

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGIA QUIMICA
(U.P.V.-C.S.I.C.)



ITQ
Valencia



**"Síntesis de productos naturales y análogos
biológicamente activos, derivados de
Penicillium brevicompactum Dierckx"**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

Ángel Cantín Sanz

BAJO LA DIRECCION DE:

Prof. Dr. Eduardo Primo Yúfera

Prof. Dr. Miguel Ángel Miranda Alonso

Valencia, Diciembre de 1998

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar el presente trabajo, deseo expresa mi más sincero agradecimiento:

Al Prof. Dr. Eduardo Primo Yúfera y al Dr. Miguel Ángel Miranda Alonso, como directores del presente trabajo, por brindarme la oportunidad de conseguir junto a ellos el grado de doctor, así como por toda la ayuda y estímulo que en todo momento me han dado.

Al Dr. Jaime Primo Millo por todas las aportaciones científicas realizadas a lo largo de la realización de la tesis, así como por el ánimo y estímulo mostrado en todo momento.

A la Dra. Pilar Moya Sanz por la realización de los ensayos biológicos de los productos obtenidos descritos en el presente trabajo.

A Elvira y todos los componentes del grupo de Ecología Química con los que he compartido laboratorio y que con tanto aprecio me acogieron durante estos años, soportándome y animándome incluso en los peores momentos.

A todos los compañeros del Instituto de Tecnología Química y del Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia por todo el apoyo y amistad mostrados.

Al Institut Valencià d'Estudis i Investigació por el "siempre puntual" pago de la beca concedida.

Por último, aunque no por ello menos importante a mi familia que en todo momento me apoyó y confió en mi, así como a todos aquellos amigos que han vivido de cerca este trabajo y me apoyaron durante su realización.

... y no me puedo olvidar de todos los "futboleros" y "festivaleros" que me han ayudado a sobrellevar los malos momentos que un trabajo de investigación conlleva.

| | PAG. |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN | 8 |
| 1.1.- Insecticidas: Problemas y Evolución. | 9 |
| 1.1.1.- Métodos de lucha contra insectos. | 10 |
| 1.1.2.- Tipos de insecticidas. | 11 |
| 1.1.3.- Inconvenientes de la lucha química. | 16 |
| 1.1.4.- Insecticidas biorracionales. | 18 |
| 1.2.- Hongos: Fuente de Metabolitos Activos. | 21 |
| 1.3.- Metabolitos Secundarios de <i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx. | 30 |
| 1.4.- Objetivos. | 38 |
| CAPÍTULO 2. SINTESIS DE ANALOGOS DERIVADOS DE PIRROL | 40 |
| 2.1.- Introducción. | 41 |
| 2.2.- Resultados y discusión. | 45 |
| 2.2.1.- Asignación estructural de los productos naturales. | 45 |
| 2.2.2.- Preparación de los análogos pirrólicos. | 46 |
| 2.3.- Actividades biológicas. | 48 |
| 2.3.1.- Actividad entomotóxica. | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.2.- Actividad fungicida. | 50 |
| 2.4.- Parte experimental. | 52 |
| 2.4.1.- Técnicas experimentales. | 52 |
| 2.4.2.- Ensayos biológicos. | 54 |
| 2.4.3.- Caracterización de los productos naturales. | 56 |
| 2.4.4.- Procedimientos sintéticos generales. | 57 |
| ANEXO I. PRODUCTOS PIRRÓLICOS ANÁLOGOS A LOS NATURALES: ^1H y ^{13}C. | 62 |
| <hr/> | |
| CAPÍTULO 3. SÍNTESIS DE LAS ENAMIDAS Y DERIVADOS BICÍCLICOS NATURALES | 78 |
| <hr/> | |
| 3.1.- Introducción. | 79 |
| 3.2.- Resultados y discusión. | 81 |
| 3.2.1.- Planteamiento y objetivos. | 81 |
| 3.2.2.- Construcción de la estructura de β -cetoamida. | 83 |
| 3.2.3.- Oxidación del anillo de pirrolidina. | 87 |
| 3.2.4.- Intentos de obtención selectiva de la enamida natural. | 92 |

| | |
|--|------------|
| 3.2.5.- Obtención de los productos de cadena insaturada. | 94 |
| 3.3.- Actividades biológicas. | 96 |
| 3.3.1.- Actividad antagonista de la hormona juvenil. | 96 |
| 3.3.2.- Actividad entomotóxica. | 98 |
| 3.3.3.- Actividad fungicida. | 99 |
| 3.3.4.- Actividad bactericida. | 102 |
| 3.3.5.- Poder atrayente de la 1-pirrolina. | 102 |
| 3.4.- Parte experimental. | 103 |
| 3.4.1.- Técnicas experimentales. | 103 |
| 3.4.2.- Caracterización de los productos naturales. | 104 |
| 3.4.3.- Procedimientos sintéticos generales. | 105 |
| ANEXO II. ENAMIDAS Y COMPUESTOS BICÍCLICOS. NATURALES E INTERMEDIOS DE SÍNTESIS: ¹H y ¹³C | 116 |
| CAPÍTULO 4. OBTENCIÓN DE LOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE LOS PRODUCTOS NATURALES. | 156 |
| 4.1.- Introducción. | 157 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.- Resultados y discusión. | 158 |
| 4.2.1.- Modificación de la cadena lateral. | 158 |
| 4.2.2.- Introducción de anillos nitrogenados de cinco miembros distintos de la pirrolidina. | 161 |
| 4.2.3.- Sustitución de la agrupación β -dicarbonílica por la monocarbonílica. | 167 |
| 4.3.- Actividades biológicas. | 169 |
| 4.3.1.- Actividad antagonista de la hormona juvenil. | 168 |
| 4.3.2.- Actividad entomotóxica. | 169 |
| 4.3.2.1.- <i>Productos obtenidos por modificación de la cadena lateral</i> | 169 |
| 4.3.2.2.- Productos obtenidos por introducción de anillos nitrogenados de cinco miembros distintos de pirrolidina | 169 |
| 4.3.2.3.- <i>Productos obtenidos por sustitución de la agrupación β-dicarbonílica por la monocarbonílica</i> | 170 |
| 4.3.3.- Actividad fungicida. | 170 |
| 4.3.3.1.- <i>Productos obtenidos por modificación de la cadena lateral</i> | 170 |
| 4.3.3.2.- Productos obtenidos por introducción de anillos nitrogenados de cinco miembros distintos de pirrolidina | 172 |
| 4.3.3.3.- <i>Productos obtenidos por sustitución de la agrupación β-dicarbonílica por la monocarbonílica</i> | 173 |
| 4.4.- Parte experimental. | 175 |
| 4.4.1.- Técnicas experimentales. | 175 |

| | |
|--|-----|
| 4.4.2.- Procedimientos sintéticos generales. | 176 |
|--|-----|

ANEXO III. ANÁLOGOS SINTÉTICOS A

| | |
|---|-----|
| LOS PRODUCTOS NATURALES: ^1H y ^{13}C . | 192 |
|---|-----|

CAPÍTULO 5. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

| | |
|--|-----|
| 5.1.- Síntesis de análogos del pirrol. | 220 |
| 5.2.- Síntesis de las enamidas y derivados bicíclicos naturales. | 221 |
| 5.3.- Obtención de análogos de los productos naturales preparados. | 222 |

Capítulo 1:

Introducción

1.1. - Insecticidas: Problemas y evolución

A lo largo de la historia, el hombre ha tenido que afrontar la competencia con otras especies, entre ellas los insectos y otros artrópodos, que destrozan los cultivos y las cosechas almacenadas. Además, algunos insectos y ácaros transportan y transmiten enfermedades, algunas peligrosas como la malaria, la fiebre amarilla, la peste, la tripanosomiasis etc.

El número de especies de insectos descritas actualmente se acerca al millón¹, constituyendo la clase más importante del reino animal. La gran capacidad reproductora de los insectos, su versatilidad ecológica y su facilidad de dispersión hacen que se encuentren en todos los lugares del planeta (a excepción de los casquetes polares y las grandes elevaciones), adaptados a los más distintos sistemas de vida.

Desde el punto de vista de la incidencia sobre la actividad humana, se acostumbra a clasificar a los insectos en beneficiosos y perjudiciales. Los primeros reportan materias primas (miel, seda) e intervienen en la polinización de numerosas plantas. Asimismo, contribuyen al mantenimiento del equilibrio de los sistemas ecológicos: controlan de forma natural (por predación o parasitismo) a otros insectos potencialmente dañinos, constituyen el alimento de muchos animales superiores y colaboran en la descomposición de la materia orgánica. Los perjuicios producidos a la especie humana pasan por ser la causa directa de parasitismo en el hombre y animales domésticos, siendo en algunos casos transmisores de peligrosas enfermedades. Los efectos negativos de los insectos sobre las plantas cultivadas y productos almacenados son muy importantes constituyendo uno de los azotes de la humanidad.

Históricamente los insectos han causado problemas graves a la humanidad. Como ejemplo se puede citar, el estudio realizado por Cramer², según el cual las pérdidas por parásitos animales en España oscilan entre el 2 % para algunos cereales y el 20 % para el olivo. Es por ello una utopía la idea de que el control de plagas de

¹ Balachowsky, A.S. (ed.). "Entomologie Appliquée à l'Agriculture". Masson. París, 1982.

² Cramer, H.H., "Defensa Vegetal y Cosecha Mundial". Bayer Pflanzenschutz. Leverkusen, 1967.

insectos es un problema de fácil solución, y de ahí la conveniencia de seguir investigando nuevos métodos que aporten unas alternativas de solución mejores a las practicadas hasta ahora.

1.1.1.-Métodos de lucha contra los insectos.

Existen muchos métodos de lucha contra insectos, que se pueden dividir en dos grandes grupos, en función de la utilización, o no, de productos químicos.

a) Métodos culturales.

Son métodos conocidos desde antiguo por el hombre y que aún en la actualidad siguen utilizándose. Entre ellos cabe resaltar el adelanto o retraso de la siembra, la alternancia de cultivos o la destrucción de los restos de cosechas.

b) Métodos de destrucción física.

Junto con los métodos culturales, eran los más utilizados en la antigüedad. El más elemental de todos ellos era la recogida y destrucción manual de los insectos. Una variante de estos métodos suponía la atracción de los insectos a diversos sistemas de trampas o a lugares donde eran destruidos.

c) Esterilización.

Los esterilizantes químicos son compuestos que interfieren en el mecanismo de reproducción de los insectos, dando lugar a la disminución de la población y, en último extremo, a la erradicación de la especie.

d) Control con parásitos y depredadores.

En la naturaleza se produce de forma espontánea el control de unas especies de insectos por la presencia de otras, contribuyendo este hecho a que muchos insectos no constituyan una verdadera plaga. La introducción artificial de insectos útiles, o el incremento de sus poblaciones mediante crías masivas, es pues una forma de llevar a cabo un control biológico de las plagas, con las ventajas sobre la lucha química de su persistencia y nula contaminación ambiental. En este sentido, también se ha de considerar la utilización de otros organismos, como diversas especies de virus, bacterias y hongos, que en la naturaleza también contribuyen al control de determinados insectos.

Sin embargo, el control biológico no es fácil y en general requiere amplios conocimientos de los ecosistemas en que se desee aplicar.

e) Insecticidas de origen biológico.

Existen diversos compuestos de origen biológico que actúan como insecticidas. Los más conocidos y utilizados actualmente son los preparados de diversas cepas de *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria, al esporular, produce un cristal con una toxina que afecta a las orugas que la ingieren, convirtiéndose en un verdadero insecticida y no en un agente de lucha biológica. Entre sus inconvenientes nos encontramos con su limitada acción frente a insectos y su degradabilidad, aunque estos inconvenientes se tornan ventajas si consideramos su baja incidencia en la contaminación del medio.

f) Insecticidas convencionales.

Son sustancias que al ser ingeridas, inhaladas o depositadas sobre los insectos provocan su muerte. Aunque las propiedades insecticidas de ciertos productos eran conocidas desde la antigüedad (los primeros usos de productos inorgánicos como el azufre, el arsénico o la sosa se remontan posiblemente a los tiempos de la Grecia y Roma clásica), su utilización se incrementó con los avances en el campo de la biología y de la química en el siglo XIX. Es entonces cuando realmente se empieza a utilizar el término plaguicida como hoy lo conocemos, para denotar sustancias que sirven para combatir las plagas de los cultivos, del ganado, de los animales domésticos y del hombre y su medio ambiente. Los plaguicidas pueden clasificarse en insecticidas, acaricidas, fungicidas, antibióticos, herbicidas y rodenticidas, en función de las especies que están destinados a combatir.

1.1.2.- Tipos de insecticidas.

La historia de este tipo de sustancias presenta un claro punto de inflexión en la aparición de los insecticidas de síntesis:

*Época anterior a los insecticidas de síntesis. Incluidos en este apartado aparecen tres grupos de compuestos diferentes:

- *Compuestos inorgánicos.* Los compuestos inorgánicos han sido utilizados, desde hace mucho tiempo, para la protección de los cultivos; así, estos fueron los primeros plaguicidas utilizados por el hombre y pese a que algunos todavía hoy son utilizados, la gran mayoría han sido desplazados por los insecticidas orgánicos más activos. Los insecticidas más representativos de este grupo son los arsenicales (arseniato, arsenito,

acetoarsenito de cobre etc.) y los fluorados (fluoruro sódico, fluorosilicatos etc.). Son productos tóxicos para el hombre, sobre todo los primeros.

- *Insecticidas obtenidos de plantas.* Son diversos compuestos de origen vegetal y que todavía se utilizan como insecticidas domésticos en la actualidad. Los más reconocidos son la nicotina, la rotenona y el pelitre. La nicotina es un alcaloide que se obtiene de las especies *Nicotina tabacum* y *Nicotina rústica* y que, a pesar de ser bastante tóxica, en las formulaciones empleadas no resulta muy peligrosa. La rotenona y sus análogos son compuestos venenosos para los peces y con actividad insecticida; sin embargo en condiciones normales se considera muy poco peligrosa, debido a su baja toxicidad para mamíferos y a la rápida degradación de sus residuos. De las flores del pelitre o *Pyrethrum* se obtiene un insecticida conocido como piretrina. Los principios activos del pelitre son ésteres de los ácidos crisantemomonocarboxílico y crisantemondicarboxílico, denominados piretrinas I y II, jasmolina II y cinerinas I y II.

Figura 1.1. Sustancias obtenidas de plantas utilizadas como insecticidas.

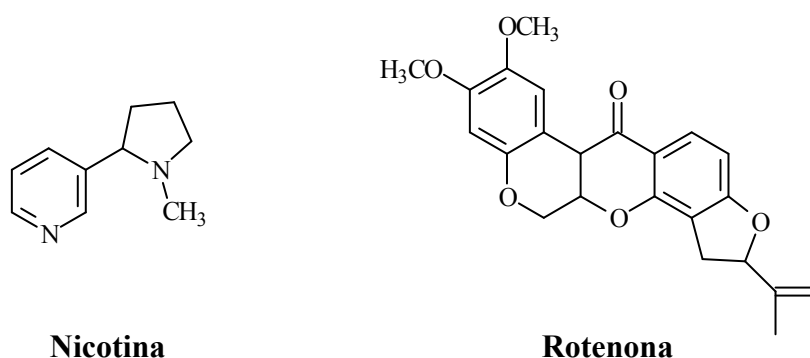
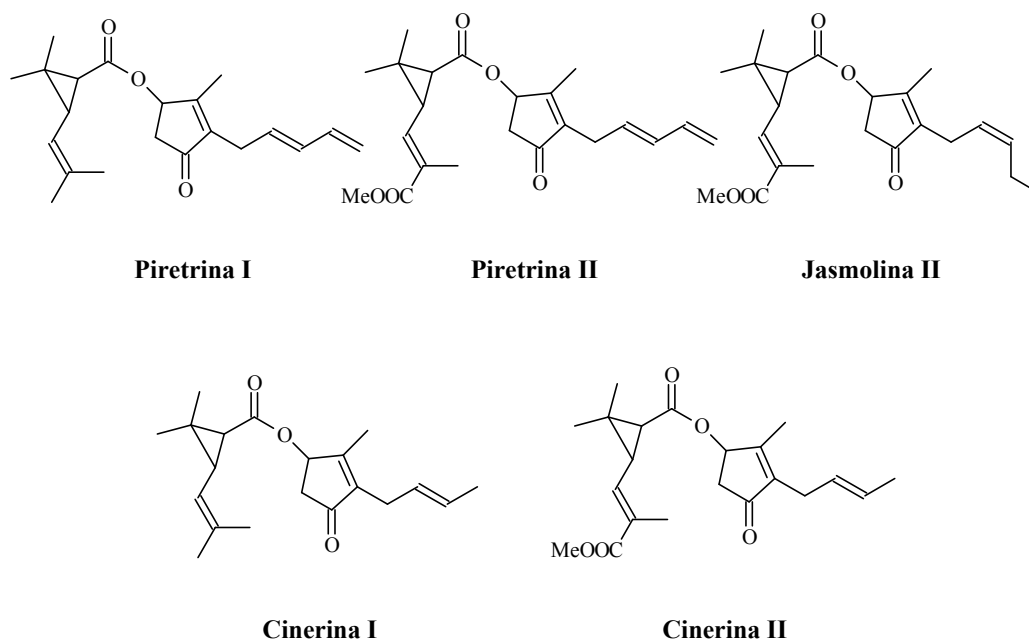


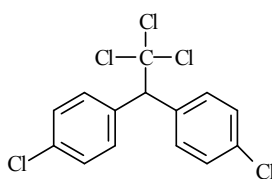
Figura 1.1 (Cont). Sustancias obtenidas de plantas utilizadas como insecticidas.



- *Aceites insecticidas.* Aunque también han sido utilizados como insecticidas aceites vegetales y animales, los más usados actualmente son los minerales, derivados del petróleo o de la hulla. Su acción como insecticida se debe fundamentalmente a su poder de penetración en las tráqueas de los insectos, produciendo su asfixia. Esta acción insecticida de los aceites varía según su viscosidad, volatilidad, tensión superficial y composición química. El factor limitante en el uso de este tipo de sustancias es la tolerancia de las plantas, pues todos son fitotóxicos en mayor o menor grado.

*Insecticidas de síntesis. El descubrimiento de las propiedades insecticidas del 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (DDT) por Müller en 1939, marcó una revolución en la lucha contra las plagas.

Figura 1.2. Estructura del 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (DDT).

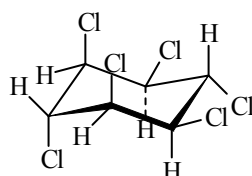


DDT

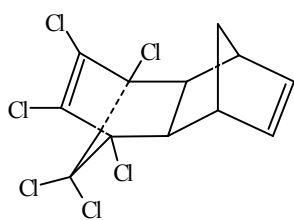
Su trascendencia ha sido extraordinaria para la producción agrícola y en la lucha contra las enfermedades transmitidas por insectos. Los principales grupos de insecticidas son:

- *Compuestos orgánicos clorados*. Como ya se ha indicado el primero de ellos fue el DDT, al cual siguió el lindano, isómero γ del hexaclorociclohexano (HCH), que es el que presenta mayor actividad y que a pesar de ser sintetizado en 1825, no trascendió por su actividad hasta 1942, cuando los laboratorios de Imperial Chemical Industries descubrieron su eficacia insecticida. Otros clorados que han tenido gran utilización son los denominados insecticidas diénicos (en alusión a su síntesis por reacciones de Diels-Alder), siendo aldrín, dieldrín y endrín los más característicos dentro de este grupo. Hoy en día, la gran mayoría de ellos están prohibidos debido a su baja degradabilidad y a su capacidad de acumulación en los tejidos grasos.

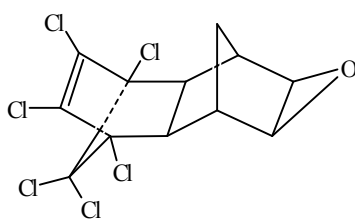
Figura 1.3. Productos clorados utilizados como insecticidas comerciales.



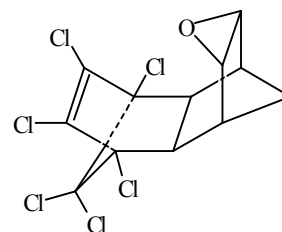
γ -HCH (Lindano)



Aldrín



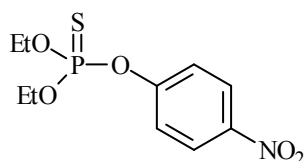
Dieldrín



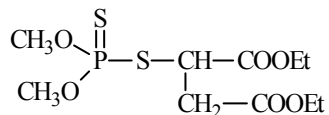
Endrín

- *Compuestos fosforados orgánicos*. Son derivados orgánicos del ácido fosfórico (amidas o ésteres fosfóricos y ésteres tiofosfóricos). Su persistencia es inferior a la de los clorados y su toxicidad en los mamíferos es muy variable dependiendo del compuesto en concreto. Ejemplos de este tipo de compuestos son el paratión y el malatión.

Figura 1.4. Derivados fosforados utilizados como insecticidas.



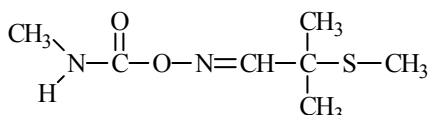
Paratión



Malatión

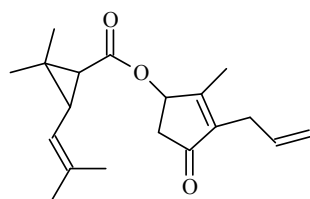
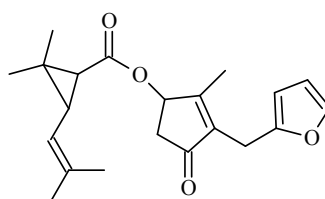
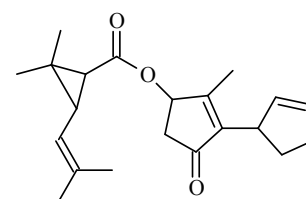
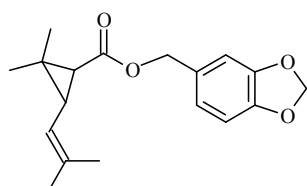
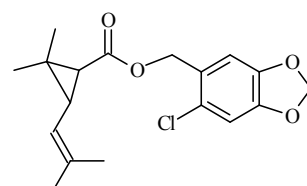
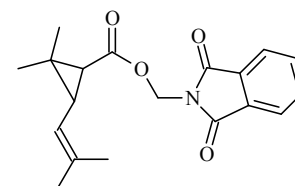
- *Carbamatos*. Son derivados del ácido carbámico. Los de más alta actividad insecticida son los *N*-alquilcarbamatos de alquilo o arilo, y los *N,N*-dialquilcarbamatos de hidroxiheterociclos. Su espectro de acción insecticida es más diversificado que el de los fosforados, presentando en algunos casos propiedades fungicidas y herbicidas. Su toxicidad en mamíferos es variable y, aunque en general no son excesivamente tóxicos, alguno de ellos, como el aldicarb, lo es en grado sumo.

Figura 1.5. Aldicarb.



Piretroides. Se trata de productos orgánicos de síntesis estructuralmente relacionados con las piretrinas y cinerinas naturales. Fueron diseñados a partir de ellas, con el fin de sustituirlas industrialmente. En general, son productos muy tóxicos para insectos y peces pero no para mamíferos. Su acción es muy polivalente, lo que constituye un aspecto negativo desde el punto de vista de la selectividad frente a la fauna útil³. Los principales piretroides sintéticos son los que se describen a continuación:

³ Lehaey, J.P (ed.), "The Pyrethroid Insecticides.", Taylor and Francis. London 1987.

Figura 1.6. Piretroides sintéticos.**Aletrina****Furetrina****Cicletrina****Crisantemato de piperonilo****Bartrín****Neopinamina****1.1.3.- Inconvenientes de la lucha química.**

En un principio, la introducción de los insecticidas sintéticos en la lucha contra plagas creó unas grandes expectativas, sin embargo pronto se comprobó que este tipo de productos llevaban asociados una serie de problemas.

- Persistencia en el medio. Uno de los problemas más ampliamente estudiado es la persistencia de residuos de plaguicidas en suelos, aire, agua, peces, aves, mamíferos e incluso en el hombre. El medio ambiente se contamina con plaguicidas debido, fundamentalmente, a la baja eficacia del proceso de aplicación en la agricultura; así, sólo el 10 % del plaguicida administrado por nebulización sobre una planta alcanza su objetivo, y un 20 % si es por pulverización líquida normal⁴.
- Bioacumulación. Este problema, produce, debido a la persistencia y solubilidad de los plaguicidas en grasas, un incremento progresivo del depósito de residuos en los tejidos de los animales a lo largo de la cadena trófica, afectando principalmente a los depredadores que ocupan los últimos

⁴ Li, S., "Pesticide Environmental Pollution and Human Health in China". En "Chemistry, Agriculture and the Environment", Richardson, H.L., (ed.). Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991.

eslabones. Esta ha sido la principal causa en la prohibición en muchos países de los insecticidas más persistentes.

- Desequilibrios. La eliminación de una plaga en un determinado ecosistema implica un aumento en las poblaciones de las especies que compiten con ella. De igual forma, la utilización de insecticidas de amplio espectro puede producir la eliminación de depredadores que de forma natural hacían de control sobre la población de una determinada plaga.
- Resistencia. Los insectos desarrollan mecanismos bioquímicos de defensa frente a los plaguicidas, dando lugar a razas resistentes a los mismos. La aparición de estas resistencias fue uno de los primeros fenómenos que se observó como consecuencia de los insecticidas de síntesis, siendo sin lugar a dudas, el problema más serio por el número de implicaciones que conlleva. Como resultado de la inducción de resistencias tenemos que algunos insecticidas, verdaderamente útiles en un principio, acaban por ser prácticamente inocuos. Este problema se ve acrecentado con los insecticidas son de amplio espectro, que dan lugar a la aparición de resistencias cruzadas en especies para las cuales no iba dirigido el tratamiento.
- Toxicidad para el hombre. La gran mayoría de los plaguicidas son tóxicos para los mamíferos en mayor o menor grado; por ello, su utilización acarrea unos riesgos de intoxicación que deben ser tenidos en cuenta por todas las personas que los manipulan. Los insecticidas químicos convencionales presentan diferentes formas de actuación sobre el hombre, como son la absorción cutánea, a través del metabolismo, etc. El consumo de alimentos contaminados y la contaminación directa por las aplicaciones de plaguicida en las cosechas son las causas más extendidas y preocupantes de la intoxicación del hombre por este tipo de sustancias.

A la vista de estos inconvenientes, los organismos públicos van adoptando una serie de medidas legales para reglamentar el uso de los plaguicidas, que son cada día más estrictas. Ello ha tenido como consecuencia que las investigaciones que se realizan hoy en día estén encaminadas a la obtención de productos cada vez más selectivos, menos persistentes y de menor toxicidad para el hombre, abriéndose camino los conceptos de "lucha dirigida" y "lucha integrada".

Lucha dirigida.

Básicamente consiste en un seguimiento de la evolución de la plaga a fin de determinar el momento oportuno de tratamiento. Con ello se consigue, además de rebajar el coste de la lucha fitosanitaria, reducir la contaminación del medio, la inducción de resistencias, la aparición de nuevas plagas y el riesgo de presencia de residuos tóxicos en las cosechas tratadas, todo ello con una mayor eficacia en el tratamiento de las plagas.

Lucha integrada.

El problema en la lucha dirigida es que no se eliminan por completo los problemas derivados de la utilización de plaguicidas. Esta es la causa de la introducción del concepto de lucha integrada, definida por Smith y Van der Bosch⁵ como "la combinación armónica de todas las técnicas para minimizar económicamente los daños causados por las plagas, con la mínima perturbación del medio ambiente".

Así pues, no se excluye la utilización de productos químicos, pero se tienen en cuenta todos los posibles sistemas de lucha, en especial la acción de los insectos útiles. Aunque este parece ser el sistema de lucha del futuro, la adopción de este método no es fácil, ya que requiere un profundo conocimiento del ecosistema agrícola de cada zona, de los efectos secundarios de los tratamientos, así como efectuar seguimientos muy precisos y conocer los umbrales a partir de los que conviene intervenir.

1.1.4.- Insecticidas biorracionales.

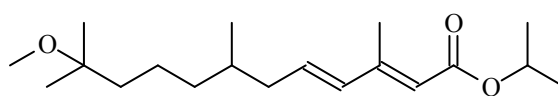
Los insecticidas biorracionales representan una nueva generación de productos químicos destinados al control de insectos, cuya estrategia de investigación se basa en un buen conocimiento de aquellos procesos fisiológicos o mecanismos de comunicación específicos de insectos, y en la obtención de agentes capaces de perturbarlos⁶. Dentro de este contexto, han sido ya comercializados compuestos pertenecientes a tres grupos fundamentales:

⁵ Primo, E. y Carrasco, J.M., "Química Agrícola II: Plaguicidas y Fitorreguladores". Ed. Alhambra, Madrid, 1977.

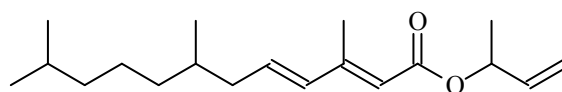
⁶ Menn, J.J. y Henrick, C.A., *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 1981, B 295, 57.

- Análogos de la hormona juvenil. Inducen unos efectos biológicos idénticos a las propias hormonas juveniles naturales, en particular inhiben la metamorfosis y son secundariamente letales. Su mayor ventaja reside en su inocuidad frente a animales superiores y en la relativa especificidad que puede lograrse. Por el contrario, que sean efectivos sólo en determinados momentos del desarrollo de los insectos conlleva una gran limitación para este tipo de productos. Sustancias de este tipo que han alcanzado la comercialización son el metopreno, el kinopreno y el fenoxicarb.

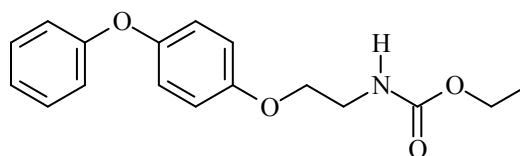
Figura 1.7. Sustancias comerciales con actividades similares a la hormona juvenil.



Metopreno



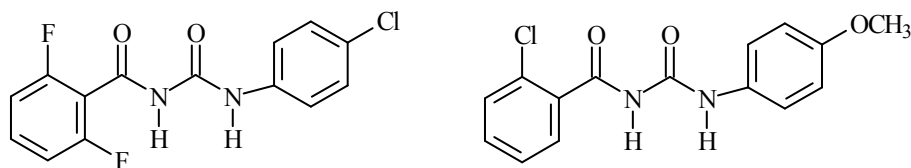
Kinopreno



Fenoxicarb

- Inhibidores de la formación de la cutícula. Son compuestos que al ser ingeridos por determinados insectos impiden la formación del exoesqueleto, con lo que entre otras perturbaciones impide la muda de las larvas, que terminan por morir. El diflubenzurón y el triflumurón son sustancias de este tipo ampliamente utilizadas debido a su eficacia, especificidad e inocuidad para los animales superiores. No obstante presentan como inconvenientes el limitado campo de aplicación, la lentitud de acción y su larga persistencia en algún tipo de formulaciones.

Figura 1.8. Inhibidores de la formación de la cutícula.

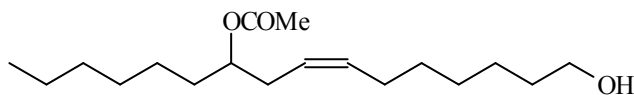


Diflubenzurón

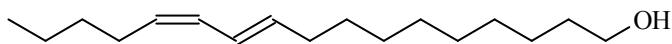
Triflumurón

- Feromonas. Constituyen la base química de la comunicación de los insectos, siendo las feromonas sexuales las más usadas hasta el momento. Existen tres variantes de utilización básicas:
 1. *Captura masiva* con trampas cebadas de feromona.
 2. *Atracción hacia parcelas concretas* y tratamiento de las mismas con insecticidas.
 3. *Confusión*, difundiendo en el ambiente una gran cantidad de feromona, con lo que se dificulta el encuentro de machos y hembras.

Figura 1.9. Ejemplos de atrayentes sexuales.



Dextro-10-acetoxi-cis-7-hexadecen-1-ol
(obtenido de *Portheria dispar*)



trans-10-cis-12-Hexadecadien-1-ol
(obtenido de *Bombix mori*)

Sin embargo, las posibilidades de perturbación de funciones específicas de insectos van mucho más allá de los tres tipos mencionados. En el ámbito de laboratorio se han obtenido ya resultados prometedores a través de otras aproximaciones, destacándose los antagonistas de la hormona juvenil y otras hormonas endocrinas,

compuestos defensivos de plantas contra insectos (repelentes y deterrentes) y antagonistas de feromonas.

Todo ello configura un panorama muy amplio de alternativas (algunas con mayores perspectivas de aplicación práctica que otras), siendo la estrategia biorracional para el diseño de plaguicidas un buen camino para resolver, al menos parcialmente, los graves y numerosos problemas planteados en la lucha contra insectos.

1.2. - Hongos: Fuente de Metabolitos Activos

Como hemos podido comprobar, los problemas asociados a la utilización de insecticidas químicos están provocando en la actualidad, un cambio en el sentido de las investigaciones, cada vez más encaminados a la obtención de plaguicidas más "ecológicos".

En este sentido, las plantas y los hongos han demostrado ser una fuente inagotable de metabolitos de autodefensa frente a diferentes plagas. Así, se puede decir que tanto unas como otros han ido coevolucionando a la vez que las diferentes especies de insectos, de forma que su supervivencia ha estado supeditada a su capacidad de adaptación y creación de mecanismos de defensa. Por esta razón, no es de extrañar que exista gran interés en el aislamiento de las sustancias responsables de estas actividades para su utilización como plaguicidas, o simplemente para tener moléculas cabezas de serie que permitan, mediante la obtención de análogos sintéticos, optimizar las actividades por relaciones estructura-actividad.

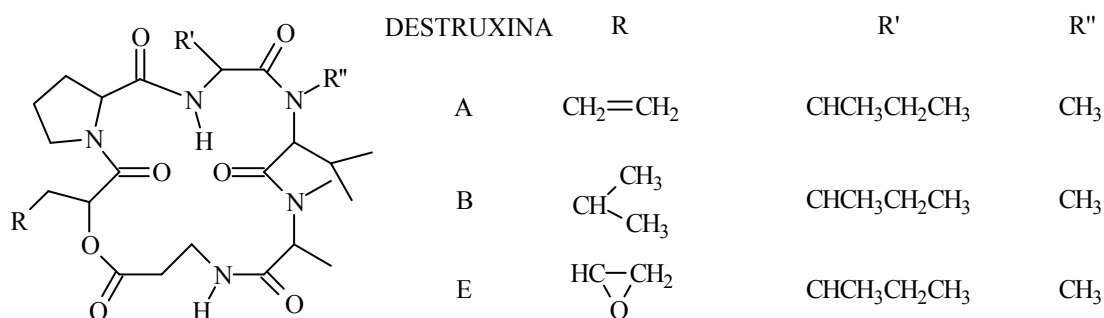
Así, desde que Di Bassi, en 1836, demostró la intervención de un hongo como causante de la enfermedad muscardina del gusano de seda, se han estudiado y ensayado infinidad de cepas de distintos hongos⁷ para la detección de los metabolitos secundarios responsables de la toxicidad frente a insectos. Los hongos han demostrado ser una vía muy interesante para el control de insectos, pues presentan las ventajas de que no producen desequilibrios ecológicos, no generan resistencias y son persistentes,

⁷ Gilliespie, A.T., Claydon, N. "The Use of Entomopathogenous Fungi for Pest Control and the Role of Toxins in Pathogenesis". *Pestic. Sci.*, **1989**, 27, 203-15.

autorrenovándose cada año. Esto ha sugerido la posibilidad de implantarlos como instrumentos útiles en la lucha contra plagas.

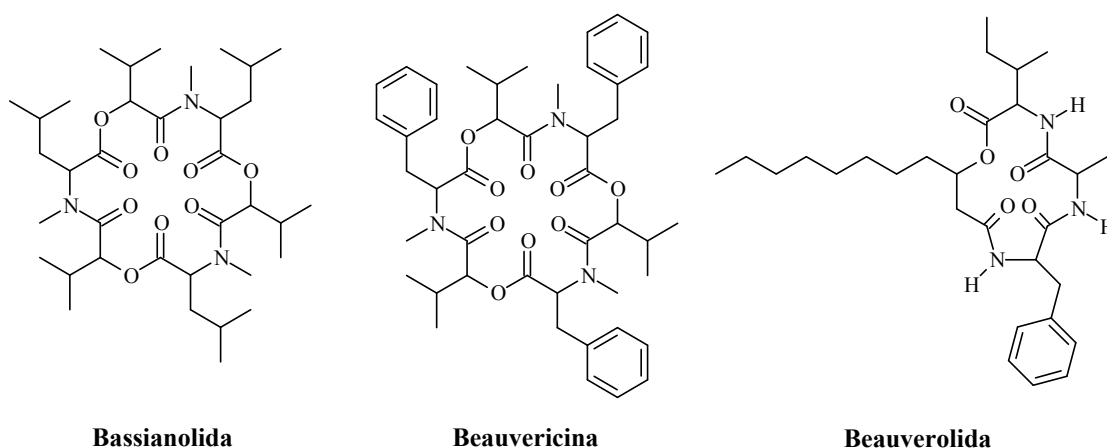
Uno de los primeros estudios encaminado a la detección de sustancias tóxicas de hongos se realizó sobre cepas de *Metarhizium anisopliae*, conduciendo al aislamiento de dos depsipéptidos cíclicos que se denominaron destruxinas A y B. Hoy en día se conocen catorce especies de destruxinas⁸ con actividades insecticidas variables.

Figura 1.10. Destruxinas.



La beauvericina, el grupo de beauverolidas y la bassianolida son otros péptidos cíclicos con actividad insecticida aislados de *Beauveria bassiana* (la bassianolida también ha sido aislada de *Verticillium lecanii*⁹).

Figura 1.11. Bassianolida, beauvericina y beauverolida.

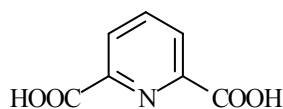


⁸ a) País, M., Das, B.C., Ferron, P. "Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*". *Phytochemistry* **1981**, *20*, 715-23.

⁹ Suzuki, A., Kanaoka, M., Isogai, A., Murakoshi, S., Ichinoe, M., Tamura, S. "Bassianolide, a New Insecticidal Cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*". *Tetrahedron Lett.*, **1977**, *25*, 2167-70.

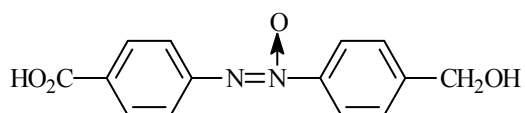
Otro metabolito que ha sido aislado tanto de *B. bassiana* como de *V. lecanii* es el ácido dipicolínico (ácido 2,6-piridindicarboxílico), habiendo presentado su sal de sodio propiedades insecticidas frente a *Calliphora erythrocephala*¹⁰.

Figura 1.12. Ácido dipicolínico.



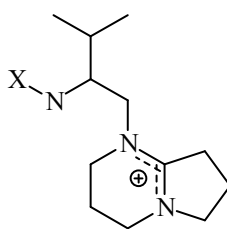
El ácido 4'-hidroximetilazoxibenceno-4-carboxílico, que había sido aislado con su producto de oxidación (ácido azoxibenceno-4,4'-dicarboxílico) del filtrado del caldo de cultivo de *Entomophthora virulenta*, demostró ser el responsable de la actividad insecticida exhibida frente a *Calliphora erythrocephala*¹¹.

Figura 1.13. Ácido 4'-hidroximetilazoxibenceno-4-carboxílico.



Las efrapeptinas¹² son un grupo formado por cinco compuestos relacionados estructuralmente que fueron aislados del extracto de CH₂Cl₂ del caldo de cultivo de *Tolypocladium niveum*. Dos de estos compuestos presentaron actividad insecticida.

Figura 1.14. Estructura base de las Efrapeptinas.



X= Cadena de aminoácidos

¹⁰ Claydon, N., Grove, J.F. "Insecticidal Secondary Metabolic Products from the Entomogenous Fungus *Verticillium lecanii*". *J. Invert. Pathol.*, **1982**, 40, 413-8.

¹¹ Claydon, N., Grove, J.F. "Metabolic Products of *Entomophthora virulenta*". *J. Chem. Soc. Perkin Trans., I*, **1978**, 171-3.

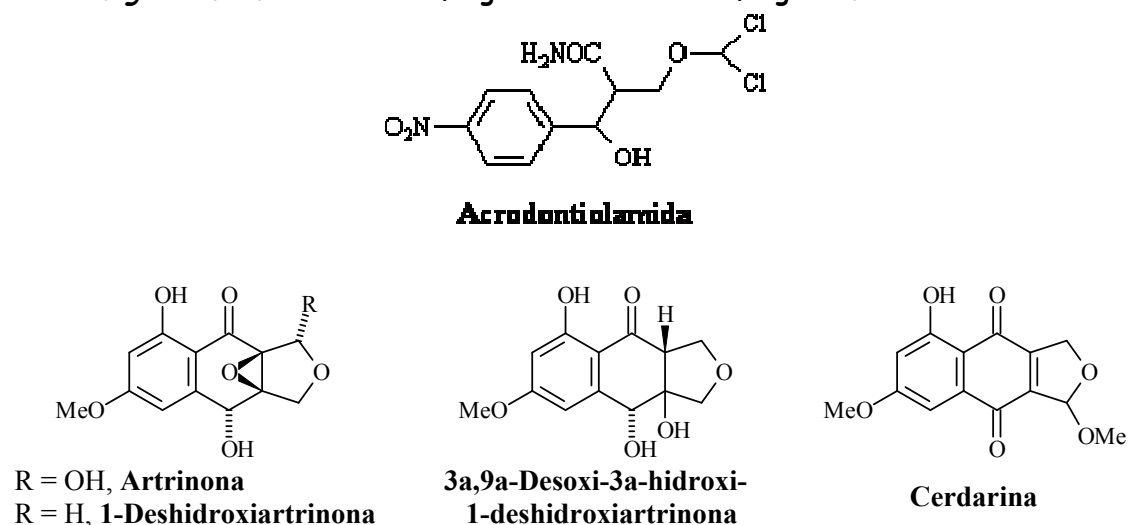
¹² Krasnoff, S.B., Gupta, S., St. Leger, R.J., Renwick, J.A.A., Roberts, D.W. "Antifungal and Insecticidal Properties of the Efrapeptins: Metabolites of the Fungus *Tolypocladium niveum*". *J. Inverteb. Pathol.*, **1991**, 58, 180-8.

La tolipina¹³ es un metabolito obtenido del hongo entomopatógeno *Tolypocladium inflatum*, que ha producido un alto índice de mortalidad en a larvas de *Culex pipiens*.

Por otro lado, los metabolitos de hongos no sólo han presentado propiedades para combatir a los insectos, sino que también podemos encontrar sustancias que exhiben características como:

- Fungicidas. Ejemplos de este tipo de sustancias lo constituyen: a) la fenamida¹⁴, metabolito derivado de la fenilalanina obtenido de *Streptomyces albospinus*, que presenta actividad frente a *Septoria nodorum*, agente causante de las manchas en el trigo b) la acrodontiolamida¹⁵, metabolito clorado extraído de *Acrodontium salmoneum* o c) los metabolitos estructuralmente relacionados con la artrinona¹⁶, aislados de *Cercophora sordarioides*, de los que la 1-deshidroiartrinona y la cerdarina presentan actividad frente al género *Candida*.

Figura 1.15. Metabolitos fúngicos con actividad fungicida.



¹³ Weiser, J., Matha, V., Zizka, Z., Jegorov, A. "Ultrastructural Changes in *Culex pipiens* Larvae with Tolypin, the Insecticidal Metabolite of *Tolypocladium inflatum* Gams (Deuteromycetes)". *Cytobios*, **1992**, 69, 179-86.

¹⁴ Makkar, N.S., Nickson, T.E., Tran, M., Biest, N., Miller-Wideman, M., Lawson, J., McGary, C.I., Stonard, R. "Phenamida, a Fungidal Metabolite from *Streptomyces albospinus* A19301. Taxonomy, Fermentation, Isolation, Physico-Chemical and Biological Properties". *J. Antibiot.*, **1995**, 48, 369-74.

¹⁵ Buarque de Gusmao, N., Kaouadji, M., Seigle-Murandi, F., Steiman, R., Thomasson, F. "Acrodontiolamide, a Chlorinated Fungal Metabolite from *Acrodontium salmoneum*". *Spectrosc. Lett.*, **1993**, 26, 1373-80.

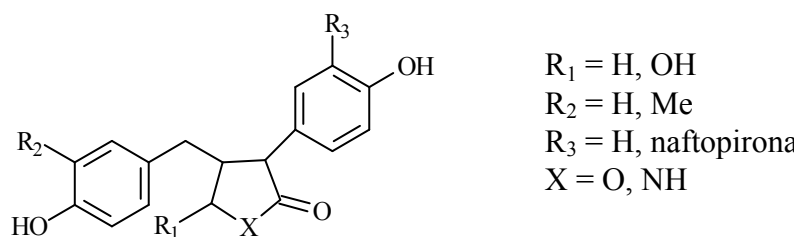
¹⁶ Whyte, A.C., Gloer, K.B., Gloer, J.B., Koster, B., Malloch, D. "New Antifungal Metabolites from the Coprophilous Fungus *Cercophora sordarioides*". *Can. J. Chem.*, **1997**, 75, 768-72.

- Bactericidas. Como ejemplo de este tipo de sustancias encontramos la leucocina F10¹⁷, una bacteriocina producida por *Leuconostoc carnosum* y que presenta actividad contra *L. innocua*.

Los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* merecen mención especial a la hora de hablar de nuevos compuestos con actividad plaguicida de origen fúngico. Son ampliamente conocidos por la gran variedad de metabolitos secundarios que producen, siendo muchos de ellos antibióticos y/o micotoxinas. Esto imposibilita el uso como insecticida de muchos de los metabolitos encontrados. La investigación llevada a cabo con especies del género *Aspergillus* se ha dirigido hacia la búsqueda de nuevos metabolitos producidos por unas estructuras de resistencia, denominadas esclerocios. De entre los metabolitos aislados se han detectado actividades antialimentarias, reductoras de peso y tóxicas¹⁸.

También dentro del género *Aspergillus* (*Aspergillus carbonarius*), se han encontrado recientemente un grupo de metabolitos denominados carbonarinas¹⁹ (A-H) que pueden ser utilizados para el control de coleópteros y lepidópteros.

Figura 1.16. Carbonarinas.



Dentro del género *Fusarium* encontramos las enniantinas²⁰, depsipéptidos cíclicos que son responsables del efecto insecticida en *Choristoneura fumiferana*.

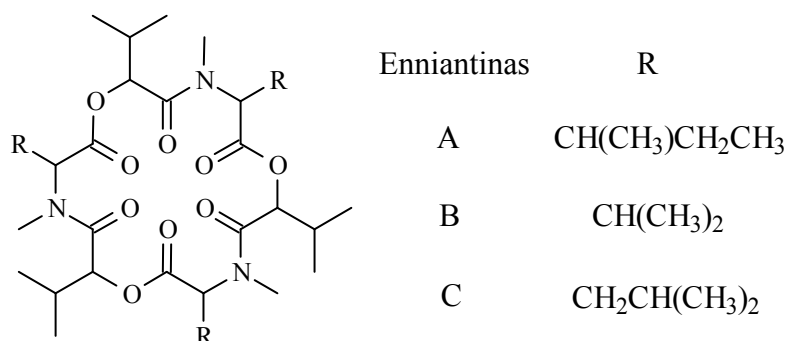
¹⁷ Parente, E., Moles, M., Ricciardi, A. "Leucocin F10, a Bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*". *Int. J. Food Microbiol.*, **1996**, 33, 231-43.

¹⁸ a) Staub, G.M., Gloer, J.B., Wicklow, D.T., Dowd, P.F. "Aspernomine: a Cytotoxic Antiinsectan Metabolite with a Novel Ring System from the Sclerotia of *Aspergillus nomius*". *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 1015-17. b) Laakso, J.A., Gloer, J.B., Wicklow, D.T., Dowd, P.F. "Radarins A-D: New Antiinsectan and Cytotoxic Indole Terpenoids from the Sclerotia of *Aspergillus sulphureus*". *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 138-41. c) Laakso, J.A., Gloer, J.B., Wicklow, D.T., Dowd, P.F. "Sulpinines A-C and Secopenitrem B: New Antiinsectan Metabolites from the Sclerotia of *Aspergillus sulphureus*". *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 2066-71.

¹⁹ Alfatafta, A.A., Dowd, P.F., Gloer, J.B., Wicklow, D.T. "Carbonarin Insecticidal Fungal Metabolites". Patente **1996**.

²⁰ Strunz, G.M., Strongman, D.B. "Insecticidal Metabolites from *Fusarium avenaceum*, a Fungus Associated with Foliage of *Abies balsamea* Infested by Spruce Budworm, *Choristoneura fumiferana*".

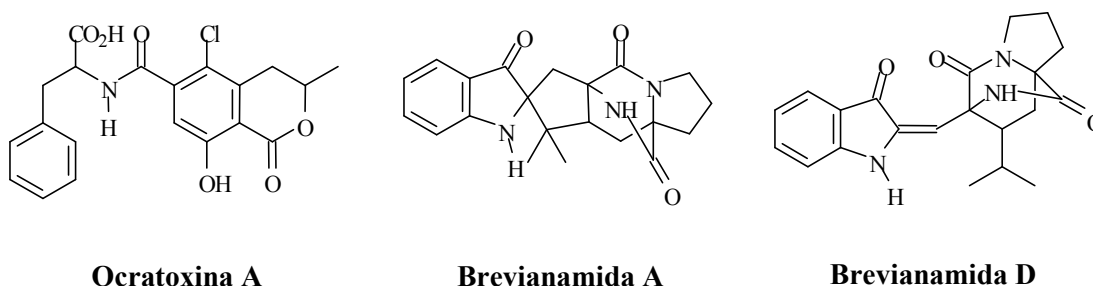
Figura 1.17. Enniantinas.



Las okaraminas **A**²¹, **B**²² y **C**²³ son alcaloides de tipo indólico con actividad insecticida frente a *Bombix mori*, que fueron aislados de una cepa de *Penicillium simplicissimum*.

Del género *Penicillium* también han sido aislados tres metabolitos con actividad antialimentaria: ocratoxina **A**, y las brevianamidas **A** y **D**²⁴ (esta última es el producto de fotólisis de la primera). La ocratoxina es conocida por ser una potente micotoxina sin embargo, diferentes autores discuten la utilización de los otros dos como insecticidas.

Figura 1.18. Metabolitos activos de *Penicillium*.



Biotechnology for Crop Protection (P.A. Hedin, J.J. Menn & R.M. Hollingworth, Eds), ACS American Chemical Society, Washington D.C., **1988**, 110-6.

²¹ Murao, S., Hayashi, H., Takiuchi, K., Arai, M. "Okaramine A, a Novel Indole Alkaloid with Insecticidal Activity, from *Penicillium simplicissimum* AK-40". *Agric. Biol. Chem.*, **1988**, 52, 885-6.

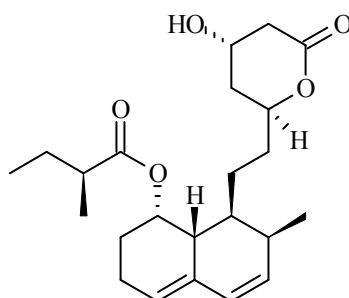
²² Hayashi, H., Takiuchi, K., Murao, S., Arai, M. "Structure and Insecticidal Activity of New Indole Alkaloids, Okaramine A and B, from *Penicillium simplicissimum* AK-40". *Agric. Biol. Chem.*, **1989**, 53, 461-9.

²³ Hayashi, H., Takiuchi, K., Murao, S., Arai, M. "Okaramine C, a New Insecticidal Alkaloid, from *Penicillium simplicissimum*". *Agric. Biol. Chem.*, **1991**, 55, 3143-5.

²⁴ Paterson, R.R.M., Simmonds, M.J.S., Kemmelmeier, C., Blaney, W.M. "Effects of Brevianamide A, its Photolysis Product Brevianamide D, and Ochratoxin A from two *Penicillium* Strains on the Insect Pests *Spodoptera frugiperda* and *Heliothis virescens*". *Mycol. Res.*, **1990**, 94, 538-42.

Uno de los hechos más importantes en el aislamiento de compuestos fúngicos con actividad insecticida es el aislamiento de la compactina²⁵ a partir de *Penicillium brevicompactum*. En principio, fue considerado como un antifúngico, pero en un estudio paralelo se observó que inhibía la biosíntesis del colesterol. El hecho de que los primeros pasos de la síntesis del colesterol coincidan con los de la biosíntesis de la hormona juvenil (HJ), hizo que se estudiara más a fondo para comprobar su efectividad como antagonista de HJ²⁶.

Figura 1.19. Compactina.



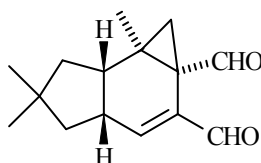
Vista la diversidad de metabolitos y actividades que podemos encontrar en los distintos hongos, no parece extraño que se hayan realizado numerosos intentos para llevar a cabo la síntesis de algunas de estas sustancias, así como de diferentes derivados, con el ánimo de mejorar las actividades presentadas por las moléculas utilizadas como guía.

²⁵ Brown, A.G., Smale, T.C., King, T.J., Hasenkamp, R., Thompson, R.H. "Crystal and Molecular Structure of Compactin, a New Antifungal Metabolite from *Penicillium brevicompactum*". *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1976**, 1165-70.

²⁶ a) Endo, A., Kuroda, M., Tsujita, Y. "ML-236A, ML-236B and ML-236C, New Inhibitors of Cholesterol Synthesis Produced by *Penicillium citrium*". *J. Antibiot.*, **1976**, 29, 1346-8. b) Doss, S.L., Chu, C.K., Mesbah, M.K., Cutler, H.G., Cole, P.D., Arrendale, R.F., Springer, J.P. "Isolation of Compactin (a Hypocholesterolemic Metabolite) from a New Source: *Penicillium cyclopium*". *J. Nat. Prod.*, **1986**, 49, 357-8. c) Monger, D.J., Lim, W.A., Kezdy, F.J., Law, J.H. "Compactin Inhibits Insect HMG-CoA Reductase and Juvenile Hormone Biosynthesis". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1982**, 105, 1374-80. d) Hiruma, K., Yagi, S., Endo, A. "ML-236B (Compactin) as an Inhibitor of Juvenile Hormone Biosynthesis". *Appl. Ent. Zool.*, **1983**, 18, 111-5. e) Edwards, J.P., Price, N.R. "Inhibition of Juvenile Hormone III Biosynthesis in *Periplaneta americana* with the Fungal Metabolite Compactin (ML-236B)". *Insect Biochem.*, **1983**, 13, 185-9. f) Bellés, X., Camps, F., Casas, J., Lloria, J., Messeguer, A., Piulachis, M.D., Sánchez, F.J. "In vivo and In vitro Effects of Compactin in Liposome Carriers on Juvenile Hormone Biosynthesis in Adult Females of *Blattella germanica*". *Pestic. Biochem. Physiol.*, **1988**, 32, 1-10.

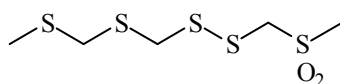
Así, nos encontramos como el metabolito de origen fúngico isovellera²⁷ fue preparado como mezcla racémica, la cual pudo ser resuelta por separación de los diésteres derivados del tratamiento con el ácido (-)-mentoxiacético del diol resultante de la reducción de los grupos aldehído presentes. Esta separación permitió comprobar que aunque el producto natural (+) y su isómero (-) presentan actividades antimicrobianas y citotóxicas semejantes, el primero es aproximadamente diez veces más mutagénico en el test de Ames frente a la cepa TA98.

Figura 1.20. Isovellera.

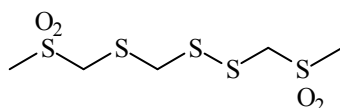


Otro ejemplo reciente que aparece en la bibliografía²⁸ es la síntesis total de distintos óxidos de compuestos orgánicos de azufre (el 2,2,9,9-tetraóxido de 2,4,5,7,9-pentatiadecano, obtenido de *Dysoxylum richii*, el 9,9-dióxido de 2,3,5,7,9-pentatiadecano, obtenido de *Lentinus edodes*, y el 2,2-dióxido de 2,4,5,7-tetratiadecano, obtenido de *Tulbaghia violacea*). Esta síntesis permitió comprobar que la estructura propuesta para el segundo de los compuestos no era la correcta, además de ver y corroborar las actividades fungicidas y bactericidas de todos los productos preparados.

Figura 1.21. Productos naturales de azufre sintetizados.



2,2-Dióxido de 2,4,5,7,9-pentatiadecano



2,2,9,9-Tetraóxido de 2,4,5,7,9-pentatiadecano

²⁷ Jonassohn, M., Hjertberg, R., Anke, H., Dekermendjian, K., Azallasi, A., Thines, E., Witt, R., Stener, O. "Structure-Activity Relationships for Unsaturated Dialdehydes. The Preparation and Bioactivities of (-)-Isovellera". *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, 5, 1363-7.

²⁸ Block, E., DeOrazio, R., Thiruvazhi, M. "Simple Total Synthesis of Biologically Active Pentathiadecane Natural Products, 2,4,5,9-Pentathiadecane 2,2,9,9-Tetraoxide (Dysoxysulfone), from *Dysoxylum richii*, and 2,3,5,7,9-Pentathiadecane 9,9-Dioxide, the Misidentified Lenthionine Precursor SE-3 from Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*)". *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 2273-5.

Por último, podemos mencionar los fungicidas de amplio espectro BAS 490 F²⁹ y BAS 494 02F³⁰. El primero de ellos entra en el grupo de las estrobilurinas, análogos sintéticos de la estrobilurina A obtenida de *Strobilurus tenacellus*. El segundo, por su parte, está constituido por dos ingredientes activos: el kresoxim-Me (desarrollado a partir de un metabolito secundario obtenido de hongos) y el epoxiconazol. De la combinación de ambos productos se obtiene un producto de alta eficacia frente a la mayoría de las enfermedades fúngicas de los cereales.

Para finalizar, podemos comprobar la importancia que pueden llegar a tener los compuestos activos aislados de los diferentes hongos (o análogos sintéticos obtenidos a partir de ellos), a través de la utilidad comercial³¹ de algunos de estos productos resumidos en la *Tabla I*.

Tabla I. Productos de origen microbiano usados en la agricultura.

| Tipo de Actividad | Sustancia | Efecto contra |
|----------------------------|----------------|--|
| Actividad Fungicida | Blasticidina S | <i>Pyricularia oryzae</i> |
| | Kasugamicina | <i>Pyricularia oryzae</i> |
| | Polioxinas | Mancha de la vaina del arroz y enfermedades fúngicas de frutales y vegetales |
| | Validamicinas | Mancha de la vaina del arroz |
| | Mildiomicina | Moho polvoriento |

²⁹ Gold, R.E., Ammermann, E., Koehle, H., Leinhos, G.M.E., Lorenz, G., Speakman, J.B., Stark-Urnau, M., Sauter, H. "The Synthetic Strobilurin BAS 490 F: Profile of a Modern Fungicide". Mod. Fungic. Antifungal Compd., Int. Symp., 11th, Meeting Date, **1995**.

³⁰ De Vleeschauwer, J., Schelberger, K., Saur, R., Defloor, K. "BAS 494 02F, a New Broad-Spectrum Fungicide for Disease Control in Cereals". *Toegepaste Biol. Wet.*, **1996**, 61, 367-76.

³¹ Yamguchi, I. "Extended Summary. SCI Pesticides Group Symposium. Novel Approaches in Agrochemical Research III". *Pestic. Sci.*, **1992**, 35, 391-2.

Tabla I (Cont.). Productos de origen microbiano usados en la agricultura.

| <i>Tipo de Actividad</i> | <i>Sustancia</i> | <i>Efecto contra</i> |
|------------------------------|------------------|--|
| Actividad Bactericida | Estreptomicina | Enfermedades de origen bacteriano de frutales y vegetales |
| | Oxitetraciclina | Enfermedades de origen bacteriano de frutales y vegetales |
| | Novobiocina | Chancro bacteriano del tomate |
| Actividad Herbicida | Bilanafos | Malas hierbas de campos de moras y en huertas |
| Actividad Insecticida | Tetranactina | Ácaros de los frutales y de las plantas del té |
| | Avermectinas | Ácaros e insectos de cítricos, algodón, plantas de decoración, vegetales, patatas... |

1.3. - Metabolitos Secundarios de *Penicillium brevicompactum* Dierckx

Como ha sido expuesto con anterioridad, el hecho de que los organismos oficiales hayan comenzado a tomar conciencia del peligro del uso indiscriminado de insecticidas químicos de síntesis está conduciendo a que las investigaciones realizadas hoy en día por los grupos de trabajo más importantes del sector estén encaminadas a la obtención de productos cada vez más selectivos, menos persistentes y de menor toxicidad para el hombre.

Con este objetivo y viendo las grandes posibilidades que en este sentido presentan hongos y plantas, nuestro grupo de trabajo ha venido realizando durante años estudios para la obtención de nuevos metabolitos presentes en la naturaleza, contribuyendo así a la búsqueda de nuevos agentes naturales de control de plagas, que puedan aportar soluciones alternativas, mejorando las practicadas hasta el momento³².

Así, en los primeros años de la década de los noventa, se llevaron a cabo búsquedas de actividad insecticida y antagonista de la HJ sobre diferentes extractos, obtenidos de 21 cepas del género *Penicillium*, que previamente habían sido aisladas de 15 muestras de cereales suministradas por diferentes almacenes de grano de la Comunidad Valenciana.

Como consecuencia de esta búsqueda de actividad se seleccionó una cepa caracterizada por presentar importantes actividades entomotóxica y antagonista de la HJ^{32b}. Este hongo fue clasificado por el International Mycological Institute (IMI, Surrey; UK) como *Penicillium brevicompactum* Dierckx. Un cultivo del hongo, codificado como cepa P79, se mantiene en la "Colección de Cultivos de la Cátedra de Microbiología" de la Universidad Politécnica de Valencia.

P. brevicompactum es uno de los hongos más prolíficos en la producción de metabolitos secundarios, de los cuales algunos sólo son producidos bajo condiciones muy específicas, mientras que la producción de otros es menos dependiente del sustrato o de los factores externos³³. Así de esta especie han sido aislados compuestos importantes como: a) ácido micofenólico³⁴ y compuestos relacionados, b) fenoles

³² a) March, M.C., "Compuestos Insecticidas, Fungicidas y bactericidas en Plantas Mediterráneas". Tesis Doctoral, 1996. b) Moya, M.P., "Productos Naturales con Actividad Insecticida y Antagonista de la Hormona Juvenil. Metabolitos Secundarios de *Penicillium brevicompactum* Dierckx.". Tesis Doctoral, 1995. c) Castillo, M.P. "Detección de Sustancias con Actividad Toxigénica Producidas por Cepas Fúngicas del Género *Penicillium*. Aislamiento e Identificación de Metabolitos Segregados por *Penicillium chrysogenum*". Tesis Doctoral 1995. d) Morte, M.T., "Aislamiento e Identificación de Compuestos Activos de *Chrysanthemum coronarium* L. y dos cepas de *Penicillium* sp.". Tesis Doctoral, 1995. e) Vargas, I.C., "Aislamiento e Identificación de Componentes del Residuo no Volátil del Aceite Esencial de Naranja: Actividades Biológicas y Antioxidantes". Tesis Doctoral, 1994.

³³ Frisvad, J.C., Filtenborg, O. "Terverticillate penicillia: Chemotaxonomy and Mycotoxin Production". *Mycologia*, 1989, 81, 837-61.

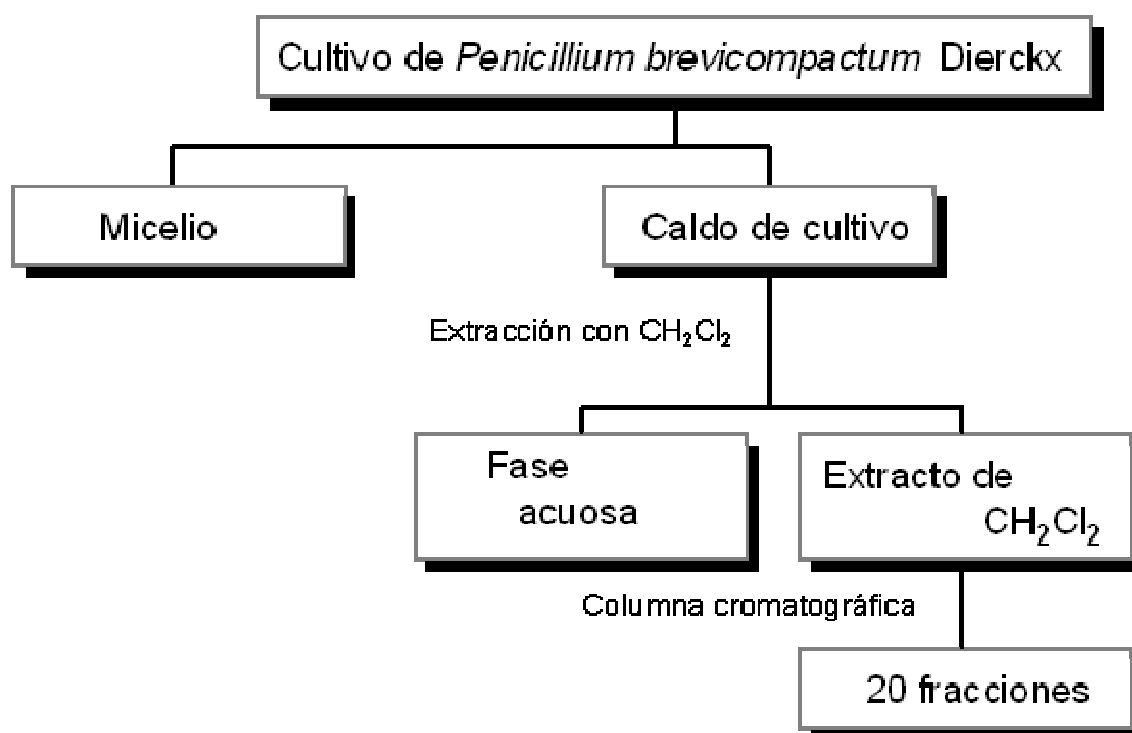
³⁴ a) Clutterbuck, P.W., Oxford, D.E., Raistrick, H., Smith, G. "The Metabolic Products of the *Penicillium brevicompactum* series". *Biochem. J.*, 1932, 26, 1441-58. b) Birkinshaw, J. F., Raistrick, H., Ross, D.J. "The Molecular Constitution of Micophenolic Acid, a Metabolic Product of *Penicillium brevicompactum*". *Biochem. J.*, 1952, 50, 630-4.

Raistrick^{34a,35}, c) brevianamidas³⁶, d) pebrolide y compuestos relacionados³⁷ e) compactina^{25,26} f) brevigellina³⁸.

Como se puede apreciar *P. brevicompactum* es un hongo ampliamente estudiado, no obstante las importantes actividades presentadas por dicha cepa hizo necesario, como se resume a continuación, un estudio más profundo y detallado de la mencionada cepa, intentando con ello proceder al aislamiento e identificación de los productos responsables de la actividad.

Para ello se llevó a cabo el cultivo a gran escala del mencionado hongo y se procedió a la separación, por filtración, del micelio y del caldo de cultivo, como aparece representado en la Figura 1.22.

Figura 1.22. Esquema de separación de las fracciones obtenidas de la cepa activa.



³⁵ Godin, P. "Separation, par Chromatographie sur Colonne de Cellulose, des Substances Phenoliques Produites par *Penicillium brevicompactum* et Analyse Chimique Sommaire de l'une d'entre elles". *Antonie van Leeuwenhoek*, **1955**, 21, 362-6.

³⁶ Birch, A.J., Wright, J.J. "The Brevianamides: A New Class of Fungal Alkaloid". *Chem. Comm.*, **1969**, 644-5.

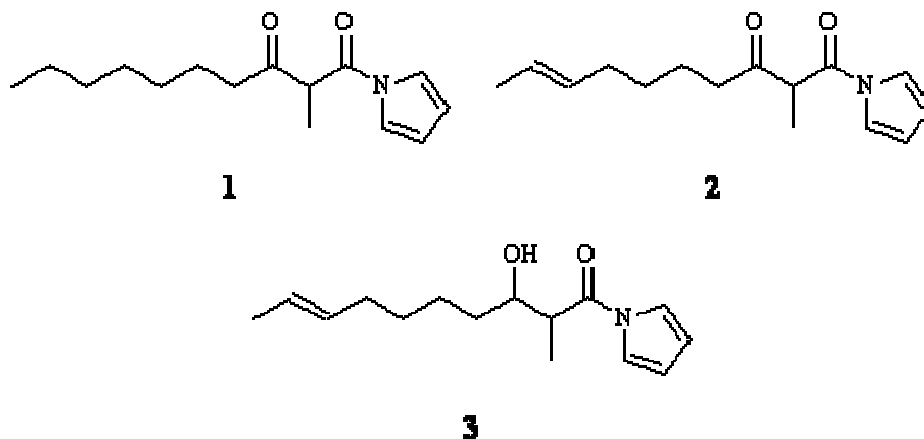
³⁷ McCorkindale, N.J., Calzadilla, C.H., Hutchinson, S.A., Kitson, D.H., Ferguson, G., Campbell, I.M. "The Structure and Chemistry of Pebrolide, Desacetylpebrolide and 1-Deoxypebrolide, Sesquiterpene Benzoates from *Penicillium brevicompactum*". *Tetrahedron*, **1981**, 37, 649-53.

³⁸ McCorkindale, N.J., Baxter, R.L. "Brevigelin, a Benzoylated Cyclodepsipeptide from *Penicillium brevicompactum*". *Tetrahedron*, **1981**, 37, 1795-1801.

El caldo de cultivo se extrajo con CH_2Cl_2 , siendo el conjunto de fracciones orgánicas obtenidas secadas, filtradas y concentradas. Se obtuvo de esta forma un residuo que se purificó por cromatografía de columna, conduciendo a la separación de 20 fracciones. Dichas fracciones se estudiaron sistemáticamente para la localización de la fracción o fracciones responsables de las importantes actividades detectadas en el extracto. A continuación se resume el resultado de la mencionada búsqueda:

- A dos de los productos aislados (1 y 2) se asignaron de forma tentativa estructuras caracterizadas por la presencia de una agrupación α -dicarbonílica asociada, en forma de amida, a un anillo de pirrol; la única diferencia entre ambos fue la presencia o ausencia de una insaturación en la cadena lateral de siete átomos de carbono. Al mismo tiempo, en un estudio³⁹ paralelo sobre otro hongo del mismo género, *Penicillium chrysogenum*^{32c}, se detectó la presencia de otro metabolito con anillo pirrólico, al que se asignó tentativamente la estructura 3 en base a los datos espectroscópicos.

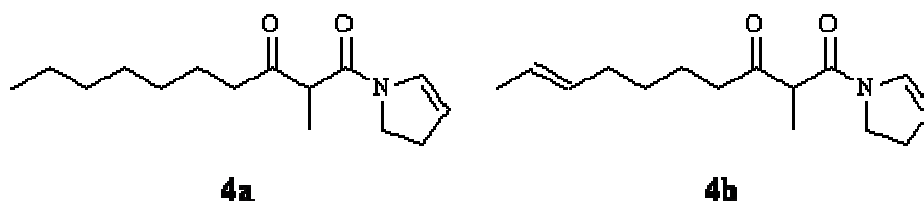
Figura 1.23. Metabolitos pirrólicos obtenidos de hongos del género *Penicillium*.



- Los metabolitos 4a y 4b, con anillos de 2-pirrolina, presentaron esqueletos carbonados similares a los anteriores, difiriendo únicamente en el grado de oxidación del anillo heterocíclico.

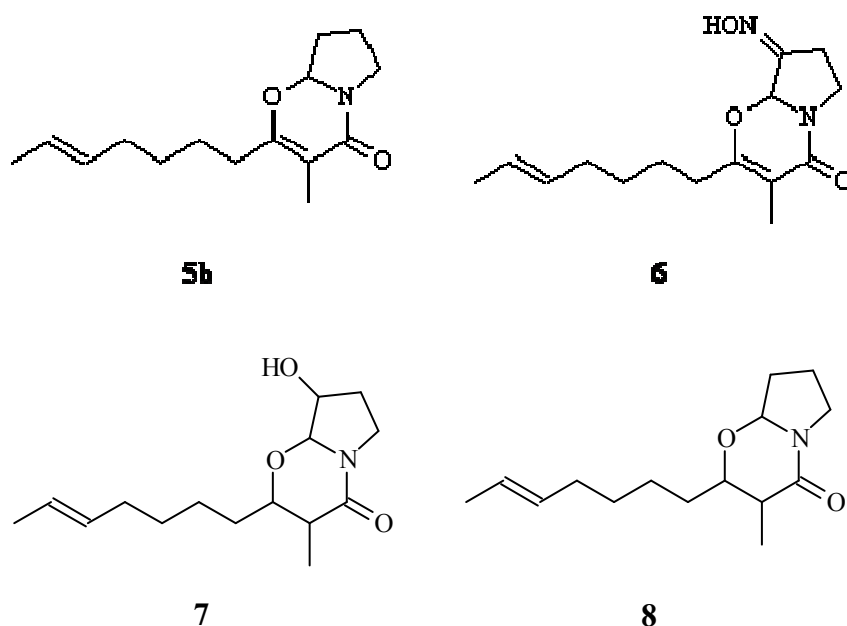
³⁹ En dicho estudio sobre *Penicillium chrysogenum*^{32c}, se detectó la presencia de algunos de los metabolitos a continuación descritos (3, 4a y 4b).

Figura 1.24. *Metabolitos derivados de la 2-Pirrolina aislados de hongos del género Penicillium.*



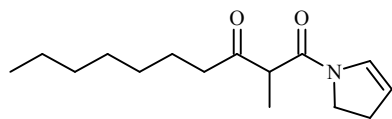
- Al tercer grupo de productos fueron asignadas a estructuras bicíclicas, que diferían entre sí en el grado de insaturación de los anillos y en los sustituyentes presentes en el anillo de cinco miembros. Las estructuras tentativas (5b-8) se indican a continuación.

Figura 1.25. *Metabolitos con estructuras bicíclicas aislados de Penicillium brevicompactum.*



Los productos aislados se ensayaron por separado, para conocer cual de ellos eran los responsables de las importantes actividades que habían sido detectadas previamente en los extractos. A continuación se resumen los resultados más interesantes obtenidos con aquellos productos que presentaron una actividad⁴⁰ significativa:

⁴⁰ Los derivados *N*-acilados del pirrol no presentaron ningún tipo de actividad significativa.



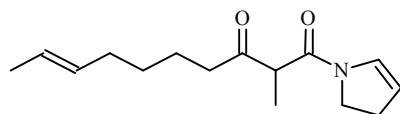
N-(2-Metil-3-oxodecanoil)-2-pirrolina
4a

- Entomotoxicidad: Por el método de aplicación tópica se observó un 30 % de mortalidad a dosis de 10 µg/ninfa en individuos de *Oncopeltus fasciatus* Dallas.

- Actividad anti-HJ: Se observó una elevada actividad (71 %) a

10 µg/ninfa; las ninfas ensayadas sufrieron metamorfosis precoz.

- Actividad Fungicida: Se observó cierta actividad frente a todos los hongos estudiados, aunque sólo en el caso de *Alternaria tenuis* y *Colletotrichum gloesporoides* los datos eran significativos (50 y 65 % de inhibición del crecimiento radial del micelio respectivamente), si comparamos con un producto comercial de amplio espectro como el benomilo.

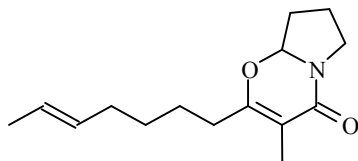


N-(2-Metil-3-oxodec-8-enoil)-2-pirrolina
4b

- Entomotoxicidad: Los ensayos realizados sobre individuos de la especie *O. fasciatus* por el método de aplicación tópica dieron como resultado un 20 % de

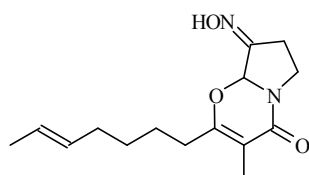
toxicidad a la dosis de 10 µg/ninfa.

- Actividad anti-HJ: Al igual que en el caso anterior, se observó una elevada metamorfosis precoz de las ninfas ensayadas (78 % de adultos precoces a la dosis de 10 µg/ninfa).
- Actividad fungicida: Aunque se detectó actividad frente algunos hongos, en ningún caso resultó destacable al compararla con la actividad exhibida por el benomilo comercial frente a esas mismas especies.



**2-Hept-5-enil-3-metil-4-oxo-6,7,8,8a-tetrahidro-4H-pirrol[2,1-b]1,3-oxazina
5b**

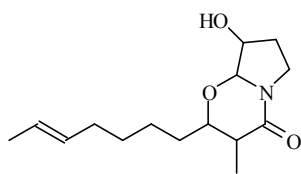
- Entomotoxicidad: De los ensayos realizados por aplicación tópica se obtuvo un 100 % de toxicidad a la dosis de 10 µg/ninfa, pero que desaparecía rápidamente al disminuir la dosis a la mitad.
- Actividad fungicida: Aunque se observó actividad fungicida frente a algunos de los hongos ensayados, en ningún caso los valores de inhibición del crecimiento radial del micelio eran importantes al compararlos con los del benomilo.
- Actividad bactericida: Se detectó cierta actividad bactericida, principalmente frente a las bacterias Gram-positivas; sin embargo, al comparar con la actividad de la tetraciclina, los datos obtenidos resultaban poco significativos.



**2-Hept-5-enil-3-metil-4-oxo-6,7,8,8a-tetrahidro-4H-pirrol[2,1-b]1,3-oxazin-8-ona, oxima
6**

- Entomotoxicidad⁴¹: Al igual que el compuesto anterior, se detectó una elevada toxicidad (100 %) a la dosis de 10 µg/ninfa, pero bastaba reducir la dosis a la mitad para que desapareciera la actividad.
- Actividad anti-HJ: A 5 µg/ninfa in vivo, sobre *O. fasciatus*, no produjo la metamorfosis precoz, ni alteraciones leves del desarrollo, así como tampoco efecto antigonadotrópico en los adultos. Sin embargo, de los ensayos en cultivos in vitro de corpora-allata de *Locusta migratoria* se obtuvo una inhibición total (100 %) de la biosíntesis de HJ a la concentración de 4.2×10^{-4} M.

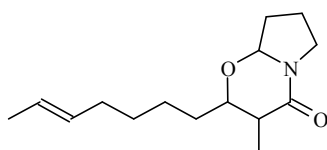
⁴¹ Los ensayos para la determinación de las actividades fungicida y bactericida de estos compuestos no pudieron ser llevados a cabo por no disponer de suficiente cantidad de muestra.



2-Hept-5-enil-8-hidroxi-3-metil-4-oxo-2,3,6,7,8,8a-hexahidro-4H-pirrol[2,1-b]1,3-oxazina

7

- Entomotoxicidad⁴¹: De los ensayos realizados por el método de aplicación tópica a la dosis de 10 µg/ninfa se obtuvo como resultado un 30 % de toxicidad.



2-Hept-5-enil-3-metil-4-oxo-2,3,6,7,8,8a-hexahidro-4H-pirrol[2,1-b]1,3-oxazina

8

- Entomotoxicidad: Los ensayos por aplicación tópica sobre individuos de *O. fasciatus* dieron como resultado un 90 % de toxicidad a la dosis de 10 µg/ninfa; sin embargo, este

valor disminuía a 10 % cuando la dosis se reducía a la mitad.

- Actividad fungicida: Ninguna de las actividades exhibidas frente a los hongos ensayados era especialmente significativa al compararla con el fungicida benomilo, a excepción del 55 % de inhibición del crecimiento radial del micelio obtenido para *A. tenuis* (donde el benomilo presenta un 0 %) y el 60 % para *Trichoderma viride*.
- Actividad bactericida: Se observó cierta actividad bactericida, principalmente frente a las bacterias Gram-positivas, pero en ningún caso los valores obtenidos eran destacables cuando se comparaba con la actividad de la tetraciclina.

En resumen los estudios realizados previamente por nuestro grupo de trabajo sobre hongos del género *Penicillium*, han conducido a la obtención de un conjunto de compuestos nitrogenados, estrechamente relacionados, que no están descritos en la literatura, ya sea como productos naturales o de síntesis y que presentan importantes propiedades biológicas. Estas sustancias pueden ser englobadas en dos grupos, uno de compuestos monocíclicos y otro de compuestos bicíclicos. Los compuestos monocíclicos contienen un sistema α -dicarbonílico (parcialmente reducido en una de las estructuras), siendo uno de los carbonilos parte de una agrupación amida, cuyo

átomo de nitrógeno forma parte de la 2-pirrolina o del pirrol. Los compuestos bicíclicos presentan todos una misma estructura de pirrolo[2,1-b]oxazina parcialmente hidrogenada, con una cadena lateral insaturada de siete átomos de carbono.

A modo de hipótesis, parece probable que la biosíntesis de todos estos productos, tanto mono como bicíclicos, pase por un mismo precursor, siendo, en realidad, los derivados del pirrol y la 2-pirrolina intermediarios en la ruta metabólica hacia compuestos más evolucionados biosintéticamente. Así, desde el punto de vista químico los productos bicíclicos podrían provenir de la ciclación intramolecular de los monocíclicos, por ataque nucleofílico intramolecular, a la posición C-2 del anillo de 2-pirrolina, a través de la forma enólica del carbonilo de cetona. Ciclaciones de este estilo ya han sido descritas en la literatura para explicar la biosíntesis de productos fúngicos⁴² y, según Bu'Lock⁴³, dichos productos presentan actividades más potentes cuanto más cerca están del final de la ruta de biosíntesis, lo que sugiere que la selección ha guiado tales rutas; así, los compuestos con mayores actividades biológicas (compuestos bicíclicos), surgirían como productos finales de los derivados del pirrol y de la 2-pirrolina.

1.4. - Objetivos

Como continuación y desarrollo complementarios de los trabajos de aislamiento, caracterización y determinación de las actividades biológicas de metabolitos obtenidos del género *Penicillium*, nuestro grupo de trabajo contempló la posibilidad de llevar a cabo la síntesis de estos productos, marcando como objetivos prioritarios:

- La confirmación de las estructuras que se habían propuesto de forma tentativa para los distintos metabolitos. Al tratarse de productos nuevos, y debido a las mínimas cantidades de muestra aisladas, en muchos casos existía un margen de incertidumbre en las asignaciones.

⁴² a) Birch, A.J., "Terpenoid Compounds of Mixed Biogenetic Origins". *J. Agr. Food Chem.*, **1971**, *19*, 1088-92. b) Holzapfel, C.W., Hutchison, R.D. "The Isolation and Structure of Two New Indole Derivatives from *Penicillium cyclospium* Westling". *Tetrahedron* **1970**, *26*, 5239-46.

⁴³ Bu'Lock, J.D., "Mycotoxins as Secondary Metabolites". En: "The Biosynthesis of Mycotoxins: a Study in Secondary Metabolism". (Steyn, P.S. ed.). Academic Press, New York, pp: 1-16.

- La obtención de mayores cantidades de los productos, para así poder completar todos los ensayos biológicos, y confirmar todos los resultados previamente observados.
- La obtención del mayor número posible de análogos para poder ensayar su actividad frente a plagas y tratar de establecer relaciones estructura-actividad que permitan la optimización de las estructuras.

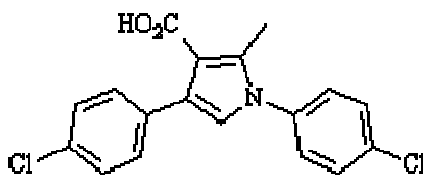
Por tanto, la obtención por síntesis alternativa de los nuevos metabolitos aislados de los hongos del género *Penicillium* supone el objetivo principal del presente trabajo. En capítulos posteriores se describen los procedimientos seguidos para su consecución.

Capítulo 2: Síntesis de Análogos Derivados del Pirrol

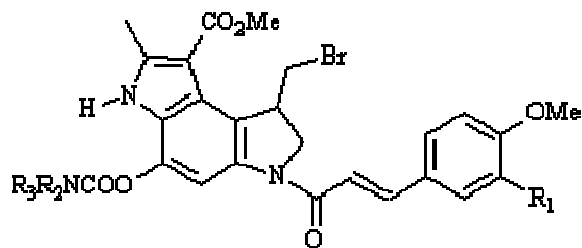
2.1. Introducción

Un simple repaso a la literatura más reciente, revela que cada año aparecen descritos un gran número de moléculas activas que incorporan a sus estructuras anillos de pirrol. Estos productos, que en general presentan muy diversas actividades, pueden ser naturales o de síntesis; en la mayoría de los casos su obtención es el resultado de estudios donde productos naturales con determinadas propiedades han sido modificados a fin de optimizar las estructuras.

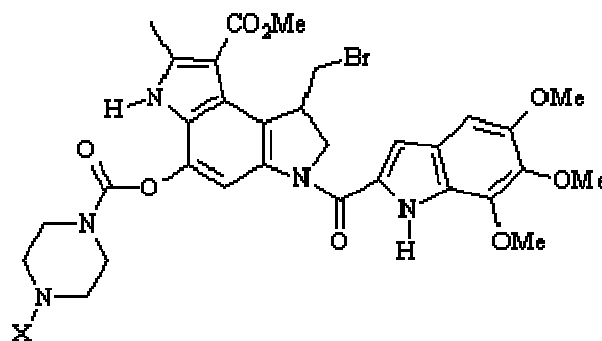
Así, dentro del campo farmacológico, parece que este tipo de productos son especialmente útiles como a) antitumorales⁴⁴ b) antibióticos⁴⁵ c) antiinflamatorios⁴⁶ d) anticonvulsivos⁴⁷ e) antimicrobianos⁴⁸. A continuación se presentan las estructuras de algunos productos de carácter pirrólico que han sido utilizados en este área en los últimos años:



-
- ⁴⁴ a) Nagamaru, S., Asai, A., Amishiro, N., Kobayashi, E., Gomi, K., Saito, H. "Synthesis and Antitumor Activity of Duocarmycin Derivatives: A-Ring Pyrrole Compounds Bearing Cinnamoyl Groups". *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 972-9. b) Nagamura, S., Kinugawa, M., Ogasa, T., Saito, H. "The Synthesis of [³H]KW-2189 a Novel Antitumor Antibiotic". *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, **1997**, *39*, 471-7.
- ⁴⁵ Gustafsson, J., Jonassohn, M., Kahnberg, P., Anke, H., Sterner, O. "Structure-Activity Relationships for Unsaturated Dialdehydes. The Reactivity of the Antibiotic Sesquiterpene Isovelleral Towards Primary Amines". *Nat. Prod. Lett.*, **1997**, *9*, 253-8.
- ⁴⁶ Bucolo, C., Spadro, A. "Pharmacological Evaluation of Anti-Inflammatory Pyrrole-Acetic Acid Derivative Eye Drops". *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **1997**, *13*, 353-1.
- ⁴⁷ Carson, J.R., Carmosin, R.J., Pitis, P.M., Vaught, J.L., Almond, H.R., Stables, J.P., Wolf, H.H., Swinyard, E.A. "Aroyl(aminoacyl)pyrroles, a New Class of Anticonvulsant Agents". *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 1578-84.
- ⁴⁸ a) El-Sayed, O.A., Mokhtar, H.M., El-Shamy, H. "Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Some Pyrrole Derivatives" *Bull. Pharm. Sci., Assiut Univ.*, **1995**, *18*, 115-23. b) Poretta, G.C., Biava, M., Fioravanti, R., Fishertti, M., Melino, C., Venza, F., Bolle, P., Tita, B. "Research on Antibactericidas and Antifungal Agents. Synthesis and Antimicrobial Activity of 1,4-Diarylpyrroles". *Eur. J. Med. Chem.*, **1992**, *27*, 717-22.



$R_1 = H$; $R_2R_2N = 4$ -metilpirazinilo, 4-pirepidinopiperidinilo, 4-(*i*-propilamino carbonilmetil)piperazinilo
 $R_1 = NEt_2$, NMe_2 , 3-aminopropiloxi, NH_2 , OCH_2CO_2H ; $R_2R_2N = 4$ -metilpirazinilo



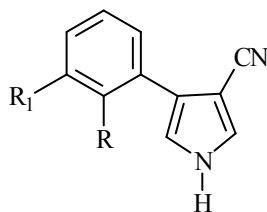
$X = C^3H_3$

Mientras, dentro del área biológica, donde parecen estar más extendidos, estos productos que incorporan a sus estructuras anillos de pirrol presentan actividades como a) fungicidas⁴⁹ b) insecticidas⁵⁰ c) bactericidas^{49a,51}. A continuación se presentan las

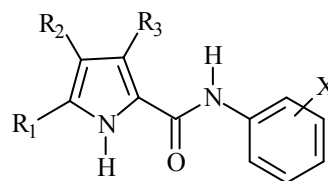
⁴⁹ a) Di Santo, R., Costi, R., Artico, M., Massa, S., Musiu, C., Milia, C., Putzolu, M., La Colla, P. "N-(1-Naphthylmethyl)-N-(1-alkyl-4-aryl-1H-pyrrol-3-ylmethyl)methylamines Related to Naftifine. Synthesis and Antifungal Activity". *Med. Chem. Res.*, **1997**, 7, 98-108. b) Ligon, J.M., Lam, S.T., Gaffney, T.D., Hill, D.S., Hammer, P.E., Torkewitz, N. "Biocontrol: Genetic Modifications for Enhanced Antifungal Activity". *Biol. Plant-Microbe Interact., Proc. Int. Symp. Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1996**, 8th, 457-62. c) Massa, S., Mai, A., Ragno, R., Porretta, G.C., Retico, A., Simonetti, G., Artico, M. "Antifungal Agents. Dichorophenylpyrrolimidazolymethane Derivatives: Synthesis and Antifungal Activities". *Farmaco* **1994**, 49, 51-5. d) Massa, S., Di Santo, R., Artico, M., Costi, R., Apuzzo, G., Simonetti, G., Artico, M. "Novel in vitro Highly Active Antifungal Agents with Pyrrole and Imidazole Moieties". *Med. Chem. Res.*, **1992**, 2, 148-53. e) Jones, R.A., Rustidge, D.C., Sarin, R. "Pyrrole Studies. Synthesis of Potentially Biologically Active Pyrroloylanilines". *Synth. Commun.*, **1993**, 23, 771-7. f) Nyfeler, R., Ackermann, P. "Phenylpyrroles, a New Class of Agricultural Fungicides Related to the Natural Antibiotic Pyrrolnitrin". *ACS Symp. Ser.*, 504 (*Synth. Chem. Agrochem. III*), **1992**, 395-404. g) Knüppel, P.C., Lantusch, R., Wollweber, D. "Synthesis of Fungicidal Phenylpyrroles". In *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III*. Baker, D.R., Fenyes, J.G., Steffens, J.J., Eds.; ACS Symposium Series; American Chemical Society; Washington, DC, **1992**, pp 405-13.

⁵⁰ a) Kuhn, D.G. "Structure-Activity Relationships for Insecticidal Pyrroles". *ACS Symp. Ser.*, 658 (*Phytochemicals for Pest Control*), **1997**, 195-205. b) Addor, R.W., Babcock, T.J., Black, B.C., Brown, D.C., Diehl, R.E., Furch, J.A., Kameswaran, V., Kamhi, V.M., Kremer, K.A., Kuhn, D.G., Lowell, J.B., Lowen, G.T., Miller, T.P., Peevey, R.M., Siddens, J.K., Treacy, M.F., Trotto, S.H., Wright, D.P. "Insecticidal Pyrroles: Discovery and Overview". In *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III*; Baker, D.R., Fenyes, J.G., Steffens, J.J., Eds.; ACS Symposium Series; American Chemical Society; Washington, DC, **1992**, pp 283-97. c) Black, B.C., Hollingworth, R.M., Ahammdsahib, K.I., Kukel, C.D., Donovan, S. "Insecticidal Action and Mitochondrial Uncoupling

estructuras de algunos productos de carácter pirrólico que han sido utilizados en este área en los últimos años:



R, R₁ = H, Cl, Br, CN, OMe, SMe, SO₂Me

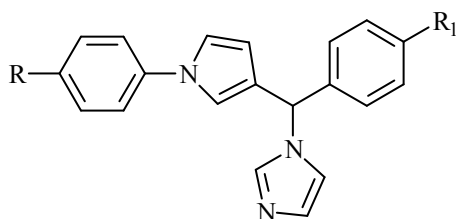


R₁ = R₃ = Me, R₂ = CO₂Et,

X = Me, alcoxi, halo, nitro, CO₂Et

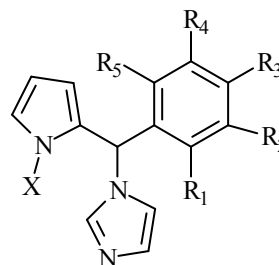
R₁ = R₃ = CO₂Et, R₂ = Me,

X = Me, alcoxi, halo, nitro, CO₂Et

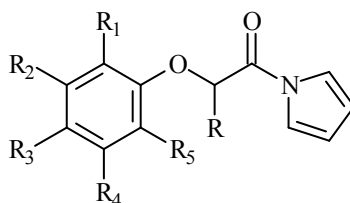


R = H, Cl, F

R₁ = H, Cl, Me, F



X = CH₂CH₂CH₂, Pr, Me,
ciclopropilmetil, estiril
R₁-R₅ = H, Cl



R=Me, R₁-R₅=H

R=Me, R₁=R₃=R₅=Br, NO₂, R₂=R₄=H

R=R₂=R₄=H, R₁=R₃=R₅=Br, Cl, NO₂

R=R₂-R₅=H, R₁=Me, Cl, NO₂

R=R₁=R₃-R₅=H, R₂=Me, NO₂

R-R₂=R₄-R₅=H, R₃=Me, Cl, NO₂

R=R₂=R₄-R₅=H, R₁=R₃=Cl

R=R₂=R₃=R₅=H, R₁=R₄=Cl

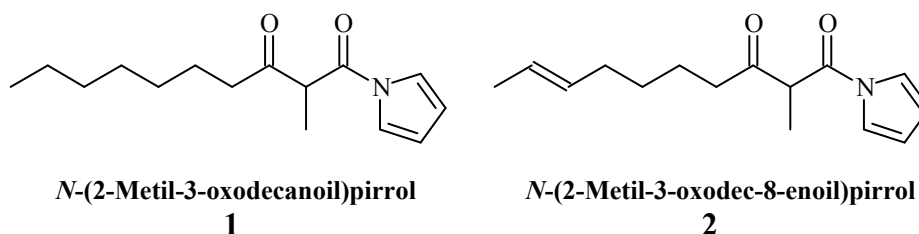
Activity of AC-303, 630 and Related Halogenated Pyrroles". *Pestic. Biochem. Physiol.*, **1994**, *50*, 115-28.

⁵¹ Srivastava, S.K., Jain, P.K. "Synthesis of New Pyrrole Derivatives as Biological Active Agents". *Proc. Natl. Acad. Sci. India, Sect. A*, **1991**, *61*, 331-4.

De todas las actividades descritas, parece que la actividad fungicida es la más extendida entre este tipo de compuestos, provocando que sea la rama donde mayor número de estudios sintéticos se realicen para la optimización de la actividad.

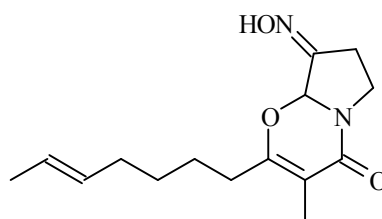
Como se ha descrito previamente, dentro de la serie de metabolitos aislados de las cepas de *Penicillium*, había un grupo de compuestos cuya característica común era la presencia en su estructura de un anillo de pirrol, con el átomo de nitrógeno formando parte de una agrupación amida.

Figura 2.1. Metabolitos de origen pirrólico aislados de especies del género *Penicillium*.



A pesar de los antecedentes mencionados, los metabolitos aislados no exhibieron ninguna actividad significativa. No obstante, el hecho de que **1** y **2** fueran obtenidos a partir del mismo extracto que la brevioxima activa⁵², **6**, junto a la similitud en las estructuras entre todos los productos, nos impulsaron a llevar a cabo la síntesis de compuestos pirrólicos análogos a los naturales.

Figura 2.2. Estructura de la brevioxima activa aislada de *Penicillium brevicompactum*.



2-Hept-5-enil-3-metil-4-oxo-6,7,8,8a-tetrahidro-4H-pirrol[2,1-b]-1,3-oxazin-8-ona, oxima
6

⁵² Moya, P., Castillo, M., Primo-Yúfera, E., Couillaud, F., Martínez-Mañez, R., Garcerá, M.D., Miranda, M.A., Primo, J., Martínez-Pardo, R. "Brevioxime, a New Juvenile Hormone Biosynthesis Inhibitor Isolated from *Penicillium brevicompactum*". *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 8544-5.

2.2. Resultados y Discusión

2.2.1.- Asignación estructural de los productos naturales

Las estructuras de los metabolitos pirrólicos **1**, **2** y **3** fueron asignados en base a los datos espectroscópicos obtenidos mediante las distintas técnicas disponibles.

Así, la fórmula molecular del metabolito obtenido en mayor cantidad, **2**, resulto ser $C_{15}H_{21}NO_2$, según HRMS. El espectro de masas exhibe fragmentos correspondientes a los iones resultantes de la rotura de la agrupación amida, m/z 181.1226 ($C_{11}H_{17}O_2$), y del enlace C_2-C_3 , m/z 125.0968 ($C_8H_{13}O$). Asimismo, el espectro de 1H RMN presenta dos señales ($\delta= 7.3$ y 6.3 ppm) correspondientes a cuatro protones de un anillo de pirrol (ello indica sustitución en el N), y un multiplete ($\delta= 5.4$ ppm) asignable a los dos protones de un doble enlace disustituido por dos grupos alquilo. La presencia de estas agrupaciones se ve confirmada por la aparición en el espectro de ^{13}C RMN de dos grupos de señales a $\delta= 119.6$ y 114.1 ppm (pirrol), y a $\delta= 131.1$ y 125.5 ppm (doble enlace). Además, el 1H RMN muestra un cuadruplete que integra un único protón a $\delta= 4.1$ ppm debido a un grupo metino conectado a un metilo. El espectro de IR revela la presencia de dos grupos carbonilo, que dan lugar a dos bandas intensas a $\nu= 1727$ y 1700 cm^{-1} . Todos estos hechos parecen indicar la presencia de una subestructura de β -cetoamida. Por otro lado, la comparación de los espectros de 1H RMN del producto **2** y la brevioxima⁵³ (**6**), muestra que ambos compuestos poseen la misma cadena lateral.

El otro metabolito aislado de *Penicillium brevicompactum*, **1**, posee, de acuerdo con HRMS, una fórmula molecular $C_{15}H_{23}O_2$. Como en el caso anterior, el espectro de masas presenta fragmentos correspondientes a la ruptura del enlace de amida. De nuevo, el espectro de IR muestra la presencia de dos bandas intensas correspondientes a dos grupos carbonilo a $\nu= 1725$ y 1703 cm^{-1} . El 1H RMN exhibe señales a $\delta= 4.1$ y 1.6 ppm (como un cuadruplete y un doblete respectivamente), correspondientes a la agrupación $CHCH_3$ presente entre dos grupos carbonilo. El resto de las señales y la ausencia de protones olefínicos indican que ambos productos naturales únicamente difieren en el grado de insaturación de la cadena lateral, debido a la presencia o ausencia del doble enlace.

⁵³ La estructura del producto natural activo brevioxima fue inequívocamente establecida por rayos X.

2.2.2.- Preparación de los análogos pirrólicos

El hecho de haber aislado los compuestos **1** y **2** de una de las fracciones presente en el mismo extracto que la brevioxima (**6**) y los demás metabolitos activos (**4-8**), junto con la presencia en todos los productos naturales de una cadena lateral común de siete átomos de carbono (con o sin insaturación), nos indujo a llevar a cabo la síntesis de productos relacionados derivados del pirrol, con el objetivo de explorar sus actividades biológicas.

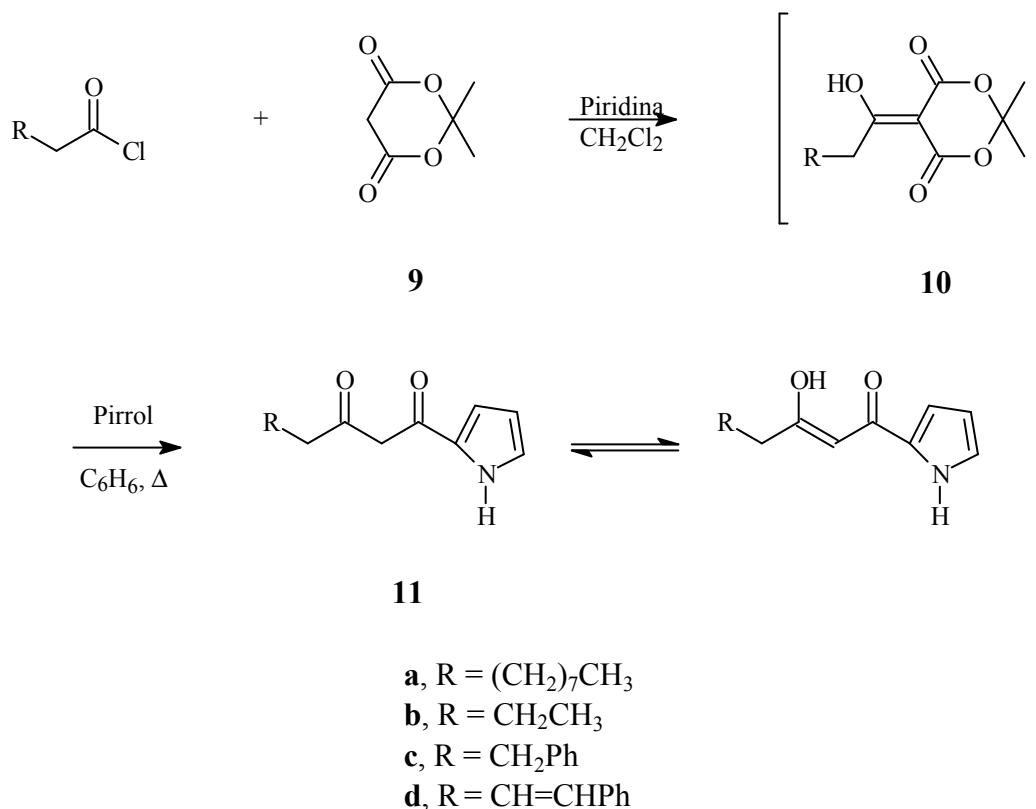
La presencia en los metabolitos aislados de una agrupación amida, donde el grupo carbonilo aparece unido al N de un anillo de pirrol, sugería que estos productos debían ser fácilmente hidrolizables, química o enzimáticamente, lo que podría repercutir en sus posibles actividades biológicas. Esta fue la principal razón que nos hizo variar la estrategia de síntesis, dirigiendo nuestros esfuerzos hacia la obtención de productos que presentasen cadenas laterales similares a las exhibidas por los productos naturales, pero donde la unión al anillo heterocíclico fuese mediante un enlace C-C más estable.

Así, para introducir esta variación decidimos acilar el ácido de Meldrum⁵⁴, **9**, con diferentes cloruros de ácido [cloruro de octanoilo (**a**), cloruro de propionilo (**b**), cloruro de fenilacetilo (**c**) y cloruro de cinamoilo (**d**)], usando piridina como base.

Los derivados acilados **10** son intermedios de reacción susceptibles de ser atacados por diferentes nucleófilos, proporcionando subestructuras β -dicarbonílicas⁵⁵. Así, hicimos reaccionar, sin previa purificación, los diferentes derivados acilados del ácido de Meldrum con el pirrol, obteniendo directamente las β -dicetonas **11**, correspondientes a la sustitución del anillo aromático en el C₂.

⁵⁴ a) Meldrum, A.N. "A β -Lactonic Acid from Acetone and Malonic Acid". *J. Chem. Soc.*, **1908**, 93, 598-601. b) Davidson, D., Bernhardt, S.A. "The Structure of Meldrum's Supposed β -Lactonic Acid". *J. Am. Chem. Soc.*, **1948**, 70, 3426-8.

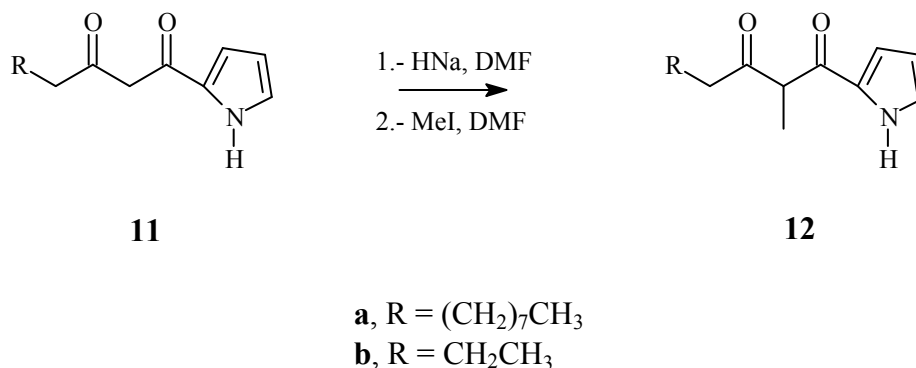
⁵⁵ a) Oikawa, Y., Sugano, K., Yonemitsu, O. "Meldrum's Acid in Organic Synthesis. A General and Versatile Synthesis of β -Keto Esters". *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 2087-8. b) Pak, C.S., Yang, H.C., Choi, E.B. "Aminolysis of 5-Acyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-diones (Acyl Meldrum's Acids) as a Versatile Method for the Synthesis of β -Oxo carboxamides". *Synthesis*, **1992**, 1213-4.

Esquema 2.1. Preparación de los derivados pirrólicos.

En los espectros de ¹H RMN se hace patente que estos compuestos se encuentran en disolución como una mezcla resultante del equilibrio entre las formas ceto y enólica. En el caso particular del producto **11d**, el equilibrio se encuentra totalmente desplazado hacia la forma enólica, debido probablemente a la elevada estabilidad que produce el alto grado de conjugación en esta forma.

Obtenidos los diferentes productos de acilación del pirrol, decidimos llevar a cabo la introducción de un grupo metilo entre los dos carbonilos con ánimo de obtener un isómero estructural del producto natural **1**. De este modo, se procedió al tratamiento con ioduro de metilo del carbanión resultante de la reacción de las β-dicetonas con un equivalente de HNa⁵⁶, obteniendo de una forma limpia y sencilla los productos de alquilación **12 a-b**.

⁵⁶ a) Benetti, S., Romagnoli, R. "Mastering β-Keto Esters". *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 1065-114. b) Abad, A., Agulló, C., Arnó, M., Cantín, A., Cuñat, A.C., Meseguer, B., Zaragoza, R.J. "Stereoselective Synthesis of (-)-Metasequoic Acid B". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 1837-43.

Esquema 2.2. Metilación de las β -dicetonas pirrónicas.

En los compuestos metilados se observó el equilibrio ceto-enólico hacia la forma cetónica. Esto se debe probablemente a que la introducción del grupo metilo implica una mayor rigidez de la cadena lateral de la molécula.

Como se ha mencionado con anterioridad de la metilación del producto **11a** se obtuvo un isómero estructural del producto natural **1**, lo que permitió comparar los datos espectroscópicos y apreciar las diferencias que existen entre uno y otro. La simetría en el anillo de pirrol del producto natural se pierde en el producto sintético, y ello se traduce en la aparición en los espectros de RMN de diferentes picos para cada uno de los protones y carbonos del anillo (ver *Anexo I*). La otra diferencia significativa la encontramos en los grupos carbonilo de ambas moléculas; así, el paso de β -cetoamida a β -dicetona va acompañado de variaciones en las frecuencias de la tensión C=O del espectro de IR y en los desplazamientos químicos en el ¹³C RMN.

2.3. Actividades Biológicas⁵⁷

Como ya se ha comentado con anterioridad, en la literatura aparecen descritos gran variedad de compuestos pirrónicos sintéticos que poseen propiedades protectoras de las plantas. Este tipo de compuestos ha mostrado especial actividad como fungicida⁴⁹ e insecticida⁵⁰. Por ello, resulta en cierto modo, sorprendente que los productos naturales aislados no presentaran actividad cuando fueron ensayados frente a *O. fasciatus*, para la

⁵⁷ Los datos correspondientes a los ensayos para la obtención de las actividades anti-HJ (*in vivo*) y bactericida no aparecen reflejados, por no haber obtenido ningún resultado significativo.

detección de sus actividades entomotóxicas, o frente a las diferentes especies de hongos, buscando sus actividades como fungicidas. Esta falta de actividad fue atribuida a la facilidad de hidrólisis que tiene una amida cuyo átomo de N forma parte de un anillo de pirrol.

Por ello, para la obtención de isómeros potencialmente activos decidimos llevar a cabo la modificación estructural más sencilla, consistente en la introducción de cadenas laterales similares pero con uniones C-C, más estables que las C-N (de pirrol), presentes en los metabolitos.

2.3.1- Actividad entomotóxica

Con la introducción de esta simple variación, se tuvo como resultado la obtención de los productos **11b** y **12b** con actividades insecticidas relevantes. Sus LD₅₀ (dosis letal para el 50 % de los individuos) fueron de 5.26 y 5.07 µg/cm², respectivamente, frente a ninfas de tercer estadio de *O. fasciatus*, ensayados por el método de contacto en placa.

De este resultado podemos comentar que a pesar del hecho de que ambos productos presentan una LD₅₀ similar, parece que la introducción del grupo metilo entre los dos carbonilos está asociada con una importante disminución en la pendiente de la curva dosis-respuesta (*Tabla I*). Así, el compuesto **11b** produjo el 100 % de mortalidad a 7.5 µg/cm², mientras que en el caso de **12b** la mortalidad fue de 73.3 % a la misma dosis.

Tabla I. Toxicidad de los compuestos pirrólicos activos frente *Oncopeltus fasciatus*.

| Producto | a^a | b^a | r^b | LD ₅₀ (µg/cm ²) |
|------------|--------|--------|-------|--|
| 11b | 5.0022 | 1.3934 | 0.96 | 5.26 |
| 12b | 3.1583 | 2.7731 | 0.98 | 5.07 |

^aAnálisis de regresión lineal modelo: $y = ax + b$; log-dosis vs mortalidad probit. ^b Coeficiente de correlación.

El resto de los productos obtenidos por síntesis no mostraron actividad insecticida al ser ensayados frente a ninfas de tercer estadio de *O. fasciatus* a la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ por el método de contacto. Estos resultados parecen indicar que la introducción de una cadena lateral larga o anillos aromáticos adicionales provoca un efecto adverso en la entomotoxicidad.

2.3.2.- Actividad fungicida

Las actividades fungicidas de los análogos sintéticos aparecen representadas en la *Tabla II*⁵⁸. En esta tabla cabe destacar el amplio espectro de actividad mostrado por los compuestos **11a**, **12a** y **11c**. Las actividades fungicidas de estos compuestos fueron determinadas frente a diferentes hongos pertenecientes a distintos géneros, siendo inhibido en todos los casos el crecimiento del micelio en mayor o menor grado. Por otro lado, y salvo en contadas excepciones, las especies pertenecientes al género *Colletotrichum* junto con *Trichothecium roseum* fueron las más sensibles a los mencionados productos, mientras que las especies *Fusarium culmorum* y *Rosellina necatrix* fueron las que exhibieron una menor sensibilidad.

Otro dato que cabe resaltar de la *Tabla II* es el hecho de que, en general, la actividad fungicida del producto **12a** es aproximadamente el doble que la del compuesto **11a**. Ello parece indicar que, en este caso, la introducción del grupo metilo entre los dos carbonilos produce un efecto beneficioso en la acción inhibidora del crecimiento del hongo. En este sentido, es interesante recalcar que la metilación provoca un aumento en la rigidez de la molécula, produciendo un desplazamiento total en el equilibrio ceto-enólico existente en disolución hacia la forma cetónica. En los compuestos no metilados (tales como **11a**) la forma enólica es predominante, según se desprende de los espectros de ¹H RMN. Este cambio pudiera estar relacionado con las actividades biológicas.

⁵⁸ Los datos de actividad fungicida se han analizado mediante un Anova (Análisis de varianza) y el test de diferencia menos significativo (LSD) se ha utilizado para comparar las medias. (Statgraphics Plus 2.1).

Tabla II. Actividades fungicidas de los productos activos.

| Fitopatógenos Objetivo | Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial del Micelio^a | | | | |
|--|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | % (Media ± DS) ^b | | | | |
| | 11a | 11b | 11c | 11d | 12a |
| <i>Fusarium culmorum</i> | 0 ^a | 0 ^a | < 20 ^b | 0 ^a | < 20 ^b |
| <i>Fusarium oxysporium</i> <i>ssp. gladioli</i> | 24.8±0.3 ^b | 0 ^a | 31.0±3.4 ^c | 0 ^a | 60.7±1.2 ^d |
| <i>Fusarium oxysporium</i> <i>ssp. niveum</i> | 27.7±0.9 ^b | 0 ^a | 51.7±4.3 ^c | 0 ^a | 47.7±5.2 ^c |
| <i>Geotrichum candidum</i> | < 20 ^b | 0 ^a | 26.4±0.4 ^c | 0 ^a | 36.7±3.4 ^d |
| <i>Colletotrichum gloeosporoides</i> | 29.3±3.5 ^b | < 20 ^a | 56.4±1.0 ^c | < 20 ^a | 40.9±2.1 ^d |
| <i>Colletotrichum coccodes</i> | 25.7±3.8 ^a | 33.8±1.3 ^b | 62.5±2.3 ^c | 54.3±2.7 ^d | 31.8±1.5 ^b |
| <i>Trichothecium roseum</i> | 20.2±2.3 ^b | 30.9±1.3 ^c | 82.2±3.6 ^d | 0 ^a | 30.8±2.3 ^c |
| <i>Alternaria tenuis</i> | 34.8±3.0 ^b | 0 ^a | 50.5±0.5 ^c | 0 ^a | 56.9±2.3 ^d |
| <i>Rosellinia necatrix</i> | < 20 ^b | 0 ^a | < 20 ^b | 0 ^a | 28.2±2.0 ^c |
| <i>Verticillium dahliae</i> | 27.8±3.6 ^c | < 20 ^b | 55.1±4.8 ^d | 0 ^a | 30.8±2.3 ^c |
| <i>Trichoderma viride</i> | < 20 ^b | 0 ^a | 23.0±2.0 ^c | 0 ^a | 43.0±1.0 ^d |
| <i>Penicillium italicum</i> | 24.1±0.1 ^b | 0 ^a | < 20 ^c | 0 ^a | 31.2±0.1 ^d |
| <i>Aspergillus parasiticus</i> | 24.6±0.1 ^b | 0 ^a | 25.7±1.4 ^b | 0 ^a | 43.3±0.1 ^c |

^a Concentración en los ensayos: 100 µg/mL ^b Cada valor indica la media y la desviación standard de los tres experimentos diferentes. En una línea, los valores que presentan el mismo superíndice (A-D) no presentan diferencias significativas (P > 0.05).

Asimismo, la longitud de la cadena parece tener mucha importancia en lo que respecta a la actividad fungicida de estos productos. Al contrario de lo que había sido observado para la actividad insecticida, los productos con cadenas laterales más largas presentan una mayor actividad fungicida.

De todos los compuestos ensayados, el compuesto **11c** presentó la más alta actividad fungicida, con inhibiciones del crecimiento alrededor de 50% en casi la mitad de los hongos ensayados. Otros pirroles que contienen sustituyentes fenilo han presentado importantes actividades fungicidas. Este es el caso del metabolito secundario pirrolnitrina, producido por diferentes especies de *Pseudomonas*, y del cual dos análogos han sido elegidos para el desarrollo comercial de fungicidas^{49f}.

También el compuesto **11d**, estructuralmente relacionado con **11c**, fue efectivo selectivamente contra las especies del género *Colletotrichum*, particularmente contra *C. coccodes*. En este caso, la pérdida de actividad, que se ve reflejada en el reducido rango de fitopatógenos afectados, podría estar relacionada con el alto grado de conjugación presente en la molécula, capaz de desplazar el equilibrio ceto-enólico totalmente hacia la forma enólica. Al igual que ocurría para el anteriormente comentado **11a**, parece que la presencia de un determinado porcentaje de las moléculas en la forma enólica provoca una disminución de la actividad fungicida de este tipo de compuestos.

Como resumen, se puede decir que se ha detectado un destacado incremento en la actividad de los análogos sintéticos, obtenidos por introducción de una única variante estructural, frente a los productos naturales aislados y tomados como punto de partida; a pesar de ello, todavía es necesario llevar a cabo mejoras que proporcionen nuevos productos capaces de conseguir un control más efectivo de insectos y hongos. En este sentido, las estructuras aquí presentadas son lo suficientemente simples como para permitir considerarlas como punto de partida de distintas modificaciones sintéticas.

2.4. Parte Experimental

2.4.1.- Técnicas experimentales

Los puntos de fusión están sin corregir y se han determinado en un aparato Büchi 510. Los valores de la rotación óptica para los productos naturales se determinaron en un polarímetro Schmidt Haensch utilizando la luz de longitud de onda correspondiente a la línea D del espectro de emisión del sodio, empleando CHCl₃ como disolvente. Las concentraciones de las disoluciones se expresan en gr/100 mL. Los espectros de IR se han obtenido en forma de película líquida en un espectrómetro Perkin Elmer modelo 781 o utilizando un espectrómetro Nicolet 710 FT-IR, abarcando ambos

la región de 4000-600 cm^{-1} (pastilla de KBr para los productos naturales). Se indican las ν_{max} para las bandas de absorción principales. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C fueron registrados en un espectrómetro Varian Gemini, en CDCl_3 como disolvente a 300 y 75 MHz (o con un espectrómetro Varian Unity a 400 y 100 MHz en el caso de los productos naturales), respectivamente. Los desplazamientos químicos aparecen expresados en δ (ppm), usando TMS como patrón interno standard. La determinación de la multiplicidad en los espectros de ^{13}C RMN se realizó mediante la técnica DEPT. Los espectros de masas se obtuvieron por la técnica de impacto electrónico en un espectrómetro Hewlett-Packard 8988A apareciendo reflejadas las relaciones m/z y las intensidades relativas. Los datos de HRMS se consiguieron en un espectrómetro Fisons VG Autospec (GC 8000).

La purificación por cromatografía de columna se llevó a cabo sobre gel de sílice para cromatografía flash 60 (230-400 mesh) según el método de Still⁵⁹. Para la cromatografía de capa fina analítica se utilizaron cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄, siendo las manchas visualizadas con luz UV y/o cámara de I₂.

Los reactivos químicos disponibles comercialmente se emplearon sin tratamiento previo excepto en aquellos casos en los que se menciona. Los reactivos sensibles al aire y/o humedad se manejaron con ayuda de jeringas y cánulas secas, siempre bajo una ligera presión de atmósfera inerte. Las reacciones que implican el uso de reactivos sensibles a la humedad y/o oxígeno se realizaron bajo atmósfera inerte, especificándose en cada caso. Para reacciones que implican ausencia de humedad se utilizaron, sin mayor purificación, disolventes grado anhidro disponibles comercialmente. Usualmente la mezcla de reacción era diluida con agua destilada y extraída tres veces con un disolvente orgánico. Los extractos orgánicos reunidos eran lavados con una disolución saturada de cloruro sódico y secados por tratamiento con sulfato sódico anhidro. Tras la correspondiente filtración la evaporación del disolvente se realizó con un rotavapor y finalmente bajo vacío hasta alcanzar total sequedad.

⁵⁹ Still, W.C., Kanh, M., Mitra, A. "Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution". *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 2923-5.

2.4.2.-Ensayos biológicos

Insectos. Individuos de la especie *Oncopeltus fasciatus* Dallas se mantuvieron a 28 ± 1 °C, a una humedad relativa del 50-60 %, con fotoperiodo de 16h/8h (luz/oscuridad) y alimentación basada en semillas de girasol.

Microorganismos Objetivo. La actividad fungicida se determinó contra quince fitopatógenos importantes desde el punto de vista agrícola: *Aspergillus parasiticus* (CECT 2681), *Geotrichum candidum* (CCM 245), *Alternaria tenuis* (CECT 2662), *Colletotrichum gloeosporoides* (CECT 2859), *Colletotrichum coccodes* (CCM 327), *Fusarium oxysporium* ssp *gladioli* (CCM 233), *Fusarium oxysporum* ssp *niveum* (CCM 259), *Fusarium culmorum* (CCM 172), *Penicillium italicum* (CECT 2294), *Trichoderma viride* (CECT 2423), *Trichothecium roseum* (CECT 2410), *Rosellinia necatrix* (CCM 297), *Verticillium dahliae* (CCM 269), *Pyricularia oryzae* (CCM 391) y *Phytophthora citrophthora* (CECT 2353). Seis cepas bacterianas fueron utilizadas con objetivo de determinar la actividad bactericida: *Staphylococcus aureus* (CECT 86), *Enterococcus faecalis* (CCM 12), *Salmonella typhi* (CECT 409), *Erwinia carotovora* (CECT 225), *Escherichia coli* (CECT 405) y *Bacillus cereus* (CECT 148).

Las cepas fueron proporcionadas por la "Colección Española de Cultivos Tipo" (CECT) o por la "Colección de la Cátedra de Microbiología" (CCM) del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia.

Entomotoxicidad y Actividad Anti-JH. Los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Bowers⁶⁰, tal y como se describe brevemente a continuación. Quince ninfas de tercer estadio de *O. fasciatus* fueron introducidas en placas Petri de 9 cm con $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de los productos, realizándose en paralelo, ensayos por aplicación tópica sobre ninfas de cuarto estadio de *O. fasciatus* recién mudadas a $10 \mu\text{g}/\text{ninfa}$. Los efectos de toxicidad fueron considerados de acuerdo al número de insectos muertos después de 72 h de exposición a las muestras y realización del análisis probit⁶¹ para la estimación de la LD₅₀. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Las ninfas supervivientes fueron transferidas a un matraz de 500 mL y mantenidas en condiciones standard con un vial de agua y dieta de mantenimiento,

⁶⁰ Bowers, W.S.; Ohta, T.; Cleere, J.S.; Marsella, P.A. "Discovery of Insect Anti-Juvenile Hormones in Plants". *Science*, **1976**, *193*, 542-7.

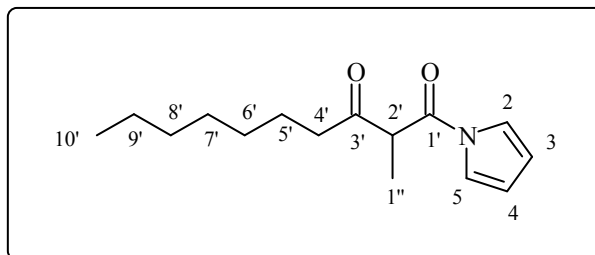
⁶¹ Finney, D.J. "Probit Analysis" Cambridge University Press: Cambridge, England, 1971.

donde se hace el seguimiento de su desarrollo. Cuando se realiza la metamorfosis y la reproducción y las ninfas son viables, el ensayo se considera negativo. Por el contrario, la prueba es positiva cuando se produce metamorfosis precoz o cuando se detecta esterilidad en los adultos. En paralelo, se realizaron ensayos control donde los insectos fueron tratados con la misma cantidad de acetona.

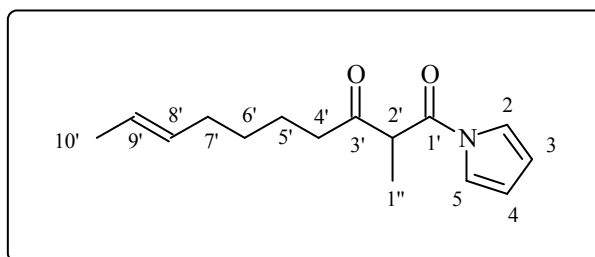
Actividad Fungicida. Los productos disueltos en acetona, fueron añadidos a PDA, en una concentración de 100 µg/mL. Se usaron placas de PDA conteniendo únicamente acetona como control. Cultivos de siete días de cada hongo en placas PDA se usaron como un inóculo en las placas de ensayo. El crecimiento del micelio se midió y el porcentaje de inhibición fue calculado en base al crecimiento en las placas de control después de cuatro días de incubación a 28 °C (seis días para *R. necatrix* y *V. dahliae*). La actividad fungicida se determinó por triplicado para cada hongo.

Actividad Bactericida. Los ensayos de actividad bactericida se realizaron por el método del disco de papel en placa. Cultivos de 24 h de cada microorganismo, crecidos en medio de cultivo Plate Count (Difco), se siembran en caldo de nutritivo (Nutrient Broth "Difco") y se incuban, durante un periodo de 16-24 h., a 28 ó 37 °C, según la bacteria, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.15-0.20, medida a 700 nm (Colorímetro Cecil Instruments CE 343). Posteriormente, se inocula 1 mL de la suspensión bacteriana en una placa Petri estéril y se vierten 15 mL del medio de ensayo Mueller-Hinton (Difco); cuando el medio está totalmente solidificado se colocan los discos (papel Whatman nº 113, 0.5 cm de diámetro), previamente impregnados con las muestras y secados a temperatura ambiente. Se colocan un máximo de cinco discos por placa.

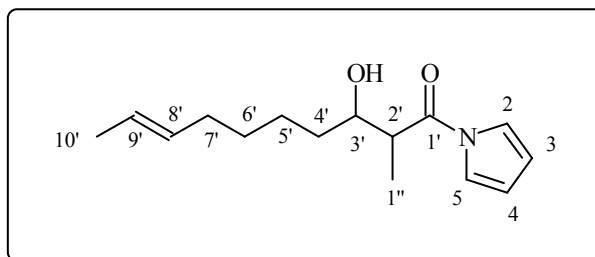
2.4.3.- Caracterización de productos naturales



Al metabolito **1** fue asignada la estructura de ***N*-(2-metil-3-oxodecanoil)pirrol** en base a los siguientes datos espectroscópicos y por comparación con el compuesto **2**. $[\alpha]_D^{19} = 14^\circ$ (c 0.14, CHCl_3); HRMS (CI): m/z 278.2121 ($M + \text{C}_2\text{H}_5^+$, $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{NO}_2$ requiere 278.2120); IR: ν_{max} 3150, 2951, 2925, 2855, 1725, 1703, 1466, 1404, 1345, 1275, 1128, 1070, 903 y 742; $^1\text{H NMR}$: δ_{H} 7.3 (m, 2H, H-2+H-5), 6.3 (m, 2H, H-3+H-4), 4.1 (q, $J = 7$ Hz, 1H, H-2'), 2.6 y 2.5 (m+m, 2H, H-4'), 1.6 (d, $J = 7$ Hz, CHCH_3), 1.3 (m, 8H, $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) y 0.9 (m, 3H, CH_2CH_3); MS: m/z 249 (M^+ , 2), 183 (1), 154 (1), 150 (1), 127 (11), 123 (2), 109 (2), 98 (2), 94 (5), 83 (6), 67 (100), 57 (18) y 55 (10).



Al producto natural **2** fue asignada la estructura de ***N*-(2-metil-3-oxodec-8-enil)pirrol** en base a los siguientes datos espectroscópicos. $[\alpha]_D^{20} = 23^\circ$ (c 0.20, CHCl_3); HRMS (CI): m/z 248.1661 ($M + \text{H}^+$, $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_2$ requiere 248.1650); IR: ν_{max} 3150, 2937, 2871, 1727, 1700, 1465, 1404, 1345, 1275, 1129, 1072, 965, 900, 741 y 587; $^1\text{H NMR}$: δ_{H} 7.3 (m, 2H, H-2+H-5), 6.3 (m, 2H, H-3+H-4), 5.4 (m, 2H, H-8'+H-9'), 4.1 (q, $J = 7$ Hz, 1H, H-2'), 2.5 y 2.4 (m+m, 2H, H-4'), 1.9 (m, 2H, H-7'), 1.6 (d, $J = 5$ Hz, 3H, $\text{CH}=\text{CHCH}_3$), 1.6-1.5 (m, 2H, H-5'), 1.5 (d, $J = 7$ Hz, CHCH_3) y 1.3 (m, 2H, H-6'); $^{13}\text{C NMR}$: δ_{C} 131.1 ($\text{C}_{8'}$), 125.5 ($\text{C}_{9'}$), 119.6 ($\text{C}_2 + \text{C}_5$), 114.2 ($\text{C}_3 + \text{C}_4$), 53.6 ($\text{C}_{2'}$), 39.8 ($\text{C}_{4'}$), 32.2, 28.9, 23.0 ($\text{C}_5 - \text{C}_7$), 17.8 y 13.8 ($2 \times \text{CH}_3$); MS: m/z 229 (1), 200 (1), 180 (2), 178 (2), 165 (3), 150 (6), 125 (4), 123 (3), 97 (8), 94 (6), 83 (10), 81 (16), 67 (100) y 55 (30).

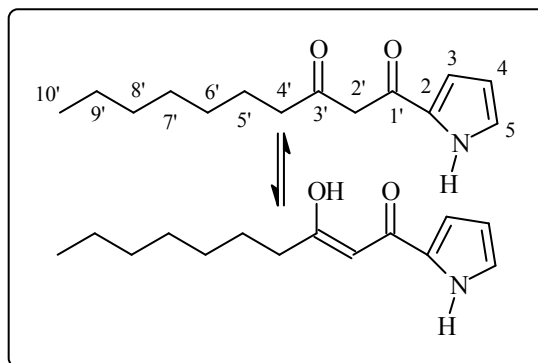


Por su parte, los espectros del metabolito aislado de la especie *Penicillium chrysogenum*, son compatibles con la estructura de ***N*-(3-hidroxi-2-metilodec-8-enoil)pirrol, 3**, presentando los siguientes datos espectroscópicos: HRMS (EI): m/z 249.1724 ($C_{15}H_{23}NO_2$ requiere 249.1728); IR: ν_{max} 3300, 2922, 2849, 1698, 1625, 1459, 1406, 1366, 1267, 1073, 960, 907 y 734; 1H NMR: δ_H 7.3 (m, 2H, H-2+H-5), 6.3 (m, 2H, H-3+H-4), 5.4 (m, 2H, H-8'+H-9'), 3.8 (m, 1H, H-3'), 3.1 (m, 1H, H-4'), 2.7 (m, 2H, H-4'), 2.0 (m, 2H, H-7'), 1.6 (d, $J = 5$ Hz, 3H, CH=CHCH₃), 1.6-1.5 (m, 4H, H-5'+H-6') y 1.4 (d, $J = 7$ Hz, CHCH₃); MS: m/z 249 (M^+ , 100), 232 (10), 182 (22), 152 (27), 123 (38), 109 (40), 67 (57), 55 (12), y 41 (13).

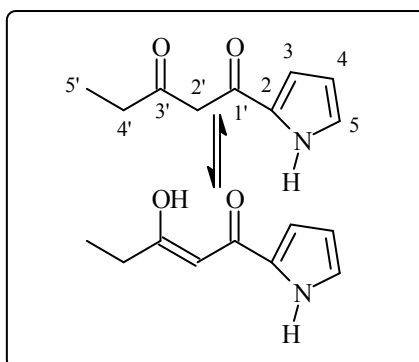
2.4.4.- Procedimientos sintéticos generales

Acilación del pirrol. Esta reacción se llevó a cabo con diferentes cloruros de ácido de acuerdo con el procedimiento descrito a continuación: Sobre una disolución enfriada a 0 °C de 2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona (1.12 mmol) en CH₂Cl₂ (1.50 mL), se añadió piridina (2.47 mmol) y el correspondiente cloruro de acilo (1.23 mmol) vía jeringa, gota a gota y bajo atmósfera de nitrógeno. La disolución se agitó a 0° C durante 1 h y a continuación, se dejó alcanzar la temperatura ambiente, permaneciendo así a lo largo de un periodo adicional de 2 h. La disolución se vertió sobre HCl (5%) y se extrajo con CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con NaCl y agua y se secó sobre Na₂SO₄, obteniendo, una vez evaporado el disolvente, el intermedio de acilación del ácido de Meldrum casi puro, el cual fue utilizado en la aminólisis posterior sin realizar una mayor purificación.

La disolución del intermedio acilado del ácido de Meldrum y pirrol (2.15 mmol) en benceno (9.00 mL) se calentó a reflujo durante 14 h. El disolvente se evaporó a vacío proporcionando un residuo que se purificó por cromatografía de columna, obteniendo las β -dicetonas respectivas.

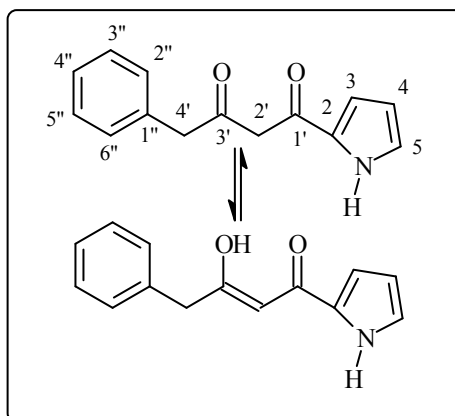


2-(3-Oxodecanoil)pirrol (11a)⁶². Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (8:2). Rendimiento 37 %; p.f. 45-47° C (de hexano); HRMS (EI): m/z 235.1578 (C₁₄H₂₁NO₂ requiere 235.1572); IR: ν_{\max} 3280, 3090, 2900, 2820, 1700, 1610, 1550, 1450, 1430, 1390, 1310, 1180, 1110, 1030, 940, 870, 790 y 740; ¹H NMR: δ_{H} 10.0 (s a, 1H, N-H), 7.1 (m, 1H, H-5c), 7.0 (m, 1H, H-5e), 6.9 (m, 1H, H-3c), 6.8 (m, 1H, H-3e), 6.3 (m, 1H, H-4), 5.9 (s, 1H, H-2'e), 3.9 (s, 1H, H-2'c), 2.6 (t, $J=7$ Hz, 2H, H-4'c), 2.3 (m, 2H, H-4'e), 1.6 (m, 2H, H-5'), 1.3 (s a, 8H, (CH₂)₄CH₃) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR: δ_{C} 209.9 (C_{3'c}), 191.4 (C_{1'c}), 185.2 y 179.0 (C_{1'e} y C_{3'e}), 132.5 (C_{2c}), 130.2 (C_{2e}), 126.3 (C_{5c}), 124.5 (C_{5e}), 118.6 (C_{3c}), 114.7 (C_{3e}), 111.3 (C_{4c}), 111.0 (C_{4e}), 95.3 (C_{2'e}), 53.6 (C_{2'c}), 45.2 (C_{4'c}), 43.2 (C_{4'e}), 36.4, 34.0, 31.7, 31.6, 29.2, 29.0, 26.4, 24.7, 23.5, 22.6 (C_{5'-C_{9'}}), y 14.1 (CH₃); MS: m/z 235 (M⁺, 63), 217 (6), 193 (4), 164 (16), 151 (100), 136 (51), 123 (8), 109 (89), 94 (78), 80 (7), 68 (13) y 57 (14); Anal. Calcd. para C₁₄H₂₁NO₂: C, 71.49 %; H, 8.94 %; N, 5.96 %; Encontrado: C, 71.34 %; H, 9.35 %; N, 5.54 %.



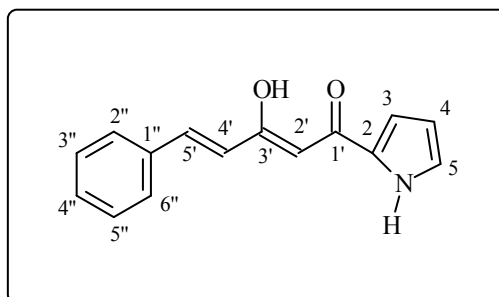
⁶² Como se reseñó en el apartado de discusión, las β -dicetonas exhiben en disolución el equilibrio ceto-enólico, utilizando ahora una "c" o una "e" para asignar las señales que corresponden a la especie cetónica y enólica respectivamente.

2-(3-Oxopentanoil)pirrol (11b)⁶². Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (5-10 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 28 %; HRMS (EI): m/z 165.0783 (C₉H₁₁NO₂ requiere 165.0789); IR: ν_{\max} 3280, 3100, 2960, 2940, 2860, 1710, 1640, 1540, 1400, 1320, 1220, 1180, 1120, 1080, 1040, 990, 950, 930, 880, 810, 790 y 750; ¹H NMR: δ_{H} 9.7 (s a, 1H, N-H), 7.1 (m, 1H, H-5c), 7.0 (m, 1H, H-5e), 6.9 (m, 1H, H-3c), 6.8 (m, 1H, H-3e), 6.3 (m, 1H, H-4), 5.9 (s, 1H, H-2'e), 3.9 (s, 2H, H-2'c), 2.6 (q, $J=7$ Hz, 2H, H-4'c), 2.3 (q, $J=7$ Hz, 2H, H-4'e), 1.2 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH₃e) y 1.1 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH₃c); ¹³C NMR: δ_{C} 204.8 (C_{3'c}), 185.9 (C_{1'c}), 183.1 y 182.1 (C_{1'e} y C_{3'e}), 131.5 (C_{2c}), 130.1 (C_{2e}), 126.4 (C_{5c}), 124.7 (C_{5e}), 118.6 (C_{3c}), 114.8 (C_{3e}), 111.1 (C_{4c}), 110.9 (C_{4e}), 94.4 (C_{2'e}), 53.1 (C_{2'c}), 36.4 (C_{4'c}), 29.3 (C_{4'e}), 10.4 (CH₃e) y 7.5 (CH₃c); MS: m/z 165 (M⁺, 100), 150 (2), 148 (3), 136 (58), 125 (2), 109 (30), 94 (65), 80 (7) 68 (21) y 57 (7); Anal. Calcd. para C₉H₁₁NO₂: C, 65.45 %; H, 6.66 %; N, 8.48 %; Encontrado: C, 64.94 %; H, 6.98 %; N, 8.39 %.



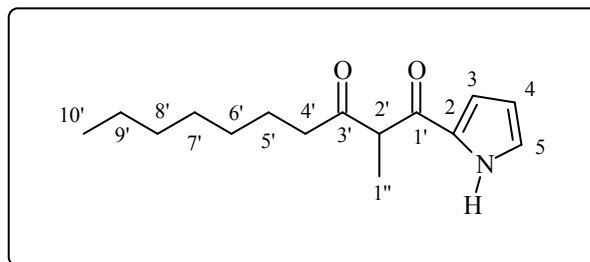
2-(3-Oxo-4-fenilbutanoil)pirrol (11c)⁶². Eluyente: Mezclas hexano-éter dietílico (5-20 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 42 %; p.f. 115-117° C (de hexano); HRMS (EI): m/z 227.0944 (C₁₄H₁₃NO₂ requiere 227.0946); IR: ν_{\max} 3270, 1700, 1620, 1590, 1560, 1530, 1490, 1450, 1430, 1410, 1310, 1130, 1110, 1040, 950, 920, 870, 830, 780, 740 y 690; ¹H NMR: δ_{H} 9.5 (s a, 1H, N-H), 7.4-7.3 (m, 5H, Ph), 7.1 (m, 1H, H-5c), 7.0 (m, 1H, H-5e), 6.8 (m, 1H, H-3), 6.2 (m, 1H, H-4), 5.8 (s, 1H, H-2'e), 3.9 y 3.8 (s+s, 2H+2H, H-2'c+H-4'c) y 3.6 (s, 2H, H-4'e); ¹³C NMR: δ_{C} 201.7 (C_{3'c}), 182.9 (C_{1'c}), 182.8 y 181.8 (C_{1'e} y C_{3'e}), 135.6 (C_{1''}), 131.5 (C_{2c}), 130.0 (C_{2e}), 129.6 (C_{3'c}), 129.2 (C_{3'e}), 128.7 (C_{2'c}), 128.6 (C_{2'e}), 127.2 (C_{4'c}), 127.0 (C_{4'e}), 126.2 (C_{5c}), 124.7 (C_{5e}), 118.4 (C_{3c}), 115.1 (C_{3e}), 111.1 (C_{4c}), 111.0 (C_{4e}), 95.9, (C_{2'e}), 52.1 (C_{2'c}), 50.2 (C_{4'c}) y 42.8 (C_{4'e}); MS m/z 227 (M⁺, 53), 136 (100), 123 (5),

118 (2), 109 (40), 94 (93), 91 (26), 86 (7) y 68 (24); Anal. Calcd. para $C_{14}H_{13}NO_2$ C, 74.01 %; H, 5.73 %; N, 6.17 %. Encontrado: C, 73.70 %; H, 5.78 %; N, 6.24 %.

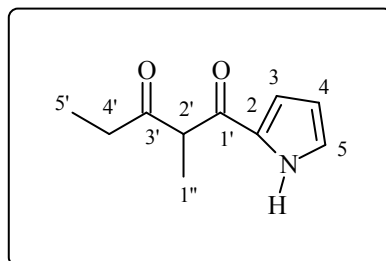


2-(3-Hidroxi-5-fenilpenta-2,4-dienoil)pirrol (11d). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (7-20 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 40 %; HRMS (EI): m/z 239.0950 ($C_{15}H_{13}NO_2$ requiere 239.0946); IR: ν_{max} 3290, 1630, 1590, 1550, 1520, 1450, 1435, 1380, 1320, 1120, 790, 730 y 690; 1H NMR: δ_H 9.6 (s a, 1H, N-H), 7.5 (m, 2H, H-2''), 7.4 (m, 3H, H-3''+H-4'), 7.2 (m, 1H, H-5), 6.9 (m, 1H, H-3), 6.6 (s, 1H, H-4'), 6.5 (s, 1H, H-5'), 6.3 (s, 1H, H-4) y 6.1 (s, 1H, H-2'); ^{13}C NMR: δ_C 189.5 ($C_{1'}$), 172.8 ($C_{3'}$), 138.0 ($C_{1''}$), 129.6 ($C_{3''}$), 128.9 ($C_{4''}$), 127.8 ($C_{2''}$), 124.5 (C_5), 122.6 (C_4+C_5'), 114.8 (C_3), 111.2 (C_4) y 98.0 (C_2); MS m/z 239 (M^+ , 41), 221 (34), 211 (7), 210 (6), 179 (5), 169 (13), 149 (16), 131 (27), 126 (15), 115 (9), 111 (25), 101 (20), 97 (37), 91 (62), 83 (100), 71 (35), 69 (42), 57 (62), 55 (50) y 49 (84).

Procedimiento general para la metilación de β -dicetonas. Sobre una suspensión a 0° C de NaH (aceite al 60%; 1.64 mmol), previamente lavado, en DMF (2.50 mL) se añadió una disolución de la β -dicetona **11** (1.26 mmol) en DMF (4.00 mL), *vía* cánula, gota a gota. Una vez hubo cesado el desprendimiento de H_2 , la mezcla se calentó a temperatura ambiente, permaneciendo con agitación durante 2 h. Entonces, se enfrió de nuevo a 0° C y se adicionó el yodometano (1.77 mmol). Después de 4 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con agua y se extrajo con CH_2Cl_2 . El conjunto de extractos orgánicos se lavó con NaCl, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía de columna obteniendo los correspondientes 2-acilpirroles metilados.

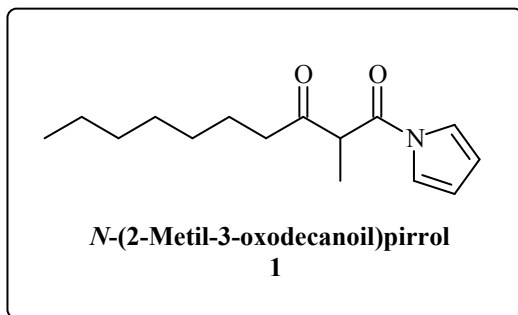


2-(2-Metil-3-oxodecanoil)pirrol (12a). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (9:1). Rendimiento 45 %; HRMS (EI): m/z 249.1728 ($C_{15}H_{23}NO_2$ requiere 249.1728); IR: ν_{\max} 3300, 3100, 2905, 2840, 1710, 1620, 1540, 1445, 1400, 1140, 1090, 1040, 1000, 900 y 750; 1H NMR: δ_H 10.0 (s a, 1H, N-H), 7.1 (m, 1H, H-5), 7.0 (m, 1H, H-3), 6.3 (m, 1H, H-4), 4.2 (t, $J=7$ Hz, 1H, H-2'), 2.5 (m, 2H, H-4'), 1.5 (m, 2H, H-5'), 1.4 (d, $J=7$ Hz, 3H, $CHCH_3$), 1.2 (s a, 8H, $(CH_2)_4CH_3$) y 0.8 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_2CH_3); ^{13}C NMR: δ_C 206.9 ($C_{3'}$), 186.9 ($C_{1'}$), 131.1 (C_2), 125.9 (C_5), 117.7 (C_4), 111.1 (C_3), 56.2 ($C_{2'}$), 40.7 ($C_{4'}$), 31.6, 28.9, 23.5, 22.6 ($C_{5'}$ - $C_{9'}$), 14.0 y 13.7 (2x CH_3); MS m/z 249 (M^+ , 24), 218 (2), 181 (2), 165 (5), 150 (2), 123 (100), 94 (34), 69 (4), 66 (5) y 57 (12).

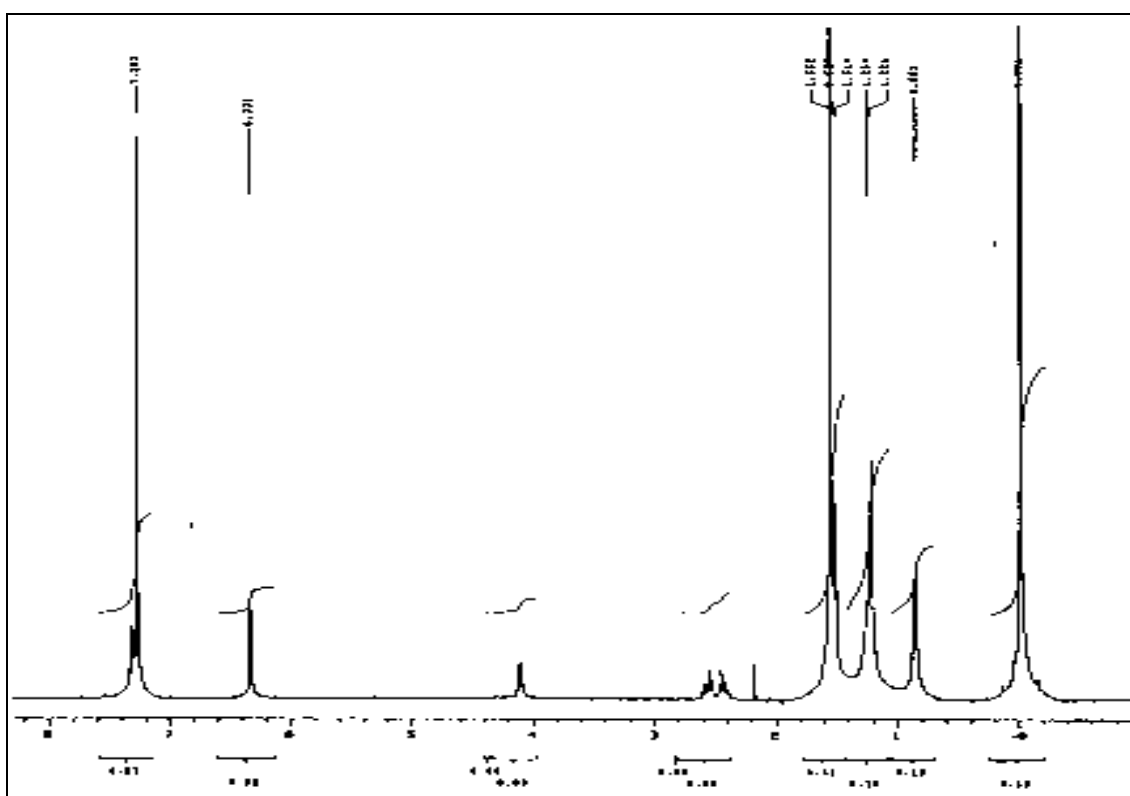


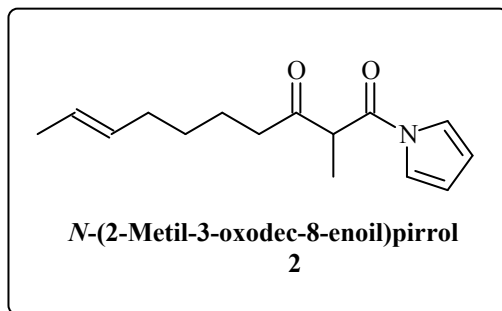
2-(2-Metil-3-oxopentanoil)pirrol (12b). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (85:15). Rendimiento 99 %; HRMS (EI): m/z 179.0945 ($C_{10}H_{13}NO_2$ requiere 179.0946); IR: ν_{\max} 3500, 3150, 2980, 2920, 2860, 1710, 1620, 1540, 1450, 1420, 1400, 1320, 1150, 1090, 1045, 900 y 750; 1H NMR: δ_H 10.1 (s a, 1H, N-H), 7.1 (m, 1H, H-5), 7.0 (m, 1H, H-3), 6.3 (m, 1H, H-4), 4.2 (t, $J=7$ Hz, 1H, H-2'), 2.5 (t, $J=7$ Hz, 2H, H-4'), 1.4 (d, $J=7$ Hz, 3H, $CHCH_3$) y 1.0 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_2CH_3); ^{13}C NMR: δ_C 207.3 ($C_{3'}$), 187.1 ($C_{1'}$), 131.1 (C_2), 126.3 (C_5), 117.9 (C_3), 111.1 (C_4), 55.8 ($C_{2'}$), 34.1 ($C_{4'}$), 13.8 y 7.7 (2x CH_3); MS: m/z 179 (M^+ , 67), 150 (2), 123 (73), 106 (3), 94 (100), 83 (2), 66 (11) y 57 (12).

***ANEXO I: Productos
Pirrólicos Análogos a los
Naturales: ^1H y ^{13}C***

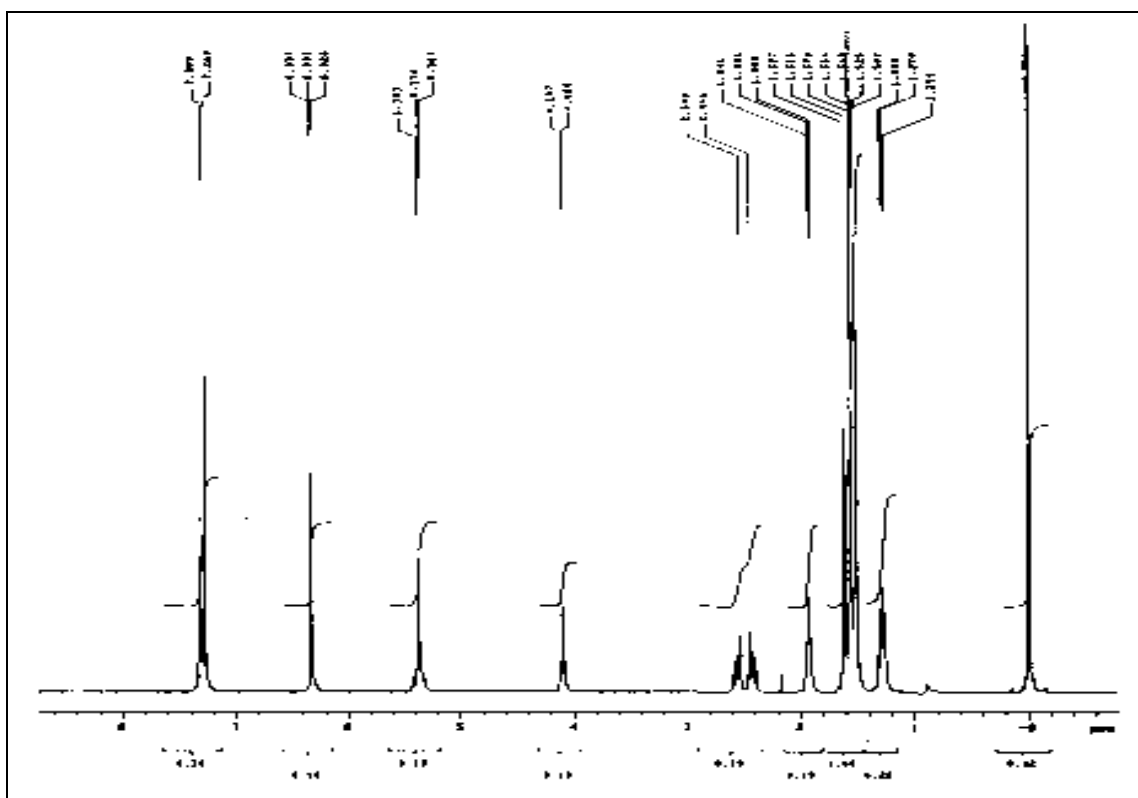


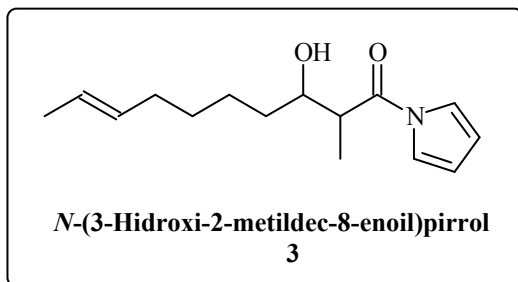
¹H RMN (Producto natural):



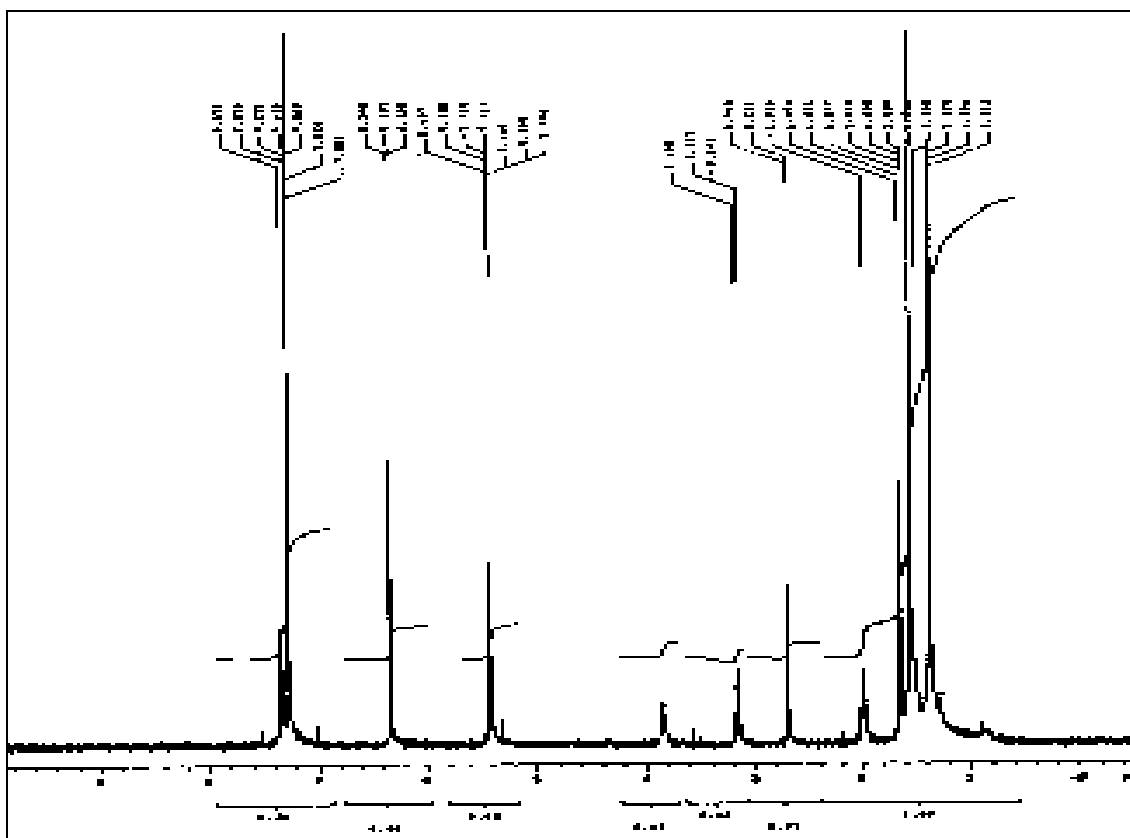


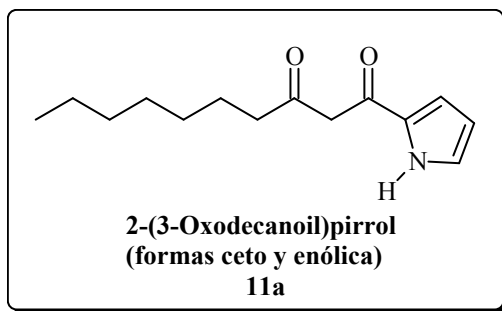
¹H RMN (Producto natural):



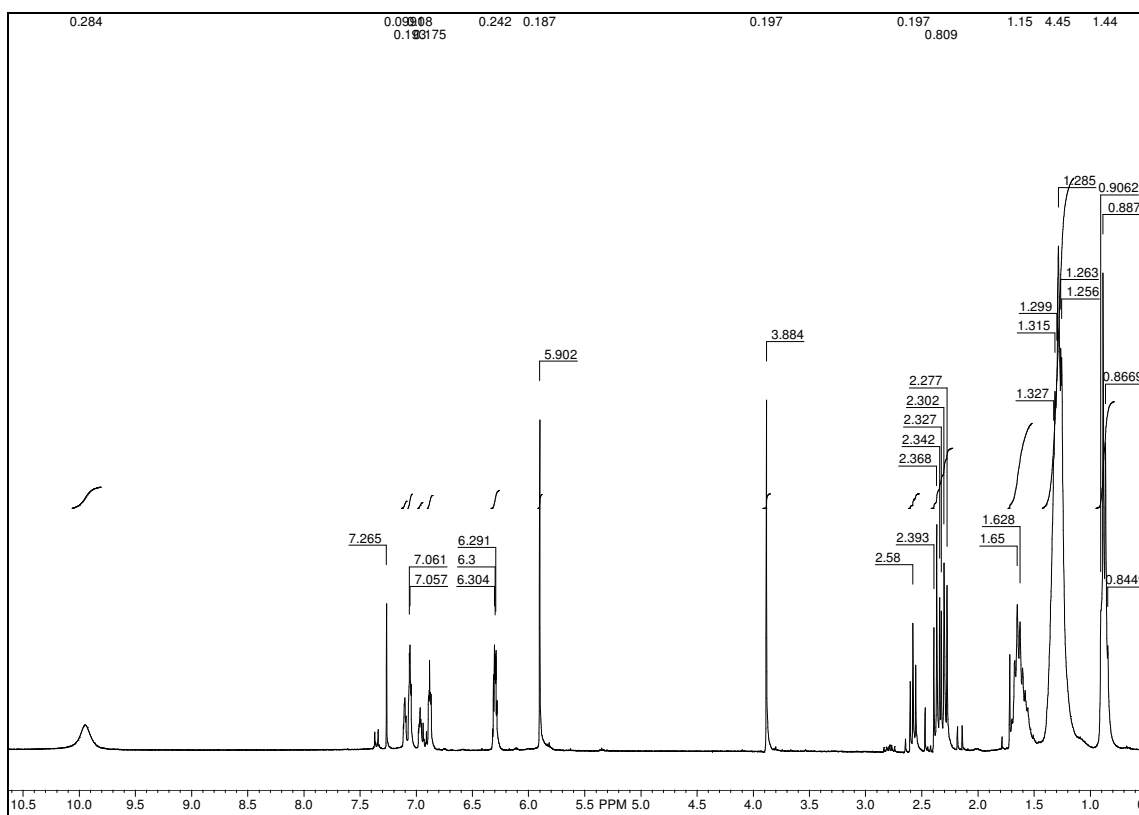


¹H RMN (Producto natural):

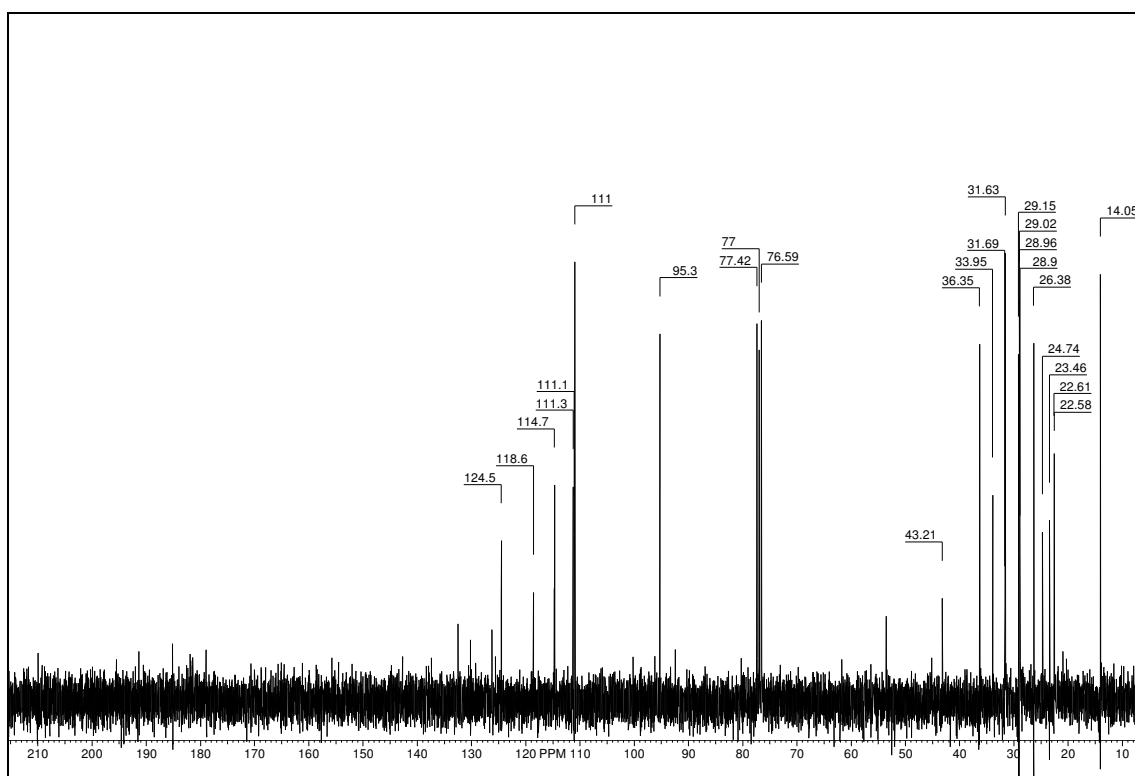


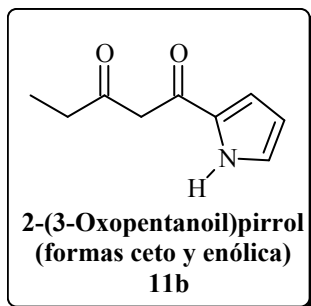


¹H RMN:

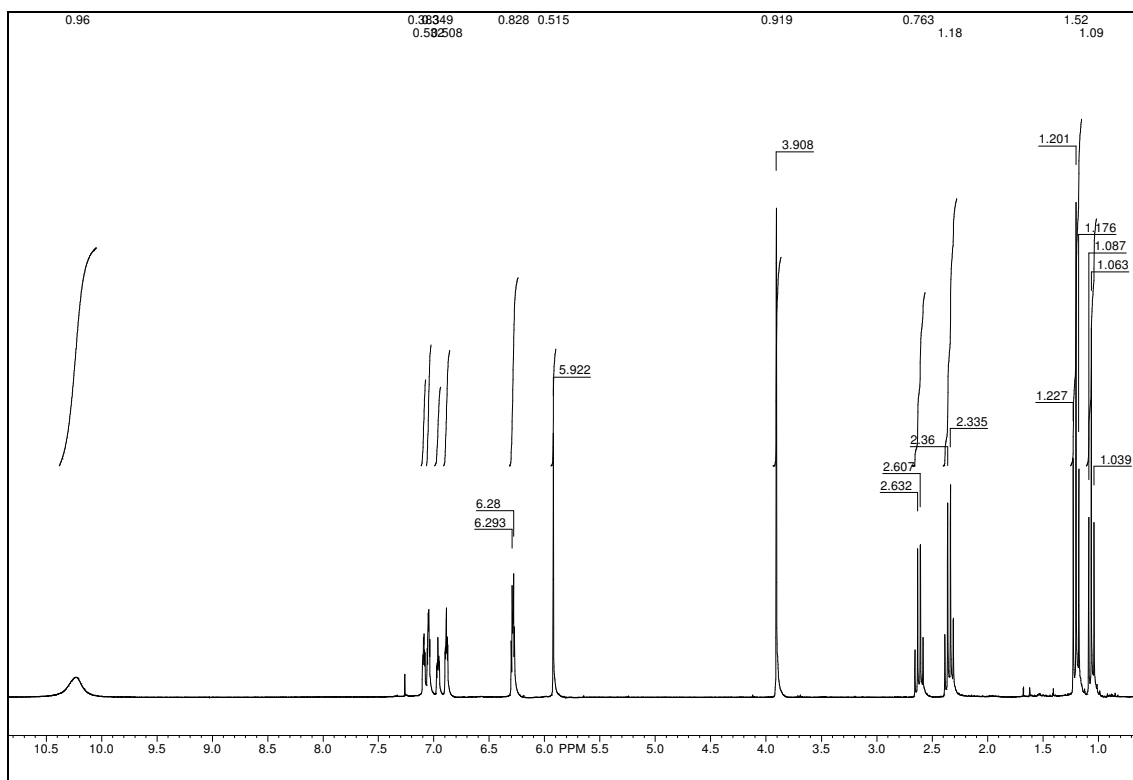


¹³C RMN:

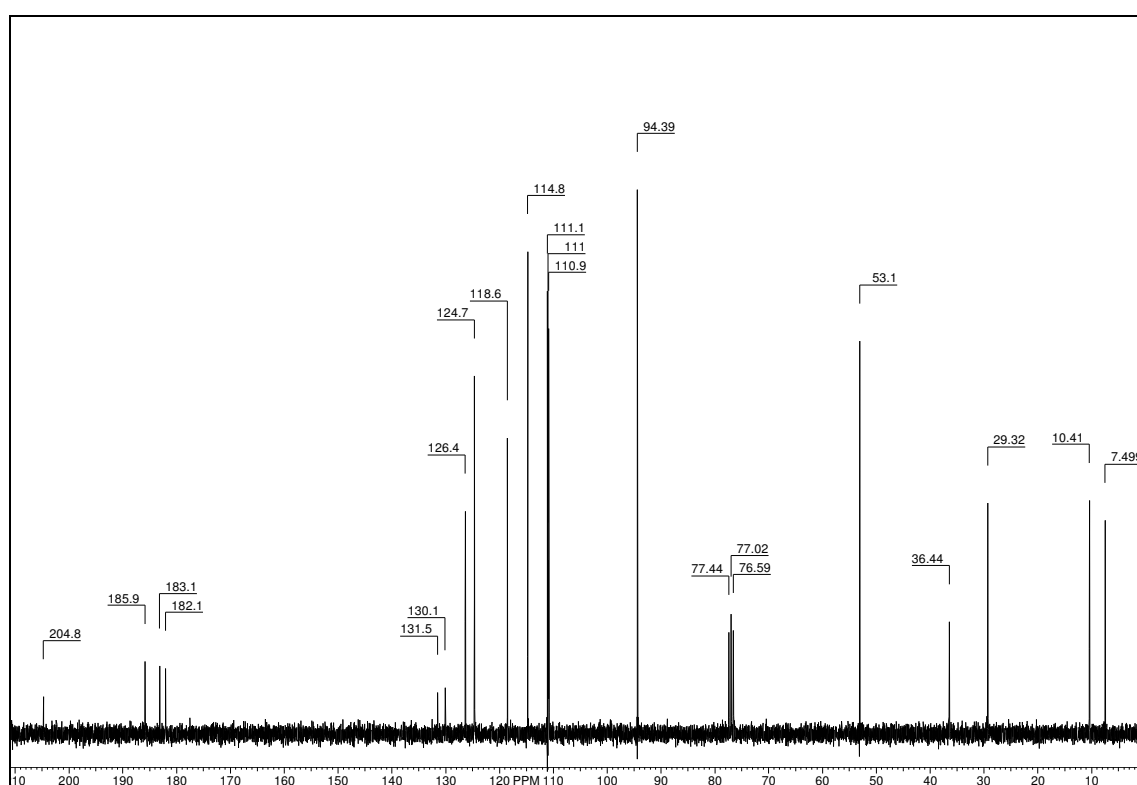


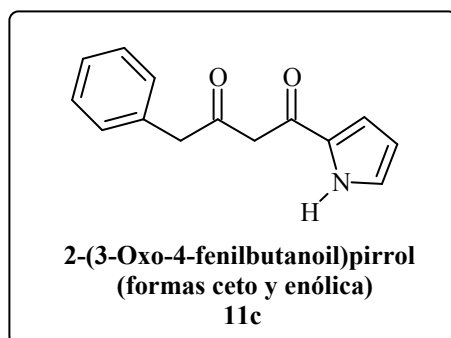


¹H RMN:

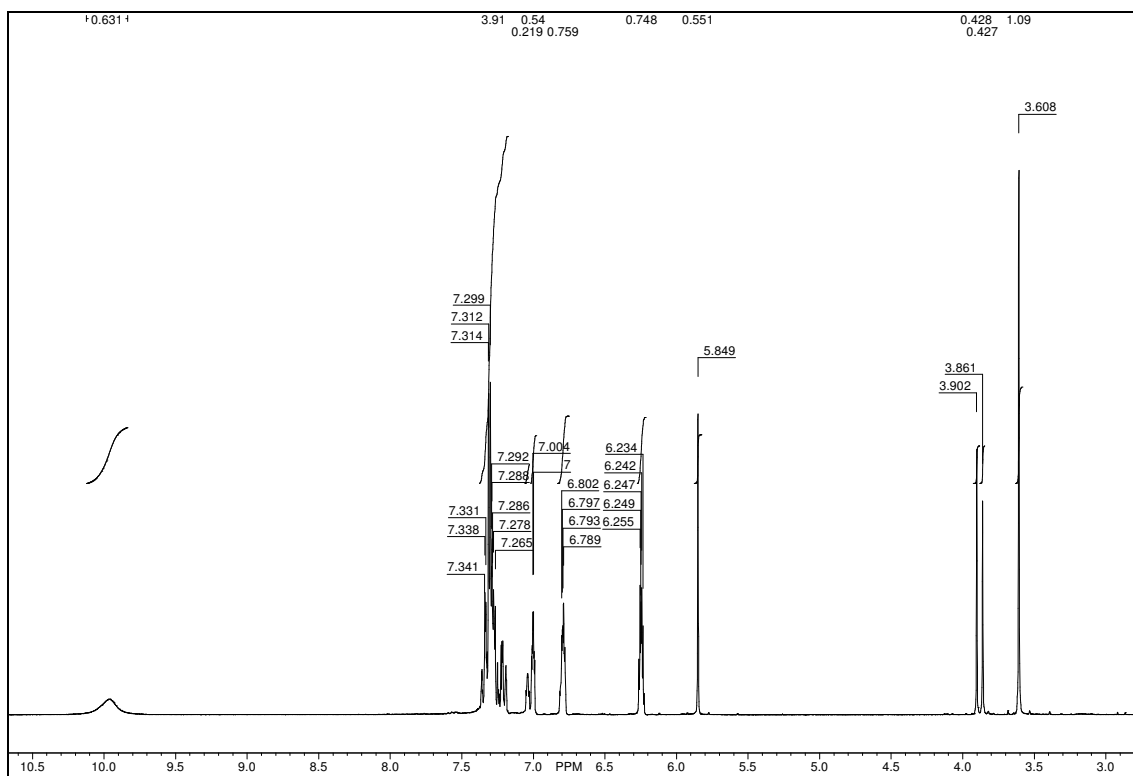


¹³C RMN:

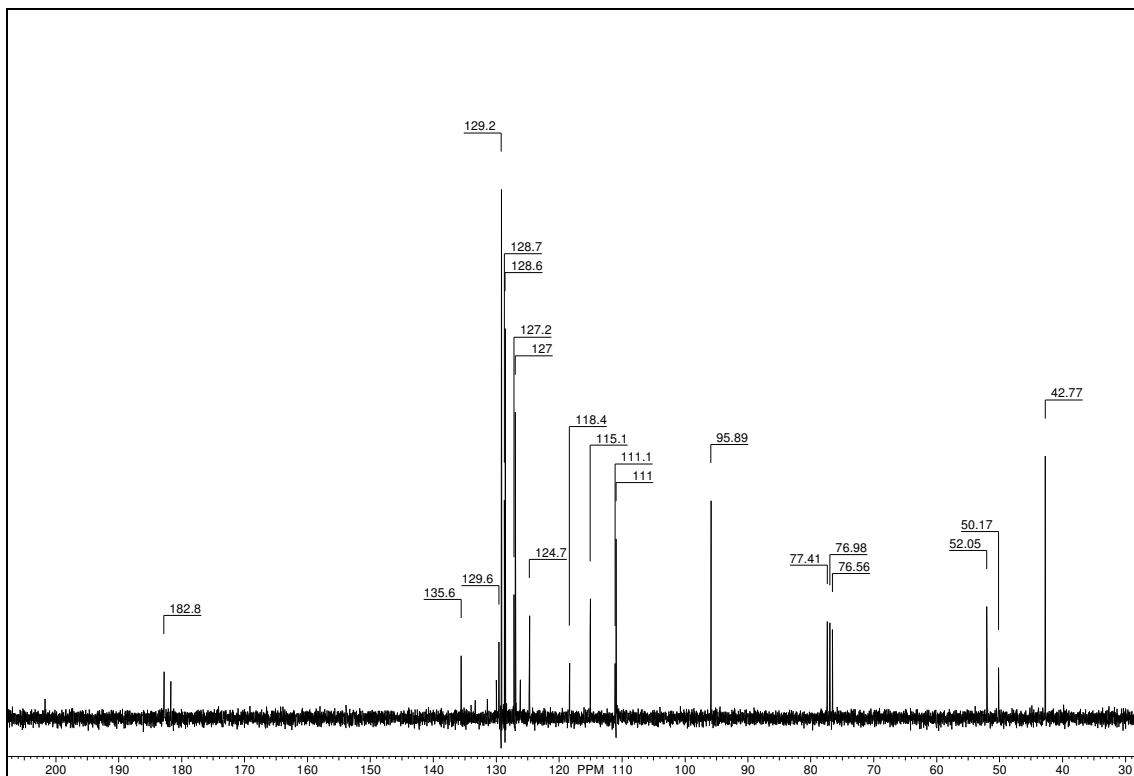




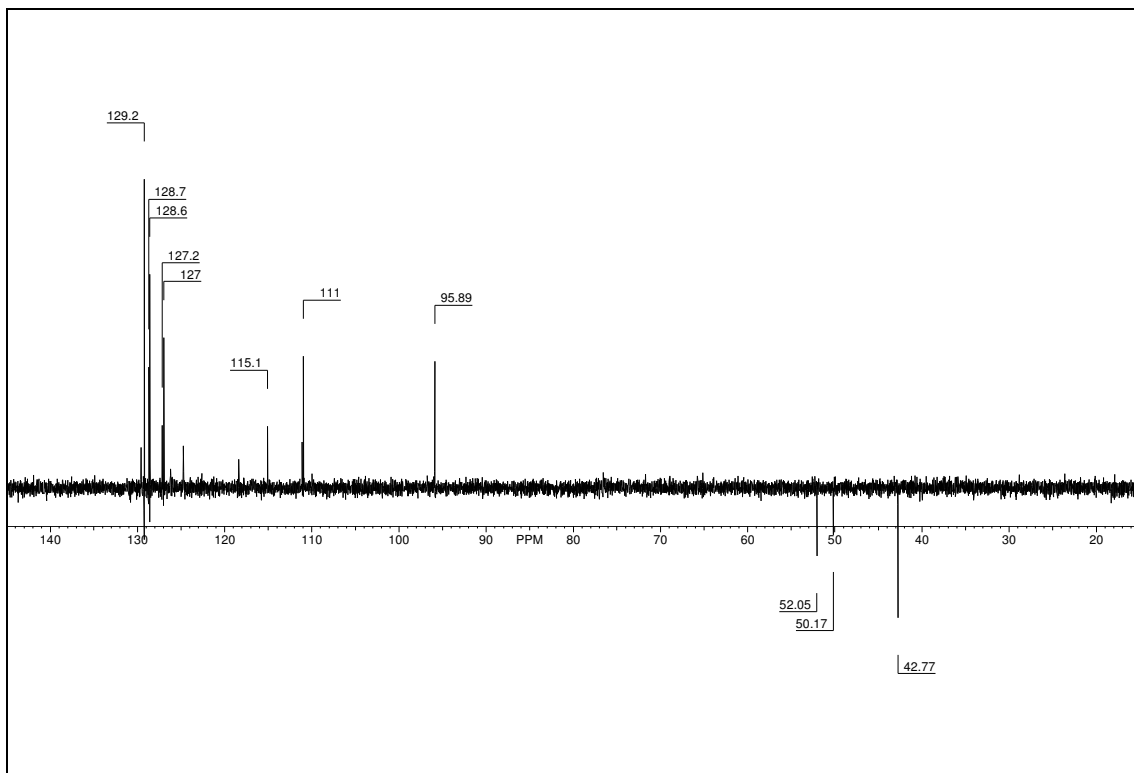
¹H RMN:

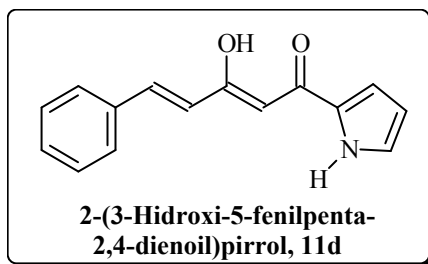


¹³C RMN:

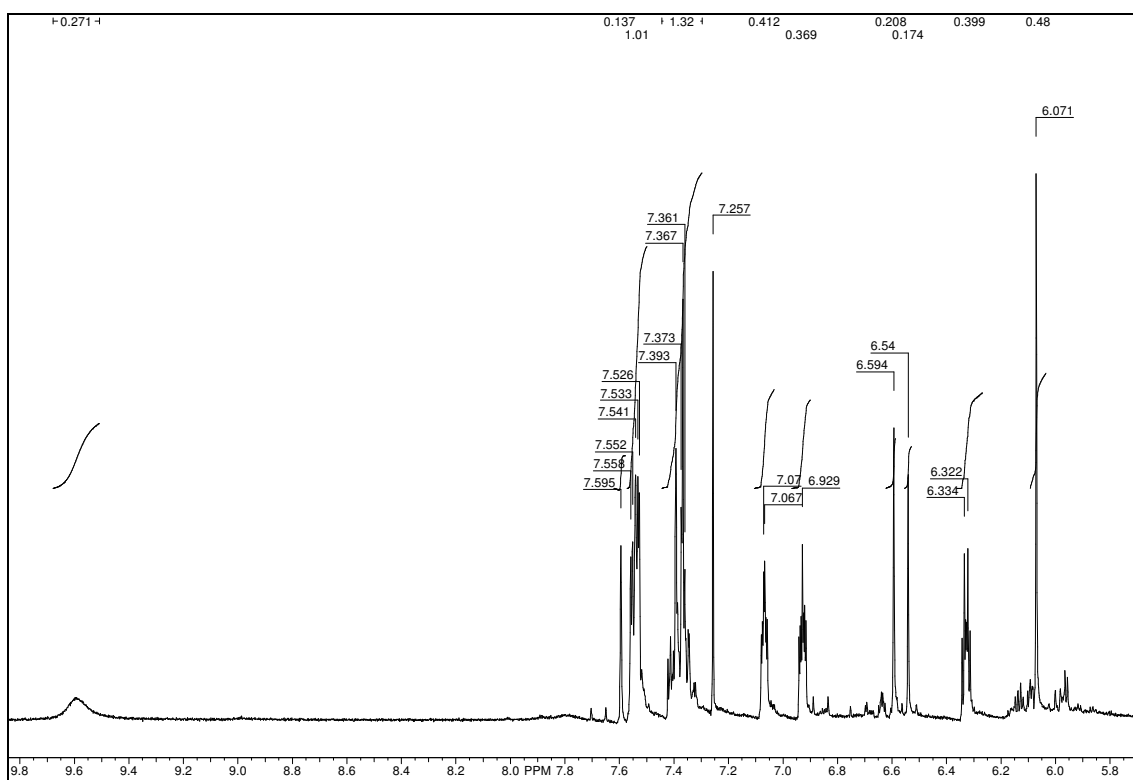


DEPT:

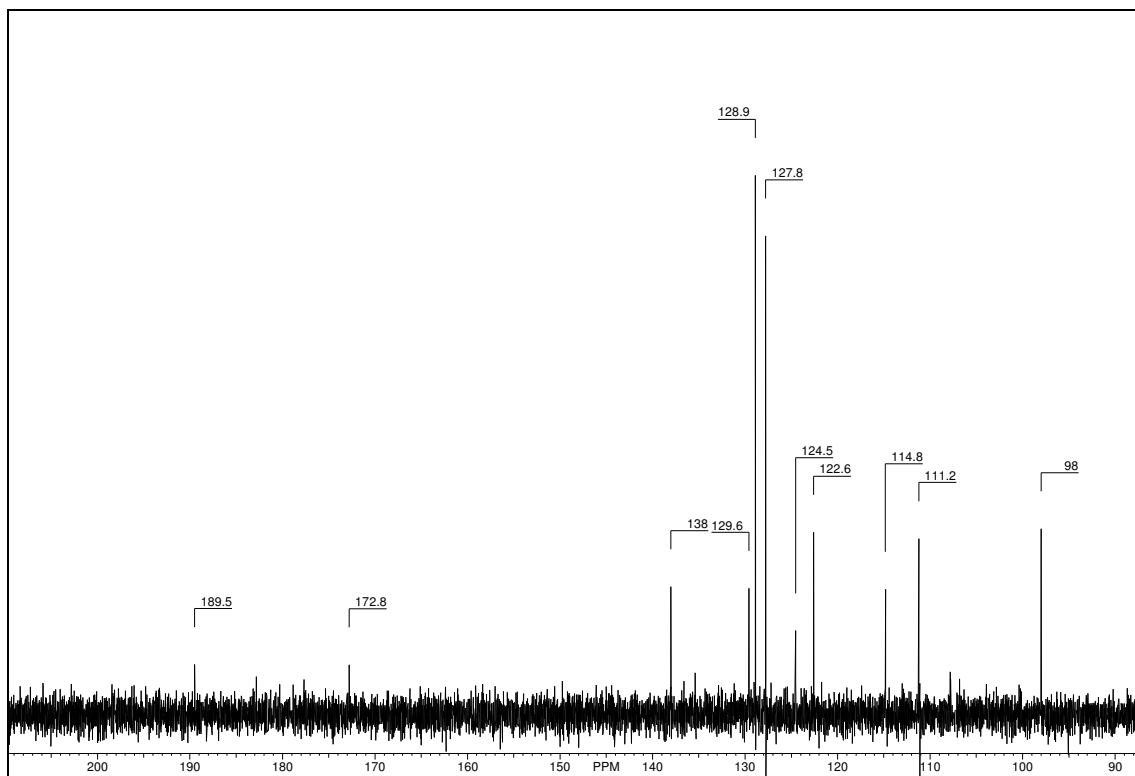




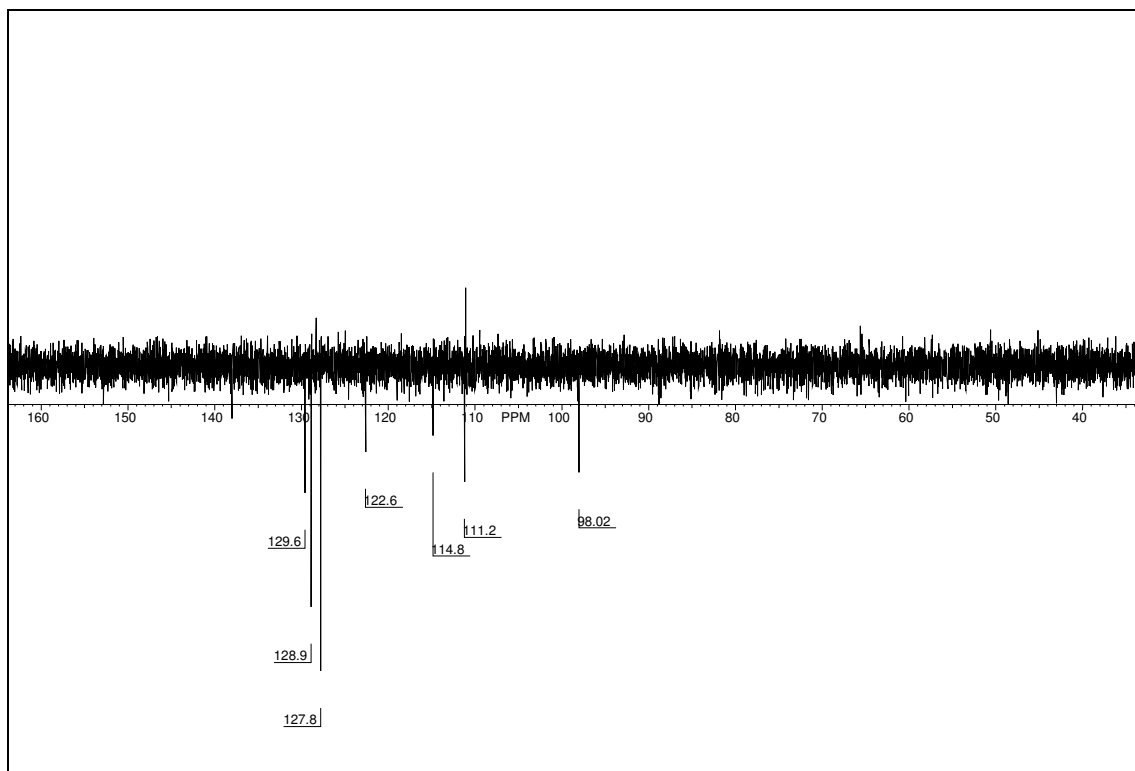
¹H RMN:

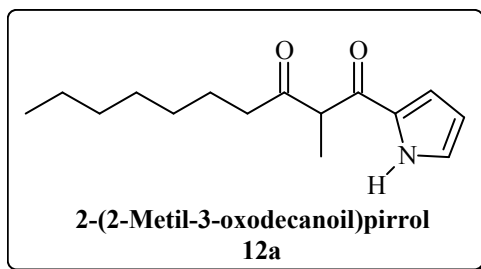


¹³C RMN:

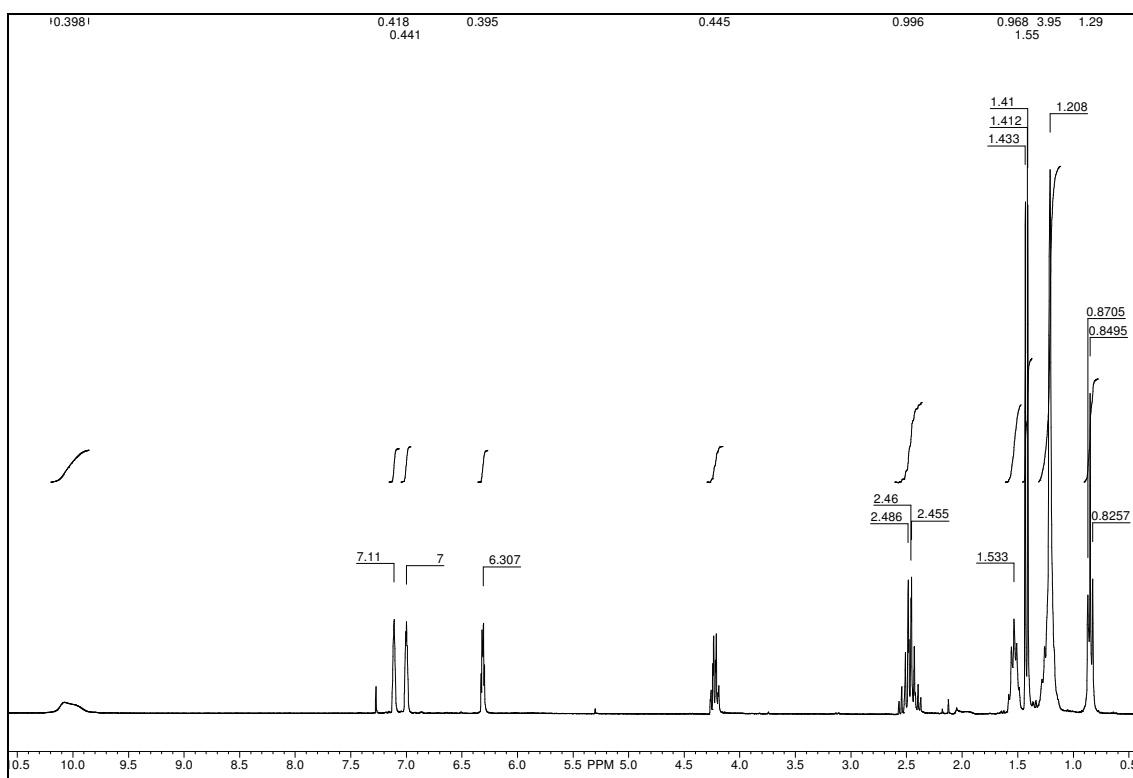


DEPT:

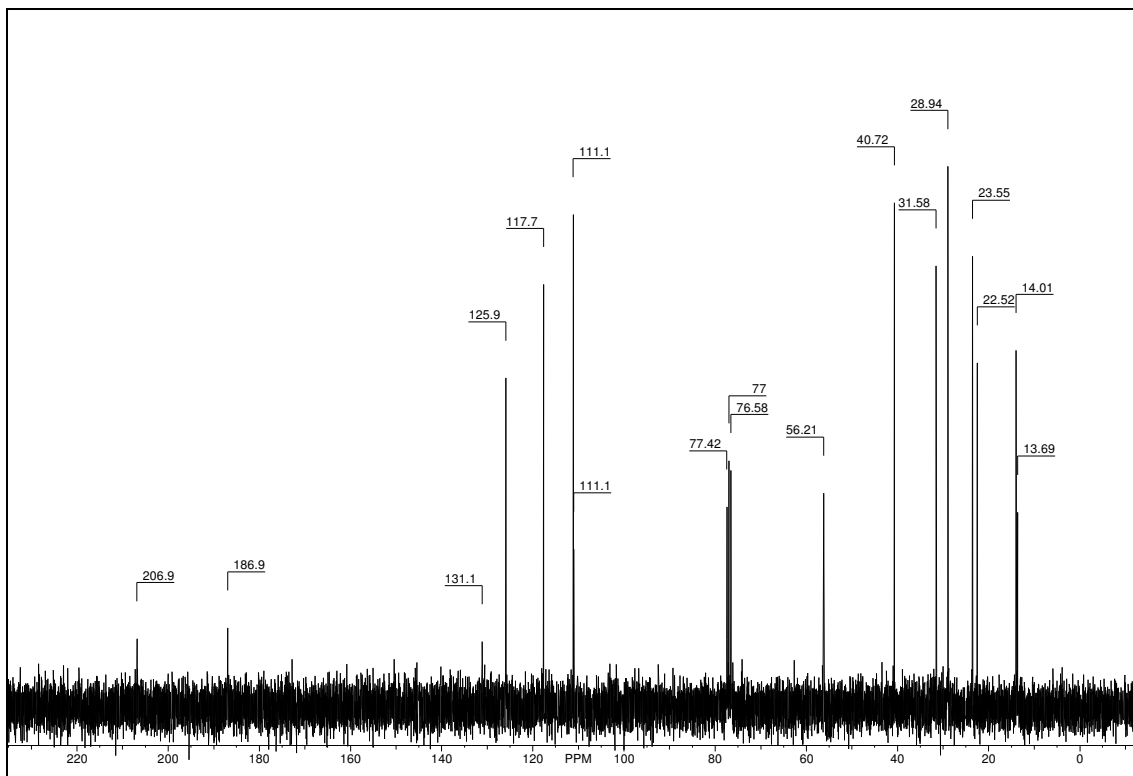




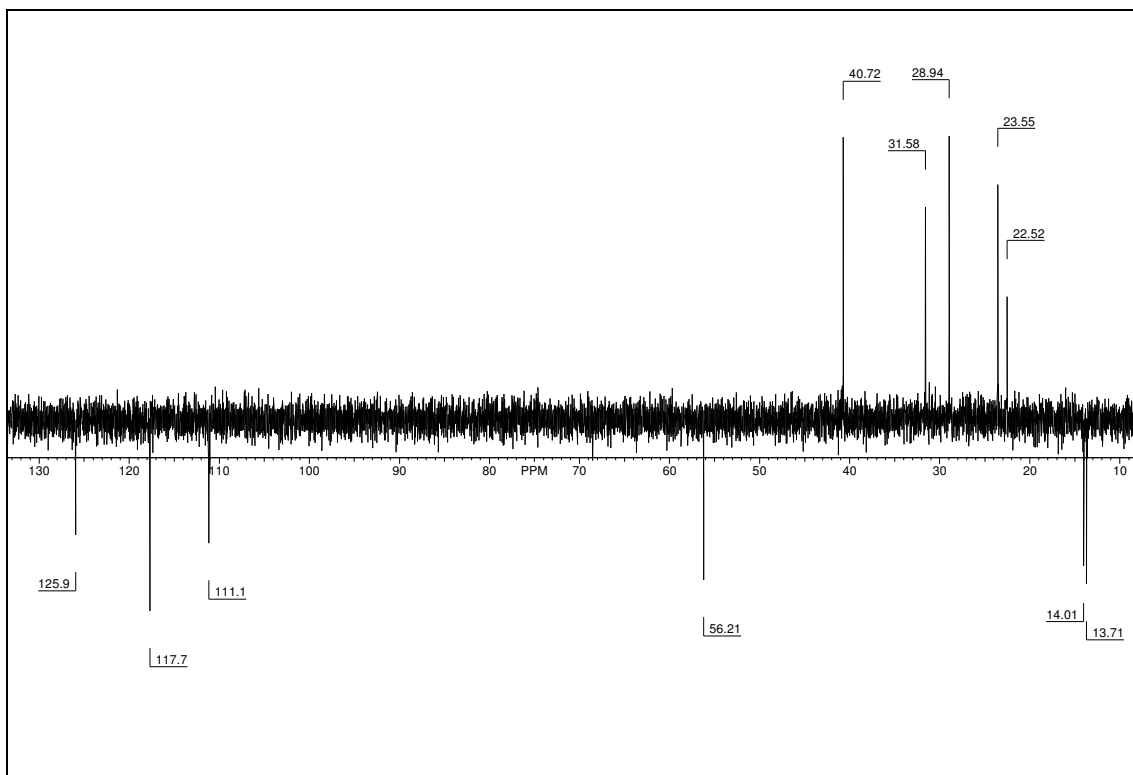
¹H RMN:

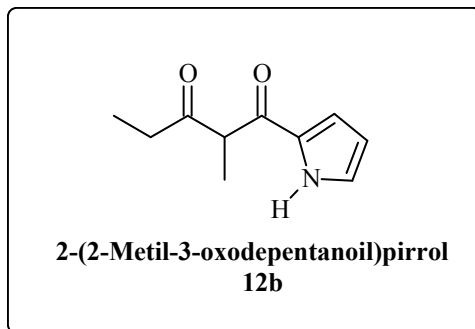


¹³C RMN:

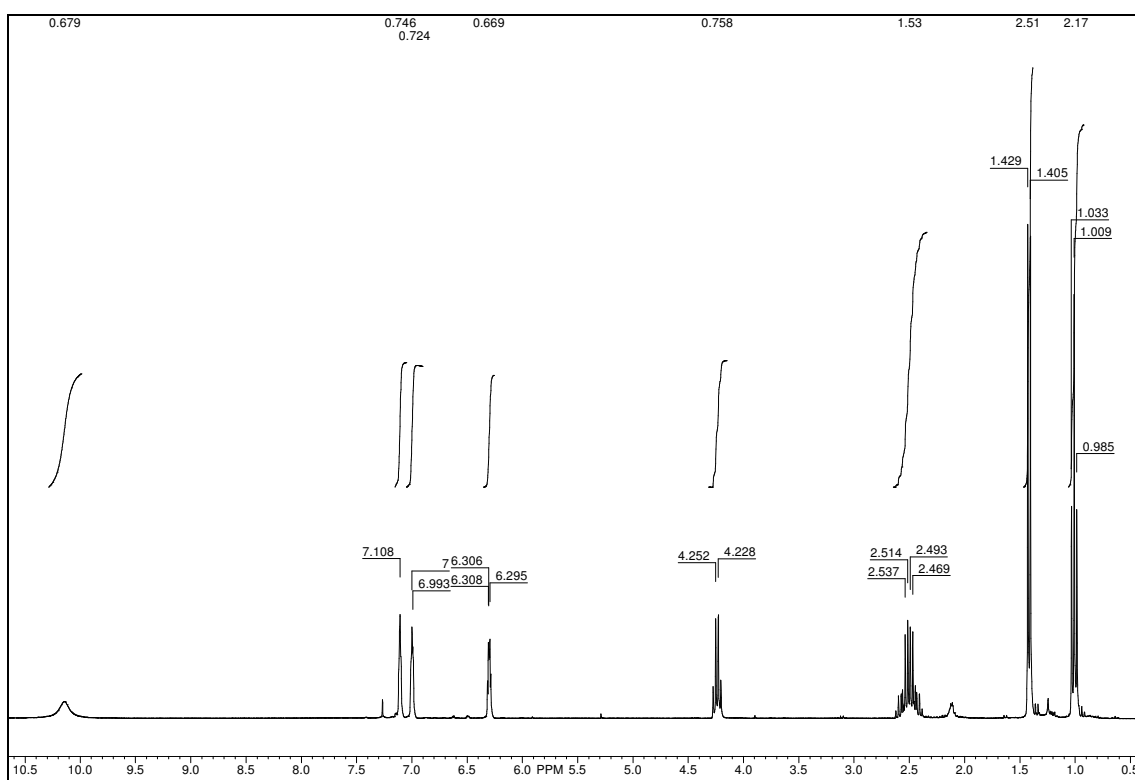


DEPT:

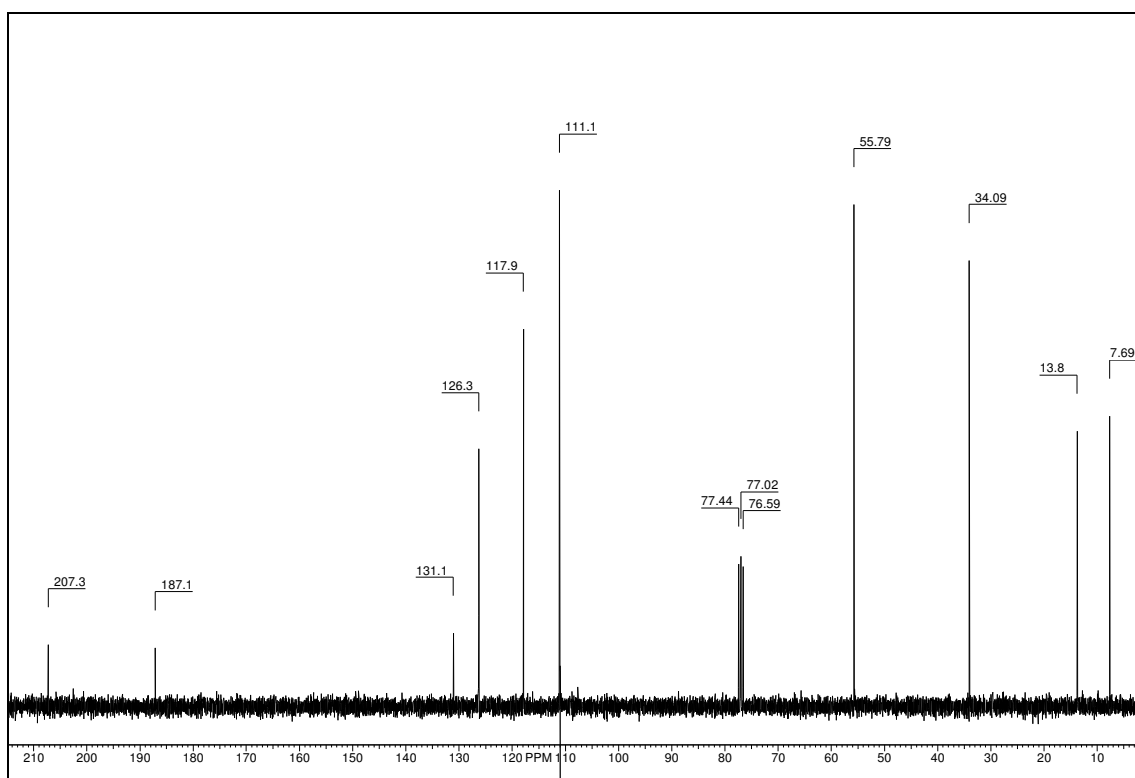




¹H RMN:



¹³C RMN:



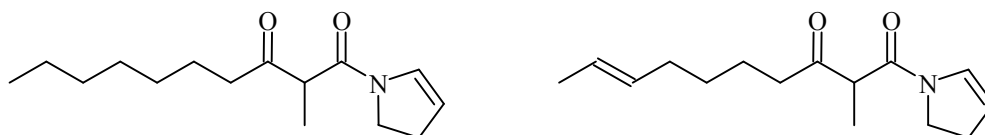
***Capítulo 3: Síntesis de
las Enamidas y
Derivados Bicíclicos
Naturales***

3.1. Introducción

Es bien conocido que la naturaleza es una fuente inagotable de sustancias activas. De ahí la necesidad de llevar a cabo estudios para el aislamiento y la identificación de estos productos.

Como se describió en la introducción, en los últimos años han sido obtenidos por nuestro grupo de trabajo distintos extractos activos de origen fúngico. En este apartado cabe resaltar las actividades mostradas por los extractos de *P. brevicompactum*⁶³ y *P. chrysogenum*⁶⁴. La selección por bioensayo de las fracciones obtenidas de dichos extractos condujo al aislamiento de los metabolitos responsables de las actividades observadas.

Figura 3.1. Metabolitos con anillo de 2-pirrolina obtenidos del género *Penicillium*.



N-(2-Metil-3-oxodecanoil)-2-pirrolina **N-(2-Metil-3-oxodec-8-enoil)-2-pirrolina**
4a **4b**

En una primera aproximación los metabolitos aislados se podían dividir en dos grupos, en función de las características estructurales presentadas. El primero de ellos reunía sustancias cuya característica común era la presencia en sus estructuras de anillos de 2-pirrolina, donde el átomo de N formaba parte de una agrupación de β -cetoamida.

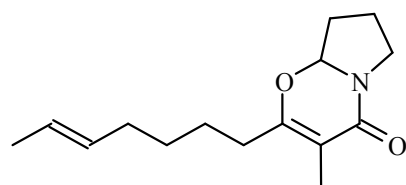
⁶³ Moya, M.P., "Productos Naturales con Actividad Insecticida y Antagonista de la Hormona Juvenil. Metabolitos Secundarios de *Penicillium brevicompactum* Dierckx.". Tesis Doctoral, 1995.

⁶⁴ Castillo, M.A., "Detección de Sustancias con Actividad Toxigénica Producidas por Cepas Fúngicas del Género *Penicillium*. Aislamiento e Identificación de Metabolitos Segregados por *Penicillium chrysogenum*". Tesis Doctoral 1995.

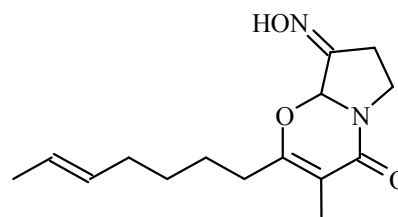
En este conjunto aparecían dos productos que sólo se diferenciaban por la presencia o ausencia de un doble enlace en la cadena lateral.

Asimismo, el resto de sustancias se caracterizaron por presentar estructuras bicíclicas. Todas ellas contenían un anillo de cinco miembros con un átomo de N, que a su vez formaba parte del anillo de seis miembros tomando con una amida oxazolinica.

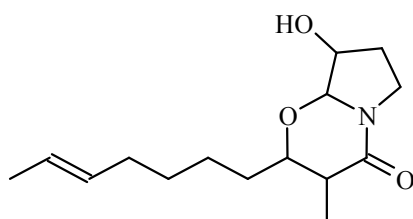
Figura 3.2. Metabolitos bicíclicos aislados de *P. brevicompactum*.



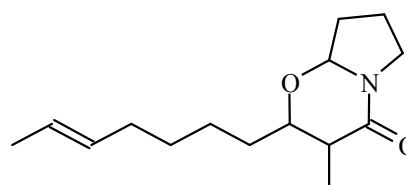
2-Hept-5-enil-3-metil-4-oxo-6,7,8,8a-tetrahidro-4H-pirrolo[2,1-b]1,3-oxazina
5b



2-Hept-5-enil-3-metil-4-oxo-6,7,8,8a-tetrahidro-4H-pirrolo[2,1-b]1,3-oxazin-8-ona, oxima
6



2-Hept-5-enil-8-hidroxi-3-metil-4-oxo-2,3,6,7,8,8a-hexahidro-4H-pirrolo[2,1-b]1,3-oxazina
7



2-Hept-5-enil-3-metil-4-oxo-2,3,6,7,8,8a-hexahidro-4H-pirrolo[2,1-b]1,3-oxazina
8

Estos productos bicíclicos se diferenciaban principalmente entre sí, por la presencia o ausencia de sustituyentes sobre el anillo de cinco miembros y el grado de insaturación en el anillo de seis.

Así quedaban asignadas las estructuras a los productos aislados en función de sus datos espectroscópicos; sin embargo, el hecho de que este tipo de estructuras no hubiesen sido descritas con anterioridad, junto con las mínimas cantidades de producto aisladas (que no permitieron, en algunos casos, la obtención de datos suficientes) hizo que estas asignaciones sólo pudiesen ser confirmadas por síntesis alternativa. Además, su obtención permitiría corroborar y ampliar los estudios biológicos realizados sobre los productos aislados.

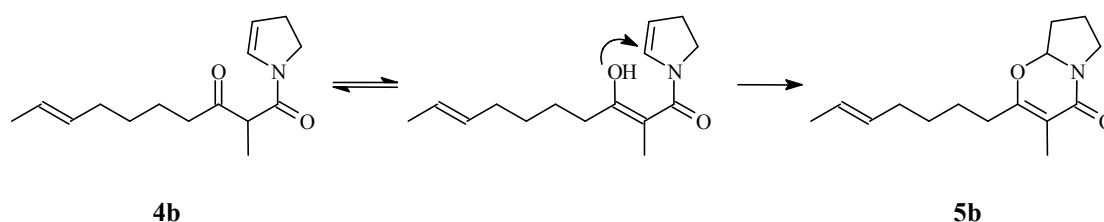
3.2. Resultados y Discusión

3.2.1.- Planteamiento y objetivos

Un aspecto clave a la hora de plantear la síntesis de estos compuestos fue realizar un análisis retrosintético común para todos ellos, ya que tanto los productos bicíclicos como los monocíclicos habían sido obtenidos de los mismos extractos y todas las estructuras presentaban un anillo de cinco miembros con un átomo de N formando parte de una agrupación amida. Todas estas analogías nos hicieron pensar que podía tratarse de una única familia de metabolitos más o menos evolucionados desde el punto de vista biosintético.

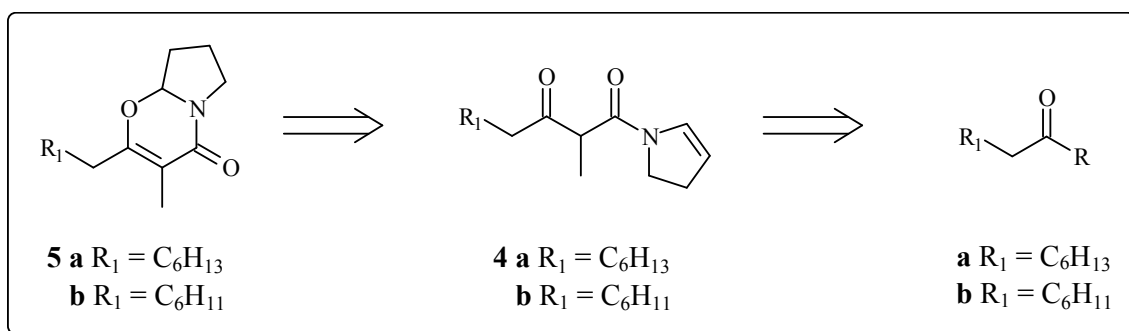
Además, esta suposición parecía razonable desde el punto de vista químico; así, los compuestos **4b** y **5b**, presentan la misma fórmula molecular, no resultando insólita la idea de que **4b** puede sufrir una ciclación intramolecular a través de la forma enólica del grupo cetona presente, conduciendo a su isómero **5b**.

Figura 3.3. Ciclación intramolecular a través de la forma enólica del metabolito 4b.



Por ello se planteó llevar a cabo la síntesis de los productos monocíclicos, para tomarlos después como punto de partida en la construcción de los sistemas bicíclicos, de acuerdo al análisis retrosintético representado en *Esquema 3.1*.

Esquema 3.1. Análisis retrosintético para la obtención de los isómeros mono y bicíclicos.



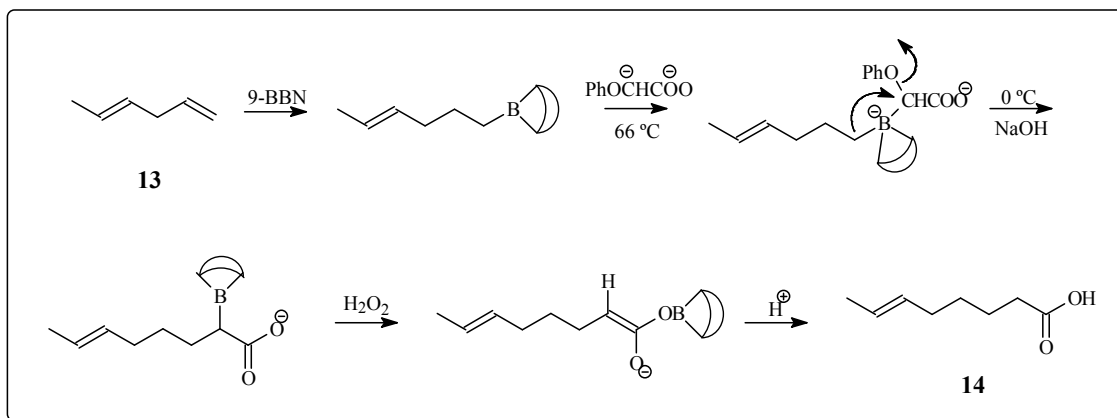
Este esquema implica la construcción inicial del sintón correspondiente a la cadena lateral de ocho átomos de carbono con un carbonilo sobre C₁, presente en todos los metabolitos, teniendo en cuenta que puede aparecer totalmente saturada o presentando una insaturación entre las posiciones C₆-C₇. La subestructura obtenida es utilizada en la formación del sistema de β-cetoamida. Por último, la oxidación del anillo de pirrolidina (seguido, eventualmente, de ciclación) debía proporcionar la estructura base de los metabolitos deseados.

Así, para la elaboración de las correspondientes cadenas laterales los materiales de partida adecuados serían los ácidos (o derivados) octanoico y 6-octenoico respectivamente, pues ya poseen uno de los dos carbonilos presentes en las sustancias objetivo. El ácido totalmente saturado es comercial (al igual que su haluro); sin embargo, el ácido 6-octenoico ha de ser preparado previamente por uno de los métodos ya descritos en la literatura⁶⁵.

De entre todos ellos elegimos el método de Hara^{65b}. Este procedimiento toma como producto de partida el 1,4-hexadieno (**13**) comercial, y lo hace reaccionar con el 9-borabicyclo[3.3.1]nonano (9-BBN), el cual ha demostrado una alta regioselectividad en favor de los dobles enlaces terminales en la hidroboração de dienos⁶⁶.

⁶⁵ a) Kirihara, M., Yokoyama, S., Kakuda, H., Momose, T. "Efficient Fragmentation of the Tertiary Cyclopropanol System: Oxidation of 1-(Trimethylsiloxy)bicyclo[n.1.0]alkanes and Analogues by Using Phenylodine (III) Diacetate". *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6907-10. b) Hara, S., Kishimura, K., Suzuki, A. "Direct Synthesis of Carboxylic Acids from Organoboranes". *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 6356-60. c) Julia, M., Maumy M. "Cyclisation Radicalaire. Cyclisation de Radicaux Libres & Éthyleniques Diversement Substitués. Étude de la Taille des Cycles Engendrés". *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1969**, 7, 2415-27. d) Okano, T., Kaji, M., Isotani, S., Kiji, J. "Novel Regioselective Hydroboration of Alkadienoic Acids Caused by the Addition of Water". *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5547-50. e) Levin, D., Warren, S. "Stereochemically Controlled Synthesis of Unsaturated Acids by the Coupled Baeyer-Villiger and Horner-Wittig Reactions: Synthesis of (Z)-Oct-6-enoic Acid". *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1992**, 2155-7. f) Levin, D., Warren, S. "The Stereochemically Controlled Horner-Wittig Route to Unsaturated Acids: The Baeyer-Villiger Rearrangement of α-(1-Ph₂PO-Alkyl)-Cyclohexanones". *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 2265-6.

⁶⁶ a) Miyaura, N., Tagami, H., Itoh, M., Suzuki, A. "Isoprenylation of Olefins Via the Reaction of Iodine with Lithium Trialkylpropenylborates Obtainable from Trialkylboranes". *Chem. Lett.* **1974**, 1411-14. b) Levy, A.B., Angelastro, R., Marinelli, E.R. "An Improved Synthesis of Trisubstituted Ethylenes (Olefins) Via Organoboranes". *Synthesis* **1980**, 945-7. c) Liotta, R., Brown, H.C. "Hydroboration. Effect of Structure on Selective Monohydroboration of Representative Nonconjugated Dienes by 9-Borabicyclo[3.3.1]nonane". *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 2836-9.

Esquema 3.2. Preparación del ácido 6-octenoico.

Bajo estas condiciones se tiene un buen grupo saliente susceptible de ser desplazado por ataque del dianión del ácido fenoxiacético, previamente preparado por tratamiento del ácido con 2 equivalentes de diisopropilamido de litio (LDA). El calentamiento de la mezcla a 66 °C durante prolongados períodos de tiempo, seguido de basificación con NaOH y oxidación final con H₂O₂, conduce al deseado ácido 6-octenoico, **14**.

3.2.2.- Construcción de la estructura de β-cetoamida

Conseguidos los dos ácidos de partida, el paso siguiente era la obtención del sistema β-dicarbonílico, que sería unido posteriormente a un anillo de 2-pirrolina. Dicha agrupación se consiguió haciendo uso de la 2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona (ácido de Meldrum⁶⁷, **9**), que como el resto de derivados del ácido malónico permite la fácil creación de agrupaciones 1,3-dicarbonílicas, presentando la ventaja en este caso de que los subproductos se eliminan de forma sencilla como acetona y CO₂.

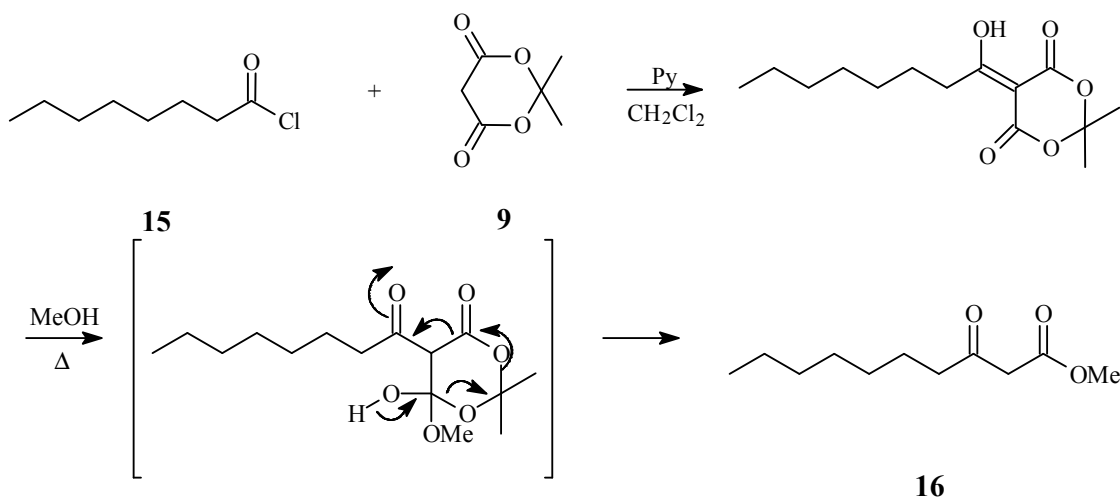
De este modo, en un primer intento llevamos a cabo la reacción entre el ácido de Meldrum, **9**, y el ácido octanoico⁶⁸ (como cloruro de ácido), **15**, utilizando piridina

⁶⁷ a) Meldrum, A.N. "A β-Lactonic Acid from Acetone and Malonic Acid". *J. Chem. Soc.*, **1908**, 93, 598-601. b) Davidson, D., Bernhardt, S.A. "The Structure of Meldrum's Supposed β-Lactonic Acid". *J. Am. Chem. Soc.*, **1948**, 70, 3426-8.

⁶⁸ La mayor disponibilidad del ácido octanoico hizo que primero se desarrollara la secuencia con él y una vez establecida esta se llevara a cabo con el ácido 6-octenoico, no comercial. Es por ello que en muchas de las reacciones descritas en adelante sólo vienen descritas para el primero de ellos.

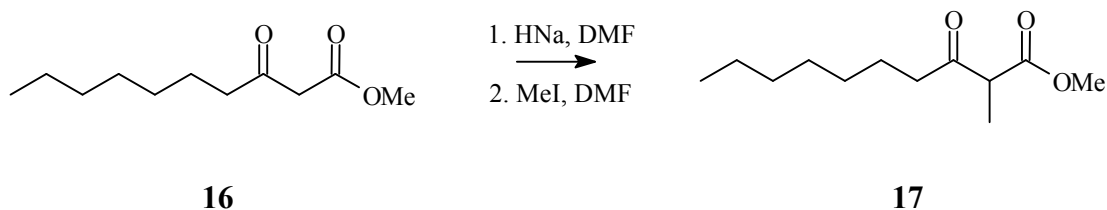
como base y CH_2Cl_2 como disolvente⁶⁹, lo que condujo al derivado acilado del ácido de Meldrum. Dicho derivado fue sometido a metanolisis sin previa purificación, obteniéndose el β -cetoéster **16**, como queda reflejado en el *Esquema 3.3*.

Esquema 3.3. Obtención de la agrupación β -dicarbonílica.



La siguiente transformación pasaba por la introducción entre ambos carbonilos de un grupo metilo. El producto metilado **17** se consiguió de una forma limpia y sencilla al hacer reaccionar con yodometano el carbanión resultante del tratamiento del β -cetoéster **16** con un equivalente de HNa ⁷⁰.

Esquema 3.4. Introducción del grupo metilo.



Con la cadena lateral totalmente construida, el siguiente paso debía ser la unión a través de un enlace de tipo amida con el anillo de 2-pirrolina. En la literatura aparece

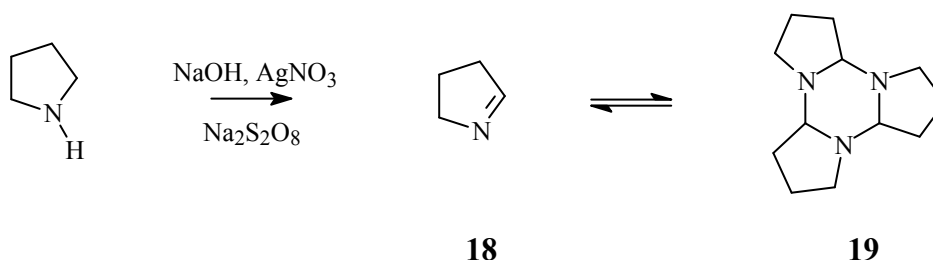
⁶⁹ Oikawa, Y.; Sugano, K.; Yonemitsu, O. "Meldrum's Acid in Organic Synthesis. A General and Versatile Synthesis of β -Keto Esters". *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 2087-8.

⁷⁰ a) Abad, A., Agulló, C., Arnó, M., Cantín, A., Cuñat, A.C., Meseguer, B., Zaragoza, R.J. "Stereoselective Synthesis of (-)-Metasequoic Acid B". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 1837-43.
b) Benetti, S., Romagnoli, R. "Mastering β -Keto Esters". *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 1065-1114.

descrita la formación de este tipo de enamidas⁷¹, por reacción del cloruro de ácido correspondiente con la 1-pirrolina, a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en presencia de Et_3N como base.

La 1-pirrolina, **18**, se consiguió por oxidación en medio básico de la pirrolidina con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ en presencia de una cantidad catalítica de AgNO_3 ⁷². La 1-pirrolina así obtenida aparece a temperatura ambiente en equilibrio con su trímero (**19**), que es la especie predominante.

Esquema 3.5. Preparación de la 1-pirrolina.



Conseguida la 1-pirrolina, se intentó a continuación obtener el cloruro de ácido correspondiente al éster sintetizado previamente, **17**. Sin embargo, este objetivo no se consiguió, debido a que el intermedio descarboxilaba espontáneamente. Aún en las condiciones descritas por Mitz⁷³ para la hidrólisis de β -cetoésteres de cadena larga, con HCl -ácido acético, nuestro producto sufría descarboxilación conduciendo a la etilheptilcetona. Por otro lado, al someter el cetoéster a condiciones ácidas mucho más suaves ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) el éster permanecía inalterado.

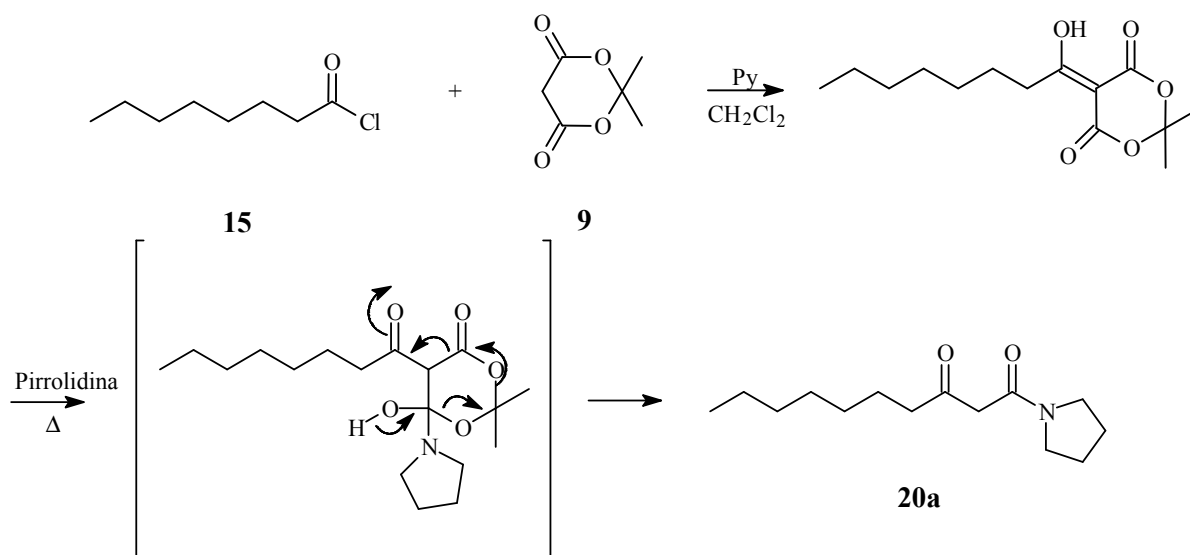
Vista la dificultad de obtener el ácido correspondiente al éster **17**, decidimos intentar la síntesis directa del cloruro de ácido de acuerdo al procedimiento descrito por Gross⁷⁴, por tratamiento con tricloruro de fosfobenzocatequina, preparado previamente a partir de PCl_5 y catecol. Sin embargo, todos los intentos en este sentido resultaron también infructuosos.

⁷¹ Kraus, G.A., Neuenschwander, K. "A Facile Synthesis of N-2-pyrrolines". *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 4791-2.

⁷² Nomura, Y., Ogawa, K., Takeuchi, Y., Tomoda, S. "One-Step Synthesis and Structural Confirmation of 1-Pyrroline Trimer". *Chem. Lett.*, **1977**, 693-6.

⁷³ Mitz, M.A., Axelrod, A.E., Hofmann, K. "The Synthesis of Higher Aliphatic β -Keto Acids". *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 1231-2.

⁷⁴ Gross, H., Gloede, J. "Brenzcatchyl-phosphortrichlorid als Neues Präparatives Hilfsmittel". *Chem. Ber.*, **1963**, 1387-94.

Esquema 3.6. Construcción del sistema de β -cetoamida 20a.

Estos resultados tuvieron como consecuencia un replanteamiento del problema. En este sentido decidimos introducir una variación en la construcción del sistema dicarbonílico, llevando a cabo la aminólisis directa del derivado acilado del ácido de Meldrum⁷⁵, utilizando como amina la pirrolidina. Se consiguió así la β -cetoamida (**20a**) deseada con un 61 % de rendimiento global para las etapas de acilación y aminólisis.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se caracterizaban por el desdoblamiento de algunas señales, hecho que es debido al equilibrio entre las formas cetónica y enólica (bastante desplazado hacia la forma cetónica). Las señales más características del espectro de RMN ^1H eran el singlete que aparece a $\delta = 3.5$ ppm, correspondiente a los protones metilénicos entre los dos carbonilos, y el triplete a $\delta = 2.6$ ppm de los protones sobre el C_4 . En el espectro de ^{13}C RMN sobresalen las señales a $\delta = 204.6$ y 171.8 ppm debidas a los carbonilos de cetona y amida respectivamente. Estas señales se ven correspondidas con la aparición de dos bandas a $\nu = 1710$ y 1630 cm^{-1} en el espectro de IR.

Construido el esqueleto de β -cetoamida **20a**, restaba tan sólo la metilación y la oxidación del anillo de pirrolidina para la obtención de los sistemas monocíclicos.

⁷⁵ Pak, C.S., Yang, H.C., Choi, E.B. "Aminolysis of 5-Acyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-diones (Acyl Meldrum's Acids) as a Versatile Method for the Synthesis of β -Oxo Carboxamides". *Synthesis*, **1992**, 1213-4.

Para evitar posibles complicaciones, decidimos llevar a cabo en primer lugar la introducción del grupo metilo en α a ambos grupos carbonilo en las mismas condiciones utilizadas en el caso del β -cetoéster⁷⁰. Se obtuvo así, por tratamiento con HNa en DMF, seguido de adición de yodometano, la β -cetoamida metilada **21a** con un 79 % de rendimiento.

Esquema 6. Metilación de la β -cetoamida 20a.



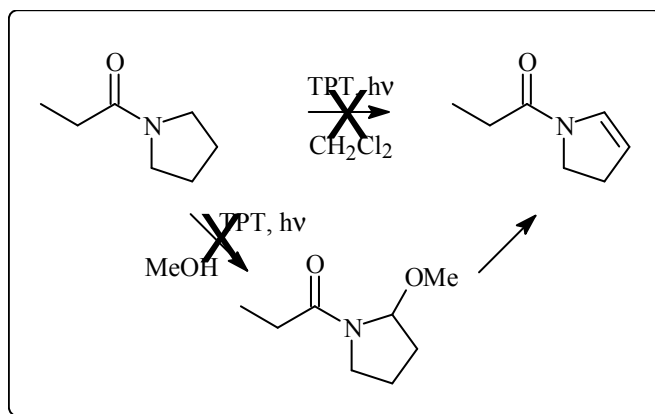
La presencia del metilo se vio reflejada en los espectros de RMN con la aparición de un doblete a $\delta = 1.4$ ppm en la resonancia de ^1H y un nuevo pico a $\delta = 13.0$ ppm en la de ^{13}C .

3.2.3.- Oxidación del anillo de pirrolidina

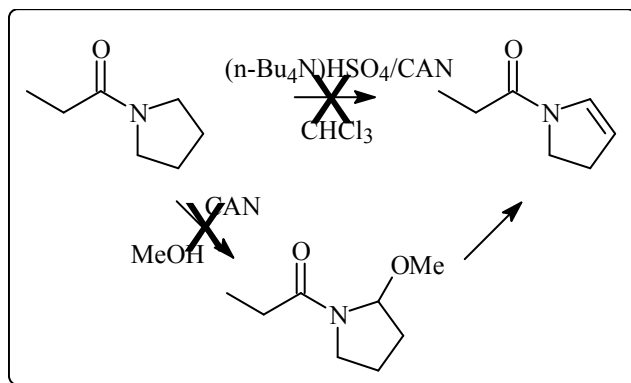
En este punto, habíamos de proceder a la introducción de la insaturación en el anillo de pirrolidina. Tras una búsqueda bibliográfica se consideró la posibilidad de llevar a cabo dicha oxidación por tres caminos diferentes:

- Vía fotoquímica⁷⁶. Tomando como sustancia de referencia la *N*-propionilpirrolidina, se llevó a cabo la irradiación de disoluciones en CH_2Cl_2 y en MeOH a $\lambda > 400$ nm utilizando el tetrafluoroborato de 2,4,6-trifenilpirilio (TPT), como sensibilizador. Sin embargo, este tratamiento no condujo a ninguna variación apreciable sobre nuestro sistema.

⁷⁶ Miranda, M.A., García, H. "2,4,6-Triphenylpyrylium Tetrafluoroborate as an Electron-Transfer Photosensitizer". *Chem. Rev.*, **1994**, 94, 1063-89.

Esquema 3.8. Intento de fotooxidación del anillo de pirrolidina.

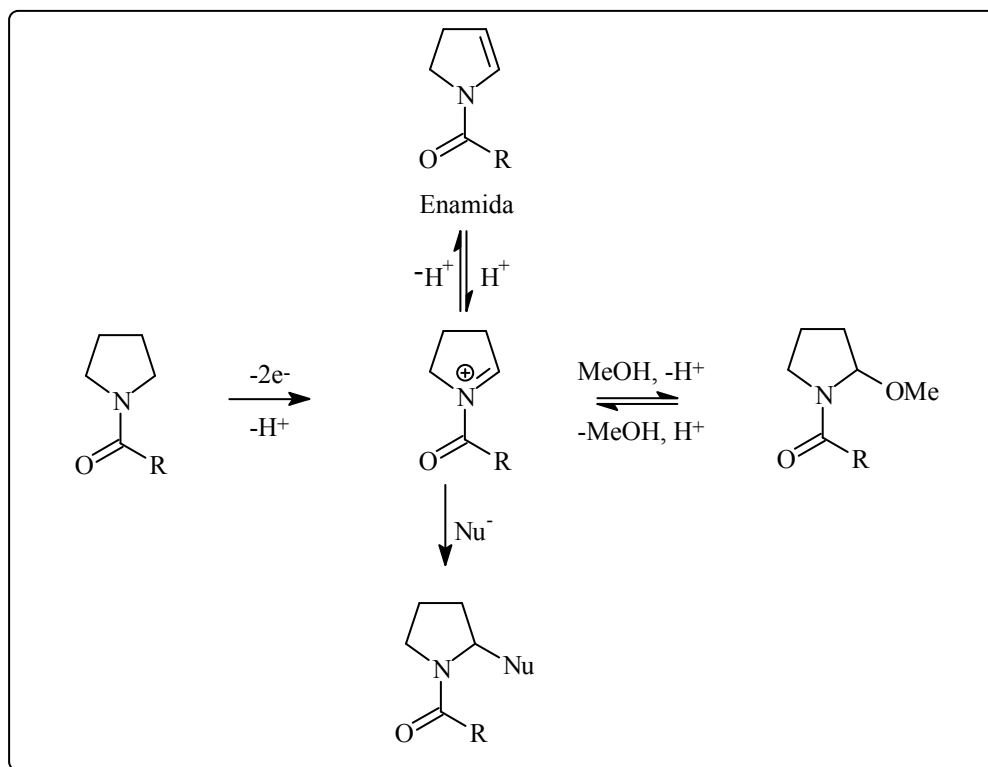
- Vía oxidación química⁷⁷. Este método suponía la utilización como agente oxidante del nitrato de cerio (IV) y amonio (CAN). Al igual que en el caso anterior, se realizaron ensayos para la obtención del anillo de 2-pirrolina directamente, por oxidación en CHCl_3 , usando como agente de transferencia de fase el (n-Bu₃N)HSO₄, o a través del intermedio metoxilado (oxidando en MeOH). Sin embargo, ninguno de los dos métodos condujo a resultados positivos.

Esquema 3.9. Intento de oxidación química del anillo de pirrolidina.

⁷⁷ Adam, W., Miranda, M.A., Mojarrad, F., Sheikh, H. "Carbon-Carbon Bond Cleavage of the [2.2]Paracyclophane Radical Cation Generated by Electron Transfer Oxidation with Cerium (IV) Ammonium Nitrate", *Chem. Ber.*, **1994**, 127, 875-9.

- Vía oxidación anódica⁷⁸. Este procedimiento ha sido ampliamente descrito en la bibliografía para la obtención de enamidas según el método de Ross-Ebersson-Nyberg. Este método implica inicialmente la pérdida de uno de los electrones del par solitario existente sobre el átomo de N, formándose los correspondientes iones *N*-aciliminio como intermedios de reacción. Ello permite realizar sustituciones nucleofílicas usando catalizadores de tipo ácido, como se aprecia en la *Esquema 3.10*.

Esquema 3.10. Esquema de obtención de enamidas por oxidación anódica.

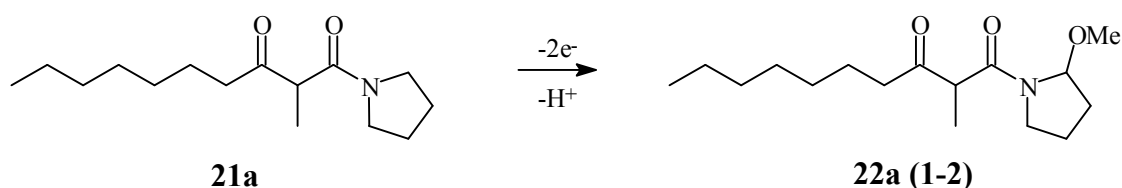


⁷⁸ a) Shono, T., "Electroorganic Chemistry in Organic Synthesis". *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 40, 811-50. b) Shono, T., Matsumura, Y., Tsubata, K., Sugihara, Y., Yamane, S., Kanazawa, T., Aoki, T. "Electroorganic Chemistry. Electroorganic Synthesis of Enamides and Enecarbamates and Their Utilization in Organic Synthesis". *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 6697-703. c) Shono, T., Matsumura, Y., Tsubata, K., Sugihara, Y. "A New Method of Acylation at β -Position of Aliphatic Amines". *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23, 1201-4. d) Shono, T., Hamaguchi, H., Matsumura, Y. "Electroorganic Chemistry. Anodic Oxidation of Carbamates". *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 4262-8. e) Shono, T., Matsumura, Y., Tsubata, K. "Electroorganic Chemistry. A New Carbon-Carbon Bond Forming Reaction at the α -Position of Amines Utilizing Anodic Oxidation as a Key Step". *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 1172-6. f) Shono, T., Matsumura, Y., Tsubata, K. "A New Synthetic Method of α -Amino Acids from α -Methoxyurethanes". *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 2411-2. g) Palasz, P.D., Utley, J.H.P., Hardstone, J.D. "Electro-organic Reactions. Regioselectivity and the Stereochemistry of Anodic Methoxylation of *N*-Acylpiperidines and *N*-Acylmorpholines". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1984**, 807-13.

Esta variante de oxidación parecía la más viable para la consecución de las enamidas naturales. No obstante, el elevado número de variables que es necesario controlar para llevar a cabo la reacción electroquímica (intensidad de corriente, superficie de electrodo, concentración, etc), hizo que fuesen necesarias algunas pruebas hasta la obtención de resultados aceptables.

Finalmente, se consiguió la amida metoxilada al someter a una corriente continua y constante de 20 mA una disolución metanólica de la β -cetoamida **21a**, en presencia de *p*-toluensulfonato de tetrabutilamonio como soporte electrolítico, hasta haber pasado 3.7 F/mol a través de la disolución. En estas condiciones se obtenía una mezcla correspondiente a las dos posibles cetoamidas metoxiladas diastereómeras (**22a1** y **22a2**) con un rendimiento del 45 %⁷⁹.

Esquema 3.11. Obtención del par de β -cetoamidas metoxiladas diastereómeras.



La mezcla de β -cetoamidas metoxiladas diastereómeras pudo ser resuelta por cromatografía de columna. Aunque cada uno de los productos fue caracterizado por separado, de los experimentos de NOE diferencial realizados no se pudieron sacar conclusiones que nos permitiesen la asignación inequívoca de las estereoestructuras.

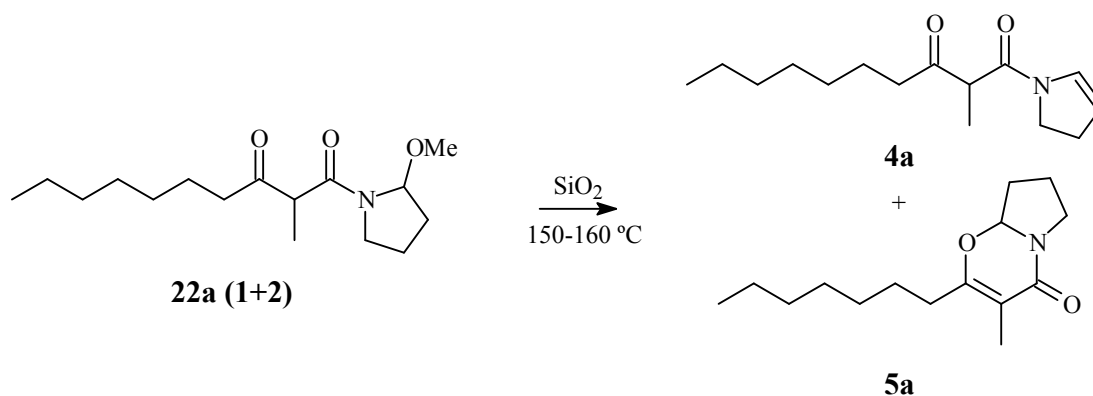
Los espectros de RMN de 1H y ^{13}C de ambas se caracterizaban por la duplicación de las señales. Estas amidas presentan una barrera de energía suficiente para el giro alrededor del enlace C-N, por lo que a temperatura ambiente no pueden cambiar libremente de conformación, siendo este hecho la causa de esa duplicidad. Ambos productos presentaban como señales más características en el RMN 1H , un doblete a $\delta= 5.5+5.0$ ppm en un caso y $\delta= 5.5+4.9$ ppm en el otro correspondientes al protón sobre C_2 , así como los singletes debidos a los protones de los metoxilos a $\delta= 3.4+3.3$ y $\delta= 3.3+3.2$ ppm. Estos datos se correspondían con señales en el espectro de RMN de ^{13}C a

⁷⁹ Cabe destacar que en esta reacción se recuperaba en torno a un 50 % de producto de partida, tras la separación de las cetoamidas diastereoméricas.

$\delta = 88.5+87.2$ y $\delta = 88.7+87.3$ ppm para el C₂, mientras que el metilo de los metoxilos se diferenciaba a $\delta = 53.0$ y $\delta = 52.8+52.2$ ppm en los espectros de DEPT.

Obtenidos los productos metoxilados **22a1** y **22a2**, sólo nos faltaba realizar la eliminación para la consecución de la enamida deseada **4a**. Para lograr la eliminación de MeOH, llevamos a cabo la adsorción de la mezcla de ambos diasterómeros sobre SiO₂ y calentamos a 150-160 °C^{78b,80}. La utilización de SiO₂ como catalizador ácido implicaba volver a pasar a través del ion *N*-aciliminio, continuando hasta la formación de la enamida (*Esquema 3.10*). Además, la presencia en la molécula de un grupo carbonilo enolizable, podía provocar la sustitución nucleofílica sobre la posición C₂ a través de la forma enólica. Así, al someter a las mencionadas condiciones una mezcla de los productos metoxilados **22a1** y **22a2**, obtuvimos una mezcla 1:1 de la enamida natural deseada **4a**, y su isómero bicíclico **5a**.

Esquema 3.12. Obtención del producto natural 4a y su isómero bicíclico 5a.



⁸⁰ a) Slomczynska, U., Chalmers, D.K., Cornille, F., Smythe, M.L., Beusen, D.D., Moeller, K.D., Marshall, G.R. "Electrochemical Cyclization of Dipeptides to Form Novel Bicyclic, Reverse-Turn Peptidomimetics. Synthesis and Conformational Analysis of 6,5-Bicyclic Systems". *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 1198-204; b) Cornille, F., Fobian, Y.M., Slomczynska, U., Beusen, D.D., Marshall, G.R., Moeller, K.D. "Anodic Amide Oxidations: Conformationally Restricted Peptide Building Blocks from the Direct Oxidation of Dipeptides". *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 6889-992; c) Cornille, F., Slomczynska, U., Smythe, M.L., Beusen, D.D., Marshall, G.R., Moeller, K.D. "Electrochemical Cyclization of Dipeptides toward Novel Bicyclic, Reverse-Turn Peptidomimetics. Synthesis and Conformational Analysis of 7,5-Bicyclic Systems". *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 909-17; d) Moeller, K.D., Rutledge, L.D. "Anodic Amide Oxidations: The Synthesis of Two Spirocyclic L-Pyroglutamide Building Blocks". *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 6360-3; e) Moeller, K.D., Hanau, C.E., Avignon, A. "The Use of HMQC-TOCSY Experiments for Elucidating the Structures of Bicyclic Lactams: Uncovering a Surprise Rearrangement in the Synthesis of a Key PRO-PHE Building Block". *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 825-8.

Los datos espectroscópicos correspondientes a la enamida sintética **4a** coincidieron completamente con los exhibidos por el producto natural aislado, confirmándose por tanto su estructura.

El producto bicíclico **5a**, se caracterizaba espectroscópicamente por la aparición en RMN ^1H de un doble doblete a $\delta = 5.2$ ppm, correspondiente al protón sobre el carbono puente entre ambos anillos; así como por el singlete a $\delta = 1.8$ ppm del metilo sobre el doble enlace. Por su parte, el espectro de RMN ^{13}C exhibía dos señales a $\delta = 168.2$ y 163.8 ppm, correspondientes al carbonilo α,β -insaturado de amida y al C_4 del anillo de oxazina.

3.2.4.- Intentos de obtención selectiva de la enamida natural

Con ánimo de obtener de forma selectiva cada uno de los productos (especialmente la enamida **4a**), y aprovechando la infraestructura en materia de catálisis del Instituto de Tecnología Química, llevamos a cabo diferentes pruebas con diferentes catalizadores de tipo ácido para la eliminación de MeOH, resumiéndose los resultados en la *Tabla I*.

Tabla I. Distribución de productos en función del catalizador y la temperatura de reacción.

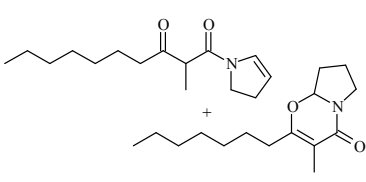
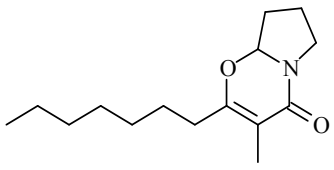
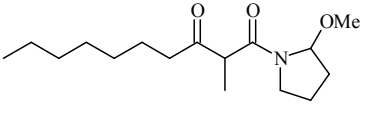
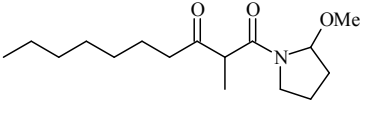
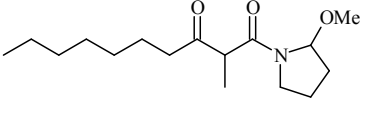
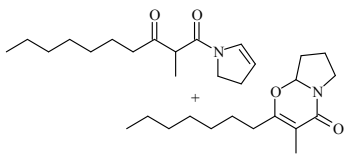
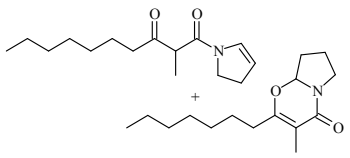
| CATALIZADOR | TEMPERATURA | DISOLVENTE | PRODUCTOS |
|----------------|-------------|--------------------------|---|
| SiO_2 | 150-160 | -- |  |
| HZSM-5 | t.a. | CH_2Cl_2 |  |

Tabla I (Cont.). Distribución de productos en función del catalizador y la temperatura de reacción.

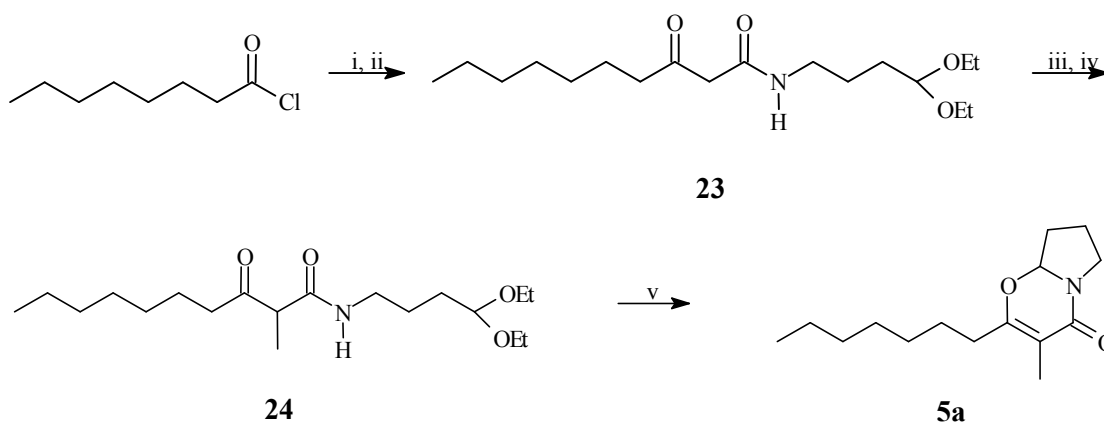
| CATALIZADOR | TEMPERATURA | DISOLVENTE | PRODUCTOS |
|-------------|-------------|---------------------------------|---|
| NaZSM-5 | t.a. | CH ₂ Cl ₂ |  |
| NaZSM-5 | reflujo | CH ₂ Cl ₂ |  |
| SAPO 11 | t.a. | CH ₂ Cl ₂ |  |
| ALPO | t.a. | CH ₂ Cl ₂ |  |
| SAPO 14 | reflujo | CH ₂ Cl ₂ |  |

Como se puede deducir de la *Tabla I*, no hubo ningún catalizador entre los ensayados que permitiese la obtención de la enamida **4a** como único producto, sin el subsiguiente proceso de ciclación. En el mejor de los casos se consiguió como una mezcla de proporciones similares a las obtenidas con SiO₂.

Por esta razón, se ideó como ruta alternativa aquella que suponía la construcción del anillo de 2-pirrolina. De esta forma, se procedió a la síntesis de la estructura de β -cetoamida por acilación previa del ácido de Meldrum con el cloruro del ácido y posterior aminólisis a reflujo de benceno⁷⁵, pero esta vez utilizando como amina el

dietilacetal del 4-aminobutiraldehído. La posterior introducción del grupo metilo, según las condiciones anteriormente estudiadas⁷⁰ conducía a una estructura lineal, pero donde existe la posibilidad de ciclación interna por ataque nucleofílico del átomo de N al acetal.

Esquema 3.13. Intento de obtención selectiva del producto natural 4a.



i.- Ácido de Meldrum, piridina, CH_2Cl_2 ; ii.- Dietilacetal del 4-aminobutiraldehído, benceno, reflujo;
iii.- HNa , DMF; iv.- MeI, DMF; v.- PPTS, acetona (ac), reflujo.

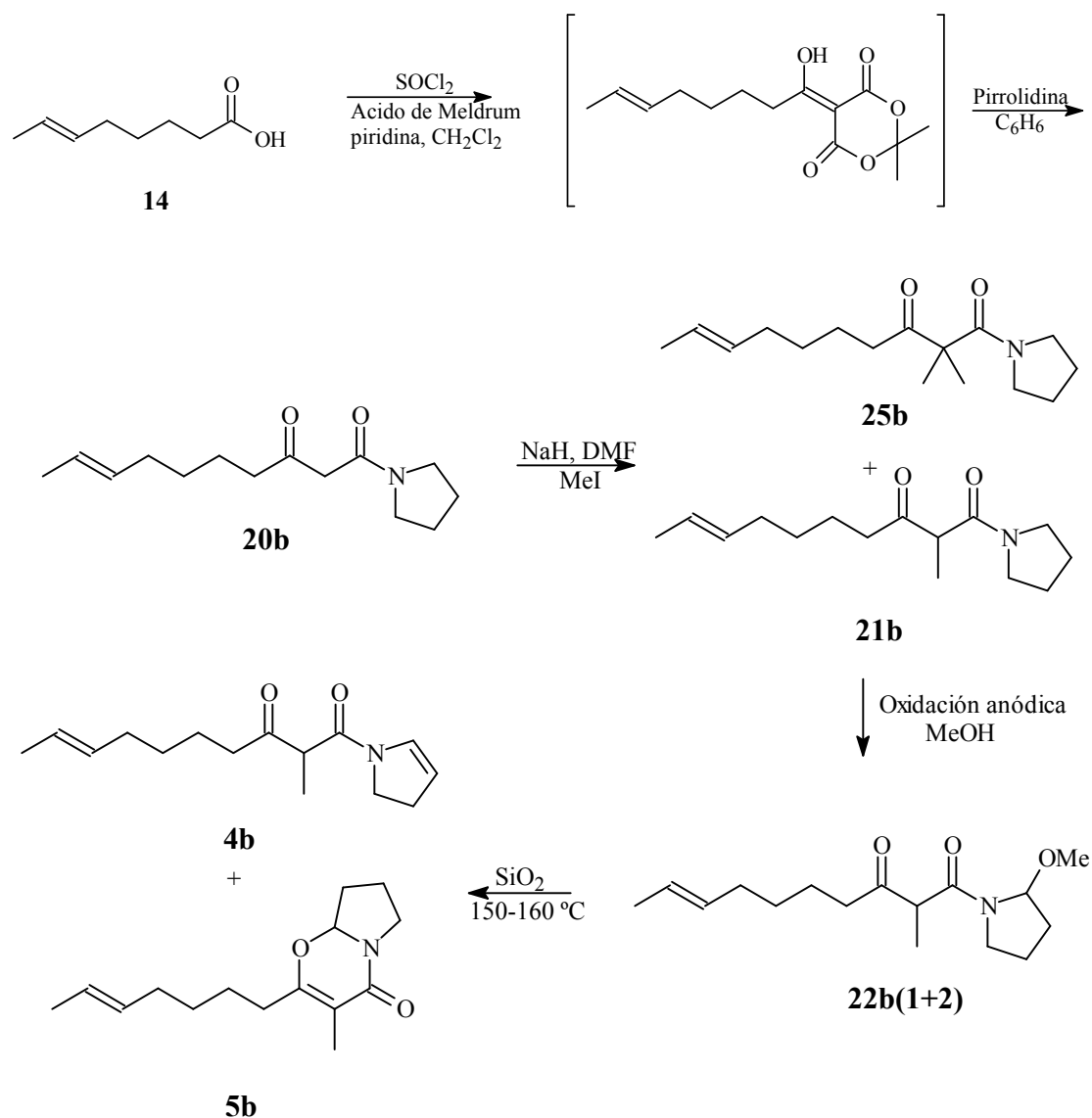
Conseguido el acetal **24**, se sometió a hidrólisis ácida con *p*-toluensulfonato de piridinio (PPTS)^{70a}. Sin embargo, en estas condiciones se obtenía una mezcla compleja de productos donde únicamente aparecía como producto reconocible la oxazina **5a**.

El hecho de que la ciclación de la enamida **4a** se produzca con facilidad para dar la oxazina **5a**, junto con la relación estructural que ésta presenta con los esqueletos de los productos naturales bicíclicos obtenidos de los extractos de *Penicillium*, sugiere que todos estos productos, mono y bicíclicos están biosintéticamente relacionados.

3.2.5.- Obtención de los productos de cadena insaturada

Tras obtener el producto natural **4a**, nos dispusimos a reproducir la secuencia con la cadena lateral insaturada, con el objetivo de conseguir los dos productos naturales análogos, **4b** y **5b**. Para ello se tomó el ácido 6-octenoico que había sido preparado según el método descrito por Hara^{65b} (*vide infra*).

Esquema 3.14. Preparación de los productos naturales análogos de cadena insaturada.



Así, previa conversión del ácido a su correspondiente cloruro de ácido, se realizó la acilación del ácido de Meldrum, seguida, de la aminólisis con pirrolidina a reflujo de benceno⁷⁵. De este modo se obtuvo la β -cetoamida **20b**, cuya diferencia básica en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C respecto al análogo **20a**, radicaba en de las señales correspondientes al doble enlace a $\delta = 5.4$ ppm (protones) y $\delta = 130.7$ y 125.0 ppm (carbonos).

La metilación⁷⁰ fue llevada a cabo sin mayores problemas, aunque en este caso cabe destacar la formación del producto de dimetilación **25b**, que no había sido detectado en la secuencia anterior. Este producto exhibía en su espectro de RMN de ^1H

dos tripletes a $\delta = 3.5$ y 3.1 ppm correspondientes a los protones del anillo en α al átomo de N, así como un singlete que integraba 6 protones a $\delta = 1.3$ ppm. La variación más significativa en el espectro de ^{13}C RMN era la desaparición de la señal de C_2 , en el DEPT, acompañado de la aparición de una nueva señal muy intensa a $\delta = 22.3$ ppm correspondiente a ambos metilos.

Como en el caso anterior, como resultado de la reacción electroquímica⁷⁸ aparecieron dos cetoamidas diastéricas que fueron resueltas por cromatografía de columna y que como entonces mostraban desdoblamiento en las señales en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C .

Finalmente, como se esperaba, la reacción de eliminación⁸⁰ condujo a los productos deseados **4b** y **5b**, los productos obtenidos por síntesis y los productos naturales aislados presentaron características espectroscópicas coincidentes.

3.3. Actividades Biológicas

Una vez conseguidas las enamidas naturales **4 (a y b)**, así como los isómeros bicíclicos **5 (a y b)** se debía proceder a corroborar las importantes actividades plaguicidas que habían sido detectadas previamente. Asimismo, se evaluaron las actividades insecticida, anti-HJ y microbicida del conjunto de intermedios de síntesis, pues constituían una familia de análogos a los productos naturales activos, lo que los convertía en sustancias potencialmente activas.

3.3.1.- Actividad antagonista de la hormona juvenil

De todos los productos ensayados destacan los productos naturales **4a** y **5b** que presentaron notables actividades anti-HJ *in vivo*, induciendo a la metamorfosis precoz de las ninfas de *O. fasciatus* tratadas (Tabla II).

Tabla II. Actividad Anti-HJ in vivo frente a *O. fasciatus*

| Productos ^a | Dosis (µg/ninfa) | Actividad anti-HJ % ^{b,c} |
|------------------------|---------------------|------------------------------------|
| 4a | 10.0 | 71.4 ± 5.4 |
| | 2.0 | 90.0 ± 2.0 |
| 4b | 1.0 | 60.0 ± 3.2 |
| | 0.5 | 35.7 ± 1.7 |
| | 0.2 | 14.3 ± 0.8 |

^a Los productos sin actividad no aparecen reflejados en la tabla. ^b Porcentaje de adultos precoces respecto a las ninfas supervivientes al test entomotóxico. ^c La actividad anti-HJ ha sido determinada por aplicación tópica, en ninfas de cuarto estadio recién mudadas, a las dosis que en la tabla aparecen reflejadas como porcentaje de adultos precoces respecto a las ninfas supervivientes al test entomotóxico.

Los efectos observados por la administración de estos productos eran del mismo tipo que los detectados en el caso de los precocenos⁸¹. Por otro lado y de acuerdo con Staal⁸², los productos **4a** y **4b** han demostrado ser verdaderos agentes anti-HJ, ya que su coadministración con un juvenoide, como el metopreno, es capaz de contrarrestar el efecto anti-juvenoide.

Aunque son necesarios estudios más exhaustivos sobre el mecanismo de acción de estos compuestos, parece ser que interrumpen la secreción y/o biosíntesis de la hormona juvenil más que interferir o competir por el lugar de recepción, ya que la metamorfosis es impedida por tratamiento exógeno con el juvenoide. Otra posibilidad podría ser la acción directa sobre el *corpora allata*, actuando como una citotoxina allatalica.

Existen estudios en progreso para aclarar el modo de acción y encontrar si esta acción sobre el crecimiento de los insectos puede ser extendida a otras especies de plagas, más importantes comercialmente.

⁸¹ a) Bowers, W.S., Ohta, T., Cleere, J.S., Marsella, P.A. "Discovery of Insect Anti-Juvenile Hormones in Plants". *Science*, **1976**, 193, 542-7. b) Bowers, W.S. "Discovery of Insect Antiallatopropins". (Gilbert, L.I., ed.) *The Juvenile Hormones*. Pags: 394-408. Plenum, New York, **1976**.

⁸² Staal, G.B. "Antijvenile Hormone Agents". *Ann. Rev. Entomol.*, **1986**, 31, 391.

Por otro lado, se ha observado que el compuesto **5b** produce un importante efecto en el crecimiento, induciendo retrasos importantes en la muda, aunque en estos momentos se desconoce si estas características son debidas a un efecto anti-HJ en el *corpora allata*, glándulas protorácicas u otros tejidos objetivo. Previamente se han descrito retrasos en la muda de *O. fasciatus* por administración del precoceno II debido a su efecto directo sobre las glándulas protorácicas^{81a, 83}.

3.3.2.- Actividad entomotóxica

En la *Tabla III* aparecen reflejadas las actividades insecticidas más relevantes exhibidas por estos productos frente al hemíptero de *O. fasciatus*.

Tabla III. Actividad Entomotóxica frente a *O. fasciatus*

| Productos ^a | Dosis ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) | Toxicidad % ^b |
|------------------------|--|-----------------------------|
| 4a | 10.0 | 20.0 \pm 4.5 |
| | 10.0 | 91.1 \pm 3.9 |
| 20a | 7.5 | 56.7 \pm 4.7 |
| | 5.0 | 6.7 \pm 0.0 |
| | 10.0 | 100 |
| 21a | 7.5 | 100 |
| | 5.0 | 82.2 \pm 2.2 |
| | 2.5 | 24.4 \pm 4.6 |
| | 1.0 | 13.3 \pm 0.0 |
| | 1.0 | 13.3 \pm 0.0 |

^a Los productos sin actividad no aparecen reflejados en la tabla. ^b Cada valor representa la media (n=3) y desviación standard del porcentaje de mortalidad, respecto al control. Los resultados fueron obtenidos por el método de contacto en placa⁸¹.

De esta tabla se desprende que los intermedios de síntesis que incorporaban a su estructura el anillo de pirrolidina y la cadena lateral totalmente saturada (compuestos **20a** y **21a**), presentan una mayor acción insecticida que el producto natural al que conducen posteriormente, **4a**. Este hecho, unido a las diferencias estructurales entre el

⁸³ Masner, P., Bowers, W.S., Kalin, M., Muhle, T. "Effect of Precocene II on Endocrine Regulation in the Bug, *Oncopeltus fasciatus*". *Gen. Comp. Endocr.*, **1979**, 37, 156-6.

producto natural y sus intermedios, conduce a la conclusión de que la presencia del anillo heterocíclico totalmente saturado implica un notable aumento en la actividad insecticida; por otro lado, las diferencias en actividad observadas en dos moléculas tan similares como **20a** y **21a** hacen pensar que la presencia del grupo metilo entre ambos carbonilos realza la actividad.

Por otro lado, los productos que incorporaban a su estructura la cadena lateral insaturada no presentaron propiedades entomotóxicas destacables, siendo en esta serie el compuesto **5b** el que destacó por su mayor actividad, con una LD₅₀ de 20 µg/ninfa⁸⁴ por aplicación tópica sobre ninfas de cuarto estadio de *O. fasciatus*.

3.3.3.- Actividad fungicida

Las *Tablas IV* y *V*⁸⁵ muestran las actividades fungicidas exhibidas por los diferentes compuestos. Para todos los productos ensayados, el valor de la concentración mínima inhibitoria (MIC) detectado fue superior a 100 µg/mL, hecho que indicaba que ninguno de estos compuestos era muy efectivo en la inhibición del crecimiento de los diferentes microorganismos. Sin embargo, se han encontrado algunos productos que presentan interesantes actividades, pudiendo ser utilizados como moléculas guía para una optimización de las actividades por modificaciones en las estructuras.

Dentro de los productos que no presentan insaturación en la cadena, resulta interesante el hecho que **4a**, **20a** y **22a2** son activos de forma selectiva frente al género *Colletotrichum*. Bajo ciertas condiciones, un fungicida selectivo puede ser muy útil en el control de un microorganismo en particular; así, estos compuestos pueden ser utilizados como punto de partida para la síntesis de nuevos análogos con actividades fungicidas perfeccionadas contra un importante fitopatógeno, como es *Colletotrichum*.

⁸⁴ Los datos biológicos reflejados para este producto corresponden al producto obtenido por síntesis, mostrando el natural una mayor actividad.

⁸⁵ Los datos de actividad fungicida se han analizado mediante un Anova (Análisis de varianza) y el test de diferencia menos significativo (LSD) se ha utilizado para comparar las medias. (Statgraphics Plus 2.1).

Tabla IV. Actividades fungicidas de los productos que presentan la cadena saturada.

| Fitopatógenos Objetivo | Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial del Micelio ^a | | | | | |
|--|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | % (Media ± DS) ^b | | | | | |
| | 4a | 5a | 20a | 21a | 22a1 | 22a2 |
| <i>Fusarium culmorum</i> | 0 ^A | 0 ^A | 6.2±1.0 ^B | 0 ^A | 7.4±1.2 ^B | 7.0±0.9 ^B |
| <i>Fusarium oxysporium</i> <i>ssp. gladioli</i> | 0 ^A | 0 ^A | 11.4±1.5 ^B | 0 ^A | 0 ^A | 0 ^A |
| <i>Fusarium oxysporium</i> <i>ssp. niveum</i> | 7.9±0.4 ^A | 11.4±1.6 ^B | 10.2±1.5 ^B | 0 ^C | 0 ^C | 5.2±0.2 ^A |
| <i>Geotrichum candidum</i> | 0 ^A | 0 ^A | 14.3±5.8 ^B | 0 ^C | 0 ^B | 6.9±1.0 ^C |
| <i>Colletotrichum</i> <i>gloesporoides</i> | 46.8±4.9 ^A | 7.1±0.5 ^B | 26.3±3.0 ^C | 17.5±2.5 ^D | 11.1±2.0 ^E | 12.9±1.0 ^E |
| <i>Colletotrichum coccodes</i> | 31.7±2.9 ^A | 20.0±1.7 ^B | 45.9±4.4 ^C | 20.0±3.3 ^B | 38.2±4.4 ^{CA} | 47.8±5.8 ^C |
| <i>Trichothecium roseum</i> | 34.7±3.4 ^A | 18.0±4.4 ^B | 26.2±2.5 ^C | 9.9±2.7 ^D | 22.0±2.5 ^{CB} | 33.3±4.9 ^A |
| <i>Alternaria tenuis</i> | 26.0±5.8 ^{AD} | 28.2±4.4 ^B | 27.1±2.7 ^A | 31.9±4.6 ^B | 15.5±1.4 ^C | 21.7±2.7 ^D |
| <i>Rosellinia necatrix</i> | 16.1±7.8 ^A | 0 ^B | 0 ^B | 0 ^B | 0 ^B | 0 ^B |
| <i>Verticillium dahliae</i> | 18.4±4.0 ^A | 30.1±7.0 ^B | 38.3±5.4 ^B | 17.3±2.0 ^A | 39.5±4.5 ^B | 38.5±7.8 ^B |
| <i>Trichoderma viride</i> | 17.3±8.3 ^A | 9.2±2.0 ^B | 6.3±1.7 ^B | 15.0±1.0 ^A | 8.0±1.9 ^B | 9.5±2.3 ^B |
| <i>Penicillium italicum</i> | 0 ^A | 20.9±3.6 ^B | 18.2±3.5 ^B | 0 ^A | 9.1±0.5 ^C | 9.7±1.1 ^C |
| <i>Aspergillus parasiticus</i> | 0 ^A | 0 ^B | 0 ^A | 16.2±2.7 ^B | 0 ^A | 0 ^A |

^a Concentración en los ensayos: 100 µg/mL ^b Cada valor indica la media y la desviación standard de los tres experimentos diferentes. Dentro de cada fila, los compuestos que presentan el mismo superíndice (A-E) no presentan diferencias significativas de actividad (P > 0.05).

En lo que respecta a los productos que incorporan la cadena lateral insaturada, son los productos naturales sintetizados⁸⁶ los que mostraron mayores actividades, destacando especialmente el producto bicíclico **5b**. Dicho compuesto aparece como un fungicida de amplio espectro, produciendo una inhibición del crecimiento del micelio del 40 % 100 µg/mL contra doce de los quince hongos ensayados pertenecientes a catorce géneros diferentes. Por otro lado, la enamida **4b** exhibió una mayor selectividad, afectando a un menor número de especies, especialmente *F. culmorum* y *C.*

⁸⁶ Las actividades fungicidas de los productos naturales no fueron determinadas por falta de muestra.

gloesporoides; por tanto, resulta nuevamente de interés para el control selectivo de este tipo de especies.

Tabla V. Actividades fungicidas de los productos que presentan la cadena insaturada.

| Fitopatógenos Objetivo | Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial del Micelio ^a | | | | |
|--|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | % (Media ± DS) ^b | | | | |
| | 4b | 5b | 20b | 21b | 25b |
| <i>Fusarium culmorum</i> | 51.9±1.9 ^A | 66.1±1.6 ^B | 0 ^C | 0 ^C | 0 ^C |
| <i>Fusarium oxysporium</i> <i>ssp. gladioli</i> | 15.4±0.7 ^A | 52.8±3.9 ^B | 13.9±0.9 ^A | 14.2±1.1 ^A | 24.0±4.7 ^C |
| <i>Fusarium oxysporium</i> <i>ssp. niveum</i> | 29.7±2.1 ^A | 48.6±0.1 ^B | 16.1±1.2 ^C | 15.6±0.3 ^C | 27.0±1.0 ^A |
| <i>Geotrichum candidum</i> | 20.0±3.4 ^A | 43.8±1.8 ^B | 17.3±2.4 ^A | 0 ^C | 18.2±1.3 ^A |
| <i>Colletotrichum gloesporoides</i> | 61.5±3.2 ^A | 29.4±2.0 ^B | 17.6±2.1 ^C | 19.7±1.2 ^C | 22.0±2.8 ^C |
| <i>Colletotrichum coccodes</i> | 32.2±4.1 ^A | 66.2±2.4 ^B | 49.1±3.6 ^C | 29.4±2.7 ^A | 48.4±2.3 ^C |
| <i>Trichothecium roseum</i> | 34.4±2.6 ^A | 42.3±2.4 ^B | 16.3±2.8 ^D | 33.0±2.2 ^A | 51.0±4.4 ^C |
| <i>Alternaria tenuis</i> | 39.4±1.3 ^A | 68.5±4.9 ^B | 22.2±4.1 ^C | 12.6±0.6 ^D | 21.0±3.1 ^C |
| <i>Rosellinia necatrix</i> | 11.4±1.1 ^A | 12.8±0.7 ^A | 24.4±0.9 ^B | 34.5±2.5 ^C | 26.3±2.8 ^B |
| <i>Verticillium dahliae</i> | 17.2±0.9 ^A | 62.5±7.7 ^B | 29.0±3.6 ^C | 28.6±1.4 ^C | 28.6±0.0 ^C |
| <i>Trichoderma viride</i> | 0 ^A | 47.0±1.8 ^B | 0 ^A | 0 ^A | 25.0±2.5 ^C |
| <i>Penicillium italicum</i> | 0 ^A | 77.3±3.4 ^B | 0 ^A | 0 ^A | 0 ^A |
| <i>Pyricularia oryzae</i> | 9.8±0.4 ^A | 27.8±0.9 ^A | 10.2±0.2 ^A | 0 ^C | 0 ^C |
| <i>Phytophthora citrophthora</i> | 45.0±2.9 ^A | 41.1±3.6 ^A | 16.0±1.5 ^C | 17.8±2.0 ^C | 31.1±0.1 ^B |
| <i>Aspergillus parasiticus</i> | 11.9±1.0 ^A | 45.3±2.7 ^B | 12.7±0.7 ^A | 13.1±1.5 ^A | 13.1±1.5 ^A |

^a Concentración en los ensayos: 100 µg/mL ^b Cada valor indica la media y la desviación standard de los tres experimentos diferentes. Dentro de cada fila, los compuestos que presentan el mismo superíndice (A-D) no presentan diferencias significativas de actividad (P > 0.05).

De los productos intermedios de síntesis las β-cetoamidas **20b**, **21b** y **25b** no presentaron actividades muy importantes. Sin embargo, hay que resaltar que la introducción de grupos metilo entre los dos carbonilos va asociado a un aumento de la actividad fungicida en todas las especies ensayadas excepto para *C. coccodes*. Esto se produce en cierta extensión al pasar del producto sin metilar **20b** al monometilado **21b**

y de una forma más acusada al introducir el segundo grupo metilo conduciendo a **25**, en el cual aumenta aún más el porcentaje de inhibición y el número de especies afectadas.

3.3.4.- Actividad bactericida

Las actividades bactericidas han sido determinadas contra seis bacterias seleccionadas Gram-positivas y Gram-negativas. Los compuestos estudiados no han mostrado actividades significativas y sólo el producto **5a** presentó una moderada actividad en *Bacillus cereus*, con una zona de inhibición de 11 mm a la dosis de 20 µg/mm².

3.3.5.- Poder atrayente de la 1-pirrolina

En la literatura aparece descrito que el macho de *Ceratitis capitata* Wied libera una feromona que atrae a las hembras para el apareamiento⁸⁷. Asimismo, Baker⁸⁸ identificó nueve compuestos volátiles emitidos y/o extraídos por machos de mosca del Mediterráneo sexualmente maduros, apareciendo entre los componentes activos identificados la 1-pirrolina, aunque sin dar ningún dato de su actividad como feromona.

Los problemas de estabilidad de la 1-pirrolina (se descompone a temperaturas superiores a 45° C, mientras que a temperatura ambiente aparece en equilibrio con la forma trimérica), hacen muy difícil la determinación de su verdadera actividad. Sin embargo, una vez sintetizada, nuestro grupo de trabajo llevó a cabo ensayos de campo para determinar el poder atrayente de esta sustancia, obteniendo los siguientes resultados:

⁸⁷ Féron, M. "L'Instinct de Reproduction chez la Mouche Méditerranéenne des Fruits *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera: Tephritidae). Comportement Sexuel-Comportement de Ponte". *Rev. Pathol. Veg. Entomol. Agric. Fr.*, **1962**, 41, 1-129.

⁸⁸ Baker, R., Herbert, R.H., Grant, G.G. "Isolation and Identification of the Sex Pheromone of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wied)". *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1985**, 824-5.

Tabla VI. Actividad como atrayente de la 1-pirrolina frente a *Ceratitis capitata*.

| | Capturas de machos Media ± SD | Capturas de hembras Media ± SD | Capturas totales Media ± SD | Relación de sexos |
|-------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| 1-Pirrolina | 0.41 ± 0.11 | 0.33 ± 0.12 | 0.74 ± 0.14 | 1.24 |
| Blanco | 0.10 ± 0.08 | 0.24 ± 0.09 | 0.35 ± 0.09 | 0.44 |

Ensayos realizados utilizando 1 g. de producto.

Como se desprende de la *Tabla VI*, no parece que la sustancia ensayada presentara un verdadero poder atrayente sobre las hembras de *Ceratitis capitata*. Estos resultados pueden ser debidos a la presencia de la forma trimérica y/o a las altas temperaturas que se registran en los campos valencianos en verano, llevando a la degradación del producto.

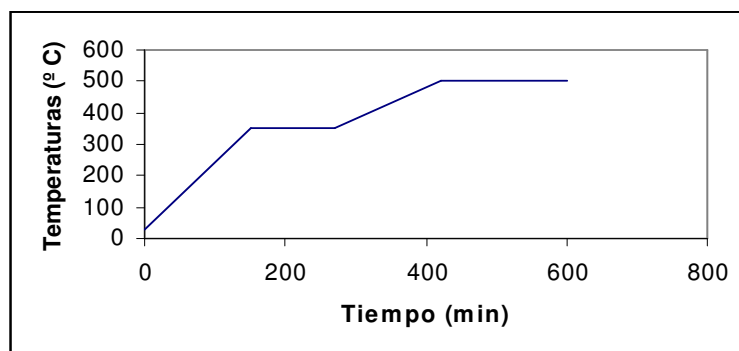
3.4. Parte Experimental

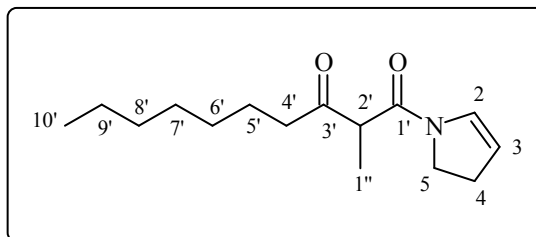
3.4.1.- Técnicas experimentales

Las técnicas experimentales, así como la descripción de los ensayos, aparecen reflejados en el capítulo anterior.

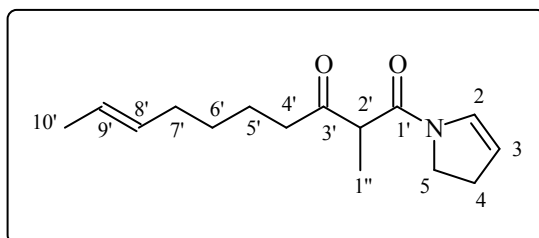
Las zeolitas utilizadas como catalizadores ácidos eran comerciales o en su defecto fueron preparadas por el equipo de síntesis del Instituto de Tecnología Química, siendo activadas previamente a su utilización según el programa descrito en la Figura 3.4.

Figura 3.4. Programa utilizado en la activación de zeolitas.

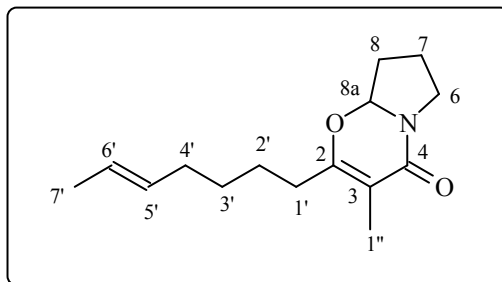


3.4.2.- Caracterización de productos naturales

El producto natural **4a** fue identificado como la *N*-(2-metil-3-oxodecanoil)-2-pirrolina en base a los siguientes datos espectroscópicos: $[\alpha]_{D=20}^{20} = 27^\circ$ (c 0.07, CHCl₃); HRMS (EI) : m/z 251.1888 (C₁₅H₂₅NO₂ requiere 251.1885); IR: ν_{\max} 2952, 2924, 2855, 1718, 1642, 1610, 1457 y 1419; ¹H NMR: δ_H 6.9 y 6.6 (m+m, 1H, H-2), 5.3 (m, 1H, H-3), 3.9 (m, 2H, H-5), 3.6 y 3.5 (q+q, $J = 7$ Hz, 1H, H-2'), 2.8-2.4 (m, 4H, H-4'+H-4), 1.6 (m, 2H, H-5'), 1.4 (d, $J = 7$ Hz, 3H, CHCH₃), 1.2 (m, 8H, (CH₂)₄CH₃) y 0.9 (t, $J = 7$ Hz, 3H, CH₂CH₃); ¹³C NMR: δ_C 207.2 (C_{3'}), 165.6 (C_{1'}), 129.3 y 128.3 (C₂), 113.1 y 111.6 (C₃), 53.3 (C_{2''}), 45.5 (C₅), 39.3 (C_{4'}), 31.7, 29.0, 28.1, 23.5, 22.6 (C₄, C_{5'}-C_{9'}), 14.1 y 13.1 (2xCH₃); MS: m/z 251 (M⁺, 2), 167 (1), 126 (5), 125 (6), 96 (4), 70 (6), 69 (100), 68 (20), 57 (10), 55 (4) y 41 (3).

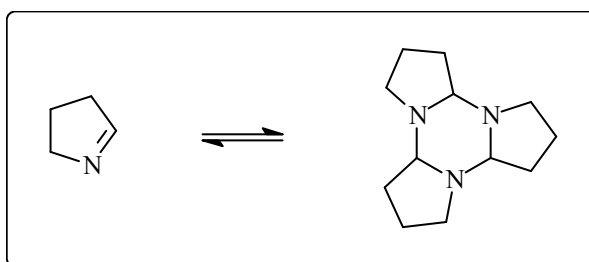


Por su parte **4b**, fue caracterizado como a la *N*-(2-metil-3-oxodec-8-enoil)-2-pirrolina al presentar como características espectrales: HRMS (CI): m/z 250.1807 (M+H⁺, C₁₅H₂₄NO₂ requiere 250.1807); IR: ν_{\max} 2997, 2850, 1716, 1638, 1620, 1455, 1420, 1370, 1276, 1122, 1067, 962, 833, 708 y 457; ¹H NMR: δ_H 6.9 y 6.5 (m+m, 1H, H-2), 5.4 (m, 2H, H-8'+H-9'), 5.3 (m, 1H, H-3), 3.9 (m, 2H, H-5), 3.6 y 3.5 (q+q, $J = 7$ Hz, 1H, H-2'), 2.8 y 2.6 (m+m, 2H, H-4'), 2.5 (m, 2H, H-3), 2.0 (m, 2H, H-7'), 1.7 y 1.6 (m+m, 3H, CH=CHCH₃), 1.5 (m, 2H, H-5'), 1.4 (d+d, $J = 7$ Hz, 3H, CHCH₃) y 1.3 (m, 2H, H-6'); ¹³C NMR: δ_C 207.2 (C_{3'}), 165.9 (C_{1'}), 131.0 (C_{8'}), 129.5 y 128.5 (C₂), 125.2 (C_{9'}), 113.1 y 111.6 (C₃), 53.4 (C_{2''}), 45.5 (C₅), 39.2 (C_{4'}), 32.3, 29.0, 28.2, 23.1 (C₄, C_{5'}-C_{7'}), 17.9 y 13.2 (2xCH₃); MS: m/z 249 (M⁺, 1), 180 (2), 167 (1), 125 (6), 96 (3), 81 (5), 69 (100), 68 (23), 55 (22) y 41 (11).



Al producto bicíclico **5b**, se asignó la estructura de **2-hept-5-enil-3-metil-4-oxo-6,7,8,8a-tetrahydro-4H-pirrolo[2,1-b]1,3-oxazina** sobre la base de los diferentes datos espectroscópicos. HRMS (CI): m/z 250.1789 ($M+H^+$, $C_{15}H_{24}NO_2$ requiere 250.1807); IR: ν_{max} 2929, 2880, 2858, 1654, 1436, 1372, 1344, 957 y 759; 1H NMR: δ_H 5.4 (m, 2H, H-5'+H-6'), 5.2 (dd, $J=6$ y 5 Hz, 1H, H-8a), 3.7 y 3.4 (m+m, 2H, H-6), 2.3 (m, 2H, H-1'), 2.2 (m, 2H, H-8), 2.0 (m, 2H, H-4'), 1.9 (m, 2H, H-7), 1.8 (s, 3H, CH_3), 1.6 (m, 3H, $CH=CHCH_3$), 1.5 (m, 2H, H-2') y 1.4 (m, 2H, H-3'); ^{13}C NMR: δ_C 163.9 (C_2), 163.8 (C_4), 131.2 ($C_{5'}$), 125.3 ($C_{6'}$), 106.7 (C_3), 87.7 (C_{8a}), 44.3 (C_6), 32.2, 31.8, 30.5, 29.2, 26.3, 21.8 ($C_7, C_8, C_{1'-C_{4'}}$), 17.8 y 10.0 (2x CH_3); MS: m/z 249 (M^+ , 1), 221 (1), 206 (1), 180 (2), 167 (6), 164 (6), 152 (6), 138 (6), 137 (6), 126 (3), 125 (6), 111 (13), 98 (15), 83 (49), 70 (100), 69 (11), 55 (23) y 41 (22).

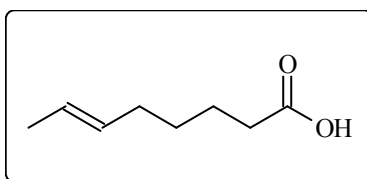
3.4.3.- Procedimientos sintéticos generales



1-Pirrolina junto al trímero (18+19). Sobre una disolución 2.1 M de NaOH (15.0 mL) se añadió una cantidad catalítica de $AgNO_3$ (36 mg, 0.21 mmol) y pirrolidina (1.3 mL, 15.11 mmol). Después de 10 min con agitación a temperatura ambiente, se añadió, gota a gota, otra disolución de $Na_2S_2O_8$ (3560 mg, 14.95 mmol) en H_2O (15.0 mL).

Después de 4 h de agitación continua, la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas se lavaron con NaCl y agua, y se secaron sobre Na_2SO_4 , obteniéndose, una

vez evaporado el disolvente, un residuo correspondiente a la 1-pirrolina (869 mg, 83%)⁸⁹, que a temperatura ambiente, aparece en equilibrio con su trímero en una proporción, 13:87. Los datos espectroscópicos correspondientes a este equilibrio: ¹H NMR⁹⁰: δ_{H} 7.6 (s, 1H, H-2m), 3.8 (m, 2H, H-5m), 3.0 (m, 3H, H-2t), 2.5 (m, 2H, H-3m), 2.3 (dd, $J=15$ y 8 Hz, 6H, H-4t) y 1.8-1.7 (m, 14H, H-4m+H-3t+H-4t); ¹³C NMR: δ_{C} 166.9 (C₂m), 81.9 (C₂t), 61.1 (C₅m), 45.8 (C₅t), 36.5 (C₃m), 27.8 (C₃t), 20.4 (C₄m) y 20.2 (C₄t); MS: m/z 69 (M⁺, 38), 68 (55), 67 (6), 55 (6), 54 (6), 43 (6), 41 (100) y 40 (42).



Ácido 6-octenoico (14). *Preparación del organoborano.* Sobre un matraz previamente secado a la llama, se adicionó 1,4-hexadieno (10.0 g, 121.7 mmol) sobre THF anhidro (100.0 mL) bajo flujo de N₂ y a 0 °C. Una vez enfriada la disolución, se añadió lentamente *vía* cánula otra disolución de 9-BBN 0.5 M en THF anhidro (250.0 mL, 125.0 mmol). La mezcla se mantuvo con agitación continua a temperatura ambiente 6 h 30 min.

Preparación del dianión del ácido fenoxiacético. Un matraz secado a la llama y equipado con un refrigerante de reflujo se enfrió, bajo N₂, a 0 °C. Entonces se añadió una disolución LDA 2.0 M en THF/heptano/etilbenceno (250.0 mL, 500.0 mmol), seguida del ácido fenoxiacético (37.0 g, 243.5 mmol) disuelto en THF anhidro (200.0 mL). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente permaneciendo con agitación durante 4 h.

Reacción del organoborano con el dianión del ácido fenoxiacético. La disolución del organoborano se añadió sobre la aniónica *vía* cánula y a 0 °C, calentando la mezcla de reacción a 66 °C durante 14 h 30 min. Transcurrido este período de tiempo, el crudo se re-enfrió a 0 °C y se añadió lentamente NaOH 3 M (125.0 mL) seguida de H₂O₂ 35 % (110.0 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h a 0 °C,

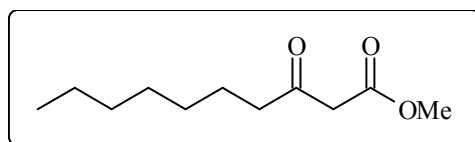
⁸⁹ Una mayor purificación presenta grandes dificultades por la fácil descomposición que presenta este producto a 40° C y su sensibilidad a medios ácidos.

⁹⁰ Las señales asignadas a la forma monomérica aparecen con una "m" y las asignadas al trímero con una "t".

añadiendo seguidamente éter dietílico. Se extrajo la fase acuosa, se acidificó a continuación con HCl (5 %) y se re-extrajo con éter. El conjunto de extractos orgánicos se lavaron con NaCl, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía de columna, utilizando como eluyente mezcla hexano-AcOEt (0-20 % con gradiente de polaridad) obteniendo el ácido 6-octenoico **14** (8.4 g, 49 %) como un aceite amarillo. IR: ν_{\max} 3600, 1705, 1590, 1405, 1280, 1230, 1100, 960, 810, 750, 690 y 660; ¹H NMR: δ_{H} 10.2 (s a, 1H, OH), 5.4 (m, 2H, H-6+H-7), 2.3 (t, $J=8$ Hz, 2H, H-2), 2.0 (m, 2H, H-5), 1.6 (m, 5H, H-3+H-8) y 1.4 (m, 2H, H-4); ¹³C NMR: δ_{C} 180.4 (C₁), 130.7 (C₆), 125.2 (C₇), 33.9 y 32.1 (C₂+C₅), 28.8 y 24.1 (C₃+C₄) y 17.9 (C₈); MS: m/z 142 (M⁺, 8), 124 (35), 113 (4), 109 (4), 106 (2), 100 (13), 96 (50), 95 (15), 87 (17), 83 (47), 82 (100), 81 (30), 79 (13), 73 (34), 68 (39), 67 (91), 60 (39) y 56 (25).

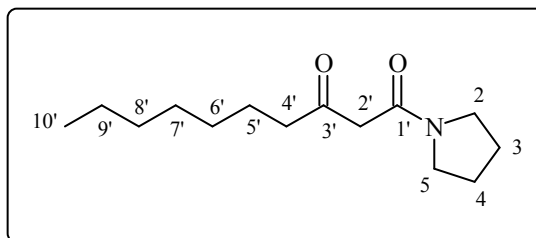
Preparación de derivados de β -cetoácidos. Sobre una disolución enfriada a 0 °C de 2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona, **9** (1.48 mmol) en CH₂Cl₂ (1.50 mL), se añadió piridina (2.96 mmol) y el correspondiente cloruro de acilo (1.23 mmol) *via* jeringa, gota a gota y bajo atmósfera de N₂. La disolución se agitó a 0 °C durante 1 h subiendo, a continuación, hasta temperatura ambiente, permaneciendo ahí a lo largo de un periodo adicional de 2 h. La disolución se vertió sobre HCl (5%) y se extrajo con CH₂Cl₂, lavando la fase orgánica con NaCl y agua, secándola sobre Na₂SO₄, obteniendo, una vez evaporado el disolvente, el intermedio de acilación del ácido de Meldrum casi puro, el cual fue utilizado en la etapa posterior sin realizar una mayor purificación.

a) Metanolisis: El producto acilado intermedio se calentó a reflujo de MeOH (exceso), durante 3 h. El disolvente se eliminó por concentración a vacío, resultando un residuo que se purificó por cromatografía de columna, conduciendo al correspondiente β -cetoéster.

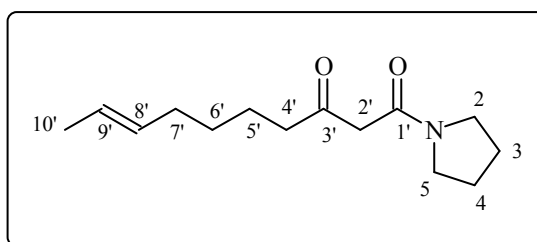


Ester metílico del ácido 3-oxodecanoico (16). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (25-40 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 51 %; ¹H NMR: δ_{H} 3.7 (s, 3H, OCH₃), 3.4 (s, 2H, H-2), 2.5 (t, $J=7$ Hz, H-4), 1.6 (m, 2H, H-5), 1.3 (s a, 8H, (CH₂)₄CH₃) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH₃).

b) Aminolisis. Una disolución del intermedio acilado del ácido de Meldrum y la amina correspondiente (2.76 mmol) en benceno (9.00 mL) se calentó a reflujo durante 12 h. El disolvente se evaporó a vacío proporcionando un residuo que se purificó por cromatografía de columna, proporcionando las respectivas β -cetoamidas.

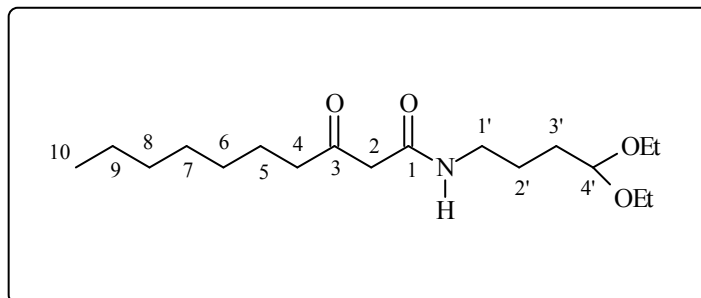


***N*-(3-Oxodecanoil)pirrolidina (20a).** Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (30-40 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 61 %; HRMS (EI): m/z 239.1891 ($C_{14}H_{25}NO_2$ requiere 239.1885); IR: ν_{max} 2940, 2920, 2840, 1710, 1630, 1450, 1420, 1360, 1330, 1295, 1250, 1220, 1190, 1160, 1105, 910, 860, 780 y 720; 1H NMR: δ_H 3.5 (s, 2H, H-2'), 3.5-3.4 (m, 4H, H-2+H-5), 2.6 (t, $J=8$ Hz, 2H, H-4'), 2.0-1.9 (m, 4H, H-3+H-4), 1.6 (m, 2H, H-5'), 1.3 (s a, 8H, $(CH_2)_4CH_3$) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR: δ_C 204.6 ($C_{3'}$), 171.8 ($C_{1'}$), 50.3 ($C_{2'}$), 47.0 (C_2), 45.7 (C_5), 43.0 ($C_{4'}$), 31.5, 28.9, 25.8, 24.2, 23.3, 22.4 ($C_5, C_4, C_{5'}-C_{9'}$) y 13.9 ($C_{10'}$); MS: m/z 239 (M^+ , 23), 222 (3), 210 (5), 197 (10), 196 (5), 182 (6), 168 (53), 155 (67), 140 (32), 127 (4), 113 (85), 112 (100), 98 (80), 85 (43), 72 (41), 71 (56), 70 (96), 69 (31), 57 (27), 56 (28), 55 (50) y 43 (45).



***N*-(3-Oxodec-8-enoil)pirrolidina (20b).** Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (20-40 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 11 %; HRMS (EI): m/z 237.1728 ($C_{14}H_{23}NO_2$ requiere 237.1728); IR: ν_{max} 2940, 2880, 1720, 1640, 1590, 1480, 1440, 1370, 1290, 1190, 970 y 780; 1H NMR: δ_H 5.4 (m, 2H, H-8'+H-9'), 3.5 (s, 2H, H-2'), 3.5-3.4 (m, 4H, H-5+H-2'), 2.6 (t, $J=7$ Hz, 2H, H-4'), 2.0-1.8 (m, 6H, H-3+H-4+H-7'), 1.6 (m, 3H, $CH=CHCH_3$), 1.5 (m, 2H, H-5'), y 1.3 (m, 2H, H-6'); ^{13}C NMR: δ_C 204.5 ($C_{3'}$), 165.0 ($C_{1'}$), 130.7 ($C_{8'}$), 125.0 ($C_{9'}$), 50.4 ($C_{2'}$), 47.1 (C_2), 45.7 (C_5), 35.5 ($C_{4'}$),

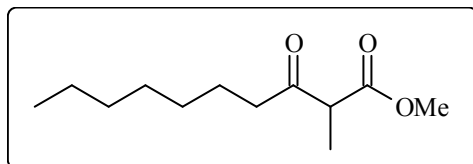
32.1, 28.8, 25.9, 24.3, 22.8 (C₃, C₄, C₅-C₇) y 17.8 (CH₃); MS: m/z 237 (M⁺, 12), 219 (3), 208 (7), 195 (5), 182 (7), 168 (65), 155 (65), 140 (60), 126 (15), 113 (100), 112 (35), 98 (50), 85 (16), 70 (56) y 55 (49).



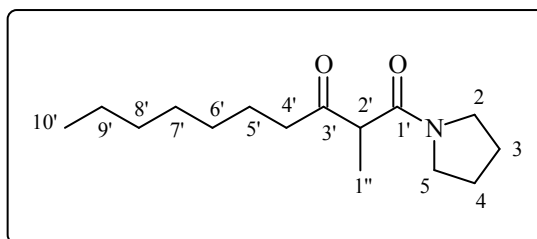
N-(4,4-Dietoxibutil)-3-oxodecanamida (23). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (15-30 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 38 %; HRMS (CI): m/z 330.2633 (M+H⁺, C₁₈H₃₆NO₄ requiere 330.2644); IR: ν_{\max} 3290, 2905, 2860, 1700, 1660, 1440, 1360, 1330, 1110, 1050 y 990; ¹H NMR: δ_{H} 7.1 (s a, 1H, N-H), 4.5 (t, $J = 5$ Hz, 1H, H-4'), 3.6 (m, 2H, OCH₂CH₃), 3.5 (m, 2H, OCH₂CH₃), 3.4 (s, 2H, H-2), 3.3 (t, $J = 5$ Hz, 2H, H-1'), 2.5 (t, $J = 5$ Hz, 2H, H-4), 1.6 (m, 6H, H-5+H-2'+H-3'), 1.2 (s a, 8H, (CH₂)₄CH₃), 1.2 (t, $J = 7$ Hz, 6H, OCH₂CH₃) y 0.9 (t, $J = 7$ Hz, 3H, CH₂CH₃); ¹³C NMR: δ_{C} 207.4 (C₃), 165.5 (C₁), 102.5 (C_{4'}), 61.4 y 61.2 (2xOCH₂CH₃), 48.7 (C₂), 44.0 (C_{1'}), 39.2 (C₄), 31.6, 31.0, 29.0, 25.8, 24.6, 23.4, 22.6 (C₅-C₉, C_{2'}, C_{3'}), 15.3 (2xOCH₂CH₃) y 14.0 (CH₃); MS: m/z 330 (M+H⁺, 3), 312 (7), 284 (36), 266 (7), 242 (57), 238 (100), 211 (9) y 103 (44).

Procedimiento general para la metilación de derivados de ácido β -cetoácidos. Sobre una suspensión a 0° C en DMF (2.50 mL) de NaH (aceite al 60%; 1.64 mmol), previamente lavado, se añadió una disolución de β -cetoamida⁹¹ (1.26 mmol) en DMF (4.00 mL), *vía* cánula, gota a gota. Cesado el desprendimiento de H₂, la mezcla se calentó a temperatura ambiente, permaneciendo con agitación durante 2 h. Entonces, fue enfriada de nuevo a 0° C y se adicionó el yodometano (1.77 mmol). Después de 4 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con agua y se extrajo con CH₂Cl₂. El conjunto de extractos orgánicos se lavó con NaCl, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a vacío. El residuo obtenido fue purificado por cromatografía de columna obteniendo las correspondientes cetoamidas⁹¹ metiladas.

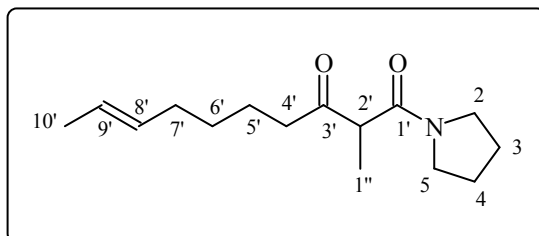
⁹¹ En el caso de **16** se trataba de un β -cetoéster.



Ácido 2-metil-3-oxodecanoato de metilo (17). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (95:5). Rendimiento 75 %; IR: ν_{\max} 2940, 2920, 2840, 1745, 1710, 1450, 1435, 1370, 1320, 1200, 1110, 1060 y 850; $^1\text{H NMR}$: δ_{H} 3.7 (s, 3H, OCH_3), 3.5 (q, $J=7$ Hz, 2H, H-2), 2.5 (m, 2H, H-4), 1.5 (m, 2H, H-5), 1.3 (d, $J=7$ Hz, 3H, CHCH_3), 1.2 (s a, 8H, $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) y 0.8 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_2CH_3); $^{13}\text{C NMR}$: δ_{C} 205.8 (C_3), 170.9 (C_1), 52.5 (C_2), 52.2 (OMe), 41.2 (C_4), 31.5, 28.9, 28.8, 23.8, 22.5 (C_3 , C_4 , C_5 - C_9), 13.9 y 12.7 (2x CH_3).

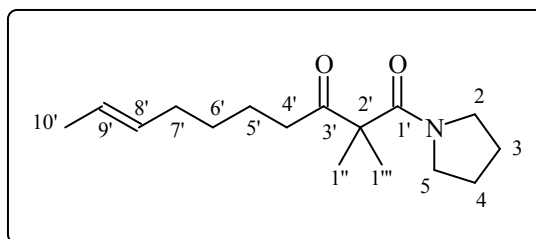


***N*-(2-Metil-3-oxodecanoil)pirrolidina (21a).** Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (20-30 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 79 %; HRMS (EI): m/z 253.2050 ($\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_2$ requiere 253.2041); IR: ν_{\max} 2930, 2900, 2840, 1710, 1630, 1445, 1420, 1360 y 1330; $^1\text{H NMR}$: δ_{H} 3.6-3.4 (m, 5H, H-2+H-5+H-2'), 2.5 (m, 2H, H-4'), 2.1-1.8 (m, 4H, H-3+H-4), 1.6 (m, 2H, H-5'), 1.4 (d, $J=7$ Hz, 3H, CHCH_3), 1.3 (s a, 8H, $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_2CH_3); $^{13}\text{C NMR}$: δ_{C} 207.1 (C_3), 168.4 (C_1), 52.8 (C_2), 46.6 (C_2), 45.8 (C_5), 39.3 (C_4), 31.4, 28.8, 25.8, 24.0, 23.2, 22.3 (C_3 , C_4 , C_5 - C_9), 13.8 y 13.0 (2x CH_3); MS m/z 253 (M^+ , 8), 207 (1), 182 (6), 169 (6), 154 (1), 127 (100), 126 (48), 112 (6), 99 (10), 98 (27), 71 (17), 70 (51), 57 (42), 55 (39) y 43 (39).

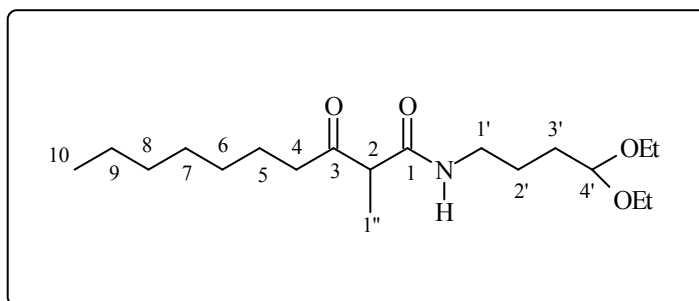


***N*-(2-Metil-3-oxodec-8-enil)pirrolidina (21b).** Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (15-30 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 55 %; HRMS (EI): m/z

251.1890 ($C_{15}H_{25}NO_2$ requiere 251.1885); IR: ν_{\max} 2910, 2860, 1710, 1630, 1450, 1430 y 960; 1H NMR: δ_H 5.4 (m, 2H, H-8'+H-9'), 3.4 (m, 5H, H-2+H-5+H-2'), 2.5 (m, 2H, H-4'), 2.0-1.8 (m, 6H, H-3+H-4+H-7'), 1.6 (m, 3H, CH=CHCH₃), 1.5 (m, 2H, H-5'), 1.3 (d, $J=7$ Hz, 3H, CHCH₃) y 1.4-1.2 (m, 2H, H-6'); ^{13}C NMR: δ_C 207.4 (C_{3'}), 168.5 (C_{1'}), 130.9 (C_{8'}), 125.0 (C_{9'}), 53.2 (C_{2'}), 46.8 (C₂), 46.1 (C₅), 39.2 (C_{4'}), 32.3, 28.9, 26.1, 24.2, 23.0 (C₃, C₄, C₅-C_{7'}), 17.9 y 13.3 (2xCH₃); MS m/z 251 (M⁺, 18), 236 (17), 222 (11), 210 (4), 207 (7), 196 (8), 182 (99), 169 (34), 154 (12), 152 (13), 140 (6), 127 (93), 126 (100), 113 (41), 98 (99), 70 (92) y 55 (97).



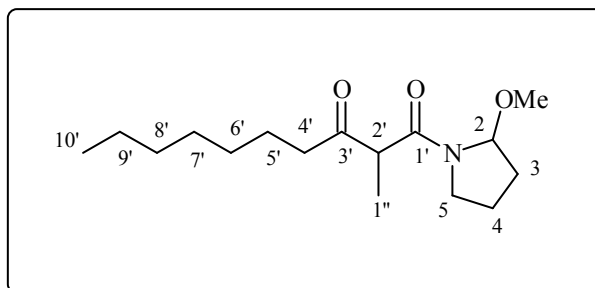
N-(2,2-Dimetil-3-oxodec-8-enoil)pirrolidina (25b). HRMS (EI): m/z 265.2043 ($C_{16}H_{27}NO_2$ requiere 265.2041); IR: ν_{\max} 2920, 2860, 1700, 1620, 1395, 1355 y 960; 1H NMR: δ_H 5.4 (m, 2H, H-8'+H-9'), 3.5 (t, $J=7$ Hz, 2H, H-2), 3.1 (t, $J=7$ Hz, 2H, H-5), 2.4 (t, $J=7$ Hz, 2H, H-4'), 1.9 (m, 2H, H-7'), 1.8 (m, 4H, H-3+H-4), 1.6 (m, 3H, CH=CHCH₃), 1.5 (m, 2H, H-5'), 1.3 (s, 6H, C(CH₃)₂) y 1.4-1.2 (m, 2H, H-6'); ^{13}C NMR: δ_C 210.6 (C_{3'}), 170.9 (C_{1'}), 130.8 (C_{8'}), 125.2 (C_{9'}), 56.3 (C_{2'}), 47.4 (C₂), 46.6 (C₅), 37.7 (C_{4'}), 32.3, 29.0, 26.6, 23.5, 23.3 (C₃, C₄, C₅-C_{7'}), 22.3 y 17.9 (3xCH₃); MS m/z 265 (M⁺, 24), 250 (7), 221 (1), 196 (20), 183 (6), 166 (4), 141 (100), 140 (62), 126 (30), 113 (56), 98 (100), 81 (15), 70 (46) y 55 (74).



N-(4,4-Dietoxibutil)-2-metil-3-oxodecanamida (24). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (7:3). Rendimiento 45 %; 1H NMR: δ_H 6.5 (s a, 1H, N-H), 4.5 (t, $J=5$ Hz, 1H, H-4'), 3.6 (m, 2H, OCH₂CH₃), 3.5 (m, 3H, H-2+OCH₂CH₃), 3.3 (t, $J=5$ Hz,

2H, H-1'), 2.5 (m, 2H, H-4), 1.6 (m, 6H, H-5+H-2'+H-3'), 1.4 (d, $J=7$ Hz, 3H, CHCH₃), 1.2 (s a, 8H, (CH₂)₄CH₃), 1.2 (t, $J=7$ Hz, 6H, OCH₂CH₃) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH₂CH₃); ¹³C NMR: δ_C 210.0 (C₃), 173.0 (C₁), 102.4 (C_{4'}), 61.4 y 61.2 (2xOCH₂CH₃), 54.3 (C₂), 41.6 (C_{1'}), 39.1 (C₄), 31.6, 31.0, 29.0, 25.8, 24.4, 23.3, 22.5 (C₅-C₉, C_{2'}, C_{3'}), 15.3 (2xOCH₂CH₃), 15.1 y 14.0 (2xCH₃).

Preparación de β -cetoamidas metoxiladas. Una disolución de la β -cetoamida **21** (1.6 mmol) en metanol (60.0 mL) conteniendo *p*-toluensulfonato de tetraetilamonio (4.4 mmol) como soporte electrolítico se colocó en una celda de electroquímica equipada con electrodos de grafito (8.5 cm²). Se hizo circular una corriente constante (20 mA) a través de la disolución hasta alcanzar los 3.7 F/mol. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente se vertió sobre agua y se extrajo con CH₂Cl₂. El conjunto de fases orgánicas se secó sobre Na₂SO₄, evaporando el disolvente a vacío y obteniendo un crudo que se filtró a través de silica gel con el fin de eliminar el soporte electrolítico. El disolvente fue evaporado, obteniéndose un residuo que se purificó por cromatografía de columna. Se aislaron dos diastereoisómeros de la β -cetoamida metoxilada **22**, así como la β -cetoamida **21** sin reaccionar (aproximadamente un 50 %).

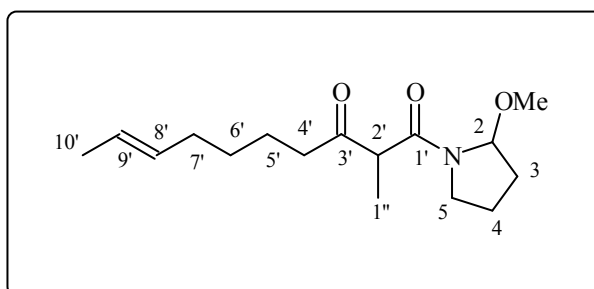


2-Metoxi-N-(2-metil-3-oxodecanoil)pirrolidina (22a). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (75:25). Rendimiento global de ambos diastereómeros 45 % (52 % de producto de partida recuperado).

Datos espectroscópicos del primer diastereoisómero eluído (**22a1**). HRMS (EI): m/z 283.2140 (C₁₆H₂₉NO₃ requiere 283.2147); IR: ν_{\max} 2910, 2840, 1710, 1650, 1450, 1405, 1360, 1170, 1075, 1060 y 810; ¹H NMR: δ_H 5.5 y 5.0 (d+d, $J=4$ Hz, 1H, H-2), 3.7-3.3 (m, 3H, H-5+H-2'), 3.4 y 3.3 (s+s, 3H, OMe), 2.5 (m, 2H, H-4'), 2.2-1.8 (m, 4H, H-3+H-4), 1.5 (m, 2H, H-5'), 1.4 y 1.3 (d+d, $J=7$ Hz, 3H, CHCH₃), 1.3 (s a, 8H, (CH₂)₄CH₃) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH₂CH₃); ¹³C NMR: δ_C 206.9 (C_{3'}), 170.5 y 169.9 (C_{1'}), 88.5 y 87.2 (C₂), 56.6 y 54.0 (C_{2'}), 53.0 (OMe), 46.2 y 45.9 (C₅), 39.4 y 39.2

(C_{4'}), 31.5 y 31.3, 30.6, 29.0 y 28.9, 23.4, 22.7 y 22.5, 20.8 (C₃, C₄, C_{5'}-C_{9'}), 14.0 y 13.9, 13.0 (2xCH₃); MS: m/z 283 (M⁺, 2), 268 (10), 253 (23), 252 (16), 251 (20), 199 (4), 183 (9), 167 (8), 156 (34), 127 (64), 126 (30), 125 (61), 100 (22), 97 (52), 85 (17), 70 (100), 69 (26), 57 (20) y 155 (16)

Datos espectroscópicos del segundo diastereoisómero eluido (**22a2**). HRMS (EI): m/z 283.2146 (C₁₆H₂₉NO₃ requiere 283.2147); IR: ν_{\max} 2920, 2840, 1710, 1650, 1455, 1405, 1370, 1170, 1090, 1070 y 810; ¹H NMR: δ_{H} 5.4 y 4.9 (d+d, $J=4$ Hz, 1H, H-2), 3.8-3.2 (m, 3H, H-5+H-2'), 3.3 y 3.2 (s+s, 3H, OMe), 2.5 (m, 2H, H-4'), 2.2-1.8 (m, 4H, H-3+H-4), 1.5 (m, 2H, H-5'), 1.4 y 1.3 (d+d, $J=7$ Hz, 3H, CHCH₃), 1.2 (s a, 8H, (CH₂)₄CH₃) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH₂CH₃); ¹³C NMR: δ_{C} 206.5 (C_{3'}), 170.7 (C_{1'}), 88.7 y 87.3 (C₂), 56.5 y 53.6 (C_{2'}), 52.8 y 52.2 (OMe), 46.1 y 45.9 (C₅), 39.8 y 39.3 (C_{4'}), 31.5 y 31.2, 30.4, 29.0 y 28.9, 23.3, 22.7 y 22.4, 20.9 (C₃, C₄, C_{5'}-C_{9'}), 13.9 y 13.8, 14.0 (2xCH₃); MS: m/z 283 (M⁺, 1), 268 (26), 253 (15), 252 (12), 251 (12), 199 (1), 183 (13), 167 (4), 157 (13), 156 (12), 127 (32), 126 (21), 125 (46), 100 (35), 97 (57), 85 (23), 70 (100), 69 (25), 57 (22) y 55 (17).



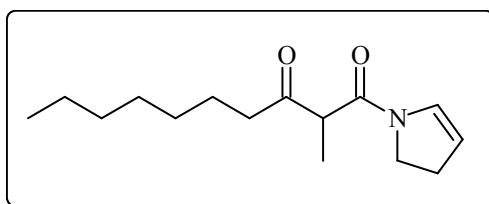
2-Metoxi-N-(2-metil-3-oxodec-8-enoil)pirrolidina (22b). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (8:2). Rendimiento global de ambos diastereómeros 20 % (62 % de producto de partida recuperado).

Datos espectroscópicos del primer diastereoisómero eluido **22b1**. HRMS (CI): m/z 282.2066 (M+H⁺, C₁₆H₂₈NO₃ requiere 282.2069); IR: ν_{\max} 2920, 2880, 1710, 1630, 1390, 1230, 1150 y 950; ¹H NMR: δ_{H} 5.5 y 5.0 (d+d, $J=5$ Hz, 1H, H-2), 5.4 (m, 2H, H-8'+H-9'), 3.7-3.3 (m, 3H, H-5+H-2'), 3.4 y 3.3 (s+s, 3H, OMe), 2.5 (m, 2H, H-4'), 2.2-2.1 (m, 2H, H-7'), 2.0-1.8 (m, 4H, H-3+H-4), 1.6 (m, 3H, CH=CHCH₃), 1.5 (m, 2H, H-5'), 1.4 y 1.3 (d+d, $J=7$ Hz, 3H, CHCH₃) y 1.4-1.2 (m, 2H, H-6'); ¹³C NMR: δ_{C} 208.2 y 206.9 (C_{3'}), 170.6 y 169.9 (C_{1'}), 130.9 (C_{8'}), 125.1 (C_{9'}), 88.5 y 87.2 (C₂), 56.7 y 54.1 (OMe), 53.2 y 53.1 (C_{2'}), 46.2 y 46.0 (C₅), 39.3 y 38.9 (C_{4'}), 32.3, 31.4, 30.6, 28.9, 23.0,

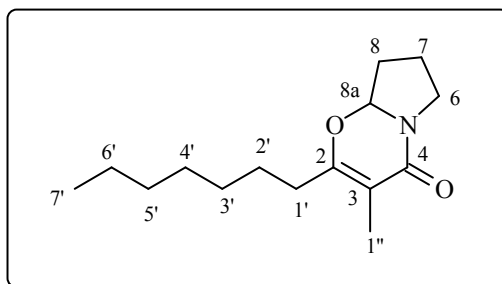
22.9, 20.8 (C₃, C₄, C₅'-C₇'), 17.9, 14.0 y 13.2 (2xCH₃); MS: m/z 282 (M+1⁺, 38), 266 (4), 250 (100), 249 (30), 233 (8), 180 (10), 167 (14) y 125 (21).

Datos espectroscópicos del segundo diastereoisómero eluido **22b2**. HRMS (CI): m/z 282.2077 (M+H⁺, C₁₆H₂₈NO₃ requiere 282.2069); IR: ν_{max} 2910, 2880, 1700, 1640, 1400, 1360 y 1055; ¹H NMR: δ_H 5.4 y 4.9 (d+d, J= 5 Hz, 1H, H-2), 5.4 (m, 2H, H-8'+H-9'), 3.8-3.3 (m, 3H, H-5+H-2'), 3.4 y 3.2 (s+s, 3H, OMe), 2.5 (m, 2H, H-4'), 2.2-2.1 (m, 2H, H-7'), 2.0-1.8 (m, 4H, H-3+H-4), 1.6 (m, 3H, CH=CHCH₃), 1.5 (m, 2H, H-5'), 1.4 y 1.3 (d+d, J= 7 Hz, 3H, CHCH₃) y 1.4-1.2 (m, 2H; H-6'); ¹³C NMR: δ_C 207.2 y 206.5 (C₃'), 170.9 y 170.7 (C₁'), 131.1 y 130.9 (C₈'), 125.1 y 124.9 (C₉'), 88.8 y 87.5 (C₂'), 56.7 (OMe), 53.7 y 52.4 (C₂'), 46.3 y 46.0 (C₅), 39.7 y 39.2 (C₄'), 32.3, 32.2, 30.5, 28.9, 23.0, 22.9, 21.0 (C₃, C₄, C₅'-C₇'), 17.9, 14.0 y 13.4 (2xCH₃); MS: m/z 282 (M+1⁺, 10), 266 (22), 250 (100), 249 (37), 233 (4), 180 (15), 167 (16) y 125 (21).

Procedimiento para la eliminación de MeOH. Una mezcla de las dos metoxiamidas **22** (0.05 mmol) y silica gel (0.05 mmol) se calentó a 150-160° C, bajo presión reducida y atmósfera de N₂. Después de 2 h 45 min, se añadió agua sobre la mezcla resultante, extrayéndose con CH₂Cl₂ y secándose el conjunto de extractos orgánicos sobre Na₂SO₄. El residuo obtenido tras concentrar se purificó por cromatografía de columna, obteniéndose la enamida **4**, la mezcla diastereoisomérica de partida **22** y la oxazina **5** según orden de elución.

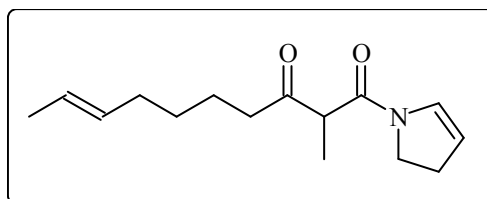


N-(2-Metil-3-oxodecanoil)-2-pirrolina (4a). La enamida **4a** era un aceite amarillo cuyos datos espectroscópicos coincidían plenamente con los del producto natural descrito con anterioridad. Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (15-20 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 29 %.

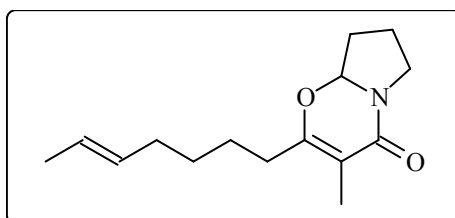


2-Heptil-3-metil-4-oxo-6,7,8,8a-tetrahidro-4H-pirrol[2,1-b]1,3-oxazina

(5a). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (15-20 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 37 %. HRMS (EI): m/z 251.1883 ($C_{15}H_{25}NO_2$ requiere 251.1885); IR: ν_{max} 2920, 2840, 1720, 1655, 1425, 1370, 1345, 1080 y 760; 1H NMR: δ_H 5.2 (dd, $J=6$ y 5 Hz, 1H, H-8a), 3.7 y 3.4 (m+m, 2H, H-6), 2.4-1.8 (m, 6H, H-7+H-8+H-1'), 1.8 (s, 3H, CH_3), 1.5 (m, 2H, H-2'), 1.3 (s a, 8H, $(CH_2)_4CH_3$) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_2CH_3); ^{13}C NMR: δ_C 168.2 (C_2), 163.8 (C_4), 106.4 (C_3), 87.5 (C_{8a}), 44.3 (C_6), 31.8, 31.7, 30.6, 29.3, 29.0, 26.8, 22.6, 21.9 (C_7, C_8, C_1-C_6'), 14.1 y 10.1 (2x CH_3); MS: m/z 251 (M^+ , 39), 250 (92), 223 (7), 210 (12), 183 (53), 166 (16), 152 (25), 141 (100), 140 (65), 139 (42), 127 (97), 126 (97), 113 (97), 112 (98), 111 (81), 98 (93), 97 (81), 83 (99) y 71 (94).

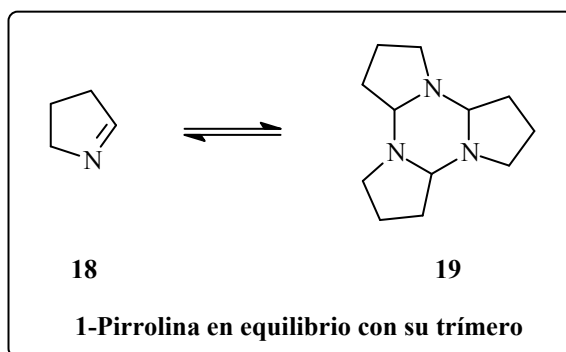


N-(2-Metil-3-oxodec-8-enoil)-2-pirrolina (4b). La enamida **4b** era un aceite amarillo que presentaba datos espectroscópicos plenamente coincidentes con los del producto natural descrito con anterioridad. Eluyente: mezclas hexano-AcOEt (20-30 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 12 %.

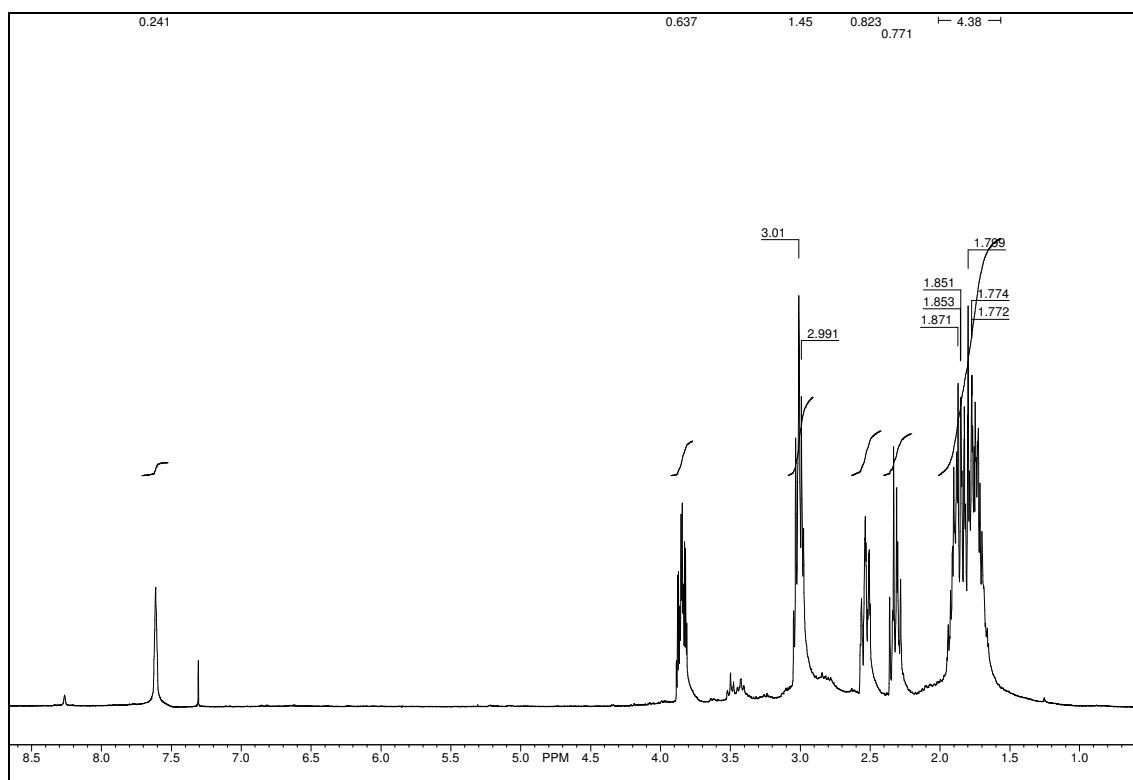


2-Hept-8-enil-3-metil-4-oxo-6,7,8,8a-tetrahidro-4H-pirrol[2,1-b]1,3-oxazina (5b). La oxazina **5b** era un aceite amarillo que presentaba espectroscópicos idénticos datos al producto natural aislado con anterioridad. Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (20-30 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 59 %.

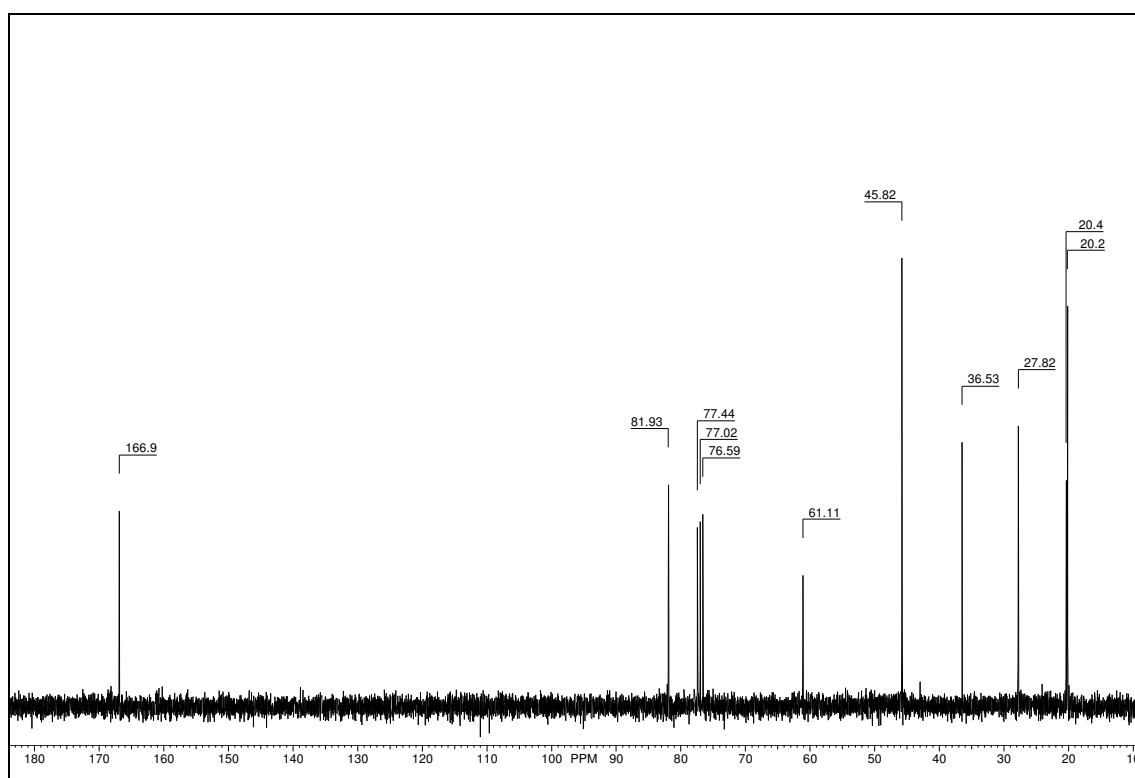
ANEXO II: Enamidas
y Derivados Bicíclicos
Naturales e
Intermedios de
Síntesis: ^1H y ^{13}C

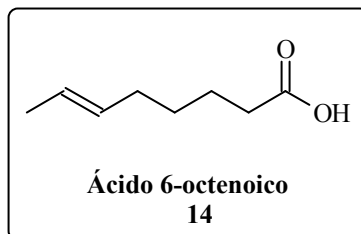


¹H RMN:

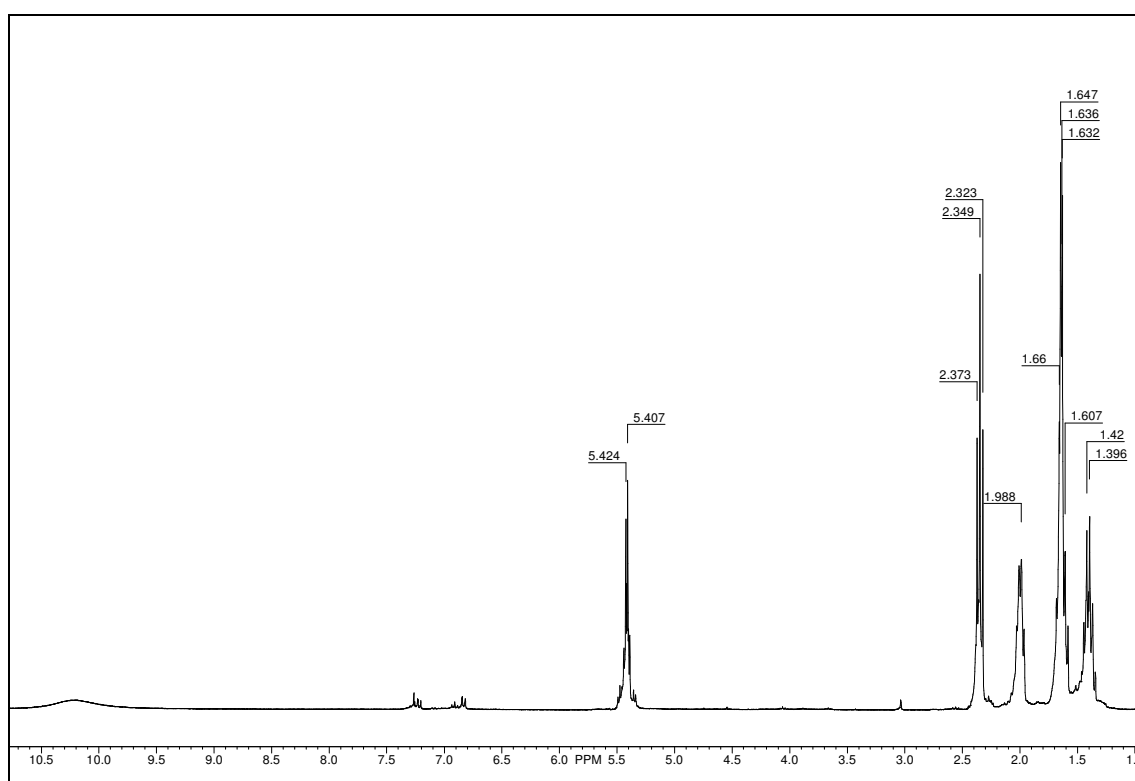


¹³C RMN:

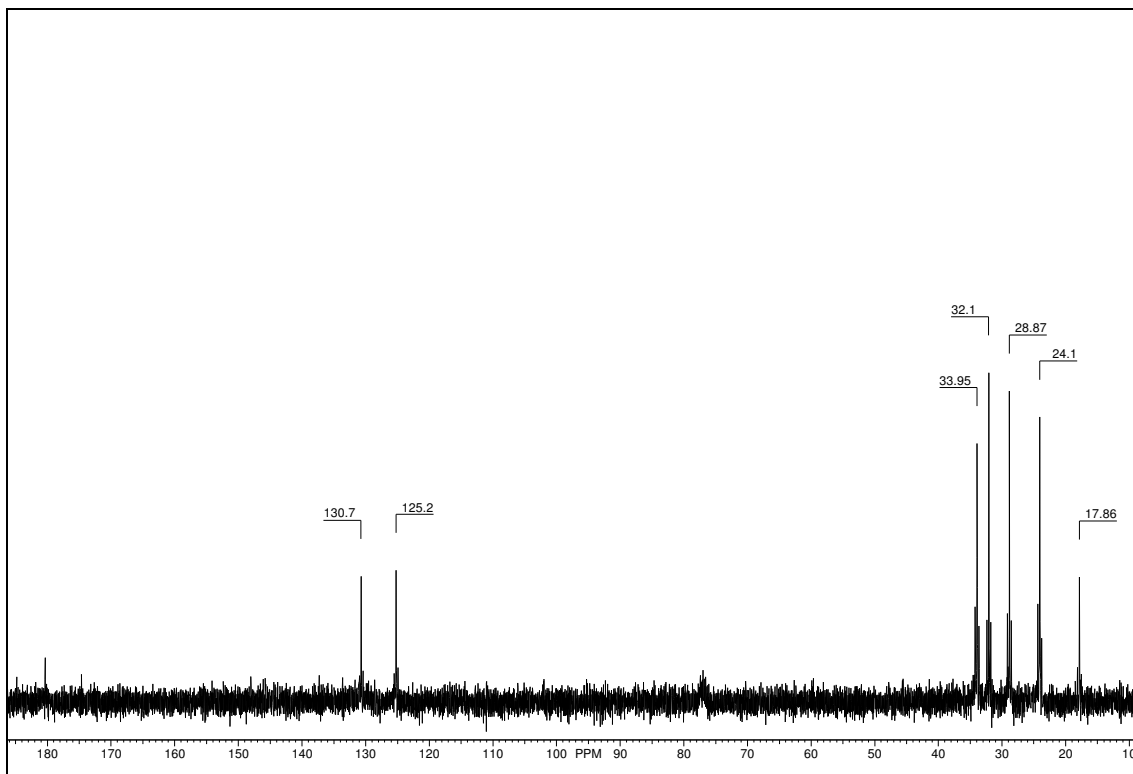




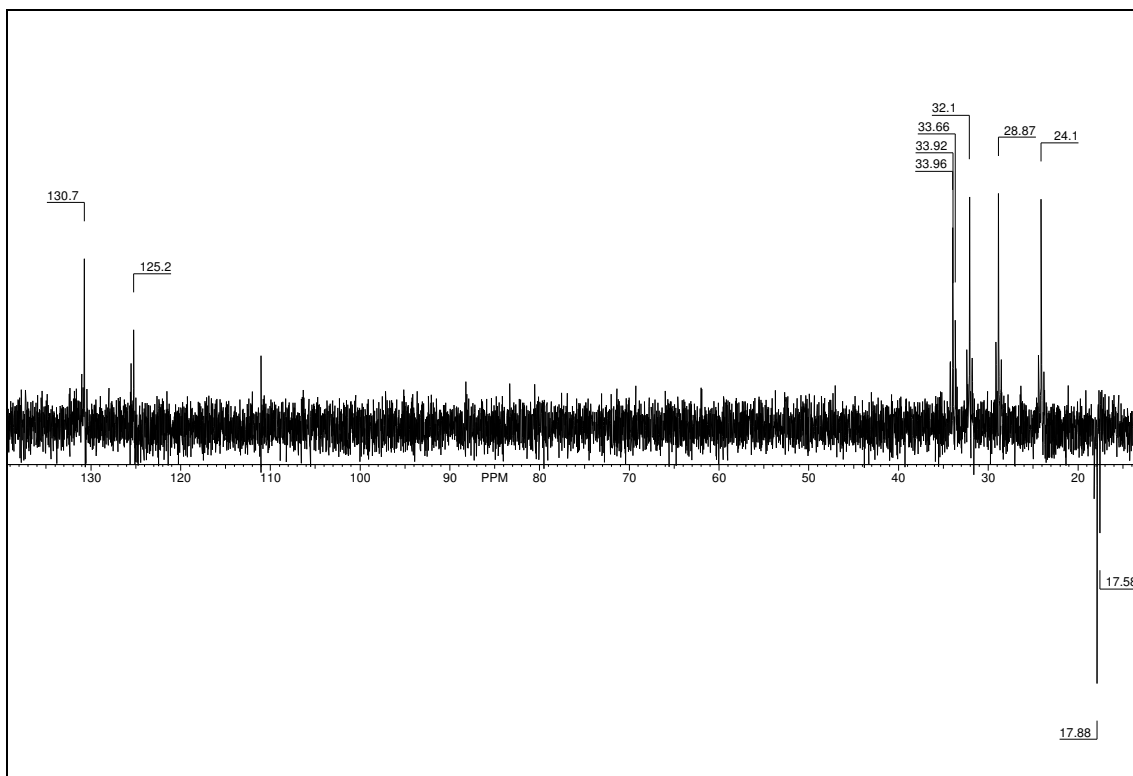
¹H RMN:

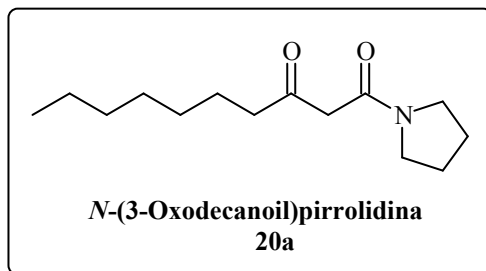


¹³C RMN:

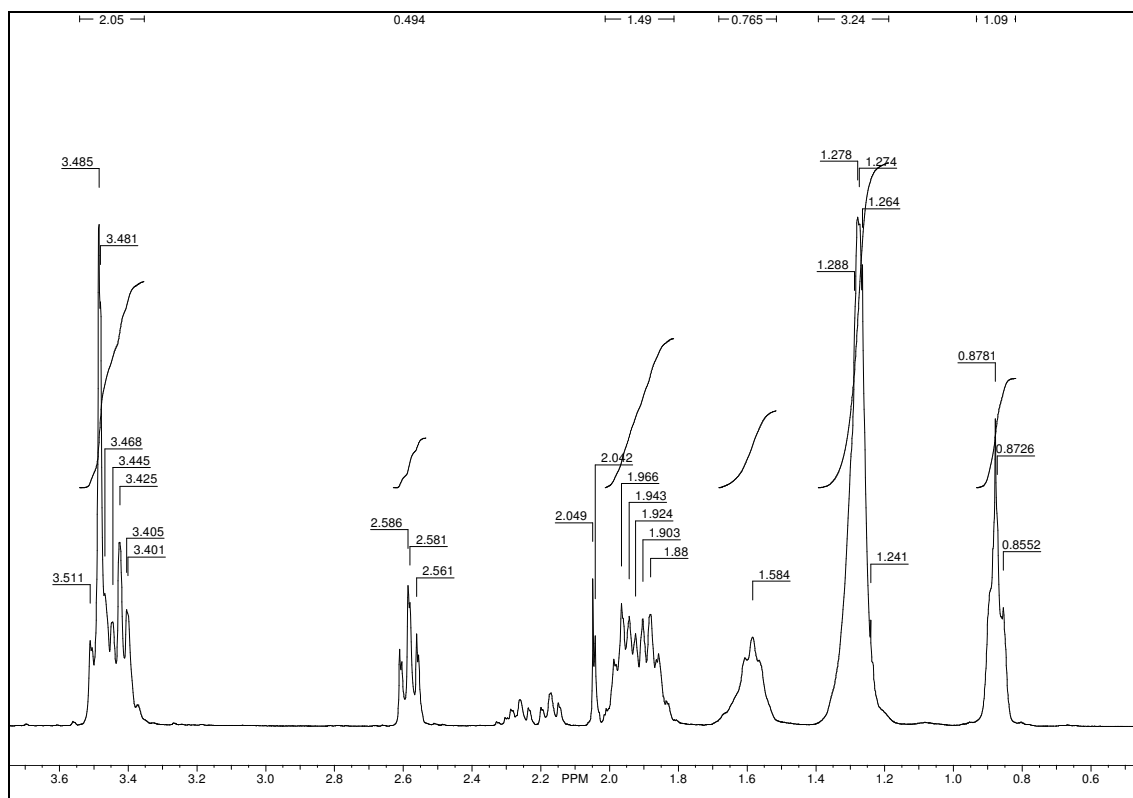


DEPT:

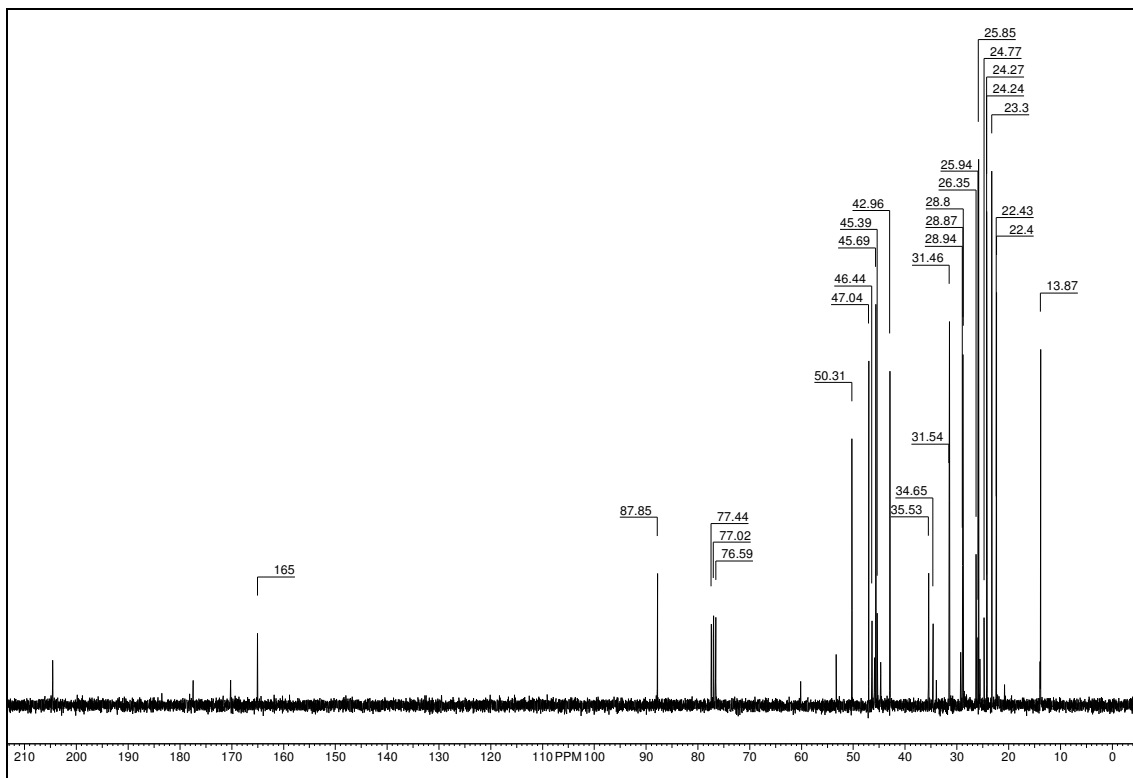




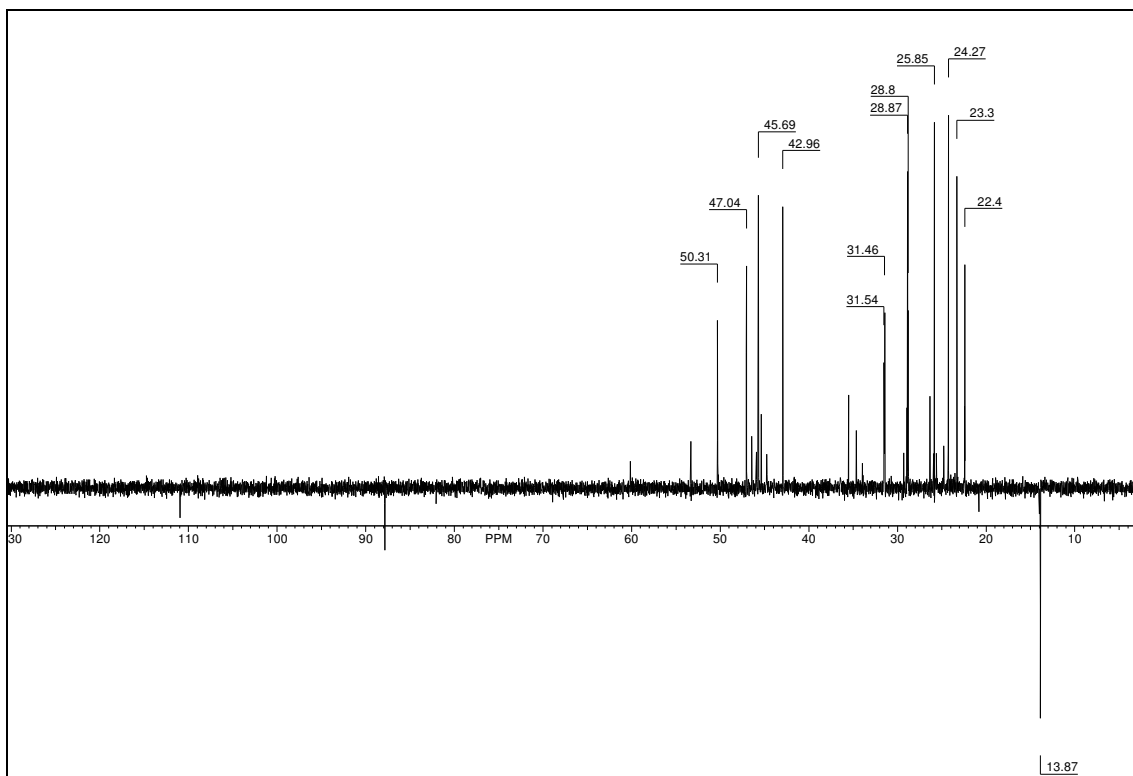
¹H RMN:

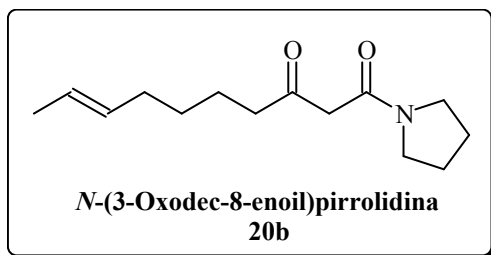


¹³C RMN:

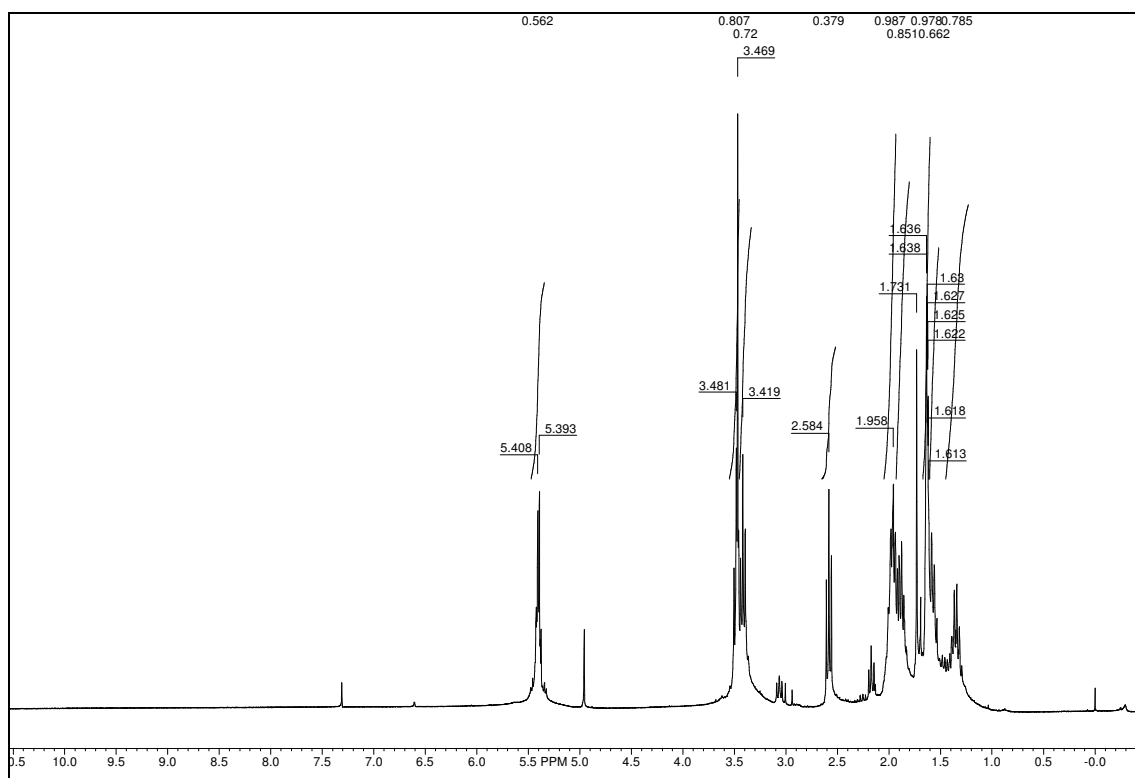


DEPT:

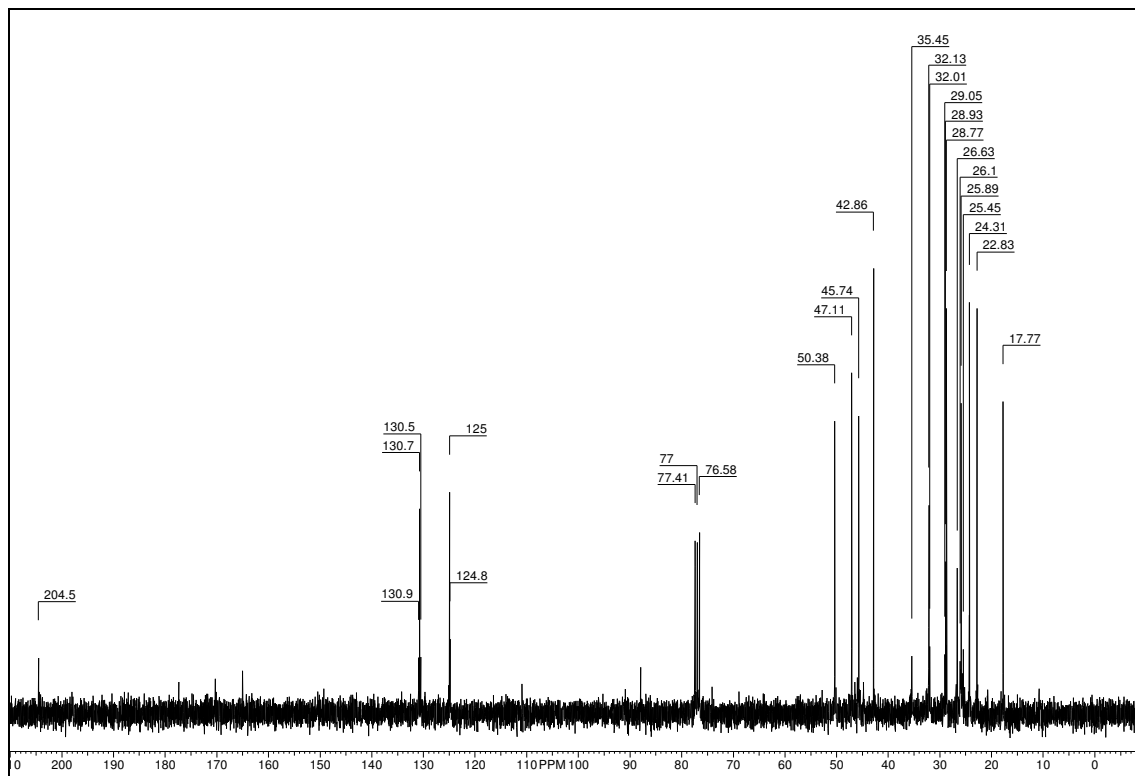




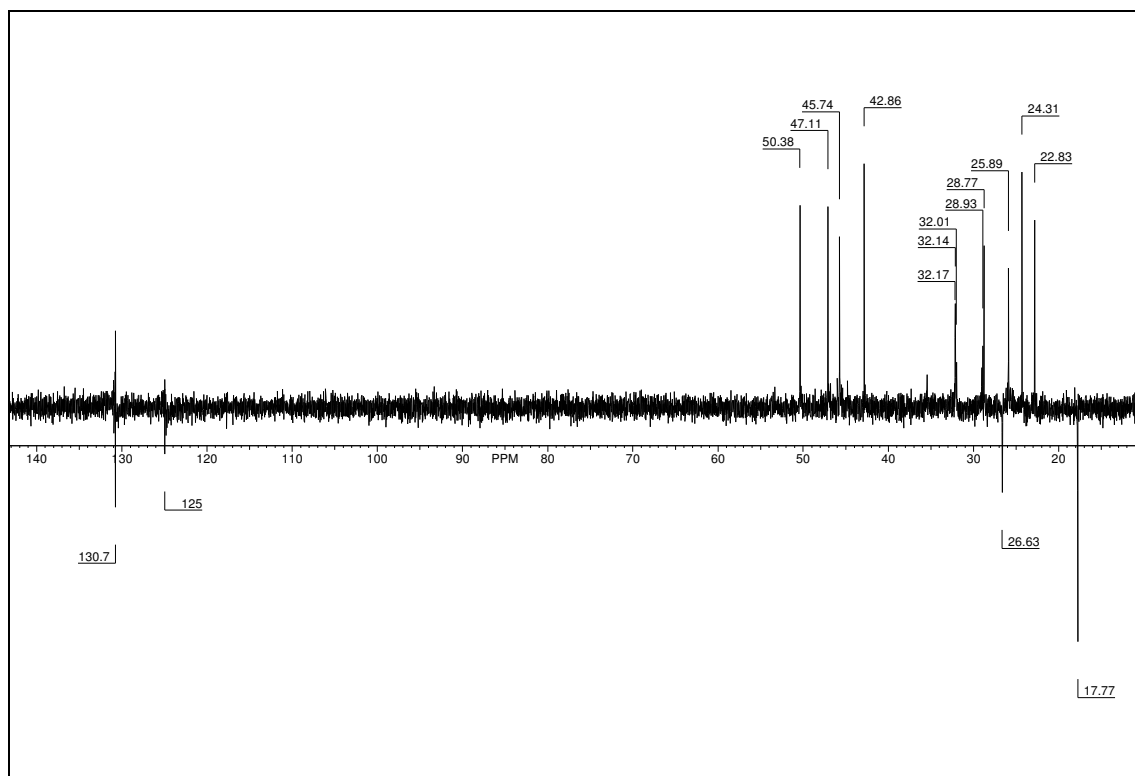
¹H RMN:

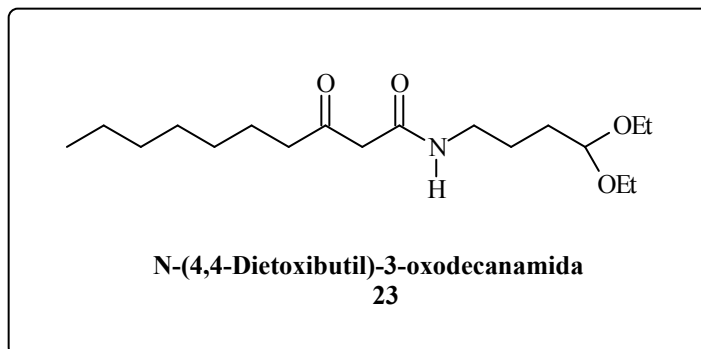


¹³C RMN:

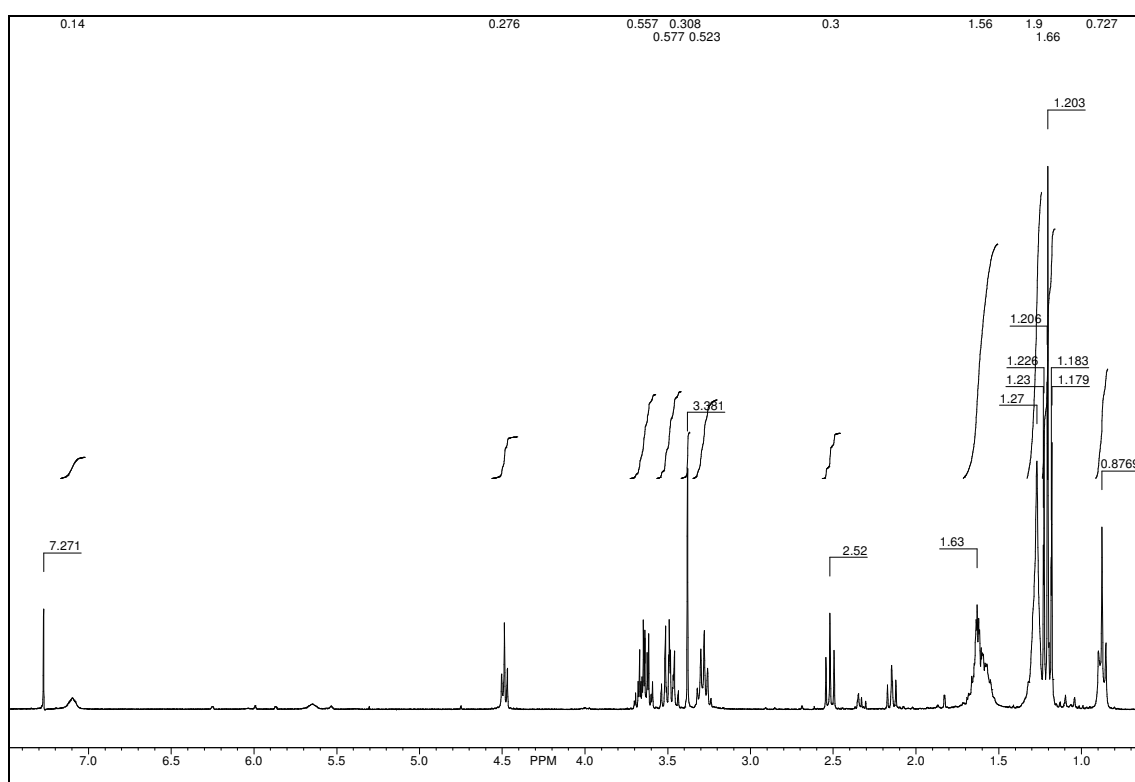


DEPT:

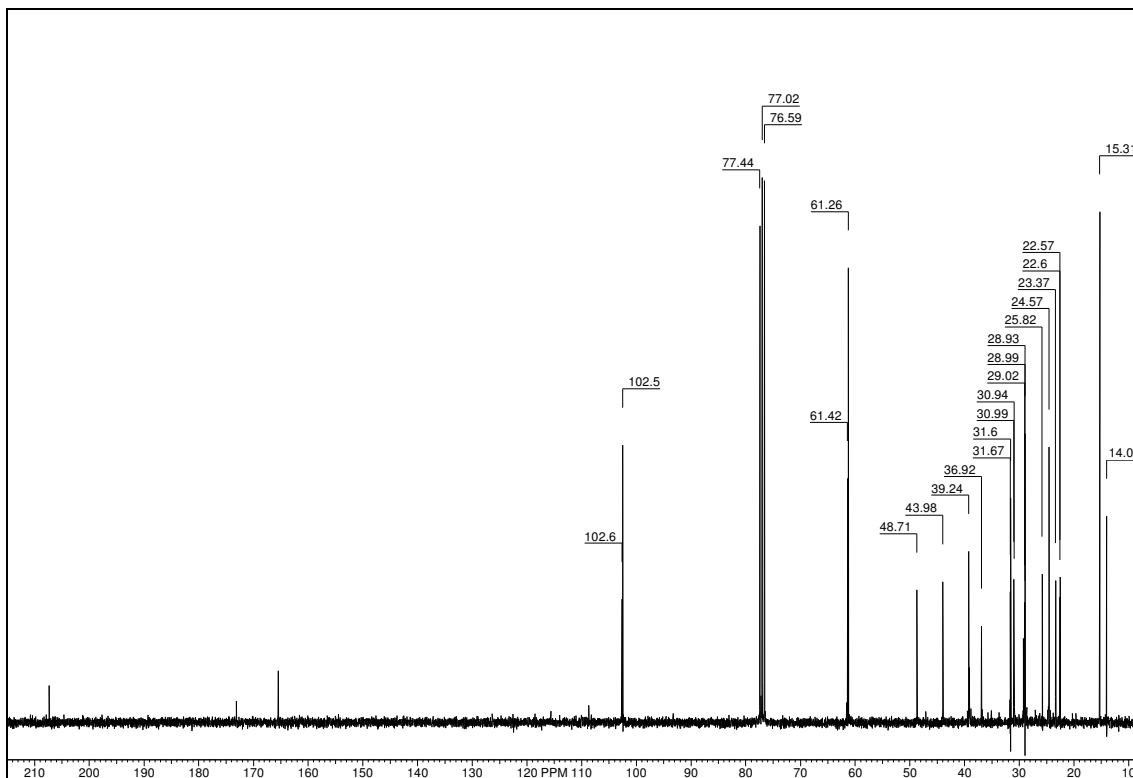




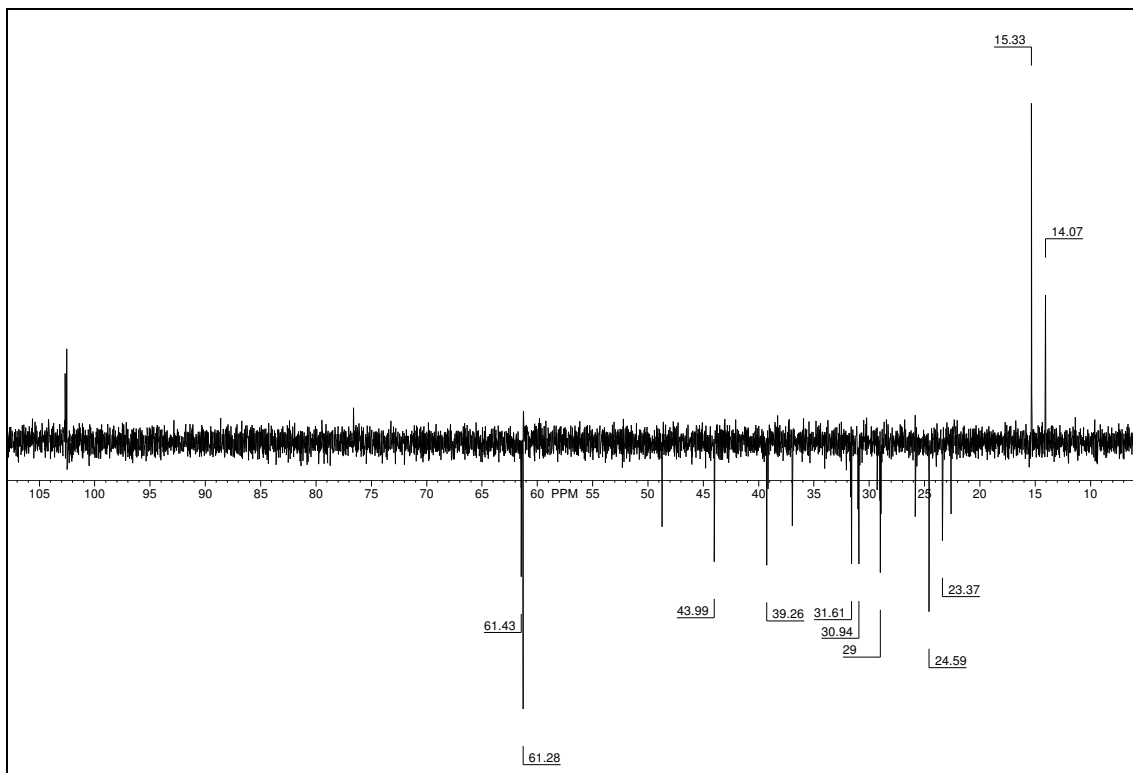
¹H RMN:

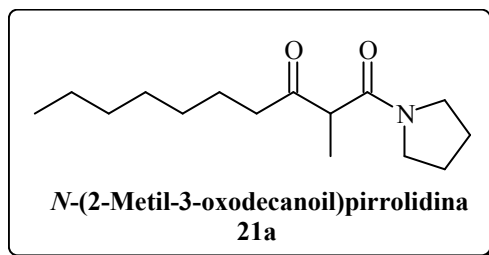


¹³C RMN:

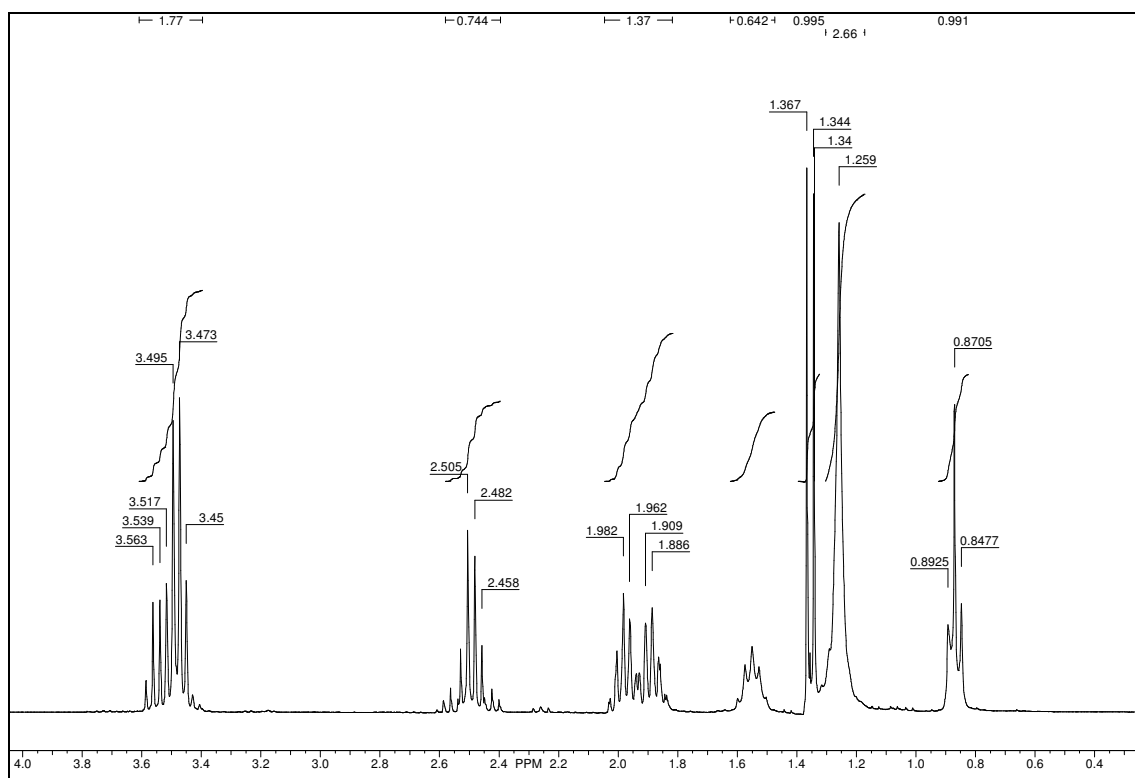


DEPT:

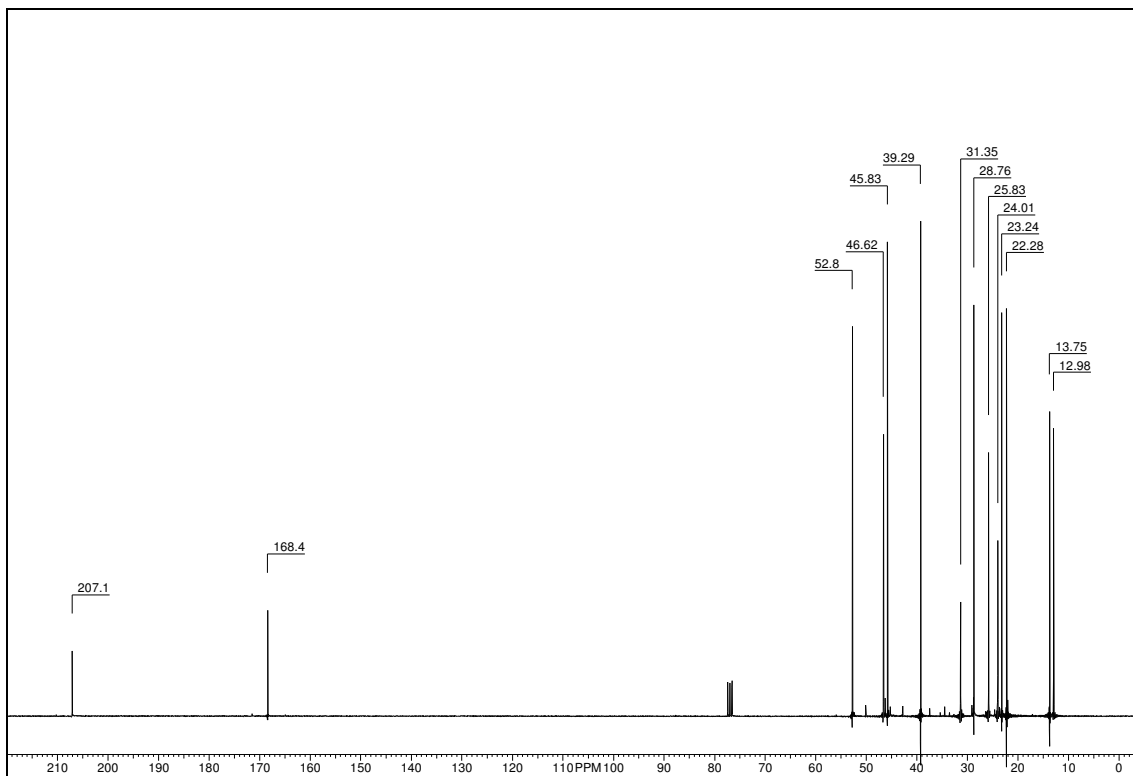




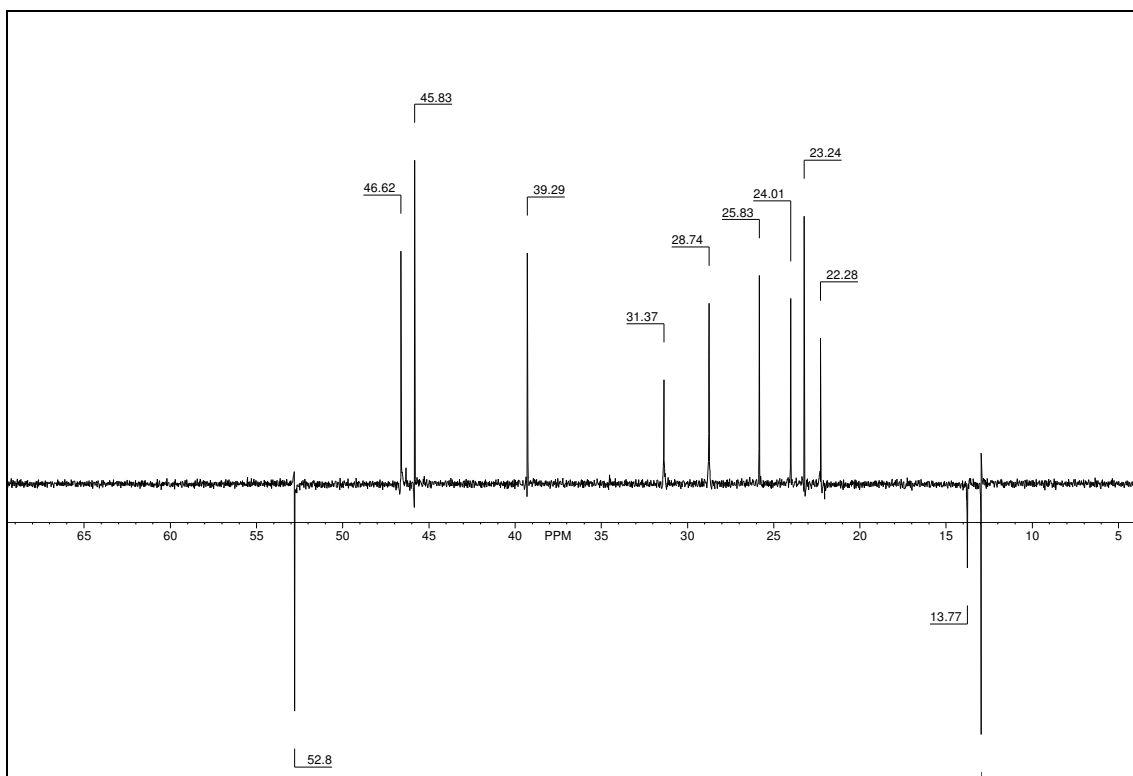
¹H RMN:

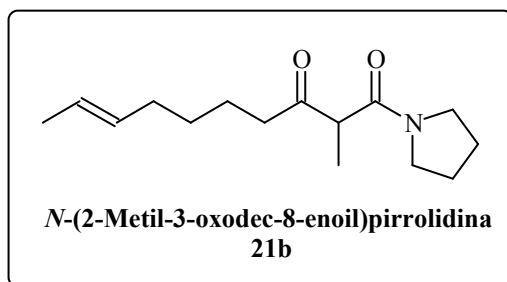


¹³C RMN:

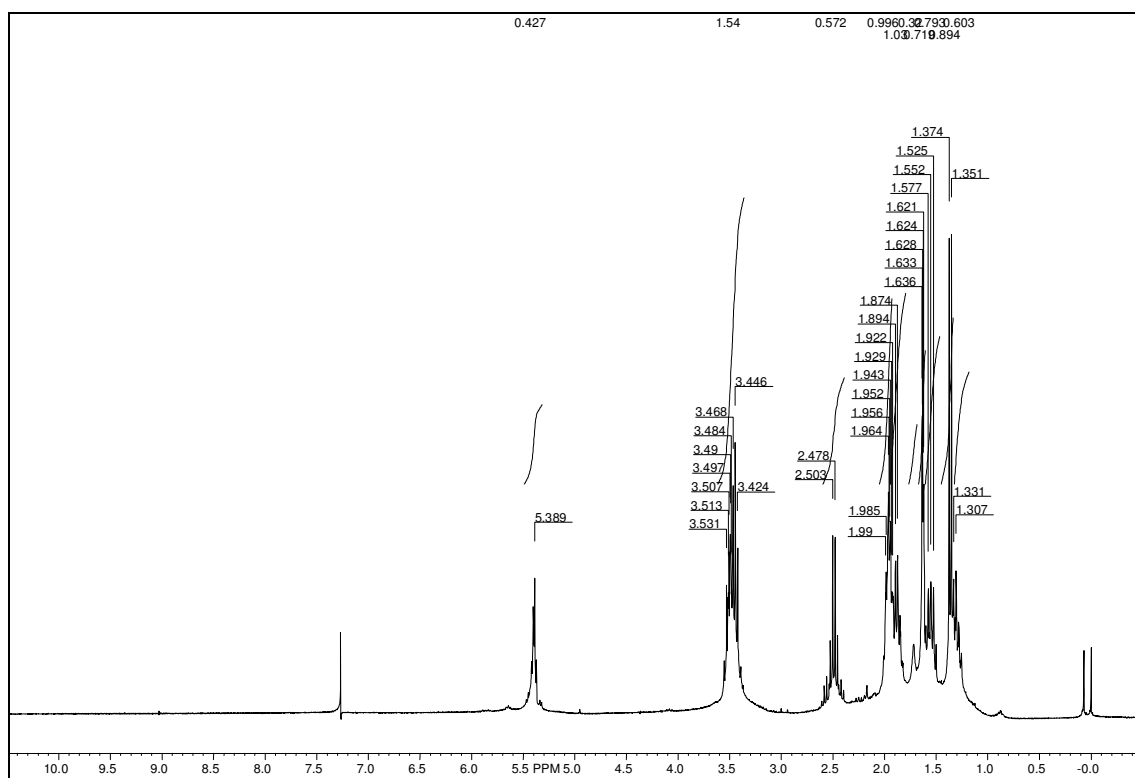


DEPT:

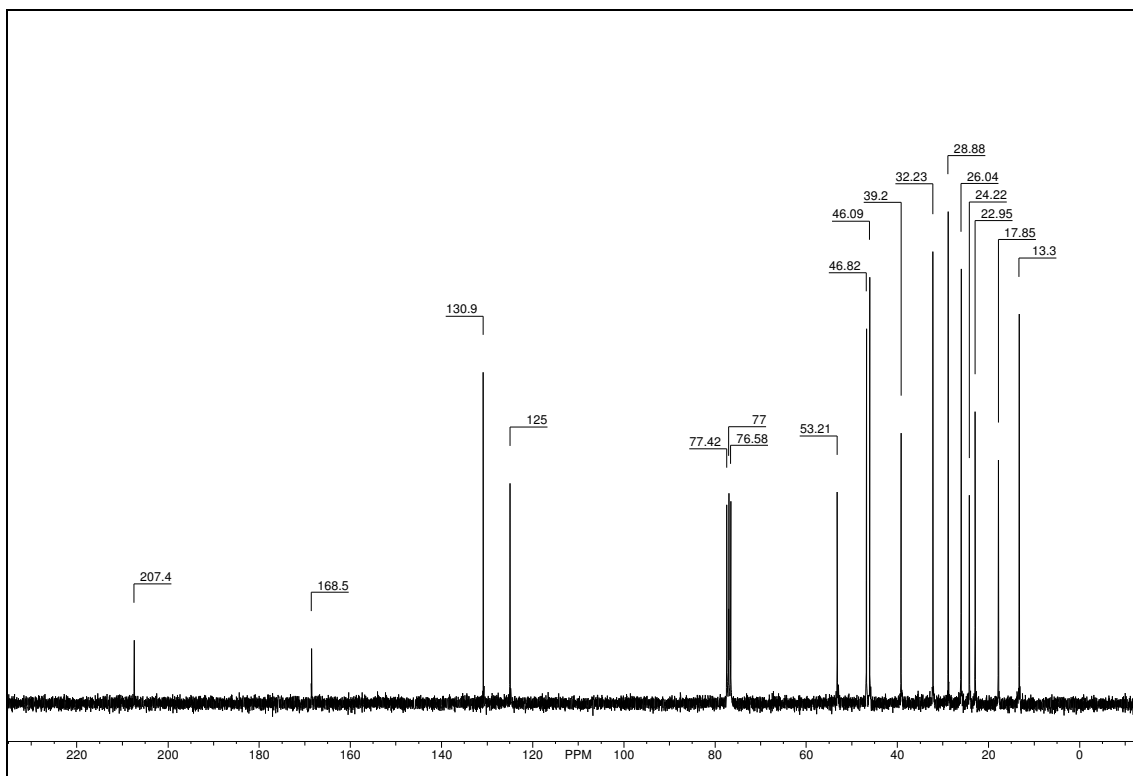




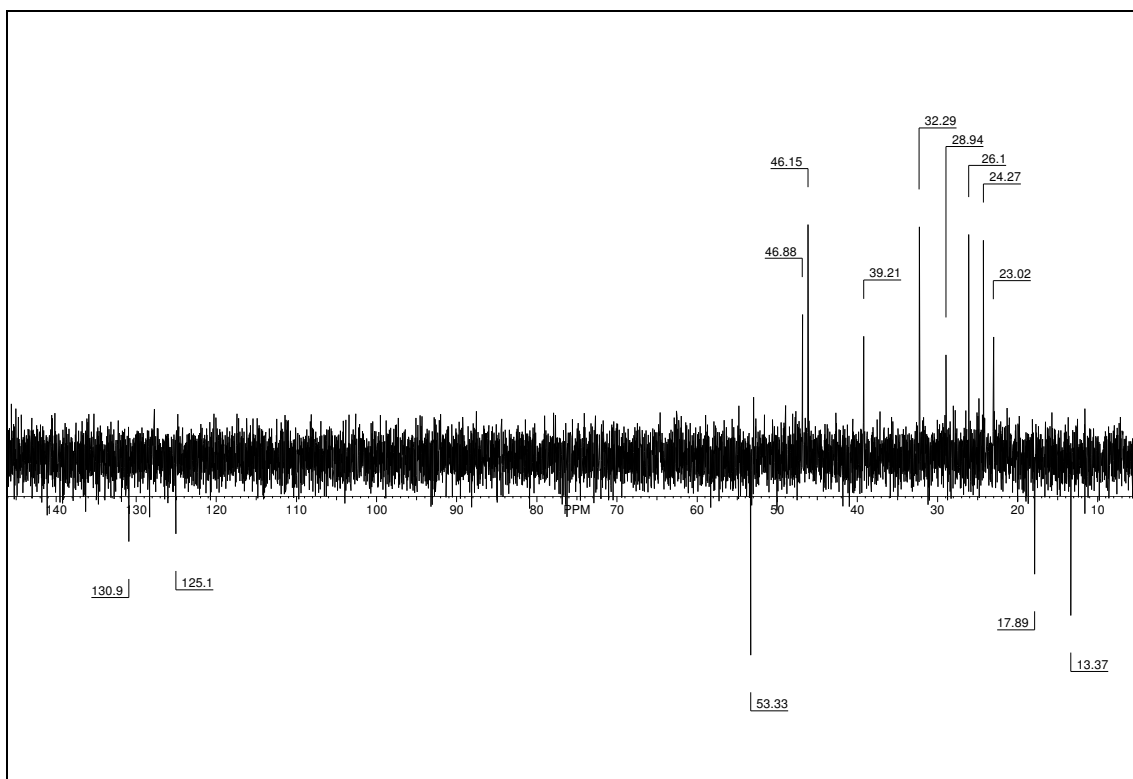
¹H RMN:

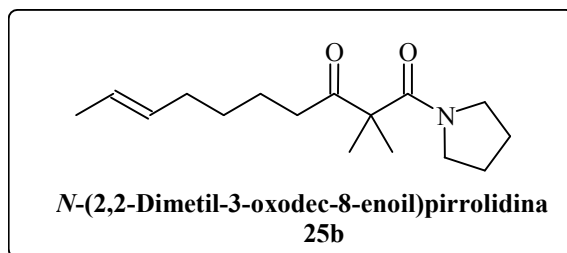


¹³C RMN:

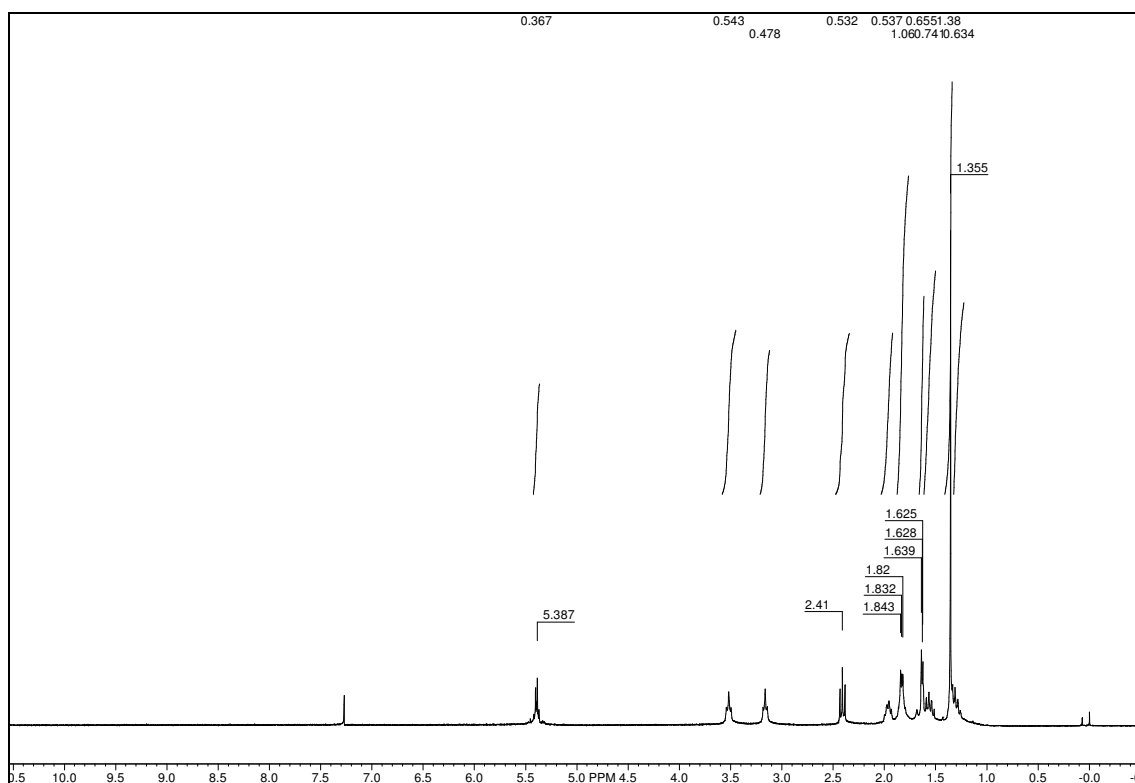


DEPT:

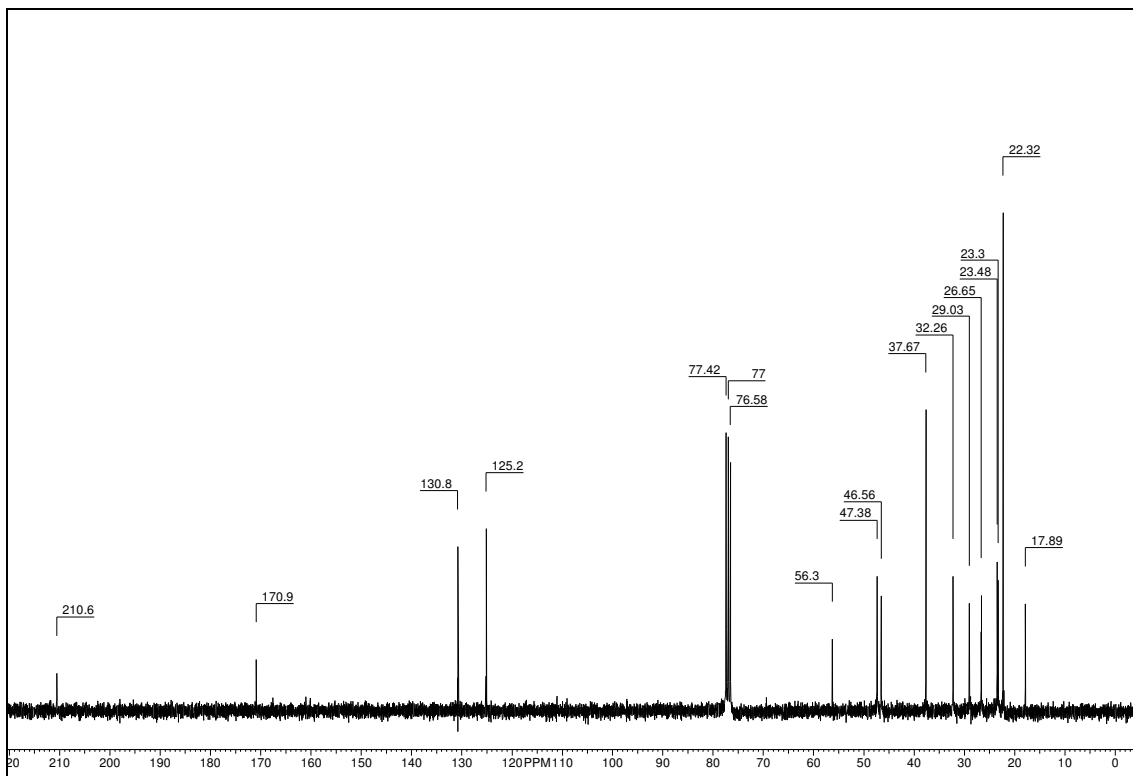




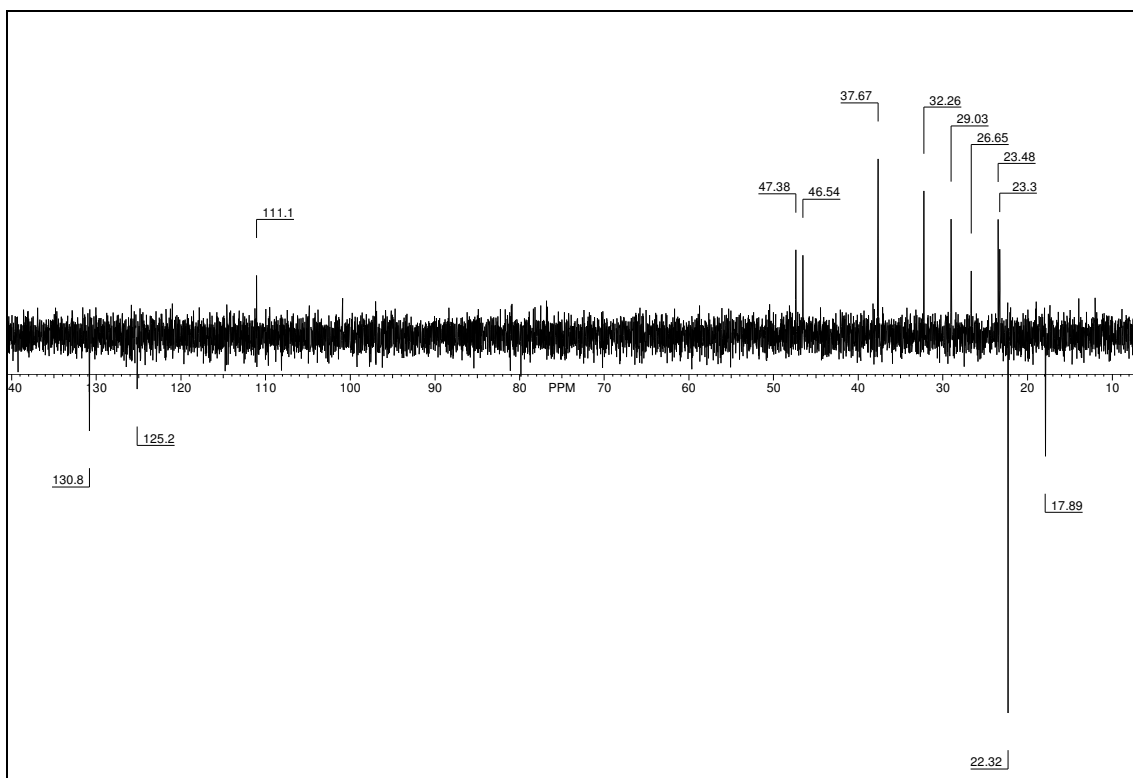
¹H RMN:

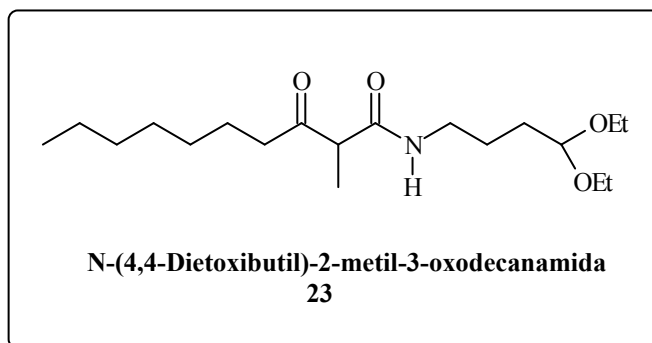


¹³C RMN:

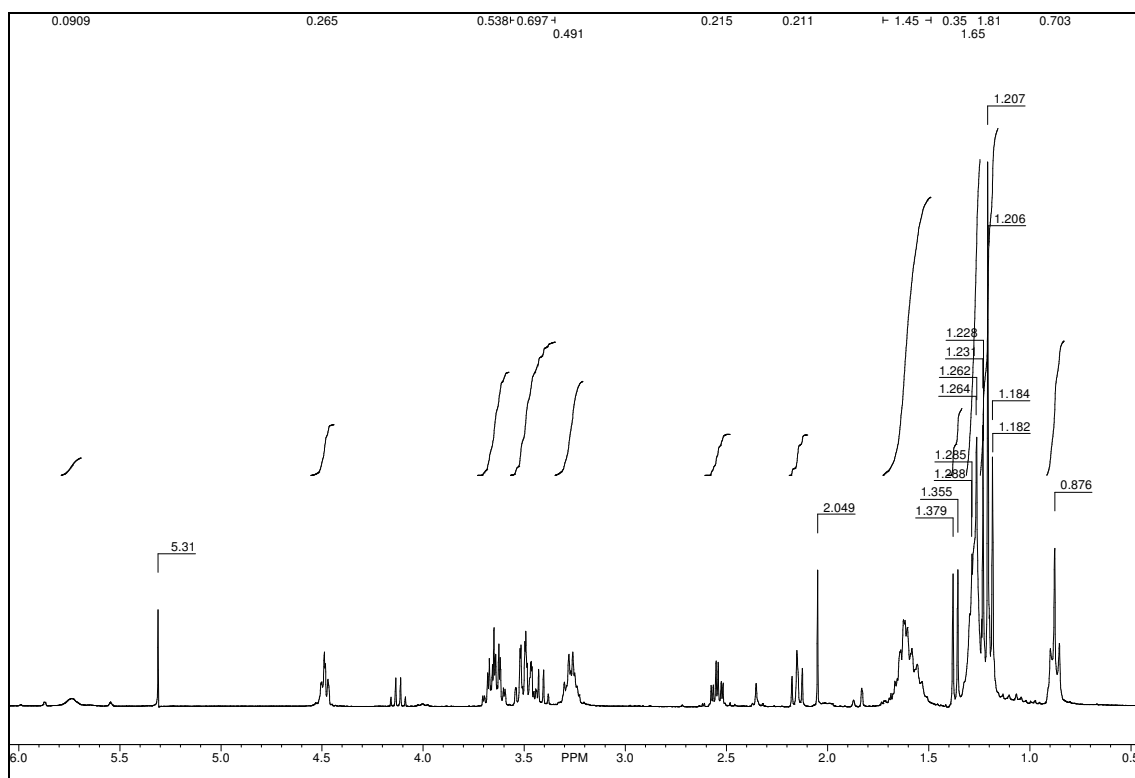


DEPT:

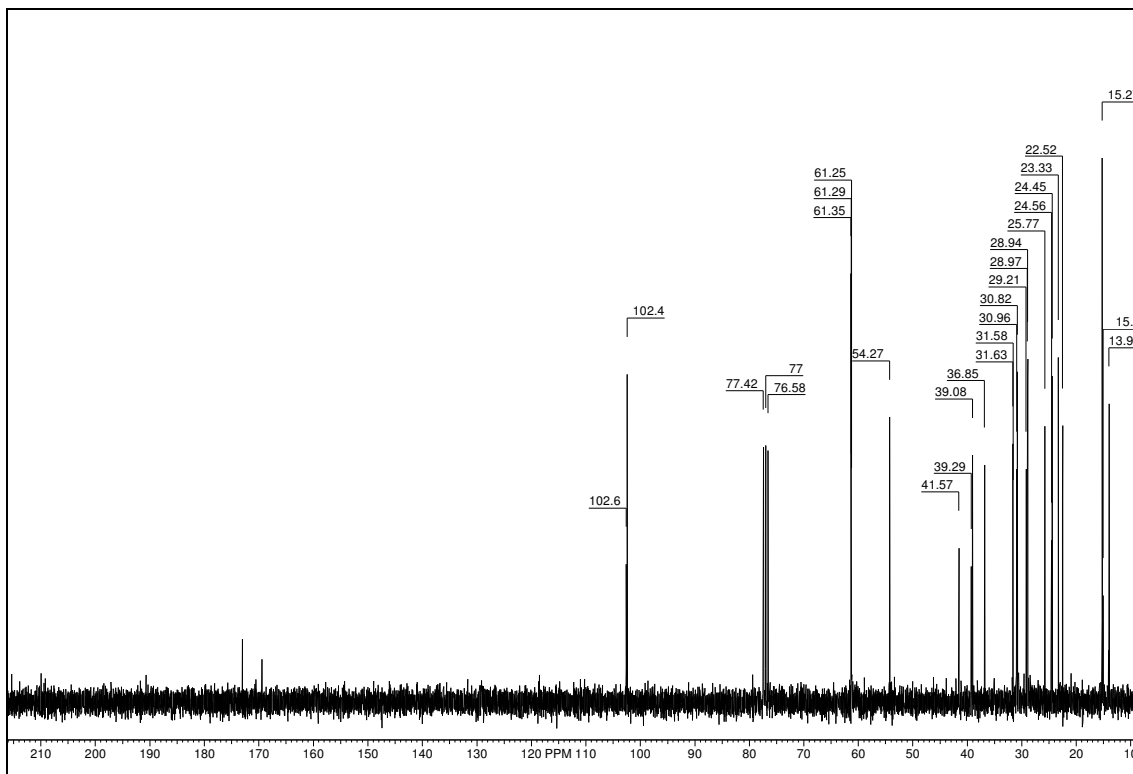




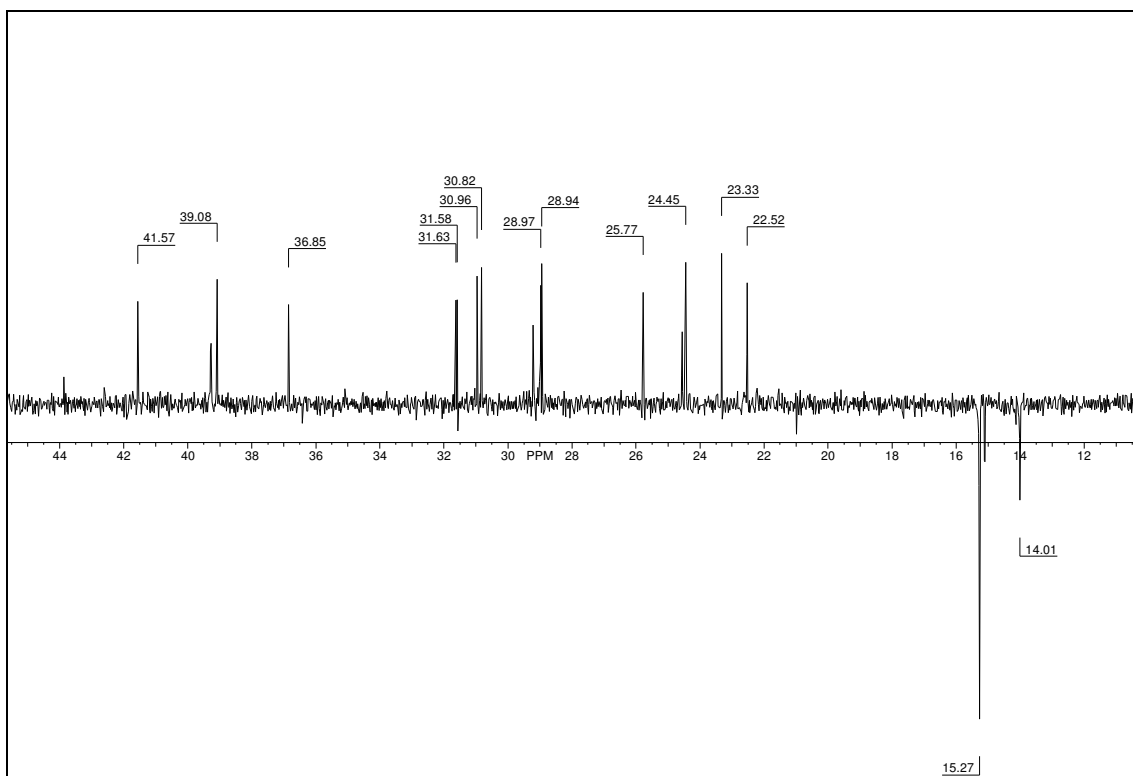
¹H RMN:

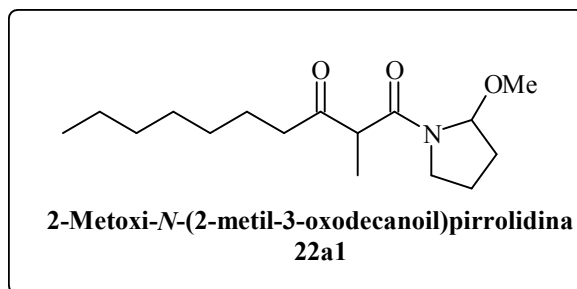


¹³C RMN:

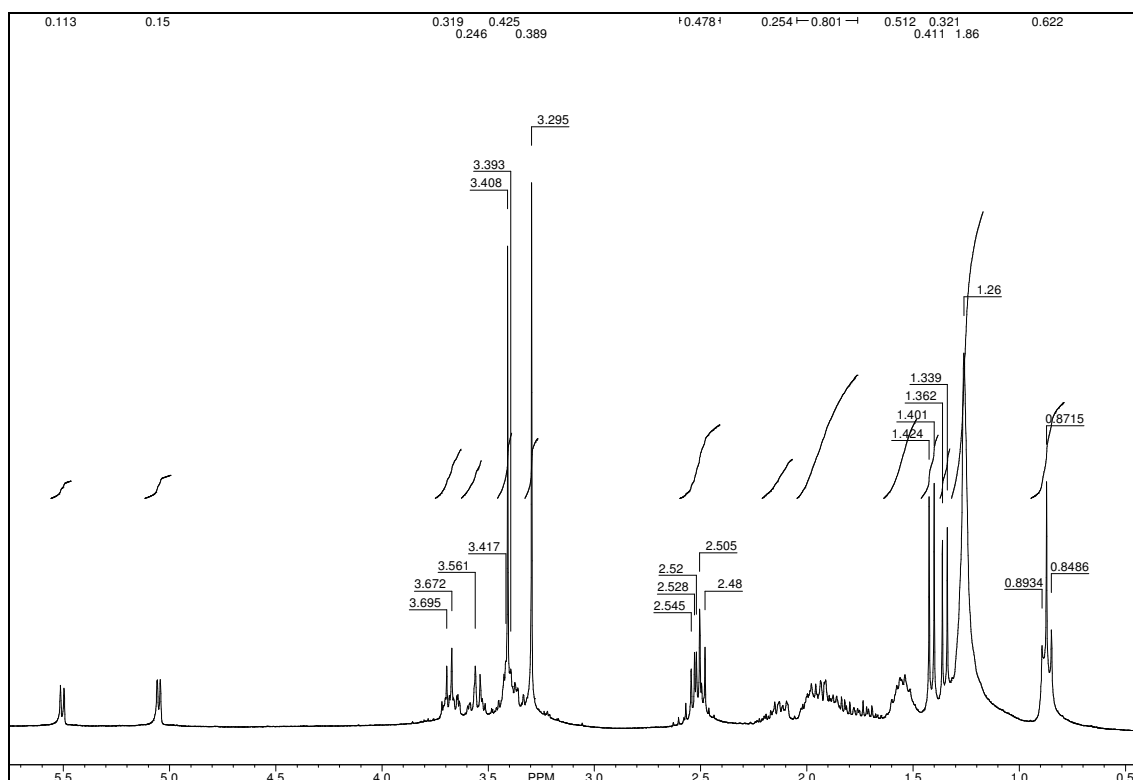


DEPT:

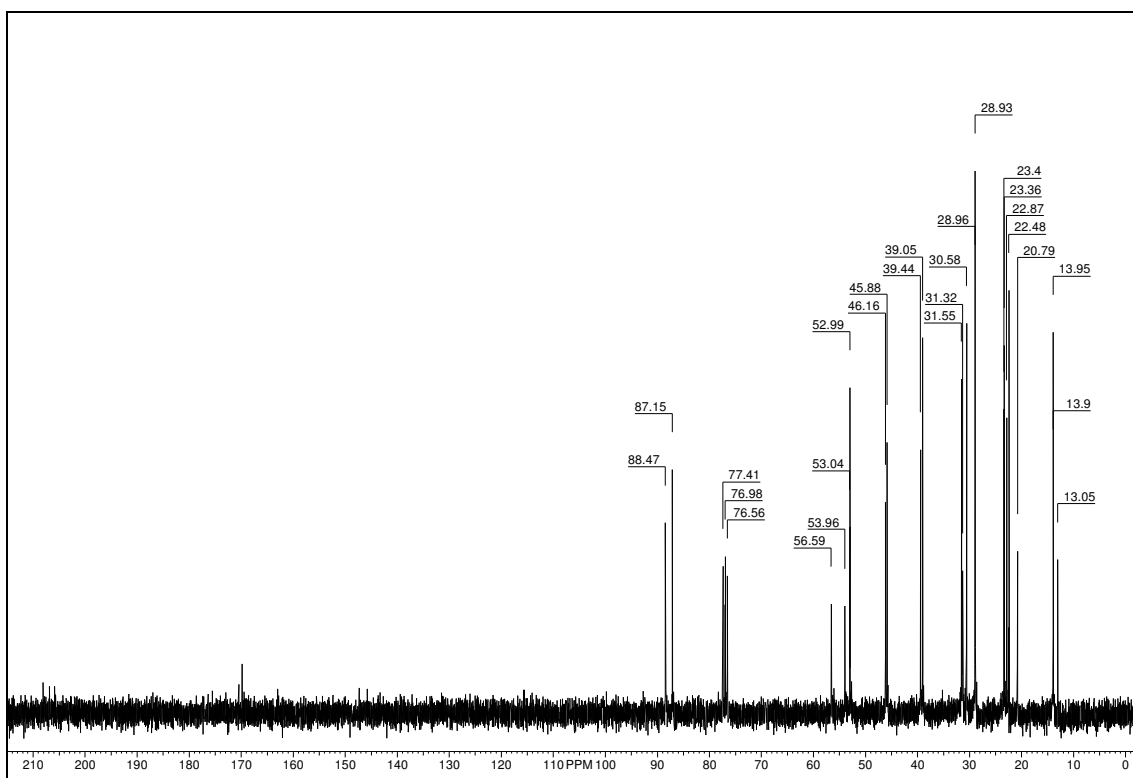




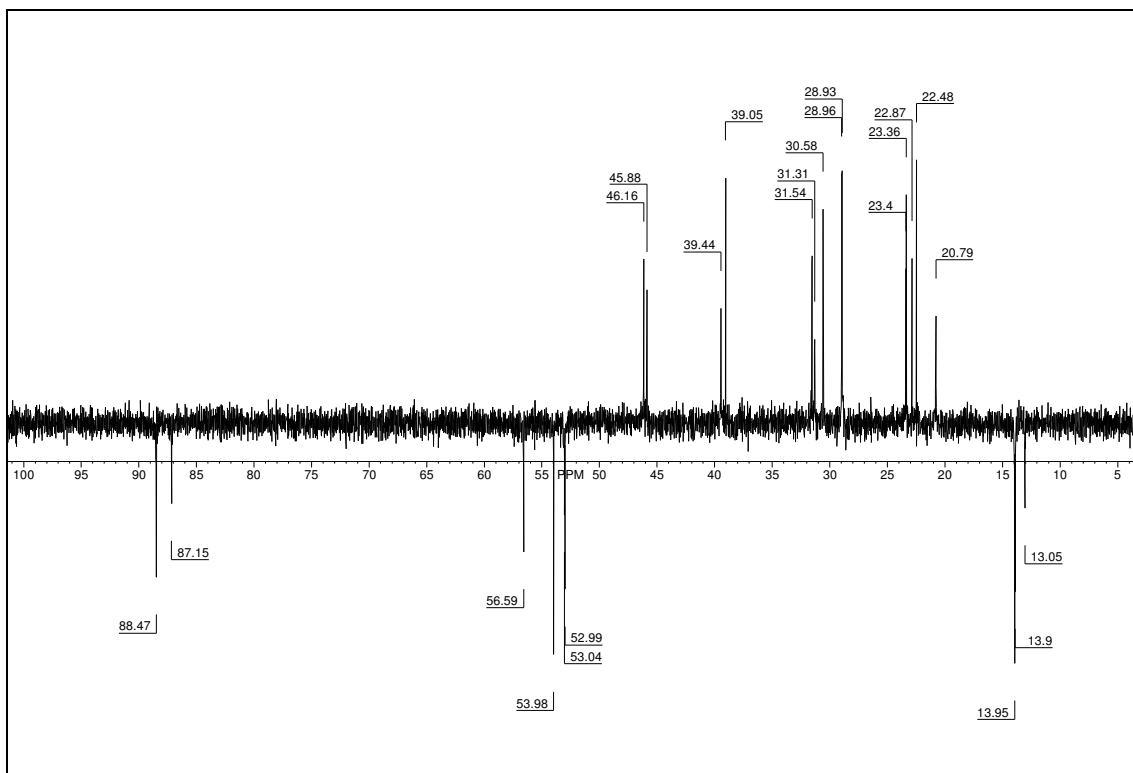
¹H RMN:

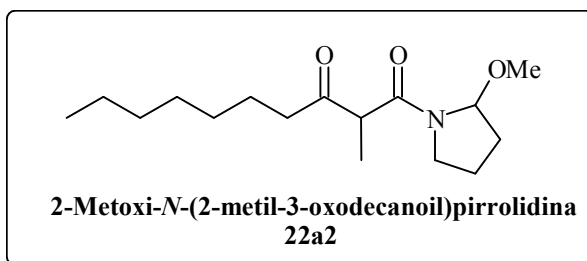


¹³C RMN:

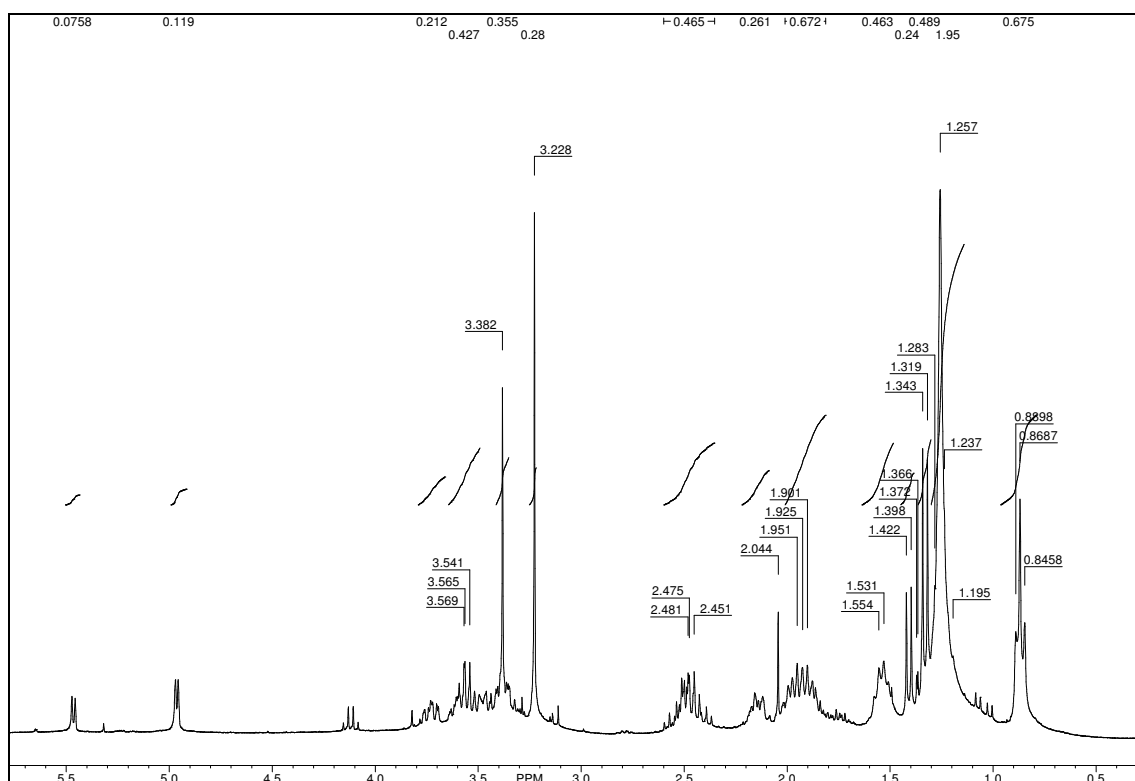


DEPT:

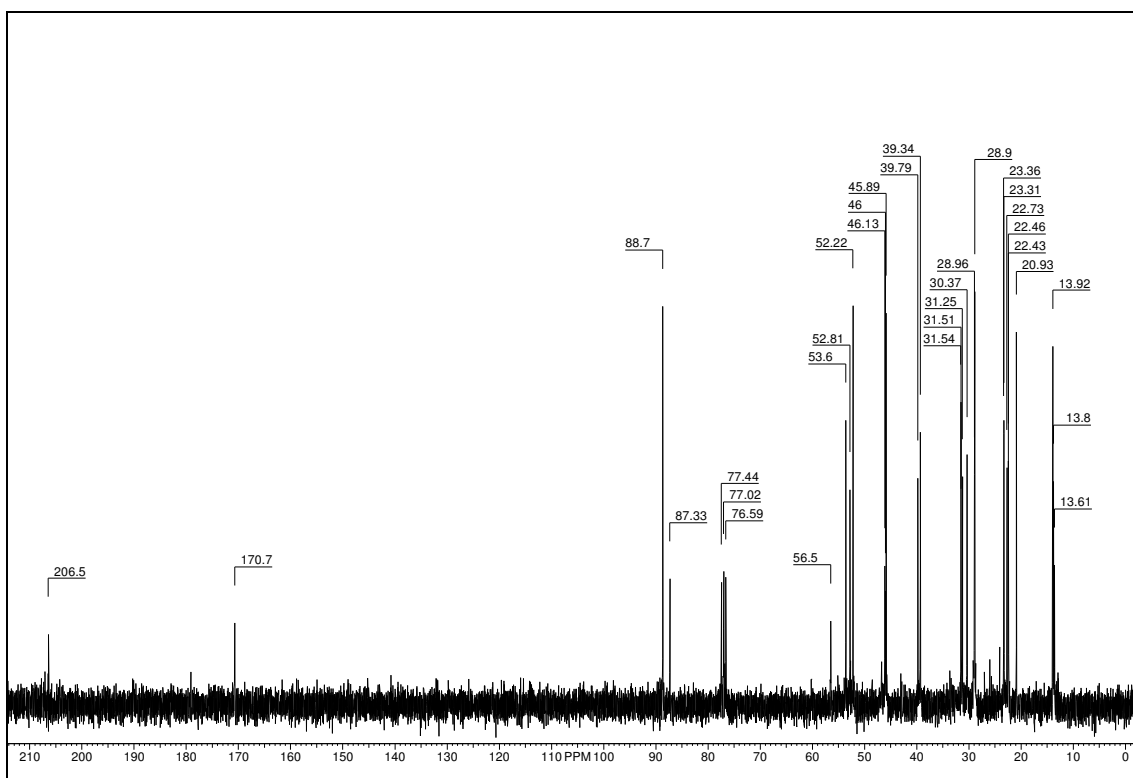




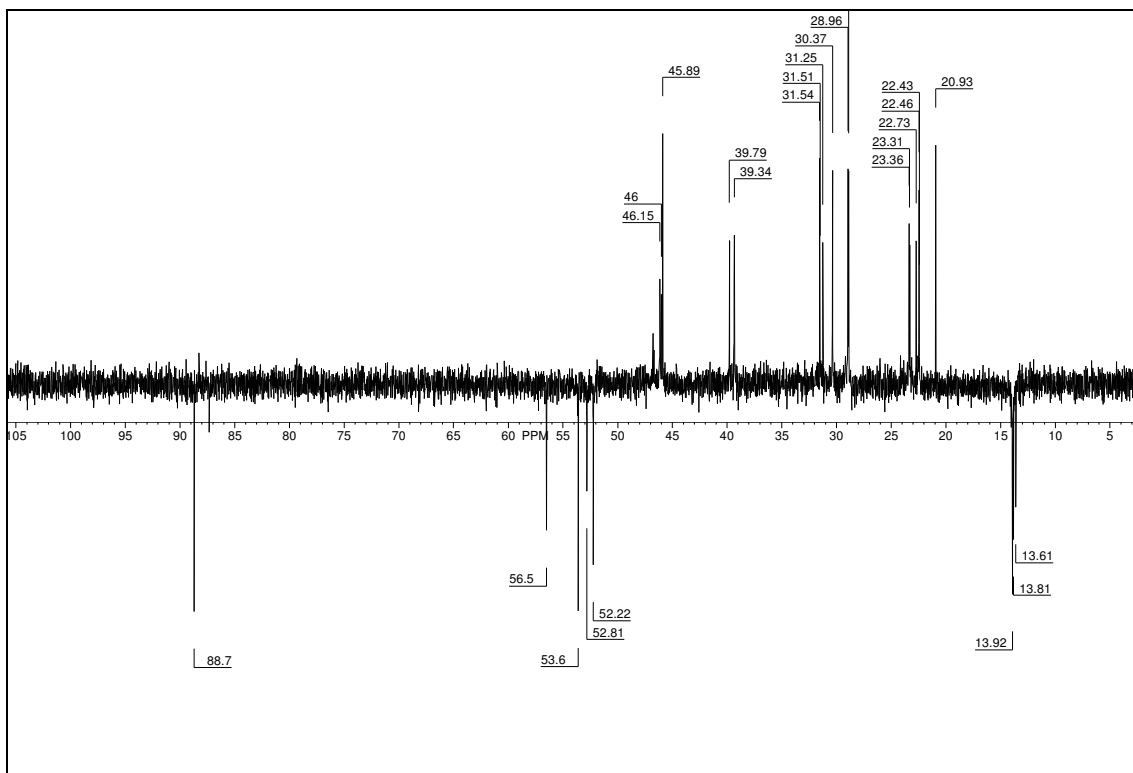
¹H RMN:

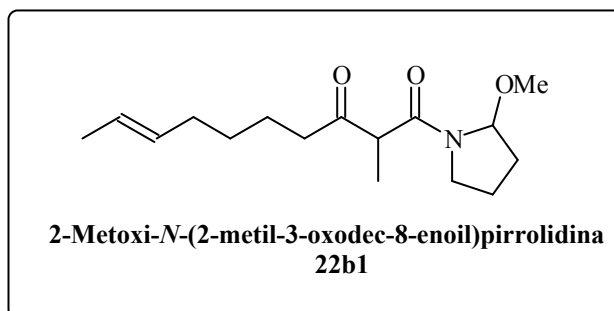


¹³C RMN:

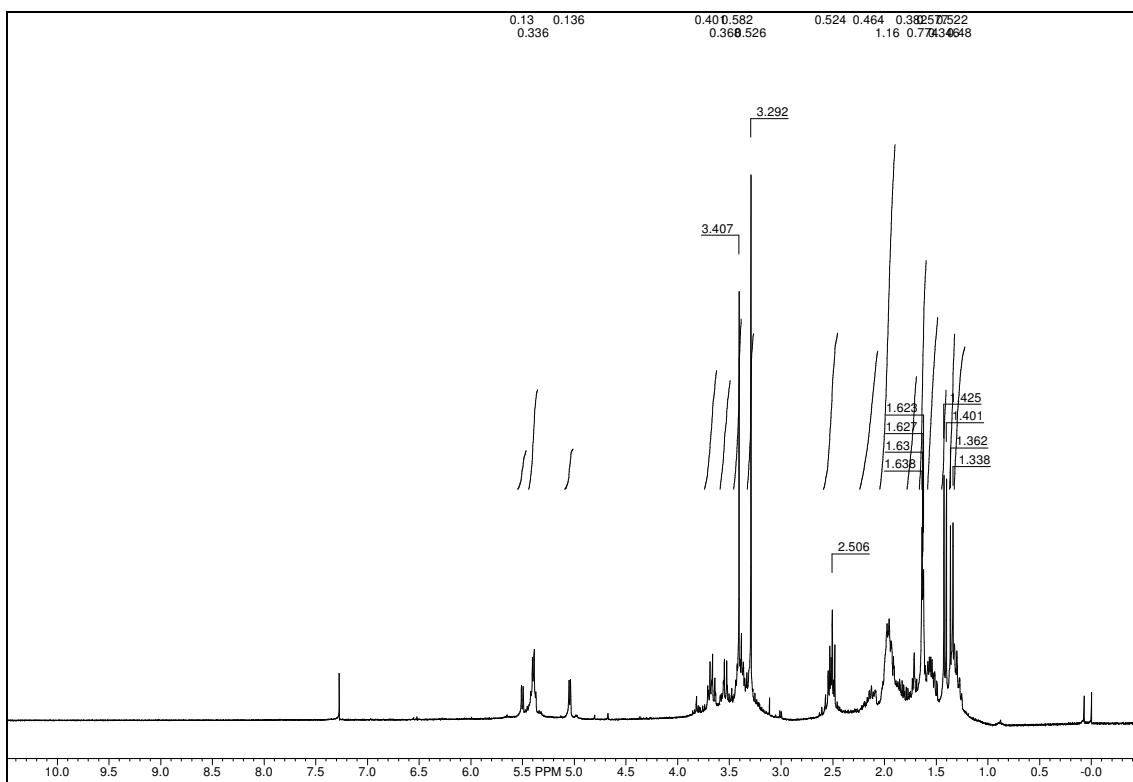


DEPT:

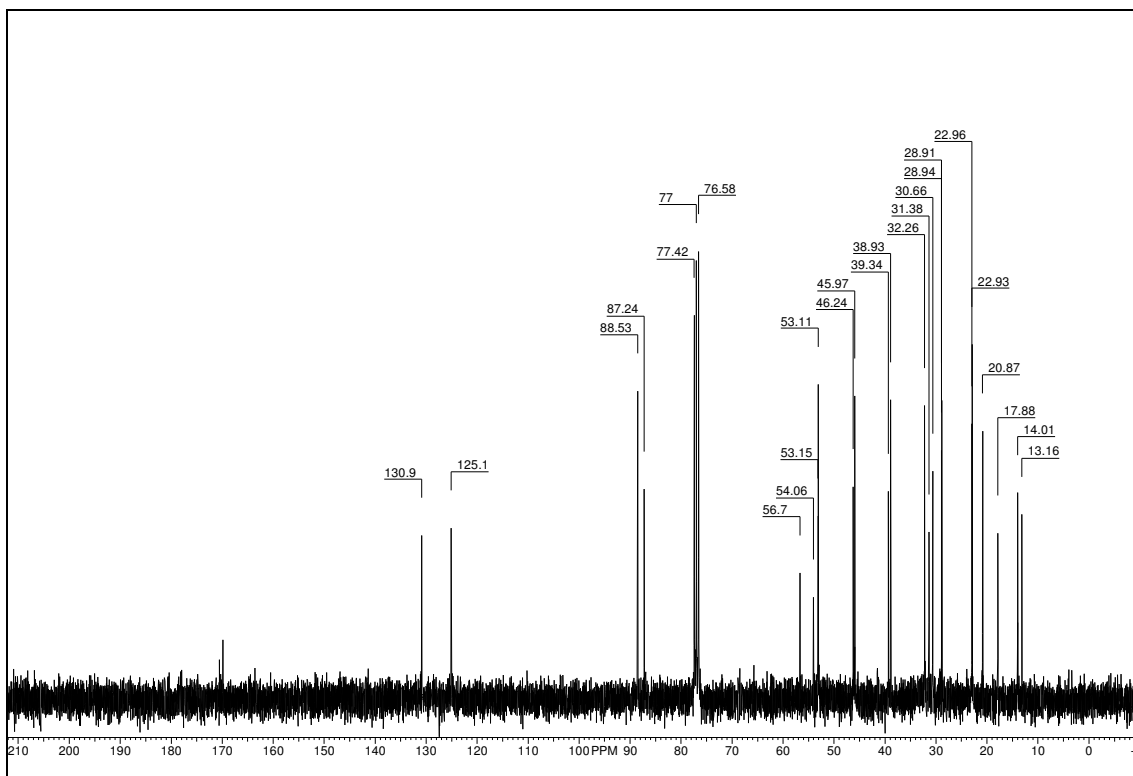




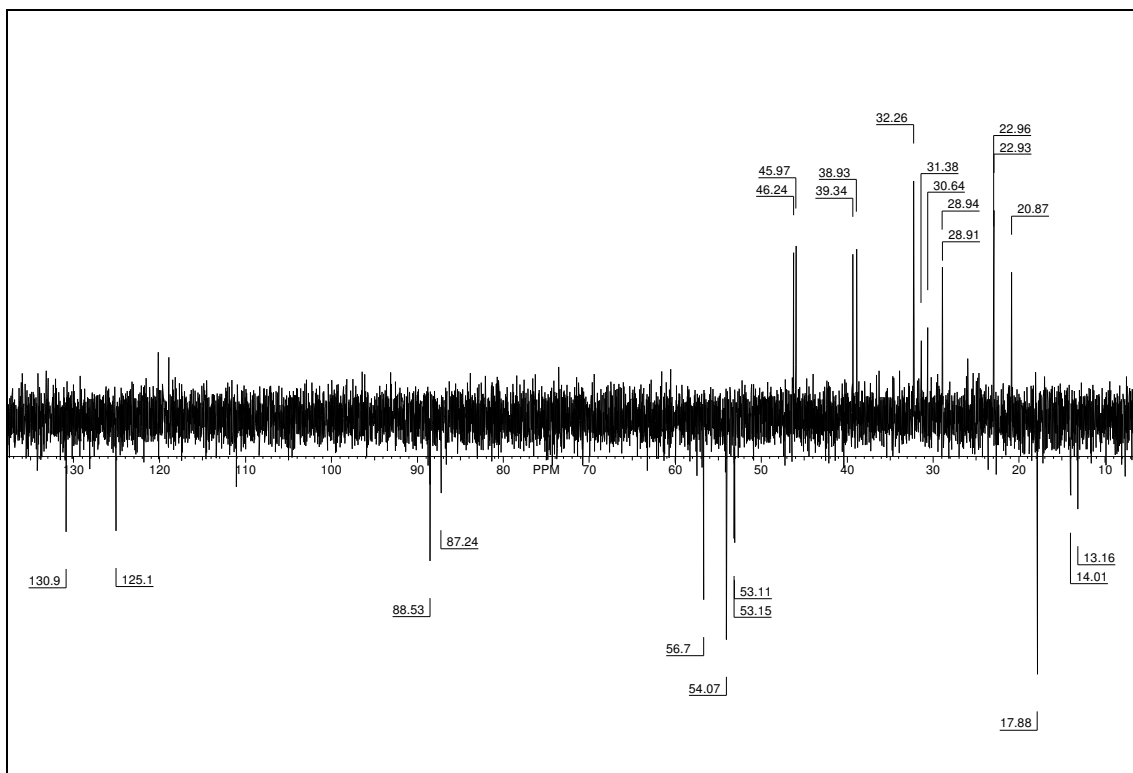
¹H RMN:

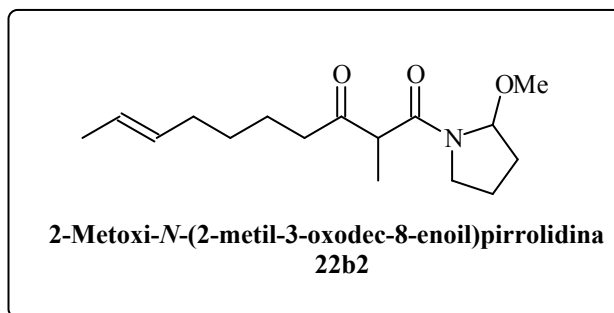


¹³C RMN:

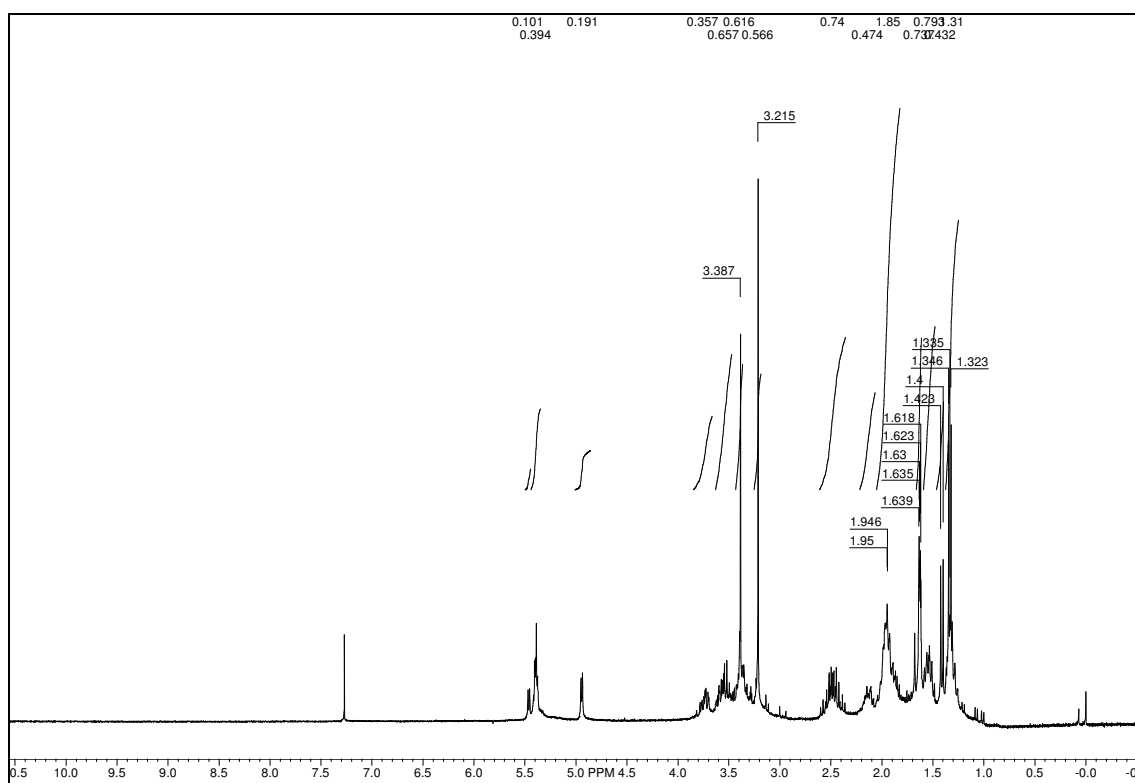


DEPT:

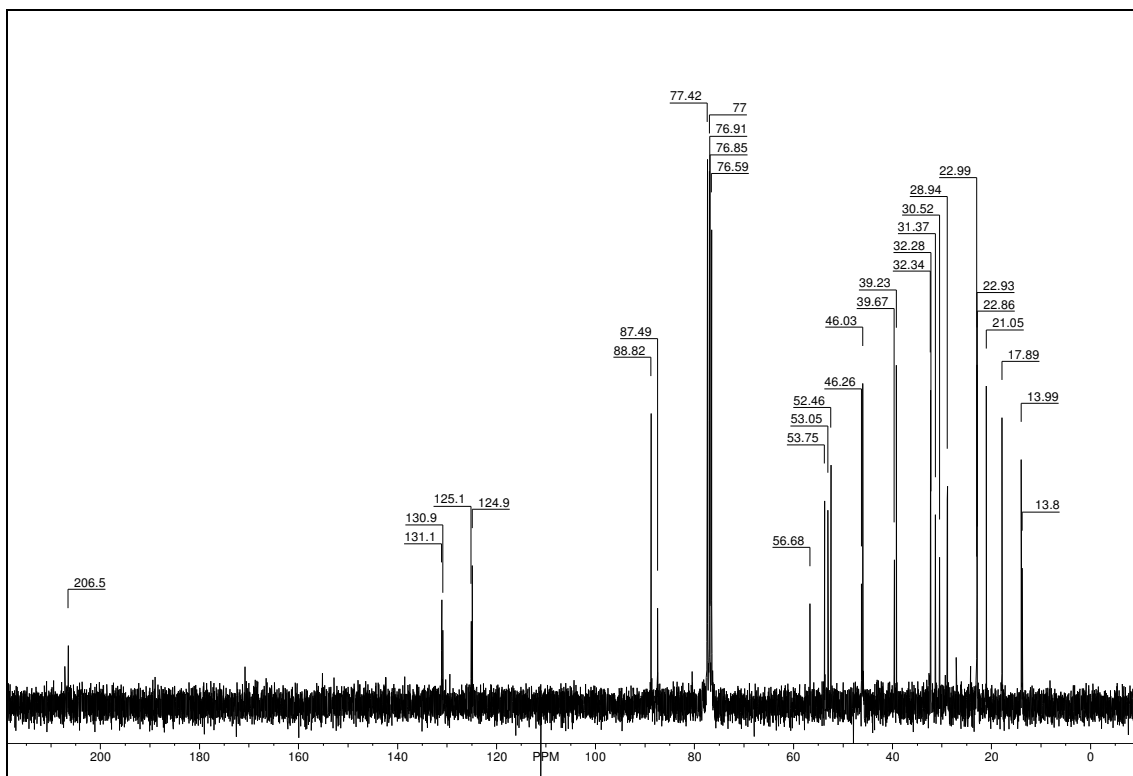




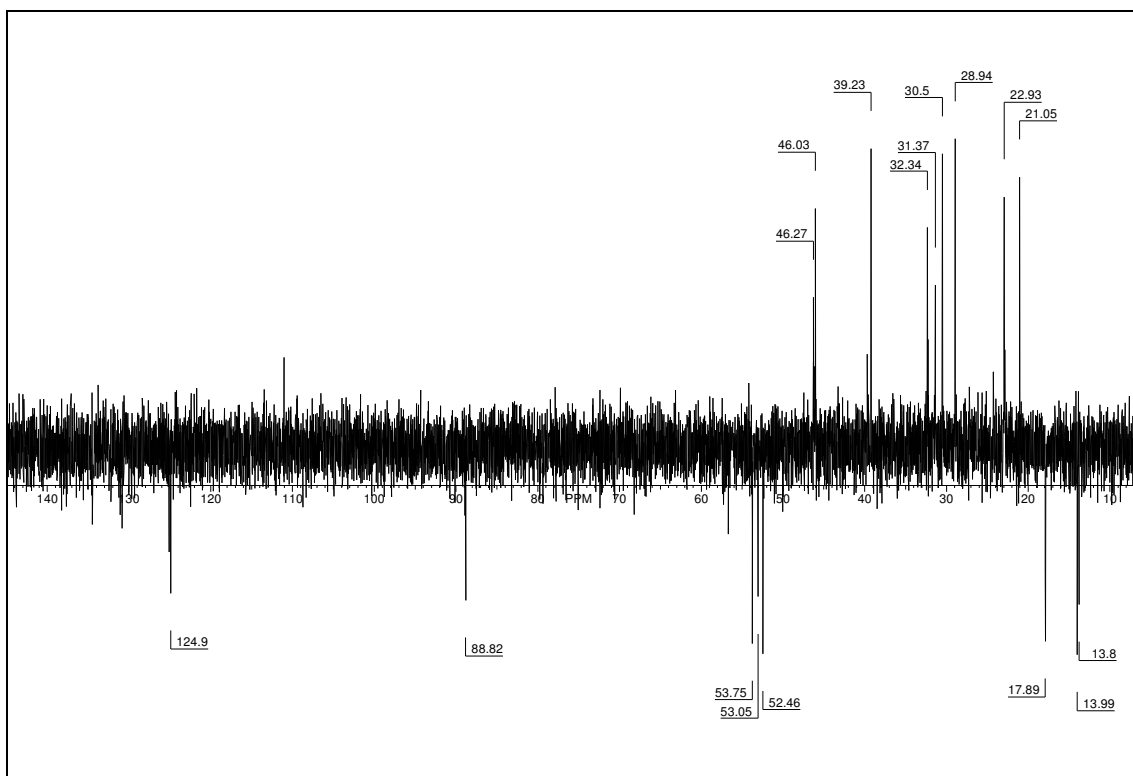
¹H RMN:

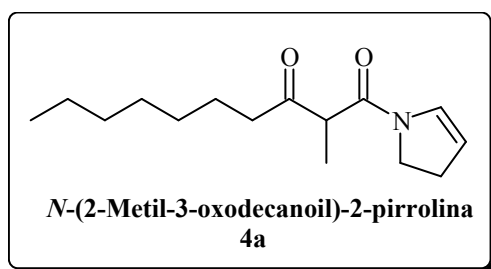


¹³C RMN:

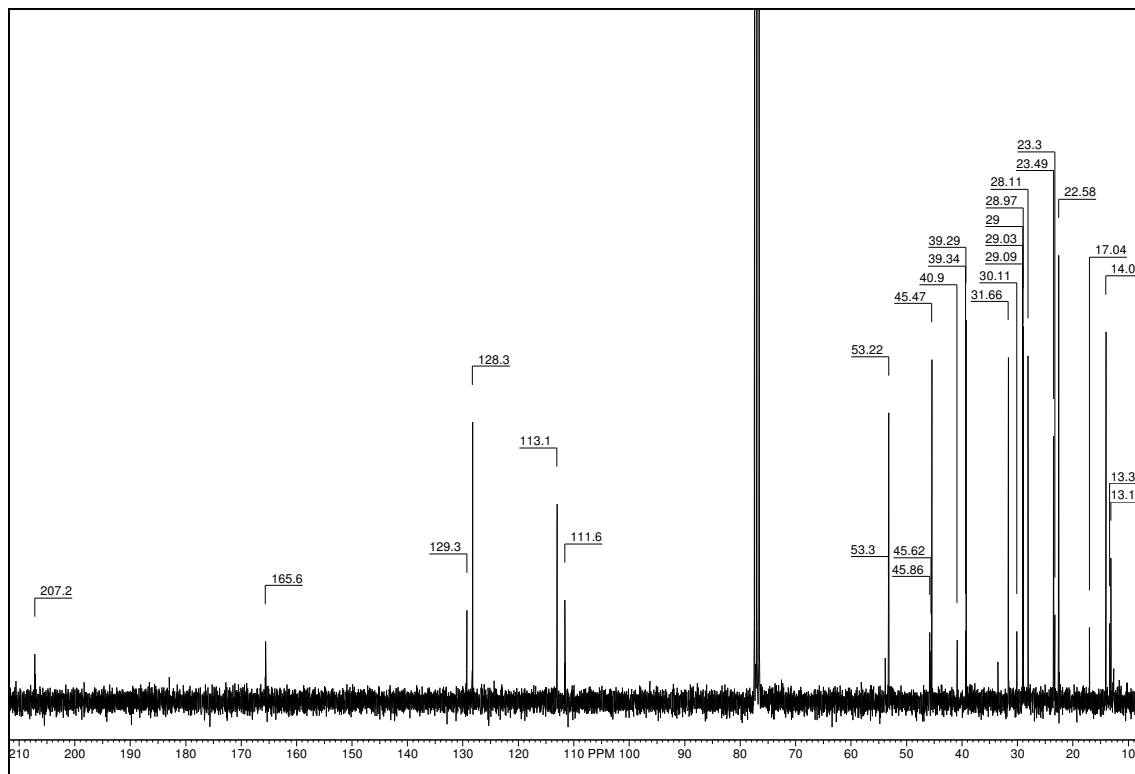


DEPT:

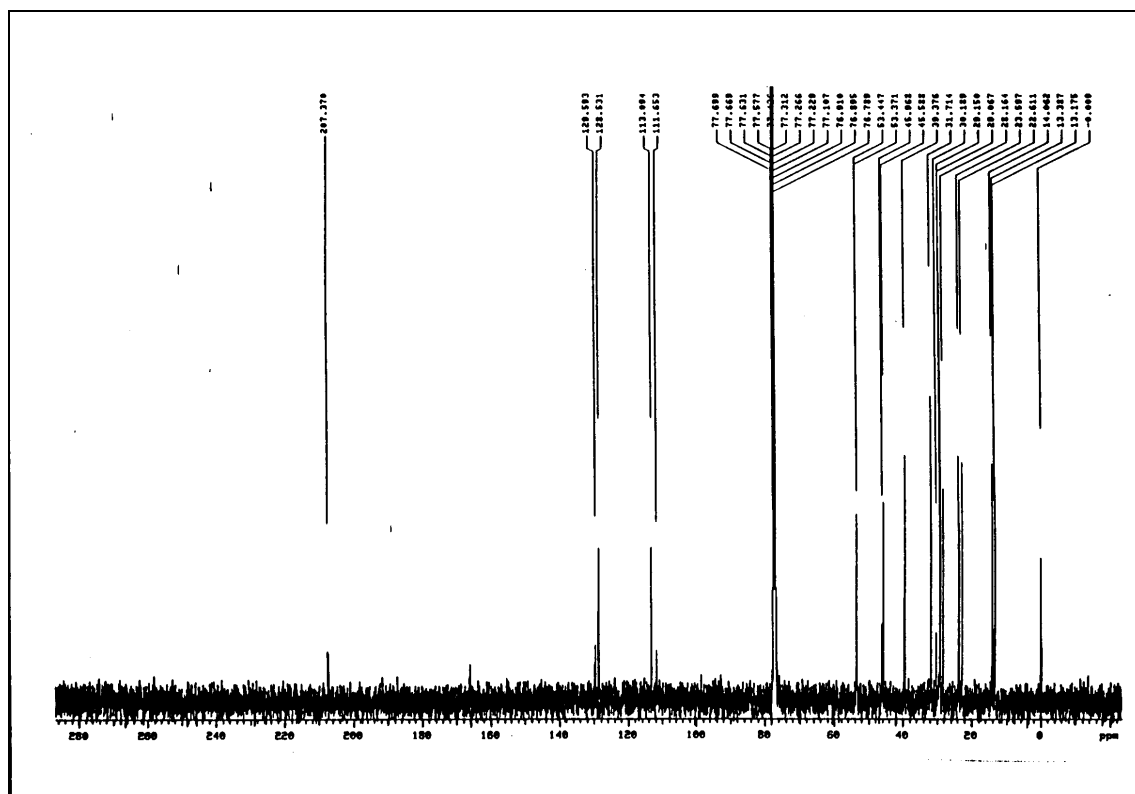




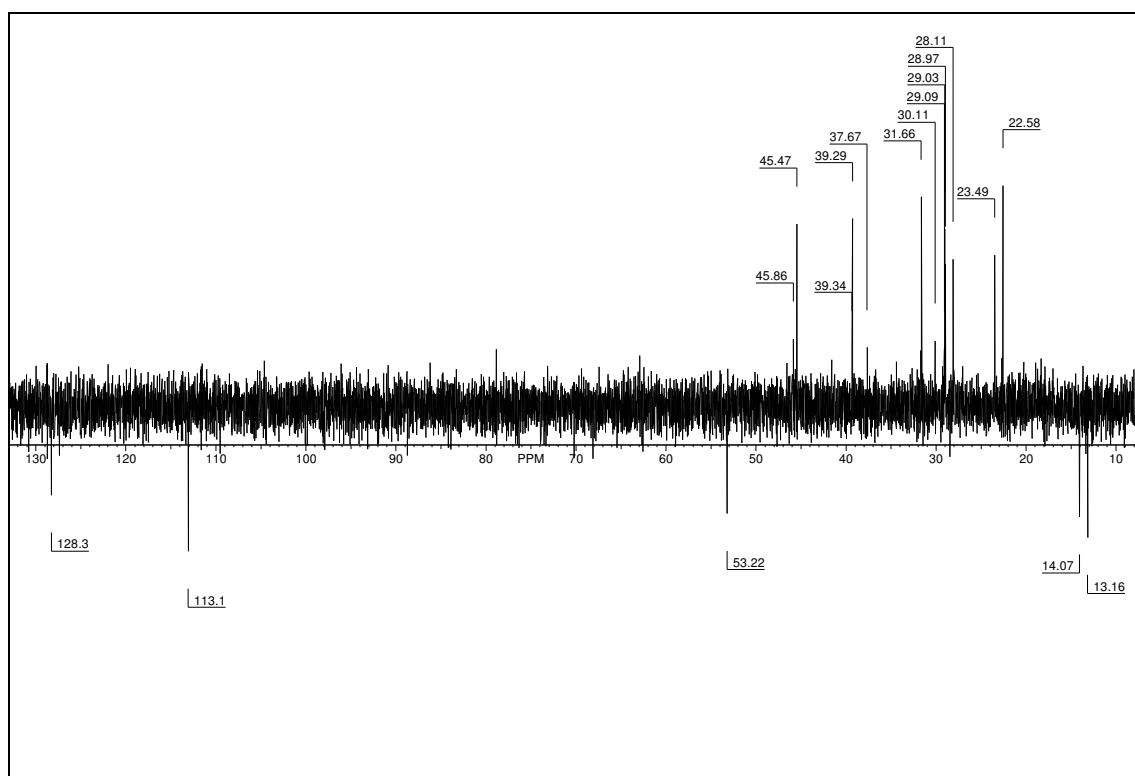
¹³C RMN (Producto sintético):

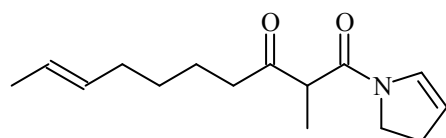


¹³C RMN (Producto natural):



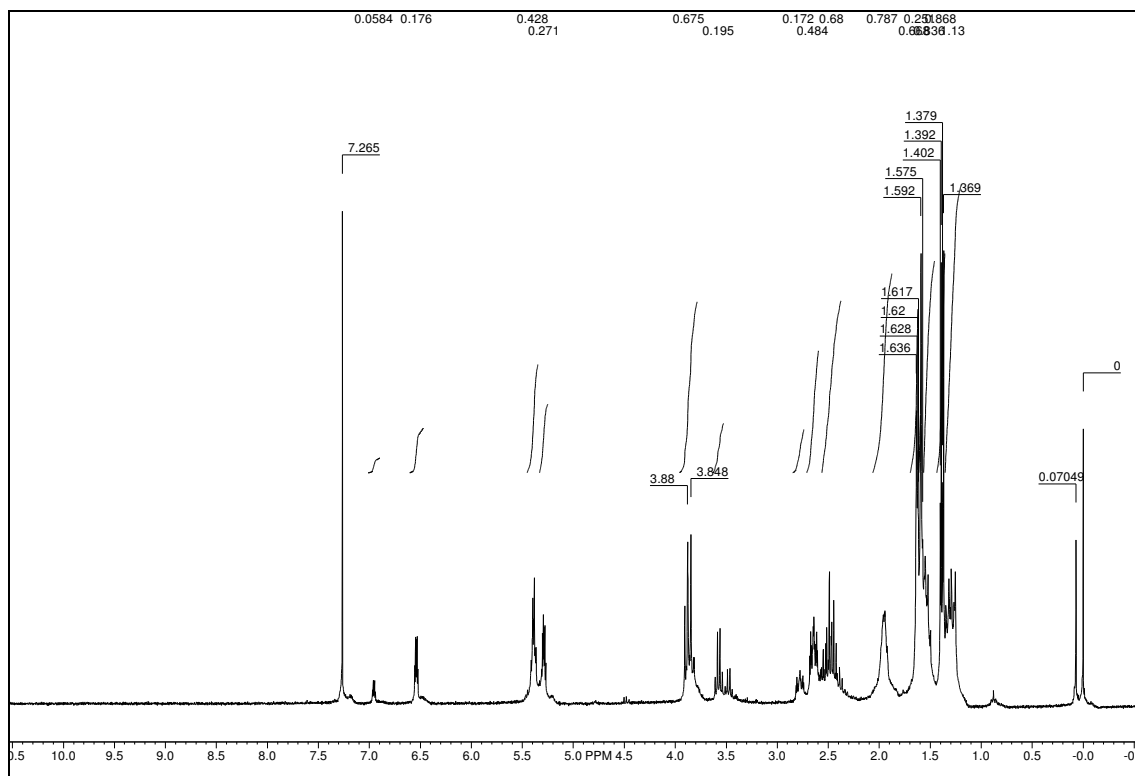
DEPT:



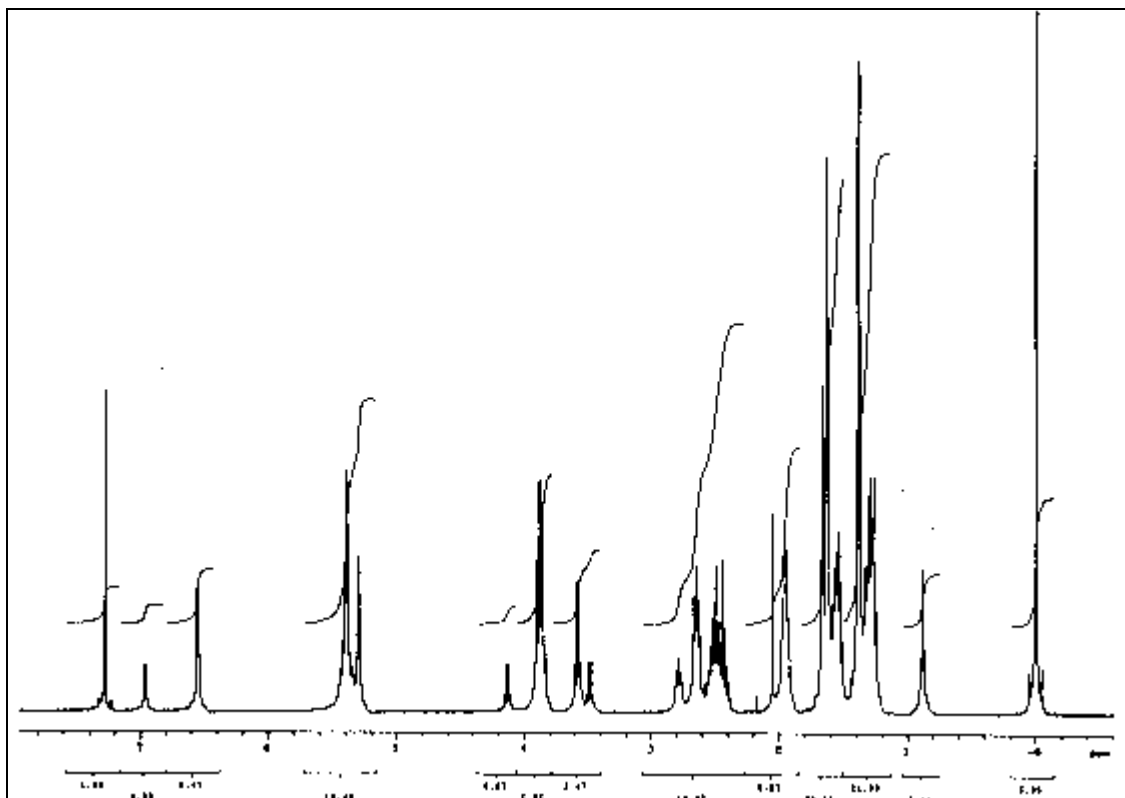


***N*-(2-Metil-3-oxodec-8-enoil)-2-pirrolina
4b**

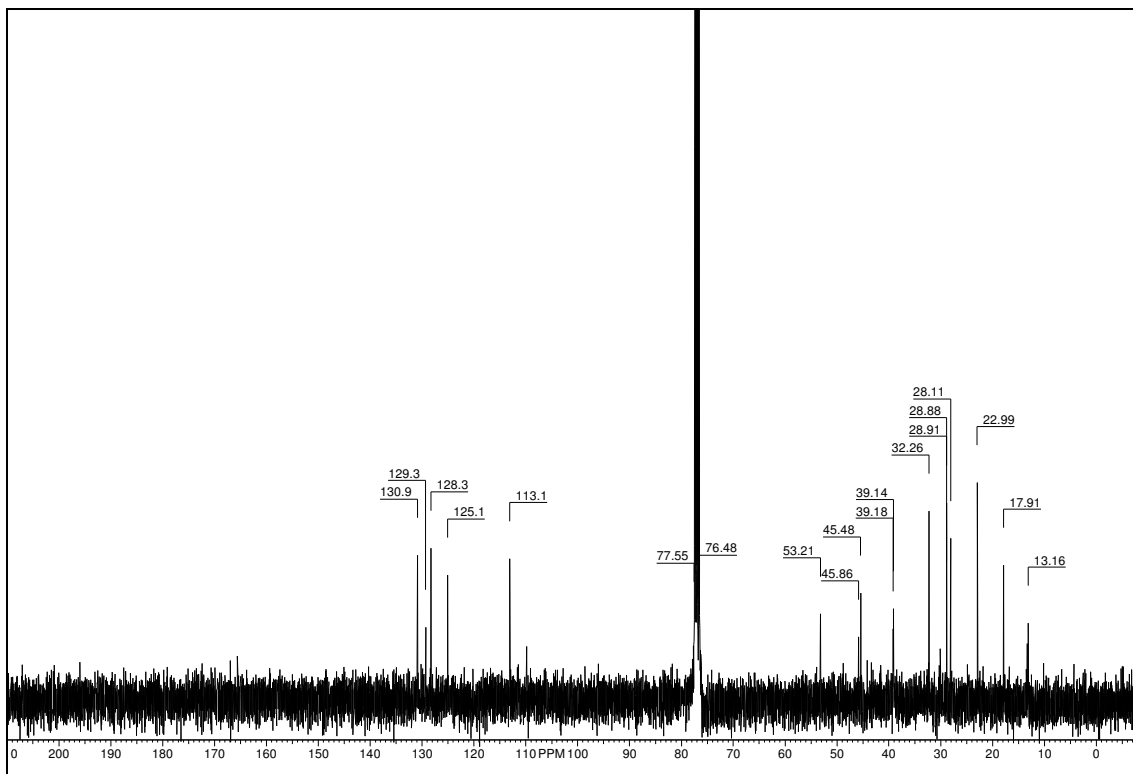
¹H RMN (Producto sintético):



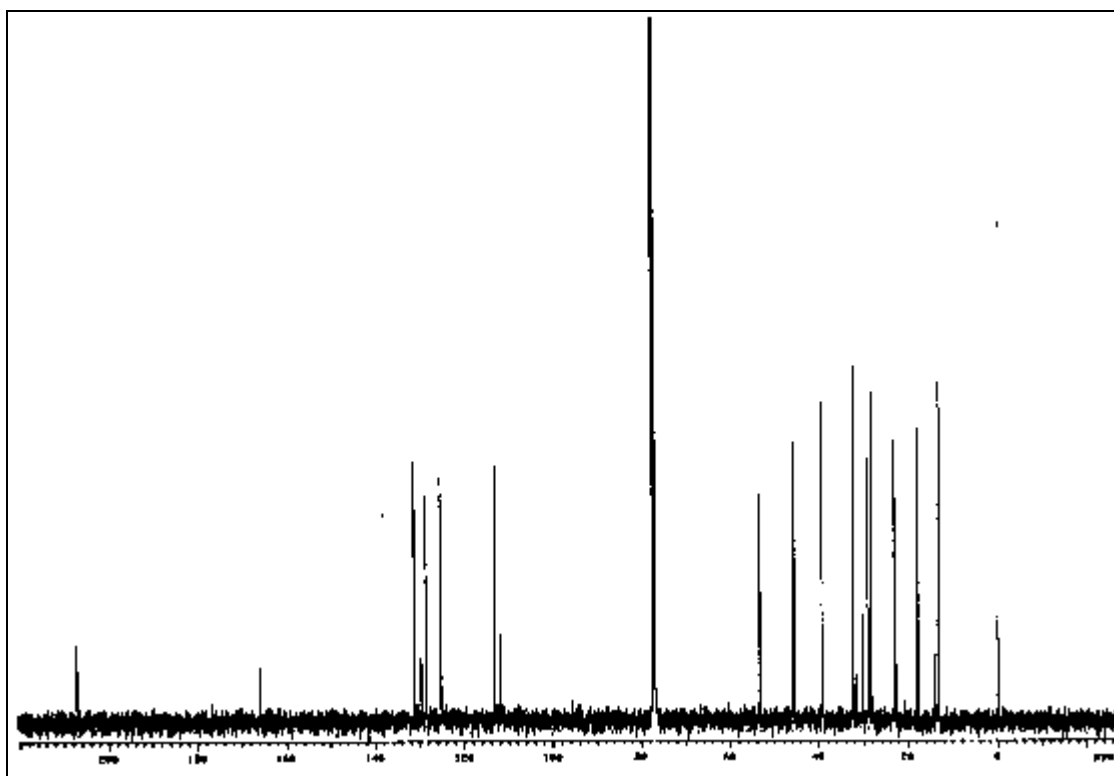
¹H RMN (Producto natural):

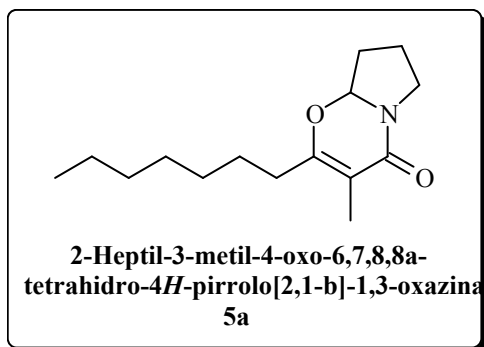


^{13}C RMN (Producto sintético):

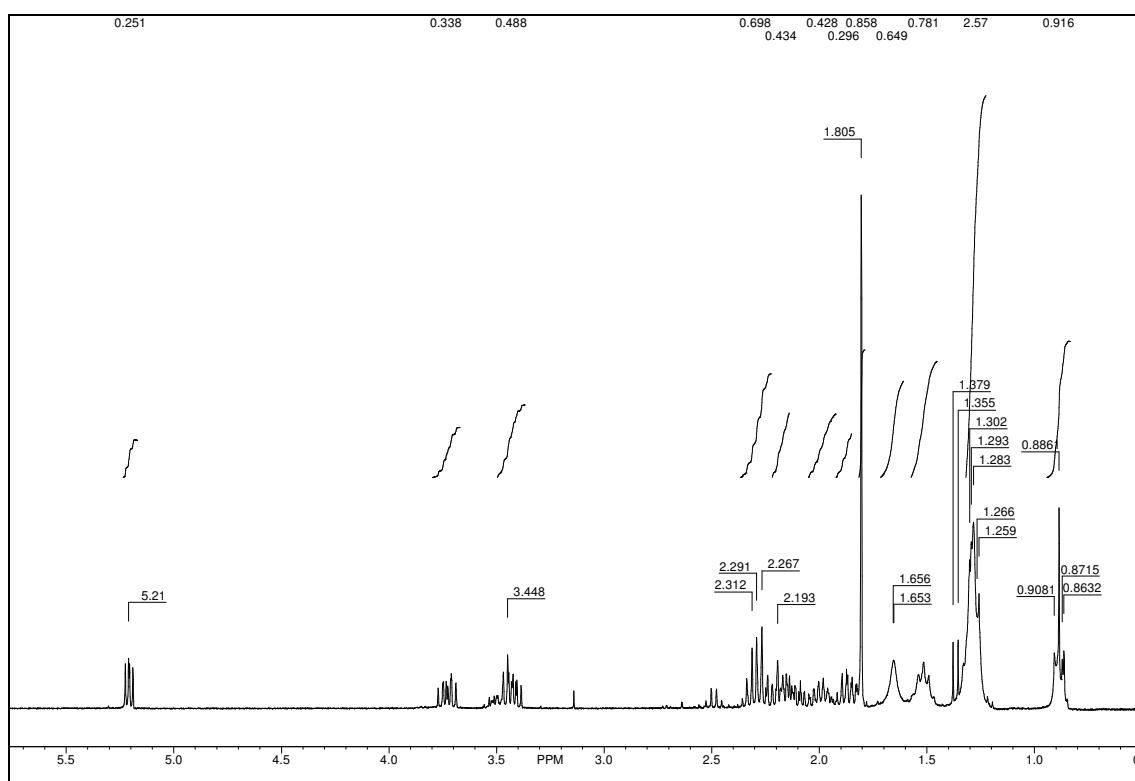


^{13}C RMN (Producto natural):

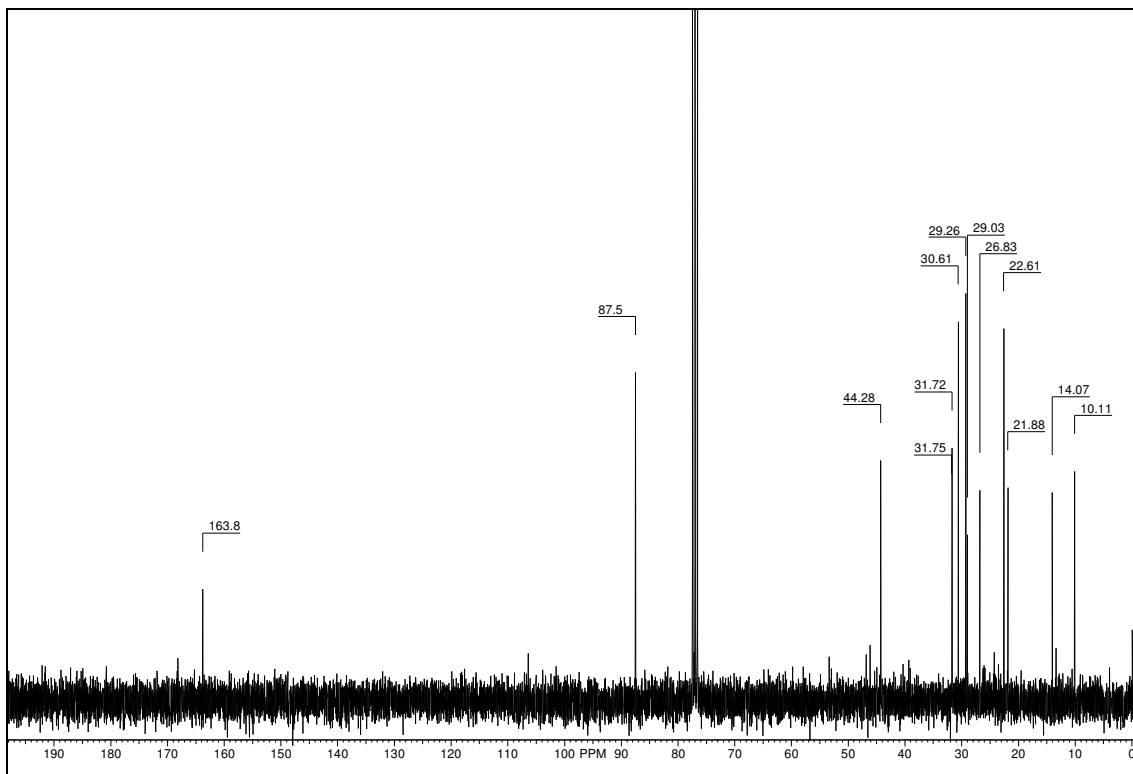




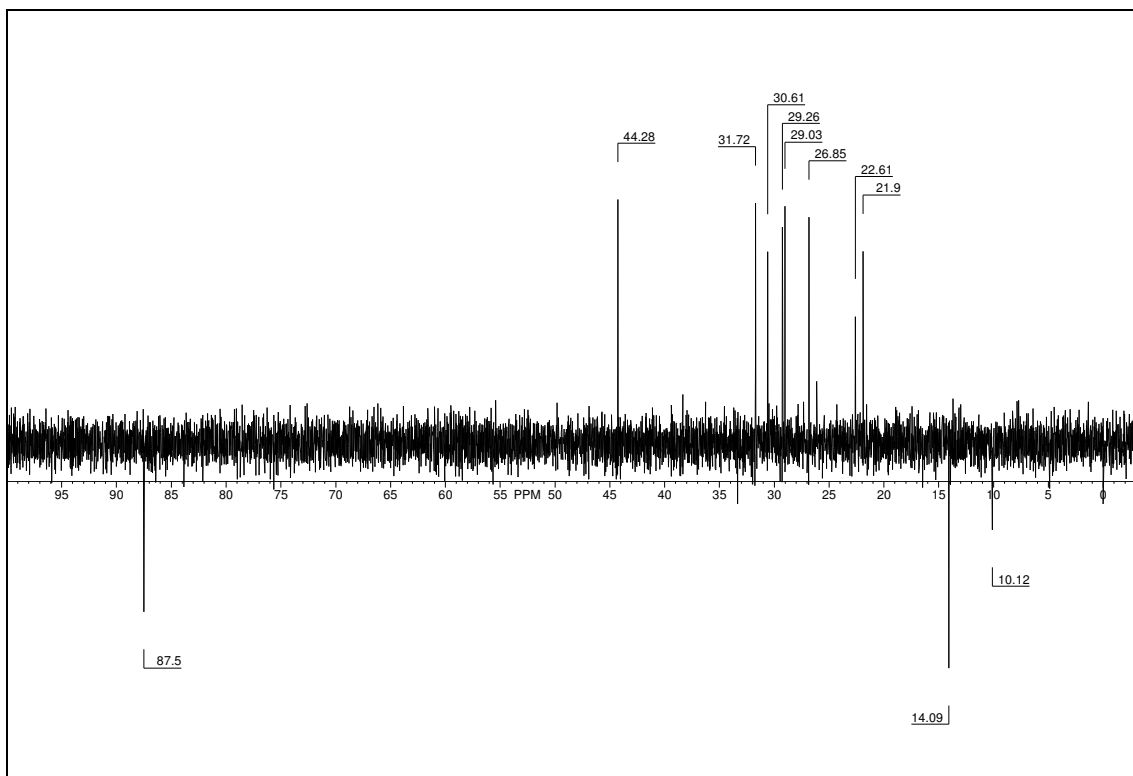
¹H RMN:

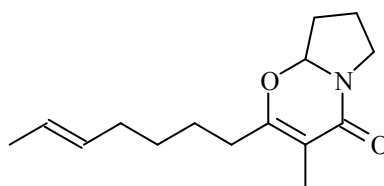


¹³C RMN:



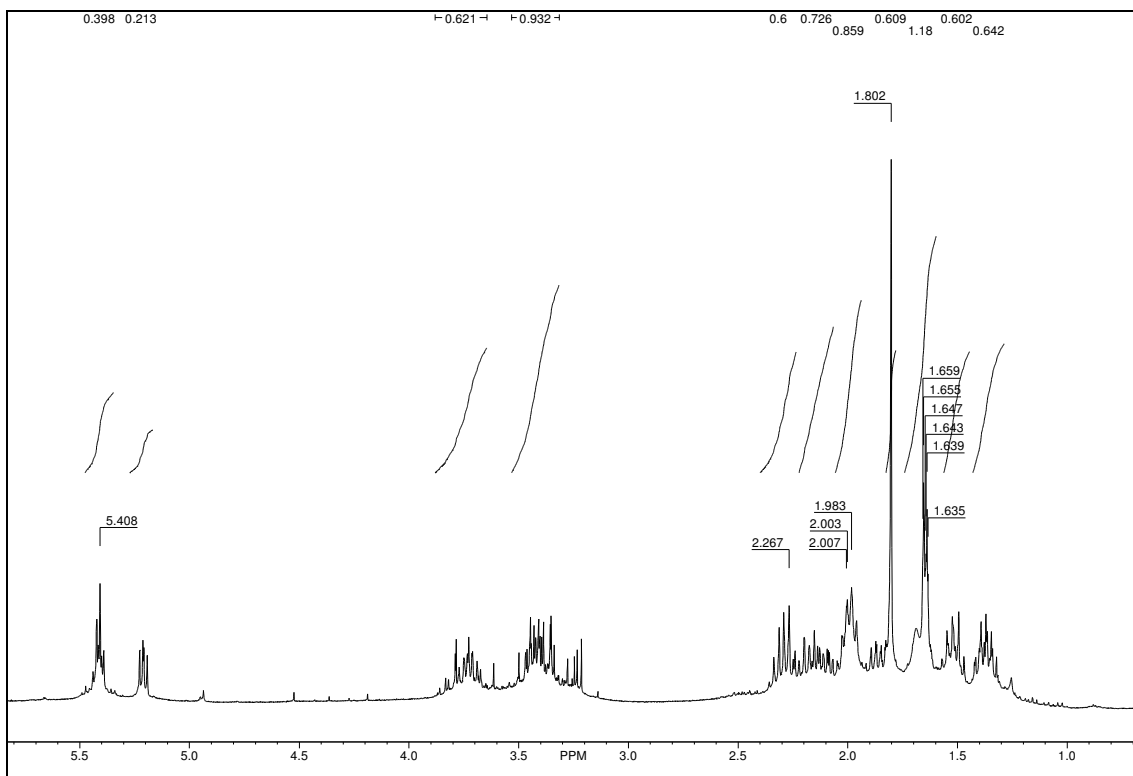
DEPT:



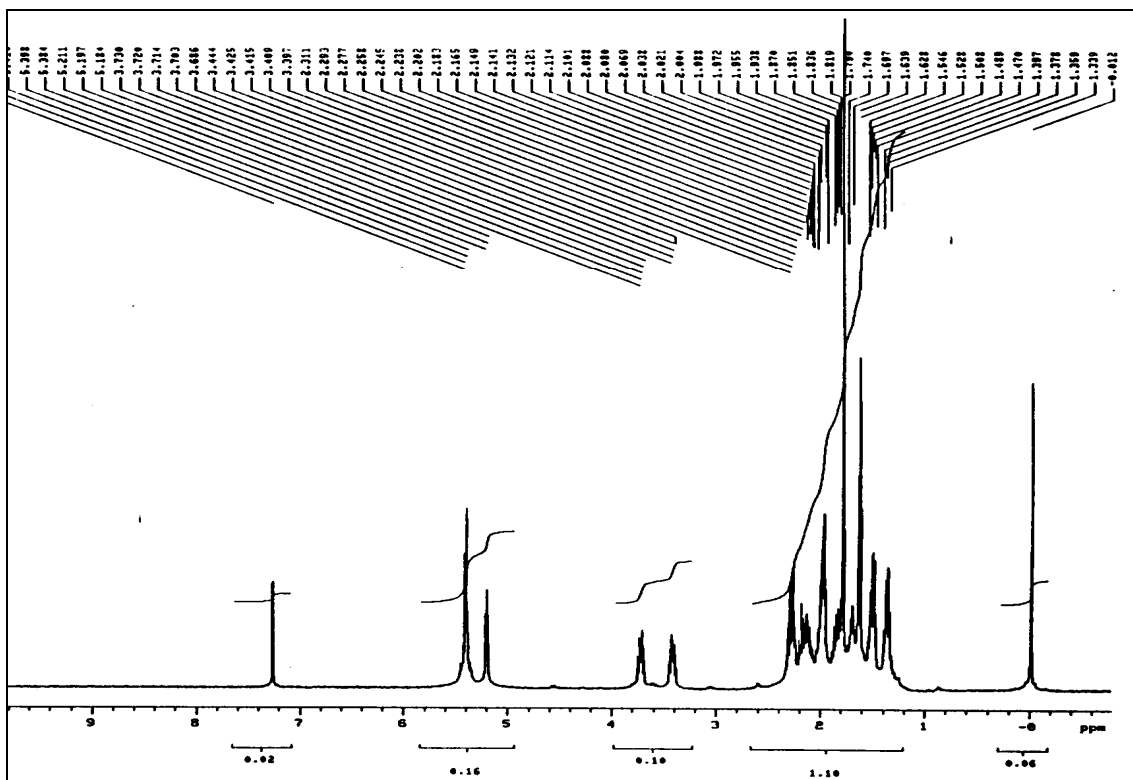


**2-Hept-8-enil-3-metil-4-oxo-6,7,8,8a-tetrahidro-
4H-pirrol[2,1-b]-1,3-oxazina, 5b**

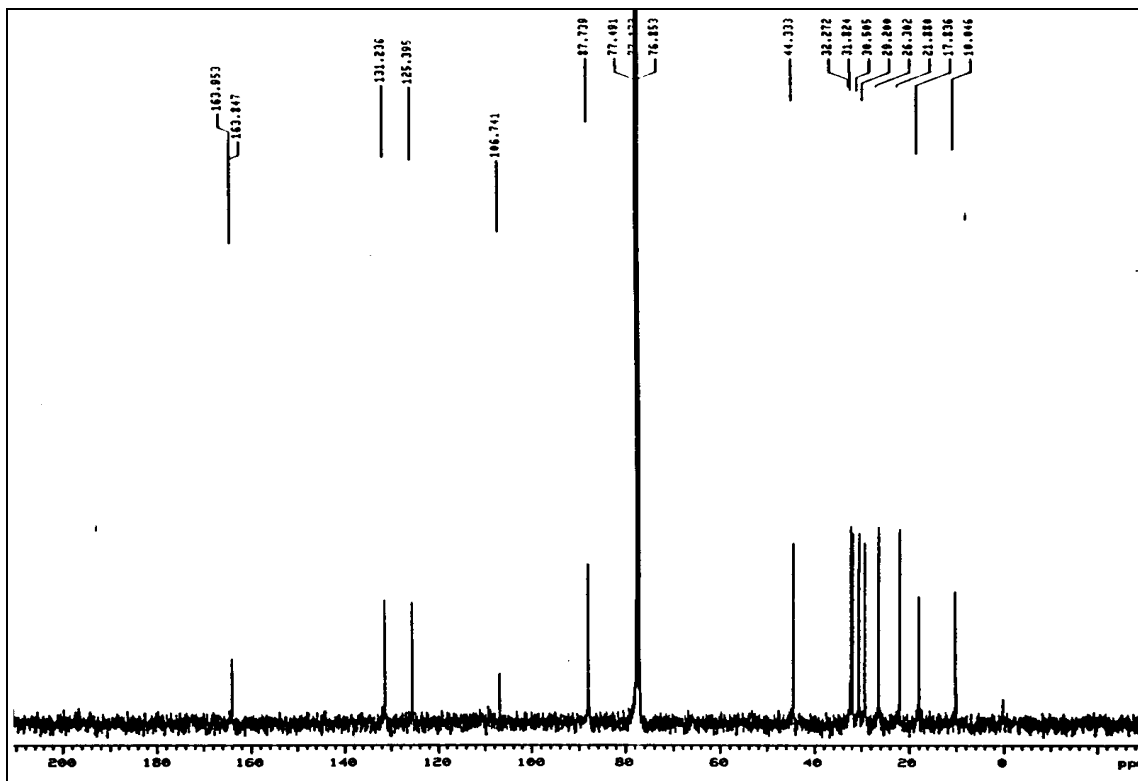
¹H RMN (Producto sintético):



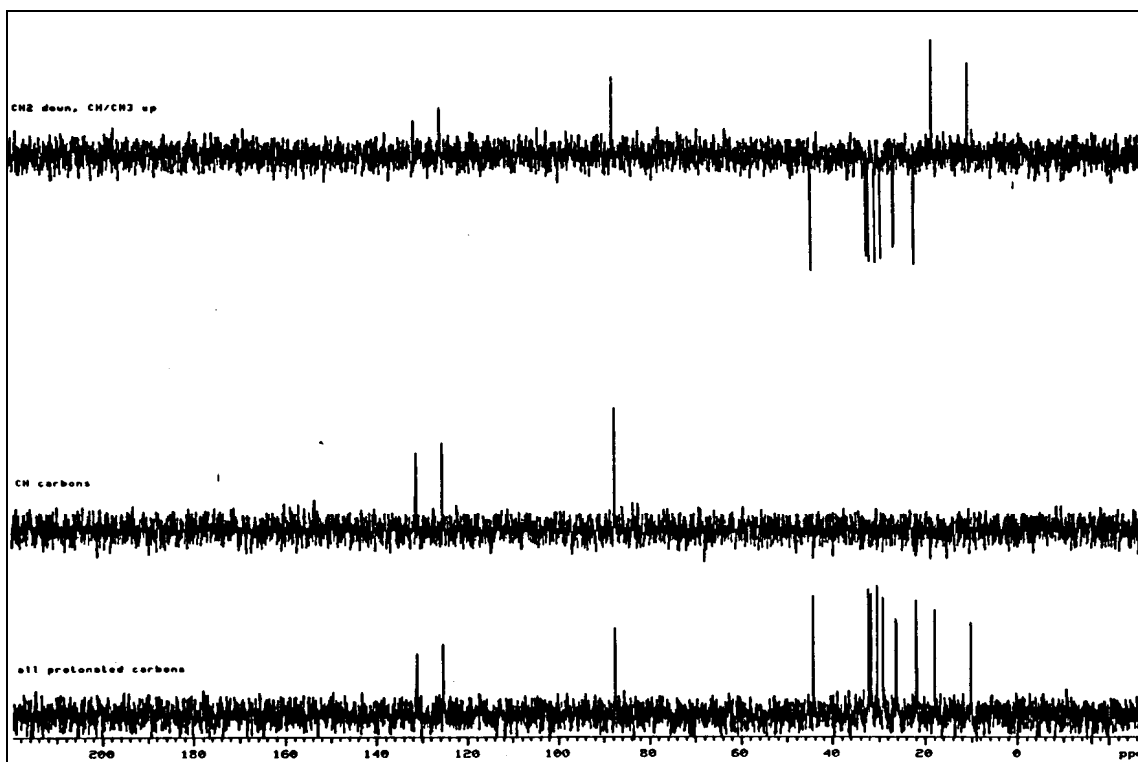
¹H RMN (Producto natural):



¹³C RMN (Producto natural):



DEPT (Producto natural):



Capítulo 4:
Obtención de Análogos
Sintéticos de los
Productos Naturales

4.1. Introducción

Como se ha descrito en el *capítulo 3*, la obtención de los distintos productos naturales no sólo permitió la confirmación de sus estructuras y actividades, sino que además proporcionó una vía sintética para la obtención de derivados con funcionalización similar, cambiando los sustituyentes introducidos en las diferentes etapas para poder utilizar todas estas nuevas estructuras como moléculas guía en la obtención de nuevas sustancias con actividades mejoradas, así como de los intermedios de la secuencia de reacciones.

La posibilidad de obtención de análogos es de gran importancia si se tiene en cuenta la dificultad de encontrar nuevos compuestos con actividad.

Así, con la idea de conseguir optimizar las actividades se llevaron a cabo tres tipos de variaciones:

- Modificación de la cadena lateral. El primer cambio consistió en sustituir la cadena lateral de siete carbonos (con o sin insaturación) presente en todos los productos naturales por otros sustituyentes.
- Introducción de anillos de cinco miembros con N distintos de la pirrolidina. Esta variación no sólo tenía por objetivo la obtención de nuevos análogos, sino que además se buscaba conseguir un sistema con mayor grado de oxidación y que en principio nos podía ayudar en el intento de obtención del resto de productos naturales.
- Sustitución de la agrupación β -cetoamida por la de amida monocarbonílica. Este cambio pretendía comprobar como influye la presencia de dos grupos carbonilo en la molécula y sus efectos sobre la actividad.

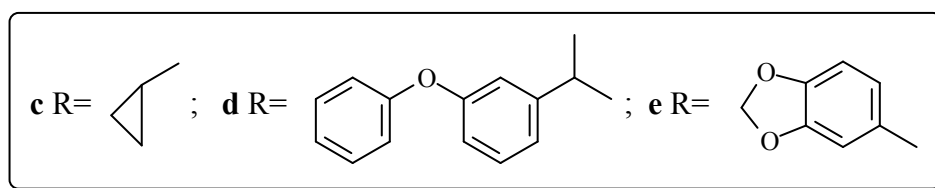
4.2. Resultados y Discusión

4.2.1.- Modificación de la cadena lateral

En este apartado se pretendía ver cómo se traducía en las actividades la sustitución de la cadena de ocho carbonos por otras cadenas laterales diferentes.

Tras realizar un detallado estudio bibliográfico se seleccionaron algunas agrupaciones que aparecen con frecuencia en productos activos. Así, se intentaba conseguir la optimización de actividades por combinación de los efectos producidos por estos grupos y los inherentes a los productos naturales aislados de *P. brevicompactum*. En la selección de estas estructuras se tuvo en cuenta su compatibilidad con las condiciones de reacción. En concreto, se reprodujo la secuencia sintética utilizando como sustituyentes el anillo ciclopropano (**c**), una agrupación fenoxifenil (**d**) y una agrupación metilendioxi (**e**):

Figura 4.1. Cadenas laterales para unir a la agrupación de β -cetoamida.

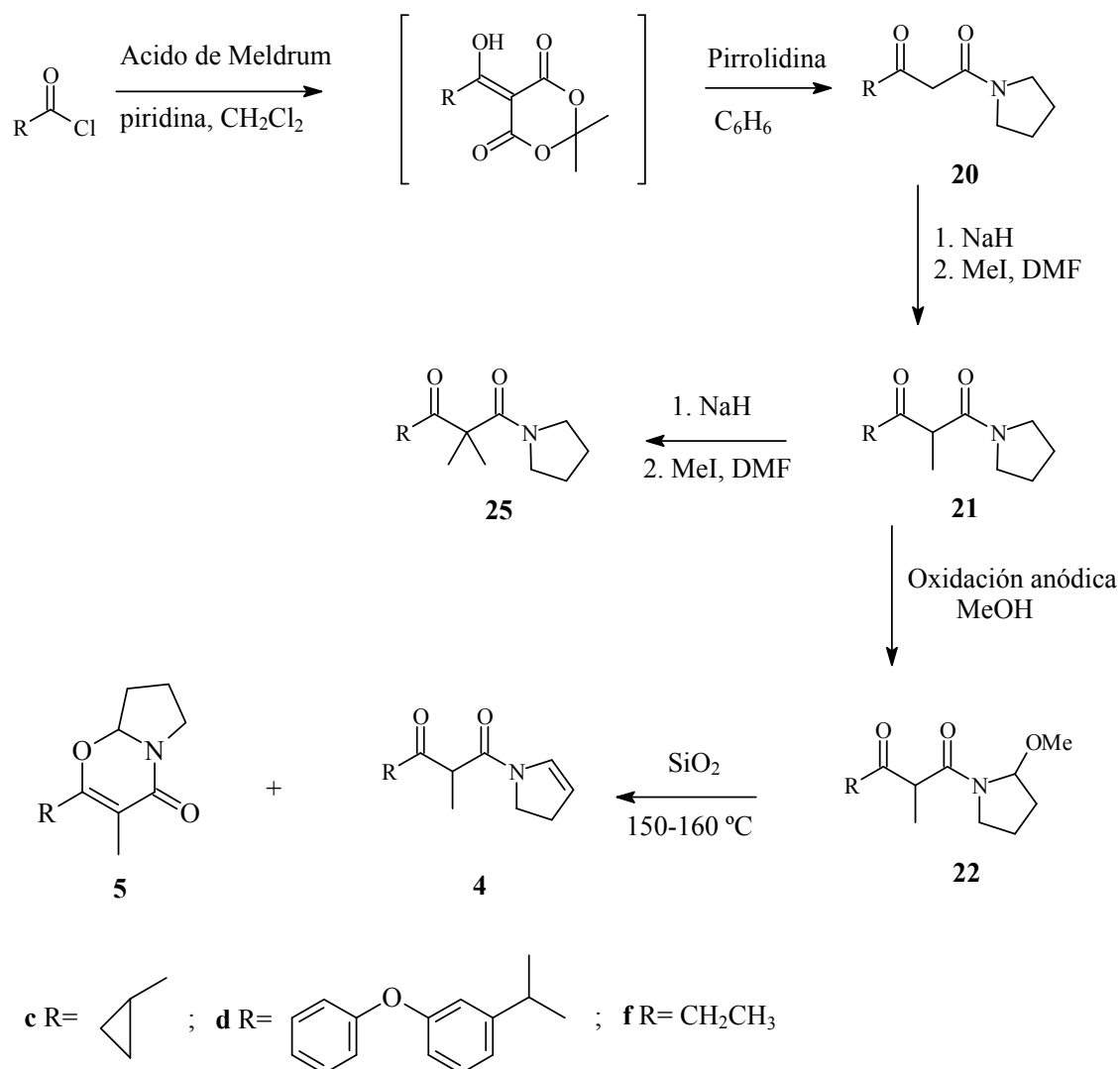


Para la fácil introducción de estos sustituyentes se hacía necesaria la presencia de un grupo ácido que permitiese llevar a cabo la acilación del ácido de Meldrum y según reflejaba la secuencia establecida. Por esta razón se eligieron como materiales de partida el ácido ciclopropanocarboxílico, el fenoprofeno (ácido 2-[3-fenoxifenil]propiónico) y el monosuccinato de 3,4-metilendioxifenilo (preparado por tratamiento del 3,4-metilendioxifenol con anhídrido succínico⁹²).

Conseguidos los cloruros de ácido correspondientes por tratamiento con SOCl_2 se procedió al desarrollo de la ruta sintética como se refleja en el *Esquema 4.1*.

⁹² Filloi, L., Martínez-Utrilla, R., Miranda, M.A., Morera, I.M. "Photochemical Versus Aluminium Chloride-Catalyzed Fries Rearrangement of Aryl Hydrogen Succinates. Synthesis of 2(3H)-Furanones". *Monatshefte für Chemie* **1989**, 120, 863-70.

Esquema 4.1. Secuencia de reacciones para la obtención de análogos sintéticos.



Así, como había ocurrido en la preparación de los productos naturales, una vez formado el intermedio acilado del ácido de Meldrum correspondiente a cada cadena lateral, se sometió a condiciones de aminólisis con pirrolidina a reflujo de benceno⁹³. Concluida la etapa de metilación^{94,95}, se sometieron las β-cetoamidas obtenidas a

⁹³ Pak, C.S., Yang, H.C., Choi, E.B. "Aminolysis of 5-Acyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-diones (Acyl Meldrum's Acids) as a Versatile Method for the Synthesis of β-Oxo Carboxamides". *Synthesis*, **1992**, 1213-4.

⁹⁴ a) Abad, A., Agulló, C., Arnó, M., Cantín, A., Cuñat, A.C., Meseguer, B., Zaragoza, R.J. "Stereoselective Synthesis of (-)-Metasequoic Acid B". *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 1837-43.

b) Benetti, S., Romagnoli, R. "Mastering β-Keto Esters". *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 1065-1114.

⁹⁵ En el caso del sustrato ciclopropanado además del producto monometilado, se preparó el sustrato correspondiente a la introducción por separado de dos unidades C₁.

oxidación anódica⁹⁶ según las condiciones previamente establecidas. Por último, la eliminación de metanol⁹⁷ por calentamiento tras absorción sobre SiO₂ debía conducir a la enamida y la oxazina análogas a las naturales.

La incorporación del anillo de ciclopropano a la estructura no supuso ningún problema a la hora de llevar a cabo la reproducción de la secuencia y todos los productos, incluso los análogos a los naturales, se obtuvieron según lo esperado.

En el caso de la cadena de fenoxifenilo, se realizó la reacción de acilación del ácido de Meldrum sin más problemas que los derivados de su purificación, pues el gran número de subproductos de reacción obtenidos en la reacción nos impidió el aislamiento del correspondiente producto dicarbonílico totalmente puro. Tras la metilación se obtuvo por separado el producto monometilado (**21d**) y el correspondiente a la introducción de dos unidades C₁ (**25d**) como producto secundario de reacción. En este punto cabe resaltar que la introducción de un nuevo centro asimétrico condujo a la obtención de dos diastereómeros que pudieron ser separados en la purificación por cromatografía de columna, pero que fueron reunidos de nuevo para realizar la posterior reacción.

⁹⁶ a) Shono, T., "Electroorganic Chemistry in Organic Synthesis". *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *40*, 811-50. b) Shono, T., Matsumura, Y., Tsubata, K., Sugihara, Y., Yamane, S., Kanazawa, T., Aoki, T. "Electroorganic Chemistry. Electroorganic Synthesis of Enamides and Enecarbamates and Their Utilization in Organic Synthesis". *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 6697-703. c) Shono, T., Matsumura, Y., Tsubata, K., Sugihara, Y. "A New Method of Acylation at α -Position of Aliphatic Amines". *Tetrahedron Lett.*, **1982**, *23*, 1201-4. d) Shono, T., Hamaguchi, H., Matsumura, Y. "Electroorganic Chemistry. Anodic Oxidation of Carbamates". *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 4262-8. e) Shono, T., Matsumura, Y., Tsubata, K. "Electroorganic Chemistry. A New Carbon-Carbon Bond Forming Reaction at the α -Position of Amines Utilizing Anodic Oxidation as a Key Step". *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 1172-6. f) Shono, T., Matsumura, Y., Tsubata K. "A New Synthetic Method of α -Amino Acids from α -Methoxyurethanes". *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22*, 2411-2. g) Palasz, P.D., Utley, J.H.P., Hardstone, J.D. "Electro-organic Reactions. Regioselectivity and the Stereochemistry of Anodic Methoxylation of N-Acylpiperidines and N-Acylmorpholines". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1984**, 807-13.

⁹⁷ a) Slomczynska, U., Chalmers, D.K., Cornille, F., Smythe, M.L., Beusen, D.D., Moeller, K.D., Marshall, G.R. "Electrochemical Cyclization of Dipeptides to Form Novel Bicyclic, Reverse-Turn Peptidomimetics. Synthesis and Conformational Analysis of 6,5-Bicyclic Systems". *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 1198-204; b) Cornille, F., Fobian, Y.M., Slomczynska, U., Beusen, D.D., Marshall, G.R., Moeller, K.D. "Anodic Amide Oxidations: Conformationally Restricted Peptide Building Blocks from the Direct Oxidation of Dipeptides". *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 6889-992; c) Cornille, F., Slomczynska, U., Smythe, M.L., Beusen, D.D., Marshall, G.R., Moeller, K.D. "Electrochemical Cyclization of Dipeptides toward Novel Bicyclic, Reverse-Turn Peptidomimetics. Synthesis and Conformational Analysis of 7,5-Bicyclic Systems". *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 909-17; d) Moeller, K.D., Rutledge, L.D. "Anodic Amide Oxidations: The Synthesis of Two Spirocyclic L-Pyroglutamide Building Blocks". *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 6360-3; e) Moeller, K.D., Hanau, C.E., Avignon, A. "The Use of HMQC-TOCSY Experiments for Elucidating the Structures of Bicyclic Lactams: Uncovering a Surprise Rearrangement in the Synthesis of a Key PRO-PHE Building Block". *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 825-8.

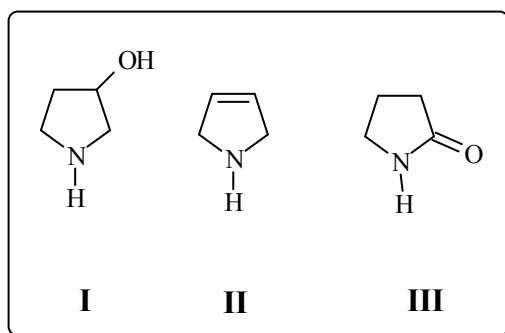
La subsiguiente oxidación anódica del anillo condujo a la introducción de un nuevo estereocentro, y por consiguiente a de seis estereoisómeros diferentes. Este hecho, junto con la aparición de productos derivados de la oxidación del anillo de fenol, hicieron que como resultado de dicha oxidación anódica se obtuviese una mezcla de difícil resolución, lo que unido a los bajos rendimientos de la reacción de oxidación no permitió el aislamiento de los productos metoxilados. Por consiguiente, no se continuó con la etapa final de eliminación de metanol que concluiría con la obtención de los análogos a los productos naturales.

Por razones análogas se desistió en el intento de reproducir la secuencia con la agrupación metilendioxfenol, pues el intento de oxidación anódica sobre el producto monocarbonílico (*vide supra*) condujo a una mezcla de productos derivados de la oxidación del anillo fenólico.

4.2.2.- Introducción de anillos nitrogenados de cinco miembros distintos de la pirrolidina

Como ya se ha comentado, esta variación no sólo tenía como objetivo la consecución de nuevos análogos, sino que se buscaba también la posibilidad de introducir un grado de oxidación más en el anillo de cinco miembros. Para este fin, se escogieron los anillos de 3-hidroxipirrolidina (I), 3-pirrolina (II) y 2-pirrolidona (III), todos ellos comerciales.

Figura 4.2. Anillos de cinco miembros con un átomo de N utilizados para la sustitución de la pirrolidina.

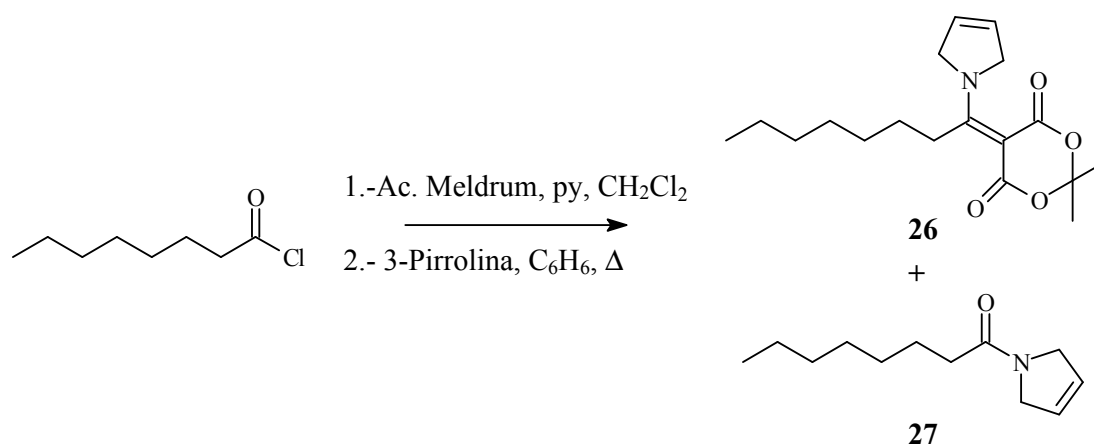


La utilización del 3-hidroxipirrolidina en las condiciones de aminólisis del derivado acilado del ácido de Meldrum condujo, como cabría esperar, a productos

donde además de la aminólisis deseada se producía la esterificación correspondiente a través del grupo hidroxilo presente.

En el caso de la 3-pirrolina se observó formación preferente de la enamina resultante del ataque al grupo carbonilo cetónico presente en el intermedio, en lugar de la β -cetoamida correspondiente por eliminación de acetona y CO_2 . La enamina **26**, aislada junto a la *N*-octanoil-3-pirrolina (**27**) (derivada de la acilación directa del anillo con el exceso de cloruro de ácido presente en el medio de reacción), se caracterizaba en el espectro de ^1H RMN por la aparición a $\delta = 6.0$ y 5.9 ppm de las señales correspondientes a los protones sobre el doble enlace del anillo de cinco; a $\delta = 4.6$ y 4.5 ppm aparecían los protones contiguos al doble enlace; y a $\delta = 1.7$ ppm el singlete que integraba seis protones correspondientes a los dos metilos. Por su parte el ^{13}C RMN junto con el experimento de DEPT confirmaron la presencia de dos grupos carbonilo a $\delta = 180.3$ y 162.2 ppm, de muy diferente intensidad (debidas a tres carbonilos: el del doble enlace que soporta la amina y los dos grupos carbonilo); también se apreciaban dos señales olefínicas debidas a los grupos CH del doble enlace del anillo (a $\delta = 126.1$ y 122.3 ppm), y otras dos de carbonos cuaternarios asignadas a los presentes en el anillo de seis (a $\delta = 101.8$ y 82.0 ppm); por último, el DEPT dejaba constancia de la presencia de los dos metilos, que daban lugar a una señal muy intensa a $\delta = 26.0$ ppm.

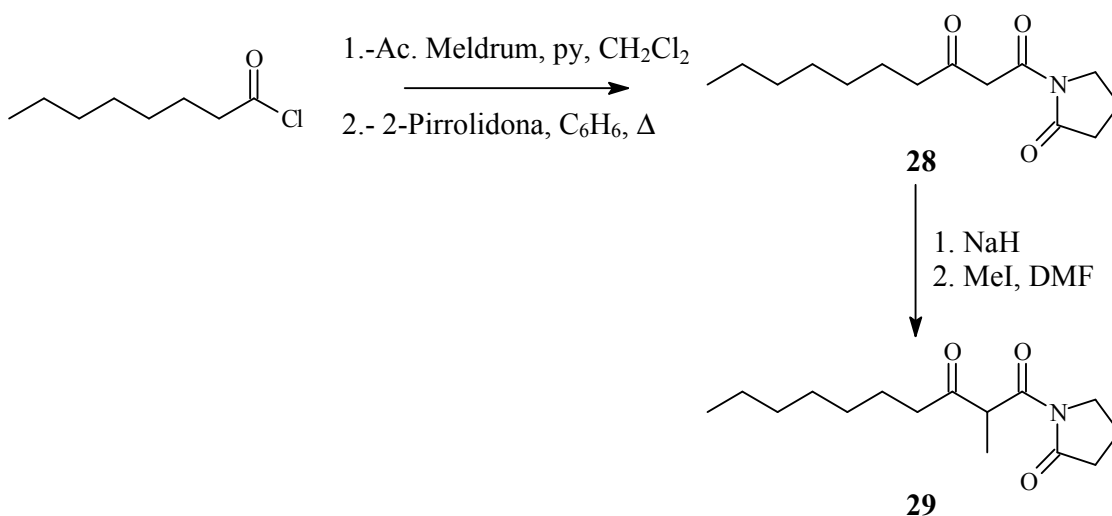
Esquema 4.2. Productos derivados de la aminólisis del derivado acilado del ácido de Meldrum con 3-pirrolina.



Este resultado hizo descartar desde un principio la utilización de la 3-pirrolina para la obtención de otros análogos.

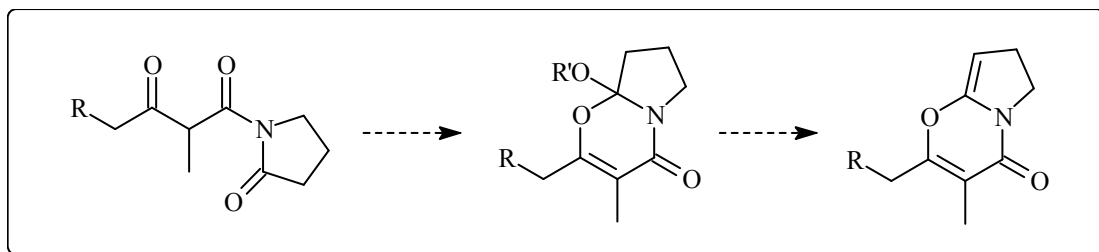
El tercer anillo a probar era el de 2-pirrolidona sobre el que existían ciertas dudas debidas a la naturaleza de la función amida, con la pérdida de nucleofilia del átomo de N que ello supone. Sin embargo, y en contra de lo que se podía pensar en un principio, la *N*-(3-oxodecanoil)-2-pirrolidona (**28**) se obtuvo con buenos rendimientos por reacción del derivado acilado del ácido de Meldrum con la 2-pirrolidona a reflujo de benceno⁹³; el producto metilado (**29**) también se obtuvo satisfactoriamente, según las condiciones previamente establecidas⁹⁴.

Esquema 4.3. Introducción del anillo de 2-pirrolidona.



Obteníamos de esta forma una estructura con una función oxigenada, al igual que en el producto metoxilado, pero de mayor grado de oxidación en el anillo; su ciclación podría en principio conducir a un producto hemiacetálico, que nos proporcionaría la posibilidad de introducir nueva funcionalización en el anillo.

Figura 4.3. Introducción de un mayor grado de oxidación en el anillo de cinco por ciclación del derivado con 2-pirrolidona.



No obstante, y pese a los intentos realizados tanto en medio ácido como en medio básico, no se consiguió que la reacción intramolecular tuviera lugar. La *Tabla I*

recoge esquemáticamente las diferentes condiciones a que se sometió el sustrato con ánimo de conseguir la ciclación y los productos obtenidos.

Tabla I. Condiciones de reacción para la ciclación intramolecular de la *N*-(2-metil-3-oxodecanoil)-2-pirrolidona (29).

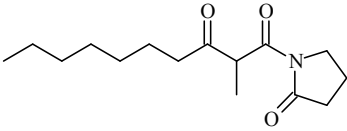
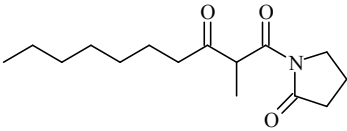
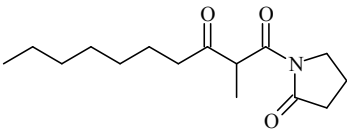
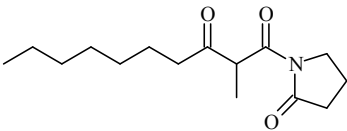
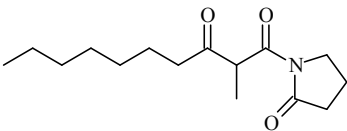
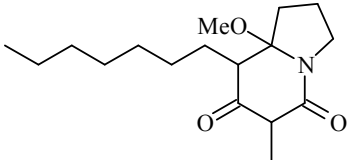
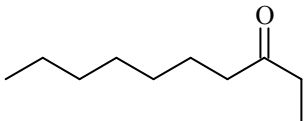
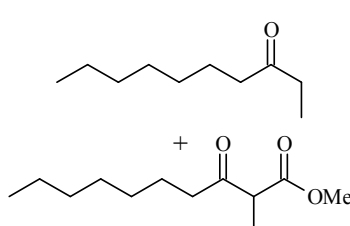
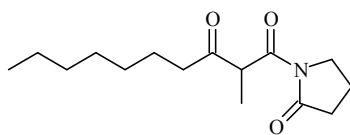
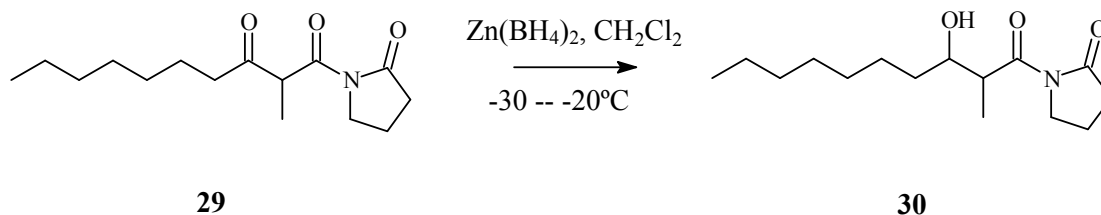
| CATALIZADOR | TEMPERATURA | DISOLVENTE | PRODUCTO |
|-------------------|-------------|---------------------------------|---|
| SiO ₂ | 150-160° C | -- |  |
| HZSM-5 | t.a. | CH ₂ Cl ₂ |  |
| HZSM-5 | reflujo. | CH ₂ Cl ₂ |  |
| Ac. Polifosfórico | t.a. | CH ₂ Cl ₂ |  |
| Ac. Polifosfórico | reflujo | CH ₂ Cl ₂ |  |
| KOH | t.a. | MeOH |  |
| KOH | reflujo | MeOH |  |

Tabla I (Cont.). Condiciones de reacción para la ciclación intramolecular de la *N*-(2-metil-3-oxodecanoil)-2-pirrolidona (29).

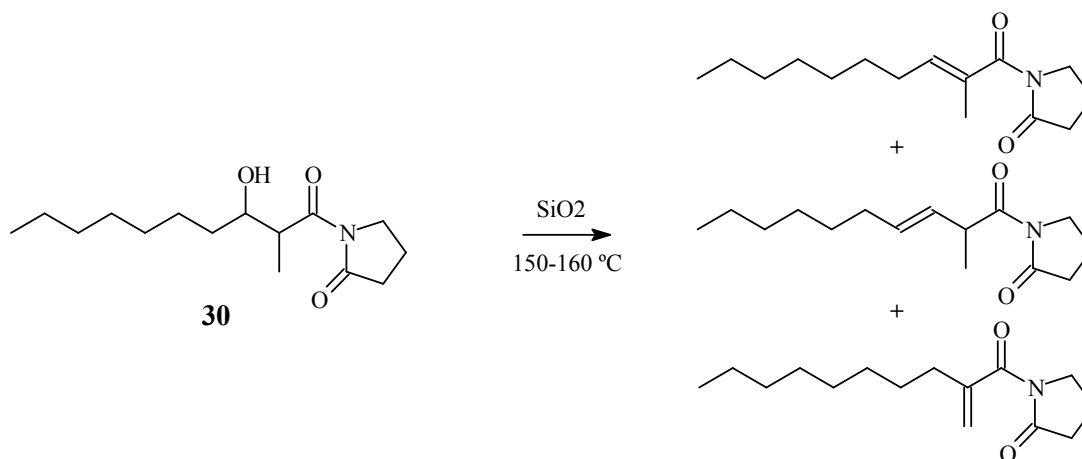
| CATALIZADOR | TEMPERATURA | DISOLVENTE | PRODUCTO |
|-------------|--------------|------------|---|
| LiOH | t.a. | MeOH |  |
| t-BuOK | t.a. | DMF | ? |
| n-BuLi | -20 -- -0° C | THF |  |

Como puede observarse, el sustrato permaneció inalterado en condiciones ácidas y únicamente en condiciones básicas sufrió algún tipo de modificación: la mayoría de condiciones conducen a descarboxilación debido a la presencia de la agrupación β -dicarbonílica. Sólo en el caso del tratamiento con KOH/MeOH/t.a. se obtuvo el producto de ciclación interna a través de la forma enólica del carbonilo de cetona, pero ésta no se produjo por el oxígeno, sino por el carbono en α al carbonilo.

Vistos estos resultados, se intentó la reducción regioselectiva del carbonilo de cetona; ello proporcionaría un hidroxilo que podría participar en un ataque nucleofílico sobre el carbonilo de imida presente en el anillo de cinco.

Figura 4.4. Reducción regioselectiva del carbonilo de cetona.

Las reducciones de cetonas en presencia de amidas⁹⁸ aparecen descritas en la bibliografía utilizando distintos reactivos derivados del NaBH_4 ; sin embargo de todos ellos sólo el $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$, preparado según el método descrito por Gensler⁹⁹, aportó resultados positivos conduciendo a la β -hidroximida deseada **30**.

Figura 4.5. Deshidratación del producto reducido 30.

Pese a conseguir el posible precursor para la ciclación, ésta no se alcanzó, ya que en su lugar se obtuvieron mezclas de los diferentes productos de deshidratación (eventualmente con migración del doble enlace formado).

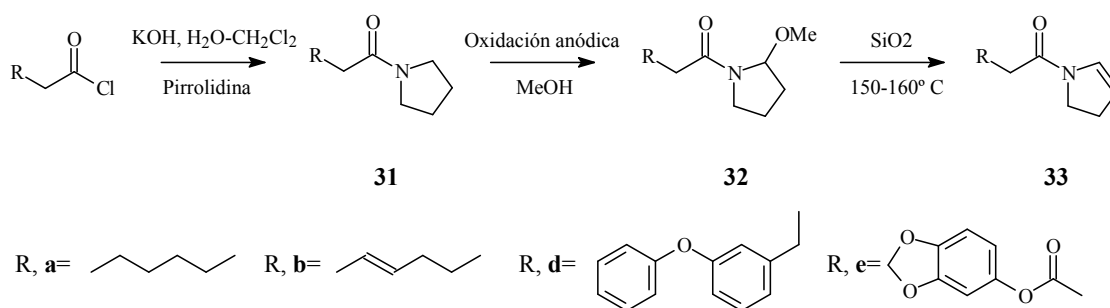
⁹⁸ a) Evans, D.A., DiMare, M. "Asymmetric Synthesis of Premonensin, a Potential Intermediate in the Biosynthesis of Monensin". *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 2476-8. b) Evans, D.A., Ennis, M.D., Le, T. "Asymmetric Acylation Reactions of Chiral Imide Enolates. The First Direct Approach to the Construction of Chiral β -Dicarbonyl Synthons". *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 1154-6. c) Nakata, T., Kuwabara, T., Tani, Y., Oishi, T. "Total Synthesis of (\pm)-Oudemansin". *Tetrahedron Lett.*, **1982**, *23*, 1015-6. d) Nakata, T., Oishi, T. "Stereoselective Reduction of β -Keto Esters with Zinc Borohydride. Stereoselective Synthesis of Erythro-3-hydroxy-2-alkylpropionates". *Tetrahedron Lett.*, **1980**, *21*, 1641-4. e) Saksena, A.K., Mangiaracina, P. "Recent Studies on Veratrum Alkaloids: a New Reaction of Sodium Triacetoxyborohydride [$\text{NaBH}(\text{OAc})_3$]". *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 273-6. f) Eguchi, S., Suzuki, T., Okawa, T., Matsushita, Y. "Synthesis of Optically Active Vasicinone Based on Intramolecular aza-Wittig Reaction and Asymmetric Oxidation". *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 7316-9.

⁹⁹ a) Gensler, W.J., Johnson, F., Sullivan, W.F. "Compounds Related to Podophyllotoxin. XI. An Unusual Stobbe Condensation". *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 6070-4. b) Wiberg, E. "Nevere Ergebnisse der präparativen Hydrid-Forschung". *Angew. Chem.* **1953**, *63*, 16-33.

4.2.3.- Sustitución de la agrupación β -dicarbonílica por la monocarbonílica

Una característica común de muchos de los productos preparados era la presencia de agrupaciones β -cetoamida en sus estructuras. Es por ello que, a la hora de preparar análogos a los productos naturales, parecía interesante ver la influencia de esta agrupación en la actividad. Con este objetivo, se decidió la síntesis de sustancias análogas, pero omitiendo las etapas de introducción del segundo carbonilo y alquilación.

Esquema 4.4. Preparación de enamidas monocarbonílicas.



La preparación de las amidas monocarbonílicas se realizó por tratamiento de la amina en medio básico y adición posterior del correspondiente cloruro de ácido, según la síntesis de Schotten-Baumann¹⁰⁰. Las etapas de oxidación del anillo de pirrolidina⁹⁶ y posterior eliminación de MeOH⁹⁷ se llevaron a cabo de acuerdo a las condiciones previamente establecidas para los compuestos dicarbonílicos.

Esta alteración en la secuencia tenía como consecuencias inmediatas:

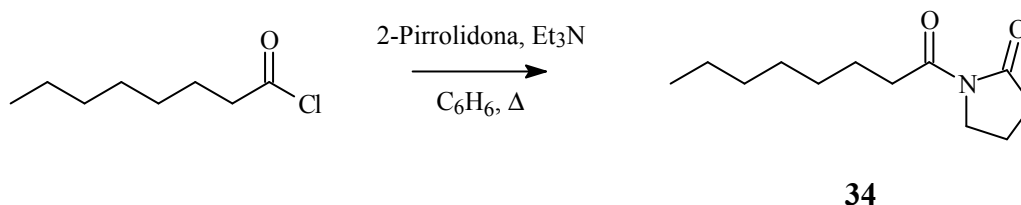
- La ausencia de centros asimétricos (excepto en el derivado del fenoprofeno), hasta la reacción electroquímica; sin embargo, a pesar de no existir diastereómeros, sí se podía apreciar el mismo efecto de duplicidad en las señales atribuido al fenómeno de inversión de la amida.
- La presencia de un único grupo carbonilo hacía imposible la aparición del producto bicíclico análogo al natural, obteniéndose en la reacción de eliminación únicamente la enamida correspondiente.

¹⁰⁰ Furniss, B.S., Hannaford, A.J., Smith, P.W.G., Tatchell, A.R. "Vogel's. Textbook of Practical Organic Chemistry". 5th Edition. Longman Scientific & Technical. Great Britain, 1989. Págs. 916-7.

Como se ha comentado en apartados anteriores (*vide supra*), en los sustratos con sistemas fenólicos se detectó que la reacción electroquímica causaba no solo la introducción del grupo metoxilo en el anillo de pirrolidina, sino que además producía la oxidación de los sistemas aromáticos. Este hecho hizo muy difícil el aislamiento del producto metoxilado derivado del fenoprofeno (**32d**), y que no se llegase a apreciar la existencia de su análogo con la agrupación metilendioxfenol, donde parece que el efecto es más acusado.

Dentro de este bloque, y combinando dos de las variaciones propuestas sobre las estructuras activas encontradas, se preparó la imida correspondiente por calentamiento a reflujo de benceno de la 2-pirrolidona y el cloruro de octanoilo en presencia de Et_3N ¹⁰¹.

Esquema 4.5. Preparación de la N-octanoil-2-pirrolidona.



4.3. Actividades Biológicas

Como se comentó con anterioridad, el fin que se buscaba con la preparación de estos compuestos análogos a los naturales era una optimización de las actividades mostradas por éstos, así como por sus intermedios de síntesis. Por tanto, los distintos análogos sintéticos obtenidos por introducción de modificaciones tanto en la cadena lateral y en el anillo fueron ensayados para evaluar sus actividades insecticidas, así como sus actividades frente a hongos.

Los productos preparados resultaron activos en muchos casos; algunos de ellos presentan con mayores actividades que los productos guía que se utilizaron para su diseño.

¹⁰¹ a) Ostrovskaya, R.U., Trofimov, S.S., Burov, Y.V., Kikhosherstov, A.M., Kovalev, G.I., Rayevsky, K.S., Skoldinov, A.P., Wunderlich, G., Zenker, L. "Synthesis and Neurotropic activity of Some N-di-(n-propyl)acetyl Lactams". *Khim.-Farm. Zh.*, **1993**, 27, 13-6. b) Sasaki, H., Mori, Y., Nakamura, J., Shibasaki, J. "Synthesis and Anticonvulsant Activity of 1-Acyl-2-Pyrrolidinone Derivatives". *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 628-33.

4.3.1- Actividad antagonista de la hormona juvenil

Ninguno de los productos preparados presentó actividades anti-HJ *in vivo* frente a individuos de la especie *Oncopeltus fasciatus*.

4.3.2.- Actividad entomotóxica

4.3.2.1.- Productos obtenidos por modificación de la cadena lateral

Los productos obtenidos en este apartado, así como sus intermedios de síntesis, no mostraron actividades frente a individuos de la especie *O. fasciatus* a la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ por el método de contacto y sólo a dosis superiores (20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) encontramos que los productos ciclopropanados **4c** y **21c** producía el 100 % de mortalidad.

4.3.2.2.- Productos obtenidos por introducción de anillos nitrogenados de cinco miembros distintos de pirrolidina

Dentro de este bloque aparecen dos productos, **26** y **27**, que mostraron actividad entomotóxica frente a ninfas de tercer estadio de *O. fasciatus*, cuando se ensayaron mediante método de contacto en placa¹⁰².

De los dos compuestos, **27** presentó una elevada actividad dando un 100 % de mortalidad a la dosis de 7.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; sin embargo esta actividad aparece en un estrecho margen, disminuyendo drásticamente al bajar ligeramente la dosis; así, a 5.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, la mortalidad decrece hasta un 20 %.

Por su parte, el compuesto **26** se muestra bastante menos activo, y ya a la dosis inicial de 10.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ únicamente presenta un 40 % de mortalidad.

El resto de productos englobados en esta sección no presentó actividad insecticida en las condiciones de ensayo y dosis iniciales, lo que parece indicar que la presencia del anillo de 2-pirrolidona se traduce en una desaparición total de la actividad insecticida, mientras que los productos que incorporan el anillo de 3-pirrolina sí que exhiben en mayor o menor grado una cierta toxicidad frente a insectos.

¹⁰² a) Bowers, W.S., Ohta, T., Cleere, J.S., Marsella, P.A. "Discovery of Insect Anti-Juvenile Hormones in Plants". *Science*, **1976**, 193, 542-7. b) Bowers, W.S. "Discovery of Insect Antiallatopropins". (Gilbert, L.I., ed.) *The Juvenile Hormones*. Pags: 394-408. Plenum, New York, **1976**.

4.3.3.3.-*Productos obtenidos por sustitución de la agrupación β -dicarbonílica por la monocarbonílica*

Dentro de este apartado se han encontrado los dos análogos con mayor actividad insecticida de todos los descritos en el presente trabajo: se trata de las amidas **31a** y **31b**, obtenidas en la primera etapa de la secuencia de reacciones que conduce a las enamidas monocarbonílicas.

El compuesto **31a** mostró una actividad del 100 % a 5.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, mientras que por su parte el compuesto que incorpora la cadena de siete átomos de carbono con una insaturación, **31b**, presentó un mayor grado de actividad produciendo un porcentaje de mortalidad del 90 % a la dosis de 2.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. También se obtuvieron los valores de LD_{50} aguda (72 horas) frente a ninfas de tercer estadio de *O. fasciatus* según el método de contacto en placa¹⁰², obteniendo como resultado 3.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para **31a**, mientras que el valor procedente de **31b** fue 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Intentando establecer una relación estructura-actividad entre estos dos compuestos, parece que la introducción de la insaturación en la cadena provoca que se doble la actividad.

Por otro lado, el resto de compuestos pertenecientes a este apartado no presentaron actividades apreciables, lo que parece indicar que tanto la introducción de la agrupación fenoxifenilo como la sustitución del anillo de pirrolidina por el de 2-pirrolidona se traduce en una pérdida total de la actividad (corroborando estos resultados los datos obtenidos en los anteriores apartados).

4.3.3.- Actividad fungicida

4.3.3.1.- *Productos obtenidos por modificación de la cadena lateral*

La *Tabla II*¹⁰³ muestra los valores de actividad fungicida.

¹⁰³ Los datos de actividad fungicida se han analizado mediante un Anova (Análisis de varianza) y el test de diferencia menos significativo (LSD) se ha utilizado para comparar las medias. (Statgraphics Plus 2.1).

Tabla II. Actividades fungicidas de los productos activos obtenidos por modificación de la cadena lateral.

| Fitopatógenos Objetivo | Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial del Micelio ^a % (Media ± DS) ^b | | |
|--|---|-----------------------|-----------------------|
| | 5c | 21d | 25d |
| <i>Fusarium culmorum</i> | 38.9±0.7 ^C | 23.5±3.9 ^A | 16.3±3.7 ^B |
| <i>Fusarium oxysporium</i> <i>ssp. gladioli</i> | 24.1±0.9 ^A | 23.1±1.6 ^A | 34.8±3.2 ^B |
| <i>Fusarium oxysporium</i> <i>ssp. niveum</i> | 26.2±1.6 ^C | 17.4±2.7 ^A | 36.9±2.7 ^B |
| <i>Geotrichum candidum</i> | 0 | 12.3±2.5 ^A | 11.7±2.9 ^A |
| <i>Colletotrichum gloeosporoides</i> | 11.8±0.3 ^C | 41.4±1.3 ^A | 62.2±5.9 ^B |
| <i>Colletotrichum coccodes</i> | 37.8±2.0 ^A | 37.6±1.5 ^A | 55.7±1.8 ^B |
| <i>Trichothecium roseum</i> | 0 | 46.6±3.4 ^A | 53.2±2.0 ^B |
| <i>Alternaria tenuis</i> | 23.9±3.0 ^C | 39.5±0.8 ^A | 55.2±3.3 ^B |
| <i>Verticillium dahliae</i> | 65.4±1.2 ^B | 19.0±3.3 ^A | 22.7±2.8 ^A |
| <i>Phytophthora citrophthora</i> | 37.5±3.3 ^C | 25.9±4.2 ^A | 48.5±1.3 ^B |
| <i>Trichoderma viride</i> | 0 | 30.7±1.2 ^A | 38.7±3.1 ^B |
| <i>Penicillium italicum</i> | 23.6±4.2 ^A | 22.2±3.9 ^A | 17.8±3.9 ^A |
| <i>Aspergillus parasiticus</i> | 11.3±1.6 ^C | 27.9±2.7 ^A | 37.9±2.3 ^B |

^a Concentración en los ensayos: 100 µg/mL ^b Cada valor indica la media y la desviación standard de los tres experimentos diferentes. Dentro de cada fila, los compuestos que presentan el mismo superíndice (A-C) no presentan diferencias significativas de actividad (P > 0.05).

Como se puede apreciar sólo tres de los productos obtenidos al introducir modificaciones en la cadena lateral presentaron actividades fungicidas después de haber sido ensayado todos ellos frente a diferentes tipos de hongos pertenecientes a distintos géneros; no obstante en ninguno de los casos las actividades mostradas fueron demasiado relevantes.

De los resultados obtenidos para este grupo de compuestos sobresale el producto **25d**, que presenta la agrupación fenoxifenilo y donde han sido introducidas dos unidades C₁, por exhibir un mayor espectro de actividad que el resto de productos, dando inhibiciones en torno al 50 % en cinco de los fitopatógenos ensayados.

Por otro lado el producto, **5c**, destaca por el valor de inhibición del crecimiento radial del micelio mostrado frente a *Verticillium dahliae*, indicando la posibilidad de utilización selectiva como fungicida frente a esta especie.

4.3.3.2.- Productos obtenidos por introducción de anillos nitrogenados de cinco miembros distintos de pirrolidona

La Tabla III¹⁰³ recoge los resultados obtenidos tras ensayar frente a distintas especies de hongos los productos obtenidos al introducir los anillos de 3-pirrolina y 2-pirrolidona en la secuencia de reacciones, en lugar de la pirrolidina.

Dentro de los compuestos que incorporan el anillo de 3-pirrolina (**26** y **27**), la enamina **27**, obtenida como subproducto de reacción, ha presentado un elevado porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio frente a *C. coccodes* (76.7 %). El resto de actividades presentadas por este producto están en el orden del 50 % en los casos más destacados (frente a *A. tenuis* y *P. citrophthora*). Estos resultados indican posible utilidad de este producto de forma selectiva frente al mencionado fitopatógeno. Por su parte, la amida **26**, no presentó ningún valor interesante para su posible aplicación como fungicida, siendo el valor más alto exhibido del 54 % frente a *T. viride*.

De los compuestos que presentan el anillo de 2-pirrolidona, sólo han mostrado actividades en torno al 50 % frente a cuatro de los fitopatógenos ensayados (*C. coccodes*, *T. roseum*, *A. tenuis* y *V. dahliae*). El resultado más interesante es el mostrado por el compuesto que presenta reducido el carbonilo de cetona, **30**, que consigue una inhibición del crecimiento del micelio en un 69 % frente a *C. coccodes*.

Tabla III. Actividades fungicidas de los productos obtenidos por introducción de anillos nitrogenados de cinco miembros distintos de la pirrolidina.

| Fitopatógenos Objetivo | Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial del Micelio ^a | | | | |
|--|--|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| | % (Media ± DS) ^b | | | | |
| | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| <i>Fusarium culmorum</i> | 39.7±2.0 ^A | 24.5±4.2 ^B | 8.2±1.0 ^C | 18.1±1.9 ^D | 24.3±4.4 ^B |
| <i>Fusarium oxysporium</i> <i>ssp. gladioli</i> | 26.0±1.8 ^A | 38.5±1.8 ^B | 35.5±5.1 ^{BC} | 26.8±4.7 ^{AC} | 36.5±1.7 ^B |
| <i>Fusarium oxysporium</i> <i>ssp. niveum</i> | 28.0±1.0 ^A | 30.5±3.3 ^{AC} | 27.6±1.7 ^A | 21.0±1.8 ^B | 33.3±1.7 ^C |
| <i>Geotrichum candidum</i> | 23.9±0.5 ^A | 0 | 0 | 24.4±0.9 ^A | 0 |
| <i>Colletotrichum gloesporoides</i> | 29.9±2.6 ^A | 35.4±2.4 ^{AB} | 34.5±3.7 ^{AB} | 35.6±2.3 ^B | 36.6±3.9 ^B |
| <i>Colletotrichum coccodes</i> | 18.8±2.8 ^A | 76.7±5.4 ^B | 48.3±3.5 ^C | 52.0±1.8 ^C | 69.0±3.5 ^D |
| <i>Trichothecium roseum</i> | 38.6±3.0 ^A | 34.3±1.7 ^B | 0 | 49.5±1.8 ^C | 19.6±3.4 ^D |
| <i>Alternaria tenuis</i> | 21.1±4.1 ^A | 51.4±7.5 ^B | 30.2±4.3 ^C | 47.5±4.9 ^B | 38.1±1.7 ^C |
| <i>Verticillium dahliae</i> | 13.9±2.5 ^A | 39.6±3.6 ^B | 49.8±0.3 ^C | 56.2±3.0 ^D | 45.9±3.6 ^C |
| <i>Phytophthora citrophthora</i> | 18.3±2.5 ^A | 48.3±2.9 ^B | 26.7±2.7 ^C | 27.6±2.5 ^C | 36.7±2.9 ^C |
| <i>Trichoderma viride</i> | 54.0±4.0 ^A | 38.0±2.0 ^B | 22.0±2.0 ^C | 21.1±1.8 ^C | 38.0±3.5 ^B |
| <i>Penicillium italicum</i> | 29.9±2.0 ^{AB} | 31.2±3.2 ^B | 26.4±2.0 ^B | 8.6±0.7 ^C | 33.3±2.1 ^B |
| <i>Aspergillus parasiticus</i> | 39.3±1.2 ^A | 19.3±1.2 ^B | 21.3±2.3 ^B | 31.7±1.5 ^C | 31.5±1.3 ^C |

^a Concentración en los ensayos: 100 µg/mL ^b Cada valor indica la media y la desviación standard de los tres experimentos diferentes. Dentro de cada fila, los compuestos que presentan el mismo superíndice (A-D) no presentan diferencias significativas de actividad (P > 0.05).

4.3.3.3.-Productos obtenidos por sustitución de la agrupación β-dicarbonílica por la monocarbonílica

En la *Tabla IV*¹⁰³ aparecen los valores correspondientes a los porcentajes de inhibición del crecimiento radial presentados por los productos correspondientes a los ensayos frente a diferentes fitopatógenos pertenecientes a diferentes géneros. Se ha notado que estos productos han resultado especialmente activos frente a hongos del género *Colletotrichum*, en particular frente a *C. coccodes*, hongo cuyo crecimiento es inhibido en al menos un 45 % por todos los productos del bloque excepto dos; por contra ninguno de los productos consiguió una inhibición aceptable para la especie *G. candidum*.

Tabla IV. Actividades fungicidas de los productos obtenidos por sustitución de la agrupación β-dicarbonílica por la monocarbonílica.

| Fitopatógenos objetivo | Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio ^a | | | | | | | | |
|--|--|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | % (Media ± SD) ^b | | | | | | | | |
| | 31a | 31b | 31d | 32a | 32b | 32d | 33a | 33b | 34 |
| <i>Fusarium culmorum</i> | 0 ^E | 0 ^E | 48.8±2.5 ^A | 0 ^E | 0 ^E | 14.9±4.5 ^B | 0 ^E | 27.6±3.4 ^C | 23.0±5.1 ^D |
| <i>Fusarium oxysporium ssp. gladioli</i> | 20.6±3.3 ^{AB} | 21.3±2.6 ^B | 52.0±1.0 ^D | 0 ^E | 0 ^E | 21.1±1.4 ^B | 15.8±0.3 ^{AC} | 17.9±2.0 ^{ABC} | 56.0±8.2 ^D |
| <i>Fusarium oxysporium ssp. niveum</i> | 21.6±0.1 ^A | 24.7±3.4 ^A | 52.2±2.2 ^B | 0 ^F | 0 ^F | 16.1±1.2 ^C | 13.5±4.3 ^{CD} | 21.3±4.1 ^A | 36.9±5.4 ^E |
| <i>Geotrichum candidum</i> | 13.0±0.5 ^A | 0 ^E | 27.5±2.5 ^B | 0 ^E | 0 ^E | 8.1±0.3 ^C | 0 ^E | 0 ^E | 40.7±1.6 ^D |
| <i>Colletotrichum gloeosporoides</i> | 36.6±3.4 ^A | 25.3±1.8 ^B | 61.4±1.7 ^D | 11.7±2.1 ^E | 0 ^G | 29.6±1.3 ^C | 34.1±4.6 ^{AC} | 84.0±5.4 ^F | 77.2±6.8 ^F |
| <i>Colletotrichum coccodes</i> | 67.9±6.6 ^{AB} | 50.2±2.3 ^C | 70.5±6.3 ^A | 44.7±1.8 ^C | 45.8±2.2 ^C | 20.5±0.8 ^D | 47.8±3.9 ^C | 61.3±1.7 ^B | 68.3±6.0 ^{AB} |
| <i>Trichothecium roseum</i> | 34.9±6.9 ^{AB} | 48.8±5.3 ^C | 77.4±10.4 ^D | 14.1±2.3 ^E | 24.6±0.7 ^F | 46.4±5.8 ^{BC} | 42.0±7.3 ^{ABC} | 38.9±6.6 ^{ABC} | 34.3±4.3 ^A |
| <i>Alternaria tenuis</i> | 26.4±1.6 ^{AD} | 22.1±3.4 ^{AC} | 74.3±2.9 ^B | 19.9±3.0 ^C | 10.7±1.9 ^G | 29.3±3.4 ^D | 38.9±0.6 ^E | 26.2±3.7 ^{AD} | 89.0±5.2 ^F |
| <i>Verticillium dahliae</i> | 44.6±4.8 ^A | 27.3±1.5 ^B | 76.1±5.4 ^C | 17.3±3.7 ^D | 19.5±2.2 ^D | 17.8±1.6 ^D | 19.9±3.2 ^D | 34.1±9.3 ^{BE} | 36.8±3.5 ^E |
| <i>Phytophthora citrophthora</i> | 41.5±3.2 ^A | 13.6±4.5 ^B | 62.0±2.8 ^C | 15.6±4.6 ^B | 0 ^F | 29.1±5.1 ^{DE} | 18.0±3.4 ^B | 26.4±4.2 ^D | 33.6±2.0 ^E |
| <i>Trichoderma viride</i> | 23.3±2.3 ^A | 9.9±0.1 ^B | 48.0±2.0 ^C | 0 ^E | 0 ^E | 0 ^E | 8.7±2.3 ^B | 0 ^E | 65.3±1.2 ^D |
| <i>Penicillium italicum</i> | 15.8±2.8 ^{AC} | 0 ^F | 48.9±3.8 ^B | 0 ^F | 0 ^F | 18.4±2.0 ^C | 9.0±2.0 ^D | 12.2±1.9 ^{AD} | 38.9±1.9 ^E |
| <i>Aspergillus parasiticus</i> | 21.9±1.7 ^A | 15.5±2.8 ^B | 50.9±1.3 ^C | 12.5±0.8 ^B | 7.6±1.0 ^D | 12.0±2.4 ^B | 15.0±2.5 ^B | 21.9±4.0 ^A | 48.3±1.5 ^C |

^a Concentración en los ensayos: 100 µg/mL ^b Cada valor indica la media y la desviación standard de los tres experimentos diferentes. Dentro de cada fila, los compuestos que presentan el mismo superíndice (A-G) no presentan diferencias significativas de actividad (P > 0.05).

En este bloque hay dos productos que destacan por el amplio espectro de acción que exhiben: **31c** y **34**. Al igual que ocurría con los productos que presentan la agrupación dicarbonílica, parece que la presencia del sustituyente fenoxifenilo implica la aparición de actividad fungicida. Así, en el caso del producto **31c** encontramos que es capaz de causar la inhibición del crecimiento radial del micelio en porcentajes superiores al 50 % frente a todos los fitopatógenos ensayados excepto para *G. Candidum*, siendo además los valores superiores al 70 % cuando se trata de las especies *C. coccodes*, *T. roseum*, *A. tenuis* y *V. dahliae*, lo que convierte a este producto en un agente potencialmente útil como fungicida de amplio espectro.

En el caso de la imida **34**, el número de fitopatógenos que presentan inhibición superior al 50 % es menor (cinco de los trece ensayados); sin embargo, frente a *A. tenuis* se llega a una contención del crecimiento de hasta un 89 % y de en torno al 70 % para especies del género *Colletotrichum*.

Del resto de productos hay que destacar la selectividad mostrada por la enamida **33b** frente a las especies del género *Colletotrichum*, frente a las que presenta un 84 y un 61 % de inhibición, sin dar valores destacables frente al resto de fitopatógenos. Ello sugiere un posible uso de este producto como fungicida selectivo frente a especies de este género.

Las actividades observadas para el resto de compuestos son, en los casos más destacados, de alrededor al 50 % (a excepción del 68 % de inhibición de la amida **31a** frente a *C. coccodes*) sin destacar en particular frente a ningún tipo de fitopatógeno.

4.4. Parte experimental

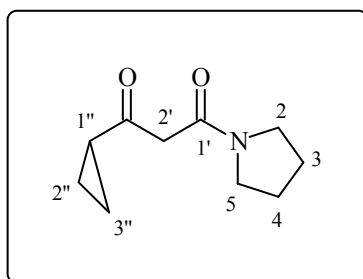
4.4.1.- Técnicas experimentales

Las técnicas experimentales así como la descripción de los ensayos aparecen reflejados en los capítulos anteriores.

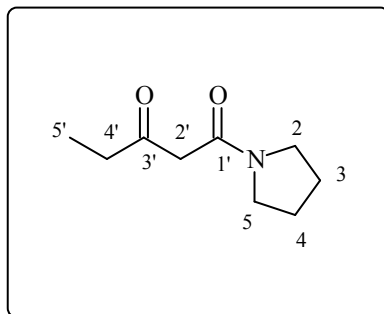
4.4.2.- Procedimientos sintéticos generales

Síntesis de β -oxoamidas y β -oxoimidias. Esta reacción se llevó a cabo con diferentes cloruros de ácido de acuerdo con el procedimiento descrito a continuación: Sobre una disolución enfriada a 0 °C de 2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona (1.1 mmol) en CH_2Cl_2 (1.5 mL), se añadió piridina (2.2 mmol) y el correspondiente cloruro de acilo (0.9 mmol) *vía* jeringa, gota a gota y bajo atmósfera de N_2 . La disolución fue agitada a 0° C durante 1 h. A continuación se dejó alcanzar temperatura ambiente, permaneciendo así a lo largo de un periodo adicional de 2 h. La disolución se vertió sobre HCl (5%) y se extrajo con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó con NaCl y agua y se secó sobre Na_2SO_4 . Se obtuvo una vez evaporado el disolvente, el intermedio de acilación del ácido de Meldrum casi puro, el cual fue utilizado en la aminólisis posterior sin realizar una mayor purificación.

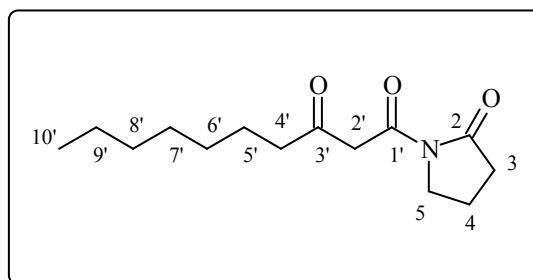
La disolución del intermedio acilado del ácido de Meldrum y pirrolidina o 2-pirrolidona (2.1 mmol) en benceno (9.00 mL) fue calentada a reflujo durante 14 h. El disolvente se evaporó a vacío, proporcionando un residuo que fue purificado por cromatografía de columna, obteniendo las β -oxoamidas o β -oxoimidias respectivas.



N-(3-Ciclopropil-3-oxopropanoil)pirrolidina (20c). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (50-80 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 19 %; HRMS (EI): m/z 181.1099 ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ requiere 181.1102); IR ν_{max} 2980, 2960, 2890, 1670, 1600, 1390, 1350, 1310, 1230, 1180, 1170, 1140, 1070, 1035, 990, 970 940, 900, 880, 860, 840, 800, 730 y 720; ^1H NMR: δ_{H} 3.6 (s, 2H, H-2'), 3.5 y 3.4 (t+t, $J=7$ Hz, 4H, H-2+H-5), 2.1 (m, 1H, H-1''), 2.0-1.8 (m, 4H, H-3+H-4), 1.1 y 0.9 (m+m, 4H, H-2''+H-3''); ^{13}C NMR: δ_{C} 203.8 ($\text{C}_{3'}$), 164.6 ($\text{C}_{1'}$), 50.4 ($\text{C}_{2'}$), 46.5 (C_2), 45.2 (C_5), 25.3 (C_3), 23.7 (C_4), 20.1 ($\text{C}_{4''}$), y 10.8 ($\text{C}_{2''}+\text{C}_{3''}$); MS m/z 181 (M^+ , 46), 166 (11), 153 (13), 140 (5), 138 (6), 124 (3), 112 (35), 98 (14), 96 (5), 84 (11), 70 (100), 69 (26), 55 (18), 43 (10) y 41 (10).



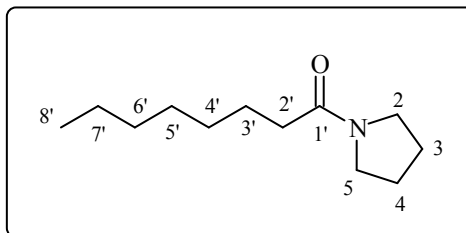
***N*-(3-Oxopentanoil)pirrolidina (20f).** Eluyente: mezclas hexano-AcOEt (30-40 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 64 %; HRMS (EI): m/z 169.1106 ($C_9H_{15}NO_2$ requiere 169.1102); IR: ν_{max} 2980, 2870, 1720, 1630, 1450, 1380, 1240, 1200, 1110 y 850; 1H NMR: δ_H 3.5 (s, 2H, H-2'), 3.5-3.4 (m, 4H, H-2+H-5), 2.6 (q, $J=7$ Hz, 2H, H-4'), 1.9 (m, 4H, H-3+H-4) y 1.0 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR: δ_C 205.6 ($C_{3'}$), 165.6 ($C_{1'}$), 50.5 ($C_{2'}$), 47.6 (C_2), 46.3 (C_5), 36.8 ($C_{4'}$), 26.4 (C_3), 24.8 (C_4) y 7.0 (CH_3); MS: m/z 169 (M^+ , 94), 152 (3), 140 (70), 136 (8), 128 (10), 112 (73), 98 (38), 85 (16), 70 (100), 57 (23) y 55 (27).



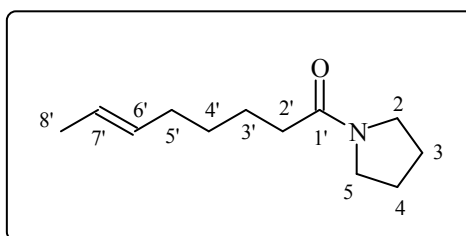
***N*-(3-Oxodecanoil)-2-pirrolidona (28).** Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (8:2). Rendimiento 70 %; HRMS (EI): m/z 253.1678 ($C_{14}H_{23}NO_3$ requiere 253.1677); IR: ν_{max} 2910, 2840, 1735, 1690, 1610, 1450, 1400, 1360, 1320, 1190, 1160, 1070, 1010, 930, 880, 830, 800 y 720; 1H NMR: δ_H 4.0 (s, 2H, H-2'), 3.9 (t, $J=7$ Hz, 2H, H-5), 2.6 (m, 4H, H-3+H-4'), 2.1 (m, 2H, H-4), 1.6 (m, 2H, H-5'), 1.3 (s a, 8H, $(CH_2)_4CH_3$) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_2CH_3); ^{13}C NMR: δ_C 203.7 ($C_{3'}$), 175.6 (C_2), 167.2 ($C_{1'}$), 51.4 ($C_{2'}$), 45.1 ($C_{5'}$), 42.9 ($C_{4'}$), 33.8, 33.1, 31.5, 28.9, 23.2, 22.5 ($C_3, C_{5'}$ - $C_{9'}$), 16.8 (C_4) y 13.9 (CH_3); MS: m/z 253 (M^+ , 6), 235 (1), 211 (4), 182 (6), 169 (100), 154 (42), 150 (9), 127 (40), 112 (12), 99 (19), 86 (99), 69 (6) y 57 (40).

Síntesis de *N*-Acilpirrolidinas. Sobre una mezcla de pirrolidina (14.1 mmol) en KOH 1.7 M (9.0 mL) se añadió una disolución del cloruro de ácido correspondiente (14.0 mmol) en CH_2Cl_2 (9.0 mL), gota a gota (10 min). Después de 5 h 30 min de

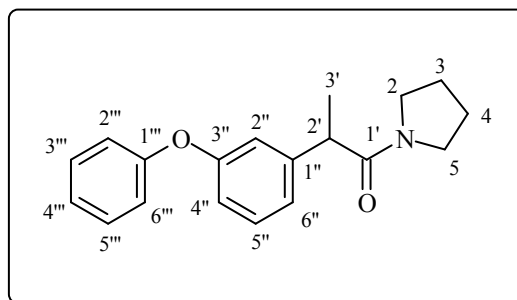
agitación continua a temperatura ambiente, la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 ; el extracto orgánico resultante se lavó con NaCl y se secó sobre Na_2SO_4 . Una vez eliminado el disolvente y purificado el residuo por cromatografía de columna se obtuvo la *N*-acilpirrolidina correspondiente.



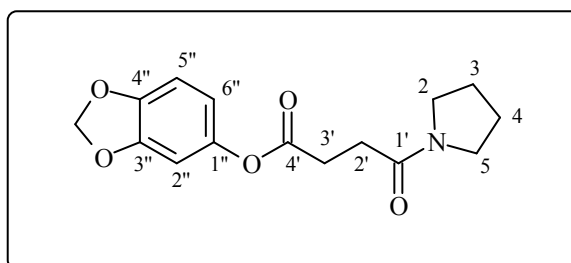
***N*-Octanoilpirrolidina (31a).** Rendimiento 91 %; HRMS (EI): m/z 197.1774 ($\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NO}$ requiere 197.1779); IR: ν_{max} 2900, 2860, 2840, 1605, 1410, 1330, 1230, 1160, 1090, 1030, 905 y 830; ^1H NMR: δ_{H} 3.4 (m, 4H, H-2+H-5), 2.2 (t, $J=7$ Hz, 2H, H-2'), 2.0-1.8 (m, 4H, H-3+H-4), 1.6 (m, 2H, H-3'), 1.3 (s a, 8H, $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR: δ_{C} 171.8 ($\text{C}_{1'}$), 46.5 (C_2), 45.5 (C_5), 34.8 ($\text{C}_{2'}$), 31.6, 29.4, 29.0, 26.0, 24.9, 24.3, 22.5 (C_3 , C_4 , $\text{C}_{3'}$ - $\text{C}_{7'}$) y 14.0 (CH_3); MS: m/z 197 (M^+ , 11), 168 (12), 154 (9), 140 (13), 126 (73), 113 (100), 98 (46), 85 (56), 71 (72), 70 (80), 57 (30) y 55 (65).



***N*-Oct-6-enoilpirrolidina (31b).** Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (20-50 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 85 %; HRMS (EI): m/z 195.1627 ($\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}$ requiere 195.1623); IR: ν_{max} 2910, 2845, 1640, 1430, 1330, 1250, 1220, 1190, 1160 y 960; ^1H NMR: δ_{H} 5.4 (m, 2H, H-6'+H-7'), 3.4 (m, 4H, H-2+H-5), 2.2 (t, $J=7$ Hz, 2H, H-2'), 2.0-1.7 (m, 6H, H-3+H-4+H-5'), 1.6 (m, 5H, H-3'+H-8') y 1.4 (m, 2H, H-4'); ^{13}C NMR. δ_{C} 171.5 ($\text{C}_{1'}$), 130.9 ($\text{C}_{6'}$), 124.7 ($\text{C}_{7'}$), 46.4 (C_2), 45.4 (C_5), 34.5, 32.2, 29.2, 25.9, 24.2 (C_3 , C_4 , $\text{C}_{2'}$ - $\text{C}_{5'}$) y 17.7 (CH_3); MS: m/z 195 (M^+ , 87), 180 (6), 166 (12), 152 (7), 140 (30), 127 (95), 126 (57), 113 (58), 99 (36), 98 (65), 85 (42), 70 (100) y 55 (85).



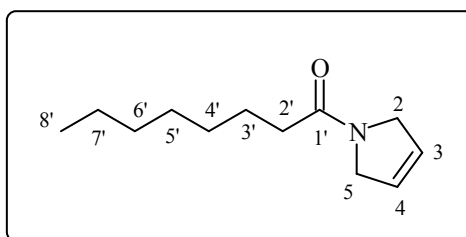
N-[2-(3-Fenoxifenil)propionil]pirrolidina (31d). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (20-50 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 80 %; HRMS (EI): m/z 295.1577 ($C_{19}H_{21}NO_2$ requiere 295.1572); IR: ν_{\max} 3040, 2960, 2860, 1700, 1630, 1575, 1480, 1420, 1360, 1330, 1240, 1160, 1060, 1020, 950, 920, 750 y 695; 1H NMR: δ_H 7.3 (m, 2H, H-3''' + H-5'''), 7.2 (t, $J = 8$ Hz, 1H, H-5''), 7.1 y 6.9 (m, 5H, H-2'' + H-6'' + H-2''' + H-4''' + H-6'''), 6.8 (ddd, $J = 8, 3$ y 1 Hz, 1H, H-4''), 3.7 (q, $J = 7$ Hz, 1H, H-2'), 3.5 y 3.4 (m+m, 4H, H-2 + H-5), 1.8 (m, 4H, H-3 + H-4) y 1.4 (d, $J = 7$ Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR: δ_C 171.5 ($C_{1'}$), 157.1, 156.8, 143.4 ($C_{1''}$, $C_{3''}$, $C_{1'''}$), 129.7, 129.4, 122.9, 122.0, 118.4, 117.9, 116.6 ($C_{2''}$, $C_{4''}$ - $C_{6''}$, $C_{2'''}$ - $C_{6'''}$), 46.0 (C_2), 45.7 (C_5), 44.4 ($C_{2'}$), 25.7 (C_3), 23.8 (C_4) y 19.8 (CH_3); MS: m/z 295 (M^+ , 81), 242 (5), 224 (3), 197 (18), 181 (4), 104 (8), 103 (7), 98 (100), 91 (7), 77 (10) y 55 (33).



N-[4-(3,4-Metilendioxi-fenoxi)-4-oxobutanoil]pirrolidina¹⁰⁴ (31e). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (20-50 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 78 %;

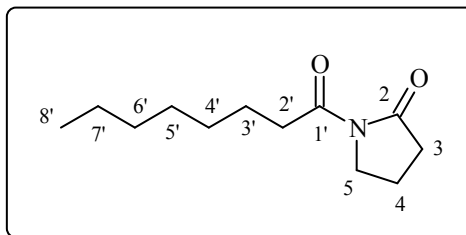
¹⁰⁴ El ácido de partida necesario se consiguió en base al siguiente procedimiento: Sobre una suspensión de 3,4-metilendioxi-fenol (18.1 mmol) en NaOH 0.5 M (37 mL), se añadió, bajo vigorosa agitación, anhídrido succínico. La mezcla permaneció con agitación continua 20 min. a temperatura ambiente, y transcurrido este periodo se acidificó con HCl (c). Se extrajo repetidamente con CH_2Cl_2 , secando las fases orgánicas sobre Na_2SO_4 y concentrando a vacío. El residuo resultante se purificó por cromatografía de columna utilizando como eluyente mezclas hexano-AcOEt (30-40%, con gradiente de polaridad), y obteniendo el ácido deseado en un 48%. IR: ν_{\max} 3500-2500, 1720, 1690, 1550, 1480, 1415, 1305, 1205, 1170, 1130, 1030, 910, 890, 800 y 670; 1H NMR: δ_H 6.7 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H-5'), 6.6 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-2'), 6.5 (dd, $J = 8$ y 2 Hz, 1H, H-6'), 6.0 (s, 2H, $CH_2(O)_2$) y 2.8 (m, 4H, H-2 + H-3); ^{13}C NMR: δ_C 176.4 (C_1), 171.1 (C_4), 148.0 (C_3), 145.4 ($C_{1'}$), 144.8 ($C_{4'}$), 113.8 (C_5), 108.0 (C_6), 103.6 ($C_{2'}$), 101.7 ($CH_2(O)_2$), 29.0 (C_2) y 28.7 (C_3).

HRMS (CI): m/z 292.1183 ($M+H^+$, $C_{15}H_{18}NO_5$ requiere 292.1184); IR: ν_{\max} 3100, 2980-2890, 1740, 1620, 1490, 1470, 1430, 1350, 1230, 1140, 1020 y 910; 1H NMR: δ_H 6.7 (d, $J=8$ Hz, 1H, H-5''), 6.6 (d, $J=2$ Hz, 1H, H-2''), 6.5 (dd, $J=8$ y 2 Hz, 1H, H-6''), 6.0 (s, 2H, $CH_2(O)_2$), 3.4 (m, 4H, H-2+H-5), 2.9 (t, $J=6$ Hz, 2H, H-3'), 2.6 (t, $J=7$ Hz, 2H, H-2'), 1.9 y 1.8 (m+m, 4H, H-3+H-4); ^{13}C NMR: δ_C 172.0 ($C_{1'}$), 148.8, 147.7 y 144.9 ($C_{1''}$, $C_{3''}$, $C_{4''}$), 113.8, 107.7 y 103.6 ($C_{2''}$, $C_{5''}$, $C_{6''}$), 101.5 ($CH_2(O)_2$), 46.4 (C_2), 45.6 (C_5), 29.1, 29.0, 25.8 y 24.2 (C_3 , C_4 , C_2' , C_3'); MS (CI): m/z 292 ($M+H^+$, 5), 274 (1), 154 (100), 138 (4) y 96 (1).



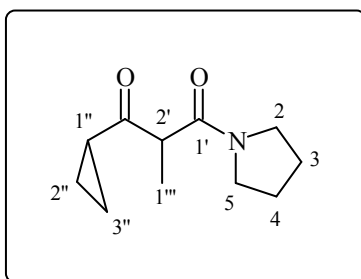
N-Octanoil-3-pirrolina (27). Obtenida en un 15 % como subproducto de reacción en la aminólisis con 3-pirrolina del derivado acilado del ácido de Meldrum. Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (20-40 %, con gradiente de polaridad). HRMS (EI): m/z 195.1619 ($C_{12}H_{21}NO$ requiere 195.1623); IR: ν_{\max} 3020, 2900, 2820, 1710, 1630, 1605, 1440, 1345, 1320, 1260, 1190, 1100, 1060, 990, 940, 910, 800, 730, 710 y 660; 1H NMR: δ_H 5.9 (m, 2H, H-3+H-4), 4.2 (m, 4H, H-2+H-5), 2.3 (t, $J=8$ Hz, 2H, H-2'), 1.7 (m, 2H, H-3'), 1.3 (m, 8H, $(CH_2)_4CH_3$) y 0.9 (t, $J=6$ Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR: δ_C 171.6 ($C_{1'}$), 126.3 (C_3), 124.8 (C_4), 53.2 (C_2), 53.0 (C_5), 34.3 ($C_{2'}$), 31.6, 29.3, 29.0, 24.7, 22.4 ($C_{3'}$ - $C_{7'}$) y 14.0 (CH_3); MS: m/z 195 (M^+ , 75), 180 (1), 169 (6), 166 (6), 153 (22), 143 (3), 138 (12), 127 (11), 124 (29), 111 (100), 110 (57), 96 (19), 84 (19), 69 (92), 68 (99), 57 (39) y 55 (15).

Síntesis de imidas. Una mezcla de 2-pirrolidona (2.7 mmol), el cloruro de ácido correspondiente (1.8 mmol) y Et_3N (2.0 mmol) en benceno (20 mL) se calentó a reflujo durante 8 h. La mezcla de reacción se extrajo con CH_2Cl_2 ; los extractos orgánicos resultantes se lavaron con NaCl, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron a sequedad, obteniéndose un residuo que fue purificado por cromatografía de columna conduciendo a las imidas correspondientes.



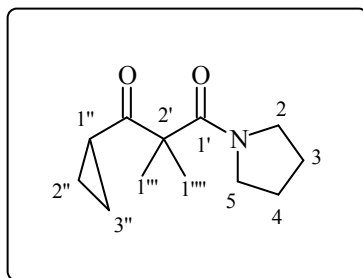
N-Octanoil-2-pirrolidona (34). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (8:2). Rendimiento 68 %; HRMS (EI): m/z 211.1570 ($C_{12}H_{21}NO_2$ requiere 211.1572); IR: ν_{\max} 2952, 2922, 2853, 1738, 1694, 1460, 1379, 1360, 1324, 1250 y 611; 1H NMR: δ_H 3.8 (t, $J=7$ Hz, 2H, H-5), 2.9 (t, $J=7$ Hz, 2H, H-3), 2.6 (t, $J=8$ Hz, 2H, H-2'), 2.0 (m, 2H, H-4), 1.6 (m, 2H, H-3'), 1.3 (s a, 8H, $(CH_2)_4CH_3$) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR: δ_C 175.4 (C_2), 174.4 ($C_{1'}$), 45.4 (C_5), 36.7, 33.7, 31.6, 29.1, 29.0, 24.1, 22.5, 17.1 (C_3 , C_4 , C_2 - C_7) y 14.0 (CH_3); MS: m/z 211 (M^+ , 35), 182 (7), 154 (23), 140 (98), 127 (100), 112 (14), 99 (88), 86 (53), 69 (26), 57 (91) y 55 (58).

Metilación de β -Oxoamidas. Sobre una suspensión de NaH (aceite al 60 %; 1.1 mmol), previamente lavado con pentano, en DMF (1.5 mL) se añadió, a 0 °C y gota a gota, una disolución de β -oxoamida (0.9 mmol) en DMF (3.0 mL). La mezcla se calentó a temperatura ambiente durante un periodo de 2 h 30 min, transcurrido el cual se volvió a enfriar a 0 °C, tratándose entonces con yodometano (1.9 mmol). Después de 5 h 15 min de agitación continua la mezcla se diluyó con H_2O y se extrajo con CH_2Cl_2 . El conjunto de extractos orgánicos se lavaron con NaCl, se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron a sequedad, proporcionando la β -oxoamida metilada.

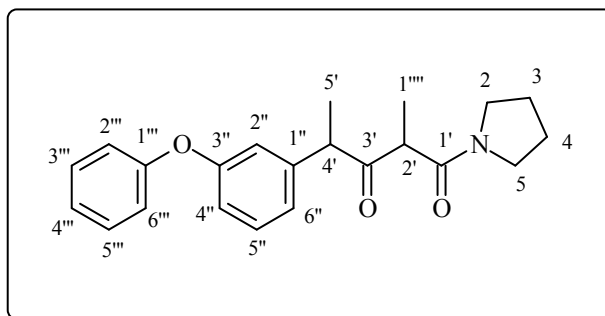


N-(3-Ciclopropil-2-metil-3-oxopropanoil)pirrolidina (21c). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (40-50 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 82 %; HRMS (EI): m/z 195.1268 ($C_{11}H_{17}NO_2$ requiere 195.1259); IR: ν_{\max} 2960, 2860, 1700, 1630, 1420, 1380, 1330, 1300, 1250, 1220, 1190, 1160, 1130, 1100, 1040, 1010, 940,

910, 870 y 810; $^1\text{H NMR}$: δ_{H} 3.7 (q, $J=7$ Hz, 1H, H-2'), 3.5-3.4 (m, 4H, H-2+H-5), 2.1 (m, 1H, H-1''), 2.0 (m, 4H, H-3+H-4), 1.4 (d, $J=7$ Hz, 3H, CH₃), 1.1-0.9 (m, 4H, H-2''+H-3''); $^{13}\text{C NMR}$: δ_{C} 207.0 (C_{3'}), 168.0 (C_{1'}), 53.2 (C_{2'}), 46.2 (C₂), 45.6 (C₅), 25.6 (C₃), 23.7 (C₄), 17.8 (C_{1''}), 12.9 (CH₃), 11.1 y 10.9 (C_{2''}+C_{3''}); MS m/z 195 (M⁺, 52), 180 (5), 167 (23), 152 (4), 138 (6), 127 (64), 126 (63), 110 (8), 99 (12), 98 (31), 84 (7), 70 (100), 69 (61) y 55 (25).



***N*-(3-Ciclopropil-2,2-dimetil-3-oxopropanoil)pirrolidina (25c).** Eluyente: mezclas hexano-AcOEt (6:4). Rendimiento 79 % desde **21c**; HRMS (CI): m/z 210.1491 (M+H⁺, C₁₂H₂₀NO₂ requiere 210.1494); IR: ν_{max} 2980, 2940, 2860, 1690, 1620, 1460, 1410, 1370, 1330, 1250, 1220, 1170, 1160, 1090, 1050, 1010, 1000, 960, 910, 890, 870, 810 y 720; $^1\text{H NMR}$: δ_{H} 3.5 y 3.2 (t+t, $J=7$ Hz, 4H, H-2+H-5), 2.0 (m, 1H, H-1''), 1.9 (m, 4H, H-3+H-4), 1.4 (s, 6H, 2xCH₃), 1.0 y 0.9 (m+m, 4H, H-2''+H-3''); $^{13}\text{C NMR}$: δ_{C} 210.5 (C_{3'}), 170.8 (C_{1'}), 56.2 (C_{2'}), 47.1 (C₂), 46.3 (C₅), 26.4 (C₃), 23.2 (C₄), 22.0 (2xCH₃), 17.5 (C_{1''}) y 11.4 (C_{2''}+C_{3''}); MS (CI) m/z 210 (M+H⁺, 100), 209 (M⁺, 15), 196 (3), 181 (3), 166 (2), 150 (2), 141 (27), 140 (17), 139 (13), 124 (3) y 111 (4).

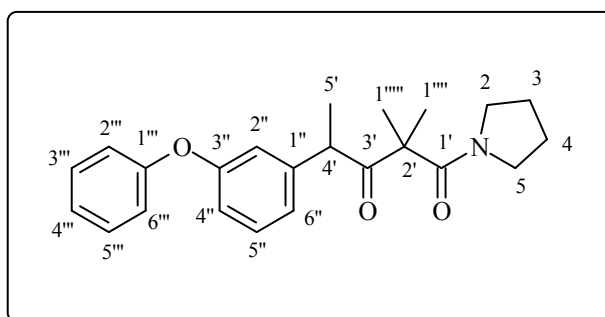


***N*-[2-Metil-4-(3-fenoxifenil)pentanoil]pirrolidina (21d).** Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (30-40 %, con gradiente de polaridad). Dos diastereómeros, con un rendimiento global: 71 %; HRMS (EI): m/z 351.1830 (C₂₂H₂₅NO₃ requiere 351.1834); IR: ν_{max} 3040, 2960, 2910, 2865, 1705, 1625, 1570, 1475, 1430, 1360, 1320, 1240,

1150, 1060, 970, 910, 745 y 680; MS: m/z 351 (M^+ , 75), 295 (1), 280 (1), 224 (4), 197 (23), 181 (6), 167 (7), 154 (39), 127 (89), 103 (10), 98 (100), 91 (18), 77 (10) y 55 (2).

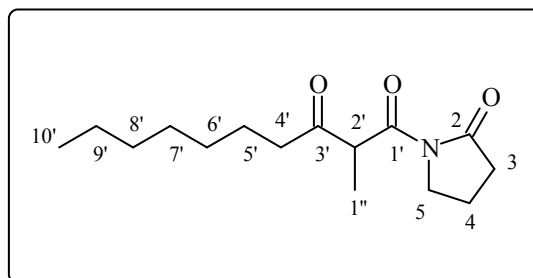
El diastereómero eluído en primer lugar exhibió en los experimentos de RMN las siguientes señales: ^1H NMR: δ_{H} 7.3 (m, 2H, H-3'''+H-5'''), 7.2 (m, 1H, H-5''), 7.1 (tt, $J=8$ and 1 Hz, 1H, H-4'''), 7.0-6.8 (m, 5H, H-2'''+H-4'''+H-6'''+H-2'''+H-6'''), 4.0 (q, $J=7$ Hz, 1H, H-4'), 3.4 (q, $J=7$ Hz, 1H, H-2'), 3.3, 3.2 y 2.7 (m+m+m, 4H, H-2+H-5), 1.8 (m, 4H, H-3+H-4), 1.4 y 1.3 (d+d, $J=7$ Hz, 6H, 2xCH₃); ^{13}C NMR: δ_{C} 206.8 (C_{3'}), 169.2 (C_{1'}), 157.6, 156.6, 142.7 (C_{1''}, C_{3''}, C_{1'''}), 129.9, 129.8, 123.5, 122.7, 118.9, 118.5, 117.0 (C_{2''}, C_{4''-C_{6''}}, C_{2'''-C_{6'''}}), 50.9 (C_{4'}), 49.8 (C_{2'}), 46.6 (C₂), 45.8 (C₅), 25.8 (C₃), 24.1 (C₄), 18.3 y 13.0 (2xCH₃).

El segundo diastereómero presentó en los experimentos de RMN las siguientes señales: ^1H NMR: δ_{H} 7.3 (m, 2H, H-3'''+H-5'''), 7.2 (t, $J=8$ Hz, 1H, H-5''), 7.1 (tt, $J=8$ y 1 Hz, 1H, H-4'''), 7.1-6.9 (m, 4H, H-2'''+H-6'''+H-2'''+H-6'''), 6.8 (ddd, $J=8, 3$ y 1 Hz, 1H, H-4''), 4.0 (q, $J=7$ Hz, 1H, H-4'), 3.6 (q, $J=7$ Hz, 1H, H-2'), 3.4, 3.0 y 2.9 (m+m+m, 4H, H-2+H-5), 1.8 (m, 4H, H-3+H-4), 1.4 y 1.3 (d+d, $J=7$ Hz, 6H, 2xCH₃); ^{13}C NMR: δ_{C} 206.8 (C_{3'}), 167.8 (C_{1'}), 157.0, 156.6, 141.9 (C_{1''}, C_{3''}, C_{1'''}), 129.7, 129.6, 123.3, 122.9, 118.7, 118.4, 117.2 (C_{2''}, C_{4''-C_{6''}}, C_{2'''-C_{6'''}}), 51.6 (C_{4'}), 50.0 (C_{2'}), 46.0 (C₂), 45.8 (C₅), 26.0 y 25.8 (C₃), 23.9 (C₄), 18.2 y 13.4 (2xCH₃).



***N*-[2,2-Dimetil-4-(3-fenoxifenil)pentanoil]pirrolidina (25d).** Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (7:3). Rendimiento 11 % como subproducto de reacción en la obtención de **21d**; HRMS (EI): m/z 365.1992 (C₂₃H₂₇NO₃ requiere 365.1991); IR: ν_{max} 3040, 2960, 2920, 2860, 1700, 1620, 1570, 1480, 1435, 1400, 1240, 1205 y 690; ^1H NMR: δ_{H} 7.3 (m, 2H, H-3'''+H-5'''), 7.2 (t, $J=8$ Hz, 1H, H-5''), 7.1 (tt, $J=8$ y 1 Hz, 1H, H-4'''), 7.0-6.9 (m, 4H, H-2'''+H-6'''+H-2'''+H-6'''), 6.8 (ddd, $J=8, 3$ y 1 Hz, 1H, H-4''), 4.1 (q, $J=9$ Hz, 1H, H-4'), 3.4, 3.2, 3.0 y 2.6 (m+m+m+m, 4H, H-2+H-5), 1.6

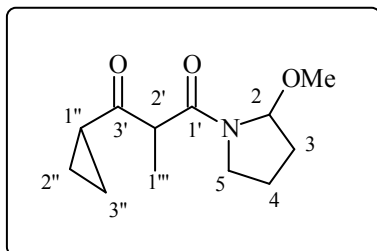
(m, 4H, H-3+H-4), 1.5 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1.4 (d, $J=7$ Hz, 3H, CHCH₃) y 1.3 (s, 3H, (CH₃)₂C); ¹³C NMR: δ_C 210.4 (C_{3'}), 169.4 (C_{1'}), 157.0, 156.8, 142.6 (C_{1''}, C_{3''}, C_{1'''}), 129.7, 129.6, 123.4, 122.7, 118.8, 118.2, 117.2 (C_{2''}, C_{4''-C_{6''}}, C_{2'''-C_{6'''}}), 57.2 (C_{2'}), 47.4 (C₂), 47.2 (C_{4'}), 46.8 (C₅), 25.9 (C₃), 23.8 (CH₃), 22.9 (C₄), 21.8 y 20.2 (2xCH₃); MS: m/z 365 (M⁺, 41), 224 (7), 197 (28), 168 (24), 141 (100), 112 (19), 104 (9), 98 (62), 91 (7), 77 (7) y 55 (13).



N-(2-Metil-3-oxodecanoil)-2-pirrolidona (29). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (15-20 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 70 %; HRMS (EI): m/z 267.1833 (C₁₅H₂₅NO₃ requiere 267.1834); IR: ν_{\max} 2920, 2850, 1730, 1685, 1450, 1400, 1350, 1240, 1120, 1010, 910, 830 y 715; ¹H NMR: δ_H 4.5 (q, $J=7$ Hz, 1H, H-2'), 3.9 (m, 2H, H-5), 2.7 (m, 2H, H-3), 2.6 (t, $J=8$ Hz, 2H, H-4'), 2.1 (m, 2H, H-4), 1.6 (m, 2H, H-5'), 1.4 (d, $J=7$ Hz, 3H, CH₃CH), 1.3 (s a, 8H, (CH₂)₄CH₃) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH₂CH₃); ¹³C NMR: δ_C 207.7 (C_{3'}), 175.6 (C₂), 170.8 (C_{1'}), 53.8 (C_{2'}), 45.6 (C₅), 40.8 (C_{4'}), 33.5, 31.6, 29.1, 23.3, 22.5 (C₃, C_{5'-C_{9'}}), 17.0 (C₄), 14.0 y 12.6 (2xCH₃); MS: m/z 267 (M⁺, 4), 196 (1), 183 (59), 168 (20), 141 (100), 127 (39), 113 (57), 86 (87), 83 (17), 69 (10), 57 (79) y 55 (14).

Oxidación anódica de N-acilpirrolidinas. Una disolución de la amida correspondiente (1.6 mmol) en metanol (60.0 mL), conteniendo *p*-toluensulfonato de tetraetilamonio (4.4 mmol) como soporte electrolítico, se introdujo en una celda electroquímica equipada con electrodos de carbono (8.5 cm²). A través de dicha disolución se hizo circular una corriente continua y constante de 20 mA. Después de pasar 4.0 F/mol de electricidad, el disolvente se evaporó, obteniéndose un residuo que se vertió sobre H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂. El conjunto de extractos orgánicos se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron a sequedad obteniéndose un nuevo residuo, que fue filtrado a través de silica gel para conseguir la eliminación del soporte electrolítico,

utilizando como eluyente acetato de etilo. El disolvente se evaporó y el resto sobrante obtenido se purificó por cromatografía de columna con silica gel para la obtención de la amida metoxilada correspondiente.

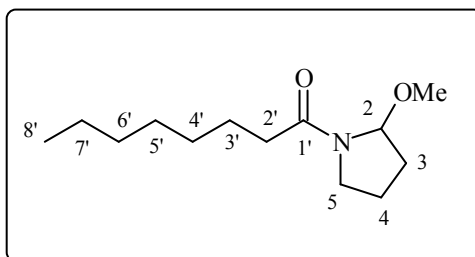


2-Metoxi-N-(3-ciclopropil-2-metil-3-oxopropanoil)pirrolidina (22c).

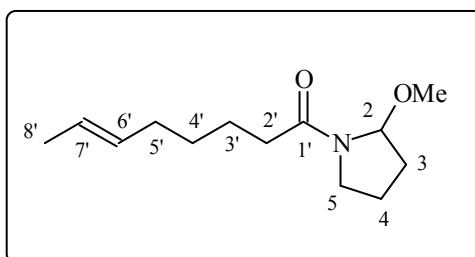
Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (7:3). Dos diastereómeros. Rendimiento global: 40 % (48 % de producto de partida recuperado).

Datos espectroscópicos del diastereómero eluido en primer lugar **22c1**: HRMS (CI): m/z 226.1441 ($M+H^+$, $C_{12}H_{20}NO_3$ requiere 226.1443); IR ν_{max} 2920, 2880, 1690, 1635, 1380, 1155, 1140, 1050, 1000 y 810; 1H NMR: δ_H 5.6 y 5.0 (d+d, $J=4$ Hz, 1H, H-2), 3.8 (q, $J=7$ Hz, 1H, H-2'), 3.7 (m, 2H, H-5), 3.4 y 3.3 (s+s, 3H, OMe), 2.1 (m, 2H, H-3), 1.9 (m, 2H, H-4), 1.8 (m, 1H, H-1''), 1.5 y 1.4 (d+d, $J=7$ Hz, 3H, $CHCH_3$) y 1.0 y 0.9 (m+m, 4H, H-2''+H-3''); ^{13}C NMR: δ_C 208.5 y 207.2 ($C_{3'}$), 170.2 y 169.7 ($C_{1'}$), 88.4 y 87.1 (C_2), 56.4 y 54.0 ($C_{2'}$), 54.2 y 53.5 (OMe), 46.0 y 45.9 (C_5), 31.4 y 30.7 (C_3), 22.9 y 20.8 (C_4), 18.0 y 17.7 ($C_{1''}$), 14.1 y 13.2 (CH_3), 11.9, 11.8, 11.7 y 11.5 ($C_{2''}+C_{3''}$); MS (CI) m/z 226 ($M+H^+$, 59), 225 (M^+ , 14), 210 (38), 195 (100), 193 (89), 185 (5), 166 (7), 156 (12), 140 (4), 128 (41) y 125 (23).

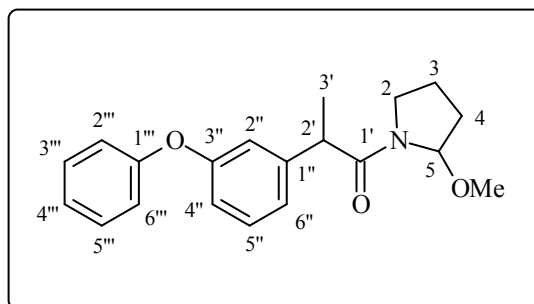
Datos espectroscópicos del diastereómero eluido en segundo lugar **22c2**: HRMS (ED): m/z 225.1375 ($C_{12}H_{19}NO_3$ requiere 225.1365); IR ν_{max} 2920, 2880, 2820, 1690, 1640, 1380, 1155, 1130, 1050, 990, 930, 910, 855 y 810; 1H NMR: δ_H 5.5 y 5.0 (d+d, $J=4$ Hz, 1H, H-2), 3.7 (m, 3H, H-5+H-2'), 3.4 y 3.2 (s+s, 3H, OMe), 2.1 (m, 2H, H-3), 1.9 (m, 2H, H-4), 1.8 (m, 1H, H-1''), 1.5 y 1.4 (d+d, $J=7$ Hz, 3H, $CHCH_3$) y 1.0 y 0.9 (m+m, 4H, H-2''+H-3''); ^{13}C NMR: δ_C 207.4 y 206.5 ($C_{3'}$), 170.5 y 170.4 ($C_{1'}$), 88.8 y 87.5 (C_2), 56.6 y 53.8 ($C_{2'}$), 53.7 y 51.1 (OMe), 46.0 y 45.9 (C_5), 31.4 y 30.5 (C_3), 22.8 y 21.0 (C_4), 18.3 y 18.1 ($C_{1''}$), 13.9 y 13.8 (CH_3), 11.6 y 11.1 ($C_{2''}+C_{3''}$); MS m/z 225 (M^+ , 14), 210 (4), 193 (73), 167 (6), 156 (3), 126 (16), 100 (30), 97 (23), 85 (19), 83 (26), 70 (100) y 55 (13).



2-Metoxi-N-octanoylpirrolidina (32a). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (10-40 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 9 % (recuperado un 70 % de producto de partida); HRMS (CI): m/z 228.1965 ($M+H^+$, $C_{13}H_{26}NO_2$ requiere 228.1963); IR: ν_{max} 2910, 2840, 1650, 1410, 1350, 1330, 1240, 1160, 1110, 1040, 990, 910 y 830; 1H NMR: δ_H 5.4 y 5.0 (d+d, $J=4$ Hz, 1H, H-2), 3.6 (m, 2H, H-5), 3.4 y 3.3 (s+s, 3H, OMe), 2.3 (m, 2H, H-2'), 2.2-1.8 (m, 4H, H-3+H-4), 1.6 (m, 2H, H-3'), 1.3 (s a, 8H, $(CH_2)_4CH_3$) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR: δ_C 173.5 ($C_{1'}$), 88.7 y 86.9 (C_2), 56.4 y 53.9 (OMe), 46.1 y 45.4 (C_5), 34.6, 34.0, 31.6, 31.3, 30.9, 29.4, 29.3, 29.0, 25.1, 24.5, 22.9, 22.5, 21.0 (C_3 , C_4 , C_2 - C_7) y 14.0 (CH_3); MS (CI): m/z 228 ($M+H^+$, 61), 214 (74), 195 (73), 184 (8), 180 (7), 173 (9), 142 (12), 129 (100), 113 (29) y 111 (85).

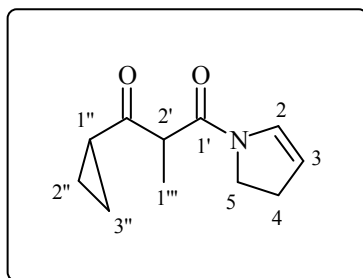


2-Metoxi-N-oct-6-enoylpirrolidina (32b). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (20-40 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 25 % (recuperado un 53 % de producto de partida); HRMS (CI): m/z 226.1813 ($M+H^+$, $C_{13}H_{24}NO_2$ requiere 226.1807); IR: ν_{max} 2920, 2860, 1645, 1400, 1350, 1310, 1230, 1170, 1090, 1070, 1060, 960, 910, 810 y 720; 1H NMR: δ_H 5.4 (m, 2H, H-6'+H-7'), 5.0 (d, $J=4$ Hz, 1H, H-2), 3.6 (m, 2H, H-5), 3.4 y 3.3 (s+s, 3H, OMe), 2.3 (m, 2H, H-2'), 2.1-1.8 (m, 6H, H-3+H-4+H-5'), 1.6 (m, 5H, H-3'+H-8') y 1.4 (m, 2H, H-4'); ^{13}C NMR: δ_C 173.1 y 173.0 ($C_{1'}$), 131.0 y 130.9 (C_6), 124.9 y 124.8 (C_7), 88.6 y 86.8 (C_2), 56.3 y 53.8 (OMe), 46.0 y 45.3 (C_5), 34.4, 33.8, 32.2, 31.3, 30.8, 29.2, 29.1, 24.5, 23.9, 22.8, 20.9 (C_3 , C_4 , C_2 - C_5) y 17.8 (CH_3); MS (CI): m/z 226 ($M+H^+$, 9), 212 (22), 194 (100), 165 (5), 142 (10), 129 (16), 124 (9) y 111 (10).

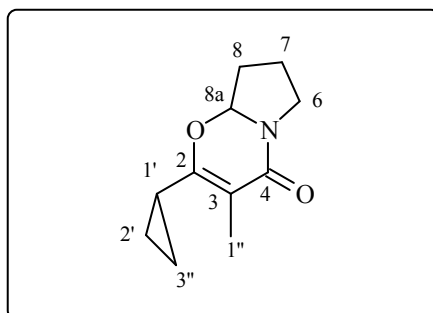


2-Metoxi-N-[2-(3-fenoxifenil)propionil]pirrolidina (32d). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (10-30 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 29 % (recuperado un 35 % de producto de partida); HRMS (EI): m/z 325.1686 ($C_{20}H_{23}NO_3$ requiere 325.1678); IR: ν_{\max} 3060, 2980, 2930, 2890, 2810, 1655, 1580, 1485, 1440, 1405, 1240, 1210, 1160, 1070, 920, 820, 760 y 700; 1H NMR: δ_H 7.4-6.8 (m, 9H, Ar-H), 5.5, 5.4 y 4.8 (d+d+d, $J=5$ Hz, 1H, H-2), 3.9-3.6 (m, 3H, H-2'+H-5), 3.4, 3.3, 3.2 y 3.1 (s+s+s+s, 3H, OMe), 2.2-1.8 (m, 4H, H-3+H-4) y 1.5 (m, 3H, CH_3); ^{13}C NMR: δ_C 173.4 ($C_{1'}$), 157.5, 156.9, 143.0 ($C_{1''}$, $C_{3''}$, $C_{1'''}$), 130.0, 129.6, 123.2, 122.2, 118.7, 117.9, 117.1 ($C_{2''}$, $C_{4''}$ - $C_{6''}$, $C_{2'''}$ - $C_{6'''}$), 87.9, 87.6, 87.0 (C_2), 56.9, 56.5 (OMe), 45.8, 45.7 (C_5), 44.7, 43.9 ($C_{2'}$), 31.2, 31.1, 30.5 (C_3), 22.8, 22.7 (C_4) y 20.6, 20.4, 19.8 (CH_3); MS: m/z 325 (M^+ , 25), 310 (28), 293 (11), 224 (21), 197 (31), 181 (5), 128 (100), 104 (12), 91 (11), 85 (81), 77 (14), 70 (27) y 55 (17).

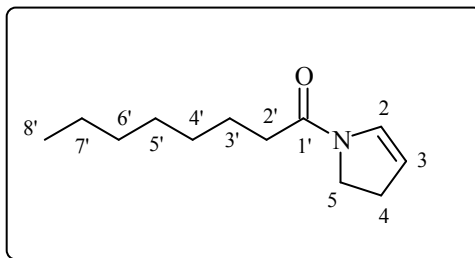
Síntesis de Enamidas. Una mezcla de los derivados metoxilados correspondientes (0.05 mmol) y silica gel (0.05 mmol) se calentó a 150-160 °C en un matraz a presión reducida y bajo atmósfera de N_2 . Después de 2 h 45 min, se añadió agua sobre el crudo, siendo este extraído con CH_2Cl_2 . El residuo resultante una vez evaporado el disolvente se purificó por cromatografía de columna. Bajo estas condiciones se obtuvieron las respectivas enamidas; en el caso donde el producto de partida era una β -oxoamida, el producto resultante fue una β -oxoenamida que iba acompañada de la oxazina bicíclica isómera.



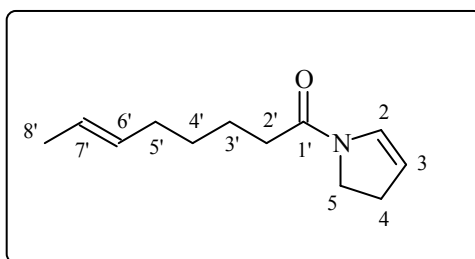
N-(3-Ciclopropil-2-metil-3-oxopropanoil)-2-pirrolina (4c). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (20-30 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 13 %; HRMS (EI): m/z 193.1095 ($C_{11}H_{15}NO_2$ requiere 193.1102); IR ν_{max} 3080, 2980, 2860, 1690, 1630, 1410, 1360, 1040, 1000, 900 y 720; 1H NMR: δ_H 7.0 y 6.5 (m, 1H, H-2), 5.3 (m, 1H, H-3), 3.9 (t, $J=9$ Hz, 2H, H-5), 3.7 (q, $J=7$ Hz, 1H, H-2'), 2.7 y 2.6 (m, 2H, H-4), 2.0 (m, 1H, H-1''), 1.48 y 1.47 (d+d, $J=3$ Hz, 3H, CH_3), 1.1 y 0.9 (m+m, 4H, H-2'''+H-3''); ^{13}C NMR: δ_C 207.3 ($C_{3'}$), 165.5 ($C_{1'}$), 129.4 y 128.3 (C_2), 112.9 y 111.5 (C_3), 54.0 ($C_{2'}$), 45.5 (C_5), 28.1 (C_4), 18.0 ($C_{1''}$), 13.2 (CH_3), 11.8 y 11.6 ($C_{2'''}+C_{3''}$); MS m/z 193 (M^+ , 20), 125 (3), 124 (2), 96 (7), 69 (100), 68 (47), 55 (7), 53 (4) y 41 (50).



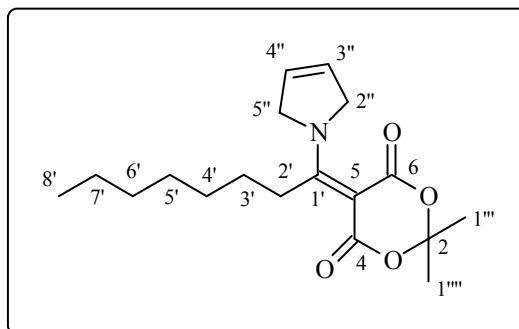
2-Ciclopropil-3-Metil-4-oxo-6,7,8,8a-tetrahidro-4H-pirrololo[2,1-b]1,3-oxazina (5c). Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (20-30 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento: 36 %; HRMS (EI): m/z 193.1104 ($C_{11}H_{15}NO_2$ requiere 193.1102); IR: ν_{max} 3070, 2960, 2920, 2860, 1700, 1640, 1430, 1350, 1250, 1180, 1080, 950, 920, 900, 880, 810, 760 y 640; 1H NMR: δ_H 5.1 (dd, $J=8$ y 4 Hz, 1H, H-8a), 3.7 y 3.4 (m+m, 2H, H-6), 2.4-1.6 (m, 5H, H-7+H-8+H-1'), 1.9 (s, 3H, CH_3), 1.1, 0.9 y 0.7 (m+m+m, 4H, H-2'''+H-3''); ^{13}C NMR: δ_C 166.4 (C_4), 163.1 (C_2), 105.6 (C_3), 87.6 (C_{8a}), 44.3 (C_6), 31.6 (C_8), 21.9 (C_7), 10.5 ($C_{1''}$), 9.7 ($C_{1'}$), 7.8 y 4.4 ($C_{2'''}+C_{3''}$); MS m/z 193 (M^+ , 72), 165 (7), 156 (9), 142 (10), 100 (23), 97 (12), 83 (32), 70 (100), 69 (74) y 55 (10).



***N*-Octanoil-2-pirrolina (33a).** Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (10-20 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 30 %; HRMS (EI): m/z 195.1619 ($C_{12}H_{21}NO$ requiere 195.1623); IR: ν_{\max} 2960, 2920, 2860, 1630, 1550, 1410, 1350, 1160, 1110, 1050 y 840; 1H NMR: δ_H 7.0 y 6.5 (m+m, 1H, H-2), 5.2 (m, 1H, H-3), 3.8 (dd, $J=9$ Hz, 2H, H-5), 2.7 y 2.6 (m+m, 2H, H-4), 2.3 y 2.2 (t+t, $J=7$ Hz, 2H, H-2'), 1.6 (m, 2H, H-3'), 1.3 (m, 8H, $(CH_2)_4CH_3$) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR: δ_C 169.1 ($C_{1'}$), 129.3 y 128.9 (C_2), 111.3 y 111.0 (C_3), 45.5 y 44.7 (C_5), 34.5, 34.2 (C_4), 31.6, 29.3, 29.0, 25.0, 22.5 (C_4 , C_2 - C_7) y 14.0 (CH_3); MS: m/z 195 (M^+ , 12), 156 (5), 145 (33), 141 (98), 129 (48), 127 (52), 111 (39), 98 (26), 86 (45), 70 (73), 69 (64), 57 (100) y 55 (37).

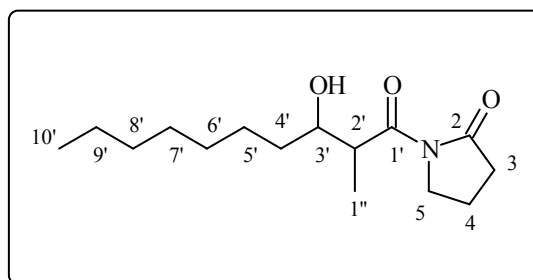


***N*-Oct-6-enoil-2-pirrolina (33b).** Eluyente: Mezclas hexano-AcOEt (15-20 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento 28 %; HRMS (EI): m/z 194.1463 ($C_{12}H_{19}NO$ requiere 193.1466); IR: ν_{\max} 2920, 2850, 1647, 1224, 1333, 1106, 964, 734 y 612; 1H NMR: δ_H 7.0 y 6.5 (m+m, 1H, H-2), 5.4 (m, 2H, H-6'-H-7'), 5.2 (m, 1H, H-3), 3.8 (dd, $J=9$ Hz, 2H, H-5), 2.7 y 2.6 (m+m, 2H, H-4), 2.3 y 2.2 (t+t, $J=7$ Hz, 2H, H-2'), 2.0 (m, 4H, H-4+H-5'), 1.6 (m, 5H, H-3'+H-8') y 1.4 (m, 2H, H-4'); ^{13}C NMR: δ_C 169.0 ($C_{1'}$), 130.9 (C_6'), 130.9 y 129.2 (C_2), 125.0 ($C_{7'}$), 111.4 y 110.1 (C_3), 45.5 y 44.8 (C_5), 34.1(C_4), 32.2, 30.1, 29.2, 24.4 (C_2 - C_5) y 17.9 (CH_3); MS: m/z 193 (M^+ , 37), 138 (5), 124 (21), 111 (17), 97 (11), 96 (11), 84 (18), 81 (35), 69 (72), 68 (100) y 55 (98).



5-[1-(2,5-Dihidro-1H-pirrolil)octiliden]-2,2-dimetil-1,3-dioxan-4,6-diona

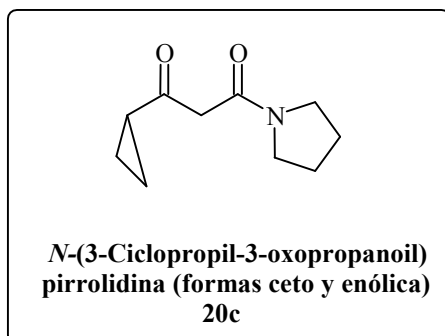
(26). Eluyente: mezclas hexano-AcOEt (20-40 %, con gradiente de polaridad). Rendimiento: 28 % (a partir del cloruro de octanoilo); HRMS (EI): m/z 321.1950 ($C_{18}H_{27}NO_4$ requiere 321.1940); IR: ν_{\max} 3080, 2920, 2840, 1740, 1705, 1660, 1640, 1410, 1390, 1330, 1290, 1200, 1150, 1040, 950, 930, 790, 730 y 660; 1H NMR: δ_H 6.0 y 5.9 (m+m, 2H, CH=CH), 4.6 y 4.5 (s a+s a, 4H, 2xNCH₂), 3.2 (t, $J=8$ Hz, 2H, H-2'), 1.7 (s, 6H, C(CH₃)₂), 1.6 (m, 2H, H-3'), 1.3 (m, 8H, (CH₂)₄CH₃) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH₃); ^{13}C NMR: δ_C 180.3 (C_{1'}), 162.2 (C₄+C₆), 126.1 y 122.3 (CH=CH), 101.8 (C₂), 82.0 (C₅), 60.7 y 57.8 (2xNCH₂), 34.9, 31.4, 29.5, 28.7, 26.9, 26.0, 22.4 (C_{3'}-C₉, C(CH₃)₂) y 13.9 (CH₃); MS: m/z 321 (M⁺, 2), 320 (9), 319 (8), 305 (6), 265 (30), 246 (16), 238 (18), 235 (17), 220 (10), 203 (10), 191 (52), 177 (100), 160 (69), 148 (50), 134 (62), 121 (45), 118 (45), 106 (60), 92 (38) y 81 (46); Anal. Calcd. para C₁₈H₂₇NO₄ 65.75 %, C; 8.49 %, H. Encontrado 65.42 %, C; 8.58 %, H.



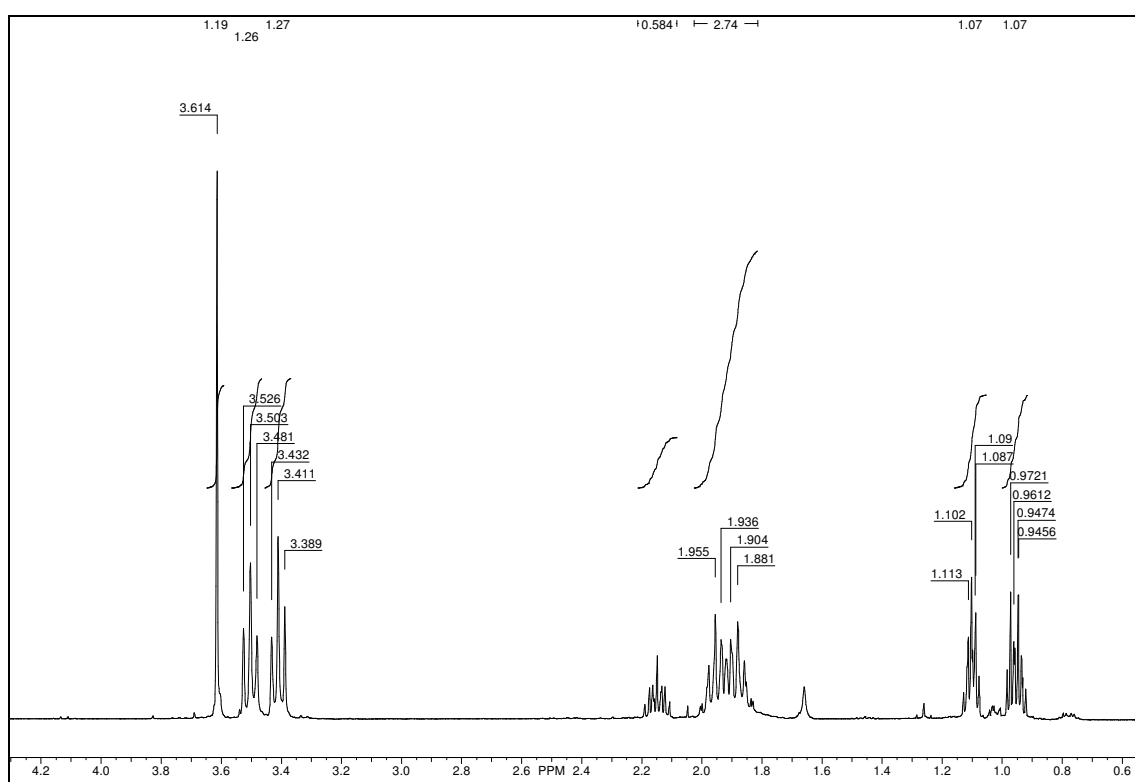
N-(3-Hidroxi-2-metildecanoil)-2-pirrolidona (30). Sobre una disolución, enfriada a -30 °C, de la cetoimida **29** (170 mg, 0.6 mmol) en CH₂Cl₂ (35.0 mL) se vertió Zn(BH₄)₂ (0.14 M en éter dietílico; 4.5 mL, 0.6 mmol). Después de 1 h 15 min. de agitación continua, donde se permitió subir la temperatura hasta -20 °C, se añadió acetona en exceso y se calentó a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con agua y disolución saturada de NaCl, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía de columna utilizando como

eluyente mezclas hexano-AcOEt (8:2) obteniendo la β -hidroxiimida **30** (82 mg, 49 %) como un aceite amarillento. HRMS (EI): m/z 270.2067 ($M+H^+$, $C_{15}H_{28}NO_3$ requiere 270.2069); IR: ν_{max} 3450, 2920, 2840, 1740, 1690, 1450, 1350, 1250, 1220, 1090, 1020, 970, 930, 890 y 830; 1H NMR: δ_H 3.9 (m, 1H, H-3'), 3.8 (td, $J=7$ y 2 Hz, 2H, H-5), 3.7 (m, 1H, H-2'), 3.0 (d, $J=3$ Hz, 1H, OH), 2.6 (t, $J=8$ Hz, 2H, H-3), 2.0 (m, 2H, H-4), 1.3 (sa, 8H, $(CH_2)_4CH_3$), 1.2 (d, $J=7$ Hz, 3H, $CHCH_3$) y 0.9 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_2CH_3); ^{13}C NMR: δ_C 178.7 ($C_{1'}$), 175.3 (C_2), 71.5 ($C_{3'}$), 45.7 (C_5), 42.9 ($C_{2'}$), 33.9, 33.8, 31.8, 29.6, 29.2, 26.0, 22.6 ($C_3, C_{4'}$ - $C_{9'}$), 17.0 (C_4), 14.1 y 10.0 ($2 \times CH_3$); MS: m/z 270 ($M+H^+$, 3), 251 (9), 183 (4), 170 (27), 166 (13), 141 (100), 113 (59), 98 (13), 86 (99), 69 (10), 57 (14) y 55 (14).

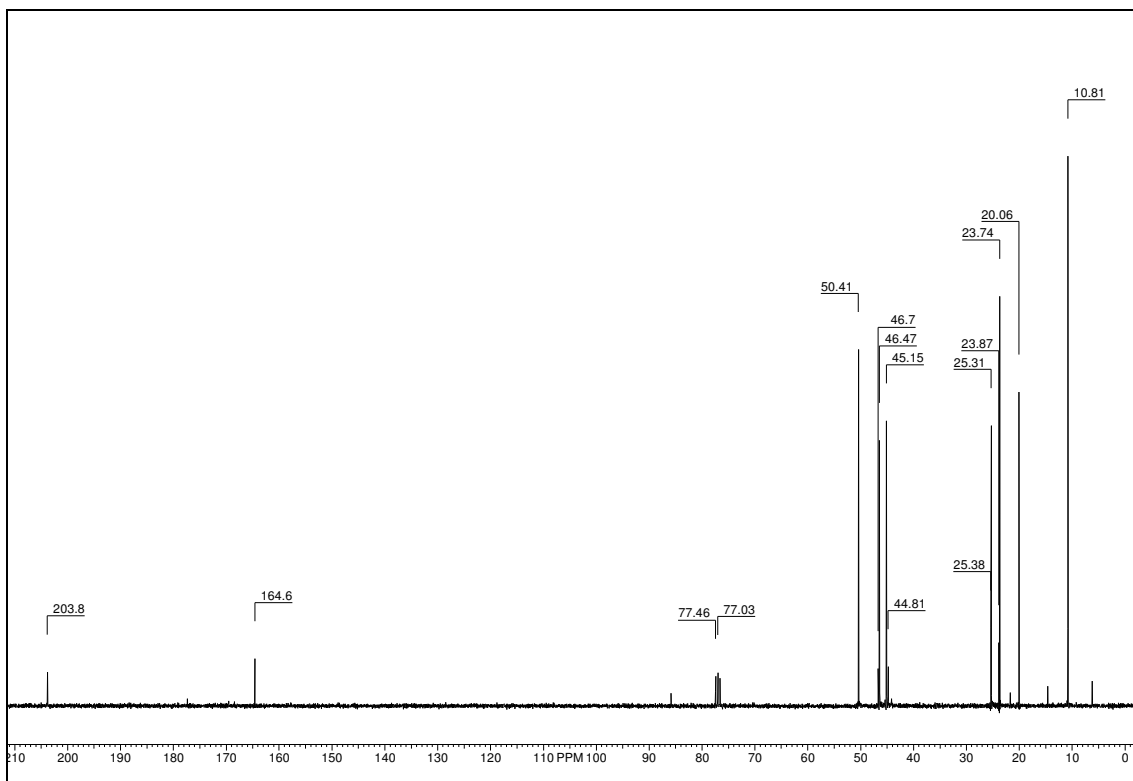
ANEXO III: Análogos
Sintéticos de los
Productos Naturales:
 ^1H y ^{13}C



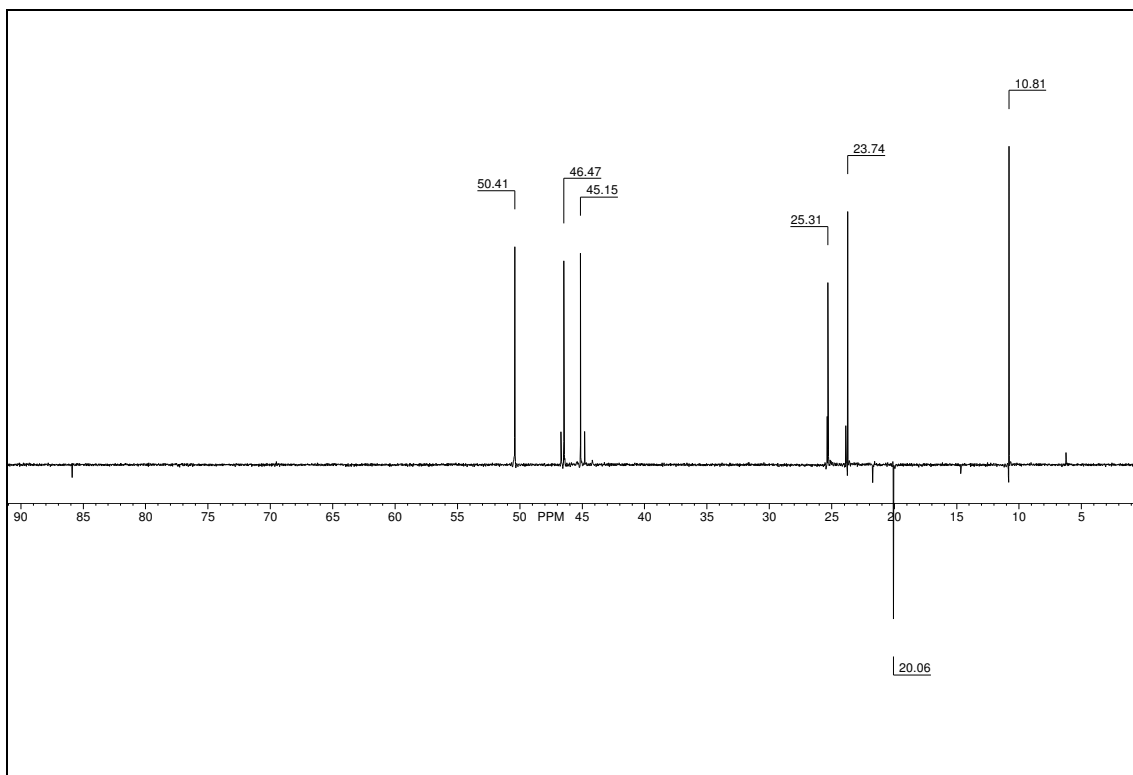
¹H RMN:

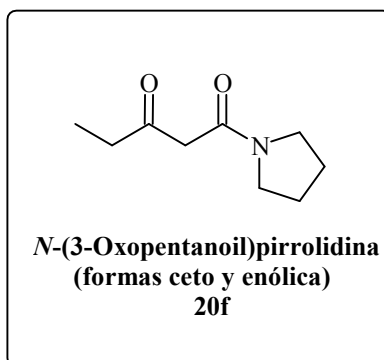


¹³C RMN:

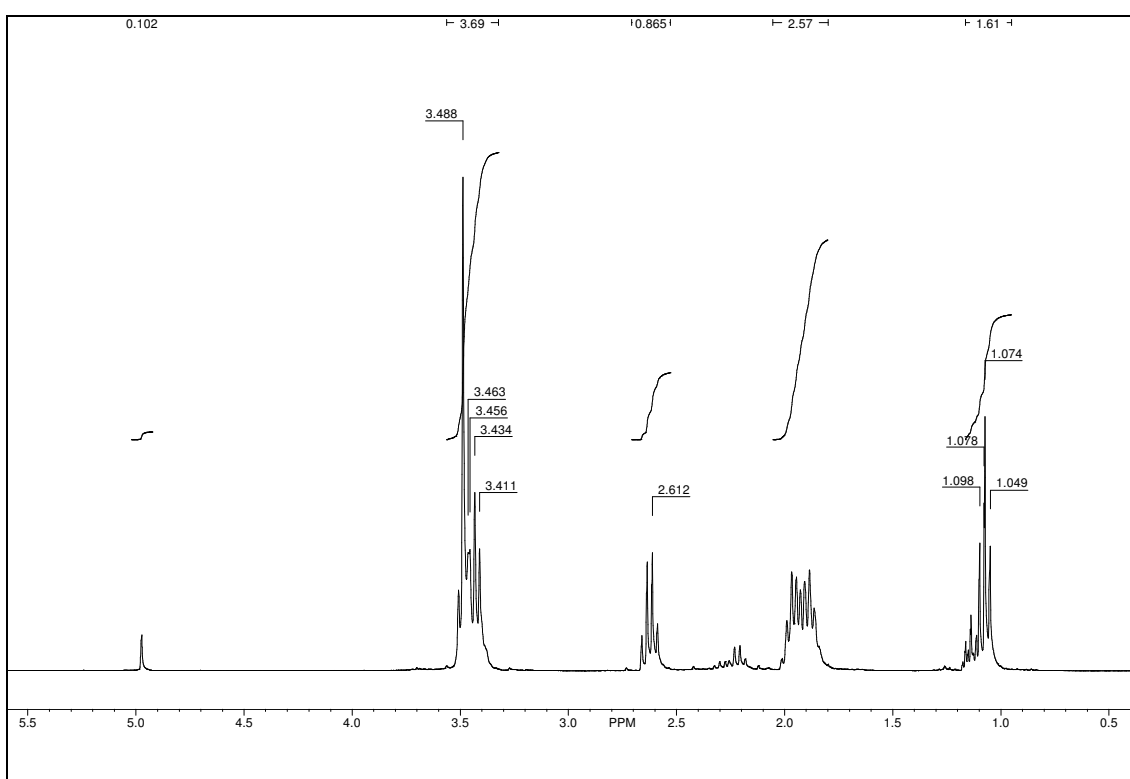


DEPT:

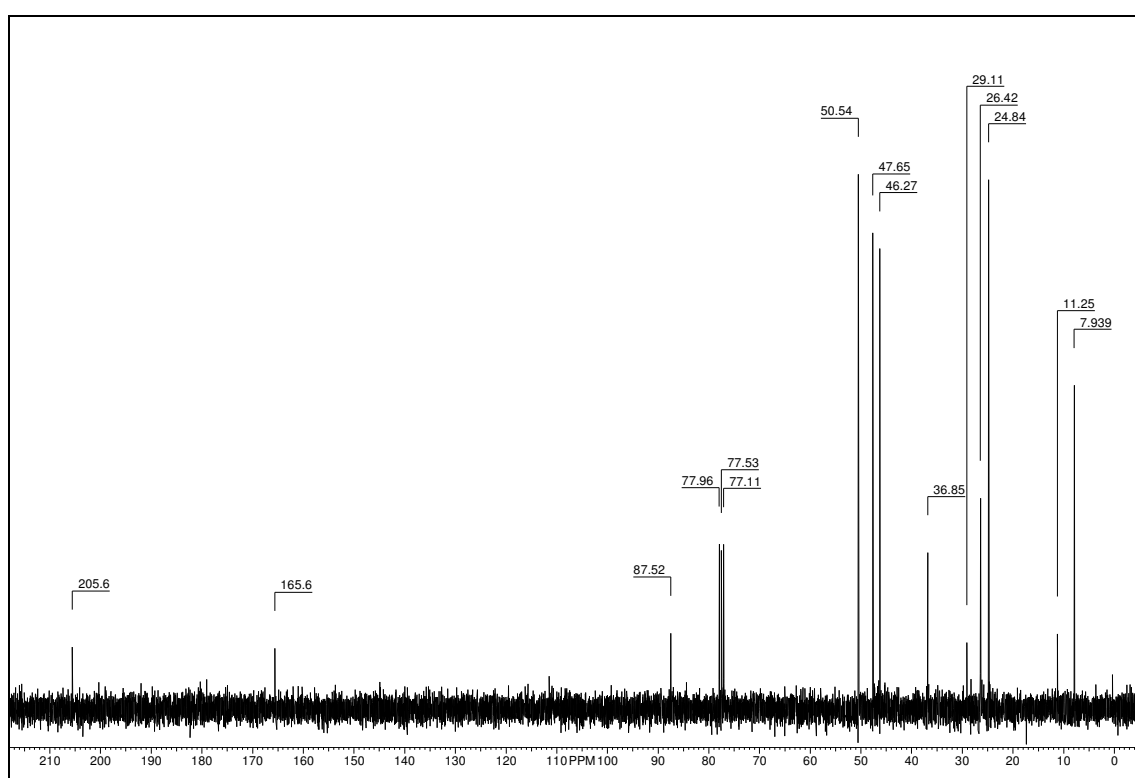


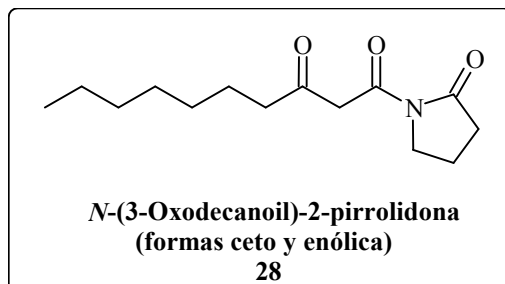


¹H RMN:

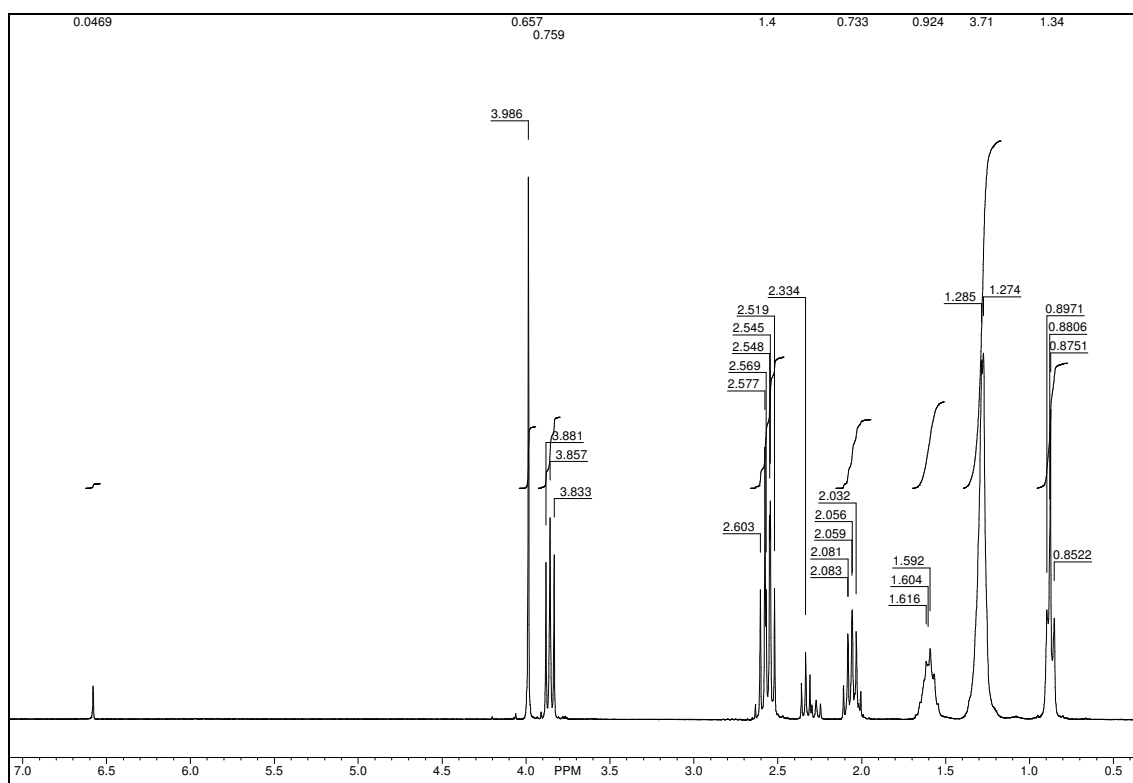


¹³C RMN:

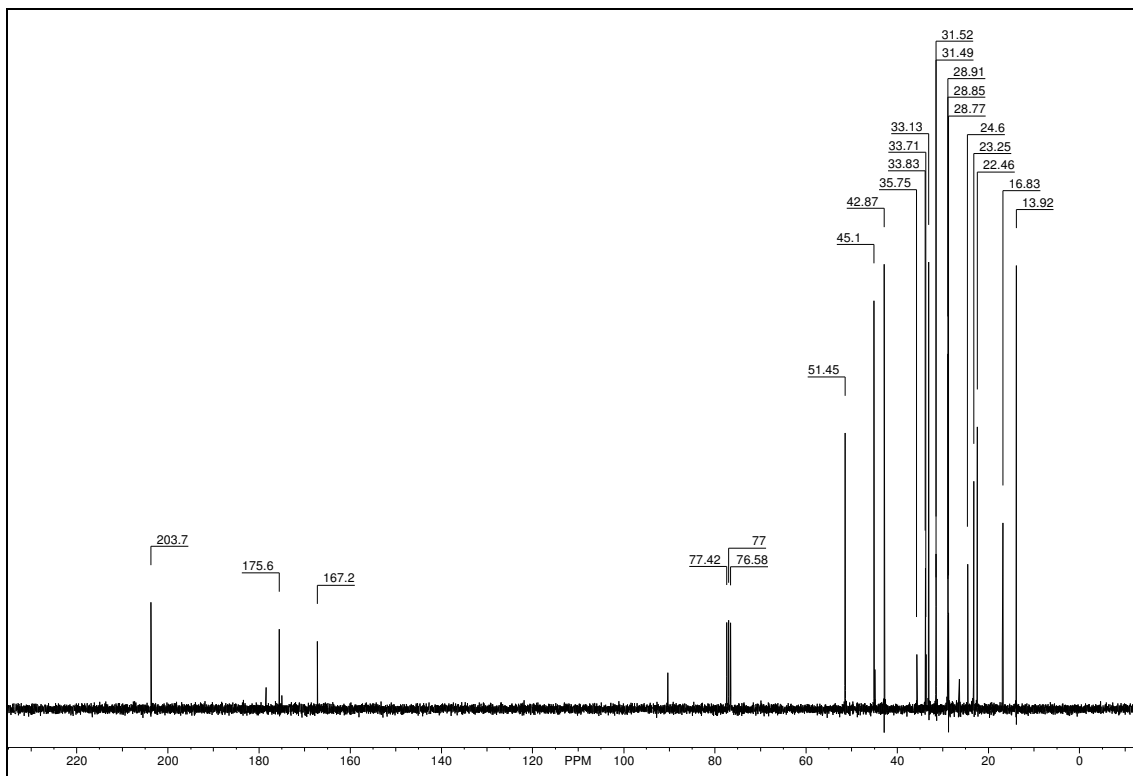




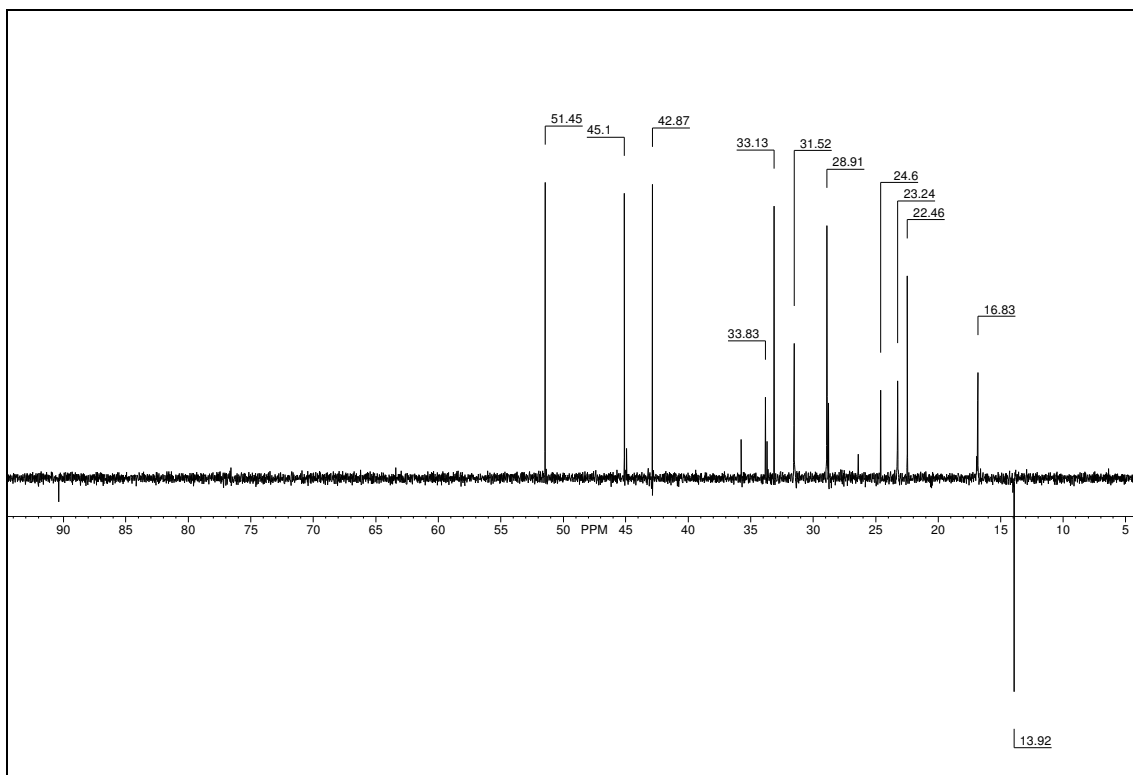
¹H RMN:

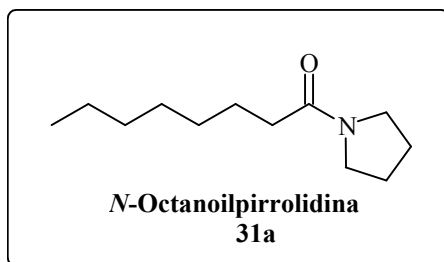


¹³C RMN:

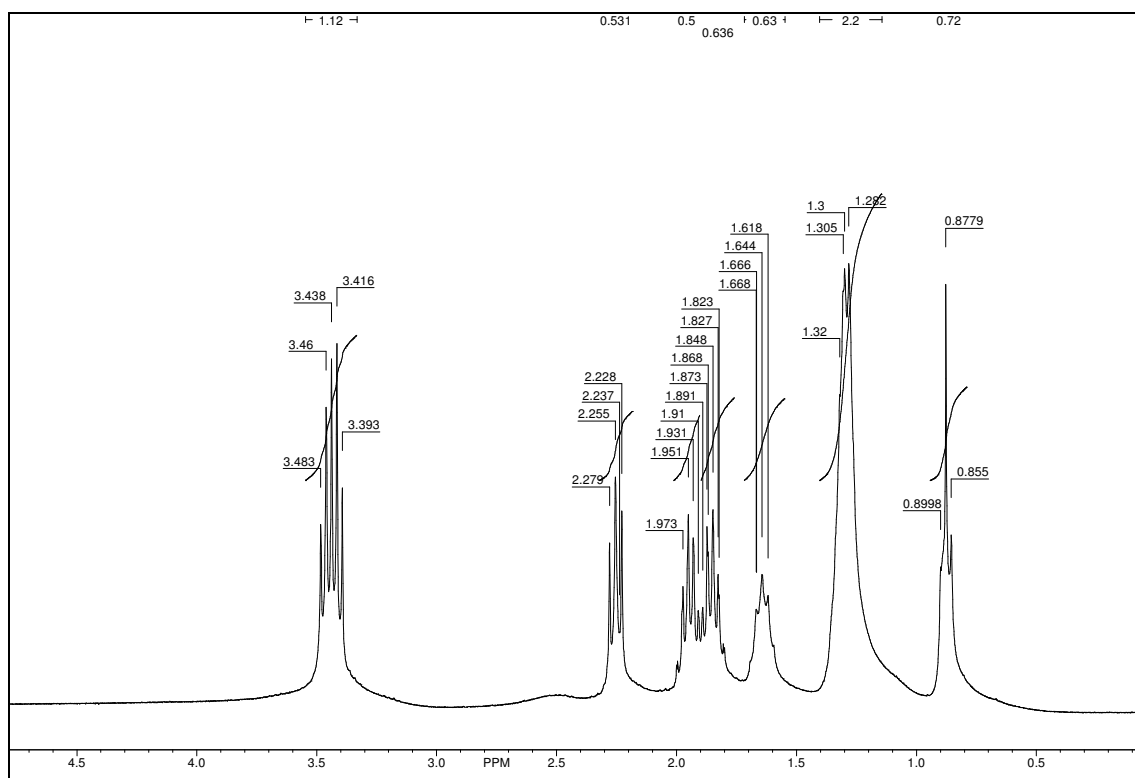


DEPT:

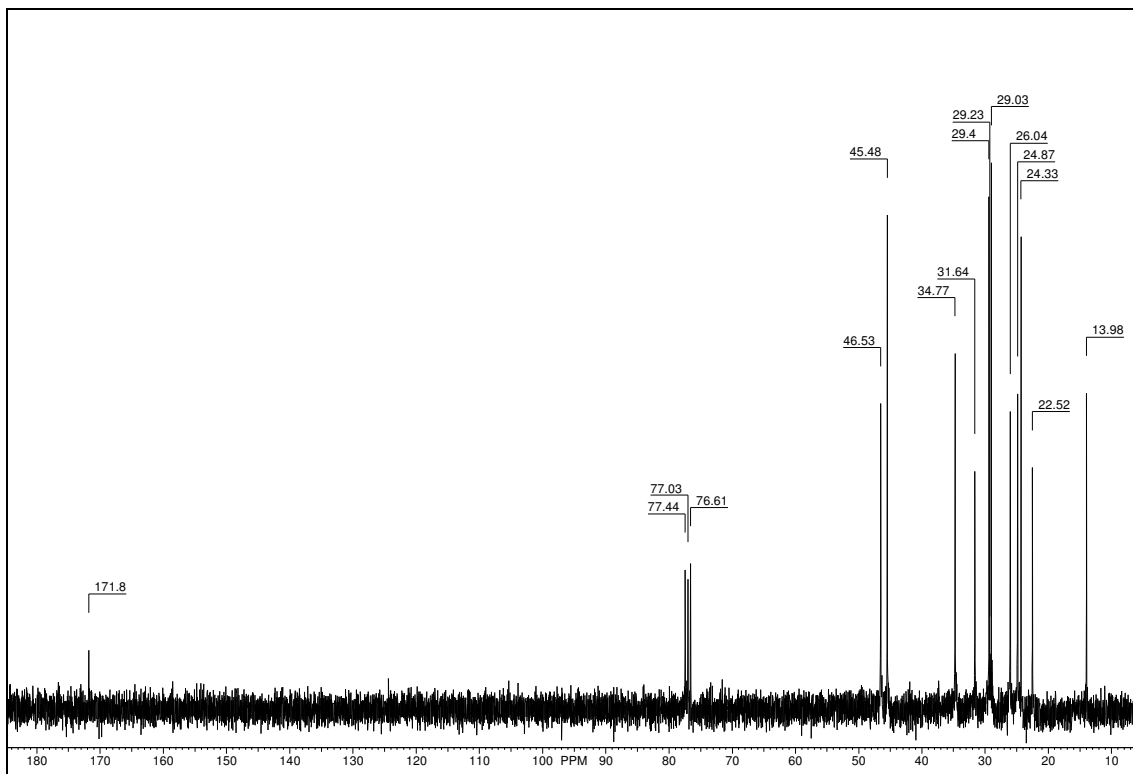




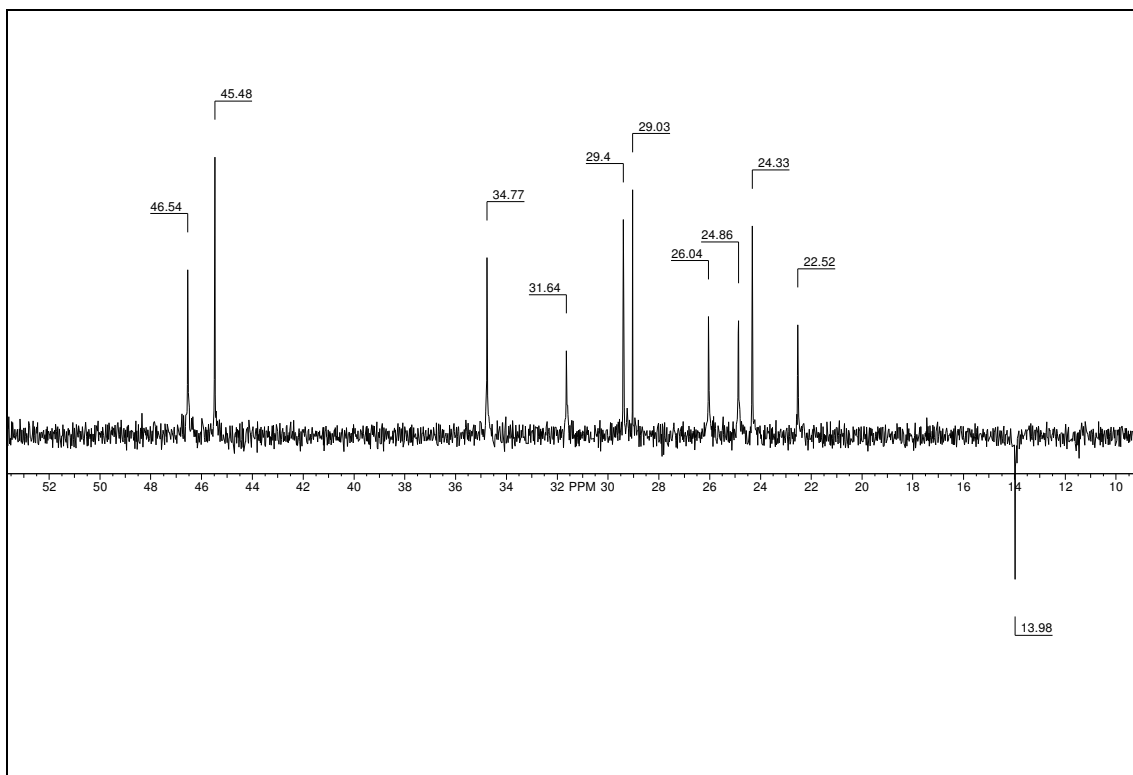
¹H RMN:

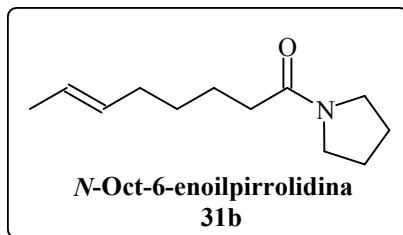


¹³C RMN:

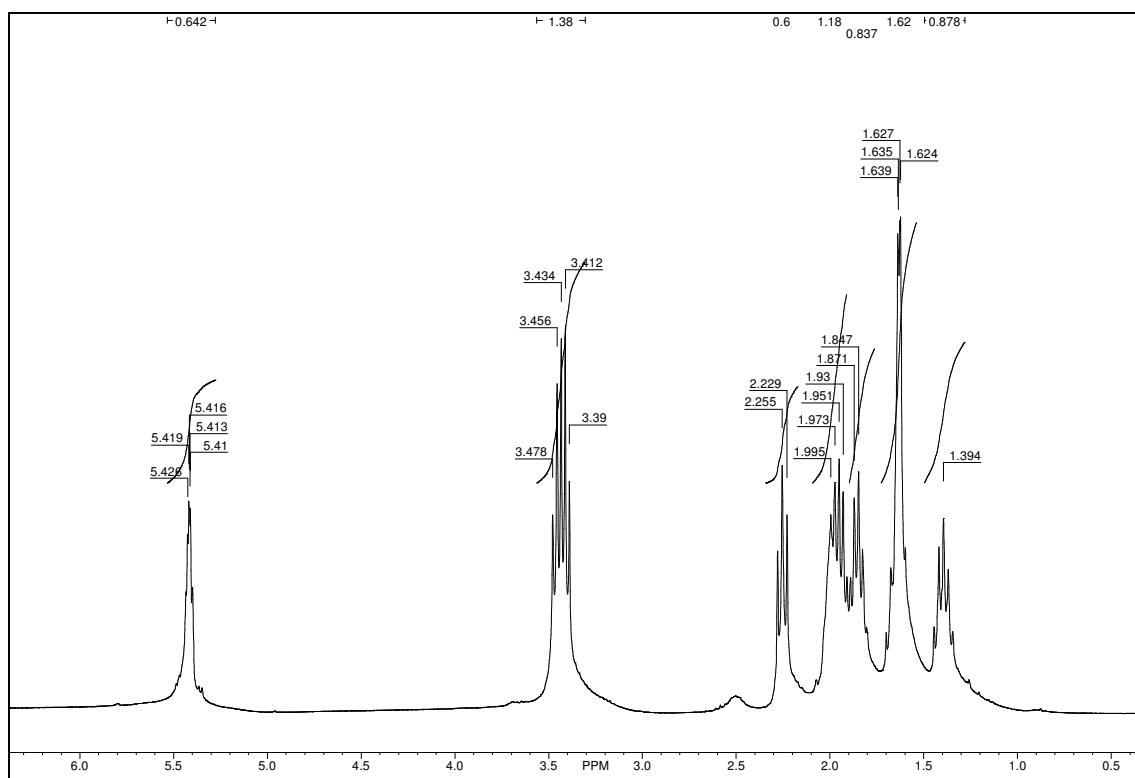


DEPT:

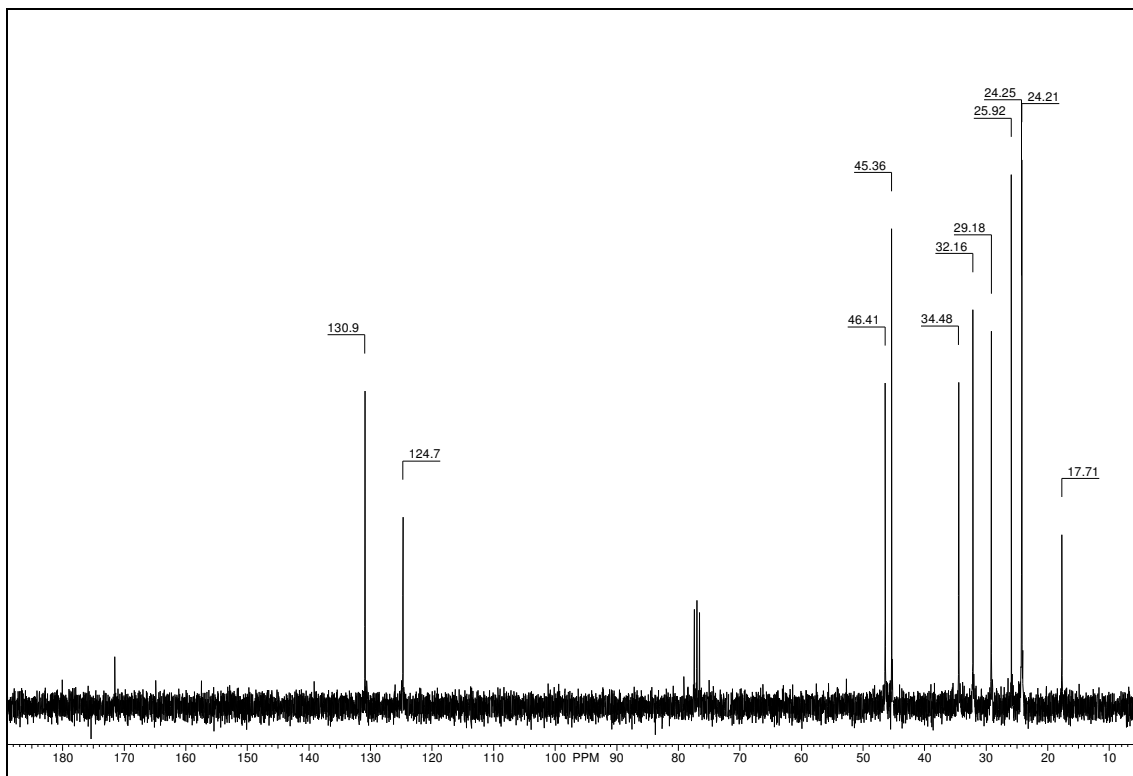




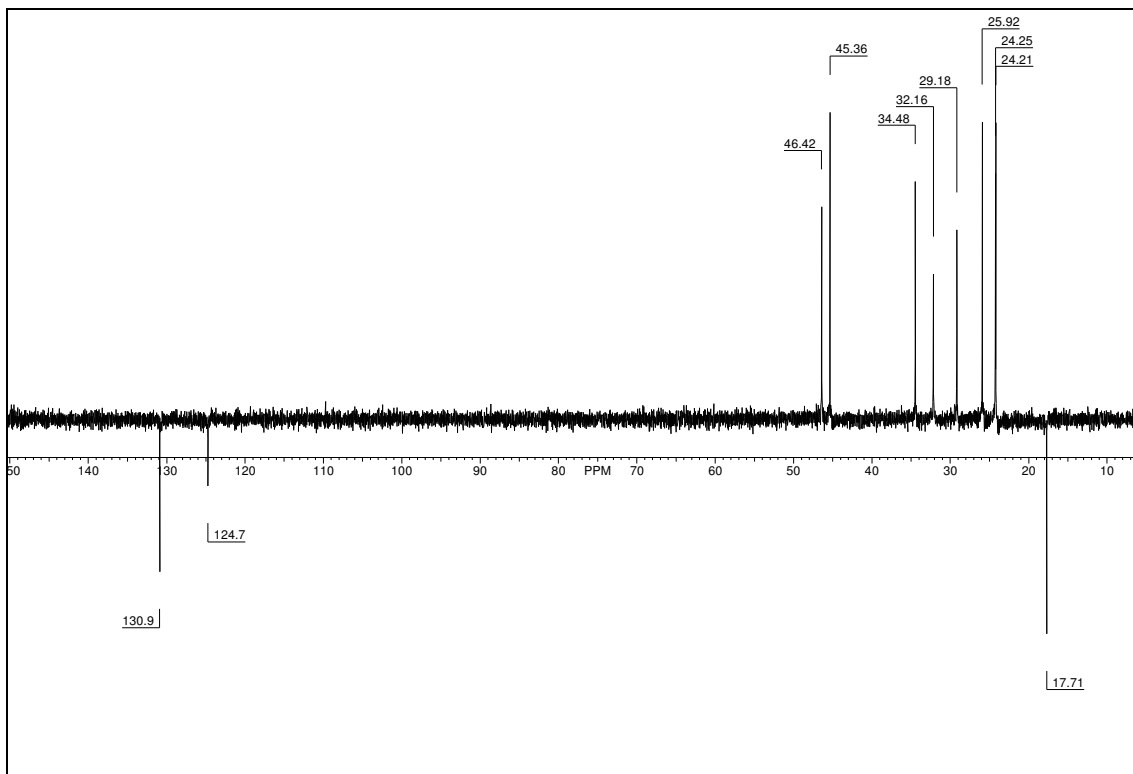
¹H RMN:

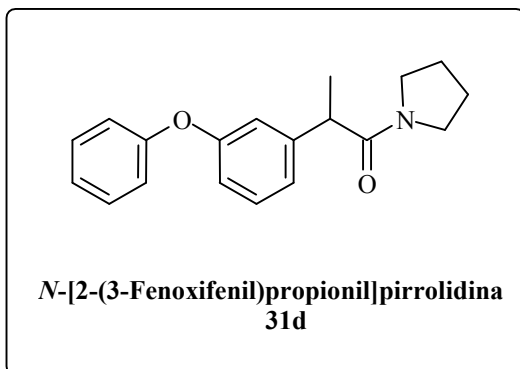


¹³C RMN:

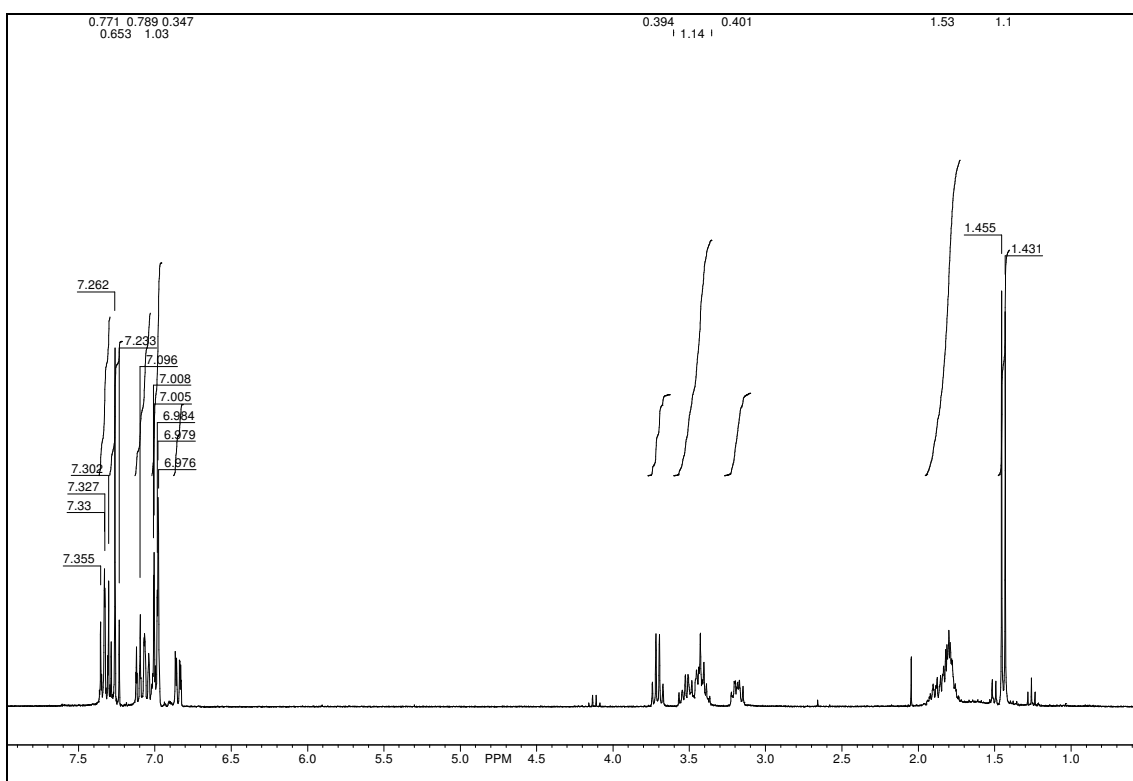


DEPT:

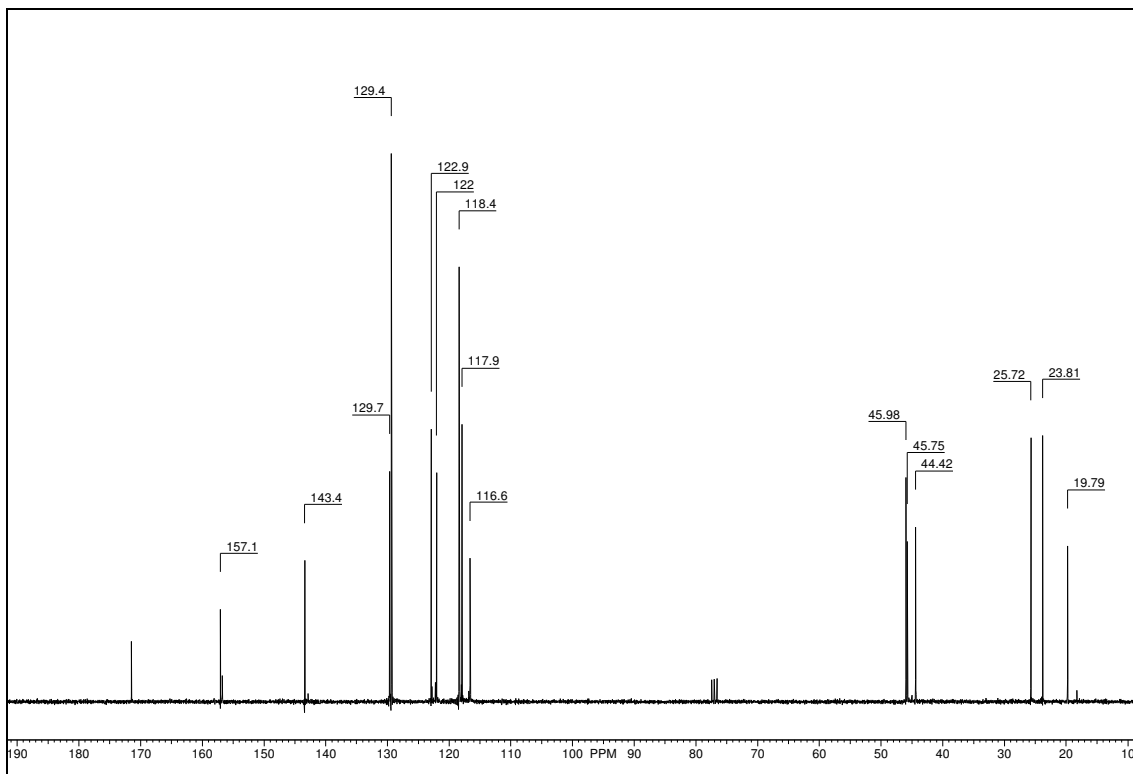




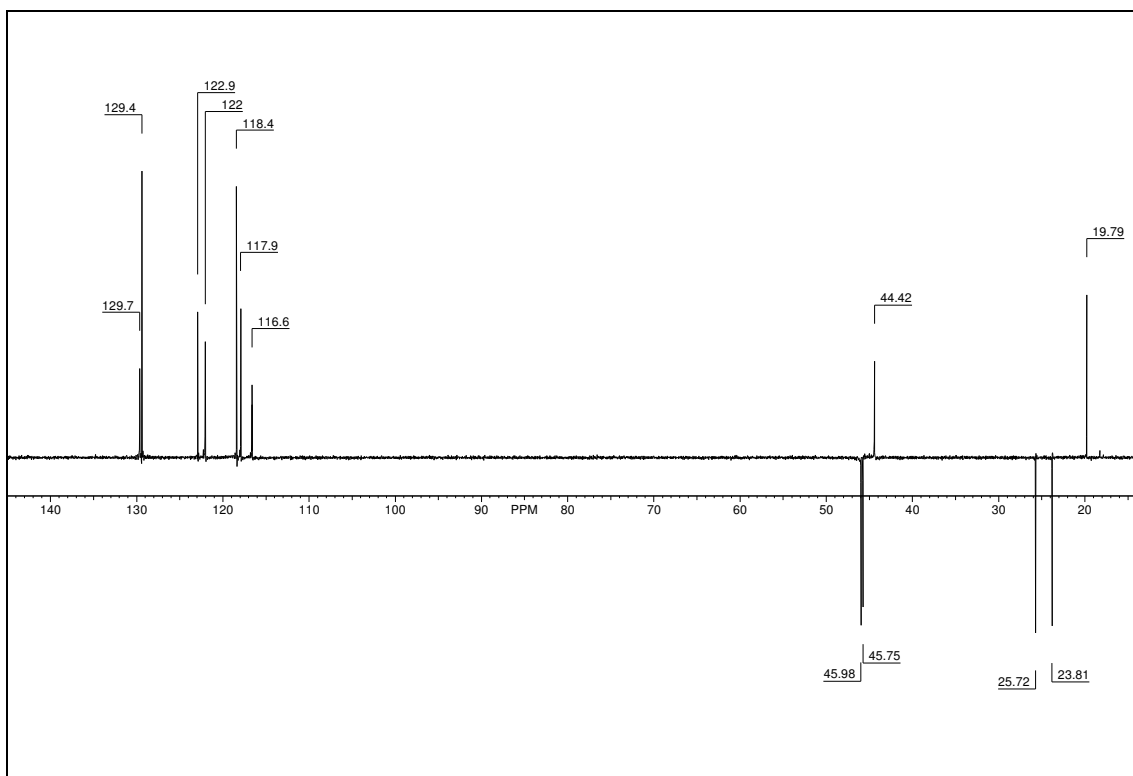
¹H RMN:

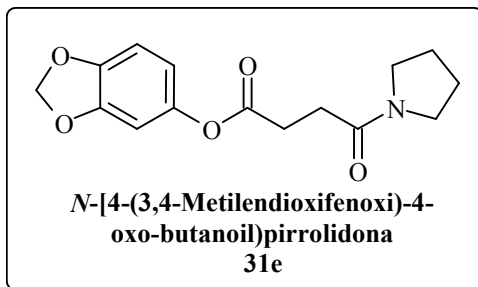


¹³C RMN:

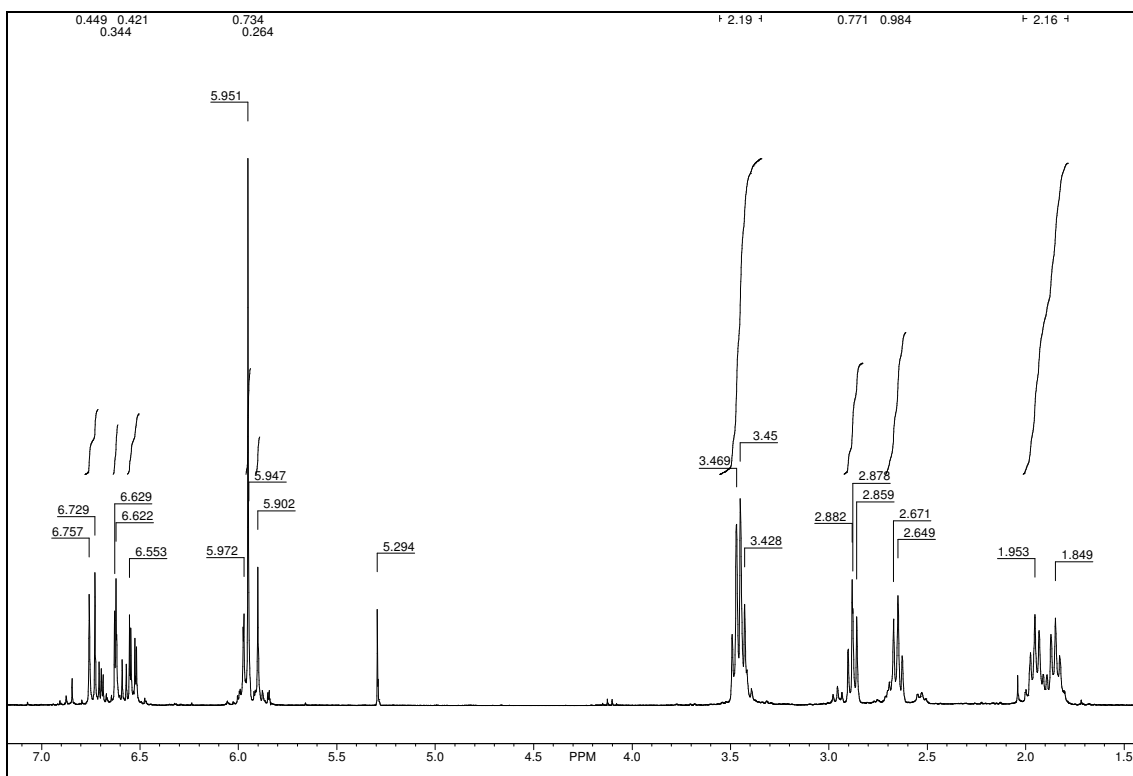


DEPT:

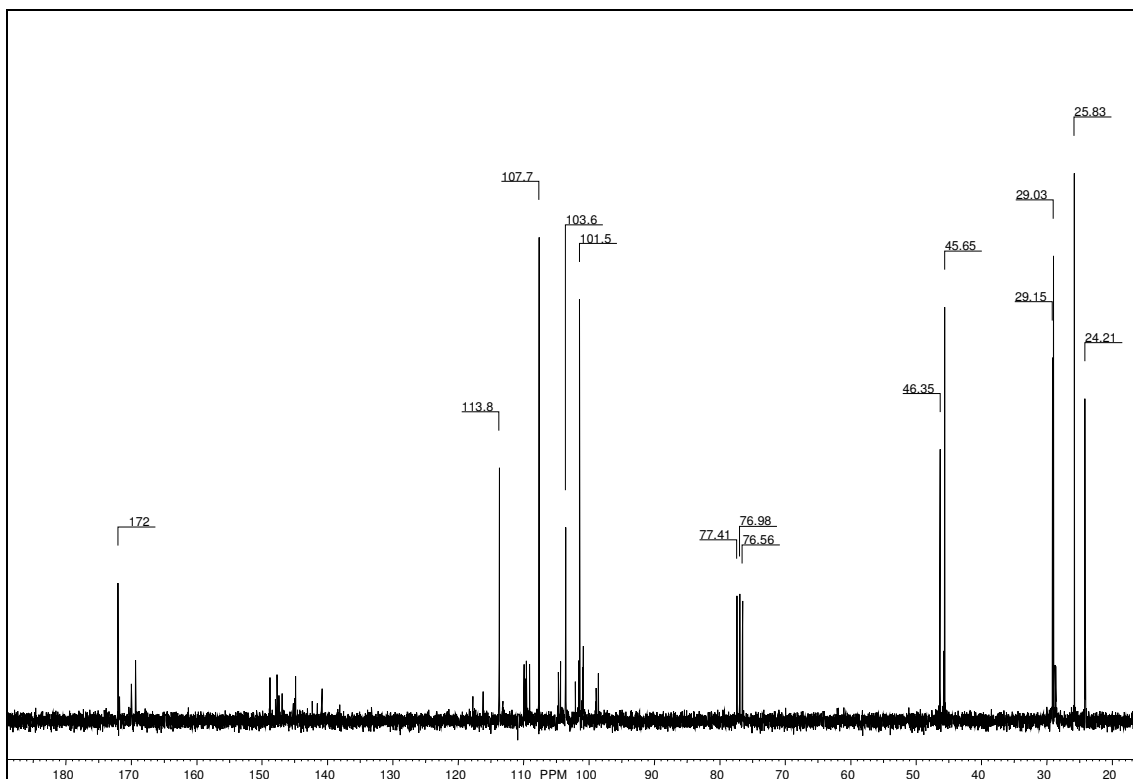




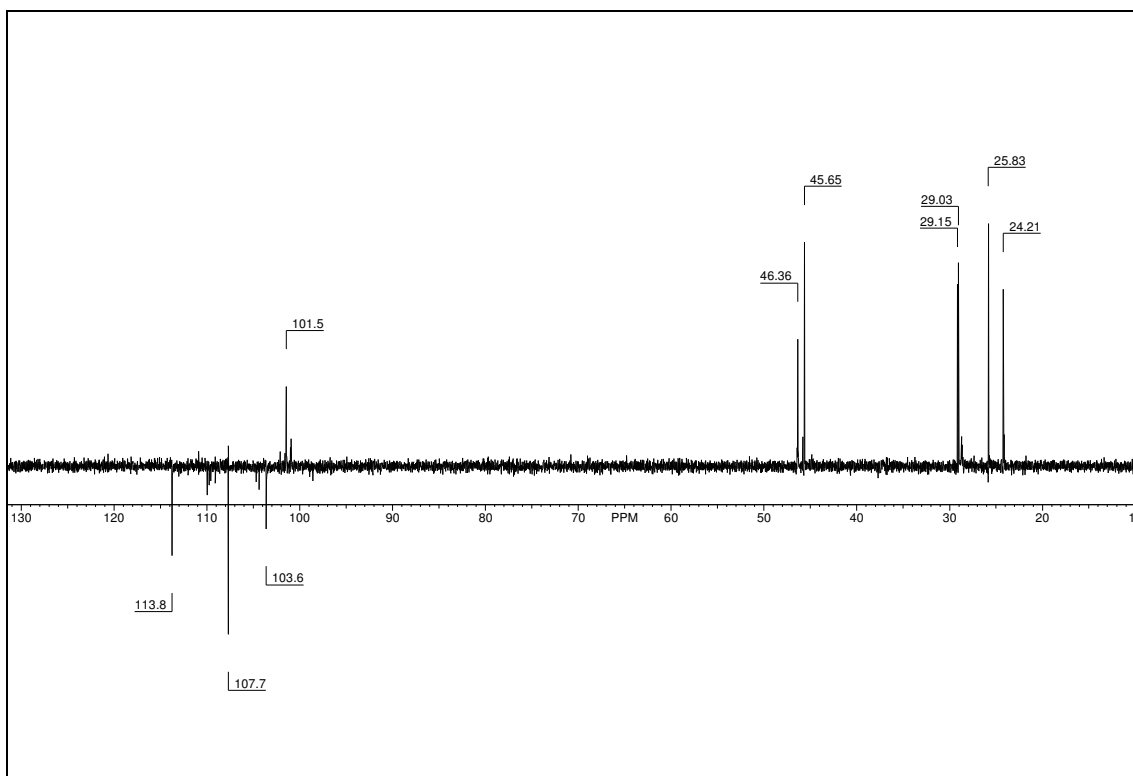
¹H RMN:

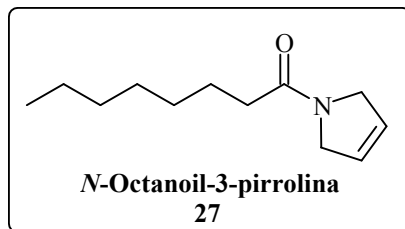


¹³C RMN:

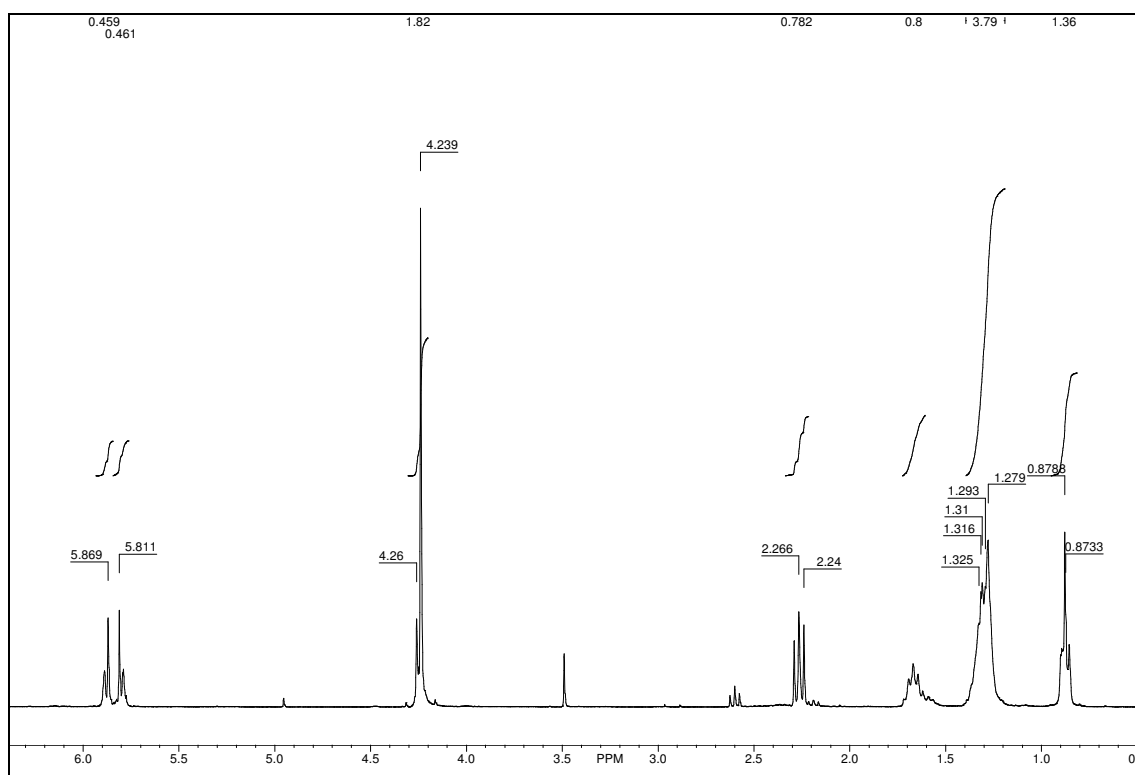


DEPT:

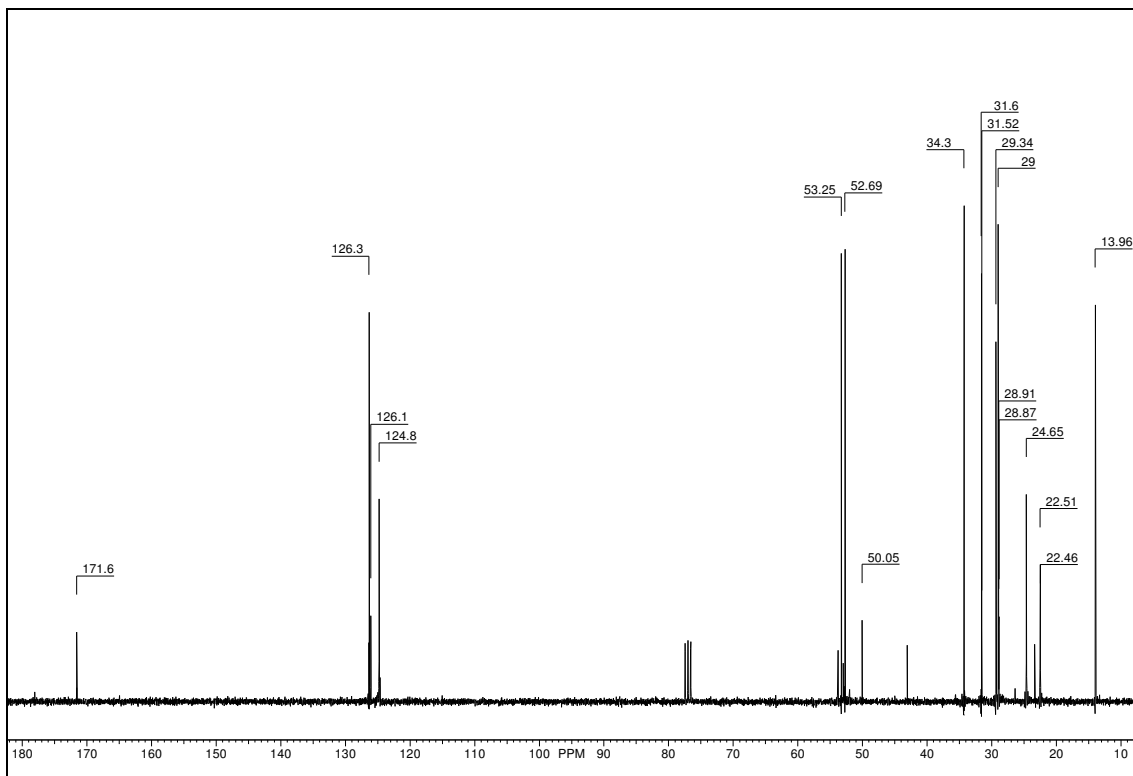




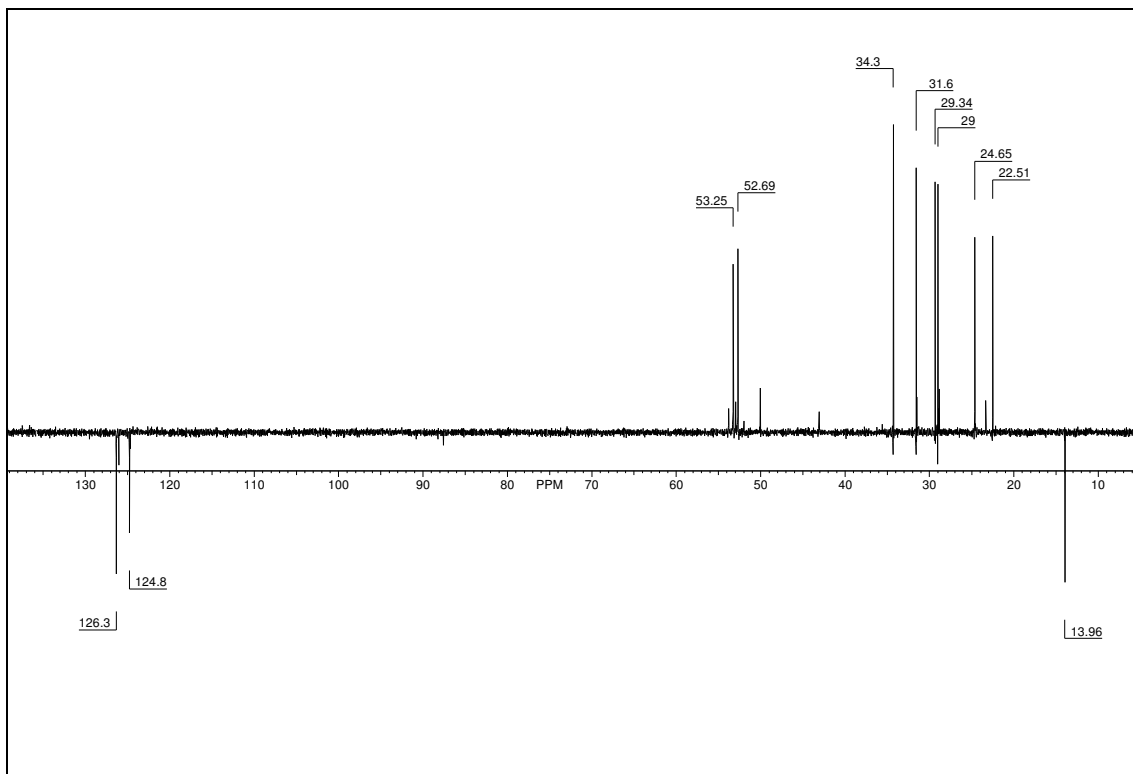
¹H RMN:

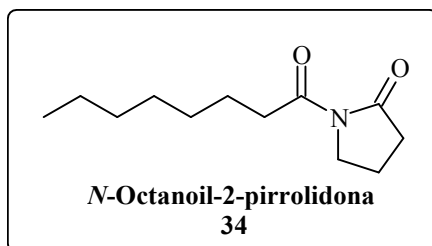


¹³C RMN:

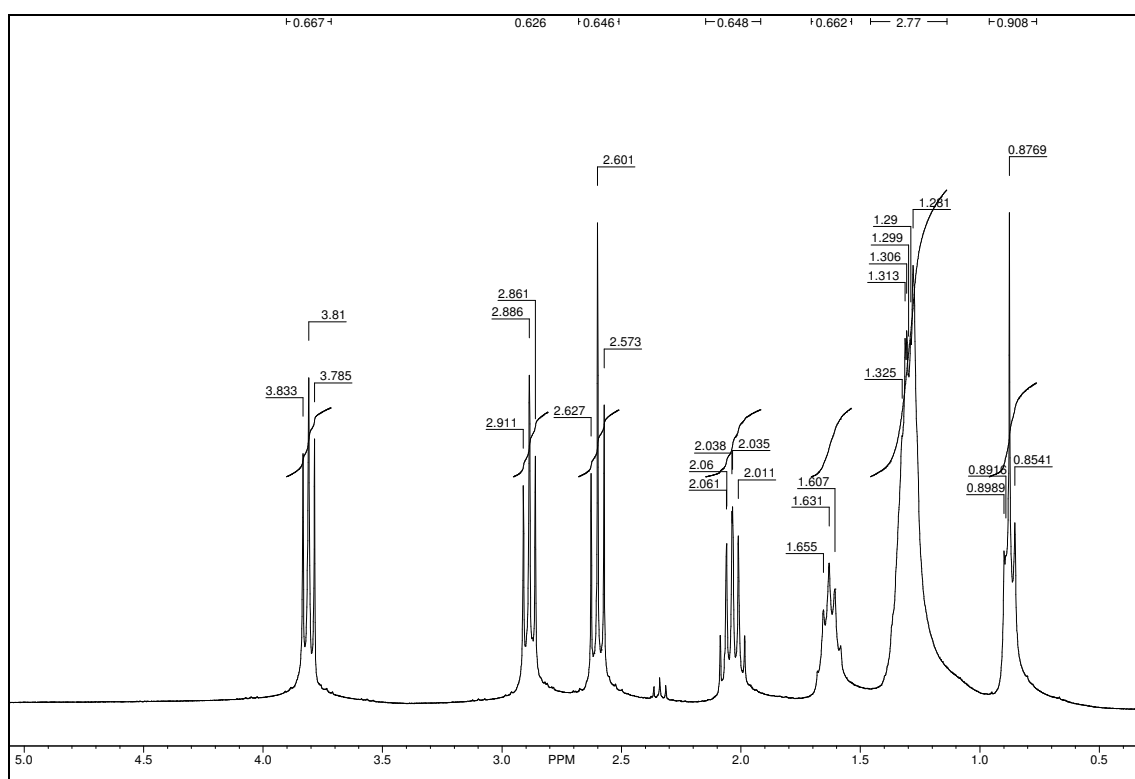


DEPT:

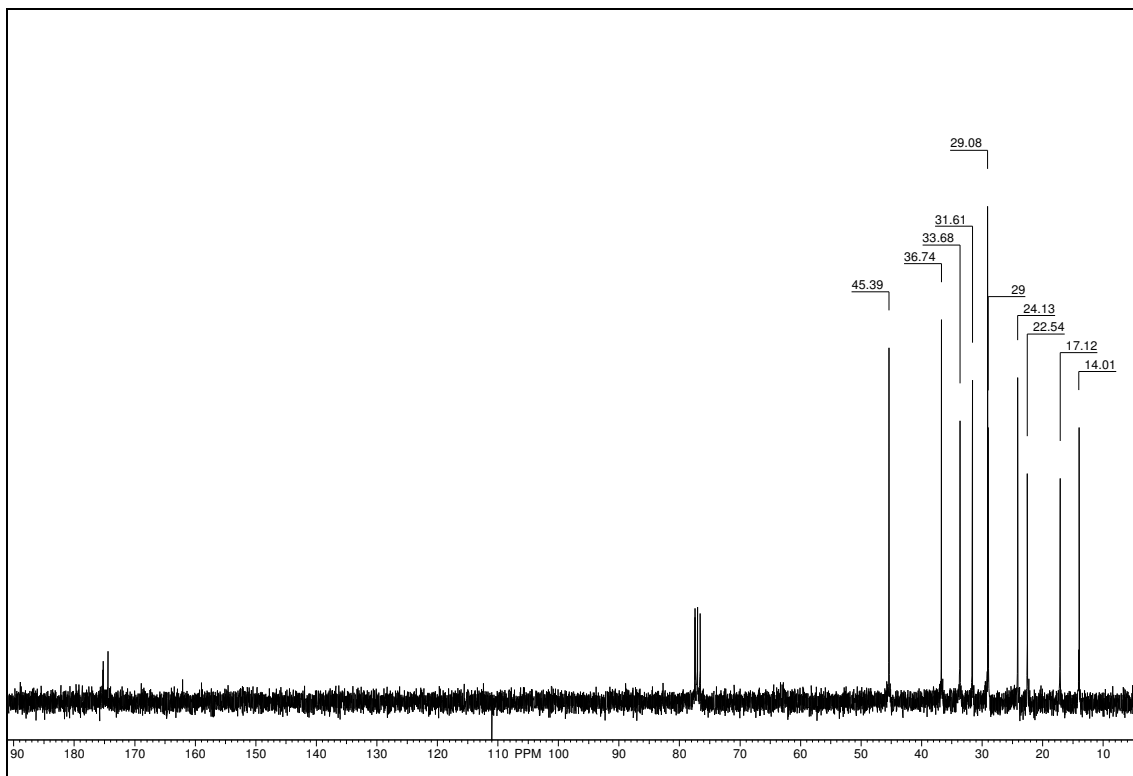




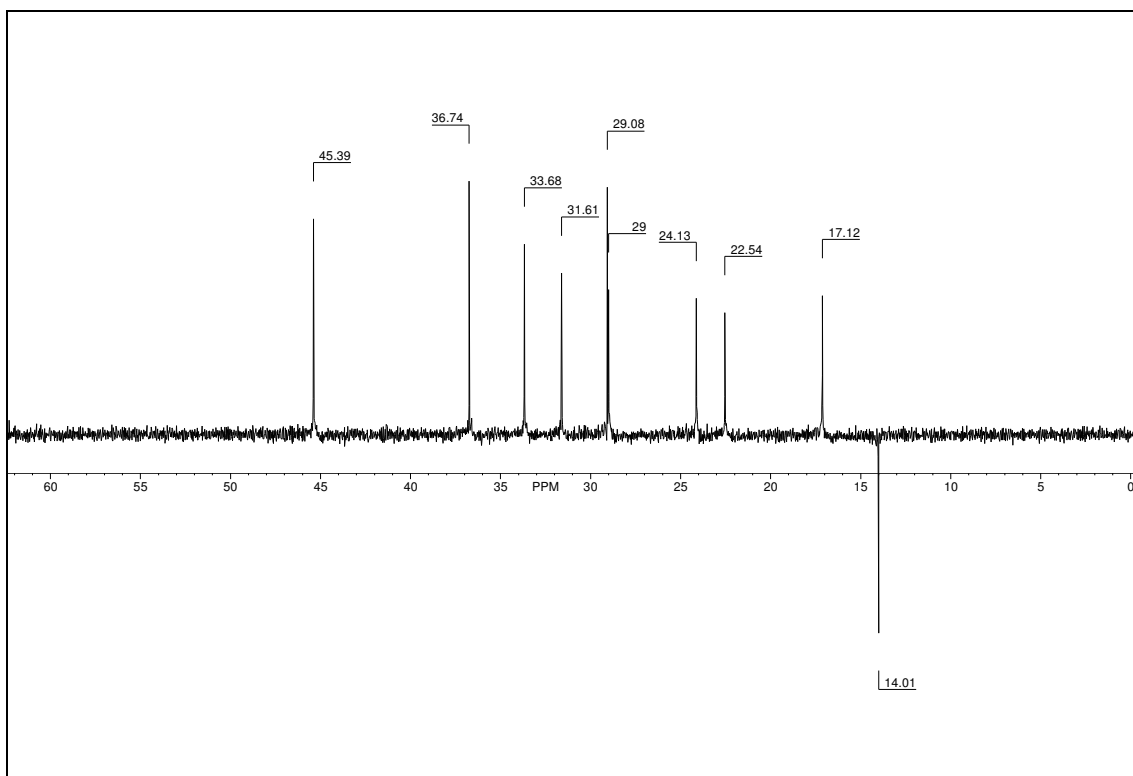
¹H RMN:

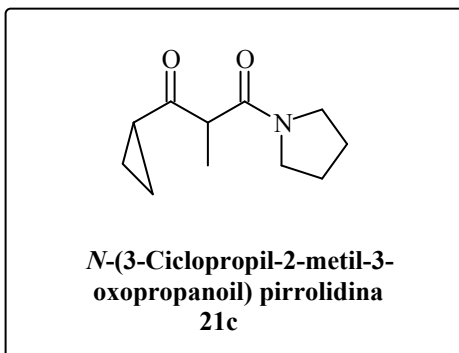


¹³C RMN:

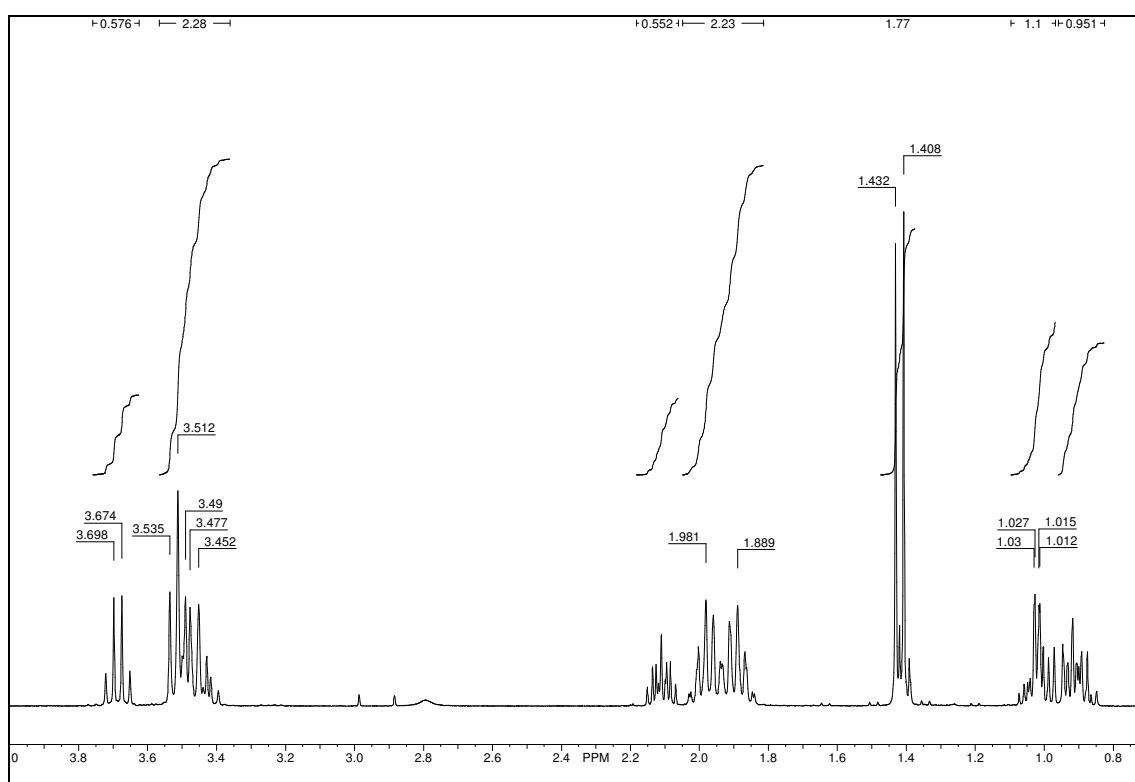


DEPT:

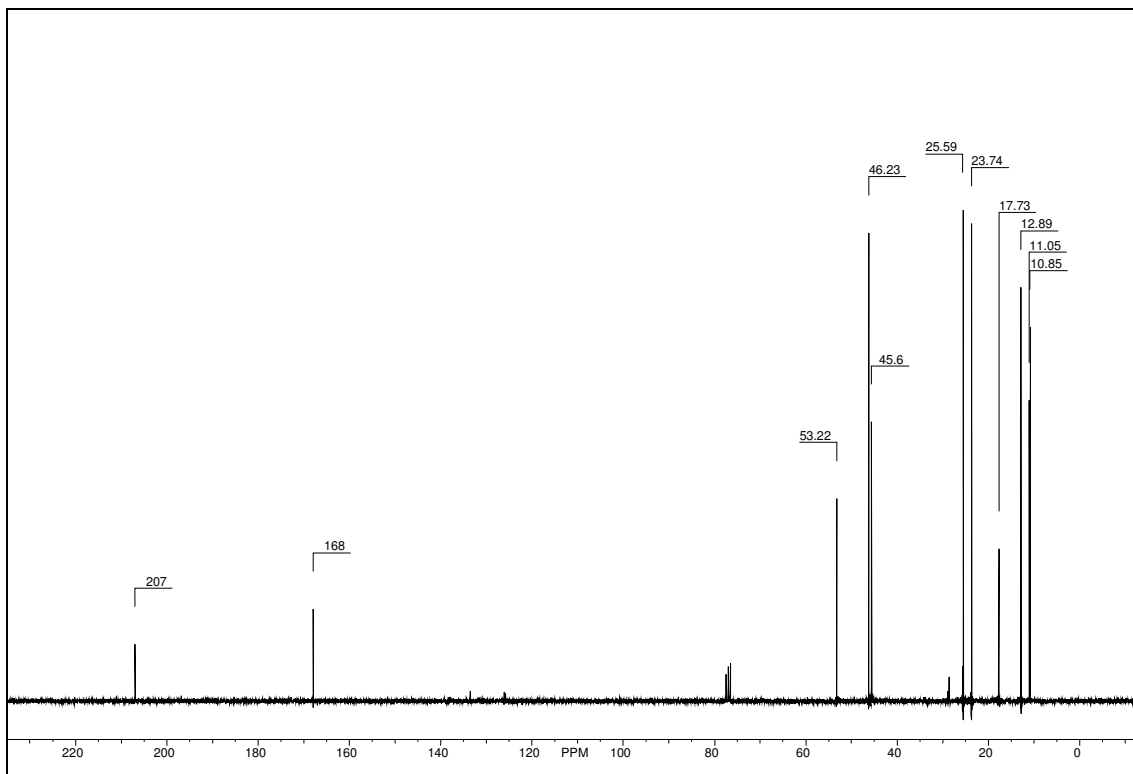




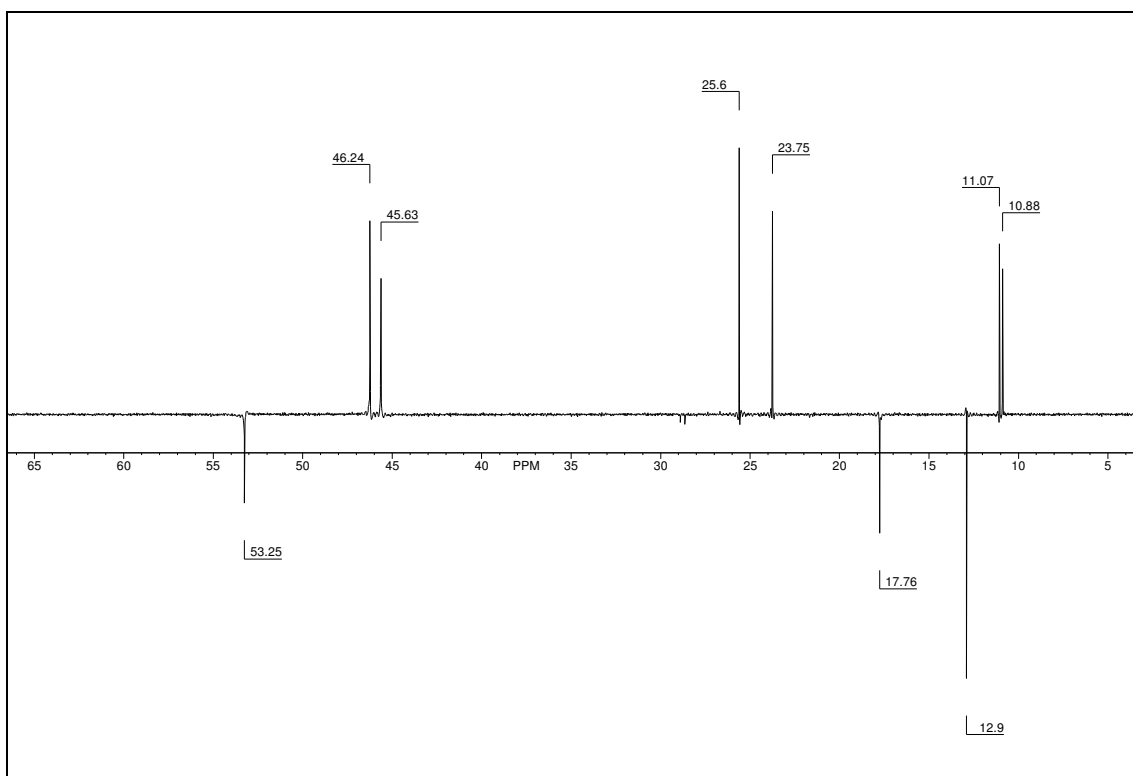
¹H RMN:

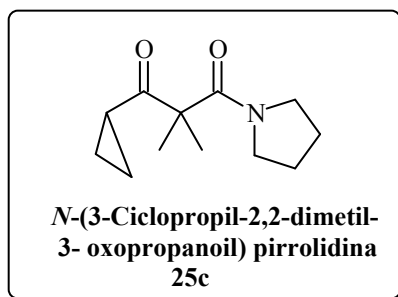


¹³C RMN:

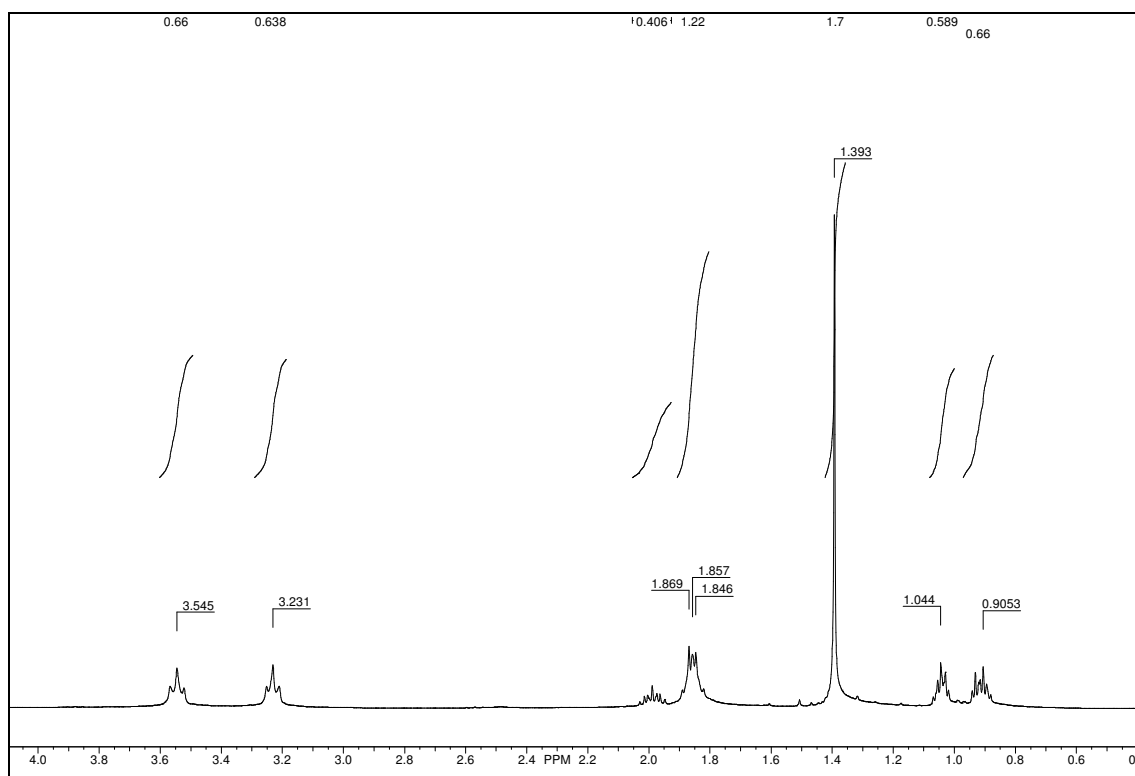


DEPT:

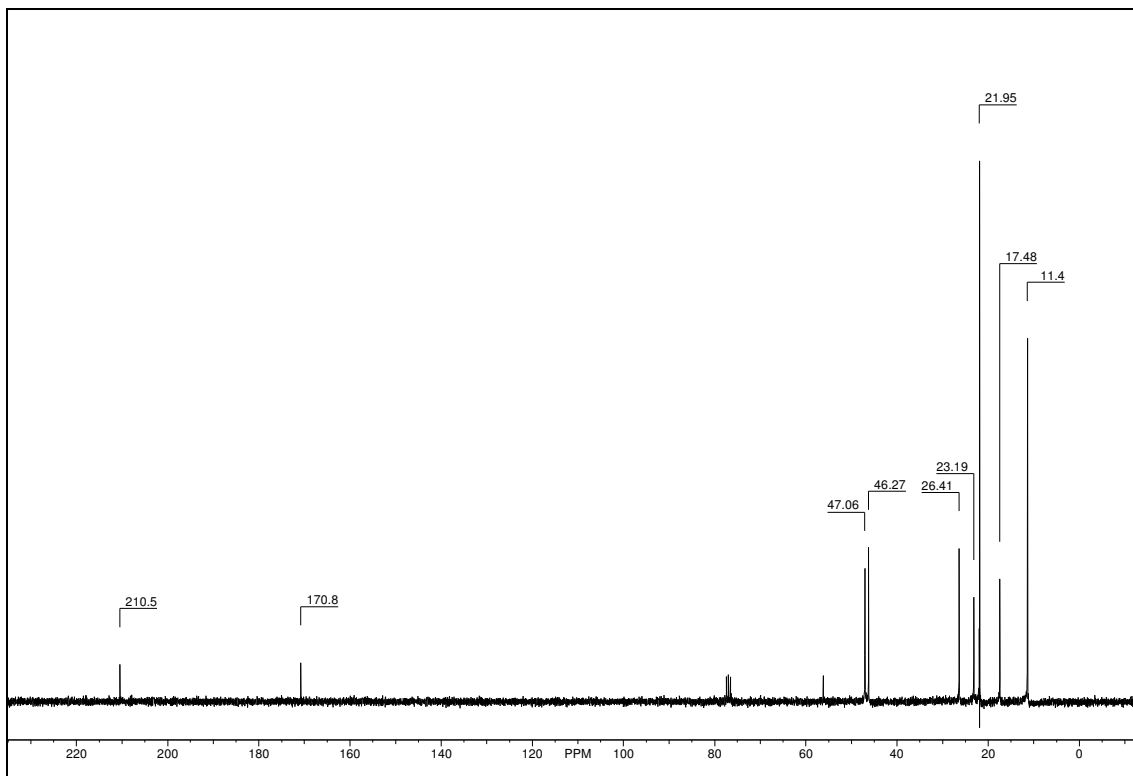




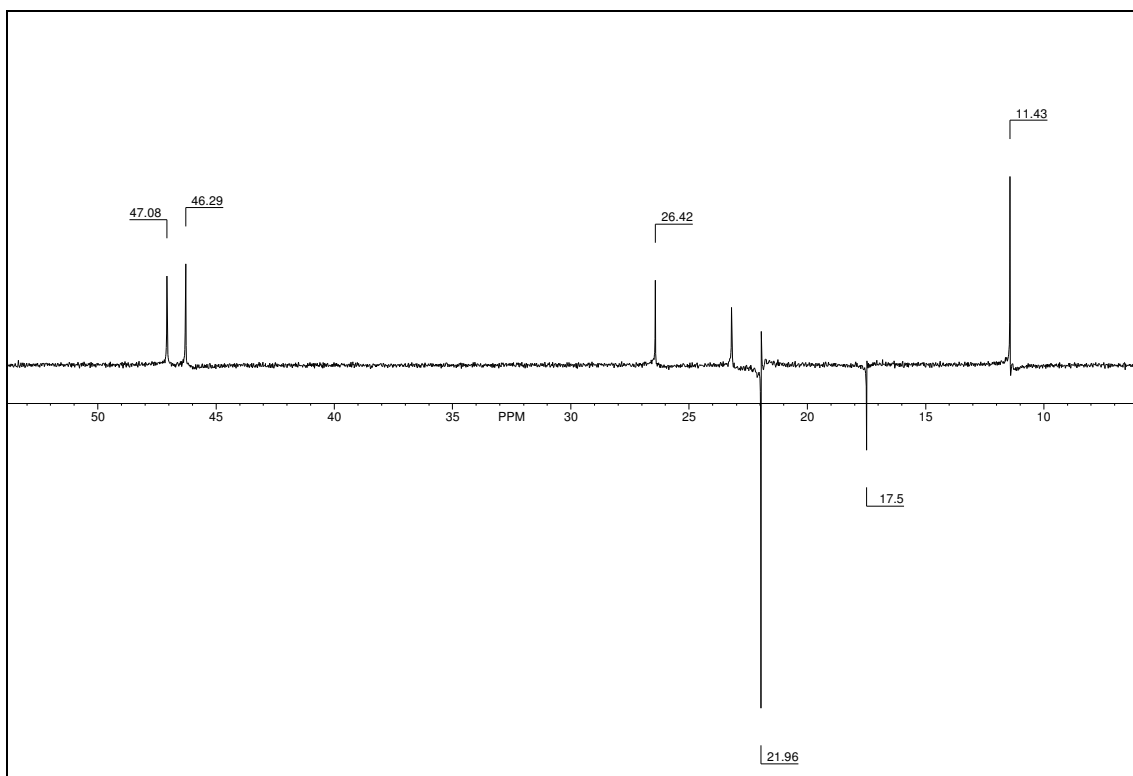
¹H RMN:

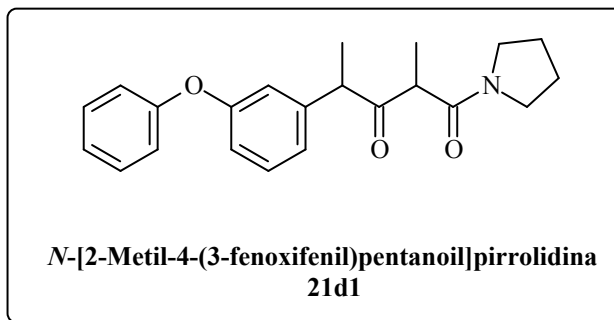


¹³C RMN:

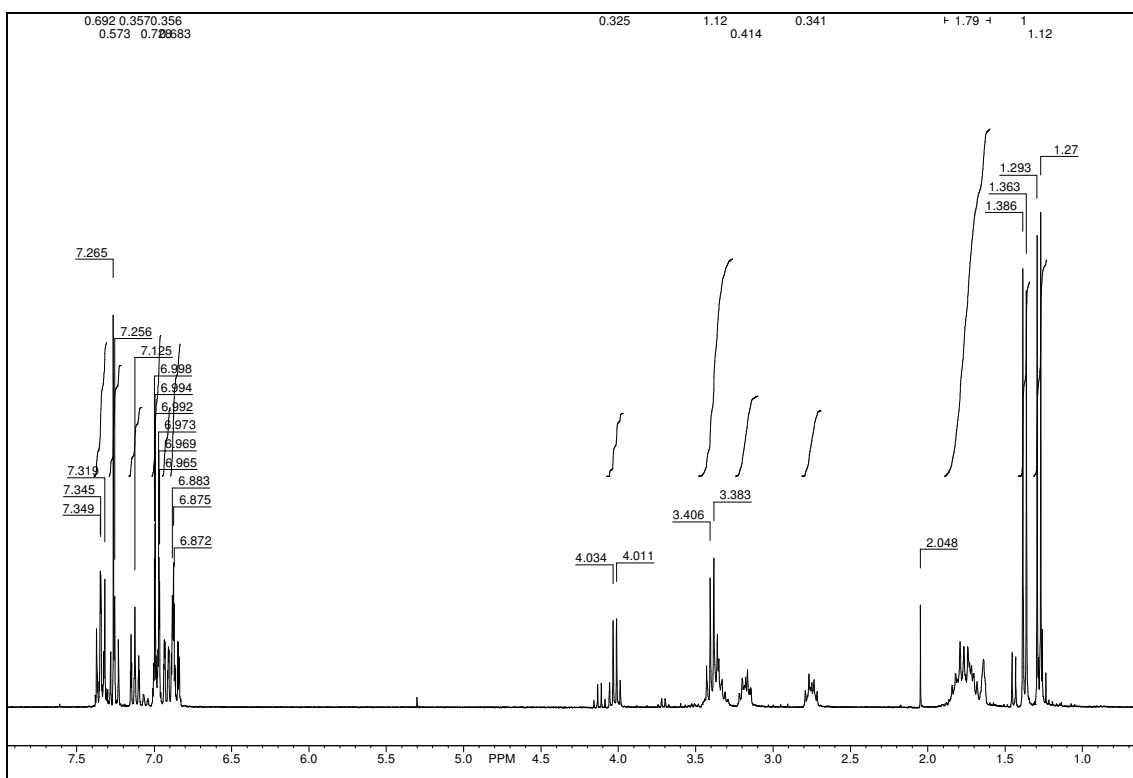


DEPT:

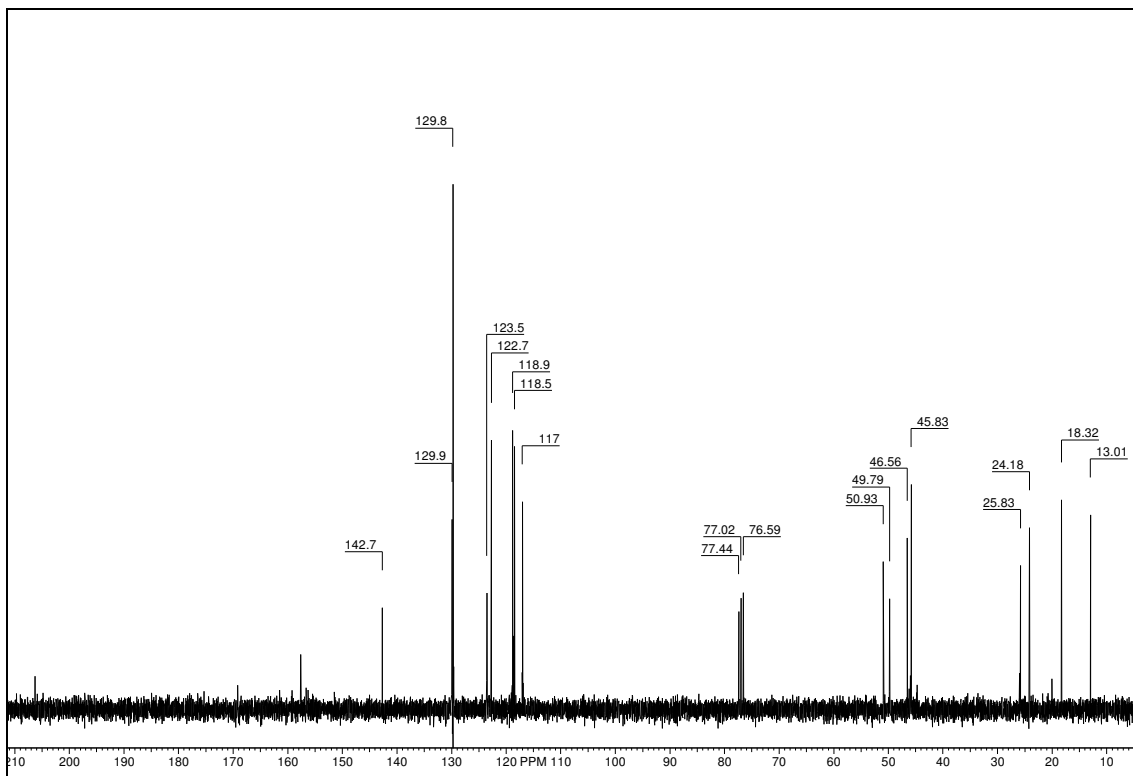




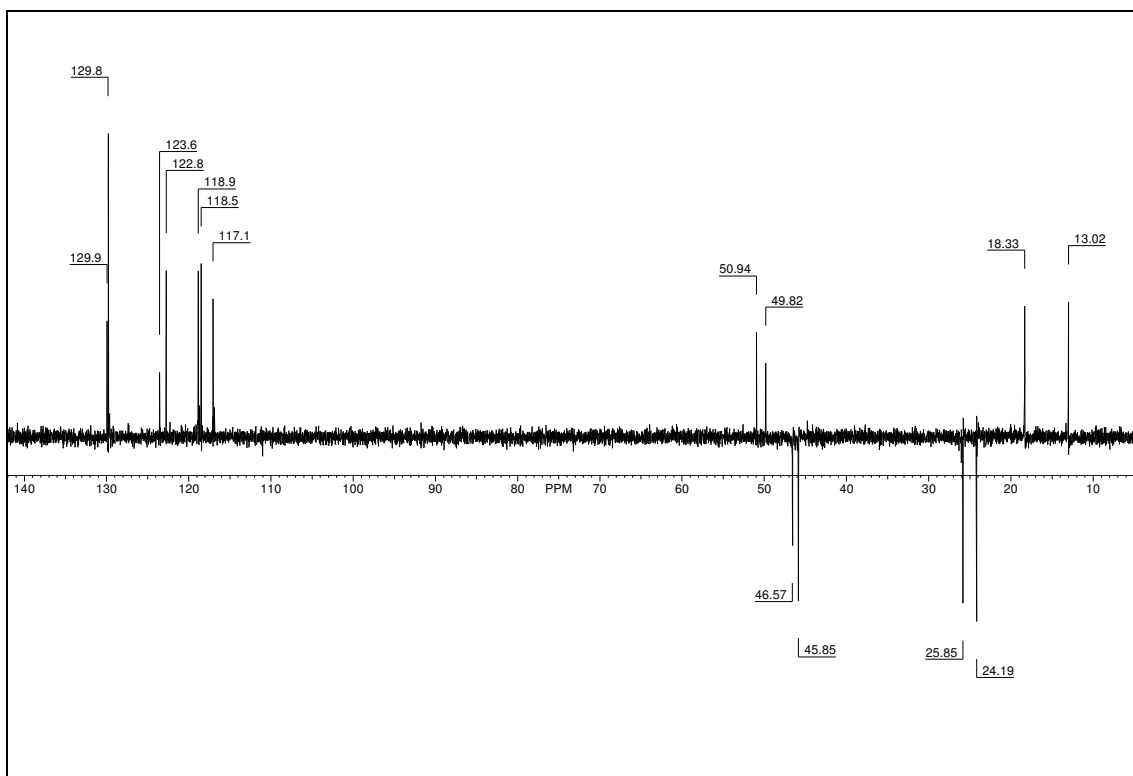
¹H RMN:

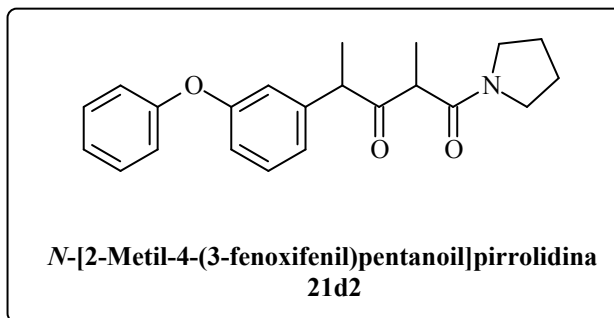


¹³C RMN:

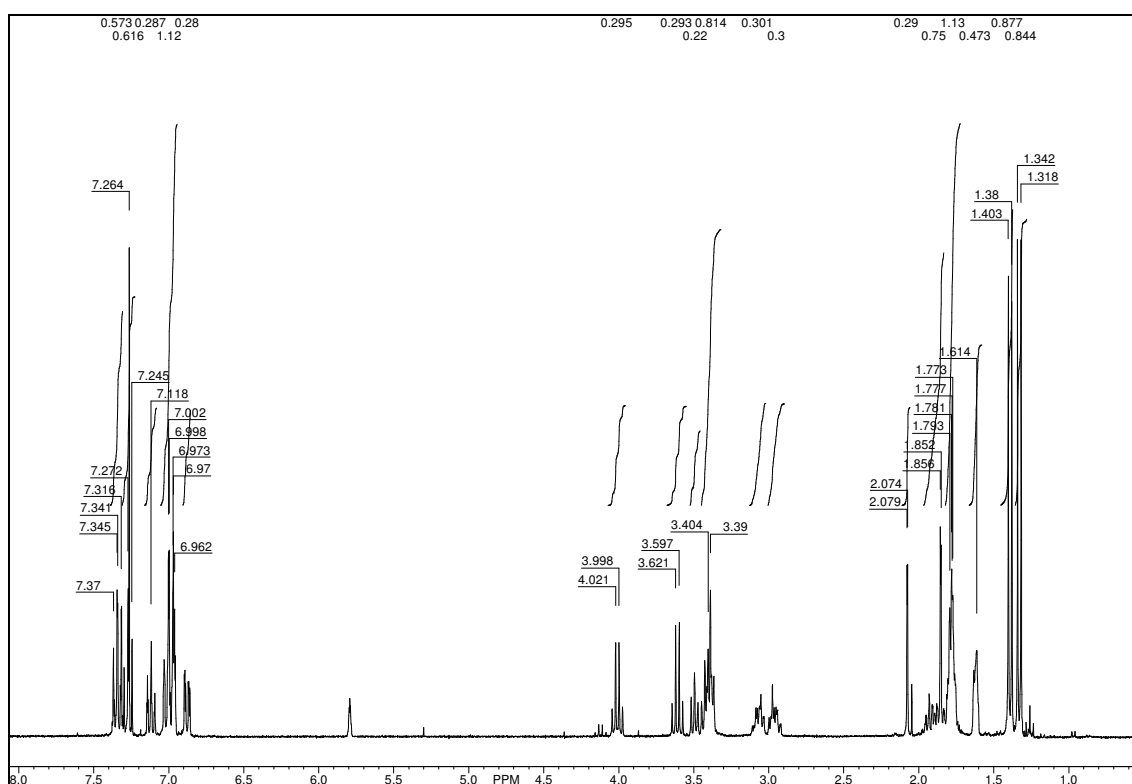


DEPT:

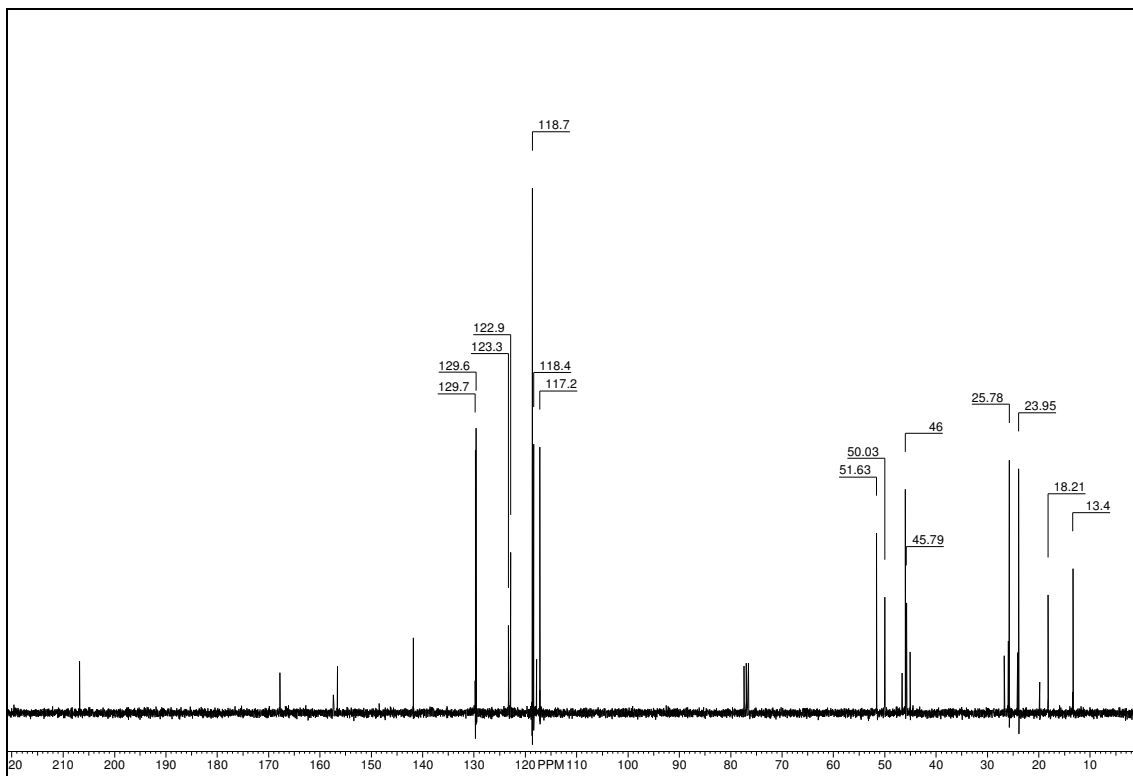




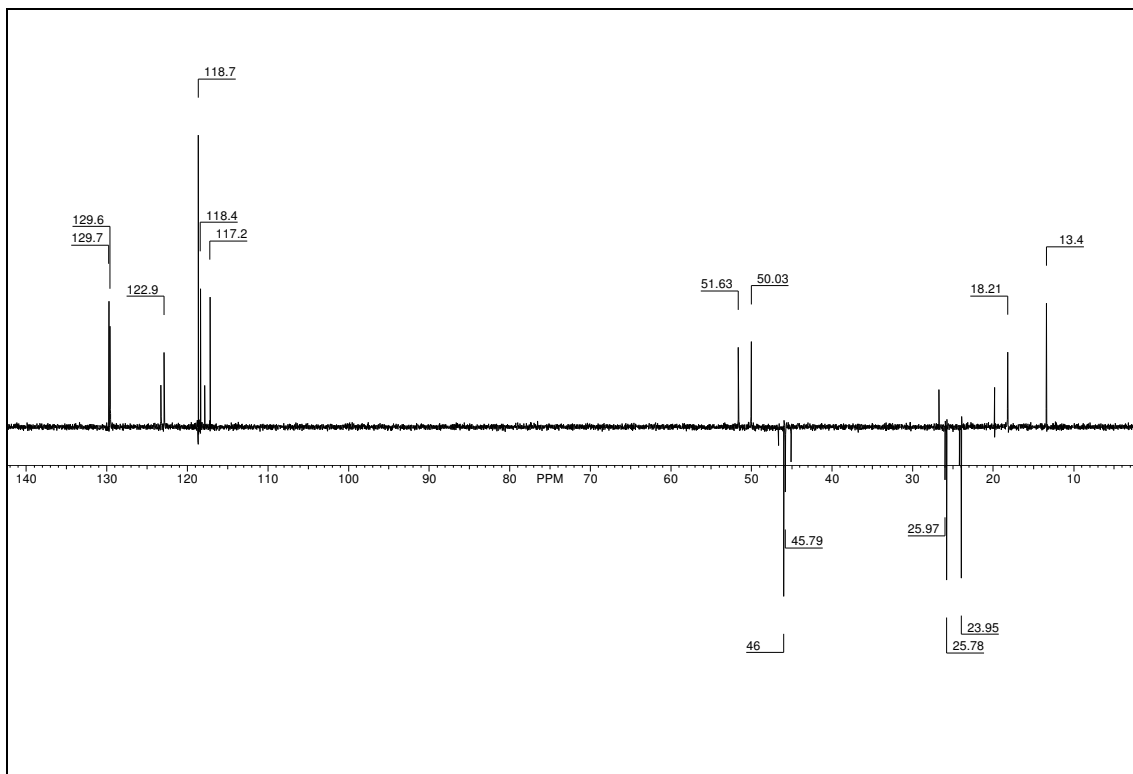
¹H RMN:



¹³C RMN:



DEPT:



Capítulo 5: Resumen y *Conclusiones*

En la naturaleza se encuentran una innumerable cantidad de sustancias que presentan muy diversas actividades de tipo plaguicida y que pueden ser utilizadas por el hombre en su lucha contra las diferentes especies que producen, cada año, incalculables daños a la agricultura. Además, este tipo de sustancias evitan todos los inconvenientes asociados a los insecticidas denominados químicos, no implicando problemas de acumulación, resistencias, toxicidad para el hombre ...

En este sentido, los hongos han demostrado ser una buena fuente de este tipo de sustancias. Por esta razón, en nuestro grupo de trabajo se han llevado a cabo estudios para la obtención de metabolitos secundarios activos de hongos. De este tipo de trabajos, se han aislado de extractos de cepas del género *Penicillium* un grupo de compuestos relativamente sencillos, químicamente relacionados entre sí, y que presentan muy interesantes actividades de tipo insecticida y anti hormona juvenil. La importancia de las actividades observadas, hacía necesaria la confirmación por síntesis de las estructuras propuestas de forma tentativa en función de los datos espectroscópicos obtenidos.

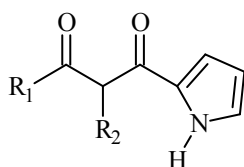
En la presente Tesis se han desarrollado unas secuencias sintéticas que han permitido la confirmación de las estructuras de estos metabolitos, bien sea por síntesis total de los mismos o por preparación de sustancias análogas que hacen inequívoca la asignación realizada en un principio. Por otro lado, se han utilizado las rutas sintéticas abiertas para la consecución de diferentes análogos con el fin de establecer relaciones estructura-actividad que permitan la optimización de las actividades observadas para los productos naturales aislados.

5.1. - Síntesis de análogos derivados de pirrol

Los productos naturales derivados del pirrol aislados de *Penicillium brevicompactum* no habían presentado actividades destacadas; sin embargo, el hecho de estar estructuralmente relacionados con el resto de metabolitos, así como el gran

número de productos de tipo pirrólico descritos como activos en la bibliografía, nos impulsó a llevar a cabo la preparación de productos isómeros a los naturales, pero introduciendo como importante variación la unión de la cadena lateral β -dicarbonílica al C₂ del anillo pirrólico.

Figura 5.1. Compuestos pirrólicos preparados.



R₁ = (CH₂)₇CH₃, R₂ = Me, H

R₁ = CH₂CH₃, R₂ = Me, H

R₁ = CH₂Ph, R₂ = H

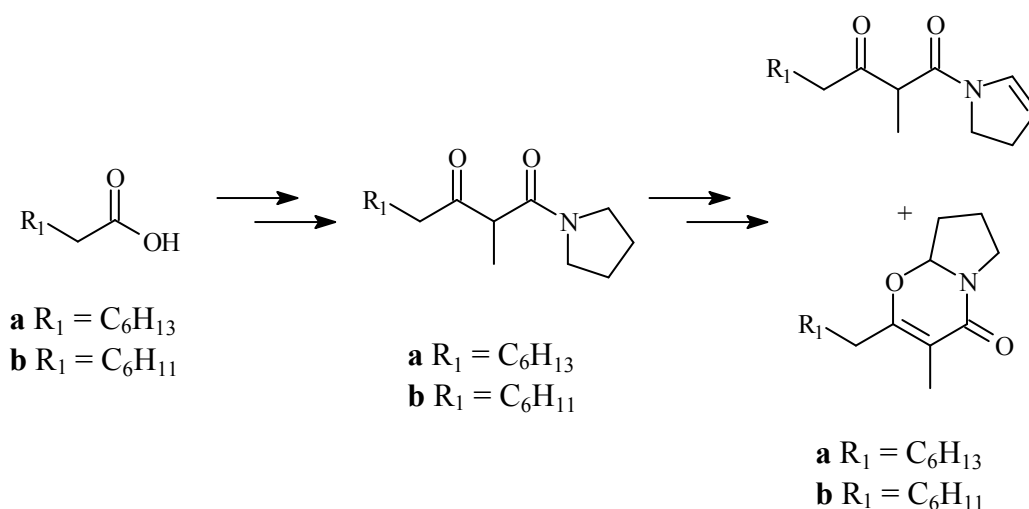
R₁ = CH=CHPh, R₂ = H

Con esta variación estructural se han conseguido una serie de compuestos análogos a los productos naturales, pero que presentan una mayor estabilidad, hecho que ha tenido como consecuencia la aparición de actividad, principalmente de tipo fungicida. Además, uno de los análogos obtenidos es isómero estructural de uno de los productos naturales; las pequeñas diferencias espectroscópicas entre ambos, han apoyado asignación de la estructura de los pirroles naturales.

5.2. - Síntesis de las enamidas y derivados bicíclicos naturales

Dentro del conjunto de metabolitos con actividades biológicas obtenidos del género *Penicillium*, parecían existir dos grupos, uno de productos monocíclicos caracterizados por presentar una agrupación α -cetoamida con el N integrado en un anillo de 2-pirrolina, y otro caracterizado por un anillo de cinco miembros condensado con otro de seis, que también engloba un enlace de tipo amida. Como hipótesis, se ha de considerado que todos los productos pertenecen a una misma familia, donde las diferencias se basan únicamente en el grado de evolución biosintética. Ello nos ha permitido concluir en la obtención de productos de ambos grupos, mediante una misma secuencia sintética.

Figura 5.2. Secuencia sintética desarrollada para la obtención de las enamidas naturales y sus isómeros bicíclicos.



Dicha secuencia sintética parte de los ácidos lineales de ocho átomos de C (con o sin insaturación). La β -cetoamida se prepara por acilación del ácido de Meldrum y posterior aminólisis con pirrolidina; la metilación entre ambos carbonilos, seguida de la oxidación anódica del anillo y eliminación de metanol conducen a la obtención de las correspondientes enamidas naturales, así como sus isómeros bicíclicos.

Esta ruta sintética no sólo nos permite comprobar que las estructuras propuestas para los productos naturales aislados eran correctas, sino que además apoya químicamente la posible relación biosintética entre los productos monocíclicos con los bicíclicos.

Por otro lado, la mencionada secuencia da lugar a un grupo de nuevos productos análogos, precursores de los productos naturales, que han mostrado nuevas e importantes actividades biológicas para la lucha contra las plagas.

5.3. - Obtención de análogos de los productos naturales preparados

Conseguidos los primeros productos naturales se decidió aprovechar la secuencia desarrollada para llevar a cabo la preparación de productos análogos a los

naturales, para así poder establecer relaciones estructura-actividad. En este sentido, se introdujeron tres tipos de variantes:

- Sustitución de la cadena lateral de siete átomos de carbono.
- Sustitución del anillo de pirrolidina por otros anillos de cinco miembros que incorporen un átomo de N.
- Sustitución de la cadena dicarbonílica por una más sencilla con un único carbonilo.

Estas modificaciones han supuesto la obtención de diferentes análogos que han permitido llegar a algunas conclusiones importantes, así como mejorar determinadas actividades de los productos naturales utilizados como guía. Destaca la importante actividad insecticida detectada en los productos monocarbonílicos que presentan el anillo de pirrolidina (previamente a la oxidación anódica) con cadena de ocho carbonos. Estos productos, probablemente los más sencillos de todos los preparados, demuestran que no siempre la elección de una modificación complicada conduce a unos mejores resultados.

El presente trabajo ha tenido como resultado los siguientes artículos:

1.- Pilar Moya, Ángel Cantín, Maria-Angeles Castillo, Jaime Primo, Miguel A. Miranda y Eduardo Primo-Yúfera. "Isolation Structural Assignment and Synthesis of *N*-(2-Methyl-3-oxodecanoyl)-2-pyrroline, a New Natural Product from *Penicillium brevicompactum* with in vivo Anti-Juvenile Hormone Activity". *J. Org. Chem.* **1998** (aceptado).

2.- Ángel Cantín, Pilar Moya, Miguel A. Miranda, Jaime Primo y Eduardo Primo-Yúfera. "Isolation of *N*-(2-Methyl-3-oxodecanoyl)pyrrole and *N*-(2-Methyl-3-oxodec-8-enoyl)pyrrole, Two New Natural Products from *Penicillium brevicompactum*, and Synthesis of Analogues with Insecticidal and Fungicidal Activity". *J. Agric. Food Chem.* **1998** (aceptado).

3.-, Ángel Cantín, Pilar Moya, Maria-Angeles Castillo, Jaime Primo, Miguel A. Miranda y Eduardo Primo-Yúfera. "Isolation and Synthesis of *N*-(2-Methyl-3-oxodec-8-enoyl)-2-pyrroline and 2-Hept-5-enyl-3-methyl-4-oxo-6,7,8,8a-tetrahydro-4H-pyrrolo[2,1-*b*]-1,3-oxazine, Two New Fungal Metabolites with in vivo Anti-Juvenile Hormone and Insecticidal Activity". *Eur. J. Org. Chem.*, **1998** (aceptado).

4.- Maria-Angeles Castillo, Pilar Moya, Ángel Cantín, Miguel A. Miranda, Jaime Primo, Enrique Hernández y Eduardo Primo-Yúfera. "Insecticidal, anti-juvenile hormone and fungicidal activities of organic extracts from different *Penicillia* species and their isolated active components" *J. Agric. Food Chem.* **1998** (enviado).

5.- Pilar Moya, Ángel Cantín, Miguel A. Miranda, Jaime Primo y Eduardo Primo-Yúfera. "Synthesis and Biological Evaluation of Analogues of the Active Fungal Metabolites *N*-(2-Methyl-3-oxodecanoyl)-2-pyrroline and *N*-(2-Methyl-3-oxodec-8-enoyl)-2-pyrroline". *J. Agric. Food Chem.* **1998** (enviado).

6.- Ángel Cantín, Pilar Moya, Miguel A. Miranda, Jaime Primo y Eduardo Primo-Yúfera. "Synthesis and Biological Evaluation of Analogues of the Active Fungal Metabolites *N*-(2-Methyl-3-oxodecanoyl)-2-pyrroline and *N*-(2-Methyl-3-oxodec-8-enoyl)-2-pyrroline II". *J. Agric. Food Chem.* **1998** (enviado).