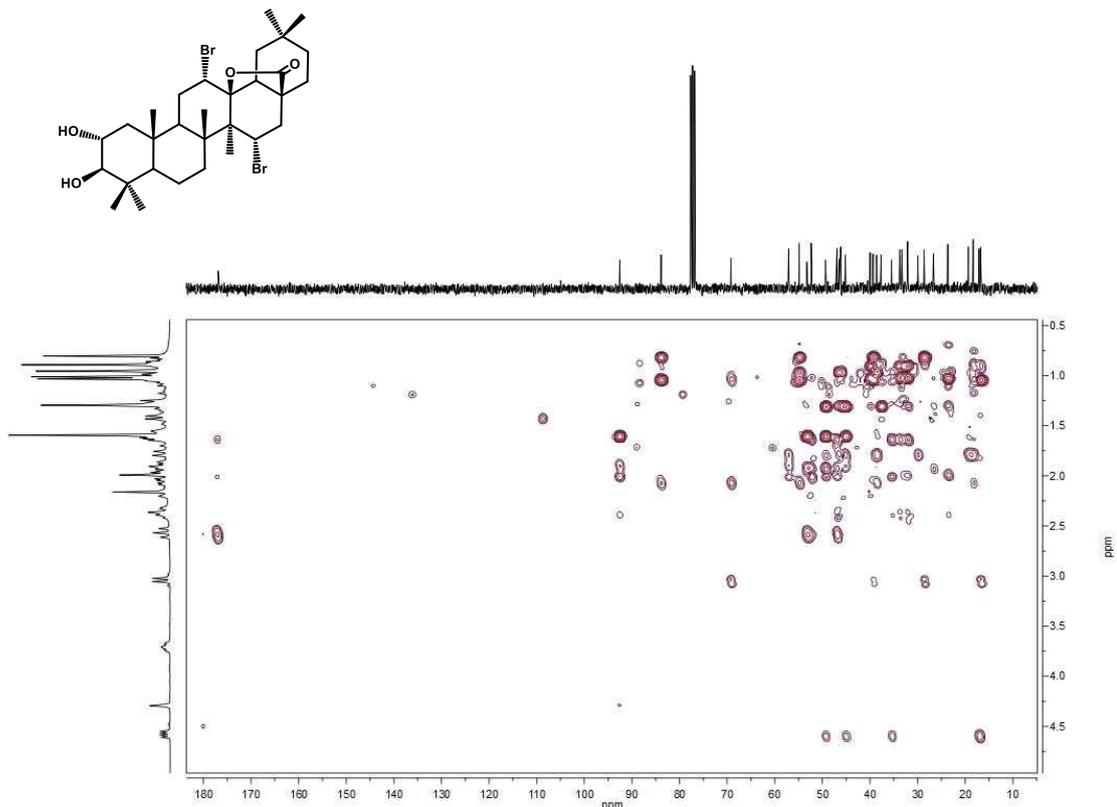
Espectro de ^1H RMN del producto 28



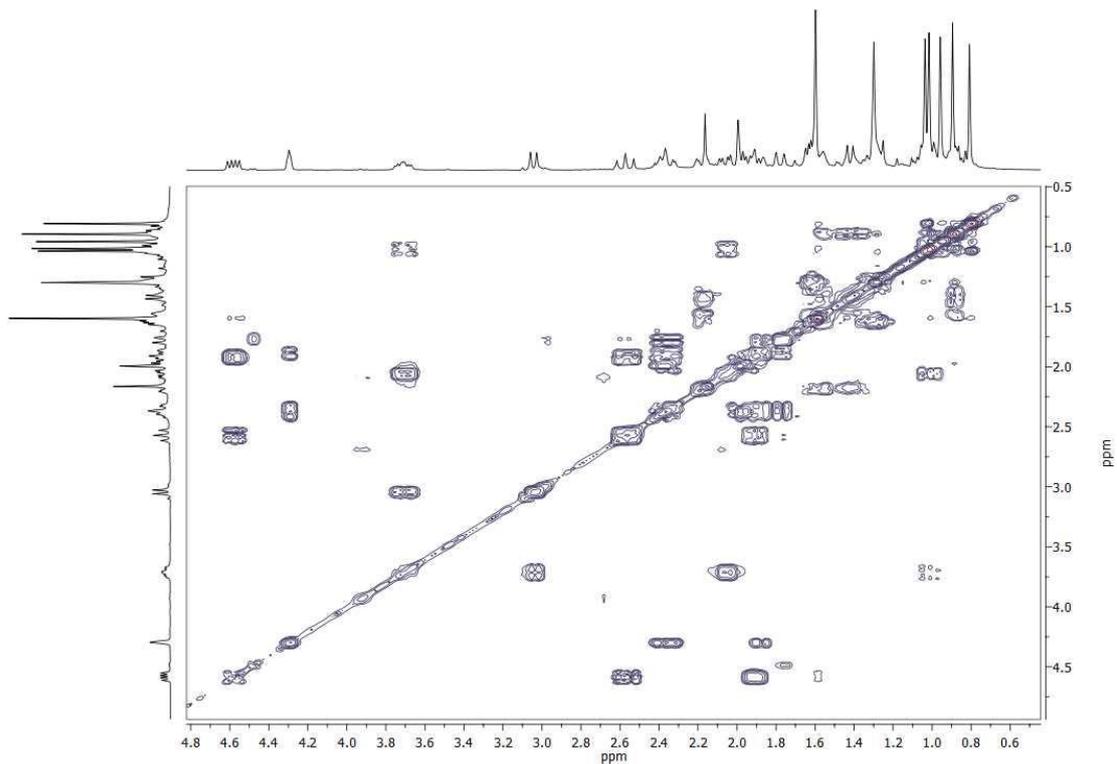
Espectro de ^{13}C RMN del producto 28



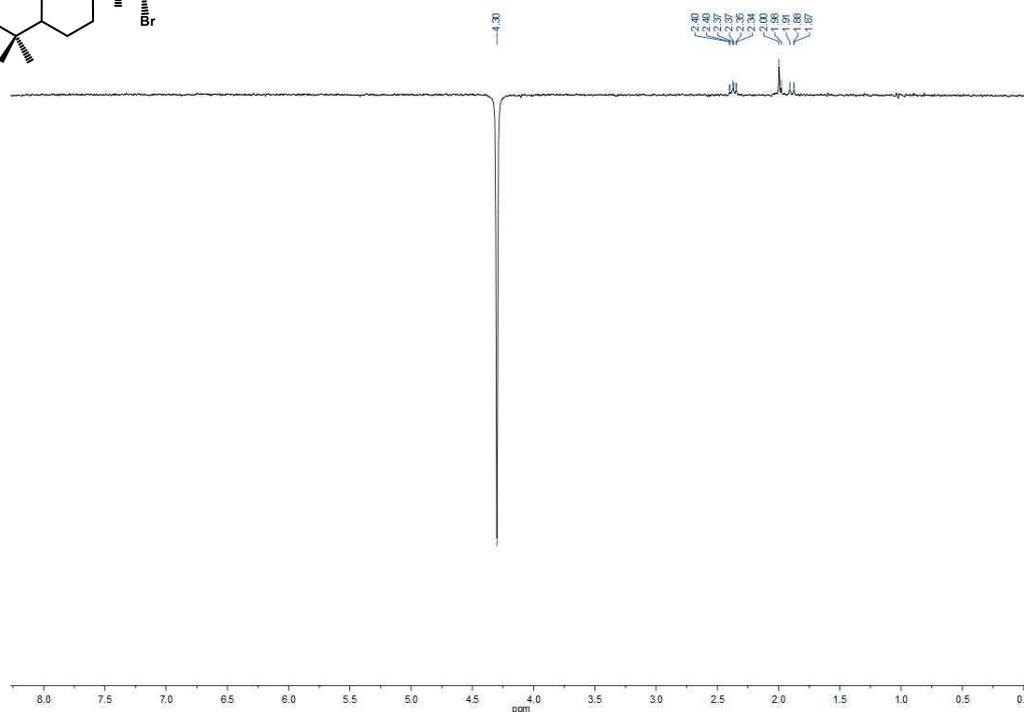
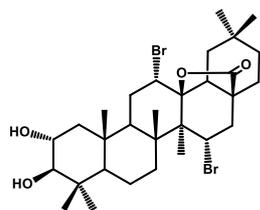
Espectro HMQC del producto 28



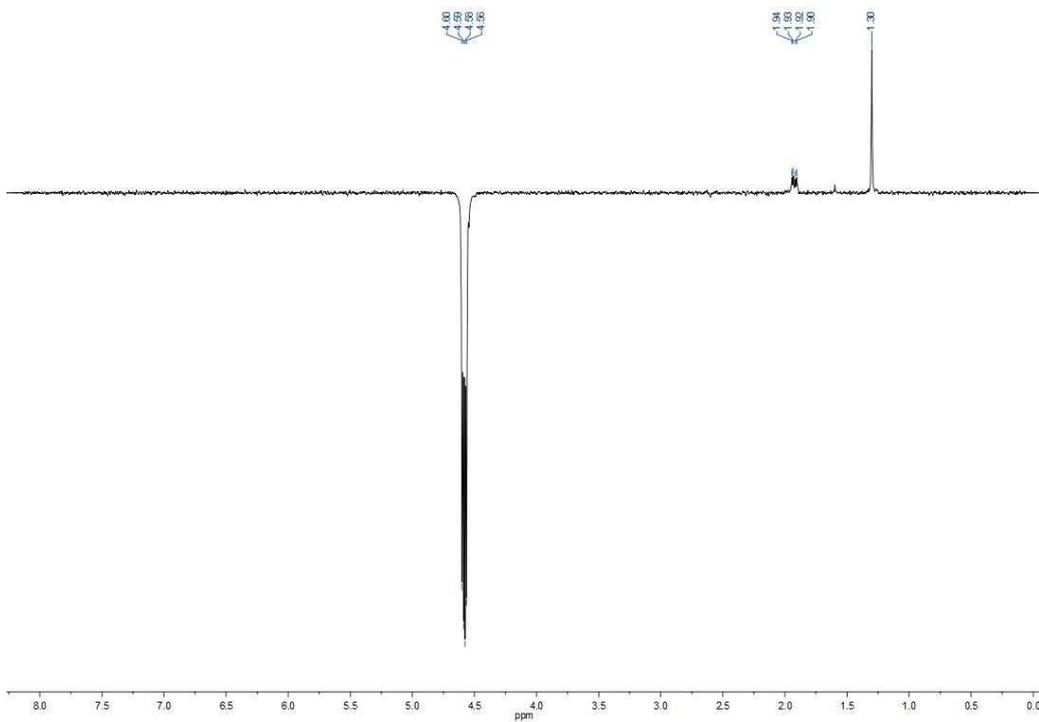
Espectro HMBC del producto 28



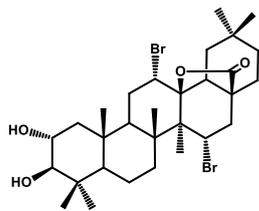
COSY del producto 28

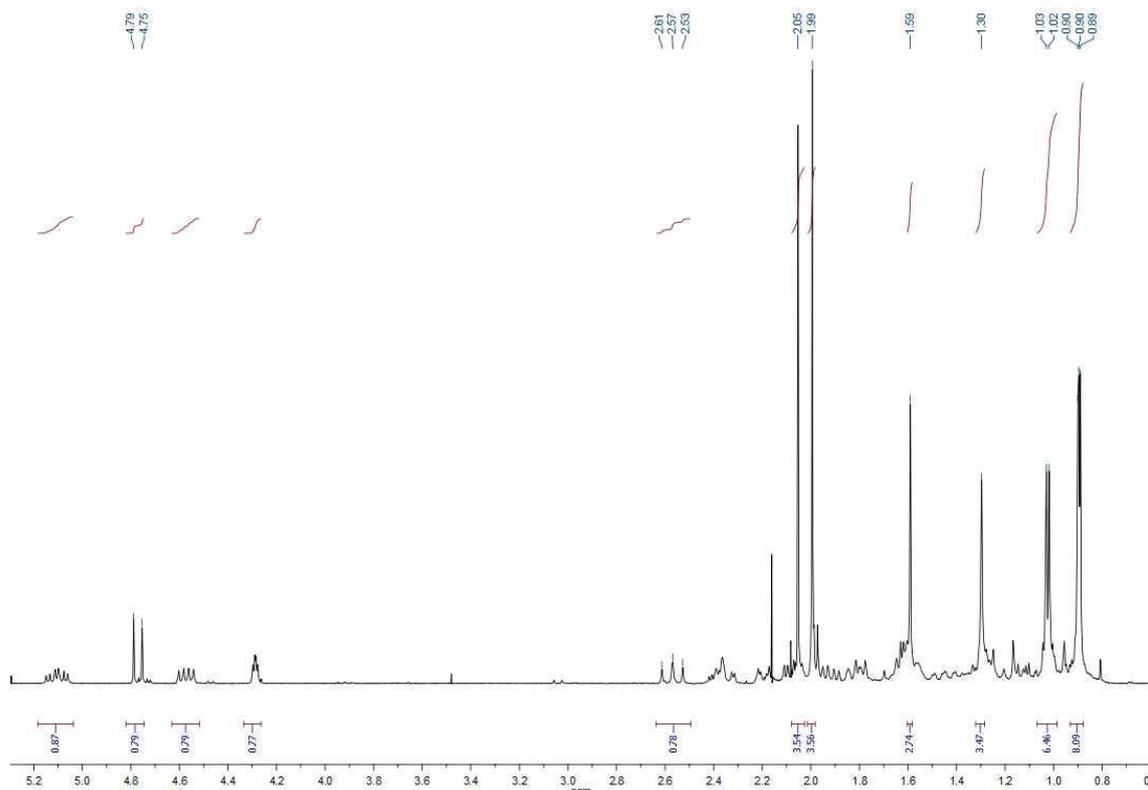


1d-NOESY del producto 28 a 4.30 ppm

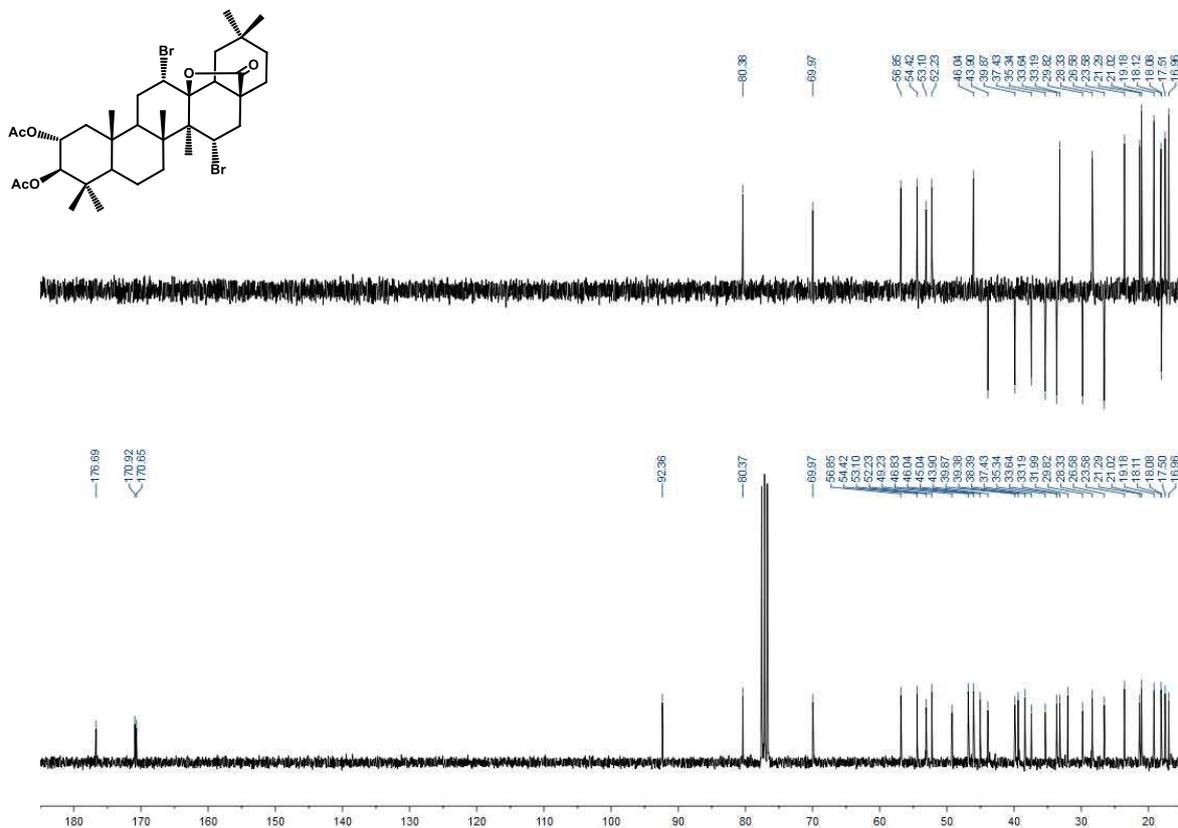


1d-NOESY del producto 28 a 4.58 ppm

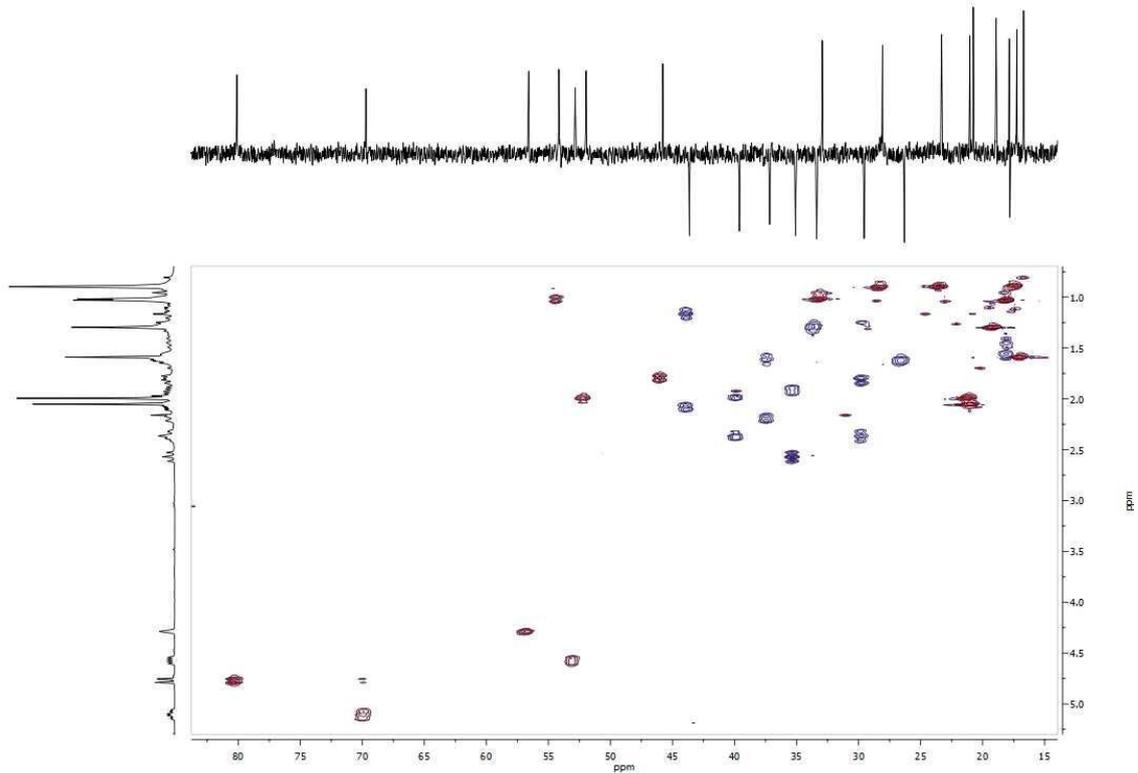




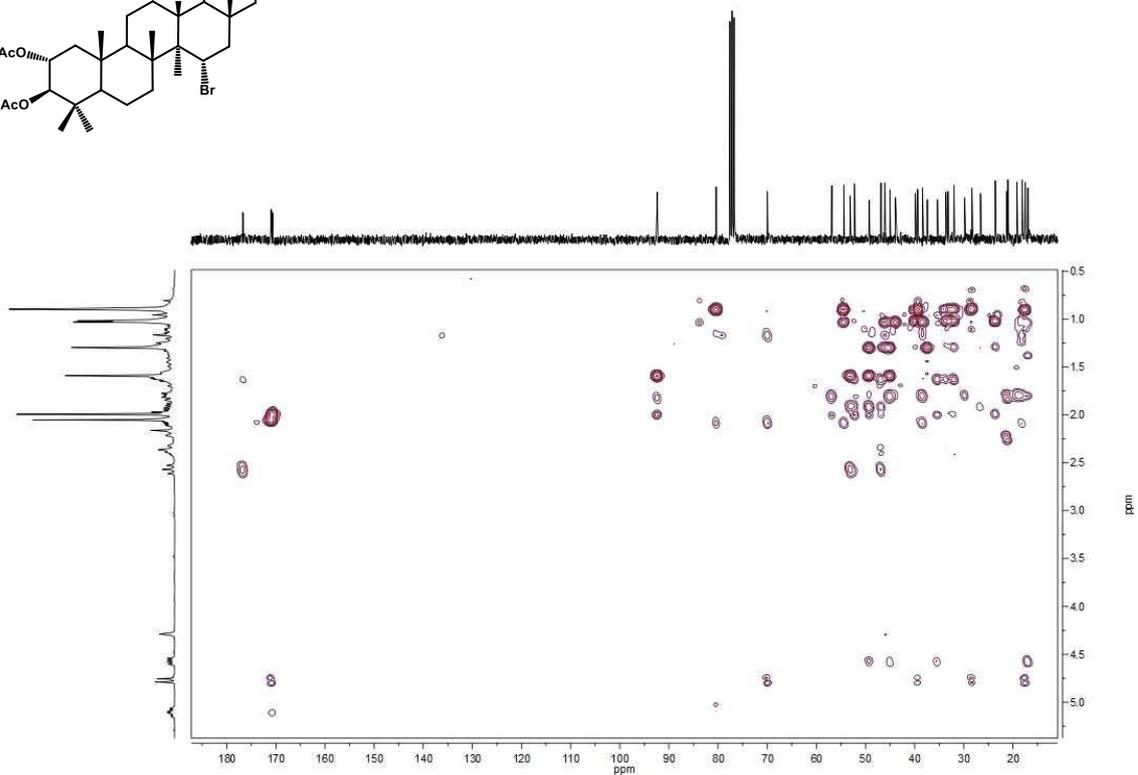
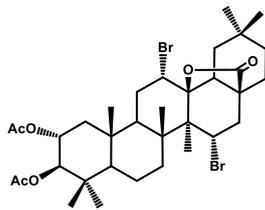
Espectro de ^1H RMN del producto 29



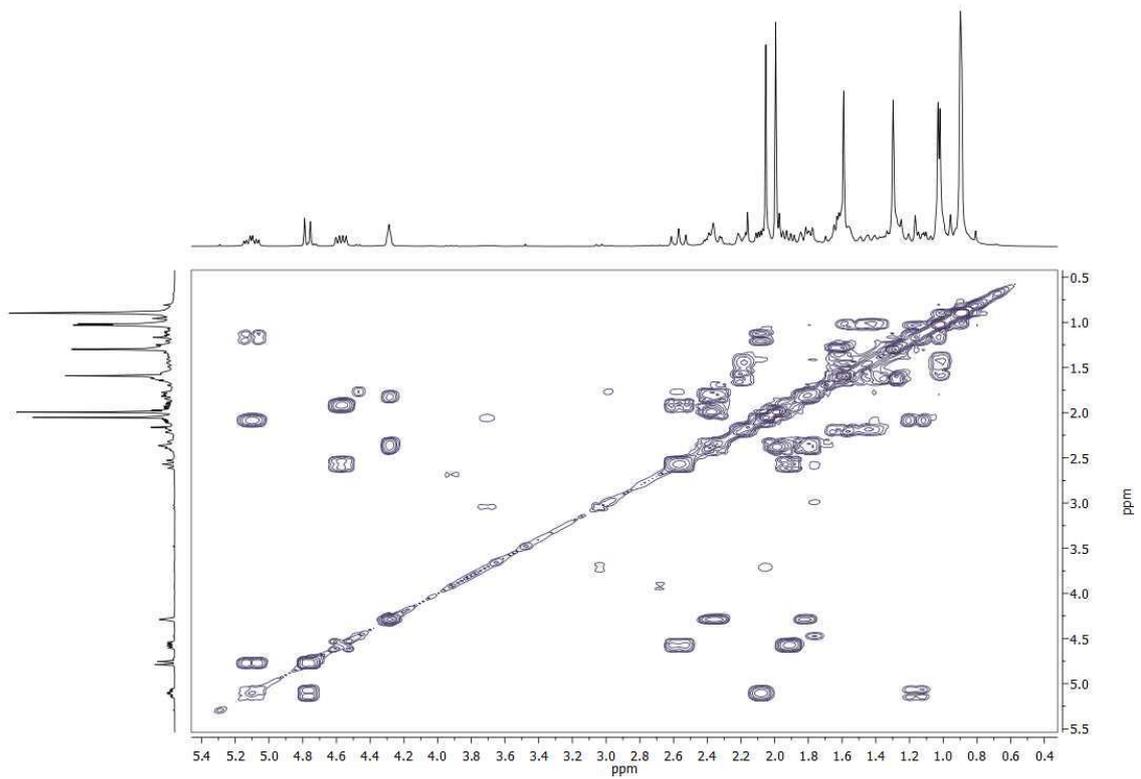
Espectro de ^{13}C RMN del producto 29



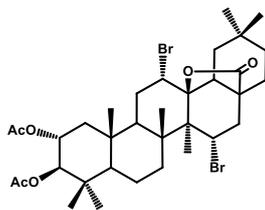
Espectro HSQC del producto 29

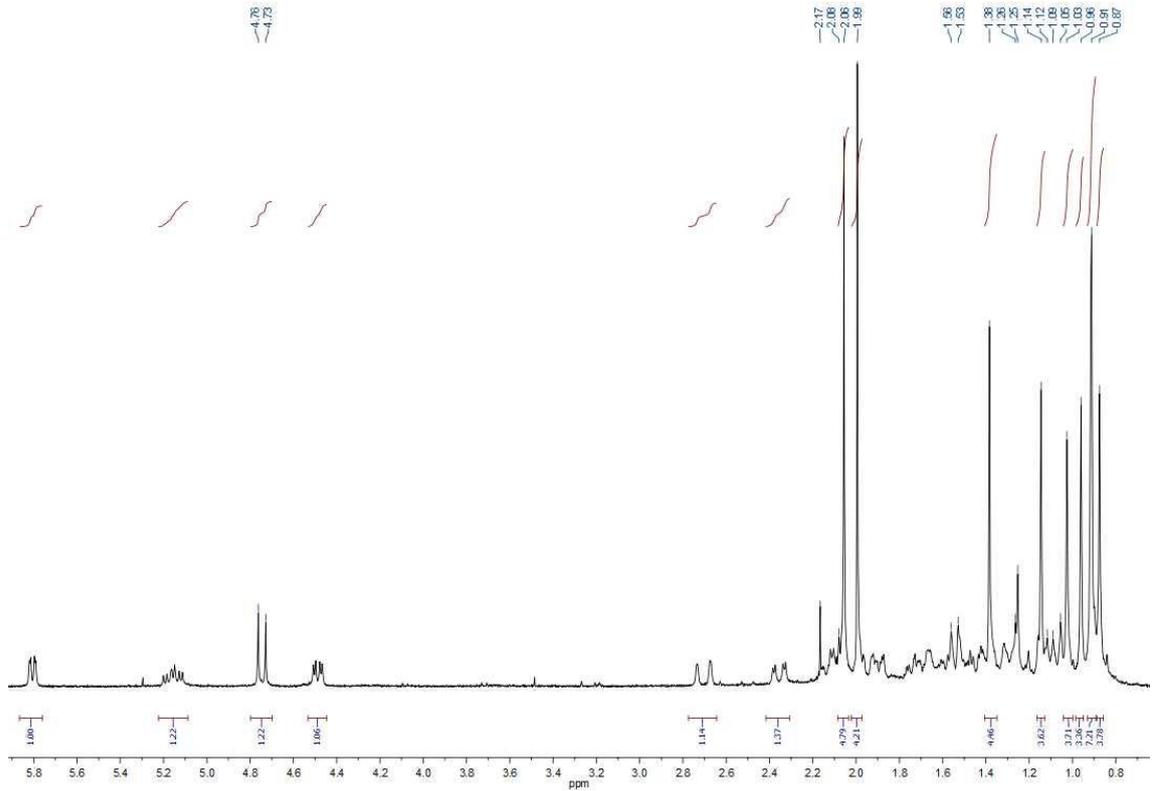


Espectro HMBC del producto 29

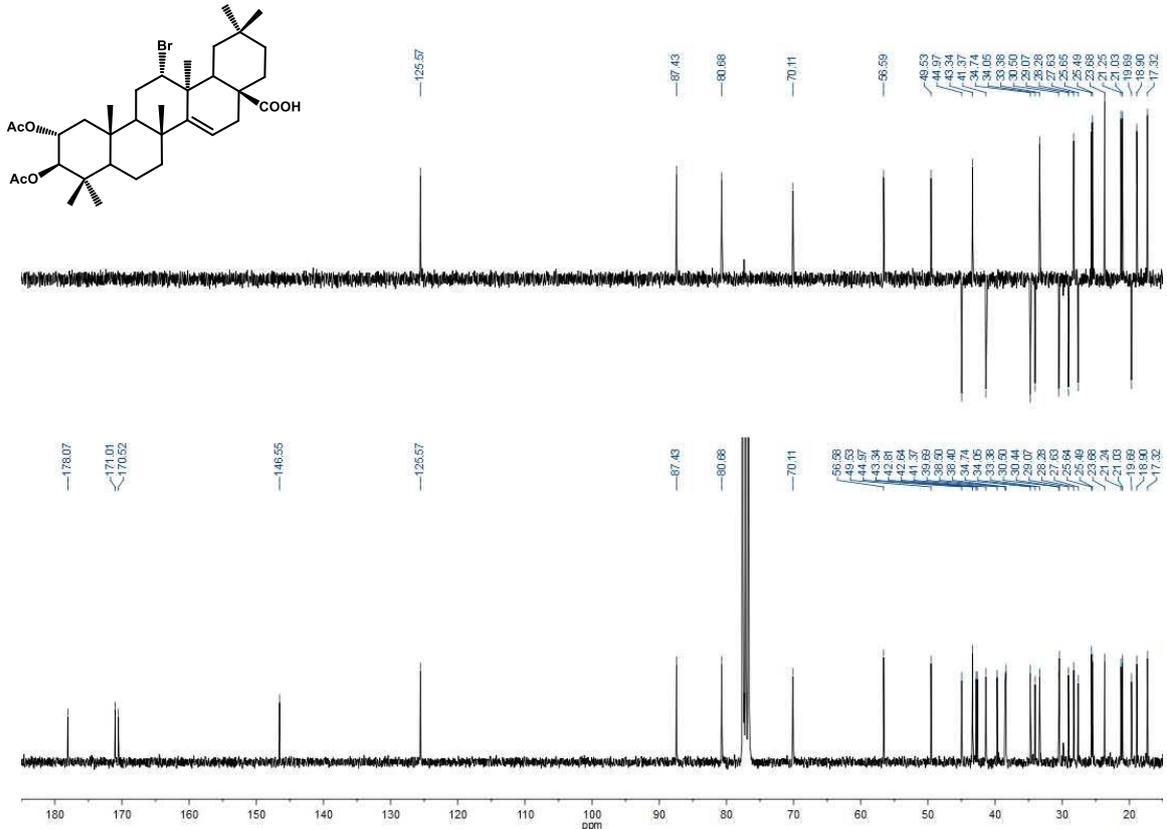


COSY del producto 29

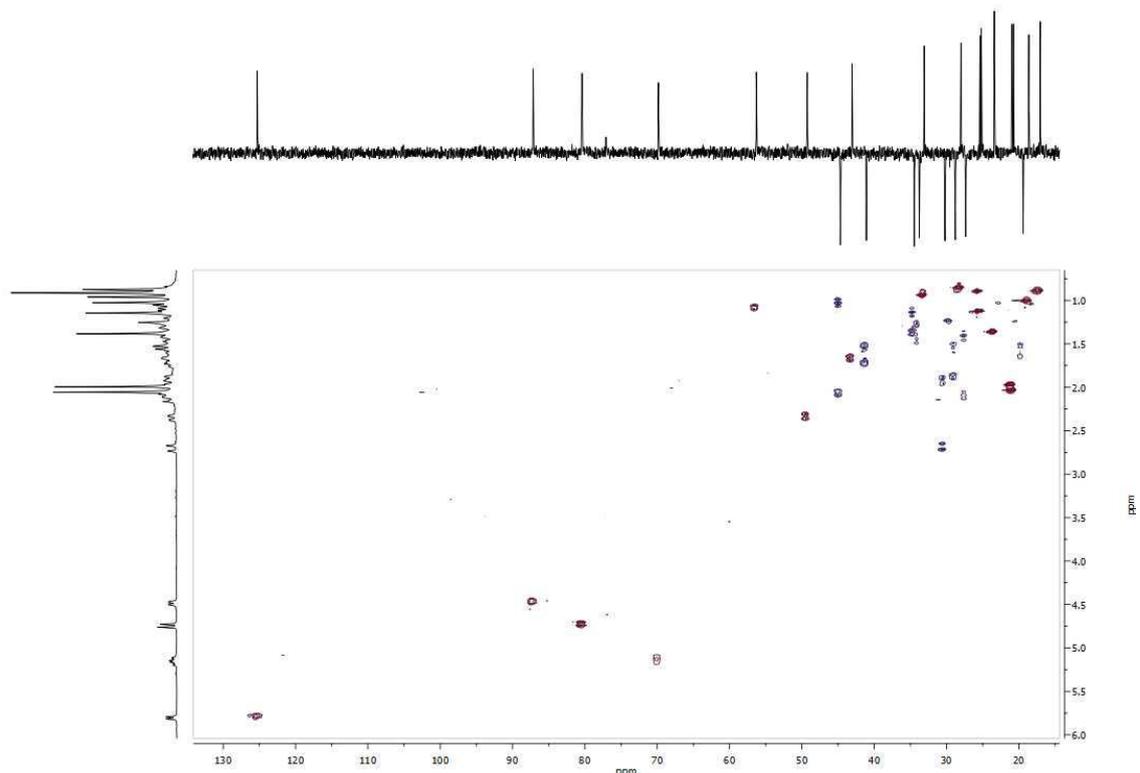




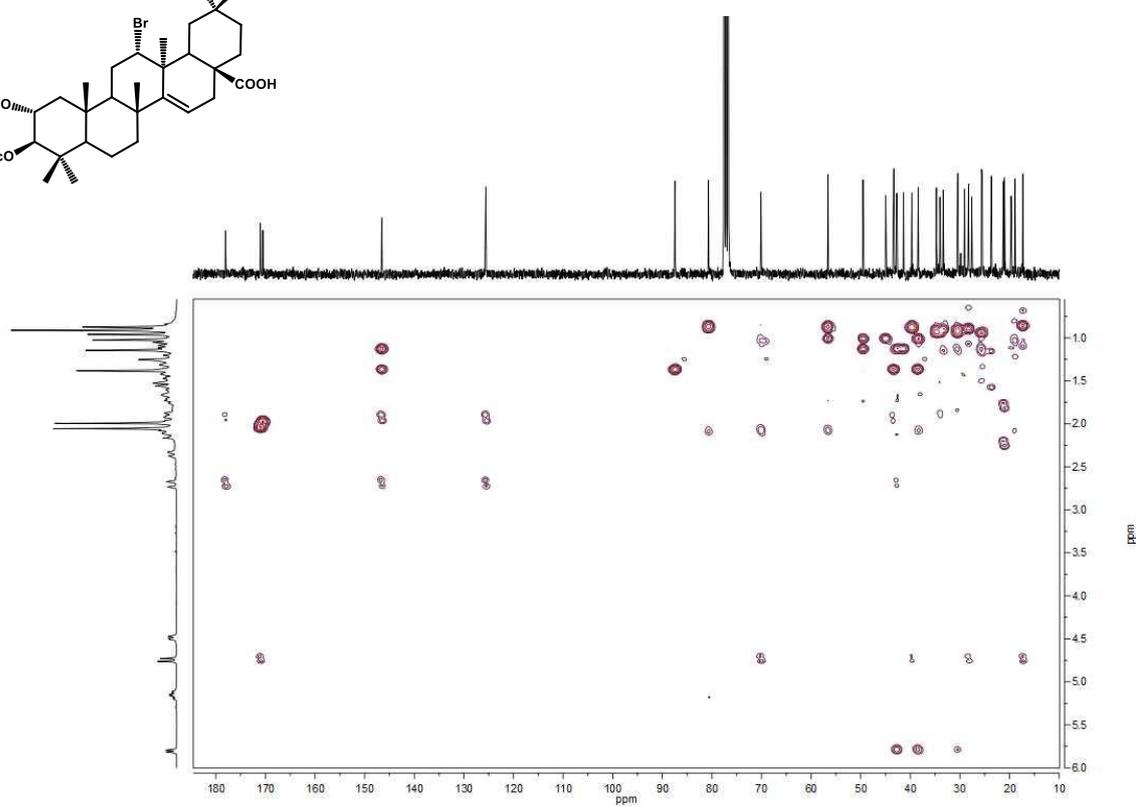
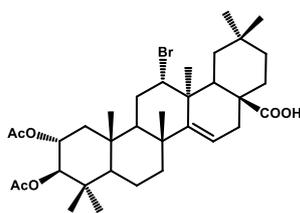
Espectro de ¹H RMN del producto 30



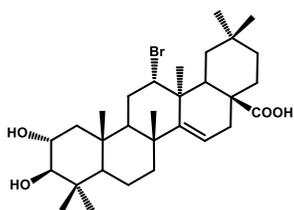
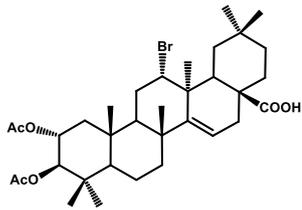
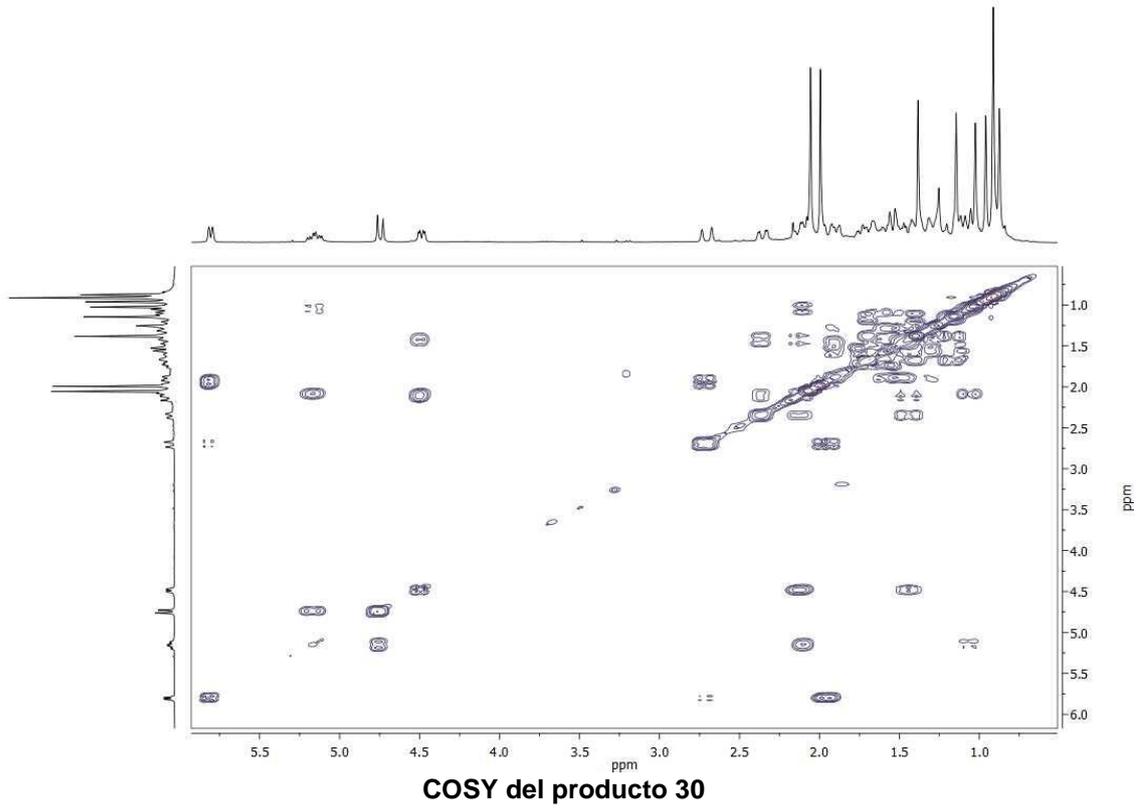
Espectro de ¹³C RMN del producto 30



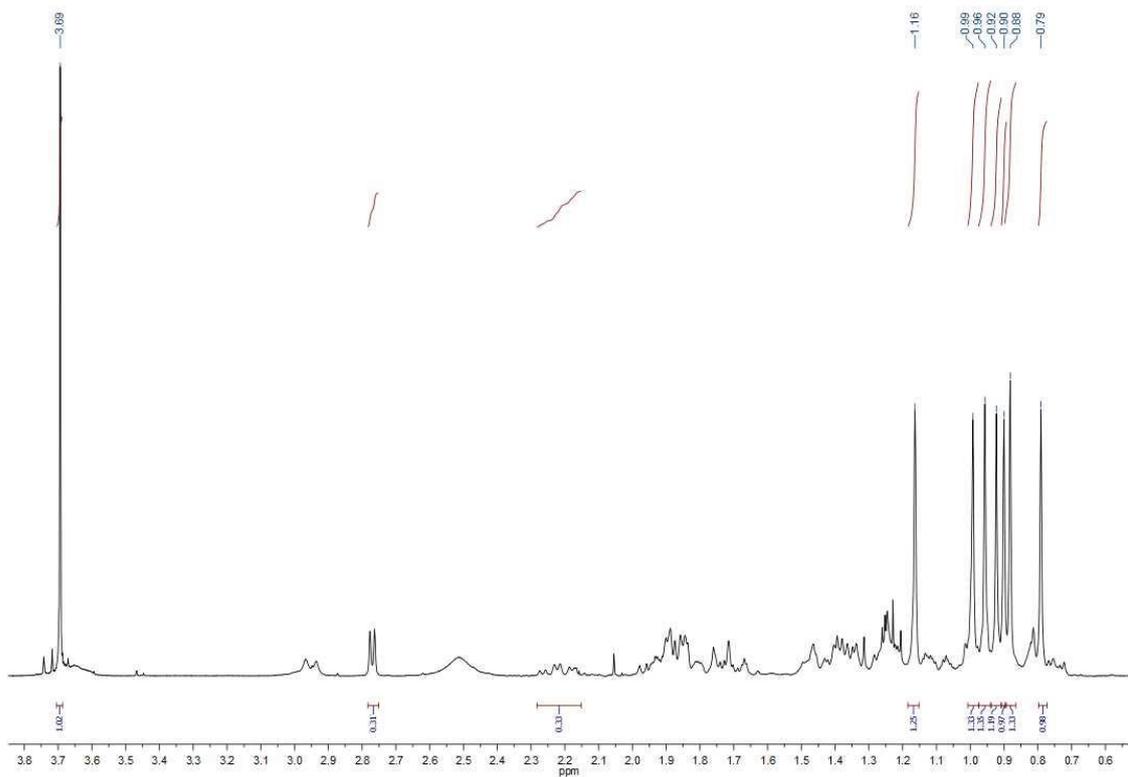
Espectro HSQC del producto 30



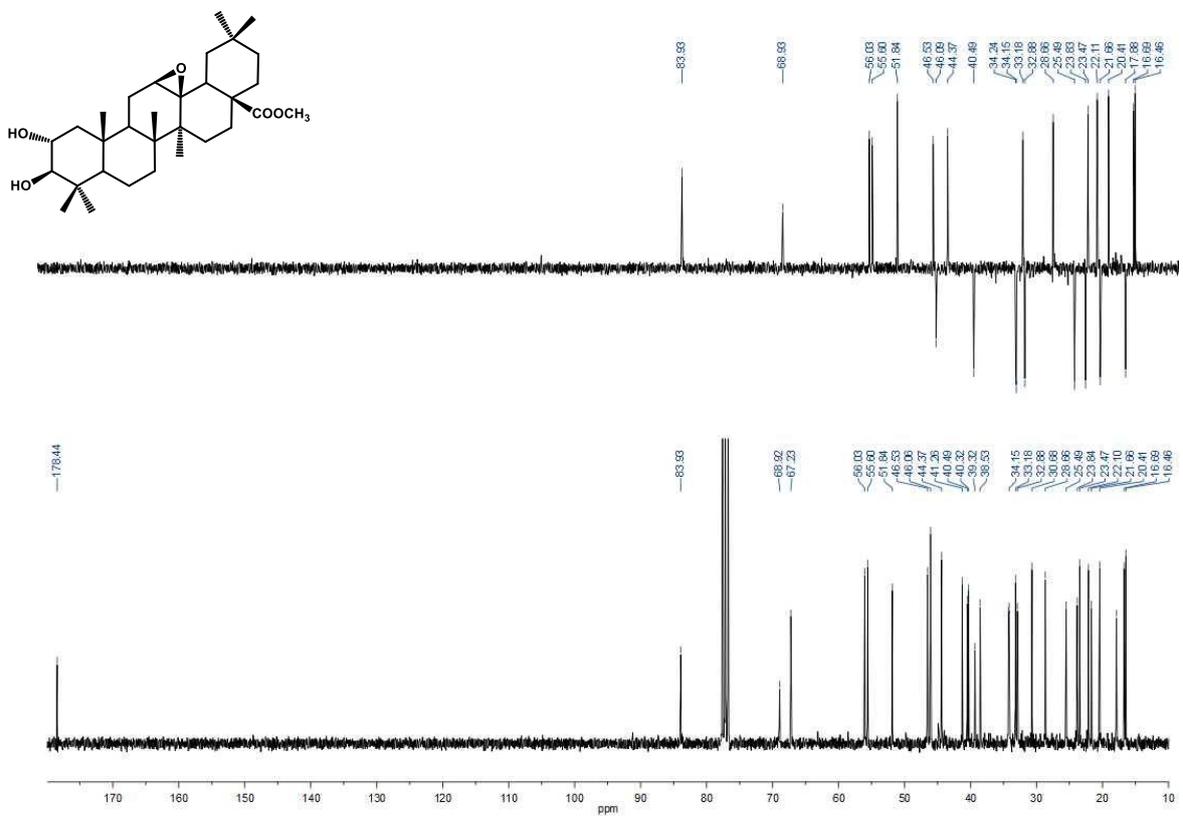
Espectro HMBC del producto 30



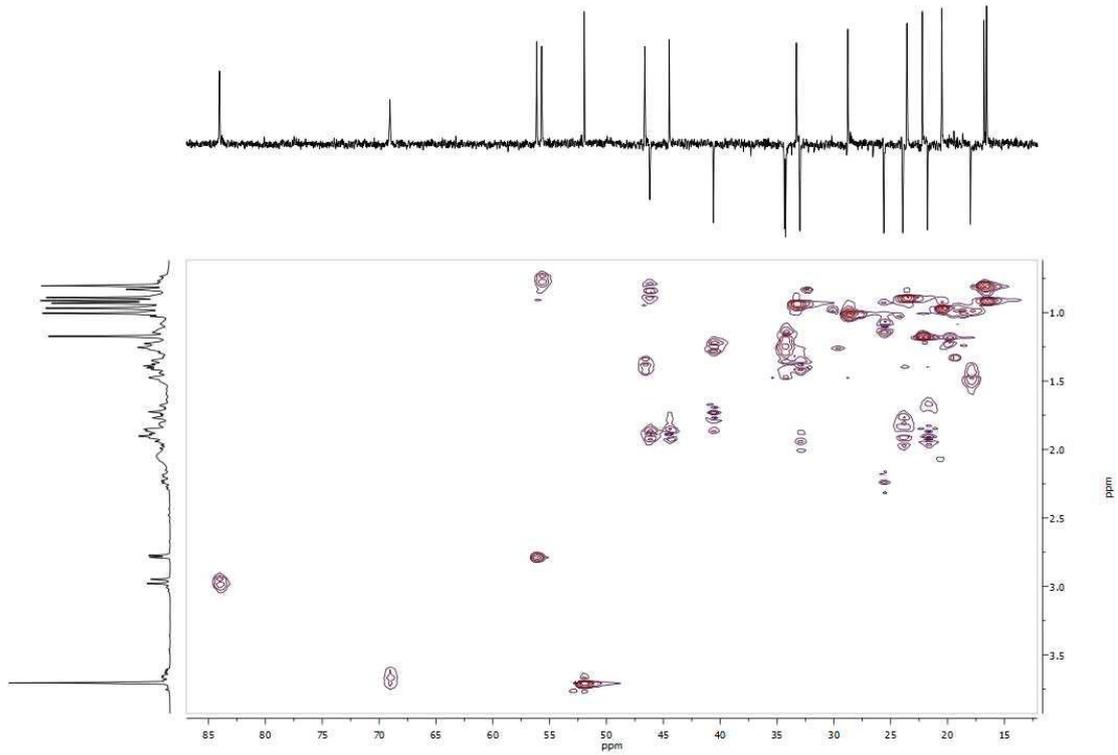
Espectro de 1H RMN del producto 31



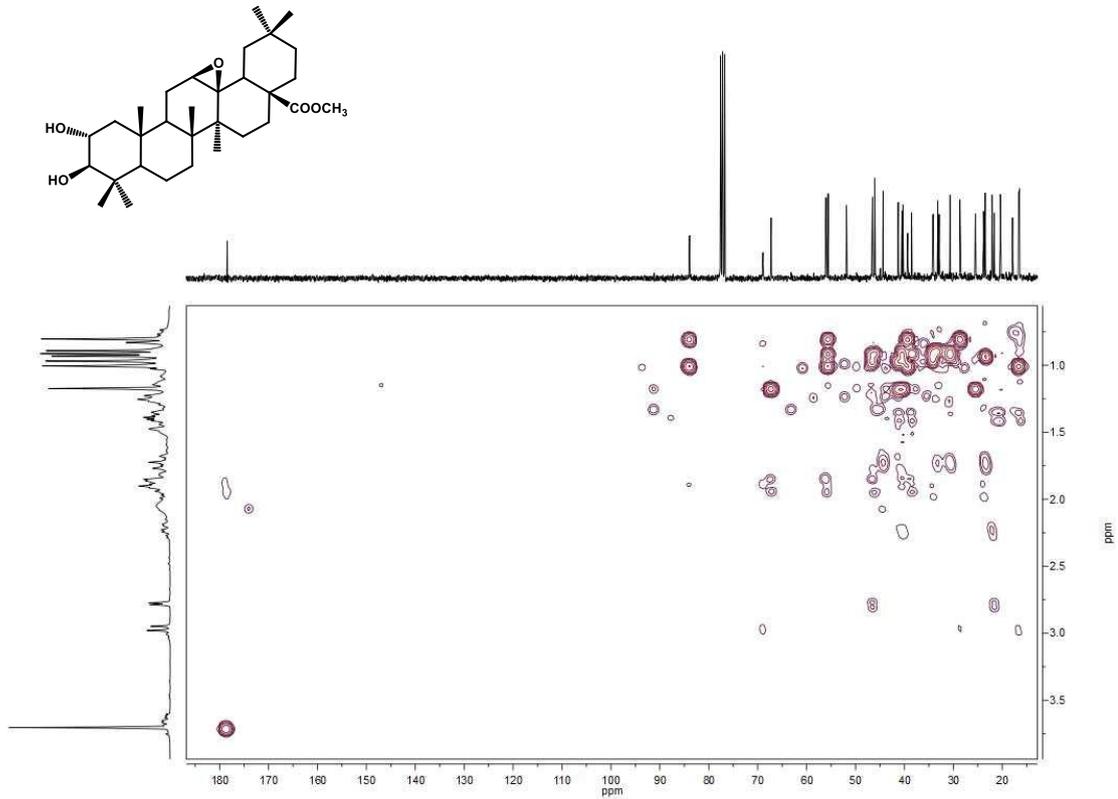
Espectro de ^1H RMN del producto 32



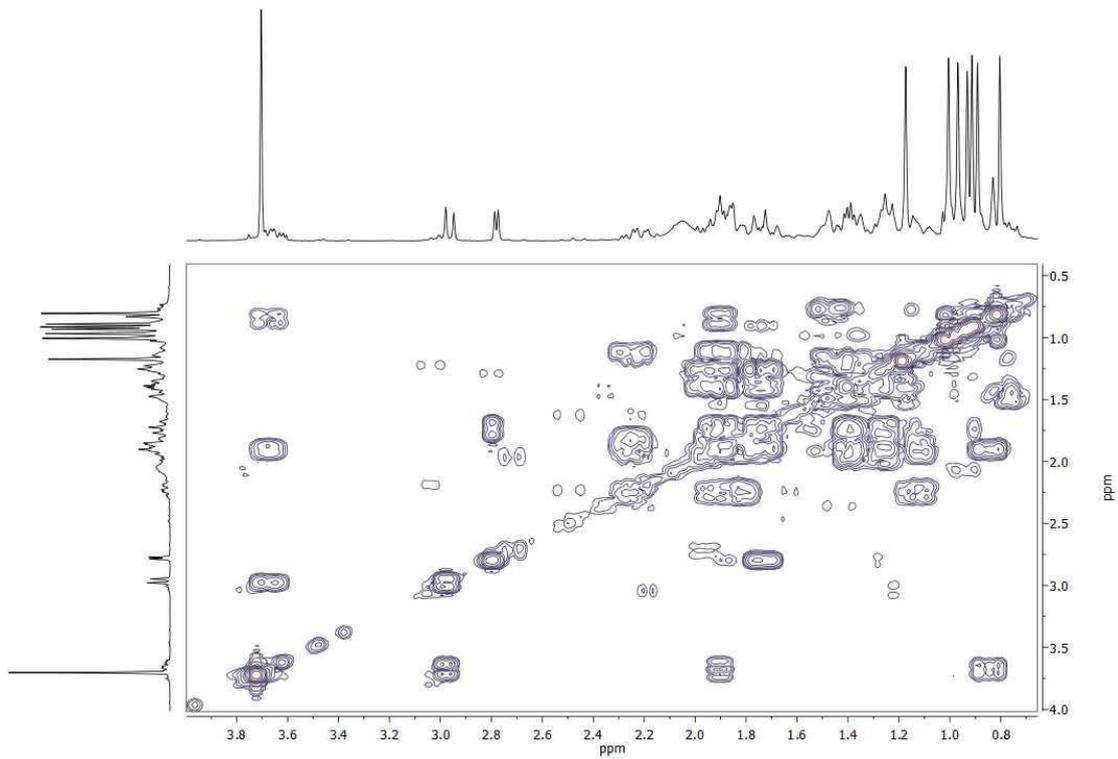
Espectro de ^{13}C RMN del producto 32



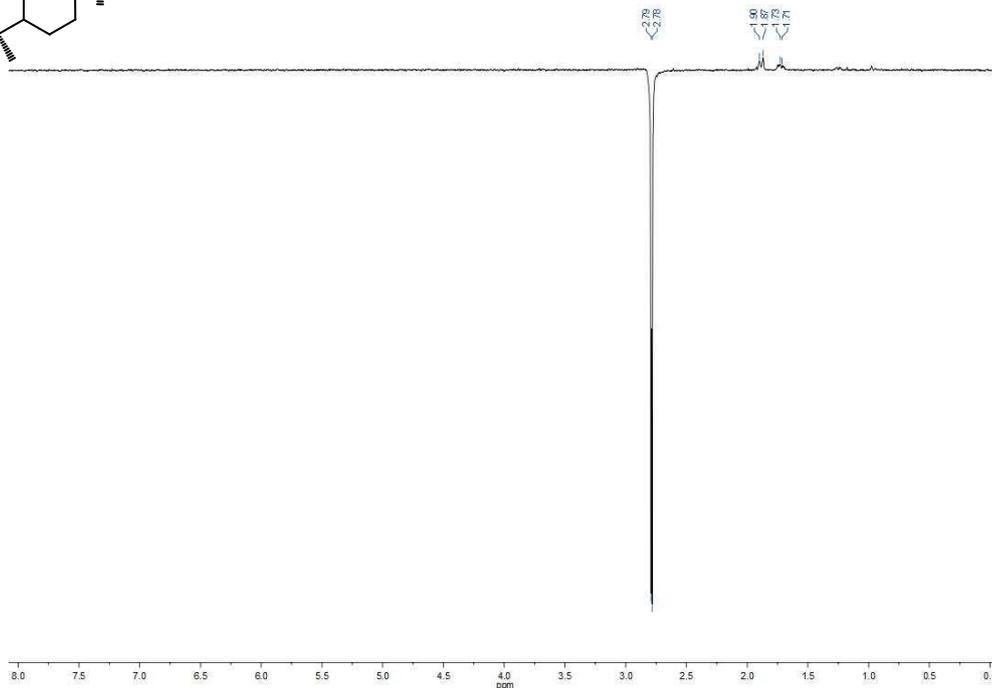
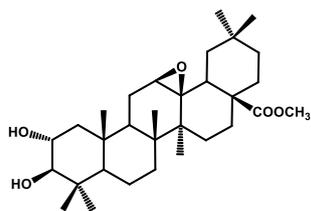
Espectro HMBC del producto 32



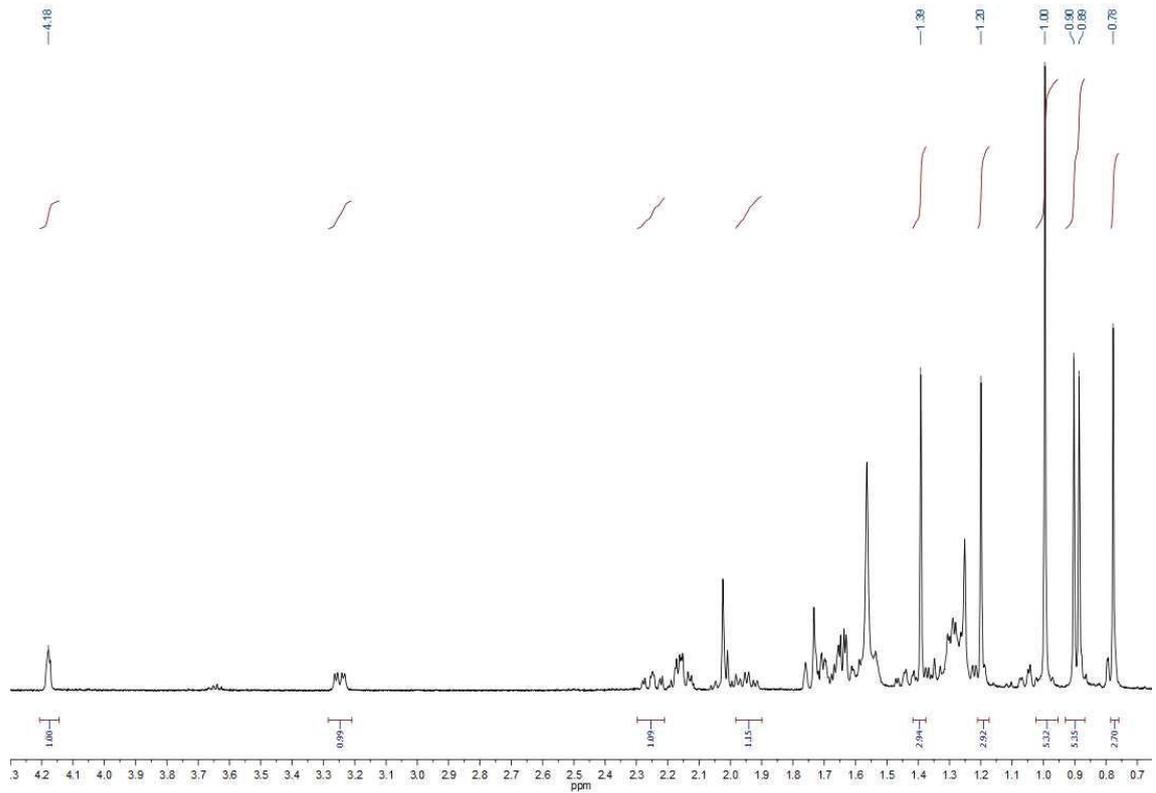
Espectro HMBC del producto 32



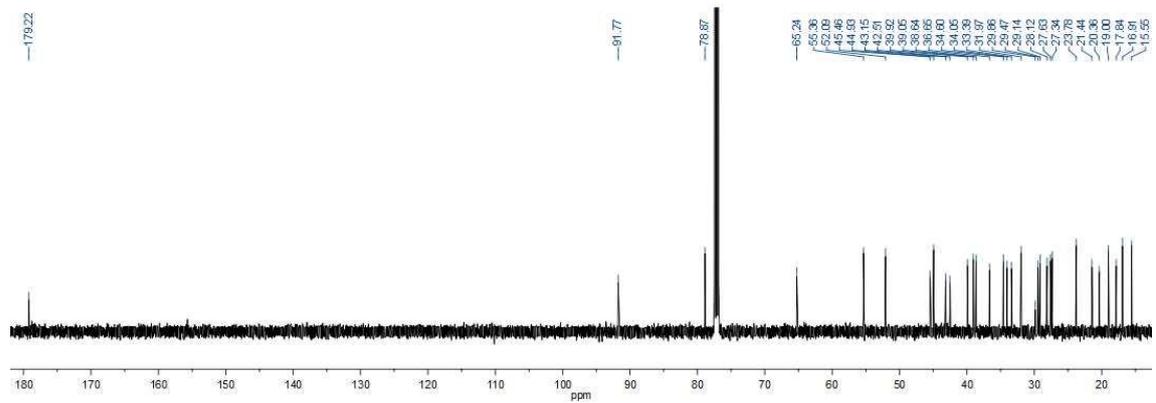
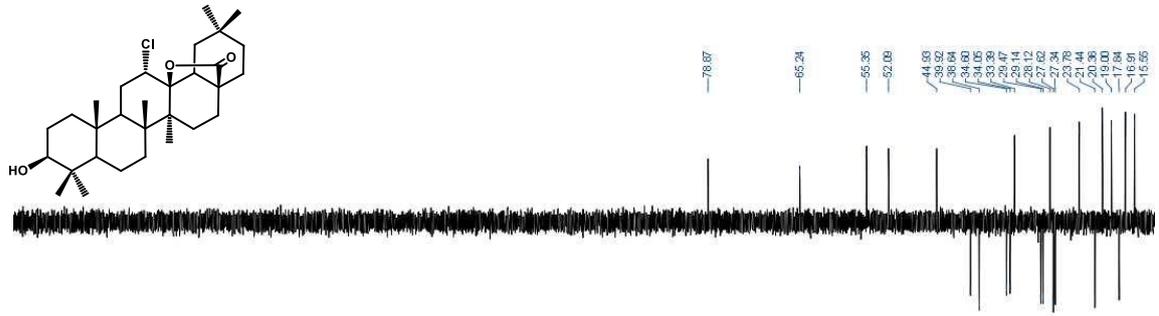
COSY del producto 32



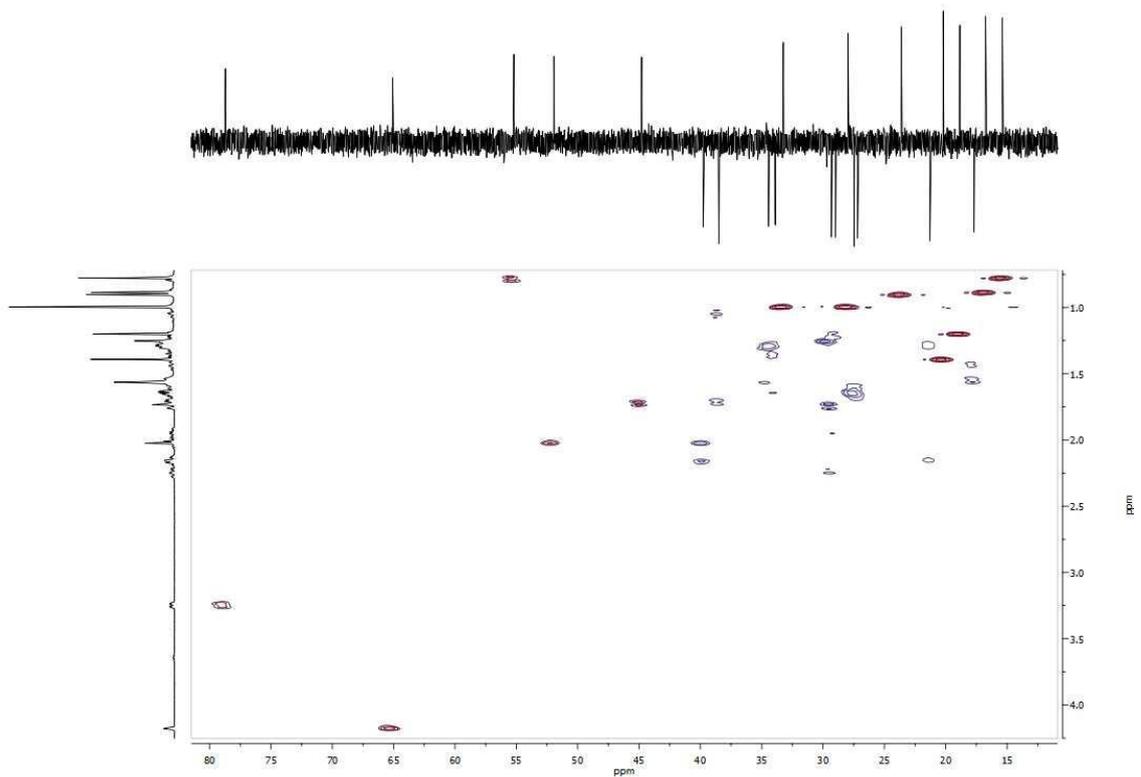
1d-NOESY del producto 32 a 2.79 ppm



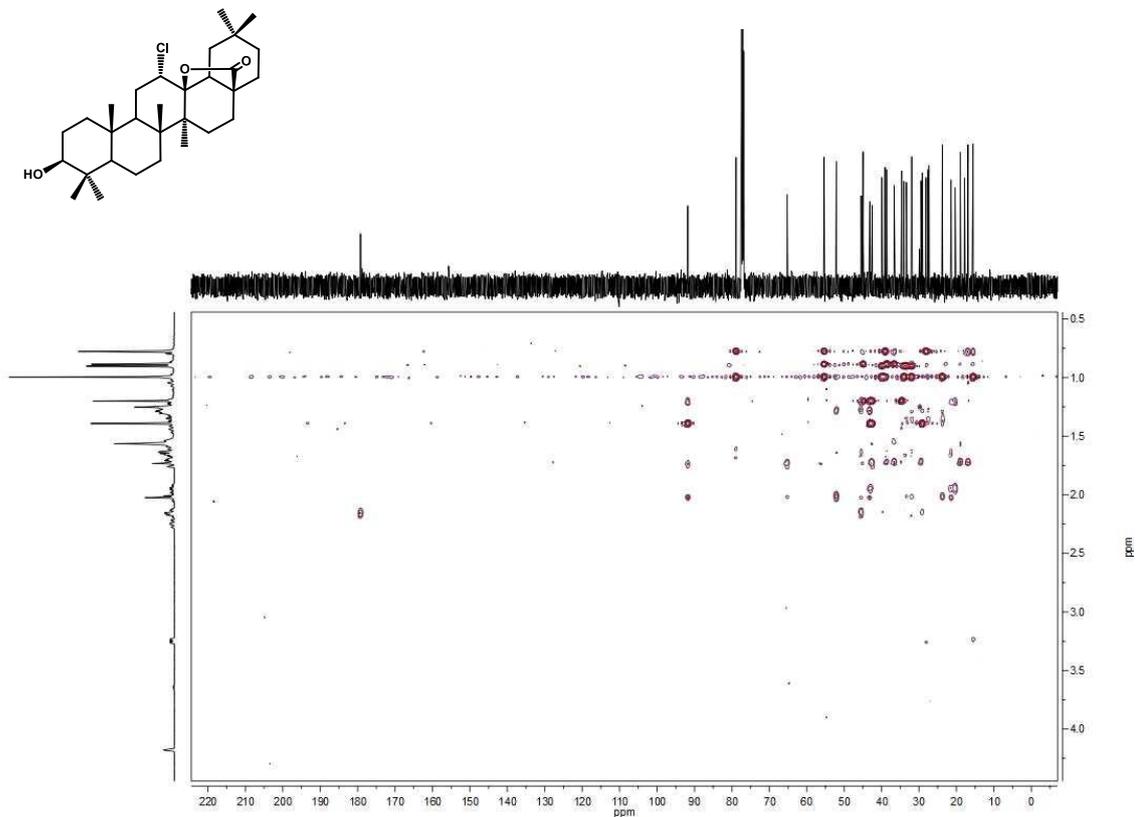
Espectro de ^1H RMN del producto 33



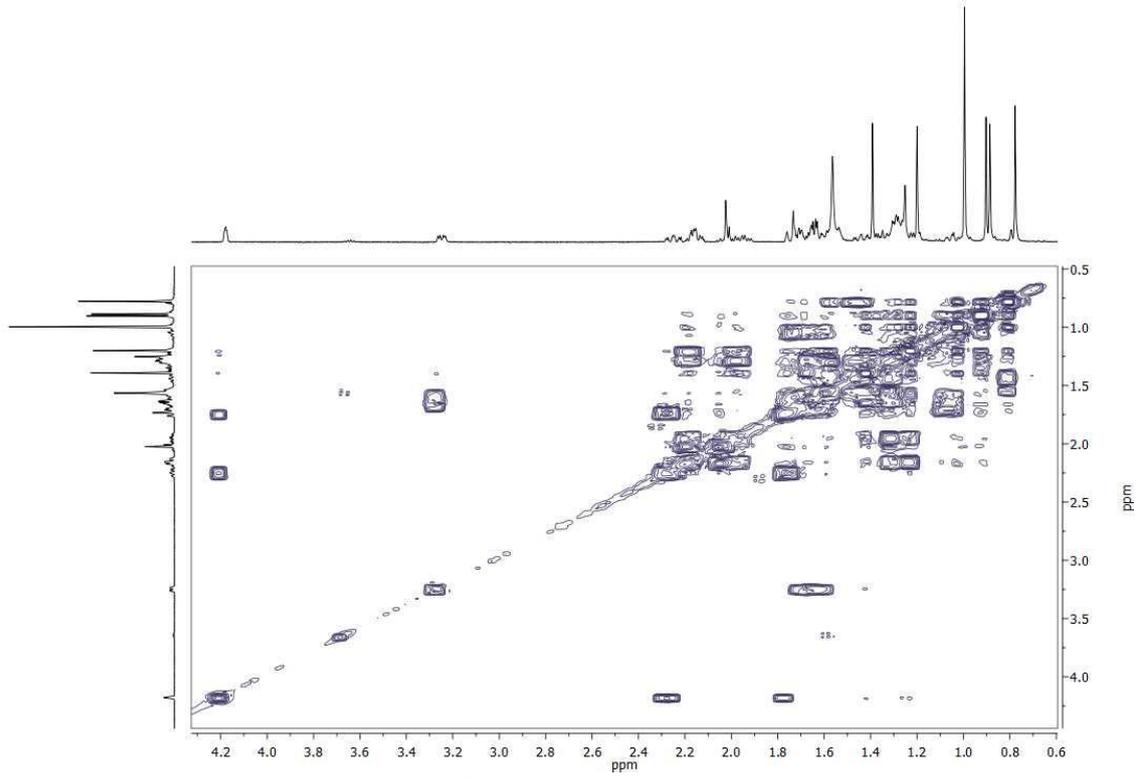
Espectro de ^{13}C RMN del producto 33



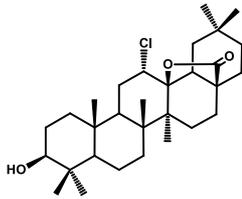
Espectro HSQC del producto 33

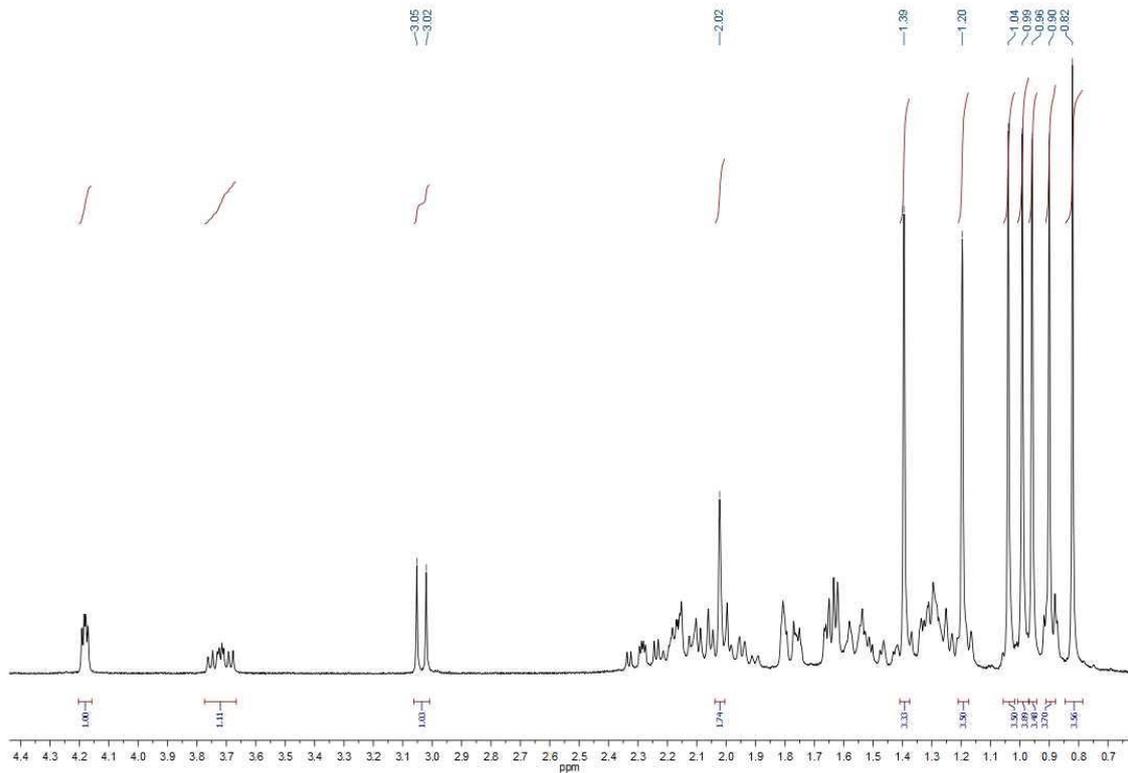


Espectro HMBC del producto 33

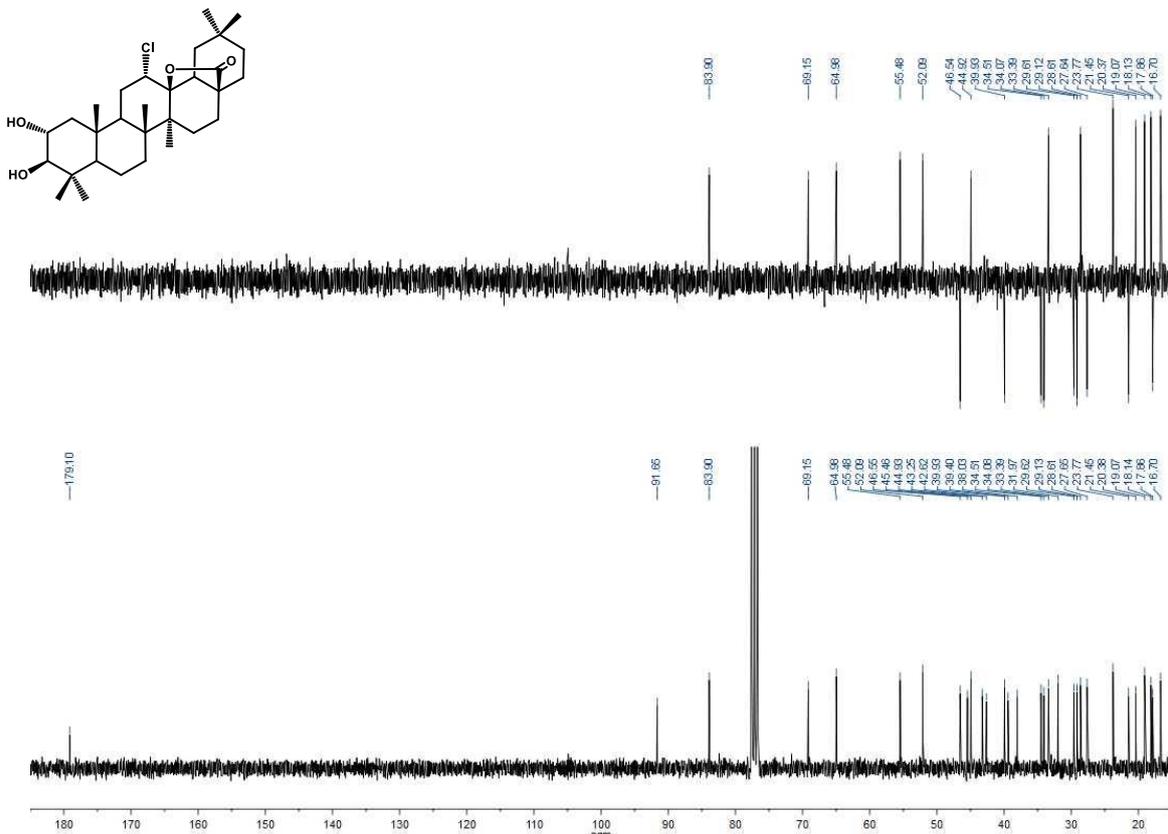


COSY del producto 33

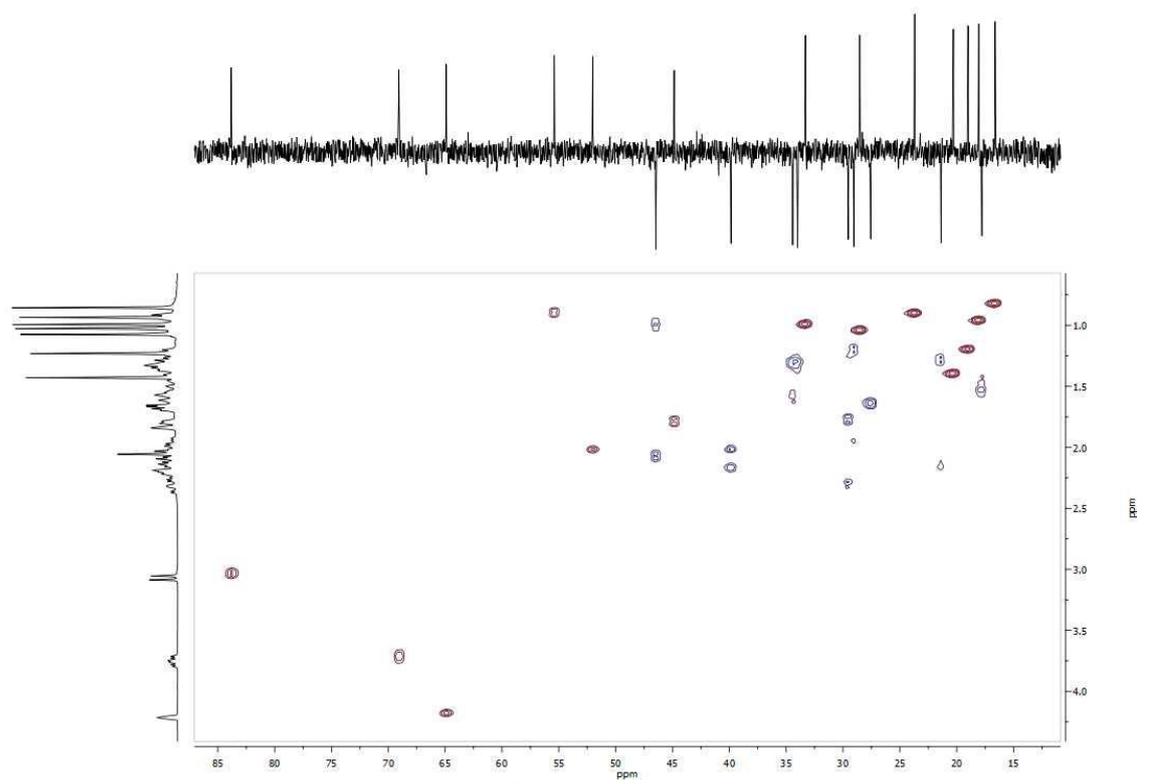




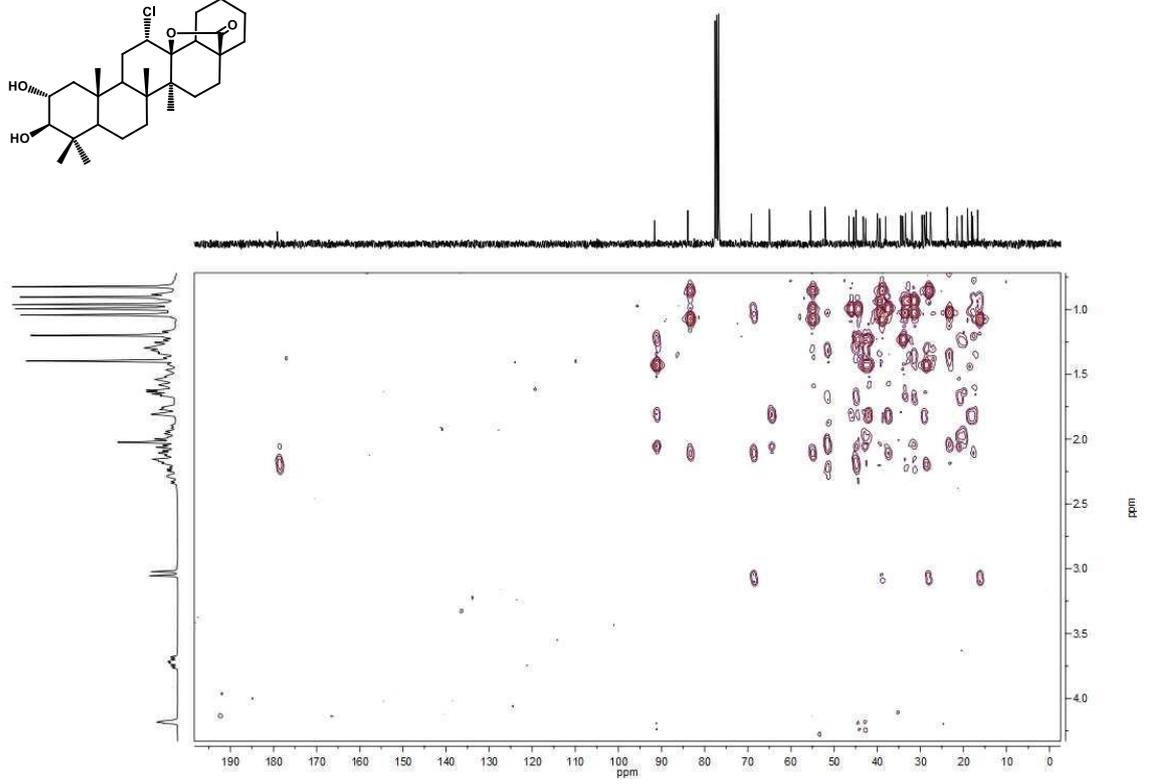
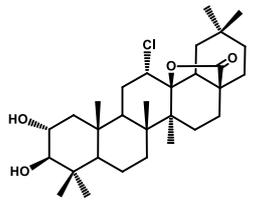
Espectro de ^1H RMN del producto 34



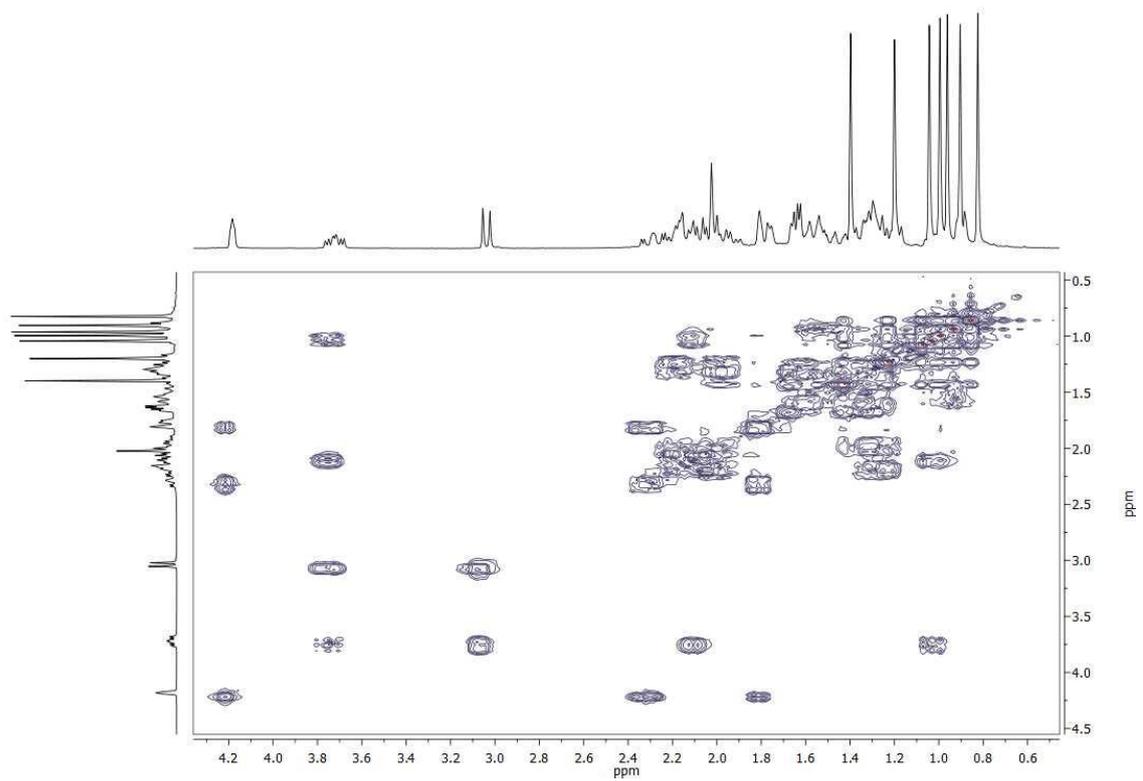
Espectro de ^{13}C RMN del producto 34



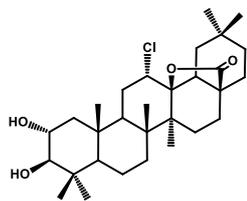
Espectro HSQC del producto 34

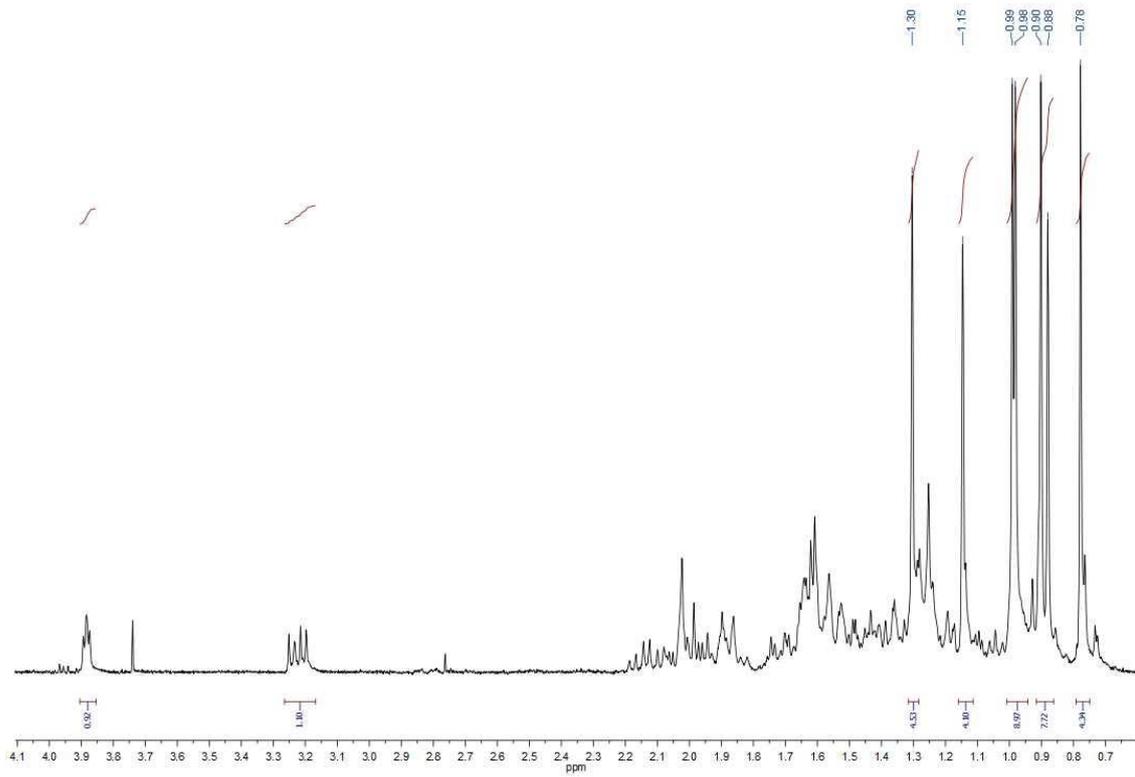


Espectro HMBC del producto 34

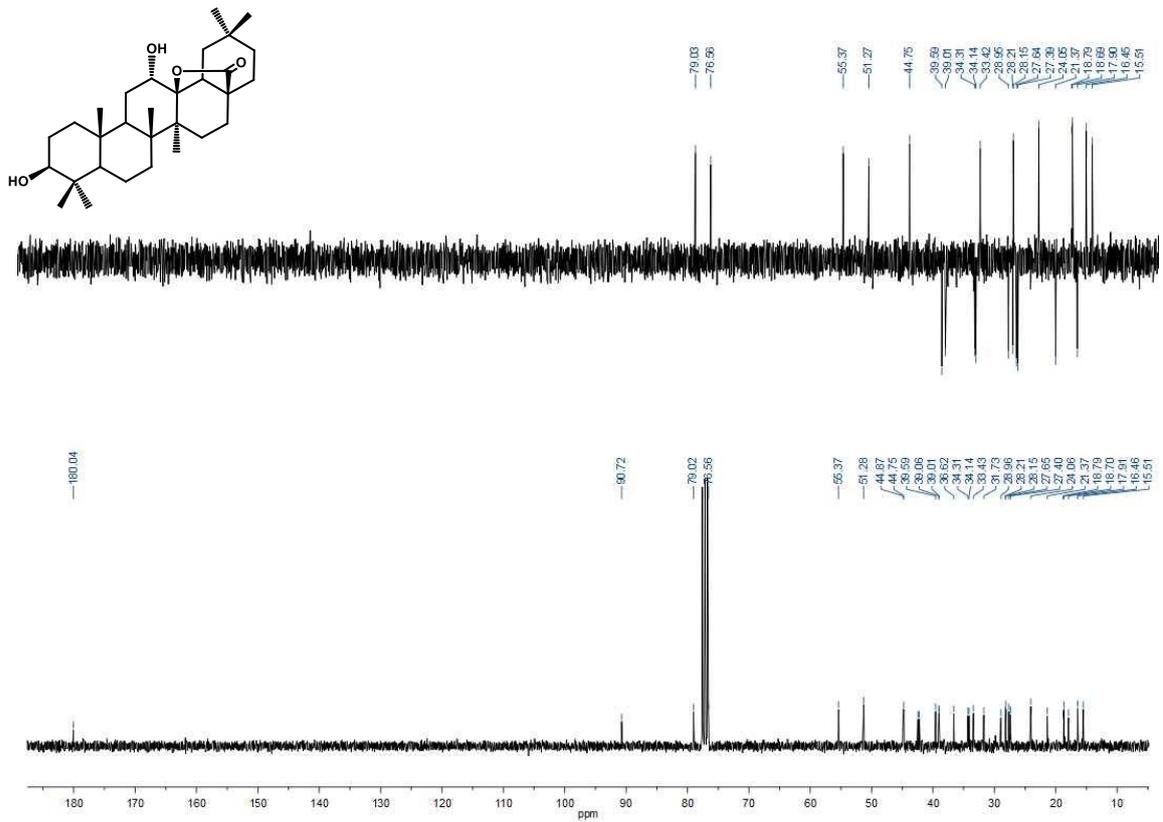


COSY del producto 34

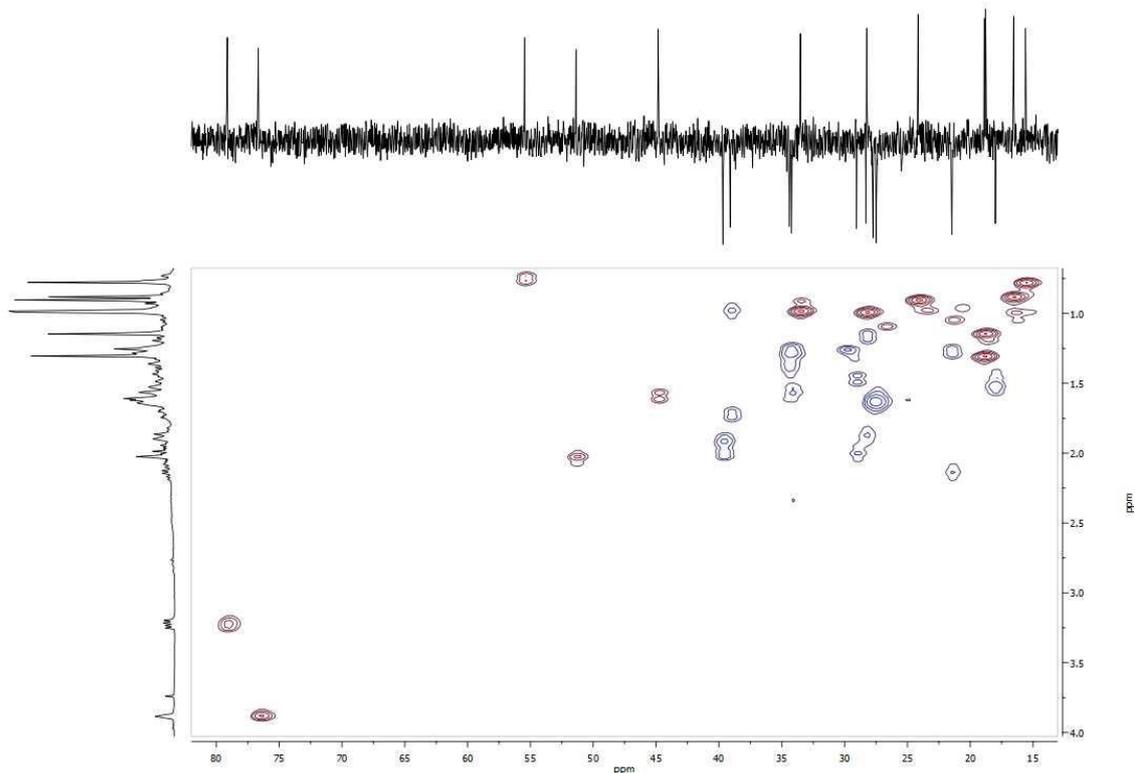




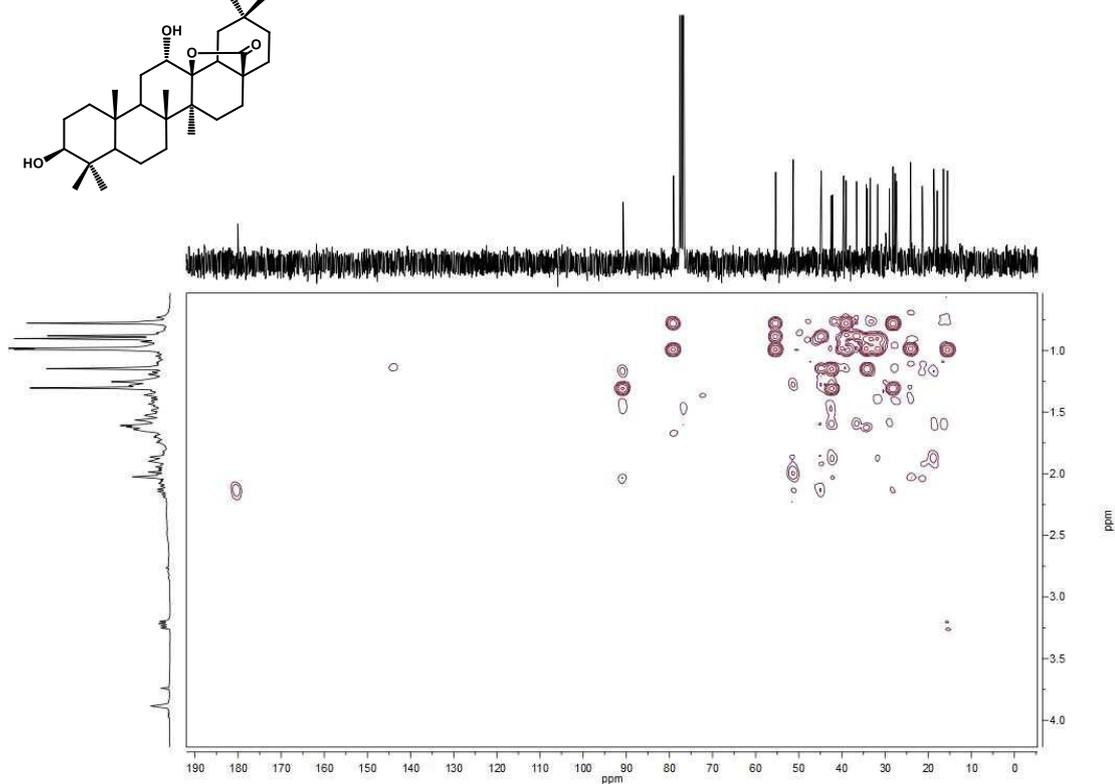
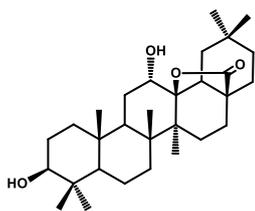
Espectro de ¹H RMN del producto 35



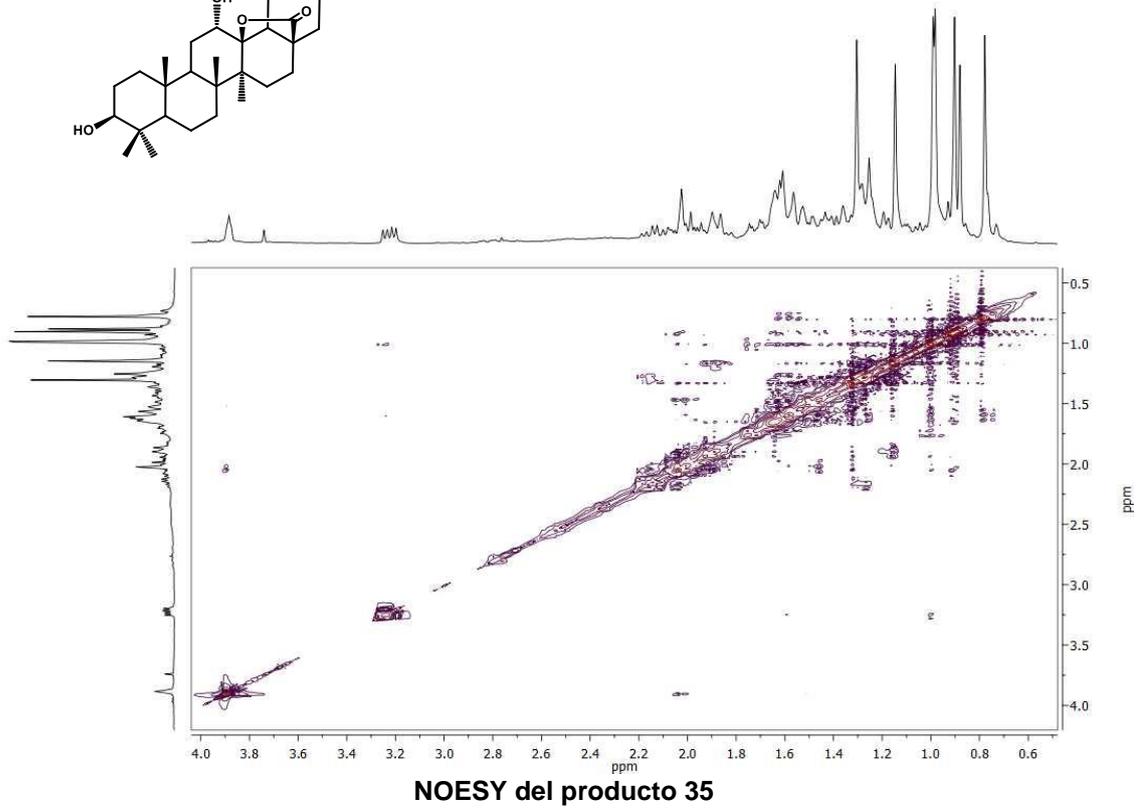
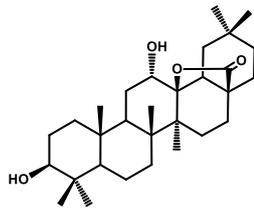
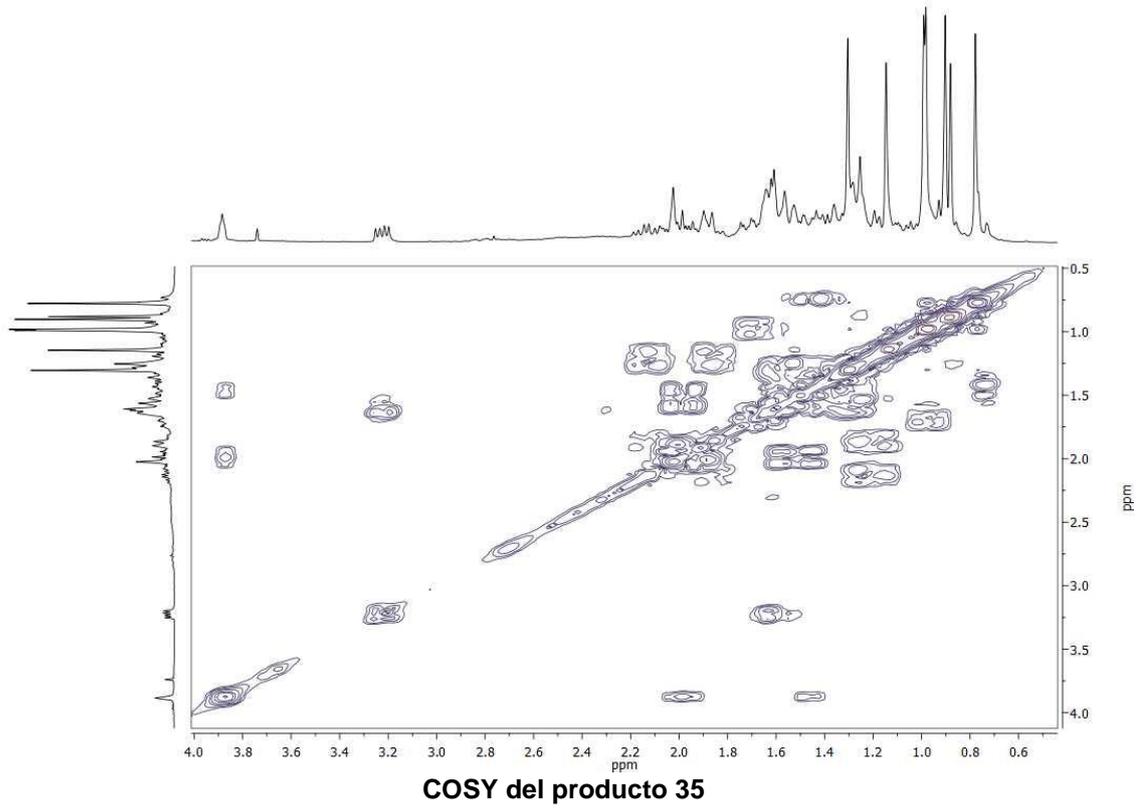
Espectro de ¹³C RMN del producto 35

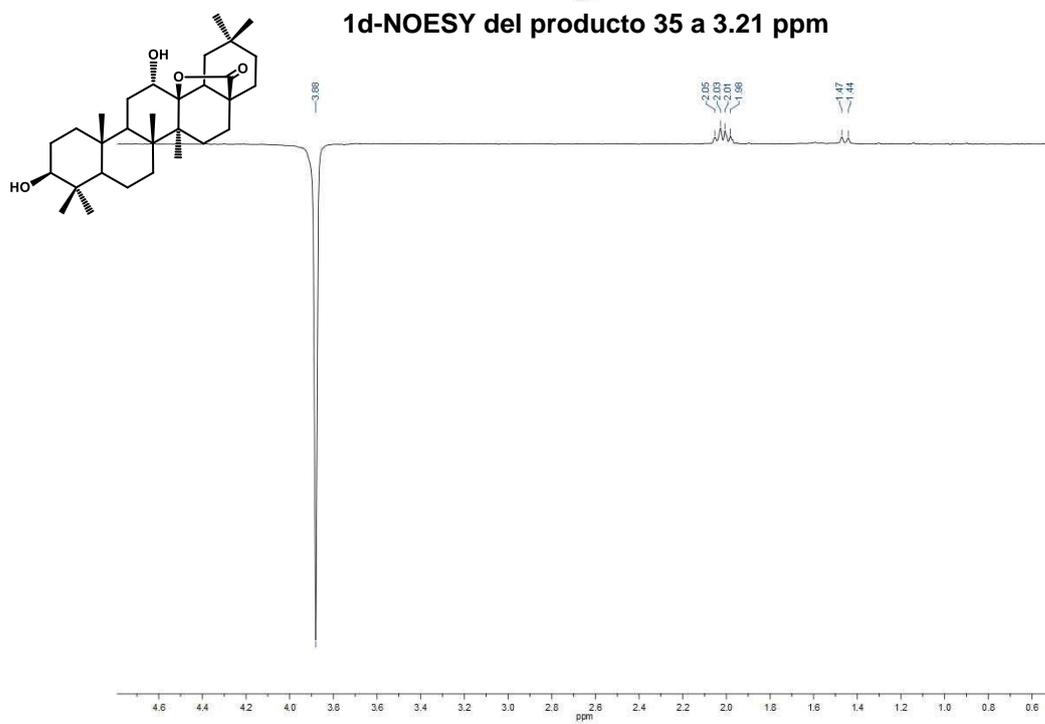
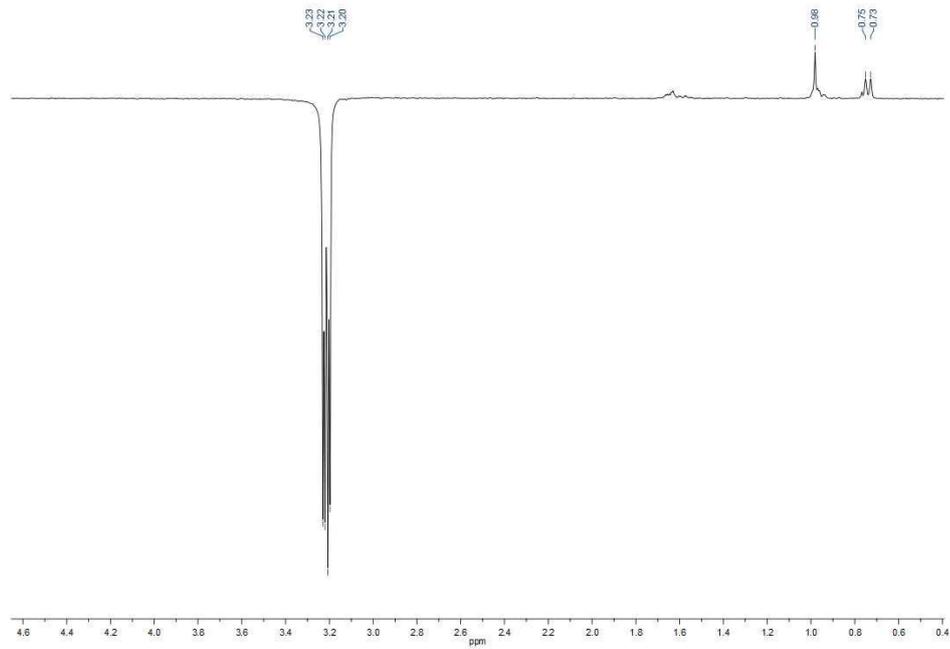


Espectro HSQC del producto 35

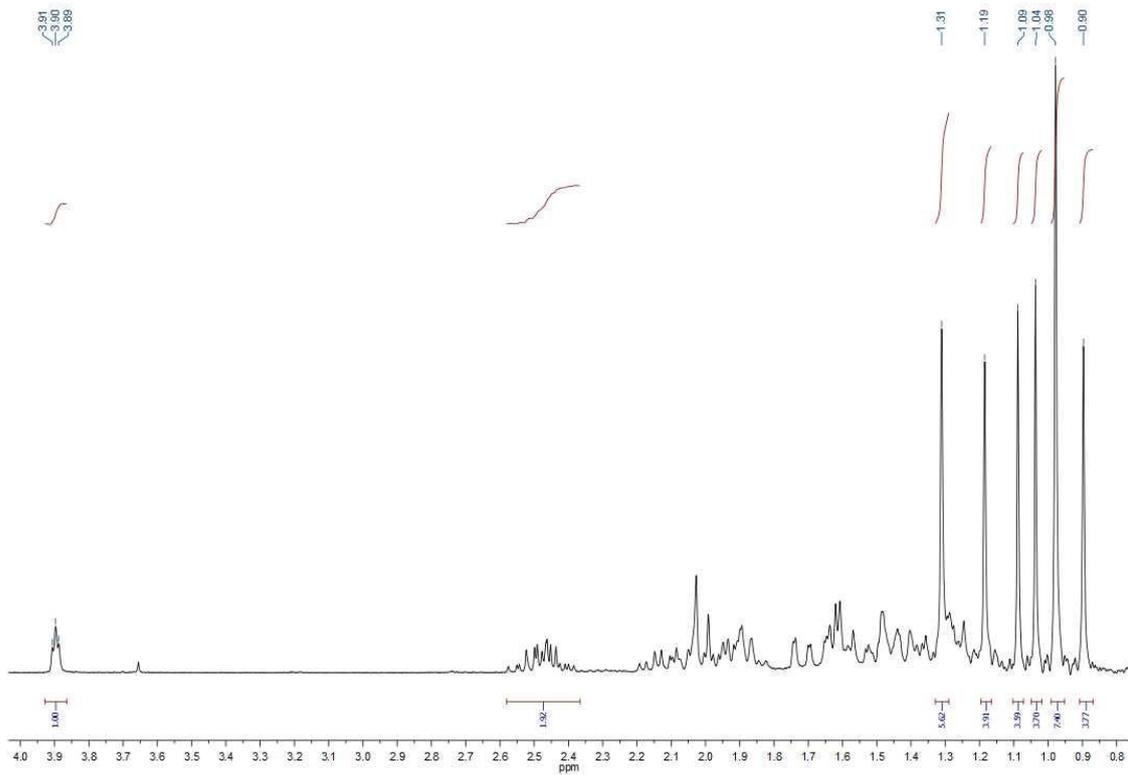


Espectro HMBC del producto 35

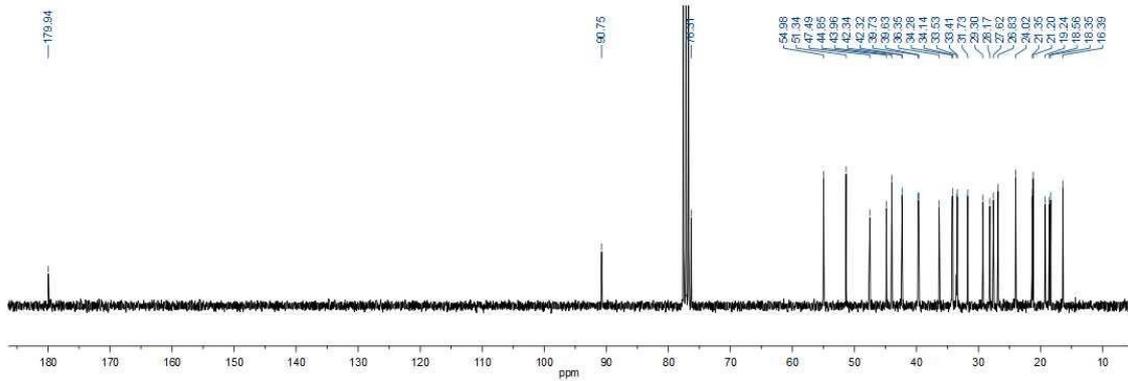
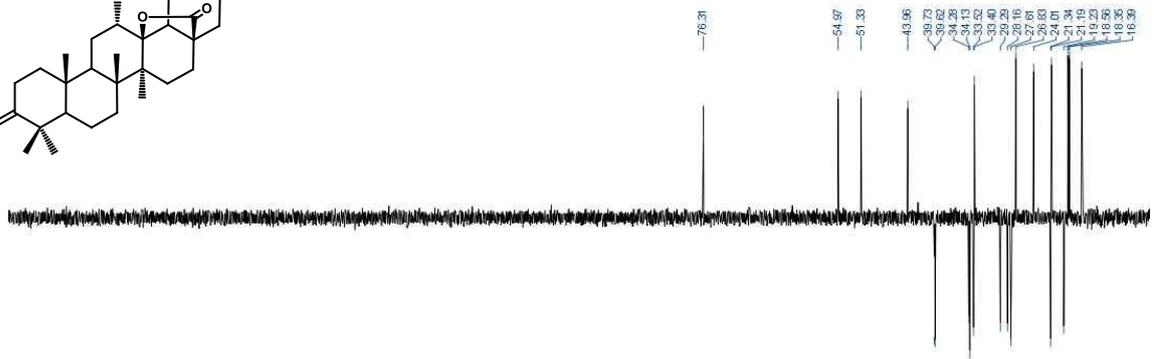
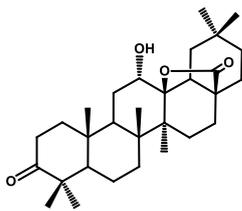




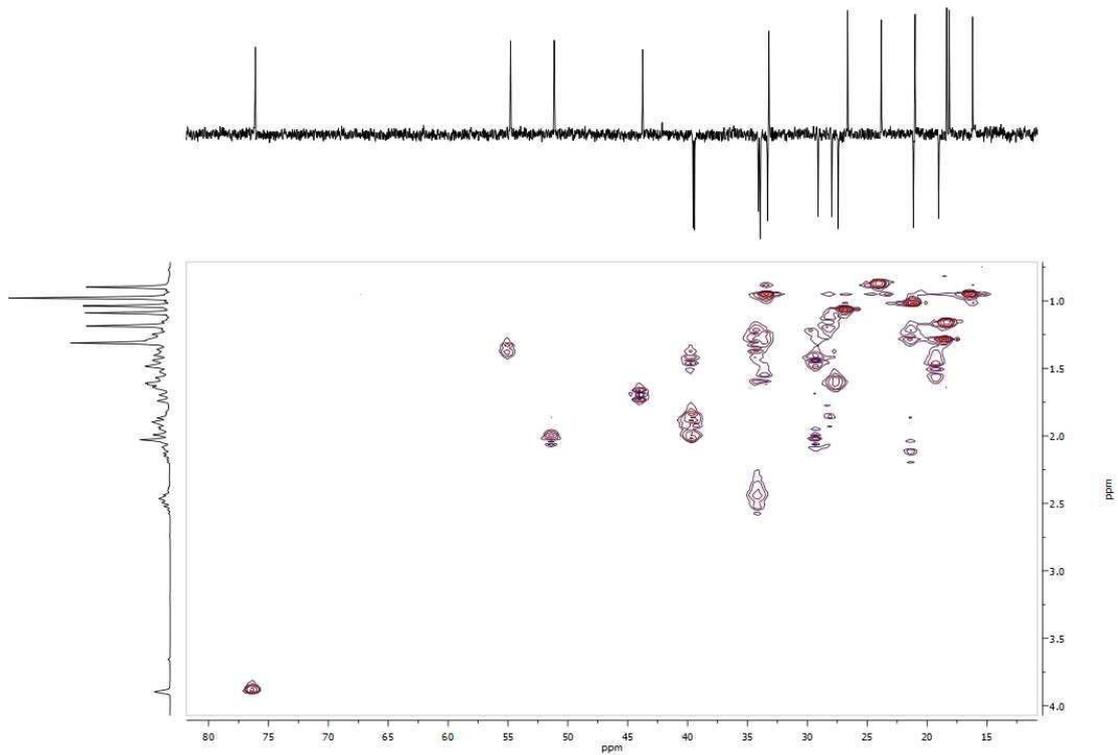
1d-NOESY del producto 35 a 3.88 ppm



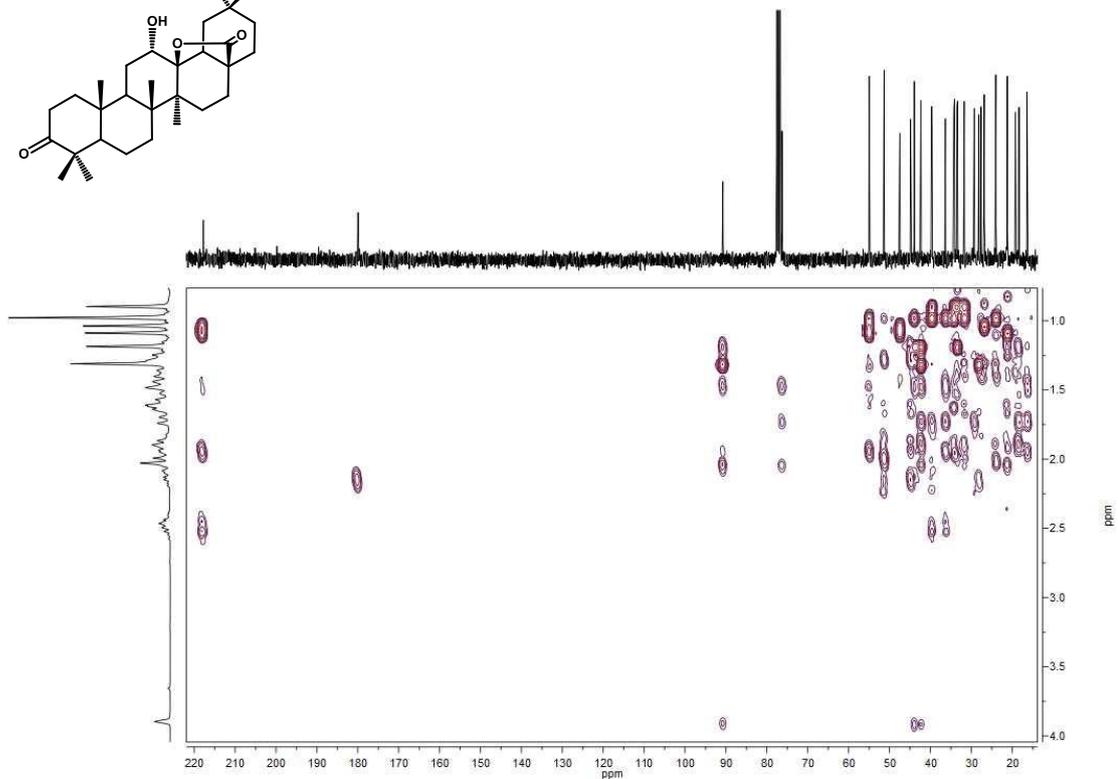
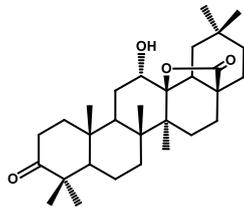
Espectro de ^1H RMN del producto 36



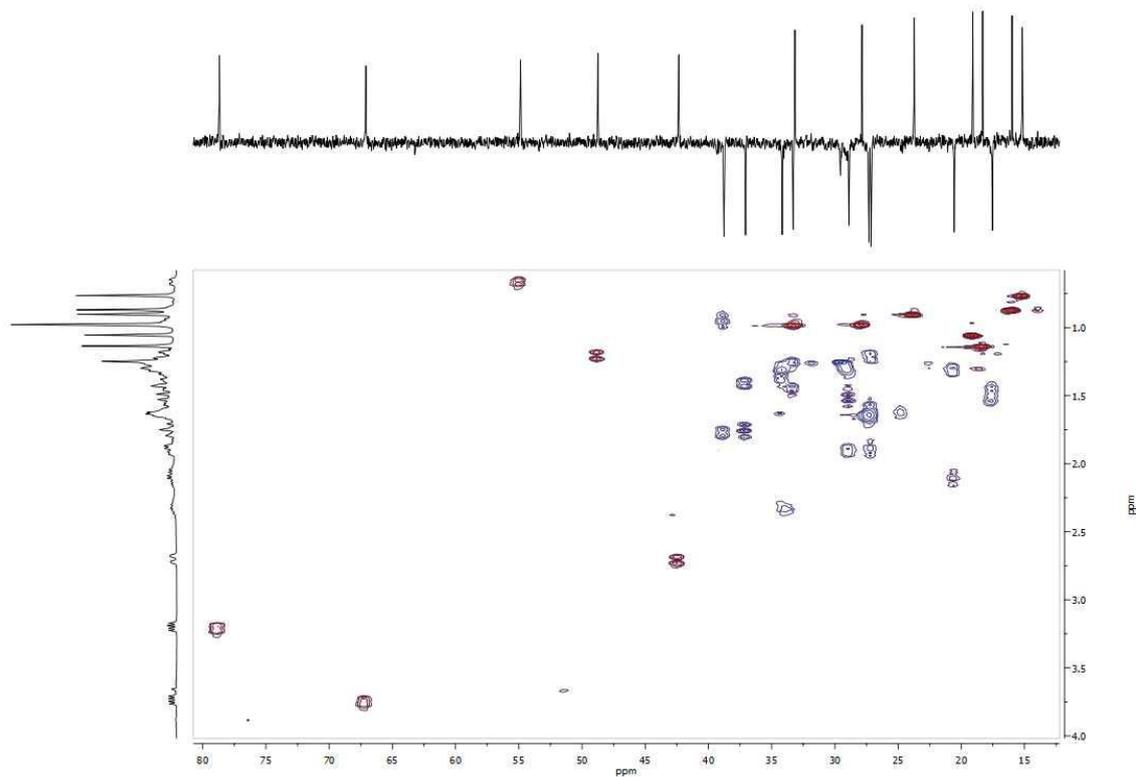
Espectro de ^{13}C RMN del producto 36



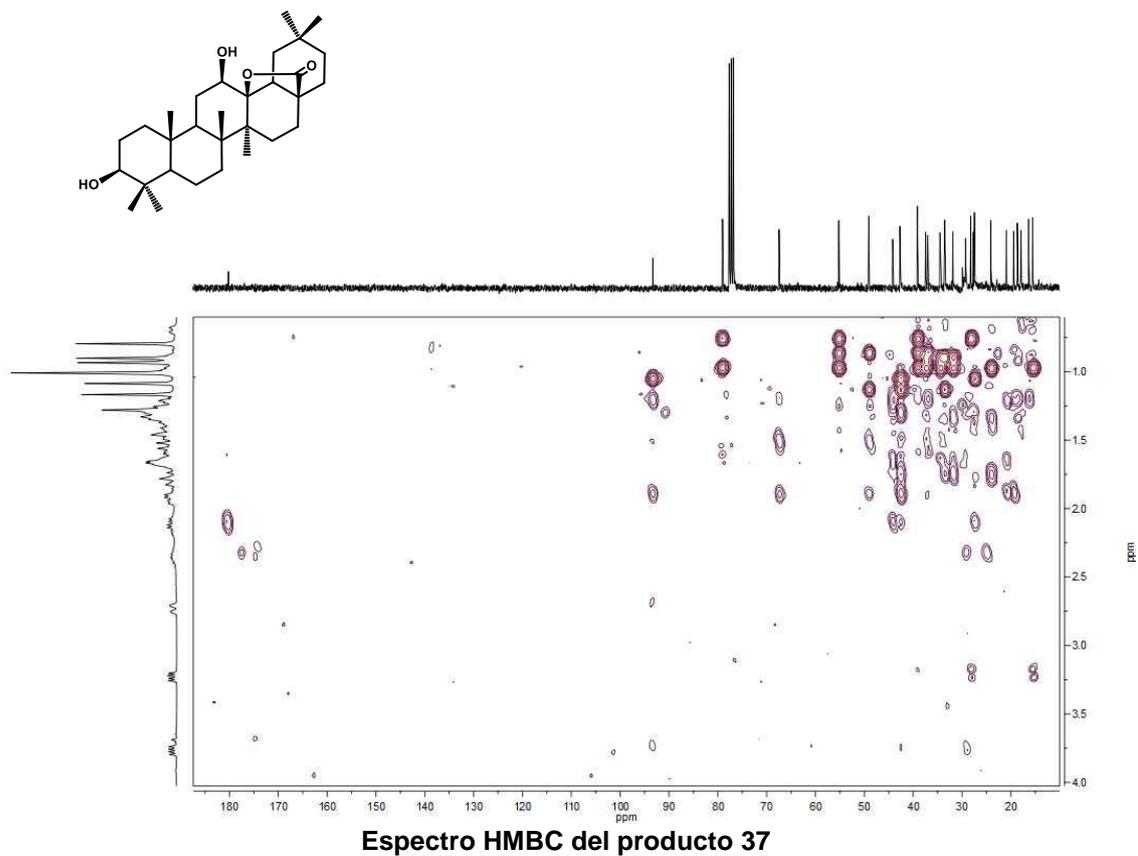
Espectro HMQC del producto 36



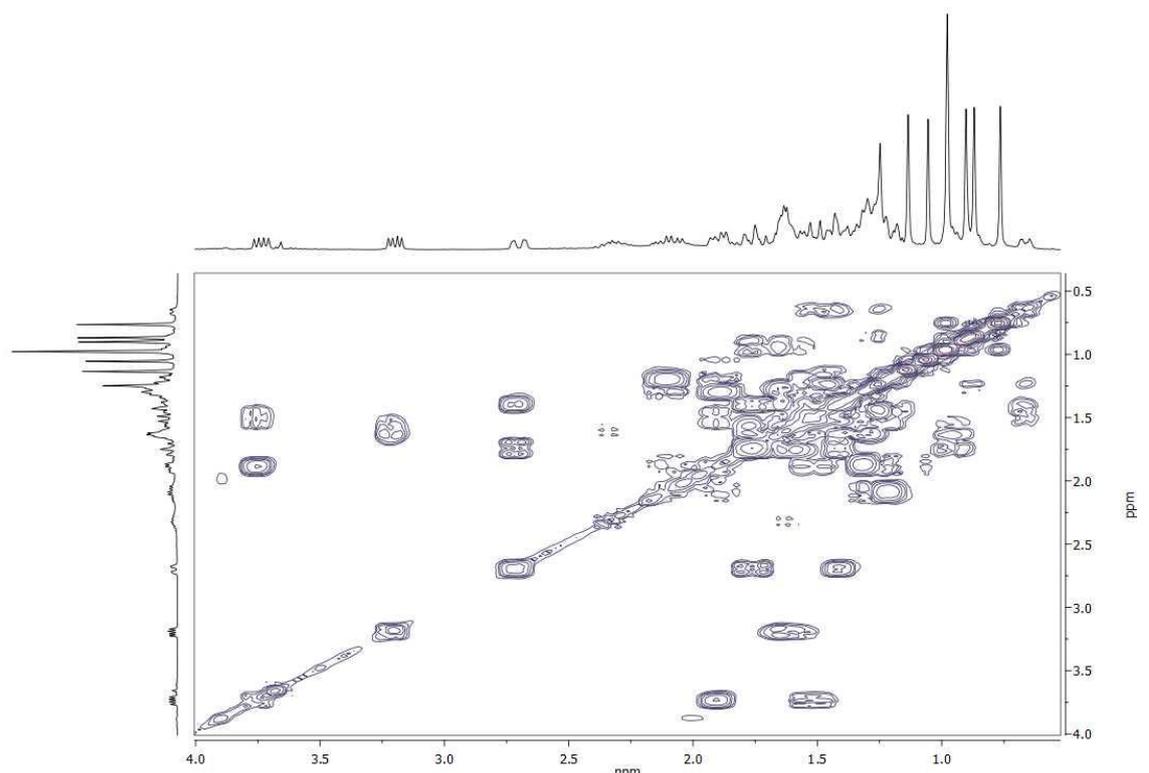
Espectro HMBC del producto 36



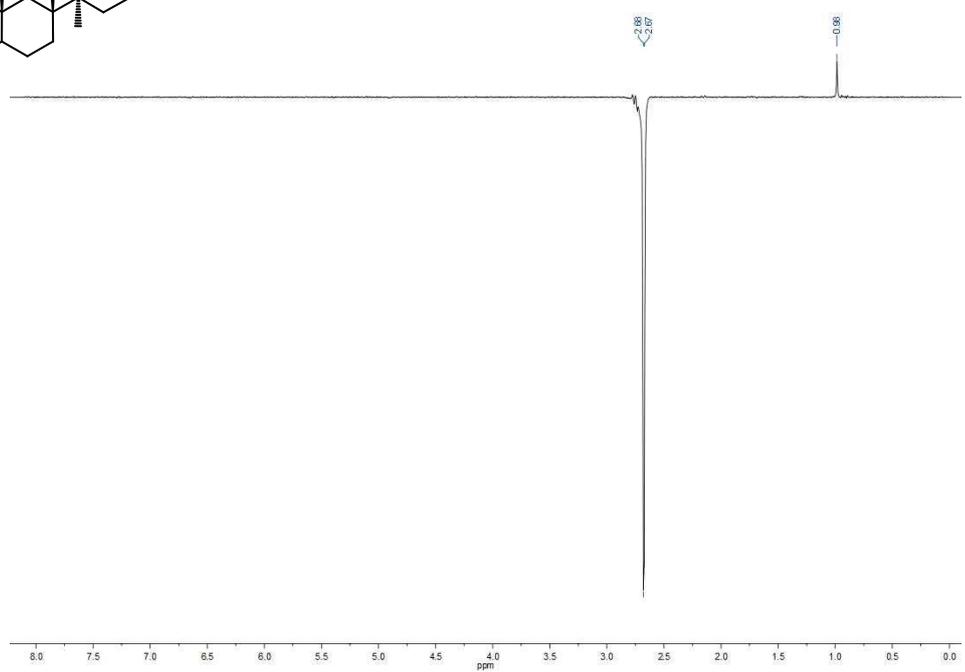
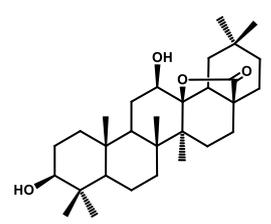
Espectro HSQC del producto 37



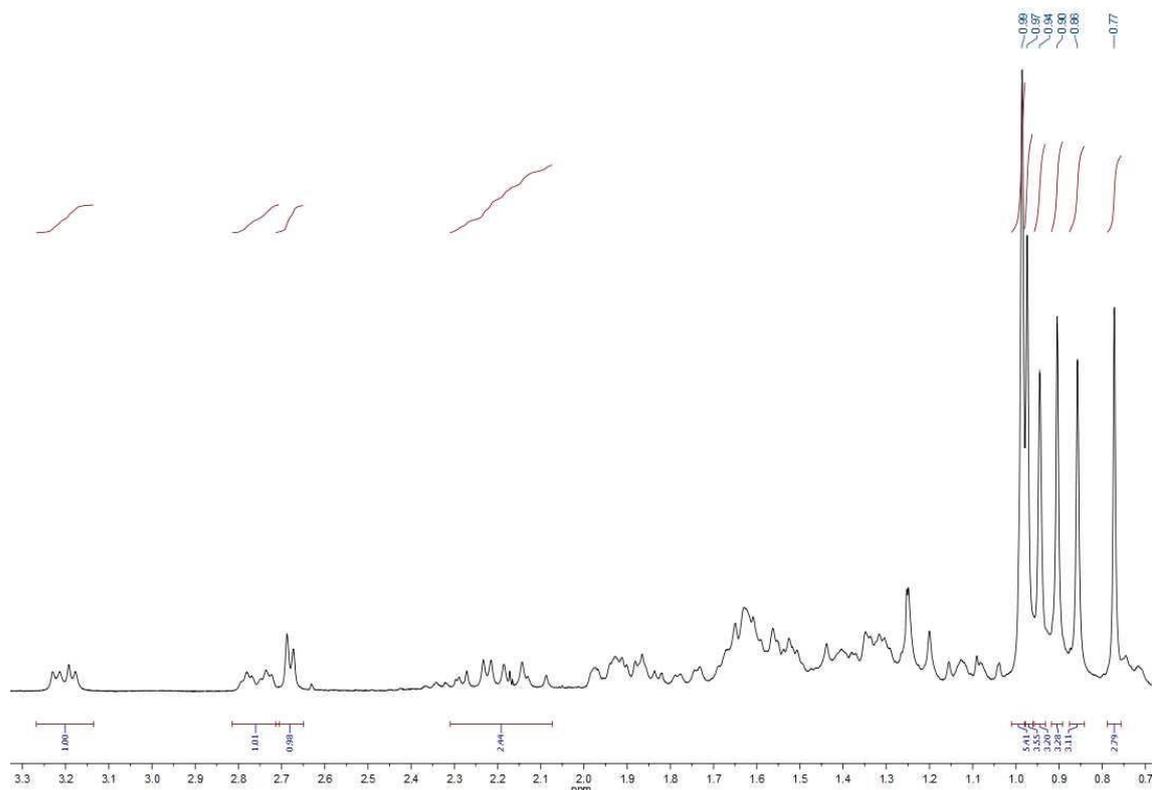
Espectro HMBC del producto 37



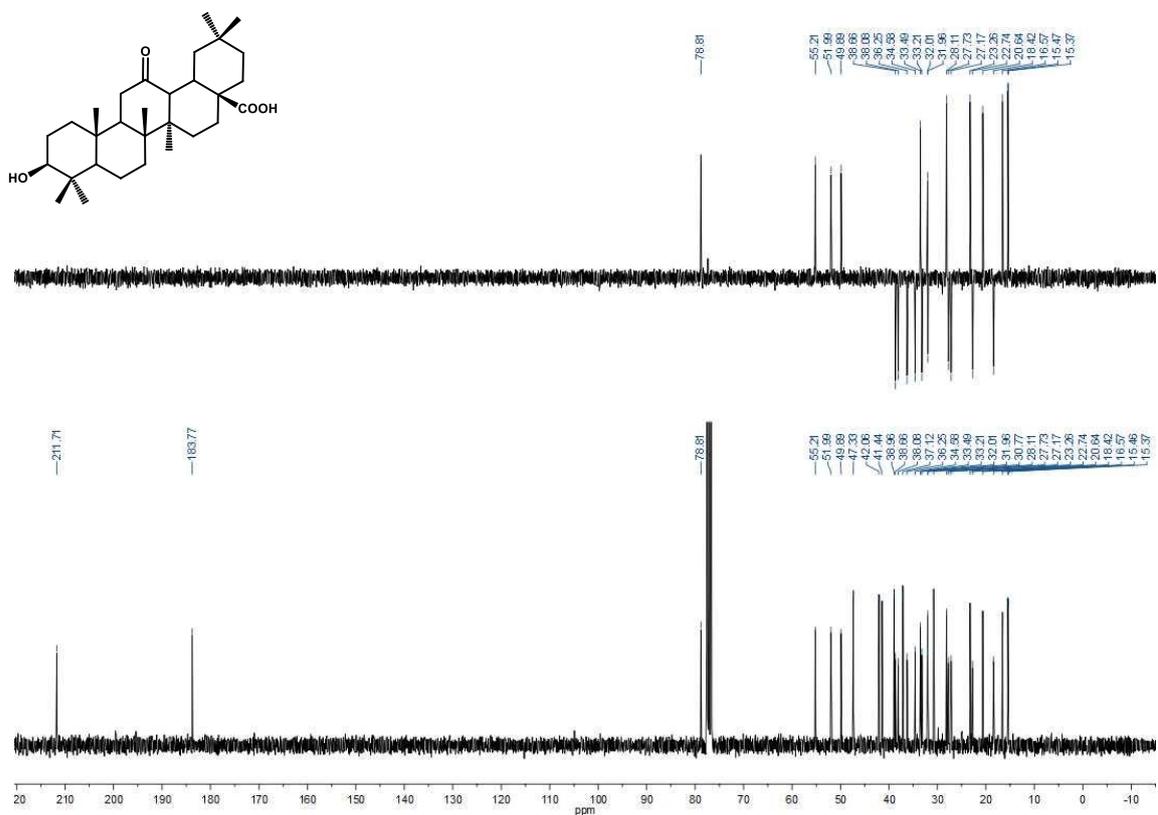
COSY del producto 37



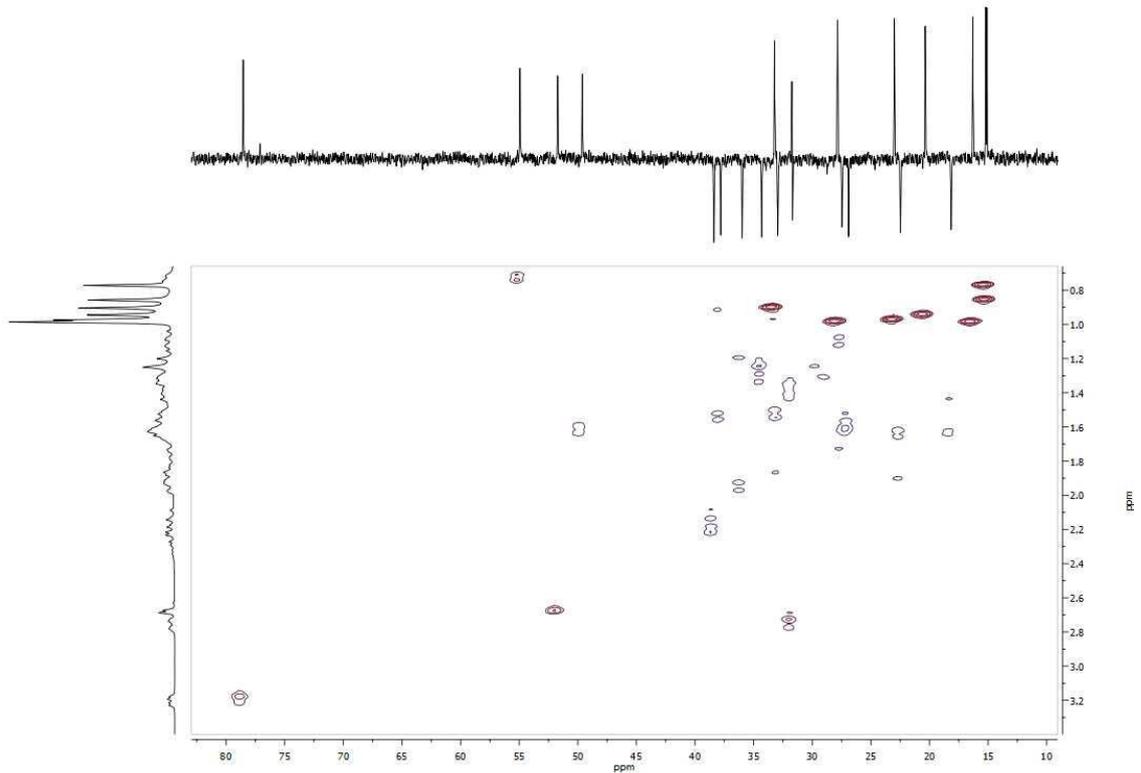
1d-NOESY del producto 37 a 2.68 ppm



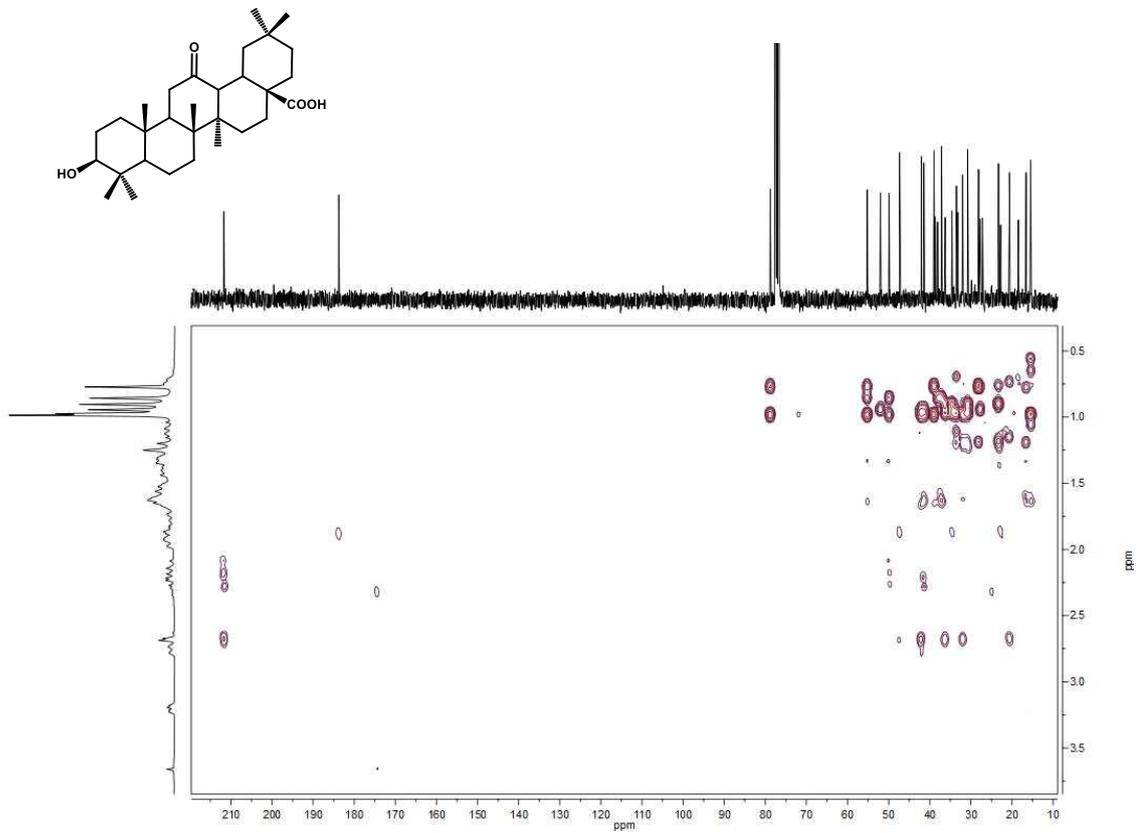
Espectro de ^1H RMN del producto 38



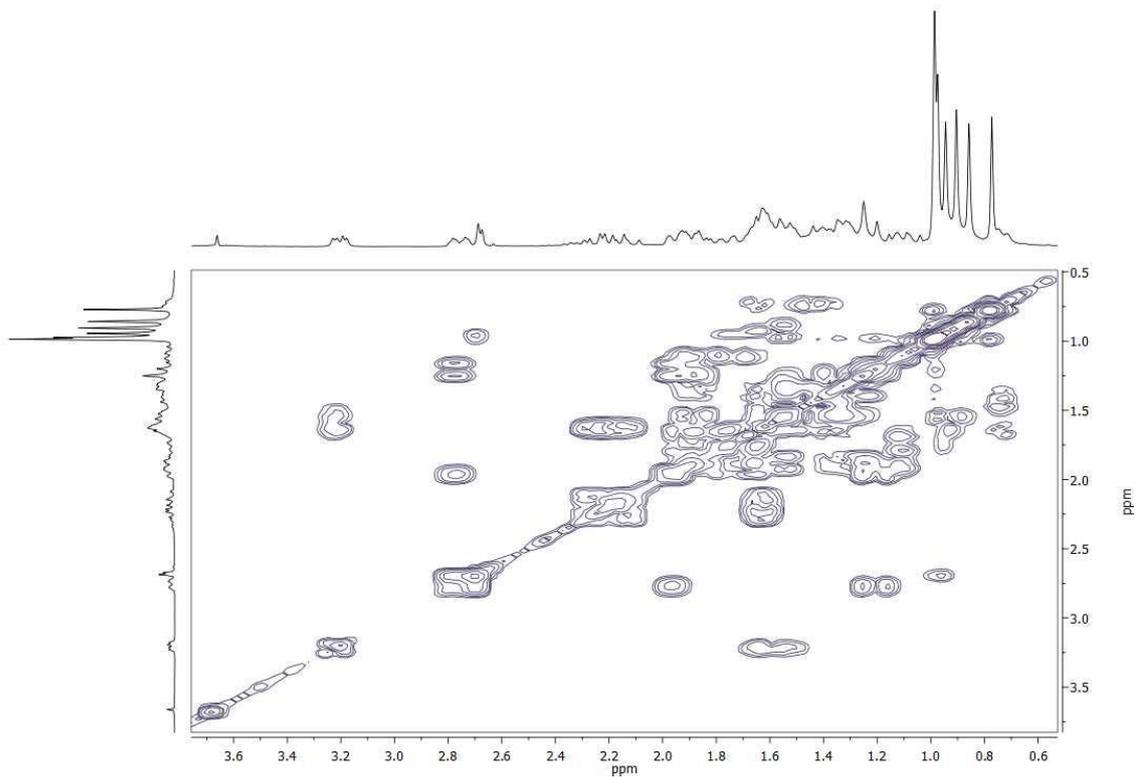
Espectro de ^{13}C RMN del producto 38



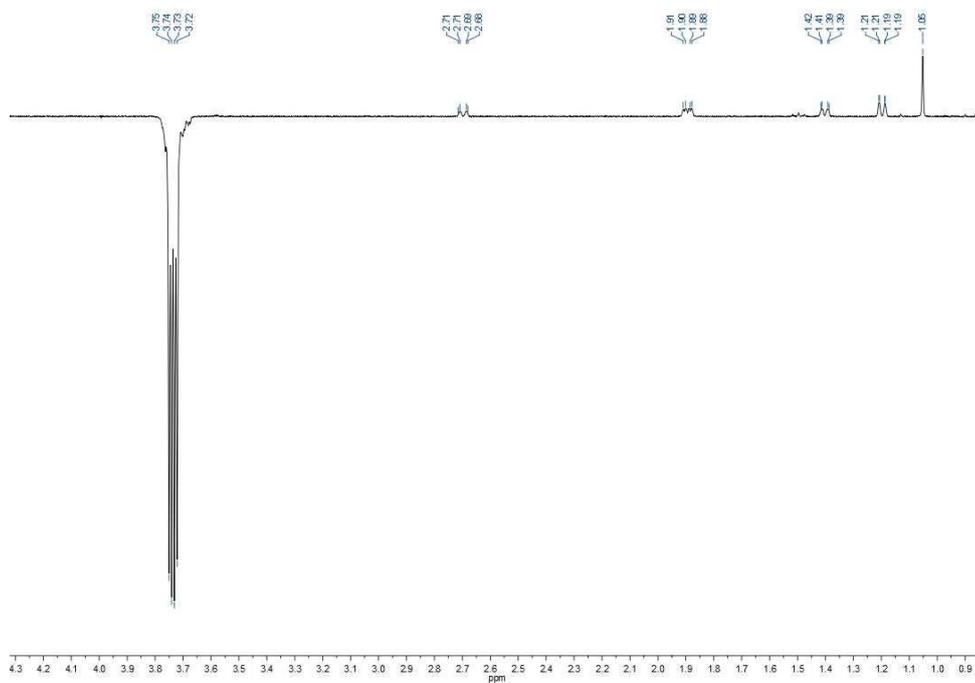
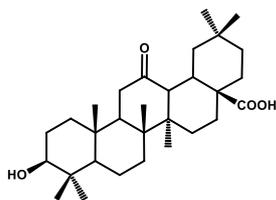
Espectro HSQC del producto 38



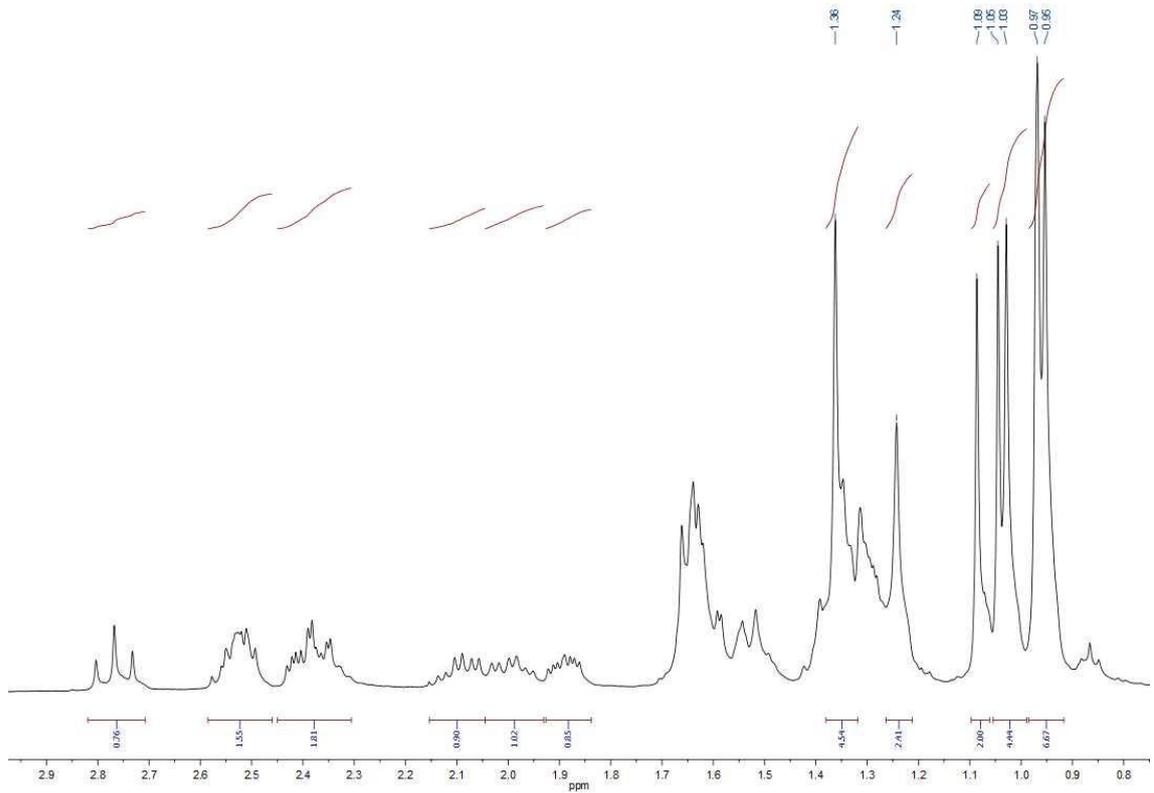
Espectro HMBC del producto 38



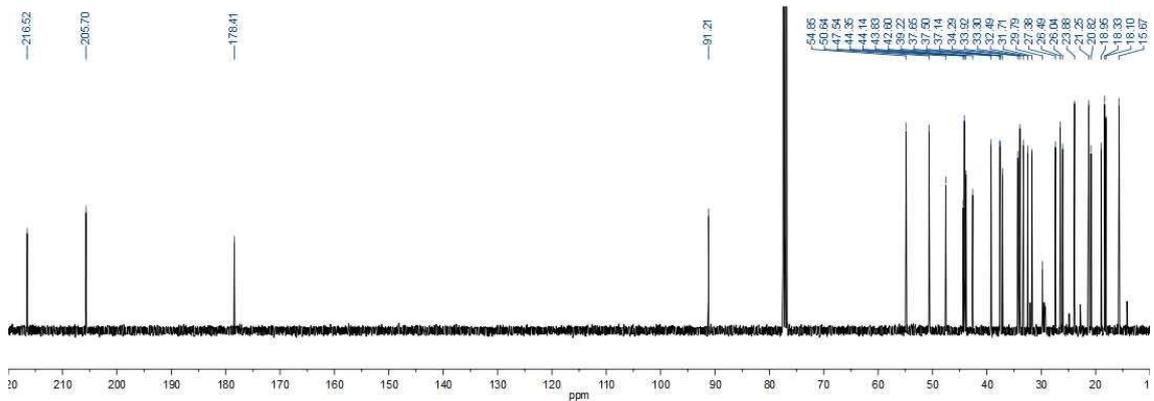
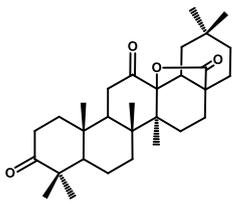
COSY del producto 38



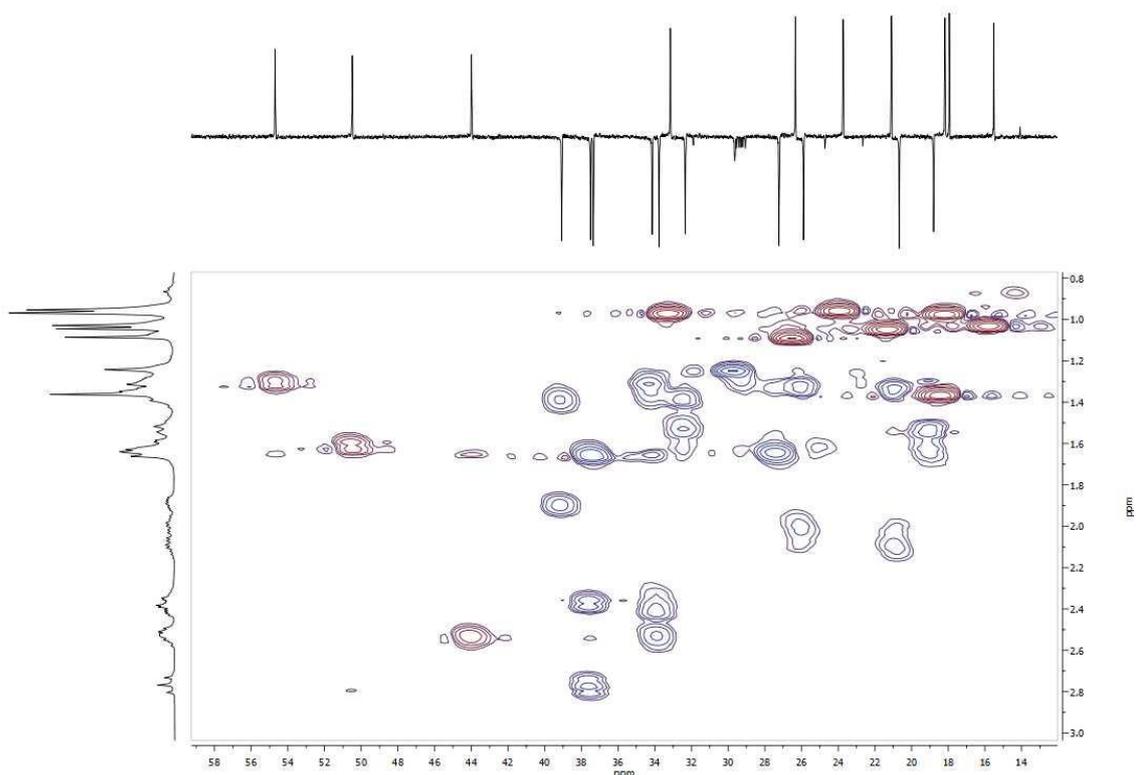
1d-NOESY del producto 38 a 3.75 ppm



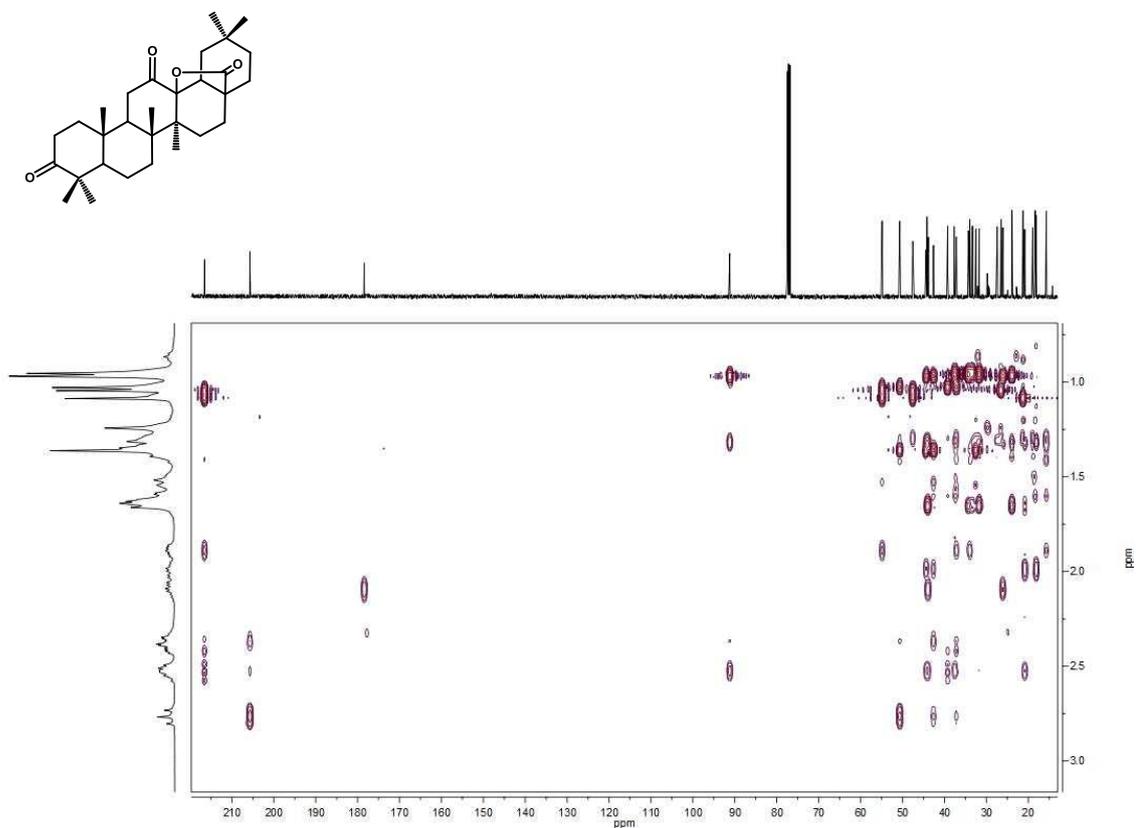
Espectro de ^1H RMN del producto 39



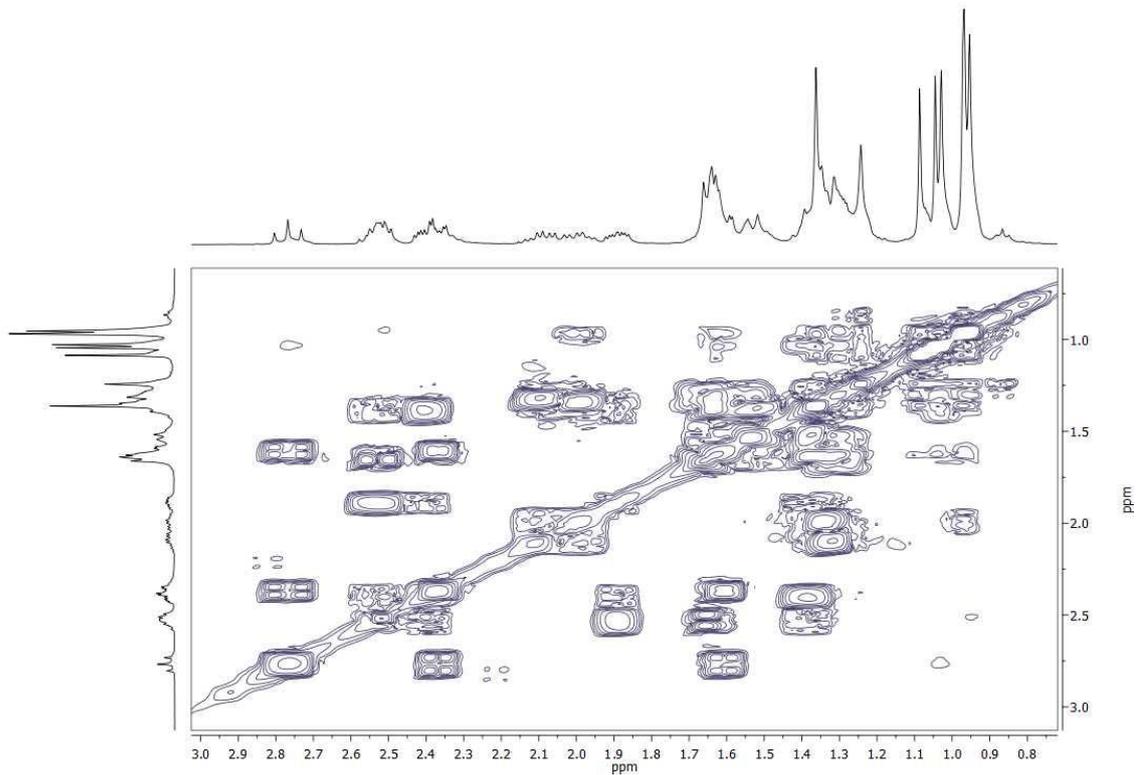
Espectro de ^{13}C RMN del producto 39



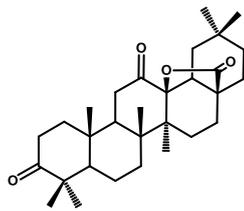
Espectro HSQC del producto 39

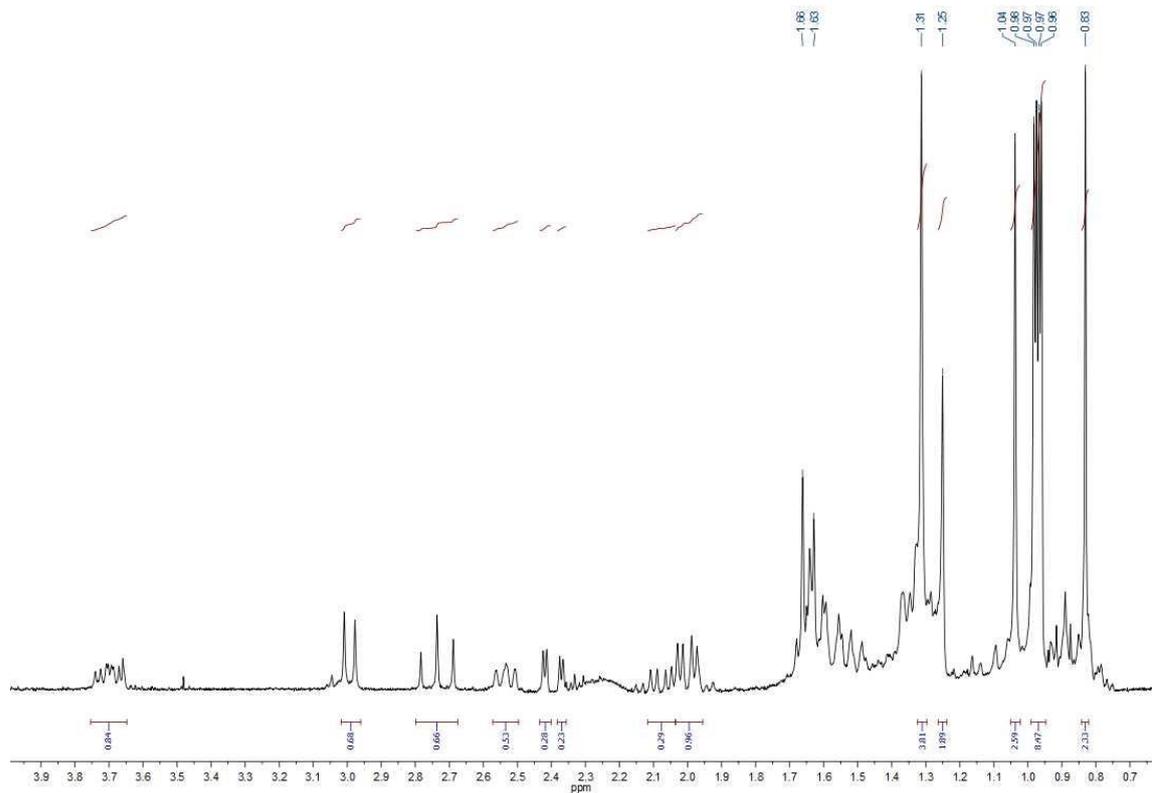


Espectro HMBC del producto 39

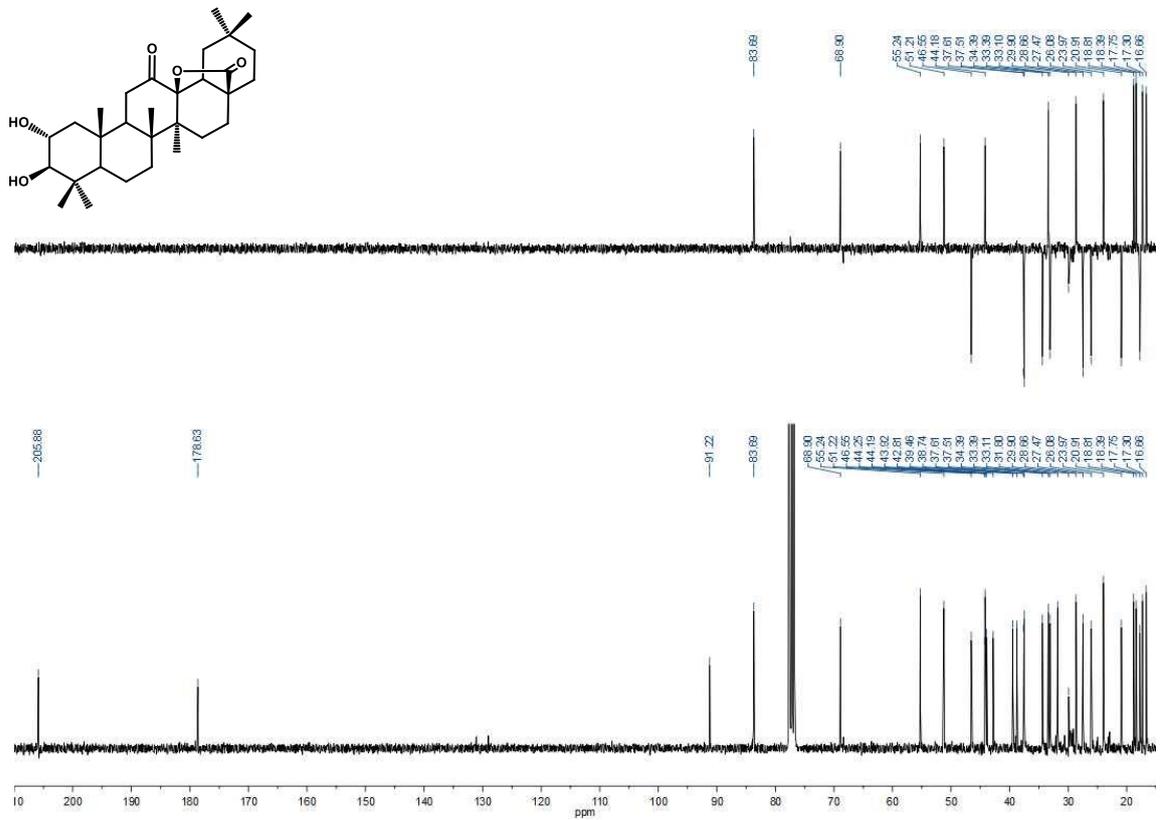


COSY del producto 39

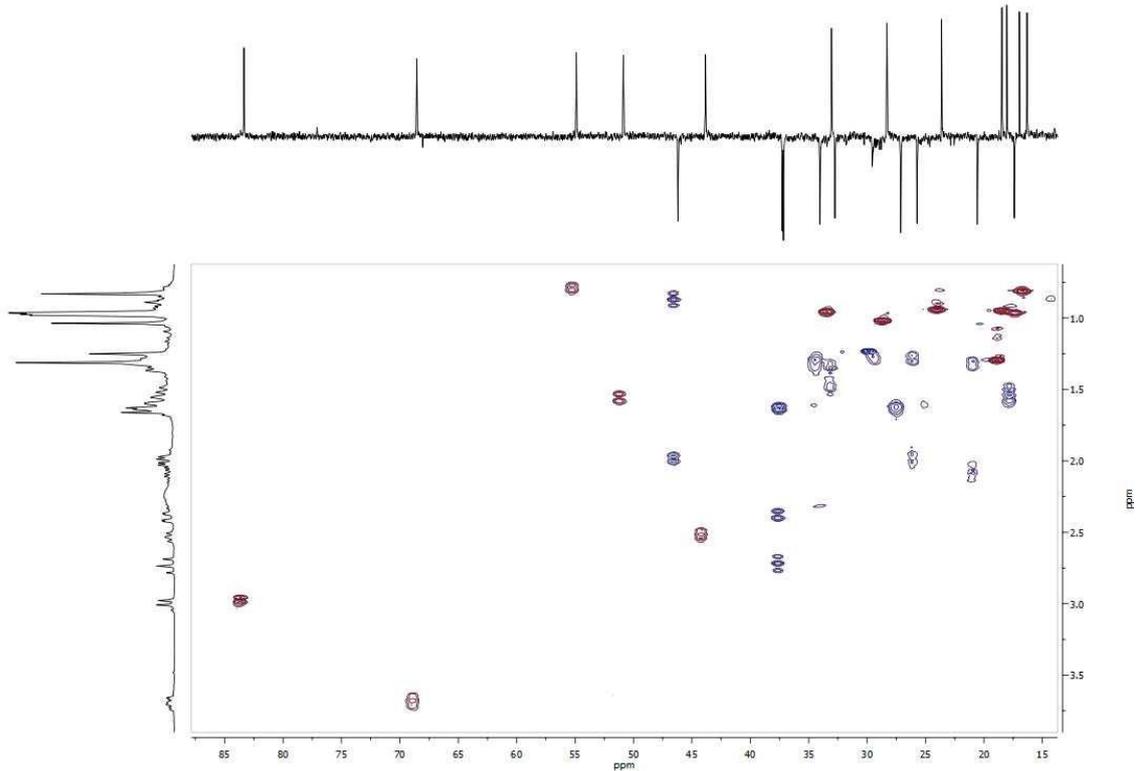




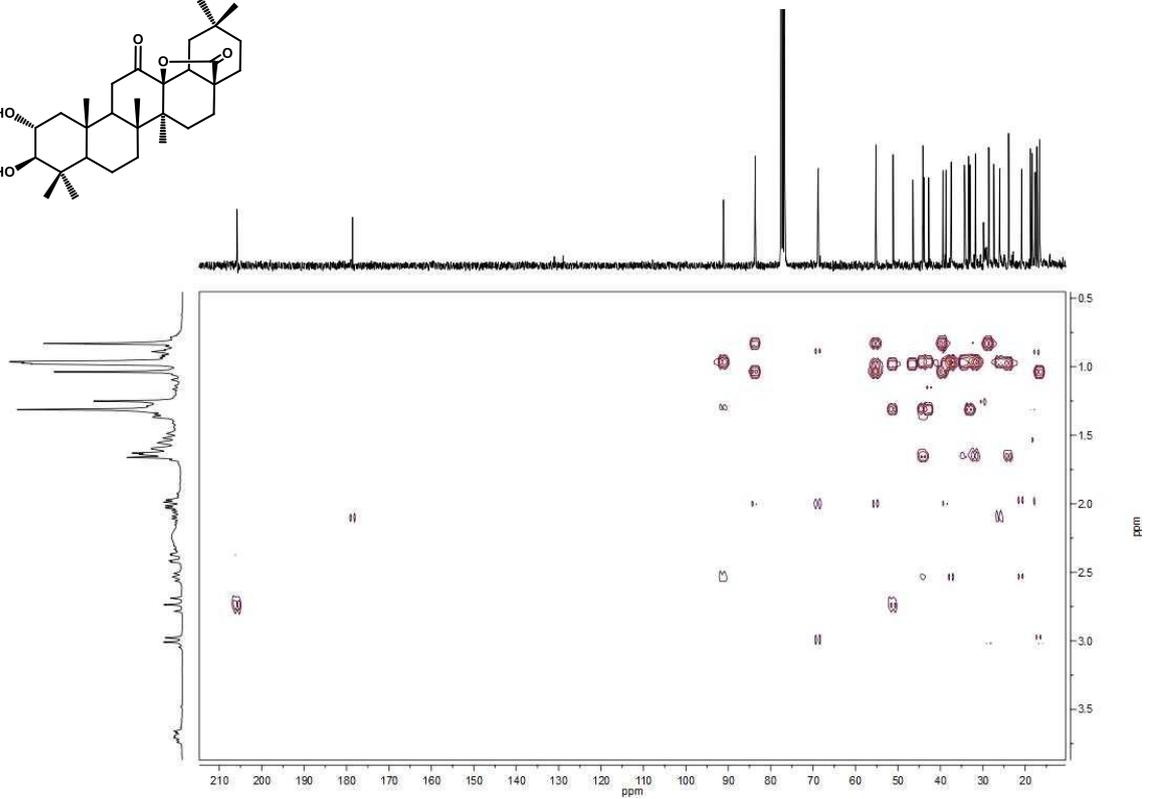
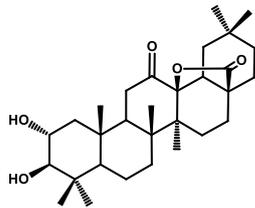
Espectro de ^1H RMN del producto 40



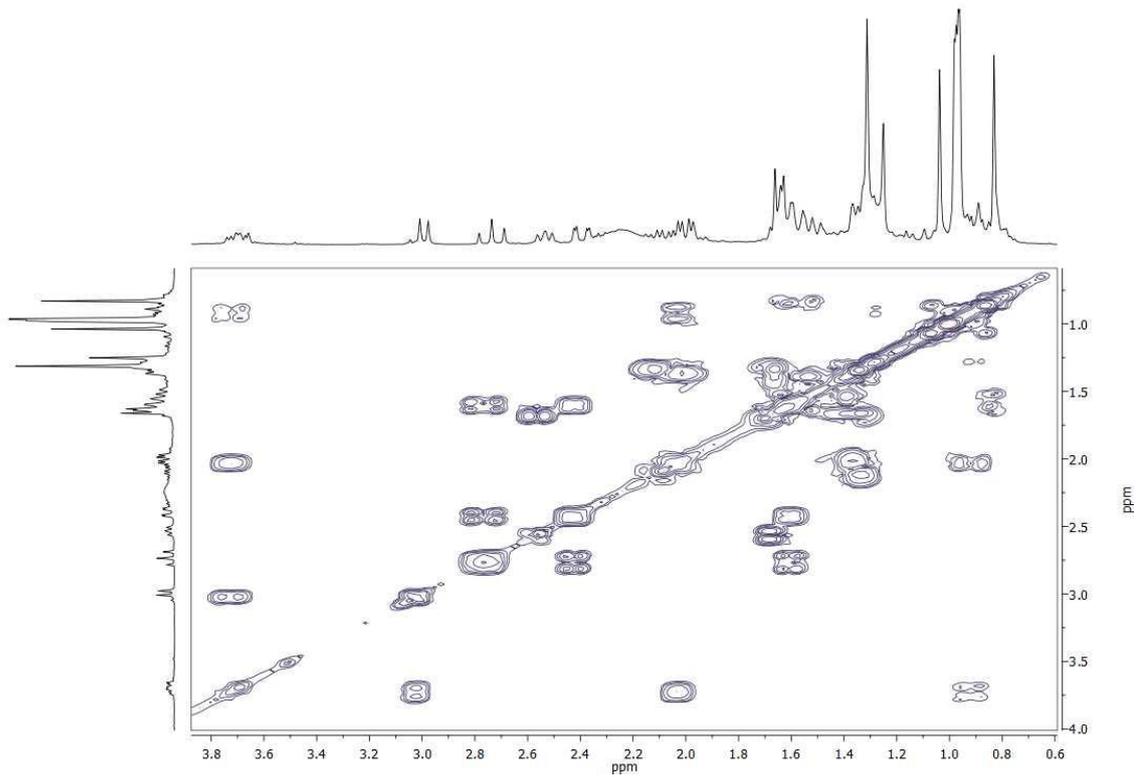
Espectro de ^{13}C RMN del producto 40



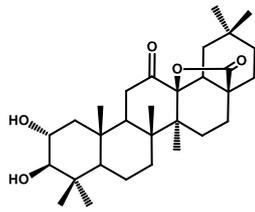
Espectro HSQC del producto 40

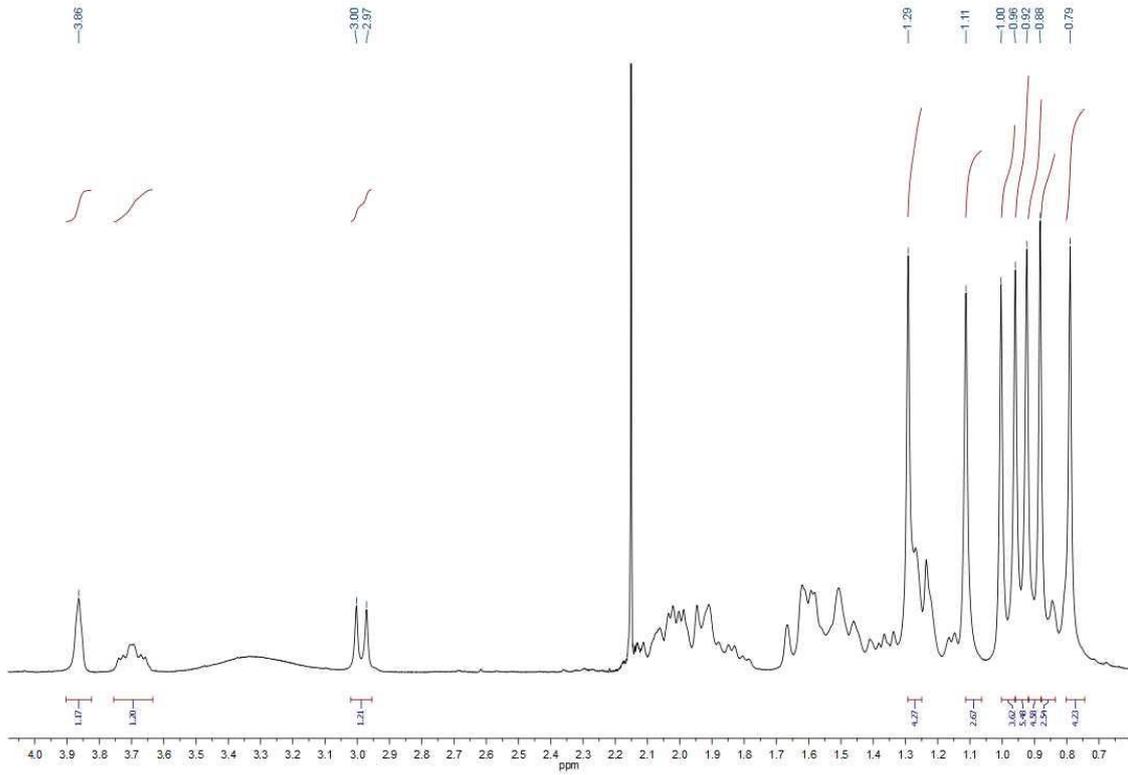


Espectro HMBC del producto 40

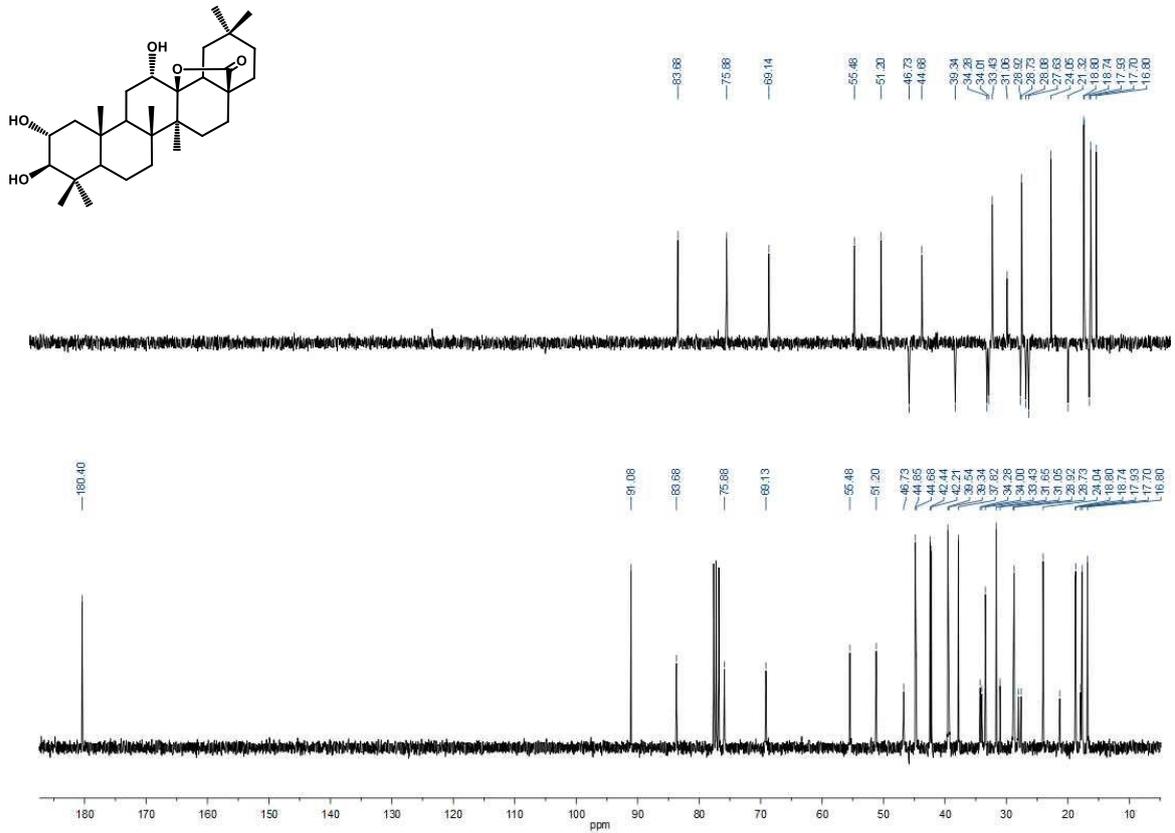


COSY del producto 40

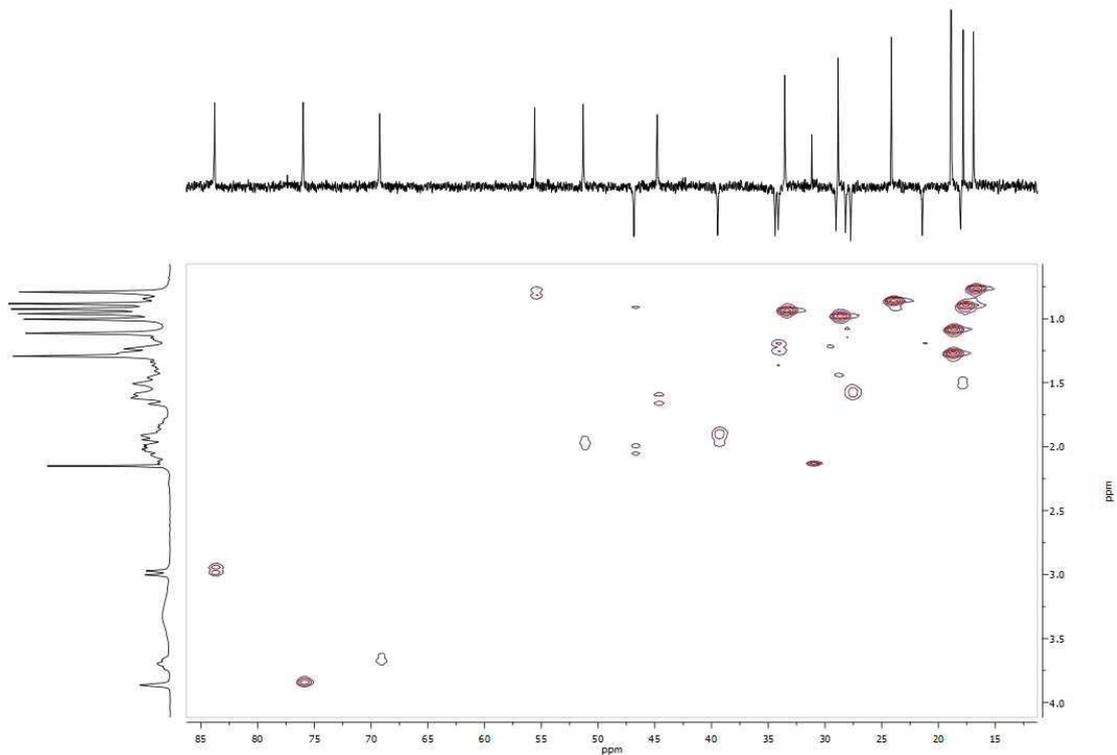




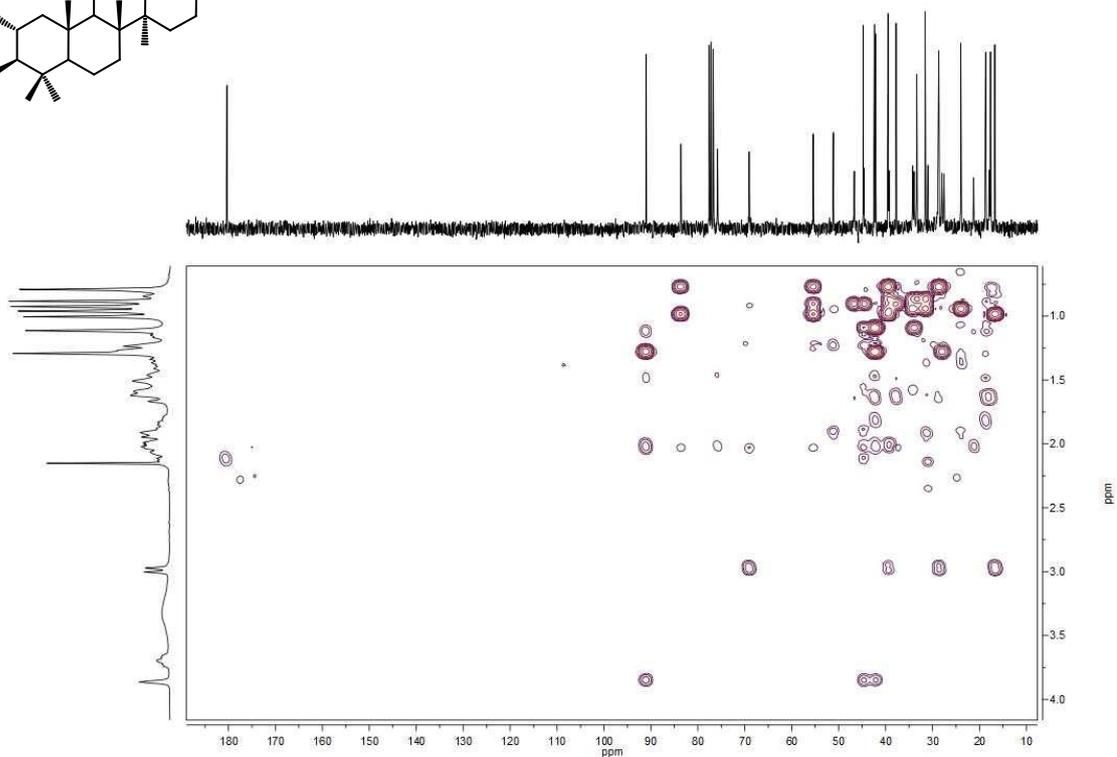
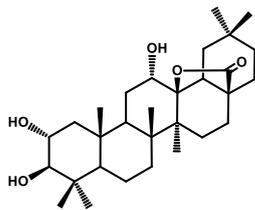
Espectro de ^1H RMN del producto 41



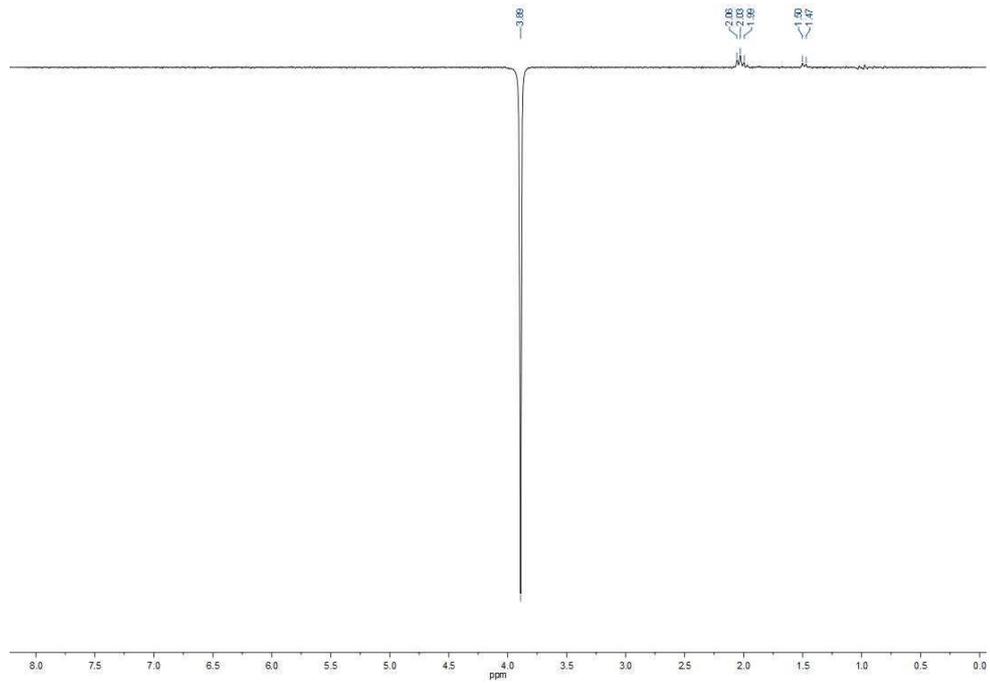
Espectro de ^{13}C RMN del producto 41



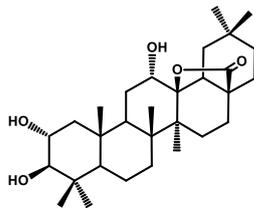
Espectro HMQC del producto 41

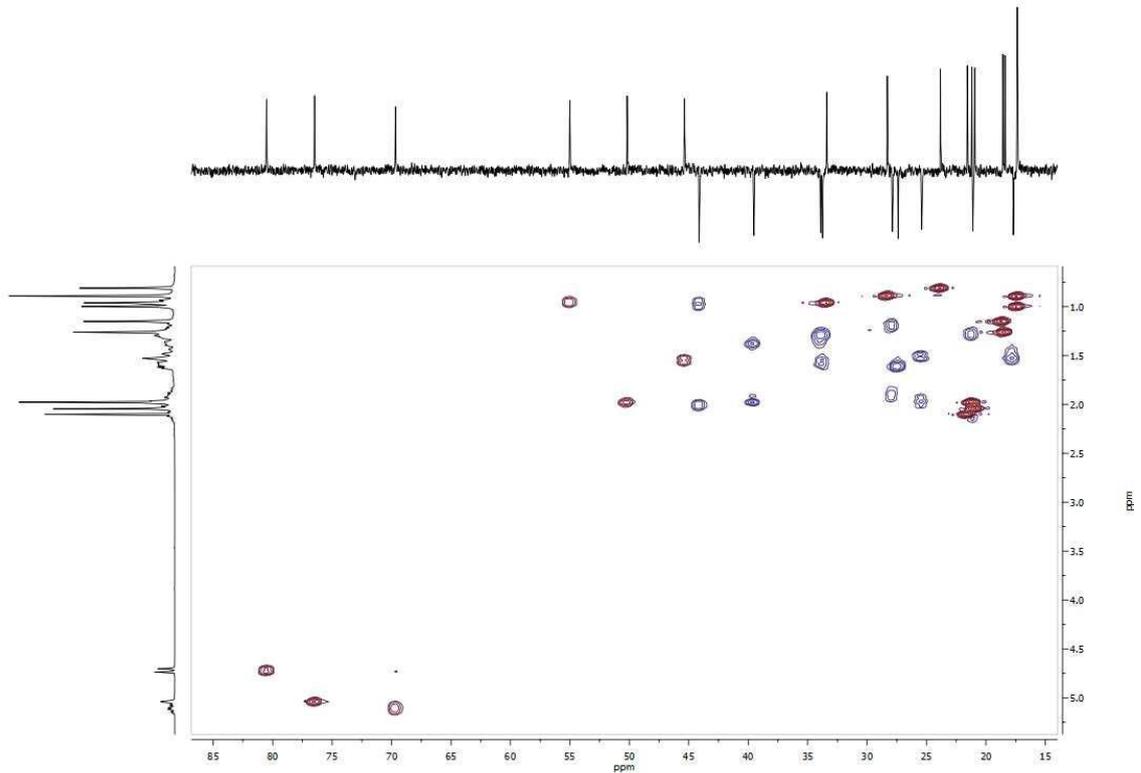


Espectro HMBC del producto 41

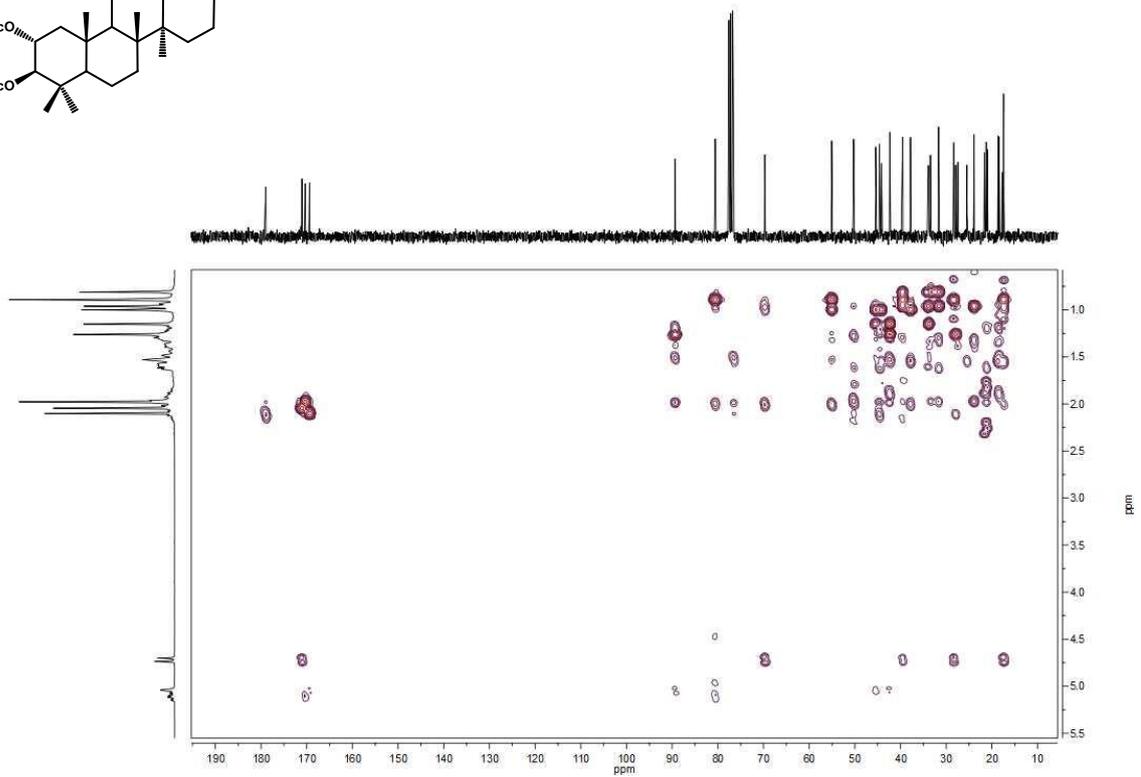
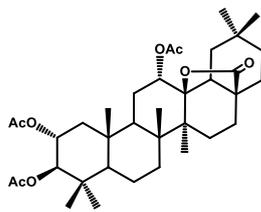


1d-NOESY del producto 41 a 3.89 ppm

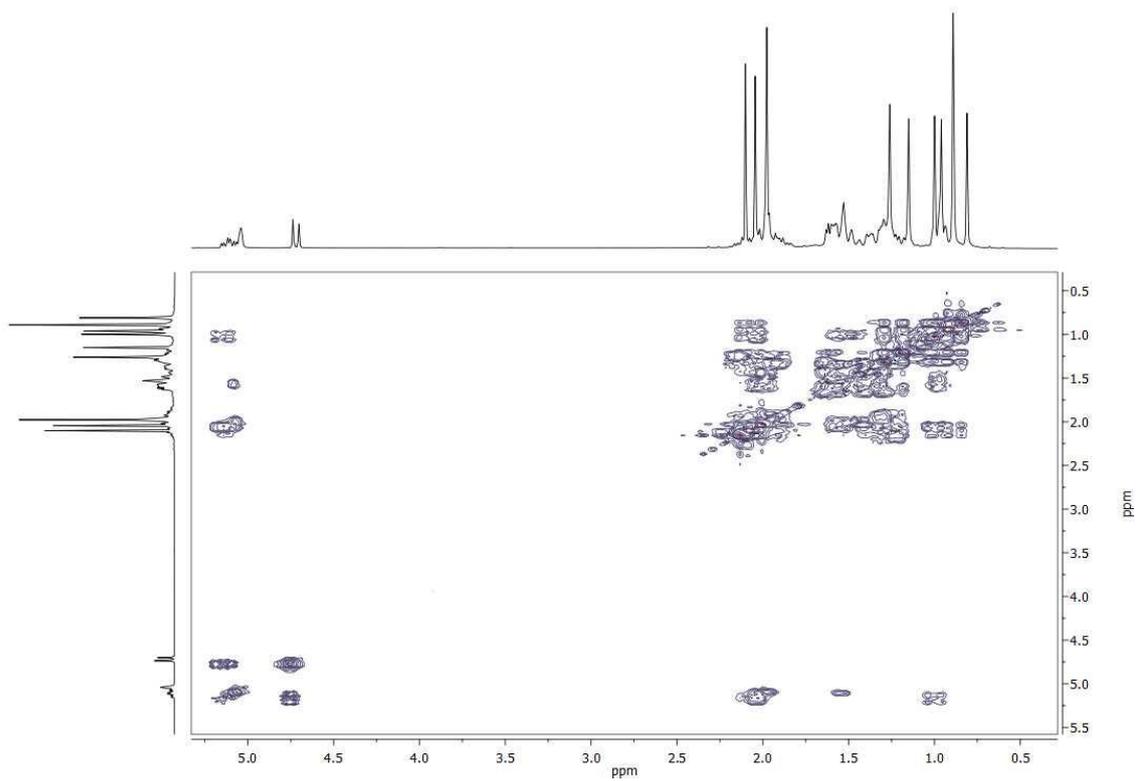




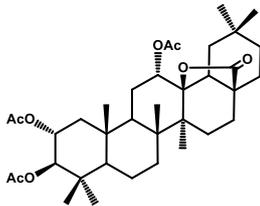
Espectro HSQC del producto 42

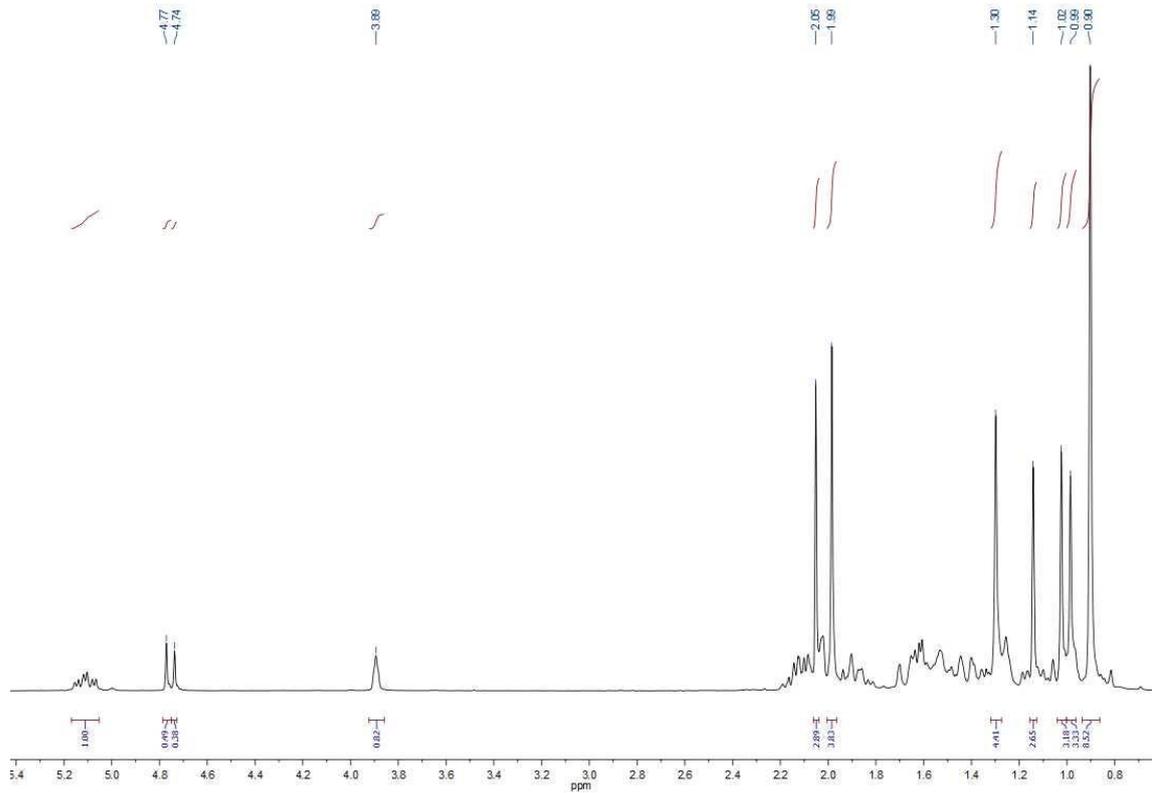


Espectro HMBC del producto 42

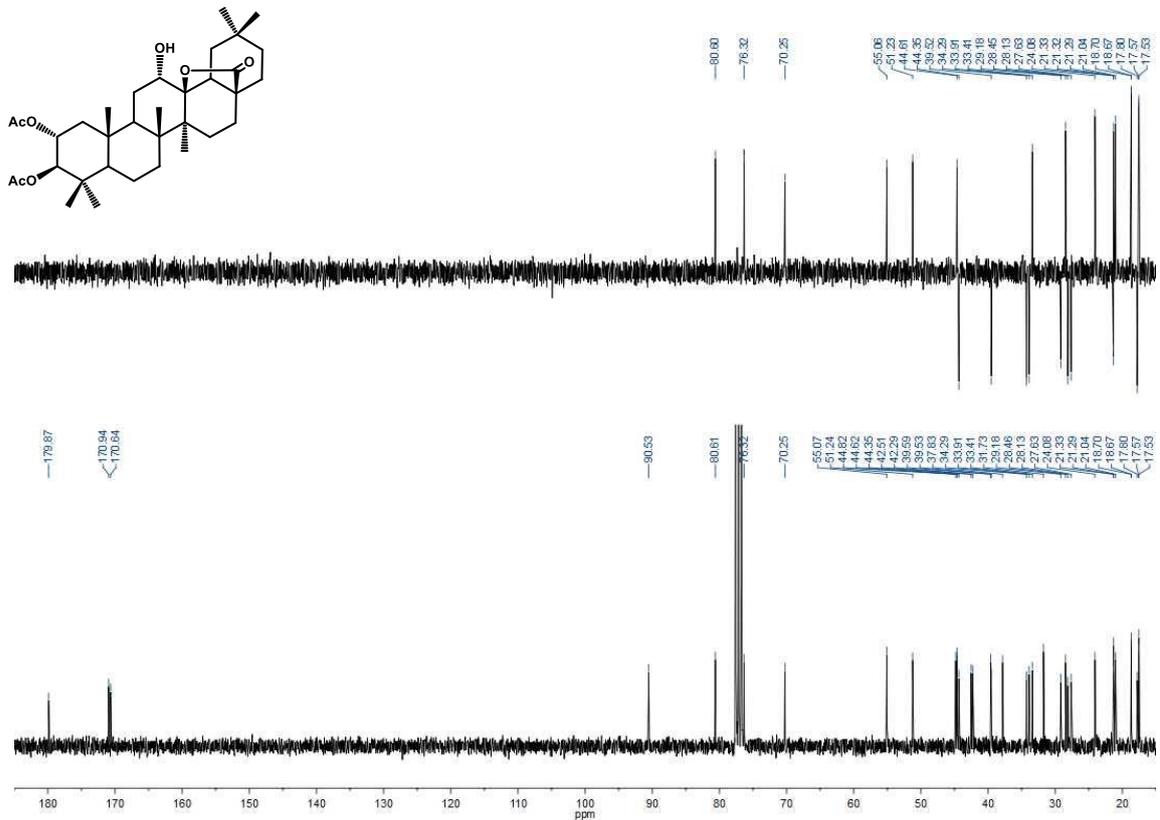


COSY del producto 42

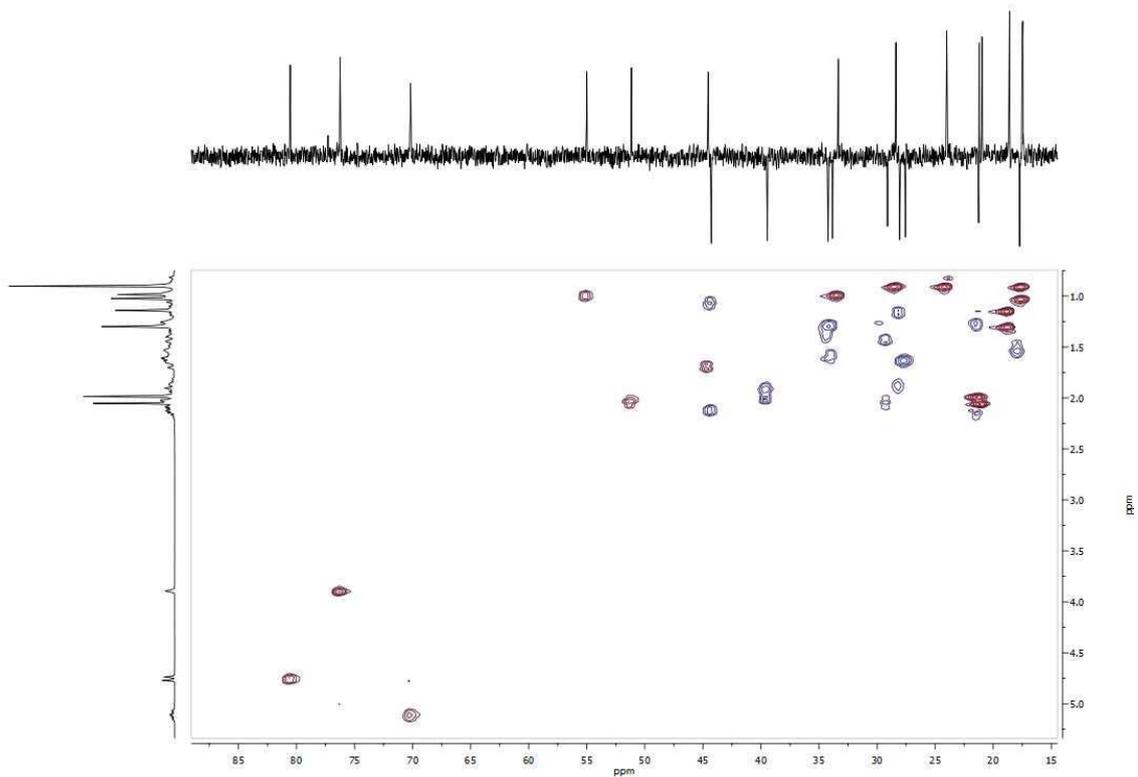




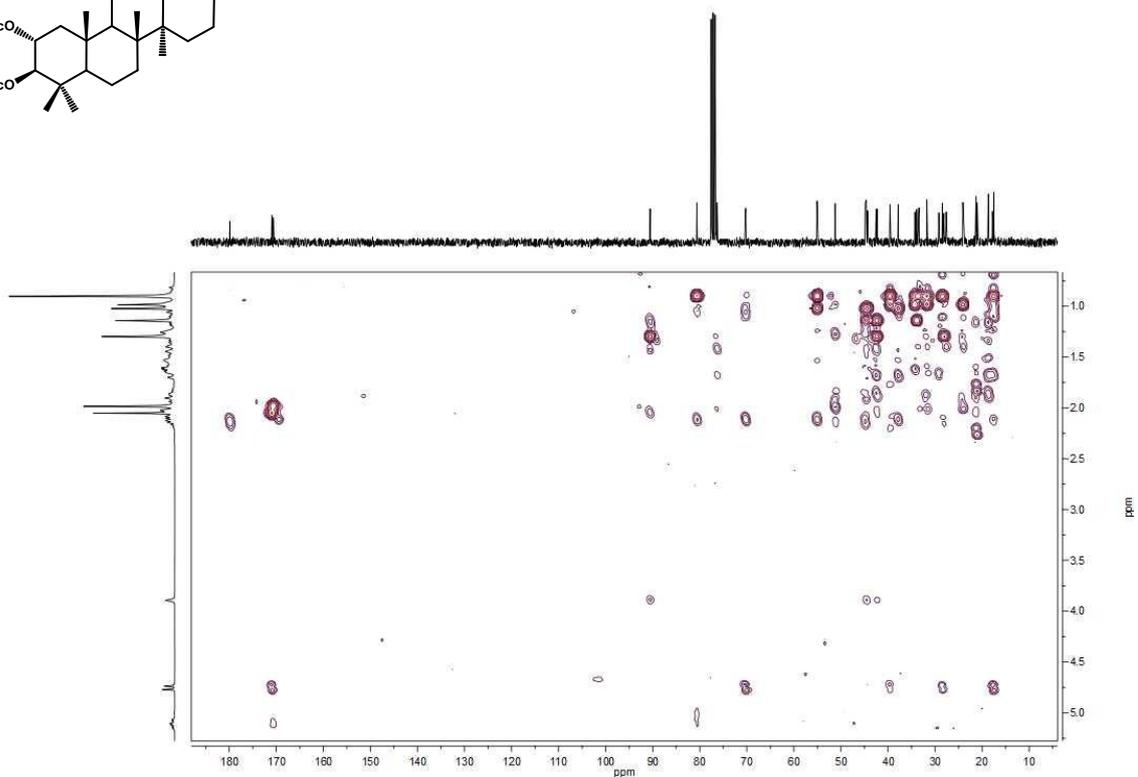
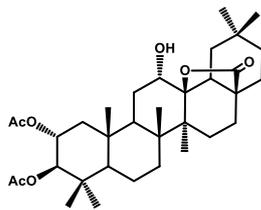
Espectro de ¹H RMN del producto 43



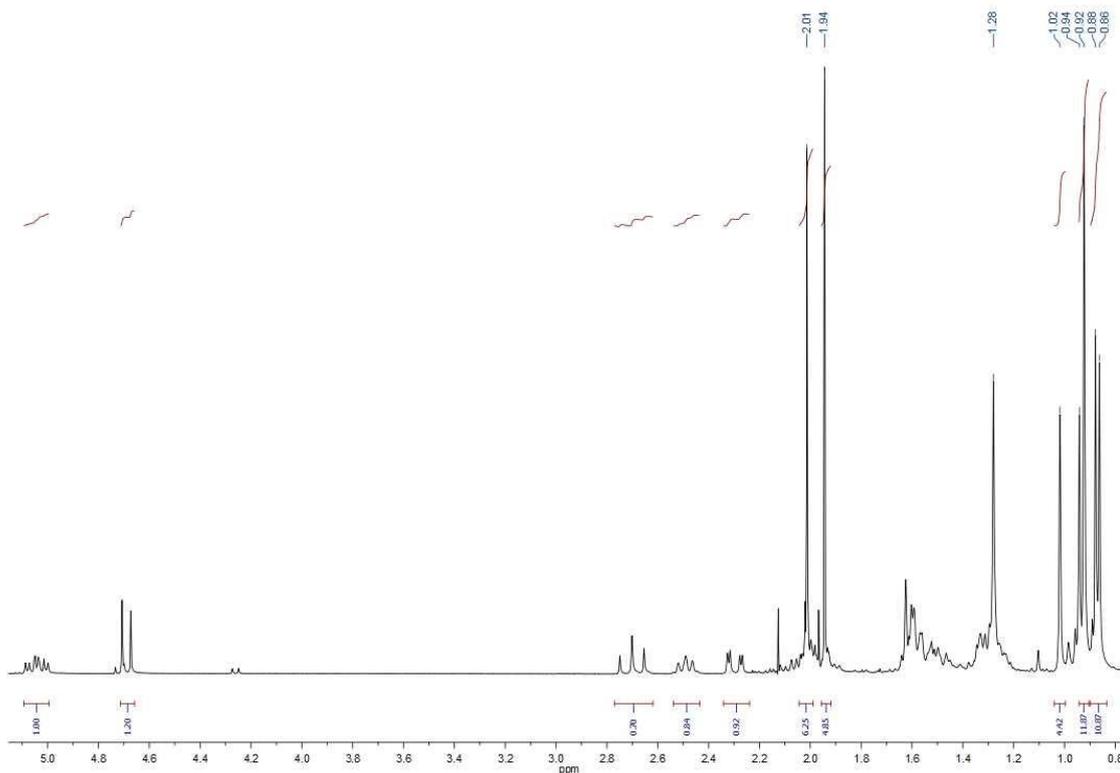
Espectro de ¹³C RMN del producto 43



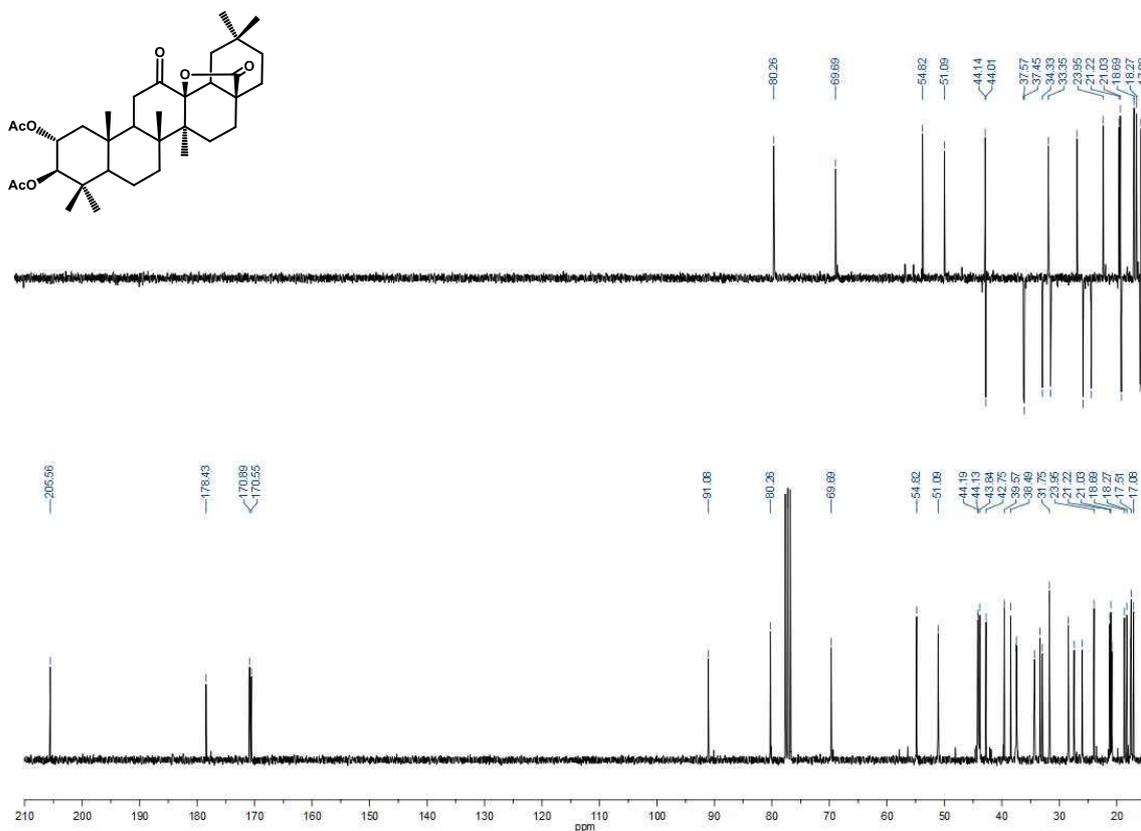
Espectro HSQC del producto 43



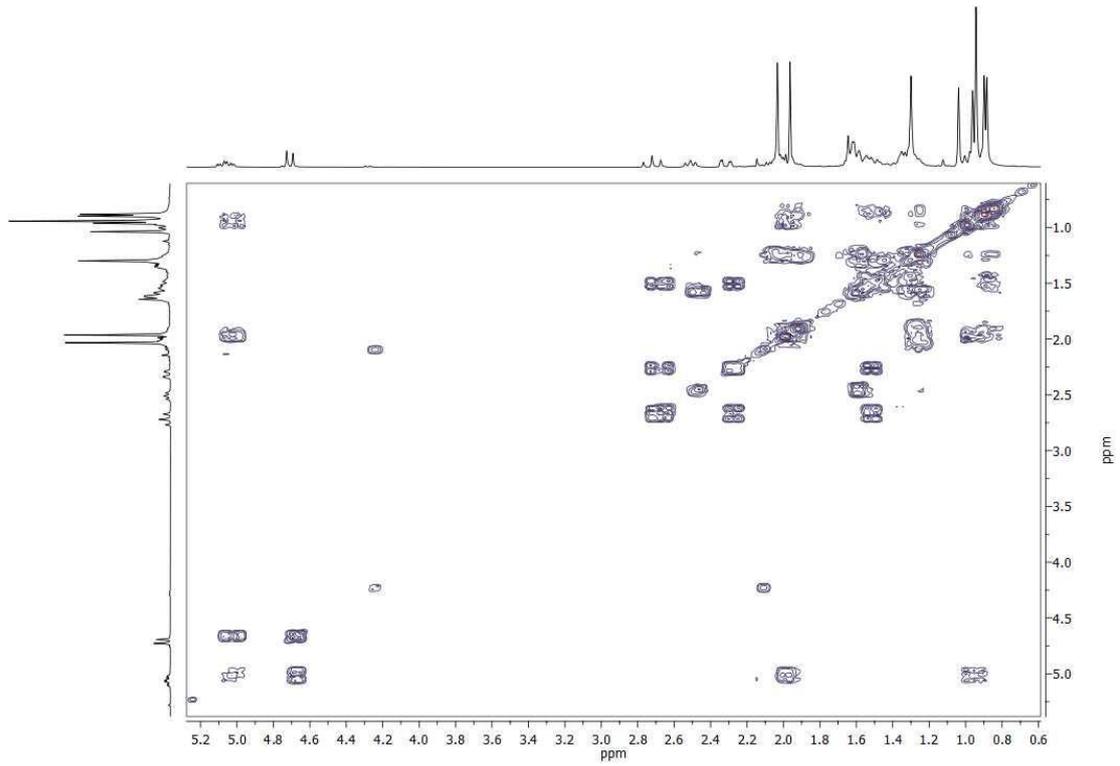
Espectro HMBC del producto 43



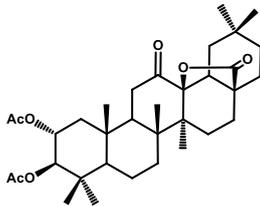
Espectro de ^1H RMN del producto 44

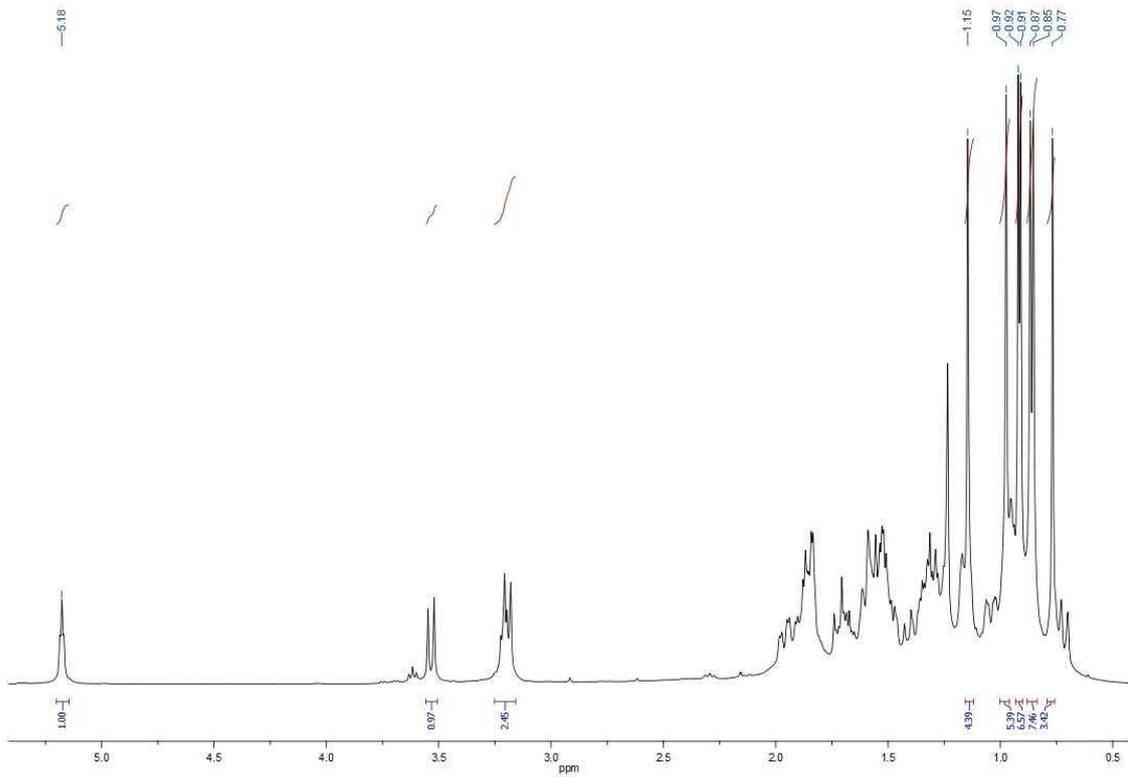


Espectro de ^{13}C RMN del producto 44

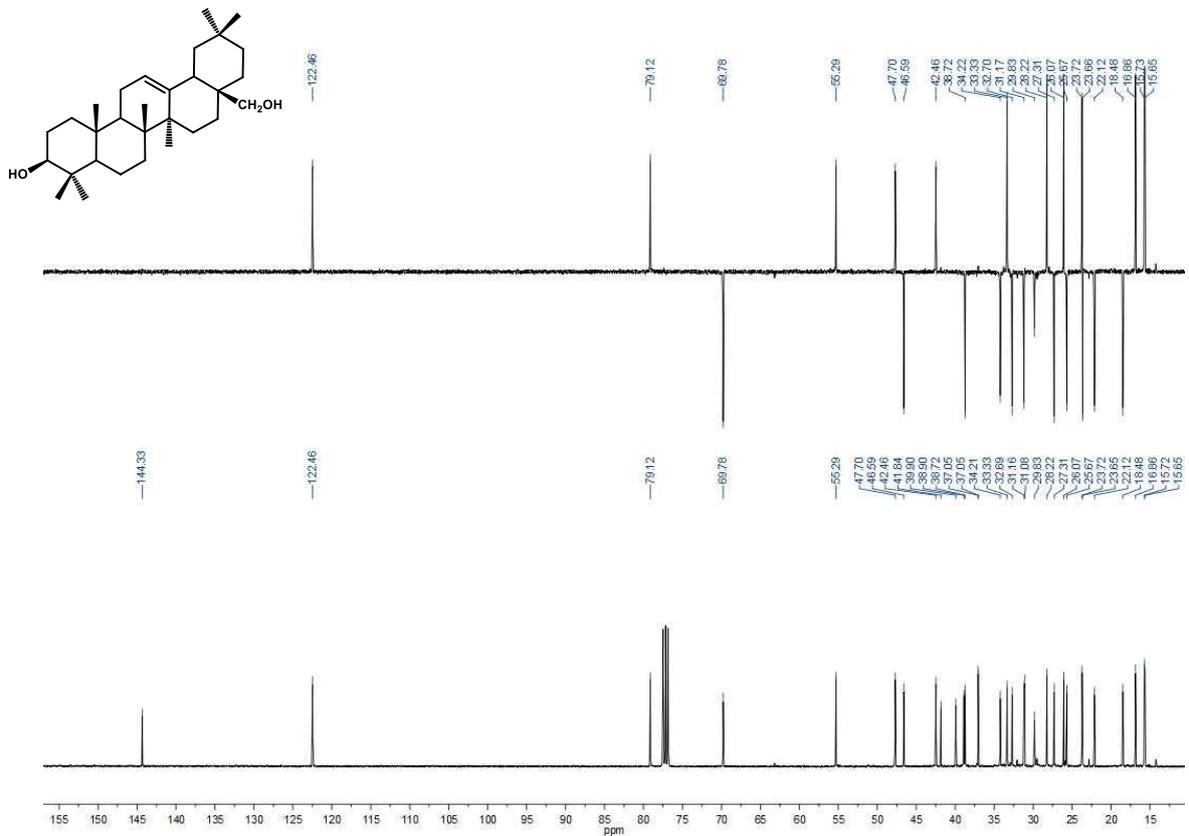


COSY del producto 45

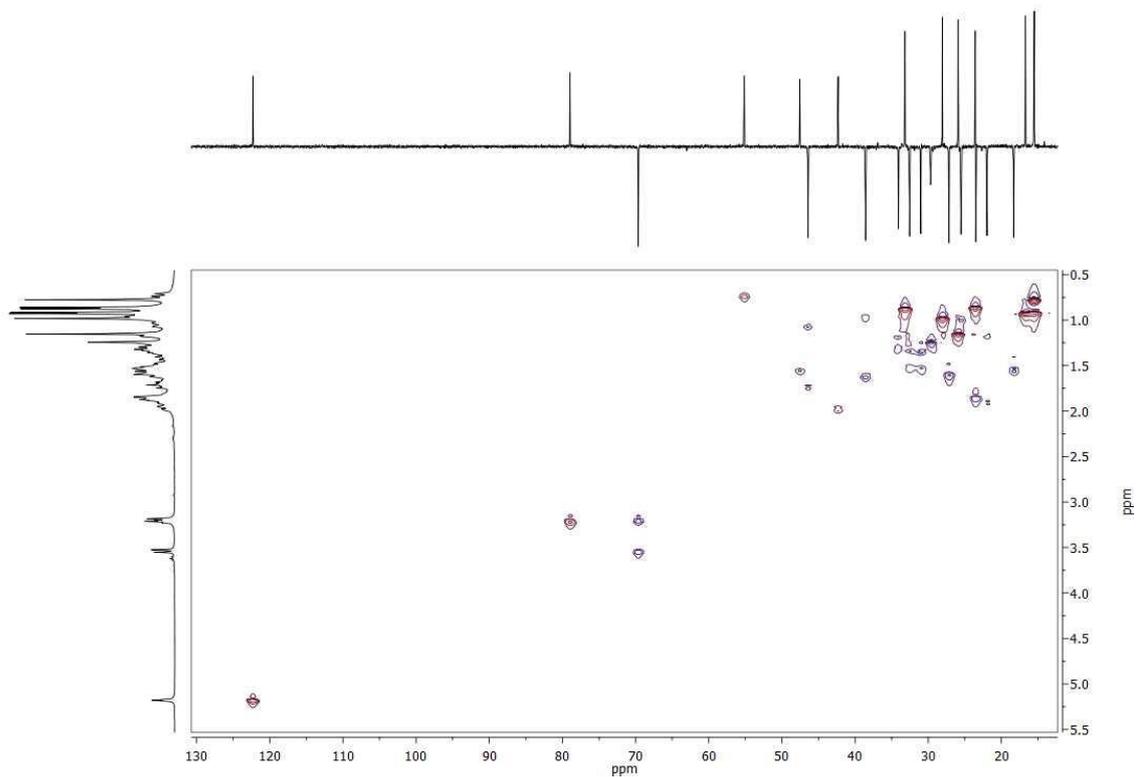




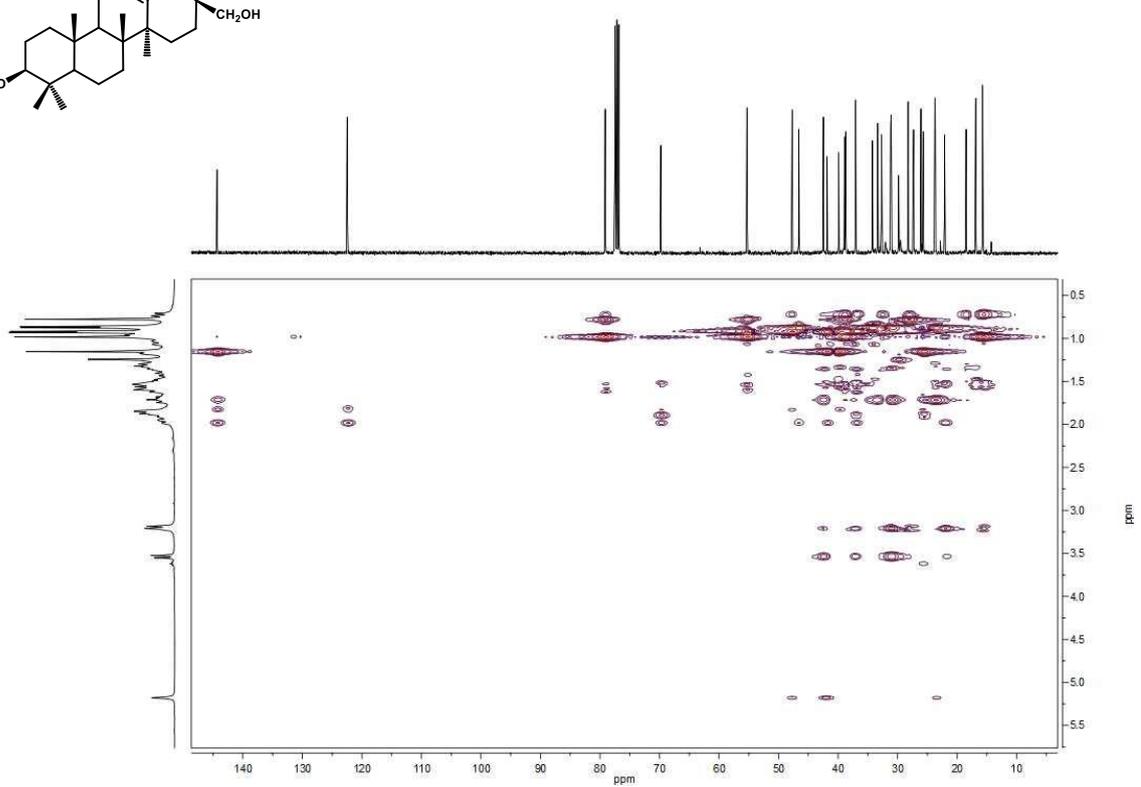
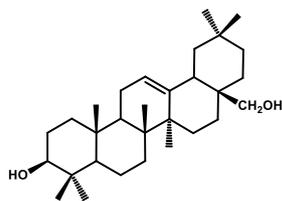
Espectro de ¹H RMN del producto 45



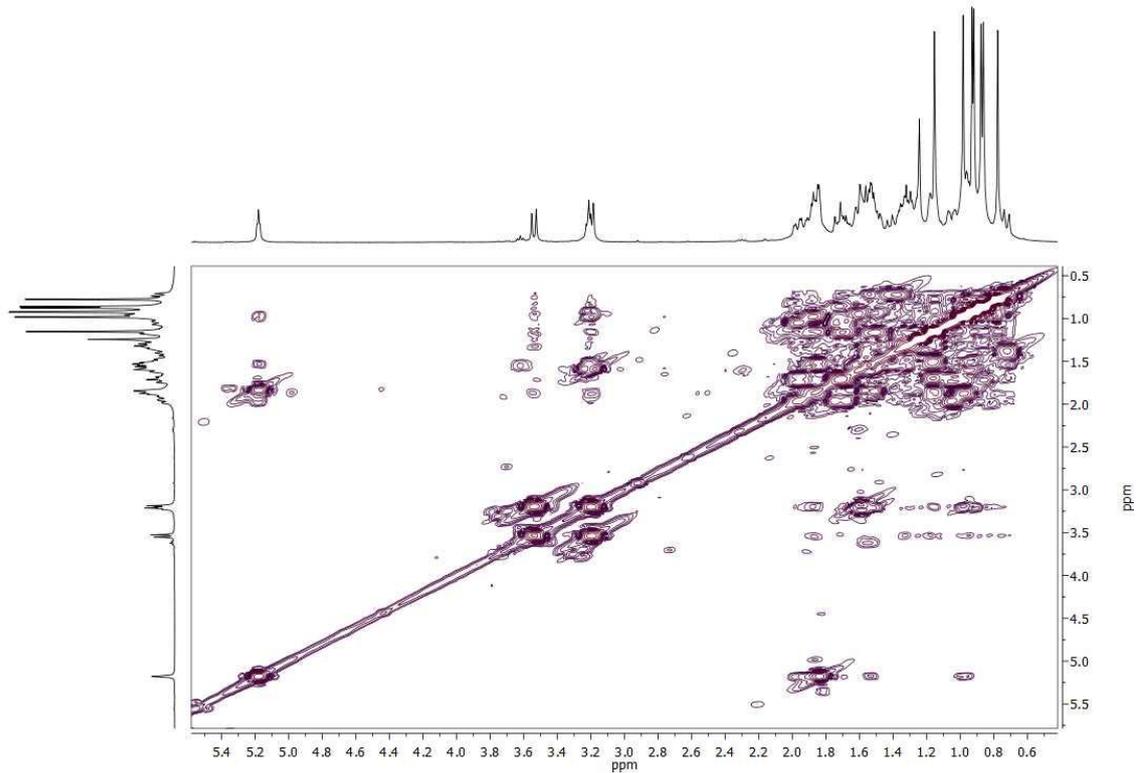
Espectro de ¹³C RMN del producto 45



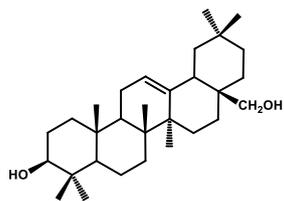
Espectro HMQC del producto 45

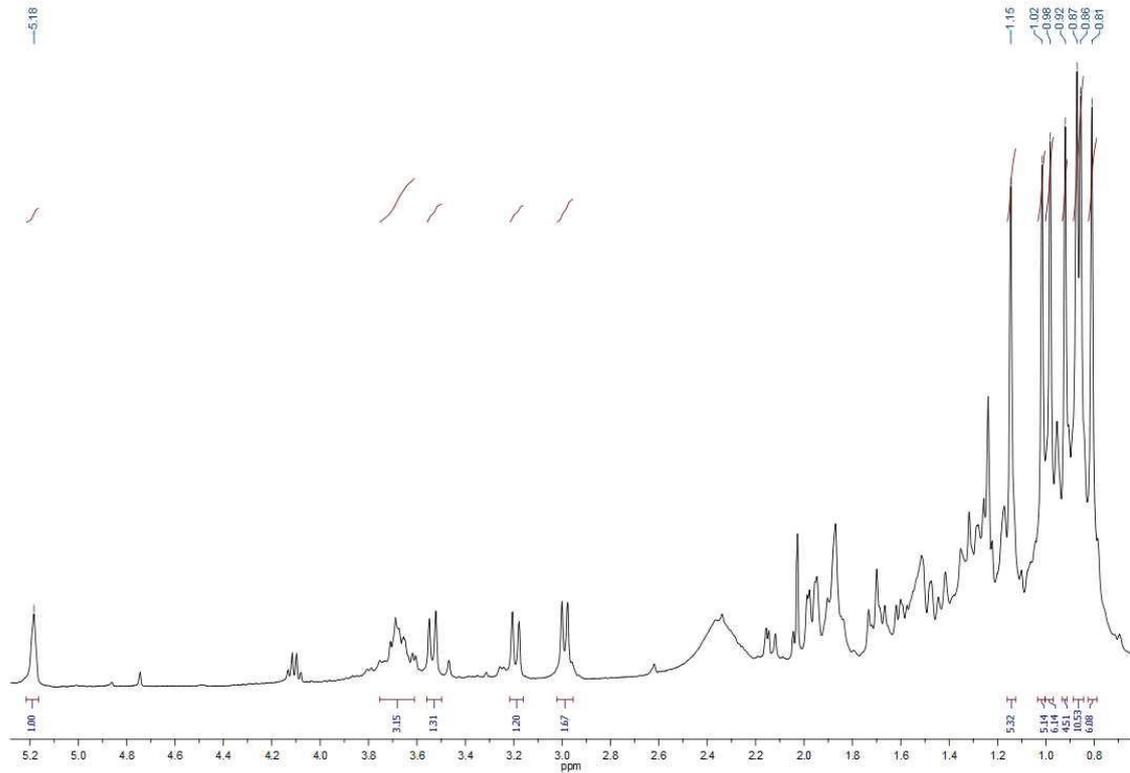


Espectro HMBC del producto 45

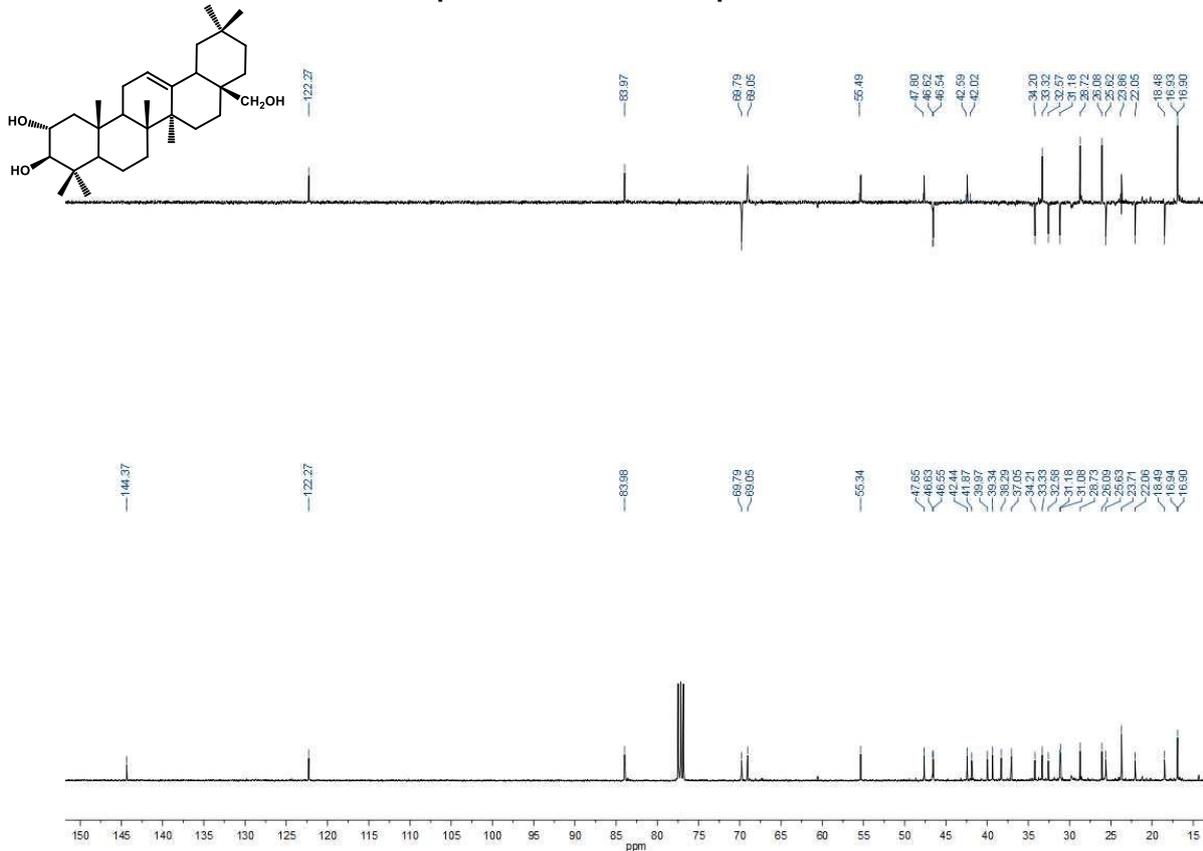


COSY del producto 45

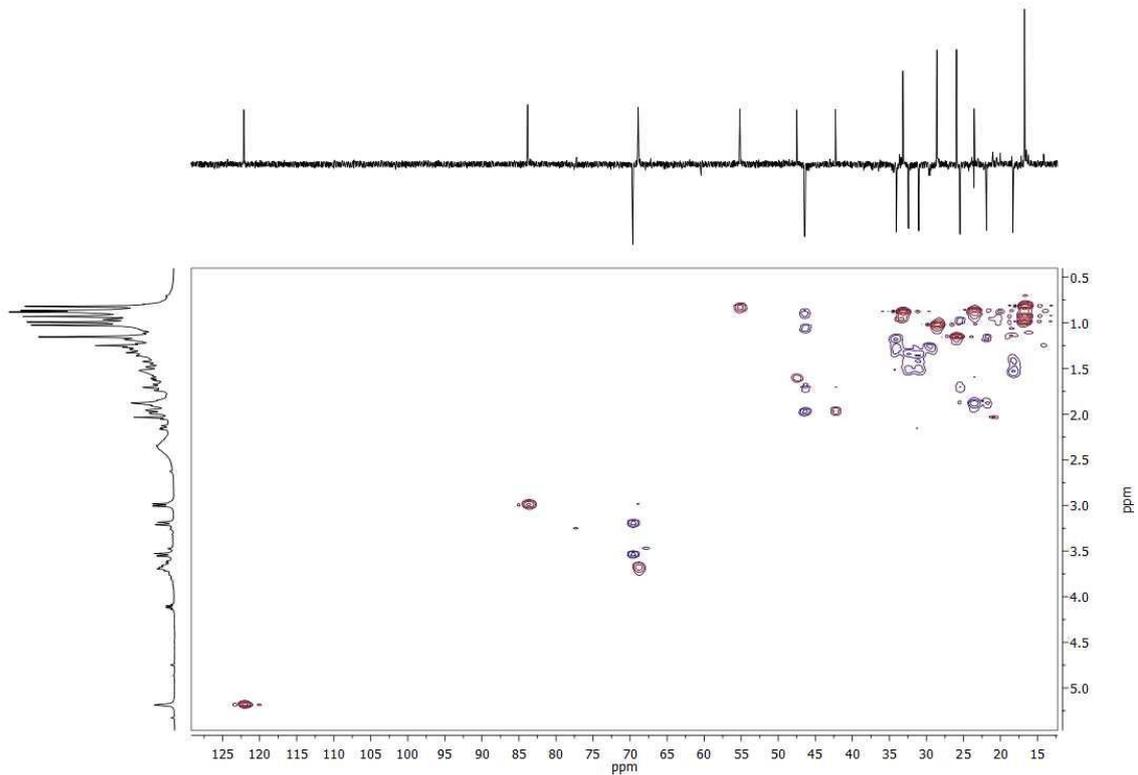




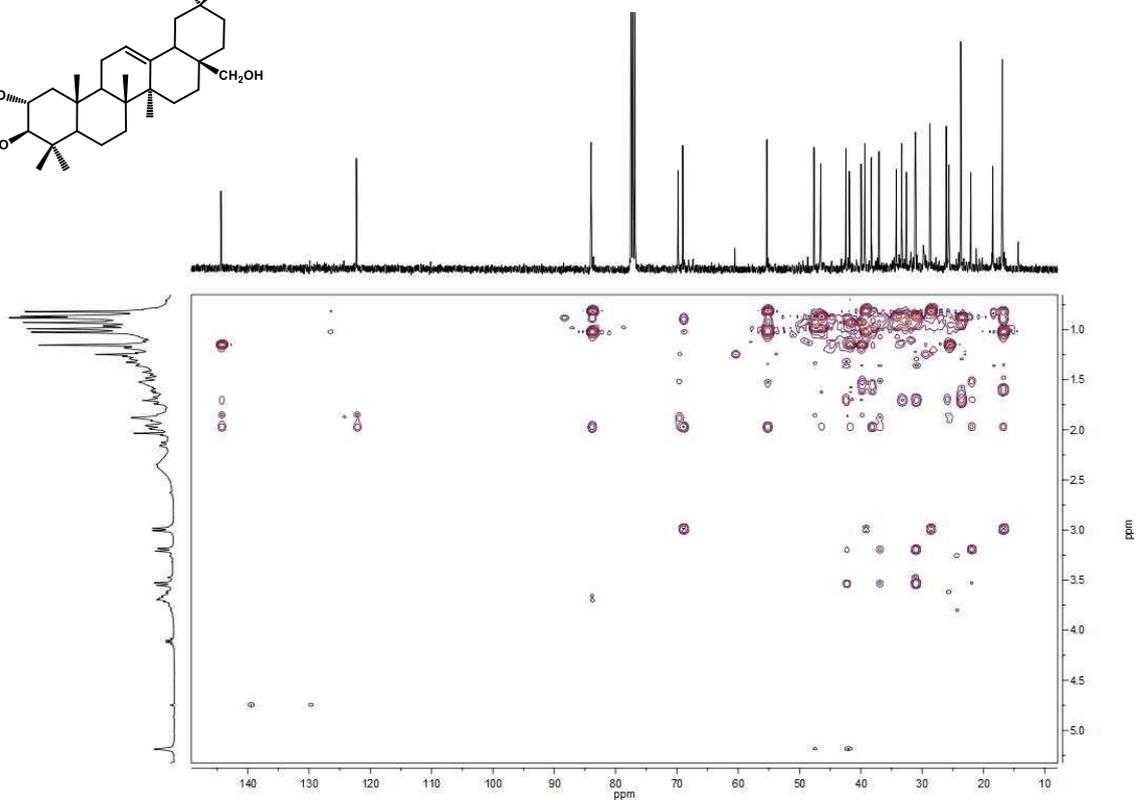
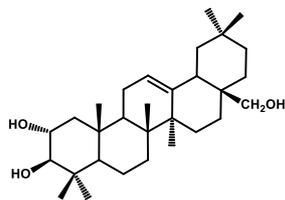
Espectro de ^1H RMN del producto 46



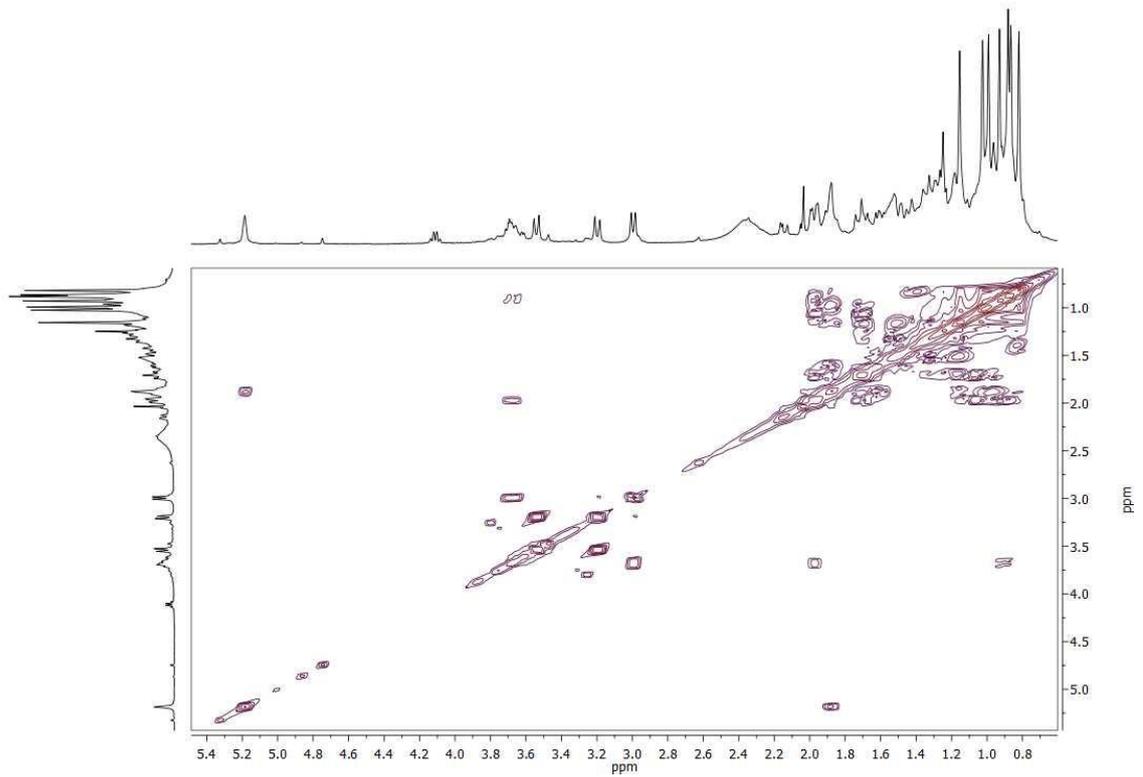
Espectro de ^{13}C RMN del producto 46



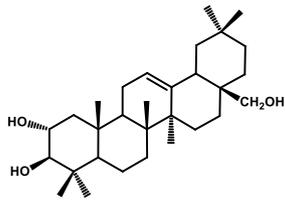
Espectro HSQC del producto 46

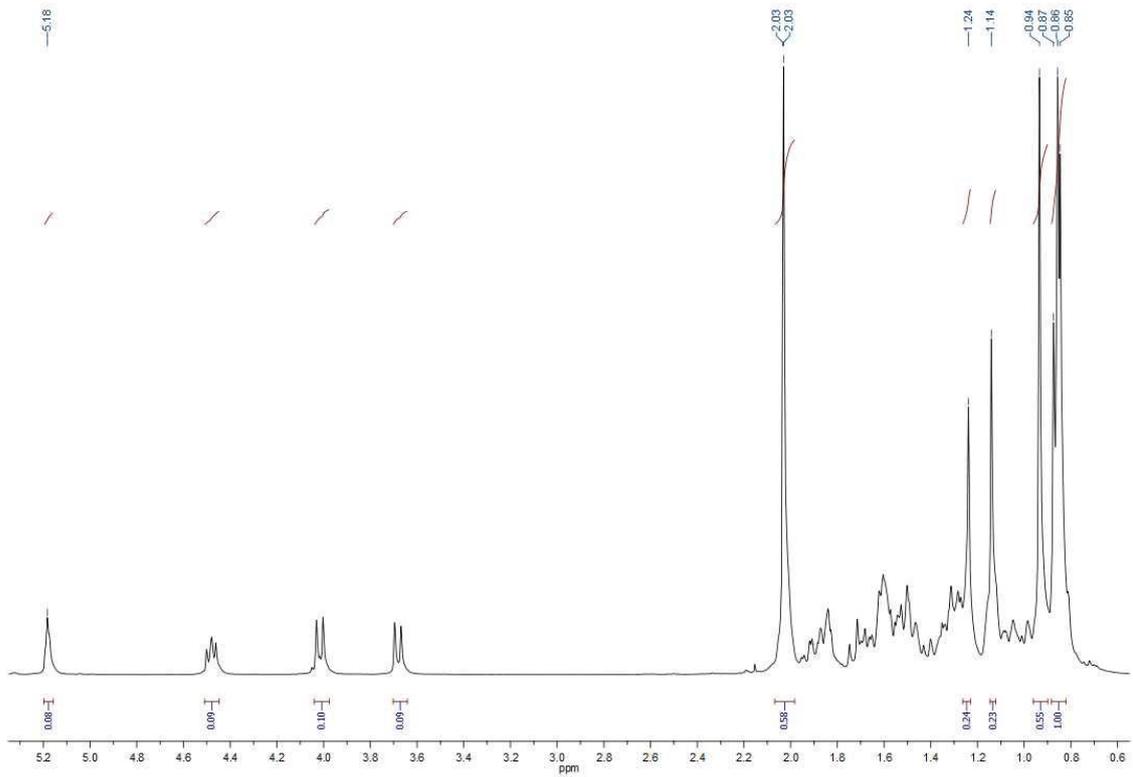


Espectro HMBC del producto 46

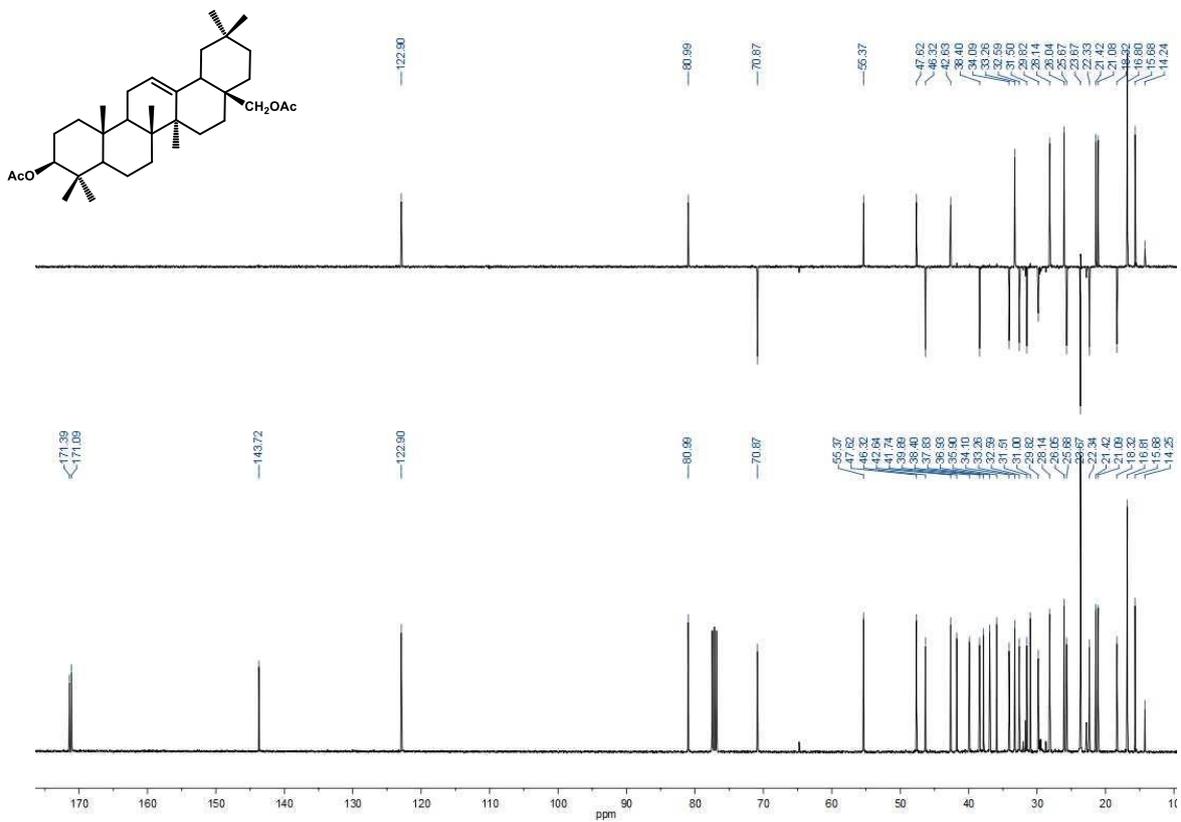


COSY del producto 46

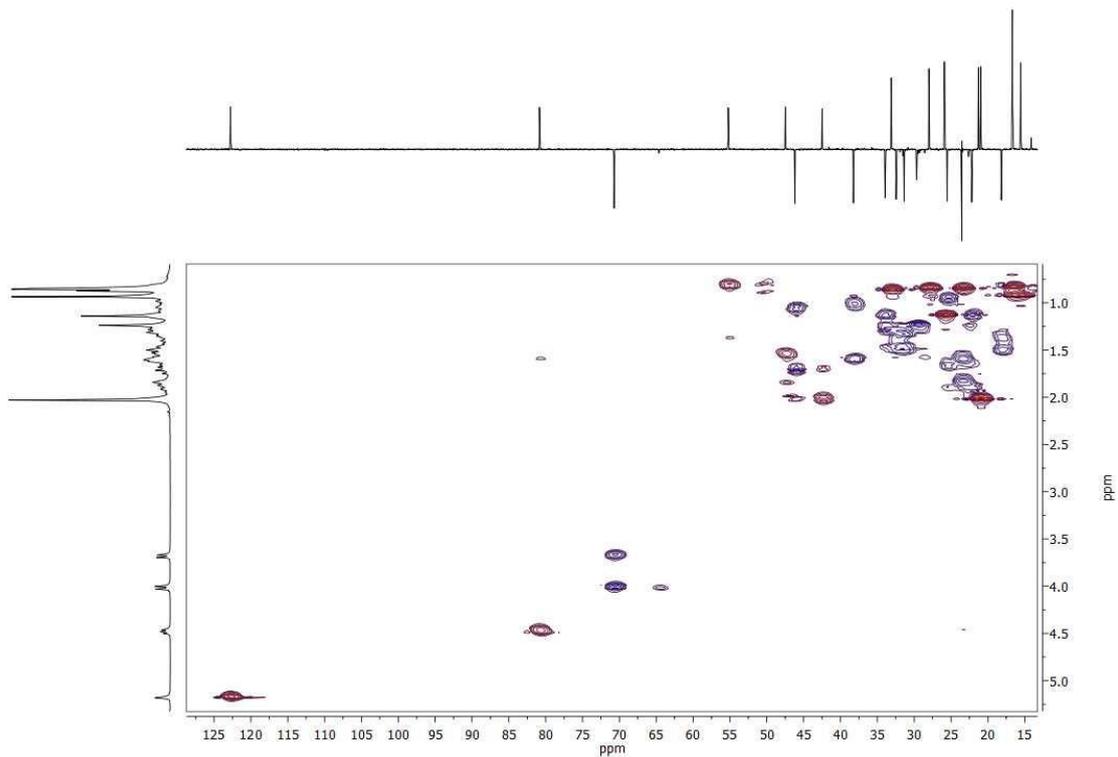




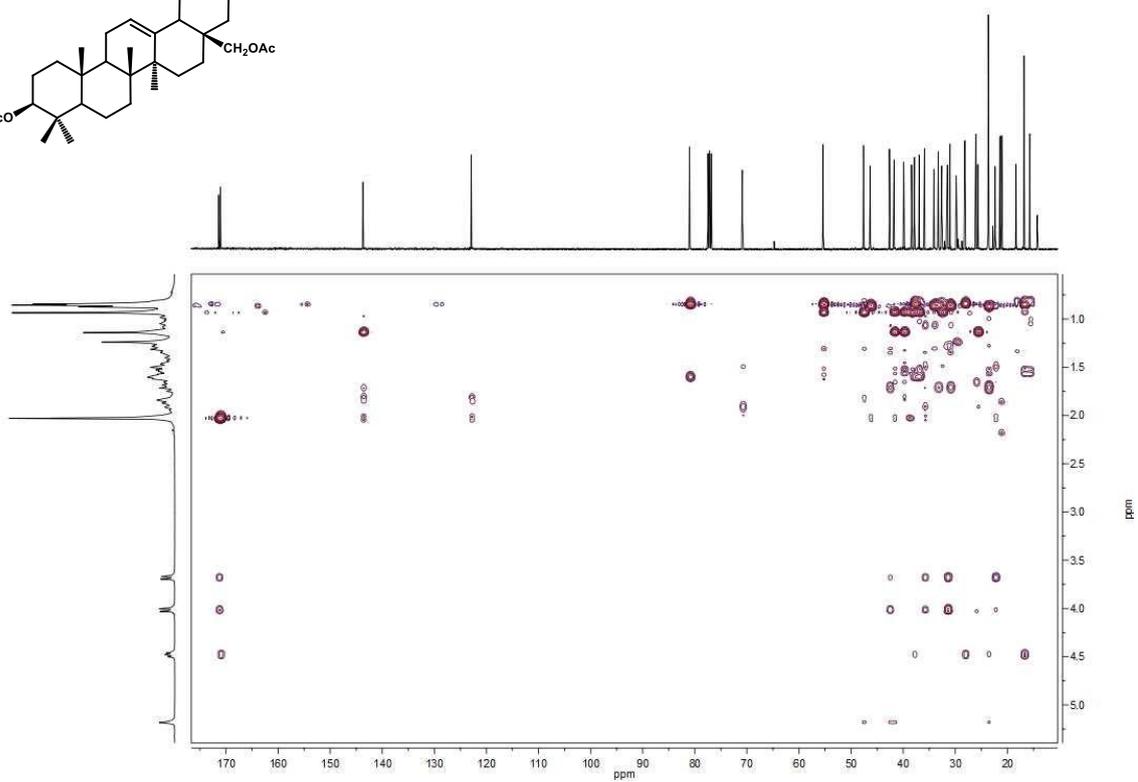
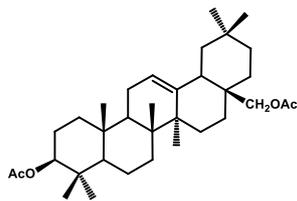
Espectro de ¹H RMN del producto 47



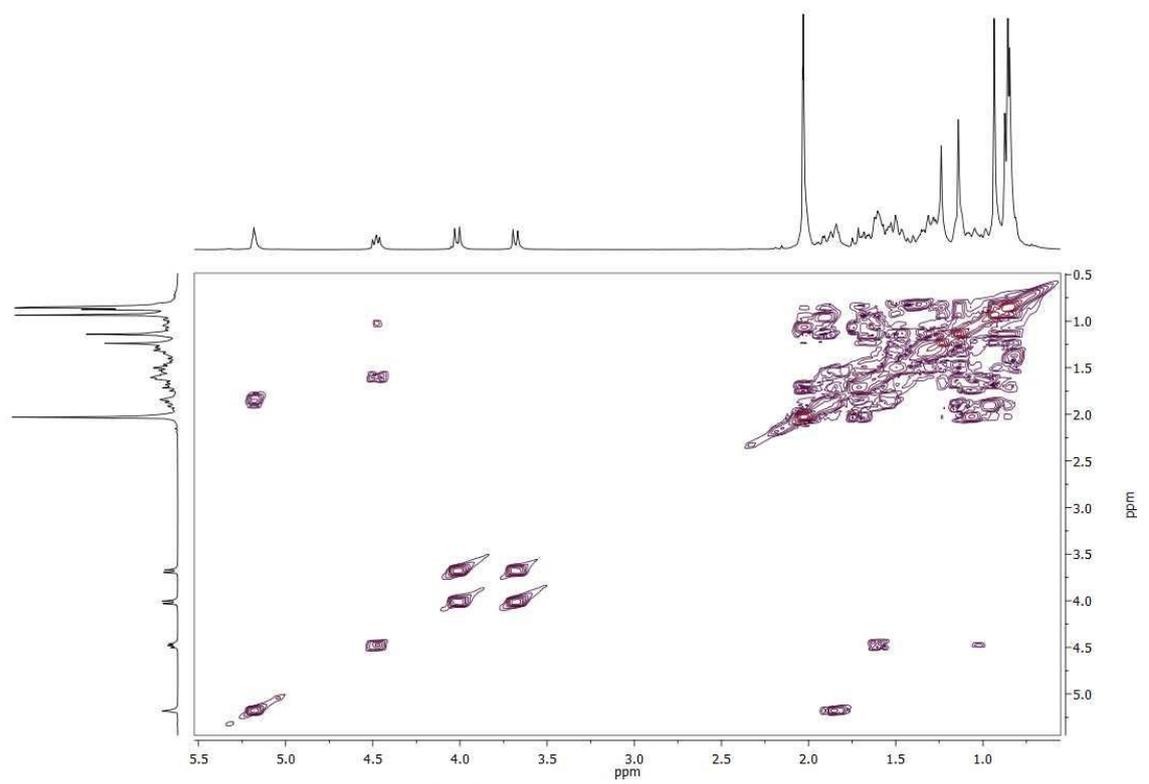
Espectro de ¹³C RMN del producto 47



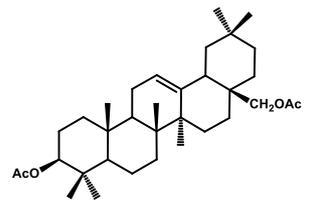
Espectro HSQC del producto 47

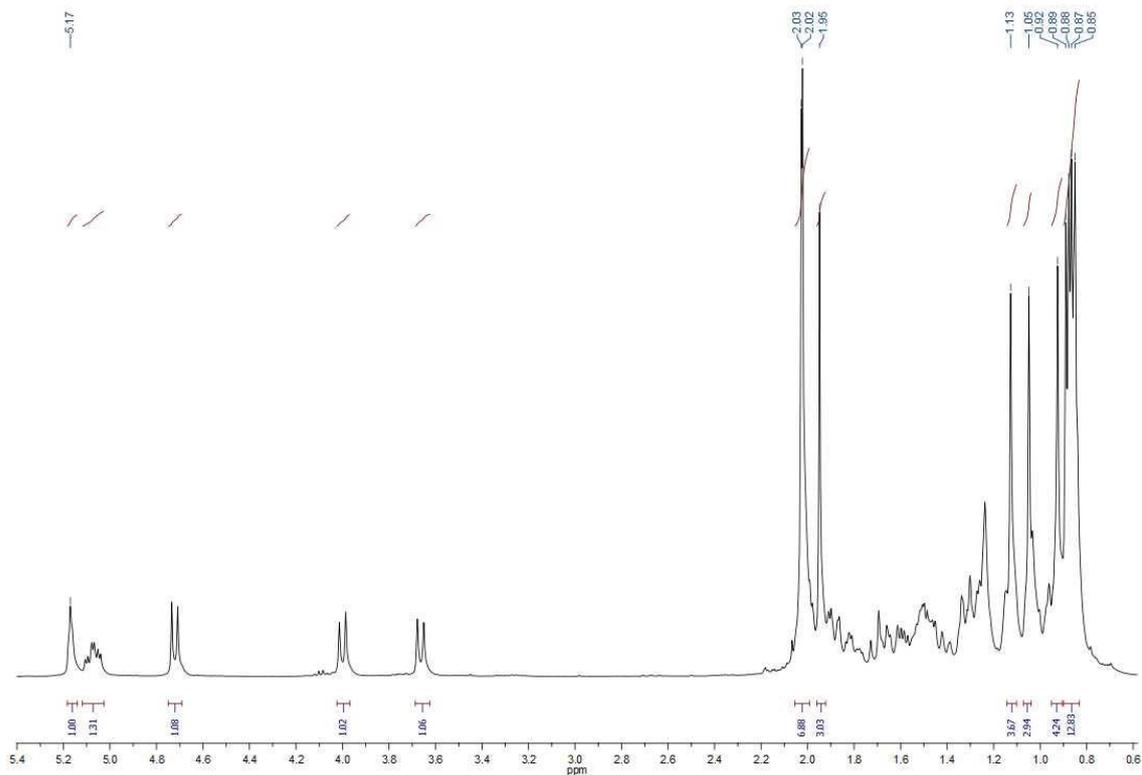


Espectro HMBC del producto 47

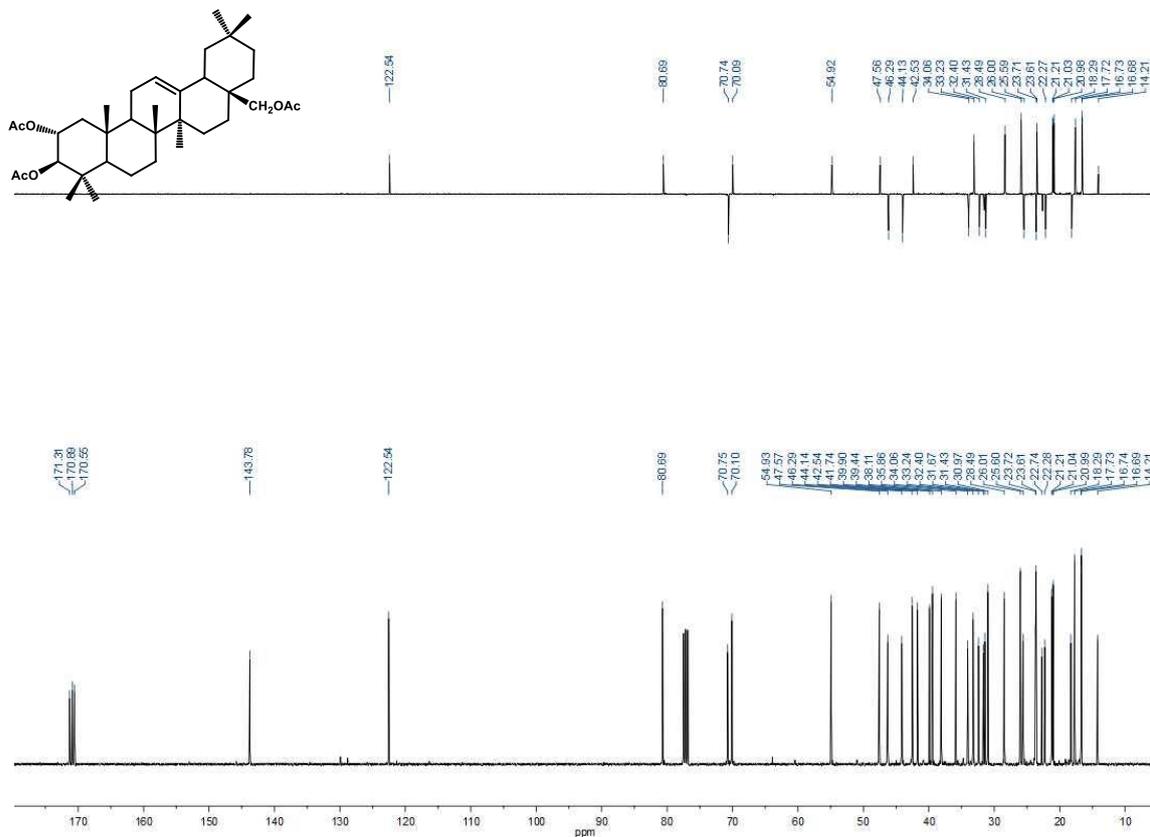


COSY del producto 47

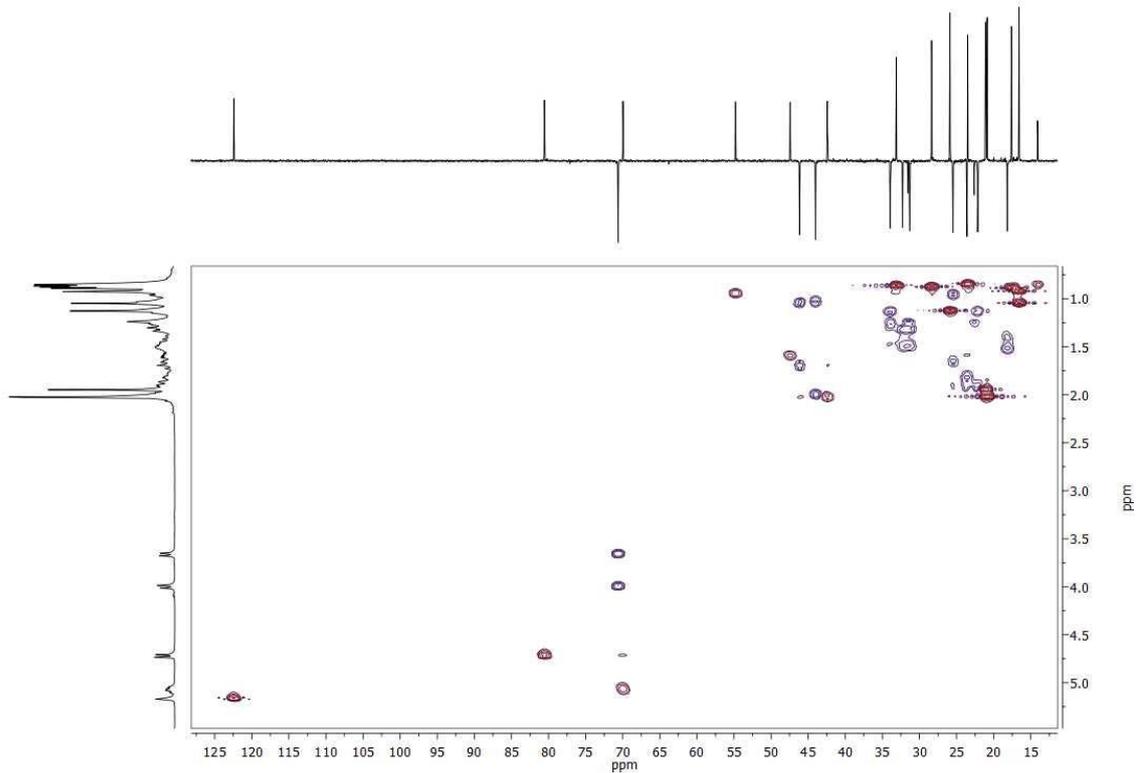




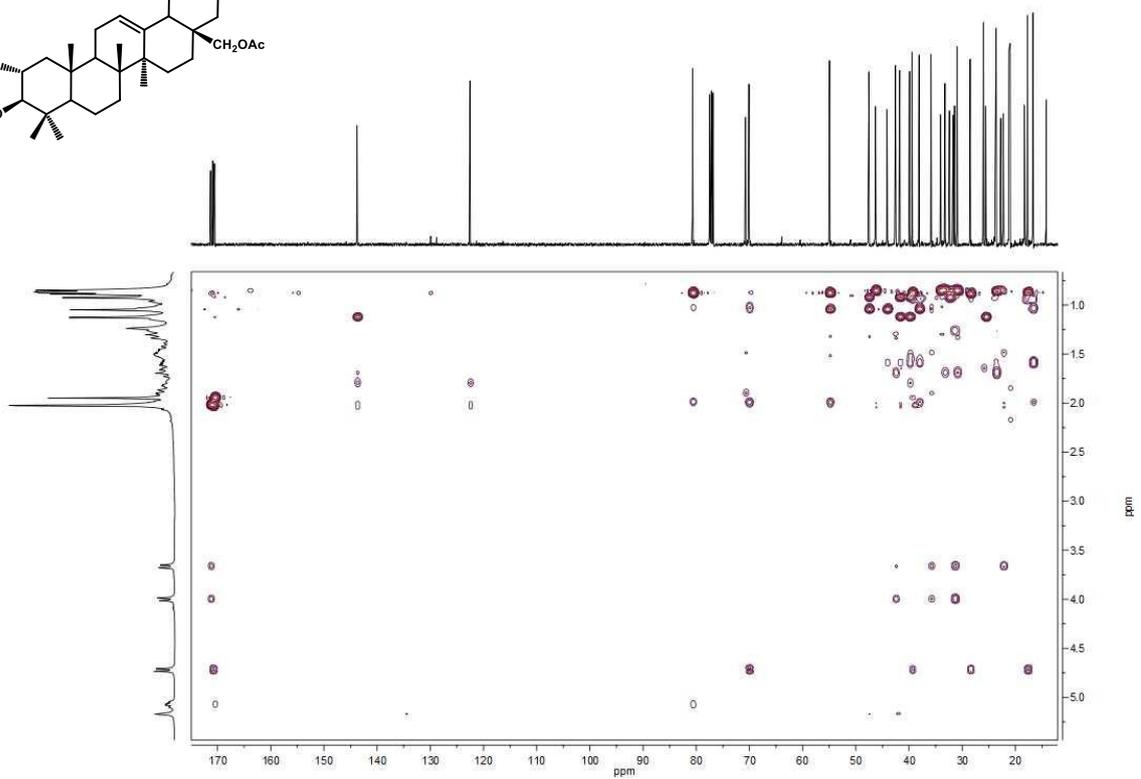
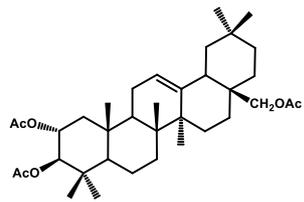
Espectro de ^1H RMN del producto 48



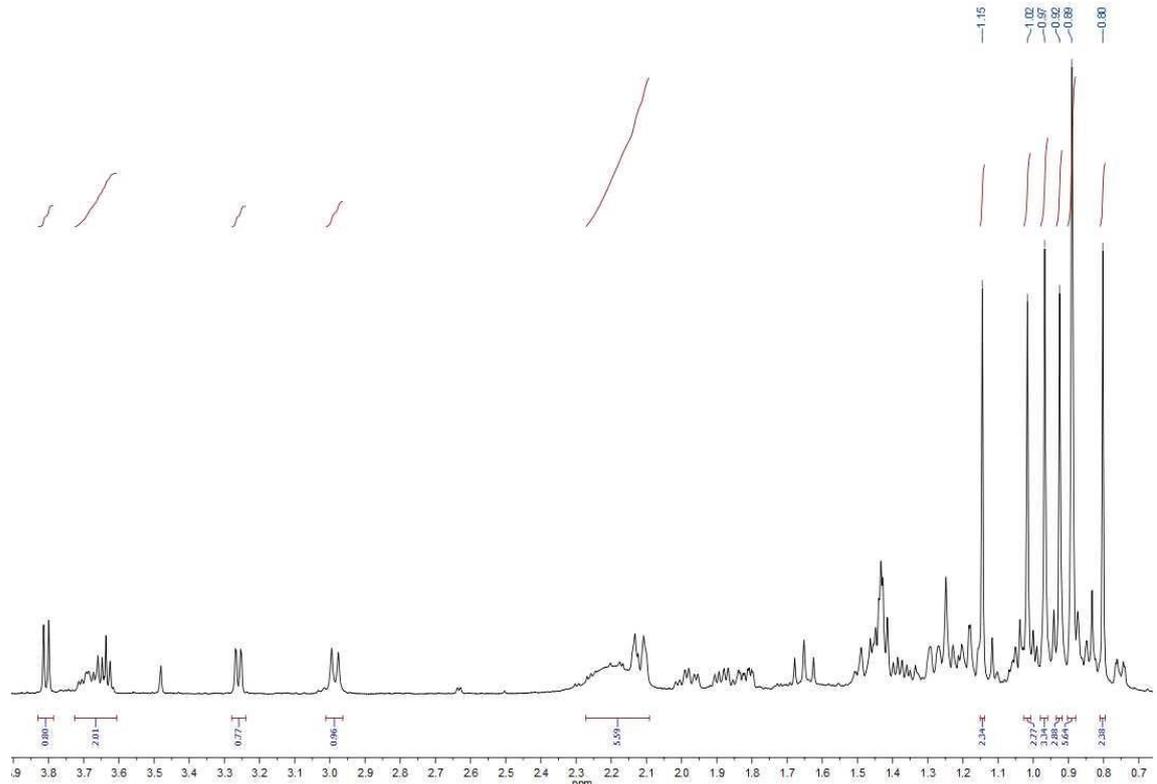
Espectro de ^{13}C RMN del producto 48



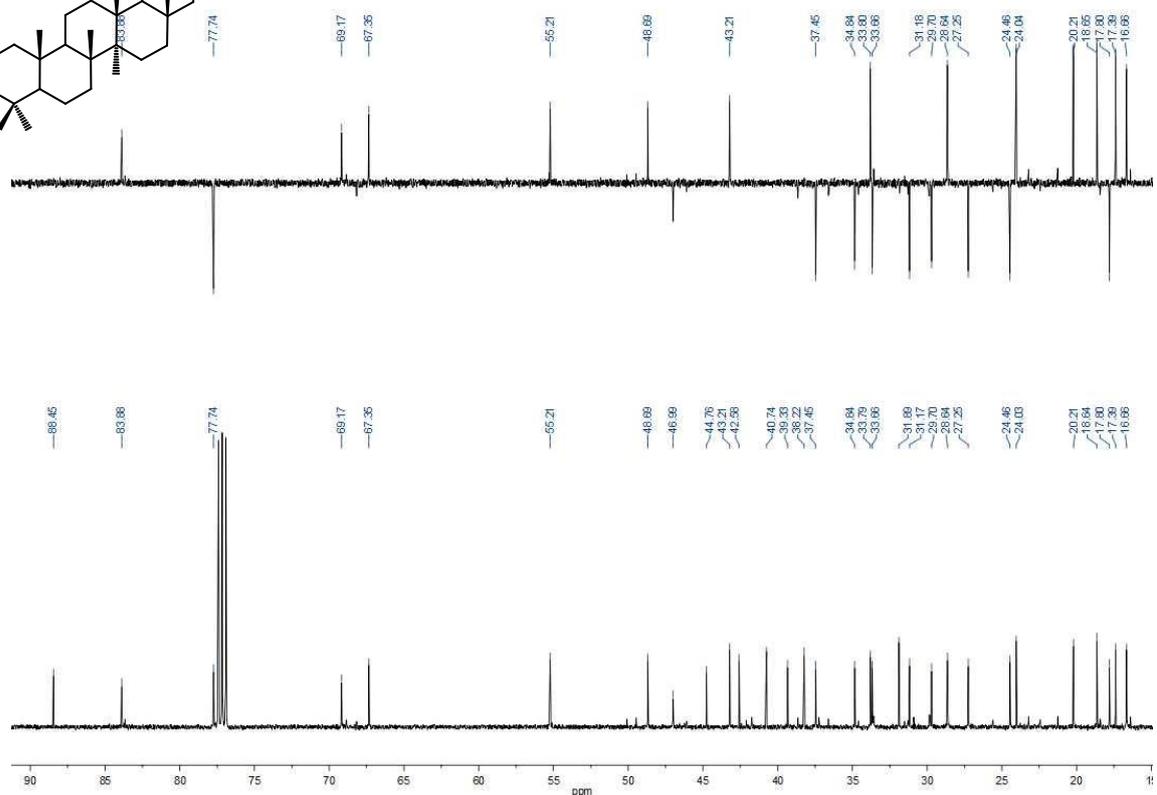
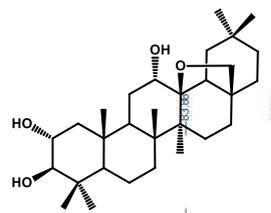
Espectro HSQC del producto 48



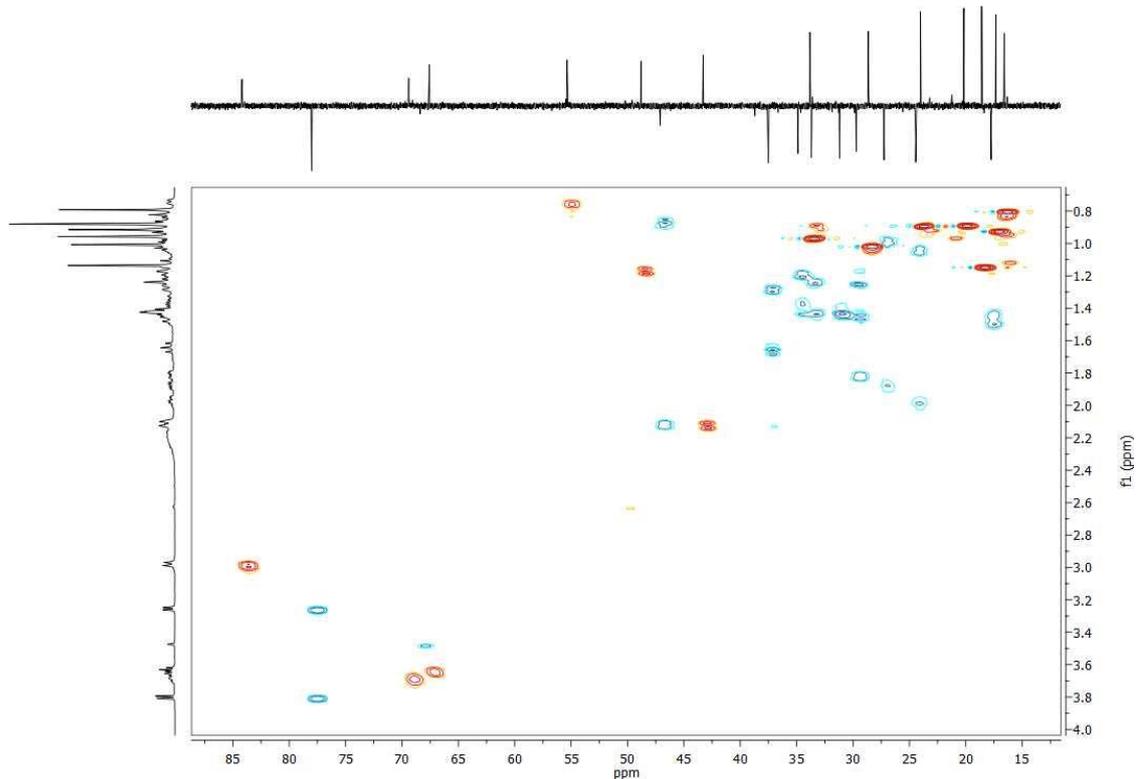
Espectro HMBC del producto 48



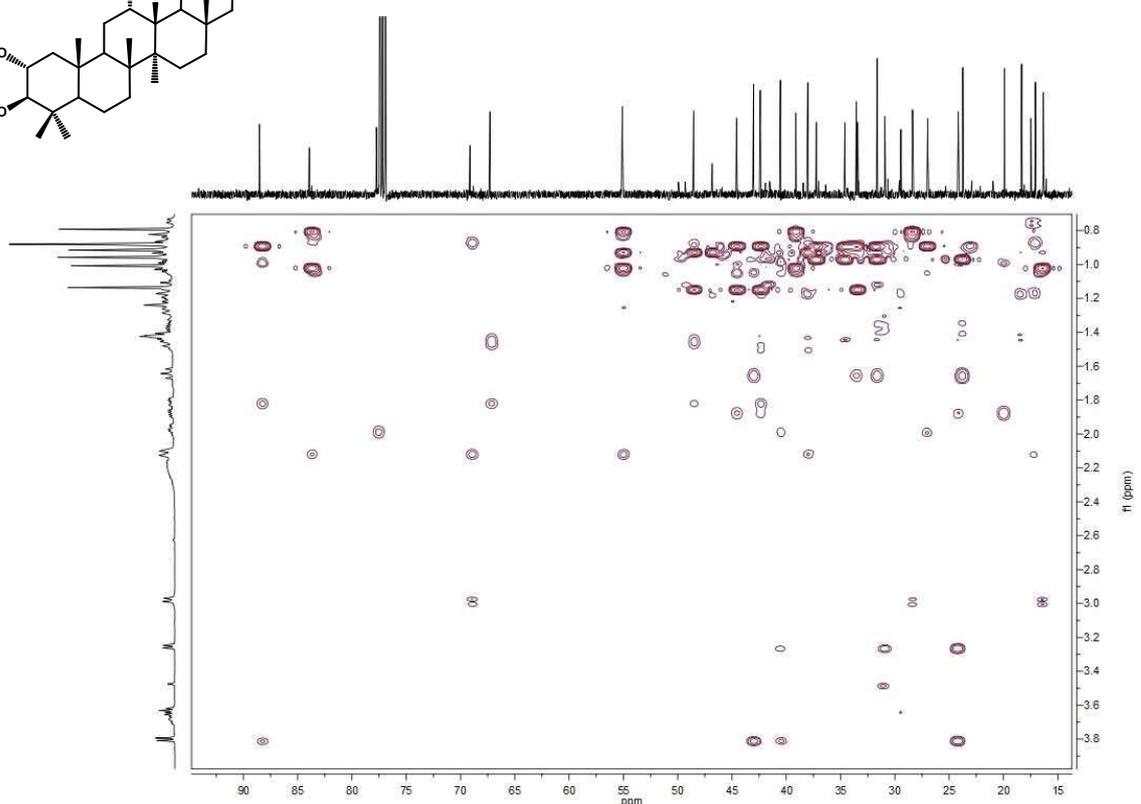
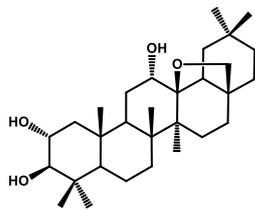
Espectro de ¹H RMN del producto 49



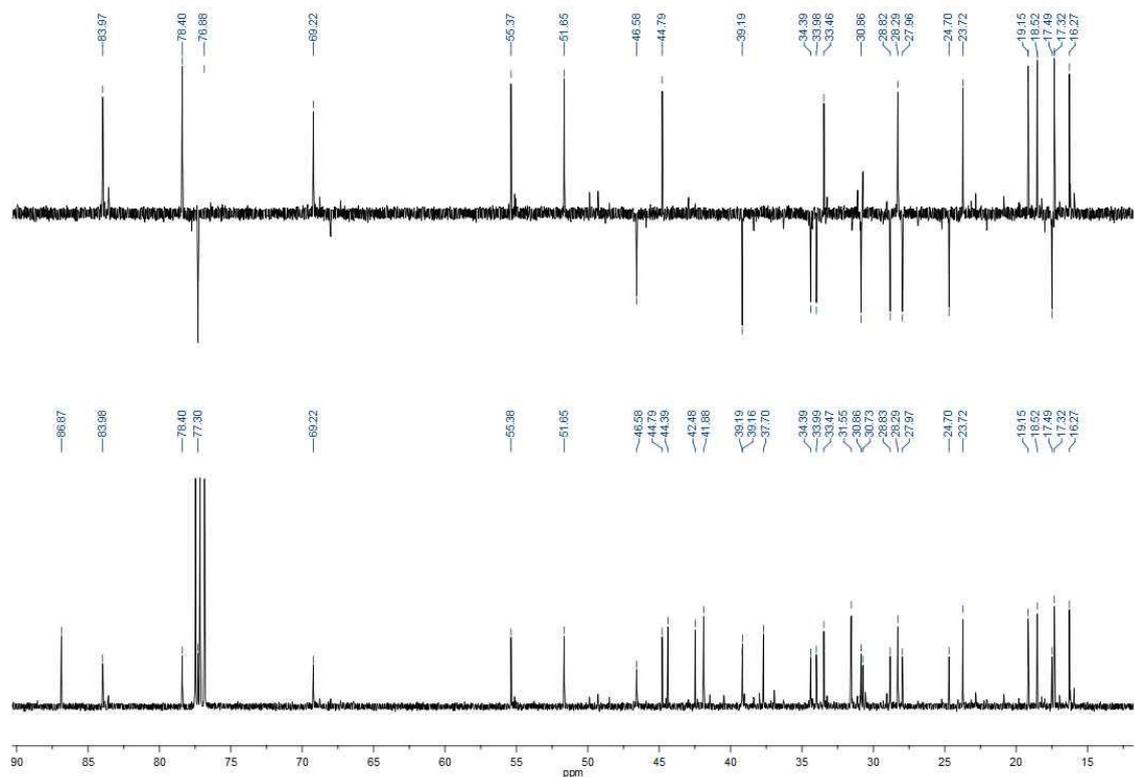
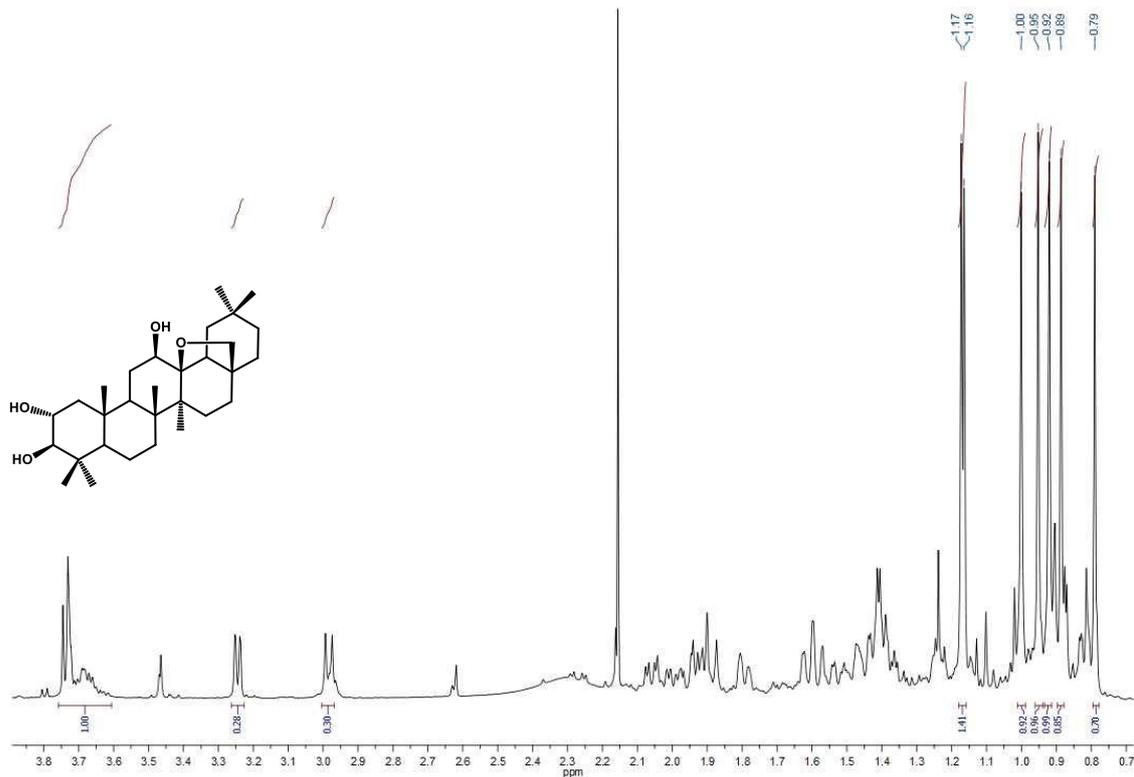
Espectro de ¹³C RMN del producto 49

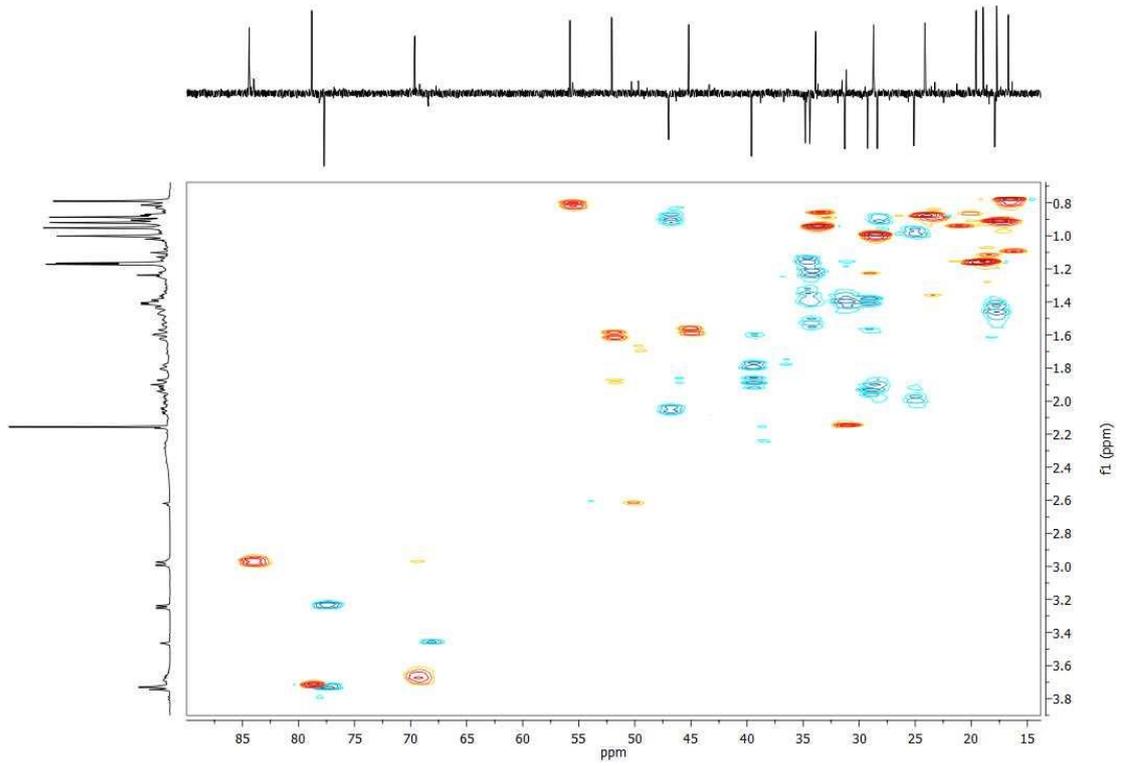


Espectro HSQC del producto 49

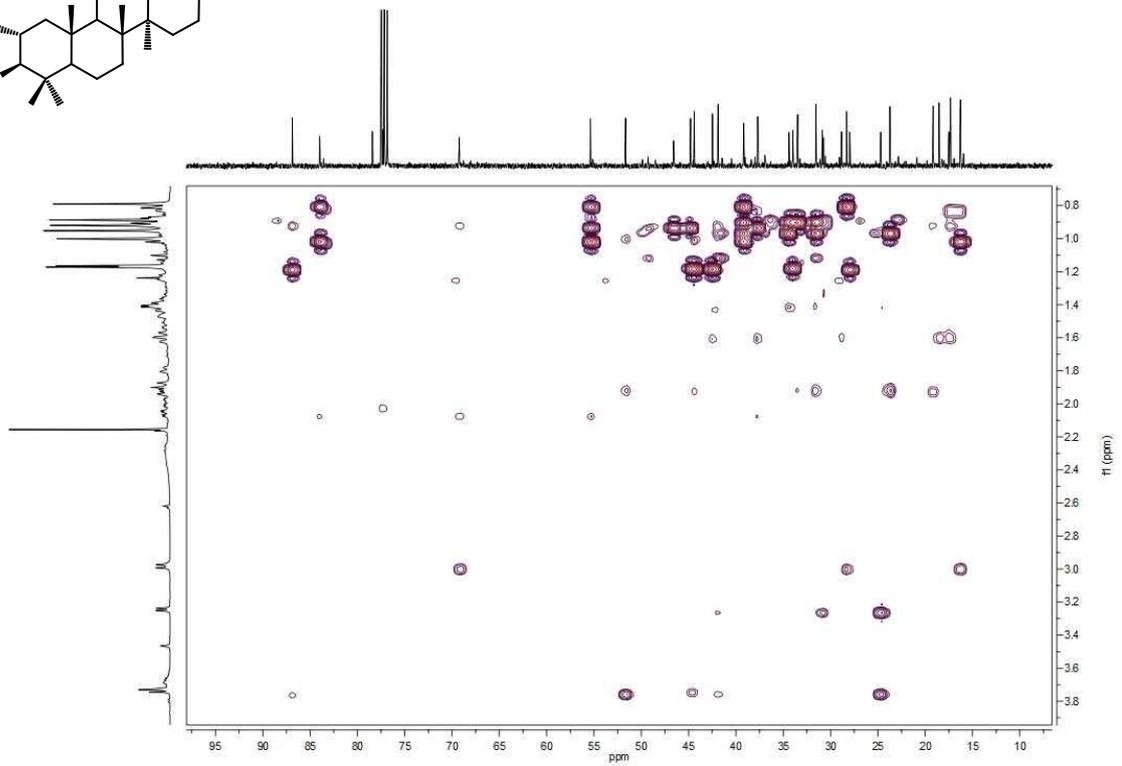
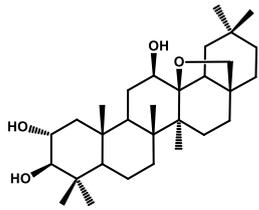


Espectro HMBC del producto 49

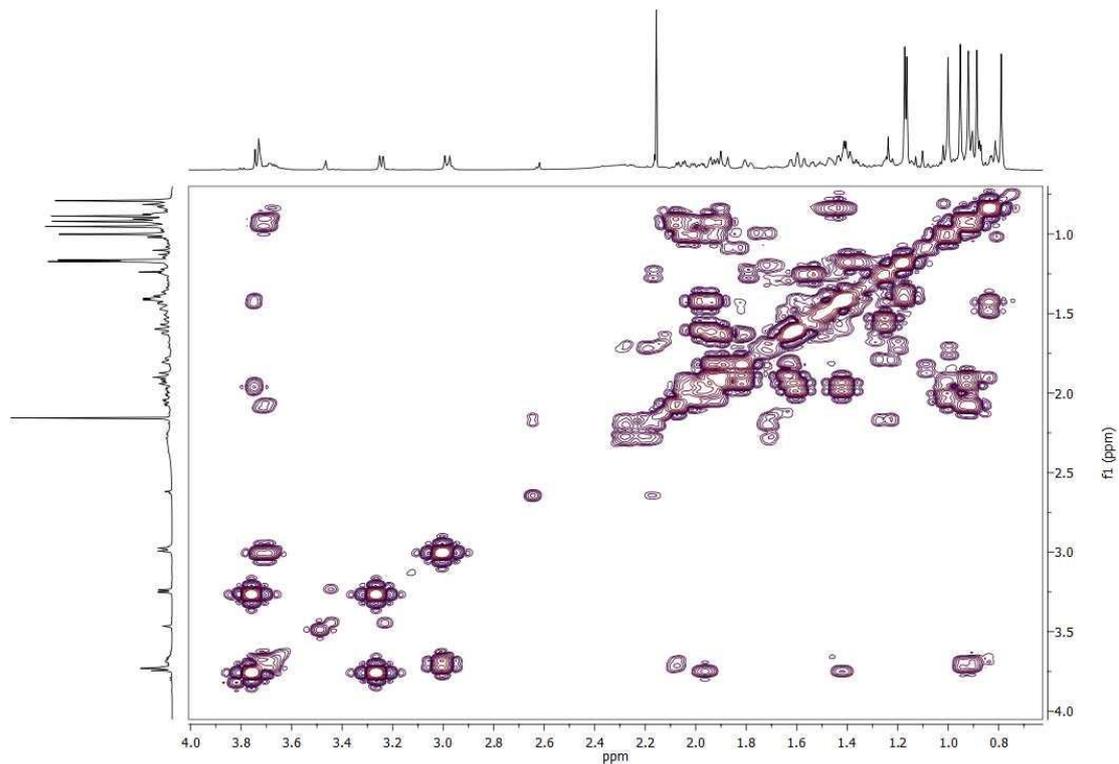




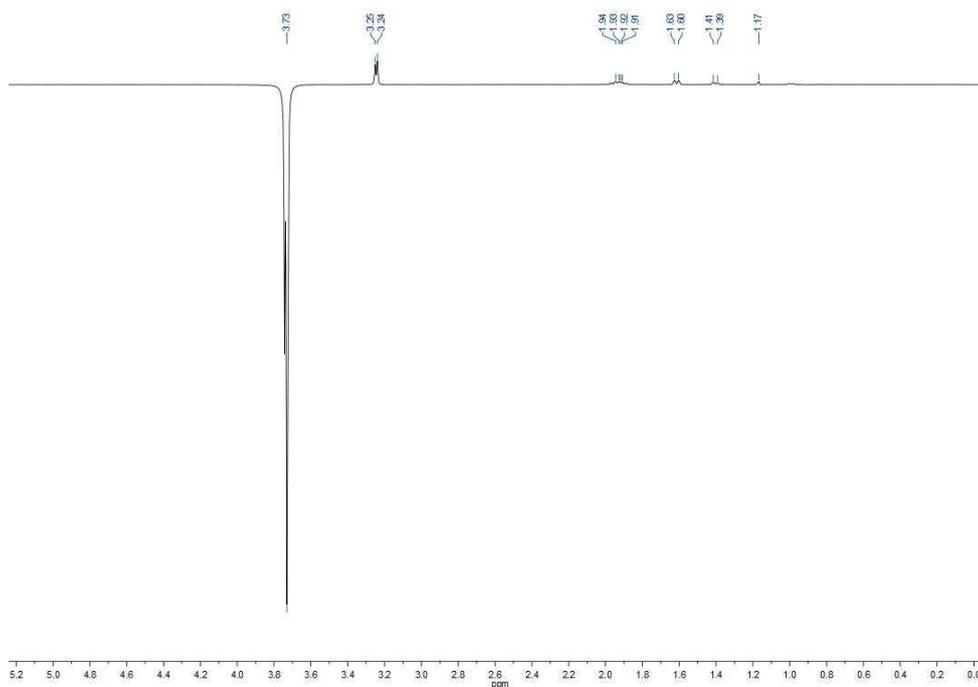
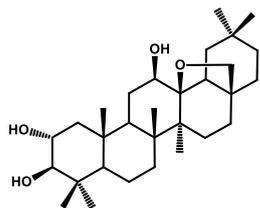
Espectro HSQC del producto 50



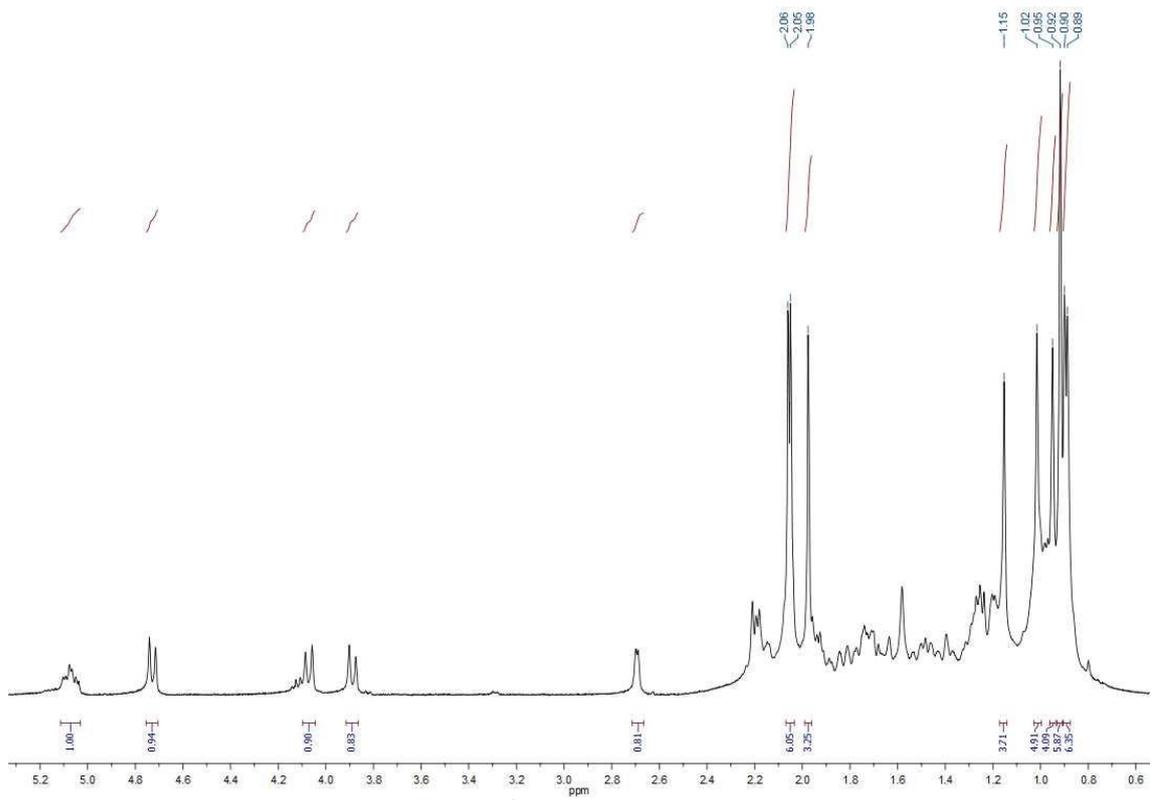
Espectro HMBC del producto 50



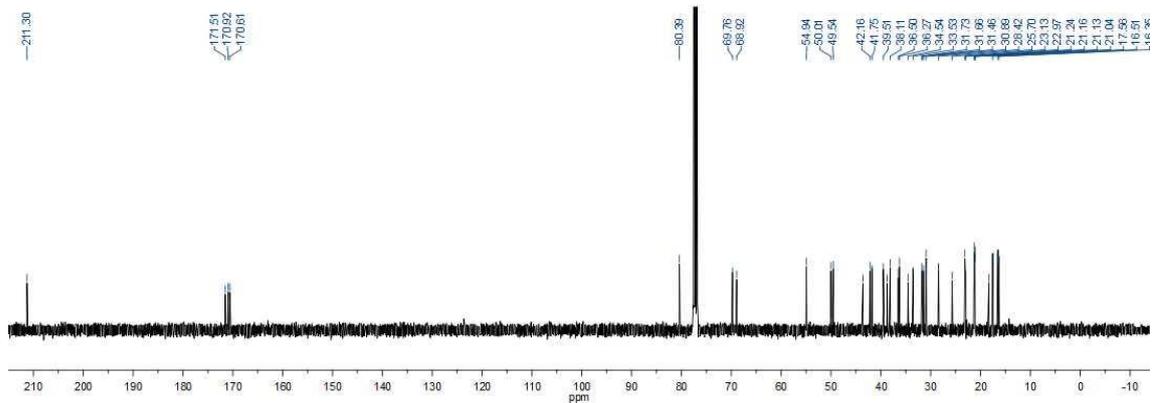
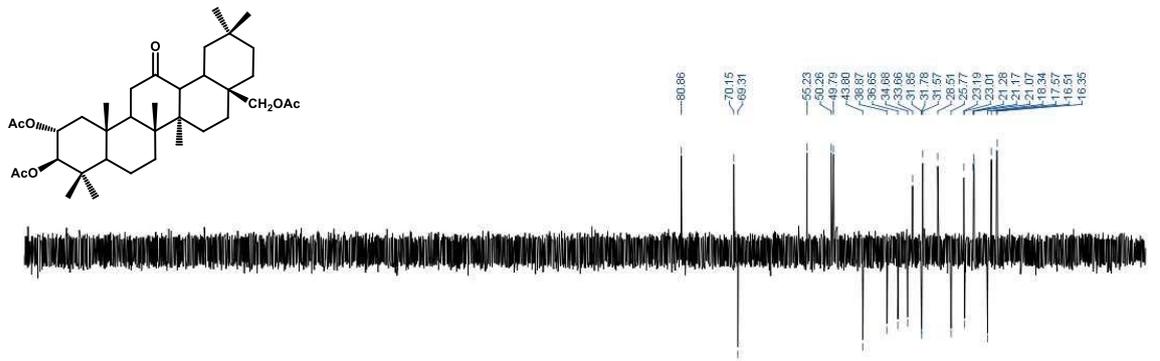
COSY del producto 50



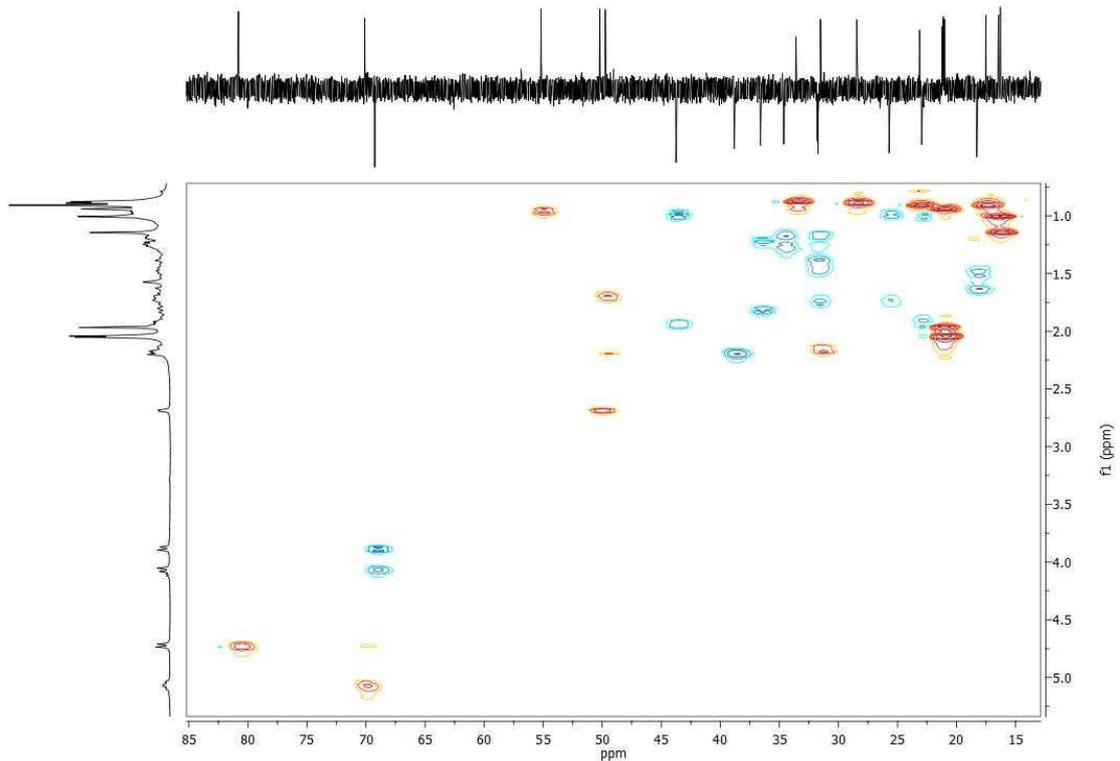
1d-NOESY del producto 50 a 3.73 ppm



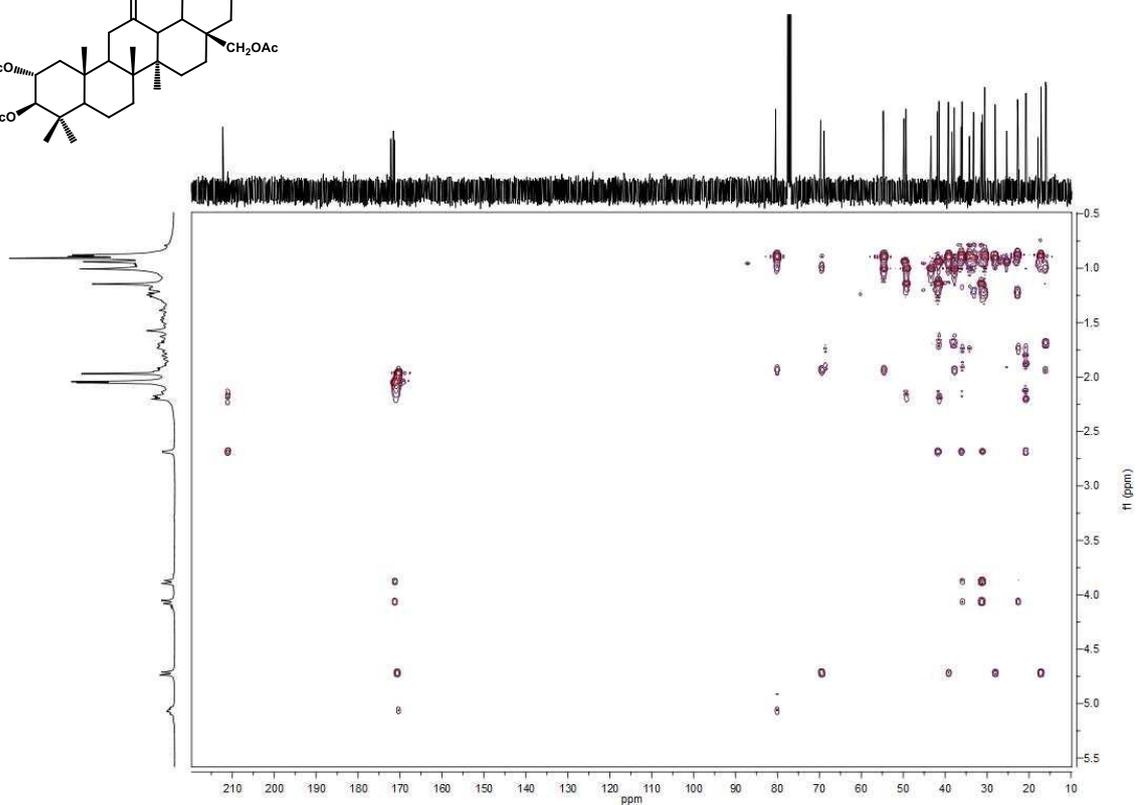
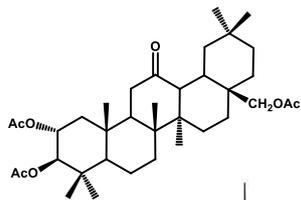
Espectro de ¹H RMN del producto 51



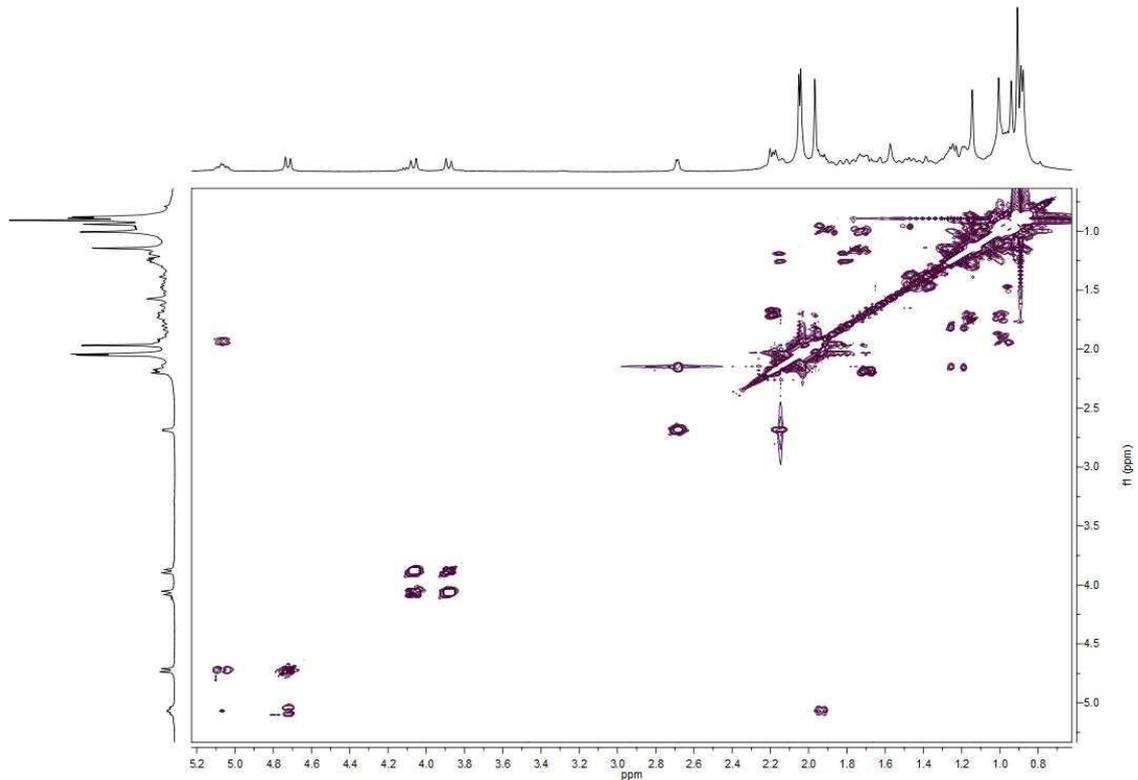
Espectro de ¹³C RMN del producto 51



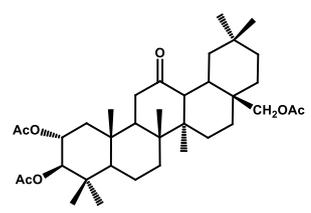
Espectro HSQC del producto 51

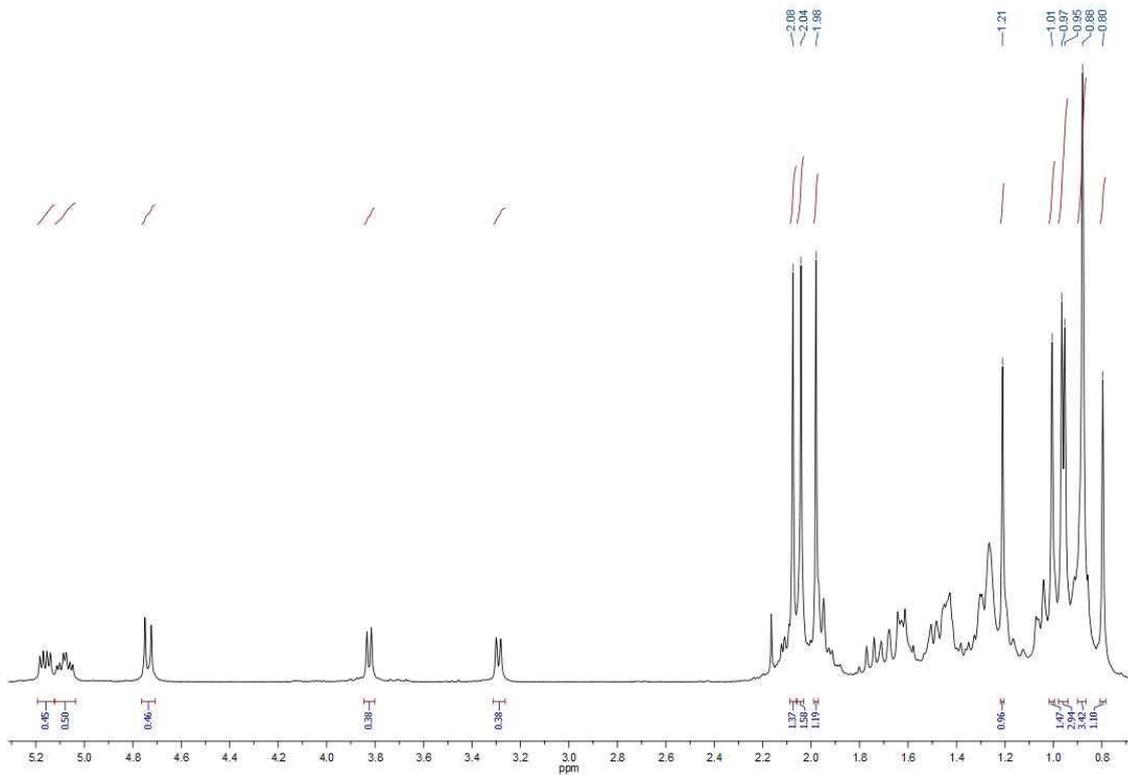


Espectro HMBC del producto 51

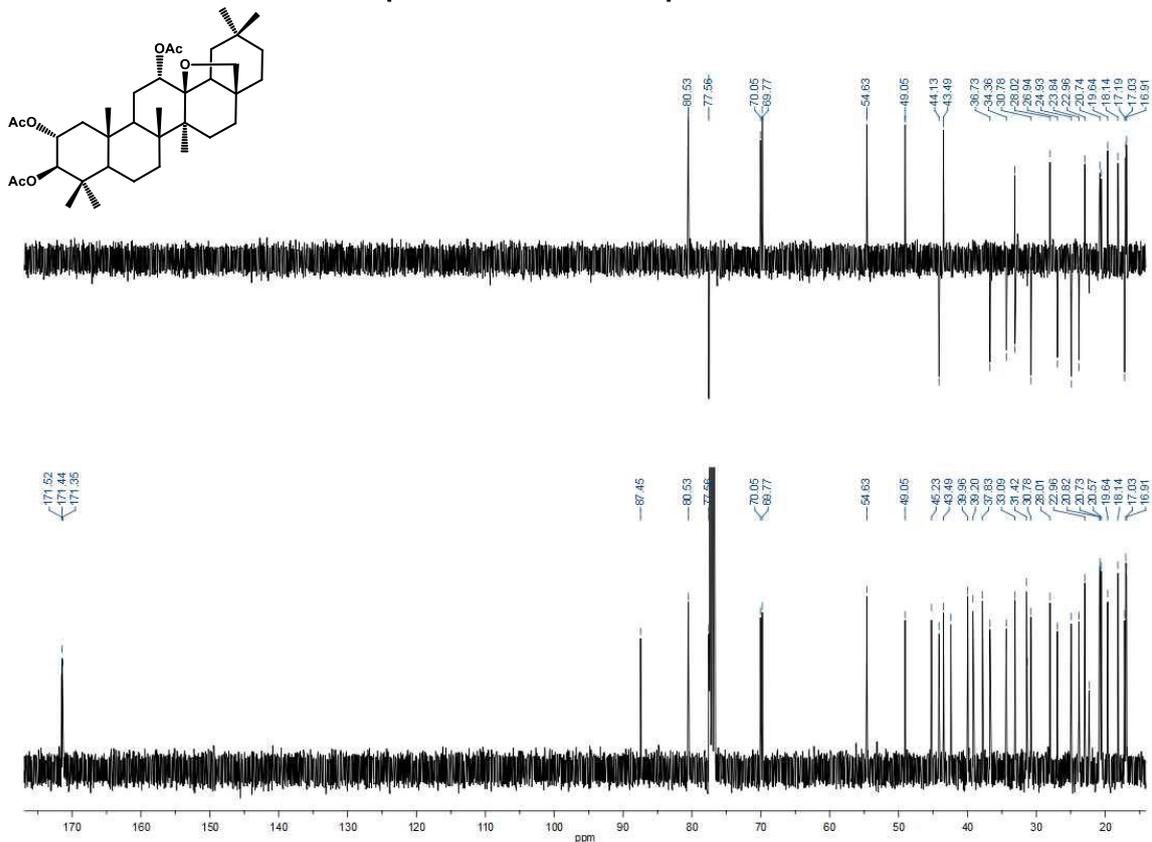


COSY del producto 51

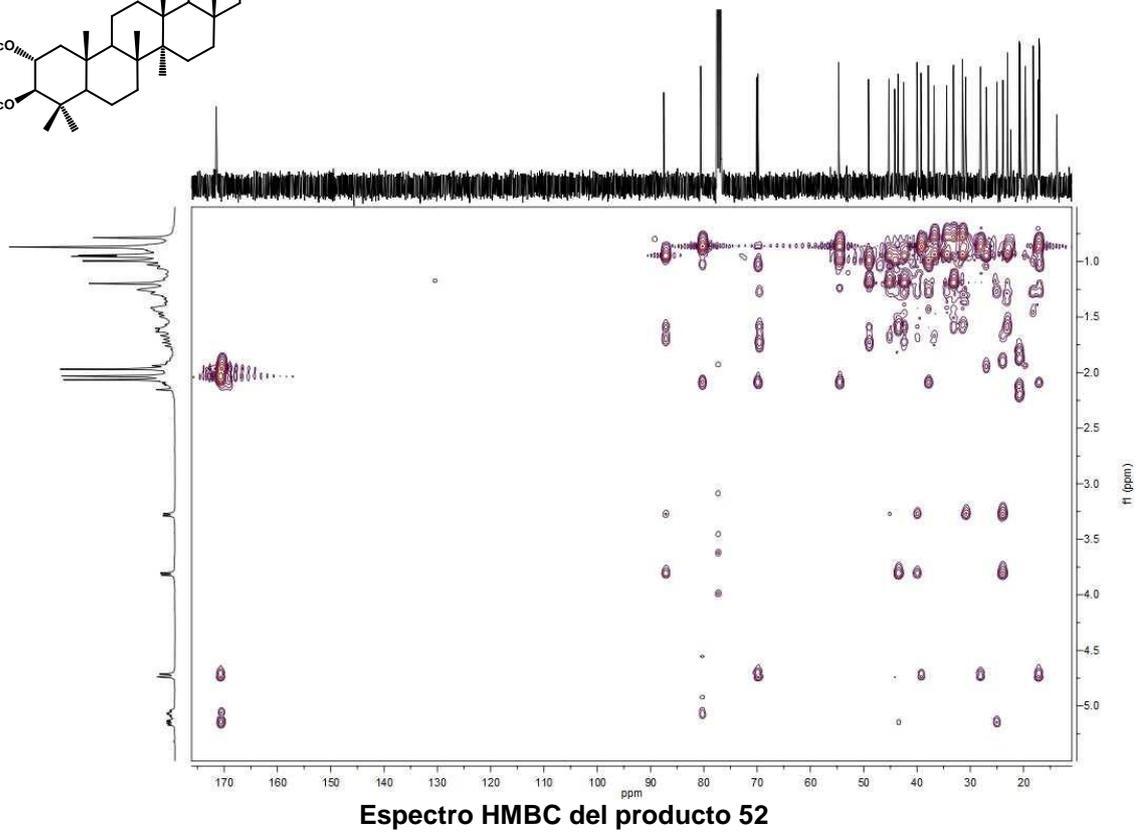
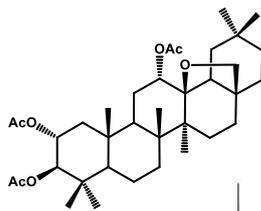
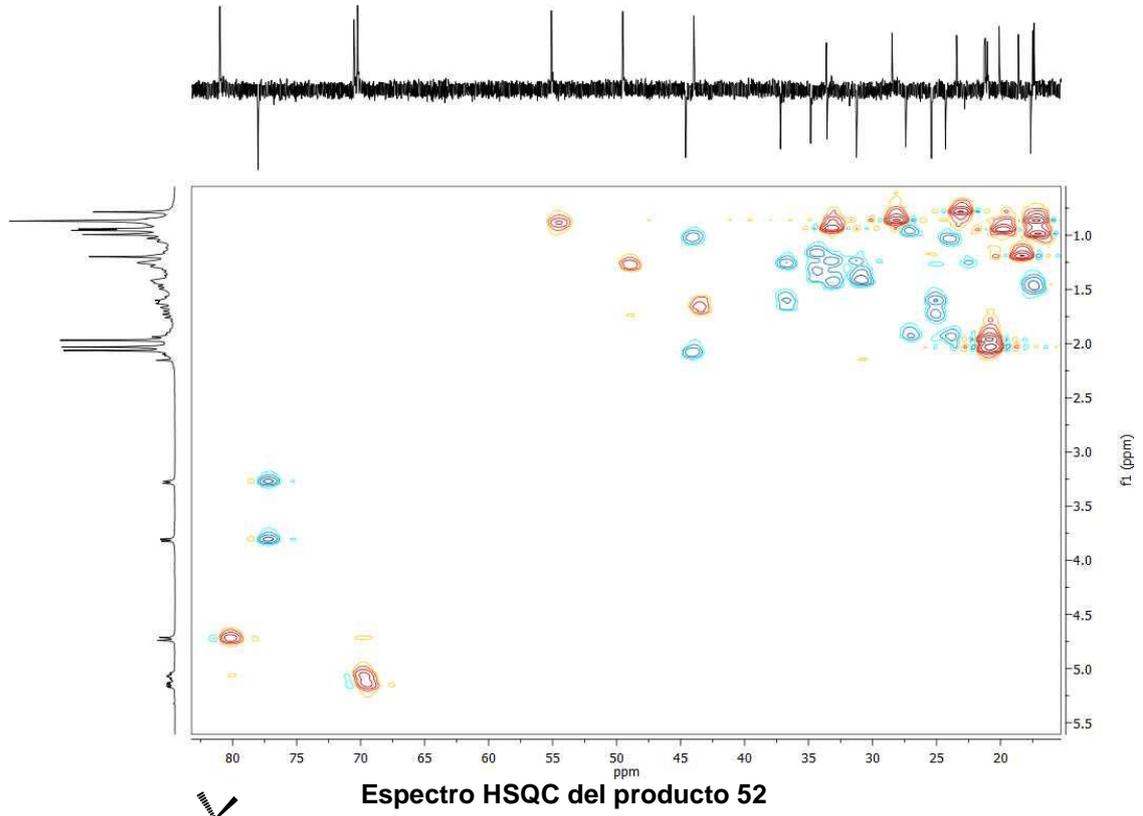


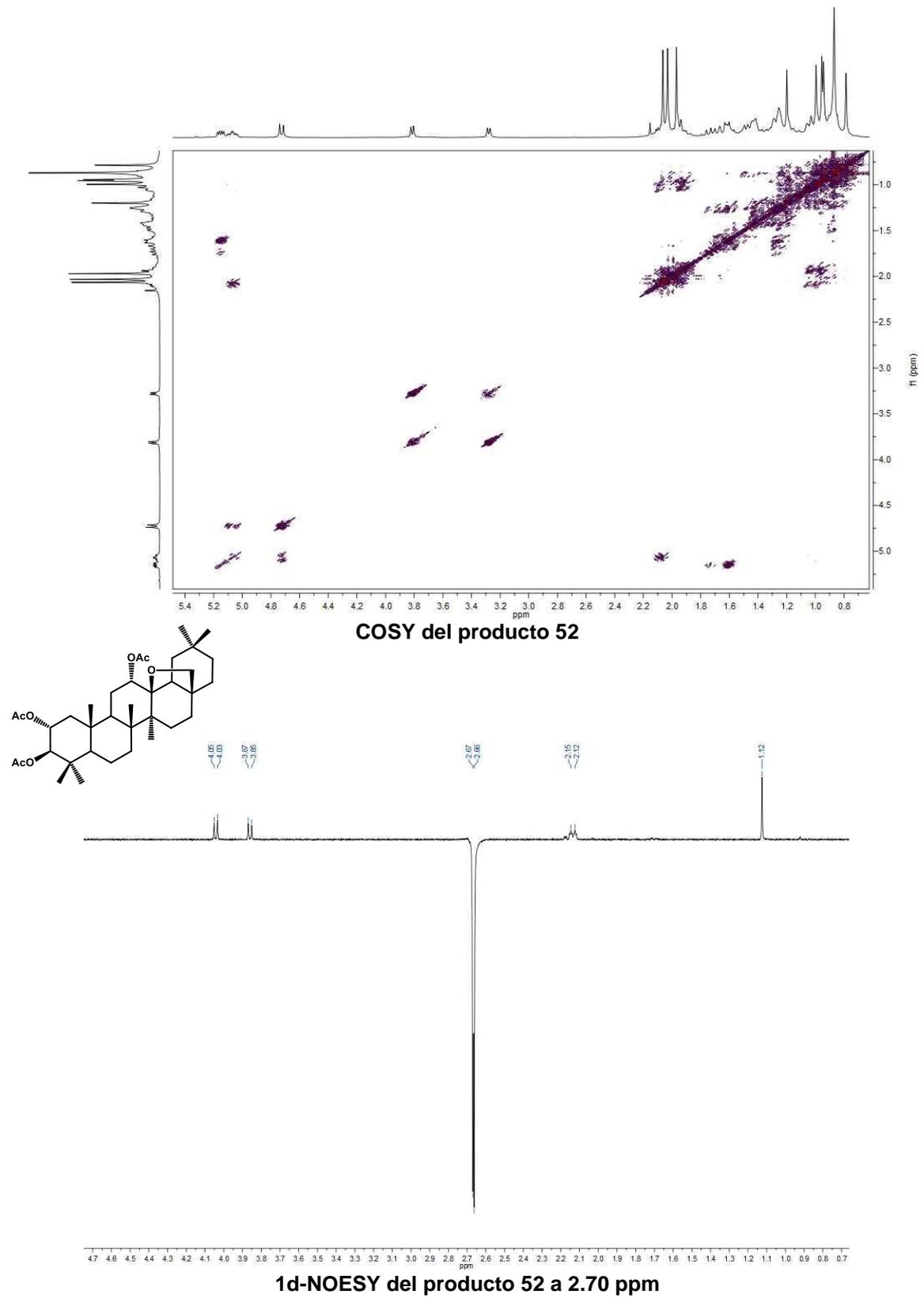


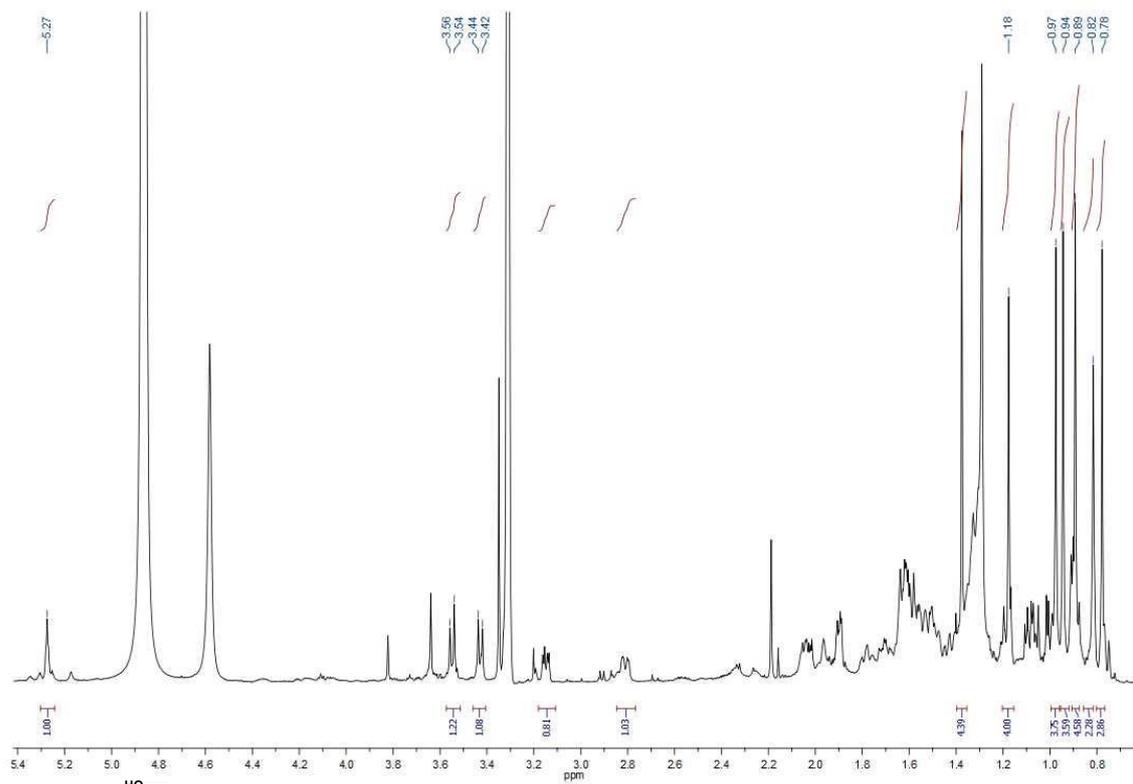
Espectro de ^1H RMN del producto 52



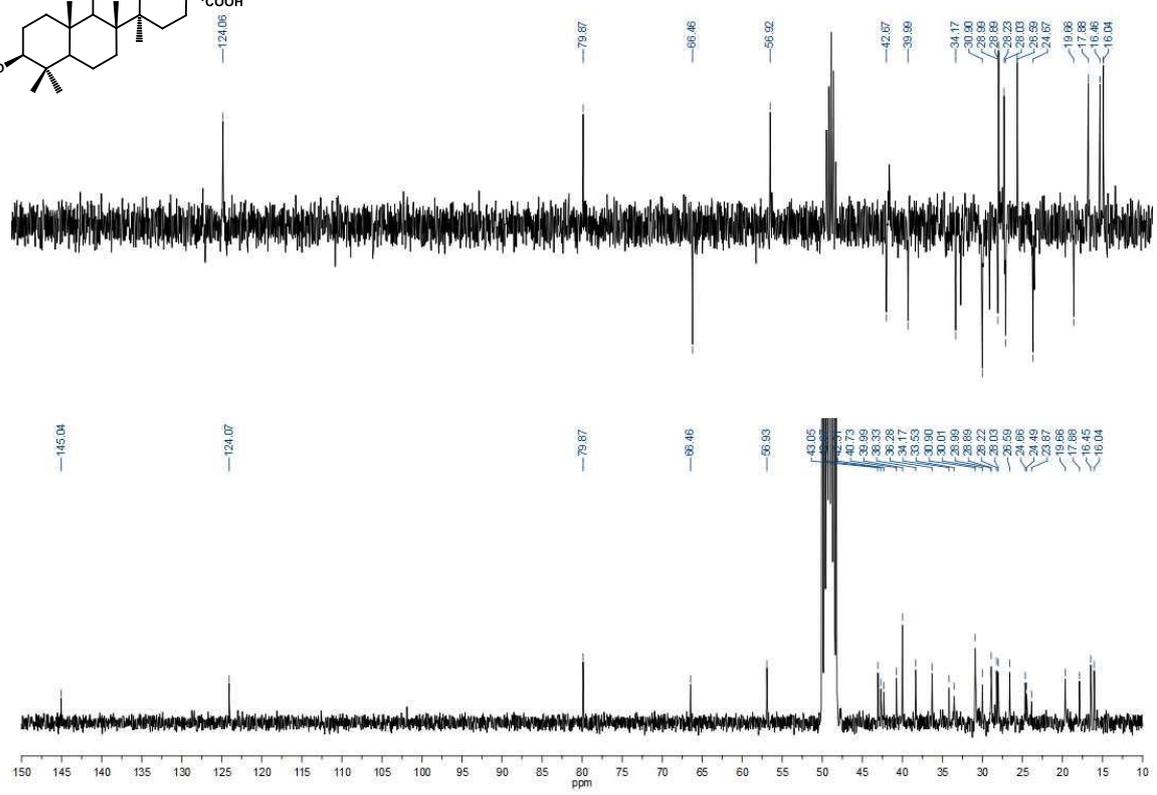
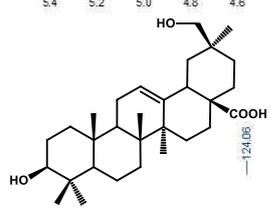
Espectro de ^{13}C RMN del producto 52



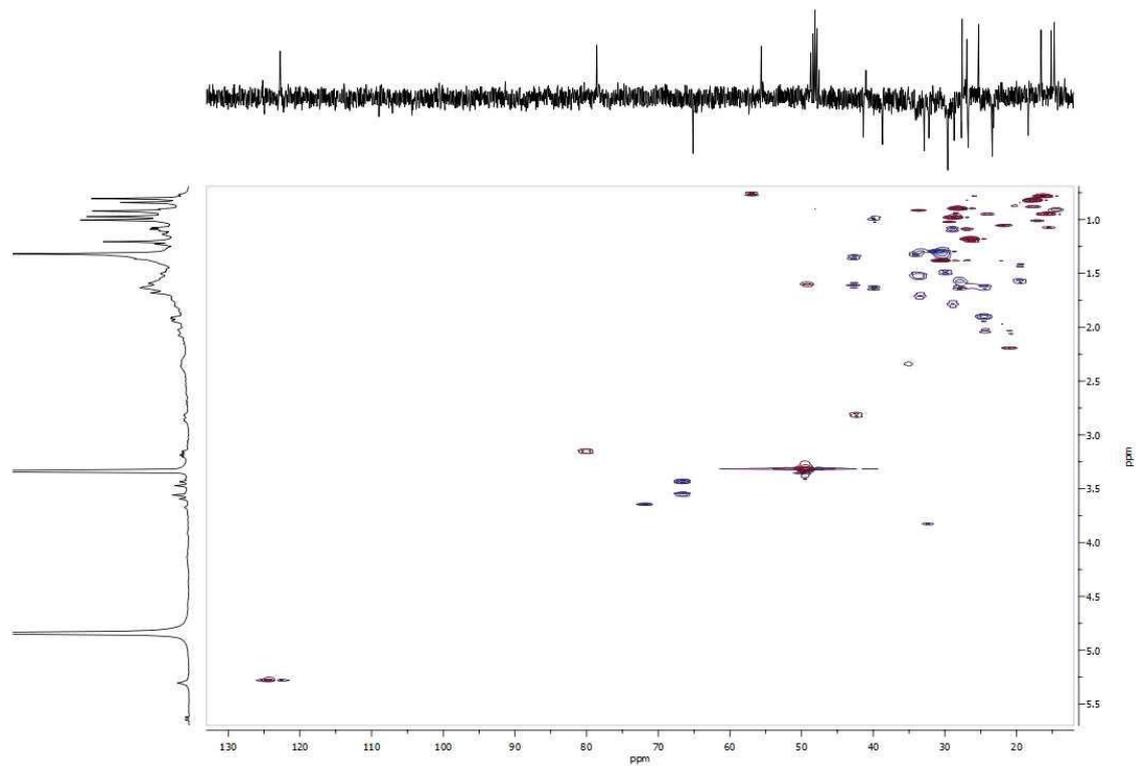




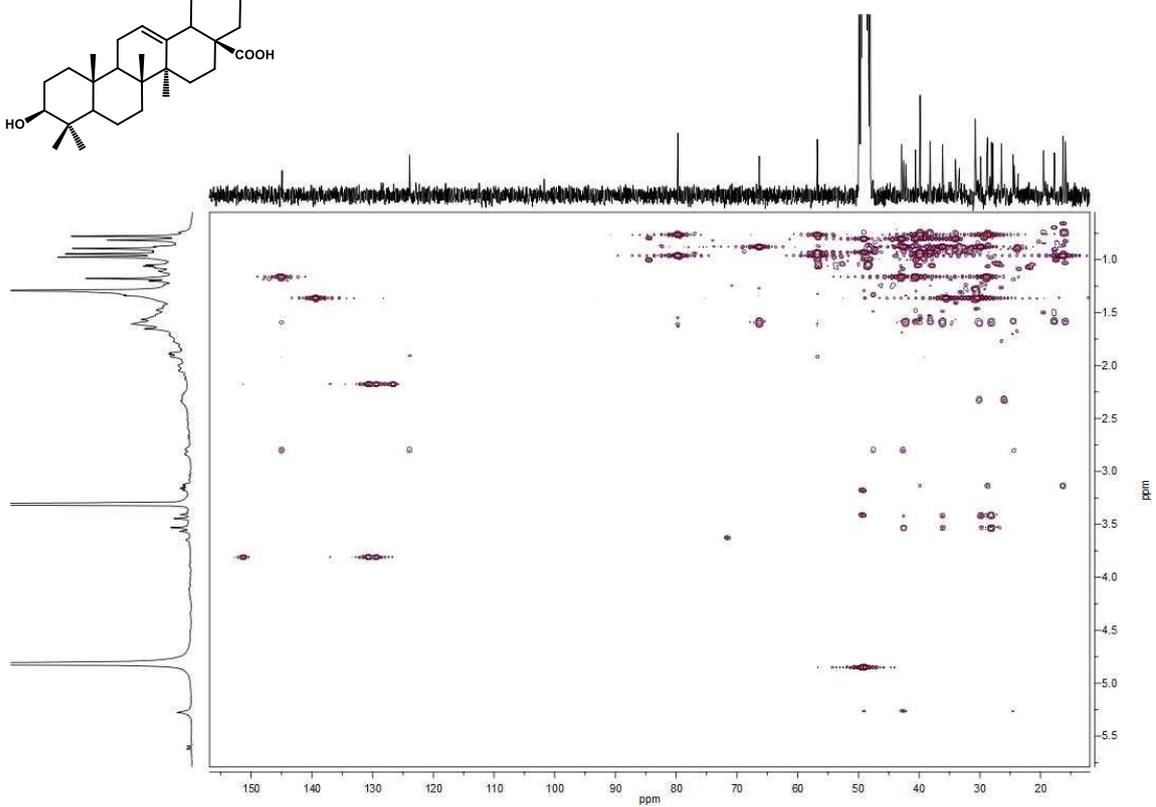
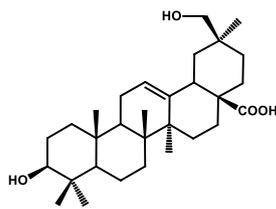
Espectro de ¹H RMN del producto 53



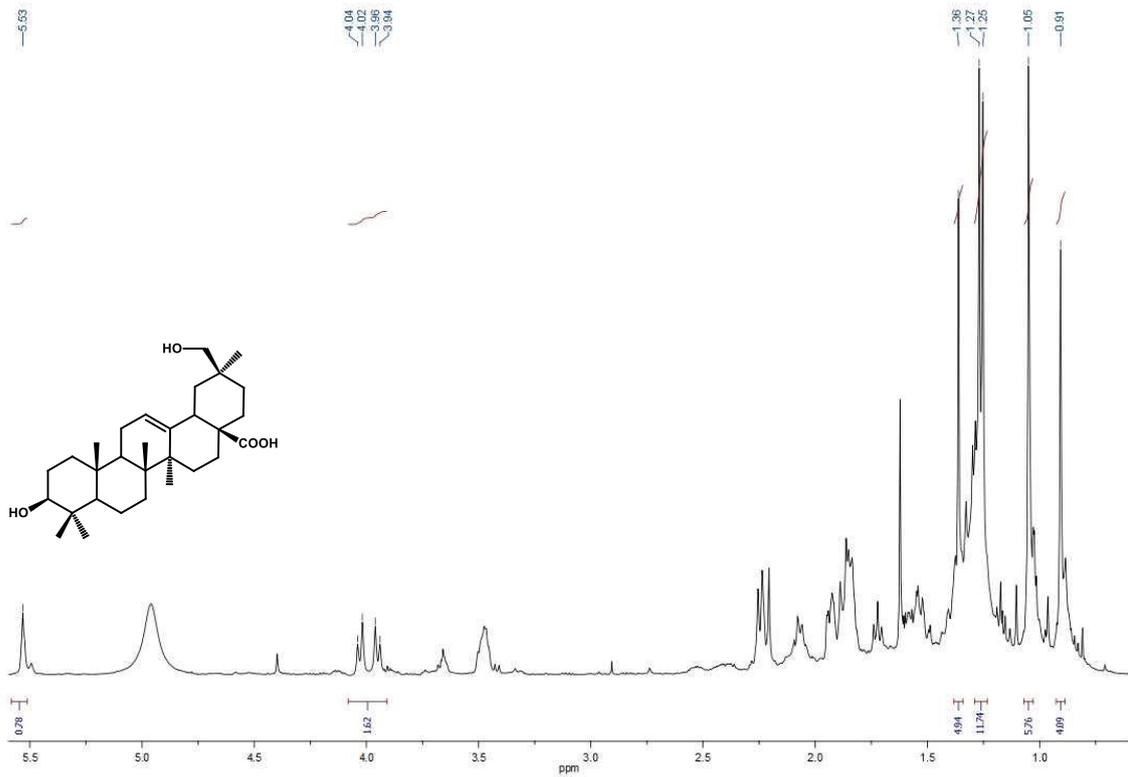
Espectro de ¹³C RMN del producto 53



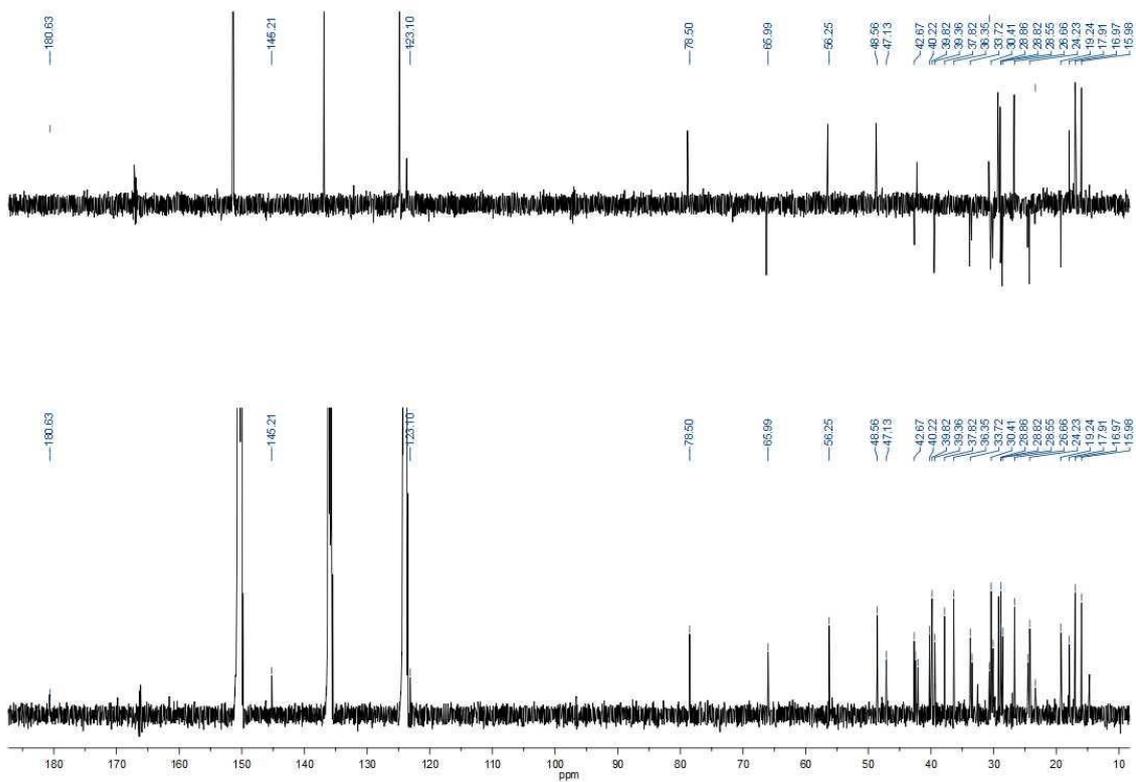
Espectro HSQC del producto 53



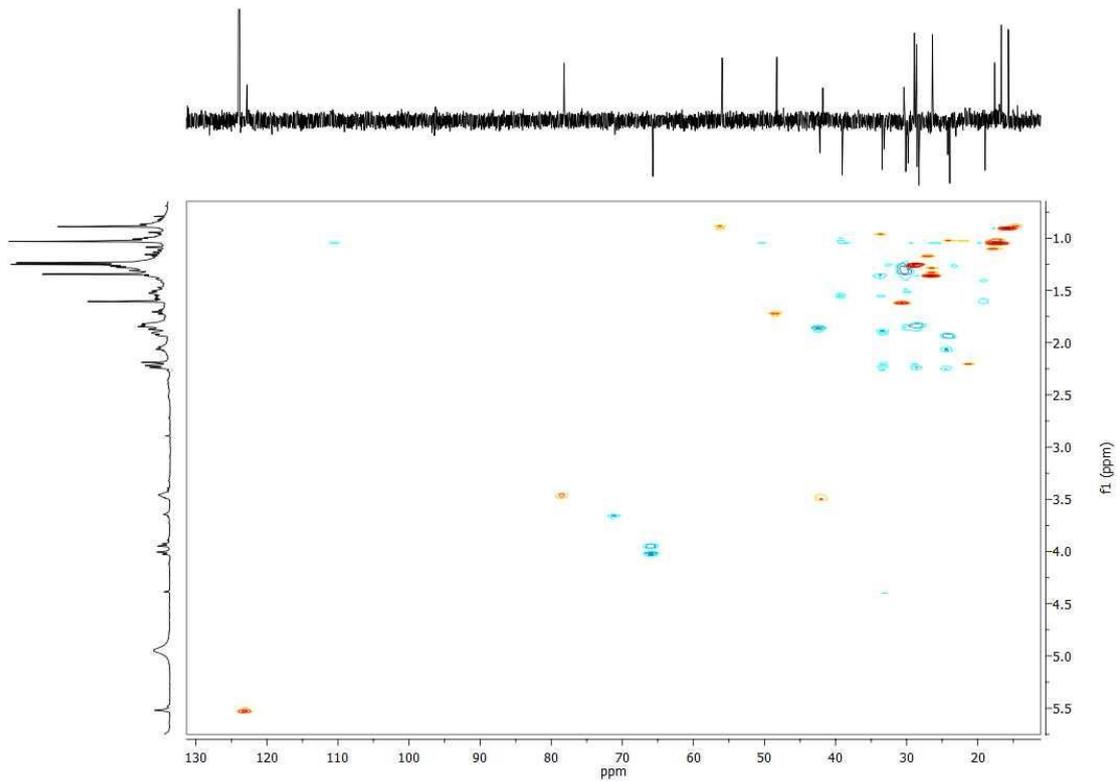
Espectro HMBC del producto 53



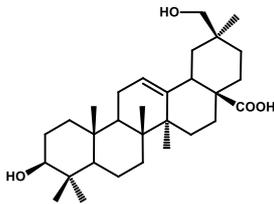
Espectro de ^1H RMN del producto 53 en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

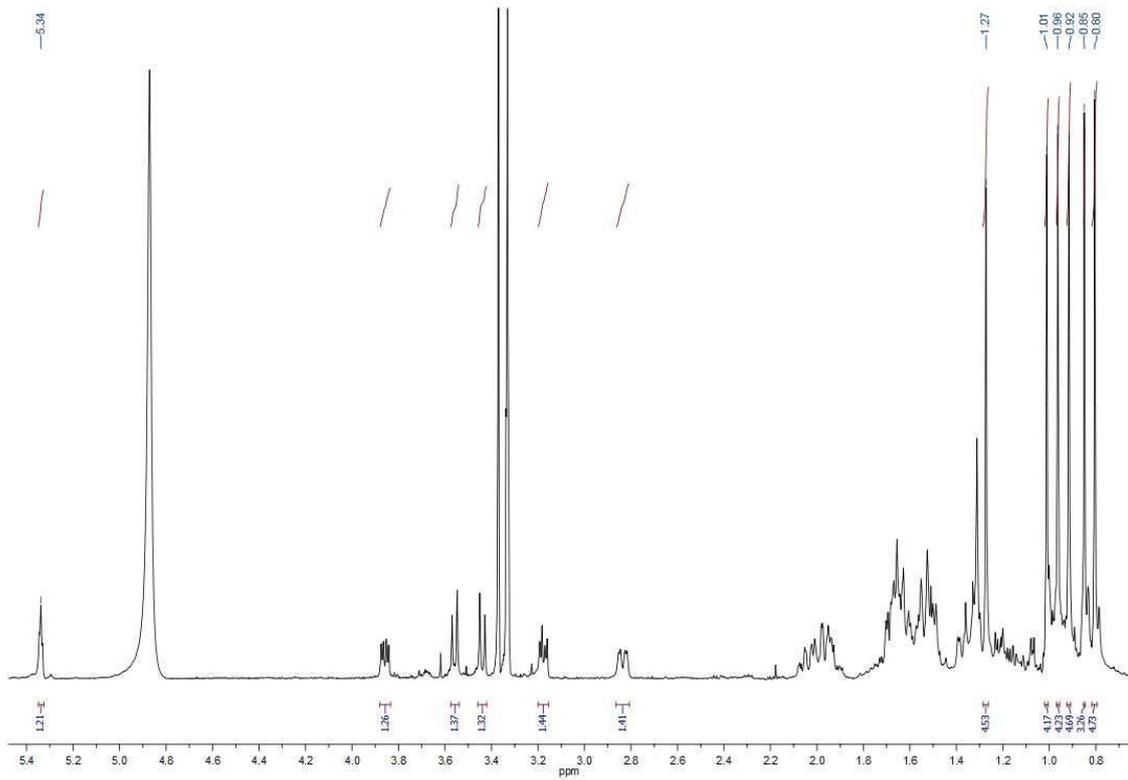


Espectro de ^{13}C RMN del producto 53 en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

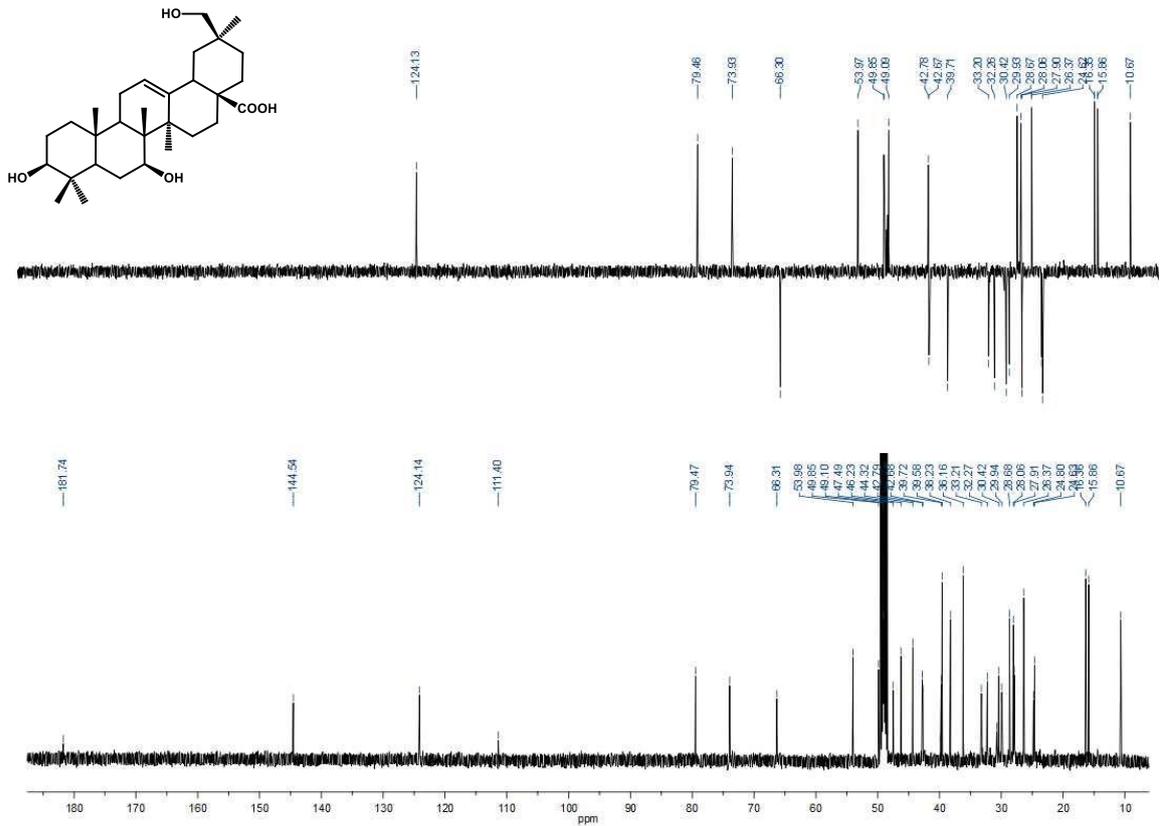


Espectro HSQC del producto 53 en C₅D₅N

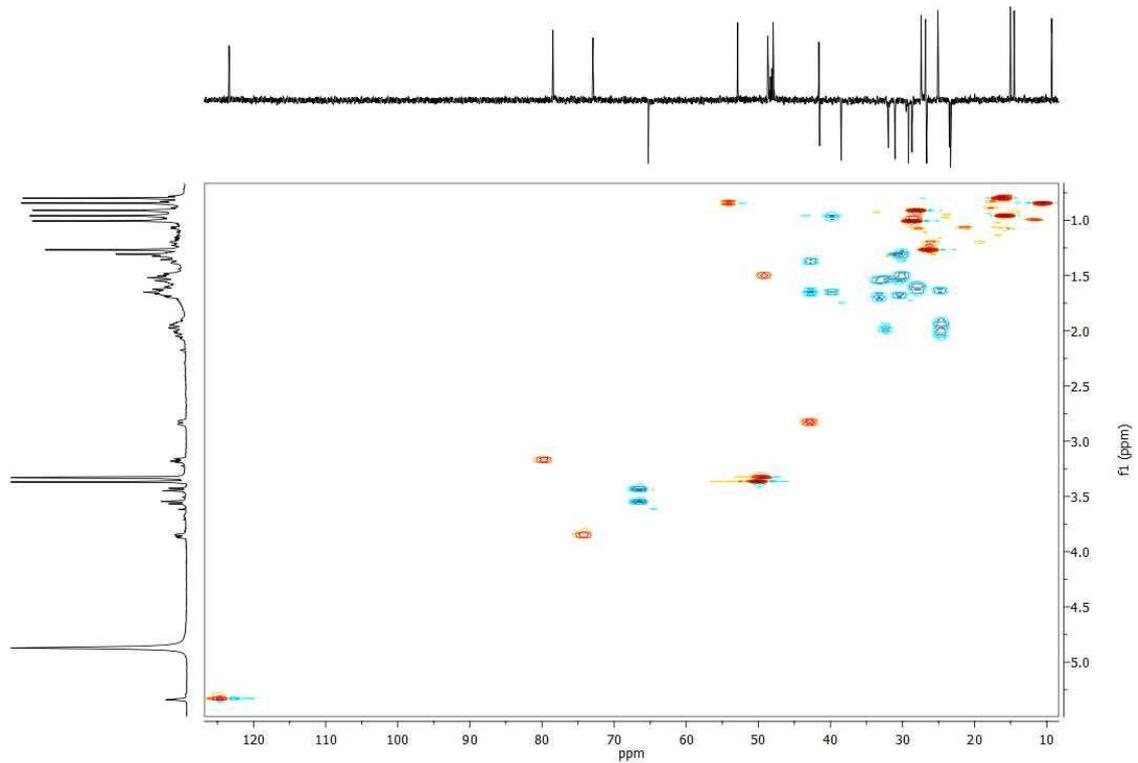




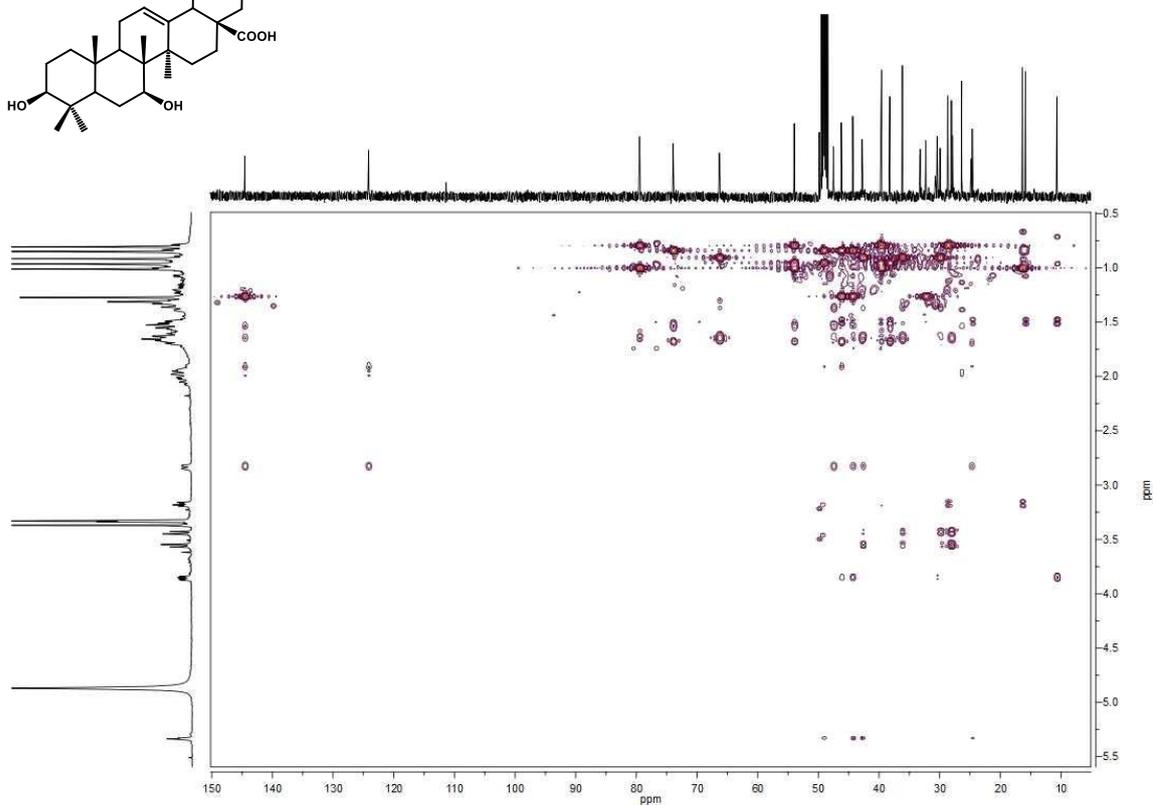
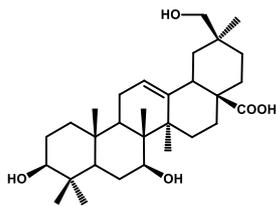
Espectro ^1H RMN del producto 54



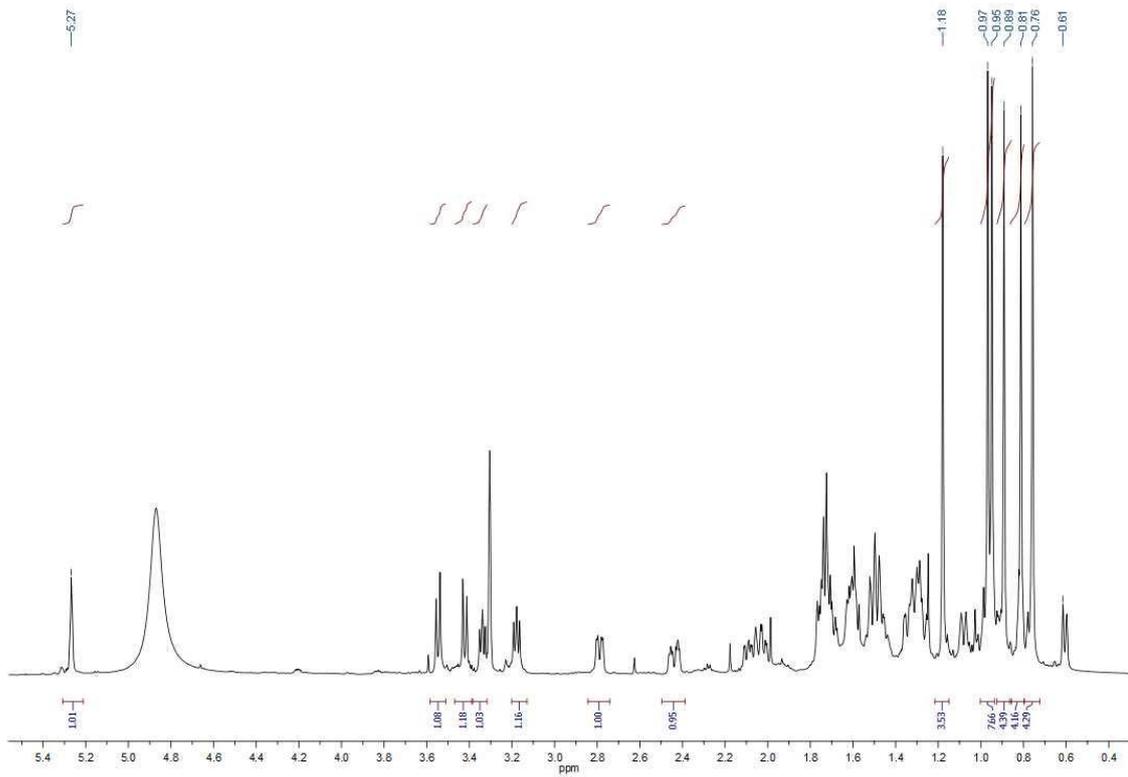
Espectro ^{13}C RMN del producto 54



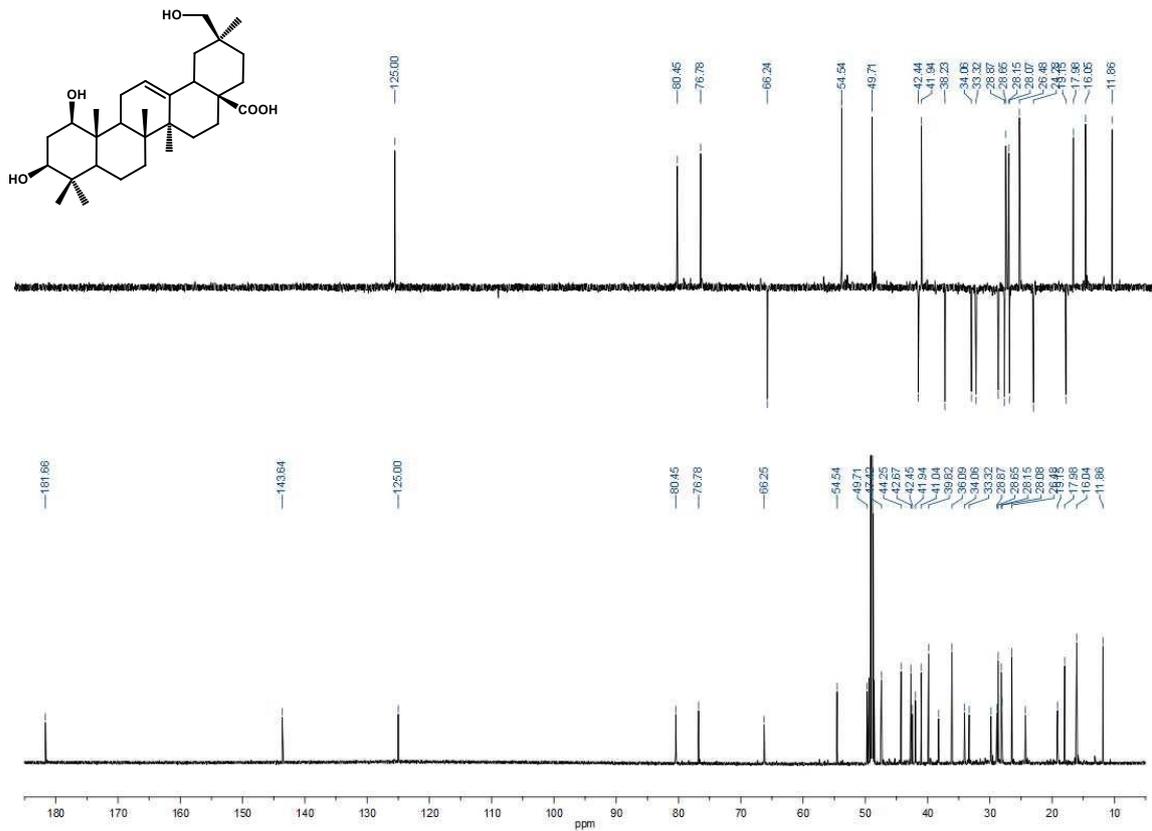
Espectro HSQC del producto 54



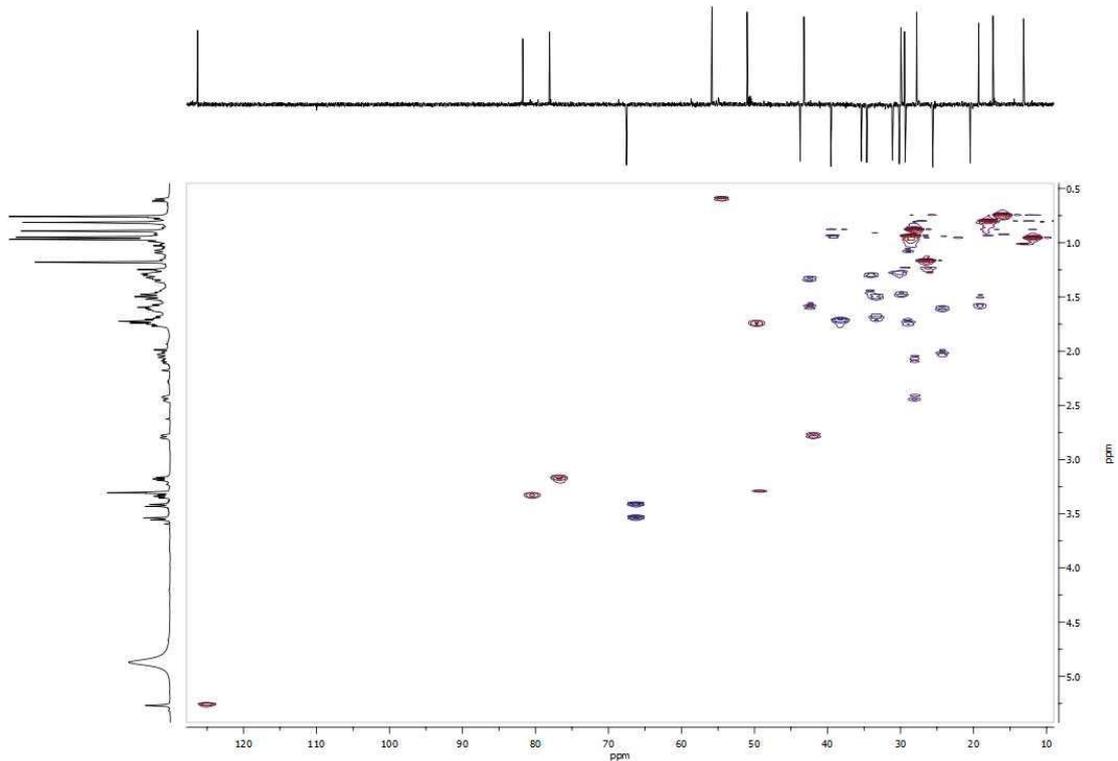
Espectro HMBC del producto 54



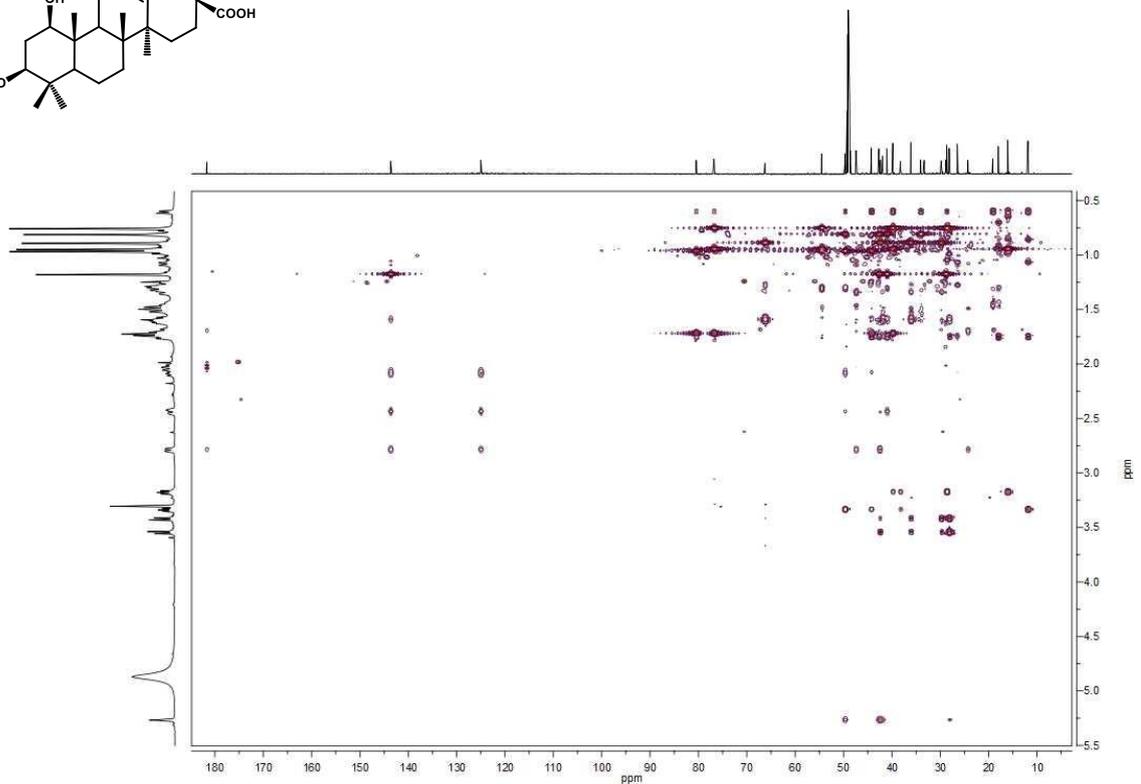
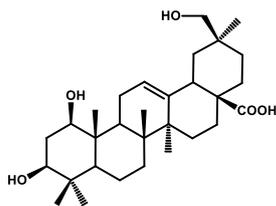
Espectro ^1H RMN del producto 55



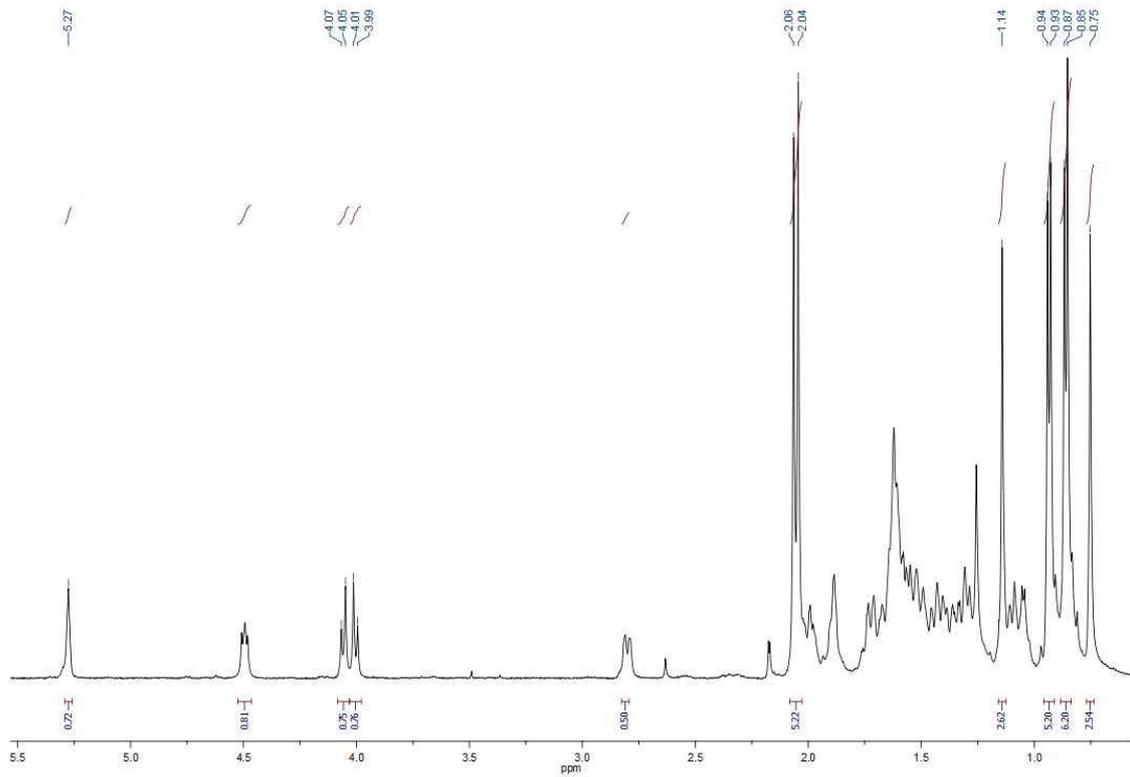
Espectro ^{13}C RMN del producto 55



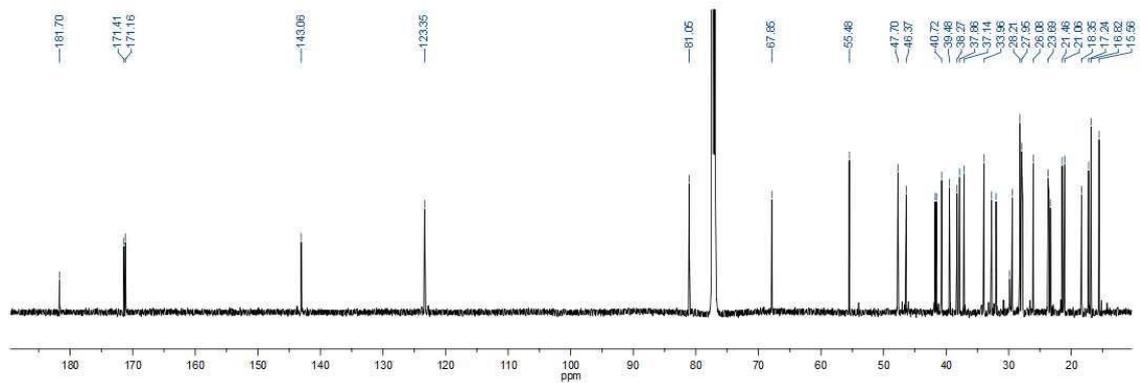
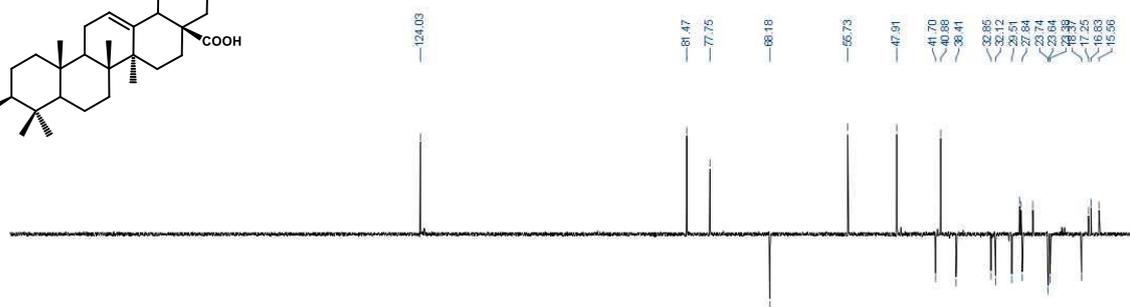
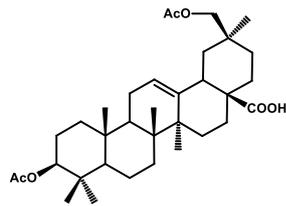
Espectro HSQC del producto 55



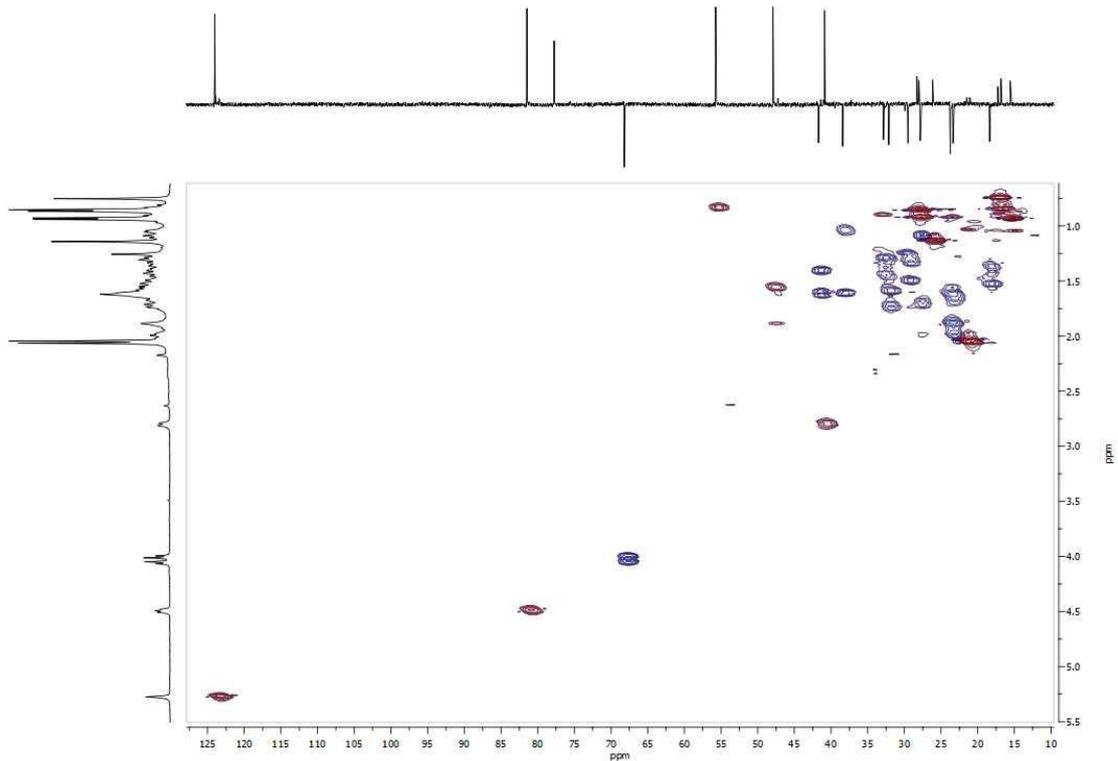
Espectro HMBC del producto 55



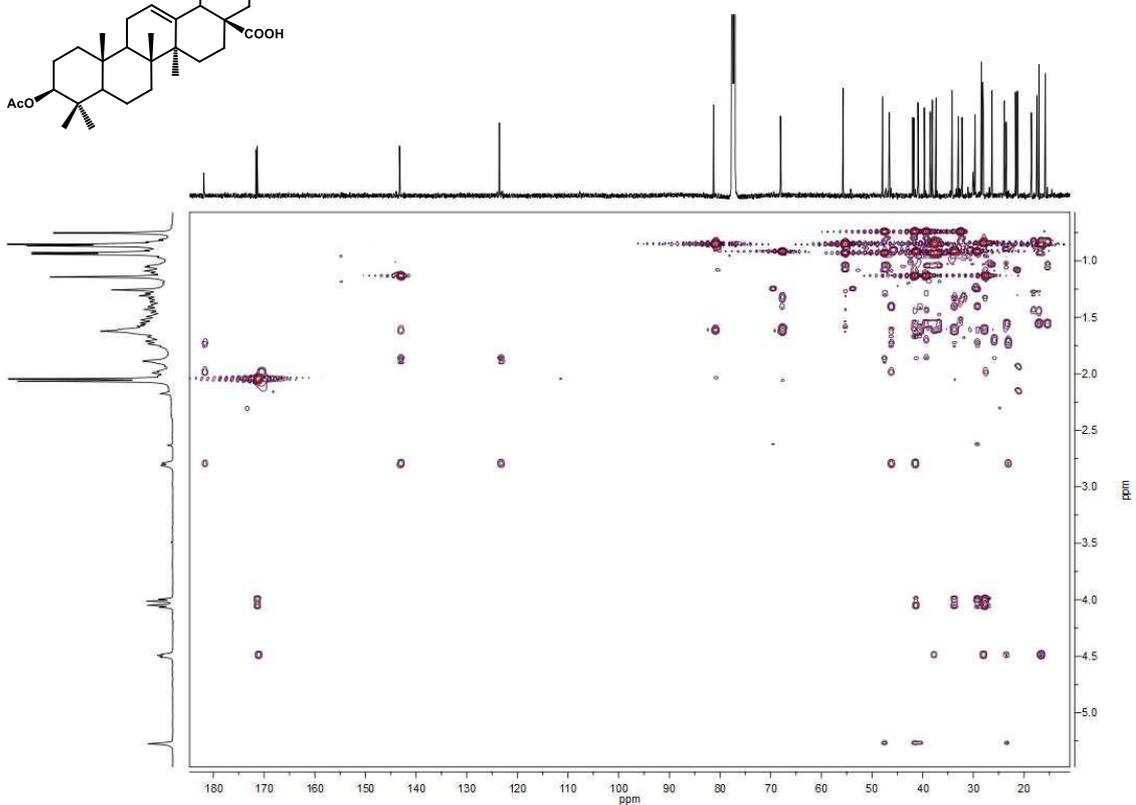
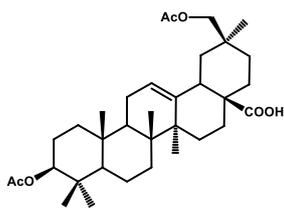
Espectro ^1H RMN del producto 56



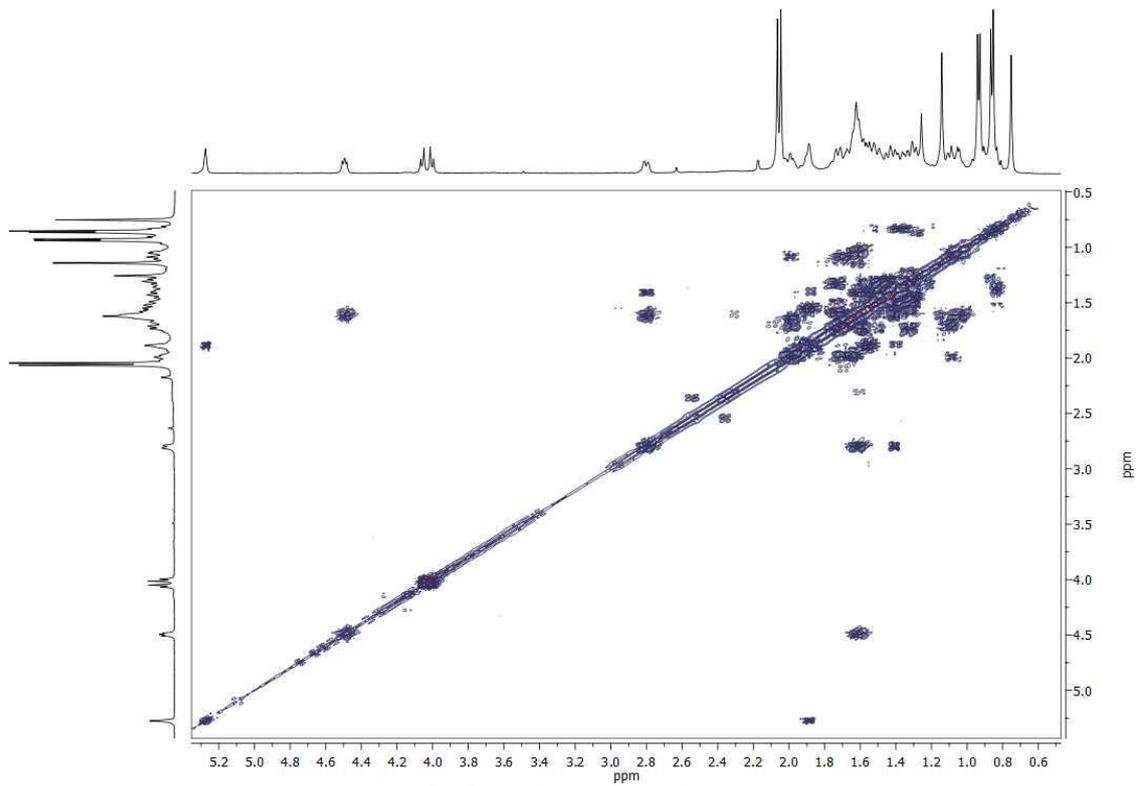
Espectro ^{13}C RMN del producto 56



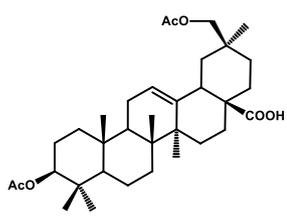
Espectro HSQC del producto 56

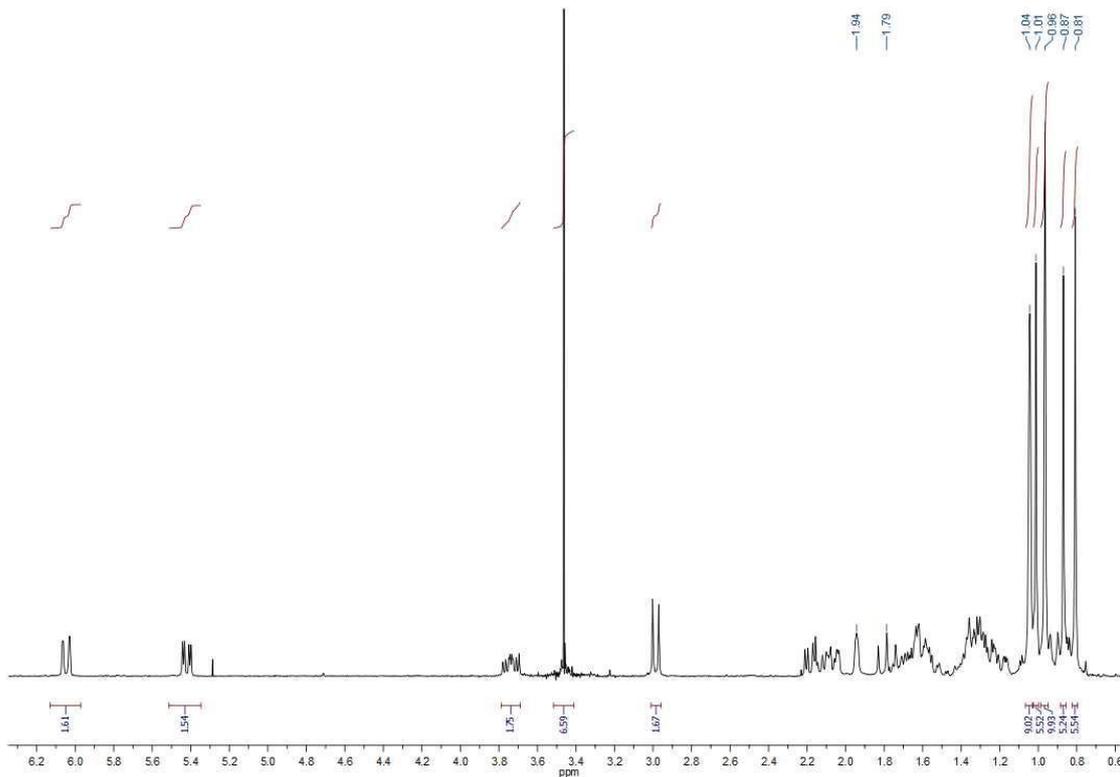


Espectro HMBC del producto 56

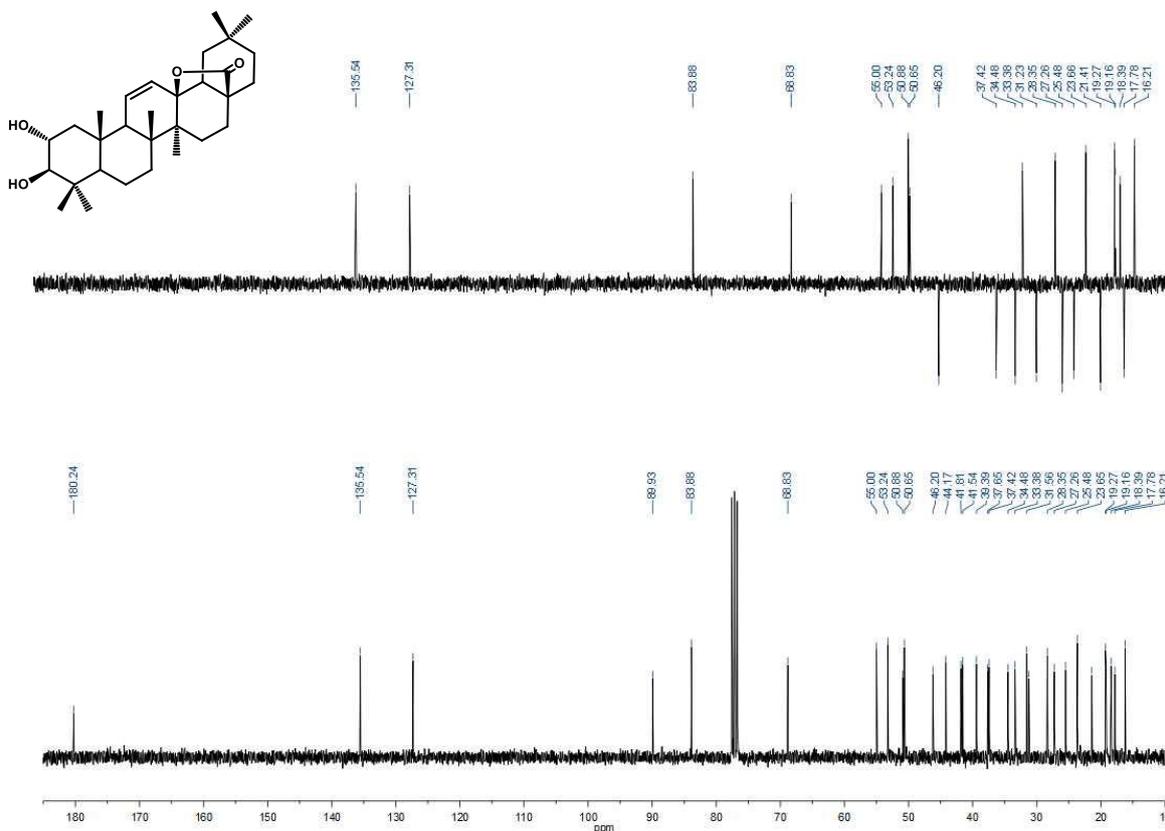


COSY del producto 56

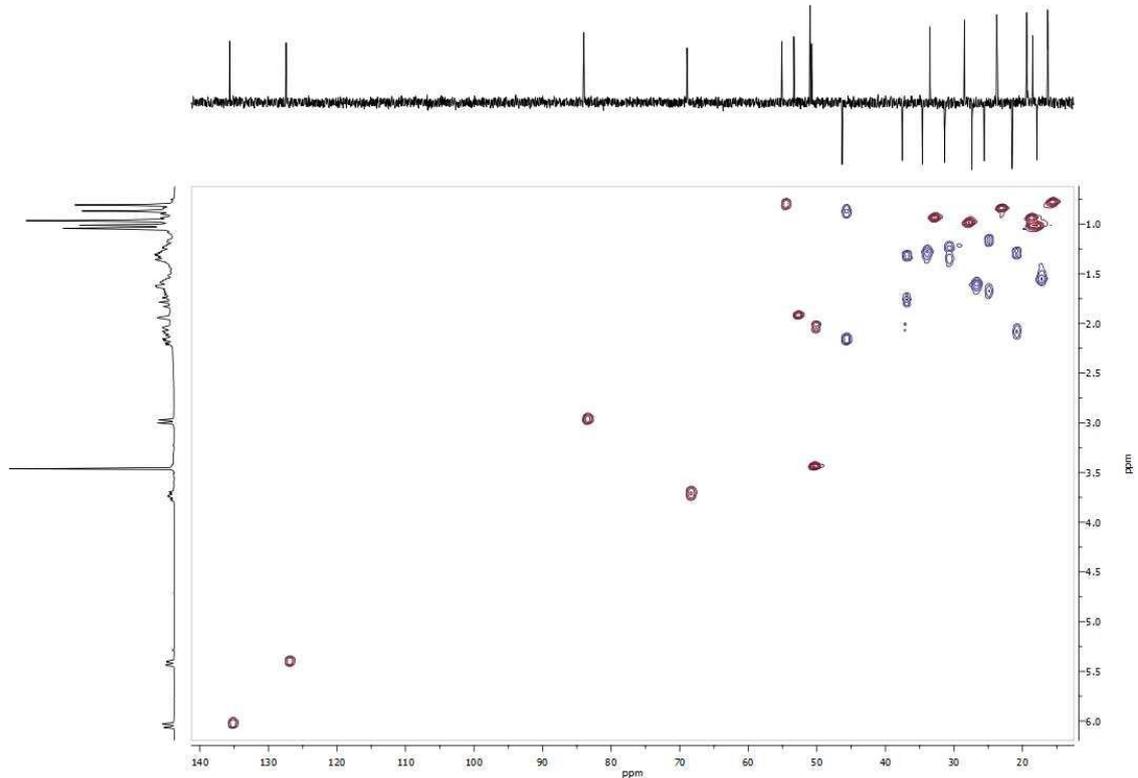




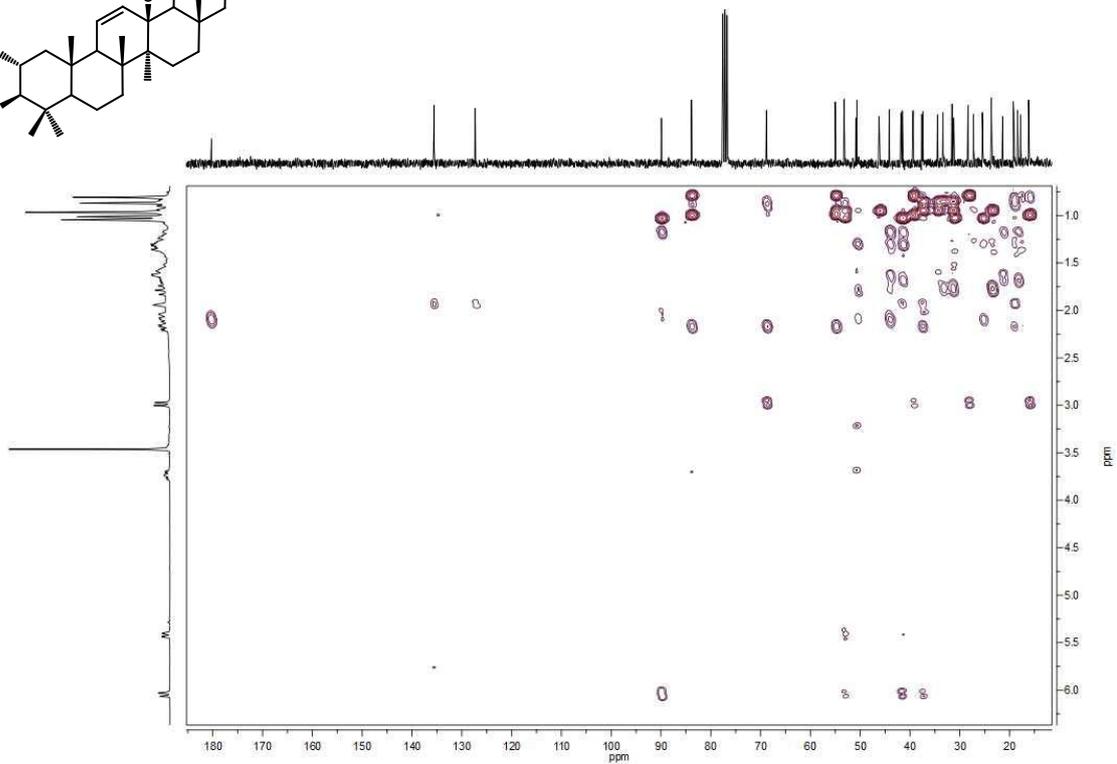
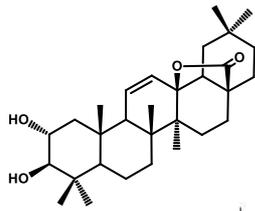
Espectro ^1H RMN del producto 57



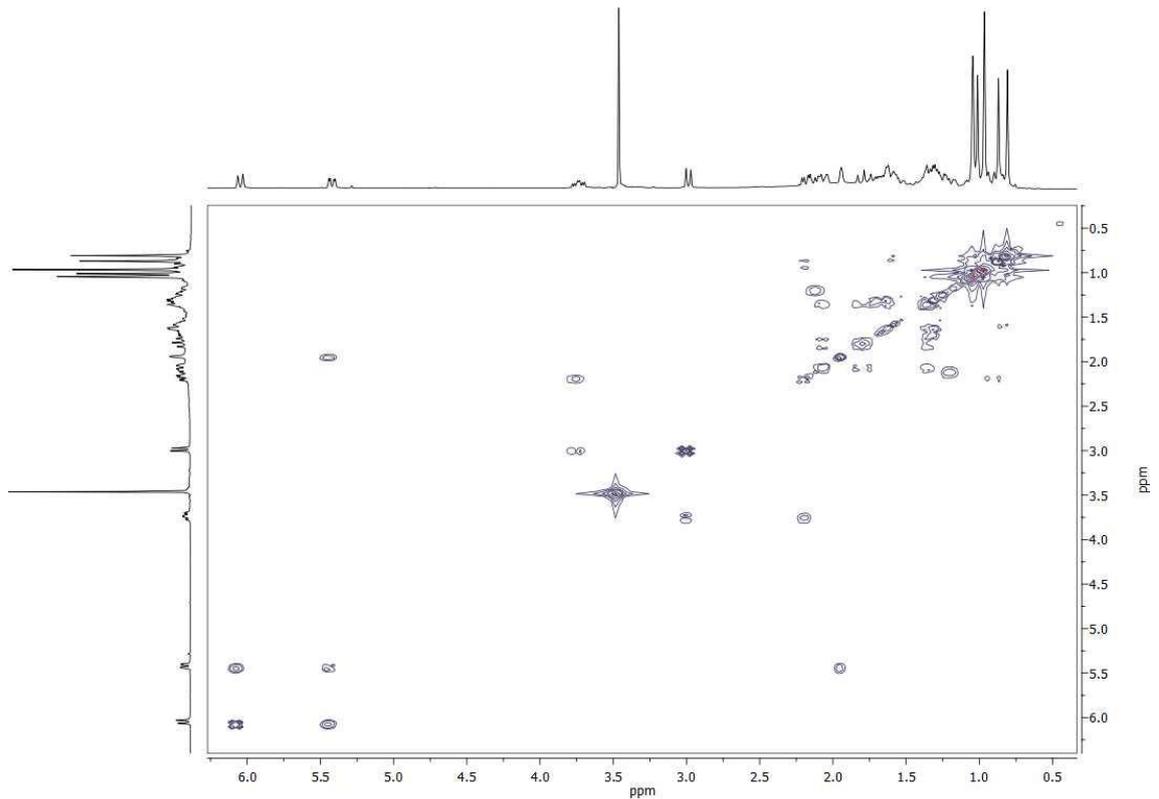
Espectro ^{13}C RMN del producto 57



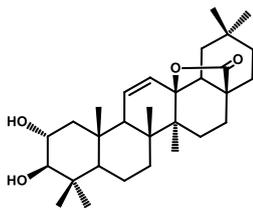
Espectro HSQC del producto 57

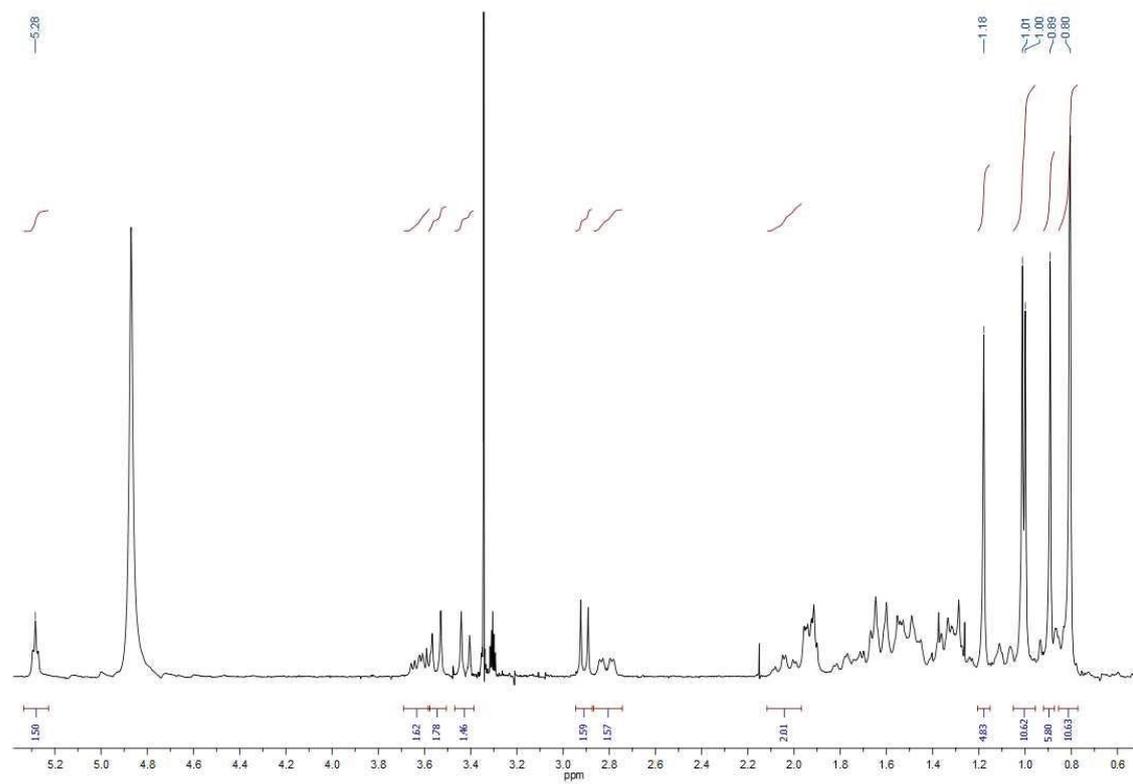


Espectro HMBC del producto 57

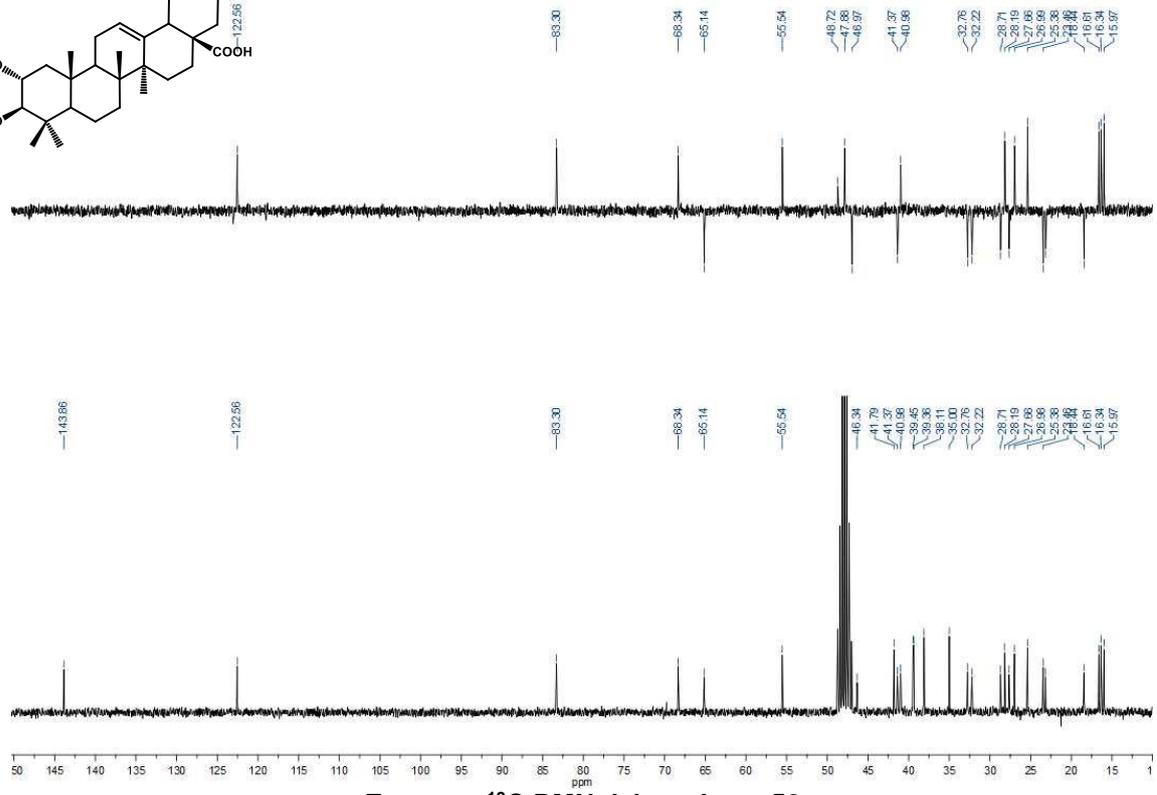
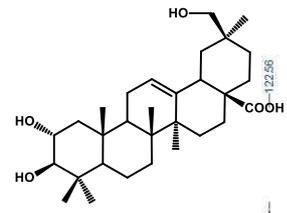


COSY del producto 57

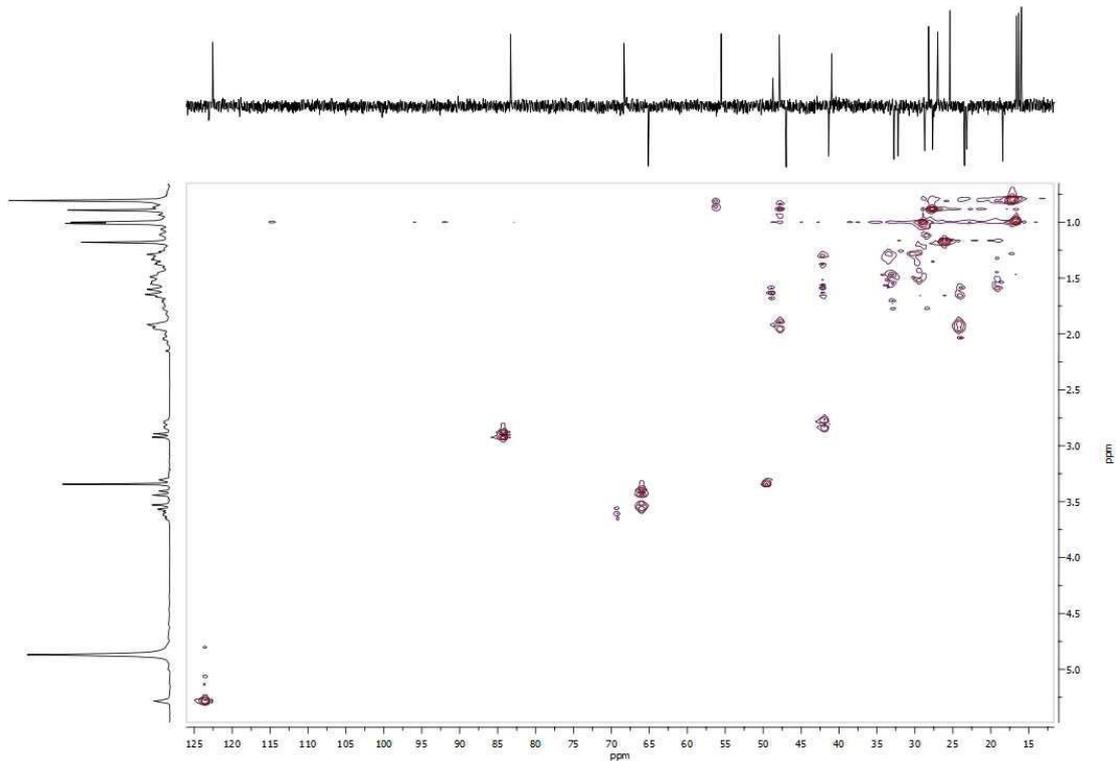




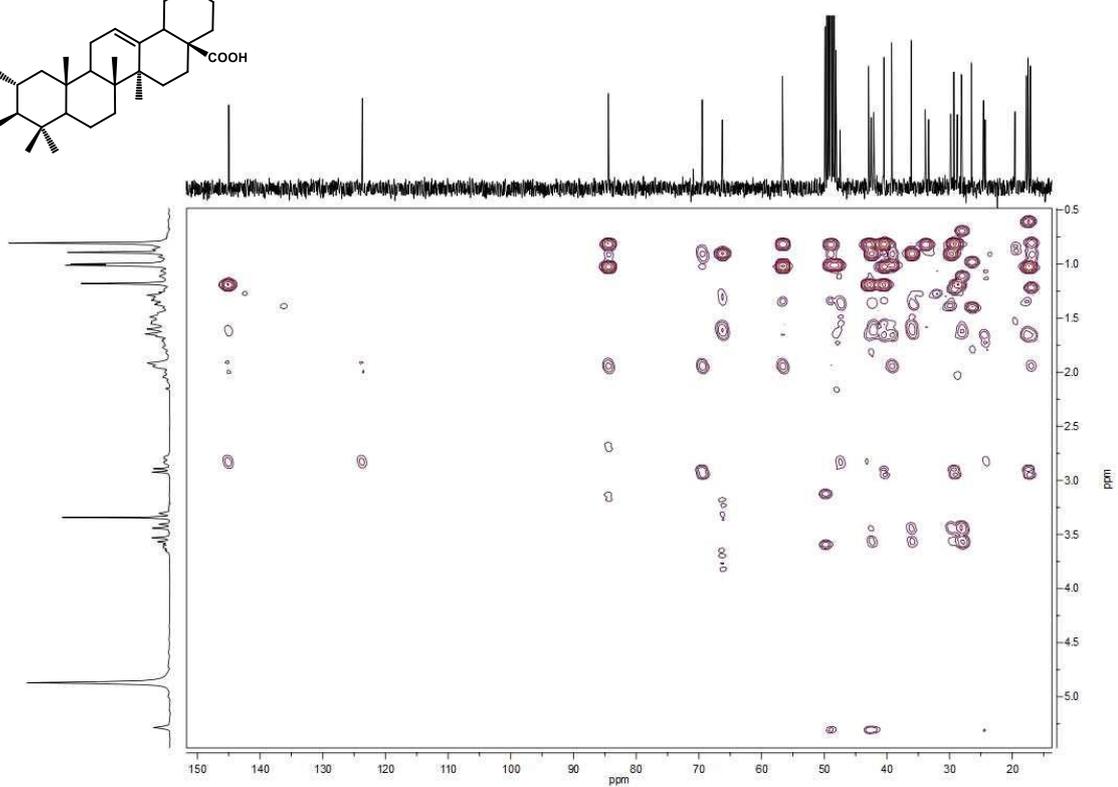
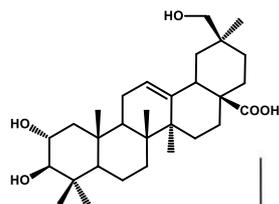
Espectro ¹H RMN del producto 58



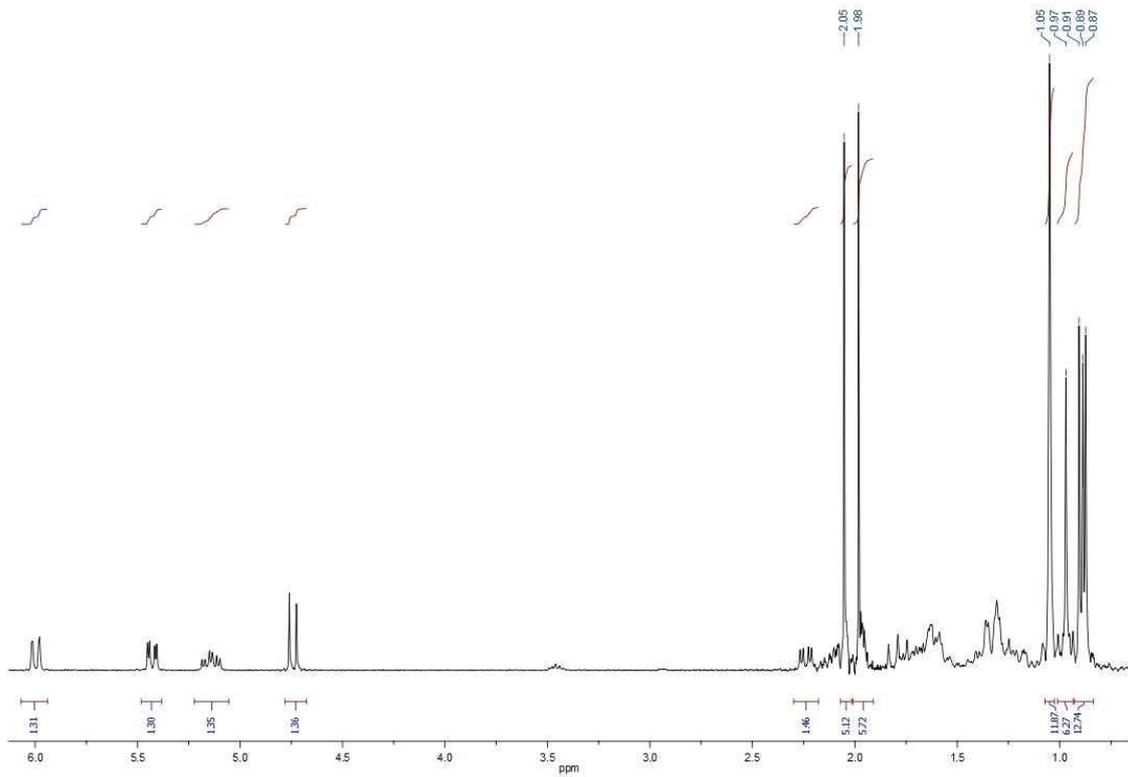
Espectro ¹³C RMN del producto 58



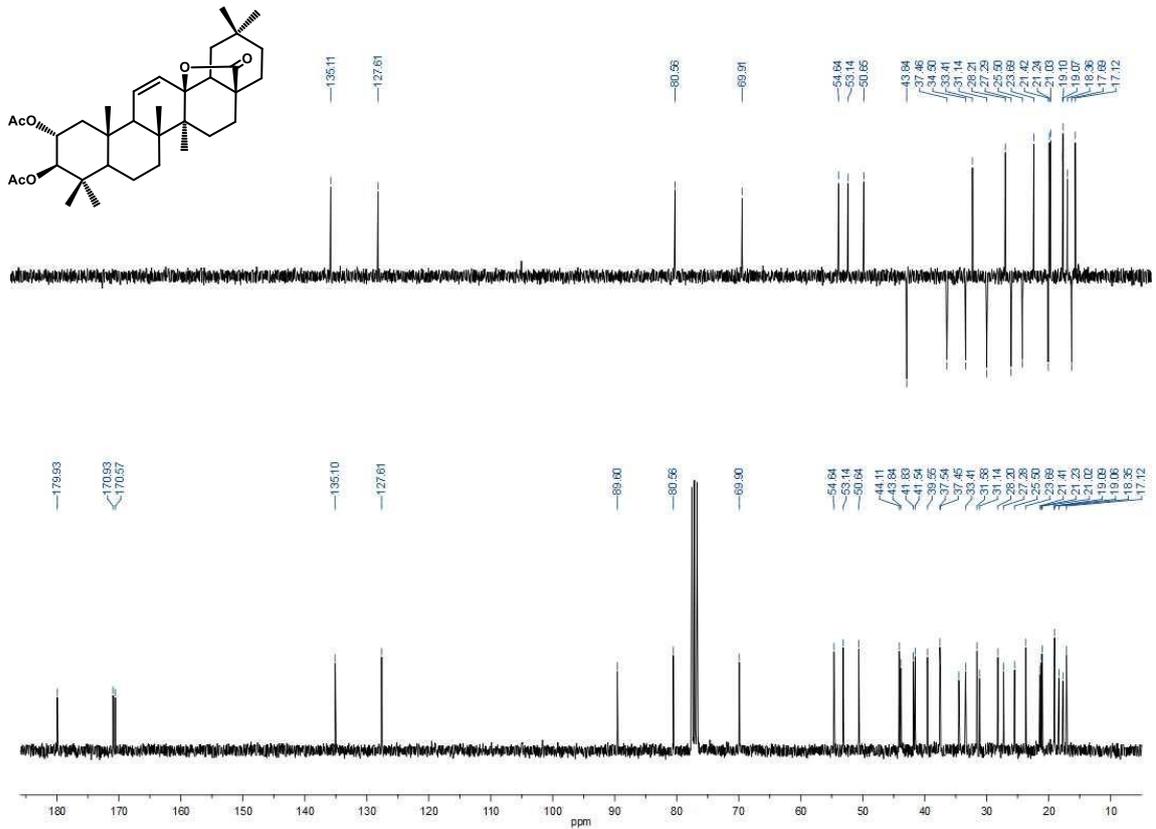
Espectro HMQC del producto 58



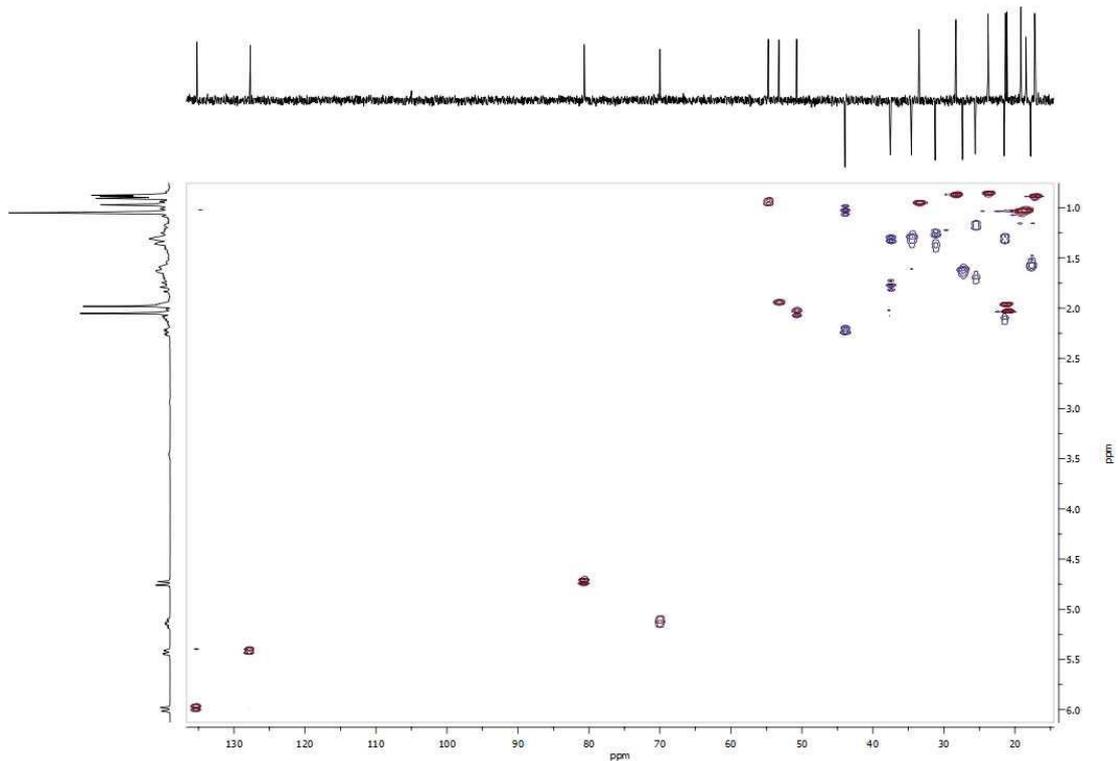
Espectro HMBC del producto 58



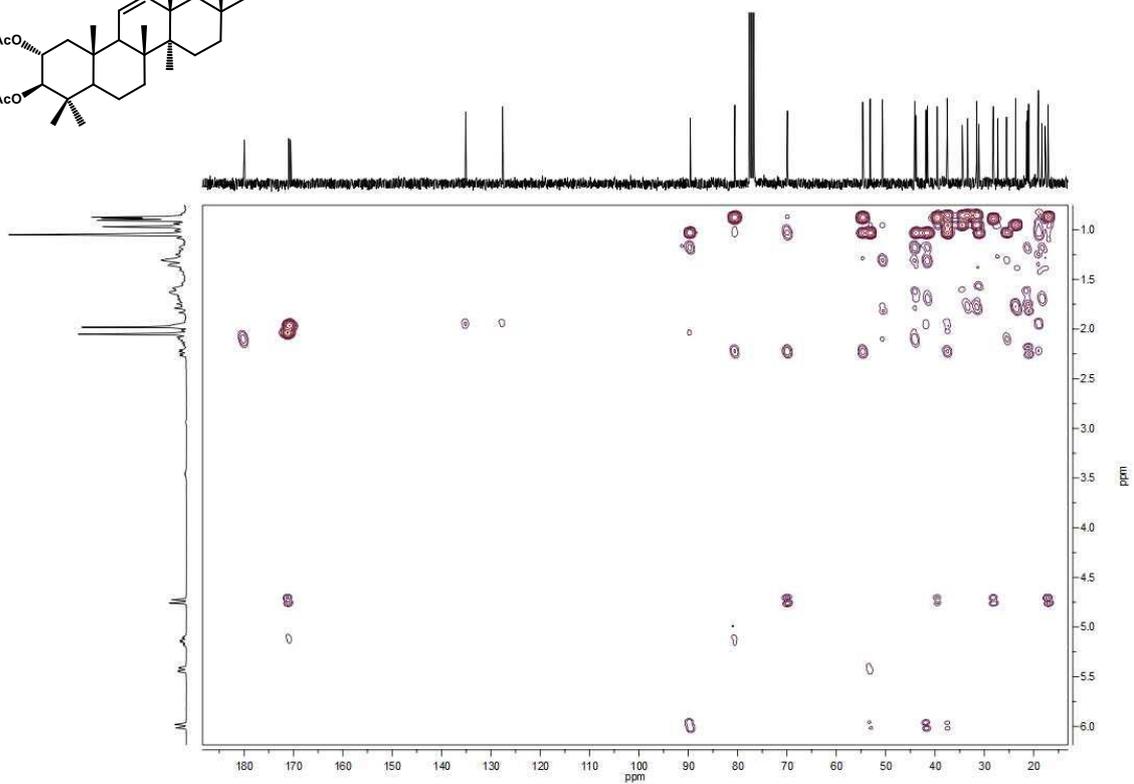
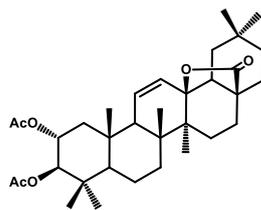
Espectro ¹H RMN del producto 59



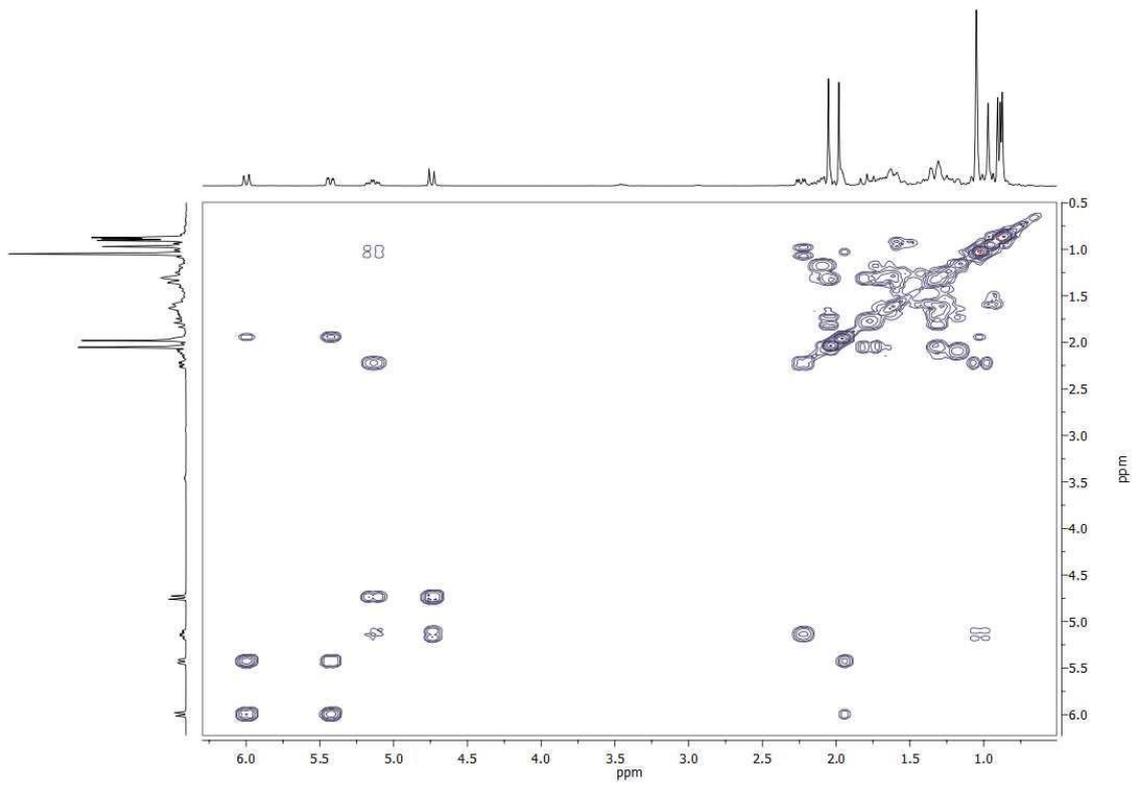
Espectro ¹³C RMN del producto 59



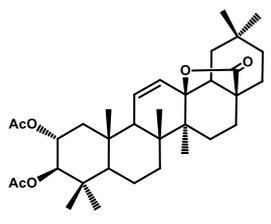
Espectro HSQC del producto 59

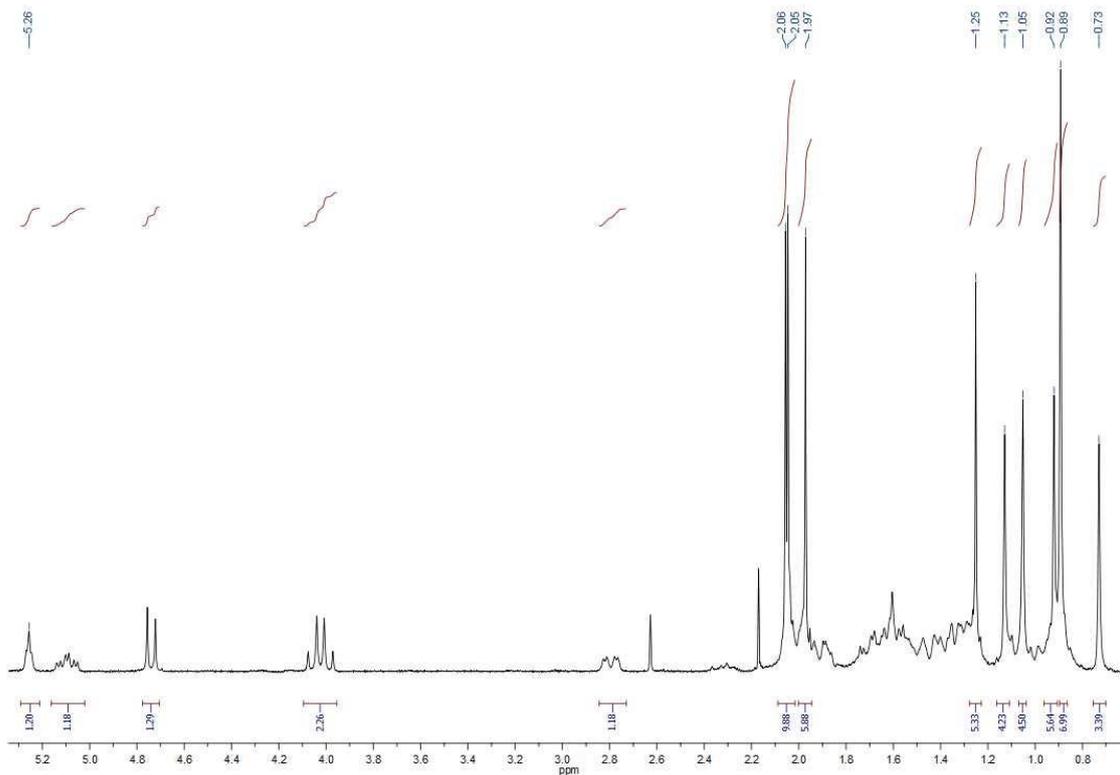


Espectro HMBC del producto 59

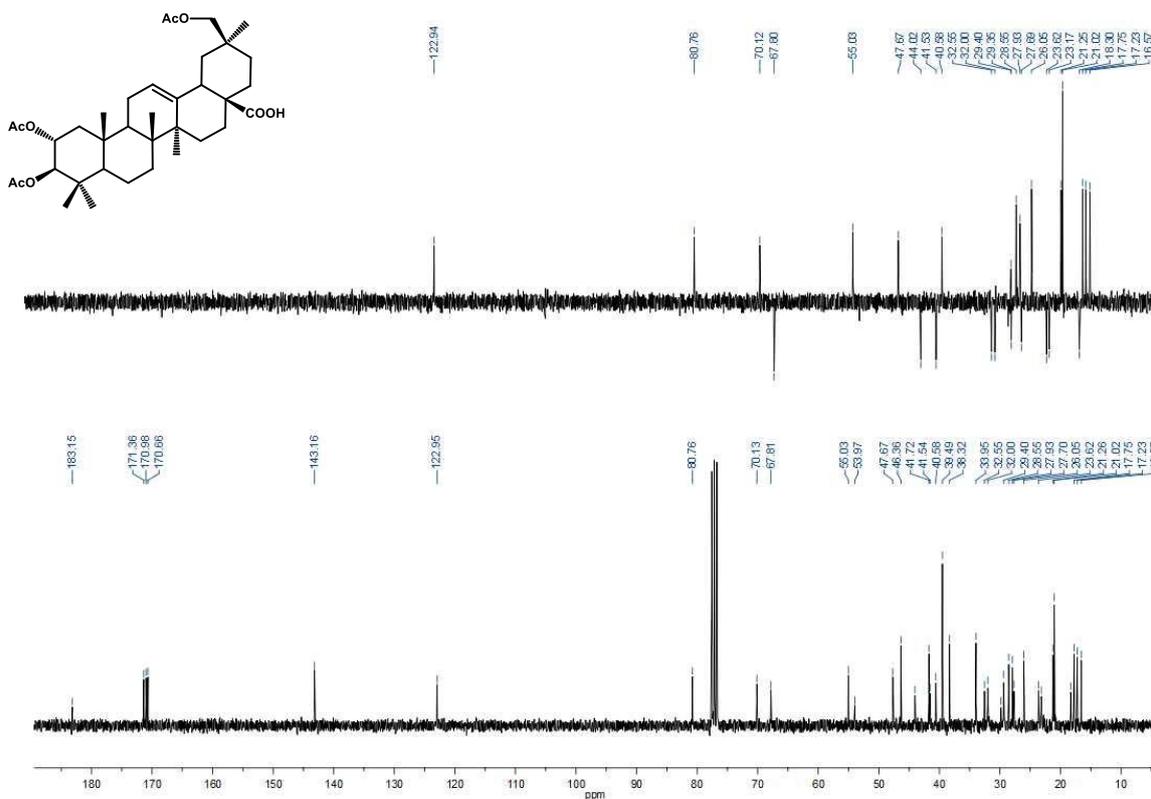


COSY del producto 59

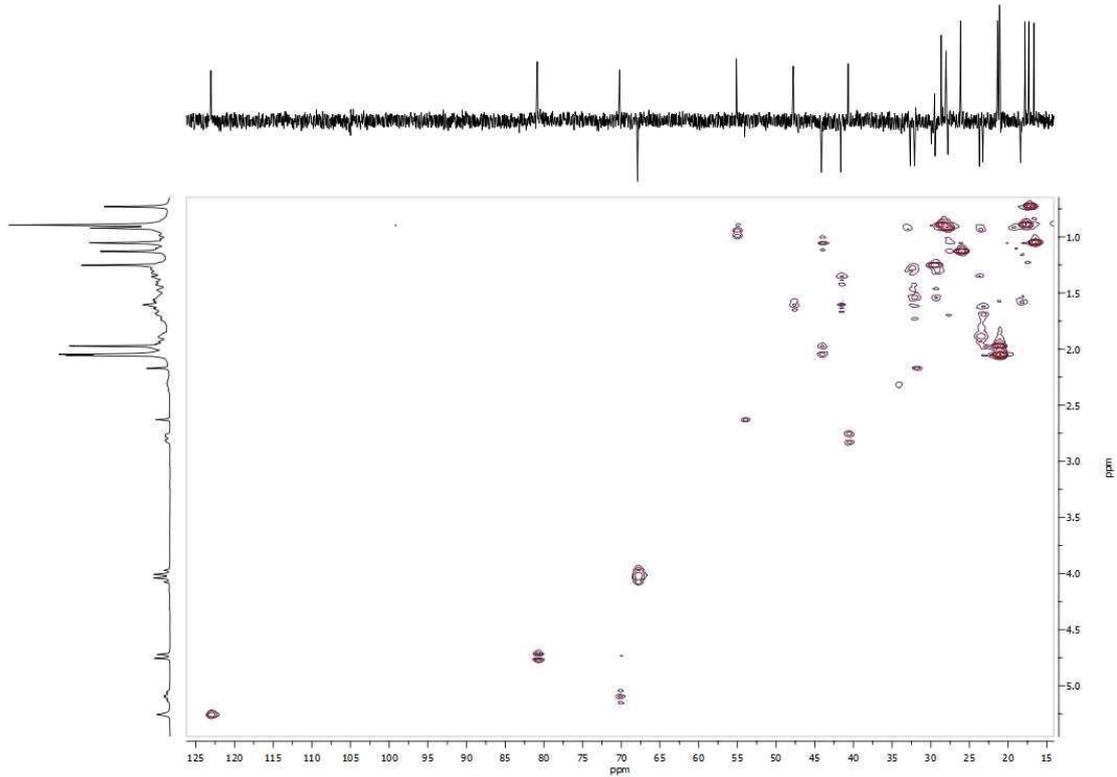




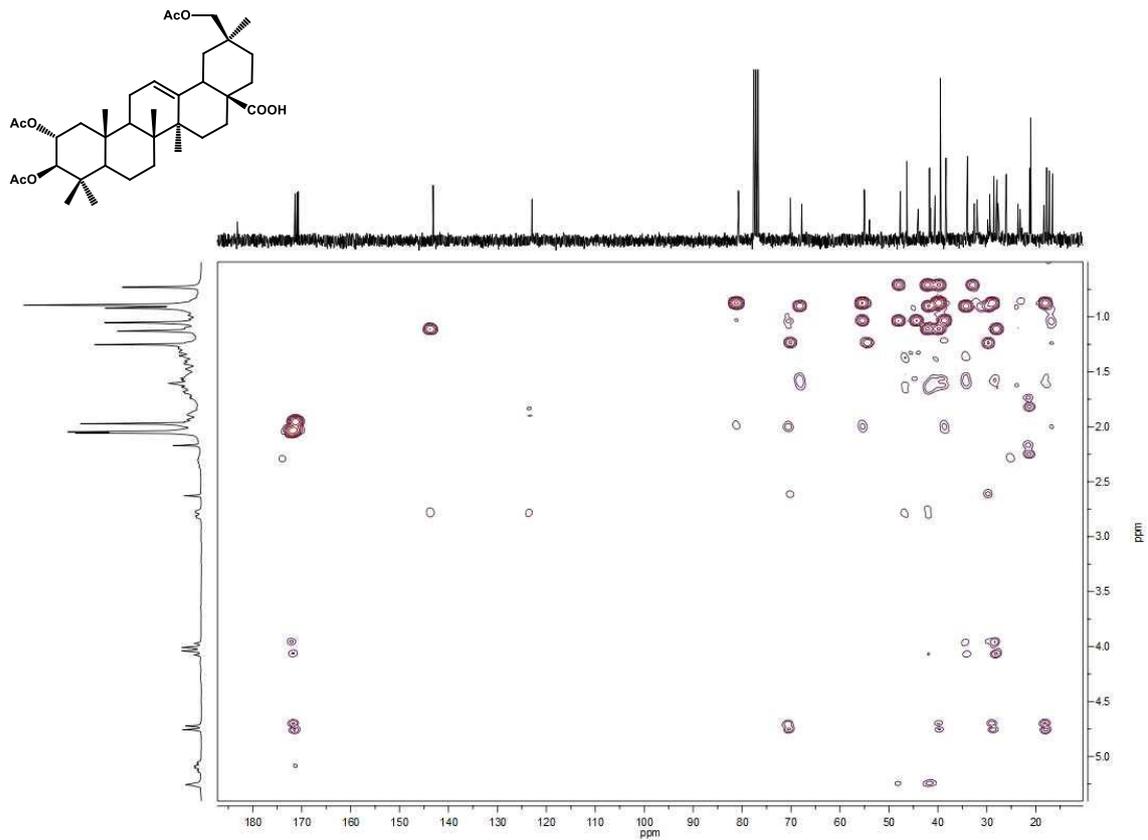
Espectro ^1H RMN del producto 60



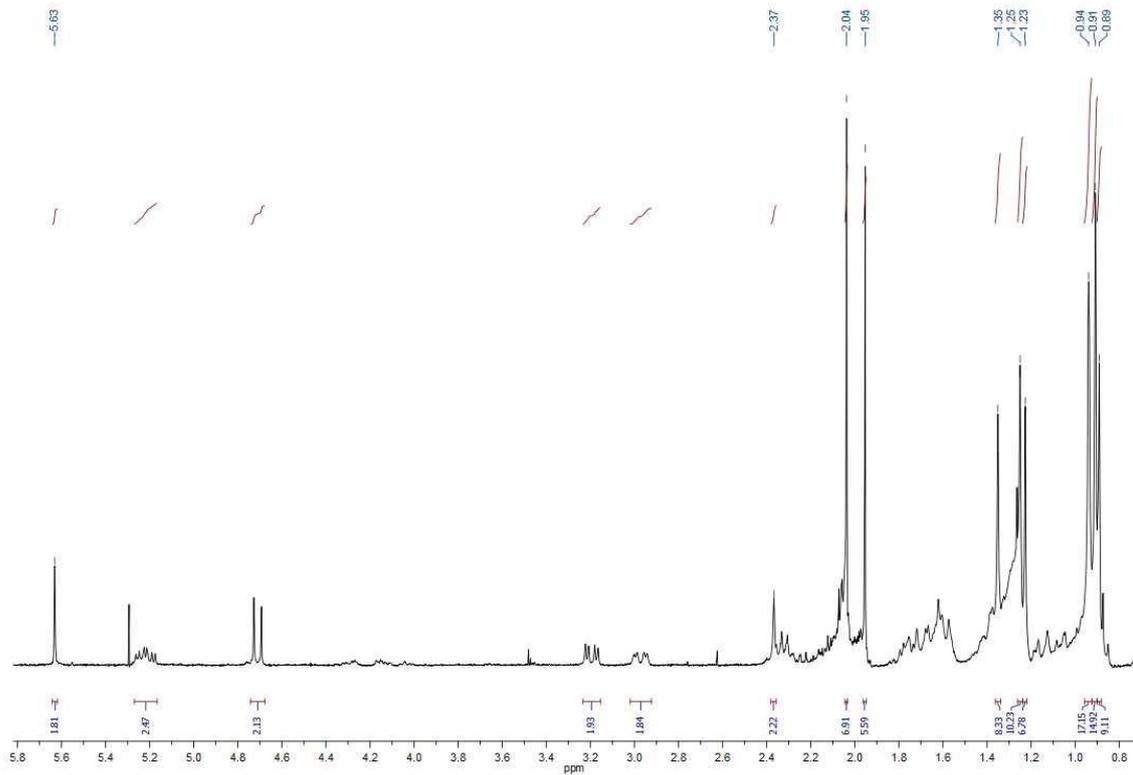
Espectro ^{13}C RMN del producto 60



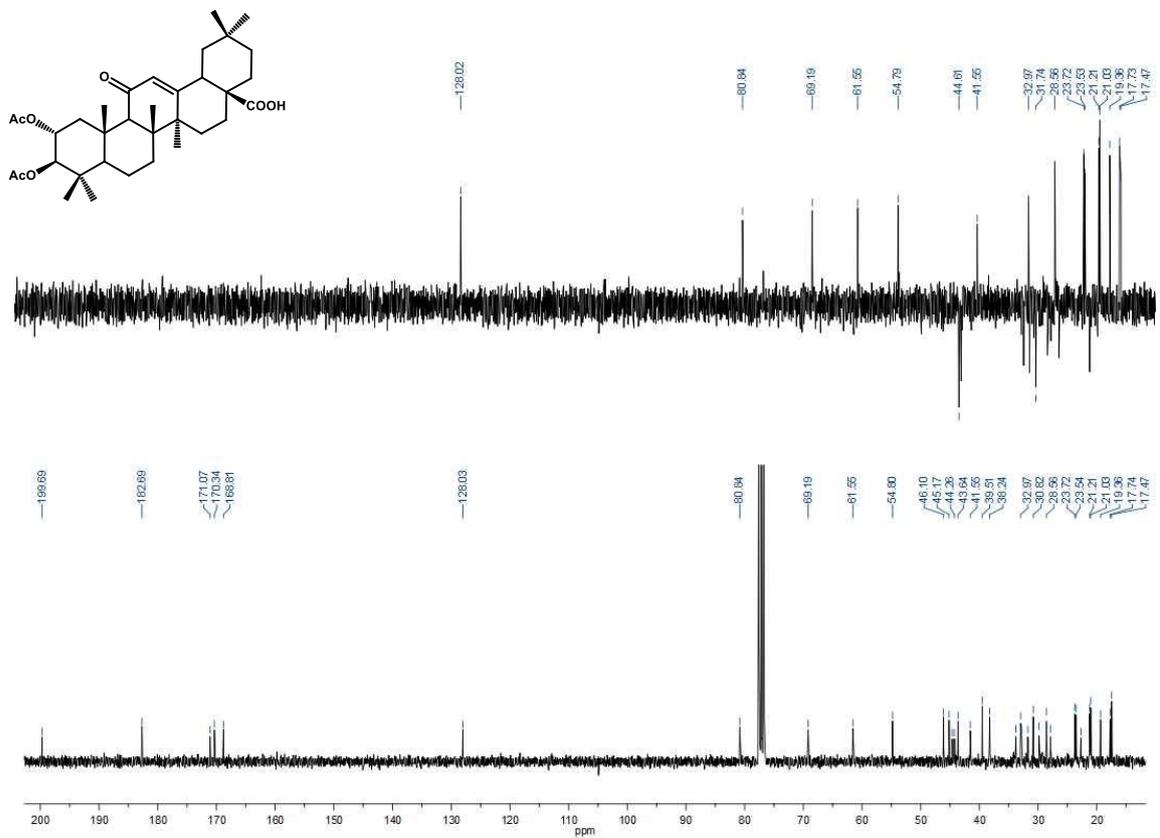
Espectro HMQC del producto 60



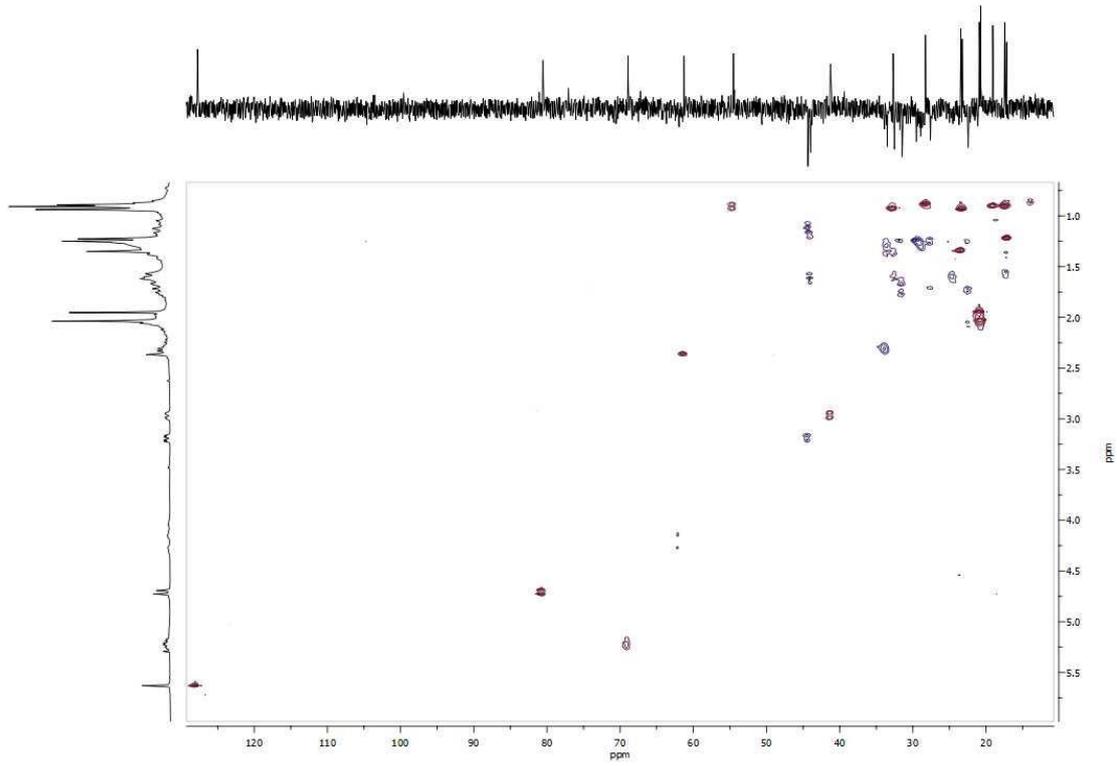
Espectro HMBC del producto 60



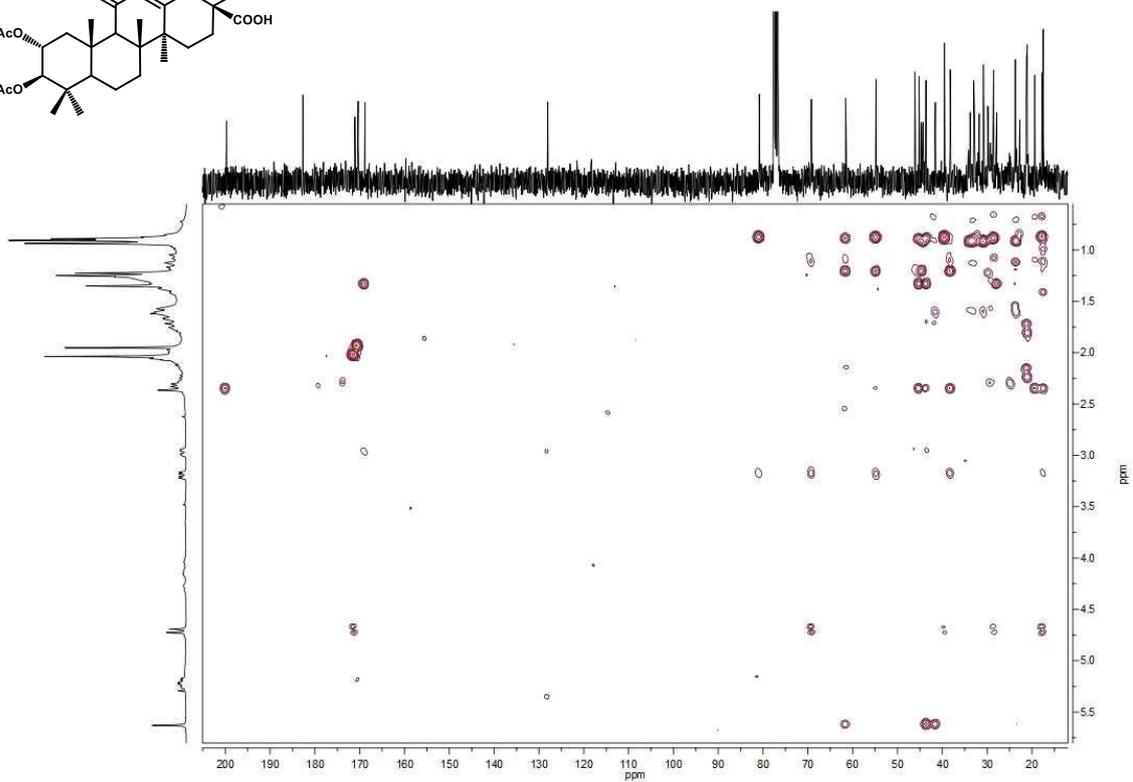
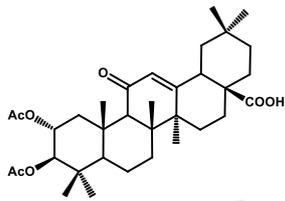
Espectro ^1H RMN del producto 61



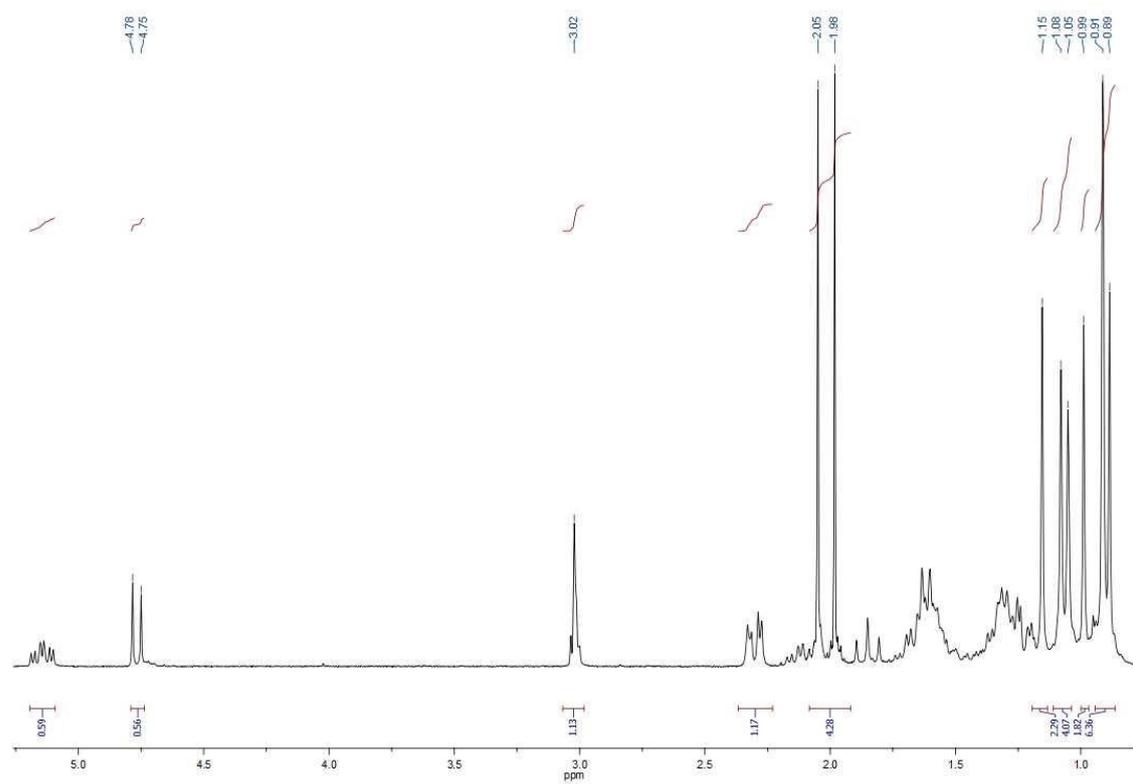
Espectro ^{13}C RMN del producto 61



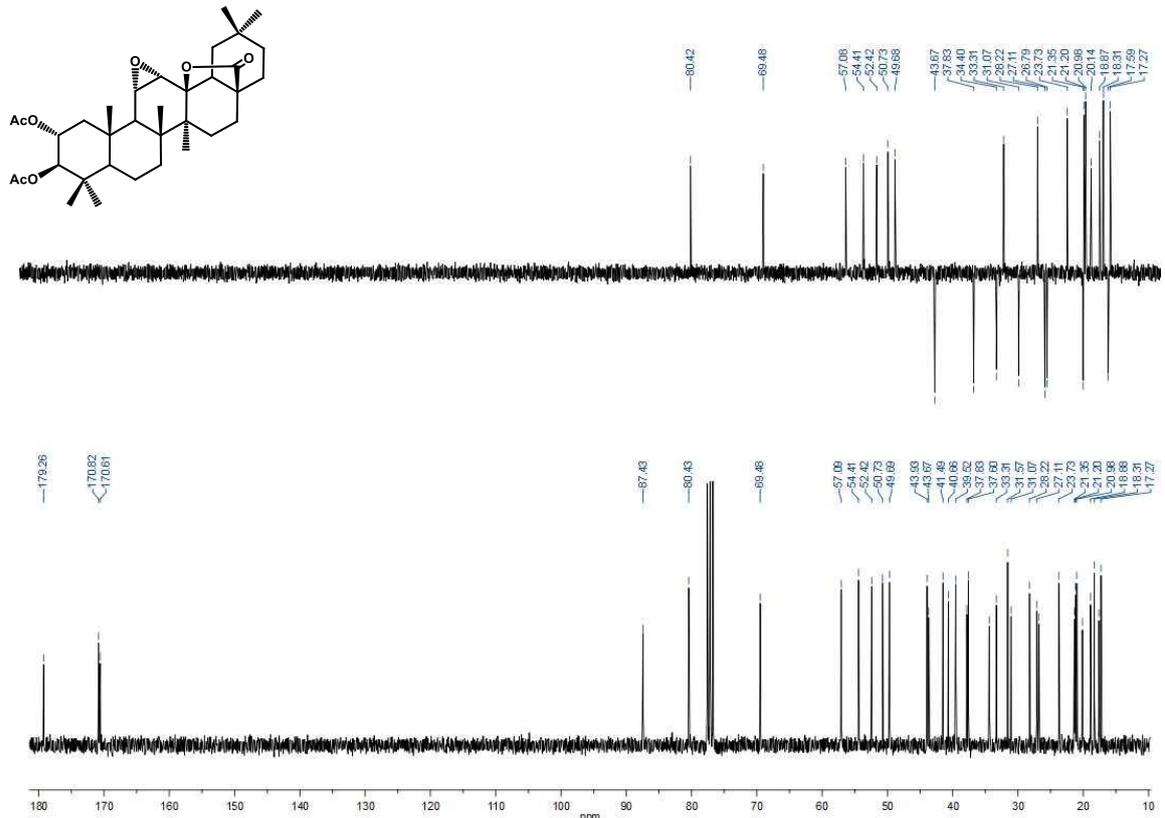
Espectro HSQC del producto 61



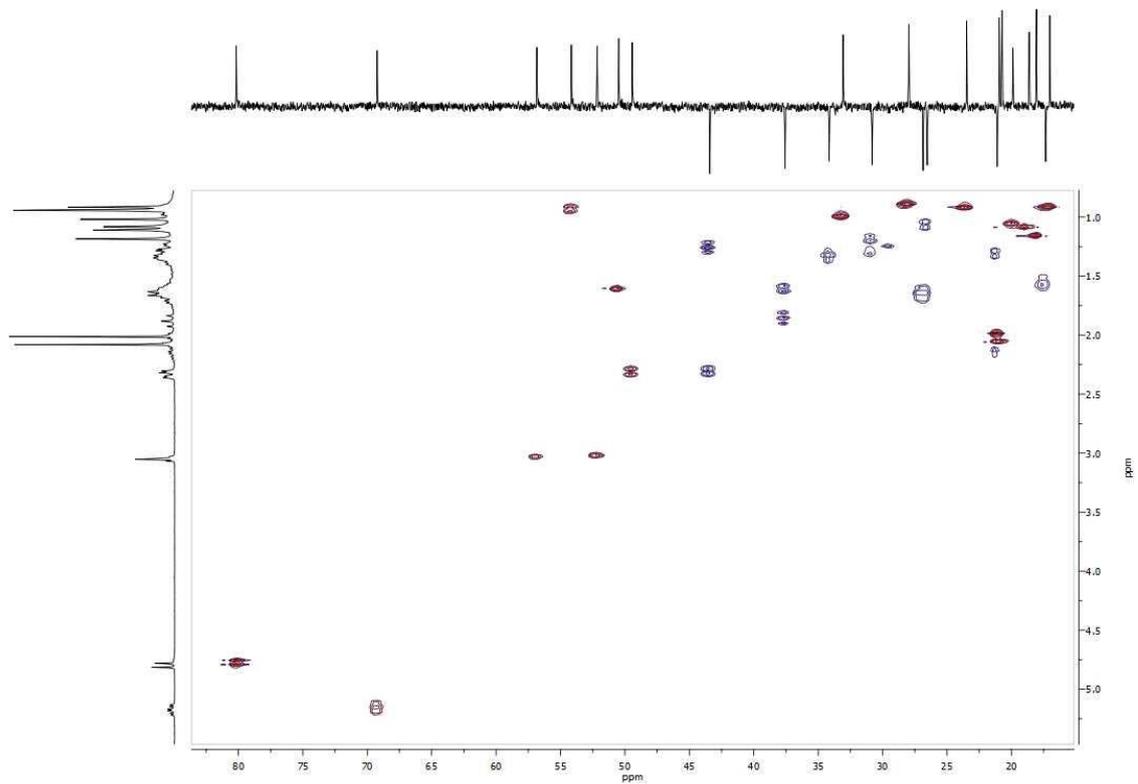
Espectro HMBC del producto 61



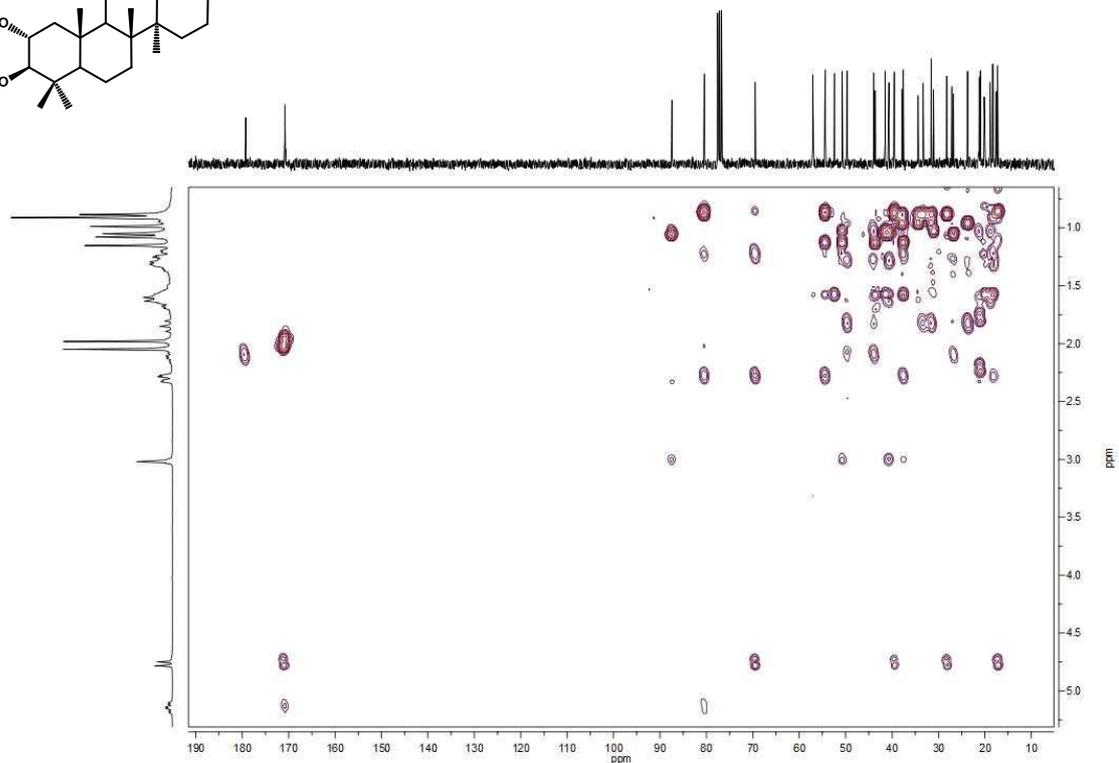
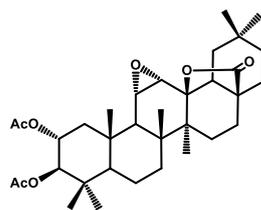
Espectro ¹H RMN del producto 62



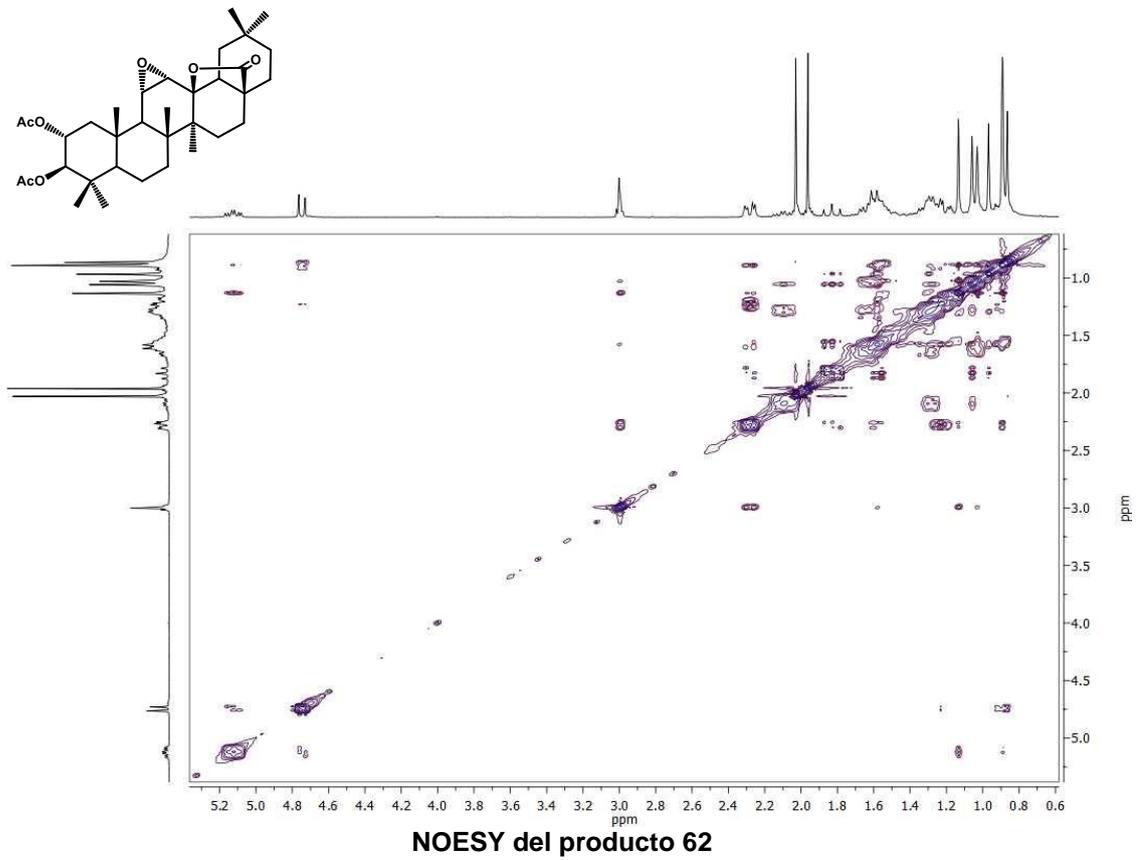
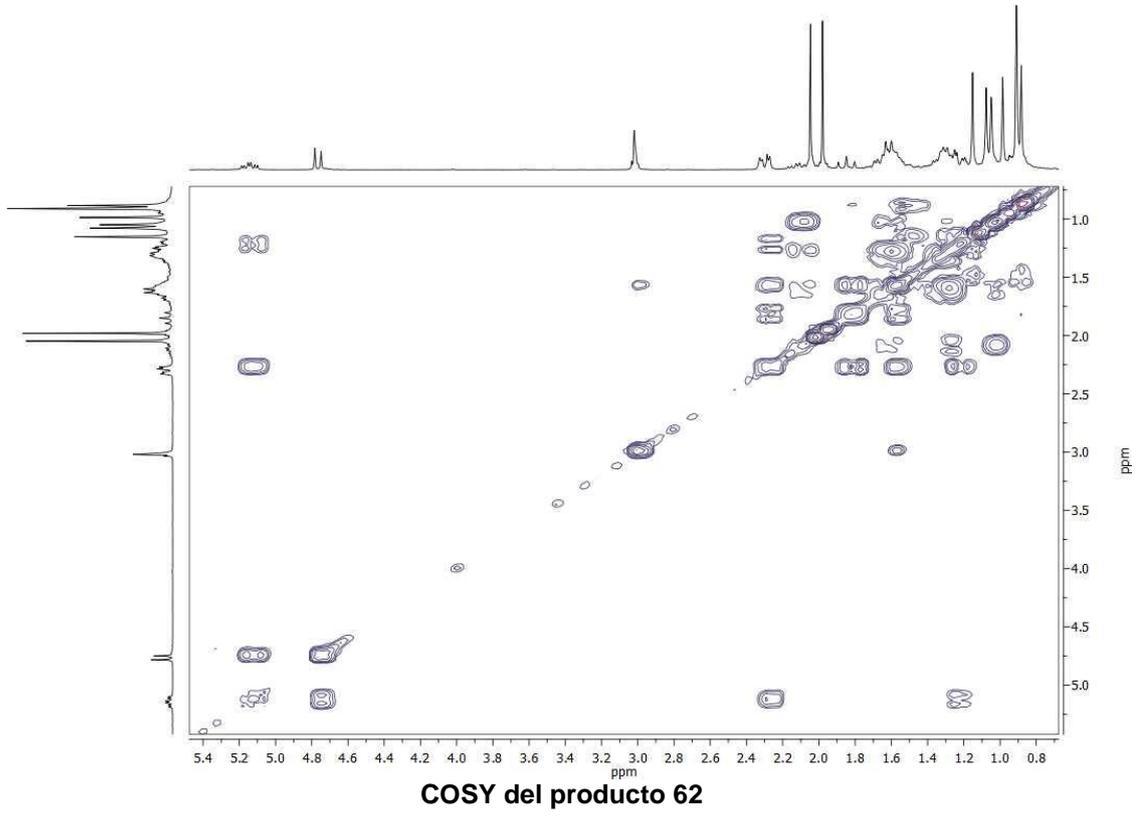
Espectro ¹³C RMN del producto 62

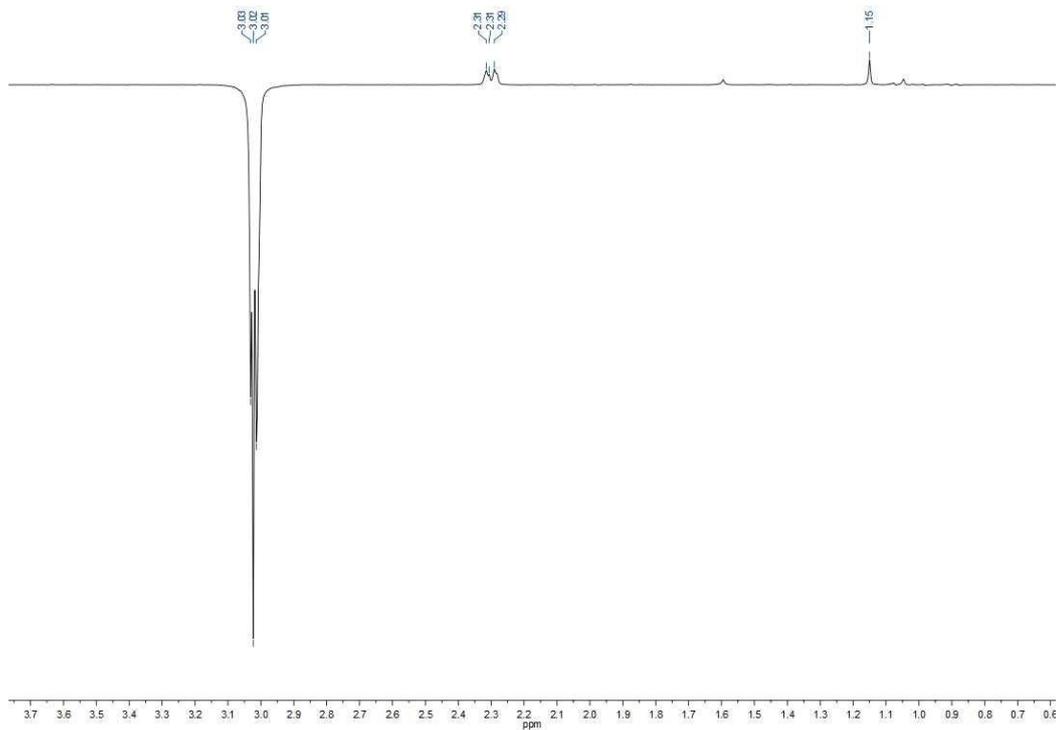


Espectro HSQC del producto 62

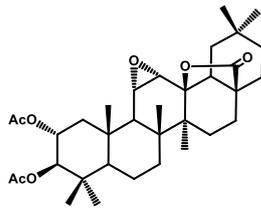


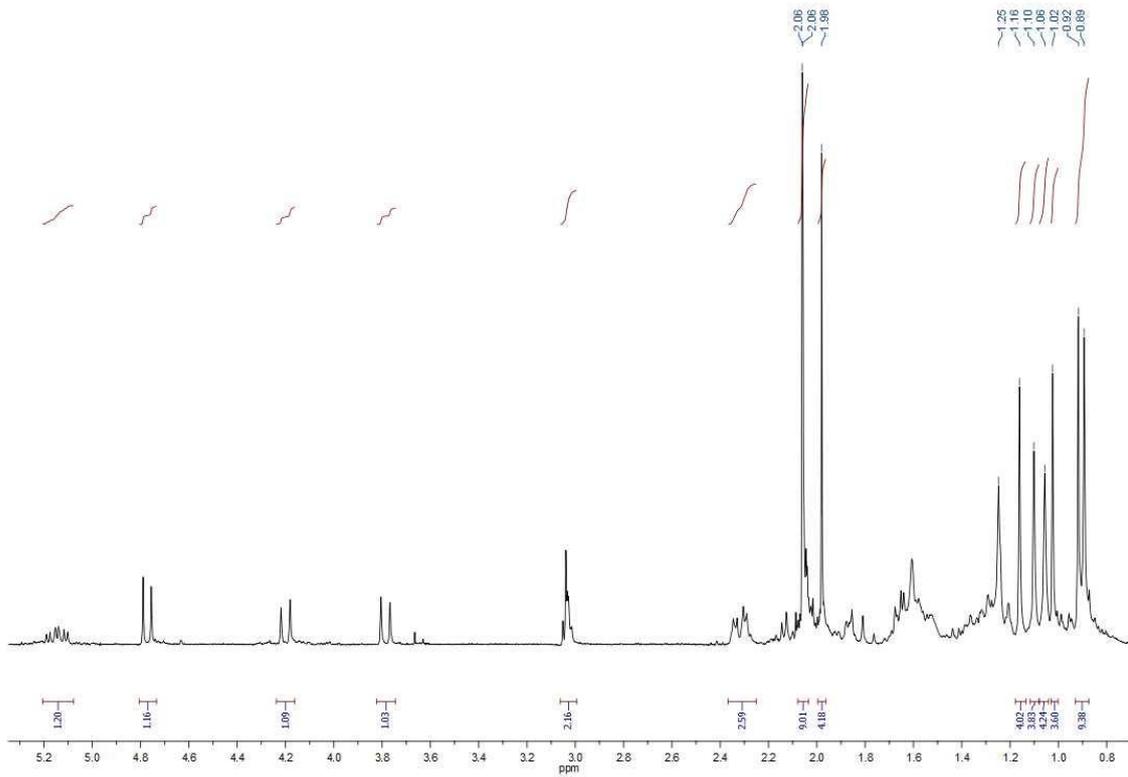
Espectro HMBC del producto 62



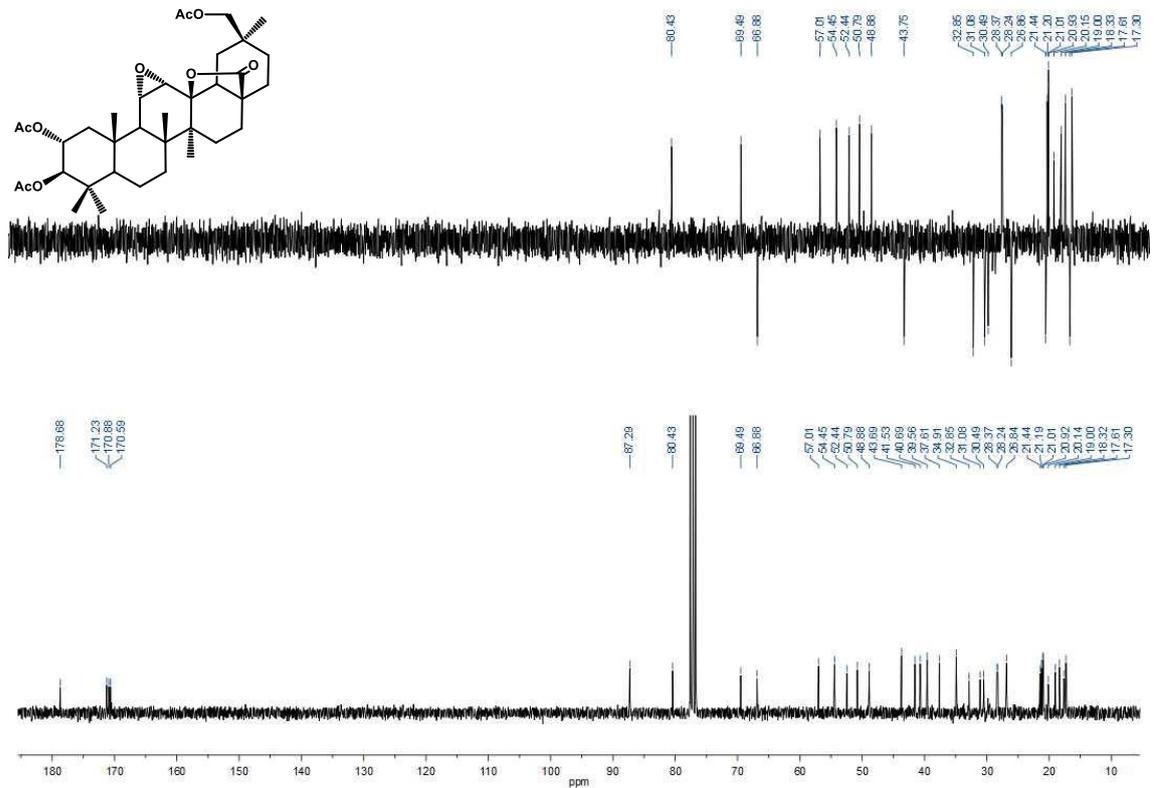


1d-NOESY del producto 62 a 3.03 ppm

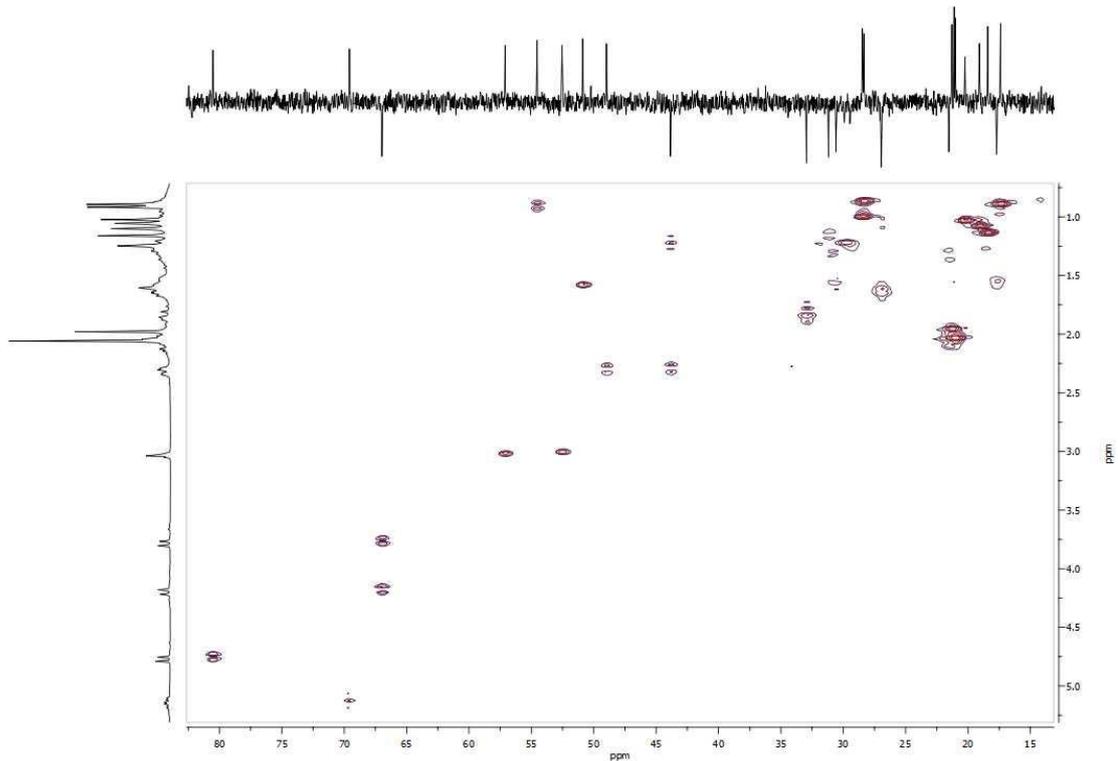




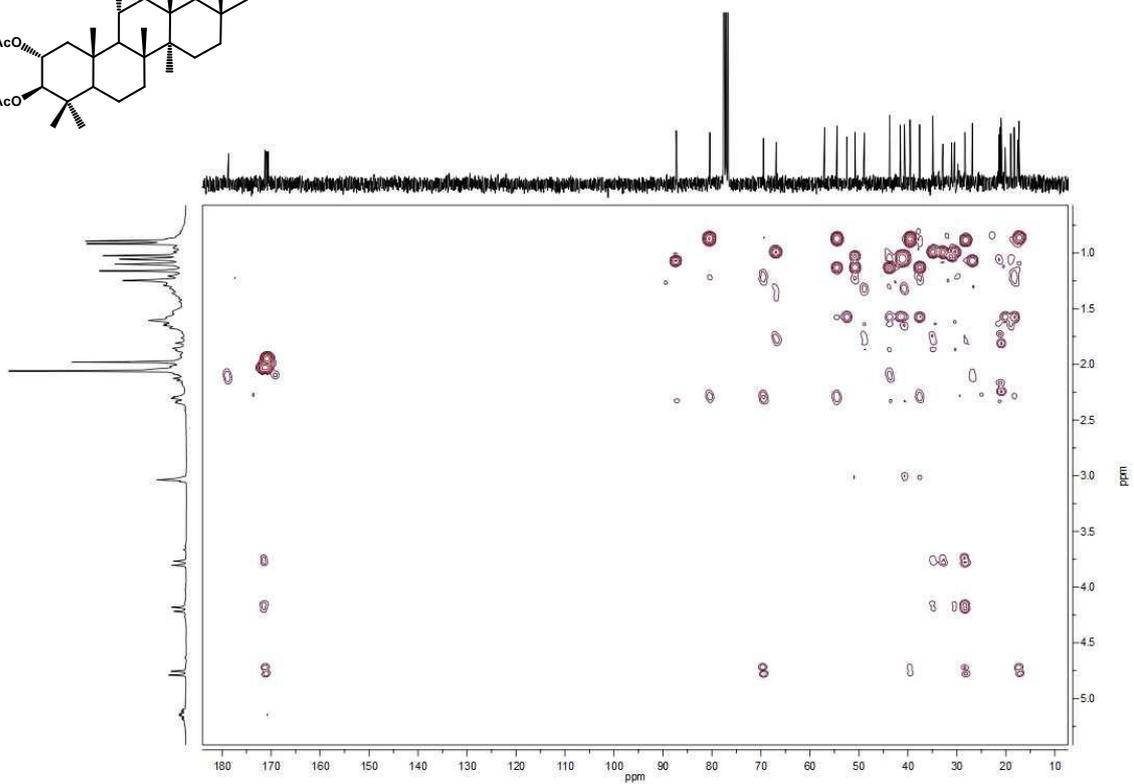
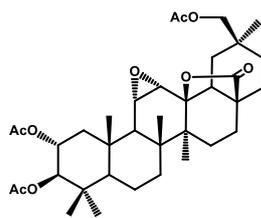
Espectro ¹H RMN del producto 63



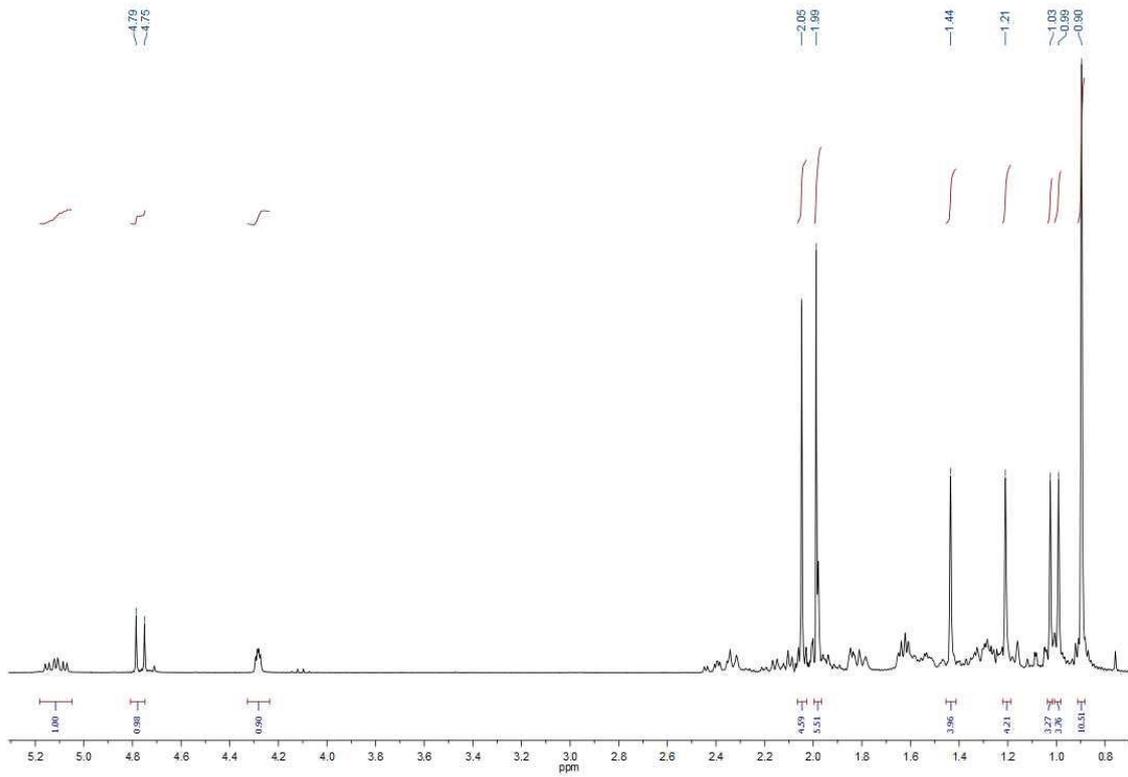
Espectro ¹³C RMN del producto 63



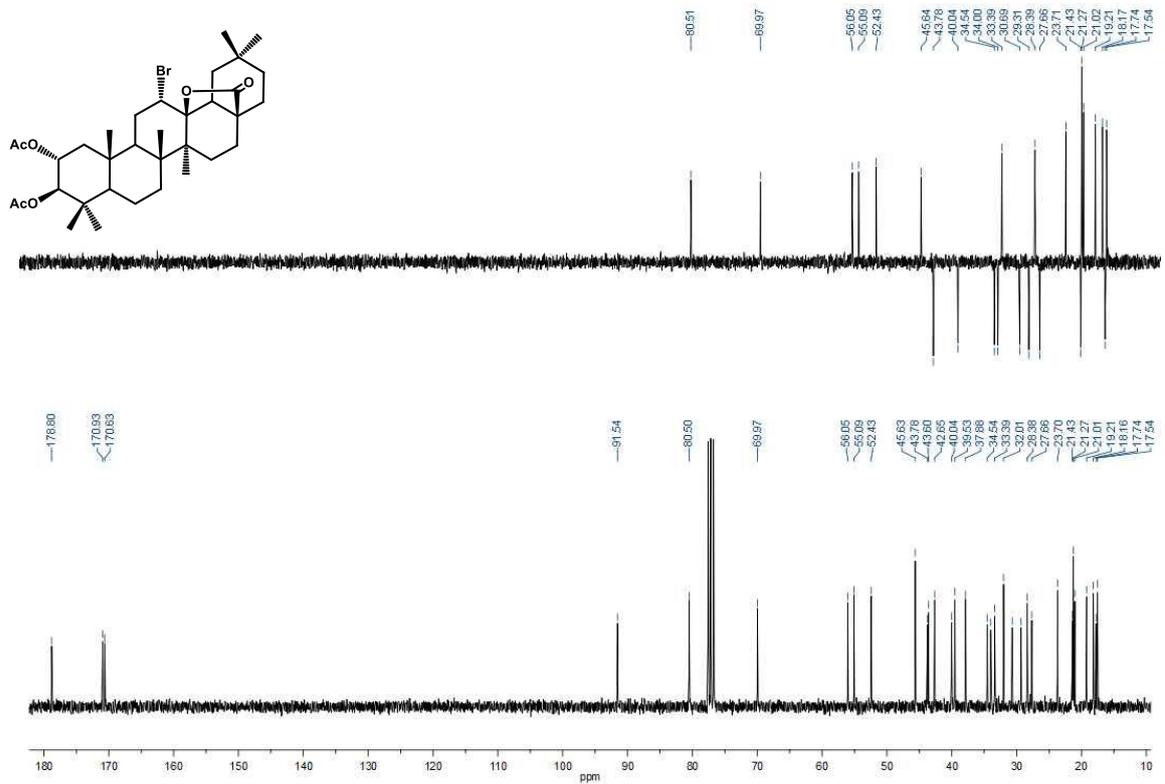
Espectro HMQC del producto 63



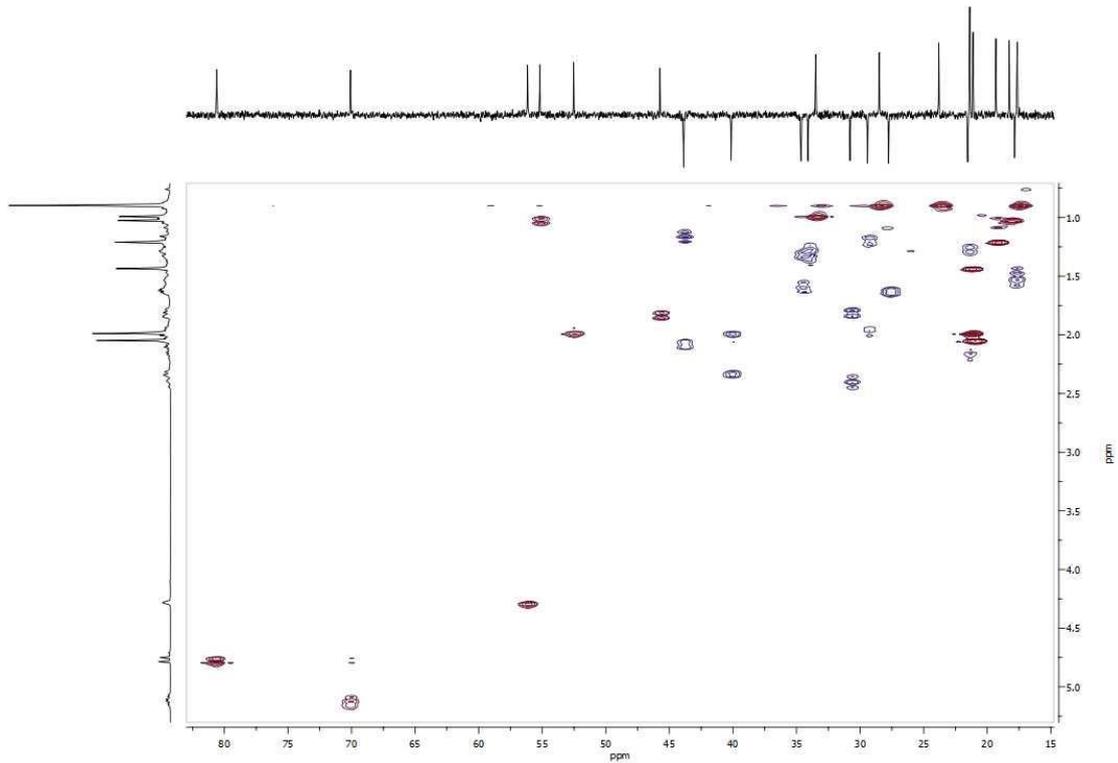
Espectro HMBC del producto 63



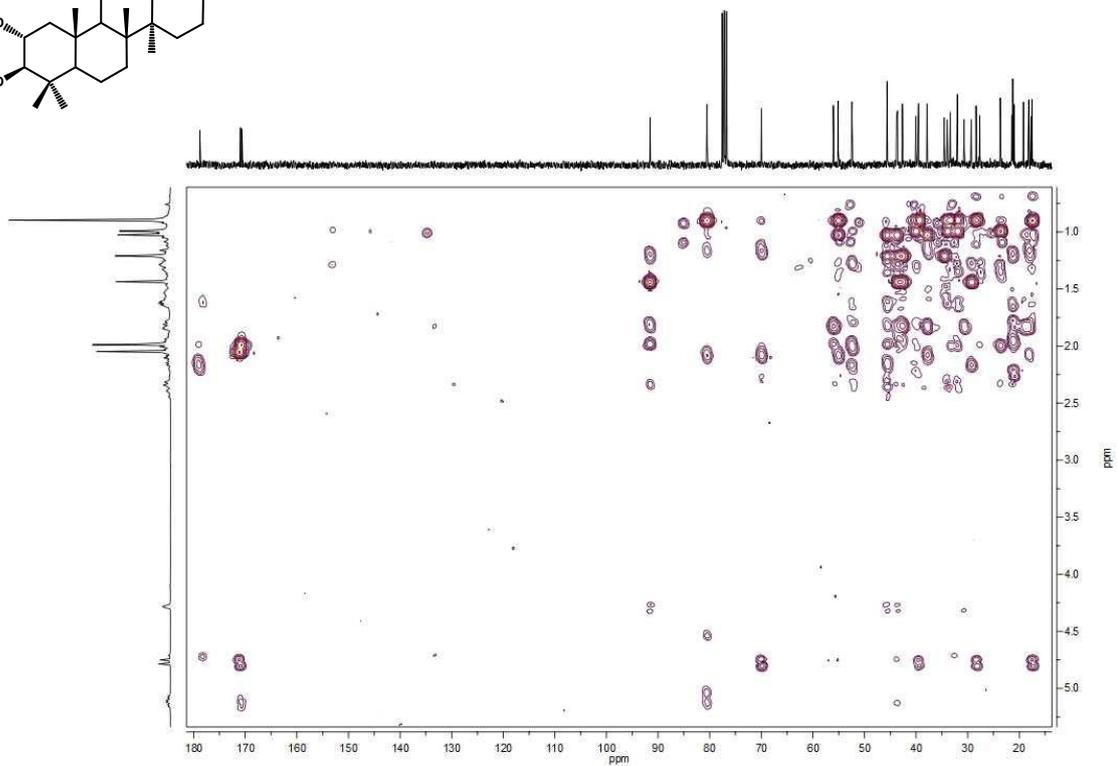
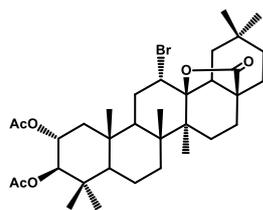
Espectro ¹H RMN del producto 64



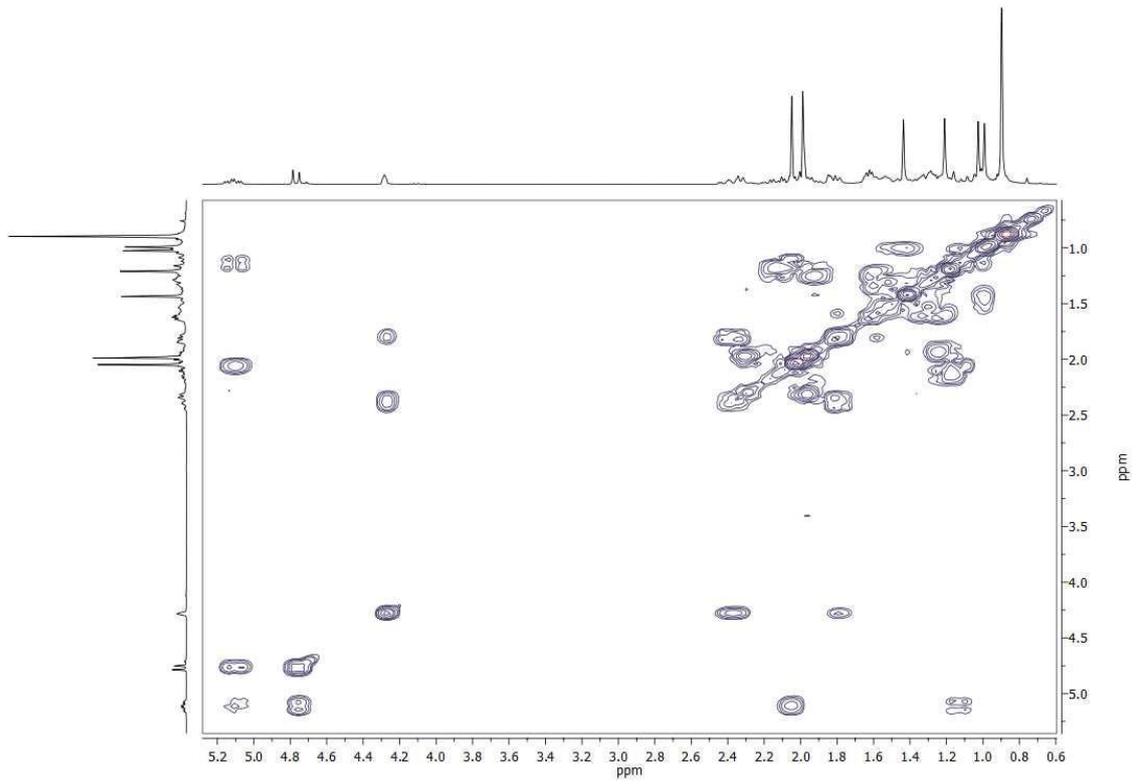
Espectro ¹³C RMN del producto 64



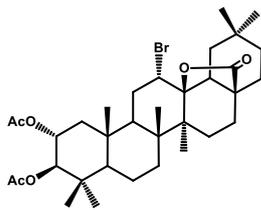
Espectro HSQC del producto 64

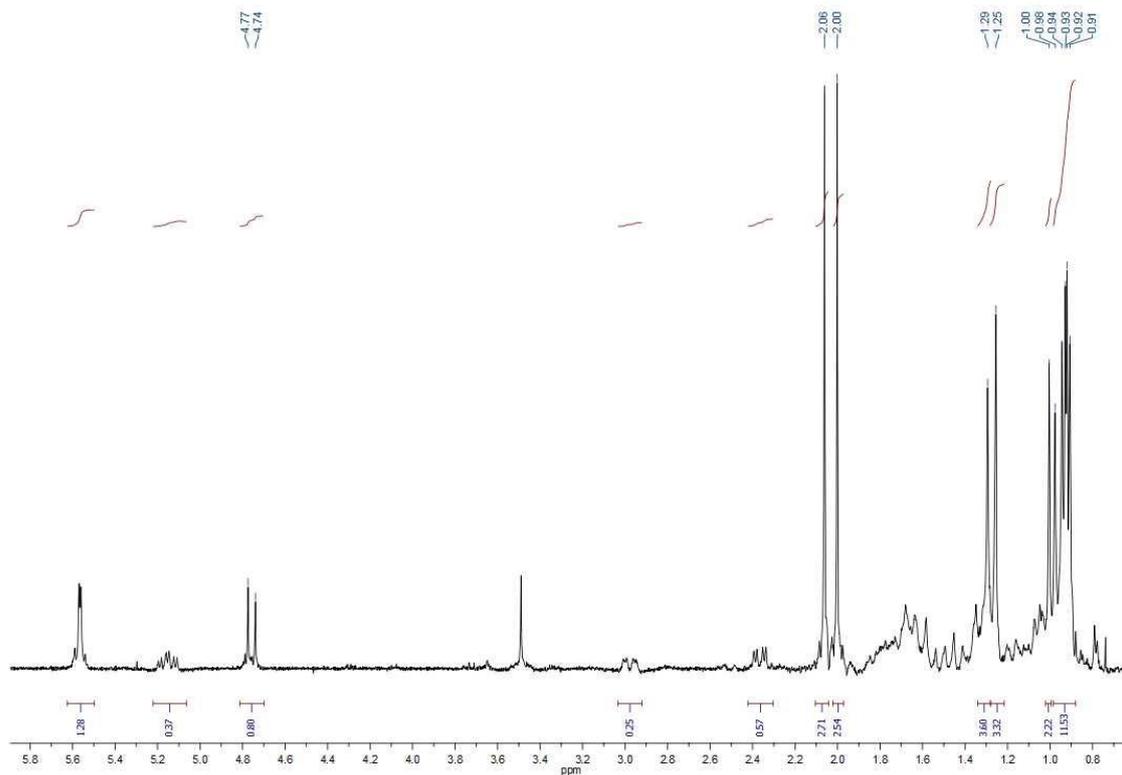


Espectro HMBC del producto 64

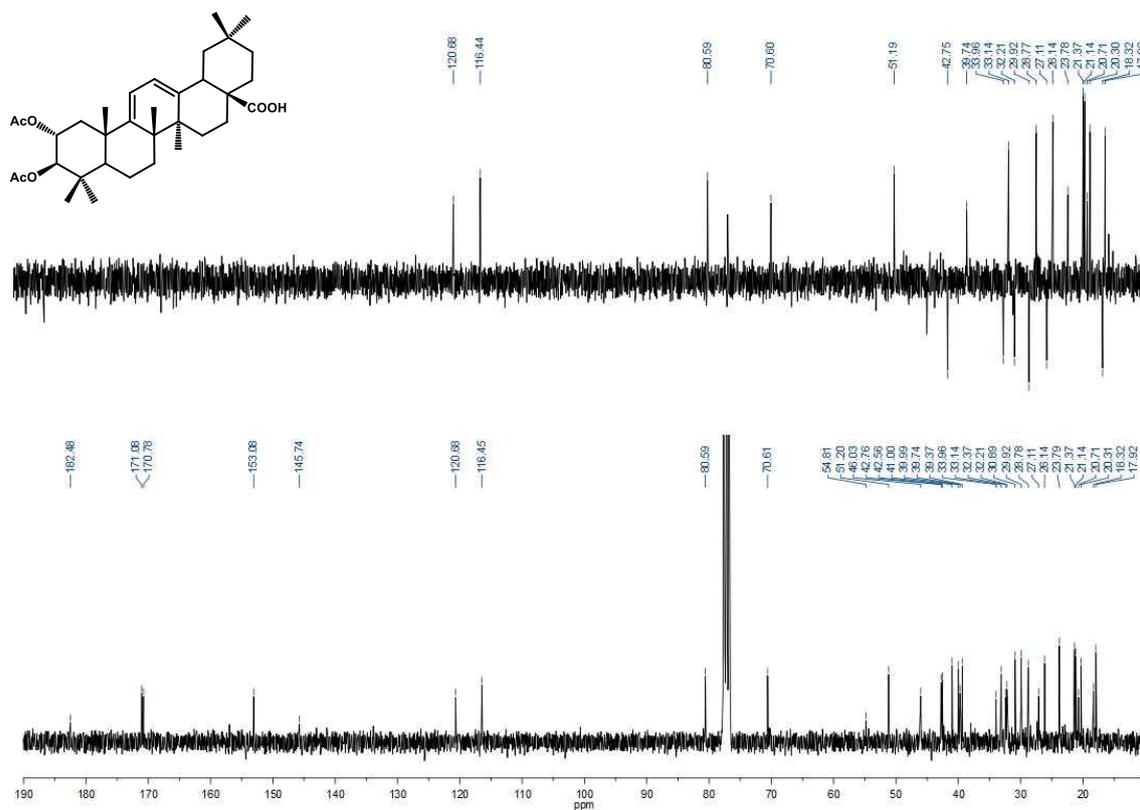


COSY del producto 64

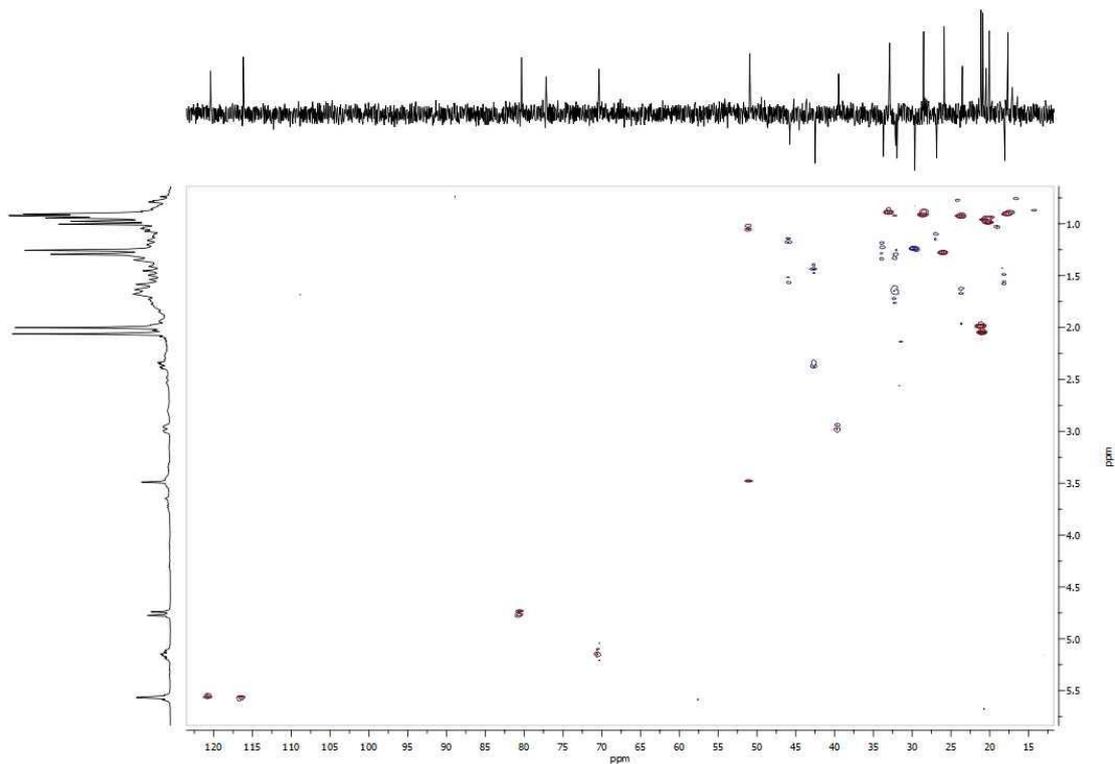




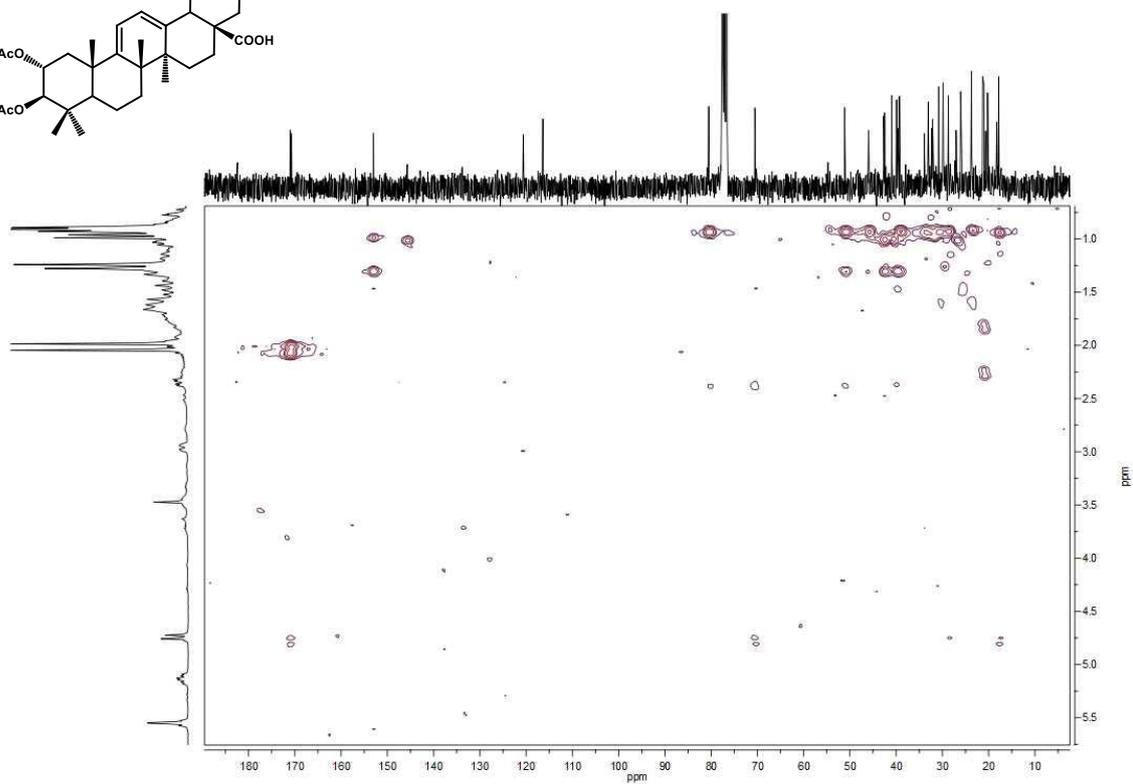
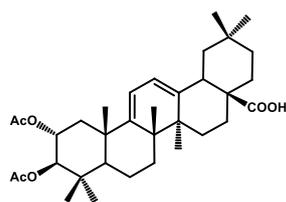
Espectro ^1H RMN del producto 65



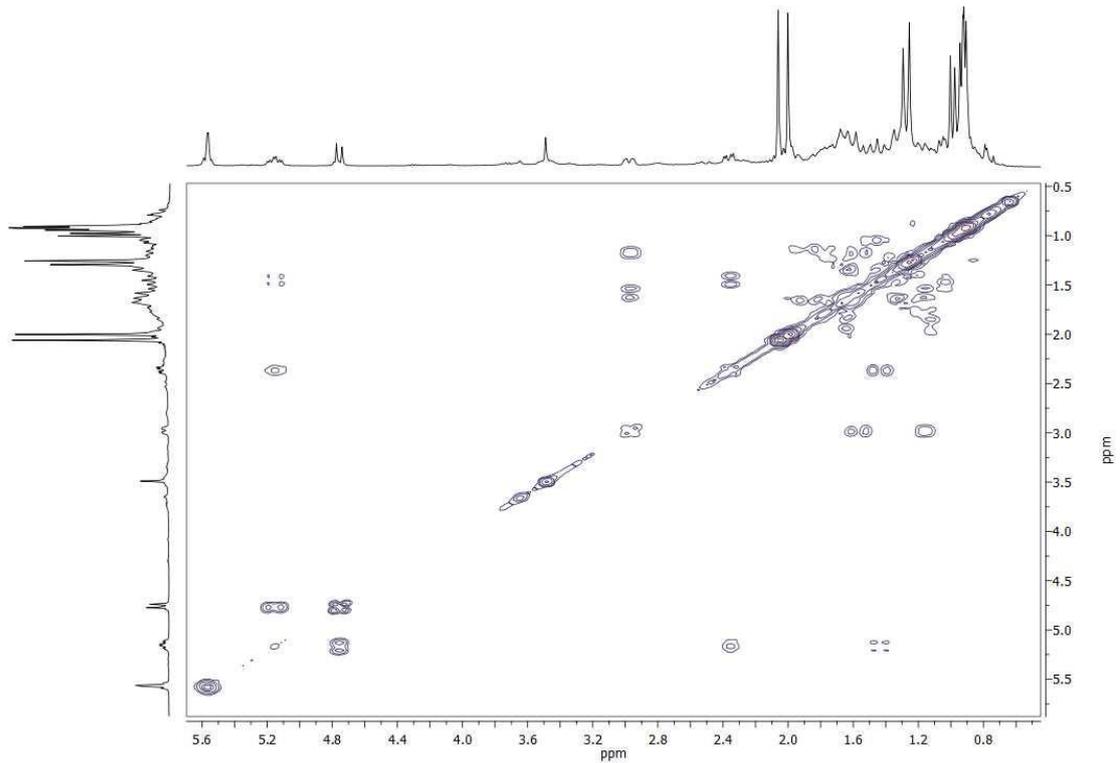
Espectro ^{13}C RMN del producto 65



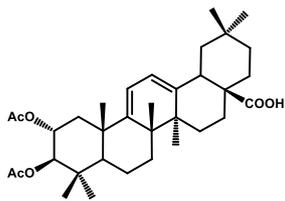
Espectro HSQC del producto 65

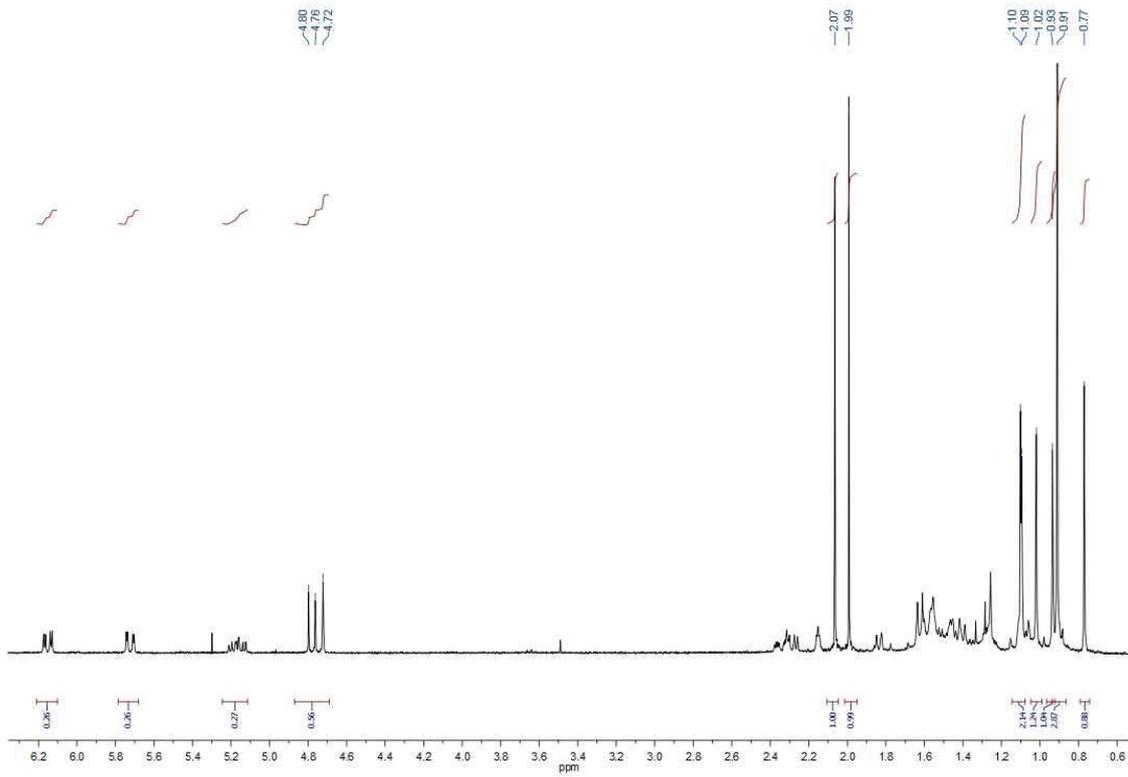


Espectro HMBC del producto 65

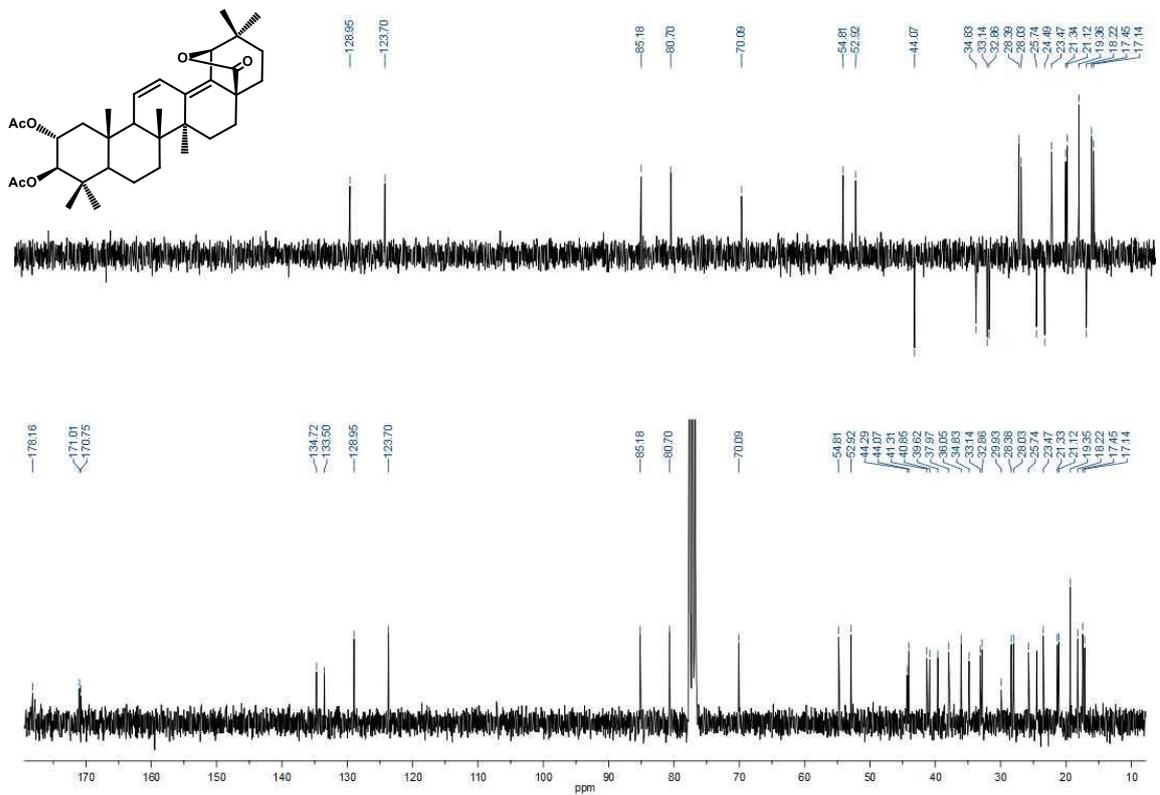


COSY del producto 65

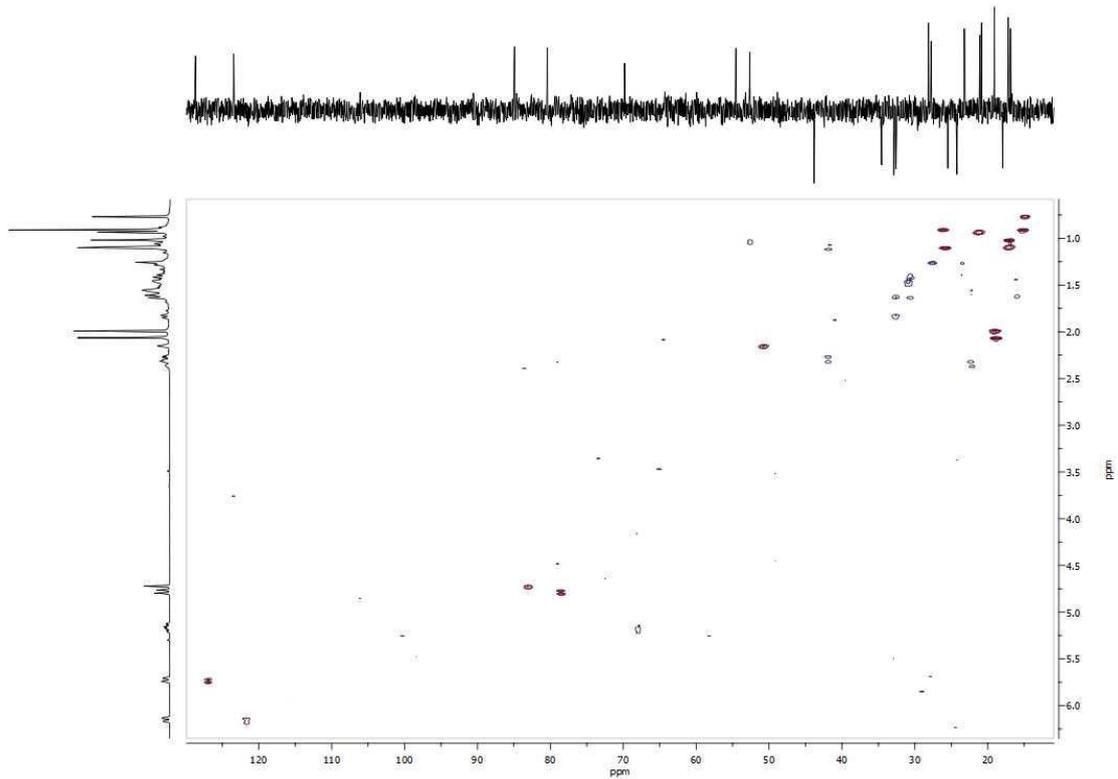




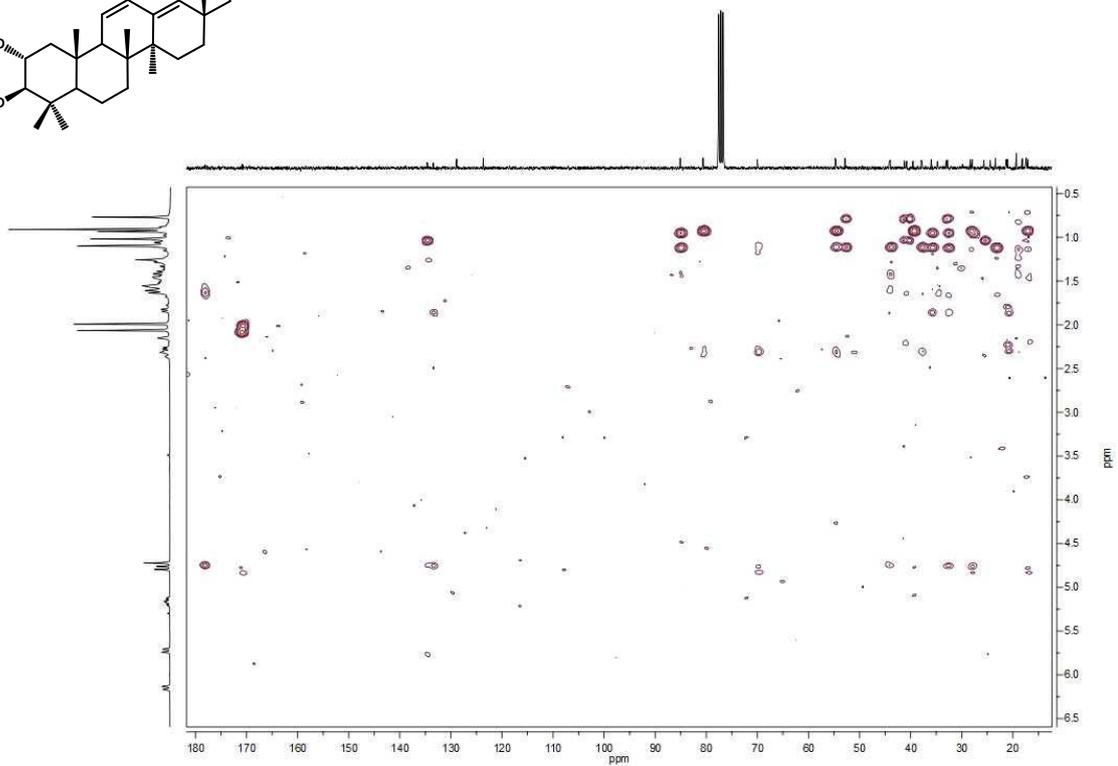
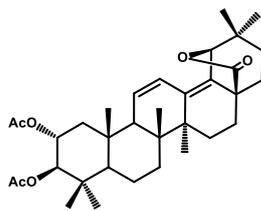
Espectro ¹H RMN del producto 66



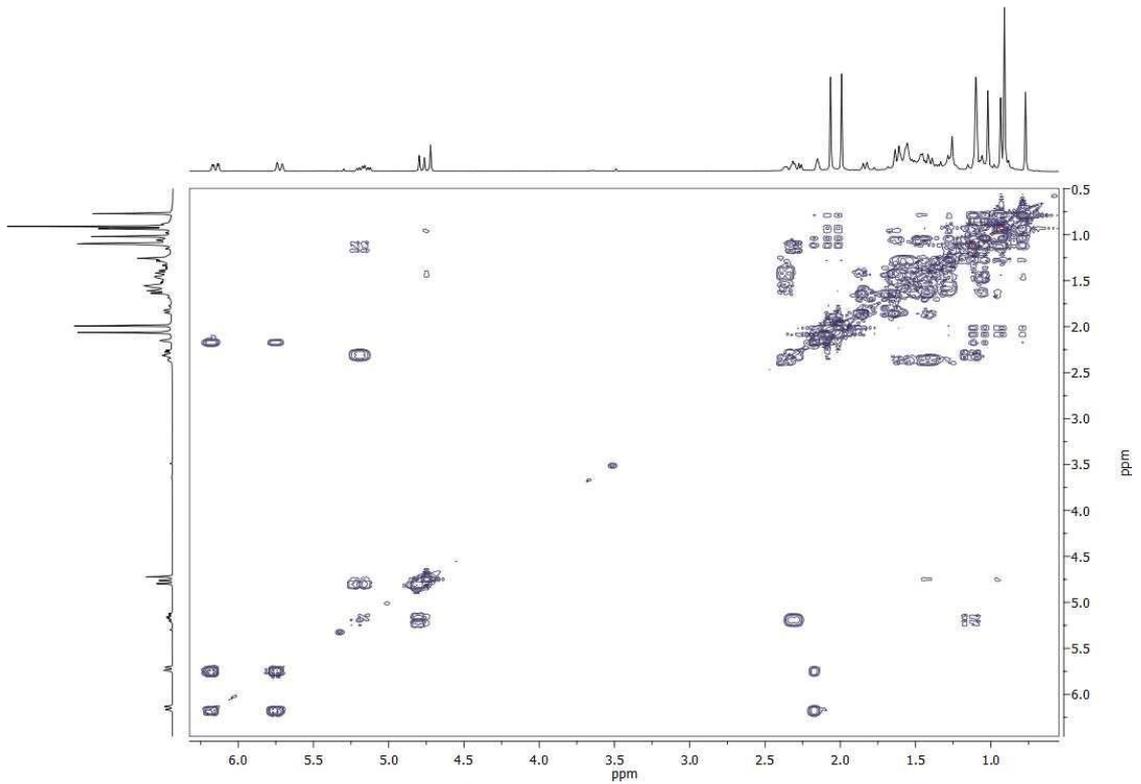
Espectro ¹³C RMN del producto 66



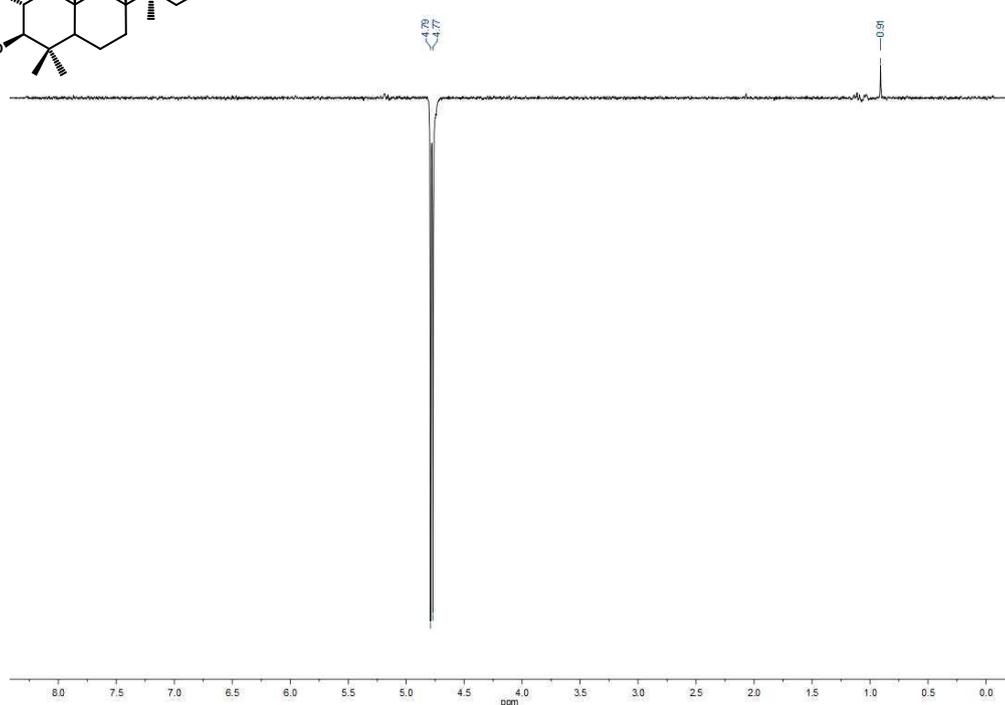
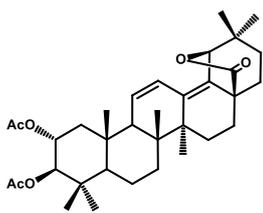
Espectro HSQC del producto 66



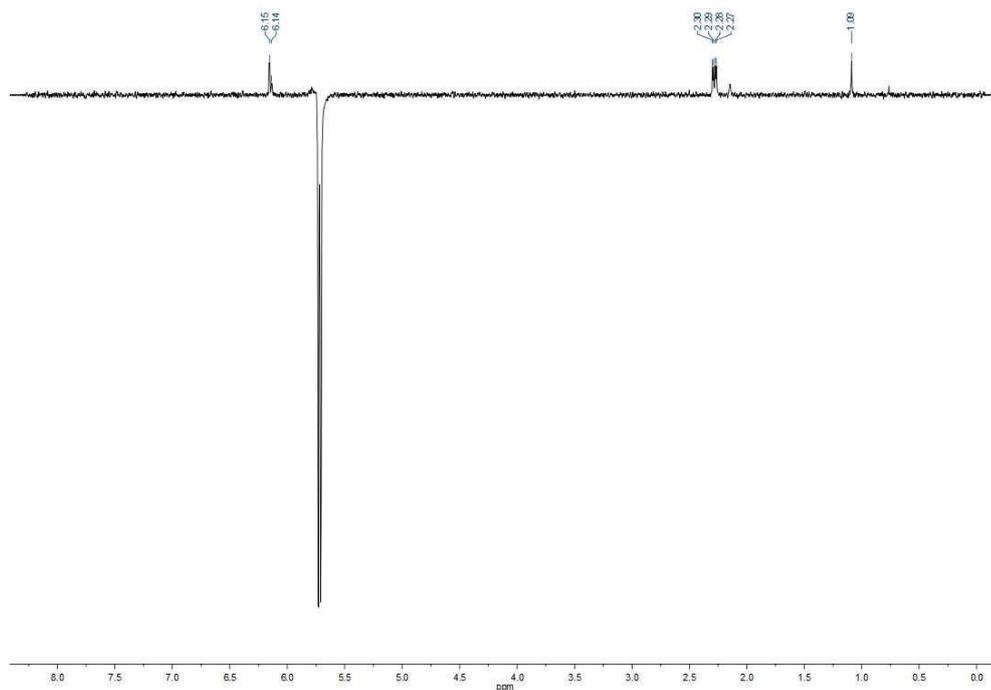
Espectro HMBC del producto 66



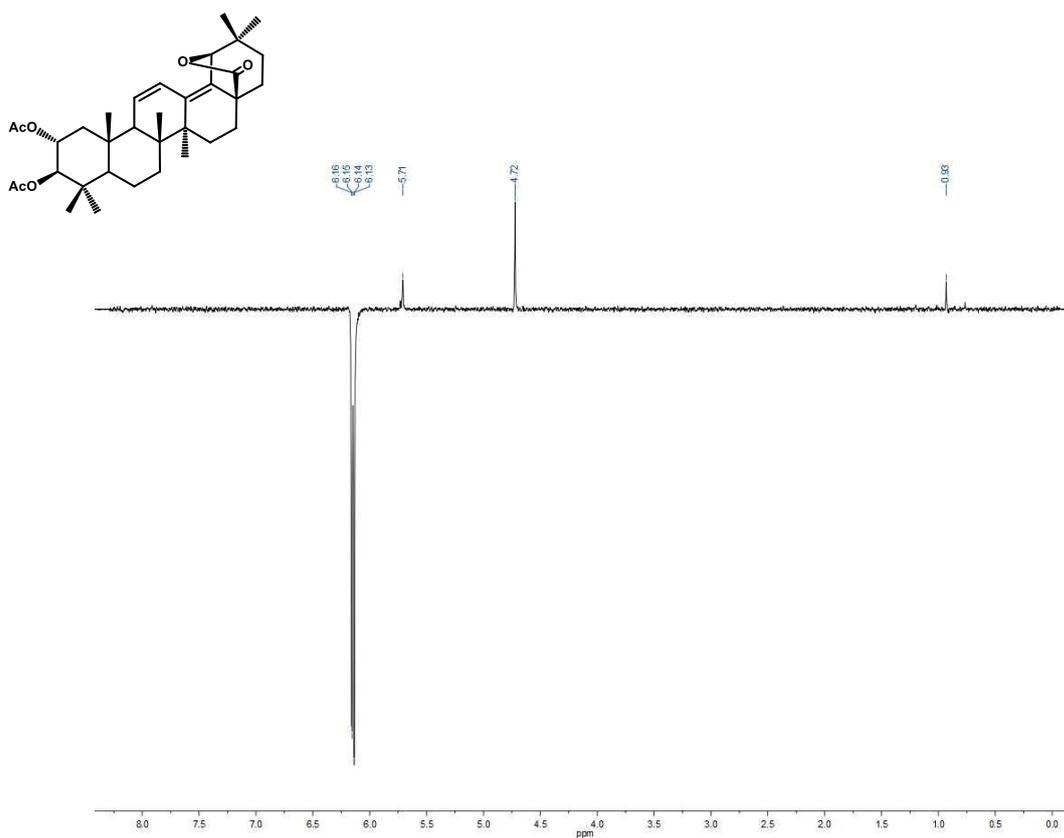
COSY del producto 66



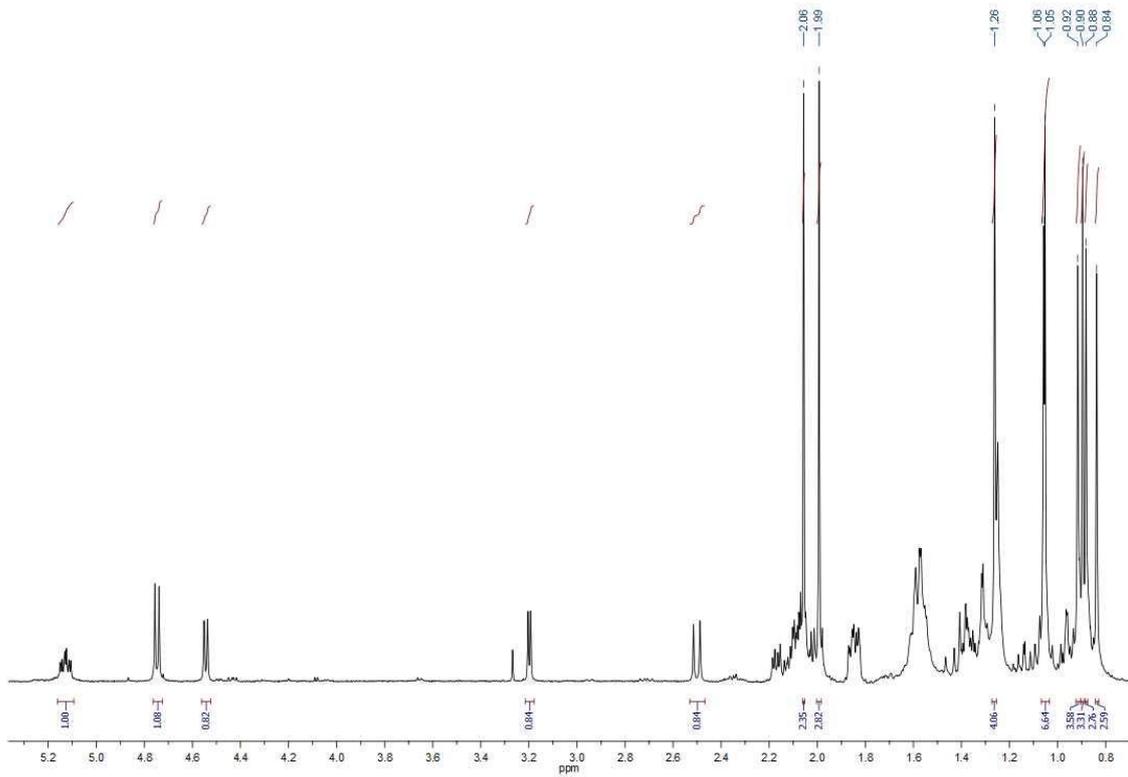
1d-NOESY del producto 66 a 4.79 ppm



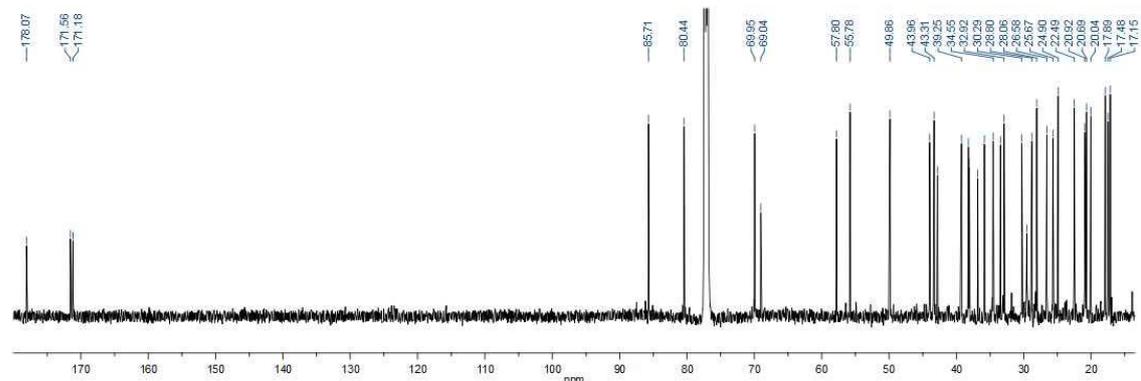
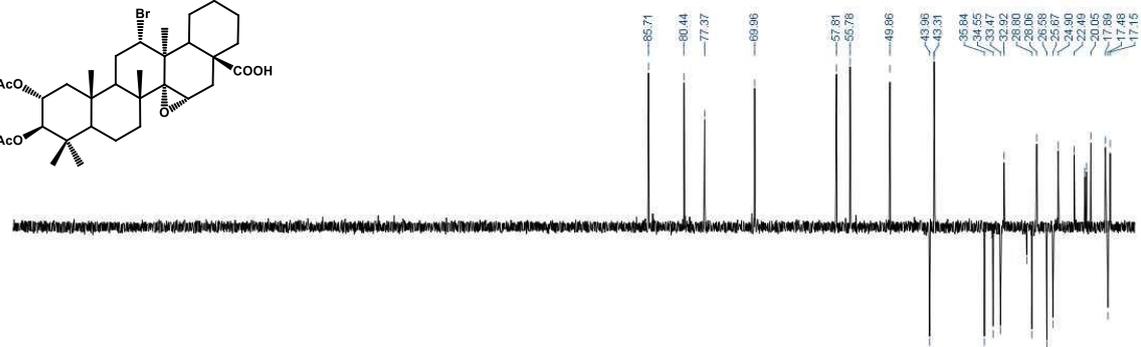
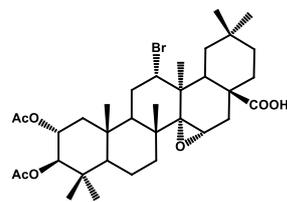
1d-NOESY del producto 66 a 5.73 ppm



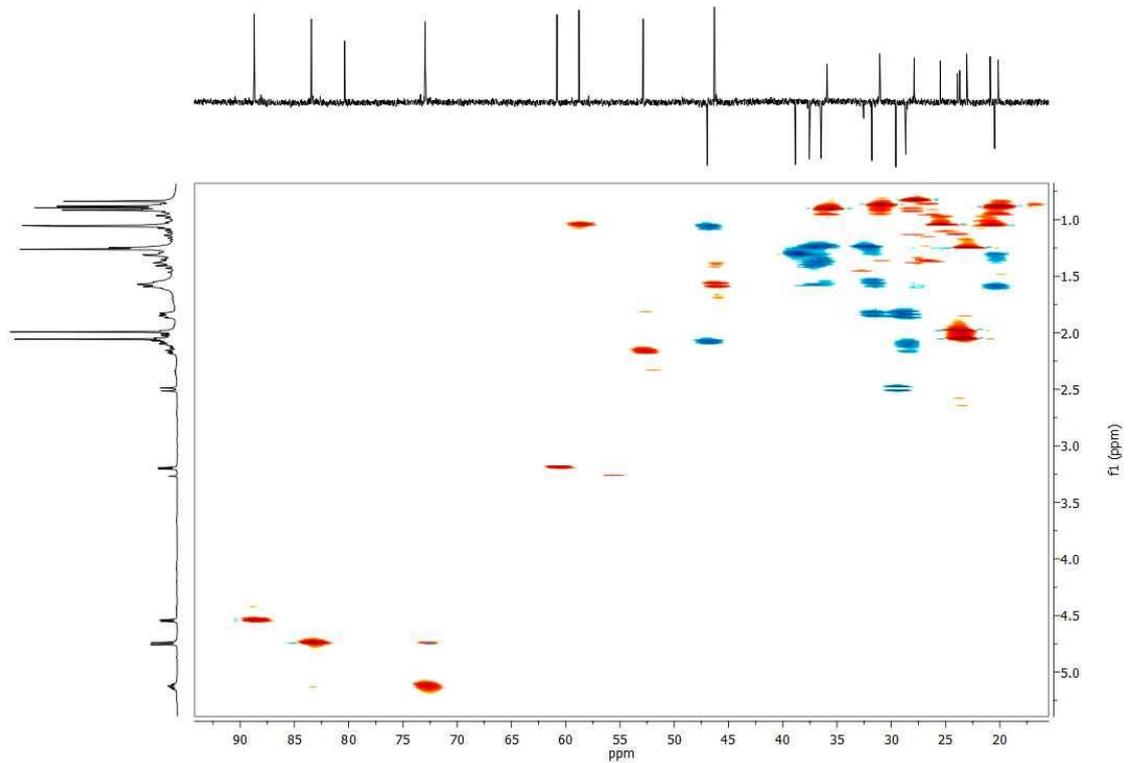
1d-NOESY del producto 66 a 6.14 ppm



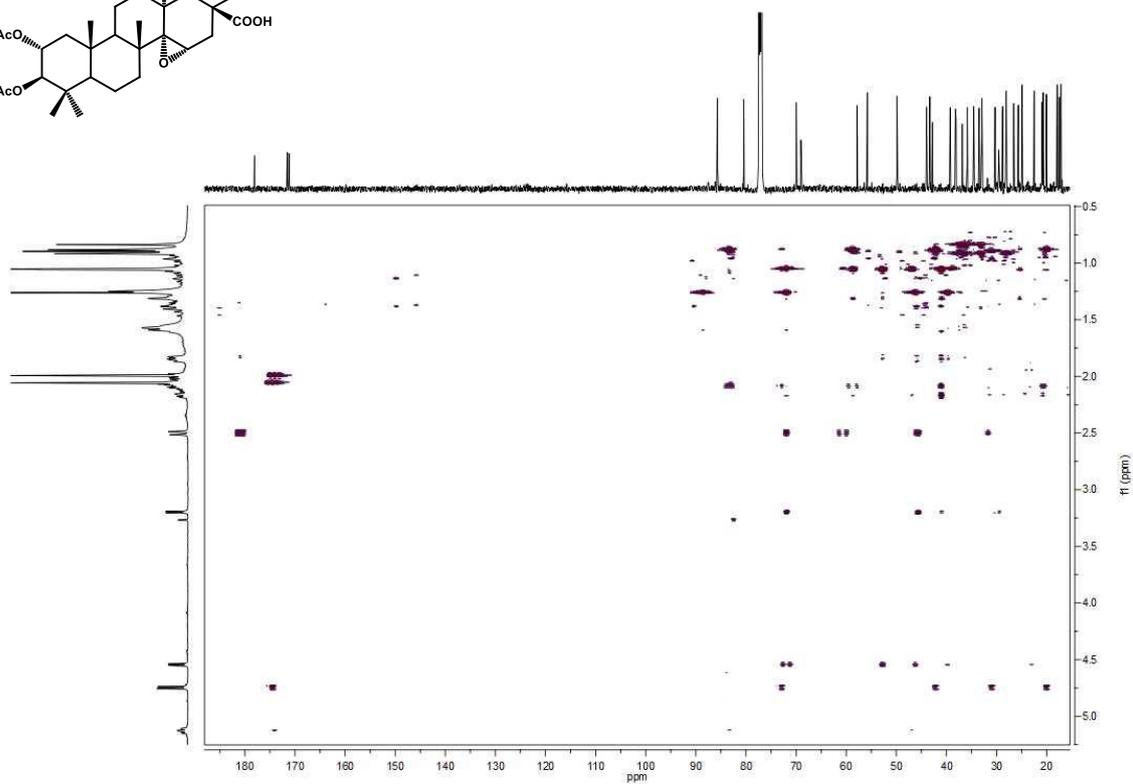
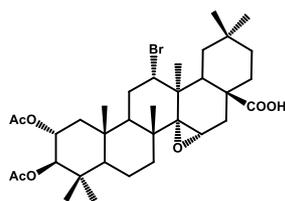
Espectro ¹H RMN del producto 67



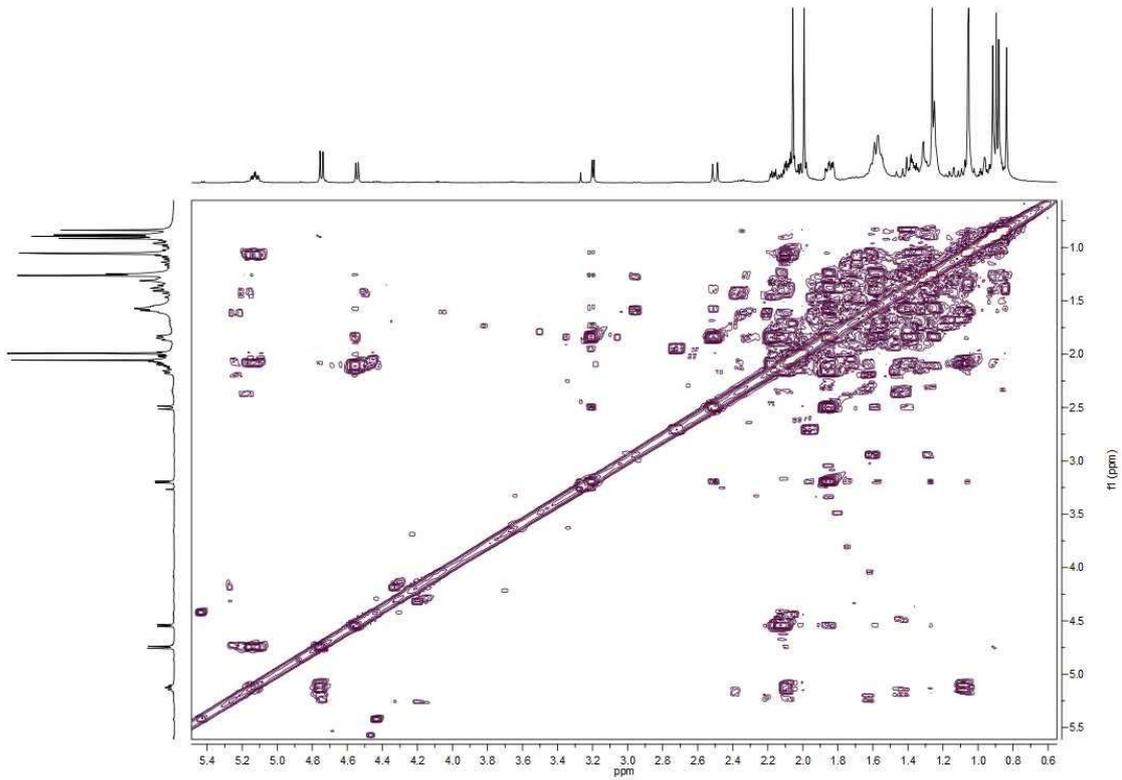
Espectro ¹³C RMN del producto 67



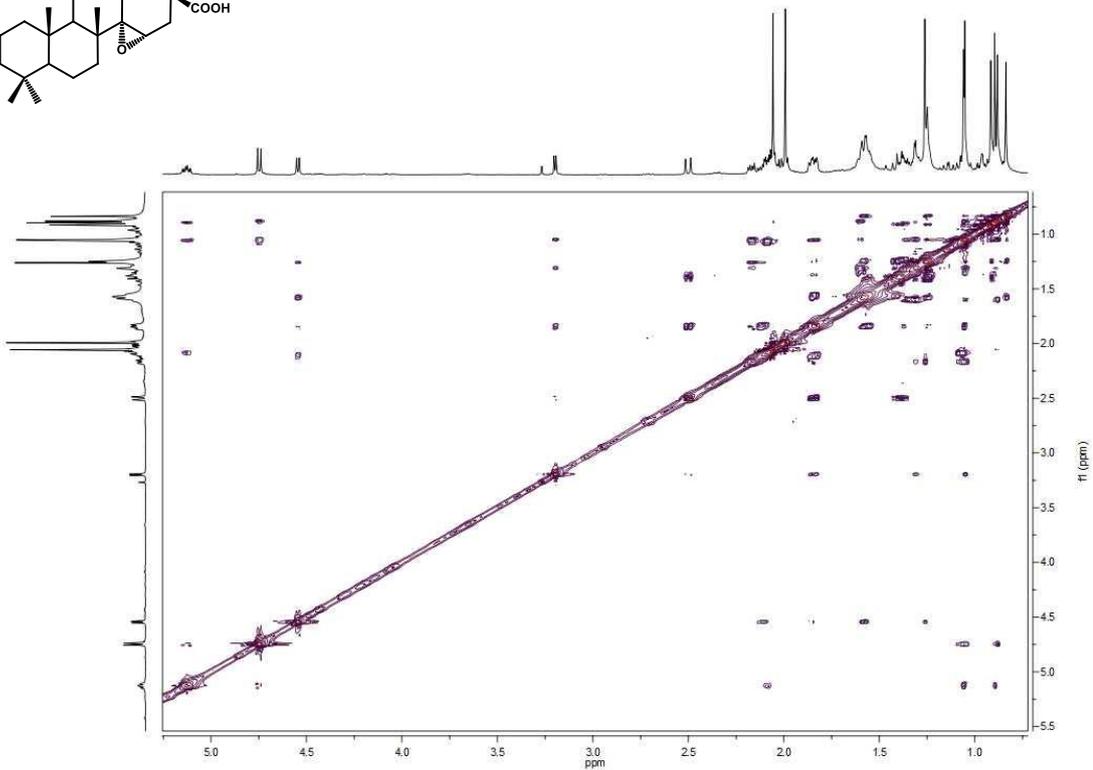
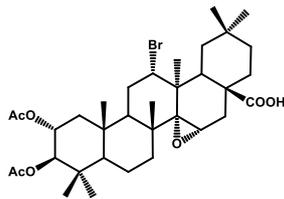
Espectro HSQC del producto 67



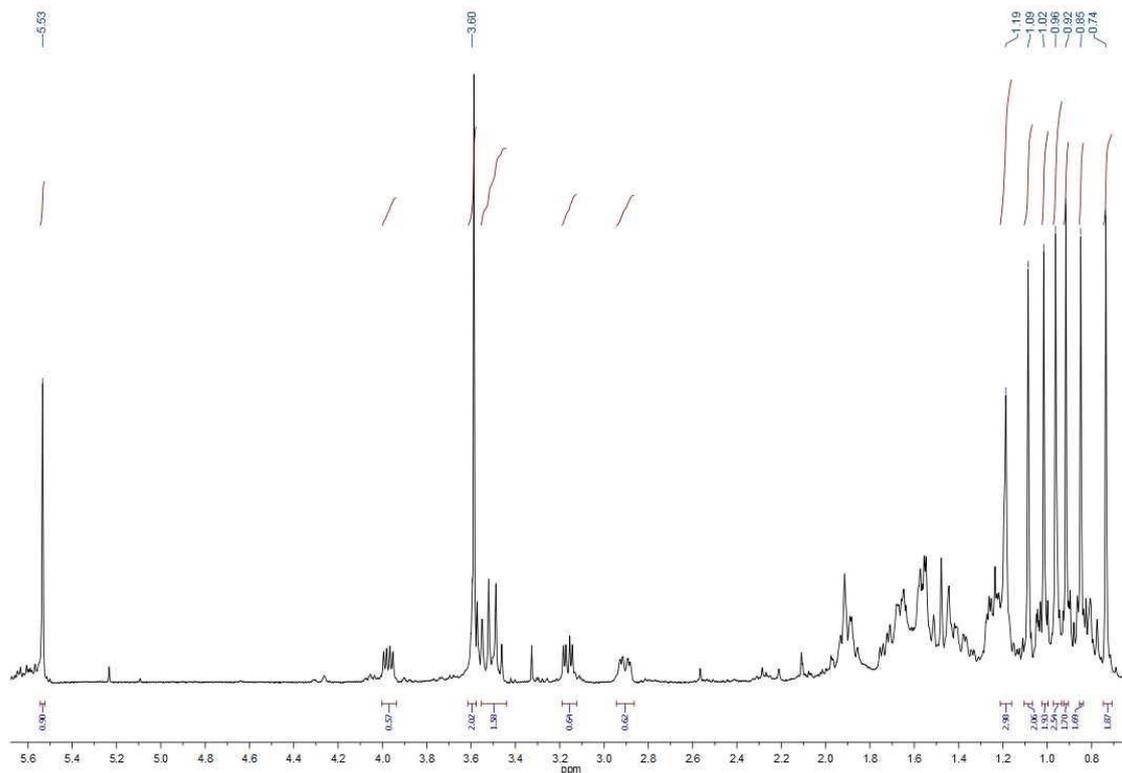
Espectro HMBC del producto 67



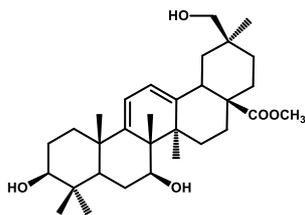
COSY del producto 67

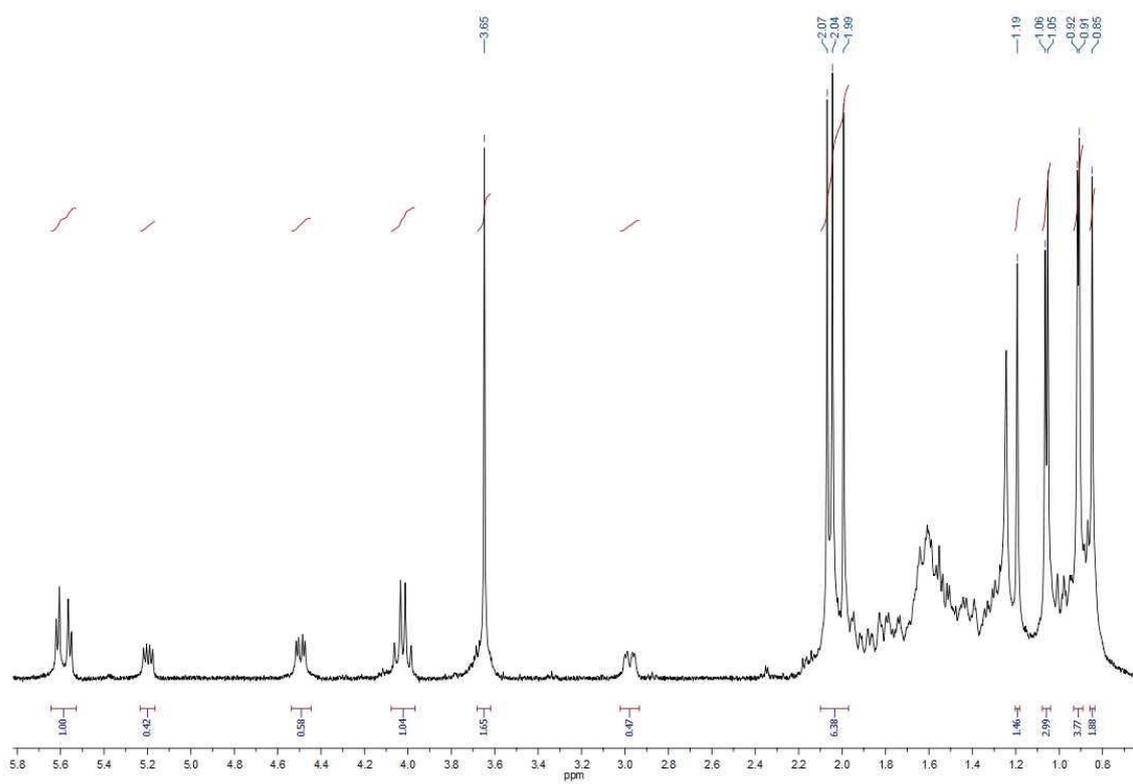


NOESY del producto 67

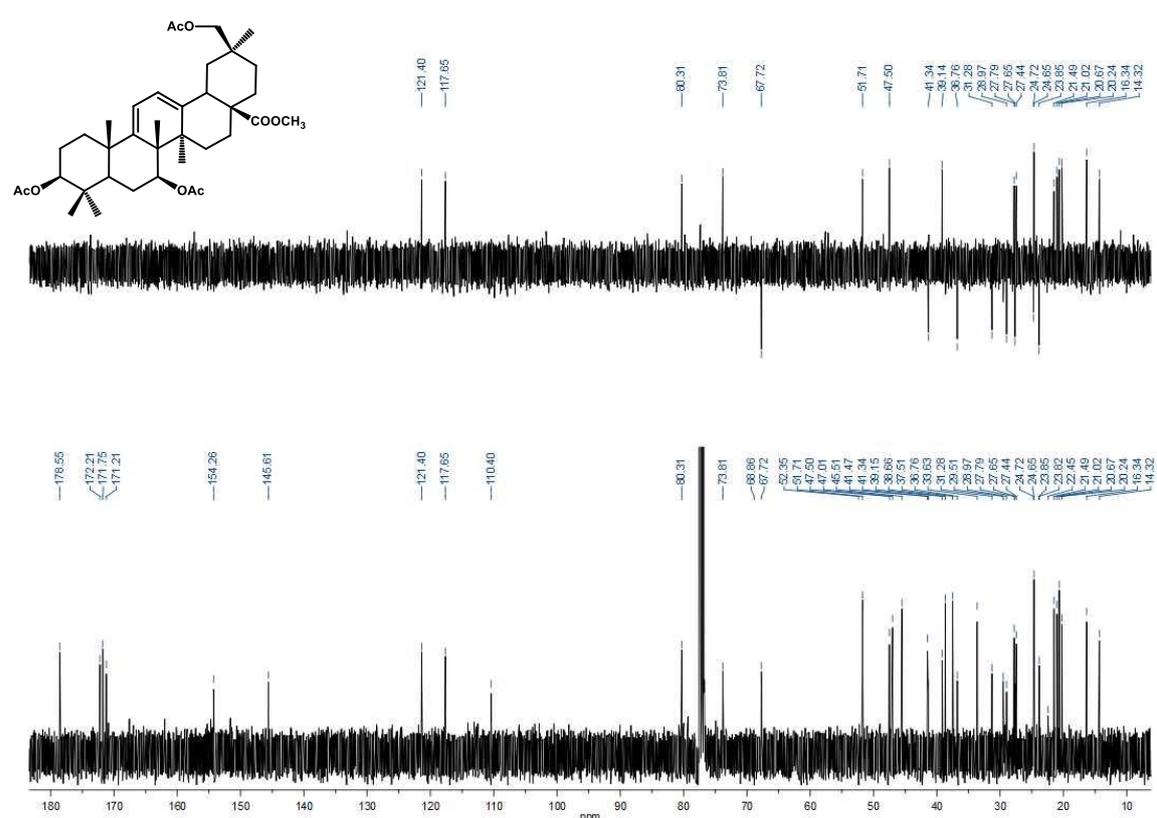


Espectro de ^1H RMN del producto 68

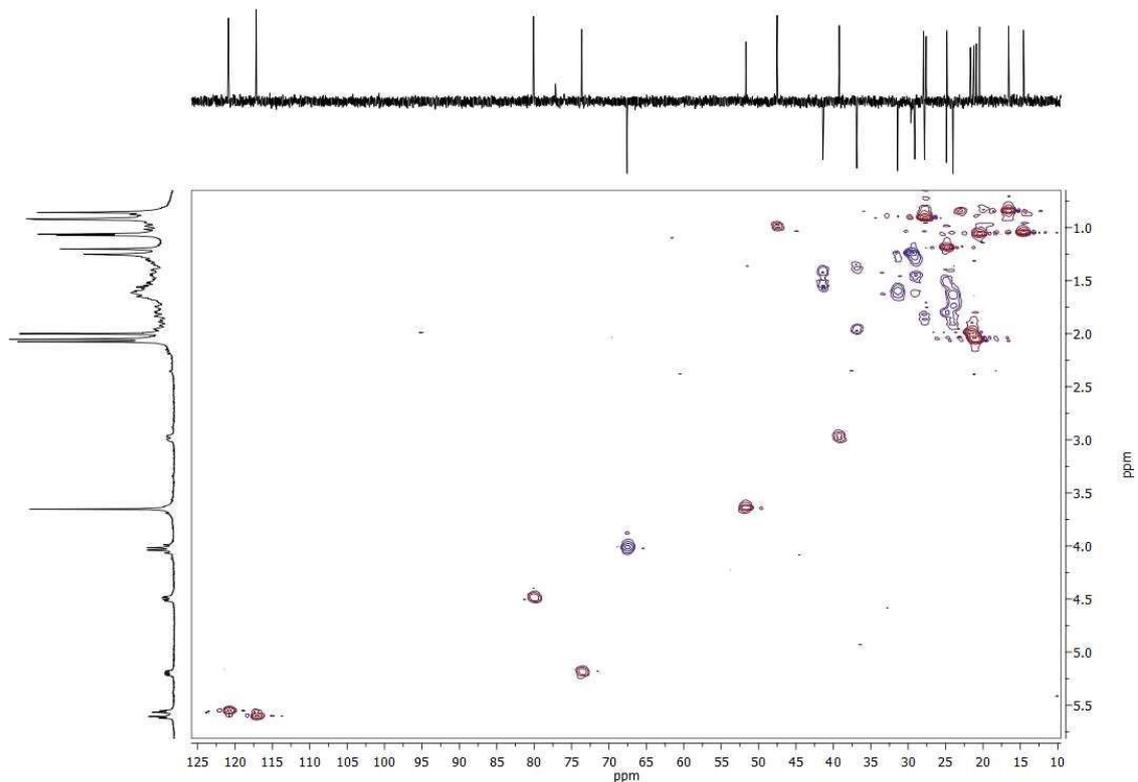




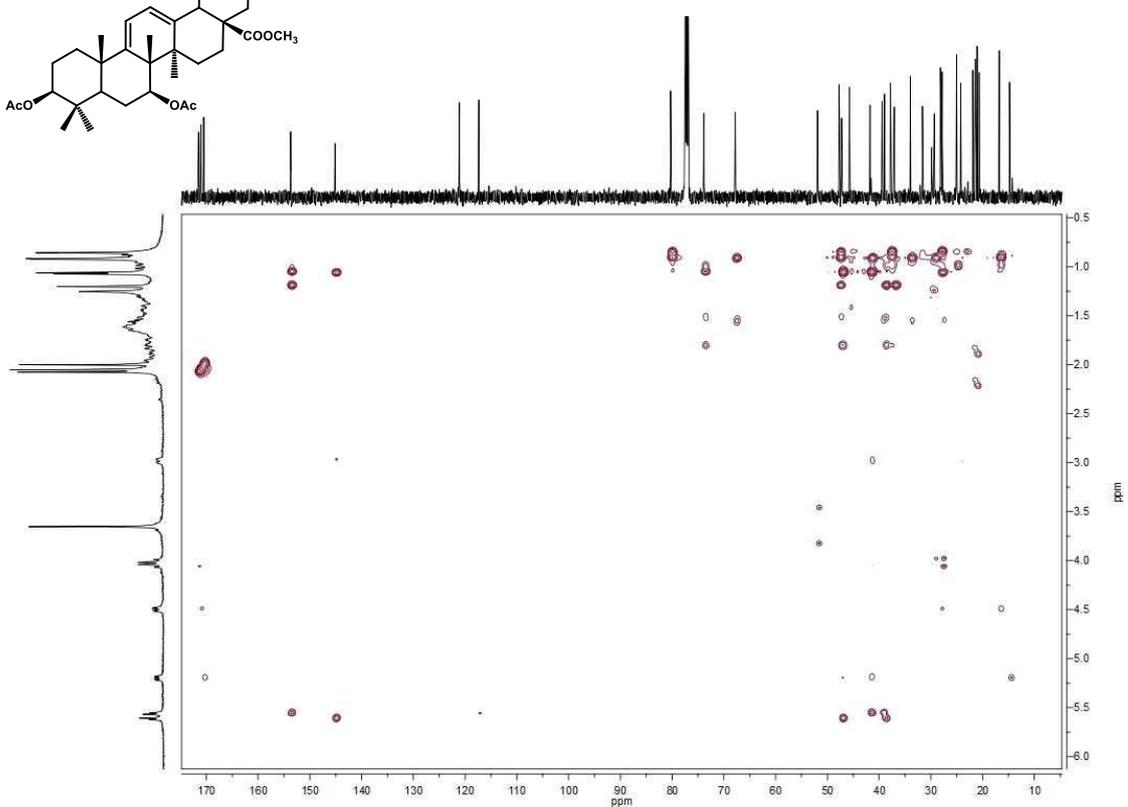
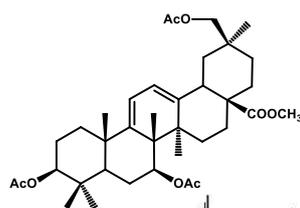
Espectro ¹H RMN del producto 69



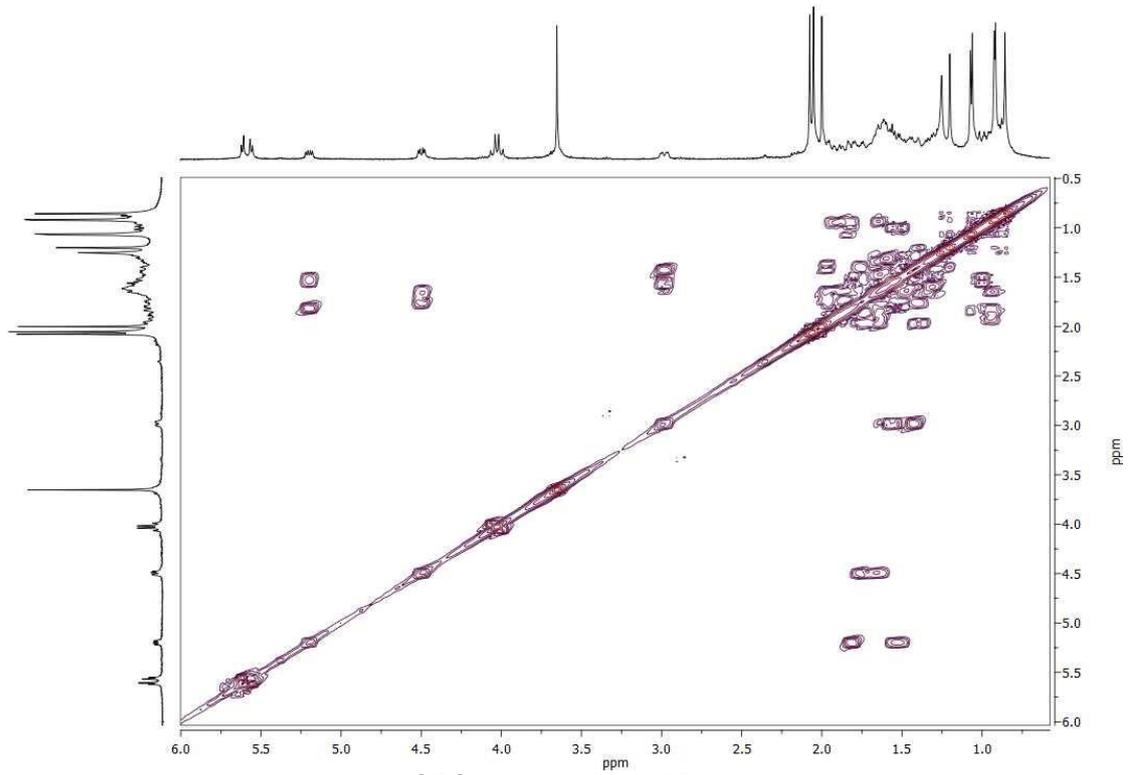
Espectro ¹³C RMN del producto 69



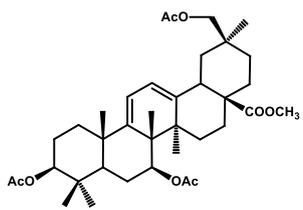
Espectro HSQC del producto 69

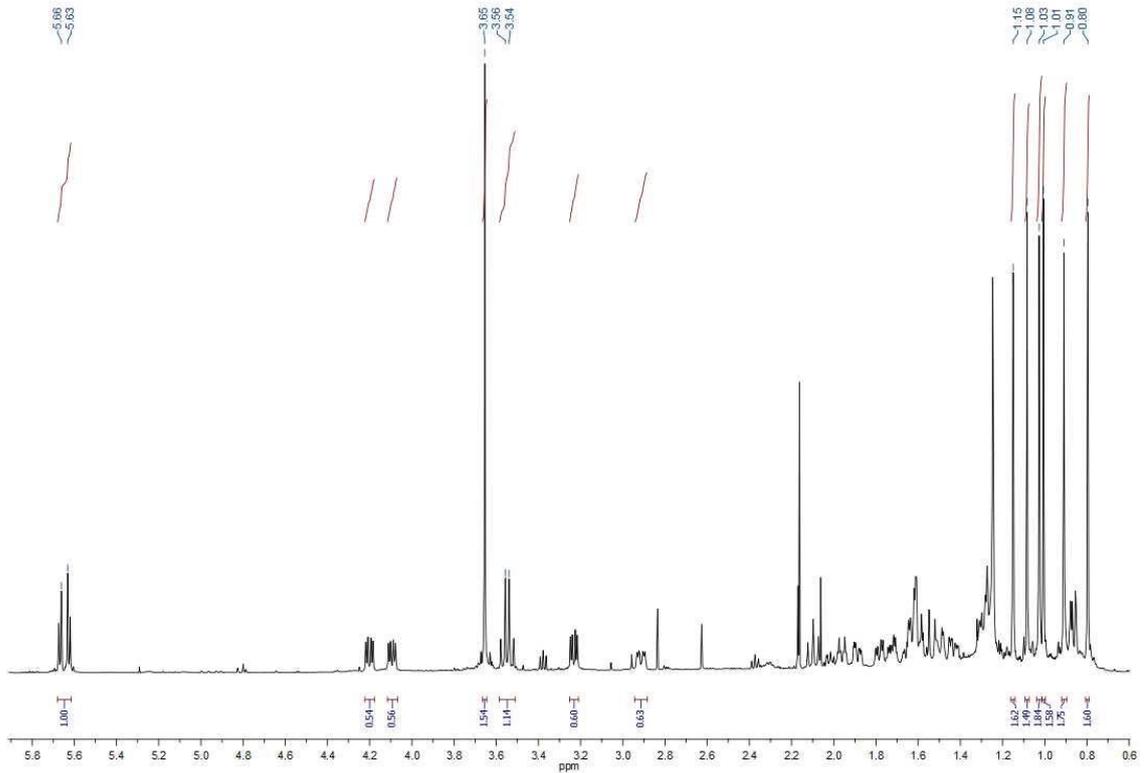


Espectro HMBC del producto 69

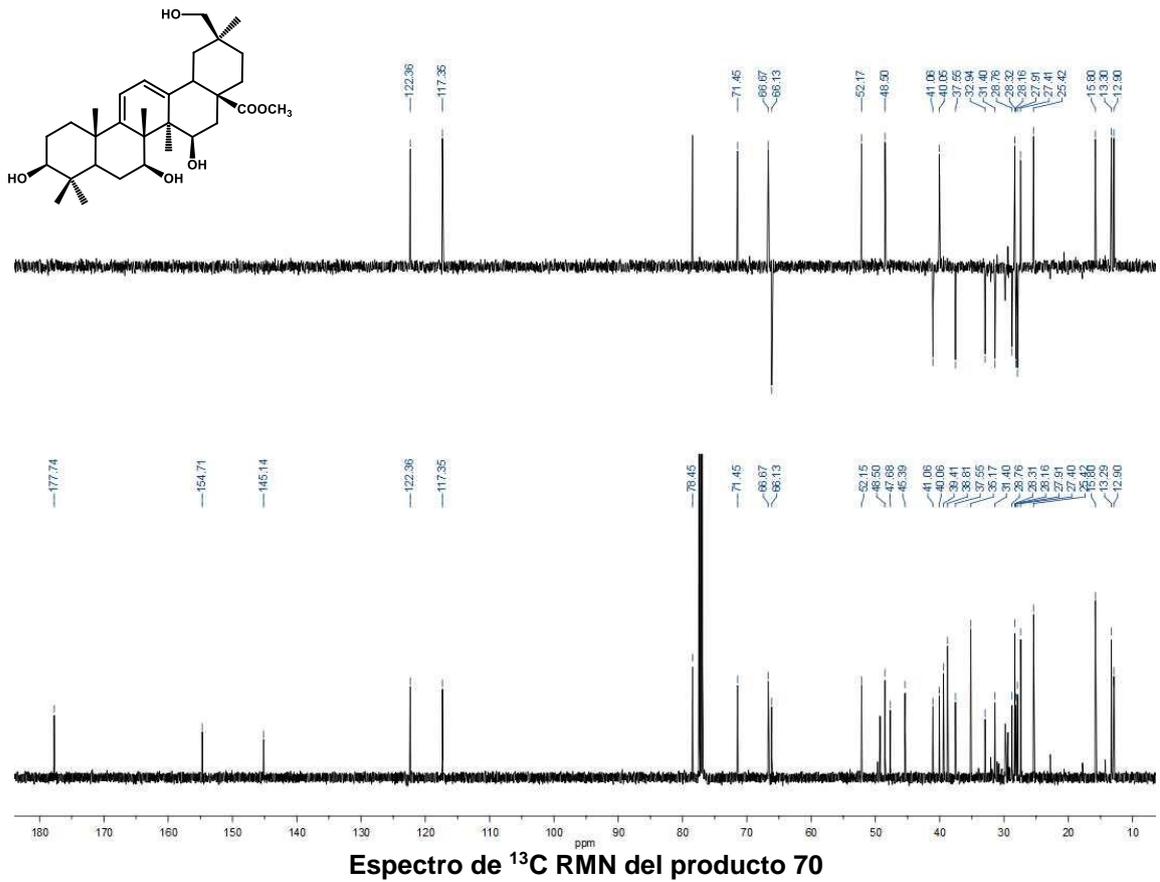


COSY del producto 69

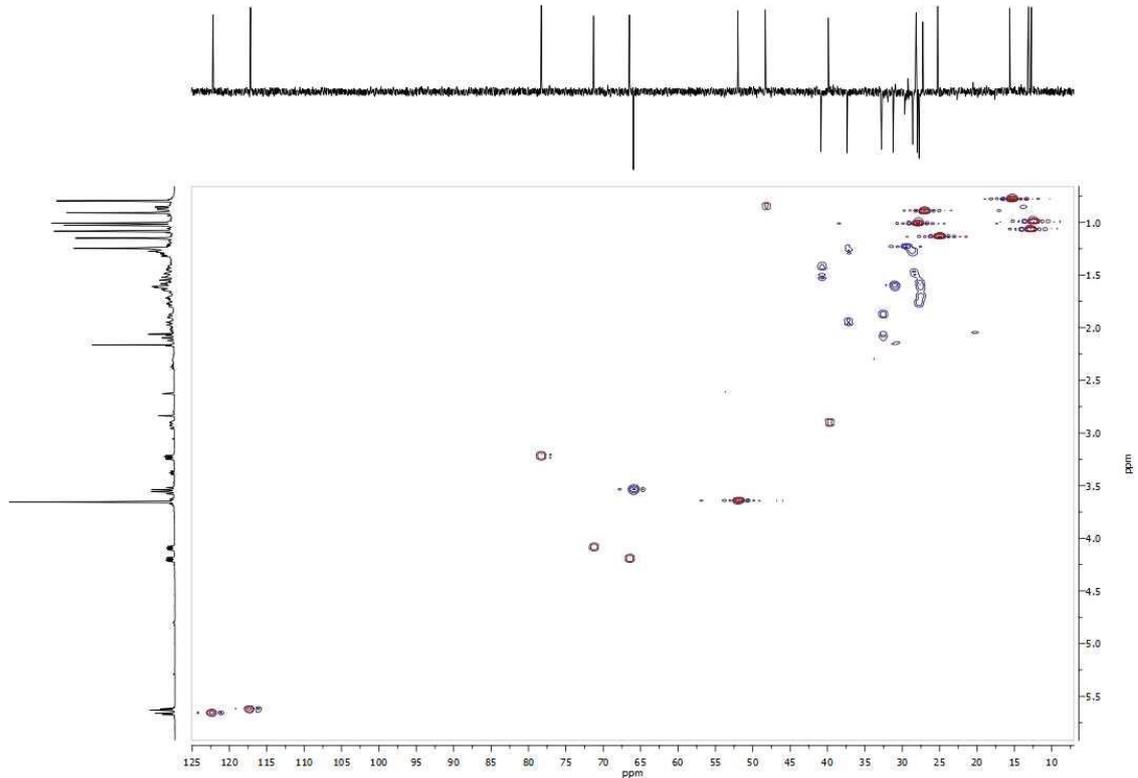




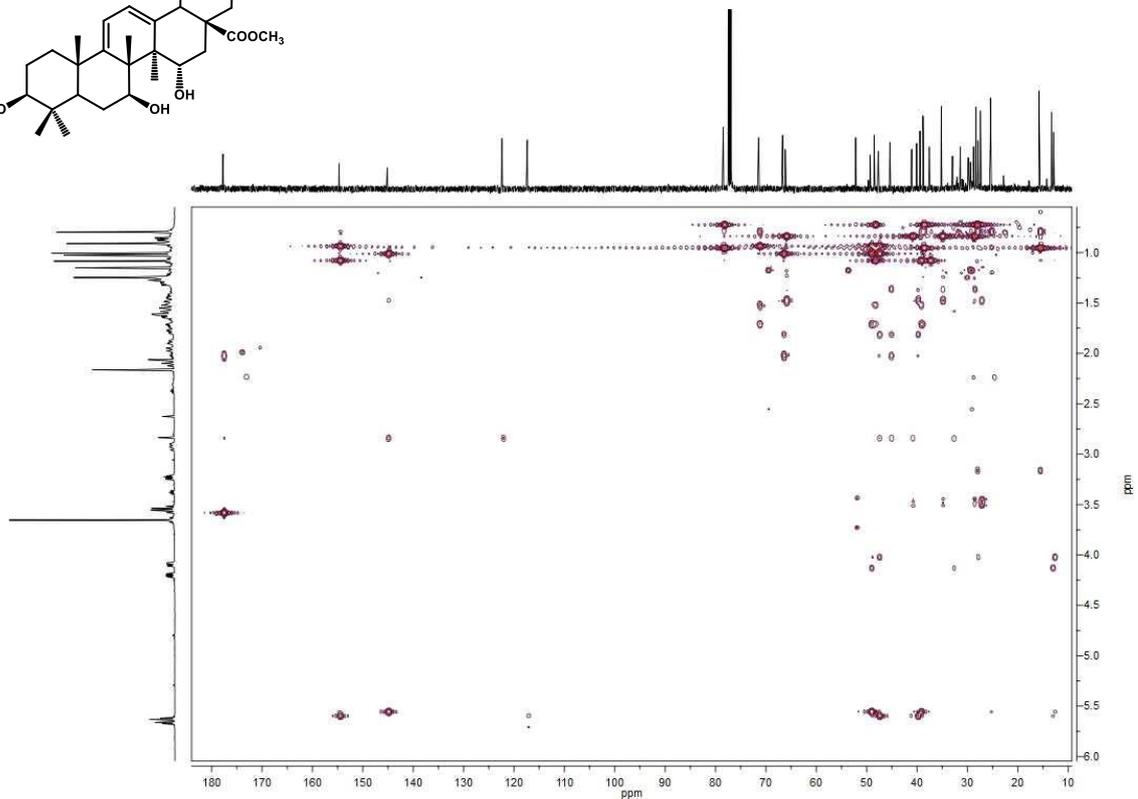
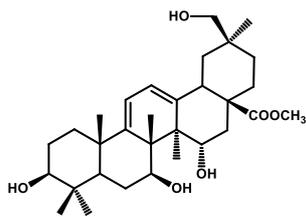
Espectro de ^1H RMN del producto 70



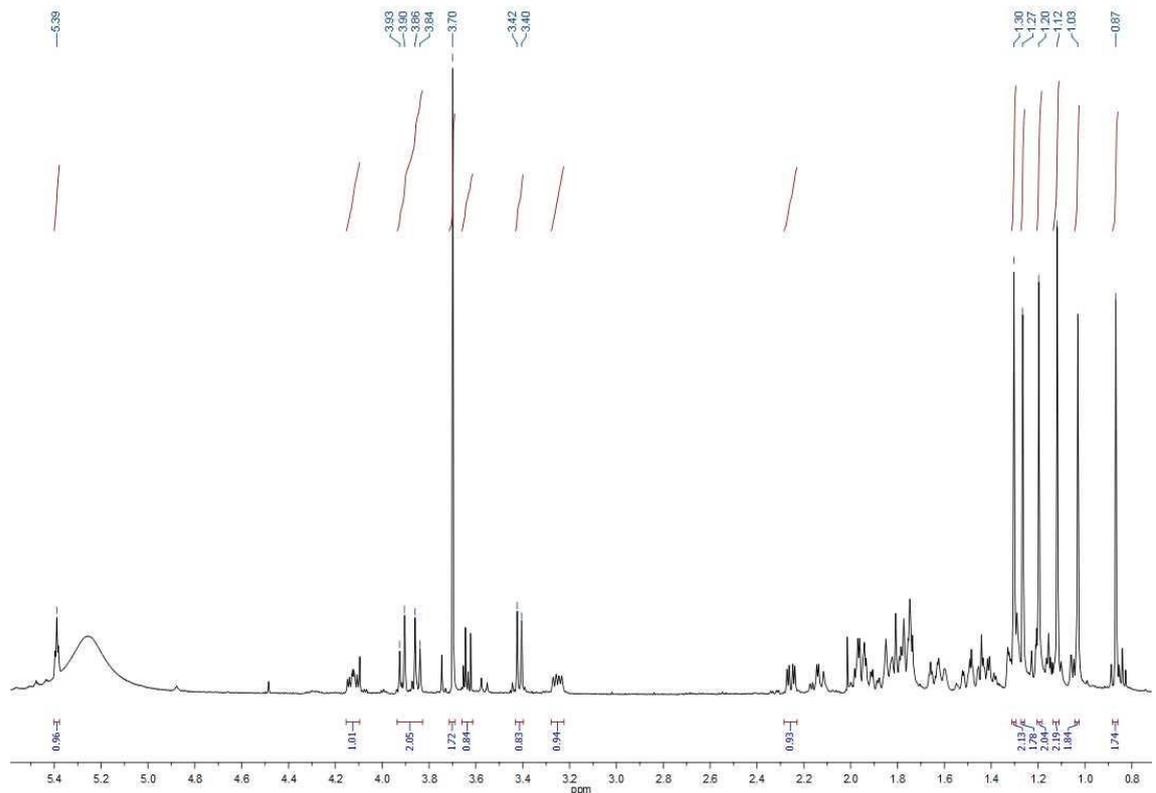
Espectro de ^{13}C RMN del producto 70



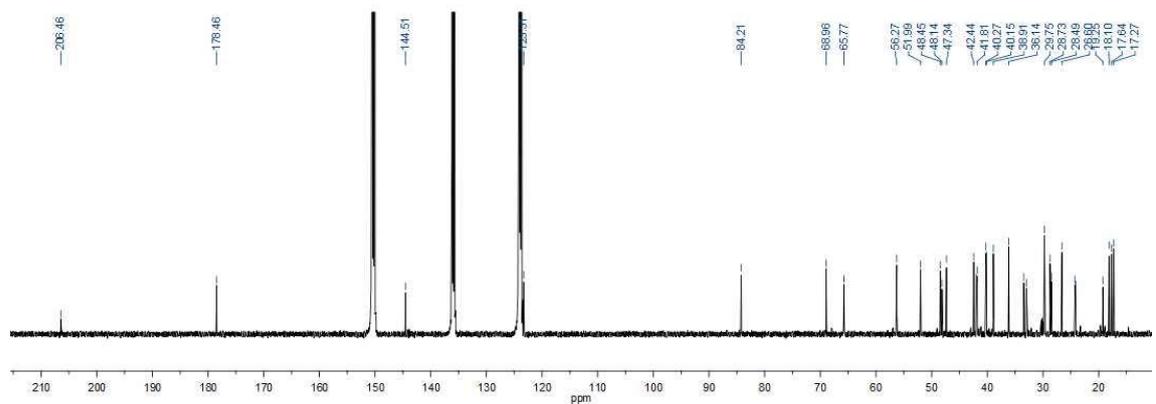
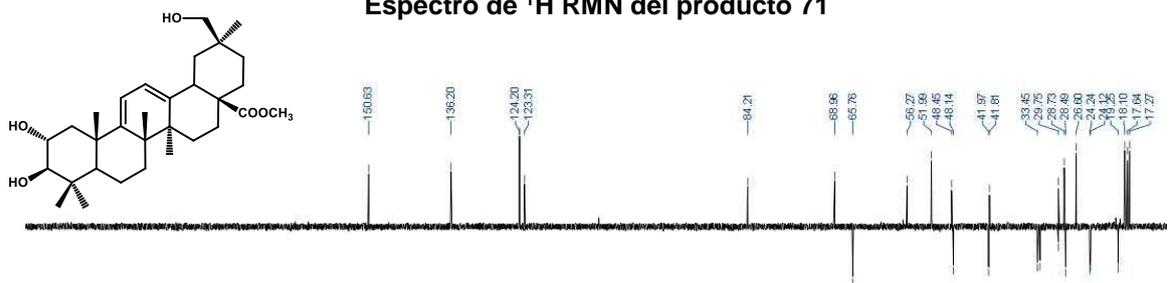
Espectro HSQC del producto 70



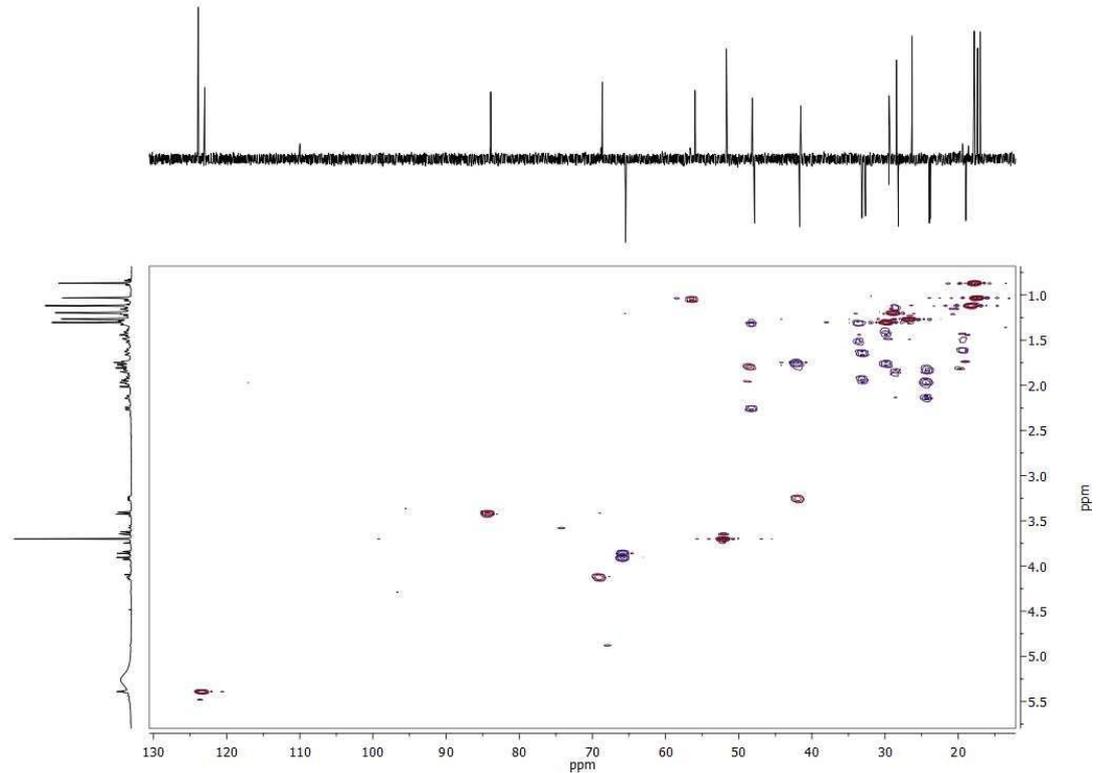
Espectro HMBC del producto 70



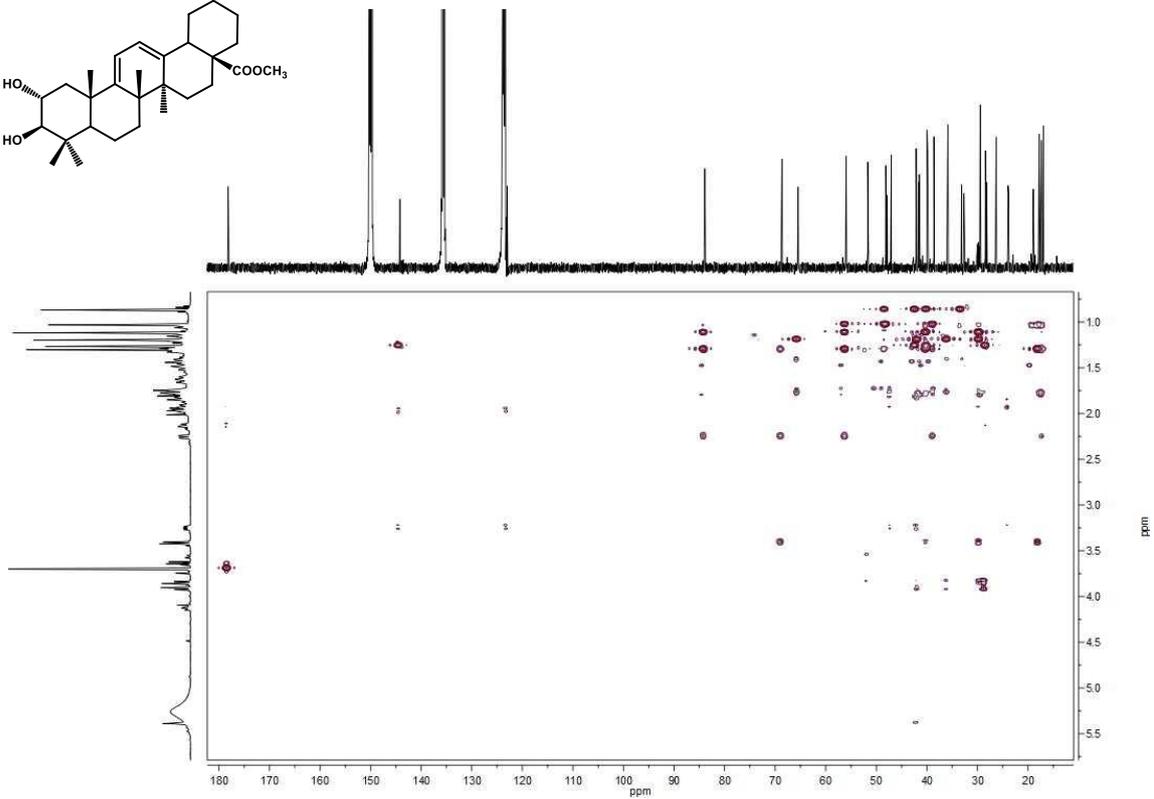
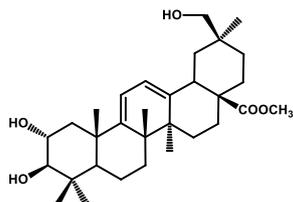
Espectro de ^1H RMN del producto 71



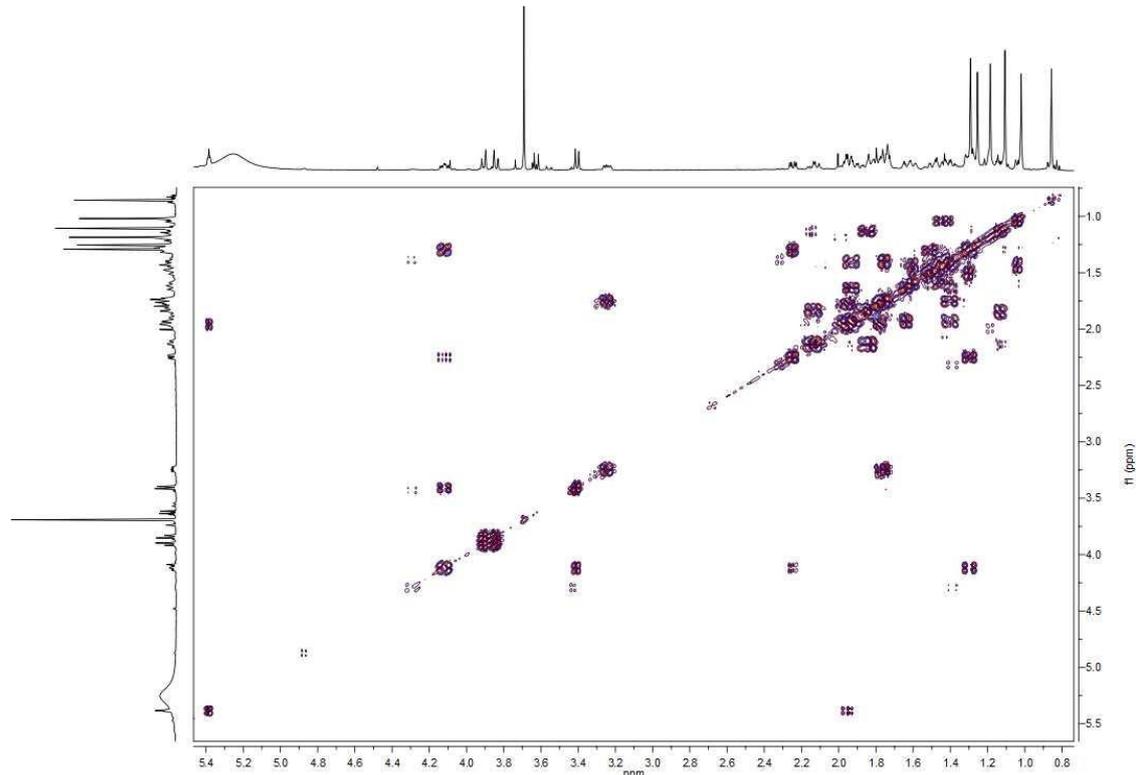
Espectro de ^{13}C RMN del producto 71



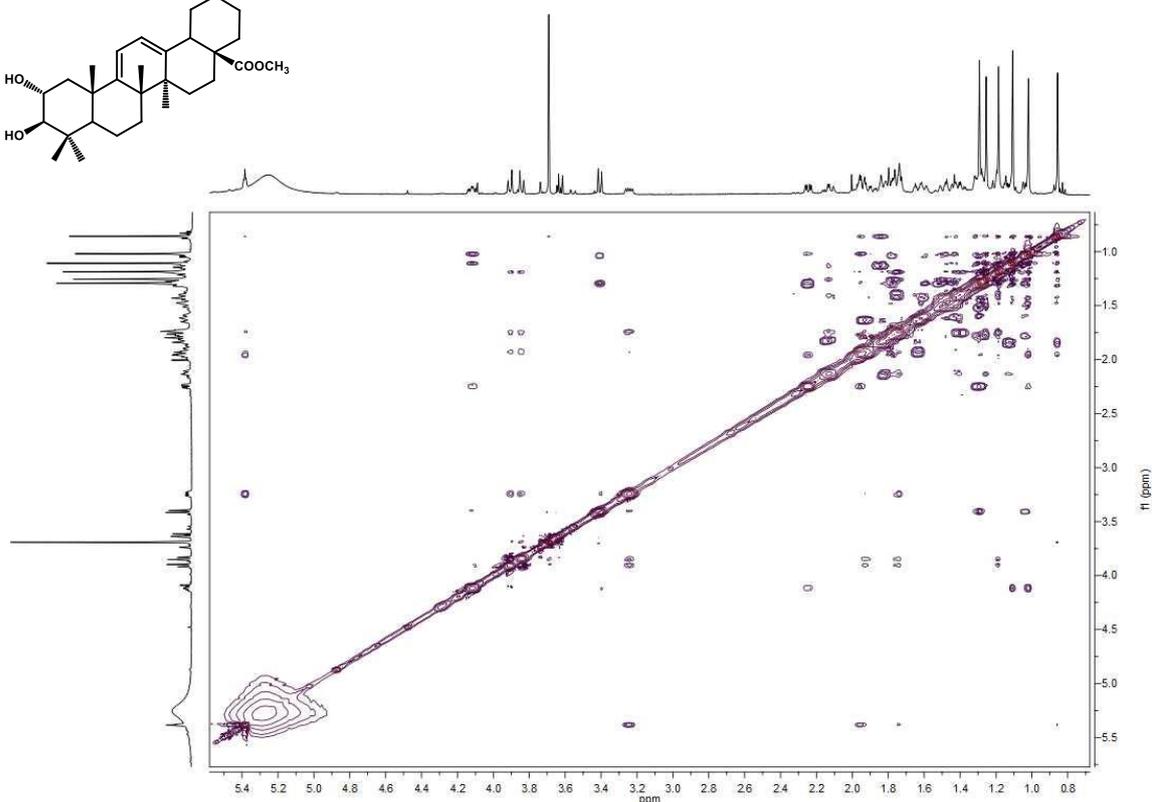
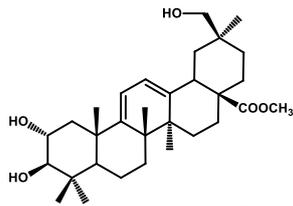
Espectro HSQC del producto 71



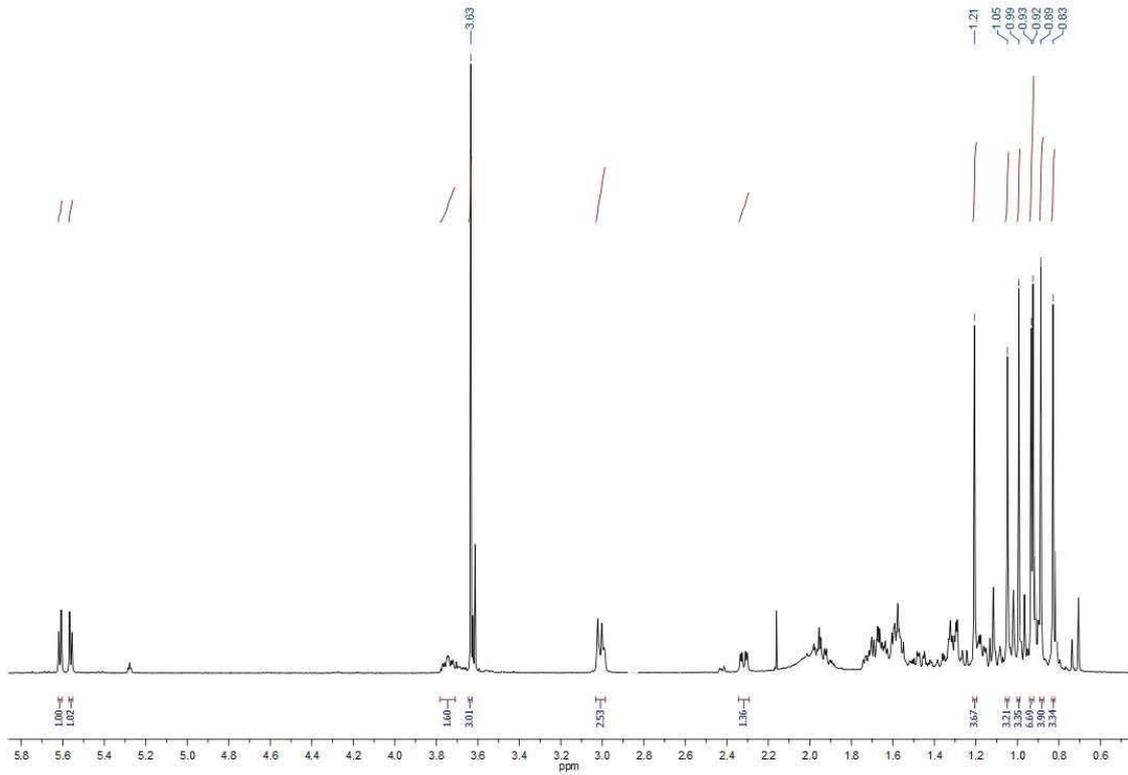
Espectro HMBC del producto 71



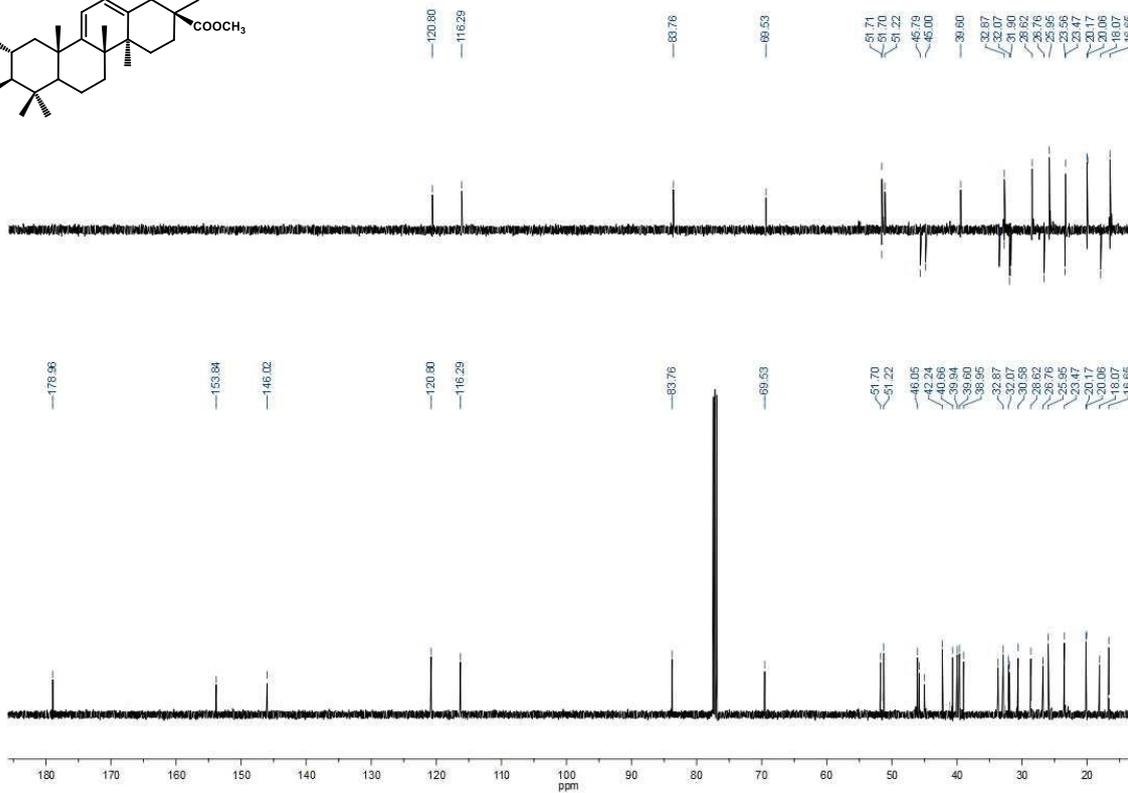
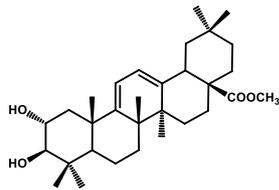
COSY del producto 71



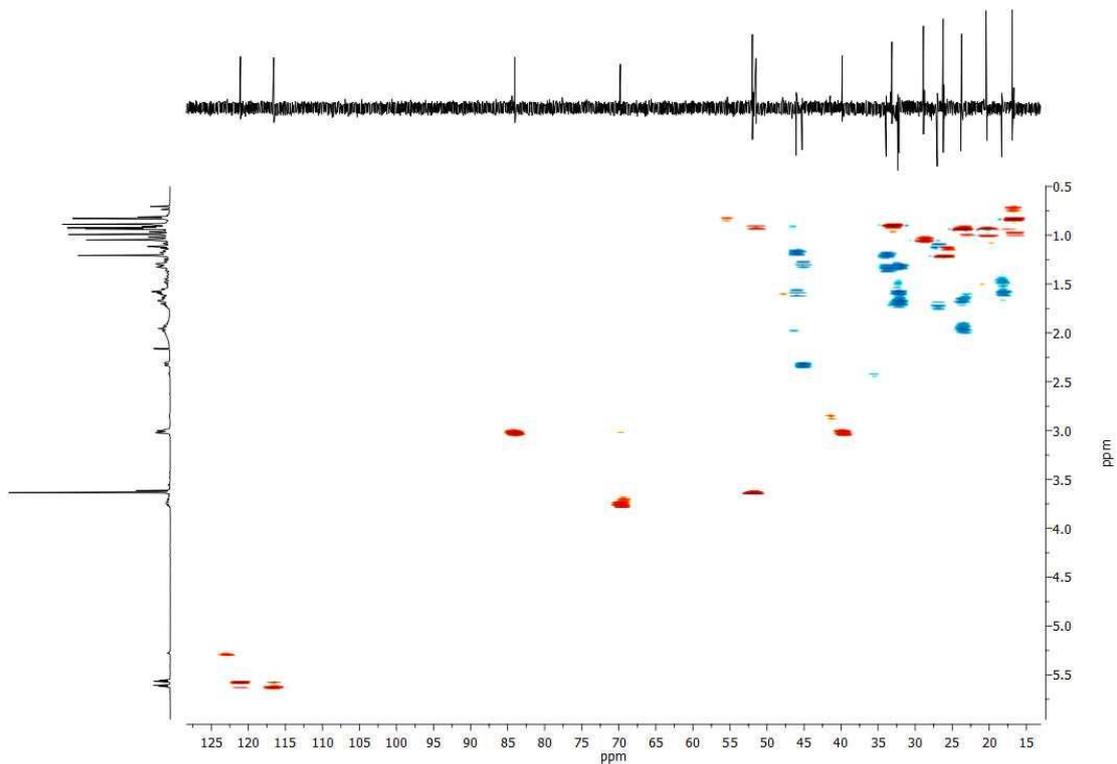
NOESY del producto 71



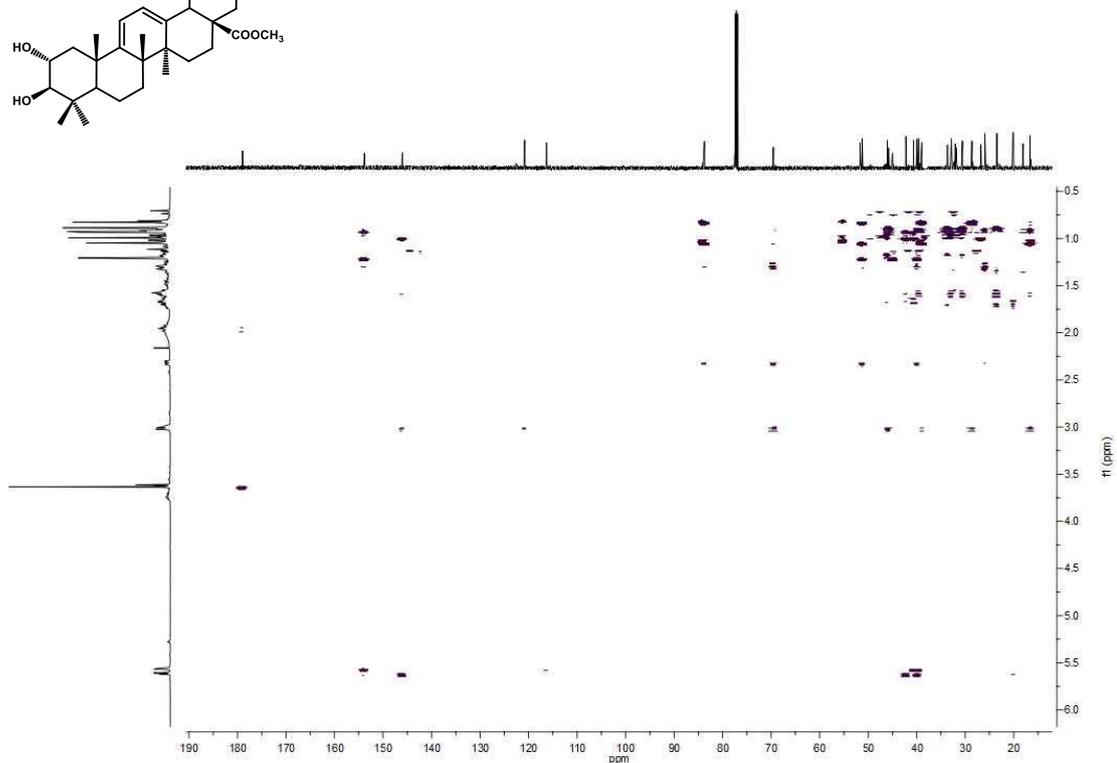
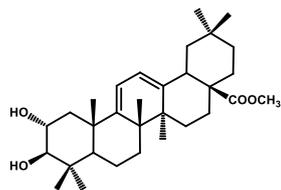
Espectro de ¹H RMN del producto 72



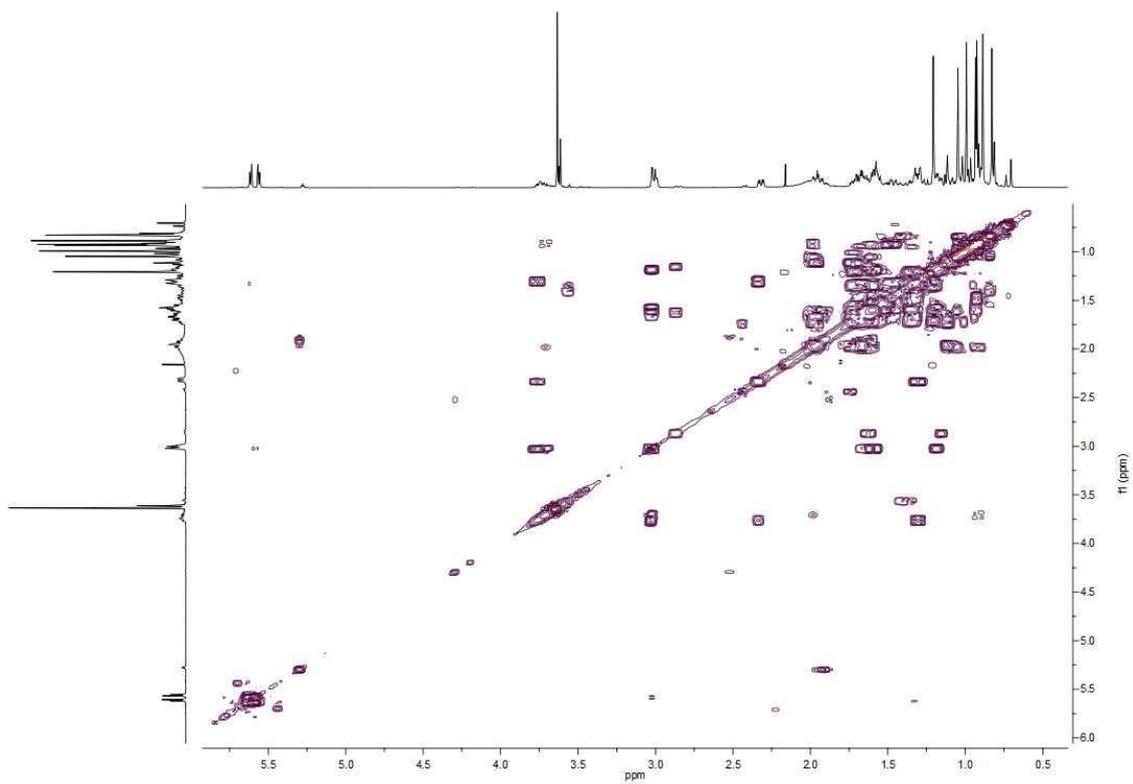
Espectro de ¹³C RMN del producto 72



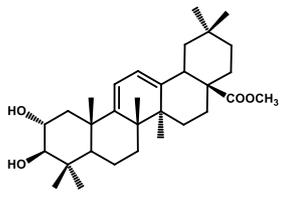
Espectro HSQC del producto 72

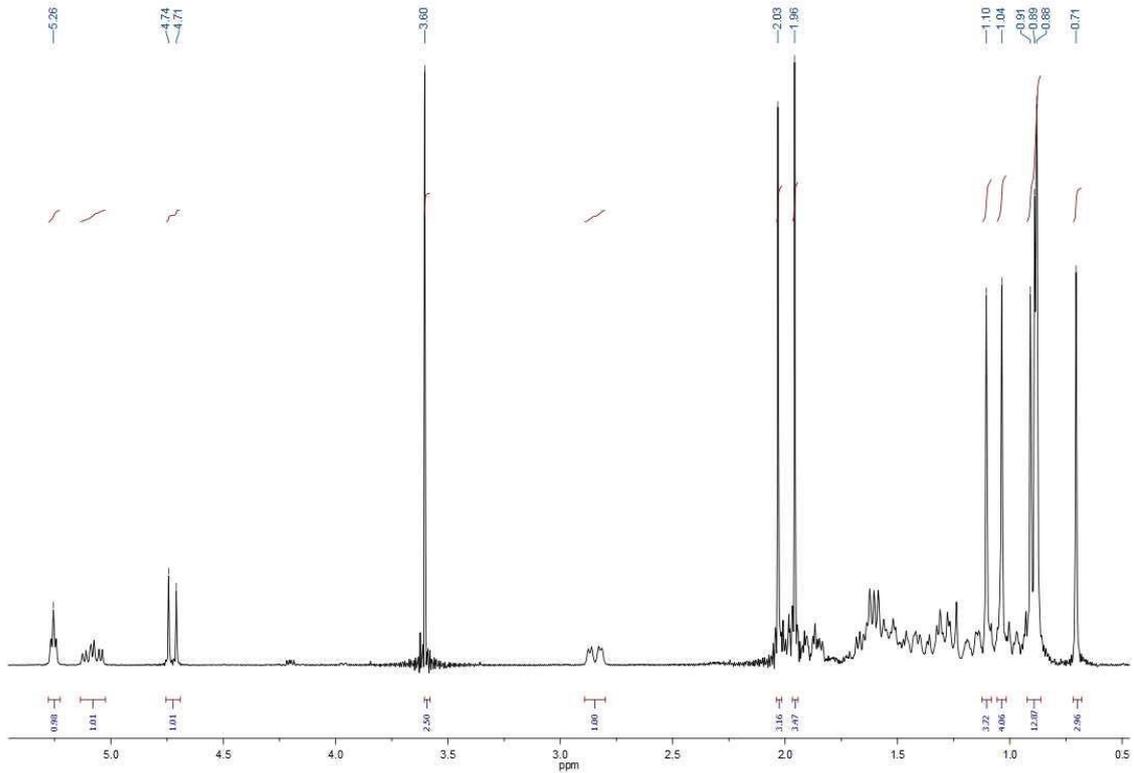


Espectro HMBC del producto 72

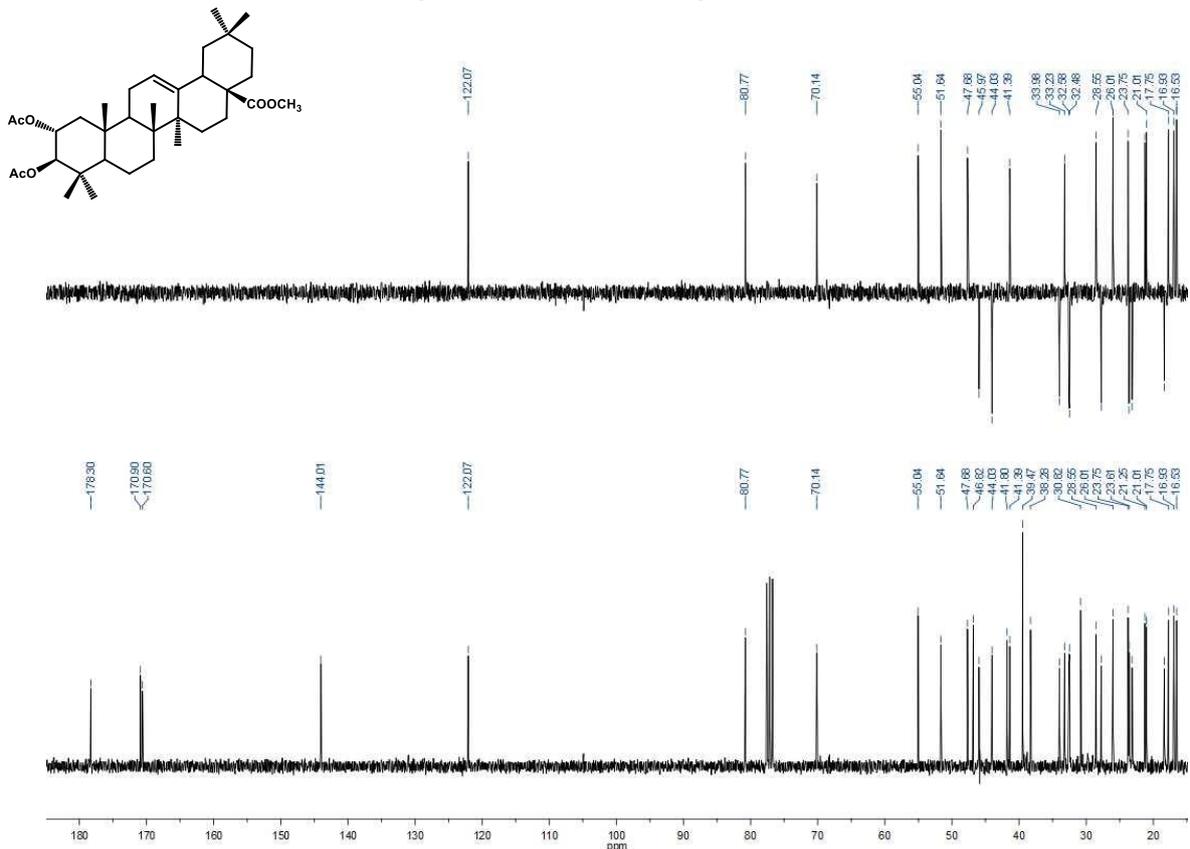


COSY del producto 72

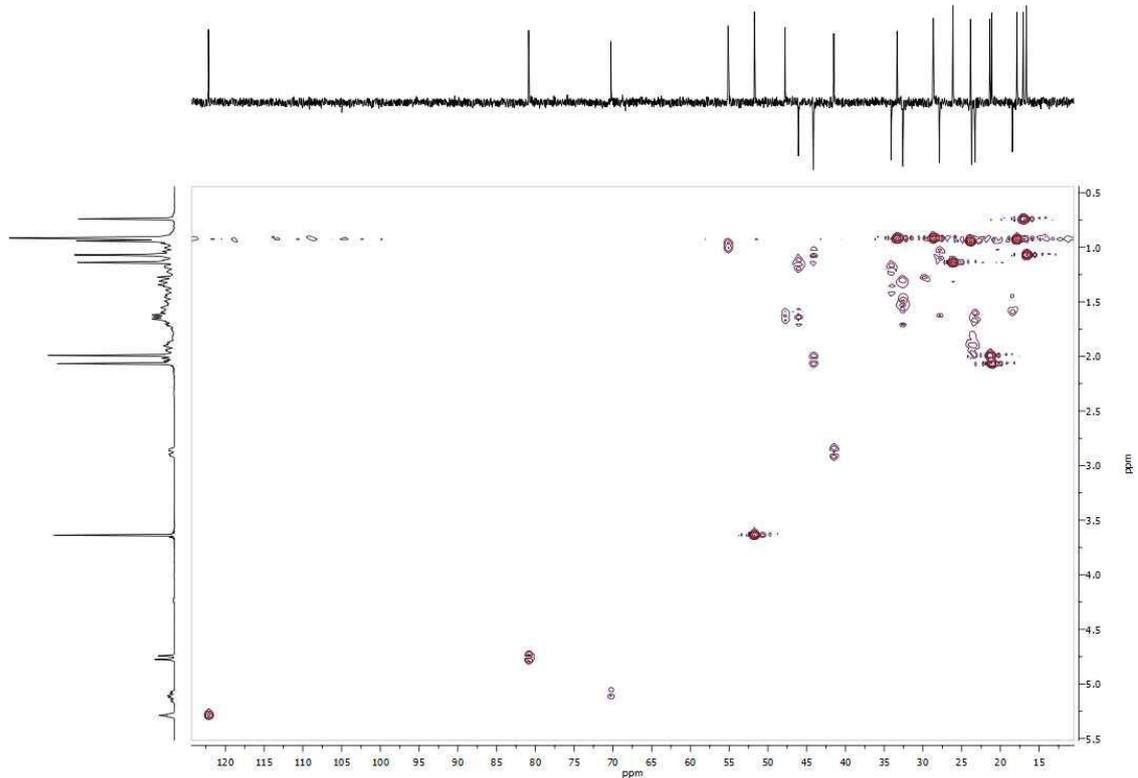




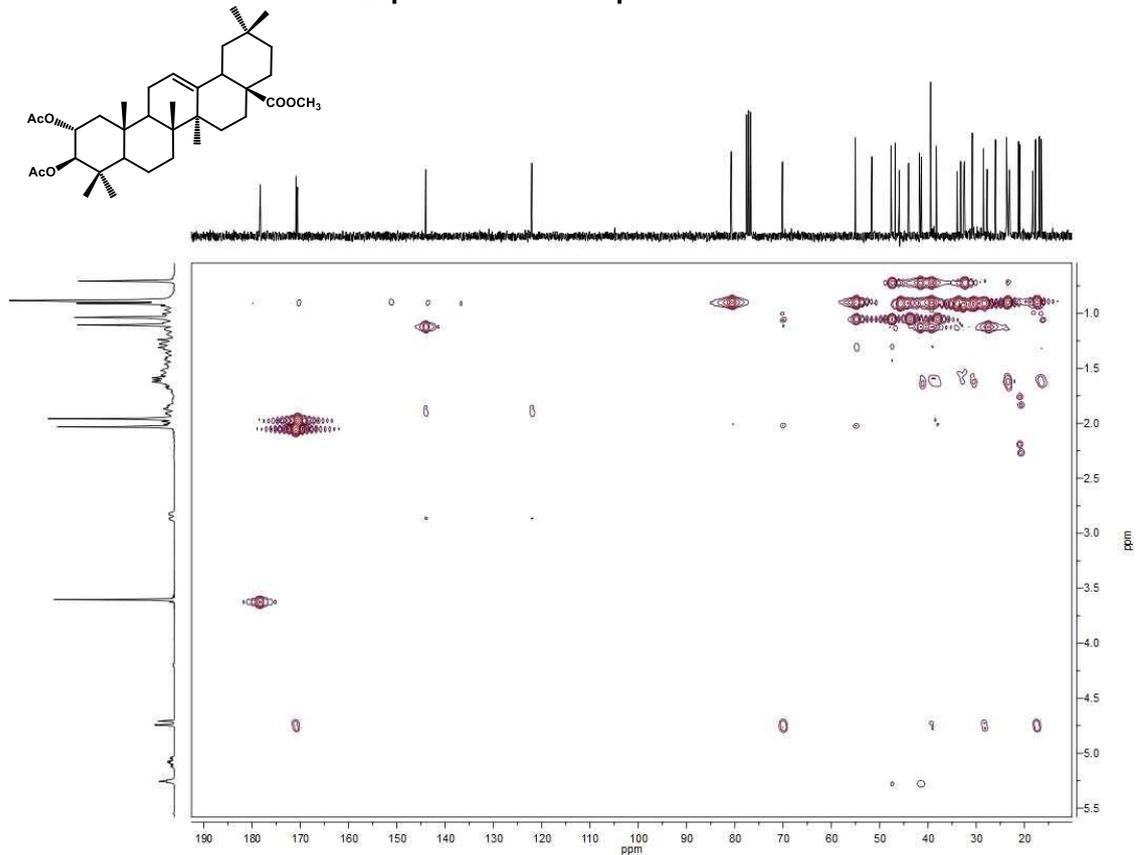
Espectro de ^1H RMN del producto 73



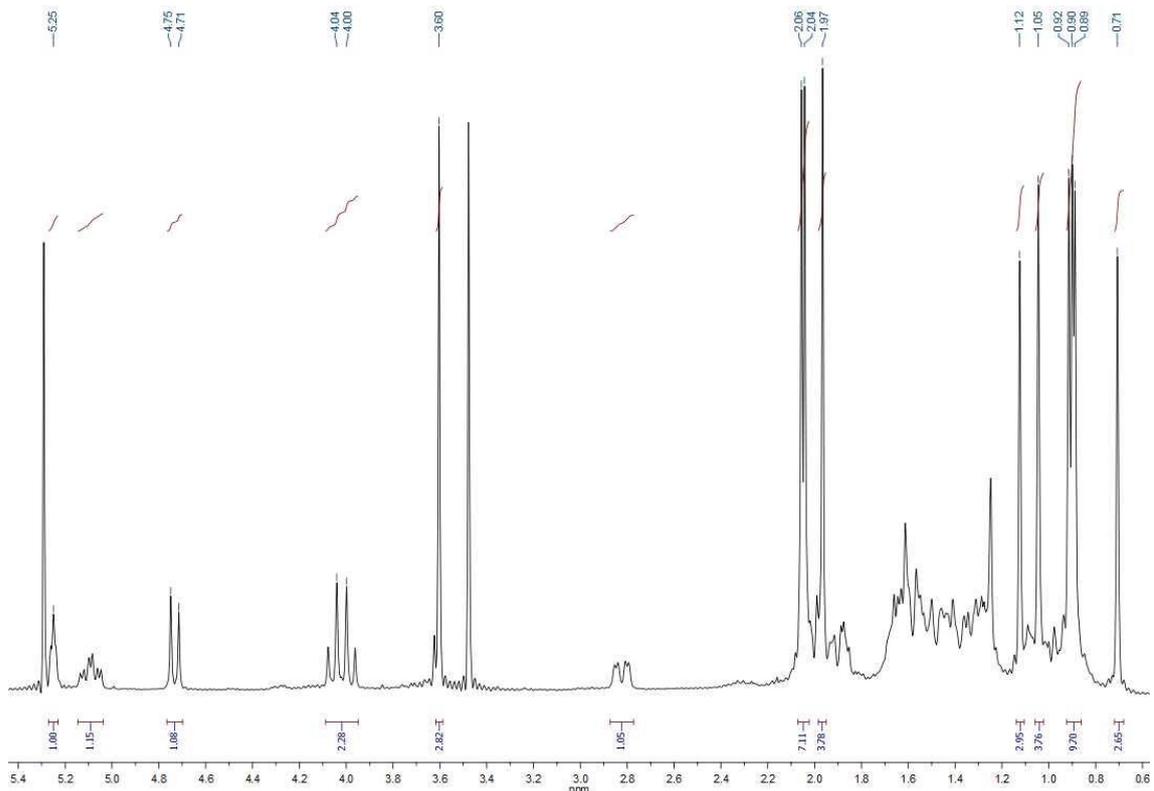
Espectro de ^{13}C RMN del producto 73



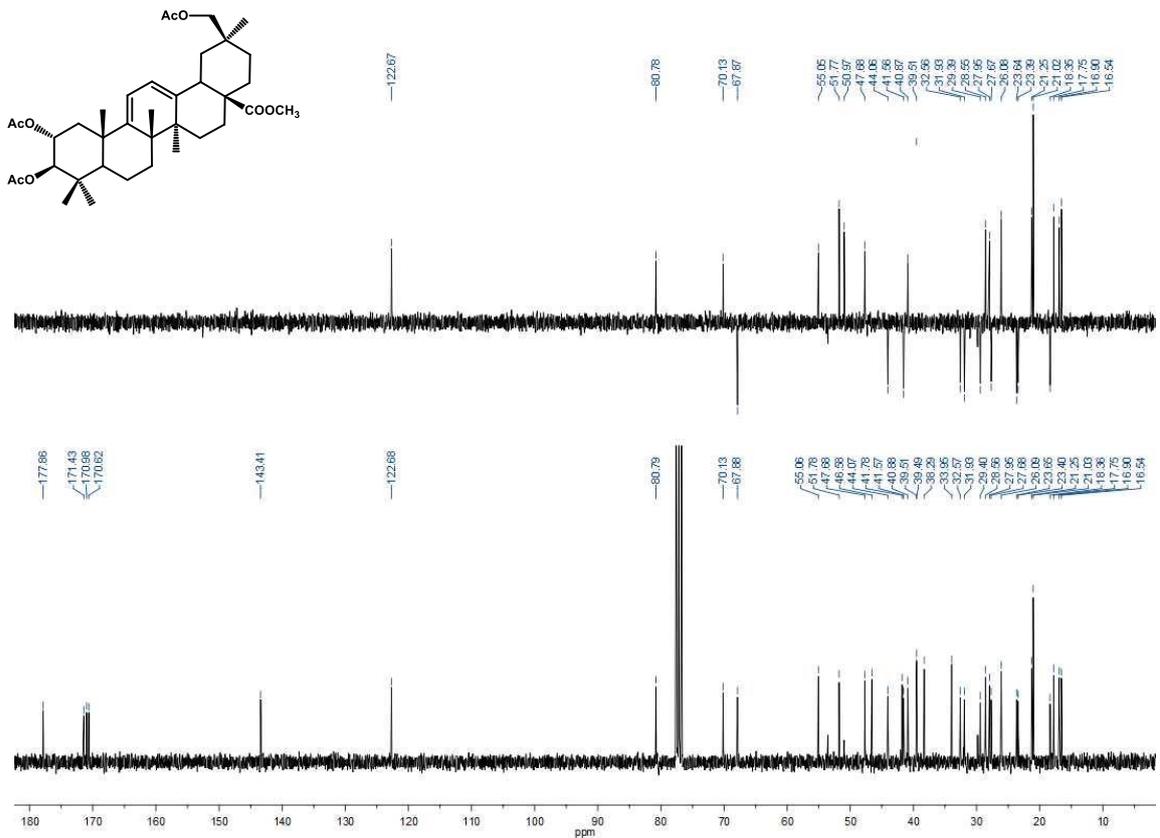
Espectro HMQC del producto 73



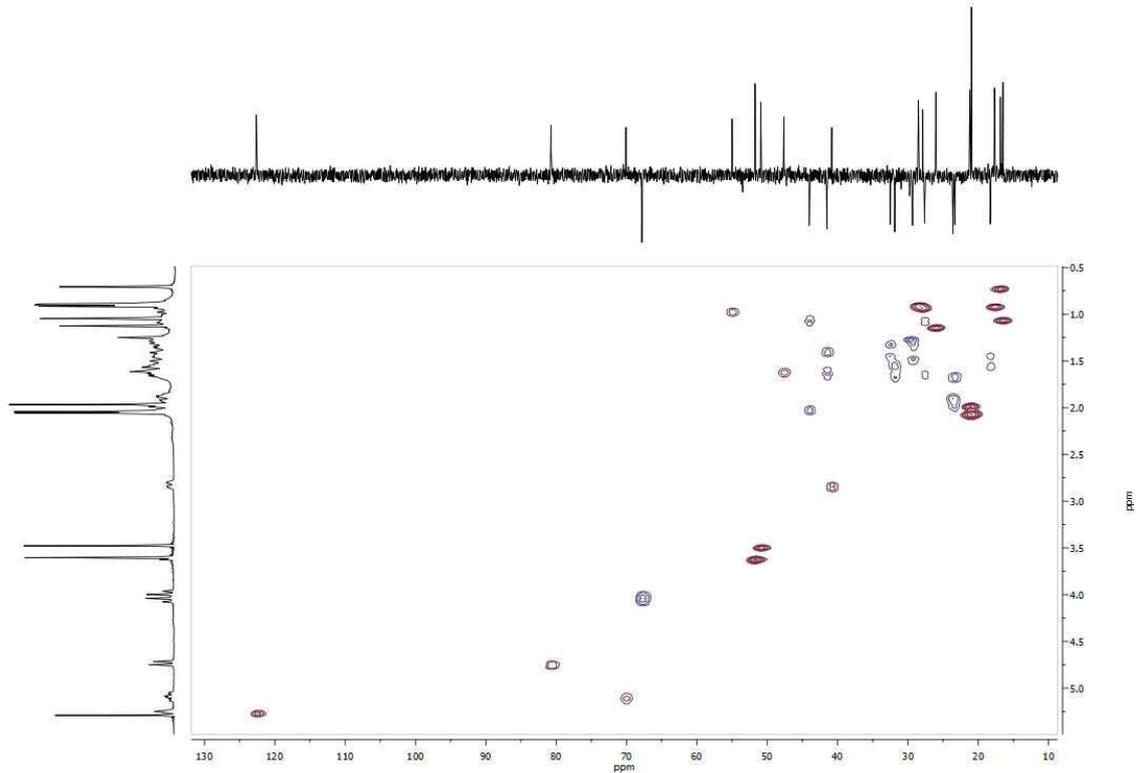
Espectro HMBC del producto 73



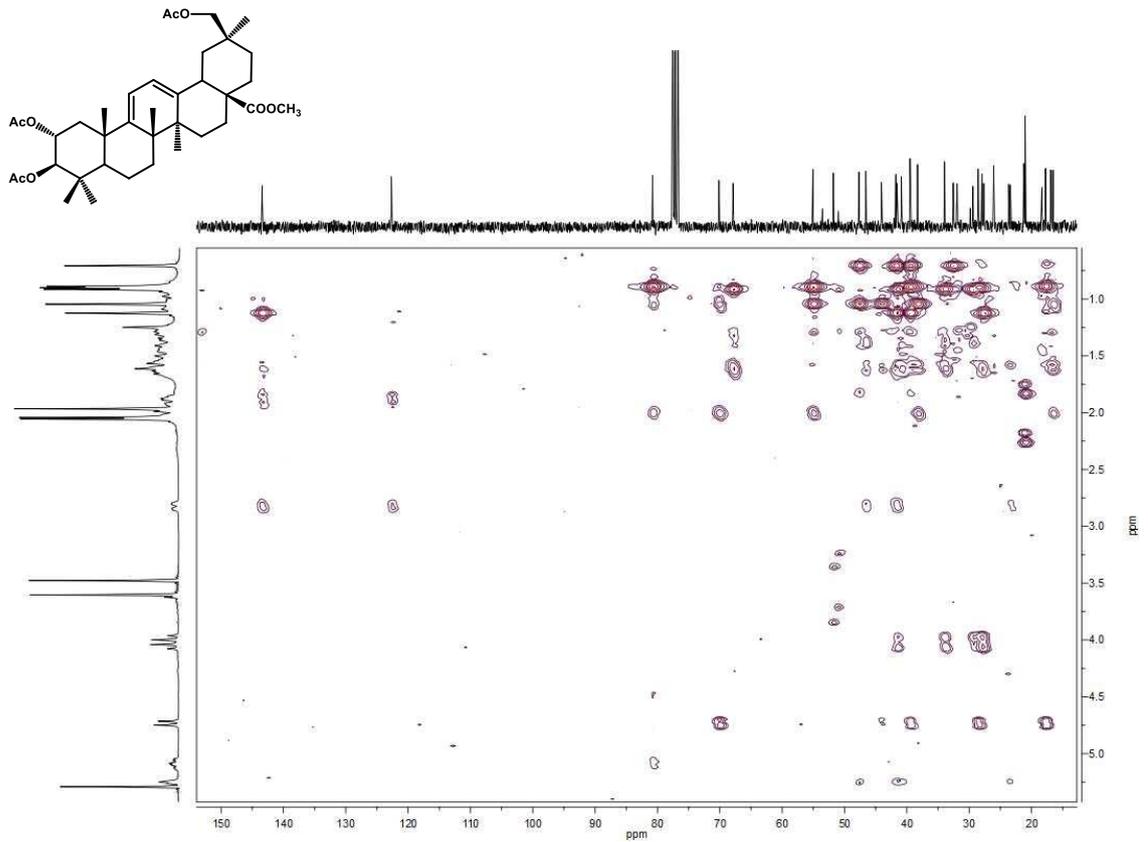
Espectro de ^1H RMN del producto 74



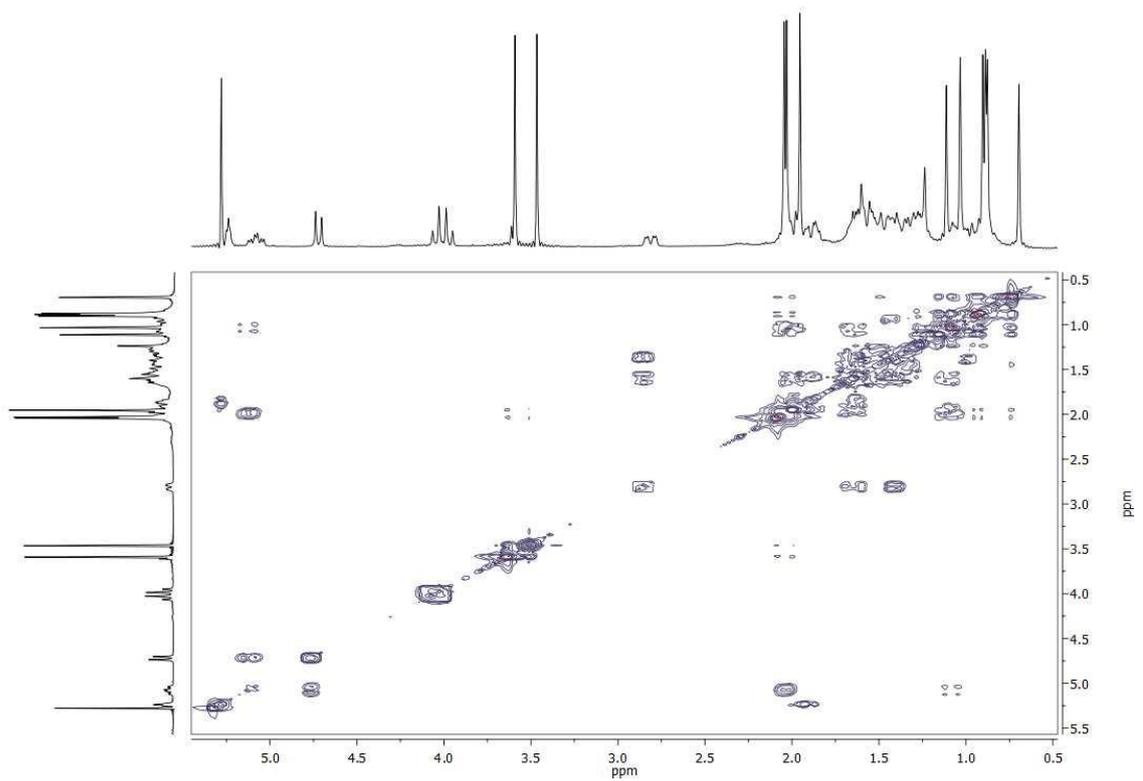
Espectro de ^{13}C RMN del producto 74



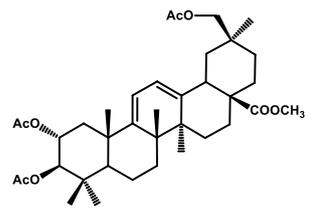
Espectro HSQC del producto 74

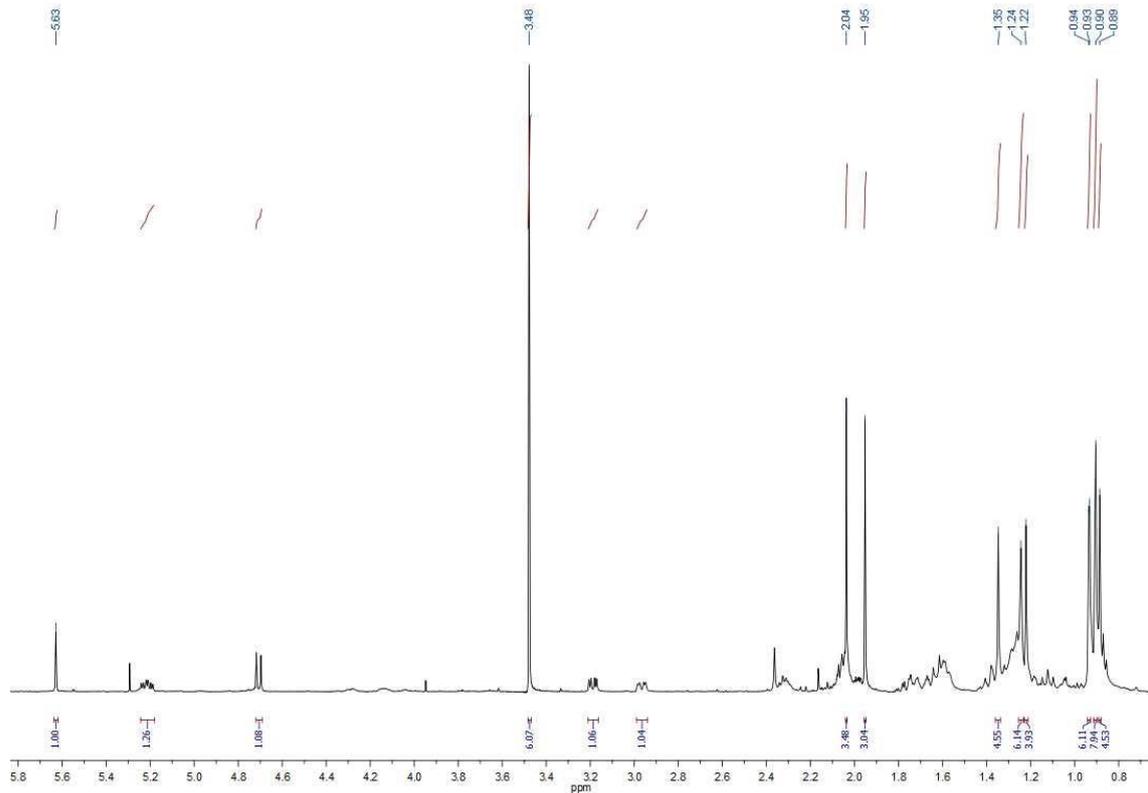


Espectro HMBC del producto 74

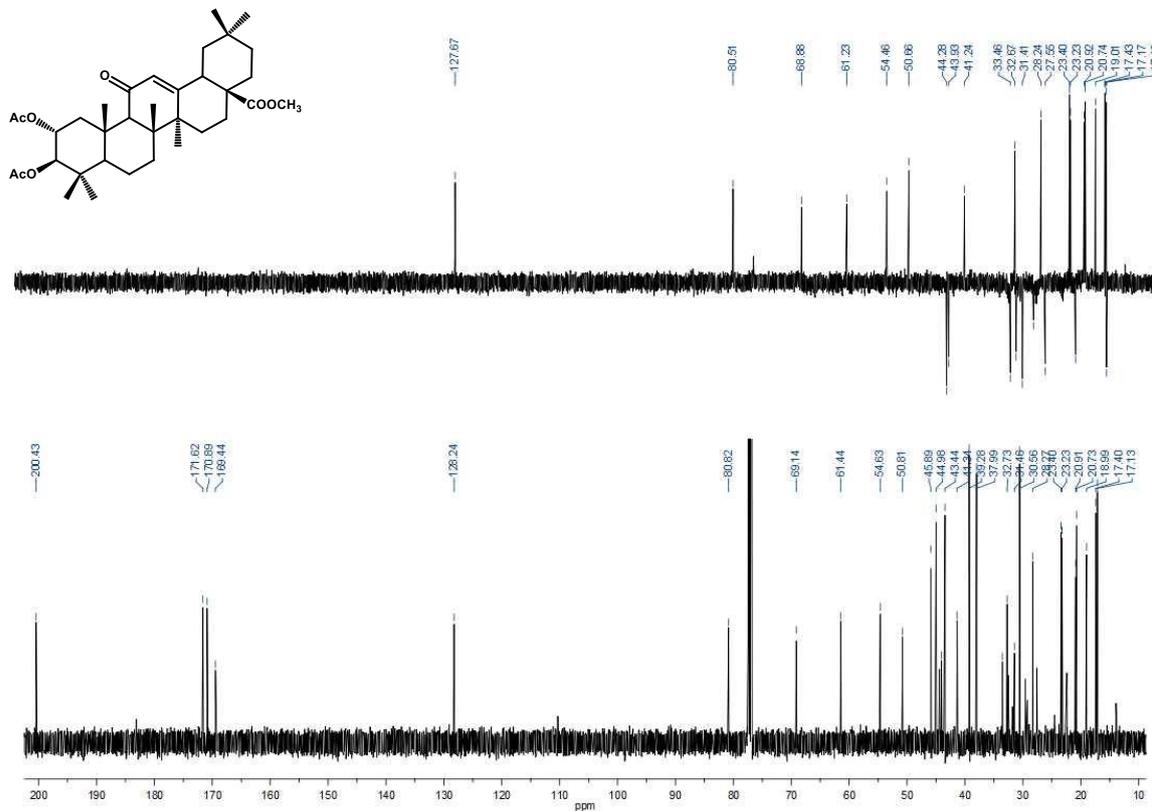


COSY del producto 74

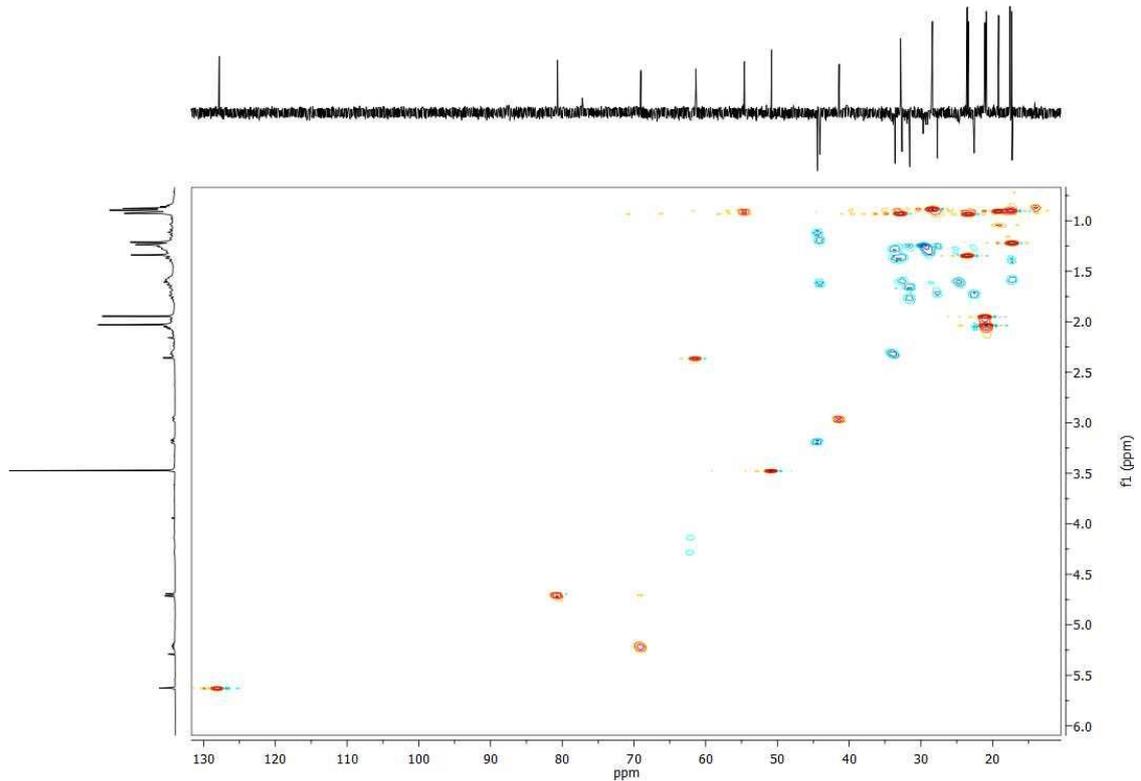




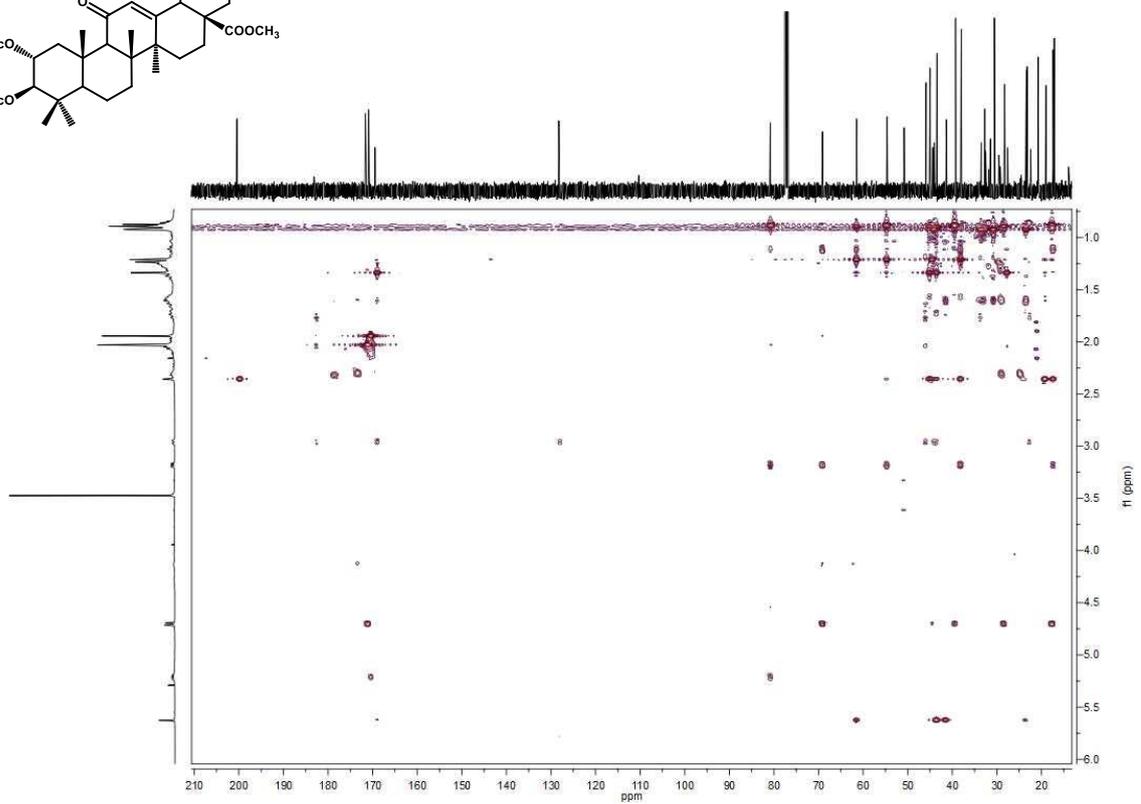
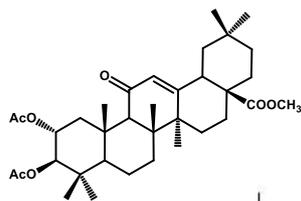
Espectro de ¹H RMN del producto 75



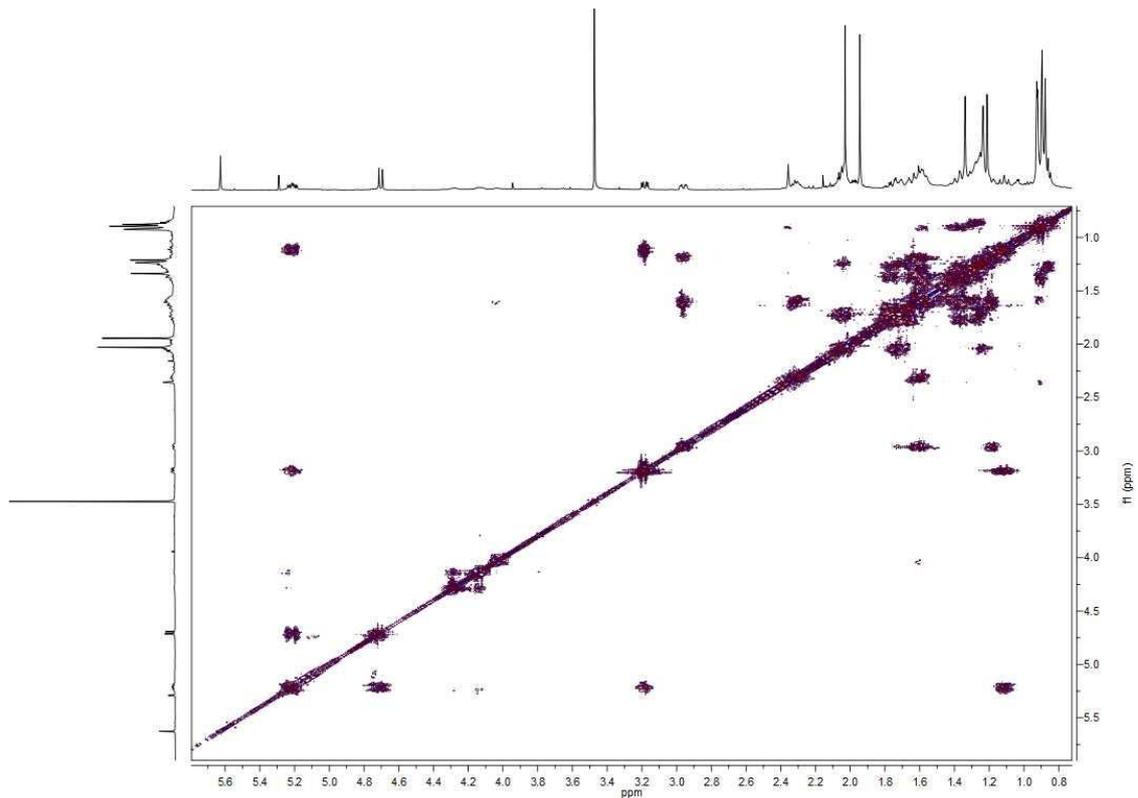
Espectro de ¹³C RMN del producto 75



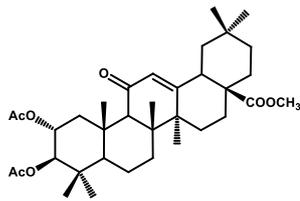
Espectro HSQC del producto 75

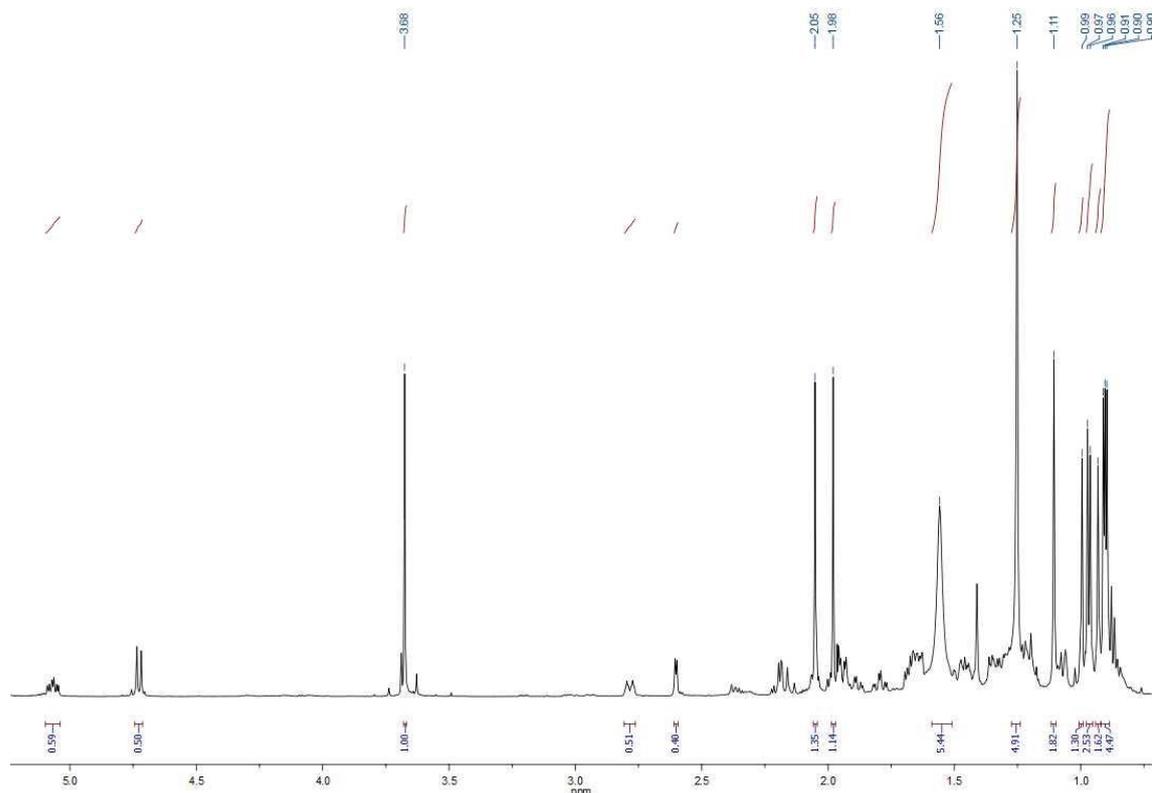


Espectro HMBC del producto 75

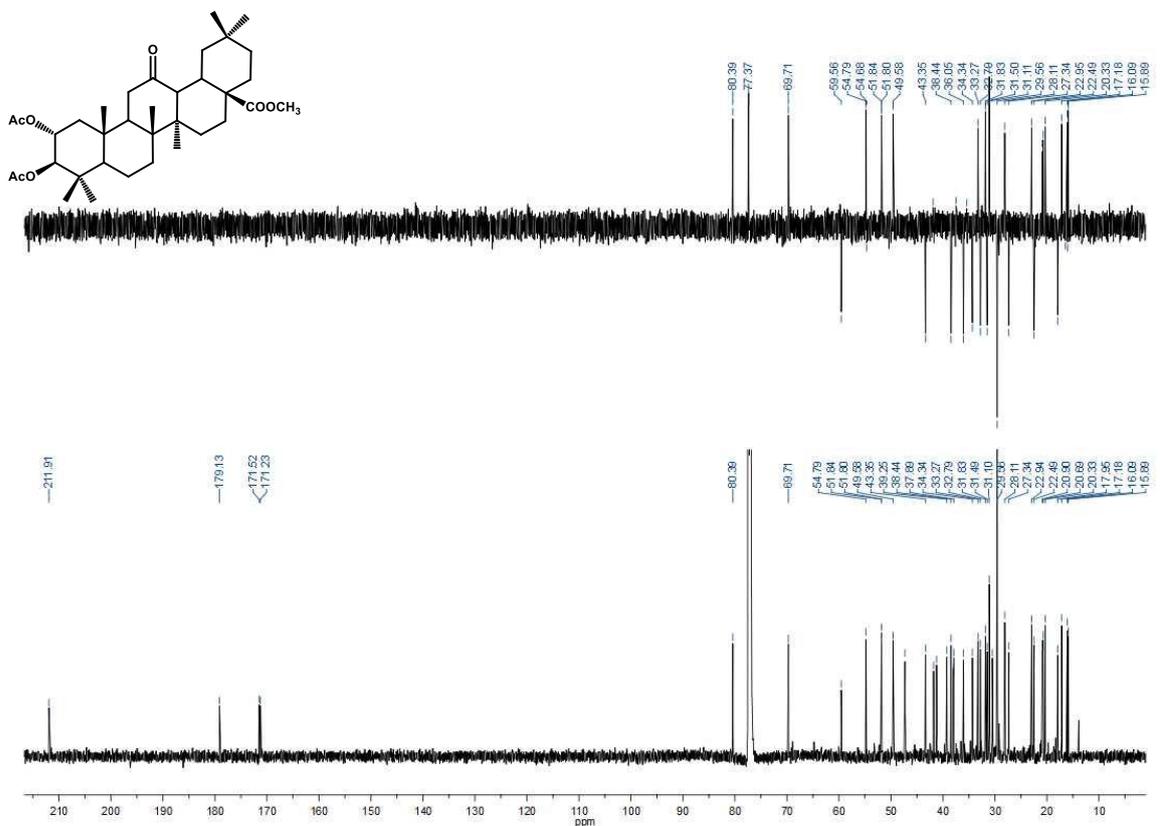


COSY del producto 75

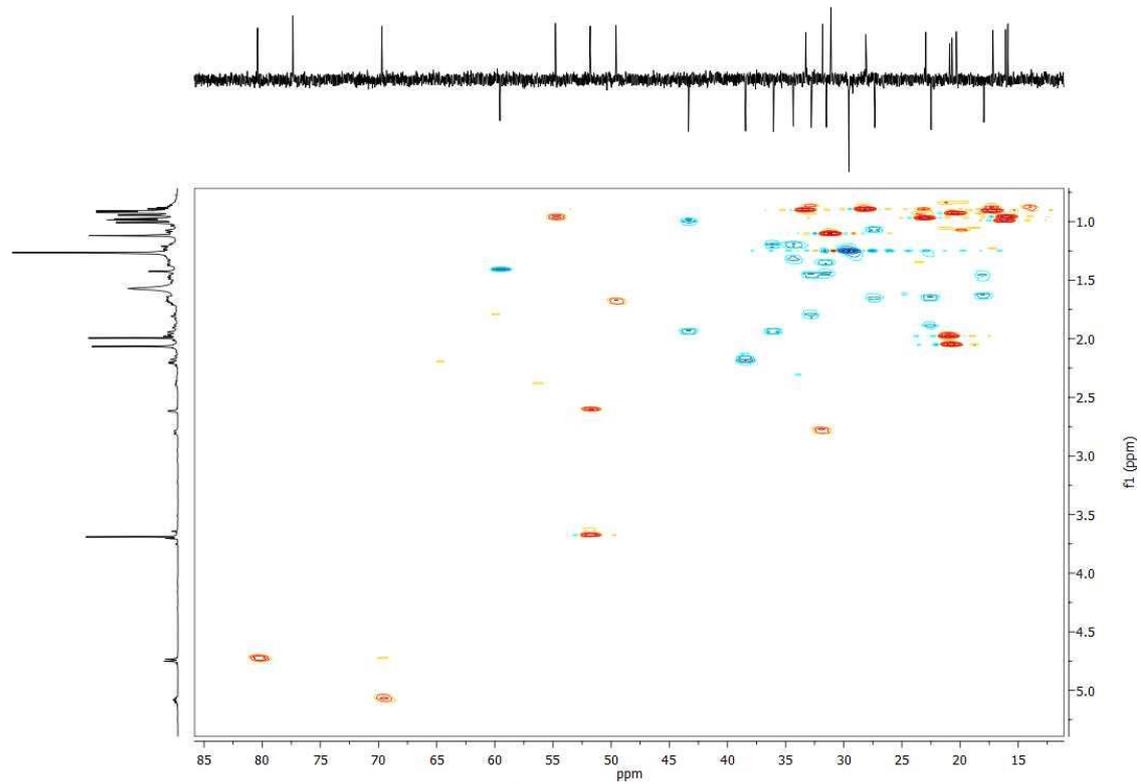




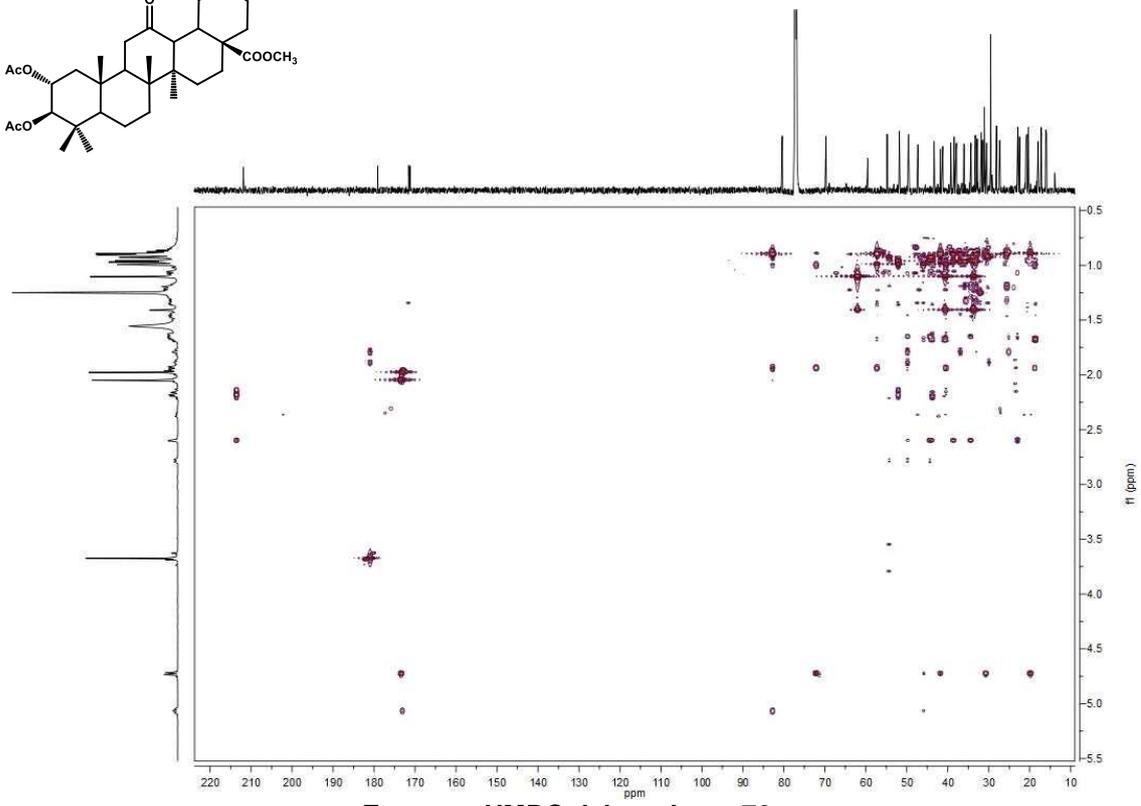
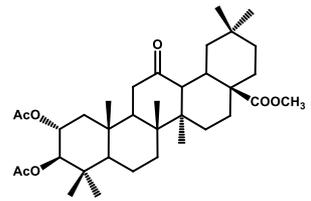
Espectro de ^1H RMN del producto 76



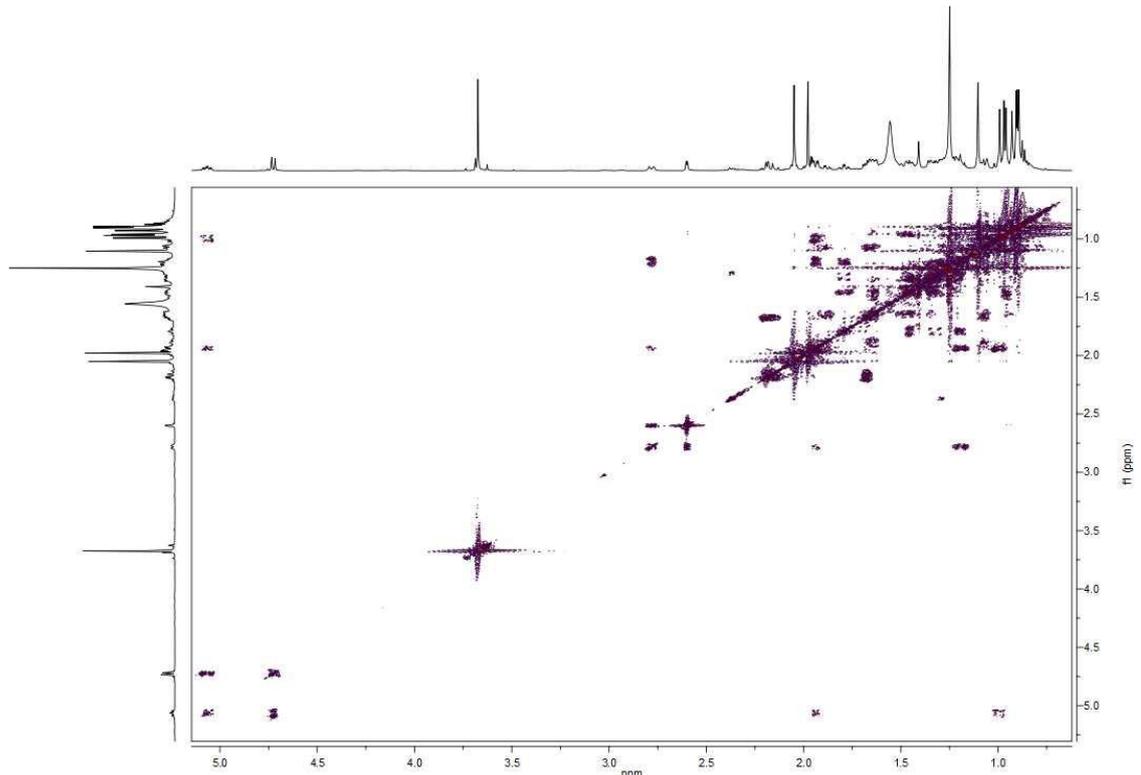
Espectro de ^{13}C RMN del producto 76



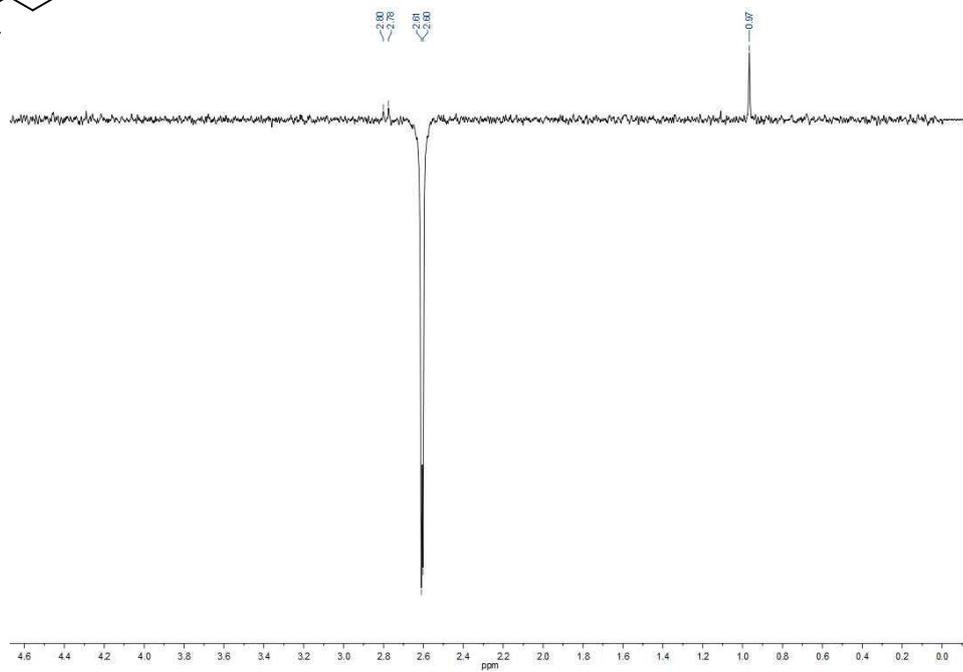
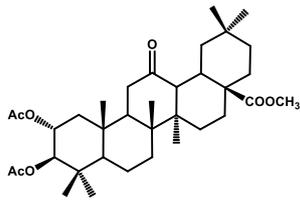
Espectro HSQC del producto 76



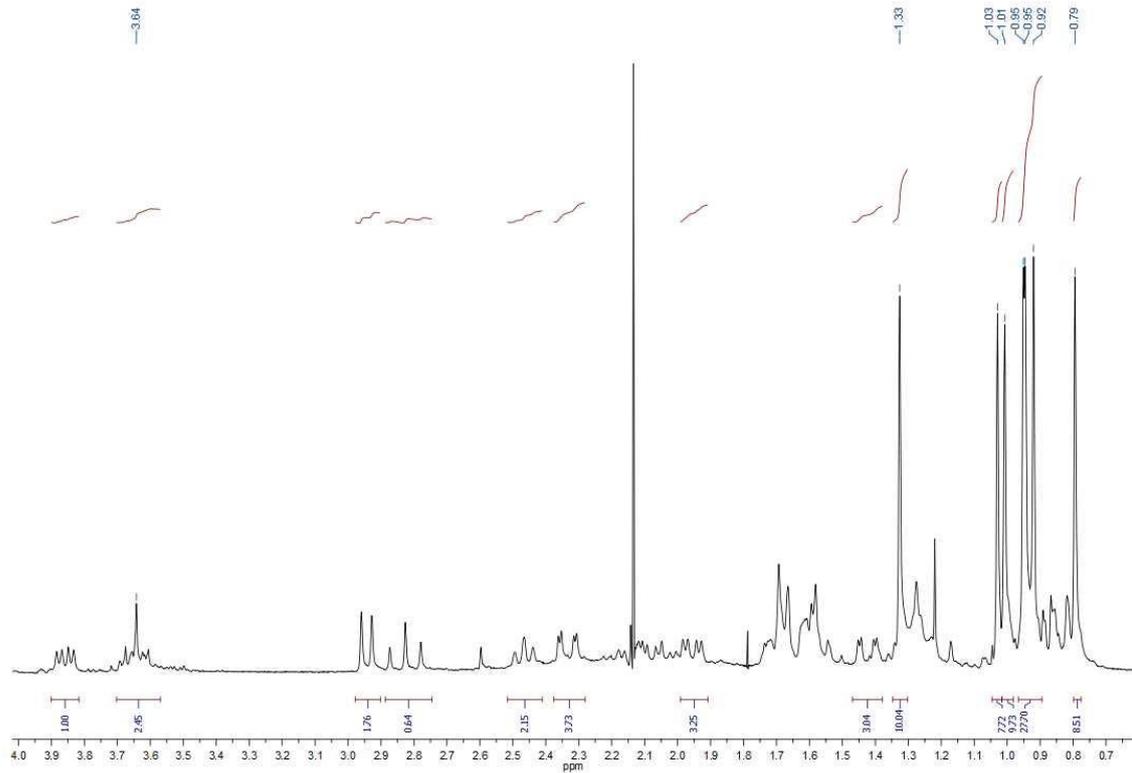
Espectro HMBC del producto 76



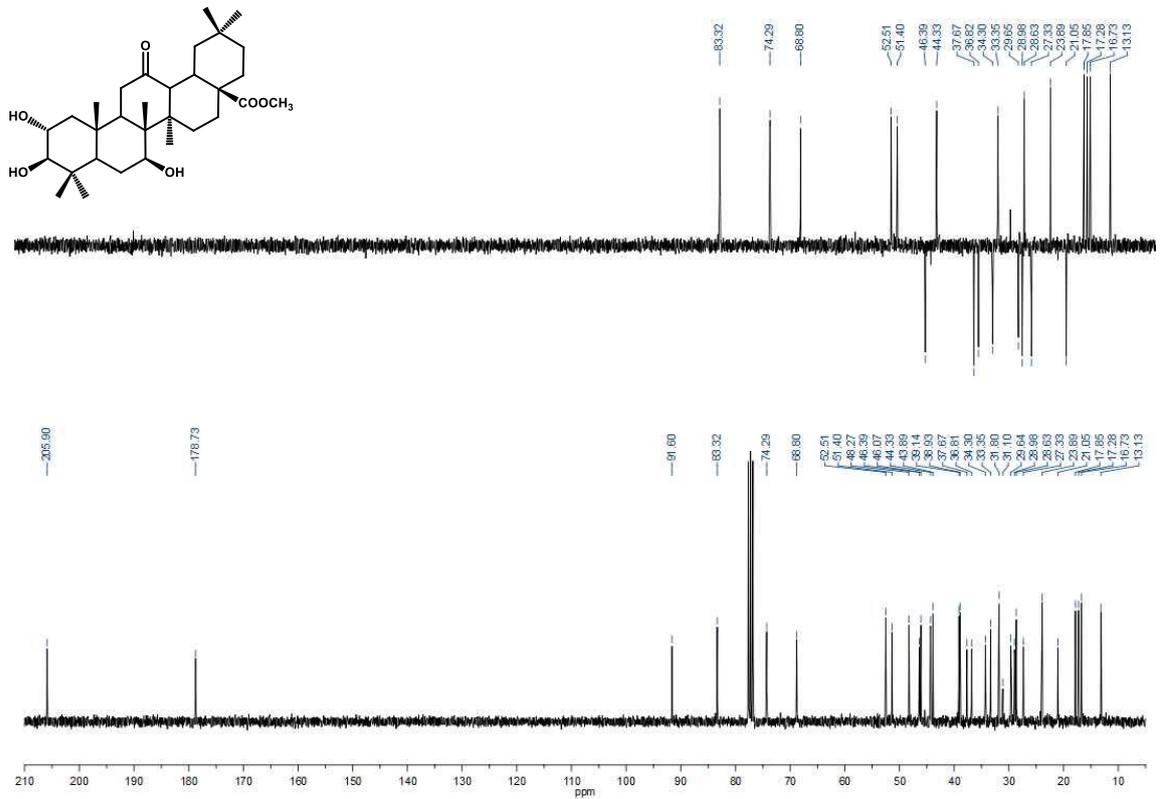
COSY del producto 76



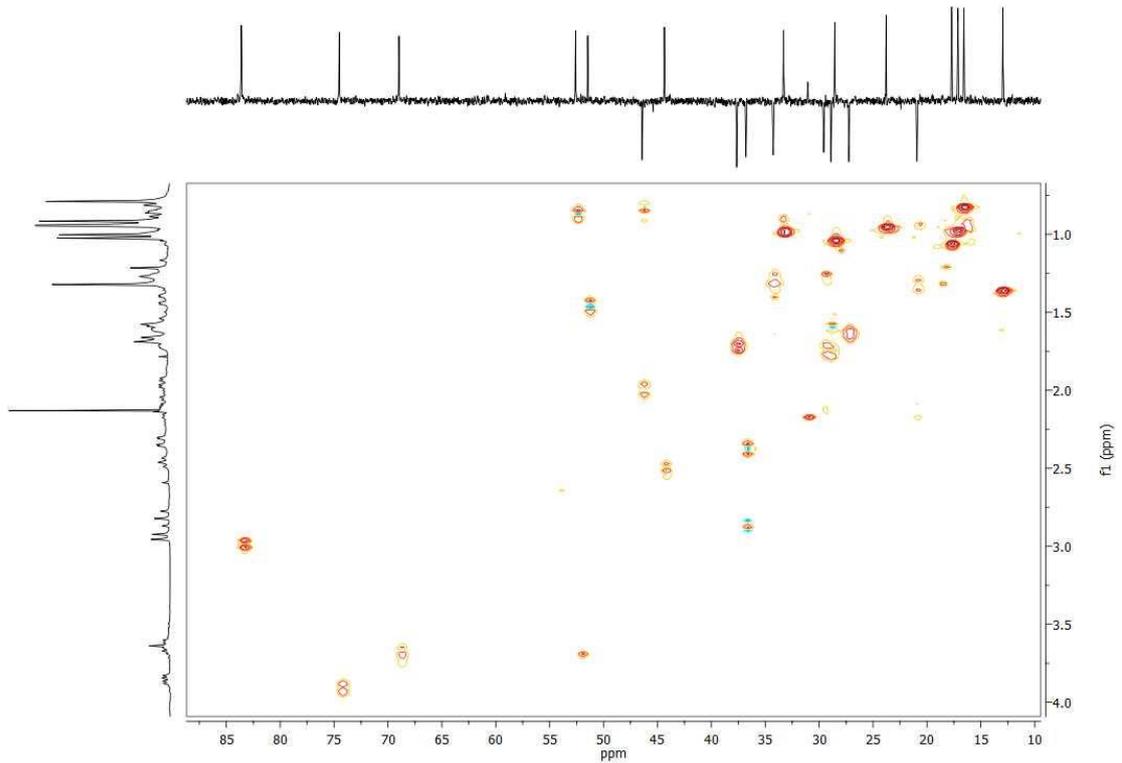
1d-NOESY del producto 76 a 2.61 ppm



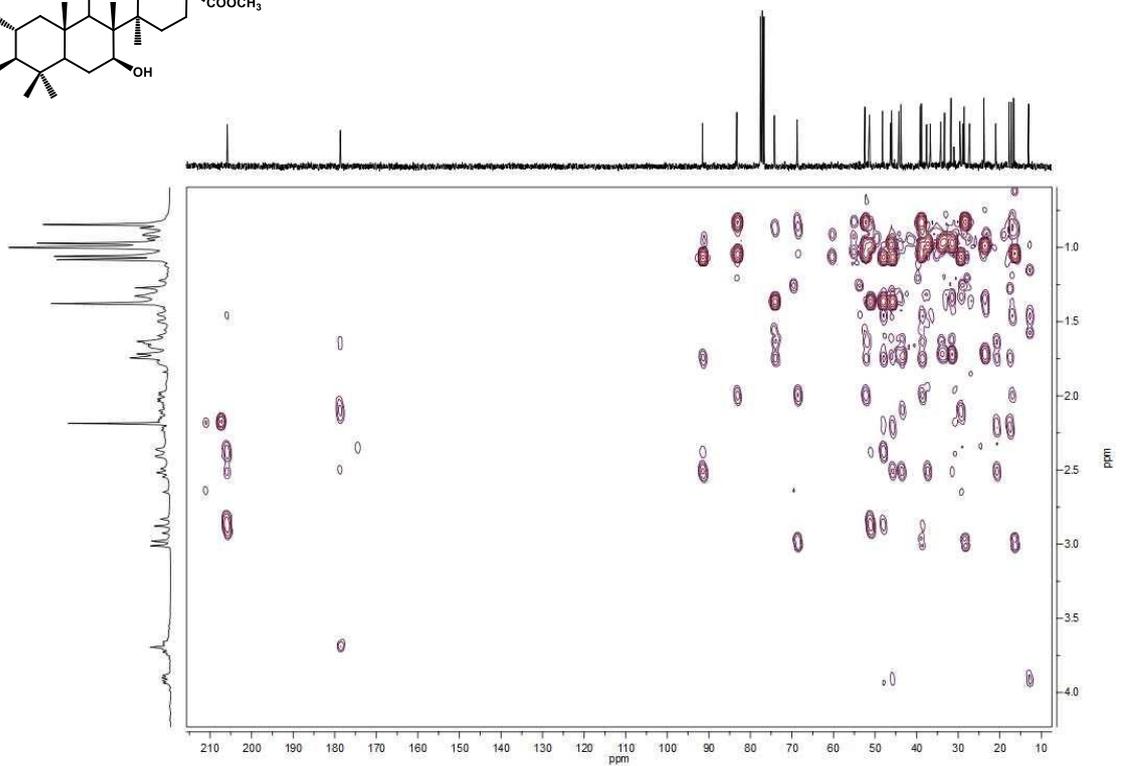
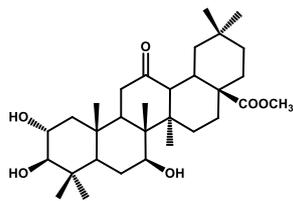
Espectro de ^1H RMN del producto 77



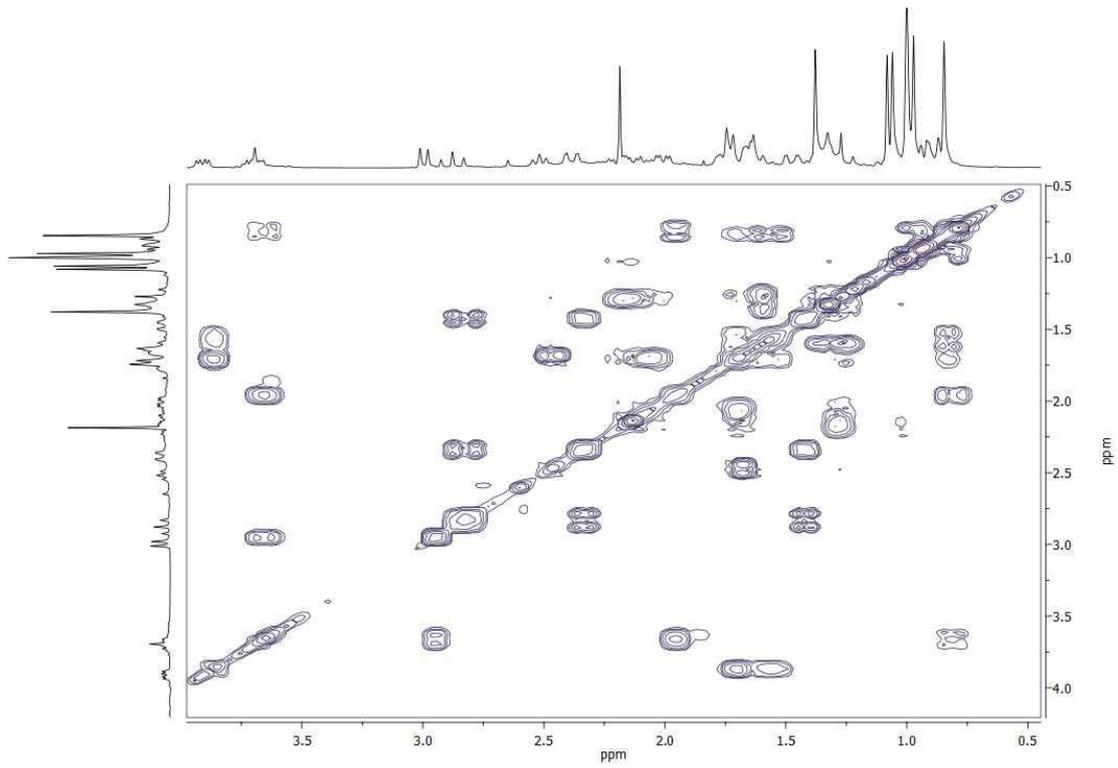
Espectro de ^{13}C RMN del producto 77



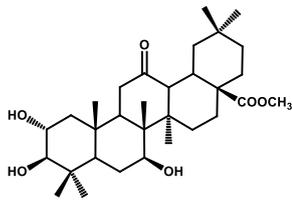
Espectro HMQC del producto 77

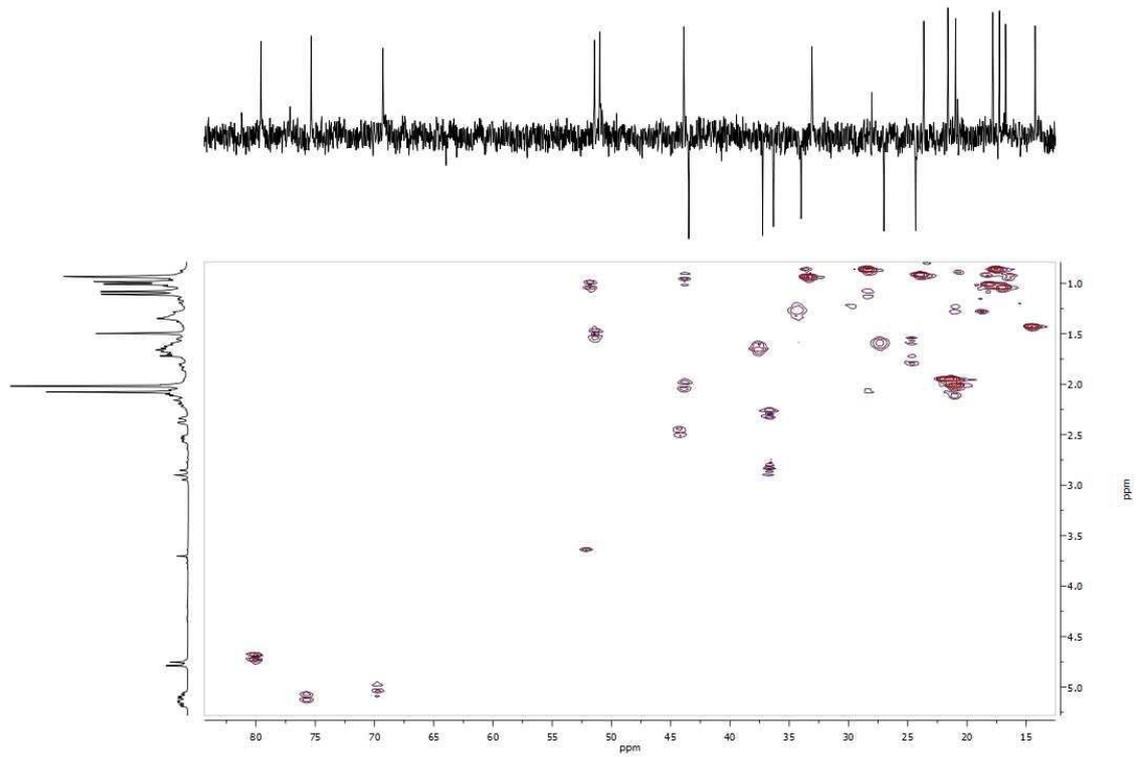


Espectro HMBC del producto 77

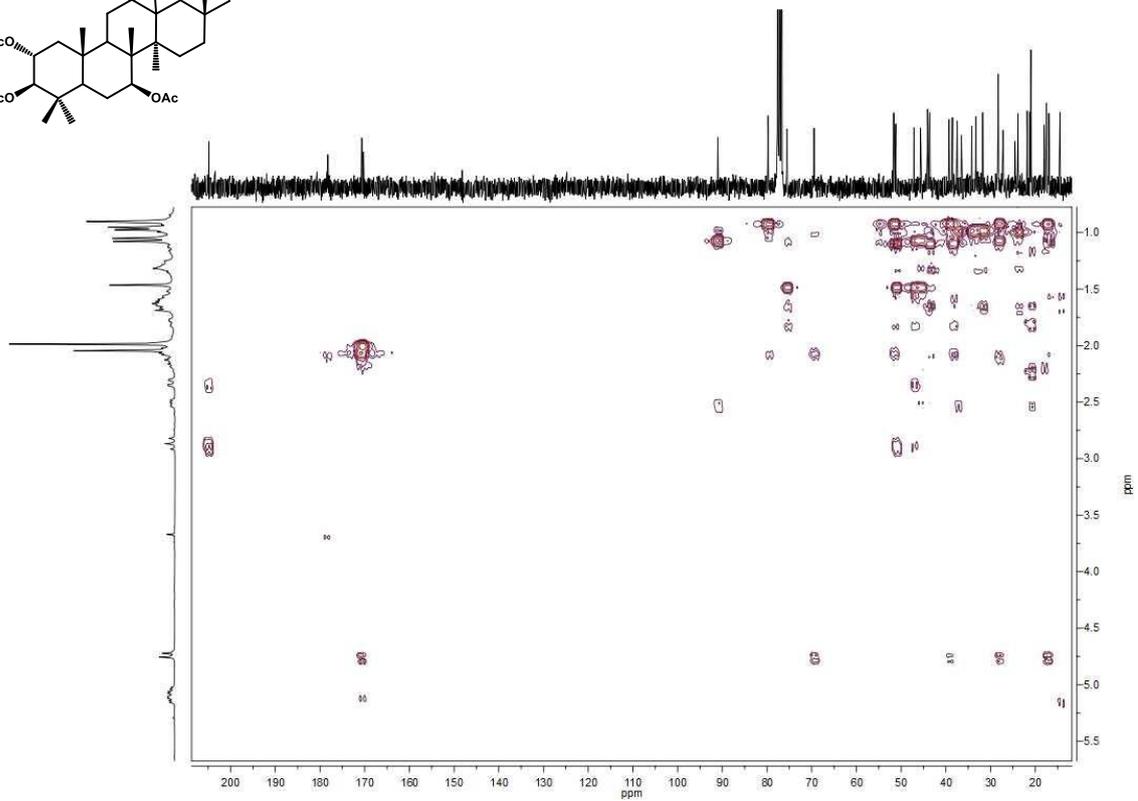
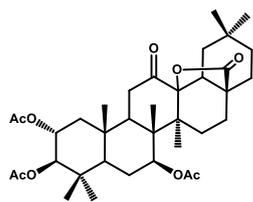


COSY del producto 77

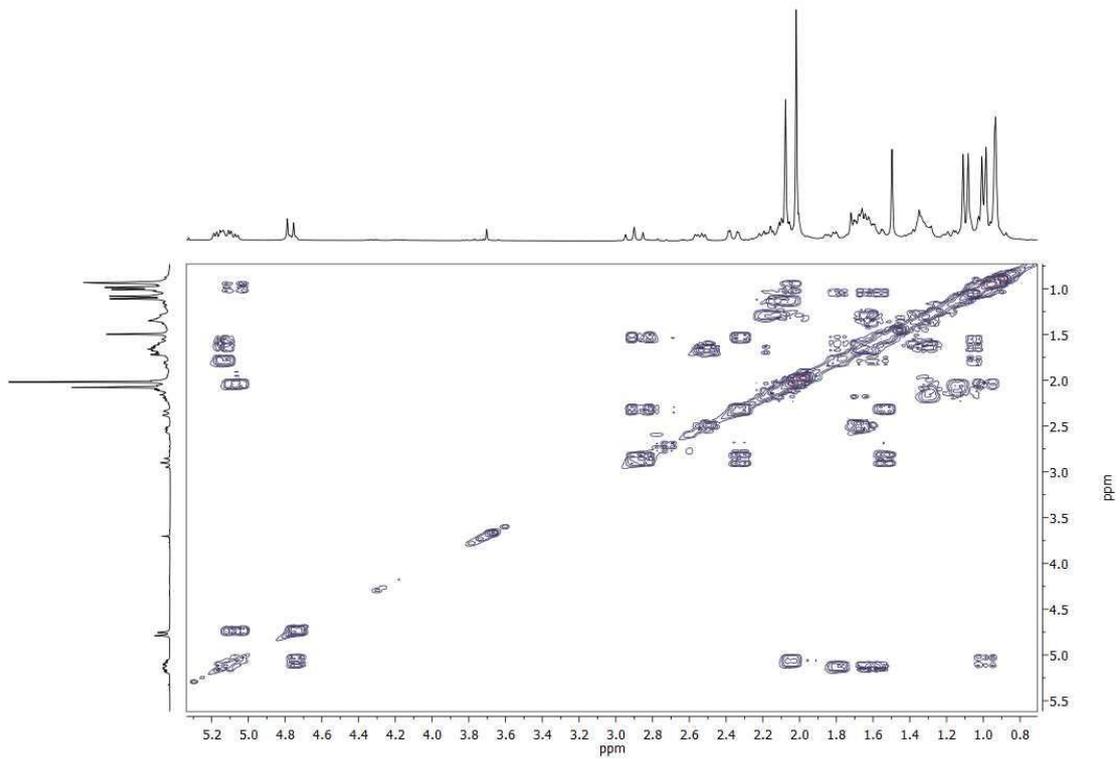




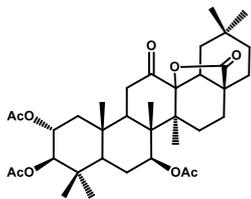
Espectro HMQC del producto 78

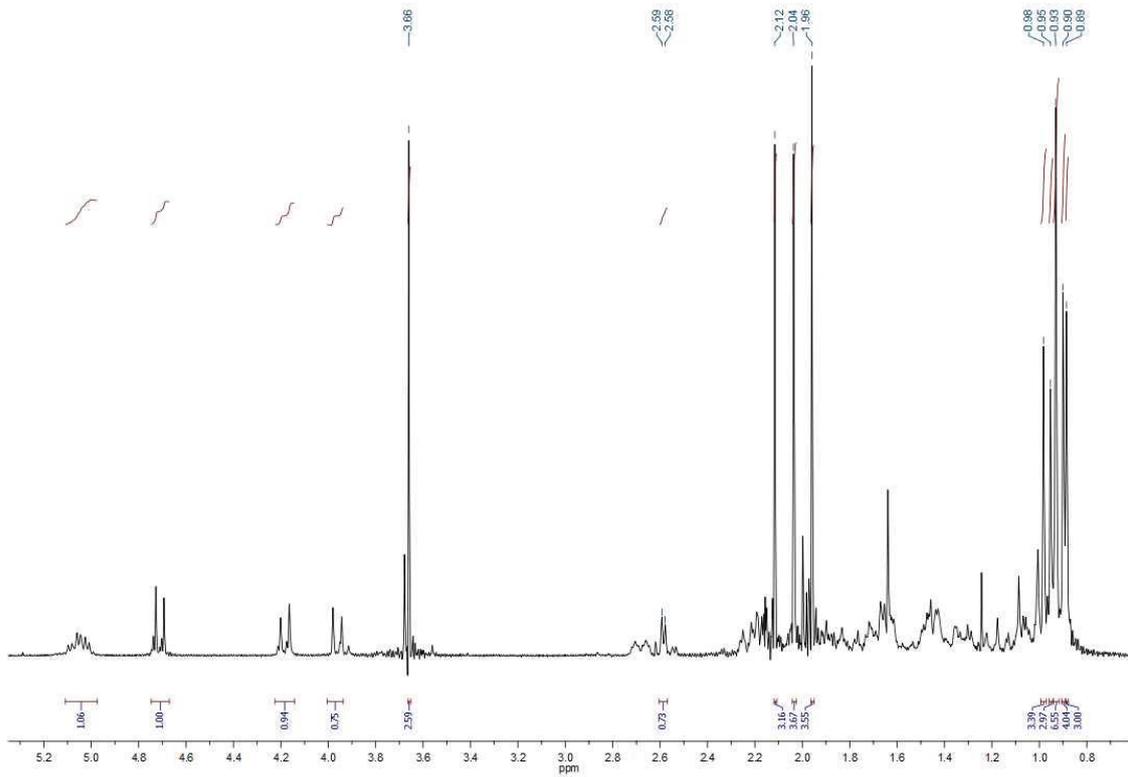


Espectro HMBC del producto 78

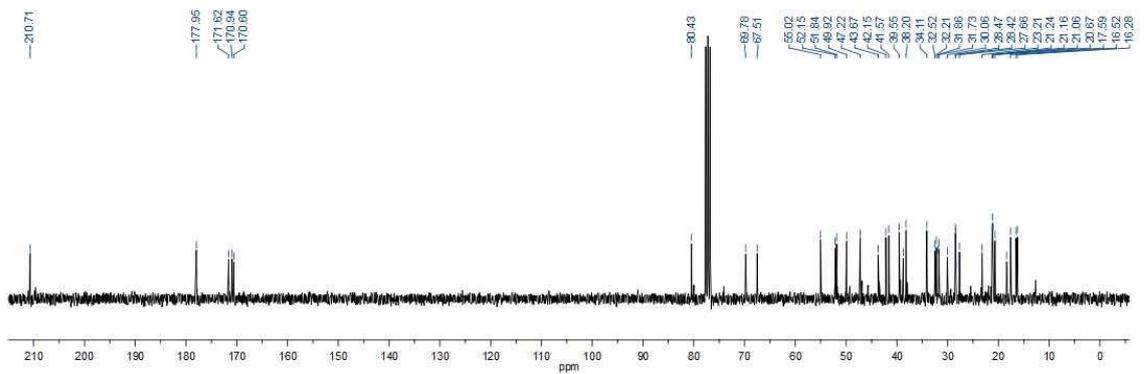
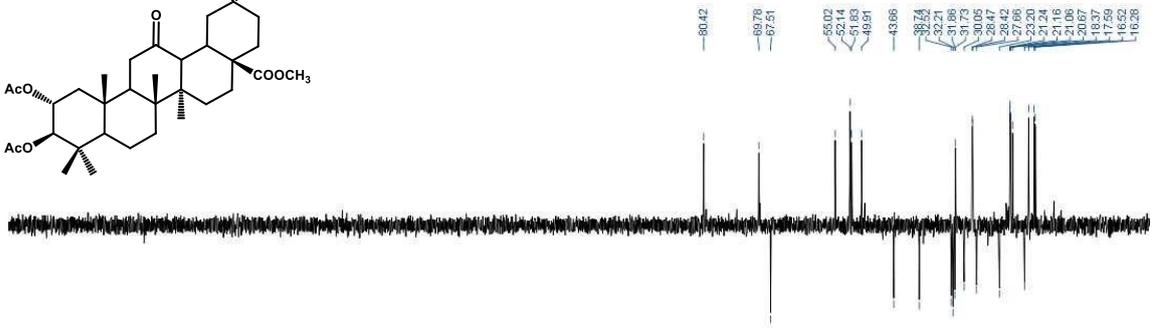
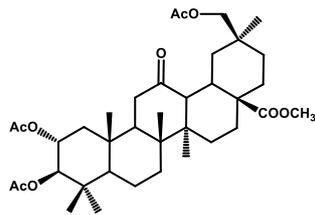


COSY del producto 78

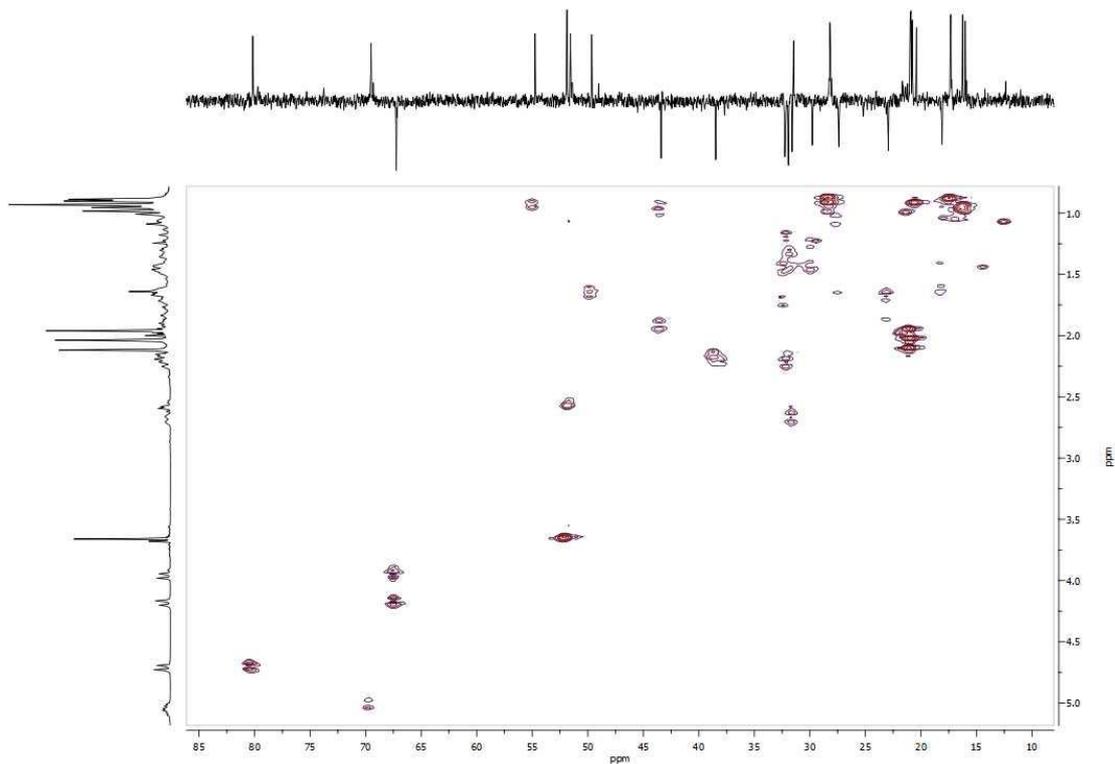




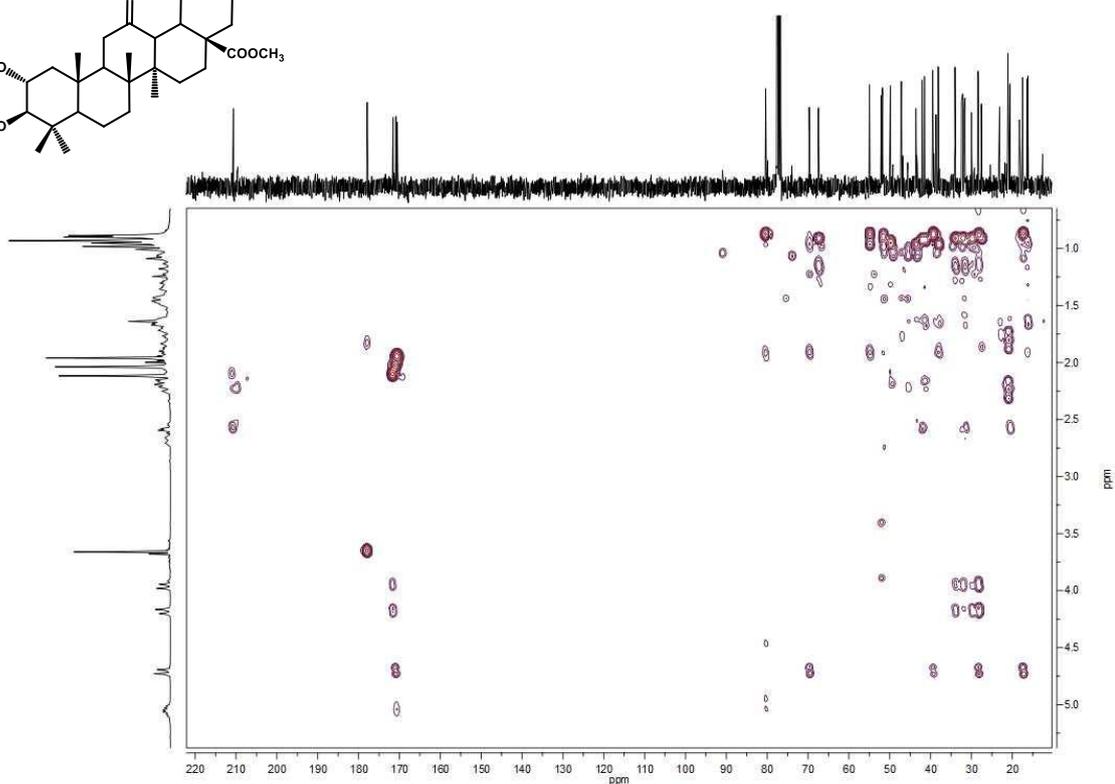
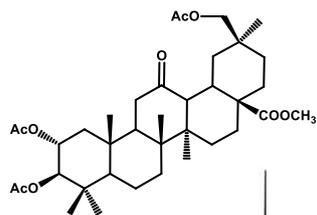
Espectro de ¹H RMN del producto 79



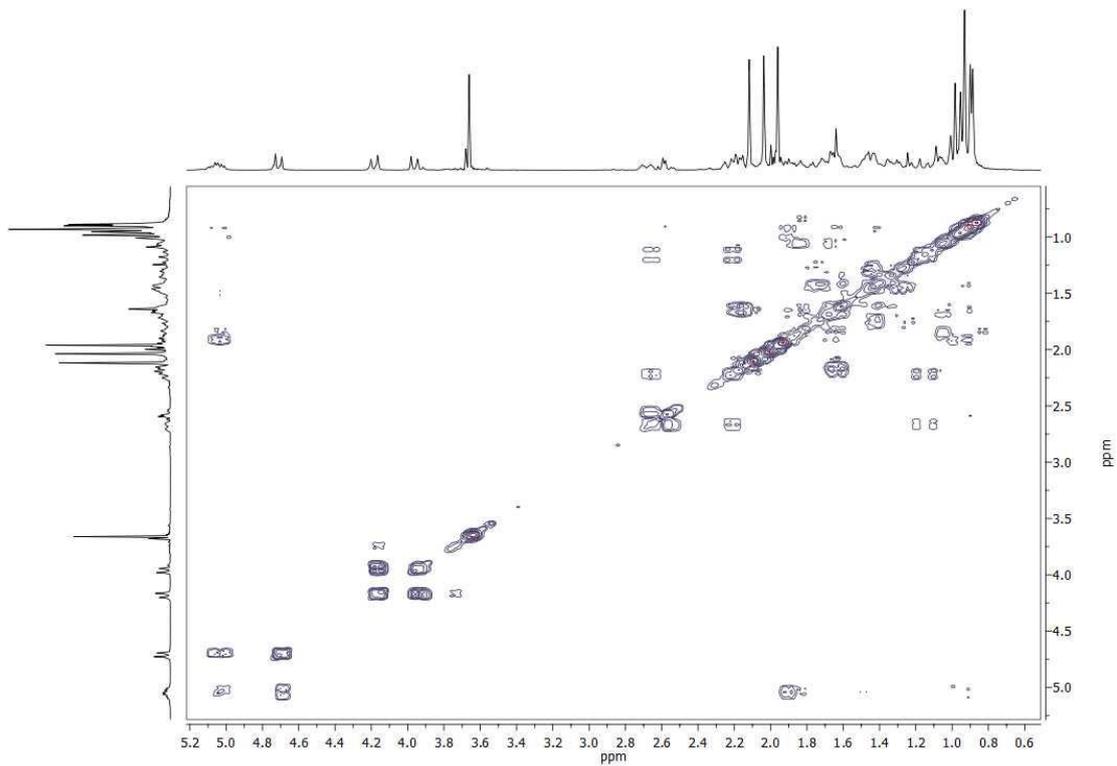
Espectro de ¹³C RMN del producto 79



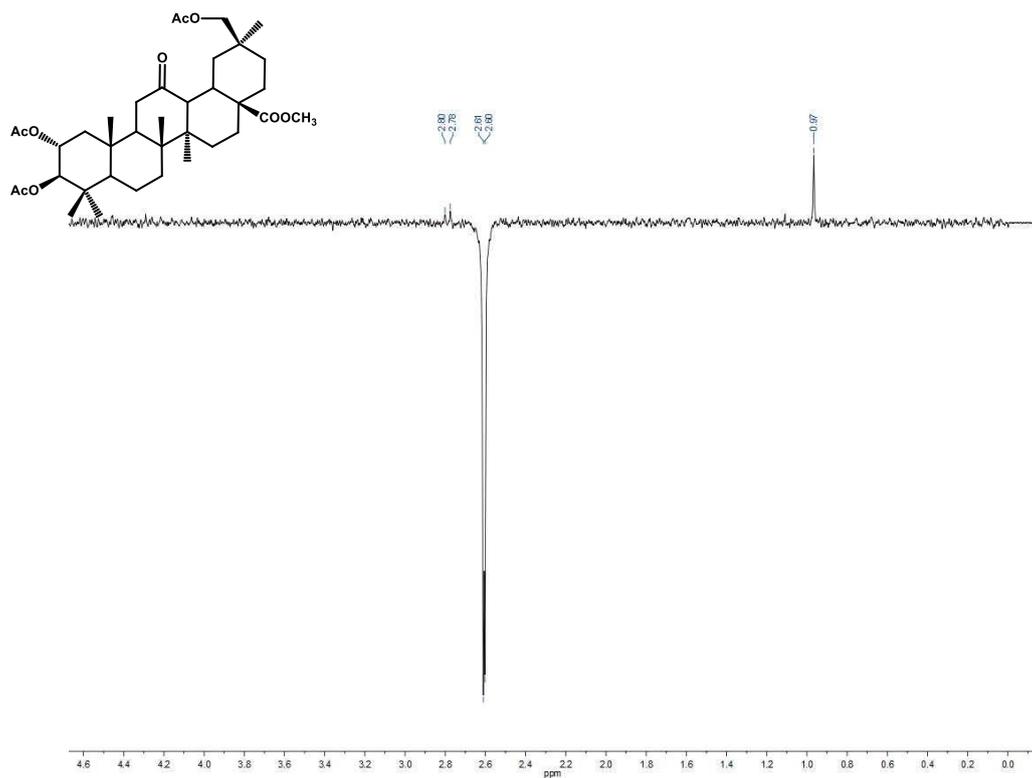
Espectro HMQC del producto 79



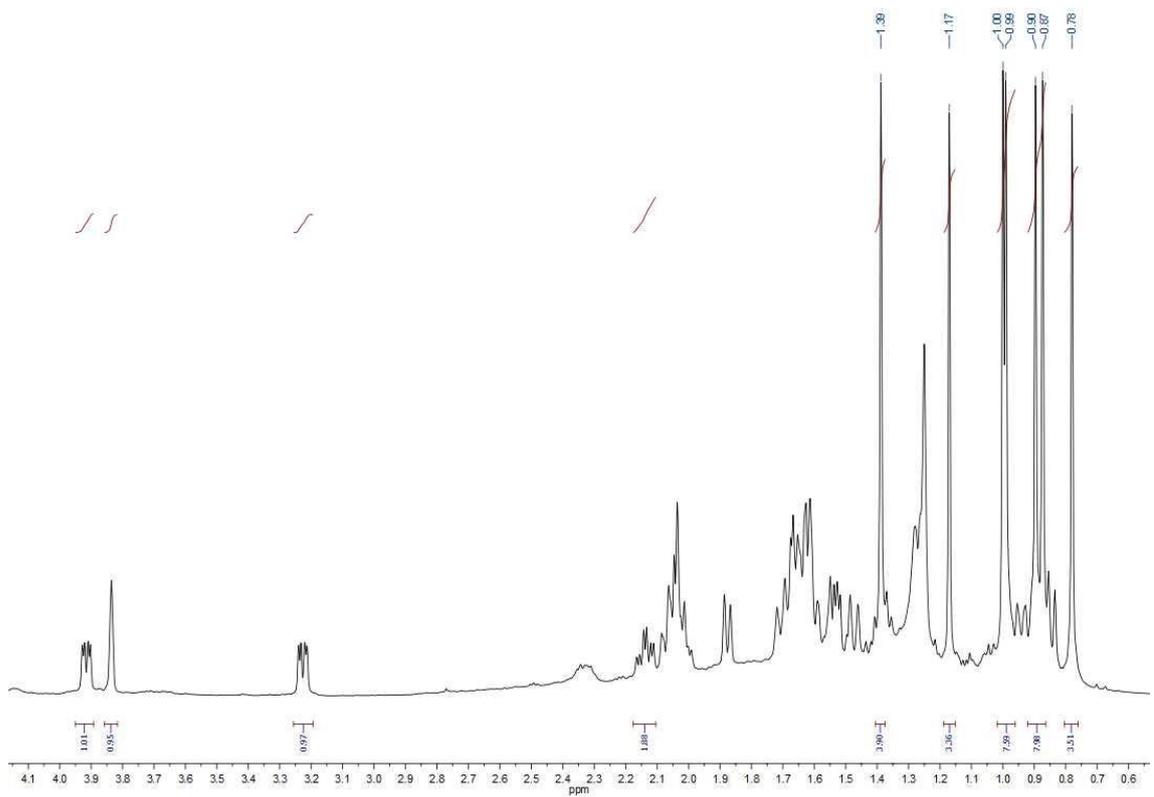
Espectro HMBC del producto 79



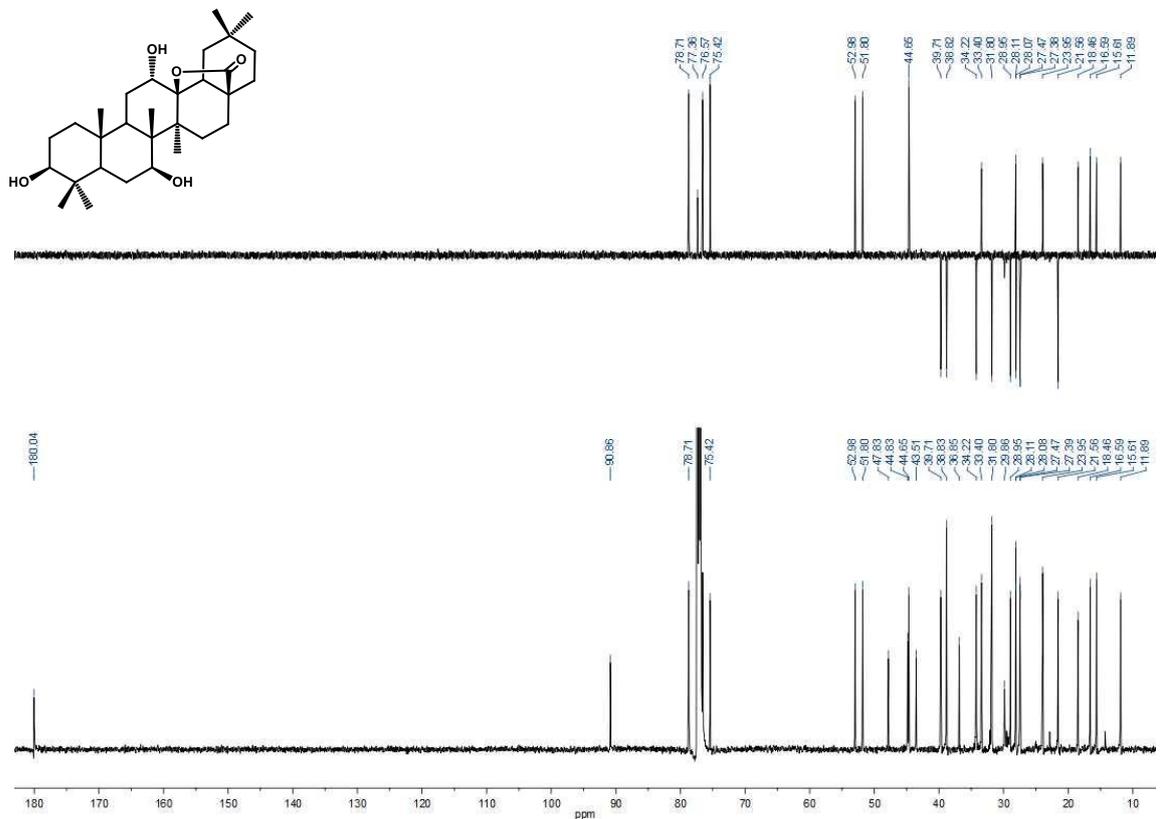
COSY del producto 79



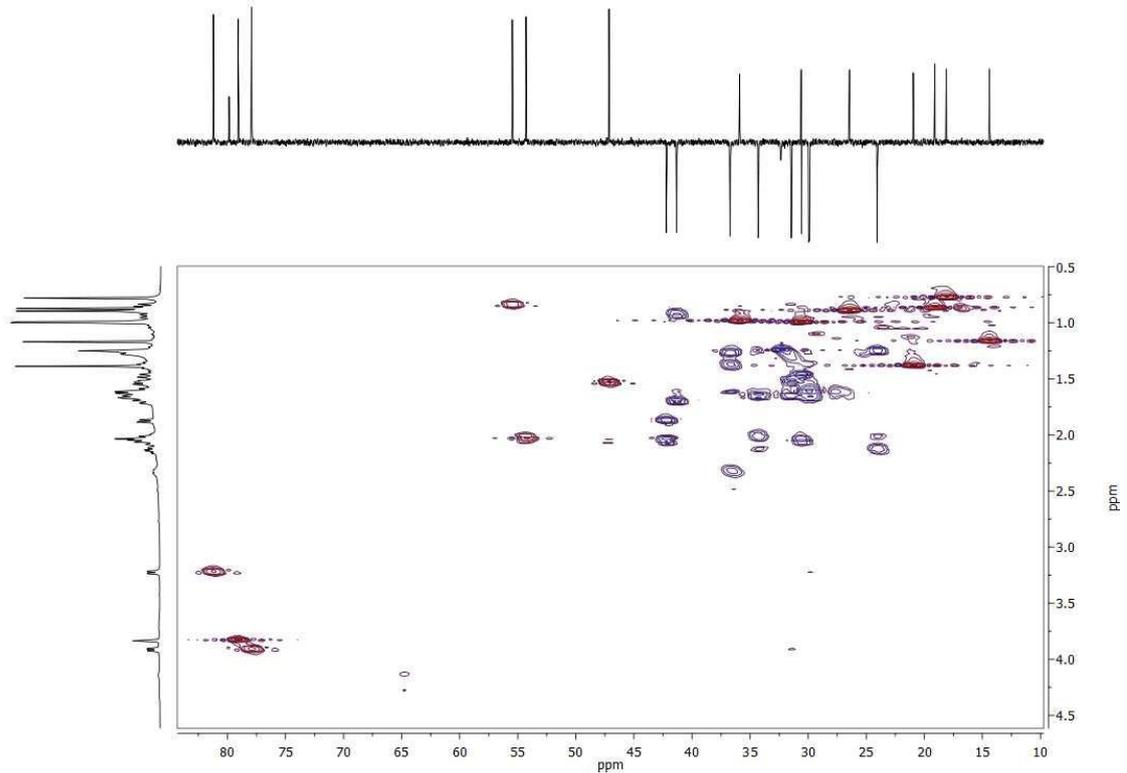
1d-NOESY del producto 79 a 259 ppm



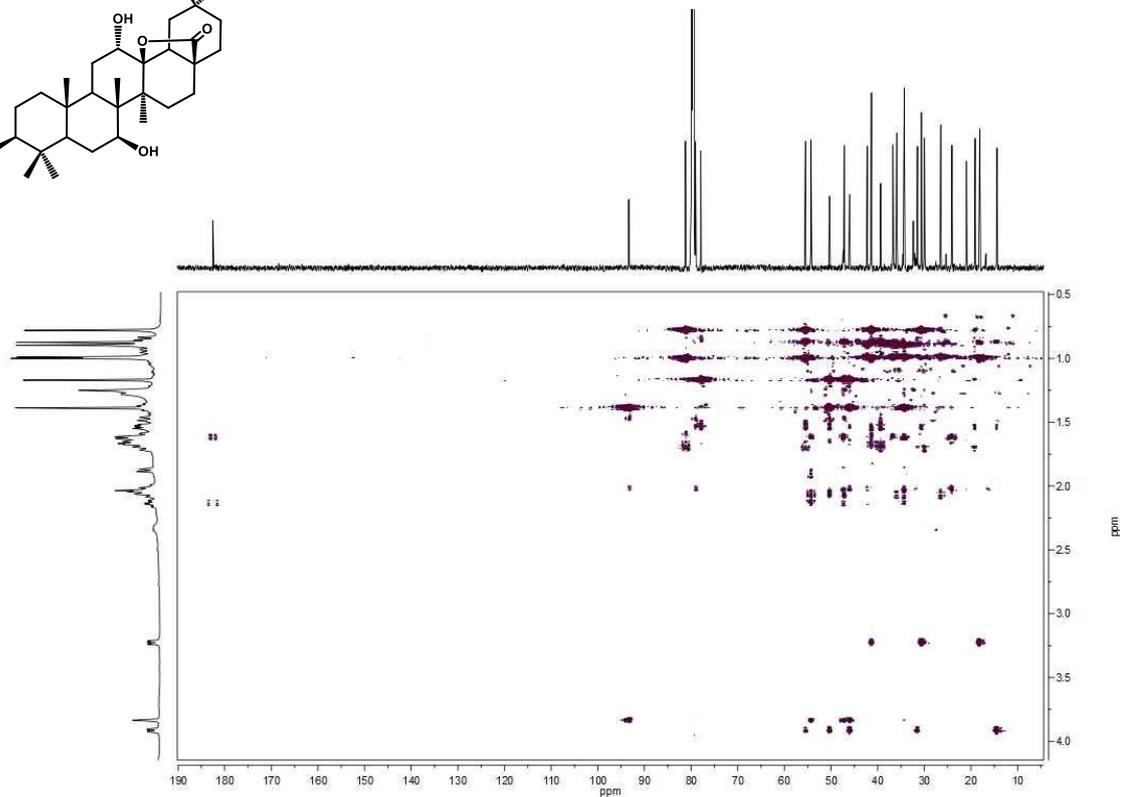
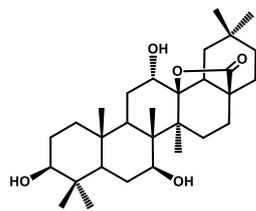
Espectro de ^1H RMN del producto 80



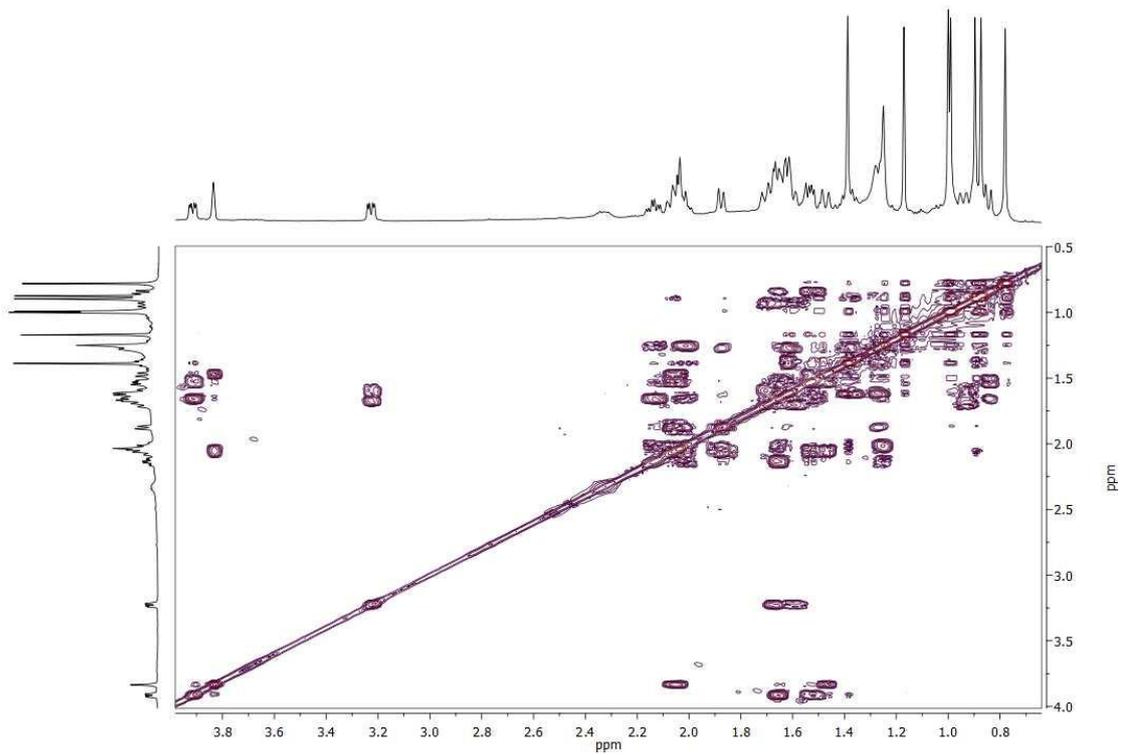
Espectro de ^{13}C RMN del producto 80



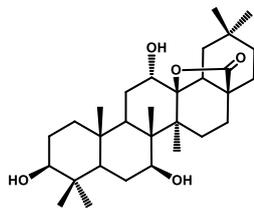
Espectro HSQC del producto 80

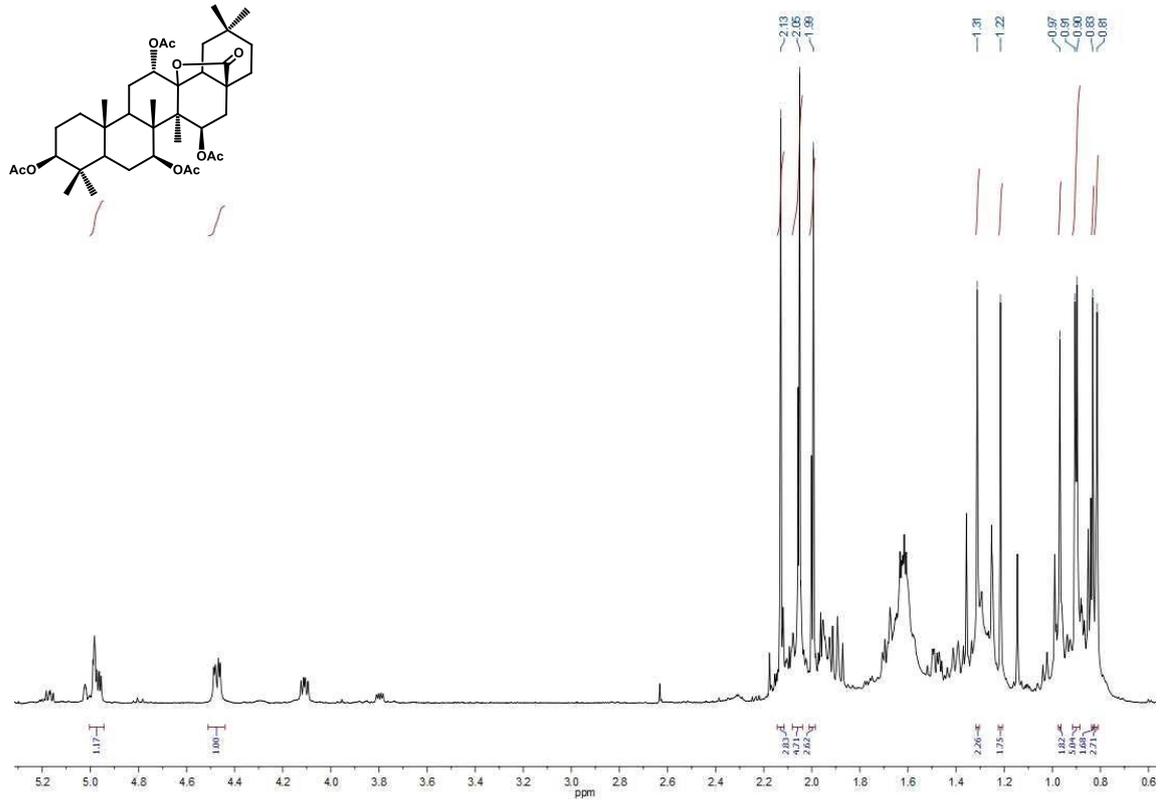


Espectro HMBC del producto 80

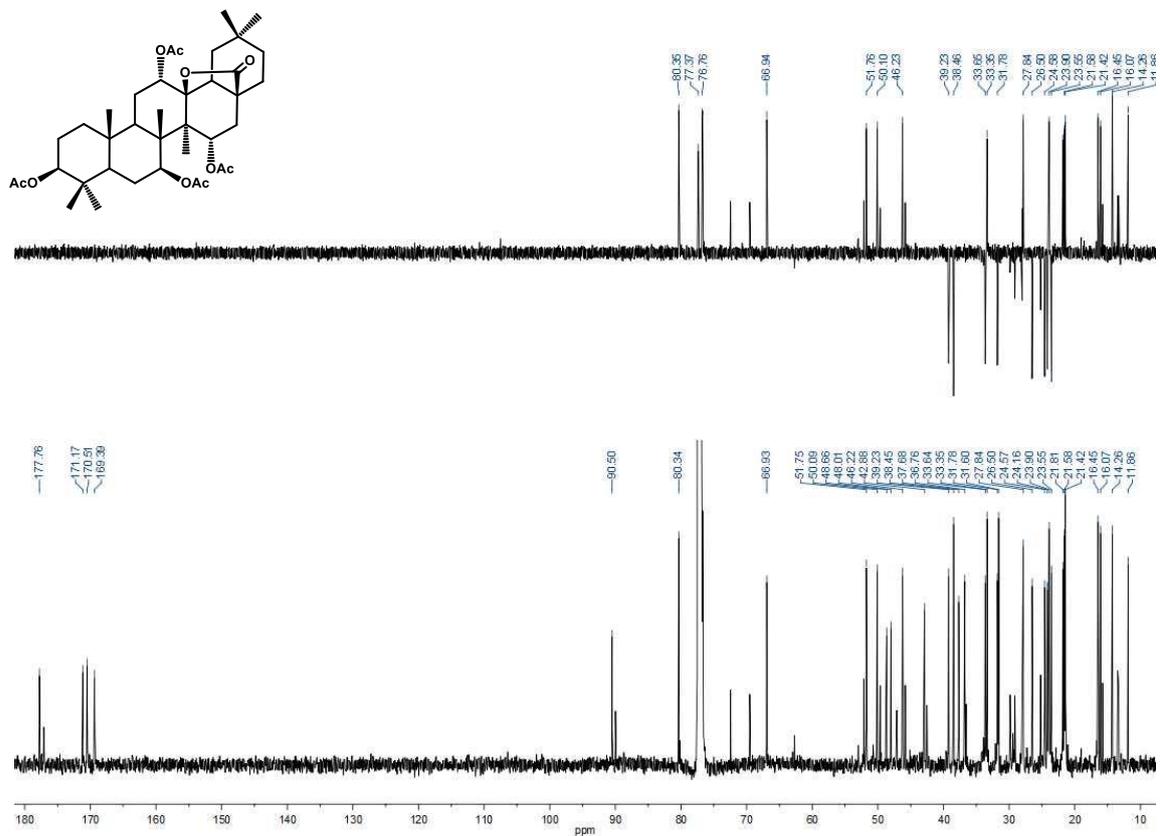


COSY del producto 80

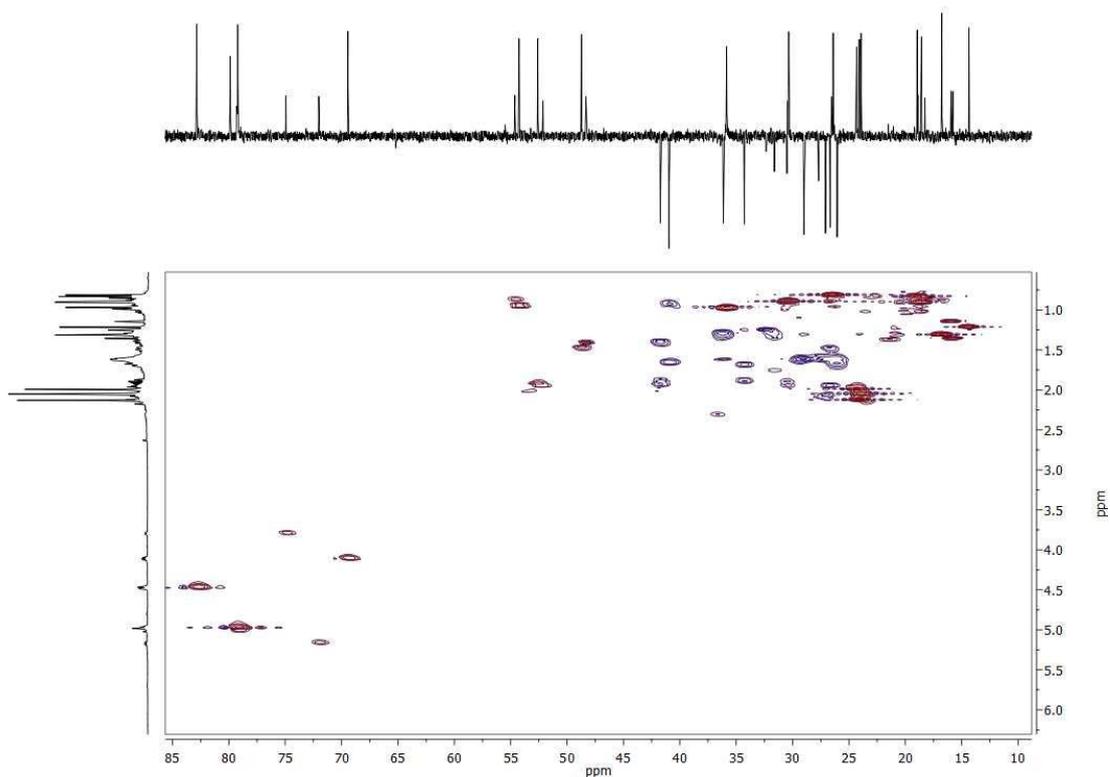




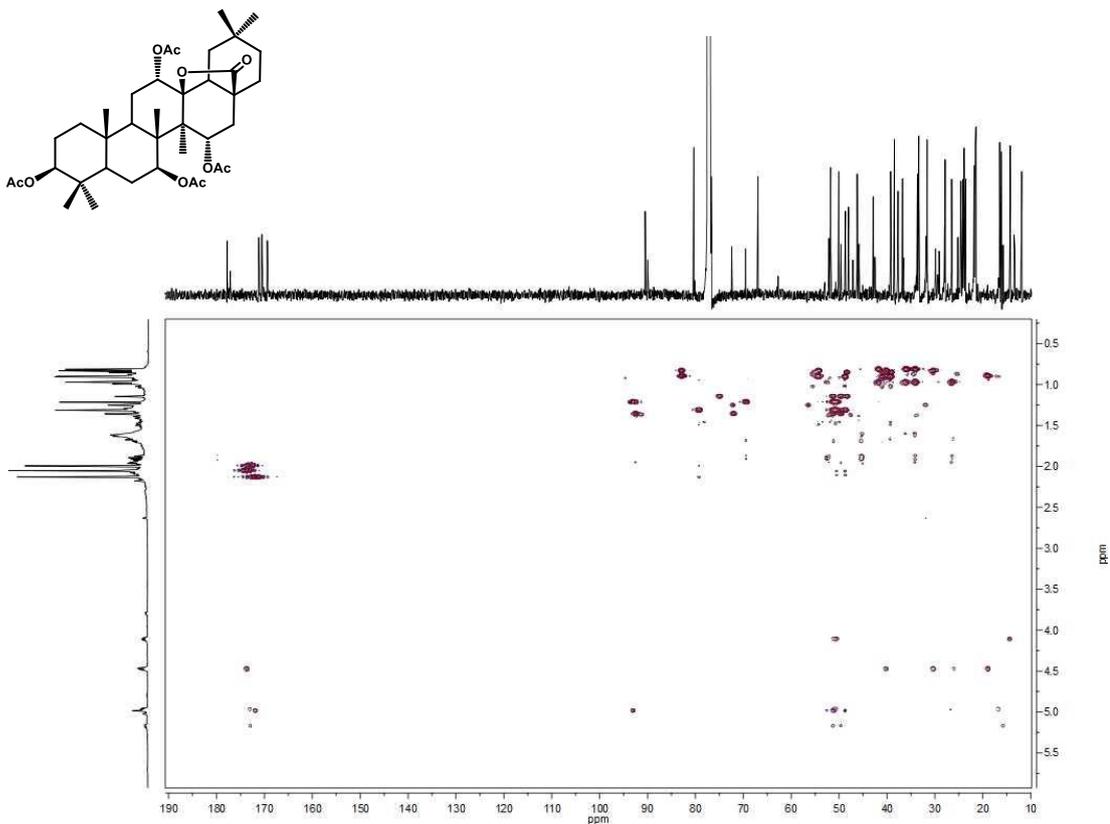
Espectro de ^1H RMN del producto 81



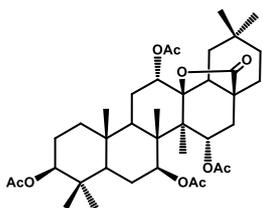
Espectro de ^{13}C RMN del producto 81

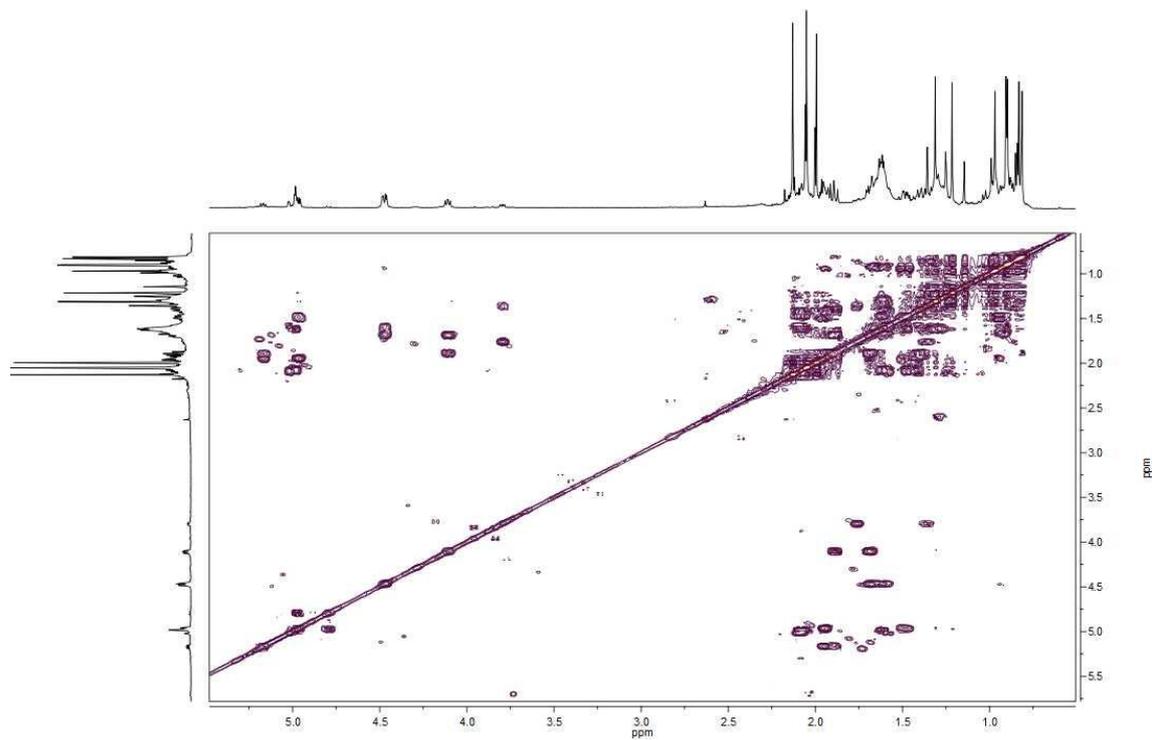


Espectro HSQC del producto 81

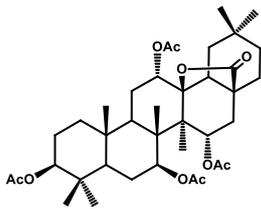


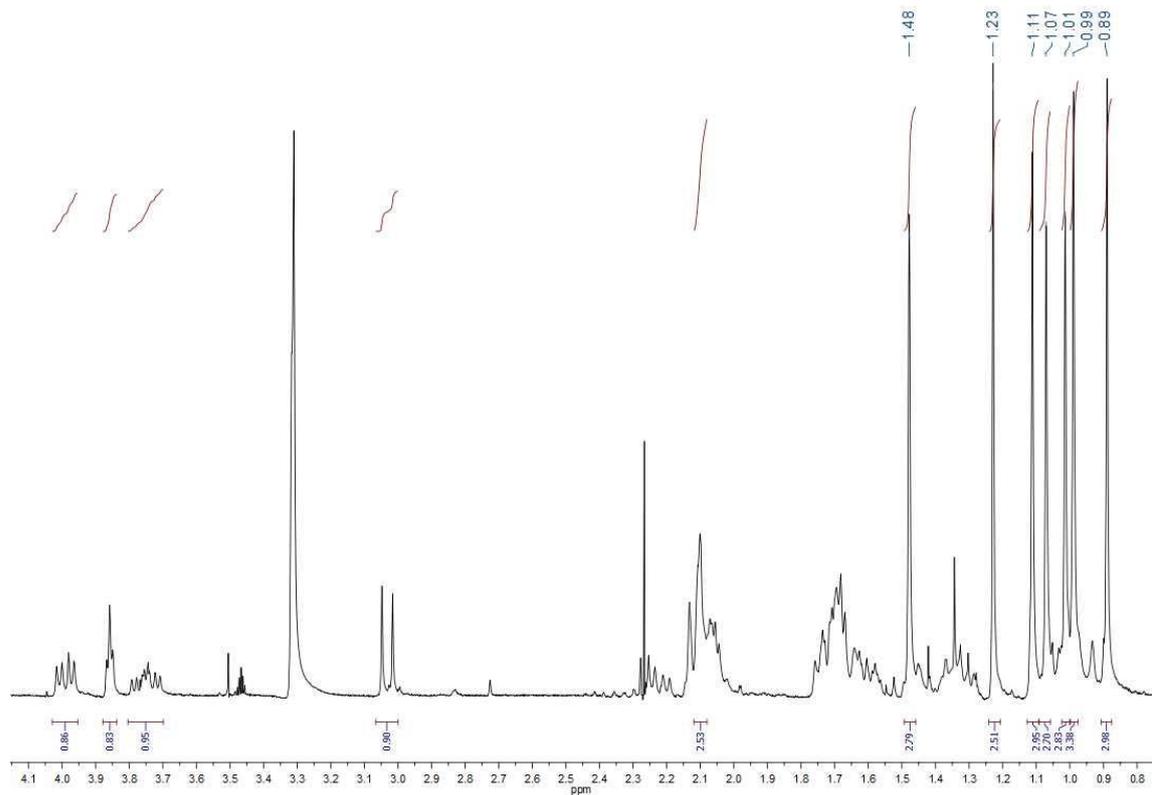
Espectro HMBC del producto 81



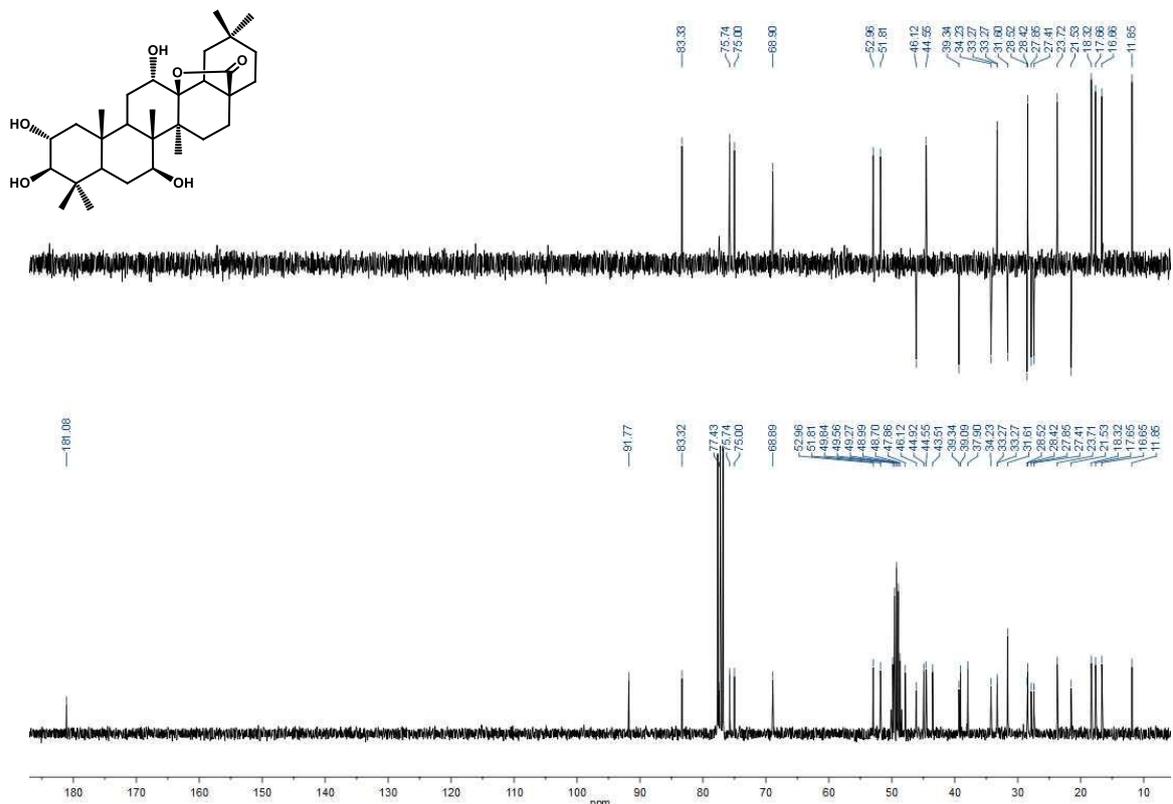


COSY del producto 81

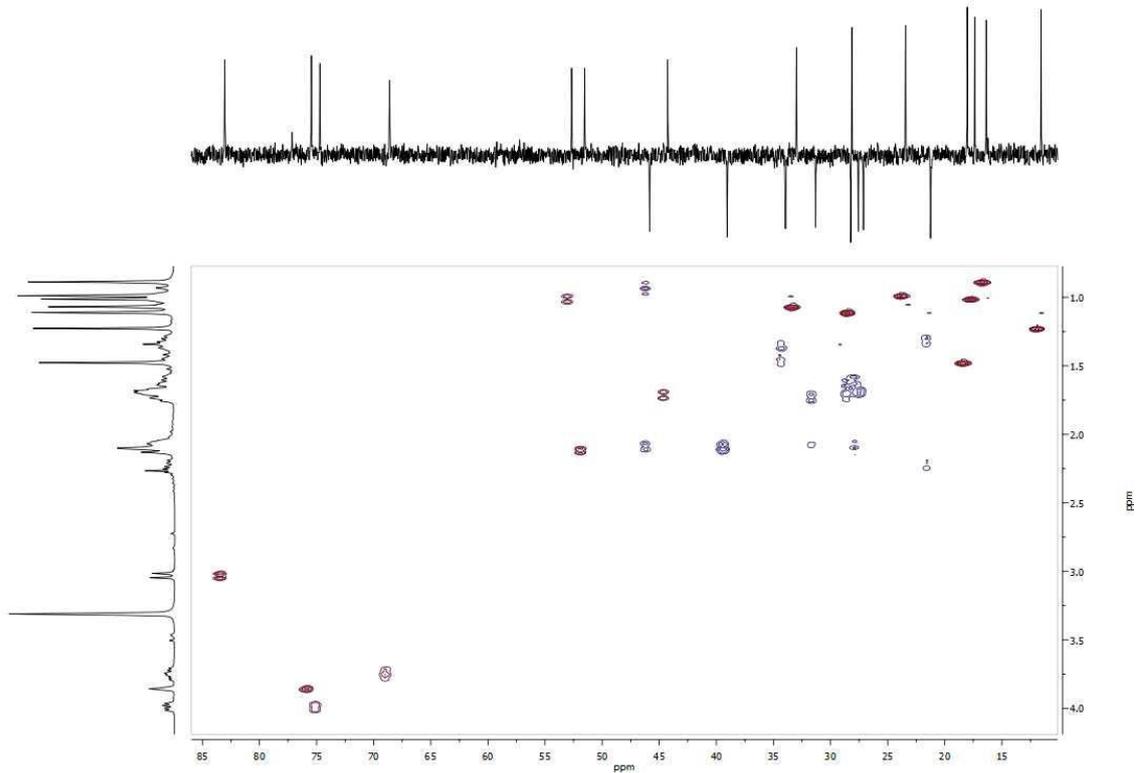




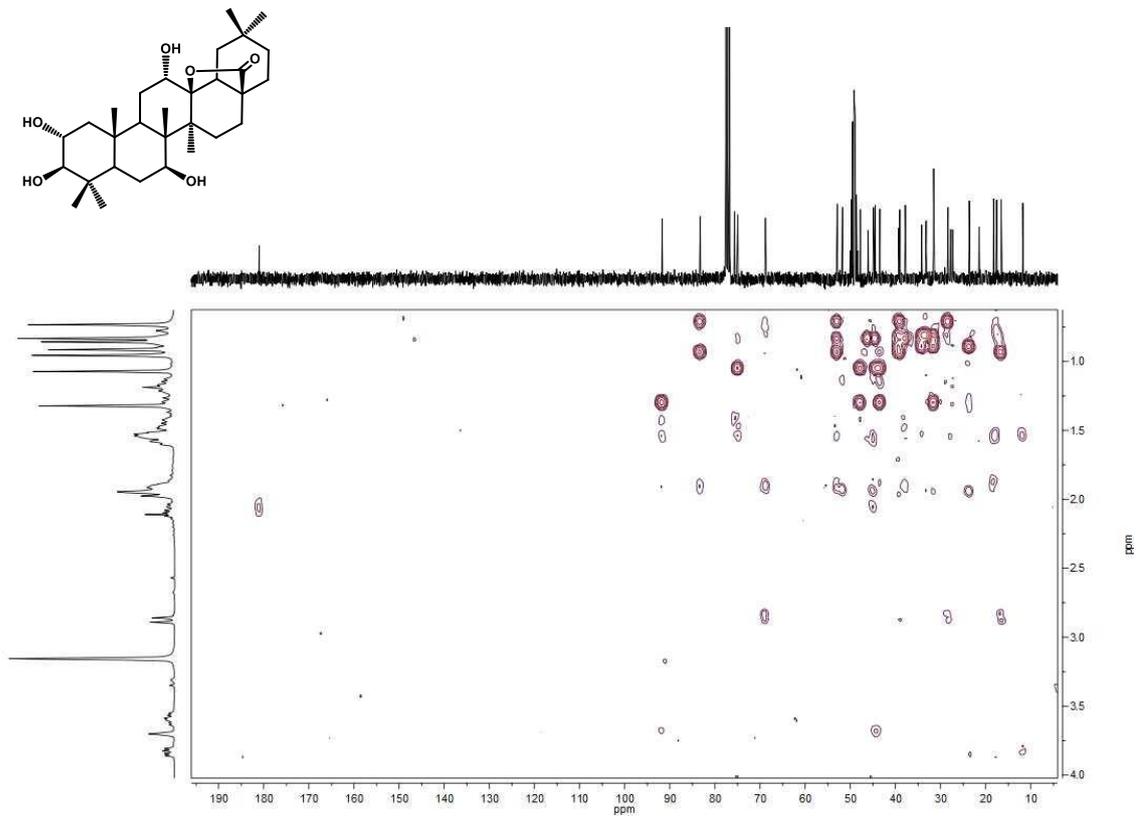
Espectro de ^1H RMN del producto 82



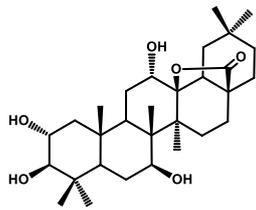
Espectro de ^{13}C RMN del producto 82

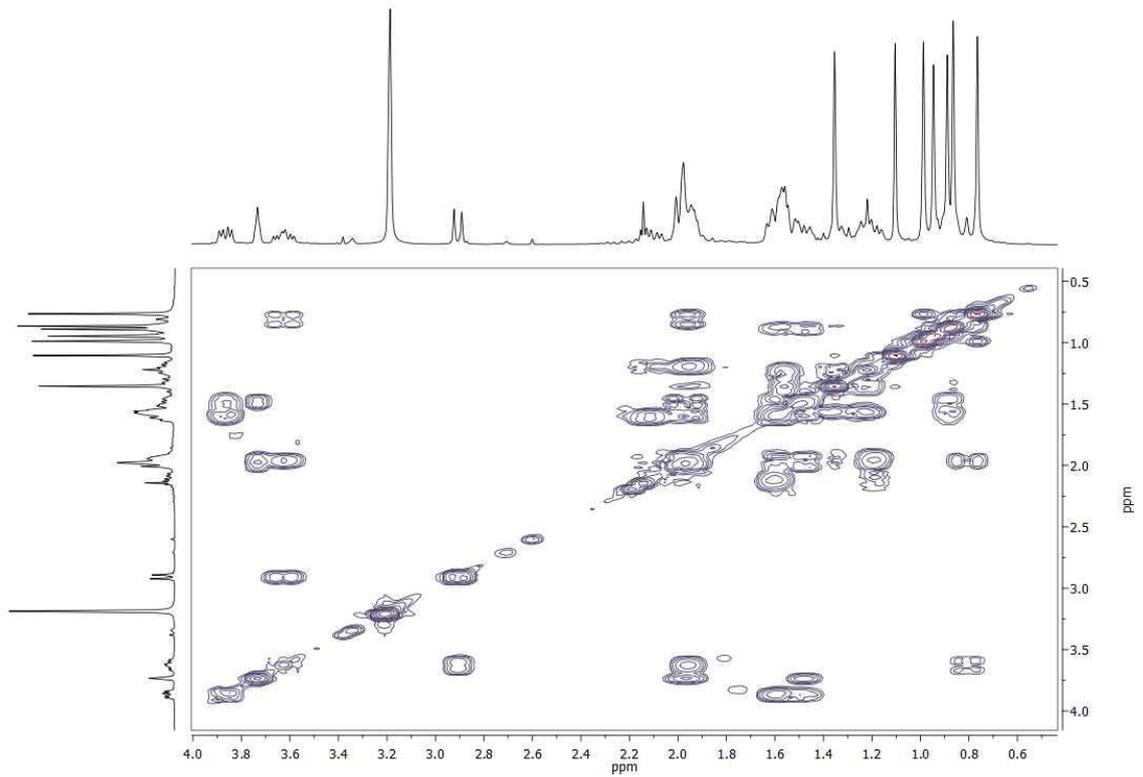


Espectro HSQC del producto 82

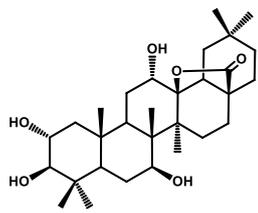


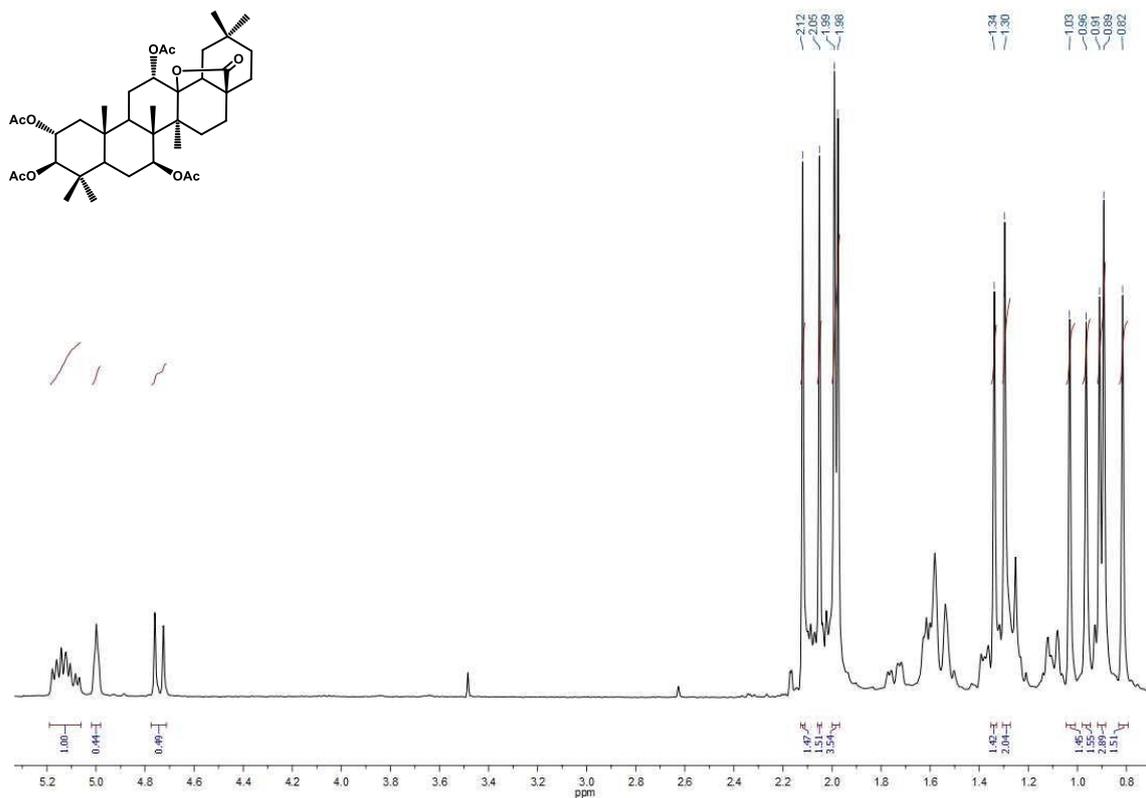
Espectro HMBC del producto 82



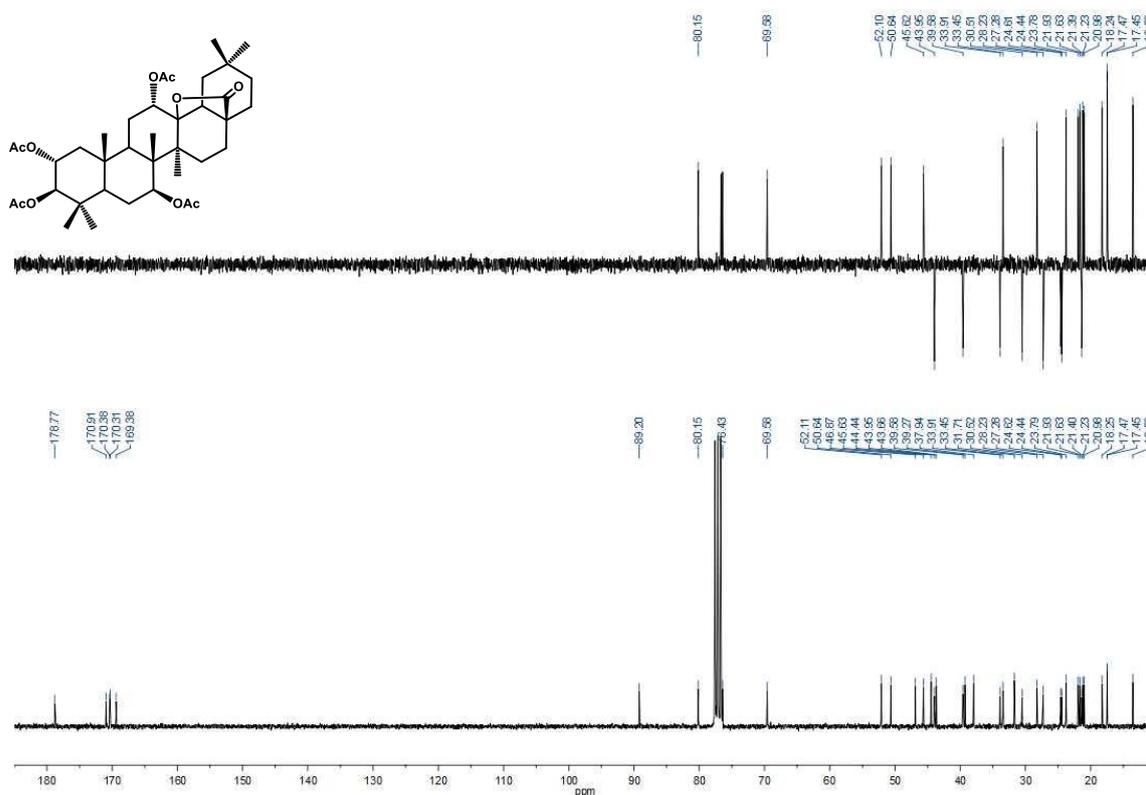


COSY del producto 82

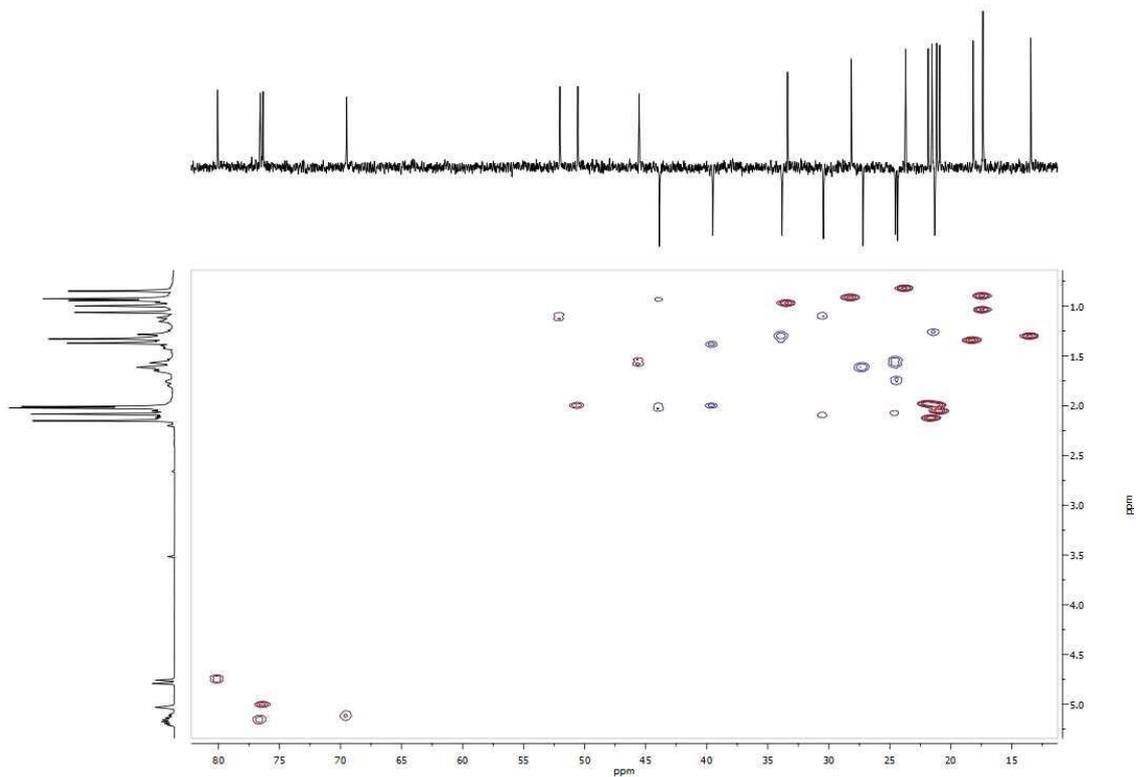




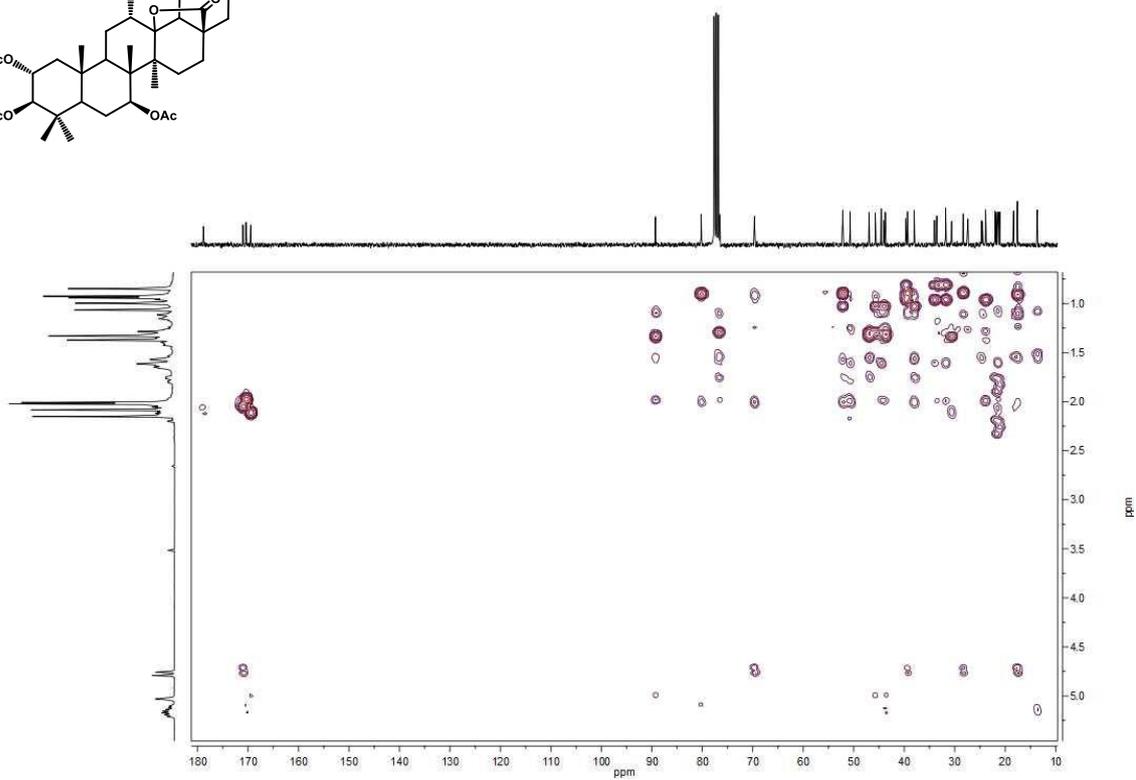
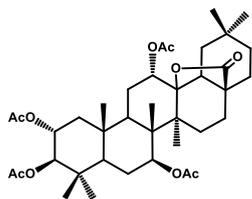
Espectro de ¹H RMN del producto 83



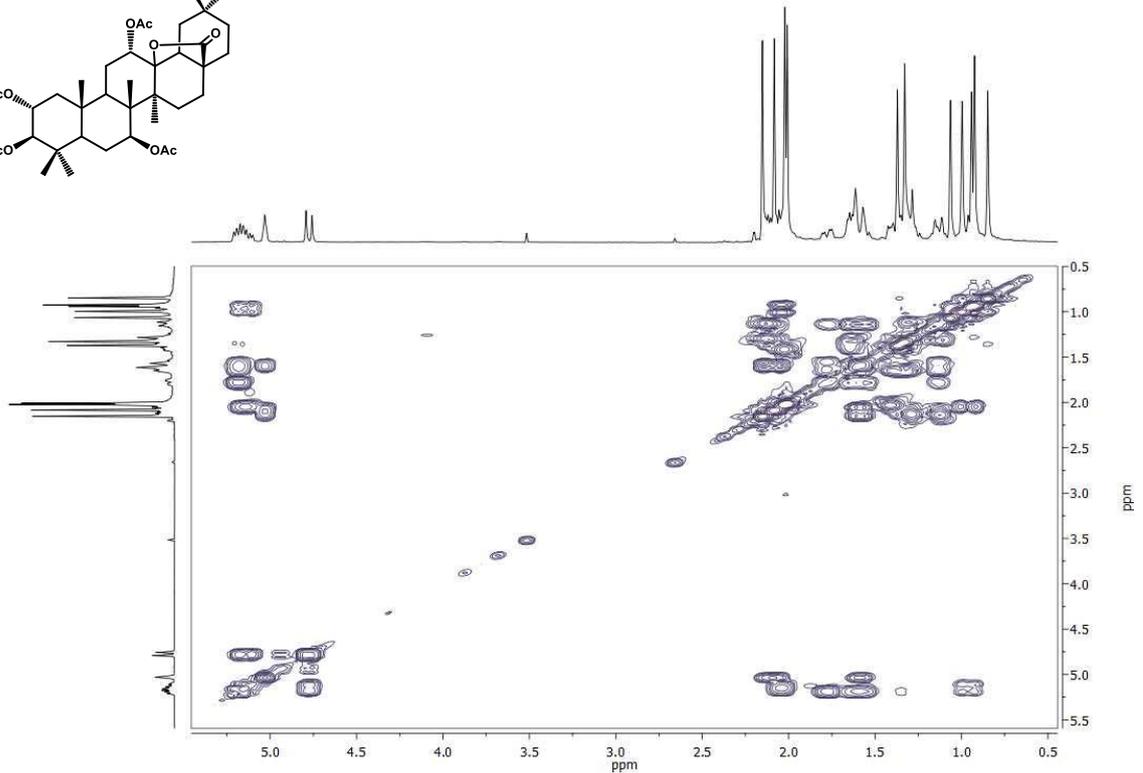
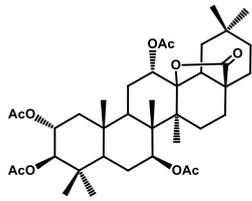
Espectro de ¹³C RMN del producto 83



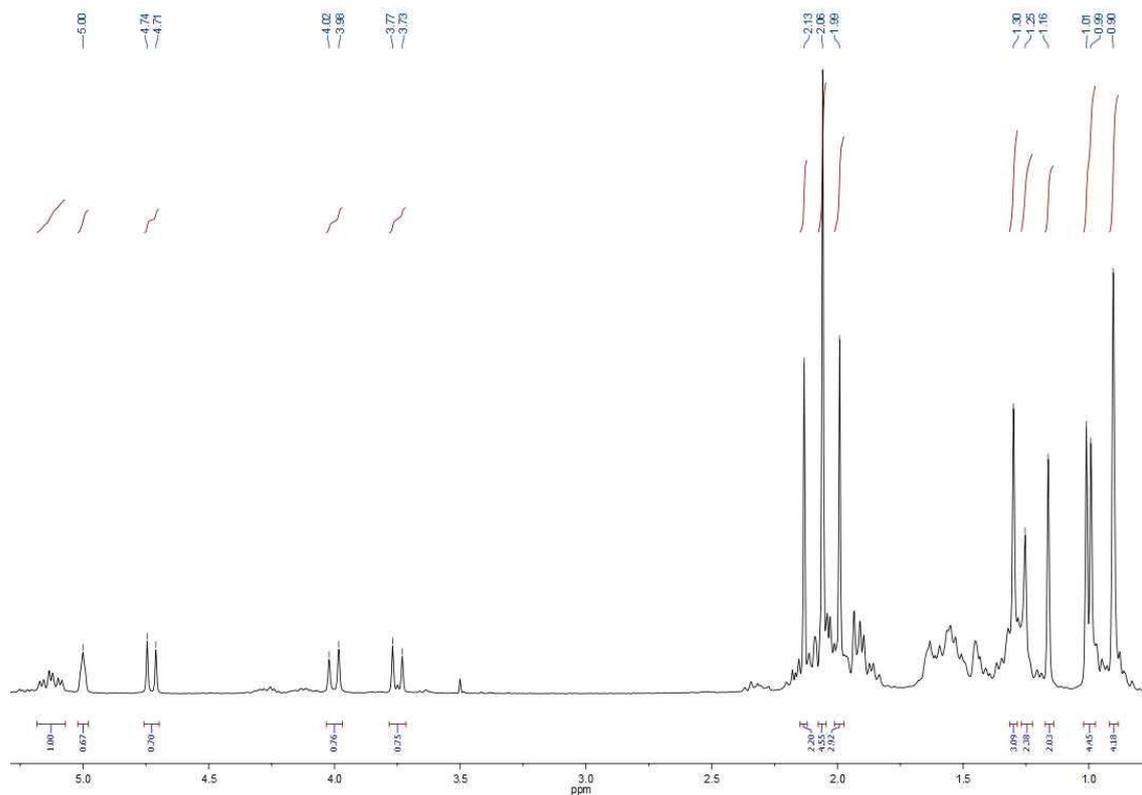
Espectro HSQC del producto 83



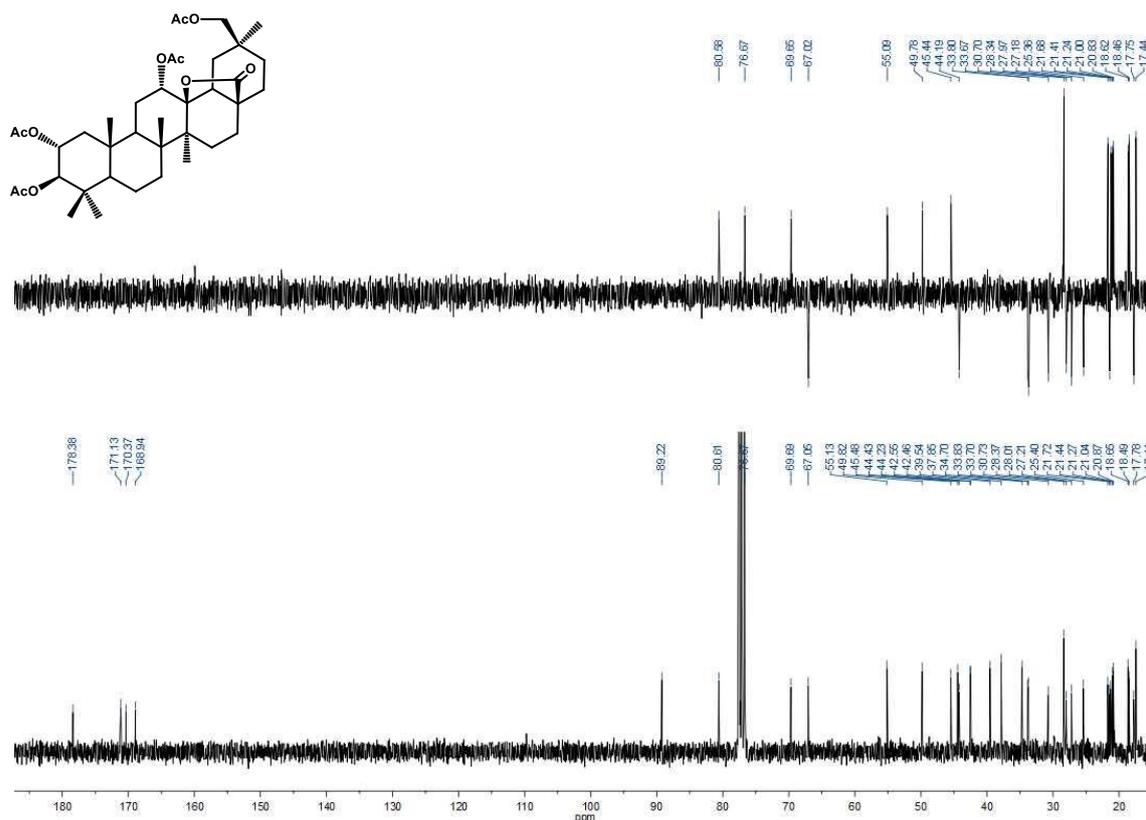
Espectro HMBC del producto 83



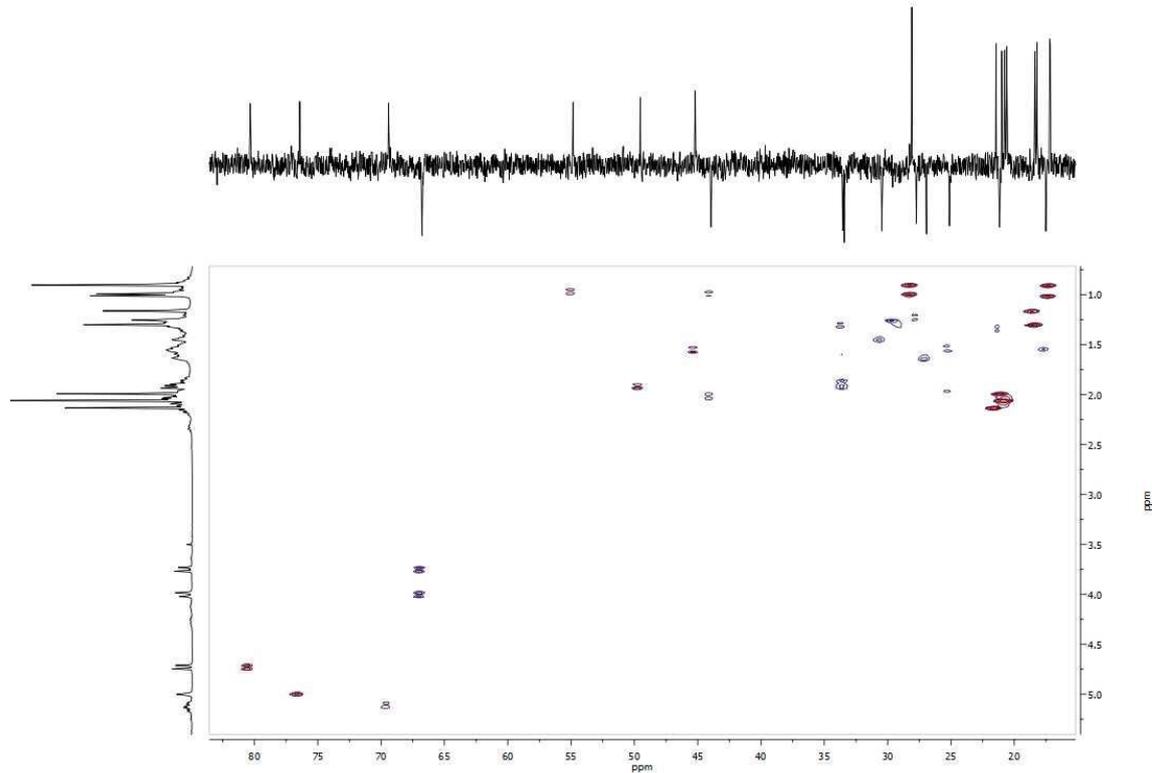
COSY del producto 83



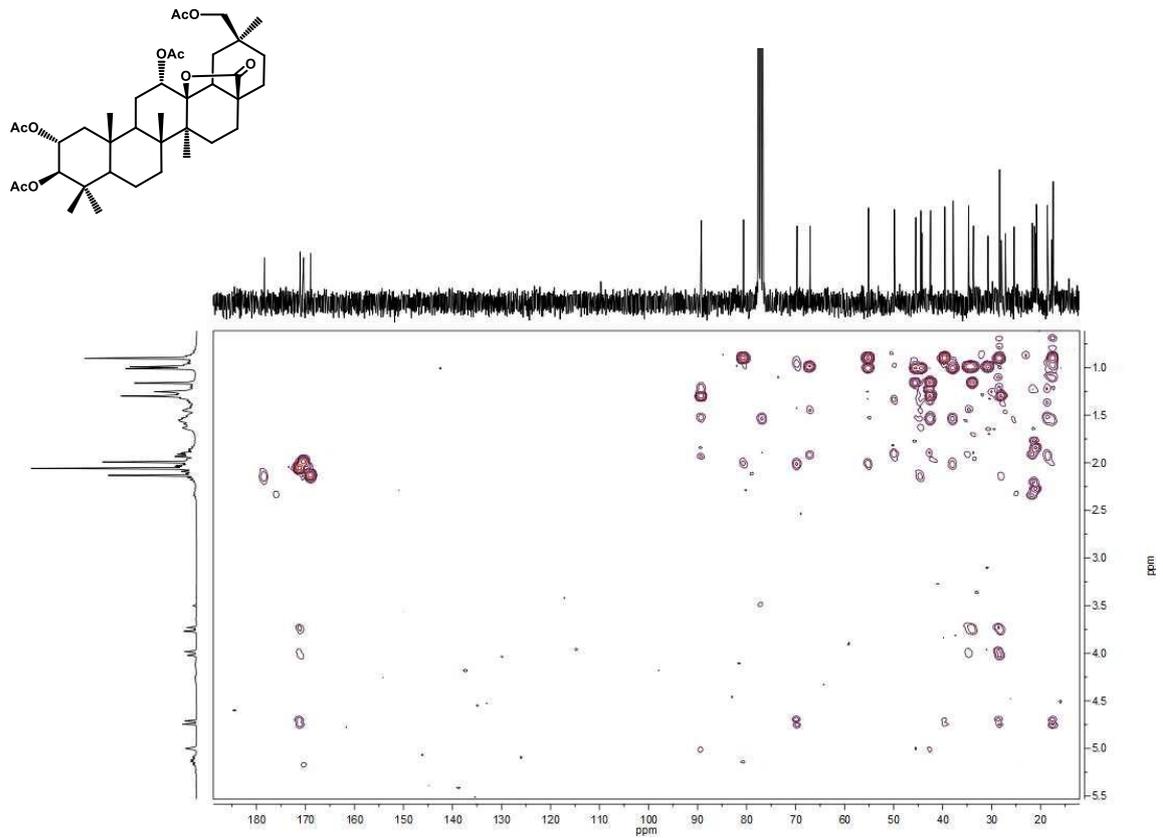
Espectro de ^1H RMN del producto 84



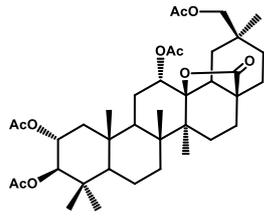
Espectro de ^{13}C RMN del producto 84

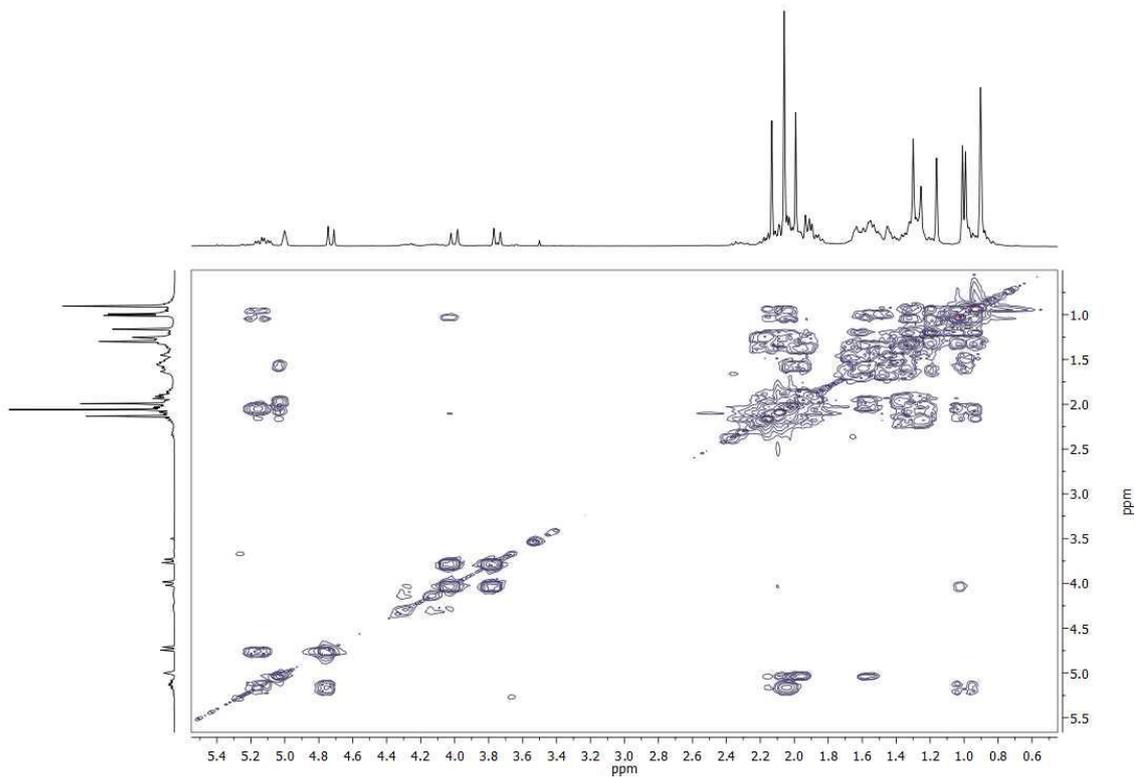


Espectro HSQC del producto 84

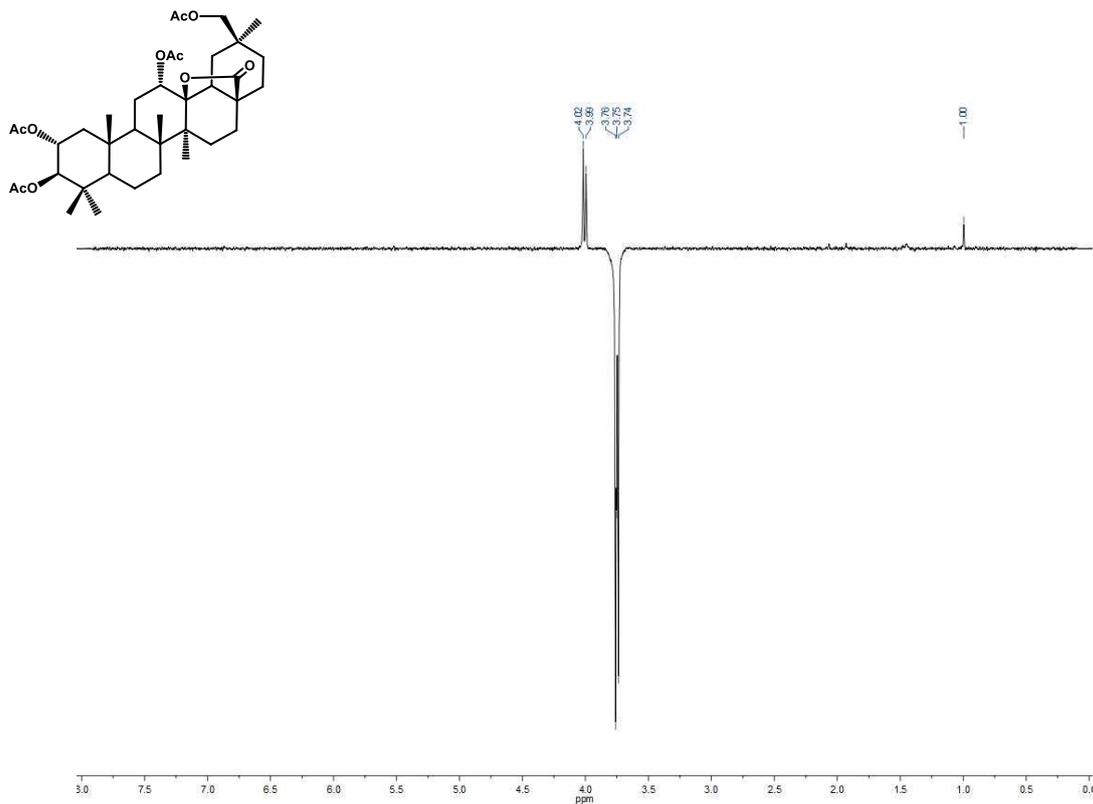


Espectro HMBC del producto 84

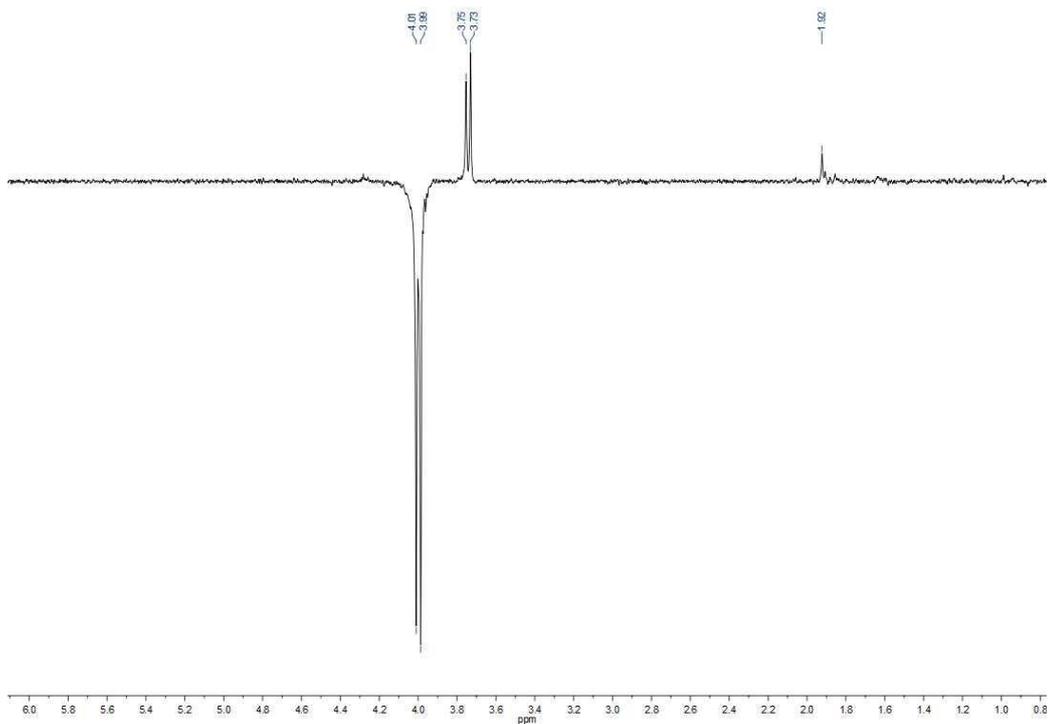




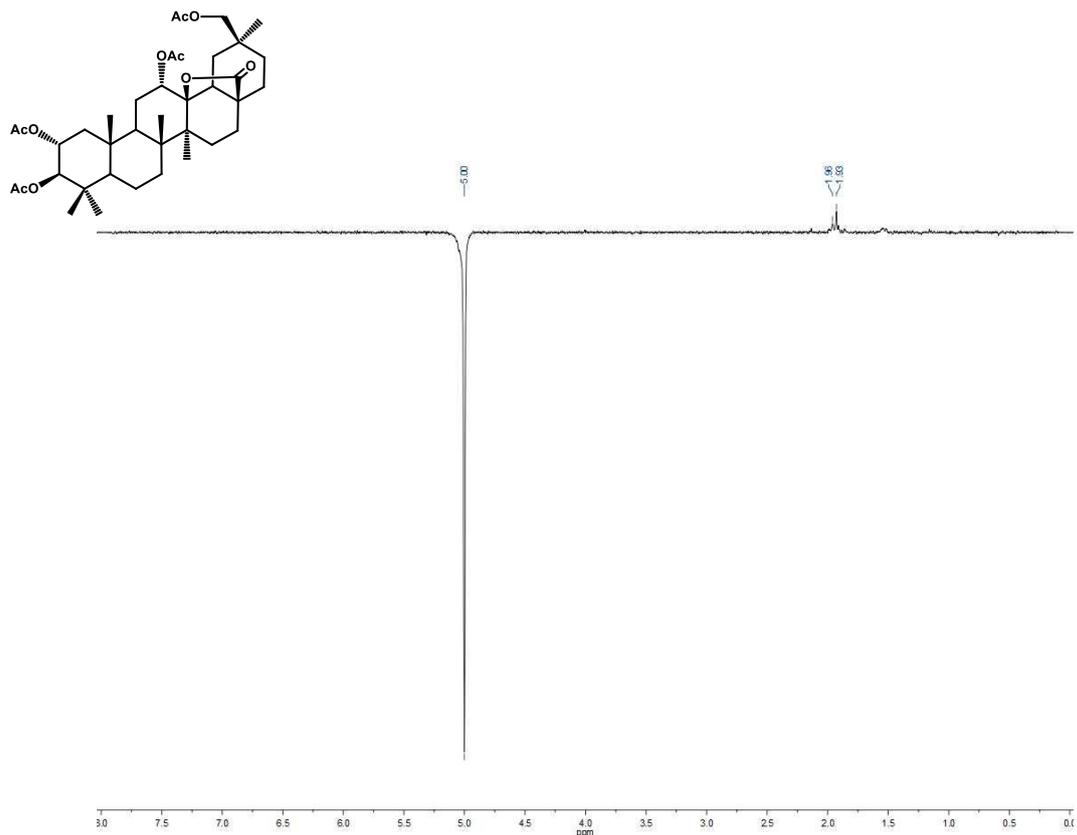
COSY del producto 84



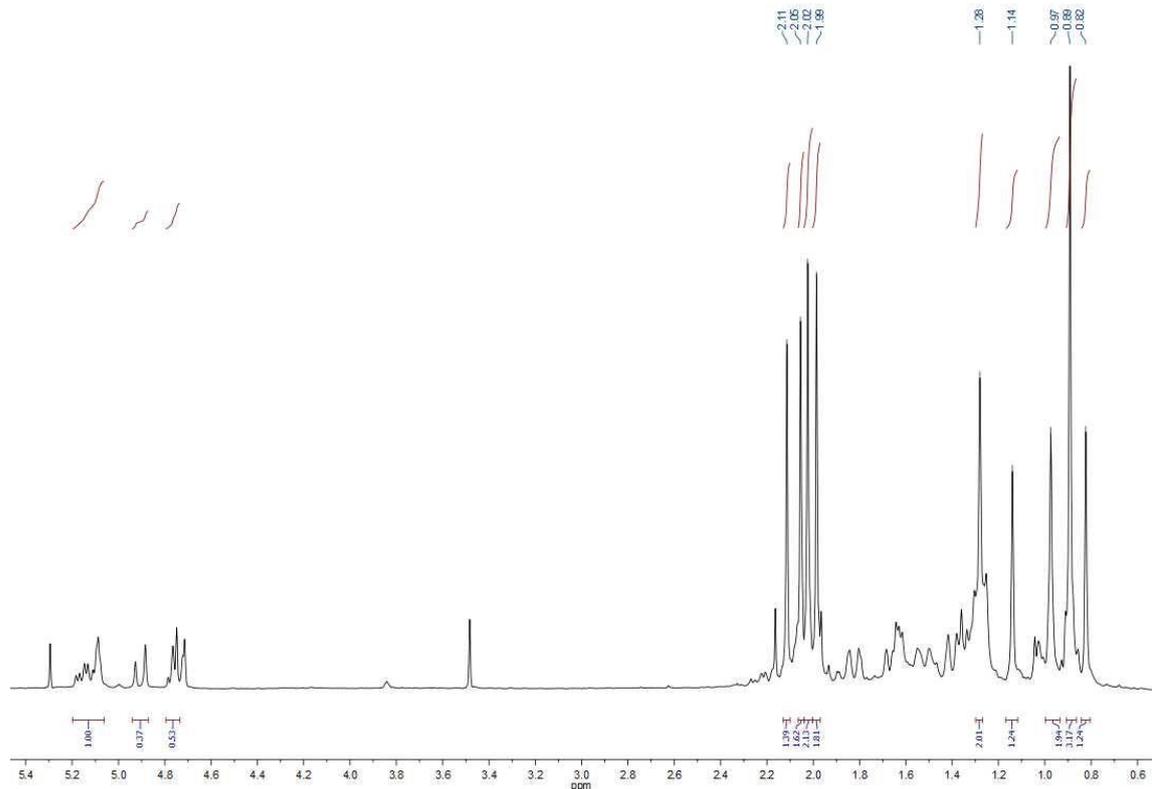
1d-NOESY de producto 84 a 3.76 ppm



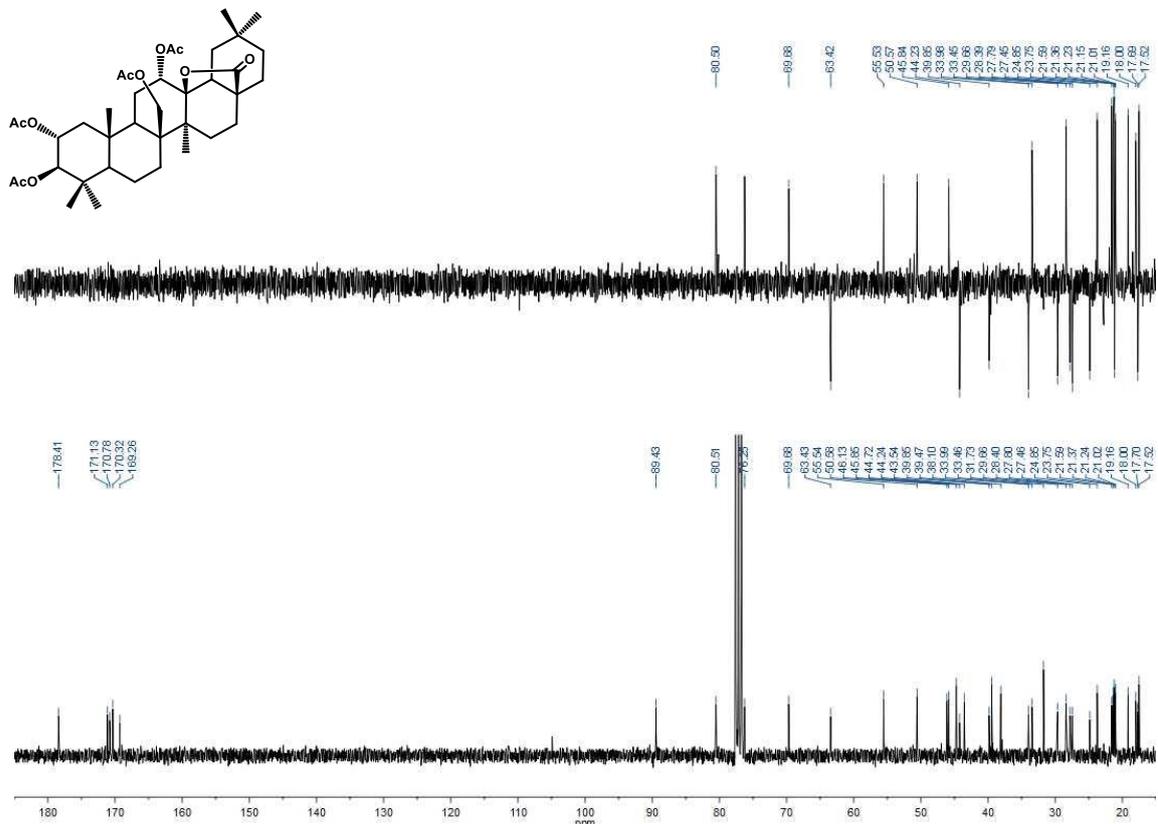
1d-NOESY del producto 84 a 4.01 ppm



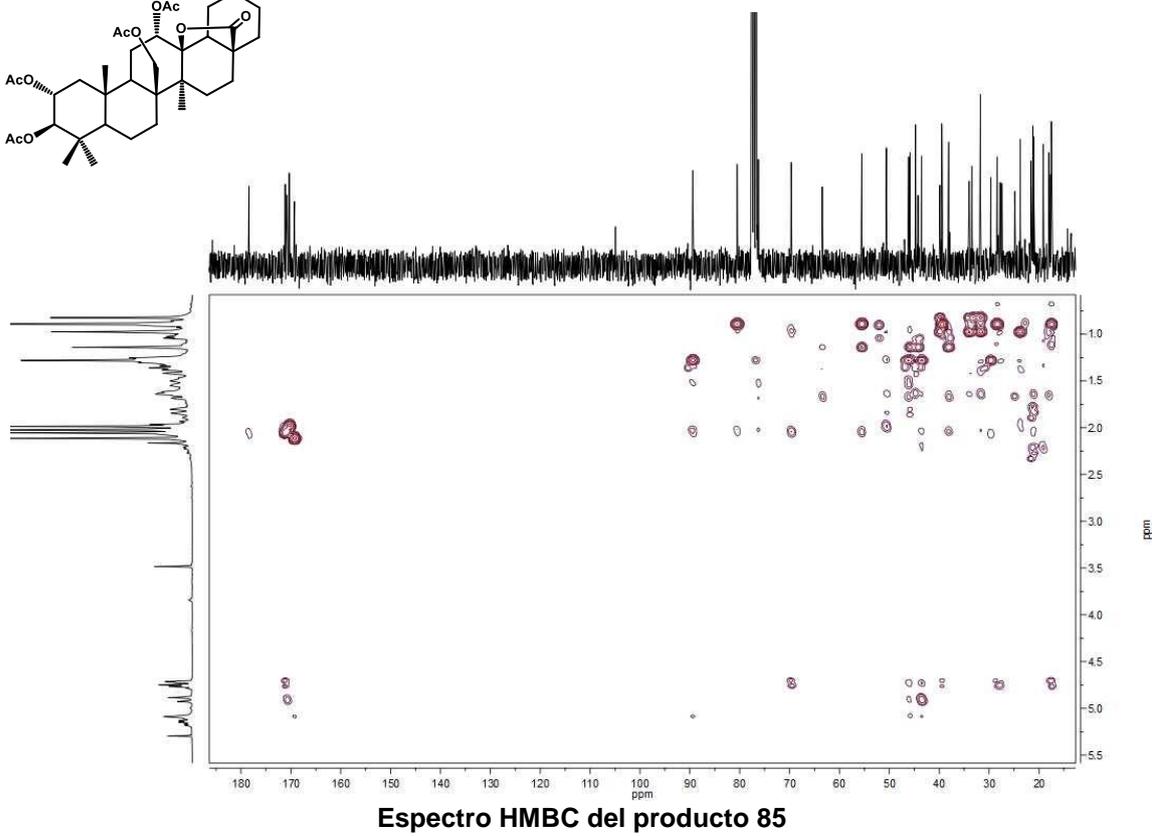
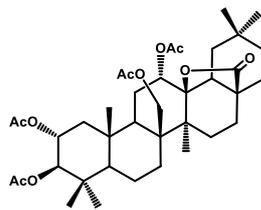
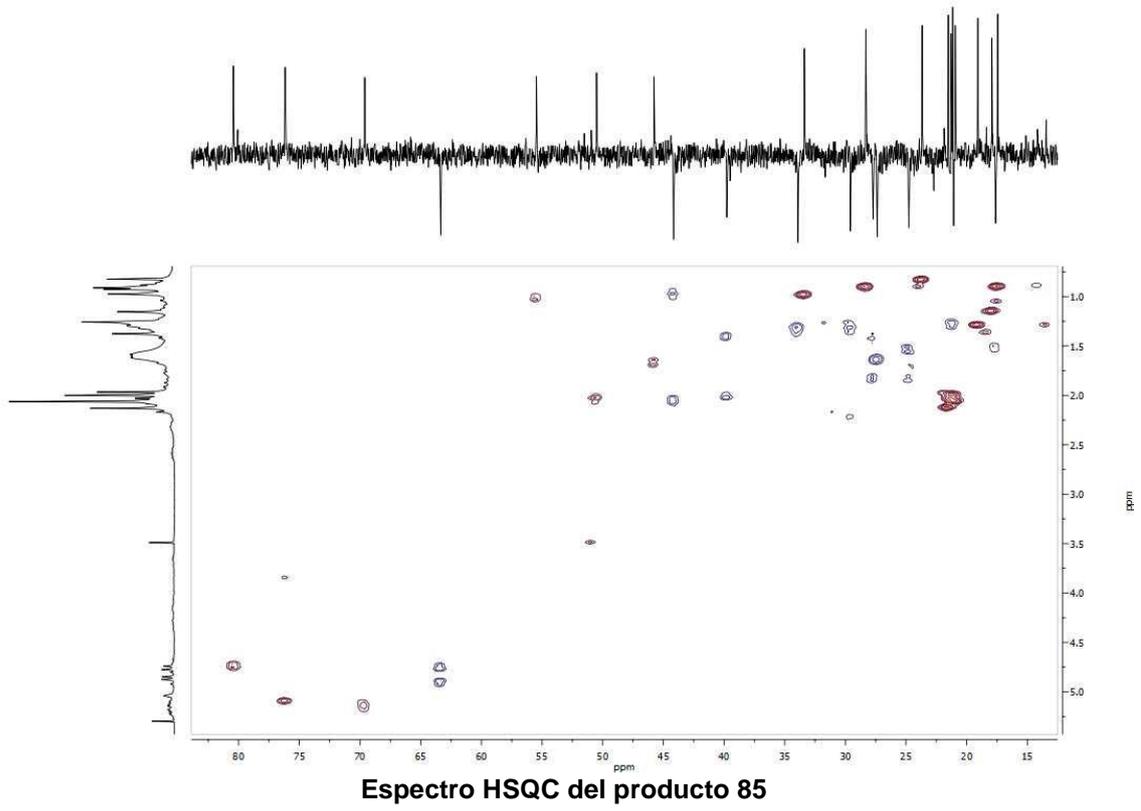
1d-NOESY del producto 84 a 5.00 ppm

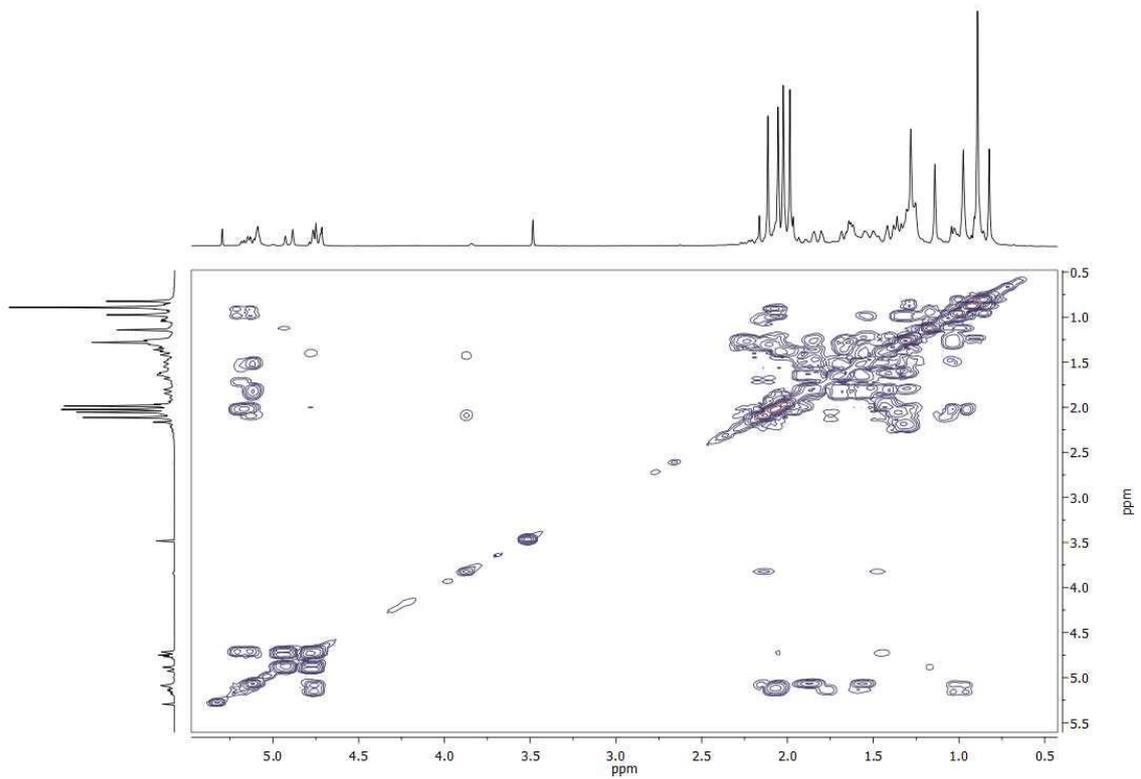


Espectro de ^1H RMN del producto 85

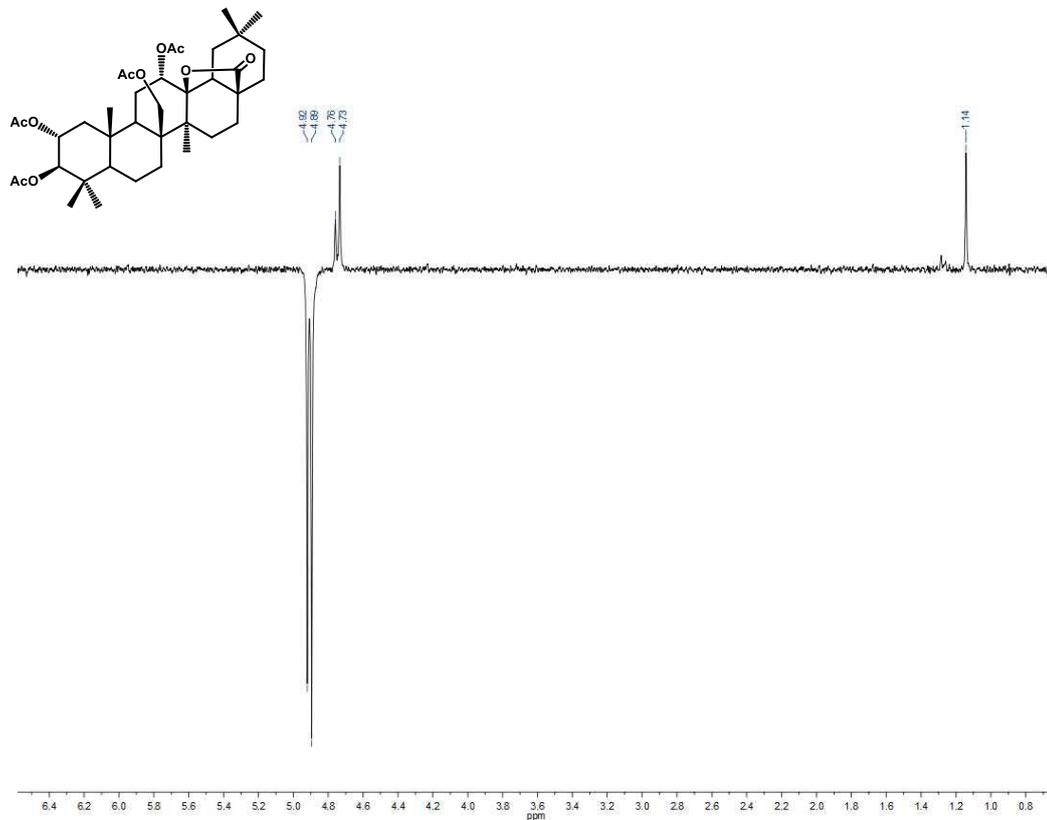


Espectro de ^{13}C RMN del producto 85

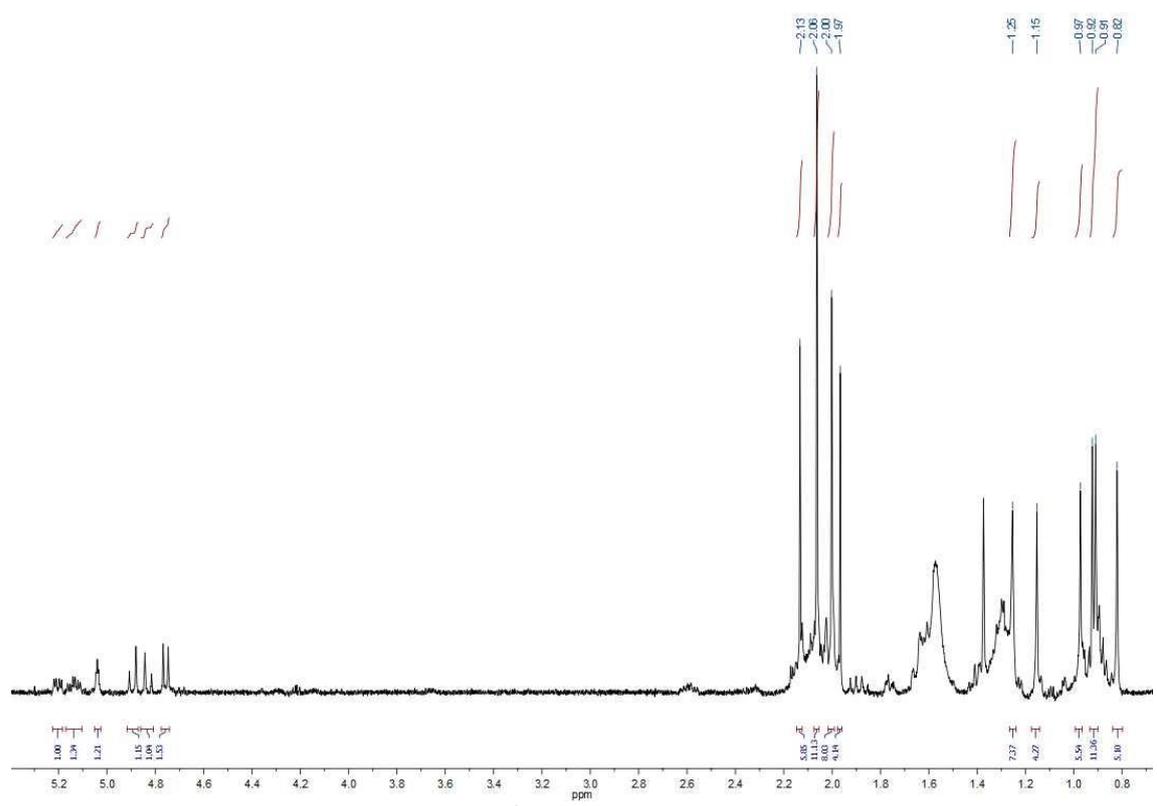




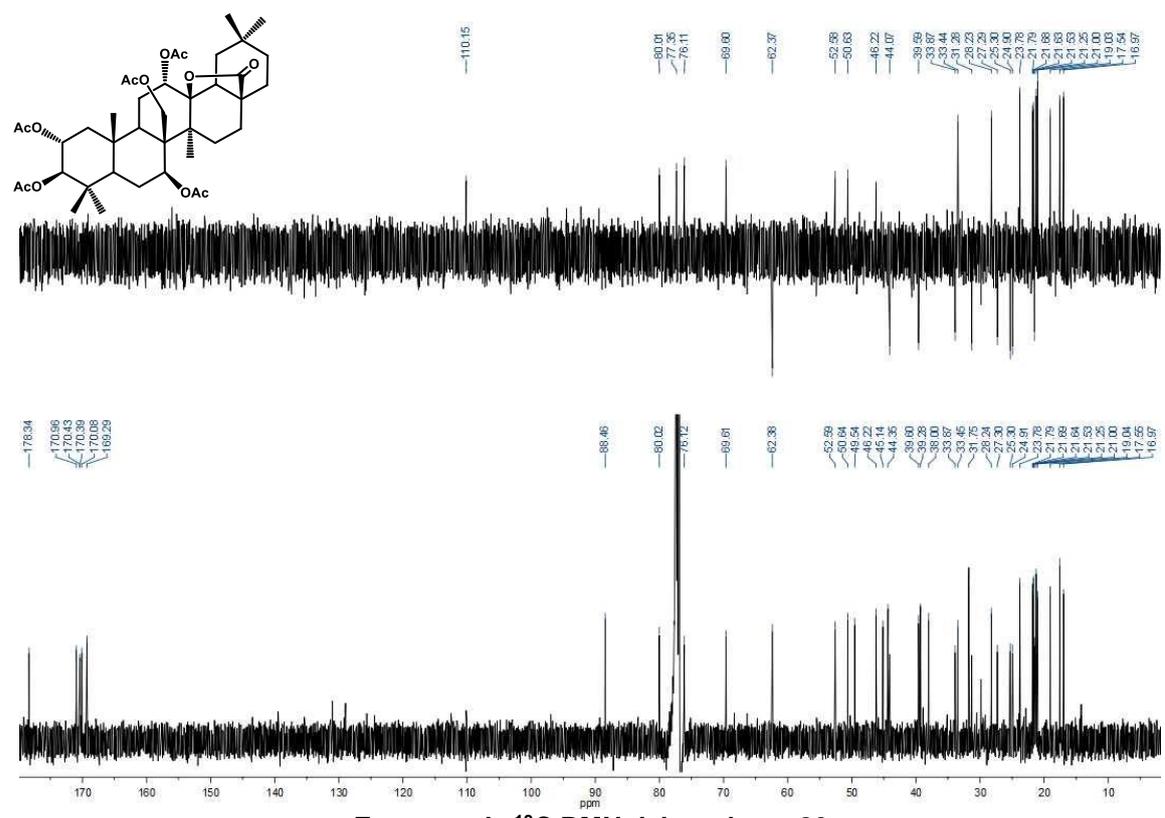
COSY del producto 85



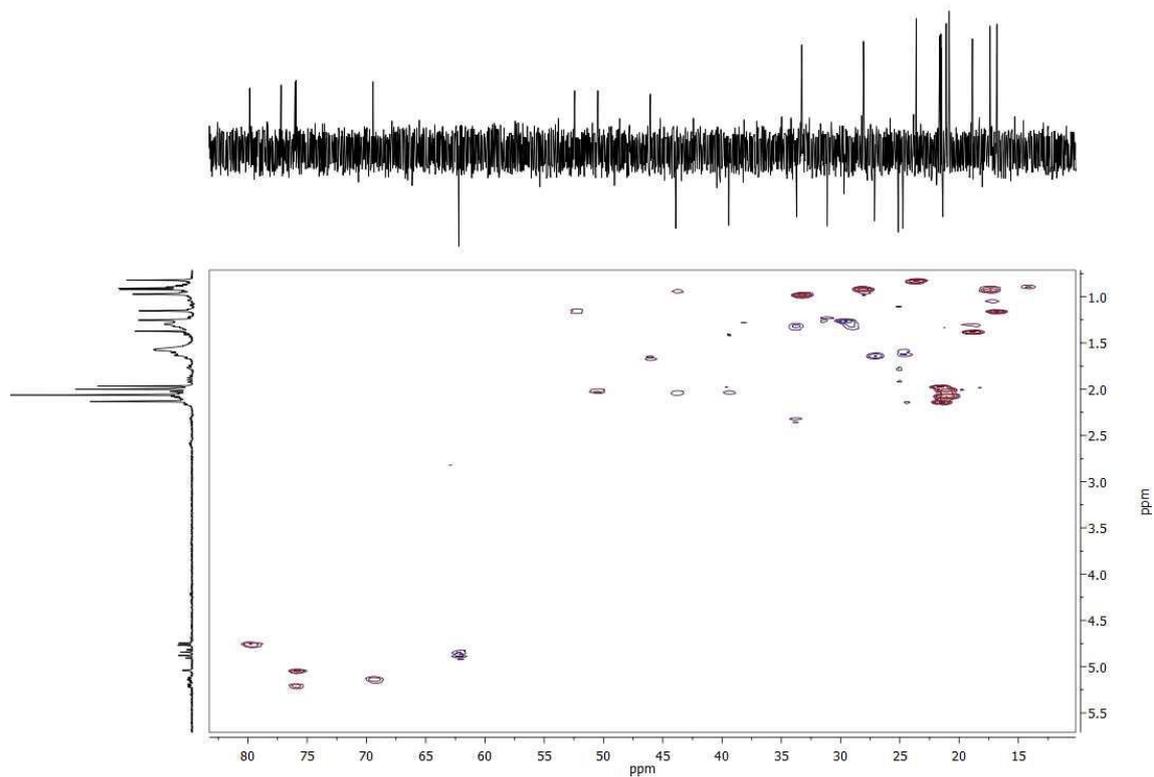
1d-NOESY del producto 85 a 4.92 ppm



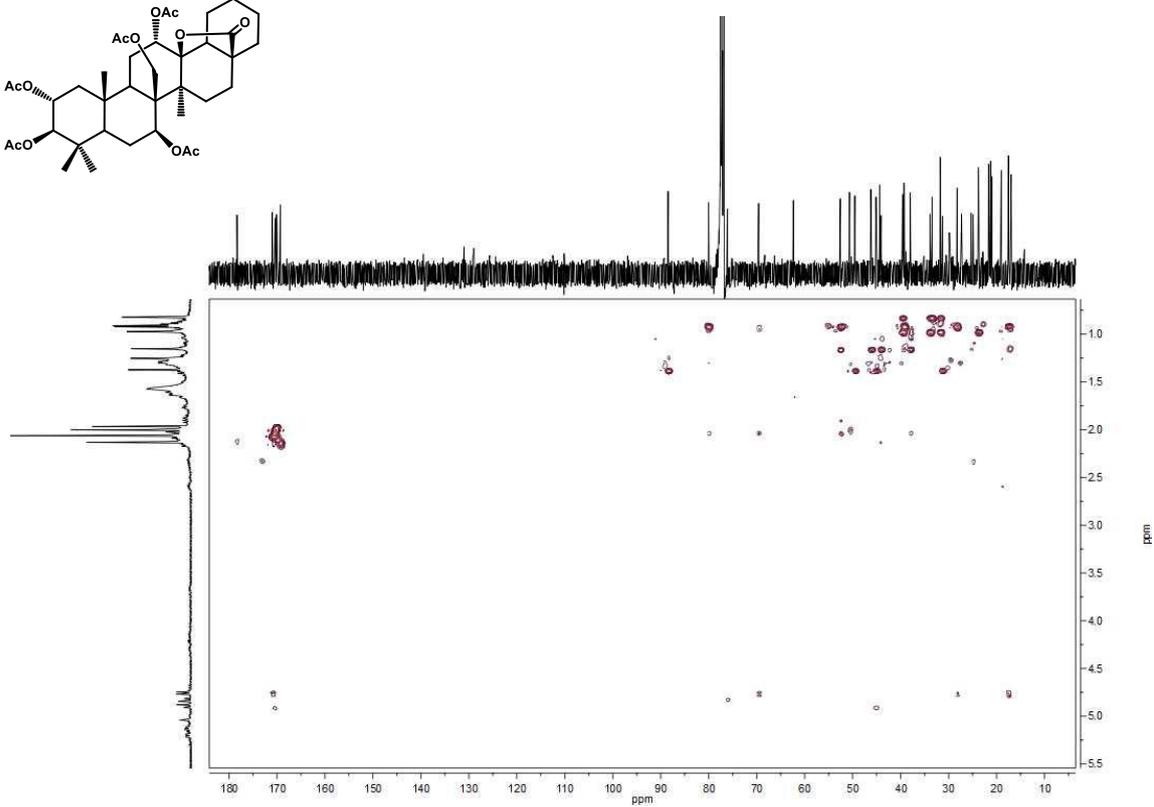
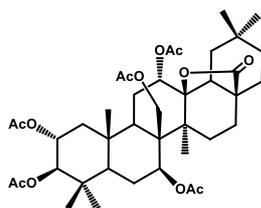
Espectro de ¹H RMN del producto 86



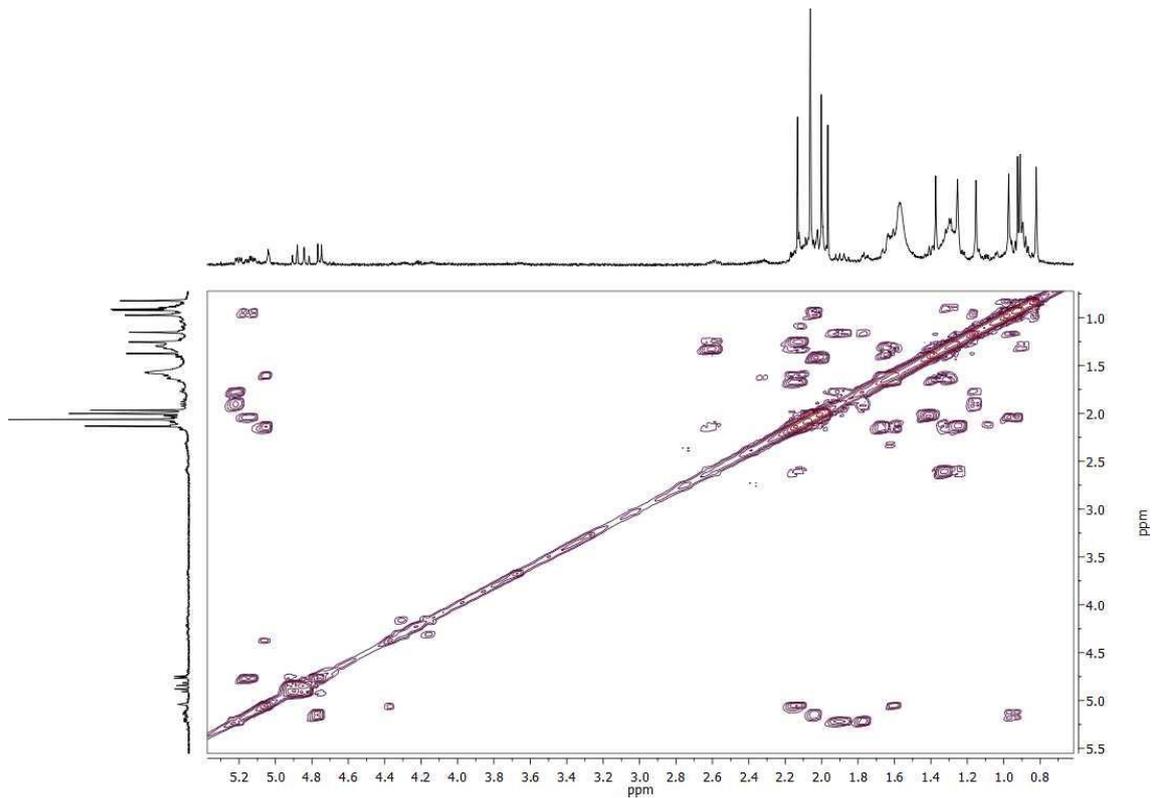
Espectro de ¹³C RMN del producto 86



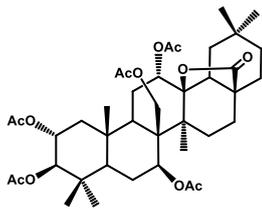
Espectro HSQC del producto 86

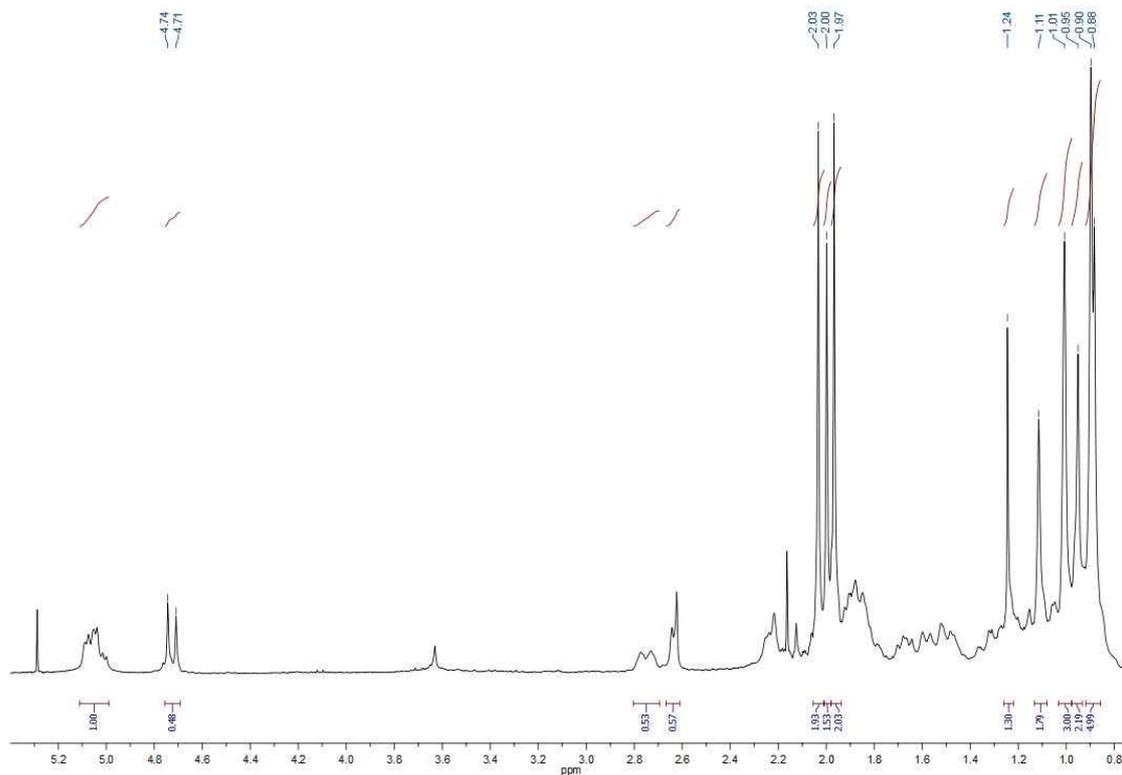


Espectro HMBC del producto 86

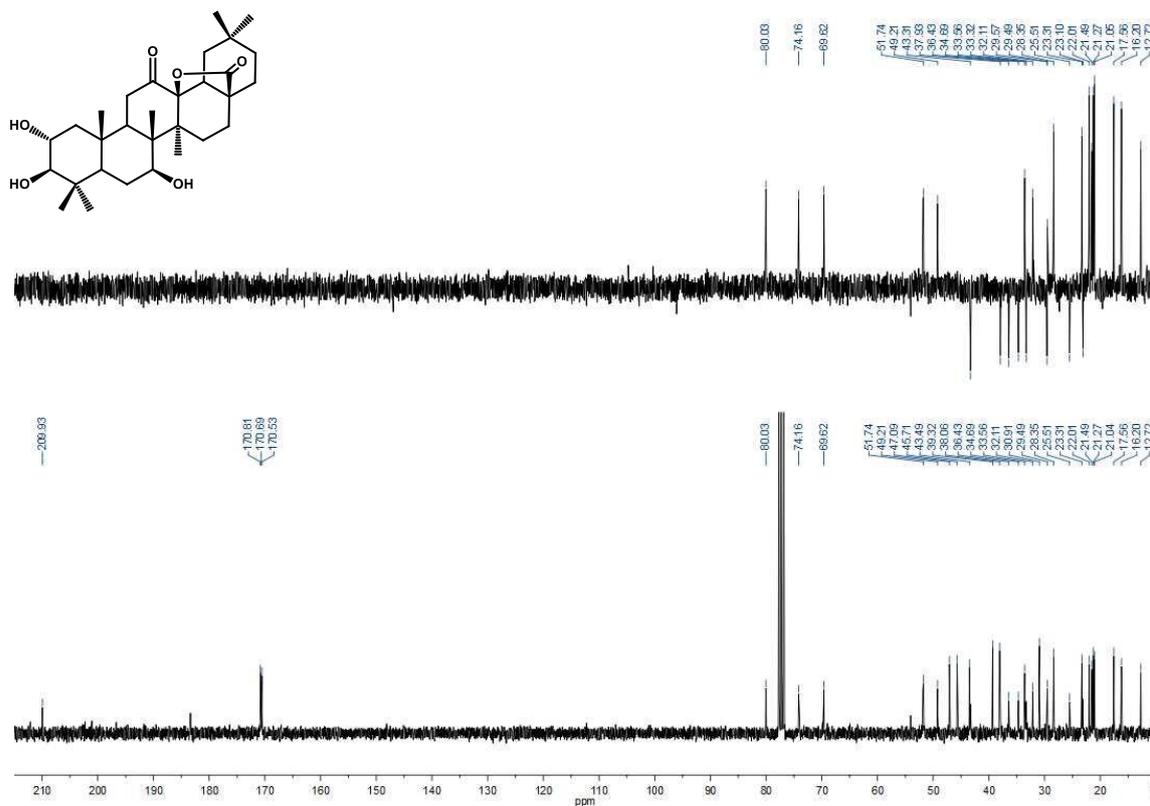


COSY del producto 86

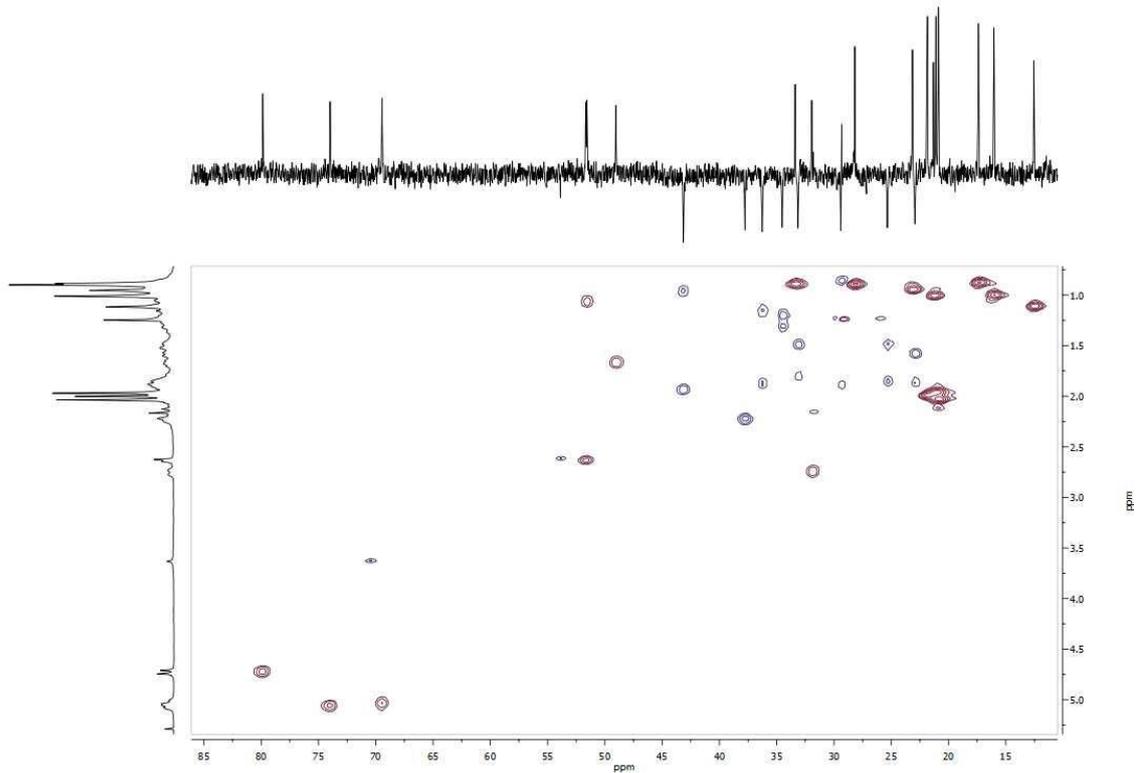




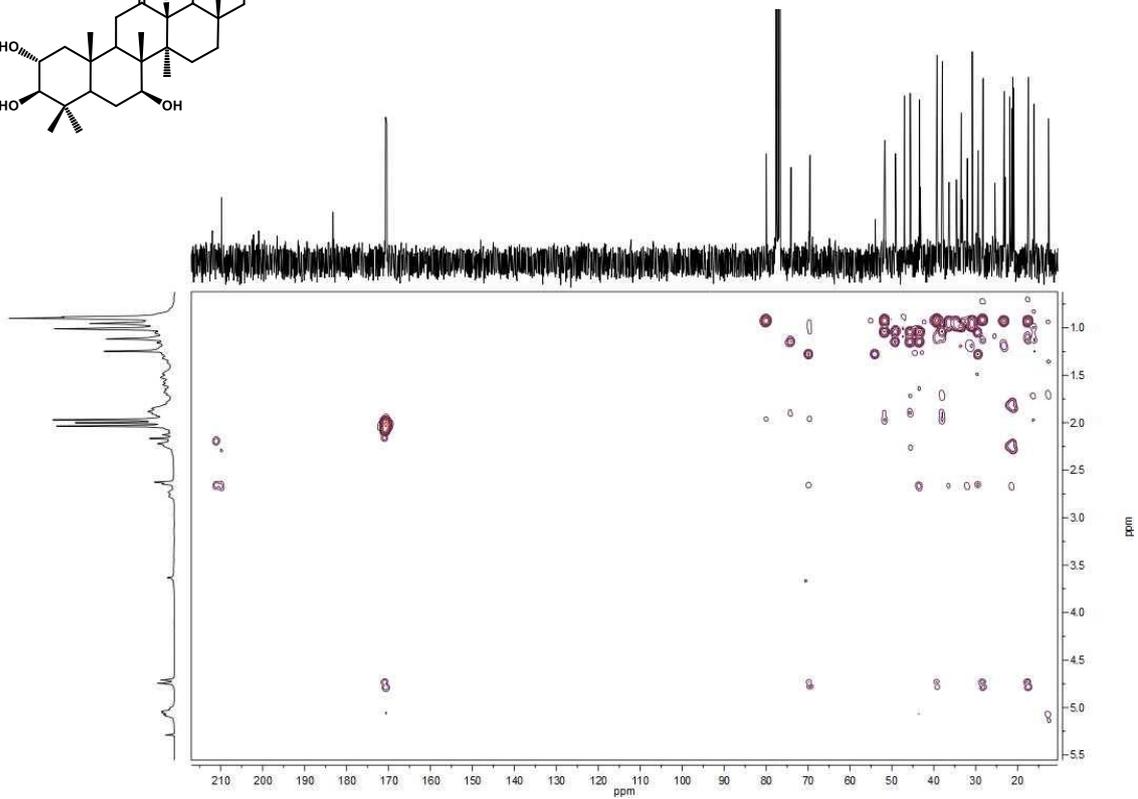
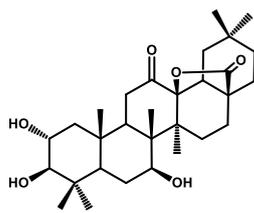
Espectro de ^1H RMN del producto 87



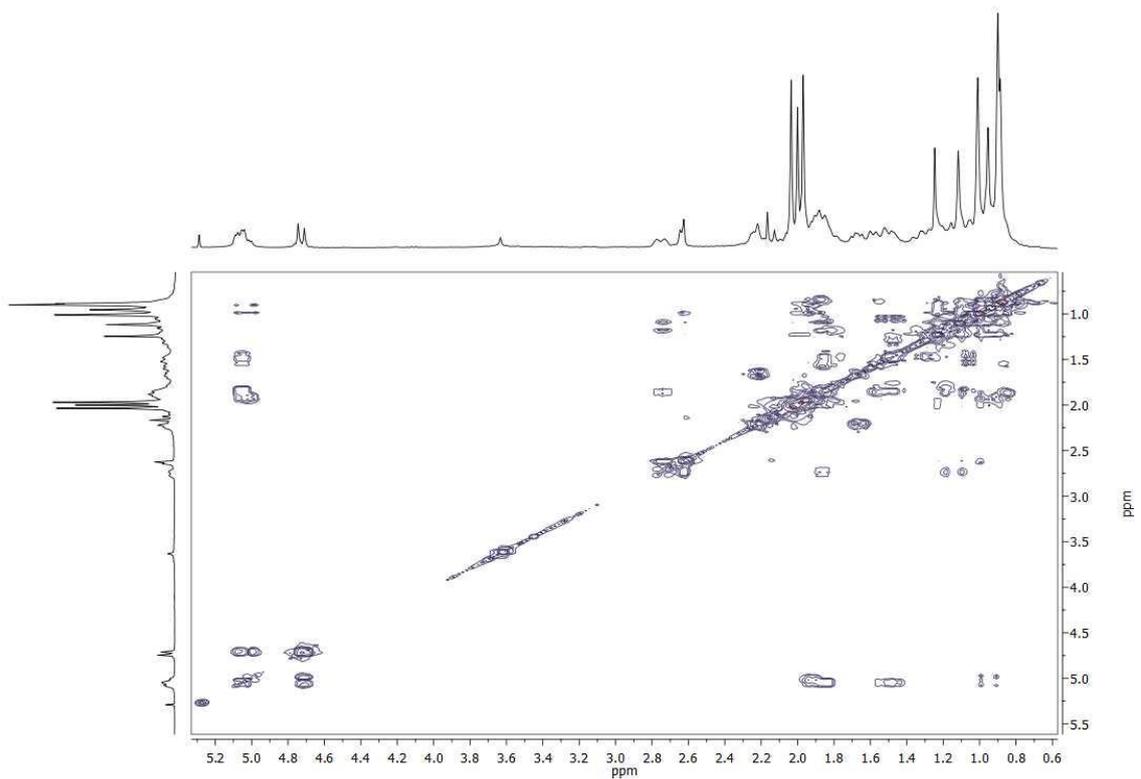
Espectro de ^{13}C RMN del producto 87



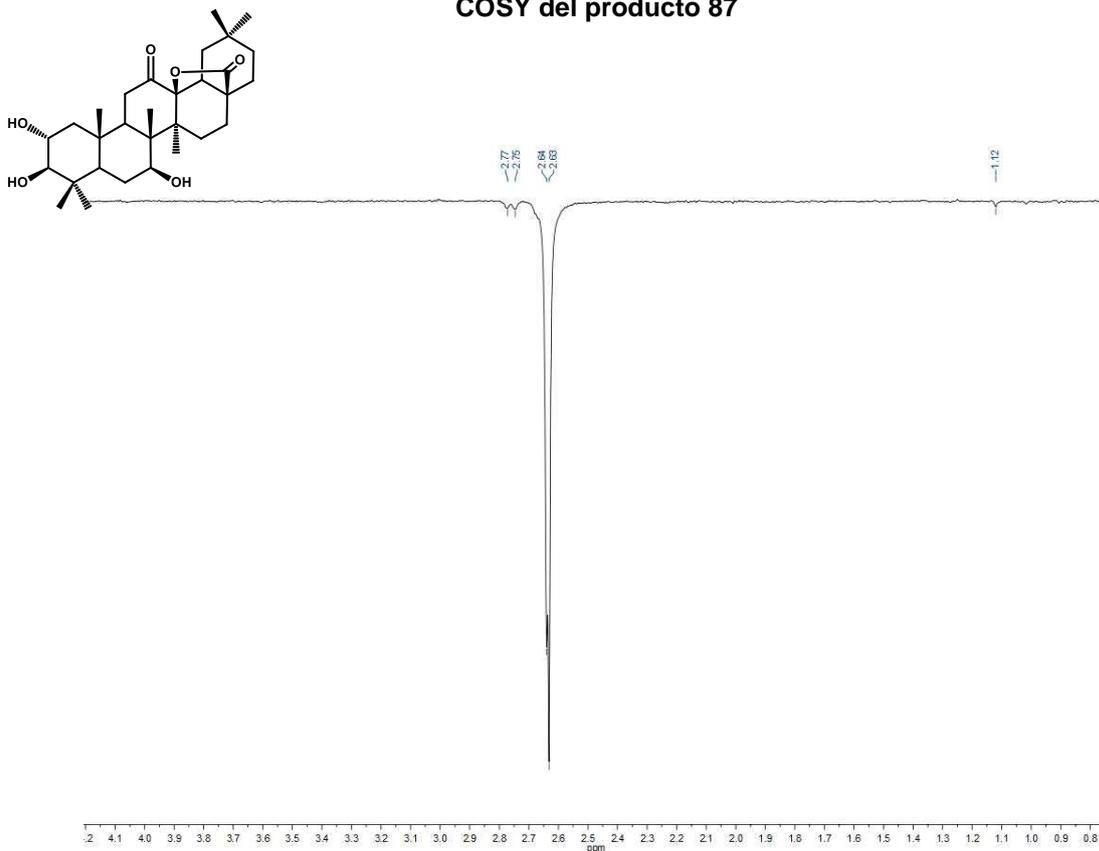
Espectro HSQC del producto 87



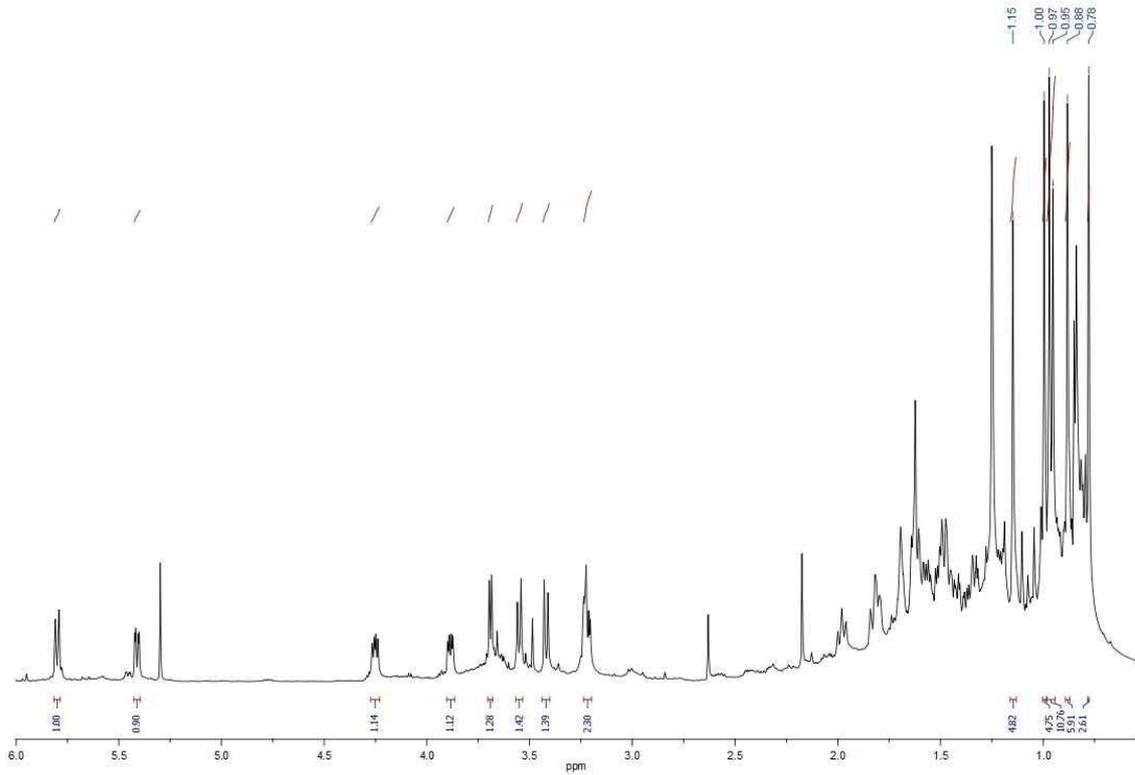
Espectro HMBC del producto 87



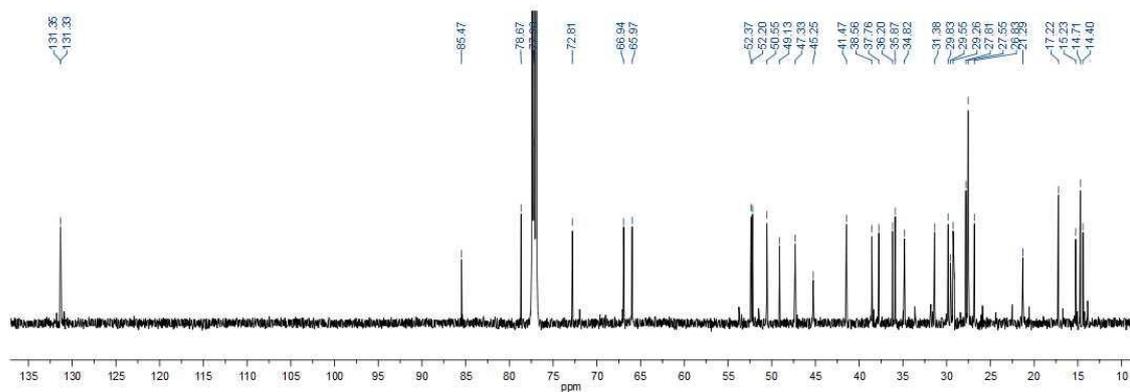
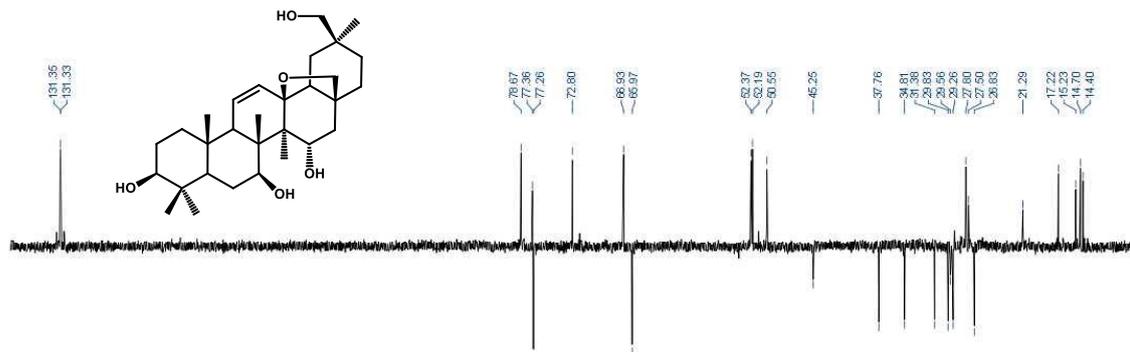
COSY del producto 87



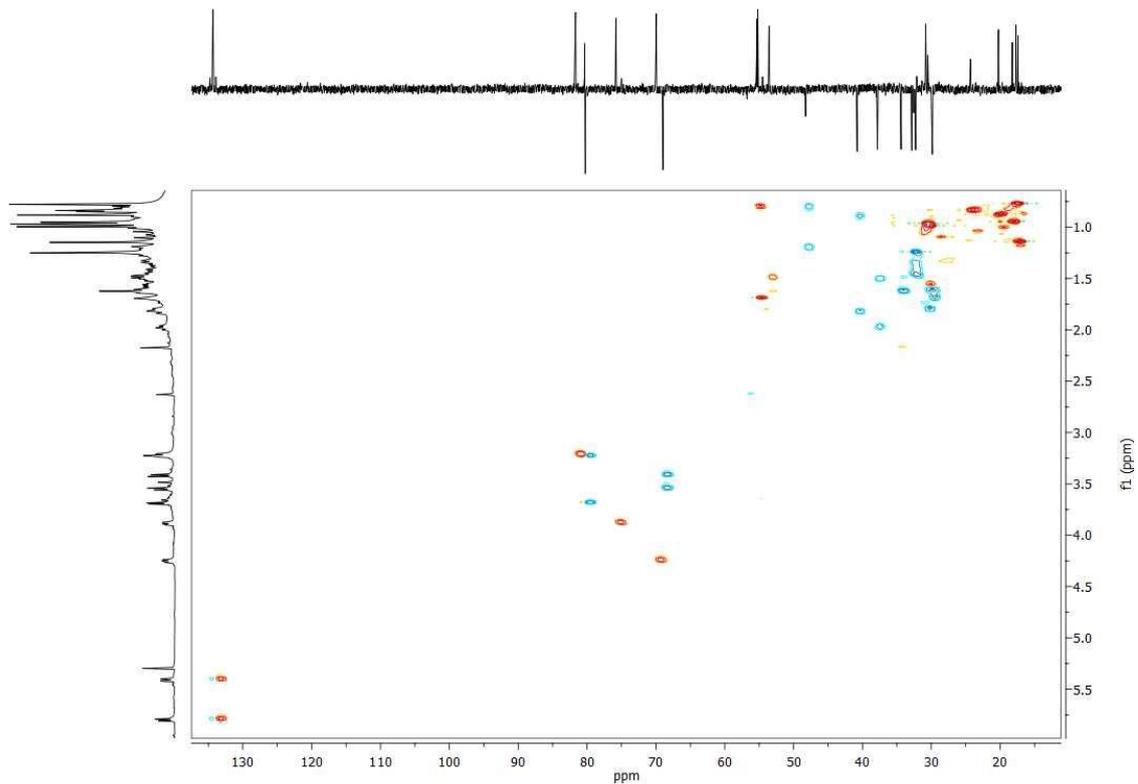
1d-NOESY del producto 87 a 2.64 ppm



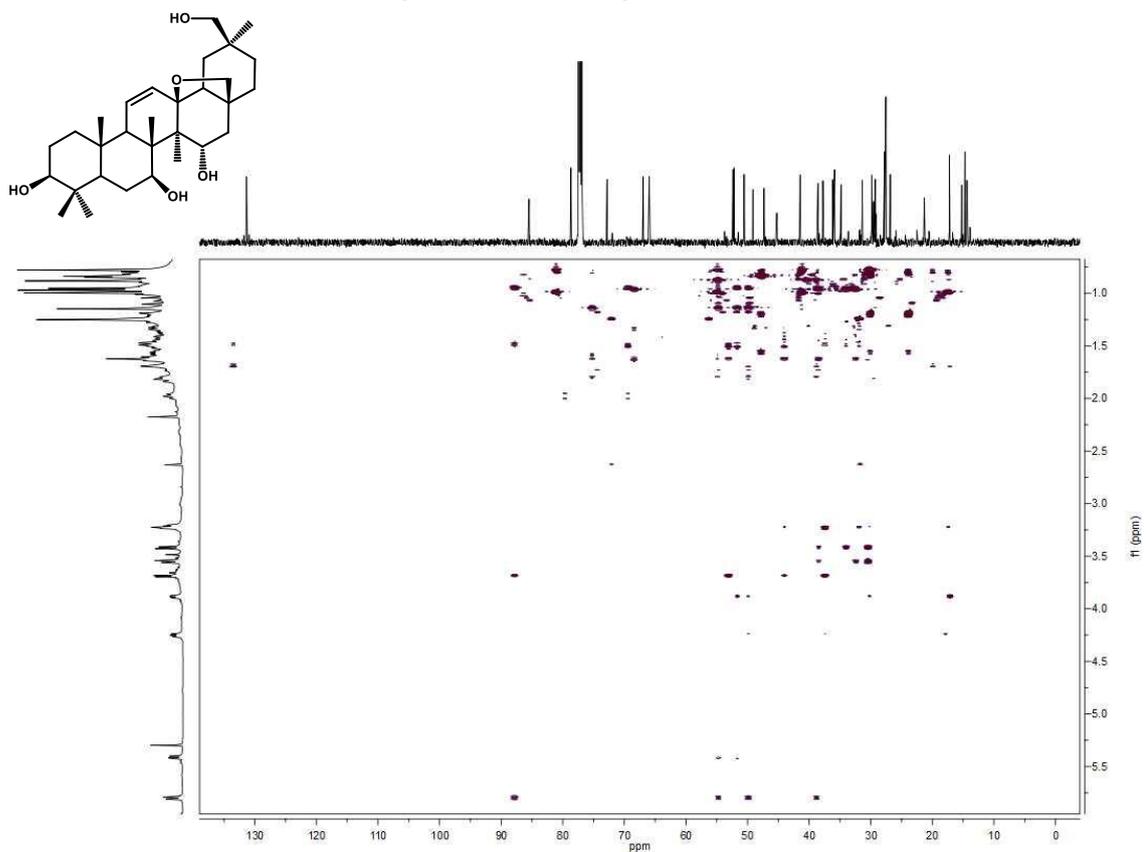
Espectro de ^1H RMN del producto 88



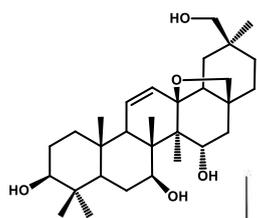
Espectro de ^{13}C RMN del producto 88

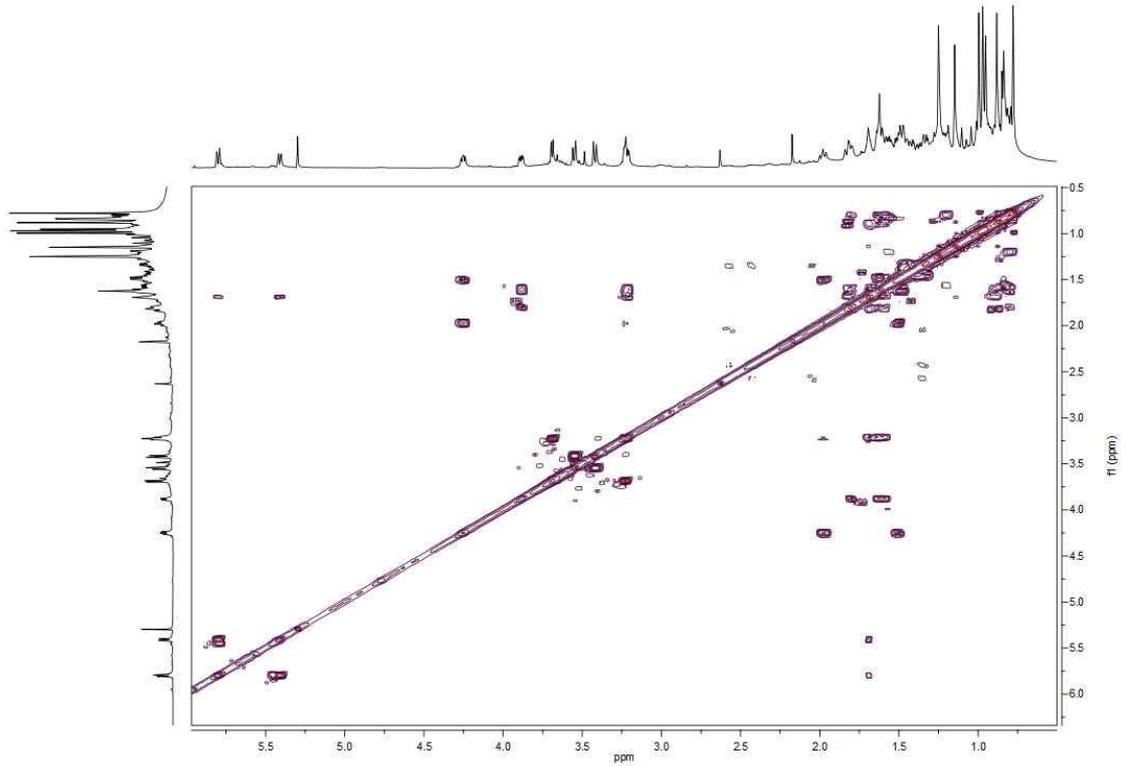


Espectro HSQC del producto 88

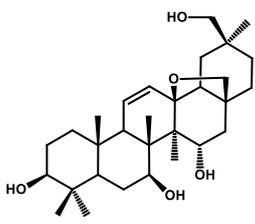


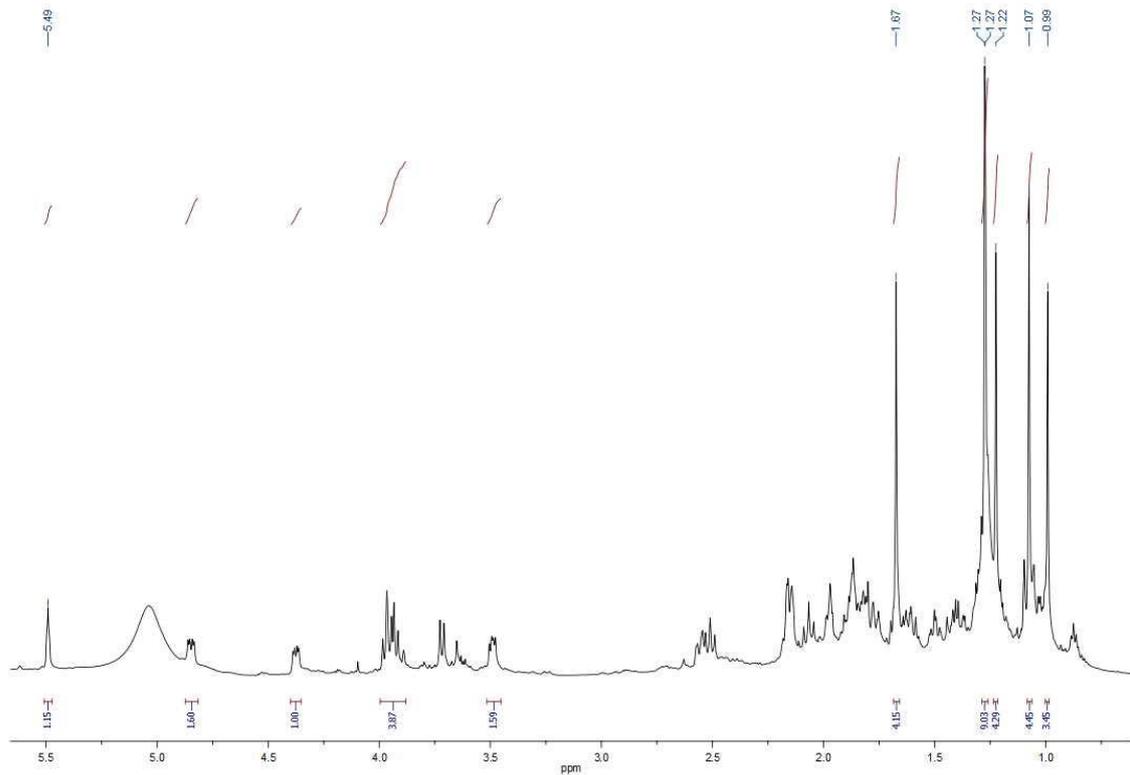
Espectro HMBC del producto 88



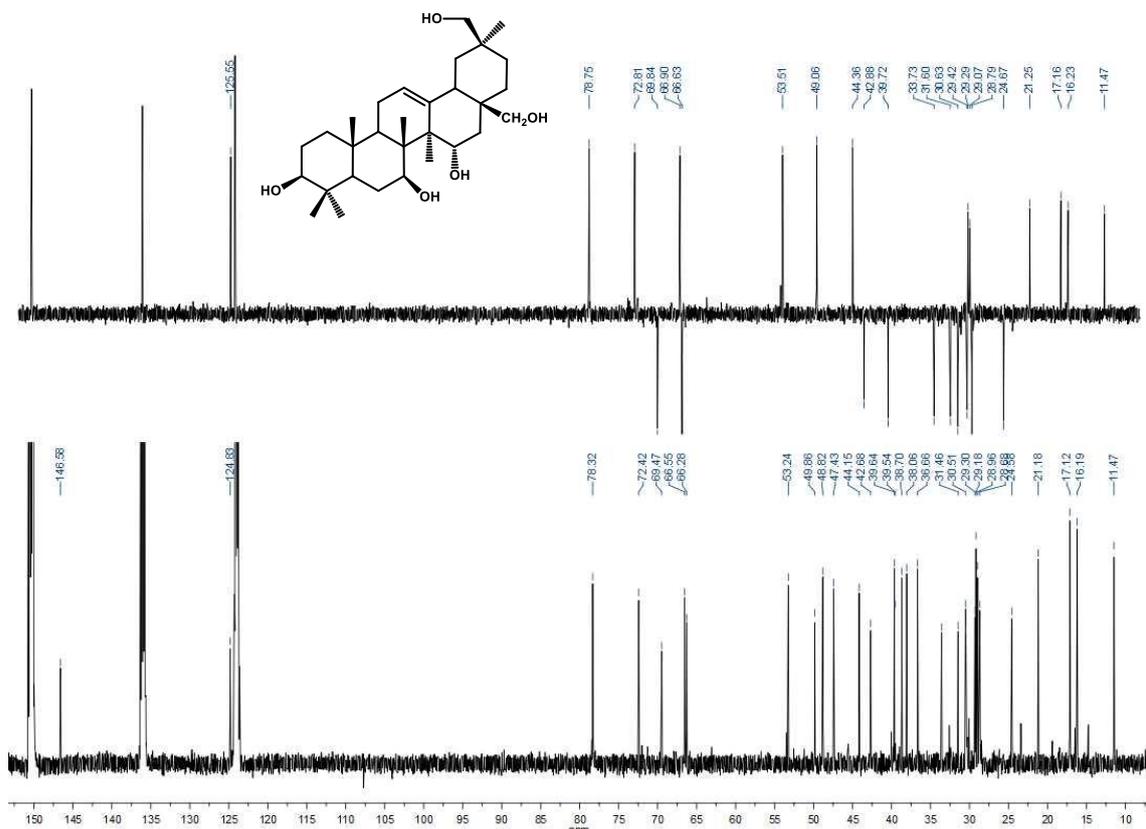


COSY del producto 88

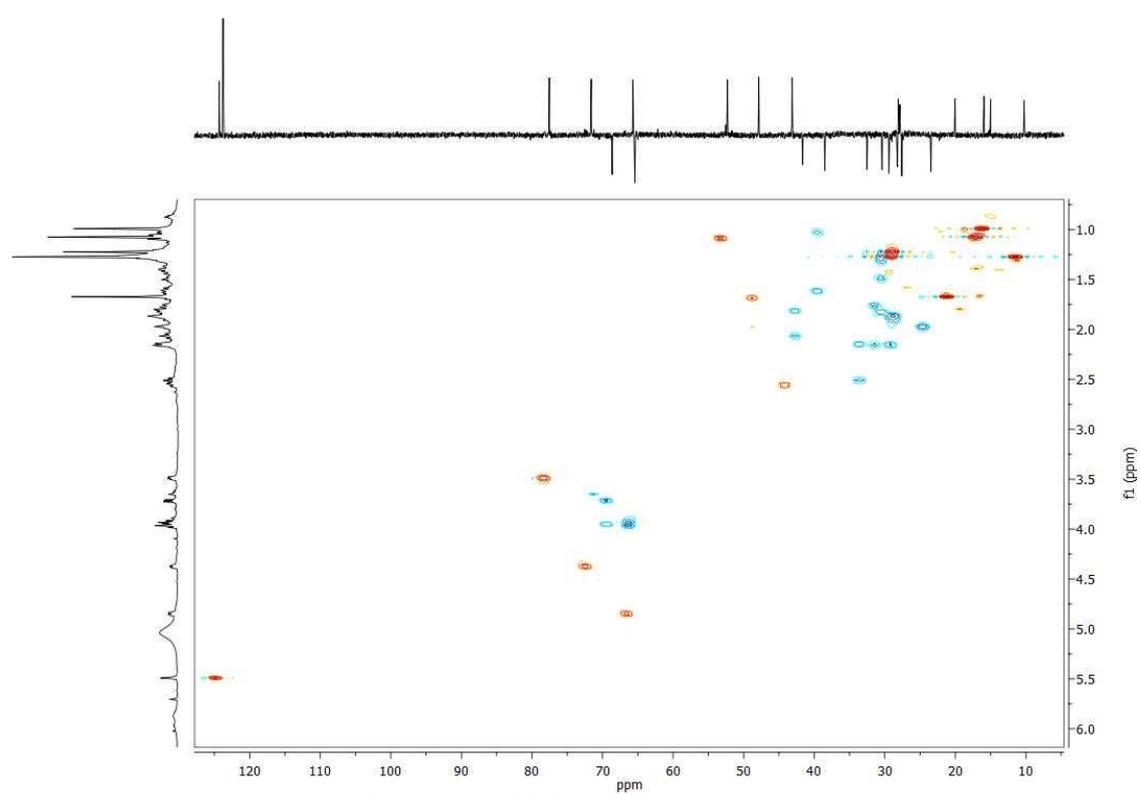




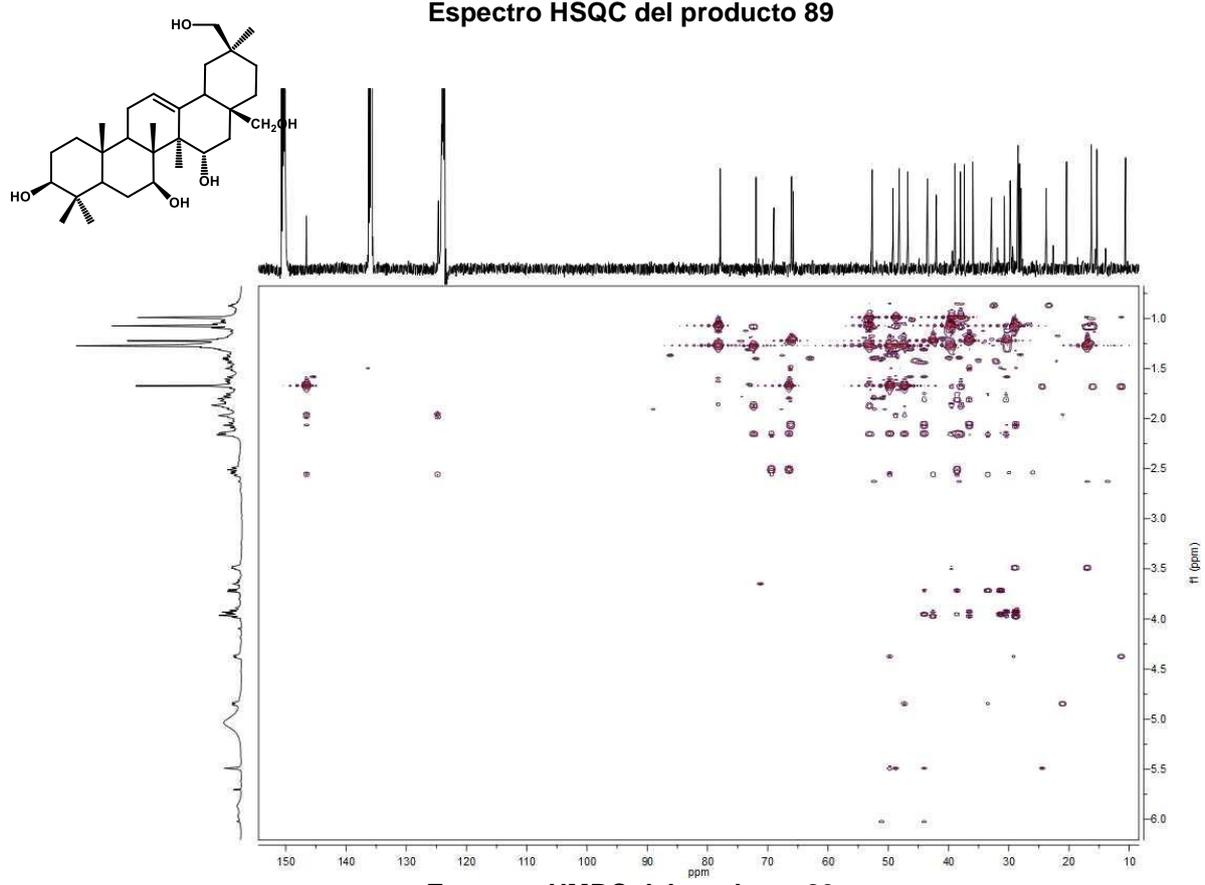
Espectro de ^1H RMN del producto 89



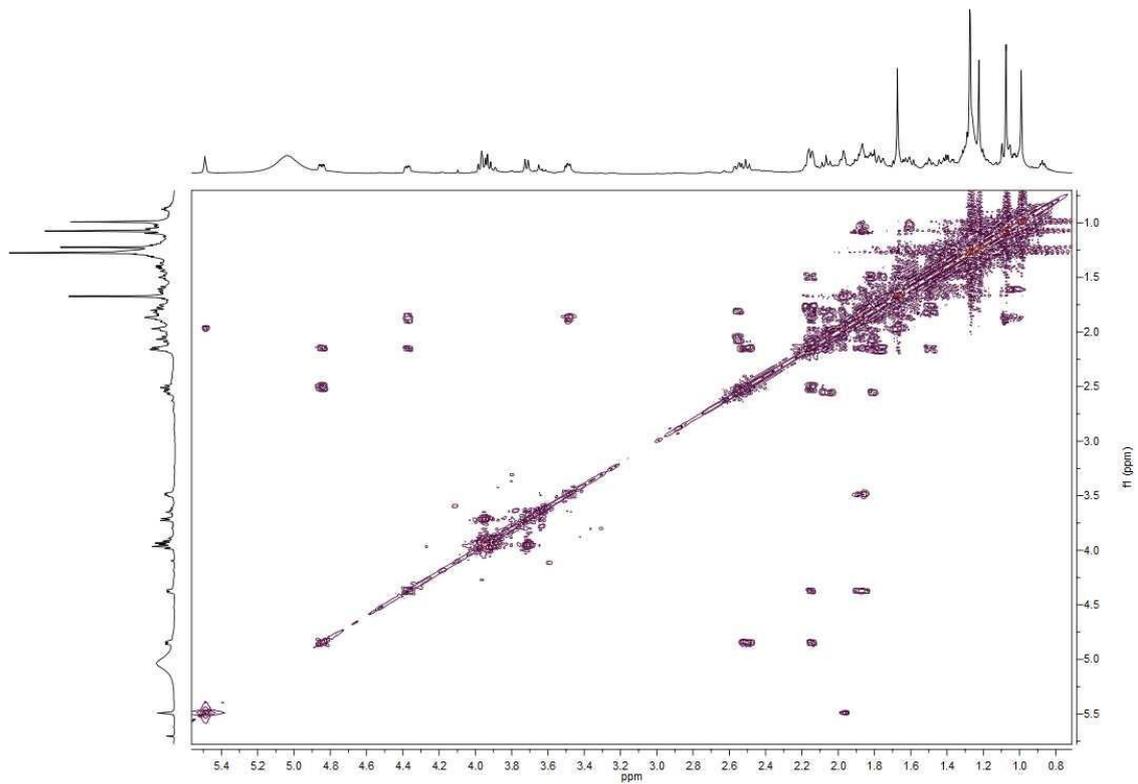
Espectro de ^{13}C RMN del producto 89



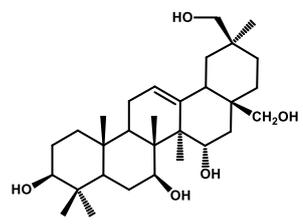
Espectro HSQC del producto 89

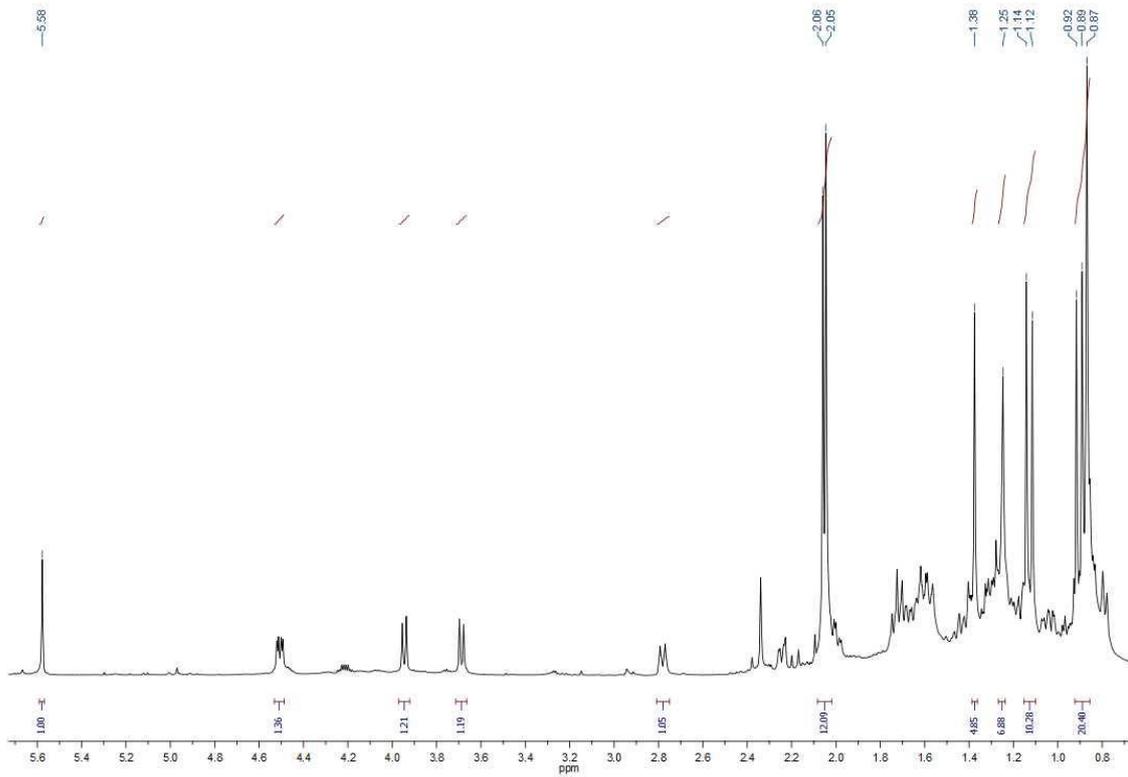


Espectro HMBC del producto 89

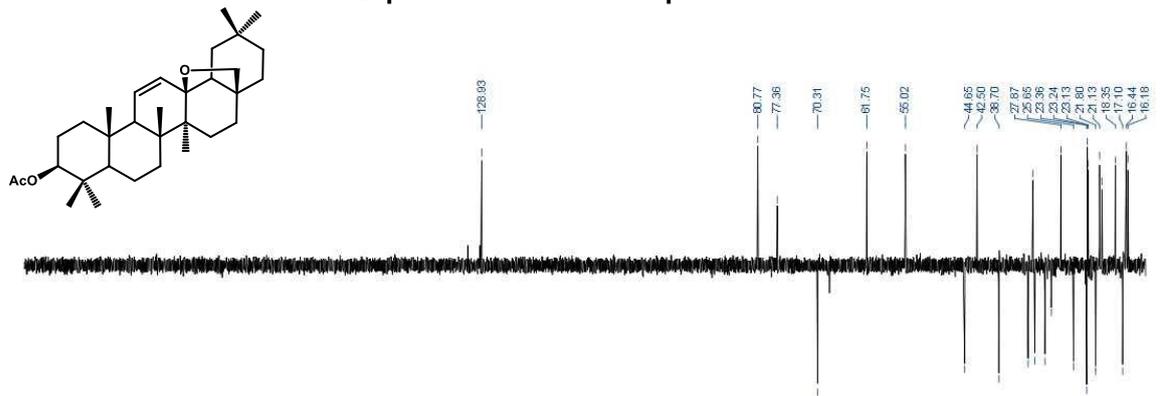


COSY del producto 89

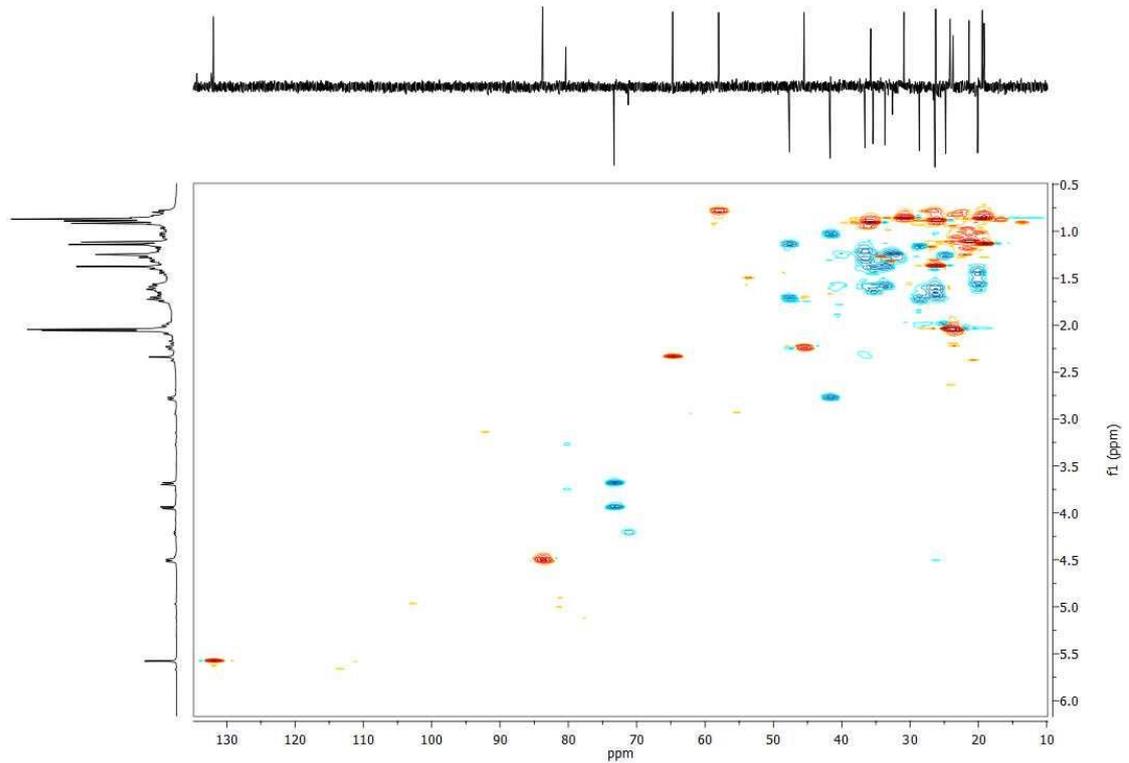




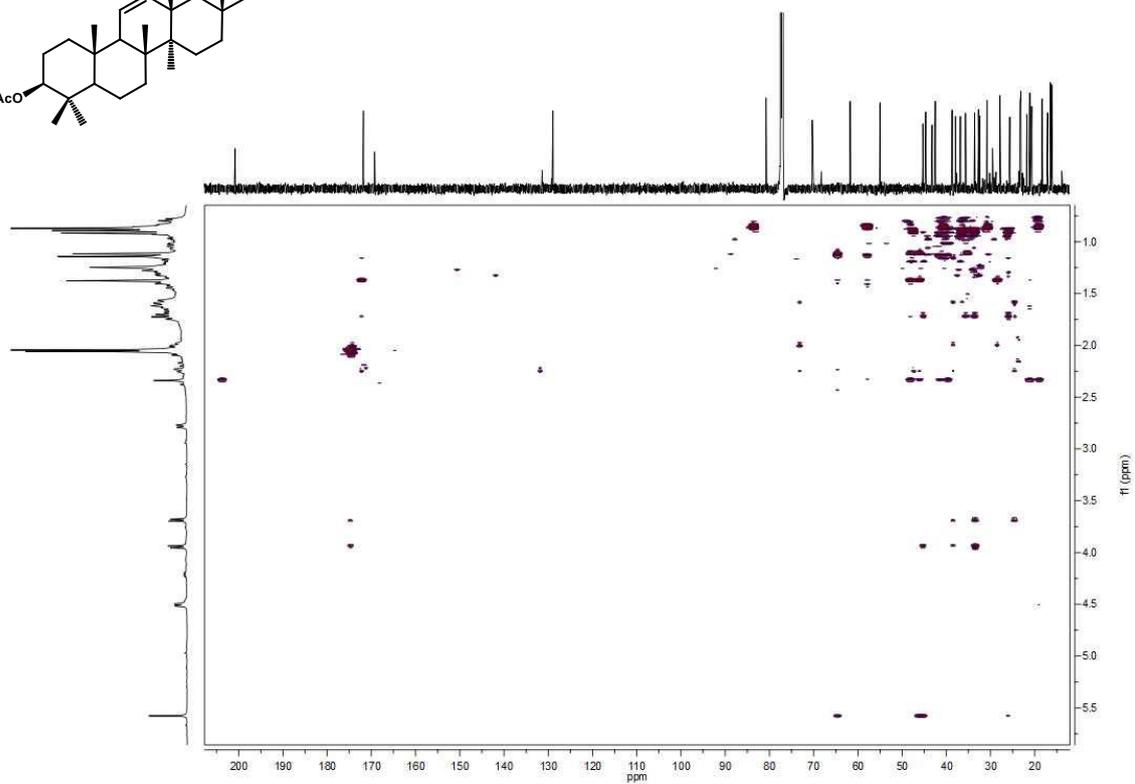
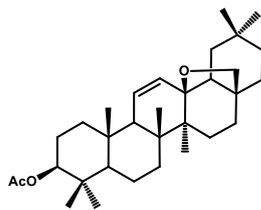
Espectro de ¹H RMN del producto 90



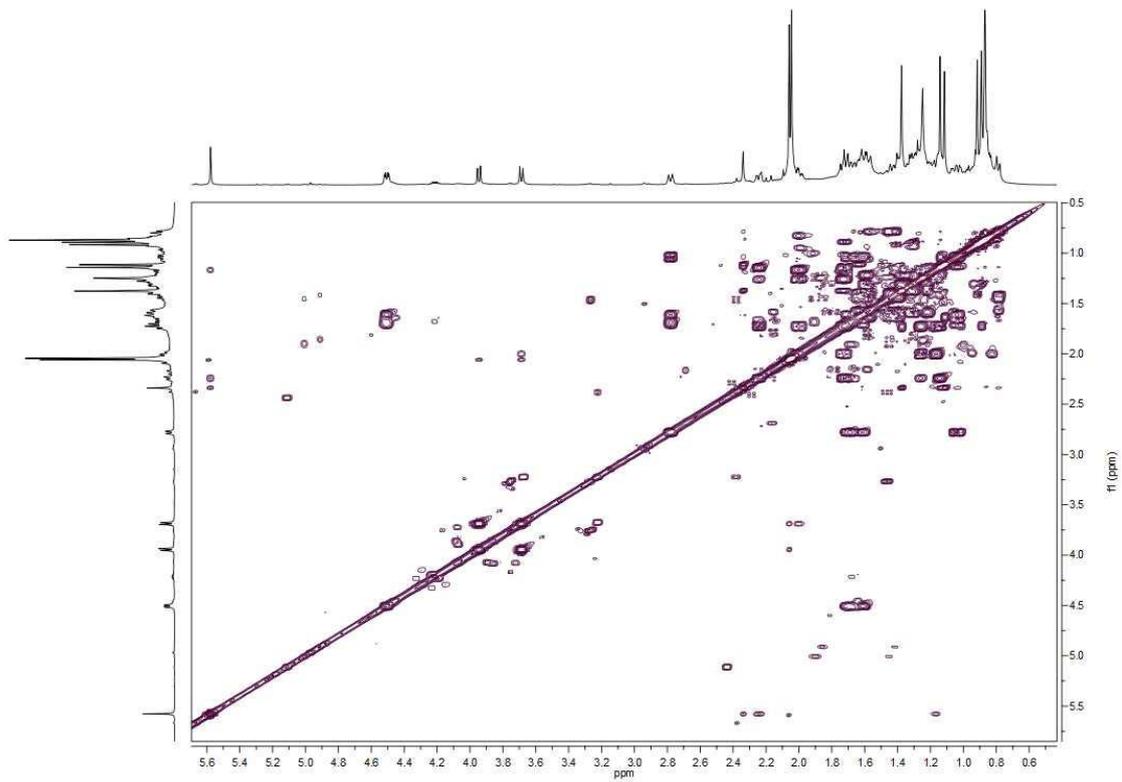
Espectro de ¹³C RMN del producto 90



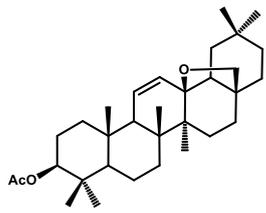
Espectro HSQC del producto 90

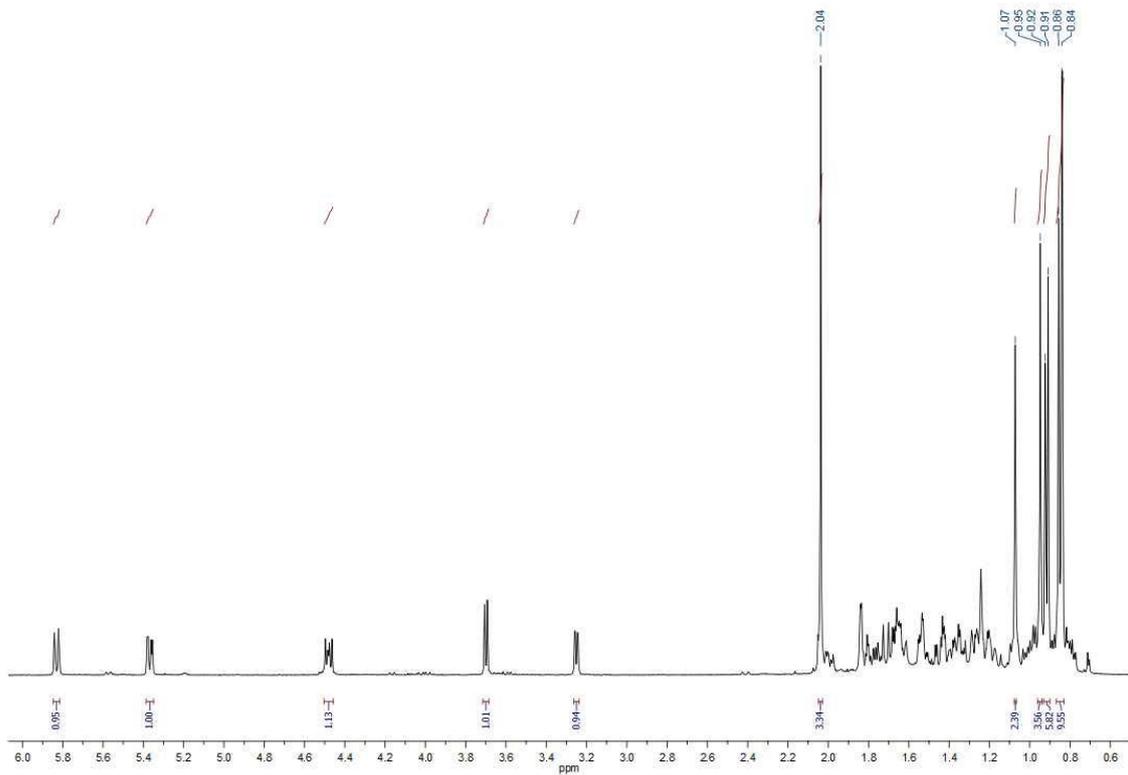


Espectro HMBC del producto 90

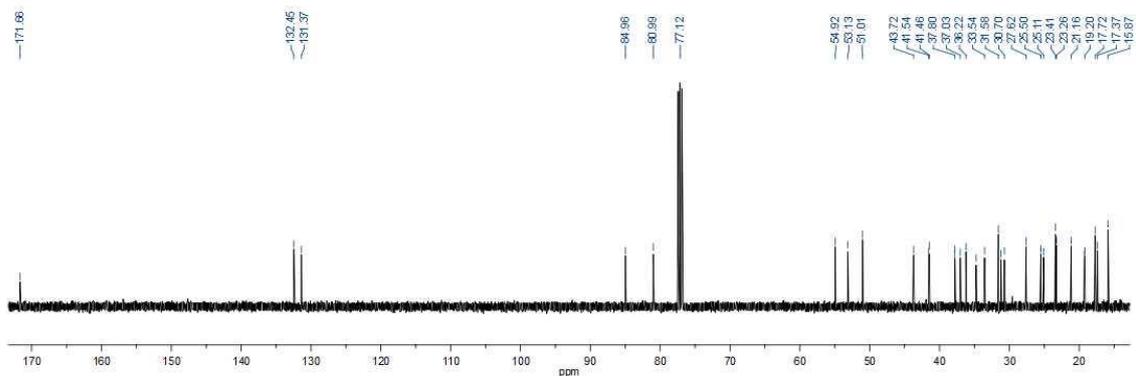
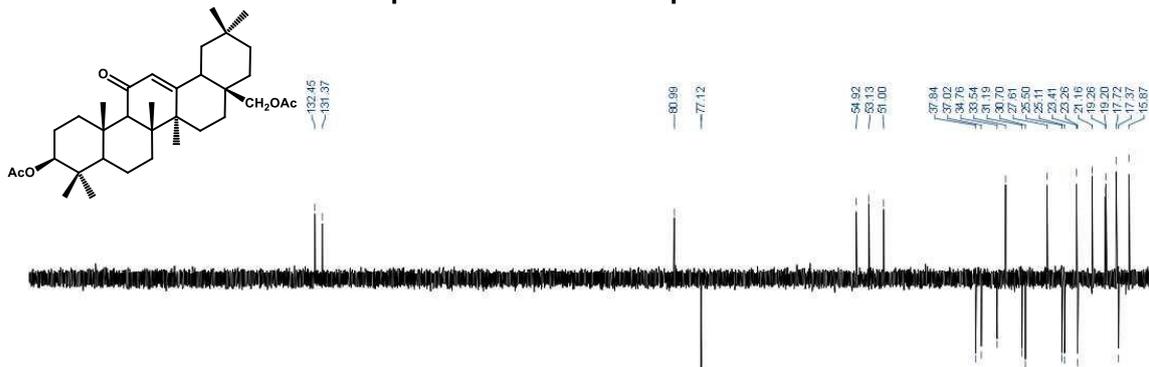


COSY del producto 90

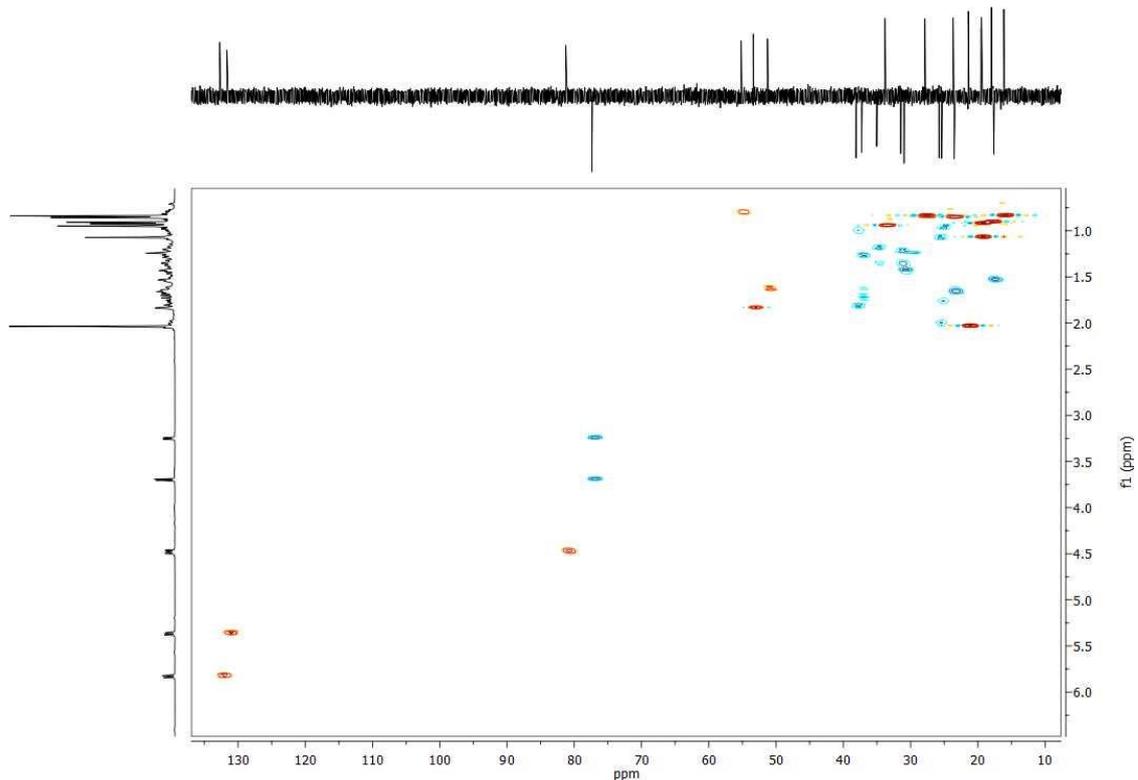




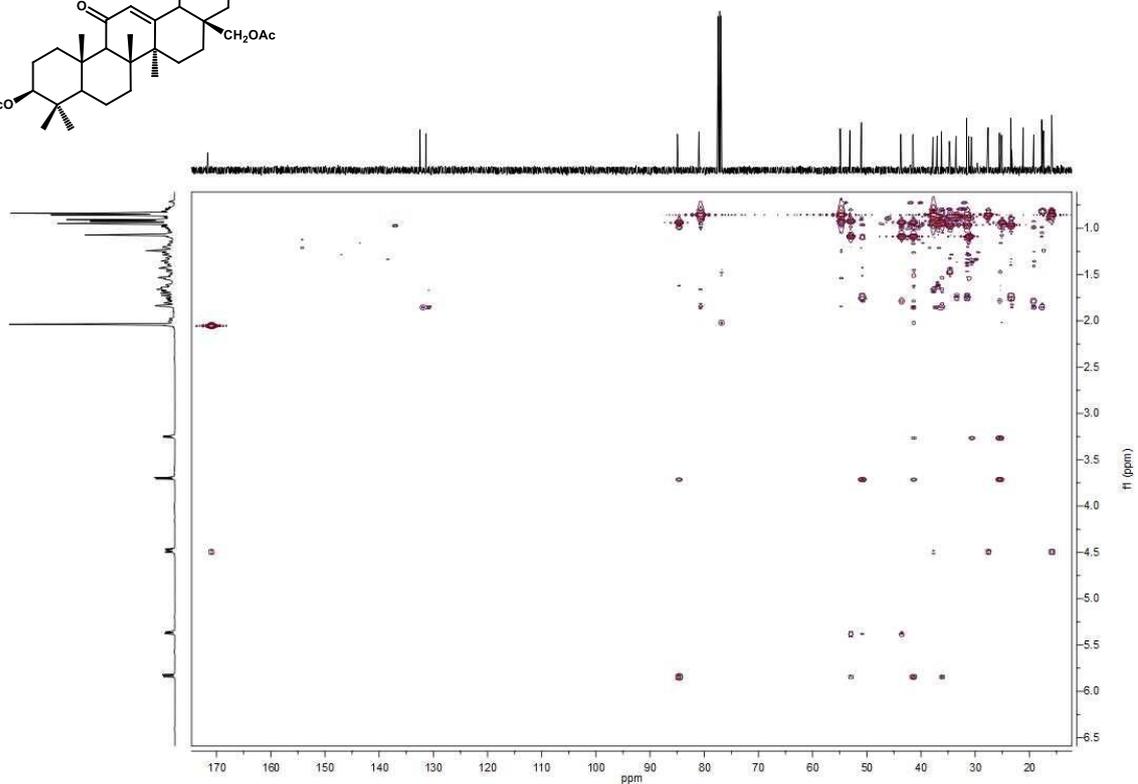
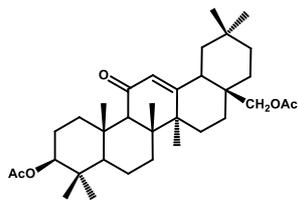
Espectro de ^1H RMN del producto 91



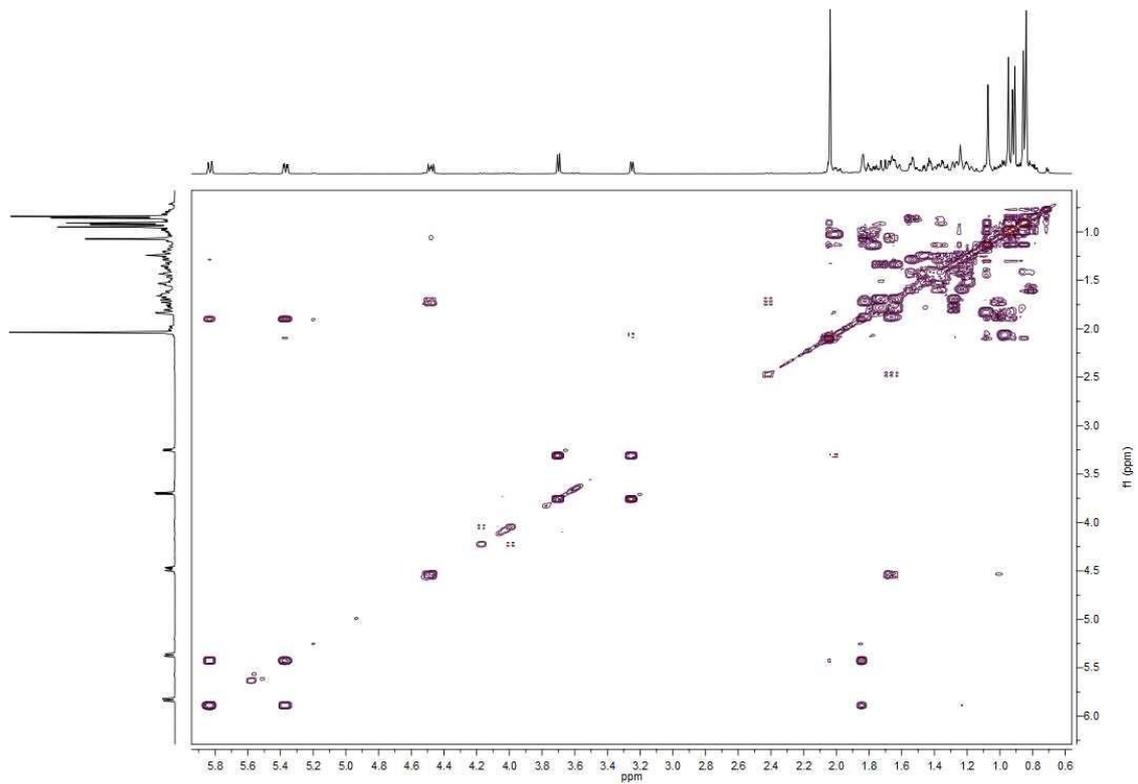
Espectro de ^{13}C RMN del producto 91



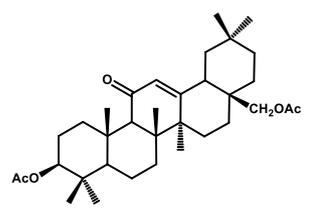
Espectro HSQC del producto 91

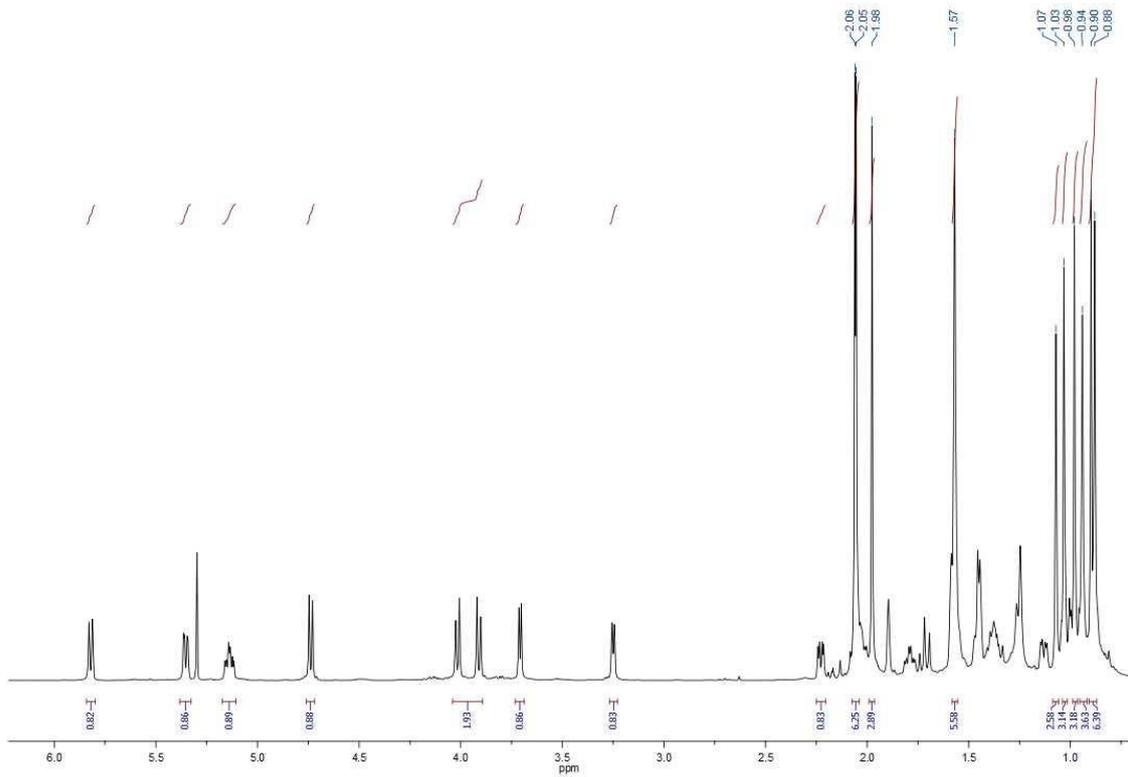


Espectro HMBC del producto 91

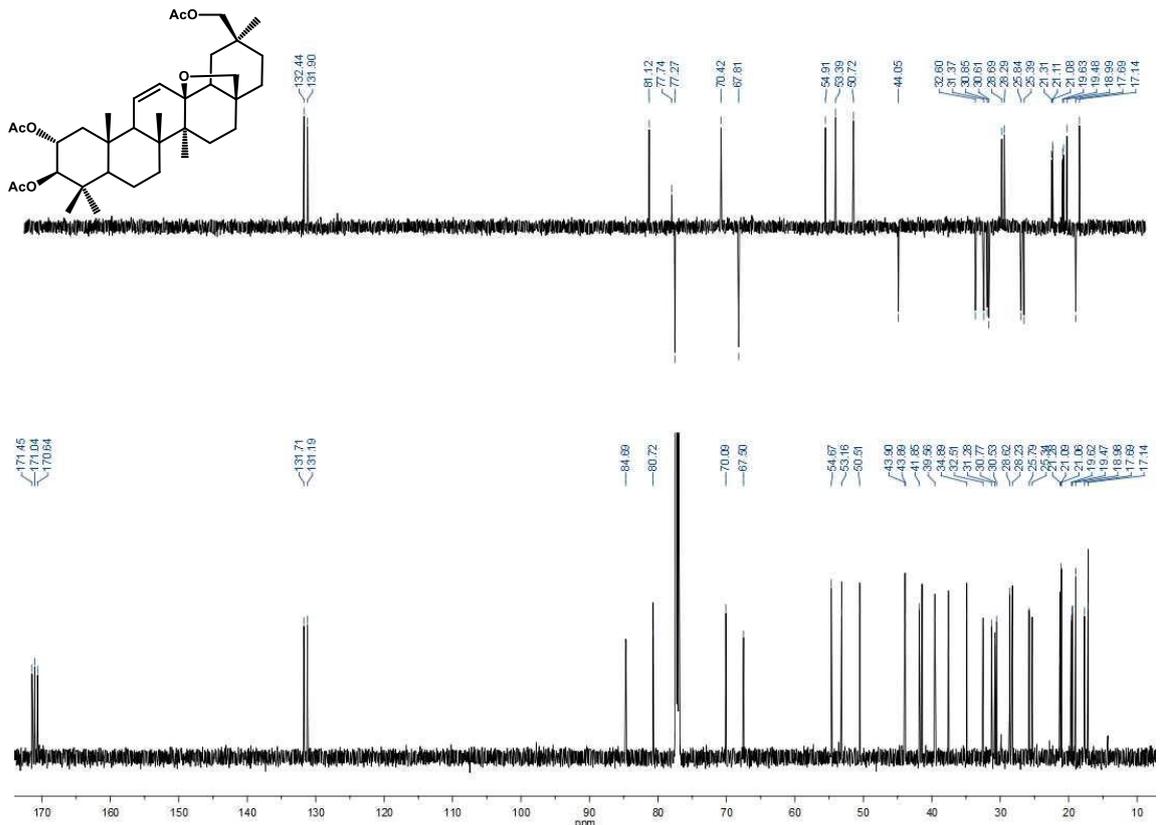


COSY del producto 91

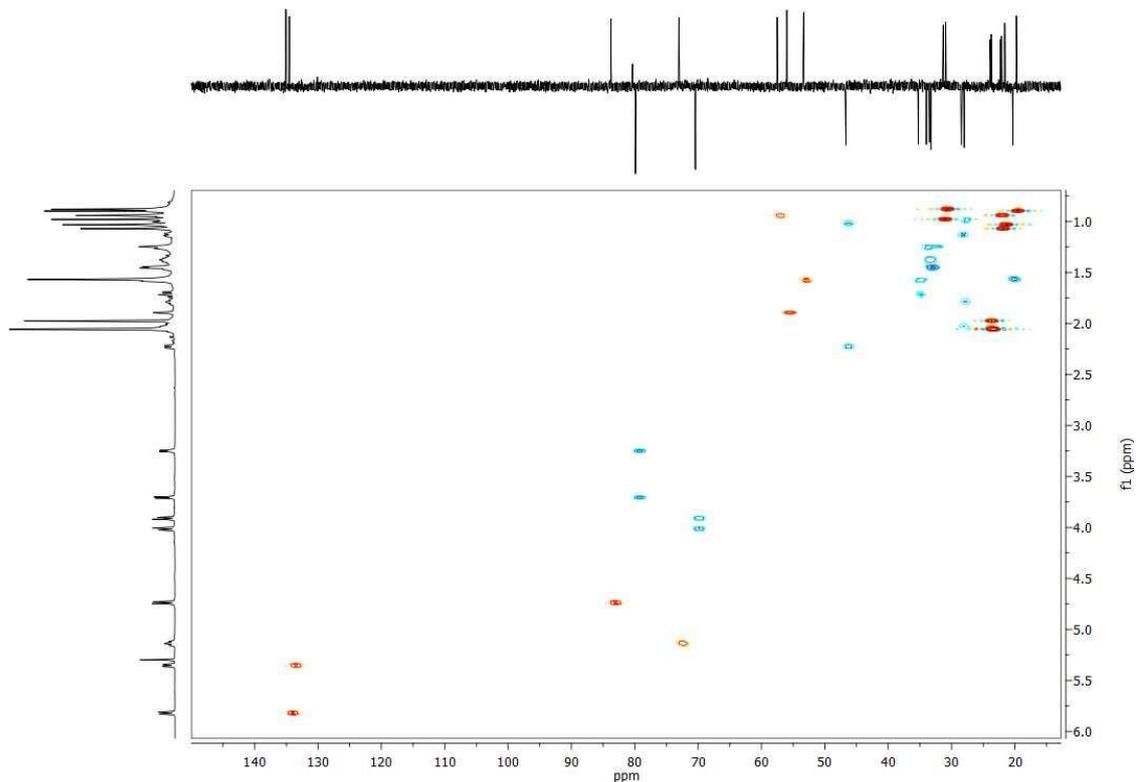




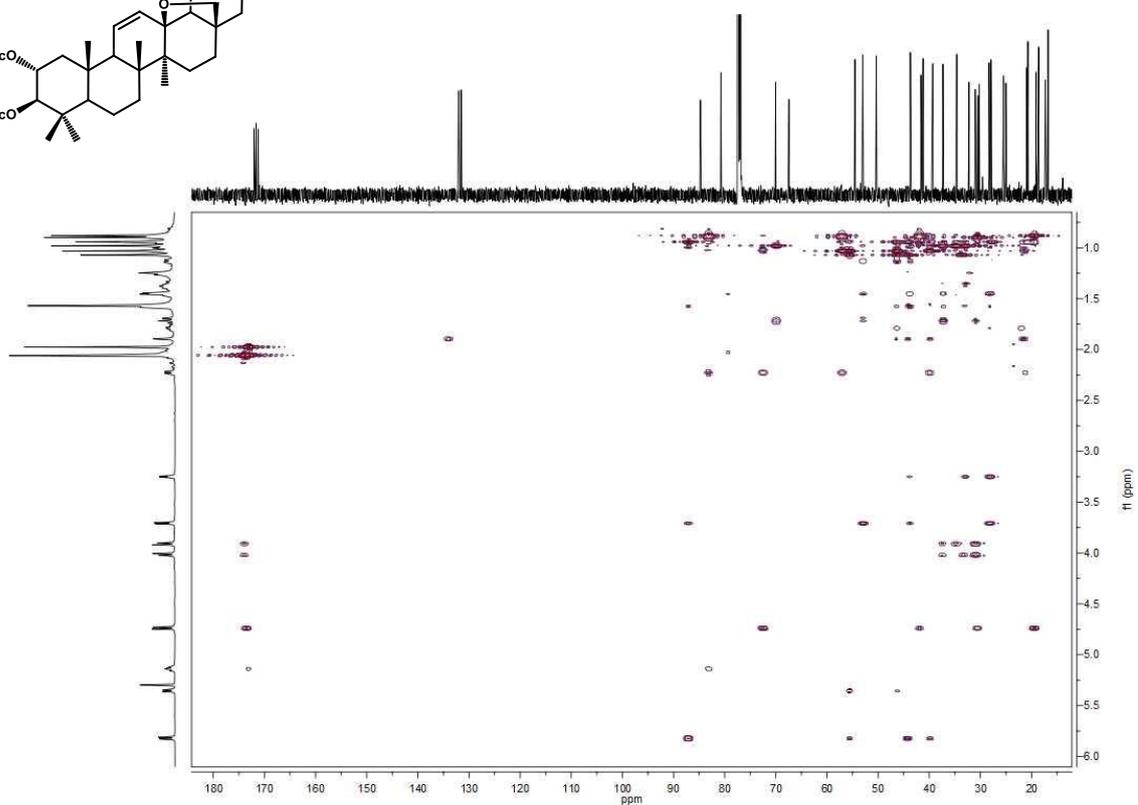
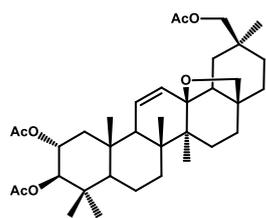
Espectro de ¹H RMN del producto 92



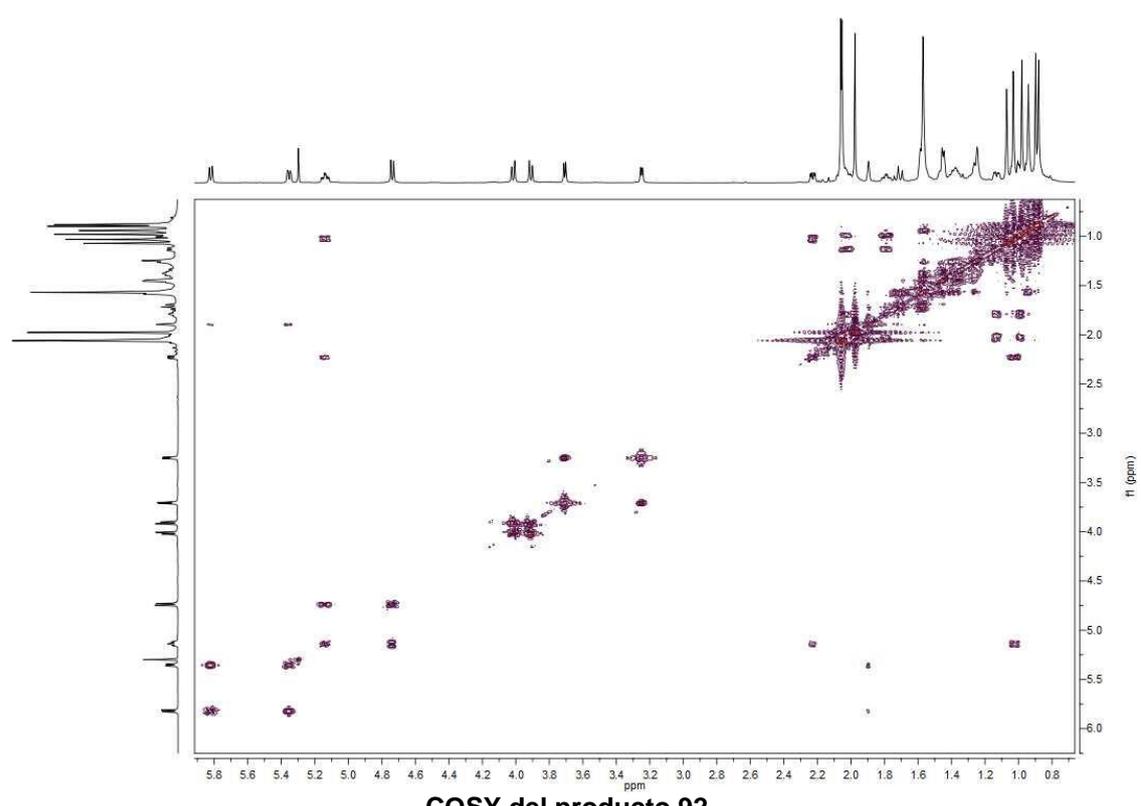
Espectro de ¹³C RMN del producto 92



Espectro HSQC del producto 92



Espectro HMBC del producto 92



COSY del producto 92

