

Reactividad y estudio conformacional de las germacranolidas

Enrique Ruiz-Reyes, Margarita Suarez-Navarro

Departamento de Química General, Facultad de Química, Universidad de la Habana. Zapata entre calles G y Carlitos Aguirre, Vedado, La Habana, Cuba. enrique@quimica.uh.cu

Recibido: 24 de septiembre de 2013.

Aceptado: 9 de diciembre de 2013.

Palabras claves: lactonas sesquiterpénicas, germacranos, germacranolidas, análisis conformacional, ciclaciones electrofílicas
Key words: sesquiterpenes lactones, germacrane, germacranolides, conformational analysis, electrophilic cyclizations

RESUMEN. Los germacranos son un grupo importante de sesquiterpenos presentes en la naturaleza, considerados intermedios en la biosíntesis de otros sesquiterpenos. La flexibilidad que tiene el anillo de ciclodecadieno hace que estas moléculas experimenten cambios conformacionales. Ellas tienen gran tendencia a experimentar reagrupamientos de Cope y transformaciones en una amplia variedad de productos a través del tratamiento con ácidos o irradiación. Uno de las más importantes clases de metabolitos secundarios que presentan un esqueleto de germacrano son las germacranolidas, las cuales son consideradas precursores biogénicos de otros tipos de lactonas sesquiterpénicas. El amplio intervalo de reacciones que experimentan las germacranolidas las convierte en un intermedio fundamental para la síntesis de otra variedad de compuestos. Por otra parte, el sistema de anillos de estos compuestos posee flexibilidad conformacional, por lo que pueden existir como mezclas de conformeros muy próximos en energía e intercambiables entre sí a través de barreras de energía muy pequeñas, lo que hace muy interesante su estudio. En este trabajo se lleva a cabo una revisión de la reactividad que pueden realizar estos compuestos, las cuales se recogen en los diferentes tipos reacciones: Cope, ciclaciones electrofílicas intramoleculares e irradiación con luz ultravioleta.

ABSTRACT. Germacrane are an important group of sesquiterpenes widely occurring in nature and considered as key intermediates in the biosynthesis of other sesquiterpenes. They share a cyclodecadiene ring characterized by their ability to undergo conformational changes, their great tendency to undergo Cope rearrangement and transformation to a large variety of products upon acid or irradiation treatment. One of the most important class of secondary metabolites, showing the germacrane skeleton are the germacranolides, considered as biogenetic precursors for other related skeletal types of lactones. A significant number of these ones has demonstrated a broad spectrum of biological activities. Recently information has been collected on their antitumor activity. The wide range of reactions experienced by germacranolides makes this group of compounds as key intermediates for the synthesis of a great variety of compounds. Moreover, the ring systems of these compounds possess a conformational flexibility so that exists as a mixture of conformers, very close in energy and interchangeable though very small energy barriers, which makes then very interesting. In this work, a review concerning the reactivity of these compounds was carried out through various types of reaction: Cope, Electrophilic Cyclizations and UV irradiation.

INTRODUCCION

El hombre ha encontrado en el Reino Vegetal una amplia fuente de productos naturales para satisfacer muchas de sus necesidades. Las plantas le han servido de alimento, para luchar contra plagas, para tratar enfermedades, para aliviar el dolor, etc. Estos productos, también denominados metabolitos secundarios, se encuentran en todos los organismos vivos y han contribuido en gran medida al desarrollo de la Química Orgánica.

Dentro de los metabolitos secundarios se encuentran las lactonas sesquiterpénicas un grupo extenso de productos naturales que poseen una amplia actividad biológica: antitumoral, antileucémica, citotóxica o antimicrobiana.

Los germacranos que pertenece a esta familia, han recibido mucha atención en la Química Orgánica debido a su estructura, comportamiento conformacional, distribución en la naturaleza y a su importante papel en la biosíntesis de otros sesquiterpenos.

Las germacranolidas son compuestos con esqueleto de germacrano y un anillo γ -lactona cerrado sobre las posiciones C-7/C-6 o C-7/C-8. El costunolido, un ejemplo simple de germacranolida, se considera un intermedio común a un gran número de otras lactonas sesquiterpénicas. Este se aisló por primera vez por Paul del “costus” (*Saussurea lappa*) y posteriormente se ha encontrado en varias plantas junto con otros sesquiterpenos. Conocer cómo se determinan las conformaciones de las germacranolidas a través de las distintas técnicas que se emplean y estudiar la reactividad de estas moléculas a partir de las reacciones que ellas experimentan, es el objetivo principal de este trabajo.

GERMACRANOS

Por su amplia distribución en la naturaleza y por su papel central en la biosíntesis de otros sesquiterpenos, los germacranos han suscitado el interés de la comunidad científica¹. Estos compuestos se caracterizan por presentar un esqueleto 4, 10-dimetil-7- isopropilciclododecano.

Es frecuente la existencia de dobles enlaces en las posiciones 1(10) y 4. Los (*E,E*)-germacra-1(10),4-dienos son los más característicos y abundantes, aunque también se han descrito germacradienos con diferente configuración en los dobles enlaces (Fig. 1).

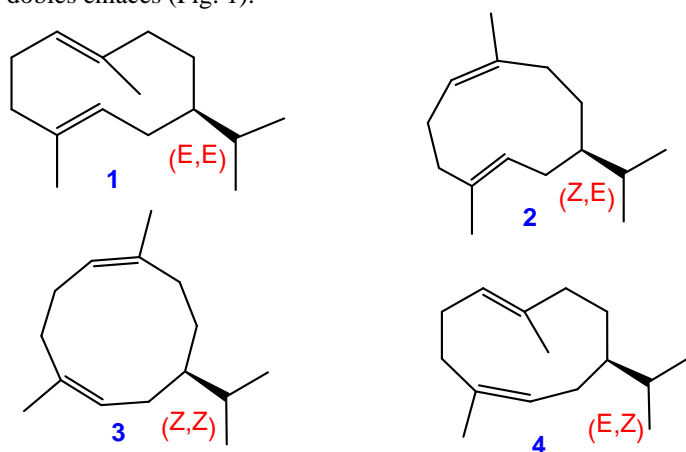


Fig. 1. Tipos estereoquímicos de germacra-1(10),4-dienos.

La biosíntesis de sesquiterpenos comienza con la ciclación del pirofosfato de farnesilo (FPP) para dar el catión germacradienilo, a partir del cual surgen otros esqueletos carbonados: guayano, eudesmano, pseudoguayano, eremofilano y elemmano. El esqueleto de cadinano proviene de la ciclación del pirofosfato de nerolidilo (Fig. 2).²

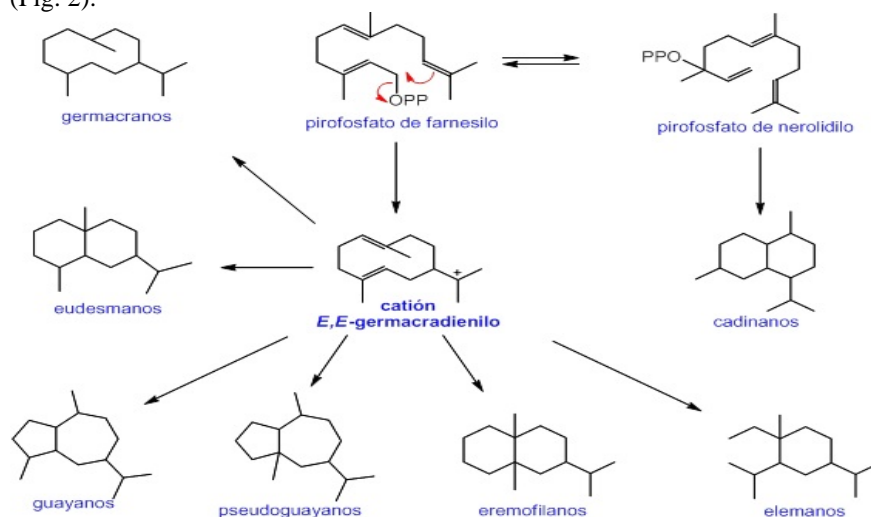


Fig. 2. Biosíntesis de otros esqueletos de sesquiterpenos.

Las lactonas sesquiterpénicas forman un amplio grupo de metabolitos secundarios aislados principalmente de plantas de la familia de las compuestas (*Asteraceae*)³ y en menor extensión, en las umbelíferas (*Apiaceae*).⁴ En otras familias de plantas superiores, como *Lauraceae* y *Magnoliaceae*, también se encuentra este tipo de compuestos. De forma esporádica, se encuentran en hongos y plantas hepáticas.

La búsqueda bibliográfica en SciFinderScholar mediante el término *sesquiterpene lactone* muestra ~4500 registros, lo cual da una idea del interés por este tipo de sustancias.

Este interés se justifica en las diferentes actividades biológicas y farmacológicas que presentan, entre las que destacan la actividad antineoplásica y citotóxica, ambas vinculadas a la función del agrupamiento α -metilén- γ -lactona, al parecer por ataque nucleofílico de determinados centros activos de las proteínas al doble enlace a través de una adición de Michael.⁵ Así, los grupos tiol de la cisteína parecen ser las dianas primarias de las lactonas sesquiterpénicas, produciendo la inhibición de diversas funciones celulares que conducen a las células a la apoptosis⁶ También se han descrito otros tipos de actividades biológicas de lactonas sesquiterpénicas, tales como antibacteriana, antimicrobiana, antiinflamatoria, fungicida y fitotóxica^{7,8,9} Particularmente significativo resulta su papel determinante en las relaciones de la planta con su entorno (actividad alelopática).^{10,11}

BIOSÍNTESIS DE LACTONAS SESQUITERPÉNICAS

Los resultados de los estudios de los trabajos de Kraker y col¹². Sobre la biosíntesis de lactonas sesquiterpénicas en raíces de achicoria (*Cichorium intybus*) se consideraron razonablemente válidos para otras especies. Estos autores establecieron primeramente que la ciclación del FPP **5** da (+)-germacreno A **6** conservándose la estereoquímica *E* de los dobles enlaces (Fig. 3)¹³

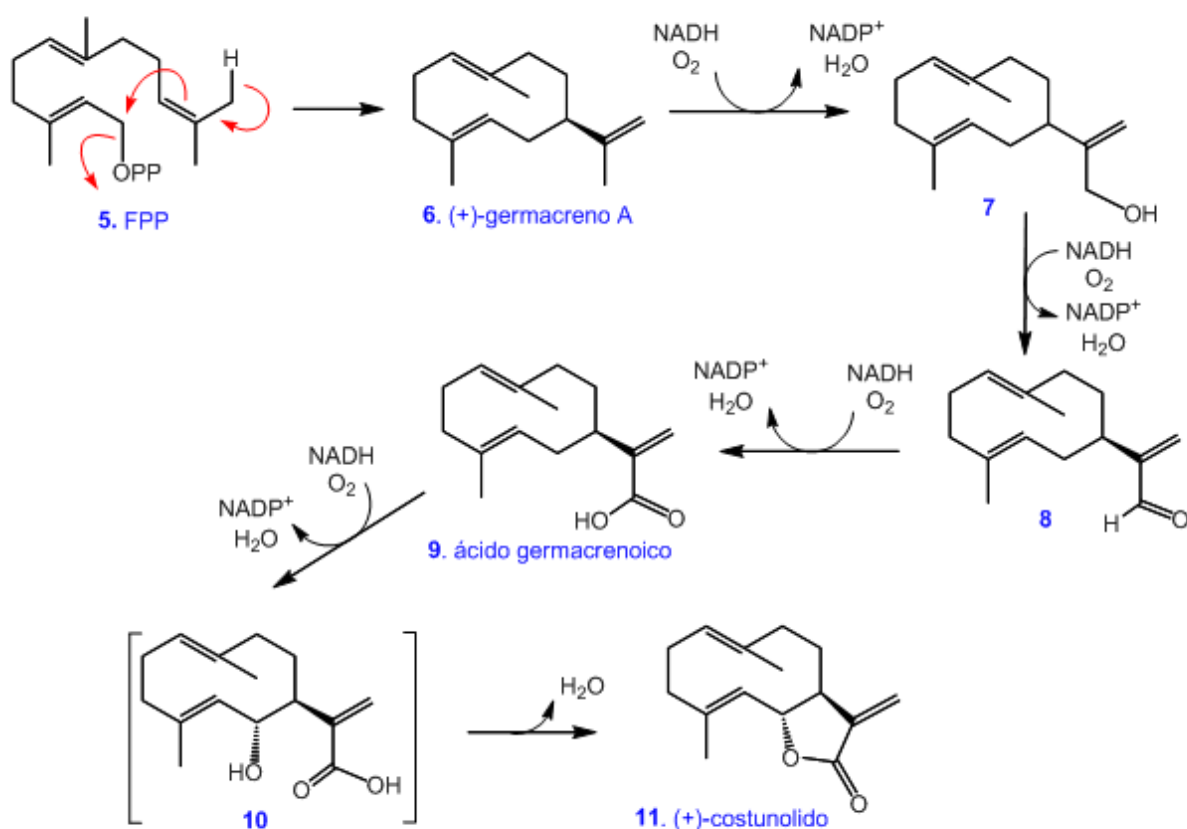


Fig. 3. Biosíntesis de (+)-costunolido 11.

La oxidación de la cadena lateral isoprenilo, por la (+)-germacreno A hidroxilasa, origina el alcohol primario **7**¹⁴ y posteriores oxidaciones por deshidrogenasas NAD(P)-dependientes originan ácido germacrenoico **9**. Posteriormente, se demuestra que la hidroxilación en la posición C6, seguida de lactonización origina el (+)-costunolido **11**.¹⁵ También se encontró que el costunolido **11** es un precursor de otras dos lactonas sesquiterpénicas de la achicoria, el 11 β ,13-dihidrocostonolido **12** y la guayanolida leucodina **13** (Fig. 4).

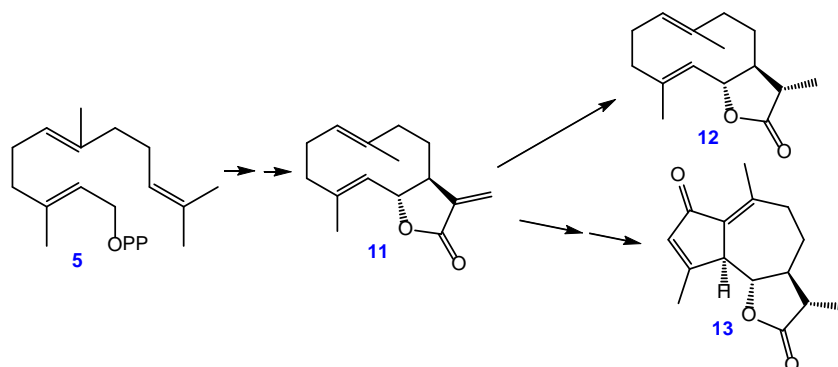


Fig. 4. Derivados biosintéticos de costunolido **11**.

Se ha confirmado la ruta biosintética que conduce al costunolido **11** y determinado los genes responsables recientemente.^{16,17,18}

Estos resultados permiten establecer que el costunolido **11** es el precursor de otras lactonas sesquiterpénicas, lo que implica admitir que la formación del anillo lactona es anterior a otras transformaciones biosintéticas.¹⁹

Existe la hipótesis de que las guayanolidas biosintetizadas por la achicoria se originan a partir del partenolido **14** obtenido por epoxidación del doble enlace C4-C5 del costunolido **11** (Fig. 5).^{20,21,22}

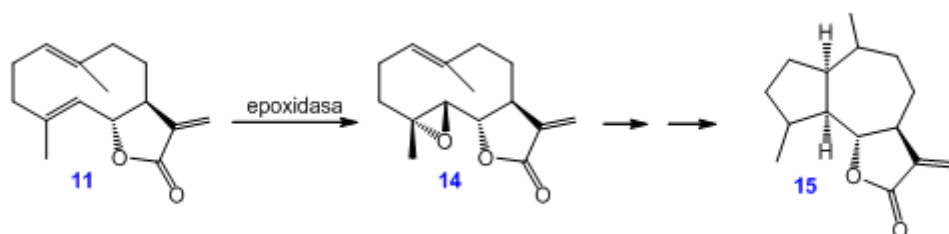


Fig. 5. Hipótesis biogenética de guayanolidas.

Las enzimas implicadas en los últimos pasos de la biosíntesis de las guayanolidas en *Asteraceae* no han sido aún identificadas. Sin embargo, los estudios realizados en *Lactuca floridiana* apoyan la teoría de que el partenolido **14**, es un intermedio en la biosíntesis de las guayanolidas.²³

GERMACRANOLIDAS

Las germacranolidas son un grupo de lactonas sesquiterpénicas que presentan un esqueleto de germacrano y al menos un anillo de γ -lactona, normalmente cerradas sobre C6. Las más abundantes son aquellas en las que los dobles enlaces del núcleo de germacrano muestran una configuración *E,E*. Se muestran ejemplos de cada uno de los cuatro tipos estereoquímicos en la (Fig. 6).

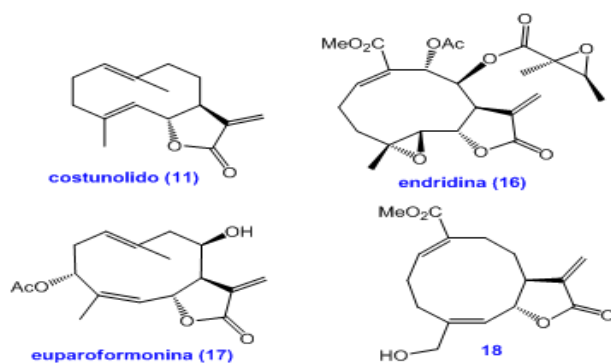


Fig. 6. Germacranolidas naturales con distintas configuraciones estereoquímicas.

Actividad biológica

Un número significativo de germacranolidas han demostrado poseer un amplio espectro de actividades biológicas. Recientemente se ha recopilado sobre la actividad antitumoral de las lactonas sesquiterpénicas con especial hincapié en la múltiple actividad del partenolido **14**.²⁴

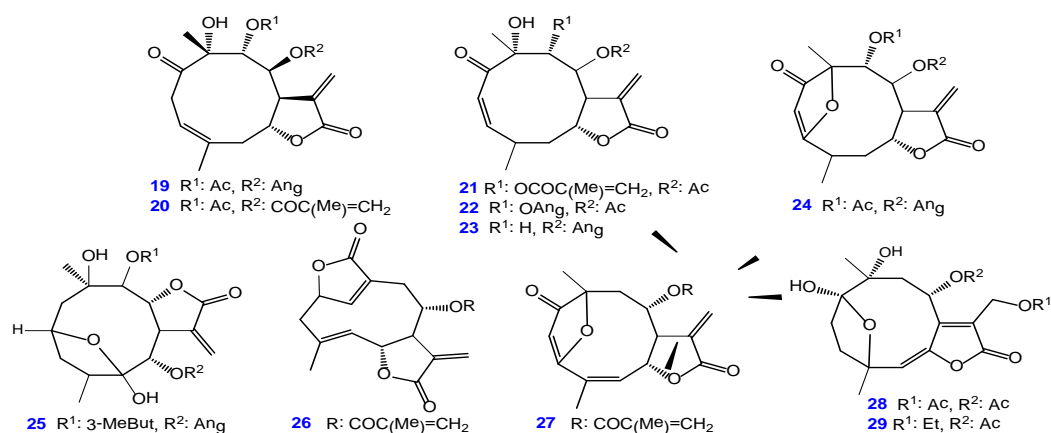


Fig. 7. Ejemplos recientes de germacranolidas con actividad biológica.

En la Tabla 1 se muestran varias especies de las que recientemente se han aislado germacranolidas bioactivas (Fig. 7 Tabla 1).

Tabla 1. Actividad biológica de varias especies de germacranolidas

Especies	Compuestos	Actividad	Ref.
<i>Calea zacatechichi</i>	19, 20, 21, 22, 23, 24	Antiprotozoaria antimicrobiana	25
<i>Carpesium triste</i> var. <i>Manshuricum</i>	25	Inhibe la producción del óxido nítrico (NO)	26
<i>Elephantopus scaber</i>	26	Citotóxica	27
<i>Piptocoma rufescens</i>	27	Citotóxica	28
<i>Pseudelephantopus spicatus</i>	28, 29	Antiprotozoaria	29

Las seis germacranolidas aisladas de *Calea zacatechichi* muestran actividad antiprotozoaria; ellas tienen una importante actividad antileishmania, siendo 20 y 21 más activas que el compuesto referencia (pentamidina); 21, 22 y 23 presentan también actividad antiplasmodica (referencia: cloroquina). Solamente el compuesto 20 muestra una actividad antimicrobiana moderada (*Mycobacterium intracellulare*) y ninguno de los seis muestra actividad antifúngica.

El compuesto **25**, aislado de *Carpesium triste* var. *manshuricum*, inhibe la producción de óxido nítrico (NO) y la expresión de la óxido nítrico sintasa.

La actividad citotóxica de la desoxielefantopina **26** ha sido comparada con la del paclitaxel. Ha mostrado un nivel de actividad similar frente a distintas líneas celulares, especialmente, en el caso de células de cáncer de mama y con un mayor tiempo de supervivencia de animales portadores de tumores.

En una planta oriunda de la República Dominicana se ha aislado la 15-desoxigoyazensolida **27**, junto con otros doce compuestos similares. Todas ellas muestran actividad citotóxica frente a células de cáncer de colon, comparadas con paclitaxel, siendo **27** la más activa.

En un estudio biodirigido del extracto de una planta empleada en la medicina popular de la selva amazónica de Perú se aislaron las lactonas **28** y **29** que presentan una actividad antileishmania superior al compuesto de referencia (anfotericina B).

CONFORMACIONES DE LAS *E,E*-GERMACRANOLIDAS

El sistema de (*E,E*)-ciclodeca-1(10),4-dieno posee flexibilidad conformacional, por lo que pueden existir como mezclas de conformeros muy próximos en energía e intercambiables entre sí a través de barreras de energía muy pequeñas. Los cuatro conformeros más estables obedecen a las restricciones de los dobles enlaces endocíclicos y la disposición ecuatorial del resto R en C7. Estos conformeros se describen de acuerdo con la nomenclatura de Samek³⁰ como ¹⁵D_{5,10}D¹⁴ / ¹⁵D^{5,10}D₁₄ / ¹⁵D^{5,10}D¹⁴ y ¹⁵D_{5,10}D¹⁴, o como UU, DD, UD y DU, dependiendo de la orientación relativa de los metilos C14 y C15 (Fig. 8).

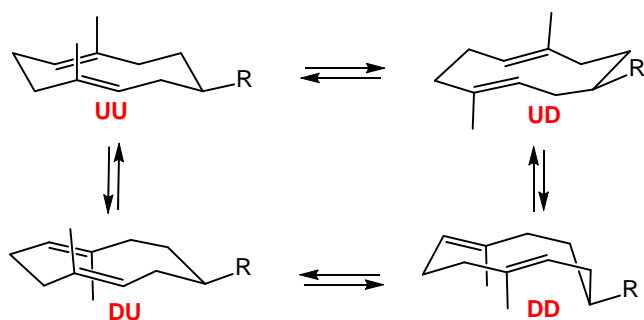


Fig. 8. Conforméros más estables del (E,E)-germacradieno.

Las conformaciones UU y DD presentan los dobles enlaces del ciclo cruzados, mientras que en las conformaciones UD y DU estos enlaces tienen una disposición paralela.

Faraldos y cols.³¹ plantean que la proporción de conforméros en disolución para el caso del germacreno A **6**, y han encontrado la relación 52 // 29 // 19 asignable a las conformaciones UU, UD y DU respectivamente; no detectaron el conformérom DD.

La presencia de un anillo de *trans*- γ -lactona cerrado sobre C6 genera una nueva restricción conformacional que da lugar a conforméros más estables para el costunolido **11**, serían los indicados en la Fig. 9.³²

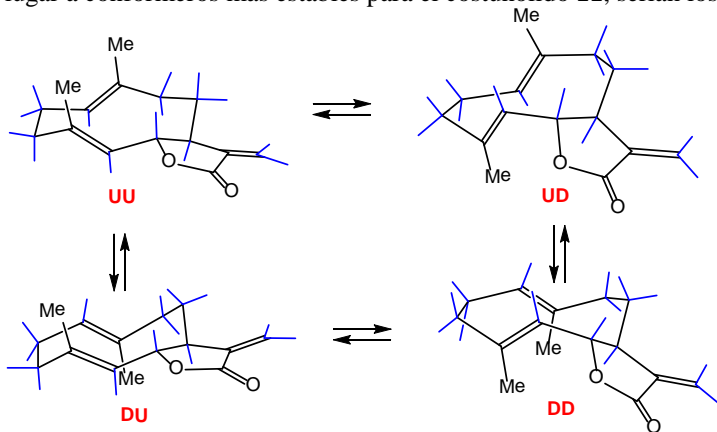


Fig. 9. Conforméros más estables del costunolido **11**.

Asimismo, mediante estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en disolución y análisis por difracción de rayos X, sólo se detecta la presencia del conformérom UU.³² Los cálculos moleculares están de acuerdo con este resultado.

Para una germacranolida con la lactona cerrada en C8, como el inunolido **30**, las conformaciones son más estables Fig. 10.³²

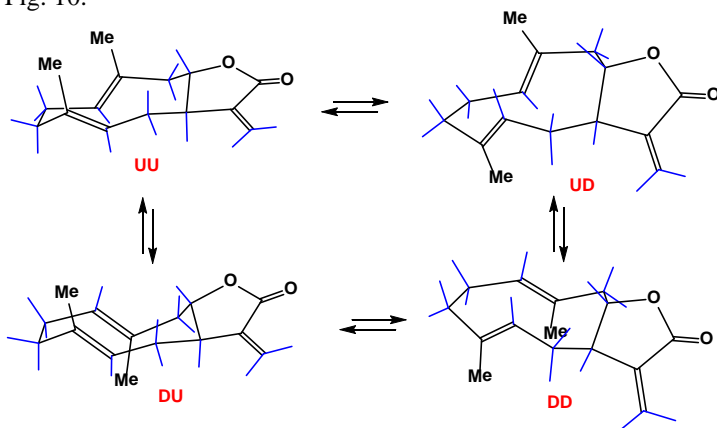


Fig. 10. Conforméros más estables del inunolido **30**.

En este caso, se detectan en disolución tres conforméros en una proporción aproximada de 4 // 3 // 2³³. Desde el análisis de los espectros de RMN, se informa que el mayoritario es el DD. Los cálculos moleculares indican que las

conformaciones más estables son la DD y la UD, con energías prácticamente iguales y las menos estables la UU y la DU.³²

Esta flexibilidad conformacional del anillo de diez eslabones en las germacranolidas desempeña un papel fundamental para entender la reactividad de estos compuestos y la biosíntesis de otros esqueletos de lactonas sesquiterpénicas. Por ello, el análisis conformacional de las germacranolidas posee notable interés porque puede explicar las reacciones más características de estos compuestos, como son las ciclaciones intramoleculares y los reagrupamientos de Cope. Además, el estudio de las conformaciones puede dar información sobre el origen biosintético de las lactonas sesquiterpénicas que tienen a las germacranolidas como sus precursoras.³⁴

Como se ha visto en este apartado, el estudio de las conformaciones del anillo de germacrano en los sesquiterpenos y lactonas sesquiterpénicas puede abordarse utilizando diversos métodos: difracción de rayos X, RMN y cálculos de mecánica molecular.

DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Desde hace tiempo se ha establecido por rayos X que las *E,E*-germacranolidas con el anillo lactónico cerrado sobre C6, muestran en estado sólido la conformación UU.³⁵ Este es el caso del costunolido **11**,³⁶ el partenolido **14**³⁷ y el salonitenolido **31**³⁸ (Fig. 11).

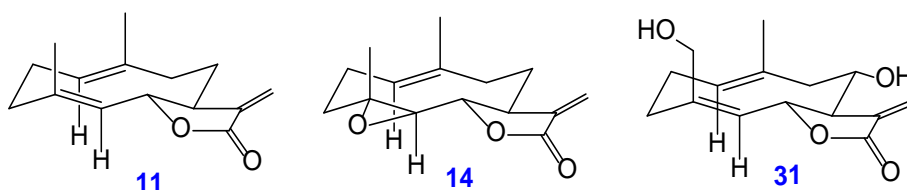


Fig. 11. Conformaciones preferidas en estado sólido (rayos X).

En estas representaciones y algunas posteriores, se ignora el efecto de distorsión generado por el anillo α -metilen- γ -lactona.

De las conformaciones de las germacranolidas obtenidas a partir del análisis por rayos X, normalmente solo una de los cuatro posibles, indicadas anteriormente, tienen interés desde el punto de vista de la determinación estructural. Sin embargo, no siempre permiten sacar conclusiones acerca del comportamiento químico, ya que estos compuestos se muestran en disolución como mezclas de cónformeros y cada uno de ellos suele presentar distinta reactividad.

La artemisifolina **32** una *trans*- α -metilen- γ -lactona cerrada sobre C8, en estado sólido, posee conformación UU (Fig. 12).³⁹

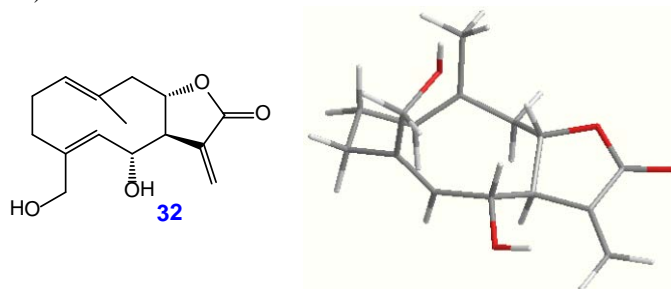


Fig. 12. Conformación en estado sólido de artemisifolina **32** (rayos X).

Sin embargo, los mismos autores encuentran que en disolución (CDCl_3) se ha encontrado que predomina la conformación UD. En el espectro de RMN se aprecian las cuatro conformaciones UD, UU, DU y DD en una proporción 60 // 15 // 14 // 11. Cuando se observa el espectro en $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$, las proporciones son 29 // 30 // 27 // 14. Este último resultado pone de manifiesto que la difracción de rayos X no es una técnica decisiva en la predicción del comportamiento químico de las lactonas sesquiterpénicas. El disolvente desempeña un papel fundamental en el comportamiento químico de este tipo de compuestos.

ESTUDIOS TEÓRICOS

Los estudios teóricos han demostrado ser de gran utilidad para predecir las conformaciones de las germacranolidas, al tiempo que constituyen un complemento importante de las técnicas espectroscópicas de RMN. Los numerosos trabajos que utilizan MM, incluyendo Dinámica Molecular, métodos semiempíricos y de Mecánica Cuántica, han

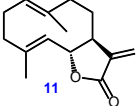
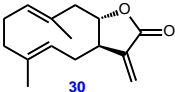
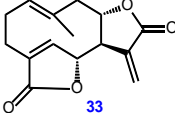
permitido determinar la conformación preferente de distintos germacranoes, así como otras conformaciones de baja energía y sus estabildades relativas, lo que permite establecer de manera aproximada la proporción entre ellas. También se han establecido las barreras de interconversión entre distintos conformeros.

Los cambios en los sustituyentes en el anillo de diez miembros o en la estereoquímica de estos, o en ambos inclusive genera diferentes requerimientos estéricos que se traducen en cambios en las proporciones de los conformeros.

La tabla 2 muestra los resultados de los cálculos por MM utilizando el campo de fuerza MM2 de Allinger⁴⁰ para tres germacranolidas representativas.

Los cálculos mediante MM predicen que en el costunolido **11** la conformación UU es mucho más estable que en el resto de los conformeros, mientras que en su isómero lactonizado en C8, inunolido **30**, las diferencias de energía entre los cuatro conformeros son poco significativas, por lo que debería existir como mezcla de los cuatro conformeros, sin embargo, experimentalmente solo se detectan tres.³³ La presencia de una γ -lactona extra en la isabelina**33**, restringe la movilidad del anillo ciclodecadieno, por lo que solo son posibles los conformeros UD y DD, muy próximos en energía

Tabla 2. Energías relativas (kcal/mol) de conformeros por MM2

Compuesto	UU	UD Energías relativas (Kcal/mol)	DU	DD
	0,00	3,55	4,41	4,46
	1,25	0,00	1,40	0,01
	—	0,04	—	0,00

Turdybekov y cols. estudiaron mediante MM las estabildades relativas de los cuatro posibles conformeros de los dos pares de germacranolidas epiméricas: **11/34** y **30/35** (Fig. 13).⁴¹

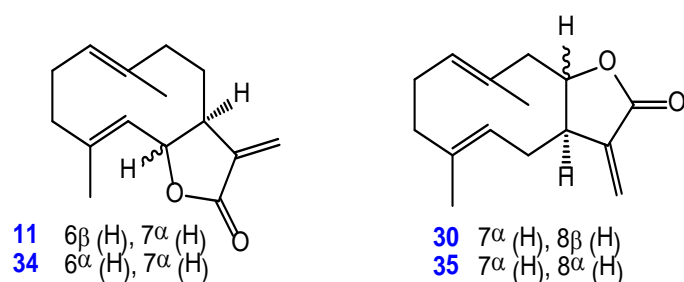


Fig. 13. Germacranolidas epiméricas lineales y angulares.

Estos autores establecieron que la conformación más estable para el costunolido **11** es la UU, resultado que está de acuerdo con los ya publicados.³² El cambio en la disposición de la lactona de *trans* a *cis* provoca una transformación drástica de la conformación más estable, que pasa a ser la DD para el 6-epicostunolido **34**. En el grupo de trabajo del autor del presente estudio, después de transformar **11** en **34**, se confirmaron mediante experimentos NOE estas predicciones teóricas (Fig. 14).⁴²

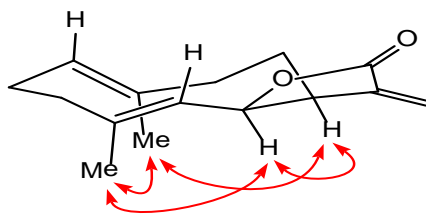


Fig. 14. Efectos NOE más significativos en 6-epicostunolido **34**.

Para las germacranolidas lineales inunolido **30** y su epímero en C8 **35**, los cuatro tipos de conformeros tienen valores de energía muy próximos, aunque en el caso de **35** resultan 6 a 8 kcal/mol mayores que las correspondientes a los conformeros de **30**.

La presencia de un grupo hidroxilo en C8 en el 8- α -hidroxicostunolido **36**, o de dos en C8 y C15, para el salonitenolido **31**, no produce cambios, respecto al comportamiento conformacional del costunolido **11**. Así, los cálculos mecanicocuánticos a nivel DFT para ambos compuestos, establecen que la conformación más estable es la UU y el estudio por RMN ofrece resultados concordantes (Fig. 15).⁴³

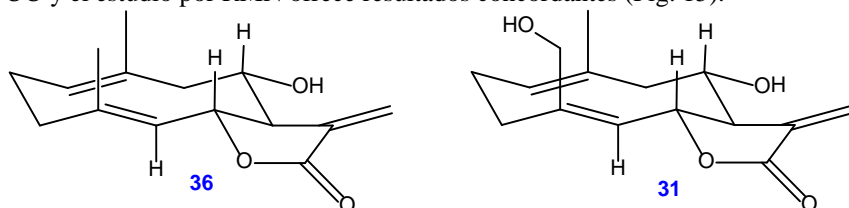


Fig. 15. Conformaciones más estables de **36** y **31**.

Cuevas y cols. han obtenido datos físico químicos de la dinámica conformacional y de la superficie de energía asociada con los cambios conformacionales del anillo germacrano.⁴⁴ El compuesto modelo fue el 6-epi-desacetil-laurenobiolido **37** aislado en 1984, fecha en la que se determinó que el conformero en el cristal es UD, el cual se corresponde con una estructura bote-bote, en la que los dos dobles enlaces del anillo están paralelos (Fig. 16).⁴⁵

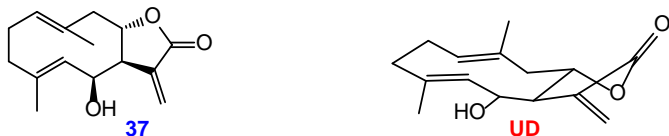


Fig. 16. **37** y su conformero más estable.

El estudio conformacional de Cuevas y cols.⁴⁴ se basa en una optimización de la geometría mediante la teoría difuncional de la densidad (DFT) y el análisis de las interacciones entre dos sistemas pequeños de referencia, uno el 4-metil-3-penten-2-ol, que se identifica con la parte inferior (de C3 a C7) y el otro, el 3-metilpent-2-eno, que se identifica con la parte superior (de C2 a C8), para evaluar las interacciones independientes del anillo. De esta manera, formularon más de cuatro conformeros aunque los cálculos indicaron que las situaciones más estables eran UD y DD con una diferencia de energía de 1,04 kcal/mol y una barrera de 15,79 kcal/mol. Posteriormente, hicieron un estudio de las señales de RMN en CD₃CN y C₆D₆, con el que confirmaron resultado teórico.

Otras muchas germacranolidas han sido sometidas a estudios conformacionales mediante cálculos teóricos.^{46,47,48,49,50}

ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Los espectros de RMN de germacranolidas son en muchos casos, poco nítidos, con señales anchas que hacen difícil la interpretación e, incluso, señales múltiples que ponen de manifiesto su movilidad conformacional al existir como mezclas de conformeros en disolución a temperatura ambiente.

A pesar de estas dificultades, la espectroscopia de RMN se ha convertido en una potente herramienta para el estudio de las conformaciones de germacranolidas.⁵¹

La realización de los espectros a temperatura variable y la aplicación de técnicas basadas en el efecto nuclear Overhauser (NOE) han permitido determinar la conformación o las conformaciones de germacranolidas en disolución.

Así, los estudios de los NOE en los espectros de RMN del costunolido **11**^{52,53} y del acetato de la dihidrotamulipina A **38**⁵⁴ demostraron que la conformación preferente de ambos compuestos en disolución es la UU (Figuras. 9 y 17).

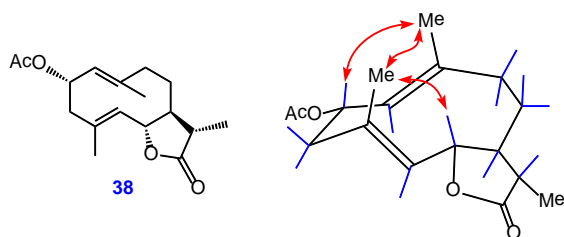


Fig. 17. 38 y NOE más significativos.

Cuando la libertad conformational está limitada por la presencia de determinados grupos funcionales como lactonas, epóxidos, etc., los espectros RMN suelen tener mayor nitidez y es posible distinguir las señales correspondientes a los distintos conformeros. Es el caso de la isabelina **33** cuyo RMN- ^1H en CDCl_3 (100 MHz) muestra una mezcla de conformeros DD (A) y UD (B) en una proporción 10 // 7 (Fig. 18).⁵⁵

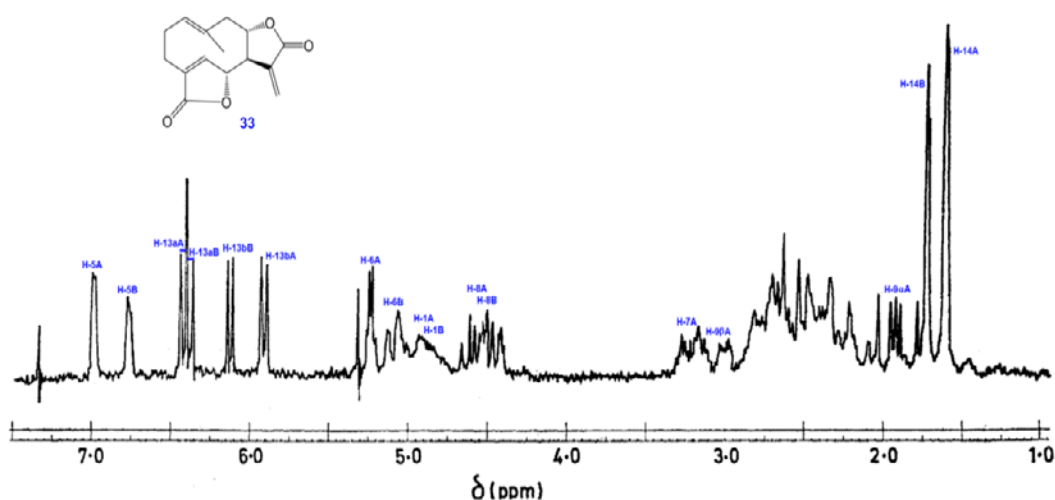


Fig. 18. RMN- ^1H de la isabelina **33**

La figura 19 muestra las estructuras de los dos conformeros y los efectos NOE más significativos.

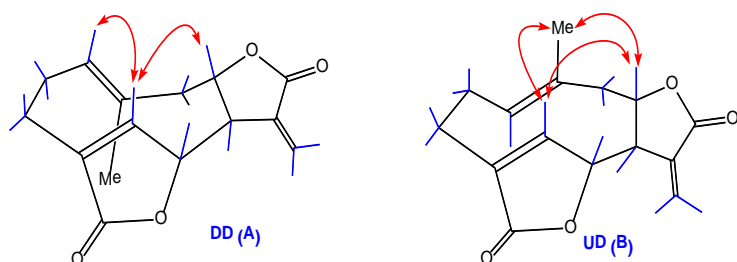


Fig. 19. Conformeros y NOEs de la isabelina **33**.

El empleo de diferentes métodos espectroscópicos de RMN (DQ-COSY, TOCSY, gHSQC, gHMBC) permitió determinar las conformaciones de la artemisifolina **32** y la de sus derivados: 11,13-dihidroartemisifolina **39**, 15-oxo-artemisifolina **40** e isabelina **33** (Fig. 20).³⁹

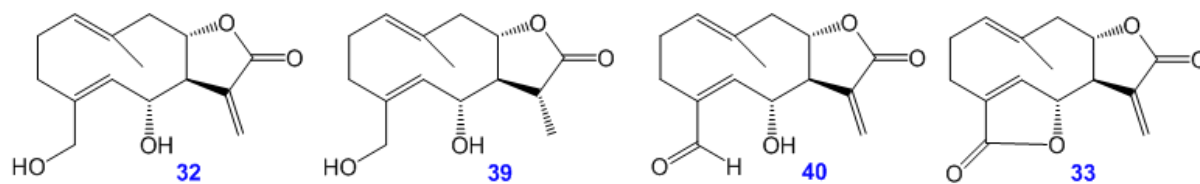


Fig. 20. Estructura de la artemisifolina y sus derivados.

En el RMN- ^1H de la artemisifolina **32** se identifica una mezcla de los cuatro conformeros: UD, UU, DU y DD. La composición depende del disolvente: 60 // 15 // 14 // 11 en CDCl_3 y 29 // 30 // 27 // 14 en $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

La combinación de las técnicas de RMN indicadas anteriormente, a -30°C , junto con cálculos de MM y rayos-X, permitió establecer de forma clara la estructura de los distintos conformeros para las cuatro sustancias estudiadas.

La figura 21 muestra estructuras de los cuatro conformeros de la artemisifolina **32**, obtenidos con cálculos moleculares AM1 y en ella se indican algunos NOE significativos para cada uno de ellos.

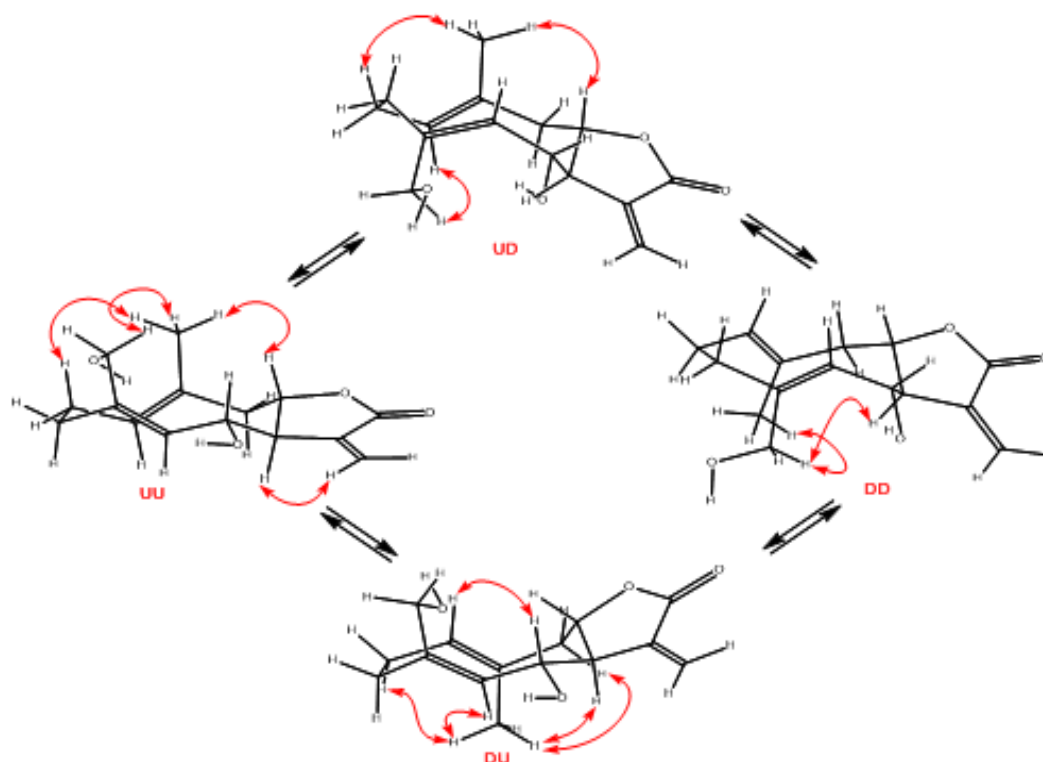


Fig. 21. Conformaciones AM1 de **32**, en las que se indican los NOEs significativos.

El tratamiento de **32** con borohidruro sódico origina el dihidroderivado **39**, para el que en el RMN- ^1H [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, temperatura ambiente] se observan solo dos conformeros en una proporción 85 // 15. Desde estudios NOE, solo se pudo determinar la estructura del conformero mayoritario (UU).

Para la isabelina **33** (CDCl_3) también se encuentran dos conformeros que desde estudios NOE se identifican como DD y UD y el resultado concuerda con lo descrito previamente (Fig. 19).⁵⁵

Para el producto de oxidación en C15, el hidroxialdehído **40**, desde RMN (CDCl_3), se encuentra que sólo existe una conformación, DU, aunque es muy evidente la diferencia con la correspondiente conformación DU de la artemisifolina **32** (Fig. 22).

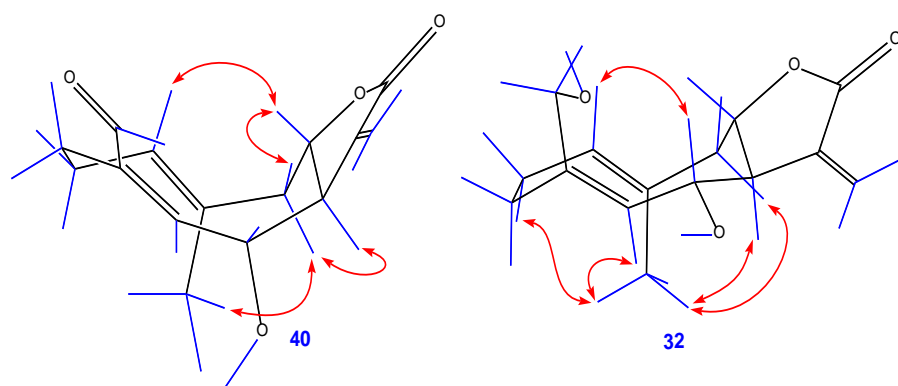


Fig. 22. Conórmeros DU de **40** y **32** en los que se indican NOE significativos.

Muchos estudios de RMN hacen uso de programas que permiten determinar las constantes de acoplamiento o los correspondientes desplazamientos químicos en RMN- ^{13}C para los conórmeros generados desde los cálculos moleculares.^{39,44} El grado de coincidencia de los resultados teóricos con los encontrados experimentalmente se considera una prueba de la bondad de las predicciones de los cálculos de MM.

Reactividad de germacranolidas

Reagrupamiento de cope

El mecanismo de esta reacción fue establecido por Woodward y Hoffmann y está definido como un reagrupamiento sigmatrópico [3,3] que procede a través de un estado de transición de ciclohexano tipo silla.⁵⁶ En consonancia con este mecanismo, los estudios espectroscópicos de RMN han puesto de manifiesto que las conformaciones en las que la disposición de los dos dobles enlaces es la cruzada son las que dan lugar a este reagrupamiento.

La existencia de un equilibrio entre los compuestos que poseen el anillo de *E,E*-germacradieno y los sesquiterpenos con estructura de *trans* elemmano ha sido ampliamente descrita. La posición de dicho equilibrio está influenciada por diversos factores tales como el patrón de sustitución, los grupos funcionales, la tensión de anillo y los efectos conformacionales y de conjugación.⁵⁷

Los estudios mediante MM de las estabilidades relativas de las conformaciones de los germacranos en el estado fundamental y de transición, indicaron que los elemmanos se forman a través del estado de transición de menor energía, con independencia de las conformaciones más estables de los germacranos en el estado fundamental.⁵⁸

En cualquier caso, existe una clara correlación entre las conformaciones preferentes de los germacranos precursores y la estereoquímica de los elemmanos obtenidos en el reagrupamiento de Cope.

Así, Fischer y col. que habían determinado la conformación en disolución del acetato de dihidrotamaulipina A **41** como UU mediante NOE en RMN,⁵⁴ comprobaron que el reagrupamiento de Cope de esta germacranolida conduce al derivado elemmano **42** de dicha conformación (Fig. 23).⁵⁹

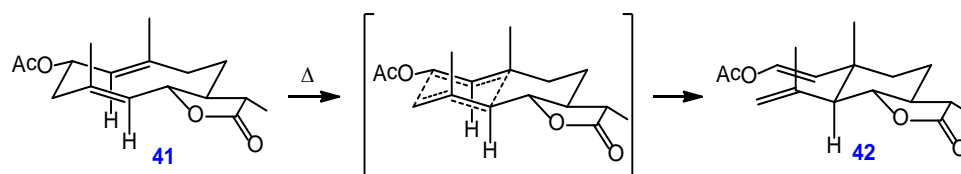


Fig. 23. Reagrupamiento de Cope de **41**.

Takeda y cols reagruparon determinados germacranos furánicos, del tipo de **43** y **45**, para obtener los correspondientes derivados de *trans*-1,2-divinilciclohexano (Fig. 24).^{60,61}

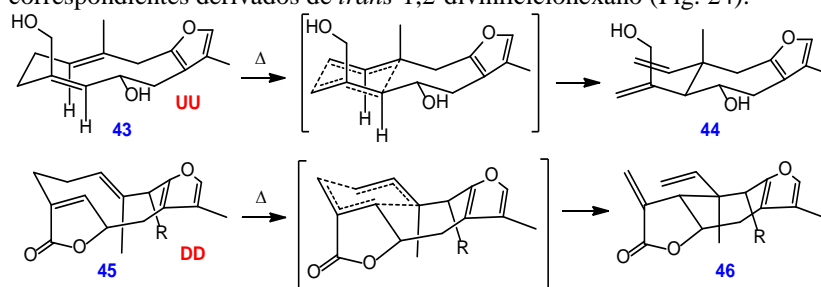


Fig. 24. Reagrupamiento de Cope de furanogermacranos.

El diol furánico **43**, que posee la conformación preferente UU, se reagrupa al correspondiente trans-divinilciclohexano **44**, con el metilo C14 beta. Los productos de reagrupamiento de la linderalactona (**45**, R = H) y su acetato (**45**, R = Ac), también mantienen orientaciones de los distintos enlaces coherentes con las de los sustratos de partida.⁶²

Basados en estos resultados, Takeda y cols. concluyeron que el reagrupamiento de germacradienos para obtener elemanos sigue el modelo de reacción concertada a través de un estado de transición de seis centros en un anillo de ciclohexano tipo silla y que la estereoquímica de los productos de reacción proporciona evidencias acerca de la orientación de los sustituyentes en el anillo de diez miembros del confórmero que lo origina.

Las condiciones de reacción para la conversión térmica de germacradienos en elemanos son generalmente muy severas puesto que se llevan a cabo en tubo sellado a temperaturas entre 120 y 150 °C.⁶³

El uso de cantidades catalíticas de Pd(II) da lugar a un incremento de las velocidades de reacción y una disminución de las temperaturas de reacción.⁶³

La presencia de determinados grupos funcionales origina también una disminución de las temperaturas requeridas para que el reagrupamiento de Cope tenga lugar, aunque el intervalo de temperaturas es amplio. Este es el caso de las 15-oxogermacranolidas (Fig. 25).

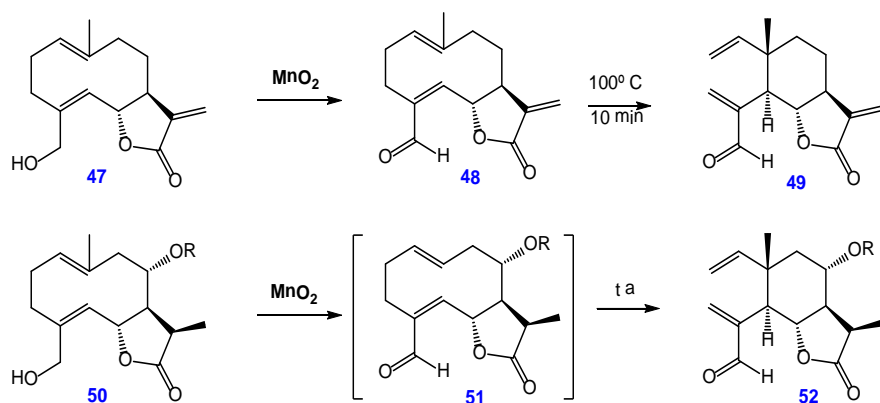


Fig. 25. *Reagrupamiento de Cope de 15-oxogermacranolidas.*

Appendino y cols. aislaron de la *Centaurea hurdica* el 8-desoxisalonitenolido (**47**) que transformaron, por oxidación con MnO₂, en el aldehído **48**. El calentamiento a 100 °C de **48** durante 10 min produjo cuantitativamente el elemano **49**. Por otro lado, cuando sometieron **50** (R = COCHMeCH₂OH) a la misma oxidación aislaron directamente el elemano **52**.⁶⁵

Rosselli y cols. encontraron que la 15-oxogermacranolida **53**, disuelta en CDCl₃ a 20 °C, se transforma completamente en el elemano **54** después de 20 d. Si la disolución se mantiene a 60 °C, requiere solo 10 h y la adición de gel de sílice cataliza el reagrupamiento a 20 °C, llevando a conversión total a **54** en sólo tres días (Fig. 26).⁶⁶

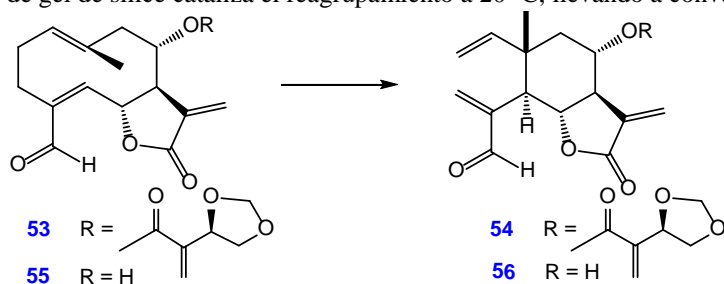


Fig. 26. *Reagrupamiento de Cope de 15-oxogermacranolidas.*

La presencia del éster en C8 influye en la velocidad de reacción puesto que el aldehído desacilado **55**, en el mismo medio y a 20 °C requiere de 10 d para conversión total a **56** y solo de 5 h a 60 °C.

Ciclaciones electrofílicas intramoleculares

Las germacranolidas se consideran metabolitos precursores de otros esqueletos de lactonas sesquiterpénicas a través de ciclaciones intramoleculares producidas por determinadas enzimas.⁶⁷ De hecho, está generalmente admitido que

las ciclaciones llevadas a cabo en el laboratorio mediante tratamiento en medio ácido de estos compuestos, son síntesis biomiméticas de eudesmanolidas, guayanolidas y pseudoguayanolidas. En estas ciclaciones se considera al costunolido **11** como compuesto de referencia y es posible plantear dos alternativas. Una de ellas es la ciclación directa catalizada por ácido (Fig. 27).

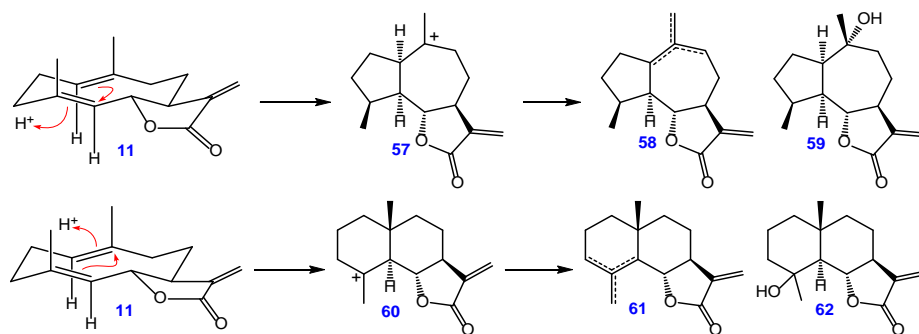


Fig. 27. Ciclaciones de costunolido (**11**) catalizadas por ácido.

Como se puede observar en la figura anterior, la ciclación directa catalizada por ácido tiene a su vez dos alternativas. En el primer caso, la adición del protón se produce en el enlace C4-C5, lo que conduce al ataque del enlace C1-C10 y origina el catión terciario intermedio con esqueleto de guayanolida **57**, que puede evolucionar con pérdida de protón hacia los tres alquenos representados por **58**, o a una adición de agua sobre C10 originando **59**. El segundo caso es paralelo al anterior, pero la protonación ocurre en el enlace C1-C10 y origina vía el catión **60**, eudesmanolidas: los alquenos representados por **61** y el alcohol **62**.

El alto grado de estereoespecificidad con el que transcurren este tipo de ciclaciones se pone de manifiesto en la Fig. 27, lo que ha llevado a Sutherland a considerar este hecho como una evidencia de la importancia que tienen las conformaciones con los dos dobles enlaces cruzados en tales ciclaciones.⁶⁸

La ciclación electrofílica directa que origina eudesmanolidas (Fig. 27) requiere de una adición tipo Markownikoff, mientras que la ciclación a guayanolidas requiere de una adición anti-Markownikoff. No es pues sorprendente que las ciclaciones directas conduzcan prácticamente en todos los casos a eudesmanolidas.

En la segunda alternativa, el costunolido **11** se epoxida antes de la ciclación. Si la epoxidación ocurre en el enlace C4-C5 origina el partenolido **14**, y si la epoxidación ocurre en el enlace C1-C10 origina **63** (Fig. 28).

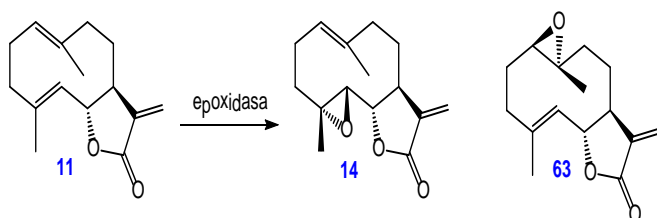


Fig. 28. Monoepóxidos de costunolido **11**.

El partenolido **14** es bastante común en fuentes naturales⁶⁹ y se postula como intermedio clave en la biosíntesis de las guayanolidas. El epóxido **63** no ha sido aislado de fuente natural.

Las ciclaciones de **14** y **63** son paralelas a lo visto anteriormente para la ciclación directa del costunolido **11** (Fig. 29).

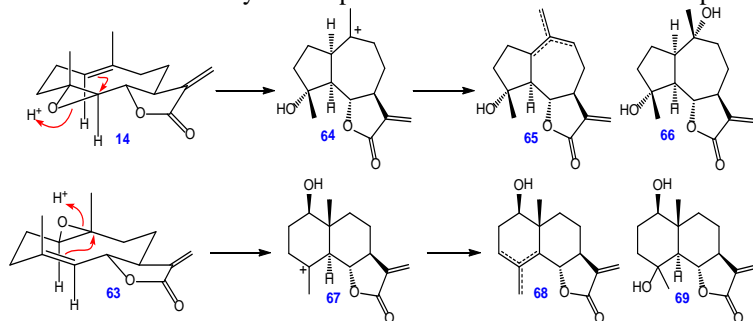


Fig. 29. Ciclación de los epóxidos del costunolido **11**.

Como se puede observar en la ciclación catalizada por ácido, el partenolido **14** origina guayanolidas hidroxiladas en C4, y su regioisómero **20** eudesmanolidas hidroxiladas en C1.^{20,70,71}

Debido a su interés biosintético, estos compuestos han sido ampliamente sometidos a reacciones de ciclación en condiciones ácidas, conociéndose numerosos ejemplos de las dos alternativas de ciclación recogidas en las (Figuras 27 y 29)^{72,73}

Dada su elevada estereoespecificidad, estas reacciones de tipo biomimético han contribuido de modo importante a la determinación de la estereoestructura de un gran número de lactonas sesquiterpénicas.^{20,21,22}

Las ciclaciones intramoleculares de las germacranolidas pueden producirse, no solo en condiciones ácidas, sino también, por irradiación con luz ultravioleta. Cuando la isabelina **33** y la dihidroisabelina **70** se irradian con ella, se obtiene la fotoisabelina **71**, la fotodihidroisabelina **72** y la lumidihidroisabelina **73** (Fig. 30).⁷⁴

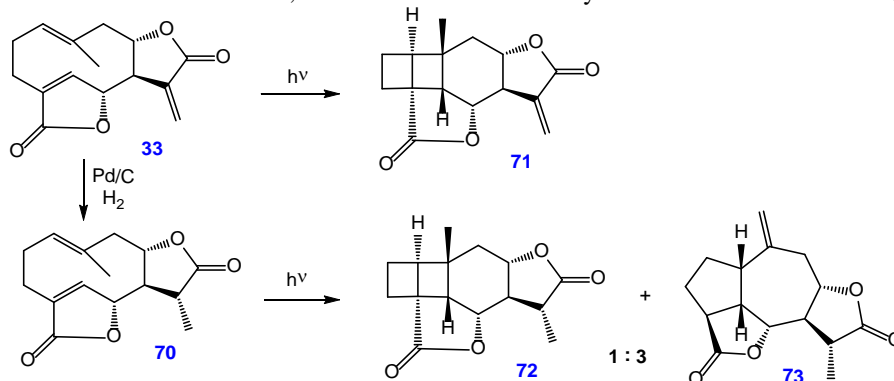


Fig. 30. Fotoquímica de la isabelina **33** y la dihidroisabelina **70**.

Tanto la fotoisabelina **71**, como la fotodihidroisabelina **72**, proceden de fotociclaciones ($2\pi + 2\pi$). Para la lumidihidroisabelina **73** la reacción transcurre probablemente a través de especies intermedias diradicálicas y la migración de un hidrógeno desde C10 a C4 (Fig. 31).

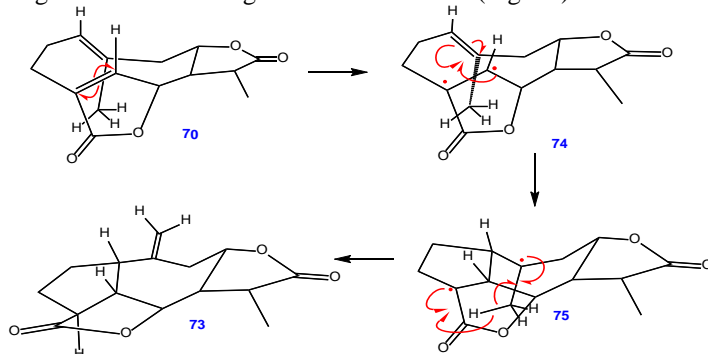


Fig. 31. Mecanismo de formación de la lumidihidroisabelina **73**.

La estereoquímica de la lumidihidroisabelina **73** sugiere que la conformación reactiva en **70** es la DD. Ya en la publicación original,⁷⁴ se indica que contrariamente a lo que ocurre con la isabelina **33**, que se muestra como una mezcla de dos conformeros (UD y DD), la lumidihidroisabelina **73** muestra en su RMN un solo conformero.

Otras germacranolidas como el dihidrocostunolido **12**⁷⁵ o el herbolido A **74**⁷⁶ también han sido sometidas a irradiación con luz de 254 nm (Fig. 32).

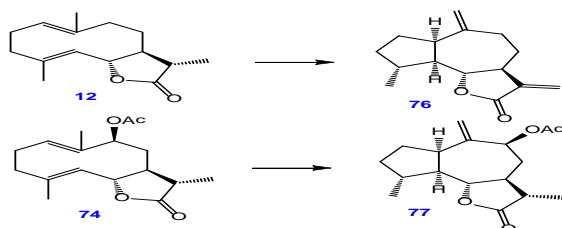


Fig 32. Fotoquímica de **12** y **74**.

En estos casos, se generan el fotonulido **76** y el fotoherbolido A **77** y como se puede deducir desde la estereoquímica, la transferencia de hidrógeno se produce por la cara beta.

La gran versatilidad química de las ciclaciones de las germacranolidas las convierte en interesantes productos de partida para llevar a cabo síntesis de tipo biomimético de un amplio espectro de sesquiterpenolidas potencialmente bioactivas

CONSIDERACIONES GENERALES

Debido a la flexibilidad conformacional que presenta el anillo de germacrano en las germacranolidas resulta muy complejo la elucidación de sus conformaciones en disolución. Actualmente, con la realización de espectros a temperatura variable y la aplicación de técnicas basadas en el efecto nuclear Overhauser, se ha avanzado mucho en la determinación de las conformaciones de las moléculas de estos compuestos. Los estudios teóricos que se reportan conjuntamente la mayoría de las veces, contribuyen a predecir las conformaciones, las cuales no difieren mucho de los resultados que se obtienen en disolución. Otra de las técnicas empleadas para el estudio conformacional de las germacranolidas es la difracción de rayos X, pero tiene como inconveniente que no es una técnica concluyente, pues solo muestra una de las posibles conformaciones.

En este trabajo se ha encontrado que la flexibilidad conformacional del anillo de diez eslabones en las germacranolidas desempeña un papel fundamental para entender la reactividad de estos compuestos y la biosíntesis de otros esqueletos de lactonas sesquiterpénicas. Por ello, el análisis conformacional de estos compuestos posee notable interés porque puede explicar sus reacciones más características, como son las ciclaciones intramoleculares y los reagrupamientos de Cope.

CONCLUSIONES

El presente trabajo ha permitido corroborar que los germacrano y germacranolidas constituyen precursores de otras lactonas sesquiterpénicas. Además que las germacranolidas presentan una amplia diversidad de actividades biológicas. Se confirmó que para realizar la determinación de las conformaciones en las germacranolidas las herramientas que se emplean son la difracción de rayos X, los cálculos teóricos y la resonancia magnética nuclear. Se comprobó que el anillo de ciclodecadieno en las germacranolidas desempeña un papel decisivo para comprender la reactividad de estos compuestos, la cual se puede manifestar mediante las reacciones más particulares como son las ciclaciones electrofílicas y los reagrupamientos de Cope.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adio AM. Germacrenes AGE and Related Compounds: Thermal, Photochemical and Acid Induced Transannular Cyclizations. *Tetrahedron*. 2009; 65:1533-1552.
2. Degenhardt J, Köllner TJ, Gershenzon J. Monoterpene and Sesquiterpene Synthases and the Origin of Terpene Skeletal Diversity in Plants. *Phytochemistry* 2009, 70, 1621–1637.
3. Scotti MT, Emerenciano V, Ferreira MJP, Scotti L, Stefani R, Da Silva MS, *et al.* Self-Organizing Maps of Molecular Descriptors for Sesquiterpene Lactones and Their Application to the Chemotaxonomy of the Asteraceae Family. *Molecule*. 2012; 17:4684-4702.
4. Rubal Lobo JJ. Estudio Fitoquímico de Especies del Género *Thapsia*. Tesis Doctoral, Universidad de Cádiz, Cádiz (España), 2009.
5. Scotti MT, Marcelo MBF, Ferreira MJP, Emerenciano V. Quantitative Structure-Activity Relationship of Sesquiterpene Lactones with Cytotoxic Activity. *Bioorg Med Chem*. 2007; 15:2927-2934.
6. Ghantous A, Vuorela H, Saliba NA, Darwiche N. What Made Sesquiterpene Lactones Reach Cancer Clinical Trials?. *Drug Discov Today*. 2010; 15:668-678.
7. Bruno M, Rosselli S, Maggio A, Raccuglia RA, Napolitano F, Senatore F. Antibacterial Evaluation of Cnicin and Some Natural and Semisynthetic Analogues. *Planta Medica*. 2003; 69:277-281.
8. Barrero AF, Oltra JE, Alvarez M, Raslan DS, Saude DA, Akssira M, New Sources and Antifungal Activity of Sesquiterpene Lactones. *Fitoterapia*. 2000;71:60-64.
9. Tao L, Zhou L, Zheng L, Yao M. Elemene Displays Anti-Cancer Ability on Laryngeal Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006; 58: 24-34.
10. Chappell J, Coates RM, Sesquiterpenes, in *Comprehensive Natural Products II, vol 1*, (Mander L, and Liu HW, Eds.), Elsevier, 2010. 609-641.
11. Cheng AX, Lou YG, Mao YB, Lu S, Wang LJ, Chen XY, Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *J Integr Plant Biol*, 2007; 49, 179-186.
12. De Kraker JW. The Biosynthesis of Sesquiterpene Lactones in Chicory (*Cichorium intybus* L.) Roots, Ph.D. Thesis, Wageningen Univ., Wageningen (Netherlands), 2002.
13. De Kraker JW, Franssen MCR, De Groot A, Konig WA, Bouwmeester HJ. (+)-Germacrene A Biosynthesis. -The Committed Step in the Biosynthesis of Bitter Sesquiterpene Lactones in Chicory. *Plant Physiol.*, 1998; 117:1381-1392.

14. De Kraker JW, Franssen MCR, Dalm MCF, De Groot A, Bouwmeester HJ. Biosynthesis of Germacrene A Carboxylic Acid in Chicory Roots: Demonstration of a Cytochrome P450 (+)-Germacrene A Hydroxylase and NADP-Dependent Sesquiterpenoid Dehydrogenase(s) Involved in Sesquiterpene Lactone Biosynthesis. *Plant Physiol.* 2001; 125:1930-1940.
15. De Kraker JW, Franssen MCR, Joerink M, De Groot A, Bouwmeester HJ. Biosynthesis of Costunolide, Dihydrocostunolide, and Leucodin. Demonstration of Cytochrome P450-Catalyzed Formation of the Lactone Ring Present in Sesquiterpene Lactones of Chicory. *Plant Physiol.* 2002; 129: 257-268.
16. Liu Q, Majdi M, Cankar K, Goedbloed M, Charnikhova T, Verstappen FWA, *et al* Reconstitution of the Costunolide Biosynthetic Pathway in Yeast and *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, 2011, 6, e23255, doi:10.1371/journal.pone.0023255.
17. Nguyen DT, Göpfert JC, Ikezawa N, MacNevin G, Kathiresan M, Conrad J, *et al*. Biochemical Conservation and Evolution of Germacrene A Oxidase in Asteraceae. *J Biol Chem.* 2010; 285:16588-16598.
18. Ikezawa N, Göpfert JC, Nguyen DT, Kim SU, O'Maille PE, Spring O, *et al*. Lettuce costunolide Synthase (CYP71BL2) and its Homolog (CYP71BL1) from Sunflower Catalyze Distinct Regio- and Stereoselective Hydroxylations in Sesquiterpene Lactone Metabolism. *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 21601-21611.
19. Barquera-Lozada JE, Cuevas GJ. Biogenesis of Sesquiterpene Lactones Pseudoguaianolides from Germacranolides: Theoretical Study on the Reaction Mechanism of Terminal Biogenesis of 8-Epiconfertifin. *J Org Chem.*, 2009; 74: 874-883.
20. Brown ED, Sutherland JK, Sam TW. Medium-Ring 1,5-Dienes: Part III. Cyclisation of Germacra-1(10),4,7-(11)-triene Oxides. *JCS Perkin Trans I* 1975; 2332-2336.
21. Fischer NH. Sesquiterpene Lactones: Biogenesis and Biomimetic Transformations, in *Biochemistry of the Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids*. (Tower, G.H.N. and Stafford, H.A., Eds.), New York: Plenum Press; 1990: pp. 161-201.
22. Dewick PM. The Biosynthesis of C5-C20 Terpenoid Compounds. *Nat Prod Rep.* 1995; 12:507-534.
23. Song Q, Gomez-Barrios ML, Hopper EL, Ujortso MA, Fischer NH, Biosynthetic Studies of Lactucin Derivatives in Hairy Root Cultures of *Lactuca floridiana*. *Phytochemistry* 1995, 40, 1659-1665.
24. Orofino-Kreuger MR, Grootjans S, Biavatti MW, Vandenabeele P, D'Herde K, Sesquiterpene Lactones as Drugs with Multiple Targets in Cancer Treatment: Focus on Parthenolide. *Anticancer Drugs.* 2012; 23:883-896.
25. Wu H, Fronczek FR, Burandt CL, Zjawiony JK. Antileishmanial Germacranolides from *Calea zacatechichi*. *Planta Med.* 2011; 77:749-753.
26. Lee HJ, Jung H, Kwon J, Li H, Lee Y, Lim HJ, *et al*. A Germacranolide Sesquiterpene Lactone Suppressed Inducible Nitric Oxide Synthase by Downregulating NF- κ B Activity. *Can J Physiol. Pharmacol.* 2011; 89: 232-237.
27. Lee WL, Wen TN, Shiau JY, Shyur LF. Differential Proteomic Profiling Identifies Novel Molecular Targets of Paclitaxel and Phytoagent Deoxyelephantopin against Mammary Adenocarcinoma Cells. *J Proteome Res.* 2010; 9: 237-253.
28. Ren Y, Acuña UM, Jiménez F, García R, Mejía M, Chai H, *et al*. Cytotoxic and NF- κ B Inhibitory Sesquiterpene Lactones from *Piptocoma rufescens*. *Tetrahedron.* 2012; 68:2671-2678.
29. Odonne G, Herbette G, Eparvier V, Bourdy G, Rojas R, Sauvain M, *et al*. Antileishmanial Sesquiterpene Lactones from *Pseudelephantopus spicatus*, A Traditional Remedy from the Chayahuita Amerindians (Peru). Part III. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137: 875-879.
30. Samek Z, Harmatha J Use of Structural Changes for Stereochemical Assignments of Natural α -Exomethylene γ -Lactones of the Germacra-1(10),4-dienolide Type on the Basis of Allylic and Vicinal Couplings of Bridgehead Protons. Hydrogenation of Endocyclic Double Bonds. *Collect. Czech Chem Commun.* 1978; 43: 2779-2799.
31. Faraldos JA, Wu S, Chappell J, Coates RM, Conformational Analysis of (D)-Germacrene A by Variable Temperature NMR and NOE Spectroscopy. *Tetrahedron.* 2007; 63: 7733-7742.
32. Watson WH, Kashyap RP. Conformations of Germacra-1(10),4-dien-6,12-olides and -8,12-olides. A Comparison of x-ray Diffraction, NMR, and Molecular Mechanics Derived Conformations. *J Org Chem.* 1986; 51:2521-2524.
33. Bohlmann F, Umemoto K, Jakupovic J, King RM, Robinson H, Seven Sesquiterpene Lactones from *Ferreyanthus* Species. *Phytochemistry.* 1984; 23: 1689-1672.
34. Minnaard AJ, Wijnberg JBPA, De Groot A, The Synthesis of Germacrene Sesquiterpenes and Related Compounds. *Tetrahedron.* 1999; 55:2115-2146.
35. Fischer NH, Oliver EJ, Fischer HD, The Biogenesis and Chemistry of Sesquiterpene Lactones. In *Progress in the Chemistry of Natural Products* (Herz, W.; Grisebach, H.; Kirby, G.W. Eds.) 1979, Vol. 38:47-390.
36. Bovill MJ, Cox PJ, Cradwick PD, Guy MHP, Sim GA, White DNJ. Sesquiterpenoids. XXV. X-ray Crystal Structure Analysis of Costunolide. *Acta Cryst.* 1976; B32: 3203-3209.

37. Quick A, Rogers DJ. Crystal and Molecular Structure of Parthenolide [4,5-Epoxygermacra-1(10),11(13)-dien-12,6-olactone]. JCS, Perkin Trans. 1976; 2, 465-469.
38. Makhmudov MK, Tashkhodzhaev B, Yusunova IM, Sham'yanov ID, Yagudaev MR, Malikov VM. Spatial Structure of the Germacrane Lactones Hanphyllin, Salonitenolide, and Sachosin. Chem. Nat Comp. 1989; 25:657-661.
39. Jimeno ML, Aprea-Rojas MC, Cano FH, Rodríguez B. NMR and x-ray Conformational Study of Artemisiifolin and Three Other Related Germacranolides. Magn Reson Chem. 2004; 42:474-483.
40. Allinger NL. Conformational-Analysis.130. MM2 - Hydrocarbon Force-Field Utilizing V1 and V2 Torsional Terms. J Am Chem Soc., 1977; 99:8127-8134.
41. Turdybekov KM, Linderman SV, Timofeeva TV, Struchkov YT. Conformation of 10-Membered Ring and Relative Stability of Conformers of (E,E)- $\Delta^{1(10),4}$ -Germacranolides. Chem Nat Comp. 1991; 27:288-291.
42. Azarken R, Guerra FM, Moreno-Dorado FJ, Jorge ZD, Massanet GM. Substituent Effects in the Transannular Cyclizations of Germacrane. Synthesis of 6-Epi-Costunolide and Five Natural Steiractinolides. Tetrahedron. 2008; 64:10896-10905.
43. Maggio AM, Barone G, Bruno M, Duca D, Rosselli S. Conformational Analysis and DFT Calculations of 8 α -Hydroxy-germacradiene-6,12-olide Derivatives. J Phys Org Chem 2005;18:1116-1122.
44. Barquera-Lozada JE, Quiroz-García B, Quijano L, Cuevas G. Conformational Properties of the Germacra-dienolide 6-Epidesacetyl-laurenobiolide by Theory and NMR Analyses. J Org Chem 2010; 75:2139-2146.
45. Quijano L, Calderon JS, Gomez GF, Lopez PJ, Rios T, Fronczek FR, The Crystal Structure of 6-Epi-Desacetyl-laurenobiolide, A Germacra-1(10),4-Diene-12,8-olide from *Montanoa grandiflora*. Phytochemistry. 1984; 23:1971-1974.
46. Turdybekov KM, Edilbaeva TT. Conformational Analysis of Sesquiterpene Lactones of the Germacrane Type 1. 1(10)E,4E-Germacranolides. Russ Chem Bull 1996; 45:2741-2744.
47. Turdybekov KM, Edilbaeva TT. Conformational Analysis of Sesquiterpene Lactones of Germacrane Type 2. 1(10)Z,4Z-Germacranolides. Russ. Chem. Bull. 1997; 46:254-257.
48. Tashkhodzhaev B, Makhmudov MK. Conformational Analysis of E,E-Germacrane by the Method of Molecular Mechanics. Chem Nat Comp 1997; 33:289-292.
49. Kaldybaeva AK, Edil'baeva TT, Turdybekov KM. Effect of Epoxidation of Carbocyclic Double Bonds on Conformational Flexibility of 1(10)E,4E-Germacranolides. Chem Nat Comp 2000; 36:497-500.
50. Edil'baeva TT, Turdybekov KM. Conformational Analysis of Germacrane Sesquiterpene Lactones. 1(10)Z,4E- and 1(10)E,4Z-Germacranolides. Chem. Nat. Comp. 2001; 37:143-147.
51. Porter TH, Mabry TJ, Yoshioka H, Fischer NH. The Isolation and Structure Determination of Artemisiifolin, a New Germacranolide from *Ambrosia artemisiifolia* (Compositae). Phytochemistry. 1970; 9:199-204.
52. Takeda K. Stereospecific Cope Rearrangement of the Germacrene-Type Sesquiterpenes. Tetrahedron. 1974; 30:1525-1534.
53. Tori K, Horibe I, Tamura Y, Tada H. Simultaneous Application of the Nuclear Overhauser Effect and an N.M.R. Shift Reagent. Conformation of Costunolide and Dihydrocostunolide in Solution JCS, Chem. Comm. 1973; 620-621.
54. Bhacca NS, Fischer NH. The Determination of the Conformation of a Germacranolide (Dihydrotamaulipin-A Acetate) with the Aid of Nuclear Overhauser Effects. JCS Chem Comm 1969; 68-69.
55. Tori K, Horibe I, Yoshioka H, Mabry TJ. Configuration of the Endocyclic Double-Bond and Conformation of the Germacranolide Dilactones, Isabelin, Isoisabelin, and Related Germacranolide Monolactones, As Studied by Nuclear Overhauser Effect. J Chem Soc B, 1971;1084-1088.
56. Woodward RB, Hoffmann R, Stereochemistry of Electrocyclic Reactions. J Amer Chem Soc 1965; 87: 395-307.
57. Hill RK. Cope, Oxy-Cope and Anionic Oxy-Cope Rearrangements in Comprehensive Organic Synthesis, Vol 5 (Trost, B.M.; Fleming, I.; Paquette, L.A., Eds.), Pergamon Press, New York, 1991:p.785-826.
58. Terada Y, Yamamura S. An Application of Molecular Mechanics Calculations on Thermal Reactions of Ten-membered Ring Sesquiterpenes. Bull Chem Soc Jpn. 1982; 55:2495-2499.
59. Fischer NH, Mabry TJ, Kagan HB, The Structure of Tamaulipin-A: a New Germacranolide from *Ambrosia confertiflora* DC. (Compositae). Tetrahedron. 1968; 24:4091-4097.
60. Takeda K, Horibe I, Minato H, Cope Rearrangement of Some Germacrane-Type Furan Sesquiterpenes. Part I. J Chem Soc C 1970; 1142-1147.
61. Takeda K, Tori K, Horibe I, Ohtsuru M, Minato H, Cope Rearrangement of Some Germacrane-Type Furan Sesquiterpenes. Part II. Relationship between Conformations of Carbocyclic Ten-Membered Rings in Germacrane-Type Furan Sesquiterpenes and the Stereochemistry of Their Cope Rearrangement Products. J Chem Soc C 1970; 2697-2703.
62. Takeda K. Stereospecific Cope Rearrangement of the Germacrene-Type Sesquiterpenes. Tetrahedron. 1974; 30: 1525-1534.

63. Jain TC, Banks CM, McCloskey JE. Dehydrosaussurea Lactone from Costunolide and Reversibility in the Germacranolide-Cope Reaction. *Tetrahedron Lett.* 1970; 11:841-844.
64. Barrero AF, Oltra JE, Álvarez M, Palladium II Promoted Rearrangement of Germacranolides. Synthesis of (+)-Stoebenolide and (+)-Dehydromelitensin. *Tetrahedron Lett.* 1998; 39:1401-1404.
65. Appendino G, Ozen HC. Sesquiterpene Lactones from *Centaurea hurdica* Reichardt. *Gazz. Chim Ital* 1993; 123:93-94.
66. Rosselli S, Maggio A, Raccuglia RA, Bruno M. Rearrangement of Germacranolides. Synthesis and Absolute Configuration of Elemene and Heliangolane Derivatives from Cnicin, *Eur J Org Chem* 2003; 2690-2694.
67. Cane DE. Sesquiterpene Biosynthesis: Cyclization Mechanisms en *Comprehensive Natural Products* (Meth-Cohn, O.; Barton, D.; Nakanishi, K., Eds.) Elsevier, Oxford, 1999; 2:155-200.
68. Sutherland JK. Regio- and Stereo-Specificity in the Cyclisation of Medium Ring 1,5-Dienes. *Tetrahedron.* 1974; 30: 1651-1660.
69. Majdi M, Liu Q, Karimzadeh G, Malboobi MA, Beekwilder J, Cankar K, *et al.*, Biosynthesis and Localization of Parthenolide in Gandular Trichomes of Feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). *Phytochemistry.* 2011; 72: 1739-1750.
70. Fischer NH, Sesquiterpene Lactones: Biogenesis and Biomimetic Transformations. *Recent Adv. Phytochem.* 1990; 24:161-201.
71. Piet DP, Schrijvers R, Franssen MCR, De Groot A. Biotransformation of Germacrene Epoxides by *Cichorium intybus* L. *Tetrahedron.* 1995; 51:6303-6314.
72. Harrowven DC, Pattenden. G, Transanular Electrophilic Cyclizations en *Comprehensive Organic Synthesis*, (Trost, B.M.; Fleming, I., Eds.), Pergamon Press, Oxford, 1999;3:379-411.
73. Appendino G, Jakupovic J, Cravotto G, Biavatti-Weber M, The Reaction of 6,8-Disubstituted *E,E*-Germacrene-1(10),4-diene 4-Epoxides with Oxyphilic Reagents. *Tetrahedron.* 1997;53:4681-4692.
74. Yoshioka H, Mabry TJ, Higo A. The Photochemistry of Isabelin. *J Am Chem Soc.* 1970; 92: 923-927.
75. Winter REK, Lindauer RF. The Photoisomerization of Dihydrocostunolide, *Tetrahedron.* 1976; 32: 955-959.
76. Blum S, Segal R, Sokoloff S, Lichtenberg D. Photoherbolide A, A 9-Acetoxy-guaianolide. *Lloydia.* 1978; 41:117-119.