

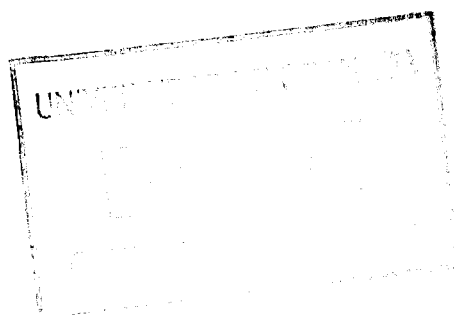
Proy. T-13/114

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA

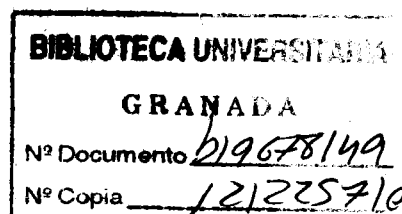
T
16
13

TESIS DOCTORAL

**BIOTRANSFORMACION DE SESQUITERPENOIDES
AISLADOS DE SIDERITIS ANDALUZAS CON HONGOS
FILAMENTOSOS. SINTESIS QUIMICO-MICROBIOLOGICA
DE 6 β -SESQUITERPENOLIDOS**



Francisco Rivas Sánchez



BIOTRANSFORMACION DE SESQUITERPENOIDES AISLADOS DE
SIDERITIS ANDALUZAS CON HONGOS FILAMENTOSOS. SINTESIS
QUIMICO-MICROBIOLOGICA DE 6 β -SESQUITERPENOLIDOS.

Francisco Rivas Sánchez

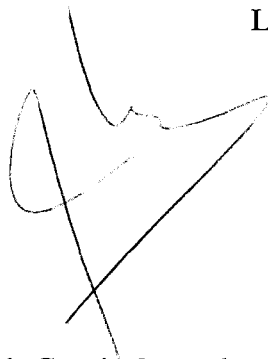
Memoria presentada para optar al
Grado de Doctor en Ciencias,
Sección de Químicas.



Fdo. Francisco Rivas Sánchez

Granada, Febrero de 1991

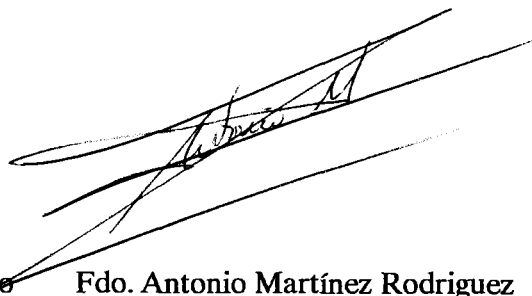
Los Directores de la Tesis



Fdo. Andrés García-Granados Lopez de Hierro

Profesor Titular de Química Orgánica

Universidad de Granada.



Fdo. Antonio Martínez Rodríguez

Prof. Titular de Química Orgánica

Universidad de Granada.

A mis padres

A Maria Belinda

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Prof. Dr. D. Andrés García-Granados López de Hierro y del Prof. Dr. D. Antonio Martínez Rodríguez a quienes expreso mi más sincero agradecimiento.

También quiero manifestar mi agradecimiento a la Dra. D^a María Esther Onorato Gutierrez por su colaboración en la elucidación de estructuras por RMN de alta resolución, de los productos descritos en la presente Memoria.

Asímismo, quiero agradecer al Prof. Dr. D. Andrés Parra Sánchez por la realización de los estudios de Mecánica Molecular desarrollados en la presente Memoria.

Mi agradecimiento también al Prof. Dr. D. Jose María Arias, del Departamento de Microbiología, por las incubaciones realizadas y al Prof. Dr. D. Oswaldo Socorro, del Departamento de Botánica, por su ayuda en el aspecto botánico de la presente Memoria.

A mis compañeros de laboratorio les quiero dar las gracias sinceramente por su constante ayuda.

Este trabajo de investigación ha sido realizado durante el periodo de disfrute de una Beca perteneciente al Plan de Formación del Personal Investigador en España y gracias al Proyecto de Investigación concedido por la C.A.I.C.Y.T. titulado "BIOTRANSFORMACIONES Y TRANSFORMACIONES BIOMIMETICAS DE SESQUITERPENOS Y DITERPENOS" nº 1209/84 y al Proyecto de Investigación concedido por la C.I.C.Y.T. titulado "BIOTRANSFORMACIONES Y TRANSFORMACIONES BIOMIMETICAS DE SESQUITERPENOS Y DITERPENOS PARA LA OBTENCION DE MOLECULAS BIOLOGICAMENTE ACTIVAS" PB88-0527.

INDICE

INDICE

INTRODUCCION	PAG
1. Objeto del trabajo	1
2. Estudio de los productos de la <i>Sideritis varoi</i> subespecie <i>Cuatrecasasii</i>	2
2.1. Características botánicas del género <i>Sideritis</i>	2
2.1.1. Posición sistemática	2
2.1.2. Descripción de la familia	2
2.1.3. Descripción del género	3
2.1.4. Delimitación de subgéneros y secciones	4
2.2. Diterpenos de <i>Sideritis</i>	8
2.3. Sesquiterpenos del género <i>Sideritis</i>	11
3. Biotransformación de sesquiterpenoides	15
PARTE TEORICA	
1. Aislamiento y determinación de estructuras de terpenos de la <i>Sideritis varoi</i> subespecie <i>Cuatrecasasii</i>	47
2. Biotransformación de germacranos con <i>Rhizopus nigricans</i>	57
2.1. Incubación del 6 β -acetoxi-4 β ,5 α -epoxi- <i>trans</i> -germacr-1(10)-eno	57
2.2. Incubación del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano	61
2.3. Discusión de los resultados obtenidos	65
3. Biotransformación de compuestos eudesméricos con <i>Curvularia lunata</i>	68
3.1. Obtención de los productos de partida	68

3.2. Incubación de la 6 β -acetoxieudesm-3-en-1-ona	69
3.3. Incubación de la 6 β -acetoxieudesm-4(15)-en-1-ona	73
3.4. Discusión de los resultados	76
4. Biotransformación de sistemas eudesmánicos con hongos filamentosos	78
4.1. Obtención de los productos de partida para estas incubaciones	78
4.2. Biotransformación de eudesmanos con <i>Curvularia lunata</i>	79
4.2.1. Incubación del 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxeudesmano	79
4.2.2. Incubación de la 6 β -acetoxi-4 β -hidroxeudesman-1-ona	83
4.2.3. Incubación del 1 β ,4 β ,6 β -trihidroxeudesmano	87
4.2.4. Incubación de la 1 β -acetoxi-4 β -hidroxeudesman-6-ona	90
4.2.5. Incubación de la 4 β -hidroxeudesmano-1,6-diona	92
4.2.6. Incubación de 4 α -hidroxeudesmanos	95
4.2.7. Discusión de los resultados obtenidos	96
4.3. Biotransformación de eudesmanos con <i>Rhizopus nigricans</i>	99
4.3.1. Incubación del 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxeudesmano	99
4.3.2. Incubación de la 6 β -acetoxi-4 β -hidroxeudesman-1-ona	101
4.3.3. Incubación del 1 β ,4 β ,6 β -trihidroxeudesmano	102
4.3.4. Incubación de la 1 β -acetoxi-4 β -hidroxeudesman-6-ona	104
4.3.5. Incubación de la 4 β -hidroxeudesmano-1,6-diona	105
4.3.6. Incubación del 6 β -acetoxi-1 β ,4 α -dihidroxeudesmano	106
4.3.7. Discusión de los resultados obtenidos	107
5. Conversión de sesquiterpenos 12-hidroxilados en 6 β -sesquiterpenolidas	111
5.1. Obtención de 1 β -hidroxi-6 β -eudesmanolidas	112
5.2. Obtención de 1 α -hidroxi-6 β -eudesmanolidas	115
5.3. Obtención de 6 β -germacranolidas	116

6. Conversión de sesquiterpenos 11-hidroxiados en 6 β -sesquiterpenolidas	119
6.1. Conversión de eudesmanos 11-hidroxiados en 6 β -eudesmanolidas	120
6.2. Conversión de germacranos 11-hidroxiados en 6 β -germacranolidas	121
7. Estudios conformacionales de eudesmanos	124
7.1. Introducción	124
7.2. Análisis conformacional de eudesmanos	129
7.2.1. Análisis conformacional de 6 β -lactonas	129
7.2.2. Análisis conformacional de 6 β -acetoxieudesmanos	135
7.2.3. Análisis conformacional de eudesmanos 12-hidroxiados	136
7.2.4. Análisis conformacional de eudesmanos 12-acetilados	138

PARTE EXPERIMENTAL

1. Técnicas generales utilizadas	142
2. Formación de derivados y reacciones utilizadas	144
3. Estudio de los productos de la <i>Sideritis varoi</i> subespecie <i>Cuatrecasasii</i>	148
3.1. Recogida y procesado de la planta	148
3.2. Aislamiento e identificación de terpenos	149
4. Microorganismos y condiciones de cultivo	156
5. Recuperación de los metabolitos	157
6. Biotransformación de germacranos con <i>Rhizopus nigricans</i>	158
6.1. Obtención de los productos de partida	158
6.2. Incubación del 6 β -acetoxi-4 β ,5 α -epoxi- <i>trans</i> -germacr-1(10)-eno	159
6.3. Incubación del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano	161

7. Biotransformación de sesquiterpenos eudesméricos con <i>Curvularia lunata</i>	164
7.1. Obtención de los productos de partida para las incubaciones	164
7.2. Incubación de la 6 β -acetoxieudesm-3-en-1-ona	166
7.3. Incubación de la 6 β -acetoxieudesm-4(15)-en-1-ona	168
8. Biotransformación de eudesmanos con hongos filamentosos	170
8.1. Obtención de los productos de partida para las incubaciones	170
8.2. Biotransformación de eudesmanos con <i>Curvularia lunata</i>	176
8.2.1. Incubación del 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmano	176
8.2.2. Incubación de la 6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-1-ona	177
8.2.3. Incubación del 6 β -acetoxi-1 α ,4 β -dihidroxiudesmano	180
8.2.4. Incubación del 1 β ,4 β ,6 β -trihidroxiudesmano	180
8.2.5. Incubación de la 1 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-6-ona	182
8.2.6. Incubación de la 4 β -hidroxieudesmano-1,6-diona	184
8.2.7. Incubación del 6 β -acetoxi-1 β ,4 α -dihidroxiudesmano	187
8.2.8. Incubación de la 4 α -hidroxieudesmano-1,6-diona	187
8.3. Biotransformación de eudesmanos con <i>Rhizopus nigricans</i>	189
8.3.1. Incubación del 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmano	189
8.3.2. Incubación de la 6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-1-ona	190
8.3.3. Incubación del 1 β ,4 β ,6 β -trihidroxiudesmano	191
8.3.4. Incubación de la 1 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-6-ona	192
8.3.5. Incubación de la 4 β -hidroxieudesmano-1,6-diona	194
8.3.6. Incubación del 6 β -acetoxi-1 β ,4 α -dihidroxiudesmano	195
9. Conversión de sesquiterpenos 12-hidroxilados en 6 β -sesquiterpenolidas	196
9.1. Obtención de 1 β ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11-H-eudesman-6 β ,12-olidas	196
9.2. Obtención de 1 α ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11-H-eudesman-6 β ,12-olidas	199

9.3. Obtención de la (1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-7 α ,11 β -H-germacran-6 β ,12-olida	202
10. Conversión de sesquiterpenos 11-hidroxilados en 12-hidroxilados	204
10.1. Conversión del producto 56 en los productos 36 y 38	204
10.2. Conversión del producto 14 en los productos 66 y 70	205
CONCLUSIONES	207
BIBLIOGRAFIA	214
ESPECTROS	222

INTRODUCCION

1. OBJETO DEL TRABAJO

El trabajo a desarrollar en la presente Memoria lo podemos situar dentro del campo de los Productos Naturales. En primer lugar, se realizará el aislamiento de sistemas terpénicos presentes en la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii*. Esta planta posee gran cantidad de compuestos sesquiterpénicos, especialmente con esqueletos germacránicos y eudesmánicos, siendo estos los productos de partida utilizados en este trabajo de investigación. Una vez aislados estos productos, se someterán a diversas reacciones químicas con el fin de preparar una serie de sustratos diferentemente funcionalizados, que posteriormente serán biotransformados por hongos filamentosos.

La biotransformación de estos sistemas sesquiterpénicos nos permitirá estudiar la acción de estos microorganismos, y el efecto que las variaciones estructurales que estos sistemas puedan ejercer en dicha acción. De este modo, pretendemos conseguir un conocimiento más preciso de la acción de los microorganismos sobre estos sustratos, y por lo tanto, estudiar la utilidad de estos microorganismos en síntesis orgánica, particularmente en la funcionalización de posiciones de difícil acceso por procedimientos químicos.

Del mismo modo, pretendemos aportar nuevos conocimientos tanto a los procesos de biotransformación, como a los procesos químicos que sobre los metabolitos obtenidos de estas biotransformaciones puedan realizarse. En definitiva, estudiaremos la utilidad de la combinación de procedimientos químicos y microbiológicos, para el diseño de la síntesis de nuevos productos sesquiterpénicos de interés.

2. ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS DE LA SIDERITIS VAROI SUBESPECIE CUATRECASASII

2.1. CARACTERISTICAS BOTANICAS DEL GENERO SIDERITIS

2.1.1. Posición sistemática

Desde el punto de vista sistemático, el enclave botánico del género Sideritis L. es el siguiente:

DIVISION : Magnoliophyta

CLASE : Magnoliopsida

SUBCLASE : Asteridae

SUPERORDEN: Lamiales

ORDEN : Lamiales

FAMILIA : Lamiaceae (= Labiatae)

2.1.2. Descripción de la familia

La familia *Labiadas* está constituida aproximadamente por unas 3000 especies de plantas herbáceas o arbustivas, frecuentemente glandulares y aromáticas, distribuidas por todos los países cálidos y templados del globo, pero con especial representación en la región mediterránea.

Presentan tallos de sección cuadrangular y hojas opuestas y decusadas.

Las flores son hermafroditas, zigomorfas y pentámeras, en cimas modificadas; en las axilas, brácteas u hojas florales opuestas formando pseudovertilicios o verticilastros, los cuales estan dispuestos en espigas simples o compuestas, cimosas, corimbosas, paniculadas o inflorescencias capitadas, raramente en verdaderas cimas. Bracteolas generalmente pequeñas, en ocasiones ausentes.

Cáliz gamosépalo, persistente y casi siempre bilabiado, con el labio superior tridentado y el inferior bidentado. Corola tubulosa, bilabiada, raramente unilabiada o casi regular. Androceo frecuentemente de cuatro estambres didínamos, raramente dos.

El ovario es súpero y bicarpelar, pero dividido ya durante la floración en cuatro profundos lóbulos, convirtiéndose en densas en las que el micropilo y radícula están vueltos hacia abajo, quedando el estilo inserto entre ellos.

2.1.3. Descripción del género

Plantas anuales herbáceas o perennes sufruticasas. Cáliz tubuloso-campanulado, pentadentado, dientes espinosos o subespinosos, iguales, subiguales o el superior más largo y ancho que los cuatro inferiores, garganta frecuentemente con una corona de pelos (carpostegio). Corola con tubo incluido en el cáliz, limbo bilabiado, labio superior erecto, subplano entero o brevemente bífido, el inferior trilobado, con lóbulo central más grande. Estambres cuatro, incluidos en la corola. Estilo incluso con ápice bífido. Núculas con ápice redondeado-obtuso.

2.1.4. Delimitación de subgéneros y secciones

Willdenow en 1880 en la 5ª edición de *Species Platarum* de Linneo (tomo 3, pg 63) subdividió el género *Sideritis* en tres grupos: el primero reúne las especies consideradas por el autor como desprovistas de brácteas "Ebracteatae", el segundo agrupa a la de las brácteas enteras y el tercero incluye a las de brácteas dentadas. Estos dos últimos grupos son bastante naturales y pueden mantenerse aún en la actualidad.

Bentham en su obra *Labiatarum Genera et Species* (1834), lo considera subdividido en cuatro secciones: *Marrubiastrum*, *Empedoclea*, *Ensideritis* y *Hesiodia*. Briquet (1893) subdivide la sección *Hesiodia* en *Hesiodia p. d.* y *Burgsdorfia*. Willkomm en su *Prodromus Florae Hispanicae* (1868) mantiene las secciones consideradas por Bentham. Font Quer, en su estudio sobre la morfología y nomenclatura de las *Sideritis* (1924) subdivide a la sección *Ensideritis* en dos subsecciones: *Gymnocarpae* (sin carpostegio) y *Carpostegiatae* (con carpostegio).

Por último, Mendoza-Heuer en 1977 fundamentandose básicamente en la estructura de la inflorescencia y morfología de la flor, ratifica lo propuesto por Huynh en 1972 y agrupa las especies en dos subgéneros que diagnostica de la siguiente forma:

Subgenero Sideritis

Con pelos sencillos, pluricelulares, brácteas ausentes, plantas anuales herbáceas o perennes sufruticosas.

- Sección Hesiodia (Moench) Bentham

Brácteas foliáceas, pecioladas, o al menos estrechadas en la base. Hojas superiores estériles, en general ausentes. Cáliz bilabiado, con tres sépalos superiores, cortos y dos inferiores mayores. Plantas anuales. Polen tricolpado.

Especie tipo: *Sideritis montana* L.

Distribución: Europa mediterránea, desde el sur de Rusia hasta España y Norte de África.

- Sección Burgsdorfia (Moench) Briquet

Brácteas foliáceas, pecioladas o no. Hojas superiores estériles, en general ausentes. Cáliz bilabiado con un sépalo superior más ancho o largo y cuatro inferiores más cortos, o raramente iguales todos. Plantas anuales. Polen tetracolpado.

Especie tipo: *Sideritis romana* L.

Distribución: Ampliamente representada en los países europeos y africanos de la cuenca mediterránea, desde Siria hasta Portugal.

- Sección Sideritis

Brácteas sésiles, con base ancha, amplexantes, dentadas, siempre distintas de las hojas inferiores. Hojas superiores estériles, generalmente sésiles. Plantas perennes con base leñosa. Polen tetracolpado.

Especie tipo: *Sideritis hyssopifolia* L.

Distribución: Región mediterránea. Frecuentemente en la parte occidental de la misma, fundamentalmente en la Península Ibérica.

- Sección Empedoclea (Rafin) Bentham

Brácteas sésiles, con base ancha, amplexantes, enteras, diferente de las hojas inferiores, más alargadas. Hojas superiores estériles, frecuentemente sésiles. Plantas perennes con base leñosa. Polen 6-pantocolpado.

Especie tipo: *Sideritis syriaca* L.

Distribución: Región mediterránea oriental, fundamentalmente Grecia, Asia Menor, Crimea, Siria, etc.

Subgenero Marrubiastrum (Moench) Mendoza-Heuer

Con pelos ramificados, pluricelulares, brácteas presentes, plantas perennes, en general arboreiformes.

- Sección Marrubiastrum (Moench) Bentham

Brácteas la mayoría con peciolo, o al menos estrechamiento en la base, semejantes a las hojas basales. Hojas superiores estériles, si aparecen, por encima de los paracladeos. Plantas perennes, arboreiformes. Polen tetracolpado.

Especie tipo: *Sideritis canariensis* L.

Distribución: Región Macaronésica: Islas de Canarias y de Madeira.

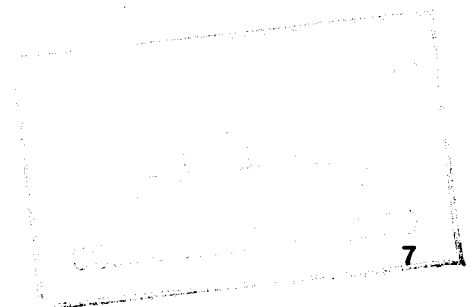
- Sección Empedocleopsis Huynh

Brácteas sésiles, con base ancha, amplexantes, enteras, diferentes de las hojas inferiores más alargadas. Sin paracladeos. Hojas superiores estériles, la mayoría sésiles. Plantas perennes arboreiformes. Polen tetracolpado.

Especie tipo: *Sideritis gomerae* Bolle

Distribución: Islas Canarias. Exclusiva de la isla de la Gomera.

Los taxones que son objeto de nuestro estudio en la presente Memoria están incluidos en la sección *Sideritis*, la cual está constituida casi exclusivamente por *Sideritis Ibero-Mauritánicas*.



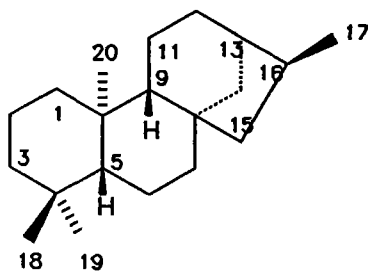
2.2. DITERPENOS DE SIDERITIS.

El género botánico de las *Sideritis* crece abundantemente en nuestro país, contando con alrededor de un centenar de especies, con la particularidad de que la mayor parte de ellas son endemismos.

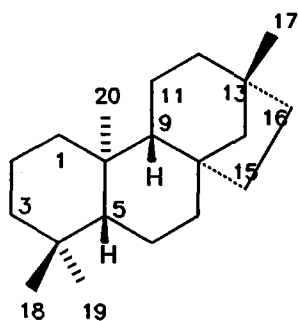
Los estudios sobre este género se iniciaron en 1968, con la aparición de un trabajo de Piozzi, dedicando su atención, a partir de este momento, algunos grupos de investigadores españoles. Existe una gran diversidad de diterpenos aislados de *Sideritis*. Contrariamente a la afirmación mantenida por Ourisson respecto al contenido diterpénico de Labiadas (Ourisson, 1974), en el caso del género *Sideritis* puede observarse que la totalidad de los compuestos tri-, tetra- y pentacíclicos pertenecen a la serie enantio (*ent-*) y entre los diterpenos tipo labdano, con esqueleto carbonado bicíclico, sólo el borjatriol corresponde a la serie normal, (llamando serie normal a la de configuraciones similares a los esteroides). La nomenclatura de los compuestos diterpénicos que aparecen en esta Memoria está basada en la nomenclatura de Rowe (1968).

De los diterpenos aislados de *Sideritis* la mayoría poseen un doble enlace exocíclico (*ent-kaur-16-enos*) ó endocíclico (*ent-kaur-15-enos*). También se han descrito *ent-kaurenos* en los que la posición 16 ó 17 están oxigenadas. Una constante biogénica practicamente universal entre los diterpenos tipo *ent-kaurénicos* procedentes de *Sideritis*, es la hidroxilación en C-18 (sustituyente ecuatorial). Muy frecuente es también la presencia de un grupo hidroxilo en C-7 y configuración axial. Otras posiciones usualmente

oxidadas en los *ent*-kaurenos pertenecientes a este género botánico son C-3, C-6, C-11, C-15, C-16 y C-17.



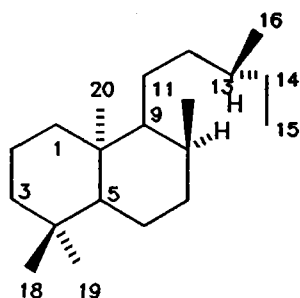
También son abundantes los diterpenos con esqueleto *ent*-beyer-15-énicos procedentes de *Sideritis*. Suelen estar hidroxilados en las mismas posiciones que los *ent*-kaurenos (excepto C-16), pero además se dan oxidaciones en C-12 y, sorprendentemente, en C-14, aunque las teorías biogénéticas de Wenkert no permiten (aunque puede explicarse de otra forma) el origen de derivados del *ent*-beyer-15-en-14 β -ol y, como aproximación estructural, sólo justificarían la presencia de *ent*-beyeranos (compuestos saturados con un hidroxilo en C-14 pero de configuración *ent*- α) (Hall, 1972).



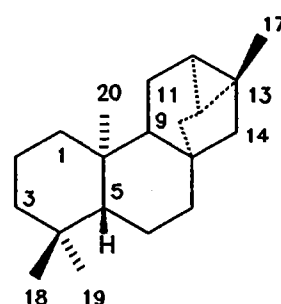
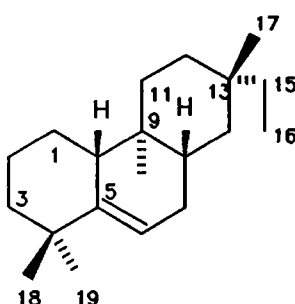
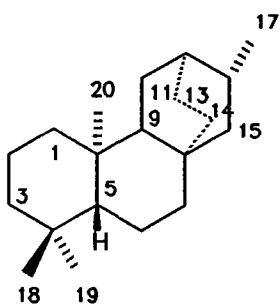
La coexistencia en la *Sideritis grandiflora* de compuestos con esqueleto *ent*-kaur-15-eno y *ent*-beyer-15-eno, junto con epoxikaurenos sugieren (Rodríguez, 1974-1) que la biogénesis del sistema *ent*-beyer-15-en-14 β -ol debe transcurrir a través de los derivados epoxídicos de *ent*-kaur-15-enos, que por un reagrupamiento de Wagner-Meewein

generarían *ent*-beyer-15-enos con un grupo hidroxilo en C-14 y estereoquímica idéntica a la encontrada en los compuestos naturales; experiencias "in vitro" han demostrado que esta hipótesis puede ser correcta (Rodríguez, 1974-2).

Otro de los sistemas muy distribuido en *Sideritis* es el sistema *ent*-labdánico. Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio han dado como resultado nuevos sistemas *ent*-labda-13(16),14-dienos (García-Granados, 1983; Algarra, 1983) coexistiendo con nuevos *ent*-13-*epi*-óxidos de manoilo (García-Granados, 1985-2). Igualmente, investigaciones realizadas en nuestro laboratorio han demostrado la relación biogenética de ambos sistemas (García-Granados, 1985-2).



También se han aislado de *Sideritis*, aunque en menor proporción, diterpenos con esqueletos *ent*-atisánico (generalmente con un doble enlace entre C-13 y C-14), *ent*-8,5-friedopimar-5-enos y *ent*-trachilobano (Gonzalez, 1990).



2.3. SESQUITERPENOS DEL GENERO *SIDERITIS*

El género *Sideritis* ha demostrado ser una gran fuente de diterpenoides (García de Quesada, 1972-1, 1972-2; Gonzalez, 1973-1, 1973-2; García-Alvarez, 1980; Algarra, 1983; García-Granados, 1984-1, 1984-2 y 1985-2), sin embargo tan sólo después de quince años de estudiar el género, se aislaron los primeros sesquiterpenos. Poseen esqueleto eudesménico y eudesmánico (García-Granados, 1985-1), con hidroxilación β sobre C-1 y un característico acetoxilo axial sobre C-6. Estas estructuras, determinadas por combinación de procedimientos químicos y espectroscópicos, son parecidas a otras aisladas de algunas especies del género *Verbesina*, pertenecientes a la familia de las Compuestas, que crecen en la parte sur del continente americano (Bohlmann, 1980).

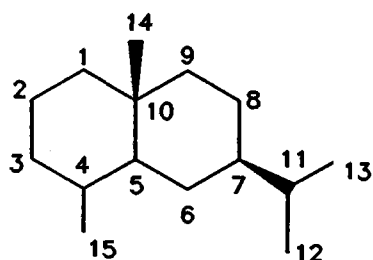
En el caso de los eudesmanos, estas estructuras poseen un grupo hidroxilo terciario sobre C-4 cuya configuración ha suscitado controversias (Herz, 1982) y posteriores rectificaciones (Bohlmann, 1985). De las *Sideritis* se han aislado 4-hidroxi eudesmanos con ambas configuraciones sobre C-4 (García-Granados, 1985-1, 1986-1).

Además de compuestos eudesménicos y eudesmánicos se han aislado de la *Sideritis* algún germacreno (García-Granados, 1986-2), que ha sido objeto de diversos estudios de ciclación para obtener (1 β ,5 β -H)-guayenos.

Recientemente se han aislado en nuestro laboratorio nuevos compuestos eudesmánicos y eudesménicos (García-Granados, 1988).

Sesquiterpenos del género "Sideritis"

a) Esqueleto de eudesmano:



1. 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-4(15)-eno

Sideritis varoi (*Cuatrecasasii*)

(García-Granados, 1985-1)

2. 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-3-eno

Sideritis varoi (*Cuatrecasasii*)

(García-Granados, 1985-1)

3. 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-4-eno

Sideritis varoi (*Cuatrecasasii*)

(García-Granados, 1985-1)

4. 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxieudesmano

Sideritis varoi (*Cuatrecasasii*)

(García-Granados, 1985-1)

5. 6 β -acetoxi-1 β ,4 α -dihidroxieudesmano

Sideritis varoi (*Oriensis*)

(García-Granados, 1986-1)

6. 6 β -acetoxi-1 α ,4 α -oxieudesmano

Sideritis varoi (Nijarensis)

(García-Granados, 1988)

7. 1 β -hidroxieudesm-3,5-dieno

Sideritis varoi (Nijarensis)

(García-Granados, 1988)

8. 6 β -acetoxi-1 β ,5 α -dihidroxieudesm-4(15)-eno

Sideritis varoi (Nijarensis)

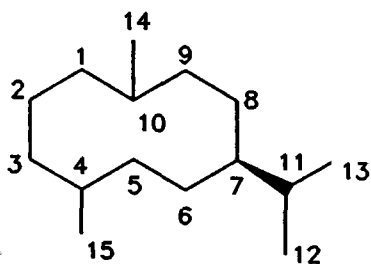
(García-Granados, 1988)

9. 6 β -hidroxieudesma-1,4-dien-3-ona

Sideritis varoi (Nijarensis)

(García-Granados, 1988)

b) Esqueleto de germacreno: (trans-germacreno)



10. 4 β ,5 α -epoxi-6 β -hidroxi-trans-germacr-1(10)-eno

Sideritis varoi (Cuatrecasasii)

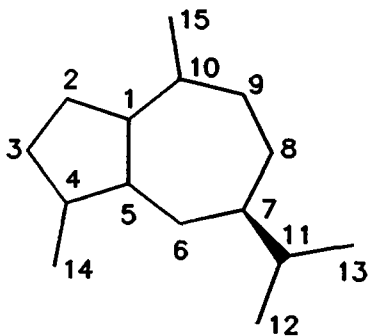
(García-Granados, 1986-2)

11. 6 β -acetoxi-4 β ,5 α -epoxi-trans-germacr-1(10)-eno

Sideritis varoi (Cuatrecasasii)

(García-Granados, 1986-2)

c) Esqueleto de guayano: (cis-guayeno)



12. $4\beta,6\beta$ -dihidroxi-($1\beta,5\beta$ -H)-cis-guay-10(15)-eno

Sideritis varoi (Cuatrecasasii)

(García-Granados, 1986-2)

3. BIOTRANSFORMACION DE SESQUITERPENOIDES

En los últimos años se ha prestado bastante atención a la utilización de microorganismos en síntesis orgánica. Este interés radica en la regio y estereo especificidad de los sistemas enzimáticos, que permite, por un lado, el que un determinado microorganismo transforme un grupo sin afectar a otros que existan en la molécula, y por otro lado, la posibilidad de 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 alto grado de pureza, utilizando procedimientos sencillos, una serie de productos que no son fácilmente asequibles por procedimientos químicos. Utilizando este último tipo de procedimientos se han obtenido resultados interesantes, como es el caso del reactivo de Mazur, con el que se obtienen alcoholes terciarios en átomos de carbono no activados (Trifilieff, 1977 y 1978). También se pueden conseguir oxidaciones en átomos de carbono secundarios utilizando el reactivo de Gif, con el que se consiguen mezclas de cetonas, pero en muy bajos rendimientos (Barton, 1986, 1987-1 y 1987-2).

Algunos enzimas presentan especificidad casi absoluta por un determinado sustrato y no actúan sobre moléculas con estructura muy parecida. Otros, sin embargo, no poseen tanta especificidad y son capaces de actuar sobre un determinado número de moléculas que poseen características estructurales comunes.

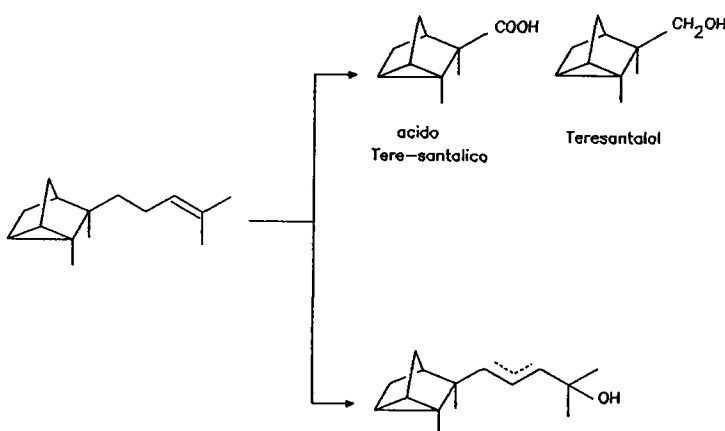
Dentro de los procesos de hidroxilación podemos ver que los sistemas enzimáticos involucrados son monooxigenasas, las cuales son capaces de proporcionar uno de los dos átomos de oxígeno de la molécula. El enzima clave es el citocromo P-450.

Diversas han sido las transformaciones realizadas utilizando microorganismos. Existiendo diversas revisiones de estos procesos de biotransformación de sesquiterpenos, como son la ya clásica de Kieslich de 1976 y, más recientemente la de Mikami (1988) y la de Furstoss (Lamare, 1990).

Las biotransformaciones se pueden estudiar atendiendo a diversos criterios como son: los microorganismos utilizados, el tipo de transformación producida (oxidación, reducción, hidroxilación, degradación, reagrupamiento, ciclación, etc.) ó al tipo de familia sesquiterpénica al que pertenezca el producto a transformar. He seguido este último criterio a la hora de clasificar las distintas biotransformaciones de sesquiterpenos encontradas en la bibliografía.

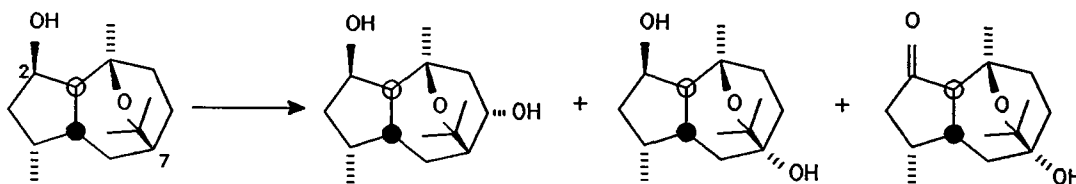
α -santaleno

Prema y Bhattacharyya (1962) estudiaron la bioconversión de este hidrocarburo, llevada a cabo por *Aspergillus niger*. El producto mayoritario obtenido de esta transformación fue el ácido tere-santánico. Además se obtuvieron dos alcoholes: el tere-santalol y un compuesto de fórmula molecular $C_{15}H_{24}O$, no identificado.

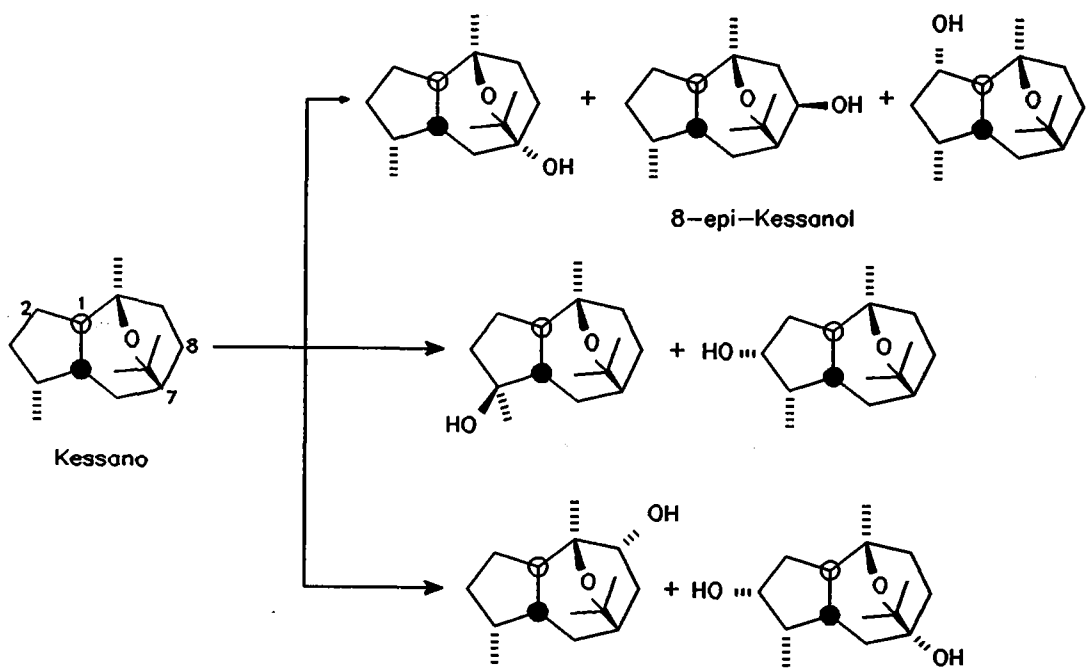


alcohol α -kessílico y kessano

El alcohol α -kessílico y el glicol kessílico son constituyentes de varias especies de valerianas japonesas. Hikino y col. (1968-1) estudiaron la transformación del alcohol α -kessílico, con la intención de conseguir el glicol α -kessílico por hidroxilación enzimática. Con esto intentaban probar que el alcohol era el precursor biogénico del glicol. Se utilizaron cuatro microorganismos: *Cunninghamella blakesleeana*, *Corticium sasakii*, *Corticium centrifugum* y *Streptomyces aureofaciens*. Se obtuvieron como productos mayoritarios, con diferentes rendimientos según el microorganismo utilizado, el glicol kessílico y el 2 β ,7-dihidroxikessano y trazas de un cetol.

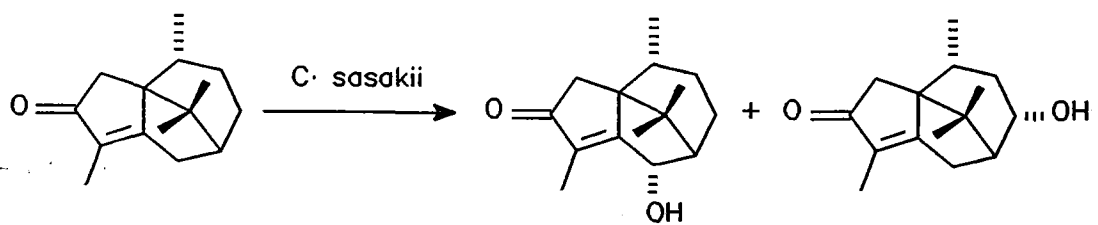


En la naturaleza existen otros dos derivados con esqueleto kessánico, como son el kessanol y el 8-*epi*-kessanol. Probablemente, se originan en las plantas mediante hidroxilación enzimática del kessano. Para comprobar esta hipótesis, se llevó a cabo la transformación del kessano con *Cunninghamella blakesleeana* (Hikino, 1969). Se obtuvieron siete productos, incluyendo el 8-*epi*-kessanol, lo que confirmó la hipótesis biogénica.



cyperotundona

La transformación microbiológica de la cyperotundona con *Corticium sasakii* (Hikino, 1968-2) dió lugar a una gran variedad de metabolitos, de los cuales únicamente fue posible aislar y caracterizar dos: el sugeonol y el isopatchoul-4-en-3-on-8 α -ol.

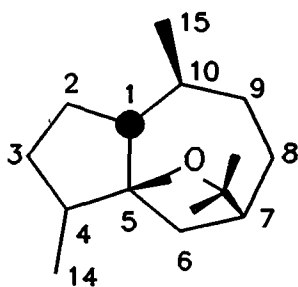


guaióxido y ligulóxido

Para determinar la estructura del guaióxido, Ishii (1968, 1970) estudió su biotransformación con *Mucor parasiticus* (ATCC 6476). La determinación de la estructura de los productos obtenidos en esta transformación, hizo posible el establecer la esteoquímica del guaióxido y por tanto la de su epímero en C-4, el ligulóxido.

Ishii (1971), también estudió la biotransformación del guaióxido con *Streptomyces purpureus*. De la misma se obtuvieron seis derivados monohidroxilados. Entre estos estaba el 9 α -hidroxiguaióxido, que mediante una transformación química se convirtió en bulnesóxido, un epímero del guaióxido en C-10.

También se ha estudiado la transformación microbiológica del ligulóxido con *Mucor parasiticus* (Ishii, 1972) y *Streptomyces purpureus* (Funke, 1970). Todos estos resultados aparecen en la siguiente tabla:



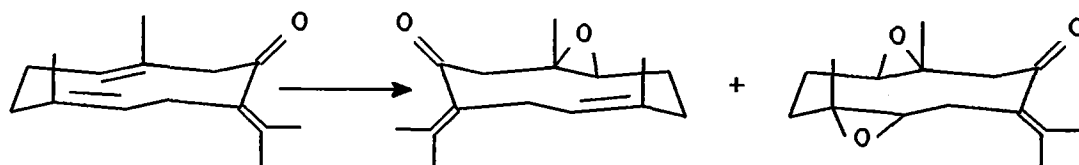
4 β -Me ligulóxido

4 α -Me guaióxido

Sustrato	Microorganismo	Posición de hidroxilación
Guaióxido	<i>Mucor parasiticus</i>	4 α ,8 α -; 8 α -; 4 α -; 7 α -; 6 β -
	<i>Streptomyces purp.</i>	4 α -; 2 α -; 8 β -; 8 α -; 9 α -; 3 α -
Ligulóxido	<i>Mucor parasiticus</i>	8 α -; 9 α -; 8 β -; 3-; 2 β ,7 α -
	<i>Streptomyces purp.</i>	2 α -; 2 β -; 8 α -; 9 β -

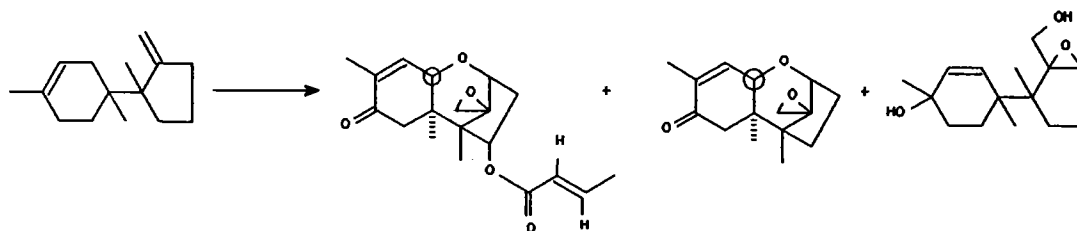
germacrona

De la biotransformación de la germacrona mediante el microorganismo *Cunninghamella blakesleeana*, se obtienen tres productos mayoritarios (Hikino, 1971 y 1977).



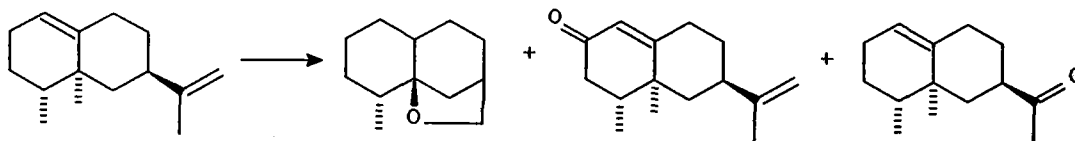
trichodieno

El trichodieno se incubó con *Trichothecium roseum* obteniéndose los siguientes metabolitos: trichothecin, 12,13-epoxitrichothec-9-eno y trichodiol (Machida, 1972-1 y 1972-2); el 12,13-epoxitrichothec-9-eno se obtuvo también con un cultivo de *Fusarium culmorum* (Baldwin, 1987).



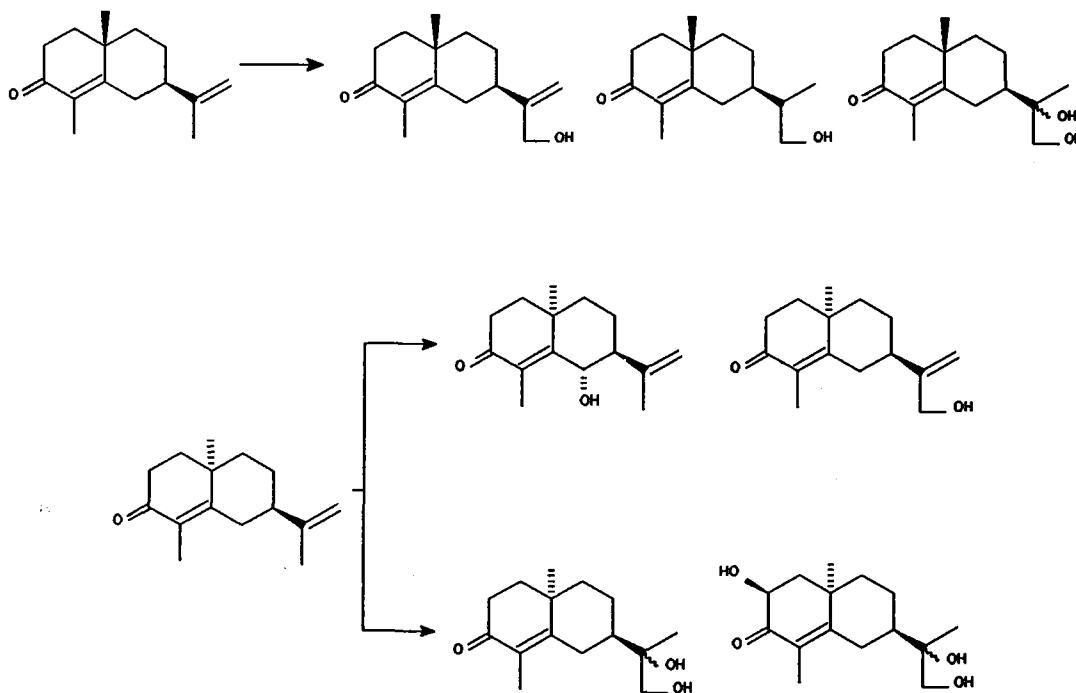
valenceno

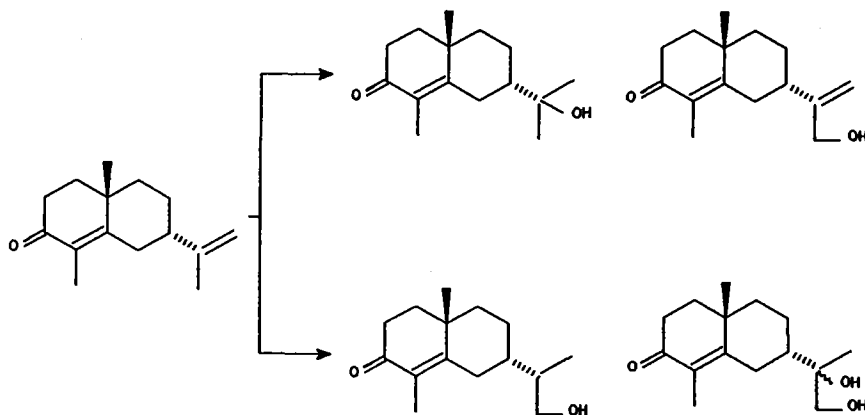
Dhavlikar y col. (1973, 1975) estudiaron la biotransformación del valenceno con dos bacterias del género *Enterobacter*. Se identificaron tres metabolitos monooxigenados (un eter y dos cetonas).



α -cyperona

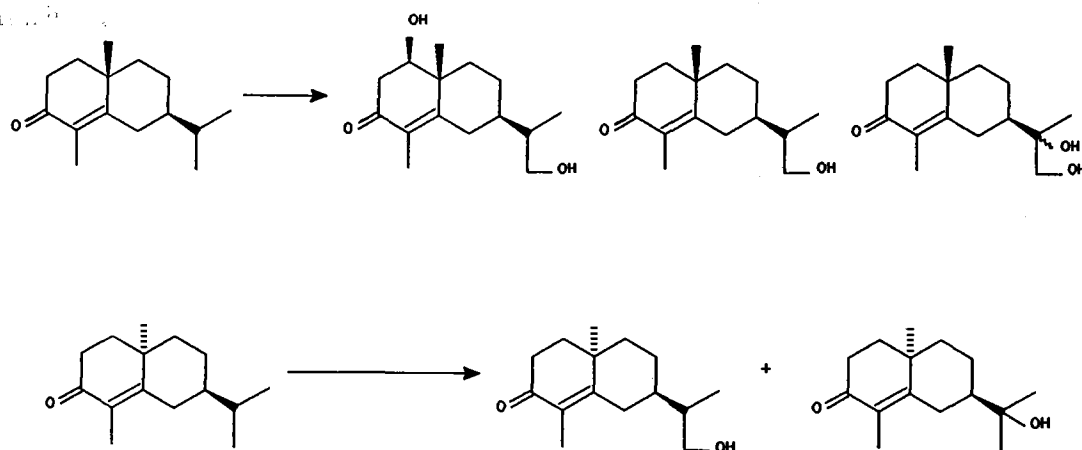
Se ha estudiado la bioconversión de distintos isómeros de la α -cyperona con *Collectotrichum phomoides* con el objeto de investigar las reacciones estereoselectivas en microorganismos (Hikino, 1975).

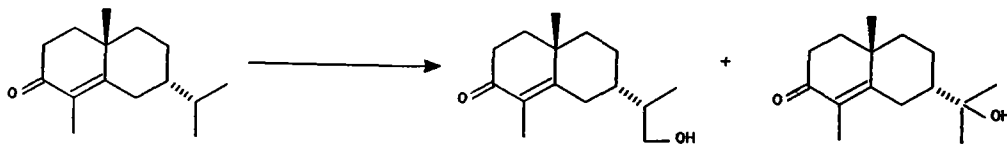




Como se observa en el esquema anterior las transformaciones se producen principalmente en el grupo isopropílico (como son la hidratación hacia un alcohol, la hidroxilación alílica hacia un alcohol alílico y la oxidación hacia un glicol), con diferentes rendimientos. Además en uno de los isómeros ((-)-10-*epi*- α -cyperona) se producen hidroxilaciones sobre C-2 y C-6 respectivamente.

Se prepararon también diversos isómeros de la α -cyperona, obtenidos por hidrogenación del doble enlace terminal del isopropilo, para evitar la actuación del microorganismo en la cadena lateral isopropílica.

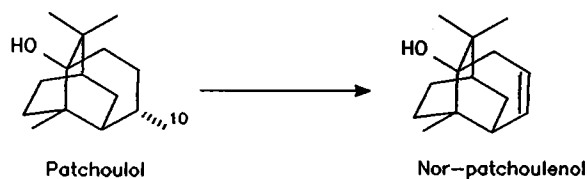




Los resultados mostraron que *C. phomoides* prefiere actuar en la cadena lateral isopropílica incluso en ausencia del doble enlace terminal del isopropilo. Solo en el caso de la (+)-dihidro- α -cyperona se produce una hidroxilación sobre C-1.

patchoulol

El *nor*-patchoulenol es el causante de la fragancia del patchouli, un aceite esencial. El *nor*-patchoulenol se puede obtener a partir del 10-hidroxi-patchoulol por oxidación y subsiguiente descarboxilación.

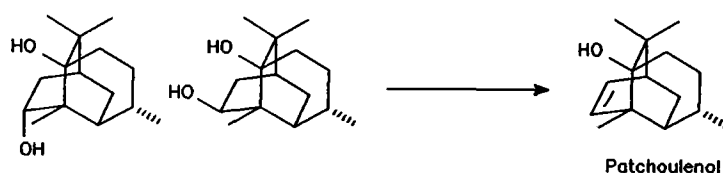


Suhara y col. (1981) investigaron la posibilidad de convertir el patchoulol en 10-hidroxi-patchoulol mediante microorganismos, ya que es prácticamente imposible de obtener por métodos químicos puros. De unos 850 microorganismos ensayados, dos cultivos del género *Pithomyces* llevaron a cabo esta hidroxilación (*Pithomyces chartarum* y *Pithomyces niger*), con un rendimiento de entre un 50 y un 60%.

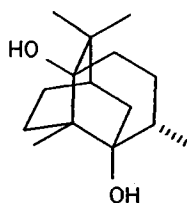
Por otra parte, Fujiwara y col. (1980) hicieron ensayos del mismo tipo, encontrando un cultivo de *Penicillium rubrum* (FX-318) que producía 10-hidroxi-patchoulol

con un 75% de rendimiento, y otro de *Paecilomyces carneus* (FX-101) que lo producía con un 50% de rendimiento.

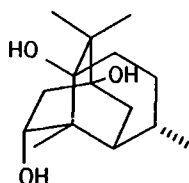
Con otros hongos (*A. clavatus*, *A. ochraceus*, *C. lunata*, *F. lycopersici*, *M. aureocyaneus*) ha sido posible obtener los siguientes dioles (50-55%). Esta mezcla se puede transformar en patchoulenol, un sesquiterpeno con un olor muy parecido al del *nor*-patchoulenol (Becher, 1978; Teisseire, 1980; Becker, 1981).



Con *A. niger*, *C. circinana*, *G. roseum*, *R. niginana* y *M. parasiticus* se puede obtener el siguiente diol (50-86%).

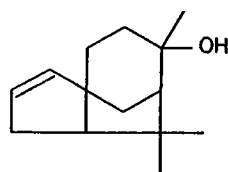


Dependiendo de las condiciones de fermentación usadas, *C. circinana* produce el siguiente triol.



cedrol y α -cedreno

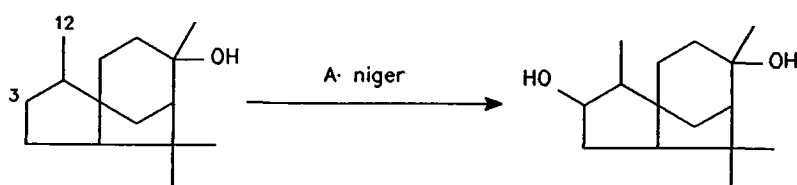
El *nor*-cedrenol es un compuesto aún no aislado, pero del que se sospecha que desempeña el mismo papel en el aceite esencial de la madera de cedro, que el que desempeña el *nor*-patchoulenol en la esencia de patchouli.



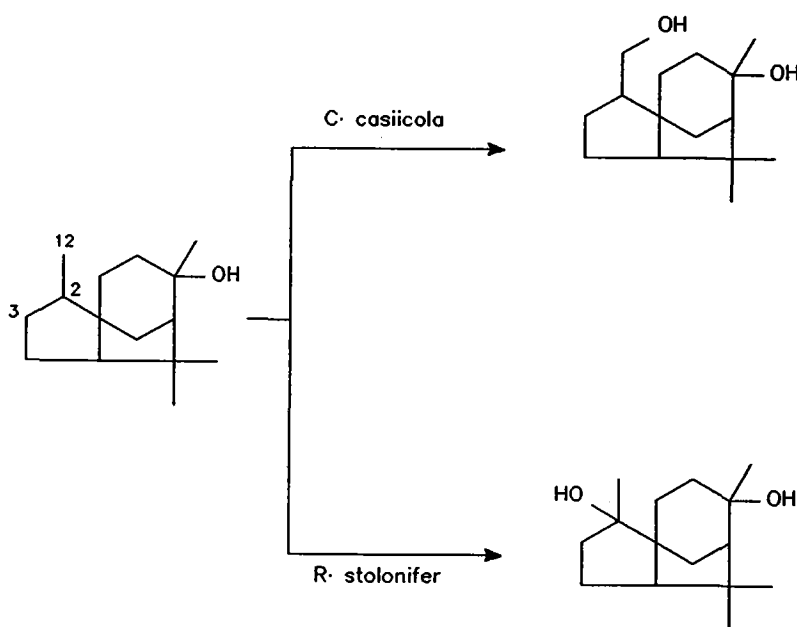
Nor-cedrenol

Han sido diversos los estudios de biotransformación realizados con el cedrol intentando conseguir el 12-hidroxicedrol, aunque no todos han sido igual de fructíferos.

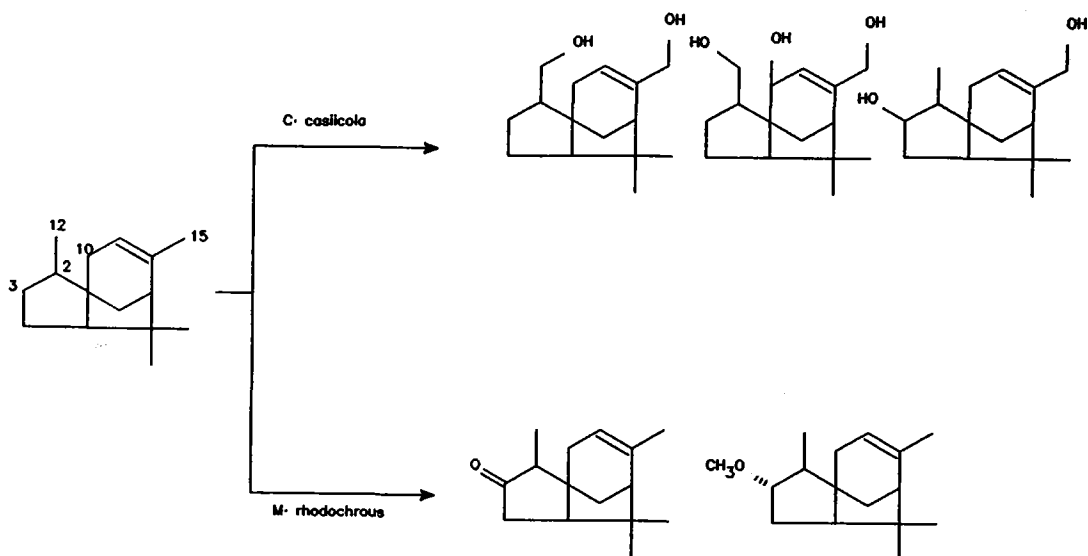
En 1972 Wang estudió el efecto del *Aspergillus niger* (ATCC 9142) sobre el cedrol. Obtuvo tres metabolitos, de los cuales el mayoritario era un producto hidroxilado en C-3.



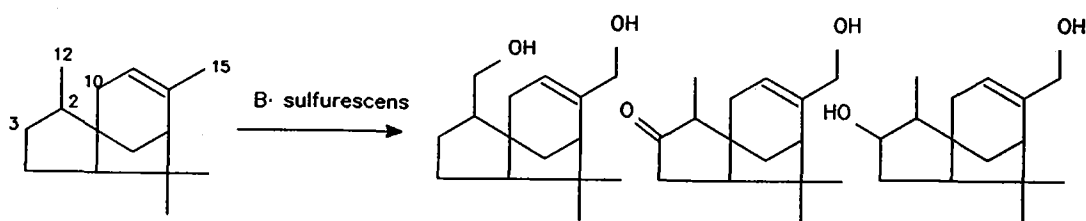
Abraham y col. (1987) también han estudiado la hidroxilación microbiológica del α -cedreno y del cedrol. Seleccionaron cinco cultivos para el estudio de los metabolitos del cedrol, después de un estudio de 47 microorganismos. Estos fueron *Corynespora casiicola* (DSM 62474), *Rhizopus stolonifer* (CBS 38252), *Streptomyces bikiniensis* (IFO 13350), *Verticillium tenerum* (DSM 63545) y *Streptoverticillium reticuli* (DSM 40776). Se obtuvieron ocho dioles y trioles; los productos mayoritarios eran metabolitos hidroxilados en C-12 y C-2 respectivamente.



Sin embargo, las incubaciones con α -cedreno fueron decepcionantes. La biotransformación de este con *C. casiicola* (Abraham, 1987) y *Mycobacterium rhodochrous* (ATCC 999) (Kieslich, 1986) produjo diversos metabolitos, pero en rendimientos muy pequeños.

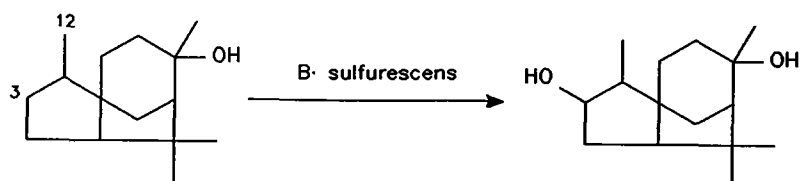


Se han descrito similares resultados por Furtoss y col. (Lamare, 1984) con respecto a la biotransformación del α -cedreno y del cedrol con el hongo *Beauveria sulfurescens* (ATCC 7159). Los resultados obtenidos indican que el α -cedreno se transforma muy lentamente, obteniéndose pequeños rendimientos de los dioles anteriormente descritos.



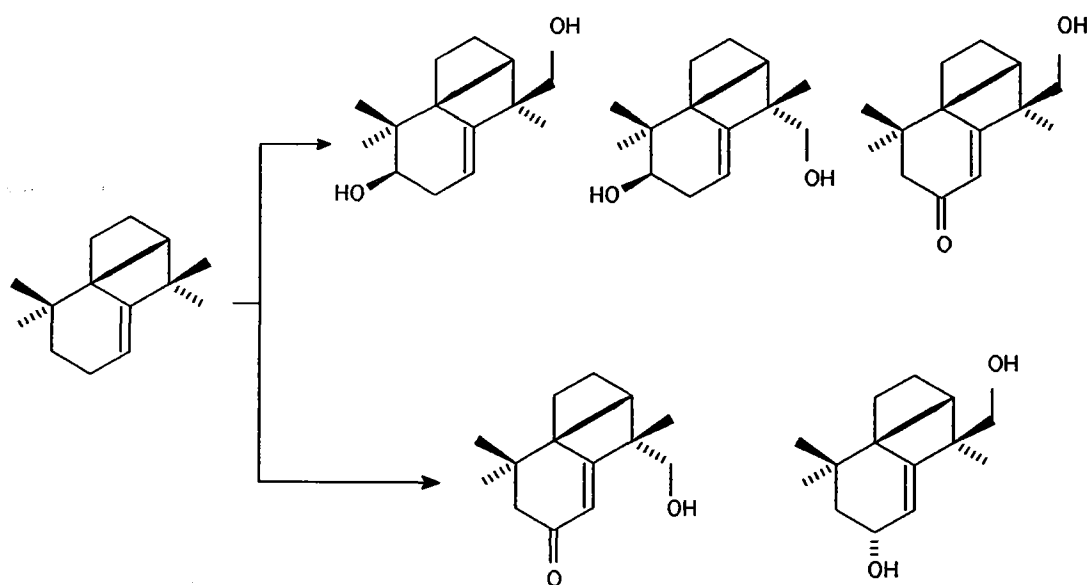
Sin embargo, se observa una distinta regioselectividad en la hidroxilación del cedrol de la descrita por Abraham con otros hongos. El diol mayoritario, obtenido ya por Wang con *A. niger*, es un buen síntón para la síntesis de la 8-hidroxicedren-3-ona, un

producto minoritario del aceite esencial de la madera de cedro de Virginia, que posee propiedades odoríferas.



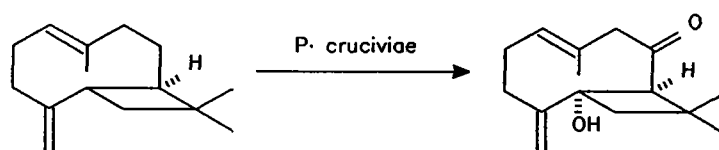
longifoleno e isolongifoleno

Se ha estudiado la bioconversión del longifoleno y del isolongifoleno (producto de transformación del longifoleno en medio ácido) con *C. casicola* (Kieslich, 1984-1). Con este microorganismo el longifoleno no se transforma. Sin embargo, si se obtienen productos de transformación del isolongifoleno con *C. casicola* y otro hongo, *Metarrhizium anisopliae* (IFO 5940).

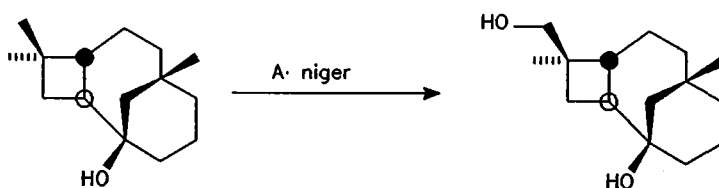


cariofileno, cariolanol, oxido de cariofileno y humuleno

En 1979, Rama Devi realizó la biotransformación del cariofileno con *Pseudomonas cruciviae*. El producto mayoritario se puede observar en el esquema siguiente, aunque se obtuvo con un bajo rendimiento.

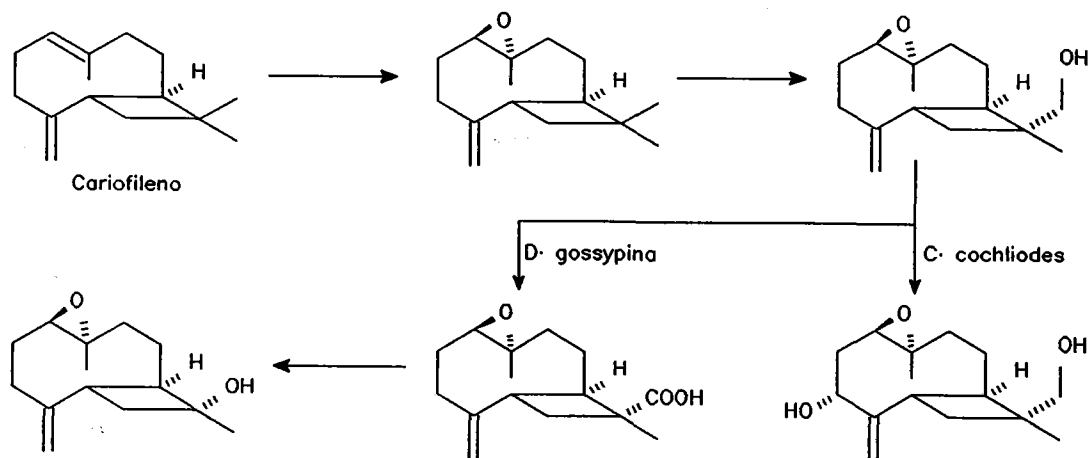


Más reciente, Furtoss y col. (Lamare, 1989) realizaron la oxidación del cariolan-1-ol con el hongo *Aspergillus niger* (MMP 521), obteniendo un 26% de un producto procedente de la hidroxilación regioespecífica del metilo de C-14.

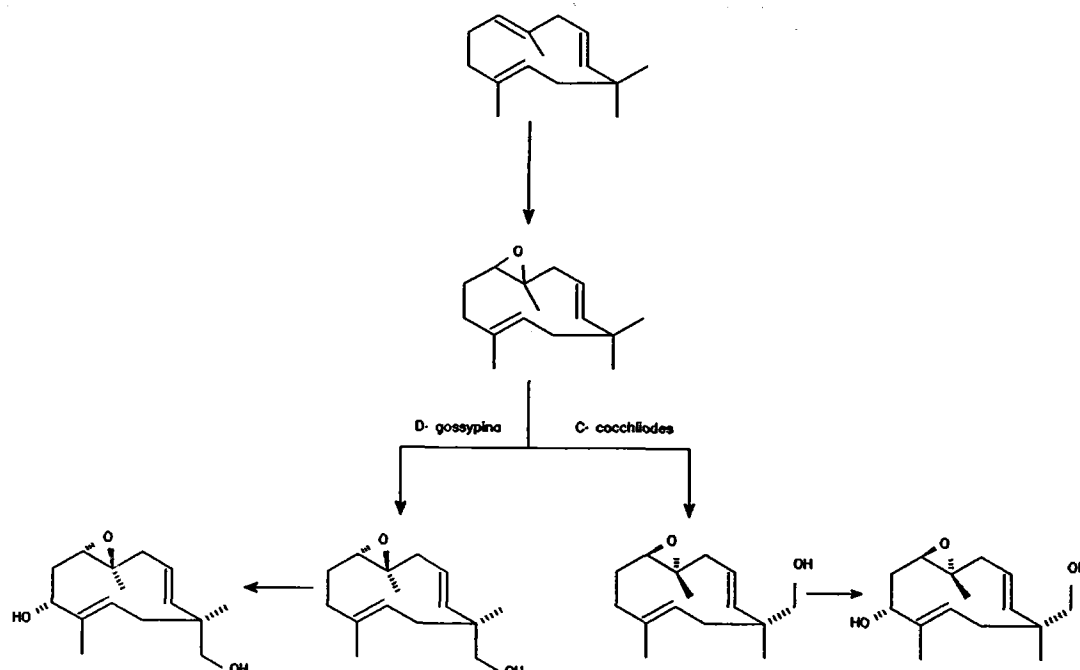


La fermentación de cariofileno con *Diplodia gossypina* (ATCC 10936) produce una serie de metabolitos que derivan del 4,5-epóxido de cariofileno (Abraham, 1985-1 y 1990-1). Los productos principales son el 12-hidroxi-4,5-epoxicariofileno y su correspondiente ácido. Se observa también la presencia de metabolitos procedentes de la epoxidación del grupo exometilénico y posterior degradación. Se encontraron también dos productos reagrupados; el primero resultante del reagrupamiento del epóxido que

condujo a un producto con un anillo de ocho miembros y el otro es un producto de ciclación que posee el esqueleto de los antibióticos como la punctanina. La biotransformación de cariofileno con *Chaetomium cochliodes* (DSM 63353 y ATCC 10195) conduce al 4,5-epoxicariofileno-7,12-diol como producto principal (Abraham, 1985-1 y 1990-2). Aunque la hidroxilación de los grupos metilo geminales no es muy estereoespecífica, al igual que con la *D. gossypina*, el producto principal posee al configuración 11-R. Se producen también reacciones colaterales de contracción de anillo o formación de clovanos, probablemente a través del reagrupamiento del epóxido. El uso de mono- o diepoxicariofileno como sustrato no incrementa significativamente los rendimientos. Cuando se incuba el diepoxicariofileno se obtiene un derivado de la punctanina, similar al que se obtiene en la fermentación del cariofileno con la *D. gossypina*, lo que afirma la presunción de que el cariofileno es el precursor de esta clase de antibióticos.

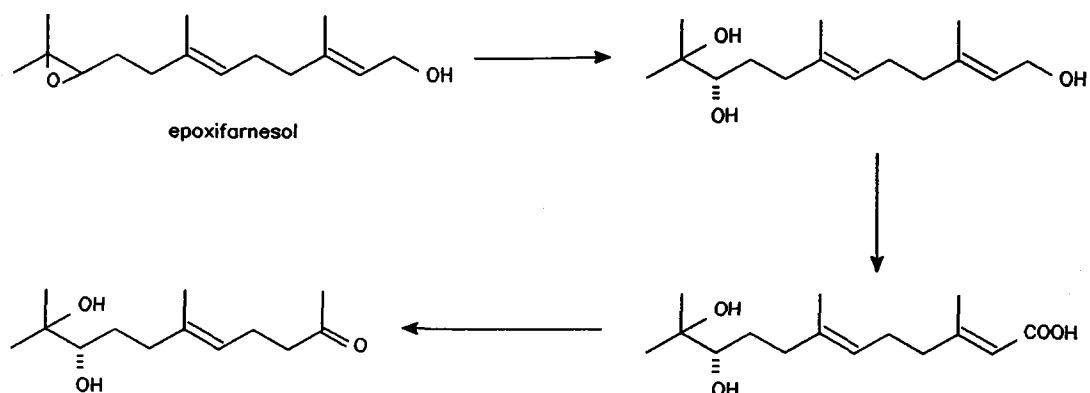


En el caso de la biotransformación del humuleno con *C. cochliodes* y *D. gossypina*, se puede ver que dependiendo del microorganismo usado, se pueden obtener uno u otro monoepóxido (Kieslich, 1986). El producto mayoritario, en ambos casos, es el 1,2-epoxihumuleno-10,13-diol.

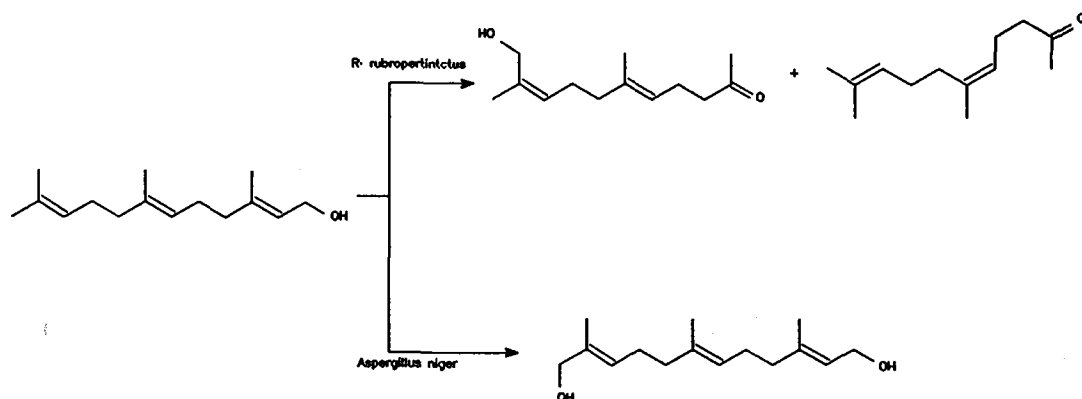


epoxifarnesol, farnesol y *cis*- y *trans*-nerolidol

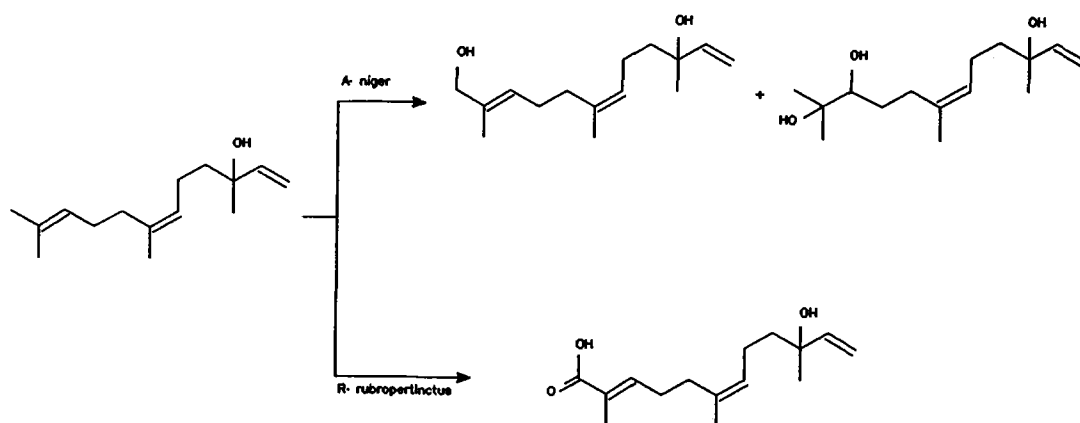
El epoxifarnesol se incubó con cultivos de *Helminthosporium sativum* (Suzuki, 1972) obteniéndose tres metabolitos: el (-)-10,11-dihidroxfarnesol (12.4%), el ácido (-)-10,11-dihidroxfarnésico y la (-)-9,10-dihidroxigeranilacetona (6.6%). Estos resultados llevaron a postular el siguiente mecanismo para esta transformación.



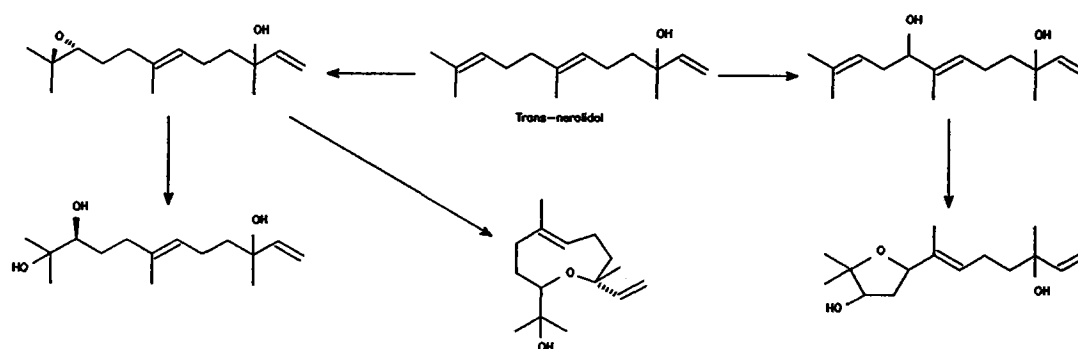
La biotransformación de una mezcla de cuatro isómeros del farnesol con *Rhodococcus rubropertinctus* (DSM 43197) dió dos productos que tenían la cadena carbonada reducida en dos unidades. Bajo idénticas condiciones, con el *Aspergillus niger* se obtuvo un producto monohidroxlado (4.5%) (Arfmann, 1988).



La bioconversión del *cis*-nerolidol con *Aspergillus niger* dió dos productos de hidroxilación, siendo el metabolito mayoritario un triol (44%). *Rhodococcus rubropertinctus* transformó el *cis*-nerolidol en un derivado carboxílico (25%) (Arfmann, 1988).

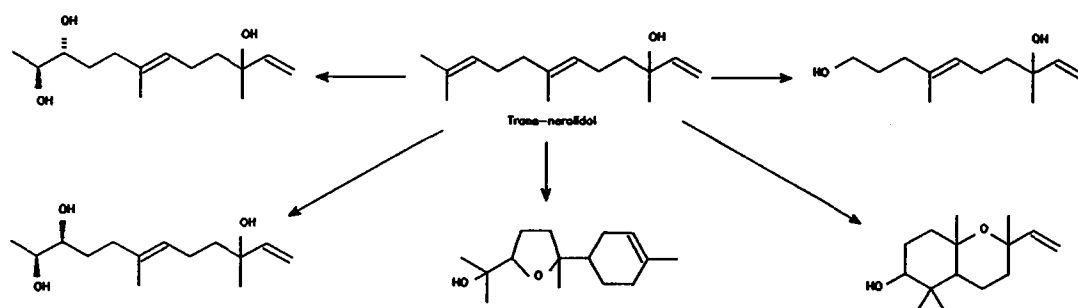


La transformación microbiológica del *trans*-nerolidol ha sido estudiada por Kieslich y col.; de la que se obtienen, dependiendo del microorganismo usado, bien productos de epoxidación o bien productos resultantes de una hidroxilación en posición ω . *Corynespora casiiicola* (DSM 627), *Diplodia gossypina* (ATCC 10936) y *Gibberella cyanea* epoxidan el doble enlace terminal trisustituido (Kieslich, 1984-2; Abraham, 1985-2). El epóxido, bien se cicla intramolecularmente ó se abre dando un diol. Este último se obtiene con un 48% de rendimiento con *D. gossypina* (Stumpf, 1984).

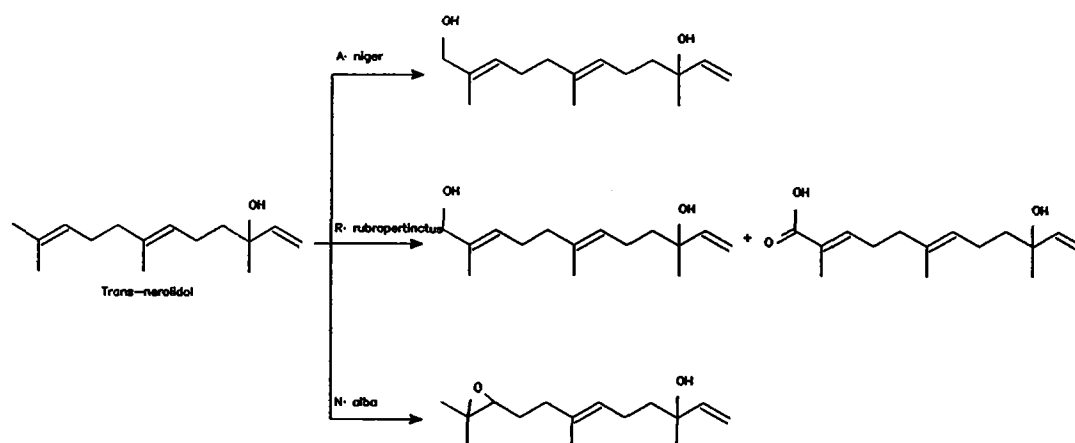


Absidia blakesleeana (ATCC 10148), *Rhizopus arrhizus* (ATCC 11145) y *G. cyanea* producen, en varios pasos, derivados tetrahidrofuránicos.

C. casicola transforma el *trans*-nerolidol, obteniéndose dos glicoles (perdiendo un átomo de carbono) y dos productos de ciclación con anillos de seis miembros.



A. niger produce el 12-hidroxinerolidol como producto mayoritario. *Rhodococcus rubropertinctus* conduce a dos metabolitos, incluyendo un hidroxiácido (45%). *Nocardia alba* (DSM 43130) produce como metabolito mayoritario el 10,11-epoxi-*trans*-nerolidol (26%).

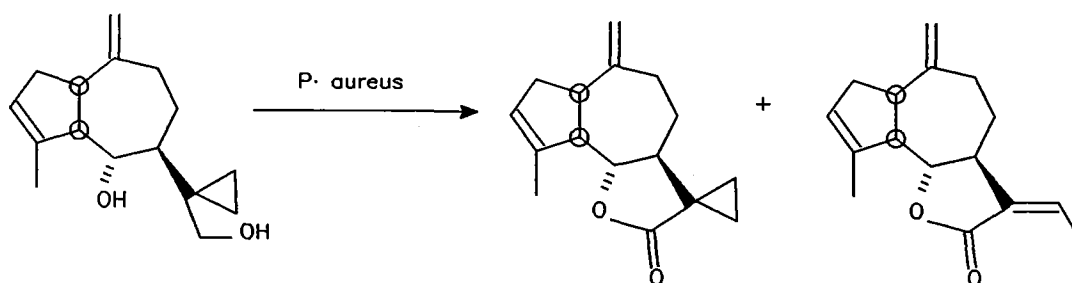


En las incubaciones de *trans*-nerolidol y geranilacetona con *Fusarium solani* (DSM 62416 y 62413) se observaron hidrataciones en el doble enlace principal (Abraham, 1989). Las hidratatas solo actúan en aquellos dobles enlaces con configuración E, no

observándose hidratación en el isopropilo terminal. Las hidratasas difieren en la especificidad por el sustrato. Mientras que la hidratasa del cultivo DSM 62416 solo actúa con el *trans*-nerolidol, ocurre lo contrario con la hidratasa DSM 62413, que solo actúa con la geranilacetona.

guayano-6,12-diol

Se ha estudiado también la biotransformación del guayano-6,12-diol con *Phaseolus aureus*, de la que se obtienen una mezcla de guyanolidos biológicamente activos (Talwar, 1985).

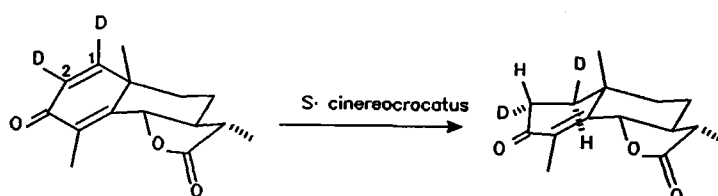


lactonas sesquiterpénicas

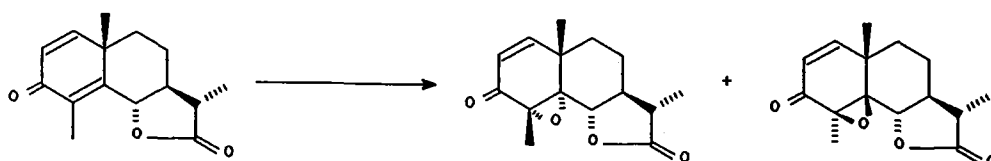
α -santonina

Han sido varios los estudios de biotransformación realizados sobre la α -santonina. La fermentación de α -santonina con *Cunninghamella blakesleeana* y *Streptomyces aureofaciens* condujo a la formación de 1,2-dihidro- α -santonina (Hikino, 1970). Sato y col. (1984) estudiaron la estereoquímica de la hidrogenación

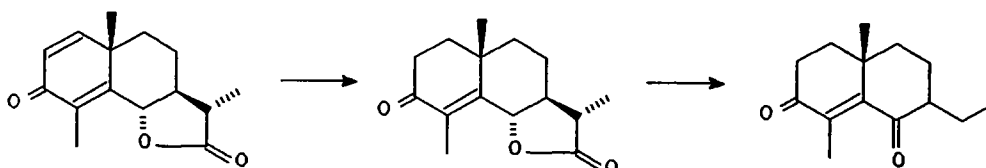
enzimática de la α -santonina con *Streptomyces cinereocrocatus* (NRRL 3443), obteniéndose la (+)-1,2-dihidosantonina. Para ello utilizaron α -santonina 1,2-deuterada. La transformación microbiológica de este sustrato produjo la (+)-(1 β ,2 α -D)-dihidro-(1,2)-santonina (36%). Por tanto, se deduce que la reacción se produce por una adición *trans* de dos átomos de hidrógeno sobre la cara SI del doble enlace 1,2.



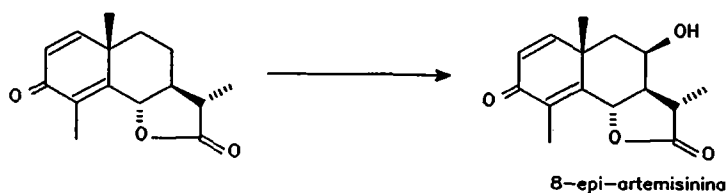
Se ha descrito también la transformación microbiológica de la α -santonina y sus análogos con *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium nivale* y *Fusarium solani* (Fujimoto, 1978). El 4 α -óxido y el 4 β -óxido se transformaron en los correspondientes 1,2-dihidro-3 β -hidroxiderivados.



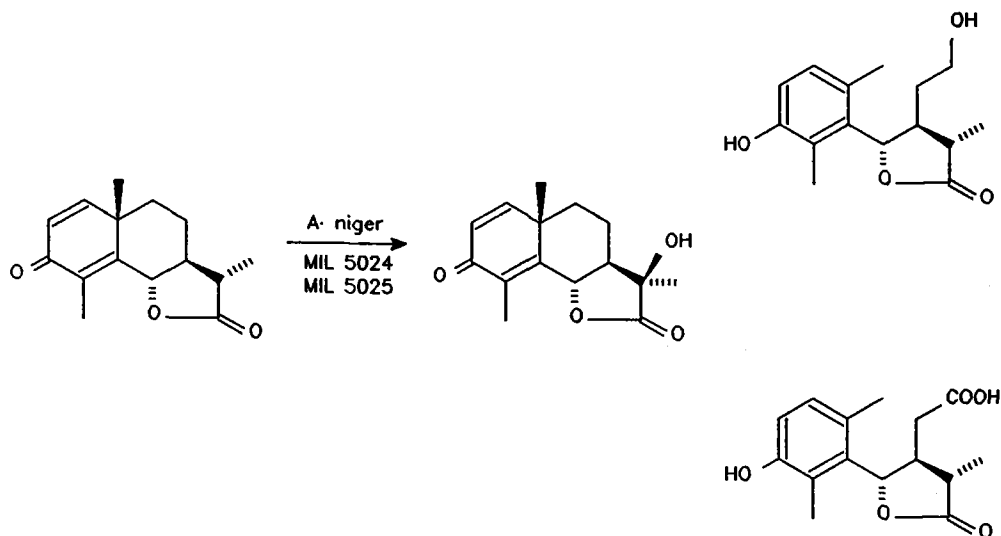
Otro estudio de degradación enzimática de la α -santonina ha sido realizado con un cultivo de *Pseudomonas S* (ATCC 43388), con el que se obtuvo una dicetona (Furtado, 1988).



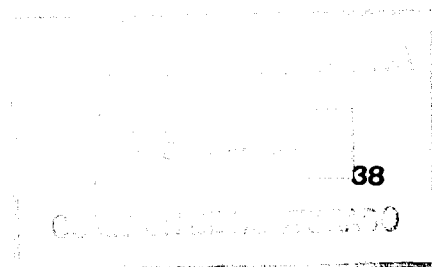
La incubación de la misma con *Aspergillus* (MIL 5024) tuvo como resultado la transformación en 8-epiartemisina (Yamakawa, 1986).

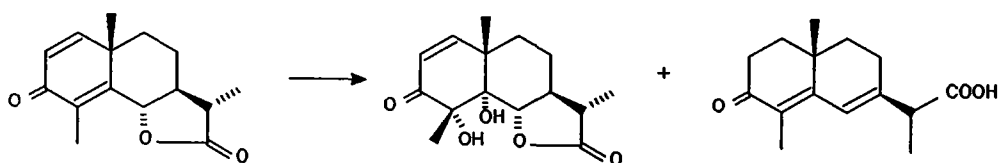


También se ha realizado la transformación microbiológica de la (-)- α -santonina con *Aspergillus niger* (MIL 5024 y 5025) (Iida, 1988), obteniéndose resultados similares con ambas cepas. Los productos obtenidos fueron la 11 β -hidroxi-(-)- α -santonina, el ácido 3,6,9-trihidroxi-9,10-*seco*-selina-1,3,5(10)-trien-12-óico 12,6-lactona y el ácido 3,6-dihidroxi-9,10-*seco*-selina-1,3,5(10)-trien-9,12-dióico 12,6-lactona.

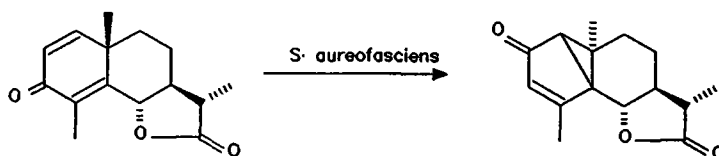


También se ha descrito la incubación de la α -santonina con un cultivo de *P. cichorii* S (Naik, 1988) cuyos resultados se pueden observar en el siguiente esquema:

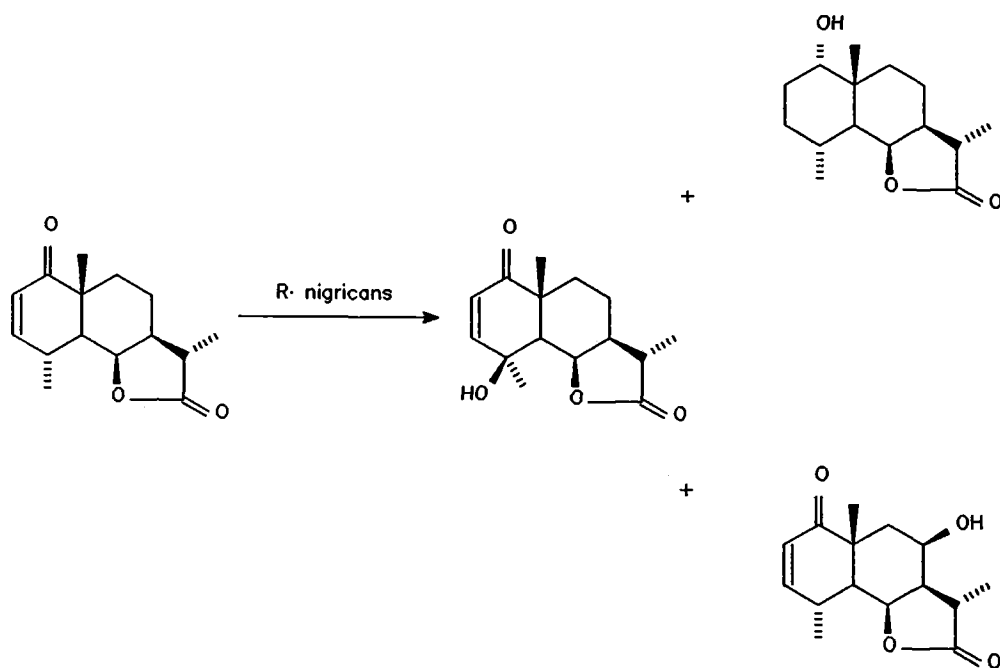




Usando otro cultivo de *Streptomyces aureofasciens* (KCC-S-0624), es posible la transformación de α -santonina en lumisantonina (4%).

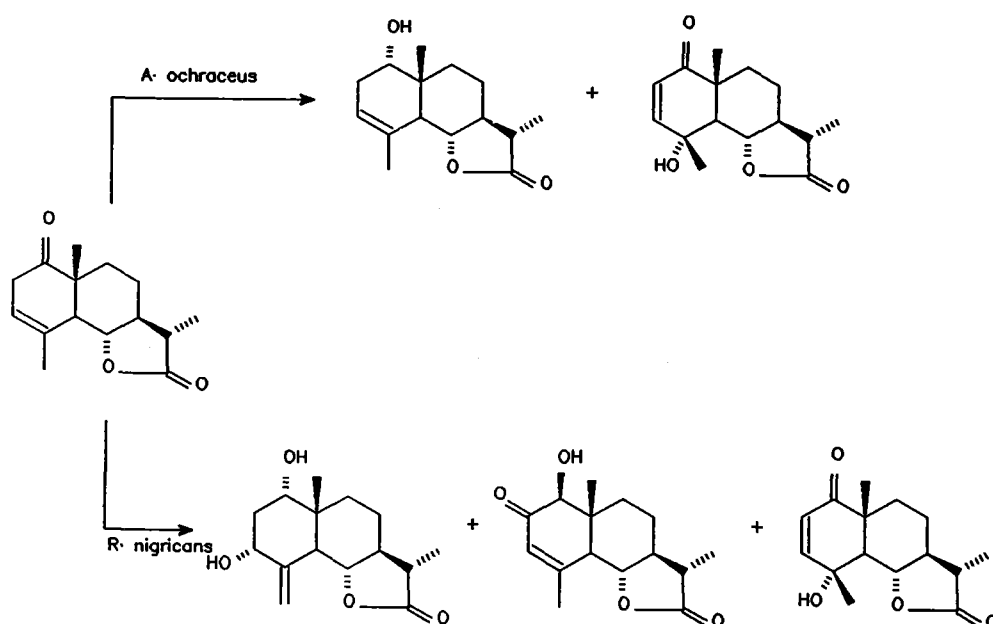


Recientemente, en nuestro laboratorio (Amate, 1990), se ha realizado un estudio de transformación de derivados obtenidos a partir de la α -santonina, cuyos resultados se pueden observar en el siguiente esquema.



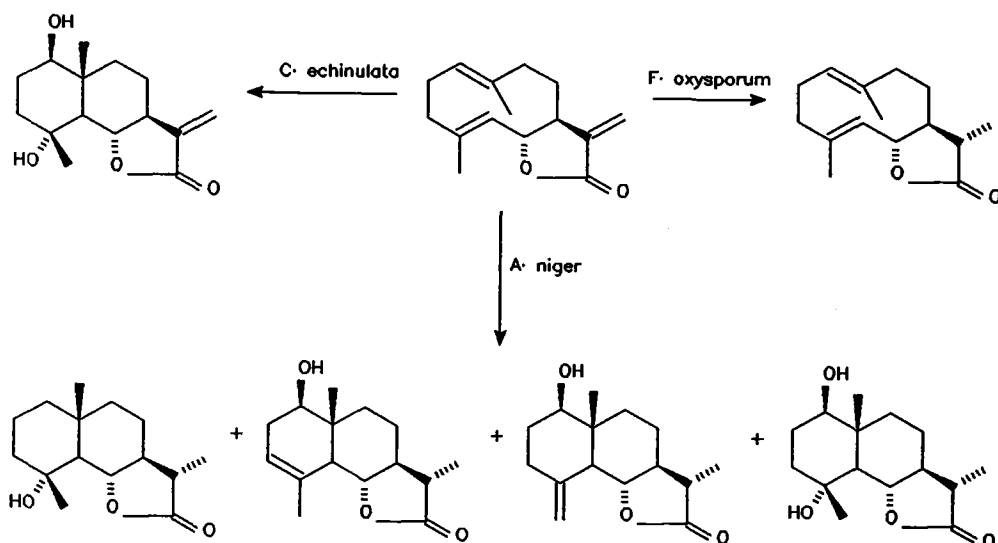
deoxivulgarina

También en nuestro laboratorio, se ha realizado un estudio de biotransformación de lactonas sesquiterpénicas con los microorganismos *Aspergillus ochraceus* (CECT 2069) y *Rhizopus nigricans* (CECT 2072) (Arias, 1987). El sustrato del que se partió fué la deoxivulgarina. Los resultados obtenidos aparecen en el esquema siguiente.



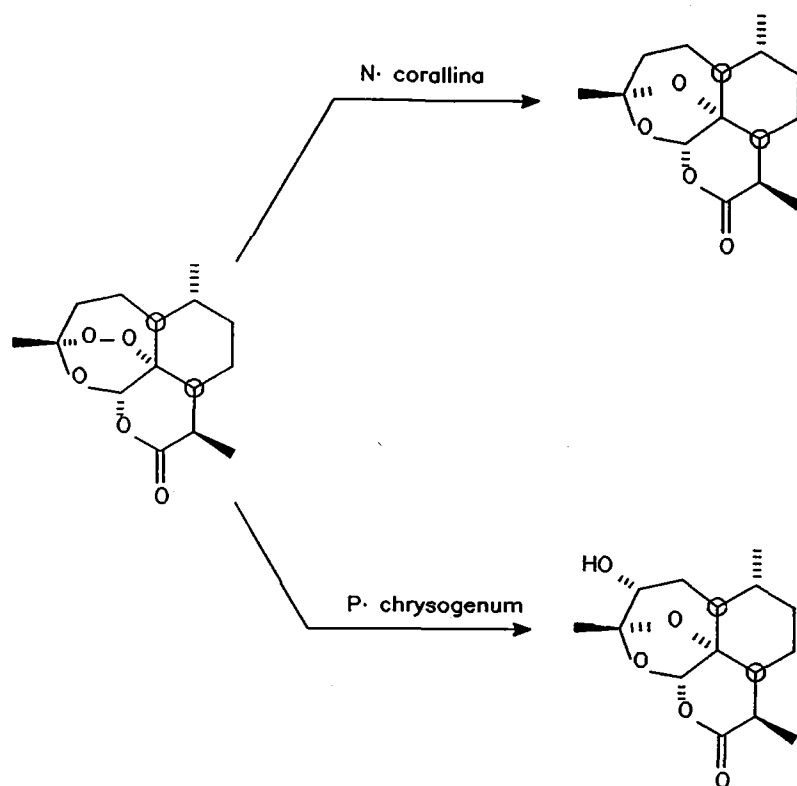
costunolido

Clark (1979) realizó las incubaciones del costunólido con *Cunninghamella echinulata*, *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger*, obteniendo lactonas eudesmánicas. Estos resultados aparecen en el siguiente esquema.



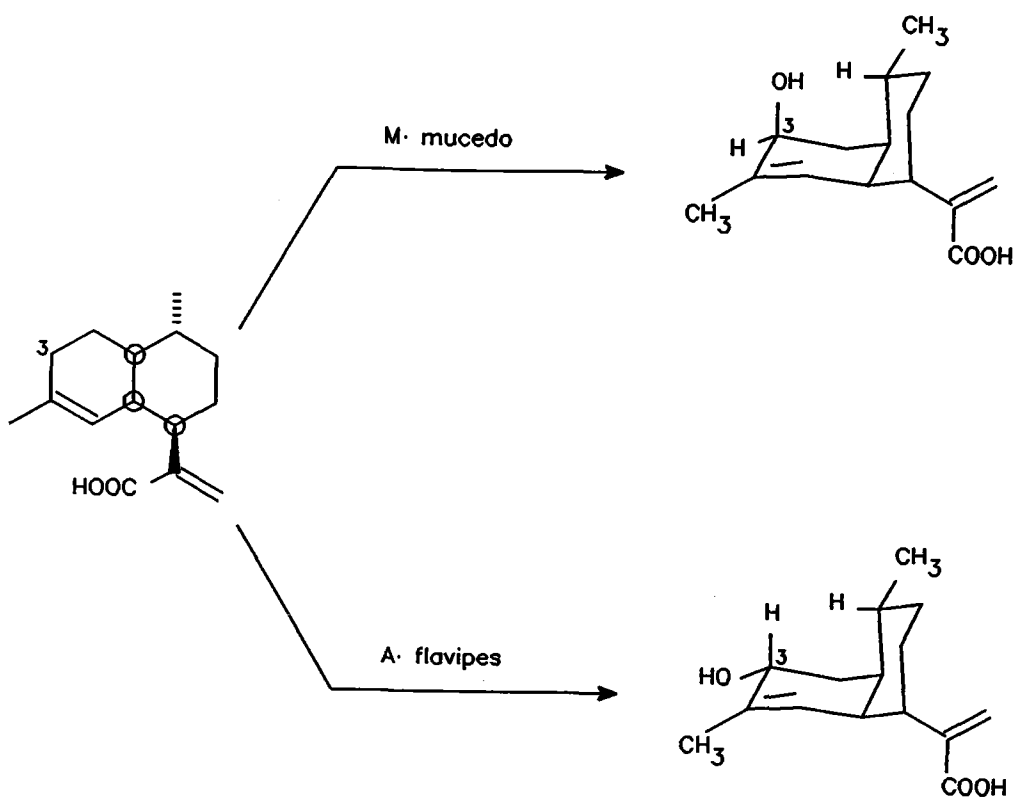
artemisinina

No son muy frecuentes los estudios de transformación microbiológica de sesquiterpenos biológicamente activos. Un caso es el estudio del metabolismo microbiológico de la artemisinina, un antimalárico. Se han realizado una serie de ensayos con diversos microorganismos intentando conocer cuales de ellos eran capaces de metabolizar al sustrato. La *Nocardia corallina* (ATCC 19070) transformó la artemisinina en deoxiartemisinina y el *Penicillium chrysogenum* (ATCC 9480) en 3 α -hidroxideoxiartemisinina (Lee, 1989).



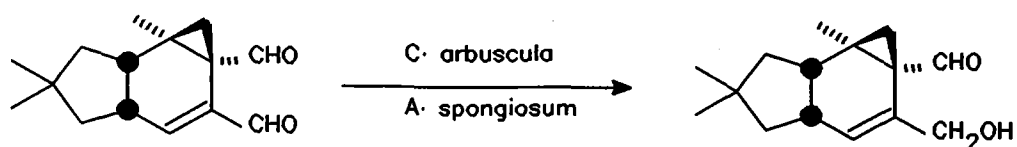
Acido artemisínico

Recientes estudios han sugerido que el ácido artemisínico es un posible precursor biogénico de la artemisinina. Es por lo que Hufford y col. (Elmarakby, 1988) han estudiado la bioconversión de este ácido (mucho más abundante que la artemisinina) con diversos microorganismos, con el objeto de obtener metabolitos similares a los productos intermedios de la ruta biogénica de la artemisinina. Los microorganismos utilizados fueron el *Mucor mucedo* (UI 4605) y el *Aspergillus flavipes* (ATCC 16795). *M. mucedo* convirtió el ácido artemisínico en el ácido 3 β -hidroxiartemisínico y el *A. flavipes* en ácido 3 α -hidroxiartemisínico.



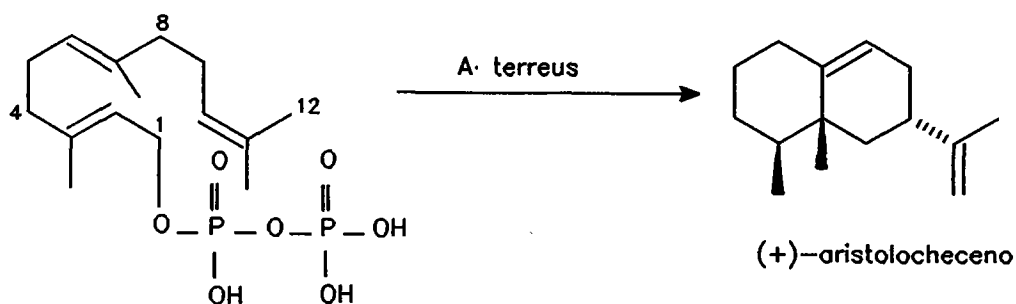
isovalleral

El hongo *Calcarisporium arbuscula*, un parásito de los frutos de las especies de *Russulaceas*, resiste grandes concentraciones del sesquiterpénico antifúngico isovalleral; lo que sugiere que este compuesto se produce enzimáticamente como una respuesta al ataque de parásitos. Esta insensibilidad del hongo frente al sesquiterpeno se cree que es debida a la capacidad del mismo para transformar el isovalleral en su derivado reducido, el isovalleroil. Sterner y col. (Anke, 1988) incubaron isovalleral con *C. arbuscula* obteniendo el antes mencionado isovalleroil en un 35%. Además, se hicieron pruebas con el hongo *Amblyosporium spongiosum*, aunque solo se obtuvo menos de un 10% de isovalleroil, recuperándose un 90% del sustrato inalterado.



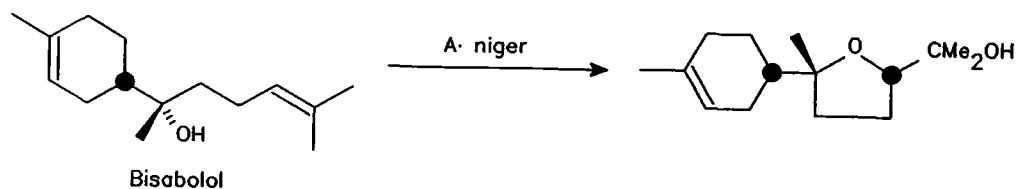
aristolocheceno

Se han llevado a cabo estudios con transformaciones microbiológicas en los que se trata de demostrar la biogénesis de ciertos esqueletos sesquiterpénicos. Se observó que un extracto de células libres de *Aspergillus terreus* catalizaba la ciclación del farnesil pirofosfato (FPP) hacia el sesquiterpeno (+)-aristolocheceno. La ciclación tiene lugar con total inversión de la configuración en C-1 del FPP (Cane, 1989). Nuevos estudios de ciclación microbiológica del FPP, marcado isotópicamente, con *aristolocheceno sintasa* aislada de *Aspergillus terreus* (Cane, 1990), establecieron que el grupo metilo *cis* (C-12) del FPP es el que experimenta la desprotonación en la formación del isopropilo del aristolocheceno. También se demostró por un análisis posterior que el protón H-8 *si* del FPP es el que se pierde en la formación del (+)-aristolocheceno. Estos resultados se explican por una conformación silla-bote del sustrato en el centro activo de la ciclasa.



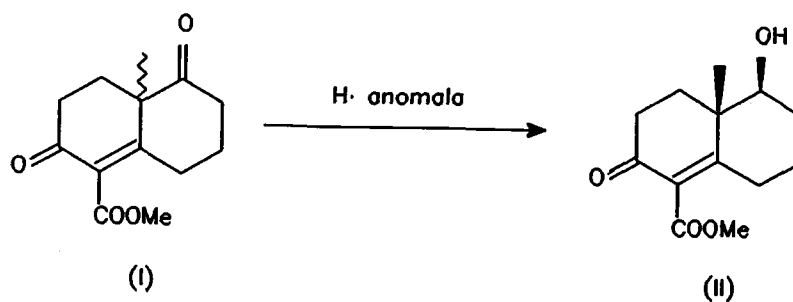
bisabolol

Se ha estudiado la biotransformación del (-)-bisabolol con *Aspergillus niger* (Miyazama, 1990). El metabolito mayoritario posee una estructura que fue establecida como óxido B de (-)-bisabolol.

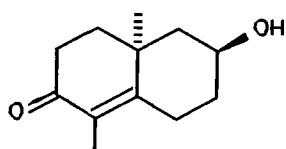


sintones quirales

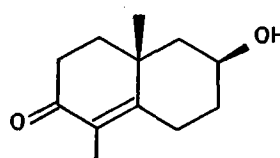
Recientemente, se han utilizado las transformaciones microbiológicas para la obtención de sintones quirales. Se ha llevado a cabo la reducción microbiológica de la 3,8-dioxo-4-metoxicarbonil-9-metil- $\Delta^{4(10)}$ -octalina proquiral (I) con diversos cultivos (Inayama, 1989). Utilizando el microorganismo *Hansenula anomala* se obtiene la (+)-(8S)-hidroxi-4-metoxicarbonil-(9S)-metil-3-oxo- $\Delta^{4(10)}$ -octalina (II), con una pureza óptica superior al 99%. Este es un sintón quiral muy útil para la síntesis total de ciertos sesquiterpenoides, como por ejemplo el α -costal.



Asimismo, se prepararon la 4,(9S)- (III) y la 4,(9R)-dimetil-(8S)-hidroxi-3-oxo- $\Delta^{4(10)}$ -octalina (IV) con alta pureza óptica ($> 99\%$ ee), con moderados rendimientos, por reducción asimétrica de la correspondiente dicetona racémica, utilizando cultivos de microorganismos (Shimizu, 1989). Estos compuestos se utilizan para la síntesis total de sesquiterpenos oxigenados en C-8 tales como la (-)-artemisina, (-)-yomogina, (-)-3-oxodiplofillina, β -elemenona, (+)-isotelekina, (+)-cuahtemona y 4-epi-aubergenona.



(III)



(IV)

Como se puede observar, las transformaciones microbiológicas nos permiten el acceso a productos valiosos en el campo de la perfumería, a productos con actividad biológica que tienen su aplicación en la industria farmacéutica, nos permite también llegar a conocer mejor las rutas biogénicas de diversos productos, e incluso su estructura en algunos casos y la realización de procesos importantes dentro de la síntesis orgánica.

PARTE TEORICA

1. AISLAMIENTO Y DETERMINACION DE ESTRUCTURAS DE TERPENOS DE LA SIDERITIS VAROI SUBESPECIE CUATRECASASII.

El estudio fitoquímico de la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii* reveló que se trataba de una planta que poseía tanto esqueletos sesquiterpénicos como diterpénicos (García-Granados, 1985-1).

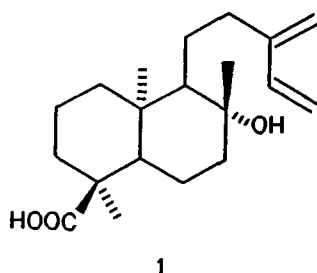
Se ha realizado el aislamiento de los compuestos terpénicos mayoritarios de esta planta, con el objeto de llevar a cabo un estudio de biotransformación de los mismos con diversos microorganismos.

Del estudio de la fracción ácida del extracto terpénico se aisló un único producto.

Acido *ent*-8 α -hidroxilabda-13(16),14-dien-18-óico (1)

El producto 1 aislado de la fracción ácida presenta absorción en UV (max. 227 nm) y en su espectro de IR aparecen bandas de grupo carboxilo (3000-2500 y 1720 cm^{-1}). En su espectro de ^1H RMN se aprecia un sistema vinílico $\text{A}_2\text{B}_2\text{X}$ similar al observado en los derivados labda-13(16),14-diénicos y dos señales de metilos singletes (δ 1.15 (6H) y 0.85 (3H)). En su espectro de ^{13}C RMN puede observarse la existencia del grupo carboxilo (δ 184.17) y una señal debida a carbono oxigenado totalmente sustituido a 74.77 ppm, además de las señales producidas por los carbonos del sistema diénico (δ 147.36, 138.84, 115.79 y 113.60). Todos estos datos coinciden con los del ácido *ent*-8 α -

hidroxilabda-13(16),14-dien-18-óico (ácido 6-desoxiandalusoico), un producto aislado en nuestro laboratorio (García-Granados, 1985-3).



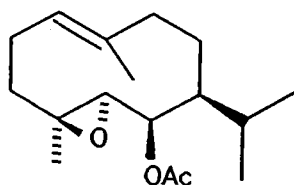
La fracción neutra del extracto terpenico de esta planta se cromatografió en columna aislandose varios grupos de productos que se vuelven a someter a nuevos procesos cromatográficos.

De la fracción más apolar se aislaron cinco productos, cuya descripción se comenta seguidamente.

6 β -acetoxi-4 β ,5 α -epoxi-*trans*-germacr-1(10)-eno (2)

El primer compuesto sesquiterpénico aislado (2), muestra un pico molecular a 280 u.m.a., acorde con una formula molecular $C_{17}H_{28}O_3$. Su espectro de infrarrojo presenta absorciones debidas a grupos acetoxilo (1745 y 1230 cm^{-1}) y a doble enlace (3110 cm^{-1}). En su espectro de ^1H RMN aparece una señal a δ 5.27 (1H, m, $w_{1/2} = 18\text{ Hz}$) atribuible a un protón vinílico; a δ 4.96 (1H, dd, $J_1 = 8$, $J_2 = 1.5\text{ Hz}$) aparece una señal de protón geminal a grupo acetoxilo; a δ 2.64 (1H) se encuentra un doblete, debido a un protón geminal a función oxigenada, acoplado con el protón anteriormente descrito;

a δ 2.05 (3H, s) aparece una señal correspondiente a grupo acetoxilo; además aparecen señales de metilo alílico (δ 1.66) y de metilo geminal a función oxigenada (δ 1.25, 3H, s). Por último aparecen señales de metilo doblete a δ 0.95 y 0.90. La comparación de estos datos con los publicados para el 6 β -acetoxi-4 β ,5 α -epoxi-*trans*-germacr-1(10)-eno (García-Granados, 1986-2), muestra que se trata del mismo producto.

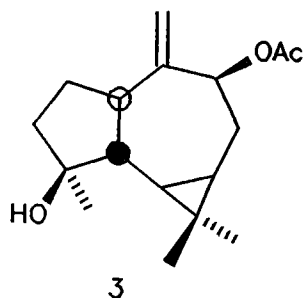


2

9 β -acetoxi-4 β -hidroxiaromadendreno (3)

El segundo producto aislado (3) tiene un peso molecular de 278 u.m.a., compatible con una fórmula molecular $C_{17}H_{26}O_3$. En su espectro de IR aparecen bandas de hidroxilo (3454 cm^{-1}), doble enlace exocíclico (3102 , 1639 y 900 cm^{-1}) y acetoxilo (1735 y 1244 cm^{-1}). En su espectro de ^1H RMN se confirma la existencia de tales funciones; a δ 5.09 aparece la señal de un protón geminal a grupo acetoxilo (dd, $J_1 = 11.2$, $J_2 = 0.5\text{ Hz}$); a δ 4.88 y 4.81 aparecen dos singletes (1H cada uno) debidos a los protones de un grupo exometilénico. También pueden observarse la señal del grupo acetoxilo a δ 2.09 y tres señales de metilos singletes (δ 1.26, 1.05 y 1.01), uno de ellos geminal a grupo hidroxilo. Otras señales presentes son las que aparecen a δ 0.81 (1H, ddd, $J_1 = 11.4$, $J_2 = 9.4$, $J_3 = 6.4\text{ Hz}$) y a δ 0.49 (1H, dd, $J_1 = 11.3$, $J_2 = 9.4\text{ Hz}$) y que dado su pequeño desplazamiento químico pueden ser debidas a los protones de un anillo de ciclopropano.

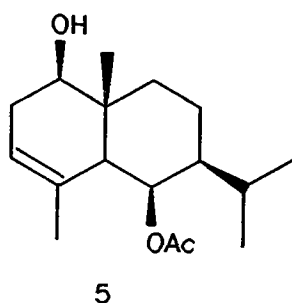
El estudio del espectro de ^{13}C RMN del producto 3 nos confirma la existencia del doble enlace exocíclico: carbono cuaternario a δ 150.81 y carbono metilénico a δ 103.01. También se observa la existencia de dos carbonos oxigenados, uno de ellos terciario (δ 80.87) y otro secundario (δ 75.75) así como la presencia de cuatro carbonos metínicos, uno cuaternario y tres carbonos metilénicos. Teniendo en cuenta estos datos, puede pensarse en un esqueleto de aromadendreno para este producto, con un grupo hidroxilo sobre C-4 y dada la forma de la señal del protón geminal a grupo acetoxilo, éste sólo podrá estar en C-3 ó C-9. Dado que la saponificación del producto 3 origina un producto (4) totalmente idéntico al 4 β ,9 β -dihidroxi-aromadendreno, previamente aislado en nuestro laboratorio (García-Granados, 1989), podemos afirmar que el producto 3 se trata del 9 β -acetoxi-4 β -hidroxiaromadendreno, un nuevo acetato sesquiterpénico natural.



6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-3-eno (5)

El tercer producto aislado (5) posee un pico molecular a 280 u.m.a., compatible con una fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3$, presentando absorciones en infrarrojo debidas a grupos hidroxilo, acetoxilo y doble enlace. En su espectro de ^1H RMN aparece una señal a δ 5.58 (1H, sa) debida a un protón geminal a acetato; a δ 5.32 aparece un multiplete (1H, $w_{1/2} = 8$ Hz) que corresponde a un protón vinílico; a δ 3.46 aparece un

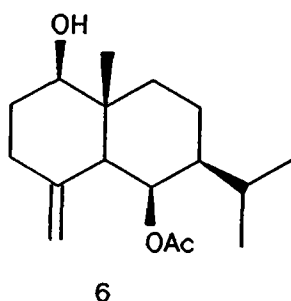
doble doblete (1H, $J_1 = 11$, $J_2 = 4$ Hz) debido a un protón axial geminal a grupo hidroxilo; a δ 2.00 existe un singlete correspondiente a un grupo acetoxilo y a δ 1.63 una señal de metilo alílico; por último encontramos una de metilo singlete a δ 0.96 y dos señales de metilo doblete a δ 0.98 y 0.86 respectivamente ($J = 6.5$ Hz). El comportamiento espectroscópico de este producto sugiere una estructura de 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-3-eno, lo que se confirma comparando sus datos con los de una muestra auténtica (García-Granados, 1985-1).



6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-4(15)-eno (6)

Otro producto aislado (6) posee una polaridad análoga a la del producto 5, presentando un pico molecular de 280 u.m.a. compatible con la fórmula molecular $C_{17}H_{28}O_3$. En su espectro de infrarrojo se observan bandas debidas a grupos hidroxilo, acetoxilo y doble enlace exocíclico. En su espectro de 1H RMN se confirma la existencia de grupo acetoxilo (δ 2.01) situado sobre un carbono secundario (δ 5.57, 1H, sa, protón geminal a acetato) y también la presencia de un grupo exometilénico (δ 4.74 y 4.59, 1H cada uno, s); a δ 3.31 existe una señal atribuible a un protón geminal a grupo hidroxilo ecuatorial (1H, dd, $J_1 = 11$, $J_2 = 4$ Hz); también aparecen una señal de metilo singlete (δ 0.88) y dos señales de metilo doblete (δ 0.96 y 0.84 respectivamente, $J = 6.5$ Hz). Estos

datos concuerdan con los de una muestra auténtica de 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-4(15)-eno (García-Granados, 1985-1).



ent-3 β -hidroxi-13-*epi*-óxido de manoilo (7)

El último producto aislado de esta fracción presenta una fórmula molecular de C₂₀H₃₄O₂. En su espectro de IR se aprecian bandas de grupo hidroxilo (3450 cm⁻¹) y doble enlace (3090, 1632 y 910 cm⁻¹). En su espectro de ¹H RMN puede apreciarse la existencia de cinco singletes debidos a cinco grupos metilo (δ 1.20, 1.11, 0.96, 0.73 y 0.71) y un sistema ABX característico del esqueleto de óxido de manoilo. Además aparece una señal debida a un protón axial geminal a un hidroxilo secundario a 3.20 ppm (dd, J₁ = 11.3, J₂ = 4.6 Hz) y que podría ser debida a un protón sobre C-3. Según estos datos, el producto 7 podría tratarse del *ent*-3 β -hidroxi-13-*epi*-óxido de manoilo (ribenol), lo que confirmamos comparando sus datos con los publicados para este producto (Algarra, 1983).

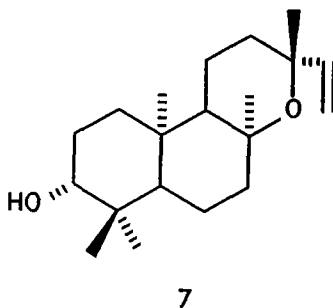


Tabla 1. Datos de ^{13}C RMN de los diterpenos aislados de la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii*.

C	1	7	10	11
1	38.37	37.66	37.47	39.63
2	17.47	27.34	27.23	17.84
3	36.88	78.92	78.95	38.22
4	47.25	38.89	38.90	38.26
5	50.24	55.30	55.52	56.61
6	23.28	19.57	19.65	67.71
7	43.86	43.04	42.78	53.27
8	74.77	75.83	76.13	73.59
9	61.64	58.31	49.69	60.98
10	38.80	36.60	36.17	39.24
11	24.44	16.04	23.83	24.54
12	34.99	34.81	69.13	34.82
13	147.36	73.47	75.74	147.19
14	138.84	147.60	147.19	138.80
15	115.79	109.63	110.83	115.94
16	113.60	32.73	27.04	113.69
17	23.89	23.87	24.32	25.34
18	184.17	28.02	28.01	74.60
19	16.16	15.21	15.27	17.94
20	15.87	15.93	15.95	16.94

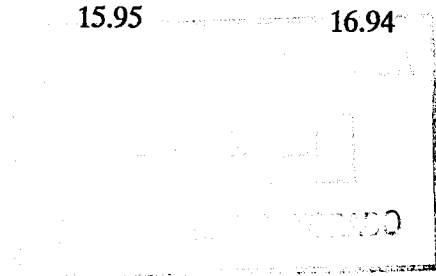


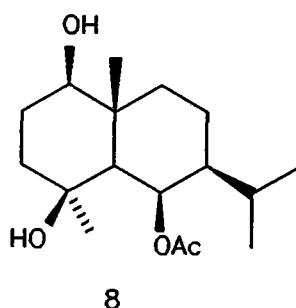
Tabla 2. Datos de ^{13}C RMN de los sesquiterpenos aislados de la fracción más apolar de la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii*.

C	2	3	5	6
1	123.59	50.43	76.81	79.96
2	22.97	26.38	32.14	30.63
3	37.17	41.95	121.33	34.49
4	59.60	80.87	133.49	145.15
5	66.06	54.44	50.77	51.66
6	74.13	29.93	71.23	71.14
7	45.97	23.50	49.16	50.12
8	26.61	31.99	20.42	21.82
9	38.25	75.75	35.56	37.35
10	136.75	150.81	37.86	40.32
11	31.43	20.39	28.74	28.10
12	20.66	16.25	20.68	20.39
13	20.66	28.50	20.22	20.39
14	16.45	103.01	11.90	12.79
15	18.61	26.03	22.03	108.48
<u>MeCOO</u>	20.98	21.31	21.46	21.83
<u>MeCOO</u>	170.00	169.85	170.18	170.69

De la fracción más polar se aislaron cuatro productos que comentaré seguidamente.

6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroieudesmano (8)

El primer producto (8), de esta fracción presenta absorciones en infrarrojo debidas a grupos hidroxilo (3450 cm^{-1}) y acetoxilo ($1730, 1250\text{ cm}^{-1}$). El espectro de ^1H RMN confirma tanto la presencia de grupo acetoxilo axial sobre C-6 (δ 2.00, 3H, s; y δ 5.65, 1H, sa), como la presencia de un grupo hidroxilo ecuatorial situado en C-1 (δ 3.12, dd, $J_1 = 11, J_2 = 4\text{ Hz}$, protón geminal a hidroxilo), por comparación con los espectros de ^1H RMN de los productos 5 y 6, anteriormente descritos. Aparecen además señales de metilos singletes a δ 1.32 y 1.23 respectivamente y de metilos dobles a δ 0.89 y 0.85 ($J = 6.5\text{ Hz}$). La comparación de los datos espectroscópicos de este producto con los de una muestra autentica del 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroieudesmano (García-Granados, 1985-1), demuestra que ambos son el mismo producto.



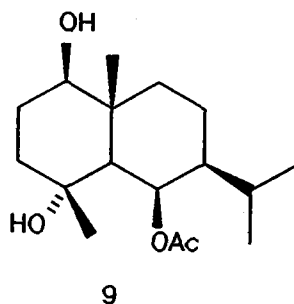
6 β -acetoxi-1 β ,4 α -dihidroieudesmano (9)

El segundo producto aislado de esta fracción más polar (9), posee la misma

Tabla 3. Datos de ^{13}C RMN de los sesquiterpenos aislados de la fracción más polar de la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii*.

C	8	9
1	80.43	80.25
2	26.72	28.52
3	40.82	41.34
4	71.79	71.10
5	52.94	55.08
6	70.41	69.70
7	49.56	49.55
8	20.86	20.59
9	39.56	41.45
10	39.43	39.08
11	29.72	28.75
12	21.24	21.24
13	20.51	20.59
14	13.52	14.67
15	28.81	24.56
<u>MeCOO</u>	21.69	21.76
<u>MeCOO</u>	171.32	172.28

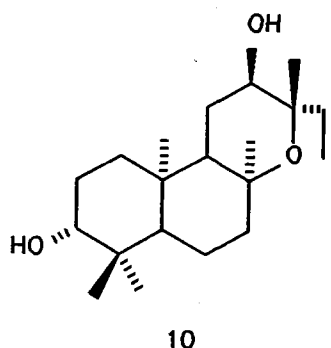
fórmula molecular y las mismas absorciones en infrarrojo que el producto anteriormente descrito (8). El espectro de ^1H RMN de este producto es similar al del producto 8: señal de grupo acetoxilo (δ 2.00) axial sobre C-6 (δ 5.74, sa, protón geminal a acetato); también aparece una señal de protón axial geminal a hidroxilo en C-1 (δ 3.28, dd, $J_1 = 12$, $J_2 = 6$ Hz) y señales de grupos metilos singletes (δ 1.21 y 1.11 respectivamente) y grupos metilos dobles (δ 0.89 y 0.88, 3H cada uno, $J = 6.5$ Hz). Estos datos sugieren que dicho producto podría tratarse del epímero del producto 8 en el carbono 4; lo que se confirma por comparación con los datos publicados para el 6β -acetoxi- $1\beta,4\alpha$ -dihidroxi-eudesmano (García-Granados, 1986-1).



ent-3 β ,12 α -dihidroxi-13-epi-óxido de manoilo (10)

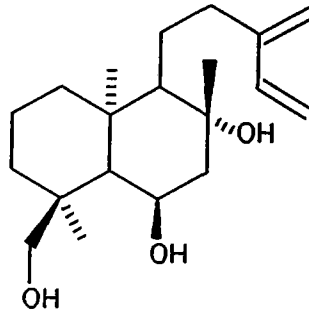
El siguiente producto aislado (10) posee una fórmula molecular de $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$. Su espectro de IR muestra bandas de hidroxilo y doble enlace. El estudio del espectro de ^1H RMN revela la existencia de cinco señales singletes, correspondientes a otros tantos metilos y la de un sistema ABX característico de los óxidos de manoilo. Aparece además una señal a δ 4.04 (1H, dd, $J_1 = J_2 = 3.4$ Hz) que corresponde a un protón ecuatorial geminal a un grupo hidroxilo y que puede ser debida a un protón sobre C-12. Se observa también la presencia de una señal a δ 3.18 (1H, dd, $J_1 = 11.3$, $J_2 = 4.1$

Hz) correspondiente a un protón axial geminal a un grupo hidroxilo que podría ser debida a un protón sobre C-3. La comparación de estos datos con los publicados para el *ent*-3 β ,12 α -dihidroxi-13-*epi*-óxido de manoilo (varodiol), muestra que se trata del mismo producto (Algarra, 1983).



ent-6 α ,8 α ,18-trihidroxiabda-13(16),14-dieno (11)

El último producto aislado posee una fórmula molecular de $C_{20}H_{34}O_3$ y presenta absorción en UV (225 nm, $\epsilon = 11000$). En su espectro de IR se denota la presencia de grupo hidroxilo y de doble enlace. En su espectro de 1H RMN aparece un sistema A_2B_2X característico de los esqueletos labdánicos y tres metilos singletes (δ 1.20, 0.90 y 0.85) uno de ellos (δ 1.20) geminal a grupo hidroxilo. También se observa la existencia de un sistema AB (dobletes centrados a δ 3.60 y 3.10, $J = 12$ Hz) producido por un grupo hidroximetilénico; además de otra señal originada por un protón geminal a un hidroxilo ecuatorial (δ 3.86, ddd, $J_1 = J_2 = 10$, $J_3 = 4$ Hz). Estos datos nos hacen pensar en la existencia de un esqueleto *ent*-labda-13(16),14-diénico hidroxilado en C-6, C-8 y C-18. La comparación de estos datos con los publicados para el *ent*-6 α ,8 α ,18-trihidroxiabda-13(16),14-dieno (andalusol) (Algarra, 1983) muestra que se trata del mismo producto.



11

El aislamiento en esta *Sideritis* de sesquiterpenos con esqueleto eudesménico y eudesmánico, nos permite completar el estudio de este tipo de productos, sobre todo en el campo de la biotransformación, poco estudiada hasta la fecha y que puede conducir a resultados interesantes.

2. BIOTRANSFORMACION DE GERMACRANOS CON RHIZOPUS NIGRICANS

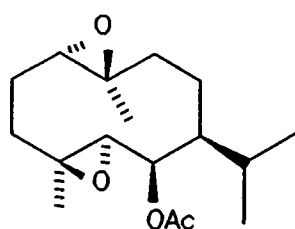
2.1. Incubación del 6 β -acetoxi-4 β ,5 α -epoxi-*trans*-germacr-1(10)-eno (2)

El producto **2** se aisló de la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii*. La biotransformación del mismo con un cultivo de *Rhizopus nigricans* se mantuvo durante seis días, transcurridos los cuales se observó por cromatografía en capa fina, la total transformación del sustrato. Tras la recuperación de los metabolitos obtenidos y su purificación por cromatografía en columna, se aisló un producto mayoritario (**12**, 57%), junto con dos productos minoritarios más polares (**13**, 5%) y (**14**, 8%).

El primer producto aislado posee, en su espectro de masas, un pico molecular de 297 u.m.a. (ionización química), lo cual nos indica que un átomo de oxígeno ha sido introducido por el microorganismo en el sustrato (**2**). En su espectro de IR se observa la desaparición de las bandas correspondientes a un doble enlace. Comparando los espectros de ^1H RMN del sustrato **2** con los del metabolito **12**, podemos observar que en el espectro del metabolito **12** no existe señal de doble enlace ni de metilo alílico, apareciendo sin embargo, una señal a δ 2.99 (1H, dd, $J_1 = 9.2$, $J_2 = 5.8$ Hz) que corresponde a un protón geminal a una función oxigenada y una señal a δ 1.41 (3H, s) debida a un grupo metilo geminal a una función oxigenada. En el espectro de ^{13}C RMN del metabolito **12** no se observa la presencia de un doble enlace, apareciendo dos nuevas señales debidas a carbonos oxigenados, uno de ellos metínico (δ 61.49) y el otro totalmente sustituido (δ 61.85). Según estos datos podemos afirmar que el microorganismo ha realizado la epoxidación del doble enlace del sustrato (**2**).

Nos queda por determinar la configuración de los carbonos C-1 y C-10, para lo cual realizamos la epoxidación del producto **2** con ácido m-cloro-perbenzónico (AMCPB), de la que se obtiene un producto mayoritario originado por el ataque del reactivo por la cara "re,re" a la conformación más estable ${}_{15}D^5, {}_{14}D^4$ (McClure, 1970), que corresponde al $1\alpha, 10\beta$ -epoxidado. También se obtiene un segundo producto minoritario originado por el ataque del reactivo por la misma cara (re,re) a una conformación ${}_{15}D^5, {}_{11}D^4$ menos estable que corresponde al $1\beta, 10\alpha$ -epoxidado (Pascual de Teresa, 1985).

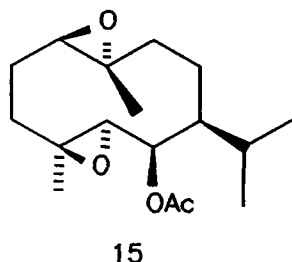
La estructura de los dos productos obtenidos en la epoxidación química fue confirmada por el estudio de sus datos espectroscópicos. Podemos observar que el producto mayoritario posee unos datos espectroscópicos idénticos a los del metabolito (**12**), aislado en la incubación del sustrato **2** con *R. nigricans*. Por lo que podemos afirmar que este metabolito se trata del 6β -acetoxi-($1\alpha, 10\beta$), ($4\beta, 5\alpha$)-diepoxigermacrano (**12**).



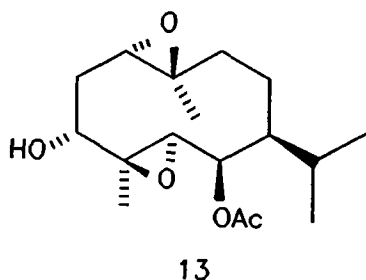
12

El producto minoritario de la epoxidación química posee unos datos espectroscópicos similares a los del producto **12**. Si bien se puede apreciar en su espectro de 1H RMN una diferencia en la multiplicidad de la señal correspondiente al protón sobre C-1. Así, en el producto **12** este protón aparece a δ 2.99 (1H, dd, $J_1 = 9.2$, $J_2 = 5.8$ Hz),

mientras que la señal del protón sobre C-1 del producto **15** aparece a δ 2.92 como un doblete ($J = 10$ Hz), lo que está de acuerdo con los datos descritos para un $1\beta,10\alpha$ -epoxiderivado (Bohlmann, 1981). Según esto podemos asignar al producto **15** la estructura de 6β -acetoxi-($1\beta,10\alpha$),($4\beta,5\alpha$)-diepoxigermacrano.



El segundo producto aislado de esta incubación presenta un pico molecular a 313 u.m.a. ($[M + 1]^+$) compatible con una fórmula molecular de $C_{17}H_{28}O_5$. En su espectro de infrarrojo se observan bandas de grupo hidroxilo (3450 cm^{-1}) y acetoxilo (1741 y 1242 cm^{-1}). Analizando su espectro de ^1H RMN y comparándolo con el del metabolito **12**, podemos observar que ambos son similares, si bien, en el espectro del metabolito **13** aparece una nueva señal a δ 2.95 (1H, dd, $J_1 = 8.7$, $J_2 = 6.4$ Hz) debida aun protón axial geminal a un grupo hidroxilo, que podría situarse sobre C-3 ó C-9. El estudio de los espectros de ^{13}C RMN de los metabolitos **12** y **13** nos ayuda a establecer la posición de esta nueva hidroxilación en el metabolito **13**, puesto que se observan claros efectos γ sobre C-1 ($\Delta\delta = -1.86$), C-5 ($\Delta\delta = -1.78$) y C-15 ($\Delta\delta = -5.48$), efectos β sobre C-2 ($\Delta\delta = +8.57$) y C-4 ($\Delta\delta = +2.83$) y un efecto α sobre C-3 ($\Delta\delta = +40.64$). Según esto, podemos asignar la estructura de 6β -acetoxi-($1\alpha,10\beta$),($4\beta,5\alpha$)-diepoxi- 3α -hidroxigermacrano al metabolito **13**.



El metabolito más polar aislado (**14**), presenta al igual que el metabolito **13** un pico molecular de 313 u.m.a. (ionización química) en su espectro de masas, y un espectro de infrarrojo similar al del metabolito anterior. Comparando los espectros de ^1H RMN de los metabolitos **12** y **14** podemos observar que las señales de los metilos del grupo isopropílico nos indican que en el caso del metabolito **14** existe una hidroxilación sobre C-11, ya que estas aparecen como singletes (δ 1.18 y 1.14) más desapantalladas que las correspondientes señales doblete del metabolito **12** (δ 0.89 y 0.87), lo que es compatible con una función oxigenada geminal a estos grupos metilo. Esto se confirma analizando los datos de los espectros de ^{13}C RMN de los metabolitos **12** y **14**. Así, se observa un claro efecto α sobre C-11 ($\Delta\delta = +41.26$), efectos β sobre C-7 ($\Delta\delta = +2.33$) y sobre C-12 y C-13 ($\Delta\delta = +7.79$ y $+6.47$ respectivamente) y efectos γ sobre C-6 ($\Delta\delta = -0.45$) y C-8 ($\Delta\delta = -3.06$); por lo tanto, al metabolito **14** le asignamos la estructura de 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-11-hidroxigermacrano.

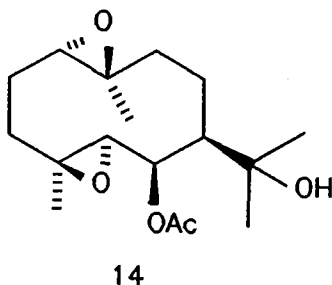


Tabla 4. Datos ^{13}C RMN de los productos **2**, **12**, **13**, **14** y **15**.

C	2	12	13	14	15
1	123.59	60.07	58.21	60.28	61.49
2	22.97	24.70	33.27	24.62	25.97
3	37.17	34.30	74.94	34.21	36.54 ^a
4	59.60	59.24 ^a	62.07	59.59 ^a	58.81
5	66.06	65.76	63.98	65.91	66.23
6	74.13	72.73	72.26	72.28	73.54
7	45.97	48.76	48.62	51.09	44.22
8	26.61	23.49	23.49	20.43	23.75
9	38.25	40.78	40.68	41.13	36.62 ^a
10	136.75	59.86 ^a	59.60	59.83 ^a	61.85
11	31.43	31.81	31.88	73.07	31.05
12	20.66	20.62 ^b	20.65 ^a	28.41 ^b	20.94 ^b
13	20.66	20.56 ^b	20.60 ^a	27.03 ^b	20.60 ^b
14	16.45	16.75 ^c	17.15	16.79	16.74
15	18.61	16.78 ^c	11.30	16.79	23.17
<u>MeCOO</u>	20.98	21.10	21.13	21.50	21.10
<u>MeCOO</u>	170.00	170.12	170.16	170.87	170.21

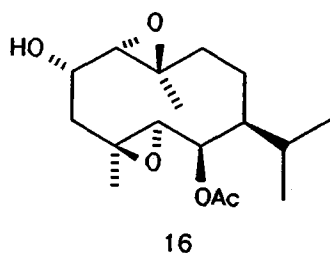
2.2. Incubación del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano (12)

La incubación con *Rhizopus nigricans* del producto mayoritario (12) aislado de la epoxidación del producto 2 con AMCPB, se mantuvo durante 12 días, al cabo de los cuales se aislaron 21 mg (2%) del producto de partida (12), 203 y 241 mg respectivamente de los metabolitos 13 (21%) y 14 (25%), obtenidos en la anterior biotransformación del sustrato 2, junto con cuatro nuevos metabolitos; estos son el 16 (91 mg, 10%), 17 (106 mg, 11%), 18 (20 mg, 2%) y 19 (16 mg, 2%).

Los metabolitos 16, 17 y 18 presentan, en sus espectros de masas, unos picos moleculares de 313 u.m.a. y similares espectros de infrarrojo, con bandas de grupos hidroxilo y acetoxilo, lo que nos indica que el microorganismo ha introducido un nuevo grupo hidroxilo en diferentes posiciones del sustrato 12. En el espectro de ^1H RMN del metabolito 16 podemos observar que la señal del protón sobre C-1 aparece a 3.08 ppm como un doblete ($J = 7.3$ Hz) junto con una señal a 3.82 ppm que aparece como un doblete (doblete) ($J_1 = 7.3$, $J_2 = 6.5$, $J_3 = 1.2$ Hz). La irradiación sobre la señal a 3.82 ppm convierte el doblete situado a 3.08 ppm (H-1) en un singlete, mientras que la irradiación sobre esta última señal convierte la señal situada a 3.82 ppm en un doblete (doblete) ($J_1 = 6.5$, $J_2 = 1.2$ Hz). Estas experiencias de doble resonancia nos permiten situar la nueva hidroxilación sobre el carbono 2.

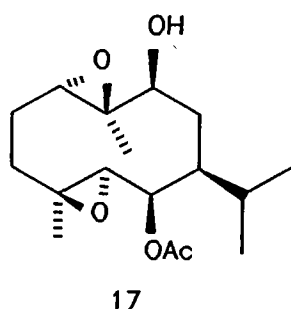
En cuanto a la configuración de este nuevo hidroxilo, analizando las constantes de acoplamiento de su protón geminal, podemos pensar en una disposición axial para el mismo; esta suposición está apoyada por el desapantallamiento que sufren los protones situados sobre C-14 y C-15. Este desapantallamiento se observa al comparar

los desplazamientos químicos de los mismos con los correspondientes desplazamientos de tales protones del sustrato **12**. Esto se confirma por el análisis de los datos de ^{13}C RMN del producto **12** y del metabolito **16**, observándose efectos γ sobre C-4 ($\Delta\delta = -0.80$) y C-10 ($\Delta\delta = -0.16$), efectos β sobre C-1 ($\Delta\delta = +10.01$) y C-3 ($\Delta\delta = +9.64$) y un efecto α sobre C-2 ($\Delta\delta = +40.89$), así como sendos desapantallamientos de los carbonos 14 ($\Delta\delta = 1.83$) y 15 ($\Delta\delta = 0.62$). Por lo tanto asignamos la estructura de 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-2 α -hidroxigermacrano al metabolito **16**.



El metabolito **17** posee un espectro de ^1H RMN en el que se observa una señal a δ 3.08 debida a un protón geminal a un grupo hidroxilo, acoplado a otros dos protones ($J_1 = 11.7$, $J_2 = 2.0$ Hz). Según esto, puesto que su espectro es diferente al del metabolito **13**, esta hidroxilación debe estar situada sobre C-9, lo que se confirma también con los datos de ^{13}C RMN, pues se aprecian efectos γ sobre C-1 ($\Delta\delta = -1.39$), C-7 ($\Delta\delta = -3.18$) y C-14 ($\Delta\delta = -6.19$), efectos β sobre C-8 ($\Delta\delta = +8.78$) y C-10 ($\Delta\delta = +2.41$) y un efecto α sobre C-9 ($\Delta\delta = +39.96$). Según estos datos, y apoyándonos en el efecto γ sobre C-14, podríamos pensar que este nuevo hidroxilo se encuentra en posición α , si bien no se puede asegurar con certeza, ya que las variaciones conformacionales de la molécula hacen difícil la asignación de esta configuración. Sin embargo esta configuración ha sido establecida por el procedimiento de Horeau. Dado que el poder rotatorio del ácido α -fenilbutírico aislado es negativo, la configuración absoluta de C-9 es "S", ó lo que es lo

mismo que la disposición del grupo hidroxilo es β . Por lo tanto, el metabolito 17 es el 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-9 β -hidroxigermacrano.



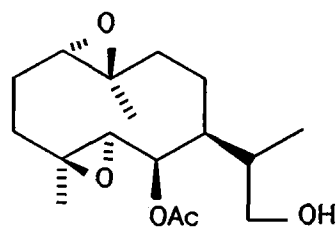
El espectro de ^1H RMN del metabolito 18, comparado con el del sustrato 12, nos indica que el grupo isopropilo de esta molécula ha sido funcionalizado por el microorganismo, ya que desaparece uno de los metilos dobles de este grupo, encontrándose dos nuevos dobles dobles centrados a δ 3.58 (1H) y 3.48 (1H), que constituyen la parte AB de un sistema ABX. Estos datos son compatibles con la hidroxilación de uno de los dos metilos del grupo isopropílico, lo que se ve confirmado por el análisis de los datos de ^{13}C RMN del mismo, comparados con los del sustrato 12. Podemos observar que ha desaparecido una de las dos señales de carbono del sustrato 12, asignadas a los metilo del grupo isopropilo (δ 20.62 y 20.56), encontrándose una señal de grupo metilo a δ 14.79 (efecto δ de -5.77 ppm. C-13) y otra de carbono metilénico oxigenado a δ 64.93 (efecto α de +44.31, C-12). Existe además un efecto β sobre C-11 ($\Delta\delta = +7.20$) y un efecto γ sobre C-7 ($\Delta\delta = -6.25$), que corroboran que la hidroxilación por el microorganismo se ha efectuado sobre C-12.

Nos queda por determinar la configuración del carbono 11 para este

Tabla 5. Datos de ^{13}C RMN de los productos 16, 17, 18 y 19.

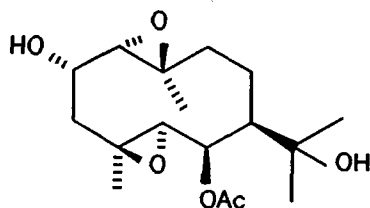
C	16	17	18	19
1	70.08	58.68	60.09	69.41
2	65.59 ^a	24.21	24.75	65.92 ^a
3	43.94	34.07	34.35	43.86
4	58.44	58.98	59.60 ^a	58.78
5	65.67 ^a	65.52	65.84	66.02 ^a
6	72.80	72.74	73.62	72.24
7	48.87	45.58	42.51	51.08
8	23.43	32.27	22.58	20.23
9	41.12	80.74	40.62	41.27
10	60.02	62.27	59.84 ^a	60.28
11	31.90	32.04	39.01	73.11
12	20.62	20.58 ^a	64.93	27.42 ^b
13	20.62	20.49 ^a	14.79	27.27 ^b
14	18.58 ^b	10.56	16.78	18.44 ^c
15	17.40 ^b	16.92	16.78	17.33 ^c
<u>MeCOO</u>	21.18	21.17	21.25	21.42
<u>MeCOO</u>	170.16	170.16	170.47	170.79

metabolito, lo que hemos logrado después de realizar la conversión del mismo en un derivado lactónico, cuya discusión veremos posteriormente en el apartado 5 de la parte teórica de esta Memoria, y que nos permite asignar la estructura de 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),4 β ,5 α)-diepoxi-12-hidroxigermacr-11(S)-ano al metabolito 18.



18

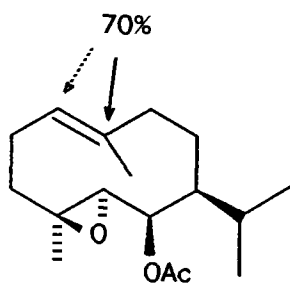
El producto más polar aislado de esta incubación (19), tiene un pico molecular de 329 u.m.a. (EM, $[M+1]^+$) y bandas de hidroxilo y acetoxilo en su espectro de infrarrojo. En su espectro de ^1H RMN se observan dos señales a 3.81 ppm (1H, ddd, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 6.5$, $J_3 = 1.2$ Hz) y 3.08 ppm (1H, d, $J = 7.3$ Hz) similares a las observadas en el correspondiente espectro del metabolito 16 y que se originan por un grupo hidroxilo en posición α sobre C-2. También podemos ver dos señales de metilos geminales a una función oxigenada a δ 1.20 y 1.17 (3H cada uno, s) similares a las observadas en el espectro de ^1H RMN del metabolito 14. Estos datos nos sugieren que el microorganismo ha hidroxilado en C-2 y C-11, lo cual confirmamos observando el espectro de ^{13}C RMN del mismo. Se producen efectos α , β y δ similares a los producidos por las hidroxilaciones sobre C-2 y C-11 en los metabolitos monohidroxilados 14 y 16. Podemos concluir que el metabolito 19 es el 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β), (4 β ,5 α)-diepoxi-2 α ,11-dihidroxigermacrano.



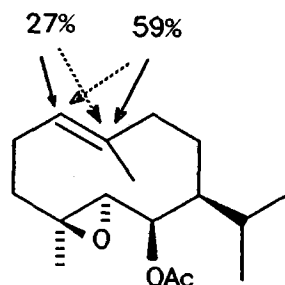
19

2.3. Discusión de los resultados obtenidos

Como resumen de las biotransformaciones realizadas en estos sistemas germacránicos con *Rhizopus nigricans*, podemos comentar en primer lugar, que cuando en el sustrato existe un doble enlace entre los carbonos 1 y 10, el microorganismo origina un 70% de productos procedentes de la epoxidación de este doble enlace por la cara más accesible de la molécula, para dar un 1 α ,10 β -epóxido derivado. La obtención de este epóxido por vía microbiológica, se produce con mayores rendimientos globales (70%) que la epoxidación por vía química (59%), existiendo una mayor selectividad por parte del microorganismo, ya que el producto obtenido en este caso procede del ataque a la conformación más estable del sustrato; mientras que por vía química el reactivo actúa sobre dos de las conformaciones, obteniéndose productos isómeros (59 y 27% respectivamente).

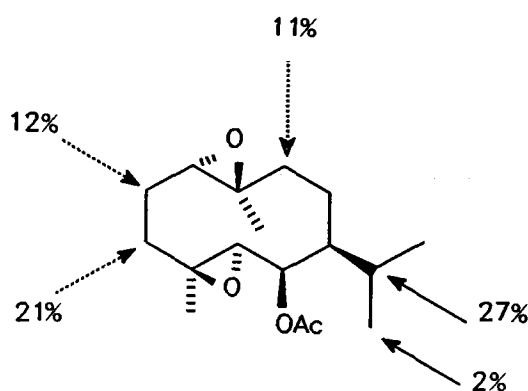


VIA MICROBIOLÓGICA



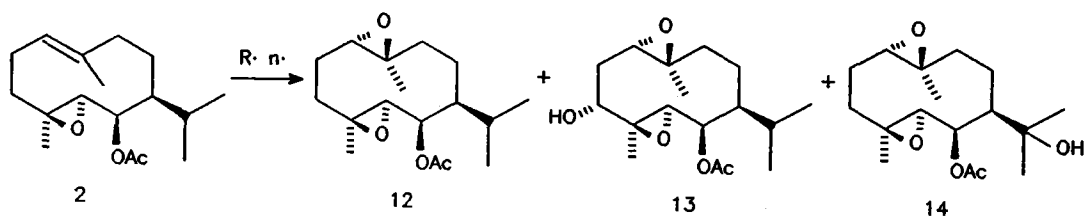
VIA QUÍMICA

En segundo lugar, hemos comprobado que el *Rhizopus nigricans* hidroxila al $1\alpha,10\beta$ -epoxiderivado en diferentes posiciones del anillo, originando mayoritariamente productos monohidroxiados en C-11 y C-3. También origina otros derivados monohidroxiados (sobre C-2, C-9 y C-12), aunque con menor rendimiento. Además, el microorganismo produce un 2% de un producto $2\alpha,11$ -dihidroxiado.

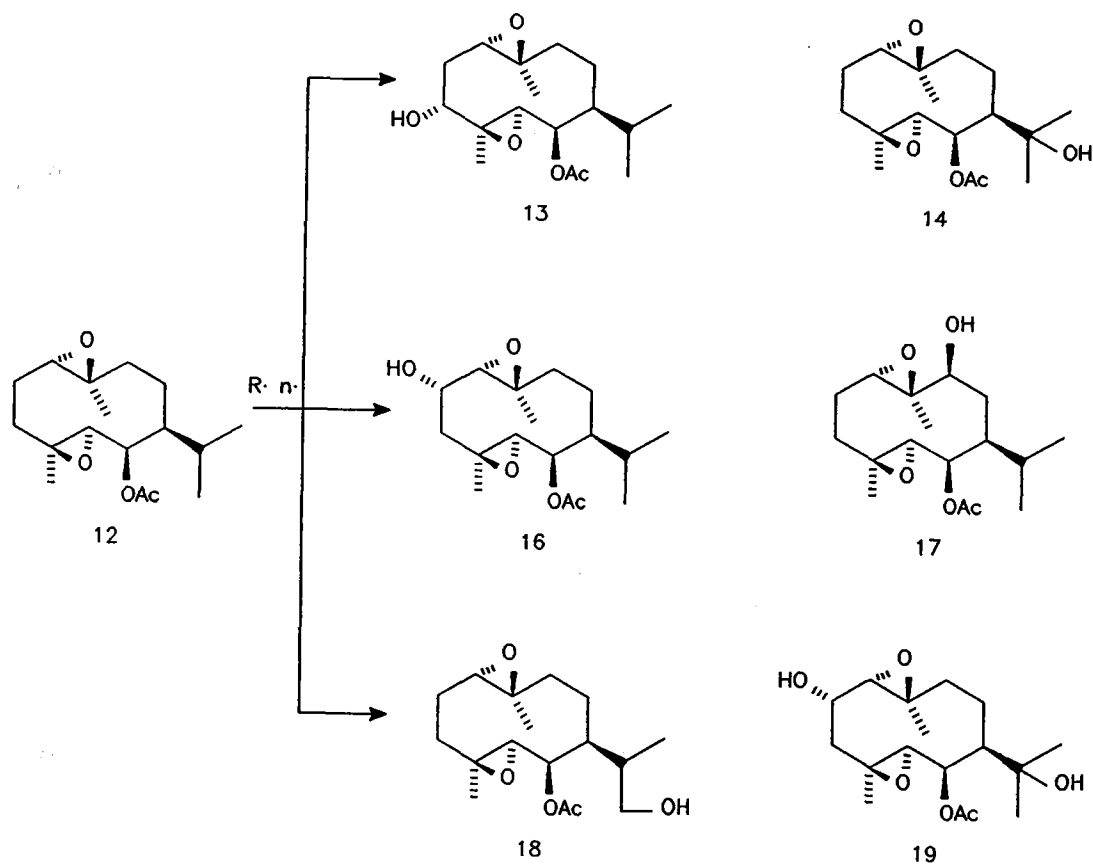


El aislamiento de metabolitos con hidroxilaciones sobre C-11 ó C-12 es particularmente interesante, ya que como veremos en el apartado 5 de esta Memoria, pueden utilizarse para su conversión en 6β -germacranolidas.

BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO 2 CON *RHIZOPUS NIGRICANS*



BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO 12 CON *RHIZOPUS NIGRICANS*



2000

3. BIOTRANSFORMACION DE COMPUESTOS EUDESMENICOS CON CURVULARIA LUNATA

3.1.- Obtención de los productos de partida

Continuando con el estudio de biotransformación de compuestos sesquiterpénicos, se han realizado una serie de biotransformaciones de sesquiterpenos eudesménicos.

Para estas incubaciones se seleccionaron los productos 5 y 6, aislados de la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii*, anteriormente estudiados, así como sus productos de oxidación. La oxidación de los productos 5 y 6 con dicromato de piridinio (Cainelli, 1976), conduce respectivamente a los productos 6 β -acetoxieudesm-3-en-1-ona (20) y 6 β -acetoxieudesm-4(15)-en-1-ona (21).

Un estudio previo de las incubaciones de estos productos con los microorganismos *Curvularia lunata*, *Fusarium moniliforme* y *Drechslera halodes* reveló que los productos 5 y 6 no eran transformados en ningún caso, mientras que los demás productos originaron transformaciones idénticas con todos los microorganismos, siendo el *Curvularia lunata* el que producía un mayor rendimiento en productos de transformación, por lo que se eligió este microorganismo para realizar las incubaciones.

3.2. Incubación del 6 β -acetoxiudesm-3-en-1-ona (20)

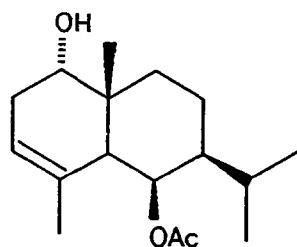
El sustrato **20** se incuba con *Curvularia lunata*. A los tres días, se dá por finalizada la incubación obteniéndose una mezcla de productos (83 mg) que se separan por cromatografía de columna.

El más apolar de los productos (34 mg, 28%) resulta ser el producto de partida (**20**) no transformado.

El segundo metabolito (**22**, 25 mg, 21%) presenta, en su espectro de masas, un pico molecular de 280 u.m.a., acorde con una fórmula molecular $C_{17}H_{28}O_3$. En su espectro de infrarrojo se observan bandas de hidroxilo (3442 cm^{-1}), acetoxilo ($1734, 1243\text{ cm}^{-1}$) y doble enlace (912 cm^{-1}). En la comparación del espectro de ^1H RMN de este metabolito con el del sustrato **20** se ve que difiere, en la aparición de una señal estrecha a δ 3.27 (1H, d, $J = 3.7\text{ Hz}$) en el primero y en la desaparición de las señales de los protones en posición α con respecto al grupo carbonilo en C-1 en el producto de partida **20**. Las demás señales existentes en el espectro de ^1H RMN del metabolito **22** coinciden con las del producto **20**.

Así, a δ 5.72 aparece una señal (1H, m, $w_{1/2} = 7\text{ Hz}$) que es debida al protón geminal al grupo acetoxilo en C-6 y a δ 5.29 se observa un multiplete (1H, $w_{1/2} = 10\text{ Hz}$) que puede corresponder al protón vinílico en C-3. A δ 2.00 se aprecia la señal del grupo acetoxilo, existiendo también cuatro señales de grupos metilo, uno de ellos alílico a δ 1.69 (3H-15), otro singlete a δ 0.93 (3H-14) y dos metilos dobles (δ 1.00 y 0.86, $J = 6.5\text{ Hz}$, grupo isopropilo). Estos datos están de acuerdo con la reducción del grupo carbonilo en

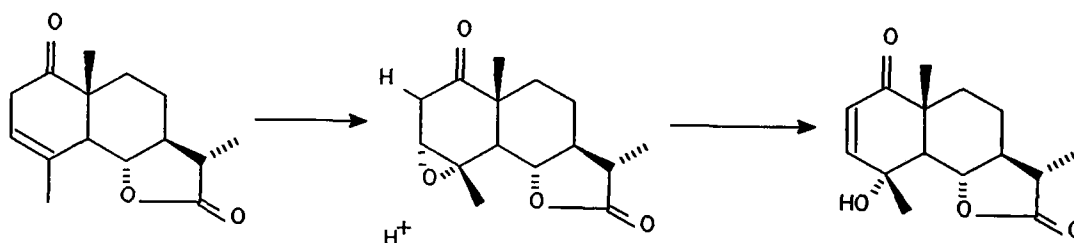
C-1 del sustrato por el *Curvularia lunata*. Dada la forma de la señal del protón geminal al grupo hidroxilo producido en esta reducción, puede pensarse que se trata de un protón ecuatorial. La comparación de los datos de ^{13}C RMN del metabolito **22** con los del producto **5** (protón en C-1 axial) (García-Granados, 1985-1), nos permite confirmar la configuración 1α -hidroxi para el metabolito **22**, ya que sobre C-3, C-5 y C-9 existen efectos δ más acusados ($\Delta\delta = -2.10, -6.79$ y -1.71 respectivamente) que sobre los mismos carbonos en el producto **5**. Además sobre C-14 se observa una disminución del efecto δ , ejercido por el grupo hidroxilo en C-1, de 7.40 ppm, debida a la disposición "*anti*" del grupo hidroxilo en C-1 con respecto a C-14 en el metabolito **22**, frente a la disposición "*gauche*" para estos mismos grupos en el producto **5**. Por tanto podemos concluir que la estructura del metabolito **22** es la de 6β -acetoxi- 1α -hidroxieudesm-3-eno, producto procedente de la reducción producida por el microorganismo por la cara β del sustrato, originando un alcohol α sobre C-1, reducción que también se observa en la incubación de la deoxivulgarina con *Aspergillus ochraceus* (Arias, 1987). Cabe destacar que este tipo de hidroxilación (1α -OH), es muy dificultosa de obtener por vía química, ya que la cara β está más impedida estéricamente que la cara α , y por tanto el ataque del reactivo se produce por esta última, originando un alcohol 1β (Ando, 1977 y 1983).



22

Los últimos metabolitos (**23**, 12 mg, 10%; **24**, 12 mg, 10%) aislados de esta incubación poseen un pico molecular a 294 u.m.a. y similares espectros de IR, ^1H RMN y masas. El espectro de ^1H RMN del metabolito **23** muestra la existencia de un sistema AB vinílico con dobletes centrados a δ 6.55 y 5.89 respectivamente, $J = 10.5$ Hz) junto con un multiplete estrecho (1H, $w_{1/2} = 4$ Hz) a δ 5.86, un singlete de grupo acetoxilo a δ 2.10 (3H), señales de grupos metilo singletes (δ 1.61 y 1.50, 3H cada uno) y grupos metilo dobletes (δ 0.99 y 0.97, $J = 6.5$ Hz, 3H cada uno). En el espectro de ^1H RMN del metabolito **24** se observan las siguientes señales; sistema AB vinílico cuyos dobletes están centrados a δ 6.62 y 5.80 respectivamente ($J = 10.5$ Hz), multiplete estrecho a δ 5.85 (1H, $w_{1/2} = 4$ Hz), grupo acetoxilo a δ 2.08 (3H), metilos singletes a δ 1.38 y 1.35 (3H cada uno) y metilos dobletes a δ 0.96 y 0.88 ($J = 6.5$ Hz, 3H cada uno). Todos estos datos sugieren la existencia en ambos productos, de un doble enlace en C-2 conjugado con el grupo carbonilo de C-1 e hidroxilación sobre C-4. Esta suposición está apoyada además por el estudio de los espectros de ^{13}C RMN para ambos metabolitos. Existen grupos carbonilo (δ 207.50 para **23** y δ 195.37 para **24**), dos carbonos etilénicos (δ 150.97 y 125.53 para **23** y δ 154.94 y 125.20 para **24**) y un carbono oxigenado totalmente sustituido (δ 69.25 para **23** y δ 70.42 para **24**). Estos datos nos hacen pensar que los metabolitos **23** y **24**, con estructura de 6 β -acetoxi-4-hidroxiudesm-2-en-1-ona, son epímeros en C-4. El problema ahora consiste en la determinación de la configuración en C-4 para ambos metabolitos, cuestión que no es muy sencilla por métodos clásicos y que ha dado bastantes problemas dentro de la Química de los Productos Naturales (Herz, 1982; Bohlmann, 1985). Se ha abordado esta determinación por consideraciones químicas y espectroscópicas, particularmente de n.O.e.-diferencia, ya que disponemos de ambos epímeros.

Para confirmar las configuraciones se procedió a realizar su semisíntesis. Se ha descrito que la epoxidación de la deoxivulgarina con ácido metacloroperbenzoico origina un epóxido que evoluciona a vulgarina (Arias, 1987). La epoxidación ocurre por la cara α , ya que la cara β está más impedida estéricamente, obteniéndose un 4α -hidroxicompuesto.



El tratamiento del producto **20** con ácido meta-cloroperbenzoico origina un producto cuyos datos físicos y espectroscópicos coinciden con los del metabolito **24**, por lo que este debe de poseer una configuración 4α -hidroxi. La realización de experiencias de n.O.e.-diferencia en los metabolitos **23** y **24** nos permite confirmar que el metabolito **23** posee una configuración 4β -hidroxi (n.O.e. entre los protones del grupo metilo en C-15 y el protón sobre C-6), mientras que como es de esperar para una configuración 4α -hidroxi, en el metabolito **24**, no existe efecto n.O.e. entre tales protones.

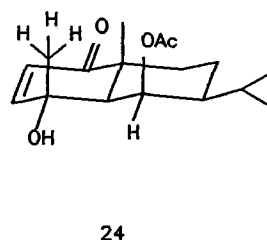
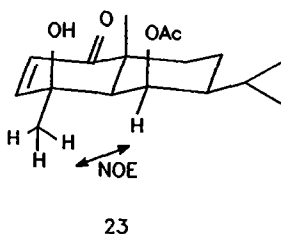
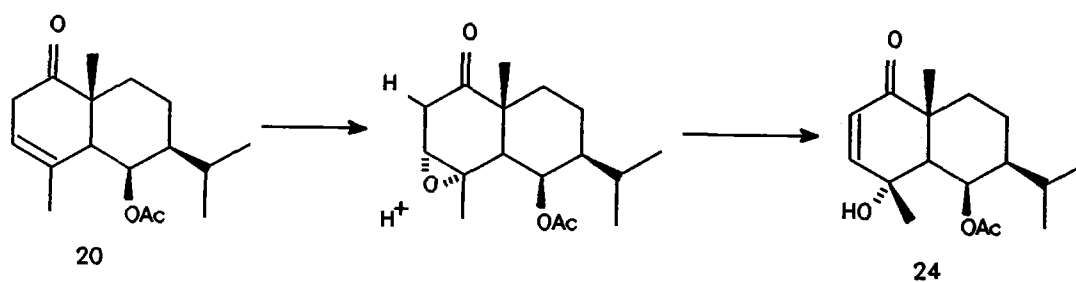
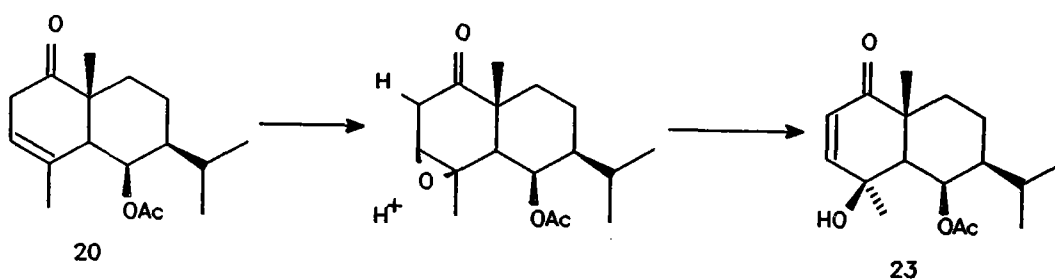


Tabla 6. Datos de ^{13}C RMN de los metabolitos obtenidos en la biotransformación del producto 20 con *Curvularia lunata*.

C	20	22	23	24
1	213.55	74.56	207.50	195.37
2	31.61	31.75	150.97	154.94
3	120.01	119.23	125.53	125.20
4	134.31	133.77	69.25	70.42
5	48.95	43.97	49.92	54.11
6	72.15	71.60	69.51	69.40
7	49.26	49.33	49.34	49.63
8	19.97	20.65	20.83	20.59
9	38.43	33.85	34.06	35.82
10	47.02	37.58	44.50	----
11	28.54	28.80	29.29	28.51
12	20.47 ^a	21.02 ^a	21.10 ^a	20.82 ^a
13	20.23 ^a	20.28 ^a	20.71 ^a	20.49 ^a
14	18.49	19.30	21.55	21.61
15	21.55	21.53	28.88	23.83
<u>MeCOO</u>	22.03	22.05	21.71	21.85
<u>MeCOO</u>	170.02	170.19		171.27

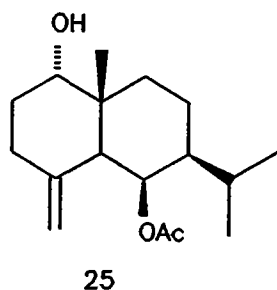
Por tanto las estructuras para ambos metabolitos son la de 6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesm-2-en-1-ona (**23**) y 6 β -acetoxi-4 α -hidroxieudesm-2-en-1-ona (**24**). Estas estructuras son compatibles con la epoxidación del doble enlace de sustrato **20** por ambas caras y posterior reagrupamiento de los sistemas oxiránicos para dar los productos **23** y **24**.



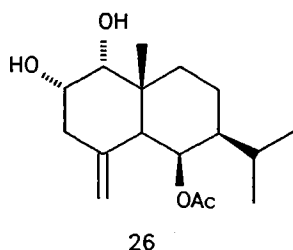
3.3. Incubación del 6 β -acetoxieudesm-4(15)-en-1-ona (**21**)

Después de siete días de incubación del sustrato **21**, se obtienen 88 mg de productos. Se aislan, además de parte del sustrato sin transformar (20 mg, 12%), dos metabolitos que se separan por cromatografía de columna.

El primer metabolito (**25**, 51 mg, 30%), posee una fórmula molecular de $C_{17}H_{28}O_3$, estimada por espectrometría de masas. En su espectro de infrarrojo aparecen bandas de hidroxilo (3446 cm^{-1}), acetoxilo ($1732, 1241\text{ cm}^{-1}$) y doble enlace ($1643, 897\text{ cm}^{-1}$). En el espectro de ^1H RMN del metabolito **25** aparece, al igual que en el metabolito **22**, una señal estrecha a δ 3.35 (1H, m, $W_{1/2} = 7\text{ Hz}$), probablemente debida al protón geminal al grupo hidroxilo axial sobre C-1 procedente de la reducción del grupo carbonilo sobre C-1 del sustrato **21**. Las demás señales, son compatibles con la estructura de 6β -acetoxi-1-hidroxiudesm-4(15)-eno. Multiplete estrecho a δ 5.63 ($w_{1/2} = 4\text{ Hz}$), correspondiente al protón geminal a grupo acetoxilo axial sobre C-6, señales de grupo metileno exocíclico (δ 4.74 y 4.56, s, 1H cada uno), señal de grupo acetoxilo a δ 2.02 (3H) y señales de grupos metilo a δ 0.92 (s, 3H-14), a δ 0.99 y 0.85 (3H cada uno, d, $J = 6.5\text{ Hz}$). La comparación de los espectros de ^{13}C RMN del metabolito **25** y del producto **6** nos permite confirmar la configuración 1α -hidroxi para el metabolito **25**, ya que sobre C-3 C-5 y C-9 existen efectos δ más acusados ($\Delta\delta = -3.67, -5.58$ y -3.40 respectivamente) que sobre los mismos carbonos en el producto **6** y una disminución de 8.74 ppm sobre C-14, debida a la disposición "anti" del grupo hidroxilo en C-1 con respecto a C-14 en el metabolito **25**, frente a la disposición "gauche" para estos mismos grupos en el producto **6**. Atendiendo a estos datos podemos asignar la estructura de 6β -acetoxi- 1α -hidroxiudesm-4(15)-eno para el metabolito **25**.



El otro metabolito (**26**, 17 mg, 10%) aislado de esta incubación posee un pico molecular de 296 u.m.a. compatible con una fórmula molecular $C_{17}H_{28}O_4$. En su espectro de infrarrojo se observan bandas de hidroxilo (3430 cm^{-1}), acetoxilo ($1730, 1235\text{ cm}^{-1}$) y doble enlace (976 cm^{-1}). Su espectro de ^1H RMN solo difiere de el del metabolito **25** en que la señal estrecha a δ 3.35 para el metabolito **25** (debida al protón geminal al grupo hidroxilo axial sobre C-1) aparece a δ 3.32 como un doblete ($J = 2.9\text{ Hz}$) para el metabolito **26**, existiendo además una nueva señal debida a un protón geminal a un grupo hidroxilo (δ 3.93, ddd, $J_1 = J_2 = 8.6\text{ Hz}$ y $J_3 = 2.9\text{ Hz}$). Conociendo la estructura del metabolito **25**, este protón debe estar situado en C-2, lo cual confirmamos por experiencias de doble resonancia, que demuestran que este protón está acoplado con el protón geminal al grupo hidroxilo sobre C-1 ya que al irradiar sobre la señal situada a δ 3.32, la señal a δ 3.93 aparece como un triplete ($J = 8.6\text{ Hz}$).

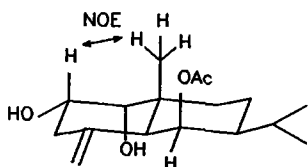


El estudio de los espectros de ^{13}C RMN para los metabolitos **25** y **26** corrobora la hidroxilación sobre C-2. Efecto α sobre C-2 (+38.88), efectos β sobre C-1 (+2.76) y C-3 (+9.04) y efectos γ sobre C-4 (-2.75) y C-10 (-0.77). Una vez establecida la posición de hidroxilación, nos falta aún determinar la configuración de este nuevo grupo hidroxilo, lo cual se realiza por experiencias de n.O.e.-diferencia. Si se asume una configuración $2\beta\text{-OH}$ para este metabolito, el protón 2α no debe producir efecto n.O.e. con los protones de C-14, mientras que para una configuración $2\alpha\text{-OH}$, debe existir efecto

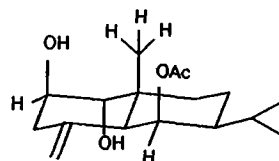
Tabla 7. Datos de ^{13}C RMN de los metabolitos obtenidos de la biotransformación del producto 21 con *Curvularia lunata*.

C	21	25	26
1	214.55	75.85	78.61
2	32.73	29.41	68.29
3	33.80	30.82	39.86
4	142.77	146.60	143.85
5	50.81	46.08	45.05
6	71.23	71.83	71.38
7	49.63	50.06	49.97
8	20.24	20.52	20.09
9	37.66	33.95	33.94
10	48.39	40.27	39.50
11	28.26	28.30	28.30
12	20.39 ^a	20.73 ^a	20.50 ^a
13	20.31 ^a	20.47 ^a	20.04 ^a
14	21.44	21.53	21.49
15	110.59	107.40	109.44
<u>MeCOO</u>	21.81	21.93	21.89
<u>MeCOO</u>	170.53	170.78	170.73

n.O.e. entre el protón 2β y los protones en C-14. Los resultados obtenidos en estas experiencias demuestran que existe efecto n.O.e. entre tales protones, lo que nos hace concluir que la estructura para el metabolito **26** es la de 6β -acetoxi- $1\alpha,2\alpha$ -dihidroxiudesm-4(15)-eno.



26



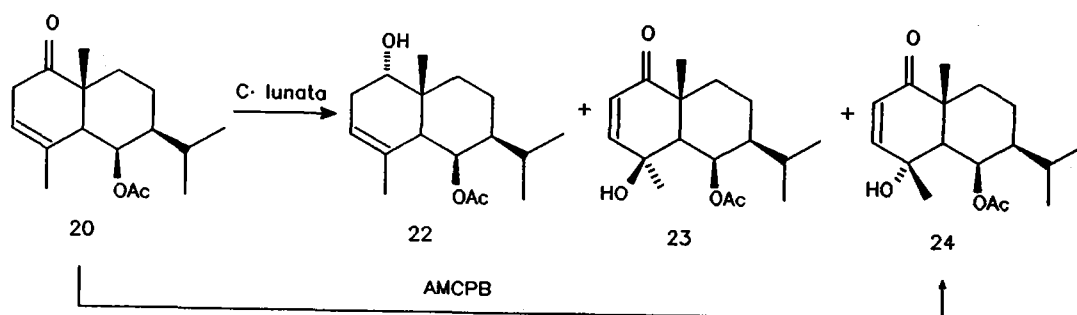
3.4. Discusión de los resultados

Del estudio de la biotransformación de los sistemas eudesméricos **20** y **21**, se desprende que en ambos casos el *C. lunata* produce la reducción del grupo carbonilo en C-1 por la cara β , originando alcoholes axiales, difíciles de obtener por métodos químicos, en los que el ataque se produce por la cara α , ya que la cara β está más impedida estéricamente.

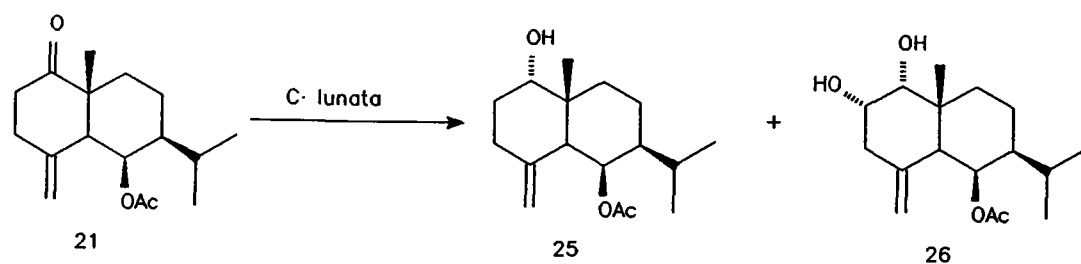
En el caso del producto **20**, la formación de los metabolitos **23** y **24** podría explicarse considerando la epoxidación, por parte del microorganismo *C. lunata*, de las dos caras del doble enlace de **20**, con posterior reagrupamiento de los sistemas oxiránicos para dar los productos **23** y **24**, lo que se confirma mediante correlación química en el caso del producto **24**.

En el caso del metabolito **21**, se observa que *C. lunata*, además de producir la reducción del grupo carbonilo en C-1 del sustrato, origina una nueva hidroxilación en C-2 por la cara α .

BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO **20** CON *CURVULARIA LUNATA*



BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO **21** CON *CURVULARIA LUNATA*



4. BIOTRANSFORMACION DE SISTEMAS EUDESMANICOS CON HONGOS FILAMENTOSOS

4.1. Obtención de los productos de partida para estas incubaciones

Con objeto de estudiar la acción del *Curvularia lunata* y *Rhizopus nigricans* sobre sistemas eudesmánicos, hemos realizado una serie de incubaciones con diversos sustratos, obtenidos bien por aislamiento de la *Sideritis* anteriormente comentada ó bien por transformación química de estos productos naturales, con diferentes funcionalizaciones.

Los productos de partida utilizados en estos estudios son el 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmano (**8**) y el 6 β -acetoxi-1 β ,4 α -dihidroxiudesmano (**9**), aislados de la *Sideritis*, con configuraciones epímeras en C-4, que nos permitirán estudiar la influencia que la configuración de C-4 pueda ejercer en estos procesos de biotransformación.

A partir del sustrato **8**, se han preparado a su vez una serie de sustratos para nuevos procesos de biotransformación. La saponificación del producto **8** origina el 1 β ,4 β ,6 β -trihidroxiudesmano (**28**), que nos puede dar información de la influencia que el grupo acetoxilo ejerce sobre la acción de los microorganismos en este tipo de sustratos. La oxidación del producto **8** da lugar al 6 β -acetoxi-4 β -hidroxiudesman-1-ona (**27**). La acetilación controlada del triol **28** nos permite obtener el 1 β -acetoxiderivado (**29**) que, tras posterior oxidación, conduce al 1 β -acetoxi-4 β -hidroxiudesman-6-ona (**30**). La oxidación del triol **28** origina el producto 4 β -hidroxiudesmano-1,6-diona (**31**). El estudio de

biotransformación de los cetoderivados **27**, **30** y **31**, nos permite estudiar la influencia que un grupo carbonilo pueda ejercer sobre la acción del microorganismo, dependiendo de la posición en la que se encuentre.

La transformación del sustrato **9** en el **1 β ,4 α ,6 β -trihidroxiudesmano (32)** y la posterior oxidación de este al **4 α -hidroxiudesmano-1,6-diona (33)**, nos permitirá estudiar la biotransformación de estos productos y comparar los resultados obtenidos con las correspondientes biotransformaciones de los derivados **4 β -hidroxilados**.

4.2. Biotransformación de eudesmanos con *Curvularia lunata*

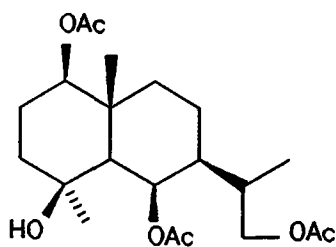
4.2.1. Incubación de **6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmano (8)**

El sustrato **8** se incubó con *Curvularia lunata* durante 12 días, transcurridos los cuales se obtiene una mezcla de metabolitos que se separan por cromatografía de columna.

El primer supuesto metabolito que se aísla (62%) resulta ser producto de partida (**8**) no transformado.

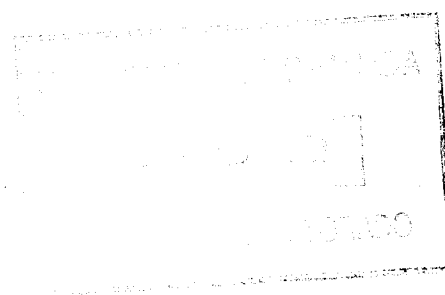
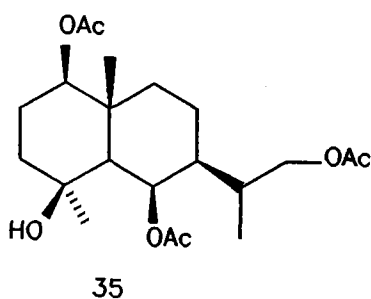
El siguiente conjunto aislado resulta ser una mezcla muy polar de dos productos (lo cual se desprende del análisis de su espectro de ^1H RMN), y cuya separación es muy problemática, por lo que se decidió formar su derivado acetilado. De la mezcla obtenida de esta acetilación se aíslan dos productos (**34** y **35**) cromatográficamente.

El más apolar de ellos posee un espectro de masas en el que estimamos que el pico de mayor (m/z) es el $[M-120]$. En el espectro de IR aparecen bandas debidas a un grupo hidroxilo (3505 cm^{-1}) y grupo acetoxilo (1731 y 1246 cm^{-1}). En su espectro de ^1H RMN se observa que se trata de un producto triacetilado: singletes de grupo acetoxilo a δ 2.06, 2.04 y 2.02 (3H cada uno, s), con protones geminales a δ 5.66 (1H, m, $w_{1/2} = 3.7$ Hz, H-6), δ 4.45 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 11.9$, $J_{1,2ec} = 3.6$ Hz, H-1) y, centrados a δ 4.04 y 3.95 (1H cada uno), dos dobles dobletes que forman la parte AB de un sistema ABX. Además, aparece una señal de metilo singlete a δ 1.34 (6H, 3H-14 y 3H-15), junto con una sola señal de metilo doblete a δ 0.90 (3H, d, $J = 6.5$ Hz). La existencia del sistema ABX, junto con la ausencia de uno de los metilos dobletes del grupo isopropilo del sustrato **8**, nos hace pensar que el microorganismo *C. lunata* ha introducido un nuevo grupo hidroxilo en C-12 (ó C-13). Esta hipótesis también se confirma al analizar los datos de ^{13}C RMN, ya que por comparación con los datos del sustrato **8**, se observa que aparece un nuevo carbono metilénico oxigenado (δ 67.64), y desaparece una de las señales de grupo metilo, observándose un efecto β sobre C-11 ($\Delta\delta = +4.13$) y efectos γ sobre C-7 ($\Delta\delta = -5.35$) y C-13 ($\Delta\delta = -6.44$ ó -5.71). Según estos datos, el producto **34** posee una estructura de 1 β ,6 β ,12-triacetoxi-4 β -hidroxieudesmano. El problema reside ahora en la determinación de la configuración absoluta de C-11.



34

El segundo producto aislado (35) de la mezcla de acetilación, posee unos datos espectroscópicos similares a los del producto 34. Se observan, en IR, bandas de grupo hidroxilo (3504 cm^{-1}) y acetoxilo (1727 y 1246 cm^{-1}). En su espectro de ^1H RMN se observa, al igual que en el producto 34, que se trata de un producto triacetilado: singletes a δ 2.04 (6H) y 2.02 (3H), debidos a los grupos acetoxilo, con protones geminales a δ 5.66 (1H, dd, $J_{5,6} = J_{6,7} = 1.9\text{ Hz}$, H-6), δ 4.44 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 11.9$, $J_{1,2ec} = 3.6\text{ Hz}$, H-1) y, centrados a δ 4.12 y 3.92, dos dobles dobles que forman la parte AB de un sistema ABX. También se observan dos señales de grupos metilo singletes a δ 1.38 y 1.34 (3H cada uno, 3H-14 y 3H-15) y una señal de metilo doblete a δ 1.00 (3H, $J = 6.5\text{ Hz}$). Según estos datos, al igual que en el producto anterior, se puede pensar que este producto posee una hidroxilación en C-12 (ó C-13), lo que también se confirma por ^{13}C RMN: aparece un nuevo carbono hidroximetilénico a δ 67.41 y se observa un efecto β sobre C-11 ($\Delta\delta = +3.95$) y efectos δ sobre C-7 ($\Delta\delta = -4.25$) y sobre C-13 ($\Delta\delta = -5.44$ ó -4.71). A la vista de estos resultados, el producto 35 posee, al igual que el producto 34, una estructura de 1 β ,6 β ,12-triacetoxi-4 β -hidroxieudesmano y puesto que estos productos son distintos, cabe pensar que ambos son epímeros en C-11.



El problema reside ahora en la determinación de la configuración absoluta de C-11 para ambos metabolitos. Los estudios espectroscópicos realizados con experiencias

de n.O.e.-diferencia, no aportaron datos suficientes como para asignar con total seguridad la configuración de este carbono. No obstante, la conversión del triacetato 34 en el 1 β ,4 β ,6 β ,12-tetrahidroxiderivado 36, nos ha permitido obtener la 6 β -eudesmanolida 37, como veremos más adelante en el apartado 5 de la parte teórica de esta Memoria. Igualmente, la conversión del triacetato 35 en el tetrol 38, nos ha conducido a la obtención de la 6 β -eudesmanolida 39. De esta forma se pudo determinar inequívocamente la configuración de C-11 de cada 6 β -lactona. Por lo tanto, podemos adelantar que el producto 34 es el 1 β ,6 β ,12-triacetoxi-4 β -hidroxieudesm-11(R)-ano, y que el producto 35 es el 1 β ,6 β ,12-triacetoxi-4 β -hidroxieudesm-11(S)-ano.

BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO 8 CON *CURVULARIA LUNATA*

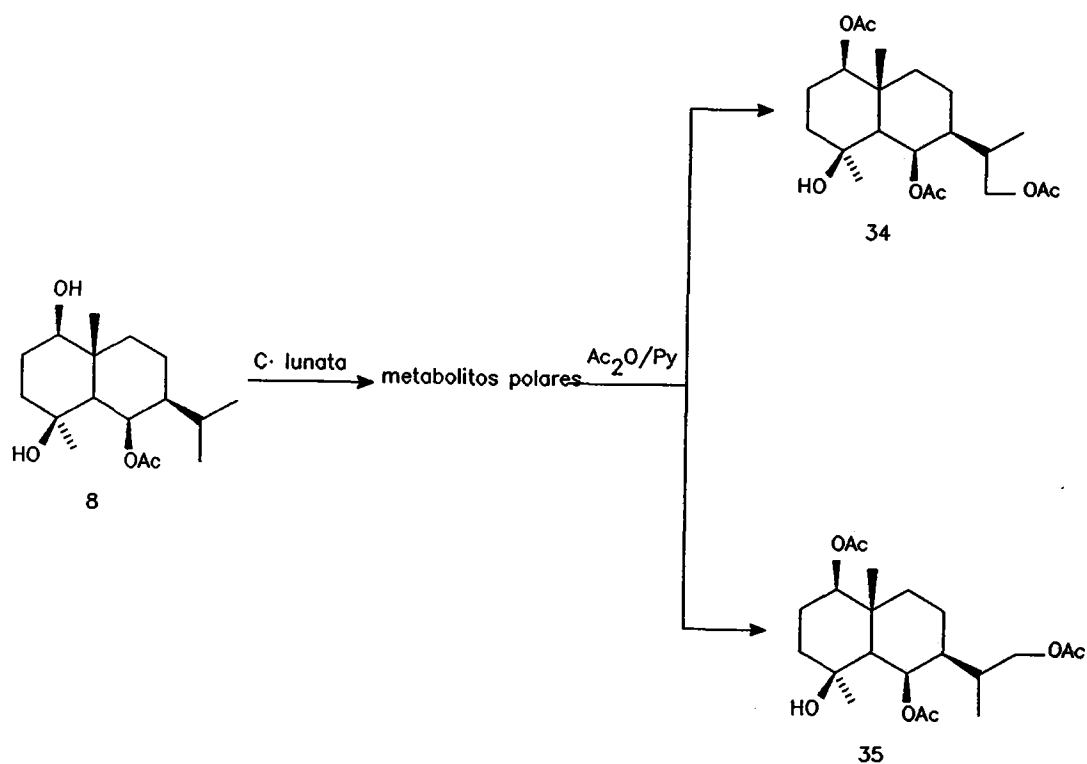


Tabla 8. Datos de ^{13}C RMN de los metabolitos obtenidos de la biotransformación del producto **8** con *Curvularia lunata*.

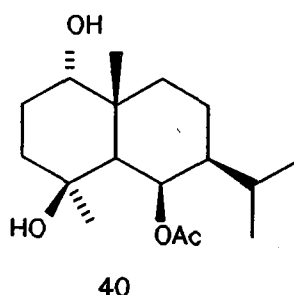
C	8	34	35
1	80.43	81.50	81.54
2	26.72	23.50	23.49
3	40.82	40.61	40.78
4	71.79	71.75	71.74
5	52.94	53.03	53.15
6	70.41	70.60	69.58
7	49.56	44.21	45.31
8	20.86	20.06	20.81
9	39.56	39.12	39.00
10	39.43	38.71	38.69
11	29.72	33.85	33.67
12	21.24	67.64	67.41
13	20.51	14.80	15.80
14	13.52	14.72	14.70
15	28.81	28.82	29.82
<u>MeCOO</u>	21.69	21.81	21.77
<u>MeCOO</u>		21.32	21.32
<u>MeCOO</u>		21.03	21.00
<u>MeCOO</u>	171.32	171.32	171.33
<u>MeCOO</u>		170.95	171.33
<u>MeCOO</u>		170.95	170.90

4.2.2. Incubación de la 6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-1-ona (27)

El sustrato **27** se incubó con *Curvularia lunata* durante 7 días. Transcurrido este tiempo se dá por finalizada la incubación, extrayéndose una mezcla de metabolitos, de la que se aisló, además del sustrato no transformado (**27**, 43%), un metabolito (**40**, 42%) y una mezcla de metabolitos (10%).

El primero de estos metabolitos (**40**), posee unos datos espectroscópicos similares a los del producto **8**. Así, en su espectro de infrarrojo, se observan bandas de hidroxilo, acetoxilo y no de grupo carbonilo. En su espectro de ^1H RMN aparece, además de la señal de protón geminal al grupo acetoxilo axial en C-6 (δ 5.72), una señal de protón geminal a hidroxilo (δ 3.81, m, $w_{1/2}$ = 8 Hz). Dicha señal es debida al protón ecuatorial geminal al grupo hidroxilo, originado en la reducción del grupo carbonilo en C-1 del sustrato por *C. lunata* por la cara β (más impedida estéricamente), al igual que sucede en las incubaciones de los sustratos **20** y **21**. También se observa la señal de grupo acetoxilo a δ 2.00, dos señales de metilos singletes a δ 1.35 y 1.24 respectivamente y señales de metilos dobles a δ 0.88 y 0.86, debidas al grupo isopropilo (J = 6.5 Hz). La presencia de un grupo hidroxilo axial sobre C-1 se confirma analizando los datos de ^{13}C -RMN del metabolito **40** y el producto **8**. Así, se observa, al igual que en los metabolitos **22** y **25** (aislados de las incubaciones de los sustratos **20** y **21** respectivamente con *C. lunata*, anteriormente comentados), un aumento de los desplazamientos de C-3, C-5 y C-9 de 4.83, 3.26 y 3.45 ppm respectivamente, frente a los mismos carbonos del producto **8**, y una disminución de 7.07 ppm en el desplazamiento de C-14, debida, a la disposición "anti" del grupo hidroxilo en C-1 con respecto a dicho carbono.

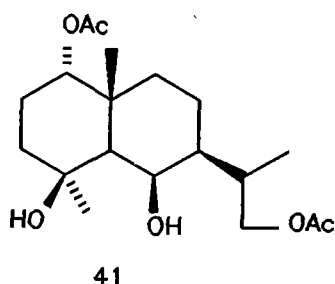
En base a estos datos podemos asignar la estructura de 6 β -acetoxi-1 α ,4 β -dihidroxiudesmano para el metabolito 40.



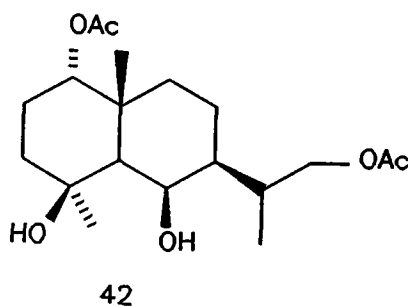
Los siguientes metabolitos aislados de esta incubación son bastante polares y su separación por cromatografía en columna es bastante problemática, por lo que se optó por formar sus derivados acetilados. La acetilación a temperatura ambiente de estos metabolitos, originó dos productos, que pudieron ser separados cromatográficamente.

El más apolar de estos (41) posee un espectro de masas en el que el pico de mayor m/z es impar y de peso molecular menor que el del sustrato. Posiblemente se trate de un $[M-15]$. En su espectro de IR se observan bandas de grupo hidroxilo (3462 cm^{-1}) y acetoxilo (1730 y 1245 cm^{-1}). De su espectro de ^1H RMN se desprende que dicho producto se trata de un derivado diacetilado (δ 2.07 y 2.05, 3H cada uno, s). A δ 4.56 aparece un multiplete (2H, $w_{1/2} = 13\text{ Hz}$), debido al solapamiento de las señales de un protón ecuatorial geminal al grupo acetoxilo sobre C-1 y de un protón geminal al grupo hidroxilo axial sobre C-6. Hay que señalar que se produce una transposición del grupo acetoxilo en C-6 hacia el grupo hidroxilo sobre C-12 (6 C-13). Centrados a δ 4.27 y 3.86 aparecen dos dobles dobletes (1H cada uno, $J_{AB} = 10.5$, $J_{AX} = 4.5$ y $J_{BX} = 7.5\text{ Hz}$), que forman la parte AB de un sistema ABX. Teniendo en cuenta que aparecen dos señales

de metilos singletes a δ 1.39 y 1.30 y solo una señal de metilo doblete a δ 1.00 (3H, $J=6,5$ Hz), se puede pensar que el microorganismo ha hidroxilado la posición 12 (ó 13) del sustrato. Los datos de ^{13}C RMN para este metabolito son totalmente concordantes con estos resultados. A la vista de los mismos, podemos concluir que el metabolito **41** se trata del producto de hidroxilación en C-12 (ó C-13) del metabolito **40**, con estructura de 1 α ,12-diacetoxi-4 β ,6 β -dihidroxiudesmano, si bien, falta por determinar su configuración en C-11, lo cual se discutirá más adelante.



El segundo producto, aislado (**42**) de la acetilación de la mezcla de metabolitos polares, posee unos datos de Espectrometría de masas, IR, ^1H RMN y ^{13}C RMN muy similares a los del producto **23**. Así, en su espectro de infrarrojo aparecen bandas de grupo hidroxilo (3454 cm^{-1}) y acetoxilo (1731 y 1246 cm^{-1}). En su espectro de ^1H RMN se observa que también se trata de un producto diacetilado (δ 2.07 y 2.06, 3H cada uno, s). A δ 4.57 aparece la señal de un protón ecuatorial geminal al grupo acetoxilo sobre C-1. Centrados a δ 4.33 y 3.85 se encuentran dos dobles dobletes (1H cada uno, $J_{\text{AB}} = 10.5$, $J_{\text{AX}} = 3.6$ y $J_{\text{BX}} = 7.5$ Hz), que es la parte AB de un sistema ABX. También aparecen dos señales de metilos singletes a δ 1.41 y 1.34 respectivamente y sólo una señal de metilo doblete a δ 1.06 (3H, $J=6.5$ Hz). Tanto estos resultados como los de ^{13}C RMN nos sugieren que el metabolito **42** posee una hidroxilación en C-12 (ó C-13), obteniéndose, en este caso, el producto de configuración contraria en C-11 a la del producto **41**.



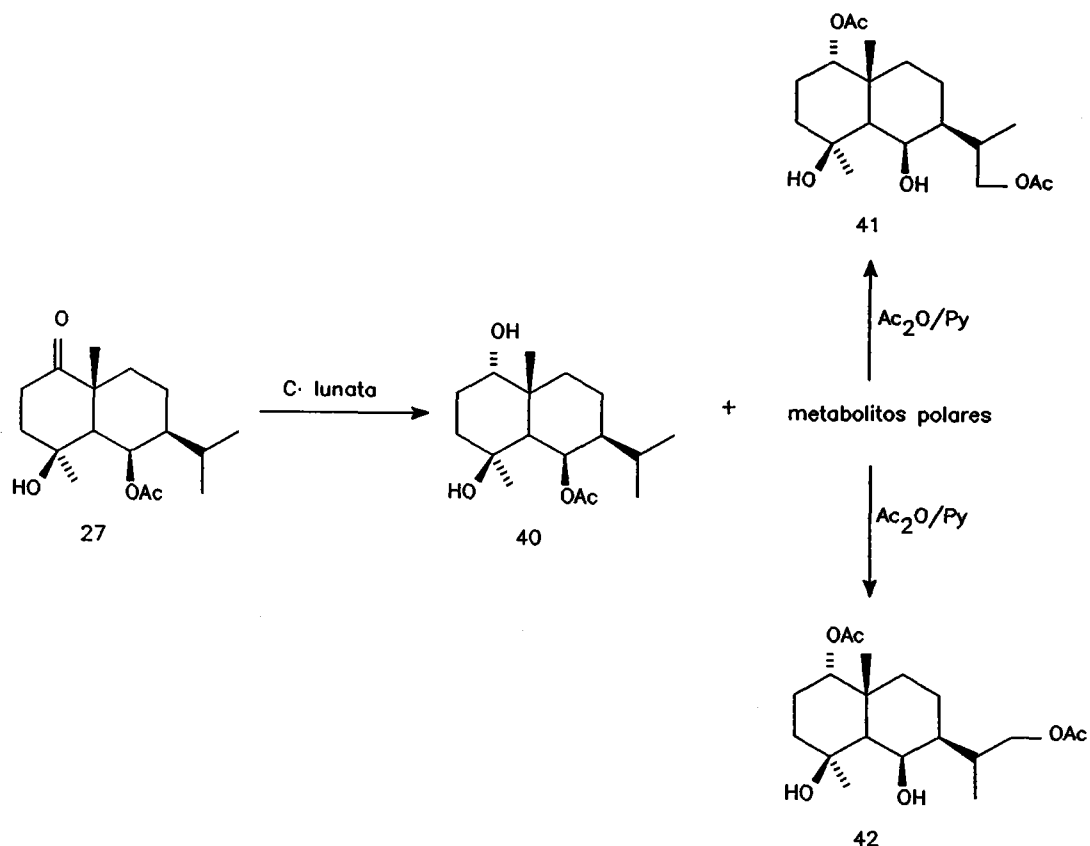
Al igual que en los productos 34 y 35, obtenidos en la incubación del sustrato 8 con *C. lunata*, la determinación de la configuración en C-11 para los productos 41 y 42 mediante experiencias de n.O.e.-diferencia no resultó concluyente, por lo que la determinación de esta configuración para estos productos solo se pudo conseguir por conversión del producto 41 en el tetrol 43 y posterior lactonización hacia la 1 α ,4 β -dihidroxi-6 α ,11 α -H-eudesman-6,12-olida (44). De la misma forma el producto 42 se transforma en el tetrol 45 para convertirse posteriormente en la 1 α ,4 β -dihidroxi-6 α ,11 β -H-eudesman-6,12-olida (46). El estudio espectroscópico de las lactonas 44 y 46, al igual que el de las lactonas 37 y 39, nos permite determinar la configuración de C-11, como ya veremos en el apartado 5 de la parte teórica. Así, podemos concluir que el producto 41 es el 1 α ,12-diacetoxi-4 β ,6 β -dihidroxi-eudesman-11(R)-ano y el 42 el 1 α ,12-diacetoxi-4 β ,6 β -dihidroxi-eudesman-11(S)-ano.

Con motivo de confirmar que la hidroxilación sobre C-12 ocurre después de la reducción en C-1, se realizó la incubación del metabolito 40 con el mismo microorganismo (*C. lunata*), aislándose una mezcla de metabolitos polares que, tras su acetilación a temperatura ambiente, originó los mismos productos 41 y 42.

Tabla 9. Datos de ^{13}C RMN de los metabolitos obtenidos en la biotransformación del producto **27** con *Curvularia lunata*.

C	27	40	41	42
1	215.77	75.92	78.17	78.14
2	34.38	25.01	22.62	22.57
3	42.22	36.11	36.39	36.40
4	71.57	72.36	73.22	73.46
5	53.87	49.68	46.93	47.16
6	71.16	70.95	68.75	69.88
7	49.28	46.93	45.91	45.90
8	21.10	21.01	20.68	19.45
9	34.42	35.99	35.66	35.90
10	48.05	38.54	37.15	37.28
11	29.23	30.06	34.03	34.59
12	21.10	21.43	68.58	68.26
13	21.10	21.33	15.99	16.38
14	20.63	20.59	21.76	21.85
15	28.85	28.87	30.35	30.33
<u>MeCOO</u>	21.74	21.82	21.37	21.38
<u>MeCOO</u>			21.12	21.11
<u>MeCOO</u>	171.59	171.45	171.55	171.69
<u>MeCOO</u>			170.59	170.56

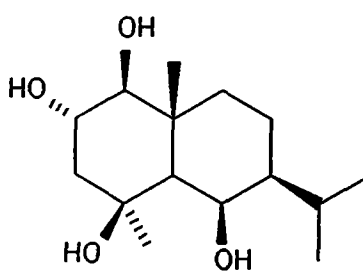
BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO 27 CON *CURVULARIA LUNATA*



4.2.3. Incubación del 1 β ,4 β ,6 β -hidroxieudesmano (28)

La biotransformación del triol 28 con *Curvularia lunata* durante 12 días origina tan solo un 13% de metabolitos, recuperándose un 79% del sustrato inalterado. De los metabolitos obtenidos, un 2% corresponde a un metabolito (47) más polar que el sustrato y el 11% restante está formado por una mezcla de metabolitos polares de la que, tras su acetilación, se obtienen los triacetatos 34 y 35, aislados anteriormente en la incubación del sustrato 8 con *C. lunata*, además de un diacetato (48).

El primer metabolito (**47**) aislado posee en su espectro de masas un pico molecular de 273 u.m.a. (I.Q.) compatible con una fórmula molecular de $C_{15}H_{28}O_4$ y que refleja la introducción, por el microorganismo, de un nuevo átomo de oxígeno en el sustrato **28**. En su espectro de 1H RMN observamos que, además de las señales características del sustrato **28**, aparece una nueva señal a δ 4.00 (1H, ddd, $J_1 = 11.2$, $J_2 = 9.2$, $J_3 = 5.1$ Hz), y la señal correspondiente a H-1 aparece como un doblete ($J = 9.2$ Hz) a δ 2.94. La irradiación sobre esta última señal convierte a la señal anteriormente descrita en un doble doblete ($J_1 = 11.2$ y $J_2 = 5.1$ Hz). Esto nos indica que la nueva hidroxilación se encuentra sobre el carbono 2 y, por la magnitud de las constantes de acoplamiento con los protones situados sobre C-3, que su disposición es ecuatorial. Esto se confirma al comparar los datos de ^{13}C RMN del metabolito **47** y los del sustrato **28**: efecto α de +41.18 ppm, efectos β sobre C-1 de +4.61 ppm y sobre C-3 de +7.72 ppm y un efecto δ -*anti* sobre C-4 de +1.39. Por lo tanto, el metabolito **47** es el 1 β ,2 α ,4 β ,6 β -tetrahidroxieudesmano.



47

El diacetato **48**, aislado de la acetilación de la mezcla de metabolitos polares, posee un pico molecular de 357 u.m.a. (EM, Ionización química). Analizando su espectro de 1H RMN, se observan dos señales de protones geminales a un grupo acetoxilo a δ 5.87 (1H, sa, H-6) y a δ 4.45 (1H, dd, $J_1 = 11.8$, $J_2 = 3.7$ Hz, H-1), junto con dos

señales de metilo de grupo acetoxilo a δ 2.06 y 2.05. Además de las señales debidas a grupos metilo singletes a δ 1.37 y 1.32 (3H-14 y 3H-15), aparecen dos nuevas señales de metilo singlete a δ 1.19 y 1.11 (3H cada una). El desapantallamiento producido sobre estos dos últimos metilos, comparado con los dobletes del grupo isopropilo del sustrato **28**, nos hace pensar que este grupo ha sido hidroxilado por el microorganismo en C-11, lo que explicaría la conversión de los dobletes en singletes y el desapantallamiento de los mismos. Esta hidroxilación sobre C-11 se aprecia claramente cuando comparamos los datos de ^{13}C RMN del diacetato **48** y los del producto **8**, observándose el efecto α de +42.3 ppm sobre C-11, los efectos β sobre C-7 (+3.32 ppm), C-12 (+8.04 ppm) y C-13 (+6.34 ppm) y los efectos γ sobre C-6 (-0.5 ppm) y C-8 (-1.77 ppm). Podemos concluir que el diacetato **48** es el 1 β ,6 β -diacetoxi-4 β ,11-dihidroxiudesmano.

BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO **28** CON *CURVULARIA LUNATA*

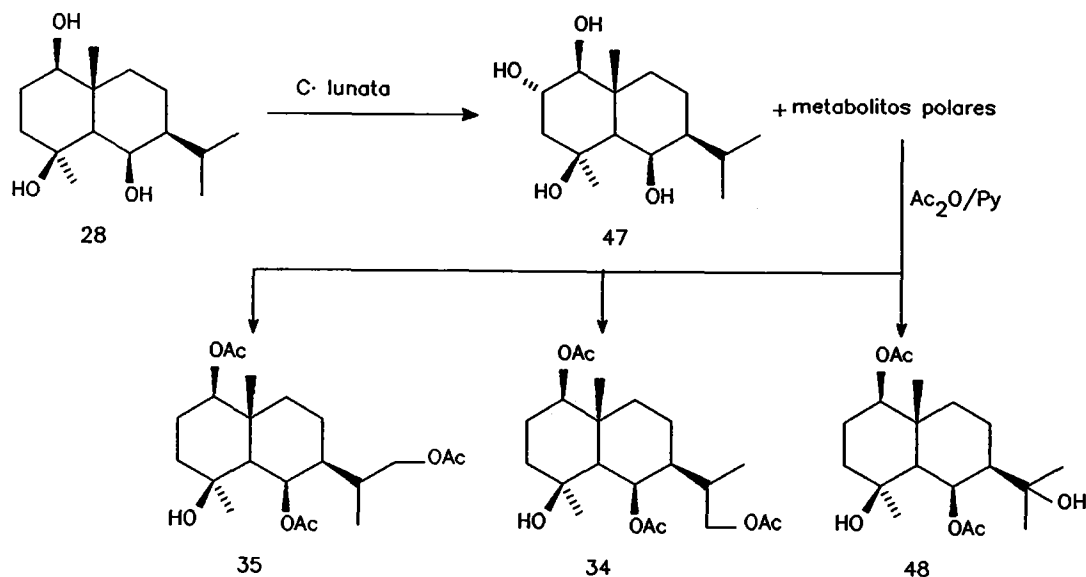


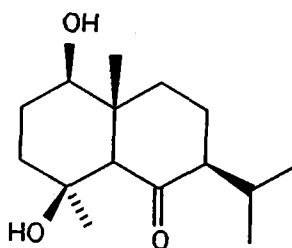
Tabla 10. Datos de ^{13}C RMN de metabolitos obtenidos en la biotransformación del producto 28 con *Curvularia lunata*.

C	28	47	48
1	80.06	84.67	81.40
2	27.01	68.19	23.47
3	39.55 ^a	47.27	40.65 ^a
4	73.02	74.41	71.97
5	52.19	52.28	53.20
6	69.06	69.07	69.90
7	49.58	49.43	52.88
8	20.50	20.20	19.09
9	39.37 ^a	39.39	39.38 ^a
10	38.69	----	38.89
11	30.14	30.30	72.02
12	21.11 ^b	21.14 ^b	29.28 ^b
13	20.82 ^b	20.78 ^b	26.85 ^b
14	14.55	15.64	15.05
15	28.78	28.79	29.92
<u>MeCOO</u>			21.33
<u>MeCOO</u>			22.18
<u>MeCOO</u>			170.96
<u>MeCOO</u>			172.27

4.2.4. Incubación del 1 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-6-ona (30)

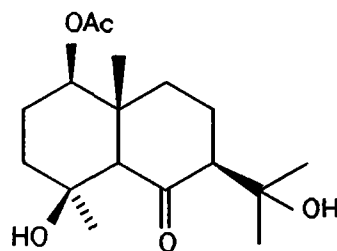
De la biotransformación del sustrato **30** durante tres días con un cultivo de *Curvularia lunata*, se aisló un 31% de un metabolito (**49**), más polar que el sustrato, y un 15% de una mezcla de metabolitos polares de la que, tras su acetilación, se obtienen el monoacetato **50** (20%) y el diacetato **51** (66%).

El metabolito **49** posee unos datos espectroscópicos que nos revelan que el microorganismo ha originado la desacetilación del sustrato, lo que se comprueba acetilando este metabolito para obtener de nuevo el sustrato **30**.



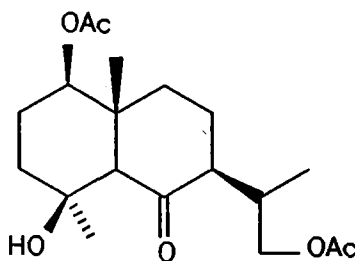
49

El primer acetato (**50**) aislado de la acetilación de la mezcla de metabolitos polares, posee un pico molecular de 313 u.m.a. (EM, Ionización Química). El espectro de ^1H RMN es similar al del sustrato **30**, salvo que los dobletes del grupo isopropilo de este aparecen como singletes desapantallados en el espectro del monoacetato **50**, al igual que sucedía en el caso del diacetato **48** estudiado en la biotransformación anterior. Esto nos sugiere que de nuevo el microorganismo ha producido una hidroxilación sobre C-11, lo que confirmamos al comparar los datos de ^{13}C RMN del producto **50** con los del sustrato **30**. Por lo tanto asignamos la estructura de 1 β -acetoxi-4 β ,11-dihidroxiudesman-6-ona al producto **50**.



50

El segundo producto (51), aislado de la acetilación de la mezcla de metabolitos polares, posee un espectro de ^1H RMN que, comparado con el del sustrato 30, nos permite observar que el grupo isopropilo ha sido funcionalizado, ya que aparecen un doblete a δ 0.95 ($J = 7.0$ Hz) y dos metilos singletes a δ 1.27 y 1.26, junto con una nueva señal formada por dos dobles dobletes centrados a δ 3.59 y 3.51, muy similar a la observada en el espectro de ^1H RMN del metabolito 34, que es debida a un grupo acetoxilo sobre C-12. Igualmente, los datos de ^{13}C RMN del diacetato 51 estan de acuerdo con la funcionalización sobre C-12. La configuración se determinó por correlación química de este diacetato con el producto 36, de configuración en C-11 conocida. Por lo tanto podemos afirmar que el diacetato 51 es el 1 β ,12-diacetoxi-4 β -hidroxieudesm-11(R)-an-6-ona.

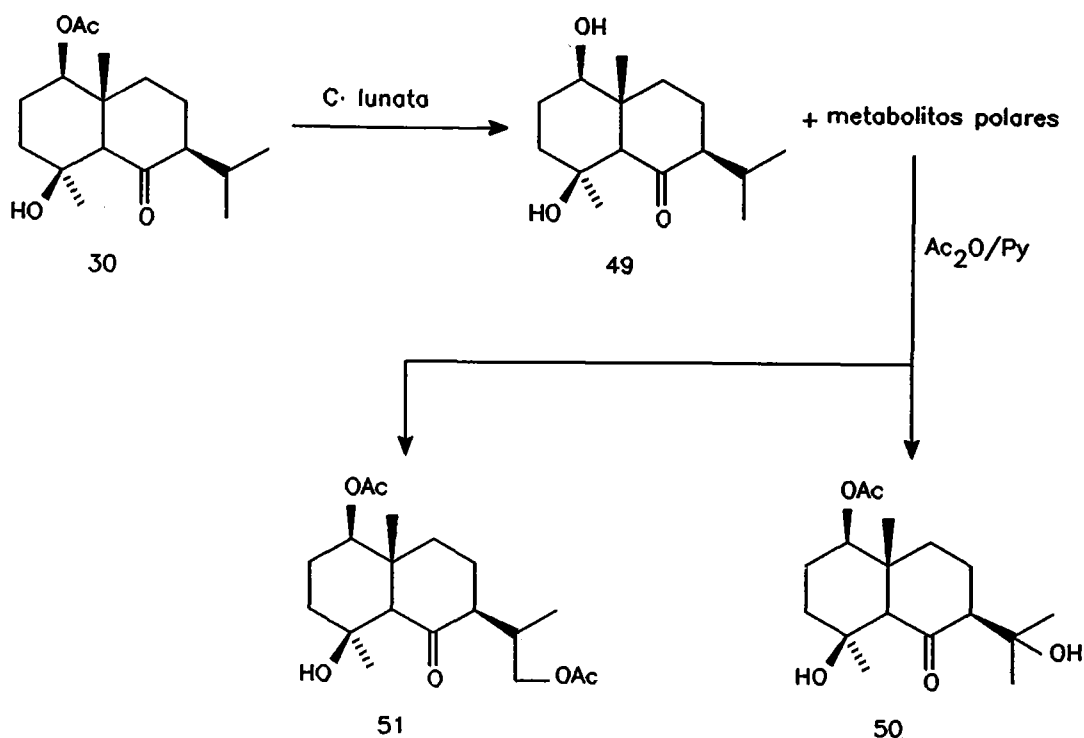


51

Tabla 11. Datos de ^{13}C RMN de los metabolitos obtenidos en la biotransformación del producto 30 con *Curvularia lunata*.

C	29	30	49	50	51
1	81.31	79.69	78.70	79.54	79.58
2	23.61	23.15	26.97	23.12	23.17
3	39.20 ^a	37.84 ^a	38.10 ^a	37.60 ^a	37.85 ^a
4	72.85	69.53	69.73	69.58	69.54
5	52.27	62.24	62.40	62.79	62.38
6	68.87	216.05	216.85	218.69	214.94
7	49.49	57.95	58.09	60.37	54.42
8	20.30	26.61	26.75	25.97	27.23
9	39.09 ^a	37.45 ^a	37.71 ^a	37.53 ^a	37.50 ^a
10	37.82	45.47	46.85	45.75	45.60
11	30.01	26.06	26.07	71.09	31.28
12	21.03 ^b	21.46 ^b	21.55 ^b	28.70 ^b	66.62
13	20.76 ^b	18.67 ^b	18.72 ^b	26.06 ^b	15.82
14	15.67	14.02	12.92	14.07	14.11
15	28.69	29.94	30.00	29.94	29.97
<u>Me</u> COO	21.28	21.24		21.27	21.04
<u>Me</u> COO					21.30
Me <u>C</u> OO	171.10	170.80		170.82	170.86
Me <u>C</u> OO					171.23

BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO 30 CON *CURVULARIA LUNATA*

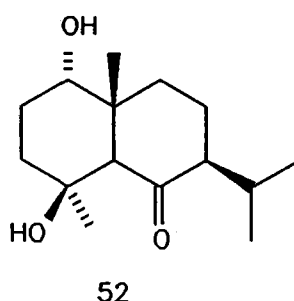


4.2.5. Incubación de la 4B-hidroxiudesmano-1,6-diona (31)

La biotransformación de la dicetona 31 con *Curvularia lunata* durante 4 días, permite aislar, además de un 7% del sustrato inalterado, un 28% del metabolito 52, un 32% del metabolito 53 y un metabolito polar que tras su acetilación origina un diacetato 54 (11%).

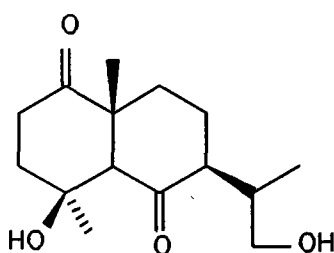
El primer metabolito (52) aislado posee un pico molecular de 255 u.m.a. ($[\text{M}+1]^+$), que se diferencia en dos u.m.a. con el sustrato 31. Esto nos sugiere que este último ha sufrido la reducción de uno de los grupos carbonilos, lo que se confirma mediante el uso de experiencias de RMN. En su espectro de ^1H RMN aparece una señal

a δ 3.52, debida a un protón geminal a grupo hidroxilo, acoplado con dos protones (dd, $J_1 = J_2 = 3$ Hz). La anchura de esta señal nos indica que se trata de un protón ecuatorial. Tras la consideración del espectro de ^{13}C RMN del metabolito **52**, comparado con el del sustrato **31**, podemos determinar cual de los dos grupos carbonilo ha sido reducido. Puesto que no se observan variaciones en los desplazamientos químicos de C-7, C-8 y C-11, y dado el fuerte apantallamiento que sufre C-5, se puede descartar la reducción del grupo carbonilo sobre C-6. Además se observan efectos α , β y γ de igual magnitud a los observados al comparar los espectros de ^{13}C RMN del metabolito **40** y del sustrato **27**. Por lo tanto, podemos significar que *Curvularia lunata* ha reducido el grupo carbonilo sobre C-1, obteniéndose la 1 α ,4 β -dihidroxiudesman-6-ona (**52**).



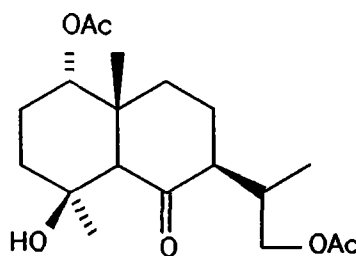
El segundo metabolito (**53**) aislado de esta incubación posee un pico molecular de 269 u.m.a. ($[\text{M}+1]^+$, 16 u.m.a. más que el sustrato **31**), lo que nos hace pensar que el sustrato **31** ha sido hidroxilado por el microorganismo. En su espectro de ^1H RMN se confirma esta hidroxilación, ya que existen dobles dobletes centrados a δ 3.59 y 3.51 similares a los observados en el correspondiente espectro del producto **36** y que era debida a una hidroxilación sobre C-12. Los datos de ^{13}C RMN están de acuerdo también con esta hidroxilación, aunque falta todavía por determinar la configuración de C-11 para este metabolito. Esto se ha realizado mediante la correlación química del metabolito **53**

con el tetrol 36 que posee una configuración 11R. Por lo tanto el metabolito 53 es la 4β,12-dihidroxiudesm-11(R)-ano-1,6-diona.



53

El último producto (54), aislado de la acetilación de metabolitos polares, posee unos datos espectroscópicos similares a los del diacetato 51, si bien su espectro de ^1H RMN se diferencia en la señal del protón geminal a grupo acetoxilo situado sobre un carbono secundario, ya que en este metabolito 54 aparece como un doble doblete estrecho a δ 4.77 ($J_1 = 3.2$, $J_2 = 2.4$ Hz), mientras que en el correspondiente espectro del diacetato 51, esta señal aparece como un doble doblete ancho a δ 4.71 ($J_1 = 11.8$, $J_2 = 4.1$ Hz). Esto nos indica que el grupo carbonilo sobre C-1 ha sido reducido por el microorganismo por la cara β , obteniéndose un alcohol axial, y que además el microorganismo ha hidroxilado sobre C-12. Los datos de ^{13}C RMN, también son concordantes con estas funcionalizaciones. Para determinar la configuración en C-11 de este producto, se procedió a la reducción del grupo carbonilo situado sobre C-6 y desacetilación de los grupos acetoxilo presentes, obteniéndose el tetrol 43, lo que nos indica que el diacetato 54 se trata de la 1 α ,12-diacetoxi-4 β -hidroxiudesm-11(R)-an-6-ona.

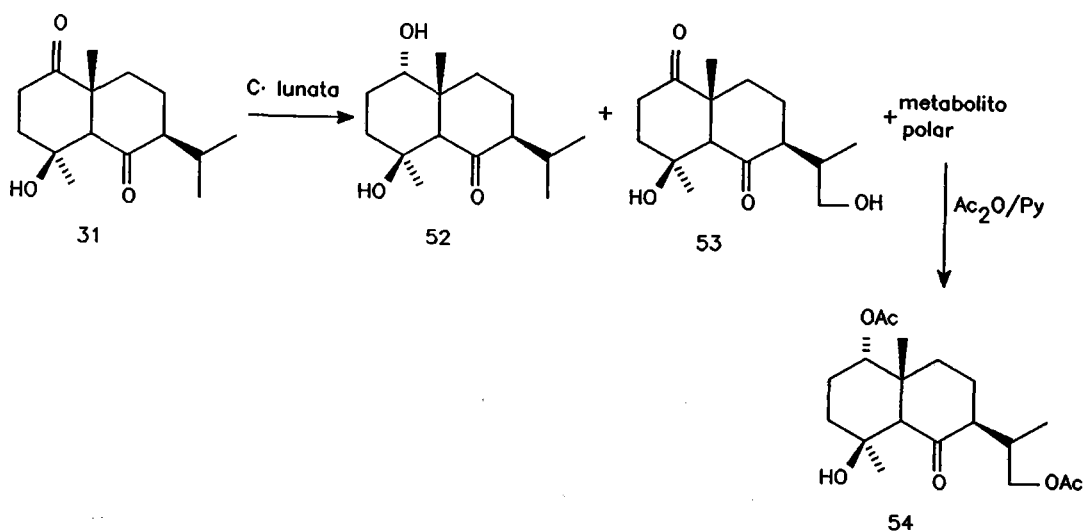


54

Tabla 12. Datos de ^{13}C RMN de los metabolitos obtenidos de la biotransformación del producto 31 con *Curvularia lunata*.

C	31	52	53	54
1	213.76	73.60	213.59	75.85
2	33.13 ^a	25.31	33.11 ^a	26.63
3	39.64	33.76	39.58	35.10 ^a
4	69.64	70.11	69.58	69.84
5	63.28	57.12	63.29	58.13
6	214.95	218.45	215.91	216.00
7	57.71	58.10	54.62	54.60
8	25.74	26.49	25.04	22.41
9	33.86 ^a	35.09	33.80 ^a	33.34 ^a
10	53.79	45.93	53.89	44.69
11	26.15	26.08	33.48	31.28
12	21.44 ^b	21.59 ^b	64.96	66.68
13	18.70 ^b	18.80 ^b	15.47	15.84
14	19.65	19.47	19.70	19.43
15	29.31	30.35	29.33	30.29
	<u>MeCOO</u>			21.06
	<u>MeCOO</u>			21.33
	<u>MeCOO</u>			170.31
	<u>MeCOO</u>			171.19

BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO 31 CON *CURVULARIA LUNATA*



4.2.6. Incubación de 4 α -hidroxieudesmanos

Después de 14 días de incubación del producto 9, aislado de la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii*, con *Curvularia lunata*, no se detectan metabolitos, recuperándose un 91% del sustrato 9 sin transformar.

La incubación de la dicetona 33 con *C. lunata* durante 5 días sólo origina un metabolito (55, 64%), procedente de la reducción del grupo carbonilo sobre C-1, lo que se deduce de la comparación de sus datos espectroscópicos con los de los metabolitos 1 α -hidroxilados obtenidos en anteriores biotransformaciones, por lo que asignamos al metabolito 55 la estructura 1 α ,4 α -dihidroxiudesman-6-ona.

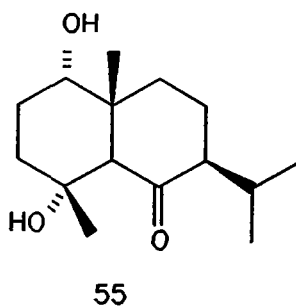
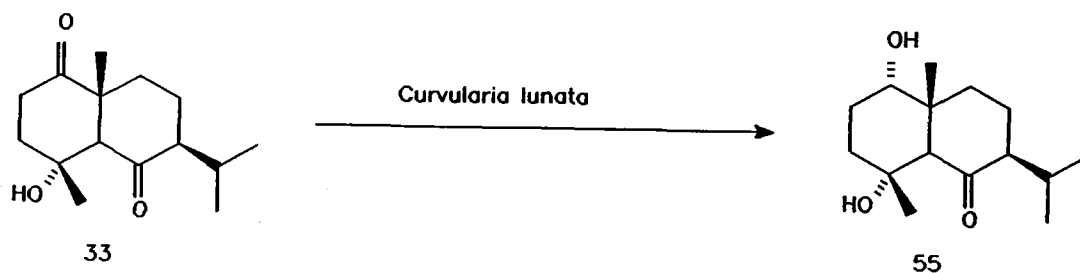


Tabla 13. Datos de ^{13}C RMN de los metabolitos obtenidos de la biotransformación del producto 33 con *Curvularia lunata*.

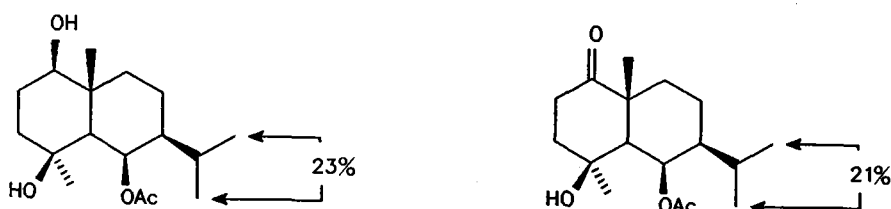
C	32	33	55
1	80.53	211.96	72.47
2	28.73	34.27 ^a	26.93
3	41.26	39.46	33.90 ^a
4	72.41	69.97	71.24
5	55.85	65.11	60.06
6	66.84	212.20	214.87
7	50.39	55.67	55.71
8	20.34	21.39	21.34
9	42.51	35.15 ^a	35.89 ^a
10	39.09	50.76	43.47
11	28.90	23.71	24.07
12	21.13 ^b	20.71 ^b	20.87 ^b
13	20.70 ^b	18.10 ^b	17.97 ^b
14	14.70	20.45	20.65
15	25.42	25.69	25.45

BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO 33 CON *CURVULARIA LUNATA*

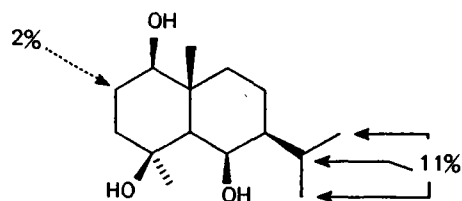


4.2.7. Discusión de los resultados obtenidos

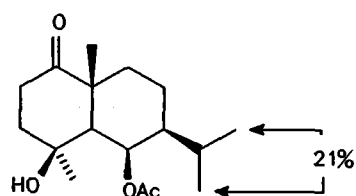
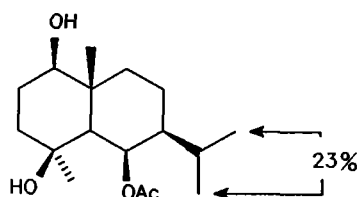
El estudio de estas biotransformaciones nos ha permitido conocer la acción del *Curvularia lunata* sobre este tipo de sustratos eudesmánicos. Así, hemos observado que cuando sobre el carbono 6 existe un grupo acetoxilo axial, independientemente de la estereoquímica del carbono 1, la acción del microorganismo se dirige hacia ambos metilos del grupo isopropilo originando 12-hidroxiderivados epímeros en C-11, aproximadamente en la misma proporción, con un 20% de rendimiento global.



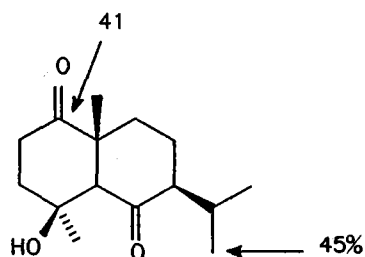
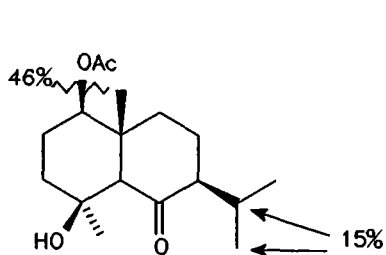
La incubación del sustrato sin el grupo acetoxilo axial sobre C-6 produce un descenso en la obtención de metabolitos 12-hidroxilados, obteniéndose sin embargo otros productos 2 α - y 11-hidroxilados.



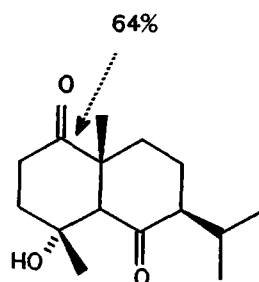
En el caso de las incubaciones de los cetoderivados, hemos observado que siempre que exista un grupo carbonilo sobre C-1, el microorganismo actúa sobre él por la cara β , más impedida estéricamente, originando productos 1α -hidroxilados, oscilando entre el 41 y el 64% de rendimiento, al igual que veíamos en las biotransformaciones de los 1-cetoeudesmenos con *C. lunata*, estudiadas anteriormente.



En sustratos que poseen un grupo carbonilo sobre C-6, se observa que solo se obtiene un 12-hidroxiderivado con configuración "R" en el carbono 11. Se ha comprobado que cuando además existe un grupo carbonilo sobre C-1, los rendimientos mejoran notablemente (45%). Si sobre C-1 existe un grupo acetoxilo se produce su parcial desacetilación (46%), junto con una hidroxilación minoritaria sobre C-11.



Cuando los productos incubados poseen una hidroxilación 4α , la acción del microorganismo es muy limitada. Solo hemos observado en este caso la reducción del grupo carbonilo sobre C-1, anteriormente comentada, no habiéndose detectado productos con otras hidroxilaciones.



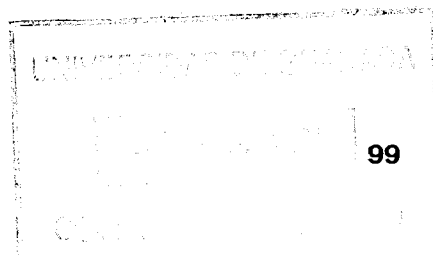
4.3. BIOTRANSFORMACION DE EUDESMANOS CON *RHIZOPUS NIGRICANS*

Con objeto de comparar la acción del *Rhizopus nigricans* con la del *Curvularia lunata* sobre sistemas eudesmánicos, hemos realizado una serie de biotransformaciones, cuyos resultados pasamos a comentar a continuación.

4.3.1. Incubación del 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroieudesmano (8)

La biotransformación del sustrato **8** con un cultivo de *R. nigricans* durante 7 días, da lugar a un metabolito (**56**, 40%) junto con otro más polar (17%) que tras acetilación origina el diacetato **48**, aislado anteriormente en la incubación del sustrato **28** con *C. lunata* y que se trata del 1 β ,6 β -diacetoxi-4 β ,11-dihidroieudesmano.

El metabolito **56** posee un pico molecular de 313 u.m.a., compatible con una fórmula molecular de $C_{17}H_{28}O_5$. En su espectro de infrarrojo observamos la presencia de una banda de grupo carbonilo (1707 cm^{-1}) junto con bandas de grupo hidroxilo (3464 cm^{-1}) y acetoxilo (1734 y 1258 cm^{-1}). En su espectro de ^1H RMN comparado con el del sustrato **8**, se observan apreciables diferencias. Así, en el espectro del metabolito **56** ha desaparecido la señal del protón axial geminal a grupo hidroxilo sobre C-1 (para el sustrato **8** aparece a δ 3.12, dd, $J_1 = 11$, $J_2 = 4$ Hz). El análisis estos datos junto con los de EM e IR nos hace pensar en la posible en la posible oxidación del grupo hidroxilo sobre C-1, del sustrato **8**, por parte del microorganismo. Esto además estaría apoyado por la existencia de una nueva señal a δ 3.08 como un doble doblete, que podría deberse



a uno de los protones de C-2 y el desapantallamiento sufrido por los protones del grupo metilo sobre C-10. Además se observan otras tres señales de metilos singlete geminales a función oxigenada, lo que nos hace pensar que este metabolito se encuentra hidroxilado sobre C-11. la existencia del grupo carbonilo sobre C-1 se pone de manifiesto observando su espectro de ^{13}C RMN (aparición de una señal a δ 215.45). La hidroxilación sobre C-11 se confirma por los efectos α , β y γ que esta produce y que aparecen reflejados en la tabla . Así, podemos decir que el metabolito **56** se trata del 6 β -acetoxi-4 β ,11-dihidroxiudesman-1-ona.

BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO **8** CON *RHIZOPUS NIGRICANS*

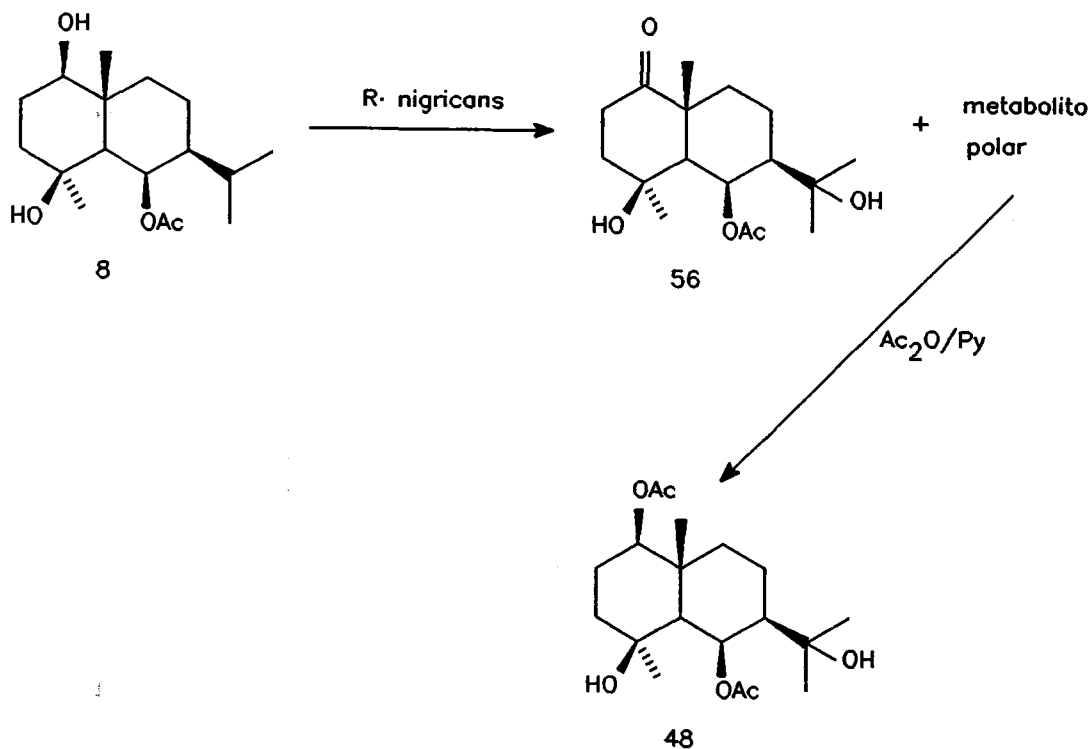


Tabla 14. Datos de ^{13}C RMN de los metabolitos obtenidos en las biotransformaciones de los productos **8** y **27** con *Rhizopus nigricans*.

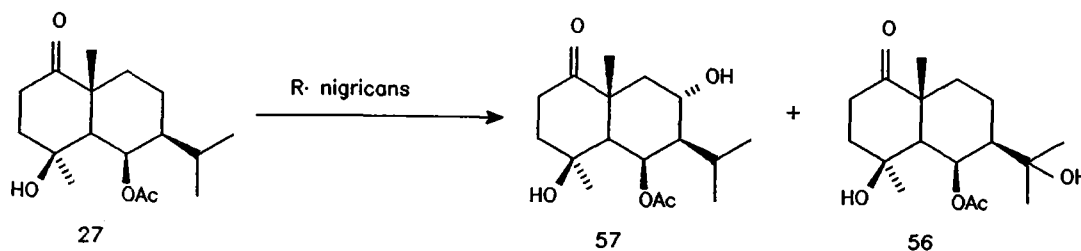
C	56	48	57
1	215.45	81.40	214.40
2	34.33 ^a	23.47	33.99
3	42.31	40.65 ^a	42.41
4	71.69	71.97	71.40
5	53.87	53.20	53.79
6	70.61	69.90	72.23
7	52.53	52.88	53.74
8	19.02	19.09	66.29
9	34.48 ^a	39.38 ^a	44.36
10	48.28	38.89	49.15
11	72.02	72.02	27.40
12	29.10 ^b	29.28 ^b	22.16 ^a
13	27.11 ^b	26.85 ^b	20.10 ^a
14	21.33	15.05	20.03
15	29.34	29.92	29.34
<u>Me</u> COO	22.11	21.33	22.09
<u>Me</u> COO		22.18	
Me <u>COO</u>	172.15	170.96	171.30
Me <u>COO</u>		172.27	

4.3.2. Incubación de la 6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-1-ona (27)

De la incubación del sustrato **27** con *Rhizopus nigricans* durante 3 días se aislan, además de un 6% del sustrato inalterado, un metabolito (**57**, 15%) junto con otro (72%) que es idéntico al metabolito **56**, aislado de la anterior incubación del sustrato **8** con *R. nigricans*.

El metabolito **57** posee un pico molecular de 313 u.m.a., lo que nos sugiere que se ha producido una hidroxilación por parte del microorganismo sobre el sustrato **27**. Comparando su espectro de ^1H RMN con el del sustrato **27**, observamos que aparece una nueva señal a δ 4.28 debida a un protón acoplado con otros tres protones. Teniendo en cuenta la estructura del sustrato **27**, esta hidroxilación solo puede encontrarse sobre C-8. La magnitud de las constantes de acoplamiento ($J_1 = J_2 = 11.1$, $J_3 = 4.5$ Hz), nos indica que este hidroxilo se encuentra en disposición ecuatorial. La posición y la estereoquímica de esta hidroxilación se confirma al comparar los espectros de ^{13}C RMN del metabolito **57** y del sustrato **27**: efecto α sobre C-8 ($\Delta\delta = +45.19$), efectos β sobre C-7 ($\Delta\delta = +4.46$) y C-9 ($\Delta\delta = +9.94$) y efectos γ -*anti* sobre C-6 ($\delta = +1.07$) y C-10 ($\delta = +1.10$). Por lo tanto, el metabolito **57** se trata del 6 β -acetoxi-4 β ,8 α -dihidroxiudesman-1-ona.

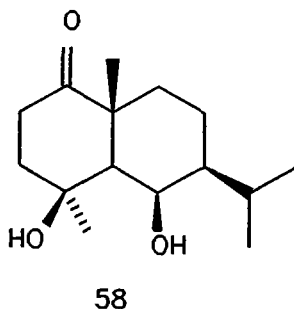
BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO **27** CON *RHIZOPUS NIGRICANS*



4.3.3. Incubación del 1 β ,4 β ,6 β -trihidroxiudesmano (28)

La biotransformación del sustrato **28** con *Rhizopus nigricans* durante 7 días, permite recuperar un 62% del sustrato **28** inalterado, junto con tres metabolitos **58** (5%), **59** (5%) y **60** (14%).

El primer metabolito aislado posee un pico molecular de 255 u.m.a. frente a las 257 u.m.a. del pico molecular del sustrato **28**. En su espectro de infrarrojo junto a la banda de grupo hidroxilo (3397 cm^{-1}) aparece una banda de grupo carbonilo (1701 cm^{-1}). Estos datos nos sugieren que como sucedió en la incubación del sustrato **8**, el microorganismo produce la oxidación del grupo hidroxilo β sobre C-1. Esto se confirma por el análisis de sus datos de RMN. En el espectro de ^1H RMN no aparece la señal del protón geminal a grupo hidroxilo sobre C-1. En su espectro de ^{13}C RMN aparece una señal a 216.32 ppm asignable al grupo carbonilo de C-1, lo que nos indica que el metabolito **58** es el 4 β ,6 β -dihidroxiudesman-1-ona.

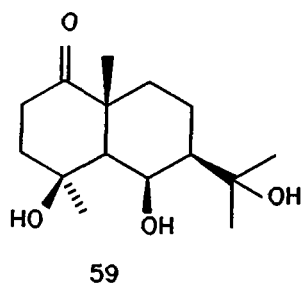


El segundo metabolito (**59**) aislado de esta incubación, posee un pico molecular de 271 u.m.a. (16 u.m.a. más que el metabolito **58**). Los datos de RMN tanto de protones como de carbono 13 (tabla 15) nos indican que el metabolito **59** es el

Tabla 15. Datos de ^{13}C RMN de los metabolitos obtenidos en las biotransformaciones de los productos **28** y **9** con *Rhizopus nigricans*.

C	58	59	60	65
1	216.32	216.31	79.91	80.28
2	34.53	34.29 ^a	27.05	28.57
3	41.04	40.97	39.71 ^a	41.49 ^a
4	72.75	72.73	73.29	71.14
5	52.95	52.78	52.05	55.45
6	70.32	69.29	69.23	69.34
7	49.18	49.05	49.49	52.91
8	20.46	16.78	16.86	18.96
9	34.53	34.58 ^a	39.09 ^a	41.72 ^a
10	47.63	47.52	38.52	39.53
11	29.57	74.12	73.72	72.07
12	21.92 ^a	29.26 ^b	28.98 ^b	29.13 ^b
13	21.07 ^a	28.85 ^b	28.83 ^b	27.30 ^b
14	20.78	21.85	14.51	14.78
15	28.75	29.49	30.07	24.63
<u>MeCOO</u>				22.39
<u>MeCOO</u>				172.97

resultado de la hidroxilación en C-11 del metabolito **58**, por lo tanto se trata del 4 β ,6 β ,11-trihidroxieudesman-1-ona.



El último metabolito (**60**) aislado posee un pico molecular 16 u.m.a. mayor que el del sustrato **28**. En su espectro de IR se observa una fuerte banda debida a grupos hidroxilo (3343 cm^{-1}). Al igual que sucede en los metabolitos **56** y **59**, del análisis del espectro de ^1H RMN del metabolito **60** se desprende que el microorganismo ha hidroxilado el grupo isopropílico del sustrato **28** en C-11, lo que además se confirma por ^{13}C RMN, al estudiar los efectos que esta hidroxilación produce sobre los carbonos 8, 11, 12 y 13 (tabla 6). Por tanto, el metabolito **60** es el 1 β ,4 β ,6 β ,11-tetrahidroxieudesmano.

BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO **28** CON *RHIZOPUS NIGRICANS*

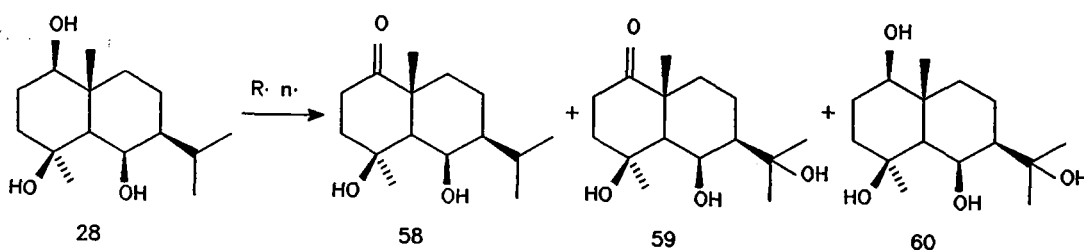


Tabla 16.

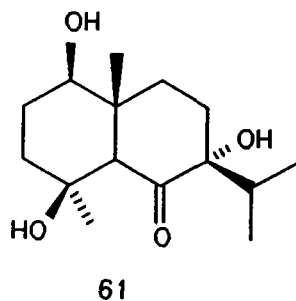
C	a	b	c	d	e	f	g
6	-0.55	-1.03	0.17	-0.36	2.56	2.28	2.79
7	3.25	-0.13	-0.09	3.36	2.25	2.23	2.16
8	-2.08	-3.68	-3.64	-1.63	-0.49	-0.88	-0.78
11	42.79	44.55	43.58	43.32	45.11	44.82	45.06
12	8.00	7.34	7.87	7.89	7.06	7.06	7.12
13	6.01	7.78	8.01	6.71	7.23	7.23	7.31

a: $\delta 56-\delta 27$, b: $\delta 59-\delta 58$, c: $\delta 60-\delta 28$, d: $\delta 65-\delta 9$, e: $\delta 62-\delta 49$, f: $\delta 63-\delta 31$ y g: $\delta 64-\delta 52$.

4.3.4. Incubación del 1 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-6-ona (30)

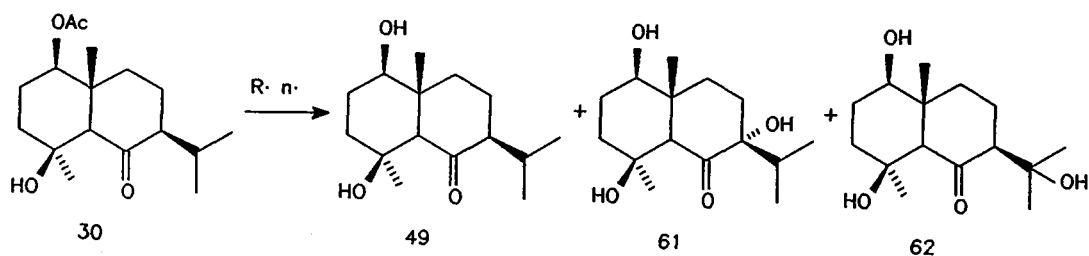
De la biotransformación del sustrato **30** con *Rhizopus nigricans* durante 3 días, se obtiene principalmente un metabolito (**49**, 56%) ya descrito anteriormente en la incubación de este mismo sustrato con un cultivo de *Curvularia lunata*, tratándose del producto de desacetilación. Además se obtienen dos metabolitos minoritarios **61** (5%) y **62** (14%).

El metabolito **61** posee un pico molecular a 271 u.m.a. (16 u.m.a. más que el metabolito **49**). Su espectro de ^1H RMN es similar al del metabolito **49**, observándose sin embargo, un fuerte desapantallamiento sobre H-5 ($\Delta\delta = +0.94$) con respecto a este mismo protón en el metabolito **49**. Al no observarse nuevas señales de protones geminales a grupo hidroxilo, podemos pensar que se ha producido una hidroxilación sobre un carbono terciario. Estando perfectamente asignados tanto el protón sobre el carbono 5 (aparece como un singlete a δ 3.13) y los metilos del grupo isopropílico (aparecen como dobletes a δ 0.93 y 0.92, $J = 6.8$ Hz), la única posición terciaria que nos queda es C-7. El desapantallamiento de H-5, anteriormente comentado, nos indica una disposición axial para esta hidroxilación. Confirmandose la misma por el análisis de los datos de ^{13}C RMN de los metabolitos **61** y **49**. Existen claros efectos γ sobre C-5 ($\Delta\delta = -5.90$), C-9 ($\Delta\delta = -4.10$), C-12 ($\Delta\delta = -4.56$) y C-13 ($\Delta\delta = -2.05$), efectos β sobre C-8 ($\Delta\delta = +6.42$) y C-11 ($\Delta\delta = +5.39$) y un efecto α sobre C-7 ($\Delta\delta = +22.25$). Por lo tanto este metabolito es el 1 β ,4 β ,7 α -trihidroxieudesman-6-ona (**61**).



El último metabolito (**62**) aislado posee unos datos espectrocópicos que comparados con los del metabolito **49**, nos indican claramente que se ha producido la hidroxilación sobre C-11 de este último (ver parte experimental y tabla 14). Este metabolito **62** se trata del 1 β ,4 β ,11-trihidroxiudesman-6-ona.

BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO **30** CON *RHIZOPUS NIGRICANS*

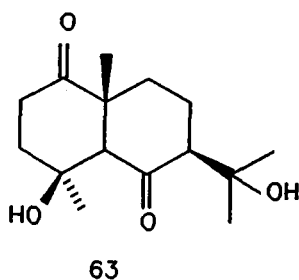


4.3.5. Incubación de la 4 β -hidroxiudesmano-1,6-diona (**31**)

La biotransformación del sustrato **31** con un cultivo de *Rhizopus nigricans* durante 4 días origina con un alto rendimiento dos metabolitos, **63** (32%) y **64** (53%), con hidroxilaciones sobre C-11, lo que se deduce de sus datos espectroscópicos, principalmente de RMN (ver parte experimental y tabla 15). El metabolito **63** (4 β ,11-dihidroxiudesmano-1,6-diona) es el resultado de la hidroxilación del sustrato **31**, por parte del microorganismo, sobre C-11.

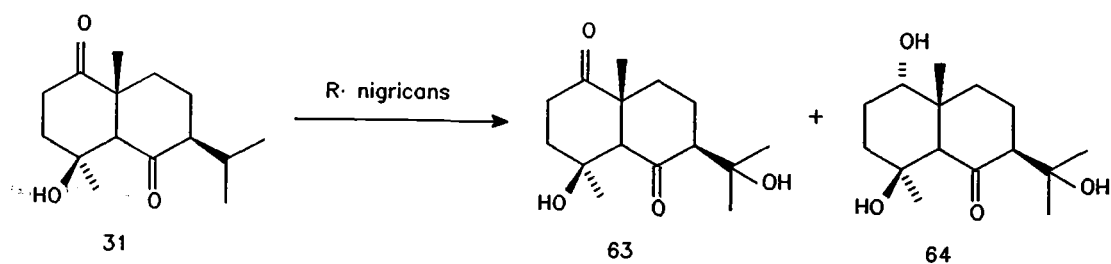
Tabla 17. Datos de ^{13}C RMN de los metabolitos obtenidos en las biotransformaciones de los productos **30** y **31** con *Rhizopus nigricans*.

C	61	62	63	64
1	78.76	78.44	213.08	73.33
2	26.83	26.59 ^a	32.73 ^a	25.25
3	37.82	37.71	39.48	32.47
4	69.95	69.73	69.54	70.12
5	56.50	62.81	63.54	57.71
6	216.00	219.41	217.23	221.24
7	80.34	60.34	60.04	60.26
8	33.17 ^a	26.26 ^b	24.86	25.71
9	33.61 ^a	37.71	33.68 ^a	34.70
10	46.79	47.03	53.74	46.24
11	31.46	71.18	70.97	71.14
12	16.99 ^b	28.61 ^b	28.50 ^b	28.71 ^a
13	16.67 ^b	25.95 ^b	26.02 ^b	26.11 ^a
14	12.43	12.92	19.53	19.38
15	29.83	29.93	29.16	30.27



El estudio de los espectros de RMN del metabolito **64**, nos indica que además de la hidroxilación sobre C-11, existe una hidroxilación sobre C-1 que se habría originado por la reducción del grupo carbonilo, situado sobre este mismo carbono, del metabolito **63**. Como se ha descrito anteriormente para las biotransformaciones de los 1-cetoderivados **27**, **31** y **33** con *C. lunata*, esta reducción tiene lugar por la cara β . Por tanto, esta reducción microbiológica del metabolito **63** origina el $1\alpha,4\beta,11$ -trihidroxiudesman-6-ona (**64**).

BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO **31** CON *RHIZOPUS NIGRICANS*

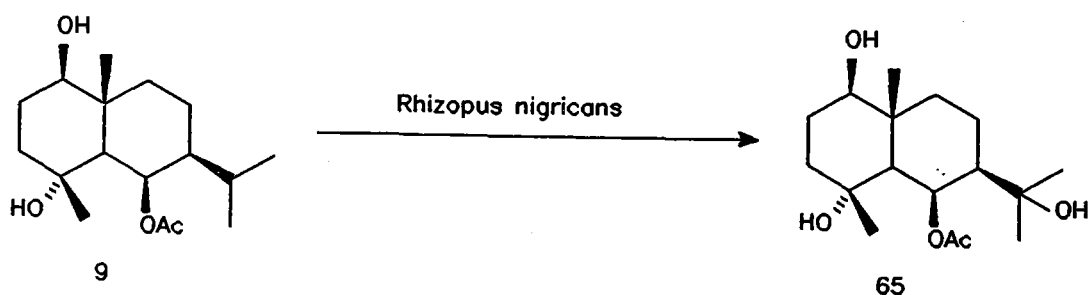


4.3.6. Incubación del 6β -acetoxi- $1\beta,4\alpha$ -dihidroxiudesmano (9)

La incubación del sustrato **9** durante 7 días con *Rhizopus nigricans*, nos permite recuperar el 59% del sustrato **9**, junto con un 18% de un metabolito (**65**).

En el espectro de masas de este metabolito (**65**), se observa un pico molecular de 315 u.m.a. compatible con una fórmula molecular de $C_{17}H_{30}O_5$. En su espectro de 1H RMN, comparado con el del sustrato **9**, de nuevo podemos observar que se ha producido la hidroxilación sobre C-11, lo que además se confirma por ^{13}C RMN (ver tabla **46**). Por lo que el metabolito **65** se trata del 6 β -acetoxi-1 β ,4 α ,11-trihidroxiudesmano.

BIOTRANSFORMACION DEL SUSTRATO **9** CON *RHIZOPUS NIGRICANS*



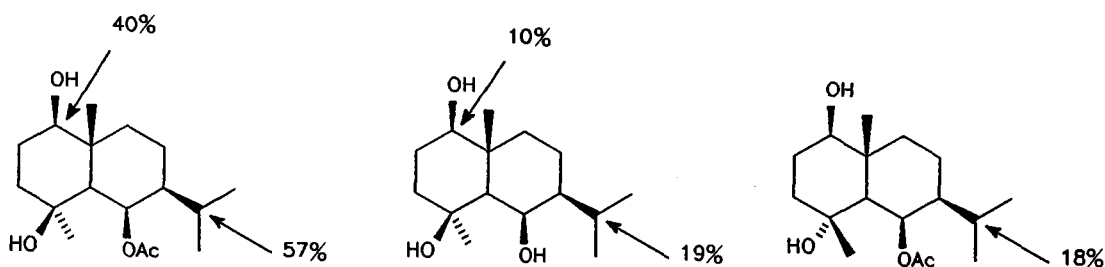
4.3.7. Discusión de los resultados obtenidos

De los resultados obtenidos en estas biotransformaciones, podemos sacar información de como la acción del *Rhizopus nigricans* sobre estos sistemas eudesmánicos, varía en función de las modificaciones efectuadas en estos sustratos.

En primer lugar podemos señalar que los sustratos 4 β -hidroxilados con un grupo hidroxilo ecuatorial sobre C-1, son parcialmente oxidados en esta posición, lo que no se observa en el sustrato 4 α -hidroxilado.

También hemos podido comprobar que la acción del *Rhizopus nigricans* está dirigida principalmente y en todos los casos, hacia la hidroxilación sobre C-11.

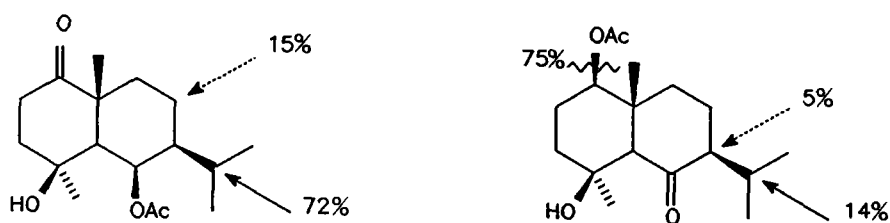
Como sucedía en las incubaciones de estos sustratos con *Curvularia lunata*, cuando sobre C-6 existe un grupo hidroxilo axial en vez de un grupo acetoxilo, el rendimiento global de metabolitos obtenidos en la transformación microbiológica disminuye considerablemente, lo que también sucede en el caso del sustrato 4 α -hidroxilado.



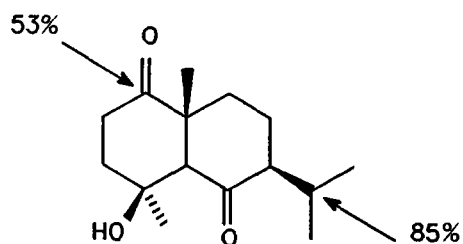
La presencia de un solo grupo carbonilo en estos sustratos modifica la acción del microorganismo, hidroxilando diferentes posiciones de la molécula, además de la ya mencionada hidroxilación sobre C-11.

En la biotransformación del sustrato con un grupo carbonilo sobre C-1 se origina un alto rendimiento de hidroxilación sobre C-11, junto con una hidroxilación minoritaria sobre C-8 por la cara α . Si el sustrato posee un grupo carbonilo sobre C-6 y un acetoxilo sobre C-1, se originan productos desacetilados, si bien el rendimiento de productos con nuevas hidroxilaciones disminuye. Hay que hacer notar que en este caso se

obtiene un producto hidroxilado sobre C-7. Como podemos ver la posición del grupo carbonilo parece influir en la posición de la hidroxilación minoritaria.



Cuando el sustrato incubado posee grupos carbonilo sobre C-1 y C-6, hemos podido observar que el rendimiento global de productos 11-hidroxilados es muy alto, actuando además el microorganismo sobre el grupo carbonilo de C-1, lo que no ocurre cuando sobre C-6 existe un grupo acetoxilo.



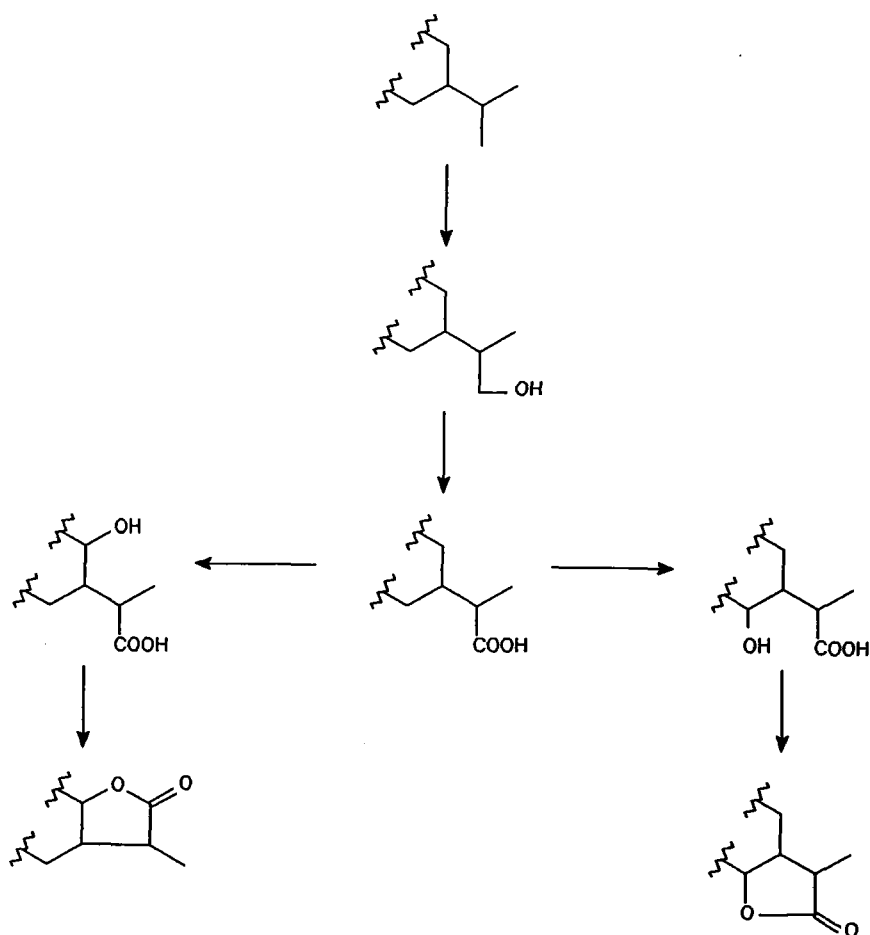
Si comparamos la acción de los hongos *Curvularia lunata* y *Rhizopus nigricans* sobre estos sistemas eudesmánicos, podemos comprobar que la acción de ambos se dirige principalmente hacia el grupo isopropilo de estas moléculas, si bien *C. lunata* hidroxila mayoritariamente sobre C-12, mientras que *R. nigricans* lo hace sobre C-11. Observamos también que la acción de *R. nigricans* sobre estos sustratos es más rápida que la de *C. lunata*.

Se ha podido observar que ciertas modificaciones químicas de los sustratos, permiten dirigir la acción del microorganismo, de forma minoritaria, hacia otras posiciones de la molécula, o bien influir en los rendimientos de los metabolitos obtenidos.

Por último, queremos destacar que con la utilización del microorganismo y sustrato adecuados, se pueden obtener una amplia gama de productos con rendimientos interesantes, como para afrontar la síntesis de nuevos productos sesquiterpénicos y profundizar así en el estudio de los mismos.

5. CONVERSION DE SESQUITERPENOS 12-HIDROXILADOS EN 6 β -SESQUITERPENOLIDAS

La obtención por vía microbiológica de 12-hidroxiderivados, como hemos comentado en los apartados 2 y 4 de esta Memoria, nos permite acceder a productos precursores de 6 β -sesquiterpenolidas, ya que biogenéticamente se conoce que la formación de estas lactonas sesquiterpénicas tiene lugar a partir de una inicial hidroxilación en C-12 y posterior evolución hacia el ácido carboxílico. Seguidamente se produce la hidroxilación enzimática sobre C-6 ó C-8 que, tras lactonización, origina los respectivos sesquiterpenolidos (Geissman, 1969 y 1973; Herz, 1977).



Dado que los productos de partida utilizados en nuestra biotransformación, poseen una función oxigenada axial sobre C-6, la introducción por los microorganismos de un grupo hidroxilo sobre C-12 nos ha permitido el acceso a las 6 β -sesquiterpenolidas.

5.1. Obtención de 1 β -hidroxi-6 β -eudesmanolidas

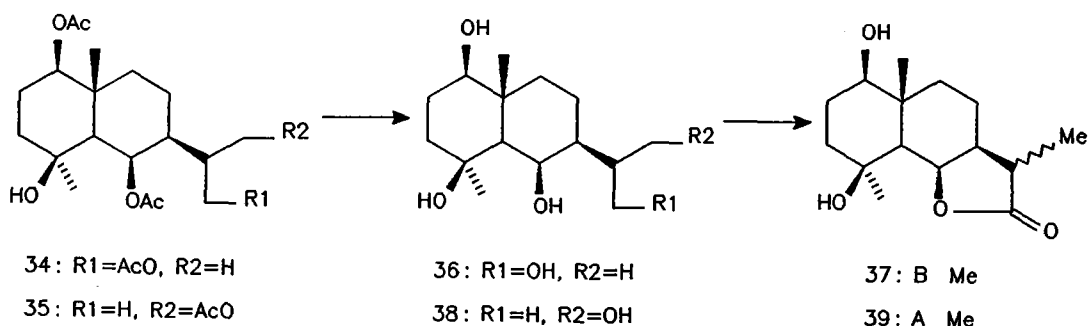
La biotransformación del 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxi-eudesmano (**8**) con *Curvularia lunata*, estudiada en el apartado 4 de esta Memoria, nos ha permitido disponer de 12-hidroxiderivados epímeros en C-11. Debido a la dificultad de su purificación, estos se aislaron como los 12-acetoxiderivados **34** y **35**. La saponificación de estos acetatos conduce a los tetroles **36** y **38** respectivamente, en donde disponemos de funciones hidroxilo en C-6 y C-12. La oxidación selectiva del grupo hidroxilo primario conduciría al correspondiente ácido, el cual se encuentra en una disposición adecuada para reaccionar con el grupo hidroxilo sobre C-6, originando el correspondiente derivado lactónico.

La obtención de derivados lactónicos a partir de 1,4-dioles, en donde uno de los hidroxilos es primario, ha sido realizada eficientemente mediante el uso de complejos de rutenio (Murahashi, 1987).

El tratamiento del tetrol **36** con $\text{RuH}_2(\text{PPh}_3)_4$, origina un producto **37** (43%) cuyo peso molecular (EM) es 4 u.m.a. inferior al del tetrol **36**. En su espectro de IR aparecen bandas a 1767 y 1161 cm^{-1} . Estos datos nos hacen pensar que el producto **37** es un producto de oxidación de **36**. En el espectro de ^1H RMN del producto **37**, comparado con el del tetrol **36**, podemos observar algunas diferencias: no aparecen las señales de los protones sobre C-12 (para el tetrol **36** aparecen como dobles dobletes centrados a δ 3.57

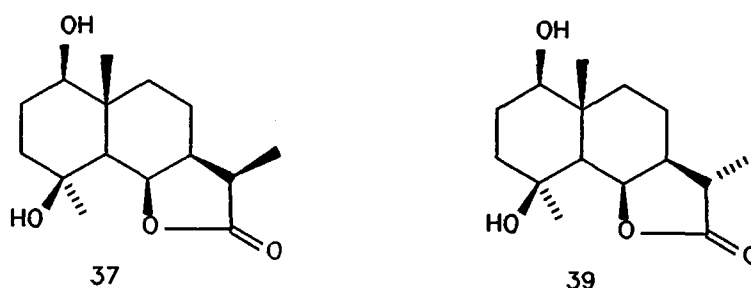
y 3.49), la señal de H-6 aparece como un doble doblete a δ 4.74 con constantes de acoplamiento de 3.7 Hz (para el tetrol **36** aparece como un singlete ancho a δ 4.34) y la señal del metilo doblete sobre C-11 aparece más desapantallada ($\Delta\delta = +0.24$). Analizando el espectro de ^{13}C RMN del producto **37**, podemos observar la existencia de un carbono carboxílico (δ 178.66), junto con tres carbonos de grupo metilo (δ 9.11, 14.29 y 29.62), no observándose carbonos metilénicos oxigenados. Estos datos nos hacen pensar que el producto **37** es el resultado de la oxidación en C-12 y lactonización del tetrol **36**.

Cuando la reacción de oxidación con el catalizador de rutenio se realiza sobre el tetrol **38**, se aísla un producto **39** (43%), cuyos datos de EM, IR y RMN son similares a los del producto **37** (ver parte Experimental). Ya que los tetroles **36** y **38** son epímeros en C-11, sus derivados lactónicos **37** y **39** respectivamente, deben ser igualmente epímeros en este carbono.



Nos queda por determinar la configuración de C-11 para cada epímero. Esta configuración se ha determinado por experiencias de RMN mono y bidimensional. Así, la señal del protón sobre C-11 de la lactona **37** (δ 2.77, dq, $J_{7,11} = J_{11,13} = 7.1$ Hz) nos

indica que el ángulo dihedral formado entre H-7 y H-11 es de aproximadamente unos 30°. La señal de H-11 en la lactona **39**, que aparece como un cuadruplete a δ 2.38 ($J_{11,13} = 7.7$ Hz), nos indica que no existe acoplamiento entre H-7 y H-11 debido a que el ángulo dihedral formado por estos protones es cercano a 90°. Estos datos están de acuerdo con una disposición 11 α -H para la lactona **37** y una disposición 11 β -H para la lactona **39**. Los datos de ^{13}C RMN para estas lactonas confirman también las configuraciones asignadas. Comparando ambos espectros, podemos observar un fuerte efecto γ ejercido por C-13 sobre C-8 y viceversa, en el caso de la lactona **37**, compatible con una disposición 11 α -H, comentada anteriormente. Las experiencias NOESY realizadas para estas lactonas confirman también estas configuraciones, mostrando una correlación dipolar entre H-6 y H-11 para la lactona **37** y correlaciones dipolares entre H-6/H-13 y H-7/H-13 para la lactona **39**. Por lo tanto, asignamos la configuración 11(R) para la lactona **37** y la 11(S) para la lactona **39**. Así, el producto **37** es la 1 β ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11 α -H-eudesman-6 β ,12-olida y el producto **39** la 1 β ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11 β -H-eudesman-6 β ,12-olida.



La asignación inequívoca de estas configuraciones, nos ha permitido determinar las configuraciones de C-11 para los tetroles **36** y **38**, así como las de los triacetatos **34** y **35**, aislados de la incubación del sustrato **8** con *Curvularia lunata*. Puesto que la configuración en C-11 de la lactona **37** es "R", la configuración en ese mismo

Tabla 18. Datos de ^{13}C RMN de productos para la formación de 1 β -hidroxilactonas.

C	36	38	37	39
1	79.96	80.10	79.41	79.38
2	27.07	27.13	27.29	27.20
3	39.55 ^a	39.57 ^a	38.64	38.66
4	73.07	72.86	71.20	71.28
5	52.27	51.90	50.29	50.15
6	71.42	68.14	77.85	77.38
7	48.49	48.63	40.18	42.46
8	16.88	22.04	18.28	23.32
9	39.49 ^a	39.34 ^a	36.58	36.79
10	39.22	38.96	38.23	37.99
11	38.68	37.91	40.55	43.44
12	64.37	66.47	178.66	179.49
13	17.82	16.15	9.11	14.84
14	14.70	14.54	14.29	14.24
15	30.11	30.24	29.62	29.63

carbono del tetrol precursor (36) también es "R". El producto 34, obtenido de la acetilación de los metabolitos polares aislados de la incubación de los sustratos 8 y 28 con *Curvularia lunata*, es por tanto el 1 β ,6 β ,12-triacetoxi-4 β -hidroxieudesm-11(R)-ano. Del mismo modo, ya que la configuración de lactona 39 es "S", el tetrol 38 tiene una configuración "S" en el carbono 11, y por tanto el producto 35 es el 1 β ,6 β ,12-triacetoxi-4 β -hidroxieudesm-11(S)-ano.

5.2. Obtención de 1 α -hidroxi-6 β -eudesmanolidas

La incubación de los sustratos 27 y 40 con *Curvularia lunata*, nos ha permitido obtener los diacetatos 41 y 42 (epímeros en C-11) funcionalizados sobre C-12, con una configuración "S" sobre C-1. La saponificación de los mismos origina los tetroles 43 y 45 respectivamente. El tratamiento del tetrol 43 con un complejo de rutenio origina la lactona 44, cuyos datos espectroscópicos son similares a los de la lactona 37. El tetrol 45 origina mediante la misma oxidación la lactona 46, con unos datos espectroscópicos similares a los de la lactona 39.

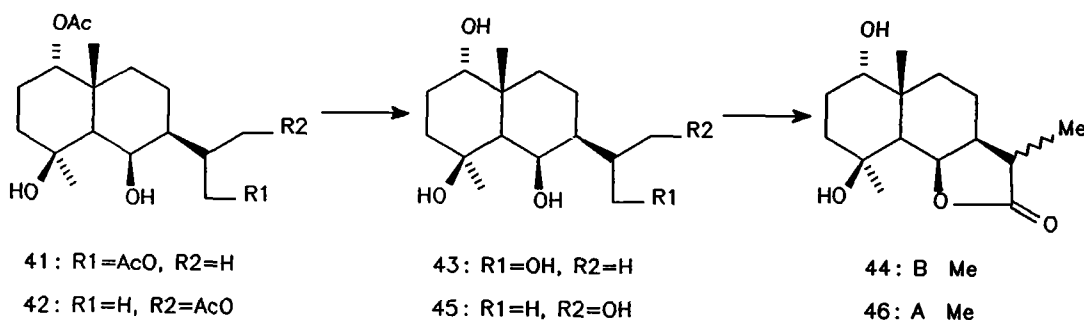
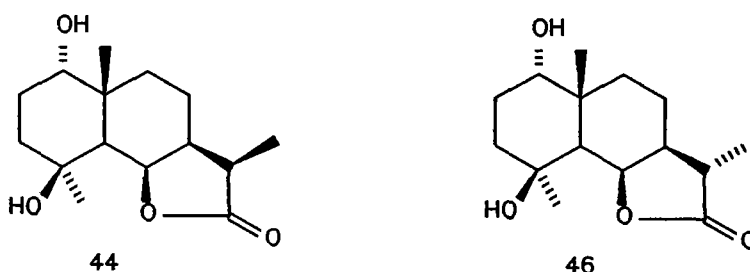


Tabla 19. Datos de ^{13}C RMN de productos para la formación de 1 α -hidroxilactonas.

C	43	45	44	46
1	75.99	75.99	78.64	78.11
2	25.27	25.31	25.76	25.64
3	35.16	34.82	34.24	34.21 ^a
4	73.90	73.62	71.86	71.88
5	48.68	48.70	44.29	44.18
6	71.71	68.15	75.09	75.04
7	46.01	45.59	40.63 ^a	42.73
8	17.97	22.30	18.53	23.51
9	36.68	36.70	34.24	34.37 ^a
10	38.37	38.10	37.38	37.10
11	38.96	38.04	40.48 ^a	43.43
12	64.42	66.17	178.87	179.65
13	16.97	16.21	9.13	14.72
14	22.27	22.07	20.91	20.80
15	30.37	30.41	29.82	29.79

La comparación de los espectros de RMN para las lactonas **44** y **46**, nos ha permitido asignar la configuración 11(R) para la lactona **44** y la 11(S) para la lactona **46**, del mismo modo que se realizó para las lactonas **37** y **39**. La lactona **44** es por tanto la 1 α ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11 α -H-eudesman-6 β ,12-olida y la lactona **46** la 1 α ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11 β -H-eudesman-6 β ,12-olida. De esta forma hemos podido obtener 6 β -lactonas eudesmánicas, con ambas configuraciones en C-1, mediante la combinación de métodos químicos y microbiológicos.

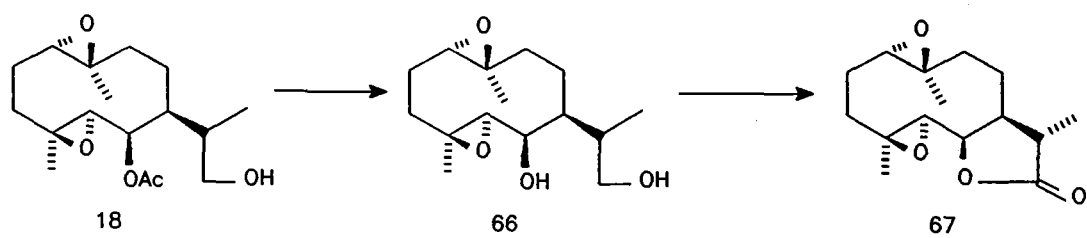


A partir de la incubación de la dicetona **31** con *Curvularia lunata*, se obtiene con un buen rendimiento la dicetona **53**, que químicamente se puede transformar en la 1 β -hidroxilactona **37**, y el producto **54**, que puede ser convertido en la 1 α -hidroxilactona **44**, ambas con configuración 11(R).

5.3. Obtención de 6 β -germacranolidas

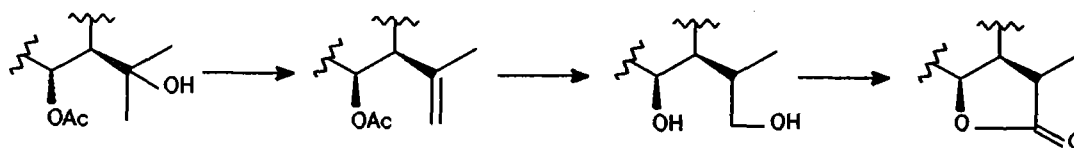
La biotransformación del sustrato **12** con *Rhizopus nigricans*, dió lugar al 12-hidroxiderivado **18**, como vimos en el apartado 2 de esta Memoria. Puesto que estos sistemas germacránicos poseen una función oxigenada sobre C-6, al igual que los sistemas eudesmánicos estudiados anteriormente, la obtención del metabolito **18** nos ha abierto la vía hacia la síntesis de 6 β -germacranolidas.

La saponificación del metabolito **18** conduce al diol **66** que, al igual que los tetroles **36**, **38**, **43** y **45**, posee un grupo hidroxilo (axial) sobre C-6 y otro sobre sobre C-12, con la disposición adecuada para la formación del correspondiente derivado lactónico. El tratamiento de este diol con $\text{RuH}_2(\text{PPh}_3)_4$ origina un producto (**67**), en cuyo espectro de masas se observa un pico molecular 4 u.m.a. menor que el pico molecular del diol **66**. Dado que en su espectro de IR no se observan bandas de grupo hidroxilo, pensamos que el producto **67** efectivamente se trata del producto de lactonización de **66**, lo que se confirma por el estudio de sus datos de RMN. En su espectro de ^1H RMN aparecen, además de las señales de protones geminales a grupo epoxídico (H-1, δ 2.81, dd, $J_1 = 9.5$, $J_2 = 5.5$ Hz y H-5, δ 2.94, d, $J = 9.5$ Hz), una señal de un protón geminal a función oxigenada a δ 4.24 (dd, $J_1 = 9.5$, $J_2 = 4.7$ Hz) que asignamos al protón sobre C-6, no observándose las señales debidas a los protones de C-12 (dobles dobletes centrados a δ 3.74 y 3.51 para el diol **66**). Además, se observa que el metilo doblete sobre C-11 aparece más desapantallado (δ 1.32, d, $J = 7.7$ Hz) que el correspondiente metilo del diol **66**, como ocurre en el caso de las lactonas **39** y **46**. Estos datos están de acuerdo con una configuración "S" para el carbono 11. La asignación de esta configuración se confirma analizando los espectros de ^{13}C RMN de la lactona **67** y del diol **66**, en los que se observan variaciones en los desplazamientos químicos de los carbonos similares a los existentes entre las lactonas **39** y **46** con sus respectivos tetroles **38** y **45**. Por lo tanto, la lactona **67** se trata de la $(1\alpha, 10\beta), (4\beta, 5\alpha)$ -diepoxi- $7\alpha, 11\beta$ -H-germacran- $6\beta, 12$ -olida. Esto nos permite además asignar las configuraciones 11(S) tanto para el diol **66** como para el metabolito **18**. Así, el metabolito **18** es el 6β -acetoxi- $(1\alpha, 10\beta), (4\beta, 5\alpha)$ -diepoxi-12-hidroxigermacr-11(S)-ano.



6. CONVERSION DE SESQUITERPENOS 11-HIDROXILADOS EN 6 β -SESQUITERPENOLIDOS

La obtención de 11-hidroxiderivados de forma mayoritaria en las biotransformaciones con *Rhizopus nigricans* de los sesquiterpenos estudiados nos ha permitido disponer de productos que puedan ser convertidos en 6 β -sesquiterpenolidos, mediante la deshidratación de este grupo hidroxilo (sobre C-11) y posterior conversión hacia el 12-hidroxiderivado, que como ya hemos visto en el apartado anterior, es un precursor de los 6 β -sesquiterpenolidos.

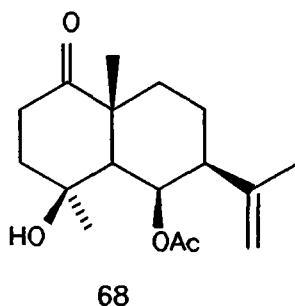


La deshidratación de alcoholes terciarios ha sido realizada a través de la formación del mesilato, mediante el uso de la 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Yadav, 1989), un catalizador hipernucleófilo de reacciones de acilación. En alcoholes terciarios situados sobre un grupo isopropílico unido a un grupo voluminoso, la reacción de deshidratación da lugar al producto de eliminación que sigue la regla de Hofmann, es decir, al producto con el doble enlace menos sustituido (Yadav, 1989). En las reacciones de deshidratación que hemos realizado sobre los 11-hidroxisesquiterpenos sólo se obtienen productos de deshidratación que siguen la regla de Hofmann. Son precisamente estos productos de deshidratación los necesarios para su conversión en 12-hidroxisesquiterpenos.

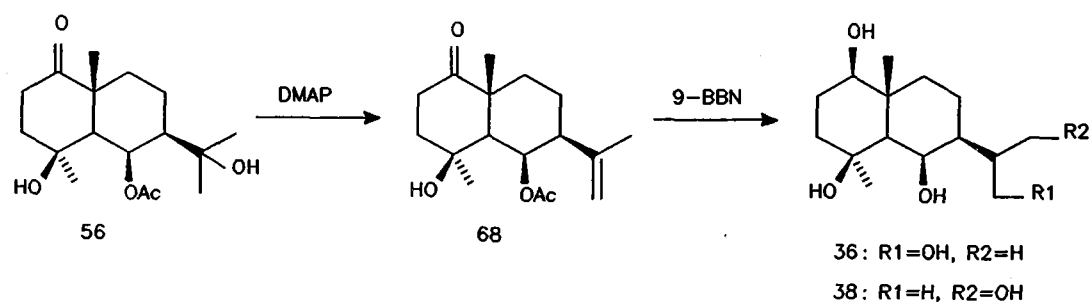
Las reacciones de hidrobioración de dobles enlaces se han llevado a cabo mediante la utilización del agente hidrobiorante 9-borabicio[3.3.1]nonano (9-BBN), un reactivo regioselectivo de olefinas terminales y de olefinas con estereoquímica *cis* (Brown, 1974). Un grupo metilo situado en la posición α del doble enlace aumenta el rendimiento de productos de hidrobioración, en comparación con el correspondiente alqueno sin metilo en posición α , cuando se utiliza 9-BBN como reactivo, a pesar de los mayores impedimentos estéricos que se producen. Esto puede ser debido al efecto inductivo de un grupo metilo en posición α , que debe incrementar la disponibilidad electrónica del doble enlace sobre el que está situado, lo que favorece la reacción de hidrobioración (Brown, 1976). Los productos de deshidratación que hemos obtenido a partir de los 11-hidroxisesquiterpenos, obtenidos por vía microbiológica, poseen un doble enlace terminal con un grupo metilo en posición α , es por ello por lo que hemos elegido el 9-BBN como reactivo de hidrobioración.

6.1. Conversión de eudesmanos 11-hidroxiados en 6 β -eudesmanolidas

El tratamiento con DMAP del metabolito **56**, obtenido de las incubaciones de los sustratos **8** y **27** con *Rhizopus nigricans*, origina el producto **68**, cuyos datos espectroscópicos nos revelan que se ha producido la deshidratación del hidroxilo sobre C-11, obteniéndose la 6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesm-11-en-1-ona.

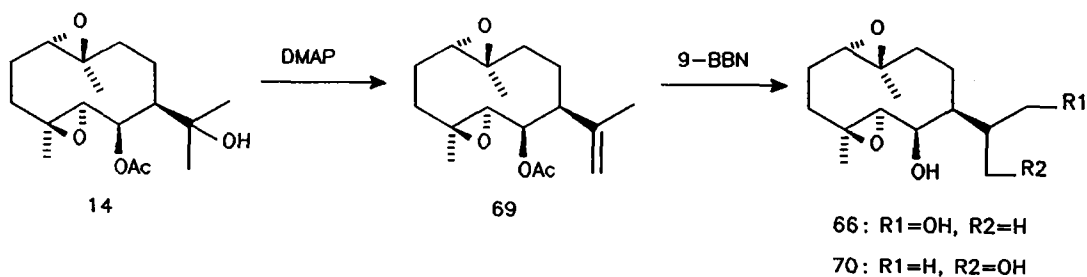


La hidrobioración del producto **68** con 9-BBN conduce a dos productos polares, uno de ellos mayoritario (66%) cuyos datos espectroscópicos coinciden con los del tetrol **36** y el otro más minoritario (19%) idéntico al tetrol **38**. Como hemos visto en el apartado anterior estos tetroles (**36** y **38**) pueden ser transformados fácilmente en las lactonas **37** y **39** respectivamente.

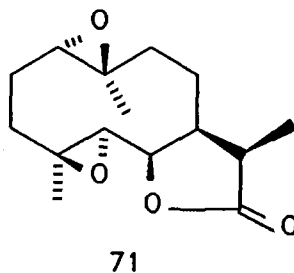


6.2. Conversión de germacranos 11-hidroxiados en 6 β -germacranolidas

El metabolito 11-hidroxiado (**14**) obtenido de forma mayoritaria en la biotransformación del sustrato **12** con *Rhizopus nigricans*, se convirtió en el (1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacr-11-eno (**69**) por deshidratación de su grupo hidroxilo con DMAP, de forma paralela a la descrita para el metabolito **56**. La posterior hidrobioración de este producto con 9-BBN condujo a un producto (28%) cuyos datos espectroscópicos coinciden con los del diol **66**, junto con otro producto (**70**, 55%) cuyos datos espectroscópicos nos indican que se trata del epímero en C-11 del diol **66**. Como vimos en el apartado anterior, el diol **66** puede ser convertido en la lactona **67**.



El tratamiento con $\text{RuH}_2(\text{PPh}_3)_4$ del diol **70** conduce al derivado lactónico **71**. La comparación de los datos espectroscópicos de las lactonas **67** y **71** entre sí y con los de las lactonas **37** y **39**, nos permiten establecer claramente las configuraciones de C-11 para las lactonas **67** y **71**. Así, podemos observar como las señales debidas a H-6 y 3H-13 aparecen más desapantalladas para la lactona **67** con respecto a las correspondientes señales de la lactona **71**, mientras que la señal de H-11 aparece más desapantallada en el espectro de la lactona **71**. Considerando los datos de ^{13}C RMN de estas lactonas, podemos observar que en el caso del producto **71** el metilo sobre C-11 produce un fuerte efecto γ sobre C-8 y viceversa, como ya vimos al comparar los espectros de ^{13}C RMN de las lactonas **37** y **39**, siendo compatible con una disposición "B" del grupo metilo sobre C-11. Así, la lactona **71** se trata de la $(1\alpha,10\beta),(4\beta,5\alpha)$ -diepoxi-7 α ,11 α -H-germacran-6 β ,12-olida.



Es interesante señalar que estas reacciones sobre el metabolito **56** nos han permitido obtener como producto mayoritario el diol **70**, no obtenido por vía microbiológica. De esta forma combinando métodos químicos y microbiológicos, podemos obtener ambas 6 β -lactonas germacránicas.

Tabla 20. Datos de ^{13}C RMN de los productos **66**, **69** y **68**.

C	66	69	68
1	60.24	60.24	215.41
2	24.70	24.66	34.26 ^a
3	34.48	34.25	41.61
4	59.89 ^a	59.49 ^a	71.75
5	67.78	65.31	53.24
6	69.44	73.02	70.32
7	46.92	49.12	48.89
8	23.41	23.05	21.37
9	40.59	40.33	34.39 ^a
10	60.06 ^a	59.84 ^a	48.15
11	39.78	146.12	145.44
12	64.62	112.15	111.58
13	16.10	22.41	22.97
14	16.74	16.85 ^b	21.22
15	16.74	16.75 ^b	29.27
<u>MeCOO</u>		21.07	21.51
Me <u>COO</u>		170.01	170.61

7. ESTUDIOS CONFORMACIONALES DE EUDESMANOS

7.1. Introducción

Los métodos de cálculo, aplicados en Química, nos pueden proporcionar diversa información sobre las moléculas, tal como su estructura, calor de formación, momento dipolar, potenciales de ionización, densidad de carga, órdenes de enlace y densidades de spin. Se utilizan también para calcular energías conformacionales relativas, ordenamientos cristalinos e incluso estructuras de estados de transición y reactividades.

Los primeros campos de fuerza desarrollados, precursores de los de hoy en día, incluían únicamente dos funciones de potencial, una relativa a la energía de deformación de enlace (extensión ó compresión) y la otra dependiente de la flexión de ángulos. Ambas funciones tenían la misma forma y se utilizaban para calcular energías de tensión de diversas moléculas.

Los modernos campos de fuerza contienen muchos más tipos de funciones de potencial. La más importante de estas funciones adicionales son los potenciales torsionales, en los que se repite tres veces una barrera torsional del tipo del etano en 360° (Allinger, 1976). Un avance importante se ha realizado con la inclusión de funciones torsionales, en las que se dan una sola ó dos barreras torsionales en los 360° , en el llamado campo de fuerzas MM2 (Allinger, 1977).

Los cálculos de Mecánica Molecular ó de campos de fuerza se basan en un modelo mecano-cuántico de estructura molecular (Boyd, 1982 y Cox, 1982). Consideran una molécula como una agrupación de átomos unidos entre si por fuerzas elasticas ó armónicas. Estas fuerzas se pueden describir por funciones de energía potencial de parámetros estructurales tales como longitudes de enlace, ángulos de enlace, interacciones no enlazantes y demás. La combinación de estas funciones de energía potencial constituye el campo de fuerzas. La energía, E , de la molécula en el campo de fuerzas se deduce a partir de la desviación de los valores ideales de los parámetros estructurales y viene dada aproximadamente por la suma de las contribuciones energéticas:

$$E = E_s + E_b + E_\phi + E_{nb} + \dots$$

E_s (tensión de enlace); E_b (potencial de deformación de ángulos); E_ϕ (potencial de rotación interna en función del ángulo torsional ϕ); E_{nb} (energía potencial relativa a interacciones de átomos no enlazados, como función de la distancia al nucleo).

Constituye la llamada ecuación de Westheimer. E es la energía *estérica*. Es la diferencia de energía entre la molécula real y una molécula hipotética, donde todos los valores estructurales como longitudes de enlace y ángulos de enlace tiene exactamente su valor ideal ó *natural*.

La combinación de las tres primeras funciones de potencial es conocida como campo de fuerzas de valencia.

Los campos de fuerza de valencia no son, sin embargo, todavía adecuados para realizar cálculos altamente cualitativos y cuantitativos. Para tales aplicaciones se incluyen las así llamadas funciones de Van der Waals, utilizadas para estimar interacciones estéricas (Allinger, 1976 y Schneider, 1975).

Un estudio extendido y de gran interés para el análisis conformacional se ha realizado sobre la relación entre constantes de acoplamiento vecinales y los ángulos de torsión involucrados.

En general para sistemas saturados, esta relación viene dada por la ecuación de Karplus (1963):

$$J_{\text{HH}'} = A + B \cos\phi + C \cos 2\phi$$

dada para el fragmento HCC'H'. Para una longitud de enlace C-C de 1.543 Å, con átomos de carbono sp³ y un promedio de energía (ΔE) igual a 9 eV, las constantes son A = 4.22, B = -0.5 y C = 4.5 cps.

Una vez obtenidas las constantes de acoplamiento se pueden calcular las poblaciones de los distintos conformeros (Altona, 1980) según la ecuación:

$$J_{(\text{av})} = P_{\text{I}} J_{\text{I}} + P_{\text{II}} J_{\text{II}}$$

En general, para sistemas insaturados en los que se incluyen fragmentos del tipo CH-CH=CH, dicha relación entre constantes de acoplamiento vecinales y ángulos

torsionales viene definida por la ecuación semiempírica derivada por Garbisch:

$${}^3J_{(\text{vecinal})} = 6.6 \cos^2\phi + 2.6 \sin^2\phi$$

$${}^4J_{(\text{alílica})} = 2.6 \cos^2\phi - 1.3 \sin^2\phi$$

para ángulos dihedros ϕ entre 0° y 90° .

Si hay sustituyentes electronegativos sobre el átomo de carbono alílico, se introduce un factor de corrección utilizando la ecuación:

$${}^3J = (4 \cos^2\phi + 2.6) (1 - \sum f_i \Delta x_i)$$

donde $\Delta x_i = x_i - x_H$; $f_i = 0.05$, $0^\circ < \phi < 90^\circ$; y $f_i = 0.15$, $90^\circ < \phi < 180^\circ$

Se ha introducido más recientemente (Haasnoot, 1980) una generalización empírica de la ecuación de Karplus clásica:

$${}^3J_{\text{HH}'} = P_1 \cos^2\phi + P_2 \cos\phi + P_3 + \sum \Delta x_i [P_4 + P_5 \cos^2(\epsilon_i \phi + P_6 \Delta x_i)]$$

Los primeros tres términos de la ecuación de Karplus generalizada describen la dependencia de la constante de acoplamiento vecinal en un fragmento H-C-C-H con el ángulo torsional. Los siguientes términos tienen en cuenta la dependencia de ${}^3J_{\text{HH}'}$ con la electronegatividad y la orientación relativa del sustituyente S_i . ϵ_i toma los valores +1 ó -1 según la orientación de S_i con respecto a su protón geminal. los valores de x_i vienen influenciados por los sustituyentes β . Cuando la influencia de los sustituyentes β es

opuesta a la de los sustituyentes α , el efecto electronegativo de un sustituyente α se puede considerar moderado por un sustituyente β . La electronegatividad de un sustituyente α se puede expresar como:

$$\Delta X^{\text{grupo}} = \Delta X^{\text{sust. } \alpha} - P_j \sum \Delta X_j^{\text{sust. } \beta}$$

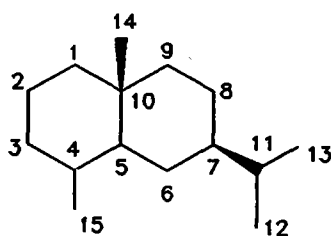
donde la suma es sobre todos los sustituyentes j enlazados al sustituyente en α es S_j .

En estas dos últimas ecuaciones se basan los cálculos realizados de constantes de acoplamiento en el programa QCMP 025 (Petillo), a partir de geometrías deducidas por cálculos de Mecánica Molecular.

La bondad de los estudios conformacionales que vamos a describir seguidamente se puede comprobar comparando la similitud existente entre las constantes de acoplamiento teóricas y las experimentales.

7.2. Análisis conformacional de eudesmanos (Parra, 1990)

En primer lugar vamos a establecer las disposiciones teóricas de los átomos en la molécula. Para ello situamos la molécula de forma que los enlaces carbono-carbono C2-C3, C5-C10 y C7-C8 se situen en disposición vertical:



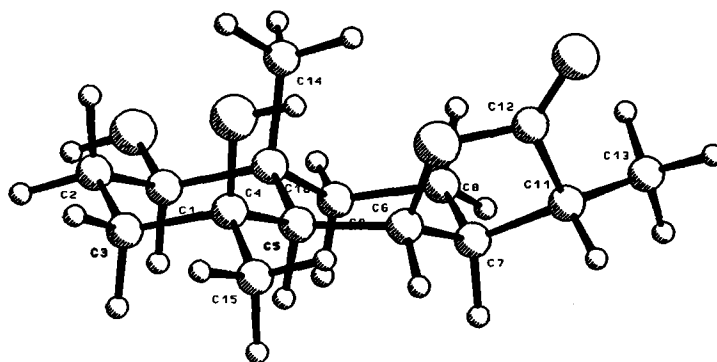
A continuación determinamos, con la ayuda de un modelo molecular, la disposición teórica de los enlaces carbono-carbono con respecto al plano vertical que determinan los enlaces C2-C3, C5-C10 y C7-C8.

Con estos datos teóricos podemos calcular las energías correspondientes a las distintas conformaciones de la molécula, con la ayuda de un campo de fuerzas.

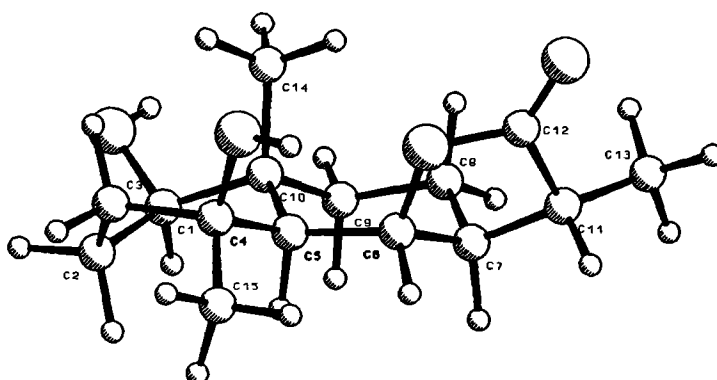
7.2.1. Análisis conformacional de 6 β -lactonas

- Conformaciones de la 1 β ,4 β -dihidroxi-6 α ,11 α -H-eudesman-6,12-olida.

La conformación silla-silla posee una energía de 32.56 Kcal/mol con una contribución a la estructura de la molécula del 99.99%.



La conformación bote-silla posee un energía de 37.99 Kcal/mol con una contribución del 0,01%.



Las conformaciones silla-bote y bote-bote no contribuyen a la estructura de la molécula. Estas poseen una energía de 40.02 y 42.07 Kcal/mol respectivamente.

Una vez vista la estructura conformacional de los anillos de la molécula, nos queda por ver la disposición de los protones de los grupos hidroxilo, por lo que realizamos una serie de giros de los mismos para calcular la disposición que posee un mínimo de energía. Los giros realizados son tres: "G(+)", alrededor de 60° de ángulo

dihedro hacia la derecha entre los átomos extremos; "G(-)", alrededor de 60° hacia la izquierda entre los átomos extremos; y "ANTI", alrededor de 180° entre los átomos extremos.

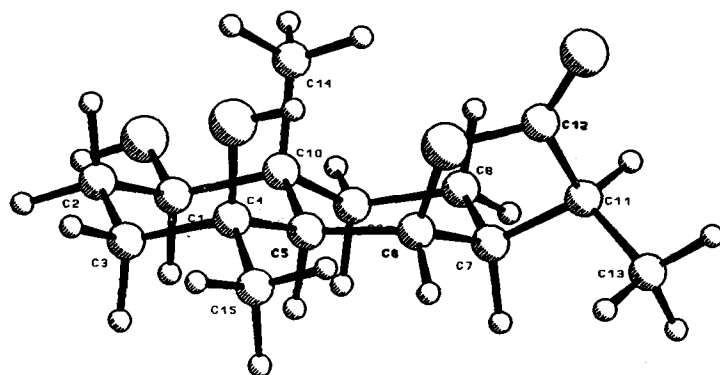
En este caso, los giros los vamos a realizar entre los enlaces C2-C1 y O18-H23 a través del enlace C1-O18 (Angulo-1) y entre los enlaces C3-C4 y O19-H24 a través del enlace C4-O19 (Angulo-2). Las energías correspondientes a las diversas conformaciones se reflejan en la siguiente tabla:

Configuración	angulo-1	angulo-2	$E_{\text{lactona(R)}}$
ANTI-ANTI	-162.0	168.2	32,56
G(+)-ANTI	53.1	169.8	32.26
G(-)-ANTI	-61.5	172.6	31.91
ANTI-G(+)	-164.5	65.4	32.53
ANTI-G(-)	-163.2	-23.4	33.26
G(-)-G(+)	-62.1	68.0	32.14
G(-)-G(-)	-64.9	-26.6	32.96
G(+)-G(+)	54.3	69.8	32.40
G(+)-G(-)	54.6	-13.5	33.89

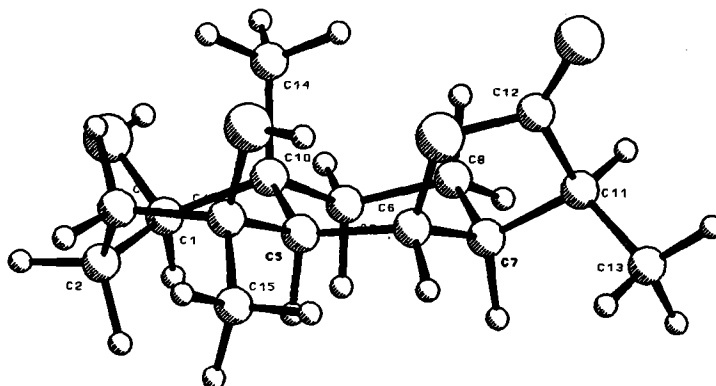
Como podemos observar, se consigue la energía mínima cuando la disposición es G(-)-ANTI o sea, cuando el ángulo dihedro formado entre los enlaces C2-C1 y O18-H23 es de -61.5° y el formado entre C3-C4 y O19-H24 es de 172.6°. Esta energía es de 31.91 Kcal/mol .

- Conformaciones de la 1 β ,4 β -dihidroxi-6 α ,11 β -H-eudesman-6,12-olida.

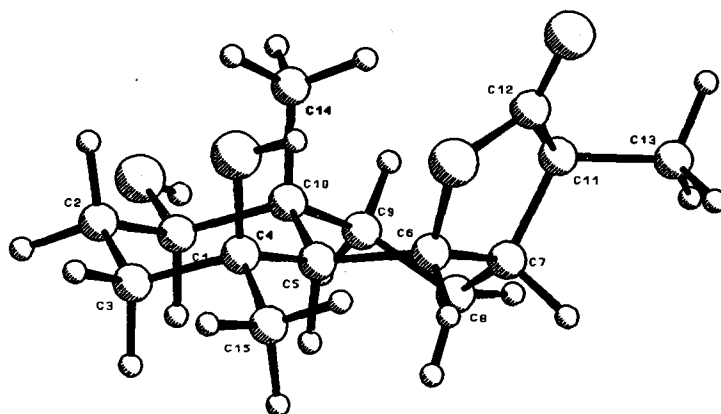
La conformación silla-silla posee una energía de 32.87 Kcal/mol con una contribución a la estructura de la molécula del 99.89%.



La conformación bote-silla posee una energía de 38.37 Kcal/mol con una contribución del 0.01%.



En esta molécula la conformación silla-bote tiene una contribución del 0.10% a la estructura de la misma, lo que no ocurre con su anterior epímera en el carbono 11. Esto es debido al menor impedimento estérico que produce el metilo sobre C-11 en aquella. La energía para esta conformación es de 36.93 Kcal/mol .



La conformación bote-bote, al igual que en la molécula anterior, no contribuye a la estructura de la molécula. La energía es de 41.72 Kcal/mol .

Realizando los mismos giros de los protones de los grupos hidroxilo, se obtienen las energías correspondientes a cada conformación, que aparecen en la siguiente tabla:

Configuración	Angulo-1	Angulo-2	$E_{\text{lactona(S)}}$
ANTI-ANTI	-168.8	167.3	32.87
G(+)-ANTI	52.9	168.7	32.56
G(-)-ANTI	-61.9	171.1	32.21
ANTI-G(+)	-164.2	64.9	32.87
ANTI-G(-)	-162.9	-23.2	33.62
G(-)-G(+)	-62.1	67.3	32.46
G(-)-G(-)	-64.9	-27.3	33.31
G(+)-G(+)	54.1	69.4	32.73
G(+)-G(-)	54.4	-12.0	34.24

La energía mínima se alcanza con una disposición G(-)-ANTI y es de 32.21

Kcal/mol

Al igual que en la molécula epímera anterior, el protón H24 se orienta hacia el átomo de oxígeno O16, lo que nos hace suponer que se forma un puente de hidrógeno entre ambos, con la consiguiente disminución de la energía de la molécula.

Para comprobar la bondad de los resultados obtenidos realizamos un cálculo de las constantes de acoplamiento teóricas y las comparamos con las obtenidas experimentalmente.

HIDROGENOS	LACTONA (R)		LACTONA (S)	
	$J_{teórica}$	$J_{experimental}$	$J_{teórica}$	$J_{experimental}$
H5-H6	3.07	3.7	3.13	3.3
H6-H7	5.15	3.7	5.49	4.7
H7-H11	7.12	7.1	0.59	0

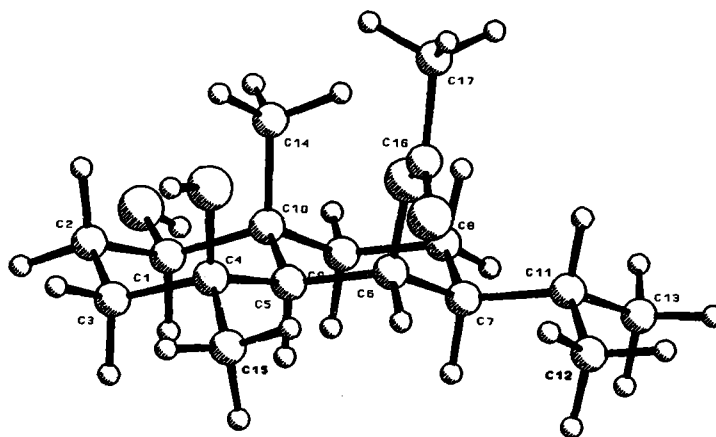
Como podemos observar las constantes de acoplamiento teóricas y las experimentales concuerdan aceptablemente, por lo que se confirman las asignaciones de la configuración en C-11 de las lactonas eudesmánicas estudiadas. Además, en el caso de la 1 β ,4 β -dihidroxi-6 α ,11 β -H-eudesman-6,12-olida, nos permitió asignar las constantes de acoplamiento del protón H-6 con los protones H-5 y H-7; lo que no hemos conseguido de forma experimental.

7.2.2. Análisis conformacional de 6 β -acetoxieudesmanos

Este estudio se realizó para ver la disposición espacial de los grupos acetoxilo e isopropilo en estas moléculas.

En primer lugar estudiamos la disposición del grupo acetoxilo. Para ello efectuamos los cálculos energéticos correspondientes a los giros de los enlaces del mismo. El mínimo de energía (34.62 Kcal/mol) se consigue cuando el ángulo dihedro formado entre los enlaces C6-O18 y C16-C17 es de aproximadamente -175° y el formado entre los enlaces C5-C6 y O18-C16 de aproximadamente 113° .

En segundo lugar estudiamos la disposición del grupo isopropilo. El mínimo de energía (33.83 Kcal/mol) se consigue cuando el ángulo dihedro existente entre los enlaces C8-C7 y C11-C13 es de -52.9° , o sea una conformación G(-).

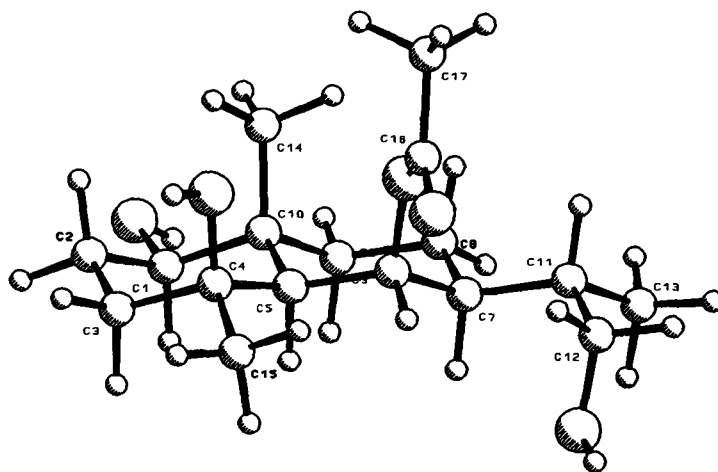


7.2.3. Análisis conformacional de eudesmanos 12-hidroxiados

Los compuestos que vamos a estudiar son el 6 β -acetoxi-1 β ,4 β ,12-trihidroxiudesman-11(S)-ano, con una energía inicial para una conformación silla-silla de 36.49 Kcal/mol , y el 6 β -acetoxi-1 β ,4 β ,12-trihidroxiudesman-11(R)-ano con una energía inicial de 37.14 Kcal/mol .

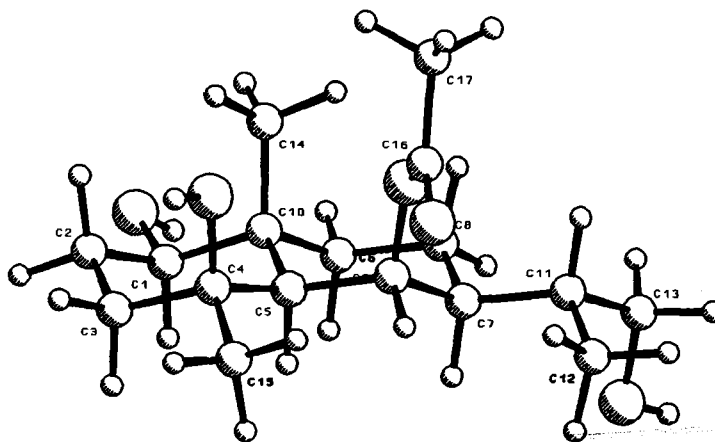
Para estas dos moléculas realizamos los giros de los enlaces implicados en la disposición espacial del grupo hidroxilo primario, para conocer que conformación posee el mínimo de energía. Los ángulos dihedros que queremos conocer son los formados por los enlaces C8-C7 y C11-C12, C7-C11 y C12-O22, C11-C12 y O22-H29.

Para el compuesto de configuración 11(S) la conformación más estable es la que tiene una disposición, de los anteriores ángulos dihedros, ANTI (-178.5°), G(+) (56.3°) y ANTI (-178.8°) respectivamente, con una energía de 34.58 ^{Kcal}/_{mol}.

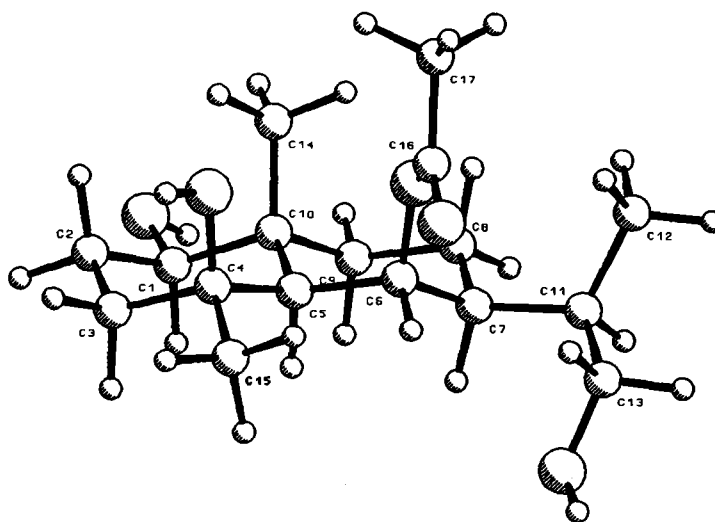


Para el compuesto de configuración 11(R) existen dos conformaciones con un mínimo de energía similar.

La conformación en la que los ángulos dihedros tienen una disposición G(-) (-51.9°), G(-) (-55.4°) y ANTI (-177.4°), posee una energía de 34.97 ^{Kcal}/_{mol}.



La conformación cuya disposición es ANTI (-173.9°), G(+) (52.2°) y ANTI (178.5°) posee una energía de 35.21 Kcal/mol .



Esta última conformación, que posee una energía un poco mayor que la anterior, es la que posee una disposición que explicaría la transposición del grupo acetoxilo que se observa experimentalmente en esta molécula.

7.2.4. Análisis conformacional de eudesmanos 12-acetilados

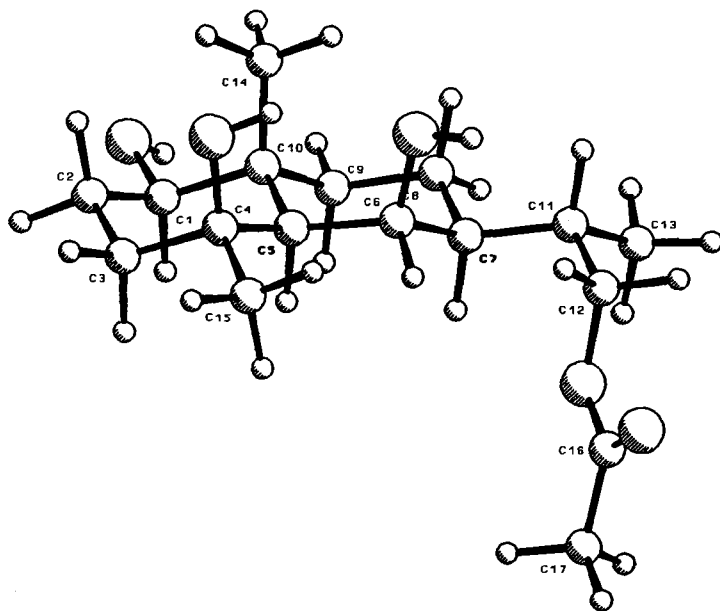
Los compuestos analizados son el 12-acetoxi-1 β ,4 β ,6 β -trihidroxieudesman-11(S)-ano, con una energía inicial para una conformación silla-silla de 36.42 Kcal/mol ; y el 12-acetoxi-1 β ,4 β ,6 β -trihidroxieudesmano-11(R)-ano, con una energía de 36.25 Kcal/mol .

Realizamos cuatro giros de los enlaces implicados en la disposición espacial del grupo acetoxilo primario. Los ángulos dihedros que queremos conocer para obtener

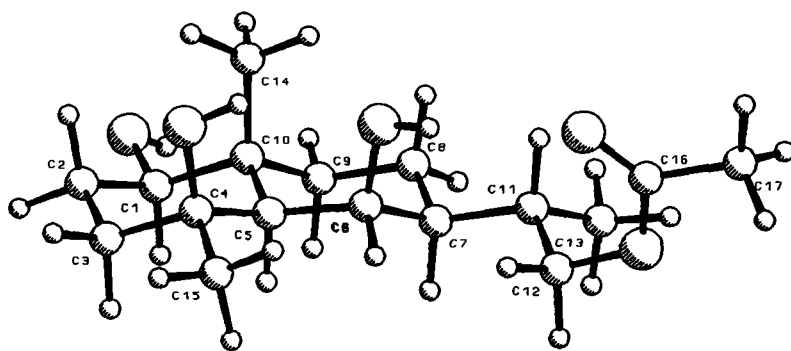
una conformación con un mínimo de energía son los formados por los enlaces C8-C7 y C11-C12; C7-C11 y C12-O18; C11-C12 y O18-C16 y por último C12-O18 y C16-O19.

Para el compuesto de configuración 11(S), existen dos conformaciones con un contenido energético similar.

La conformación con unos ángulos dihedros en una disposición ANTI-G(+)-ANTI-G(+) respectivamente, posee una energía de 35.69 Kcal/mol .



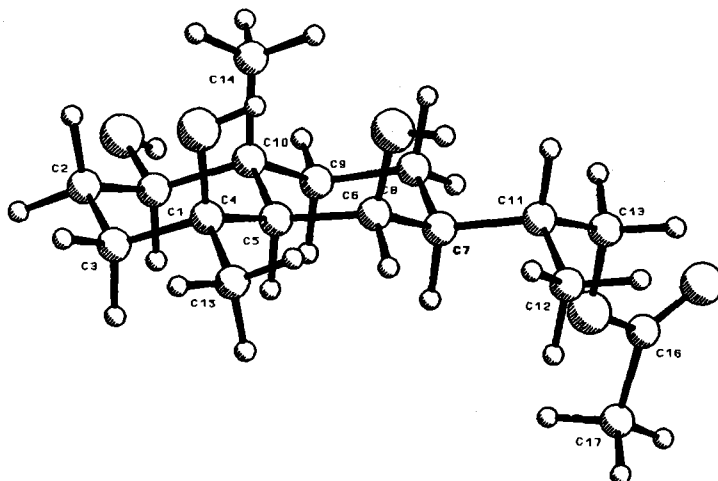
La conformación con unos ángulos dihedros en una disposición ANTI-ANTI-G(+)-G(+) respectivamente, posee una energía de 35.33 Kcal/mol .



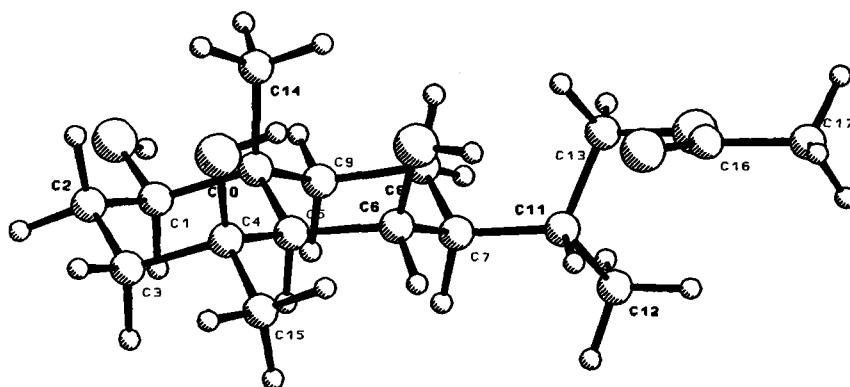
Como se puede observar en esta última conformación, a pesar de estar más impedida estéricamente que la anterior, tiene un menor contenido energético. Esto se puede explicar, por posible formación de un puente de hidrógeno entre el protón del grupo hidroxilo sobre C-6 y el oxígeno O19 del grupo acetoxilo.

Para el compuesto de configuración 11(R), también existen dos conformaciones con un contenido energético similar.

La conformación con una disposición, de los ángulos dihedros antes mencionados, G(-)-G(-)-ANTI-G(+) respectivamente, posee una energía de 35.66 Kcal/mol .



La conformación con una disposición G(+)-ANTI-G(-)-G(-), posee una energía de 35.27 Kcal/mol .



Al igual que en el compuesto epímero anterior, esta última conformación, más impedida estéricamente, se estabiliza por la formación de un puente de hidrógeno entre el protón del grupo hidroxilo sobre C-6 y el oxígeno O19 del grupo acetoxilo.

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

1. TECNICAS GENERALES UTILIZADAS

Los puntos de fusión microscópicos han sido determinados en un aparato tipo KOFER, de la casa REICHERT y no están corregidos.

Las rotaciones específicas, $[\alpha]_D$, se midieron a temperatura de laboratorio en un polarímetro automático PERKIN-ELMER 141, en célula de 1 dm de longitud y en los disolventes y a las concentraciones que se indican en cada caso.

Los espectros de infrarrojo se han realizado entre cristales de NaCl o en pastilla de KBr, según se indique, tanto en un espectrómetro PERKIN-ELMER mod. 983 G., como en un espectrómetro Nicolet 20SX FT-IR.

Los espectros de ultravioleta se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 124.

Los espectros de masas se han realizado en un sistema CG/EM HEWLETT-PACKARD mod. 5988 A.

Los espectros de ^1H RMN y de ^{13}C RMN se registraron en un espectrómetro BRUKER AM-300 con cabeza dual, empleando CDCl_3 como disolvente, que al mismo tiempo proporciona la señal del lock. Las asignaciones en ^{13}C RMN

monodimensional, se han realizado con la ayuda de experiencias DEPT (135°). Las experiencias de n.O.e.-diferencia monodimensional se realizaron se realizaron por irradiaciones de cuatro segundos en series de ocho. Las experiencias bidimensionales realizadas (COSY 45°, NOESY, CONOESY 90°, correlación C/H y J-resuelta), se han llevado a cabo utilizando programas de la casa Bruker, en las condiciones estandar del servicio de Resonancia Magnética Nuclear de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

Las cromatografías en columna se han realizado con silica gel como absorbente (SDS 60 A CC, 40-60 μm), trabajando entre 0.5 y 1 atmósfera de presión. En ocasiones se ha empleado esta conteniendo un 10% de NO_3Ag .

La cromatografía en capa fina se ha realizado con silica gel Merck 7747, en capas de 0.25 mm de espesor. La visualización de los productos se realizó con la mezcla usualmente denominada "oleum" ($\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{AcOH}$, 32/8/160) y calefacción a 120° hasta aparición de manchas.

En todos los procedimientos cromatográficos se han empleado n-hexano, CHCl_3 , CH_2Cl_2 , éter etílico y acetona, sólo o mezclados, como eluyentes. En la cromatografía en columna se ha utilizado un gradiente de polaridad creciente con mezclas de CH_2Cl_2 /acetona, CHCl_3 /acetona y n-hexano/éter etílico.

2. FORMACION DE DERIVADOS Y REACCIONES UTILIZADAS

Reacción de acetilación

100 mg del producto a acetilar se tratan con 2 mL de Ac_2O y 4 mL de piridina, a la temperatura especificada en cada caso y controlando el tiempo de reacción por comatografía en capa fina. Al cabo de este tiempo se interrumpe la reacción, vertiendo sobre agua helada, extrayendo con CH_2Cl_2 y lavando con una solución saturada de SO_4HK (varias veces) y posteriormente con agua. La solución orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora a vacío.

Reacción de epoxidación

De una forma general se puede establecer que 100 mg de producto se disuelven en 10 mL de CHCl_3 , añadiendo 250 mg de ácido m-cloro-perbenzónico (AMCPB), manteniendo la reacción a temperatura ambiente y controlando el tiempo de reacción por cromatografía en capa fina. Una vez finalizada la reacción, se diluye con CHCl_3 (30 mL) y posteriormente se lava con una solución saturada de FeSO_4 , posteriormente con otra solución de NaHCO_3 y para finalizar con agua. La fase clorofórmica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío.

Oxidación con el reactivo de Jones (Curtis, 1953)

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 el reactivo de Jones hasta persistencia de color anaranjado, tras lo cual se añaden unas gotas de metanol, agua y se lava con una disolución de Na_2CO_3 y posteriormente con agua. Se extrae con CH_2Cl_2 , se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente a vacío. El bruto obtenido se cromatografía en columna.

Oxidación con dicromato de piridinio (Cainelli, 1976)

100 mg de producto se disuelven en CH_2Cl_2 bien seco y se le añaden 125 mg de dicromato de piridinio. El matraz conteniendo tanto el producto, el disolvente, como el reactivo se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. Cuando finaliza la reacción (se sigue por capa fina) se precipita el catalizador con una mezcla de n-hexano/éter etílico (1:1) y posteriormente se lava con esta misma mezcla.

Procedimiento de saponificación con potasa alcohólica

El sustrato a saponificar se disuelve en potasa alcohólica (KOH (5%) en disolución hidrometanólica (70%)), manteniendo la reacción a la temperatura que se indique en cada caso y controlando el tiempo de reacción por cromatografía en capa fina. Una vez finalizada la reacción, se diluye con agua y se neutraliza con HCl diluido hasta medio básico débil. Posteriormente se extrae con CH_2Cl_2 , se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío.

Reacción de saponificación con LiAlH_4

100 mg del producto a saponificar se disuelven en 20 mL de THF seco y se hacen reaccionar con 40 mg de LiAlH_4 durante dos horas a reflujo. La mezcla de reacción se enfría, se le añade agua y se extrae con CH_2Cl_2 . La fracción orgánica extraída se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío.

Reducción con brohidruro sódico

100 mg de producto se disuelven en 10 mL de EtOH y se añaden lentamente 50 mg de NaBH_4 , manteniendo la reacción a temperatura ambiente y controlandola por cromatografía en capa fina. Una vez finalizada se diluye con HCl diluido y se extrae con CH_2Cl_2 . Esta disolución se seca, se concentra a vacío y se purifica mediante cromatografía en columna.

Reacción de lactonización (Murahashi, 1987)

100 mg del producto que se va a lactonizar se disuelven en 0.5 mL de tolueno seco y 0.1 mL de acetona. Se le añaden entonces 10 mg de $\text{RuH}_2(\text{PPh}_3)_4$. Esta solución se introduce en un tubo cerrado, bajo atmosfera de argón, y se calienta en un baño de aceite a 180° durante el tiempo indicado en cada caso. Una vez transcurrido este tiempo, se enfría el tubo que contiene la mezcla de reacción. Posteriormente, se concentra esta a vacío y se cromatografía.

Reacción de deshidratación de alcoholes terciarios (Yadav, 1989)

Se disuelve 1 mmol de sustrato que posee un alcohol terciario en 5 mL de CH_2Cl_2 y se pone en agitación. A la solución se le añaden 3 mmol de Et_3N y 0.04 mmol de DMAP (4-dimetilaminopiridina). La mezcla se enfría a 0° y entonces se le añaden 1.5 mmol de cloruro de mesilo, gota a gota. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h. Entonces se le añade hielo picado y se agita durante 1 h, después se extrae la mezcla de reacción con CH_2Cl_2 , se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío.

Reacción de hidroboración (Brown, 1974 y 1976)

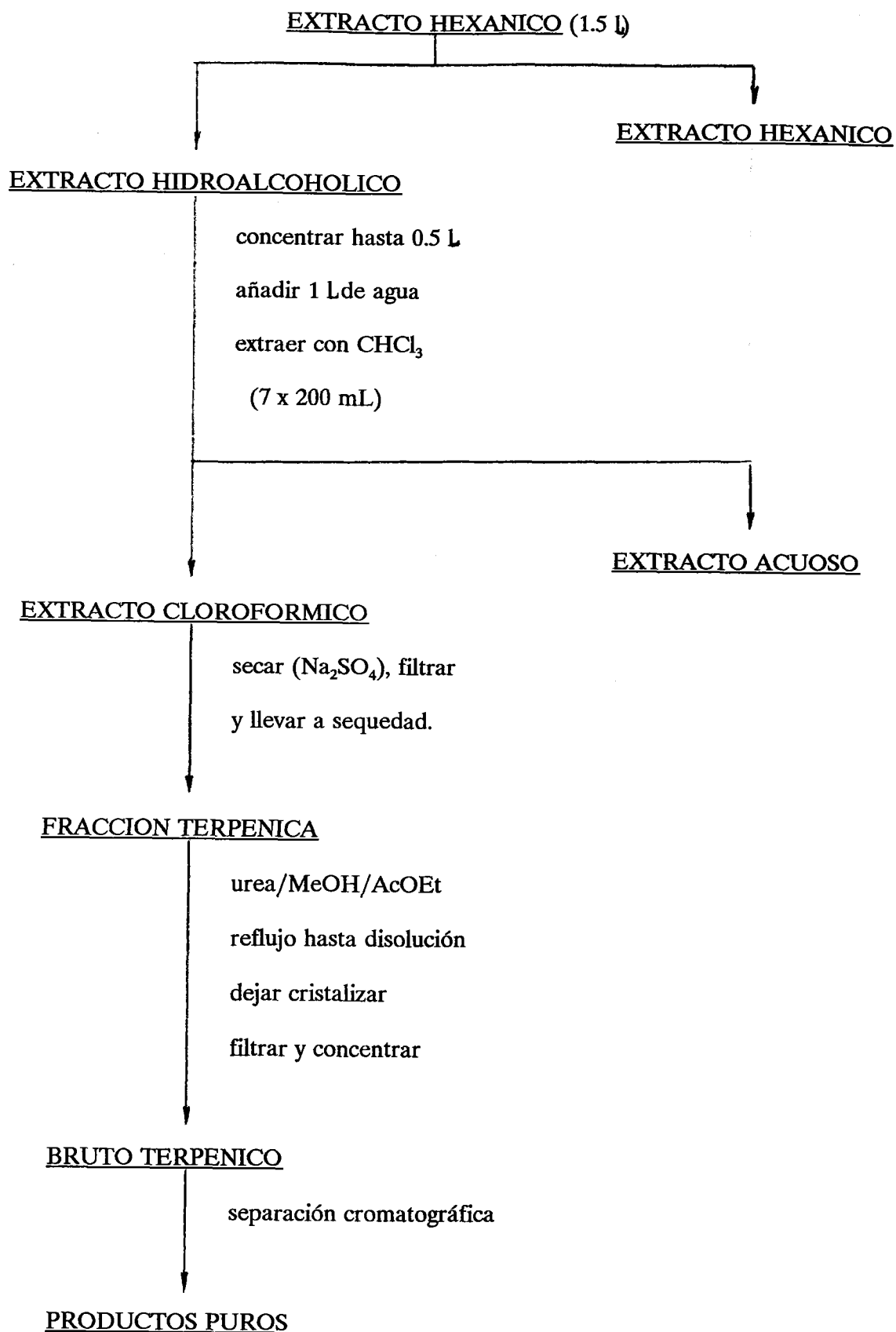
100 mg del producto a hidroborar se disuelven en 1 mL de THF seco bajo atmósfera de argón. A esta solución se le añade 1 mL de una solución 0.5 M de 9-BBN (9-borabicyclo[3.3.1]nonano) en THF, agitando la misma a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente el organoborano formado se va a oxidar añadiendo, sucesivamente a la mezcla de reacción, 0.6 mL de etanol, 0.2 mL de una solución 6 N de NaOH y 0.4 mL de peróxido de hidrógeno al 30%. La mezcla se calienta a 50° durante 1 h, enfriándose luego a temperatura ambiente. A continuación, la fracción acuosa se satura con carbonato potásico y se extrae la fracción orgánica con CH_2Cl_2 , que se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a vacío.

3. ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS DE LA *SIDERITIS VAROI* SUBESPECIE *CUATRECASASII*

3.1. Recogida y procesado de la planta

La *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii* fue recogida cerca de Carboneras (Almería) en Junio de 1985. Las exicatas se encuentran depositadas en el Herbario de la Facultad de Farmacia (Universidad de Granada).

3.83 Kg de partes aéreas de la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii* se extrajeron con n-hexano en un soxhlet hasta agotamiento. El extracto se concentró a vacío hasta 1.5 litros y fué extraído repetidamente con metanol acuoso al 90% (6 x 200 mL). Los extractos metanólicos se concentraron hasta un tercio del volumen total (0.5 l) y se diluyeron con agua (1 l), extrayendose con cloroformo (7 x 200 mL). Los extractos clorofórmicos se secaron sobre sulfato magnésico anhidro y tras filtrar y concentrar se obtuvo un residuo de 165 g de peso.



3.2. Aislamiento e identificación de terpenos

Los 165 g de extracto terpénico se disolvieron en CH_2Cl_2 y se lavaron con una disolución acuosa diluida (1%) de NaOH. La fase acuosa se aciduló con HCl diluido hasta conseguir un medio ácido débil y se extrajo con CH_2Cl_2 . Esta disolución se secó con sulfato magnésico anhidro y se concentró a vacío, aislándose el ácido *ent*-8 α -hidroxilabda-13(16),14-dien-18-oico (ácido 6-desoxiandalusoico) (**1**, 4.6 g).

ácido *ent*-8 α -hidroxilabda-13(16),14-dien-18-oico (**1**)

Sirupo

$[\alpha]_D = -25^\circ$ (c 1, EtOH)

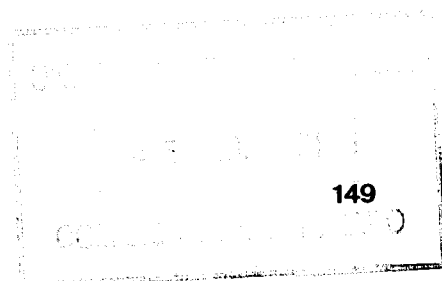
IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3000-2500, 1720, 1610, 1465, 1250, 970 cm^{-1}

UV $\lambda(\text{max})$ (ϵ): 227 nm (12000)

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 6.34 (1H, dd, parte X de un sistema $\text{A}_2\text{B}_2\text{X}$, $J_{\text{AX}} = 10.9$, $J_{\text{BX}} = 17.6$ Hz, H-14), entre 5.32 y 4.97 (4H, parte A_2B_2 de un sistema $\text{A}_2\text{B}_2\text{X}$, 2H-15 y 2H-16), 1.13, 1.11 y 0.81 (3H cada uno, s, grupos metilo 3H-17, 3H-19 y 3H-20).

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 1.

La fase orgánica que quedó una vez eliminado el ácido (**1**) se puso en la cabeza de una columna eluyendo con mezclas de n-hexano/cloruro de metileno en primer lugar, y en segundo lugar con mezclas de cloruro de metileno/acetona de polaridad creciente, aislándose varios grupos de productos que a su vez se sometieron a repetidos procesos cromatográficos.



- Fracción más apolar:

De la fracción más apolar se aislan el 6 β -acetoxi-4 β -5 α -epoxi-*trans*-germacr-1(10)-eno (2, 4 g), el 9 β -acetoxi-4 β -hidroxi-aromadendreno (3, 100 mg), el 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-3-eno (5, 3.2 g), el 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-4(15)-eno (6, 2 g) y el *ent*-3 β -hidroxi-13-*epi*-óxido de manoilo (ribenol) (7, 1.1 g). La descripción se realiza según el orden de elución.

6 β -acetoxi-4 β ,5 α -epoxi-*trans*-germacr-1(10)-eno (2)

Sólido de P.F. 45-47°

$[\alpha]_D = +48^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR μ (max) (KBr): 3110, 2980, 1745, 1230, 860 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.27 (1H, m, $w_{1/2} = 18$ Hz, H-1); 4.96 (1H, dd, $J_1 = 8$, $J_2 = 1.5$ Hz, H-6); 2.64 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-5); 2.05 (3H, s, grupo acetoxilo); 1.66 (3H, sa, 3H-14); 1.25 (3H, s, 3H-15); 0.95 y 0.90 (3H cada uno, d, $J = 6.5$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³CRMN (δ , CDCl₃): ver tabla 2

Masas (m/z) (%): 280 [M]⁺ (3), 262 (3), 237 (8), 220 (10), 205 (13), 202 (10), 177 (55), 107 (100).

9β-acetoxi-4α-hidroxiaromadendreno (3)

Sólido de P.F. 76-78°

$[\alpha]_D = +3^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (KBr): 3454, 3102, 1735, 1639, 1244, 900 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.09 (1H, dd, $J_1 = 11.2$, $J_2 = 0.5$ Hz, H-9); 4.88 y 4.81 (2H, s, 2H-14); 2.19 (1H, m, $w_{1/2} = 35$ Hz, H-1); 2.09 (3H, s, grupo acetoxilo); 1.26 (3H, s, 3H-15); 1.05 y 1.01 (3H cada uno, s, 3H-12 y 3H-13); 0.81 (1H, ddd, $J_1 = 11.4$, $J_2 = 9.4$ y $J_3 = 6.4$ Hz, H-7); 0.49 (1H, dd, $J_1 = 11.3$ y $J_2 = 9.4$ Hz, H-6)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 2

Masas (m/z) (%): 278 [M]⁺ (4), 218 (40), 203 (34), 200 (38), 185 (46), 175 (47), 160 (100).

6β-acetoxi-1β-hidroxiudesm-3-eno (5)

Sirupo

$[\alpha]_D = +37^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3450, 3030, 1745, 1250 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.58 (1H, sa, H-6); 5.32 (1H, m, $w_{1/2} = 8$ Hz, H-3); 3.46 (1H, dd, $J_1 = 11$, $J_2 = 4$ Hz, H-1); 2.00 (3H, s, grupo acetoxilo); 1.63 (3H, s, 3H-15); 0.96 (3H, s, 3H-14); 0.98 y 0.86 (3H cada uno, d, $J = 6.5$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 2

Masas (m/z) (%): 280 [M]⁺ (5), 237 (4), 220 (32), 205 (14), 202 (57), 187 (25), 177 (34), 159 (100)

Análisis elemental: C, 72.98%; H, 10.14%

calculado para C₁₇H₂₈O₃: C, 72.82%; H, 10.05%.

6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-4(15)-eno (6)

Sirupo

$[\alpha]_D = +63^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3450, 3080, 1740, 1650, 1240, 895 cm⁻¹

¹H RMN (360 MHz) (δ , CDCl₃): 5.57 (1H, sa, H-6); 4.74 y 4.59 (1H cada uno, s, 2H-15); 3.31 (1H, dd, J₁ = 11, J₂ = 4 Hz, H-1); 2.01 (3H, s, grupo acetoxilo); 0.88 (3H, s, 3H-14); 0.96 y 0.84 (3H cada uno, d, J = 6.5 Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 2

Masas (m/z) (%): 280 [M]⁺ (4), 262 (1), 220 (63), 205 (19), 202 (78), 187 (38), 177 (7), 159 (100)

Análisis elemental: C, 72.95%; H, 10.16%

calculado para C₁₇H₂₈O₃: C, 72.82%; H, 10.05%.

ent-3 β -hidroxi-13-epi-óxido de manoilo (7)

Sólido de P.F. 83-84°

$[\alpha]_D = -33^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (KBr): 3450, 3090, 1632, 1453, 1378, 1092, 1032, 960 y 910 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.99 (1H, parte X de un sistema ABX, J_{AX} + J_{BX} = 29 Hz, H-14); 4.99-4.87 (2H, parte AB de un sistema ABX, 2H-15); 3.20 (1H, dd, J₁ = 11.3, J₂ = 4.6 Hz, H-3); 1.20, 1.11, 0.96, 0.73 y 0.71 (3H cada uno, s, 3H-16, 3H-17, 3H-18, 3H-19 y 3H-20)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 1

Masas (m/z) (%): 306 [M]⁺ (1), 291 (100), 273 (13), 255 (96).

-Fracción más polar:

De la fracción más polar se aislaron los siguientes terpenos: el 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroieudesmano (**8**, 4.6 g), el 6 β -acetoxi-1 β ,4 α -dihidroieudesmano (**9**, 1 g), el *ent*-3 β ,12 α -dihidroxi-13-*epi*-óxido de manoilo (varodiol) (**10**, 2.8 g) y el *ent*-6 α ,8 α ,18-trihidroxiabda-13(16),14-dieno (andalusol) (**11**, 1.3 g). La descripción se realiza según el orden de elución.

6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroieudesmano (**8**)

Sirupo

$[\alpha]_D = +27^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR μ (max) (CHCl₃): 3450, 1730, 1250 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.65 (1H, sa, H-6); 3.12 (1H, dd, J₁ = 11, J₂ = 4 Hz, H-1); 2.00 (3H, s, grupo acetoxilo); 1.32 y 1.23 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15); 0.89 y 0.85 (3H cada uno, d, J = 6.5 Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 3

Masas (m/z) (%): 281[M-17]⁺ (0.1), 221 (1), 205 (1), 203 (0.5), 177 (1), 138 (9), 101 (100)

Análisis elemental: C, 68.54%; H, 10.25%

calculado para C₁₇H₃₀O₄: C, 68.43%; H, 10.12%.

6 β -acetoxi-1 β ,4 α -dihidroxiudesmano (9)

Sirupo

$[\alpha]_D = +21^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3500, 1740, 1260 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.74 (1H, sa, H-6); 3.28 (1H, dd, J₁ = 12, J₂ = 6 Hz, H-1); 2.00 (3H, s, grupo acetoxilo); 1.21 y 1.11 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15); 0.89 y 0.88 (3H cada uno, d, J = 6.5 Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 3

Análisis elemental: C, 68.51%; H, 10.20%

calculado para C₁₇H₃₀O₄: C, 68.43%; H, 10.12%.

ent-3 β ,12 α -dihidroxi-13-epi-óxido de manoilo (10)

Sólido de P.F. 136-138°

$[\alpha]_D = +42^\circ$ (c 1, EtOH)

IR $\mu(\text{max})$ (KBr): 3410, 2937, 2868, 1073 y 1039 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 6.03 (1H, dd, parte X de un sistema ABX, J_{AX} + J_{BX} = 29.6 Hz, H-14); 4.94 y 4.92 (2H, parte AB de un sistema ABX, 2H-15); 4.04 (1H, dd, J₁ = J₂ = 3.4 Hz, H-12); 3.18 (1H, dd, J₁ = 11.3, J₂ = 4.1 Hz, H-3); 1.15 (3H, s, 3H-17); 1.00 (3H, s, 3H-16); 0.93, 0.71 y 0.70 (3H cada uno, s, 3H-18, 3H-19 y 3H-20)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 1

Masas (m/z) (%): 323 [M+1]⁺ (2), 305 (87), 287 (100)

ent-6 α ,8 α ,18-trihidroxiabda-13(16),14-dieno (11)

Sólido de P.F. 170-2°

$[\alpha]_D = -35^\circ$ (c 1, EtOH)

IR $\mu(\max)$ (KBr): 3500, 3090, 1640, 1600, 920 y 895 cm^{-1}

UV $\lambda(\max)$ (ϵ): 225 nm (11000)

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 6.34 (1H, dd, parte X de un sistema $\text{A}_2\text{B}_2\text{X}$, $J_{\text{AX}} = 10.8$, $J_{\text{BX}} = 17.6$ Hz, H-14), entre 5.34 y 4.96 (4H, parte A_2B_2 de un sistema $\text{A}_2\text{B}_2\text{X}$, 2H-15 y 2H-16), 3.81 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 10.2$, $J_3 = 4.2$ Hz, H-6), 3.52 y 3.13 (2H, Q_{AB} , $J = 11.1$ Hz, 2H-18), 1.18 (3H, s, 3H-17), 0.89 y 0.81 (3H cada uno, s, 3H-19 y 3H-20)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 1

4. MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Los microorganismos utilizados en los estudios de biotransformación han sido: *Curvularia lunata* (CECT 2130), *Fusarium moniliforme* (CECT 2667), *Drechslera halodes* (CECT 2152) y *Rhizopus nigricans* (CECT 2072), todos ellos procedentes de la Colección Española de Cultivos Tipo.

Para la preparación del inóculo se ha empleado un medio YEPGA conteniendo un 1% de extracto de levadura, un 1% de pectona, un 2% de agar, manteniendo el medio a pH 5.

En todas las transformaciones realizadas se usó un medio de cultivo que corresponde a la siguiente composición: 0.1% de pectona, 0.1% de extracto de levadura, 0.1% de extracto de carne de vaca y 0.5% de glucosa, todos ellos en agua, manteniendo un pH de 5.7.

En matraces Erlenmeyer (250 cc) conteniendo 80 mL del medio de cultivo, se realiza la inoculación con una densa suspensión de cada uno de los microorganismos utilizados. Estas incubaciones se mantienen a 28° con agitación orbital (150 rpm) durante seis días. Al cabo de este tiempo, se adiciona el sustrato al 5% en etanol.

5. RECUPERACION DE LOS METABOLITOS

El contenido de los matraces Erlenmeyer se filtra en una Placa filtrante para separar el micelio, y la solución acuosa resultante se satura con NaCl y se extrae repetidas veces con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se lleva a sequedad (a vacío), obteniéndose una mezcla de metabolitos que se separan mediante cromatografía en columna (gel de sílice) eluyendo con CH_2Cl_2 que contiene cantidades crecientes de acetona. La visualización de los productos, por cromatografía en capa fina (silica gel Merck 7747), se efectúa con la mezcla formada por $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{AcOH}$ (32/8/160) y posterior calefacción a 120° , hasta aparición de manchas.

6. BIOTRANSFORMACION DE GERMACRANOS CON *RHIZOPUS NIGRICANS*

6.1. Obtención de los productos de partida

Aislamiento del 6 β -acetoxi-4 β ,5 α -epoxi-*trans*-germacr-1(10)-eno (2)

El producto 2, es un producto natural aislado de la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii*.

Obtención del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano (12)

1.5 g del 6 β -acetoxi-4 β ,5 α -epoxi-*trans*-germacr-1(10)-eno (12) se disolvieron en 150 mL de CHCl₃, añadiendo 2 g de ácido m-cloro-perbenzónico (AMCPB) y manteniendo la reacción a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez finalizada la reacción, se diluyó la misma con 200 mL de CHCl₃, se lavó con una solución saturada de FeSO₄, posteriormente con otra solución de NaHCO₃ y para finalizar con agua. La fase clorofórmica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a vacío, aislandose por cromatografía en columna 932 mg (59%) del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano (12) y 426 mg (27%) del 6 β -acetoxi-(1 β ,10 α),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano (15).

6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano (12)

$[\alpha]_D = -66^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 1734 y 1244 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.00 (1H, dd, J₁ = 8.5, J₂ = 1.6 Hz, H-6), 2.99 (1H, dd, J₁ = 9.2, J₂ = 5.8 Hz, H-1), 2.89 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5), 2.04 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.41 (3H, s, 3H-14), 1.30 (3H, s, 3H-15) y 0.89 y 0.87 (3H cada uno, d, J = 6.4 Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 4

Masas (m/z) (%): [M+1]⁺ 297 (9), 279 (4), 237 (100), 219 (30).

6 β -acetoxi-(1 β ,10 α),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano (15)

$[\alpha]_D = +81^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 1738 y 1241 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 4.95 (1H, dd, J₁ = 7.1, J₂ = 1.6 Hz, H-6), 3.00 (1H, d, J = 7.1 Hz, H-5), 2.92 (1H, d, J = 10.6 Hz, H-1), 2.05 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.44 (3H, s, 3H-14), 1.30 (3H, s, 3H-15) y 0.98 y 0.90 (3H cada uno, d, J = 6.6 Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 4

Masas (m/z) (%): [M+1]⁺ 297 (15), 279 (3), 237 (100), 219 (40), 201 (11).

6.2. Incubación del 6 β -acetoxi-4 β ,5 α -epoxi-*trans*-germacr-1(10)-eno (2)

Se tomaron 100 mg del producto 2 y se disolvieron en 2 mL de etanol distribuyéndose en otros tantos matraces Erlenmeyer que contenían el microorganismo con



el caldo de cultivo. El proceso de incubación se dió por finalizado a los 6 días, obteniéndose una mezcla de productos (75 mg) que se separó cromatografía en columna. De esta, se aislaron los siguientes metabolitos: el 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano (12) (60 mg, 57%), el 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-3 α -hidroxigermacrano (13) (6 mg, 5%) y el 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-11-hidroxigermacrano (14) (9 mg, 8%).

6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-3 α -hidroxigermacrano (13)

$[\alpha]_D = -43^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR μ (max) (CHCl₃): 3450, 1741, 1242 y 1022 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.06 (1H, dd, J₁ = 8.4, J₂ = 1.6 Hz, H-6), 3.32 (1H, dd, J₁ = 10.1, J₂ = 8.2 Hz, H-1), 2.95 (1H, dd, J₁ = 8.7, J₂ = 6.4 Hz, H-3 β), 2.94 (1H, d, J = 8.4 Hz; H-5), 2.08 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.44 (3H, s, 3H-14), 1.32 (3H, s, 3H-15) y 0.91 y 0.89 (3H cada uno, d, J = 6.6 Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 4

Masas (m/z) (%): [M+1]⁺ 313 (14), 295 (65), 253 (100), 235 (67), 217 (19), 199 (12).

6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-11-hidroxigermacrano (14)

$[\alpha]_D = -38^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR μ (max) (CHCl₃): 3482, 1738, 1237, 1022 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.19 (1H, dd, J₁ = 8.4, J₂ = 1.3 Hz, H-6), 3.00 (1H, dd, J₁ = 9.1, J₂ = 5.8 Hz, H-1), 2.92 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 2.07 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.43 (3H, s, 3H-14), 1.33 (3H, s, 3H-15) y 1.18 y 1.14 (3H cada uno, s, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 4

Masas (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 313 (11), 295 (69), 277 (4), 253 (90), 235 (100), 217 (50).

6.3. Incubación del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano (12)

900 mg del sustrato **12** se disolvieron en 20 mL de EtOH y fueron distribuidos en 20 matraces Erlenmeyer que contenían un cultivo de *R. nigricans*. La incubación se mantuvo durante 12 días, después de los cuales, se recuperó una mezcla de productos (698 mg) que se separaron cromatográficamente, aislándose 21 mg (2%) del sustrato de partida (**12**), 91 mg (10%) del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-2 α -hidroxigermacrano (**16**), 106 mg (11%) del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-9 β -hidroxigermacrano (**17**), 203 mg (21%) del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-3 α -hidroxigermacrano (**13**), 241 mg (25%) del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-11-hidroxigermacrano (**14**), 20 mg (2%) del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-12-hidroxigermacr-11(S)-ano (**18**) y 16 mg (2%) del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-2 α ,11-dihidroxigermacrano (**19**).

6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-2 α -hidroxigermacrano (16)

$[\alpha]_D = -29^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3452, 1740, 1234 y 1021 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 5.05 (1H, dd, $J_1 = 8.4$, $J_2 = 1.4$ Hz, H-6), 3.82 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2 α), 3.08 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1), 2.85 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 2.07 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.55 (3H, s, 3H-14), 1.32 (3H, s, 3H-15) y 0.92 y 0.90 (3H cada uno, d, $J = 6.5$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 5

Masas (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 313 (11), 295 (26), 253 (100), 235 (29), 217 (8).

6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-9 β -hidroxigermacrano (17)

$[\alpha]_D = -32^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3454, 1741, 1242 y 1022 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 5.01 (1H, dd, $J_1 = 8.4$, $J_2 = 1.5$ Hz, H-6), 3.08 (1H, dd, $J_1 = 11.7$, $J_2 = 2.0$ Hz, H-9 β), 3.00 (1H, dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 5.9$ Hz, H-1), 2.90 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 2.08 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.42 (3H, s, 3H-14), 1.36 (3H, s, 3H-15) y 0.96 y 0.90 (3H cada uno, d, $J = 6.6$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 5

Masas (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 313 (18), 295 (9), 253 (100), 235 (40), 217 (13).

6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-12-hidroxigermacr-11(S)-ano (18)

$[\alpha]_D = -33^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3469, 1738, 1235 y 1021 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (constantes de acoplamiento medidas sobre la carta espectral) (δ , CDCl_3): 5.02 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 3.48 y 3.48 (1H cada uno, parte AB de un sistema ABX, $J_{AB} = 10.6$, $J_{AX} = 4.2$, $J_{BX} = 3.5$ Hz, 2H-12), 3.05 (1H, dd, $J_1 = 9.1$, $J_2 = 5.8$ Hz, H-1), 2.91 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 2.07 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.44 (3H, s, 3H-14), 1.32 (3H, s, 3H-15) y 0.95 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 5

Masas (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 313 (8), 295 (18), 253 (100), 235 (98), 223 (23), 217 (38).

6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-2 α ,11-dihidroxi-germacrano (19)

$[\alpha]_D = -35^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3472, 1739, 1235 y 1022 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.22 (1H, dd, $J_1 = 8.4$, $J_2 = 1.3$ Hz, H-6), 3.81 (1H, ddd, $J_1 = 7.3$, $J_2 = 6.5$, $J_3 = 1.2$ Hz, H-2 α), 3.08 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1), 2.86 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 2.08 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.56 (3H, s, 3H-14), 1.33 (3H, s, 3H-15) y 1.20 y 1.17 (3H cada uno, s, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 5

Masas (m/z) (%): [M+1]⁺ 329 (8), 311 (34), 293 (25), 269 (100), 251 (52), 233 (40).

7. BIOTRANSFORMACION DE SESQUITERPENOS EUDESMENICOS CON CURVULARIA LUNATA

7.1. Obtención de los productos de partida para las incubaciones

Los productos de partida utilizados en las biotransformaciones realizadas son: el 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-3-eno (5), el 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-4(15)-eno (6), el 6 β -acetoxieudesm-3-en-1-ona (20) y el 6 β -acetoxieudesm-4(15)-en-1-ona (21).

Aislamiento del 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-3-eno (5)

El producto 5, es un producto natural aislado de la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii*.

Aislamiento del 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-4(15)-eno (6)

El producto 6, es un producto natural aislado de la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii*.

Obtención de 6 β -acetoxieudesm-3-en-1-ona (20)

200 mg de 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-3-eno (5) se oxidan con 250 mg de dicromato de piridinio en CH₂Cl₂ bien seco durante 12 horas con agitación, a temperatura ambiente. La reacción se interrumpe precipitando el catalizador con una mezcla de

n-hexano/éter etílico (1:1), lavando posteriormente con esta misma mezcla. La solución que queda se concentra a vacío y la mezcla de productos se separan por cromatografía en columna, obteniéndose el 6 β -acetoxieudesm-3-en-1-ona (**20**, 120 mg, 60%).

Sólido de P.F.: 95-97°

$[\alpha]_D = +38^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR μ (max) (KBr): 1750, 1730, 1260 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.63 (1H, sa, H-6), 5.49 (1H, m, $w_{1/2} = 12$ Hz, H-3), 3.07 y 2.68 (1H cada uno, da, J = 20 Hz, 2H-2), 2.05 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.70 (3H, m, $w_{1/2} = 6$ Hz, 3H-15), 1.26 (3H, s, 3H-14) y 0.99 y 0.86 (3H cada uno, d, J = 6.5 Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 6.

Obtención de 6 β -acetoxieudesm-4(15)-en-1-ona (**21**)

300 mg de 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-4(15)-eno (**6**) se oxidan con 375 mg de dicromato de piridinio en CH₂Cl₂ bien seco durante 12 horas en agitación, a temperatura ambiente. Para detener la reacción se procede de la misma forma que para la oxidación del producto **5**, anteriormente descrita. La mezcla de productos obtenidos se separa por cromatografía en columna, obteniéndose el 6 β -acetoxieudesm-4(15)-en-1-ona (**21**, 173 mg, 58%).

Sólido de P.F.: 115-117°

$[\alpha]_D = +31^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR μ (max) (KBr): 3070, 1740, 1715, 1250, 900 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.70 (1H, sa, H-6), 4.99 y 4.91 (1H, cada uno, s, 2H-15),

2.05 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.18 (3H, s, 3H-14) y 0.97 y 0.85 (3H cada uno, d, J= 6.5 Hz, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 7

Masas (m/z) (%): $[\text{M}]^+$ 278 (19), 218 (43), 203 (11), 200 (3), 185 (4).

7.2. Incubación de la 6 β -acetoxieudesm-3-en-1-ona (20)

120 mg del sustrato **20** fueron disueltos en 2.5 ml de EtOH y distribuidos en 5 matraces Erlenmeyer que contenían el cultivo de *C. lunata*, manteniendo la incubación durante 3 días, después de los cuales, se recuperó una mezcla de metabolitos (83 mg) de la que, tras someterla a cromatografía en columna, se aislaron 34 mg del producto de partida **20**, 25 mg del metabolito **22** (21%), 12 mg del metabolito **23** (10%) y 12 mg del metabolito **24** (10%).

6 β -acetoxi-1 α -hidroxieudesm-3-eno (22)

Sirupo

$[\alpha]_{\text{D}} = +70^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3442, 1734, 1643, 1243, 912 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 5.72 (1H, m, $w_{1/2} = 7$ Hz, H-6), 5.29 (1H, m, $w_{1/2} = 10$ Hz, H-3), 3.27 (1H, d, J= 3.7 Hz, H-1), 2.29 (1H, m, $w_{1/2} = 10$ Hz, H-5), 2.00 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.69 (3H, sa, 3H-15); 0.93 (3H, s, 3H-14) y 1.00 y 0.86 (3H cada uno, d, J= 6.5 Hz, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 6

Masas (m/z) (%): $[\text{M}]^+$ 280 (4), 220 (10), 205 (3), 202 (44), 187 (11), 159 (100).

6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesm-2-en-1-ona (23)

Sirupo

$[\alpha]_D = +17^\circ$ (c 0.5, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3442, 1735, 1677, 1248, 976, cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 6.55 (1H, d, J = 10.5 Hz, H-3), 5.89 (1H, d, J = 10.5 Hz, H-2), 5.86 (1H, m, $w_{1/2} = 4$ Hz, H-6), 2.10 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.61 y 1.50 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 0.99 y 0.97 (3H cada uno, d, J = 6.5 Hz, 3H-12 y 3H-13) ¹³C RMN (δ ; CDCl₃): ver tabla 6

Masas (m/z) (%): [M]⁺ 294 (2), 279 (5), 234 (4), 219 (6).

6 β -acetoxi-4 α -hidroxieudesm-2-en-1-ona (24)

Sirupo

$[\alpha]_D = +6^\circ$ (c 0.5, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3426, 1735, 1676, 1242, 883 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 6.62 (1H, d, J = 10.5 Hz, H-3), 5.85 (1H, m, $w_{1/2} = 4$ Hz, H-6), 5.80 (1H, d, J = 10.5 Hz, H-2), 2.08 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.38 y 1.35 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15), 0.96 y 0.88 (3H cada uno, d, J = 6.5 Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 6

Masas (m/z) (%): [M]⁺ 294 (4), 279 (7), 234 (7), 219 (10).

Correlación química entre el sustrato 20 y el metabolito 24

20 mg del producto 20 se disolvieron en 2 ml de CHCl_3 y se epoxidaron con 50 mg de ácido m-cloroperbenzóico (AMCPB) durante 48 horas a temperatura ambiente. Después de su purificación se obtienen 16 mg (82%) de un producto cuyas propiedades físicas y espectroscópicas son idénticas a las del metabolito 24.

7.3. Incubación de la 6 β -acetoxieudesm-4(15)-en-1-ona (21)

170 mg del sustrato 21 se disolvieron en 3 ml de EtOH y fueron distribuidos en 6 matraces Erlenmeyer que contenían el cultivo de *C. lunata*. La incubación se mantuvo durante 7 días, después de los cuales se recuperó una mezcla de productos (88 mg), que se separaron cromatográficamente, aislándose 20 mg del producto de partida 21, 51 mg del metabolito 25 (30%) y 17 mg del metabolito 26 (10%).

6 β -acetoxi-1 α -hidroxieudesm-4(15)-eno (25)

Sirupo

$[\alpha]_D = +67^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3446, 1732, 1643, 1241, 897 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 5.63 (1H, m, $w_{1/2} = 4$ Hz, H-6), 4.74 y 4.56 (1H cada uno, s, 2H-15), 3.35 (1H, m, $w_{1/2} = 7$ Hz, H-1), 2.43 (1H, sa, H-5), 2.02 (3H, s, grupo acetoxilo), 0.92 (3H, s, 3H-14), 0.99 y 0.85 (3H cada uno, d, $J = 6.5$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 7

Masas (m/z) (%): [M-60] 220 (6), 202 (55), 187 (14), 159 (100).

6 β -acetoxi-1 α ,2 α -dihidroxiudesm-4(15)-eno (26)

Sirupo

$[\alpha]_D = +24^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3430, 1730, 1646, 1235, 930 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.66 (1H, m, $w_{1/2} = 4$ Hz, H-6), 4.82 y 4.65 (1H cada uno, s, 2H-15), 3.93 (1H, ddd, $J_{2,3ax} = J_{2,3ec} = 8.6$, $J_{1,2} = 2.9$ Hz, H-2), 3.32 (1H, d, $J = 2.9$ Hz, H-1), 2.40 (1H, sa, H-5), 2.02 (3H, s, grupo acetoxilo), 0.91 (3H, s, 3H-14) y 0.99 y 0.85 (3H cada uno, d, $J = 6.5$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 7

Masas (m/z) (%): $[M]^+$ 296 (1), 278 (1), 236 (6), 218 (39), 203 (15), 175 (38), 157 (100).

8. BIOTRANSFORMACION DE EUDESMANOS CON HONGOS FILAMENTOSOS

8.1. Obtencion de los productos de partida para las incubaciones

Los productos de partida utilizados en las biotransformaciones realizadas con *Curvularia lunata* son: 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmano (8), 6 β -acetoxi-4 β -hidroxiudesman-1-ona (27), 1 β ,4 β ,6 β -trihidroxiudesmano (28), 1 β -acetoxi-4 β -hidroxiudesman-6-ona (30), 4 β -hidroxiudesmano-1,6-diona (31), 6 β -acetoxi-1 β ,4 α -dihidroxiudesmano (9) y 4 α -hidroxiudesmano-1,6-diona (33).

Aislamiento del 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmano (8)

El producto 8, es un producto natural aislado de la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii*.

Obtención de la 6 β -acetoxi-4 β -hidroxiudesman-1-ona (27)

700 mg de 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmano (8), se oxidaron con el reactivo de Jones, en baño de hielo. El exceso de reactivo se elimina con metanol, lavandose la disolución con Na₂CO₃ y posteriormente con agua; se extrae con CH₂Cl₂ y se seca con Na₂SO₄ anhidro, evaporandose el disolvente a vacío. La mezcla de productos se separó cromatográficamente, obteniendose el 6 β -acetoxi-4 β -hidroxiudesman-1-ona (27, 610 mg, 88%).

Sólido de P.F.: 115-117°

$[\alpha]_D = +73^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (KBr): 3400, 1730, 1680, 1260 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.65 (1H, sa, H-6); 3.08 (1H, ddd, $J_1 = J_2 = 15$, $J_3 = 7$ Hz, H-2); 2.06 (3H, s, grupo acetoxilo); 1.50 y 1.45 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15); 0.90 y 0.88 (3H cada uno, d, $J = 6.5$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 9

Masas (m/z) (%): 296[M]⁺ (1), 278 (1), 236 (49), 222 (9), 203 (10), 193 (23), 175 (31), 159 (100).

Obtención del 1 β ,4 β ,6 β -trihidroxiudesmano (28)

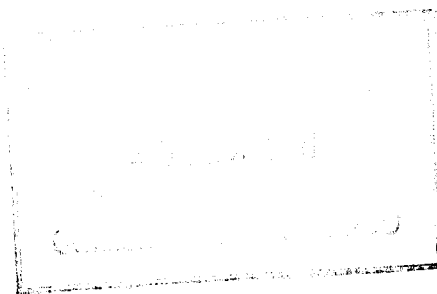
2.5 g de 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmano (8), se disolvieron en una solución hidrometanólica (MeOH al 70%, 150 mL) que contenía un 5% de KOH (7.5 g), manteniendo la reacción a reflujo durante una hora. Una vez finalizada la reacción, se diluyó con agua y se neutralizó con HCl diluido hasta conseguir un medio básico débil. Posteriormente se extrajo con CH₂Cl₂, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a vacío. Trás una separación cromatográfica se obtuvo el 1 β ,4 β ,6 β -trihidroxiudesmano (28, 1935 mg, 90%).

Sirupo

$[\alpha]_D = +10^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3450 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 4.49 (1H, dd, $J_{6,7} = 2.8$, $J_{6,5} = 2.4$ Hz, H-6), 3.16 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 11.7$, $J_{1,2ec} = 4.0$ Hz, H-1), 1.30 y 1.27 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15), 0.98 y 0.95



(3H cada uno, d, J= 6.6 Hz, 3H-12 y 3H-13) y 0.88 (1H, d, $J_{5,6}$ = 2.4 Hz, H-5)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 10

Masas (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 257 (1), 239 (28), 221 (100), 203 (11).

Obtención de la 1 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-6-ona (30)

925 mg de 1 β ,4 β ,6 β -trihidroxieudesmano (28) se disolvieron en 20 mL de piridina y se le agregaron 10 mL de Ac_2O , manteniéndose la reacción durante 2 h a 0°. La mezcla de reacción se diluyó con agua, se extrajo con CH_2Cl_2 , se lavó con una solución saturada de SO_4HK y se secó con Na_2SO_4 anhidro. Tras su cromatografía en columna se obtuvo el 1 β -acetoxi-4 β ,6 β -dihidroxieudesmano (29, 942 mg, 87%).

Sirupo

$[\alpha]_{\text{D}}$ = +20 (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3390, 1731 y 1248 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 4.48 (1H, m, $w_{1/2}$ = 6 Hz, H-6), 4.42 (1H, dd, $J_{1,2\text{ax}}$ = 11.8, $J_{1,2\text{ec}}$ = 3.9 Hz, H-1), 2.01 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.35 y 1.26 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 0.95 y 0.91 (3H cada uno, d, J= 6.6 Hz, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 11

Masas (m/z) ($^{\circ}/_{\text{ooo}}$): $[\text{M}+1]^+$ 299 (38), 281 (1334), 263 (1211), 221 (10000), 203 (1155).

942 mg de 1 β -acetoxi-4 β ,6 β -dihidroxieudesmano (29) se disolvieron en 20 mL de acetona y se oxidaron con el reactivo de Jones, añadido gota a gota hasta que persista el color anaranjado de la disolución, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción se añaden una gotas de metanol y se lava con una disolución de Na_2CO_3 y posteriormente con agua. La fracción orgánica se extrajo con

CH₂Cl₂, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó. El bruto obtenido se cromatografió en columna obteniéndose la 1β-acetoxi-4β-hidroxiudesman-6-ona (30, 844 mg, 90%).

sirupo

[α]_D = +62° (c 1, CHCl₃)

IR μ(max) (CHCl₃): 3513, 1731, 1694 y 1246 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ, CDCl₃): 4.67 (1H, dd, J_{1,2ax} = 11.8, J_{1,2ec} = 4.1 Hz, H-1), 2.26 (1H, s, H-5), 2.02 (3H, s, Grupo acetoxilo), 1.25 y 1.02 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15), 0.88 y 0.84 (3H cada uno, d, J = 6.7 Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ, CDCl₃): ver tabla 11

Masas, (m/z) (%): [M+1]⁺ 297 (40), 279 (76), 237 (100), 219 (88).

Obtención de 4β-hidroxiudesmano-1,6-diona (31)

Para la obtención de este producto se tomaron 700 mg de 1β,4β,6β-trihidroxiudesmano (28) y se disolvieron en 15 mL de acetona, añadiendo gota a gota el reactivo de Jones (hasta persistencia del color anaranjado). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez finalizada la reacción se procedió de la misma forma que para la anterior reacción de oxidación. Tras la cromatografía en columna de la mezcla de reacción se aisló la 4β-hidroxiudesmano-1,6-diona (31, 669 mg, 88%).

sirupo

[α]_D = +67° (c 1, CHCl₃)

IR μ(max) (CHCl₃): 3527, 1712 y 1705 cm⁻¹

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 3.07 (1H, ddd, $J_{2\alpha,2\text{ec}} = J_{2\alpha,3\alpha} = 14.2$, $J_{2\alpha,3\text{ec}} = 6.0$ Hz, H-2 β), 2.58 (1H, s, H-5), 1.25 y 1.24 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15), 0.91 y 0.87 (3H cada uno, d, $J = 6.6$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 12

Masas, (m/z) (%): $[\text{M} + 1]^+$ 253 (80), 235 (100).

Aislamiento del 6 β -acetoxi-1 β ,4 α -dihidroieudesmano (9)

El producto **9**, es un producto natural aislado de la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasii*.

Obtención de 4 α -hidroieudesmano-1,6-diona (33)

Se añadieron 100 mg de LiAlH_4 a una solución de 6 β -acetoxi-1 β ,4 α -dihidroieudesmano (**9**) (300 mg) en THF seco (60 mL). La reacción se mantuvo durante 2 h a reflujo. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se enfrió y se le añadió agua, siendo posteriormente extraída con CH_2Cl_2 y secada con Na_2SO_4 anhidro, concentrándose a vacío. De la separación cromatográfica de la misma se obtuvo el 1 β ,4 α ,6 β -trihidroieudesmano (**32**, 224 mg, 87%).

Sirupo

$[\alpha]_D = -24^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3413 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 4.53 (1H, sa, H-6), 3.20 (1H, dd, $J_{1,2\alpha} = 10.7$, $J_{1,2\text{ec}} = 4.3$ Hz, H-1), 1.49 y 1.14 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 0.94 y 0.92 (3H cada uno, d, $J =$

6.4 Hz, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 13

Masas (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 257 (17), 239 (5795), 221 (10000), 203 (2810).

210 mg de 1 β ,4 α ,6 β -trihidroxiudesmano (32) se disolvieron en 5 mL de acetona y se le añadió gota a gota el reactivo de Jones (persistencia de color anaranjado), manteniéndose la reacción durante 30 min. a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, controlada por capa fina, se procedió de la misma forma que para las anteriores reacciones de oxidación. Seguidamente se procedió a la cromatografía en columna de la mezcla de reacción de la que se obtuvo la 4 α -hidroxiudesmano-1,6-diona (33, 183 mg, 89%).

sirupo

$[\alpha]_D = -5^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3487 y 1706 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 2.67 (1H, s, H-5), 2.66 (1H, ddd, $J_{2\alpha,2\text{ec}} = J_{2\alpha,3\alpha} = 15.0$, $J_{2\alpha,3\text{ec}} = 6.3$ Hz, H-2 β), 1.70 y 1.08 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15), 0.91 y 0.85 (3H cada uno, d, $J = 6.9$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 13

Masas, (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 253 (18), 235 (100).

8.2. Biotransformación de eudesmanos con *Curvularia lunata*

8.2.1. Incubación del 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroieudesmano (8)

345 mg del sustrato 8 se disolvieron en 7 mL de EtOH y fueron repartidos en siete matraces Erlenmeyer, que contenían el cultivo de *C. lunata*. La incubación se mantuvo durante 12 días, después de los cuales se recuperó una mezcla de productos (296 mg), que se separaron por cromatografía en columna, aislándose 214 mg del producto de partida 8 y 82 mg (23%) de una mezcla de metabolitos polares.

Acetilación de los metabolitos polares aislados

82 mg de la mezcla de metabolitos aislados de la incubación con *C. lunata* del producto 8, se acetilaron con 2 mL de Ac₂O y 4 mL de piridina, durante 2 horas a reflujo. Una vez finalizada la reacción se procedió a su extracción con CH₂Cl₂ y posteriormente a la eliminación de la piridina. Una vez concentrados los productos obtenidos, se separaron cromatográficamente, obteniéndose 46 mg (44%) del producto 1 β ,6 β ,12-triacetoxi-4 β -hidroxieudesm-11(R)-ano (34) y 44 mg (42%) del producto 1 β ,6 β ,12-triacetoxi-4 β -hidroxieudesm-11(S)-ano (35).

1 β ,6 β ,12-triacetoxi-4 β -hidroxieudesm-11(R)-ano (34)

sirupo

$[\alpha]_D = +44^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR μ (max) (CHCl₃): 3505, 1731 y 1246 cm⁻¹

^1H RMN (300 MHz) (constantes de acoplamiento medidas sobre la carta espectral) (δ , CDCl_3): 5.66 (1H, m, $w_{1/2} = 3.7$ Hz, H-6), 4.45 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 11.9$, $J_{1,2ec} = 3.6$ Hz, H-1), 4.04 y 3.95 (1H cada uno, parte AB de un sistema ABX, $J_{AB} = 11.0$, $J_{AX} = 4.9$, $J_{BX} = 6.3$ Hz, 2H-12), 2.06, 2.04 y 2.02 (3H cada uno, s, Grupos acetoxilo), 1.34 (6H, s, 3H-14 y 3H-15) y 0.90 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 8

Masas, (m/z) (%): [M-120] 278 (20), 218 (21), 160 (32).

1 β ,6 β ,12-triacetoxi-4 β -hidroxieudesm-11(S)-ano (35)

sirupo

$[\alpha]_D = +27^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3504, 1727 y 1246 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (constantes de acoplamiento medidas sobre la carta espectral) (δ , CDCl_3): 5.66 (1H, dd, $J_{5,6} = J_{6,7} = 1.9$ Hz, H-6), 4.44 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 11.9$, $J_{1,2ec} = 3.6$ Hz, H-1), 4.12 y 3.92 (1H cada uno, parte AB de un sistema ABX, $J_{AB} = 11.0$, $J_{AX} = 3.7$, $J_{BX} = 6.2$ Hz, 2H-12), 2.04 (6H, s, Grupos acetoxilo), 2.02 (3H, s, Grupo acetoxilo), 1.38 y 1.34 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 1.00 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 8

Masas, (m/z) (%): [M-120] 278 (22), 218 (25), 160 (36).

8.2.2. Incubación de la 6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-1-ona (27)

440 mg del sustrato 27 se disolvieron en 9 mL de EtOH y se distribuyeron en 9 matraces Erlenmeyer que contenían el cultivo de *C. lunata*. A los 12 días se dió por

finalizada la incubación, obteniéndose 421 mg de una mezcla de productos, que se separaron por cromatografía en columna, aislándose 188 mg del producto de partida **27**, 185 mg del metabolito **40** (42%) y 48 mg (10%) de una mezcla de productos polares.

6 β -acetoxi-1 α ,4 β -dihidroxiudesmano (40)

sirupo

$[\alpha]_D = +25^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR μ (max) (CHCl₃): 3373, 1712 y 1266 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.72 (1H, m, $w_{1/2} = 4$ Hz, H-6), 3.81 (1H, m, $w_{1/2} = 8$ Hz, H-1), 2.00 (3H, s, Grupo acetoxilo), 1.35 y 1.24 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15), 0.88 y 0.86 (3H cada uno, d, J = 6.5 Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 9

Masas, (m/z) ($^{\circ}/_{\infty}$): [M-15] 283 (2), 223 (18), 220 (29), 205 (97)

Acetilación de la mezcla de metabolitos polares

48 mg de la mezcla de metabolitos aislados de la incubación con *C. lunata* del producto **27**, se acetilaron con 1 mL de Ac₂O y 2 mL de piridina, a temperatura ambiente, durante 2 horas (en el proceso de extracción y purificación de los productos aislados, se procedió de igual forma que para la acetilación de los metabolitos procedentes de la incubación del producto **8**). De esta acetilación se obtienen los siguientes productos: 25 mg (46%) del producto 1 α ,12-diacetoxi-4 β ,6 β -dihidroxiudesm-11(R)-ano (**41**) y 24 mg (44%) del producto 1 α ,12-diacetoxi-4 β ,6 β -dihidroxiudesm-11(S)-ano (**42**).

1 α ,12-diacetoxi-4 β ,6 β -dihidroxiudesm-11(R)-ano (41)

sirupo

$[\alpha]_D = +31^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3462, 1730 y 1245 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (constantes de acoplamiento medidas sobre la carta espectral) (δ , CDCl₃): 4.56 (2H, m, $w_{1/2} = 13$ Hz, H-1 y H-6), 4.27 y 3.86 (1H cada uno, parte AB de un sistema ABX, $J_{AB} = 10.5$, $J_{AX} = 4.5$, $J_{BX} = 7.5$ Hz, 2H-12), 2.07 y 2.05 (3H cada uno, s, Grupos acetoxilo), 1.39 y 1.30 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 1.00 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 9

Masas, (m/z) (%): [M-15] 341 (1), 323 (5), 278 (9), 263 (12), 221 (9), 218 (41), 203 (67)

1 α ,12-diacetoxi-4 β ,6 β -dihidroxiudesm-11(S)-ano (42)

sirupo

$[\alpha]_D = +25^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3454, 1731 y 1246 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (constantes de acoplamiento medidas sobre la carta espectral) (δ , CDCl₃): 4.57 (1H, m, $w_{1/2} = 8$ Hz, H-1), 4.51 (1H, m, $w_{1/2} = 8$ Hz, H-6), 4.33 y 3.85 (1H cada uno, parte AB de un sistema ABX, $J_{AB} = 10.5$, $J_{AX} = 3.6$, $J_{BX} = 7.5$ Hz, 2H-12), 2.07 y 2.06 (3H cada uno, s, Grupo acetoxilo), 1.41 y 1.34 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 1.06 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 9

Masas, (m/z) (%): [M-15] 341 (3), 323 (9), 278 (10), 263 (18), 218 (30), 203 (94).

8.2.3. Incubación del 6 β -acetoxi-1 α ,4 β -dihidroxiudesmano (40)

170 mg del producto **40** se disolvieron en 4 mL de EtOH y se distribuyeron en 4 matraces Erlenmeyer que contenían el cultivo de *C. lunata*, a los 12 días se finalizó la incubación obteniendo 152 mg de una mezcla de productos que fué separada en cromatografía en columna, aislandose 116 mg del producto de partida (**40**) y 36 mg (21%) de una mezcla polar que se acetila con Ac₂O (1 mL) y piridina (2 mL) a temperatura ambiente, durante 2 horas. De la mezcla de productos de acetilación se aislaron 19 mg (46%) del producto **41** y 19 mg (46%) del producto **42**.

8.2.4. Incubación del 1 β ,4 β ,6 β -trihidroxiudesmano (28)

Se disolvieron 300 mg del sustrato **28** en 6 mL de EtOH y se distribuyeron en seis matraces Erlenmeyer, siendo incubados durante 12 días. Transcurridos estos se recuperó una mezcla de metabolitos (280 mg) que se cromatografió obteniendose 238 mg del sustrato de partida **28**, 7.5 mg (2%) del 1 β ,2 α ,4 β ,6 β -tetrahidroxiudesmano (**47**) y 34 mg (11%) de una mezcla de metabolitos polares.

1 β ,2 α ,4 β ,6 β -tetrahidroxiudesmano (47)

sirupo

$[\alpha]_D = +3^\circ$ (c 0.5, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3353 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 4.53 (1H, dd, $J_{6,7} = J_{6,5} = 2.6$ Hz, H-6), 4.00 (1H, ddd, $J_{2,3ax} = 11.2$, $J_{2,1} = 9.2$, $J_{2,3ec} = 5.1$ Hz, H-2), 2.94 (1H, d, $J_{1,2} = 9.2$ Hz, H-1), 1.34 y 1.31 (3H

cada uno, s, 3H-14 y 3H-15), 0.99 y 0.96 (3H cada uno, d, J= 6.7 Hz, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 10

Masas, (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 273 (1), 255 (43), 237 (100), 219 (84), 201 (5).

Acetilación de la mezcla de metabolitos polares

Esta se disolvió en 2 mL de piridina y se le añadió 1 mL de anhídrido acético y se mantuvo durante 2 h a reflujo. Finalizada la reacción se le adicionó agua y se eliminó la piridina con una solución acuosa saturada de SO_4HK . Trás la extracción de la misma con CH_2Cl_2 y posterior secado y concentración, se cromatografió sobre silica gel en columna obteniéndose tres productos: 1 β ,6 β -diacetoxi-4 β ,11-dihidroxiudesmano (**48**, 19 mg, 43%), 1 β ,6 β ,12-triacetoxi-4 β -hidroxiudesm-11(R)-ano (**34**, 9 mg, 18%) y 1 β ,6 β ,12-triacetoxi-4 β -hidroxiudesm-11(S)-ano (**35**, 8 mg, 16%).

1 β ,6 β -diacetoxi-4 β ,11-dihidroxiudesmano (48)

sirupo

$[\alpha]_{\text{D}} = +28^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3468, 1731 y 1245 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 5.87 (1H, sa, H-6), 4.45 (1H, dd, $J_{1,2\text{ax}} = 11.8$, $J_{1,2\text{ec}} = 3.7$ Hz, H-1), 2.06 y 2.05 (3H cada uno, s, Grupos acetoxilo), 1.37 y 1.32 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15), 1.19 y 1.11 (3H cada uno, s, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 10

Masas, (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 357 (3), 339 (100), 279 (24), 237 (43), 219 (62).

8.2.5. Incubación del 1 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-6-ona (30)

El sustrato **30** (465 mg) se disolvió en EtOH (10 mL, 10 matraces Erlenmeyer) y se incubó durante 3 días, obteniéndose una mezcla de 421 mg que se cromatografió en una columna de gel de sílice, de la que se obtuvieron 235 mg del producto de partida **30**, 124 mg (31%) del 1 β ,4 β -dihidroieudesman-6-ona (**49**) y una mezcla de 62 mg (15%) de una mezcla de metabolitos.

1 β ,4 β -dihidroieudesman-6-ona (49)

sirupo

$[\alpha]_D = +34^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3440 y 1691 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 3.41 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 11.6$, $J_{1,2ec} = 4.1$ Hz, H-1), 2.19 (1H, s, H-5), 1.15 y 0.94 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15), 0.89 y 0.85 (3H cada uno, d, $J = 6.5$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 11

Masas, (m/z) (%): [M+1]⁺ 255 (16), 237 (100), 219 (7).

Correlación química entre el sustrato **30** y el metabolito **49**

25 mg del metabolito **49** se disolvieron en 3 mL de una mezcla de Ac₂O/Py (1:2) y se mantuvieron durante 2 h a temperatura ambiente. De esta acetilación se obtuvieron 24 mg (82%) del producto **30**.

Acetilación de la mezcla de metabolitos

Esta mezcla de metabolitos se disolvió en Ac₂O/Py (1:2) (3 mL), llevándose a cabo la reacción durante 2 h a reflujo. La cromatografía de esta dió lugar a dos productos: el 1β-acetoxi-4β,11-dihidroxiudesman-6-ona (**50**, 14 mg, 20%) y el 1β,12-diacetoxi-4β-hidroxiudesman-11(R)-an-6-ona (**51**, 54 mg, 66%).

1β-acetoxi-4β,11-dihidroxiudesman-6-ona (50)

sirupo

$[\alpha]_D = +39^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3531, 1730, 1692 y 1242 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 4.69 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 11.8$, $J_{1,2ec} = 4.2$ Hz, H-1), 2.46 (1H, ddd, $J_{7,8ax} = 12.7$, $J_{7,8ec} = 6.4$, $J_{7,5(w)} = 1.0$ Hz, H-7), 2.29 (1H, sa, H-5), 2.05 (3H, s, Grupo acetoxilo), 1.26 y 1.08 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 1.21 (6H, s, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 11

Masas, (m/z) (%): [M+1]⁺ 313 (28), 295 (65), 277 (16), 253 (38), 235 (100), 217 (11)

1β,12-diacetoxi-4β-hidroxiudesman-11(R)-an-6-ona (51)

sirupo

$[\alpha]_D = +54^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3530, 1735, 1697 y 1243 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (constantes de acoplamiento medidas sobre la carta espectral) (δ , CDCl₃): 4.71 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 11.8$, $J_{1,2ec} = 4.1$ Hz, H-1), 4.06 y 3.98 (1H cada uno, parte AB

de un sistema ABX, $J_{AB} = 10.9$, $J_{AX} = 5.0$, $J_{BX} = 6.1$ Hz, 2H-12), 2.41 (1H, ddd, $J_{7,8ax} = 12.7$, $J_{7,8ec} = J_{7,11} = 6.7$ Hz, H-7), 2.30 (1H, s, H-5), 2.18 (1H, dddq, $J_{11,12} = 5.0$, $J_{11,12'} = 6.1$, $J_{11,7} = J_{11,13} = 6.7$ Hz, H-11), 2.05 y 2.04 (3H cada uno, s, Grupos acetoxilo), 1.18 y 1.05 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 0.99 (3H, d, $J_{13,11} = 6.7$ Hz, 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 11

Masas, (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 355 (8), 337 (48), 295 (68), 277 (100), 235 (18).

Reducción y saponificación del producto (51)

Se añadieron 10 mg de NaBH_4 a una solución de 1 β ,12-diacetoxi-4 β -hidroxieudesm-11(R)-an-6-ona (51) (54 mg) en EtOH (4 mL) y se mantuvo durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se acidificó con HCl diluido, se extrajo con CH_2Cl_2 , se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a vacío. De la cromatografía en columna se obtuvo el producto 36 (33 mg, 79%), descrito anteriormente.

8.2.6. Incubación de la 4 β -hidroxieudesmano-1,6-diona (31)

340 mg del sustrato 31 se disolvieron en 7 mL de EtOH distribuyéndose en 7 matraces Erlenmeyer. A los 4 días se dió por finalizada la incubación, obteniéndose una mezcla de productos (283 mg) que se cromatografió obteniéndose los siguientes productos: 23 mg del sustrato de partida 31, 95 mg (28%) de la 1 α ,4 β -dihidroxiudesman-6-ona (52), 117 mg (32%) de la 4 β ,12-dihidroxiudesm-11(R)-ano-1,6-diona (53) y 48 mg (13%) de un metabolito polar.

1 α ,4 β -dihidroxiudesman-6-ona (52)

sirupo

$[\alpha]_D = +21^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3444 y 1690 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 3.52 (1H, dd, $J_{1,2ax} = J_{1,2ec} = 3.0$ Hz, H-1), 2.64 (1H, s, H-5), 1.18 (3H, s, 3H-15), 0.98 (3H, s, 3H-14), 0.88 y 0.85 (3H cada uno, d, $J = 6.6$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 12

Masas, (m/z) (%): $[M+1]^+$ 255 (9), 237 (100), 219 (45)

4 β ,12-dihidroxiudesm-11(R)-ano-1,6-diona (53)

sirupo

$[\alpha]_D = +9^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3454 y 1711 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (constantes de acoplamiento medidas sobre la carta espectral) (δ , CDCl₃): 3.59 y 3.51 (1H cada uno, parte AB de un sistema ABX, $J_{AB} = 10.7$, $J_{AX} = 5.3$, $J_{BX} = 6.7$ Hz, 2H-12), 3.07 (1H, ddd, $J_{2ax,2ec} = J_{2ax,3ax} = 14.2$, $J_{2ax,3ec} = 6.0$ Hz, H-2 β), 2.62 (1H, d, $J_{5,7(w)} = 1.0$ Hz, H-5), 2.43 (1H, dddd, $J_{7,8ax} = 11.9$, $J_{7,8ec} = 6.5$, $J_{7,11} = 5.3$, $J_{7,5(w)} = 1.0$ Hz, H-7), 1.27 y 1.26 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 0.95 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 12

Masas, (m/z) (%): $[M+1]^+$ 269 (29), 251 (100), 233 (25).

Acetilación del metabolito polar

48 mg de este metabolito polar se acetilaron con 3 mL de una solución de $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}$ (1:2) durante 2 h a reflujo. De esta se obtuvo la 1 α ,12-diacetoxi-4 β -hidroxieudesm-11(R)-an-6-ona (54, 53 mg, 84%).

1 α ,12-diacetoxi-4 β -hidroxieudesm-11(R)-an-6-ona (54)

sirupo

$[\alpha]_D = +46^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3527, 1739, 1695 y 1243 cm^{-1}

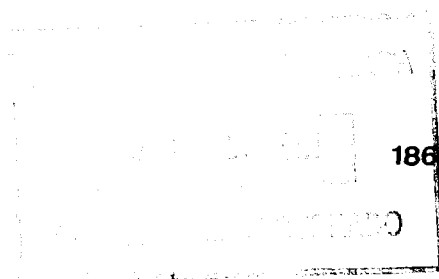
^1H RMN (300 MHz) (constantes de acoplamiento medidas sobre la carta espectral) (δ , CDCl_3): 4.77 (1H, dd, $J_1 = 3.2$, $J_2 = 2.4$ Hz, H-1), 4.06 y 3.99 (1H cada uno, parte AB de un sistema ABX, $J_{AB} = 10.9$, $J_{AX} = 5.1$, $J_{BX} = 6.2$ Hz, 2H-12), 2.57 (1H, sa, H-5), 2.39 (1H, dddd, $J_{7,8ax} = 12.6$, $J_{7,8ec} = J_{7,11} = 6.3$, $J_{7,5(w)} = 1.0$ Hz, H-7), 2.12 y 2.04 (3H cada uno, s, Grupos acetoxilo), 1.22 y 1.07 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 0.99 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 12

Masas, (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 355 (5), 337 (78), 295 (81), 277 (100), 235 (33), 217 (20).

Reducción del producto 53

Se llevó a cabo la reducción de la 4 β ,12-dihidroxiudesm-11(R)-ano-1,6-diona (53) (117 mg) disuelta en EtOH (6 mL) añadiéndole 20 g de NaBH_4 . Esta reacción se mantuvo durante 30 min a temperatura ambiente, obteniéndose un compuesto (104 mg, 88%) idéntico al metabolito 36.



Reducción y saponificación del producto 54

Se añadieron 10 mg de NaBH₄ a una solución de 1 α ,12-diacetoxi-4 β -hidroxieudesm-11(R)-an-6-ona (**54**) (53 mg) en EtOH (4 mL), bajo las mismas condiciones de trabajo que la reacción de reducción anterior. Seguidamente se cromatografió obteniéndose un producto idéntico al metabolito **43**, aislado anteriormente.

8.2.7. Incubación del 6 β -acetoxi-1 β ,4 α -hidroxieudesmano (9)

250 mg del producto **9** se disolvieron en 5 mL de EtOH y se distribuyeron en 5 matraces Erlenmeyer y se incubaron durante 14 días. En este proceso se obtuvieron únicamente 228 mg (91%) del sustrato de partida **9**.

8.2.8. Incubación del 4 α -hidroxieudesmano-1,6-diona (33)

180 mg del producto **33** se disolvieron en 4 mL de EtOH y se distribuyeron en 4 Erlenmeyer, incubándose durante 5 días. De esta incubación se obtuvo el 1 α ,4 α -dihidroxieudesman-6-ona (**55**) (117 mg, 64%).

1 α ,4 α -dihidroxieudesman-6-ona (55)

sirupo

$[\alpha]_D = +18^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR μ (max) (CHCl₃): 3434, 1690 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 3.35 (1H, dd, $J_{1,2ax} = J_{1,2ec} = 2.3$ Hz, H-1), 2.69 (1H, d,

$J_{5,7(w)} = 1.0$ Hz, H-5), 1.39 y 0.79 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15), 0.83 y 0.76 (3H cada uno, d, $J = 6.9$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 13

Masas, (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 255 (4), 237 (100), 219 (65).

8.3. Biotransformación de eudesmanos con *Rhizopus nigricans*

8.3.1. Incubación del 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmano (8)

Se tomaron 120 mg del sustrato **8** y se disolvieron en 3 mL de EtOH y se distribuyeron en 3 matraces Erlenmeyer que contenían el cultivo de *R. nigricans*, manteniendo la incubación durante 7 días, después de los cuales, se recuperó una mezcla de metabolitos (96 mg), de la que, tras someterla a una cromatografía en columna, se aislaron 25 mg del producto de partida **8**, 50 mg del 6 β -acetoxi-4 β ,11-dihidroxiudesman-1-ona (**56**, 50 mg, 40%) y **21** (17%) de un metabolito polar, que se acetiló con 1 mL de Ac₂O y 2 mL de piridina, a reflujo durante 2 h. Una vez finalizada la reacción se procedió a su extracción con CH₂Cl₂ y posteriormente a la eliminación de la piridina. Una vez concentrada se separó cromatográficamente, obteniéndose 21 mg (88%) del producto 1 β ,6 β -diacetoxi-4 β ,11-dihidroxiudesmano (**48**), obtenido anteriormente en la incubación del sustrato **28** con *C. lunata*.

6 β -acetoxi-4 β ,11-dihidroxiudesman-1-ona (56)

Sirupo

$[\alpha]_D = +47^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3464, 1734, 1707 y 1258 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.86 (1H, sa, H-6), 3.08 (1H, ddd, $J_{2ax,2ec} = J_{2ax,3ax} = 14.1$, $J_{2ax,3ec} = 6.1$ Hz, H-2 β), 2.06 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.53 (3H, s, 3H-14), 1.40 (3H, s, 3H-15), 1.33 (1H, d, $J_{5,6} = 1.1$ Hz, H-5) y 1.18 y 1.12 (3H cada uno, s, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 14

Masas (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 313 (67), 295 (100), 253 (12), 235 (56), 217 (20).

8.3.2. Incubación del 6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-1-ona (27)

161 mg del sustrato 27 fueron disueltos en 4 mL de EtOH y repartidos en otros tantos matraces Erlenmeyer con el cultivo de *R. nigricans*. La incubación se mantuvo durante 3 días, recuperándose, al cabo de estos, una mezcla de metabolitos (158 mg), de la que se aislaron 10 mg del producto de partida (27), 26 mg (15%) del producto 6 β -acetoxi-4 β ,8 α -dihroxieudesman-1-ona (57) y 122 mg (72%) del producto 56, aislado en la anterior incubación del producto 8.

6 β -acetoxi-4 β ,8 α -dihroxieudesman-1-ona (57)

Sirupo

$[\alpha]_{\text{D}} = +69^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3464, 1736, 1711 y 1252 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 5.78 (1H, dd, $J_{6,7} = J_{6,5} = 2.0$ Hz, H-6), 4.18 (1H, ddd, $J_{8\alpha,7} = J_{8\alpha,9\alpha} = 11.1$, $J_{8\alpha,9\text{ec}} = 4.5$ Hz, H-8 β), 3.09 (1H, ddd, $J_{2\alpha,2\text{ec}} = J_{2\alpha,3\alpha} = 14.1$, $J_{2\alpha,3\text{ec}} = 6.1$ Hz, H-2 β), 2.03 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.56 y 1.47 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15), 1.37 (1H, d, $J_{5,6} = 2.0$ Hz, H-5) y 1.03 y 0.95 (3H cada uno, d, $J = 7.1$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 14

Masas (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 313 (39), 295 (100), 253 (14), 235 (67), 217 (33).

8.3.3. Incubación del 1 β ,4 β ,6 β -trihidroxiudesmano (28)

172 mg del sustrato 28 se disolvieron en 4 mL de EtOH y se distribuyeron en 4 Erlenmeyer que contenía el cultivo de *R. nigricans*. A los 7 días se dió por finalizada la incubación, obteniéndose 149 mg de una mezcla de productos, que se separaron por cromatografía en columna, aislándose 106 mg del producto de partida (28), 8 mg (5%) del 4 β ,6 β -dihidroxiudesman-1-ona (58), 9 mg (5%) del 4 β ,6 β ,11-trihidroxiudesman-1-ona (59) y 26 mg (14%) del 1 β ,4 β ,6 β ,11-tetrahidroxiudesmano (60).

4 β ,6 β -dihidroxiudesman-1-ona (58)

Sirupo

$[\alpha]_D = +44^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\max)$ (CHCl₃): 3397 y 1701 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 4.55 (1H, m, $w_{1/2} = 6$ Hz, H-6), 3.15 (1H, ddd, $J_{2ax,2ec} = J_{2ax,3ax} = 14.1$, $J_{2ax,3ec} = 6.1$ Hz, H-2 β), 1.58 y 1.36 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15), 1.25 (1H, d, $J_{5,6} = 1.8$ Hz, H-5) y 0.98 y 0.96 (3H cada uno, d, $J = 6.7$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 15

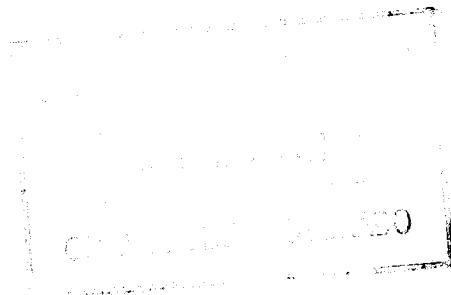
Masas (m/z) (%): $[M+1]^+$ 255 (65), 237 (100), 219 (51).

4 β ,6 β ,11-trihidroxiudesman-1-ona (59)

Sirupo

$[\alpha]_D = +34^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\max)$ (CHCl₃): 3384 y 1705 cm⁻¹



^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 4.81 (1H, dd, $J_{6,7} = J_{6,5} = 2.0$ Hz, H-6), 3.16 (1H, ddd, $J_{2ax,2ec} = J_{2ax,3ax} = 14.0$, $J_{2ax,3ec} = 6.1$ Hz, H-2 β), 1.63 y 1.41 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 1.38 y 1.27 (3H cada uno, s, 3H-12 y 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 15

Masas (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 271 (81), 253 (31), 235 (100), 217 (13).

1 β ,4 β ,6 β ,11-tetrahidroxieudesmano (60)

Sirupo

$[\alpha]_D = +6^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3343 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 4.77 (1H, dd, $J_{6,7} = J_{6,5} = 2.7$ Hz, H-6), 3.16 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 11.7$, $J_{1,2ec} = 4.0$ Hz, H-1) y 1.40, 1.34, 1.31 y 1.25 (3H cada uno, s, 3H-12, 3H-13, 3H-14 y 3H-15)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 15

Masas (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 273 (4), 255 (17), 237 (100), 219 (48).

8.3.4. Incubación de la 1 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-6-ona (30)

Se tomaron 375 mg del sustrato **30** para realizar la incubación del mismo con *R. nigricans*, disolviéndose en 7 ml de EtOH y distribuyéndose en otros tantos Erlenmeyer. A los 3 días se dió por finalizada, aislandose una mezcla de metabolitos (312 mg), de la que se obtuvieron los siguientes productos: 65 mg del producto de partida (17%), 180 mg (55%) del producto **49** (aislado anteriormente en la incubación del sustrato **30** con *C. lunata*), 18 mg (5%) del metabolito 1 β ,4 β ,7-trihidroxieudesman-6-ona (**61**) y 49 mg (14%) del metabolito 1 β ,4 β ,11-trihidroxieudesman-6-ona (**62**).

1B,4B,7-trihidroxiudesman-6-ona (61)

Sirupo

$[\alpha]_D = +78^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3442 y 1696 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 3.51 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 11.6$, $J_{1,2ec} = 4.1$ Hz, H-1), 3.13 (1H, s, H-5), 1.15 y 0.96 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 0.93 y 0.92 (3H cada uno, d, $J = 6.8$ Hz, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 17

Masas (m/z) (%): $[M+1]^+$ 271 (7), 253 (59), 235 (100), 217 (8).

1B,4B,11-trihidroxiudesman-6-ona (62)

Sirupo

$[\alpha]_D = +24^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3436 y 1689 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 3.39 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 11.6$, $J_{1,2ec} = 4.1$ Hz, H-1), 2.44 (1H, ddd, $J_{7,8ax} = 12.7$, $J_{7,8ec} = 6.5$, $J_{7,5} = 0.8$ Hz, H-7), 2.18 (1H, d, $J_{5,7} = 0.8$ Hz, H-5), 1.22 y 1.19 (3H cada uno, s, 3H-12 y 3H-13) y 1.16 y 0.96 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 17

Masas (m/z) (%): $[M+1]^+$ 271 (16), 253 (64), 235 (100).

8.3.5. Incubación de la 4β-hidroxiudesmano-1,6-diona (31)

311 mg del sustrato 31 fueron disueltos en 6 mL de EtOH y se repartieron en 6 matraces Erlenmeyer. La incubación se mantuvo durante 4 días, después de los cuales se recuperó una mezcla de productos (282 mg), que se separaron por cromatografía en columna, aislándose 105 mg (32%) del 4β,11-dihidroxiudesmano-1,6-diona (63) y 177 mg (53%) del 1α,4β,11-trihidroxiudesman-6-ona (64).

4β,11-dihidroxiudesmano-1,6-diona (63)

Sirupo

$[\alpha]_D = +61^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3527 y 1700 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 3.03 (1H, ddd, $J_{2ax,2ec} = J_{2ax,3ax} = 14.2$, $J_{2ax,3ec} = 6.0$ Hz, H-2β), 2.55 (1H, s, H-5), 2.39 (1H, dd, $J_{7,8ax} = 12.2$, $J_{7,8ec} = 7.3$ Hz, H-7), 1.24 y 1.23 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 1.21 y 1.18 (3H cada uno, s, 3H-12 y 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 17

Masas (m/z) (%): [M+1]⁺ 269 (49), 251 (100), 233 (63).

1α,4β,11-trihidroxiudesman-6-ona (64)

Sirupo

$[\alpha]_D = +50^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3443 y 1684 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 3.51 (1H, dd, $J_{1,2ax} = J_{1,2ec} = 2.8$ Hz, H-1), 2.64 (1H, sa,

H-5), 2.41 (1H, ddd, $J_{7,8ax} = 12.7$, $J_{7,8ec} = 6.3$, $J_{7,5} = 1.1$ Hz, H-7), 1.23 y 1.18 (3H cada uno, s, 3H-12 y 3H-13), 1.19 (3H, s, 3H-15) y 1.00 (3H, s, 3H-14)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 17

Masas (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 271 (38), 253 (90), 235 (100), 217 (23).

8.3.6. Incubación de L 6 β -acetoxi-1 β ,4 α -dihidroxiudesmano (9)

120 mg del sustrato 9 se disolvieron en 3 mL de EtOH y fueron distribuidos en 3 matraces Erlenmeyer, conteniendo el cultivo de *R. nigricans*. La incubación se mantuvo durante 7 días, después de los cuales se recuperó una mezcla de productos (94 mg), que se separaron cromatográficamente, aislandose 71 mg del producto de partida (9) y 23 mg (18%) del metabolito 6 β -acetoxi-1 β ,4 α ,11-trihidroxiudesmano (65).

6 β -acetoxi-1 β ,4 α ,11-trihidroxiudesmano (65)

Sirupo

$[\alpha]_D = +2^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3419, 1714 y 1261 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 5.92 (1H, sa, H-6), 3.26 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 10.6$, $J_{1,2ec} = 4.2$ Hz, H-1), 1.18 (6H) y 1.13 y 1.12 (3H cada uno) (s, 3H-12, 3H-13, 3H-14 y 3H-15)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 15

Masas (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 315 (1), 297 (100), 279 (27), 237 (74), 219 (46), 201 (7).

9. CONVERSION DE SESQUITERPENOS 12-HIDROXILADOS EN 6B-SESQUITERPENOLIDOS

9.1. Obtención de 1B,4B-dihidroxi-5 α ,7 α ,11-H-eudesman-6B,12-olidas

Saponificación del 1B,6B,12-triacetoxi-4B-hidroxiudesm-11(R)-ano (34)

43 mg del producto **34** se disolvieron en 4 mL una disolución hidrometanólica (metanol al 70%) que contenía un 5% de KOH (0.2 g). Esta se mantuvo a reflujo durante 1 h. Seguidamente la mezcla de reacción se extrajo, secó y concentró por los métodos usuales. Trás su cromatografía en columna se obtuvo el 1B,4B,6B,12-tetrahydroxiudesm-11(R)-ano (**36**, 26 mg, 88%).

sirupo

$[\alpha]_D = +7^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3332 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (constantes de acoplamiento medidas sobre la carta espectral) (δ , CDCl₃): 4.34 (1H, sa, H-6) 3.57 y 3.49 (1H cada uno, parte AB de un sistema ABX, $J_{AB} = 10.8$, $J_{AX} = 8.8$, $J_{BX} = 3.7$ Hz, 2H-12), 3.18 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 11.7$, $J_{1,2ec} = 3.7$ Hz, H- 1), 1.33 y 1.29 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 0.96 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 18

Masas, (m/z) (%): [M+1]⁺ 273 (6), 255 (47), 237 (100), 219 (37), 201 (5).

Saponificación del 1 β ,6 β ,12-triacetoxi-4 β -hidroxieudesm-11(S)-ano (35)

Se disolvieron 40 mg del producto **35** en una solución de MeOH/H₂O (70%) (4 mL) a la que se adicionó 0.2 g de KOH (5%), bajo las mismas condiciones que la reacción de saponificación anterior. Con la cromatografía con gel de sílice (en columna) de la mezcla de reacción se obtuvo el 1 β ,4 β ,6 β ,12-tetrahidroxieudesm-11(S)-ano (**38**, 25 mg, 91%).

sirupo

$[\alpha]_D = +14^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3349 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (constantes de acoplamiento medidas sobre la carta espectral) (δ , CDCl₃): 4.53 (1H, sa, H-6), 3.71 y 3.60 (1H cada uno, parte AB de un sistema ABX, $J_{AB} = 10.6$, $J_{AX} = 2.2$, $J_{BX} = 7.2$ Hz, 2H-12), 3.18 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 11.6$, $J_{1,2ec} = 4.0$ Hz, H-1), 1.33 y 1.27 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 0.97 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 18

Masas, (m/z) (%): $[M+1]^+$ 273 (3), 255 (39), 237 (100), 219 (40), 201 (4).

Lactonización del 1 β ,4 β ,6 β ,12-tetrahidroxieudesm-11(R)-ano (36)

26 mg (0.1 mmol) del producto **36** se disolvieron en 0.5 mL de tolueno seco y se le añadieron 0.02 mL (0.3 mmol) de acetona. A esta disolución se le agregaron posteriormente 2.2 mg (2×10^{-3} mmol) de RuH₂(PPh₃)₄ como catalizador. La mezcla de reacción se mantuvo a 180°, en un tubo cerrado, durante 6 h bajo atmósfera de argón. Una vez finalizada la reacción se enfrió (antes de abrir el tubo), y se concentró a vacío.

De la separación cromatográfica de la misma se obtuvo la 1 β ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11 α -H-eudesman-6 β ,12-olida (**37**, 11 mg, 43%).

sirupo

$[\alpha]_D = -42^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3302, 1767 y 1161 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 4.74 (1H, dd, $J_{6,7} = J_{5,6} = 3.7$ Hz, H-6), 3.22 (1H, dd, $J_{1,2ax} = 11.6$, $J_{1,2ec} = 4.2$ Hz, H-1), 2.77 (1H, dq, $J_{11,7} = J_{11,13} = 7.1$ Hz, H-11), 1.28 (3H, s, 3H-15), 1.20 (3H, d, $J_{13,11} = 7.1$ Hz, 3H-13) y 1.16 (3H, s, 3H-14)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 18

Masas, (m/z) (%): [M+1]⁺ 269 (9), 251 (100), 233 (52).

Lactonización del 1 β ,4 β ,6 β ,12-tetrahydroxieuodesm-11(S)-ano (**38**)

25 mg (0.09 mmol) del producto **38** se disolvieron en 0.5 mL de tolueno seco y 0.02 mL (0.3 mmol) de acetona y se le añadieron 2.2 mg (2×10^{-3} mmol) de RuH₂(PPh₃)₄. La reacción se llevó a cabo en un tubo cerrado a 180° durante 6 h y en atmósfera de argón. Seguidamente se procedió de igual forma que para la reacción de lactonización anterior. De su cromatografía en columna se obtuvo la 1 β ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11 β -H-eudesman-6 β ,12-olida (**39**, 10 mg, 41%).

sirupo

$[\alpha]_D = -41^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3314, 1766 y 1156 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 4.94 (1H, dd, $J_{6,7} = 4.7$, $J_{5,6} = 3.3$ Hz, H-6), 3.20 (1H, dd,

$J_{1,2ax} = 11.6$, $J_{1,2ec} = 4.2$ Hz, H-1), 2.38 (1H, q, $J_{11,13} = 7.7$ Hz, H-11), 1.32 (3H, d, $J_{13,11} = 7.7$ Hz, 3H-13), 1.29 (3H, s, 3H-15) y 1.17 (3H, s, 3H-14)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 18

Masas, (m/z) (%): $[\text{M} + 1]^+$ 269 (5), 251 (100), 233 (36).

9.2. Obtención de 1 α ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11-H-eudesman-6 β ,12-olidas

Saponificación del 1 α ,12-diacetoxi-4 β ,6 β -dihidroxiudesm-11(R)-ano (41)

Se disolvieron 25 mg del producto 41 en 4 mL de una mezcla hidrometanólica al 70% y se le añadieron 0.2 g (5%) de KOH, manteniendo la reacción a reflujo durante 1 h. Una vez extraída, secada y concentrada la mezcla de reacción, se cromatografió en columna obteniéndose el 1 α ,4 β ,6 β ,12-tetrahydroxiudesm-11(R)-ano (43, 16 mg, 84%).

sirupo

$[\alpha]_D = +5^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3336 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (constantes de acoplamiento medidas sobre la carta espectral) (δ , CDCl_3): 4.40 (1H, sa, H-6), 3.55 y 3.44 (1H cada uno, parte AB de un sistema ABX, $J_{AB} = 10.8$, $J_{AX} = 9.1$, $J_{BX} = 3.6$ Hz, 2H-12), 3.34 (1H, m, $w_x = 6.0$ Hz, H-1), 1.34 y 1.32 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 0.94 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, 3H-13)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 19

Masas, (m/z) (%): $[\text{M} + 1]^+$ 273 (4), 255 (16), 237 (30), 219 (100), 201 (9).

Saponificación del 1 α ,12-diacetoxi-4 β ,6 β -dihidroxiudesm-11(S)-ano (42)

En 4 mL de una mezcla hidrometanólica al 70% que contenía 0.2 g (5%) de KOH, se disolvieron 24 mg del producto 42, manteniendolo en agitación a reflujo durante 1 h. De la separación cromatográfica de la mezcla de reacción se obtuvo el 1 α ,4 β ,6 β ,12-tetrahydroxiudesm-11(S)-ano (45, 16 mg, 87%).

sirupo

$[\alpha]_D = +10^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3332 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (constantes de acoplamiento medidas sobre la carta espectral) (δ , CDCl₃): 4.60 (1H, dd, $J_{6,7} = J_{6,5} = 2.5$ Hz, H-6), 3.68 y 3.58 (1H cada uno, parte AB de un sistema ABX, $J_{AB} = 10.7$, $J_{AX} = 2.3$, $J_{BX} = 7.1$ Hz, 2H-12), 3.35 (1H, dd, $J_{1,2ax} = J_{1,2ec} = 2.8$ Hz, H-1), 1.34 y 1.30 (3H cada uno, s, 3H-14 y 3H-15) y 0.97 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 19

Masas, (m/z) (%): $[M+1]^+$ 273 (5), 255 (11), 237 (30), 219 (100), 201 (7).

Lactonización del 1 α ,4 β ,6 β ,12-tetrahydroxiudesm-11(R)-ano (43)

Se disolvieron 16 mg (0.06 mmol) del producto 43 en 0.5 mL de tolueno y trazas de acetona. A esta solución se añadieron 1.3 mg (1.2×10^{-3}) de RuH₂(PPh₃)₄ y se situó en un tubo cerrado a 180° durante 6 h bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción obtenida se cromatografió en una columna de gel de sílice, obteniendose la 1 α ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11 α -H-eudesman-6 β ,12-olida (44, 10 mg, 63%).

sirupo

$[\alpha]_D = -21^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3445, 1773 y 1159 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 4.82 (1H, dd, $J_{6,7} = J_{6,5} = 3.5$ Hz, H-6), 3.41 (1H, dd, $J_{1,2ax} = J_{1,2ec} = 2.8$ Hz, H-1), 2.75 (1H, dq, $J_{11,7} = J_{11,13} = 7.1$ Hz, H-11), 1.84 (1H, d, $J_{5,6} = 3.5$ Hz, H-5), 1.30 (3H, s, 3H-15), 1.19 (3H, s, 3H-14) y 1.18 (3H, d, $J_{13,11} = 7.1$ Hz, 3H-13)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 19

Masas, (m/z) (%): $[M+1]^+$ 269 (7), 251 (30), 233 (100).

Lactonización del 1 α ,4 β ,6 β ,12-tetrahidroieudesm-11(S)-ano (45)

16 mg del producto 45 se disolvieron en una solución de 0.5 mL de tolueno seco con trazas de acetona y 1.3 mg de RuH₂(PPh₃)₄, llevándose a cabo la reacción bajo las mismas condiciones que la reacción de lactonización anterior. De la cromatografía en columna de la misma se obtuvo la 1 α ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11 β -H-eudesman-6 β ,12-olida (46, 10 mg, 63%).

sirupo

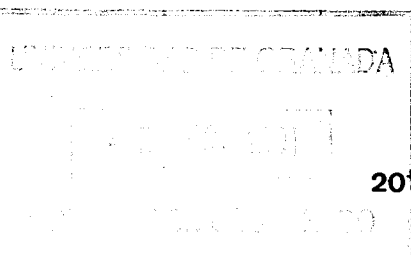
$[\alpha]_D = -22^\circ$ (c 1, CHCl₃)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl₃): 3460, 1773 y 1154 cm⁻¹

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 5.03 (1H, dd, $J_{6,7} = 4.5$, $J_{6,5} = 3.5$ Hz, H-6), 3.40 (1H, dd, $J_{1,2ax} = J_{1,2ec} = 2.8$ Hz, H-1), 2.36 (1H, q, $J_{11,13} = 7.7$ Hz, H-11), 2.02 (1H, ddd, $J_{7,8ax} = 12.0$, $J_{7,8ec} = 7.1$, $J_{7,6} = 4.5$ Hz, H-7), 1.80 (1H, d, $J_{5,6} = 3.5$ Hz, H-5), 1.32 (3H, s, 3H-15), 1.31 (3H, d, $J_{13,11} = 7.7$ Hz, 3H-13) y 1.20 (3H, s, 3H-14)

¹³C RMN (δ , CDCl₃): ver tabla 19

Masas, (m/z) (%): $[M+1]^+$ 269 (4), 251 (25), 233 (100).



9.3. Obtención de la (1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-7 α ,11 β -H-germacran-6 β ,12-olida (67)

Saponificación del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-12-hidroxi-germacr-11(S)-ano (18)

Se disolvieron 15 mg del metabolito 18 en 4 mL de una mezcla hidrometanólica al 70% y se le añadieron 0.2 g (5%) de KOH, manteniendo la reacción, durante una hora, a reflujo. De esta reacción se obtuvieron 11 mg (85%) del (1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-6 β ,12-dihidroxi-germacr-11(S)-ano (66).

^1H RMN (300 MHz) (constantes de acoplamiento medidas sobre la carta espectral) (δ , CDCl_3): 3.74 y 3.51 (1H cada uno, parte AB de un sistema ABX, J_{AB} = 11.1, J_{AX} = 2.7, J_{BX} = 5.7 Hz, 2H-12), 3.70 (1H, dd, J_1 = 8.5, J_2 = 1.4 Hz, H-6), 3.00 (1H, dd, J_1 = 9.2, J_2 = 5.7 Hz, H-1), 2.90 (1H, d, J = 8.5 Hz), 1.39 (3H, s, 3H-14), 1.32 (3H, s, 3H-15) y 0.98 (3H, d, J = 7.0 Hz, 3H-13).

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 20

Masas, (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 271 (9), 253 (54), 235 (100), 217 (42).

Lactonización del (1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-6 β ,12-dihidroxi-germacr-11(S)-ano (66)

11 mg del producto 66 se disolvieron en 0.5 mL de tolueno seco con trazas de acetona y 1 mg de $\text{RuH}_2(\text{PPh}_3)_4$, llevándose a cabo la reacción durante dos horas a 180° en atmosfera inerte. De esta se obtuvieron 7 mg (65%) de la (1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-7 α ,11 β -H-germacran-6 β ,12-olida (67).

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 4.24 (1H, dd, $J_1 = 9.5$, $J_2 = 4.7$ Hz, H-6), 2.94 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-5), 2.81 (1H, dd, $J_1 = 9.5$, $J_2 = 5.5$ Hz, H-1), 1.47 (3H, s, 3H-14), 1.32 (3H, d, $J = 7.7$ Hz, 3H-13) y 1.31 (3H, s, 3H-15)

Masas, (m/z) (%): $[\text{M} + 1]^+$ 267 (100), 249 (32), 231 (29).

10. CONVERSION DE SESQUITERPENOS 11-HIDROXILADOS EN 12-HIDROXILADOS

10.1 Conversión del producto 56 en los productos 36 y 38

100 mg del producto 56 se disolvieron en 3 mL de CH_2Cl_2 y se le agregaron 0.2 mL de Et_3N y 2 mg de DMAP. La mezcla se enfrió a 0° y se le añadieron entonces 0.1 mL de cloruro de mesilo. Esta se mantuvo en agitación durante 2 h. Una vez finalizada la reacción se le añadió hielo picado y se volvió a agitar, esta vez durante 1 h. Pasada esta se extrajo con CH_2Cl_2 , se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a vacío. De su cromatografía en columna se aislaron 69 mg (73%) del 6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesm-11-en-1-ona (68).

6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesm-11-en-1-ona (68)

$[\alpha]_D = +47^\circ$ (c 1, CHCl_3)

IR $\mu(\text{max})$ (CHCl_3): 3481, 1735, 1711 y 1248 cm^{-1}

^1H RMN (300 MHz) (δ , CDCl_3): 5.68 (1H, sa, H-6), 4.83 y 4.72 (1H cada uno, s, 2H-12), 3.11 (1H, ddd, $J_{2ax,2ec} = J_{2ax,3ax} = 14.1$, $J_{2ax,3ec} = 6.2$ Hz, H-2 β), 2.02 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.75 (3H, sa, 3H-13), 1.55 (3H, s, 3H-14) y 1.40 (3H, s, 3H-15)

^{13}C RMN (δ , CDCl_3): ver tabla 20

Masas (m/z) (%): $[\text{M}+1]^+$ 295 (100), 277 (51), 235 (34), 217 (59).

60 mg del producto **68** se disolvieron en 1 mL de THF seco (en atmósfera de argón). A esta solución se le añadió 1 mL de una solución 0.5 M de 9-BBN en THF, agitándose la misma durante 2 h. Transcurrido este tiempo se le añadieron 0.6 mL de etanol, 0.2 mL de una solución 6 N de NaOH y 0.4 mL de H₂O₂ al 30%. La mezcla se calentó entonces durante 1 h a 50°. Tras los procesos de extracción, secado, concentrado y purificación se obtuvieron 36 mg (65%) del producto **36** y 10 mg (18%) del producto **37**.

10.2. Conversión del producto **14** en los productos **66** y **70**

100 mg del producto **14** se disolvieron en 3 mL de CH₂Cl₂ y se le agregaron 0.2 mL de Et₃N y 2 mg de DMAP. La mezcla se enfrió a 0° y se le añadieron entonces 0.1 mL de cloruro de mesilo. Esta se mantuvo en agitación durante 2 h. Finalizada esta se procedió de la misma forma que para la anterior reacción de deshidratación. De su cromatografía en columna se aislaron 71 mg (75%) del 6β-acetoxi-(1α,10β),(4β,5α)-diepoxigermacr-11-eno (**69**).

6β-acetoxi-(1α,10β),(4β,5α)-diepoxigermacr-11-eno (**69**)

¹H RMN (300 MHz) (δ, CDCl₃): 4.92 (1H, dd, J₁= 8.7, J₂= 1.7 Hz, H-6), 4.81 (1H, m, w_{1/2}= 3 Hz) y 4.72 (1H, sa) (2H-12), 3.03 (1H, dd, J₁= 9.2, J₂= 6.1 Hz, H-1), 2.92 (1H, d, J= 8.7 Hz), 2.04 (3H, s, grupo acetoxilo), 1.72 (3H, sa, 3H-13), 1.47 (3H, s, 3H-14) y 1.33 (3H, s, 3H-15)

¹³C RMN (δ, CDCl₃): ver tabla 20

Masas, (m/z) (%): [M+1]⁺ 295 (26), 235 (100), 217 (28), 199 (7).

60 mg del producto **69** se disolvieron en 1 mL de THF seco (en atmosfera de argón). A esta solución se le añadió 1 mL de una solución 0.5 M de 9-BBN en THF, agitándose la misma durante 2 h. Transcurrido este tiempo se le añadieron 0.6 mL de etanol, 0.2 mL de una solución 6 N de NaOH y 0.4 mL de H₂O₂ al 30%. La mezcla se calentó entonces durante 1 h a 50°. Tras los procesos de extracción, secado, concentrado y purificación se obtuvieron 31 mg (56%) del (1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-6 β ,12-dihidroxi-germacr-11(R)-ano (**70**) y 16 mg (29%) del producto **66**.

Lactonización del (1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-6 β ,12-dihidroxi-germacr-11(R)-ano (**70**)

20 mg del producto **66** se disolvieron en 0.5 mL de tolueno seco con trazas de acetona y 1 mg de RuH₂(PPh₃)₄, llevándose a cabo la reacción durante dos horas a 180° en atmosfera inerte. De esta se obtuvieron 12 mg (61%) de la (1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-7 α ,11 α -H-germacran-6 β ,12-olida (**71**).

¹H RMN (300 MHz) (δ , CDCl₃): 4.04 (1H, dd, J₁ = 9.6, J₂ = 4.0 Hz, H-6), 2.93 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-5), 2.85 (1H, dq, J₁ = J₂ = 7.1 Hz, H-11), 2.84 (1H, dd, J₁ = 9.5, J₂ = 5.5 Hz, H-1), 1.47 (3H, s, 3H-14), 1.31 (3H, s, 3H-15) y 1.23 (3H, d, J = 7.1 Hz, 3H-13)

Masas, (m/z) (%): [M+1]⁺ 267 (100), 249 (26), 231 (24).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. De la *Sideritis varoi* subespecie *Cuatrecasasii*, se han aislado y caracterizado los siguientes compuestos diterpénicos conocidos:

- ácido *ent-8 α* -hidroxilabda-13(16),14-dien-18-óico (ácido 6-desoxiandalusóico)
- *ent-3 β* -hidroxi-13-*epi*-óxico de manoilo (ribenol)
- *ent-3 β* ,12 α -dihidroxi-13-*epi*-óxico de manoilo (varodiol)
- *ent-6 α* ,8 α ,18-trihidroxilabda-13(16),14-dieno (andalusol)

2. De esta *Sideritis*, también se han aislado e identificado los siguientes compuestos sesquiterpénicos conocidos:

- 6 β -acetoxi-4 β ,5 α -epoxi-*trans*-germacr-1(10)-eno (acetato de shiromool)
- 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-3-eno
- 6 β -acetoxi-1 β -hidroxieudesm-4(15)-eno
- 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxieudesmano
- 6 β -acetoxi-1 β ,4 α -dihidroxieudesmano

3. También se ha aislado y caracterizado un nuevo acetato sesquiterpénico natural:

- 9 β -acetoxi-4 β -hidroxiaromadendreno

4. La biotransformación del 6 β -acetoxi-4 β ,5 α -epoxi-*trans*-germacr-1(10)-eno (acetato de shiromool) con *Rhizopus nigricans* durante seis días origina los siguientes metabolitos:

- 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano
- 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-3 α -hidroxigermacrano
- 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-11-hidroxigermacrano

5. De la incubación del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano con *Rhizopus nigricans* durante 12 días se aislan, además de los 3 α - y 11-hidroxiderivados anteriormente indicados como productos mayoritarios, cuatro nuevos metabolitos:

- 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-2 α -hidroxigermacrano
- 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-9 β -hidroxigermacrano
- 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-12-hidroxigermacr-11(S)-ano
- 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-2 α ,11-dihidroxigermacrano

6. La biotransformación del 6 β -acetoxieudesm-3-en-1-ona con *Curvularia lunata* durante tres días origina los siguientes metabolitos:

- 6 β -acetoxi-1 α -hidroxieudesm-3-eno
- 6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesm-2-en-1-ona
- 6 β -acetoxi-4 α -hidroxieudesm-2-en-1-ona

La acción de *Curvularia lunata* sobre este sustrato produce la reducción del grupo carbonilo en C-1 por la cara β , más impedida estéricamente, dando lugar a un derivado 1 α -hidroxilado, al contrario de lo que ocurre cuando la reducción se realiza por vía química.

7. Se ha llevado a cabo la obtención de la 6 β -acetoxi-4 α -hidroxieudesm-2-en-1-ona por vía química, a partir de la 6 β -acetoxieudesm-3-en-1-ona, lo que nos indica que la formación de este producto en la incubación con *C. lunata* podría ocurrir vía epoxidación del sustrato por la cara α , y posterior evolución hacia un sistema 4 α -hidroxieudesm-2-en-1-ona. Dado que de la incubación también se aísla el producto con configuración 4 β -hidroxi, es posible que el microorganismo también actúe, según esta misma vía, por la cara β del sustrato.

8. La biotransformación de la 6 β -acetoxieudesm-4(15)-en-1-ona con *Curvularia lunata* durante siete días, origina los siguientes metabolitos:

- 6 β -acetoxi-1 α -hidroxieudesm-4(15)-eno
- 6 β -acetoxi-1 α ,2 α -dihidroxieudesm-4(15)-eno

La acción del microorganismo produce, además de la reducción del grupo carbonilo por la cara β del sustrato, una nueva hidroxilación sobre C-2 por la cara α .

9. El estudio de las biotransformaciones de sustratos eudesmánicos diferentemente funcionalizados con *Curvularia lunata* nos ha permitido conocer la acción de este microorganismo sobre estos sustratos. Así, cuando sobre C-6 existe un grupo acetoxilo axial, la acción del hongo se dirige hacia ambos metilos del grupo isopropilo, originando 12-hidroxiderivados epímeros en C-11. También se ha observado que la incubación del sustrato sin grupo acetoxilo axial sobre C-6 produce un descenso de rendimiento en la obtención de metabolitos 12-hidroxilados, obteniéndose sin embargo, otros metabolitos 2 α -y 11-hidroxilados.

10. En las incubaciones de los cetoderivados, siempre que exista un grupo carbonilo sobre C-1, *Curvularia lunata* lo reduce por la cara β , originando productos 1 α -hidroxilados, al igual que se ha observado en las incubaciones de los sustratos eudesmánicos con este microorganismo.

11. En sustratos que poseen un grupo carbonilo sobre C-6 se observa que *Curvularia lunata* produce un único 12-hidroxiderivado con configuración 11(R), mejorándose el rendimiento cuando además existe un grupo carbonilo sobre C-1. Si sobre C-1 existe un grupo acetoxilo se produce su parcial desacetilación, junto con una minoritaria hidroxilación sobre C-11.

12. Cuando los productos incubados poseen una hidroxilación 4α , la acción de *Curvularia lunata* es muy limitada, observándose únicamente la reducción del grupo carbonilo sobre C-1 cuando se incubaba la 4α -hidroxieudesmano-1,6-diona.
13. La acción del *Rhizopus nigricans* sobre los sistemas eudesmánicos estudiados es diferente a la observada con *Curvularia lunata* sobre los mismos sustratos. Así, mientras que *C. lunata* funcionaliza sobre C-12 preferentemente, *R. nigricans* lo hace sobre C-11.
14. La biotransformación con *Rhizopus nigricans* de eudesmanos 4β -hidroxilados con un grupo hidroxilo ecuatorial sobre C-1 origina metabolitos parcialmente oxidados en C-1, lo que no se observa en el sustrato 4α -hidroxilado.
15. En sustratos con un solo grupo carbonilo, la posición de este modifica la acción del *Rhizopus nigricans* obteniéndose, además de metabolitos 11-hidroxilados, nuevos metabolitos minoritarios funcionalizados en diferentes posiciones de la molécula. Así, se obtiene un metabolito 8α -hidroxilado cuando existe un grupo carbonilo en C-1, mientras que si esta función se encuentra en C-6 se obtiene un metabolito hidroxilado en C-7.
16. El mayor rendimiento de productos 11-hidroxilados se obtiene de la biotransformación de la 4β -hidroxieudesmano-1,6-diona con *Rhizopus nigricans*, produciéndose además la parcial reducción del grupo carbonilo sobre C-1, no observada cuando sobre C-6 existe un grupo acetoxilo.
17. La obtención de metabolitos funcionalizados en C-12 en las incubaciones con *Curvularia lunata* nos ha permitido disponer de productos precursores de 6β -

sesquiterpenolidos, que han sido sintetizados por tratamiento de los 6 β ,12-hidroxiudesmanos epímeros en C-11 con RuH₂(PPh₃)₄, originándose las correspondientes eudesma-6 β ,12-olidas.

18. Se ha realizado la conversión del 1 β ,4 β ,6 β ,12-tetrahidroxieudesm-11(R)-ano en la 1 β ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11 α -H-eudesman-6 β ,12-olida. De igual forma, el 1 β ,4 β ,6 β ,12-tetrahidroxieudesm-11(S)-ano ha sido transformado en la 1 β ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11 β -H-eudesman-6 β ,12-olida. Los estudios de RMN (mono y bidimensional) de estas lactonas nos ha permitido asignar las configuraciones de C-11, lo que a su vez nos ha permitido determinar la configuración en este mismo carbono de sus correspondientes precursores 1 β ,4 β ,6 β ,12-tetrahidroxilados, procedentes de los metabolitos aislados en la incubación del 6 β -acetoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmano con *Curvularia lunata*.

19. La biotransformación de la 6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-1-ona con *Curvularia lunata* origina productos 12-hidroxilados con un grupo hidroxilo axial sobre C-1. Se ha realizado la conversión del 1 α ,4 β ,6 β ,12-tetrahidroxieudesm-11(R)-ano en la 1 α ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11 α -H-eudesman-6 β ,12-olida, con la utilización de un catalizador de rutenio, así como la obtención de la 1 α ,4 β -dihidroxi-5 α ,7 α ,11 β -H-eudesman-6 β ,12-olida a partir del 1 α ,4 β ,6 β ,12-tetrahidroxieudesm-11(S)-ano, utilizando el mismo catalizador. Estos procedimientos nos han permitido obtener 6 β -lactonas eudesmánicas con ambas configuraciones en C-1 y C-11.

20. De la incubación del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano con *Rhizopus nigricans* se ha obtenido el 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-12-hidroxigermacr-11(S)-ano, que se transformó seguidamente en el (1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-6 β ,12-

dihidroxigermacr-11(S)-ano, y este a su vez en la (1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-7 α ,11 β -H-germacran-6 β ,12-olida.

21. La obtención de 11-hidroxiderivados en las incubaciones del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano y de la 6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesman-1-ona con *Rhizopus nigricans* nos ha permitido abrir una nueva vía de síntesis de 6 β -sesquiterpenolidos.

22. La deshidratación del 6 β -acetoxi-4 β ,11-dihidroxieudesman-1-ona con 4-dimetilaminopiridina (DMAP) ha conducido a la 6 β -acetoxi-4 β -hidroxieudesm-11-en-1-ona, que posteriormente ha sido hidroborada con 9-BBN, obteniéndose con gran regioselectividad los 1 β ,4 β .6 β ,12-tetrahidroxieudesmanos epímeros en C-11 estudiados anteriormente, que a su vez se pueden transformar en las correspondientes 1 β ,4 β -dihidroxí-5 α ,7 α ,11-H-eudesman-6 β ,12-olidas.

23. Con la obtención del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-11-hidroxigermacrano en la incubación del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano con *Rhizopus nigricans* hemos conseguido, mediante la secuencia de reacciones deshidratación/hidroboración/lactonización, llevar a cabo la semisíntesis de la (1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-7 α ,11 α -H-germacran-6 β ,12-olida y de la (1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-7 α ,11 β -H-germacran-6 β ,12-olida. La configuración de C-11 de ambas lactonas se ha establecido mediante estudios de RMN, lo que nos ha permitido a su vez, asignar la configuración, en este mismo carbono, de los precursores 12-hidroxilados.

24. En la incubación del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxigermacrano con *Rhizopus nigricans*, sólo se obtiene uno de los 12-hidroxiderivados posibles (con configuración 11S), mientras que mediante la conversión del 6 β -acetoxi-(1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-11-hidroxigermacrano, aislado mayoritariamente de esta misma incubación, hemos obtenido ambos 12-hidroxiderivados, siendo en este caso el metabolito mayoritario el (1 α ,10 β),(4 β ,5 α)-diepoxi-6 β ,12-dihidroxigermacr-11(R)-ano. De esta forma, mediante la combinación de métodos químicos y microbiológicos podemos obtener ambas 6 β -lactonas germacránicas.

25. Se han realizado estudios de Mecánica Molecular sobre algunos sesquiterpenos eudesmánicos, con objeto de obtener un mayor conocimiento teórico de sus estructuras en base a estudios de situación conformacional. Particularmente interesantes han sido los estudios realizados sobre las eudesman-6 β ,12-olidas, epímeras en C-11, habiéndose podido confirmar las configuraciones asignadas a este carbono en base a los datos experimentales, principalmente de Resonancia Magnética Nuclear.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abraham, W.R., Ernst, L., Stumpf, B. y Kieslich, K.,
F.E.C.S. 3rd Inter. Conf. Chem. Biotechnol. Active Products. Sofia, **2**, 317, (1985-1).
- Abraham, W.R., Hoffmann, H.M.R., Kieslich, K., Reng, G. y Stumpf, B.,
Enzymes in Organic Synthesis. Ciba Foundation Symposium III., p. 146, (1985-2), Pitman,
London.
- Abraham, W.R., Washausen, P. y Kieslich, K.,
Z. Naturforsch., **42c**, 414, (1987).
- Abraham, W.R. y Arfmann, H.A.,
Appl. Microbiol. Biotechnol., **32**(3), 295, (1989).
- Abraham, W.R., Ernst, L. y Stumpf, B.,
Phytochemistry, **29**(1), 115, (1990-1).
- Abraham, W.R., Ernst, L. y Arfmann, H.A.,
Phytochemistry, **29**(3), 757, (1990-2).
- Algarra, J.L., García-Granados, A., Saenz de Buruaga, A. y Saenz de Buruaga, J.M.,
Phytochemistry, **22**, 1779, (1983).
- Allinger, N.L.;
Adv. Phys. Org. Chem., **13**, 1, (1976).
- Allinger, N.L.,
J. A. C. S., **99**, 8127, (1977).
- Altona, C., Cornelis, A.,
Org. Magn. Res., **13**, 417, (1980).
- Amate, Y., García-Granados, A., López, F. y Saenz de Buruaga, A.,
Synthesis, aceptado para su publicación, Ref. H 045/05/90, (1991).
- Ando, M. y Takase, K.,
Tetrahedron, **33**, 2785, (1977).
- Ando, M., Tajima, K. y Takase, K.,
J. Org. Chem., **48**, 1210, (1983).
- Anke, H. y Sterner, O.,
Phytochemistry, **27**(9), 2765, (1988).
- Arfmann, H.A., Abraham, W.R. y Kieslich, K.,
Biocatalysis, **2**(1), 59, (1988).
- Arias, J.M., Bretón, J.L., Gavín, J.H., García-Granados, A., Martínez, A. y Onorato M.E.,
J. C. S. Perkin Trans I, 471, (1987).

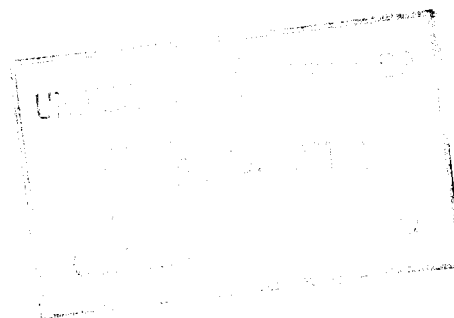
- Baldwin, N.C.P., Bycroft, B.W., Dewick, P.M., Marsh, D.C. y Gilbert, J.,
Z. Naturforsch., Teil C, **42**, 1043, (1987).
- Barton, D.H.R., Beloeil, J.C., Billion, A., Boivin, J., Lallemand, J.Y., Lelandais, P., Mergui, S. y Molleret, N.,
Nouv. J. Chim., **10**, 439, (1986).
- Barton, D.H.R., Beloeil, J.C., Billion, A., Boivin, J., Lallemand, J.Y. y Mergui, S.,
Helv. Chim. Acta, **70**, 273, (1987-1).
- Barton, D.H.R., Beloeil, J.C., Billion, A., Boivin, J., Lallemand, J.Y., Lelandais, P. y Mergui, S.,
Helv. Chim. Acta, **70**, 2187, (1987-2).
- Becker, E., Schüep, W., Matzinger, P.K. y cols.,
Chemical Abstracts, **89**, 105904p, (1978).
- Becker, E., Schüep, W., Matzinger, P.K., Ehret, C., Maruyama, H., Suhara, Y., Ito, S., Ogawa, M., Yokose, K., Sawada, T., Fujiwara, A., Fujiwara, M., Tazoe, M. y Shiomi, Y.,
Br. Patent 1 586759, (1981).
- Bentham, G.,
"Labiatarum Genera et Species", (1834).
- Bohlmann, F., Greuz, M., Gupta, R.K., Dhar, A.K., Ahmed, M., King, R.M. y Robinson, H.,
Phytochemistry, **19**, 2391, (1980).
- Bohlmann, F., Ahmed, M., Jakupovic, J. y Jeffrey, C.
Phytochemistry, **20**, 251, (1981).
- Bohlmann, F., Banerjee, S., Jalrupovic, J., King, R.M. y Robinson, H.,
Phytochemistry, **24**, 1106, (1985).
- Boyd, D.B. y Lipkowitz, K.B.,
Journal of Chemical Education, **59**(4), 269, (1982).
- Briquet, J.I.,
"Les labiées des Alpes Maritimes", (1893).
- Brown, H.C., Knights, E.F. y Scouten, C.G.,
J. A. C. S., **96**(25), 7765, (1974).
- Brown, H.C., Liotta, R. y Scouten, C.G.,
J. A. C. S., **98**, 5297, (1976).
- Cainelli, G., Gordillo, G., Oreau, M. y Sandis, S.,
J. A. C. S., **98**, 6737, (1976).

- Cane, D.E., Prabhakaran, P.C., Salaski E.J., Harrison, P.H.M., Noguchi, H. y Rawlins, B.D., *J. A. C. S.*, **111**(24), 8914, (1989).
- Cane, D.E., Prabhakaran, P.C., Oliver, J.S. y McIlwaire, D.B., *J. A. C. S.*, **112**(8), 3209, (1990).
- Clark, A.M. y Hufford, C.D., *J. C. S. Perkin Trans I*, 3022, (1979).
- Cox, P.J., *Journal of Chemical Education*, **59**(4), 275, (1982).
- Curtis, R.G., Heilbron, I., Jones, E.R.H. y Woods, Q.F., *J. Chem. Soc.*, 457, (1953).
- Dhavlikar, R.S. y Albroscheit, G., *Dragoco Report*, **12**, 251, (1973).
- ElMarakby, S.A., El-Feraly, F.S., ElSohly, H.N., Croom, E.M. y Hufford, C.D., *Phytochemistry*, **27**(10), 3089, (1988).
- Font Quer, P., *Trab. Mus. Cienc. Nat. Barcelona.*, **5**, 3, (1924).
- Fujimoto, Y., Shimizu, T. y Tatsuno, T., *Yakugazu Zassi*, **98**(2), 230, (1978).
- Fujiwara, A., Tazoe, M., Shiomi, Y. y Fujiwara, M., *Proceedings of the Annual Meeting of Agricultural and Chemical Society, Japan*, p. 212, (1980).
- Funke, E., Tozyo, T., Ishii, H. y Takeda, K., *J. Chem. Soc. (C)*, 2584, (1970).
- Furtado, I., Mavinkurve, S. y Paknikar, S.K., *Lett. Appl. Microbiol.*, **6**, 27, (1988).
- García-Alvarez, M.C. y Rodriguez, B., *Phytochemistry*, **19**, 2405, (1980).
- García-Granados, A., Cabrera, E., Saenz de Buruaga, A. y Saenz de Buruaga, J.M., *Phytochemistry*, **22**(12), 2779, (1983).
- García-Granados, A., Martínez, A., Onorato, M.E. y Socorro, O., *Phytochemistry*, **23**(3), 607, (1984-1).
- García-Granados, A., Parra, A., Peña, A. y Socorro, O., *Anales de Química*, **80C**, 175, (1984-2).

- García-Granados, A., Molina, A., Saenz de Bururaga, A. y Saenz de Buruaga, J.M., *Phytochemistry*, **24**(1), 97, (1985-1).
- García-Granados, A., Martínez, A. y Onorato, M.E., *Phytochemistry*, **24**(3), 517, (1985-2).
- García-Granados, A., Martínez, A., Molina, A. y Onorato, M.E., *phytochemistry*, **25**(9), 2171, (1986-1).
- García-Granados, A., Molina, A. y Cabrera, E., *Tetrahedron*, **42**(1), 81, (1986-2).
- García-Granados, A., Cabrera, E. y Quecuty, M.A., *Phytochemistry*, **27**(1), 183, (1988).
- García-Granados, A. y Molina, A., *Can. J. Chem.*, **67**, 1288, (1989).
- García de Quesada, T.G., Rodríguez, B., Valverde, S. y Huneck, S., *Tetrahedron Lett.*, 2187, (1972-1).
- García de Quesada, T.G., Rodríguez, B. y Valverde, S., *Anales de Química*, **68**, 1467, (1972-2).
- Geissman, T.A. y Crout, D.H.G., "*Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*". Freeman, Cooper y Co. San Francisco. (1969).
- Geissman, T.A., "*The biosynthesis of Sesquiterpene Lactones of the Compositae*". En 'Recent Advances in Phytochemistry' (Runeckles, V.C. y Mabry, T.J., eds.), Nueva York y Londres. Academic Press. **6**, 65, (1973).
- Gonzalez, A., Fraga, M.B., Hernández, M.G. y Luis, J.G., *Phytochemistry*, **12**, 1113, (1973-1).
- Gonzalez, A., Fraga, M.B., Hernández, M.G. y Luis, J.G., *Tetrahedron*, **29**, 561, (1973-2).
- Gonzalez, A.G., Luis, J.G. y Ravelo A.G., *Plantas Iberoamericanas. Lamiaceae II*. Litografía A. Romero, S.A. Tenerife (1990).
- Haasnoot, C.A.G., Leeuw, A.A.M. y Altona, C., *Tetrahedron*, **36**, 2783, (1980).
- Hall, S.F. y Oehlschager, A.C., *Tetrahedron*, 3155, (1972).

- Herz, W.,
Israel J. Chem., **16**, 32, (1977).
- Herz, W. Y Kumar, N.,
J. Org. Chem., **47**, 1785, (1982).
- Hikino, H., Tokuoka, Y., Hikino, Y. y Takemoto, T.,
Tetrahedron, **24**, 3147, (1968-1).
- Hikino, H., Aota, K., Tokuoka, Y. y Takemoto, T.,
Chem. Pharm. Bull., **16**(6), 1088, (1968-2).
- Hikino, H., Kohama, T. y Takemoto, T.,
Chem. Pharm. Bull., **17**(8), 1659, (1969).
- Hikino, H., Tokuoka, Y. y Takemoto, T.,
Chem. Pharm. Bull., **18**(10), 2127, (1970).
- Hikino, H., Konno, C., Nagashima, T., Kohama, T. y Takemoto, T.,
Tetrahedron Lett., **4**, 337, (1971).
- Hikino, H., Konno, C., Ikeda, Y., Izumi, N. y Takemoto, T.,
Chem. Pharm. Bull., **23**(6), 1231, (1975).
- Hikino, H., Konno, C., Nagashima, T., Kohama, T. Y Takemoto, T.,
Chem. Pharm. Bull., **25**(1), 6, (1977).
- Huynh, K.L.,
Bull. Nation. Hist. Nat., **3**^o, 45Bot.1.1, (1972).
- Iida, M., Totoki, S., Iizuka, H. y Yamakawa, K.,
J. Ferment. Technol., **59**(6), 483, (1981).
- Iida, M., Mikami, A., Yamakawa, K. y Nishitani, K.,
J. Ferment. Technol., **66**(1), 51, (1988).
- Inayama, S., Shimizu, N., Ohkura, T., Akita, H., Oishi, T. y Itaka, Y.,
Chem. Pharm. Bull., **37**(3), 712, (1989).
- Ishii, H., Tozyo, T. y Minato, H.,
J. C. S. Chem. Commun., 649, (1968).
- Ishii, H., Tozyo, T., Nakamura, M. y Minato H.,
Tetrahedron, **26**(11), 2751, (1970).
- Ishii, H., Tozyo, T. y Nakamura, M.,
Tetrahedron, **27**(18), 4263, (1971).

- Ishii, H., Tozyo, T., Nakamura, M. y Funke, E.,
Chem. Pharm. Bull., **20**, 203, (1972).
- Karplus, M.,
J. A. C. S., **85**, 2870, (1963).
- Kieslich, K.,
Terpenoids. En *Microbial Transformation of Non-steroid Cyclic Compounds*, pp 56-84, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. (1976).
- Kieslich, K., Abraham, W.R. y Stumpf, B.,
3rd European Congress in Biotechnology. Munchen, **1**, p. 111, (1984-1).
- Kieslich, K., Abraham, W.R. y Stumpf, B.,
Scientific Report of the GBF. Braunschweig, p. 87, (1984-2).
- Kieslich, K., Abraham, W.R., Stumpf, B., Thede, B. y Washausen, P.,
Progress in Essential Oil Research, p. 367, (1986), Walter de Gruyter and Co.
- Lamare, V., Fourneron, J.D., Ehret, C., Corbier, B. y Furstoss, R.,
Tetrahedron Lett., **40**, 3597, (1984).
- Lamare, V., Archelas, A., Faure, R., Cesario, M., Pascard, C. y Furstoss, R.,
Tetrahedron, **45**, 3761, (1989).
- Lamare, V. y Furstoss, R.,
Tetrahedron, **46**(12), 4109, (1990).
- Lee, I.S., ElSohly, H.N., Croom, E.M. y Hufford, C.D.,
Journal of Natural Products, **52**(2), 337, (1989).
- Machida, Y. y Nozoe, S.,
Tetrahedron Lett., 1969, (1972).
- Machida, Y. y Nozoe, S.,
Tetrahedron, **28**, 5113, (1972).
- McClure, R.J., Sim, G.A., Goggon, P. y McPhail, A.T.
J. Chem. Soc., Chem. Commun., 128, (1970).
- Mendoza-Heuer, L.,
Botánica Macaronésica, **3**, 61, (1977).
- Mikami, Y.,
Biotechnol. Genet. Eng. Rev., **6**, 271, (1988).
- Miyazama, M., Funatsu, Y. y Kaneoka, H.,
Chem. Express, **5**(8), 589, (1990).



- Murahashi, S.I., Naota, T., Ito, K., Maeda, Y. y Taki, H.,
J. Org. Chem., **52**, 4319, (1987).
- Naik, V.P., Mavinkurve, S., Naik, V.S. y Paknikar, S.K.,
Indian J. Chem., Sect. B, **27B**(4), 381, (1988).
- Ourisson, G.,
"Chemistry in Botanical Classification", Nobel symposia, ed. Benz, C. y Santesson, Academic Press, p. 129, Uppsala, (1974).
- Paknikar, S. y Dhavlikar, R.S.,
Chem. Ind., 432, (1975).
- Parra, A. y Molina, J.,
Estudios de Mecánica Molecular no publicados, (1990).
- Pascual Teresa, J. de, Morán, J.R., Hernández, J.M. y Grande, M.
Phytochemistry, **24**(8), 1779, (1985).
- Petillo, P.A.,
Q. C. P. E., nº QCMP 025.
- Piozzi, F., Venturella, P., Bellino, A. y Mondelli, R.,
Tetrahedron, **24**, 4073, (1968).
- Prema, B.R. y Bhattacharyya, P.K.,
Appl. Microbiol., **10**, 529, (1962).
- Rama-Devi, J.,
Indian J. Biochem. Biophys., **16**, 76, (1979).
- Rodriguez, B. y Valverde, S.,
Anales de Química, **70**, 749, (1974-1).
- Rodriguez, B. y Valverde, S.,
Chim. Ind., (London), 1010, (1974-2).
- Rowe, J.W.,
"The Common and Systematic nomenclature of Cyclic Diterpenes", 3rd revision, (1968).
- Sato, Y., Oda, T., Inoue, J., Kunugi, M. y Suzuki, K.T.,
Chem. Pharm. Bull., **32**(2), 504, (1984).
- Schneider, J.R. y Schrader, B.,
Phys. Chem., **79**(11), 1026, (1975).
- Shimizu, N., Ohkura, T., Akita, H., Oishi, T., Iitaka, Y. y Inayama, S.,
Chem. Pharm. Bull., **37**(4), 1023, (1989).

Suhara, Y., Itoh, S., Ogawa, M., Yokose, K., Sano, T., Ninomiya, R. y Maruyama, H.M.,
Applied and Environmental Microbiology, **42**, 187, (1981).

Stumpf, B., Abraham, W.R. y Kieslich, K.,
German Patent, Appl. 3418054, (1984).

Suzuki, Y. y Marumo, S.,
Tetrahedron Lett., **19**, 1887, (1972).

Talwar, K.K. y Kalsi, P.S.,
Phytochemistry, **26**(14), 3450, (1985).

Teisseire, P.,
Bull. Soc. Chim. Fr., **1-2**, 66, (1980).

Trifilieff, E., Luu Bang, Ourisson, G.,
Tetrahedron Lett., **34**, 2991, (1977).

Trifilieff, E., Luu Bang, Narula, A.S. y Ourisson, G.,
J. Chem. Res., **64**, (1978).

Wang, K.C., Ho, L.Y. y Cheng, Y.S.,
J. Chin. Biochem. Soc., **1**(2), 53, (1972).

Willdenow,
"Species Plantarum de Linneo", tomo 3, 5ª edición, p.63, (1980).

Willkomm, H.M.,
"Prodromus Florae Hispanicae", (1868).

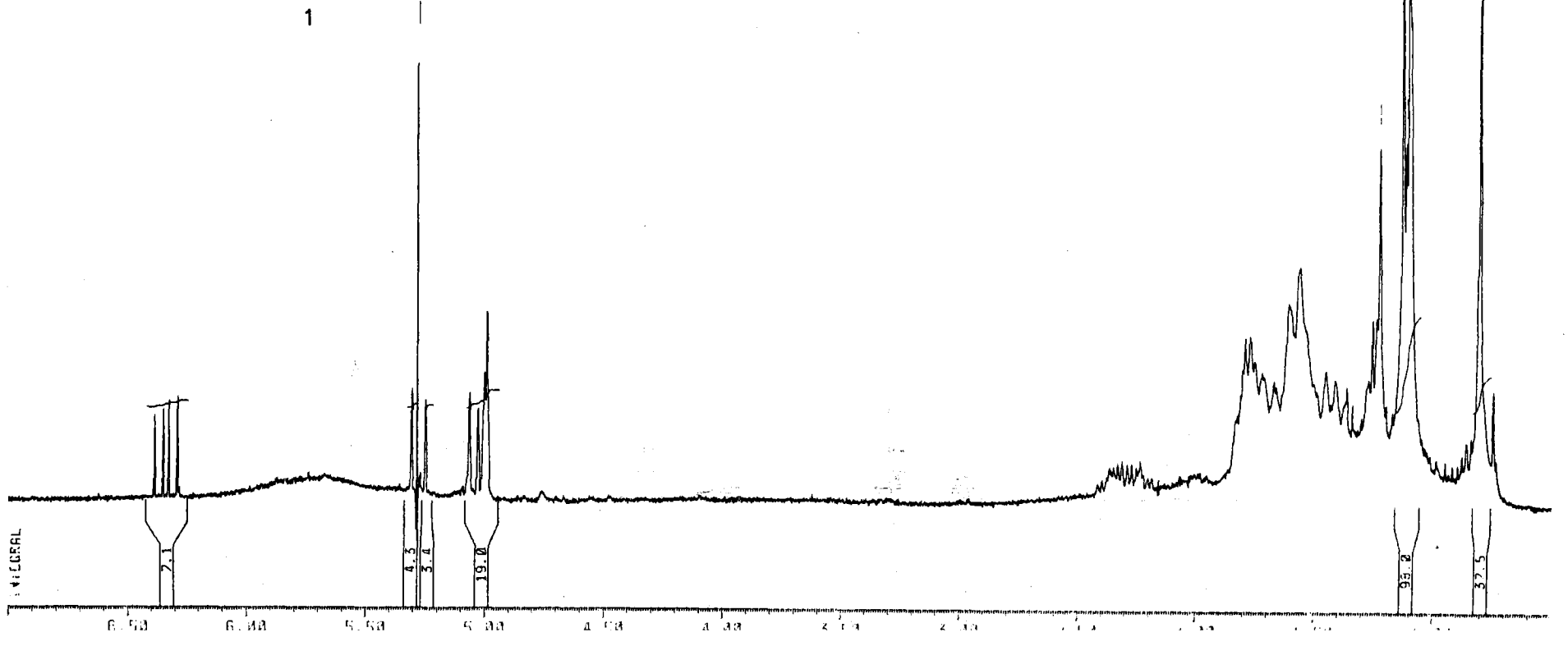
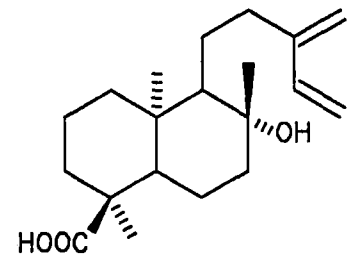
Yadav, J.S. y Mysorekar, S.V.,
Synthetic Communications, **19**(5-6), 1057, (1989).

Yamakawa, K., Nishitani, K., Iida, M. y Mikami, A.,
Chem. Pharm. Bull., **34**(3), 1319, (1986).

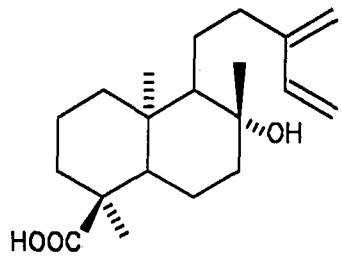
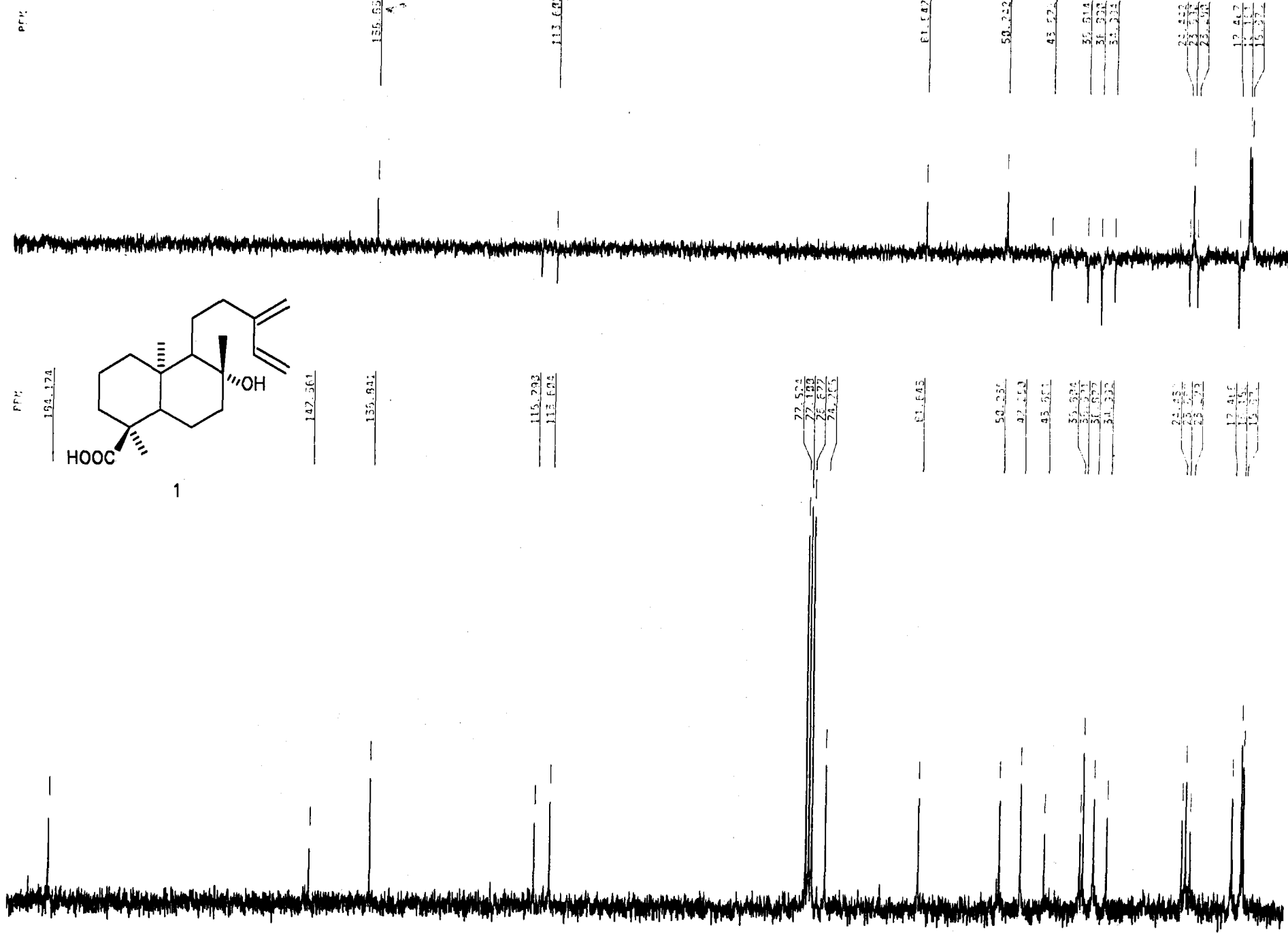
ESPECTROS

HERTZ

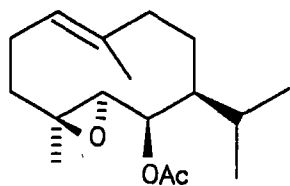
1594.3



180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20



PPM
154.174
147.561
135.844
115.292
113.601
77.504
77.190
76.876
74.700
61.642
50.237
47.450
45.501
35.924
34.241
31.677
30.232
24.452
23.266
22.872
17.416
17.116
15.372



2

INTEGRAL

5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

5.52

5.51

5.43

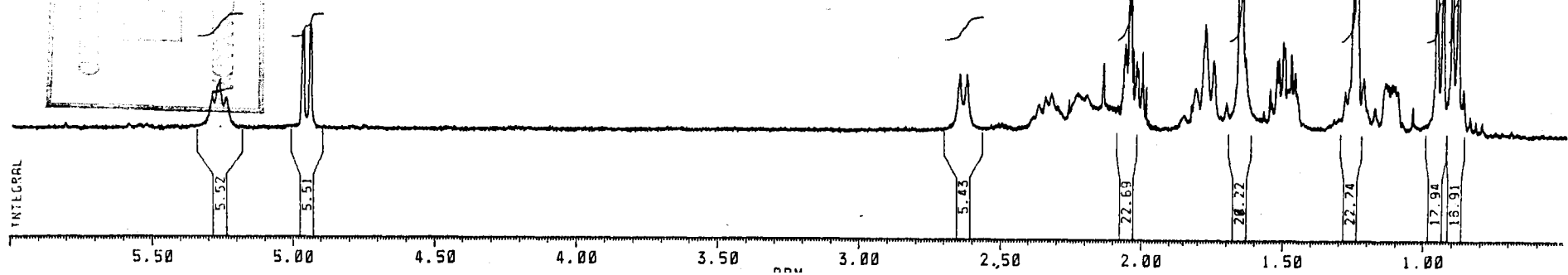
22.69

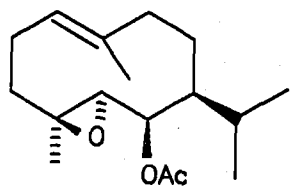
24.22

22.74

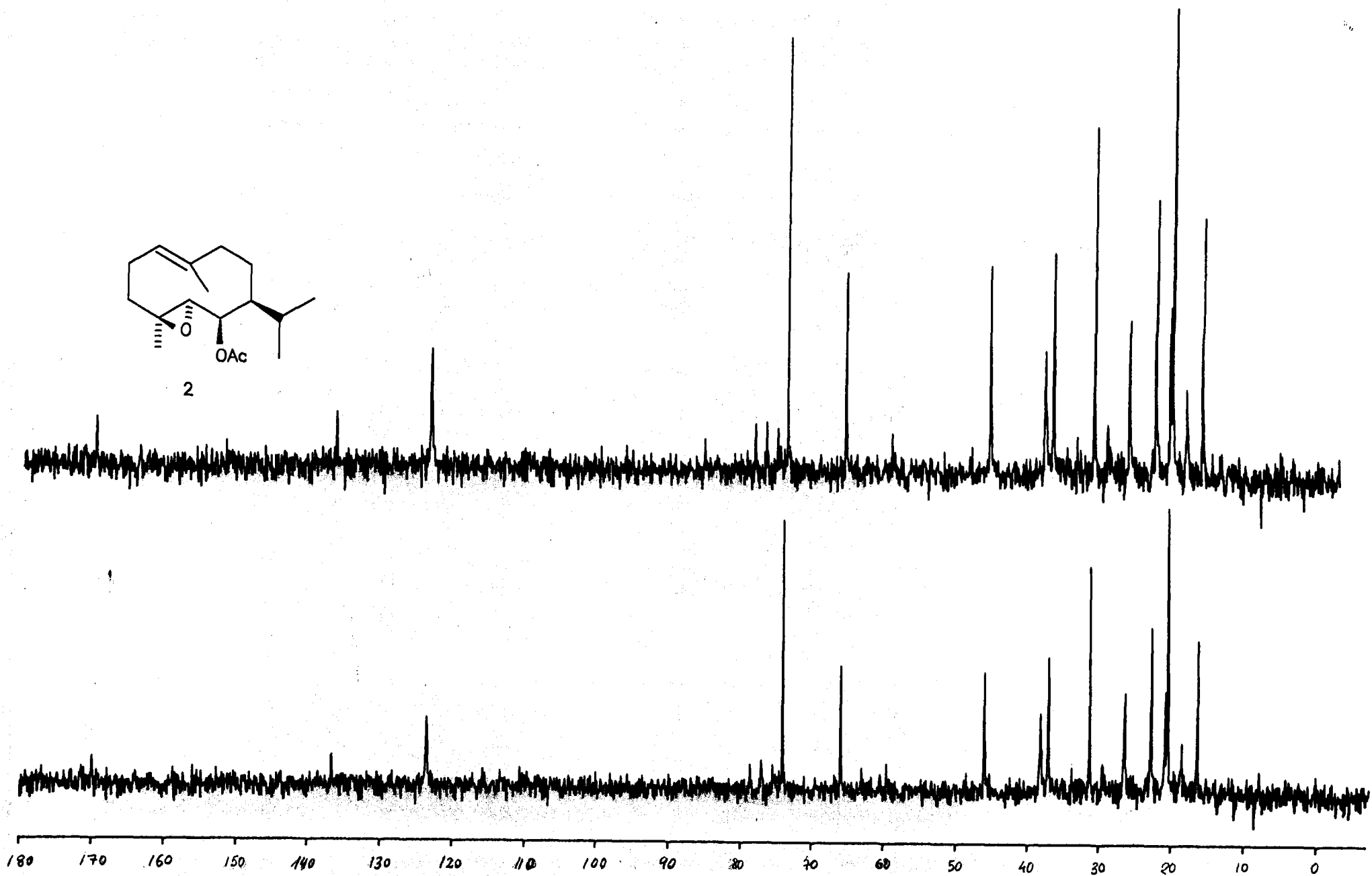
17.94

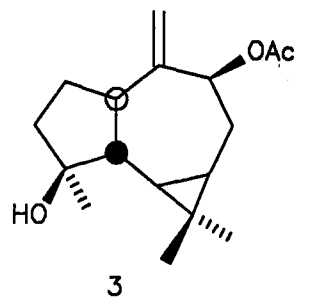
16.91





2

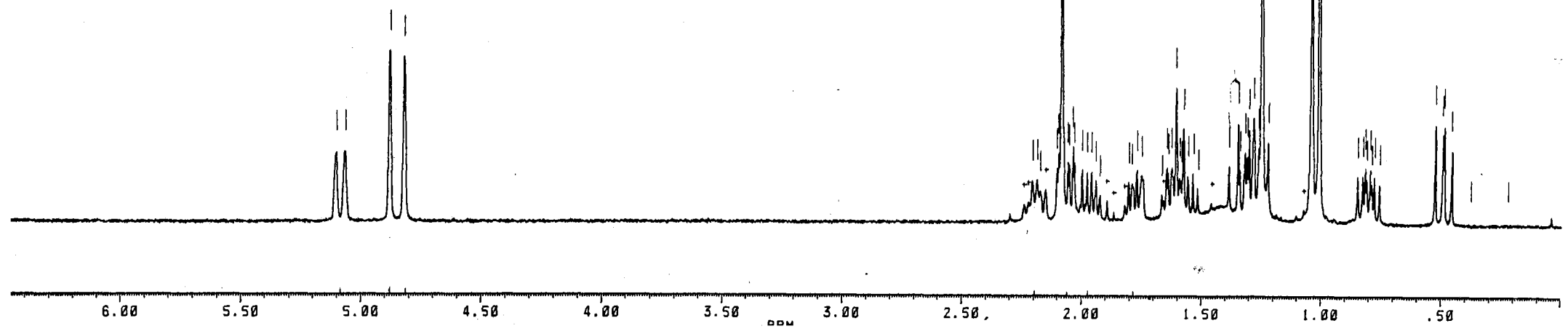


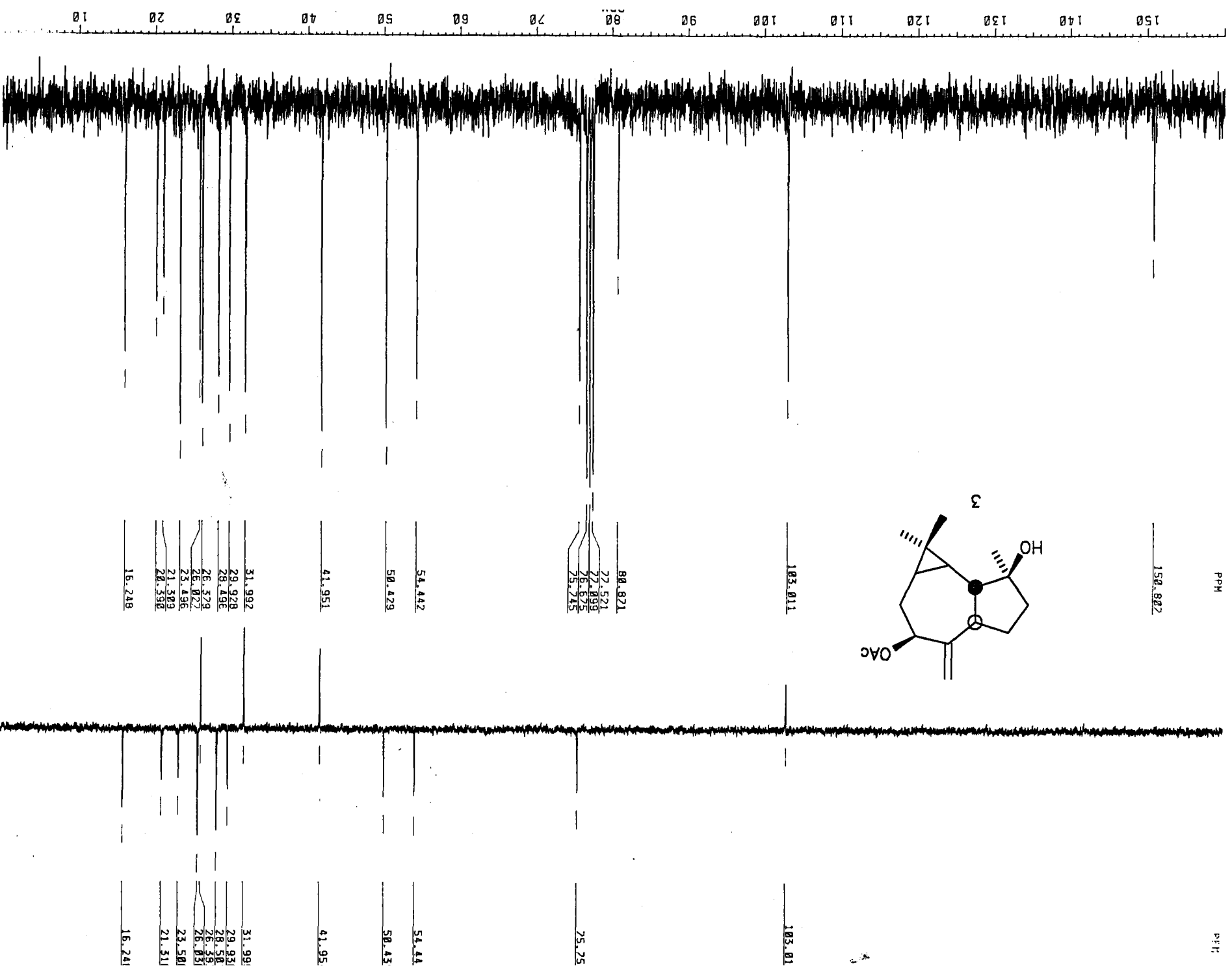
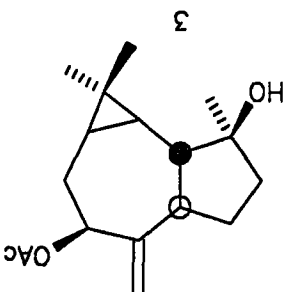


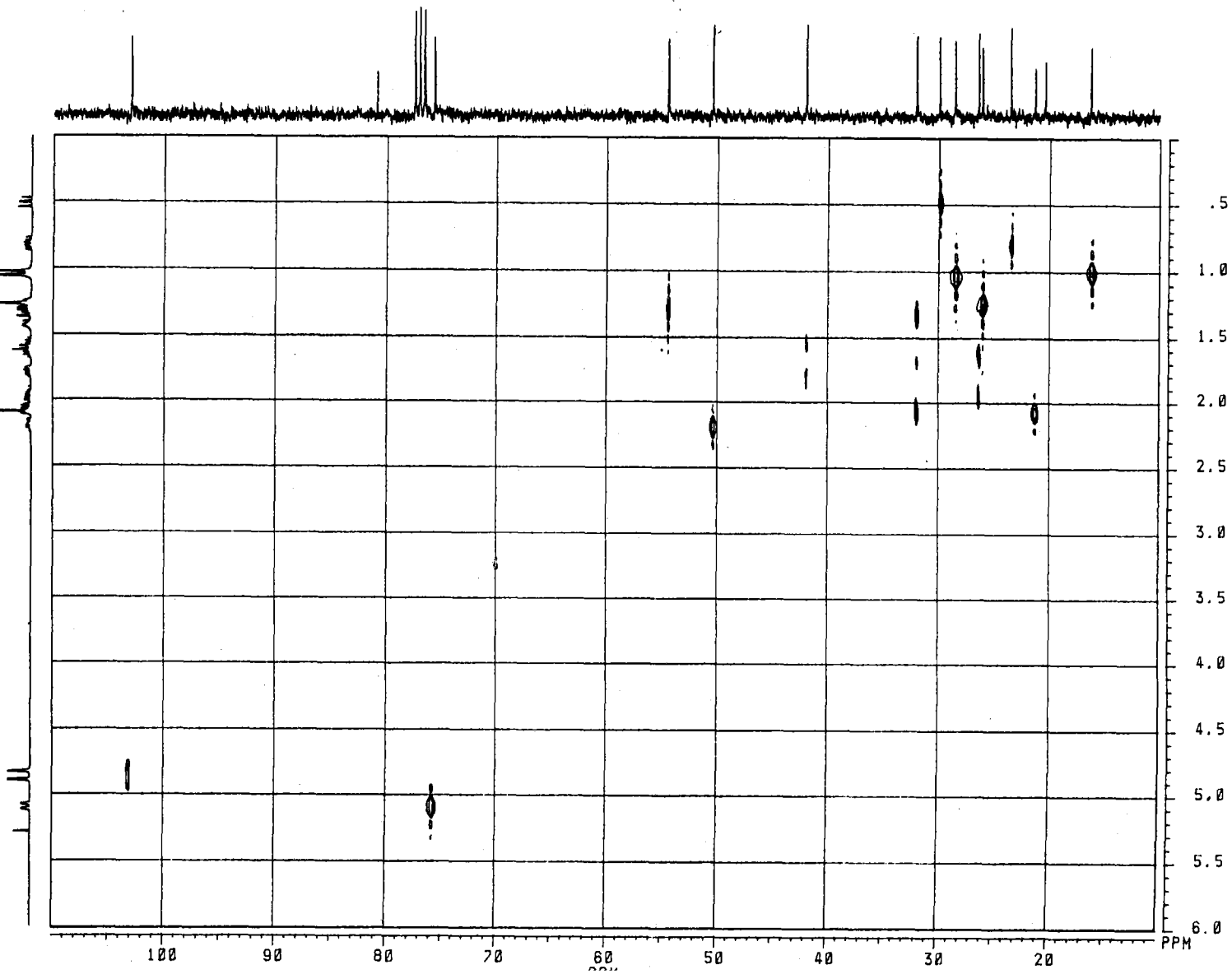
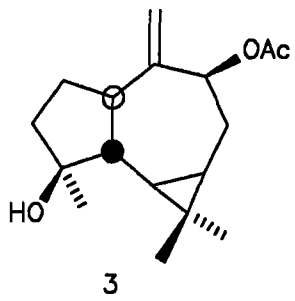
1530.1
1519.1

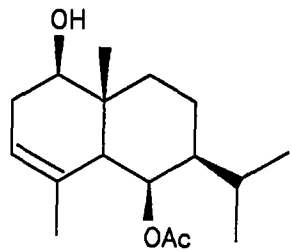
1463.3
1446.1

651.1
645.5
639.9
634.3
628.7
623.1
617.5
611.9
606.3
600.7
595.1
589.5
583.9
578.3
572.7
567.1
561.5
555.9
550.3
544.7
539.1
533.5
527.9
522.3
516.7
511.1
505.5
499.9
494.3
488.7
483.1
477.5
471.9
466.3
460.7
455.1
449.5
443.9
438.3
432.7
427.1
421.5
415.9
410.3
404.7
399.1
393.5
387.9
382.3
376.7
371.1
365.5
359.9
354.3
348.7
343.1
337.5
331.9
326.3
320.7
315.1
309.5
303.9
298.3
292.7
287.1
281.5
275.9
270.3
264.7
259.1
253.5
247.9
242.3
236.7
231.1
225.5
219.9
214.3
208.7
203.1
197.5
191.9
186.3
180.7
175.1
169.5
163.9
158.3
152.7
147.1
141.5
135.9
130.3
124.7
119.1
113.5
107.9
102.3
96.7
91.1
85.5
79.9
74.3
68.7
63.1
57.5
51.9
46.3
40.7
35.1
29.5
23.9
18.3
12.7
7.1
1.5

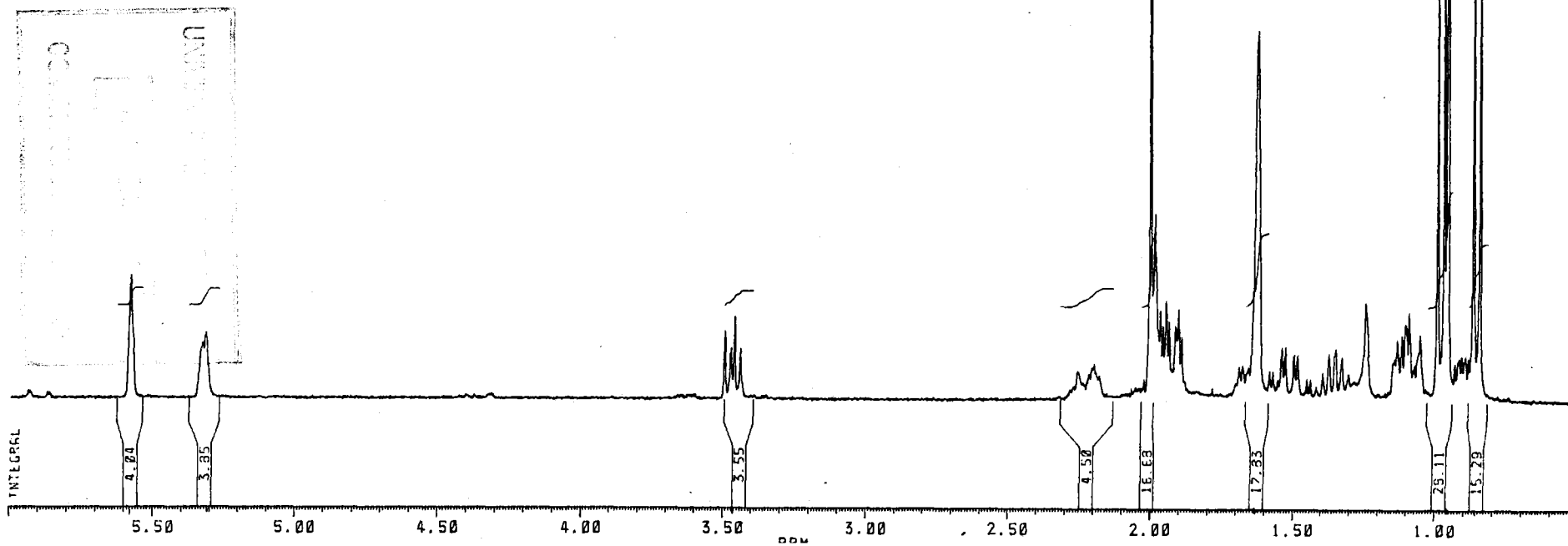


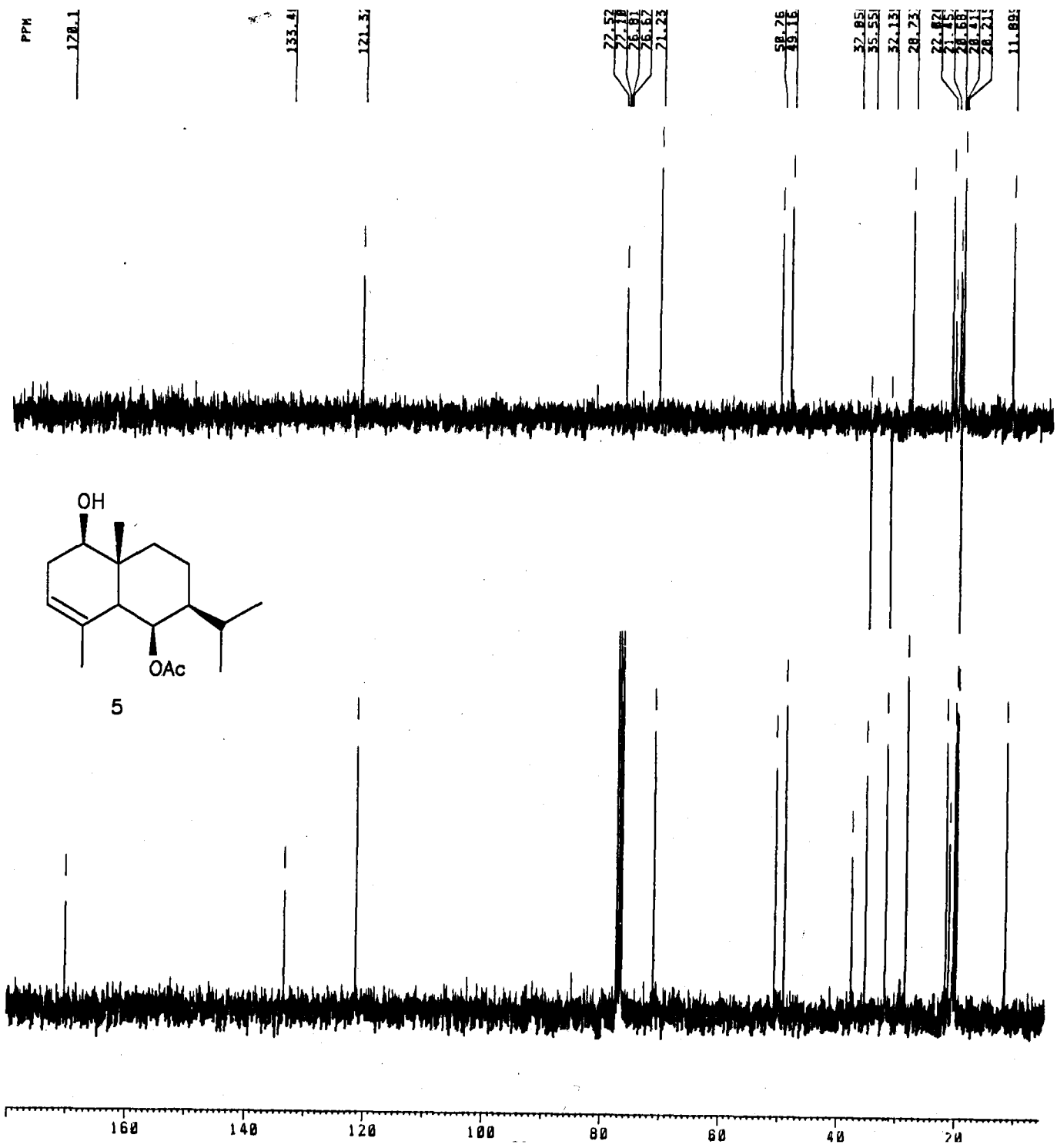






5





PPM

170.1

133.4

121.5

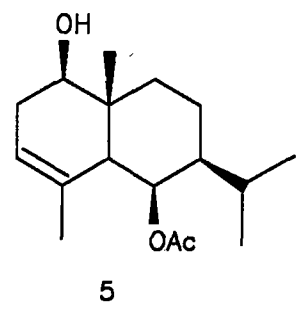
77.57
77.16
76.81
76.67
71.23

58.76
49.16

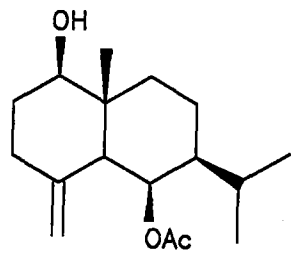
37.85
35.55
32.13
28.73

22.82
21.57
20.58
20.21
18.21

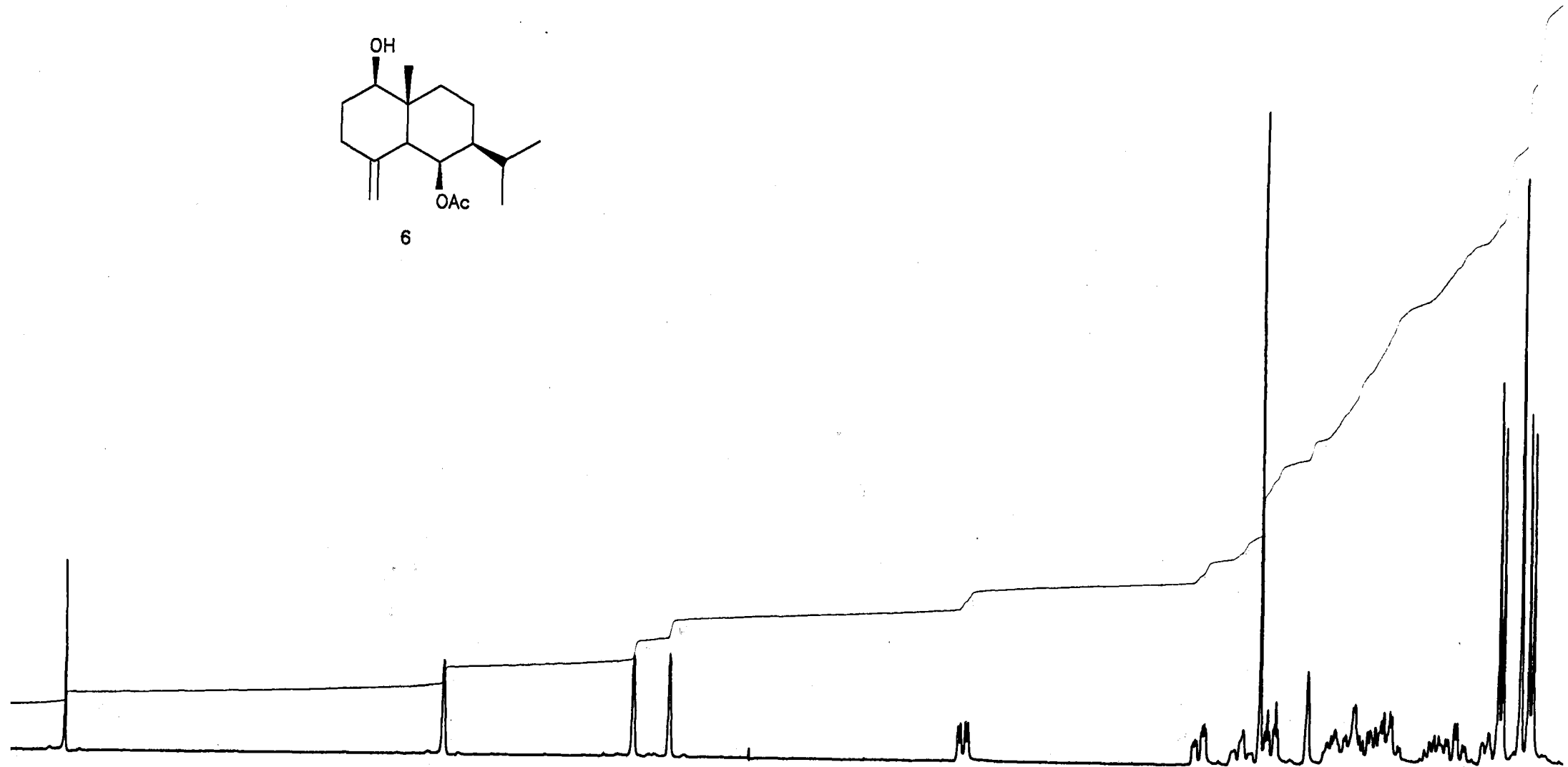
11.89

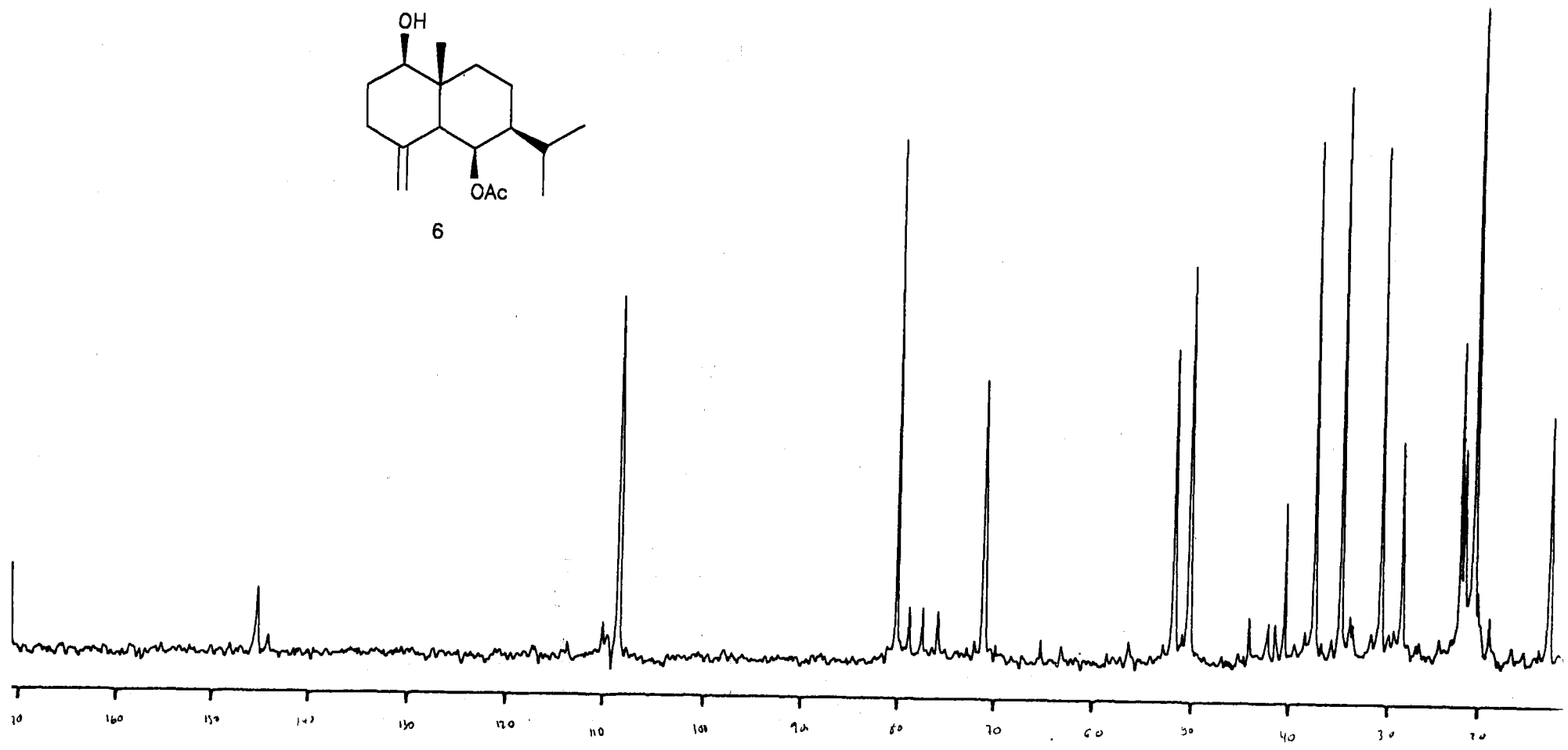
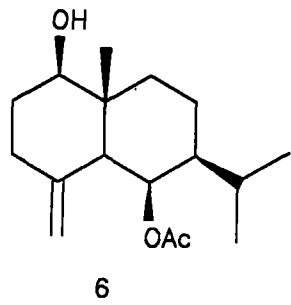


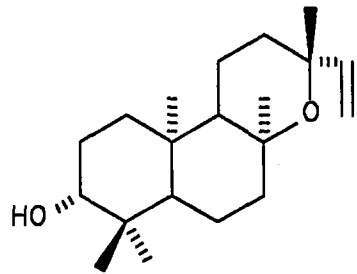
160 140 120 100 80 60 40 20



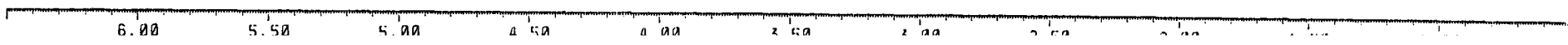
6





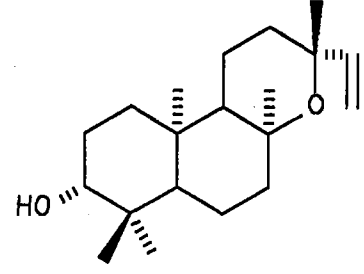
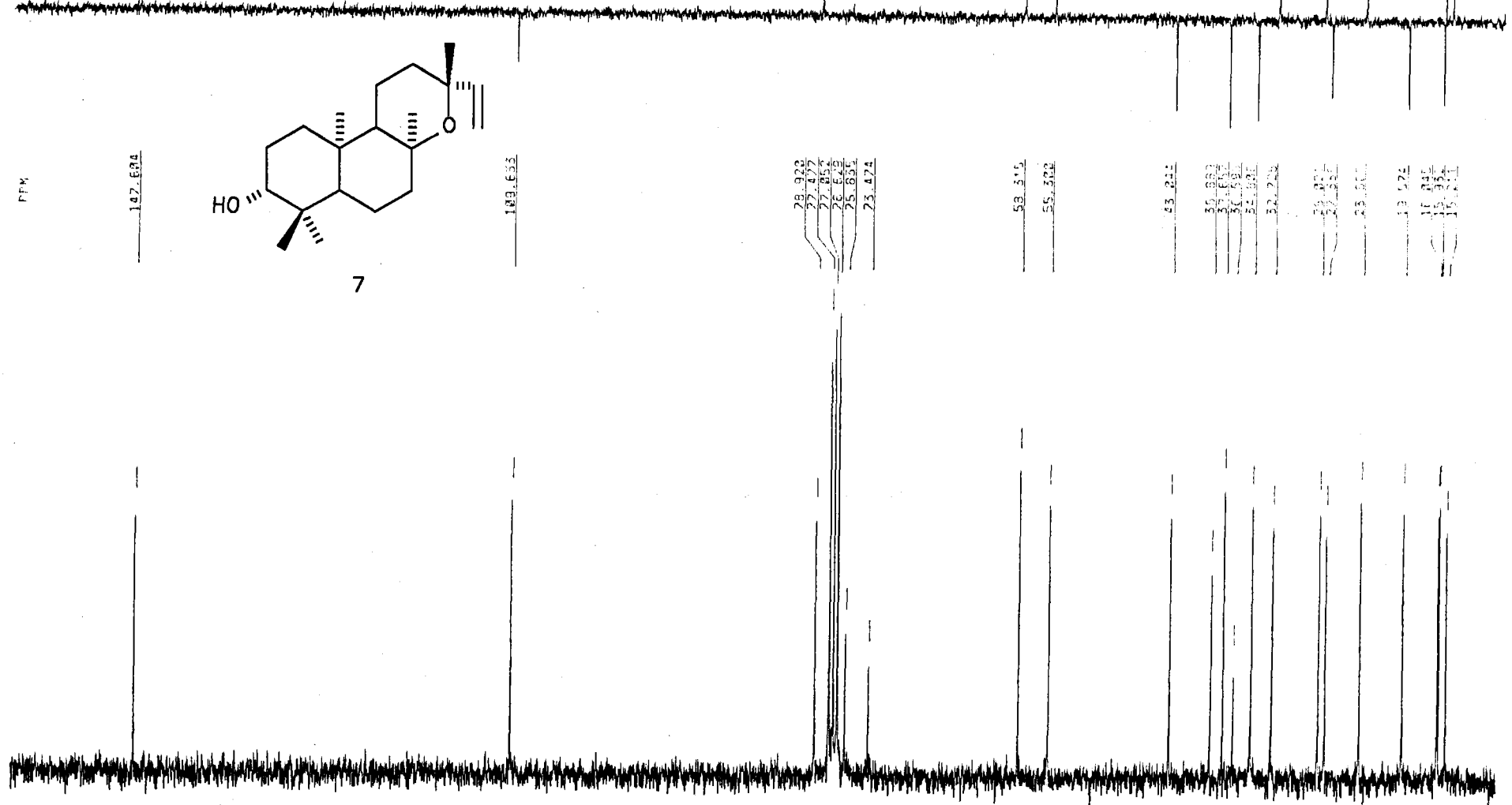


7



361.042
333.867
287.602
220.526
214.652

150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50



7

PPM

PPM

147.664

147.664

109.633

109.633

26.922
27.472
27.854
28.643
28.831
73.474

26.922
27.472
27.854
28.643
28.831
73.474

58.315
55.302

58.315
55.302

43.841

43.843

35.882
32.652
32.652
34.981
32.278

32.652
34.981
32.278

28.921
27.837
23.662

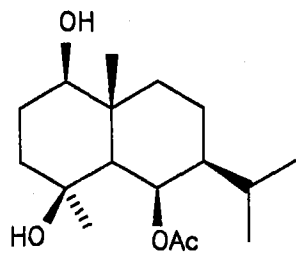
28.921
27.837
23.662

19.172

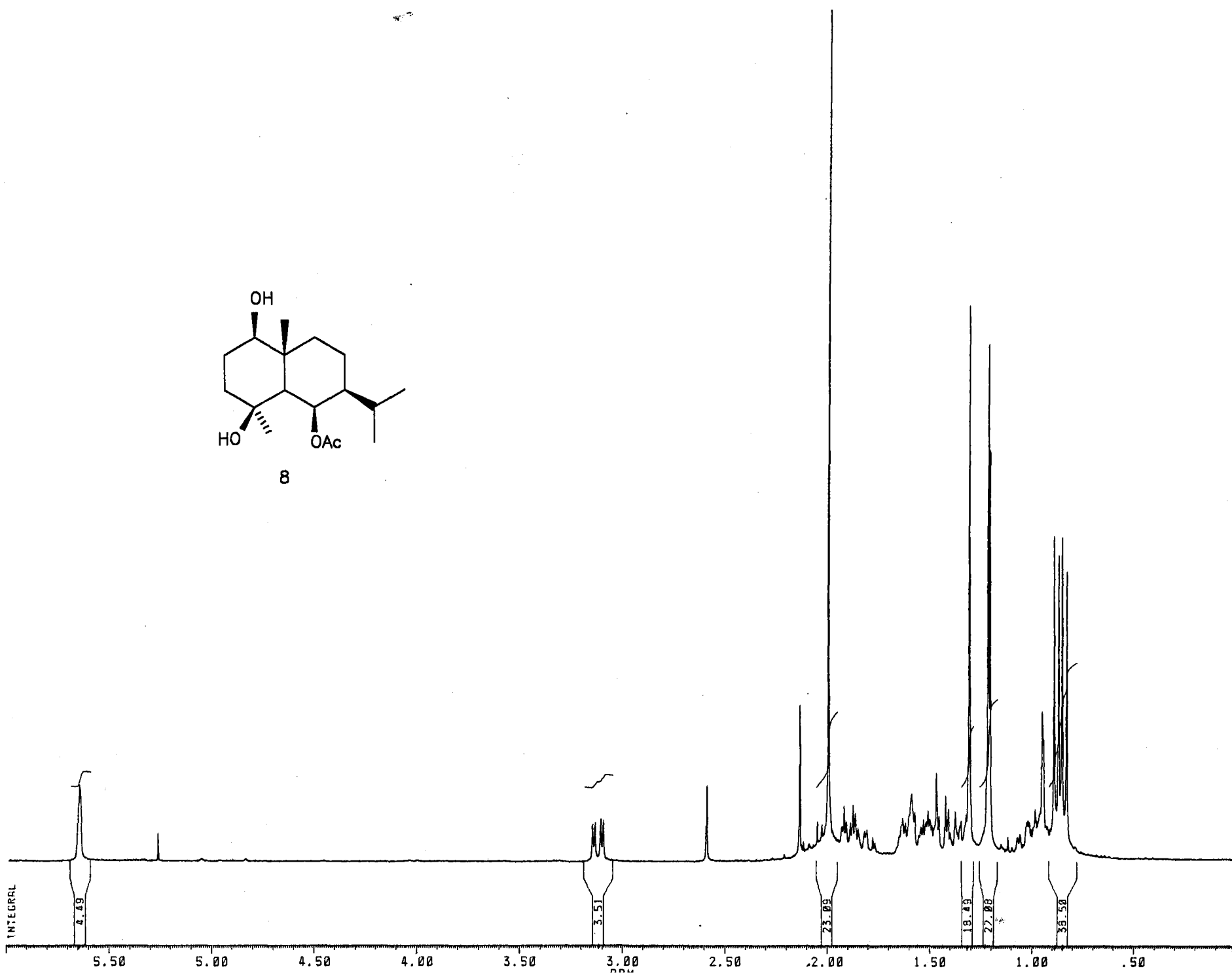
19.171

15.845
15.845
15.845

15.845
15.845
15.845



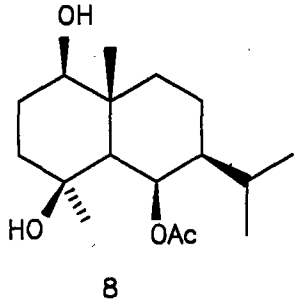
8



PPM

PPM

171.319



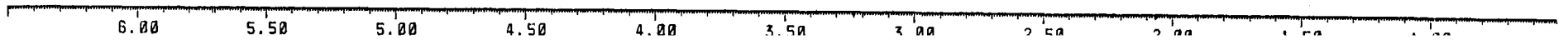
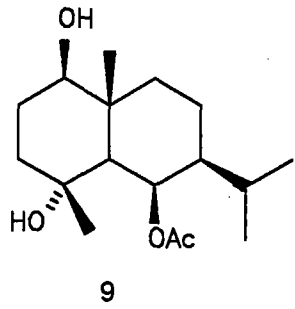
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10

98.412
78.392
52.920
49.540
40.886
39.568
29.710
29.257
28.801
26.726
21.695
21.240
20.856
20.513
13.515

80.431
77.573
77.100
76.677
71.794
70.406
52.940
49.558
40.821
39.568
39.429
29.719
28.816
26.724
21.695
21.240
20.856
20.513
13.521



PPM



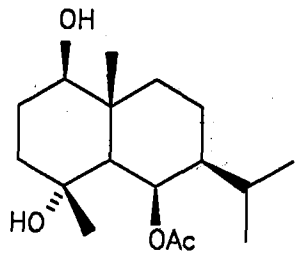
2.06011

1.16122

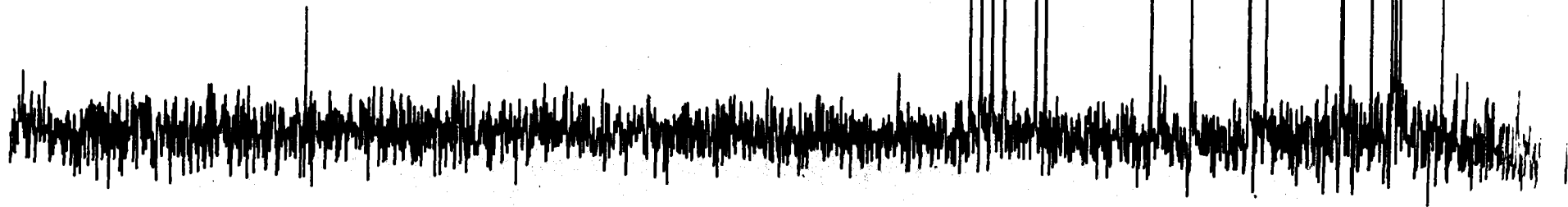
1.06634

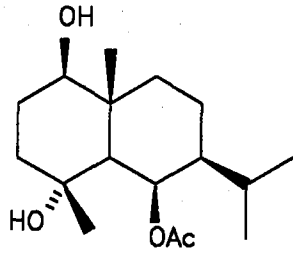
0.7538

0.5322

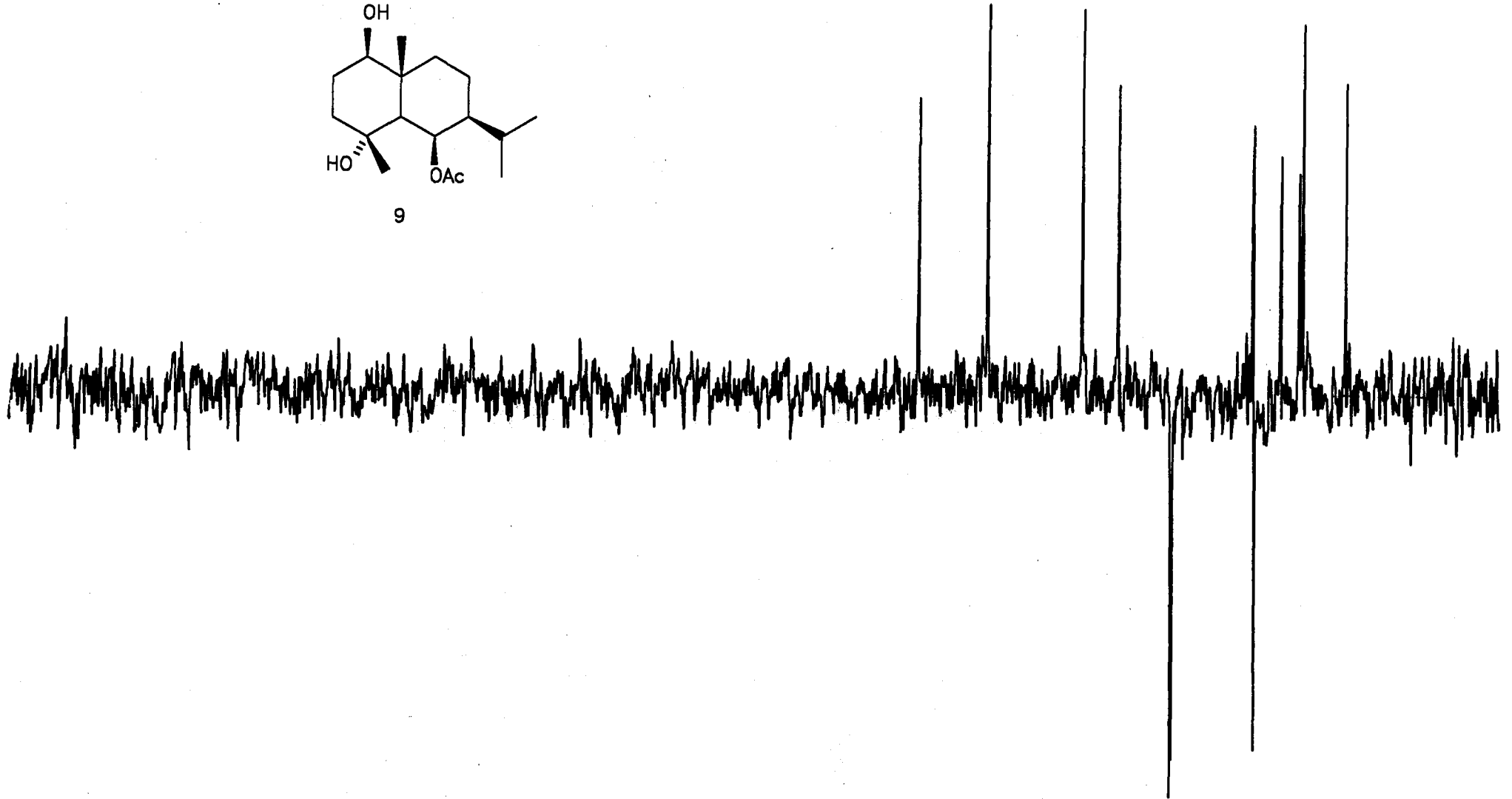


9

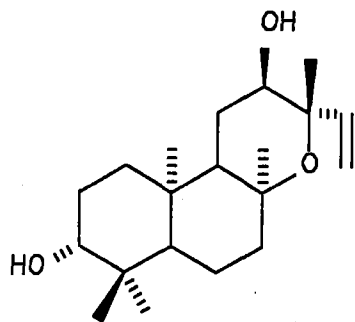




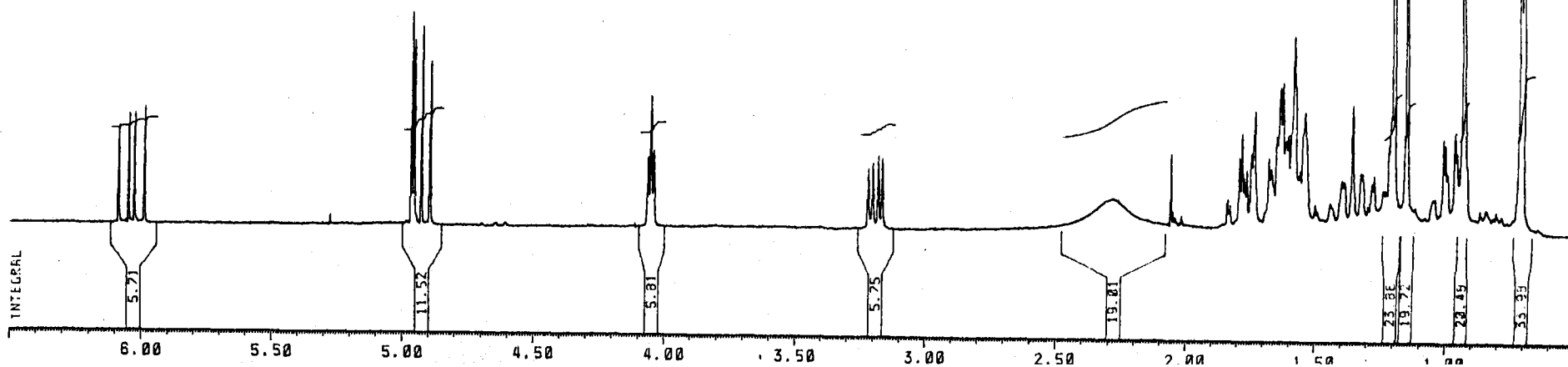
9



HERTZ

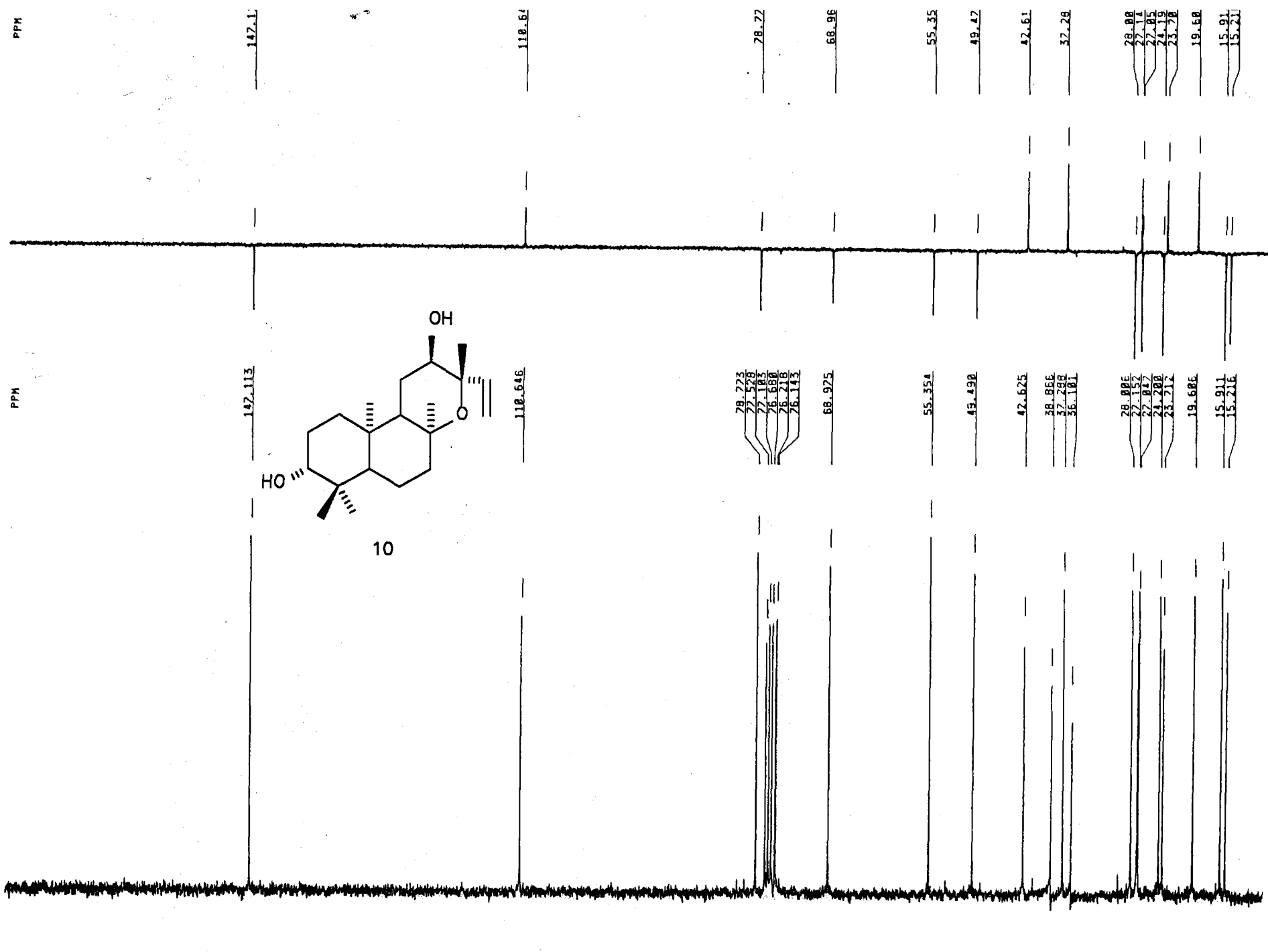


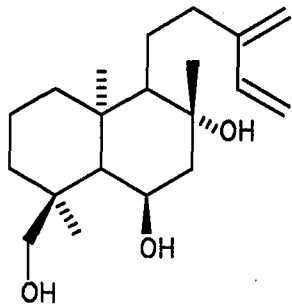
10



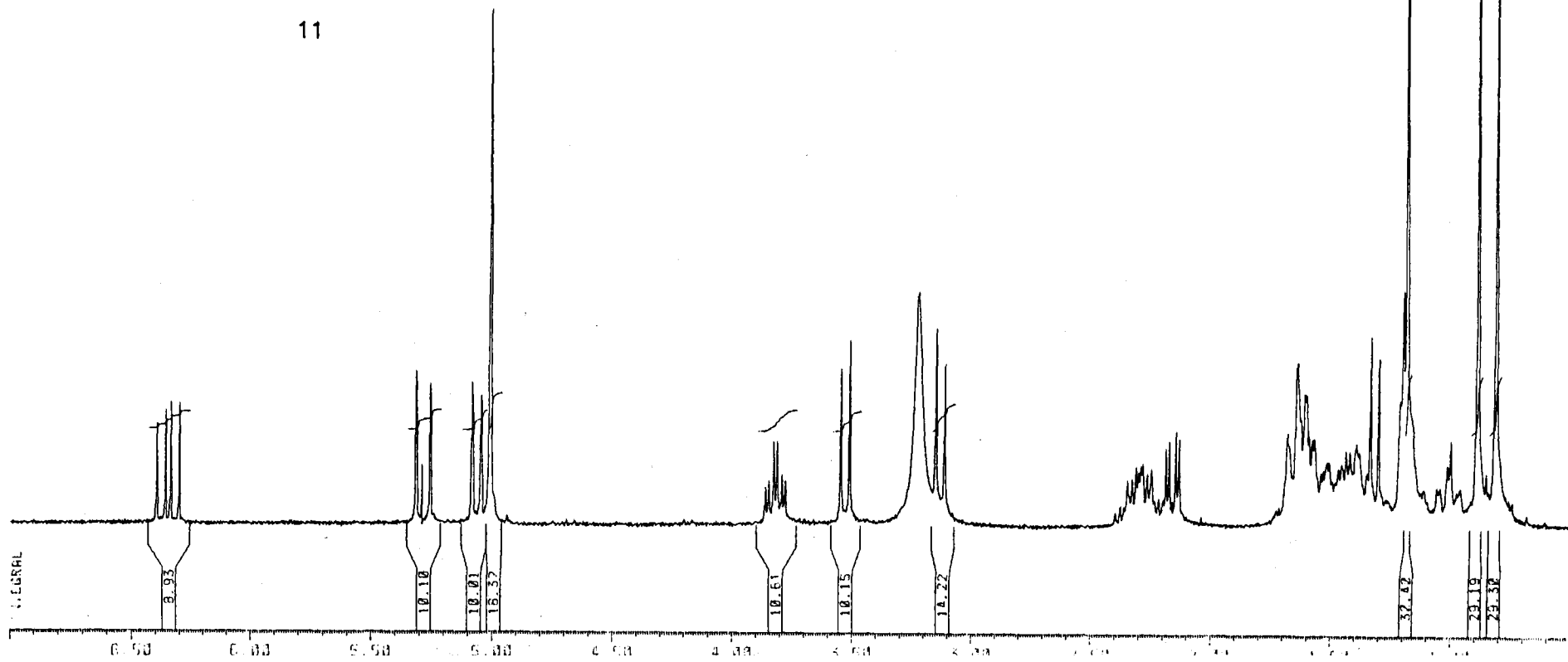
368.752
366.166
281.229
215.286
212.622

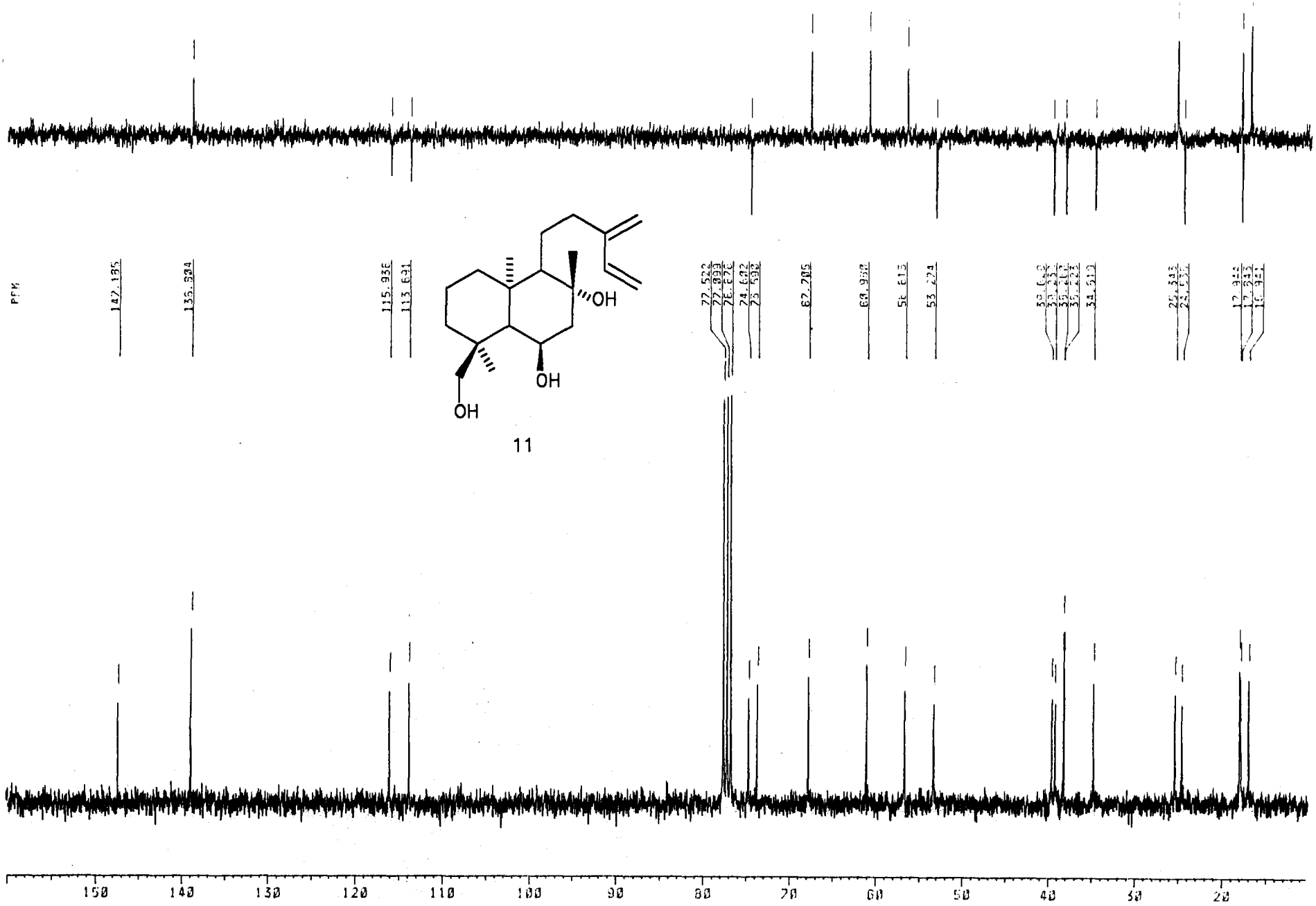
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20





11





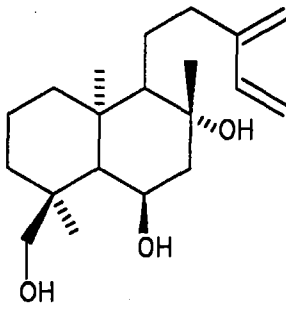
PPM

142.195

135.604

115.936

113.631



11

77.522

77.003

76.276

74.672

73.590

67.705

60.950

58.813

53.224

39.610

38.580

37.470

37.242

34.513

25.343

24.530

17.942

17.513

16.941

150

140

130

120

110

100

90

80

70

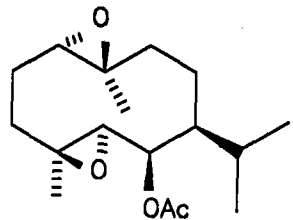
60

50

40

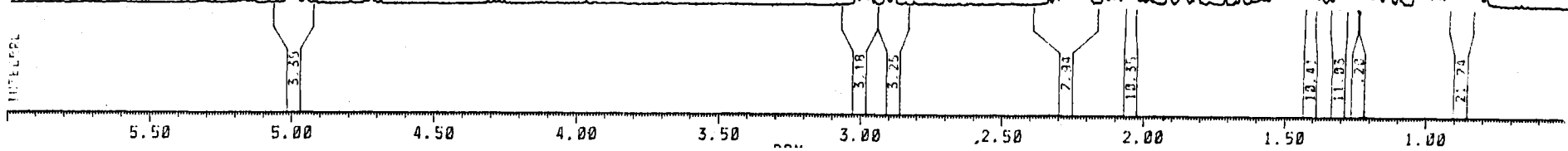
30

20



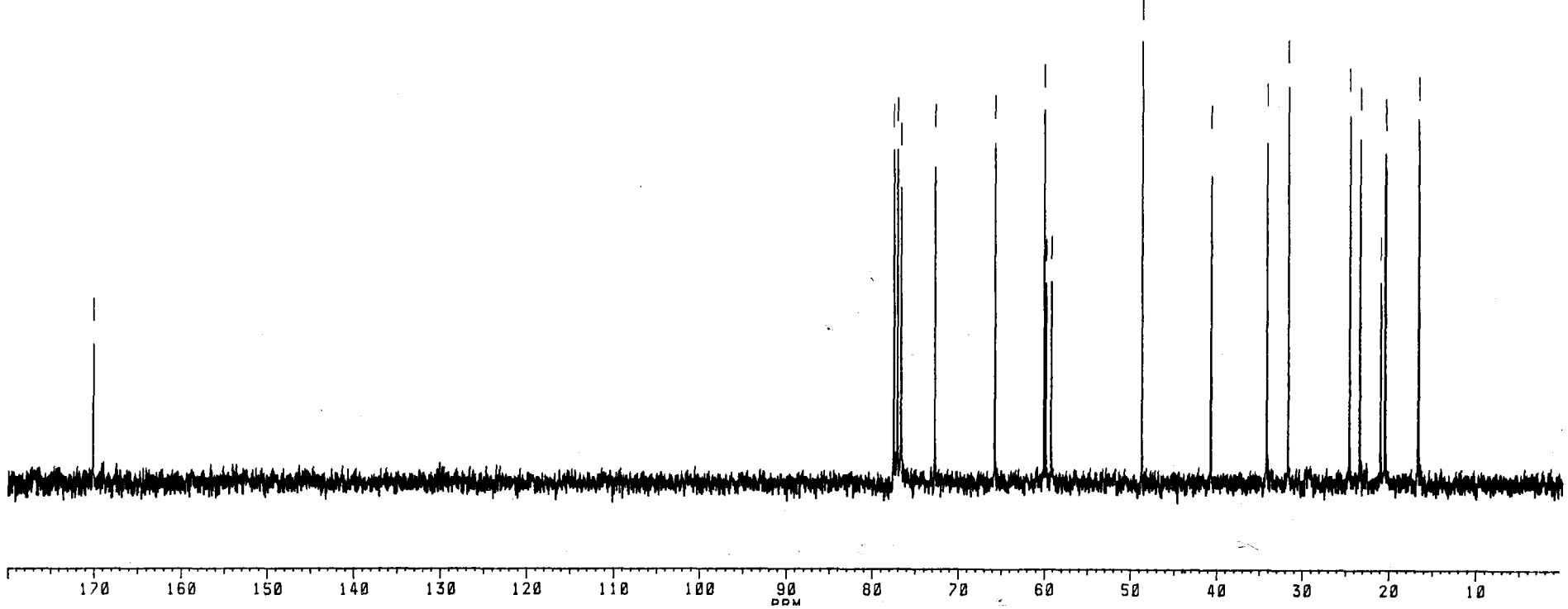
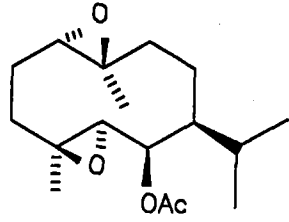
12

C:\Users\j...
12



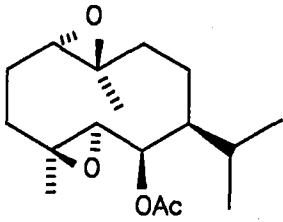
PPM

170.123

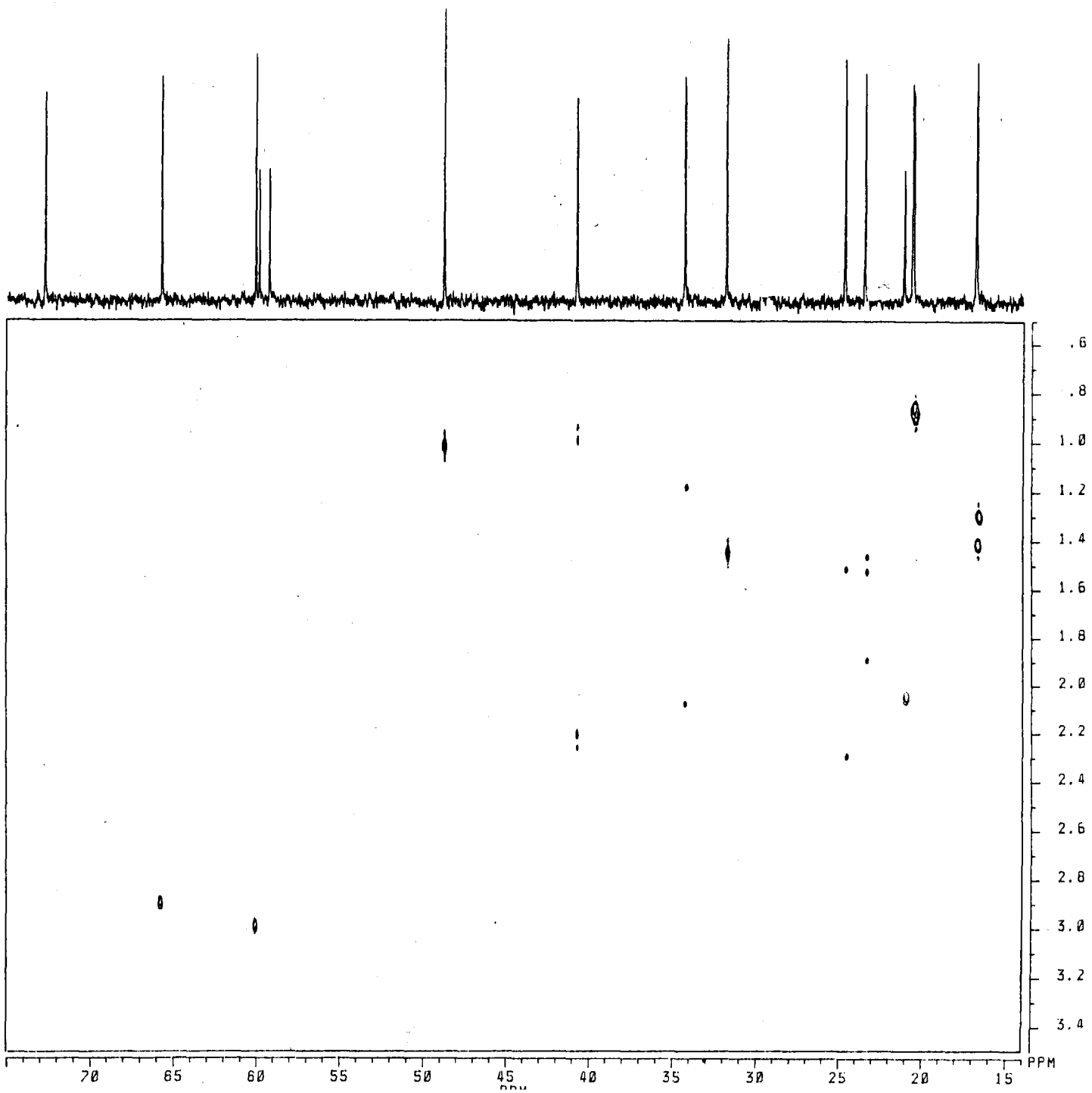


PPM

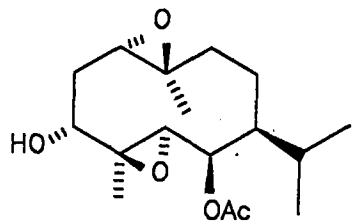
72.724
65.768
60.071
48.761
48.773
34.295
31.812
24.656
23.497
21.113
20.629
20.568
16.778
16.753



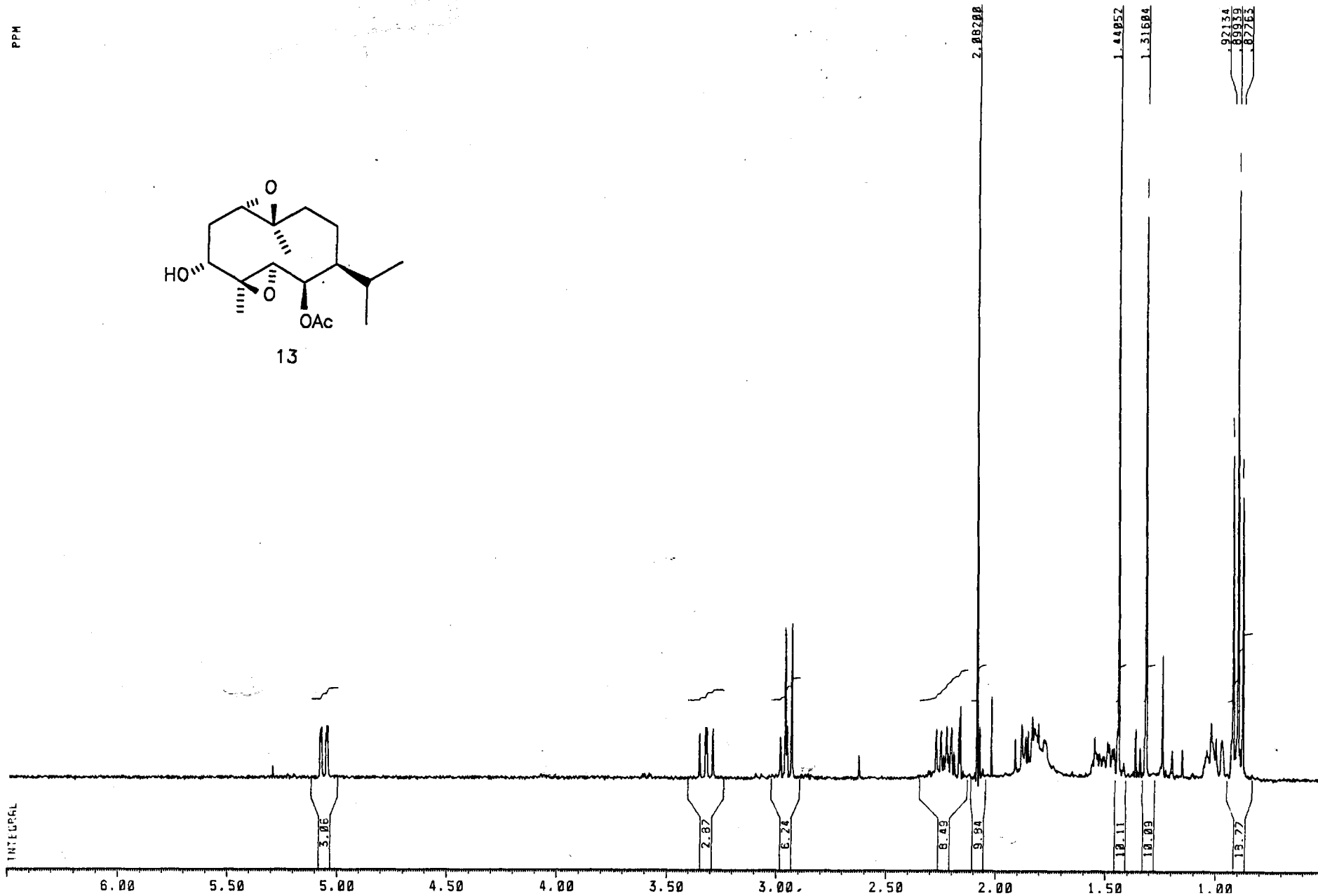
12



PPM



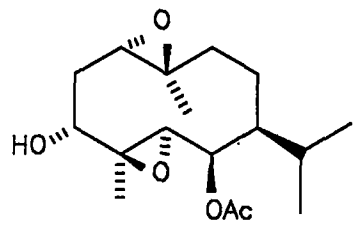
13



170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10

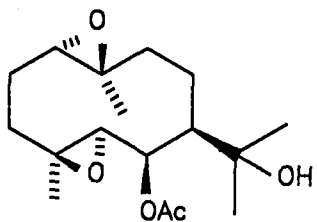
PPM

170.155

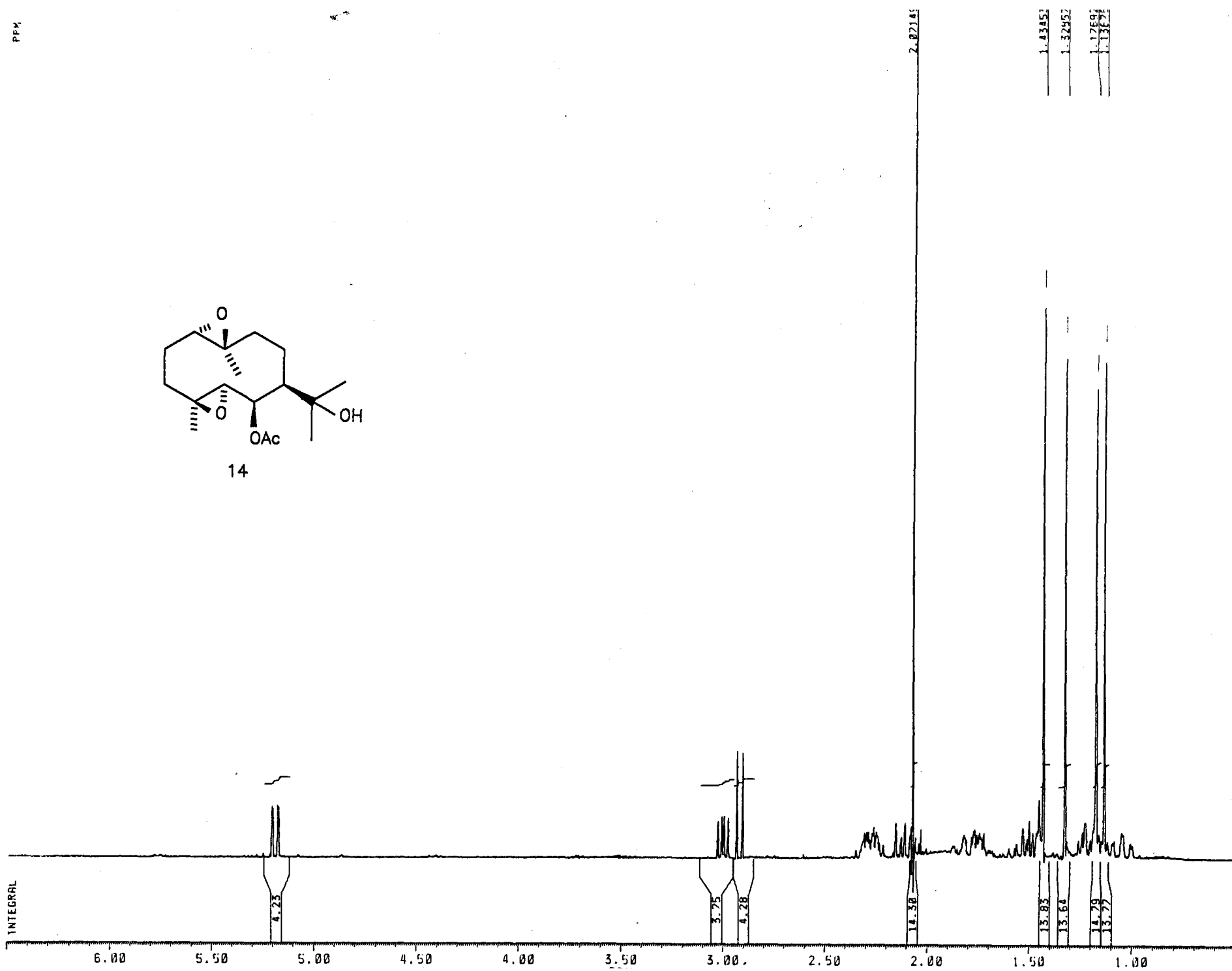


77.574
77.181
76.579
74.937
72.263
63.978
62.869
59.581
58.285
48.618
48.678
33.270
31.875
23.498
21.156
20.647
20.681
17.154
11.300





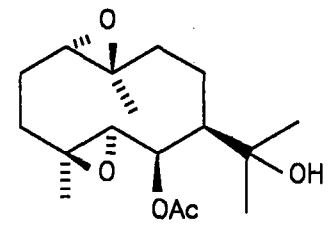
14



PPM

170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20

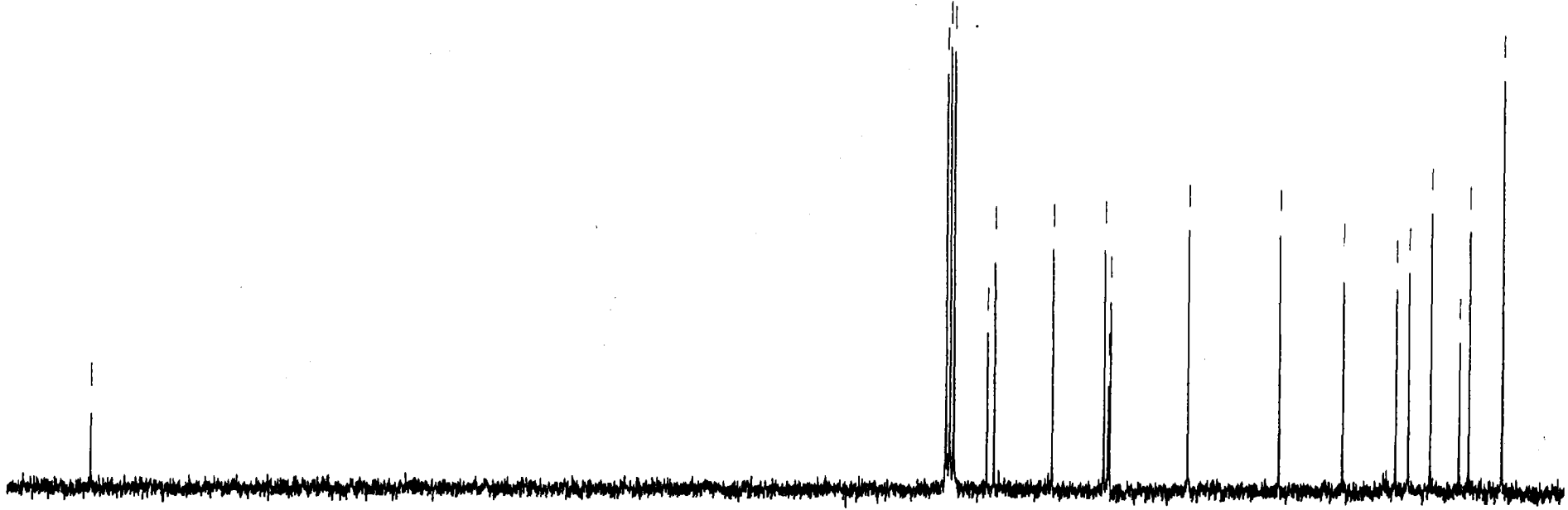
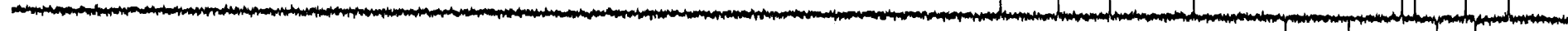
170.665

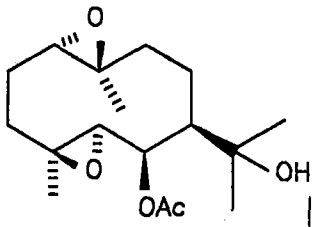


77.525
77.101
76.678
75.876
74.278
65.935
64.728
59.878
59.835
51.833
41.122
34.212
25.414
22.832
24.632
21.493
20.451
16.792

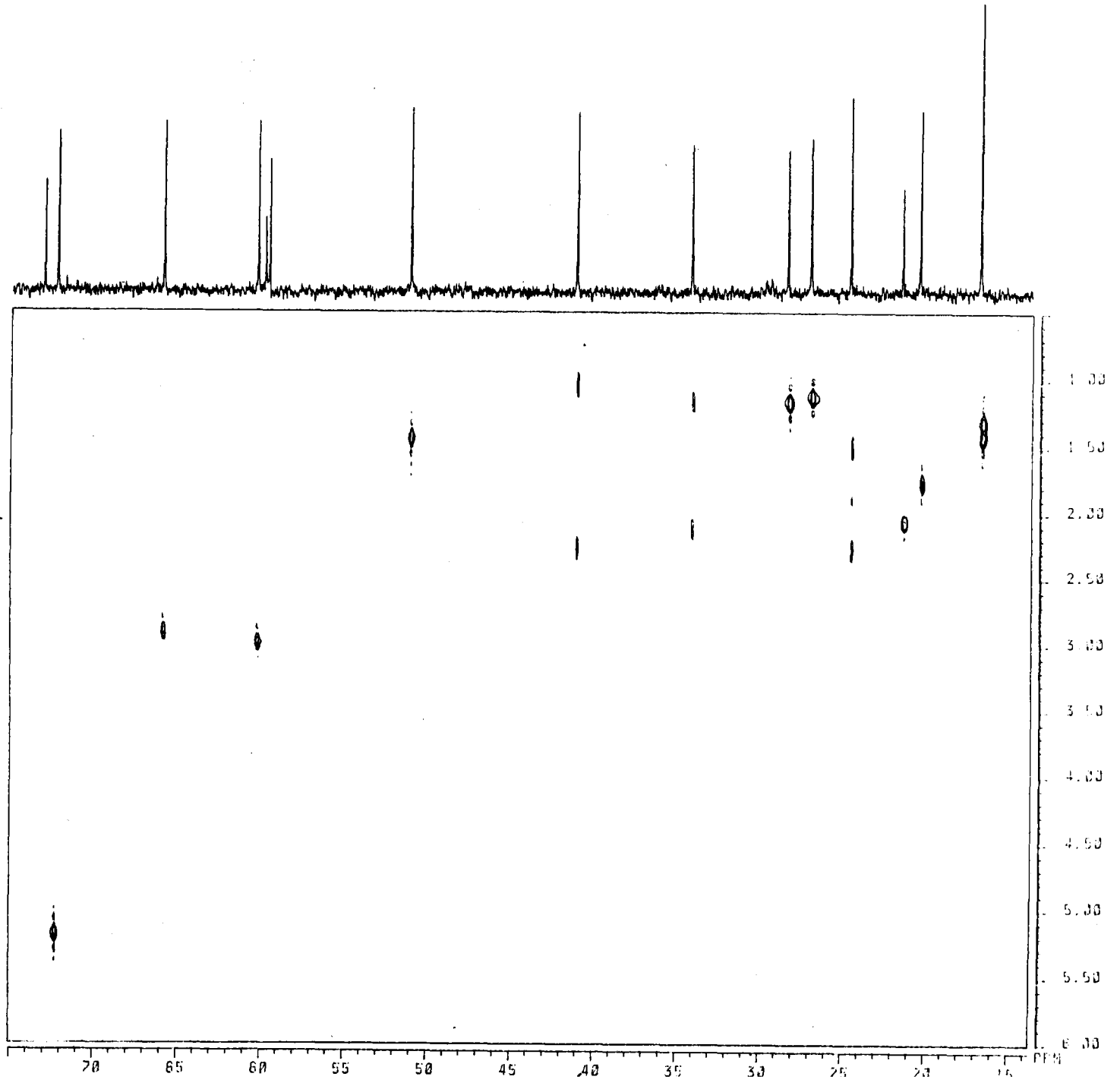
77.272
65.906
64.728
51.892
41.128
34.222
28.414
27.832
24.632
21.493
20.451
16.792

PPM





14



INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

PPM

9.99

9.58

10.41

41.39

32.45

33.76

34.80

36.13

615.44

431.69

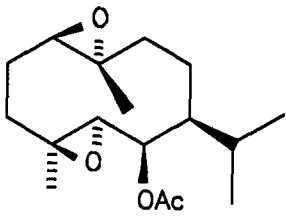
388.75

298.11

281.41

274.89

267.55



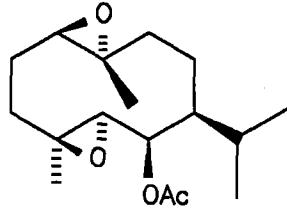
15

HERTZ

PPM

PPM

170.205

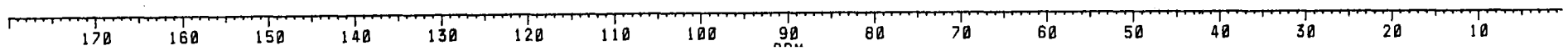


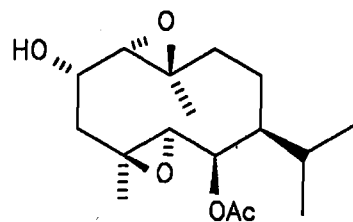
15

CDCl₃
 170.205
 77.188
 76.684
 73.541

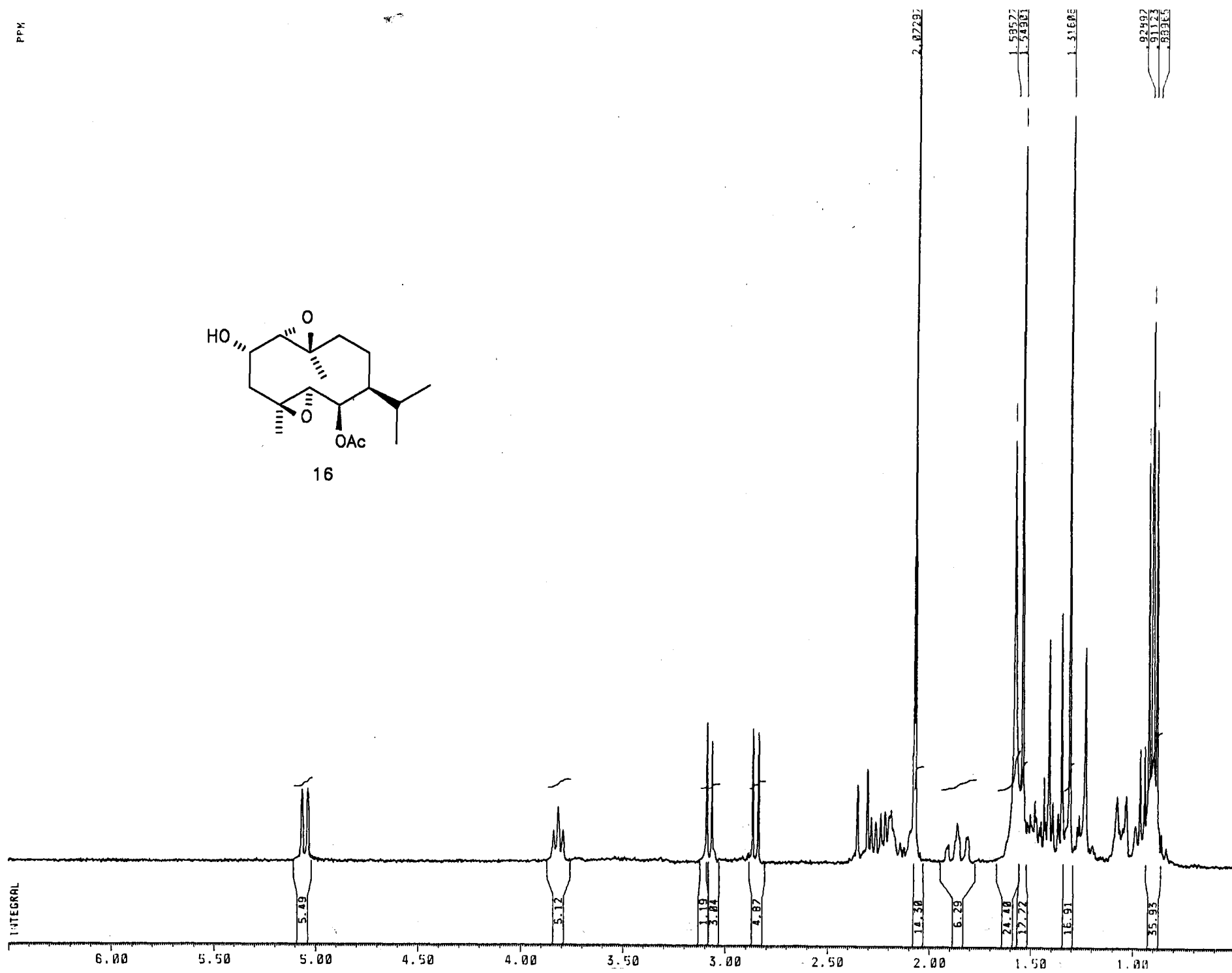
77.534
 77.188
 76.684
 73.541
 66.232
 61.853
 61.493
 58.885
 44.216
 36.615
 36.558
 31.051
 25.970
 23.745
 23.168
 21.181
 20.939
 20.507
 16.736

73.541
 61.493
 44.216
 36.615
 36.558
 31.051
 25.969
 23.745
 23.168
 21.181
 20.939
 20.507
 16.736

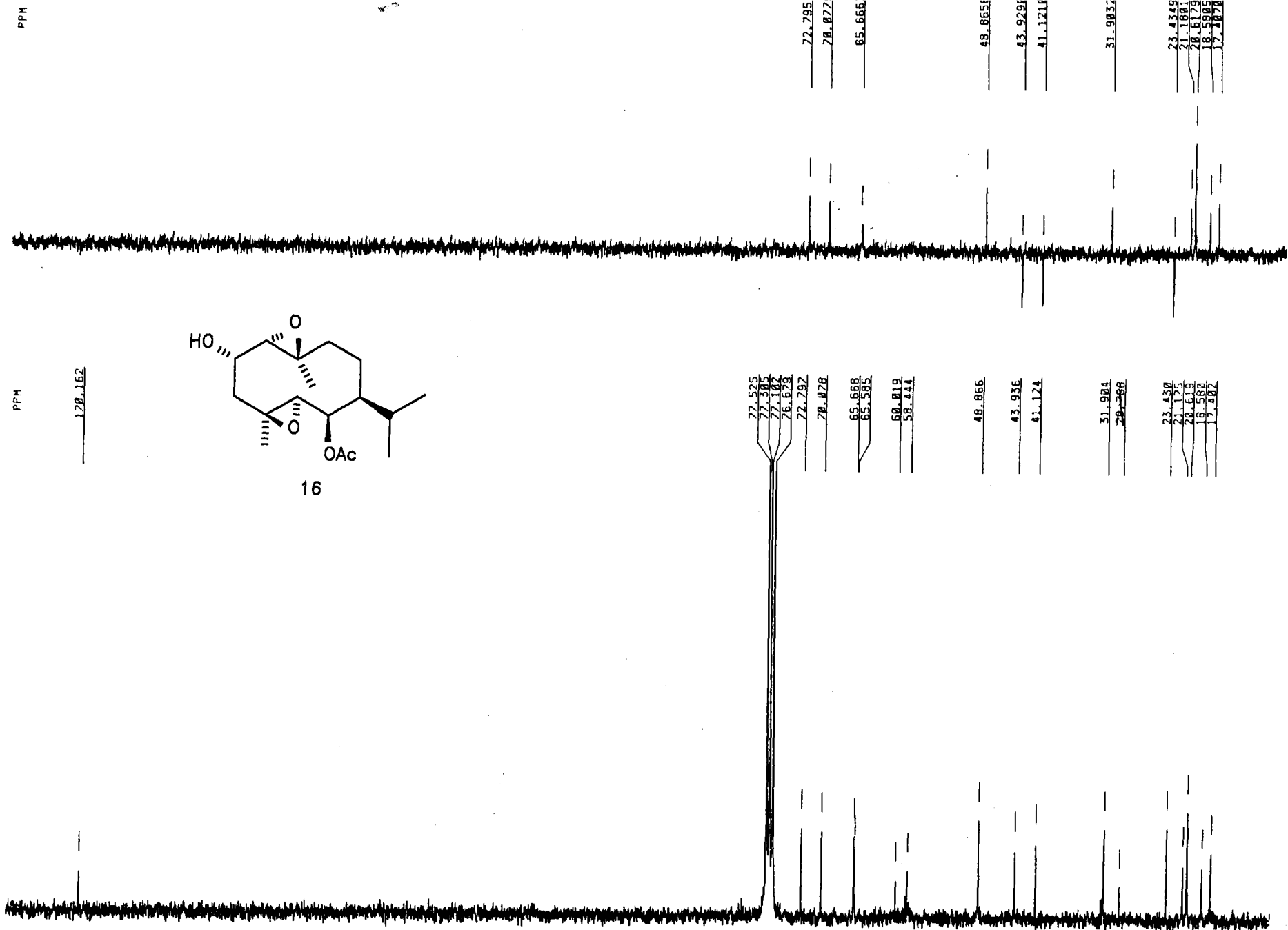


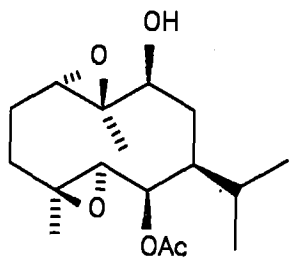


16

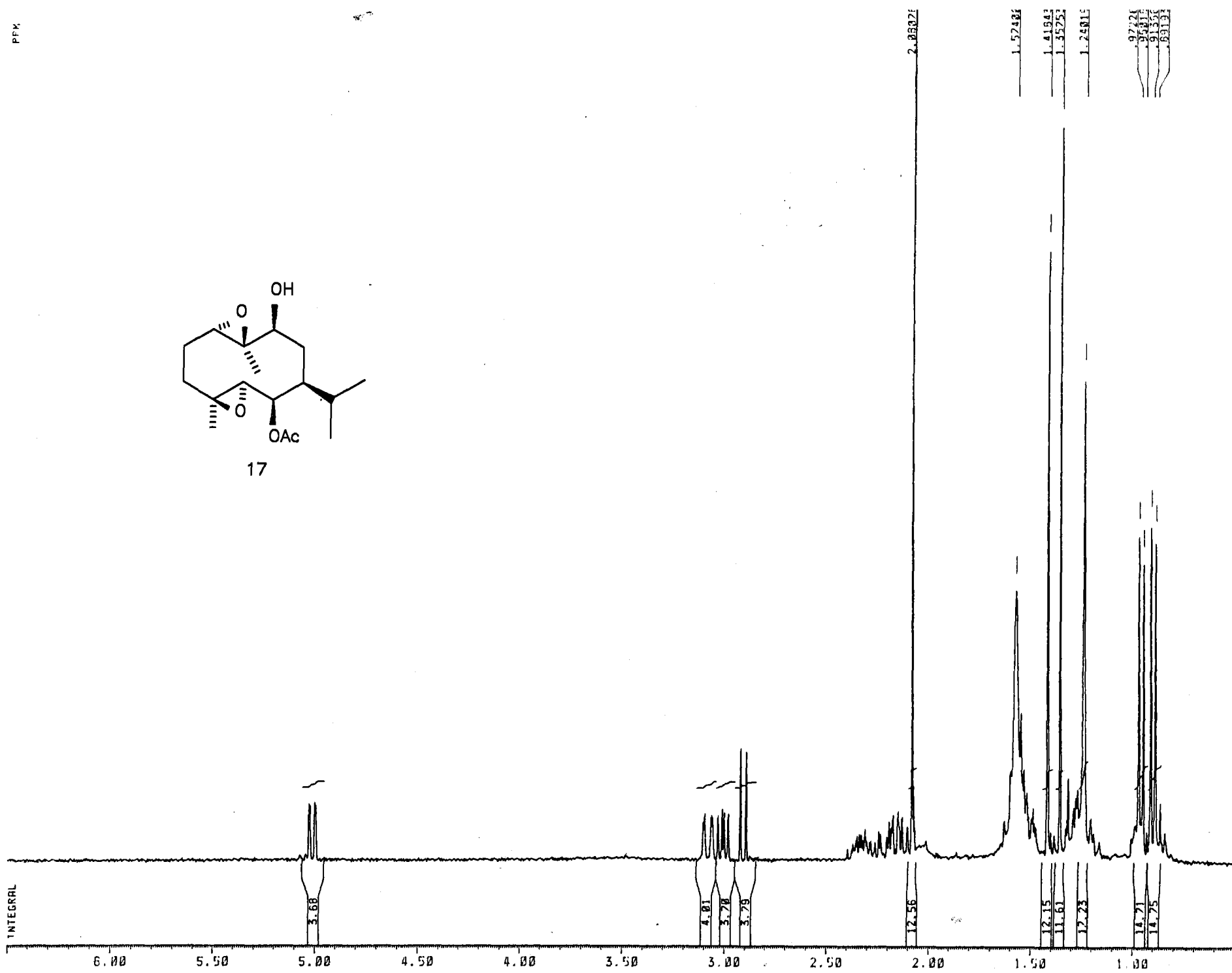


170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10





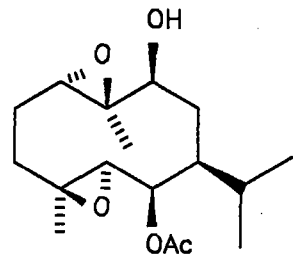
17



PPM

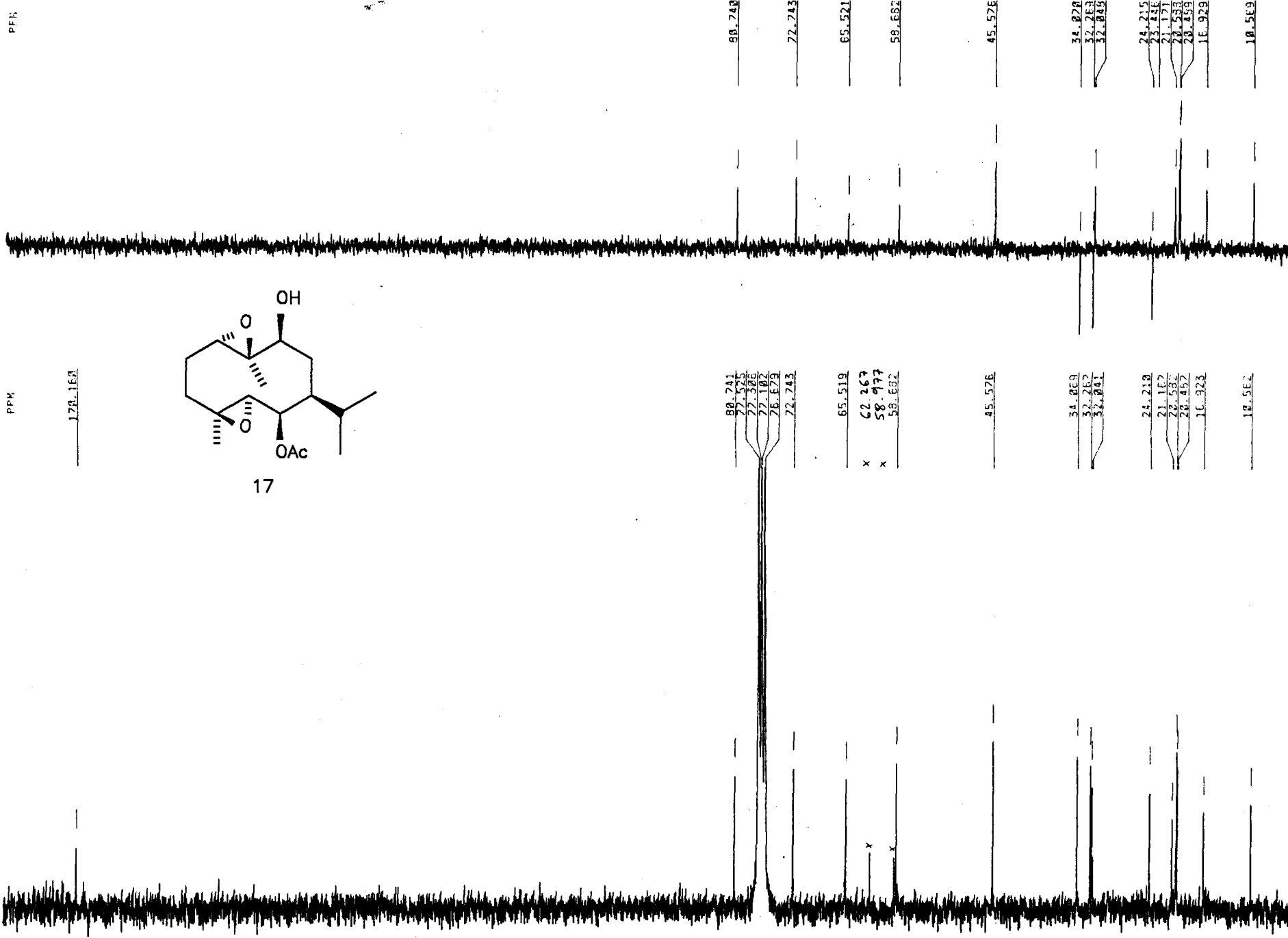
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10

178.162



80.741
77.472
77.362
77.182
76.872
72.743
65.519
62.267
58.977
58.682
45.576
34.869
32.262
32.049
24.218
21.167
20.657
20.453
18.929
18.563

x
x

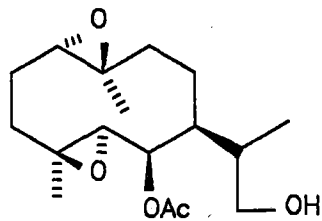
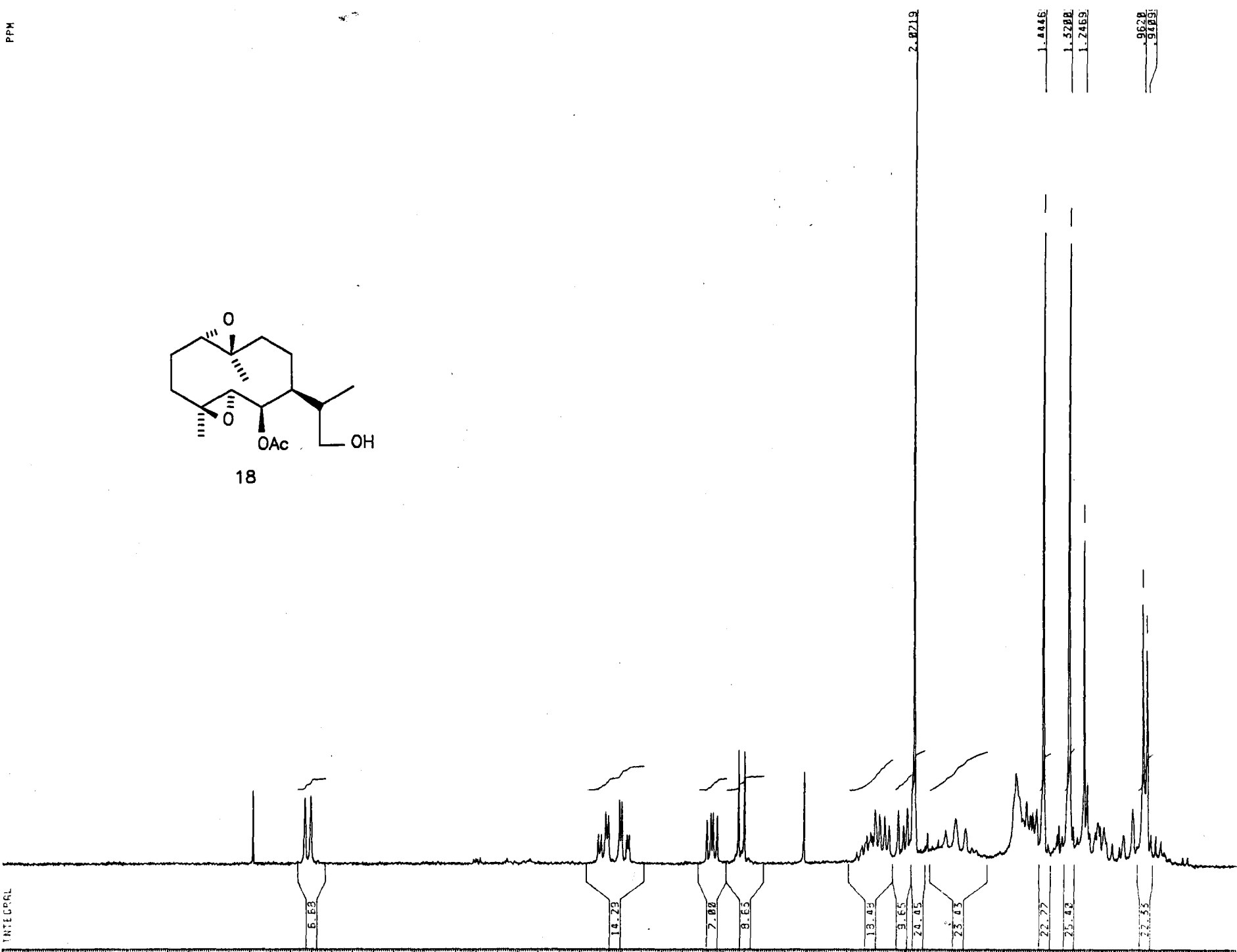


PPM

80.740
72.743
65.521
58.682
45.576
34.878
32.263
32.049
24.215
23.446
21.171
20.657
20.453
18.929
18.563

INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

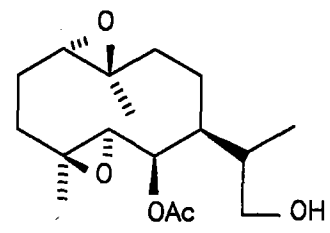
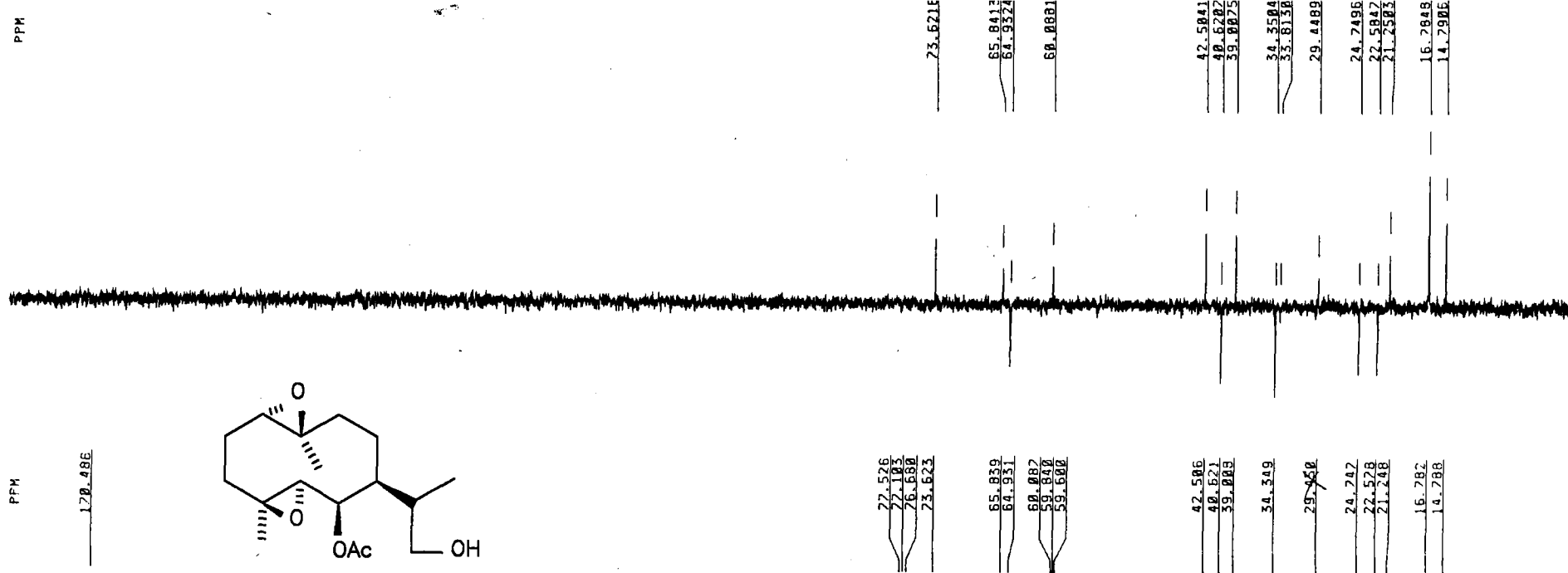


18

PPM

170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10

170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10



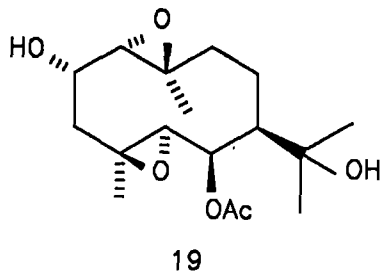
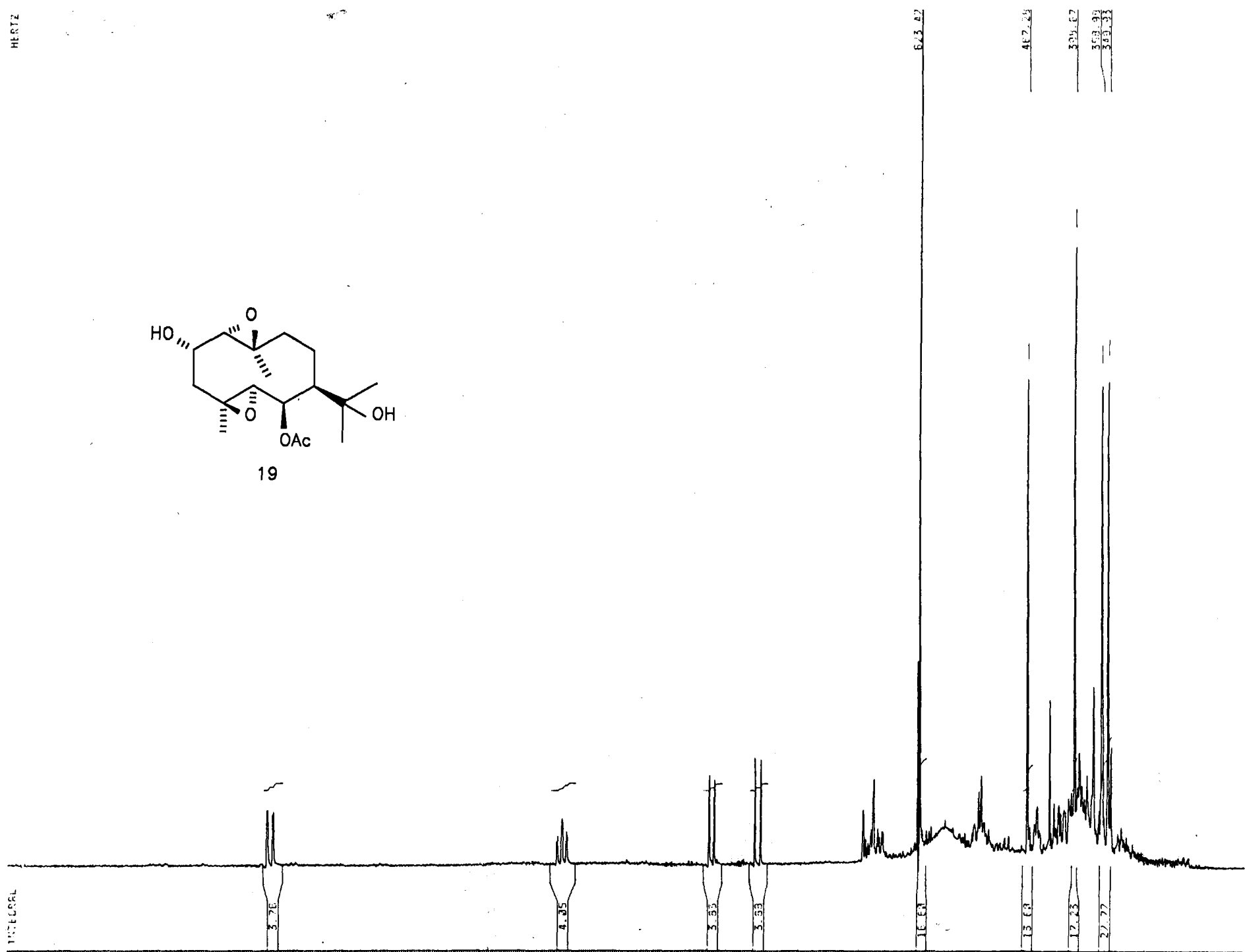
18

PPM 170.486

73.621E
65.841E
64.932E
60.080E
42.584E
40.620E
39.087E
34.350E
33.615E
29.448E
24.749E
22.584E
21.258E
16.784E
14.790E

INTEGRAL

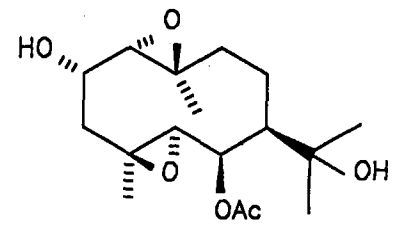
6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00



HERTZ

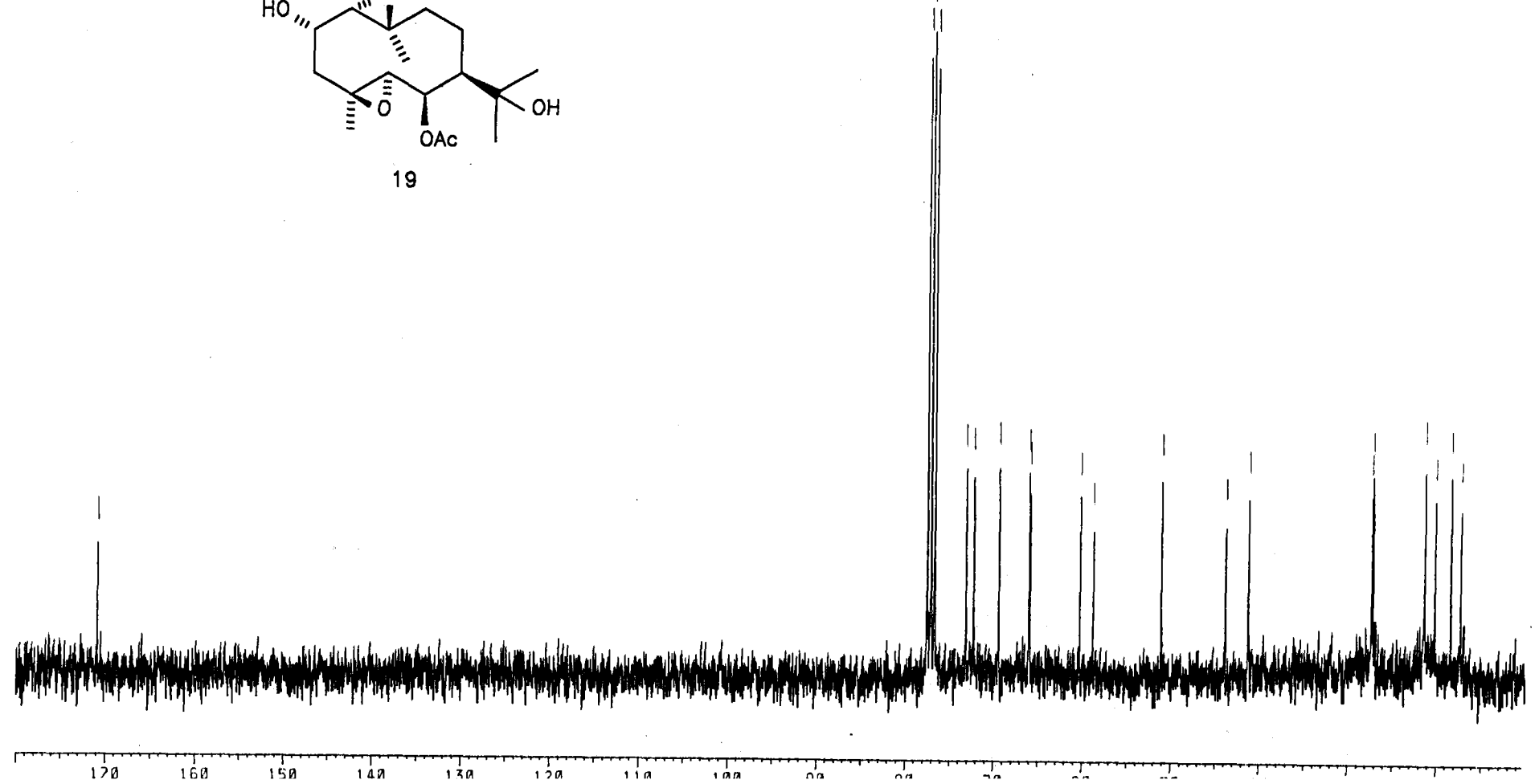
6.43 4.7 3.5 3.3

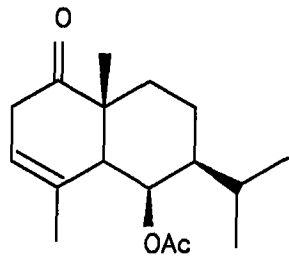
PPM
170.282



19

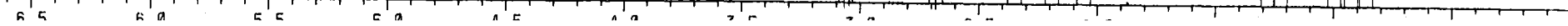
77.520
77.009
76.872
73.112
72.263
69.414
66.019
65.917
60.281
59.773
51.073
43.556
41.271
27.416
27.367
21.416
21.361
16.443
17.355

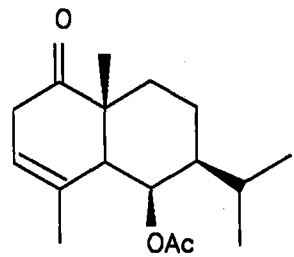




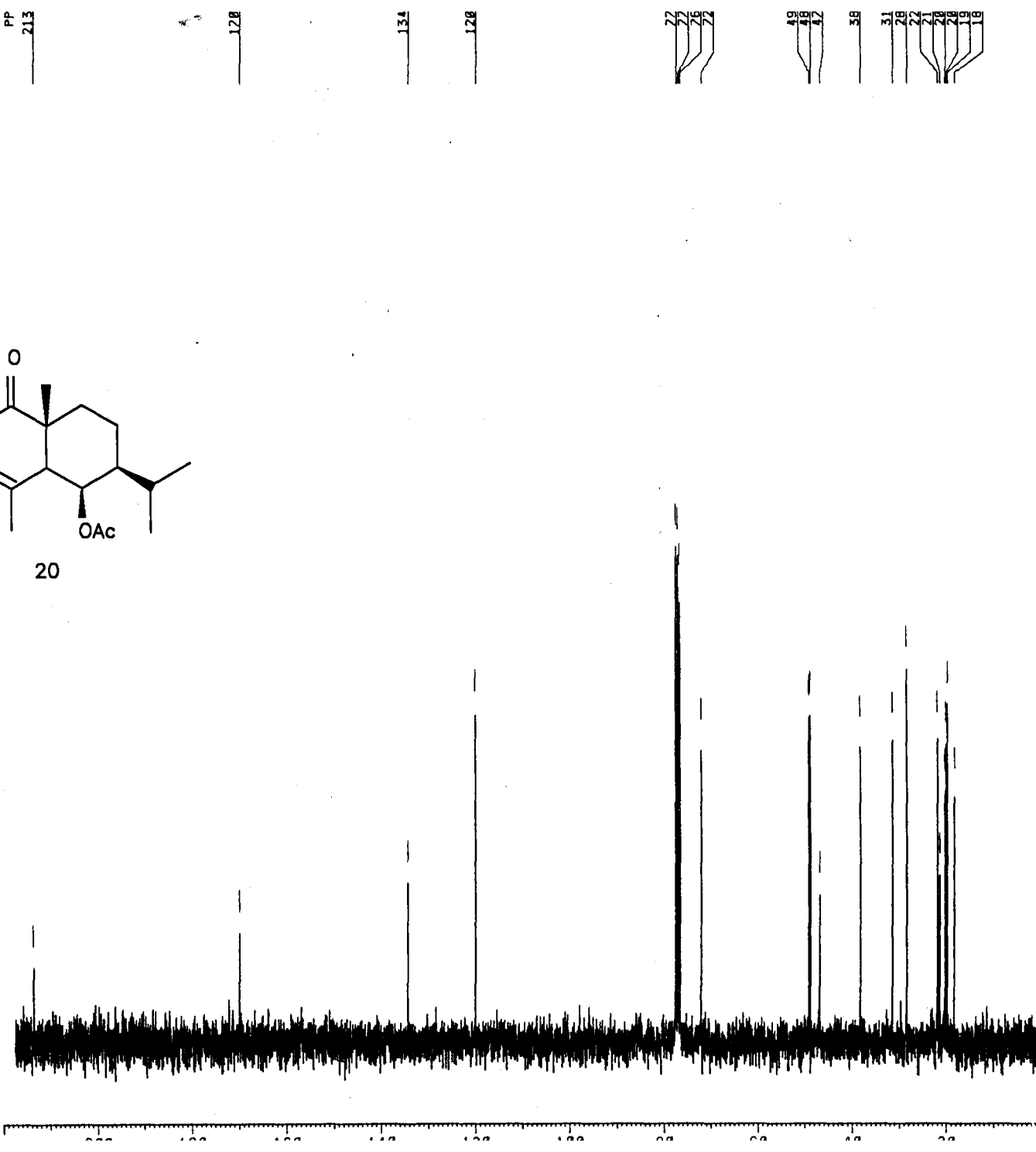
20

INTEGRAL

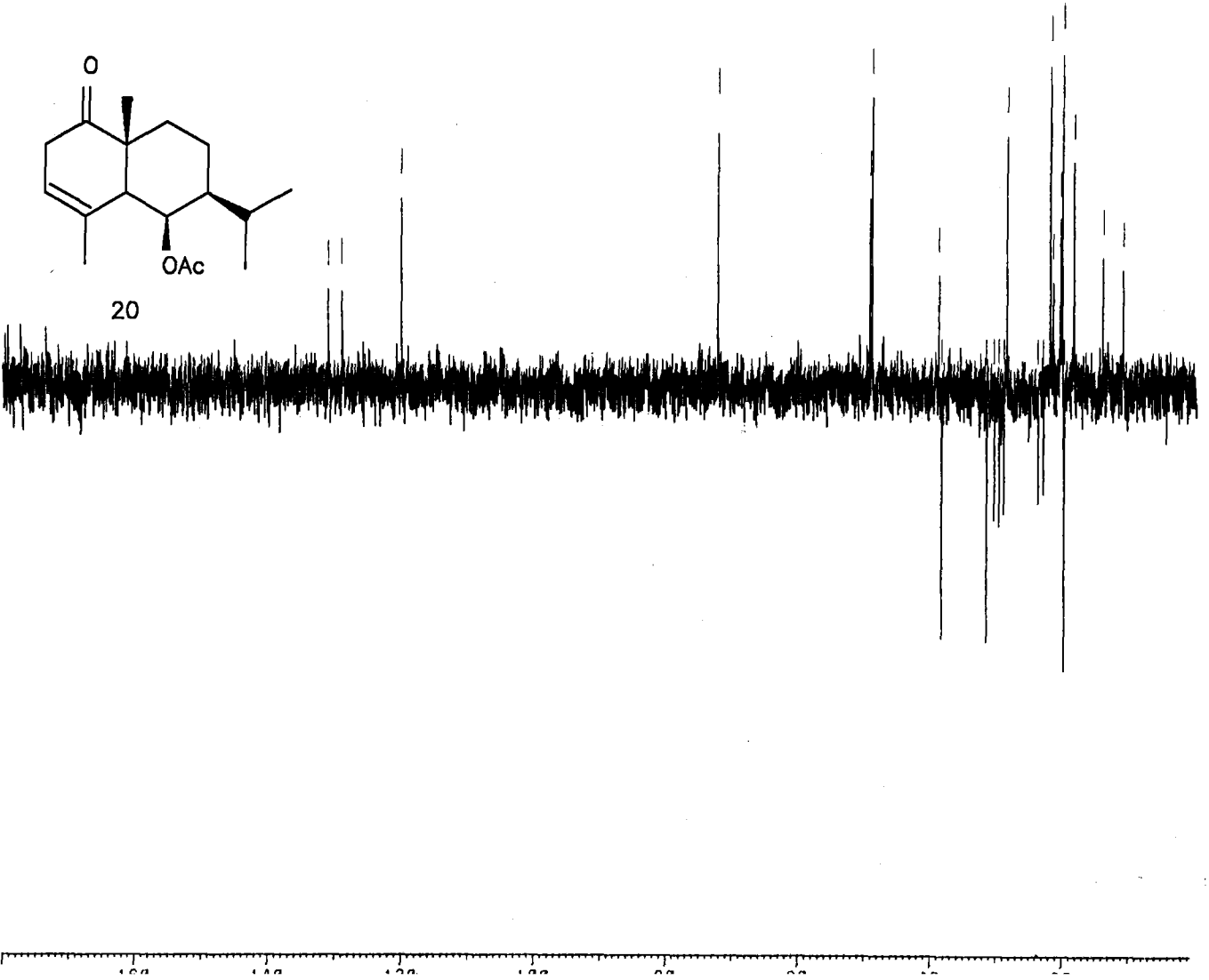
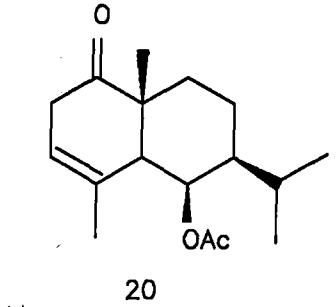




20



18445188
18445188
18445188



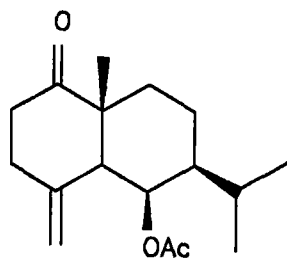
PPM
130.958
128.898
120.042

77.284

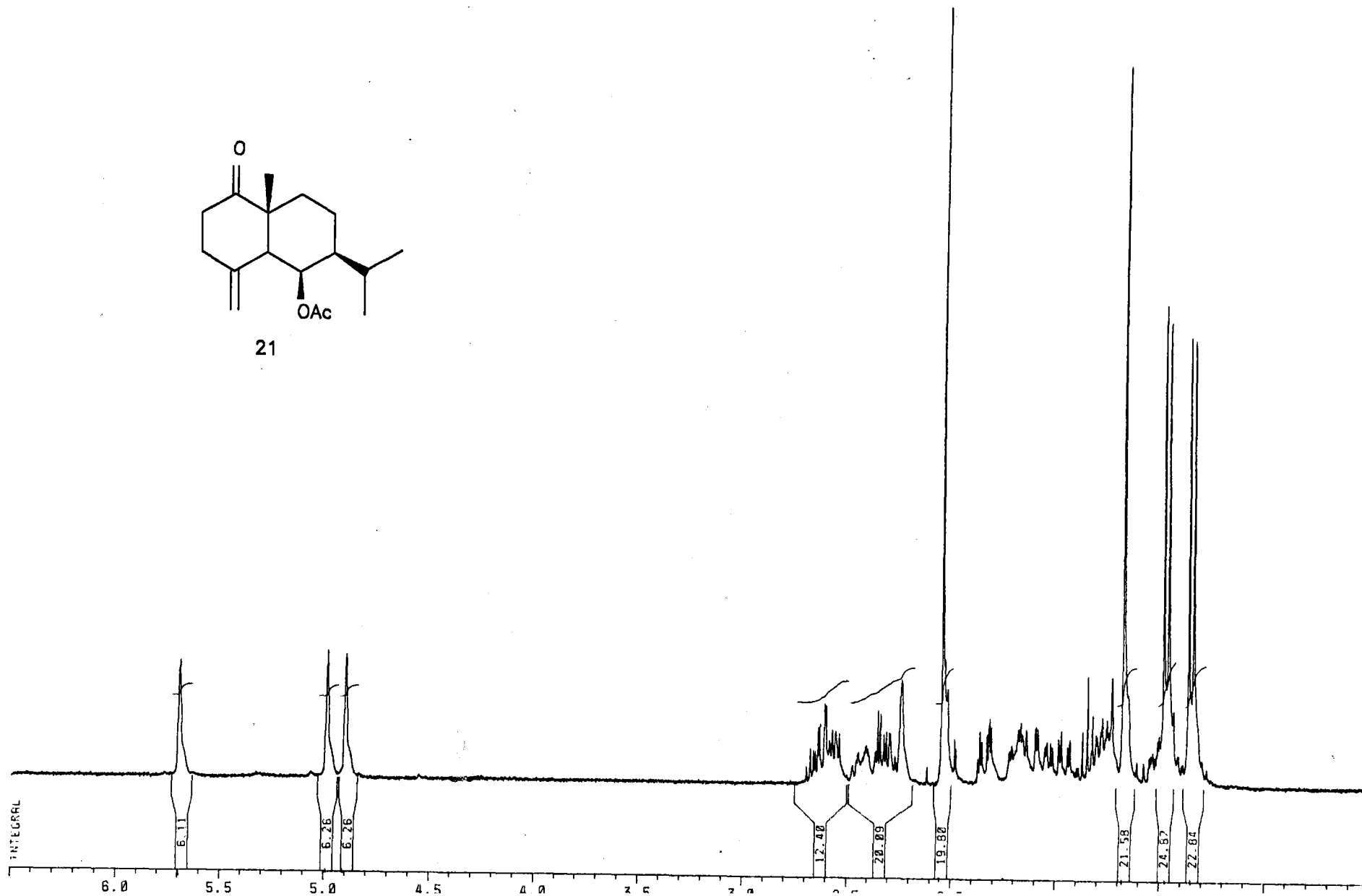
49.323
49.001

38.858
38.456
31.668
29.477
29.781
29.035
28.585
23.867
23.075
22.050
21.584
20.500
20.237
19.908
18.526
14.145
11.054

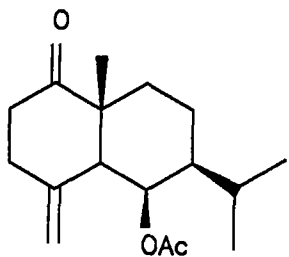
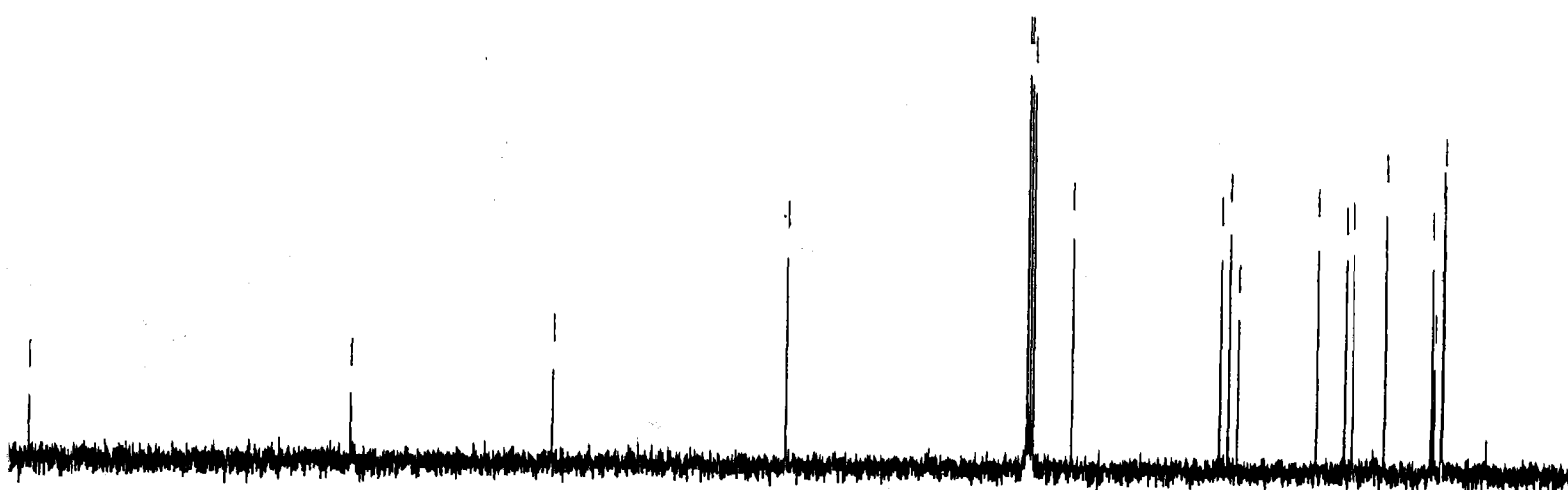
EX0-CET0/FE26.004



21



200 180 160 140 120 100 80 60 40 20



21

PPM
214.6

178.5

142.7

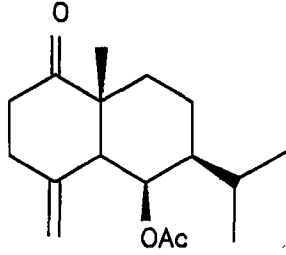
110.5

77.0
77.0
76.6
71.7

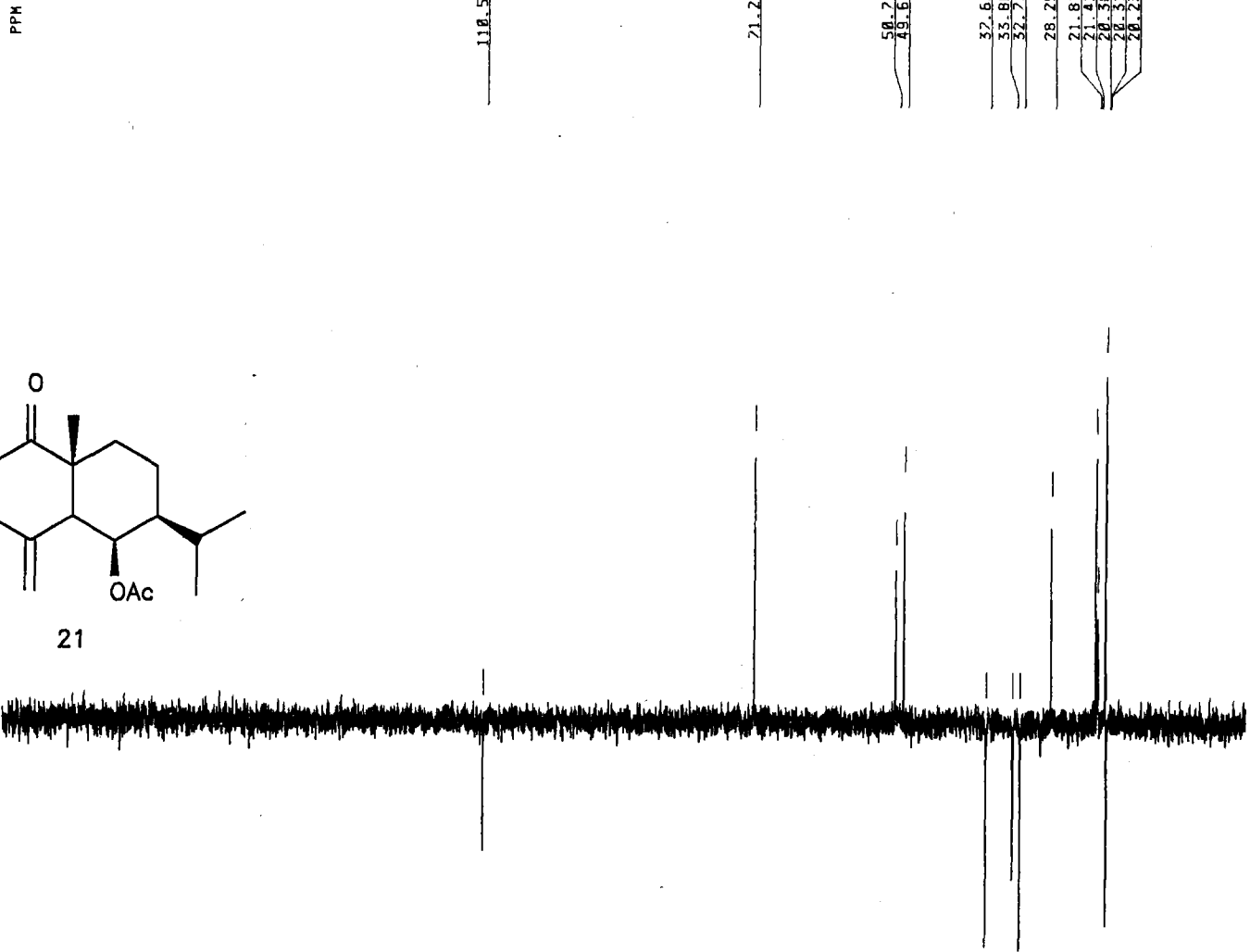
58.8
49.6
48.5

37.6
35.8
32.7

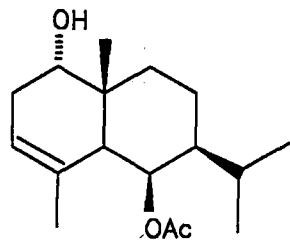
28.2
21.8
21.4
20.9
20.5
20.2



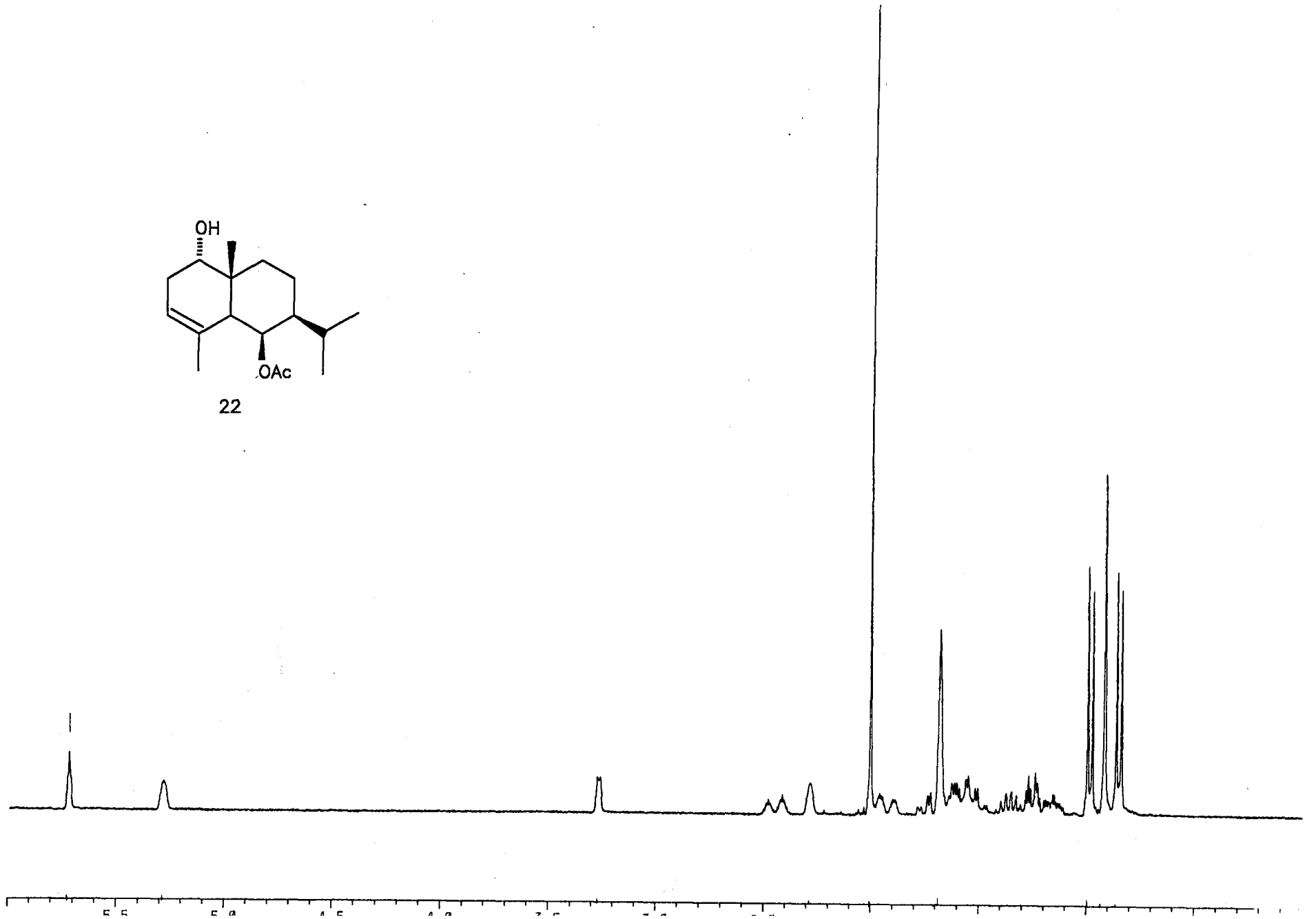
21



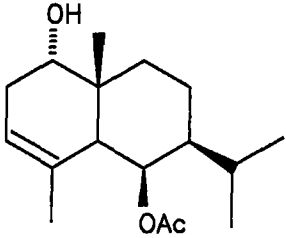
HI
12



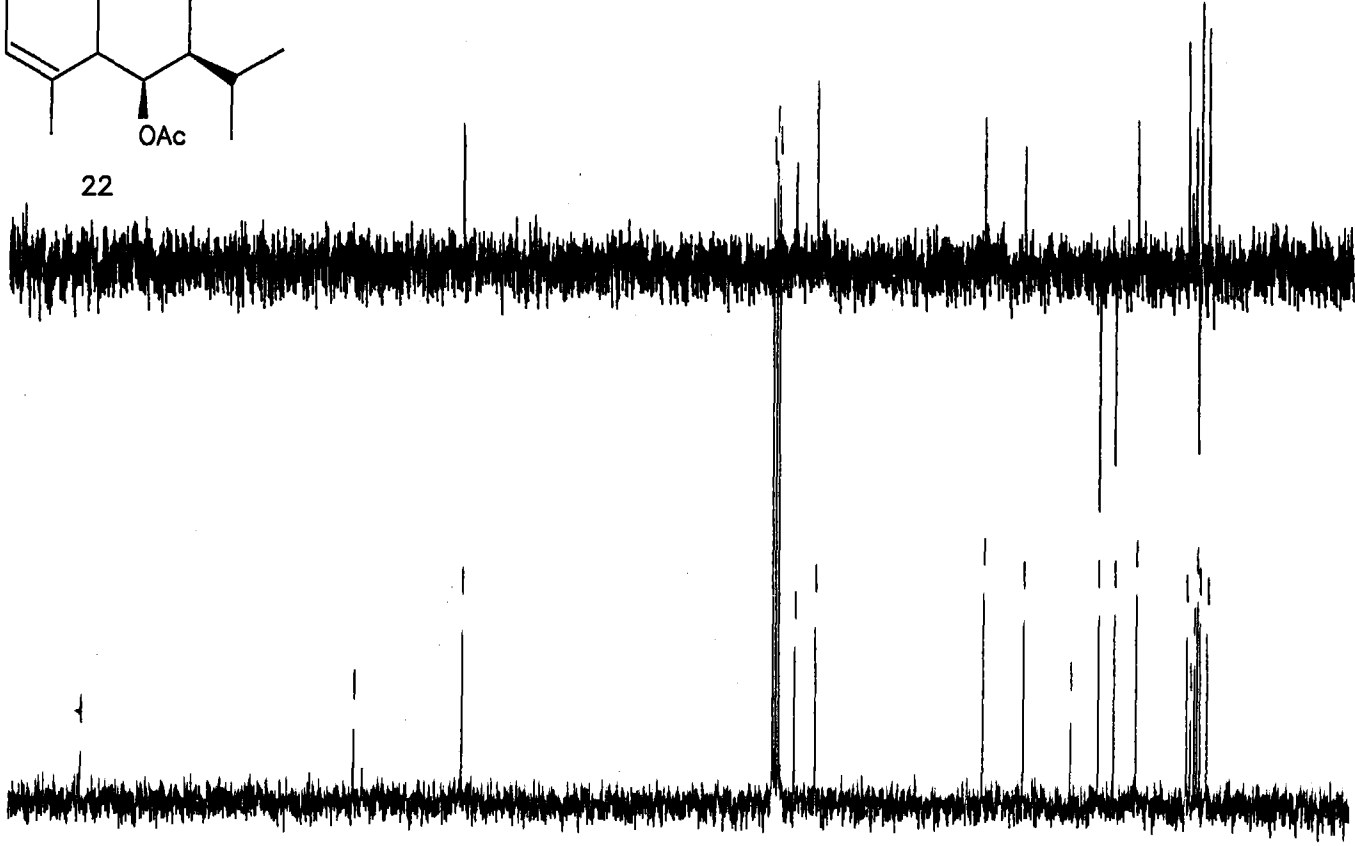
22



Pt 12 13 11 27 26 25 24 49 43 37 33 31 29 22 21 20 19

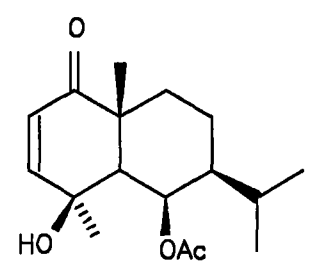
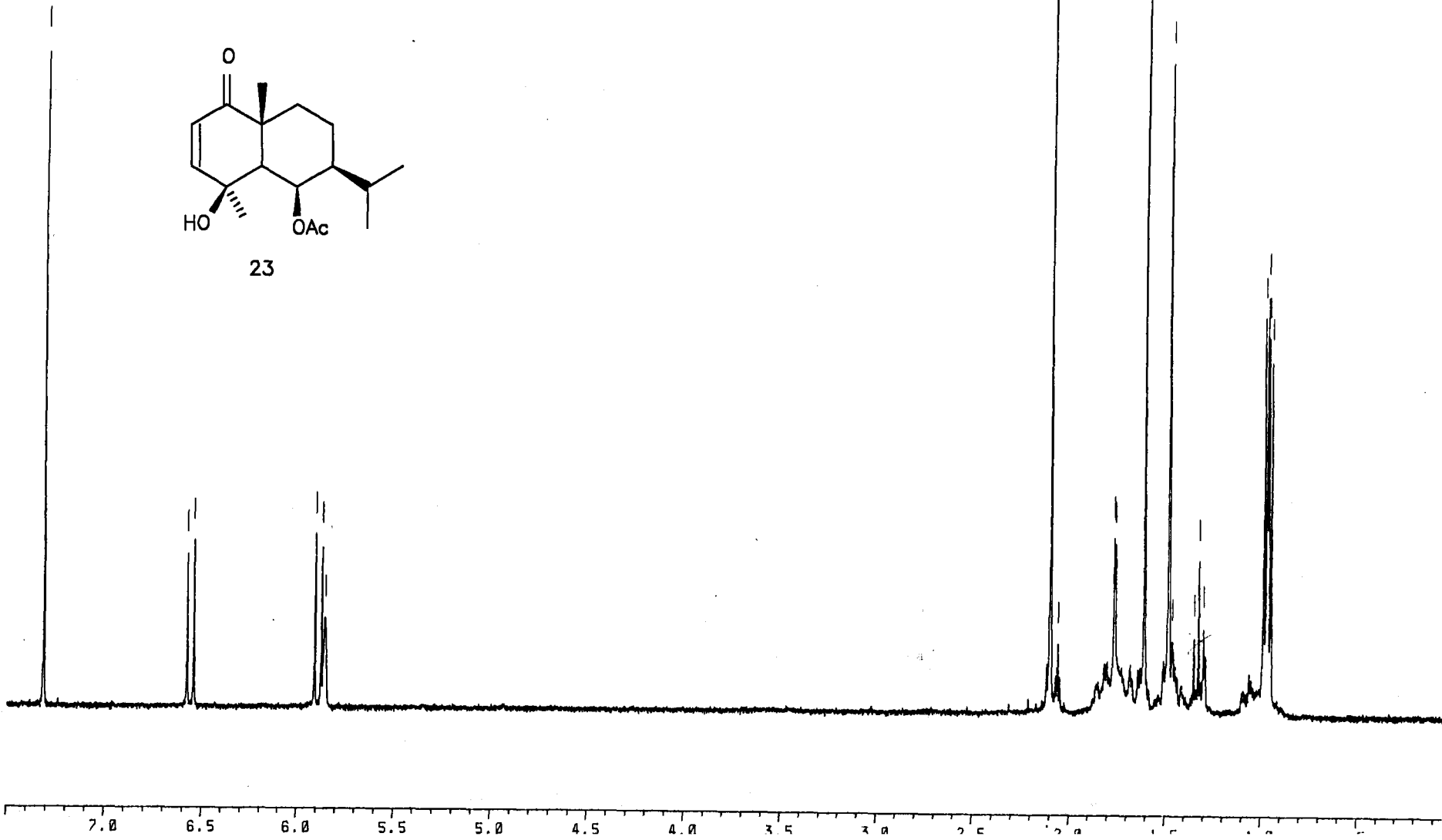


22



Go
[]
VANDERBILT UNIVERSITY

100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200



23

PPM

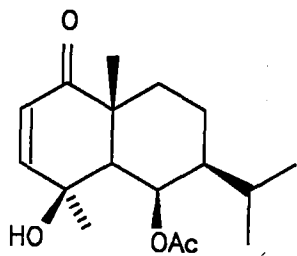
5.987
5.873
5.653

4.164
4.163

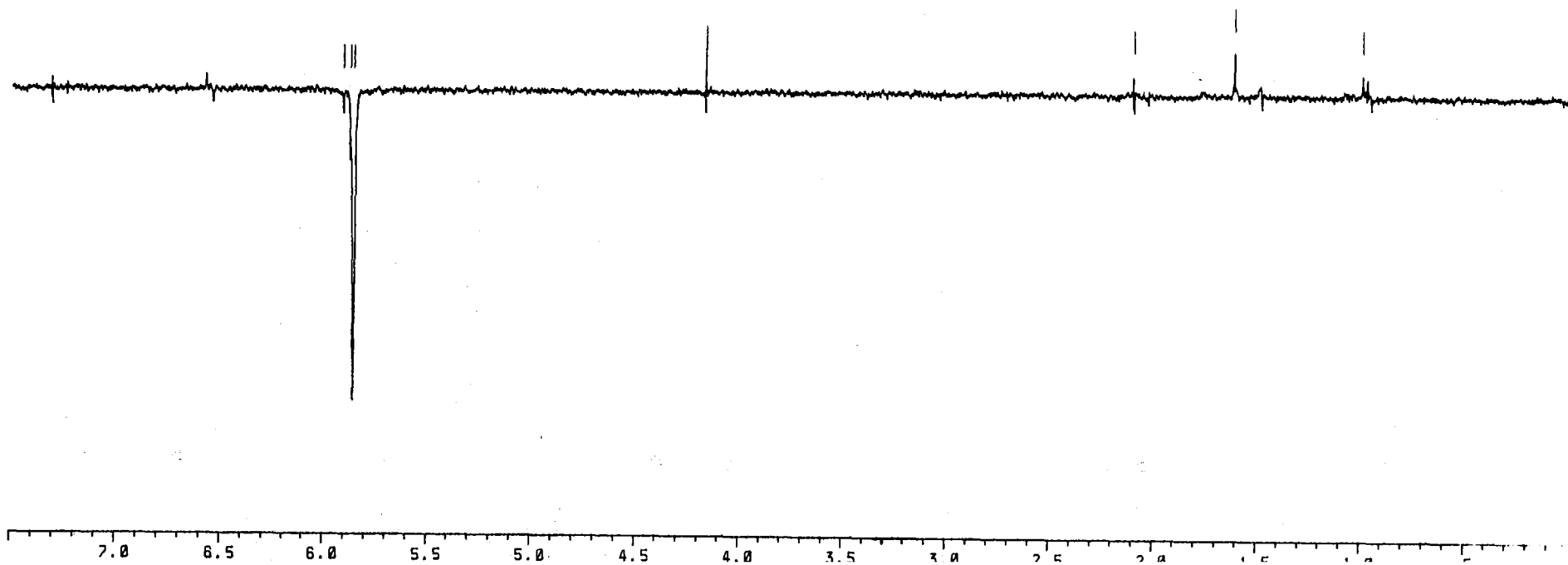
2.1006

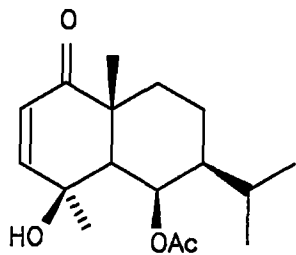
1.6153

.9972

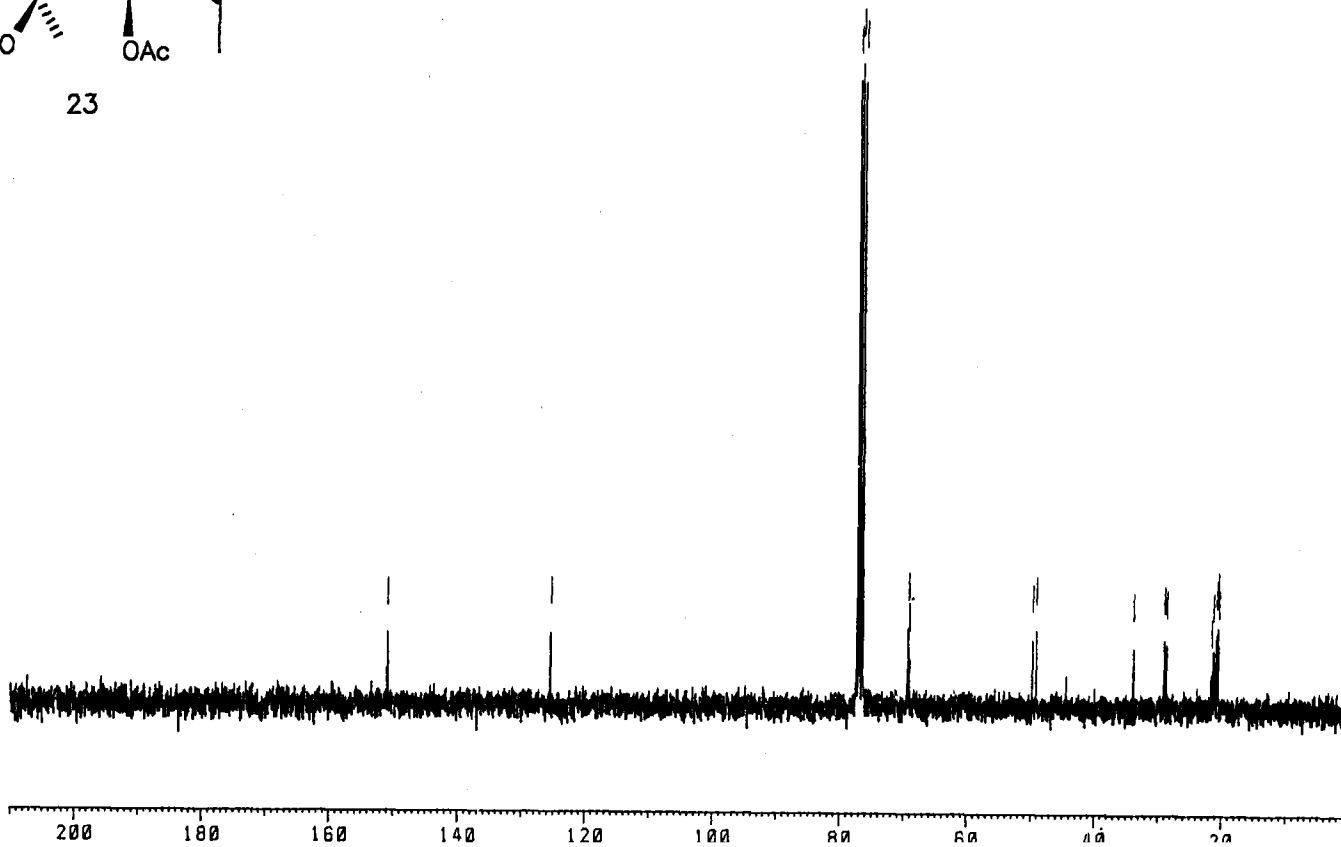


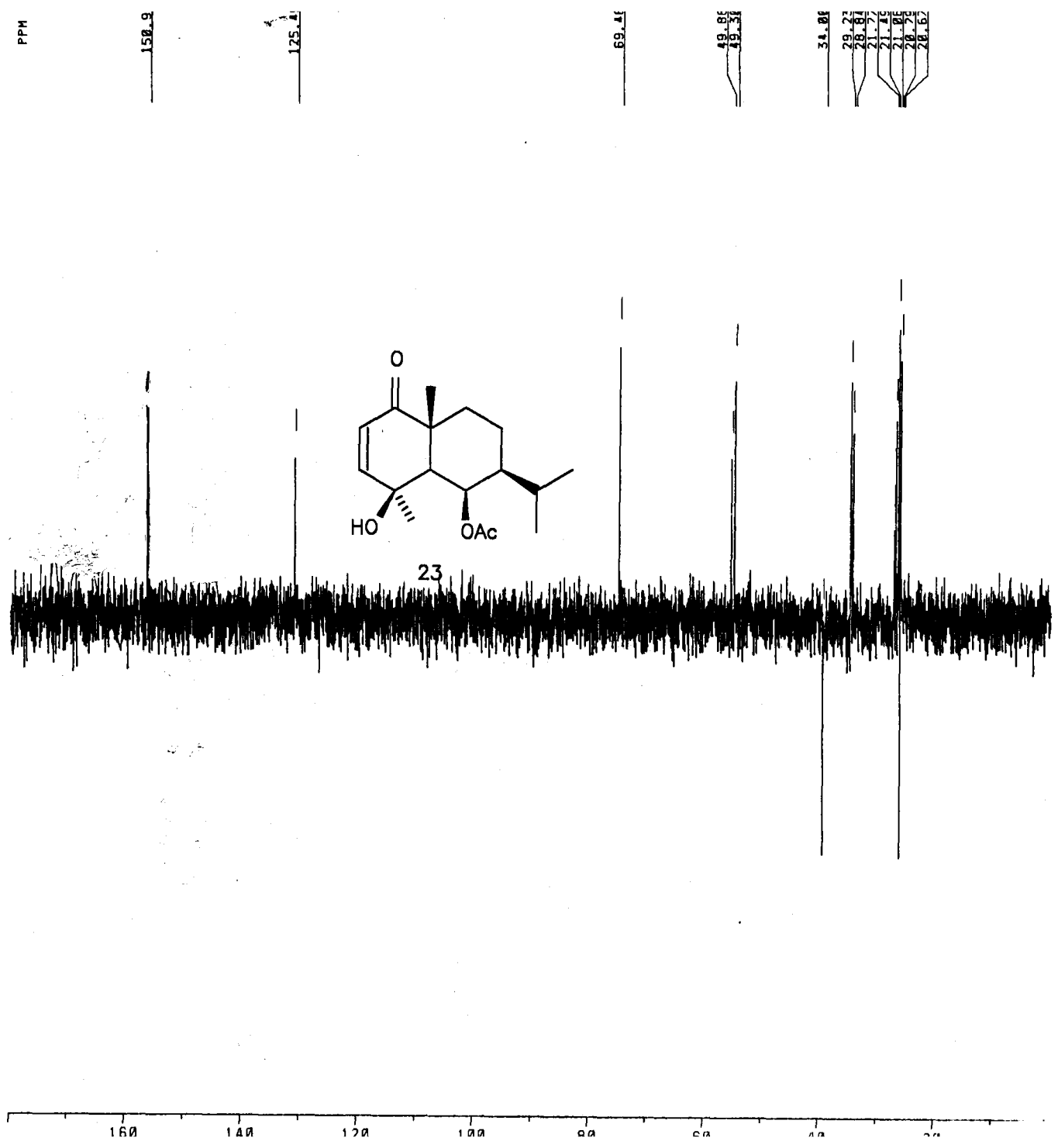
23

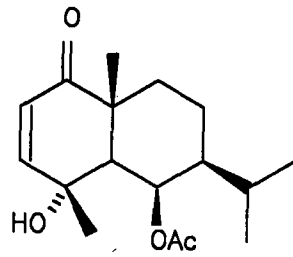




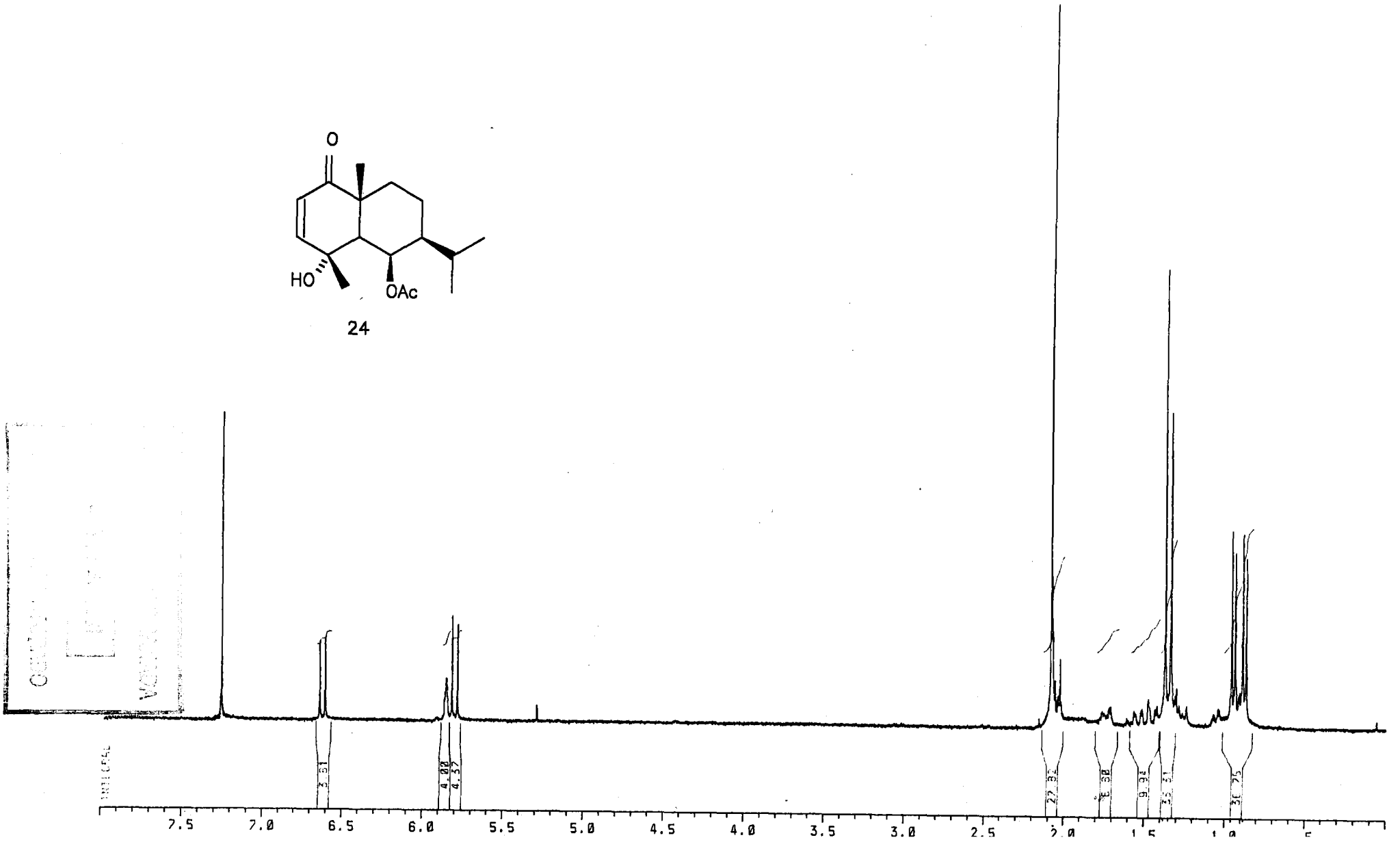
23

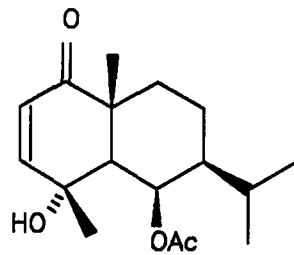




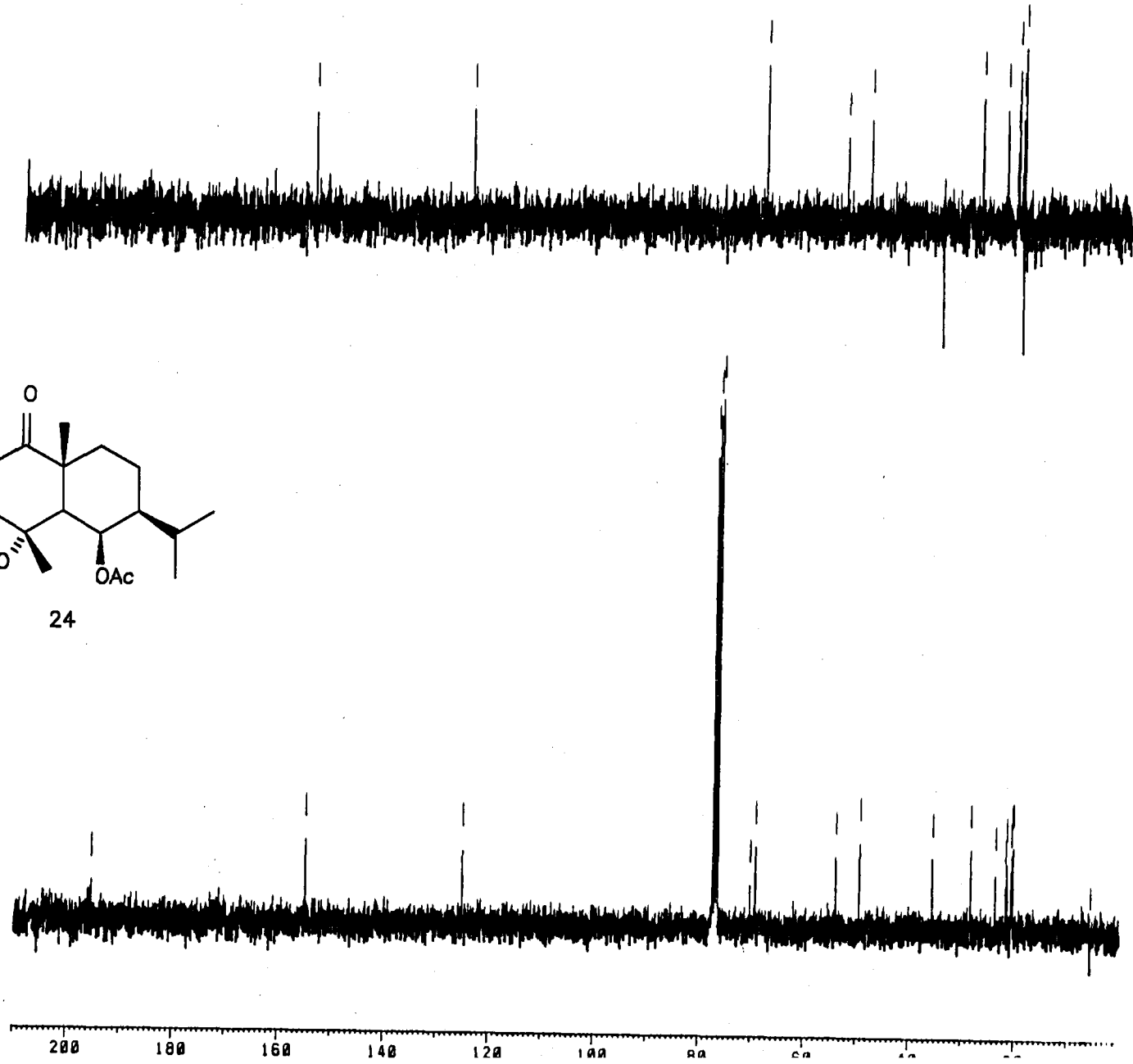


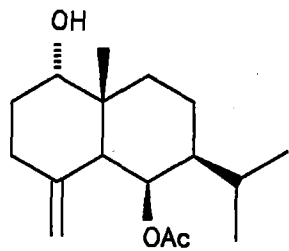
24



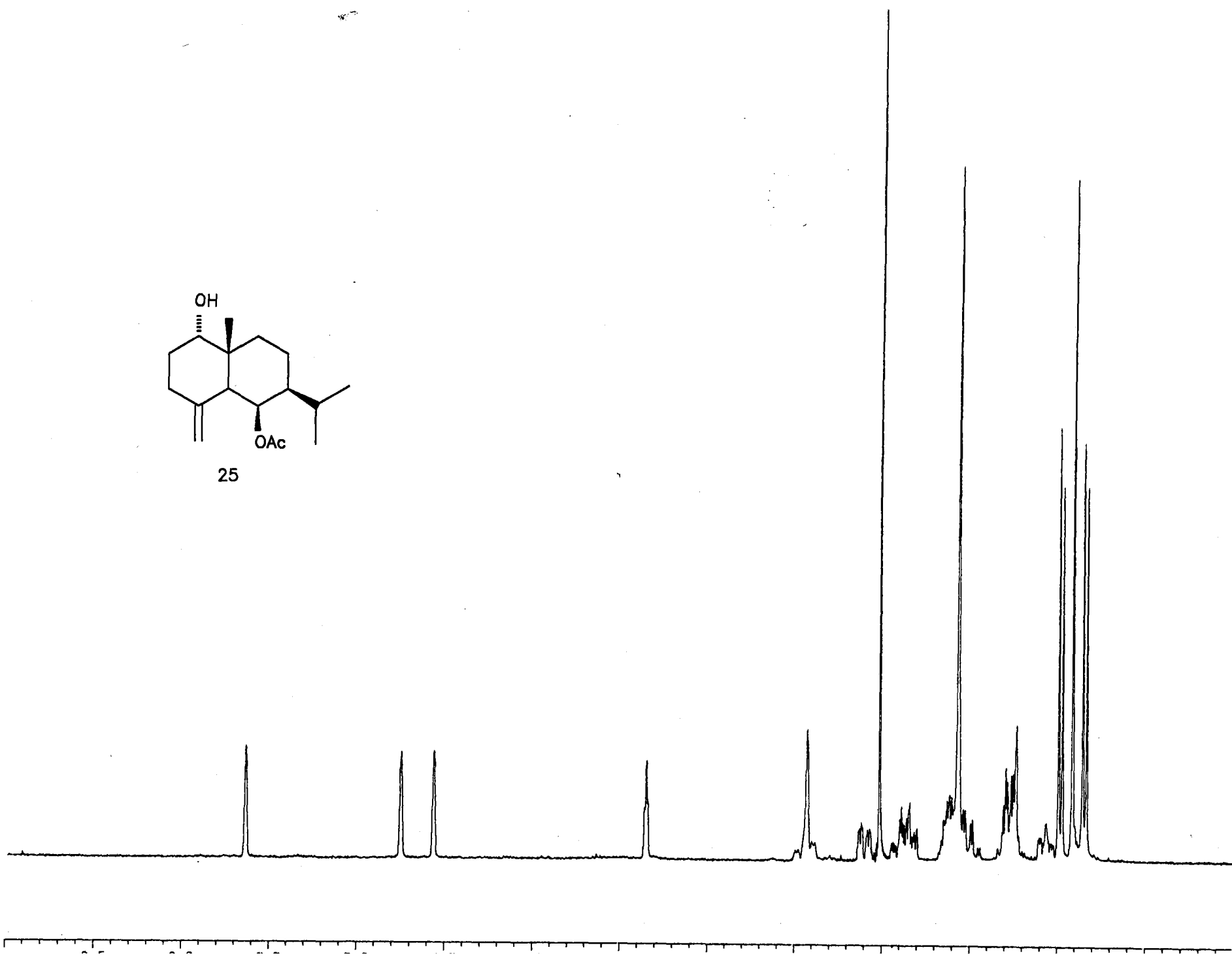


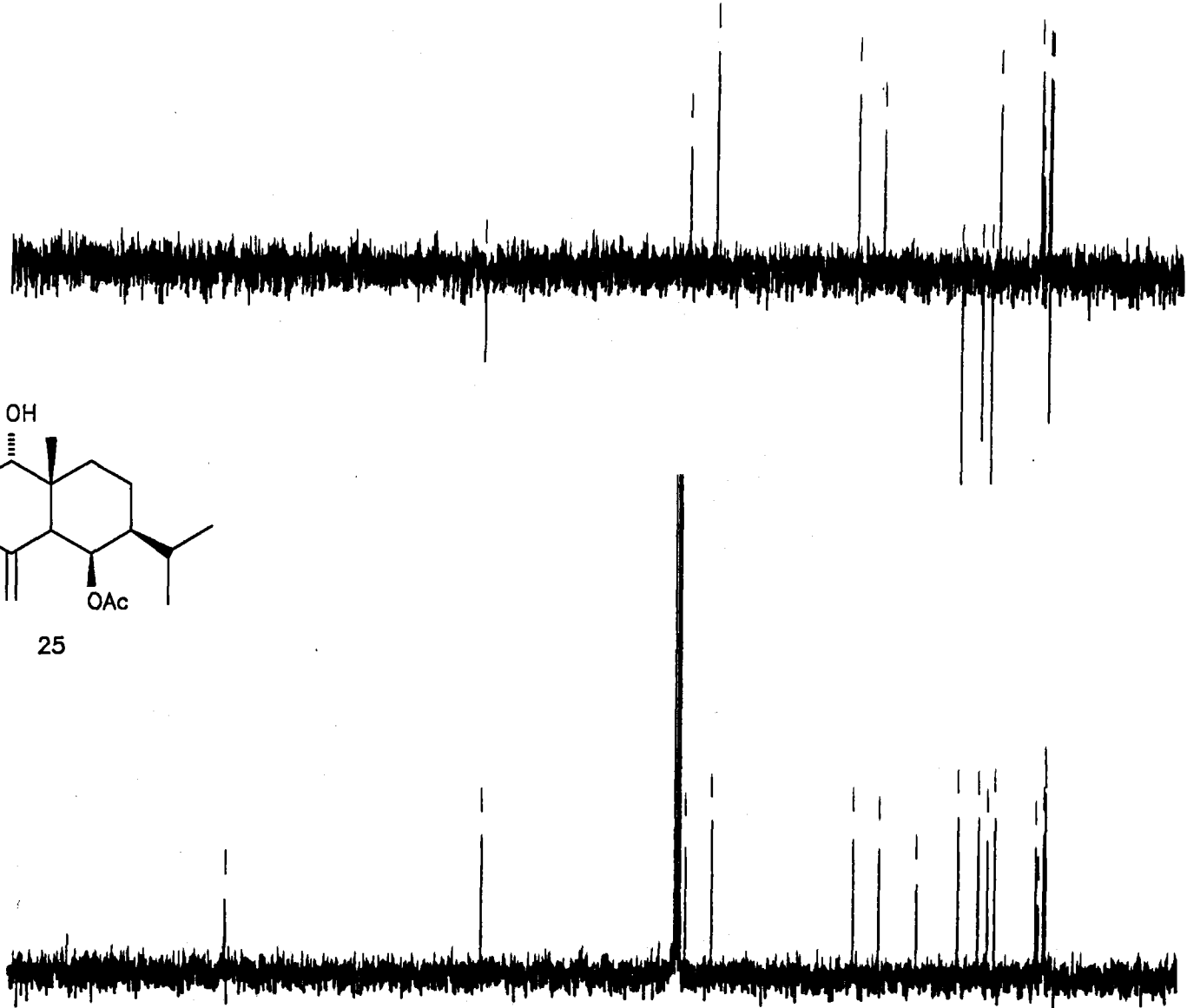
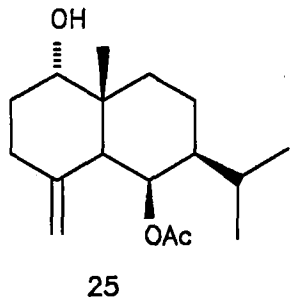
24





25





PPM

17.9.7

186.3

187.3

77.5

77.1

76.6

75.9

71.8

58.8

46.8

48.2

33.9

38.8

37.4

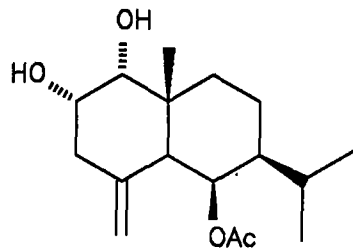
20.3

31.2

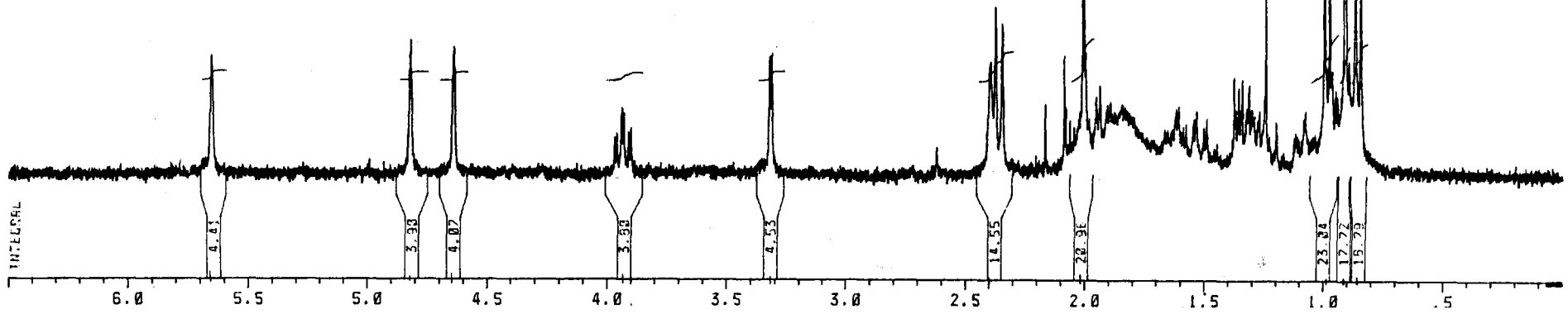
39.5

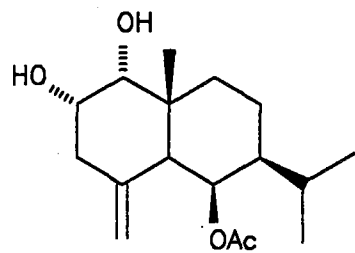
28.2

28.1



26

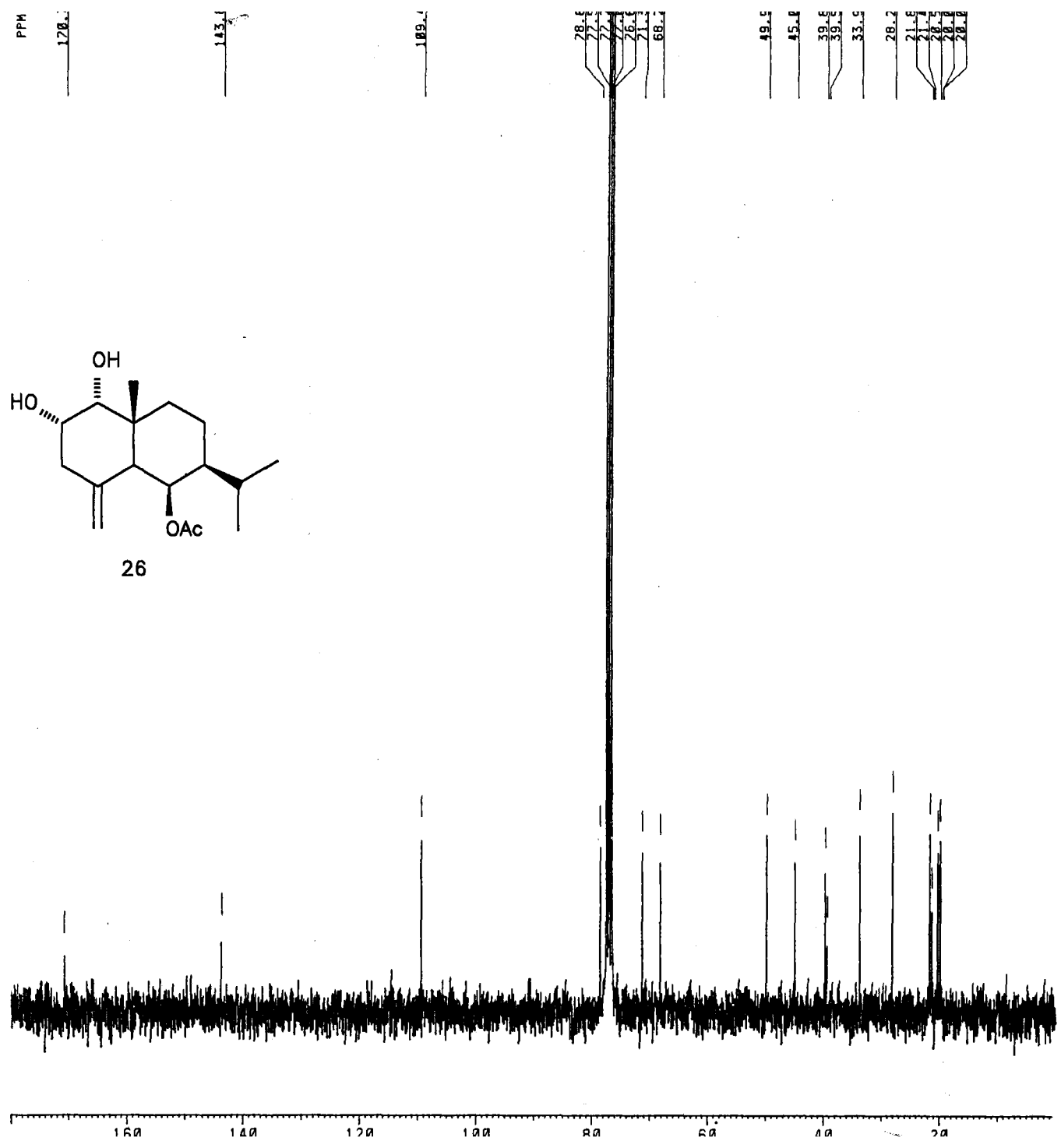
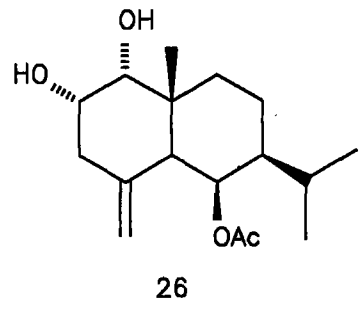


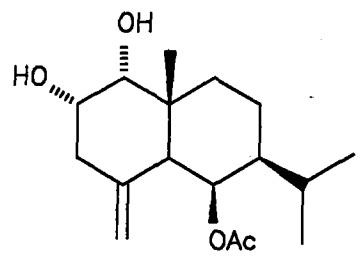


26



00777
[]
VCHWED 1000 1000

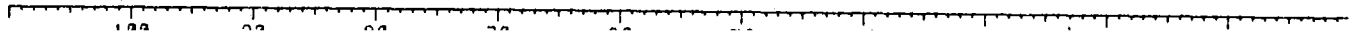


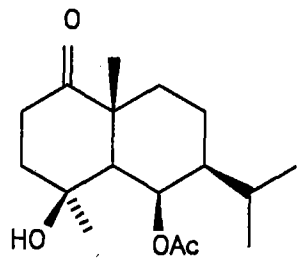


26



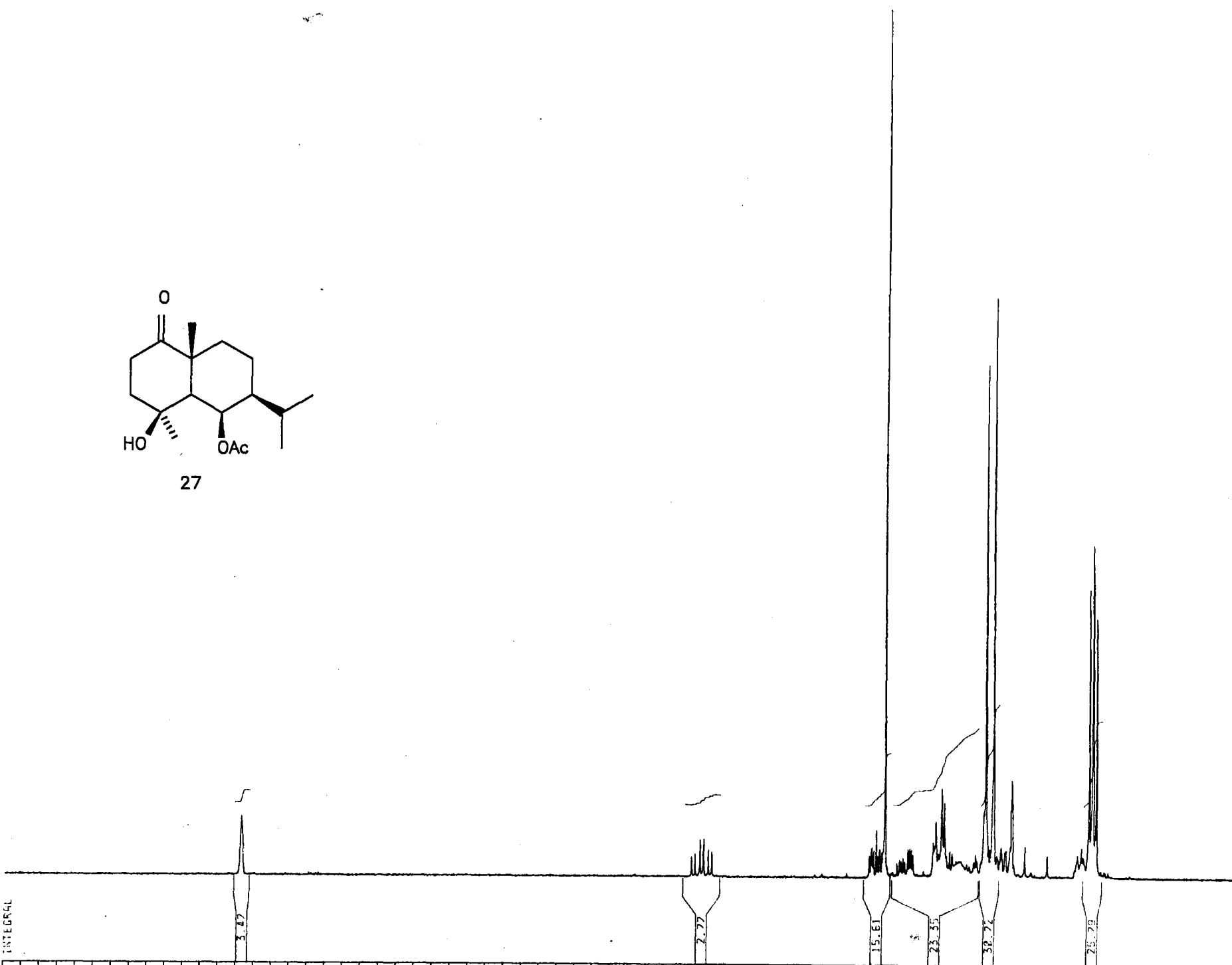
189.1	78.6	71.1	65.2	49.9	45.8	39.3	33.9	29.2	21.9	20.4	20.0	20.0
-------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

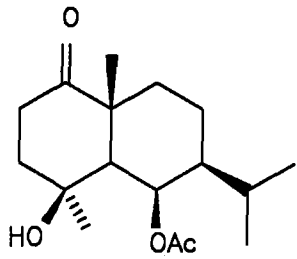




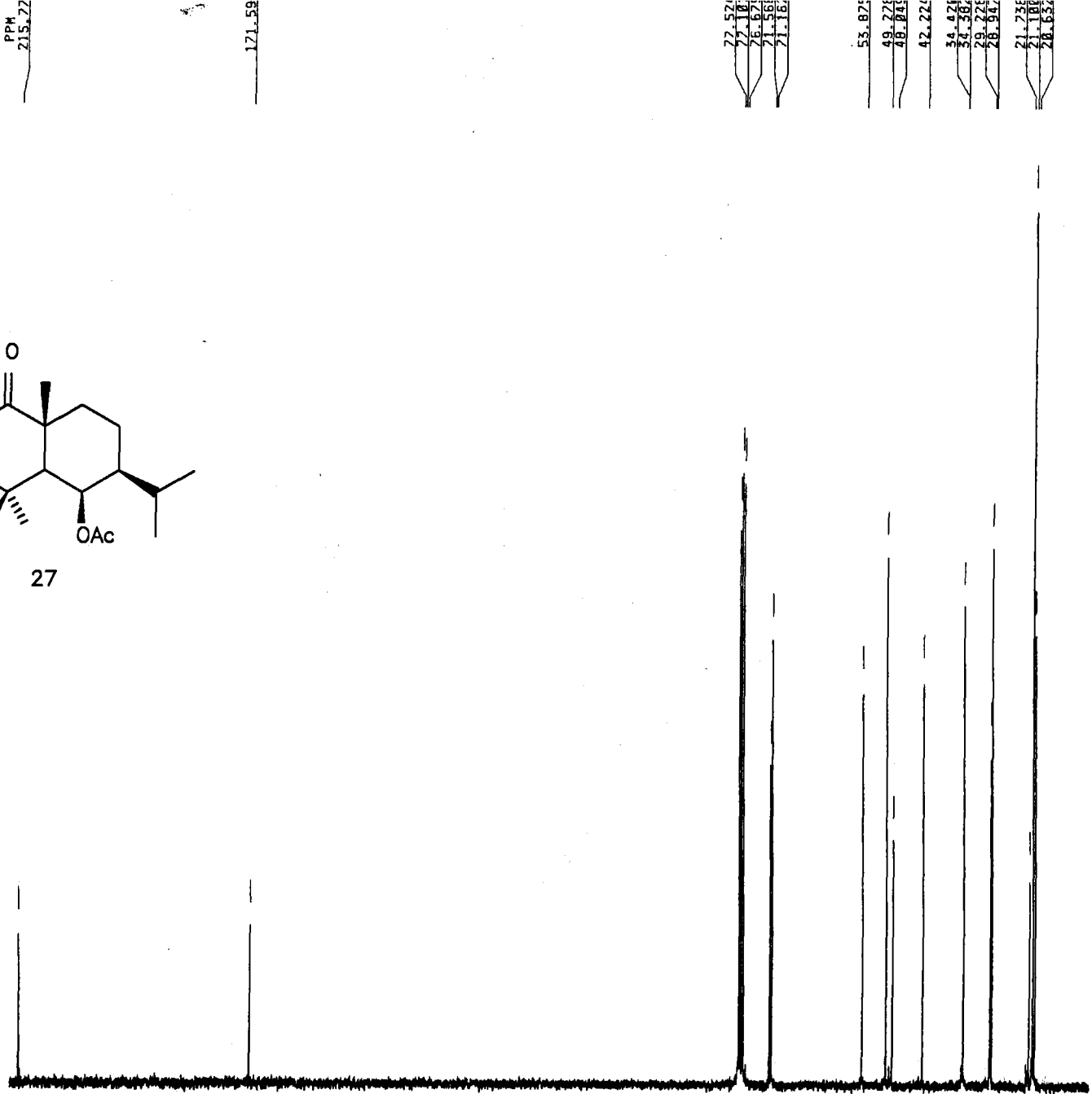
27

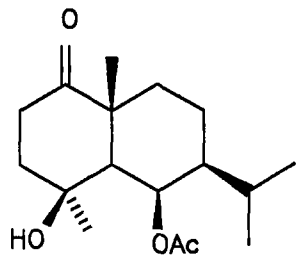
INTEGRAL





27

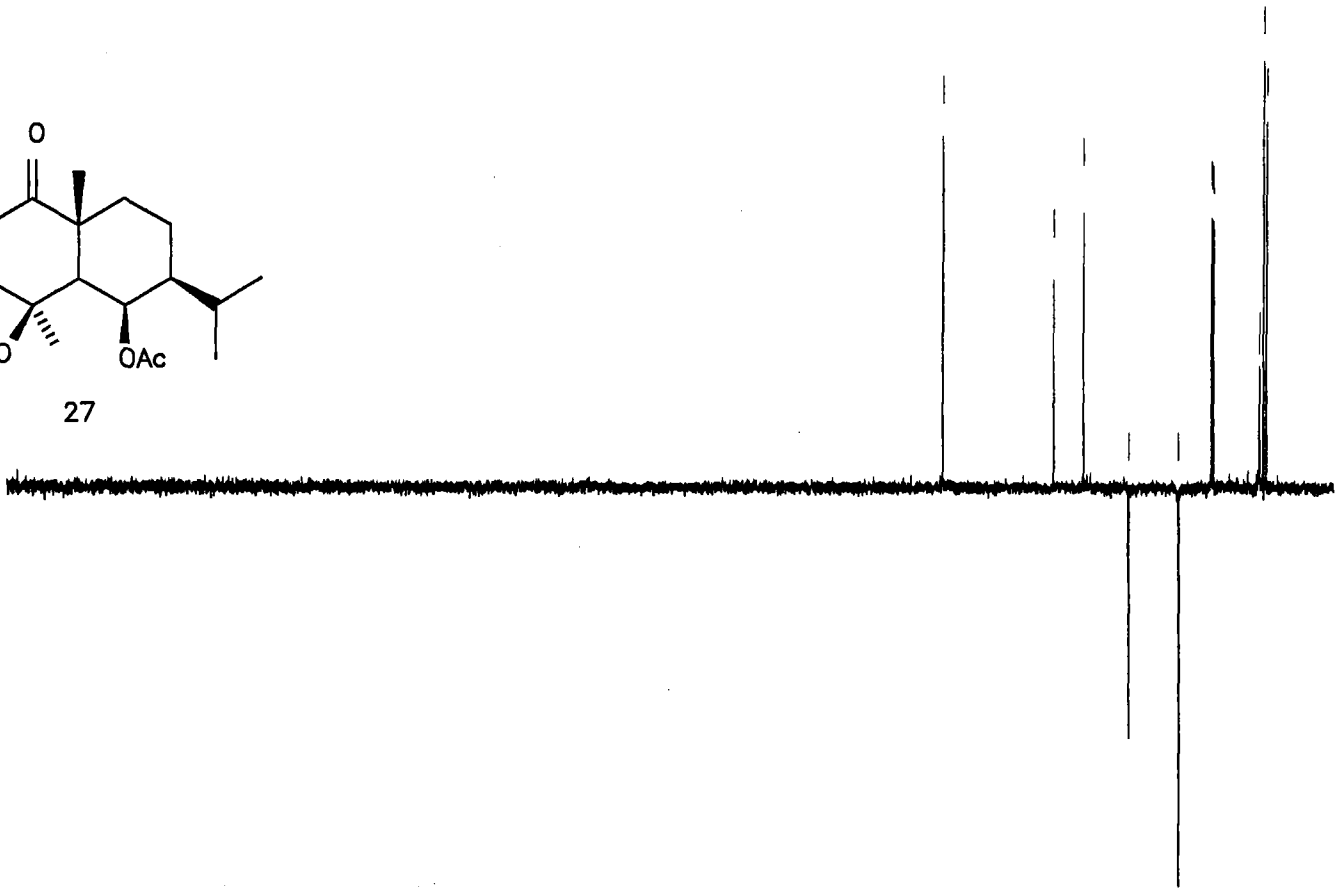




27

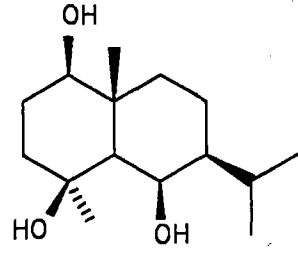
PPM

71.159E
53.8631
49.2713
42.2210
34.5803
29.7324
28.9446
21.7639
21.7178
21.1183
20.6328

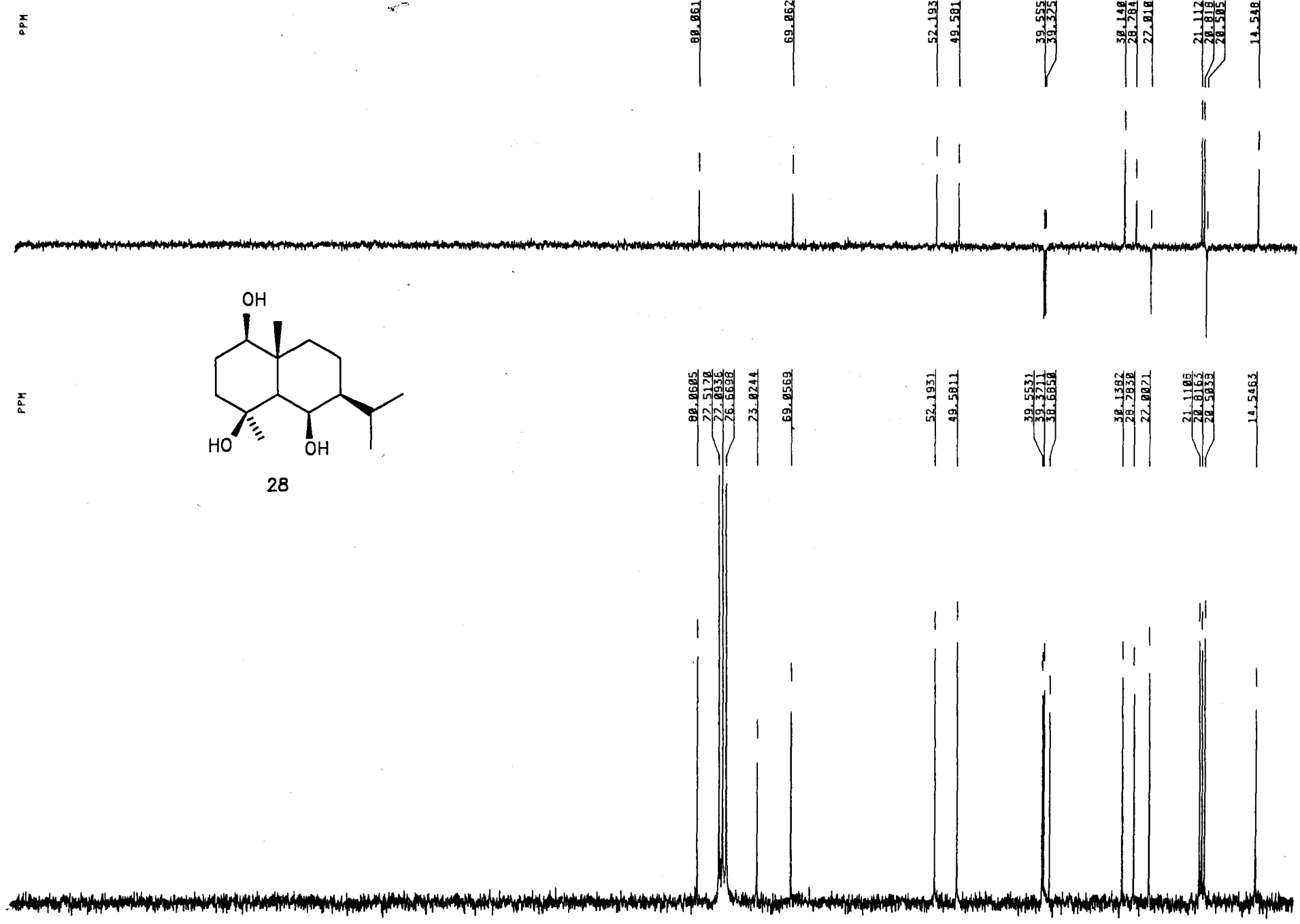


PPM

PPM

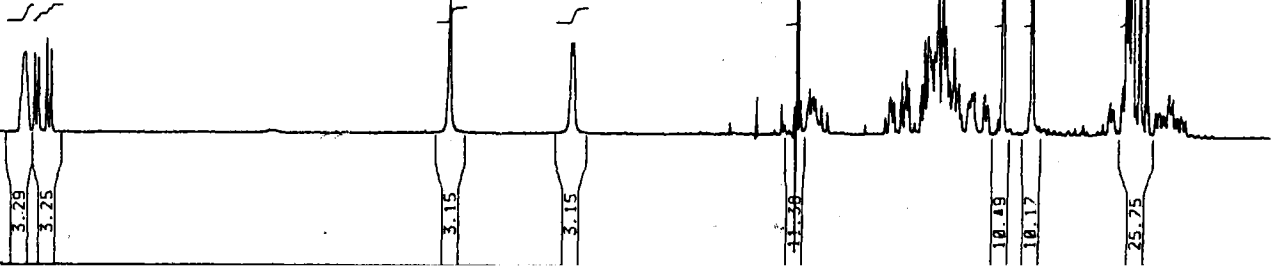
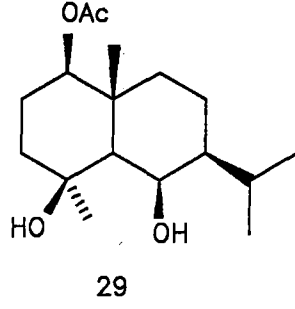


28



INTEGRAL

HERTZ

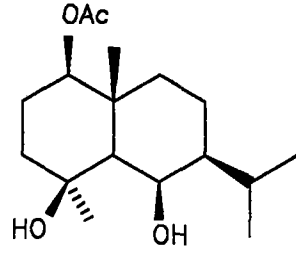


803.121

PPM

PPM

121.098



29

81.312

77.222

77.032

76.676

72.953

68.872

81.313

68.862

52.285

49.492

52.253

49.492

39.196

39.032

37.822

39.196

39.072

30.823

29.656

30.802

29.656

23.614

21.273

21.025

20.764

20.520

15.674

23.614

21.257

21.007

20.765

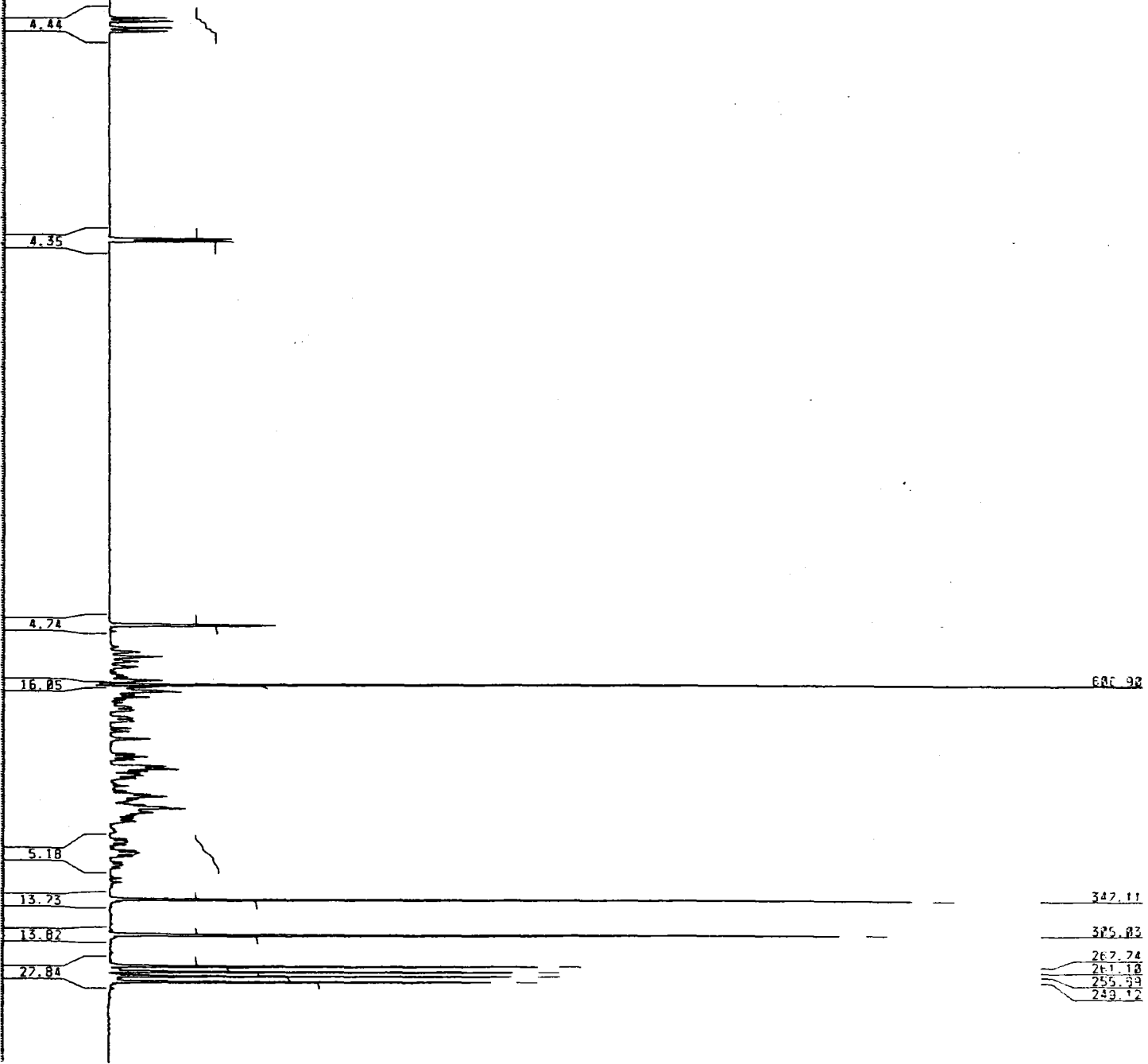
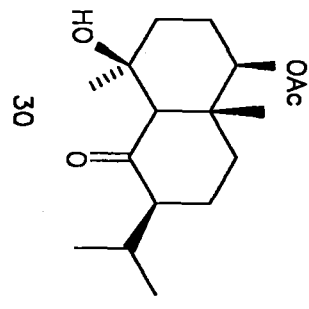
20.501

15.625

INTEGRAL

HERTZ

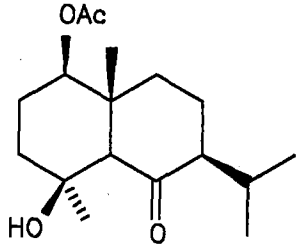
CHEMICAL
STRUCTURE
VDVWVCD 81-10000000



PPM
216.005

PPM

170.804



30

79.668

77.523

77.097

76.676

79.668

69.525

62.243

57.942

45.474

37.043

37.451

29.943

28.605

28.068

23.151

21.469

21.541

18.674

14.018

79.668

62.243

57.942

37.043

37.451

29.942

28.605

28.068

23.151

21.469

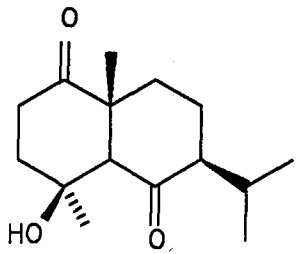
21.541

18.674

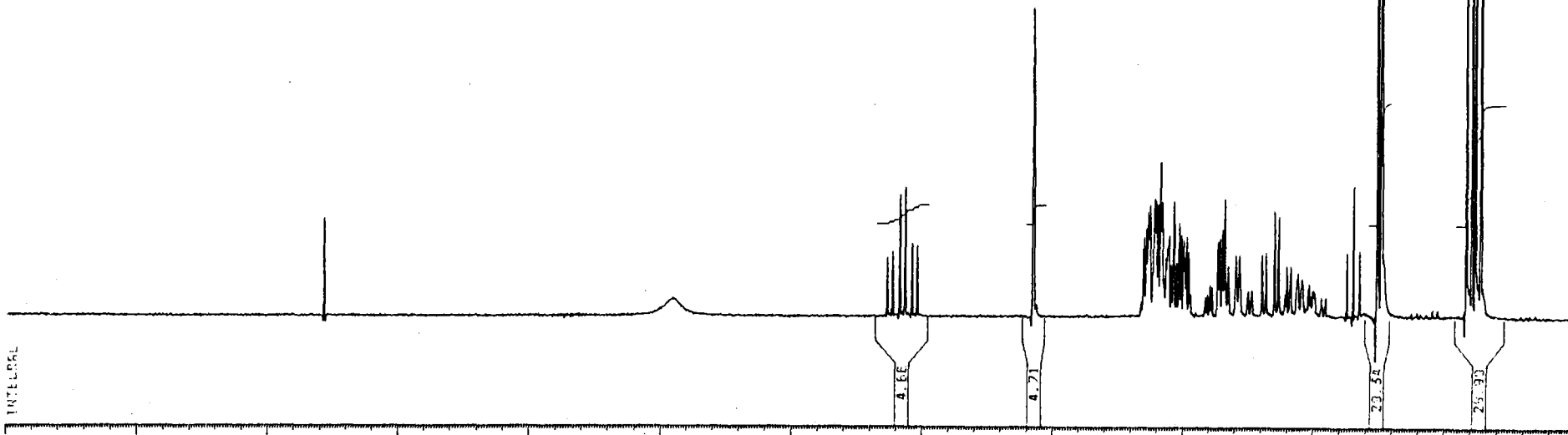
14.016

INTEGRAL

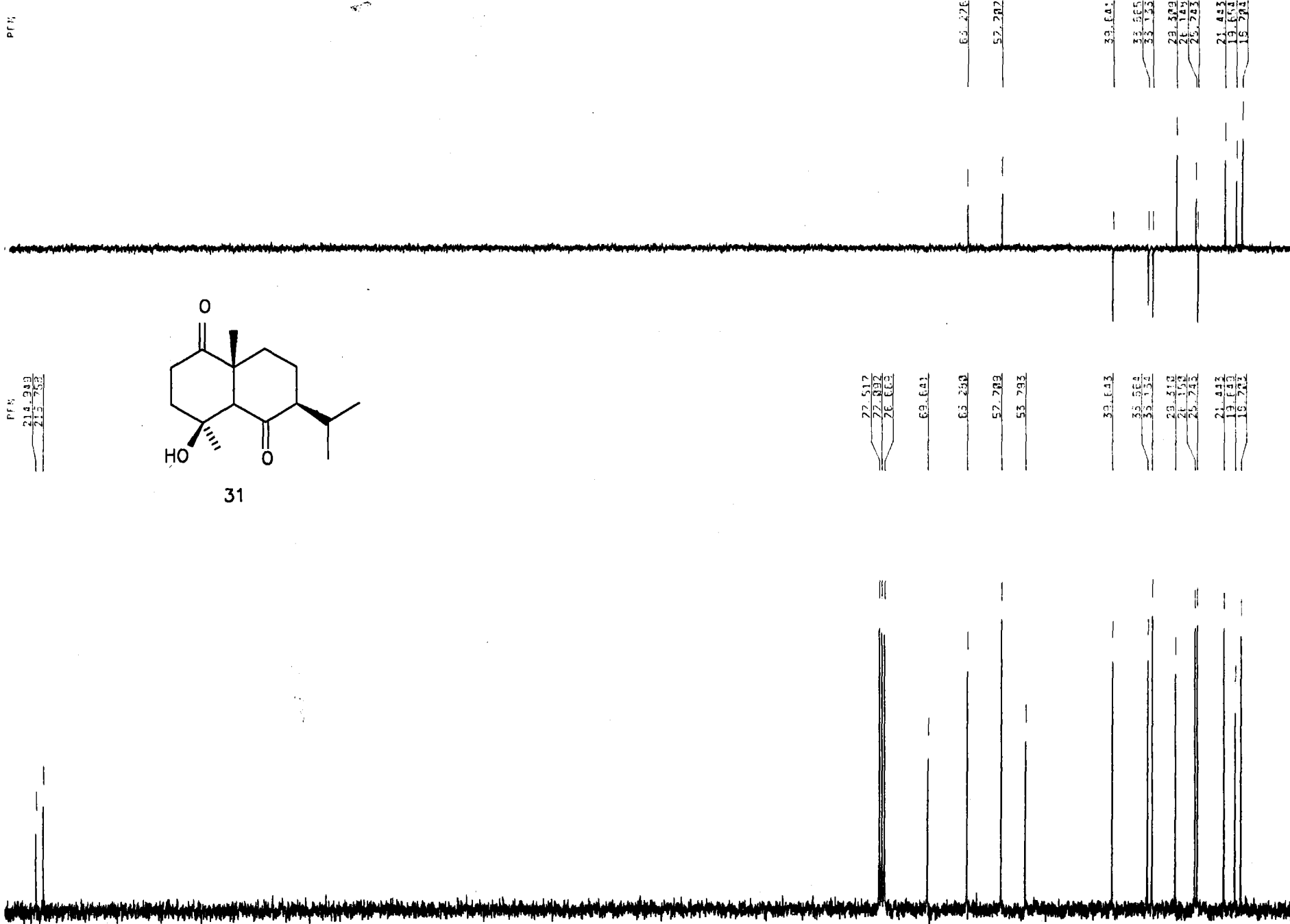
HERTZ



31



210 200 100 120 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20



PPM

INTEGRAL

INTEGRAL

6.00

5.50

5.00

4.50

4.00

3.50

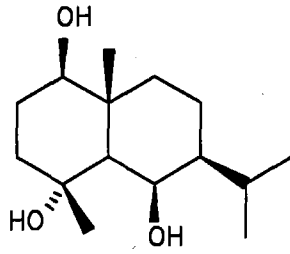
3.00

2.50

2.00

1.50

1.00



32

7.76

8.99

10.26

31.10

23.92

11.85

51.19

6.53

11.61

4.45-5.8

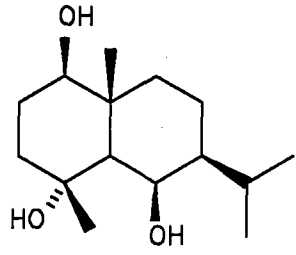
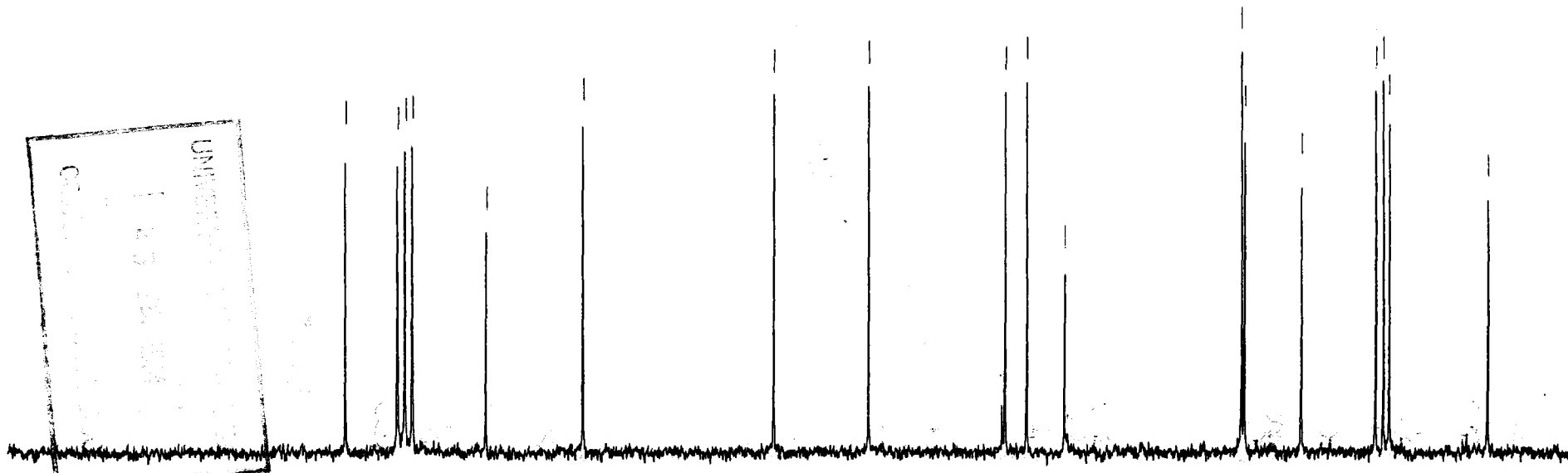
3.43-5.23

2.56-3.2

2.53-4.9

2.24-3.7

95 90 85 80 75 70 65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15



32

PPM

PPM

80.5382

77.5122
77.0377
76.6633

72.4128

66.8437

55.8518

50.3942

42.5889
41.2866

39.8324

26.9848
26.7273

25.4132

21.1515
20.6311
20.5174

14.1324

80.526

66.833

55.843

50.392

42.595
41.256

26.984
26.727
26.725

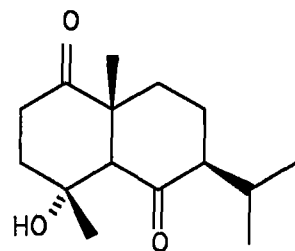
25.417

21.131
20.633
20.513

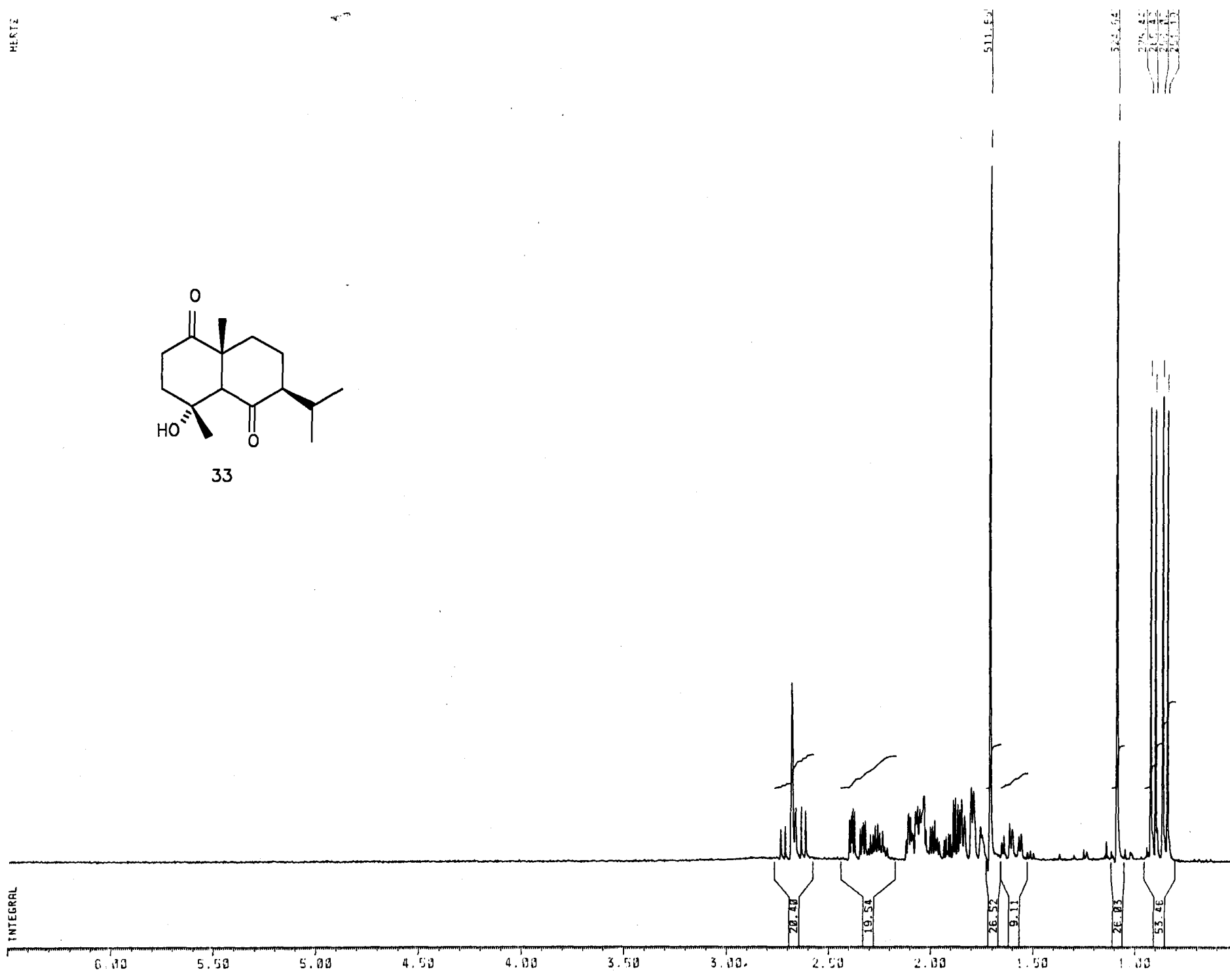
14.134

HERTZ

43

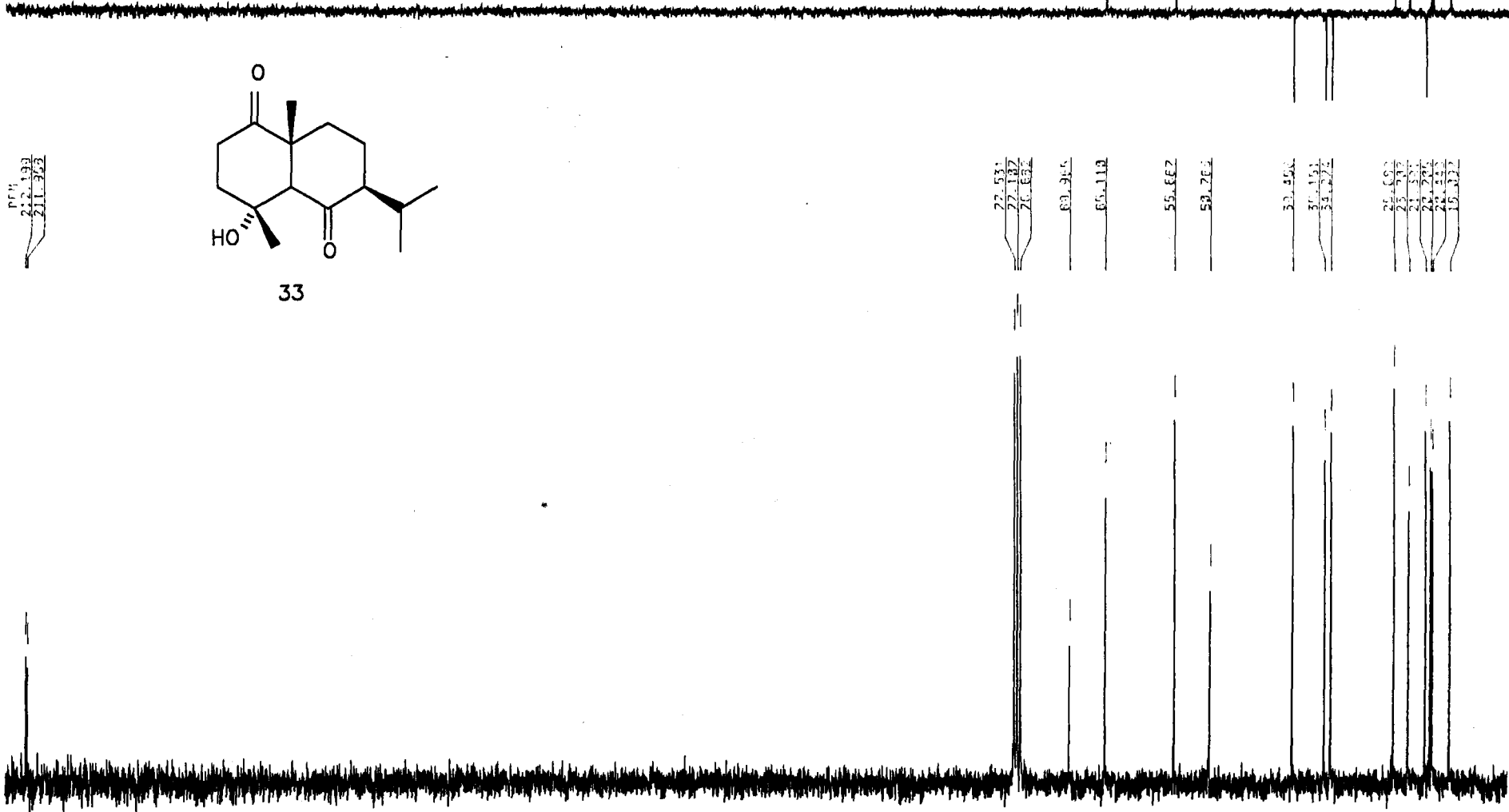


33

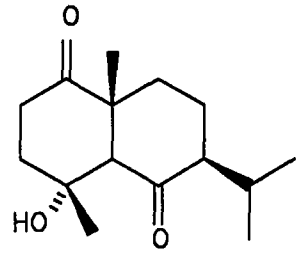


PPM

210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20



211.363
207.193
202.193



33

77.531
77.327
76.632

69.345

65.113

55.462

53.762

33.454

31.154

31.275

25.432

23.987

21.331

20.787

19.411

15.322

65.184

55.464

33.454

31.154

31.275

25.432

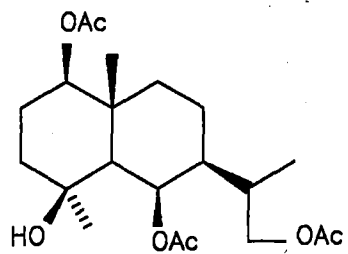
23.987

21.331

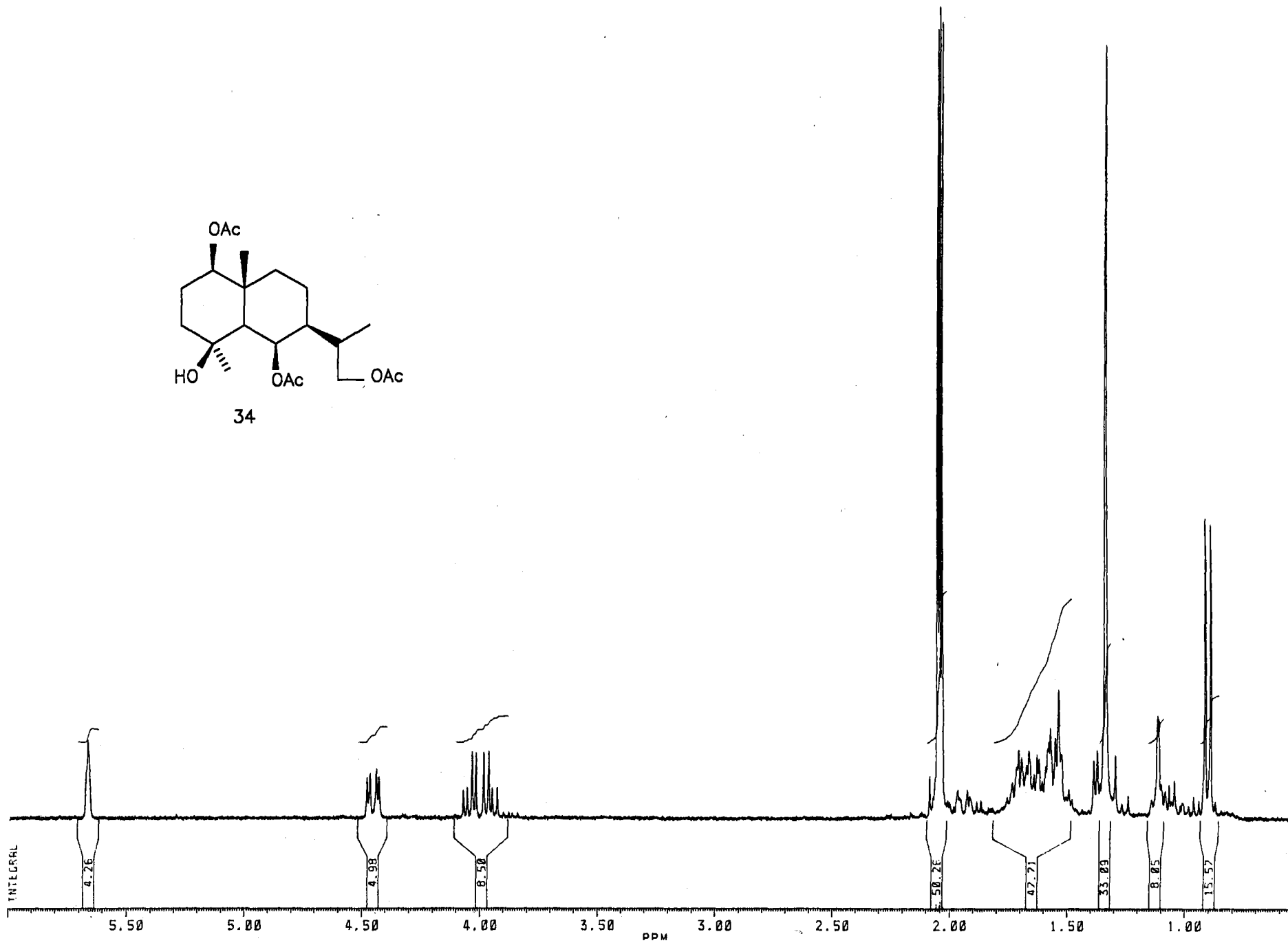
20.787

19.411

15.322



34



PPM
178
176

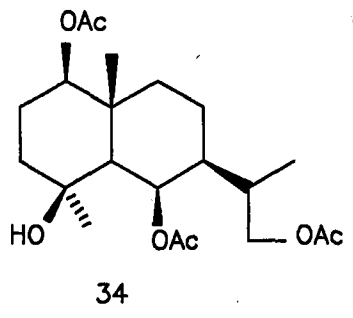
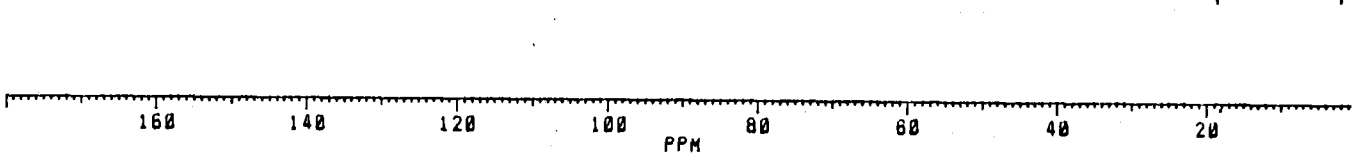
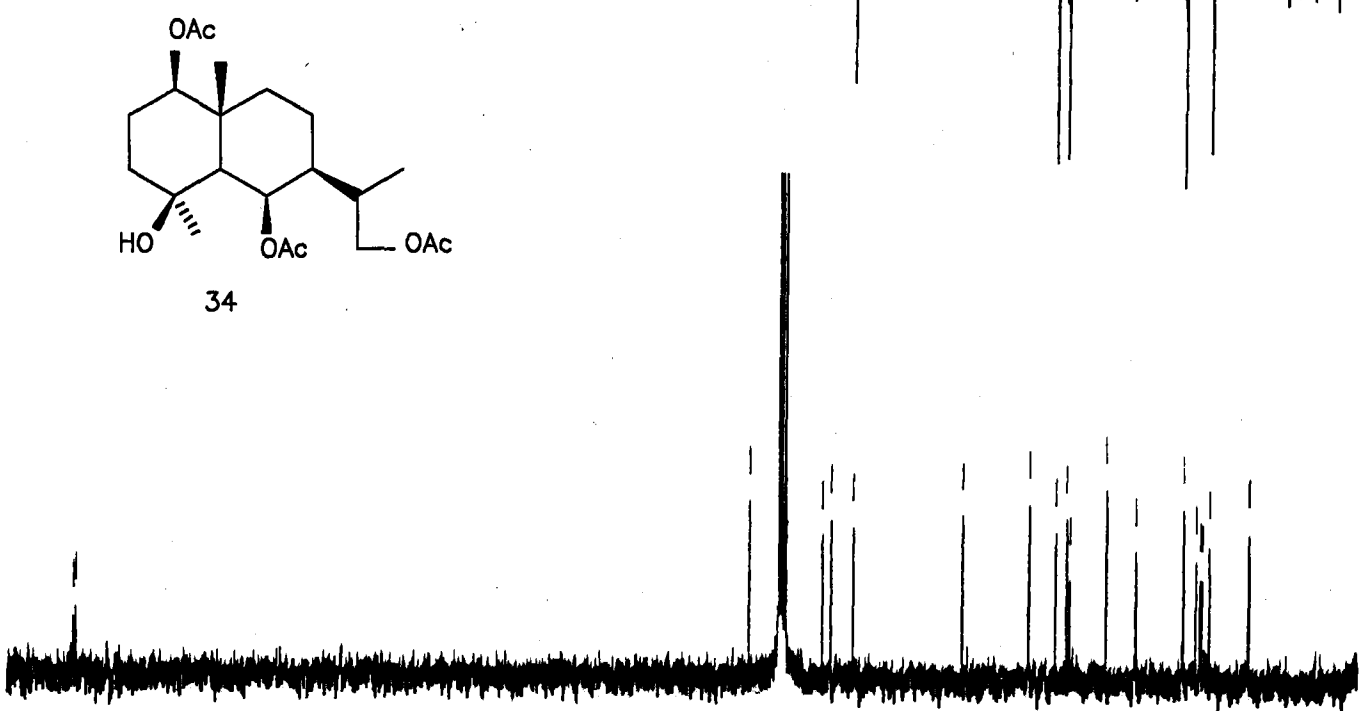
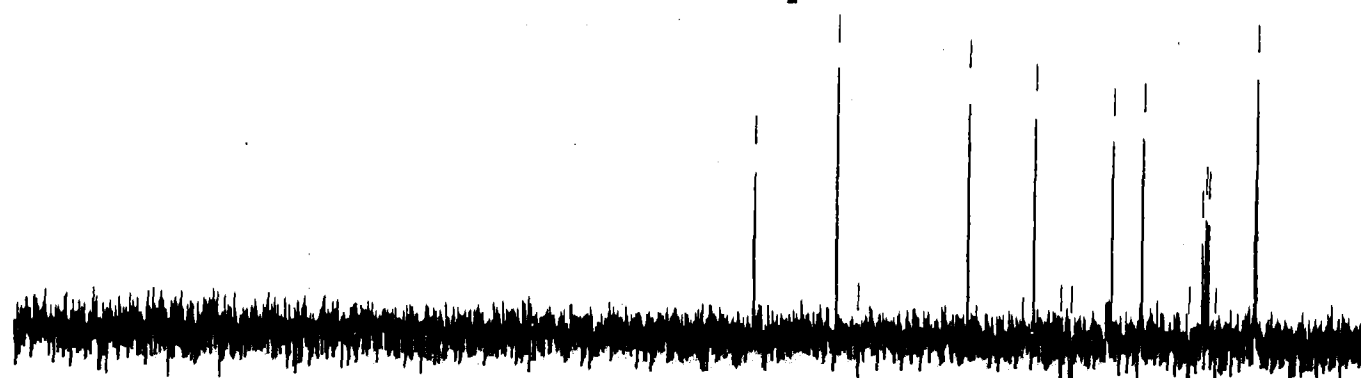
81.7
77.7
76.6
74.1
69.1

53.1

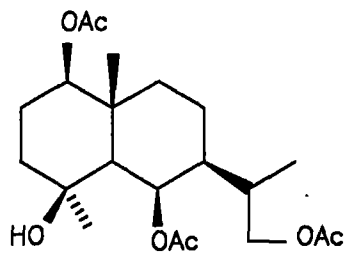
48.7
48.5
39.1
38.7
33.5

29.5

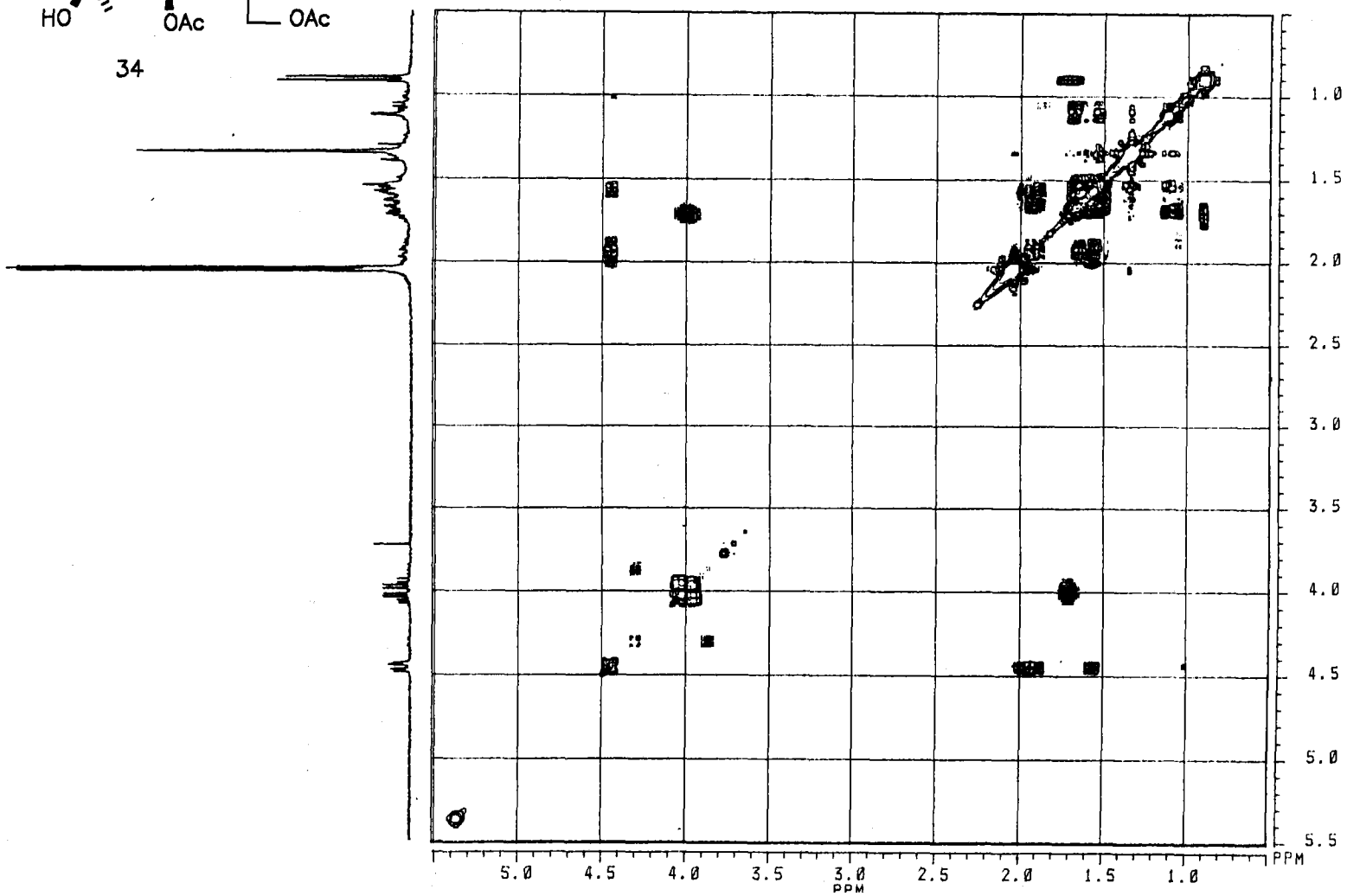
23.7
21.8
21.5
20.8
14.1

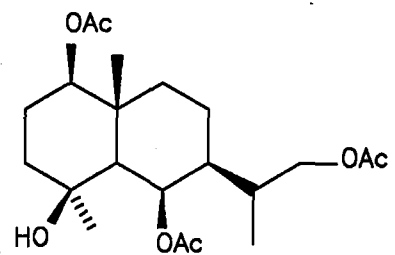


160 140 120 100 80 60 40 20 PPM

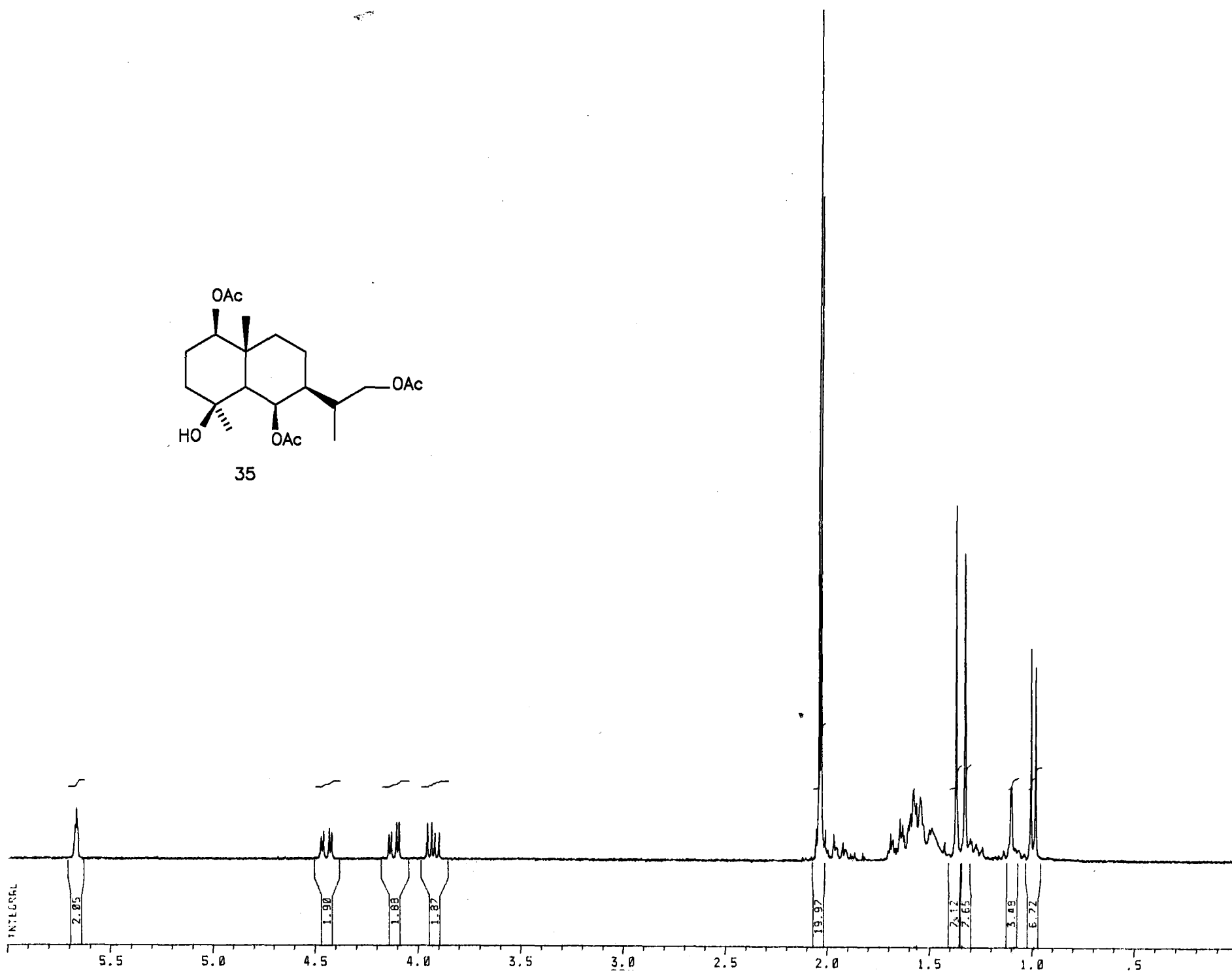


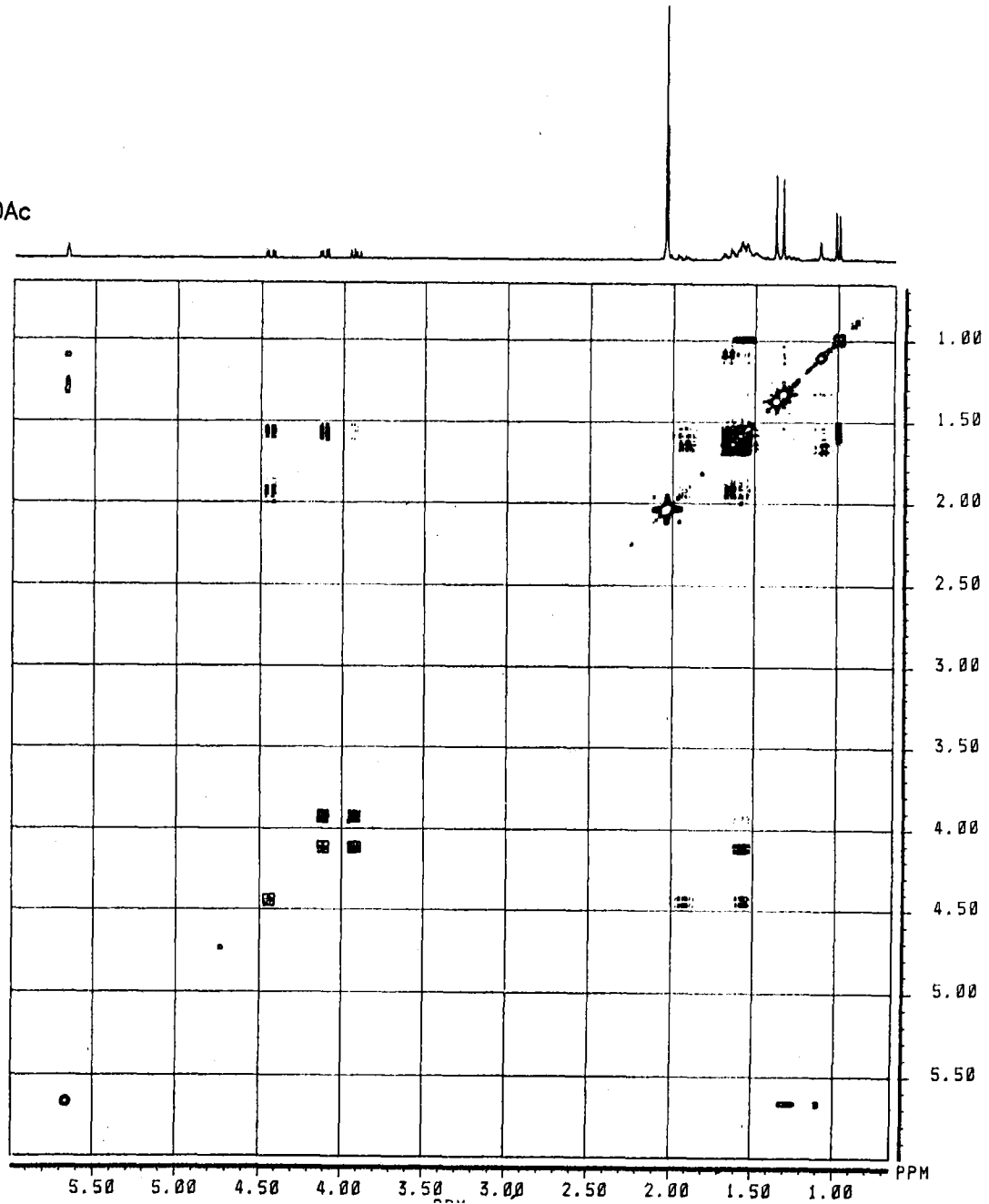
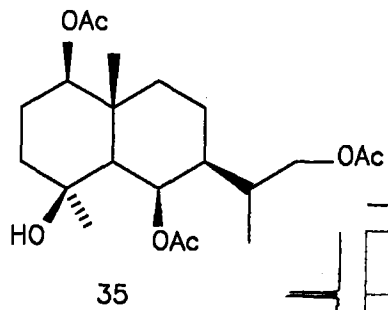
34



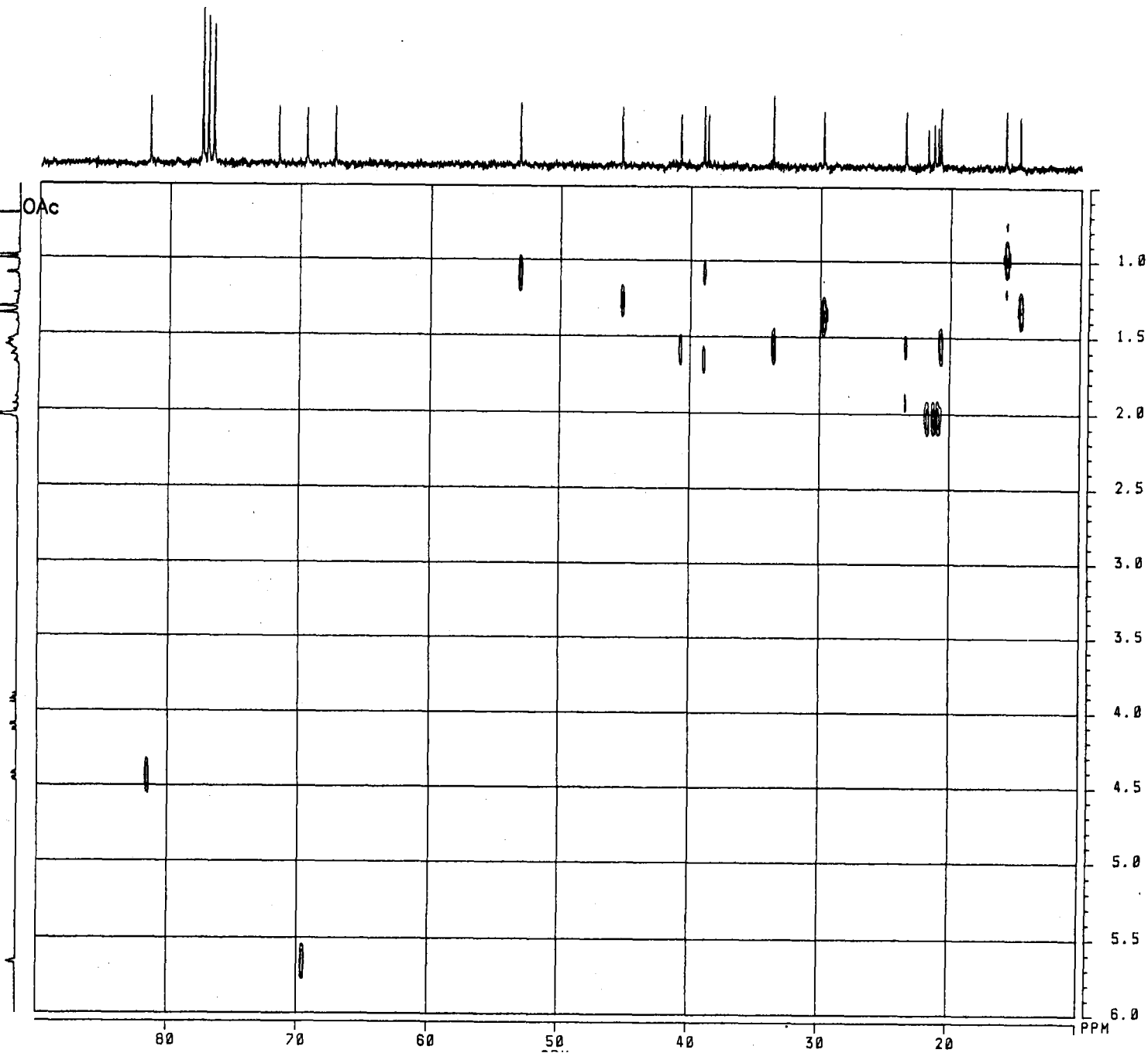
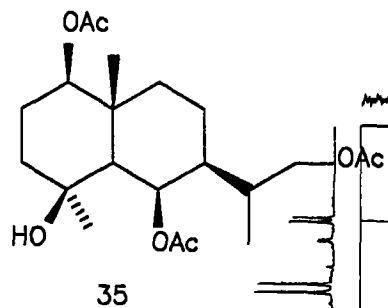


35



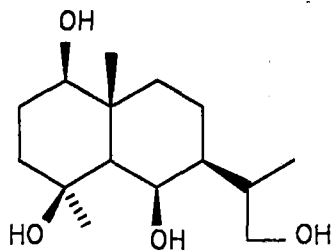


UNIVERSITÄT
 WÜRZBURG
 INSTITUT FÜR
 ORGANISCHE CHEMIE

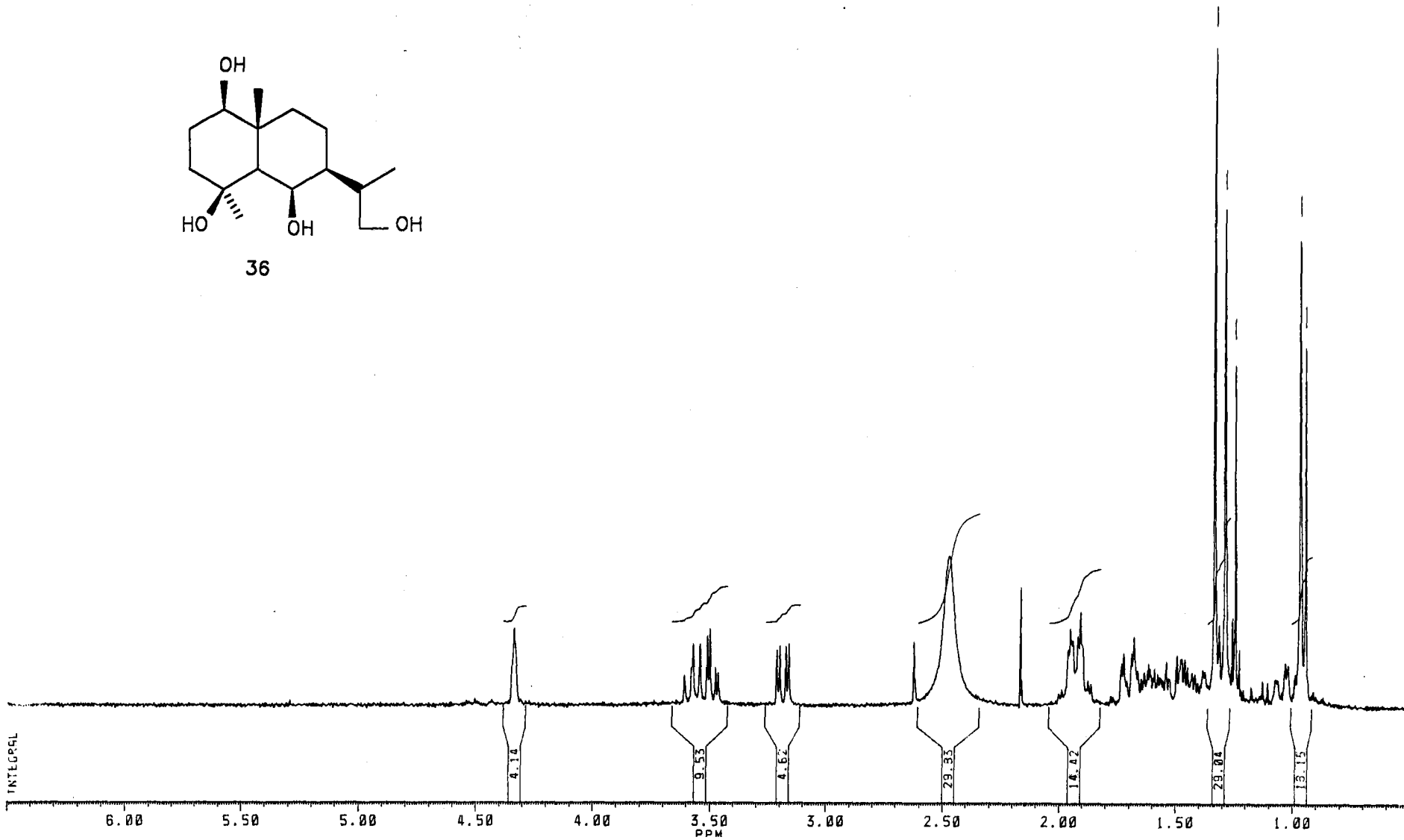


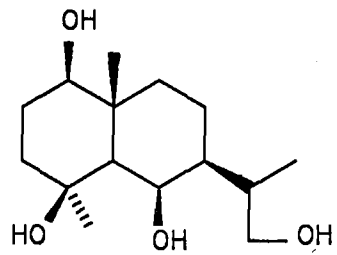
PPM

3.348
2.688
1.7111
9.683
9.443

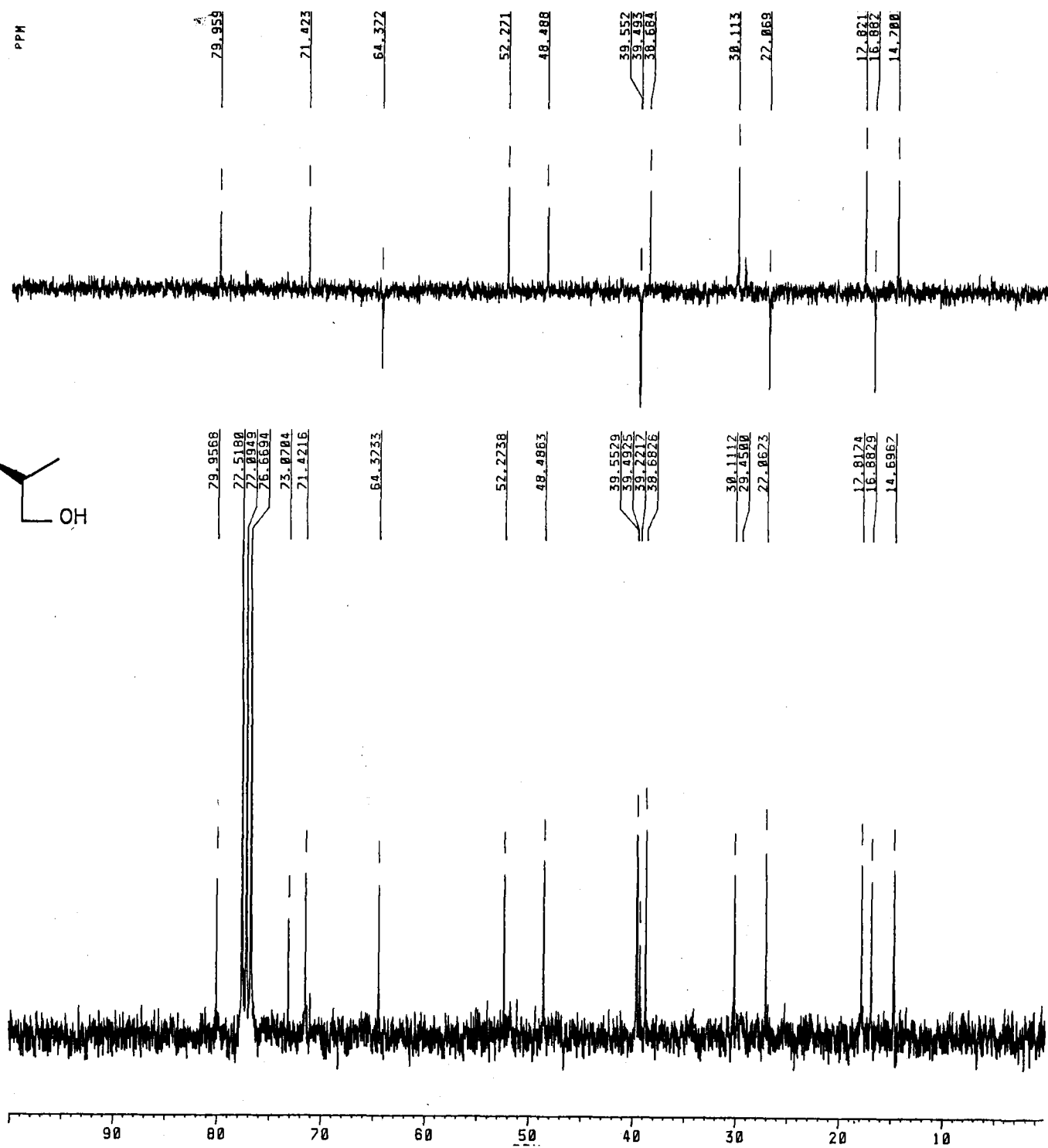


36

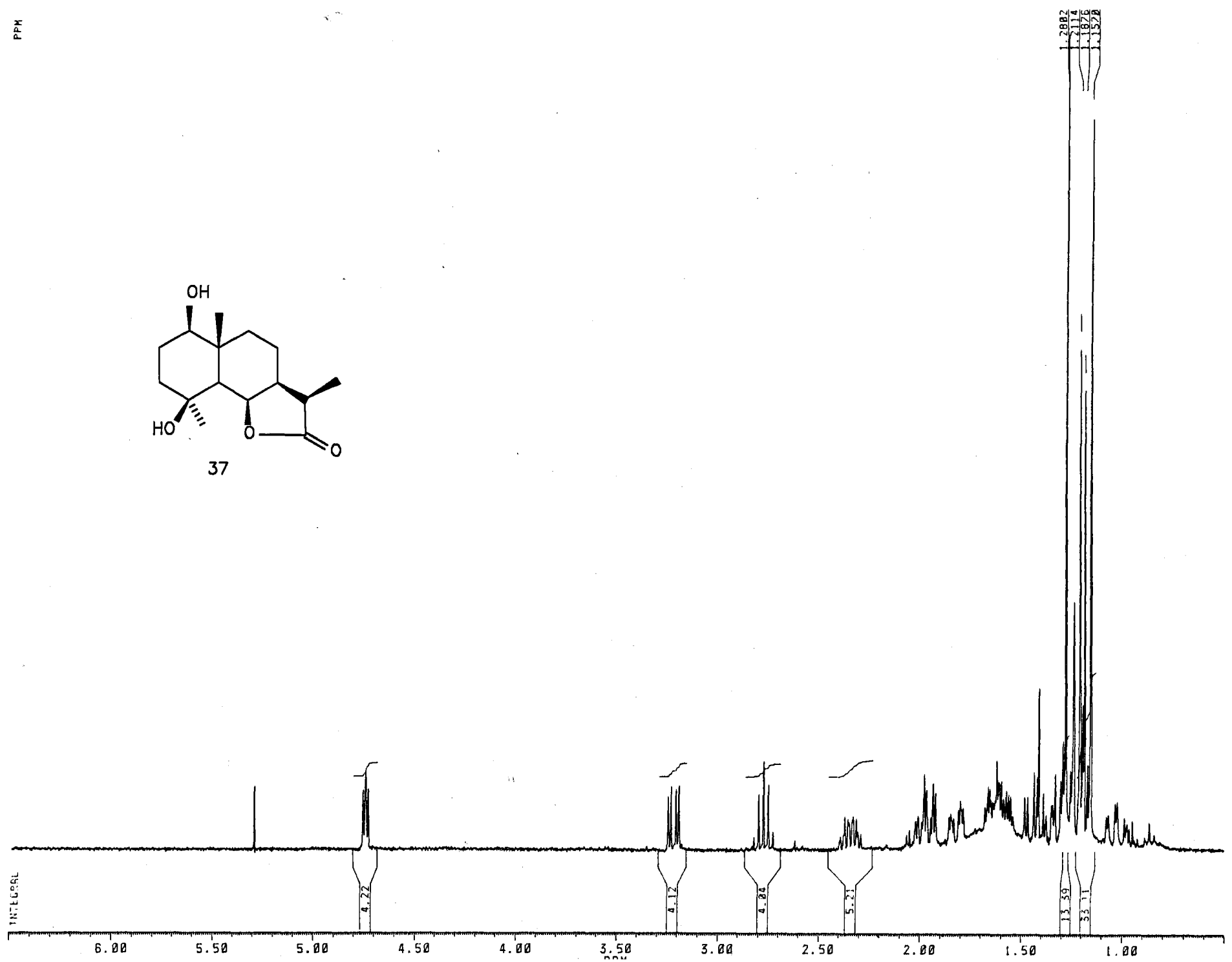
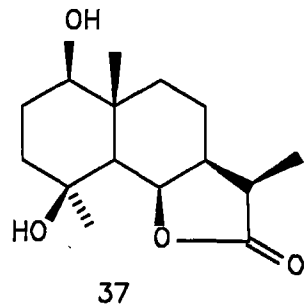




36

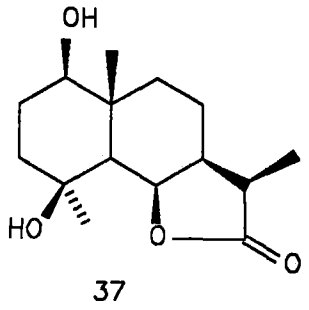


PPM



180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10

PPM
178.664



79.413
77.854
77.529
77.309
77.184
76.682
71.192

79.414
77.859

50.286

50.284

40.546
40.176
38.639
38.230
36.585

40.547
40.177
38.639
36.583

29.287
29.629
27.286

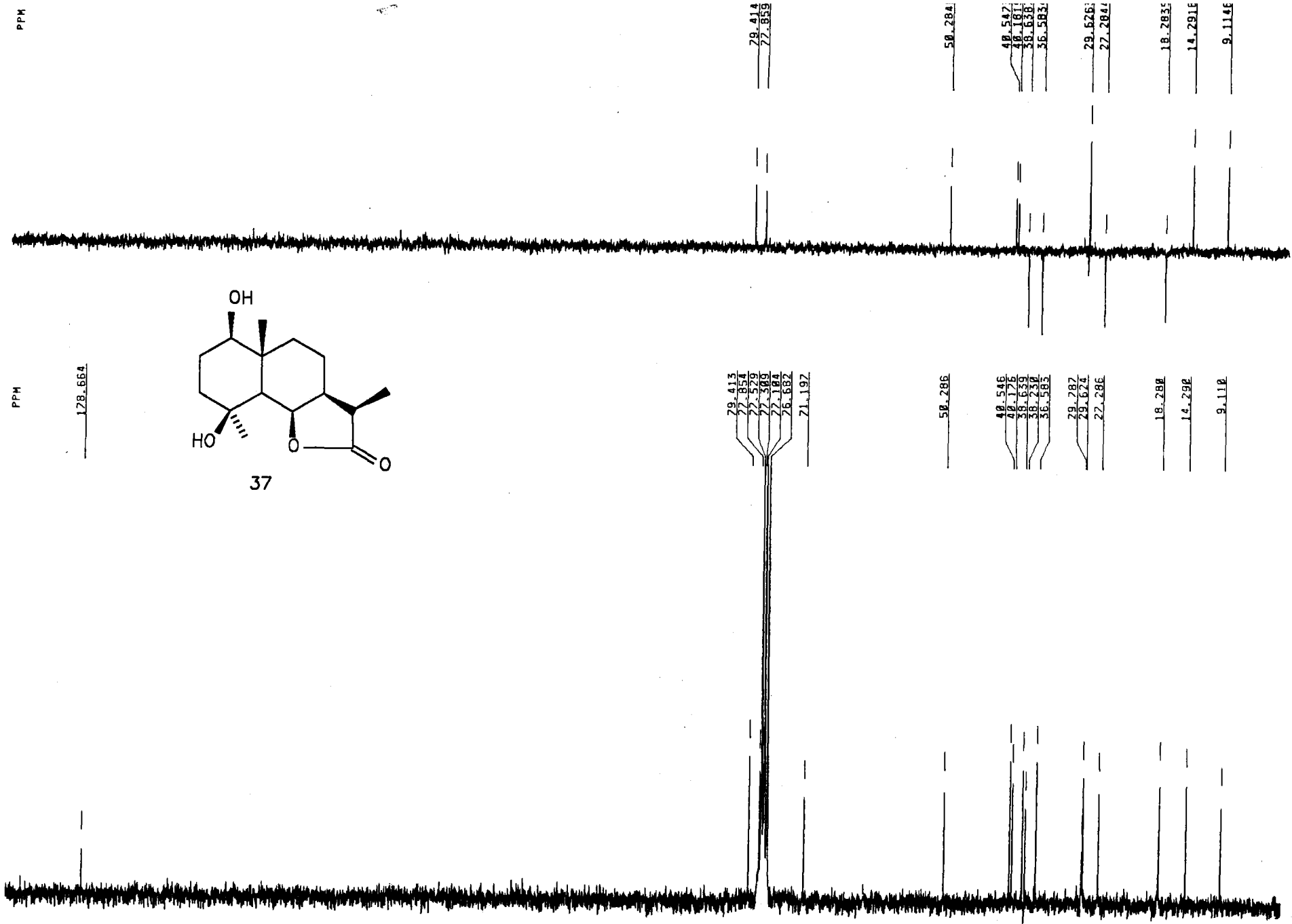
29.626
27.281

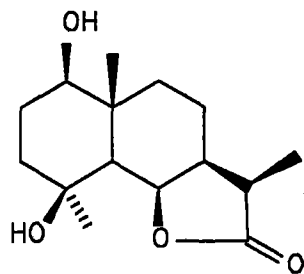
18.280
14.290

18.283
14.291

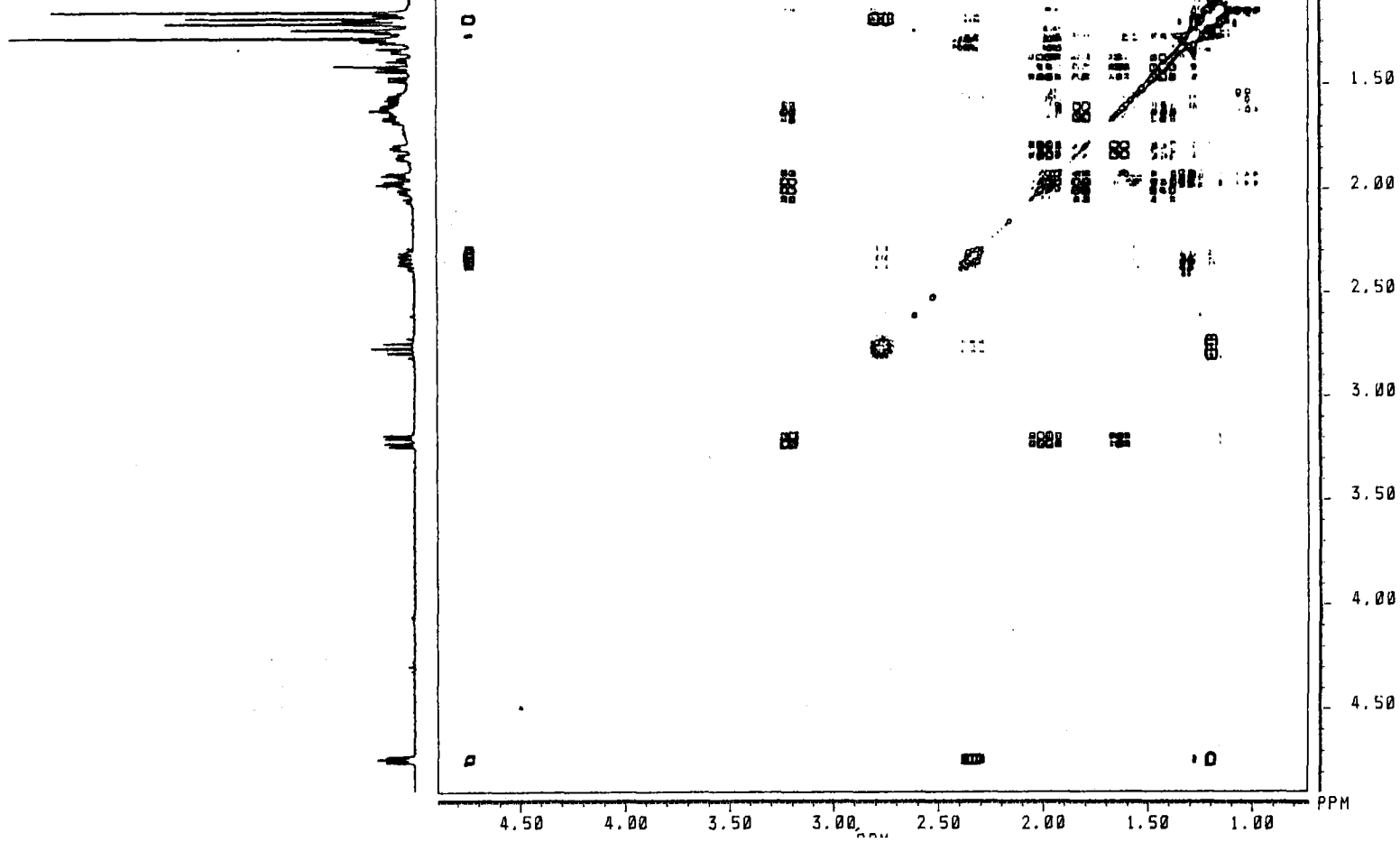
9.110

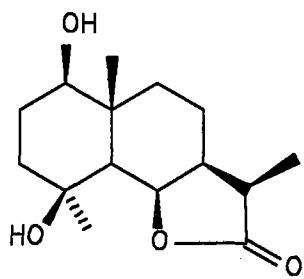
9.114



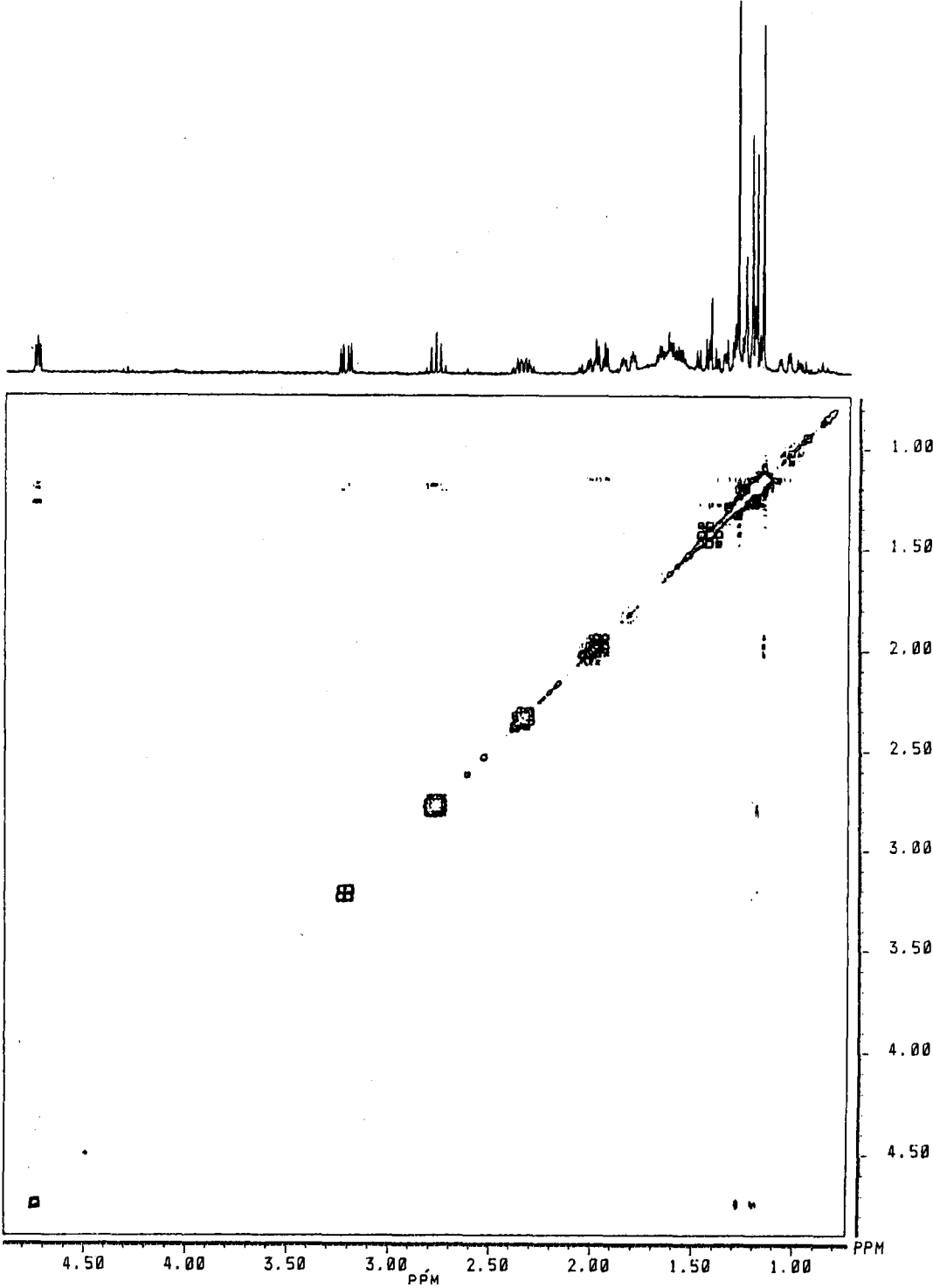
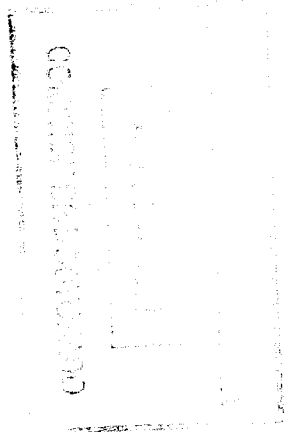


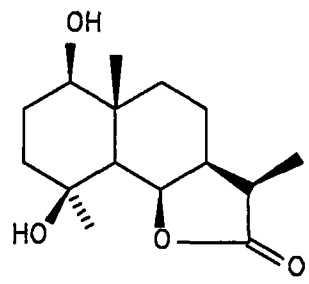
37



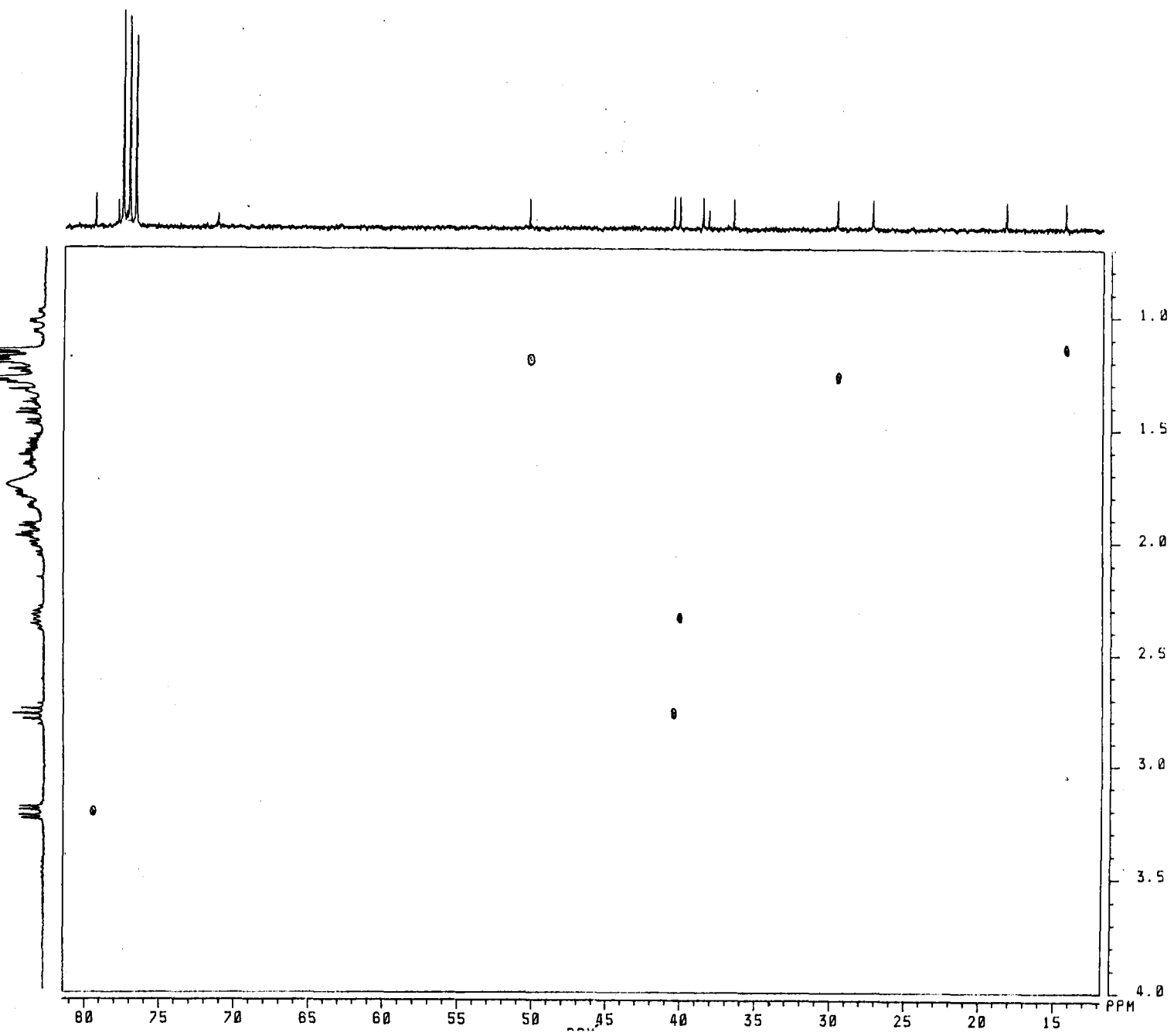


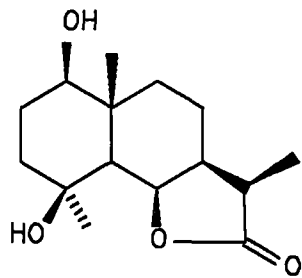
37



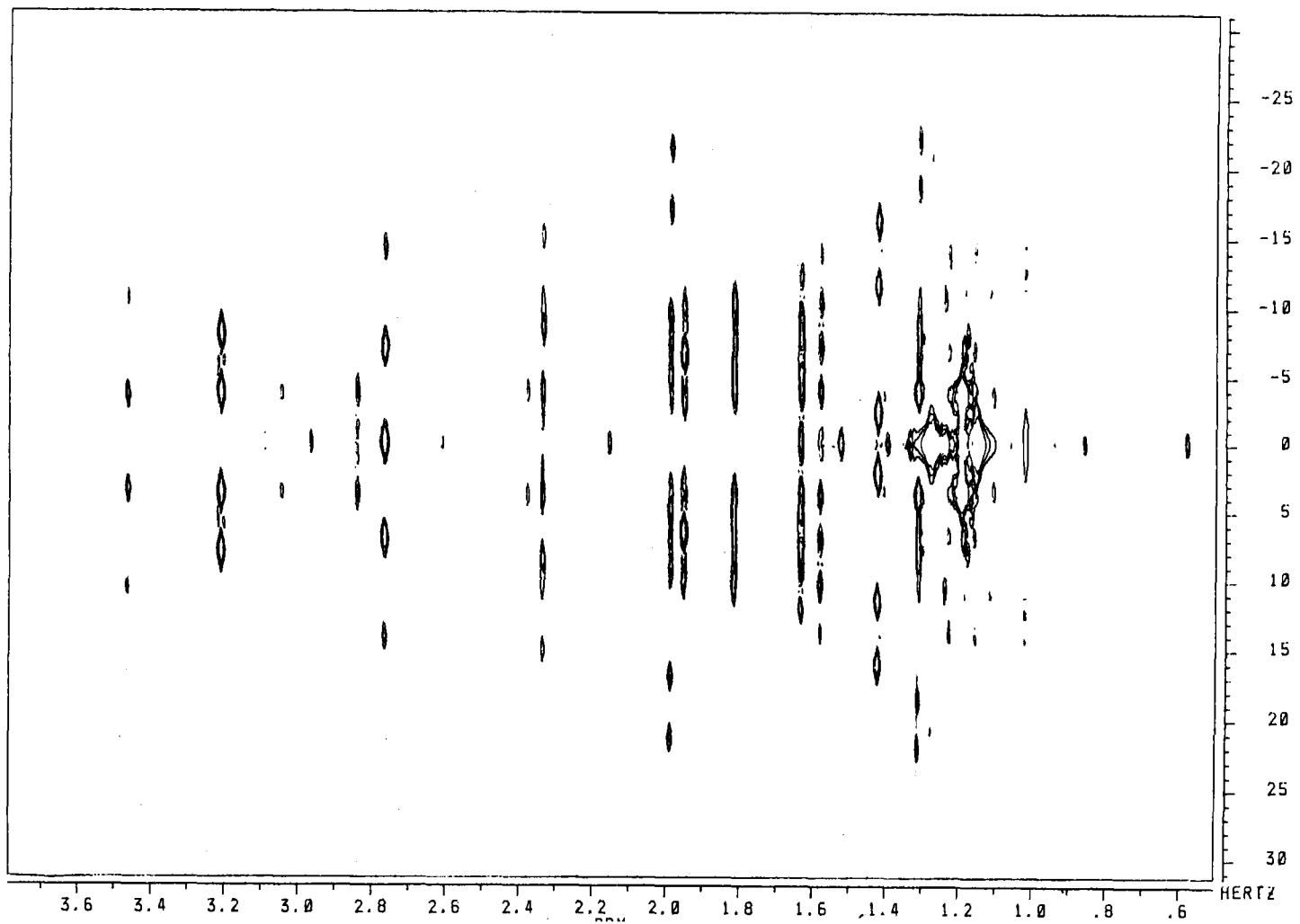


37



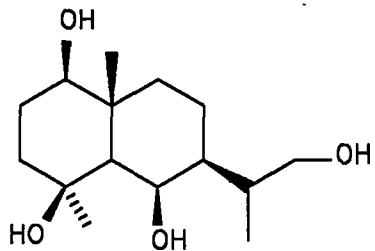
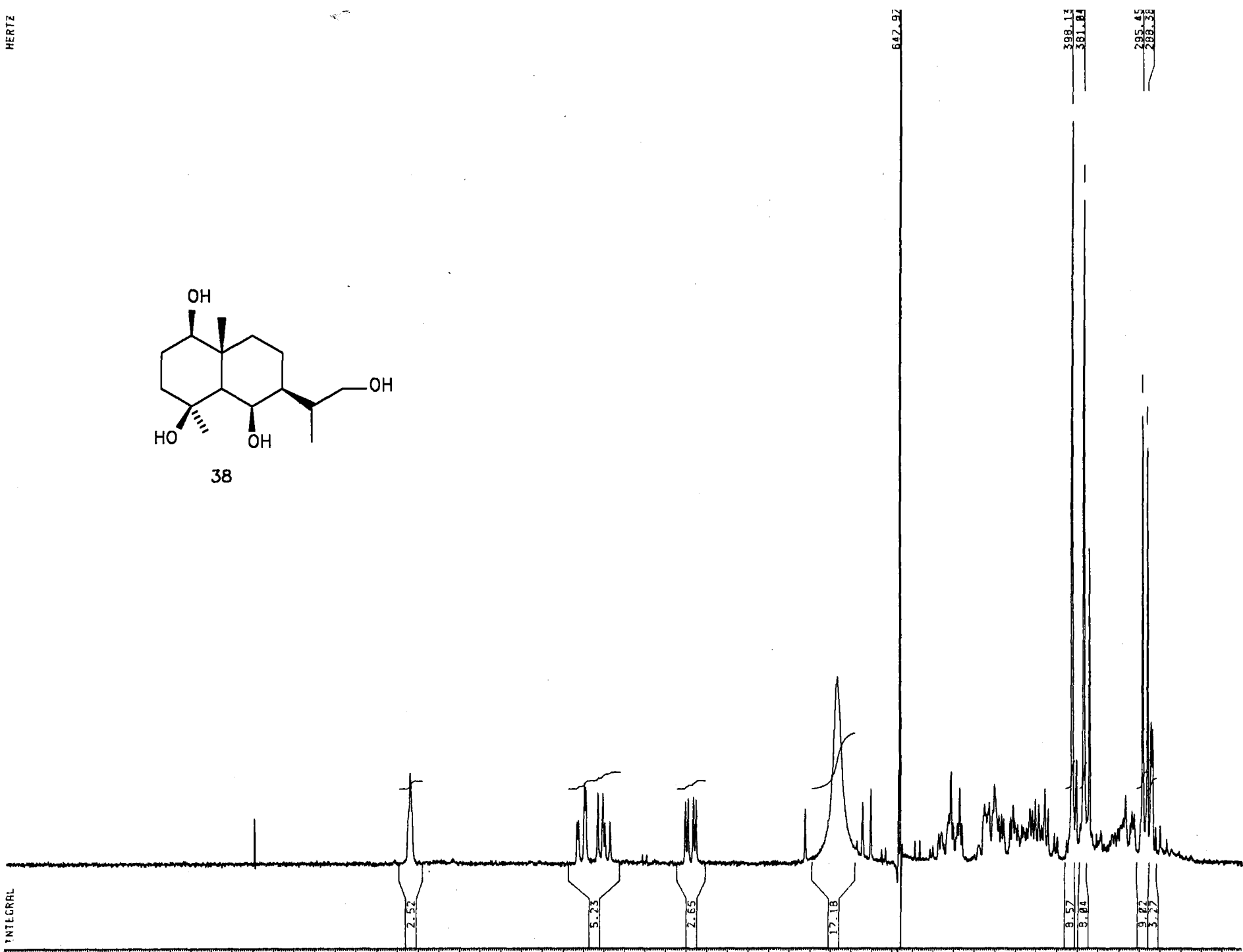


37

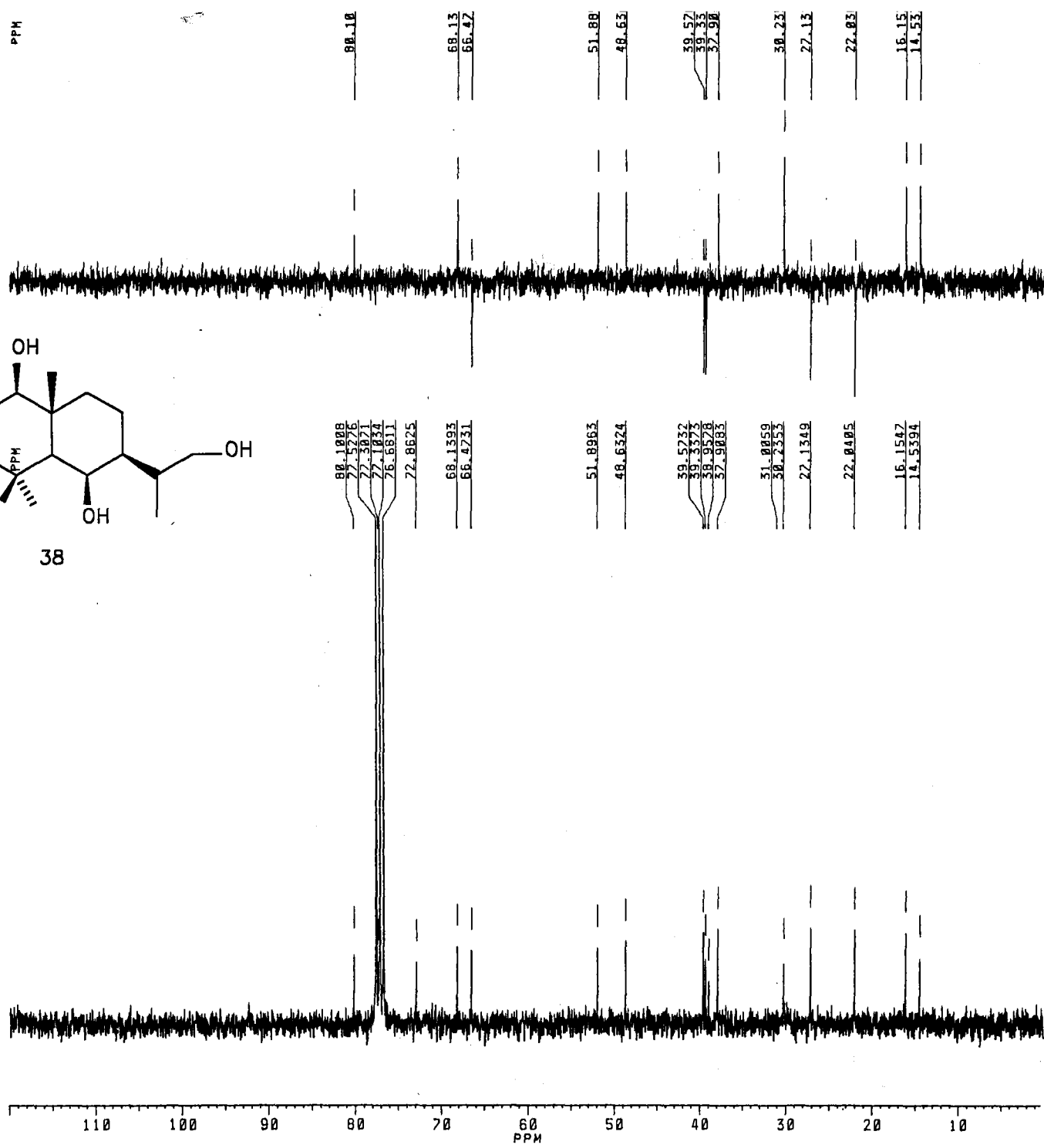
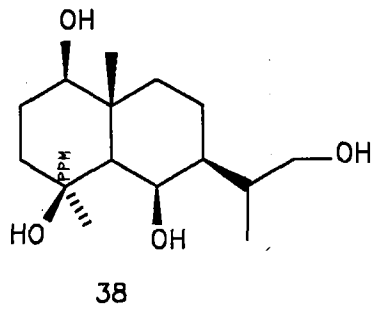


INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00



38



80.1008
 77.0000
 72.3670
 72.1831
 76.6611
 72.8625

68.1393
 66.4731

51.8963
 48.6324

39.5732
 39.3773
 38.9578
 37.9083

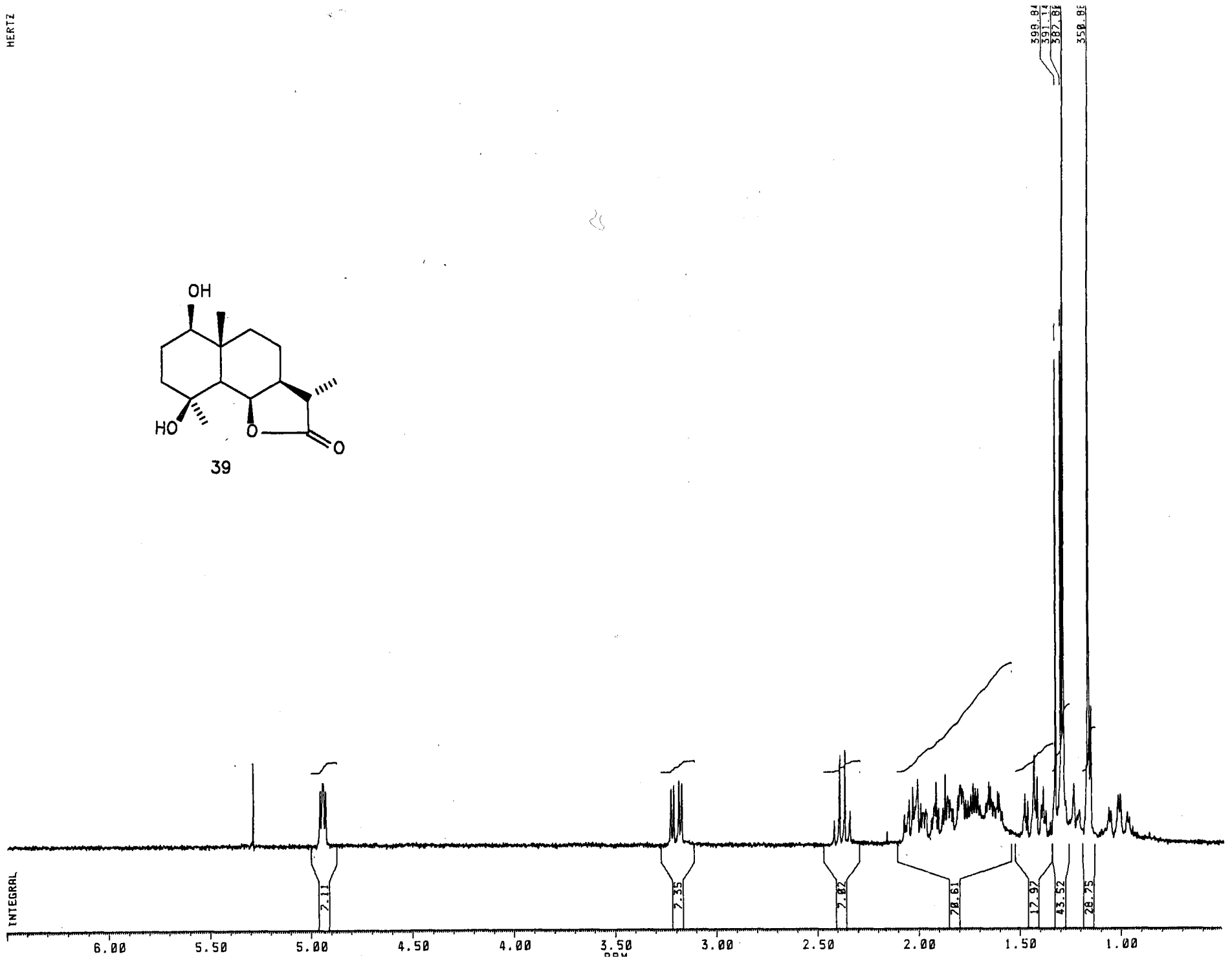
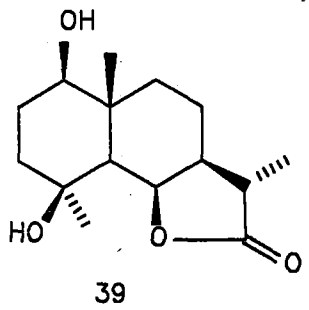
31.0059
 30.2353
 27.1349

22.8405

16.1547
 14.5394

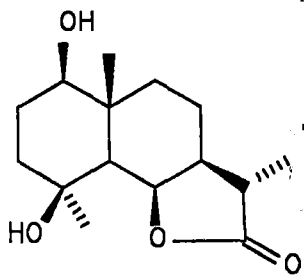
110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10
 PPM

HERTZ



PPM

179.489



39



PPM

79.387
77.577
77.376
77.207
76.805
76.668
71.278

79.31
77.31

50.149

50.11

43.437
42.464
39.655
37.977
36.724

43.41
42.41
38.61
36.71

29.677

29.61

27.208

27.11

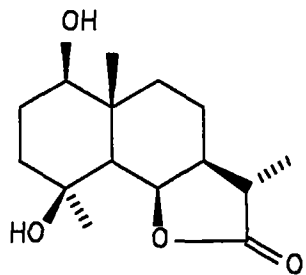
23.315

23.31

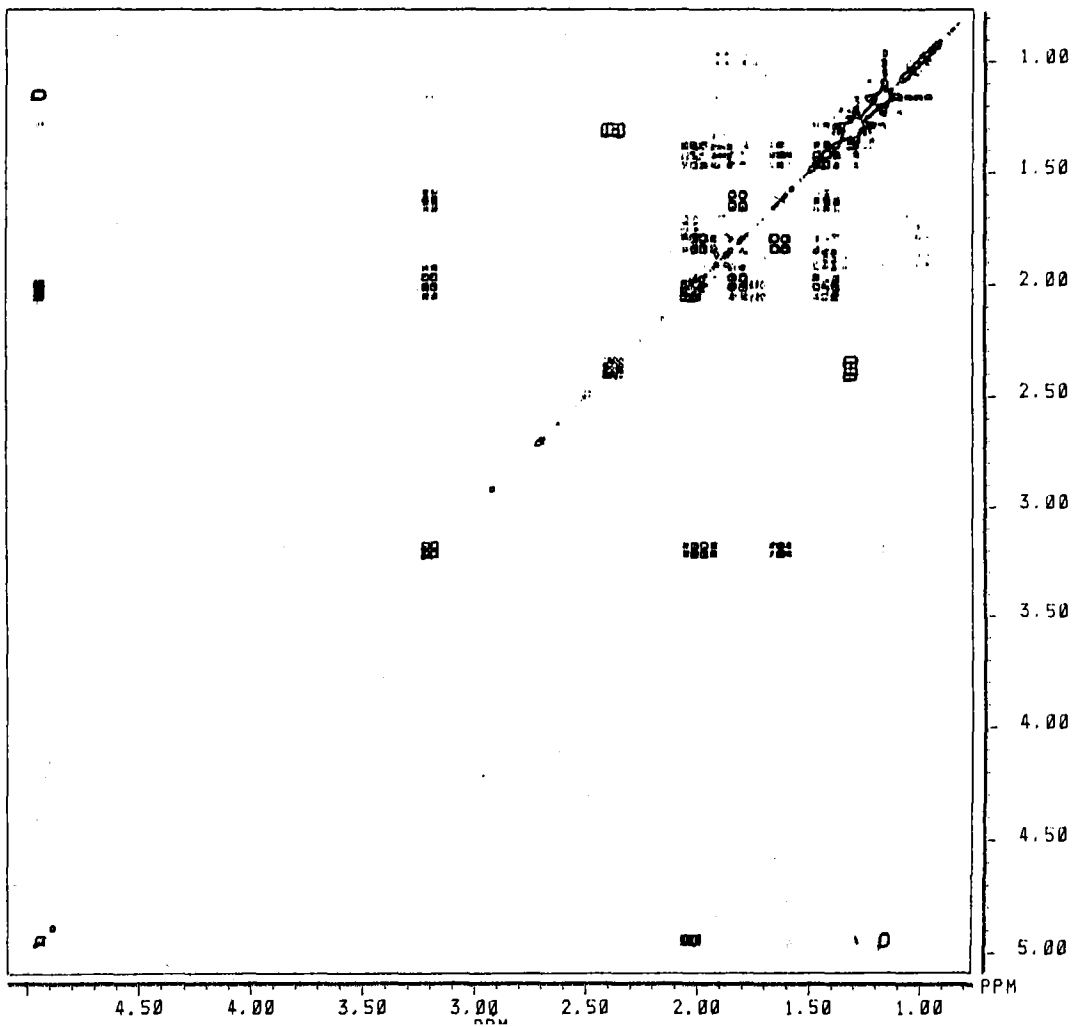
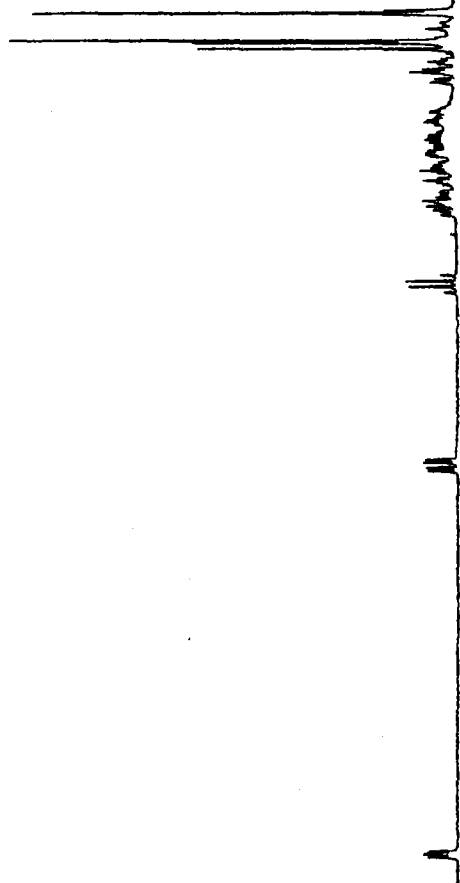
14.848
14.281

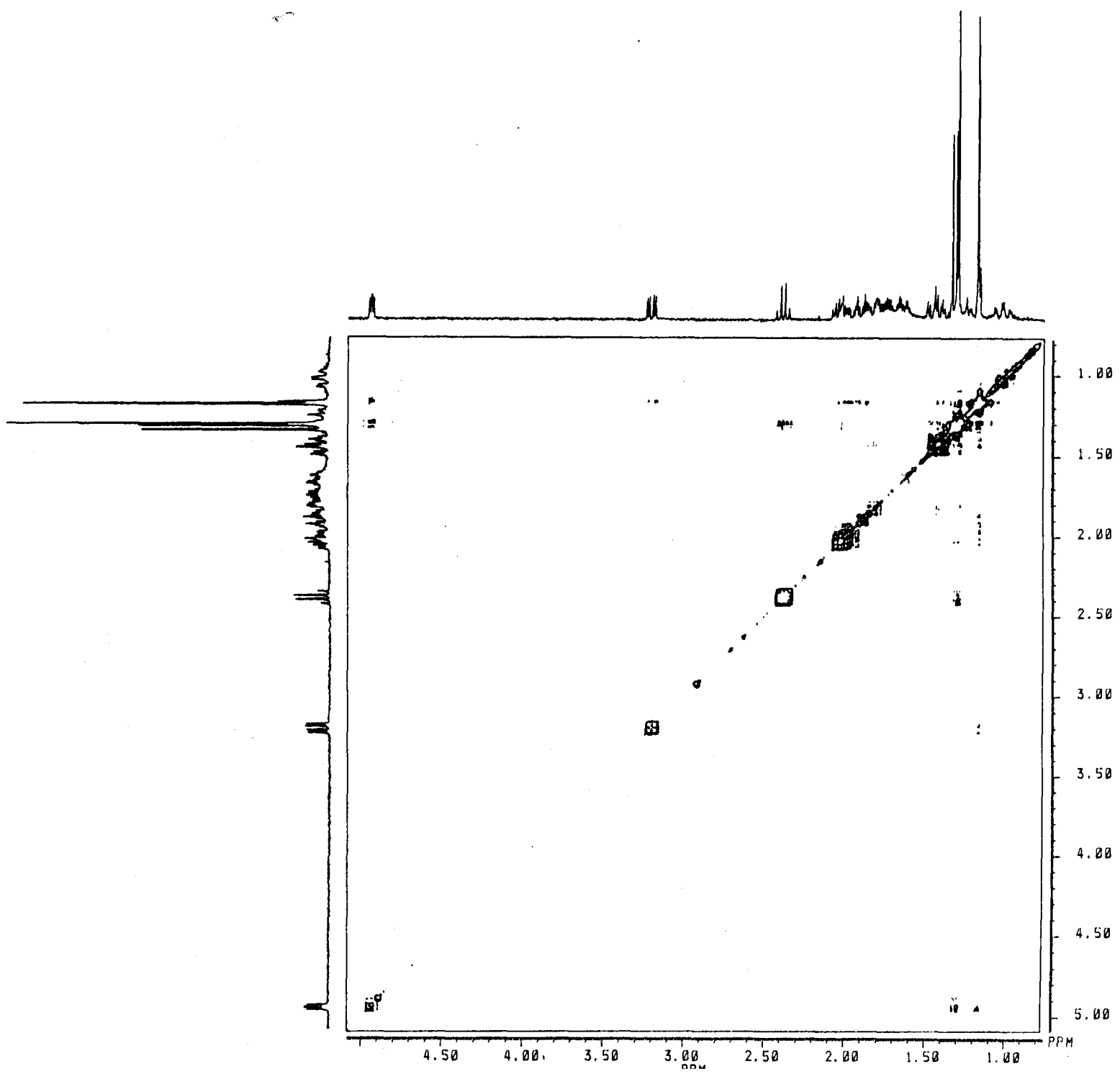
14.81
14.71

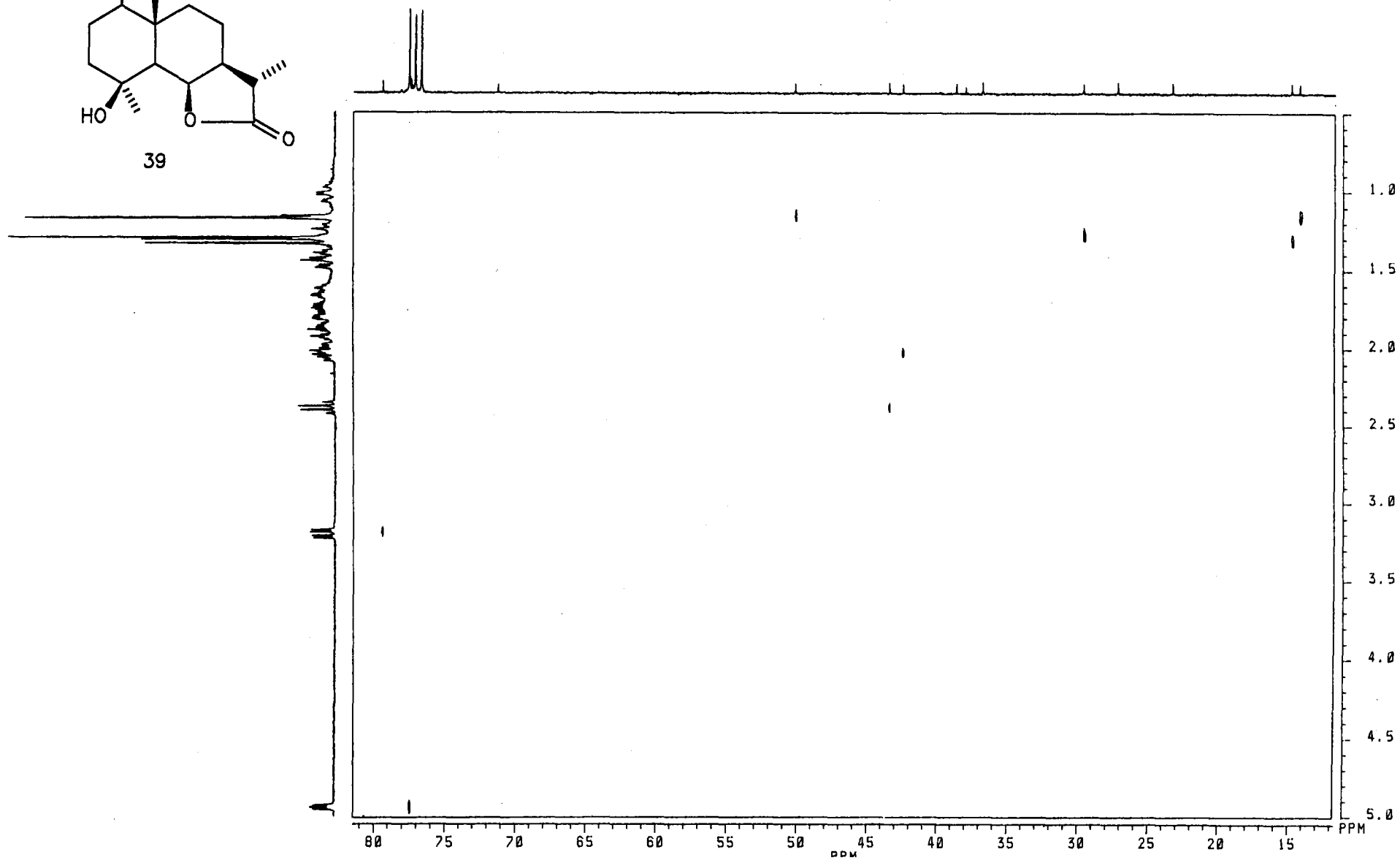
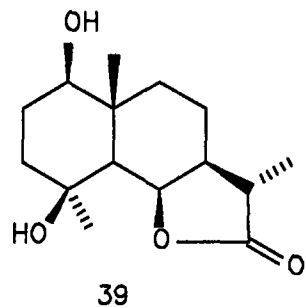
COPYRIGHT 1980 BY PERKINELMER, INC.
ALL RIGHTS RESERVED. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF PERKINELMER, INC. AND IS LOANED TO YOU. IT IS TO BE RETURNED TO PERKINELMER, INC. UPON REQUEST.

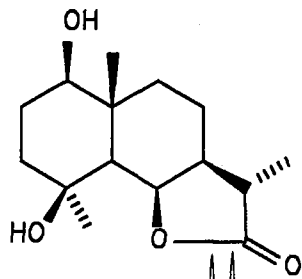


39

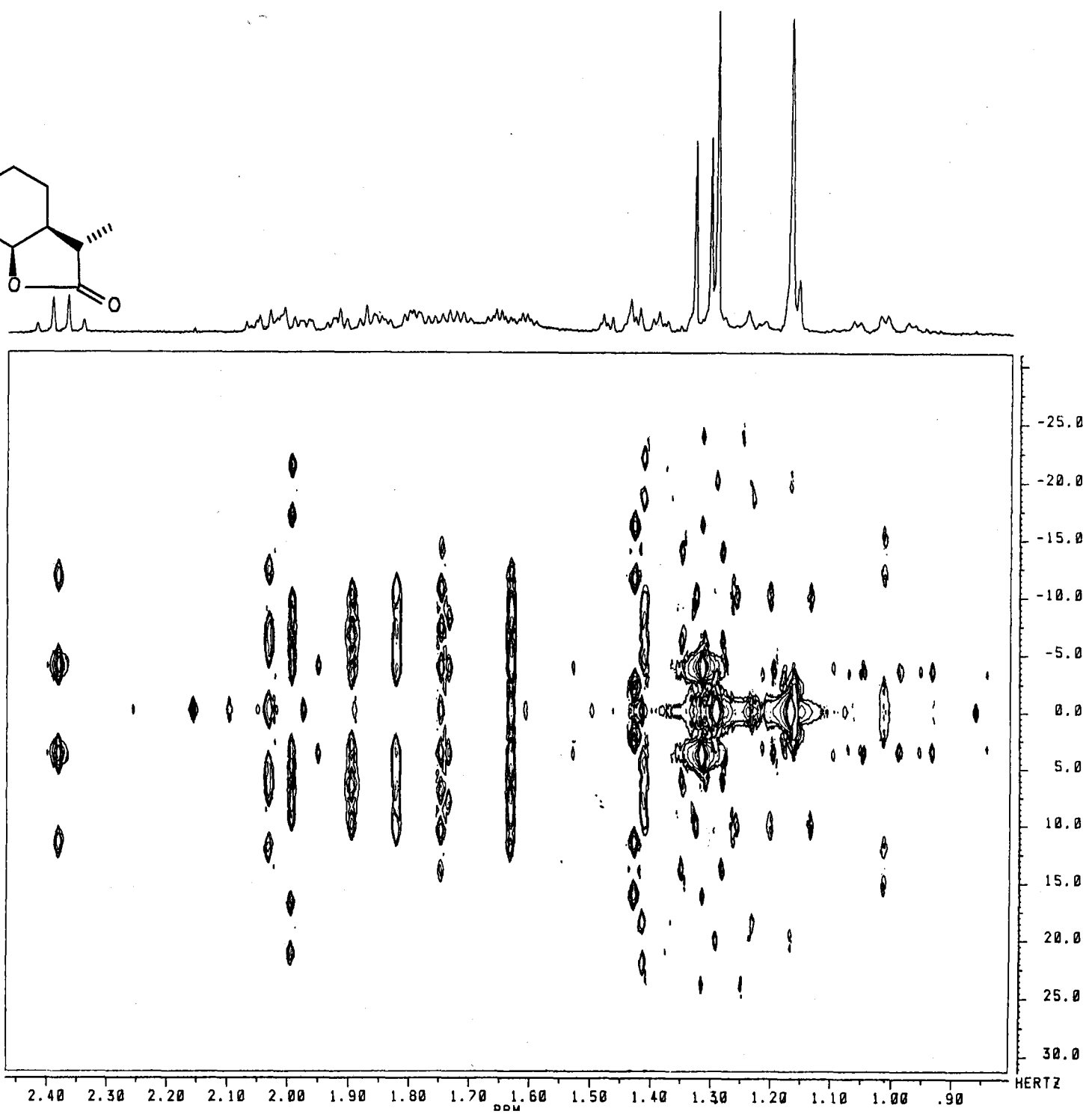


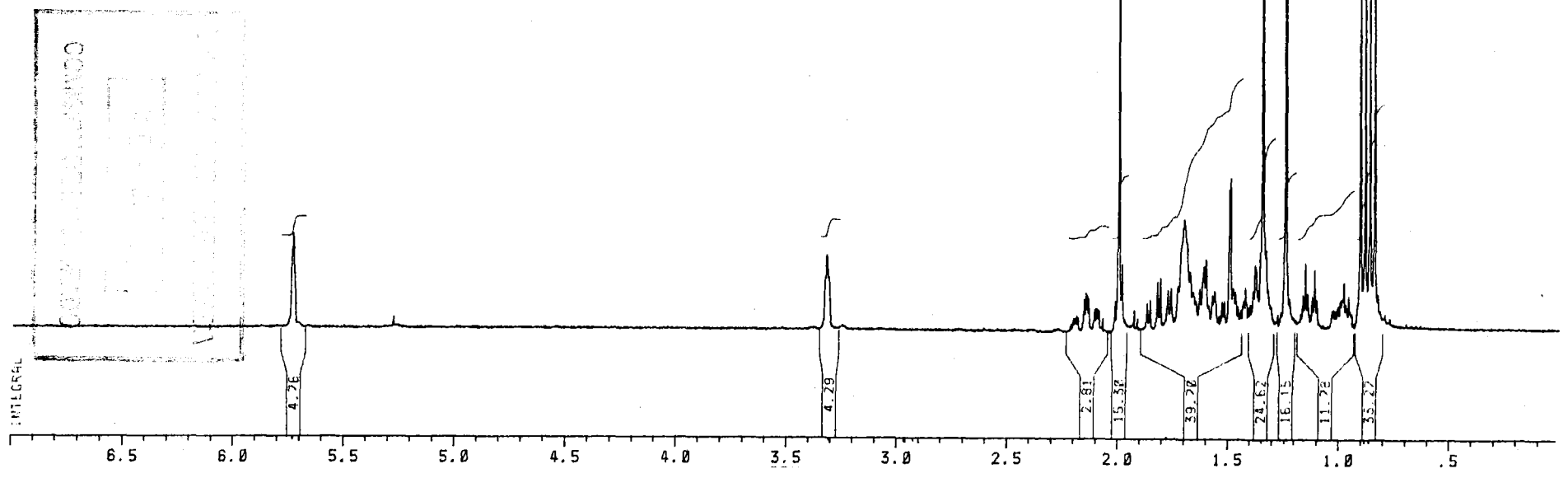
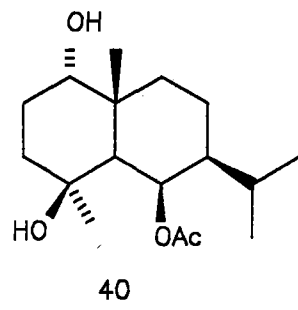


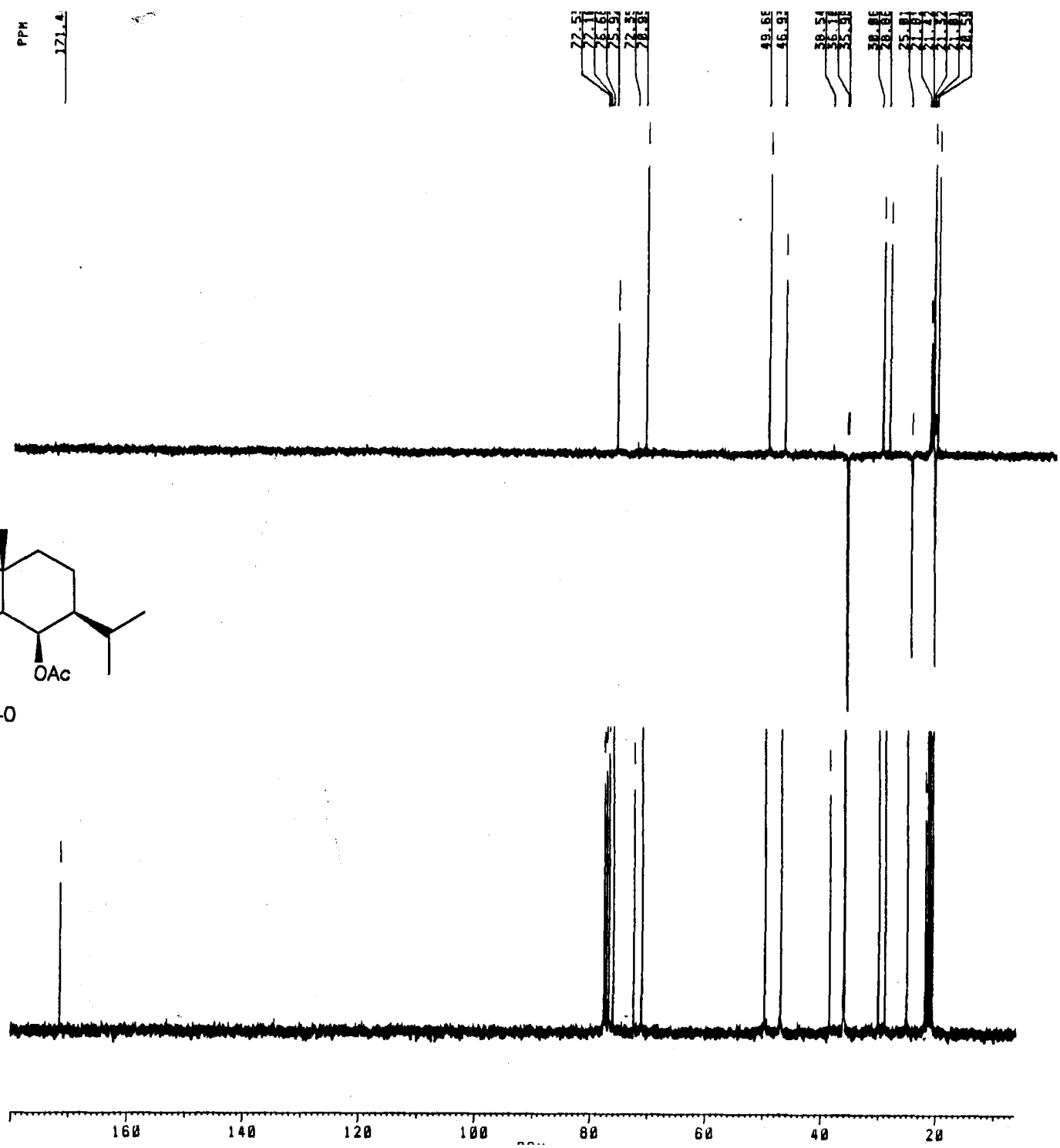
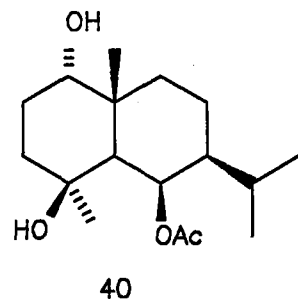


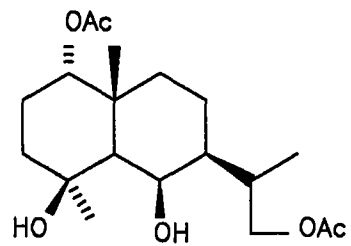


39

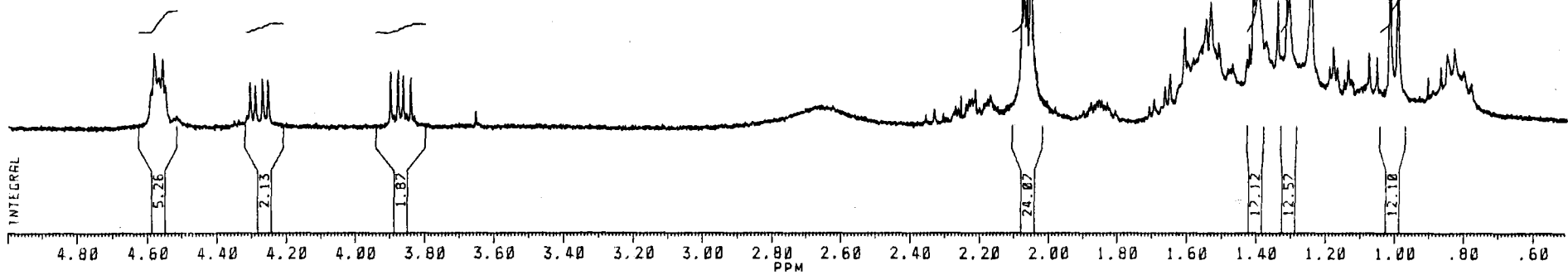




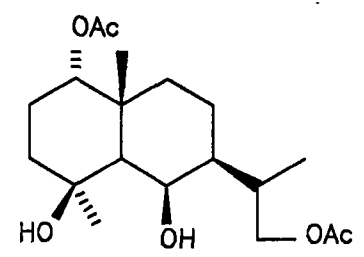
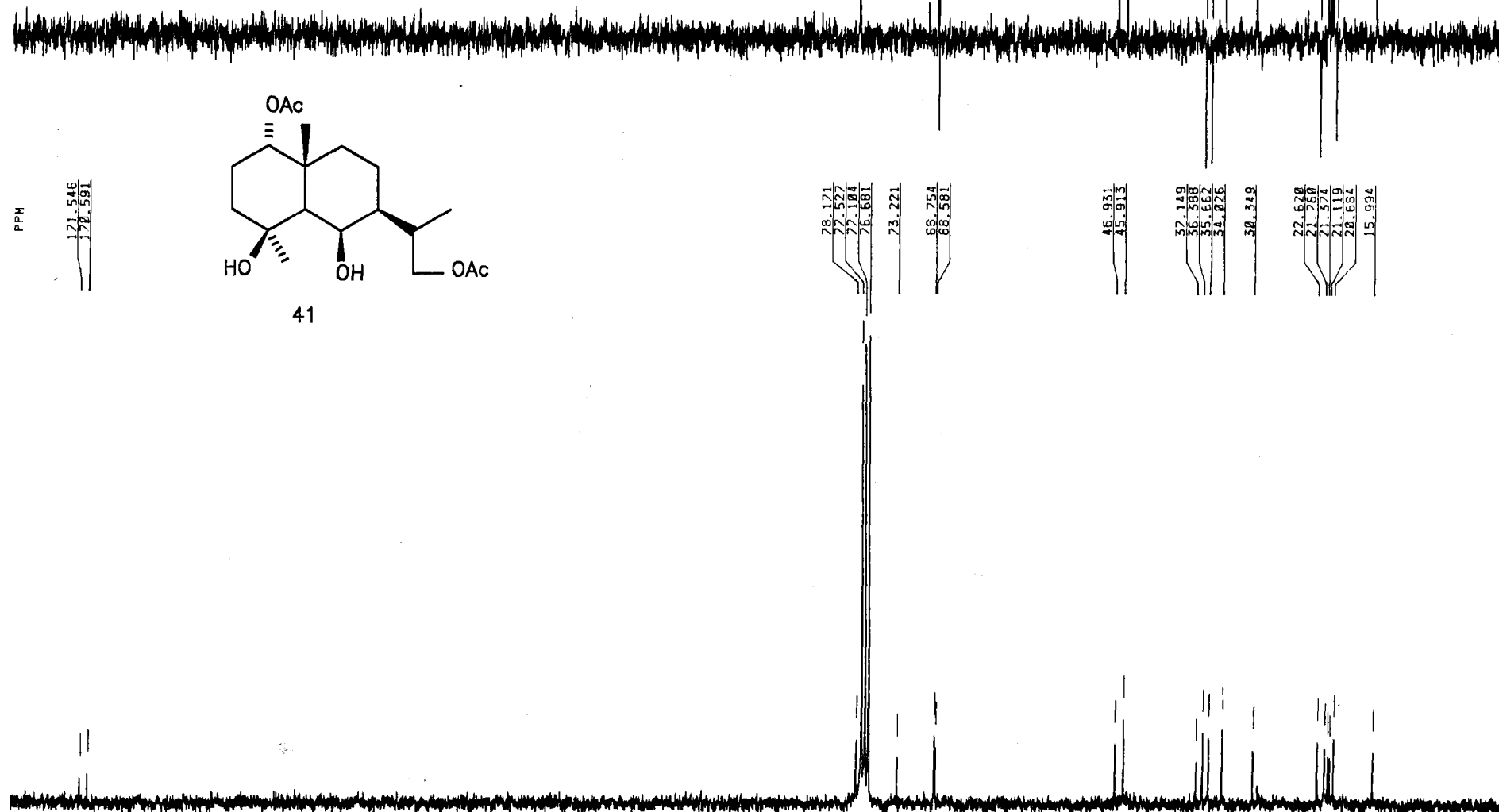




41



170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10



PPM

171.546
170.591

78.171
77.527
77.104
76.681

73.221
68.754
68.581

46.931
45.913

37.149
36.889
35.627
34.026

30.349

22.620
21.760
21.574
21.119
20.654

15.994

78.152

68.728
68.564

46.899
45.881

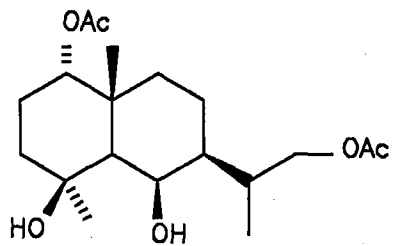
36.861
35.653
34.800

30.331

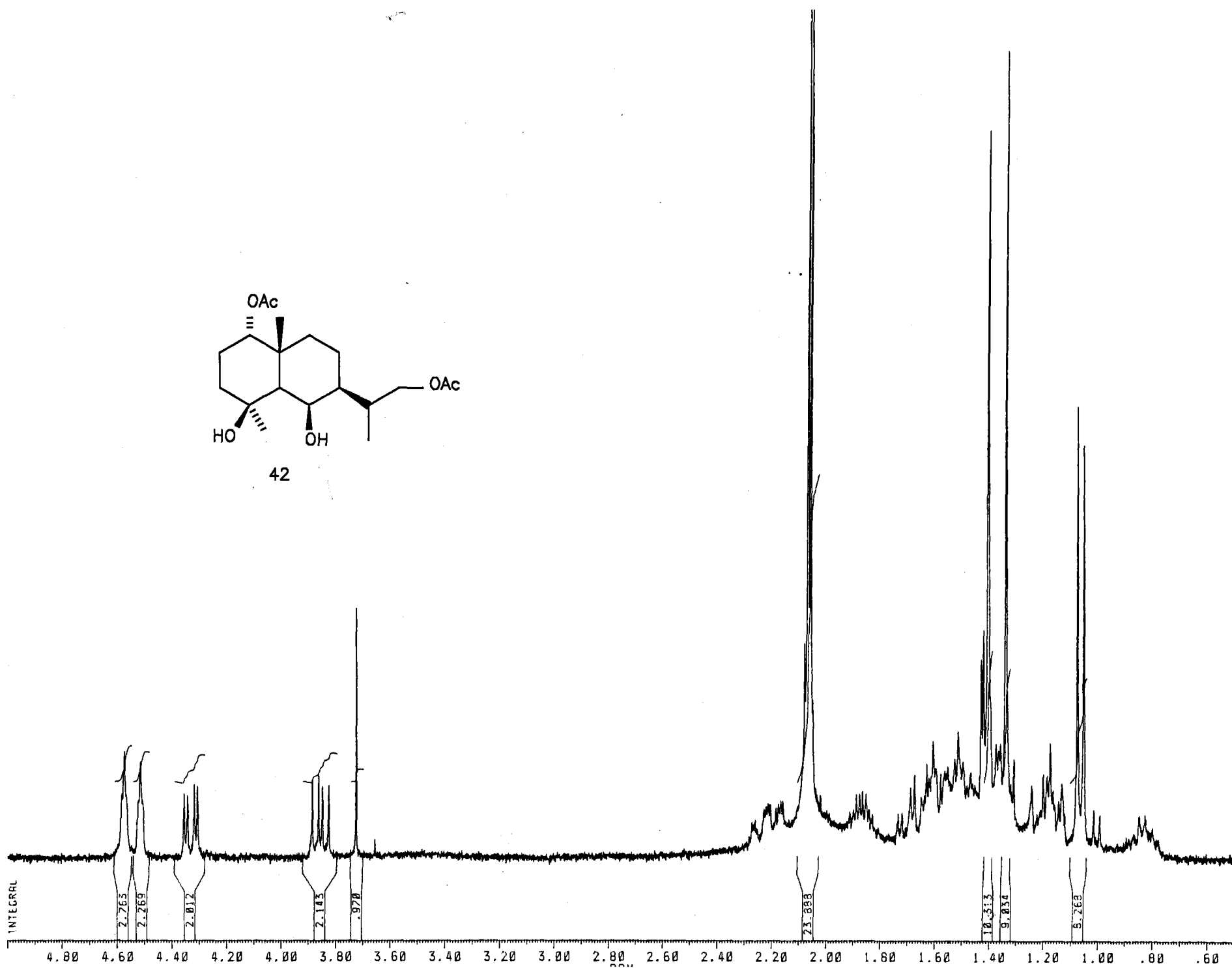
22.597
21.742
21.566
21.119
20.672

15.991

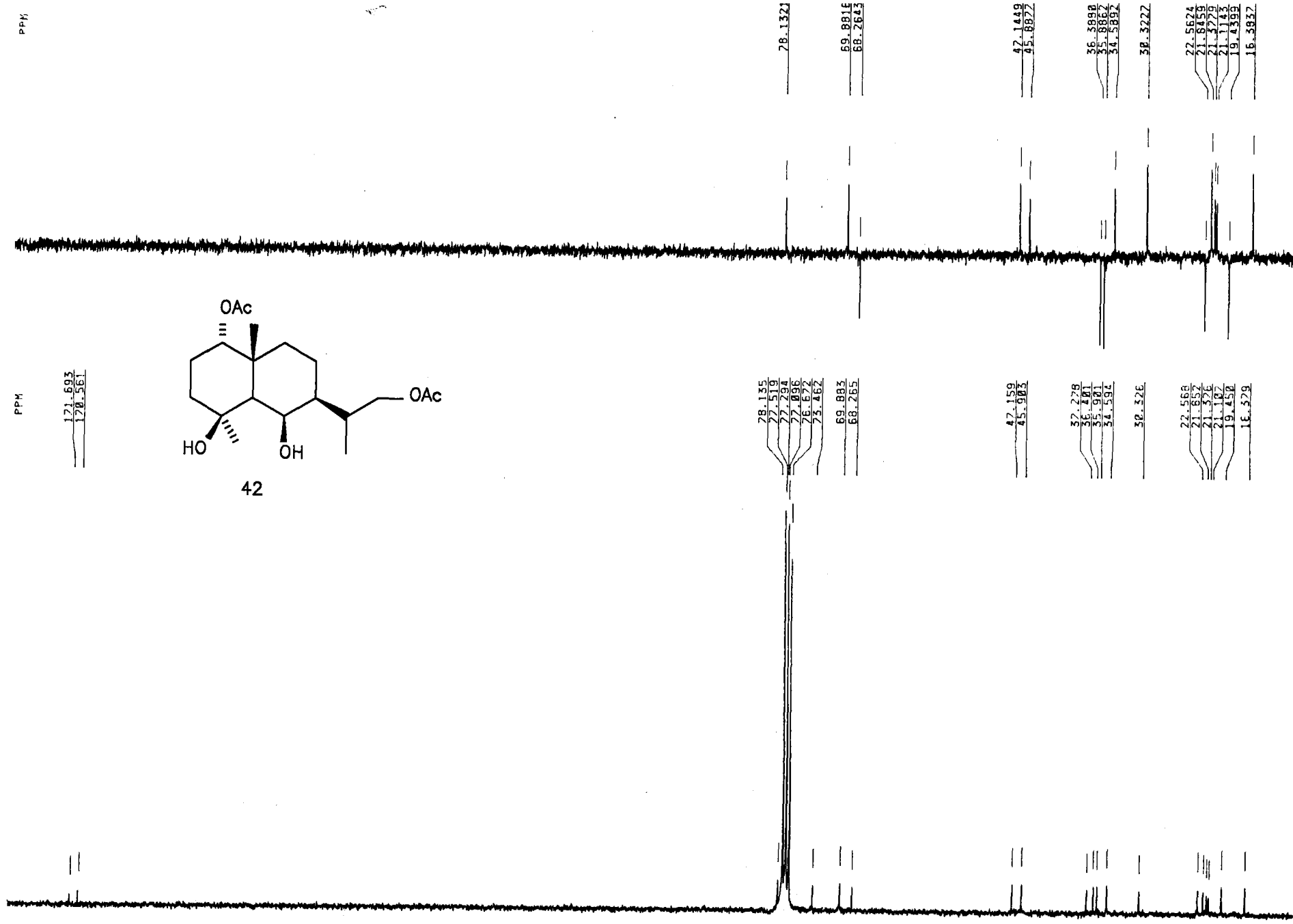
PPM



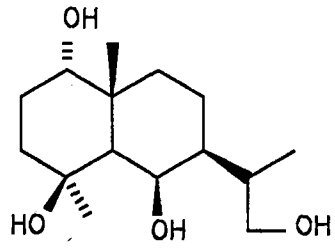
42



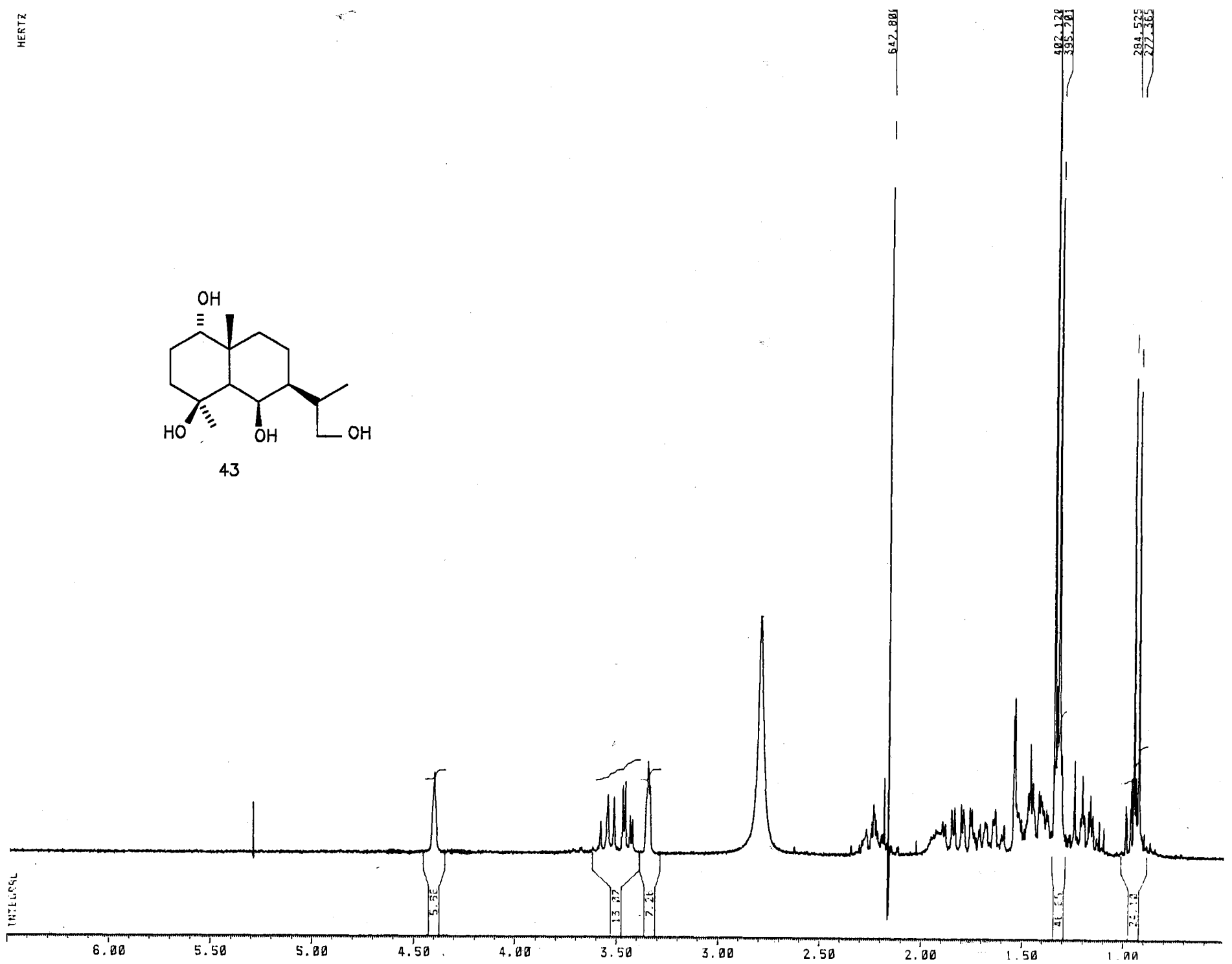
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30



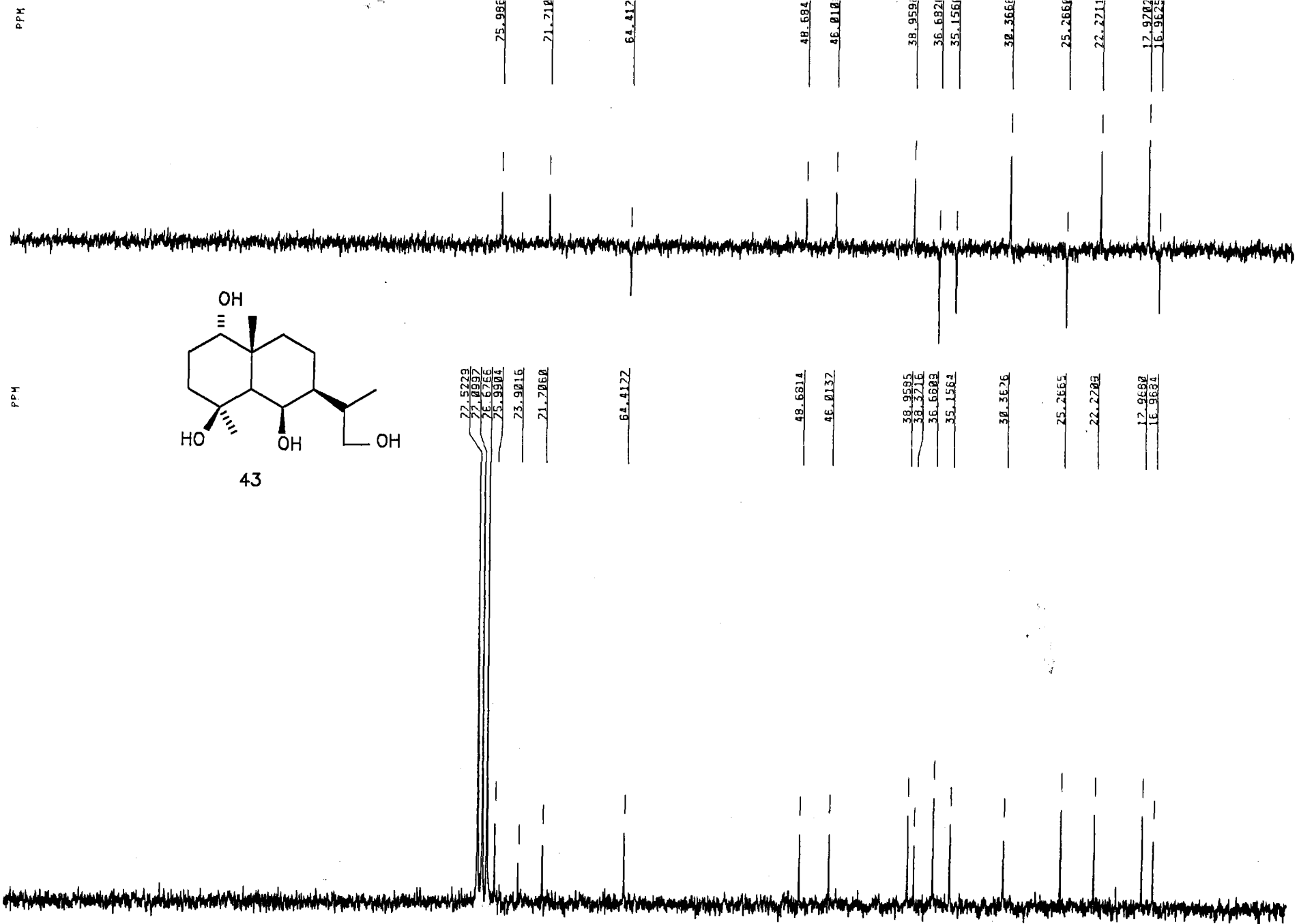
HERTZ



43



115 110 105 100 95 90 85 80 75 70 65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15 10

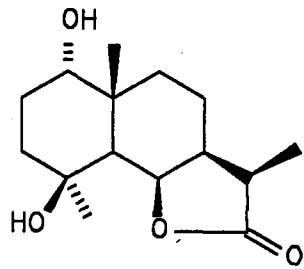
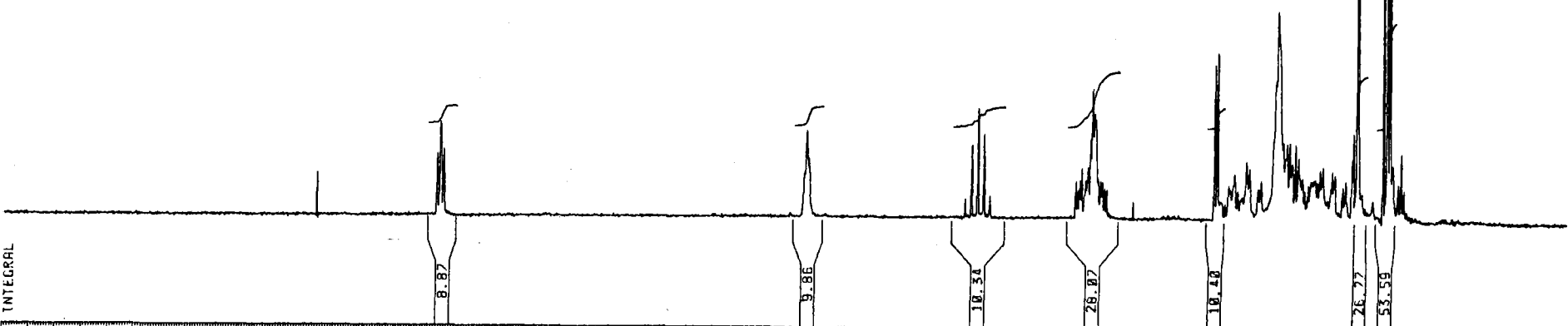


PPM

PPM

INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

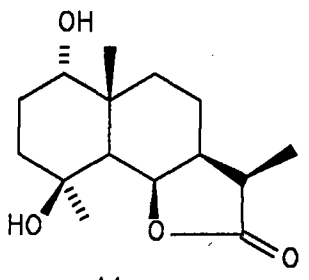
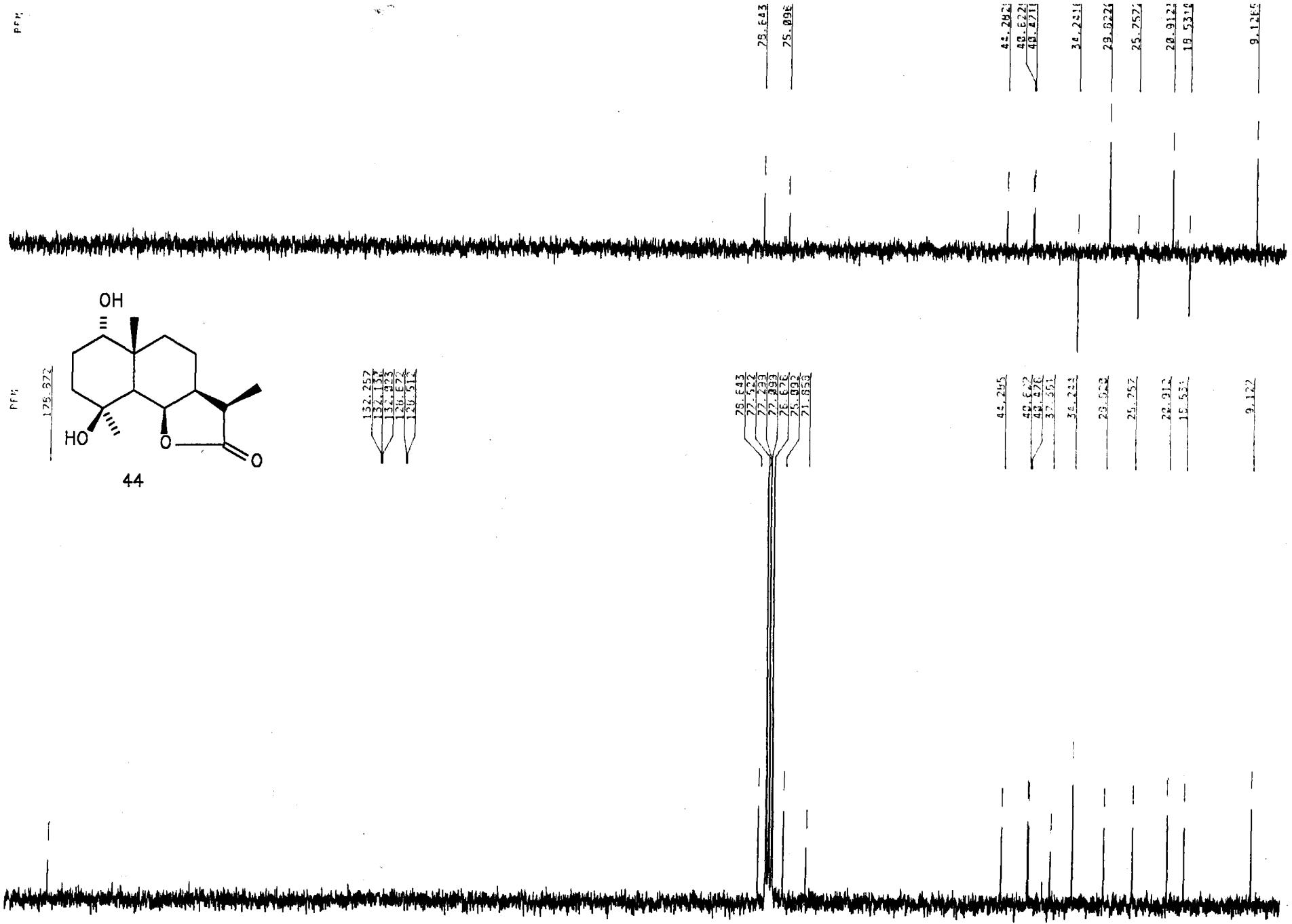


44

HERTZ

332.93
311.924
300.11
253.52

180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10



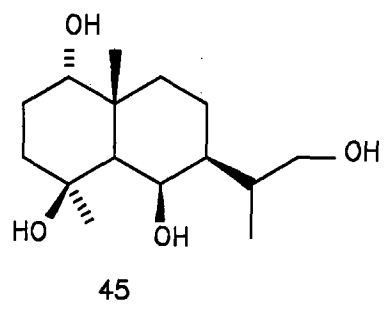
PPM

INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

9.82 9.67 8.95 9.18 15.49 39.52 51.77 25.11

OCUM...
VOT

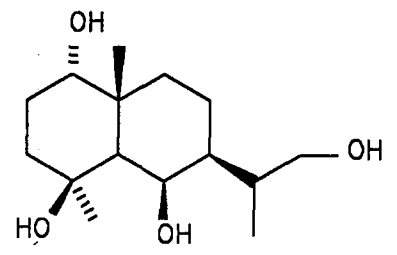
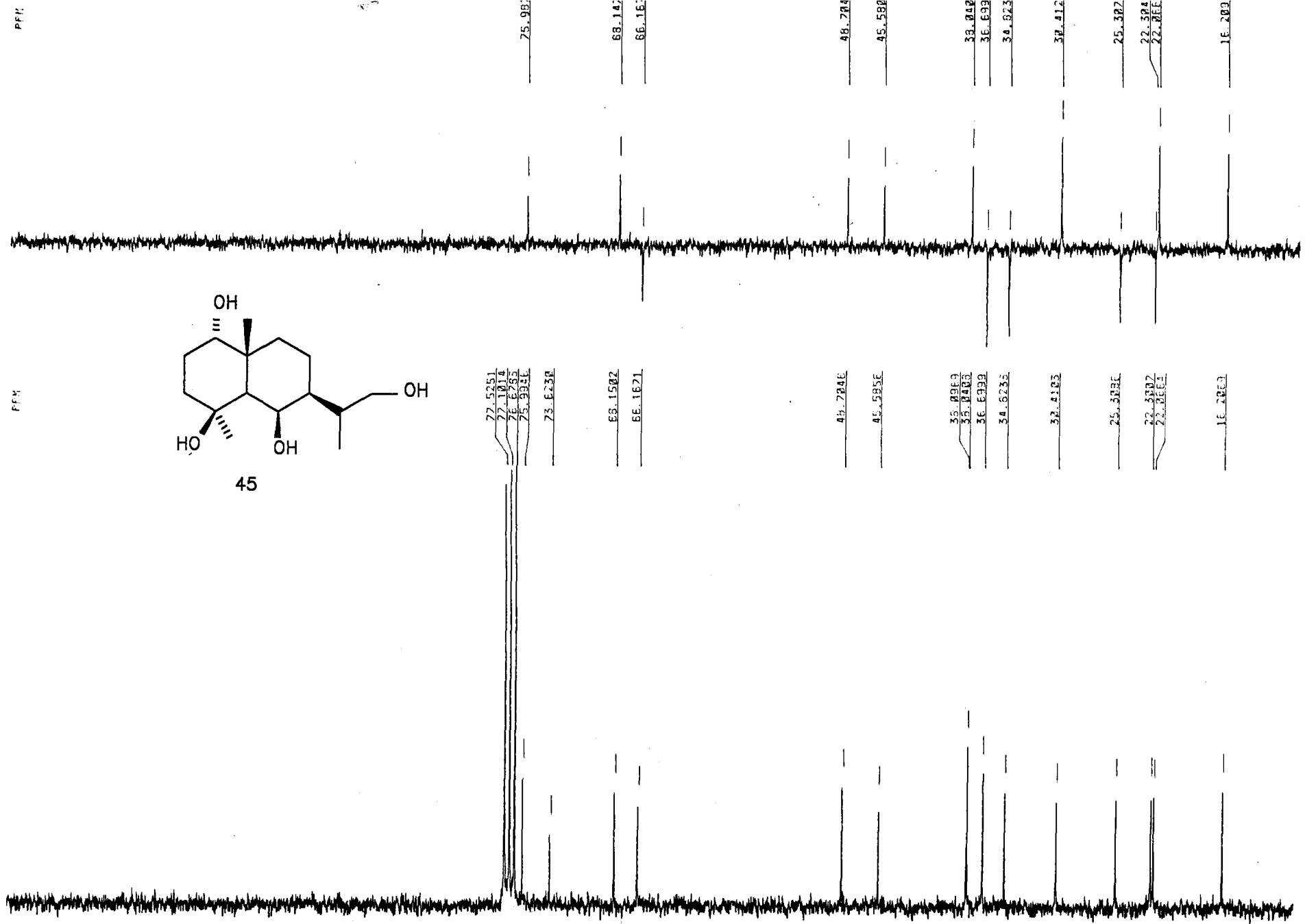


HERTZ

499.693
392.652
293.915
246.811

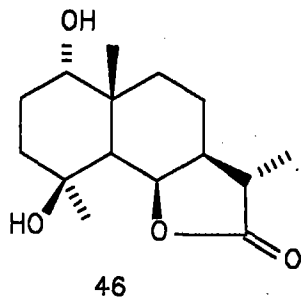
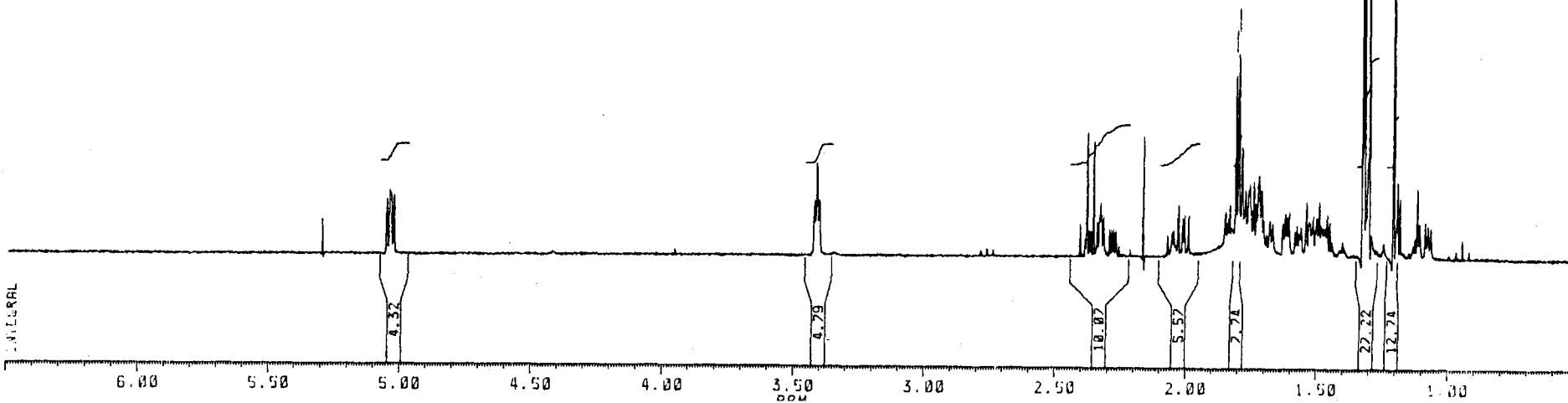


115 110 105 100 95 90 85 80 75 70 65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15



PPM

1H NMR



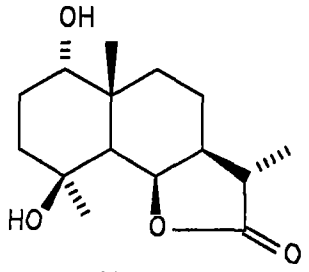
HERTZ

5.41.93
5.39.77

3.06.89
3.23.02
3.23.02
3.23.02
3.11.10

PFK

179.652



76.187
75.022

44.1631
43.4923
42.7222

34.3652
34.2116
29.2553

25.6352
23.5021
20.7995

14.7151

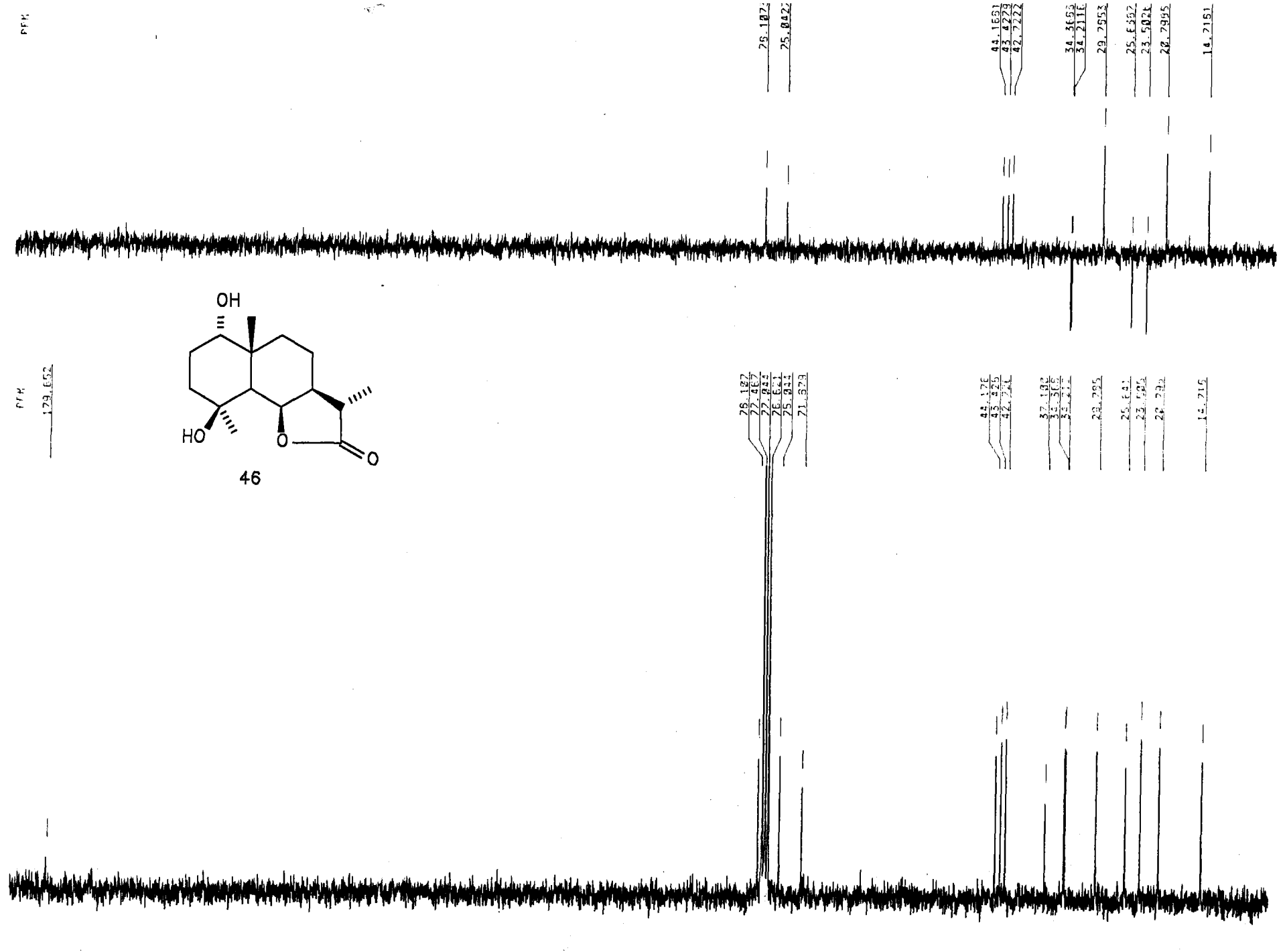
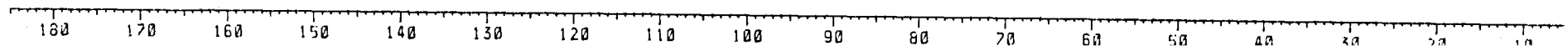
76.187
72.467
72.022
76.641
75.933
71.673

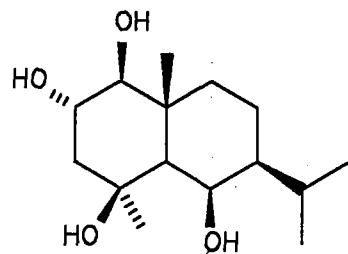
44.176
43.495
42.721

37.192
35.366
34.211
29.295

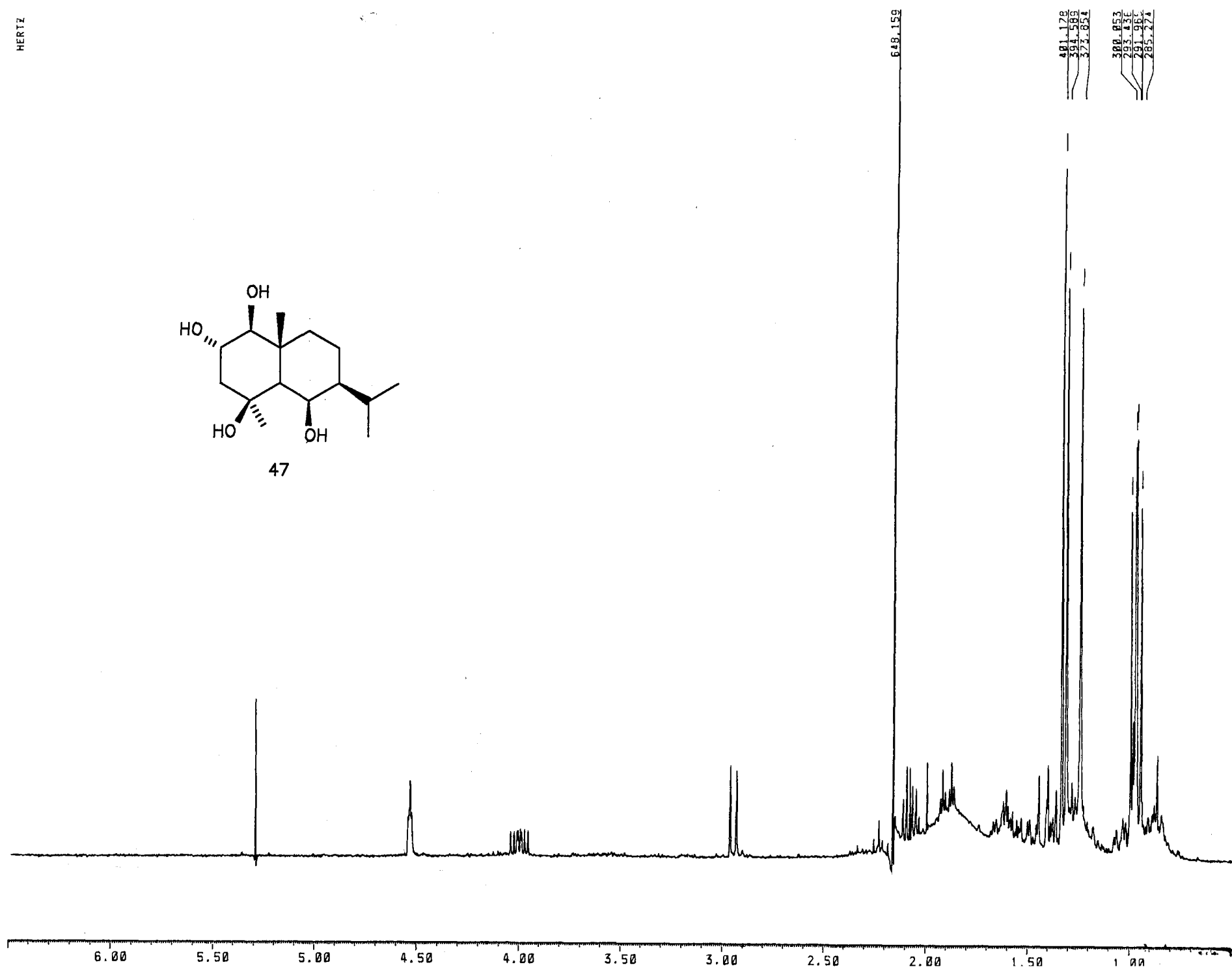
25.641
23.523
20.792

14.715

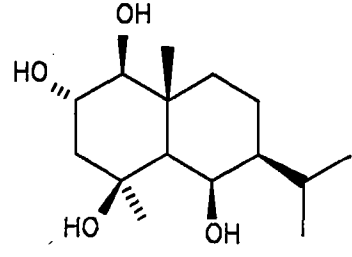
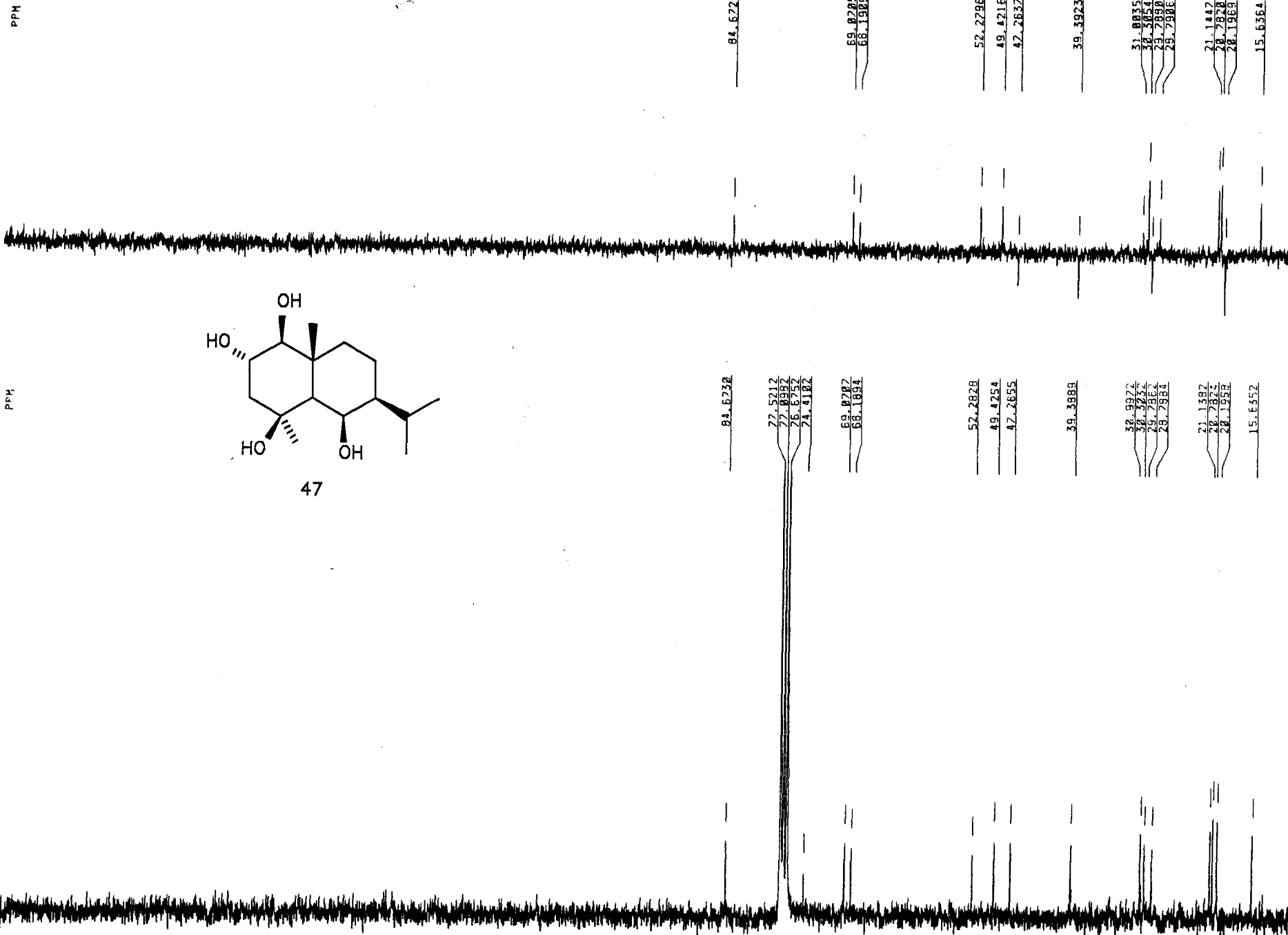




47



170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20



47

PPM

PPM

INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

3.35

3.29

20.29

12.61

6.91

10.39

11.98

14.29

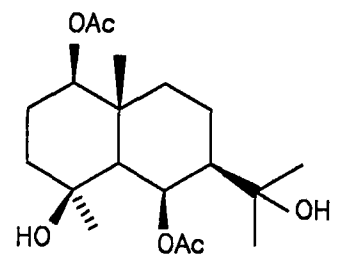
616.32

411.56

335.831

556.892

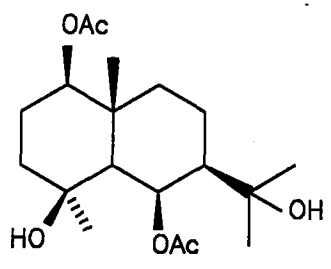
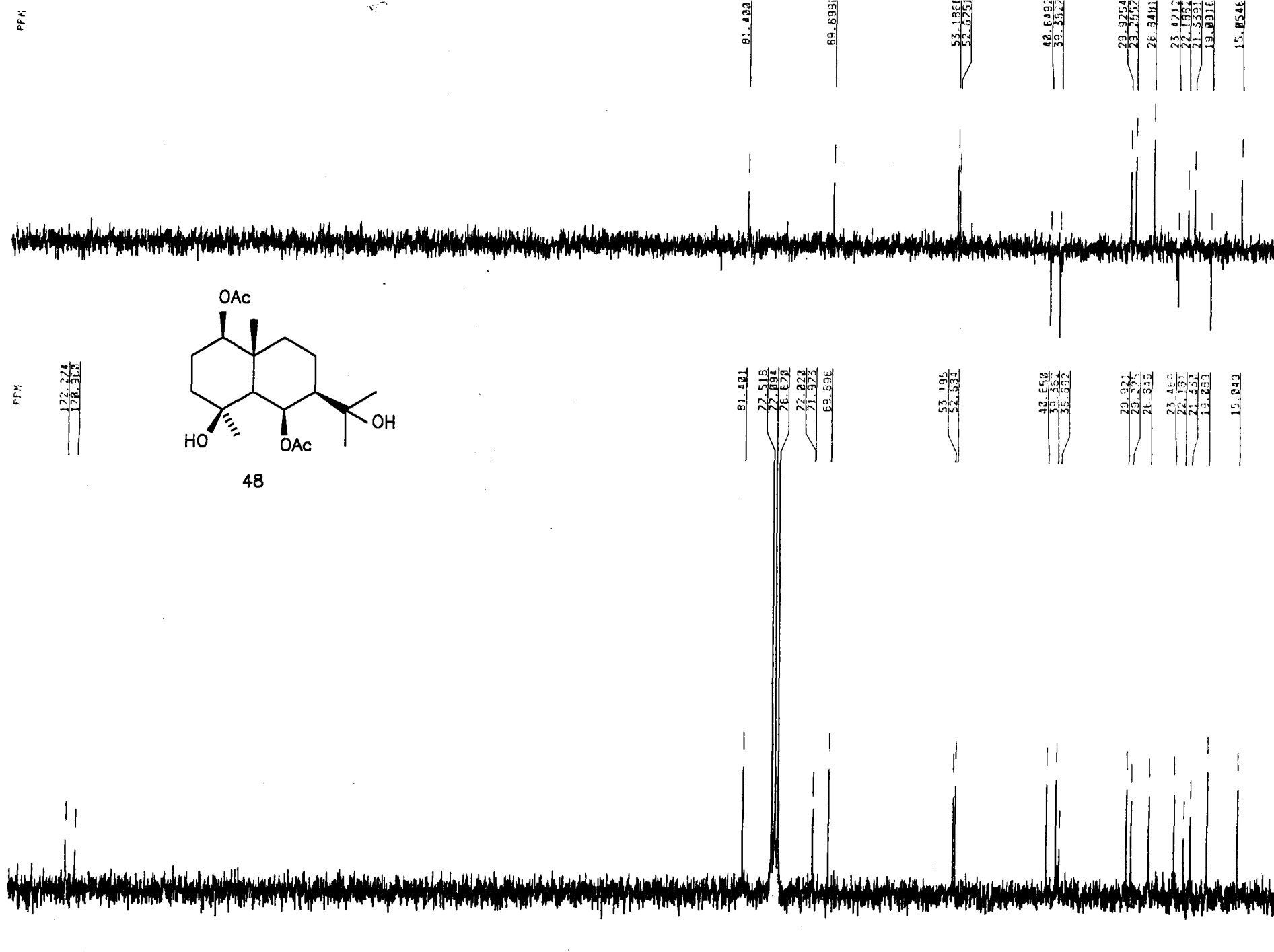
332.221



48

HERTZ

170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30



48

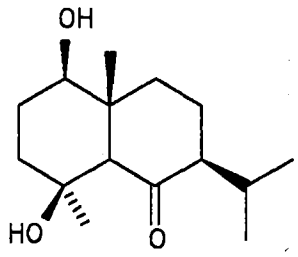
PFM

PFM

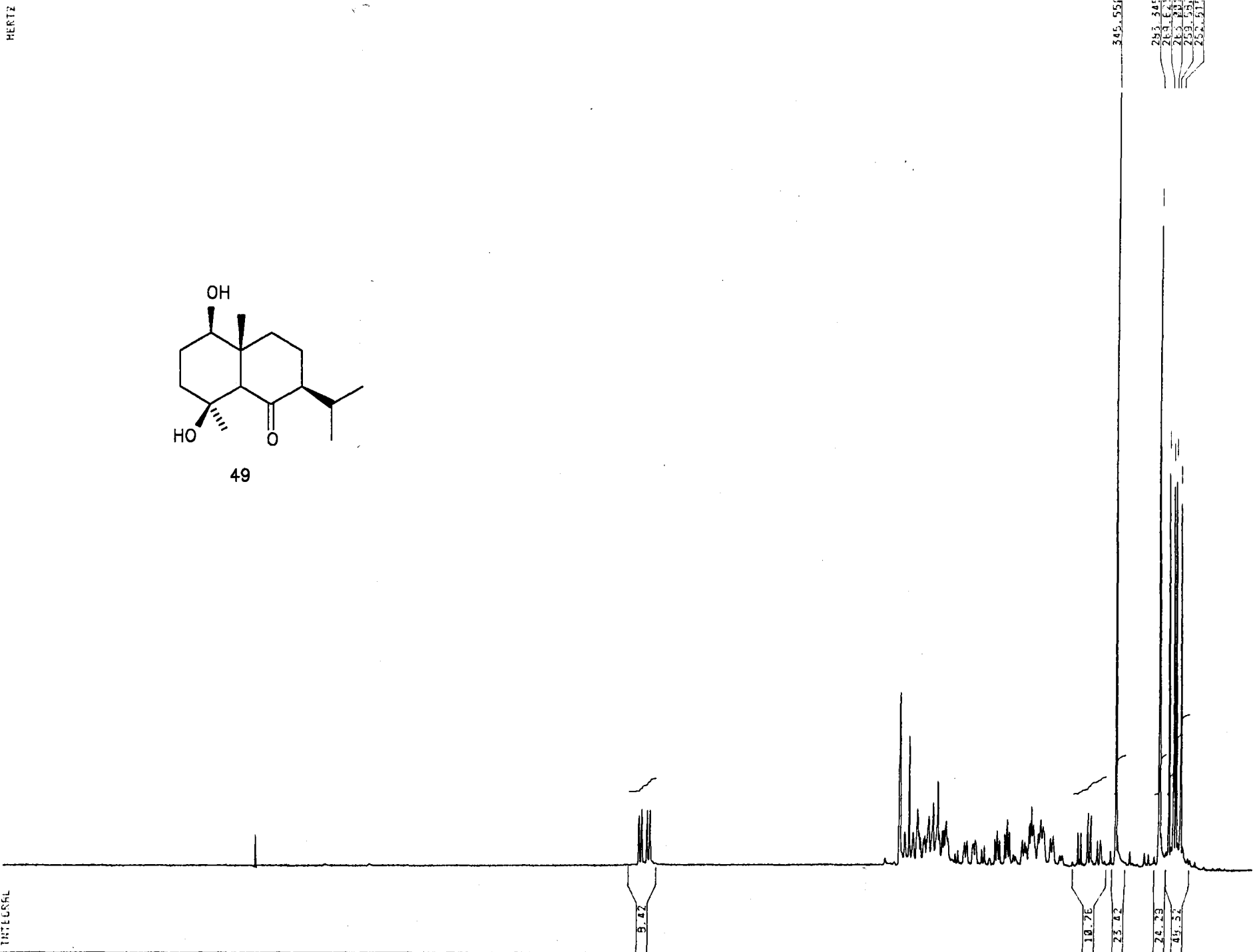
INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

HERTZ



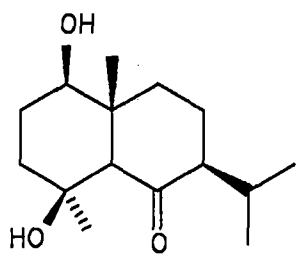
49



253.241
263.164
263.241
263.351
264.311
345.551

PPM
216.845

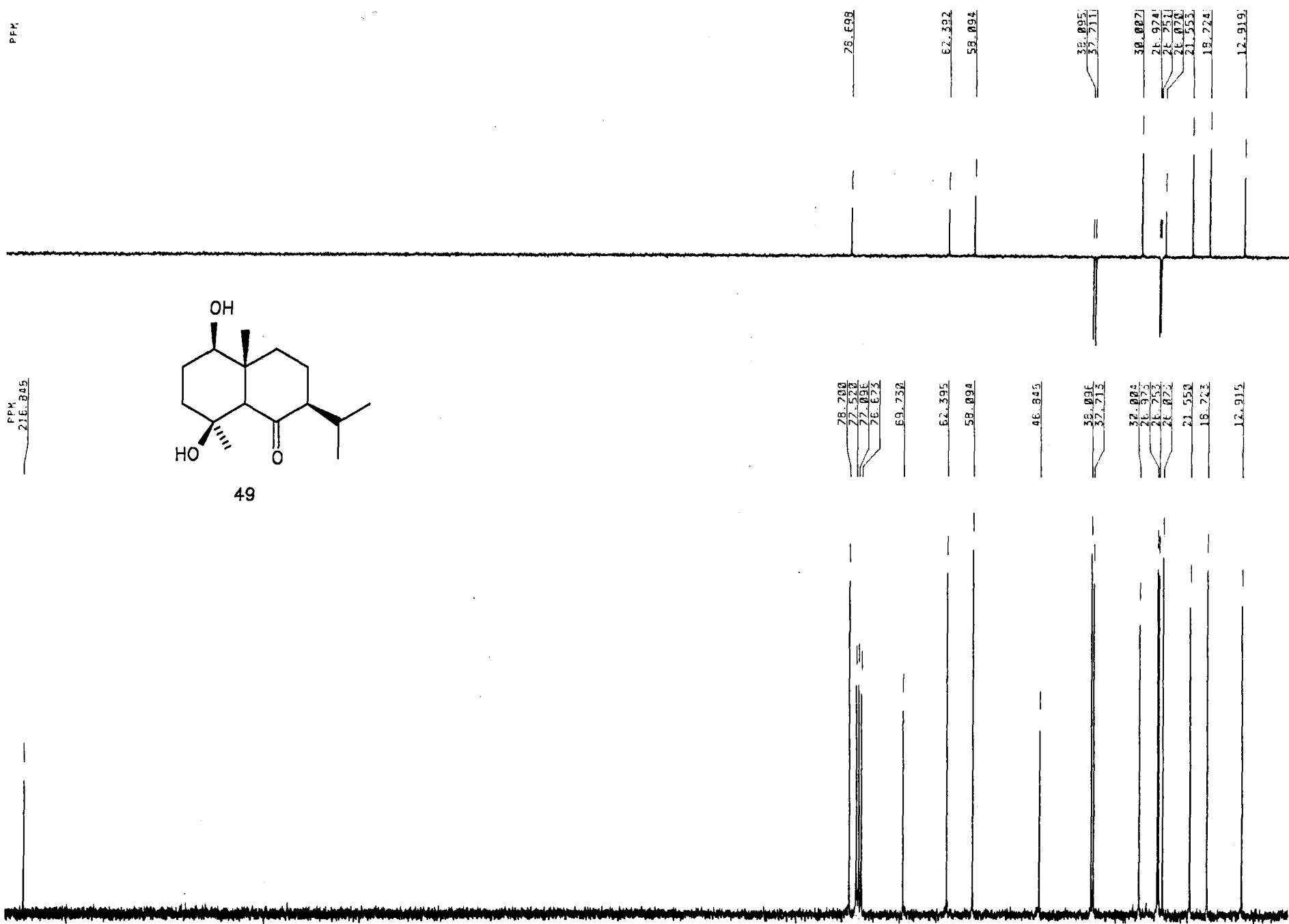
210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10



49

76.698
62.392
58.094
35.095
32.711
30.0071
28.974
28.751
28.072
21.552
18.743
12.915

76.750
72.522
72.096
76.672
69.730
62.395
58.094
46.845
35.096
32.713
30.004
28.973
28.753
28.072
21.552
18.743
12.915



INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

4.37

5.72

5.44

15.64

16.77

26.64

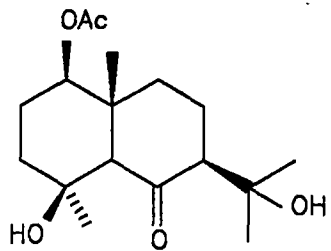
12.12

615.66

376.95

362.32

374.891

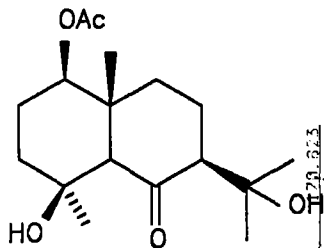


50

HERTZ

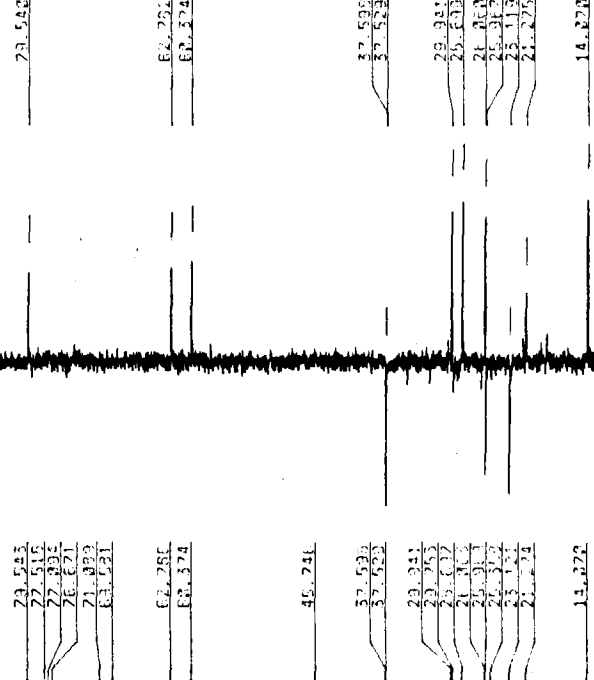
PMK

PMK
216.668



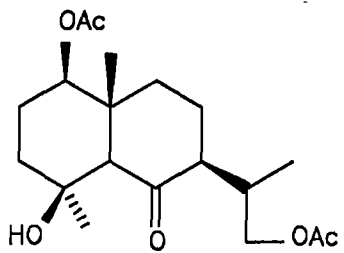
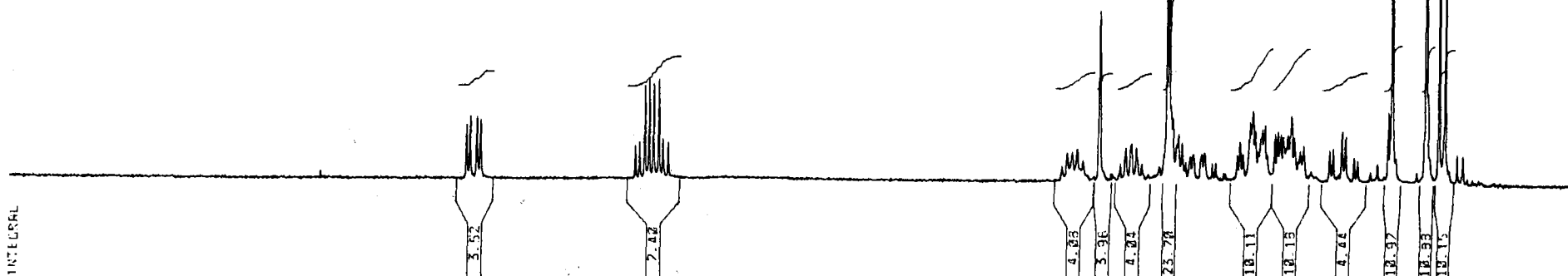
50

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10



INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

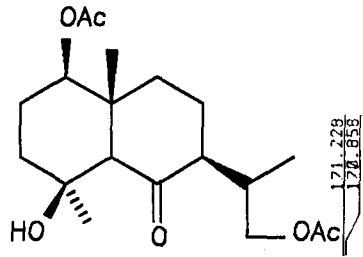
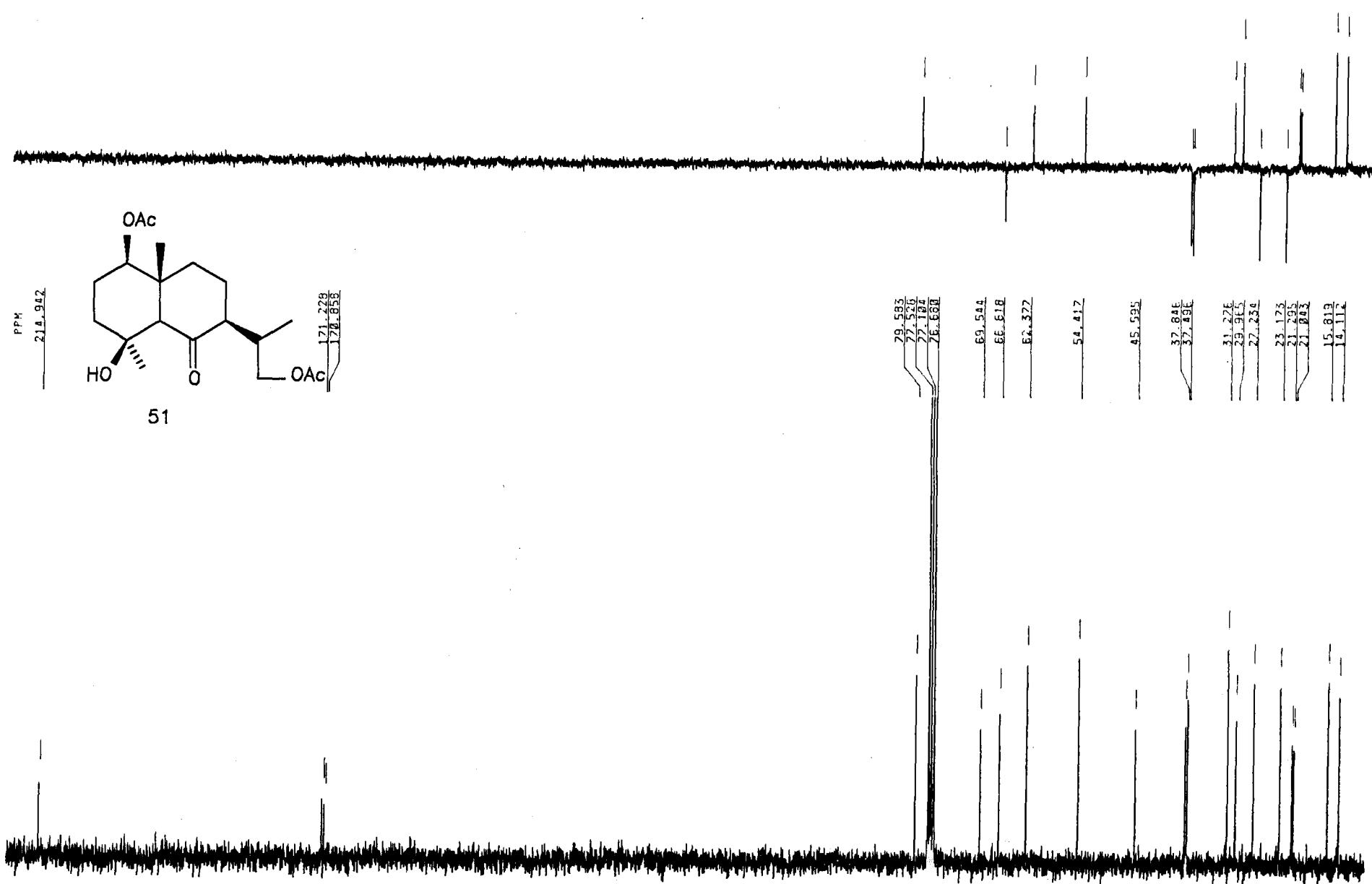


51

HERTZ

614.03
611.89
355.052
316.095
280.725
233.341

210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30



51

PPM
214.942

171.229
170.659

79.583
77.520
77.164
76.680

69.544
66.618
64.372

54.417

45.595

37.846
37.496

31.276
29.965
27.334

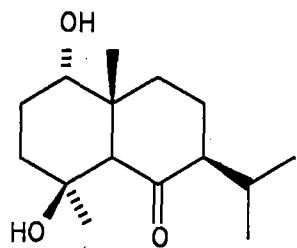
23.173
21.695
21.043

15.813
14.112

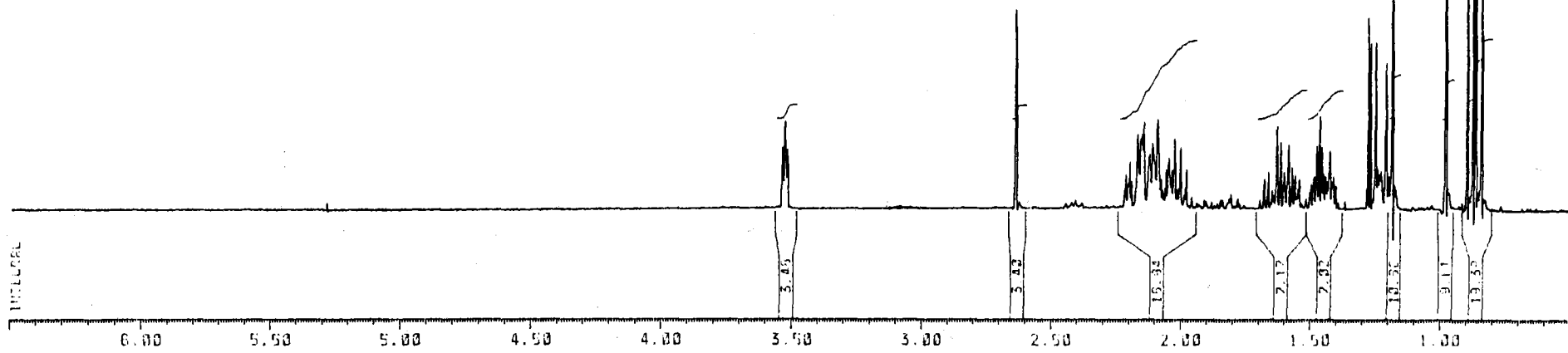
79.
66.
62.
54.

37.
37.
31.
29.
27.
23.
21.
21.
15.
14.

HERTZ



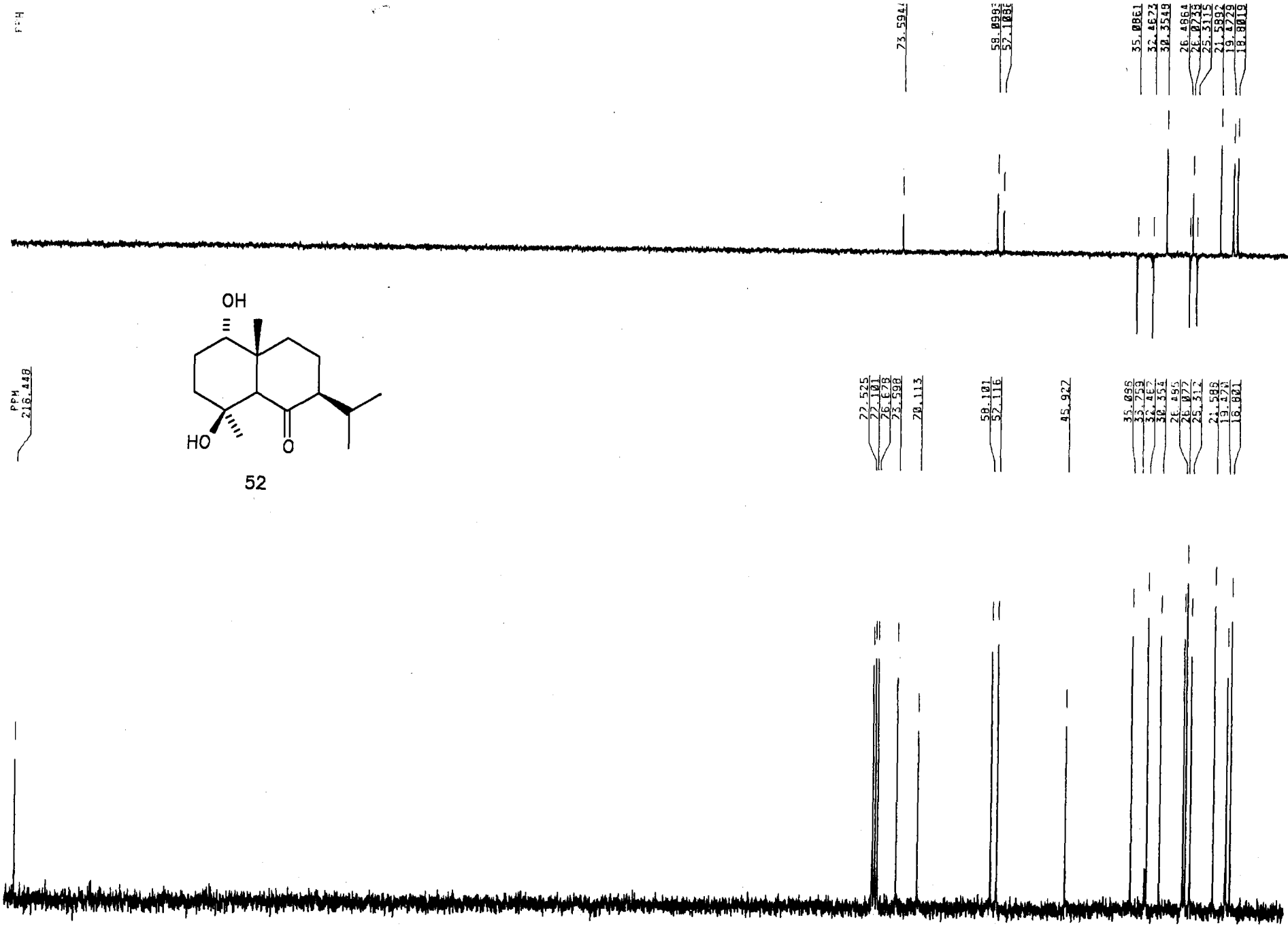
52



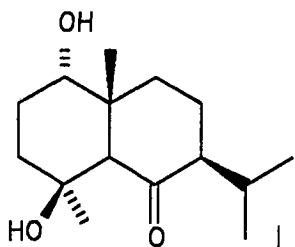
304.776

203.574
215.634
215.510
213.341
212.177

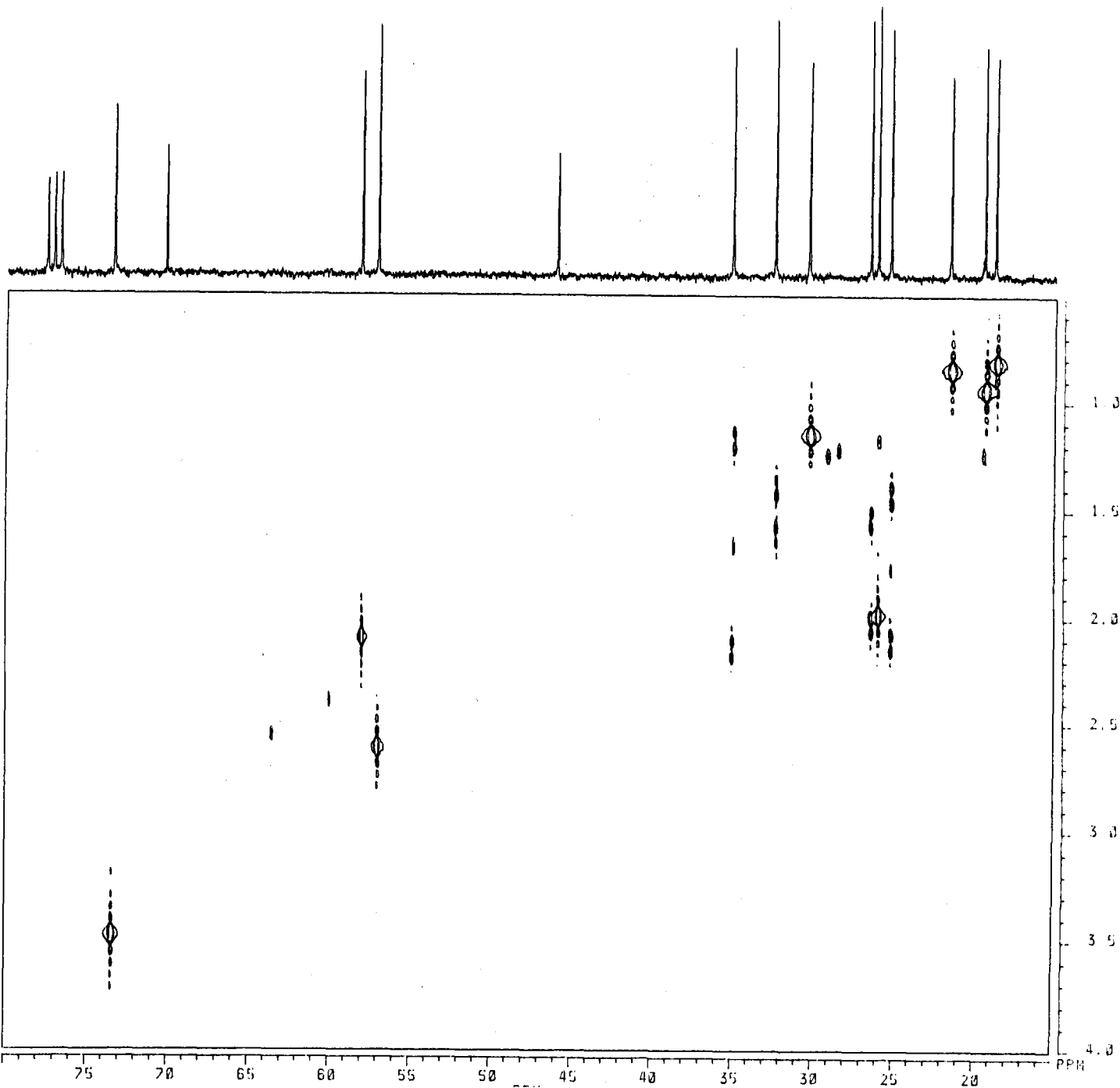
210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20

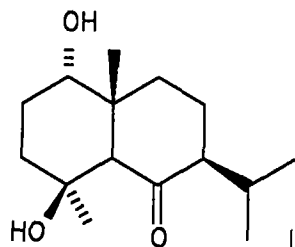


F:4

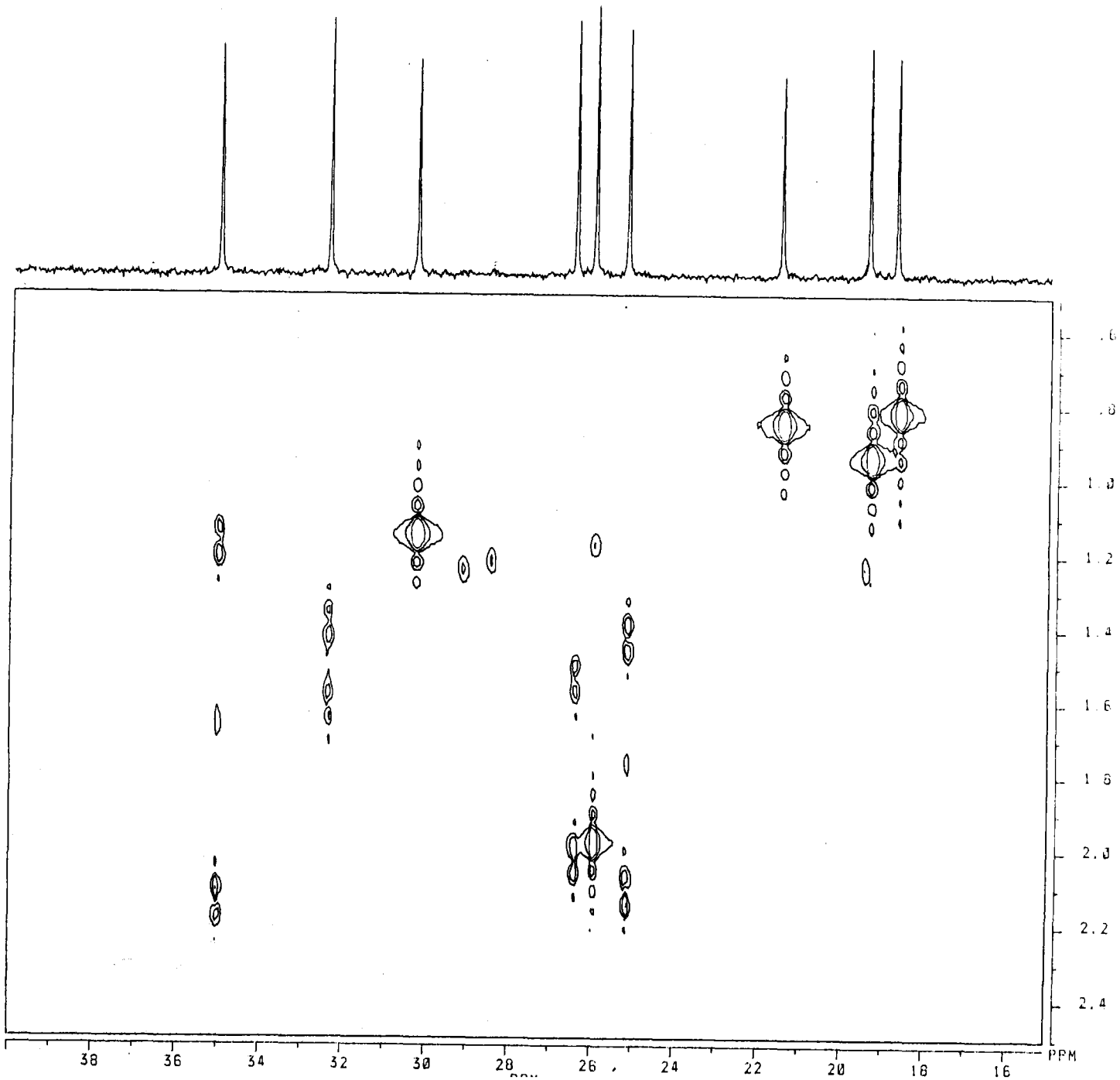


52



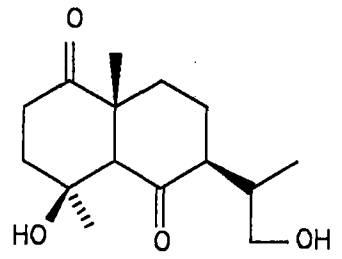
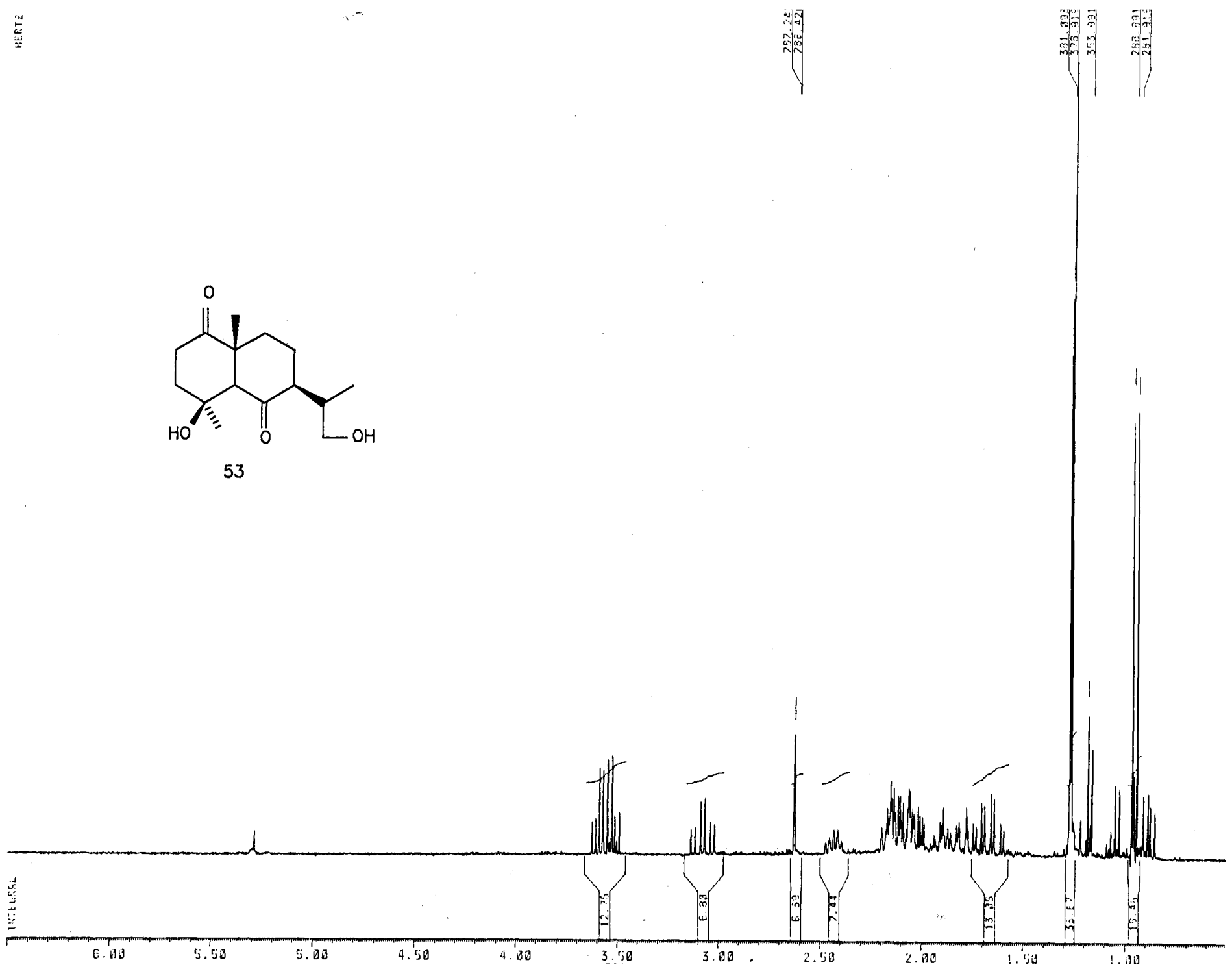


52



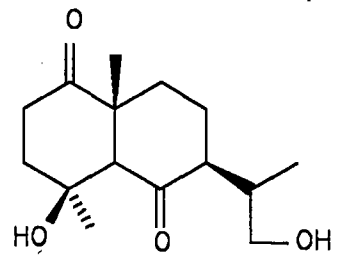
INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00



53

210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20



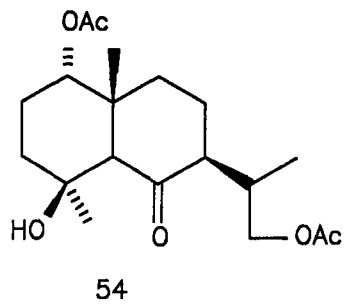
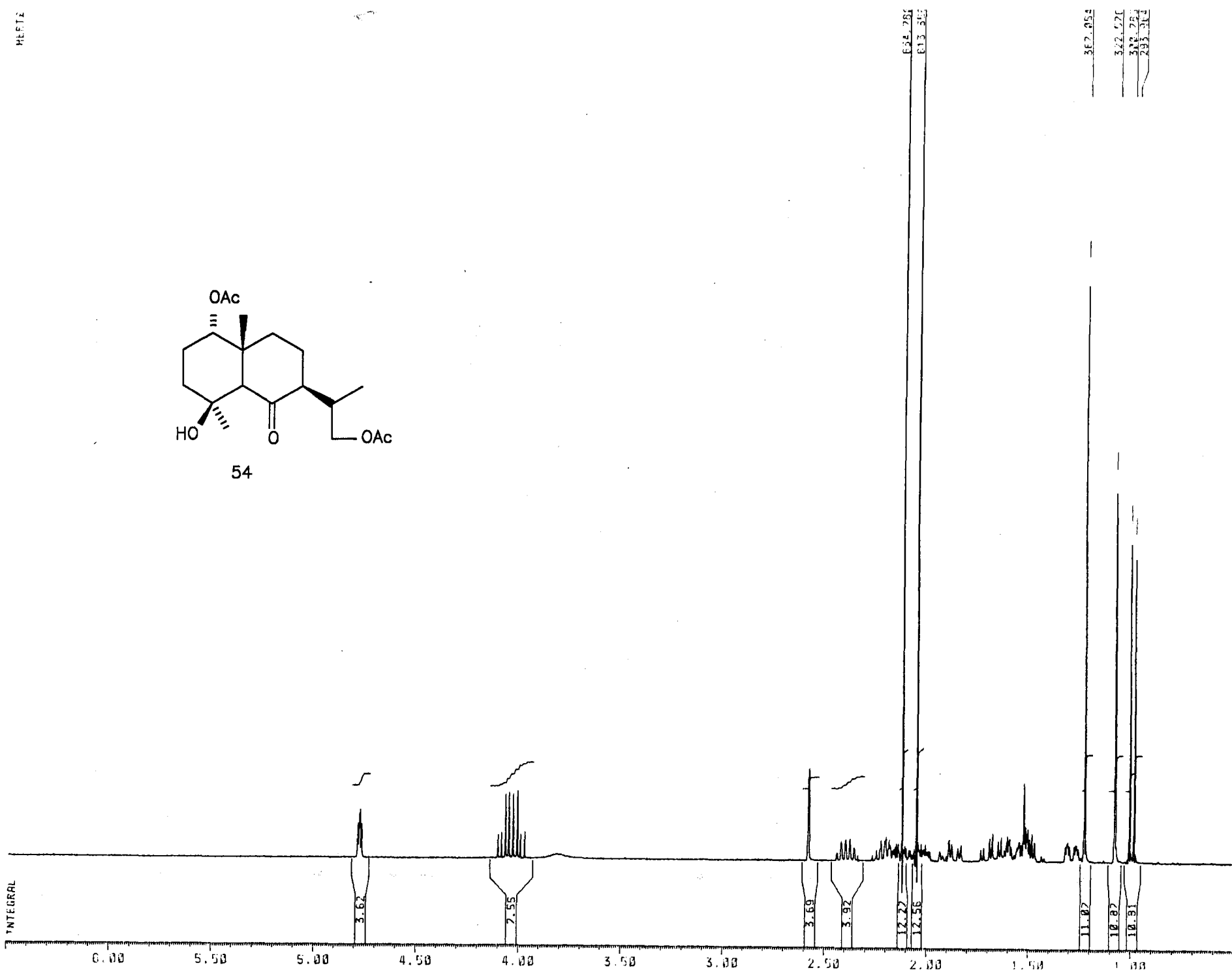
53

PPM
215.928
213.591

77.528
77.096
76.623
76.365
69.592
64.963
63.295
54.662
53.582
39.534
35.581
33.011
32.178
31.112
29.521
29.341
25.833
19.691
15.463

64.963
63.295
54.662
39.534
35.581
33.011
32.178
31.112
29.521
25.833
19.691
15.463

INTEGRAL

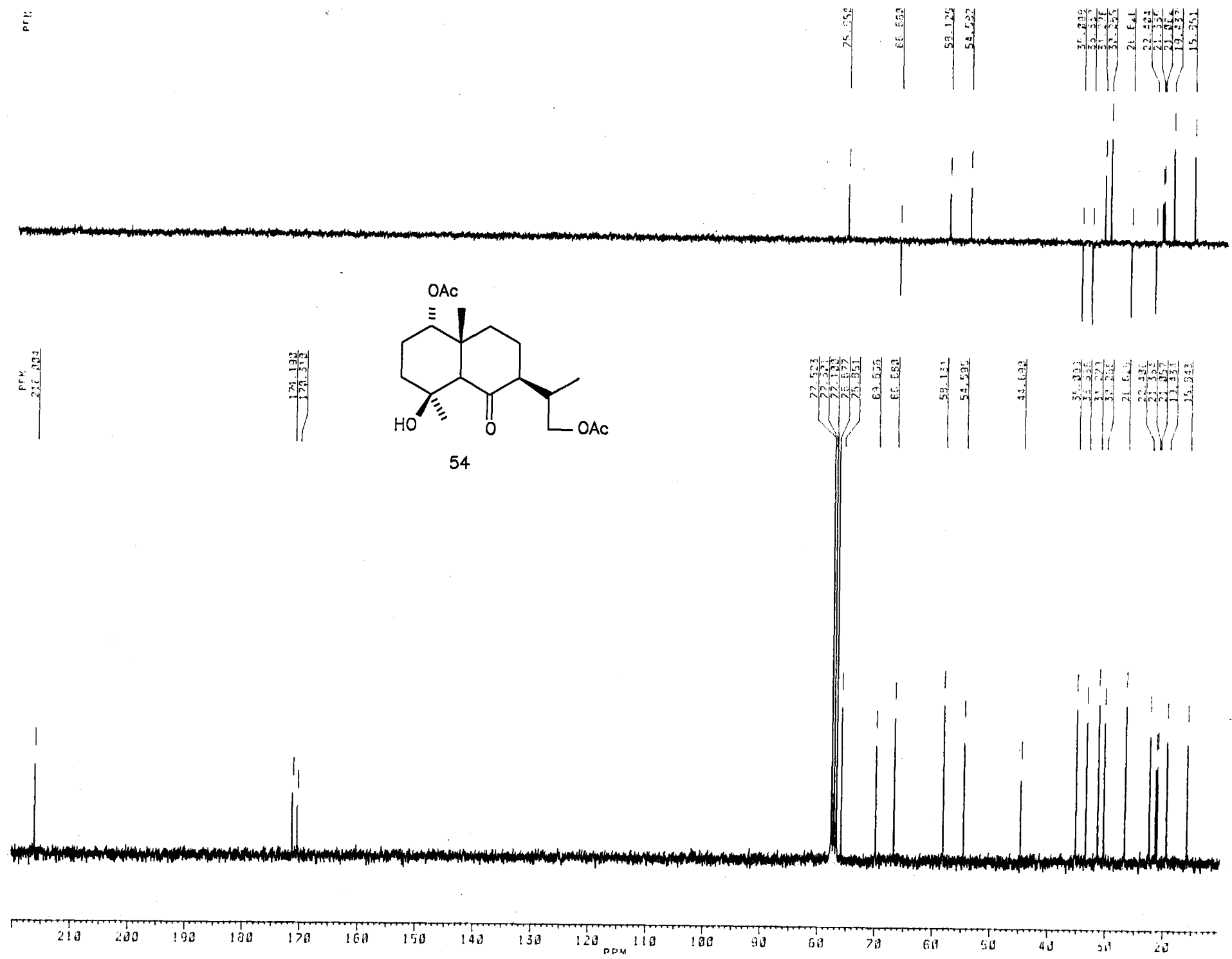
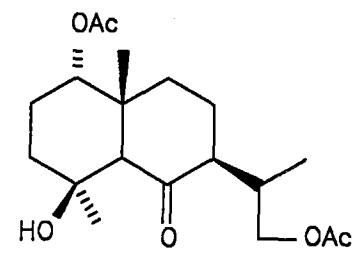


HEFTZ

PTK

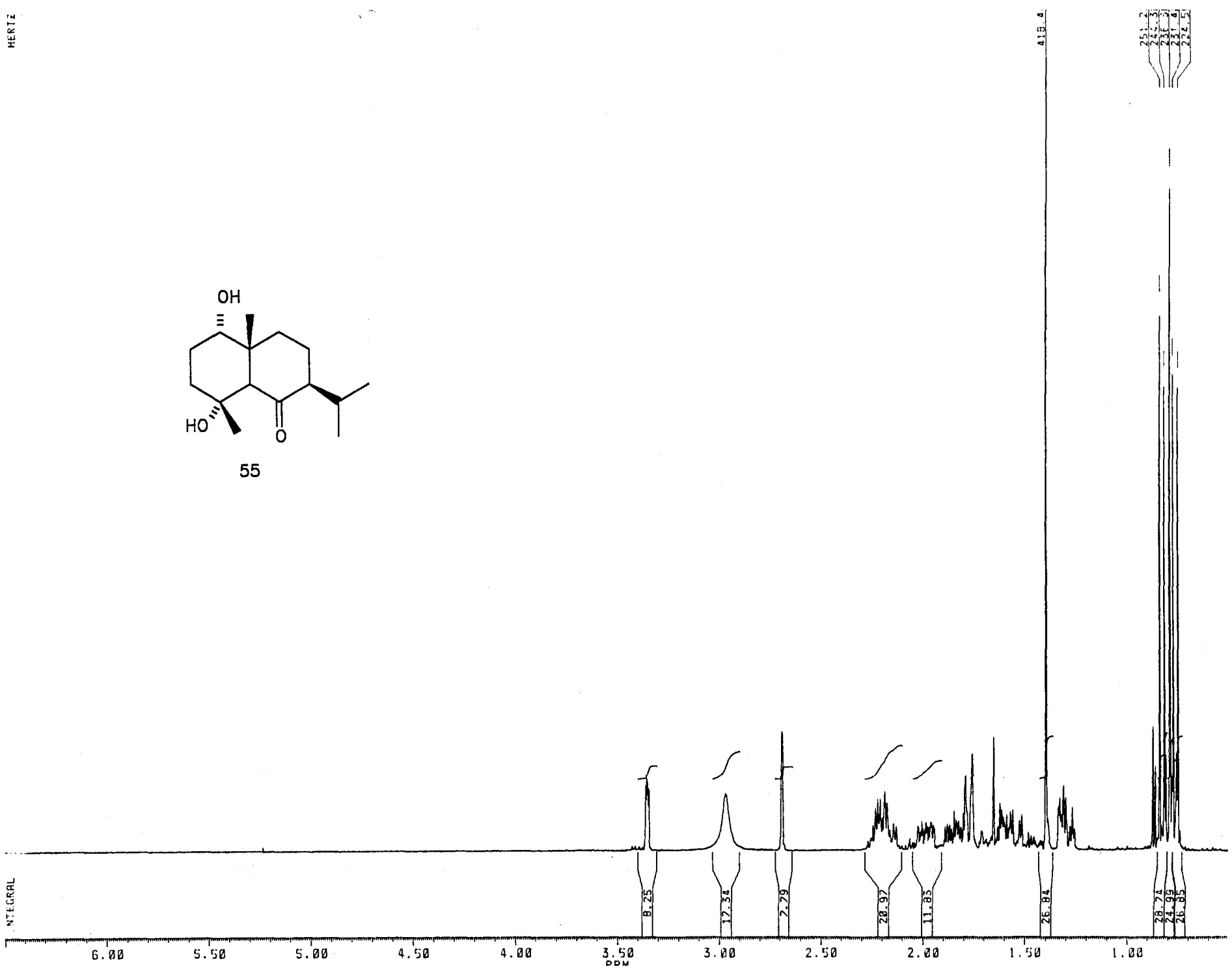
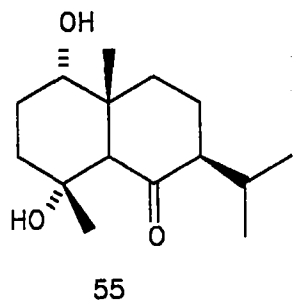
RFM
21C_304

174.132
173.312

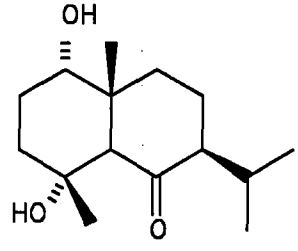
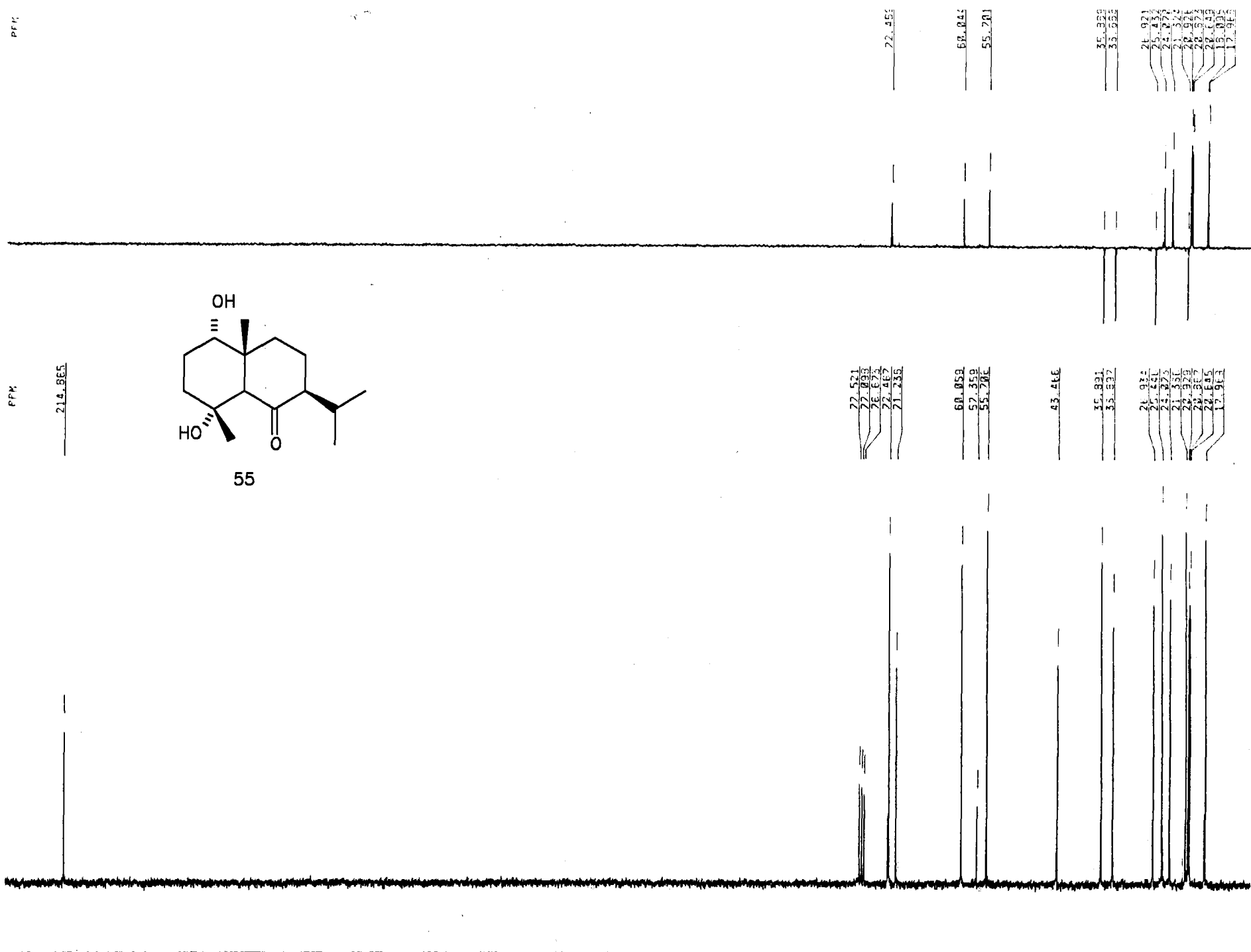


INTEGRAL

HERTZ



220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20



55

PPM

214.865

77.571
77.093
76.673
72.467
71.236

60.059
57.359
55.206

43.416

35.891
35.537

21.921
21.433
21.277
21.152
20.976
20.677
20.149
17.917

72.455

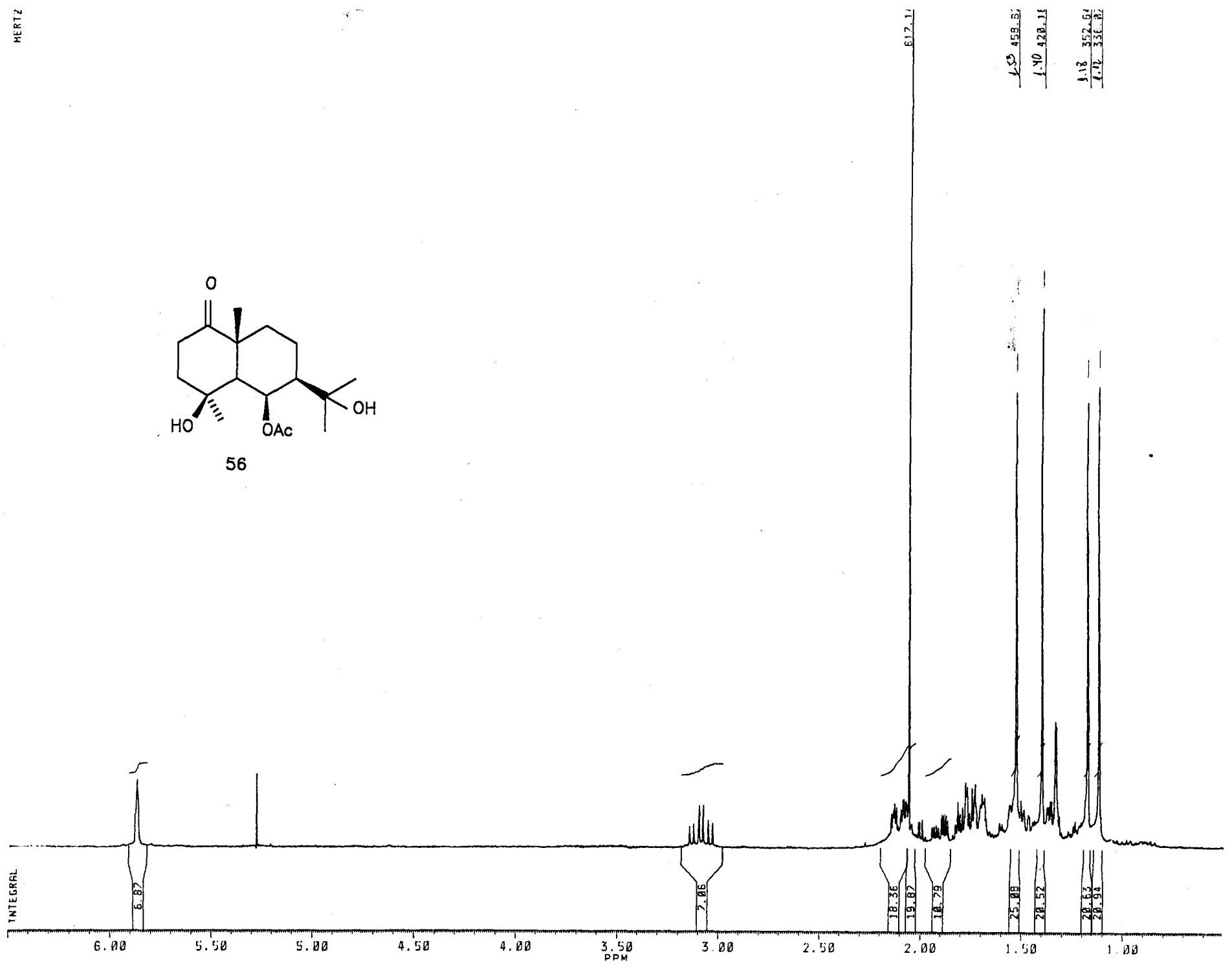
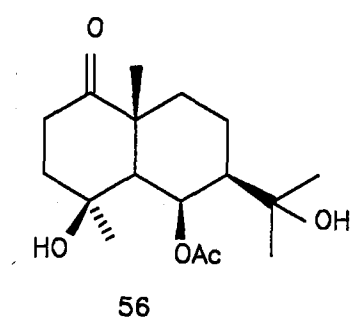
60.045
55.201

35.829
35.592

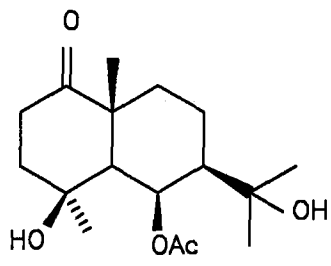
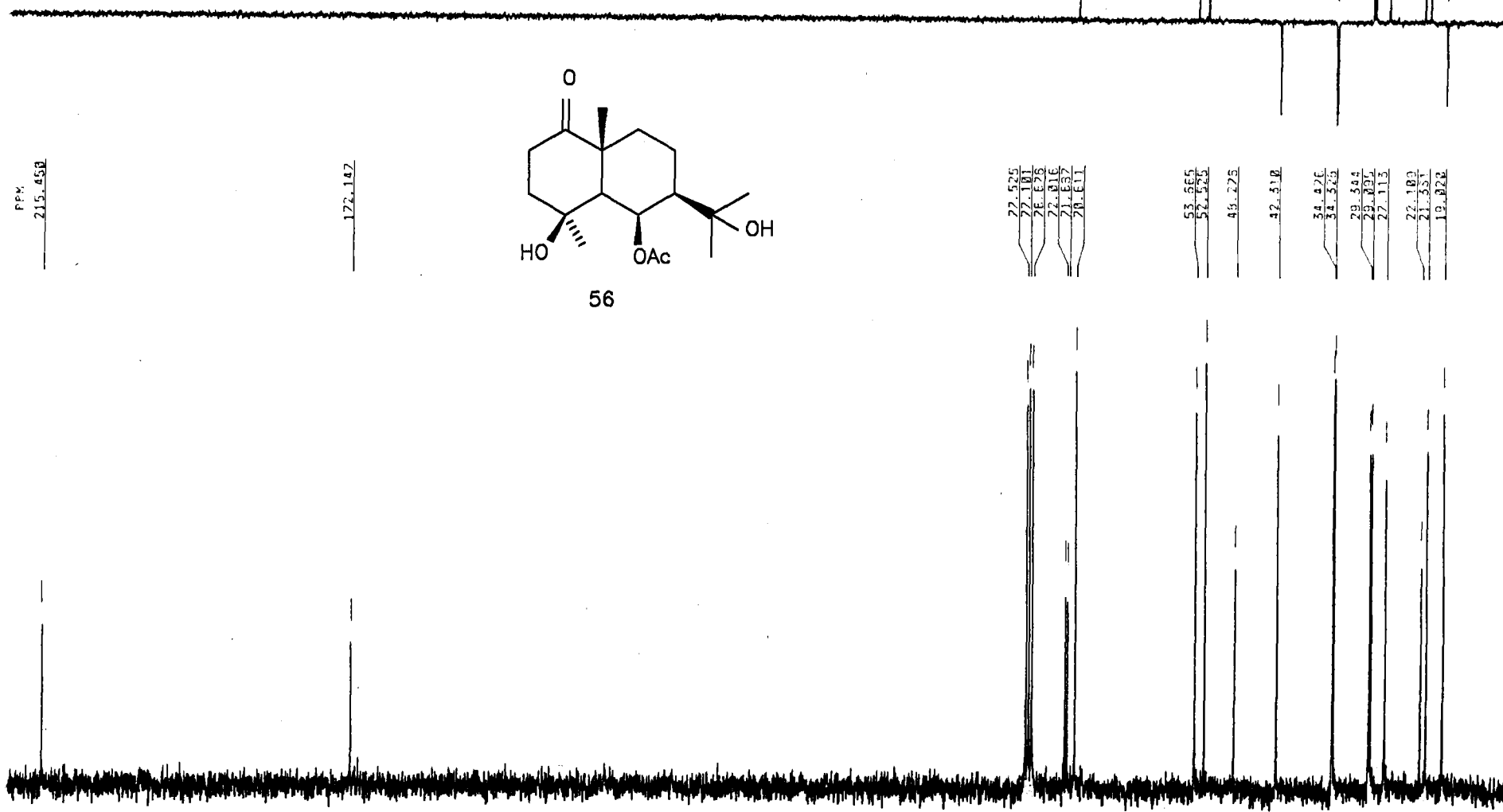
21.921
21.433
21.277
21.152
20.976
20.677
20.149
17.917

INTEGRAL

HERTZ



210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20



56

27.525
27.101
26.672
27.816
21.637
20.111

53.565
52.525
49.275

42.510

34.476
34.523
29.545
29.892
27.115

27.189
21.351
19.022

20.111

53.564
52.524

42.509

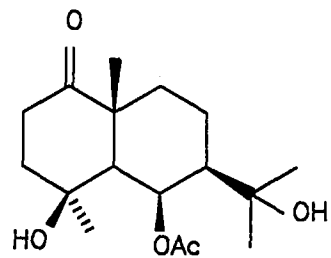
34.476
34.523
29.545
29.892
27.115

27.189
21.351
19.022

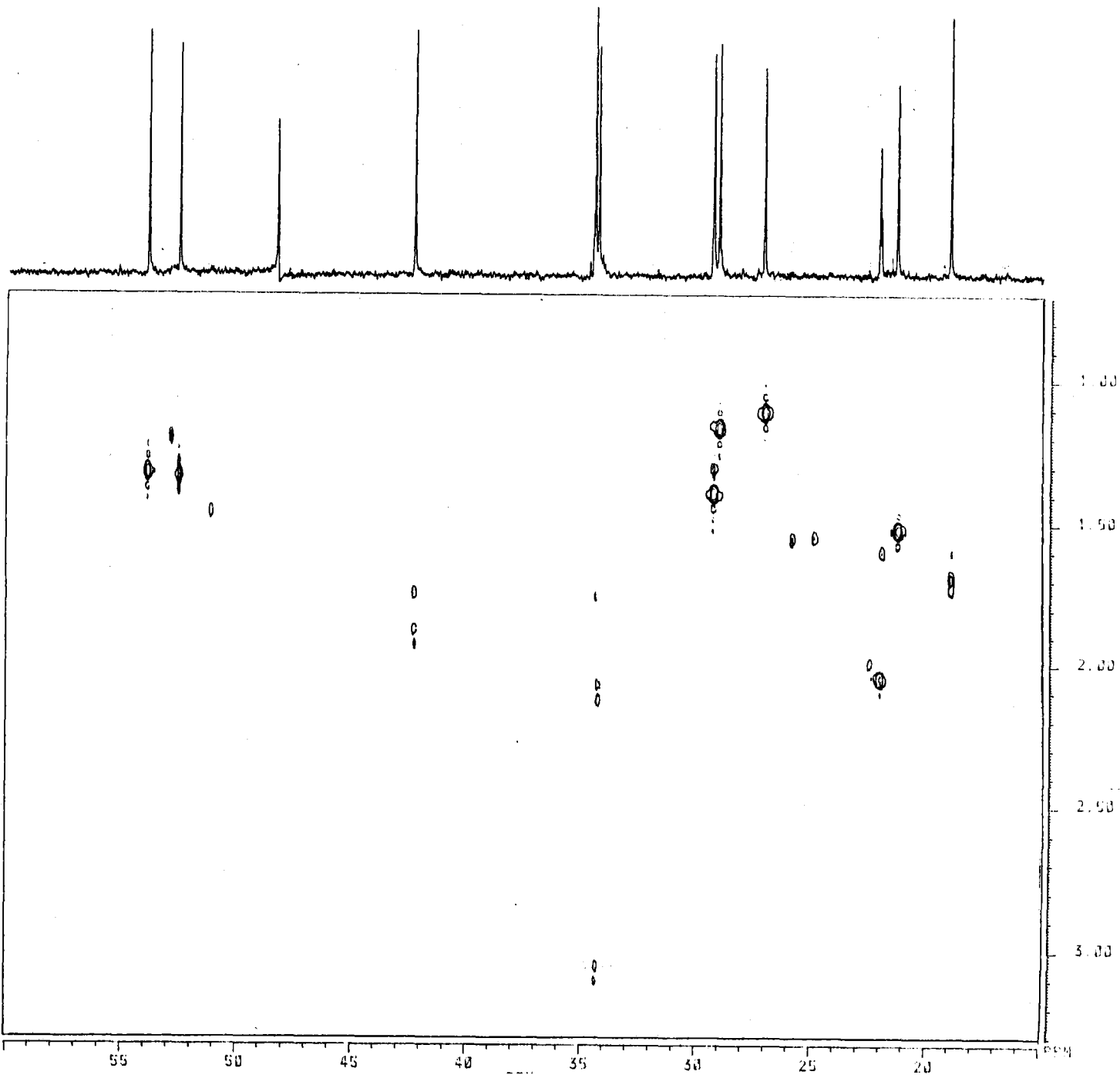
PPM

215.458

172.147



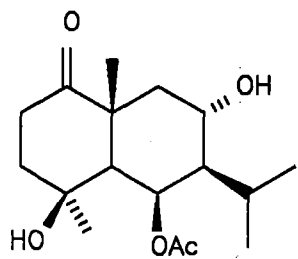
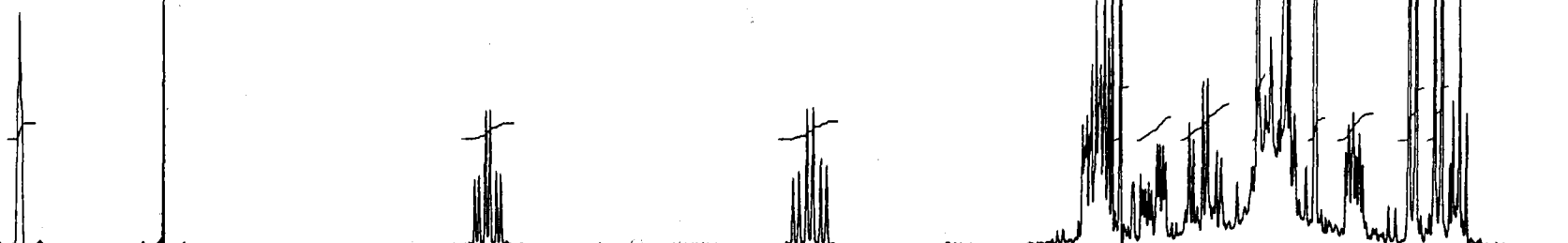
56



INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

PPM



57

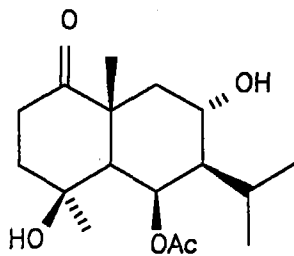
HERTZ

610.1
469.41
448.6
314.11
307.8
295.01
258.9

PPM

214.401

171.299

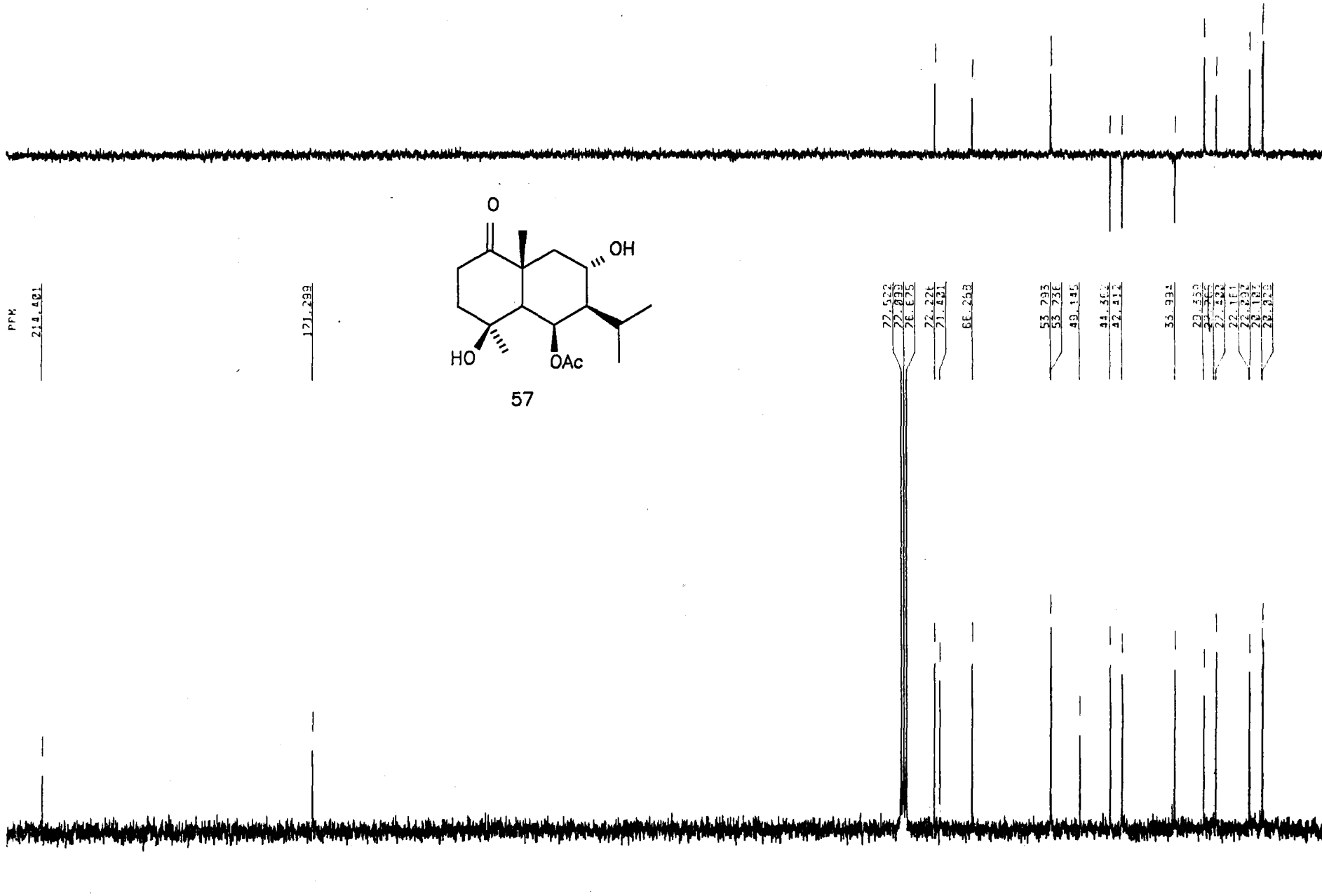


210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20

PPM

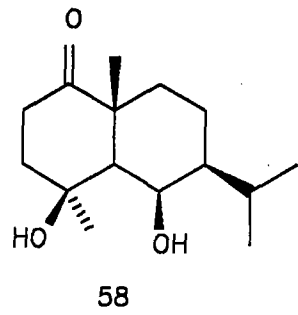
77.522
77.693
76.675
72.224
71.641
66.258
53.793
53.736
49.145
44.367
42.417
33.991
29.549
27.421
22.161
22.093
20.187
20.029

77.222
66.265
53.797
53.731
44.367
42.417
33.991
29.549
27.421
22.161
22.093
20.187
20.029



INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00
PPM

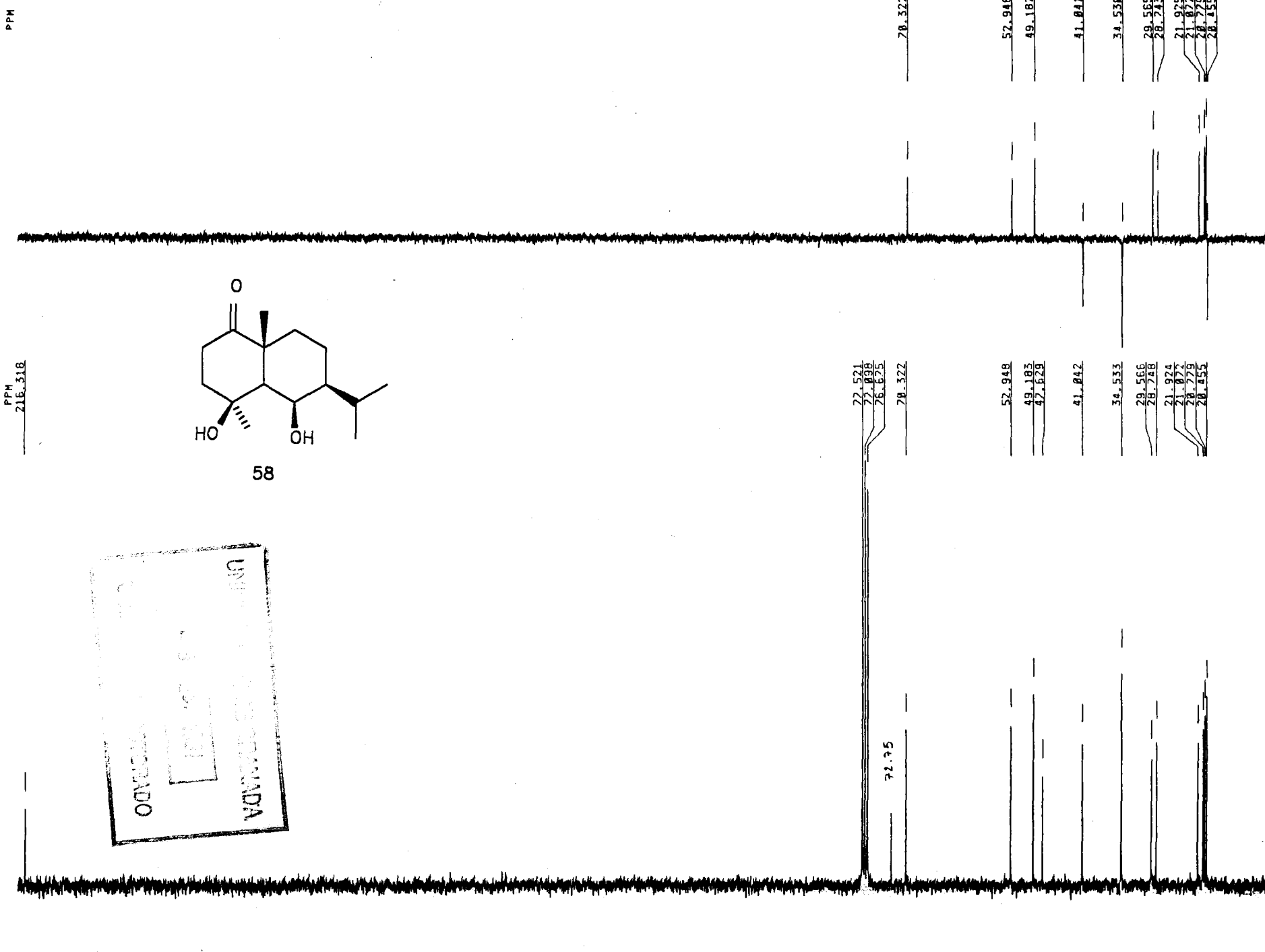


HERTZ

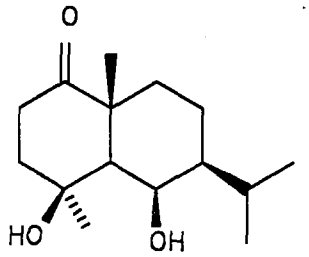
473.9
409.7
233.5
232.2
230.3
228.1

210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20

PPM



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO QUÍMICO DE MÉXICO



58

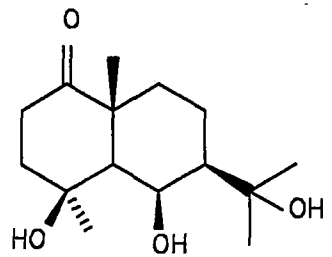
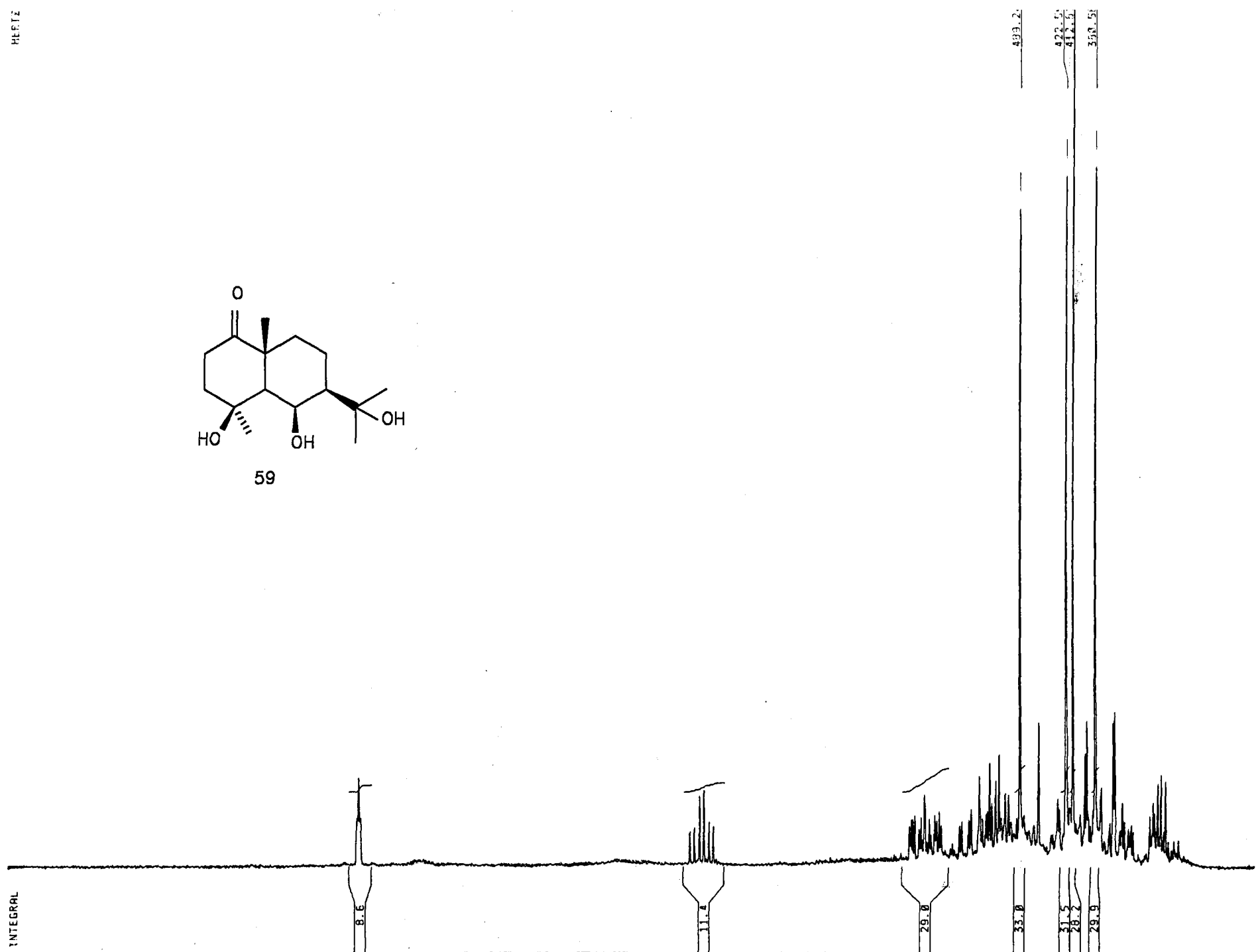
PPM
216.318

PPM

INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

PPM

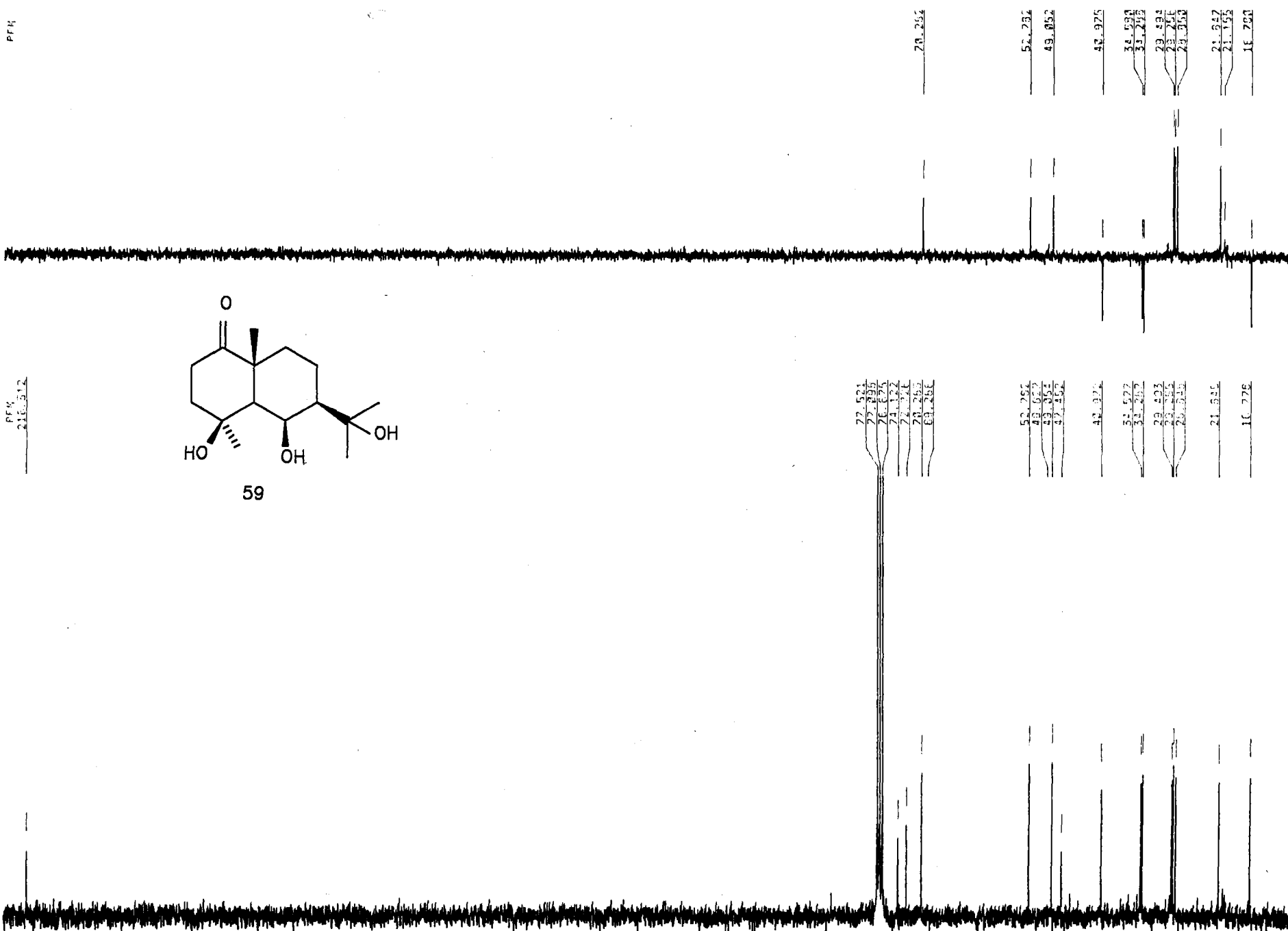


59

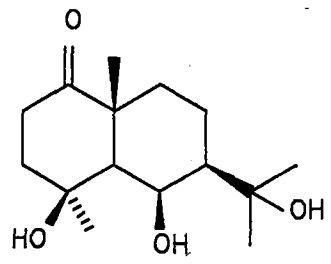
HERTZ

439.2
422.5
412.5
398.5

210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20



PPM
216.512

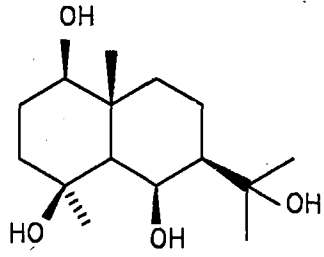


59

77.521
77.495
76.675
74.372
72.741
70.269
69.258
52.264
48.622
49.052
47.452
42.974
34.589
33.219
29.494
28.741
28.619
21.647
21.152
10.729

70.254
52.264
49.052
42.975
34.589
33.219
29.494
28.741
28.619
21.647
21.152
10.729

HERTZ



60

INTEGRAL

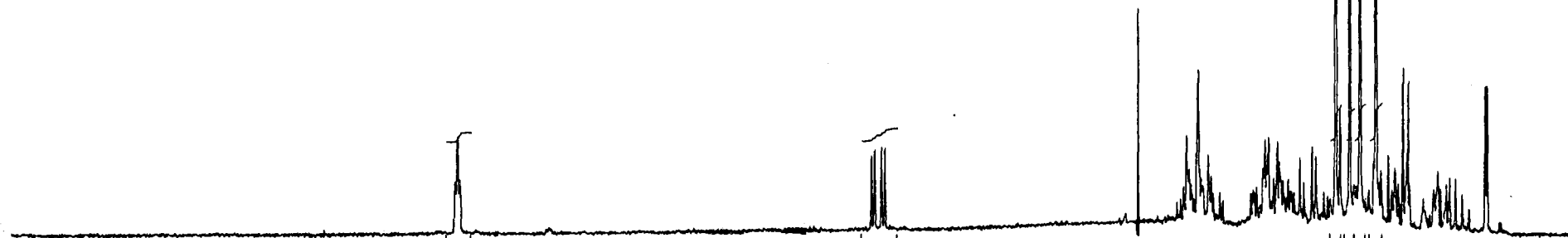
6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

5.08

6.54

2.26
1.61
1.89
1.83

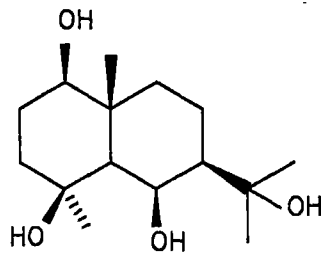
419.74
423.6
431.4
435.3



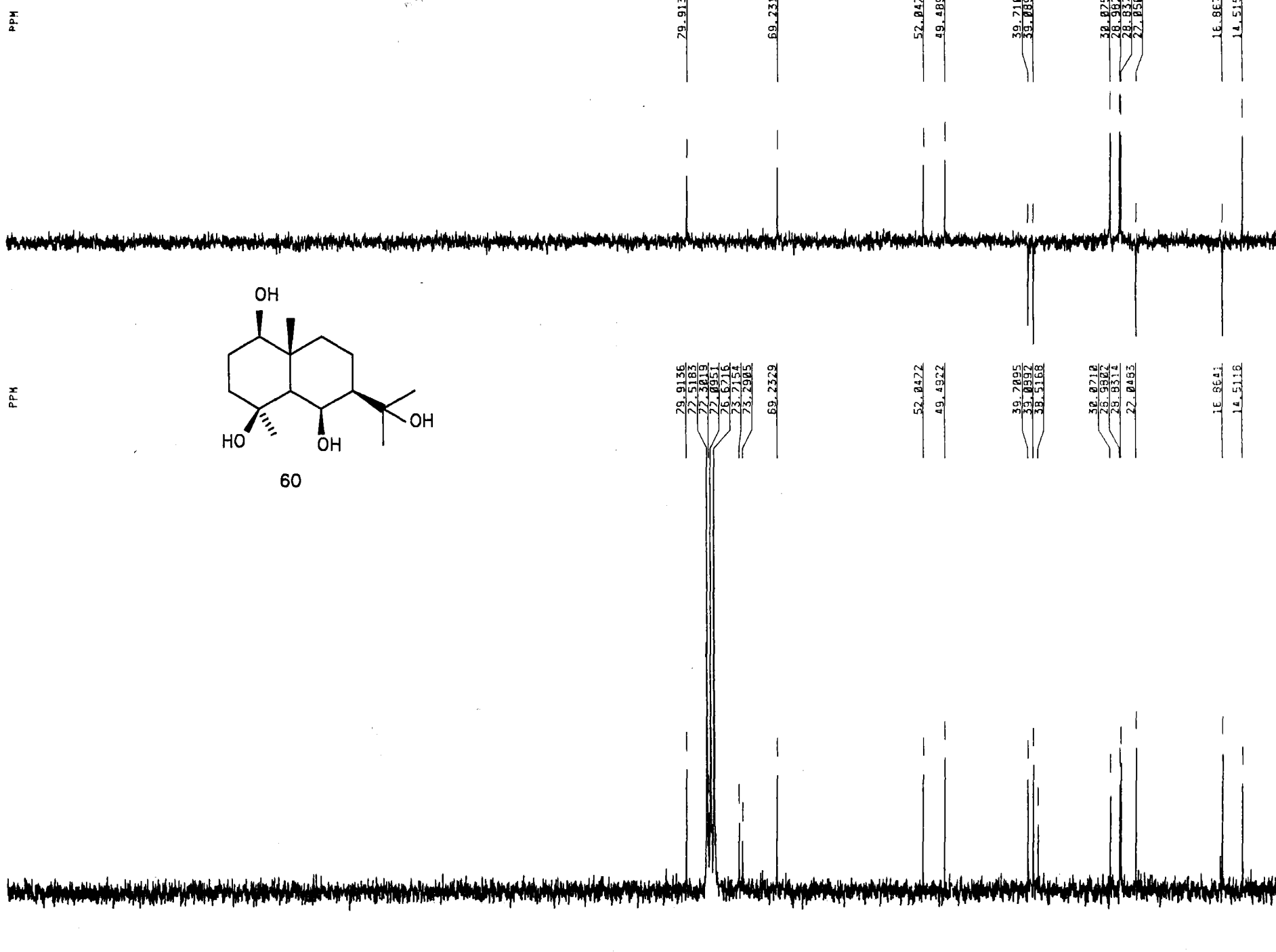
150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20

PPM

PPM



60



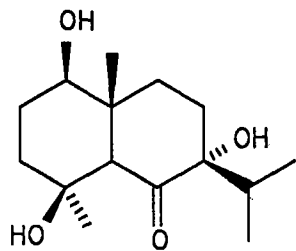
79.9136
77.5183
77.3819
77.0951
76.6216
73.2154
73.2905
69.2329
52.0422
49.4822
39.7095
39.0992
38.5168
30.0710
28.9802
28.8314
27.0163
16.8641
14.5116

HERTZ

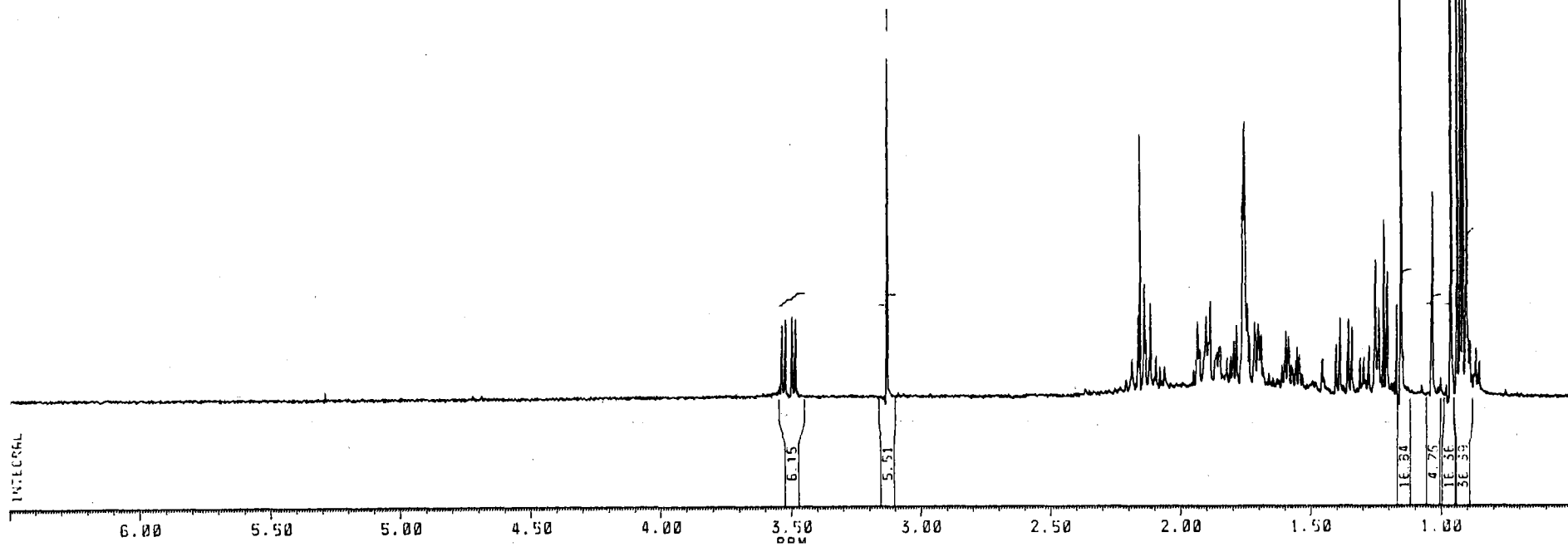
939.05

346.71

289.57
288.72
273.71
272.51
271.61



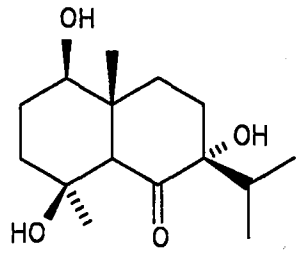
61



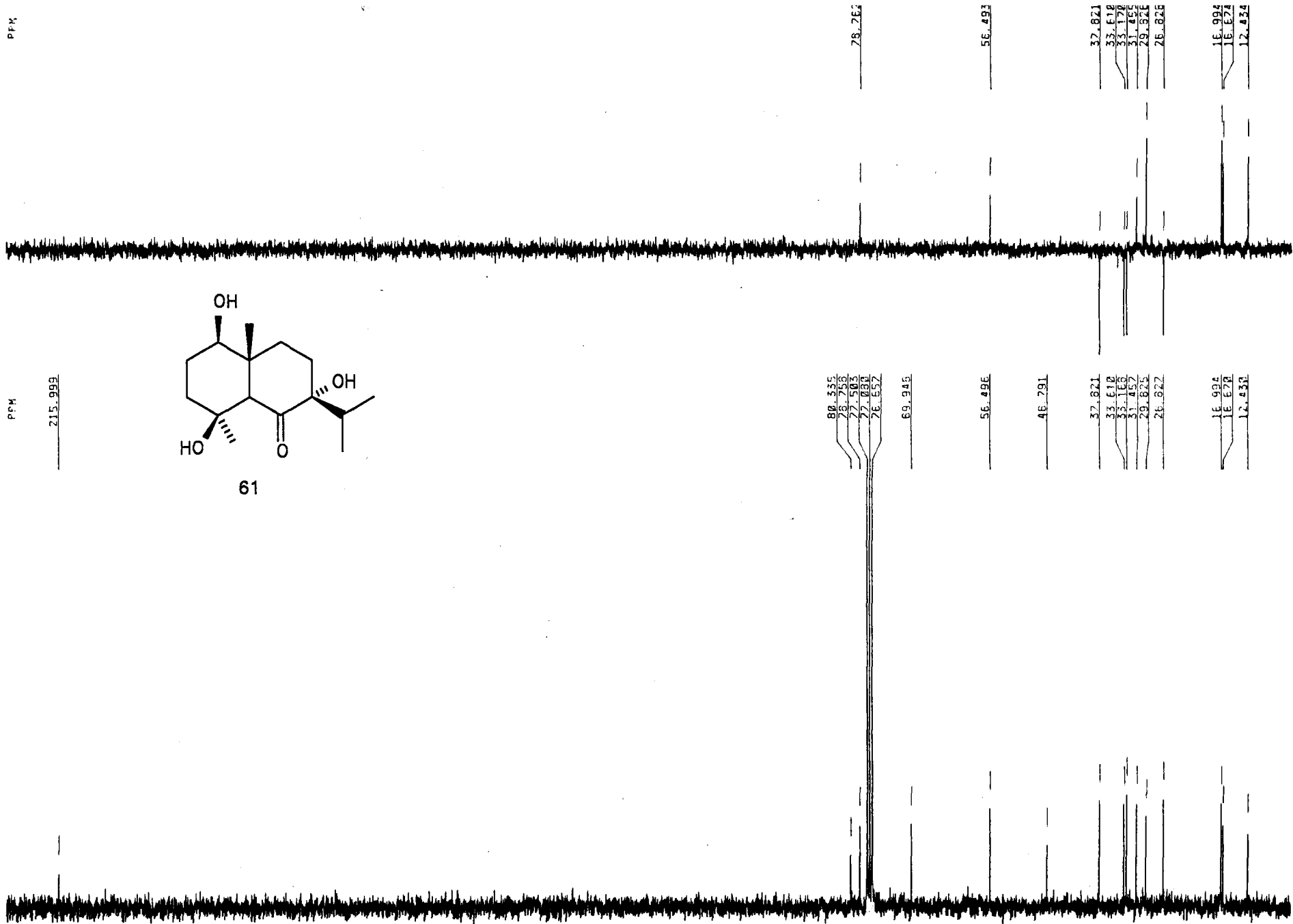
INTEGRAL

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10

PPM
215.999

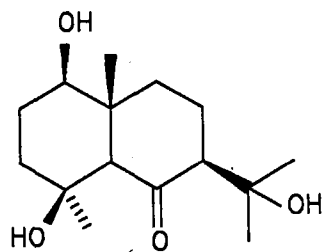


61



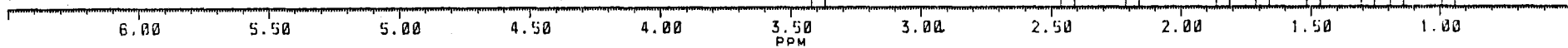
PPM

PPM



62

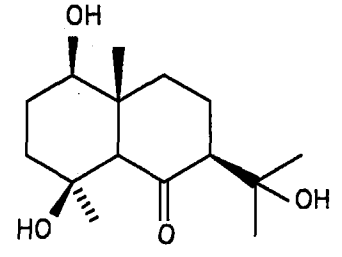
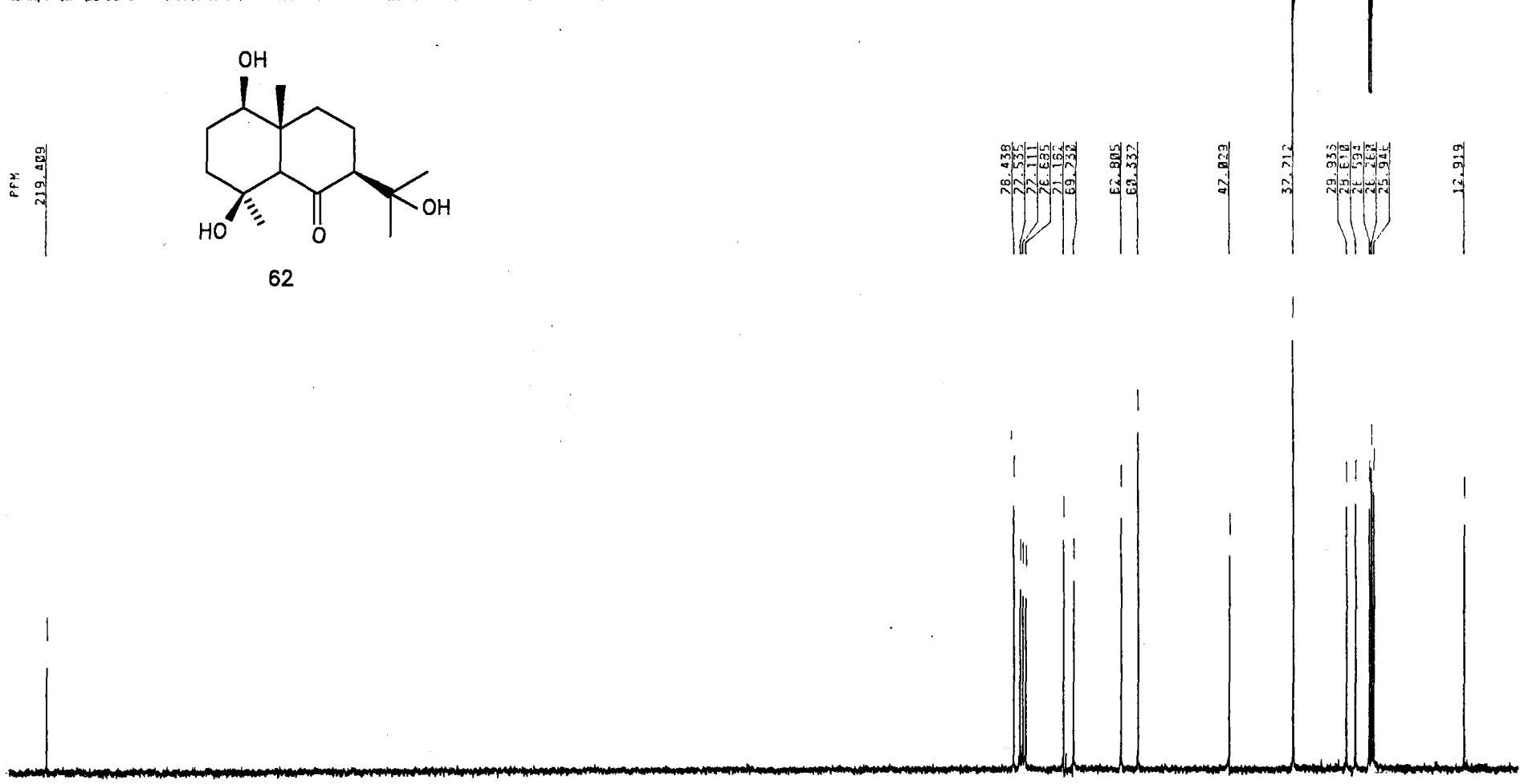
INTEGRAL



1.220
1.190
1.161

96.6

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10



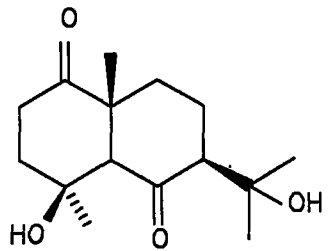
62

PPM

INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

PPM

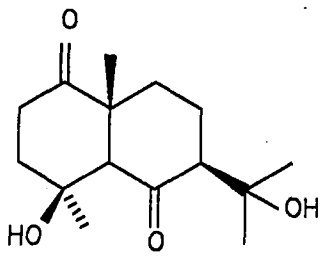


63

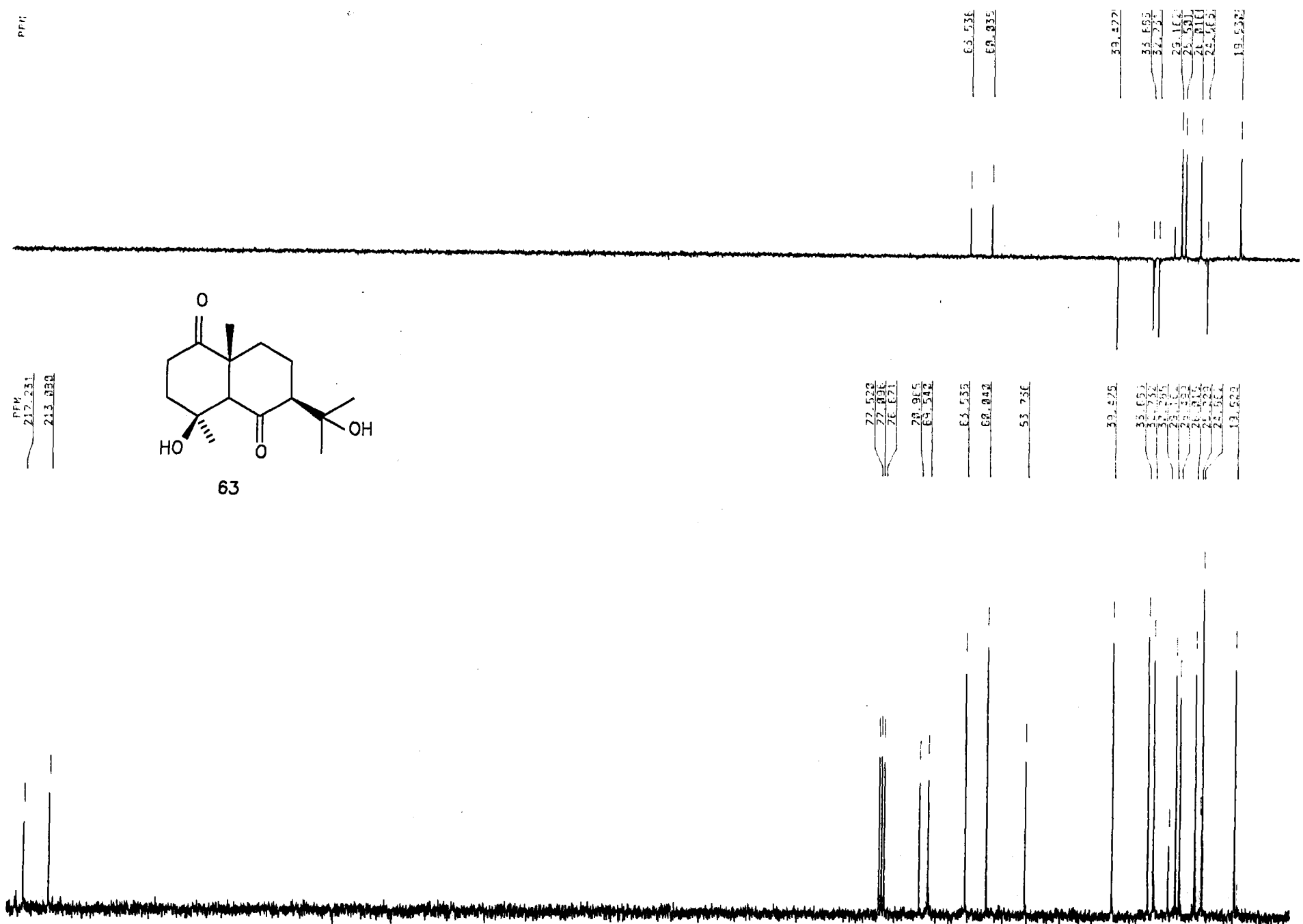
HERTZ

210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20

PPM
217.251
213.880

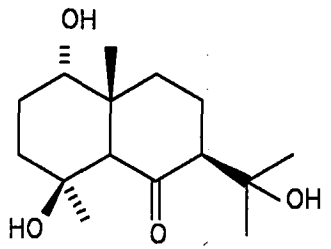
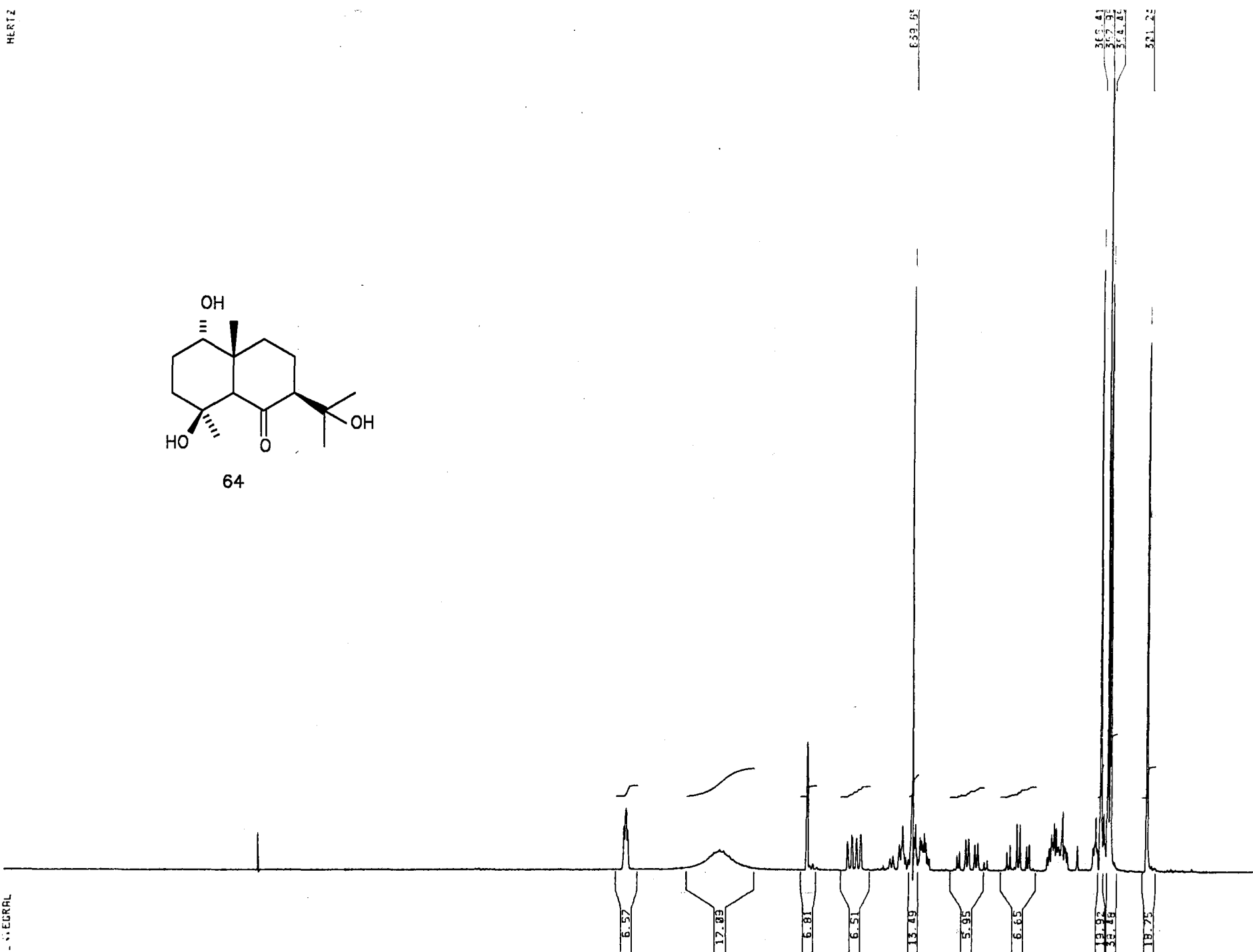


63



INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00



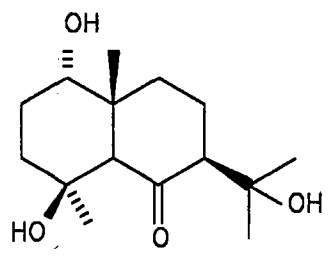
64

HERTZ

363.41
363.39
363.42
521.22

PPM

221.241



64

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20

PPM

77.524
77.189
76.677
75.532
71.144
70.112

75.531

60.262
57.781

60.261
57.636

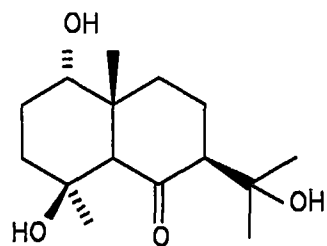
41.232

34.636
32.424
31.422
29.522
28.111
26.211
25.211
24.211

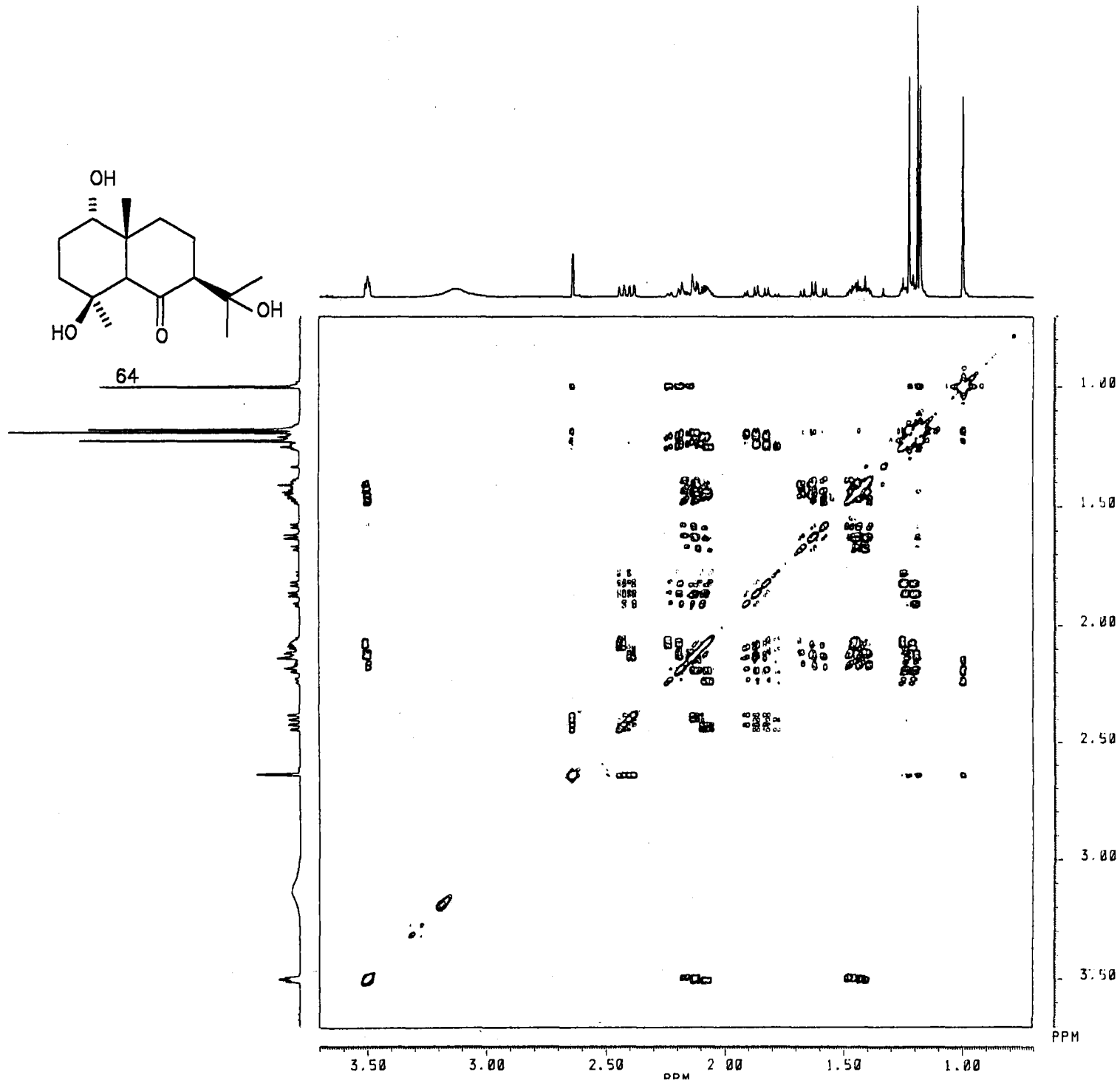
34.631
32.421
31.421
29.521
28.111
26.211
25.211
24.211

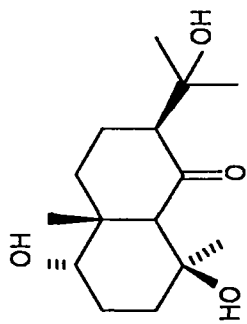
12.352

12.351

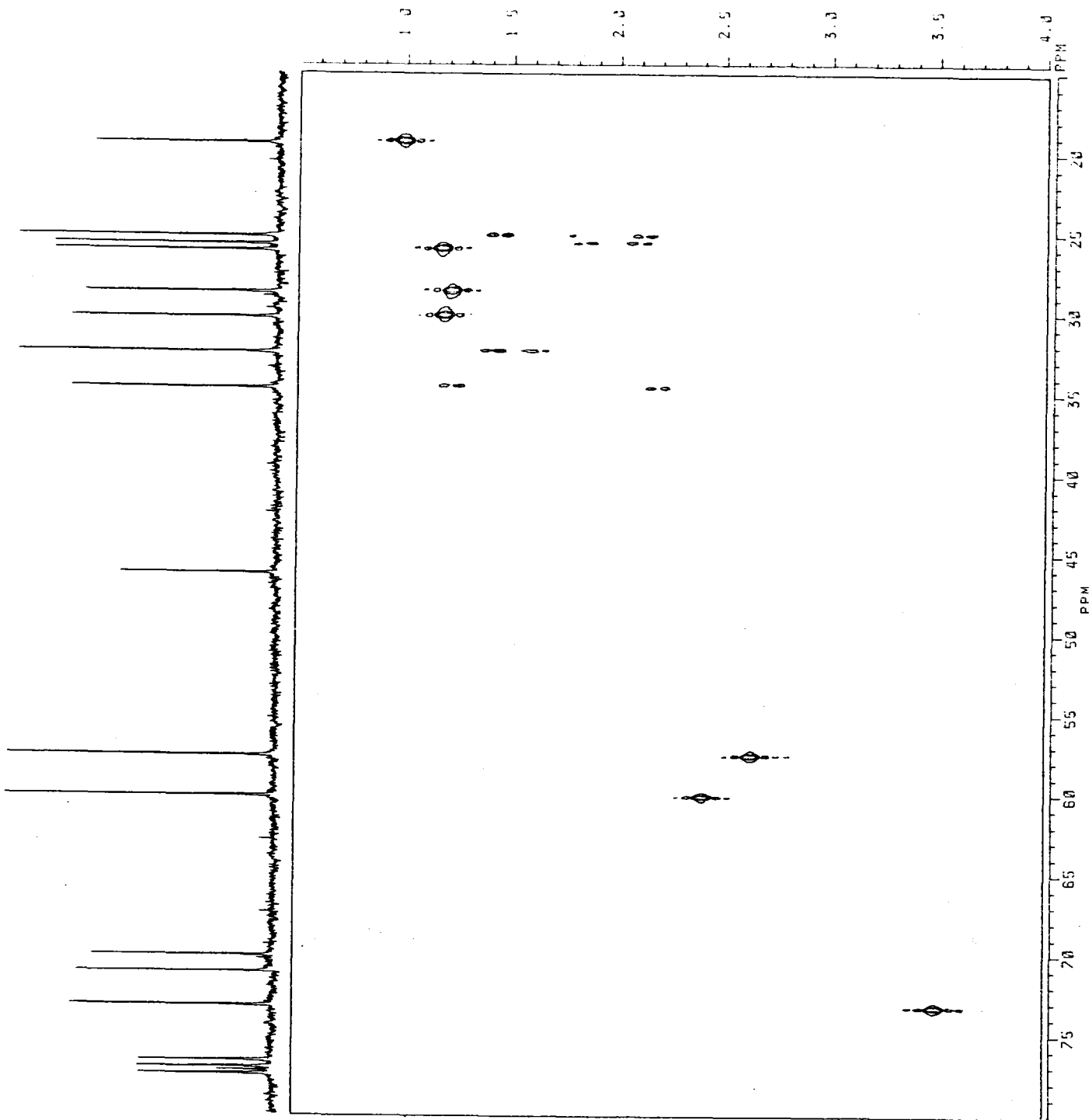


64





64



INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

DDM

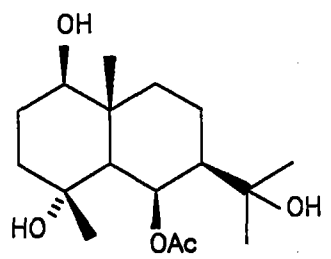
3.05

3.19

10.00

20.28

20.82

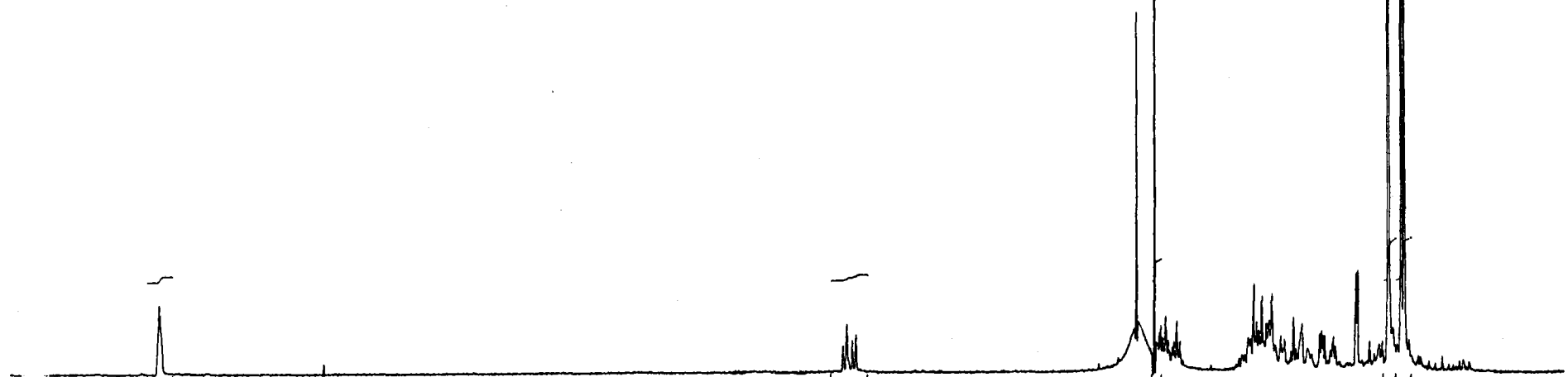


65

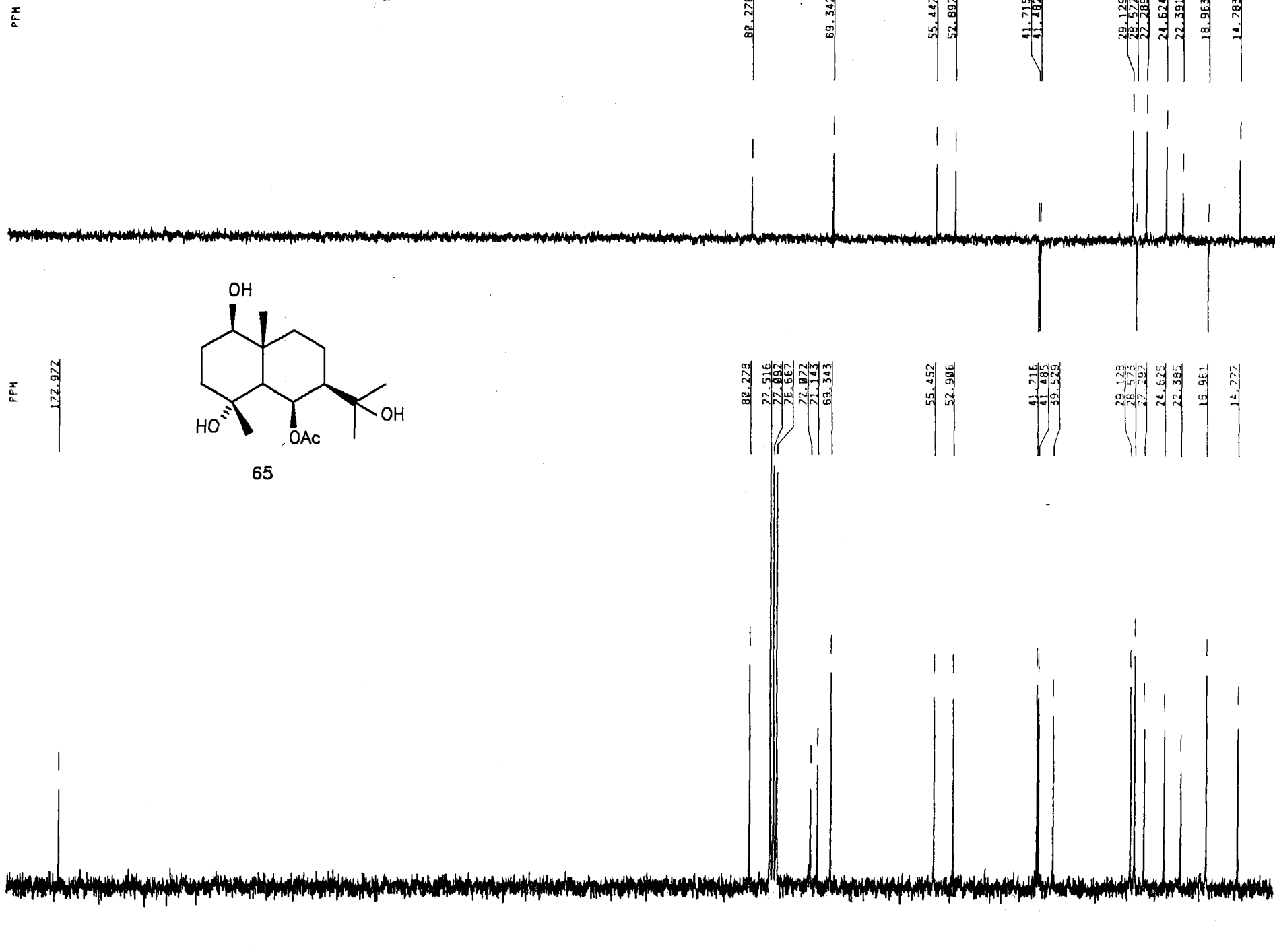
HERTZ

675.5

304.9
303.2
301.6



170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20

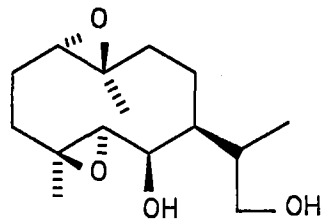
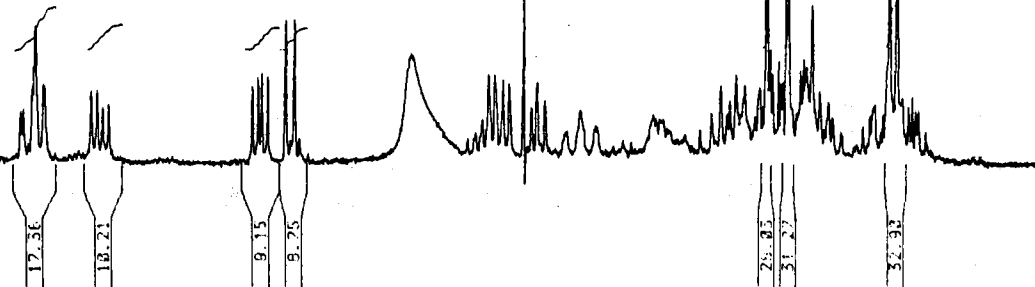


PPM

PPM

INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00



66

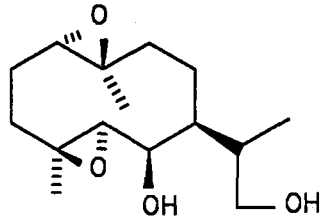
HERTZ

415.8
396.3
299.5
291.4

170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10

PPM

PPM



66

77.5209
77.8977
76.8746

69.4415
67.7252

64.6199

68.2446
68.6393
69.8971

46.9151

48.5934
39.2816

34.4783

24.6972
23.4137

16.2384
16.0956

69.431

67.761

64.611

68.244

46.911

48.591

39.271

34.471

24.701

23.421

16.731

16.091

INTEGRAL

6.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

4.86

4.91

4.89

5.71

16.67

7.04

20.26

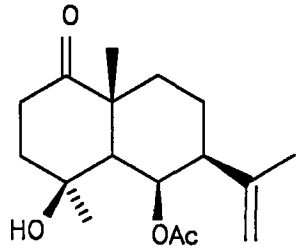
11.52

6.05, 6.2

5.24, 1.6

4.15, 3.3

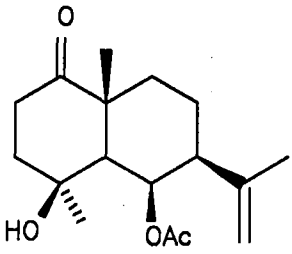
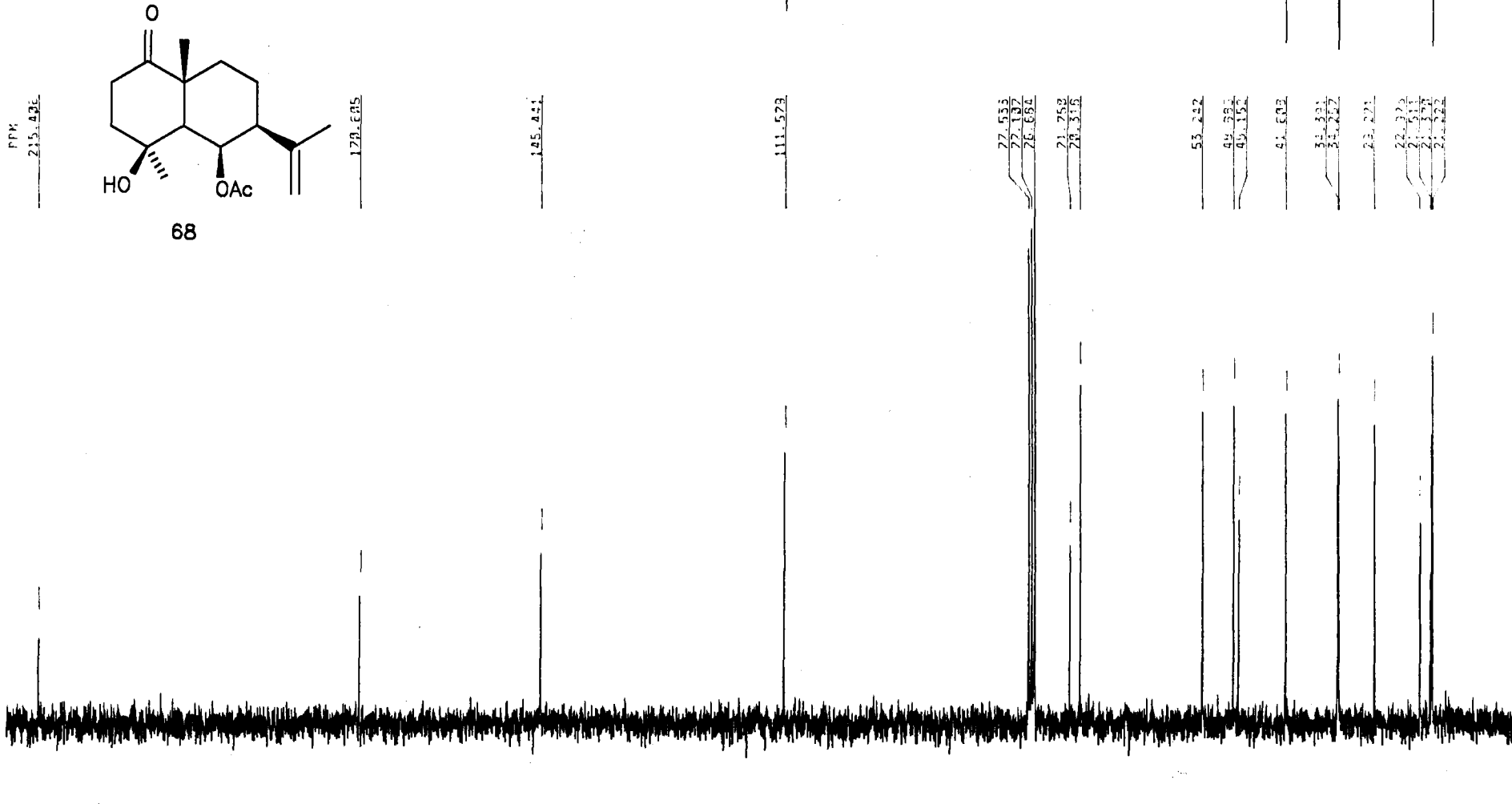
4.21, 1.6



68

HERTZ

210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20



68

PPM
215.436

170.695

145.441

111.573

77.555
77.187
76.664

71.752
70.315

53.242

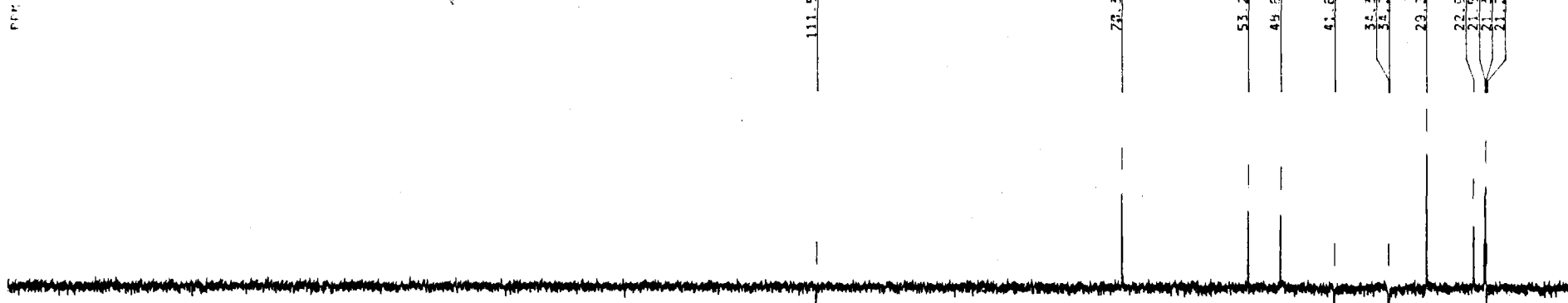
49.384
49.152

41.602

35.321
34.227

23.271

22.325
21.511
21.576
21.525



111.5

70.3

53.4

49.6

41.6

35.3
34.2

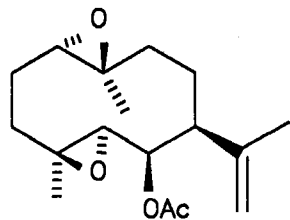
23.3

22.3
21.5
21.5
21.5

INTEGRAL

0.00 5.50 5.00 4.50 4.00 3.50 3.00 2.50 2.00 1.50 1.00

HERTZ



69

5.35

4.79

4.38

6.44

5.60

19.59

14.76

8.05

17.04

17.27

6.75

3.77

612.45

515.41

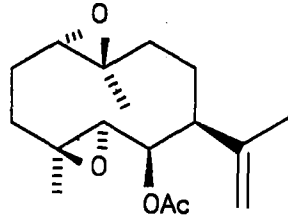
441.82

428.24

PPM

172.812

146.112



112.142

112.15

77.516
77.057
76.621

75.021

65.525

65.32

60.242
59.873
59.431

60.24

49.123

49.12

42.545

41.051
40.572

34.255

34.251

24.654
23.811
22.968
21.915

24.651
23.851
22.927
21.872

16.848
16.411

16.841
16.751

170

160

150

140

130

120

110

100

90

80

70

60

50

40

30

20