



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Departamento de Química

***“ESTUDIO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE ESPECIES
ENDÉMICAS CANARIAS DE LOS GÉNEROS TOLPIS Y
PULICARIA: APLICACIONES QUIMIOTAXONÓMICAS Y DE
ACTIVIDAD BIOLÓGICA”***

MEMORIA

Presentada para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Químicas por
Francisco Javier Pérez Galván

Las Palmas de Gran Canaria, Marzo 2008

**Dedicada con cariño a mi familia, especialmente a
mi madre, mis hermanos y mis tíos Boro y Alicia**

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del Grupo Química Orgánica I del Departamento de Química de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, en especial a los directores de tesis, el Dr. D. Jorge Triana Méndez y la Dra. Dña. Mariana López Sánchez, sin cuya experiencia, ayuda y consejos no habría sido posible la culminación de esta Memoria de Tesis, y al Dr. D. José Luis Eiroa Martínez por su ayuda en la recolección de las especies del Género *Pulicaria*, por los consejos en el terreno de la quimiotaxonomía y por sus constantes apoyo y ánimos. Asimismo, a los miembros del Departamento de Química que, de algún modo, me han ayudado y apoyado en la culminación de este trabajo.

Al Dr. D. Jaime Bermejo Barrera y a los miembros del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, C.S.I.C. de Tenerife, en especial a los Dres. D. Juan Francisco León Oyola y D. Juan Carlos Hernández Pérez por su ayuda en la obtención de los datos de RMN y Masas, así como a los técnicos encargados de dichos equipos pertenecientes al C.S.I.C. e I.U.B.O. Igualmente a los Dres. D. Javier González-Platas del Departamento de Física Fundamental de la Universidad de La Laguna y D. Matías López Rodríguez del I.U.B.O., por la realización de los espectros de difracción de rayos X (ORTEP).

Al Dr. D. Francisco Estévez Rosas del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología, de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, por la realización de las pruebas de actividad citotóxica.

Al Dr. D. Pedro Luis Pérez de Paz del Departamento de Biología Vegetal (Botánica) en la Facultad de Farmacia de la Universidad de La Laguna, por la recolección y clasificación botánica de las especies del género *Tolpis* estudiadas.

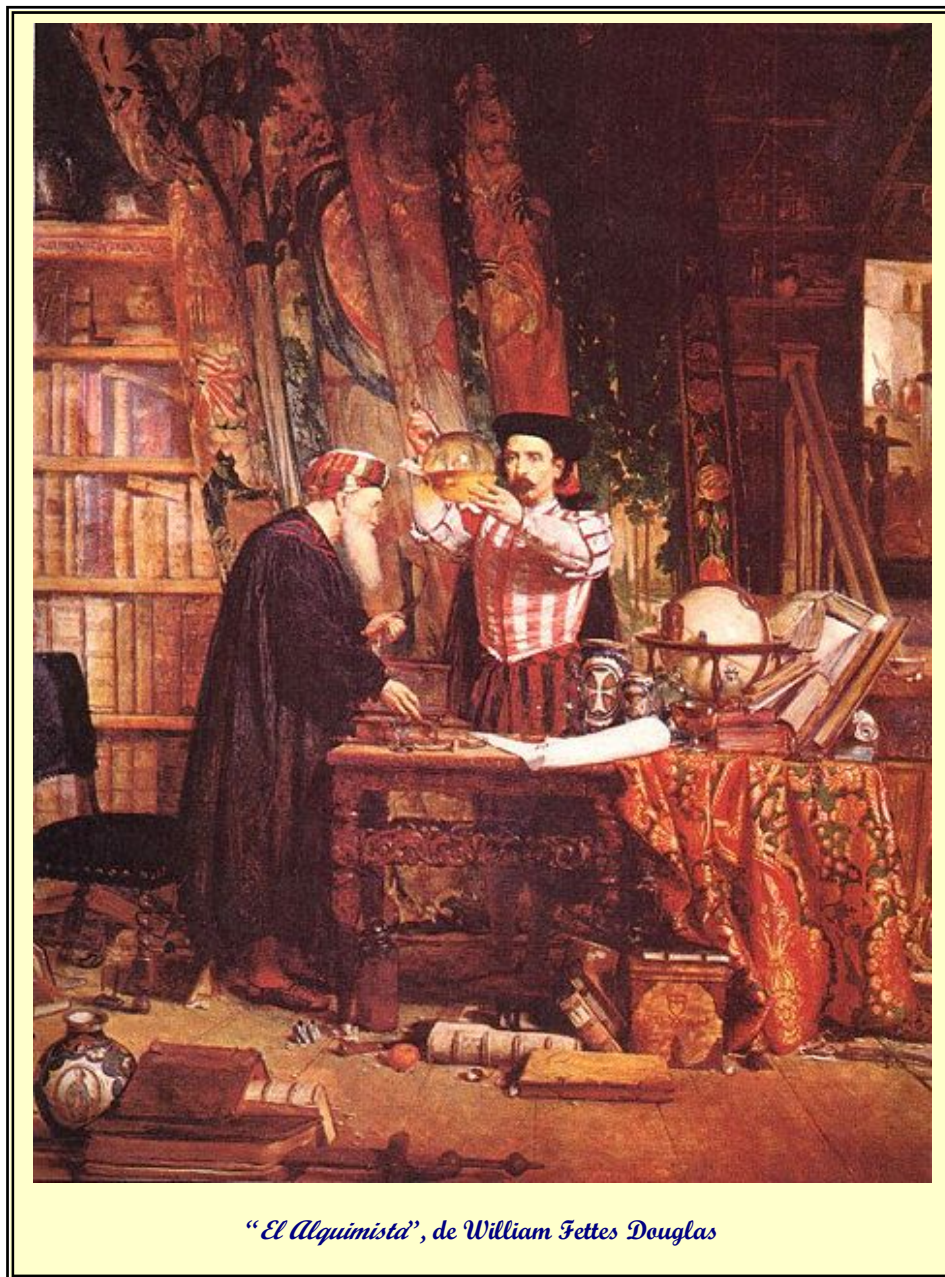
A la Dra. Dña. Rosa Febles Hernández del Jardín Botánico Canario Viera y Clavijo de Las Palmas de Gran Canaria, por la clasificación botánica de las especies del género *Pulicaria* estudiadas.

A mi madre y a mis hermanos Olga, Juani y Cristóbal por soportar estoicamente mis problemas y por ser un punto de apoyo incondicional en todo el proceso seguido en estos años de trabajo. Sin ellos no estaría al final de este proceso.

Igualmente a mis tíos Boro y Alicia por el ánimo y el apoyo recibido durante la realización del trabajo.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. Objetivos..... | 19 |
| 3. Estudio químico de especies del Género <i>Tolpis</i> | |
| 3.1. Introducción al Género <i>Tolpis</i> | 25 |
| 3.2. <i>Tolpis webbii</i> Sch. Bip. ex Webb et Berth. Parte Teórica..... | 35 |
| 3.3. <i>Tolpis webbii</i> Sch. Bip. ex Webb et Berth. Parte Experimental..... | 65 |
| 3.4. <i>Tolpis</i> sp. Parte Teórica..... | 91 |
| 3.5. <i>Tolpis</i> sp. Parte Experimental..... | 115 |
| 4. Estudio químico de especies del Género <i>Pulicaria</i> | |
| 4.1. Introducción al Género <i>Pulicaria</i> | 139 |
| 4.2. <i>Pulicaria burchardii</i> A. Hans. & Sund. ssp. <i>burchardii</i> . Parte Teórica..... | 175 |
| 4.3. <i>Pulicaria burchardii</i> A. Hans. & Sund. ssp. <i>burchardii</i> . Parte Experimental..... | 187 |
| 4.4. <i>Pulicaria canariensis</i> Bolle ssp. <i>canariensis</i> . Parte Teórica..... | 199 |
| 4.5. <i>Pulicaria canariensis</i> Bolle ssp. <i>canariensis</i> . Parte Experimental... | 253 |
| 4.6. <i>Pulicaria canariensis</i> Bolle ssp. <i>lanata</i> (Font Quer & Svent.) Bramwell & G. Kunkel. Parte Teórica..... | 291 |
| 4.7. <i>Pulicaria canariensis</i> Bolle ssp. <i>lanata</i> (Font Quer & Svent.) Bramwell & G. Kunkel. Parte Experimental..... | 307 |
| 5. Estudio de actividades biológicas | |
| 5.1. Parte Teórica..... | 327 |
| 5.2. Parte Experimental..... | 335 |
| 6. Técnicas generales e Instrumentación..... | 341 |
| 7. Abreviaturas y acrónimos..... | 347 |
| 8. Conclusiones..... | 351 |



"El Alquimista", de William Fettes Douglas

1. INTRODUCCIÓN

La flora de la región Macaronésica pone de manifiesto un cierto número de características típicas de las islas oceánicas como es el caso de un alto grado de endemismos (40% en el caso de las Islas Canarias) y un predominio de formas leñosas entre los endemismos (el 70% de los endemismos de las Islas Canarias son leñosos). Sin embargo, aunque la región Macaronésica es representante típica de los sistemas insulares oceánicos en diferentes aspectos, la región en general, y las Islas Canarias en particular, difieren de forma marcada de otros grupos de islas más aisladas (como el caso de las islas Hawaii en el Pacífico) en la relativa proximidad a las potenciales áreas fuente del continente.

Las islas más orientales de Canarias están aproximadamente a 95 km de las costas del norte de África, y en los últimos 20 millones de años probablemente han podido llegar a estar a 65 km de distancia de esas costas. Además, se han localizado más de 20 montañas volcánicas submarinas situadas entre las Islas Canarias, Madeira, Islas Salvajes, y el continente, muchas de las cuales están a profundidades inferiores a los 100 metros por debajo del nivel del mar. Estudios más recientes ponen de manifiesto que algunas de estas montañas submarinas tienen al menos una antigüedad de 60 millones de años, por lo cual es posible que pudieran haber facilitado la dispersión entre el continente y las islas, actuando como una especie de trampolín durante los periodos glaciales, cuando los niveles marinos eran más bajos y esas montañas podían emerger por encima del nivel del mar.

La relativa proximidad de las islas de la Macaronesia al continente, la existencia de estos posibles trampolines y la edad de las islas, hacen posible la hipótesis de que algunos géneros puedan haber provocado múltiples colonizaciones independientes en esta región. La retrocolonización hacia el continente desde la Macaronesia podría haber tenido lugar de igual forma, por lo que las islas actuarían como un área fuente para los endemismos continentales. Dichas relaciones entre la flora de las islas y el continente son mucho más complejas que aquellas que constituyen las hipótesis que se han planteado para otras islas de sistemas oceánicos insulares, tales como las islas Hawaii y las Galápagos.

Por todo ello, y para una mejor comprensión del proceso de formación de la flora de la Macaronesia, es necesario conocer cuál ha sido la sucesión de eventos que han dado origen a las islas, partiendo de la consideración de las teorías de la *Tectónica de Placas* y la *Deriva Continental*, pues precisamente la explicación más aceptada acerca del origen y la formación de los archipiélagos que constituyen la Macaronesia radica en los movimientos de las masas continentales.

La formación del Océano Atlántico se inicia hace unos 180 millones de años, cuando lo que hoy es América del Norte empieza a separarse de Europa (África se separa un poco más tarde), alcanzando su actual forma durante el periodo Cretácico, aproximadamente hace unos 65 millones de años, y continuando en la actualidad con su expansión a una velocidad de unos 2 cm por año. Desde un punto de vista puramente geológico, las de la Macaronesia son unas islas oceánicas de origen volcánico, y teniendo en cuenta su proceso de génesis podemos dividirlos en dos grupos, que son:

- Las Azores.
- Resto de los archipiélagos.

En el caso de las islas Azores, los estudios geológicos ponen de manifiesto que cada una de ellas se corresponde con un afloramiento de la dorsal mesoatlántica, mientras que el resto de los archipiélagos de la Macaronesia se encuentran en una zona media de la placa africana (situación intraplaca) que se corresponde con una región relativamente próxima a la zona de contacto entre la corteza oceánica y la corteza continental.

En lo que respecta a las Islas Canarias su origen ha dado lugar a diferentes polémicas entre los geólogos, con dos grandes hipótesis predominantes: la de la procedencia continental y la del origen volcánico independiente. En el primer caso se propone que las islas son fragmentos del vecino continente africano, que con el transcurso del tiempo quedaron separadas al romperse los puentes terrestres que las unían entre sí, o que las conectaban con el continente¹. En el segundo caso la existencia de pruebas de tipo geológico como son la presencia de calizas fosilíferas y playas levantadas, parecen indicar su formación en función de un origen volcánico a

1. Sunding, P. "*Origins of the Macaronesian flora*". In *Plants and Islands*. Bramwell Ed. (1979), London, 13-40.

partir del fondo marino, estando sumergidas durante largo tiempo, para posteriormente irse levantando lentamente a medida que la corteza oceánica variaba como consecuencia de la presión ejercida por los materiales emitidos en la dorsal del Atlántico².

La hipótesis más aceptada en la actualidad es la del origen volcánico independiente de la masa continental, y si nos centramos en esta idea, las islas, tras un largo periodo de erupciones submarinas que las hacían aumentar en masa y altura sobre el fondo oceánico, alcanzan la superficie marina y emergen como territorio virgen por encima del nivel del mar en contacto con la atmósfera. Ese instante se produjo en diferentes momentos para cada una de las islas que conforman el archipiélago, variando desde los 21 millones de años para las más antiguas (Fuerteventura y Lanzarote), hasta el escaso millón de años para la más joven (El Hierro)^{3, 4}, en un periodo que abarca desde finales del Terciario hasta el Cuaternario. En cualquier caso ese momento en el que la isla emerge sobre el nivel del mar marca el inicio del proceso de colonización vegetal, que se ve influido por la historia de la vegetación en los territorios continentales próximos, Europa y África, en ese periodo de finales del Terciario y durante el Cuaternario. En esta época tienen lugar importantes procesos tanto geológicos como climáticos que influyen de manera decisiva sobre la flora de las regiones continentales aledañas. En primer lugar, en el ámbito geológico se produce el levantamiento de las grandes cordilleras, como los Alpes, el Himalaya o el Atlas, que producen cambios en los patrones climáticos de las regiones adyacentes. En segundo lugar, se produce un progresivo enfriamiento que desembocará en el periodo glacial cuaternario y poco a poco se van delimitando las zonas climáticas actuales como consecuencia de la reducción progresiva de la zona cálida ecuatorial y tropical.

En este escenario, la colonización de los nuevos territorios insulares se produce atendiendo a una serie de mecanismos de dispersión característicos, seguido de un proceso de evolución postcolonización durante varios millones de años, que conducen al estado actual de la flora canaria. El estudio de los mecanismos de dispersión y de la

-
2. Bravo, T.; Báez, M. y Navarro Mederos, J. F. “*Canarias, origen y poblamiento*”. Madrid. Ed. Queimada (1983).
 3. Mitchell-Tomé, R. C. “*Radiometric studies in Macaronesia*”. Bol. Mus. Munic. Funchal (1985). 37, 52-85.
 4. Carracedo, J. C. “*The Canary Islands: An example of structural control on the growth of large oceanic-island volcanoes*”. J. Volc. Geoth. Res. (1994). 60, 225-241.

evolución postcolonización permite llegar a la conclusión de que el número mínimo de introducciones que se necesitan para alcanzar el estado actual que presenta la flora endémica de angiospermas es de unas 186 especies, las cuales se distribuyen, según los mecanismos de dispersión empleados, en: *endozoócoras*, 63; *epizoócoras*, 35; *anemócoras*, 48; *hidrócoras*, 8; *macrodiásporas (viento) e indeterminadas (probablemente endozoócoras)*, 32⁵.

Las especies **endozoócoras** y **epizoócoras** son todas aquellas en las que el mecanismo de dispersión es realizado probablemente a través de las aves. La dispersión por **endozoocoria** es posiblemente el mecanismo que ha tenido más éxito en el proceso de transporte de las plantas



Figura 2: La hierbamora (*Bosea yerbamora*) es otro ejemplo de endozoocoria. Foto de Manuel Gil González.

hasta las islas. Así, este es el mecanismo utilizado por la mayoría de los árboles que componen el bosque de laurisilva (es el caso de los



Figura 1: El barbuzano (*Apollonias barbujano*) es un ejemplo de endozoocoria. Foto de Manuel Gil González

géneros *Laurus*, *Persea*, *Apollonias*, *Ilex*, *Myrsine*, entre otros) y también se pueden englobar en este grupo a algunos endemismos como *Bencomia caudata*, *Bosea yerbamora*, *Canarina canariensis* y *Dracaena drago*.

También se considera probable que la introducción de las leguminosas de semilla dura como *Lotus*, *Dorycnium*, *Anagyris*, *Adenocarpus*, etc., se deba a la acción de las aves⁶.

El mecanismo de **epizoocoria** puede ser llevado a cabo por medio de semillas pegajosas que se adhieran de alguna forma a las aves, como sucede con *Helianthemum*, *Plantado*, *Salvia*, etc., bien mediante frutos espinosos o con cerdas ganchudas, como los casos de *Pimpinella*, *Drusa*, etc., o bien mediante unidades de dispersión pegajosas tales como fragmentos de inflorescencias, en los casos de *Forsskaolea*,

5. Bramwell, D. "Contribución a la biogeografía de las Islas Canarias". Bot. Mac. (1986), 14, 3-34.

6. Kunkel, G.; Beltrán, E.; Afonso, J.; Bañares, A.; Gil, M.C.; González, M.N.; González, J.M.; Haroun, R.J.; Hernández, C.; Losada, A.; Marrero, A.; Rodríguez, J.L. y Rodrigo, J. "Flora del Archipiélago Canario. Tratado florístico. Primera Parte". Tomo XV. (1992). Edirca S.L. Las Palmas de Gran Canaria.

Rubia, *Bystropogon*, *Dicheranthus*, etc. En esta categoría también se podrían incluir aquellas especies que presentan semillas pequeñas, que en otras regiones del mundo se ha observado que son dispersadas por medio del barro y la tierra adherida a las patas y las plumas de las aves, como es el caso de las *Ciperaceas*, *Juncos*, etc. También a través de las aves se pueden dispersar aquellos frutos y semillas secas que forman parte de la dieta de las aves granívoras, que pueden atravesar intactas el tracto digestivo y posteriormente ser capaces de germinar. Se cree que a través de este proceso han podido llegar a Canarias, entre otros, los géneros *Cheirolophus*, *Convolvulus*, *Crambe*, *Euphorbia* y *Silene*.



Figura 3: La raspilla (*Drusa glandulosa*) representa un ejemplo de epizoocoria. Foto de Manuel Gil González.



Figura 4: La hierba cruz (*Hypericum reflexum*) representa un ejemplo de dispersión por anemocoria. Foto de Manuel Gil González.

Algunos tipos de semillas, como las esporas y semillas diminutas, pueden ser dispersadas por el viento (**anemocoria**) y viajar a grandes distancias, como es el caso de helechos y orquídeas. Incluso vientos fuertes son capaces de dispersar semillas de las *Crasuláceas*, *Cistus*, *Hypericum*, etc. También pueden ser dispersadas por el viento aquellas semillas plumosas que son abundantes en la familia *Compositae* = *Asteraceae*

(*Tolpis*, *Sonchus*) y *Asclepiadaceae* (*Periploca*, *Caralluma*, *Ceropegia*). Un tercer grupo lo constituyen aquellas semillas que están provistas de alas que les permiten planear a largas distancias (varios kilómetros), como es el caso de *Marcetella moquiniana*; también pueden ser dispersadas por el viento pequeñas semillas aplanadas, como es el caso de algunas crucíferas como *Parolinia* y *Descurainia*, y en otros casos en los cuales la presencia de un cáliz expandido puede actuar como ala de dispersión, como sucede en *Echium* y *Limonium*.



Figura 5: Las semillas del palo de sangre (*Marcetella moquiniana*) se dispersan por anemocoria. Foto de Manuel Gil González.

La dispersión **hidrócora** se presenta fundamentalmente en especies costeras y halófitas, por lo cual es probable que los ancestros de varios endemismos canarios como *Astydamia latifolia*, *Patellifolia*, *Zygophyllum* o *Pancreatium*, hayan podido llegar flotando en el agua de mar.



Figura 6: Los frutos de la uvilla (*Zygochloa fontanesii*) presentan dispersión hidrócora. Foto de Manuel Gil González.

Como consecuencia de la colonización de los nuevos territorios por los procesos de dispersión mencionados, se puede considerar que la composición actual de la flora canaria responde a la influencia de elementos de diferente procedencia que se pueden agrupar de la siguiente manera:

- a) Elementos **Sáhara-Índicos**, que comprenden especies distribuidas por el norte de África hasta los márgenes asiáticos del Océano Índico.
- b) Elementos **Atlánticos**, que comprenden especies distribuidas por el Oeste europeo.
- c) Elementos **Mediterráneos**, que incluirían especies distribuidas actualmente por el Sur de Europa, Oriente Medio y Norte de África. Compuesto por unas 900 especies, es con diferencia el grupo con mayor peso en la flora canaria (hasta un 81% si se suma los elementos endémicos con afinidad mediterránea), indicando una estrecha relación entre las floras de ambas regiones.
- d) Elementos **Tropicales**, comprende especies de procedencia tropical, escasamente representadas.
- e) Elementos **Cosmopolitas**, que incluyen especies que generalmente han sido introducidas.
- f) Elementos **Endémicos**, son el segundo grupo con mayor peso (37% de la flora) e incluye especies que crecen exclusivamente en los territorios macaronésicos.

Se puede considerar que los elementos endémicos representan un relicto de una flora subtropical que tenía una distribución más amplia, por Europa y el Norte de África

hasta el final del Terciario^{1, 7}. Los cambios climáticos mencionados anteriormente, que acontecieron desde el final del Terciario, llevaron el desplazamiento de grandes zonas climáticas hacia el sur, obligando a la flora a migrar siguiendo ese patrón de desplazamiento de zonas climáticas, por lo que la flora subtropical que dominaba la cuenca Mediterránea desapareció de ese entorno, refugiándose en sus asentamientos de la región macaronésica, donde han sobrevivido hasta la actualidad⁸. Muchas de las evidencias de la naturaleza relictual de la flora macaronésica provienen del estudio de la flora fósil del sur de Europa¹. Estos depósitos fósiles contienen muchos géneros subtropicales que ahora se encuentran presentes en la Macaronesia, pero no en el Mediterráneo, incluyendo géneros tales como *Clethra*, *Dracaena*, *Ocotea* y *Persea*. Recientes comparaciones de filogenética molecular de grupos de la Macaronesia no han confirmado la naturaleza relictual de muchos de los endemismos, debido a que estos taxa se encuentran en una posición relativamente derivada con respecto a sus antecesores continentales^{9, 10}.



Figura 7: Las especies canarias del género *Tanacetum* representan un ejemplo de vicarianza. En la imagen *T. ferulaceum* y *T. oshanahanii*. Fotos de José Luis Eiroa.

Por otro lado, una vez que las especies colonizaban un territorio insular, y debido a las especiales condiciones de aislamiento de las islas, se producen fenómenos evolutivos basados en la **radiación adaptativa** y la **vicarianza** que permiten a los elementos de la flora

adaptarse para aprovechar la diversidad de nichos ecológicos disponibles. Este proceso desembocó en la producción de un gran número de especies endémicas, que en muchas ocasiones se localizan en una sola isla, y en una zona muy reducida dentro de ésta. Las

-
7. Cronk Q., C. B. “Relict floras of Atlantic islands: patterns assessed”. *Bio. J. Linn. Soc.* (1992). 46, 91-103.
 8. Koeniguer, J. C. “Gisements fossilifères continentaux paleobiogeographie et paysages forestiers en Europe occidentale et dans le nord de l’Afrique au Cénozoïque supérieur”. *Biogeographica* (1993). 69, 135-155.
 9. Caujape-Castells, J.; Jansen, R. K.; Pedrola-Monfort, J. and Membrives, N. “Chloroplast DNA restriction site phylogeny of the genus *Androcymbium* (Colchicaceae)”. *Syst. Bot.* (1999). 24, 581-597.
 10. Helfgott, D. M.; Francisco-Ortega, J.; Santos-Guerra, A.; Cansen, R. K. and Simpson, B. B. “Biogeography and breeding system evolution of the woody *Bencomia* alliance (Rosaceae) in Macaronesia based on ITS sequence data”. *Syst. Bot.* (2000). 25, 82-97.

especies vicariantes son aquellas estrechamente relacionadas que descienden de una población ancestral común y llegan a alcanzar el aislamiento, ocupando áreas separadas⁶. En cambio, cuando una serie de individuos de una población con suficiente diversidad genética, va colonizando diversos nichos ecológicos, se produce un fenómeno de formación de una clina de las frecuencias genéticas, sobreviviendo los individuos mejor adaptados genéticamente a cada ambiente particular, con modificaciones morfológicas características, en lo que constituye una manifestación de la **radiación adaptativa**.



Figura 8: Las especies canarias del género *Gonospermum* representan un ejemplo de radiación adaptativa. En la imagen *G. canariense* y *G. fruticosum*. Fotos de José Luis Eiroa.

La flora canaria ha sido objeto de diversos estudios taxonómicos con el fin de establecer las relaciones filogenéticas entre diferentes grupos desde el punto de vista morfológico. Sin embargo, en muchos casos estos estudios no permiten la concreción sobre las relaciones existentes entre las distintas especies. Por ejemplo, en la tribu *Anthemideae* (familia *Compositae*) la posición taxonómica de muchos de sus componentes ha sido muy conflictiva por el escaso valor de las diferenciaciones morfológicas establecidas dentro de dicha tribu; por ello, se hace necesario un análisis que utilice estudios morfológicos, citológicos y químicos que den apoyo filogenético a la monofilia de las especies. De hecho, algunos estudios previos han destacado la importancia de la presencia de determinados tipos de metabolitos secundarios como marcadores quimiotaxonómicos en algunos géneros de la tribu *Anthemideae*, como sucede con las lactonas sesquiterpénicas en géneros concretos como el *Anthemis*¹¹.

Las lactonas sesquiterpénicas son un amplio grupo de sesquiterpenos típicos de la familia *Compositae*, y que están caracterizados por una serie de esqueletos tipo que son el resultado de modificaciones estructurales altamente sustituidas que les confieren esa posibilidad de aplicación como caracteres químicos desde el punto de vista

11. Staneva, J.D.; Todorova, M.N. and Evstatieva, L.N. “Sesquiterpene lactones as chemotaxonomic markers in genus *Anthemis*”. *Phytochemistry* (2008), 69, 607-618.

taxonómico. En el caso del género *Anthemis* se han detectado cuatro tipos de esqueletos (guayanolidos, germacranolidos, eudesmanolidos y lineales), cuya presencia o ausencia se ha utilizado como prueba quimiotaxonómica para la ubicación de las diferentes especies dentro del género.

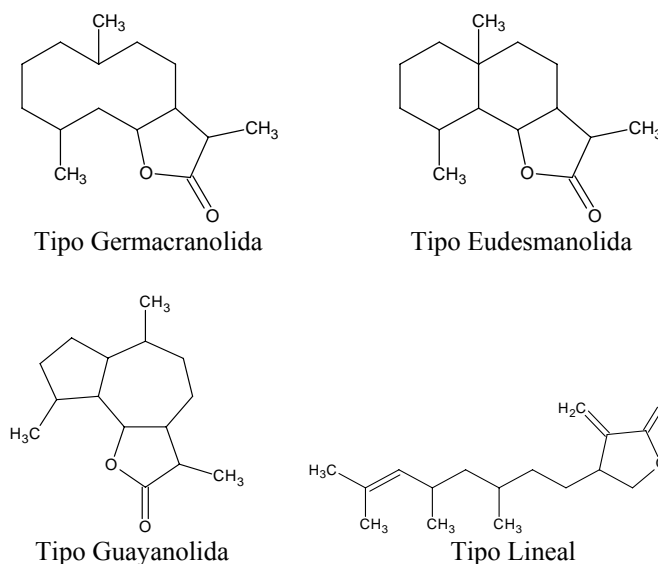


Figura 9: Esqueletos tipo de lactonas sesquiterpénicas en el género *Anthemis* (familia *Compositae*, tribu *Anthemideae*).

En este contexto, el grupo de Investigación de Química Orgánica I de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria tiene como objetivo el estudio de los componentes químicos de plantas endémicas de las Islas Canarias, concretamente de especies pertenecientes a la familia *Compositae*. Dentro de esta línea de investigación hemos fijado nuestro interés en las tribus *Inuleae* y *Anthemideae*. Las plantas de esta familia se caracterizan por la producción de lactonas sesquiterpénicas, modificadas estructuralmente y altamente sustituidas. El gran número de lactonas diferentes aisladas de las distintas tribus de la misma, permite utilizarlas como caracteres químicos desde el punto de vista taxonómico. Se ha descrito el uso de estas sustancias como caracteres taxonómicos a niveles infraespecíficos o en grupos infragenéricos en numerosos géneros de la familia *Compositae* (*Ambrosia*, *Gaillardia*, *Melampodium*, ...) ¹²,

12. Nowak, G. "A chemotaxonomic study of sesquiterpene lactones from subtribe Centaurineae of the Compositae". *Phytochem.* (1992). 31, 2363-2368.

mientras que en los géneros de las tribus *Inuleae* y *Anthemideae* han sido menos estudiados.

La tribu *Anthemideae* está dividida actualmente en doce subtribus reconocidas, destacando por su representación endémica en Canarias, la subtribu *Gonosperminae* y el género *Tanacetum*. Nuestro grupo de investigación ha realizado previamente estudios químicos de diferentes especies de los géneros endémicos *Gonospermum* (*G. canariense*, *G. fruticosum*, *G. elegans* y *G. gomerae*) y *Lugoa* (*L. revoluta*), y de las tres especies endémicas del género *Tanacetum* (*T. ferulaceum*, *T. ptarmiciflorum* y *T. oshanahanii*), cuyos resultados apuntan a una elevada presencia de lactonas sesquiterpénicas, además de flavonoides y cumarinas^{13,14}, lo que está de acuerdo con los resultados de otros estudios publicados anteriormente acerca de la tribu *Anthemideae*¹⁵ y de 16 géneros de la familia *Compositae*¹⁶.

La tribu *Inuleae* comprende más de 200 géneros que engloban a más de 2000 especies de plantas que están bien representadas en la flora europea (27 géneros y 116 especies), pero es sobre todo abundante en Sudáfrica y Australia. Está a su vez dividida en tres subtribus: *Inulinae*, *Gnaphaliinae* y *Athrixiinae*¹⁷. Dentro de la subtribu *Inulinae*, la delimitación de los géneros presenta algunos problemas, habiéndose organizado en ocho grupos, de los cuales el *Inula* comprende los siguientes géneros: *Allagopappus* (género endémico de las Islas Canarias con dos especies), *Amblyocarpum*, *Anisopappus*, *Antiphiona*, *Anvillea*, *Asteriscus*, *Bubonium*, *Buphtalmum*, *Calostephane*, *Chrysophthalmum*, *Dittrichia*, *Fontquera*, *Grantia*, *Hirschia*, *Inula*, *Iphiona*, *Jasonia*, *Limbarda*, *Mollera*, *Nauplius* (presente en las islas con cinco especies, tres de ellas endémicas), *Pallenis*, *Pegoletia*, *Pelucha*, *Perralderia*,

13. López Sánchez, M. “*Distribución y Química de los metabolitos secundarios de los géneros Tanacetum y Gonospermum*”. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (1991).

14. Ortega Rodríguez, J.J. “*Estudio químico de especies de Lugoa, Gonospermum y Tanacetum endémicas de Canarias. Aplicaciones quimi taxonómicas y de actividad biológica*”. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (2007).

15. Greger, H. “*Anthemidae chemical review*”, en “*The biology and chemistry of the Compositae*” Eds. Heywood, V.H.; Harborne, J.B. and Turner, B.L. Academic Press, London (1977). Vol. II, 899-941.

16. Valera, A. and Santos, A. “*Investigaciones fitoquímicas en plantas de Canarias*” Ed. Centro de Estudios Ramón Areces S. A. (2002).

17. Merxmüller, H.; Leins, P. and Roessler, F. “*Inuleae. Systematic review*”, en “*The biology and chemistry of the Compositae*”. Eds. Heywood, V.H.; Harborne, J.B. and Turner, B.L. Academic Press, London (1977). Vol. II, 577-619.

Pentanema, *Platychaete*, *Postia*, *Pulicaria* (representado en Canarias con dos especies), *Rhanterium*, *Schizogyne* (género endémico de las Islas Canarias con dos especies), *Telekia*, *Varthemia* y *Vieraea* (género endémico de las Islas Canarias con una única especie).

Nuestro grupo de investigación ha realizado previamente un estudio químico de las especies de los géneros endémicos *Allagopappus* (*A. dichotomus* y *A. viscosissimus*) y *Vieraea* (*V. laevigata*) cuyo resultado indica una elevada presencia de lactonas sesquiterpénicas de tipo germacranolido en las especies del género *Allagopappus*, mientras que la única especie del género *Vieraea* se caracteriza por la presencia de sustancias derivadas del timol¹⁸.

Con la presente memoria de tesis pretendemos efectuar un estudio químico de las especies del género *Pulicaria* presentes en las Islas Canarias, que amplíe el estudio realizado a los géneros endémicos o con especies endémicas del grupo *Inula*. Se ha descrito la presencia, en varias especies del género *Pulicaria*, de flavonoides y otros derivados fenólicos, diterpenos, lactonas sesquiterpénicas, derivados de cariofileno y otros diversos sesquiterpenos. La presencia de lactonas sesquiterpénicas sólo ha sido descrita hasta el momento en cuatro especies, *Pulicaria crispa*¹⁹, *Pulicaria laciniata*²⁰, *Pulicaria sicula*²¹ y *Pulicaria undulata*²², mientras que en el resto de especies estudiadas no se han encontrado tales compuestos. Estos hechos han servido de base para proponer una segregación del género *Pulicaria* en dos: el propio género *Pulicaria*, que agruparía a todas las especies que no presentan lactonas, y el género *Francoeuria*, que agruparía a las especies que sí presentan lactonas¹⁹, por lo que cobra interés la descripción de la presencia o no de tales compuestos en las especies canarias.

18. Eiroa Martínez, J.L. “Estudio químico y consideraciones quimiotaxonómicas de las especies de *Allagopappus* y *Vieraea*, géneros endémicos de las islas Canarias”. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (1994).

19. Abdel-Mogib, M., Jakupovic, J., Dawidar, A.M., Metwally, M.A. and Abou-Elzahab, M. “Sesquiterpene lactones and kaurane glycosides from *Francoeuria crispa*”. *Phytochemistry* (1990), 29 (8), 2561-2584.

20. Aberkane, M.C.; Dibi, A.; Haba, H.; Benkhaled, M.; Benkouider, A.; Mokhtari, M.; Mosset, P. and Pale, P. “Guaianolide and pseudoguaianolide from *Pulicaria laciniata*”. *Asian J. of Chem.* (2007), 19 (6), 4954-4956.

21. Zdero, C., Bihlmann, F. and Risk, A.M. “Sesquiterpene lactones from *Pulicaria sicula*”. *Phytochemistry* (1988), 27 (4), 1206-1208.

22. Rustaiyan, A., Habibi, Z., Saberi, M. and Jakupovic, J. “A norguaianolide and glaucolide-like eudesmanolide from *Pulicaria undulata*”. *Phytochemistry* (1991), 30 (7), 2405-2406.

Por otro lado, como ampliación de nuestros horizontes de investigación, nos hemos propuesto hacer una incursión en otra tribu, la *Lactuceae* (familia *Compositae*), fijando nuestra atención en el género *Tolpis* por su elevado nivel de endemismo en la Macaronesia, y por el hecho de que no se ha abordado hasta la fecha ningún estudio químico de ninguna de las especies de este género, presentando además problemas en el posicionamiento taxonómico del género y de varias especies del mismo en particular²³.

Además de la importancia quimiotaxonómica que se puede deducir de estos estudios, es de interés conocer también la posible actividad biológica de las sustancias obtenidas. Así, la tribu *Inuleae* incluye una serie de plantas que han sido empleadas por el hombre por sus aplicaciones¹⁷; entre las más utilizadas como remedio medicinal en el pasado tenemos la *Inula helenium*,

usada en el tratamiento de enfermedades del pecho, la *Pulicaria dysenterica*, empleada en remedios herbarios y la denominada pie de gato (*Antennaria dioica*) utilizada para combatir las infecciones de garganta. Las hojas de *Inula* y de



Figura 10: La medicina tradicional tiene numerosos ejemplos de utilización de plantas. Es el caso de *I. helenium* y *P. dysenterica*.

las especies de *Pulicaria* también han sido empleadas como fuente de insecticidas. Estas propiedades por las que se han venido utilizando tradicionalmente muchas de las plantas de la tribu *Inuleae*, están relacionadas con la presencia en las mismas de algunos metabolitos secundarios, como sesquiterpenoides y compuestos fenólicos (flavonoides y cumarinas), que ejercen diferentes funciones importantes para el vegetal. Por ejemplo, se ha descrito la correlación existente entre el perfil de compuestos fenólicos presentes en la planta y el mayor nivel de radiación UV-B al que está expuesta como consecuencia de su crecimiento en lugares de mayor altitud²⁴, indicando que los

23. S.-J. Park, J. Francisco-Ortega, A. Santos-Guerra and R.K. Jansen. "Phylogenetic relationship of *Tolpis* (Asteraceae: Lactuceae) based on *ndhF* sequence data". *Plant Syst. Evol.* (2001), 226, 23-33.

24. Spitaler, R.; Schlorhauser, P.D.; Ellmerer, E.P.; Merfort, I.; Bortenschlager, S.; Stuppner, H. and Zidorn, C. "Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO". *Phytochemistry* (2006), 67, 409-417.

flavonoides ejercen un papel protector para las plantas que los producen, como consecuencia de sus potentes propiedades de absorción de la radiación UV-B. Por otro lado, también se ha descrito una importante actividad antioxidante de flavonoides y cumarinas, representando elementos de un sistema de defensa de las plantas frente al estrés ambiental por procesos oxidativos, por incremento de los niveles de ozono, de polución o de presión de los herbívoros^{25, 26}. Además, el incremento de los niveles de compuestos fenólicos en las plantas como consecuencia de los cambios ambientales puede ocasionar también diversos efectos en las relaciones plantas-insectos. Los insectos que se alimentan de determinadas plantas que sintetizan compuestos fenólicos, ingieren los flavonoides y los depositan sobre su cutícula, obteniendo un efecto protector frente a patógenos y predadores. En cambio, los insectos no adaptados pueden desarrollar efectos negativos al perder valor nutricional el alimento que ingieren²⁷.

Pero además de estas funciones que ejercen los metabolitos secundarios en las plantas que los sintetizan, en las últimas décadas se han ido identificando diversas propiedades y actividades biológicas que hacen de estos compuestos un objetivo de gran interés para los científicos. En el caso de los sesquiterpenoides se ha descrito un amplio rango de propiedades biológicas y químicas, como propiedades antitumorales y antiperlipidémicas, además de su uso clínico como analépticos, antibióticos y antihemínticos²⁸, y ser posibles agentes antiinflamatorios y antiartríticos²⁹. En el caso particular de las lactonas sesquiterpénicas las propiedades abarcan desde las antiinflamatorias, citoprotectoras, antitumorales, antimicrobianas, antialimentarias, citotóxicas y como compuestos reguladores del crecimiento vegetal³⁰. Tales propiedades son debidas al agrupamiento α -metileno- γ -lactona, que permite la formación de enlaces covalentes con grupos sulfhidrilo libres en proteínas, ejerciendo interferencias en las

25. Torres, R.; Faini, F.; Modak, B.; Urbina, F.; Labbé, C. and Guerrero, J. “Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*”. *Phytochemistry* (2006), 67, 984-987.

26. Bi, J.L.; Murphy, J.B. and Felton, G.W. “Antinutritive and oxidative components as mechanisms of induced resistance in cotton to *Helicoverpa zea*”. *J. Chem. Ecol.* (1997), 23, 97-117.

27. Simmonds, M.S.J. “Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge”. *Phytochemistry* (2003), 64, 21-30.

28. Woergenbag, H.J.; Malingre, M.Th.; Lemstra, W. and Konings, A.W.T. “Cytostatic activity of eupatoriopicrin in fibrosarcoma bearing mice”. *Phytother. Res.* (1987), 1, 76-79.

29. Johnson, E.S.; Kadam, N.P.; Hylands, D.M. and Hylands, P.J. “Efficacy of feverfew (*Tanacetum parthenium*) as prophylactic treatment of migrains”. *Br. Med. J.* (1985), 291, 569-573.

30. Abad, M.J.; Bermejo, P. and Villar, A. “An approach to the Genus *Tanacetum* L. (Compositae): phytochemical and pharmacological review”. *Phytother. Res.* (1995), 9, 79-92.

funciones de las mismas, así como la inhibición de muchos enzimas involucrados en procesos biológicos. Los compuestos con grupos carbonilos α,β -insaturados (y particularmente las α -metilen- γ -lactonas) tienen además la posibilidad de actuar como agentes alquilantes³¹.

En el caso de los compuestos fenólicos, como los flavonoides y las cumarinas, se ha descrito un amplio espectro de actividades biológicas, fundamentalmente de tipo protector, de entre las que destacan los efectos anti-inflamatorios y el representar prometedores agentes anticancerígenos^{32, 33}. El hecho de poseer un número variable de grupos hidroxilo de tipo fenólico y una buena capacidad quelante sobre el hierro y otros metales de transición, les confiere a estos compuestos una gran capacidad antioxidante, jugando un papel esencial frente a procesos de daño oxidativo, y presentando efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, como el cáncer, la arterioesclerosis o la cardiopatía isquémica³⁴.

Un tercer grupo de sustancias aisladas como metabolitos secundarios de plantas con propiedades biológicas interesantes lo constituyen los triterpenoides. Estos forman una familia de compuestos con estructuras muy diversas caracterizadas por contener varios anillos penta o hexacíclicos condensados para un número total de carbonos que oscilan entre 28 y 30. Según como se distribuyan los carbonos en el esqueleto base se distinguen varios tipos de triterpenos, como los lupanos, ursanos, oleananos, etc. Se han descrito numerosas propiedades biológicas interesantes para compuestos de tipo triterpenoide³⁵, especialmente saponinas glicosiladas en determinadas posiciones del esqueleto hidrocarbonado, de entre las que destacan en primer lugar las

-
31. Rivero, A.; Quintana, J.; Eiroa, J.L.; López, M.; Triana, J.; Bermejo, J. and Estévez, F. "*Potent induction of apoptosis by germacranolide sesquiterpene lactones on human myeloid leukemia cells*". European J. of Pharmacol. (2003), 482, 77-84.
 32. Ibrahim, S.R.M.; Badr, J.M.; El Sayed, K.A. and Youssef, D.T.A. "*A new cytotoxic sesquiterpene and three anti-inflammatory flavonoids from Egyptian Tanacetum santolinoides*". Nat. Prod. Communic. (2007), 2 (11), 1071-1074.
 33. Rubio, S.; Quintana, J.; Eiroa, J.L.; Triana, J. and Estévez, F. "*Acetyl derivative of quercetin 3-methyl ether-induced cell death in human leukemia cells is amplified by the inhibition of ERK*". Carcinogenesis (2007), 28 (10), 2105-2113.
 34. Martínez-Florez, S.; González-Gallego, J.; Culebras J.M. and Tuñón, M.J. "*Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*". Nutrición Hospitalaria (2002), XVII (6), 271-278.
 35. Sun, H.; Fang, W.-S.; Wang, W.-Z. and Hu, C. "*Structure-activity relationships of oleanane- and ursane- type triterpenoids*". Botanical Studies (2006), 47, 339-368.

actividades antitumorales, como la prevención e inhibición de los tumores, o la actividad frente a células de leucemia o linfoma humanos. También destacan las actividades antivirales, como los potentes efectos anti-VIH frente a la replicación del VIH en células H-9, las actividades anti-inflamatorias, hepatoprotectoras, gastroprotectoras, antimicrobianas, antidiabetes (tratamiento de la actividad hipoglucémica) y hemolíticas. Incluso se ha descrito el uso de derivados de triterpenoides como inhibidores frente a los venenos y toxinas de determinadas serpientes, debido a sus propiedades antiproteolíticas y antihemorrágicas³⁶.

36. da Silva, J.O.; Fernandes, R.S.; Ticli, F.K.; Oliveira, C.Z.; Mazzi, M.V.; Franco, J.J.; Giuliatti, S.; Pereira, P.S.; Soares, A.M. and Sampaio, S.V. “*Triterpenoids saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroleoba**”. *Toxicon* (2007), 50, 283-291.



“El alquímista”, de Pietro Longhi

2. OBJETIVOS

El Grupo de Química Orgánica I del Departamento de Química de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, como hemos comentado en la introducción a esta Memoria de Tesis, desarrolla una línea de investigación centrada en el aislamiento y elucidación estructural de compuestos de origen natural, cuya finalidad es la evaluación de la situación taxonómica de las especies estudiadas y la actividad biológica de los productos aislados. Teniendo en cuenta esta línea de investigación y lo comentado previamente en la introducción, la presente Memoria de Tesis pretende alcanzar los siguientes objetivos:

1. Realizar el estudio químico de todas las especies canarias del género *Pulicaria* (*P. canariensis subesp. canariensis*, *P. canariensis subesp. lanata* y *P. burchardii*), mediante el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios presentes en dichas especies.
2. Iniciar el estudio químico de las especies canarias del género *Tolpis* (comenzando por *T. webbii* y *T. sp.*, especie recogida en La Palma, pendiente de clasificación botánica), mediante el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios presentes en dichas especies, estableciendo cuales son los tipos de productos característicos de estas especies.
3. Obtener resultados que aclaren la clasificación taxonómica de las especies canarias del género *Pulicaria*, bien en el propio género *Pulicaria*, bien en el género *Francoeuria*, en función de si presentan o no lactonas sesquiterpénicas.
4. Obtener resultados que ayuden a aclarar las dificultades de clasificación taxonómica de varias de las especies del género *Tolpis* en Canarias, aportando datos fitoquímicos que puedan servir de apoyo a alguna de las hipótesis de clasificación propuestas previamente.
5. Realizar ensayos de actividad biológica con los productos obtenidos en los estudios químicos de las especies de los géneros *Pulicaria* y *Tolpis*, especialmente los de naturaleza sesquiterpenoide, flavonoide y triterpenoide que pudieran ser de interés para su aplicación desde el punto de vista farmacológico.
6. Obtención de derivados de los productos aislados, con el fin de estudiar cómo afectan las posibles modificaciones estructurales a la actividad biológica de las sustancias.



T. laciniata, *T. crassiuscula*, *T. proustii* (Fotos de Manuel Gil González) y *T. lagopoda*

3. ESTUDIO DE ESPECIES DEL GÉNERO *TOLPIS*



*Detalle de la flor de *T. barbata**

3.1 INTRODUCCIÓN AL GÉNERO *TOLPIS*

El florecimiento de plantas endémicas en las islas oceánicas representa algunas de las formas más espectaculares de procesos evolutivos. Las plantas insulares han provocado desde hace tiempo la fascinación de los biólogos como consecuencia de sus morfologías divergentes, y su interés en utilizarlas como sistemas para el estudio de la evolución de las plantas sigue siendo de extrema importancia.

El género *Tolpis*²³ comprende aproximadamente unas 12 especies de plantas distribuidas principalmente por Europa, Oriente Medio y África, con una mayoría de especies (10) confinadas a los archipiélagos de la Macaronesia. Aunque se ha llevado a cabo un considerable esfuerzo para resolver las circunscripciones genéricas y relaciones entre géneros de la tribu *Lactuceae*, que ha sido el centro de varios estudios morfológicos y moleculares, aún permanece mucha controversia con respecto a estos aspectos taxonómicos para *Tolpis*.

Para la *Lactuceae* han sido propuestos tres sistemas principales de clasificación. En cada sistema, las afinidades genéricas de *Tolpis* fueron diferentes; así, Stebbins³⁷ sitúa el género en la subtribu *Cichoriinae* con los géneros *Arnoseris* Gaertn., *Catanache* L., *Cichorium* L., *Hispidella* Barnard. ex Lam., *Hymenonema* Cass., *Hyoseris* L., y *Koelpinia* Pall. Por su parte Jeffrey³⁸ erige una clasificación informal intertribal en la cual agrupa a *Tolpis* con *Andryala* L., *Arnoseris*, *Hieracium* L., *Hispidilla*, *Koelpinia*, y *Pilosella* Hill en el grupo *Tolpis*. La clasificación más reciente se basa en un análisis morfológico cladístico y considera al género *Tolpis* como un miembro de la subtribu *Hieraciinae* con *Andryala*, *Arnoseris*, *Hieracium*, *Hispidella*, *Holoion* Kitam., y *Pilosilla*³⁹. El único análisis molecular filogenético de la *Lactuceae* no incluye al género *Tolpis*. Aunque este estudio incluye 39 de los 98 géneros reconocidos, ninguna de las subtribus con más de un género en los tres principales sistemas de clasificación fueron monofiléticos.

37. Stebbins, G. L. "A new classification of the tribe Cichorieae, family Compositae". Madroño (1953), 12, 23-64.

38. Jeffrey, C. "Notes on Compositae: I The Cichorieae in east Tropical Africa". Kew Bull. (1966), 18, 427-486.

39. Bremer, K. "Asteraceae: cladistics and classification". Timber Press (1994). Portland, Oregon.

La circunscripción genérica de *Tolpis* también presenta alguna controversia, especialmente con respecto a la ubicación de dos especies, *Tolpis capensis* (L.) Sch. Bip., del África sur-central y Madagascar, y *Tolpis staticifolia* (All.) Sch. Bip., del centro y sudeste de Europa. Aunque dichas especies han sido incluidas tradicionalmente en *Tolpis*, el empleo de evidencias morfológicas y palinológicas ha permitido excluirlas del género *Tolpis*⁴⁰. Así *T. capensis* fue incluida dentro del género *Hieracium* y *T. staticifolia* se constituyó en la única especie del género *Chlorocrepis* Monn.



Figura 11: *Tolpis lagopoda* es una especie endémica que se distribuye por Gran Canaria, Tenerife y La Palma.

presentan en las cinco islas occidentales (El Hierro, La Palma, La Gomera, Tenerife y Gran Canaria). Las islas Azores contienen dos especies que se encuentran



Figura 13: *Tolpis crassiuscula* es la especie endémica del NO de Tenerife. Foto de Manuel Gil González.

Uno de los rasgos más interesantes de *Tolpis* es que muchas de las especies son endémicas de los archipiélagos que constituyen la región de la Macaronesia, siendo particularmente interesante desde una perspectiva biogeográfica porque presenta especies en cuatro de los cinco archipiélagos Macaronésicos. Las islas Canarias son el hábitat de ocho especies que se distribuyen en las cinco islas occidentales (El Hierro, La Palma, La Gomera, Tenerife y Gran Canaria). Las islas Azores contienen dos especies que se encuentran distribuidas en ocho islas⁴¹ y una de estas especies se distribuye también en las cuatro islas del archipiélago de Madeira. Una especie es endémica de la isla de Madeira y otra está restringida a las islas de Cabo Verde⁴². Por todo ello *Tolpis* es un género ideal a la hora de determinar si los acontecimientos de una múltiple colonización



Figura 12: *Tolpis proustii* es una especie exclusiva de El Hierro. Foto de Manuel Gil González.

pueden haber tenido lugar en un sencillo género endémico de la Macaronesia.

40. Blackmore, S. and Jarvis, C. E. "Palynology of the Genus *Tolpis* Adanson (Compositae: Lactuceae)". *Pollen et Spores* (1986). 28, 111-122.

41. Lack, M. W. "Die Lactuceae (asteraceae) der Azorische Inseln". *Willenowia* (1981). 11, 211-247.

42. Killian, N. "Die Lactuceae (Compositae) der Kapverdischen Inseln (W-Afrika)". *Willenowia* (1988). 18, 113-216.

Los archipiélagos de la Macaronesia son distintos de otros sistemas insulares oceánicos fundamentalmente en dos hechos biogeográficos:

1. Todos ellos presentan un amplio rango de distancias desde las áreas continentales supuestamente originarias, que van desde los 100 km de Fuerteventura en las Islas Canarias a los 1600 km de las islas Azores.
2. Hay una gran separación geográfica de aproximadamente unos 3000 km entre el archipiélago más al norte (Islas Azores) y el más al sur (Islas de Cabo Verde).

Estos dos hechos, especialmente la estrecha proximidad de algunas islas al continente, hacen posible que algunos grupos de plantas con especies endémicas en más de un archipiélago de la Macaronesia podrían haber experimentado una colonización múltiple desde tierra firme. También esta estrecha proximidad al área continental de algunas de las islas, así como el hecho de que algunos miembros de la flora puedan ser de carácter relictual, plantea la posibilidad de que se haya producido una colonización de la región continental a partir de las islas.

Estudios filogenéticos de *Tolpis*²³ han puesto de manifiesto que las especies insulares no forman un grupo monofilético. Todo ello lleva a plantear dos posibles escenarios biogeográficos que pueden de alguna manera describir las relaciones entre estas especies:

- Hubo una múltiple colonización de las islas de la Macaronesia, una de ellas tuvo lugar en las Islas Azores y una segunda en las Islas Canarias y de Cabo Verde. Si este planteamiento es correcto la posición basal de *Tolpis azorica* sugiere que las Islas Azores fueron las primeras en ser colonizadas con una segunda introducción en las Islas Canarias y de Cabo Verde.
- Hubo un único origen de las especies insulares de *Tolpis* seguida por una colonización del continente.

El género *Tolpis*⁴³ (*Compositae*, *Lactuceae*) está constituido, como ya se ha comentado, por más de 12 especies distribuidas por África, Europa y las islas de la Macaronesia. Además, se ha indicado la presencia de posibles especies no descritas. Todas, salvo dos especies de *Tolpis* (*T. barbata* y *T. virgata*) son endémicas de la Macaronesia, de las cuales ocho son endémicas del archipiélago canario. Las especies de *Tolpis* endémicas de Canarias y de las otras islas macaronésicas no se distinguen de sus parientes continentales por diferencias espectaculares en la forma del crecimiento y otros rasgos característicos de algunos linajes endémicos, como es el caso del género *Echium* en las islas Canarias. Sin embargo, los *Tolpis* de las islas Canarias varían en una serie de caracteres que normalmente permanecen relativamente estables en otros linajes insulares.

En las Islas Canarias el género *Tolpis*⁶ constituye un grupo monofilético que comprende de entre doce a quince especies, de las cuales ocho son especies endémicas perfectamente descritas y el resto está constituido por especies aún no descritas, presentes en forma de plantas perennes y lactuosas con base subleñosa y hojas arrosetadas, diferenciándose de la especie no endémica *Tolpis barbata* (L.) Gaertn., en su carácter anual. Estas especies son:

- *Tolpis barbata*, conocida localmente como *lechuguilla*, se encuentra en matorrales y laderas pedregosas desde el piso sub-basal hasta la zona de medianías elevadas de las islas mayores, llegando incluso a entrar en las zonas de pinares, como sucede en la isla de Gran Canaria.
- *Tolpis webbii*, es una especie con hojas muy angostas, endémica de Las Cañadas (Tenerife), con rara presencia fuera de esta zona, aunque en algunos barrancos puede bajar de los 1.000 metros. En estas zonas geográficas puede llegar a solaparse con *Tolpis lagopoda* y estudios botánicos de caracteres morfológicos sugieren la posibilidad de que se produzcan híbridos con esta especie⁶.

43. Jenny K. Archibald, Daniel J. Crawford, Arnoldo Santos-Guerra, and Mark E. Mort. "The utility of automated analysis of inter-simple sequence repeat (ISSR) loci for resolving relationships in the Canary Islands species of *Tolpis* (Asteraceae)". American Journal of Botany (2006), 93(8), 1154-1162.

- *Tolpis lagopoda*, presente en paredes de zonas elevadas y pinares de Gran Canaria, Tenerife y La Palma, se caracteriza por presentar hojas lanceoladas e incisas y las plantas suelen ser subestoloníferas.
- *Tolpis laciniata*, es un elemento rupícola de las zonas de medianía de La Gomera, El Hierro, La Palma y Tenerife. Se caracterizan por presentar hojas laciniadas o bipinnasectas, herbáceas, glabras o poco pubescentes, y flores de color amarillo pálido en inflorescencias laxas.
- *Tolpis calderae*, con hojas pinnatifidas, densamente blanco-tomentosas con pinnae linear y tallos alongados que tiene su hábitat en la Caldera de Taburiente (La Palma) y que algunos autores consideran un pariente local de *T. laciniata*.
- *Tolpis proustii*, planta de los riscos y paredes expuestas de las montañas del oeste de El Hierro con tallos algodonosos y hojas lanceolado-lobuladas. Al igual que *T. calderae* fue considerada como una variante de *T. laciniata*.
- *Tolpis crassiuscula*, es un endemismo presente en las paredes húmedas del noroeste de Tenerife. Presenta rosetas con hojas oblanceoladas, sinuado-dentadas y lustrosas, y tallos erectos de hasta 35 cm de altura.
- *Tolpis glabrescens*, especie con hojas oblanceoladas, subenteras, verde-pálidas, subglabras y algo carnosas, tallos con inflorescencias que no alcanzan los 20 cm de largo. Se trata de una especie tetraploide extremadamente rara, endémica de la zona de Anaga en la esquina noreste de la isla de Tenerife, donde forma varias poblaciones pequeñas. La principal característica de esta especie es su carácter tetraploide que la diferencia del resto de las especies endémicas que presentan carácter diploide. Estudios de base morfológica y biosistemática sugieren que *T. crassiuscula* podría ser uno de los parientes diploides de *T. glabrescens*, y que la especie tetraploide debe haberse originado *in situ* en el archipiélago a partir de ancestros diploides⁴⁴.
- *Tolpis coronopifolia*, al igual que la especie no endémica *T. barbata*, se diferencia de las otras especies endémicas en su carácter anual (o

44. Daniel J. Crawford, Jenny K. Archibald, Arnoldo Santos-Guerra, and Mark E. Mort. "Allozyme diversity within and divergent among species of *Tolpis* (Asteraceae-Lactuceae) in the Canary Islands: Systematic, Evolutionary, and Biogeographical implications". American Journal of Botany (2006), 93 (4), 656-664.

débilmente bianual). Esta especie se caracteriza por encontrarse distribuida en un amplio rango de hábitats a lo largo de la isla de Tenerife.

El estudio del género *Tolpis* presenta una serie de cuestiones básicas en lo que respecta al origen y evolución de las plantas insulares desde un punto de vista puramente botánico, como puede ser el sistema de desarrollo de sus colonizadores ancestrales y como fue evolucionando dicho sistema durante el proceso de radiación en el archipiélago, o el hecho de que la especie no endémica de las islas, *T. barbata*, plantea la cuestión de si es nativa o bien fue introducida en las islas desde el continente. Aun cuando desde el punto de vista botánico se ha llevado a cabo un amplio y exhaustivo estudio sobre las relaciones entre las distintas especies de *Tolpis* tanto de las Islas Canarias como de las especies presentes en otros archipiélagos de la Macaronesia, basados en estudios de ISSR (Inter-simple sequence repeat)⁴³, relaciones filogenéticas, diversidad del alozima⁴⁴, así como estudios de sistemática, evolución e implicaciones biogeográficas, nos hemos encontrado con que desde un punto de vista químico prácticamente no se ha llevado a cabo un estudio de los posibles tipos de estructuras y compuestos químicos más abundantes y característicos de las distintas especies insulares, con la única excepción de la especie continental *Tolpis virgata*, de la cual solamente se ha procedido a un estudio de sus aceites esenciales⁴⁵.

Todas estas consideraciones nos han motivado a iniciar un estudio químico de las especies presentes en las islas con el fin de contribuir al esclarecimiento de las relaciones entre las diferentes especies desde el punto de vista quimiotaxonómico.

En la **Tabla 1** mostramos a continuación, y a modo de resumen, una distribución de las poblaciones de las diferentes especies del Género *Tolpis* presentes en la región de la Macaronesia:

45. Imad Odeh, Saleh Abu-Lafi, Hasan Dewik, Ibrahim Al-Najjar, Amin Iman, Valery M. Dembitsky and Lumir O. Hanus. "A variety of volatile compounds as markers in Palestinian honey from *Thymus capitatus*, *Thymelaea hirsute* and *Tolpis virgata*". Food chemistry (2007), 101, 1393-1397.

| Tabla 1: Poblaciones de las Especies Macaronésicas de <i>Tolpis</i> incluidas en los estudios de ISSR⁴³ y de alozimas⁴⁴ | | | |
|--|----------------------|----------------|--|
| Especies | Design. Pobl. | Voucher | Isla y Localización |
| <i>T. barbata</i> | 1 | 1840 | T: entre Santiago del Teide y Masca |
| | 2 | 1849 | T: cerca de Arafo |
| | 3 | 1866 | H: entre El Pinar y La Restinga |
| | 4 | 1907 | P: Caldera de Taburiente |
| <i>T. calderae</i> | 5 | 1905 | P: Caldera de Taburiente. Bco. las Cañeras |
| | 6 | 1906 | P: Caldera de Taburiente. Junto al Río |
| | 7 | 1887 | P: Mirador de La Cumbrecita |
| <i>T. coronopifolia</i> | 8 | #5 | T: Arafo |
| | 9 | 1833 | T: Puerto de la Cruz |
| | 10 | 1834 | T: La Guancha |
| | 11 | 1850 | T: Carretera a Badajoz |
| | 12 | 1983 | T: Carretera a Arico |
| <i>T. crassiuscula</i> | 13 | 1835 | T: Teno, túnel oeste de El Fraile |
| <i>T. farinulosa</i> | 14 | s.n. | CV |
| <i>T. glabrescens</i> | 15 | 1877 | T: Anaga, Chinobre |
| | 16 | 1 | T: Anaga, Roque de Enmedio |
| <i>T. laciniata</i> | 17 | 1851 | H: Valverde a el Mocanal |
| | 18 | 1860 | H: entre Llanitos y Sabinosa |
| | 19 | 1869 | H: carretera hacia Frontera |
| | 20 | 1956 | H: Piedra de Dos Hermanas |
| | 21 | 1957 | H: cerca de Casillas |
| | 22 | 1958 | H: carretera vieja a Sabinosa |
| | 23 | 1960 | H: carretera este a Sabinosa |
| | 24 | 1962 | H: cerca de Tabano |
| | 25 | 1963 | H: cerca de Tabataje |
| | 26 | #15 | H: cerca de Tabano |
| | 27 | #16 | H: cerca de Tabano |
| | 28 | 1908 | G: carretera a Echereda |
| | 29 | 1911 | G: acantilado de Juell |
| | 30 | 1913 | G: cerca del Roque del Bailadero |
| | 31 | 1917 | G: carretera a Vallehermoso |
| | 32 | 1918 | G: carretera cerca de Epina |
| | 33 | 1921 | G: mirador de Igualero |
| | 34 | 1879 | P: Mazo |
| | 35 | 1880 | P: norte de Los Canarios |
| | 36 | 1883 | P: La Caldereta, Fuencaliente |
| | 37 | 1886 | P: sur de Jedey |
| | 38 | 1889 | P: cerca del parque de La Cumbrecita |
| | 39 | 1891 | P: por encima de El Peñón |
| | 40 | 1893 | P: La Galga |
| | 41 | 1896 | P: cerca del Roque de Los Muchachos |
| | 42 | 1903 | P: Barranco de Izcagua |
| | 43 | 1977 | P: cerca de Olen |
| | 44 | #14 | P: Los Andenes |
| | 45 | #17 | P: carretera al Roque de los Muchachos |

| | | | |
|--|----|---------|--|
| <i>T. lagopoda</i> | 46 | 1843 | T: cerca de Ayosa |
| | 47 | 1926 | T: cerca autovía TF 21 entre Kms 25 y 26 |
| | 48 | 1941 | T: por encima de La Esperanza |
| | 49 | 1948 | T: Fuente de Joco |
| | 50 | 1949 | T: cerca del Mirador de Ayosa |
| | 51 | 1966 | T: cerca de Aguamansa |
| | 52 | 1968 | T: por encima de Aguamansa |
| | 53 | 1969 | T: carretera a Pista Chemoche |
| | 54 | 1970 | T: por debajo de Montaña Bermeja |
| | 55 | GC03-01 | GC |
| | 56 | GC03-06 | GC |
| <i>T. proustii</i> | 57 | 1863 | H: Mirador de Bascos |
| <i>T. succulenta</i> | 58 | s.n. | M |
| <i>T. webbii</i> | 59 | 6 | T: por encima de Vilaflor |
| | 60 | 1842 | T: cerca del Zapatito de la Reina |
| | 61 | 11 | T: Las Cañadas, Refugio de Montañeros |
| <i>T. sp. nov. 1</i> | 62 | 4 | P: Playa de Nogales |
| | 63 | 1890 | P: El Peñón |
| <i>T. sp. nov. 2</i> | 64 | 2 | T: Masca, Chierfe |
| <i>T. sp. nov. 3</i> | 65 | 1975 | T: Barranco Seco |
| | 66 | 1987 | T: Barranco del Infierno |
| <i>T. sp. nov. 4</i> | 67 | 1984 | T: carretera por encima de Arico |
| CV: Cabo Verde G: Gomera GC: Gran Canaria H: El Hierro M: Madeira P: La Palma T: Tenerife | | | |
| Voucher n ^{os} 1 a 17 y s.n. recolectados por A. Santos Guerra | | | |
| Voucher n ^{os} 1833 a 1926 recolectados por D. J. Crawford, M. E. Mort y A. Santos Guerra | | | |
| Voucher n ^{os} 1941 a 1987 recolectados por D. J. Crawford y A. Santos Guerra | | | |
| Voucher n ^{os} GC03-01 y GC03-06 recolectados por M. E. Mort y A. Santos Guerra | | | |
| Posibles nuevas especies, observaciones de A. Santos Guerra | | | |



3.2 *Tolpis webbii* Sch. Bip. ex Webb et Berth.

Parte Teórica

La *Tolpis webbii* Sch. Bip. ex Webb et Berth es una planta endémica que se localiza en las zonas más elevadas de la isla de Tenerife (Las Cañadas del Teide) donde se la conoce como “flor del malpaís o lechuguilla de cumbre”. Las plantas de este género se diferencian de otros géneros de *Compositae* porque son plantas no espinosas que poseen látex y cuyos capítulos poseen sólo lígulas. El receptáculo carece de escamas y las cipselas nervadas no son picudas. El vilano posee unas cuantas cerdas largas con escamas por la base. Dentro del género las plantas de *Tolpis webbii* se diferencian por sus tallos, que se ramifican desde el suelo y sus hojas inferiores subrectas, linear-lanceoladas y pinnatífidas. El nombre de la especie hace referencia a Philip Barker Webb (1793-1854), viajero y naturalista inglés, que estuvo recolectando en Canarias entre 1828 y 1830, y que fue coautor junto a Sabino Berthelot de la "Historia Natural de las Islas Canarias".

Tal como se describe en la parte experimental, tras la extracción de esta planta con etanol hasta agotamiento y posterior tratamiento del extracto mediante concentración, se obtuvo un líquido oscuro y denso que, merced a su estudio en cromatografía en columna, nos condujo a la obtención de doce sustancias, para cuya descripción no se va a tener en cuenta el orden de elución cromatográfica, sino que la efectuaremos en función de sus relaciones estructurales. Según este criterio se pueden agrupar de la siguiente forma:

- a) 3 compuestos aromáticos (**W3**, **W4** y **W6**)

- b) 9 triterpenos y esteroides:
 - b.1) Estigmasterol (**W1**) y 2 derivados del estigmasterol y del β -sitosterol (**W10** y **W12**)
 - b.2) 2 derivados del lupeol (**W2** y **W8**)
 - b.3) 4 derivados del taraxasterol y la amirina (**W5**, **W7**, **W9** y **W11**)

a) COMPUESTOS AROMÁTICOS:

Sustancia W3:

Esta sustancia se aisló a partir de la fracción IV de la cromatografía general como un sólido cristalino de punto de fusión 219-221°C. Su comportamiento en CCF (fluorescencia azul cuando es expuesta a la luz ultravioleta) nos sugería que podía tener naturaleza cumarínica.

En su espectro de masas (Tabla 5A) se observa el ión molecular a m/z 192, lo que concuerda con una fórmula molecular $C_{10}H_8O_4$, apareciendo picos relativamente intensos a m/z 177 (indicaría pérdida de un metilo) y 164 (correspondería a la pérdida de un grupo CO). En el espectro infrarrojo observamos bandas de absorción para grupos OH (a 3465 cm^{-1}) y carbonilo (a 1693 cm^{-1}) que apunta nuevamente a su naturaleza cumarínica.

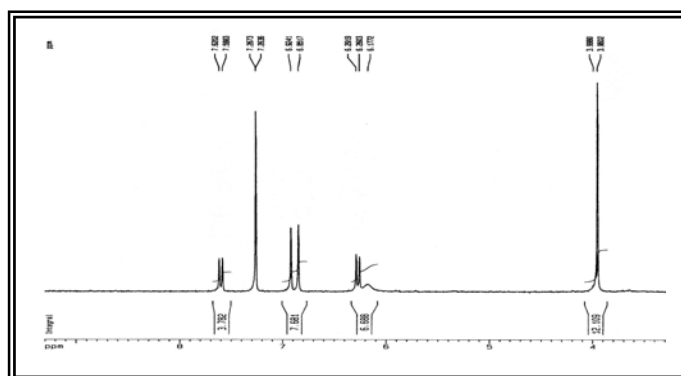
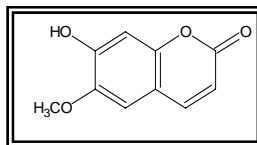


Figura 14: Espectro de RMN ^1H de la sustancia W3

El espectro de RMN ^1H (Figura 14; tabla 5B) confirma el grupo cumarínico al dar las siguientes señales: dos singletes a δ_{H} 3.96 y 6.18 correspondientes a un grupo metoxilo y un hidroxilo, respectivamente; un singlete a δ_{H} 6.85 que asignamos a H-8 y otro a δ_{H} 6.92 que asignamos a H-5; un doblete a δ_{H} 6.27 ($J=9.5\text{ Hz}$) que asignamos a H-3 y otro doblete a δ_{H} 7.60 ($J=9.5\text{ Hz}$) que asignamos a H-4.

Los datos físicos y espectroscópicos así como una comparación directa con una muestra auténtica en cromatografía en capa fina nos confirman que nuestra sustancia se corresponde con la **escopoletina**⁴⁶.

46. Murria, R.H.D., Méndez, J. and Brown, S.A. "The natural coumarins". John Wiley, Chischester, UK (1982).



W3

Sustancia W4:

Esta sustancia fue aislada a partir de la fracción IV de la cromatografía general como un sólido cristalino de punto de fusión 205-206°C.

Su comportamiento en CCF (manchas de color amarillo intenso al revelar con óleum y calor) nos hizo sospechar en primera instancia que podría tratarse de una sustancia de naturaleza flavonoide, por lo que procedimos a efectuarle medidas en el espectro UV (Tabla 6A), presentando bandas de absorción a 328 y 292 nm. Los ensayos con los reactivos habituales de desplazamiento, mostraron que únicamente se producía un desplazamiento de 54 nm con la adición de tricloruro de aluminio, que prácticamente se mantenía al añadirle posteriormente ácido clorhídrico. Esto indicaba que debía existir un grupo OH en el C-5 de la supuesta estructura flavonoide, capaz de formar un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo vecino. En el espectro IR puede destacarse la presencia de una banda de OH a 3252 cm^{-1} , y otra banda de absorción a 1675 cm^{-1} , que indica la presencia de un grupo carbonilo sobre anillo aromático.

En su espectro de masas (Tabla 6A) aparece un pico de ión molecular muy intenso (100%) a m/z 244, que se corresponde con una fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_4$, destacando además otro pico intenso a m/z 243 $[\text{M}-1]^+$ característico de agliconas libres, otro pico menos intenso a m/z 227 que indica la pérdida de un grupo hidroxilo, un pico muy intenso a m/z 151 que correspondería con un fragmento de anillo aromático con tres sustituyentes (un metoxilo, un hidroxilo y un carbonilo) y un pico menos intenso a m/z 121 que correspondería con un fragmento de anillo aromático con dos sustituyentes (un hidroxilo y un carbonilo). Esto nos hizo pensar en una estructura con dos anillos aromáticos unidos por un grupo carbonilo, y con un hidroxilo para uno de los anillos, mientras que el otro anillo debería tener un hidroxilo y un metoxilo, lo que nos permitiría explicar la presencia de los fragmentos a m/z 121 y 151 mediante la ruptura a ambos lados del grupo carbonilo que une a los dos anillos aromáticos.

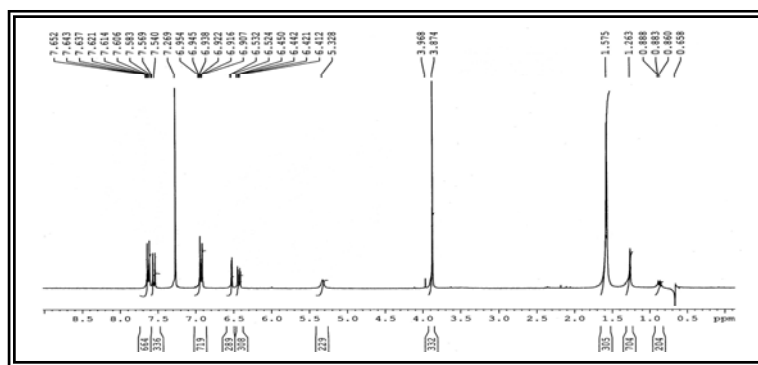


Figura 15: Espectro de RMN ^1H en CDCl_3 de la sustancia **W4**

Debido a su poca solubilidad en cloroformo, y con el objetivo de obtener un espectro de RMN ^{13}C con aceptable resolución, se disolvió la sustancia en cloroformo deuterado con unas gotas de metanol deuterado. Así, en el espectro de RMN ^{13}C (Tabla 6B) obtenido aparecen señales para un total de 14 carbonos, en concordancia con la fórmula molecular predicha en el espectro de masas, de los cuales doce corresponden con carbonos aromáticos (a δ_{C} 104.68, 110.67, 116.90, 118.75 para 2 C, 133.18, 135.29 para 2 C, 138.84, 164.45, 169.30 y 169.43), y las dos señales restantes corresponden con un carbono de carbonilo (δ_{C} 202.77) y un carbono de metoxilo (δ_{C} 59.20), lo que apoya nuestra propuesta de estructura con dos anillos aromáticos. El espectro de RMN ^1H se registró tanto en disolución de CDCl_3 como en disolución de $\text{CDCl}_3 + \text{MeOD}$. El espectro de CDCl_3 (Figura 15; Tabla 6B) presenta una señal de grupo metoxilo a δ_{H} 3.87 (s, 1H), y cinco señales de protones aromáticos: dos dobletes a δ_{H} 6.53 ($J=2.4$ Hz) y 7.55 ($J=8.7$ Hz) que integran para un protón cada uno; un doble doblete a δ_{H} 6.43 ($J=2.4$ Hz; 8.7 Hz) que integra para un protón; y dos dobles dobletes a δ_{H} 6.93 ($J=2.1$ Hz; 8.7 Hz) y 7.63 ($J=2.7$ Hz; 8.7 Hz) que integran para dos protones cada uno. Esto nos hizo pensar que uno de los anillos debe estar disustituido en posición para, lo que explicaría los dos dobles dobletes que integran para dos protones cada uno con las mismas constantes de acoplamiento, mientras que el otro anillo debe tener tres sustituyentes (el carbonilo, un hidroxilo y un metoxilo, en concordancia con la fragmentación del espectro de masas). Ahora bien, esos sustituyentes podrían situarse en posiciones 1, 2 y 4 (dejando libres las posiciones 3, 5 y 6), o bien se situarían en posiciones 1, 3 y 4 (dejando libres entonces las posiciones 2, 5 y 6), para poder explicar dos señales con acoplamiento vecinal (constante 8.7 Hz) que corresponderían con H-5 y H-6, y dos señales con acoplamiento a larga distancia (constante 2.4 Hz) que

corresponderían con H-3 y H-5, o bien H-2 y H-5.

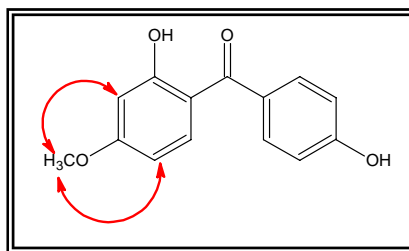


Figura 16a: Relaciones seleccionadas de ROESY de la sustancia W4

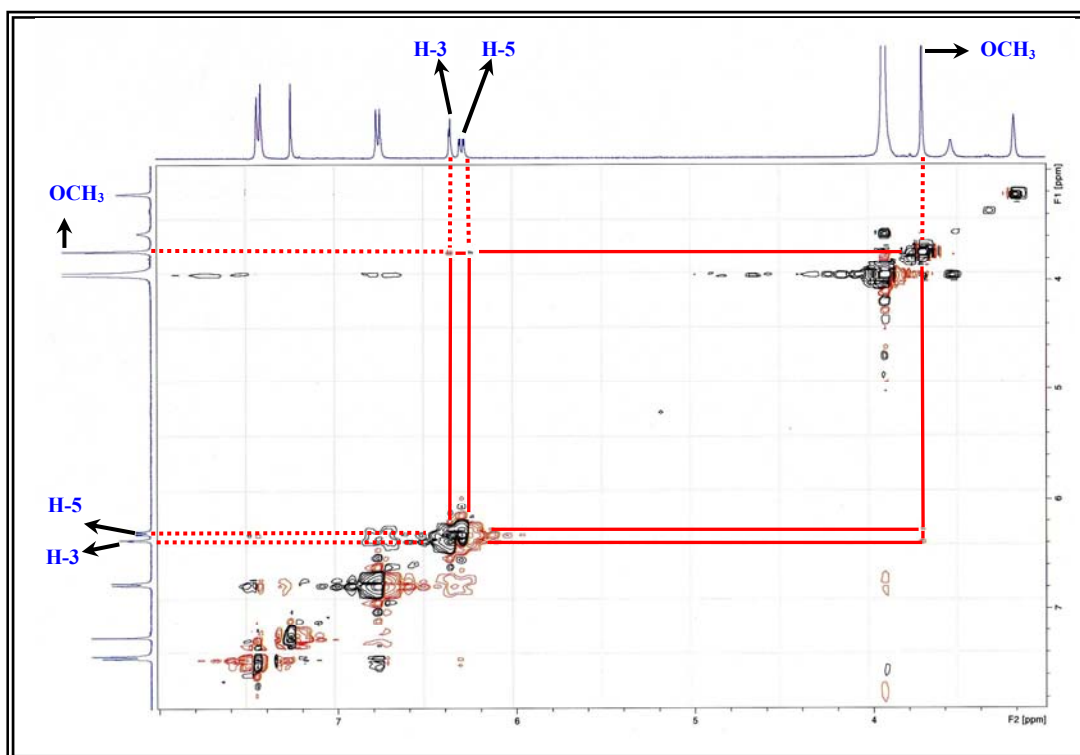


Figura 16b: Espectro de ROESY de la sustancia W4

Para deducir en qué posiciones exactas se situaban los sustituyentes, nos fue útil el análisis de los espectros de RMN bidimensional. De esta forma, tanto en el experimento NOESY como en el ROESY (Figura 16b) se puede comprobar que la señal correspondiente al grupo metoxilo presenta interacciones únicamente con las señales situadas a δ_{H} 6.43 y 6.53, indicando que debe tener dos hidrógenos situados en los carbonos vecinos al que soporta el grupo metoxilo. La única combinación posible de sustituyentes que posibilita esta situación sería la de las posiciones 1, 2 y 4, con el grupo carbonilo en posición 1, el hidroxilo en posición 2 y el metoxilo en posición 4, interaccionando con los hidrógenos en 3 y en 5.

Por lo tanto, la estructura de W4 se corresponde con la del **2,4'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona**, que fue confirmada mediante un análisis cristalográfico de rayos X (Figura 17).

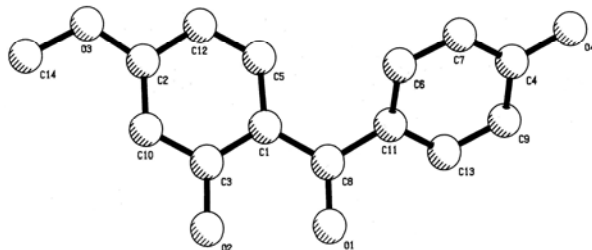
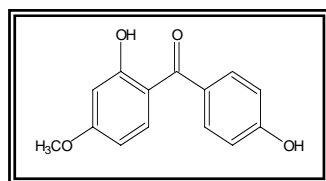


Figura 17: Difracción de rayos X (ORTEP) de la sustancia W4.

Este es un compuesto descrito como producto de síntesis en todas las fuentes bibliográficas consultadas^{47, 48}, siendo ésta la primera ocasión en que se aísla de una fuente natural.



W4

Sustancia W6:

Se aisló de la fracción IV de la cromatografía general como un sólido amorfo de color blanco cremoso.

En su espectro de masas (Tabla 8A) aparece un pico de ión molecular relativamente intenso (57%) a m/z 152, que se corresponde con una fórmula molecular $C_8H_8O_3$, destacando además otro pico menos intenso a m/z 135 que indica la pérdida de un grupo hidroxilo, y el pico base a m/z 121 que correspondería a la pérdida de un grupo metoxilo.

47. Prashad, M.; Ray, S. and Bhaduri, A.P. "Nitration of substituted benzophenones". Indian J. of Chem., Sect. B. Org. Chem. Including Med. Chem. (1978), 16B (2), 142-143.

48. Sharma, I. and Ray, S. "Acetic anhydride/triethylamine induced condensation of *o*-hydroxybenzophenone with phenylacetic acid: a study of the mechanism of coumarin formation". Indian J. of Chem., Sect. B. Org. Chem. Including Med. Chem. (1988), 27B (4), 374-375.

En el espectro IR puede destacarse la presencia de una banda de absorción a 3300 cm^{-1} , característica del grupo funcional alcohol, y otra banda de absorción a 1675 cm^{-1} , que indica la presencia de un grupo carbonilo sobre anillo aromático.

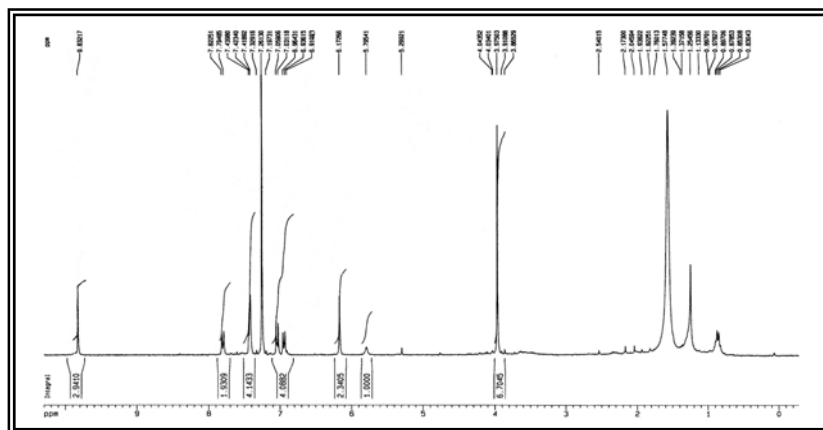
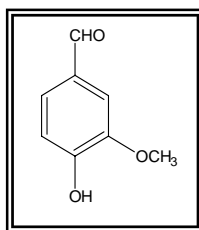


Figura 18: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **W6**

El espectro de RMN ^1H (Figura 18; Tabla 8B), relativamente sencillo, nos confirma su naturaleza de compuesto aromático, ya que sólo presenta cinco señales de protones, de las cuales dos se corresponden con protones aromáticos, a $\delta_{\text{H}} 7.04$ (d, $J=8.4$ Hz, 1H) asignada a H-5, y a $\delta_{\text{H}} 7.42$ (d, $J=1.3$ Hz, 2H), asignada a H-2 y H-6. Otra señal corresponde con un protón de grupo aldehído, $\delta_{\text{H}} 9.83$ (s, 1H), lo que concuerda con lo comentado previamente para la banda presente en el espectro IR; además se observa una señal de grupo metoxilo a $\delta_{\text{H}} 3.97$ (s, 3H), y una señal asignada a un grupo OH a $\delta_{\text{H}} 6.17$ (s, 1H). El espectro de RMN ^{13}C (Tabla 8B) nos confirma la presencia de ocho carbonos, de los cuales seis son aromáticos, a $\delta_{\text{C}} 56.1$ (correspondiente al carbono sobre el que se une el grupo aldehído), 108.8, 114.4, 115.9, 127.5 y 132.3, indicando estos dos últimos la presencia de algún átomo electronegativo unido a ellos, lo que concuerda con los grupos metoxilo e hidroxilo comentados en el espectro RMN ^1H . Las otras dos señales de carbonos se corresponden con un carbono aldehído a $\delta_{\text{C}} 190.8$ y un carbono de grupo metoxilo a $\delta_{\text{C}} 29.7$.

Estos datos espectroscópicos y físicos coinciden con los de la **vainillina**, lo que se confirmó mediante una comparación directa con una muestra auténtica en cromatografía en capa fina.



W6

b) TRITERPENOS Y ESTEROLES:

b.1) Estigmasterol y derivados del Estigmasterol y β -sitosterol

Sustancia W1:

Fue aislada a partir de la fracción V de la cromatografía general como un sólido cristalino de punto de fusión 154-156°C. El ensayo de Liebermann-Burchard da positivo, y su análisis en cromatografía en capa fina confirma que se trata de un estero. En su espectro de masas (Tabla 2A) destacan el pico de ión molecular a m/z 412, que se corresponde con una fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$, un pico relativamente intenso a m/z 394, indicativo de la pérdida de una molécula de agua, y otro a m/z 255 que podría corresponder a la fragmentación de la cadena lateral entre los carbonos 17 y 20. En su espectro de IR destaca una banda de absorción a 3500 cm^{-1} característica de grupo hidroxilo.

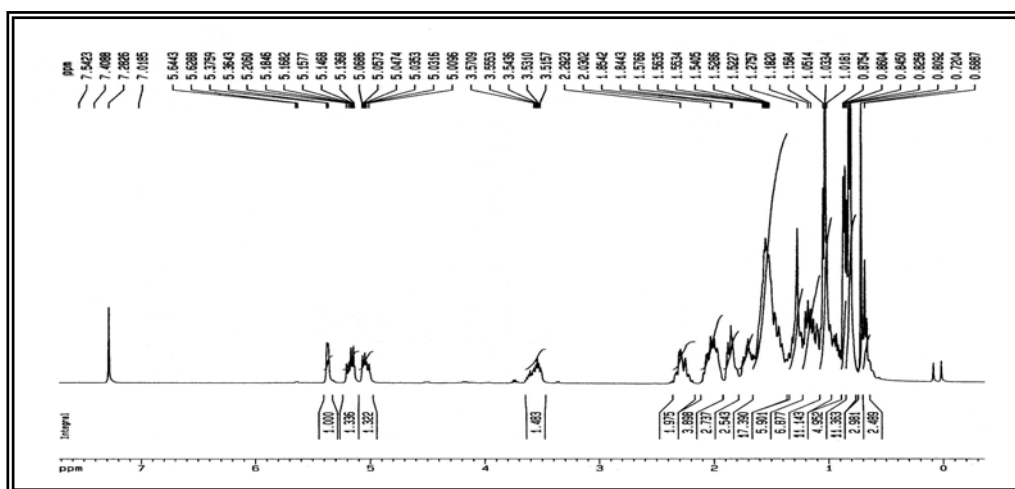
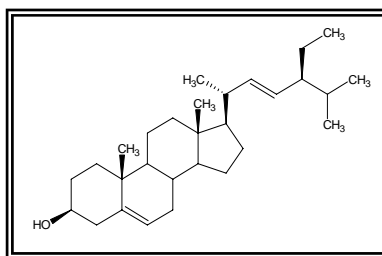


Figura 19: Espectro de RMN ^1H de la sustancia W1

En el espectro de RMN ^1H (Figura 19; Tabla 2B) se observan seis señales de grupos metilos: dos singuletes a δ_{H} 0.83 y 1.05; dos dobletes a δ_{H} 0.82 ($J=6.6$ Hz, integrando para 6H) y 1.04 ($J=7.2$ Hz); y un triplete a δ_{H} 0.86 ($J=6.0$ Hz; 6.1 Hz). Además destacan tres señales de protones olefínicos: un doblete a δ_{H} 5.37 ($J=4.6$ Hz), y dos dobles dobletes a δ_{H} 5.04 ($J=8.6$ Hz; 15.0 Hz) y 5.18 ($J=8.5$ Hz; 15.1 Hz); y una señal para un protón geminal a grupo hidroxilo a δ_{H} 3.54 (m). En el espectro de RMN ^{13}C (Tabla 2B) se observan señales para 29 carbonos, en concordancia con la fórmula molecular, destacando cuatro carbonos olefínicos a δ_{C} 121.7, 129.3, 138.3 y 140.7 (este último como carbono cuaternario), y un carbono unido a oxígeno a δ_{C} 71.8.

Se pudo comprobar mediante consulta en la bibliografía, que estos datos físicos y espectroscópicos reseñados son totalmente coincidentes con los del **estigmasterol**⁴⁹.



W1

Sustancia W10:

Fue aislada a partir de la fracción IV de la cromatografía general como un sólido amorfo. Su espectro de IR muestra bandas de absorción características de grupo hidroxilo (3411 cm^{-1}), y de un carbonilo conjugado con un doble enlace (1730 y 1672 cm^{-1}).

49. Kojima, H., Sato, N., Hatano, A. and Ogura, H. "Sterol glucosides from *Prunilla vulgaris*". *Phytochemistry* (1990), 29 (7), 2351-2355.

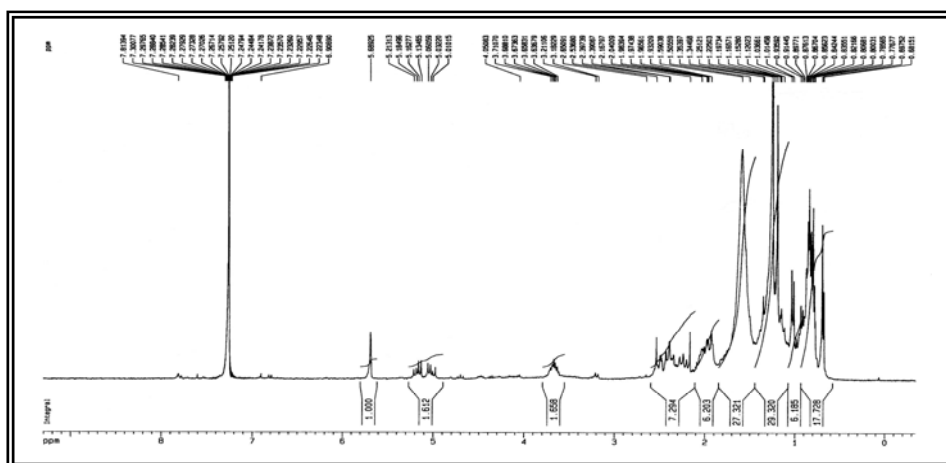


Figura 20: Espectro de RMN ^1H de la sustancia W10

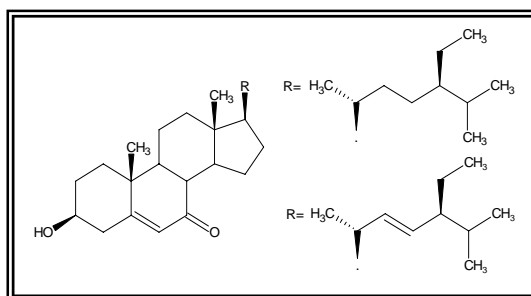
El análisis de sus datos de RMN de ^1H (Figura 20; Tabla 14B) nos permitió identificar un esqueleto triterpénico para esta sustancia. Así, aparecen dos singletes a δ_{H} 0.70 y 0.85, que integran para un metilo cada uno, tres dobletes a δ_{H} 0.81 ($J=6.2$ Hz), 0.89 ($J=6.8$ Hz) y 1.03 ($J=6.7$ Hz) con integral para un metilo cada uno, y un triplete a δ_{H} 0.80 ($J=4.4$ Hz; 6.2 Hz), que también integra para un metilo, y que se corresponden con CH_3 -18, CH_3 -19, CH_3 -21, CH_3 -26, CH_3 -27 y CH_3 -29. También se observan tres señales para protones olefínicos, como un singlete ancho a δ_{H} 5.69, y dos dobles dobletes a δ_{H} 5.02 ($J=7.9$ Hz; 14.8 Hz) y 5.17 ($J=8.8$ Hz; 15.1 Hz). Por último se aprecia la señal para un protón geminal a un grupo hidroxilo a δ_{H} 3.68 (tt, $J=5.0$ Hz; 11.0 Hz). La acetilación del compuesto nos permitió confirmar las señales en su espectro de RMN de ^1H , que son prácticamente superponibles a las comentadas para el alcohol original, salvo la señal correspondiente al protón geminal al grupo hidroxilo, que en el acetato se desplaza hasta δ_{H} 4.71 (q, $J=4.8$ Hz; 10.6 Hz).

Estos datos concuerdan con los dados en la literatura para la mezcla de **7-oxo-estigmasterol** y **7-oxo-sitosterol**^{50, 51}. El estudio del espectro de masas de este

50. Katsui, N., Matsue, H., Hirata, T. and Masamune, T. "Phytosterols and triterpenes in the roots of the "Kidney Bean" (*Phaseolus vulgaris* L.)". Bull. of the Chem. Soc. of Japan (1972), 45, 223-226.

51. Pettit, G.R. et al. "Isolation and structures of schleicherastatins 1-7 and schleicheols 1 and 2 from the teak forest medicinal tree *Schleichera oleosa*". J. Nat. Prod. (2000), 63, 72-78.

compuesto y de su derivado acetilado, nos permitió confirmar finalmente la estructura mencionada. Así, en el espectro de masas de la sustancia **W10** (Tabla 14A) se observan los picos correspondientes a los iones moleculares (428 para el 7-oxo-sitosterol, y 426 para el 7-oxo-estigmasterol), además de, entre otros, dos picos a m/z 410 y 408 que corresponden a la pérdida de una molécula de agua para cada compuesto. En el espectro de masas de su derivado acetilado (**W10a**, Tabla 15A) aparecen dos picos de ión molecular a 470 (coincidente con el derivado acetilado del 7-oxo-sitosterol) y a 468 (coincidente con el derivado acetilado del 7-oxo-estigmasterol), y además dos picos a m/z 410 y 408 que se corresponden con la pérdida de una molécula de ácido acético en ambos casos. La intensidad similar de los picos de ión molecular nos permitió además deducir que la mezcla debía estar formada por una proporción 1:1 para ambos compuestos.

**W10**

Sustancia W12:

Se consiguió aislar esta sustancia a partir de la fracción V de la cromatografía general, purificándose mediante la formación de su derivado acetilado, que es un sólido cristalino. El espectro de IR de este derivado nos indica fundamentalmente la presencia de grupos carbonilo mediante la banda de absorción característica a 1747 cm^{-1} .

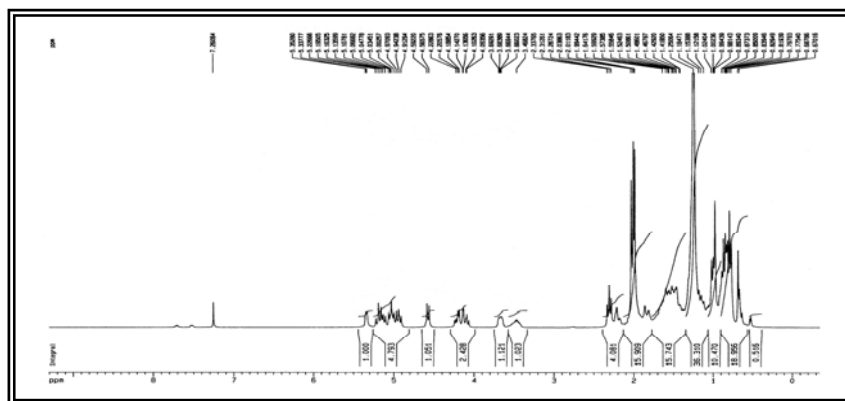
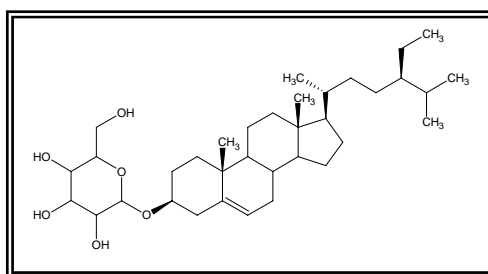


Figura 21: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **W12**

El análisis de su espectro de RMN de ^1H (Figura 21; Tabla 17B) nos permitió deducir un esqueleto triterpénico para esta sustancia. Así, podemos observar cinco singuletes a δ_{H} 0.69, 0.77, 0.80, 0.85 y 0.87, que integran para un metilo cada uno, y un doblete a δ_{H} 0.99 ($J=6.3$ Hz), con integral para un metilo, y que se corresponden con CH_3 -18, CH_3 -19, CH_3 -21, CH_3 -26, CH_3 -27 y CH_3 -29. También se observa una señal para protón olefínico, como un doblete ancho a δ_{H} 5.34 ($J=4.5$ Hz), y la señal de un protón geminal a un oxígeno a δ_{H} 3.47 (m). Además aparecen las señales características de un grupo glucopiranosil, como un doblete a 4.58 ($J=7.9$ Hz) que integra para un protón, dos dobles dobletes a δ_{H} 4.12 ($J=2.7$ Hz; 12.0 Hz) y 4.20 ($J=5.2$ Hz; 12.0 Hz) con integral para un protón cada uno, y dos multipletes a δ_{H} 3.68 (1H) y 4.91-5.23 (3H).

Estos datos son consistentes con los reseñados en la literatura para el **acetato de 3-O- β -D-glucopiranosil de β -sitosterol** por lo que el producto **W12** natural es el **3-O- β -D-glucopiranosil de β -sitosterol**⁵².



W12

52. Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G., Sevente, T. and Hadi, H.A. "Cytotoxic polyisoprenes and glycosides of long-chain fatty alcohols from *Dimocarpus fumatus*". *Phytochemistry* (1999), 50, 63-69.

b.2) Derivados del lupeol

Sustancia W2:

Esta sustancia fue aislada a partir de la fracción V de la cromatografía general, como un sólido cristalino con punto de fusión 183-185°C. En su espectro de IR se observan las bandas características para un grupo carbonilo conjugado con un doble enlace, a 1719 y 1691 cm^{-1} .

En su espectro de masas (Tabla 3A) observamos un pico de ión molecular relativamente intenso a m/z 440, en concordancia con una fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$, destacando además otros picos relativamente intensos a m/z 422 (señala la pérdida de agua) y a 407 (indica la pérdida adicional de un grupo metilo).

El espectro de RMN de ^{13}C y D.E.P.T. (Tabla 3B) muestra señales para treinta carbonos, que se desglosan en seis grupos metilo a δ_{C} 14.4, 15.3, 15.9, 16.0, 17.7 y 28.0; diez grupos metileno a δ_{C} 18.3, 20.9, 27.3 (para dos C), 29.7, 31.2, 34.2, 35.4, 38.7 y 39.9; cinco grupos metino a δ_{C} 37.7 (para dos C), 50.2, 51.2 y 55.2; y cinco carbonos cuaternarios a δ_{C} 37.1, 38.8, 40.7, 42.7 y 43.2. Además de estos grupos también se observan señales para dos carbonos olefínicos a δ_{C} 133.2 (disustituido) y 157.1 (este completamente sustituido), para un carbono oxigenado a δ_{C} 79.0 y para un carbono aldehído a δ_{C} 195.1.

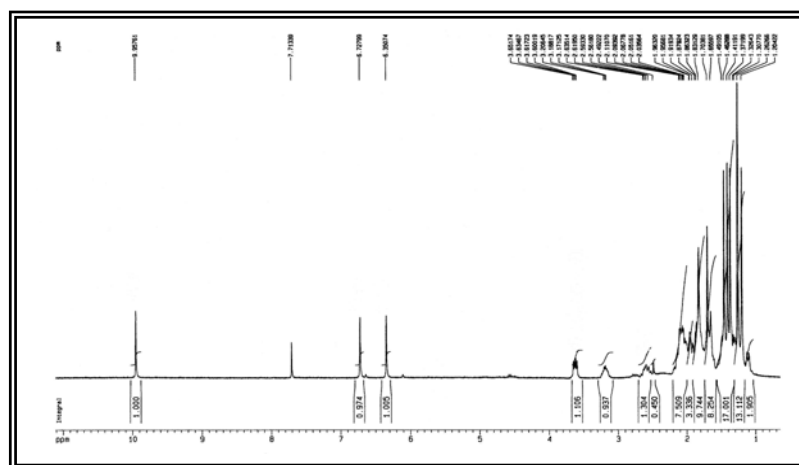


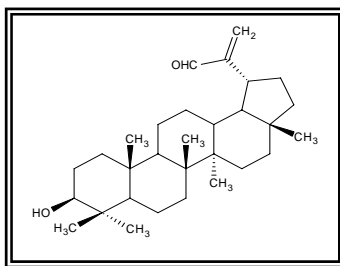
Figura 22: Espectro de RMN ^1H de la sustancia W2

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 22; Tabla 3B) observamos las señales correspondientes a los seis grupos metilo comentados en el espectro de ^{13}C , como seis singuletes situados a δ_{H} 0.75, 0.81, 0.82, 0.92, 0.96 y 1.01, que integran para tres protones cada uno. También aparece una señal de protón de grupo aldehído a δ_{H} 9.51 (s, 1H), y la señal de un protón geminal a grupo OH, como un doble doblete ($J=5.1$ Hz; 10.3 Hz) situado a δ_{H} 3.18 (1H). Destaca también la presencia de dos singuletes situados a δ_{H} 5.91 y 6.29 con integral para un protón cada uno, que indica la presencia de dos protones olefinicos algo desapantallados por la vecindad de un grupo electronegativo, posiblemente el grupo aldehído, lo que sería consistente con las señales comentadas en el IR, indicativas de un grupo carbonilo conjugado con un doble enlace.

La acetilación de **W2** nos permitió obtener su derivado acetilado **W2a**, y del estudio de sus datos espectrales pudimos extraer algunas conclusiones adicionales. En primer lugar, en el espectro de IR de **W2a** ha desaparecido la banda característica del grupo hidroxilo, mientras que en su espectro de masas se observa el pico de ion molecular a m/z 482, indicando la introducción de un único grupo acetilo. Estos datos nos revelan la probable existencia de un único grupo hidroxilo en **W2**, lo que concuerda además con la existencia de sólo dos átomos de oxígeno en la fórmula molecular de **W2**, uno de los cuales corresponde al grupo aldehído. Por otro lado, en el espectro de RMN de ^1H del derivado acetilado (Tabla 4B), se observan prácticamente las mismas señales que en el espectro del compuesto original, con la única salvedad del desplazamiento de la señal del protón geminal al grupo hidroxilo hacia campo más bajo (a δ_{H} 4.45, dd, $J=5.5$ Hz; 10.5 Hz), como consecuencia de la introducción del grupo acetilo en esa posición en el compuesto **W2a**, y la presencia de un singulete a δ_{H} 2.03 correspondiente al grupo metilo del acetilo.

Todos los datos comentados son coincidentes con los descritos en la bibliografía consultada para el compuesto **3 β -hidroxilup-20(29)-en-30-al**⁵³.

53. Burns, D., Reynolds, W.F., Buchanan, G., Reese, P. B. and Enriquez, R.G. "Assignment of ^1H and ^{13}C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives". *Magnetic Resonance in Chemistry* (2000), 38, 488-493.

**W2****Sustancia W8:**

Se aisló a partir de la fracción IV de la cromatografía general, como un sólido cristalino con punto de fusión 215-216°C. En su espectro de IR se observa la presencia de una banda de absorción a 3338 cm⁻¹, característica de grupo hidroxilo.

En su espectro de masas (Tabla 11A) se aprecia el pico del ión molecular a m/z 442, que se corresponde con una fórmula molecular C₃₀H₅₀O₂. Además, también se observan picos relativamente intensos a m/z 424 que corresponde con la pérdida de una molécula de agua, y a m/z 409, indicativo de la pérdida adicional de un grupo metilo.

El espectro de RMN de ¹³C y D.E.P.T. (Tabla 11B) muestra señales para treinta carbonos. Así, de todas esas señales seis corresponden a grupos metilos, a δ_C 14.3, 15.1, 15.7, 15.9, 17.5 y 29.5; diez son de grupos CH₂, situadas a δ_C 18.1, 20.8, 27.2, 27.7 (para dos C), 31.8, 34.0, 35.2, 38.4 y 39.6; cinco señales corresponden a grupos CH, a δ_C 37.8, 42.8, 48.6, 50.1 y 55.0; y también se observan cinco carbonos cuaternarios a δ_C 36.9, 38.6, 40.8, 42.6 y 43.1. Además de éstas se aprecian también señales para dos carbonos olefínicos a δ_C 106.7 (un CH₂) y a 106.7 (totalmente sustituido), un CH unido a oxígeno a δ_C 78.7, y un CH₂ unido a oxígeno a δ_C 64.8.

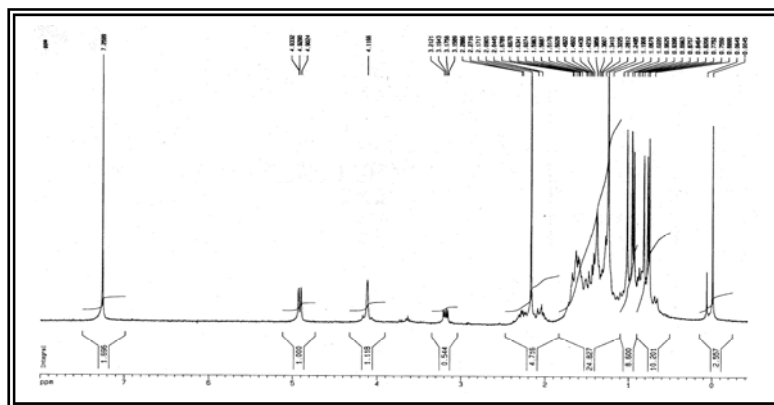
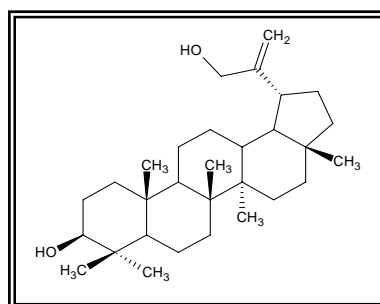


Figura 23: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **W8**

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 23; Tabla 11B) se observan seis señales singletes que integran para tres protones cada una, en correspondencia con los seis grupos metilos detectados en el espectro de RMN de ^{13}C , y que se sitúan a δ_{H} 0.77, 0.79, 0.83, 0.95, 0.97 y 1.04. Por otro lado se observan dos singletes a δ_{H} 4.91 y 4.94, con integral para un protón cada uno, que indican la presencia de dos protones olefinicos en concordancia con la señal detectada en el espectro de RMN de ^{13}C , y que fueron asignados al CH_2 -29. También aparece un singlete a δ_{H} 4.12 que integra para dos protones (asignado a CH_2 -30) y un doble doblete a δ_{H} 3.19 ($J=5.0$ Hz; 10.3 Hz) con integral para un protón (asignado a H-3), señales que indican la presencia de protones geminales a dos grupos OH como también parecía indicar el espectro de RMN de ^{13}C de la sustancia.

Estos datos concuerdan con los datos en la bibliografía consultada para el compuesto **Lup-20(29)-en-3 β ,30-diol**⁵³.



W8

b.3) Derivados del Taraxasterol y la Amirina:

Sustancia W5:

Esta sustancia fue aislada a partir de la fracción IV de la cromatografía general, como un sólido amorfo. El espectro de IR muestra la banda característica para grupos hidroxilos, situada a 3462 cm^{-1} , y además las bandas características de grupo carbonilo conjugado con doble enlace, a 1716 y 1670 cm^{-1} . En el espectro UV presenta banda de absorción a 279 nm , que vuelve a incidir en la presencia del grupo carbonilo conjugado con un doble enlace.

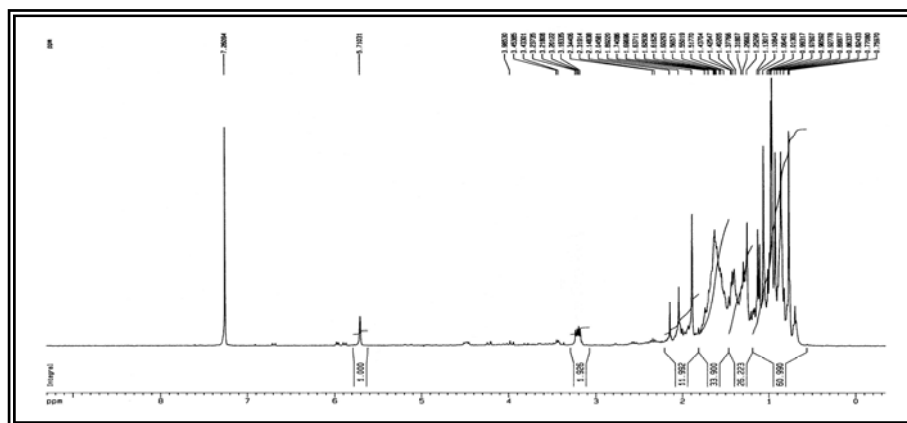
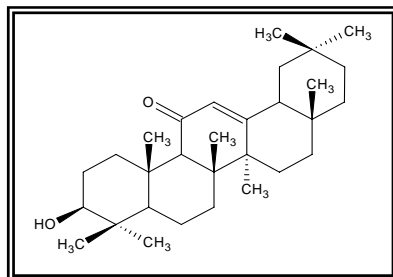


Figura 24: Espectro de RMN ^1H de la sustancia W5

El espectro de RMN de ^1H de W5 (Figura 24; Tabla 7B) muestra las señales indicativas de la presencia de ocho grupos metilos, todas como singuletes, situadas a δ_{H} 0.77, 0.86, 0.93, 0.97 (6H), 0.98, 1.06 y 1.25. También destaca la presencia de una señal singulete para un protón olefínico a δ_{H} 5.71, una señal de un protón geminal a grupo hidroxilo, como un doblete a δ_{H} 3.21 ($J=5.6\text{ Hz}$; 10.6 Hz), y una señal doblete a δ_{H} 1.42 ($J=10.5\text{ Hz}$) para un único protón.

Los datos físicos y espectroscópicos discutidos para la sustancia W5 coinciden plenamente con los presentados en la bibliografía consultada para el compuesto **11-oxo- β -amirina**^{54,55}.

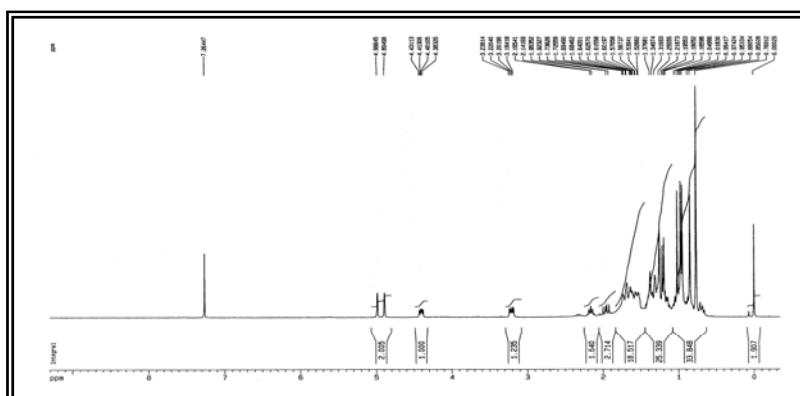
54. Hui, W.-H., Li, M.-M. and Luk, K. "Triterpenoids and steroids from *Rhodomyrtus tomentosa*". *Phytochemistry* (1975), 14, 833-834.
 55. Kapoor, V.K., Chawla, A.S., Gupta, Y.C., Passannanti, S. and Paternostro, M.P. "Constituents of *Buddleia species leaves*". *Fitoterapia* (1981), 52, 235-237.

**W5**

Sustancia W7:

Esta sustancia fue aislada a partir de la fracción IV de la cromatografía general, como un sólido cristalino. En su espectro de IR destaca principalmente la banda característica para grupos hidroxilos, situada a 3361 cm^{-1} .

En el espectro de RMN de ^{13}C y D.E.P.T. (Tabla 9B) se observan señales para treinta carbonos, desglosados en siete grupos metilos a δ_{C} 14.8, 15.4, 15.9, 16.2, 18.2, 28.0 y 28.4; nueve grupos metilenos a δ_{C} 18.3, 21.4, 26.2, 26.3, 27.4, 34.0, 37.6, 38.7 y 48.8; cinco grupos metinos a δ_{C} 38.0, 38.8, 48.4, 50.3 y 55.3; y cinco carbonos cuaternarios a δ_{C} 33.9, 37.1, 38.9, 40.9 y 42.2. Otras señales que se observan corresponden a dos carbonos olefínicos a δ_{C} 113.6 (disustituido) y 156.6 (este completamente sustituido), y dos carbonos oxigenados a δ_{C} 71.3 y 79.0.

**Figura 25:** Espectro de RMN ^1H de la sustancia W7

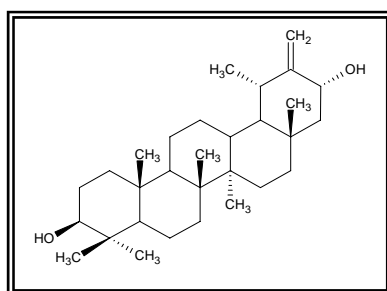
El espectro de RMN de ^1H (Figura 25; Tabla 9B) muestra señales para siete grupos metilos, seis como singuletes a δ_{H} 0.77 (6H), 0.85, 0.95, 0.97 y 1.02, y una como doblete ($J=7.0$ Hz) a δ_{H} 1.20. También aparecen señales para dos protones geminales a grupos oxigenados, a δ_{H} 3.21 (dd, $J=5.2$ Hz; 10.9 Hz) y 4.40 (dd, $J=5.3$ Hz; 9.0 Hz), y para dos protones olefínicos a δ_{H} 4.90 (s) y 4.98 (d, $J=1.4$ Hz).

En el espectro de masas (Tabla 9A) se observa un pico de ión molecular relativamente intenso a m/z 442, que concuerda con una fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$, con la presencia de otros picos relevantes a m/z 424 (que indica la pérdida de agua) y a 409 (corresponde a la pérdida adicional de un grupo metilo), de forma similar a lo que ocurría con la sustancia **W2**. La aparición de un pico poco intenso a m/z 406 (indicativo de la pérdida de una segunda molécula de agua) parece sugerir la presencia de un segundo grupo hidroxilo en su estructura.

Para aclarar la presencia de uno o dos grupos hidroxilos en su molécula se procedió a la acetilación de la sustancia **W7**, obteniendo su derivado acetilado **W7a**. En el espectro de masas de este derivado acetilado (Tabla 10A), aparece el pico de ión molecular a m/z 526, lo que apunta a la introducción de dos grupos acetilos en la molécula del compuesto. Esta apreciación se ve reforzada por la presencia de dos picos relativamente intensos a m/z 466 y 406, que indican la pérdida de sendos grupos acetilos en forma de moléculas de ácido acético. Además, en el espectro de IR de **W7a** desaparece la banda de los grupos hidroxilos, lo que nos permite concluir que en **W7** sólo existen dos grupos hidroxilos, que son reemplazados por los correspondientes grupos acetilos en **W7a**. Por último, el espectro de RMN de ^1H de **W7a** (Tabla 10B) es prácticamente idéntico al del compuesto original, con la salvedad del desplazamiento de las dos señales de los protones geminales a los grupos hidroxilos hacia campos más bajos (a δ_{H} 4.49, m; y a δ_{H} 5.45, dd, $J=4.9$ Hz; 9.4 Hz), y la presencia de las señales como singuletes correspondientes a los metilos de los grupos acetilos a δ_{H} 2.02 y 2.04.

Todos estos datos espectroscópicos y físicos mencionados concuerdan con los reseñados en la literatura consultada para el compuesto **21 α -hidroxitaraxasterol**⁵⁶.

56. Petrovic, S.D., Gorunovic, M.S., Wray, V. and Merfort, I. "A taraxasterol derivative and phenolic compounds from *Hieracium gymnocephalum*". *Phytochemistry* (1999), 50, 293-296.



W7

Sustancia W9:

Esta sustancia se aisló a partir de la fracción IV de la cromatografía general, como un sólido cristalino. En su espectro de IR aparece como señal más destacada la banda característica para grupos hidroxilos, situada a 3417 cm^{-1} .

En su espectro de masas (Tabla 12A) aparece el pico de ión molecular a m/z 458, que se corresponde con una fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3$, destacando además la presencia de otros picos relevantes a m/z 440 (indicativo de la pérdida de agua) y a 425 (corresponde a la pérdida adicional de un grupo metilo), de forma similar a lo que ocurría con las sustancias W2 y W7.

De la misma forma que se hizo con la sustancia W7, para aclarar la presencia de uno o dos grupos hidroxilos en la molécula se procedió a la acetilación de la sustancia W9, obteniendo su derivado acetilado W9a. En el espectro de masas de este derivado (Tabla 13A), aparece el pico de ión molecular a m/z 500, lo que apunta a la introducción de un único grupo acetilo en la molécula del compuesto. Por otro lado, en el espectro de IR de W9a sigue apareciendo una débil banda de grupo hidroxilo a 3508 cm^{-1} , lo que nos permite deducir que en W9 existen dos grupos hidroxilos, uno de ellos de tipo terciario que es el que permanece inalterado en el proceso de acetilación, por lo que sólo es reemplazado por el grupo acetilo el otro grupo hidroxilo.

En el espectro de RMN de ^{13}C y D.E.P.T. de W9 (Tabla 12B) observamos señales para treinta carbonos, que se corresponden con ocho grupos metilos a δ_{C} 15.1, 15.3, 15.7, 15.9, 16.8, 17.6, 26.9 y 27.7; ocho grupos metilenos a δ_{C} 18.1, 21.0, 25.8, 27.0, 27.1, 33.7, 33.8 y 38.3; cinco grupos metinos a δ_{C} 36.7, 37.1, 40.0, 49.6 y 54.9; y cinco carbonos cuaternarios a δ_{C} 35.6, 36.7, 38.6, 40.9, 43.0. También se observan otras

señales que indican la presencia de cuatro carbonos oxigenados a δ_C 60.5, 65.4, 70.3 y 78.7, de las cuales tres corresponden a grupos metinos (60.5, 65.4 y 78.7), y la cuarta señala un carbono cuaternario (70.3), lo que refuerza nuestra deducción de la presencia de un alcohol terciario en la molécula. Teniendo en cuenta que en la fórmula general sólo hay tres átomos de oxígeno, de los cuales dos se corresponden con sendos grupos hidroxilos, de acuerdo a lo explicado para los espectros de masas y de IR, la existencia de cuatro carbonos unidos a oxígenos sólo puede explicarse por la presencia de algún puente de tipo epoxídico que uniría dos de los carbonos con un mismo átomo de oxígeno.

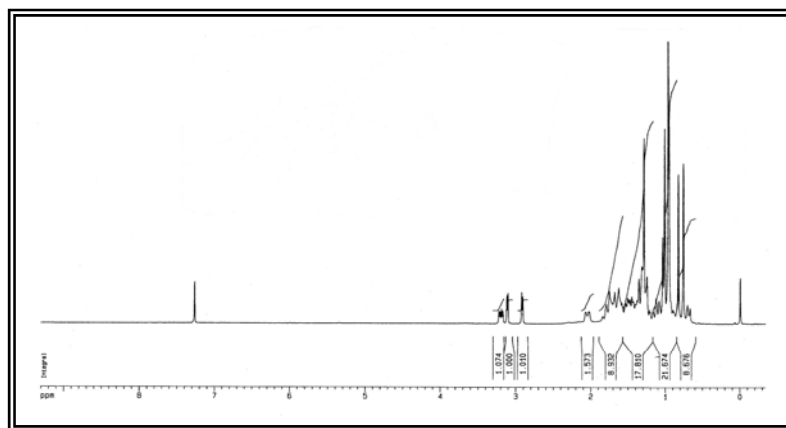


Figura 26: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **W9**

El espectro de RMN de ^1H de **W9** (Figura 26; Tabla 12B) muestra señales indicativas de ocho grupos metilos, de los cuales siete aparecen como singuletes a δ_H 0.75, 0.83, 0.95, 0.96 (6H), 1.01 y 1.28, y una como doblete a δ_H 1.02 ($J=6.9$ Hz). También observamos señales para tres protones geminales a grupos oxigenados, a δ_H 3.19 (dd, $J=4.8$ Hz; 11.4 Hz), asignada a H-3, y a δ_H 2.90 (d, $J=4.1$ Hz) y 3.10 (d, $J=4.1$ Hz), características estas últimas de los protones geminales a un grupo epóxido, reforzando nuestra deducción comentada en el párrafo anterior. Además, el espectro de RMN de ^1H de **W9a** (Tabla 13B) es prácticamente idéntico al del compuesto original, con la única salvedad del desplazamiento de la señal del protón geminal al grupo hidroxilo (H-3) hacia campos bajos (a δ_H 4.47, dd, $J=4.3$ Hz; 9.7 Hz), y la presencia de la señal singulete correspondiente al metilo del grupo acetilo a δ_H 2.04.

Estos datos espectrales nos hicieron pensar en una estructura molecular similar a la del taraxasterol, pero sin doble enlace entre las posiciones 20 y 30, permitiendo así la

presencia de los ocho grupos metilo descritos. El análisis de los datos de RMN en 2D para **W9** nos permitió deducir la ubicación del grupo epóxido y los grupos hidroxilos dentro de esa estructura. Así, en el espectro COSY (Figura 27b), la no existencia de correlación entre las señales de los protones geminales al grupo epóxido con ninguna otra señal del espectro nos informa de la situación de este grupo entre dos carbonos cuaternarios dentro de la estructura de la molécula. Además, la señal del protón geminal al hidroxilo está correlacionada con un multiplete centrado a δ_{H} 1.60, que en la bibliografía consultada para las estructuras tipo taraxasterol^{56, 57} se asigna a H-2, lo que apunta a una posición típica del primer grupo hidroxilo en C-3.

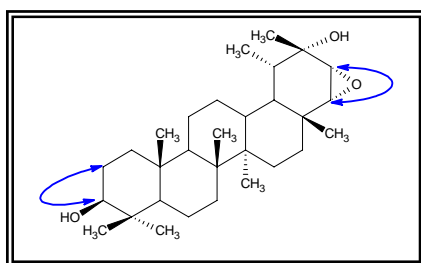


Figura 27a: Relaciones seleccionadas de COSY de la sustancia **W9**

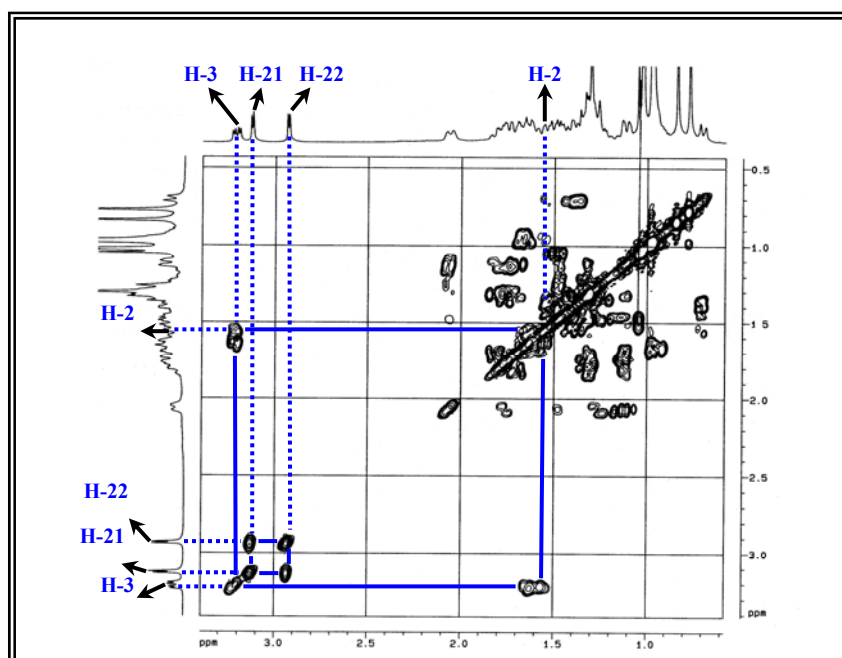


Figura 27b: Espectro de COSY de la sustancia **W9**

57. Khalilov, L.M. et al. "PMR and ¹³C NMR spectra of biologically active compounds. XII. Taraxasterol and its acetate from the aerial part of *Onopordum acanthium*". Chem. of Nat. Comp. (2003), 39 (3), 285-288.

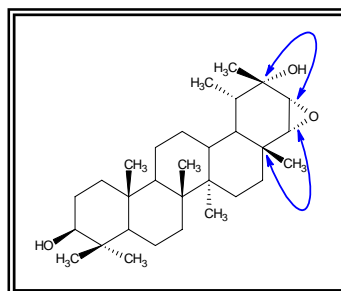


Figura 28a: Relaciones seleccionadas de HMBC de la sustancia **W9**

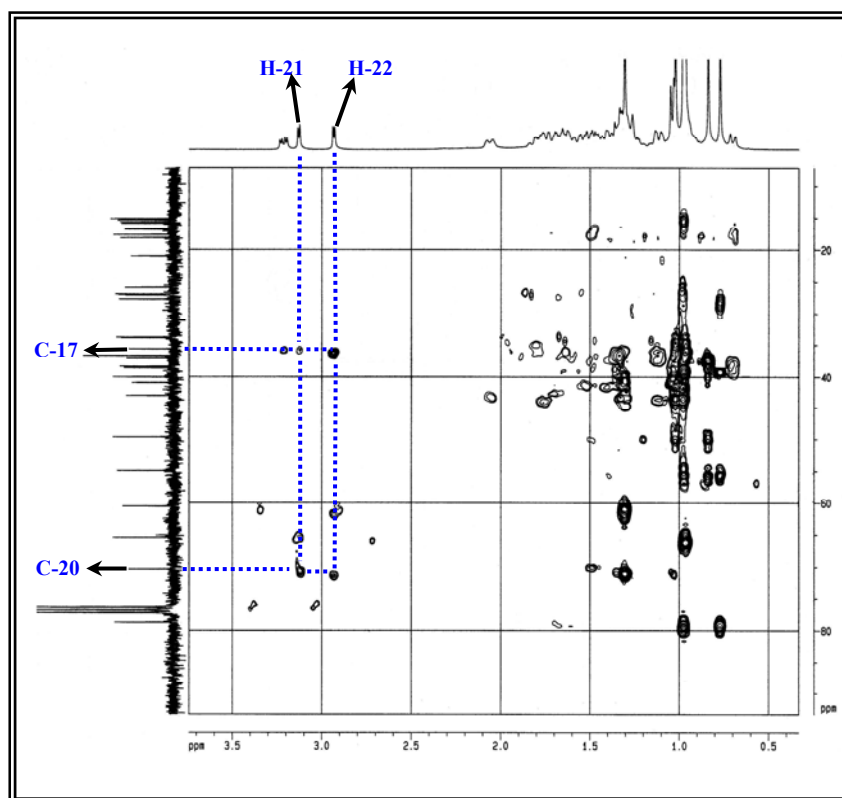


Figura 28b: Espectro de HMBC de la sustancia **W9**

El estudio del espectro HMBC (Figura 28b) nos permite deducir con qué carbonos cuaternarios concretos están relacionados los protones geminales al grupo epóxido, ya que observamos correlaciones, por un lado con el carbono cuaternario a δ_C 35.6 (asignado en la bibliografía consultada para los derivados del taraxasterol^{56, 57} a C-17), y por otro lado con el carbono cuaternario que soporta el grupo hidroxilo terciario a δ_C 70.3. Esto implica que el grupo epóxido y el hidroxilo terciario deben ser vecinales, y que el epóxido por su otro lado debe ser vecino de uno de los grupos metilos de la molécula. Las únicas posiciones dentro de la molécula donde puede situarse el grupo

epóxido cumpliendo con estos requisitos deducidos de los espectros de 2D, son las de C-21 y C-22, obligando al grupo hidroxilo terciario a situarse en C-20.

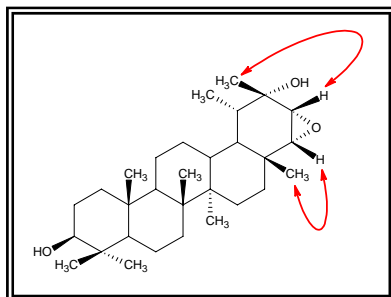


Figura 29a: Relaciones seleccionadas de NOESY de la sustancia W9

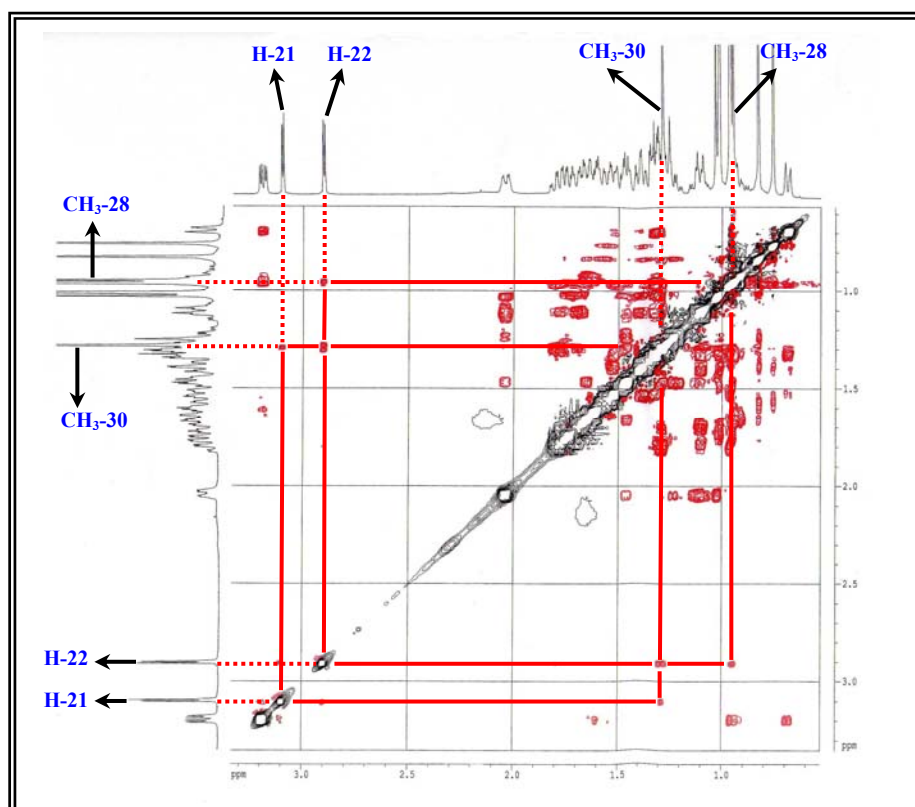
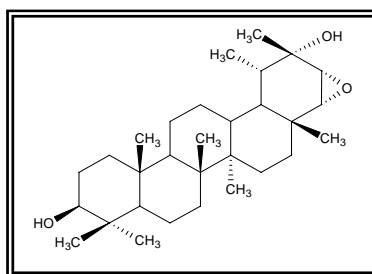


Figura 29b: Espectro de NOESY de la sustancia W9

Por otro lado, en un experimento NOESY (Figura 29b) pudimos comprobar la existencia de interacciones entre los protones geminales al grupo epóxido (δ_H 3.10 y 2.90) con las señales metilos situadas a δ_H 0.96 y 1.28, asignadas a Me-28 y Me-30, respectivamente, lo que nos indica que tanto esos protones como los grupos metilos se

sitúan en la misma cara de la molécula, obligando al grupo epóxido y al grupo hidroxilo terciario a situarse en la cara opuesta de la molécula. Como biogénicamente en la estructura del taraxasterol los metilos en 28 y 30 se sitúan en posición β^{58} , deducimos que tanto el grupo epóxido como el hidroxilo terciario deben situarse en posición α .

Por lo tanto, asignamos a **W9** la estructura del **21 α ,22 α -epoxi-20 α -hidroxi-20,30-dihidrotaraxasterol**. Esta sustancia no aparece descrita en la bibliografía consultada, y sólo hemos encontrado descrito el derivado acetilado **3 β -acetoxi-21 α ,22 α -epoxi-20 α -hidroxi-20,30-dihidrotaraxasterol**⁵⁹, cuyos datos espectroscópicos son coincidentes con los de **W9a**.



W9

Sustancia W11:

Se consiguió aislar esta sustancia a partir de la fracción V de la cromatografía general, como un sólido amorfo, purificándose mediante la formación de su derivado acetilado. En el espectro de IR observamos, como banda de absorción más destacada, la característica para carbonilos en grupos funcionales éster, situada a 1756 cm^{-1} .

Su fórmula molecular se determinó como $\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{O}_{10}$ de sus datos de HRFABMS (m/z 756.4822 $[\text{M}]^+$, tabla 16A). En el espectro de masas, el pico de ión molecular aparece a m/z 756, mostrando como pico más destacado el situado a m/z 409, que parece indicarnos la pérdida de un grupo voluminoso (masa 347), probablemente de naturaleza glucopiranosídica.

58. Eschenmoser, A. and Arigoni, D. "Revisited after 50 years: the Stereochemical interpretation of the biogenetic isoprene rule for the triterpenes". *Helvetica Chimica Acta*. (2005), 88, 3011-3050.

59. Chiang, Y.-M.; Chang, J.-Y.; Kuo, C.-C.; Chang, C.-Y. and Kuo, Y.-H. "Cytotoxic triterpenes from the aerial roots of *Ficus microcarpa*". *Phytochemistry* (2005), 66 (4), 495-501.

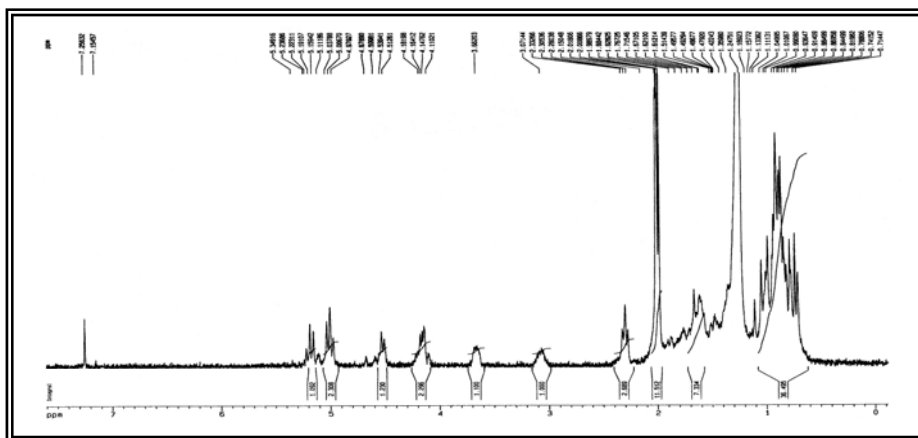


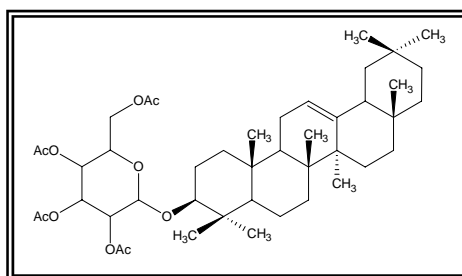
Figura 30: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **W11**

En el espectro de R.M.N. de ^1H (Figura 30; Tabla 16B) destacan seis señales que indican la presencia de un grupo glucopiranosil: cuatro dobletes con integral para un protón cada uno, a δ_{H} 4.53 ($J=8.0$ Hz), 4.99 ($J=8.5$ Hz), 5.02 ($J=9.3$ Hz) y 5.20 ($J=9.6$ Hz), asignados a Glu-1, Glu-2, Glu-6a y Glu-6b; y dos multipletes a δ_{H} 3.66 (1H) y 4.16 (2H), asignados a Glu-5, y Glu-3/Glu-4. También se observa la señal característica de un protón geminal a oxígeno, como un multiplete situado a δ_{H} 3.07. Destaca asimismo la presencia de las señales correspondientes a cuatro grupos acetilos, situadas a δ_{H} 1.99 (3H), 2.01 (6H) y 2.02 (3H), indicando que el grupo glucopiranosil está totalmente acetilado. Otras señales destacadas son las correspondientes a ocho grupos metilos, que se sitúan como singuletes a δ_{H} 0.74, 0.79, 0.87 (6H), 0.88 (6H) y 0.91 (6H), y un triplete a δ_{H} 2.31 ($J=8,0$ Hz), que integra para 2H.

El espectro de R.M.N. de ^{13}C y D.E.P.T. de **W11** (Tabla 16B) presenta señales correspondientes a 44 carbonos, desglosadas de la siguiente forma: siete carbonos oxigenados, situados a δ_{C} 68.9, 71.6, 71.7, 72.9 (2C), 90.7 y 102.9, y asignados a los seis carbonos del grupo glucopiranosil y el carbono sobre el que se sitúa el puente éter para dicho grupo (90.7); cuatro carbonos metilos asociados a grupos acetilos, a δ_{C} 20.6 (2C) y 20.7 (2C); cuatro carbonos carbonílicos asociados a grupos acetilos, situados a δ_{C} 169.1, 169.4, 170.4 y 173.4; ocho carbonos metilos, a δ_{C} 14.1, 15.6, 16.2, 16.4, 16.8, 17.5, 18.2 y 27.4; diez carbonos metilenos, con señales situadas a δ_{C} 21.4, 22.7, 24.7, 29.2, 29.3 (2C), 29.7 (2C), 34.1 y 62.2; tres carbonos metinos a δ_{C} 31.9, 55.5 y 55.6; seis carbonos cuaternarios situados a δ_{C} 33.7, 38.9 (2C), 41.5, 42.1 y 59.1, y por último

dos señales correspondientes a carbonos olefínicos, situadas a δ_C 124.0 y 139.6, este último totalmente sustituido.

Los datos espectroscópicos anteriores son similares a los presentados en la bibliografía que hemos consultado para una estructura tipo β -amirina⁶⁰, con la salvedad de la presencia del grupo glucopiranosil acetilado en el carbono 3 de dicho esqueleto, por lo que asignamos a la sustancia **W11** la estructura del **acetato del β -D-glucósido de la β -amirina**, siendo el producto natural presente en la planta objeto de estudio el **β -D-glucósido de la β -amirina**.



W11

60. Boiteau, P.; Pasich, M.B. and Ratsimamanga, A.R. “*Les triterpenoides en physiologie vegetale et animale*”. Gautier-Villars (Editor), Paris (1964), 125.



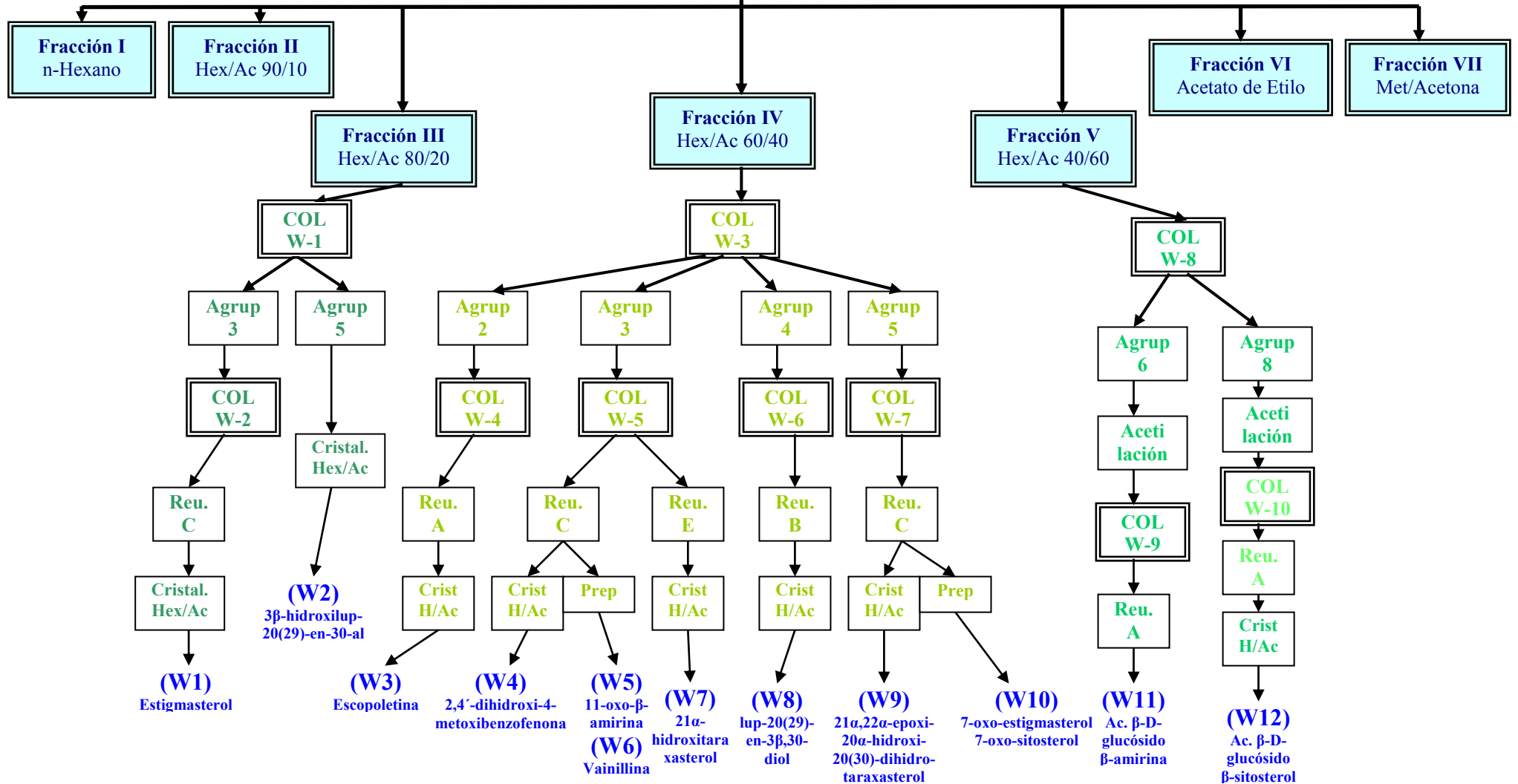
*Detalle de las flores de *T. webbii* (foto de Pedro L. Pérez de Paz)*

3.3 *Tolpis webbii* Sch. Bip. ex Webb et Berth.

Parte Experimental

***Tolpis webbii* (Parte Aérea)**

COLUMNA W-0



Se recogieron las partes aéreas de *Tolpis webbii* en Agosto de 1998 en la localidad de El Portillo, en Las Cañadas del Teide (Tenerife) a 2000 metros sobre el nivel del mar, en una zona de malpaís con retamar y plantaciones de *Pinus canariensis*. La recolección fue efectuada por los profesores Dr. Pedro Luis Pérez de Paz, Dr. C. E. Hernández Padrón y Dr. D. Pérez Hernández y un voucher espécimen (TFC 41628) fue depositado en el Herbario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de La Laguna (Tenerife). El material vegetal fue sometido a un proceso de secado a temperatura ambiental y en entorno oscuro, obteniéndose un peso de material seco de 2.300 g. Posteriormente fue triturado cuidadosamente y extraído con etanol en caliente en un aparato Soxhlet, hasta su total agotamiento. El extracto etanólico así obtenido se concentró por eliminación del disolvente a presión reducida, obteniendo un residuo viscoso oscuro con un peso de 300 gramos.

El extracto etanólico se disolvió en acetona, para a continuación reabsorberlo en gel de sílice (0,02-0,5 mm mallas), obteniendo así una mezcla que se usó como cabeza de una columna húmeda de gel de sílice con el mismo grosor de grano, para lo cual se utilizó 1,0 Kg. de ésta última. Se utilizaron como eluyentes de la columna diferentes mezclas de hexano y acetato de etilo, con incremento de la concentración de acetato de etilo conforme se avanzaba en la cromatografía, comenzando por hexano puro, y finalizando con acetato de etilo al 100% y con metanol.

Se recogieron un total de 77 fracciones, de un litro cada una, que se fueron agrupando de acuerdo a su comportamiento en cromatografía de capa fina, en un total de 7 reuniones de fracciones (nombradas I a VII). A continuación presentamos los resultados obtenidos del estudio cromatográfico de cada una de ellas:

| FRACCIONES | ELUYENTES | SUSTANCIAS |
|------------|-------------------------------|--|
| I | n-hexano | ----- |
| II | n-hexano / acetato etilo 10 % | ----- |
| III | n-hexano / acetato etilo 20 % | W1, W2 |
| IV | n-hexano / acetato etilo 40 % | W3, W4, W5, W6, W7, W8, W9, W10 |
| V | n-hexano / acetato etilo 60 % | W11, W12 |
| VI | acetato etilo | ----- |
| VII | metanol / acetona 50 % | ----- |

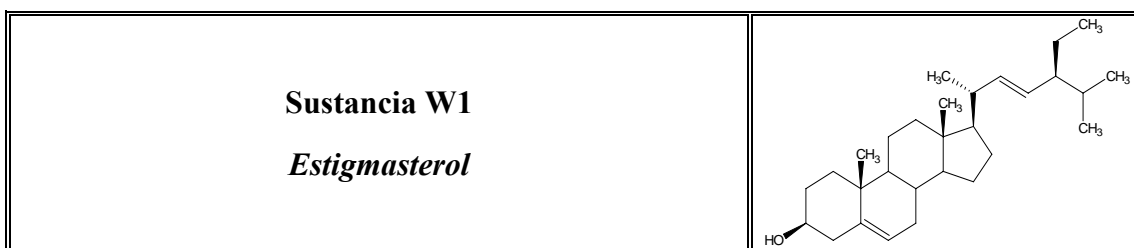
Fracción III:

Esta fracción se eluyó de la cromatografía general con hexano-acetato de etilo (8:2), y tras ser concentrada a vacío dio un residuo que pesó 7.30 g. El extracto así obtenido fue sometido a cromatografía en columna empaquetada con gel de sílice (columna W-1), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (9:1), recogándose un total de 140 fracciones de 100 mL que se reunieron, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en siete grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 7.

El agrupamiento 3 de la columna W-1 dio un residuo tras su concentración a vacío que pesó 0,466 g, y que fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna W-2) con n-hexano-acetato de etilo (9:1). Se recogieron un total de 30 fracciones de 75 mL que fueron reunidas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cuatro grupos de fracciones, nombradas de A a D. De la reunión C de la columna W-2 obtuvimos la sustancia **W1** (10 mg), purificada mediante recristalización en n-hexano-acetato de etilo.

El agrupamiento 5 de la columna W-1 fue recristalizado en n-hexano-acetato de etilo, permitiéndonos aislar la sustancia **W2** (22 mg).

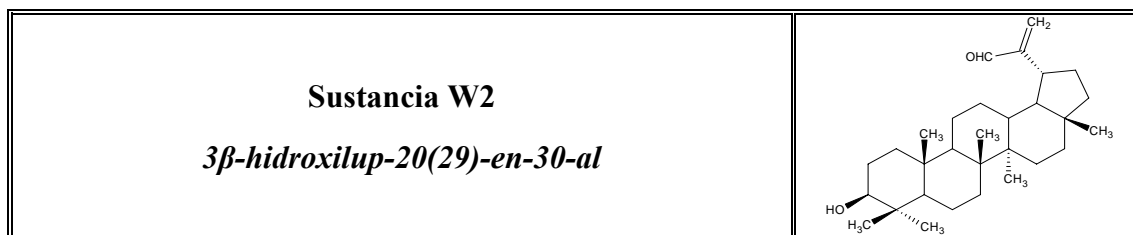
Los datos físicos y espectroscópicos de todas esas sustancias, así como las reacciones de formación de derivados y los datos de éstos, los exponemos a continuación.

**TABLA 2A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia W1**

| | |
|--|---|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | 154-156°C (MeOH) |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3500, 2934, 2867, 1718, 1455, 1379, 1265, 1035, 971, 838, 798, 756, 665. |
| EM m/z (%): | 412 [M] ⁺ (52), 394 [M-18] ⁺ (36), 379 [M-18- Me] ⁺ (7.5), 369 (12), 351 (20), 300 (19), 283 (9), 273 (24), 271 (24), 255 (64), 233 (17), 215 (29), 213 (21), 201 (17), 189 (48), 187 (50), 175 (25), 173 (29), 161 (38), 159 (44), 147 (50), 145 (44), 133 (90), 121 (59), 119 (59), 107 (71), 105 (57), 95 (73), 93 (59), 83 (73), 81 (95), 69 (75), 55 (100). |

TABLA 2B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia W1 (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|-------|--------------|--------|----------------|----------|----|-------|---------------|------------|----------------|-------------|
| 1 | 37,0 | 1,04 1,82 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 16 | 28,9 | ----- 1,73 | ----- m | ----- ----- | ----- 1H |
| 2 | 31,6 | 1,49 1,82 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 17 | 55,9 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3 | 71,8 | 3,54 | m | ----- | 1H | 18 | 12,0 | 1,05 | s | ----- | 3H |
| 4 | 42,3 | 2,28 2,34 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 19 | 19,4 | 0,83 | s | ----- | 3H |
| 5 | 140,7 | ----- | ----- | ----- | --- | 20 | 40,4 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 6 | 121,7 | 5,37 | d | 4,6 | 1H | 21 | 21,2 | 1,04 | d | 7,2 | 3H |
| 7 | 31,9 | ----- | ----- | ----- | --- | 22 | 138,3 | 5,18 | dd | 8,5;15,1 | 1H |
| 8 | 31,9 | 1,52 | m | ----- | 1H | 23 | 129,3 | 5,04 | dd | 8,6;15,0 | 1H |
| 9 | 50,2 | 1,03 | m | ----- | 1H | 24 | 51,2 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 10 | 36,5 | ----- | ----- | ----- | --- | 25 | 31,9 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 11 | 21,0 | 1,48 1,56 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 26 | 21,2 | 0,82 | d | 6,6 | 3H |
| 12 | 39,7 | 1,16 2,00 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 27 | 19,0 | 0,82 | d | 6,6 | 3H |
| 13 | 42,3 | ----- | ----- | ----- | --- | 28 | 25,4 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 14 | 56,9 | 1,12 | m | ----- | 1H | 29 | 12,2 | 0,86 | t | 6,0; 6,1 | 3H |
| 15 | 24,3 | 1,48 1,68 | m m | ----- ----- | 1H 1H | | | | | | |

**TABLA 3A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia W2**

| | |
|--|---|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | 183-185°C (Hex/AcOEt) |
| UV (MeOH) λ_{máx} nm | 219,0; 276,5 |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3448, 2928, 2855, 1719, 1691, 1458, 1381, 1246, 1107, 1029, 984, 942, 756, 669. |
| EM m/z (%): | 440 [M] ⁺ (33), 422 [M-H ₂ O] ⁺ (46), 407 [M-H ₂ O-Me] ⁺ (27), 379 (32), 353 (11), 311 (8), 271 (8), 257 (5), 243 (10), 232 (16), 218 (17), 207 (62), 189 (100), 175 (32), 161 (34), 147 (37), 135 (70), 121 (70), 107 (69), 95 (79), 81 (73), 69 (55), 55 (68). |

TABLA 3B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia W2 (CDCl₃)

| Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|-------|--------------|--------|-----------|----------|----|--------|--------------|--------|-------|----------|
| 1 | 38,67 | 0,87 1,65 | m m | ----- | 1H 1H | 16 | 35,36 | 1,44 1,52 | m m | ----- | 1H 1H |
| 2 | 27,31 | 1,52 1,61 | m m | ----- | 1H 1H | 17 | 43,25 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 3 | 79,00 | 3,18 | dd | 5,1; 10,3 | 1H | 18 | 51,21 | 1,63 | m | ----- | 1H |
| 4 | 38,82 | ----- | ----- | ----- | ---- | 19 | 37,69 | 2,75 | m | ----- | 1H |
| 5 | 55,25 | 0,66 | m | ----- | 1H | 20 | 157,10 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 6 | 18,27 | 1,42 1,52 | m m | ----- | 1H 1H | 21 | 31,22 | 1,22 2,15 | m m | ----- | 1H 1H |
| 7 | 34,24 | 1,39 | m | ----- | 2H | 22 | 39,90 | 1,39 1,44 | m m | ----- | 1H 1H |
| 8 | 40,74 | ----- | ----- | ----- | ---- | 23 | 27,96 | 0,96 | s | ----- | 3H |
| 9 | 50,21 | 1,22 | m | ----- | 1H | 24 | 15,35 | 0,75 | s | ----- | 3H |
| 10 | 37,11 | ----- | ----- | ----- | ---- | 25 | 16,04 | 0,81 | s | ----- | 3H |
| 11 | 20,91 | 1,22 1,32 | m m | ----- | 1H 1H | 26 | 15,91 | 1,01 | s | ----- | 3H |
| 12 | 29,67 | 0,89 1,05 | m m | ----- | 1H 1H | 27 | 14,38 | 0,92 | s | ----- | 3H |
| 13 | 37,69 | 1,67 | m | ----- | 1H | 28 | 17,76 | 0,82 | s | ----- | 3H |
| 14 | 42,66 | ----- | ----- | ----- | ---- | 29 | 133,20 | 5,91 6,29 | s s | ----- | 1H 1H |
| 15 | 27,31 | 1,05 1,70 | m m | ----- | 1H 1H | 30 | 195,1 | 9,51 | s | ----- | 1H |

Acetilación de W2: El compuesto W2 (10 mg) se disolvió en piridina (1 mL) y anhídrido acético (2 mL), y la solución fue agitada durante 24 horas a temperatura

ambiente. El producto se secó a vacío para conseguir el compuesto **W2a** (8 mg) como una sustancia cristalina incolora.

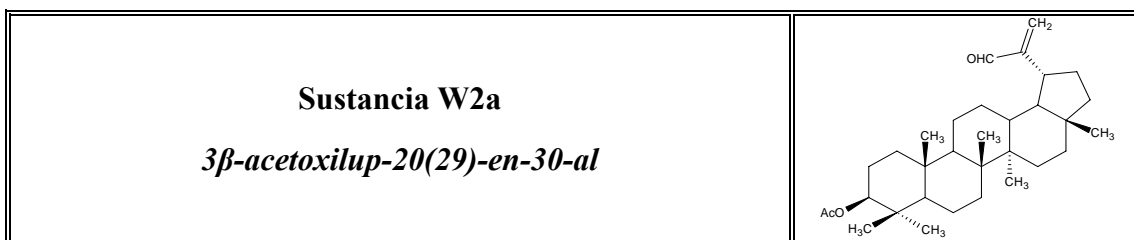


TABLA 4A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia W2a

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | 132-136°C (Hex/AcOEt) |
| UV (MeOH) λ_{máx} nm | 225,5; 280,5 |
| IR (KBr) ν máx (cm⁻¹): | 2941, 2857, 1735, 1694, 1456, 1367, 1245, 1028, 979, 756. |
| EM m/z (%): | 482 [M] ⁺ (11), 422 [M-60] ⁺ (28), 407 (22), 379 (12.5), 271 (5), 249 (9), 232 (9), 217 (13), 203 (36), 189 (100), 175 (20), 161 (23), 147 (23), 135 (46), 121 (39), 107 (37), 95 (42), 81 (40), 69 (43), 55 (28). |

TABLA 4B: R.M.N. ¹H de la Sustancia W2a (CDCl₃)

| N° | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|-------|-------|-----------|-----|-----|-------|-------|----------|------|
| 1 | 0,88 | m | ----- | 1H | 16 | 1,43 | m | ----- | 1H |
| | 1,66 | m | ----- | 1H | | 1,51 | m | ----- | 1H |
| 2 | 1,55 | m | ----- | 1H | 17 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| | 1,60 | m | ----- | 1H | | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 3 | 4,45 | dd | 5,5; 10,5 | 1H | 18 | 1,64 | m | ----- | 1H |
| 4 | ----- | ----- | ----- | --- | 19 | 2,75 | h | 5,5;10,6 | 1H |
| 5 | 0,75 | m | ----- | 2H | 20 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 6 | 1,42 | m | ----- | 1H | 21 | 1,23 | m | ----- | 1H |
| | 1,54 | m | ----- | 1H | | 2,16 | m | ----- | 1H |
| 7 | 1,39 | m | ----- | 2H | 22 | 1,39 | ----- | ----- | ---- |
| | | | | | | 1,46 | m | ----- | 1H |
| 8 | ----- | ----- | ----- | --- | 23 | 0,83 | s | ----- | 3H |
| 9 | 1,23 | m | ----- | 1H | 24 | 0,82 | s | ----- | 3H |
| 10 | ----- | ----- | ----- | --- | 25 | 0,84 | s | ----- | 3H |
| 11 | 1,23 | m | ----- | 1H | 26 | 1,01 | s | ----- | 3H |
| | 1,35 | m | ----- | 1H | | | | | |
| 12 | 0,94 | m | ----- | 1H | 27 | 0,92 | s | ----- | 3H |
| | 1,03 | m | ----- | 1H | | | | | |
| 13 | 1,66 | m | ----- | 1H | 28 | 0,84 | s | ----- | 3H |
| 14 | ----- | ----- | ----- | --- | 29 | 5,91 | s | ----- | 1H |
| | | | | | | 6,29 | s | ----- | 1H |
| 15 | 1,03 | m | ----- | 1H | 30 | 9,51 | s | ----- | 1H |
| | 1,70 | m | ----- | 1H | | | | | |
| | | | | | OAc | 2,03 | s | ----- | 3H |

Fracción IV:

Esta fracción, eluída de la cromatografía general con hexano-acetato de etilo (6:4), tras ser concentrada a vacío dio un residuo que pesó 16.0 g. El extracto se sometió a un proceso de cromatografía a través de columna empaquetada con gel de sílice (columna W-3), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (7.5:2.5), recogiendo un total de 90 fracciones de 100 mL que se reunieron, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en siete grupos de fracciones enumerados del 1 al 7.

El agrupamiento 2 de la columna W-3 dio un residuo tras su concentración a vacío que pesó 0,393 g, y que fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna W-4) con n-hexano-acetato de etilo (8:2). Se recogieron un total de 90 fracciones de 75 mL que fueron agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cuatro reuniones de fracciones, nombradas de A a D. De la fracción A de la columna W-4 obtuvimos la sustancia **W3** (11 mg), purificada mediante recristalización en n-hexano-acetato de etilo.

El agrupamiento 3 de la columna W-3 tras ser concentrado a vacío dio un residuo que pesó 1,48 g, y fue sometido a un proceso de cromatografía en columna de media presión (columna W-5), con n-hexano-acetato de etilo (9:1) como eluyente, recogiendo un total de 180 fracciones de 100 mL que, tras su análisis en cromatografía en capa fina, se agruparon en siete reuniones de fracciones nombradas de A a G. La fracción C de la columna W-5 nos permitió separar la sustancia **W4** (21 mg) mediante recristalización en n-hexano-acetato de etilo. De las aguas madres de esa fracción C purificamos las sustancias **W5** (13 mg) y **W6** (12 mg) mediante cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando n-hexano-acetato de etilo (7:3) como eluyente con tres eluciones. La reunión E de la columna W-5 nos permitió obtener la sustancia **W7** (17 mg), purificada mediante recristalización en n-hexano-acetato de etilo.

El agrupamiento 4 de la columna W-3 dio un residuo tras su concentración a vacío que pesó 0,478 g, y que posteriormente fue sometido a un proceso de cromatografía en columna de media presión (columna W-6), con n-hexano-acetato de

etilo (8:2) como eluyente. Se recogieron un total de 90 fracciones de 75 mL agrupadas tras su análisis en cromatografía en capa fina en cuatro reuniones de fracciones nombradas de A a D. La fracción B de la columna W-6 nos permitió obtener la sustancia **W8** (12 mg), purificada mediante recristalización en n-hexano-acetato de etilo.

Por último, el agrupamiento 5 de la columna W-3 tras ser concentrado a vacío dio un residuo que pesó 1,0 g, y fue tratado mediante una cromatografía en columna de media presión (columna W-7) con n-hexano-acetato de etilo (8.5:1.5), recogiendo un total de 150 fracciones de 100 mL que se agruparon, tras su análisis mediante cromatografía en capa fina, en cinco reuniones de fracciones, nombradas de A a E. La fracción E de la columna W-7 nos permitió la separación de la sustancia **W9** (16 mg) mediante recristalización en n-hexano-acetato de etilo. Las aguas madres de esa fracción E fueron sometidas a un proceso de cromatografía preparativa en capa gruesa, con n-hexano-acetato de etilo (7:3) como eluyente y tres eluciones, lo que nos permitió la purificación de la sustancia **W10** (8 mg).

Los datos físicos y espectroscópicos de todas esas sustancias, así como las reacciones de formación de derivados y los datos de éstos, los exponemos a continuación.

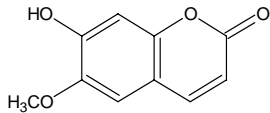
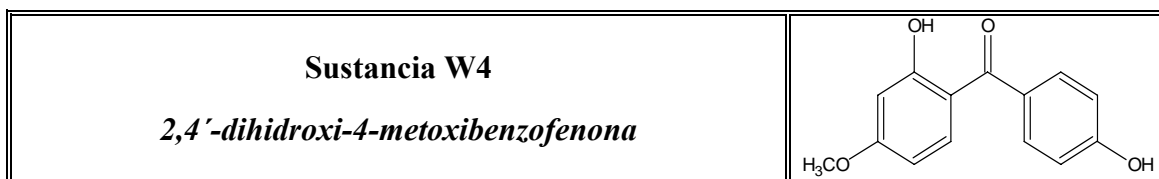
| | |
|--|--|
| Sustancia W3 <i>Escopoletina</i> |  |
|--|--|

TABLA 5A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia W3

| | |
|--|---|
| Estado: | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | 203-204°C (Hex/AcOEt). 219-221°C (MeOH). |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3465, 2925, 2855, 1693, 1454, 1382, 1358, 1284, 1243, 1166, 1045, 1010, 973. |
| EM m/z (%): | 192 [M] ⁺ (100), 177 [M-Me] ⁺ (58), 164 [M-CO] ⁺ (22), 149 (39), 121 (16), 79 (11), 69 (40). |

TABLA 5B: R.M.N. ¹H de la Sustancia W3 (CDCl₃)

| N° | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|-------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|
| 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | 7 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 2 | ----- | ----- | ----- | ----- | 8 | 6,85 | s | ----- | 1H |
| 3 | 6,27 | d | 9,5 | 1H | 9 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 4 | 7,60 | d | 9,5 | 1H | 10 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 5 | 6,92 | s | ----- | 1H | OMe | 3,96 | s | ----- | 3H |
| 6 | ----- | ----- | ----- | ----- | OH | 6,18 | s br | ----- | 1H |

**TABLA 6A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia W4**

| | | |
|---|---|---------------|
| Estado | Sólido cristalino. | |
| Punto de fusión: | 205-206°C (Hex/AcOEt) | |
| UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm: | MeOH | 328, 292 |
| | MeOH/ AlCl_3 | 382, 332, 301 |
| | MeOH/ AlCl_3/HCl | 379, 327, 299 |
| IR (KBr) ν máx (cm^{-1}): | 3252, 2989, 2947, 2847, 1675, 1635, 1607, 1581, 1558, 1506, 1435, 1346, 1261, 1219, 1161, 1113, 1022, 957, 920, 833, 814, 785, 686, 588, 534. | |
| EM m/z (%): | 244 (100), 243 (73), 227 (8), 152 (8.5), 151 (96.5), 150 (40), 122 (11), 121 (28), 108 (4), 93 (10), 65 (9). | |

TABLA 6B: R.M.N. ^1H y ^{13}C de la Sustancia W4

| (CDCl ₃) | | | | | (CDCl ₃ + MeOD) | | | | | |
|----------------------|------------|-------|---------|------|----------------------------|------------|------------|-------|---------|------|
| Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
| 1 | ----- | ----- | ----- | ---- | 1 | 116,90 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 2 | ----- | ----- | ----- | ---- | 2 | 169,43 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 3 | 6,53 | d | 2,4 | 1H | 3 | 104,68 | 6,42 | d | 2,31 | 1H |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ---- | 4 | 169,30 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 5 | 6,43 | dd | 2,4;8,7 | 1H | 5 | 110,67 | 6,34 | dd | 2,2;8,2 | 1H |
| 6 | 7,55 | d | 8,7 | 1H | 6 | 138,84 | 7,49 | d | 8,6 | 1H |
| 1' | ----- | ----- | ----- | ---- | 1' | 133,18 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 2' | 7,63 | dd | 2,7;8,7 | 2H | 2' | 135,29 | 7,49 | d | 8,6 | 2H |
| 3' | 6,93 | dd | 2,1;8,7 | 2H | 3' | 118,75 | 6,82 | d | 8,5 | 2H |
| 4' | ----- | ----- | ----- | ---- | 4' | 164,45 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 5' | 6,93 | dd | 2,1;8,7 | 2H | 5' | 118,75 | 6,82 | d | 8,5 | 2H |
| 6' | 7,63 | dd | 2,7;8,7 | 2H | 6' | 135,29 | 7,49 | d | 8,6 | 2H |
| C=O | ----- | ----- | ----- | ---- | C=O | 202,77 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| OCH ₃ | 3,87 | s | ----- | 3H | OCH ₃ | 59,20 | 3,77 | s | ----- | 3H |

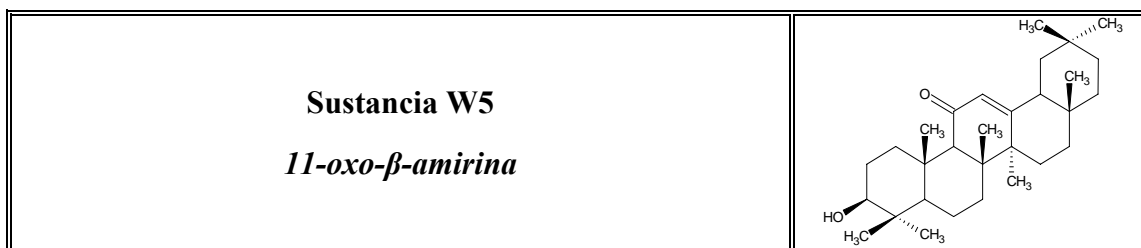
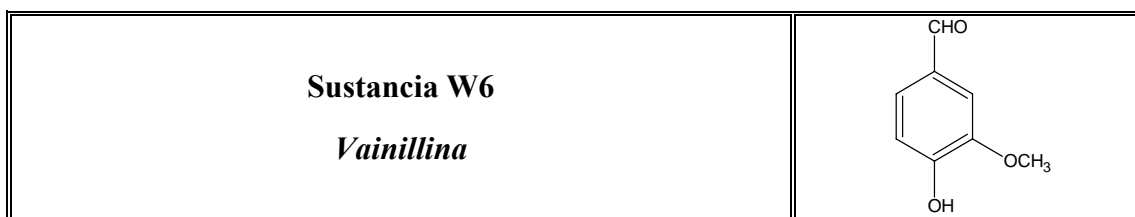


TABLA 7A: Datos Físicos, UV e IR de la Sustancia W5

| | |
|---|--|
| Estado: | Sólido amorfo. |
| UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm: | 279 |
| IR (KBr) ν máx (cm⁻¹): | 3462, 2935, 1716, 1670, 1456, 1381, 1259, 1084, 1039, 756. |

TABLA 7B: R.M.N. ¹H de la Sustancia W5 (CDCl₃)

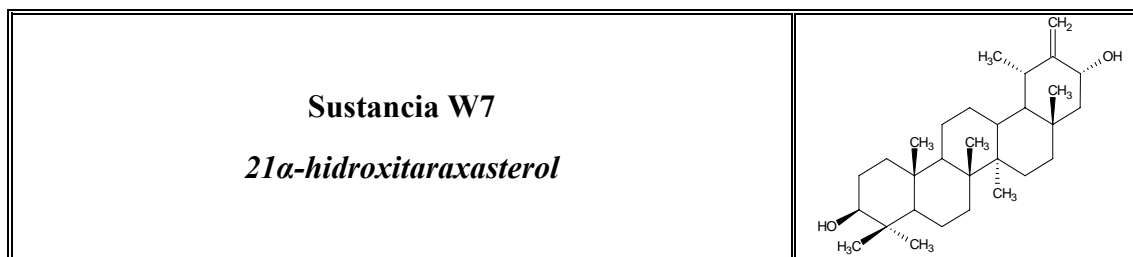
| Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|------|----------|------|----|------------|------|-------|------|
| 1 | 0,90 | m | ---- | 1H | 16 | 1,13 | m | ---- | 1H |
| | 1,74 | m | ---- | 1H | | 1,32 | m | ---- | 1H |
| 2 | 1,60 | m | ---- | 2H | 17 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 3 | 3,21 | dd | 5,6;10,6 | 1H | 18 | 1,42 | d | 10,5 | 1H |
| 4 | ---- | ---- | ---- | ---- | 19 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 5 | 0,70 | m | ---- | 1H | 20 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 6 | 1,38 | m | ---- | 1H | 21 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | 1,52 | m | ---- | 1H | | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 7 | 1,38 | m | ---- | 2H | 22 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 8 | ---- | ---- | ---- | ---- | 23 | 0,96 | s | ---- | 3H |
| 9 | 2,15 | s | ---- | 1H | 24 | 0,77 | s | ---- | 3H |
| 10 | ---- | ---- | ---- | ---- | 25 | 0,98 | s | ---- | 3H |
| 11 | ---- | ---- | ---- | ---- | 26 | 1,06 | s | ---- | 3H |
| 12 | 5,71 | s | ---- | 1H | 27 | 1,25 | s | ---- | 3H |
| 13 | ---- | ---- | ---- | ---- | 28 | 0,86 | s | ---- | 3H |
| 14 | ---- | ---- | ---- | ---- | 29 | 0,96 | s | ---- | 3H |
| 15 | 0,98 | m | ---- | 1H | 30 | 0,93 | s | ---- | 3H |
| | 1,70 | m | ---- | 1H | | ---- | ---- | ---- | ---- |

**TABLA 8A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia W6**

| | |
|--|--|
| Estado: | Sólido amorfo. |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3300, 2922, 2851, 1675, 1586, 1512, 1464, 1434, 1381, 1289, 1213, 1156, 1123, 1029, 837, 730, 632, 605. |
| EM m/z (%): | 152 [M] ⁺ (57), 151 [M-1] ⁺ (57), 135 (8), 127 (35), 122 (86), 121 (100), 109 (8), 93 (33), 81 (9), 65 (28), 57 (12), 55 (11). |

TABLA 8B: R.M.N. ¹³C y ¹H de la Sustancia W6 (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|-------|-------|-------|-------|------|-----|-------|------|-----|-------|-----|
| 1 | 56,1 | ----- | ----- | ----- | ---- | 6 | 108,8 | 7,42 | d | 1,30 | 1H |
| 2 | 114,4 | 7,42 | d | 1,30 | 1H | OMe | 29,7 | 3,97 | s | ----- | 3H |
| 3 | 127,5 | ----- | ----- | ----- | ---- | CHO | 190,8 | 9,83 | s | ----- | 1H |
| 4 | 132,3 | ----- | ----- | ----- | ---- | OH | ----- | 6,17 | s | ----- | 1H |
| 5 | 115,9 | 7,04 | d | 8,4 | 1H | | | | | | |

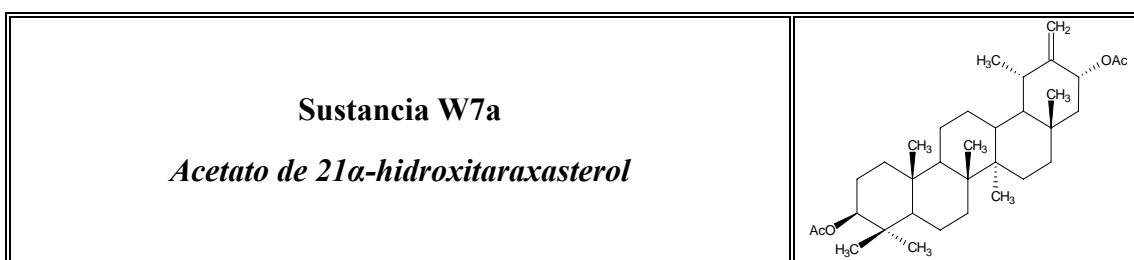
**TABLA 9A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia W7**

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de Fusión: | 255-258°C (Hex/AcOEt) |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3361, 2926, 2867, 1732, 1454, 1383, 1247, 1042, 988, 964, 897, 758. |
| EM m/z (%): | 442 [M] ⁺ (35), 424 [M-H ₂ O] ⁺ (34), 409 [M-H ₂ O-Me] ⁺ (11), 406 [M-2H ₂ O] ⁺ (5), 372 (14), 357 (7), 342 (8), 315 (7), 255 (7), 229 (10), 220 (11), 207 (89), 203 (30), 189 (100), 187 (69), 175 (27), 161 (29), 147 (35), 135 (81), 121 (76), 107 (69), 95 (97), 81 (89), 69 (88), 55 (94). |

TABLA 9B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia W7 (CDCl₃)

| Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|---------------|------------|-----------|----------|----|------------|--------------|---------|-------------------|----------|
| 1 | 38,72 | 0,90 1,73 | m m | ----- | 1H 1H | 16 | 37,65 | 1,15 1,32 | m m | ----- | 1H 1H |
| 2 | 27,36 | 1,59 | m | ----- | 2H | 17 | 33,89 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3 | 79,00 | 3,21 | dd | 5,3; 10,8 | 1H | 18 | 48,40 | 1,17 | m | ----- | 1H |
| 4 | 38,92 | ----- | ----- | ----- | --- | 19 | 38,03 | 2,16 | t | 7,1 | 1H |
| 5 | 55,30 | 0,70 | d b | 9,1 | 1H | 20 | 156,60 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 6 | 18,27 | 1,38 1,53 | m m | ----- | 1H 1H | 21 | 71,30 | 4,40 | dd | 5,4;9,0 | 1H |
| 7 | 34,02 | 1,38 | m | ----- | 2H | 22 | 48,76 | 1,32 1,95 | m dd | ----- 9,1;13,8 | 1H 1H |
| 8 | 40,90 | ----- | ----- | ----- | --- | 23 | 27,96 | 0,97 | s | ----- | 3H |
| 9 | 50,35 | 1,27 | m | ----- | 1H | 24 | 15,36 | 0,77 | s | ----- | 3H |
| 10 | 37,10 | ----- | ----- | ----- | --- | 25 | 16,23 | 0,85 | s | ----- | 3H |
| 11 | 21,37 | 1,54 | m | ----- | 2H | 26 | 15,88 | 1,02 | s | ----- | 3H |
| 12 | 26,17 | 1,16 1,64 | m m | ----- | 1H 1H | 27 | 14,76 | 0,95 | s | ----- | 3H |
| 13 | 38,84 | 1,59 | m | ----- | 1H | 28 | 18,18 | 0,77 | s | ----- | 3H |
| 14 | 42,18 | ----- | ----- | ----- | --- | 29 | 28,37 | 1,20 | d | 7,0 | 3H |
| 15 | 26,35 | ----- 1,68 | ----- m | ----- | --- | 30 | 113,60 | 4,90 4,98 | s d | ----- 1,4 | 1H 1H |

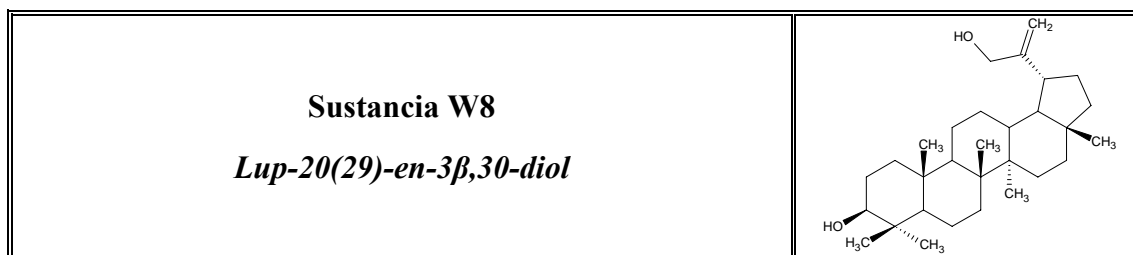
Acetilación de W7: El compuesto W7 (11 mg) se disolvió en piridina (1 mL) y anhídrido acético (2 mL), y la solución fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente. El producto se secó a vacío para conseguir el compuesto W7a (9 mg) como un sólido cristalino.

**TABLA 10A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia W7a**

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | 210-212°C (Hex/AcOEt) |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 2942, 2873, 1734, 1456, 1370, 1244, 1016, 980, 905, 756, 669. |
| EM m/z (%): | 526 [M] ⁺ (3), 484 [M-42] ⁺ (7), 466 [M-60] ⁺ (68), 451 [M-60-Me] ⁺ (5), 406 [M-120] ⁺ (20), 391 [M-120-Me] ⁺ (10), 249 (20), 216 (16), 203 (27), 189 (100), 175 (22), 173 (22), 161 (19), 159 (16), 147 (22), 135 (42), 133 (47), 121 (44), 119 (41), 109 (30), 107 (38), 95 (36), 81 (29), 69 (25), 55 (19). |

TABLA 10B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia W7a (CDCl₃)

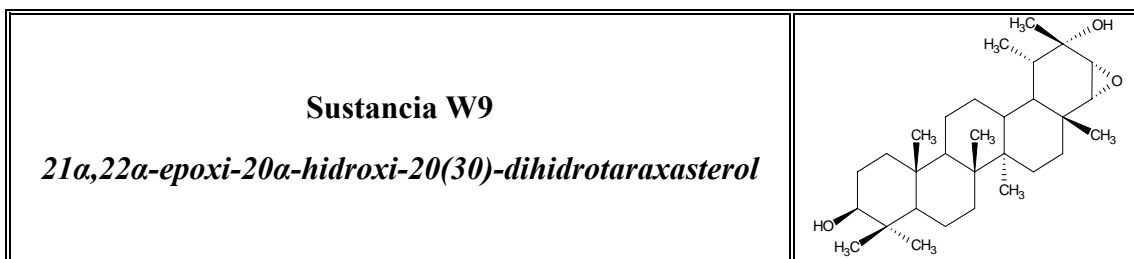
| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|------------|------|----------|------|-----|------------|------------|------|-------|------|
| 1 | 38,46 | 1,73 | m | ---- | 1H | 17 | 33,81 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 2 | 23,69 | 1,58 | m | ---- | 2H | 18 | 48,33 | 1,18 | m | ---- | 1H |
| 3 | 80,90 | 5,45 | dd | 4,9; 9,4 | 1H | 19 | 38,98 | 2,16 | t | 7,0 | 1H |
| 4 | 37,80 | ---- | ---- | ---- | ---- | 20 | 156,60 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 5 | 55,45 | 0,73 | s | ---- | 2H | 21 | 73,10 | 4,49 | m | ---- | 1H |
| 6 | 18,17 | 1,38 | m | ---- | 1H | 22 | 46,76 | 1,33 | m | ---- | 1H |
| | | 1,53 | m | ---- | 1H | | | 1,99 | m | ---- | 1H |
| 7 | 33,99 | 1,38 | m | ---- | 2H | 23 | 27,94 | 0,95 | s | ---- | 3H |
| 8 | 40,95 | ---- | ---- | ---- | ---- | 24 | 16,49 | 0,87 | s | ---- | 3H |
| 9 | 50,33 | 1,28 | m | ---- | 1H | 25 | 16,31 | 0,80 | s | ---- | 3H |
| 10 | 37,05 | ---- | ---- | ---- | ---- | 26 | 15,90 | 1,01 | s | ---- | 3H |
| 11 | 21,70 | 1,53 | m | ---- | 2H | 27 | 14,74 | 0,84 | s | ---- | 3H |
| 12 | 26,17 | 1,18 | m | ---- | 1H | 28 | 18,42 | 0,84 | s | ---- | 3H |
| | | 1,64 | m | ---- | 1H | | | ---- | ---- | 3H | |
| 13 | 38,18 | 1,58 | m | ---- | 1H | 29 | 27,24 | 1,14 | d | 7,0 | 3H |
| 14 | 42,14 | ---- | ---- | ---- | ---- | 30 | 116,50 | 4,97 | s | ---- | 1H |
| | | ---- | ---- | ---- | ---- | | | 5,08 | d | 1,2 | 1H |
| 15 | 26,34 | 0,97 | m | ---- | 1H | OAc | 21,39 | 2,02 | s | ---- | 3H |
| | | 1,68 | m | ---- | 1H | | | | | | |
| 16 | 37,66 | ---- | ---- | ---- | ---- | OAc | 21,39 | 2,04 | s | ---- | 3H |
| | | 1,33 | m | ---- | 1H | | | | | | |

**TABLA 11A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia W8**

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | 215-216°C (Hex/AcOEt) |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3338, 2925, 2851, 1728, 1453, 1380, 1252, 1044, 897, 749. |
| EM m/z (%): | 442 [M] ⁺ (37), 424 [M-H ₂ O] ⁺ (25), 409 [M-H ₂ O-Me] ⁺ (16), 384 (19), 315 (22), 297 (7), 273 (5), 257 (7), 247 (8), 234 (30), 220 (27), 207 (100), 189 (93), 175 (30), 161 (33), 147 (38), 135 (71), 121 (58), 107 (60), 95 (76), 81 (65), 69 (45), 55 (48). |

TABLA 11B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia W8 (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|------------|------|-----------|------|----|------------|------------|------|-------|------|
| 1 | 38,4 | 0,88 | m | ---- | 1H | 16 | 35,2 | 1,39 | m | ---- | 1H |
| | | 1,65 | m | ---- | 1H | | | 1,49 | m | ---- | 1H |
| 2 | 27,7 | 1,62 | m | ---- | 2H | 17 | 43,1 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 3 | 78,7 | 3,19 | dd | 5,0; 10,3 | 1H | 18 | 48,6 | 1,46 | m | ---- | 1H |
| 4 | 38,6 | ---- | ---- | ---- | ---- | 19 | 42,8 | 2,29 | m | ---- | 1H |
| 5 | 55,0 | 0,67 | m | ---- | 2H | 20 | 154,7 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 6 | 18,1 | 1,39 | m | ---- | 1H | 21 | 31,8 | 1,33 | m | ---- | 1H |
| | | 1,53 | m | ---- | 1H | | | 2,04 | m | ---- | 1H |
| 7 | 34,0 | 1,39 | m | ---- | 2H | 22 | 39,6 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | | | | | | | | 1,39 | m | ---- | 1H |
| 8 | 40,8 | ---- | ---- | ---- | ---- | 23 | 29,5 | 0,97 | s | ---- | 3H |
| 9 | 50,1 | 1,26 | m | ---- | 1H | 24 | 15,1 | 0,77 | s | ---- | 3H |
| 10 | 36,9 | ---- | ---- | ---- | ---- | 25 | 15,9 | 0,83 | s | ---- | 3H |
| 11 | 20,8 | 1,43 | m | ---- | 2H | 26 | 15,7 | 1,04 | s | ---- | 3H |
| 12 | 27,2 | 1,08 | m | ---- | 1H | 27 | 14,3 | 0,95 | s | ---- | 3H |
| | | 1,43 | m | ---- | 1H | | | | | | |
| 13 | 37,8 | 1,65 | m | ---- | 1H | 28 | 17,5 | 0,79 | s | ---- | 3H |
| 14 | 42,6 | ---- | ---- | ---- | ---- | 29 | 106,7 | 4,91 | s | ---- | 1H |
| | | | | | | | | 4,94 | s | ---- | 1H |
| 15 | 27,7 | ---- | ---- | ---- | ---- | 30 | 64,8 | 4,12 | s | ---- | 2H |
| | | 1,69 | m | ---- | 1H | | | | | | |

**TABLA 12A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia W9**

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de Fusión: | 232-233°C (MeOH) |
| $[\alpha]_D^{20}$ | -23,9° (c. 0,046; CHCl ₃). |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3417, 2936, 1447, 1385, 1174, 1038, 1008, 935, 879, 761. |
| EM m/z (%): | 458 [M] ⁺ (18), 440 [M-H ₂ O] ⁺ (25), 425 [M-H ₂ O-CH ₃] ⁺ (11), 411 (7), 407 (8), 397 (7,5), 243 (11), 229 (5), 218 (10), 208 (20), 207 (100), 190 (34), 189 (99), 175 (32,5), 163 (19), 161 (29), 149 (26), 147 (29), 135 (79), 121 (66), 109 (48), 107 (63), 95 (86), 81 (75), 69 (60,5), 55 (63). |

TABLA 12B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia W9 (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|------------|------|-----------|------|----|------------|------------|------|-------|------|
| 1 | 38,3 | 0,98 | m | ---- | 1H | 16 | 33,7 | 1,40 | m | ---- | 1H |
| | | 1,55 | m | ---- | 1H | | | 1,80 | m | ---- | 1H |
| 2 | 27,1 | 1,60 | m | ---- | 2H | 17 | 35,6 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 3 | 78,7 | 3,19 | dd | 4,8; 11,4 | 1H | 18 | 37,1 | 1,35 | m | ---- | 1H |
| 4 | 38,6 | ---- | ---- | ---- | ---- | 19 | 40,0 | 1,51 | m | ---- | 1H |
| 5 | 54,9 | 0,68 | dd | 2,4; 11,6 | 1H | 20 | 70,3 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 6 | 18,1 | 1,40 | m | ---- | 1H | 21 | 60,5 | 3,10 | d | 4,1 | 1H |
| | | 1,55 | m | ---- | 1H | | | 4,1 | 1H | | |
| 7 | 33,8 | 1,38 | m | ---- | 2H | 22 | 65,4 | 2,90 | d | 4,1 | 1H |
| 8 | 40,9 | ---- | ---- | ---- | ---- | 23 | 27,7 | 0,96 | s | ---- | 3H |
| 9 | 49,6 | 1,30 | m | ---- | 1H | 24 | 15,1 | 0,75 | s | ---- | 3H |
| 10 | 36,7 | ---- | ---- | ---- | ---- | 25 | 15,9 | 0,83 | s | ---- | 3H |
| 11 | 21,0 | 1,25 | m | ---- | 1H | 26 | 15,7 | 1,01 | s | ---- | 3H |
| | | 1,51 | m | ---- | 1H | | | 1,01 | s | ---- | 3H |
| 12 | 25,8 | 1,10 | m | ---- | 1H | 27 | 15,3 | 0,95 | s | ---- | 3H |
| | | 1,68 | m | ---- | 1H | | | 0,95 | s | ---- | 3H |
| 13 | 36,7 | 1,75 | m | ---- | 1H | 28 | 17,6 | 0,96 | s | ---- | 3H |
| 14 | 43,0 | ---- | ---- | ---- | ---- | 29 | 16,8 | 1,02 | d | 6,9 | 3H |
| 15 | 27,0 | 1,12 | m | ---- | 1H | 30 | 26,9 | 1,28 | s | ---- | 3H |
| | | 2,03 | dd | 3,5; 13,2 | 1H | | | 1,28 | s | ---- | 3H |

Acetilación de W9: El compuesto W9 (12 mg) se disolvió en piridina (2 mL) y anhídrido acético (4 mL), y la solución fue agitada durante 24 horas a temperatura

ambiente. El producto se secó a vacío para conseguir el compuesto **W9a** (8 mg) como un sólido cristalino.

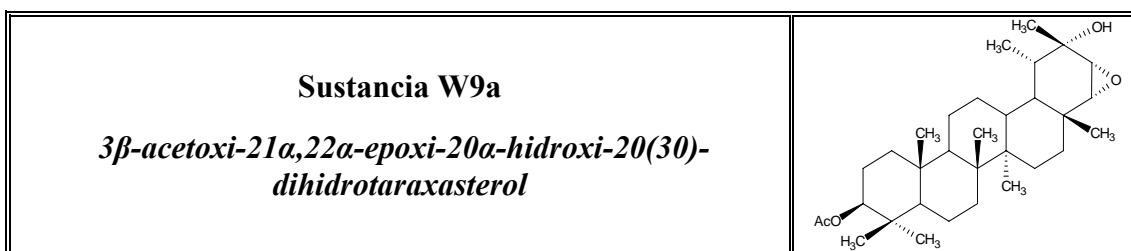
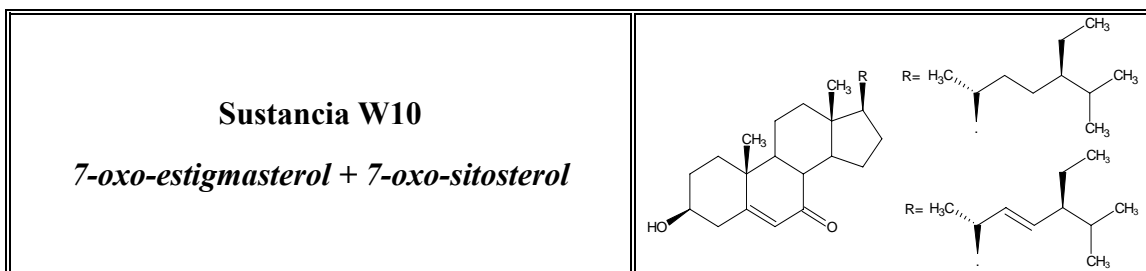


TABLA 13A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia W9a

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión | 246-251°C (Hex/AcOEt). |
| [α]²⁰_D | +29,6° (c. 0,054; CHCl ₃). |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3508, 2935, 1727, 1453, 1373, 1246, 1152, 1016, 981, 936, 868, 815. |
| EM m/z (%): | 500 [M] ⁺ (5), 482 [M-H ₂ O] ⁺ (8), 466 [M-H ₂ O-CH ₃] ⁺ (3,5), 440 (9), 243 (11,5), 231 (10), 219 (14), 205 (13,5), 203 (23), 190 (34), 189 (100), 175 (26), 161 (22), 147 (21,5), 135 (42), 121 (41), 109 (28,5), 107 (35), 95 (42), 81 (30), 69 (59), 55 (21). |

TABLA 13B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia W9a (CDCl₃)

| Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------|---------------|------------|----------|-------------|-----|---------------|--------------|--------|-------|----------|
| 1 | 38,0 | ----- 1,52 | ----- m | ----- | ----- 1H | 16 | 33,8 | 1,42 1,79 | m m | ----- | 1H 1H |
| 2 | 25,8 | 1,63 | m | ----- | 2H | 17 | 35,8 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3 | 80,7 | 4,47 | dd | 4,3; 9,7 | 1H | 18 | 37,1 | 1,36 | m | ----- | 1H |
| 4 | 37,5 | ----- | ----- | ----- | ----- | 19 | 40,0 | 1,49 | m | ----- | 1H |
| 5 | 55,0 | 0,78 | m | ----- | 1H | 20 | 70,3 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 6 | 18,0 | 1,40 1,52 | m m | ----- | 1H 1H | 21 | 60,5 | 3,11 | d | 4,1 | 1H |
| 7 | 29,6 | 1,36 ----- | m ----- | ----- | 1H ----- | 22 | 65,4 | 2,91 | d | 3,9 | 1H |
| 8 | 40,9 | ----- | ----- | ----- | ----- | 23 | 27,7 | 0,85 | s | ----- | 3H |
| 9 | 49,6 | 1,32 | m | ----- | 1H | 24 | 15,3 | 0,83 | s | ----- | 3H |
| 10 | 35,8 | ----- | ----- | ----- | ----- | 25 | 16,2 | 0,83 | s | ----- | 3H |
| 11 | 21,1 | ----- 1,49 | ----- m | ----- | ----- 1H | 26 | 16,0 | 1,01 | s | ----- | 3H |
| 12 | 23,5 | 1,13 1,68 | m m | ----- | 1H 1H | 27 | 15,7 | 0,95 | s | ----- | 3H |
| 13 | 36,7 | 1,75 | m | ----- | 1H | 28 | 17,6 | 0,96 | s | ----- | 3H |
| 14 | 43,1 | ----- | ----- | ----- | ----- | 29 | 16,8 | 1,03 | d | 7,4 | 3H |
| 15 | 27,0 | 1,13 ----- | m ----- | ----- | 1H ----- | 30 | 26,9 | 1,29 | s | ----- | 3H |
| | | | | | | OAc | 21,1 170,8 | 2,04 | s | ----- | 3H |

**TABLA 14A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia W10**

| | |
|---|---|
| Estado: | Sólido amorfo. |
| UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm | 228,5; 297,0 |
| IR (KBr) ν máx (cm^{-1}): | 3411, 2927, 2852, 1730, 1672, 1462, 1380, 1181, 1061. |
| EM m/z (%): | 428 $[\text{M}_1]^+$ (89), 426 $[\text{M}_2]^+$ (73), 410 $[\text{M}_1-\text{H}_2\text{O}]^+$ (32), 408 $[\text{M}_2-\text{H}_2\text{O}]^+$ (34), 395 (22), 383 (40), 365 (23), 347 (9), 328 (10), 314 (59), 287 (100), 269 (65), 260 (20), 247 (18), 245 (19), 229 (14), 227 (14), 205 (27), 192 (45), 174 (53), 161 (50), 145 (21), 133 (30), 121 (23), 109 (40), 107 (48), 95 (47), 81 (66), 69 (56), 55 (88). |

TABLA 14B: R.M.N. ^1H de la Sustancia W10 (CDCl_3)

| Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|-------|-------|------|----|------------|-------|----------|------|
| 1 | ----- | ----- | ----- | ---- | 16 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 2 | 1,50 | m | ----- | 1H | 17 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 3 | 3,68 | tt | 5; 11 | 1H | 18 | 0,70 | s | ----- | 3H |
| 4 | 2,40 | m | ----- | 1H | 19 | 0,85 | s | ----- | 3H |
| | 2,49 | m | ----- | 1H | | | | | |
| 5 | ----- | ----- | ----- | ---- | 20 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 6 | 5,69 | s br | ----- | 1H | 21 | 1,03 | d | 6,7 | 3H |
| 7 | ----- | ----- | ----- | ---- | 22 | 5,17 | dd | 8,8;15,1 | 1H |
| 8 | 2,25 | m | ----- | 1H | 23 | 5,02 | dd | 7,9;14,8 | 1H |
| 9 | ----- | ----- | ----- | ---- | 24 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 10 | ----- | ----- | ----- | ---- | 25 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 11 | 1,46 | m | ----- | 1H | 26 | 0,81 | d | 6,2 | 3H |
| | 1,55 | m | ----- | 1H | | | | | |
| 12 | 1,16 | m | ----- | 1H | 27 | 0,89 | d | 6,8 | 3H |
| | 2,03 | m | ----- | 1H | | | | | |
| 13 | ----- | ----- | ----- | ---- | 28 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 14 | 1,12 | m | ----- | 1H | 29 | 0,80 | t | 6,2 | 3H |
| 15 | ----- | ----- | ----- | ---- | | | | | |
| | 1,68 | m | ----- | 1H | | | | | |

Acetilación de W10: El compuesto **W10** (8 mg) se disolvió en piridina (1 mL) y anhídrido acético (2 mL), y la solución fue agitada durante 24 horas a temperatura

ambiente. El producto se secó a vacío para conseguir el compuesto **W10a** (6 mg) como un sólido amorfo.

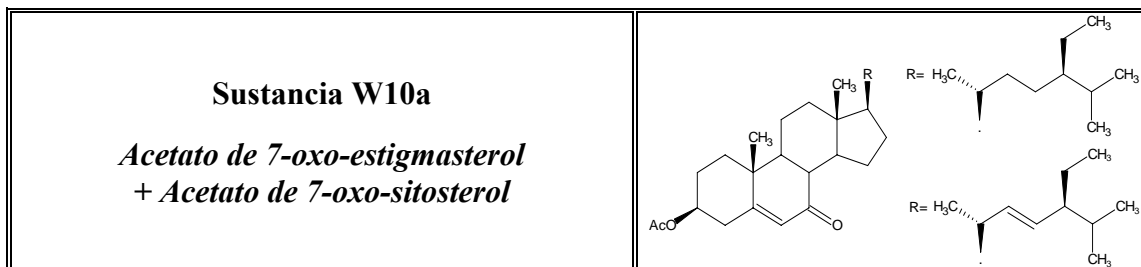


TABLA 15A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia W10a

| | |
|--|---|
| Estado: | Sólido amorfo. |
| UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm | 237,5 |
| IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): | 2954, 2870, 1731, 1674, 1461, 1372, 1243, 1183, 1039, 971. |
| EM m/z (%): | 470 [M ₁] ⁺ (1.5), 468 [M ₂] ⁺ (7), 410 [M ₁ -60] ⁺ (75), 408 [M ₂ -60] ⁺ (44), 396 (19), 382 (7), 365 (43), 297 (21), 296 (24), 269 (100), 229 (15), 227 (13), 187 (28), 174 (67), 161 (32), 149 (27), 135 (20), 133 (14), 121 (15), 109 (18), 107 (21), 95 (21), 81 (35), 69 (36), 55 (50). |

TABLA 15B: R.M.N. ¹H de la Sustancia W10a (CDCl₃)

| N° | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|---------------|------------|-----------|------------|-----|---------------|------------|-----------|------------|
| 1 | ----- 1,83 | ----- m | ----- | ---- 1H | 16 | ----- 1,74 | ----- m | ----- | ---- 1H |
| 2 | 1,46 1,87 | m m | ----- | 1H 1H | 17 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 3 | 4,71 | q | 4,8; 10,6 | 1H | 18 | 0,70 | s | ----- | 3H |
| 4 | 2,39 2,50 | m m | ----- | 1H 1H | 19 | 0,84 | s | ----- | 3H |
| 5 | ----- | ----- | ----- | ---- | 20 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 6 | 5,70 | s | ----- | 1H | 21 | 1,02 | d | 6,6 | 3H |
| 7 | ----- | ----- | ----- | ---- | 22 | 5,17 | dd | 8,6; 15,4 | 1H |
| 8 | 2,23 | m | ----- | 1H | 23 | 5,01 | dd | 8,6; 15,4 | 1H |
| 9 | ----- | ----- | ----- | ---- | 24 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 10 | ----- | ----- | ----- | ---- | 25 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 11 | 1,46 1,57 | m m | ----- | 1H 1H | 26 | 0,81 | d | 6,7 | 3H |
| 12 | 1,15 2,02 | m m | ----- | 1H 1H | 27 | 0,86 | d | 6,1 | 3H |
| 13 | ----- | ----- | ----- | ---- | 28 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 14 | 1,14 | m | ----- | 1H | 29 | 0,80 | t | 4,4; 6,7 | 3H |
| 15 | ----- 1,69 | ----- m | ----- | ---- 1H | OAc | 2,05 | s | ----- | 3H |

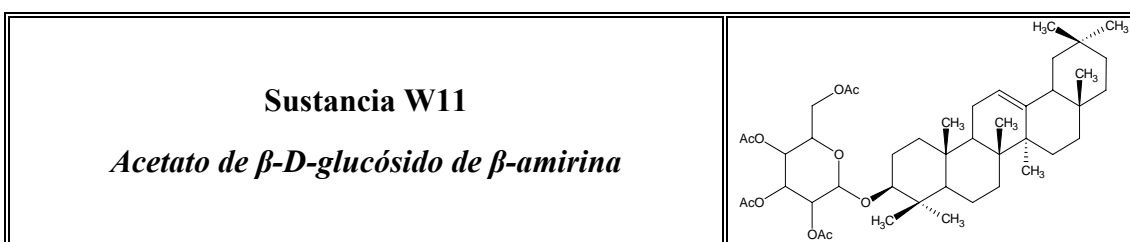
Fracción V:

Esta fracción se eluyó en la cromatografía general con hexano-acetato de etilo (4:6), y tras ser concentrada a vacío dio un residuo que pesó 11.77 g. El extracto se sometió a un proceso de cromatografía a través de columna empaquetada con gel de sílice (columna W-8), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (6:4), recogiendo un total de 64 fracciones de 100 mL que se reunieron, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en ocho grupos de fracciones enumerados del 1 al 8.

El agrupamiento 6 de la columna W-8 se concentró a vacío dando un residuo que pesó 0,360 g, y que posteriormente fue sometido a un proceso de acetilación, mediante su disolución en piridina (4 mL) y la adición en anhídrido acético (8 mL). La solución resultante fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente, siendo recuperada de la manera habitual. El extracto acetilado del mencionado agrupamiento 6 se sometió a continuación a un proceso de cromatografía en columna de media presión (columna W-9), con n-hexano-acetato de etilo (9:1) como eluyente, recogiendo un total de 100 fracciones de 75 mL, que se agruparon tras su análisis en cromatografía en capa fina en cuatro reuniones de fracciones nombradas de A a D. La fracción A de la columna W-9 nos permitió separar la sustancia **W11** (12 mg).

El agrupamiento 8 de la columna W-8 también se concentró a vacío para dar un residuo de peso 0,318 g, y que fue sometido como el anterior a un proceso de acetilación, mediante su disolución en piridina (4 mL) y posterior adición de anhídrido acético (8 mL). Tras agitación durante 24 horas a temperatura ambiente, fue recuperada de la manera habitual. El extracto acetilado se trató seguidamente mediante cromatografía en columna de media presión (columna W-10), con n-hexano-acetato de etilo (6:4) como eluyente, recogiendo un total de 84 fracciones de 75 mL que se agruparon, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cinco reuniones de fracciones nombradas de A a E. A partir de la fracción A de la columna W-10 conseguimos purificar la sustancia **W12** (11 mg) por un proceso de recristalización en n-hexano-acetato de etilo.

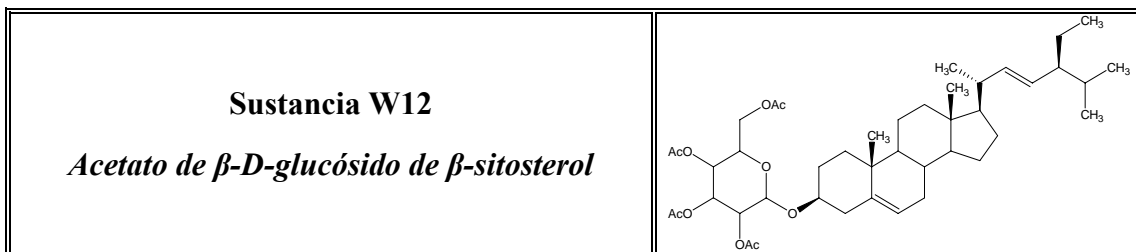
Los datos espectroscópicos de todas esas sustancias los exponemos a continuación.

**TABLA 16A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia W11**

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido amorfo. |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 2925, 2854, 1756, 1465, 1377, 1220, 1172, 1038, 908, 757. |
| HRFABMS | [M] ⁺ a m/z 756.4822 (calculado para C ₄₄ H ₆₈ O ₁₀ 756.4812). |
| EM m/z (%): | 756 [M] ⁺ (4), 557 (3), 527 (11), 423 [M-Glc] ⁺ (11), 409 (46), 407 (21), 393 (6), 365 (6), 271 (10), 239 (77), 231 (21), 218 (25), 205 (32), 203 (41), 191 (33), 189 (24), 177 (14), 175 (19), 169 (25), 161 (24), 159 (18), 149 (28), 147 (25), 137 (67), 135 (48), 121 (54), 119 (45), 109 (65), 107 (51), 105 (55), 95 (100), 81 (79), 69 (94), 55 (86). |

TABLA 16B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia W11 (CDCl₃)

| Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|-------|--------------|--------|-------|-------------|-------|--------------------------------|--------------|--------|------------|----------|
| 1 | 34,1 | 0,88 1,71 | m m | ----- | 1H 1H | 20 | 59,1 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 2 | 29,2 | 1,61 | m | ----- | 2H | 21 | 21,4 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3 | 90,7 | 3,08 | m | ----- | 1H | 22 | 24,9 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 4 | 38,9 | ----- | ----- | ----- | ----- | 23 | 27,8 | 0,91 | s | ----- | 3H |
| 5 | 55,5 | 0,71 | m | ----- | 1H | 24 | 15,6 | 0,74 | s | ----- | 3H |
| 6 | 22,7 | 1,38 1,51 | m m | ----- | 1H 1H | 25 | 16,4 | 0,87 | s | ----- | 3H |
| 7 | 29,3 | 1,36 | m | ----- | 2H | 26 | 16,2 | 1,05 | s | ----- | 3H |
| 8 | 41,5 | ----- | ----- | ----- | ----- | 27 | 14,1 | 1,25 | s | ----- | 3H |
| 9 | 55,6 | 2,15 | s | ----- | 1H | 28 | 18,2 | 0,88 | s | ----- | 3H |
| 10 | 38,9 | ----- | ----- | ----- | ----- | 29 | 16,8 | 0,78 | s | ----- | 3H |
| 11 | 62,2 | ----- | ----- | ----- | ----- | 30 | 17,5 | 0,99 | s | ----- | 3H |
| 12 | 124,0 | 5,23 | d | 5,1 | 1H | Glc-1 | 102,9 | 4,53 | d | 8,0 | 1H |
| 13 | 139,6 | ----- | ----- | ----- | ----- | Glc-2 | 71,7 | 4,99 | d | 8,5 | 1H |
| 14 | 42,1 | ----- | ----- | ----- | ----- | Glc-3 | 72,9 | 4,16 | m | ----- | 2H |
| 15 | 29,3 | 0,99 1,67 | m m | ----- | ----- 1H | Glc-4 | 71,6 | | | | |
| 16 | 29,7 | 1,11 | m | ----- | 1H | Glc-5 | 72,9 | 3,66 | m | ----- | 1H |
| 17 | 33,7 | ----- | ----- | ----- | ----- | Glc-6 | 68,9 | 5,02 5,18 | d d | 9,3 9,5 | 1H 1H |
| 18 | 39,6 | 1,42 | m | ----- | 1H | OAc | 20,6 20,6 169,1 169,4 | 1,99 2,01 | s s | ----- | 3H 3H |
| 19 | 31,9 | 2,30 | t | 8,0 | 2H | OAc | 20,7 20,7 170,4 173,4 | 2,01 2,02 | s s | ----- | 3H 3H |

**TABLA 17A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia W12**

| | |
|--|---|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de Fusión: | 110-114°C (Hex/AcOEt) |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 2924, 2851, 1747, 1467, 1368, 1329, 1231, 1172, 1128, 1039, 973, 925, 909, 889, 841. |
| EM m/z (%): | 527 (21), 395 (39,5), 394 (100), 382 (11,5), 365 (9), 255 (17), 239 (32), 169 (7), 147 (6), 139 (7), 109 (7), 97 (7), 95 (10), 83 (26), 81 (10), 69 (13), 57 (13), 55 (10). |

TABLA 17B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia W12 (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | | | |
|-------|------------|------------|------|-------|------|-------|------------|------------|------|--------|------|----|--------|----|
| 1 | 37,1 | 1,04 | m | ---- | 1H | 19 | 19,3 | 0,99 | s | ---- | 3H | | | |
| | | 1,84 | m | ---- | 1H | | | | | | | | | |
| 2 | 31,8 | 1,51 | m | ---- | 1H | 20 | 36,7 | ---- | ---- | ---- | ---- | | | |
| | | 1,84 | m | ---- | 1H | | | | | | | | | |
| 3 | 80,1 | 3,47 | m | ---- | 1H | 21 | 14,1 | 1,03 | d | 6,1 | 3H | | | |
| 4 | 40,4 | 2,26 | m | ---- | 1H | 22 | 34,1 | ---- | ---- | ---- | ---- | | | |
| | | 2,31 | m | ---- | 1H | | | | | | | | | |
| 5 | 140,3 | ---- | ---- | ---- | ---- | 23 | 28,9 | ---- | ---- | ---- | ---- | | | |
| 6 | 121,9 | 5,34 | d br | 4,5 | 1H | 24 | 50,2 | ---- | ---- | ---- | ---- | | | |
| 7 | 31,8 | ---- | ---- | ---- | ---- | 25 | 29,7 | ---- | ---- | ---- | ---- | | | |
| 8 | 31,9 | 1,53 | m | ---- | 1H | 26 | 20,6 | 0,87 | d | 6,4 | 3H | | | |
| 9 | 51,2 | 1,04 | m | ---- | 1H | 27 | 18,9 | 0,90 | d | 7,1 | 3H | | | |
| 10 | 36,7 | ---- | ---- | ---- | ---- | 28 | 22,6 | ---- | ---- | ---- | ---- | | | |
| 11 | 20,7 | 1,43 | m | ---- | 1H | 29 | 12,2 | 0,82 | t | 6,7 | 3H | | | |
| | | 1,55 | m | ---- | 1H | | | | | | | | | |
| 12 | 38,9 | 1,16 | m | ---- | 1H | Glc-1 | 99,6 | 4,58 | d | 7,9 | 1H | | | |
| 13 | 42,2 | ---- | ---- | ---- | ---- | Glc-2 | 71,5 | 4,91-5,23 | m | ---- | 3H | | | |
| 14 | 56,8 | 1,12 | m | ---- | 1H | Glc-3 | 72,9 | | | | | | | |
| 15 | 24,8 | ---- | ---- | ---- | ---- | Glc-4 | 68,7 | | | | | | | |
| 16 | 29,3 | ---- | ---- | ---- | ---- | Glc-5 | 71,7 | 3,68 | m | ---- | 1H | | | |
| 17 | 56,0 | ---- | ---- | ---- | ---- | Glc-6 | 62,0 | 4,12 | dd | 2,7;12 | 1H | | | |
| | | | | | | | | 4,20 | | | | dd | 5,2;12 | 1H |
| 18 | 12,0 | 0,70 | s | ---- | 3H | OAc | 21,0 | 2,03 | s | ---- | 3H | | | |
| | | | | | | | 21,0 | | | | | s | ---- | 3H |
| | | | | | | OAc | 169,3 | 2,04 | s | ---- | | | | |
| | | | | | | | 169,3 | | | | | | | |
| | | | | | | | 21,2 | | | | | s | ---- | 3H |
| | | | | | | | 21,2 | | | | | | | |
| 170,3 | s | ---- | 3H | | | | | | | | | | | |
| 173,4 | | | | | | | | | | | | | | |



3.4 *Tolpis* sp. Parte Teórica

Tolpis sp. es una planta que se recolectó entre Tagoja y Fuente Olén (Santa Cruz de La Palma), a 1.300 metros sobre el nivel del mar, por el profesor Dr. Pedro Luis Pérez de Paz. Como explicamos en la parte teórica de *Tolpis webbia*, las del género *Tolpis* se diferencian de otros géneros de *Compositae* porque son plantas no espinosas que poseen látex y con capítulos que poseen sólo lígula, con un receptáculo que carece de escamas y las cipselas nervadas no son picudas, mientras que el vilano posee unas cuantas cerdas largas con escamas por la base.

Tal como se describe en la parte experimental, tras la extracción de esta planta con etanol hasta agotamiento y posterior tratamiento del extracto mediante concentración, se obtuvo un líquido oscuro y denso que, merced a su estudio en cromatografía en columna, nos condujo a la separación de once sustancias, para cuya descripción no se va a tener en cuenta el orden de elución cromatográfica sino que la efectuaremos en función de sus relaciones estructurales. Según este criterio, se pueden agrupar de la siguiente forma:

- a) 1 compuesto aromático (**T5**)

- b) 10 triterpenos y esteroides:
 - b.1) peróxido de ergosterol (**T10**)
 - b.2) 1 derivado del lupeol (**T9**)
 - b.3) 8 derivados del taraxasterol y la amirina (**T1, T2, T3, T4, T6, T7a, T8a y T11**)

a) COMPUESTO AROMÁTICO:

Sustancia T5:

Esta sustancia fue aislada a partir de la fracción IV de la cromatografía general como un sólido cristalino.

Los datos espectroscópicos y físicos de esta sustancia coinciden con los de **2,4'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona**, descrita anteriormente en el estudio de *Tolpis webbii* (sustancia W4, ver página 39).

b) TRITERPENOS Y ESTEROLES:

b.1) Peróxido de ergosterol

Sustancia T10:

Se aisló como una sustancia aceitosa incolora de la fracción V de la cromatografía general. El ensayo de Liebermann-Burchard da positivo, y su análisis en cromatografía en capa fina confirma que se trata de un esteroles. El espectro de IR (tabla 27A) presenta una banda de absorción característica a $\nu_{\text{máx}}$ 3418 cm^{-1} , que indica la presencia de hidroxilo.

En el espectro de masas (Tabla 26A) destaca el pico de ión molecular a m/z 428, que está de acuerdo con una fórmula empírica $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$, además de otro a m/z 410, que corresponde a la pérdida de un grupo hidroxilo, y otro a m/z 396 que corresponde a la pérdida de dos oxígenos respecto al ión molecular, posiblemente de un grupo peróxido.

En su espectro de RMN ^1H (Figura 31; Tabla 26B) se observan dos singuletes a δ_{H} 0.82 y 0.89, con integral para tres protones cada uno, y que se asignan a CH_3 -18 y CH_3 -19. Se observa además una señal doblete a δ_{H} 0.84 ($J=6.8$) integrando para seis protones, y asignada a CH_3 -26 y CH_3 -27, y dos señales doblete a δ_{H} 0.91 ($J=6.8$) y 1.00 ($J=6.6$), con integral para tres protones cada una, y que se asignan a CH_3 -21 y CH_3 -28. También se observa un multiplete a δ_{H} 3.97 con integral para un hidrógeno, característica de un protón geminal a un grupo hidroxilo, y tres señales características de

protones vinílicos: un multiplete a δ_H 5.18 que integra para dos protones y dos dobletes a δ_H 6.24 ($J=8.5$) y 6.51 ($J=8.5$) con integración para un protón cada uno, señalándonos la presencia de protones vinílicos mas desapantallados, posiblemente por la presencia de un grupo peróxido en las proximidades.

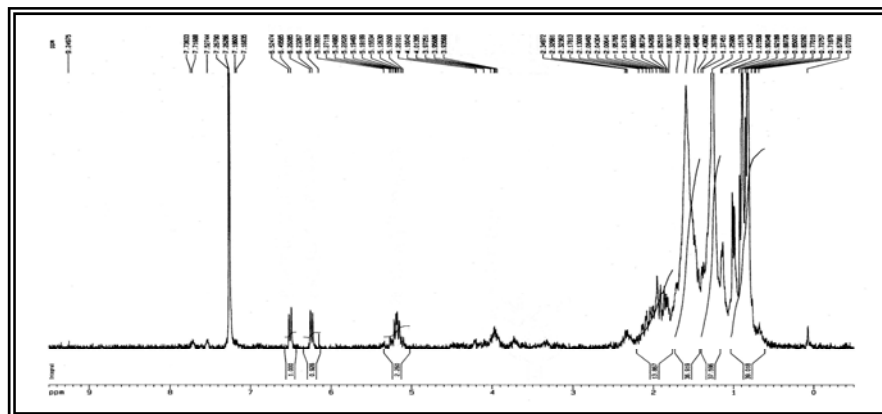


Figura 31: Espectro de RMN 1H de la sustancia **T10**

El espectro de RMN ^{13}C y D.E.P.T. de la sustancia **T10** (Tabla 26B) muestra señales correspondientes a seis grupos metilos, a δ_C 14.1, 17.5, 18.1, 19.6, 19.9 y 20.9; siete grupos metilenos a δ_C 20.6, 23.4, 25.8, 28.6, 30.1, 34.7 y 39.3; seis grupos metinos a δ_C 33.0, 39.7, 42.7, 51.1, 51.7 y 56.2, y dos carbonos cuaternarios, a δ_C 27.1 y 44.5. Además también se aprecian señales correspondientes a un metino oxigenado, a δ_C 66.4, dos carbonos terciarios oxigenados, a δ_C 64.9 y 65.5, y cuatro carbonos olefinicos, a δ_C 130.7, 132.3, δ_C 135.2 y 135.4.

La acetilación de **T10** nos permitió obtener su derivado acetilado **T10a**, y del estudio de sus datos espectrales pudimos extraer algunas conclusiones adicionales. En primer lugar, en el espectro de IR de **T10a** ha desaparecido la banda característica del grupo hidroxilo, mientras que en su espectro de masas (Tabla 27A) no se observa pico de ión molecular, pero en cambio se observa un pico a m/z 410, que indica la pérdida de un grupo acetilo. Estos datos nos revelan la probable existencia de un único grupo hidroxilo en **T10**, por lo que los otros dos átomos de oxígeno de la fórmula molecular deben corresponder al grupo peróxido comentado en los espectros de masas y de RMN de 1H de **T10**.

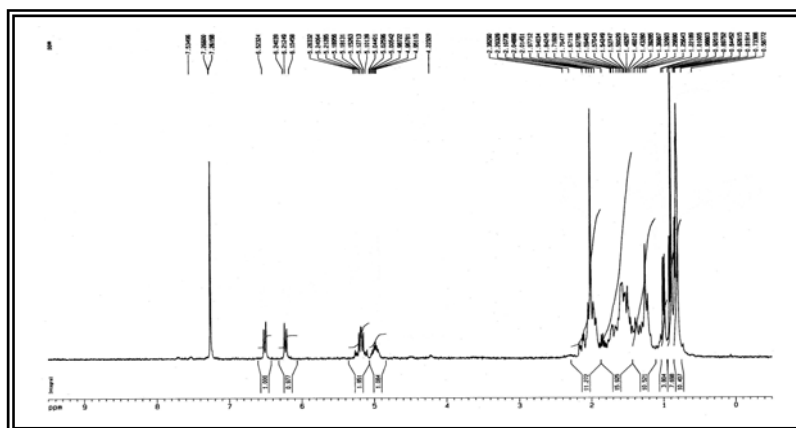
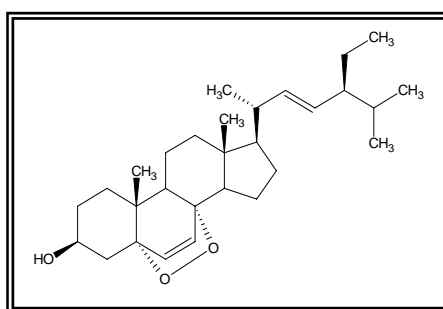


Figura 32: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **T10a**

Por otro lado, en el espectro de RMN de ^1H del derivado acetilado (Figura 32; Tabla 27B), se observan prácticamente las mismas señales que en el espectro del compuesto original, con la única salvedad del desplazamiento de la señal del protón geminal al grupo hidroxilo hacia campo más bajo (a δ_{H} 4.99, m), como consecuencia de la introducción del grupo acetilo en esa posición en el compuesto **T10a**, y la presencia de un singulete a δ_{H} 2.01 correspondiente al grupo metilo del acetilo.

Todos los datos comentados concuerdan con los dados en la literatura para el **peróxido de ergosterol**⁶¹, por lo que a la sustancia **T10** le asignamos esta estructura.



T10

61. González, A.G.; Bermejo, J.; Rodríguez Pérez, E.M. and Hernández Padrón, C.E. "Chemical constituents of the lichen *Ramalina hierrensis*". *Planta Med.* (1992). Vol. 58, pág. 214-218.

b.2) Derivado del lupeol:

Sustancia T9:

Fue aislada como su derivado acetilado (**T9a**) a partir de la fracción V de la cromatografía general, obteniéndose como un sólido cristalino. El espectro de IR de **T9a** (Tabla 25A) muestra banda de absorción característica de grupo carbonilo (1737 cm^{-1}).

En su espectro de masas (Tabla 25A) se aprecia el pico del ion molecular a m/z 526, que se corresponde con una fórmula molecular $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_4$. Además, también se observan picos relativamente intensos a m/z 466 que corresponde con la pérdida de una molécula de ácido acético, y a m/z 451, indicativo de la pérdida adicional de un grupo metilo.

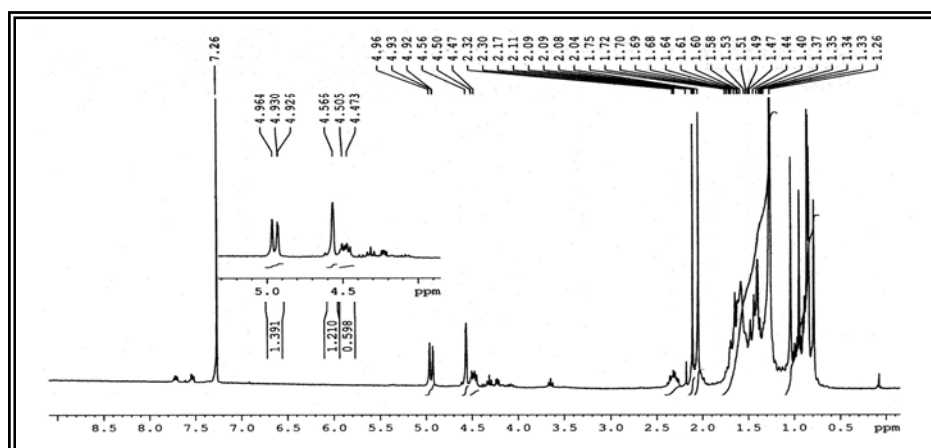
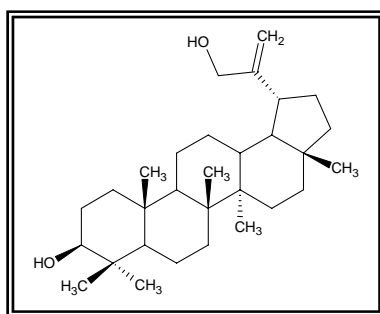


Figura 33: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **T9a**

En el espectro de RMN de ^1H de **T9a** (Figura 33; Tabla 25B) se observan seis señales singuletes que integran para tres protones cada una, que se sitúan a δ_{H} 0.79, 0.84, 0.85, 0.86, 0.95 y 1.04, además de dos singuletes a 2.05 y 2.11 (con integral para tres protones cada uno) que indican la presencia de dos grupos acetilos. Por otro lado se observan dos singuletes a δ_{H} 4.93 y 4.96, con integral para un protón cada uno, que indican la presencia de dos protones olefinicos. También aparece un singulete a δ_{H} 4.56 que integra para dos protones (asignado a CH_2 -30) y un doble doblete a δ_{H} 4.50 ($J=6.0$

Hz; 9.0 Hz) con integral para un protón (asignado a H-3), señales que indican la presencia de protones geminales a los dos grupos acetilos antes mencionados. Este espectro es similar al de la sustancia **lup-20(29)-en-3 β ,30-diol (W8**, ver página 51), diferenciándose en las señales correspondientes a los grupos acetilos presentes en el espectro de **T9a** y el desplazamiento de las señales de los protones geminales a los grupos oxigenados hacia campos más bajos, por la sustitución de los grupos hidroxilos en los carbonos 3 y 30 de **W8** por sendos grupos acetilos.

Por todo ello, hemos asignado a **T9a** la estructura del **3 β ,30-diacetoxilup-20(29)-eno**, siendo por tanto el producto natural (**T9**) el **lup-20(29)-en-3 β ,30-diol**, descrito con anterioridad en la bibliografía⁵⁵.

**T9**

b.3) Derivados del taraxasterol y la amirina:

Sustancia T2:

Esta sustancia fue aislada a partir de la fracción III de la cromatografía general como un sólido cristalino. Su espectro de IR muestra la banda de absorción característica de grupo hidroxilo (3423 cm^{-1}), además de una banda de absorción que indica la presencia de dobles enlaces en la estructura (1689 cm^{-1}).

En su espectro de masas (Tabla 19A) se aprecia el pico del ión molecular a m/z 426, que se corresponde con una fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$. Además, también se observan picos relativamente intensos a m/z 408 que corresponde con la pérdida de una molécula de agua, y m/z 393, indicativo de la pérdida adicional de un grupo metilo.

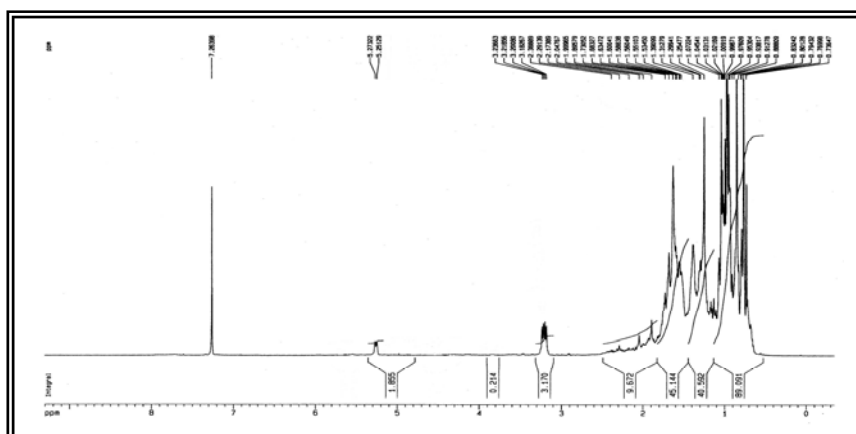
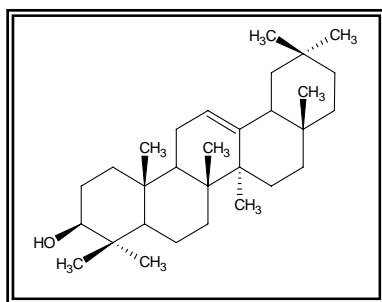


Figura 34: Espectro de RMN ^1H de la sustancia T2

En el espectro de R.M.N. de ^1H de T2 (Figura 34; Tabla 19B) destacan ocho señales como singuletes correspondientes a otros tantos grupos metilos, a δ_{H} 0.77, 0.78, 0.87, 0.88, 0.93, 0.96, 0.99 y 1.09. También se observa la señal característica de un protón geminal a grupo hidroxilo, como un doblete situado a δ_{H} 3.20 ($J=5.5\text{ Hz}$; 10.7 Hz), y una señal indicativa de un protón olefínico a δ_{H} 5.26 (d, $J=6.7\text{ Hz}$).

Los datos anteriores son coincidentes con los presentados en la bibliografía que hemos consultado para la β -amirina⁶⁰, por lo que esta es la estructura que asignamos a la sustancia T2.



T2

Sustancia T11:

Esta sustancia fue aislada a partir de la fracción VI de la cromatografía general como un aceite incoloro.

Los datos espectroscópicos y físicos de esta sustancia coinciden con los del acetato del β -D-glucósido de la β -amirina, descrita anteriormente en el estudio de *Tolpis webbii* (sustancia W11, ver página 61).

Sustancia T3:

Esta sustancia fue aislada a partir de la fracción III de la cromatografía general, como un sólido cristalino. En su espectro de IR (Tabla 20A) destaca principalmente la banda a 3450 cm^{-1} , característica de grupos hidroxilos.

En el espectro de masas (Tabla 20A) se observa un pico de ión molecular relativamente intenso a m/z 440, que concuerda con una fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$, con la presencia de otros picos relevantes a m/z 422 (que indica la pérdida de agua) y a 407 (corresponde a la pérdida adicional de un grupo metilo).

El espectro de RMN de ^1H (Figura 35; Tabla 20B) muestra señales para siete grupos metilos, seis como singuletes a δ_{H} 0.77, 0.81 (6H), 0.84, 0.95 y 1.02, y una como doblete ($J=6.8\text{ Hz}$) a δ_{H} 1.05. También aparecen la señal para un protón geminal a un grupo hidroxilo, a δ_{H} 3.20 (dd, $J=5.1\text{ Hz}$; 10.7 Hz), y las señales características para dos protones geminales a un grupo epóxido, a δ_{H} 2.91 (d, $J=4.6\text{ Hz}$) y 3.47 (d, $J=4.6\text{ Hz}$). Otras señales destacadas son las que corresponden a dos protones olefínicos a δ_{H} 4.87 (s) y 5.06 (s).

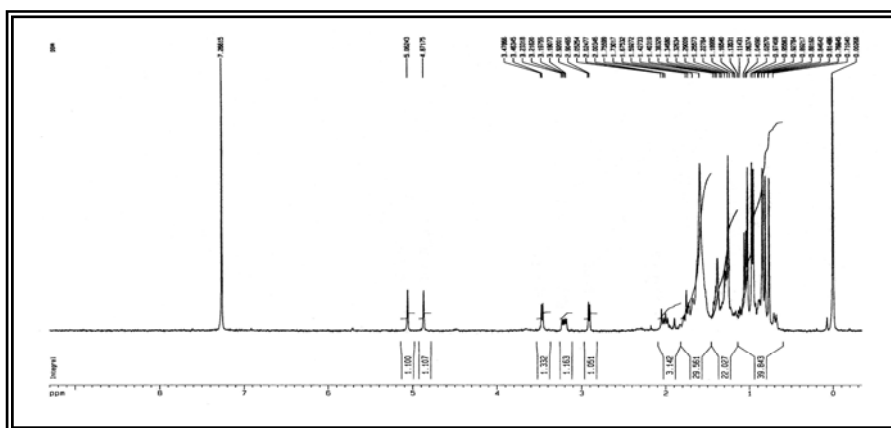
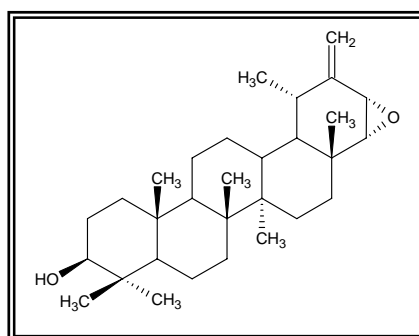


Figura 35: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **T3**

La confirmación del grupo hidroxilo se realizó mediante la acetilación de la sustancia **T3**, permitiéndonos obtener su derivado acetilado **T3a**, en cuyo espectro de masas (Tabla 21A) aparece el pico de ión molecular a m/z 482, destacando además otros picos relativamente intensos a m/z 422 (corresponde a la pérdida de una molécula de ácido acético) y 407 (indica la pérdida adicional de un grupo metilo). El espectro de RMN de ^1H de **T3a** (Tabla 21B) es prácticamente idéntico al del compuesto original, con la salvedad del desplazamiento de la señal del protón geminal al grupo hidroxilo hacia campos más bajos (a δ_{H} 4.47, dd, $J=5.4$ Hz; 10.0 Hz), y la presencia de la señal singulete correspondiente al metilo del grupo acetoxi a δ_{H} 2.04.

Todos estos datos espectroscópicos y físicos mencionados concuerdan con los reseñados en la literatura consultada para el compuesto **21 α ,22 α -epoxitaraxasterol**⁶².



T3

62. Menichini, F.; di Benedetto, R. and Delle Monache, F. "A triterpene epoxide and a guaianolide from *Ptilostemmon gnaphaloides*". *Phytochemistry* (1996), 41 (5), 1377-1379.

Sustancia T4:

Esta sustancia fue aislada a partir de la fracción III de la cromatografía general como un sólido cristalino.

Los datos espectroscópicos y físicos de esta sustancia coinciden con los del **21 α ,22 α -epoxi-20 α -hidroxi-20(30)-dihidrotaraxasterol**, descrita anteriormente en el estudio de *Tolpis webbii* (sustancia **W9**, ver página 56).

Sustancia T1:

Esta sustancia fue aislada a partir de la fracción IV de la cromatografía general, como un sólido cristalino. En su espectro de IR (Tabla 18A) destaca principalmente las bandas características para grupos hidroxilo y carbonilo (a 3470 y 1728 cm^{-1} respectivamente).

En el espectro de masas (Tabla 18A) se observa un pico de ión molecular relativamente intenso a m/z 500, que concuerda con una fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4$, con la presencia de otros picos relevantes a m/z 482 (que indica la pérdida de agua) y a 466 (corresponde a la pérdida adicional de un grupo metilo).

El espectro de RMN de ^1H (Figura 36; Tabla 18B) muestra señales para ocho grupos metilos, de las cuales siete son singuletes a δ_{H} 0.83, 0.84, 0.85, 0.95, 0.96, 1.01 y 1.29, y una como doblete ($J=7.6$ Hz) a δ_{H} 1.03, y una novena señal indica la presencia de un grupo acetato en la estructura (δ_{H} 2.04, s). También aparecen la señal para un protón geminal a un grupo acetato, a δ_{H} 4.47 (dd, $J=5.4$ Hz; 10.8 Hz), y las señales características para dos protones geminales a un grupo epóxido, a δ_{H} 2.91 (d, $J=4.0$ Hz) y 3.11 (d, $J=4.1$ Hz).

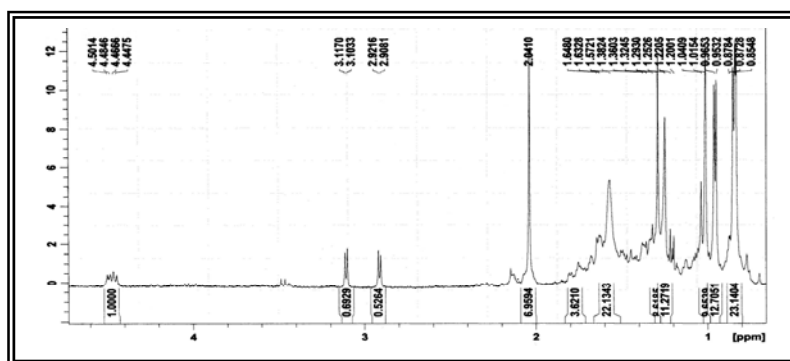


Figura 36: Espectro de RMN ^1H de la sustancia T1

Estos espectros resultan totalmente coincidentes con los de la sustancia **W9a** (extraída mediante acetilación de **W9** de *Tolpis webbia*, ver página 56), con la diferencia de que la sustancia **T1** se ha obtenido directamente del extracto de la planta *Tolpis sp.*, sin ningún proceso de acetilación previo. Por todo ello se asigna a **T1** la estructura de **3 β -acetoxi-21 α ,22 α -epoxi-20 α -hidroxi-20,30-dihidrotaraxasterol**.

Sustancia T6:

Esta sustancia fue aislada a partir de la fracción IV de la cromatografía general como un sólido cristalino.

Los datos espectroscópicos de esta sustancia coinciden con los del **acetato del 21 α -hidroxitaraxasterol**, descrita anteriormente en el estudio de *Tolpis webbia* (sustancia **W7a**, ver página 55).

Sustancia T7:

Esta sustancia se aisló a partir de la fracción IV de la cromatografía general, siendo purificada mediante la formación de su derivado acetilado **T7a**, obtenido como un sólido cristalino, tal y como se describe en la parte experimental. En el espectro IR (Tabla 22A) del derivado acetilado **T7a** se observan como señales más destacadas las bandas que indican la presencia de grupo carbonilo conjugado con un doble enlace, situadas a 1691 y 1648 cm^{-1} , y la banda característica para grupos carbonilos (asociados a grupos acetilo), a 1734 cm^{-1} .

En su espectro de masas (Tabla 22A) aparece el pico de ion molecular a m/z 540, que se corresponde con una fórmula molecular $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_5$, destacando además la presencia de otros picos relevantes a m/z 480 (indicativo de la pérdida de una molécula de ácido acético), a m/z 465 (corresponde a la pérdida adicional de un grupo metilo), y a m/z 420 (indicativo de la pérdida de una segunda molécula de ácido acético). Estos fragmentos apuntan a la presencia de dos grupos acetilos en la estructura de la molécula de la sustancia **T7a**.

En el espectro de RMN de ^{13}C y D.E.P.T. de **T7a** (Tabla 22B) observamos señales para treinta y cuatro carbonos, que se corresponden con siete grupos metilos a δ_{C} 14.3, 15.7, 16.1, 16.3, 17.5, 23.4 y 27.7; ocho grupos metilenos a δ_{C} 17.9, 23.4, 26.2, 26.9, 29.2, 29.5, 33.9 y 38.2; cinco grupos metinos a δ_{C} 26.9, 38.0, 40.9, 50.0 y 55.1; y cinco carbonos cuaternarios a δ_{C} 37.0, 37.6, 38.6, 40.9, 41.9. También se observan las señales correspondientes a los carbonos de los grupos acetilos a δ_{C} 21.1 y 170.9. Otras señales que se observan indican la presencia de dos carbonos oxigenados a δ_{C} 74.2 y 80.7, que corresponderían con los carbonos sobre los que se situarían los grupos acetilos, así como de un carbono aldehído a δ_{C} 194.3, y de dos carbonos olefínicos a δ_{C} 141.9 y 151.2. La presencia de estas tres últimas señales es coherente con las bandas presentes en el espectro de IR, que apuntaban a la presencia de un grupo carbonilo conjugado con un doble enlace, por lo que en la estructura de esta sustancia el doble enlace debe situarse en posición α respecto al grupo aldehído.

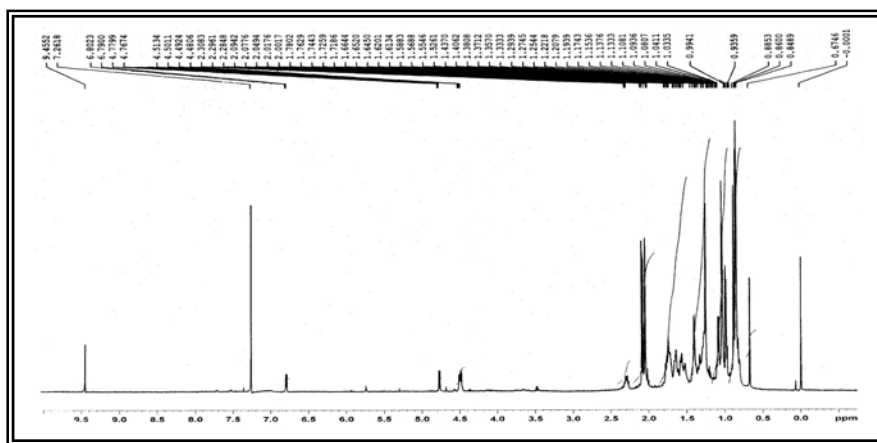


Figura 37: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **T7a**

El espectro de RMN de ^1H de **T7a** (Figura 37; Tabla 22B) muestra señales indicativas de siete grupos metilos, de los cuales seis aparecen como singuletes a δ_{H} 0.67, 0.85, 0.86, 0.98, 0.99 y 1.03, y una como doblete a δ_{H} 1.07 ($J=6.5$ Hz). Se observa además las señales para los grupos metilos de dos grupos acetilos a δ_{H} 2.05 y 2.09. También observamos señales para dos protones geminales a grupos oxigenados, uno a δ_{H} 4.50 (m), asignada a H-3, y el otro a δ_{H} 4.77 (d, $J=6.3$ Hz). Otras señales destacadas son la correspondiente a un protón de un grupo aldehído a δ_{H} 9.47, y la indicativa

a un protón vinílico a δ_{H} 6.80 (d, $J=6.2$ Hz). El elevado desapantallamiento que se deduce del desplazamiento a campos tan bajos de la señal del protón vinílico, sólo puede justificarse por la presencia en su inmediata vecindad de algún grupo muy electronegativo, como puede ser el grupo aldehído, lo que vuelve a reforzar lo comentado en los espectros de IR y de RMN de C^{13} respecto a la situación del doble enlace en posición α respecto al grupo aldehído.

El análisis de los datos de RMN en 2D para **T7a** nos permitió asignar a esta sustancia una estructura derivada del taraxasterol. El estudio de las correlaciones del espectro HMBC (Figura 38b) nos permite concretar la ubicación del grupo aldehído, el doble enlace y los grupos acetilo dentro de esa estructura. Así, las señales de los dos metilos geminales (Me-23 y Me-24) situadas a δ_{H} 0.85 y 0.98 muestran una correlación con las señales de los carbonos C3, C4 y C5 (a δ_{C} 80.7, 37.6 y 55.1), lo que nos permite concluir que dichos metilos se debían situar en C4, e indirectamente que el primer grupo acetilo debía situarse en C3. El doble enlace lo ubicamos en el carbono 20 de la estructura al observar correlaciones, por un lado, entre la señal del metilo 29 (δ_{H} 1.07, d, $J=6.5$ Hz) con la señal del carbono 20 (δ_{C} 151.2), por otro lado, entre el protón en 19 (δ_{H} 2.27, m) y los carbonos 20 y 21 (δ_{C} 151.2 y 141.9), y por último entre el protón vinílico en 21 (δ_{H} 6.80, d, $J=6.2$ Hz) y los carbonos 17 y 19 (δ_{C} 37.0 y 29.2). La conjugación entre el doble enlace y el grupo aldehído reseñada en la discusión de los espectros de IR y de RMN de ^1H y ^{13}C , se ve reforzada por la existencia de correlación entre el protón del grupo aldehído (δ_{H} 9.47, s) y los carbonos vinílicos C20 y C21 (δ_{C} 151.2 y 141.9). La posición del grupo aldehído sobre el carbono 20 fue confirmada por la existencia de correlaciones entre el protón del aldehído y el carbono 19 (δ_{C} 29.2), y entre el protón vinílico en 21 y el carbono del grupo aldehído (C30, δ_{C} 194.3). El segundo grupo acetilo fue ubicado en C22 tras el análisis de las correlaciones por un lado entre el protón vinílico en 21 y el carbono 22 (δ_{C} 74.2), por otro lado entre el protón geminal al grupo acetilo (δ_{H} 4.77, d, $J=6.3$ Hz) y los carbonos 18, 20 y 21 (δ_{C} 40.8, 151.2 y 141.9), y por último entre el metilo 28 (δ_{H} 0.67, s) y el carbono 22.

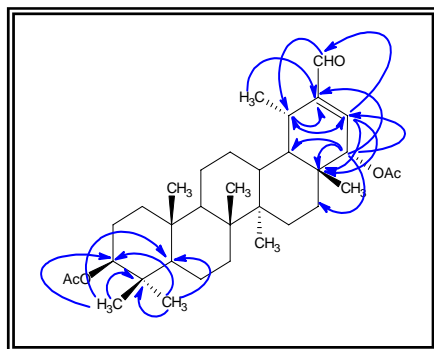


Figura 38a: Relaciones seleccionadas de HMBC de la sustancia T7a

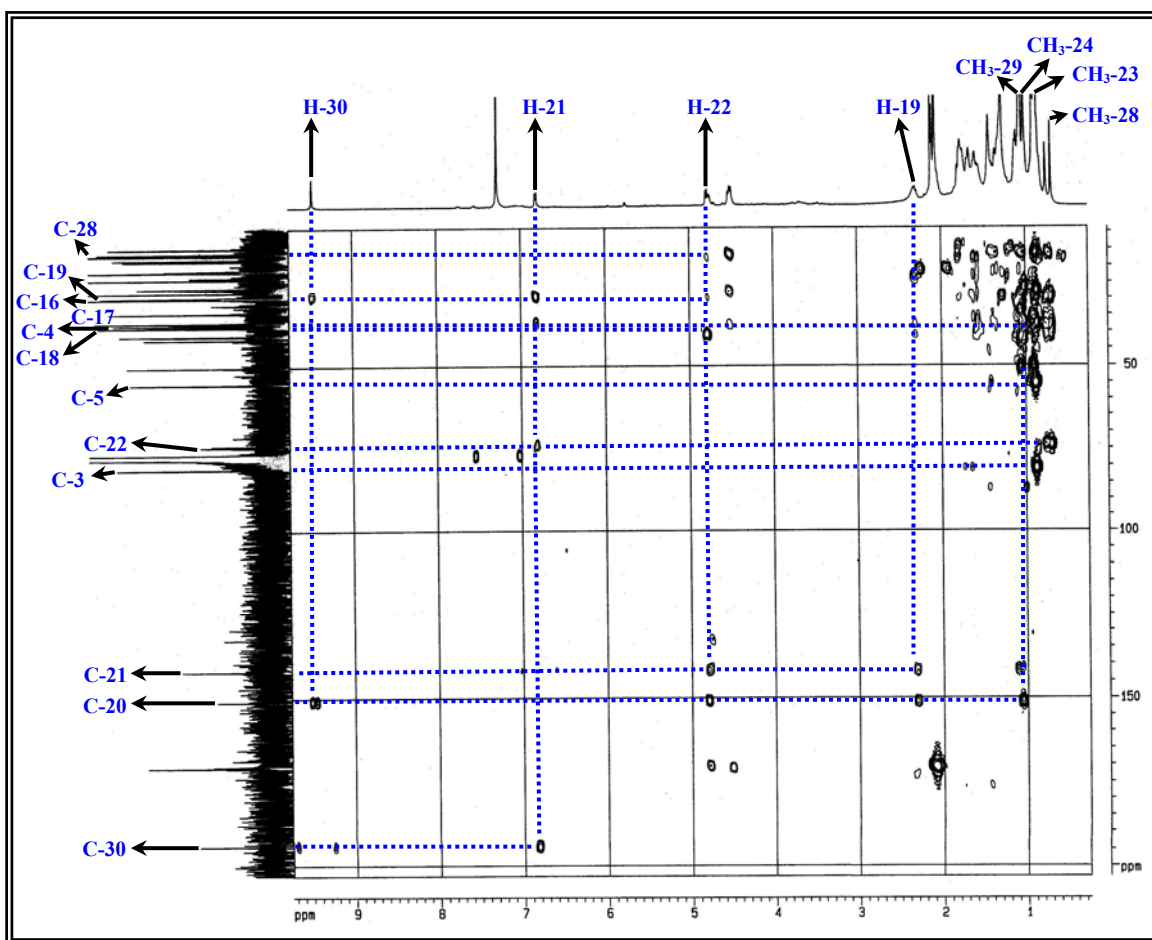


Figura 38b: Espectro de HMBC de la sustancia T7a

Por otro lado, en un experimento NOESY (Figura 39b) pudimos deducir la configuración de T7a. La existencia de interacciones entre H-3 y CH₃-23, H-9 y CH₃-27, H-18 con CH₃-27 y CH₃-29, nos mostraron que los protones en 3, en 9 y en 18, y los metilos 23, 27 y 29 debían tener una orientación α en la estructura del compuesto. Por otro lado, las correlaciones de H-13 con CH₃-26 y CH₃-28, H-19 con CH₃-28, y de CH₃-

25 con CH₃-24 y CH₃-26, nos permitieron deducir que los protones en 13 y en 19, el acetilo en 3, y los metilos 24, 25, 26 y 28 debían tener una orientación β. La existencia de correlación entre el protón geminal al segundo grupo acetilo en 22 y el metilo 28 nos indica que el grupo acetilo tiene orientación α, lo que se confirma por el hecho de la existencia de una constante de acoplamiento larga entre el protón vinílico en 21 y el protón geminal al acetilo en 22 ($J=6.2-6.3$ Hz).

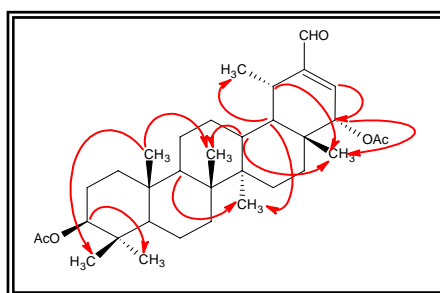


Figura 39a: Relaciones seleccionadas de NOESY de la sustancia T7a

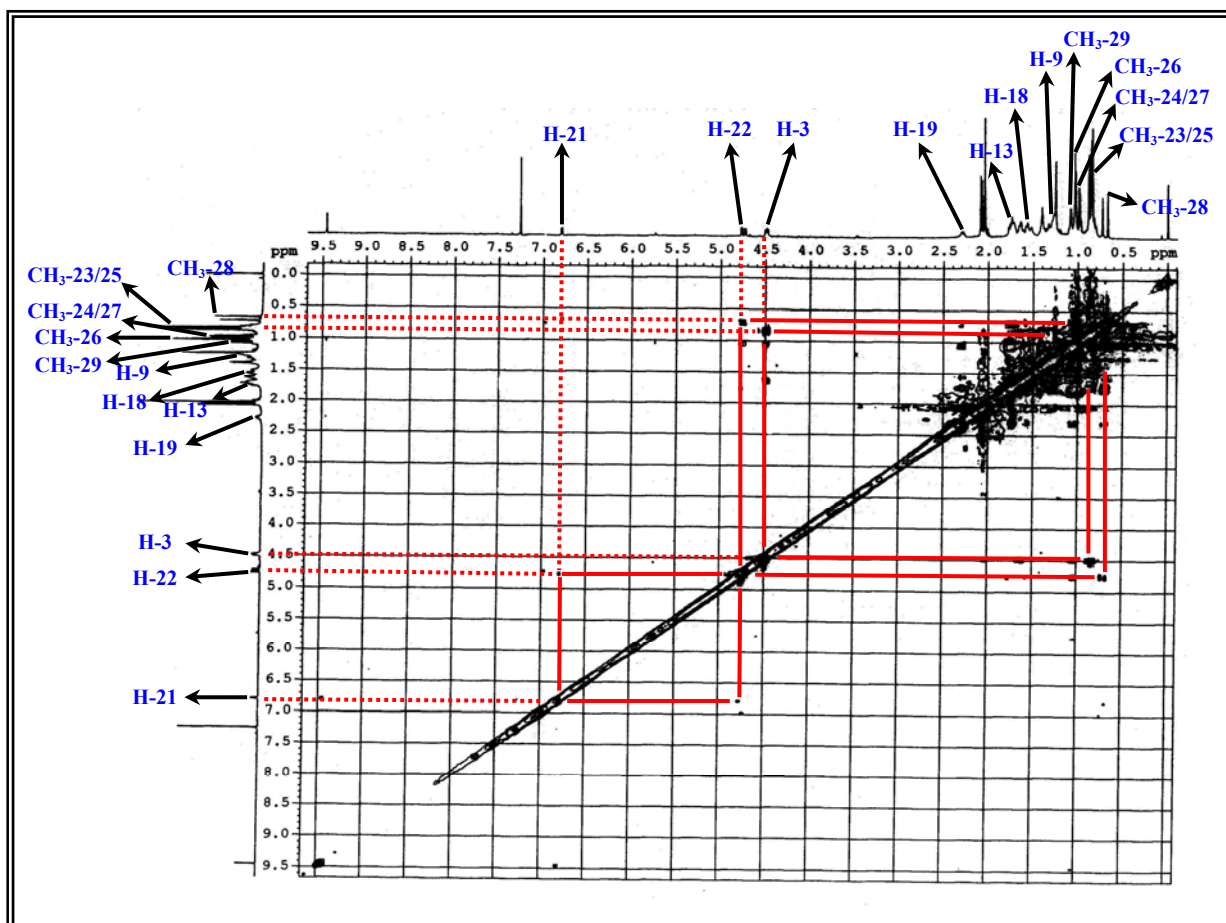
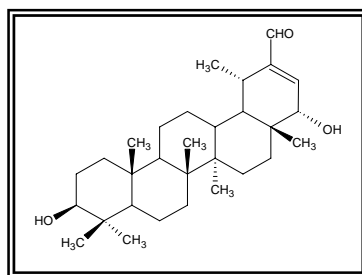


Figura 39b: Espectro de NOESY de la sustancia T7a

Por lo tanto, los datos anteriores permiten deducir que la estructura de **T7a** corresponde al **3 β ,22 α -diacetoxitaraxaster-20-en-30-al**, siendo el producto natural de la planta objeto de estudio (**T7**) el diol correspondiente. Consultada la bibliografía encontramos descrita esta sustancia, con la cual son coincidentes todos sus datos espectroscópicos⁶³.



T7

Sustancia T8:

Esta sustancia se aisló a partir de la fracción V de la cromatografía general, siendo purificada mediante la formación de su derivado acetilado **T8a**, que se obtuvo como un sólido amorfo, tal y como se describe en la parte experimental.

En el espectro IR del derivado acetilado **T8a** (Tabla 23A), de manera similar a como sucedía con **T7a**, se observan las bandas que indican la presencia de grupo carbonilo conjugado con un doble enlace, situadas a 1676 y 1640 cm⁻¹, y la banda característica para grupos carbonilos (asociados a grupos acetato), a 1735 cm⁻¹, y como diferencia respecto a **T7a** se aprecia una banda ancha sobre 3000 cm⁻¹ solapada sobre las bandas de absorción de los enlaces C-H, que es característica de grupo hidroxilo de un grupo funcional ácido carboxílico. Esto nos hizo plantearnos la posibilidad de un agrupamiento funcional similar al que presentaba la sustancia **T7a**, con un ácido carboxílico conjugado con un doble enlace.

Su fórmula molecular se determinó como C₃₂H₅₀O₄ de sus datos de HREIMS (m/z 498.3688 [M]⁺, Tabla 23A). En su espectro de masas, además del pico de ión molecular a m/z 498, destaca la presencia de otros picos relevantes a m/z 438 (indicativo de la pérdida de una molécula de ácido acético) y a m/z 423

63. He, X.-F.; Wang, X.-N.; Fan, C.-Q.; Gan, L.-S.; Yin, S. and Yue, J.-M. "Chemical constituents of *Polyalthia nemoralis*". *Helvetica Chimica Acta* (2007), 90, 783-791.

(corresponde a la pérdida adicional de un grupo metilo), de manera similar a la fragmentación que se presentaba para **T7a**, diferenciándose sólo en las fragmentaciones de los grupos acetilos (dos en **T7a** y una en **T8a**), lo que apunta a la presencia de un único grupo acetilo en la estructura de la molécula de la sustancia **T8a**.

El espectro de RMN de ^{13}C y D.E.P.T. de **T8a** (Tabla 23B) es muy similar al de **T7a**, y en él observamos señales para treinta y dos carbonos, que se corresponden con siete grupos metilos a δ_{C} 14.7, 16.0, 16.3, 16.5, 17.5, 23.7 y 28.0; nueve grupos metilenos a δ_{C} 18.2, 21.3, 23.7, 26.9, 27.3, 34.5, 37.2, 38.4 y 42.4; cinco grupos metinos a δ_{C} 29.7, 39.0, 48.3, 50.3 y 55.4; y cinco carbonos cuaternarios a δ_{C} 34.1, 37.0, 38.4, 40.9 y 42.3. También se observan las señales correspondientes a los carbonos de un grupo acetilo a δ_{C} 21.3 y 171.0. Otras señales que se detectan indican la presencia de un carbono oxigenado a δ_{C} 80.9, que correspondería con el carbono sobre el que se situaría el grupo acetilo, así como de un carbono ácido a δ_{C} 171.5, y de dos carbonos olefínicos a δ_{C} 136.8 y 138.9. La presencia de estas tres últimas señales es coherente con las bandas presentes en el espectro de IR, que apuntaban a la presencia de un grupo carbonilo conjugado con un doble enlace, por lo que en la estructura de esta sustancia el doble enlace debe situarse en posición α respecto al grupo ácido carboxílico.

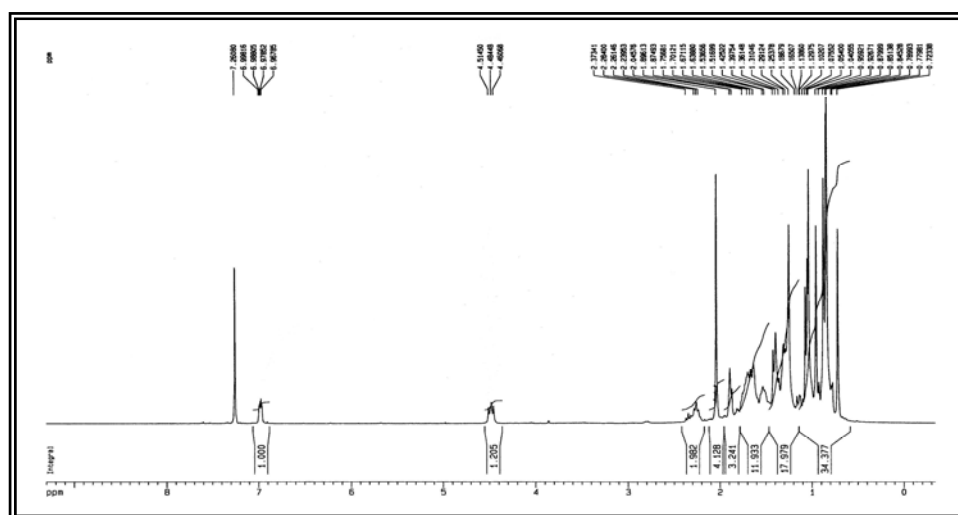


Figura 40: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **T8a**

El espectro de RMN de ^1H de **T8a** (Figura 40; Tabla 23B) también es muy similar al de la sustancia **T7a**, mostrando señales indicativas de siete grupos metilos,

de los cuales seis aparecen como singuletes a δ_{H} 0.72, 0.84, 0.85, 0.88, 0.96 y 1.04, y una como doblete a δ_{H} 1.06 ($J=6.4$ Hz). Se observa además la señal para el grupo metilo de un grupo acetilo a δ_{H} 2.04 (s, 3H), y la señal para un protón geminal a grupo oxigenado, a δ_{H} 4.48 (dd, $J=5.6$ Hz; 10.4 Hz), asignada a H-3. Otra señal destacada es la correspondiente a un protón vinílico δ_{H} 6.97 (dd, $J=2.5$ Hz; 6.5 Hz). El elevado desapantallamiento que se deduce del desplazamiento a campos tan bajos de la señal del protón vinílico, tal y como sucedía en el espectro de **T7a**, sólo puede justificarse por la presencia en su inmediata vecindad de algún grupo muy electronegativo, como puede ser el grupo ácido, lo que vuelve a reforzar lo comentado en los espectros de IR y de RMN de ^{13}C respecto a la situación del doble enlace en posición α respecto al grupo ácido. La elevada similitud entre los espectros de IR, RMN de ^{13}C y de ^1H de las sustancias **T7a** y **T8a**, nos hizo plantearnos la posibilidad de que esta última sustancia tuviera una estructura muy parecida a la de **T7a**, es decir, una estructura derivada del taraxasterol, con la diferencia de presentar un grupo ácido carboxílico donde **T7a** presentaba un grupo aldehído, y de poseer un único grupo acetilo en lugar de los dos que presentaba **T7a**.

La metilación de **T8a** con diazometano produjo el compuesto **T8b**, en cuyo espectro de RMN de ^1H (Tabla 24B) aparece un nuevo singulete a δ_{H} 3,72 (3H, s, COOMe), lo que confirma la presencia del grupo ácido en la estructura de la sustancia **T8**. En el espectro de IR de **T8b** no aparece la señal característica para grupo hidroxilo, lo que nos induce a pensar en la existencia en **T8** únicamente del grupo hidroxilo asociado al grupo ácido.

El análisis de los datos de RMN en 2D para **T8a** y **T8b** nos aportó pruebas adicionales acerca de la hipótesis planteada en el párrafo anterior sobre la estructura de esta sustancia. El estudio de las correlaciones del espectro HMBC de **T8a** (Figura 41b) nos permite confirmar la ubicación del doble enlace (e indirectamente del grupo ácido carboxílico) y el grupo acetilo dentro de esa estructura. Así, las señales de los dos metilos geminales (Me-23 y Me-24) situadas a δ_{H} 0.84 y 0.85 muestran una correlación con las señales de los carbonos C3, C4 y C5 (a δ_{C} 80.9, 38.4 y 55.4), lo que nos permite concluir que, al igual que en **T7a**, dichos metilos se debían situar en C4, y que el grupo acetilo debía situarse en C3. Estas correlaciones también se observan en el espectro

de HMBC del derivado metilado **T8b** lo que nos permite confirmar nuestra conclusión. El doble enlace lo ubicamos en el carbono 20 de la estructura al observar correlación entre la señal del metilo 29 (δ_H 1.06, d, $J=6.4$ Hz) con la señal del carbono 20 (δ_C 136.8), reforzada al observar una correlación HSQC entre el protón vinílico (δ_H 6.97, dd, $J=2.5$ Hz; 6.5 Hz) y el carbono 21 (δ_C 138.9), tanto en el espectro de **T8a** como en el de **T8b**.

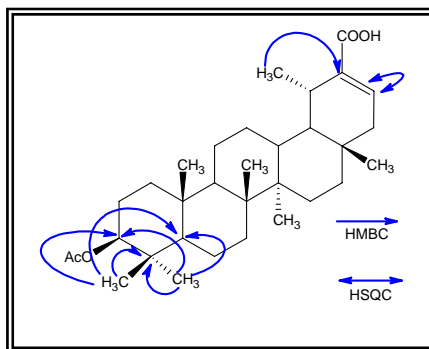


Figura 41a: Relaciones seleccionadas de HMBC y HSQC de la sustancia **T8a**

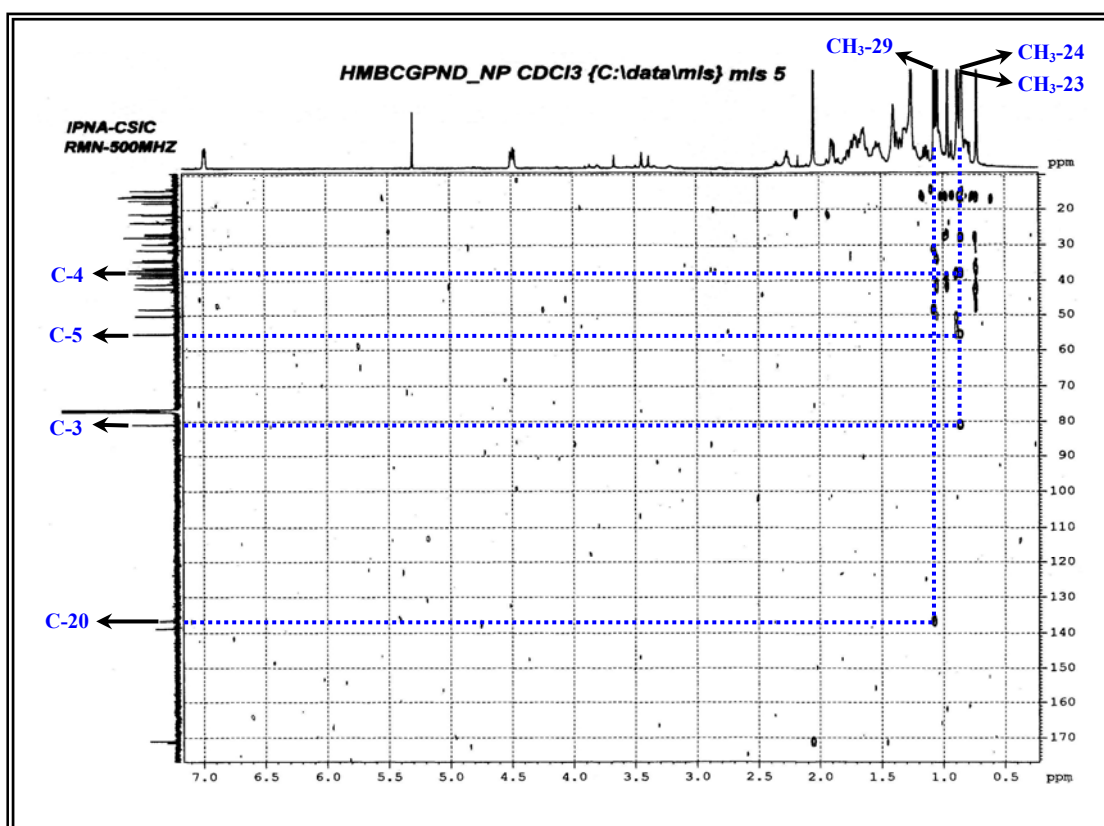


Figura 41b: Espectro de HMBC de la sustancia **T8a**

Por otro lado, en un experimento NOESY (Figuras 42b y 42c) pudimos deducir la configuración de **T8a**. La existencia de interacciones entre H-3 y CH₃-23, H-9 y CH₃-27, H-18 con CH₃-27 y CH₃-29, nos mostraron que los protones en 3, en 9 y en 18, y los metilos 23, 27 y 29 debían tener una orientación α en la estructura del compuesto. Por otro lado, las correlaciones de H-13 con CH₃-26 y CH₃-28, H-19 con CH₃-28, y de CH₃-25 con CH₃-24 y CH₃-26, nos permitieron deducir que los protones en 13 y en 19, el acetilo en 3, y los metilos 24, 25, 26 y 28 debían tener una orientación β .

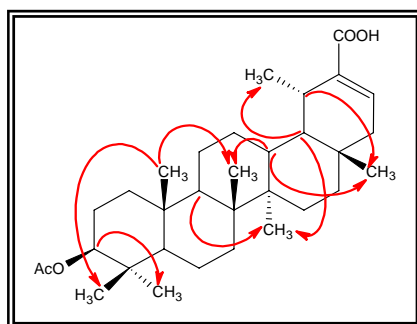


Figura 42a: Relaciones seleccionadas de NOESY de la sustancia **T8a**

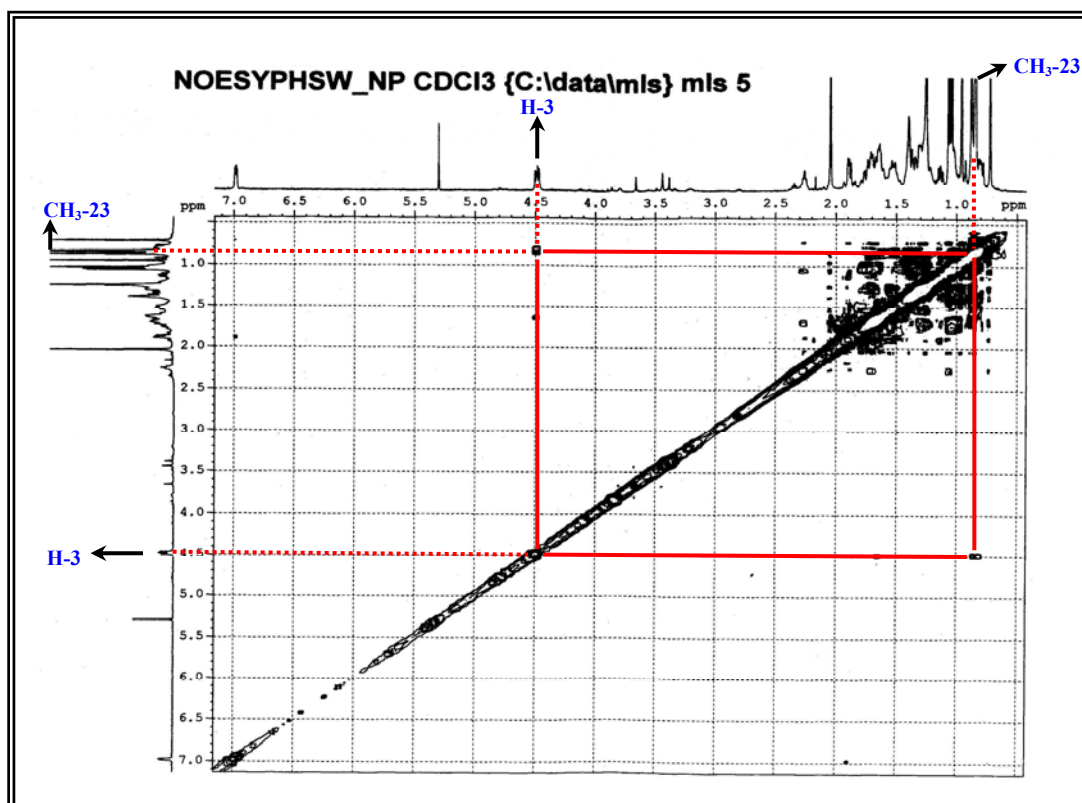


Figura 42b: Espectro de NOESY de la sustancia **T8a**

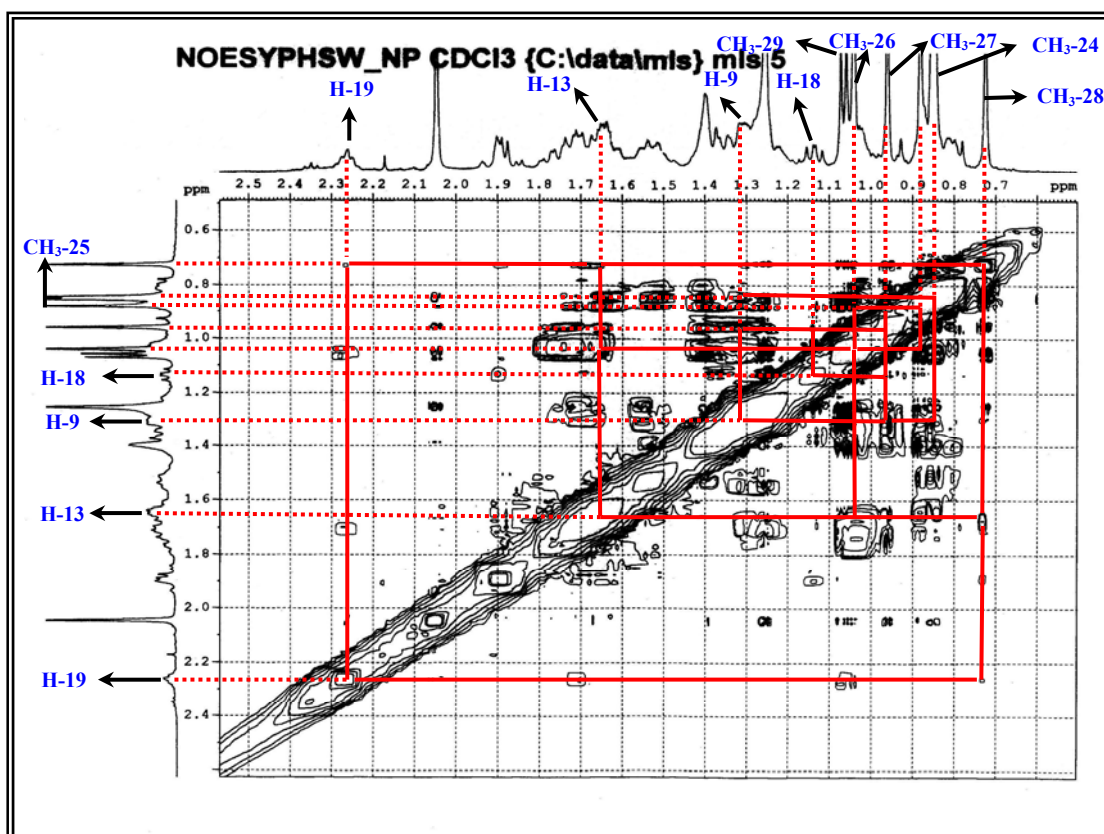
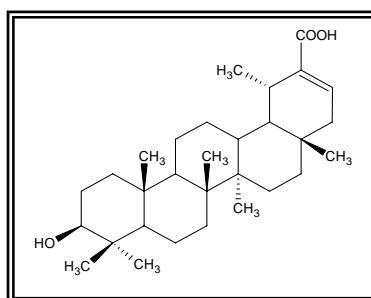


Figura 42c: Espectro de NOESY de la sustancia **T8a** (Ampliación)

Por lo tanto, los datos anteriores permiten deducir que la estructura de **T8a** se corresponde con la del **ácido 3 β -acetoxitaraxaster-20-en-30-óico**, siendo el producto natural de la planta objeto de estudio (**T8**) el **ácido 3 β -hidroxitaraxaster-20-en-30-óico**, no apareciendo descrito en la bibliografía consultada.



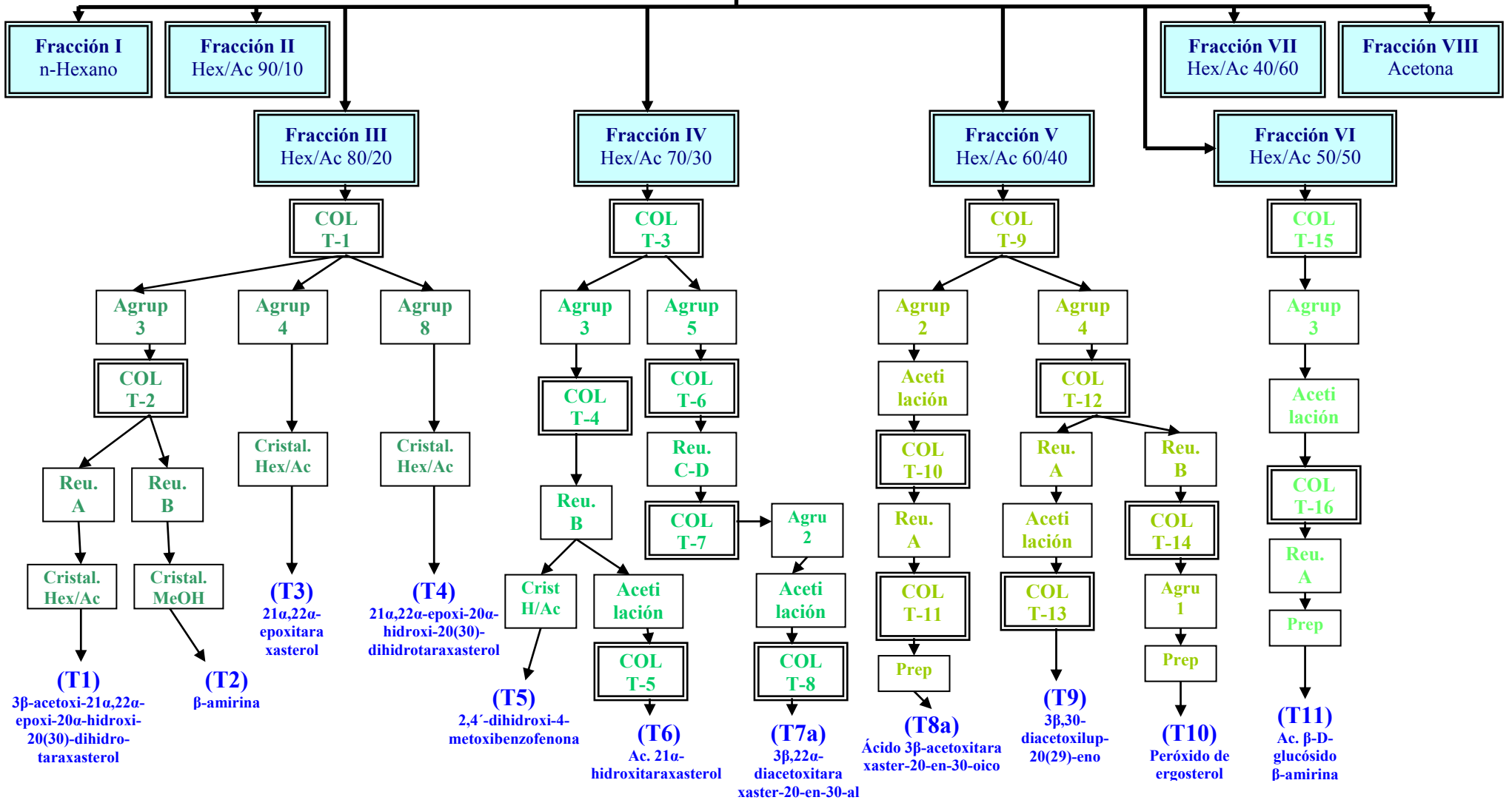
T8



3.5 *Tolpis* sp. Parte Experimental

Tolpis sp. (Parte Aérea)

COLUMNA T-0



Las partes aéreas de *Tolpis sp.* fueron recolectadas en Agosto de 1998, entre Tagoja y Fuente Olén (Santa Cruz de La Palma), a 1.300 metros sobre el nivel del mar, en un talud terroso de la carretera de Mirca a Roque de Los Muchachos en el dominio potencial del pinar canario. La recolección fue efectuada por el profesor Dr. Pedro Luis Pérez de Paz y un voucher espécimen (TFC 41627) fue depositado en el Herbario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de La Laguna (Tenerife). El material vegetal fue sometido a secado a temperatura ambiental y en entorno oscuro, dando un peso de 2.150 g de material seco. Posteriormente ese material fue triturado cuidadosamente y extraído con etanol en caliente en un aparato Soxhlet, hasta su total agotamiento. El extracto etanólico así obtenido se concentró por eliminación del disolvente a presión reducida, obteniendo un residuo viscoso oscuro con un peso de 298.8 gramos.

El extracto etanólico obtenido fue disuelto en acetona, para readsorberlo a continuación en gel de sílice (0,02-0,5 mm mallas), dando un material que se usó como cabeza de una columna húmeda de gel de sílice con el mismo grosor de grano, para lo cual se utilizó 0,9 Kg. de ésta última. Se utilizaron como eluyentes de la columna diferentes mezclas de n-hexano y acetato de etilo, con incremento de la concentración de acetato de etilo conforme se avanzaba en la cromatografía, comenzando por n-hexano puro, finalizando con acetona.

Se recogieron un total de 68 fracciones, de un litro cada una, que se fueron agrupando de acuerdo a su comportamiento en cromatografía de capa fina, en un total de 8 reuniones de fracciones (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII). A continuación presentamos los resultados obtenidos del estudio cromatográfico de cada una de ellas:

| FRACCIONES | ELUYENTES | SUSTANCIAS |
|------------|-------------------------------|-----------------------|
| I | n-hexano | ----- |
| II | n-hexano / acetato etilo 10 % | ----- |
| III | n-hexano / acetato etilo 20 % | T1, T2, T3, T4 |
| IV | n-hexano / acetato etilo 30 % | T5, T6, T7a |
| V | n-hexano / acetato etilo 40 % | T8, T9 |
| VI | n-hexano / acetato etilo 50 % | T10 |
| VII | n-hexano / acetato etilo 60 % | ----- |
| VIII | acetona | ----- |

Fracción III:

Esta fracción fue eluída de la cromatografía general con hexano-acetato de etilo (8:2), y tras ser concentrada a vacío dio un residuo que pesó 5.64 g. El extracto así obtenido fue sometido a cromatografía en columna empaquetada con gel de sílice (columna T-1), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (9:1), recogándose un total de 150 fracciones de 100 mL que se reunieron, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en nueve grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 9.

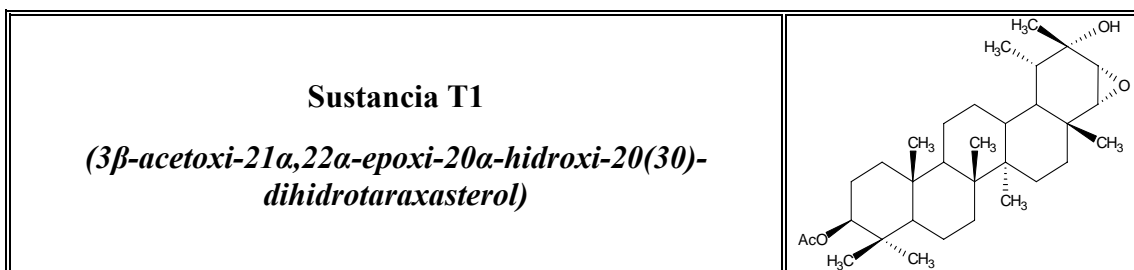
El agrupamiento 3 de la columna T-1, cuyo residuo concentrado a vacío pesó 0.86 g, fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna T-2) con n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogándose un total de 85 fracciones de 75 mL que fueron reunidas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cinco reuniones de fracciones nombradas de A a E.

La fracción A de la columna T-2 nos permitió la purificación de la sustancia **T1** (11 mg), mediante recristalización en n-hexano-acetato de etilo. La reunión B de la columna T-2 nos permitió la purificación de la sustancia **T2** (12 mg), mediante recristalización en metanol.

El agrupamiento 4 de la columna T-1 fue recristalizado en n-hexano-acetato de etilo, permitiéndonos purificar la sustancia **T3** (14 mg).

Por último, el agrupamiento 8 de la columna T-1 fue sometido a recristalización en n-hexano-acetato de etilo, consiguiendo la purificación de la sustancia **T4** (15 mg).

Los datos físicos y espectroscópicos de todas esas sustancias, así como las reacciones de formación de derivados y los datos de éstos, los exponemos a continuación.

**TABLA 18A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia T1**

| | |
|---|---|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de Fusión | 248-252°C (Hex/AcOEt). |
| [α]_D²⁰ | +25.5° (c. 0.038, CHCl ₃). |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3470, 2930, 2872, 2856, 1728, 1462, 1452, 1381, 1371, 1244, 1176.5, 1111, 1084, 1032, 1011, 980, 937, 868, 820, 756, 656, 611. |
| EM m/z (%): | 500 [M] ⁺ (33), 482 [M-H ₂ O] ⁺ (31), 466 [M-H ₂ O-CH ₃] ⁺ (9), 453 (11), 440 (25), 422 (15), 407 (11), 249 (17), 218 (18), 203 (32), 190 (37.5), 189 (100), 175 (30), 161 (26), 147 (25), 135 (51), 121 (51), 109 (38), 107 (48), 95 (55), 81 (23), 67 (25), 55 (40). |

TABLA 18B: R.M.N. ¹H de la Sustancia T1 (CDCl₃)

| N° | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|---------------|------------|-----------|-----------|-----|--------------|--------|-------|----------|
| 1 | ----- 1,50 | ----- m | ----- | --- 1H | 16 | 1,42 1,79 | m m | ----- | 1H 1H |
| 2 | 1,63 | m | ----- | 2H | 17 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3 | 4,47 | dd | 5,4; 10,8 | 1H | 18 | 1,36 | m | ----- | 1H |
| 4 | ----- | ----- | ----- | --- | 19 | 1,47 | m | ----- | 1H |
| 5 | 0,78 | m | ----- | 1H | 20 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 6 | 1,38 1,50 | m m | ----- | 1H 1H | 21 | 3,11 | d | 4,1 | 1H |
| 7 | 1,36 ----- | m ----- | ----- | 1H --- | 22 | 2,91 | d | 4,0 | 1H |
| 8 | ----- | ----- | ----- | --- | 23 | 0,85 | s | ----- | 3H |
| 9 | 1,32 | m | ----- | 1H | 24 | 0,84 | s | ----- | 3H |
| 10 | ----- | ----- | ----- | --- | 25 | 0,83 | s | ----- | 3H |
| 11 | ----- 1,47 | ----- m | ----- | --- 1H | 26 | 1,01 | s | ----- | 3H |
| 12 | 1,13 1,68 | m m | ----- | 1H 1H | 27 | 0,95 | s | ----- | 3H |
| 13 | 1,75 | m | ----- | 1H | 28 | 0,96 | s | ----- | 3H |
| 14 | ----- | ----- | ----- | --- | 29 | 1,03 | d | 7,6 | 3H |
| 15 | 1,13 ----- | m ----- | ----- | 1H --- | 30 | 1,29 | s | ----- | 3H |
| | | | | | OAc | 2,04 | s | ----- | 3H |

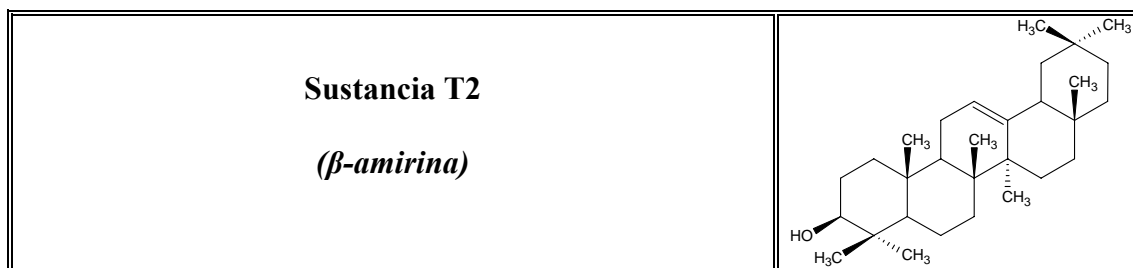
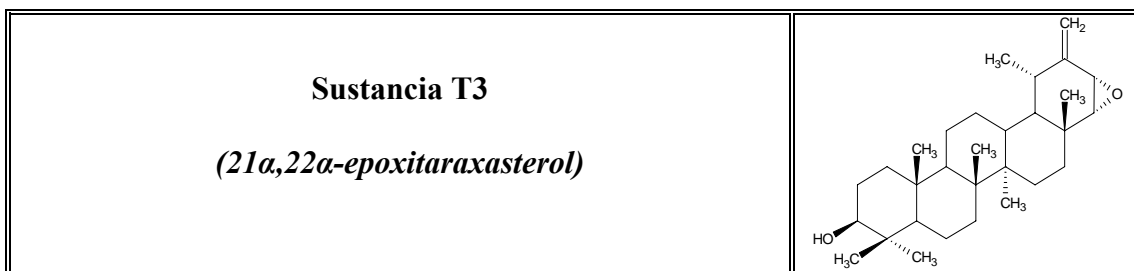


TABLA 19A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia T2

| | |
|--|---|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de Fusión | 195-201°C (MeOH). |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3423, 2918, 2850, 1689, 1460, 1376, 1242, 1032, 945, 721, 670. |
| MS m/z (%): | 426 [M] ⁺ (61), 408 [M-H ₂ O] ⁺ (44), 393 [M-H ₂ O-Me] ⁺ (14), 297 (6), 272 (8), 257 (9.5), 229 (19), 218 (66), 207 (60), 203 (34), 189 (100), 175 (31), 161 (30), 159 (21), 147 (28), 135 (60), 133 (37), 121 (70), 109 (54), 107 (55), 95 (64), 81 (44), 69 (37), 55 (37). |

TABLA 19B: R.M.N. ¹H de la Sustancia T2 (CDCl₃)

| Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------|------|-----------|------|----|------|------|-------|------|
| 1 | 0,89 | m | ---- | 1H | 16 | 1,14 | m | ---- | 1H |
| | 1,73 | m | ---- | 1H | | 1,31 | m | ---- | 1H |
| 2 | 1,60 | m | ---- | 2H | 17 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 3 | 3,20 | dd | 5,5; 10,7 | 1H | 18 | 1,39 | m | ---- | 1H |
| 4 | ---- | ---- | ---- | ---- | 19 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 5 | 0,70 | m | ---- | 1H | 20 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 6 | 1,39 | m | ---- | 1H | 21 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | 1,53 | m | ---- | 1H | | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 7 | 1,39 | m | ---- | 2H | 22 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 8 | ---- | ---- | ---- | ---- | 23 | 0,95 | s | ---- | 3H |
| 9 | 2,17 | s | ---- | 1H | 24 | 0,77 | s | ---- | 3H |
| 10 | ---- | ---- | ---- | ---- | 25 | 0,85 | s | ---- | 3H |
| 11 | ---- | ---- | ---- | ---- | 26 | 1,04 | s | ---- | 3H |
| 12 | 5,26 | d | 6,7 | 1H | 27 | 1,25 | s | ---- | 3H |
| 13 | ---- | ---- | ---- | ---- | 28 | 0,85 | s | ---- | 3H |
| 14 | ---- | ---- | ---- | ---- | 29 | 0,98 | s | ---- | 3H |
| 15 | ---- | ---- | ---- | ---- | 30 | 0,98 | s | ---- | 3H |
| | 1,68 | m | ---- | 1H | | | | | |

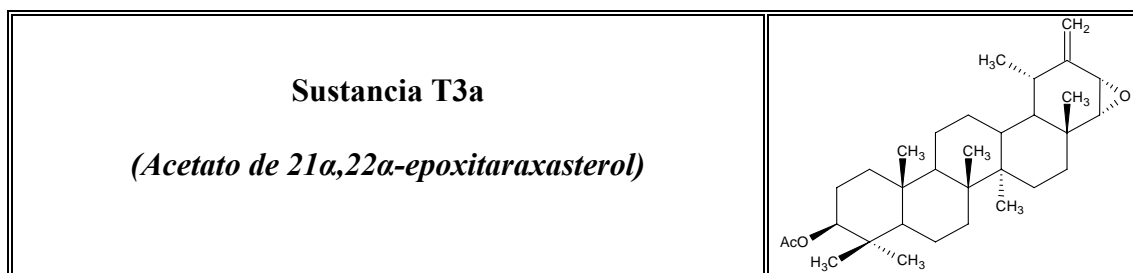
**TABLA 20A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia T3**

| | |
|--|---|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | 240-242°C (MeOH) |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3450, 2935, 2871, 1719, 1455, 1382, 1179, 1043, 987, 968, 887, 866, 813, 756, 646, 619. |
| MS m/z (%): | 440 [M] ⁺ (24), 422 [M-H ₂ O] ⁺ (20), 407 (14), 357 (27), 339 (16), 271 (7.5), 229 (9), 217 (12), 207 (85), 201 (17), 191 (24), 189 (100), 187 (48), 175 (30), 161 (34), 149 (34), 147 (30), 135 (86), 121 (69.5), 109 (63), 107 (70), 95 (77), 81 (77), 69 (64), 55 (64.5). |

TABLA 20B: R.M.N. ¹H de la Sustancia T3 (CDCl₃)

| N° | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------|------|-----------|------|----|------|------|-------|------|
| 1 | 0,89 | m | ---- | 1H | 16 | 1,19 | m | ---- | 1H |
| | 1,73 | m | ---- | 1H | | 1,73 | m | ---- | 1H |
| 2 | ---- | ---- | ---- | ---- | 17 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | 1,67 | m | ---- | 1H | | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 3 | 3,20 | dd | 5,1; 10,7 | 1H | 18 | 1,40 | m | ---- | 1H |
| 4 | ---- | ---- | ---- | ---- | 19 | 2,01 | m | ---- | 1H |
| 5 | 0,71 | m | ---- | 1H | 20 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 6 | ---- | ---- | ---- | ---- | 21 | 3,47 | d | 4,6 | 1H |
| | 1,43 | m | ---- | 1H | | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 7 | ---- | ---- | ---- | ---- | 22 | 2,91 | d | 4,6 | 1H |
| | 1,38 | m | ---- | 1H | | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 8 | ---- | ---- | ---- | ---- | 23 | 0,84 | s | ---- | 3H |
| 9 | 1,29 | m | ---- | 1H | 24 | 0,77 | s | ---- | 3H |
| 10 | ---- | ---- | ---- | ---- | 25 | 0,84 | s | ---- | 3H |
| 11 | ---- | ---- | ---- | ---- | 26 | 1,02 | s | ---- | 3H |
| 12 | ---- | ---- | ---- | ---- | 27 | 0,95 | s | ---- | 3H |
| 13 | ---- | ---- | ---- | ---- | 28 | 0,81 | s | ---- | 3H |
| 14 | ---- | ---- | ---- | ---- | 29 | 1,05 | d | 6,8 | 3H |
| 15 | ---- | ---- | ---- | ---- | 30 | 4,87 | s | ---- | 1H |
| | 1,76 | m | ---- | 1H | | 5,06 | s | ---- | 1H |

Acetilación de T3: El compuesto **T3** (8 mg) se disolvió en piridina (1 mL) y anhídrido acético (2 mL), y la solución fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente. El producto se secó a vacío para conseguir el compuesto **T3a** (5 mg) como una sustancia cristalina incolora.

**TABLA 21A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia T3a**

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | 254-258°C (Hex/AcOEt) |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 2992, 2938, 1729, 1453, 1372, 1245, 1016, 980, 934, 886, 866, 821, 655. |
| MS m/z (%): | 482 [M] ⁺ (11), 422 [M-60] ⁺ (15), 407 [M-60- Me] ⁺ (14), 339 (16), 271 (4), 229 (5), 217 (9), 203 (24.5), 191 (22), 189 (100), 187 (32), 175 (22), 161 (22), 149 (18), 147 (18), 135 (49), 121 (39), 109 (28), 107 (34), 95 (36), 81 (30), 69 (36), 55 (20). |

TABLA 21B: R.M.N. ¹H de la Sustancia T3a (CDCl₃)

| Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|---------------|------------|-----------|------------|-----|--------------|--------|-------|----------|
| 1 | ----- 1,72 | ----- m | ----- | ---- 1H | 16 | 1,19 1,72 | m m | ----- | 1H 1H |
| 2 | ----- 1,66 | ----- m | ----- | ---- 1H | 17 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3 | 4,47 | dd | 5,4; 10,0 | 1H | 18 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ---- | 19 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 5 | ----- | ----- | ----- | ---- | 20 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 6 | ----- | ----- | ----- | ---- | 21 | 3,46 | d | 4,2 | 1H |
| 7 | ----- 1,38 | ----- m | ----- | ---- 1H | 22 | 2,90 | d | 4,2 | 1H |
| 8 | ----- | ----- | ----- | ---- | 23 | 0,84 | s | ----- | 3H |
| 9 | 1,30 | m | ----- | 1H | 24 | 0,80 | s | ----- | 3H |
| 10 | ----- | ----- | ----- | ---- | 25 | 0,86 | s | ----- | 3H |
| 11 | ----- 1,58 | ----- m | ----- | ---- 1H | 26 | 1,02 | s | ----- | 3H |
| 12 | ----- 1,55 | ----- m | ----- | ---- 1H | 27 | 0,94 | s | ----- | 3H |
| 13 | 1,62 | m | ----- | 1H | 28 | 0,84 | s | ----- | 3H |
| 14 | ----- | ----- | ----- | ---- | 29 | 1,04 | d | 7,2 | 3H |
| 15 | ----- 1,75 | ----- m | ----- | ---- 1H | 30 | 4,86 5,05 | s s | ----- | 1H 1H |
| | | | | | OAc | 2,04 | s | ----- | 3H |

Sustancia T4: Sólido cristalino. Constantes físicas y espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **21 α ,22 α -epoxi-20 α -hidroxi-20(30)-dihidrotaraxasterol (W9**, ver página 83).

Fracción IV:

Esta fracción se eluyó de la cromatografía general con hexano-acetato de etilo (7:3), y tras su concentración a vacío dio un residuo que pesó 2.70 g. El extracto obtenido fue sometido a continuación a cromatografía en columna empaquetada con gel de sílice (columna T-3), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogiendo un total de 100 fracciones de 100 mL que fueron reunidas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en seis grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 6.

El agrupamiento 3 de la columna T-3, cuyo residuo concentrado a vacío pesó 0.466 g, fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna T-4) con n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogiendo un total de 45 fracciones de 75 mL que fueron agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cinco reuniones de fracciones nombradas de A a E.

La fracción B de la columna T-4 se sometió a un proceso de recristalización en n-hexano-acetato de etilo, consiguiendo la purificación de la sustancia **T5** (8 mg). Las aguas madres de esa fracción B (125 mg) fueron disueltas en piridina (3 mL) y anhídrido acético (6 mL). La solución resultante fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente, siendo recuperada de la manera habitual. El extracto acetilado de la mencionada reunión B de la columna T-4 se sometió a continuación a un proceso de cromatografía en columna de media presión (columna T-5), con n-hexano-acetato de etilo (9,5:0,5) como eluyente, lo que nos permitió separar la sustancia **T6** (14 mg).

El agrupamiento 5 de la columna T-3, que dio un residuo tras su concentración a vacío que pesó 1,365 g, fue sometido a tratamiento mediante cromatografía en columna de media presión (columna T-6) con n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogiendo un total de 125 fracciones de 100 mL que fueron agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cinco reuniones de fracciones nombradas de A a E.

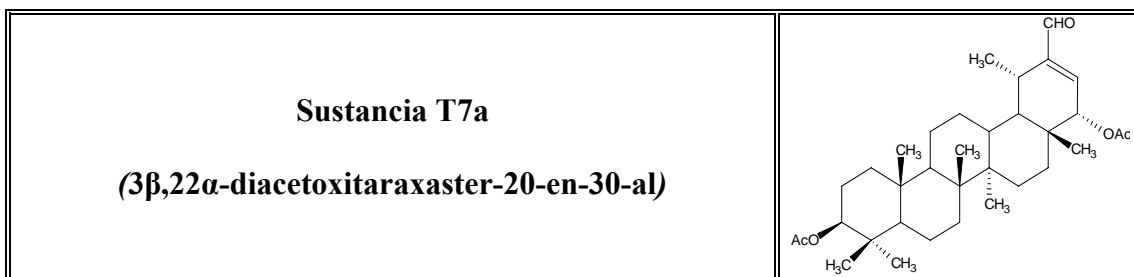
Las fracciones C y D de la columna T-6 (0,375 g) fueron sometidos a una nueva cromatografía en columna de media presión (columna T-7) con n-hexano-acetato de etilo (9:1), recogiendo 160 fracciones de 75 mL, reunidas en cinco agrupamientos

de fracciones tras su análisis en cromatografía en capa fina. El segundo de estos agrupamientos, cuyo residuo pesó 95 mg al ser concentrado a vacío, se disolvió en piridina (3 mL) y anhídrido acético (6 mL), y la solución resultante fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente, siendo recuperada de la manera habitual. El tratamiento del extracto acetilado en cromatografía en columna de media presión (columna T-8) con n-hexano-acetato de etilo (9,5:0,5), nos permitió purificar la sustancia **T7a** (14 mg).

Los datos físicos y espectroscópicos de todas esas sustancias los exponemos a continuación.

Sustancia T5: Sólido cristalino. Constantes físicas y espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **2,4'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona (W4**, ver página 77).

Sustancia T6: Sólido cristalino. Constantes físicas y espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **acetato del 21 α -hidroxitaraxasterol (W7a**, ver página 81).

**TABLA 22A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia T7a**

| | |
|---|--|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | 230-235°C (Hex/AcOEt) |
| UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm | 224,0; 280,0 |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 2941, 1734, 1691, 1648, 1541, 1457, 1371, 1242, 1020, 981, 756, 669. |
| MS m/z (%): | 540 [M] ⁺ (15), 496 [M-44] ⁺ (6), 480 [M-60] ⁺ (74), 465 [M-60-15] ⁺ (19), 437 (19), 428 (16), 420 [M-120] ⁺ (13), 235 (23), 203 (17), 189 (96), 173 (27), 161 (21), 159 (24), 149 (73), 136 (75), 121 (62), 107 (59), 95 (85), 81 (79), 69 (100), 55 (90). |

TABLA 22B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia T7a (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|--------------|--------|-------|----------|-----|--------------------------------|--------------|--------|-------|----------|
| 1 | 38,2 | 1,72 | m | ---- | 2H | 16 | 29,5 | 1,03 | m | ---- | 1H |
| 2 | 26,2 | 1,55 1,62 | m m | ---- | 1H 1H | 17 | 37,0 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 3 | 80,7 | 4,50 | m | ---- | 1H | 18 | 40,8 | 1,53 | m | ---- | 1H |
| 4 | 37,6 | ---- | ---- | ---- | --- | 19 | 29,2 | 2,27 | m | ---- | 1H |
| 5 | 55,1 | ---- | ---- | ---- | --- | 20 | 151,2 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 6 | 17,9 | 1,38 1,53 | m m | ---- | 1H 1H | 21 | 141,9 | 6,80 | d | 6,2 | 1H |
| 7 | 33,9 | 1,41 | m | ---- | 2H | 22 | 74,2 | 4,77 | d | 6,3 | |
| 8 | 41,9 | ---- | ---- | ---- | --- | 23 | 15,7 | 0,85 | s | ---- | 3H |
| 9 | 50,0 | 1,29 | m | ---- | 1H | 24 | 27,7 | 0,98 | s | ---- | 3H |
| 10 | 36,8 | ---- | ---- | ---- | --- | 25 | 16,3 | 0,86 | s | ---- | 3H |
| 11 | 23,4 | 1,33 1,57 | m m | ---- | 1H 1H | 26 | 16,1 | 1,03 | s | ---- | 3H |
| 12 | 29,2 | 1,29 1,76 | m m | ---- | 1H 1H | 27 | 14,3 | 0,99 | s | ---- | 3H |
| 13 | 38,0 | 1,74 | m | ---- | 1H | 28 | 17,5 | 0,67 | s | ---- | 3H |
| 14 | 40,9 | ---- | ---- | ---- | --- | 29 | 23,4 | 1,07 | d | 6,5 | 3H |
| 15 | 26,9 | 1,14 1,80 | m m | ---- | 1H 1H | 30 | 194,3 | 9,47 | s | ---- | 1H |
| | | | | | | OAc | 21,1 21,1 170,9 170,9 | 2,05 2,09 | s s | ---- | 3H 3H |

Fracción V:

Esta fracción fue eluída de la cromatografía general con hexano-acetato de etilo (6:4), y tras su concentración a vacío dio un residuo que pesó 6,62 g. El extracto obtenido fue sometido a continuación a cromatografía en columna empaquetada con gel de sílice (columna T-9), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogiendo un total de 65 fracciones de 100 mL que fueron reunidas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en seis grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 6.

El agrupamiento 2 de la columna T-9, cuyo residuo pesó 0,439 g tras su concentración a vacío, se disolvió en piridina (4 mL) y anhídrido acético (8 mL), y la solución resultante fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente, siendo recuperada de la manera habitual. El extracto acetilado fue sometido seguidamente a cromatografía en columna de media presión (columna T-10) con n-hexano-acetato de etilo (8,5:1,5), recogiendo un total de 65 fracciones de 100 mL que, tras su análisis en cromatografía en capa fina, fueron agrupadas en tres reuniones de fracciones nombradas de A a C.

La fracción A de la columna T-10 fue concentrada a vacío y generó un residuo que pesó 0,120 g. Este residuo fue tratado a continuación mediante cromatografía en columna de media presión (columna T11) utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (9:1), recogiendo un total de 135 fracciones de 75 mL que se agruparon, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cinco grupos. El cuarto de estos agrupamientos nos permitió obtener la sustancia **T8a** (11 mg) mediante purificación con cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando n-hexano-acetato de etilo (7:3) como eluyente y tres eluciones.

El agrupamiento 4 de la columna T-9, cuyo residuo pesó 0,771 g tras su concentración a vacío, fue sometido a cromatografía en columna de media presión (columna T-12) con n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogiendo un total de 70 fracciones de 100 mL que, tras su análisis en cromatografía en capa fina, fueron reunidas en tres grupos nombrados de A a C.

La reunión A de la columna T-12 (0,354 g) fue disuelta en piridina (4 mL) y anhídrido acético (8 mL), y la solución resultante fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente, siendo recuperada de la manera habitual. El extracto acetilado fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna T-13) con n-hexano-acetato de etilo (8:2), lo que nos permitió obtener purificada la sustancia **T9** (12 mg).

La reunión B de la columna T-12 (0,258 g) se sometió a un proceso de cromatografía en columna de media presión (columna T-14), con n-hexano-acetato de etilo (8,5:1,5) como eluyente, recogiendo 110 fracciones de 50 mL, que se reunieron en cinco grupos tras su estudio en cromatografía en capa fina. El primer agrupamiento de la columna T-14 nos permitió obtener la sustancia **T10** (14 mg) por purificación con cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando benceno-acetato de etilo (8:2) como eluyente y tres eluciones.

Los datos físicos y espectroscópicos de todas esas sustancias los exponemos a continuación.

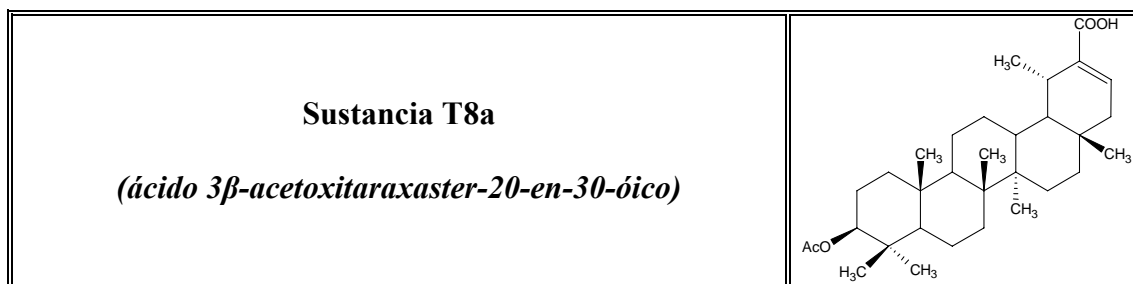


TABLA 23A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia T8a

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido amorfo. |
| [α]_D²⁰ | +60° (c. 0.24; CHCl ₃). |
| IR (KBr) ν máx (cm⁻¹): | 3000, 2940, 2871, 1735.5, 1676, 1640, 1456, 1421, 1367, 1245, 1110, 1076, 1030, 980, 755, 659. |
| HREIMS: | [M] ⁺ a m/z 498.3688 (calculado para C ₃₂ H ₅₀ O ₄ 498.3709). |
| MS m/z (%): | 498 [M] ⁺ (5), 438 [M-60] ⁺ (70), 423 [M-60-15] ⁺ (28), 405 (9), 395 [M-60-15-28] ⁺ (22), 356 (11), 259 (6), 232 (6), 219 (13), 204 (14), 189 (100), 175 (21), 161 (17), 147 (18), 136 (58), 121 (40), 107 (38), 95 (42), 81 (37), 69 (35), 55 (35). |

TABLA 23B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia T8a (CDCl₃)

| Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------|--------------|--------|-----------|----------|-----|---------------|-------|-------|-----------|-------|
| 1 | 38,4 | 1,75 | m | ----- | 2H | 16 | 37,2 | 1,30 | m | ----- | 1H |
| 2 | 23,7 | 1,63 | m | ----- | 2H | 17 | 34,1 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3 | 80,9 | 4,48 | dd | 5,6; 10,4 | 1H | 18 | 48,3 | 1,13 | dd | 8,1; 10,6 | 1H |
| 4 | 38,4 | ----- | ----- | ----- | --- | 19 | 29,7 | 2,26 | m | ----- | 1H |
| 5 | 55,4 | 0,79 | m | ----- | 1H | 20 | 136,8 | ----- | ----- | ----- | --- |
| 6 | 18,2 | 1,39 1,55 | m m | ----- | 1H 1H | 21 | 138,9 | 6,97 | dd | 2,5; 6,5 | 1H |
| 7 | 34,5 | 1,39 | m | ----- | 2H | 22 | 42,4 | 1,89 | m | ----- | 2H |
| 8 | 40,9 | ----- | ----- | ----- | --- | 23 | 28,0 | 0,85 | s | ----- | 3H |
| 9 | 50,3 | 1,30 | m | ----- | 1H | 24 | 16,5 | 0,84 | s | ----- | 3H |
| 10 | 37,0 | ----- | ----- | ----- | --- | 25 | 16,3 | 0,88 | s | ----- | 3H |
| 11 | 21,3 | 1,55 | m | ----- | 2H | 26 | 16,0 | 1,04 | s | ----- | 3H |
| 12 | 26,9 | 1,04 1,77 | m m | ----- | 1H 1H | 27 | 14,7 | 0,96 | s | ----- | 3H |
| 13 | 39,0 | 1,65 | m | ----- | 1H | 28 | 17,5 | 0,72 | s | ----- | 3H |
| 14 | 42,3 | ----- | ----- | ----- | --- | 29 | 23,7 | 1,06 | d | 6,4 | 3H |
| 15 | 27,3 | 1,69 1,04 | m m | ----- | 2H | 30 | 171,5 | ----- | ----- | ----- | 1H |
| | | | | | | OAc | 21,3 171,0 | 2,04 | s | ----- | 3H |

Metilación del Compuesto T8a: Al compuesto T8a (6 mg) en dietil éter (5 mL) se le añadió un exceso de diazometano en dietil éter, recién preparado, y la mezcla se

mantuvo a temperatura ambiente durante 12 h. La concentración de la mezcla de reacción a vacío produjo el compuesto **T8b** (7 mg), como sólido amorfo.

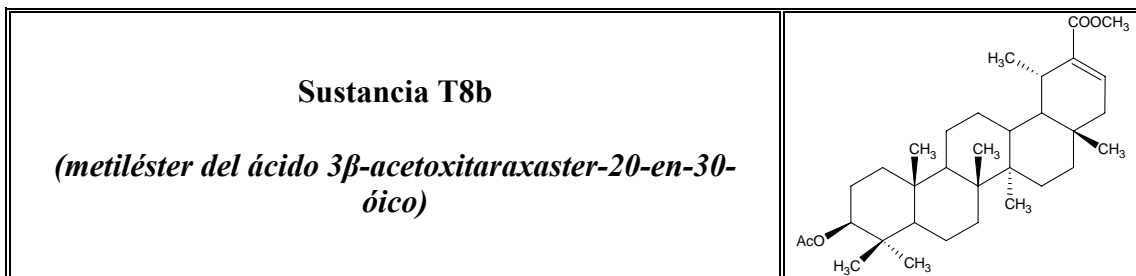
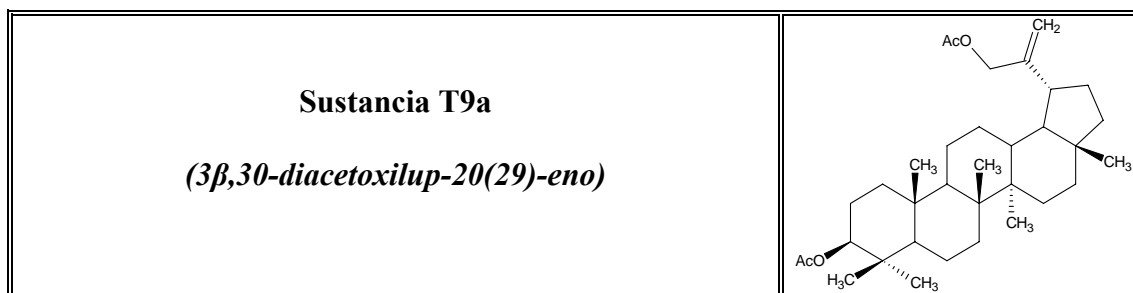


TABLA 24A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia T8b

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido amorfo. |
| $[\alpha]_D^{20}$ | +13.5° (c. 0.20; CHCl ₃). |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 2932, 1725, 1709, 1645, 1557, 1456, 1436, 1382, 1248, 1188, 1076, 1040, 1018, 982. |
| MS m/z (%): | 512 [M] ⁺ (1), 452 [M-60] ⁺ (19), 437 [M-60-15] ⁺ (8), 409 [M-60-15-28] ⁺ (7), 392 (10), 333 (7), 256 (13), 242 (45), 227 (49), 185 (100), 157 (13), 135 (25), 121 (15), 105 (18), 91 (18), 81 (19), 69 (16), 55 (20). |

TABLA 24B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia T8b (CDCl₃)

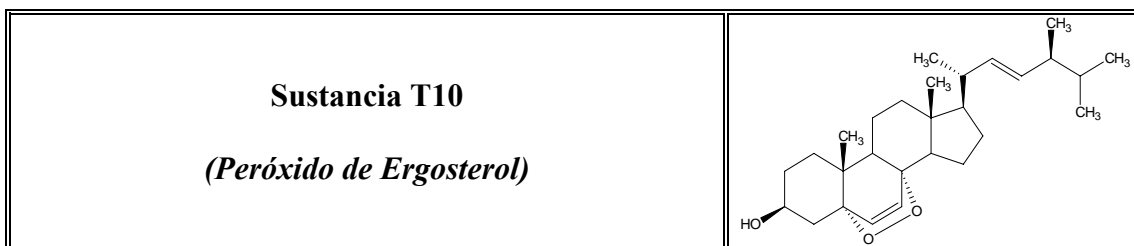
| Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|-----|------|--------------|--------|----------|----------|-----|---------------|------|------|----------|------|
| 1 | 38,4 | 1,75 | m | ---- | 2H | 16 | 36,5 | 1,32 | m | ---- | 1H |
| 2 | 23,7 | 1,66 | m | ---- | 2H | 17 | 34,1 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 3 | 80,9 | 4,48 | dd | 5,4;10,6 | 1H | 18 | 48,4 | 1,14 | dd | 8,1;10,6 | 1H |
| 4 | 38,4 | ---- | ---- | ---- | --- | 19 | 29,6 | 2,26 | m | ---- | 1H |
| 5 | 55,4 | 0,81 | m | ---- | 1H | 20 | 137,6 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 6 | 18,1 | 1,42 1,55 | m m | ---- | 1H 1H | 21 | 136,0 | 6,80 | dd | 2,6;6,9 | 1H |
| 7 | 34,5 | 1,40 | m | ---- | 2H | 22 | 42,2 | 1,89 | m | ---- | 2H |
| 8 | 41,0 | ---- | ---- | ---- | --- | 23 | 27,9 | 0,85 | s | ---- | 3H |
| 9 | 50,3 | 1,32 | m | ---- | 1H | 24 | 16,4 | 0,84 | s | ---- | 3H |
| 10 | 37,0 | ---- | ---- | ---- | --- | 25 | 16,3 | 0,88 | s | ---- | 3H |
| 11 | 21,4 | 1,55 | m | ---- | 2H | 26 | 16,0 | 1,04 | s | ---- | 3H |
| 12 | 26,9 | 1,04 1,77 | m m | ---- | 1H 1H | 27 | 14,7 | 0,96 | s | ---- | 3H |
| 13 | 39,0 | 1,65 | m | ---- | 1H | 28 | 17,5 | 0,72 | s | ---- | 3H |
| 14 | 42,2 | ---- | ---- | ---- | --- | 29 | 23,8 | 1,20 | d | 6,4 | 3H |
| 15 | 27,3 | 1,04 1,69 | m m | ---- | 1H 1H | 30 | 168,0 | ---- | ---- | ---- | 1H |
| OMe | 51,3 | 3,72 | s | ---- | 3H | OAc | 21,3 171,0 | 2,04 | s | ---- | 3H |

**TABLA 25A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia T9a**

| | |
|---|---|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | 115-120°C (Hex/AcOEt) |
| IR (KBr) ν máx (cm⁻¹): | 2925, 2854, 1737, 1461, 1371, 1244, 1029, 980, 900. |
| MS m/z (%): | 526 [M] ⁺ (18), 466 [M-60] ⁺ (60), 451 [M-60-Me] ⁺ (23), 423 (9), 391 (9), 357 (15), 297 (10), 276 (16), 262 (11), 249 (22), 229 (10), 216 (25), 203 (46), 189 (100), 175 (27), 173 (21), 161 (27), 159 (21), 149 (62), 147 (36), 135 (61), 133 (37), 121 (57), 119 (39.5), 109 (39), 107 (54), 95 (53), 93 (45), 81 (55), 69 (55), 55 (36). |

TABLA 25B: R.M.N. ¹H de la Sustancia T9a (CDCl₃)

| N° | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|------|----------|------|-----|------------|------|-------|------|
| 1 | 0,89 | m | ---- | 1H | 17 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | 1,65 | m | ---- | 1H | | | | | |
| 2 | 1,62 | m | ---- | 2H | 18 | 1,48 | m | ---- | 1H |
| 3 | 4,50 | dd | 6,0; 9,0 | 1H | 19 | 2,31 | m | ---- | 1H |
| 4 | ---- | ---- | ---- | ---- | 20 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 5 | ---- | ---- | ---- | ---- | 21 | 1,33 | m | ---- | 1H |
| | ---- | ---- | ---- | ---- | | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 6 | 1,40 | m | ---- | 1H | 22 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | 1,54 | m | ---- | 1H | | 1,40 | m | ---- | 1H |
| 7 | 1,40 | m | ---- | 2H | 23 | 0,86 | s | ---- | 3H |
| 8 | ---- | ---- | ---- | ---- | 24 | 0,85 | s | ---- | 3H |
| 9 | ---- | ---- | ---- | ---- | 25 | 0,84 | s | ---- | 3H |
| 10 | ---- | ---- | ---- | ---- | 26 | 1,04 | s | ---- | 3H |
| 11 | 1,21 | m | ---- | 1H | 27 | 0,95 | s | ---- | 3H |
| | 1,44 | m | ---- | 1H | | | | | |
| 12 | 1,08 | m | ---- | 1H | 28 | 0,79 | s | ---- | 3H |
| | 1,44 | m | ---- | 1H | | | | | |
| 13 | 1,65 | m | ---- | 1H | 29 | 4,93 | s | ---- | 1H |
| | ---- | ---- | ---- | ---- | | 4,96 | s | ---- | 1H |
| 14 | ---- | ---- | ---- | ---- | 30 | 4,56 | s | ---- | 2H |
| 15 | 1,01 | m | ---- | 1H | OAc | 2,05 | s | ---- | 3H |
| | 1,69 | m | ---- | 1H | | 2,11 | s | ---- | 3H |
| 16 | 1,40 | m | ---- | 1H | | | | | |
| | 1,49 | m | ---- | 1H | | | | | |

**TABLA 26A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia T10**

| | |
|---|--|
| Estado: | Aceite incoloro. |
| IR (film) v máx (cm⁻¹): | 3418, 2955, 2925, 2854, 1731, 1462, 1378, 1246, 1074, 1043, 969. |
| MS m/z (%): | 428 [M] (12), 410 [M-H ₂ O] ⁺ (19), 396 [M-O ₂] ⁺ (39), 394 (25.5), 392 (11.5), 376 (27), 363 (16), 303 (8), 301 (7), 285 (12), 267 (15), 251 (53), 249 (15), 235 (7), 209 (13.5), 197 (16), 152 (15), 145 (15), 135 (16), 133 (16), 121 (18), 119 (18), 109 (26), 107 (27.5), 95 (36), 81 (52), 69 (100), 55 (75). |

TABLA 26B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia T10 (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|-------|---------------|------------|-------|-------------|----|-------|---------------|------------|-------|----------------|
| 1 | 34,7 | ----- 1,82 | ----- m | ----- | ----- 1H | 15 | 20,6 | 1,48 1,70 | m m | ----- | 1H 1H |
| 2 | 30,1 | 1,48 1,84 | m m | ----- | 1H 1H | 16 | 28,6 | ----- 1,70 | ----- m | ----- | --- - 1H |
| 3 | 66,4 | 3,97 | m | ----- | 1H | 17 | 56,2 | --- | --- | --- | --- |
| 4 | 36,9 | 2,08 2,18 | m m | ----- | 1H 1H | 18 | 12,8 | 0,82 | s | ----- | 3H |
| 5 | 82,1 | --- | --- | --- | --- | 19 | 18,1 | 0,89 | s | ----- | 3H |
| 6 | 135,4 | 6,50 | d | 8,6 | 1H | 20 | 39,7 | ----- | ----- | ----- | --- - |
| 7 | 130,7 | 6,26 | d | 8,4 | 1H | 21 | 20,9 | 1,00 | d | 6,6 | 3H |
| 8 | 79,4 | ----- | ----- | ----- | ----- | 22 | 135,2 | 5,18 | m | ----- | 2H |
| 9 | 51,1 | 2,04 | m | ----- | 1H | 23 | 132,3 | | | | |
| 10 | 36,9 | ----- | ----- | ----- | ----- | 24 | 42,8 | --- | --- | --- | --- |
| 11 | 23,4 | 1,48 1,59 | m m | ----- | 1H 1H | 25 | 33,0 | --- | --- | --- | --- |
| 12 | 39,3 | 1,15 2,01 | m m | ----- | 1H 1H | 26 | 19,6 | 0,84 | d | 6,8 | 6H |
| 13 | 44,5 | ----- | ----- | ----- | ----- | 27 | 19,9 | | | | |
| 14 | 51,7 | 1,13 | m | ----- | 1H | 28 | 17,5 | 0,91 | d | 6,8 | 3H |

Acetilación de T10: El compuesto **T10** (8 mg) se disolvió en piridina (1 mL) y anhídrido acético (2 mL), y la solución fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente. El producto se secó a vacío para conseguir el compuesto **T10a** (6 mg) como un aceite incoloro.

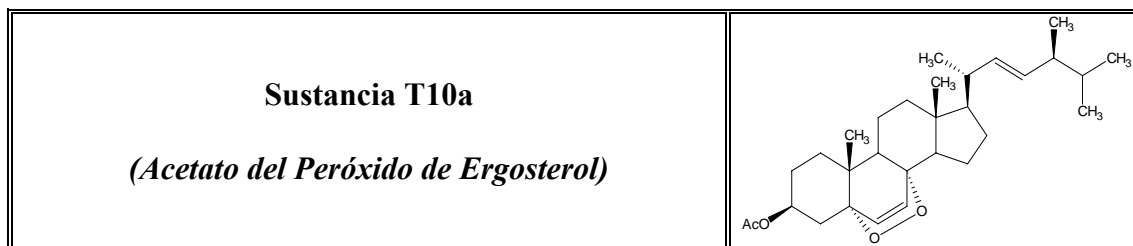


TABLA 27A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia T10a

| | |
|---|--|
| Estado: | Aceite incoloro. |
| IR (film) v máx (cm⁻¹): | 2957, 2876, 1732, 1462, 1373, 1244, 1175, 1074, 1030, 966, 756, 667, 609. |
| MS m/z (%): | 410 [M-60] ⁺ (6), 348 (10), 336 (32), 310 (6.5), 294 (12), 279 (12), 267 (12), 251 (22), 249 (19), 235 (20), 221 (12), 209 (28), 195 (55), 181 (19), 165 (21), 157 (25), 149 (56), 133 (23), 121 (26), 105 (42), 95 (49), 81 (71), 69 (66), 55 (100). |

TABLA 27B: R.M.N. ¹H de la Sustancia T10a (CDCl₃)

| Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------|------|-------|------|-----|------|------|-------|------|
| 1 | 1,04 | m | ---- | 1H | 16 | 1,70 | m | ---- | 1H |
| | 1,82 | m | ---- | 1H | | | | | |
| 2 | 1,48 | m | ---- | 1H | 17 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | 1,82 | m | ---- | 1H | | | | | |
| 3 | 4,99 | m | ---- | 1H | 18 | 0,82 | s | ---- | 3H |
| 4 | 2,11 | m | ---- | 1H | 19 | 0,90 | s | ---- | 3H |
| | 2,16 | m | ---- | 1H | | | | | |
| 5 | ---- | ---- | ---- | ---- | 20 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 6 | 6,50 | d | 8,5 | 1H | 21 | 1,00 | d | 6,6 | 3H |
| 7 | 6,23 | d | 8,4 | 1H | 22 | 5,17 | d | 8,6 | 1H |
| 8 | ---- | ---- | ---- | ---- | 23 | 5,20 | d | 7,0 | 1H |
| 9 | 2,05 | m | ---- | 1H | 24 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 10 | ---- | ---- | ---- | ---- | 25 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 11 | 1,46 | m | ---- | 1H | 26 | 0,83 | d | 7,6 | 6H |
| | 1,59 | m | ---- | 1H | | | | | |
| 12 | 1,14 | m | ---- | 1H | 27 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 13 | ---- | ---- | ---- | ---- | 28 | 0,91 | d | 6,8 | 3H |
| 14 | 1,14 | m | ---- | 1H | OAc | 2,01 | s | ---- | 3H |
| 15 | 1,48 | m | ---- | 1H | | | | | |
| | 1,70 | m | ---- | 1H | | | | | |

Fracción VI:

Esta fracción se eluyó de la cromatografía general con hexano-acetato de etilo (5:5), y tras su concentración a vacío dio un residuo que pesó 4,48 g. El extracto obtenido fue sometido a continuación a cromatografía en columna empaquetada con gel de sílice (columna T-15), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (7:3), recogiendo un total de 80 fracciones de 100 mL que fueron reunidas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en seis grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 6.

El agrupamiento 3 de la columna T-15, cuyo residuo concentrado a vacío pesó 0,267 g, fue disuelto en piridina (4 mL) y anhídrido acético (8 mL). La solución resultante fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente, siendo recuperada de la manera habitual. El extracto acetilado fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna T-16) con n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogiendo un total de 150 fracciones de 75 mL que fueron reunidas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cuatro grupos de fracciones nombradas de A a D.

La reunión A de la columna T-16 nos permitió obtener la sustancia **T11** (8 mg) mediante purificación en cromatografía preparativa en capa gruesa con n-hexano-acetato de etilo (8:2) como eluyente y cuatro eluciones.

Sustancia T11: Aceite incoloro. Constantes espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **acetato del β -D-glucósido de la β -amirina (W11**, ver página 88).



4. ESTUDIO DE ESPECIES DEL GÉNERO *PULICARIA*



*Detalle de las flores de *P. canariensis* (foto de Manuel Gil González)*

4.1 INTRODUCCIÓN AL GÉNERO *PULICARIA*

El género *Pulicaria* (familia *Compositae*, tribu *Inuleae*, subtribu *Inulinae*) está constituido por unas 80 especies que se encuentran distribuidas por Europa, Norte y Nordeste de África, Islas Canarias, islas de Cabo Verde y Asia. Este género se encuentra dividido en cuatro secciones, que agrupan a diferentes especies de las cuales solo hacemos referencia a aquellas de las cuales se han llevado a cabo estudios químicos. Estas secciones son:

Sección *Pulicaria*.

- *Pulicaria angustifolia*
- *Pulicaria arabica*
- *Pulicaria canariensis*
- *Pulicaria dysenterica*
- *Pulicaria incisa*
- *Pulicaria odora*
- *Pulicaria paludosa*
- *Pulicaria prostrata*
- *Pulicaria scabra*
- *Pulicaria sicula*
- *Pulicaria uliginosa*
- *Pulicaria wightiana*

Sección *Vieraeopsis*.

Sección *Platychaete*.

- *Pulicaria glutinosa*

Sección *Francoeuria*.

- *Pulicaria burchardii*
- *Pulicaria crispa*
- *Pulicaria gnaphalodes*
- *Pulicaria laciniata*

Como se indicó en la Introducción General, la presencia de lactonas sesquiterpénicas sólo ha sido confirmada en cuatro de las especies incluidas en la sección *Francoeuria*, lo que ha servido de base para la proposición de una posible segregación de esta sección como un nuevo género. Por otro lado, se ha indicado el posible parentesco de determinadas especies del género *Pulicaria* con otros géneros dentro del grupo *Inula*⁶⁴ (ver **Figura 44**), como sucede con las especies de la sección *Vieraeopsis*



Figura 43: *P. odora* y *P. paludosa* son dos de las especies incluidas en la sección *Pulicaria*.

64. Gamal-Eldin, E. "Revision der Gattung *Pulicaria* (*Compositae*-*Inuleae*) für Afrika, Makaronesien und Arabien". En *Phanerogamarum Monographiae*, Tomus XIV, 7-285. Gantner Verlag K. G. Ed. (1981).

(*P. elegans* y *P. vieraeoides*) respecto al género *Vieraea*, o especies de la sección *Platychaete* respecto a los géneros *Phagnalon* (*P. nobilis*) y *Varthemia* (*P. albida* y *P. confusa*), o especies de la sección *Pulicaria* respecto a los géneros *Inula* (*P. dysenterica* y *P. odora*), *Jasonia* (*P. glandulosa* y *P. sicula*) y *Pentanema* (*P. petidarís* y *P. sericea*). También existen dificultades para clasificar algunas especies dentro de una sección concreta, como sucede con *P. amanensis*, *P. burchardii*, *P. gnaphalodes*, *P. grantii*, *P. guestii*, *P. nobilis* o *P. rauhii*.

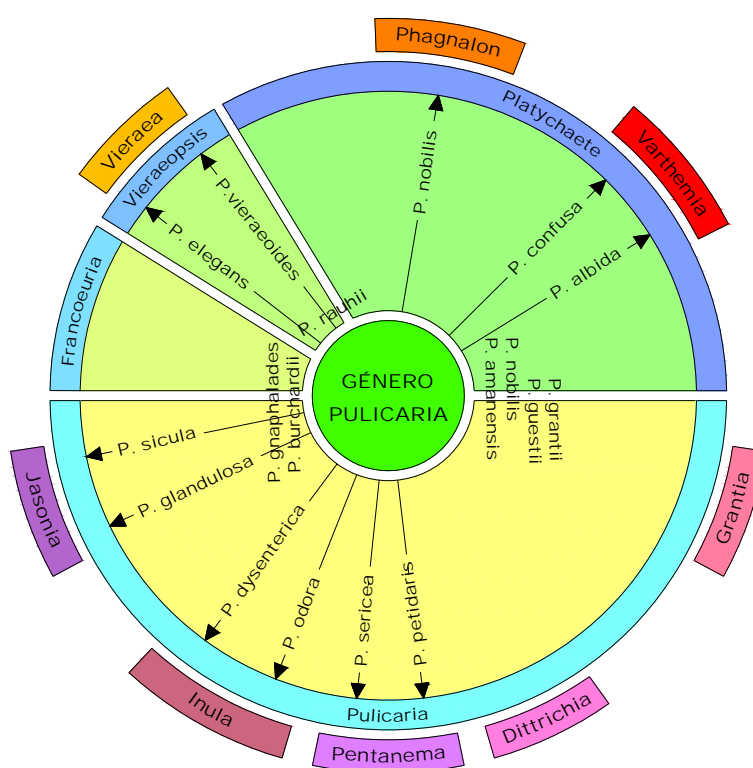


Figura 44: Clasificación de varias especies del género *Pulicaria* en cuatro secciones, y relaciones con otros géneros del grupo *Inula*, según propone Gamal-Eldin⁶⁴.

El género *Pulicaria* está representado en las Islas Canarias por dos especies que, desde un punto de vista botánico, se engloban en dos secciones, concretamente la

especie *Pulicaria canariensis* Bolle que se ubica en la sección *Pulicaria*, mientras que la especie *Pulicaria burchardii* es ubicada en la sección *Francoeuria*. Las dos especies indicadas forman poblaciones no muy abundantes y su distribución está restringida a localidades concretas del sublitoral rocoso en regiones orientadas hacia el norte de las islas de Lanzarote y Fuerteventura.

La *Pulicaria canariensis*⁶⁵ es endémica de las islas de Lanzarote y Fuerteventura, que a su vez presenta dos subespecies que son, la *Pulicaria canariensis* ssp. *lanata* cuya zona de distribución se extiende por el norte de Lanzarote,



Figura 45: Las dos subespecies de *P. canariensis* son endémicas de las Islas Canarias y se localizan en Lanzarote y Fuerteventura.

concretamente en los riscos de Famara, y la *Pulicaria canariensis* ssp. *canariensis* que se encuentra reducida al sur de Lanzarote (Playa Quemada) y en la zona de los riscos de Jandia al sur de Fuerteventura.

Se presenta como un subarbolito pequeño, leñoso en la base, cuyas hojas son ampliamente oblanceoladas, con un carácter densamente algodonoso, con bordes enteros o remotamente dentadosinuados y capítulos grandes de hasta unos 3 cm de diámetro. Las brácteas involucrales son externas o lanceoladas densamente vellosas, mientras que las internas son lineares. Las lígulas presentan un color amarillo dorado y pueden medir hasta unos 7 mm de largo.

*Pulicaria burchardii*⁶⁵ se consideró durante mucho tiempo como un endemismo de la isla de Fuerteventura, con unas poblaciones bastante restringidas y con un escaso número de individuos. En la actualidad dicha especie se encuentra dividida en dos subespecies, la *Pulicaria burchardii* ssp. *burchardii* que se distribuye por Fuerteventura, Marruecos y Sahara y la *Pulicaria burchardii* ssp. *longifolia* que es endémica de las islas de Cabo Verde.



Figura 46: *P. burchardii* se consideró durante mucho tiempo como endémica de la Isla de Fuerteventura.

65. Rosa Febles and José Ortega. "Estudio citocinegético del género *Pulicaria* Gaertn. (Compositae-Inuleae) en las Islas Canarias". Botánica Macaronésica (1982), 10, 41-47.

Es un arbusto leñoso, compacto y ramificado desde la base, con un porte generalmente hemisférico que puede llegar a tener hasta 1,4 m de diámetro y 60 cm de altura, presentando un color farináceo-plateado. En el centro de la planta las ramas son ascendentes, mientras que en la base se desarrollan a menudo ramas tendidas horizontalmente sobre la arena que parten radialmente del centro, enraizando con frecuencia. Presenta hojas enteras que van de lineares a estrechamente oblanceoladas, obtusas o redondeadas. Capítulos pequeños, con valores de 5-8 mm de diámetro, solitarios en los extremos de las ramas laterales. Brácteas involucrales y lineares. Lígulas muy cortas de un color amarillo pálido.

A continuación presentamos una revisión bibliográfica de las diferentes especies del género *Pulicaria* estudiadas desde el punto de vista químico. Se agrupan atendiendo al tipo de compuesto químico aislado en sesquiterpenos (**Tabla 28, Figura 47**), lactonas sesquiterpénicas (**Tabla 29, Figura 48**) y diterpenos, triterpenos, flavonoides y otros compuestos (**Tabla 30, Figuras 49, 50 y 51**), y dentro de cada clase, de acuerdo al tipo de esqueleto carbonado.

TABLA 28a. SESQUITERPENOS GÉNERO *Pulicaria*

| Especie | Bisaboleno | Cadinano | Cariofileno | Eudesmano |
|--|----------------------------|----------|--|-----------|
| <i>arabica</i> ⁶⁶ | | | <ul style="list-style-type: none"> - 5β,12-dihidroxi-6(14)-dehidro-5,6-dihidrocariofilen-7-ona (Car-I) - 12-hidroxi-5β-metoxi-6(14)-dehidro-5,6-dihidrocariofilen-7-ona (Car-II) - 12-acetoxi-5β-metoxi-6(14)-dehidro-5,6-dihidrocariofilen-7-ona (Car-III) - 5α,12-dihidroxi-6(14)-dehidro-5,6-dihidrocariofilen-7-ona (Car-IV) - 12-acetoxi-5α-metoxi-6(14)-dehidro-5,6-dihidrocariofilen-7-ona (Car-V) - 12-metil-14-hidroxi-5E-cariofilen-7-ona (Car-VI) - 12-metil-14-acetoxi-5E-cariofilen-7-ona (Car-VII) - 12-hidroxi-14-acetoxi-5E-cariofilen-7-ona (Car-VIII) - 12-acetoxi-14-hidroxi-5E-cariofilen-7-ona (Car-IX) - 12-acetoxi-14-metoxi-5E-cariofilen-7-ona (Car-X) - 12,14-diacetoxi-5E-cariofilen-7-ona (Car-XI) - 12-acetoxi-7α,14-dihidroxi-5E-cariofileno (Car-XII) - Bis-[5Z-7-oxo-cariofileno]-14-O-éter (Car-XIII) | |
| <i>angustifolia</i> ⁶⁷ | | | - Epóxido de Cariofileno (Car-XIV) | |
| <i>dysenterica</i> ^{68,69,70} | - 7-episesquitujeno (Bi-I) | | <ul style="list-style-type: none"> - 5,6-epóxidocariofileno (Car-XIV) - Cariofileno (Car-XV) - 14-acetoxi-13-hidroxicariofilen-7-ona (Car-XVI) - 13-acetoxi-14-hidroxicariofilen-7-ona (Car-XVII) - 13,14-diacetoxicariofilen-7-ona (Car-XVIII) - 13,14-dihidroxi-5,6-cis-cariofilen-7-ona (Car-XIX) - 14-acetoxi-13-hidroxi-5,6-cis-cariofilen-7-ona (Car-XX) - 13-acetoxi-14-hidroxi-5,6-cis-cariofilen-7-ona (Car-XXI) - 14-acetoxicariofilen-7-ona (Car-XXII) - 5,13-dihidroxi-5,6-dihidro-6,14-dehidrocariofilen-7-ona (Car-XXIII) - Pulidisenterina (Car-XXIV) - (1S,5S,6S,9R,11S)-5α,14-dimetoxi-12-acetoxicariofil-2(15)-en-7-ona (Car-XXV) - (1S,5S,6S,9R,11S)-5α,14-dimetoxi-12-hidroxicariofil-2(15)-en-7-ona (Car-XXVI) | |

66. S. Hafez, T.M. Sarg, M.M. El-Domiaty, A.A. Ahmed, F.R. Melek and F. Bohlmann. "Caryophyllenes derivatives from *Pulicaria arabica*". *Phytochemistry* (1987), 26 (12), 3356-3358.

67. Pahup Singh, Mahesh C. Sharma, Kishna C. Joshi and Bohlmann, F. "Diterpenes derived from clerodanes from *Pulicaria angustifolia*". *Phytochemistry* (1985), 24 (1), 190-192.

68. Bohlmann, F. and Zdero, C. "Caryophyllenes derivatives and a hydroxyisocomene from *Pulicaria dysenterica*". *Phytochemistry* (1981), 20, 2529-2534.

69. Marco, J.A., Sanz, J.F. and Albiach, R. "Caryophyllenes derivatives from *Pulicaria dysenterica*". *Phytochemistry* (1992), 31 (7), 2409-2413.

70. Basta, A.; Tzakou, O.; Couladis, M. and Pavlovic, M. "Chemical composition of *Pulicaria dysenterica* (L.) Bernh. From Greece". *J. of Essential Oil Res.* (2007), 19(4), 333-335.

| | | | | |
|--|---|------------------------------|---|----------------------------|
| <i>dysenterica</i> ^{68,69,70} (continuación) | | | <ul style="list-style-type: none"> - (1S,6R,9R)-14-hidroxicariofil-2(15)-en-7-ona (Car-XXVII) - (1S,6R,9R,11R)-13,14-dihidroxicariofil-2(15)-en-7-ona (Car-XXVIII) - (1S,5S,9R)-5α-metoxicariofil-2(15),6(14)-dien-7-ona (Car-XXIX) - (1S,5S,9R)-5β-metoxicariofil-2(15),6(14)-dien-7-ona (Car-XXX) - (1S,5R,9R,11S)-5β,12-dihidroxicariofil-6(14)-en-7-ona (Car-XXXI) - (1S,5R,9R,11S)-12-acetoxi-5α-metoxicariofil-2(15),6(14)-dien-7-ona (Car-XXXII) - (1S,5R,9R,11S)-12-acetoxi-5β-metoxicariofil-2(15),6(14)-dien-7-ona (Car-XXXIII) - (1S,9R,11S)-12-acetoxi-7α,14-dihidroxicariofil-2(15),5Z-dieno (Car-XXXIV) - (1S,9R,11S)-12-acetoxi-14-metoxicariofil-2(15),5Z-dien-7-ona (Car-XXXV) - (1S,9R,11S)-12,14-dihidroxi-cariofil-2(15),5Z-dien-7-ona (Car-XXXVI) - (1S,9R,11S)-12-acetoxi-14-hidroxi-cariofil-2(15),5Z-dien-7-ona (Car-XXXVII) - (1S,9R,11S)-14-acetoxi-12-hidroxi-cariofil-2(15),5Z-dien-7-ona (Car-XXXVIII) - (1S,9R,11S)-12,14-diacetoxi-cariofil-2(15),5Z-dien-7-ona (Car-XXXIX) - (1S,9R)-14-metoxicariofil-2(15),5Z-dien-7-ona (Car-XL) - (1S,9R)-14-acetoxicariofil-2(15),5Z-dien-7-ona (Car-XLI) - 14-hidroxi-9-epi-βcariofileno (Car-XLII) - Cariofil-4(14),8(15)-dien-5α-ol (Car-XLIII) - Cariofil-4(14),8(15)-dien-5β-ol (Car-XLIV) | |
| <i>glutinosa</i> ^{71,72} | <ul style="list-style-type: none"> - Puliglutol (Bi-II) - Puliglutal (Bi-III) - Puliglutona (Bi-IV) - Ácido puliglutóico (Bi-V) | | | |
| <i>paludosa</i> ^{73,74} | | - T-Cadinol (Cad-I) | - 12,14-dihidroxi-cariofil-2(15),5Z-dien-7-ona (Car-XLV) | - Oplodiol (Eu-I) |

71. Mossa, J.A., Muhammad, I., El-Feraly, F.S., Hufford, C.D., McPhail, D.R. and McPhail, A.T. "Bisabolene and guaiane sesquiterpenes from *Pulicaria glutinosa*. Phytochemistry". (1992), 31 (2), 575-578.

72. Muhammad, I., El-Feraly, F.S., Mossa, J.S. and Ramadan, A. "Terpenoids from *Pulicaria glutinosa*". Phytochemistry (1992), 31 (12), 4245-4248.

73. San Feliciano, A., Medarde, M., Gordaliza, M., Del Olmo, E. and Miguel del Corral, J.M. "Sesquiterpenoids and phenolics of *Pulicaria paludosa*". Phytochemistry (1989), 28 (10), 2717-2721.

74. San Feliciano, A.; Medarde, M.; Gordaliza, M.; Del Olmo, E. and Miguel del Corral, J.M. "Terpenoides de *Pulicaria paludosa* Link". Anal. de Quím. (1987), 283-287.

| | | | | |
|--|--|---------------------------------|---|----------------------|
| <i>paludosa</i> ^{73,74} (continuación) | | - 14-hidroxi-T-Cadinol (Cad-II) | - 12-acetoxi-14-hidroxicariofil-2(15),5Z-dien-7-ona (Car-XLVI) - 12-hidroxi-7-oxocariofil-2(15),5Z-dien-14-isobutirato (Car-XLVII) - 12-hidroxi-7-oxocariofil-2(15),5Z-dien-14-(2-metilbutirato) (Car-XLVIII) - 5 α ,14-dihidroxi-cariofil-2(15),6(14)-dien-7-ona (Car-XLIX) | - Isoplodiol (Eu-II) |
| <i>prostrate</i> ⁷⁵ | | | - Buddledin C ó 3-ceto-trans-cariofileno (Car-L) | |
| <i>scabra</i> ⁷⁶ | | | - 14-hidroxi-cariofilen-7-ona (Car-LI) - 14-acetoxi-cariofilen-7-ona (Car-LII) - 14-hidroxi-5,6-cis-cariofilen-7-ona (Car-LIII) - 14-acetoxi-5,6-cis-cariofilen-7-ona (Car-LIV) - 2-oxopuliscabrin (Car-LV) - 5,6-cis-puliscabrin (Car-LVI) - 5,6-cis-5'-epipuliscabrin (Car-LVII) - 5,14-Di-2,15-dihidropuliscabrin (Car-LVIII) | |

TABLA 28b. SESQUITERPENOS GÉNERO *Pulicaria* (CONTINUACIÓN)

| Especie | Germacrano | Guaiano | Humulanos | Oplopano / Aromadendrano | Propellano |
|-------------------------------------|--|---------------------------------------|--|---|--|
| <i>dysenterica</i> ^{68,70} | | | - α -Humuleno (Hu-I) - Epóxido de humuleno (Hu-II) | - Viridiflorol (OAr-I) | |
| <i>glutinosa</i> ^{71,77} | - Puliglano (Ge-I) - Epoxipuliglano (Ge-II) | - Cicloepoxipuliglano (Gu-I) | | | |
| <i>paludosa</i> ^{73,74,78} | | - 3 β -hidroxilguloxido (Gu-II) | | - 14-hidroxiviridiflorol (OAr-II) - Paludolona (OAr-III) - 4-epipaludolona (OAr-IV) | - Pulicaral (Pro-I) - Ác. Pulicárico (Pro-II) - β -D-glucósido del pulicaral (Pro-III) - β -D-glucósido del ácido pulicárico (Pro-IV) |

75. Sadyrbekov, D.T.; Atazhanova, G.A.; Kulyasov, A.T.; Raldugin, V.A.; Gatilov, Y.V.; Shkirov, M.M.; Edil'baeva, T.T.; Turdybekov, K.M. and Adekenov, S.M. "Buddledin C from *Pulicaria prostrate* and selective synthesis of its epoxy derivative". Chem. Nat. Comp. (2006), 42 (1), 41-44.

76. Bohlmann, F., Ahmed, M. and Jakupovic, J. "Caryophyllene derivatives from *Pulicaria scabra*". Phytochemistry (1982), 21 (7), 1659-1661.

77. Mossa, J.S., Al-Yahya, M.A., Hifnawy, M.S., Saeta, A.A., El-Ferally, F.S., Hufford, C.D., McPhail, D.R. and McPhail, A.T. "Two germacrane sesquiterpenes from *Pulicaria glutinosa*". Phytochemistry (1990), 29 (5), 1595-1599.

78. San Feliciano, A., Medade, M., Gordaliza, M., Del Olmo, E. and Miguel del Corral, J.M. "The structures of Pulicaral and related sesquiterpenoids from *Pulicaria paludosa*". Journal of Natural Products (1988), 51 (6), 1153-1160.

TABLA 29. LACTONAS SESQUITERPÉNICAS GÉNERO *Pulicaria*

| Espece | Tipo Eudesmanolido | Tipo Guayanolido y Pseudoguayanolido | Tipo Xanthanolido | Otros Tipos |
|---|---|---|---|---|
| <i>crispa</i> ^{19,79,80,81,82} | <ul style="list-style-type: none"> - 2α-hidroxialantolactona (Eu-I) - 5α,6α-epoxido-2α-hidroxialantolactona (Eu-II) | <ul style="list-style-type: none"> - Pulicariolido (Gua-I) - 4α-hidroxi-1,11(13)-guayadien-12,8-olido (Gua-II) - 4α-hidroxi-11(13)-guayen-12,8-olido, forma 1α (Gua-III) - 4α-hidroxi-11(13)-guayen-12,8-olido, forma 1β (Gua-IV) - 4-oxo-11,13-pseudoguayen-12,8-olido (Gua-V) - 10α-hidroxi-4-oxo-11,13-pseudoguayen-12,8-olido (Gua-VI) | <ul style="list-style-type: none"> - Tomentosina (Xa-I) - Xantinosina (Xa-II) - Xantatina (Xa-III) - 8-epi-xantatina (Xa-IV) - Grifinacetato (Xa-V) - Desacetilxantanol (Xa-VI) - Xantanol (Xa-VII) - Isoxantanol (Xa-VIII) - Xantanolacetato (Xa-IX) - 2-hidroxitomentosina (Xa-X) - 4-hidroxi-1(5),11(13)-xantadien-12,8-olido (Xa-XI) | <ul style="list-style-type: none"> - Secocrispiolido (Ot-I) - Pulicrispiolido (Ot-II) |
| <i>laciniata</i> ²⁰ | | <ul style="list-style-type: none"> - 4-oxo-11,13-pseudoguayen-12,8-olido (Gua-V) - 4α,5α-epoxi-1αH,10αH,-11(13)-guayen-12,8-olido (Gua-VII) | | |
| <i>sicula</i> ²¹ | | <ul style="list-style-type: none"> - Inuviscolido (Gua-VIII) - Pseudoivalina (Gua-IX) - 1,2-dehidro-1,10α-dihidropseudoivalina (Gua-X) - 1α,2α-epoxi-1,10α-dihidropseudoivalina (Gua-XI) | | |
| <i>undulata</i> ²² | <ul style="list-style-type: none"> - 2α-hidroxialantolactona (Eu-I) - 2α-hidroxieudesma-4,11(13)-dien-12,8β-olido (Eu-III) - Pulicaria glaucolido (Eu-IV) | <ul style="list-style-type: none"> - 4α,5α-epoxi-1αH,10αH,13-norguai-7(11)-en-12,8α-olido (Gua-XII) | | |

79. Bohlmann, F., Knoll, K.H. and El-Emary, N.A. "Neuartige sesquiterpenlactone aus *Pulicaria crispa*". Phytochemistry (1979), 18, 1231-1233.

80. Al-Yahya, M.A., Khafagy, S., Shihata, A., Koslowski, J.F., Antoun, M.D. and Cassady, J.M. "Phytochemical and biological screening of Saudi medicinal plants, Part 6. Isolation of 2 α -hydroxialantolactone, the antileukemic principle of *Francoeuria crispa*". Journal of Natural Products (1984), 47 (6), 1013-1017.

81. Al-Yahya, M.A., El-Sayed, A.M., Mossa, J.S., Koslowski, J.F., Antoun, M.D., Ferin, M., Baird, W.M. and Cassady, J.M. "Potencial cancer chemopreventive and cytotoxic agents from *Pulicaria crispa*". Journal of Natural Products (1988), 51 (5), 621-624.

82. Stavri, M.; Mathew, K.T. and Gibbons, S. "A novel sesquiterpene from *Pulicaria crispa* (Forssk.) Oliv". Natural Products Communications (2008), 3 (1), 1-3.

TABLA 30. DITERPENOS, TRITERPENOS, FLAVONOIDES Y OTRAS SUSTANCIAS
GÉNERO *Pulicaria*

| Especie | Diterpenos | Triterpenos | Flavonoides | Otras Sustancias |
|--|---|--|---|--|
| <i>arabica</i> ^{66,83} | | <ul style="list-style-type: none"> - Acetato de Dammaradienilo (Tri-I) - Estigmasterol (Tri-II) - Sitosterol (Tri-III) | <ul style="list-style-type: none"> - 3,7-dimetiléter de quercetagenina (Fla-I) - 3,5,7-trimetiléter de quercetagenina (Fla-II) - 3,5,7,3'-tetrametiléter de quercetagenina (Fla-III) - 3-glucósidoquercetina (Fla-IV) - 3-glucurónidoquercetina (Fla-V) | <ul style="list-style-type: none"> - Isobutirato de 10-isobutiriloxi-6,9-epoxitimol |
| <i>angustifolia</i> ⁶⁷ | <ul style="list-style-type: none"> - Ácido 1,2,3,4-tetrahidro-15-deoxopúlico (Di-I) - Ácido 5,10-seca-5(19),13-clerodadien-16,15-olido-18-óico (Di-II) - Ácido 1,2,3,4,13,14-hexahidro-14,15-epoxi-15-deoxopúlico (Di-III) - Metiléster del ác. conyscabráico (Di-IV) | <ul style="list-style-type: none"> - Estigmasterol (Tri-II) - Sitosterol (Tri-III) - Lupeol (Tri-IV) - Ac. de Lupeol (Tri-V) - Ac. de Taraxasterol (Tri-VI) | | <ul style="list-style-type: none"> - Ac. Benzóico |
| <i>crispa</i> ^{19,81,84} | <ul style="list-style-type: none"> - Crisposido A (Di-V) - Crisposido B (Di-VI) | <ul style="list-style-type: none"> - Estigmasterol (Tri-II) - Sitosterol (Tri-III) - Lupeol (Tri-IV) - Ac. de Lupeol (Tri-V) - Ac. de Taraxasterol (Tri-VI) - Taraxasterol (Tri-VII) | <ul style="list-style-type: none"> - Axillarina (Fla-VI) - Kaempferol (Fla-VII) - Quercetina (Fla-VIII) - 6-metoxikaempferol (Fla-IX) - 3-metiléter de 6-metoxikaempferol (Fla-X) | |
| <i>dysenterica</i> ^{68,85,86} | <ul style="list-style-type: none"> - Fitol (Di-VII) | <ul style="list-style-type: none"> - Estigmasterol (Tri-II) | <ul style="list-style-type: none"> - 3,7-dimetiléter de quercetagenina (Fla-I) - 3,7-dimetiléter de 6-hidroxikaempferol (Fla-XI) - 6-glucósido de 3-metiléter de 6-hidroxikaempferol (Fla-XII) | <ul style="list-style-type: none"> - Isobutirato de 10-isobutiriloxi-6,9-epoxitimol - Metoxilato de 7-isobutiriloxitimol - 8α-hidroxipresiliferoleno - Isocomeno |

83. Sabry, I., El-Negoumi, R. Manssur, M.A. and Nabel A.M. Saleh. "Flavonols of *Pulicaria arabica*". Phytochemistry (1982), 21 (4), 953-954.

84. Kapoor, B.B.S. and Ranga, P. "Flavonoids from some asteraceous medicinal plants of Rajasthan desert". J. Phytol. Res. (2003), 16 (1), 101-102.

85. Pares, J.O., Oksuz, S., Ulebelen, A. & Mabry, T.J. "6-Hydroxiflavonoids from *Pulicaria dysenterica* (Compositae)". Phytochemistry (1981), 20 (8), 2057.

86. Williams, C.A.; Harborne, J.B.; Greenham, J.R.; Grayer, R.J.; Kite, G.C. and Eagles, J. "Variations in lipophilic and vacuolar flavonoids among European *Pulicaria* species". Phytochem. (2003), 64, 275-283.

| | | | | |
|--|---|---|---|--|
| <i>dysenterica</i> ^{68,85,86} | | | - 3,6,7-trimetiléter de 6-hidroxikaempferol (Fla-XIII) - Escutellareína (Fla-XIV) - 3-glucurónido de quercetina (Fla- XV) | - 1 α -hidroxi-1,2-dihidrosilfineno - Isobutirato de Geranilo - 1 β -hidroxi-1,2-dihidrosilfineno - Esculetina |
| <i>glutinosa</i> ⁷² | - Ácido strictico (Di-VIII) - Ácido púlico (Di-IX) - Ácido 15-deoxopúlico (Di-X) | | | |
| <i>gnaphalodes</i> ^{87,88} | - Lactona del ácido 7-oxo-6 α -hidroxihardwickiico (Di-XI) | - Estigmasterol (Tri-II) - Sitosterol (Tri-III) - Campesterol (Tri-VIII) - Colesterol (Tri-IX) - α -Amirina (Tri-X) | | |
| <i>incisa</i> ⁸⁹ = <i>undulate</i> ⁹⁰ | - Ácido 16 β ,17-dihidroxi-ent-kauran-19-óico (Di-XII) | | - 7-metiléter de dihidroquercetina (Fla-XVI) - 3-galactósido kaempferol (Fla-XVII) - 3-galactósido de quercetina (Fla-XVIII) - 3-metiléter de kaempferol (Fla-XIX) - 3-metiléter de quercetina (Fla-XX) | |
| <i>laciniata</i> ²⁰ | | - Sitosterol (Tri-III) | | |
| <i>odora</i> ^{86,91,92} | | | - 3-glucósido de quercetina (Fla-IV) - 3-glucurónido de quercetina (Fla-XV) - 7-glucósido de quercetina (Fla-XXI) - 7-glucósido de patuletina (Fla-XXII) - 7-glucósido de 6-metiléter de 6-hidroxikaempferol (Fla-XXIII) | - 2-isopropil-4-metilfenol - Isobutirato de 2-isopropil-4-metilfenilo - Aceites esenciales |

87. Rustaiyan, A., Simozar, E., Ahmadi, A., Grenz, M. and Bohlmann, F. "A hardwickiic acid derivative from *Pulicaria gnaphalodes*". *Phytochemistry* (1981), 20 (12), 2772-2773.

88. Eshbakova, K.A. and Saidkhodzhaev, A.I. "Triterpenoids and sterols from three species of *Pulicaria*". *Chem. of Nat. Comp.* (2001), 37 (2), 2, 196-197.

89. Mansour, R.M.A., Ahmed, A.A., Melek, F.R. and Saleh, N.A.M. "The flavonoids of *Pulicaria incise*". *Fitoterapia* (1990), 61 (1), 186-187.

90. Rasool, N., Ahmad, V.U., Choudhary, I., Nahum, S., Fun, H.K. and Ali, S. "16 β ,17-dihydroxy-ent-kauran-19-oic acid". *Acta Cryst.* (2005), E61, o3053-o3055.

91. Ezoubeiri, A.; Gadhi, C.A.; Fdil, N.; Benharref, A.; Jana, M. and Vanhaelen, M. "Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L.". *J. of Ethnopharm.* (2005), 99, 287-292.

92. Hanbali, F.E.L.; Akssira, M.; Ezoubeiri, A.; Gadhi, C.A.; Mellouki, F.; Benherra, A.; Blazquez, A.M. and Boira, H. "Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicaria odora* L.". *J. of Ethnopharm.* (2005), 99, 399-401.

| | | | | |
|--|--|--|--|---|
| <i>paludosa</i> ^{73,74,86} | | <ul style="list-style-type: none"> - - Estigmasterol (Tri-II) - Sitosterol (Tri-III) - Ac. Taraxasterol (Tri-VI) - Ac. Pseudotaraxasterol (Tri-XI) | <ul style="list-style-type: none"> - - 3-glucósido de querce-tina (Fla-IV) - 3-glucurónido de quercetina (Fla-XV) - 3-galactósido de quercetina (Fla-XVIII) - 7-glucósido de quercetina (Fla-XXI) - Ladaneina (Fla-XXIV) - 8-hidroxiladaneina (Fla-XXV) - 3,6-dimetiléter de 6-hidroxi-kaempferol (Fla-XXVI) - 3-rutinósido de quercetina (Fla-XXVII) - 3-rhamnosylgluctósido quercetina (Fla-XXVIII) - 3-diglucurónido de quercetina (Fla-XXIX) - 3-glucósido de isorhamnetina (Fla-XXX) - 3-galactósido de isorhamnetina (Fla-XXXI) - 3-rhamnosylglucósido de isorhamnetina (Fla-XXXII) - 3-rhamnosylgalactósido de isorhamnetina (Fla-XXXIII) | |
| <i>salviifolia</i> ^{88,93,94} | <ul style="list-style-type: none"> - Ácido hautriwaico (Di-XIII) - Salvicinólida (Di-XIV) - Salvicinólina (Di-XV) | <ul style="list-style-type: none"> - Estigmasterol (Tri-II) - Sitosterol (Tri-III) - Ac. Taraxasterol (Tri-VI) - Campesterol (Tri-VIII) - Colesterol (Tri-IX) | | |
| <i>scabra</i> ⁷⁶ | | <ul style="list-style-type: none"> - Estigmasterol (Tri-II) | | <ul style="list-style-type: none"> - Isobutirato de 10-isobutiriloxi-6,9-epoxitímol - 9α-isocomeno |
| <i>sicula</i> ^{21,86,95} | | | <ul style="list-style-type: none"> - 3-glucósido de quercetina (Fla-IV) - Quercetina (Fla-VIII) - 3-glucurónido de quercetina (Fla-XV) - 3-galactósido de quercetina (Fla-XVIII) - 7-glucósido de quercetina (Fla-XXI) | <ul style="list-style-type: none"> - Isobutirato de 10-isobutiriloxi-6,9-epoxitímol - Isobutirato de 10-isobutiriloxi-8,9-dehidrotímol - Isobutirato de nerilo |

93. Eshbakova, K.A. and Saidkhodzhaev, A.I. "Hautriwaic acid from *Pulicaria salviifolia*". Chem. of Nat. Comp. (2002), 38 (4), 326-327.

94. Eshbakova, K.A.; Sagitdinova, G.V.; Levkovich, M.G.; Rasulev, B.F.; Abdullaev, N.D. and Malikov, V.M. "Diterpenoids of *P. salviifolia*. IV. Structures of salvicinólida and salvicinólina". Chem. of Nat. Comp. (1997), 33 (4), 458-460.

95. Wollenweber, E.; Christ, M.; Dunstan, R.H.; Roitman, J.N. and Stevens, J.F. "Exudate flavonoids in some *Gnaphalieae* and *Inuleae* (Asteraceae)". Z. Naturforsch. (2005), 60c, 671-678.

| | | | | |
|---|---|---|--|--|
| <i>sicula</i> ^{21,86,95} (continuación) | | | <ul style="list-style-type: none"> - 3-diglucurónido de quercetina (Fla-XXIX) - 7-glucurónido de quercetina (Fla-XXXIV) - 3,6,7,4'-tetrametiléter de 6-hidroxikaempferol (Fla-XXXV) - 3,3',4'-trimetiléter de quercetina (Fla-XXXVI) - 7,3',4'-trimetiléter de quercetagenina (Fla-XXXVII) - 3,7,3',4'-tetrametiléter de quercetagenina (Fla-XXXVIII) - 3,5,6,7,3',4'-hexametiléter de quercetagenina (Fla-XXXIX) - Artemetina (Fla-XL) - Chrysosplenol C (Fla-XLI) - Chrysosplenol D (Fla-XLII) - Oxyyanina B (Fla-XLIII) - Chrysosplenetina (Fla-XLIV) | |
| <i>somalensis</i> ⁹⁶ | - Ácido 8-epi-15-deoxopúlico (Di-X) | | <ul style="list-style-type: none"> - Chrysosplenol D (Fla-XLII) - Chrysosplenetina (Fla-XLIV) - Casticina (Fla-XLV) | |
| <i>uliginosa</i> ^{88,97} | | <ul style="list-style-type: none"> - Estigmasterol (Tri-II) - Sitosterol (Tri-III) - Campesterol (Tri-VIII) - Colesterol (Tri-IX) - α-Amirina (Tri-X) | <ul style="list-style-type: none"> - Sorbifolina ó 4',5,6-trihidroxi-7-metoxi-flavona (Fla-XLVI) | |
| <i>undulata</i> ⁹⁰ | - Ácido 16 β ,17-dihidroxi-ent-kauran-19-óico (Di-XII) | | | |
| <i>vulgaris</i> ⁸⁶ | | | <ul style="list-style-type: none"> - 3-glucósido de quercetina (Fla-IV) - 3-glucurónido de quercetina (Fla-XV) - 3-galactósido de quercetina (Fla-XVIII) | |

96. Al-Hazimi, H.M.G. and Alkhatlan, H.Z. "A new diterpene and flavonoids from *Pulicaria somalensis*". J. of King Saud University, Science (1993), 5 (2), 141-146.

97. Eshbakova, K.A.; Sagitdinova, G.V.; Malikov, V.M. and Melibaev, S. "Flavone sorbifolin from *Pulicaria uliginosa*". Chem. of Nat. Comp. (1996), 32 (1), 82.

| | | | | |
|--|--|--|--|--|
| <p><i>wightiana</i>^{98,99,100,101} (continuación)</p> | <ul style="list-style-type: none"> - 2α-hidroxiisopimara-8(14),15-dien-7-ona (Di-XVI) - Metil 6α-hidroxi-3,13-clerodadien-15,16-olido-18-oato (Di-XVII) - Metil 6α,7α-dihidroxi-3,13-clerodadien-15,16-olido-18-oato (Di-XVIII) - 6α-hidroxi-3,13-clerodadien-18(7),15(16)-diolido (Di-XIX) - Metil 6α,15-dihidroxi-3,13-clerodadien-16,15-olido-18-oato (Di-XX) - Metil 6α-hidroxi-15,16-epoxi-3,13(16),14-clerodatrien-18-oato (Di-XXI) - Metil 6α-hidroxi-3,13-clerodadien-16,15-olido-18-oato (Di-XXII) - Metil 6α-hidroxi-15,16-epoxi-3,13-clerodadien-18-oato (Di-XXIII) | | | |
|--|--|--|--|--|

98. Chiplunkar, Y.G. and Nagasampagi, B.A. "Isolation and structure elucidation of a new isopimarane from *Pulicaria wightiana*". J. of Nat. Prod. (1992), 55 (9), 1328-1329.

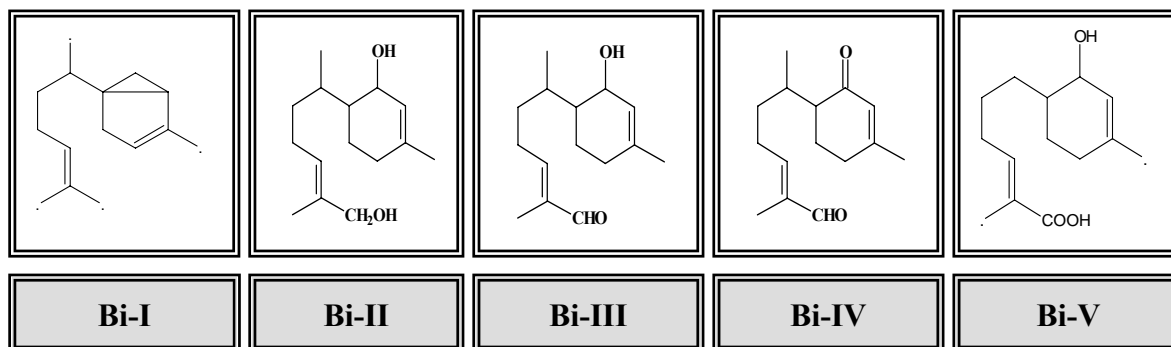
99. Rvikhumar, K., Sridhar, B., Das, B. and Venkateswarlu, K. "A clerodane diterpenoid from *Pulicaria wightiana*". Acta Cryst. (2005), E61, o854-o856.

100. Das, B., Ravinder Reddy, M., Ramu, R., Ravindranath, N., Raíz, H., Ramakishna, K.V.S., Koteswara Rao, Y., Harakishore, K. and Murthy, U.S.N. "Clerodane diterpenoids from *Pulicaria wightiana*". Phytochemistry (2005), 66, 633-638.

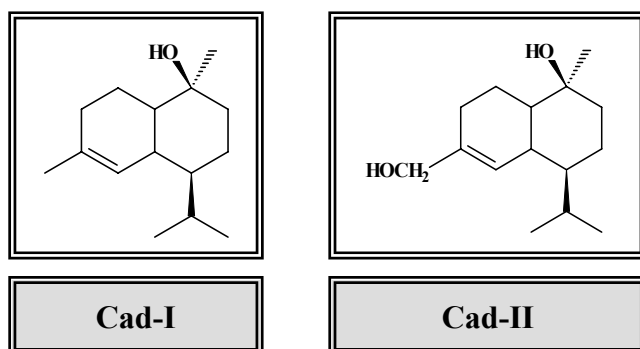
101. Das, B.; Ramu, R.; Venkateswarlu, K.; Koteswara Rao, Y.; Reddy, M.R.; Ramakishna, K.V.S.; Harakishore, K. and Murthy, U.S. "New clerodanes terpenoids from the aerial parts of *Pulicaria wightiana*". Chemistry & Biodiversity (2006), 3, 175-179.

FIGURA 47: ESTRUCTURAS DE SESQUITERPENOS DEL GÉNERO *Pulicaria*

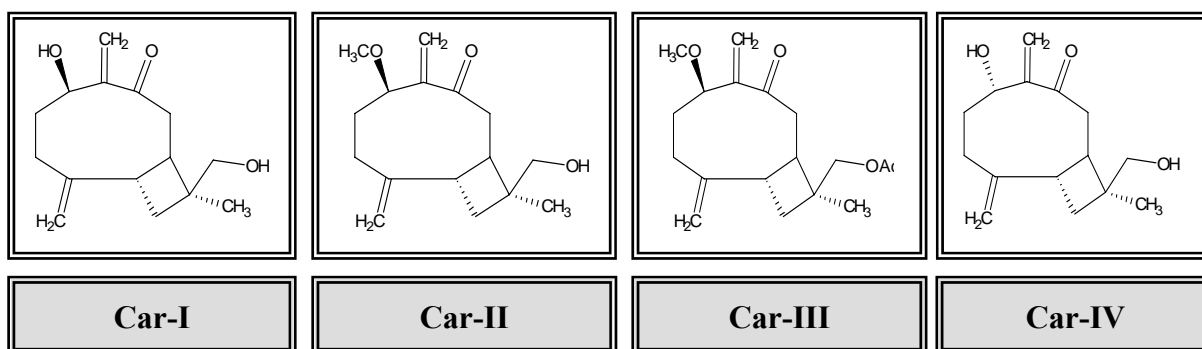
a) BISABOLENOS

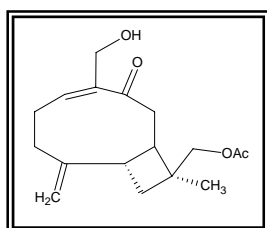
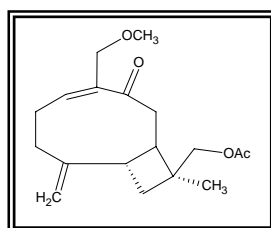
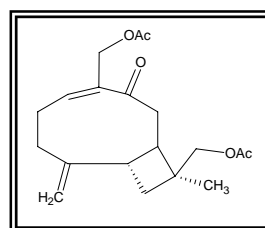
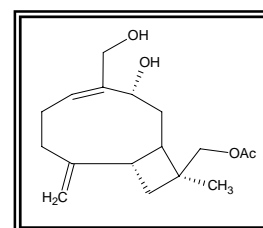
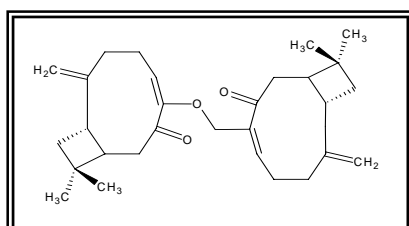
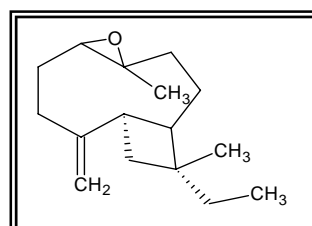
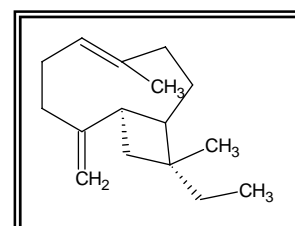
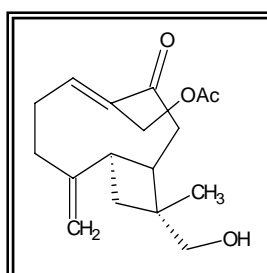
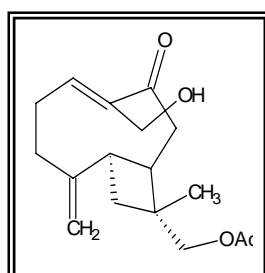
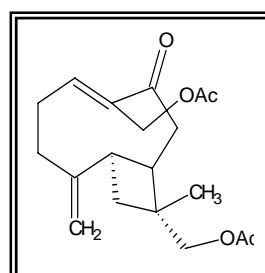
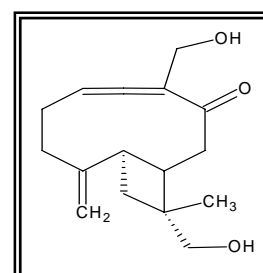
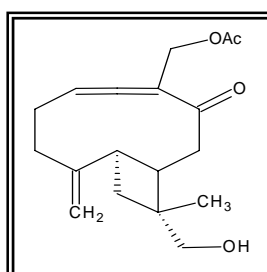
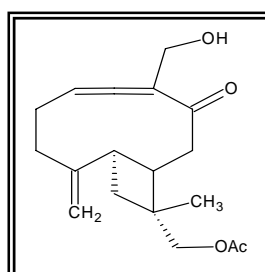
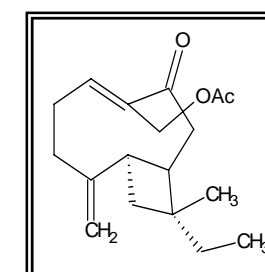
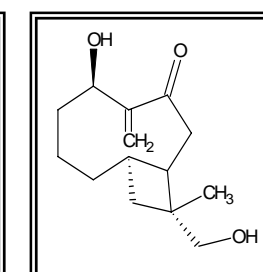


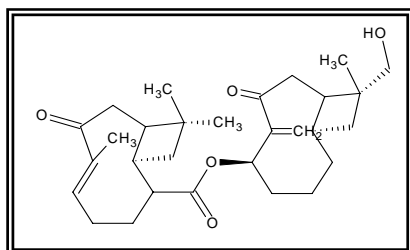
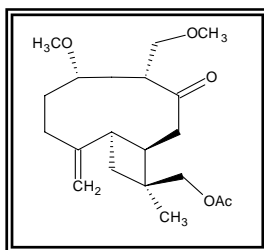
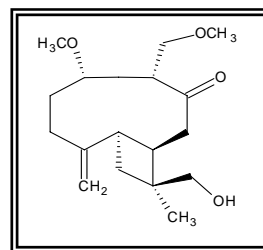
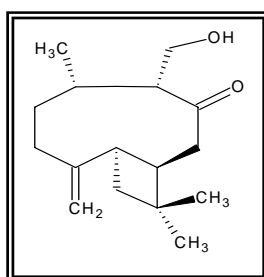
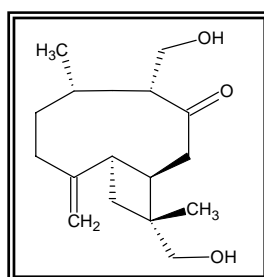
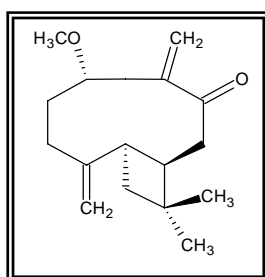
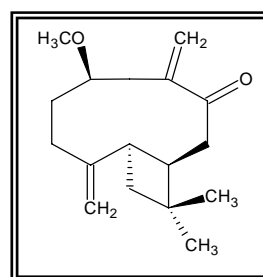
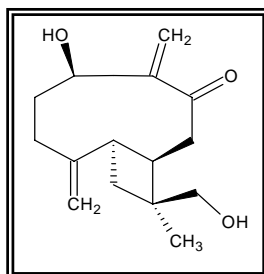
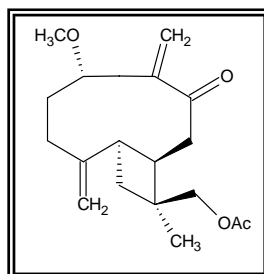
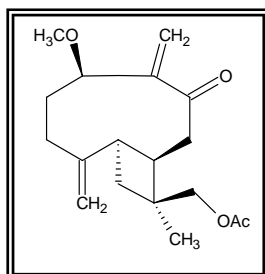
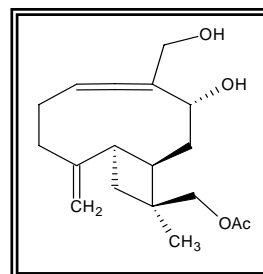
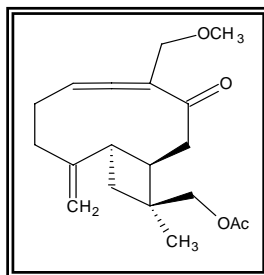
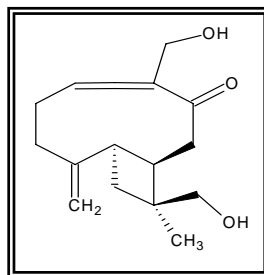
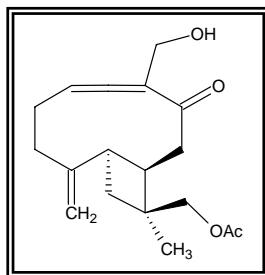
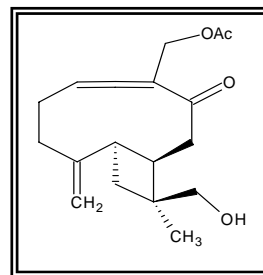
b) CADINANOS

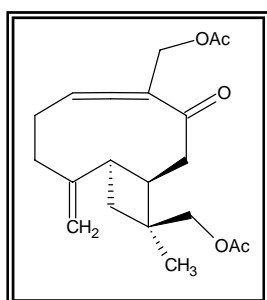
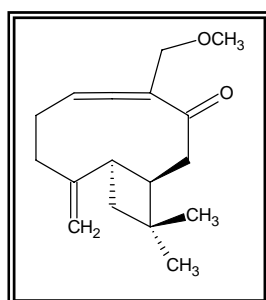
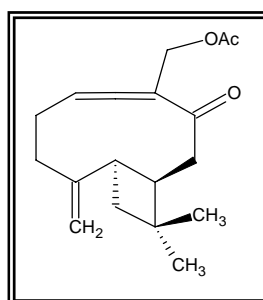
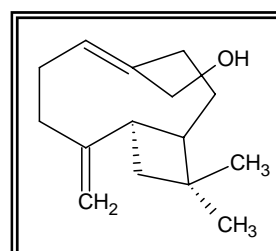
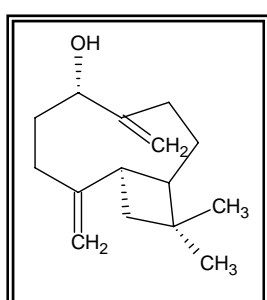
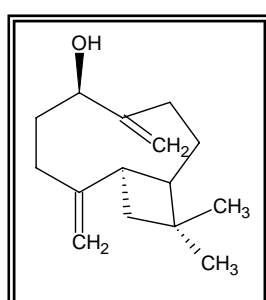
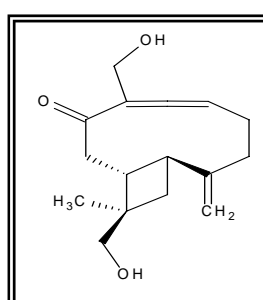
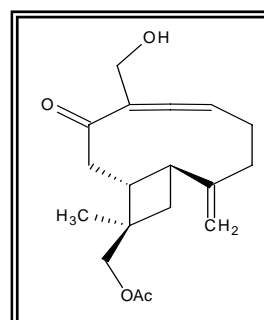
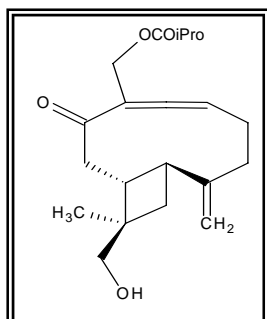
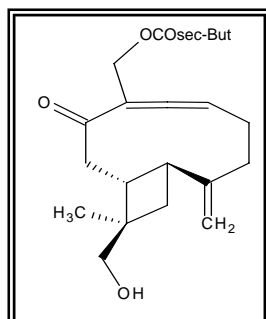
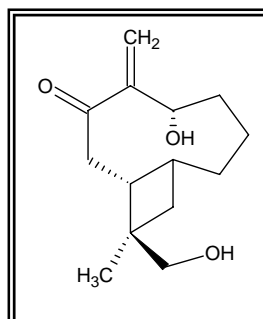
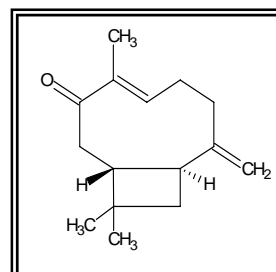
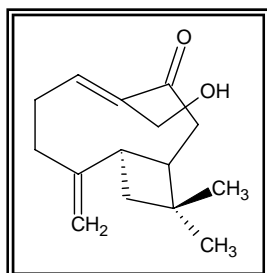
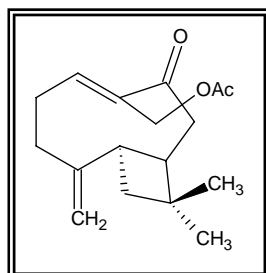
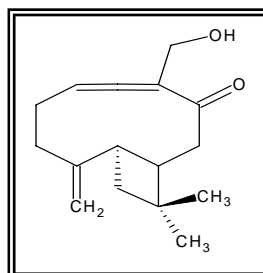
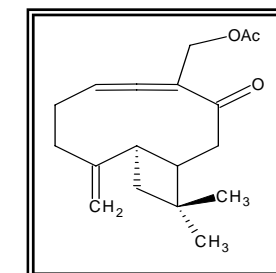


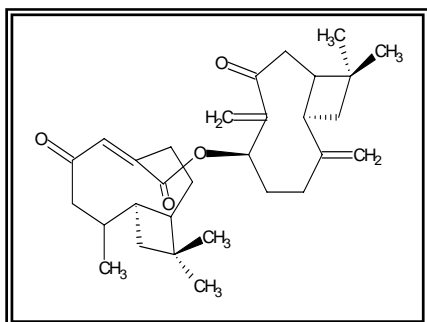
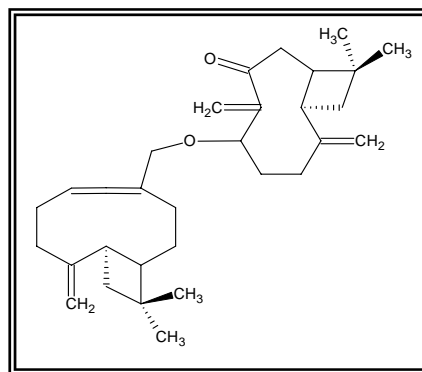
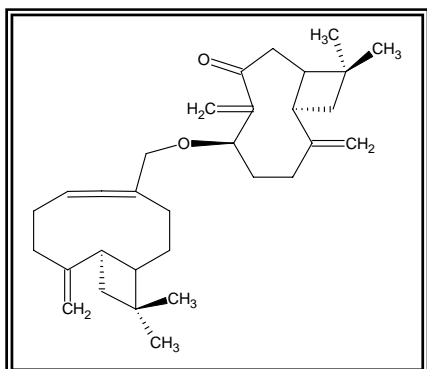
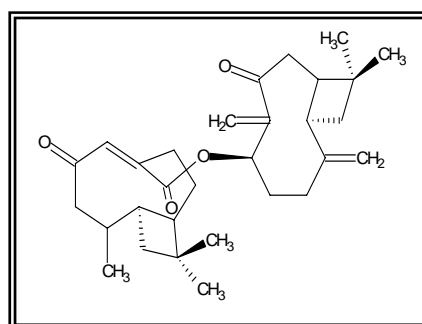
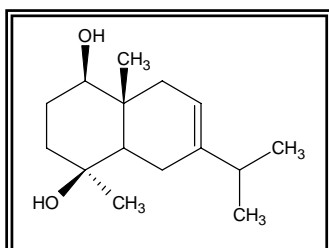
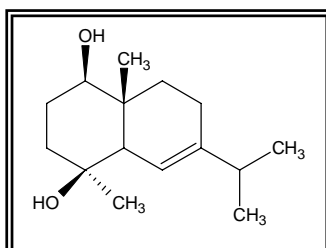
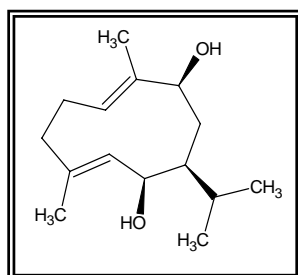
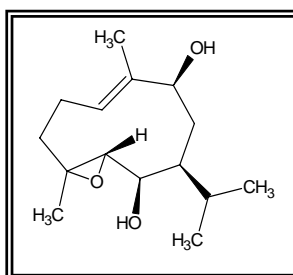
c) CARIOFILENOS

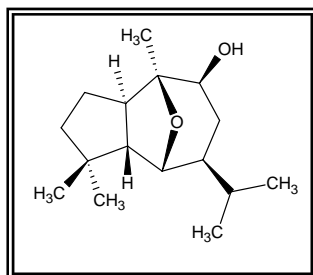
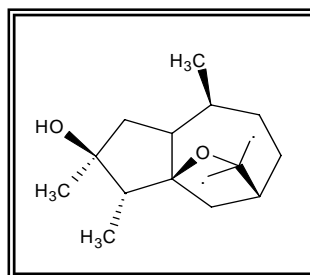
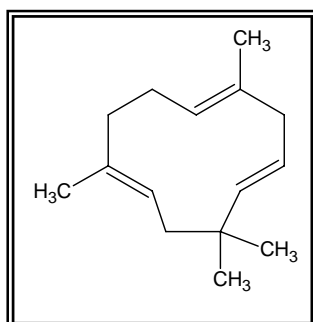
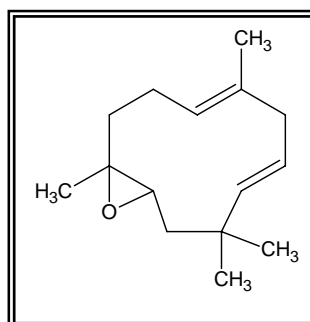
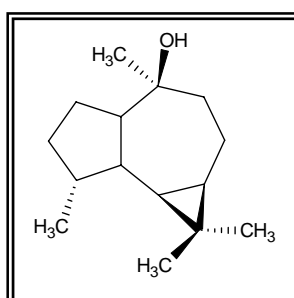
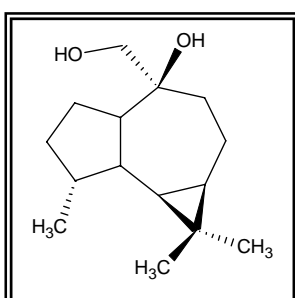
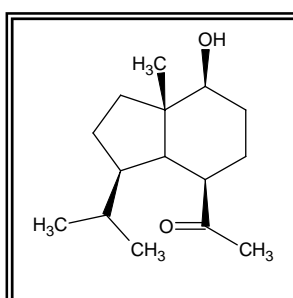
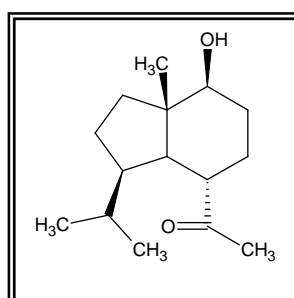


**Car-IX****Car-X****Car-XI****Car-XII****Car-XIII****Car-XIV****Car-XV****Car-XVI****Car-XVII****Car-XVIII****Car-XIX****Car-XX****Car-XXI****Car-XXII****Car-XXIII**

**Car-XXIV****Car-XXV****Car-XXVI****Car-XXVII****Car-XXVIII****Car-XXIX****Car-XXX****Car-XXXI****Car-XXXII****Car-XXXIII****Car-XXXIV****Car-XXXV****Car-XXXVI****Car-XXXVII****Car-XXXVIII**

**Car-XXXIX****Car-XL****Car-XLI****Car-XLII****Car-XLIII****Car-XLIV****Car-XLV****Car-XLVI****Car-XLVII****Car-XLVIII****Car-XLIX****Car-L****Car-LI****Car-LII****Car-LIII****Car-LIV**

**Car-LV****Car-LVI****Car-LVII****Car-LVIII****d) EUDESMANOS****Eu-I****Eu-II****e) GERMACRANOS****Ge-I****Ge-II**

f) GUAIANOS**Gu-I****Gu-II****g) HUMULANOS****Hu-I****Hu-II****h) OPLOPANOS / AROMADENDRANOS****OAr-I****OAr-II****OAr-III****OAr-IV**

h) PROPELLANOS

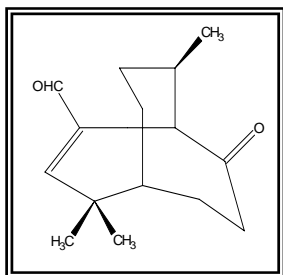
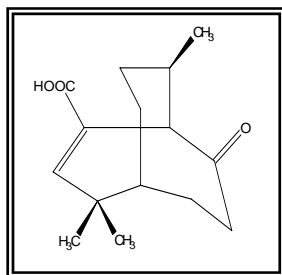
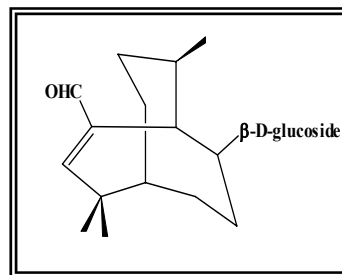
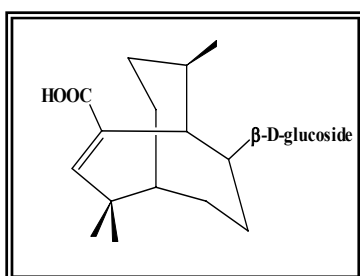
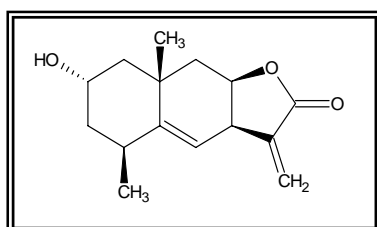
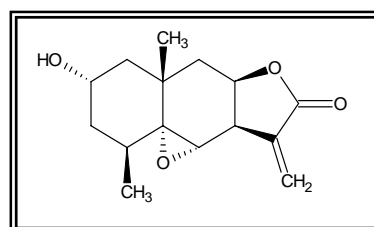
**Pro-I****Pro-II****Pro-III****Pro-IV**

FIGURA 48: ESTRUCTURAS DE LACTONAS SESQUITERPÉNICAS DEL GÉNERO *Pulicaria*

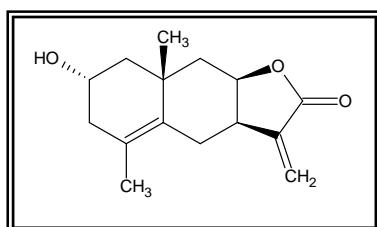
a) EUDESMANOLIDAS



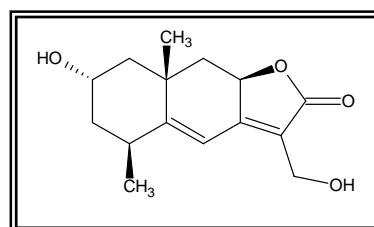
Eu-I



Eu-II

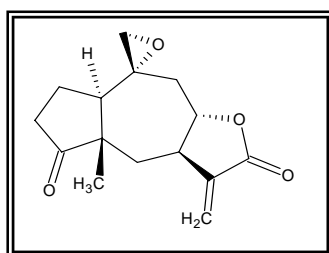


Eu-III

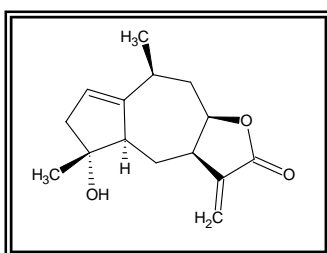


Eu-IV

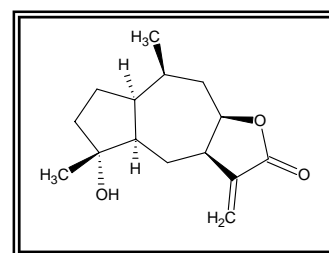
b) GUAYANOLIDAS y PSEUDOGUAYANOLIDAS



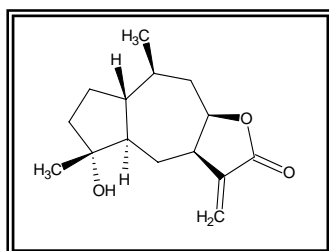
Gua-I



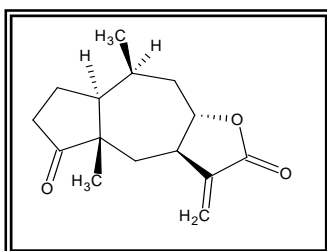
Gua-II



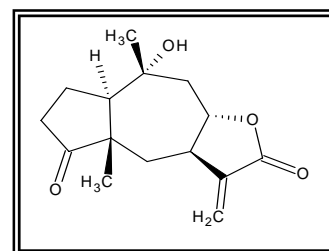
Gua-III



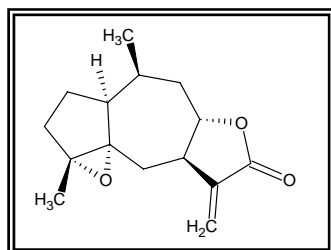
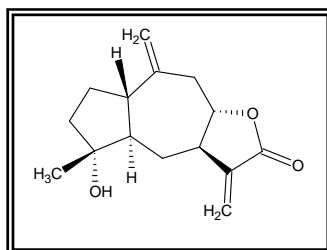
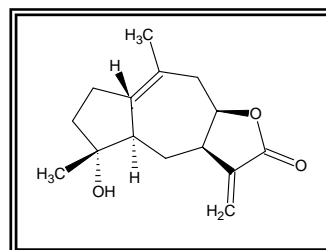
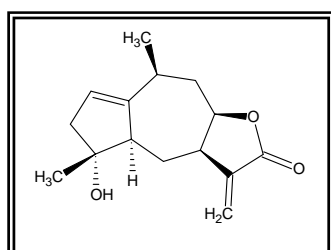
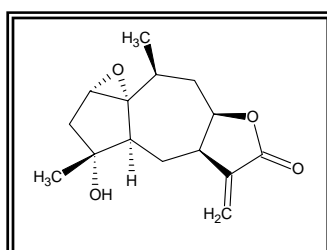
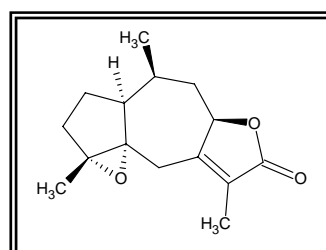
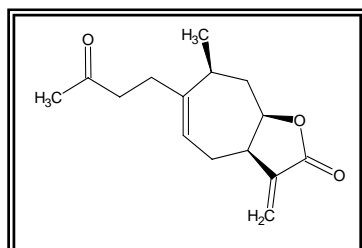
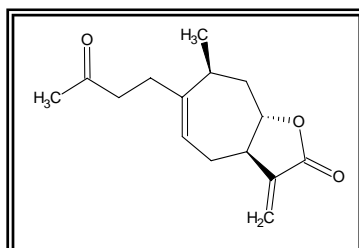
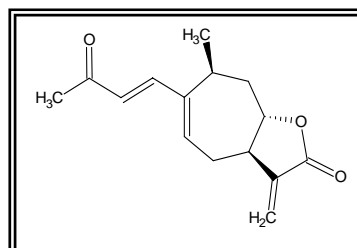
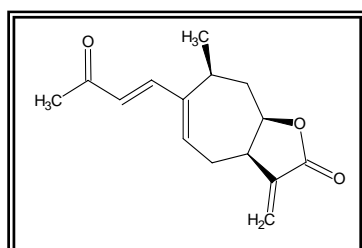
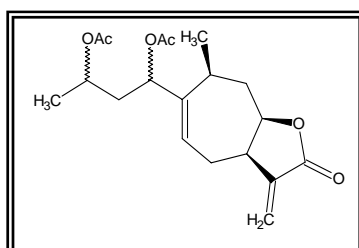
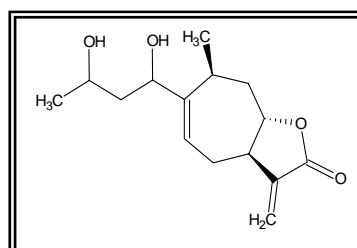
Gua-IV



Gua-V



Gua-VI

**Gua-VII****Gua-VIII****Gua-IX****Gua-X****Gua-XI****Gua-XII****c) XANTHANOLIDAS****Xa-I****Xa-II****Xa-III****Xa-IV****Xa-V****Xa-VI**

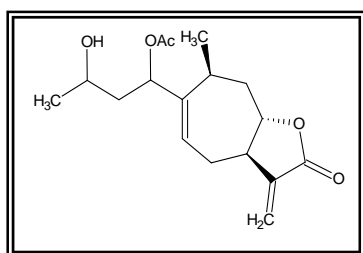
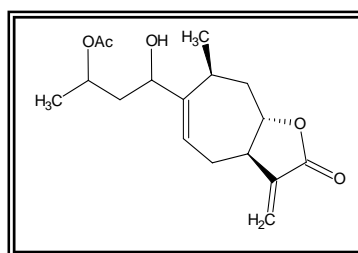
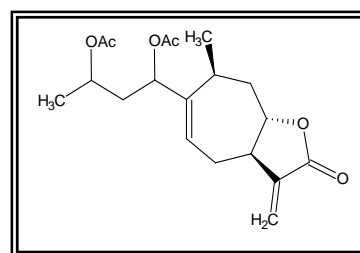
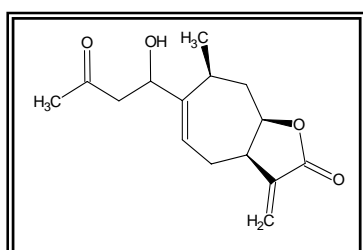
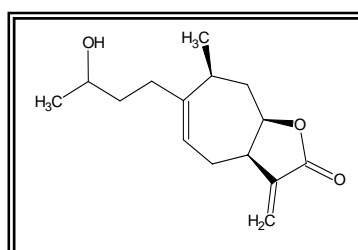
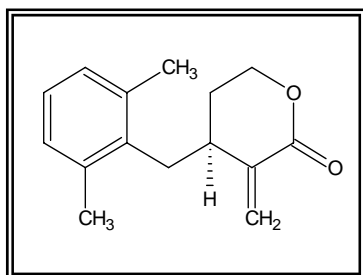
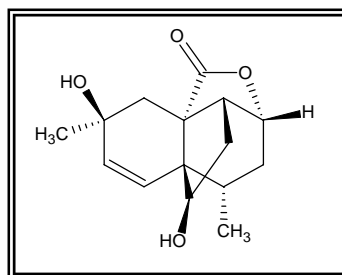
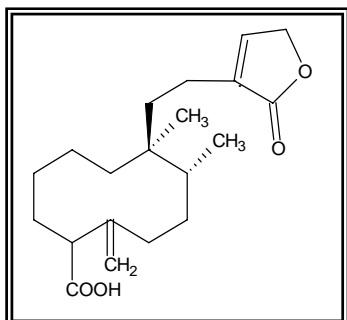
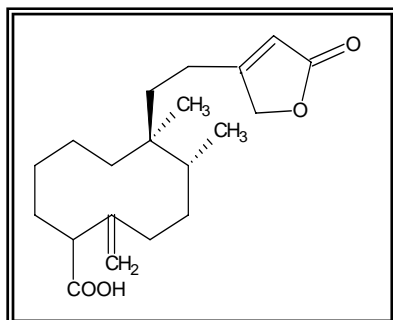
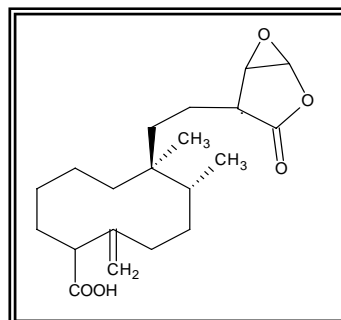
**Xa-VII****Xa-VIII****Xa-IX****Xa-X****Xa-XI****d) OTROS TIPOS****Ot-I****Ot-II**

FIGURA 49: ESTRUCTURAS DE DITERPENOS DEL GÉNERO *Pulicaria*

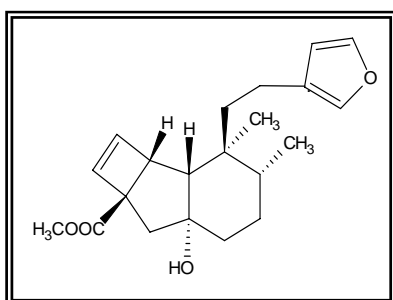
Di-I



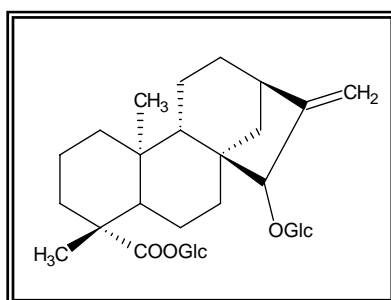
Di-II



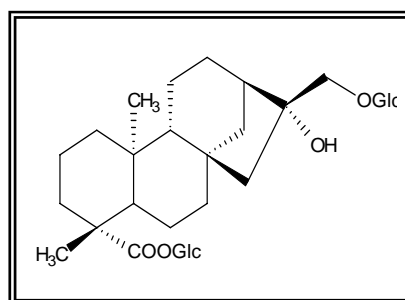
Di-III



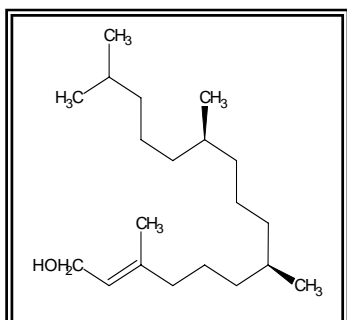
Di-IV



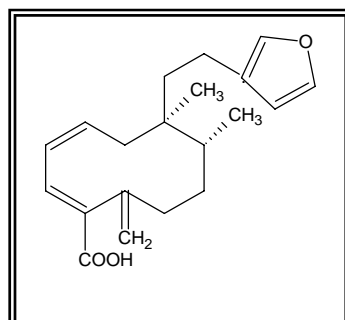
Di-V



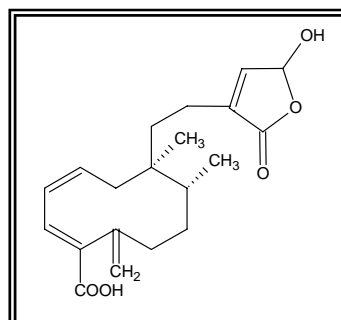
Di-VI



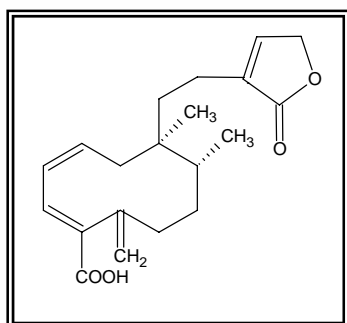
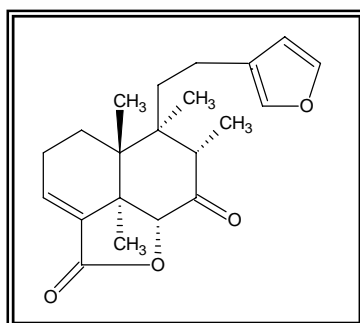
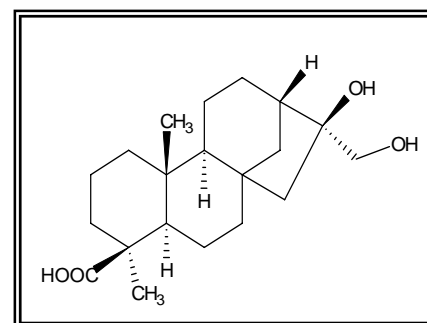
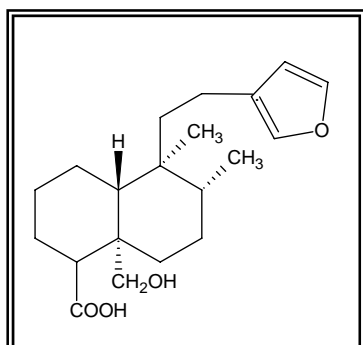
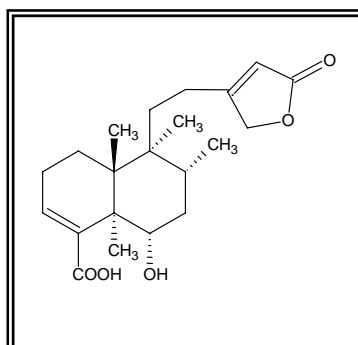
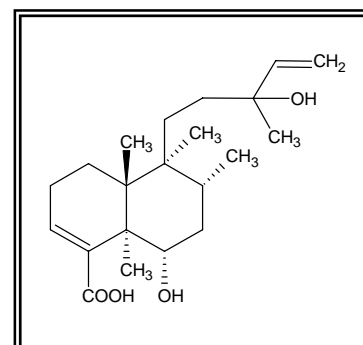
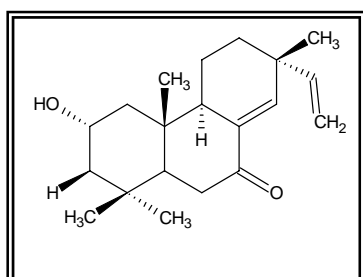
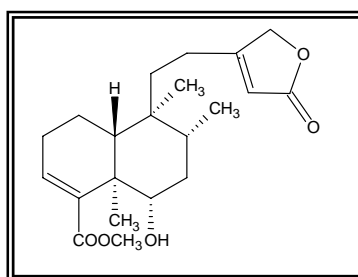
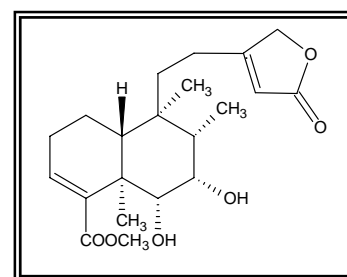
Di-VII



Di-VIII



Di-IX

**Di-X****Di-XI****Di-XII****Di-XIII****Di-XIV****Di-XV****Di-XVI****Di-XVII****Di-XVIII**

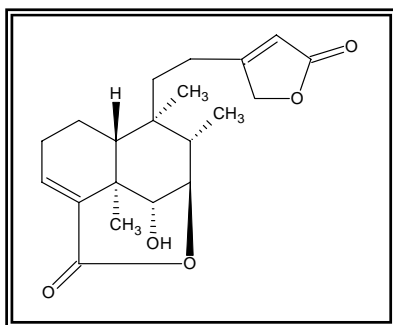
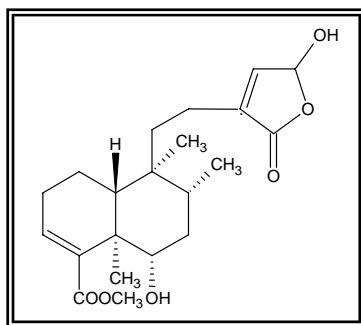
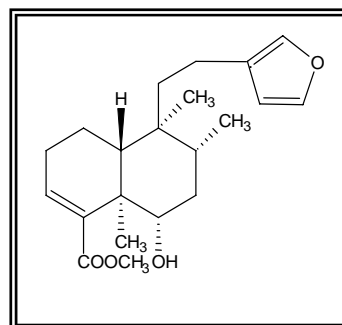
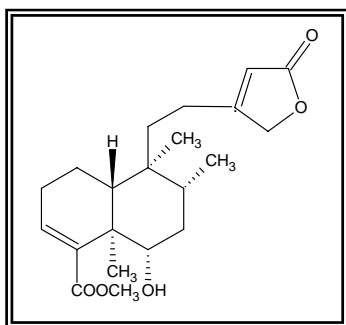
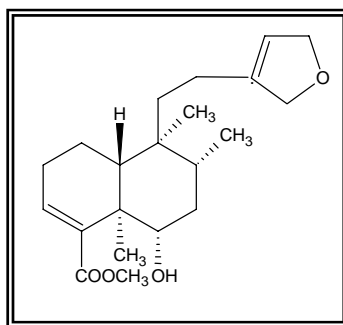
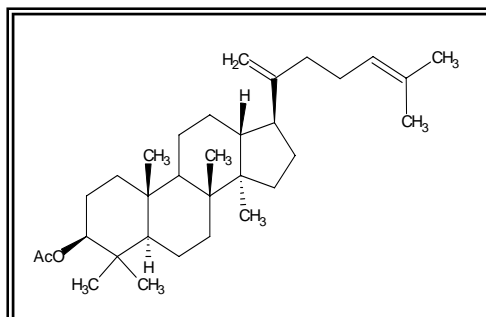
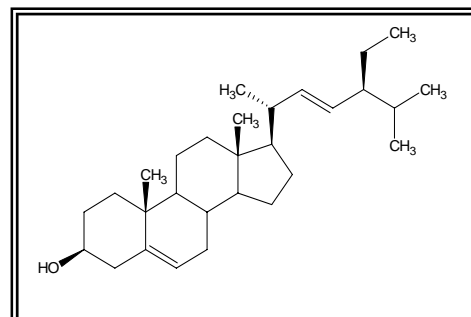
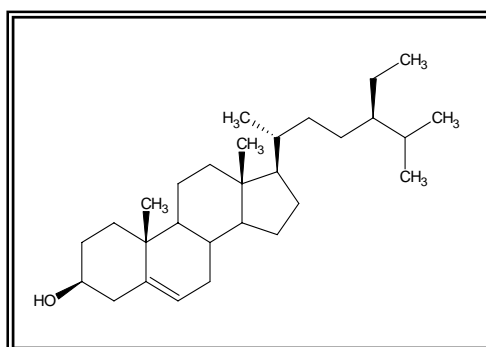
**Di-XIX****Di-XX****Di-XXI****Di-XXII****Di-XXIII**

FIGURA 50: ESTRUCTURAS DE TRITERPENOS DEL GÉNERO *Pulicaria*

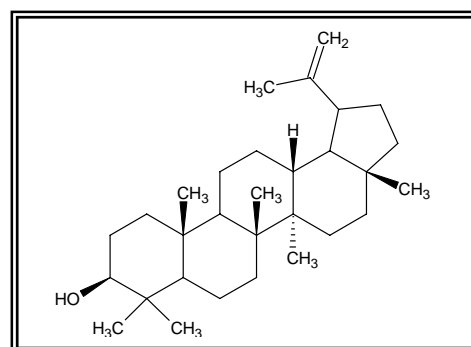
Tri-I



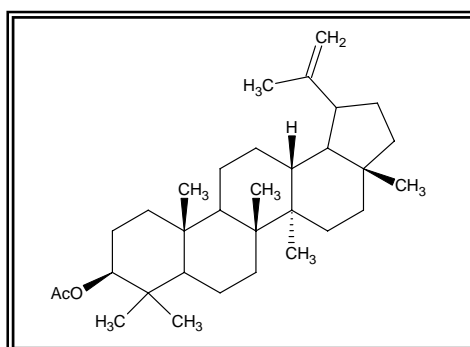
Tri-II



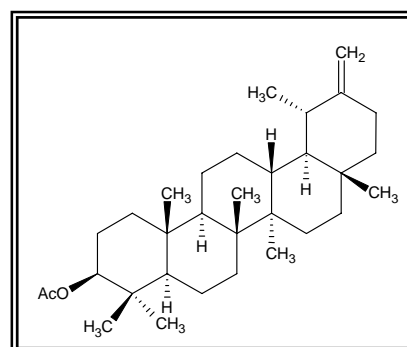
Tri-III



Tri-IV



Tri-V



Tri-VI

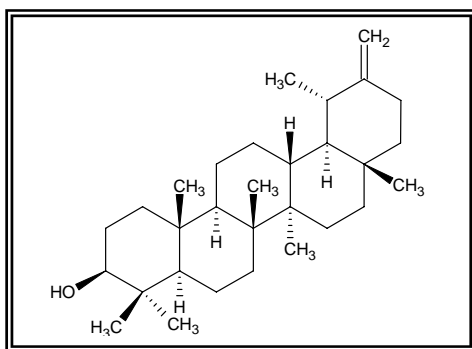
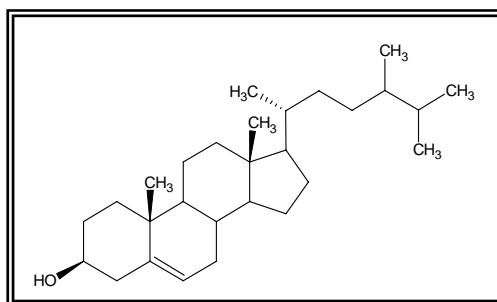
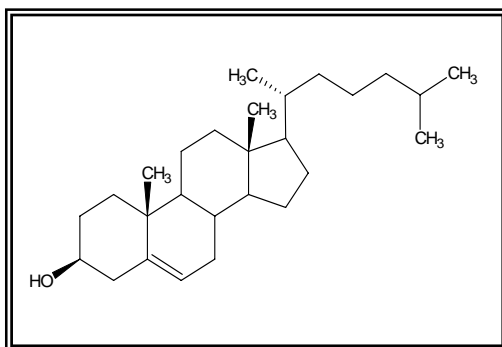
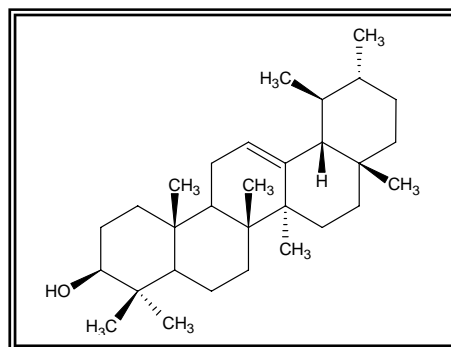
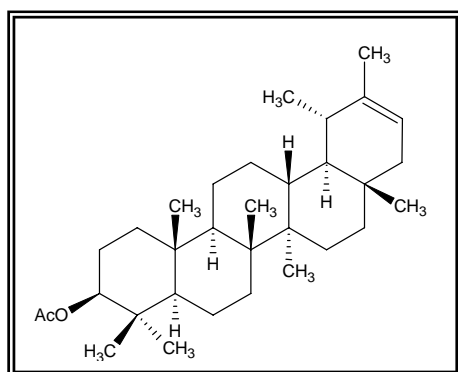
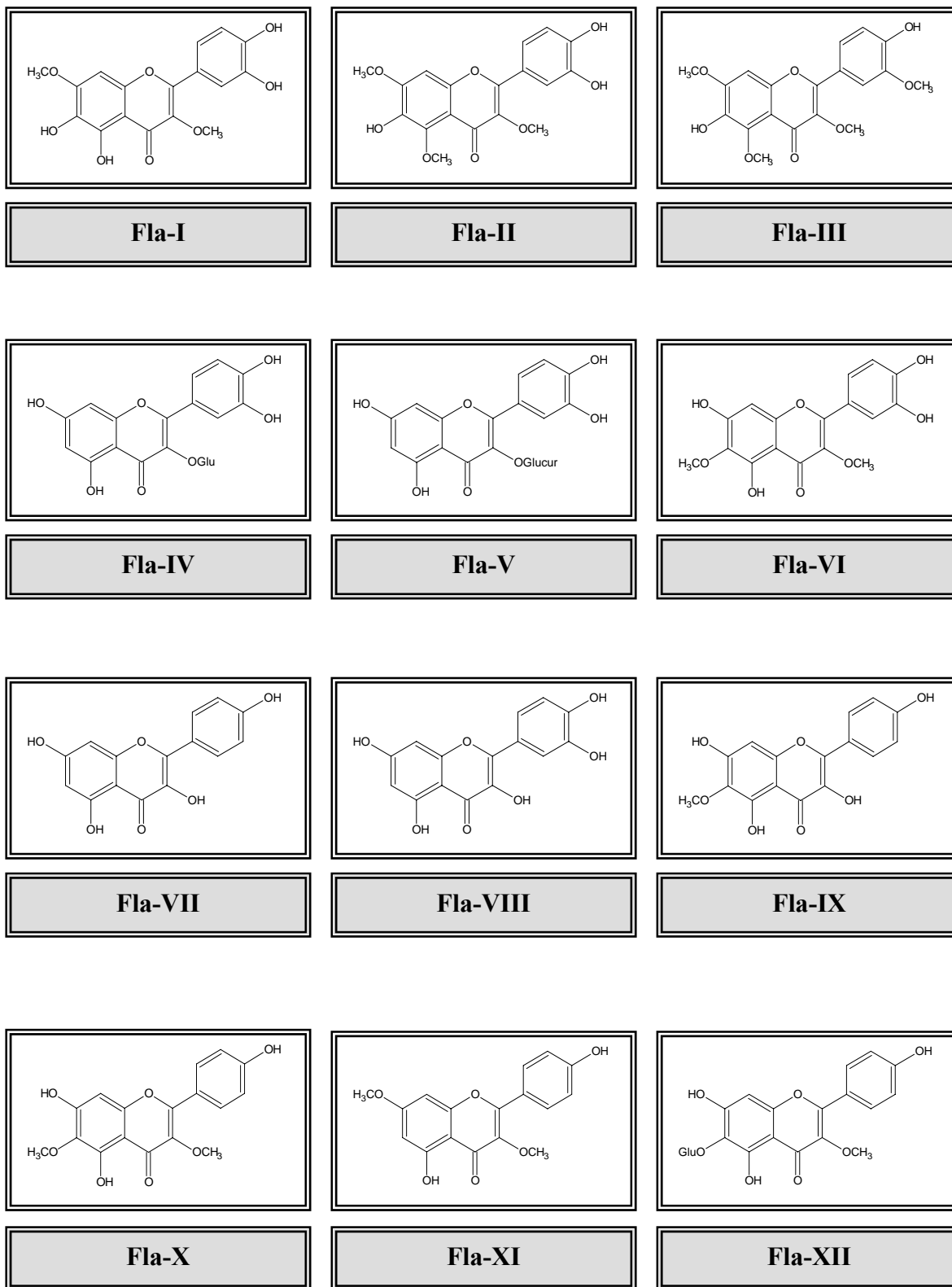
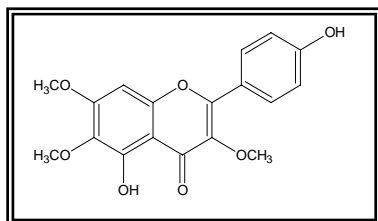
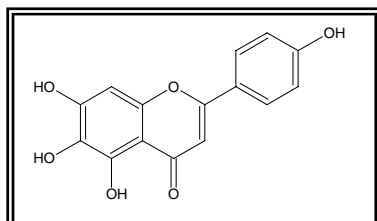
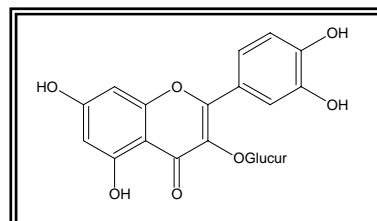
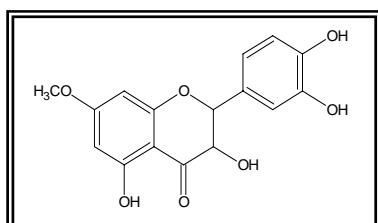
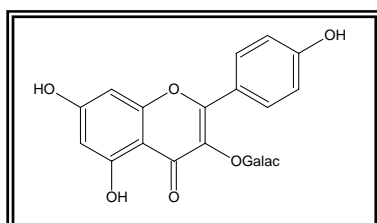
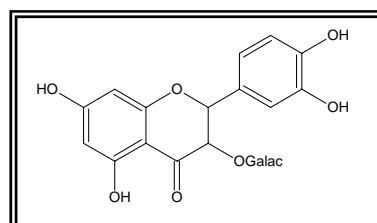
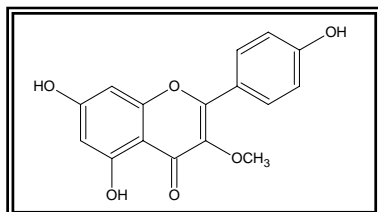
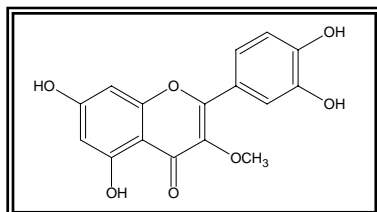
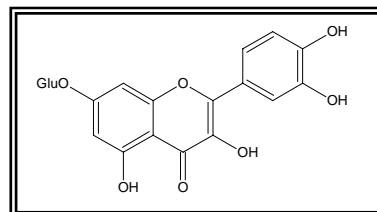
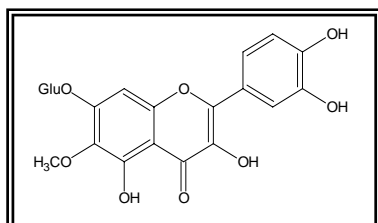
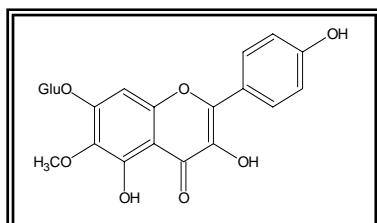
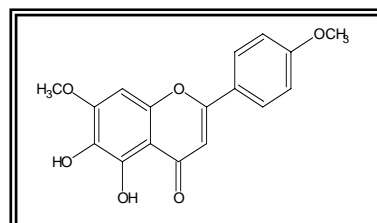
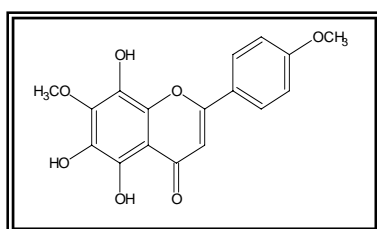
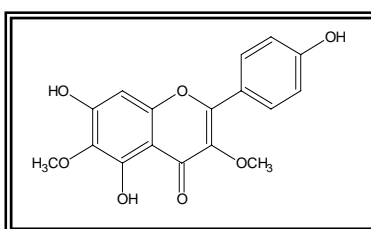
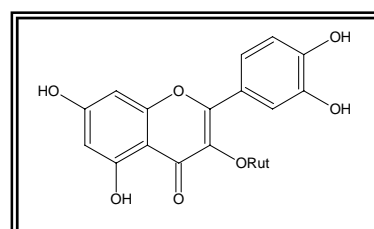
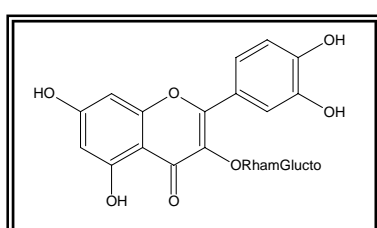
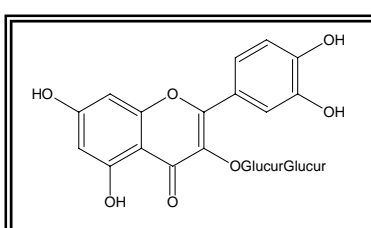
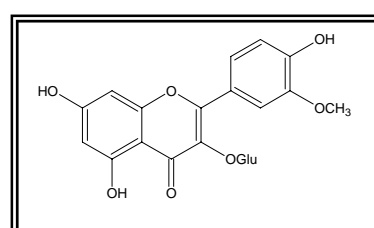
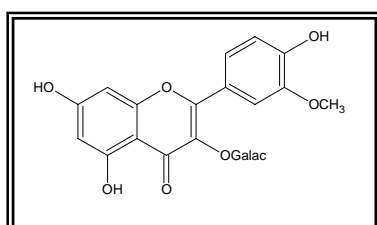
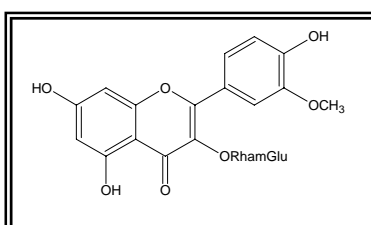
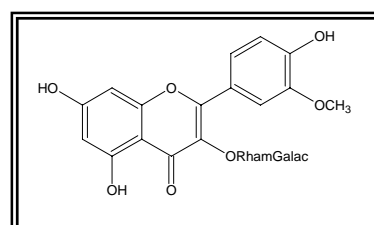
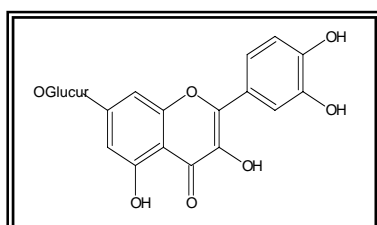
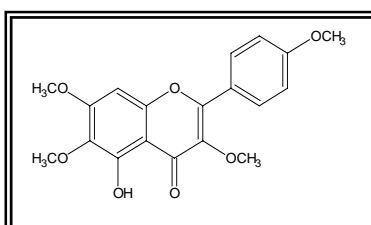
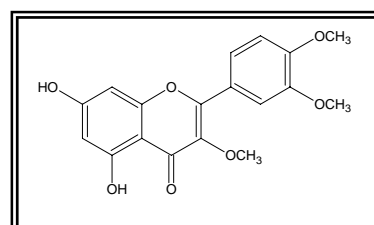
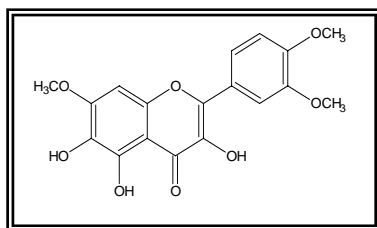
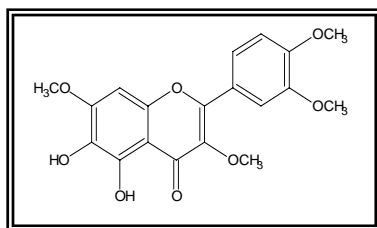
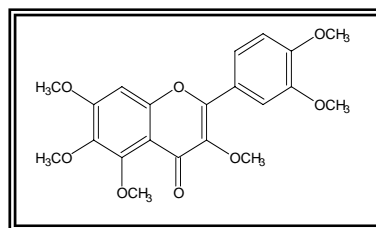
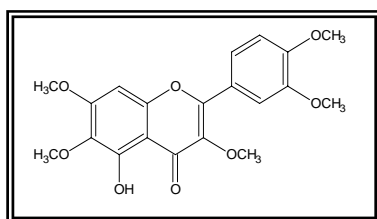
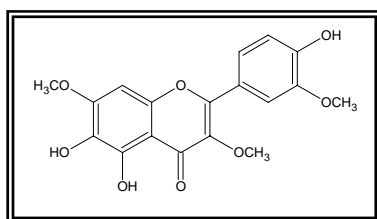
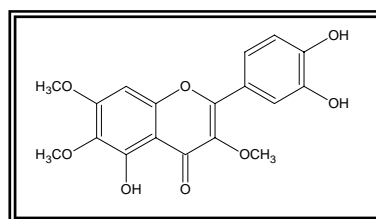
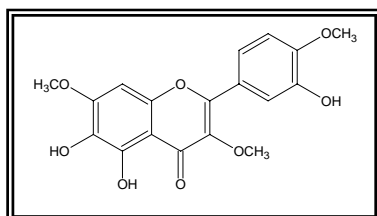
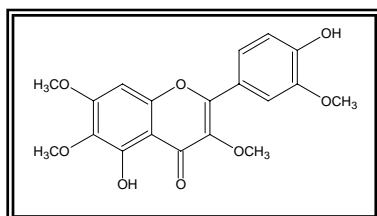
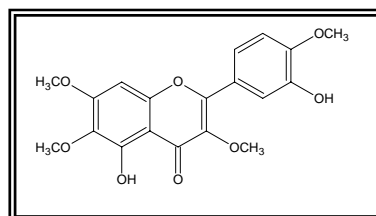
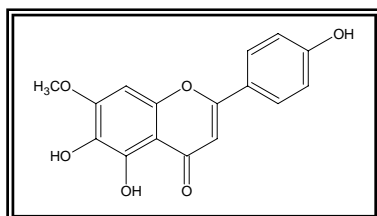
**Tri-VII****Tri-VIII****Tri-IX****Tri-X****Tri-XI**

FIGURA 51: ESTRUCTURAS DE FLAVONOIDES DEL GÉNERO *Pulicaria*

**Fla-XIII****Fla-XIV****Fla-XV****Fla-XVI****Fla-XVII****Fla-XVIII****Fla-XIX****Fla-XX****Fla-XXI****Fla-XXII****Fla-XXIII****Fla-XXIV**

**Fla-XXV****Fla-XXVI****Fla-XXVII****Fla-XXVIII****Fla-XXIX****Fla-XXX****Fla-XXXI****Fla-XXXII****Fla-XXXIII****Fla-XXXIV****Fla-XXXV****Fla-XXXVI**

**Fla-XXXVII****Fla-XXXVIII****Fla-XXXIX****Fla-XL****Fla-XLI****Fla-XLII****Fla-XLIII****Fla-XLIV****Fla-XLV****Fla-XLVI**

Con esta revisión llevada a cabo de las distintas especies de *Pulicaria*, podemos establecer una reubicación de las mismas en tres grandes grupos basándonos en los diferentes tipos de estructuras que presentan:

Grupo I. Este grupo estaría compuesto por las siguientes especies:

- *Pulicaria angustifolia*.
- *Pulicaria gnaphalodes*.
- *Pulicaria salviifolia*.
- *Pulicaria wightiana*.

La principal característica de estas especies es la presencia de diterpenos con estructura tipo clerodano como patrón común. La existencia de este tipo de estructuras nos permite establecer una relación con otros géneros de la tribu *Inuleae*, concretamente con el pequeño género *Platychaete*, el cual previamente estuvo integrado en el género *Pulicaria*.

Grupo II. Estaría constituido por las siguientes especies:

- *Pulicaria arabica*.
- *Pulicaria dysenterica*.
- *Pulicaria scabra*.
- *Pulicaria prostrata*.

Este conjunto de especies se caracteriza por la presencia de sesquiterpenos entre los que predominan las estructuras tipo cariofileno.

Grupo III. Lo constituirían las especies:

- *Pulicaria crispa*.
- *Pulicaria laciniata*.
- *Pulicaria sicula*.
- *Pulicaria undulata*.

Este conjunto de especies se diferencian de las anteriores en el hecho de que presentan como patrón común el predominio de compuestos tipo lactonas sesquiterpénicas, concretamente de los tipos guayanolida, eudesmanolida y xanthanolida, que a su vez apoyarían la propuesta realizada por algunos investigadores de realizar una segregación de estas especies y su integración en un nuevo género denominado *Francoeuria*¹⁹.

Además de la *P. odora*, de la cual solo se tienen estudios de los componentes de sus aceites esenciales, existen estudios de otras dos especies, *P. glutinosa* y *P. paludosa*, que se caracterizan por el predominio de estructuras tipo sesquiterpeno no lactónicos, con la particularidad de que en *P. glutinosa* predominan los tipos germacrano, bisaboleno y guayano, además de la presencia de diterpenos tipo clerodano que permitirían establecer una relación con las especies del **Grupo I**, mientras que *P. paludosa* presenta estructuras tipo propellano, cadinano, eudesmano y oplopano, además de compuestos tipo cariofileno, que permite relacionar esta especie con las del **Grupo II**.

La presencia de este tipo de compuestos derivados del cariofileno, en algunos casos con estructuras complejas, pone de manifiesto la posibilidad de que este tipo de compuestos podrían ser de interés quimiotaxonómico para llevar a cabo una clasificación de este género.

Esta revisión pone de relieve que es necesario proceder a realizar un estudio de más especies del género *Pulicaria* con el propósito de llevar a cabo una mejor visualización de las relaciones quimiotaxonómicas dentro de este género, así como para establecer conexiones con otros géneros de la tribu *Inuleae*.



Detalle de la planta de P. burchardii

4.2 *Pulicaria burchardii* A. Hans. & Sund. ssp. *burchardii*

Parte Teórica

La *Pulicaria burchardii* A. Hans. & Sund. ssp. *burchardii* es una planta que se distribuye por la isla de Fuerteventura, Marruecos y Sáhara. En Fuerteventura se localizan tres poblaciones, en la zona de La Pared (la mejor representada), en el islote de Cofete, y en la Punta de Jandía (muy escasa). Los ejemplares que hemos estudiado fueron recogidos de la población localizada en La Pared, al sur de la isla de Fuerteventura, como mencionamos en la parte experimental. Es una planta arbustiva de porte hemisférico, densamente ramificada, con ramas laterales tendidas que pueden enraizar en el sustrato. Tomento corto y denso de color blanco en ramas y hojas. Hojas alternas, linear-espatuladas, de 1-3 cm de longitud. Capítulos terminales de hasta 1,5 cm de diámetro, lígulas y flósculos amarillos. Es una especie halo-psammófila, siendo capaz de prosperar en suelos pedregosos o incluso con costras calcáreas. Crece en lugares expuestos al viento marino y forma a su alrededor microdunas (cuando el suelo es arenoso), agrupándose en pequeñas vaguadas donde encuentra mejores condiciones para su desarrollo.

Tal como se describe en la parte experimental, tras la extracción de esta planta con etanol, hasta agotamiento, y posterior tratamiento del extracto mediante concentración, se obtuvo un líquido denso y oscuro que, gracias a su estudio en cromatografía en columna, nos condujo a la obtención de 7 sustancias, para cuya descripción, como en las plantas estudiadas anteriormente, no se va a tener en cuenta el orden de elución cromatográfica, sino que la efectuaremos en función de sus relaciones estructurales. Según este criterio, se pueden agrupar de la siguiente forma:

a) 3 compuestos aromáticos:

- Ácido 4-hidroxibenzóico (**B3**)
- Vainillina (**B4**)
- 1 cumarina (**B5**)

b) 4 triterpenos y esteroides:

- Estigmasterol (**B1**)
- β -sitosterol (**B6**)
- 1 derivado de la amirina (**B2**)
- 1 derivado del taraxasterol (**B7**)

a) COMPUESTOS AROMÁTICOS:

Sustancia B3:

Se aisló de la fracción III de la cromatografía general como un sólido amorfo de color cremoso.

En su espectro de masas (Tabla 32A) aparece un pico de ión molecular relativamente intenso a m/z 138, que se corresponde con una fórmula molecular $C_7H_6O_3$, destacando además el pico base a m/z 121 que indica la pérdida de un grupo hidroxilo.

En el espectro IR (Tabla 32A) podemos destacar la presencia de una banda de absorción a 3406 cm^{-1} , bastante ancha y característica del grupo funcional alcohol, y otras bandas de absorción a 1708 y 1607 cm^{-1} , que indican la presencia de un grupo carbonilo sobre anillo aromático.

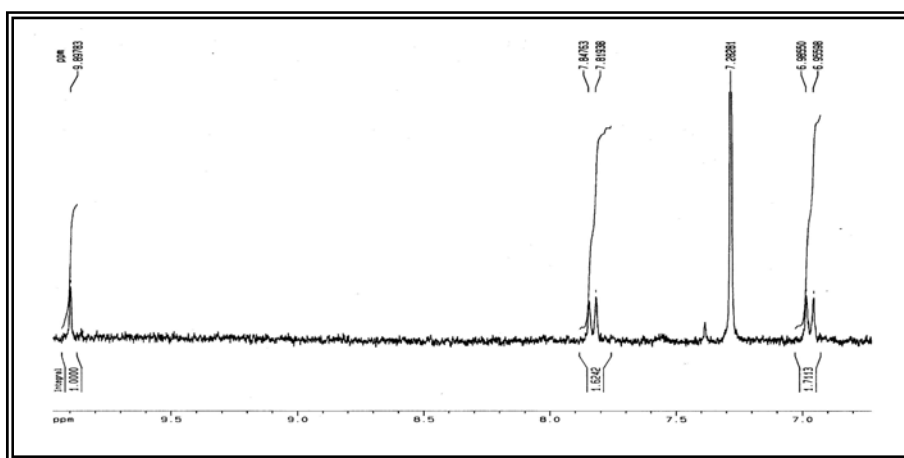
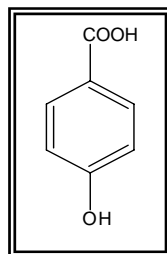


Figura 52: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **B3**

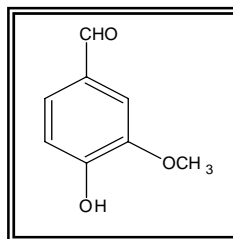
Con el estudio de su espectro de RMN ^1H (Figura 52; Tabla 32B), bastante sencillo, podemos confirmar la naturaleza de compuesto aromático para esta sustancia, sustituida además en posiciones para, ya que sólo presenta tres señales de protones, de las cuales dos se corresponden con protones aromáticos, a δ_{H} 6.97 (d, $J=8.8$ Hz, 2H) asignada a H-3 y H-5, y a δ_{H} 7.83 (d, $J=8.5$ Hz, 2H) asignada a H-2 y H-6. La otra señal corresponde con un protón de grupo ácido carboxílico, a δ_{H} 9.90 (s, 1H).

Los datos espectroscópicos coinciden con los correspondientes al **ácido 4-hidroxibenzóico**, siendo confirmada su identidad mediante una comparación directa con una muestra auténtica en cromatografía en capa fina.

**B3****Sustancia B4:**

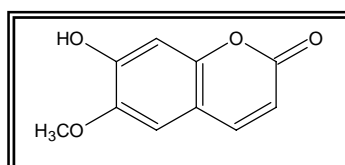
Se aisló de la fracción III de la cromatografía general como un sólido amorfo.

Los datos espectroscópicos y físicos de esta sustancia coinciden con los de la **vainillina**, descrita anteriormente en el estudio de *Tolpis webbii* (W6, ver página 42).

**B4****Sustancia B5:**

Esta sustancia se aisló a partir de la fracción IV de la cromatografía general como un sólido cristalino. Su comportamiento en CCF (fluorescencia azul cuando es expuesta a la luz ultravioleta) nos sugería que podía tener naturaleza cumarínica.

Los datos físicos y espectroscópicos de esta sustancia coinciden con los de la **escopoletina**, descrita también en *Tolpis webbii* (W3, ver página 38).

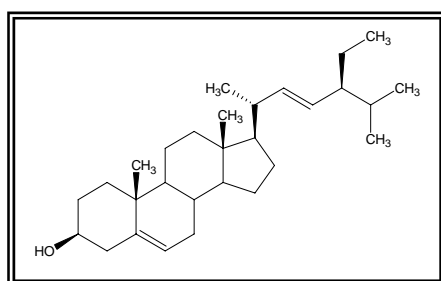
**B5**

b) TRITERPENOS Y ESTEROLES:

Sustancia B1:

Esta sustancia fue aislada a partir de la fracción III de la cromatografía general como un sólido cristalino de punto de fusión 159-161°C. El ensayo de Liebermann-Burchard da positivo, y su análisis en cromatografía en capa fina confirma que se trata de un estero.

Sus datos físicos y espectroscópicos son totalmente coincidentes con los del **estigmasterol**, descrito ya en *Tolpis webbii* (W1, ver página 44).



B1

Sustancia B6:

Se consiguió aislar esta sustancia a partir de la fracción IV de la cromatografía general como un sólido amorfo. El ensayo de Liebermann-Burchard da positivo, y su análisis en cromatografía en capa fina confirma que se trata de un estero.

Su espectro de IR (Tabla 33A) muestra fundamentalmente la presencia de grupos hidroxilo mediante la banda de absorción característica a 3416 cm^{-1} , destacando también la presencia de la banda de absorción característica para los enlaces dobles entre carbonos a 1640 cm^{-1} .

En el espectro de masas (Tabla 33A) destaca el pico de ión molecular a m/z 414, que se corresponde con una fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, además de otros picos relativamente intensos a m/z 399, que indica pérdida de un grupo metilo, a m/z 396 indicativo de la pérdida de una molécula de agua, y a m/z 381 correspondiendo a la pérdida simultánea de una molécula de agua y de un grupo metilo.

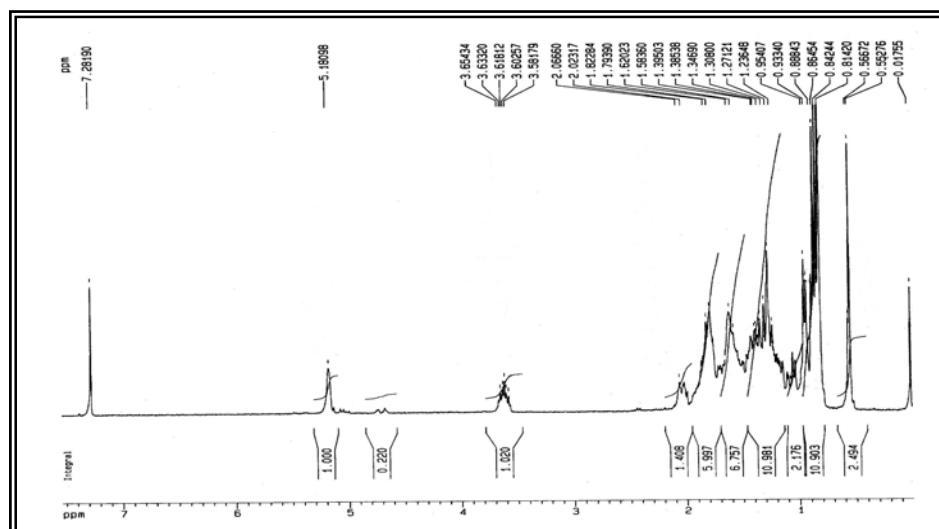
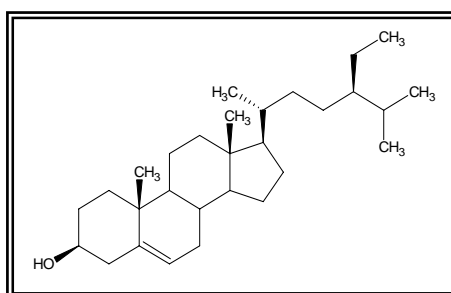


Figura 53: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **B6**

El análisis de su espectro de RMN de ^1H (Figura 53; Tabla 33B) nos permitió deducir un esqueleto triterpénico para esta sustancia. Así, podemos observar dos singuletes a δ_{H} 0.55 y 0.81, que integran para un metilo cada uno; tres dobletes a δ_{H} 0.82 ($J=8.5$ Hz), 0.87 ($J=7.2$ Hz) y 0.94 ($J=6.2$ Hz), con integral para un metilo cada uno, y un triplete a δ_{H} 0.84 ($J=6.6$ Hz; 8.5 Hz) integrando para un metilo, y que se corresponden con CH_3 -18, CH_3 -19, CH_3 -21, CH_3 -26, CH_3 -27 y CH_3 -29. También se observa una señal para protón olefínico, como un singlete ancho a δ_{H} 5.18, y la señal de un protón geminal a un oxígeno a δ_{H} 3.62 (dt, $J=4.5$ Hz; 10.9 Hz).

Estos datos son consistentes con los reseñados en la literatura para el β -sitosterol⁵¹.



B6

Sustancia B2:

Esta sustancia fue aislada a partir de la fracción III de la cromatografía general, como un sólido cristalino. En su espectro de IR (Tabla 31A) destacan principalmente las bandas indicativas de la presencia de un grupo carbonilo conjugado con un doble enlace, a 1711 y 1659 cm^{-1} , así como la banda característica para grupos hidroxilos, situada a 3432 cm^{-1} . La presencia de conjugación se confirmó al presentar una banda de absorción en el espectro UV a 250.5 nm, característica de cetonas α,β -insaturadas.

En su espectro de masas (Tabla 31A) aparece el pico de ión molecular a m/z 440, lo que concuerda con una fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$, y apunta a un esqueleto de tipo triterpénico, destacando además la presencia de picos relativamente poco intensos a m/z 422, que indica la pérdida de una molécula de agua, y a m/z 407, señalando la pérdida adicional de un grupo metilo. También se observa la presencia de dos fragmentos relativamente intensos a m/z 273 y 232, que están en concordancia con un patrón de fragmentación característico de compuestos de naturaleza triterpénica pentacíclicos con un grupo cetónico α,β -insaturado en el anillo C¹⁰².

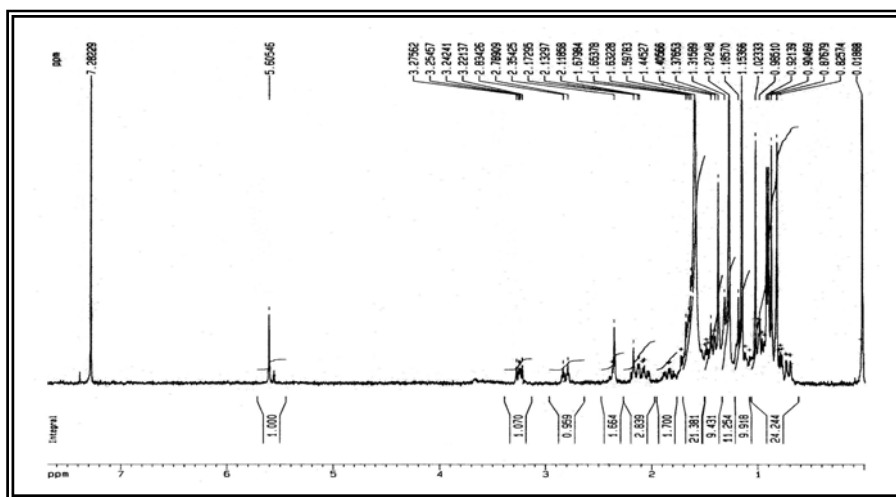
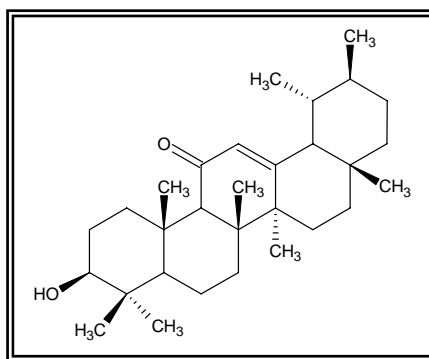


Figura 54: Espectro de RMN ^1H de la sustancia B2

102. Budzikiewicz, H.; Wilson, J.M. and Djerassi, C. "Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes". J. Am. Chem. Soc. (1963), 85 (22), 3688-3699.

El análisis de su espectro de RMN de ^1H (Figura 54; Tabla 31B) nos permite confirmar el esqueleto triterpénico para esta sustancia. Así, podemos observar la presencia de cuatro señales singuletes a δ_{H} 0.82, 0.88, 1.02 y 1.38, cada una integrando para un grupo metilo, y una quinta señal singulete a δ_{H} 1.15 con integral para dos grupos metilos, y que se asignan a CH_3 -23, CH_3 -24, CH_3 -25, CH_3 -26, CH_3 -27 y CH_3 -28. También aparece un doblete a δ_{H} 0.91 ($J=5.0$ Hz), que integra para dos metilos, asignado a CH_3 -29 y CH_3 -30. Se puede destacar también la presencia de un protón olefinico, como un singulete a δ_{H} 5.60 que asignamos a H-12 y, por último, indicar la presencia de una señal de un protón geminal a un oxígeno a δ_{H} 3.25 (dd, $J=5.3$ Hz; 10.0 Hz).

Los datos físicos y espectroscópicos reseñados son coincidentes con los indicados en la literatura consultada para **11-oxo- α -amirina**^{103, 104}.

**B2**

Sustancia B7:

Esta sustancia fue aislada a partir de la fracción IV de la cromatografía general, como un sólido amorfo. En el espectro de UV (Tabla 34A) presenta una banda de absorción a 231 nm, apuntando a la posible presencia de conjugación en su estructura, probablemente una cetona α,β -insaturada. En su espectro de IR destacan principalmente las bandas características para grupos carbonilos conjugados a 1657 y 1630 cm^{-1} , además de la banda indicativa de la presencia de grupos hidroxilos, situada a 3220 cm^{-1} .

103. Bandaranayake, W.M. "Terpenoids of *Canarium zeylanicum*". *Phytochemistry* (1980), 19, 255-257.

104. Matsunaga, S.; Tanaka, R. and Akagi, M. "Triterpenoids from *Euphorbia maculata*". *Phytochemistry* (1988), 27 (2), 535-537.

En el espectro de masas (Tabla 34A) se observa el pico de ión molecular poco intenso a m/z 440, que concuerda con una fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_2$, así como la presencia de otros picos relevantes a m/z 422 (que indica la pérdida de agua), a 407 (que corresponde a la pérdida adicional de un grupo metilo), y a m/z 379 (señalando la pérdida adicional de un grupo carbonilo).

En el espectro de RMN de ^{13}C (Tabla 34B) se observan señales para treinta carbonos, desglosados en siete grupos metilos a δ_C 14.7, 15.4, 16.0, 16.3, 17.5, 23.1 y 28.0; nueve grupos metilenos a δ_C 18.2, 21.4, 26.8, 27.2, 27.4, 29.3, 34.2, 38.7 y 43.0; cinco grupos metinos a δ_C 29.7, 39.0, 48.2, 50.3 y 55.3; y cinco carbonos cuaternarios a δ_C 34.8, 37.1, 38.8, 40.9 y 42.3. Otras señales que se observan corresponden a dos carbonos olefinicos a δ_C 149.3 (disustituido) y 148.5 (éste completamente sustituido), un carbono oxigenado a δ_C 79.0, y un carbono aldehído a δ_C 194.1.

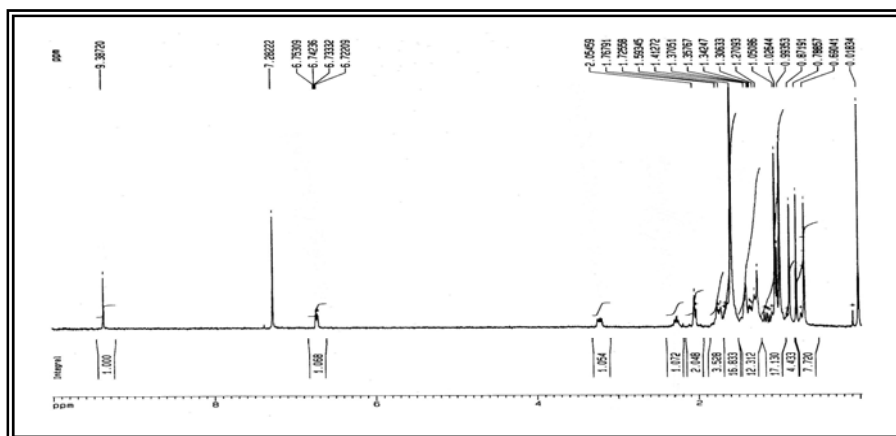
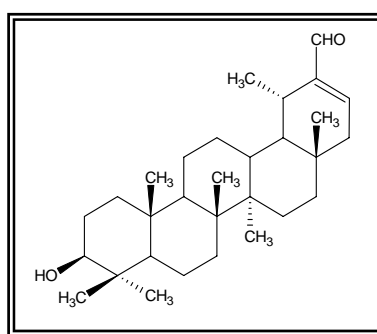


Figura 55: Espectro de RMN 1H de la sustancia **B7**

El espectro de RMN de 1H (Figura 55; Tabla 34B), junto con los datos ya comentados del espectro de RMN de ^{13}C y D.E.P.T., nos hicieron pensar en un esqueleto tipo taraxasterol. Así, además de la señal característica para el protón aldehído a δ_H 9.39 (s), muestra señales para siete grupos metilos, seis como singuletes a δ_H 0.69, 0.79, 0.87, 0.99 (6H) y 1.05, y una como doblete a δ_H 1.04 ($J=7.3$ Hz). Como el esqueleto tipo taraxasterol presenta ocho grupos metilos, probablemente la existencia de sólo siete grupos apunta a una oxidación hasta el grupo aldehído del octavo grupo metilo ausente.

También aparecen señales destacadas para un protón geminal a grupo oxigenado, a δ_H 3.22 (dd, $J=5.4$ Hz; 11.1 Hz), y para un protón olefínico a δ_H 6.73 (dd, $J=3.2$ Hz; 6.0 Hz). El desplazamiento a campo muy bajo del protón olefínico, en combinación con la existencia de conjugación en la molécula, apuntada por los datos de UV e IR, nos hicieron pensar en la posibilidad de que el grupo aldehído tuviera una insaturación conjugada. Debido a la configuración del esqueleto tipo taraxasterol, las únicas posibilidades para ubicar el grupo aldehído α,β -insaturado se corresponden con los carbonos 29 y 30. En el caso del carbono 29, la insaturación en α,β podría estar situada entre los carbonos 18 y 19, ó 19 y 20, pero en ambos casos no existiría ningún protón olefínico en la molécula, lo que sería contradictorio con los datos espectrales de la sustancia. Por lo tanto, la única posibilidad para ubicar el grupo aldehído α,β -insaturado se corresponde con el carbono 30 para el grupo aldehído, y los carbonos 20 y 21 para el doble enlace, ubicándose el protón olefínico en H-21. Estos datos resultan ser muy similares a los de la sustancia **T7** (**3 β ,22 α -dihidroxitaraxaster-20-en-30-al**, ver página 103) salvo por la presencia de una única señal de protón geminal a hidroxilo, por lo que concluimos que **B7** debía tener una estructura muy parecida a la de **T7** con un grupo hidroxilo menos.

Todos estos datos espectroscópicos mencionados concuerdan con los reseñados en la literatura consultada para el compuesto **3 β -hidroxitaraxaster-20-en-30-al**^{105, 106}.



B7

105. Herz, W. and Kulanthaivel, P. "Sesquiterpene lactones from *Liatris acidota*, *L. aspera* and *L. mucronata*". *Phytochemistry* (1983), 22 (2), 513-521.

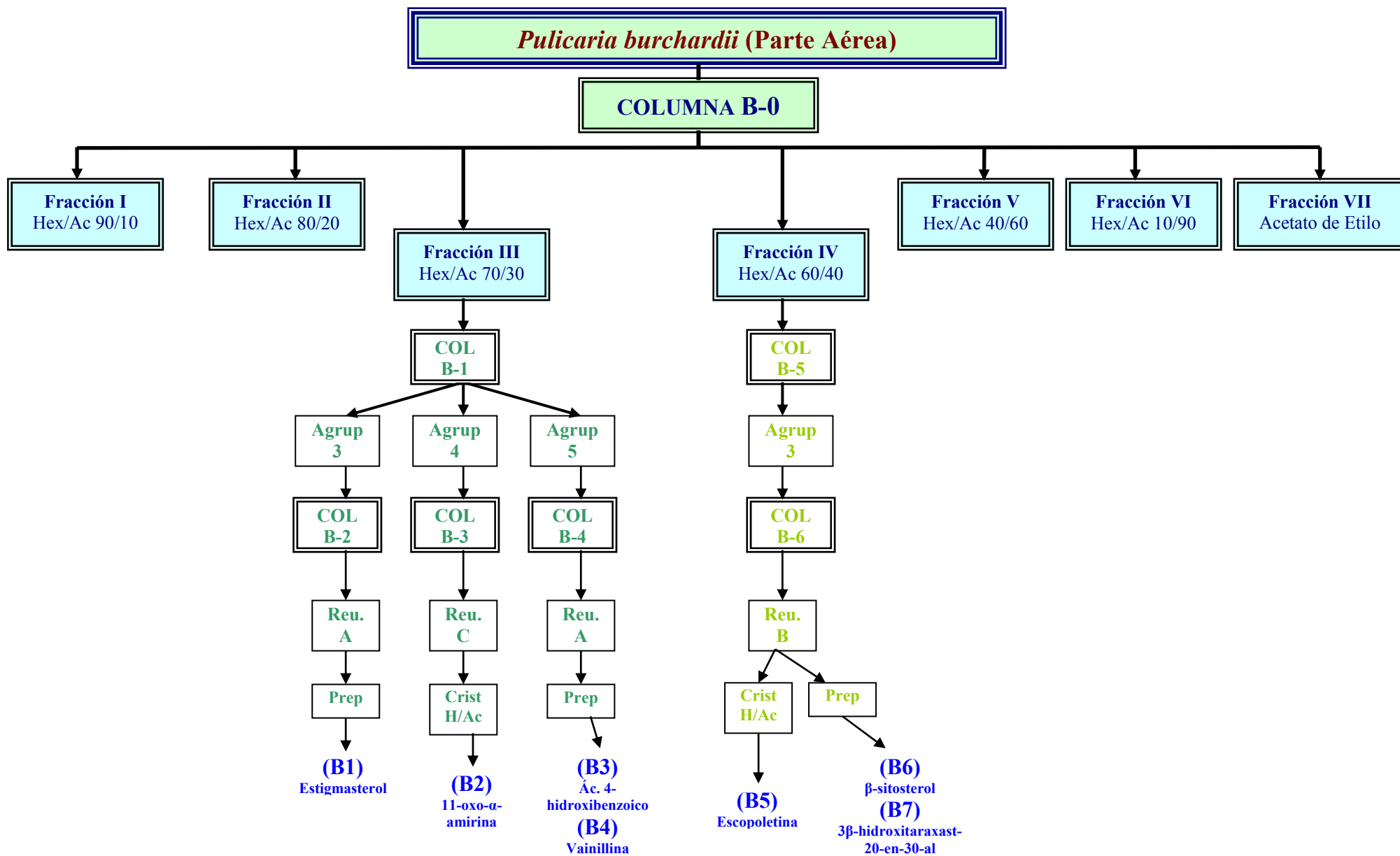
106. Shiojima, K.; Suzuki, H.; Kodera, N.; Ageta, H.; Chang, H.-C. and Chen, Y.-P. "Composite constituents: thirty-nine triterpenoids including two novel compounds from *Ixeris chinensis*". *Chem. & Pharm. Bull.* (1996), 44 (3), 509-514.



Detalle de las flores de P. burchardii

4.3 *Pulicaria burchardii* A. Hans. & Sund. ssp. *burchardii*

Parte Experimental



Se recogieron las partes aéreas de *Pulicaria burchardii* en la localidad de La Pared (sur de Fuerteventura) en Mayo de 1994. La recolección fue efectuada por el profesor Dr. José Luis Eiroa Martínez y clasificada por la Dra. Rosa Febles Hernández, depositándose un voucher espécimen (LPA 20915.916.917) en el Herbario del Jardín Canario Viera y Clavijo de Las Palmas de Gran Canaria. El material vegetal fue sometido a un proceso de secado a temperatura ambiental y en entorno oscuro, obteniéndose un peso de material seco de 3.125 g, para posteriormente ser triturado cuidadosamente y extraído con etanol en caliente en un aparato Soxhlet, hasta su total agotamiento. El extracto etanólico así obtenido se concentró por eliminación del disolvente a presión reducida, obteniendo un residuo viscoso oscuro con un peso de 495 gramos.

El extracto etanólico se disolvió en acetona, para a continuación reabsorberlo en gel de sílice (0,02-0,5 mm mallas), obteniendo así una mezcla que se usó como cabeza de una columna húmeda de gel de sílice con el mismo grosor de grano, para lo cual se utilizó 1,0 kg de ésta última. Se utilizaron como eluyentes de la columna diferentes mezclas de hexano y acetato de etilo, con incremento de la concentración de acetato de etilo conforme se avanzaba en la cromatografía, comenzando por hexano puro, y finalizando con acetato de etilo al 100%.

Se recogieron un total de 98 fracciones, de un litro cada una, que se fueron agrupando de acuerdo a su comportamiento en cromatografía de capa fina, en un total de 7 reuniones de fracciones (nombradas I a VII). A continuación presentamos los resultados obtenidos del estudio cromatográfico de cada una de ellas:

| FRACCIONES | ELUYENTES | SUSTANCIAS |
|------------|----------------------------------|-----------------------|
| I | n-hexano / acetato etilo 10% | ----- |
| II | n-hexano / acetato etilo 20 % | ----- |
| III | n-hexano / acetato etilo 30 % | B1, B2, B3, B4 |
| IV | n-hexano / acetato etilo 40/50 % | B5, B6, B7 |
| V | n-hexano / acetato etilo 60 % | ----- |
| VI | n-hexano / acetato etilo 90% | ----- |
| VII | Acetato etilo | ----- |

Fracción III:

Esta fracción fue eluída en la cromatografía general con hexano-acetato de etilo (7:3), y tras ser concentrada a vacío dio un residuo que pesó 5.47 g. El extracto obtenido fue sometido a continuación a cromatografía en columna empaquetada con gel de sílice (columna B-1), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogándose un total de 150 fracciones de 100 mL que se reunieron, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en seis grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 6.

El agrupamiento 3 de la columna B-1 tras ser concentrado a vacío dio un residuo que pesó 0,159 g, y que fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna B-2) con n-hexano-acetato de etilo (7:3), recogándose un total de 66 fracciones de 50 mL que fueron agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cuatro reuniones de fracciones que nombramos de A a D. La fracción A de la columna B-2 nos permitió obtener la sustancia **B1** (11 mg), después de purificación por cromatografía preparativa en capa gruesa (benceno-acetato de etilo, 9:1, tres eluciones).

El agrupamiento 4 de la columna B-1 dio un residuo (tras ser concentrado a vacío) que pesó 0,180 g. Este residuo fue tratado posteriormente mediante cromatografía en columna de media presión (columna B-3) con n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogándose un total de 100 fracciones de 75 mL que se agruparon, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cuatro reuniones de fracciones que nombramos de A a D. La fracción C de la columna B-3 nos permitió obtener la sustancia **B2** (18 mg) mediante recristalización en n-hexano-acetato de etilo.

El agrupamiento 5 de la columna B-1 fue concentrado a vacío y generó un residuo que pesó 0,070 g. Este residuo fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna B-4) con n-hexano-acetato de etilo (9:1), recogiendo un total de 60 fracciones de 50 mL que, tras su análisis en cromatografía en capa fina, se agruparon en tres reuniones de fracciones que nombramos de A a C. La fracción A de la columna B-4 nos permitió obtener las sustancias **B3** (5 mg) y **B4** (6 mg) después de purificación por cromatografía preparativa en capa gruesa (benceno-acetato de etilo, 8:2, cuatro eluciones).

Los datos físicos y espectroscópicos de todas esas sustancias, así como las reacciones de formación de derivados y los datos de éstos, los exponemos a continuación.

Sustancia B1: Sólido cristalino. Constantes físicas y espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **estigmasterol (W1)**, ver página 71).

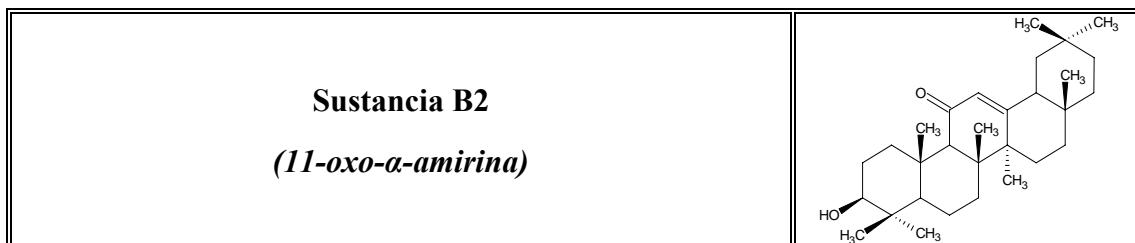


TABLA 31A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia B2

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | 200-204°C (MeOH/CHCl ₃) |
| UV (nm): | 250.5 |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3432, 2915, 2856, 1711, 1659, 1620, 1461, 1386, 1258, 1207, 1042, 993. |
| EM m/z (%): | 440 [M] ⁺ (24), 422 [M-18] ⁺ (8.5), 407 [M-18- Me] ⁺ (9), 287 (10), 273 (92), 256 (22.5), 232 (100), 217 (14), 189 (17), 175 (39), 149 (72), 135 (79), 121 (30), 109 (33), 95 (44), 83 (48), 69 (76), 57 (98), 55 (81). |

TABLA 31B: R.M.N. ¹H de la Sustancia B2 (CDCl₃)

| N° | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|------|-----------|------|----|------------|------|-------|------|
| 1 | ---- | ---- | ---- | --- | 16 | 1,12 | m | ---- | 1H |
| | 1,72 | m | ---- | 1H | | 1,31 | m | ---- | 1H |
| 2 | ---- | ---- | ---- | --- | 17 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 3 | 3,25 | dd | 6,3; 10,0 | 1H | 18 | 1,41 | m | ---- | 1H |
| 4 | ---- | ---- | ---- | --- | 19 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 5 | 0,70 | m | ---- | 1H | 20 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 6 | 1,41 | m | ---- | 1H | 21 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | 1,53 | m | ---- | 1H | | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 7 | 1,44 | m | ---- | 2H | 22 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 8 | ---- | ---- | ---- | ---- | 23 | 0,82 | s | ---- | 3H |
| 9 | 2,17 | m | ---- | 1H | 24 | 0,88 | s | ---- | 3H |
| 10 | ---- | ---- | ---- | ---- | 25 | 1,15 | s | ---- | 6H |
| 11 | ---- | ---- | ---- | ---- | | | | | |
| 12 | 5,60 | s | ---- | 1H | 27 | 1,38 | s | ---- | 3H |
| 13 | ---- | ---- | ---- | ---- | 28 | 1,02 | s | ---- | 3H |
| 14 | ---- | ---- | ---- | ---- | 29 | 0,91 | d | ---- | 6H |
| 15 | 0,98 | m | ---- | 1H | 30 | | | | |
| | 1,68 | m | ---- | 1H | | | | | |

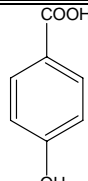
| | |
|--|---|
| <p>Sustancia B3 (Ácido 4-hidroxibenzóico)</p> |  |
|--|---|

TABLA 32A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia B3

| | |
|---|---|
| Estado: | Sólido amorfo. |
| IR (KBr) ν máx (cm⁻¹): | 3406, 2923, 2853, 1708, 1607, 1461, 1380, 1279, 1164, 1099, 853. |
| EM m/z (%): | 138 [M] ⁺ (64), 121 [M-17] ⁺ (100), 111 (14), 97 (22), 93 (28), 85 (29), 83 (26), 71 (44), 69 (36), 57 (67), 55 (42). |

TABLA 32B: R.M.N. ¹H de la Sustancia B3 (CDCl₃)

| Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|-------|-------|------|------|------------|-----|-------|-----|
| 1 | ----- | ----- | ----- | ---- | 6 | 7,83 | d | 8,5 | 1H |
| 2 | 7,83 | d | 8,5 | 1H | COOH | 9,90 | s | ----- | 1H |
| 3 | 6,97 | d | 8,8 | 1H | | | | | |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ---- | | | | | |
| 5 | 6,97 | d | 8,8 | 1H | | | | | |

Sustancia B4: Sólido amorfo. Constantes espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **vainillina (W6)**, ver página 79).

Fracción IV:

Esta fracción fue eluída en la cromatografía general con hexano-acetato de etilo (6:4 y 5:5) y, tras ser concentrada a vacío dio un residuo que pesó 7.05 g. El extracto obtenido se sometió a un proceso de cromatografía en columna empaquetada con gel de sílice (columna B-5), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogándose un total de 190 fracciones de 100 mL que se reunieron, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en siete grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 7.

El agrupamiento 3 de la columna B-5 dio un residuo que pesó 1.18 g, y fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna B-6) con n-hexano-acetato de etilo (7:3), obteniéndose un total de 92 fracciones que se agruparon (tras análisis por cromatografía en capa fina) en tres reuniones de fracciones que denominamos *A*, *B* y *C*.

La fracción *B* nos permitió en primer lugar obtener la sustancia **B5** (20 mg) mediante recristalización en n-hexano-acetato de etilo. Las aguas madres nos permitieron la obtención de los productos **B6** (7 mg) y **B7** (6 mg), purificados mediante cromatografía preparativa en capa gruesa (benceno-acetato de etilo, 8:2, dos eluciones).

Los datos físicos y espectroscópicos de todas esas sustancias, así como las reacciones de formación de derivados y los datos de éstos, los exponemos a continuación.

Sustancia B5: Sólido cristalino. Constantes físicas y espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **escopoletina (W3)**, ver página 76).

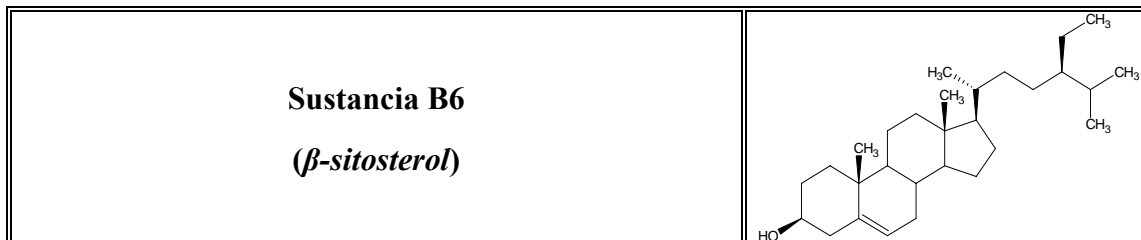
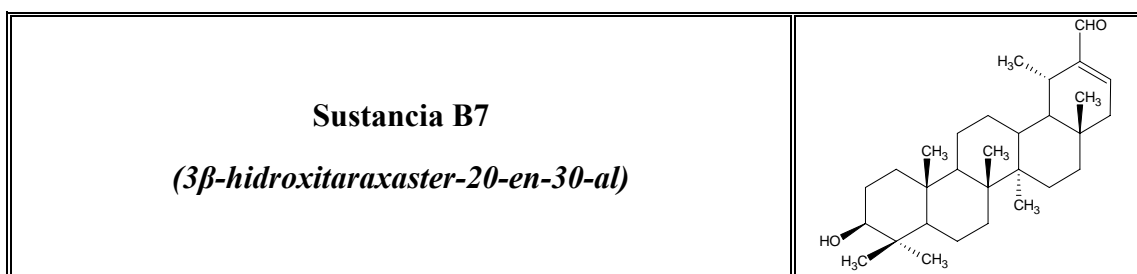


TABLA 33A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia B6

| | |
|--|--|
| Estado: | Sólido amorfo. |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3416, 2954, 2870, 1640, 1464, 1375, 1096, 1040, 971, 830. |
| EM m/z (%): | 414 [M] ⁺ (100), 399 [M-Me] ⁺ (26.5), 396 [M-H ₂ O] ⁺ (19), 386 [M-28] ⁺ (24), 381 [M-Me-H ₂ O] ⁺ (10), 271 (26), 255 (86.5), 231 (26), 173 (10), 161 (19), 147 (26), 133 (20), 119 (26), 107 (32), 95 (28), 81 (28), 69 (30.5), 55 (31). |

TABLA 33B: R.M.N. ¹H de la Sustancia B6 (CDCl₃)

| Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|------|-----------|------|----|------------|------|----------|------|
| 1 | 1,03 | m | ---- | 1H | 16 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | 1,82 | m | ---- | 1H | | 1,72 | m | ---- | 1H |
| 2 | 1,49 | m | ---- | 1H | 17 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | 1,82 | m | ---- | 1H | | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 3 | 3,62 | dt | 4,5; 10,9 | 1H | 18 | 0,55 | s | ---- | 3H |
| 4 | ---- | ---- | ---- | ---- | 19 | 0,81 | s | ---- | 3H |
| 5 | ---- | ---- | ---- | ---- | 20 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 6 | 5,18 | s br | ---- | 1H | 21 | 0,94 | d | 6,2 | 3H |
| 7 | ---- | ---- | ---- | ---- | 22 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 8 | 1,53 | m | ---- | 1H | 23 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 9 | 1,03 | m | ---- | 1H | 24 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 10 | ---- | ---- | ---- | ---- | 25 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 11 | 1,43 | m | ---- | 1H | 26 | 0,85 | d | 6,6 | 3H |
| | 1,58 | m | ---- | 1H | | | | | |
| 12 | 1,17 | m | ---- | ---- | 27 | 0,87 | d | 7,2 | 3H |
| | 2,04 | d br | 13,0 | 1H | | | | | |
| 13 | ---- | ---- | ---- | ---- | 28 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 14 | 1,11 | m | ---- | 1H | 29 | 0,84 | t | 6,6; 8,5 | 3H |
| 15 | 1,49 | m | ---- | 1H | | | | | |
| | 1,67 | m | ---- | 1H | | | | | |

**TABLA 34A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia B7**

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido amorfo. |
| UV (nm) | 231 |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3220, 2917, 2849, 1657, 1630, 1459, 1374, 1163, 1110, 1041, 971, 761, 717. |
| EM m/z (%): | 440 [M] ⁺ (18), 422 [M-H ₂ O] ⁺ (95), 407 [M-H ₂ O-Me] ⁺ (37), 379 [M-H ₂ O-Me-28] ⁺ (34.5), 353 (13), 340 (24), 311 (6), 286 (7), 271 (10), 243 (13), 217 (16), 207 (40), 189 (100), 175 (25), 161 (21), 147 (23), 135 (64), 121 (55), 107 (53), 95 (61), 81 (49), 69 (50), 55 (39). |

TABLA 34B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia B7 (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------|---------------|------------|----------------|-----------|----|-------|---------------|------------|----------------|-----------|
| 1 | 38,7 | 0,90 1,72 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 16 | 29,3 | 2,04 | d br | 6,1 | 2H |
| 2 | 27,4 | ----- 1,64 | ----- m | ----- ----- | --- 1H | 17 | 34,8 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 3 | 79,0 | 3,22 | dd | 5,4; 11,1 | 1H | 18 | 48,2 | 1,15 | dd | 8,1;10,6 | 1H |
| 4 | 38,8 | ----- | ----- | ----- | --- | 19 | 29,7 | 2,28 | m | ----- | 1H |
| 5 | 55,3 | 0,73 | m | ----- | 1H | 20 | 148,5 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 6 | 18,2 | 1,37 1,55 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 21 | 149,3 | 6,73 | dd | 3,2; 6,0 | 1H |
| 7 | 34,2 | 1,41 | m | ----- | 2H | 22 | 43,0 | 1,35 ----- | m ----- | ----- ----- | 1H --- |
| 8 | 40,9 | ----- | ----- | ----- | --- | 23 | 28,0 | 0,79 | s | ----- | 3H |
| 9 | 50,3 | 1,30 | m | ----- | 1H | 24 | 16,3 | 0,87 | s | ----- | 3H |
| 10 | 37,1 | ----- | ----- | ----- | --- | 25 | 16,0 | 0,99 | s | ----- | 3H |
| 11 | 21,4 | 1,34 ----- | m ----- | ----- ----- | 1H --- | 26 | 15,4 | 1,05 | s | ----- | 3H |
| 12 | 27,2 | 1,27 1,77 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 27 | 14,7 | 0,99 | s | ----- | 3H |
| 13 | 39,0 | 1,75 | m | ----- | 1H | 28 | 17,5 | 0,69 | s | ----- | 3H |
| 14 | 42,3 | ----- | ----- | ----- | --- | 29 | 23,1 | 1,04 | d | 7,3 | 3H |
| 15 | 26,8 | 1,09 1,68 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 30 | 194,1 | 9,39 | s | ----- | 1H |



***4.4 Pulicaria canariensis* Bolle ssp. *canariensis*.**

Parte Teórica

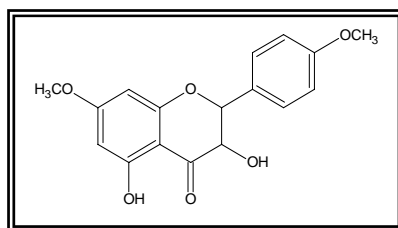
Pulicaria canariensis Bolle es un endemismo de las islas orientales, del que se diferencian dos subespecies: **ssp. canariensis**, en Lanzarote y Fuerteventura y **ssp. lanata**, endémica de Lanzarote. La **ssp. canariensis** se localiza en Lanzarote principalmente en la zona de Playa Quemada y en Los Ajaches. Dentro del género se diferencia por sus hojas ampliamente oblanceoladas (densamente vellosas en la **ssp. lanata**), y sus capítulos de unos 3 cm de diámetro. Se conoce como "pulicaria purpuraria". Esta especie se incluye en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias, como **sensible a la alteración de su hábitat**, en las islas de Lanzarote y Fuerteventura.

La extracción con etanol de *Pulicaria canariensis ssp. canariensis* hasta agotamiento, y posterior tratamiento del extracto como se describe en la parte experimental, nos permitió obtener un líquido siruposo, denso y oscuro que, mediante su estudio en cromatografía en columna, nos condujo a la obtención de 21 sustancias, cuya descripción no la efectuaremos siguiendo el orden de elución cromatográfica sino teniendo en cuenta sus relaciones estructurales. Según este criterio, se pueden agrupar de la siguiente forma:

- a) 3 flavonoides (**C7, C11 y C14**)
- b) 4 triterpenos y esteroides:
 - b.1) Estigmasterol y peróxido de ergosterol (**C2 y C10**)
 - b.2) 2 derivados del lupeol (**C1 y C8**)
- c) 14 sesquiterpenos:
 - c.1) 11 tipo germacrano (**C3, C4, C5, C6, C9, C11, C13, C15, C16, C18 y C19**)
 - c.2) 2 tipo oplopano (**C17 y C21**)
 - c.3) 1 tipo eudesmano (**C20**)

En el espectro de RMN ^1H (Figura 56; Tabla 42B) se observan dos singuletes a δ_{H} 3.45 y 11.20, que integran para un protón cada uno, y que corresponderían a dos grupos hidroxilos (el segundo desplazado a campo bajo correspondería al hidroxilo en C-5, ya que indica la existencia de puente de hidrógeno entre el hidroxilo y el carbonilo en C-4), y dos singuletes a δ_{H} 3.83 y 3.84, que integran para tres protones cada uno, y que corresponderían a dos grupos metoxilos, además de dos dobletes a δ_{H} 4.57 ($J=11.9$) y 5.04 ($J=11.9$), que integran para un protón cada uno, asignados a H-3 y H-2, respectivamente. En la zona de los protones aromáticos se aprecian dos dobletes, a δ_{H} 6.06 ($J=2.2$) y 6.12 ($J=2.2$), con integral para un protón cada uno y que se asignaron a H-6 y H-8, un doblete a δ_{H} 6.99 ($J=8.7$), que integra para dos protones y asignado a H-3' y H-5', y un doblete a δ_{H} 7.48 ($J=8.7$), con integración para dos protones, asignado a H-2' y H-6'. La existencia de un acoplamiento a larga distancia entre H-6 y H-8 ($J=2.2$), así como de un acoplamiento entre H-2' y H-3' ($J=8.7$) por un lado, y entre H-5' y H-6' ($J=8.7$) por otro, y además existir señal para un único protón en C-3, y no existir señales relativas a H-5, H-7 y H-4', nos permite deducir que los grupos hidroxilos y metoxilos deben situarse en estos carbonos (C-3, C-5, C-7 y C-4'), con los hidroxilos en C-3 y C-5 como se deducía de los espectros UV.

De toda esta información podemos concluir que los datos físicos y espectroscópicos de esta sustancia coinciden con los dados en la literatura para el **7,4'-di-O-metildihidrokaempferol**¹⁰⁷.



C7

107. Islam, M.T. and Tahara, S. "Dihydroflavonols from *Lannea coromandelica*". *Phytochemistry* (2000), 54 (8), 901-907.

Sustancia C11:

Se aisló de la fracción IV de la cromatografía general como un sólido cristalino de punto de fusión 171-172°C.

En su espectro de masas (Tabla 45A) aparece un pico muy intenso (100%) de ión molecular a m/z 344, en correspondencia con una fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_7$, además de otro pico intenso a m/z 343 $[M-H]^+$ característico de agliconas libres, y otro a m/z 326 que correspondería a la pérdida de una molécula de agua.

En el espectro UV presenta dos bandas de absorción a 353.5 nm (banda I) y 256 (banda II), lo que unido a los hechos anteriores, y dada su coloración amarilla (intensificada con NH_3), nos hizo pensar en una sustancia de naturaleza flavonoide. De esta forma, el análisis de su espectro UV con la adición de reactivos de desplazamiento (Tabla 45A), nos permitió asignar un grupo hidroxilo en el carbono C-5 (desplazamiento de la banda I de 44.5 nm al añadir $AlCl_3$, que se mantiene al añadir HCl).

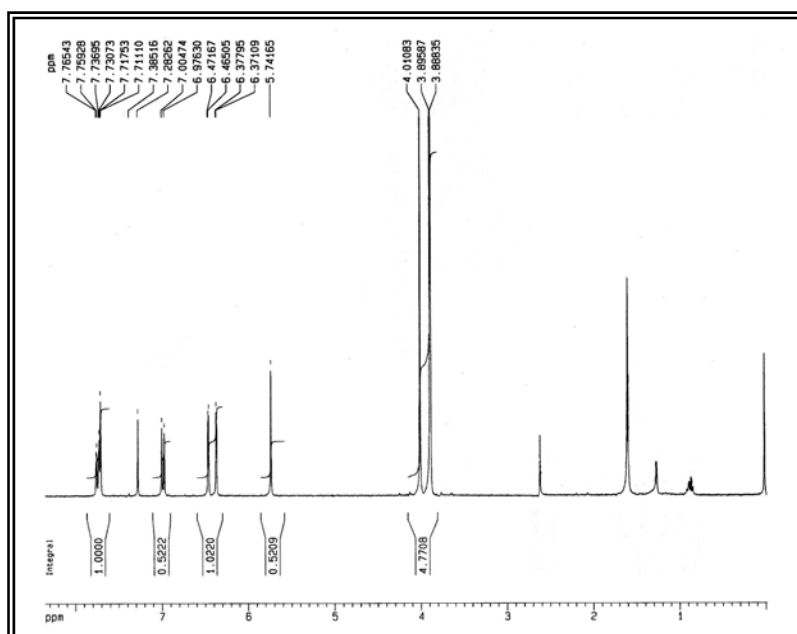
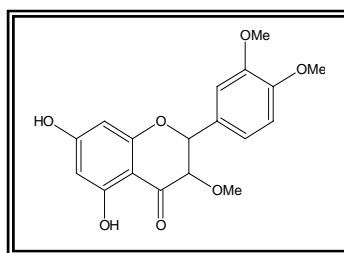


Figura 57: Espectro de 1H -RMN de la sustancia C11

En el espectro de RMN ^1H (Figura 57; Tabla 45B) aparecen dos singuletes a δ_{H} 3.89 con integral para dos metilos, y a 4.01 con integral para un metilo, y que corresponderían a tres grupos metoxilos, además de un singulete a δ_{H} 5.74 con integral para un protón, posiblemente de un segundo grupo hidroxilo, ya que el hidroxilo en C-5, confirmado por el análisis del espectro UV con reactivos de desplazamiento, forma puentes de hidrógeno con el carbonilo en C-4, desplazándose su señal a campo bajo. En la zona de los protones aromáticos se aprecian cuatro dobletes, a δ_{H} 6.37 ($J=2.1$), 6.47 ($J=2.0$), 6.99 ($J=8.5$) y 7.71 ($J=1.9$), con integral para un protón cada uno, y asignados a H-8, H-6, H-5' y H-2', respectivamente, y un doble doblete a δ_{H} 7.75 ($J=1.9$; 8.6) que también integra para un protón, asignado a H-6'. Como existe un acoplamiento a larga distancia entre H-6 y H-8 ($J=2.0$) por un lado, y entre H-2' y H-6' ($J=1.9$) por otro, así como un acoplamiento entre H-5' y H-6' ($J=8.5$), y además no existen señales relativas a H-3, H-5, H-7, H-3' y H-4', se deduce que los grupos hidroxilos y metoxilos deben situarse en estos carbonos (C-3, C-5, C-7, C-3' y C-4').

De toda esta información podemos deducir que la sustancia **C11** corresponde a **5,7-dihidroxi-3,3',4'-trimetoxiflavona**, siendo los datos físicos y espectroscópicos coincidentes con los dados para esta sustancia en la bibliografía consultada^{108, 109}.

**C11**

108. González, A.G.; Bermejo, J.; Triana, J.; Eiroa, J.L. and López, M. "Sesquiterpene and other constituents of *Allagopappus species*". *J. Nat. Prod.* (1995), 58 (3), 432-437.

109. Calvert, D.J.; Cambie, R.C. and Davis, B.R. "Carbon-13 NMR spectra of polymethoxy- and methylenedioxyflavonols". *Org. Magn. Reson.* (1979), 12 (10), 583-586.

Sustancia C14

Se aisló como un sólido cristalino de la fracción V de la cromatografía general.

En el espectro de masas (Tabla 48A) aparece el ion molecular a m/z 332, de acuerdo con una fórmula molecular $C_{17}H_{16}O_7$, observándose además picos a m/z 303, ó a m/z 275 entre otros.

En el espectro UV se presentan dos bandas de absorción a 330 nm (banda I, como hombro) y a 289 nm (banda II), por lo que, en unión a los hechos antes mencionados, nos hizo suponer una sustancia de naturaleza flavonoide, probablemente tipo flavanona. El análisis de su espectro UV con reactivos de desplazamiento (Tabla 48A), nos permitió la asignación de grupos hidroxilos en C-5 (desplazamiento de la banda I de 24 nm al añadir $AlCl_3$, que se mantiene al añadir HCl), C-4' (desplazamiento de la banda I de 20 nm al añadir NaOMe, con incremento de la intensidad) y C-3.

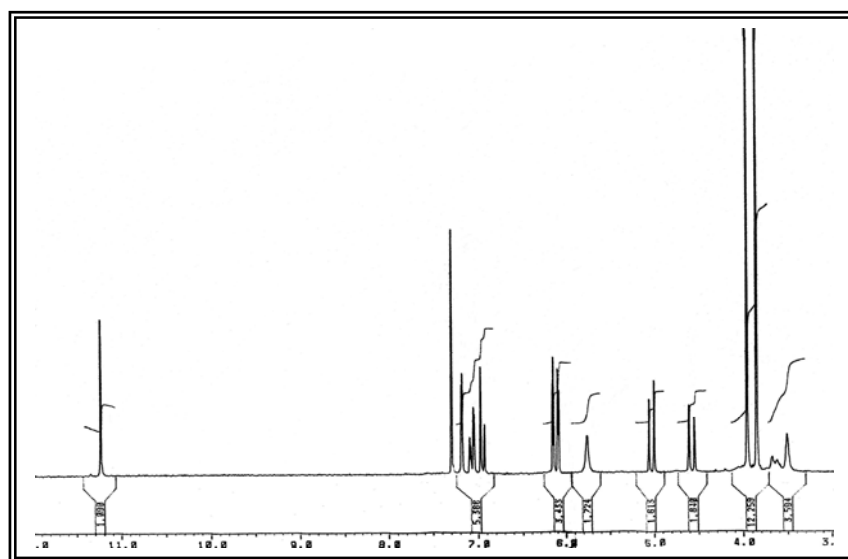
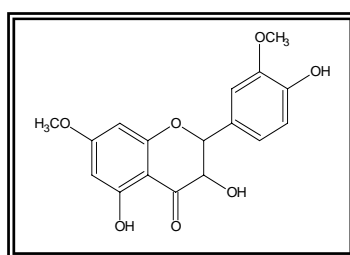


Figura 58: Espectro de 1H -RMN de la sustancia C14

En su espectro de RMN ^1H (Figura 58; Tabla 48B) aparecen tres singuletes a δ_{H} 3.48, 5.74 y 11.21, integrando para un protón cada uno, y que corresponderían a un grupo hidroxilo cada uno (el tercero desplazado a campo bajo correspondería nuevamente al hidroxilo en C-5, ya que indica la existencia de puente de hidrógeno entre éste y el carbonilo en C-4), y dos singuletes a δ_{H} 3.83 y 3.93, que integran para tres protones cada uno, y que corresponderían a dos grupos metoxilo, además de dos dobletes a δ_{H} 4.56 ($J=12.0$) y 4.99 ($J=12.0$), que integran para un protón cada uno, asignados a H-3 y H-2, respectivamente. En la zona de los protones aromáticos se aprecian cuatro dobletes, a δ_{H} 6.07 ($J=2.5$), 6.13 ($J=1.9$), 6.92 ($J=8.2$) y 7.16 ($J=1.8$), con integral para un protón cada uno y que se asignan a H-6, H-8, H-5' y H-2', respectivamente, además de un doblete a δ_{H} 7.05 ($J=1.8$; 8.3), con integración para un protón, asignado a H-6'. Como se observa un acoplamiento a larga distancia entre H-6 y H-8 ($J=2.5-1.9$) por un lado, y entre H-2' y H-6' ($J=1.8$) por otro, así como un acoplamiento entre H-5' y H-6' ($J=8.2$), y además existe una señal para un único protón en C-3, y no aparecen señales relativas a H-5, H-7, H-3' y H-4', se deduce que los grupos hidroxilos y metoxilos deben situarse en estos carbonos (C-3, C-5, C-7, C-3' y C-4'), con los hidroxilos en C-3, C-5 y C-4', como se dedujo de los espectros de UV.

De toda esta información concluimos que los datos físicos y espectroscópicos de **C14** son coincidentes con los dados en la literatura para el **7,3'-dimetileter de la dihidroquercetina**¹¹⁰.



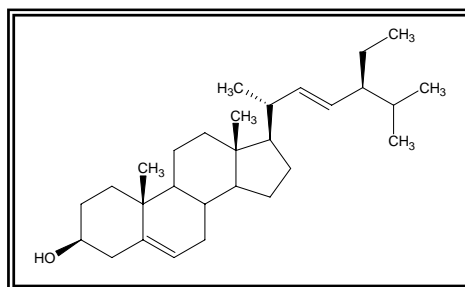
C14

110. Balza, F. and Towers, H.N. "Dihydroflavonols of *Artemisia dracunculus*". *Phytochemistry* (1984), 23 (10), 2333-2337.

b) TRITERPENOS Y ESTEROLES:**b.1) Estigmasterol y peróxido de ergosterol****Sustancia C2**

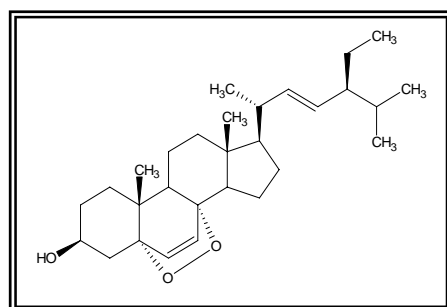
Se aisló de la fracción III de la cromatografía general como un sólido cristalino.

Los datos espectroscópicos y físicos de esta sustancia coinciden con los del **estigmasterol**, descrito anteriormente en el estudio de *Tolpis webbia* (W1, ver página 44).

**C2****Sustancia C10**

Se aisló como un aceite incoloro de la fracción IV de la cromatografía general.

Los datos espectroscópicos y físicos de esta sustancia coinciden con los del **peróxido de ergosterol**, descrito anteriormente en el estudio de *Tolpis sp.* (T10, ver página 94).

**C12**

b.2) Derivados del lupeol

Sustancia C1

Se aisló como un aceite incoloro de la fracción II de la cromatografía general.

El espectro de IR (Tabla 35A) presenta bandas de absorción a $\nu_{\text{máx}}$ 3437, típica de grupo hidroxilo, y a 1734 y 1246, características de grupo carbonilo de éster.

El análisis de sus datos de RMN de ^1H y ^{13}C nos permitió identificar un esqueleto triterpénico para esta sustancia. Así, en su espectro de RMN ^1H (Figura 59; Tabla 35B) aparecen cinco singuletes a δ_{H} 0.78, 0.84, 0.98, 1.03 y 1.67, que integran para un metilo cada uno, y un singulete a δ_{H} 0.83 que integra para dos metilos, que se corresponden con CH_3 -23, CH_3 -24, CH_3 -25, CH_3 -26, CH_3 -27, CH_3 -28 y CH_3 -30. También se observan un singulete ancho a δ_{H} 1.24 que integra para veintiocho protones metilenos, un triplete a δ_{H} 2.27 ($J=7.5$) que integra para dos protones, asignado a un metileno vecinal a un carbonilo; dos dobles dobletes a δ_{H} 3.60 ($J=4.6$; 11.0), integrando para un protón y asignado a H-16, y a 4.45 ($J=6.1$; 11.6) con integración para un protón y asignado a H-3; un singulete amplio a δ_{H} 4.58 que integra para un protón y un doblete a δ_{H} 4.69 ($J=2.0$) integrando para un protón, asignados a H₂-29.

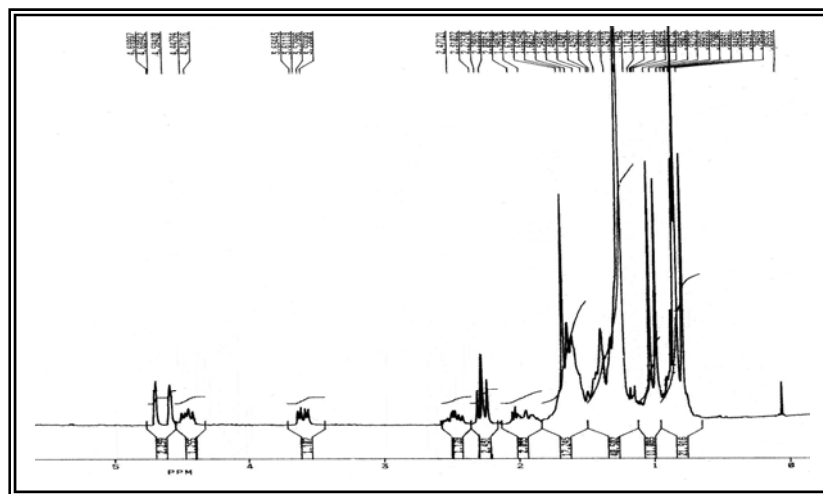


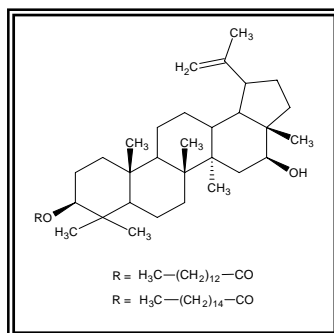
Figura 59: Espectro de ^1H -RMN de la sustancia C1

El espectro de RMN ^{13}C y D.E.P.T. (Tabla 35B) muestra señales correspondientes a ocho grupos metilos, a δ_{C} 11.6 (C-28), 14.1 (CH_3 terminal del éster), 15.9 (C-26), 16.1 (C-25), 16.1 (C-27), 16.5 (C-24), 19.3 (C-30) y 27.9 (C-23), al menos

diez grupos metilenos a δ_C 18.2 (C-6), 20.9 (C-11), 23.7 (C-2), 25.1 (C-12), 29.6 (- $(CH_2)_n$ - del éster), 31.9 (C-21), 34.1 (C-7), 34.8 (C-15), 36.8 (C-22) y 38.4 (C-1), cinco grupos metinos, a δ_C 37.2 (C-13), 47.6 (C-19), 47.7 (C-18), 49.9 (C-9) y 55.4 (C-5), cinco carbonos cuaternarios, a δ_C 37.0 (C-10), 37.7 (C-4), 40.9 (C-8), 44.0 (C-14) y 48.6 (C-17), dos metinos oxigenados, a δ_C 77.0 (C-16) y 80.5 (C-3), dos carbonos olefinicos, a δ_C 109.6 (C-29) y 150.0 (C-20) y un carbono carbonílico, a δ_C 173.7.

Estos datos concuerdan con los dados en la literatura para la mezcla de **3-palmitato y 3-miristato del 3 β ,16 β -dihidroxiupeol**¹¹¹.

El estudio del espectro de masas de este compuesto y de su derivado acetilado, nos permitió confirmar finalmente la estructura mencionada. Así, en el espectro de masas de la sustancia **C1** (Tabla 35A) no se observan los picos correspondientes a los iones moleculares (680 para el palmitato, y 652 para el miristato), y se observa, en cambio, entre otros, un pico a m/z 424 que correspondería al fragmento triterpénico resultante de la fragmentación del éster. Sin embargo, en el espectro de masas de su derivado acetilado (**C1a**, Tabla 36A) aparecen dos picos de ión molecular a 722 (coincide con el derivado acetilado del 3-palmitato de 3 β ,16 β -dihidroxiupeol) y a 694 (coincide con el derivado acetilado del 3-miristato de 3 β ,16 β -dihidroxiupeol). En ambos espectros de masas aparecen picos a m/z 256 y 228, que corresponden a los fragmentos de los ácidos palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$) y mirístico ($C_{14}H_{28}O_2$), más intensos en el espectro del derivado acetilado, mientras que en el espectro del derivado **C1a** aparece un pico a m/z 466, correspondiente al fragmento resultante de la pérdida de los dos ácidos mencionados, y sendos picos a m/z 662 y 634, que se corresponden con los fragmentos resultantes de la pérdida de un grupo acetato de cada éster.



C1

111. Öksüz, S. and Topcu, G. "Triterpene fatty acid esters and flavonoids from *Inula britannica*". *Phytochemistry* (1987), 26 (11), 3082-3084.

Sustancia C8

Se aisló de la fracción III de la cromatografía general como un sólido cristalino, de punto de fusión 218-219°C. El espectro de IR (Tabla 43A) presenta bandas de absorción a $\nu_{\text{máx}}$ 3374, que indica la presencia de grupos hidroxilos, y a 1643, que indica la existencia de insaturación en la molécula.

En el espectro de masas (Tabla 43A) destaca el pico de ión molecular a m/z 442, que está de acuerdo con una fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_2$, además de dos picos a m/z 424 y 406, que implican la pérdida de dos moléculas de agua, y a m/z 391 que corresponde a la pérdida de un grupo metilo respecto al fragmento de m/z 406.

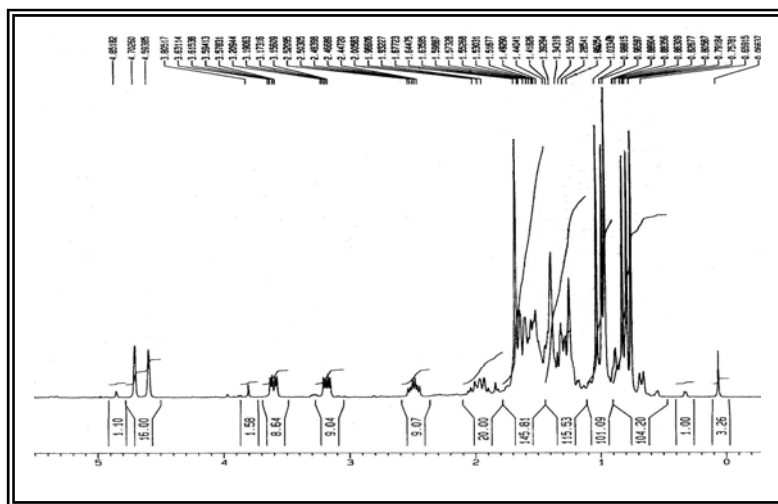
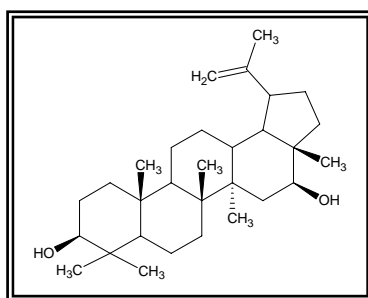


Figura 60: Espectro de ^1H -RMN de la sustancia C8

El espectro de RMN ^1H (Figura 60; Tabla 43B) nos indica la naturaleza triterpénica de esta sustancia, al observar siete singuletes a δ_{H} 0.76, 0.79, 0.83, 0.97, 0.99, 1.03 y 1.68, que integran para un metilo cada uno y que se corresponden con CH_3 -23, CH_3 -24, CH_3 -25, CH_3 -26, CH_3 -27, CH_3 -28 y CH_3 -30. También se observa un doblete a δ_{H} 0.67 ($J=9.2$) con integral para un hidrógeno y asignado a H-5, un multiplete a δ_{H} 1.98 que integra para dos hidrógenos, asignado a H_2 -21, un triple doblete a δ_{H} 2.49 ($J=5.7$; 11.0) con integración para un hidrógeno y asignado a H-19 y dos dobles

dobletes a 3.18 ($J=5.6$; 10.9) con integración para un hidrógeno y asignado a H-3, y a δ_H 3.60 ($J=4.7$; 11.1), integrando para un hidrógeno y asignado a H-16.

Estos datos nos permitieron asignar a la sustancia **C8** la estructura **3 β ,16 β -dihidroxiupeol**, ya que concuerdan con los datos en la literatura para esta sustancia, que también es mencionada como **calenduladiol**¹¹².



C8

112. Datanarayana, A.P.; Savitri Kumar, N.; Sultanbawa, M.U.S. and Balasubramaniam, S. "Structures of four new oxygenated lupanes from *Pleurostyliya opposita* (Celastraceae)". J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 (1981), 2717-2723.

c) SESQUITERPENOS:

c.1) Tipo germacrano

Sustancia C6

Se aisló como un sólido gelatinoso incoloro, de la fracción III de la cromatografía general. En su espectro IR (Tabla 40A) presenta absorciones a 3067 y 1693 cm^{-1} que parecen sugerir la presencia de un ácido carboxílico α,β -insaturado de naturaleza sesquiterpénica, como se deduce de su fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_6$, determinada por espectrometría de masas de alta resolución (Tabla 40A).

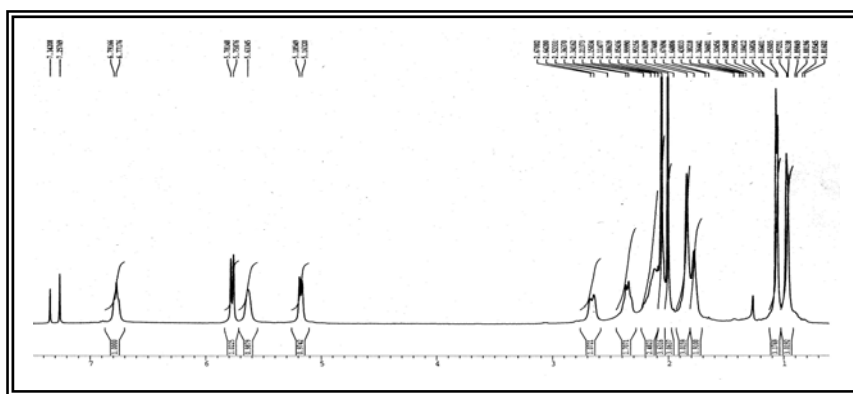


Figura 61: Espectro de ^1H -RMN de la sustancia C6

Sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C realizados a 25°C, presentaban una resolución escasa debido probablemente a la existencia de un equilibrio conformacional¹¹³, por lo que se sometió a un calentamiento hasta 50°C que consiguió afinar la mayoría de líneas y permitió la asignación de las señales. Así, en el espectro RMN ^1H (Figura 61; Tabla 40B) se observa la presencia de dos dobletes a δ_{H} 0.97 ($J=4.5$ Hz) y a δ_{H} 1.06 ($J=5.6$ Hz), con integral para tres protones cada uno, y un singulete a δ_{H} 1.84 que integra para tres protones, indicando sendos grupos metilos, correspondientes a CH_3 -12, CH_3 -13 y CH_3 -15. Se observa asimismo dos señales singuletes, con integral para tres protones cada una, correspondientes a metilos de grupos acetilos, a δ_{H} 2.00 y 2.05. También presenta señales como un doblete a δ_{H} 5.18

113. Barrero, A.F.; Herrador, M.M.; Quilez, J.F.; Alvarez-Manzaneda, R.; Portal, D.; Gavin, J.A.; Gravalos, D.G.; Simmonds, M.S.J. and Blaney, W.M. "Bioactive sesquiterpenes from *Santolina rosmarinifolia* subsp. *canescens*. A Conformational analysis of the germacrane ring". *Phytochemistry* (1999), 51 (4), 529-541.

($J=8.9$ Hz), y un triplete a δ_{H} 6.78 ($J=8.0$ Hz) que integran para un protón cada una, y que podrían atribuirse a dos protones olefínicos, así como la presencia de un doblete a δ_{H} 5.77 ($J=9.1$ Hz) y de un singulete a δ_{H} 5.63 con integral para un protón cada uno, que pueden ser atribuidas a los protones geminales a los grupos acetilos.

Los espectros de RMN ^{13}C y D.E.P.T. de este producto (Tabla 40B) muestran señales para diecinueve carbonos, señalando la presencia de un grupo ácido carboxílico α,β -insaturado a δ_{C} 173.0 (C-14), 137.3 (C-10) y 141.6 (C-1), de dos metinos oxigenados a δ_{C} 70.0 (C-8) y 70.1 (C-6), y de un grupo isopropilo a δ_{C} 26.7 (C-11), 22.4 (C-12) y 21.8 (C-13), además de dos grupos acetilos (δ_{C} 18.0, 20.6, 169.1 y 169.1), un metilo (δ_{C} 20.6, C-15), tres metilenos (δ_{C} 26.7, C-2, 31.6, C-9, y 36.5, C-3), otros dos metinos, uno de ellos olefínico (δ_{C} 52.2, C-7, y 123.7, C-5) y un carbono cuaternario olefínico (δ_{C} 132.2, C-4).

Estos datos de RMN son bastante similares a los del germacrano diacetoxivarol¹¹⁴, sugiriendo que el compuesto **C6** debe ser también un germacrano.

La metilación de **C6** con diazometano produjo el compuesto **C6a**, en cuyo espectro de RMN de ^1H (Tabla 41A) aparece un nuevo singulete a δ_{H} 3,73 (3H, s, COOMe). La comparación del compuesto **C6a** con diacetoxivarol nos llevó a la conclusión de que los grupos acetilos podrían estar situados en C-6 y C-8 en el compuesto **C6a**. Las características espectrales de RMN de ^1H y ^{13}C encontradas en ambos compuestos sugieren que son similares.

De los datos de RMN en 2D para **C6** y **C6a** se puede corroborar el grupo ácido α,β -insaturado por medio de las correlaciones observadas de HMBC para la sustancia **C6** (Figuras 62a y 62b): H-1 con C-14 ó H₂-9 con C-1, C-8, C-10 y C-14. También se observan correlaciones reseñables de CH₃-15 con C-3, C-4 y C-5, CH₃-13 con C-7, y H-6 con C-4, C-5, C-8 y C=O del grupo acetato.

114. de Pascual, J.T.; Moran, J.R.; Hernández, J.M. and Grande, M. "Tovarol and other germacrane derivatives from *Thapsia villosa*". *Phytochemistry* (1985), 24 (8), 1779-1783.

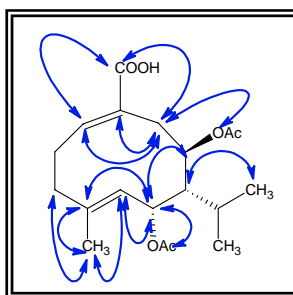


Figura 62a: Relaciones seleccionadas de HMBC de la sustancia C6 a 50°C.

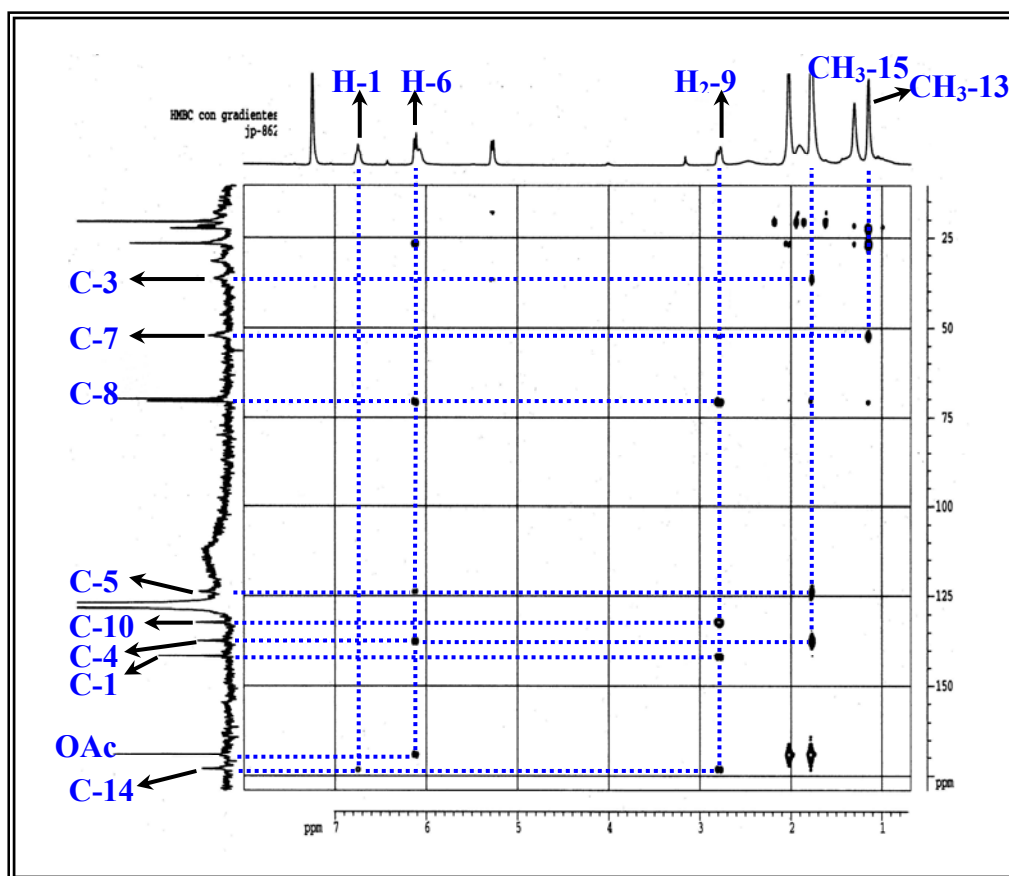


Figura 62b: Espectro de HMBC de la sustancia C6 a 50°C.

Las correlaciones NOESY (Figuras 63a y 63b) de H-6 (δ_H 5,77) con CH₃-15 y H-7 muestran claramente que esos protones están en la misma cara de la molécula. También se observan correlaciones entre H-8 (δ_H 5,63) y CH₃-12, CH₃-13 y H-5. Así, se puede deducir que los grupos acetilo en C-6 e isopropilo en C-7 están correlacionados en α . Esto también se confirma cuando se observan correlaciones similares en un experimento NOESY realizado a -50°C.

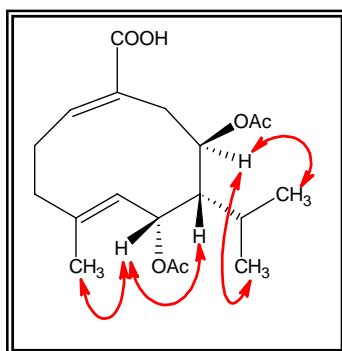


Figura 63a: Relaciones seleccionadas de NOESY de la sustancia C6 a 50°C.

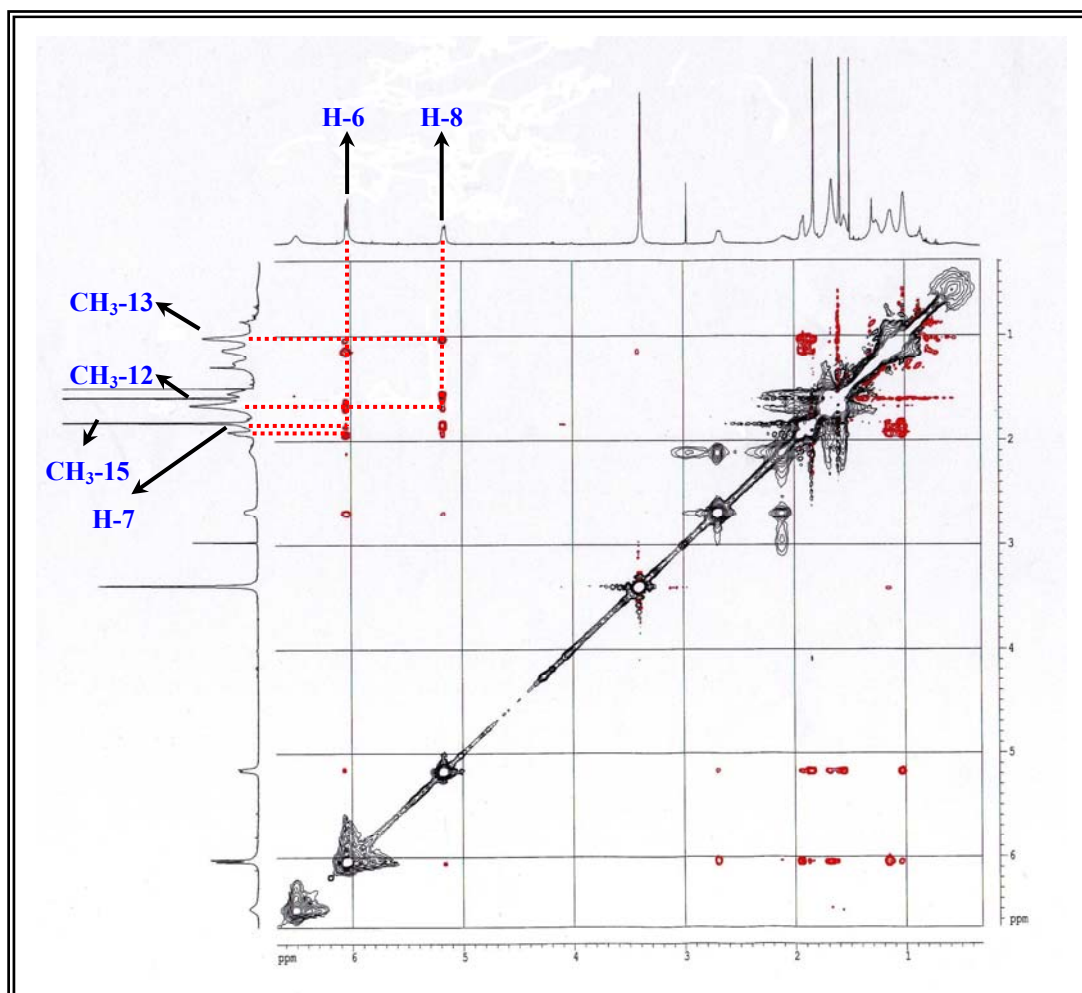


Figura 63b: Espectro de NOESY de la sustancia C6 a 50°C.

De los espectros mencionados se puede deducir que los conformeros preferidos en disolución mantienen una orientación similar en el espacio, y por todo ello al compuesto **C6** se le asignó la estructura del **ácido (1E,4E)-6 α ,8 β -diacetoxi-7 β H-germacra-1(10),4-dien-14-óico**, que fue confirmada inequívocamente por un análisis cristalográfico de rayos X de **C6a**. En él se muestra la relación trans entre el grupo metilo en C-4 y el H en C-5 y la relación cis del grupo carboxilato en C-10 y el H en C-1. Los cristales son ortorrómbicos, con $a = 9.5032 (2) \text{ \AA}$, $b = 11,2533 (3) \text{ \AA}$, $c = 19.2625 (6) \text{ \AA}$, $V = 2059.98 (9) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $D_c = 1.182 \text{ g cm}^{-3}$, $\mu(\text{Mo K}\alpha) = 0.086 \text{ mm}^{-1}$, $F_{000} = 792$, $T = 293 \text{ K}$. La unidad asimétrica contenía una molécula de composición $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_6$ ($M = 366.44$). De las 26600 reflexiones que se recolectaron, 2939 eran independientes. La estructura fue resuelta utilizando métodos directos (SIR2002) y refinados mediante métodos full-matrix least-squares (SHELX97). Un esquema de la molécula con los átomos numerados se muestra en la figura 64.

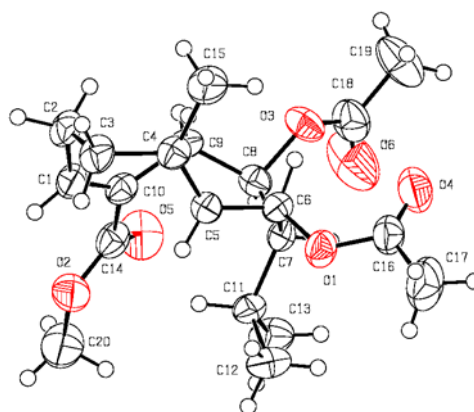
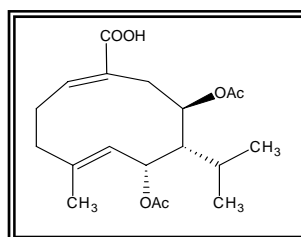


Figura 64: Difracción de rayos X (ORTEP) de la sustancia **C6a**

Después de revisada la literatura, no encontramos descrita esta sustancia, por lo que, dada su procedencia, la hemos denominado **Pulicanadieno A**.



C6

Sustancia C4

Esta sustancia se obtuvo como un aceite incoloro, de la fracción III de la cromatografía general.

Su fórmula molecular se determinó como $C_{19}H_{28}O_5$ de sus datos de HRFABMS (m/z 359.1874 $[M + Na]^+$, Tabla 38A), teniendo un átomo de oxígeno menos que la obtenida para C6.

En su espectro de IR se observan señales a 1732 y 1687 cm^{-1} , que parecen indicar la presencia de sendos grupos carbonilo, uno asociado a un grupo éster, y otro conjugado.

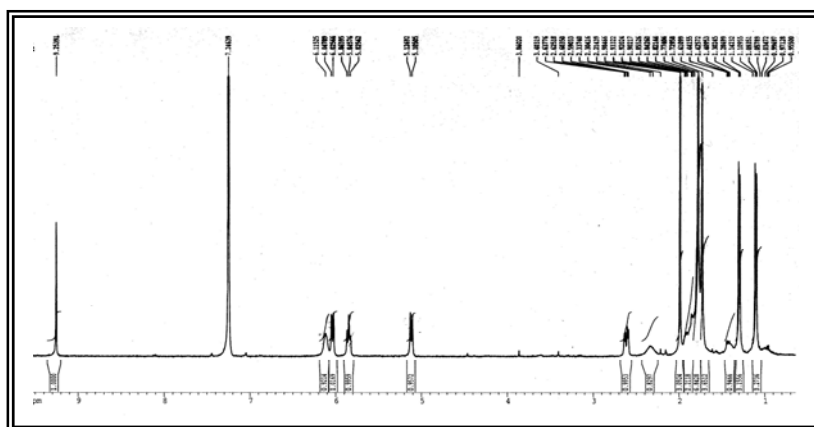


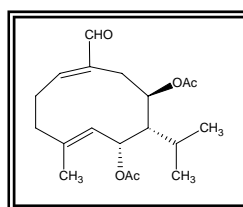
Figura 65: Espectro de ^1H -RMN de la sustancia C4 a 50°C .

Sus datos espectrales de RMN de ^1H y ^{13}C (Tabla 38B) son muy parecidos a los del compuesto C6. Así, en el espectro de RMN de ^1H de C4 (Figura 65) se observa la presencia de dos dobletes a δ_{H} 1.28 ($J=6.3\text{ Hz}$) y a δ_{H} 1.09 ($J=6.3\text{ Hz}$) y un singulete a δ_{H} 1.98 que integran para tres protones cada uno, señalando la presencia de grupos metilos correspondientes a CH_3 -12, CH_3 -13 y CH_3 -15. También se observan dos señales singuletes, con integral para tres protones cada una, correspondientes a metilos de grupos acetilos, a δ_{H} 1.72 y 1.77. Presenta además otras señales como un doblete a δ_{H} 5.11 ($J=8.6\text{ Hz}$), y un triplete a δ_{H} 5.86 ($J=8.4\text{ Hz}$) que integran para un protón cada una, y que se pueden atribuir a dos protones olefinicos, así como la presencia de un doblete a δ_{H} 6.02 ($J=1.8; 8.8\text{ Hz}$) y de un singulete amplio a δ_{H} 6.09 con integral para un protón cada uno, que se atribuyen a los protones geminales a los grupos acetilos.

Los espectros de RMN ^{13}C y D.E.P.T. de este producto (Tabla 38B) muestran señales para 19 carbonos, indicando la presencia de dos metinos oxigenados (δ_{C} 70.0,

C-6, y 70.1, C-8), y de un grupo isopropilo (δ_C 26.7, C-11, 22.6, C-12, y 21.6, C-13), además de dos grupos acetilos (δ_C 17.9, 20.5, 169.0 y 169.0), un metilo (δ_C 20.6, C-15), tres metilenos (δ_C 27.1, C-2, 30.2, C-9, y 36.8, C-3), otros cuatro metinos, tres de ellos olefínicos (δ_C 52.6, C-7, 124.3, C-5, 143.6, C-10, y 150.4, C-1) y un carbono cuaternario olefínico (δ_C 136.6, C-4). Las diferencias entre los compuestos **C6** y **C4** son evidentes en función de que el grupo carboxílico en C-14 de la sustancia **C6** está reemplazado por un grupo aldehído, a δ_H 9,26 (1H, s, H-14) y δ_C 193.6.

De esta forma, se deduce que la estructura de **C4** debe ser la de **(1E,4E)-6 α ,8 β -diacetoxi-7 β H-germacra-1(10),4-dien-14-al**, no estando descrita tampoco con anterioridad, denominándola como **Pulicanadieno B**.



C4

Sustancia C9

Se aisló también como un aceite incoloro, de la fracción IV de la cromatografía general. Su fórmula molecular se determinó como $C_{19}H_{30}O_5$ por análisis HREIMS, con un peso molecular de 338 (Tabla 44A).

El espectro IR (Tabla 44A) muestra bandas de absorción a 3414 y 1728 cm^{-1} , que indican la presencia de funciones hidroxilo y acetilo.

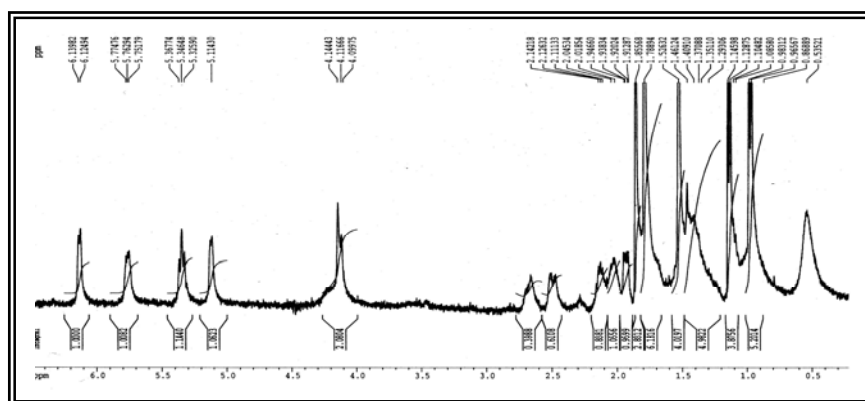
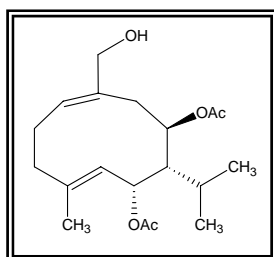


Figura 66: Espectro de 1H -RMN de la sustancia **C9** a 50°C.

Su espectro de RMN de ^1H (Tabla 44B; Figura 66) muestra señales análogas a las de la sustancia **C4**, con la excepción de que C-14 está sustituido con un grupo hidroximetilo, a δ_{H} 4,12 (2H, d, $J=11,0$ Hz, H_2 -14). El resto de señales que se observan son, como en la sustancia **C4**, dos dobletes a δ_{H} 1.13 ($J=6.8$ Hz) y a δ_{H} 0.97 ($J=6.9$ Hz), con integral para tres protones cada uno, y un singulete a δ_{H} 1.52 que integra para tres protones, indicando sendos grupos metilos, correspondientes a CH_3 -12, CH_3 -13 y CH_3 -15. Asimismo dos señales singuletes, con integral para tres protones cada una, correspondientes a metilos de grupos acetilos, a δ_{H} 1.78 y 1.85. Presenta un multiplete a δ_{H} 5.11 y un triplete a δ_{H} 5.34 ($J=8.5$ Hz) que integran para un protón cada uno, y que podrían atribuirse a dos protones olefinicos, así como un doblete amplio a δ_{H} 6.13 ($J=5.9$ Hz) y de un triplete a δ_{H} 5.76 ($J=9.2$) con integral para un protón cada uno, que pueden ser atribuidos a los protones geminales a los grupos acetilos.

Los espectros de RMN ^{13}C y D.E.P.T. de este producto (Tabla 44B) muestran señales para diecinueve carbonos, indicando la presencia de dos metinos oxigenados (δ_{C} 71.0, C-6, y 71.1, C-8), y de un grupo isopropilo (δ_{C} 27.0, C-11, 19.9, C-12, y 21.4, C-13), además de dos grupos acetilos (δ_{C} 21.5, 21.5, 170.2 y 170.2), un metilo (δ_{C} 20.0, C-15), tres metilenos (δ_{C} 26.0, C-2, 30.0, C-9, y 31.0, C-3), tres metinos olefinicos (δ_{C} 127.0, C-5, 126.7, C-1, y 135.0, C-10), otro metino (δ_{C} 50.0, C-7) y un carbono cuaternario olefinico (δ_{C} 136.1, C-4). El grupo hidroximetilo viene indicado por la señal correspondiente a C-14 (δ_{C} 69.7).

Por todo ello, al compuesto **C9** le debe corresponder la estructura de **(1E,4E)-6 α ,8 β -diacetoxi-7 β H-germacra-1(10),4-dien-14-ol**, lo cual fue comprobado al tratar **C4** con borohidruro de sodio (NaBH_4) en metanol, y obtener **C9** (los espectros IR y de RMN de ^1H del producto de la reacción con borohidruro de sodio y del compuesto **C9** son superponibles). A esta sustancia, nueva en la bibliografía consultada, la hemos denominado **Pulicanadieno C**.



C9

Sustancia C12

Esta sustancia, obtenida de la fracción IV de la cromatografía general, fue purificada como su derivado acetilado (**C12a**) mediante tratamiento con anhídrido acético en piridina.

El espectro IR de **C12a** (Tabla 46A) muestra la presencia de una función acetilo (1741 cm^{-1}) y un grupo carbonilo conjugado (1694 cm^{-1}).

El espectro UV de **C12a** (Tabla 46A) confirma la presencia de un grupo carbonilo α,β -insaturado al observarse un máximo de absorción a 223 nm.

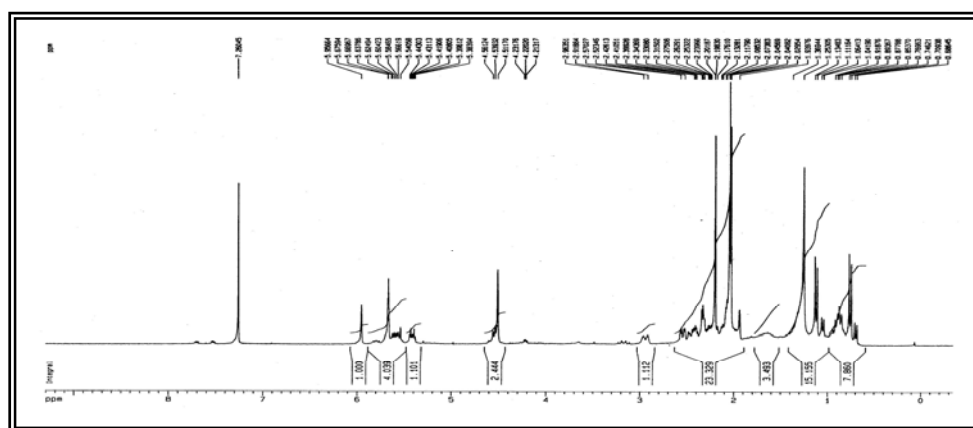


Figura 67: Espectro de ^1H -RMN de la sustancia **C12a**.

El espectro de RMN de ^1H de **C12a** (Figura 67; Tabla 46B) muestra señales que se pueden asignar a los grupos metilos de un grupo isopropilo a δ_{H} 0,75 (3H, d, $J=6,9$ Hz, CH_3 -13) y 1,12 (3H, d, $J=6,9$ Hz, CH_3 -12), a tres protones olefinicos a δ_{H} 5,59 (1H, dd, $J=5,7; 11,4$ Hz, H-1) y 5,66 (2H, br s, H_2 -15), o a cuatro hidrógenos geminales a grupos acetilo a δ_{H} 5,95 (1H, s, H-6), 5,41 (1H, dt, $J=3,5; 10,6$ Hz, H-8) y 4,51 (2H, s, H_2 -14). También aparecen señales indicativas de tres metilos correspondientes a sendos grupos acetilos, a δ_{H} 2,03 (3H, s, OAc), 2,04 (3H, s, OAc) y 2,19 (3H, s, OAc).

El espectro de RMN de ^{13}C y D.E.P.T. de **C12a** (Tabla 46B) muestra señales para veintiún carbonos, indicando la presencia de tres grupos acetilos (δ_{C} 20.8, 20.9, 21.1 169.7, 169.9 y 170.6), dos metinos oxigenados (δ_{C} 69.6, C-8, y 72.9, C-6), un grupo isopropilo (δ_{C} 27.4, C-11, 17.6, C-13, y 21.6, C-12), un metileno olefinico (δ_{C} 124.1, C-15), un metileno oxigenado (δ_{C} 69.3, C-14), tres metilenos (δ_{C} 23.3, C-2, 30.0,

C-9, y 32.6, C-3), tres metinos olefinicos (δ_C 131.9, C-1, 132.6, C-10, y 145.4, C-4), otro metino (δ_C 45.5, C-7) y un carbono carbonílico (δ_C 198.7, C-5).

En el espectro COSY ^1H - ^1H de **C12a** (Figura 68b), el que H-6 (δ_H 5,95) esté correlacionado con H-7 (δ_H 2,54), y éste último con H-8 (δ_H 5,41), sugiere que los grupos acetilos están localizados en C-6 y C-8.

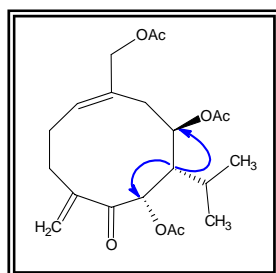


Figura 68a: Relaciones seleccionadas de COSY ^1H - ^1H de la sustancia **C12a**.

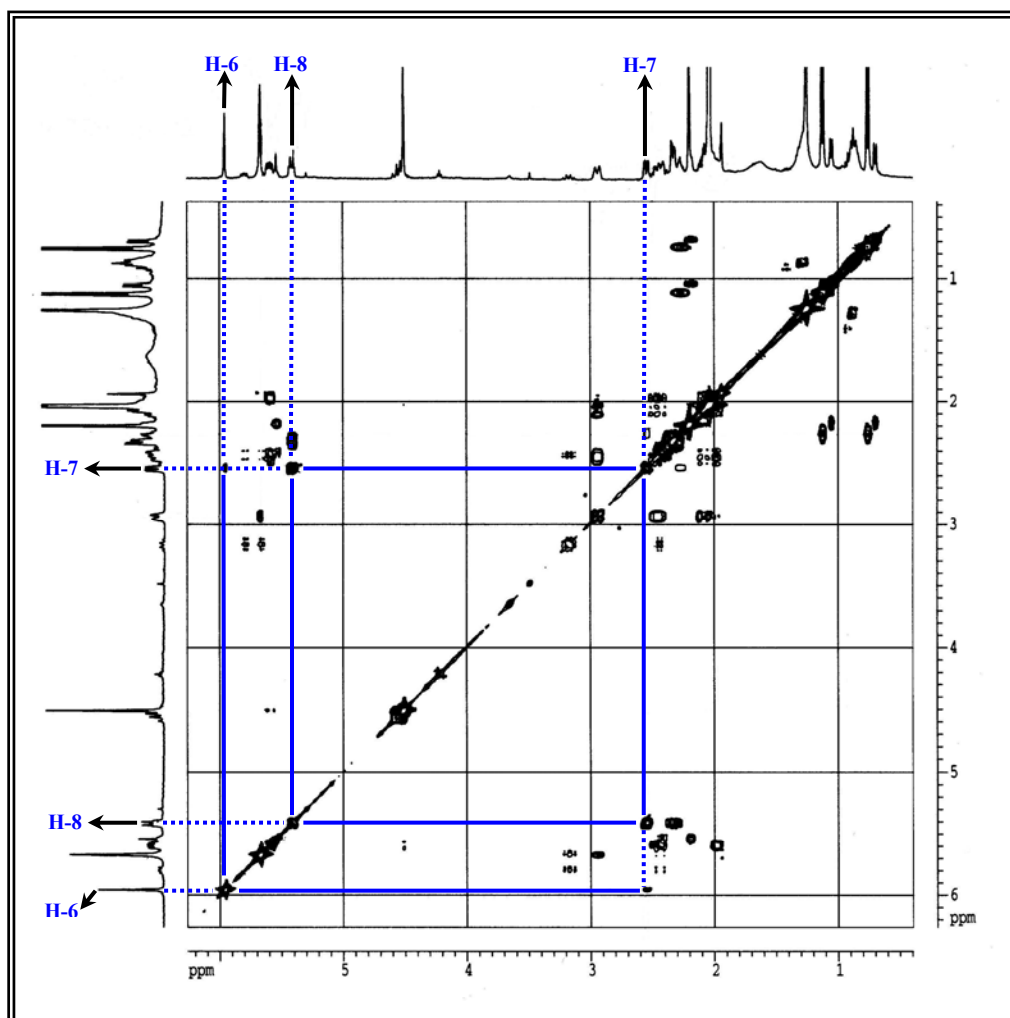


Figura 68b: Espectro de COSY ^1H - ^1H de la sustancia **C12a**.

En el espectro HMBC de **C12a** (Figura 69b) también se pudo confirmar la localización de los grupos acetilos en C-6 y C-8, al observarse conectividades entre H-6 (δ_H 5,95) y H-8 (δ_H 5,41), respecto al carbonilo de los grupos acetilos (δ_C 169,7-169,9). El espectro HMBC de **C12a** también fue útil para determinar la posición del grupo carbonilo. Así, se observaron conectividades en las señales a δ_H 5,66 (H₂-15) y 5,95 (H-6) que se relacionaban con el grupo carbonilo, y que nos ayudaron a situarlo en C-5.

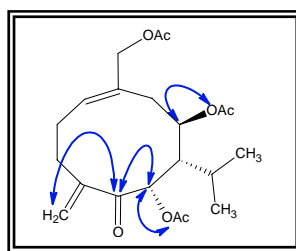


Figura 69a: Relaciones seleccionadas de HMBC de la sustancia **C12a**.

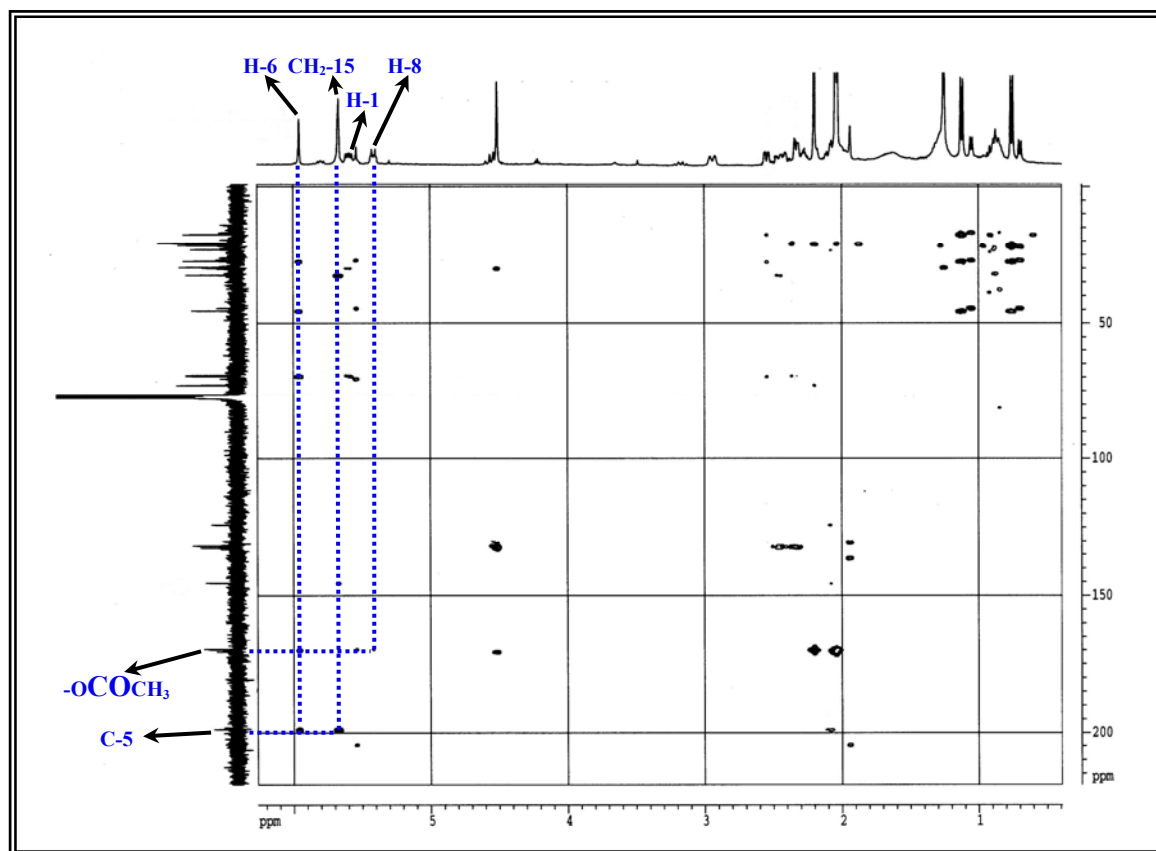


Figura 69b: Espectro de HMBC de la sustancia **C12a**.

La estereoquímica relativa de **C12a** se determinó por un experimento ROESY (Figura 70b) en el que se observaron correlaciones entre H-7 (δ_H 2,54), H-6 (δ_H 5,95) y H₂-15 (δ_H 5,66). De esta forma, se pudo deducir que los grupos acetilo en C-6 e isopropilo en C-7, como sucedía en el compuesto **C6**, poseen una orientación α .

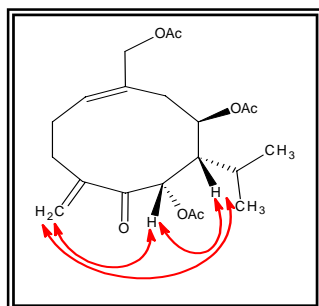


Figura 70a: Relaciones seleccionadas de ROESY de la sustancia **C12a**.

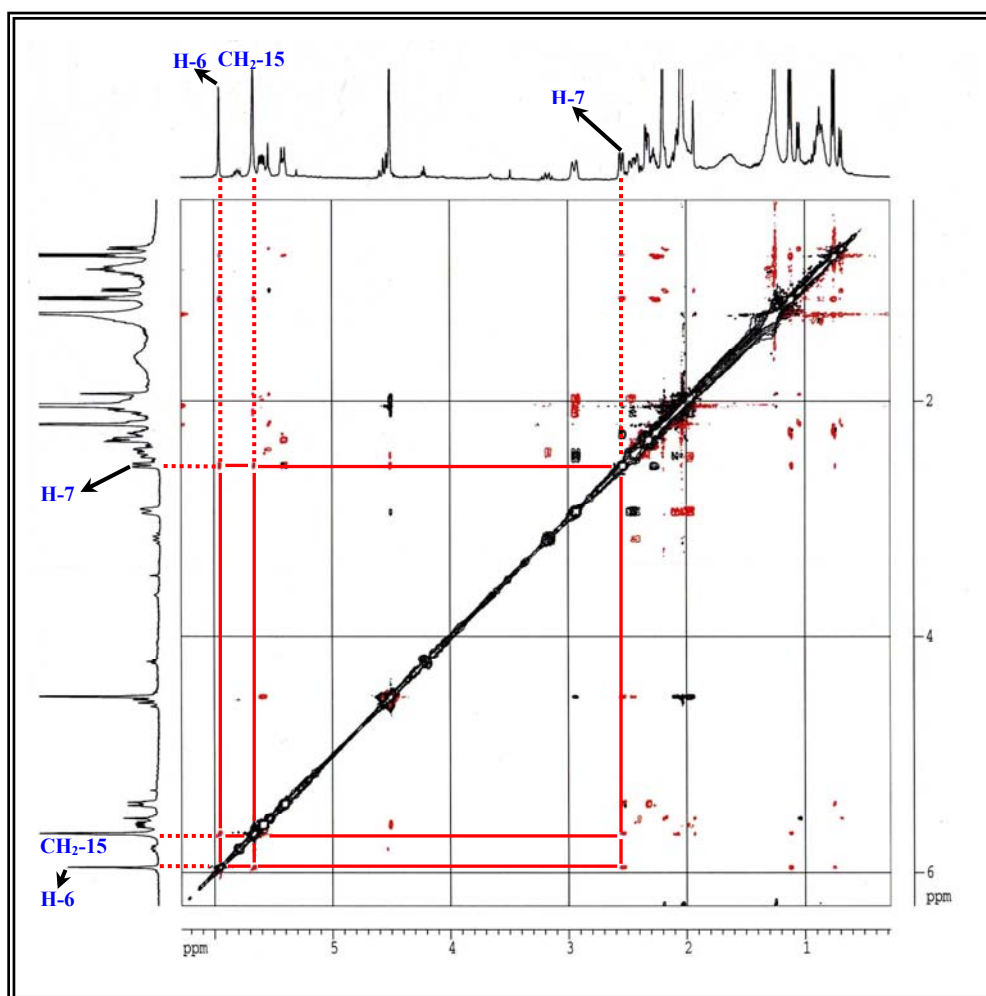
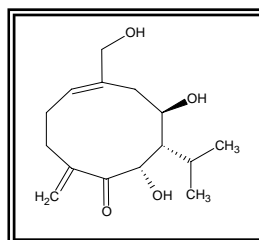


Figura 70b: Espectro de ROESY de la sustancia **C12a**.

En consecuencia, la estructura de la sustancia **C12** fue establecida como **(1E)-6 α ,8 β ,14-trihidroxi-7 β H-germacra-1(10),4(15)-dien-5-ona** que, al no estar descrita en la bibliografía consultada, hemos denominado **Pulicanona**.

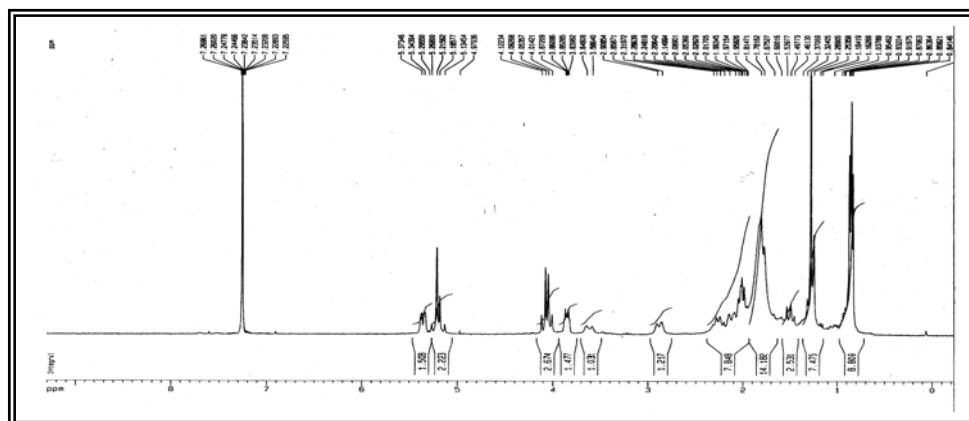
**C12**

Sustancia C19

Esta sustancia se aisló como un aceite incoloro de la fracción VI de la cromatografía general.

Su EIMS (Tabla 53A) muestra la señal de ión molecular a m/z 312 determinándose su fórmula molecular como $C_{17}H_{28}O_5$.

En el espectro IR (Tabla 53A) se observan bandas de absorción a 3404, 1736, 1647 y 897 cm^{-1} , asignadas a funciones hidroxilo, acetilo y olefinica, respectivamente.

**Figura 71:** Espectro de ^1H -RMN de la sustancia **C19**.

El espectro de RMN de ^1H de **C19** (Figura 71; Tabla 53B) muestra la presencia de tres metilos a δ_{H} 0,95 (3H, d, $J=6,4$ Hz, CH_3 -13), 1,12 (3H, d, $J=6,4$ Hz, CH_3 -12) y 1,16 (3H, s, CH_3 -15), de un grupo acetilo a δ_{H} 2,15 (3H, s, OAc), de un protón olefinico a 5,45 (1H, t, $J=6,8$ Hz, H-1), de un grupo hidroximetileno a δ_{H} 4,29 (1H, d, $J=11,8$ Hz,

H_a-14) y 4,12 (1H, d, J=11,8 Hz, H_b-14), y de tres protones de metinos oxigenados a δ_H 2,82 (1H, d, J=7,7 Hz, H-5), 3,51 (1H, m, H-6) y 5,18 (1H, dd, J=5,2; 12,0 Hz, H-8).

Para obtener una mejor resolución de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C, se procedió a la acetilación de **C19** con anhídrido acético y piridina, obteniéndose el derivado acetilado **C19a**. El espectro de RMN de ¹³C de **C19a** (Tabla 54B) muestra veintiún carbonos, con señales indicativas de un metileno oxigenado (δ_C 63,5, C-14), de un grupo funcional epóxido (δ_C 66,5, C-5; 58,8, C-4), de dos metinos oxigenados (δ_C 73,5, C-6; 72,1, C-8), y de un grupo isopropilo (δ_C 26,2, C-11; 22,9, C-12; 21,2, C-13).

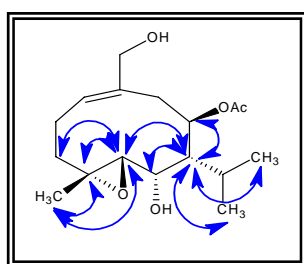


Figura 72a: Relaciones seleccionadas de HMBC de la sustancia **C19a**.

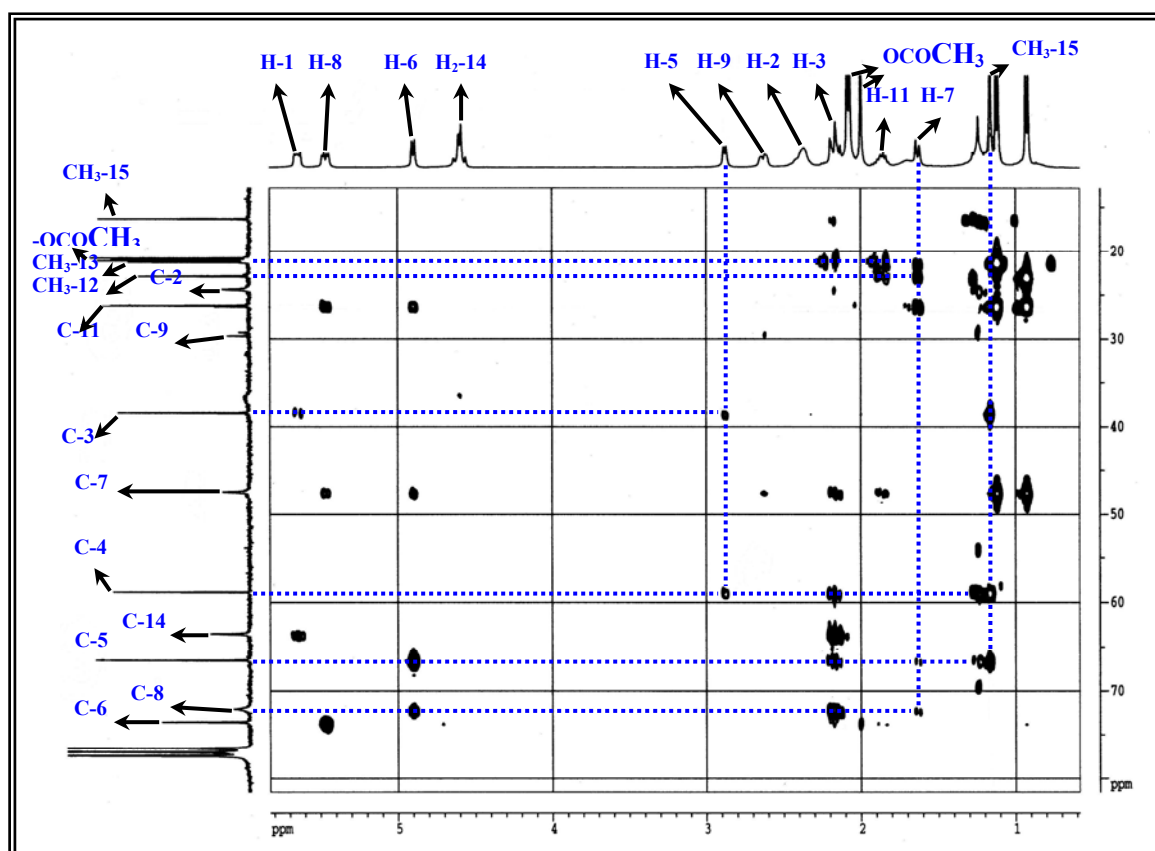


Figura 72b: Espectro de HMBC de la sustancia **C19a**.

Un análisis de los datos de RMN en 2D revela que **C19a** posee el mismo esqueleto que el compuesto **C9**, con un grupo epóxido trisustituido geminal a un metilo en el **C19a**, en lugar de la olefina trisustituida geminal a un metilo presente en el compuesto **C9**. Las correlaciones de HMBC (Figura 72b) de CH₃-15 con C-4 y C-5, de H-5 con C-3 y C-4, y de H-7 con C-5, C-6, C-8, C-12 y C-13, nos ayudaron a ubicar el grupo epóxido trisustituido geminal a un metilo.

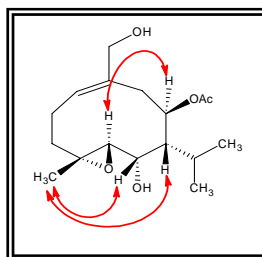


Figura 73a: Relaciones seleccionadas de ROESY de la sustancia **C19a**.

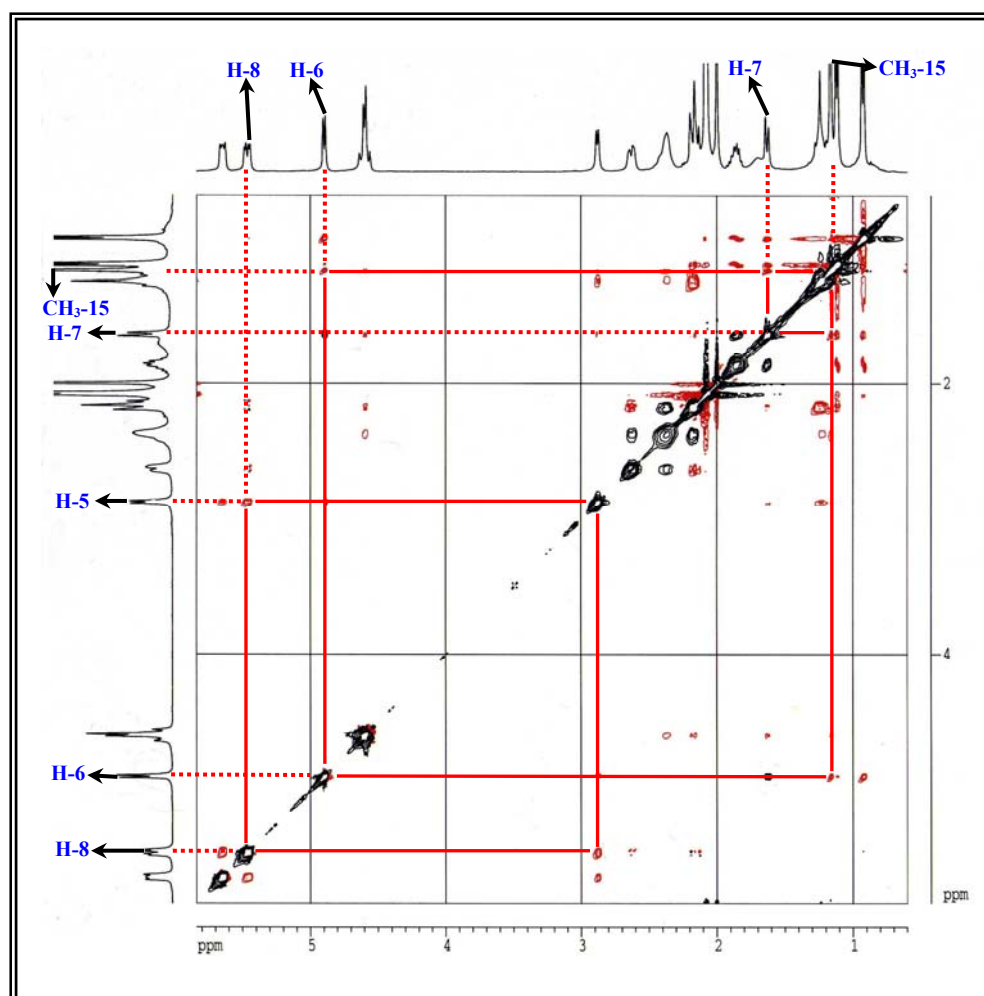
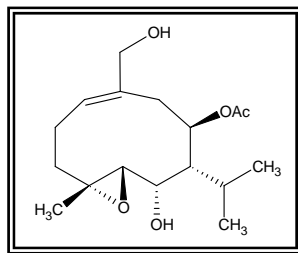


Figura 73b: Espectro de ROESY de la sustancia **C19a**.

La estereoquímica relativa de **C19a** se dedujo mediante un experimento ROESY en 2D (Figura 73b), que indicó correlaciones de CH₃-15 (δ_H 1,17) con H-7 y H-6, mostrando claramente que esos protones están en la misma cara, mientras que la correlación de H-5 (δ_H 2,87) con H-8 en el lado opuesto de la molécula, indica que el anillo epóxido 4,5 está en forma trans. Debido a su gran tamaño, el movimiento conformacional de este anillo de diez miembros se encuentra probablemente restringido¹¹⁵.

Todo esto confirmó que la estructura de **C19** corresponde a **(1E)-4 α ,5 β -epoxi-8 β -acetoxi-7 β H-germacra-1(10)-eno-6 α ,14-diol** que, al no estar descrita previamente, hemos denominado **Pulicanol**.



C19

Sustancia C3

La sustancia **C3** fue aislada como agujas incoloras de punto de fusión 183-184°C, de la fracción III de la cromatografía general.

Su fórmula molecular se determinó como C₁₉H₂₈O₆ mediante HREIMS (m/z 352,1905 [M⁺]; Tabla 37A).

En su espectro de IR (Tabla 37A) se observan señales a 1732 y 1716 cm⁻¹ que indican la presencia de sendos grupos carbonilos.

115. Wong, H.F. and Brown, G.D. "Germacranolides from *Artemisia myriantha* and their conformation". *Phytochemistry* (2002), 59 (5), 529-536.

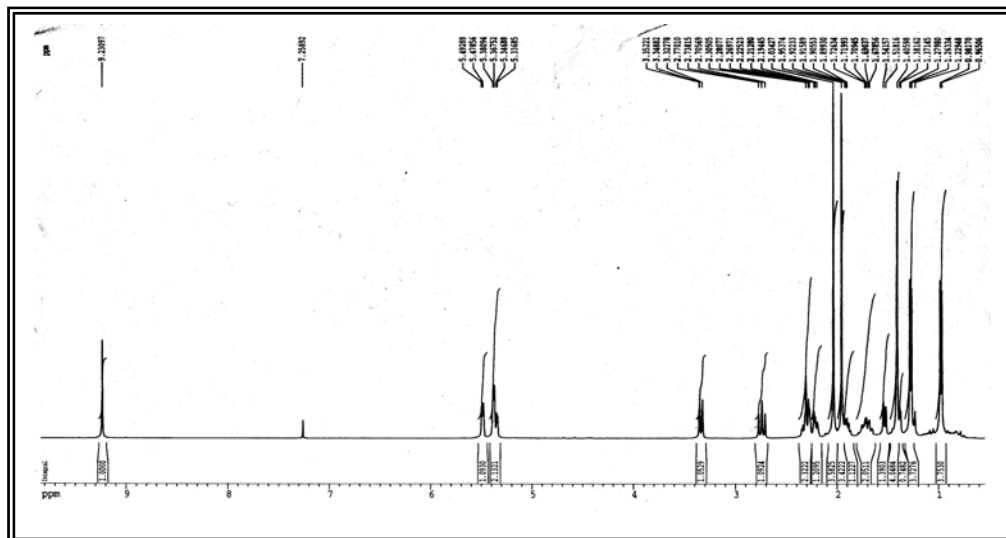


Figura 74: Espectro de ^1H -RMN de la sustancia **C3**.

Su espectro de RMN de ^1H (Figura 74; Tabla 37B) presenta señales para tres grupos metilos a δ_{H} 0,97 (3H, d, $J=6,6$ Hz, CH_3 -13), 1,32 (3H, d, $J=6,6$ Hz, CH_3 -12) y 1,45 (3H, s, CH_3 -15), dos grupos acetilos a δ_{H} 2,00 (3H, s, OAc) y 2,08 (3H, s, OAc), un protón olefínico a δ_{H} 5,43 (1H, d, $J=7,2$ Hz, H-5) y un protón aldehído a δ_{H} 9,28 (1H, s, H-14). Este espectro de RMN de ^1H es similar al de **C4** en relación con el análisis de sus grupos funcionales, aunque sólo tiene un protón olefínico, por lo que concluimos que uno de los dos dobles enlaces del compuesto **C4** debe estar epoxidado. De hecho, el espectro de RMN de ^{13}C de **C3** muestra señales a δ_{C} 63,9 (C-1) y 61,1 (C-10) correspondientes a un anillo epoxidico, confirmado por el espectro HMBC de este compuesto (Figura 75b), donde la señal a δ_{H} 9,28 (H-14) se correlaciona con el carbono cuaternario oxigenado a δ_{C} 61,1 (C-10), con el que también se correlacionan las señales a δ_{H} 3,34 (H-1) y a δ_{H} 2,79 (H-9). También se observa en ese espectro de HMBC una correlación entre el carbono cuaternario oxigenado a δ_{C} 63,9 (C-1) y la señal a δ_{H} 2,38 (H-2), lo que avala la presencia del anillo epoxidico entre los carbonos 1 y 10.

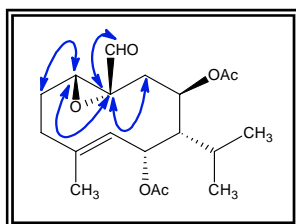


Figura 75a: Relaciones seleccionadas de HMBC de la sustancia C3.

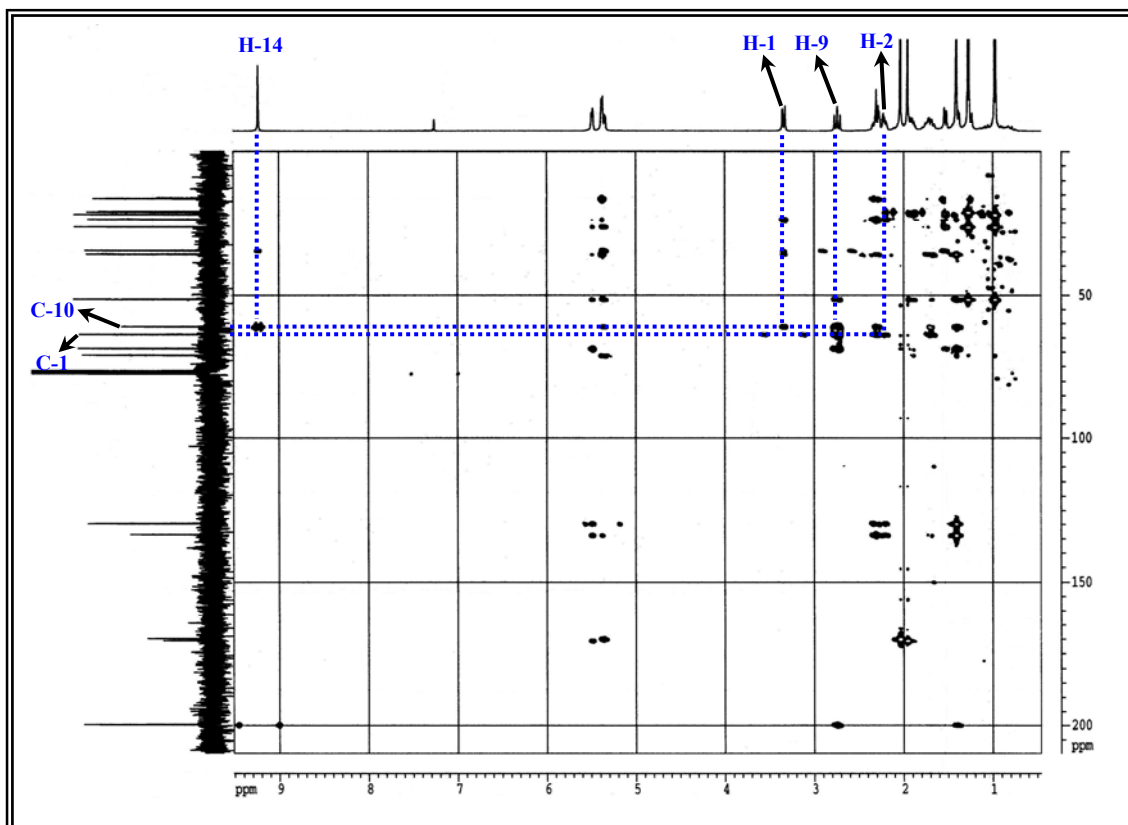


Figura 75b: Espectro de HMBC de la sustancia C3.

En total, el espectro de RMN de ^{13}C y D.E.P.T. de **C3** (Tabla 37B) muestra señales para diecinueve carbonos, incluidas las mencionadas para el anillo epoxídico (δ_{C} 63.9, C-1, y 61.1, C-10). Así, se observa señales para dos metinos oxigenados (δ_{C} 68.8, C-8, y 71.2, C-6), un grupo isopropilo (δ_{C} 26.3, C-11, 22.0, C-12, y 21.1, C-13), dos grupos acetilos (δ_{C} 20.9, 21.1, 169.8 y 170.4), un metilo (δ_{C} 16.4, C-15), tres metilenos (δ_{C} 23.7, C-2, 34.6, C-9, y 35.9, C-3), un metino olefínico (δ_{C} 129.7, C-5), otro metino (δ_{C} 45.5, C-7), un carbono cuaternario olefínico (δ_{C} 133.6, C-4) y un carbono carbonílico (δ_{C} 199.7, C-14).

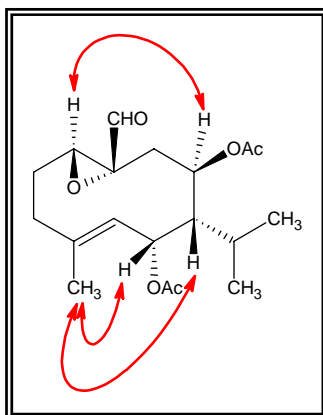


Figura 76a: Relaciones seleccionadas de ROESY de la sustancia C3.

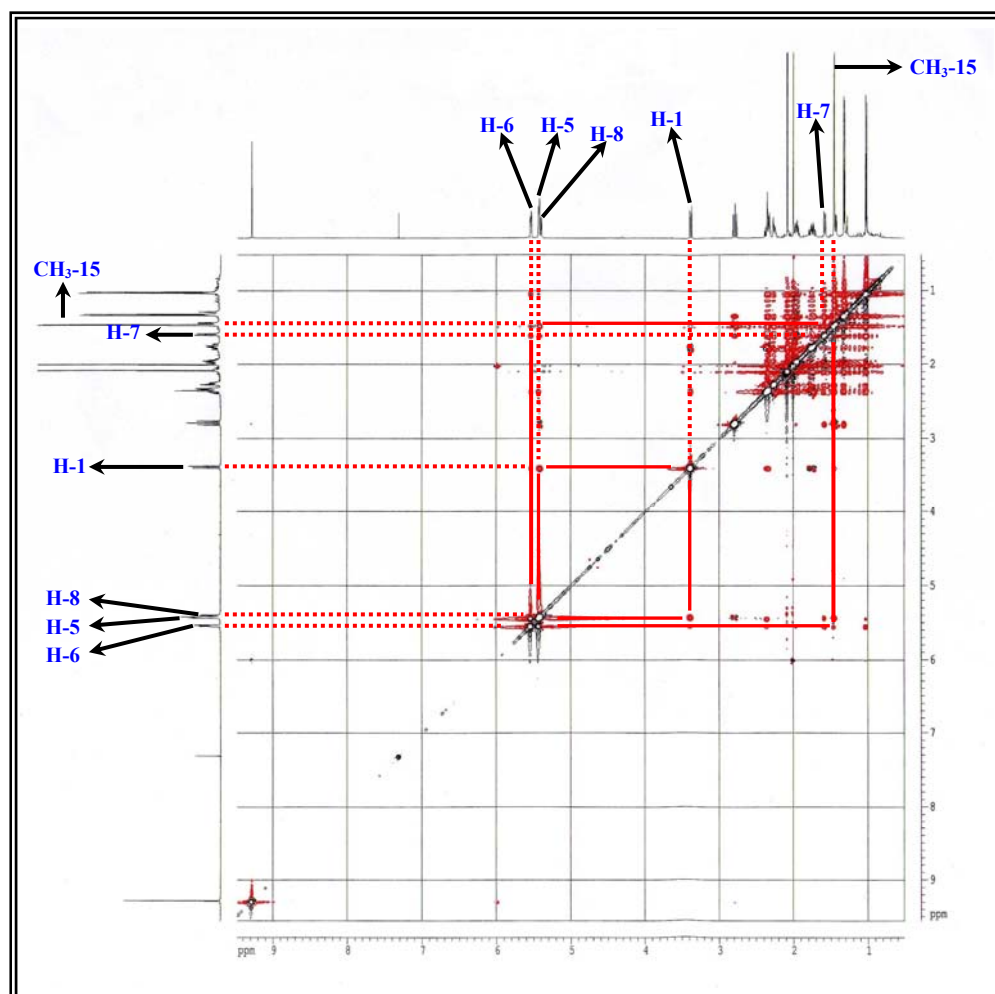


Figura 76b: Espectro de ROESY de la sustancia C3.

Para establecer la estereoquímica relativa se realizó un experimento ROESY (Figura 76b), en el que se observa una correlación entre H-1 y H-8, mientras que las correlaciones observadas entre H-6, H-7 y CH₃-15 sugieren que tienen una orientación opuesta. En el análisis de difracción de rayos X de **C3** se observa que la estereoquímica de los sustituyentes es más bien una relación trans entre el grupo metilo en C-4 y el H en C-5, y del grupo aldehído en C-10 y el H en C-1. Los cristales son ortorrómbicos, con $a = 9.0390(10) \text{ \AA}$, $b = 14.6210(10) \text{ \AA}$, $c = 14.8660(10) \text{ \AA}$, $V = 1964.7(3) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $D_c = 1.191 \text{ g cm}^{-3}$, $\mu(\text{Mo K}\alpha) = 0.088 \text{ mm}^{-1}$, $F_{000} = 760$, $T = 293 \text{ K}$. La unidad asimétrica contenía una molécula de composición C₁₉H₂₈O₆ ($M = 352.41$). De las 20935 reflexiones que se recolectaron, 2849 eran independientes. La estructura fue resuelta utilizando métodos directos (SIR2002) y refinados mediante métodos full-matrix least-squares (SHELX97). Un esquema de la molécula con los átomos numerados se muestra en la figura 77.

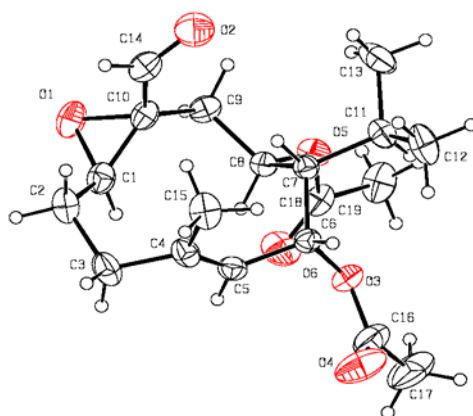
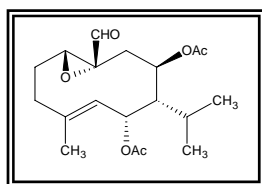


Figura 77: Difracción de rayos X (ORTEP) de la sustancia **C3**

En función de esos datos, se deduce para este nuevo compuesto la estructura de **(4E)-1 β ,10 α -epoxi-6 α ,8 β -diacetoxi-7 β H-germacra-4-en-14-al**, que hemos denominado **Pulicanaral A**.



C3

Sustancia C5

Esta sustancia se obtuvo como agujas incoloras de punto de fusión 205-210°C, a partir de la fracción III de la cromatografía general.

Su fórmula molecular resultó ser C₁₉H₂₆O₇, determinada por HRFABMS (m/z 391,1738 [M + Na]⁺; Tabla 39A).

En su espectro de IR se observan señales a 1737 y 1715 cm⁻¹, entre otras, que indican la presencia de varios grupos carbonilos.

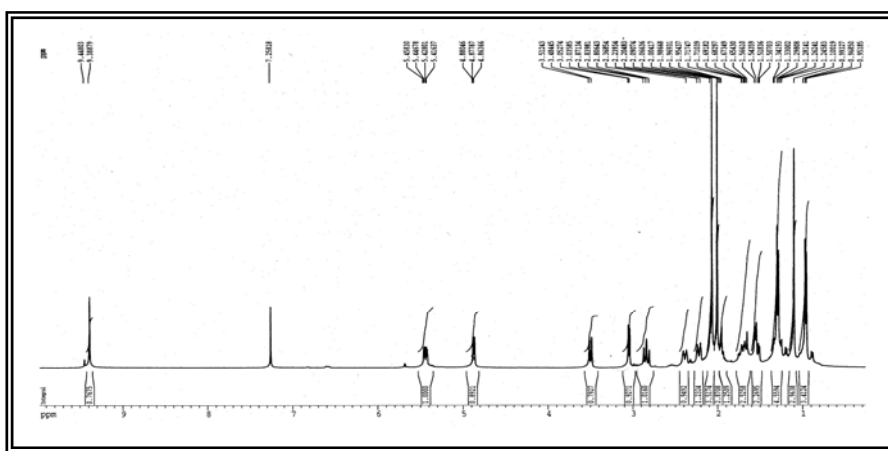


Figura 78: Espectro de ¹H-RMN de la sustancia C5.

Los datos de RMN de ¹H y ¹³C de la sustancia C5 (Tabla 39B) son muy similares a los de la sustancia C3, sugiriendo que los dos compuestos están estrechamente relacionados. Así, en su espectro de RMN de ¹H (Figura 78) se observan señales para tres grupos metilos a δ_H 0,96 (3H, d, J=6,7 Hz, CH₃-13), 1,29 (3H, d, J=6,7 Hz, CH₃-12) y 1,10 (3H, s, CH₃-15), dos grupos acetilos a δ_H 2,06 (3H, s, OAc) y 2,06 (3H, s, OAc) y un protón aldehído a δ_H 9,28 (1H, s, H-14), además de dos dobletes (δ_H 3.04, d, J=6.7 Hz, H-5; 3.50, d, J=11.2, H-1) y dos dobles dobletes (δ_H 4.87, dd, J=1.0; 6.7 Hz, H-6; 5.44, d, J=4.6; 12.1, H-8), que integran para un protón cada uno, y que corresponden a protones geminales a funciones oxigenadas.

Su espectro de RMN de ¹³C y D.E.P.T. da un total de diecinueve señales separadas de carbonos, correspondientes a dos grupos acetilos (δ_C 20.8, 20.9, 169.7, 169.8), un isopropilo (δ_C 26.3, C-11, 21.0, C-13, y 21.9, C-12), un metilo (δ_C 16.7, C-15), tres metilenos (δ_C 23.1, C-2, 33.3, C-9, y 35.7, C-3), cuatro metinos oxigenados

(δ_C 62.3, C-1, 66.2, C-5, 69.2, C-8, y 72.5, C-6), un metino (δ_C 47.9, C-7), dos carbonos cuaternarios oxigenados (δ_C 58.0, C-4, y 61.8, C-10), y un carbono carbonílico (δ_C 199.8, C-14), que están de acuerdo con la fórmula molecular. Una comparación detallada con los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **C3** (Tabla 37B) revela que las señales debidas a H-5 (δ_H 5,43, d, $J=6,7$ Hz), C-4 (δ_C 133,6) y C-5 (δ_C 129,7) del compuesto **C3** han sido reemplazadas en este caso por señales debidas a un grupo epóxido [H-5 (δ_H 3,04, d, $J=6,7$ Hz); C-4 (δ_C 58,0); C-5 (δ_C 66,2)].

Por todo ello, se dedujo que la estructura debía ser la de **1 β ,10 α ;4 α ,5 β -diepoxi-6 α ,8 β -diacetoxi-7 β H-germacra-14-al**, pudiendo determinarse la configuración relativa únicamente por un análisis de difracción de rayos X de **C5**, en el que se muestra una relación trans similar a la presente en el compuesto **C3**. Los cristales son ortorrómbicos, con $a = 9.6980(10)$ Å, $b = 13.6170(10)$ Å, $c = 14.9460(10)$ Å, $V = 1973.7(3)$ Å³, $Z = 4$, $D_c = 1.240$ g cm⁻³, $\mu(\text{Mo K}\alpha) = 0.094$ mm⁻¹, $F_{000} = 792$, $T = 293$ K. La unidad asimétrica contenía una molécula de composición C₁₉H₂₈O₇ ($M = 368.41$). De las 20036 reflexiones que se recolectaron, 2437 eran independientes. La estructura fue resuelta utilizando métodos directos (SIR2002) y refinados mediante métodos full-matrix least-squares (SHELX97). Un esquema de la molécula con los átomos numerados se muestra en la figura 79.

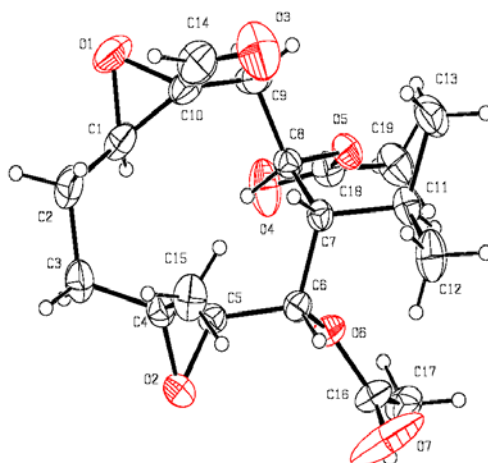
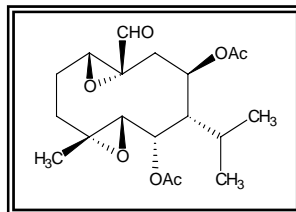


Figura 79: Difracción de rayos X (ORTEP) de la sustancia **C5**

A esta sustancia, nueva en la bibliografía consultada, la hemos denominado **Pulicanaral B**.



C5

Sustancia C18

El compuesto **C18** se obtuvo como un aceite incoloro de la fracción VI de la cromatografía general.

En su espectro de IR (Tabla 52A) se observan señales a 3462 y 1719 cm^{-1} , que indican la presencia de grupos funcionales hidroxilo y carbonilo.

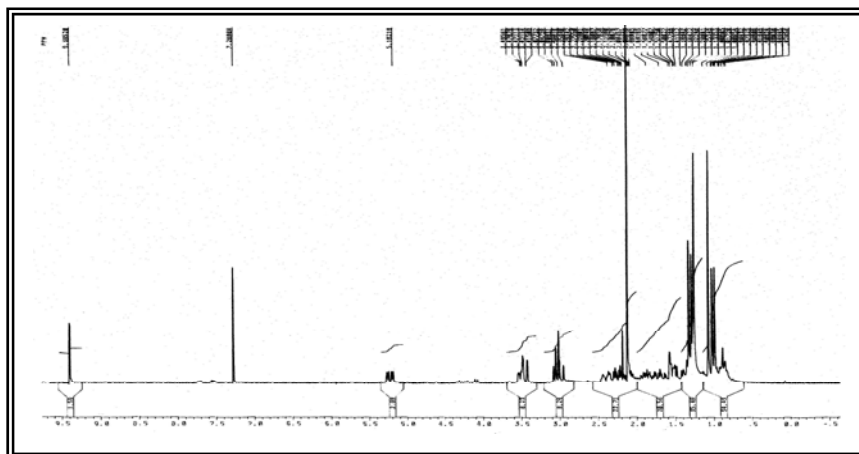


Figura 80: Espectro de ^1H -RMN de la sustancia **C18**.

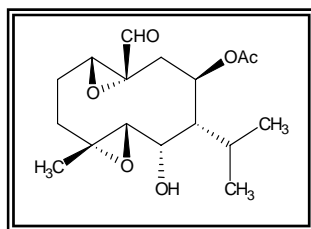
Como puede observarse, los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (Tabla 52B) son similares a los del compuesto **C5**, con la excepción de la ausencia de una señal de acetilo, ya que el protón del metino oxigenado de **C5** a δ_{H} 4,87 (1H, dd, $J=1,0$; 6,7 Hz, H-6) resulta desplazado a δ_{H} 3,51 (1H, dd, $J=1,2$; 6,7 Hz, H-6) en **C18**, y una de las dos señales de metilos de acetilos en **C5** desaparecen en **C18**. El resto de señales en el espectro de RMN de ^1H de **C18** (Figura 80) corresponden a tres grupos metilos a δ_{H}

0,99 (3H, d, $J=6,6$ Hz, CH₃-13), 1,31 (3H, d, $J=6,6$ Hz, CH₃-12) y 1,13 (3H, s, CH₃-15), un grupo acetilo a δ_H 2,12 (3H, s, OAc), un protón aldehído a δ_H 9,40 (1H, s, H-14) y tres protones geminales a funciones oxigenadas a δ_H 3,03 (1H, d, $J=6,7$ Hz, H-5), 3,45 (1H, d, $J=11,5$, H-1) y 5,20 (1H, dd, $J=4,6$; 12,6 Hz, H-8).

El espectro de RMN de ¹³C y D.E.P.T. de **C18** da un total de diecisiete señales separadas de carbonos, correspondientes a un acetilo (δ_C 21.0 y 173.0), un isopropilo (δ_C 26.3, C-11, 22.1, C-12, y 21.1, C-13), un metilo (δ_C 16.1, C-15), tres metilenos (δ_C 23.0, C-2, 34.5, C-9, y 35.8, C-3), cuatro metinos oxigenados (δ_C 62.5, C-1, 67.7, C-5, 70.0, C-8, y 70.2, C-6), un metino (δ_C 49.7, C-7), dos carbonos cuaternarios oxigenados (δ_C 58.0, C-4, y 61.5, C-10), y un carbono carbonílico (δ_C 199.3, C-14).

La acetilación de **C18** con anhídrido acético y piridina dio un derivado diacetilado cuyas constantes físicas y espectroscópicas resultaron idénticas a las de **C5**.

De acuerdo a las anteriores evidencias, asignamos a **C18** la estructura de **1 β ,10 α ;4 α ,5 β -diepoxi-8 β -acetoxi-6 α -hidroxi-7 β H-germacra-14-al**, resultando ser una sustancia nueva de acuerdo a la bibliografía consultada, por lo que la hemos denominado **Pulicanaral C**.



C18

Sustancia C15

Este compuesto fue aislado como un aceite incoloro de la fracción V de la cromatografía general, teniendo de fórmula molecular C₁₅H₂₄O₃, obtenida por medio de HRFABMS (m/z 275,1645 [M+Na]⁺; Tabla 49A).

Presenta absorciones IR (Tabla 49A) a 3410 y 1660 cm⁻¹, que indican la presencia de grupos funcionales hidroxilo y carbonilo α,β -insaturado.

El espectro de RMN de ^{13}C y el correspondiente espectro D.E.P.T. (Tabla 49B) exhiben quince señales de carbonos, que indican la presencia de un grupo isopropilo (δ_{C} 26.6, C-11, 21.7, C-12, y 16.4, C-13), un metilo (δ_{C} 29.8, C-15), tres metilenos (δ_{C} 25.0, C-2, 32.1, C-9, y 41.0, C-3), un metino oxigenado (δ_{C} 66.7, C-8), un metino (δ_{C} 55.7, C-7) y un carbono carbonílico (δ_{C} 199.5, C-14), sugiriendo la presencia de un esqueleto sesquiterpeno tipo germacrano. El espectro de RMN de ^{13}C también establece que están presentes dos enlaces olefinicos (uno disustituído, δ_{C} 139.7, C-5, y 122.2, C-6; y otro trisustituído, δ_{C} 163.7, C-1, y 139.7, C-10), y se localiza un grupo hidroxilo sobre el carbono totalmente sustituido (un carbono singlete a δ_{C} 73.6, C-4).

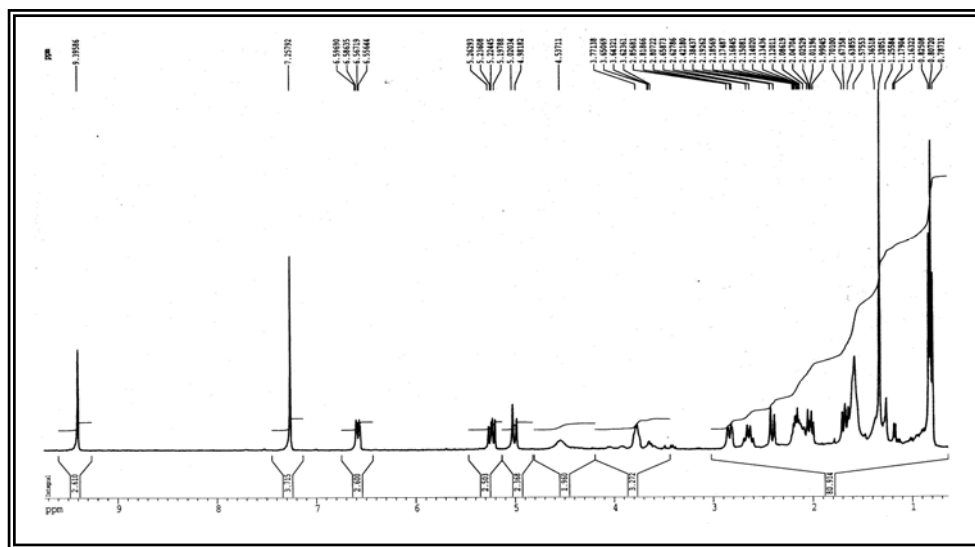


Figura 81: Espectro de ^1H -RMN de la sustancia C15.

En su espectro de RMN de ^1H (Figura 81; Tabla 49B) aparecen señales para un protón de metino oxigenado a δ_{H} 3,76 (1H, m, H-8), dos grupos metilos sobre un carbono metino a δ_{H} 0,81 (3H, d, $J=6,9$ Hz, CH_3 -12) y 0,79 (3H, d, $J=6,9$ Hz, CH_3 -13), un grupo metilo angular a δ_{H} 1,32 (3H, s, CH_3 -15), tres protones olefinicos a δ_{H} 6,58 (1H, dd, $J=4,4$; 11,9 Hz, H-1), 5,22 (1H, dd, $J=10,7$; 15,3 Hz, H-6) y 5,00 (1H, d, $J=15,3$ Hz, H-5), y un protón aldehído a δ_{H} 9,39 (1H, s, H-14).

El experimento COSY (Figura 82b) descubre dos estructuras parciales, una CHCH_2CH_2 , coincidente con el fragmento C-1, C-2, C-3, y que se corresponde con las correlaciones de H-2 con H-1 y H-3, y otra CHCHCHCH_2 , coincidente con el

fragmento C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, y que se corresponde con las correlaciones de H-6 con H-5 y H-7, y de H-8 con H-7 y H-9.

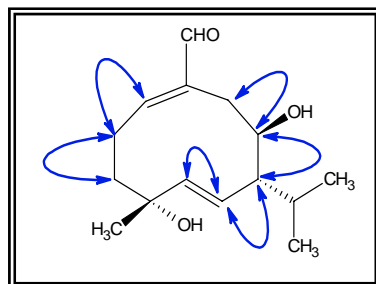


Figura 82a: Relaciones seleccionadas de COSY de la sustancia C15.

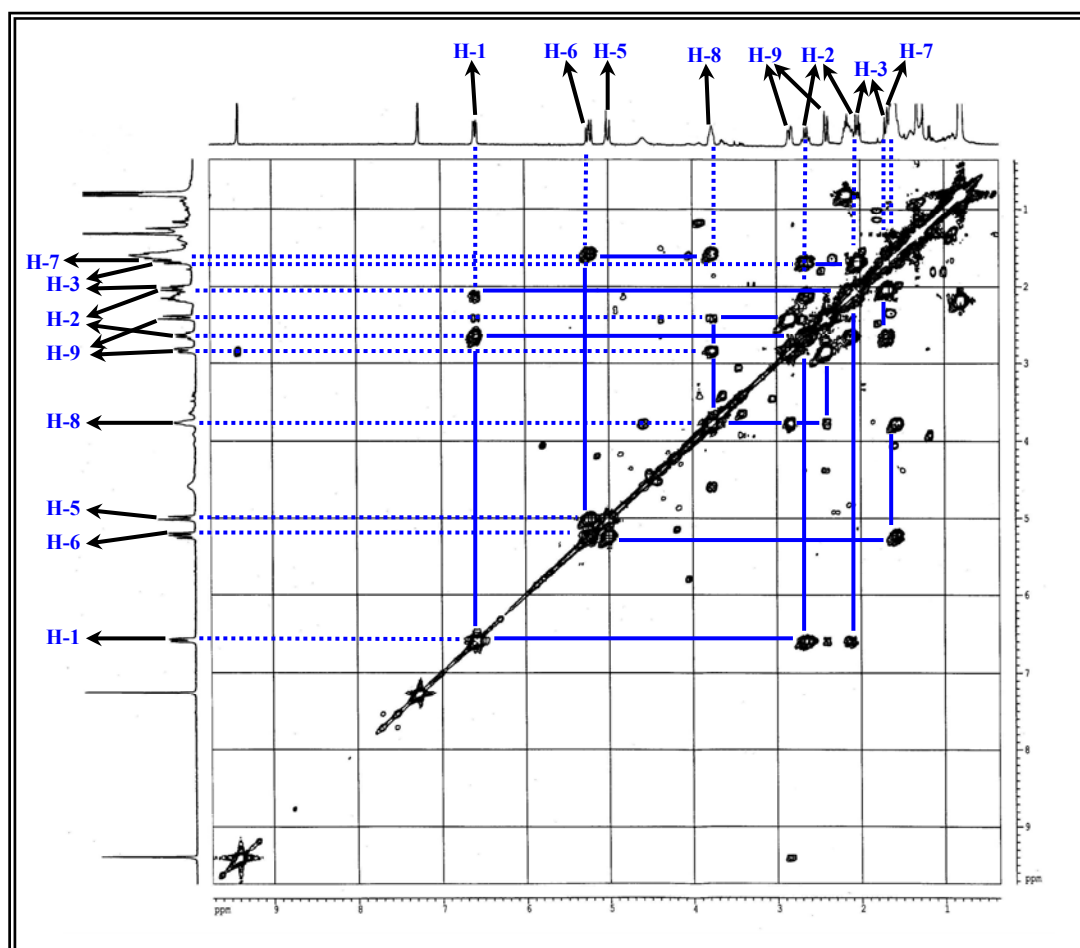


Figura 82b: Espectro de COSY de la sustancia C15.

Por otro lado, en el experimento HMBC (Figura 83b) se observan correlaciones de H-1 con C-14 y C-3; de H-5 con C-4 y C-6; de H-6 con C-5, C-4 y C-8; de H-7 con C-8 y C-13; de H-14 con C-1, C-9 y C-10; y de CH₃-15 con C-4 y C-5. La estereoquímica del doble enlace C-5, C-6 se determina como E al considerar la constante de acoplamiento ($J_{5,6}=15,3$ Hz).

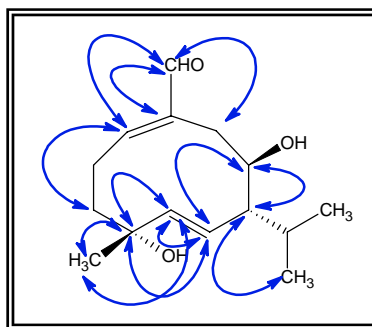


Figura 83a: Relaciones seleccionadas de HMBC de la sustancia C15.

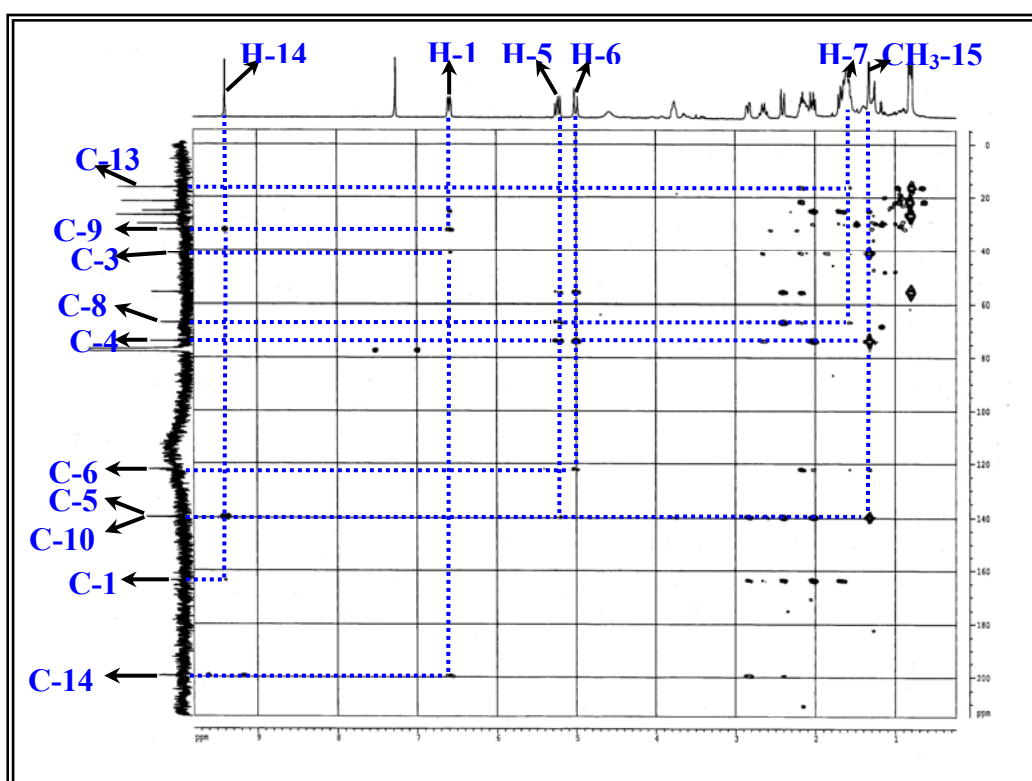


Figura 83b: Espectro de HMBC de la sustancia C15.

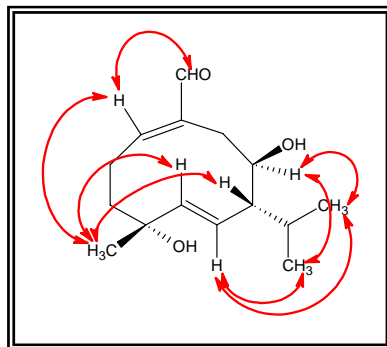


Figura 84a: Relaciones seleccionadas de NOESY de la sustancia C15.

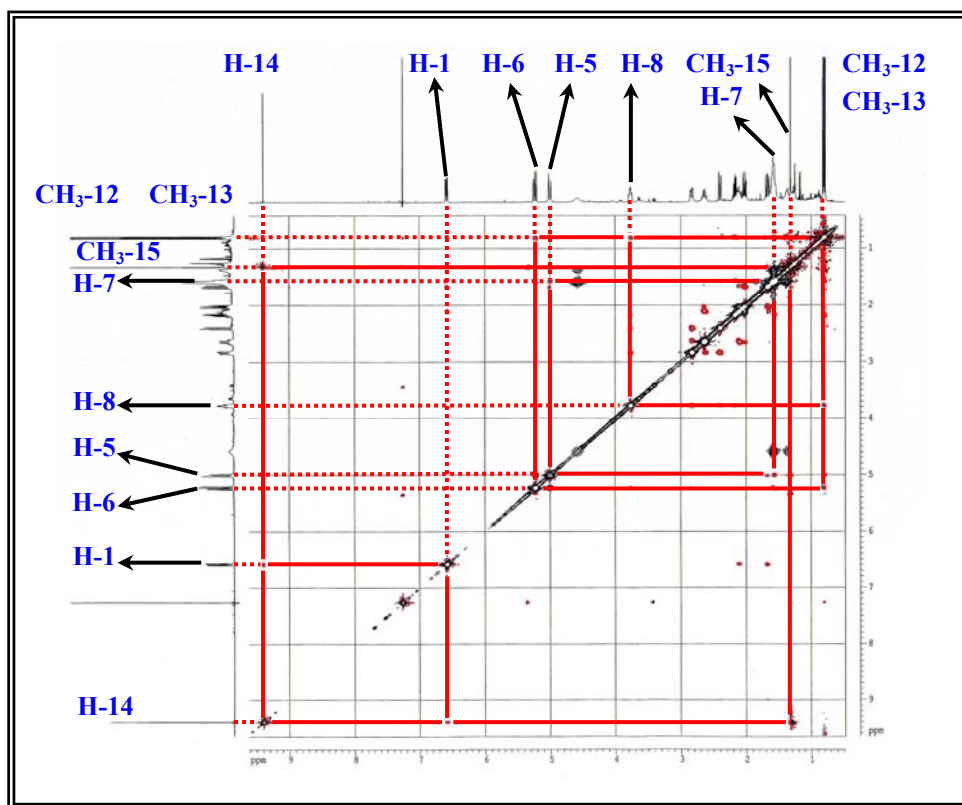


Figura 84b: Espectro de NOESY de la sustancia C15.

La estereoquímica relativa de **C15** se determina por el espectro NOESY (Figura 84b), en el que se observan importantes correlaciones entre H-8, H-6, CH₃-12 y CH₃-13, así como entre H-14, H-1 y CH₃-15, llevando a la conclusión de que la estereoquímica del doble enlace C-1, C-10 debe ser E. También se observan correlaciones entre CH₃-15, H-5 y H-7.

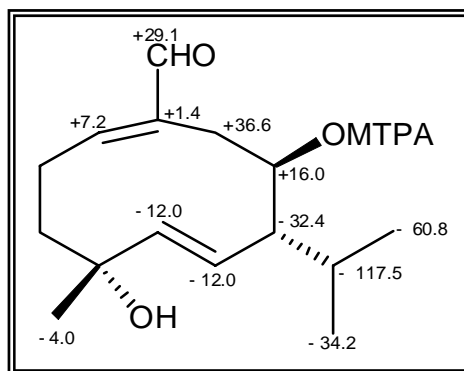
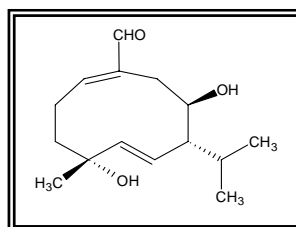


Figura 85: Valores de $\Delta\delta$ [$\Delta\delta$ (en ppm) = $\delta_S - \delta_R$] obtenidos para los ésteres (S)- y (R)-MTPA (**C15a** y **C15b**, respectivamente) del compuesto **C15**.

La configuración absoluta de C-8 (Figura 85) fue determinada usando el procedimiento del éster de Mosher modificado¹¹⁶. Para ello, el compuesto **C15** fue tratado con cloruro de (S)-(+)- y de (R)-(-)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacetilo en piridina anhidra, a temperatura ambiente durante 24 horas, para generar los derivados esterificados (R)- y (S)-MTPA, **C15a** y **C15b**, respectivamente. Se obtuvieron valores negativos ($\Delta\delta_{S-R}$) para H-7, H-11, H-6 y H-5, indicando que la configuración absoluta de C-8 es R.

De esta forma, la estructura de la sustancia **C15** debe responder a **(1E, 5E, 8R)-4 α ,8 β -dihidroxi-7 β H-germacra-1(10),5-dien-14-al** que, al no estar descrita en la bibliografía consultada, la hemos denominado **Pulicanadienal A**.



C15

116. Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y. and Kakisawa, H. "High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids". J. Am. Chem. Soc. (1991), 113 (11), 4092-4096.

Sustancia C13

La sustancia **C13** se aisló como un sólido cristalino de la fracción IV de la cromatografía general.

Su fórmula molecular fue establecida como $C_{17}H_{26}O_4$ por HRFABMS (m/z 317,1718 $[M+Na]^+$; Tabla 47A).

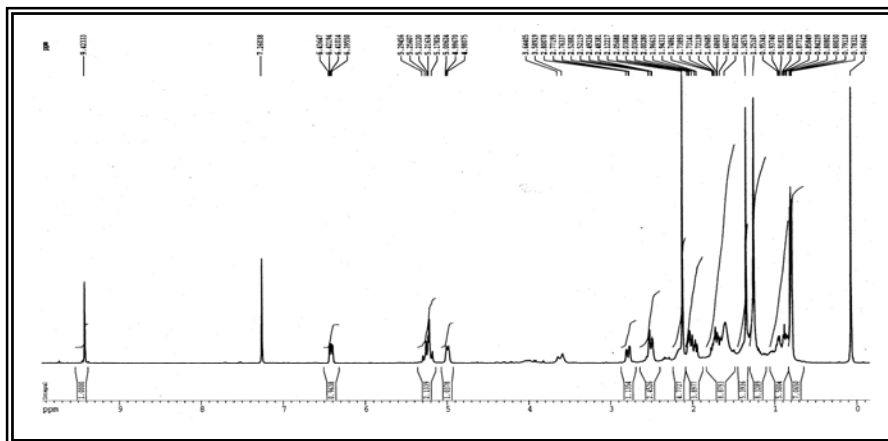


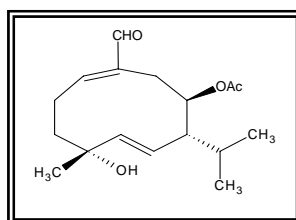
Figura 86: Espectro de 1H -RMN de la sustancia **C13**.

Los datos espectrales de RMN de 1H y ^{13}C (Tabla 47B) son similares a los de la sustancia **C15**, con la excepción de las señales para un grupo acetilo. Así, en su espectro de RMN de 1H (Figura 86) se observan señales para un protón de metino oxigenado con acetato a δ_H 5,00 (1H, m, H-8), dos grupos metilos sobre un carbono metino a δ_H 0,80 (3H, d, $J=6,8$ Hz, CH_3 -12) y 0,79 (3H, d, $J=6,8$ Hz, CH_3 -13), un grupo metilo angular a δ_H 1,34 (3H, s, CH_3 -15), tres protones olefinicos a δ_H 6,41 (1H, dd, $J=5,8$; 10,5 Hz, H-1), 5,25 (1H, dd, $J=10,0$; 15,4 Hz, H-6) y 5,20 (1H, d, $J=15,3$ Hz, H-5), un protón aldehído a δ_H 9,42 (1H, s, H-14), y el metilo de un grupo acetilo a δ_H 2,12 (3H, s, OAc).

En su espectro de RMN de ^{13}C y D.E.P.T. aparecen señales para diecisiete carbonos que se corresponden con un grupo acetilo (δ_C 21.2 y 171.2), un grupo isopropilo (δ_C 27.5, C-11, 21.4, C-12, y 16.8, C-13), un metilo (δ_C 29.6, C-15), tres metilenos (δ_C 25.2, C-2, 31.9, C-9, y 39.9, C-3), un metino oxigenado (δ_C 70.3, C-8), tres metinos olefinicos (δ_C 161.6, C-1, 138.6, C-5, y 121.4, C-6) y un carbono cuaternario olefinico (δ_C 157.6, C-10), que indican la presencia de dos insaturaciones, un metino (δ_C 52.8, C-7), un carbono cuaternario oxigenado (δ_C 73.6, C-4) y un carbono

carbonílico (δ_C 194.8, C-14). Cuando se trató el compuesto **C15** con anhídrido acético y piridina se obtuvo un derivado monoacetilado cuyas constantes físicas y espectroscópicas son idénticas a las del compuesto **C13**, demostrando que la sustancia **C13** es análoga a la **C15** con la única diferencia de la presencia del grupo acetilo sobre el carbono 8.

Puede establecerse así que la sustancia **C13** corresponde a **(1E, 5E)-8 β -acetoxi-4 α -hidroxi-7 β H-germacra-1(10),5-dien-14-al** que hemos denominado **Pulicanadienal B**, por ser una sustancia nueva según la bibliografía consultada.



C13

Sustancia C16

Este compuesto aislado de la fracción VI de la cromatografía general como un sólido amorfo, tiene de fórmula molecular $C_{15}H_{24}O_2$, determinada mediante HREIMS (m/z 236,1776 [M^+]; Tabla 50A).

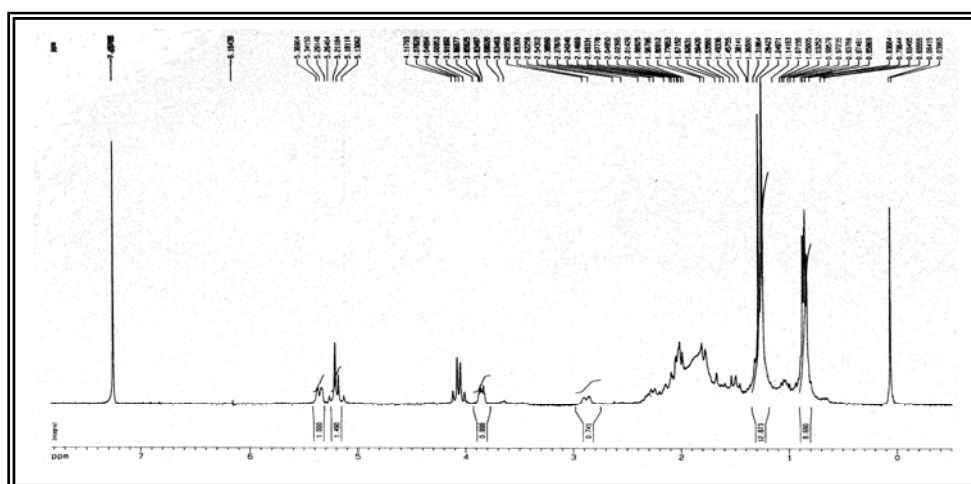
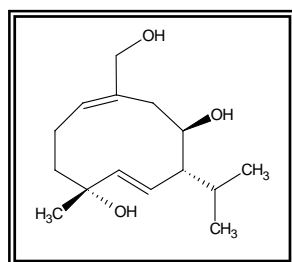


Figura 87: Espectro de 1H -RMN de la sustancia **C16**.

Su espectro de IR (Tabla 50A) muestra la presencia de grupos hidroxilos (3335 cm^{-1}), y de insaturaciones (1661 cm^{-1}), mientras que el espectro de RMN de ^1H (Figura 87; Tabla 50B) presenta señales análogas a las del compuesto **C15**. Así, en este espectro se observan señales para un protón de metino oxigenado a $\delta_{\text{H}} 3,85$ (1H, dd, $J=3,3; 6,2$ Hz, H-8), dos grupos metilos sobre un carbono metino a $\delta_{\text{H}} 0,87$ (3H, d, $J=6,4$ Hz, CH_3 -12) y $0,85$ (3H, d, $J=6,4$ Hz, CH_3 -13), un grupo metilo angular a $\delta_{\text{H}} 1,29$ (3H, s, CH_3 -15), tres protones olefinicos a $\delta_{\text{H}} 5,36$ (1H, dd, $J=2,5; 9,0$ Hz, H-1), $5,22$ (1H, dd, $J=9,4; 15,3$ Hz, H-6) y $5,17$ (1H, d, $J=15,3$ Hz, H-5), y dos protones metilénicos geminales a hidroxilo a $\delta_{\text{H}} 4,03$ (1H, d, $J=12,0$ Hz, H-14a) y $4,10$ (1H, d, $J=12,0$ Hz, H-14b). Como se puede observar la diferencia con **C15** corresponde a que el grupo aldehído en C-10 está reemplazado por un grupo hidroximetilo.

En su espectro de RMN de ^{13}C y D.E.P.T. (Tabla 50B) se observa la presencia de señales para quince carbonos, que se corresponden con un metilo ($\delta_{\text{C}} 30,0$, C-15), un isopropilo ($\delta_{\text{C}} 27,3$, C-11, $21,8$, C-12, $16,7$, C-13), un metileno oxigenado ($\delta_{\text{C}} 69,8$, C-14), tres metilenos ($\delta_{\text{C}} 23,1$, C-2, $35,6$, C-9, y $41,2$, C-3), un metino oxigenado ($\delta_{\text{C}} 68,6$, C-8), tres metinos olefinicos ($\delta_{\text{C}} 134,0$, C-1, $140,7$, C-5, y $120,0$, C-6), un metino ($\delta_{\text{C}} 55,7$, C-7), un carbono cuaternario olefinico ($\delta_{\text{C}} 150,0$, C-10), un carbono cuaternario oxigenado ($\delta_{\text{C}} 74,1$, C-4). La estereoquímica relativa de la sustancia **C16** se asignó como en el compuesto **C15**, basándose en las similitudes observadas en RMN de ^{13}C (Tablas 49B y 50B) entre ambos compuestos.

Todo lo anterior nos permitió confirmar la estructura de la sustancia **C16** como **(1E, 5E)-7 β H-germacra-1(10),5-dien-4 α ,8 β ,14-triol**, a la que hemos denominado **Pulicanadienol**, tras comprobar que corresponde a una sustancia nueva de acuerdo a la bibliografía consultada.



C16

c.2) Tipo oplopano:

Sustancia C21

El compuesto **C21** se aisló a partir de la fracción VI de la cromatografía general, como un sólido cristalino de punto de fusión 141-142°C.

Su fórmula molecular, $C_{15}H_{24}O_2Na$, se determinó mediante HRFABMS (m/z 259,1702 $[M+Na]^+$; Tabla 56A).

De sus datos espectroscópicos se deduce que su estructura corresponde a un sesquiterpeno del tipo oplopano. Así, muestra bandas en IR (Tabla 56A) a 3489, 1710 y 1660 cm^{-1} debidas a grupos hidroxilo, carbonilo y doble enlace, respectivamente.

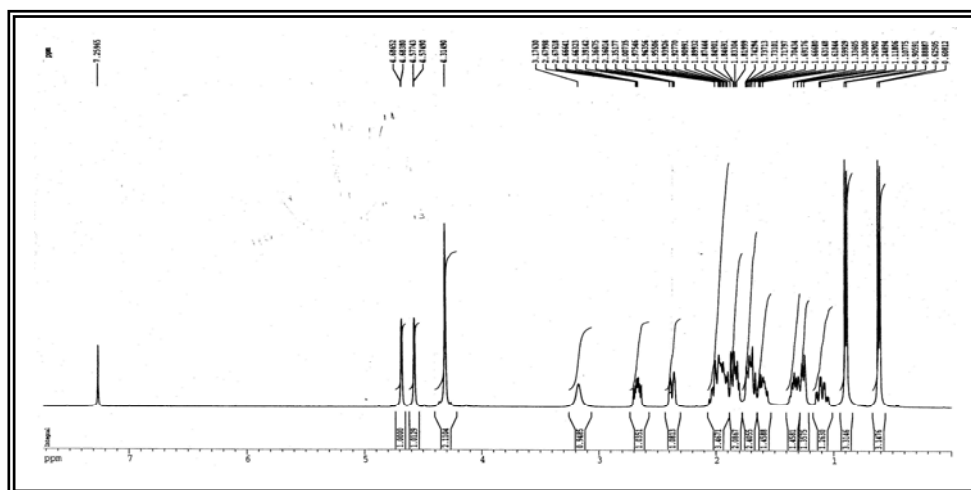


Figura 88: Espectro de 1H -RMN de la sustancia C21.

Su espectro de RMN de 1H (Figura 88; Tabla 56B) muestra señales que corresponden a un doble enlace exocíclico a δ_H 4,57 (1H, d, $J=1,1$ Hz, H-14a) y 4,68 (1H, d, $J=1,1$ Hz, H-14b); un grupo hidroximeto a δ_H 4,31 (2H, s, H₂-15); y un isopropilo a δ_H 0,61 (3H, d, $J=6,8$ Hz, H₃-13), 0,89 (3H, d, $J=6,8$ Hz, H₃-12) y 1,33 (1H, m, H-11), sugiriendo un estructura similar a la oplopenona¹¹⁷, diferenciándose de ésta en la ausencia del metilo del acoplamiento metilcetona localizado en C-5, que está reemplazado en nuestro caso por un alcohol primario, lo cual se confirmó al obtener su

117. Joseph-Natham, P.; Villagomez, J.R.; Roman, L.U. and Hernández, J.D. "Oplopanes from the leaves of *Senecio mexicanus*". *Phytochemistry* (1990), 29 (3), 977-979.

derivado acetilado **C21a** y observar un desplazamiento de dicha señal a δ_{H} 4,74 (2H, d, $J=8.3$ Hz) y δ_{C} 67,6 (Tabla 57B).

En su espectro de RMN de ^{13}C y D.E.P.T. se identifican señales correspondientes a quince carbonos, confirmando la presencia del doble enlace exocíclico (δ_{C} 150.4, C-10 y 103.9, C-14), del hidroximetilo (δ_{C} 67.7, C-15), y del isopropilo (δ_{C} 30.2, C-11, 21.9, C-12, y 15.4, C-13). Además se observan señales para cuatro metilenos (δ_{C} 27.3, C-2, 29.4, C-3, 26.3, C-8 y 35.2, C-9), cuatro metinos (δ_{C} 51.7, C-1, 50.8, C-5, 52.0, C-6 y 49.0, C-7) y un carbono carbonílico (δ_{C} 212.4, C-4).

De estos datos se dedujo que el compuesto **C21**, debe ser **15-hidroxi-10(14)-oplopen-4-ona**, cuya estructura la confirmamos por un análisis de difracción de rayos X de cristal simple. En él se confirma una configuración trans entre los protones en C-1 y C-6. Los cristales son ortorrómbicos, con $a = 5.4410(10)$ Å, $b = 14.886(3)$ Å, $c = 17.243(3)$ Å, $V = 1396.6(5)$ Å³, $Z = 4$, $D_c = 1.124$ g cm⁻³, $\mu(\text{Mo K}\alpha) = 0.072$ mm⁻¹, $F_{000} = 520$, $T = 293$ K. La unidad asimétrica contenía una molécula de composición C₁₅H₂₄O₂ ($M = 236.34$). De las 3196 reflexiones que se recolectaron, 1876 eran independientes. La estructura fue resuelta utilizando métodos directos (SIR97) y refinados mediante métodos full-matrix least-squares (SHELX97). Un esquema de la molécula con los átomos numerados se muestra en la figura 89.

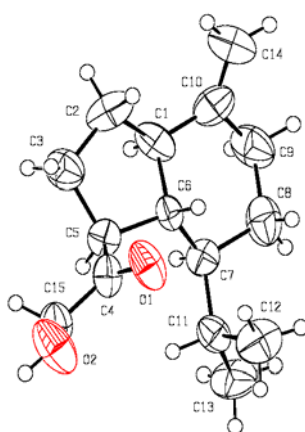
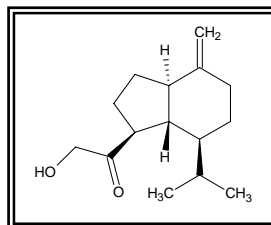


Figura 89: Difracción de rayos X (ORTEP) de la sustancia **C21**

De los datos consultados en la bibliografía se deduce que esta es una sustancia no descrita previamente, por lo que la hemos denominado **Pulioplopanona A**.



C21

Sustancia C17

La sustancia **C17** fue aislada como un aceite incoloro de la fracción VI de la cromatografía general.

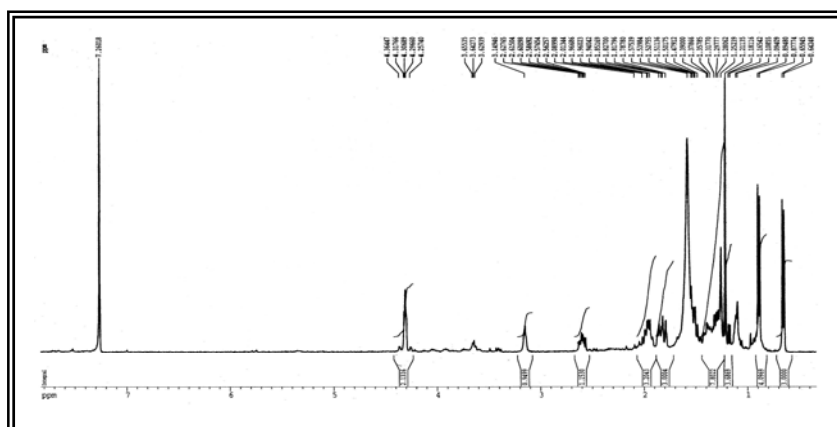


Figura 90: Espectro de ^1H -RMN de la sustancia **C17**.

Muestra una fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3$, establecida mediante HREIMS (m/z 254,1901 $[\text{M}]^+$; Tabla 51A), teniendo unos espectros de RMN de ^1H y ^{13}C (Tabla 51B) similares a los de la sustancia **C21**, excepto por la presencia de un grupo hidroxilo unido a C-10. Por este motivo en su espectro de RMN de ^1H (Figura 90) desaparecen las señales correspondientes al doble enlace exocíclico, sustituidas por una señal singlete a δ_{H} 1,21 (3H, H_3 -14). Pero en cambio siguen identificándose las señales para un grupo hidroximetilo a δ_{H} 4,30 (2H, t, $J=4.3$ Hz, H_2 -15), o un isopropilo a δ_{H} 0,66 (3H, d, $J=6,7$ Hz, CH_3 -13), 0,89 (3H, d, $J=6,7$ Hz, CH_3 -12) y 1,29 (1H, m, H-11).

En el espectro de RMN de ^{13}C y D.E.P.T. se identifican, igual que en **C21**, señales correspondientes a quince carbonos, que indican la presencia del hidroximetilo (δ_{C} 68.0, C-15), y del isopropilo (δ_{C} 30.0, C-11, 21.9, C-12, y 15.3, C-13). Además se observan señales para un metilo (δ_{C} 20.4, C-14), cuatro metilenos (δ_{C} 25.4, C-2, 29.5, C-3, 22.8, C-8 y 42.0, C-9), cuatro metinos (δ_{C} 57.0, C-1, 50.8, C-5, 47.0, C-6 y 49.2, C-7), un carbono cuaternario oxigenado (δ_{C} 73.0, C-10) y un carbono carbonílico (δ_{C} 212.4, C-4).

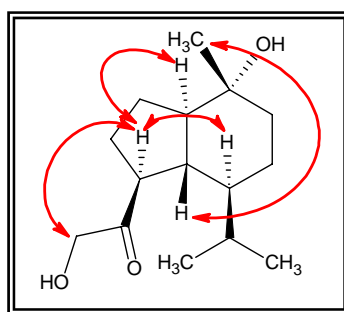


Figura 91a: Relaciones seleccionadas de NOESY de la sustancia **C17**.

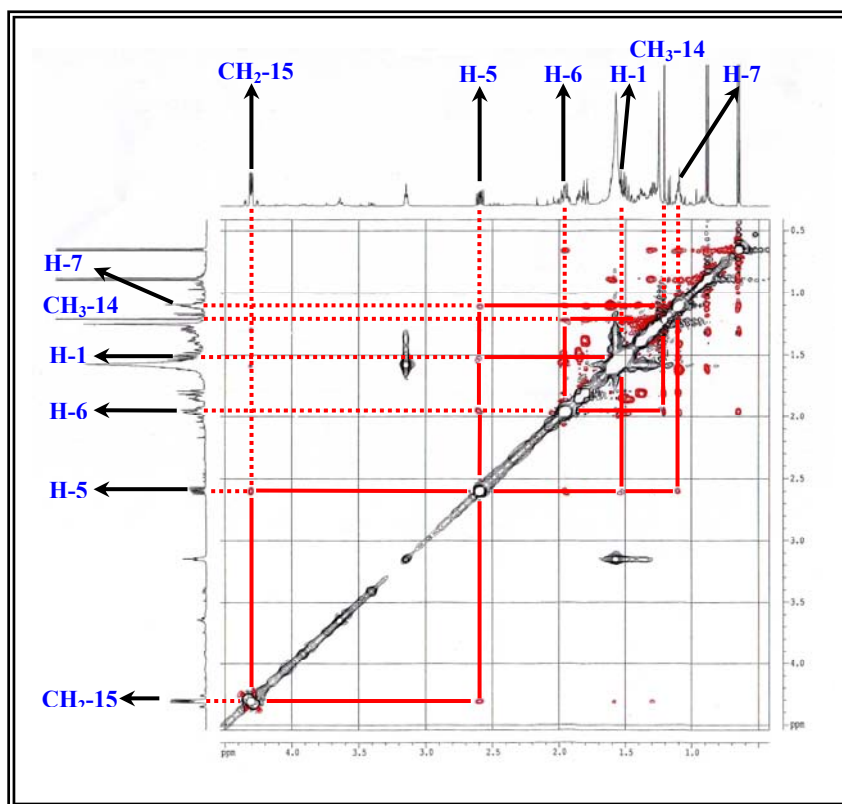
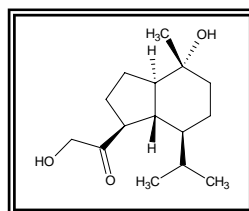


Figura 91b: Espectro de NOESY de la sustancia **C17**.

Los efectos NOE de H-5 con H₂-15, H-7 y H-1, y de H-6 con H₃-14, observados en un experimento NOESY (Figura 91b), sugieren que el OH en el carbono 10 en el compuesto **C17** tiene una orientación α , y apunta a la misma estereoquímica relativa para las sustancias **C21** y **C17**, llevando a la conclusión de que el compuesto **C17** debe ser **10 α ,15-dihidroxi-oplopan-4-ona**. Aunque se ha reportado en la literatura un derivado cinnamoilo de este compuesto¹¹⁸, la estructura anterior no ha sido descrita, por lo que proponemos para **C17** el nombre de **Pulioplopanona B**.

**C17**

118. Tamayo-Castillo, G.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F.; Rojas, A.; Castro, V. and King, R.M. "Germacranolides and other constituents from *Ageratina species*". *Phytochemistry* (1988), 27 (9), 2893-2897.

c.3) Tipo eudesmano:

Sustancia C20

La sustancia **C20** se aisló como un aceite incoloro de la fracción VI de la cromatografía general.

El espectro de IR (Tabla 55A) presenta banda de absorción a $\nu_{\text{máx}}$ 3370, que indica la presencia de grupos hidroxilos.

En el espectro de masas (Tabla 55A) destaca el pico de ión molecular a m/z 254, que está de acuerdo con una fórmula empírica $C_{15}H_{26}O_3$, lo que nos indica una naturaleza sesquiterpénica.

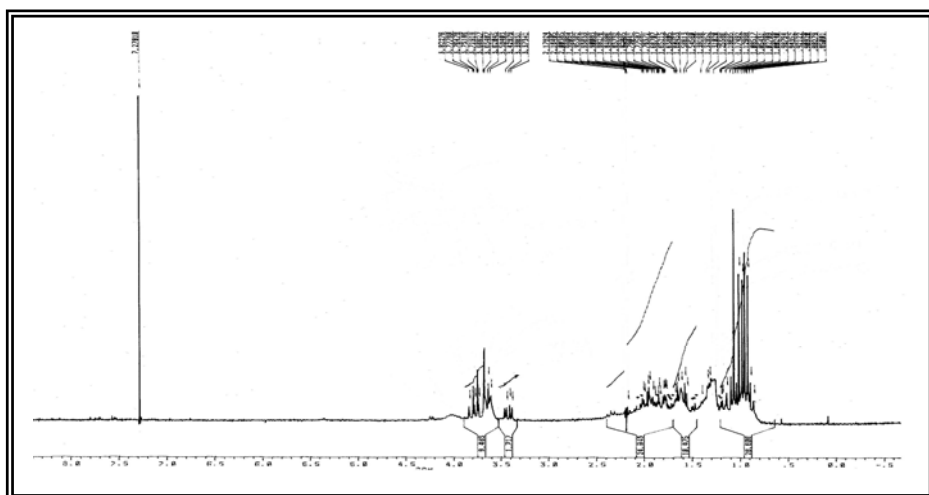
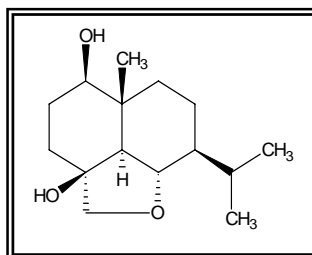


Figura 92: Espectro de ^1H -RMN de la sustancia **C20**.

En su espectro de RMN ^1H (Figura 92; Tabla 55B) aparecen dos dobletes a δ_{H} 0.97 y 0.93 ($J=6.8$), que integran para un metilo cada uno, y un singulete a δ_{H} 1.05, integrando para un metilo, y que se corresponden con CH_3 -12, CH_3 -13 y CH_3 -14 respectivamente. También se observa un doblete a δ_{H} 1.05 ($J=11.6$) con integral para un protón, asignado a H-5. El doblete presente a δ_{H} 3.45 ($J=5.0$; 11.0), con integral para un protón, y asignado a H-1, indica la presencia de un grupo hidroxilo sobre el carbono 1, mientras que un doblete a δ_{H} 3.76 ($J=9.1$; 11.6) integrando para un protón y que se asignó a H-6, junto con dos dobletes a δ_{H} 3.65 ($J=9.1$) y δ_{H} 3.75 ($J=9.1$) con integración para dos protones que se asignaron a CH_2 -15, indicaba la

presencia de un puente epóxido entre el carbono 15 y el carbono 6 en la estructura.

Estos datos concuerdan con los dados en la literatura para el **6 α ,15 α -epoxi-1 β ,4 β -dihidroieudesmano**¹¹⁹.



C20

119. Fang, N.; Yu, S.; Mabry, T.M.; Abboud, K.A. and Simonsen, S.H. "Terpenoids from *Ageratina saltillensis*". *Phytochemistry* (1988), 27 (10), 3187-3196.

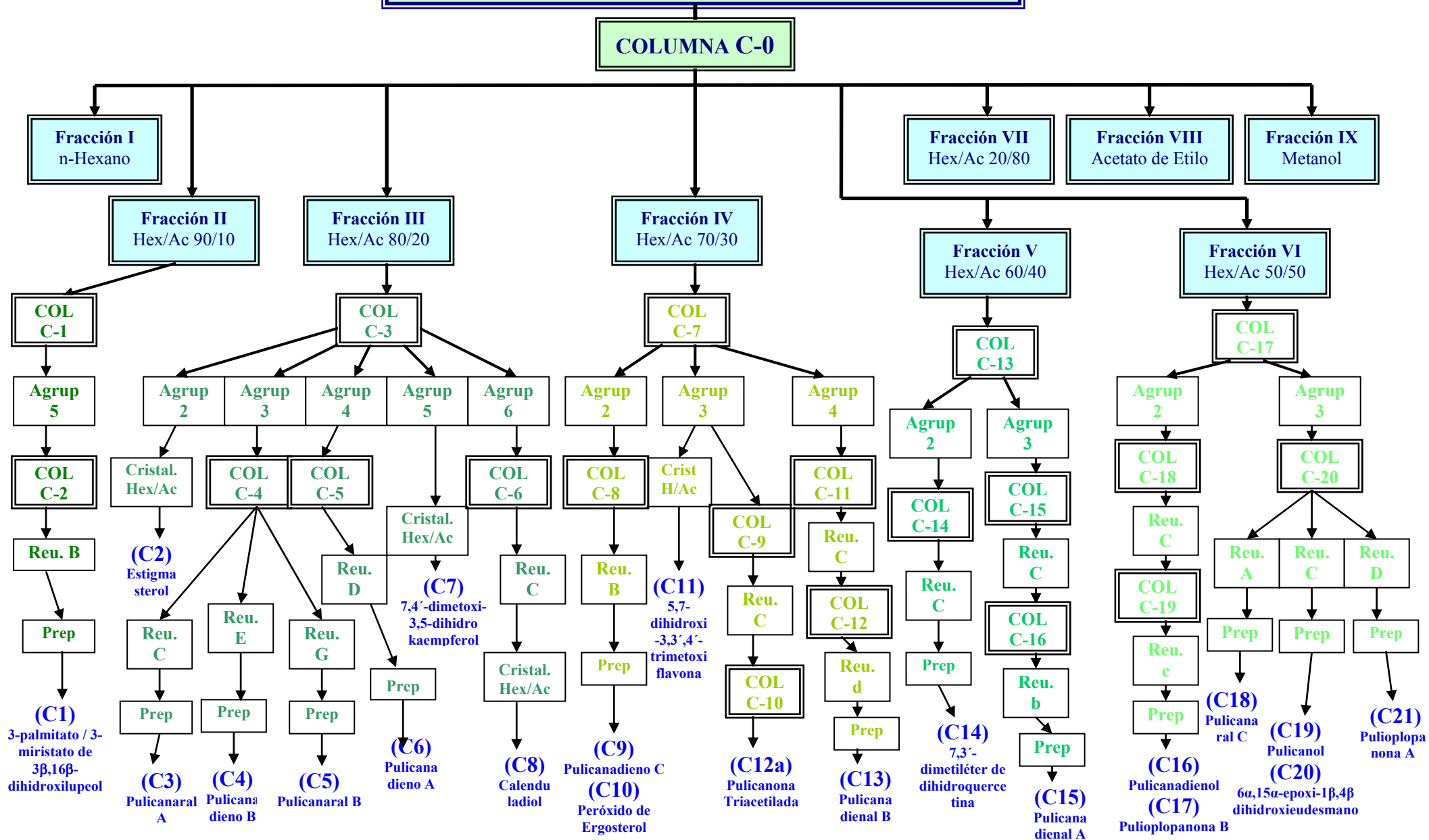


*Detalle de las flores de *P. canariensis* ssp. *canariensis**

***4.5 Pulicaria canariensis* Bolle ssp. *canariensis*.**

Parte Experimental

Pulicaria canariensis ssp. canariensis (Parte Aérea)



Las partes aéreas de *Pulicaria canariensis ssp. canariensis*, fueron recogidas en la localidad de Playa Quemada (Lanzarote) en Agosto de 1998. La recolección fue efectuada por el profesor Dr. José Luis Eiroa Martínez y clasificada por la Dra. Rosa Febles Hernández, depositándose un voucher espécimen (**LPA 20146**) en el Herbario del Jardín Canario Viera y Clavijo de Las Palmas de Gran Canaria. El material vegetal se sometió a un proceso de secado a temperatura ambiental y en entorno oscuro, obteniéndose un peso de material seco de 1.500 g. Posteriormente fue triturado cuidadosamente y extraído con etanol en caliente en un aparato Soxhlet, hasta su total agotamiento. El extracto etanólico resultante se concentró por eliminación del disolvente a presión reducida, obteniendo un residuo viscoso oscuro con un peso de 90 gramos.

El extracto etanólico obtenido fue disuelto en acetona, para reabsorberlo a continuación en gel de sílice (0,02-0,5 mm mallas), dando un material que se usó como cabeza de una columna húmeda de gel de sílice con el mismo grosor de grano, para lo cual se emplearon 0,6 kg de ésta última. Se utilizaron como eluyentes de la columna diferentes mezclas de n-hexano y acetato de etilo, con incremento de la concentración de acetato de etilo conforme se avanzaba en la cromatografía, comenzando por n-hexano puro, finalizando con acetato de etilo al 100% y con metanol. Se recogieron un total de 62 fracciones, de un litro cada una, que se fueron agrupando de acuerdo a su comportamiento en cromatografía de capa fina, en un total de 9 reuniones de fracciones (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX). A continuación presentamos los resultados obtenidos del estudio cromatográfico de cada una de ellas:

| FRACCIONES | ELUYENTES | SUSTANCIAS |
|------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| I | n-hexano | ----- |
| II | n-hexano / acetato etilo 10 % | C1 |
| III | n-hexano / acetato etilo 20 % | C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 |
| IV | n-hexano / acetato etilo 30 % | C9, C10, C11, C12, C13 |
| V | n-hexano / acetato etilo 40 % | C14, C15 |
| VI | n-hexano / acetato etilo 50 % | C16, C17, C18, C19, C20 |
| VII | n-hexano / acetato etilo 80 % | C21 |
| VIII | acetato etilo | ----- |
| IX | metanol | ----- |

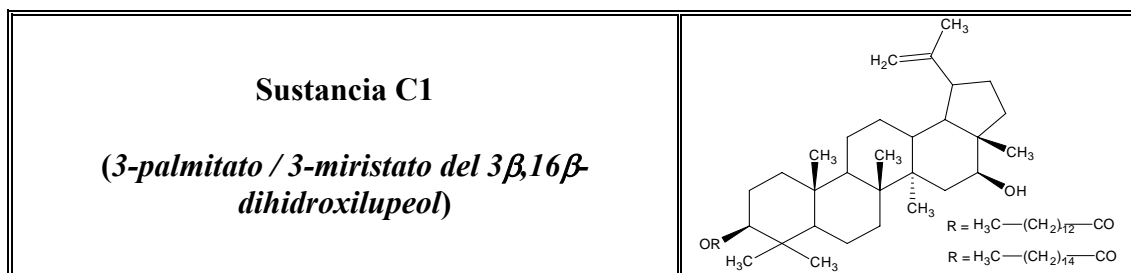
Fracción II:

Esta fracción fue eluída de la cromatografía general con n-hexano-acetato de etilo (9:1), y tras ser concentrada a vacío dio un residuo que pesó 3.70 g. El extracto así obtenido fue sometido a cromatografía en columna empaquetada con gel de sílice (columna C-1), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (9.5:0.5), recogándose un total de 200 fracciones de 100 mL que se reunieron, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en seis grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 6.

El agrupamiento 5, cuyo residuo concentrado a vacío pesó 1.4 g, fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna C-2) con n-hexano-acetato de etilo (9:1), recogándose un total de 70 fracciones de 100 mL que fueron agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en tres reuniones de fracciones nombradas de la A a la C.

La fracción B de la columna C-2 nos permitió obtener la sustancia C1 (130 mg), mezcla de 3-palmitato y 3-miristato del 3 β ,16 β -dihidroxi-lupeol, por purificación con cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando n-hexano-acetato de etilo (9:1) como eluyente y tres eluciones.

Los datos físicos y espectroscópicos de esta sustancia, así como la reacción de formación de derivado y los datos de éste, los exponemos a continuación.

**TABLA 35A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia C1**

| | |
|--|--|
| Estado: | Sólido amorfo |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3437, 3352, 2926, 1734, 1464, 1385, 1246, 1175, 1022, 980, 883. |
| MS m/z (%): | 424 (3), 407 (3), 381 (3), 363 (3), 273 (5), 257 (4), 255 (4), 239 (7), 234 (17), 229 (10), 216 (27), 203 (37), 189 (94), 135 (66), 121 (65), 108 (100), 95 (83), 81 (63), 69 (67), 55 (33). |

TABLA 35B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C1 (CDCl₃)

| Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|--------------|-----------|-----------|------------|---------------------------------|------------|--------------|-----------|-------------|----------|
| 1 | 38,4 | 0,87 1,63 | m m | ---- | 1H 1H | 18 | 47,7 | 1,63 | m | --- | 1H |
| 2 | 23,7 | 1,55 1,60 | m m | ---- | 1H 1H | 19 | 47,6 | 2,48 | m | --- | 1H |
| 3 | 80,5 | 4,45 | dd | 6,1; 11,6 | 1H | 20 | 150,0 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 4 | 37,7 | ---- | ---- | ---- | ---- | 21 | 31,9 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| | | | | | | | | 2,03 | m | ---- | 1H |
| 5 | 55,4 | ---- | ---- | ---- | ---- | 22 | 36,8 | 1,39 1,44 | m m | ---- | 1H 1H |
| 6 | 18,2 | 1,42 1,55 | m m | ---- | 1H 1H | 23 | 27,9 | | | | |
| 7 | 34,1 | 1,39 | m | ---- | 2H | 24 | 16,5 | 0,78 | s | ---- | 3H |
| 8 | 40,9 | ---- | ---- | ---- | ---- | 25 | 16,1 | 0,83 | s | ---- | 6H |
| 9 | 49,9 | ---- | ---- | ---- | ---- | 26 | 15,9 | 0,84 | s | ---- | 3H |
| 10 | 37,0 | ---- | ---- | ---- | ---- | 27 | 16,1 | 0,98 | s | ---- | 3H |
| | | | | | | | | 1,03 | s | ---- | 3H |
| 11 | 20,9 | ---- | ---- | ---- | ---- | 28 | 11,6 | | | | |
| | | 1,32 | m | ---- | 1H | | | | | | |
| 12 | 25,1 | 0,88 1,10 | m m | ---- | 1H 1H | 29 | 109,6 | 4,69 4,58 | d s br | 2,0 ---- | 1H 1H |
| 13 | 37,2 | 1,63 | m | ---- | 1H | 30 | 19,3 | 1,67 | s | ---- | 3H |
| 14 | 44,0 | ---- | ---- | ---- | ---- | C=O | 173,7 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 15 | 34,8 | 1,11 ---- | m ---- | ---- | 1H ---- | (CH ₂) _n | 29,6 | 1,24 | s br | ---- | 14H |
| 16 | 77,0 | 3,60 | dd | 4,6; 11,0 | 1H | CH ₂ CO | ---- | 2,27 | t | 7,5 | 2H |
| 17 | 48,6 | --- | --- | --- | --- | CH ₃ | 14,1 | ---- | ---- | ---- | ---- |

Acetilación de C1: El compuesto C1 (20 mg) se disolvió en piridina (2 mL) y anhídrido acético (4 mL), y la solución fue agitada durante 24 horas a temperatura

ambiente. El producto se secó a vacío para conseguir el compuesto **C1a** (11 mg) como un sólido amorfo.

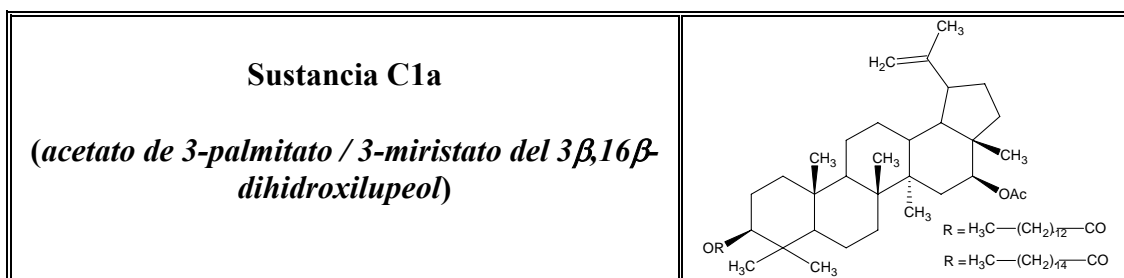


TABLA 36A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia C1a

| | |
|--|--|
| Estado: | Sólido amorfo |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 2930, 1718, 1460, 1381, 1256, 1186, 1015, 980, 889. |
| MS m/z (%): | 722 [M ₁] ⁺ (3), 721 (5), 694 [M ₂] ⁺ (1), 693 (3), 662 [M ₁ -CH ₃ COOH] ⁺ (14), 661 (27), 634 [M ₂ -CH ₃ COOH] ⁺ (6), 466 [M ₁ -Palmítico] ⁺ ó [M ₂ -Mirístico] ⁺ (5), 465 (11), 450 (6), 406 [466-CH ₃ COOH] ⁺ ó [662-Palmítico] ⁺ ó [634-Mirístico] ⁺ (31.5), 405 (18), 390 (15), 363 (10), 254 (15), 239 (21), 228 (12), 216 (50), 203 (65), 189 (100), 134 (77), 121 (50), 95 (46.5), 81 (32), 69 (37.5). |

TABLA 36B: R.M.N. ¹H de la Sustancia C1a (CDCl₃)

| Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|---------------|------------|-------|------------|---------------------------------|--------------|--------------|-------|-----------|
| 1 | 0,88 1,64 | m m | ----- | 1H 1H | 18 | 1,64 | m | ----- | 1H |
| 2 | 1,52 1,62 | m m | ----- | 1H 1H | 19 | 2,50 | m | ----- | 1H |
| 3 | 4,45 | dd | ----- | 1H | 20 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ---- | 21 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 5 | ----- | ----- | ----- | ---- | 22 | 2,03 | m | ----- | 1H |
| 6 | 1,42 1,52 | m m | ----- | 1H 1H | 23 | 1,39 1,44 | m m | ----- | 1H 1H |
| 7 | 1,39 | m | --- | 2H | 24 | 0,84 1,04 | s s | ----- | 12H 6H |
| 8 | ----- | ----- | ----- | ---- | 25 | | | | |
| 9 | ----- | ----- | ----- | ---- | 26 | | | | |
| 10 | ----- | ----- | ----- | ---- | 27 | | | | |
| 11 | ----- 1,32 | ----- m | ----- | ---- | 28 | | | | |
| 12 | 0,90 ----- | m ----- | ----- | 1H 1H | 29 | 4,69 4,59 | s br s br | ----- | 1H 1H |
| 13 | 1,62 | m | ----- | 1H | 30 | 1,68 | s | ----- | 3H |
| 14 | ----- | ----- | ----- | ---- | C=O | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 15 | 1,11 ----- | m ----- | ----- | 1H ---- | (CH ₂) _n | 1,25 | s br | ----- | 14H |
| 16 | 4,86 | dd | ----- | 1H | CH ₂ CO | 2,28 | t | 7,5 | 2H |
| 17 | ----- | ----- | ----- | ---- | OAc | 2,01 | s | ----- | 3H |

Fracción III:

Esta fracción se eluyó de la cromatografía general con n-hexano-acetato de etilo (8:2), y tras su concentración a vacío dio un residuo que pesó 9.68 g. El extracto obtenido fue sometido a continuación a cromatografía en columna empacada con gel de sílice (columna C-3), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (9:1), recogiendo un total de 125 fracciones de 100 mL que fueron reunidas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en siete grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 7.

El agrupamiento 2 de la columna C-3 fue sometido a un proceso de recristalización en n-hexano-acetato de etilo, lo que nos permitió purificar la sustancia **C2** (estigmasterol, 180 mg).

El agrupamiento 3 de la columna C-3, cuyo residuo concentrado a vacío pesó 3.0 g, fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna C-4) con n-hexano-acetato de etilo (9.5:0.5), recogiendo un total de 250 fracciones de 100 mL que fueron agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en ocho reuniones de fracciones nombradas de la A a la H.

La fracción C de la columna C-4 nos permitió obtener la sustancia **C3** (45 mg) por purificación con cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando n-hexano-acetato de etilo (9:1) como eluyente con tres eluciones. La reunión E de la columna C-4 nos permitió obtener la sustancia **C4** (48 mg) por purificación con cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando n-hexano-acetato de etilo (9:1) como eluyente con tres eluciones. La fracción G de la columna C-4 nos permitió obtener la sustancia **C5** (35 mg) por purificación con cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando n-hexano-acetato de etilo (9:1) como eluyente con tres eluciones.

El agrupamiento 4 de la columna C-3, dio un residuo tras su concentración a vacío que pesó 0.565 g, y fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna C-5) con n-hexano-acetato de etilo (8.5:1.5), recogiendo un total de 75 fracciones de 75 mL que fueron agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cinco reuniones de fracciones nombradas de la A a la E.

La fracción D de la columna C-5 nos permitió obtener la sustancia **C6** (24 mg) por purificación con cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando n-hexano-acetato de etilo (9:1) como eluyente con cuatro eluciones.

El agrupamiento 5 de la columna C-3, fue sometido a un proceso de recristalización en n-hexano-acetato de etilo, lo que nos permitió purificar la sustancia **C7** (7,4'-d-O-metildihidrokaempferol, 26 mg).

El agrupamiento 6 de la columna C-3, dio un residuo tras su concentración a vacío que pesó 0.234 g, y fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna C-6) con n-hexano-acetato de etilo (9:1), recogándose un total de 115 fracciones de 75 mL que fueron agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cuatro reuniones de fracciones denominadas de la A a la D.

La fracción C de la columna C-6 fue sometida a un proceso de recristalización en n-hexano-acetato de etilo, lo que nos permitió purificar la sustancia **C8** (calenduladiol, 41 mg).

Los datos físicos y espectroscópicos de todas esas sustancias, así como las reacciones de formación de derivados y los datos de éstos, los exponemos a continuación.

Sustancia C2: Sólido cristalino de punto de fusión 175-178°C (n-hexano-acetato etilo). Constantes espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **estigmasterol (W1, ver página 71)**.

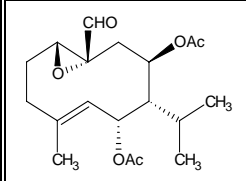
| | |
|---|---|
| <p>Sustancia C3</p> <p><i>Pulicanaral A</i></p> <p>((4E)-1β,10α-epoxi-6α,8β-diacetoxi-7βH-germacra-4-en-14-al)</p> |  |
|---|---|

TABLA 37A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia C3

| | |
|--|--|
| Estado: | Sólido cristalino (agujas incoloras). |
| Punto de fusión: | 183-184°C (Hex/AcOEt). |
| $[\alpha]_D^{25}$ | 11,1° (c. 0,108, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): | 209 (3.1), 272 (1.9). |
| IR (KBr) ν máx (cm⁻¹): | 2928, 1732, 1716, 1375, 1243, 1025, 935. |
| HREIMS | $[M]^+$ a m/z 352.1905 (calculado para C ₁₉ H ₂₈ O ₆ 352.1886). |
| MS m/z (%): | 352 $[M]^+$ (0.5), 337 (0.6), 292 (6), 249 (10), 232 (68), 203 (21), 189 (66), 175 (31), 171 (20), 166 (28), 161 (45), 153 (47), 145 (33), 143 (100), 135 (22), 129 (58), 109 (46), 107 (28), 105 (28), 95 (42), 84 (56), 81 (61), 69 (36), 55 (50). |

TABLA 37B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C3 (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|--------------|--------|----------|----------|-----|--------------------------------|--------------|--------|-------------|----------|
| 1 | 63,9 | 3,34 | d | 11,6 | 1H | 9 | 34,6 | 1,43 2,79 | d t | 4,8 12,8 | 1H 1H |
| 2 | 23,7 | 1,75 2,38 | m m | --- | 1H 1H | 10 | 61,1 | --- | --- | --- | --- |
| 3 | 35,9 | 2,33 2,44 | m m | --- | 1H 1H | 11 | 26,3 | 1,96 | m | --- | 1H |
| 4 | 133,6 | --- | --- | --- | --- | 12 | 22,0 | 1,32 | d | 6,6 | 3H |
| 5 | 129,7 | 5,43 | d | 7,2 | 1H | 13 | 21,1 | 0,97 | d | 6,6 | 3H |
| 6 | 71,2 | 5,54 | d | 6,1 | 1H | 14 | 199,7 | 9,28 | s | --- | 1H |
| 7 | 51,4 | 1,58 | d br | 9,3 | 1H | 15 | 16,4 | 1,45 | s | --- | 3H |
| 8 | 68,8 | 5,40 | dd | 4,2;12,6 | 1H | OAc | 20,9 21,1 169,8 170,4 | 2,00 2,08 | s s | --- | 3H 3H |

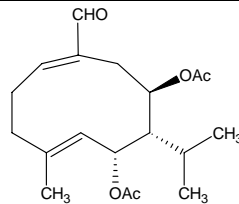
| | |
|--|---|
| <p>Sustancia C4</p> <p><i>Pulicanadieno B</i></p> <p><i>((1E,4E)-6α,8β-diacetoxi-7βH-germacra-1(10),4-dien-14-ol)</i></p> |  |
|--|---|

TABLA 38A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia C4

| | |
|--|---|
| Estado: | Aceite incoloro. |
| $[\alpha]_D^{25}$ | 35,7° (c. 0,042, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): | 209 (3.2), 222 (2.7), 251 (2.1). |
| IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): | 2932, 1732, 1687, 1433, 1372, 1243, 1141, 1023, 960. |
| HRFABMS | [M+Na] ⁺ a m/z 359.1874 (calculado para C ₁₉ H ₂₈ O ₅ Na 359.1834). |
| MS m/z (%): | 277 (35), 235 (10), 217 (74), 216 (72), 199 (79), 187 (82), 173 (93), 150 (62), 145 (94), 131 (41), 123 (83), 109 (38), 107 (100), 95 (39), 93 (33), 91 (33), 84 (45), 55 (49). |

TABLA 38B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C4 (Benceno-d₆ a 50°C)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|--------------|--------|----------|----------|-----|--------------------------------|--------------|---------|-------|----------|
| 1 | 150,4 | 5,86 | t | 8,4 | 1H | 9 | 30,2 | 2,34 2,61 | m dd | --- | 1H 1H |
| 2 | 27,1 | 1,70 1,80 | m m | --- | 1H 1H | 10 | 143,6 | --- | --- | --- | --- |
| 3 | 36,8 | 1,70 | m | --- | 2H | 11 | 26,7 | 1,80 | m | --- | 1H |
| 4 | 136,6 | --- | --- | --- | --- | 12 | 22,6 | 1,28 | d | 6,3 | 3H |
| 5 | 124,3 | 5,11 | d | 8,6 | 1H | 13 | 21,6 | 1,09 | d | 6,3 | 3H |
| 6 | 70,0 | 6,02 | dd | 1,8; 8,8 | 1H | 14 | 193,6 | 9,26 | s | --- | 1H |
| 7 | 52,6 | 1,80 | m | --- | 1H | 15 | 20,6 | 1,98 | s | --- | 3H |
| 8 | 70,1 | 6,09 | s br | --- | 1H | OAc | 17,9 20,5 169,0 169,0 | 1,77 1,72 | s s | --- | 3H 3H |

Reducción del Compuesto C4: El compuesto C4 (5 mg) en metanol (5 mL) fue tratado con exceso de NaBH₄ a temperatura ambiente durante 30 min. La reacción se concluyó por adición de agua, y se extrajo con CH₃Cl. El extracto de CH₃Cl concentrado y seco, fue separado mediante C.C.F. preparativa (Benceno-Acetato de Etilo, 8:2) y produjo el compuesto C9 (1,2 mg).

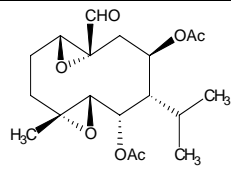
| | |
|--|---|
| Sustancia C5 <i>Pulicanaral B</i> <i>(1β,10α;4α,5β-diepoxi-6α,8β-diacetoxi-7βH-germacra-14-al)</i> |  |
|--|---|

TABLA 39A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia C5

| | |
|--|--|
| Estado: | Sólido cristalino (agujas incoloras). |
| Punto de fusión: | 205-210°C (Hex/AcOEt). |
| [α]²⁵_D | -60,0° (c. 0,005, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) λ_{máx} nm (log ε): | 208 (2.3). |
| IR (KBr) ν máx (cm⁻¹): | 2932, 1737, 1715, 1432, 1373, 1244, 1130, 1090, 1033, 894, 767. |
| HRFABMS | [M+Na] ⁺ a m/z 391.1738 (calculado para C ₁₉ H ₂₈ O ₇ Na 391.1733). |
| MS m/z (%): | 309 (3), 308 (1), 297 (4), 279 (3), 266 (6), 255 (27), 248 (4), 237 (12), 223 (15), 220 (18), 219 (28), 209 (10), 207 (13), 205 (27), 195 (34), 191 (14), 187 (11), 177 (44), 166 (27), 163 (28), 159 (14), 151 (24), 149 (47), 141 (30), 139 (66), 127 (50), 123 (44), 109 (59), 99 (76), 97 (100), 95 (74), 85 (58), 83 (100), 81 (83), 71 (53), 69 (60), 55 (90). |

TABLA 39B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C5 (CDCl₃)

| Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------|--------------|----------|------------|----------|-----|--------------------------------|--------------|--------|-------------|----------|
| 1 | 62,3 | 3,50 | d | 11,2 | 1H | 9 | 33,3 | 1,55 2,84 | m t | --- 12,6 | 1H 1H |
| 2 | 23,1 | 1,70 2,38 | m m | --- --- | 1H 1H | 10 | 61,8 | --- | --- | --- | --- |
| 3 | 35,7 | 1,29 2,22 | m ddd | --- | 1H 1H | 11 | 26,3 | 1,95 | m | --- | 1H |
| 4 | 58,0 | --- | --- | --- | --- | 12 | 21,9 | 1,29 | d | 6,7 | 3H |
| 5 | 66,2 | 3,04 | d | 6,7 | 1H | 13 | 21,0 | 0,96 | d | 6,7 | 3H |
| 6 | 72,5 | 4,87 | dd | 1,0;6,7 | 1H | 14 | 199,8 | 9,38 | s | --- | 1H |
| 7 | 47,9 | 1,52 | m | --- | 1H | 15 | 16,7 | 1,10 | s | --- | 3H |
| 8 | 69,2 | 5,44 | dd | 4,6;12,1 | 1H | OAc | 20,8 20,9 169,7 169,8 | 2,06 2,06 | s s | --- --- | 3H 3H |

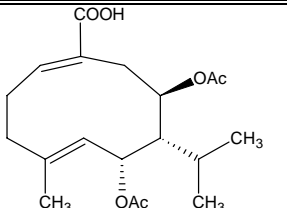
| | |
|---|--|
| Sustancia C6 <i>Pulicanadieno A</i> <i>(Ácido (1E,4E)-6α,8β-diacetoxi-7βH-germacra-1(10),4-dien-14-óico)</i> |  |
|---|--|

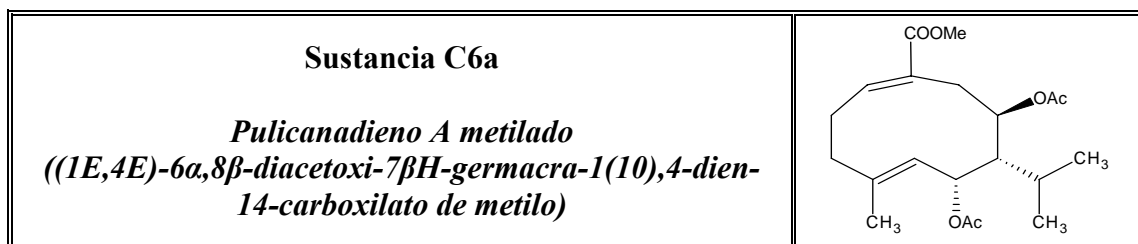
TABLA 40A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia C6

| | |
|--|---|
| Estado | Gelatinoso incoloro. |
| $[\alpha]_D^{25}$ | 21,4° (c. 0,014, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): | 206 (3.2); 250 (2.3); 273 (1.8). |
| IR (KBr) ν máx (cm⁻¹): | 3067, 2937, 1731, 1693, 1554, 1430, 1372, 1245, 1023, 960. |
| HREIMS | $[M]^+$ a m/z 352.1877 (calculado para C ₁₉ H ₂₈ O ₆ 352.1886). |
| MS m/z (%): | 352 $[M]^+$ (1), 316 (1), 292 (1), 281 (0.5), 274 (1), 250 (12), 233 (15), 232 (66), 217 (24), 203 (12), 189 (100), 187 (41), 176 (16), 171 (17), 161 (19), 145 (89), 143 (44), 131 (40), 123 (56), 105 (34), 91 (49), 81 (42), 69 (30), 55 (30). |

TABLA 40B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C6 (Benceno-d₆ a 50°C)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|------------|------|-------|-----|-----|--------------------------------|--------------|--------|-------------|----------|
| 1 | 141,6 | 6,78 | t | 8,0 | 1H | 9 | 31,6 | 2,35 2,66 | m d | --- 11,2 | 1H 1H |
| 2 | 26,7 | 2,10 | m | --- | 1H | 10 | 132,2 | --- | --- | --- | --- |
| 3 | 36,5 | 1,80 | m | --- | 1H | 11 | 26,7 | 2,10 | m | --- | 1H |
| 4 | 137,3 | --- | --- | --- | --- | 12 | 22,4 | 1,06 | d | 5,6 | 3H |
| 5 | 123,7 | 5,18 | d | 8,9 | 1H | 13 | 21,8 | 0,97 | d | 4,5 | 3H |
| 6 | 70,0 | 5,77 | d | 9,1 | 1H | 14 | 173,0 | --- | --- | --- | --- |
| 7 | 52,2 | 1,80 | m | --- | 1H | 15 | 20,6 | 1,84 | s | --- | 3H |
| 8 | 70,1 | 5,63 | s br | --- | 1H | OAc | 18,0 20,6 169,1 169,1 | 2,00 2,05 | s s | --- | 3H 3H |

Metilación del Compuesto C6: Al compuesto C6 (4 mg) en dietil éter (5 mL) se le añadió un exceso de diazometano en dietil éter, recién preparado, y la mezcla se guardó a temperatura ambiente durante 12 h. La concentración de la mezcla de reacción a vacío produjo el compuesto C6a (4 mg), como agujas incoloras.

**TABLA 41A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia C6a**

| | |
|--|--|
| Estado: | Sólido cristalino (agujas incoloras). |
| Punto de fusión: | 162-163°C (n-Hex/EtOAc). |
| $[\alpha]_D^{25}$ | 3,2° (c. 0,062, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): | 212 (2.0); 251 (2.1). |
| IR (KBr) ν máx (cm⁻¹): | 2930; 2360; 2341; 1732; 1435; 1371; 1246; 1215; 1021; 963. |
| HREIMS | [M] ⁺ a m/z 366.2019 (calculado para C ₂₀ H ₃₀ O ₆ 366.1733). |
| MS m/z (%): | 366 [M] ⁺ (2), 307 (2), 306 (2), 274 (4), 264 (12), 247 (13), 246 (58), 231 (23), 214 (16), 203 (100), 187 (78), 171 (30), 145 (37), 143 (59), 131 (37), 123 (59), 105 (28), 91 (34), 81 (38), 79 (25), 69 (20), 55 (22). |

TABLA 41B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C6a (Benceno-d₆ a 50°C)

| Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|--------------|--------|-------|----------|-----|--------------------------------|--------------|---------|-------|----------|
| 1 | 138,6 | 6,60 | t | 8,0 | 1H | 9 | 32,0 | 2,32 2,66 | m dd | --- | 1H 1H |
| 2 | 29,6 | 2,12 | m | --- | 1H 1H | 10 | 132,8 | --- | --- | --- | --- |
| 3 | 37,0 | 1,80 2,12 | m m | --- | 1H 1H | 11 | 26,5 | 2,12 | m | --- | 1H |
| 4 | 137,4 | --- | --- | --- | --- | 12 | 22,2 | 1,02 | d | 5,3 | 3H |
| 5 | 123,3 | 5,17 | d | 9,1 | 1H | 13 | 21,7 | 0,97 | d | 5,3 | 3H |
| 6 | 69,9 | 5,77 | d | 9,2 | 1H | 14 | 168,7 | --- | --- | --- | --- |
| 7 | 53,0 | 1,80 | m | --- | 1H | 15 | 20,5 | 1,83 | s | --- | 3H |
| 8 | 70,6 | 5,60 | s br | --- | 1H | OMe | 50,8 | 3,73 | s | --- | 3H |
| | | | | | | OAc | 20,4 20,5 168,7 168,7 | 1,99 2,05 | s s | --- | 3H 3H |

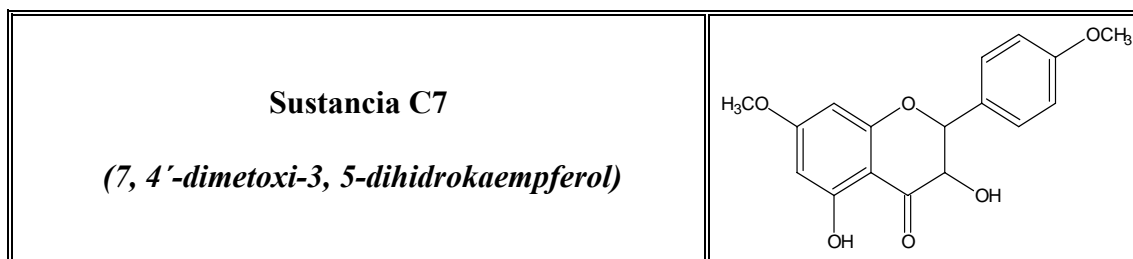
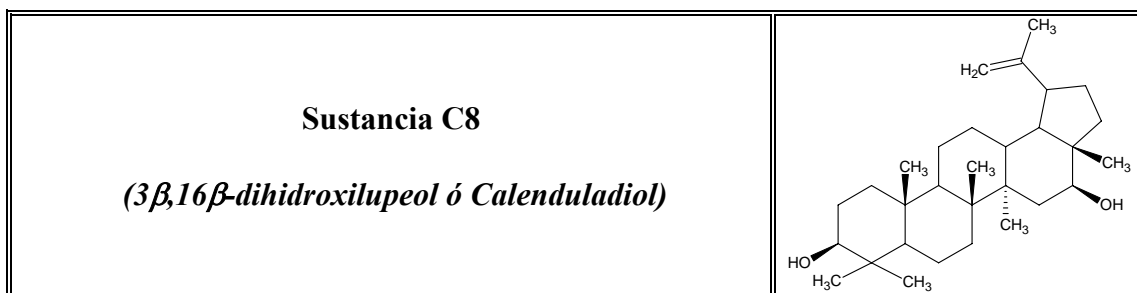


TABLA 42A: Datos Físicos, UV y EM de la Sustancia C7

| | | | |
|--|---|----------|-------------|
| Estado: | Sólido cristalino. | | |
| Punto de fusión: | 180-181°C (Hex/AcOEt). | | |
| UV: Disolvente; Banda, $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) | MeOH | B I, 329 | B II, 293 |
| | MeOH/NaOMe | B I, 359 | B II, 290 |
| | MeOH/AlCl ₃ | B I, 375 | B II, 315.5 |
| | MeOH/AlCl ₃ /HCl | B I, 372 | B II, 311 |
| | MeOH/NaOAc | B I, 330 | B II, 292 |
| | MeOH/NaOAc/H ₃ BO ₃ | B I, 332 | B II, 292 |
| MS m/z (%): | 316 [M ⁺] (38), 287 (65), 179 (20), 167 (100), 148 (60), 135 (9), 121 (36), 77 (8). | | |

TABLA 42B: R.M.N. ¹H de la Sustancia C7 (CDCl₃)

| N° | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ H | Mul | J, Hz | Int. |
|----|------------|-------|-------|-------|----------|------------|-------|-------|-------|
| 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | 1' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 2 | 5,04 | d | 11,9 | 1H | 2' | 7,48 | d | 8,7 | 2H |
| 3 | 4,57 | d | 11,9 | 1H | 3' | 6,99 | d | 8,7 | 2H |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ----- | 4' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 5 | ----- | ----- | ----- | ----- | 5' | 6,99 | d | 8,7 | 2H |
| 6 | 6,06 | d | 2,2 | 1H | 6' | 7,48 | d | 8,7 | 2H |
| 7 | ----- | ----- | ----- | ----- | OH (3) | 3,45 | s | ----- | 1H |
| 8 | 6,12 | d | 2,2 | 1H | OH (5) | 11,20 | s | ----- | 1H |
| 9 | ----- | ----- | ----- | ----- | OMe (4') | 3,84 | s | ----- | 3H |
| 10 | ----- | ----- | ----- | ----- | OMe (7) | 3,83 | s | ----- | 3H |

**TABLA 43A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia C8**

| | |
|--|--|
| Estado: | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | 218-219°C (Acetona). |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3374, 2941, 2870, 1643, 1454, 1382, 1018, 883, 756. |
| MS m/z (%): | 442 [M] ⁺ (4), 424 (7), 406 (64), 391 (33), 363 (100), 337 (14), 295 (8), 269 (8), 255 (13), 227 (15), 203 (53), 189 (46), 175 (21), 161 (31), 147 (36), 134 (50), 121 (44), 105 (37), 95 (38), 93 (42), 81 (35), 69 (28), 55 (30). |

TABLA 43B: R.M.N. ¹H de la Sustancia C8 (CDCl₃)

| Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|-------|-------|-----------|-------|----|-------|-------|-----------|-------|
| 1 | 0,90 | m | ----- | 1H | 16 | 3,60 | dd | 4,7; 11,1 | 1H |
| | 1,68 | m | ----- | 1H | | | | | |
| 2 | 1,54 | m | ----- | 1H | 17 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| | 1,61 | m | ----- | 1H | | | | | |
| 3 | 3,18 | dd | 5,6; 10,9 | 1H | 18 | 1,37 | m | ----- | 1H |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ----- | 19 | 2,49 | td | 5,7; 11,0 | 1H |
| 5 | 0,67 | d | 9,25 | 1H | 20 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 6 | 1,39 | m | ----- | 1H | 21 | 1,32 | m | ----- | 1H |
| | 1,56 | m | ----- | 1H | | | | | |
| 7 | 1,37 | m | ----- | 1H | 22 | 1,21 | m | ----- | 1H |
| | 1,40 | m | ----- | 1H | | | | | |
| 8 | ----- | ----- | ----- | ----- | 23 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 9 | 1,28 | m | ----- | 1H | 24 | 0,76 | s | ----- | 3H |
| 10 | ----- | ----- | ----- | ----- | 25 | 0,79 | s | ----- | 3H |
| 11 | 1,25 | m | ----- | 1H | 26 | 0,83 | s | ----- | 3H |
| | 1,42 | m | ----- | 1H | | | | | |
| 12 | 1,08 | m | ----- | 1H | 27 | 0,97 | s | ----- | 3H |
| | 1,68 | m | ----- | 1H | | | | | |
| 13 | 1,65 | m | ----- | 1H | 28 | 0,99 | s | ----- | 3H |
| 14 | ----- | ----- | ----- | ----- | 29 | 4,59 | s | ----- | 1H |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | | | | | |
| 15 | 1,01 | m | ----- | 1H | 30 | 1,68 | s | ----- | 3H |
| | 1,70 | m | ----- | 1H | | | | | |

Fracción IV:

Esta fracción se eluyó de la cromatografía general con n-hexano-acetato de etilo (7:3), y tras su concentración a vacío dio un residuo que pesó 7.57 g. El extracto obtenido se sometió a continuación a cromatografía en columna empacada con gel de sílice (columna C-7), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (9:1), recogiendo un total de 200 fracciones de 100 mL que fueron reunidas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en seis grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 6.

El agrupamiento 2 de la columna C-7, cuyo residuo concentrado a vacío pesó 1.0 g, fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna C-8) con n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogiendo un total de 50 fracciones de 100 mL que fueron agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en tres reuniones de fracciones nombradas de la A a la C.

La fracción B de la columna C-8 nos permitió obtener las sustancias **C9** (9 mg) y **C10** (peróxido de ergosterol, 178 mg) por purificación con cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando benceno-acetato de etilo (8.5:1.5) como eluyente con cuatro eluciones.

El agrupamiento 3 de la columna C-7 fue sometido en primer lugar a un proceso de recristalización en n-hexano-acetato de etilo, lo que nos permitió purificar la sustancia **C11** (5,7-dihidroxi-3,3',4'-trimetoxiflavona, 39 mg). Las aguas madres de este agrupamiento 3, cuyo residuo concentrado a vacío pesó 0.472 g, fueron tratadas mediante cromatografía en columna de media presión (columna C-9) con n-hexano-acetato de etilo (8.5:1.5), recogiendo un total de 70 fracciones de 100 mL que fueron agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en tres reuniones de fracciones nombradas de la A a la C.

La fracción C de la columna C-9 fue concentrada a vacío, dando un residuo que pesó 0.110 g, y que posteriormente fue sometido a un proceso de acetilación, mediante su disolución en piridina (3 mL) y la adición de anhídrido acético (6 mL). La solución resultante fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente, siendo recuperado de la manera habitual. El extracto acetilado de la mencionada fracción C se sometió a continuación a un proceso de cromatografía en columna de media presión (columna C-

10), con n-hexano-acetato de etilo (9:1) como eluyente, lo que nos permitió separar la sustancia **C12a** (30 mg).

El agrupamiento 4 de la columna C-7, cuyo residuo concentrado a vacío pesó 1.7 g, fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna C-11) con n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogándose un total de 160 fracciones de 100 mL que fueron agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cinco reuniones de fracciones nombradas de la A a la E.

La fracción C de la columna C-11 tras ser concentrada a vacío dio un residuo que pesó 0.130 g, y se trató mediante cromatografía en columna de media presión (columna C-12) con benceno-acetato de etilo (9:1), recogándose en total 70 fracciones de 50 mL que, tras su análisis en cromatografía en capa fina, fueron agrupadas en cuatro reuniones de fracciones que fueron nombradas de la *a* a la *d*. La fracción *d* de la columna C-12 fue sometida a un proceso de purificación con cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando benceno-acetato de etilo (8:2) como eluyente con tres eluciones, lo que nos permitió obtener la sustancia **C13** (12 mg).

Los datos físicos y espectroscópicos de todas esas sustancias, así como las reacciones de formación de derivados y los datos de éstos, los exponemos a continuación.

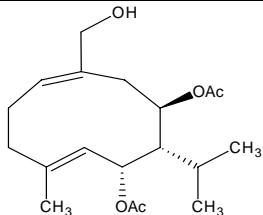
| | |
|--|--|
| <p>Sustancia C9</p> <p><i>Pulicanadieno C</i></p> <p>((1E,4E)-6α,8β-diacetoxi-7βH-germacra-1(10),4-dien-14-ol)</p> |  |
|--|--|

TABLA 44A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia C9

| | |
|--|---|
| Estado | Aceite incoloro. |
| $[\alpha]_D^{25}$ | -75,0° (c. 0,008, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): | 205 (3.2), 271 (1.9). |
| IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): | 3414, 3020, 2928, 2854, 1728, 1502, 1411, 1381, 1332, 1219, 1159, 1107, 1028, 766. |
| HREIMS | $[M]^+$ a m/z 338.2019 (calculado para C ₁₉ H ₃₀ O ₅ 338.2093). |
| MS m/z (%): | 338 $[M]^+$ (1), 290 (10), 279 (10), 241 (13), 218 (48), 203 (25), 200 (78), 193 (11), 187 (100), 178 (59), 175 (99), 161 (44), 157 (71), 149 (45), 143 (46), 135 (38), 131 (35), 122 (28), 109 (23), 105 (30), 97 (33), 95 (26), 91 (25), 83 (36), 81 (30), 69 (33), 57 (45), 55 (95). |

TABLA 44B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C9 (Benceno-d₆ a 50°C)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|--------------|--------|----------------|----------|-----|--------------------------------|--------------|--------|----------------|----------|
| 1 | 126,7 | 5,34 | t | 8,5 | 1H | 9 | 30,0 | 2,50 2,68 | m m | ----- ----- | 1H 1H |
| 2 | 26,0 | 1,70 2,01 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 10 | 135,0 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3 | 31,0 | 1,40 | m | --- | 2H | 11 | 27,0 | 2,12 | t | 6,3 | 1H |
| 4 | 136,1 | ----- | ----- | ----- | ----- | 12 | 19,9 | 1,13 | d | 6,8 | 3H |
| 5 | 127,0 | 5,11 | m | ----- | 1H | 13 | 21,4 | 0,97 | d | 6,9 | 3H |
| 6 | 71,0 | 6,13 | d br | 5,9 | 1H | 14 | 69,7 | 4,12 | d br | 17,8 | 2H |
| 7 | 50,0 | 1,92 | dd br | 3,3; 13,4 | 1H | 15 | 20,0 | 1,52 | s | --- | 3H |
| 8 | 71,1 | 5,76 | t | 9,2 | 1H | OAc | 21,5 21,5 170,2 170,2 | 1,78 1,85 | s s | --- --- | 3H 3H |

Sustancia C10: Aceite incoloro. Constantes espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **peróxido de ergosterol (T10)**, ver página 133).

Acetilación del Compuesto C10: El compuesto C10 (30 mg) se disolvió en piridina (2 mL) y anhídrido acético (4 mL), y la solución fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente. El producto se secó a vacío para conseguir el compuesto C10a (21 mg) como una sustancia aceitosa incolora.

Sustancia C10a: Aceite incoloro. Constantes espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia acetato de peróxido de ergosterol (T10a, ver página 134).

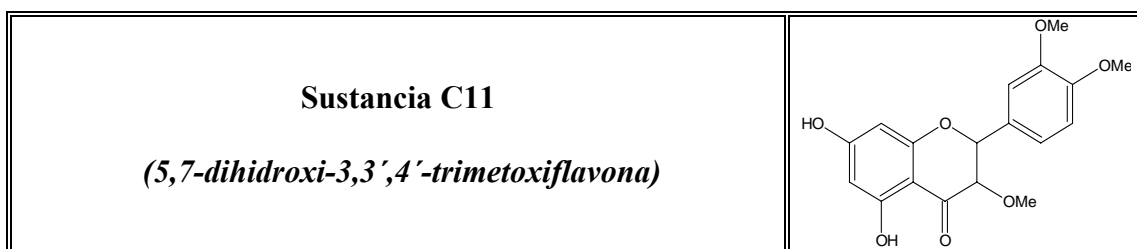
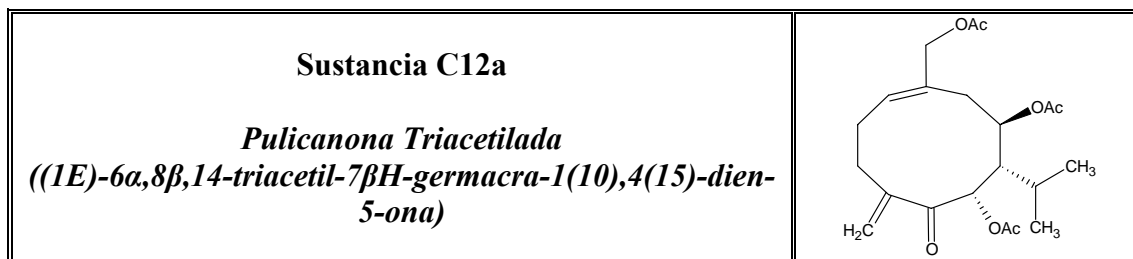


TABLA 45A: Datos Físicos, UV y EM de la Sustancia C11

| | | | |
|--|---|---------------|-----------------------|
| Estado: | Sólido cristalino. | | |
| Punto de fusión: | 171-172°C (Hex/AcOEt). | | |
| UV: Disolvente; Banda, $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) | MeOH | B I, 353.5 | B II, 256, 206.5 |
| | MeOH/NaOMe | B I, 381 | B II, 268.5, 211 |
| | MeOH/AlCl ₃ | B I, 398, 363 | B II, 298, 268, 209.5 |
| | MeOH/AlCl ₃ /HCl | B I, 395, 361 | B II, 297, 268, 207 |
| | MeOH/NaOAc | B I, 353.5 | B II, 257, 218.5 |
| | MeOH/NaOAc/H ₃ BO ₃ | B I, 354 | B II, 256, 218.5 |
| MS m/z (%): | 344, ([M] ⁺ , 100), 343 (80), 326 (10), 301 (34), 283 (5), 271 (4), 217 (5), 167 (9), 158 (11), 151 (6), 135 (4), 122 (2), 108 (1), 91 (16), 69 (3). | | |

TABLA 45B: R.M.N. ¹H de la Sustancia C11 (CDCl₃)

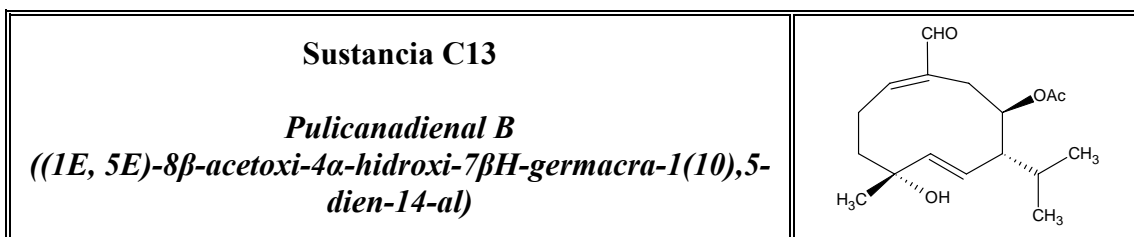
| N° | δ H | Mult | J, Hz | Int | N° | δ H | Mult | J, Hz | Int |
|----|------------|-------|-------|-------|----------|------------|-------|----------|-------|
| 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | 1' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 2 | ----- | ----- | ----- | ----- | 2' | 7,71 | d | 1,9 | 1H |
| 3 | ----- | ----- | ----- | ----- | 3' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ----- | 4' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 5 | ----- | ----- | ----- | ----- | 5' | 6,99 | d | 8,5 | 1H |
| 6 | 6,47 | d | 2,0 | 1H | 6' | 7,75 | dd | 1,9; 8,6 | 1H |
| 7 | ----- | ----- | ----- | ----- | OMe (3) | 4,01 | s | ----- | 3H |
| 8 | 6,37 | d | 2,1 | 1H | OMe (3') | 3,89 | s | ----- | 3H |
| 9 | ----- | ----- | ----- | ----- | OMe (4') | 3,89 | s | ----- | 3H |
| 10 | ----- | ----- | ----- | ----- | OH | 5,74 | s | ----- | 1H |

**TABLA 46A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia C12a**

| | |
|--|---|
| Estado | Aceite incoloro. |
| $[\alpha]_D^{25}$ | 4,9° (c. 0,081, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): | 205 (3.2), 223 (2.7), 271 (3.1). |
| IR (film) $\nu_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): | 2960, 2926, 2851, 1741, 1694, 1463, 1438, 1373, 1233, 1123, 1053, 1025, 935, 852, 666. |
| HREIMS | [M] ⁺ a m/z 394.1982 (calculado para C ₂₁ H ₃₀ O ₇ 394.1991). |
| MS m/z (%): | 394 [M] ⁺ (0.5), 334 (12), 292 (17), 274 (78), 249 (24), 232 (62), 214 (85), 205 (94), 189 (95), 171 (42), 161 (47), 149 (68), 137 (41), 136 (44), 107 (74), 96 (65), 69 (61), 57 (100). |

TABLA 46B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C12a (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | In t | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|--------------|-----------|---------------|----------|-----|---|----------------------|-------------|-------------------------|----------------|
| 1 | 131,9 | 5,59 | dd | 5,7; 11,4 | 1H | 9 | 30,0 | 2,32 2,44 | dd td | 3,5; 8,9 4,3;12,6 | 1H 1H |
| 2 | 23,3 | 2,00 | m | ----- | 2H | 10 | 132,6 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 3 | 32,6 | 2,07 2,94 | m d br | ----- 12,7 | 1H 1H | 11 | 27,4 | 2,27 | m | ----- | 1H |
| 4 | 145,4 | ----- | ----- | ----- | --- | 12 | 21,6 | 1,12 | d | 6,9 | 3H |
| 5 | 198,7 | ----- | ----- | ----- | --- | 13 | 17,6 | 0,75 | d | 6,9 | 3H |
| 6 | 72,9 | 5,95 | s | ----- | 1H | 14 | 69,3 | 4,51 | s | ----- | 2H |
| 7 | 45,5 | 2,54 | dd | 3,4; 10,5 | 1H | 15 | 124,1 | 5,66 | s | ----- | 3H |
| 8 | 69,6 | 5,41 | dt | 3,5; 10,6 | 1H | OAc | 20,8 20,9 21,1 169,7 169,9 170,6 | 2,03 2,04 2,19 | s s s | ----- ----- ----- | 3H 3H 3H |

**TABLA 47A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia C13**

| | |
|---|---|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | |
| $[\alpha]_D^{25}$ | 49,1° (c. 0,059, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) $\lambda_{m\acute{a}x}$ nm (log ϵ): | 214 (3.0), 251 (2.1). |
| IR (KBr) ν máx (cm⁻¹): | 3459, 2922, 1732, 1684, 1630, 1375, 1256, 1026, 880, 803. |
| HRFABMS | [M+Na] ⁺ a m/z 317.1718 (calculado para C ₁₇ H ₂₆ O ₄ Na 317.1729). |
| MS m/z (%): | 317 [M] ⁺ (2), 165 (1), 154 (8), 136 (13), 109 (12), 97 (17), 95 (31), 81 (35), 71 (31), 69 (66), 57 (81), 55 (100). |

TABLA 47B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C13 (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|--------------|--------|------------|----------|-----|---------------|--------------|----------|----------------------|----------|
| 1 | 161,6 | 6,41 | dd | 5,8; 10,5 | 1H | 9 | 31,9 | 2,51 2,79 | dd dd | 3,4;15,0 3,4;15,0 | 1H 1H |
| 2 | 25,2 | 2,04 2,53 | m m | ----- | 1H 1H | 10 | 157,6 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 3 | 39,9 | 1,74 1,98 | m m | ----- | 1H 1H | 11 | 27,5 | 2,16 | m | ----- | 1H |
| 4 | 73,6 | ----- | ----- | ----- | --- | 12 | 21,4 | 0,80 | d | 6,8 | 3H |
| 5 | 138,6 | 5,20 | d | 15,3 | 1H | 13 | 16,8 | 0,79 | d | 6,8 | 3H |
| 6 | 121,4 | 5,25 | dd | 10,0; 15,4 | 1H | 14 | 194,8 | 9,42 | s | ----- | 1H |
| 7 | 52,8 | 1,60 | m | ----- | 1H | 15 | 29,6 | 1,34 | s | ----- | 3H |
| 8 | 70,3 | 5,00 | m | ----- | 1H | OAc | 21,2 171,2 | 2,12 | s | ----- | 3H |

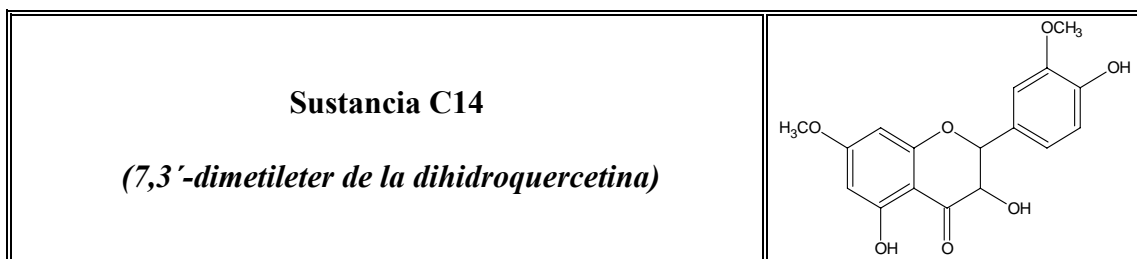
Fracción V:

Esta fracción se eluyó de la cromatografía general con n-hexano-acetato de etilo (6:4), y tras su concentración a vacío dio un residuo que pesó 2.67 g. El extracto obtenido fue sometido a continuación a cromatografía en columna empaquetada con gel de sílice (columna C-13), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (7:3), recogiendo un total de 75 fracciones de 100 mL que fueron reunidas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en tres grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 3.

El agrupamiento 2 de la columna C-13, cuyo residuo concentrado a vacío pesó 0.600 g, fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna C-14) con n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogiendo un total de 140 fracciones de 100 mL que fueron agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cuatro reuniones de fracciones nombradas de la A a la D. La fracción C de la columna C-14 nos permitió obtener la sustancia **C14** (7,3'-dimetiléter de la dihidroquercetina, 18 mg) por purificación mediante cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando hexano-acetato de etilo (5:5) como eluyente con dos eluciones.

El agrupamiento 3 de la columna C-13, tras ser concentrado a vacío dio un residuo que pesó 0.655 g, y fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna C-15) con n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogiendo un total de 120 fracciones de 100 mL que se agruparon, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cuatro reuniones de fracciones nombradas de la A a la D. La fracción C de la columna C-13 fue concentrada a vacío, dando un residuo que pesó 0.200 g, y se sometió a continuación a un proceso de cromatografía en columna de media presión (columna C-16), con n-hexano-acetato de etilo (8:2) como eluyente, recogiendo un total de 120 fracciones de 75 mL que fueron agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cuatro reuniones de fracciones nombradas de la *a* a la *d*. La fracción *b* de la columna C-16 fue sometida a un proceso de cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando benceno-acetonitrilo (8:2) con cuatro eluciones, lo que nos permitió purificar la sustancia **C15** (42 mg).

Los datos físicos y espectroscópicos de esas sustancias, así como las reacciones de formación de derivados y los datos de éstos, los exponemos a continuación.

**TABLA 48A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia C14**

| | | | |
|--|---|--------------|----------------|
| Estado: | Sólido cristalino. | | |
| Punto de fusión: | 149-152°C (Hex/AcOEt). | | |
| UV: Disolvente; Banda, $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) | MeOH | B I, 330 (i) | B II, 289 |
| | MeOH/NaOMe | B I, 360 | B II, 291, 213 |
| | MeOH/AlCl ₃ | B I, 364 | B II, 314, 226 |
| | MeOH/AlCl ₃ /HCl | B I, 364 | B II, 313, 226 |
| | MeOH/NaOAc | B I, 340 (i) | B II, 288, 217 |
| | MeOH/NaOAc/H ₃ BO ₃ | B I, 340 (i) | B II, 288, 219 |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3325, 2900, 2825, 1630, 1565, 1505, 1455, 1357, 1280, 1262, 1180, 1150, 1125, 1080, 1025, 830, 805, 655. | | |
| MS m/z (%): | 332 (23), 303 (47), 275 (7), 179 (34), 167 (100), 166 (66), 164 (37), 151 (54), 138 (28), 137 (25), 123 (20), 110 (18), 95 (78), 55 (20). | | |

TABLA 48B: R.M.N. ¹H de la Sustancia C14 (CDCl₃)

| N° | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|-------|-------|-------|----------|------------|-------|----------|-------|
| 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | 1' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 2 | 4,99 | d | 12,0 | 1H | 2' | 7,16 | d | 1,8 | 1H |
| 3 | 4,56 | d | 12,0 | 1H | 3' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ----- | 4' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 5 | ----- | ----- | ----- | ----- | 5' | 6,92 | d | 8,2 | 1H |
| 6 | 6,07 | d | 2,5 | 1H | 6' | 7,05 | dd | 1,8; 8,3 | 1H |
| 7 | ----- | ----- | ----- | ----- | OH (3) | 3,48 | s | ----- | 1H |
| 8 | 6,13 | d | 1,9 | 1H | OH (5) | 11,21 | s | ----- | 1H |
| 9 | ----- | ----- | ----- | ----- | OH (4') | 5,74 | s | ----- | 1H |
| 10 | ----- | ----- | ----- | ----- | OMe (7) | 3,83 | s | ----- | 3H |
| | | | | | OMe (3') | 3,93 | s | ----- | 3H |

| | |
|---|--|
| <p>Sustancia C15</p> <p><i>Pulicanadienal A</i></p> <p>((1E, 5E, 8R)-4α,8β-dihidroxi-7βH-germacra-1(10),5-dien-14-al)</p> | |
|---|--|

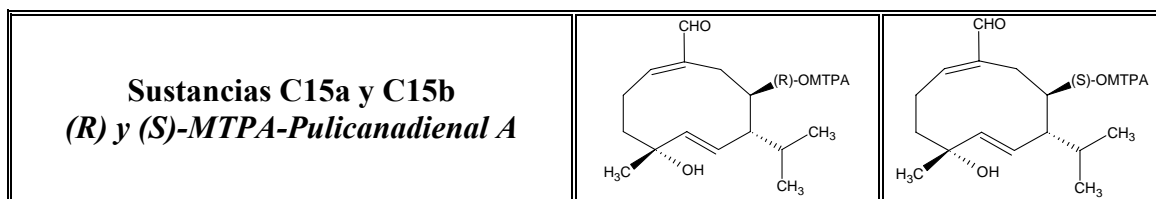
TABLA 49A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia C15

| | |
|--|---|
| Estado | Aceite incoloro. |
| $[\alpha]_D^{25}$ | 210° (c. 0,020, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): | 212 (2.9), 253 (2.2). |
| IR (film) ν máx (cm⁻¹): | 3406, 2957, 2926, 2870, 1728, 1660, 1623, 1440, 1370, 1272, 1142, 1060, 987, 669. |
| HRFABMS | [M+Na] ⁺ a m/z 275.1645 (calculado para C ₁₅ H ₂₄ O ₃ Na 275.1623). |
| MS m/z (%): | 234 (28), 219 (9), 216 (15), 205 (10), 201 (8), 194 (7), 191 (15), 187 (9), 176 (26), 173 (14), 169 (11), 161 (11), 151 (76), 145 (27), 133 (22), 131 (22), 123 (100), 122 (62), 119 (18), 117 (15), 107 (53), 105 (39), 95 (43), 93 (62), 91 (43), 81 (53), 69 (54), 67 (46), 55 (58). |

TABLA 49B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C15 (CDCl₃)

| Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|--------------|---------|-----------------|----------|----|------------|--------------|---------|------------------|----------|
| 1 | 163,7 | 6,58 | dd | 4,1;11,9 | 1H | 9 | 32,1 | 2,40 2,83 | d dd | 15,3 4,8;15,3 | 1H 1H |
| 2 | 25,0 | 2,11 2,64 | m q | ----- 12,0 | 1H 1H | 10 | 139,7 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 3 | 41,0 | 1,67 2,01 | dd m | 11; 14 ----- | 1H 1H | 11 | 26,6 | 2,17 | ddd | 2,7;6,8;6,8 | 1H |
| 4 | 73,6 | ----- | ----- | ----- | --- | 12 | 21,7 | 0,81 | d | 6,9 | 3H |
| 5 | 139,7 | 5,00 | d | 15,3 | 1H | 13 | 16,4 | 0,79 | d | 6,9 | 3H |
| 6 | 122,2 | 5,22 | dd | 10,7;15,3 | 1H | 14 | 199,5 | 9,39 | s | ----- | 1H |
| 7 | 55,7 | 1,56 | m | ----- | 1H | 15 | 29,8 | 1,32 | s | ----- | 3H |
| 8 | 66,7 | 3,76 | m | ----- | 1H | | | | | | |

Preparación de los Derivados Ésteres (R)- y (S)-MTPA del Compuesto C15: Dos porciones (1,5 mg) del compuesto **C15** fueron tratadas con cloruro de (R)-(+)- y (S)-(-)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacetil (8 μ L) en piridina anhídrido (0,5 mL) a temperatura ambiente durante toda la noche. Cuando la reacción se completó, el residuo fue concentrado y purificado en gel de sílice por C.C.F. preparativa, eluída con CHCl₃-Et₂O-MeOH (14:6:1), separando los derivados éster (S)- y (R)-MTPA (**C15a** y **C15b**) del compuesto **C15**, respectivamente.


TABLA 49C: R.M.N. ¹H de las Sustancias C15a y C15b (CDCl₃)

| 15a | | | | | 15b | | | | |
|-----|-------|-------|------------|-------|-----|-------|-------|------------|-------|
| N° | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ H | Mul | J, Hz | Int |
| 1 | 6,484 | t | 7,8 | 1H | 1 | 6,466 | t | 8,3 | 1H |
| 2 | ----- | ----- | ----- | ----- | 2 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3 | ----- | ----- | ----- | ----- | 3 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ----- | 4 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 5 | 5,322 | d | 15,4 | 1H | 5 | 5,352 | d | 15,1 | 1H |
| 6 | 5,120 | dd | 11,1; 15,4 | 1H | 6 | 5,151 | dd | 10,7; 15,1 | 1H |
| 7 | 2,170 | dd | 3,0; 8,9 | 1H | 7 | 2,251 | m | ----- | 1H |
| 8 | 5,360 | m | ----- | 1H | 8 | 5,320 | m | ----- | 1H |
| 9 | 2,610 | dd | 4,0; 14,3 | 1H | 9 | 2,518 | d br | 14,1 | 1H |
| | 2,684 | dd | 6,7; 14,3 | 1H | | 2,680 | dd | 7,7; 14,7 | 1H |
| 10 | ----- | ----- | ----- | ----- | 10 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 11 | 1,471 | td | 2,8; 6,9 | 1H | 11 | 1,765 | m | ----- | 1H |
| 12 | 0,632 | d | 6,8 | 3H | 12 | 0,784 | d | 6,7 | 3H |
| 13 | 0,730 | d | 6,9 | 3H | 13 | 0,815 | d | 7,0 | 3H |
| 14 | 9,420 | s | ----- | 1H | 14 | 9,347 | s | ----- | 1H |
| 15 | 1,310 | s | ----- | 3H | 15 | 1,321 | s | ----- | 3H |

Acetilación del Compuesto C15: El compuesto **C15** (5 mg) fue disuelto en piridina (1 mL) y anhídrido acético (2 mL), y la solución resultante fue agitada durante 18 horas a temperatura ambiente. El producto se secó a vacío para conseguir el compuesto **C13** (4 mg).

Fracción VI:

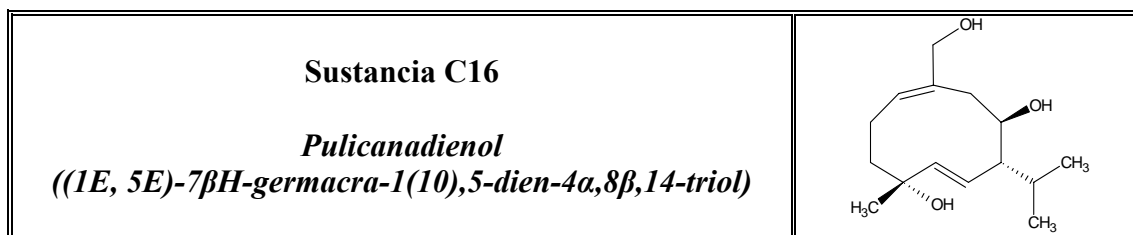
Esta fracción se eluyó de la cromatografía general con n-hexano-acetato de etilo (5:5), y tras su concentración a vacío dio un residuo que pesó 3.06 g. El extracto obtenido fue sometido a continuación a cromatografía en columna empaquetada con gel de sílice (columna C-17), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (7.5:2.5), recogiendo un total de 170 fracciones de 100 mL que fueron reunidas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en tres grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 3.

El agrupamiento 2 de la columna C-17, cuyo residuo concentrado a vacío pesó 0.373 g, fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna C-18) con n-hexano-acetato de etilo (7.5:2.5), recogiendo un total de 70 fracciones de 75 mL que, tras su análisis en cromatografía en capa fina, fueron agrupadas en tres reuniones de fracciones nombradas de la A a la C. La fracción B de la columna C-18 produjo un residuo que pesó 0.100 g tras su concentración a vacío, y fue tratada mediante cromatografía en columna de media presión (columna C-19) utilizando n-hexano-acetato de etilo (7:3) como eluyente, recogiendo un total de 60 fracciones de 50 mL, agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en tres reuniones de fracciones nombradas de la a a la c. La fracción c de la columna C-19 nos permitió obtener las sustancias **C16** (9 mg) y **C17** (8 mg) por purificación mediante cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando n-hexano-acetato de etilo (5:5) como eluyente con dos eluciones.

El agrupamiento 3 de la columna C-17, tras ser concentrado a vacío dio un residuo que pesó 0.433 g, y fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna C-20) con n-hexano-acetato de etilo (7.5:2.5), recogiendo un total de 145 fracciones de 100 mL que fueron agrupadas, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cuatro reuniones de fracciones nombradas de la A a la D. La fracción A de la columna C-20 nos permitió obtener la sustancia **C18** (25 mg) por purificación con cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando n-hexano-acetato de etilo (5:5) como eluyente con dos eluciones. La reunión C de la columna C-20 nos permitió obtener las sustancias **C19** (40 mg) y **C20** (6 α ,15 α -epoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmano, 45 mg) por purificación mediante cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando

n-hexano-acetato de etilo (5:5) como eluyente con dos eluciones. La fracción D de la columna C-20 nos permitió obtener la sustancia **C21** (68 mg), purificada mediante cromatografía preparativa en capa gruesa utilizando n-hexano-acetato de etilo (5:5) como eluyente con dos eluciones.

Los datos físicos y espectroscópicos de esas sustancias, así como las reacciones de formación de derivados y los datos de éstos, los exponemos a continuación.

**TABLA 50A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia C16**

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido amorfo. |
| $[\alpha]_D^{25}$ | 10,2° (c. 0,049, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): | 212 (3,0) |
| IR (KBr) ν máx (cm⁻¹): | 3335, 2957, 2926, 2871, 1661, 1625, 1449, 1384, 1368, 1244, 1174, 1037, 984, 891. |
| HREIMS: | [M-H ₂ O] ⁺ a m/z 236.2155 (calculado para C ₁₅ H ₂₄ O ₂ 236.1776). |
| MS m/z (%): | 236 (5), 218 (26), 203 (11), 202 (5), 201 (10), 189 (12), 187 (12), 185 (9), 175 (56), 160 (17), 159 (25), 157 (30), 145 (44), 133 (42), 131 (41), 123 (39), 107 (58), 105 (69), 95 (55), 93 (64), 91 (72), 81 (79), 69 (79), 57 (84), 55 (100). |

TABLA 50B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C16 (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|--------------|---------|--------------------|----------|----|------------|--------------|-----------|---------------|----------|
| 1 | 134,0 | 5,36 | dd | 2,5; 9,0 | 1H | 9 | 35,6 | 2,10 2,88 | m d br | ----- 14,9 | 1H 1H |
| 2 | 23,1 | 1,80 2,26 | m d | ----- 10,2 | 1H 1H | 10 | 150,0 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3 | 41,2 | 1,50 1,78 | dd m | 10,8;12,8 ----- | 1H 1H | 11 | 27,3 | 2,01 | m | ----- | 1H |
| 4 | 74,1 | ----- | ----- | ----- | ---- | 12 | 21,8 | 0,87 | d | 6,4 | 3H |
| 5 | 140,7 | 5,17 | d | 15,3 | 1H | 13 | 16,7 | 0,85 | d | 6,4 | 3H |
| 6 | 120,0 | 5,22 | dd | 9,4; 15,3 | 1H | 14 | 69,8 | 4,03 4,10 | d d | 12,0 12,0 | 1H 1H |
| 7 | 55,7 | 1,98 | m | ----- | 1H | 15 | 30,0 | 1,29 | s | ----- | 3H |
| 8 | 68,6 | 3,85 | dd | 3,3; 6,2 | 1H | | | | | | |

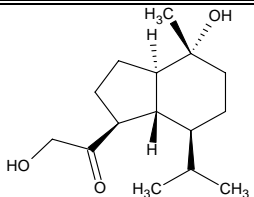
| | |
|--|---|
| <p>Sustancia C17</p> <p><i>Pulioplopanona B</i> (10α,15-dihidroxi-oplopan-4-ona)</p> |  |
|--|---|

TABLA 51A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia C17

| | |
|---|--|
| Estado | Aceite incoloro. |
| $[\alpha]_D^{25}$ | 33,3° (c. 0,012, CHCl ₃). |
| IR (film) v máx (cm⁻¹): | 3401, 2930, 2871, 2360, 2342, 1718, 1459, 1369, 1263, 1126, 1053. |
| HREIMS: | [M] ⁺ a m/z 254.1901 (calculado para C ₁₅ H ₂₆ O ₃ 254.1882). |
| MS m/z (%): | 254 [M] ⁺ (2), 236 (5), 224 (15), 223 (96), 205 (35), 187 (43), 177 (100), 169 (20), 147 (9), 135 (13), 121 (33), 107 (19), 95 (34), 81 (29), 69 (25), 55 (15). |

TABLA 51B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C17 (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|-----------------------------------|--------|----------------|----------|----|------------|--------------|-----------|---------------|----------|
| 1 | 57,0 | α , 1,50 | m | ----- | 1H | 9 | 42,0 | 1,41 1,80 | m d br | ----- 15,6 | 1H 1H |
| 2 | 25,4 | α , 1,50 β , 1,86 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 10 | 73,0 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 3 | 29,5 | β , 1,60 α , 1,96 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 11 | 30,0 | 1,29 | m | ----- | 1H |
| 4 | 212,4 | ----- | ----- | ----- | ---- | 12 | 21,9 | 0,89 | d | 6,7 | 3H |
| 5 | 50,8 | α , 2,59 | ddd | 5,0;6,3;10,6 | 1H | 13 | 15,3 | 0,66 | d | 6,7 | 3H |
| 6 | 47,0 | β , 1,92 | m | ----- | 1H | 14 | 20,4 | 1,21 | s | ----- | 3H |
| 7 | 49,2 | β , 1,10 | m | ----- | 1H | 15 | 68,0 | 4,30 | t | 4,3 | 2H |
| 8 | 22,8 | 1,10 1,60 | m m | ----- ----- | 1H 1H | | | | | | |

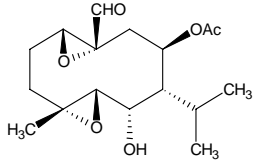
| | |
|--|---|
| Sustancia C18 <i>Pulicanaral C</i> <i>(1β,10α;4α,5β-diepoxi-8β-acetoxi-6α-hidroxi-7βH-germacra-14-al)</i> |  |
|--|---|

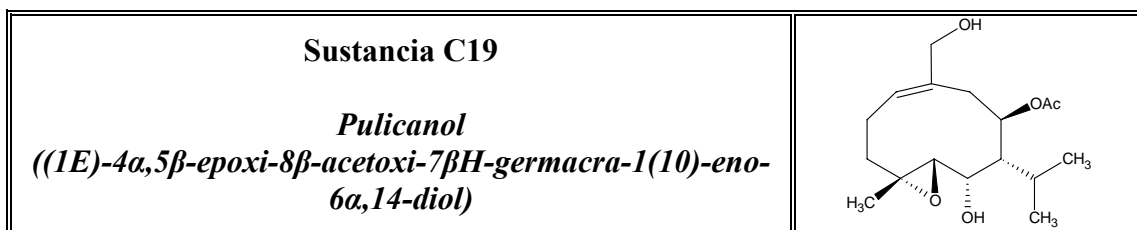
TABLA 52A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia C18

| | |
|---|---|
| Estado | Aceite incoloro. |
| IR (film) v máx (cm⁻¹): | 3462, 2964, 2925, 2856, 1719, 1597, 1455, 1382, 1255, 1074. |
| MS m/z (%): | 326 [M] ⁺ (0.2), 279 (15), 251 (6), 237 (6), 223 (8), 219 (10), 205 (7), 195 (5), 191 (13), 177 (13), 167 (27), 163 (19), 149 (90), 139 (28), 137 (31), 123 (42), 111 (41), 109 (68), 97 (100), 95 (79), 83 (72), 81 (66), 69 (61), 55 (77). |

TABLA 52B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C18 (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------|--------------|----------|-----------------------|----------|-----|---------------|--------------|--------|---------------|----------|
| 1 | 62,5 | 3,45 | d | 11,5 | 1H | 9 | 34,5 | 1,54 3,01 | m t | ----- 12,6 | 1H 1H |
| 2 | 23,0 | 1,75 2,40 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 10 | 61,5 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3 | 35,8 | 1,30 2,20 | m ddd | ----- 3,5;7,0;13,5 | 1H 1H | 11 | 26,3 | 1,90 | m | ----- | 1H |
| 4 | 58,0 | ----- | ----- | ----- | ---- | 12 | 22,1 | 1,31 | d | 6,6 | 3H |
| 5 | 67,7 | 3,03 | d | 6,7 | 1H | 13 | 21,1 | 0,99 | d | 6,6 | 3H |
| 6 | 70,2 | 3,51 | dd | 1,2; 6,7 | 1H | 14 | 199,3 | 9,40 | s | ----- | 1H |
| 7 | 49,7 | 1,54 | m | ----- | 1H | 15 | 16,1 | 1,13 | s | ----- | 3H |
| 8 | 70,0 | 5,20 | dd | 4,6; 12,6 | 1H | OAc | 21,0 173,0 | 2,12 | s | ----- | 3H |

Acetilación del Compuesto C18: El compuesto **C18** (4 mg) fue disuelto en piridina (1 mL) y anhídrido acético (2 mL), y la solución resultante fue agitada durante 18 horas a temperatura ambiente. El producto se secó a vacío para conseguir el compuesto **C5** (3,5 mg).

**TABLA 53A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia C19**

| | |
|--|--|
| Estado | Aceite incoloro. |
| IR (film) ν máx (cm⁻¹): | 3404, 2929, 1736, 1647, 1470, 1375, 1243, 1088, 1023, 963, 897. |
| MS m/z (%): | 312 [M] ⁺ (2), 279 (11), 252 (4), 234 (5), 216 (4), 173 (14), 171 (16), 167 (37), 149 (87), 133 (32), 129 (33), 123 (46), 121 (50), 111 (56), 105 (48), 97 (87), 95 (91), 91 (57), 85 (70), 83 (100), 57 (89), 55 (96). |

TABLA 53B: R.M.N. ¹H de la Sustancia C19 (CDCl₃)

| Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|-------|-----------|------|-----|------------|-------|-------|-------|
| 1 | 5,45 | t | 6,8 | 1H | 9 | 2,53 | d | 12,4 | 2H |
| 2 | 2,10 | m | ----- | 1H | 10 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3 | 2,34 | m | ----- | 2H | 11 | 1,80 | m | ----- | 1H |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ---- | 12 | 1,12 | d | 6,4 | 3H |
| 5 | 2,82 | d | 7,7 | 1H | 13 | 0,95 | d | 6,4 | 3H |
| 6 | 3,51 | m | ----- | 1H | 14 | 4,12 | d | 11,6 | 1H |
| 7 | 1,59 | m | ----- | 1H | 15 | 4,29 | d | 11,8 | 1H |
| 8 | 5,18 | dd | 5,2; 12,0 | 1H | OAc | 1,16 | s | ----- | 3H |
| | | | | | | 2,15 | s | ----- | 3H |

Acetilación del Compuesto C19: El compuesto C19 (20 mg) se disolvió en piridina (2 mL) y anhídrido acético (4 mL), y la solución fue agitada durante 18 horas a temperatura ambiente. El producto se secó a vacío para conseguir el compuesto C19a (15 mg) como un aceite incoloro.

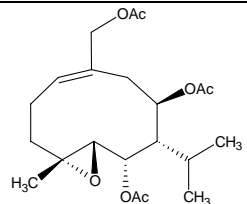
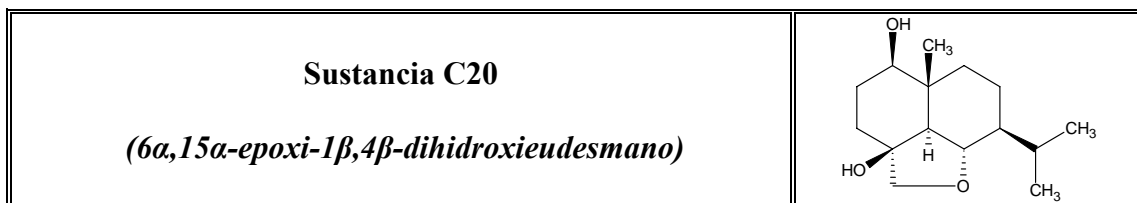
| | |
|---|---|
| <p>Sustancia C19a</p> <p><i>Pulicanol Acetilado</i></p> <p>((1E)-4α,5β-epoxi-6α,8β,14-triacetoxi-7βH-germacra-1(10)-eno)</p> |  |
|---|---|

TABLA 54A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia C19a

| | |
|--|--|
| Estado | Aceite incoloro. |
| $[\alpha]_D^{25}$ | -6,9° (c. 0,188, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): | 214 (2.4) nm. |
| IR (film) ν máx (cm⁻¹): | 2930, 2874, 1739, 1653, 1597, 1458, 1371, 1238, 1130, 1078, 1026, 962, 817. |
| HRFABMS: | [M+Na] ⁺ a m/z 419.2009 (calculado para C ₂₁ H ₃₂ O ₇ Na 419.2046). |
| MS m/z (%): | 336 (6), 294 (8), 276 (5), 234 (21), 216 (32), 194 (26), 191 (28), 175 (45), 173 (37), 163 (25), 150 (29), 145 (33), 139 (46), 131 (50), 119 (33), 107 (49), 91 (47), 84 (100), 81 (40), 69 (28), 67 (28), 57 (22), 55 (35). |

TABLA 54B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C19a (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|--------------|--------|----------|----------|-----|---|----------------------|-------------|-------------------------|----------------|
| 1 | 135,0 | 5,64 | t | 7,5 | 1H | 9 | 29,6 | 1,27 2,63 | m m | ----- ----- | 1H 1H |
| 2 | 24,4 | 2,36 | m | ----- | 2H | 10 | 129,3 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3 | 38,4 | 1,25 2,19 | m m | ----- | 1H 1H | 11 | 26,2 | 1,86 | m | ----- | 1H |
| 4 | 58,8 | ----- | ----- | ----- | ----- | 12 | 22,9 | 1,12 | d | 6,5 | 3H |
| 5 | 66,5 | 2,87 | d | 6,6 | 1H | 13 | 21,2 | 0,92 | d | 6,6 | 3H |
| 6 | 73,5 | 4,89 | d | 6,8 | 1H | 14 | 63,5 | 4,57 4,62 | d d | 12,12 12,26 | 1H 1H |
| 7 | 47,5 | 1,63 | d | 9,2 | 1H | 15 | 16,3 | 1,17 | s | ----- | 3H |
| 8 | 72,1 | 5,46 | dd | 4,7;12,1 | 1H | OAc | 20,8 21,0 21,1 169,8 169,8 170,8 | 2,00 2,07 2,09 | s s s | ----- ----- ----- | 3H 3H 3H |

**TABLA 55A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia C20**

| | |
|---|--|
| Estado | Aceite incoloro. |
| IR (film) v máx (cm⁻¹): | 3370, 2930, 1732, 1463, 1386, 1245, 1171, 1079, 923, 876, 756. |
| MS m/z (%): | 254 ([M] ⁺ , 6), 239 (2), 236 (1), 222 (17), 209 (6), 206 (7), 180 (15), 167 (13), 149 (38), 137 (17), 123 (19), 107 (29), 95 (39), 81 (46), 69 (43), 55 (100). |

TABLA 55B: R.M.N. ¹H de la Sustancia C20 (CDCl₃)

| Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|-------|-----------|------|----|------------|-------|-------|-------|
| 1 | 3,45 | dd | 5,0; 11,0 | 1H | 9 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 2 | 1,99 | m | ----- | 1H | 10 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| | 2,35 | m | ----- | 1H | | | | | |
| 3 | 1,31 | m | ----- | 1H | 11 | 1,90 | m | ----- | 1H |
| | 1,77 | m | ----- | 1H | | | | | |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ---- | 12 | 0,97 | d | 6,8 | 3H |
| 5 | 1,05 | d | 11,6 | 1H | 13 | 0,93 | d | 6,8 | 3H |
| 6 | 3,76 | dd | 9,1; 11,6 | 1H | 14 | 1,05 | s | ----- | 3H |
| 7 | 1,25 | m | ----- | 1H | 15 | 3,65 | d | 9,1 | 2H |
| | | | | | | 3,75 | d | 9,1 | |
| 8 | ----- | ----- | ----- | ---- | | | | | |

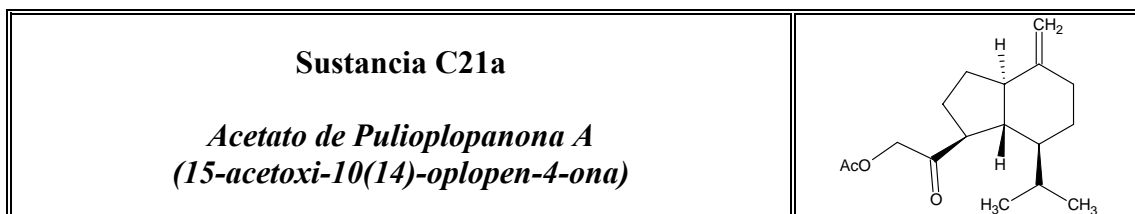
| | |
|--|--|
| <p>Sustancia C21</p> <p><i>Pulioplopanona A</i> (15-hidroxi-10(14)-oplopen-4-ona)</p> | |
|--|--|

TABLA 56A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia C21

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido cristalino (agujas incoloras). |
| Punto de fusión: | 141-142°C (Hex/AcOEt) |
| $[\alpha]_D^{25}$ | -40,0° (c. 0,005, CHCl ₃). |
| UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): | 209 (2.7), 274 (1.2). |
| IR (KBr) ν máx (cm⁻¹): | 3489, 2960, 2939, 2876, 1710, 1660, 1602, 1405, 1280, 1230, 1055, 893, 748. |
| HRFABMS: | [M+Na] ⁺ a m/z 259.1702 (calculado para C ₁₅ H ₂₄ O ₂ Na 259.1703). |
| MS m/z (%): | 236 [M] ⁺ (12), 205 (100), 187 (74), 177 (35), 135 (17), 121 (55), 107 (18), 95 (39), 93 (27), 91 (18), 79 (24), 69 (17), 67 (15), 55 (13). |

TABLA 56B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C21 (CDCl₃)

| N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|-----------------------------------|---------|--------------------|----------|----|------------|-----------------------------------|---------|-------------------|----------|
| 1 | 51,7 | α , 1,95 | m | ----- | 1H | 9 | 35,2 | α , 2,01 β , 2,37 | m dt | ----- 4,0; 6,0 | 1H 1H |
| 2 | 27,3 | α , 1,73 β , 1,83 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 10 | 150,4 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 3 | 29,4 | β , 1,60 α , 1,95 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 11 | 30,2 | 1,33 | dt | 2,8; 6,9 | 1H |
| 4 | 212,4 | ----- | ----- | ----- | ---- | 12 | 21,9 | 0,89 | d | 6,8 | 3H |
| 5 | 50,8 | α , 2,66 | ddd | 4,0;5,8;9,7 | 1H | 13 | 15,4 | 0,61 | d | 6,8 | 3H |
| 6 | 52,0 | β , 1,86 | m | ----- | 1H | 14 | 103,9 | 4,57 4,68 | d d | 1,0 1,0 | 1H 1H |
| 7 | 49,0 | β , 1,25 | m | ----- | 1H | 15 | 67,7 | 4,31 | s | ----- | 2H |
| 8 | 26,3 | β , 1,10 α , 1,70 | dq m | 4,2; 12,9 ----- | 1H 1H | | | | | | |

**TABLA 57A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia C21a**

| | |
|--|---|
| Estado | Sólido amorfo. |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 2957, 2918, 2849, 1726, 1713, 1462, 1412, 1379, 1261, 1234, 1169, 1076, 1024, 800, 754. |
| HREIMS: | [M] ⁺ a m/z 278.1895 (calculado para C ₁₇ H ₂₆ O ₃ 278.1882). |
| MS m/z (%): | 278 [M] ⁺ (4), 236 [M-42] ⁺ (11), 218 [M-60] ⁺ (23), 205 (93), 187 (100), 177 (51), 135 (24), 121 (69), 107 (30), 95 (55), 93 (40), 91 (28), 81 (38), 79 (32), 69 (29), 67 (25), 57 (25), 55 (26). |

TABLA 57B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia C21a (CDCl₃)

| Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|-------|--------------------|---------|-------------------|----------|-----|---------------|--------------------|-----------|-------|----------|
| 1 | 51,3 | α, 1,96 | m | ---- | 1H | 9 | 35,2 | α, 2,01 β, 2,38 | m d br | ---- | 1H 1H |
| 2 | 27,4 | α, 1,72 β, 1,83 | m m | ---- | 1H 1H | 10 | 150,5 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 3 | 29,0 | β, 1,62 α, 1,94 | m m | ---- | 1H 1H | 11 | 30,1 | 1,41 | t | 6,9 | 1H |
| 4 | 205,8 | ---- | ---- | ---- | ---- | 12 | 21,9 | 0,91 | d | 6,8 | 3H |
| 5 | 50,8 | α, 2,71 | m | ---- | 1H | 13 | 15,5 | 0,64 | d | 6,7 | 3H |
| 6 | 51,7 | β, 1,85 | m | ---- | 1H | 14 | 103,7 | 4,56 4,68 | s s | ---- | 1H 1H |
| 7 | 49,1 | β, 1,25 | m | ---- | 1H | 15 | 67,6 | 4,74 | d | 8,3 | 2H |
| 8 | 26,4 | β, 1,10 α, 1,70 | dq m | 4,3; 12,6 ---- | 1H 1H | OAc | 20,5 171,6 | 2,17 | s | ---- | 3H |



Detalle de las plantas de P. canariensis ssp. lanata

**4.6 *Pulicaria canariensis* Bolle *ssp. lanata*. (Font
Quer & Svent.) Bramwell & G. Kunkel.**

Parte Teórica

La *Pulicaria canariensis Bolle ssp. lanata* (Font Quer & Svent.) Bramwell & G. Kunkel es una planta que se distribuye por la llanura costera de la base de los riscos de Famara en la isla de Lanzarote, zona donde recogimos los ejemplares que hemos estudiado, como mencionamos en la parte experimental. Dentro del género se diferencia por sus hojas ampliamente oblanceoladas y densamente vellosas, y sus capítulos de unos 3 cm de diámetro. Esta especie se incluye en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias, como **sensible a la alteración de su hábitat**, en la isla de Lanzarote.

Tal como se describe en la parte experimental, tras la extracción de la parte aérea de la planta con etanol hasta agotamiento, y posterior tratamiento del extracto mediante concentración, se obtuvo un líquido denso y oscuro. Su estudio en cromatografía en columna nos ha conducido a la obtención de diez sustancias para cuya descripción, como en las plantas estudiadas anteriormente, no se va a tener en cuenta el orden de elución cromatográfica, sino que la efectuaremos en función de sus relaciones estructurales. Según este criterio, se pueden agrupar de la siguiente forma:

a) 1 compuesto aromático:

- Ácido ferúlico (L9)

b) 1 flavonoide (L5)

c) 4 triterpenos y esteroides:

- β -amirina (L1)

- Estigmasterol (L3)

- 2 derivados del lupeol (L2 y L4)

d) 4 sesquiterpenos tipo germacrano (L6, L7, L8 y L10)

a) COMPUESTO AROMÁTICO:

Sustancia L9:

Se aisló de la fracción V de la cromatografía general como un sólido cristalino.

En su espectro de masas (Tabla 62A) aparece un pico de ión molecular relativamente intenso a m/z 194, que se corresponde con una fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$, destacando además otros picos a m/z 179 que indica la pérdida de un grupo metilo, y a m/z 149 que indica la posible pérdida de un grupo ácido carboxílico.

En el espectro IR (Tabla 62A) podemos destacar la presencia de las bandas de absorción a 3348, 1726 y 1599 cm^{-1} , que parecen apuntar hacia la existencia de un grupo ácido carboxílico α,β -insaturado en la estructura de la sustancia.

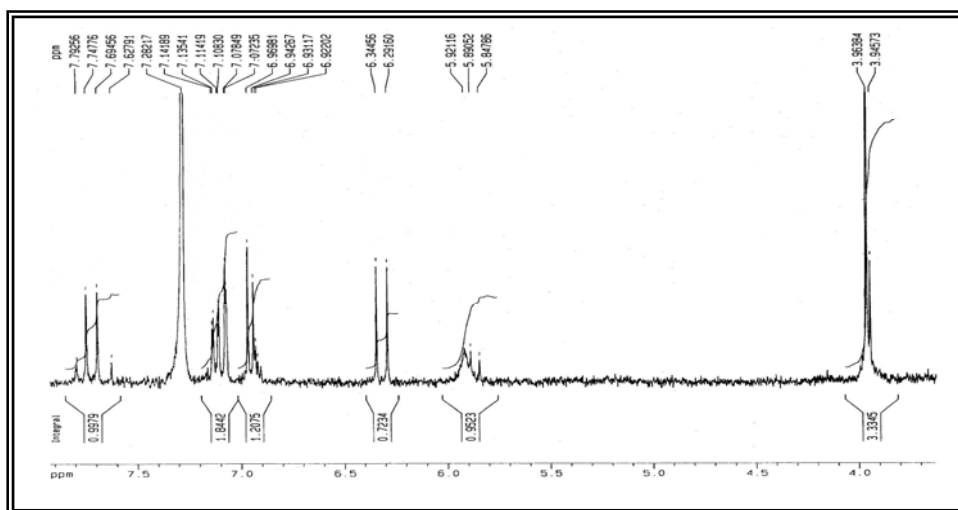


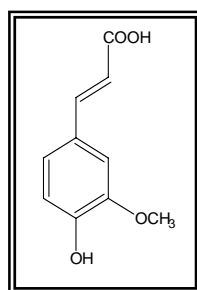
Figura 93: Espectro de RMN 1H de la sustancia L9

El estudio de su espectro de RMN 1H (Figura 93; Tabla 62B) nos permitió deducir una estructura de compuesto aromático para esta sustancia, ya que sólo presenta siete señales de protones, de las cuales tres se corresponden con protones aromáticos, a δ_H 6.95 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.12 (dd, $J=1.9; 8.1$ Hz, 1H) indicando la presencia de tres sustituyentes en el anillo aromático, posiblemente en posiciones 1, 3 y 4. Otras dos señales, a δ_H 6.31 (d, $J=15.88$ Hz, 1H) y 7.72 (d, $J=15.88$ Hz, 1H), indican la presencia de protones olefinicos, necesariamente en una cadena lateral del anillo

aromático. Las otras señales corresponden a un protón de grupo hidroxilo, a δ_H 5.92 (s br, 1H), y a un grupo metoxilo, a δ_H 3.96 (s, 3H), lo que confirma la naturaleza de dos de los tres sustituyentes del anillo aromático.

Para aclarar la presencia de uno o más grupos hidroxilos en la molécula, se procedió a la obtención de su derivado acetilado (sustancia **L9a**). En el espectro de masas de este derivado acetilado (Tabla 63A) se observa el pico de ión molecular a m/z 236, lo que implica la introducción de un único grupo acetilo en el mismo, y que por lo tanto la sustancia **L9** sólo tiene un grupo hidroxilo en su estructura. El espectro de RMN de 1H del derivado acetilado (Tabla 63B) confirma esta deducción, ya que es totalmente coincidente con el espectro de la sustancia **L9**, con la única diferencia de la sustitución de la señal del protón del grupo hidroxilo (δ_H 5.92) de **L9** por la señal de los protones de un grupo acetilo en el caso de **L9a** (δ_H 2.35, s, 3H).

Teniendo en cuenta que la fórmula molecular de la sustancia **L9**, establecida a partir del espectro de masas, presenta diez carbonos y que en su estructura hay un anillo aromático con tres sustituyentes, de los cuales uno es un grupo hidroxilo y el segundo es un grupo metoxilo, se deduce que el tercer sustituyente debe estar formado por una cadena de tres carbonos, dos de ellos unidos por un doble enlace, y el tercero debe soportar el grupo ácido. Por lo tanto, estos datos apuntan a la estructura del **ácido ferúlico (ácido 3-(3-metoxi-4-hidroxifenil)propenóico)** para la sustancia **L9**, siendo confirmada su identidad mediante una comparación directa, tanto de sus datos físicos y espectroscópicos como por cromatografía en capa fina con una muestra auténtica.

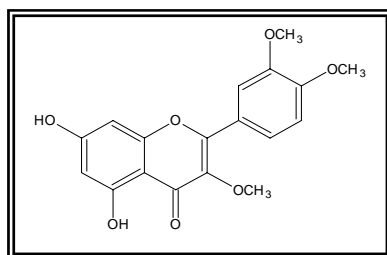
**L9**

b) FLAVONOIDE:

Sustancia L5:

Se aisló de la fracción V de la cromatografía general como un sólido cristalino.

Los datos espectroscópicos y físicos de esta sustancia coinciden con los de **5,7-dihidroxi-3,3',4'-trimetoxiflavona**, descrita anteriormente en el estudio de *Pulicaria canariensis ssp. canariensis* (C11, ver página 204).



L5

Al objeto de disponer de diversas funciones en este flavonoide para su estudio de actividad biológica, la sustancia **L5** se sometió a un proceso de acetilación tal como se indica en la parte experimental, obteniéndose dos derivados acetilados, **L5a** y **L5b**.

La estructura de la sustancia **L5a** coincide con la del derivado monoacetilado de **L5**, tal y como se deduce del análisis de sus datos espectroscópicos. Así, por un lado el espectro de RMN ^1H de **L5a** (Figura 94; Tabla 58B) muestra una única señal para los protones de un grupo acetilo (a δ_{H} 2,35, s, 3H).

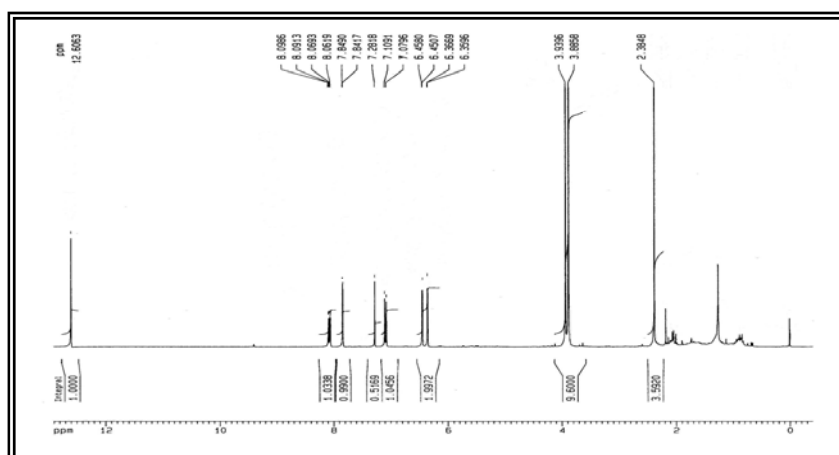


Figura 94: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **L5a**

Por otro lado, el espectro de masas de **L5a** (Tabla 58A) presenta un pico de ión molecular a m/z 386, coincidente con la introducción de un único grupo acetilo, lo que se confirma por las fragmentaciones observadas, en las que destacan dos picos muy intensos a m/z 344 y 343, que indican la salida de un grupo acetilo de la molécula. En cuanto a la posición en la que se sitúa el grupo acetilo, los datos de las bandas de absorción del espectro UV con reactivos de desplazamiento (Tabla 58A) nos fueron útiles para su deducción. Así, se observa un desplazamiento de la banda I de 58 nm al añadir AlCl_3 , que se mantiene al añadir HCl, de manera similar a como sucede con el espectro de la sustancia **L5**, lo que nos permite deducir la presencia en **L5a** de un grupo hidroxilo en C-5, por lo que necesariamente el grupo acetilo debe situarse en C-7. Esto se confirma por la presencia de una señal de protón de grupo hidroxilo desplazada a campo bajo (δ_{H} 12,61) como resultado de la formación de puente de hidrógeno entre ese grupo hidroxilo y el carbonilo en C-4. En consecuencia, la estructura de **L5a** es la de **7-acetoxi-5-hidroxi-3,3',4'-trimetoxi-flavona**.

En cuanto a la sustancia **L5b**, su estructura corresponde a la del derivado diacetilado según se deduce del análisis de sus datos espectroscópicos. En el espectro de RMN ^1H de **L5b** (Figura 95; Tabla 59B) se observan dos señales de grupos acetilos a δ_{H} 2,38 (s, 3H) y 2,48 (s, 3H). En el espectro de masas (Tabla 59A) se observa el pico de ión molecular a m/z 428, congruente con la introducción de dos grupos acetilos, destacando además la presencia de picos de fragmentación a m/z 386 y 344 que indican la salida sucesiva de los dos grupos acetilos de la molécula. Por lo tanto la estructura de **L5b** es la de **5,7-diacetoxi-3,3',4'-trimetoxiflavona**.

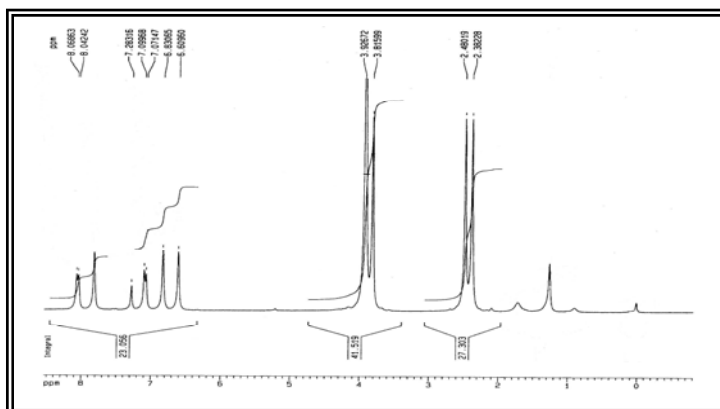


Figura 95: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **L5b**

También se sometió la sustancia **L5** a una reacción de metilación¹²⁰ de la forma que se explica en la parte experimental, en la que sólo obtuvimos un único derivado, **L5c**. Del análisis de los datos espectroscópicos de este derivado, se deduce que su estructura se corresponde con la del derivado monometilado de **L5**. Así, en el espectro de RMN ¹H (Figura 96; Tabla 60B) se observan las señales correspondientes a los protones de cuatro grupos metoxilos (uno más que **L5**), a δ_H 3,87 (s, 3H), 3,89 (s, 3H) y 3,98 (s, 6H). En el espectro de masas (Tabla 60A) se observa el pico de ión molecular a m/z 358, consistente con la introducción de un único grupo metilo en la estructura de la molécula. En cuanto a la deducción de la posición en la que se sitúa el grupo metoxilo adicional, nos fueron útiles los datos de las bandas de absorción del espectro UV con reactivos de desplazamiento (Tabla 60A). Así, se observa un desplazamiento de la banda I de 46 nm al añadir AlCl₃, que se mantiene al añadir HCl, de manera similar a como sucede con el espectro de las sustancias **L5** y **L5a**, por lo que deducimos la presencia en **L5c** de un grupo hidroxilo en C-5, y necesariamente el grupo metoxilo adicional debe situarse en C-7. Esta deducción vuelve a confirmarse por la presencia de una señal de protón de grupo hidroxilo desplazada a campo bajo (δ_H 12,66) como resultado de la formación de puente de hidrógeno entre ese grupo hidroxilo y el carbonilo en C-4. En consecuencia, la estructura de **L5c** es la de **5-hidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona**.

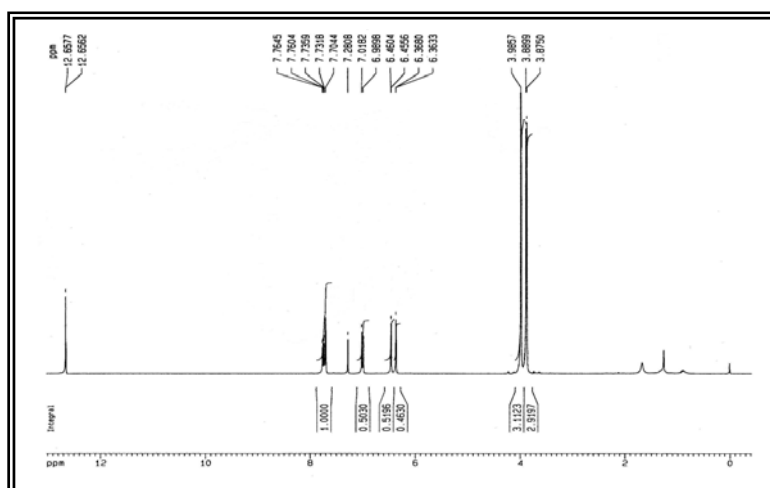


Figura 96: Espectro de RMN ¹H de la sustancia **L5c**

120. Johnstone, R.A.W. and Rose, M.E. "A rapid, simple, and mild procedure for alkylation of phenols, alcohols, amides and acids". Tetrahedron (1979), 35, 2169-2173.

Finalmente, la sustancia **L5c** fue sometida a un proceso de acetilación de la manera habitual, del que se obtuvo, como era de esperar, un único derivado, la sustancia **L5d**. La estructura de esta sustancia es la de **5-acetoxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona**, como se confirma al analizar sus datos espectroscópicos. Así, en el espectro de RMN ^1H (Figura 97; Tabla 61B) se observan las señales correspondientes a los protones de cuatro grupos metoxilos (a δ_{H} 3,81 (s, 3H), 3,92 (s, 3H) y 3,98 (s, 6H)) y de un grupo acetilo (a δ_{H} 2,48, s, 3H), desapareciendo la señal de protón desplazada a campo bajo indicativa de la formación de puente de hidrógeno entre el hidroxilo en C-5 y el carbonilo en C-4. En el espectro de masas (Tabla 61A), el pico de ión molecular se sitúa a m/z 400, consistente con la entrada de un grupo acetilo en la estructura de **L5c**, destacando además el pico base a m/z 358, que indica la salida del grupo acetilo de la molécula.

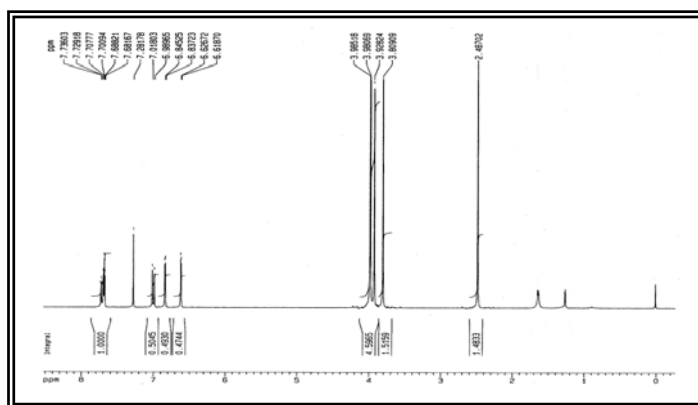


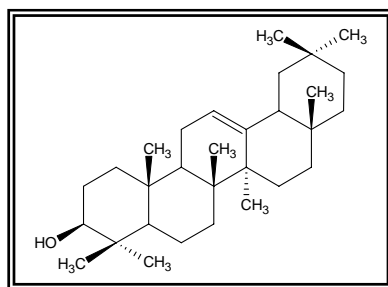
Figura 97: Espectro de RMN ^1H de la sustancia **L5d**

c) TRITERPENOS Y ESTEROLES:

Sustancia L1:

Se aisló de la fracción III de la cromatografía general como un sólido cristalino.

Los datos espectroscópicos y físicos de esta sustancia coinciden con los de β -**amirina**, descrita anteriormente en el estudio de *Tolpis sp.* (T2, ver página 99).

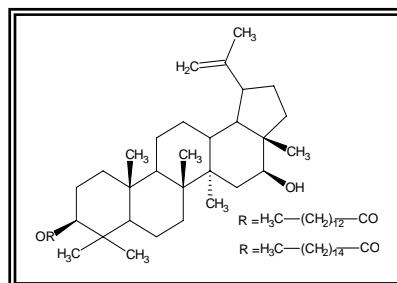


L1

Sustancia L2:

Se aisló de la fracción III de la cromatografía general como un aceite incoloro.

Los datos espectroscópicos y físicos de esta sustancia coinciden con los de la sustancia **C1**, descrita anteriormente en el estudio de *Pulicaria canariensis ssp. canariensis* (mezcla de 3-palmitato y 3-miristato del 3 β ,16 β -dihidroxiupeol, ver página 209).

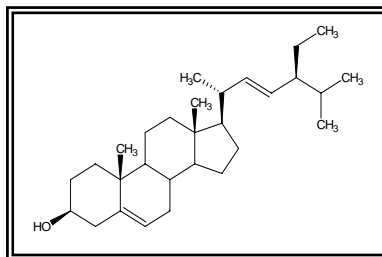


L2

Sustancia L3:

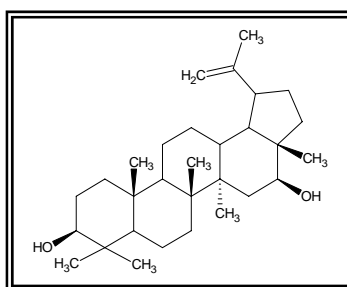
Se aisló de la fracción III de la cromatografía general como un sólido cristalino.

Los datos espectroscópicos y físicos de esta sustancia coinciden con los de **estigmasterol**, descrita anteriormente en el estudio de *Tolpis webbii* (W1, ver página 44).

**L3****Sustancia L4:**

Se aisló de la fracción IV de la cromatografía general como un sólido cristalino.

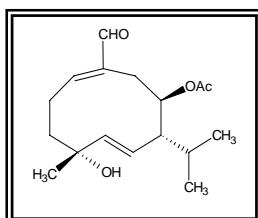
Los datos espectroscópicos y físicos de esta sustancia coinciden con los de **3 β ,16 β -dihidroxiupeol ó calenduladiol**, descrita anteriormente en el estudio de *Pulicaria canariensis ssp. canariensis* (C8, ver página 211).

**L4**

d) SESQUITERPENOS:**Sustancia L6:**

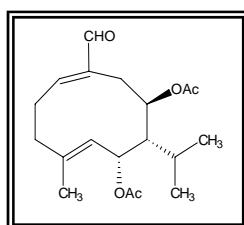
Se aisló de la fracción V de la cromatografía general como un sólido amorfo.

Los datos espectroscópicos y físicos de esta sustancia coinciden con los de **pulicanadienal B**, descrita anteriormente en el estudio de *Pulicaria canariensis ssp. canariensis* (C13, ver página 242).

**L6****Sustancia L7:**

Se aisló de la fracción V de la cromatografía general como un aceite incoloro.

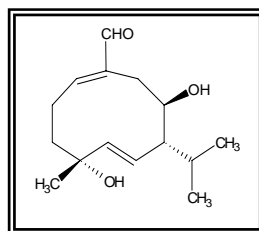
Los datos espectroscópicos de esta sustancia coinciden con los de **pulicanadieno B**, descrita anteriormente en el estudio de *Pulicaria canariensis ssp. canariensis* (C4, ver página 218).

**L7**

Sustancia L8:

Se aisló de la fracción V de la cromatografía general como un aceite incoloro.

Los datos espectroscópicos de esta sustancia coinciden con los de **pulicanadienal A**, descrita anteriormente en el estudio de *Pulicaria canariensis* ssp. *canariensis* (C15, ver página 236).

**L8****Sustancia L10:**

Se consiguió aislar esta sustancia a partir de la fracción V de la cromatografía general como un sólido cristalino.

Su espectro de IR (Tabla 64A) muestra fundamentalmente la presencia de bandas de absorción características a 3177, 1693 y 1635 cm^{-1} , que parecen sugerir la presencia de un grupo ácido carboxílico α,β -insaturado de naturaleza sesquiterpénica, como se deduce de su fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_5$, determinada por espectrometría de masas de alta resolución (Tabla 64A). Además, presenta una banda característica a 3477 cm^{-1} , que parece indicar la presencia de un grupo hidroxilo terciario de manera similar a como sucede con **L6**.

Los datos espectrales de RMN de ^1H y ^{13}C (Tabla 64B) son similares a los de la sustancia **L6**. Así, en su espectro de RMN de ^1H (Figura 98) se observan señales para un protón de metino oxigenado con acetato a δ_{H} 4,99 (1H, s br, H-8), dos grupos metilos sobre un carbono metino a δ_{H} 0,83 (3H, d, $J=6,6$ Hz, CH_3 -12) y 0,81 (3H, d, $J=6,8$ Hz, CH_3 -13), un grupo metilo angular a δ_{H} 1,35 (3H, s, CH_3 -15), tres protones olefínicos a δ_{H} 6,63 (1H, m, H-1) y 5,23 (2H, m, H-5 y H-6), y el metilo de un grupo acetilo a δ_{H} 2,05 (3H, s, OAc).

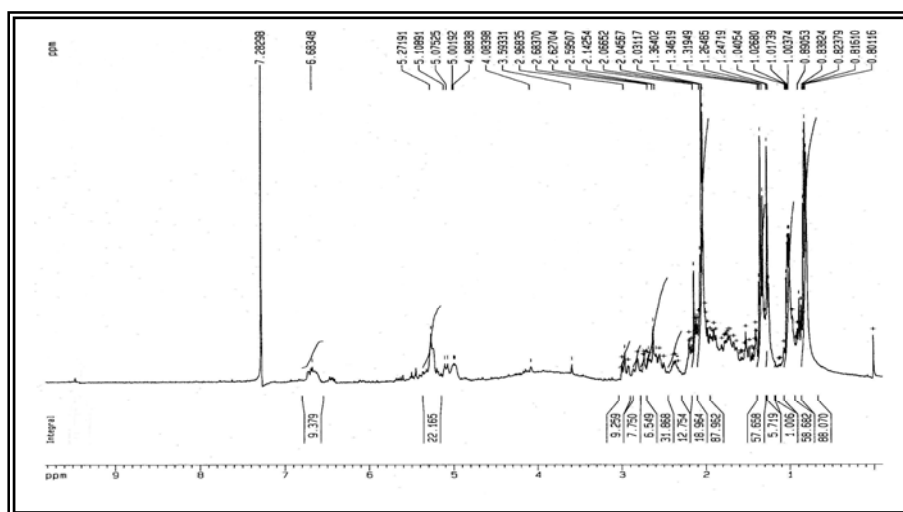


Figura 98: Espectro de ^1H -RMN de la sustancia **L10**.

En su espectro de RMN de ^{13}C y D.E.P.T. (Tabla 64B) aparecen señales para 17 carbonos, indicando la presencia de un grupo ácido carboxílico α,β -insaturado (δ_{C} 174.2, C-14, 147.6, C-10, y 145.7, C-1), de un metino oxigenado (δ_{C} 70.1, C-8), un carbono cuaternario oxigenado (δ_{C} 73.8, C-4), y de un grupo isopropilo (δ_{C} 27.5, C-11, 21.2, C-12, y 16.8, C-13), además de un grupo acetilo (δ_{C} 21.0 y 170.6), un metilo (δ_{C} 28.9, C-15), tres metilenos (δ_{C} 24.6, C-2, 29.7, C-9, y 37.2, C-3), otros dos metinos, uno de ellos olefínico (δ_{C} 54.6, C-7, y 141.3, C-5) y un carbono cuaternario olefínico (δ_{C} 128.8, C-6).

La metilación de **L10** con diazometano produjo el compuesto **L10a**, en cuyo espectro de RMN de ^1H (Figura 99; Tabla 65B) aparece un nuevo singulete a δ_{H} 3,73 (3H, s, COOMe). El espectro de IR de **L10a** (Tabla 65A) sigue mostrando una banda de absorción característica de grupo hidroxilo, por lo que teniendo en cuenta la metilación del grupo ácido y la existencia de un grupo acetilo nos permite concluir que la estructura debe poseer un grupo hidroxilo terciario, de la misma forma que sucede en **L6**, tal y como suponíamos anteriormente al explicar las señales del espectro IR.

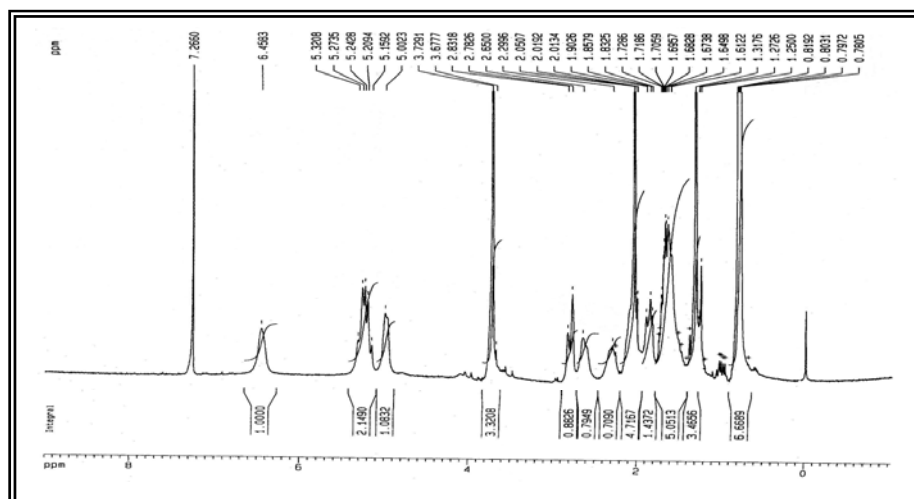


Figura 99: Espectro de ^1H -RMN de la sustancia L10a.

Puede establecerse así que la sustancia L10 corresponde al **ácido (1E, 5E)-8 β -acetoxi-4 α -hidroxi-7 β H-germacra-1(10),5-dien-14-óico**, cuya estructura fue confirmada mediante un análisis cristalográfico de rayos X (Figura 100).

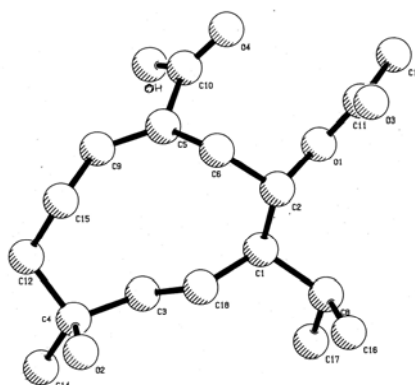
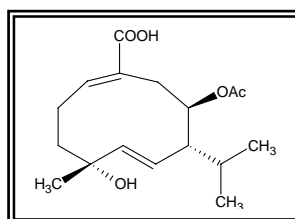
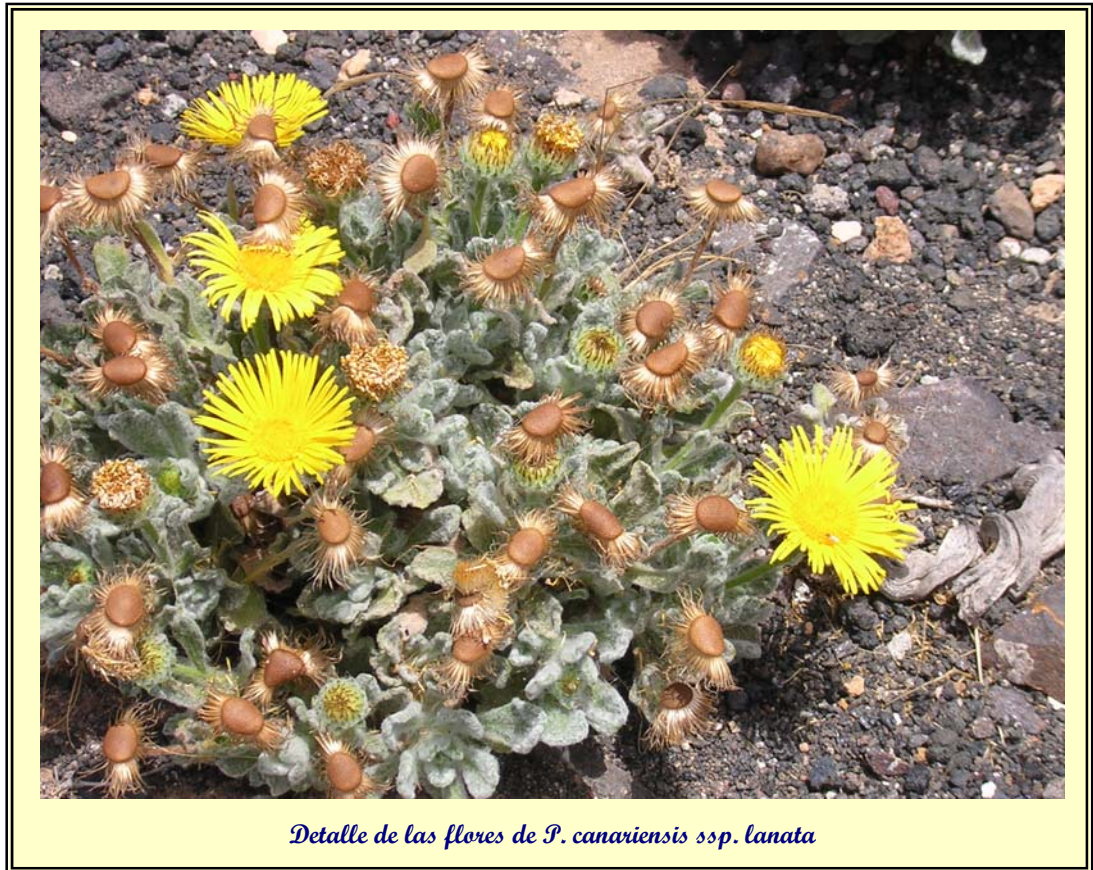


Figura 100: Difracción de rayos X (ORTEP) de la sustancia L10.

Después de revisada la literatura no encontramos descrita esta sustancia, por lo que, dada su procedencia, la hemos denominado **Ácido Pulicanadienóico**.



L10

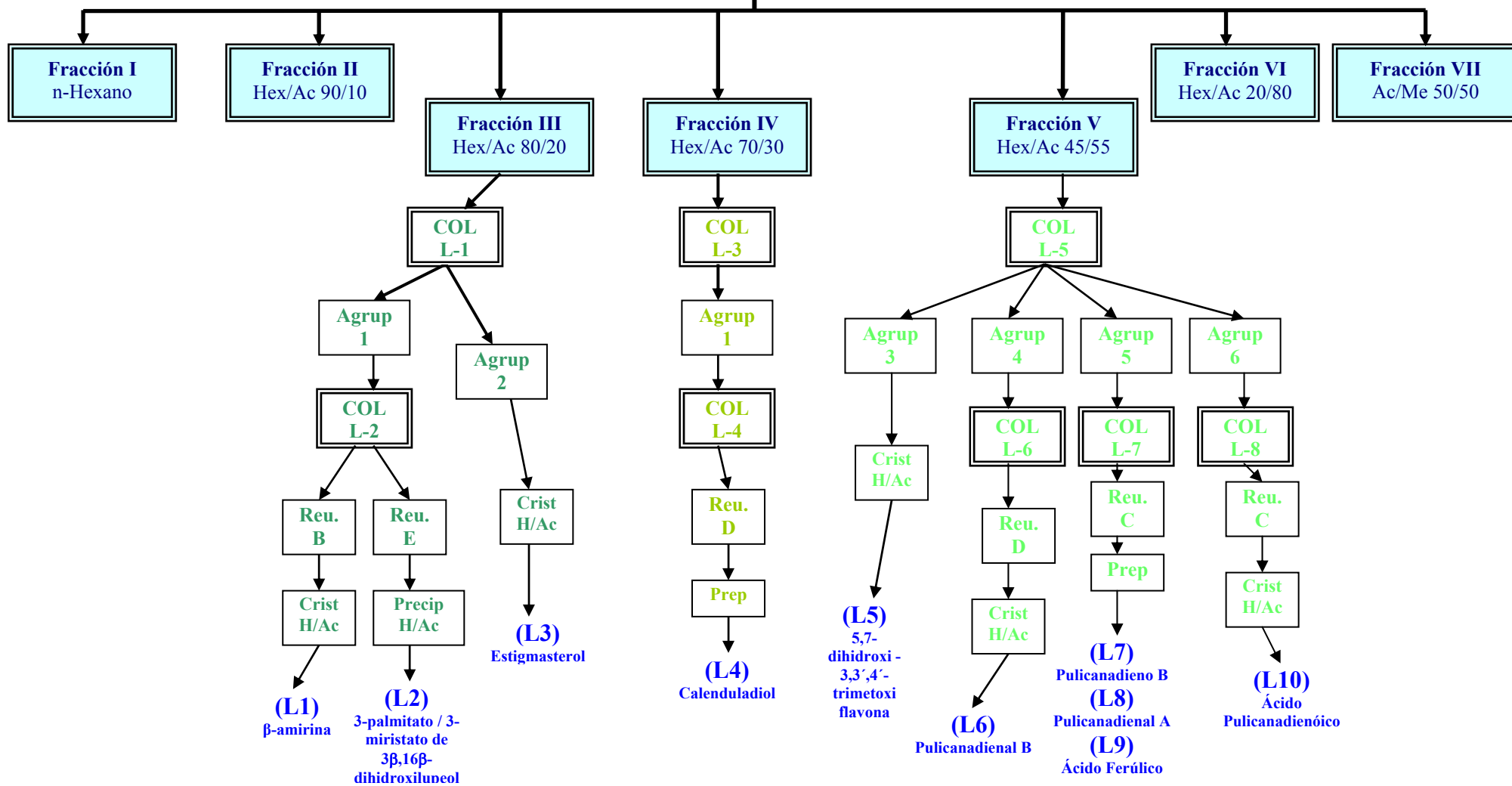


**4.7 *Pulicaria canariensis* Bolle *ssp. lanata*. (Font
Quer & Svent.) Bramwell & G. Kunkel.**

Parte Experimental

Pulicaria canariensis ssp. *lanata* (Parte Aérea)

COLUMNA L-0



Se recogieron las partes aéreas de *Pulicaria canariensis ssp. lanata* en la llanura de la base de los riscos de Famara, antes de llegar a la playa del mismo nombre (norte de Lanzarote) en Mayo de 2005. La recolección la realizó el profesor Francisco Javier Pérez Galván, siendo clasificada por la Dra. Rosa Febles Hernández, depositándose un voucher espécimen (**LPA 22943**) en el Herbario del Jardín Canario Viera y Clavijo de Las Palmas de Gran Canaria. El material vegetal fue sometido a un proceso de secado a temperatura ambiental y en entorno oscuro, obteniéndose un peso de material seco de 1.504 g, para posteriormente ser triturado cuidadosamente y extraído con etanol en caliente en un aparato Soxhlet, hasta su total agotamiento. El extracto etanólico así obtenido se concentró por eliminación del disolvente a presión reducida, obteniendo un residuo viscoso oscuro con un peso de 115,4 gramos.

El extracto etanólico se disolvió en acetona, para a continuación adsorberlo en gel de sílice (0,02-0,5 mm mallas), obteniendo así una mezcla que se usó como cabeza de una columna húmeda de gel de sílice con el mismo grosor de grano, para lo cual se utilizó 1,0 kg de ésta última. Se usaron como eluyentes de la columna hexano y diferentes mezclas de hexano y acetato de etilo, con incremento de la concentración de acetato de etilo conforme se avanzaba en la cromatografía, y finalizando con acetato de etilo y metanol al 50%. Se recogieron un total de 90 fracciones, de un litro cada una, que se fueron agrupando de acuerdo a su comportamiento en cromatografía de capa fina, en un total de 7 reuniones de fracciones (nombradas I a VII). A continuación presentamos los resultados obtenidos del estudio cromatográfico de cada una de ellas:

| FRACCIONES | ELUYENTES | SUSTANCIAS |
|------------|----------------------------------|--------------------------------|
| I | n-hexano | ----- |
| II | n-hexano / acetato etilo 10 % | ----- |
| III | n-hexano / acetato etilo 20 % | L1, L2, L3 |
| IV | n-hexano / acetato etilo 30 % | L4 |
| V | n-hexano / acetato etilo 40/50 % | L5, L6, L7, L8, L9, L10 |
| VI | n-hexano / acetato etilo 80% | ----- |
| VII | Acetato etilo / Metanol 50% | ----- |

Fracción III:

Esta fracción fue eluída en la cromatografía general con n-hexano-acetato de etilo (8:2), y tras ser concentrada a vacío dio un residuo que pesó 8,346 g. El extracto obtenido fue sometido a continuación a cromatografía en columna empaquetada con gel de sílice (columna L-1), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (9:1), recogiénose un total de 60 fracciones de 150 mL que se reunieron, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cinco grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 5.

El agrupamiento 1 de la columna L-1 se concentró a vacío, dando un residuo que pesó 0,830 g. Este residuo fue tratado posteriormente mediante cromatografía en columna de media presión (columna L-2) con n-hexano-acetato de etilo (9:1), recogiénose un total de 150 fracciones de 100 mL que se agruparon, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en seis reuniones de fracciones que nombramos de A a F. La fracción B de la columna L-2 nos permitió obtener la sustancia **L1** (14 mg) mediante recristalización en n-hexano-acetato de etilo. La reunión E de la columna L-2 nos permitió obtener la sustancia **L2** (39 mg) mediante precipitación en n-hexano-acetato de etilo.

El agrupamiento 2 de la columna L-1 nos permitió obtener la sustancia **L3** (11 mg) mediante recristalización en n-hexano-acetato de etilo.

Los datos físicos y espectroscópicos de estas sustancias los exponemos a continuación.

Sustancia L1: Sólido cristalino. Constantes físicas y espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **β -amirina (T2)**, ver página 122).

Sustancia L2: Sólido amorfo. Constantes físicas y espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **C1 (mezcla de 3-palmitato y 3-miristato del 3 β ,16 β -dihidroxiupeol)**, ver página 259).

Acetilación de L2: El compuesto **L2** (18 mg) se disolvió en piridina (2 mL) y anhídrido acético (4 mL), y la solución fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente. El producto se secó a vacío para conseguir el compuesto **L2a** (13 mg) como un sólido amorfo.

Sustancia L2a: Sólido amorfo. Constantes físicas y espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **C1a (mezcla de acetato de 3-palmitato y 3-miristato del 3 β ,16 β -dihidroxiupeol)**, ver página 260).

Sustancia L3: Sólido cristalino. Constantes físicas y espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **estigmasterol (W1)**, ver página 71).

Fracción IV:

Fue eluída en la cromatografía general con n-hexano-acetato de etilo (7:3), y tras su concentración a vacío dio un residuo que pesó 1,902 g. El extracto obtenido fue sometido a continuación a cromatografía en columna empaquetada con gel de sílice (columna L-3), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogándose un total de 75 fracciones de 100 mL que se reunieron, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cinco grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 5.

El agrupamiento 1 de la columna L-3 se concentró a vacío, dando un residuo que pesó 0,130 g. Este residuo fue tratado posteriormente mediante cromatografía en columna de media presión (columna L-4) con n-hexano-acetato de etilo (9:1), recogándose un total de 55 fracciones de 75 mL que, tras su análisis en cromatografía en capa fina, se agruparon en cuatro reuniones de fracciones que nombramos de A a D. La fracción D de la columna L-4 nos permitió obtener la sustancia **L4** (12 mg), purificada mediante cromatografía en capa gruesa, utilizando como eluyente benceno-acetonitrilo (9:1) con dos eluciones.

Los datos físicos y espectroscópicos de esta sustancia los exponemos a continuación.

Sustancia L4: Sólido cristalino. Constantes físicas y espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **3 β ,16 β -dihidroxiupeol o calenduladiol (C8**, ver página 269).

Fracción V:

Se eluyó en la cromatografía general con n-hexano-acetato de etilo (6:4 y 5:5), y tras ser concentrada a vacío dio un residuo que pesó 17.77 g. El extracto obtenido fue sometido a continuación a cromatografía en columna empaquetada con gel de sílice (columna L-5), utilizando como eluyente n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogándose un total de 120 fracciones de 100 mL que se reunieron, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en seis grupos de fracciones que enumeramos del 1 al 6.

El agrupamiento 3 de la columna L-5 nos permitió obtener la sustancia **L5** (361 mg) mediante recristalización en n-hexano-acetato de etilo.

El agrupamiento 4 de la columna L-5 dio un residuo (tras su concentración a vacío) que pesó 0,471 g. Este residuo fue tratado posteriormente mediante cromatografía en columna de media presión (columna L-6) con n-hexano-acetato de etilo (8:2), recogándose un total de 90 fracciones de 100 mL que se agruparon, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cinco reuniones de fracciones que nombramos de A a E. La fracción D de la columna L-6 nos permitió obtener la sustancia **L6** (33 mg) mediante recristalización en n-hexano-acetato de etilo.

El agrupamiento 5 de la columna L-5 fue concentrado a vacío y generó un residuo que pesó 0,602 g. Este residuo fue tratado mediante cromatografía en columna de media presión (columna L-7) con n-hexano-acetato de etilo (6,5:3,5), recogiendo un total de 50 fracciones de 100 mL que, tras su análisis en cromatografía en capa fina, se agruparon en cuatro reuniones de fracciones que nombramos de A a D. La fracción C de la columna L-7 nos permitió obtener las sustancias **L7** (5 mg), **L8** (6 mg) y **L9** (15 mg) después de purificación por cromatografía preparativa en capa gruesa (benceno-acetonitrilo, 8:2, y cuatro eluciones).

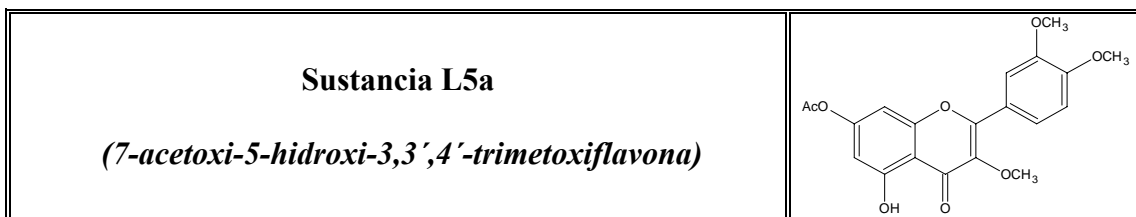
El agrupamiento 6 de la columna L-5 se concentró a vacío y dio un residuo que pesó 0,449 g, y que fue tratado posteriormente mediante cromatografía en columna de media presión (columna L-8) con n-hexano-acetato de etilo (6:4) como eluyente. Se

recogieron 75 fracciones de 100 mL que se agruparon, tras su análisis en cromatografía en capa fina, en cuatro reuniones de fracciones que nombramos de A a D. La fracción D de la columna L-8 nos permitió obtener la sustancia **L10** (56 mg) mediante recristalización en n-hexano-acetato de etilo.

Los datos físicos y espectroscópicos de todas esas sustancias, así como las reacciones de formación de derivados y los datos de éstos, los exponemos a continuación.

Sustancia L5: Sólido cristalino. Constantes físicas y espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **5,7-dihidroxi-3,3',4'-trimetoxiflavona (C11**, ver página 273).

Monoacetilación de L5: El compuesto **L5** (57 mg) se disolvió en piridina (2 mL) y anhídrido acético (4 mL), y la solución fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla resultante se secó a vacío y se purificó mediante cromatografía en columna de media presión (eluyente n-hexano-acetato de etilo, 7,5:2,5) para conseguir el compuesto **L5a** (31 mg).

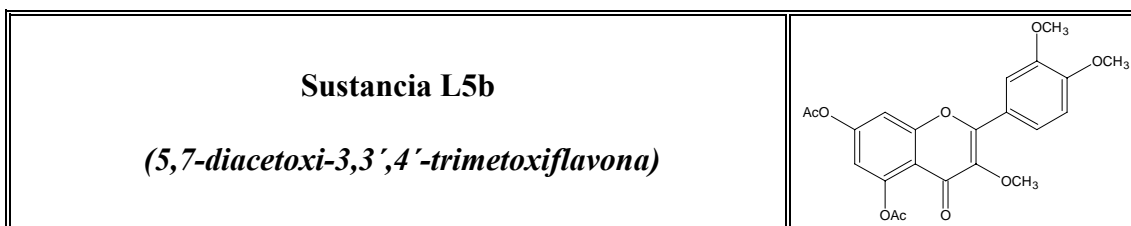
**TABLA 58A: Datos Físicos, UV y EM de la Sustancia L5a**

| | | | |
|---|---|------------|------------------|
| Estado: | Sólido cristalino. | | |
| Punto de fusión: | 134-136°C y 154-156°C (Hex/AcOEt). | | |
| UV.: Disolvente; Banda, $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) | MeOH | B I, 345 | B II, 290 |
| | MeOH/NaOMe | B I, 349 | B II, 290 |
| | MeOH | B I, 340 | B II, 281 |
| | MeOH/AlCl ₃ | B I, 398 | B II, 347, 292 |
| | MeOH/AlCl ₃ /HCl | B I, 396.5 | B II, 342, 291.5 |
| | MeOH | B I, 340 | B II, 290 |
| | MeOH/NaOAc | B I, 344 | B II, 290 |
| | MeOH/NaOAc/H ₃ BO ₃ | B I, 346 | B II, 290 |
| HREIMS | [M] ⁺ a m/z 386.1006 (calculado para C ₂₀ H ₁₈ O ₈ 386.1002). | | |
| MS m/z (%): | 387 [M+1] ⁺ (32), 386 [M] ⁺ (92), 385 [M-1] ⁺ (15), 344 [M-42] ⁺ (74), 343 [M-43] ⁺ (100), 329 [M-42-15] ⁺ (18.5), 326 [M-60] ⁺ (18), 301 (40), 167 (10.2), 135 (4.9), 95 (3.5), 79 (3.3). | | |

TABLA 58B: R.M.N. ¹H de la Sustancia L5a (CDCl₃)

| Nº | δ H | Mul. | J, Hz | Int. | Nº | δ H | Mult. | J, Hz | Int. |
|----|------------|-------|-------|-------|----------|------------|-------|----------|-------|
| 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | 1' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 2 | ----- | ----- | ----- | ----- | 2' | 7,84 | d | 2,2 | 1H |
| 3 | ----- | ----- | ----- | ----- | 3' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ----- | 4' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 5 | ----- | ----- | ----- | ----- | 5' | 7,09 | d | 8,85 | 1H |
| 6 | 6,36 | d | 2,2 | 1H | 6' | 8,08 | dd | 2,2; 8,8 | 1H |
| 7 | ----- | ----- | ----- | ----- | OH (5) | 12,61 | s | ----- | 1H |
| 8 | 6,45 | d | 2,2 | 1H | OAc (7) | 2,38 | s | ----- | 3H |
| 9 | ----- | ----- | ----- | ----- | OMe (3) | 3,94 | s | ----- | 3H |
| 10 | ----- | ----- | ----- | ----- | OMe (3') | 3,89 | s | ----- | 3H |
| | | | | | OMe (4') | 3,89 | s | ----- | 3H |

Diacetilación de L5: El compuesto L5 (71 mg) se disolvió en piridina (3 mL) y anhídrido acético (6 mL), y la solución fue agitada durante una noche a temperatura de 40°C. La mezcla de reacción se recuperó a la manera usual y se obtuvo el compuesto L5b (41 mg) mediante cristalización en n-hexano-acetato de etilo.

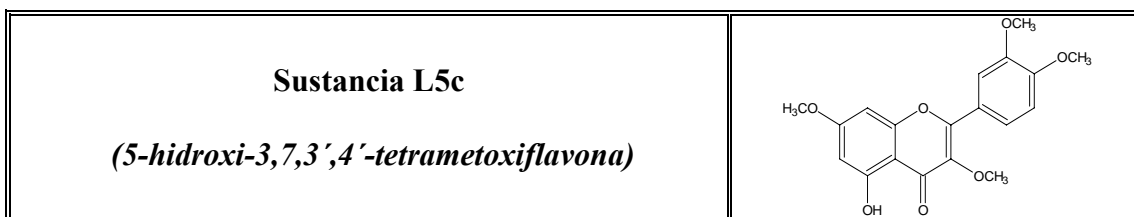
**TABLA 59A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia L5b**

| | |
|--|--|
| Estado: | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | 172-174°C (Hex/AcOEt). |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3011; 2916; 2849; 1770; 1634; 1608; 1514; 1436; 1362; 1311; 1277; 1227; 1207; 1196; 1159; 1145; 1130; 1082; 1043; 1022; 924; 891; 820; 754; 665; 623; 590; 519. |
| HREIMS | [M] ⁺ a m/z 428.1099 (calculado para C ₂₂ H ₂₀ O ₉ 428.1107). |
| EIMS m/z (%): | 428 [M] ⁺ (37), 386 [M-42] ⁺ (54), 344 [M-42-42] ⁺ (65), 343 [M-42-42-1] ⁺ (100), 327 (13), 326 (17), 315 (11), 301 (23), 167 (7), 151 (5), 123 (2), 95 (1), 57 (2.5). |

TABLA 59B: R.M.N. ¹H de la Sustancia L5b (CDCl₃)

| N° | δ H | Mul. | J, Hz | Int. | N° | δ H | Mult. | J, Hz | Int. |
|----|-------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | 1' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 2 | ----- | ----- | ----- | ----- | 2' | 7,82 | s br | ----- | 1H |
| 3 | ----- | ----- | ----- | ----- | 3' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ----- | 4' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 5 | ----- | ----- | ----- | ----- | 5' | 7,08 | d | 8,5 | 1H |
| 6 | 6,61 | s br | ----- | 1H | 6' | 8,05 | d br | 7,9 | 1H |
| 7 | ----- | ----- | ----- | ----- | OAc (5) | 2,48 | s | ----- | 3H |
| 8 | 6,83 | s br | ----- | 1H | OAc (7) | 2,38 | s | ----- | 3H |
| 9 | ----- | ----- | ----- | ----- | OMe (3) | 3,82 | s | ----- | 3H |
| 10 | ----- | ----- | ----- | ----- | OMe (3') | 3,93 | s | ----- | 3H |
| | | | | | OMe (4') | 3,93 | s | ----- | 3H |

Metilación de L5: El compuesto L5 (40 mg, 0,1163 milimoles) se disuelven en dimetilsulfóxido (2 mL), añadiéndole a continuación 4 milimoles de KOH y posteriormente 2 milimoles de yoduro de metilo. La solución fue agitada durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la reacción la mezcla se vertió en 20 mL de agua, y posteriormente fue extraída con diclorometano (60 mL en porciones de 20 mL). El extracto orgánico se lavó con agua destilada (50 mL en porciones de 10 mL) y posteriormente se filtró a vacío y se secó. La mezcla resultante se purificó por cromatografía en columna de media presión con n-hexano-acetato de etilo (8,5:1,5) obteniendo el compuesto L5c (28 mg) como una sustancia cristalina incolora.

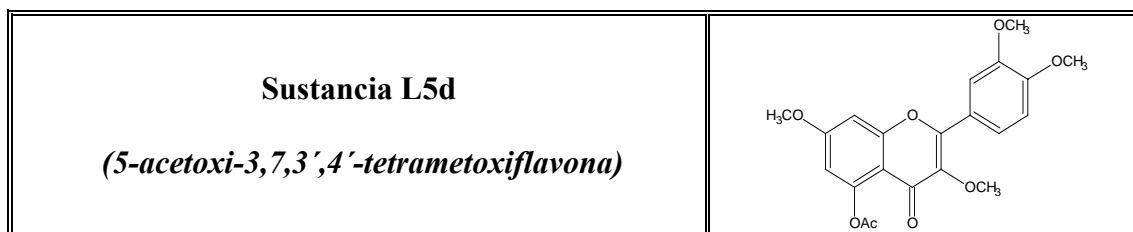
**TABLA 60A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia L5c**

| | | | |
|--|--|------------|------------------|
| Estado: | Sólido cristalino. | | |
| Punto de fusión: | 138-140°C y 148-150°C (Hex/AcOEt). | | |
| UV: Disolvente; Banda, $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) | MeOH | B I, 352 | B II, 289.5 |
| | MeOH/NaOMe | B I, 359 | B II, 286 |
| | MeOH | B I, 353 | B II, 286 |
| | MeOH/AlCl ₃ | B I, 399 | B II, 362, 284 |
| | MeOH/AlCl ₃ /HCl | B I, 400.5 | B II, 354.5, 280 |
| | MeOH | B I, 351 | B II, 290 |
| | MeOH/NaOAc | B I, 351.5 | B II, 290 |
| | MeOH/NaOAc/H ₃ BO ₃ | B I, 352 | B II, 290.5 |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 2918; 2849; 1591; 1504; 1454; 1360; 1327; 1311; 1271; 1254; 1234; 1211; 1190; 1159; 1126; 1092; 1028; 1009; 974; 953; 908; 852; 827; 812; 773; 713; 704; 667; 644; 590. | | |
| HREIMS | [M] ⁺ a m/z 358.1052 (calculado para C ₁₉ H ₁₈ O ₇ 358.1053). | | |
| MS m/z (%): | 358 [M] ⁺ (100), 357 [M-1] ⁺ (50), 343 [M-15] ⁺ (42), 327 (13), 315 (48.5), 285 (6), 271 (4), 229 (2), 167 (8), 165 (17), 149 (14), 142 (3), 97 (5), 83 (6), 71 (10), 57 (16), 55 (10). | | |

TABLA 60B: R.M.N. ¹H de la Sustancia L5c (CDCl₃)

| Nº | δ H | Mul. | J, Hz | Int. | Nº | δ H | Mult. | J, Hz | Int. |
|----|------------|-------|-------|-------|----------|------------|-------|-----------|-------|
| 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | 1' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 2 | ----- | ----- | ----- | ----- | 2' | 7,72 | d | 1,22 | 1H |
| 3 | ----- | ----- | ----- | ----- | 3' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ----- | 4' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 5 | ----- | ----- | ----- | ----- | 5' | 7,00 | d | 8,52 | 1H |
| 6 | 6,36 | d | 1,39 | 1H | 6' | 7,76 | dd | 1,25; 8,5 | 1H |
| 7 | ----- | ----- | ----- | ----- | OH (5) | 12,65 | s | ----- | 1H |
| 8 | 6,45 | d | 1,46 | 1H | OMe (3) | 3,89 | s | ----- | 3H |
| 9 | ----- | ----- | ----- | ----- | OMe (7) | 3,87 | s | ----- | 3H |
| 10 | ----- | ----- | ----- | ----- | OMe (3') | 3,98 | s | ----- | 3H |
| | | | | | OMe (4') | 3,98 | s | ----- | 3H |

Acetilación de L5c: El compuesto L5c (20 mg) se disolvió en piridina (2 mL) y anhídrido acético (4 mL), y la solución fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente. El producto se secó a vacío para conseguir el compuesto L5d (19 mg) como una sustancia cristalina incolora.

**TABLA 61A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia L5d**

| | |
|--|---|
| Estado: | Sólido cristalino. |
| Punto de fusión: | 143-144°C y 159-162°C (Hex/AcOEt). |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 2926; 2849; 1769; 1631; 1604; 1514; 1445; 1392; 1360; 1327; 1271; 1217; 1151; 1082; 1043; 1022; 995; 980; 906; 889; 821; 769; 737; 696; 667; 623; 588. |
| HREIMS | [M] ⁺ a m/z 400.1158 (calculado para C ₂₁ H ₂₀ O ₈ 400.1158). |
| MS m/z (%): | 400 [M] ⁺ (54), 358 [M-42] ⁺ (100), 357 (71), 343 [M-42-15] ⁺ (56), 327 (17), 315 (49), 297 (6.5), 285 (6.5), 167 (9), 165 (13), 149 (15), 79 (2), 71 (4.5), 60 (3), 57 (8), 55 (5). |

TABLA 61B: R.M.N. ¹H de la Sustancia L5d (CDCl₃)

| Nº | δ H | Mult. | J, Hz | Int. | Nº | δ H | Mult. | J, Hz | Int. |
|----|-------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|----------|-------|
| 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | 1' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 2 | ----- | ----- | ----- | ----- | 2' | 7,68 | d | 1,96 | 1H |
| 3 | ----- | ----- | ----- | ----- | 3' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ----- | 4' | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 5 | ----- | ----- | ----- | ----- | 5' | 7,00 | d | 8,5 | 1H |
| 6 | 6,62 | d | 2,41 | 1H | 6' | 7,71 | dd | 2,1; 8,5 | 1H |
| 7 | ----- | ----- | ----- | ----- | OAc (5) | 2,48 | s | ----- | 3H |
| 8 | 6,84 | d | 2,41 | 1H | OMe (3) | 3,92 | s | ----- | 3H |
| 9 | ----- | ----- | ----- | ----- | OMe (7) | 3,81 | s | ----- | 3H |
| 10 | ----- | ----- | ----- | ----- | OMe (3') | 3,98 | s | ----- | 3H |
| | | | | | OMe (4') | 3,98 | s | ----- | 3H |

Sustancia L6: Sólido cristalino. Constantes físicas y espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **pulicanadienal B (C13)**, ver página 275).

Sustancia L7: Aceite incoloro. Constantes físicas y espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **pulicanadieno B (C4)**, ver página 264).

Sustancia L8: Aceite incoloro. Constantes físicas y espectroscópicas totalmente coincidentes con las de la sustancia **pulicanadienal A (C15)**, ver página 278).

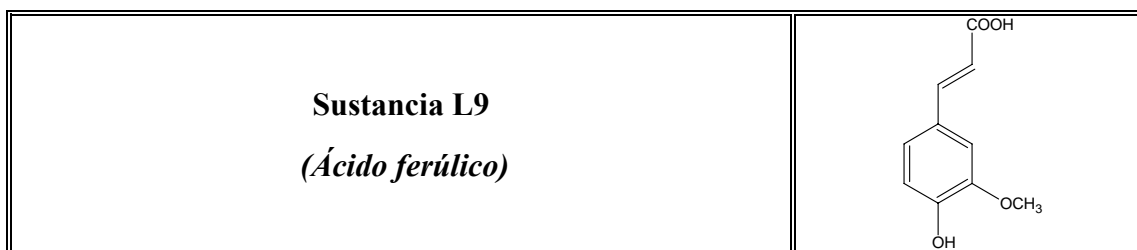


TABLA 62A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia L9

| | |
|--|--|
| Estado: | Sólido cristalino. |
| Punto de Fusión: | 171-173,5°C (MeOH) |
| IR (KBr) v máx (cm⁻¹): | 3348, 2924, 2852, 1726, 1599, 1514, 1462, 1379, 1273, 1180, 1124, 1074, 1034, 804. |
| EM m/z (%): | 194 [M] ⁺ (19), 179 [M-15] ⁺ (3), 149 [M-45] ⁺ (13), 129 (14), 105 (3), 97 (4), 86 (100), 73 (12), 57 (30). |

TABLA 62B: R.M.N. ¹H de la Sustancia L9 (CDCl₃)

| N° | δ H | Mul | J, Hz | Int | N° | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|-------|-------|----------|------|-----|-------|-------|-------|------|
| 1 | ----- | ----- | ----- | ---- | OMe | 3,96 | s | ----- | 3H |
| 2 | 7,07 | s | ----- | 1H | 8 | 6,31 | d | 15,88 | 1H |
| 3 | ----- | ----- | ----- | ---- | 9 | 7,72 | d | 15,88 | 1H |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ---- | 10 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 5 | 6,95 | d | 8,1 | 1H | OH | 5,92 | s br | ----- | 1H |
| 6 | 7,12 | dd | 1,9; 8,1 | 1H | | | | | |

Acetilación de L9: El compuesto **L9** (10 mg) se disolvió en piridina (1 mL) y anhídrido acético (2 mL), y la solución fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente. El producto se secó a vacío para conseguir el compuesto **L9a** (8 mg) como un sólido amorfo.

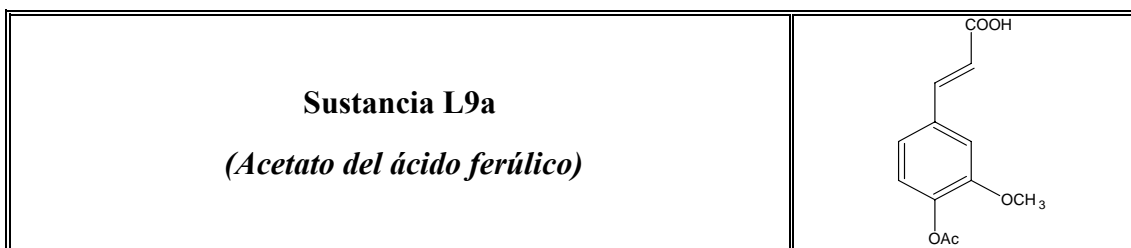


TABLA 63A: Datos Físicos y EM de la Sustancia L9a

| | |
|--------------------|---|
| Estado: | Sólido amorfo. |
| EM m/z (%): | 236 [M] ⁺ (4), 194 [M-42] ⁺ (100), 179 [M-42-15] ⁺ (11), 149 [M-42-45] ⁺ (10), 133 (9), 105 (7), 95 (9), 83 (7), 77 (8), 55 (15). |

TABLA 63B: R.M.N. ¹H de la Sustancia L9a (CDCl₃)

| Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|-------|-------|-------|------|-----|-------|-------|-------|------|
| 1 | ----- | ----- | ----- | ---- | OMe | 3,90 | s | ----- | 3H |
| 2 | 7,15 | s | ----- | 1H | 8 | 6,42 | d | 15,87 | 1H |
| 3 | ----- | ----- | ----- | ---- | 9 | 7,74 | d | 15,79 | 1H |
| 4 | ----- | ----- | ----- | ---- | 10 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 5 | 7,09 | d | 7,9 | 1H | OAc | 2,35 | s | ----- | 3H |
| 6 | 7,17 | d | 10,1 | 1H | | | | | |

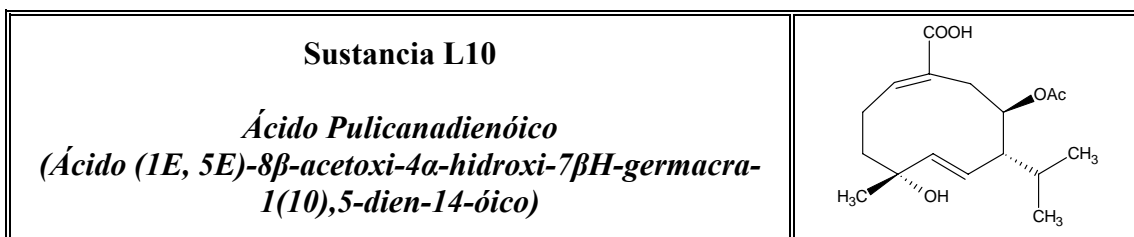


TABLA 64A: Datos Físicos, UV, IR y EM de la Sustancia L10

| | |
|--|--|
| Estado | Sólido cristalino. |
| Punto de Fusión | 198-200°C (Hex/AcOEt) |
| $[\alpha]_D^{20}$ | +71.4° (c. 0.042; CHCl ₃) |
| UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm (log ϵ): | 230. |
| IR (KBr) ν máx (cm⁻¹): | 3477, 3177, 2964, 2935, 2889, 1709, 1693, 1635, 1441, 1398, 1383, 1364, 1279, 1261, 1198, 1163, 1134, 1051, 1022, 983, 912, 881, 827, 735. |
| HRFABMS | [M+Na] ⁺ a m/z 333.1683 (calculado para C ₁₇ H ₂₆ O ₅ Na 333.1678). |
| MS m/z (%): | 250 [M-60] ⁺ (4), 235 [M-60-15] ⁺ (3), 232 [M-60-18] ⁺ (30), 207 (21), 204 (11), 189 (60), 161 (34), 137 (23), 123 (100), 109 (25), 95 (39), 81 (42), 71 (27), 55 (29). |

TABLA 64B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia L10 (CDCl₃)

| Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|------------|--------------|--------|----------------|----------|-----|---------------|--------------|--------|--------------|----------|
| 1 | 145,7 | 6,63 | m | ----- | 1H | 9 | 29,7 | 2,60 2,81 | m d | ----- 9,4 | 1H 1H |
| 2 | 24,6 | 2,60 | m | ----- | 2H | 10 | 147,6 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 3 | 37,2 | 1,73 1,98 | m m | ----- ----- | 1H 1H | 11 | 27,5 | 2,20 | m | ----- | 1H |
| 4 | 73,8 | ----- | ----- | ----- | --- | 12 | 21,2 | 0,83 | d | 6,6 | 3H |
| 5 | 141,3 | 5,23 | m | ----- | 1H | 13 | 16,8 | 0,81 | d | 6,8 | 3H |
| 6 | 128,8 | 5,23 | m | ----- | 1H | 14 | 174,2 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 7 | 54,6 | 1,71 | m | ----- | 1H | 15 | 28,9 | 1,35 | s | ----- | 3H |
| 8 | 70,1 | 4,99 | s br | ----- | 1H | OAc | 21,0 170,6 | 2,05 | s | ----- | 3H |

Metilación del Compuesto L10: Al compuesto L10 (4 mg) en dietil éter (5 mL) se le añadió un exceso de diazometano en dietil éter, recién preparado, y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 12 h. La concentración de la mezcla de reacción a vacío produjo el compuesto L10a (3 mg), como aceite incoloro.

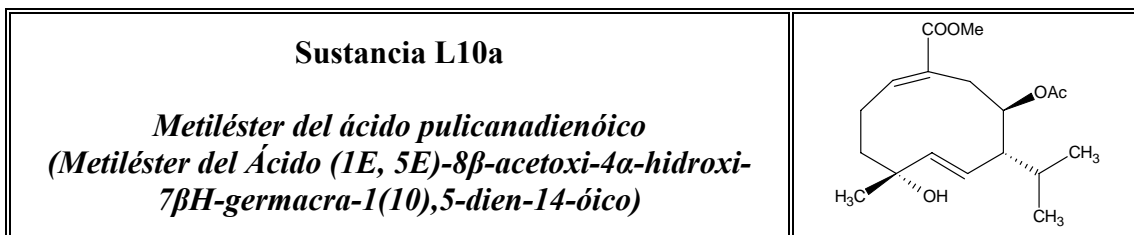


TABLA 65A: Datos Físicos, IR y EM de la Sustancia L10a

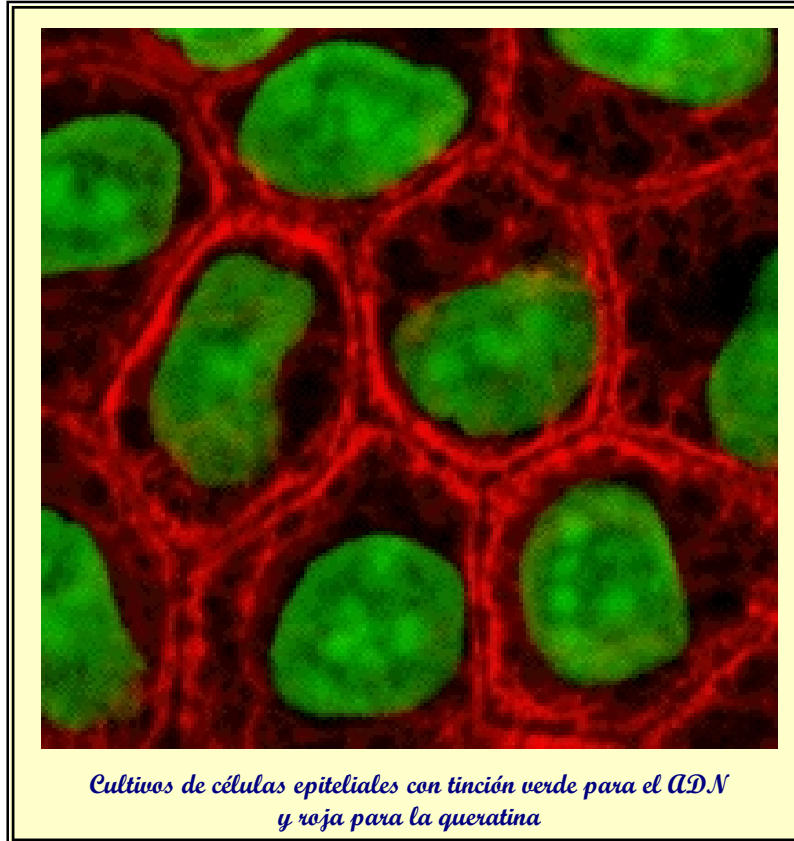
| | |
|---|--|
| Estado | Aceite incoloro. |
| IR (film) v máx (cm⁻¹): | 3478, 2954, 1739, 1712, 1641, 1436, 1376, 1290, 1255, 1234, 1163, 1050, 1025. |
| HRFABMS | [M+Na] ⁺ a m/z 347.1827 (calculado para C ₁₈ H ₂₈ O ₅ Na 347.1834). |
| FABMS m/z (%): | 347 [M+Na] ⁺ (100), 325 [M+1] ⁺ (7), 265 [M-60+1] ⁺ (6), 247 [M-60-17] ⁺ (17), 233 (15), 205 (8), 191 (13), 187 (13), 147 (7), 115 (22), 105 (12), 91 (30), 81 (9), 69 (9), 55 (10). |

TABLA 65B: R.M.N. ¹H y ¹³C de la Sustancia L10a (CDCl₃)

| Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int | Nº | δ C | δ H | Mul | J, Hz | Int |
|----|-------|---------------|------------|-----------|-----------|-----|---------------|--------------|--------|---------------|----------|
| 1 | 141,6 | 6,45 | s br | ----- | 1H | 9 | 29,7 | 2,65 2,81 | m d | ----- 15,0 | 1H 1H |
| 2 | 24,4 | 2,28 2,65 | m m | ----- | 1H 1H | 10 | 145,1 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 3 | 31,7 | 1,70 ----- | m ----- | ----- | 1H --- | 11 | 27,5 | 2,10 | m | ----- | 1H |
| 4 | 73,7 | ----- | ----- | ----- | --- | 12 | 21,2 | 0,81 | d | 6,6 | 3H |
| 5 | 127,5 | 5,22 | d | 10,0 | 1H | 13 | 16,8 | 0,79 | d | 6,7 | 3H |
| 6 | 120,1 | 5,24 | dd | 10,0;15,0 | 1H | 14 | 170,6 | ----- | ----- | ----- | ---- |
| 7 | 51,7 | 1,86 | m | ----- | 1H | 15 | 30,0 | 1,31 | s | ----- | 3H |
| 8 | 70,6 | 5,00 | s br | ----- | 1H | OAc | 20,7 170,9 | 2,05 | s | ----- | 3H |
| | | | | | | OMe | | 3,73 | s | ----- | 3H |



5. ESTUDIO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA



5.1 PARTE TEÓRICA

Como comentamos en la Introducción General de esta Memoria de Tesis Doctoral, muchos metabolitos secundarios presentan prometedoras propiedades relativas a su actividad biológica, especialmente en los casos de las lactonas sesquiterpénicas (actividades antiinflamatorias, citoprotectoras, antitumorales, antimicrobianas, ...), los compuestos flavonoides (efectos anti-inflamatorios, prometedores agentes anti-cancerígenos, gran capacidad antioxidante, ...) y los triterpenos (actividades antitumorales y antivirales, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, gastroprotectoras, antimicrobianas, ...). Por eso, nos planteamos como un objetivo de interés el tratar de investigar las propiedades de actividad biológica para aquellos compuestos de naturaleza sesquiterpenoide, triterpenoide o flavonoide que pudiéramos aislar en nuestro estudio de las especies canarias de los géneros *Tolpis* y *Pulicaria*.

Nuestro Grupo de Investigación, en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Francisco Estévez Rosas del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha venido desarrollando el estudio de la actividad citotóxica de diversos productos aislados de fuente vegetal, centrandó la investigación en el efecto citotóxico inducido en la línea de células leucémicas humanas HL-60.

Los estudios previos acerca de la utilización de productos naturales en la lucha contra las células cancerígenas, se centran en sus efectos sobre diferentes aspectos de la apoptosis celular¹²¹. La apoptosis, o muerte celular programada, es una forma de suicidio celular que ejerce un papel central en el desarrollo normal, la homeostasis y la respuesta defensiva frente a los patógenos, por parte de los organismos multicelulares¹²². Este tipo de muerte celular se cree que es una importante respuesta a la mayoría de los agentes quimioterapéuticos en las células leucémicas^{123, 124}. Los estudios previos han demostrado que las señales apoptóticas producen la liberación de citocromo C desde las mitocondrias al citoplasma¹²⁵, el cual es capaz de activar algunas de las caspasas (por ejemplo, la caspasa-9 que a su vez activa la caspasa-3, una de las

121. Makin, G. and Dive, D. "Recent advances in understanding apoptosis: new therapeutic opportunities in cancer chemotherapy". Trends Mol. Med. (2003), 9 (6), 251-255.

122. Ameisen, J.C. "On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years". Cell Death Differ. (2002), 9, 367-393.

123. Dive, C. and Hickman, J.A. "Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death?". British J. Cancer (1991), 64 (1), 192-196.

124. Hickman, J.A. "Apoptosis induced by anticancer drugs". Cancer Metastasis Rev. (1992), 121-139.

125. Cain, K., Bratton, S.B. and Cohen, G.M. "The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex". Biochimie (2002), 84, 203-214.

principales caspasas ejecutoras), que son una familia de proteasas que actúan de manera esencial en la apoptosis¹²⁶. Está admitido que la muerte celular por apoptosis viene caracterizada por la pérdida de la capacidad proliferativa celular, por el daño en el ADN y por profundas alteraciones de la morfología celular, lo que permite su determinación mediante microscopía de fluorescencia y por fragmentación del ADN.

El procedimiento seguido para el estudio de la actividad citotóxica de las sustancias de origen vegetal estudiadas, se basa en primer lugar en la determinación de la capacidad de inhibición del crecimiento y viabilidad de cultivos de células leucémicas humanas HL-60, mediante el ensayo **MTT**, consistente en la estimación de la supervivencia celular basada en la capacidad para metabolizar el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a cristales de formazano¹²⁷. Este ensayo, en esencia, permite medir la función respiratoria mitocondrial mediante la reducción del colorante MTT, y por tanto puede detectar el comienzo de la muerte celular antes que los métodos de exclusión. El proceso se inicia con el cultivo celular en fase exponencial que se siembra con disoluciones de los productos vegetales a diferentes concentraciones, durante 24 horas, para seguidamente medir la viabilidad celular mediante la densidad óptica a 570 nm, y calcular la supervivencia celular como la fracción de células vivas relativa a un control en cada punto (absorbancia media en las células tratadas respecto a la absorbancia media en el control). Los resultados se expresan en términos del parámetro **IC₅₀** o concentración inhibidora del 50%¹²⁸, lo que nos permite deducir la bondad de la actividad citotóxica de una sustancia en función de si los valores de ese parámetro son más o menos bajos. Por ejemplo, un valor bajo de **IC₅₀** nos informa de una buena capacidad citotóxica para una determinada sustancia, ya que se consigue la inhibición del crecimiento del 50% de las células a concentraciones reducidas del agente químico.

Además, para el análisis y confirmación de los efectos de las sustancias vegetales objeto de estudio sobre el crecimiento celular y la activación de la apoptosis,

126. Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. "*Caspases: enemies within*". Science (1998), 281, 1312-1316.

127. Mossman, T. "*Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*". J. Immunol. Methods (1983), 65, 55-63.

128. De Lean, A.; Munson, P.J.; Todbard, D. "*Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay and physiological-dose response curves*". Am. J. Physiol. (1978), 235 (2), E97-E102.

se utilizaron otras técnicas adicionales. La primera de estas técnicas es la microscopía fluorescente, en cuyo caso el cultivo celular se desarrolla en un ambiente específico, con una serie de reactivos^{129, 130}, para seguidamente tomar pequeños volúmenes que se sitúan sobre placas de vidrio para su análisis bajo microscopio fluorescente en busca de núcleos celulares anormales indicativos de procesos apoptóticos. La segunda de estas técnicas es el análisis por citometría de flujo, en el que se somete el cultivo celular a un tratamiento específico³¹, para obtener un histograma de medidas de formación de ADN hipodiploide que nos ofrece información de los cambios en el contenido del ADN celular asociados con la apoptosis. La tercera de las técnicas adicionales consiste en el análisis de degradación de la poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1)^{31, 131}, un paso clave de la apoptosis que indica la activación de las caspasas. El PARP-1 es un enzima que cataliza la transferencia del ADP desde su sustrato (el NAD⁺) a un número limitado de proteínas involucradas en la estructura de la cromatina o en el metabolismo del ADN, y su inactivación hace imposible la reparación del ADN, por lo que en este análisis se deben observar dos bandas que se corresponden, respectivamente, con el remanente de proteína PARP-1 intacta y con una fracción apoptótica. Por último, para definir qué caspasas están implicadas durante la apoptosis inducida por las sustancias vegetales estudiadas, se procede al análisis de la actividad enzimática de lisados de células HL-60 sobre sustratos tetrapeptídicos específicos para la caspasa-3 y la caspasa-8^{31, 131}.

a) Actividad citotóxica de sesquiterpenos:

En primer lugar, sometimos a investigación sobre su posible actividad citotóxica frente a la línea de células tumorales humanas HL-60 a una serie de sesquiterpenos aislados de *Pulicaria canariensis*, concretamente las sustancias **C3 (pulicanaral A)**, **C5 (pulicanaral B)**, **C12a (triacetato de pulicanona)**, **C19a (diacetato de pulicanol)**

129. Kaufmann, S.H.; Desnoyers, S.; Ottaviano, Y.; Davidson, N. and Poirier, G.G. "Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis". *Cancer Res.* (1993), 53, 3976-3985.

130. Schwartz, G.K.; Farsi, K.; Maslak, P.; Kelsen, D.P. and Spriggs, D. "Potentiation of apoptosis by flavopiridol in mitromycin-C-treated gastric and breast cancer cells". *Clin. Cancer Res.* (1997), 3 (9), 1467-1472.

131. Benyahia, S.; Benayache, S.; Benayache, F.; Quintana, J.; López, M.; León, F.; Hernández, J.C.; Estévez, F. and Bermejo, J. "Isolation from *Eucalyptus occidentalis* and identification of a new kaempferol derivative that induces apoptosis in human myeloid leukemia cells". *J. of Natural Products* (2004), 67 (4), 527-531.

y **C21 (pulioplopanona)**. El ensayo MTT nos permitió concluir que todos los componentes ensayados eran débilmente citotóxicos a esta línea de células, mostrando valores de concentración inhibidora del 50% (IC_{50}) que oscilaban entre 20 y 298 μM (ver **Tabla 66**). El **triacetato de la pulicanona (C12a)** demostró ser el compuesto más potente, con un valor de IC_{50} entre 6 y 15 veces menor que el de **C3** y de **C19a**, respectivamente.

| SESQUITERPENOS | IC_{50} (μM) |
|---------------------------------|-----------------------|
| Pulicanaral A (C3) | 115 \pm 18 |
| Pulicanaral B (C5) | 264 \pm 6 |
| Triacetato de Pulicanona (C12a) | 20 \pm 7 |
| Diacetato de Pulicanol (C19a) | 298 \pm 22 |
| Pulioplopanona (C21) | 242 \pm 80 |

Tabla 66: Efecto de sesquiterpenos aislados de *Pulicaria canariensis* en el crecimiento de cultivo de células HL-60.

Para saber si el compuesto **C12a** disminuye la viabilidad celular a través de la activación de la apoptosis, se analizaron y cuantificaron mediante microscopía fluorescente los cambios morfológicos característicos de las células apoptóticas (i.e., cromatina condensada y fragmentada). El porcentaje de células apoptóticas se incrementó como respuesta a dosis en relación a **C12a**, como se demuestra en la **figura 101**.

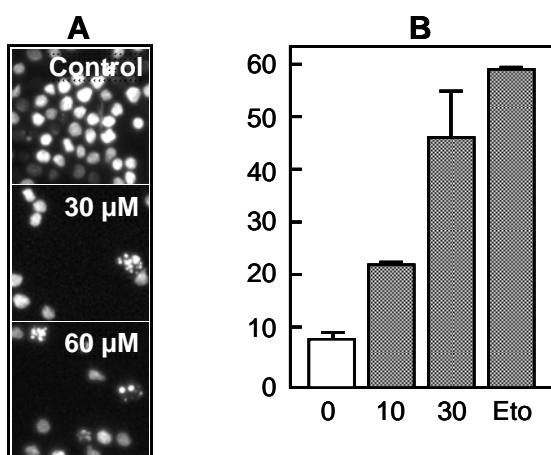


Figura 101. Inducción de apoptosis en células HL-60 en respuesta al derivado de la pulicanona **C12a**.

(A) Las células fueron cultivadas durante 12 h en ausencia (control) o presencia de las dosis indicadas de **C12a** y después teñidas con Hoechst 33258 para evaluar la condensación de la cromatina nuclear.

(B) Análisis cuantitativo de células apoptóticas por microscopía fluorescente; se utilizó etopósido (Eto, 10 μM) como control positivo. Se muestran los resultados de un experimento representativo, y cada punto representa el promedio de determinaciones por triplicado. En abscisas la concentración de **C12a** (μM) y en ordenadas el % de células apoptóticas.

Por otro lado, el análisis de flujo citométrico de células HL-60 incubadas con **C12a** (30 μM , 12 h) indica que la transición de las células de la región diploide a la hipodiploide (i.e. células apoptóticas) ocurre con la acumulación de células en la fase G-1 del ciclo celular. En concordancia con la inducción de la apoptosis, las células HL-60 también respondieron a **C12a** con la activación de la caspasa-3 y la caspasa-8 (**Figura 102**) y de desactivación de PARP-1 (**Figura 103**).

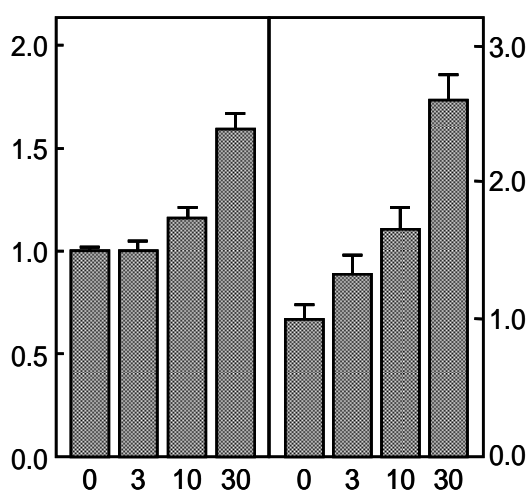


Figura 102. El derivado de la pulicanona **C12a** induce la activación de las caspasas-3/8. Las células HL-60 fueron cultivadas en presencia de concentraciones crecientes del compuesto **C12a** y recolectadas a las 12 h. Los lisados celulares totales fueron obtenidos y utilizados para determinar las actividades de la caspasa-3 y la caspasa-8. Se muestran también los resultados de un experimento representativo realizado por duplicado y expresado como un incremento de X-veces de la actividad de la caspasa respecto al control. En abscisas la concentración del compuesto **C12a** (μM) y en ordenadas las actividades de las caspasas (caspasa-3 a la izquierda y caspasa-8 a la derecha).

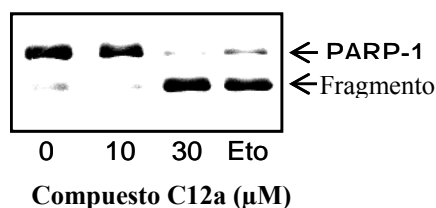


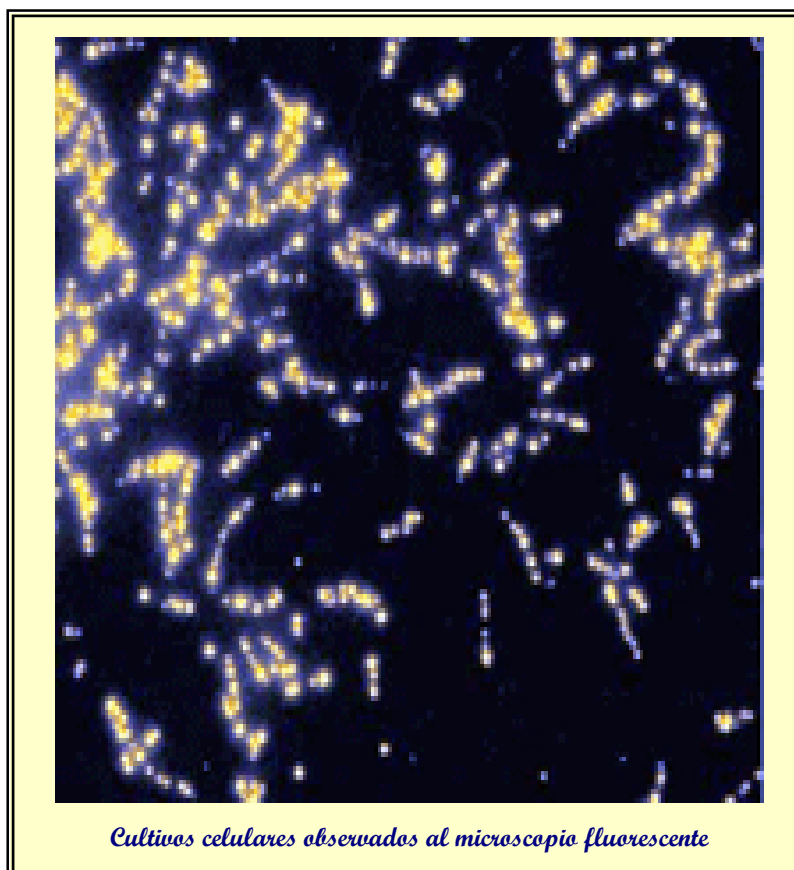
Figura 103. El derivado de la pulicanona **C12a** induce la desactivación de la poli(ADP-ribosa)polimerasa-1 (PARP-1) en las células HL-60. Las concentraciones indicadas de **C12a** se añadieron a las células durante 12 horas y los lisados celulares totales fueron analizados entonces por inmunoblot con anticuerpo anti-PARP-1. Se incluyó etopósido (Eto, 10 μM) como control positivo.

b) Actividad citotóxica de triterpenos:

Otro grupo de compuestos que sometimos a investigación sobre su posible actividad citotóxica es el de algunos triterpenos, aislados principalmente de las dos especies del género *Tolpis* (*Tolpis webbii* y *Tolpis sp.*) y de *Pulicaria burchardii*. Concretamente analizamos la actividad de las sustancias **W2** (**3 β -hidroxilup-20(29)-en-30-al**), **W2a** (**3 β -acetoxilup-20(29)-en-30-al**), **W7** (**21 α -hidroxitaraxasterol**), **W7a** (**diacetato de 21 α -hidroxitaraxasterol**), **W8** (**lup-20(29)-en-3 β ,30-diol**), **W8a** (**3 β ,30-diacetoxilup-20(29)-eno**), **W9** (**21 α ,22 α -epoxi-20 α -hidroxi-20(30)-dihidrotaraxasterol**), **T1** (**3 β -acetoxi-21 α ,22 α -epoxi-20 α -hidroxi-20(30)-dihidrotaraxasterol**), **T3** (**21 α ,22 α -epoxitaraxasterol**), **T3a** (**acetato de 21 α ,22 α -epoxitaraxasterol**), **T7a** (**3 β ,22 α -diacetoxitaraxaster-20-en-30-al**), **T10** (**Peróxido de Ergosterol**) y **B7** (**3 β -hidroxitaraxaster-20-en-30-al**). El ensayo MTT nos permitió concluir que todos esos componentes eran débilmente citotóxicos a esta línea de células, mostrando valores de concentración inhibidora del 50% (IC₅₀) por encima de 100 μ M.

c) Actividad citotóxica de flavonoides:

El último grupo de compuestos que sometimos a investigación sobre su posible actividad citotóxica es el de los flavonoides, aislados exclusivamente de las dos subespecies de *Pulicaria canariensis*. Concretamente analizamos la actividad de la sustancia **L5** (**5,7-dihidroxi-3,3',4'-trimetoxiflavona**) y de sus derivados monoacetilado (**L5a**), diacetilado (**L5b**), monometilado (**L5c**) y el acetato del derivado monometilado (**L5d**). El ensayo MTT nos permitió concluir que todos esos componentes eran débilmente citotóxicos a esta línea de células, mostrando valores de concentración inhibidora del 50% (IC₅₀) por encima de 20 μ M. El componente que mostró una mayor actividad citotóxica fue el derivado diacetilado de **L5** (**L5b**) con un valor de IC₅₀ de 20 μ M, junto con el derivado monoacetilado de **L5** (**L5a**) que mostró un valor de IC₅₀ de 30 μ M.



5.2 PARTE EXPERIMENTAL

Cultivo celular

La línea celular leucémica promielocítica humana HL-60 se cultivó en RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal inactivado por calor, penicilina (100 unidades/mL) y estreptomycin (10 µg/mL) en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ y temperatura de 37°C. Los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y las disoluciones stock se almacenaron a -20°C. Posteriores diluciones de las muestras de sustancias vegetales se realizaron en medio de cultivo justo antes de su uso. En todos los experimentos, la concentración final de DMSO no excedió el 1% (v/v), concentración que no es tóxica para las células.

Ensayos de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron usando el ensayo de MTT. Las células (1×10^4 / pocito) se expusieron a diferentes concentraciones de los compuestos en placas de 96 pocitos durante 72 horas a 37°C. Los compuestos se añadieron disueltos en DMSO y los controles contenían la misma cantidad de DMSO. Como se explicó en la parte teórica, la supervivencia celular se detectó basándose en la capacidad para metabolizar el MTT a cristales de formazano, utilizando la densidad óptica a 570 nm como una medida de la viabilidad celular. La supervivencia celular se calculó como la fracción de las células vivas respecto al control de cada punto como supervivencia celular (%) = absorbancia media en pocitos tratados / absorbancia media en pocitos control \times 100. Las concentraciones que inducen un 50% de inhibición del crecimiento celular (IC₅₀) se determinaron gráficamente para cada experimento usando el programa informático Prism 2.0 (GraphPad) y la ecuación derivada por De Lean y colaboradores.

Microscopía de fluorescencia cuantitativa

Las células se fijaron en paraformaldehído al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se tiñeron con 10 µg/mL de trihidrocloruro de bisbencimida (Hoerchst 33258) durante 30 minutos a 37°C antes del análisis por microscopía de fluorescencia. Las células apoptóticas se identificaron por su cromatina fragmentada. Los núcleos teñidos con la cromatina condensada o los núcleos

fragmentados en cuerpos múltiples y densos se consideraron como apoptóticos. Los núcleos con la cromatina no condensada y dispersa se consideraron como no apoptóticos. Se contaron un mínimo de 500 células de cada muestra, y cada experimento se realizó por triplicado.

Análisis por citometría de flujo

Se estudiaron los cambios en el contenido de ADN celular mediante histogramas de las medidas de formación de ADN hipodiploide, que se obtuvieron mediante citometría de flujo utilizando un citómetro Coulter EPICS (Beckman Coulter). Los histogramas se analizaron con el programa Expo 32 ADC (Beckman Coulter). La células HL-60 ($\sim 1 \times 10^6$) se centrifugaron durante 10 minutos a $500 \times g$, se lavaron con 1 mL de PBS y se resuspendieron en 50 μ L de PBS. A continuación se añadió gota a gota 1 mL de etanol al 75% enfriado, y las células fijadas se almacenaron durante 1 hora a -20°C . A continuación las muestras se centrifugaron a $500 \times g$ durante 10 minutos a 4°C y se lavaron con PBS antes de resuspensión en 1 mL de PBS conteniendo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de yoduro de propidio y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNasa A, e incubación durante 1 hora a 37°C en la oscuridad. Se hizo recuento del porcentaje de células con ADN manchado decreciente, compuesto por células apoptóticas resultantes tanto de la fragmentación como de la disminución de la cromatina, de un mínimo de 10.000 células por condición experimental.

Análisis de transferencia Western de poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP-1)

Las células HL-60 ($\sim 1 \times 10^6$) se trataron con las sustancias vegetales a la concentración indicada durante diferentes periodos de tiempo a 37°C . Se prepararon los lisados celulares en una disolución tampón que contenía HEPES 20 mM (pH 7,4), NaCl 250 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Nonidet P-40 0,1%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, leupeptina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, aprotinina y pepstatina A. Los materiales insolubles se eliminaron por centrifugación a $10.000 \times g$ durante 10 minutos. Las proteínas extraídas (50 $\mu\text{g}/\text{pocito}$) se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico al 7,5%, y se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF Immobilon-P de Millipore. La carga y la transferencia de

cantidades iguales de proteínas se confirmaron por tinción de la membrana con Ponceau S. Las membranas se bloquearon con 5% de leche desnatada en tampón Tris salino conteniendo 0,1% de Tween-20 (TBST) durante 1 hora, seguido por incubación con el anticuerpo monoclonal anti-PARP (BD-PharMingen; dilución 1:1.000 en TBST suplementado con 3% de leche desnatada) durante toda la noche. Después del lavado e incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP, Amersham Pharmacia Biotech), los complejos antígeno-anticuerpo se visualizaron por quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) usando el protocolo del fabricante. La aparición de una banda de 85-kd se usó como medida de la apoptosis.



6. TÉCNICAS GENERALES E INSTRUMENTACIÓN

1. Técnicas Cromatográficas

1.1. Cromatografía en columna

Para las columnas generales de cada planta se utilizó como fase estacionaria gel de sílice tipo 0,02-0,5 mm 60G de la casa Merck. La preparación de las columnas se efectuó mezclando la gel en suspensión con n-hexano, para rellenarlas seguidamente con esta mezcla que se compactaba mediante el paso de la fase móvil.

Para las columnas secas intermedias se utilizó como fase estacionaria gel de sílice tipo 0,02-0,5 mm 60G de la casa Merck. Las columnas se prepararon rellenándolas con la fase estacionaria en seco y posterior compactación mediante el flujo de n-hexano.

Para las columnas de media presión se utilizó como fase estacionaria gel de sílice tipo 70-230 mesh, grado 9385 60A de la casa Merck. La preparación de las columnas se efectuó mezclando la gel con la fase móvil, rellenando la columna con esta mezcla y procediendo a compactarla mediante la circulación de la fase móvil.

1.2. Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas cromatográficas de soporte de aluminio con fase estacionaria de gel de sílice de la casa Merck 60F₂₅₄ 0.2 mm. Para el revelado se procedió a la pulverización con una disolución de H₂SO₄-H₂O-Ac₂O en proporción (1:4:20) y posterior calentamiento a 120°C durante varios minutos, seguido de exposición a luz ultravioleta de 254 nm y 356 nm.

1.3. Cromatografía preparativa

Se utilizaron placas de gel de sílice de 1 mm de espesor de la casa Merck 60PF₂₅₄₊₃₆₆, siendo eluidas en los disolventes que se indican en cada caso.

2. Otras Técnicas

Para la obtención de los derivados acetilados se procedió, salvo que se indique lo contrario, al tratamiento con anhídrido acético y piridina a temperatura ambiente (18-25°C) durante doce horas. La manera usual de extracción consistió en el vertido de la mezcla resultante del tratamiento anterior sobre agua helada, y posterior extracción con el disolvente orgánico indicado. A continuación se somete la fase orgánica resultante a lavados sucesivos con solución acuosa de ácido clorhídrico al 5%, solución de hidrógenocarbonato sódico al 5%, y agua. Posteriormente se seca la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, para finalizar con una filtración y eliminación del disolvente orgánico a presión reducida.

3. Disolventes

Los disolventes utilizados en los procesos de purificación de las sustancias (n-hexano, acetato de etilo, acetona, benceno, metanol) fueron previamente secados y posteriormente destilados.

4. Material Vegetal

Las especies estudiadas fueron recolectadas en las fechas y lugares que se indican en cada caso, habiendo sido clasificadas por la Dra. Rosa Febles Hernández del Jardín Botánico Canario “Viera y Clavijo” de Las Palmas de Gran Canaria, y el Dr. Pedro Luis Pérez de Paz del Departamento de Biología Vegetal (Botánica) en la Facultad de Farmacia de la Universidad de La Laguna, encontrándose en los herbarios de dichos centros muestras de las mismas.

5. Instrumentación

5.1. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se obtuvieron a partir de espectrofotómetros Bruker Avance 300, Avance 400 y AMX 500, empleando para las disoluciones de las sustancias cloroformo deuterado, salvo que se indique otra cosa, y

tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. Los experimentos bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC, ROESY y NOESY) se realizaron en los espectrofotómetros antes mencionados utilizando programas convencionales suministrados por la casa Bruker.

5.2. *Espectroscopia Infrarroja*

Los espectros de infrarrojo fueron realizados en dos espectrofotómetros: Bruker IFS 55 y Perkin-Elmer mod. FTIR-8400S. Se utilizaron células de 0,1 mm de cloruro de sodio, preparando las muestras en disolución de cloroformo y aplicación en film, con nujol y en pastillas de bromuro potásico. Los valores de $\nu_{\text{máx}}$ se expresan en cm^{-1} .

5.3. *Espectroscopia Ultravioleta*

Los espectros de ultravioleta se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240, empleando celdas de cuarzo de 5 mm. Como disolvente se utilizó metanol. Los valores de $\lambda_{\text{máx}}$ se expresan en nm.

5.4. *Espectrometría de Masas*

Los espectros de masas se realizaron mediante técnicas de ionización por impacto electrónico (EI) o ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB) a 70 eV, en un espectrómetro Fisons VG Micromass modelo VG Autospec. En el caso de los FAB (modo positivo) se utilizó como matriz el alcohol 3-nitrobencílico.

5.5. *Puntos de Fusión*

Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Gallenkamp, los valores obtenidos se expresan en grados centígrados y están sin corregir.

5.6. *Rotación Óptica*

La actividad óptica se determinó en un polarímetro Perkin Elmer, modelo 343, empleando la línea D del sodio a 25°C y en disolución de cloroformo seco en células de 1 dm. La concentración se expresa en g/100 mL de disolución.



7. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | | | |
|---------------------|---|---------------------|---|
| [α] | Rotación específica | HMBC | Experimento de RMN de acoplamiento C-H a larga distancia |
| Ac ₂ O | Anhídrido acético | HREIMS | Espectrometría de masas de alta resolución (EIMS) |
| AcOEt | Acetato de etilo | HRFABMS | Espectrometría de masas de alta resolución (FABMS) |
| AcOH | Ácido acético | ¹ H RMN | Resonancia magnética nuclear de protón |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico | HSQC | Experimento de RMN de acoplamiento C-H a corta distancia |
| ADP | Adenosín difosfato | Hz | Herzios |
| c | Concentración | IC ₅₀ | Concentración inhibitoria al 50% de individuos analizados |
| CCP | Cromatografía en capa fina | Int | Integral |
| COSY | Experimento RMN (correlación escalar protón-protón) | IR | Espectroscopia infrarroja |
| ¹³ C RMN | Resonancia magnética nuclear de carbono | J | Constante de acoplamiento |
| d | Doblete | kg | Kilogramos |
| dd | Doble doblete | Liebermann-Burchard | Cloroformo, anhídrido acético y ácido sulfúrico |
| ddd | Doble doblete | min | Minutos |
| D.E.P.T. | Espectros de RMN de carbono con transferencia de polarización (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) | mg | Miligramos |
| DMF | Dimetil formamida | mL | Mililitros |
| DMSO | Dimetil sulfóxido | mm | Milímetros |
| dt | Doble triplete | mM | Milimolar |
| DTT | Ditiotreitolo | MTT | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio |
| EDC | Hidrocloruro de 1-etil-(3-di metilaminopropil)-3-etil carbodiimida | Mul / Mult | Multiplicidad |
| EDTA | Ácido etilendiamino tetraacético | nm | Nanómetros |
| EGTA | Ácido etilenebis(oxonitrilo) tetraacético | NOESY | Experimento de RMN de correlación espacial protón-protón |
| EIMS | Espectrometría de masas de impacto electrónico | °C | Grados Celsius |
| EM | Espectrometría de masas | PBS | Solución buffer de fosfatos |
| Eto | Etopósido | PCC | Clorocromato de piridinio |
| eV | Electrónvoltio | PARP-1 | Poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 |
| FABMS | Espectrometría de masas por bombardeo de átomos rápidos | p.f. | Punto de fusión |
| g | Gramo | PVDF | Membrana de polivinil dieno difluoruro |
| h | Hora | q | Cuarteto |
| HEPES | Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazine etanosulfónico | RMN | Resonancia magnética nuclear |
| Hex | Hexano | | |

| | | | |
|-------|---|------------------------|-----------------------------|
| ROESY | Rotating Overhauser effect spectroscopy (correlación espacial protón-protón) | UV | Espectroscopía ultravioleta |
| s | Singulete | δ | Desplazamiento químico |
| sp. | Especie | $\lambda_{\text{máx}}$ | Longitud de onda máxima |
| ssp. | Subespecie | μg | Microgramos |
| t | Triplete | μL | Microlitros |
| TBST | Tampón TBST: Tris Buffer salino Conteniendo Tris 50 mM -6,05 g/L-, NaCl 140 mM -8,20g/L- conteniendo 0,5% Tween 20 | μM | Micromolar |
| THF | Tetrahidrofurano | ν | Frecuencia |
| Tris | 2-amino-2-hidroximetilpropano- 1,3-diol | | |



8. CONCLUSIONES

1. Se hace una revisión bibliográfica de las especies del Género *Tolpis*, encontrando que los únicos estudios realizados sobre este Género han sido de tipo taxonómico, con una ausencia total de estudios fitoquímicos de las especies, salvo en el caso de *T. virgata* de la que se han estudiado sus aceites esenciales.
2. Se hace un estudio fitoquímico de la especie *Tolpis webbii*, endémica de las Islas Canarias, recogida en Tenerife (El Portillo), habiéndose aislado e identificado las siguientes sustancias: **estigmasterol (W1)**, **3 β -hidroxilup-20(29)-en-30-al (W2)**, **escopoletina (W3)**, **2,4'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona (W4)**, **11-oxo- β -amirina (W5)**, **vainillina (W6)**, **21 α -hidroxitaraxasterol (W7)**, **lup-20(29)-en-3 β ,30-diol (W8)**, **21 α ,22 α -epoxi-20 α -hidroxi-20(30)-dihidrotaraxasterol (W9)**, **7-oxo-estigmasterol y 7-oxo-sitosterol (W10)**, **β -D-glucósido de β -amirina (W11)** y **β -D-glucósido de β -sitosterol (W12)**.
3. Se hace un estudio fitoquímico de la especie *Tolpis sp.*, recogida en La Palma (Montaña Tagoja), habiéndose aislado e identificado las siguientes sustancias: **3 β -acetoxi-21 α ,22 α -epoxi-20 α -hidroxi-20(30)-dihidrotaraxasterol (T1)**, **β -amirina (T2)**, **21 α ,22 α -epoxitaraxasterol (T3)**, **21 α ,22 α -epoxi-20 α -hidroxi-20(30)-dihidrotaraxasterol (T4)**, **2,4'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona (T5)**, **21 α -hidroxitaraxasterol (T6)**, **3 β ,22 α -dihidroxitaraxaster-20-en-30-al (T7)**, **ácido 3 β -hidroxitaraxaster-20-en-30-óico (T8)**, **lup-20(29)-en-3 β ,30-diol (T9)**, **peróxido de ergosterol (T10)** y **β -D-glucósido de β -amirina (T11)**.
4. Se procedió a la formación de diversos derivados de las sustancias **W2**, **W7**, **W9**, **W10**, **T3**, **T8** y **T10**, aportando datos complementarios para la elucidación estructural de dichas sustancias.
5. De las sustancias identificadas en los apartados anteriores son nuevas en la bibliografía consultada las siguientes: **2,4'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona (W4=T5)**, **21 α ,22 α -epoxi-20 α -hidroxi-20(30)-dihidrotaraxasterol (W9=T4)** y **ácido 3 β -hidroxitaraxaster-20-en-30-óico (T8)**.
6. De los resultados obtenidos en el estudio de las dos especies del Género *Tolpis* se deduce la presencia de una elevada proporción de sustancias de naturaleza triterpénica, con esqueletos predominantes de tipo ursano, oleanano y lupano, no

presentando sustancias terpénicas de otro tipo, y destacando la ausencia de lactonas sesquiterpénicas, lo que parece apuntar a una diferenciación de este género respecto a otros géneros de la Familia *Compositae*, donde se observa la predominancia de sustancias de este tipo como un indicador taxonómico muy importante, tal y como se comentó en la Introducción General a esta Memoria de Tesis.

7. Se hace una revisión bibliográfica de las diferentes especies del Género *Pulicaria* ya estudiadas, en función de los tipos de compuestos presentes como sesquiterpenos y lactonas sesquiterpénicas, diterpenos, triterpenos o flavonoides.
8. Se observa que tan sólo cuatro especies (*P. crispa*, *P. laciniata*, *P. sicula* y *P. undulata*) presentan lactonas sesquiterpénicas, principalmente de tipo eudesmanolido, guayanolido y xantanolido, siendo utilizado este hecho como base para la propuesta de segregación de estas especies respecto al resto del Género *Pulicaria*, en un nuevo Género denominado *Francoeuria*.
9. Se hace un estudio fitoquímico de la especie *Pulicaria burchardii*, recogida en Fuerteventura (La Pared), habiéndose aislado e identificado las siguientes sustancias: **estigmasterol (B1)**, **11-oxo- α -amirina (B2)**, **ácido 4-hidroxi-benzóico (B3)**, **vainillina (B4)**, **escopoletina (B5)**, **β -sitosterol (B6)** y **3 β -hidroxitaraxaster-20-en-30-al (B7)**.
10. Se hace un estudio fitoquímico de la especie *Pulicaria canariensis subespecie canariensis*, recogida en Lanzarote (Playa Quemada), habiéndose aislado e identificado las siguientes sustancias: **3-palmitato y 3-miristato del 3 β ,16 β -dihidroxiupeol (C1)**, **estigmasterol (C2)**, **pulicanaral A (C3)**, **pulicanadieno B (C4)**, **pulicanaral B (C5)**, **pulicanadieno A (C6)**, **7, 4'-dimetoxi-3, 5-dihidrokaempferol (C7)**, **3 β ,16 β -dihidroxiupeol (C8)**, **pulicanadieno C (C9)**, **peróxido de ergosterol (C10)**, **5,7-dihidroxi-3,3',4'-trimetoxiflavona (C11)**, **pulicanona (C12)**, **pulicanadienal B (C13)**, **7,3'-dimetileter de la dihidroquercetina (C14)**, **pulicanadienal A (C15)**, **pulicanadienol (C16)**, **pulioplopanona B (C17)**, **pulicanaral C (C18)**, **pulicanol (C19)**, **6 α ,15 α -epoxi-1 β ,4 β -dihidroxiudesmano (C20)** y **pulioplopanona A (C21)**.
11. Se hace un estudio fitoquímico de la especie *Pulicaria canariensis subespecie lanata*, recogida en Lanzarote (Famara), habiéndose aislado e identificado las

siguientes sustancias: β -amirina (L1), 3-palmitato y 3-miristato del 3 β ,16 β -dihidroxiupeol (L2), estigmasterol (L3), 3 β ,16 β -dihidroxiupeol (L4), 5,7-dihidroxi-3,3',4'-trimetoxiflavona (L5), pulicanadienal B (L6), pulicanadieno B (L7), pulicanadienal A (L8), ácido ferúlico (L9) y ácido pulicanadienóico (L10).

12. Se realizó, con éxito, la síntesis de diversos derivados de las sustancias C1, C4, C6, C10, C15, C19, L2, L5, L9 y L10, aportando datos complementarios para la elucidación estructural de dichas sustancias, además de proporcionar pruebas de las relaciones estructurales entre algunas de esas sustancias (caso de C4 cuya reducción originó C9), de la configuración absoluta en algún carbono asimétrico de alguna de esas sustancias (caso de C15 al aplicarle el procedimiento del éster de Mosher modificado), o para la utilización de los derivados en estudios de actividad biológica (caso de L5).
13. De las sustancias identificadas en los apartados anteriores son nuevas en la bibliografía consultada las siguientes: pulicanaral A (C3), pulicanadieno B (C4), pulicanaral B (C5), pulicanadieno A (C6), pulicanadieno C (C9), pulicanona (C12), pulicanadienal B (C13), pulicanadienal A (C15), pulicanadienol (C16), pulioplpanona B (C17), pulicanaral C (C18), pulicanol (C19), pulioplpanona A (C21) y ácido pulicanadienóico (L10).
14. De los resultados obtenidos en el estudio de las dos especies canarias del Género *Pulicaria* se deduce la presencia de una elevada proporción de sustancias de naturaleza sesquiterpénica, con esqueletos predominantes de tipo germacrano y oplopano, destacando la ausencia de lactonas sesquiterpénicas, lo que apoya el mantenimiento de estas especies en el Género *Pulicaria*, evitando su segregación hacia el nuevo Género *Francoeuria*. Esto es especialmente significativo en el caso de *P. burchardii*, ya que algunos de los estudios previos revisados proponían situarla en la sección *Francoeuria* del Género *Pulicaria*, contradiciendo a esta hipótesis los resultados obtenidos.
15. En el caso de las dos subespecies de *P. canariensis*, la presencia de las mismas sustancias en ambas implica una escasa diferenciación desde el punto de vista químico, apuntando a una pobre influencia del medio en el que se desarrollan

- ambas plantas a pesar de las diferencias ambientales (vertiente sur, soleada y en sustrato terroso cerca del mar en el caso de la *ssp. canariensis*, frente a vertiente norte, más húmeda y ventosa, en sustrato terroso algo más alejado del mar en el caso de la *ssp. lanata*).
16. La realización de ensayos de actividad citotóxica frente a células leucémicas humanas HL-60 a varias de las sustancias aisladas y a varios de sus derivados mostró que algunas de ellas tenían una actividad importante, frente a la mayoría que mostraba escasa actividad. Así, entre los sesquiterpenos se ensayaron las sustancias **pulicanaral A (C3)**, **pulicanaral B (C5)**, **triacetato de pulicanona (C12a)**, **diacetato de pulicanol (C19a)** y **pulioplopanona (C21)**, de las que sólo el **triacetato de pulicanona** mostró una actividad destacable (IC_{50} de $20 \pm 7 \mu\text{M}$).
 17. Entre los triterpenos se sometieron a ensayos de actividad citotóxica las sustancias **3β -hidroxilup-20(29)-en-30-al (W2)**, **3β -acetoxilup-20(29)-en-30-al (W2a)**, **21α -hidroxitaraxasterol (W7)**, **diacetato de 21α -hidroxitaraxasterol (W7a)**, **lup-20(29)-en- 3β ,30-diol (W8)**, **3β ,30-diacetoxilup-20(29)-eno (W8a)**, **21α , 22α -epoxi- 20α -hidroxi-20(30)-dihidrotaraxasterol (W9)**, **3β -acetoxi- 21α , 22α -epoxi- 20α -hidroxi-20(30)-dihidrotaraxasterol (T1)**, **21α , 22α -epoxitaraxasterol (T3)**, **acetato de 21α , 22α -epoxitaraxasterol (T3a)**, **3β , 22α -diacetoxitaraxaster-20-en-30-al (T7a)**, **Peróxido de Ergosterol (T10)** y **3β -hidroxitaraxaster-20-en-30-al (B7)**, no mostrando ninguna de ellas una actividad citotóxica destacable (IC_{50} superior a $100 \mu\text{M}$).
 18. Entre los flavonoides se sometieron a ensayos de actividad citotóxica la sustancia **5,7-dihidroxi-3,3',4'-trimetoxiflavona (L5)** y sus derivados monoacetilado (**L5a**), diacetilado (**L5b**), monometilado (**L5c**) y el acetato del derivado monometilado (**L5d**), de las que sólo mostraron actividad destacable los derivados acetilados **L5a** y **L5b** (IC_{50} de 30 y 20 μM , respectivamente), lo que apunta a una relación entre la estructura y la actividad citotóxica del metabolito, como se menciona en algunas referencias previas.