



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"Estudio químico de *Physalis nicandroides* Schltdl."

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A:
YUNUEN ROMERO GUTIÉRREZ



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Dra.	María Isabel Aguilar Laurents
Vocal	Química	Silvia de Jesús Mendoza Arellano
Secretario	M. en C.	Emma Maldonado Jiménez
1er. Suplente	Química	Josefina Elizalde Torres
2do. Suplente	M. en C.	Isabel del Carmen Rivero Cruz

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 2-7, Departamento de Productos Naturales
Instituto de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesora

M. en C. Emma Maldonado Jiménez

Sustentante

Yunuen Romero Gutiérrez

***Nuestra recompensa se encuentra
en el esfuerzo y no en el resultado.***

***Un esfuerzo total
es una victoria completa.***

Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a la M. en C. Emma Maldonado, por sus enseñanzas y hacer del tiempo que trabaje con ella una increíble experiencia.

A todos los que forman parte del maravilloso laboratorio 2-7, por su amistad y buenos deseos.

Al personal técnico del Instituto de Química, por su trabajo ya que fue de gran importancia para la realización de este proyecto.

A mi jurado, por haber revisado y corregido la presente tesis.

A mis amigos, porque durante todos estos años me han hecho pasar momentos increíbles. Gracias a cada uno por ser parte importante de mi vida.

A mis hermanos, por su apoyo incondicional, los adoro.

Y en especial a mis padres, porque sin ellos no hubiera podido cumplir la más grande de mis metas. Gracias por guiarme sobre el camino de la educación.

ÍNDICE

Índice.....	1
Abreviaturas.....	3
1. Introducción.....	5
2. Antecedentes.....	6
2.1 Medicina Tradicional en México.....	6
2.2 Familia Solanaceae.....	6
2.3 Género <i>Physalis</i>	7
2.4 Química de <i>Physalis</i>	8
2.5 <i>Physalis nicandroides</i> Schltdl.....	10
2.6 Metabolitos primarios y secundarios.....	11
2.7 Terpenos.....	13
2.8 Rutas Acetato-Mevalonato (MVA) y 1-Desoxi-D-Xilosa-5-Fosfato (DOXP).....	14
2.9 Diterpenos.....	17
2.9.1 Principales tipos estructurales de diterpenos.....	17
2.9.1.1 Diterpenos acíclicos.....	17
2.9.1.2 Diterpenos cíclicos.....	18
2.10 Actividad biológica de diterpenos.....	22
2.10.1 Actividad biológica de diterpenos labdánicos.....	23
2.11 Acilsacarosas.....	26
3. Planteamiento del Problema.....	28
4. Hipótesis.....	28

5. Objetivos.....	29
5.1 General.....	29
5.2 Particulares.....	29
6. Parte experimental.....	30
6.1 Material y equipo.....	30
6.2 Material vegetal.....	31
6.3 Extracción.....	31
6.4 Aislamiento y purificación.....	32
6.5 Reacciones.....	42
6.6 Pruebas biológicas.....	45
6.6.1 Actividad antiinflamatoria. Modelo de edema inducido por TPA en oreja de ratón.....	46
6.6.2 Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano.....	48
7. Resultados y discusión.....	50
7.1 Elucidación estructural de los compuestos aislados.....	50
7.2 Pruebas biológicas.....	66
7.2.1 Actividad antiinflamatoria. Modelo de edema inducido por TPA en oreja de ratón.....	66
7.2.2 Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano.....	67
8. Conclusiones.....	69
9. Bibliografía.....	71
Anexo I	
Espectros.....	79

Abreviaturas

[α]	rotación óptica
AcOEt	acetato de etilo
a	ancho
calc	calculado
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CPP	Cromatografía en placa preparativa
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear (Correlated Spectroscopy)
δ	desplazamiento químico
d	doblete
dd	doble de doble
ddd	doble de doble de doble
DEPT	Aumento sin distorsión de la transferencia de polarización (Distortionless Enhancement of Polarization Transfer)
dt	doble de triple
dtd	doble de triple de doble
EM-ARBAR	Espectrometría de masas de alta resolución por bombardeo con átomos rápidos
EM-BAR	Espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EM-IQ	Espectrometría de masas por ionización química
frs	fracciones
hept	heptuplete
HMBC	Correlación heteronuclear de enlaces múltiples ($^2\text{JC-H}$, $^3\text{JC-H}$) (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple ($^1\text{JC-H}$) (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
Hz	Hertz

IC ₅₀	Concentración Inhibitoria cincuenta
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
lit	literatura
m	multiplete
MeOH	metanol
m/z	relación masa carga
M ⁺	Ión molecular
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	singulete
t	triplete
tc	triple de cuarteto
td	triple de doble
TMS	tetrametilsilano
tt	triple de triple
TPA	acetato 12-O-tetradecanoilforbol

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de los constituyentes de las plantas es una importante área de investigación que ha conducido al descubrimiento de miles de compuestos con estructuras que van desde las muy simples hasta las extraordinariamente complejas. Estos compuestos simples o complejos poseen funciones dentro de la planta que en su mayoría desconocemos, pero que si se conocieran se podrían aprovechar, lo mismo que su diversidad de actividades biológicas.

Las plantas han sido una fuente común de remedios para enfermedades y son parte fundamental de la medicina tradicional de muchas culturas. En nuestro país el uso de las plantas medicinales no es espontáneo, sino el resultado de un largo proceso empírico de observación, experimentación y de transmisión oral; tradición que ha prevalecido a lo largo de los siglos y que se conserva principalmente entre las comunidades indígenas y mestizas rurales.

Ahora hacemos lo mismo, tomamos una planta, vemos qué contiene y para qué nos puede servir; pero lo hacemos con tecnologías modernas de aislamiento, purificación, elucidación estructural y con el uso de ensayos para saber si presenta una cierta actividad biológica o de otro tipo.

Hoy en día seguimos tratando de descifrar los secretos de la naturaleza y de aprovechar esos conocimientos en beneficio de la humanidad; y es así como a través del estudio químico de *Physalis nicandroides* Schltdl. cuyos resultados expongo a continuación, se pretende contribuir al conocimiento de la química de un género, *Physalis*, que está íntimamente ligado a la cultura mexicana.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta ahora se han analizado aproximadamente veinte especies de *Physalis*, y de todas se han aislado withaesteroides. Sin embargo, en estudios recientes se ha descubierto que algunas de estas especies como *P. patula*, *P. pruinosa*, *P. coztomatl* y *P. nicandroides* var. *attenuata*, contienen además de withaesteroides, diterpenos de tipo labdano. Así, dentro del género parecen existir dos grupos de plantas, uno que produce withaesteroides, pero no diterpenos y otro que elabora ambos tipos de compuestos. Con el análisis de *Physalis nicandroides* Schltdl. se pretende conocer su composición química y establecer a que grupo pertenece esta especie.

4. HIPÓTESIS

Taxonómicamente, *P. nicandroides* Schltdl. es cercana a las *Physalis* que elaboran tanto withaesteroides como diterpenos labdánicos, por lo que se esperaría que esta especie presente un perfil químico similar.

2. ANTECEDENTES

2.1 MEDICINA TRADICIONAL EN MÉXICO

Su origen se remonta a las culturas prehispánicas, pero al paso del tiempo, ha sido influenciada por otras culturas médicas (española, africana, moderna), por cambios epidemiológicos de las poblaciones y por factores no médicos de diversa índole (económicos, ecológicos, religiosos, etc.) (Torres, 2006). Las plantas medicinales son el recurso material más importante de la medicina tradicional mexicana y su uso no sólo ha prevalecido a lo largo de los siglos, sino que ha resurgido en respuesta a la crisis económica, que afecta a México, pues la mayor parte de la sociedad se enfrenta a los altos costos de los fármacos de patente (La Jornada, 1998).

Dentro de la práctica de la medicina tradicional en México, se emplean especies del género *Physalis*, algunas como *P. philadelphica*, *P. coztomatl*, *P. aequata* y *P. chenopodifolia*, se utilizan para tratar desórdenes digestivos, infecciones de las vías respiratorias, diabetes, hipertensión y dermatitis (Argueta, 1994).

2.2 FAMILIA SOLANACEAE

Familia de unos 96 géneros y más de 2000 especies; es de distribución cosmopolita, tiene diversos hábitats y exhibe formas de vida muy variadas, son plantas herbáceas, arbustos, árboles, lianas terrestres o epífitas. Se les encuentra con mayor frecuencia en regiones tropicales, subtropicales y zonas templadas; en un intervalo de altitud de 0 a 3000 m. Incluye, entre otros, a los géneros *Nicandra* (1

esp.), *Lycium* (80-90 esp.), *Atropa* (4 esp.), *Hyoscyamus* (20 esp.), *Physalis* (90 esp.), *Capsicum* (unas 50 esp.), *Solanum* y *Lycopersicon* (1700 esp.), *Mandrágora* (6 esp.), *Datura* (10 esp.), *Solandra* (10 esp.), *Cestrum* (150 esp.), *Nicotiana* (66 esp.), *Petunia* (40 esp.), *Salpiglossis* (18 esp.), *Schizanthus* (15 esp.), *Scopolia* (6 esp.), *Withania* (10 esp.), *Duboisia* (2 esp.), *Acnistus* (50 esp.) y *Fabiana* (25 esp.).

Posee gran importancia económica, varias especies son alimenticias (papa, tomate, jitomate, berenjena y chile); algunas de uso industrial como el tabaco; otras ornamentales como petunia, floripondio, copa de oro y huelle de noche. A varias especies se les atribuye uso medicinal, ceremonial o estimulante (Trease y Evans, 1991).

2.3 GÉNERO *Physalis*

Uno de los géneros más grandes e importantes de la familia Solanaceae es *Physalis*. Éste es un taxón americano que incluye cerca de 90 especies y se distribuye en Estados Unidos de América, México, Centroamérica, Sudamérica y Las Antillas, con algunas especies en el Viejo Mundo. La mayor parte de las especies de *Physalis* crecen en México, por lo que su territorio es señalado como su centro de diversidad. *Physalis* tiene un alto potencial económico y biológico, así, el cultivo comercial de *Physalis philadelphica* para la obtención de su fruto, el tomate verde, cada vez toma mayor importancia. Más relevante aún, es la existencia de variedades criollas o autóctonas en diversas regiones del país, donde se consumen los frutos de estas arvenses o de las especies silvestres, que son fuentes promisorias de

alimentos y podrían ser consideradas al menos como un recurso genético de gran potencial (Vargas *et al.*, 2003).

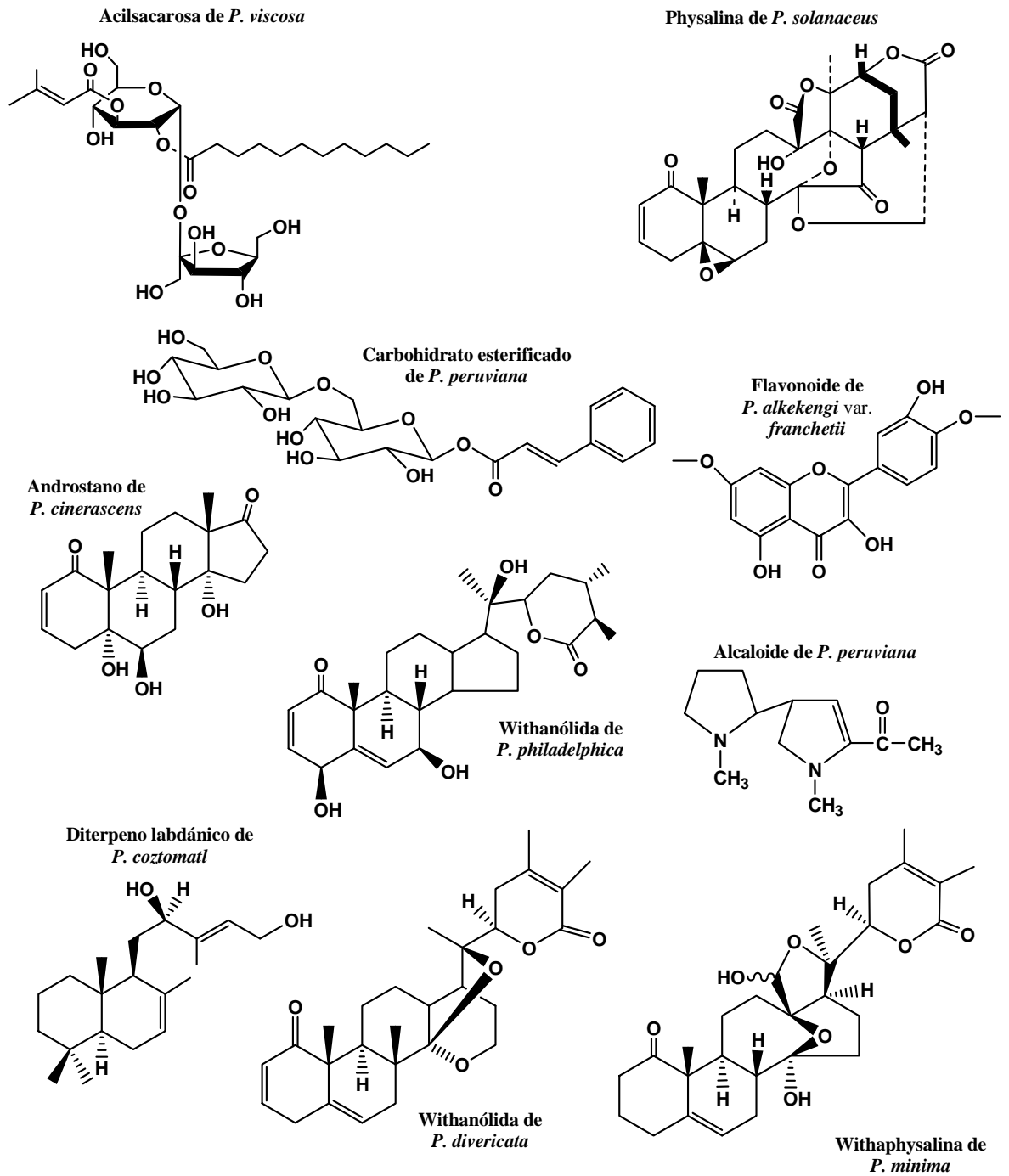
2.4 QUÍMICA DE *Physalis*

El género *Physalis* es representativo de México, se conocen más de 70 especies de tipo endémico, se sabe que es una fuente muy rica de una gran variedad de metabolitos secundarios y primarios (esquema 1), principalmente withaesteroides del tipo de las withanólidas y de las physalinas.

Se han aislado withanólidas de *P. coztomatl* (Pérez-Castorena *et al.*, 2006), de *P. peruviana* (Ahmad *et al.*, 1998; Baumann *et al.*, 1992), de *P. philadelphica* (Gu *et al.*, 2003), *P. cinerascens* (Maldonado *et al.*, 2005), de *P. divericata* (Ma *et al.*, 2007), de *P. chenopodifolia* (Maldonado *et al.*, 2004) y de *P. angulata* (Abe *et al.*, 2006). Se han aislado physalinas de *P. solanaceus* (Pérez-Castorena *et al.*, 2004), al igual que de *P. minima* Linn var. *indica* (Choudhary *et al.*, 2007) y de *P. angulata* (Damu *et al.*, 2007; Makino *et al.*, 1995).

De *P. minima* (Koh *et al.*, 1993) y de *P. alkekengi* var. *franchetii* (Qiu *et al.*, 2008) se han aislado flavonoides y de *P. peruviana* (Lacza *et al.*, 1996), *P. viscosa* (Ovenden *et al.*, 2005) y *P. nicandroides* var. *attenuata* (Torres, 2006) se han aislado carbohidratos esterificados.

Se aislaron alcaloides de las partes aéreas de *P. peruviana* (Kubwabo *et al.*, 1992) y recientemente se han aislado diterpenos labdánicos de *P. coztomatl*, *P. patula*, *P. pruinosa* y *P. nicandroides* var. *attenuata* (Torres, 2006).



Esquema 1. Ejemplos de metabolitos aislados de *Physalis*.

2.5 *Physalis nicandroides* Schtdl.

Sus nombres comunes son coyotomatli (tomate del coyote), zolcoanepilli o coanepilli de codorniz (Hernández, 1946) es una planta herbácea anual, erecta, hasta de 1 m de alto, ramificada, viscosa, fétida, con tricomas simples, algunos glandulares. El tallo es cilíndrico, liso o algo anguloso. Las hojas son alternas, limbo de 3.5-18.4 cm de largo, 2.5-16 cm de ancho, ovado, suborbicular ovado a cordiforme, ápice agudo a casi acuminado, base oblicua, truncada a subcordata, margen entero a aserrado, los dientes numerosos, agudos; pecíolo de 1-9 cm de largo, algo robusto, acanalado, pubescente. Tiene una flor solitaria; botones esféricos, de 3-4 mm de largo, excedidos bien por los lóbulos del cáliz; pedicelo en flor de 6-8 mm de largo; cáliz de 7-8 mm de largo, 2-4 mm de ancho en la base, dividido por abajo de la mitad en lóbulos caudado subulados, de 4-5 mm de largo, una corola de color crema blanquecino, pequeña, de 6-8 mm de largo, 4-6 mm de diámetro, campanulada, máculas simples, verdosas, pequeñas. Estambres con anteras azules o azul verdes, de 2-3 mm de largo, filamento púrpura, de 3 mm de largo. Ovario con un estilo de 5 mm de largo, estigma capitado. El cáliz 5-angulado en el fruto, de 3.5-4.3 cm de largo, 2.5-2.6 cm de ancho, cordato, lóbulos caudado subulados, hasta de 1.5 cm de largo, de color verde al inicio, al secar de color café dorado, coriáceo; pedicelo en fructificación de 1.2-1.4 cm de largo, robusto. Su fruto es una baya hasta de 1.5 cm de diámetro (figura 1).

DISTRIBUCIÓN: Desde México (B. C., Chihuahua, Chiapas, Colima, D. F., Durango, Estado de México, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán,

Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, S. L. P., Tamaulipas, Veracruz, Yucatán) hasta Costa Rica (Vargas *et al.*, 2003).

USOS: En Morelos las hojas hervidas se utilizan para baños postparto (baño de temascal o torito) (Aguilar *et al.*, 1994), las hojas que son pegajosas se extienden sobre el suelo para atrapar insectos, especialmente moscas. Los frutos de esta especie son consumidos como alimento en el estado de Morelos y en Guatemala. (Martínez, 1998).



Figura 1. *Physalis nicandroides* Schltdl.
(Fotografía tomada de Vargas *et al.*, 2003)

2.6 METABOLITOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS

El metabolismo primario, comprende una serie de procesos metabólicos mediante los cuales los organismos vivos sintetizan y degradan una serie de

sustancias orgánicas que les son indispensables para vivir. Estos procesos son similares en casi todos los organismos vivos y a los productos biosintetizados se les denomina metabolitos primarios como son los carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, polisacáridos, proteínas, lípidos, RNA y DNA (Demetzos, 2001). Estos metabolitos cumplen una función vital en los seres vivos y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza.

A través del metabolismo los seres vivos sintetizan un gran número de compuestos orgánicos que aparentemente no le son indispensables para vivir. Estos compuestos se forman a partir de los metabolitos primarios y los procesos que conllevan a su formación pueden variar en los diferentes organismos. Los productos del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, mismos que presentan una distribución taxonómica restringida (en ocasiones característica de un género o especie) por lo que pueden contribuir a la clasificación de las plantas. Entre los metabolitos secundarios se encuentran las cumarinas, los alcaloides, los flavonoides y los terpenoides, entre otros. Existe cada vez un mayor número de evidencias que indican que los metabolitos secundarios si cumplen con una función específica en el organismo que los produce, por ejemplo, se ha visto que son un mecanismo de defensa contra bacterias, virus y hongos, análogo al sistema inmunológico de animales (Demetzos, 2001). De manera general los principios activos y los agentes responsables del aroma y el color de numerosas plantas son metabolitos secundarios (Mata *et al.*, 2000).

2.7 TERPENOS

Los terpenos son una clase de metabolitos secundarios y muchos de ellos tienen interés económico, ya que son usados como fármacos, aditivos alimenticios y como cosméticos (Knöss *et al.*, 1998). El número de unidades de isopreno que contienen se usa para su clasificación (tabla 1). Se encuentran en aceites esenciales, resinas, tejidos de plantas y microorganismos (Demetzos, 2001). Se forman a través de las rutas del acetato-mevalonato o de la DOXP (1-Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato) (Mata *et al.*, 2000). Algunos terpenos juegan un papel importante en la defensa de los organismos que los producen, esto se debe a que son tóxicos, irritantes o alergénicos y algunos son repelentes volátiles.

Tabla 1. Clasificación general de las sustancias terpenoides

Tipo	No. De átomos de carbono	No. Unidades isopreno	Ruta metabólica
Hemiterpenos	5	1	DOXP
Monoterpenos	10	2	DOXP
Sesquiterpenos	15	3	Acetato-mevalonato
Diterpenos	20	4	DOXP
Sesterterpenos	25	5	DOXP
Triterpenos	30	6	Acetato-mevalonato
Tetraterpenos	40	8	DOXP
Politerpenos	C _{5n}	N	Acetato-mevalonato

2.8 RUTAS ACETATO-MEVALONATO (MVA) Y 1-DESOXI-D-XILULOSA-5-FOSFATO (DOXP)

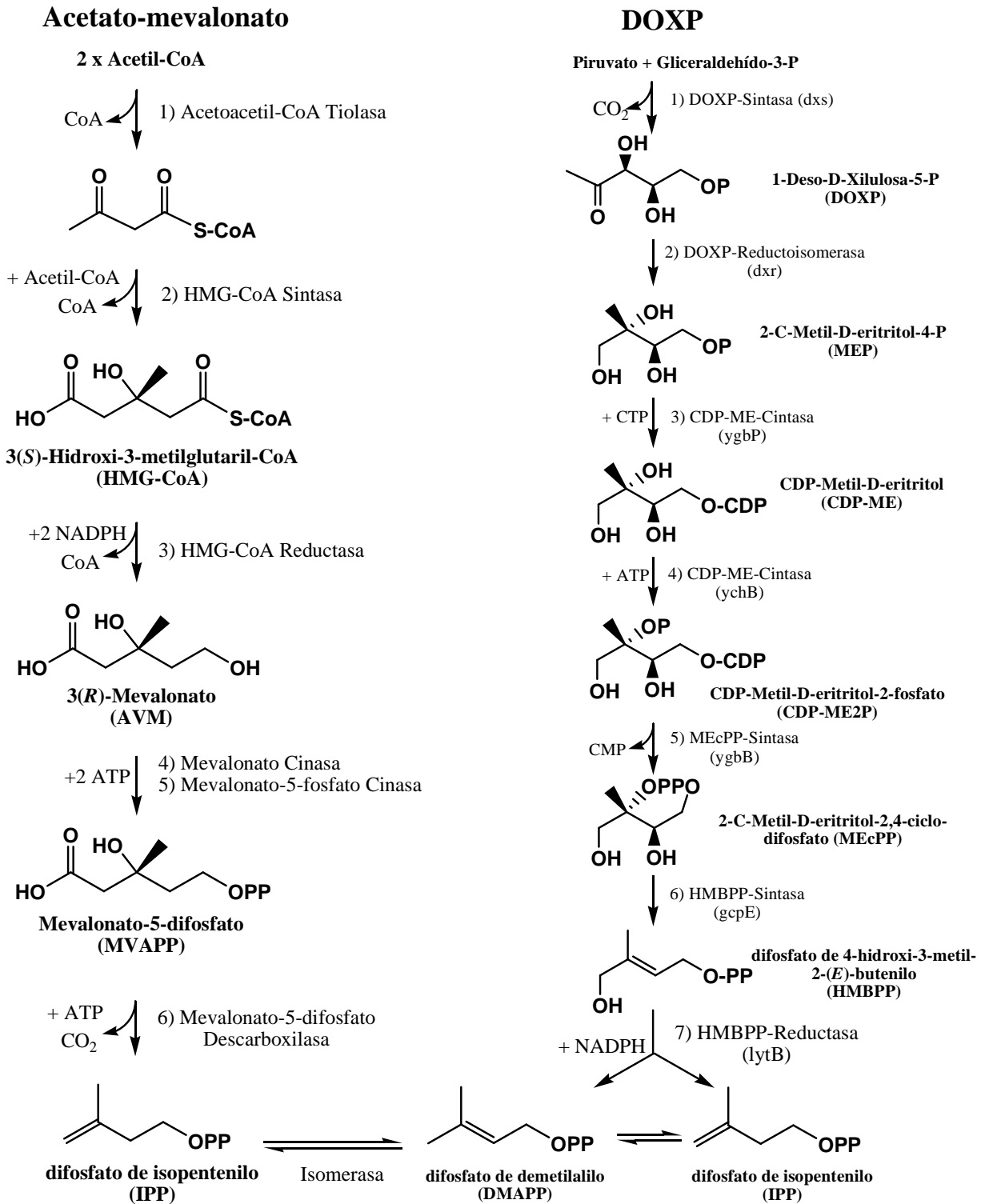
Plantas, animales y microorganismos contienen compuestos isoprenoides hechos de unidades C₅ de “isopreno activo”. La “regla biogenética del isopreno” fue detectada en 1885 por Wallach y las adiciones “cabeza-cola” de unidades C₅ por Ruzicka. En la década de los 50’s, el acetato y la acetil-CoA fueron detectados como precursores, el ácido mevalónico (MVA) como intermediario y el difosfato de isopentenilo (IPP) como la unidad C₅ biosintéticamente activa. Por más de tres décadas se creyó que todos los isoprenoides eran sintetizados por la vía acetato/MVA, pero no fue hasta los 90’s cuando se propuso otra ruta para la síntesis de algunos isoprenoides (hemiterpenos, monoterpenos, diterpenos, carotenos y plastoquinona-9) que fue denominada como vía mevalonato-independiente (Lichtenthaler). Actualmente se conoce también como vía no-mevalonato, vía gliceraldehído-3-fosfato/piruvato, vía metileritritol-fosfato (MEP) (Dewick, 2002) o ruta 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato. Esta ruta fue detectada primero en las bacterias (Knöss *et al.*, 1998; Lichtenthaler).

Las plantas superiores poseen ambas rutas: en el citoplasma la vía MVA es responsable de la biosíntesis de sesquiterpenos, triterpenos, politerpenos y esteroides; y en los plástidos opera la vía DOXP en la que se biosintetizan los hemiterpenos, diterpenos, carotenoides y plastoquinona-9. La mayoría de las algas también posee ambas rutas.

La ruta clásica de biogénesis acetato/MVA (esquema 2) comienza con 3 moléculas de acetil-CoA, requiere 6 enzimas, 2 NADPH y 3 ATP. El producto final de

la vía es el difosfato de isopentenilo (IPP), el cual puede ser transformado por una IPP-isomerasa a su isómero difosfato de dimetilalilo (DMAPP).

En contraste, la ruta DOXP (esquema 2) comienza con una molécula de piruvato y una de gliceraldehído-3-fosfato, requiere de 7 enzimas, 3 moléculas de ATP o CTP, 3 NADPH y el último paso enzimático es catalizado por la HMBPP-reductasa. El último intermediario de la vía es el difosfato de 4-hidroxi-3-metil-2-(*E*)-butenilo (DMBPP) el cual puede generar al difosfato de isopentenilo (IPP) y a su isómero difosfato de dimetilalilo (DMAPP), generalmente en una relación 5:1 o 3:1 (Lichtenthaler).

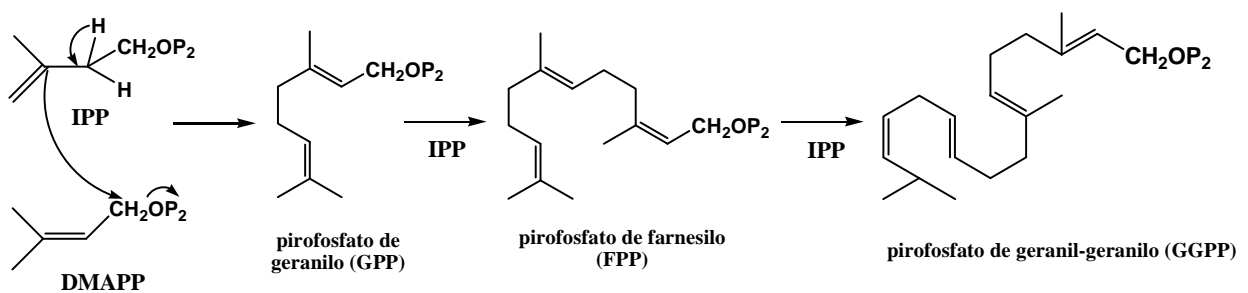


Esquema 2. Biosíntesis del difosfato de isopentenilo (IPP) por las dos rutas metabólicas: vía Acetato-mevalonato (MVA) y 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DOXP)

2.9 DITERPENOS

Los diterpenos constituyen un amplio conjunto de compuestos C_{20} procedentes del metabolismo del *2E,6E,10E*-geranilgeranilpirofosfato (GGPP). Se encuentran en determinados insectos y en diversos organismos marinos, pero sobre todo en los vegetales.

Se forman a partir de IPP y DMAPP provenientes de la ruta DOXP, como se ilustra en el esquema 3 (Bruneton, 2001; Demetzos, 2001).



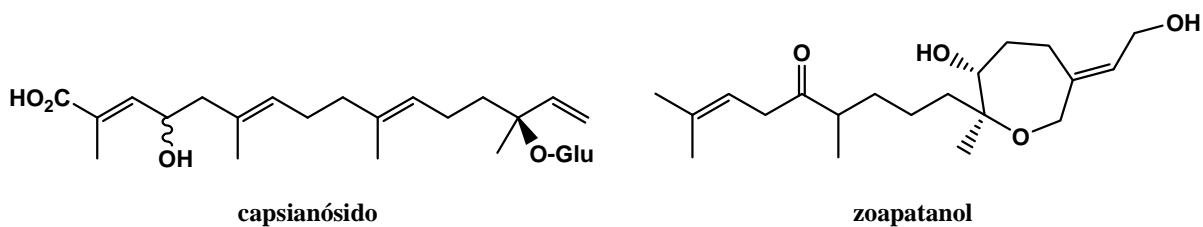
Esquema 3. Formación de GGPP a partir de IPP y DMAPP

2.9.1 PRINCIPALES TIPOS ESTRUCTURALES DE DITEPENOS

La estructura de los diterpenos es muy variable, dependiendo estrechamente de su biogénesis por tanto, es lógico clasificarlos en función de la misma.

2.9.1.1 DITERPENOS ACÍCLICOS

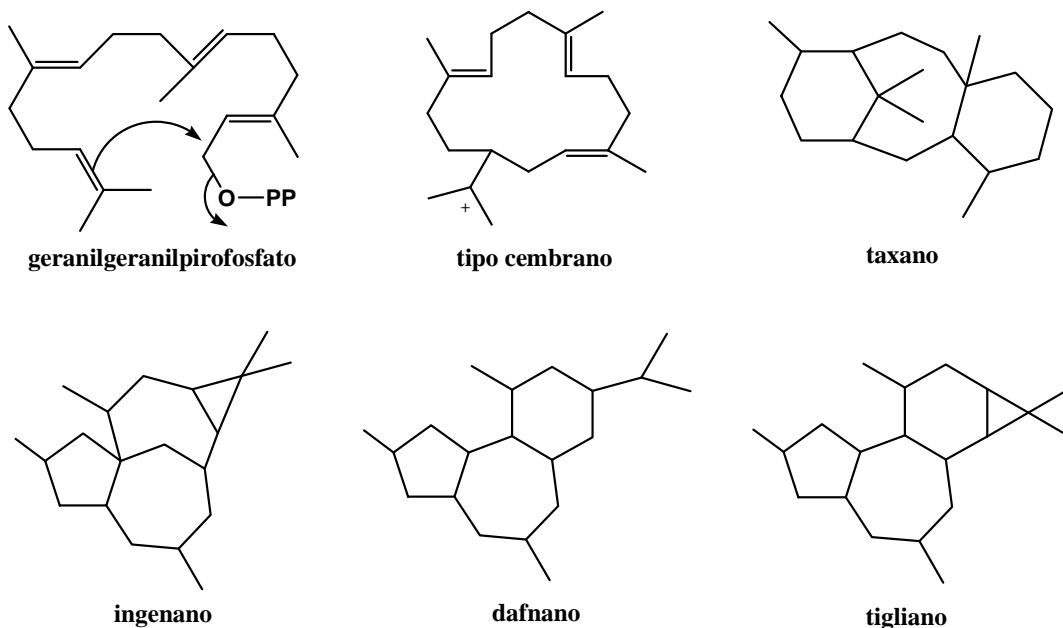
No son los más frecuentes. Pueden ser lineales como el capsianósido o contener una lactona o un éter cíclico procedente de la apertura de oxiranos (zoapatanol).



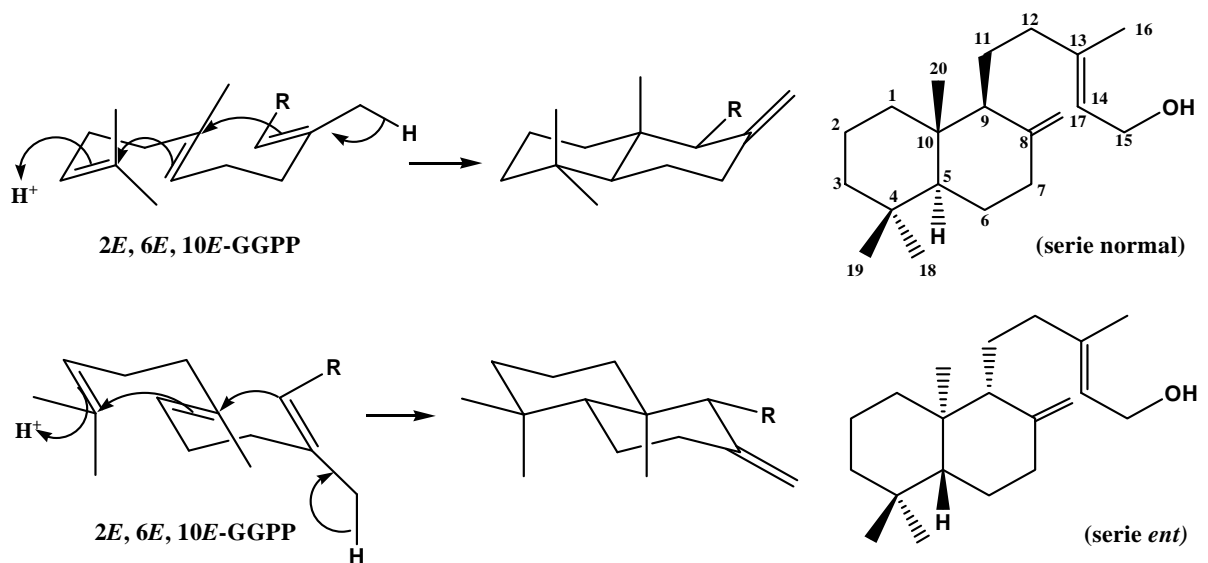
2.9.1.2 Diterpenos cíclicos

Existen dos modos de ciclación del GGPP precursor:

- Ciclación inducida por la pérdida del grupo pirofosfato, formación de un carbocatión y alquilación de un doble enlace por éste. Generalmente se trata del doble enlace del isopropilideno terminal, lo que da lugar a la formación de un macrociclo. El catión macrocíclico poli-insaturado es muy reactivo. Puede estabilizarse o, frecuentemente conducir a una estructura policíclica por sustitución nucleófila intramolecular: taxano, tigliano, dafnano, ingenano.



- Ciclación ácido-catalizada del GGPP, se forma así una decalina sustituida. Este tipo de ciclación conduce a dos series enantiómeras que difieren por las configuraciones opuestas de los carbonos C-5, C-9 y C-10. La serie se llama “normal” cuando la fusión de los ciclos A y B es idéntica a la de los esteroides y «ent» (enantio) cuando es la antípoda: ej.: labdano y *ent*-labdano, kaurano y *ent*-kaurano, etc., ver esquema 4 (Bruneton, 2001; Dewick, 2002).

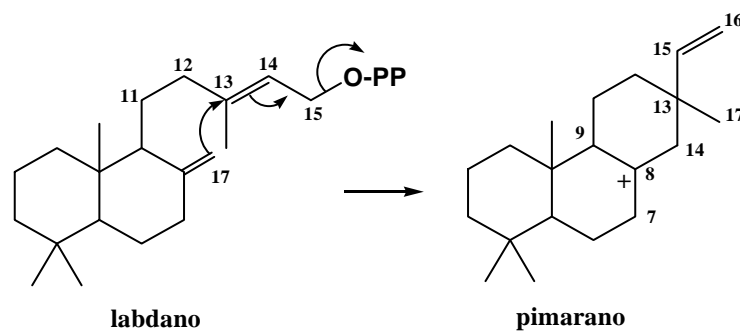


Esquema 4. Ciclación del GGPP; ejemplos y formación de los labdanos y *ent*-labdanos

La orientación hacia una u otra serie está dirigida por la conformación del precursor lineal (GGPP) sobre la superficie del enzima que cataliza la ciclación. La secuencia de la reacción es la siguiente: protonación del doble enlace 14(15) del precursor y adiciones 1,2-antiparalelas de los enlaces 6(7) y 10(11) para formar, en ambos casos, una *trans*-decalina. El carbocatión que resulta de esta ciclación puede

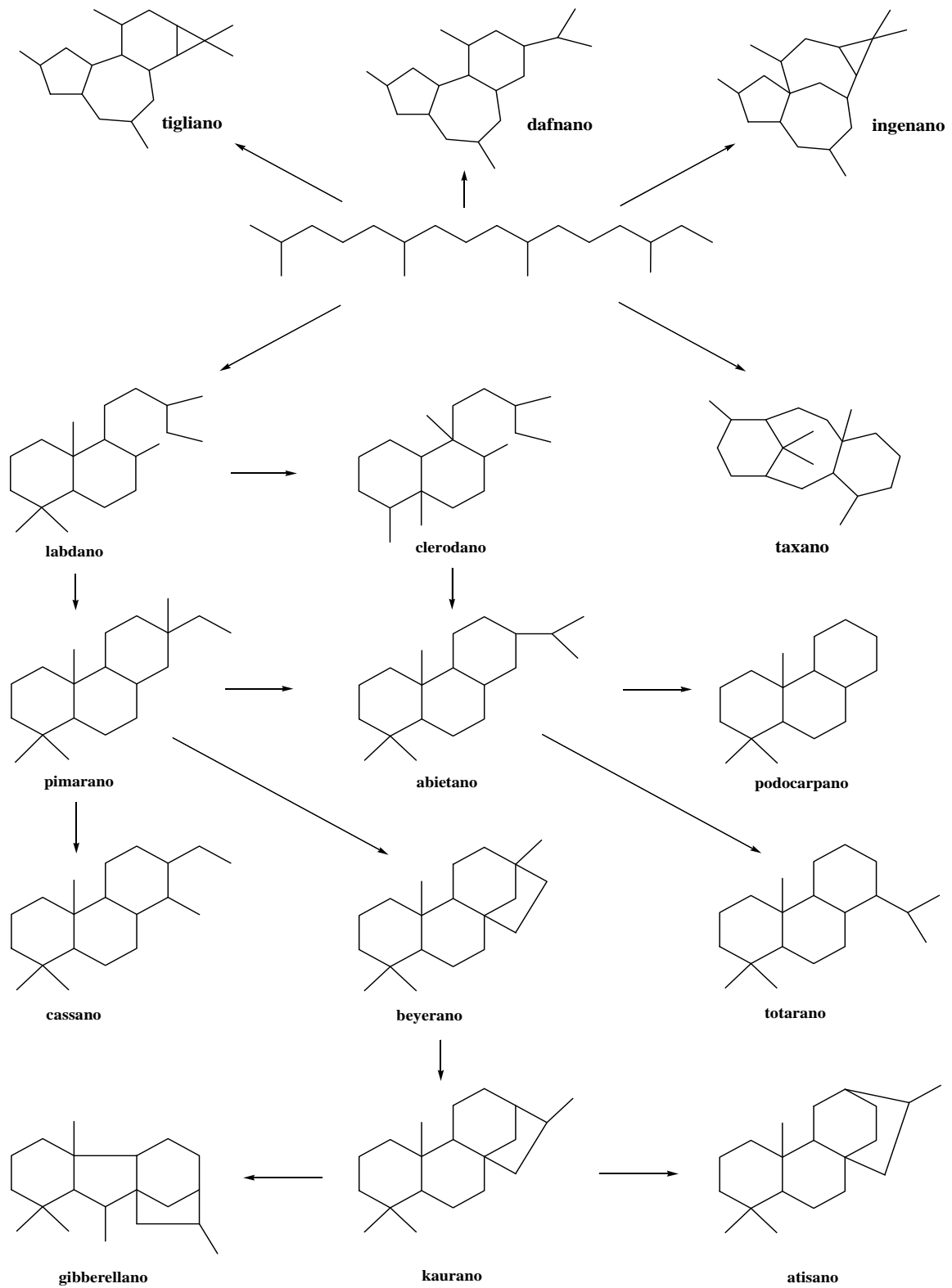
estabilizarse por eliminación de un protón (Bruneton, 2001; Demetzos, 2001; Dewick, 2002).

El carbocatión formado a partir del pirofosfato de labdadienilo se puede ciclar de varias maneras: ataque al C-13 por el doble enlace exocíclico, migración del doble enlace 13(14) y estabilización del catión por eliminación de un protón en C-7 o C-14 (isopimaranos, pimaranos, esquema 5) o continuación del ordenamiento (abietanos, casanos, rosanos) (Bruneton, 2001).



Esquema 5. Formación de los pimaranos

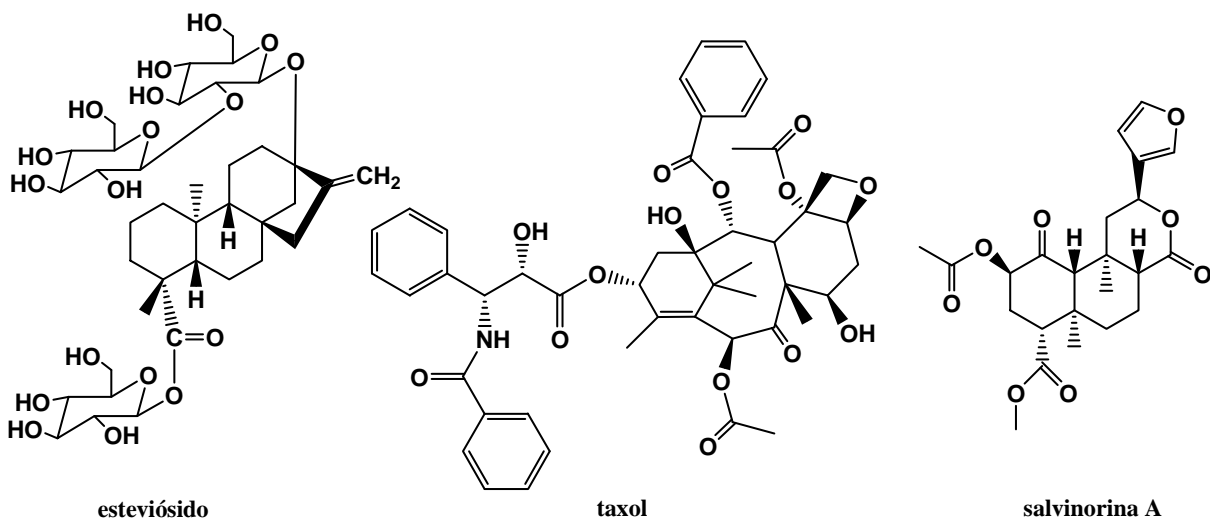
A continuación se presenta un esquema (esquema 6) con los principales tipos de diterpenos (Demetzos, 2001).



Esquema 6. Clases de estructuras de diterpenos

2.10 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DITERPENOS

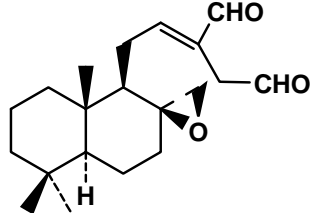
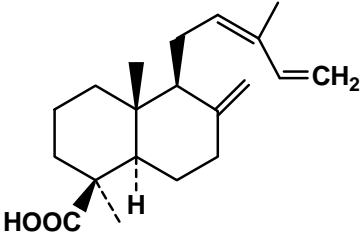
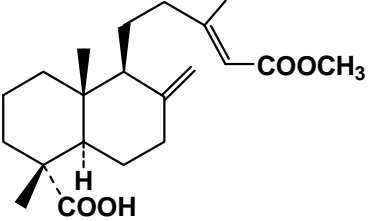
Los diterpenos no están desprovistos de potencialidades terapéuticas, al menos tres de ellos presentan propiedades biológicas por las que son reconocidos a nivel mundial. Estos diterpenos son el taxol, un compuesto aislado de *Taxus brevifolia* para tratar el cáncer de mama y ovario avanzado; la salvinorina A, diterpeno activo no alcaloidal aislado de *Salvia divinorum* cuyas hojas frescas mastican (o fuman) los Indios Mazatecas del noreste de Oaxaca para ayudarse en adivinaciones rituales y curar diversas afecciones (Bruneton, 2001), y el esteviósido, glucósido diterpénico con un aglicon denominado steviol, aislado de las hojas de *Stevia rebaudiana*, cuyo poder edulcorante es 300 veces mayor que el de la sacarosa y es utilizado en una gran variedad de alimentos y bebidas de bajo contenido calórico (Boonkaewwan *et al.*, 2008).

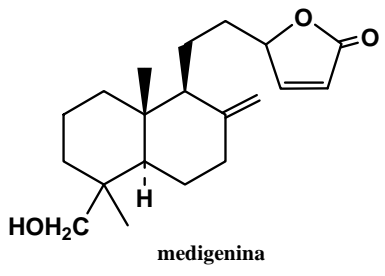
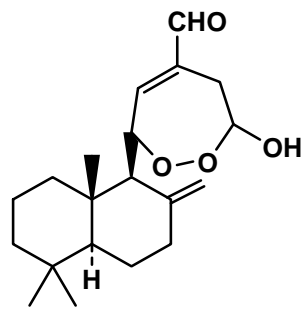
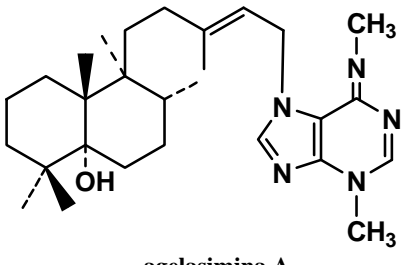
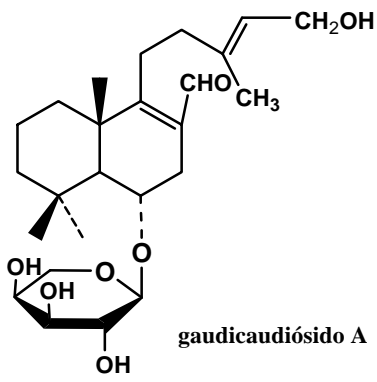


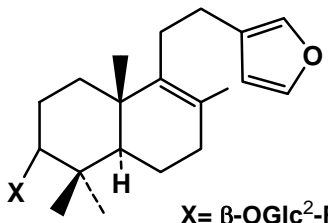
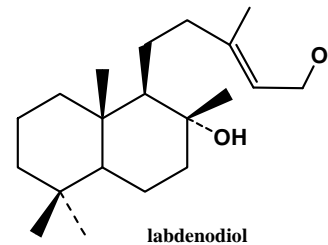
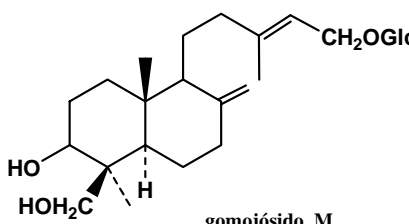
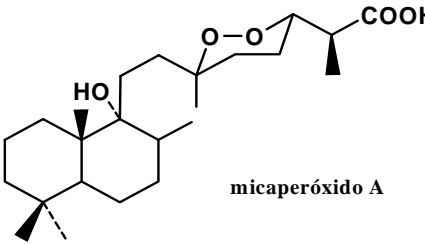
2.10.1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DITERPENOS LABDÁNICOS

Una gran variedad de actividades biológicas han sido descubiertas en diterpenos labdánicos: antibacteriana, antifúngica, antiprotozoaria, antiinflamatoria, así como citotóxica y citostática. En la tabla 2 se presentan algunos ejemplos.

Tabla 2. Ejemplos de actividades biológicas de diterpenos labdánicos.

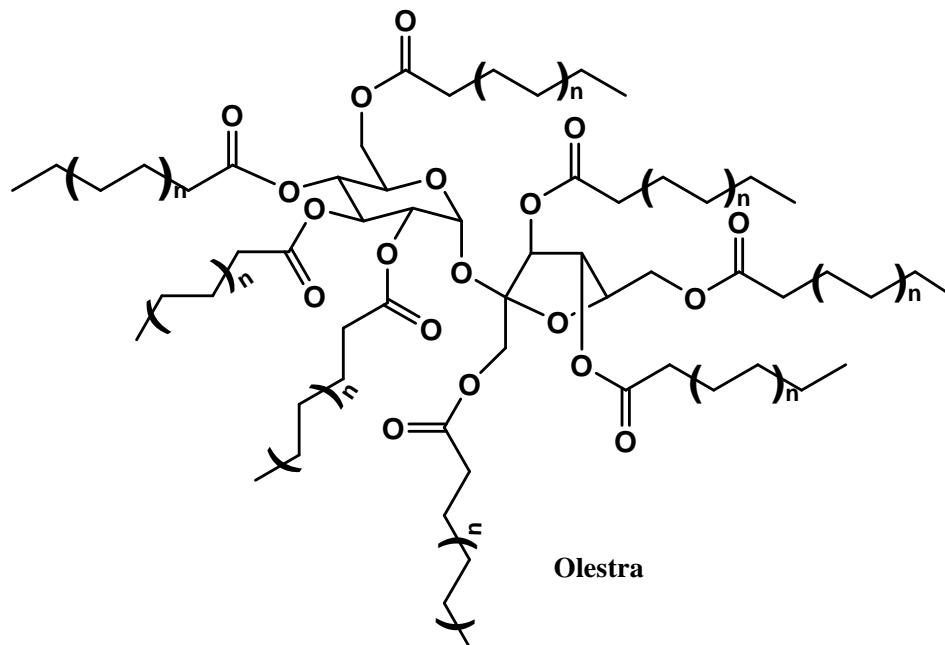
Especie	Estructura	Actividad
<p><i>Alpinia galanga</i> (Zingiberaceae)</p>	 <p><i>E-8β(17)-epoxilabd-12-en-15,16-dial</i></p>	<p>Antifúngica <i>Candida albicans</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. tropicales</i> <i>C. utilis</i></p> <p>(Singh <i>et al.</i>, 1999)</p>
<p><i>Cryptomeria japonica</i> (Taxodiaceae)</p>	 <p>ácido <i>cis</i>-commúnico</p>	<p>Antiinflamatoria</p> <p>(Singh <i>et al.</i>, 1999)</p>
<p><i>Polyalthia macropoda</i> (Annonaceae)</p>		<p>Antileishmanial <i>Leishmania donovani</i></p> <p>(Singh <i>et al.</i>, 1999)</p>

<p><i>Melodinus monogynus</i> (Apocyanaceae)</p>	 <p>medigenina</p>	<p>Cardiotónica (Singh <i>et al.</i>, 1999)</p>
<p><i>Hedychium coronarium</i> (Zingiberaceae)</p>	 <p>coronarina B</p>	<p>Citotóxica (Singh <i>et al.</i>, 1999)</p>
<p><i>Agelas mauritiana</i> (esponja marina)</p>	 <p>agelasimina A</p>	<p>Citotóxica y relajamiento muscular (Singh <i>et al.</i>, 1999)</p>
<p><i>Baccharis gaudichaudiana</i> (Compositae)</p>	 <p>gaudicaudiósido A</p>	<p>Hipoglucémica (Singh <i>et al.</i>, 1999)</p>

<p><i>Phlomis younghusbandii</i> (Labiatae)</p>	 <p>X= β-OGlc²-Rha flomisósido I</p>	<p>Antipirética (Singh <i>et al.</i>, 1999)</p>
<p><i>Cistus incanus</i> subs. <i>creticus</i> (L.) (Cistaceae)</p>	 <p>labdenodiol</p>	<p>Antibacteriana <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Chinou <i>et al.</i>, 1993)</p>
<p><i>Viburnum suspensum</i> (Caprifoliaceae)</p>	 <p>gomojósido M</p>	<p>Antibacteriana <i>Aeromonas salmonishida</i> <i>Bacillus subtilis</i> (Singh <i>et al.</i>, 1999)</p>
<p><i>Mycale</i> (esponja marina)</p>	 <p>micaperóxido A</p>	<p>Antiviral Estomatitis vesicular Herpes simple tipo-1 (Singh <i>et al.</i>, 1999)</p>

2.11 ACILSACAROSAS

Son compuestos formados por el azúcar común de mesa pero esterificado con ácidos grasos. Se utilizan como adyuvantes de vacunas (Blom *et al.*, 2004), también como emulsificantes y emolientes en las industrias alimenticia y cosmética (Ghangas *et al.*, 1999) y como sustitutos grasos. “Los químicos investigadores de Procter & Gamble han buscado un sustituto de las grasas de la dieta que confiera a los alimentos el mismo sabor y textura que proporcionan las grasas naturales, pero que sea indigerible. Después de 30 años (y un costo de más de 200 millones de dólares) se ha encontrado una respuesta en el Olestra, una combinación simple de sacarosa y ácidos grasos... las uniones éster están demasiado impedidas para que las enzimas digestivas las escindan, y este octaéster atraviesa intacto el sistema digestivo, por lo cual no aporta calorías ni grasa al cuerpo. Pasó con éxito las pruebas exigidas por la FDA y fue aprobado para uso limitado en bocadillos salados... El Olestra se lleva consigo pequeñas cantidades de las vitaminas solubles en grasas (A, D, E y K) en su paso a través del intestino” (Fox *et al.*, 2000).



Las acilsacarosas se encuentran naturalmente en algunas plantas. Se han aislado de las partes aéreas de varios de los géneros de la familia Solanaceae como *Datura*, *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Petunia*, *Solanum* (King *et al.*, 1993) y *Physalis* (Maldonado *et al.*, 2006; Ovenden *et al.*, 2005). También se han aislado de *Polygala sibirica* (Miyase *et al.*, 1999) y *P. arillata* (Kobayashi *et al.*, 2000), plantas que se utilizan en la medicina tradicional China como tónico, tranquilizante y para prevenir la falta de memoria; de *Bidens parviflora* (Wang *et al.*, 2002) y de *Vernonia guineensis* (Tchinda *et al.*, 2003).

Se ha encontrado que poseen diferentes actividades biológicas entre las que se encuentran antialimentaria en insectos (King *et al.*, 1988), anticancerígena (Takasaki *et al.*, 2001) e inhibidora de la histamina (Wang *et al.*, 2002).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta ahora se han analizado aproximadamente veinte especies de *Physalis*, y de todas se han aislado withaesteroides. Sin embargo, en estudios recientes se ha descubierto que algunas de estas especies como *P. patula*, *P. pruinosa*, *P. coztomatl* y *P. nicandroides* var. *attenuata*, contienen además de withaesteroides, diterpenos de tipo labdano. Así, dentro del género parecen existir dos grupos de plantas, uno que produce withaesteroides, pero no diterpenos y otro que elabora ambos tipos de compuestos. Con el análisis de *Physalis nicandroides* Schltdl. se pretende conocer su composición química y establecer a que grupo pertenece esta especie.

4. HIPÓTESIS

Taxonómicamente, *P. nicandroides* Schltdl. es cercana a las *Physalis* que elaboran tanto withaesteroides como diterpenos labdánicos, por lo que se esperaría que esta especie presente un perfil químico similar.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

- Determinar la composición química de partes aéreas (hojas, flores y tallos) de *Physalis nicandroides* Schltld. y contribuir así, al conocimiento del género *Physalis*.

5.2 PARTICULARES

- Aislar y purificar el mayor número de los compuestos presentes en el extracto de la planta.
- Elucidar las estructuras de los compuestos aislados.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 MATERIAL Y EQUIPO

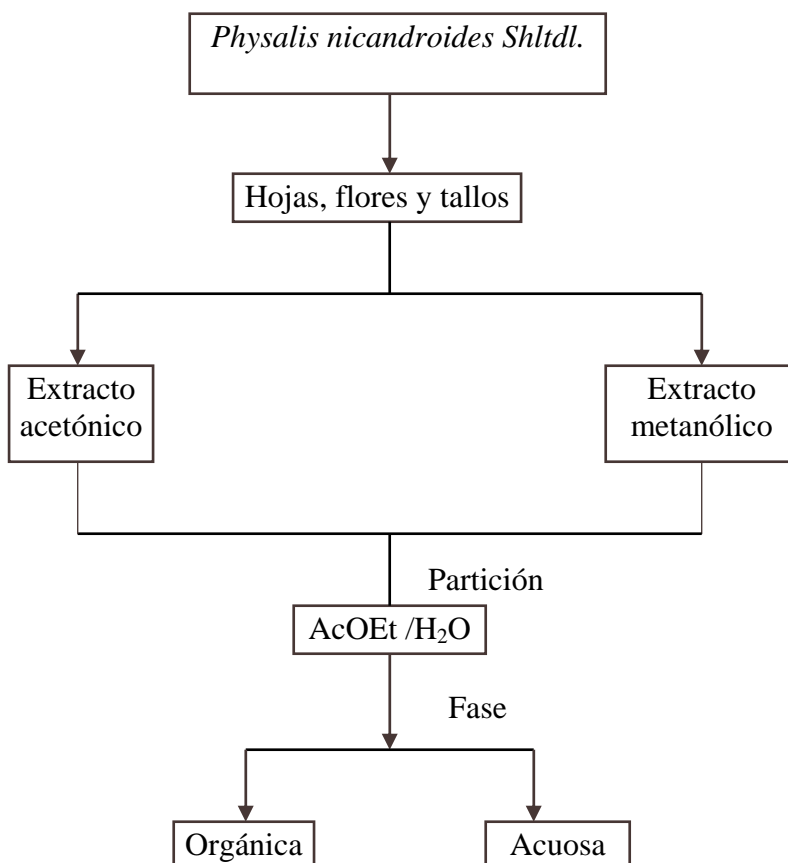
Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns. En las cromatografías en columna (CC) se utilizó como fase estacionaria silica gel (Merck G). El desarrollo de las cromatografías en columna fue monitoreado mediante cromatografía en capa fina (CCF), para lo que se usaron cromatofolios Alugram Sil G/UV₂₅₄ de 0.25mm y cromatofolios Alugram RP-18 W/UV₂₅₄ de 0.15mm y como revelador sulfato cérico al 3% en ácido sulfúrico 2N y/o lámpara de UV Spectroline modelo CX-20 a 254 y 366 nm. Para las cromatografías en placa preparativa (CPP) se emplearon placas Macherey-Nagel SIL G200/UV₂₅₄ y SIL RP-18W/UV₂₅₄. La rotación óptica de los compuestos se determinó en un polarímetro Perkin Elmer 343. Los espectros de IR se obtuvieron por la técnica de solución (CHCl₃) en un espectrofotómetro Nicolet FTIR-Magna 750. Los espectros de masas por ionización química (IQ), impacto electrónico (IE), bombardeo de átomos rápidos (BAR⁺) y alta resolución fueron determinados en los espectrómetros JEOL JMS-AX505HA y JEOL/JMS-SX102A. Los espectros de RMN se determinaron en los espectrómetros Varian XR-300 (300 MHz ¹H, 75 MHz ¹³C) y Varian Unity Plus 500 (500 MHz ¹H, 125 MHz ¹³C), los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm respecto al tetrametilsilano (TMS) que se usó como referencia interna.

6.2 MATERIAL VEGETAL

Physalis nicandroides Schltdl. fue recolectada en la Delegación Santa Rosa Jáuregui, La Barreta, Estado de Querétaro, el 3 de octubre de 2006. Fue identificada por la Dra. Mahinda Martínez. Un ejemplar de la planta fue depositado en el Herbario de la Universidad Autónoma de Querétaro (M. Martínez 5742).

6.3 EXTRACCIÓN

Las partes aéreas (hojas, flores y tallos) de *Physalis nicandroides* Schltdl. secas y molidas (960 g), se extrajeron por el método de percolación, primero con acetona y después con metanol hasta agotar el material vegetal. Después de eliminar el disolvente de cada extracto a presión reducida en un rotavapor se obtuvieron 37.28 g del extracto de acetona y 43.82 g del metanólico. Los extractos de acetona y de metanol se reunieron para someterlos a un proceso de partición AcOEt/H₂O. La fase orgánica resultante se concentró a presión reducida, mientras que la fase acuosa se concentró haciéndole pasar una corriente de aire. Se obtuvieron 40.23 g de extracto de la fase orgánica y 40.51 g de la acuosa (esquema 7).



Esquema 7. Extracción de partes aéreas

6.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

El extracto de AcOEt proveniente de la partición (40.23 g) se disolvió en acetona, se adsorbió en celita y se dejó evaporar el disolvente. Una vez que se secó, se colocó en la parte superior de una columna que tenía como fase estacionaria silica gel (columna A) para proceder a su fraccionamiento. La columna se comenzó a eluir con hexano y la polaridad se aumentó gradualmente, adicionando acetato de etilo. Se obtuvieron 167 fracciones, las cuales fueron analizadas por CCF y se reunieron las que mostraron una composición semejante (tabla 3).

Tabla 3. Cromatografía en columna A

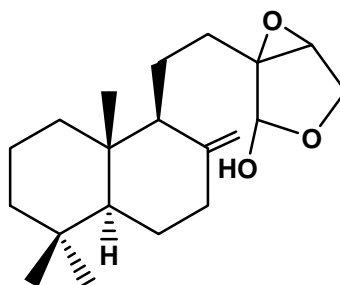
Fracciones	Eluente	Proporción
1A-18A	hexano	100
19A-37A	hexano-AcOEt	95:5
38A-56A	hexano-AcOEt	90:10
57A-78A	hexano-AcOEt	85:15
79A-91A	hexano-AcOEt	80:20
92A-98A	hexano-AcOEt	70:30
99A-112A	hexano-AcOEt	60:40
113A-120A	hexano-AcOEt	50:50
121A-134A	hexano-AcOEt	40:60
135A-140A	hexano-AcOEt	30:70
141A-147A	hexano-AcOEt	20:80
148A-160A	AcOEt	100
161A-167A	MeOH	100

Se reunieron las fracciones A21-A29 y el residuo se fraccionó por cromatografía en columna (columna B) eluida con mezclas de hexano-acetona de polaridad creciente (hexano-acetona 98:2, frs. 1B-35B; hexano-acetona 97:3, frs. 36B-40B; hexano-acetona 95:5, frs. 41B-51B; hexano-acetona 90:10, frs. 52B-62B; hexano-acetona 85:15, frs. 63B-72B). Las fracciones 21B-40B se reunieron y de éstas cristalizó la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol. Se obtuvieron 321.3 mg (p.f. 136-138°C).

Las fracciones 30A-42A se reunieron y se decoloraron con carbón activado para obtener un residuo (1.82 g) que se sometió al siguiente proceso de purificación: cuatro CC (silica gel, hexano-AcOEt 90:10), seguidas de CPP eluida con hexano-

isopropanol 95:5, 6x; para obtener la mezcla de los compuestos **1a,1b** (labda-8(17)-en-13,14-15,16-diepoxi-16-ol, 42.8 mg) libre de impurezas. Esta mezcla no pudo ser separada en sus componentes.

13,14:15,16-Diepoxi-labd-8(17)-en-16-ol (1a,1b). Aceite amarillo; IR (película) $\nu_{\text{máx}}$: 3411, 3079, 1643, 895 cm^{-1} ; RMN ^1H **tabla 6**; RMN ^{13}C **tabla 7**; EM-IE m/z (int. rel.): 320 $[\text{M}]^+$, ($\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$, 5), 305 $[\text{M-Me}]^+$ (7), 287 $[\text{M-Me-H}_2\text{O}]^+$ (10), 271 $[\text{287-O}]^+$ (3), 177 $[\text{C}_{13}\text{H}_{21}]^+$ (17), 137 $[\text{M-C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_3]^+$ (100), 123 $[\text{137-CH}_2]^+$ (32), 109 $[\text{123-CH}_2]^+$ (24), 95 $[\text{109-CH}_2]^+$ (45), 81 $[\text{95-CH}_2]^+$ (50); EM-ARBAR m/z 320.2356 (calcd de $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$, 320.2351).

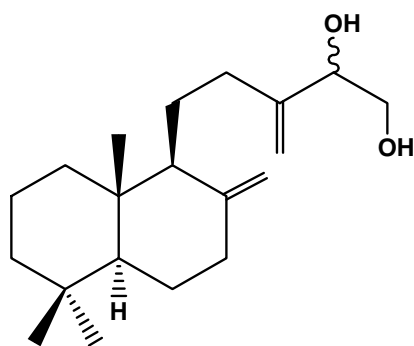


13,14:15,16-diepoxi-labd-8(17)-en-16-ol

Las fracciones 43A-60A se reunieron (2.84 g), y se purificaron por cromatografía en columna (columna C), eluida con mezclas de hexano-AcOEt (hexano-AcOEt 90:10, frs. 1C-58C; hexano-AcOEt 85:15, frs. 59C-92C; hexano-AcOEt 75:25, frs. 93C-99C). Las fracciones 8C-24C (623.6 mg) se reunieron, se decoloraron con carbón activado y se sometieron a cromatografía en columna (columna D), eluida con hexano-acetona 90:10, 18 fracciones. De esta columna D se reunieron las fracciones 3D-18D (372.7 mg), mismas que se sometieron a otra CC

(columna E) (hexano-acetona 90:10, 9 fracciones) de la cual las fracciones 1E-5E se reunieron (332.5 mg) y fraccionaron en la columna F, eluida con CH₂Cl₂ y acetona (CH₂Cl₂, frs. 1F-37F; CH₂Cl₂-acetona 95:5, frs. 38F-44F). Las fracciones 7F-27F (133.3 mg) se aplicaron a dos placas preparativas de silica gel que se eluyeron con CH₂Cl₂-acetona 98:2, 4x. De aquí se aisló la mezcla **2a,2b** (labda-8(17),13(16)-dien-14,15-diol, 69.9 mg) libre de impurezas. Esta mezcla no pudo ser separada en sus componentes.

Labda-8(17),13(16)-dien-14,15-diol (2a,2b). Aceite amarillo; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3590, 3434, 3081, 1643, 894 cm⁻¹; RMN ¹H **tabla 5**; RMN ¹³C **tabla 7**; EM-IE *m/z* (int. rel.): 306 [M]⁺, (C₂₀H₃₄O₂, 10), 291 [M-Me]⁺ (19), 273 [291-H₂O]⁺ (14), 255 [291-2H₂O]⁺ (18), 205 [M-C₅H₉O₂]⁺ (12), 191 [C₁₄H₂₃]⁺ (13), 177 [C₁₃H₂₁]⁺ (23), 137 [M-C₁₀H₁₇O₂]⁺ (100), 123 [137-CH₂]⁺ (44), 109 [123-CH₂]⁺ (49), 95 [109-CH₂]⁺ (63), 81 [95-CH₂]⁺ (65); EM-ARBAR *m/z* 307.2640 (calcd de C₂₀H₃₅O₂, 307.2637).



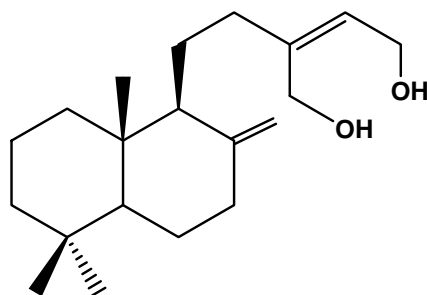
labda-8(17),13(16)-dien-14,15-diol

Las fracciones 61A-95A (6.66 g) se decoloraron con carbón activado y se sometieron a cromatografía en columna (columna G), eluida con mezclas de hexano-

acetona (hexano-acetona 85:15, frs. 1G-18G; hexano-acetona 75:25, frs. 19G-29G). Las fracciones 2G-9G se reunieron (5.12 g) y fraccionaron mediante cromatografía en columna (columna H), eluida con mezclas de hexano-isopropanol (hexano-isopropanol 97:3, frs.1H-70H; hexano-isopropanol 95:5, frs. 71H-80H). La fracción 59H contenía al compuesto **3**, el cual se purificó por cristalización de hexano/AcOEt. Se reunieron las fracciones 21H-24H y se purificaron por cromatografía en columna (columna I), eluida con hexano-AcOEt 75:25. Se obtuvieron 22 fracciones de las cuales la fr. 4I contenía al compuesto **4**, el cual se purificó por cristalización de hexano/AcOEt. Las fracciones 10H-80H contenían los compuestos **3** y **4**, éstas se reunieron y el residuo se sometió a dos sucesivas CC eluidas con hexano-isopropanol 97:3. Finalmente se obtuvieron por cristalización de la mezcla de la que cristalizaba el compuesto mayoritario. Se obtuvieron 2.117 g de labda-8(17),13(Z)-dien-15,16-diol (**3**) y 385.2 mg de labdenodiol (**4**).

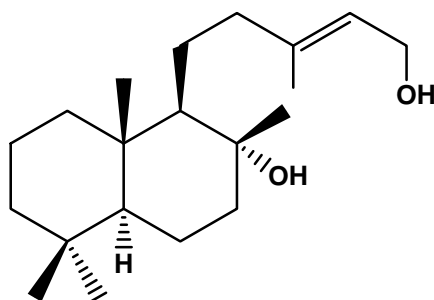
(+)-Labda-8(17),13(Z)-dien-15,16-diol (3). Cristales blancos; p.f. 119-120 °C; $[\alpha]_D^{20} +40$ (c 0.19, CHCl₃), lit. $[\alpha]_D^{24} +40$ (c 1.0, CHCl₃) (Villamizar *et al.*, 2003); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3661, 3423, 3081, 1642, 892 cm⁻¹; EM-IE *m/z* (int. rel.): 306 [M]⁺ (2), (C₂₀H₃₄O₂), 288 [M-H₂O]⁺ (11), 273 [M-H₂O-Me]⁺ (44), 257 [273-O]⁺ (24), 255 [273-H₂O]⁺ (12), 205 [M-C₅H₉O₂]⁺ (12), 137 [M-C₁₀H₁₇O₂]⁺ (100), 123 [137-CH₂]⁺ (44), 109 [123-CH₂]⁺ (49), 95 [109-CH₂]⁺ (66), 81 [95-CH₂]⁺ (75); EM-ARBAR *m/z* 306.2559 (calcd de C₂₀H₃₄O₂, 306.2559); RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 0.68 (CH₃-20), 0.80 (CH₃-19), 0.87 (CH₃-18), 4.22 (1H, s, H-15), 4.20 (1H, s, H-15'), 4.17 (2H, sa, H-16, H-16'), 4.52 (1H, d, *J*= 1.5 Hz, H-17), 4.84 (1H, dt, *J*= 3, 1.5 Hz, H-17'), 5.61 (1H, ta,

$J = 6.9$ Hz, H-14); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75.4 MHz) δ 14.5 (C-20), 19.4 (C-2), 21.7 (C-19), 22.2 (C-11), 24.5 (C-6), 33.6 (C-4), 33.6 (C-18), 34.7 (C-12), 38.4 (C-7), 39.1 (C-1), 39.7 (C-10), 42.2 (C-3), 55.6 (C-5), 56.5 (C-9), 58.7 (C-15), 61.1 (C-16), 106.3 (C-17), 126.2 (C-14), 144.5 (C-13), 148.6 (C-8).



(+)-labda-8(17),13(Z)-dien-15,16-diol

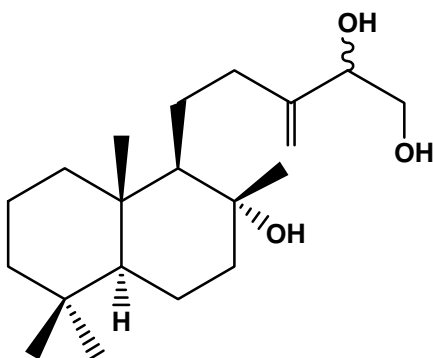
Labdenodiol (4). Cristales blancos; p.f. 127-128 °C; $[\alpha]_D^{20} -2$ (c 0.20, CHCl_3), lit. $[\alpha]_D -0.5$ (c 0.8, CHCl_3) (Forster *et al.*, 1985); IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx}}$: 3602, 3447, 3010, 1666, 852 cm^{-1} ; EM-IE m/z (int. rel.): 308 $[\text{M}]^+$, ($\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$, no observado), 290 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]$ (7), 275 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{Me}]^+$ (9), 257 $[\text{275}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (6), 205 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_5\text{H}_9\text{O}]^+$ (7), 192 $[\text{C}_{14}\text{H}_{24}]^+$ (100), 177 $[\text{C}_{13}\text{H}_{21}]^+$ (98), 137 $[\text{308}-\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_2]^+$ (25), 123 $[\text{137}-\text{CH}_2]^+$ (36), 109 $[\text{123}-\text{CH}_2]^+$ (32), 95 $[\text{109}-\text{CH}_2]^+$ (40), 81 $[\text{95}-\text{CH}_2]^+$ (44); RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ 0.79 (CH_3 -20), 0.80 (CH_3 -19), 0.87 (CH_3 -18), 1.14 (CH_3 -17), 1.70 (CH_3 -16), 4.17 (1H, dd, $J = 12, 7$ Hz, H-15), 4.13 (1H, dd, $J = 12, 7$ Hz, H-15'), 5.44 (1H, tc, $J = 7, 1$ Hz, H-14); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ 15.5 (C-20), 16.4 (C-16), 18.5 (C-2), 20.6 (C-6), 21.5 (C-19), 23.6 (C-11), 24.0 (C-17), 33.3 (C-4), 33.4 (C-18), 39.3 (C-10), 39.8 (C-1), 42.0 (C-3), 42.9 (C-12), 44.6 (C-7), 56.1 (C-5), 59.3 (C-15), 61.3 (C-9), 74.1 (C-8), 123.2 (C-14), 141.0 (C-13).



labdenodiol

De las fracciones 100A-112A (2.62 g) se aisló la mezcla de **5a,5b** (labda-13(16)-en-8 α ,14,15-triol) después del siguiente proceso de purificación: Cromatografía en columna (columna J) eluida con mezclas de hexano-acetona (hexano-acetona 80:20, frs. 1J-15J; hexano-acetona 75:25, frs. 16J-23J; hexano-acetona 60:40, frs. 24J-36J). Las frs. 3J-5J (846.5 mg) se decoloraron con carbón activado y se fraccionaron mediante cromatografía en columna (columna K) eluida con CH₂Cl₂-acetona (CH₂Cl₂-acetona 90:10, frs. 1K-29K; CH₂Cl₂-acetona 85:15, frs. 30K-35K). De las frs. 14-32K se obtuvieron 516.1 mg de la mezcla **5a,5b**.

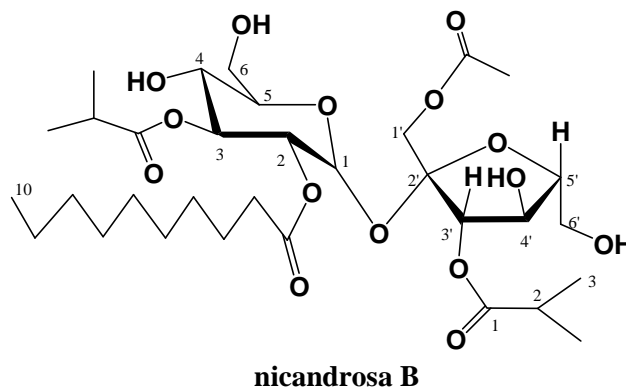
Labd-13(16)-en-8 α ,14,15-triol (5a,5b). Aceite amarillo; IR (disolución) $\nu_{\text{máx}}$: 3595, 3410, 1647, 863 cm⁻¹; RMN ¹H **tabla 5**; RMN ¹³C **tabla 7**; EM-IQ m/z (int. rel.): 325 [M+H]⁺, (C₂₀H₃₆O₃, no observado), 307 [M+H-H₂O]⁺ (47), 289 [M+H-2H₂O]⁺ (100), 271 [M+H-3H₂O]⁺ (98), 205 [M-H₂O-C₅H₉O₂]⁺ (10), 191 [C₁₄H₂₃]⁺ (29), 177 [C₁₃H₂₁]⁺ (11), 137 [M-C₁₀H₁₉O₃]⁺ (8), 123 [137-CH₂]⁺ (18), 109 [123-CH₂]⁺ (6), 95 [109-CH₂]⁺ (7), 81 [95-CH₂]⁺ (4).

labd-13(16)-en-8 α ,14,15-triol

Las fracciones 113A-123A (2.55g), mostraron ser una mezcla de compuestos, de la que se logró separar el compuesto **6**, después del siguiente proceso: decoloración con carbón activado y cromatografía en columna (columna L) eluida con mezclas de hexano-AcOEt (hexano-AcOEt 50:50, frs. 1L-28L; hexano-AcOEt 60:40, frs. 29L-35L), de las cuales se reunieron 3L-11L (1.43 g) y se purificaron por cromatografía en columna (columna M) eluida con mezcla de hexano-acetona (hexano-acetona 75:25, frs. 1M-21M; hexano-acetona 40:60, frs. 22M-26M). Las fracciones 6M-11M (550.2 mg) contenían al compuesto **6**, que se purificó mediante cromatografía en placa preparativa de fase reversa (SIL RP-18 W/UV₂₅₄, EtOH-H₂O 6:4, 7x).

Nicandrosa B (6). Aceite amarillo; $[\alpha]_D^{20} +36.96$ (*c* 0.23, CHCl₃); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3479, 1741, 1190 cm⁻¹; EM-BAR *m/z* (int. rel.): 701 [M + Na]⁺ (5), (C₃₂H₅₄O₁₅ + Na), 387 [C₂₀H₃₅O₇]⁺ (10), 275 [C₁₂H₁₉O₇]⁺ (11), 215 [275-AcOH]⁺ (8), 181 [C₆H₁₃O₆]⁺ (7), 155 [C₁₀H₁₉O]⁺ (10), 127 [C₉H₁₉]⁺ (22), 71 [C₄H₇O]⁺ (92), 57 [C₄H₉]⁺ (100), 43 [C₃H₇, CH₃CO]⁺ (74); EM-ARBAR *m/z* 701.3359 [M+Na]⁺ (calcd de C₃₂H₅₄O₁₅ + Na, 701.3360); RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.56 (1H, d, *J*= 3.5 Hz, H-1), 4.92 (1H, dd, *J*=

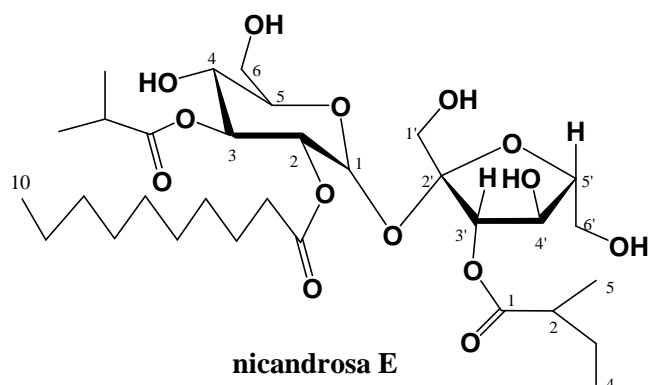
10.2, 3.5 Hz, H-2), 5.16 (1H, dd, $J= 10.5, 9.3$ Hz, H-3), 3.54 (1H, t, $J= 9.3$ Hz, H-4), 4.05 (1H, m, H-5), 3.97 (1H, dd, $J= 12.3, 1.5$ Hz, H-6a), 3.76 (1H, dd, $J= 12.3, 6$ Hz, H-6b), 4.07 (1H, d, $J= 12$ Hz, H-1'a), 3.91 (1H, d, $J= 12$ Hz, H-1'b), 5.24 (1H, d, $J= 8.7$ Hz, H-3'), 4.60 (1H, t, $J= 8.7$ Hz, H-4'), 3.91 (1H, m, H-5'), 3.91 (1H, m, H-6'a), 3.72 (1H, d, $J= 13.5$ Hz, H-6'b); 2-O-decanoil: 2.37 (1H, dt, $J= 16.2, 7.5$ Hz, H-2a), 2.30 (1H, dt, $J= 16.2, 7.5$ Hz, H-2b), 1.57 (2H, m, H-3), 1.25 (12H, m, H-4 – H-9), 0.88 (3H, t, $J= 6.9$ Hz, H-10); 3-O-isobutiril: 2.57 (1H, hept, $J= 6.9$, H-2), 1.16 (3H, d, $J= 6.9$ Hz, H-3), 1.15 (3H, d, $J= 6.9$ Hz, H-4); 1'-O-acetil: 2.10 (3H, s, H-2); 3'-O-isobutiril: 2.74 (1H, hept, $J= 6.9$ Hz, H-2), 1.30 (3H, d, $J= 6.9$ Hz, H-3), 1.27 (3H, d, $J= 6.9$ Hz, H-4).



Las fracciones 124A-132A (1.48 g) se decoloraron con carbón activado y el residuo se fraccionó por cromatografía en columna (columna N) eluida con mezclas de hexano-acetona (hexano-acetona 70:30, frs. 1N-31N; hexano-acetona 65:35, frs. 32N-34N; hexano-acetona 60:40, frs. 35N-36N). Las fracciones 15N-34N (389.1 mg) se purificaron por cromatografía en columna (columna O) eluida con CHCl_3 -acetona 80:20, se obtuvieron 20 fracciones, de las que se reunieron 8O-20O (173.3 mg) y se

aplicaron (100 mg) en dos placas preparativas de fase reversa eluidas con MeOH-H₂O 7:3, 5x. Se obtuvieron 15.4 mg de **7**.

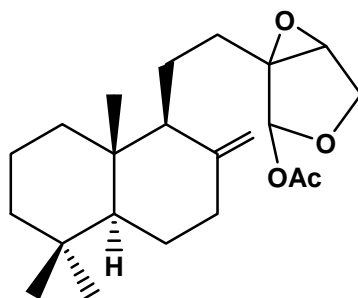
Nicandrosa E (7). Aceite amarillo; $[\alpha]_D^{20} +30.56$ (c 0.23, CHCl₃); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3466, 1733, 1191 cm⁻¹; EM-BAR m/z : 673 [M + Na]⁺ (46), (C₃₁H₅₄O₁₄ + Na), 387 [C₂₀H₃₅O₇]⁺ (11), 247 [C₁₁H₁₉O₆]⁺ (80), 181 [C₆H₁₃O₆]⁺ (36), 155 [C₁₀H₁₉O]⁺ (46), 85 [C₅H₉O]⁺ (44), 71 [C₄H₇O]⁺ (49), 69 [C₄H₅O]⁺ (53), 57 [C₄H₉]⁺ (100), 43 [C₃H₇]⁺ (70); EM-ARBAR m/z 673.3401 [M+Na]⁺ (calcd de C₃₁H₅₄O₁₄ + Na, 673.3411); RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.54 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-1), 4.91 (1H, dd, J = 10.2, 3.9 Hz, H-2), 5.16 (1H, dd, J = 10.2, 9.3 Hz, H-3), 3.55 (1H, t, J = 9.3 Hz, H-4), 4.05 (1H, ddd, J = 9.3, 6, 2 Hz, H-5), 3.99 (1H, da, J = 12.3, Hz, H-6a), 3.75 (1H, dd, J = 12.3, 6 Hz, H-6b), 3.56 (1H, d, J = 12.3 Hz, H-1'a), 3.45 (1H, d, J = 12.3 Hz, H-1'b), 5.21 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-3'), 4.61 (1H, t, J = 8.4 Hz, H-4'), 3.93 (1H, m, H-5'), 3.92 (1H, d, J = 12.6 Hz, H-6'a), 3.74 (1H, d, J = 12.6 Hz, H-6'b); 2-O-decanoil: 2.27 (1H, dt, J = 16, 7.7 Hz, H-2a), 2.26 (1H, dt, J = 16, 7.7 Hz, H-2b), 1.57 (2H, m, H-3), 1.25 (12H, m, H-4 – H-9), 0.88 (3H, t, J = 6.9 Hz, H-10); 3-O-isobutiril: 2.56 (1H, hept, J = 6.9, H-2), 1.15 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-3), 1.14 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-4); 3'-O-2-metilbutanoil: 2.59 (1H, sext, J = 6.9 Hz, H-2), 1.78 (1H, dqnt, J = 13.8, 6.9 Hz, H-3a), 1.60 (3H, dqnt, J = 13.8, 7.2 Hz, H-3b), 0.96 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-4), 1.24 (3H, d, J = 6.9 Hz, H-5).



6.5 REACCIONES

Acetilación de 1a,1b. A 29.6 mg de la mezcla de los compuestos **1a,1b** se agregaron 0.5 mL de piridina y 0.5 mL de anhídrido acético. La solución se dejó reaccionar dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 4 g de hielo y la mezcla se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se acidificó con HCl 5%, se lavó con agua, posteriormente se le agregó una solución saturada de NaHCO_3 y se lavó nuevamente con agua. Finalmente, la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro. La mezcla acetilada se concentró y purificó por CC. Se obtuvieron 24.8 mg de los compuestos **8a,8b**.

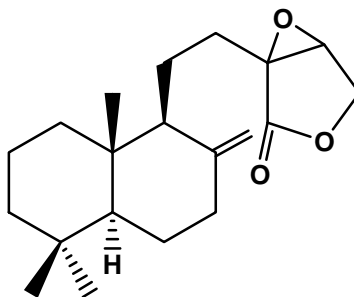
16-O-acetil-13,14:15,16-diepoxi-labd-8(17)-en (8a,8b). Aceite amarillo; IR (película) $\nu_{\text{máx}}$: 3079, 1748, 1642, 1229, 1011, 892 cm^{-1} ; RMN ^1H **tabla 5**; RMN ^{13}C **tabla 6**; EM-IE m/z (int. rel.): 362 $[\text{M}]^+$, ($\text{C}_2\text{H}_{34}\text{O}_4$, no observado), 346 $[\text{M}-\text{O}]^+$ (1), 320 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{CO}]^+$ (2), 291 $[\text{320}-\text{CHO}]^+$ (23), 273 $[\text{291}-18]^+$ (18), 255 $[\text{273}-18]^+$ (22), 205 $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_4]^+$ (22), 191 $[\text{C}_{14}\text{H}_{23}]^+$ (21), 177 $[\text{C}_{13}\text{H}_{21}]^+$ (17), 137 $[\text{M}-\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4]^+$ (100), 123 $[\text{137}-\text{CH}_2]^+$ (63), 109 $[\text{123}-\text{CH}_2]^+$ (64), 95 $[\text{109}-\text{CH}_2]^+$ (73), 81 $[\text{95}-\text{CH}_2]^+$ (76).



16-O-acetil-13,14:15,16-diepoxi-labd-8(17)-en

Oxidación de la mezcla 1a,1b. A 13.1 mg de **1a,1b** se le agregaron 3mL de CH_2Cl_2 y 27.2 mg de clorocromato de piridonio (CCP). La reacción se dejó con agitación a temperatura ambiente, se monitoreó por CCF y cuando terminó (24 hrs) se adsorbió en celita, se dejó secar a temperatura ambiente y se colocó en la parte superior de una columna de silica gel que se eluyó con hexano- CHCl_3 7:3. Se obtuvieron 3.8 mg de las lactonas **9a,9b**.

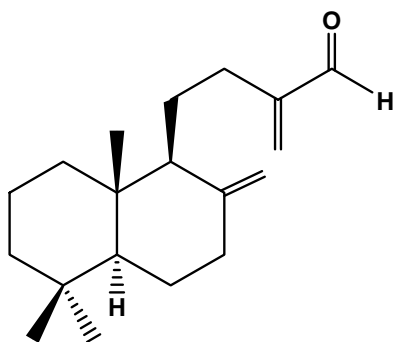
13,14-Epoxi-labd-8(17)-en-15,16-olida. (9a,9b). Aceite amarillo; IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx}}$: 1784, 1643, 895 cm^{-1} ; RMN ^1H **tabla 6**; RMN ^{13}C **tabla 7**; EM-IE m/z (int. rel.): 318 $[\text{M}]^+$ (28), ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$), 303 $[\text{M}-15]^+$ (57), 177 $[\text{C}_{13}\text{H}_{21}]^+$ (34), 137 $[\text{C}_{10}\text{H}_{17}]^+$ (98), 123 $[\text{137-CH}_2]^+$ (38), 109 $[\text{123-CH}_2]^+$ (28), 95 $[\text{109-CH}_2]^+$ (45), 81 $[\text{95-CH}_2]^+$ (76); EM-ARBAR m/z 319.2282 (calcd de $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_3$, 319.2273).



13,14-epoxy-labd-8(17)-en-15,16-olida

Oxidación de la mezcla 2a,2b. A 19.8 mg de **2a,2b** se agregaron 117 mg de NaIO₄ soportado en silica gel (NaIO₄ se disolvió en agua caliente, se le agregó silica gel y se dejó secar) y 2 mL de CH₂Cl₂ (Zhong *et al.*, 1997). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente en agitación. Se monitoreó mediante ccf y al término de la misma (60 minutos), se purificó por CC eluida con hexano-CHCl₃ 9:1. Se obtuvo el compuesto **10** (13.7 mg).

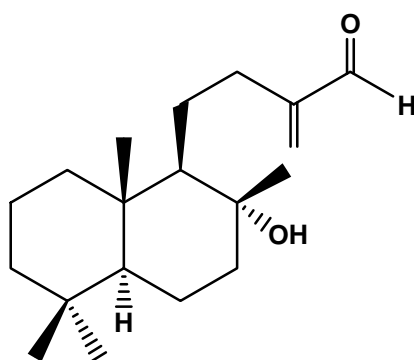
15-nor-Labda-8(17),13(16)-dien-14-al (10). Aceite amarillo; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3081, 1718, 1690, 1643, 908 cm⁻¹; RMN ¹H **tabla 5**; RMN ¹³C **tabla 7**; EM-IE *m/z* (int. rel.): 274 [M]⁺, (C₁₉H₃₀O, 10), 259 [M-Me]⁺ (11), 189 [M-Me-C₄H₆O]⁺ (16), 177 [C₁₃H₂₁]⁺ (21), 137 [M-C₉H₁₃O]⁺ (100), 123 [137-CH₂]⁺ (42), 109 [123-CH₂]⁺ (36), 95 [109-CH₂]⁺ (54), 81 [95-CH₂]⁺ (55).



15-nor-labda-8(17),13(16)-dien-14-al

Oxidación de la mezcla 5a,5b. A 60 mg de **5a,5b** se agregaron 170 mg de NaIO₄ soportado en silica gel y 3 mL de CH₂Cl₂ (Zhong *et al.*, 1997). La mezcla de reacción se dejó con agitación a temperatura ambiente, se monitoreó por CCF hasta que la transformación fue total (60 minutos). Se purificó por CC eluida con hexano-AcOEt 9:1. Se obtuvieron 21.6 mg del compuesto **11**.

15-nor-8 α -hidroxi-labd-13(16)-en-14-al (11). Aceite amarillo; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3591, 3492, 1719, 1687, 1628, 910 cm⁻¹; RMN ¹H **tabla 6**; RMN ¹³C **tabla 7**; EM-IE m/z (int. rel.): 292 [M]⁺, (C₁₉H₃₂O₂, 8), 275 [M-H₂O]⁺ (7), 262 [M-CH₂O]⁺ (12), 238 [M-C₃H₄O]⁺ (19), 222 [M-C₄H₆O]⁺ (37), 191 [C₁₄H₂₃]⁺ (73), 177 [C₁₃H₂₁]⁺ (50), 137 [M-C₉H₁₅O₂]⁺ (58), 123 [137-CH₂]⁺ (68), 109 [123-CH₂]⁺ (76), 95 [109-CH₂]⁺ (83), 81 [95-CH₂]⁺ (84).



15-nor-8 α -hidroxi-labd-13(16)-en-14-al

6.6 PRUEBAS BIOLÓGICAS

Los compuestos más abundantes (**3** y **4**) fueron sometidos a pruebas biológicas para determinar su actividad antiinflamatoria mediante el modelo de edema inducido con TPA (acetato de tetradecanoilforbol) y su actividad citotóxica en las líneas celulares de cáncer humano U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama y SKLU= pulmón.

6.6.1 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA. MODELO DE EDEMA INDUCIDO POR TPA EN OREJA DE RATÓN

Condiciones generales

Los animales utilizados se adquirieron en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se manipularon de acuerdo con las condiciones establecidas por el “Comité de usos y cuidados de animales de experimentación”, en el proyecto contenido en la Ley General de Salud (PROY-NOM 087-ECOL-SSA1-2000). Dentro de esa norma se establece su colocación dentro de cajas de polipropileno translúcidas, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y condiciones ambientales controladas (20-22 °C de temperatura y 50-60% de humedad). Los animales recibieron *ad libitum* agua y una dieta estándar de laboratorio.

Se utilizaron ratones hembras de la cepa CD-1 con un peso comprendido entre 22-30 g. Los animales se dividieron al azar en los siguientes grupos (n= 4-9): control (recibieron TPA más el vehículo), de prueba (recibieron TPA más las sustancias problema) y de referencia (recibieron TPA más indometacina).

Procedimiento

El ensayo se efectuó según la técnica descrita por De Young *et al.* (1989) y con algunas modificaciones por Oviedo-Chávez *et al.*, 2004, como se describe a continuación.

Los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico (Sedalforte®, 0.063 g/mL) por vía *ip*. Posteriormente, se administró tópicamente una solución etanólica de 2.5 µg/10 µL de TPA en el pabellón de la oreja derecha de todos los animales (5

μL en cada lado). Diez minutos después a los ratones de prueba se les administró el compuesto **3** o el **4** disuelto en 20 μL del vehículo (diclorometano-acetato de etilo 1:1).

La oreja izquierda sirvió como control negativo; primero se administraron 10 μL de etanol (EtOH), y luego 20 μL del vehículo. Después de 4 h, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvieron biopsias de ambas orejas con ayuda de un sacabocados circular de 7 mm de diámetro.

El edema se determinó de la diferencia de peso (en mg) del tejido tratado (oreja derecha), respecto del tejido no tratado (oreja izquierda). Los porcentajes de inhibición del edema (% *IE*) se calcularon de acuerdo con la ecuación 1. En donde *A* corresponde al valor promedio del edema en el grupo control y *B* al valor promedio del edema en el grupo de prueba o de referencia.

$$\% IE = 100 - [B / A \times 100] \quad (1)$$

Se construyó una curva dosis-respuesta, siendo las variables “x” y “y” los valores de la dosis y los % *IE*, respectivamente. La dosis efectiva 50 (*IC*₅₀) se determinó a partir de los datos significativos de las curvas que mostraron un efecto dependiente de la dosis y un valor *IE* mayor de 50%. Los valores de *IC*₅₀ en mg/oreja se convirtieron en unidades de μmol/oreja considerando el peso molecular del compuesto.

Los datos obtenidos se calcularon a través de un análisis de regresión no lineal, mediante el programa estadístico JMP versión 5.1 (® SAS Institute Inc., 2003).

6.6.2 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER HUMANO

Condiciones generales

Para la determinación de la citotoxicidad en líneas tumorales se siguieron los protocolos establecidos por el Instituto Nacional de Cáncer (INC) de Estados Unidos (Skehan *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991). El ensayo se efectuó en las siguientes líneas celulares de cáncer humano: U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama y SKLU= pulmón. Las líneas se obtuvieron del INC.

Los compuesto **3** y **4** se disolvieron por separado en DMSO. La concentración final de DMSO en los cultivos celulares fue menor del 0.1% y no tuvo efecto en los ensayos. La dosis del ensayo fue de 50 μ M. El ensayo se efectuó por triplicado.

Procedimiento

Las células se cultivaron en el medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SBF inactivado, 100 UI/mL de penicilina G, 100 μ g/mL de sulfato de estreptomicina, 0.25 μ g/mL de anfotericina B (GIBCO) y 2 mM de L-glutamina (GIBCO). Se conservaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

En una placa de 96 pozos se colocaron 100 μ L de cada línea celular y se midieron las densidades celulares. A continuación, la placa se incubó durante 24 h a 37 °C en CO₂ al 5%. Posteriormente, se adicionaron 100 μ L de las sustancias de prueba (compuesto **3** y **4**) y se incubó por 48 h en las mismas condiciones. A los

grupos control se les adicionaron 100 μ L de medio y se les dejó incubar 1 h en las mismas condiciones.

Las células se fijaron con una disolución acuosa de ácido tricloroacético al 50% p/v (50 μ L/pozo). La placa se incubó durante 60 min a 4°C. Los sobrenadantes se desecharon, la placa se lavó 3 veces con agua destilada desionizada y se dejó secar durante 24 h. Las células se trataron con 100 μ L de sulforrodamina B (SRB) al 0.4 % durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente la placa se lavó tres veces con una disolución de ácido acético al 1%. El colorante se extrajo con una disolución 10 mM de base Tris no amortiguada y se dejó secar durante 24 h. Las absorbancias se determinaron en un lector de placas a una λ de 515 nm. La intensidad de color es directamente proporcional al número de células vivas, por lo tanto, a mayor coloración menor porcentaje de inhibición del crecimiento celular.

La citotoxicidad se calculó conforme con la ecuación 2. En donde *A* corresponde al valor de las densidades de las células sin tratar; y *B*, al valor de las densidades de las células tratadas con los compuestos **3** o **4**.

$$\% IC = 100 - [B / A \times 100] \quad (2)$$

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

Como resultado del estudio químico de hojas, tallos y flores de *Physalis nicandroides* Schltl. se aislaron 8 diterpenos de tipo labdano y dos acilsacarosas. Dos de los diterpenos (+)-labda-8(17),13(Z)-dien-15,16-diol (**3**) (Villamizar *et al.*, 2003) y labdenodiol (**4**) (Forster *et al.*, 1985) ya han sido descritos en la literatura, lo mismo que las acilsacarosas que fueron identificadas como nicandrosa B (**6**) y nicandrosa E (**7**) (Maldonado *et al.*, 2006). Las estructuras de estos compuestos se determinaron mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y la comparación de éstos y de sus constantes físicas con las descritas en la literatura .

Además de los compuestos mencionados, se aislaron tres pares de nuevos labdanos. Su elucidación estructural se describe a continuación.

De las fracciones eluidas con hexano-AcOEt 9:1, se aisló un aceite (**2a,2b**) que en CCF presentaba una mancha homogénea con todos los eluyentes que se ensayaron. Su espectro de IR (espectro 1) mostró bandas para grupo hidroxilo en 3590 cm^{-1} (libre), 3434 cm^{-1} (asociado) y doble enlace terminal (3081 , 1643 y 894 cm^{-1}). Su espectro de masas (EM-IE) presentó un ión molecular de m/z 306 (espectro 2), el cual es congruente con la fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$. El espectro de RMN ^1H (espectro 3) presenta señales características de un labdano, como son tres singuletes en δ 0.87, 0.80 y 0.69, las cuales se asignaron a los metilos 18, 19 y 20, respectivamente. En el espectro HSQC (espectro 4), la señal en δ 0.87 correlaciona con la señal del carbono en δ 33.6 (C-18), la de δ 0.80 con la del carbono en δ 21.7 y

la de δ 0.69 con las de los carbonos en δ 14.52 y 14.48 (C-20). Esto último es indicio de que se trata de una mezcla. En efecto, el espectro de RMN ^{13}C (espectro 5) confirma lo anterior al presentar 31 señales. Éstas se atribuyen a dos labdanos muy semejantes, ya que nueve de las señales son comunes a los dos compuestos, mientras que las once restantes aparecen duplicadas. El espectro de RMN ^1H también presenta señales duplicadas. En consecuencia se hicieron muchos intentos para separar estos compuestos, pero no se tuvo éxito, de tal modo que la asignación estructural se hizo a partir de los datos espectroscópicos de la mezcla **2a,2b**.

La presencia de un doble enlace 8(17) en ambos compuestos, se dedujo de tres señales para protones vinílicos en δ 4.83 (dt, $J = 1.5, 1.5$ Hz, 2H), 4.50 (da, $J = 1.5$ Hz, 1H) y 4.48 (da, $J = 1.5$ Hz, 1H). En el espectro COSY (espectro 6) la primera señal correlaciona con las otras dos y en el espectro HSQC, las dos primeras señales correlacionan con el carbono de un metileno en δ 106.3, mientras que la primera y la tercera lo hacen en el carbono de otro metileno en δ 106.2, por lo que estas señales se atribuyen a los grupos CH_2 -17 de ambos compuestos. Esto se confirma por las interacciones de los protones H-17ab con los carbonos en δ 38.3 (C-7ab), 148.6 (C-8ab) y 56.7, 56.4 (C-9ab), observados en el espectro HMBC (espectro 7).

En el espectro de RMN ^1H se observan dos sistemas ABX, que por su desplazamiento se atribuyen a protones geminales a grupos hidroxilo. El primer sistema está formado por tres señales doble de doble en δ 3.69 ($J = 11.5, 3.5$ Hz), 3.51 ($J = 11.5, 7$ Hz) y 4.19 ($J = 7, 3.5$ Hz); en tanto que el segundo lo forman las

señales en δ 3.68 (dd, $J = 11.5, 3.5$ Hz), 3.50 (dd, $J = 11.5, 7$ Hz) y 4.18 (dd, $J = 7, 3.5$). En el espectro HSQC las señales en δ 3.69, 3.68, 3.51 y 3.50 correlacionan con los carbonos de dos metilenos en δ 65.7 y 65.6 y las señales en δ 4.19 y 4.18 con los carbonos de dos metinos en δ 74.9 y 75.2, respectivamente, por lo que se establece que en ambos compuestos existe un fragmento como el que se ilustra en la figura A y que este fragmento solo puede existir en el extremo de la cadena lateral del esqueleto del labdano, o sea a los carbonos C-14 y C-15.

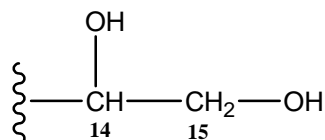


Figura A

Las correlaciones observadas en el espectro HMBC entre las señales en δ 74.9 y 75.2 (C-14ab) y las de dos metilenos vinílicos (δ 5.13, sa, 1H; δ 4.98, sa, 1H y δ 5.12, sa, 1H; δ 4.97, sa, 1H), así como los de H-14ab, H-15ab y H-15'ab con las señales de dos carbonos vinílicos no protonados en δ 149.3 y 149.1 (C-13ab) establecen la presencia de un doble enlace 13(16).

El espectro HMBC permitió localizar las señales de los metilenos C-12ab (δ 31.59 y 31.57) y C-11ab (δ 22.3 y 22.0), mediante las correlaciones que se muestran en la figura B.

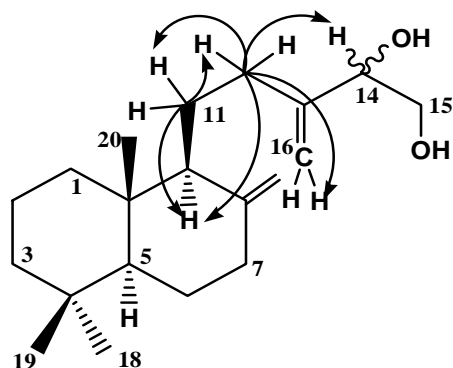
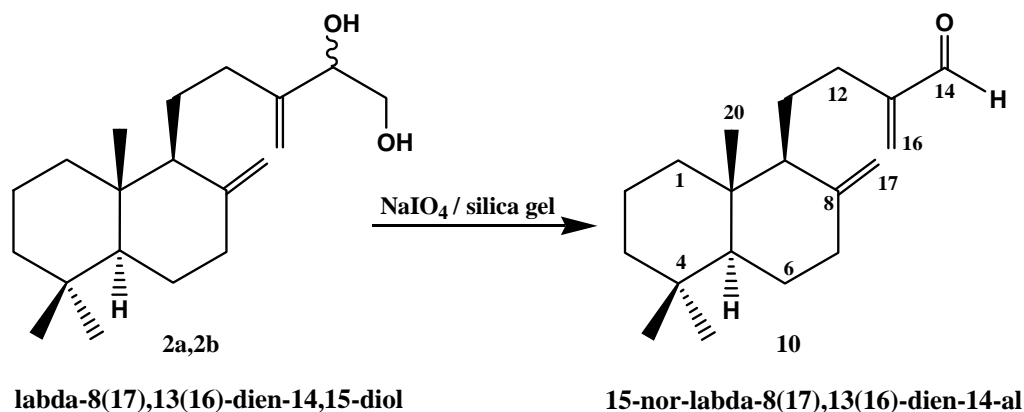


Figura B. Algunas interacciones C-H observadas en el espectro HMBC de **2a,2b**

Con lo expuesto se establece que los dos compuestos tienen la misma estructura (**2a,2b**). Se cree que la diferencia entre ellas debe estar en la configuración de alguno de los cuatro centros estereogénicos de las moléculas, aunque se consideró que lo más probable es que estos compuestos fueran epímeros en C-14.

La confirmación de lo anterior se logró al tratar la mezcla **2a,2b** con NaIO_4 soportado en sílica gel, con lo que se llevó a cabo la ruptura oxidativa del diol y se obtuvo como único producto el compuesto **10**. Este compuesto mostró una mancha homogénea en CCF. Su espectro de IR presentó absorciones para carbonilo de aldehído α,β -no saturado ($1718, 1690 \text{ cm}^{-1}$) y dobles enlaces terminales ($3081, 1643$ y 908 cm^{-1}) y su espectro de masas mostró un ión molecular de m/z 274, que concuerda con una fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}$. El espectro de RMN ^{13}C (espectro 8) mostró 19 señales, una de las cuales (δ 194.8) se atribuye al carbono del aldehído (C-14). Las señales de C-13 y C-16 se desplazan a campo bajo (δ 151.0, C-13; δ 133.8, C-16) debido a la conjugación con el carbonilo. En el espectro de RMN ^1H

(espectro 9), la señal del protón aldehídico aparece en δ 9.54 y las señales de H-16 y H-16' se desplazan a campo bajo (δ 6.23 y 5.97).



De las fracciones 100A-123A se aisló un aceite (**5a,5b**) que con todos los eluyentes ensayados presentaba una mancha homogénea en CCF. Su espectro de IR mostró absorciones para grupos hidroxilo en 3595 cm^{-1} (libre), 3410 cm^{-1} (asociado) y doble enlace (1647 y 863 cm^{-1}). El espectro de RMN ^1H (espectro 10) mostró que, al igual que en el caso de los compuestos **2a,2b**, se trata de la mezcla de dos labdanos. En él se observan señales para grupos metilo: la señal en δ 0.87 se asignó a los metilos 18, la señal en δ 0.79 a los metilos 19 y las señales en δ 0.80 y 0.796 a los metilos 20. El espectro HSQC (espectro 11) mostró que la señal en δ 0.87 correlaciona con la señal de carbono en δ 33.4 (C-18), la de δ 0.79 con la del carbono en δ 21.5 (C-19) y las de δ 0.80 y 0.796 con la de los carbonos en δ 15.47 y 15.51 (C-20). El espectro de RMN ^{13}C (espectro 12) confirmó que se trata de una mezcla al presentar 33 señales. A pesar de muchos intentos no se logró separar

estos compuestos, de tal modo que la asignación estructural se hizo a partir de los datos espectroscópicos de la mezcla **5a,5b**.

En el espectro de RMN ^1H se observan dos sistemas ABX, que por su desplazamiento se atribuyen a protones geminales a grupos hidroxilo. Estos sistemas son similares a los observados en los compuestos **2a,2b** para H-14 y H-15, H-15'. El primero está formado por tres señales en δ 3.67 (dd, $J = 11, 3.5$ Hz, H-15), 3.60 (dd, $J = 11, 8$ Hz, H-15') y 4.23 (dda, $J = 8, 3$ Hz, H-14); en tanto que el segundo lo forman las señales en δ 3.65 (dd, $J = 8, 3$ Hz, H-15), 3.55 (dd, $J = 11, 8$ Hz, H-15') y 4.23 (dda, $J = 8, 3$ Hz, H-14). En el espectro HSQC las señales en δ 3.67, 3.65, 3.60 y 3.55 correlacionan con los carbonos de dos metilenos en δ 65.8 y 65.7 (C-15ab), y la señal en δ 4.23 (H-14ab) con los carbonos de dos metinos en δ 74.5 y 75.6 (C-14ab).

La presencia de un doble enlace 13(16) en ambos compuestos se dedujo a partir de las correlaciones observadas en el espectro de HMBC (espectro 13) entre las señales en δ 74.5 y 75.6 (C-14ab) y las de dos metilenos vinílicos (δ 5.11, dda, $J = 1.5, 1$ Hz, 2H, H-16ab; δ 4.97, da, $J = 1.5$ Hz, 2H, H-16'ab), así como las de H-14ab, H-15ab y H-15'ab con las señales de dos carbonos vinílicos no protonados en δ 149.5 y δ 149.3 (C-13ab).

Las correlaciones observadas en el espectro HMBC entre las señales en δ 36.3 y 35.5 (C-12ab) con las de los protones de los metilenos vinílicos H-16ab y H-16'ab, H-9ab (δ 1.13, t, $J = 4$ Hz), H-11ab (δ 1.58, m; 1.63, m); H-11'ab (δ 1.46, m); así como las correlaciones observadas entre las señales en δ 24.4 y 23.97 (C-11ab)

con H-9ab, H-12ab (δ 2.24, ddd, $J = 14.5, 9, 5.5$ Hz; δ 2.13, t, $J = 8$ Hz) y H-12'ab (δ 2.09, m) permitieron localizar las señales de los metilenos C-12ab y C-11ab.

De acuerdo a lo anterior, la presencia de un doble enlace en 13(16) y un sistema ABX en ambas moléculas establece que existe un fragmento como el que se ilustra en la figura C, el cual forma parte de la cadena lateral.

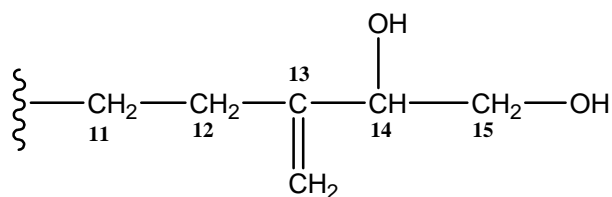


Figura C

En el espectro de RMN ^1H se observan dos singuletes para dos grupos metilo base de función oxigenada en δ 1.15 y 1.14 y en el espectro HSQC se observa su correlación con las señales en δ 24.1 y 24.03. Estas señales se asignan a los CH_3 -17 de ambos compuestos. En el espectro de RMN de ^{13}C se observan dos señales en δ 74.7 y 74.6, que fueron atribuidas a carbonos base de alcohol y se asignaron a los carbonos C-8ab, por las correlaciones que muestran con H-7, H-9 y H-17 en el espectro HMBC (figura D). En el espectro de masas (EM-IQ) de **5a,5b** no se observa el ión molecular m/z 325 $[\text{M}+\text{H}]^+$, que corresponde a la fórmula $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_3$, pero si uno de m/z 307 que corresponde a la pérdida de una molécula de agua $[\text{M}+\text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$.

La orientación α de los hidroxilos en C-8a y C-8b se propuso al comparar los desplazamientos químicos de **5a,5b** con los de compuestos similares descritos en la

literatura, como se muestra en la tabla 4 (Barton *et al.*, 1987; Boalino *et al.*, 2004; Forster *et al.*, 1985; Giang *et al.*, 2005).

Tabla 4. Comparación de datos espectroscópicos de RMN ¹³C en la orientación de los hidroxilos en C-8

C	Labd-13-en-8β,15-diol (Leoheteronina D)	Ácido leonotínico	Labd-13-en-8α,15-diol	Sclareol	5a,5b
6	20.7	22.0	20.6	20.6	20.5
7	37.7	37.1	44.6	43.3	44.5 44.3
8	73.5	73.2	74.2	74.8	74.7 74.6
9	60.9	59.9	61.3	61.8	60.6 60.4
10	38.8	39.1	39.3	39.3	39.2
11	25.5	24.8	23.7	19.1	24.4 23.97
17	32.1	31.3	24.0	24.2	24.1 24.03
20	24.8	22.1	15.5	15.5	15.51 15.47

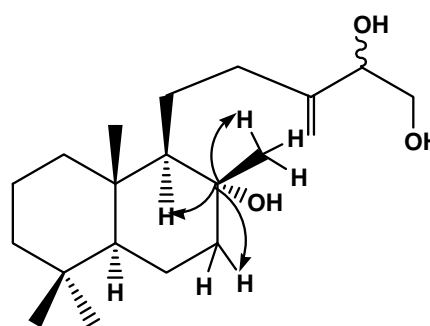
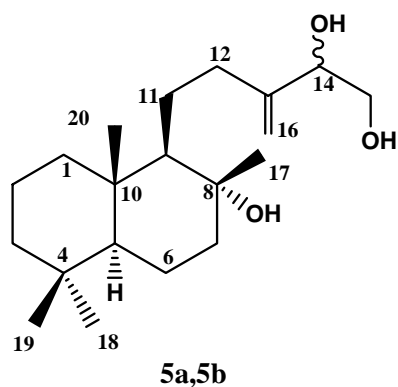
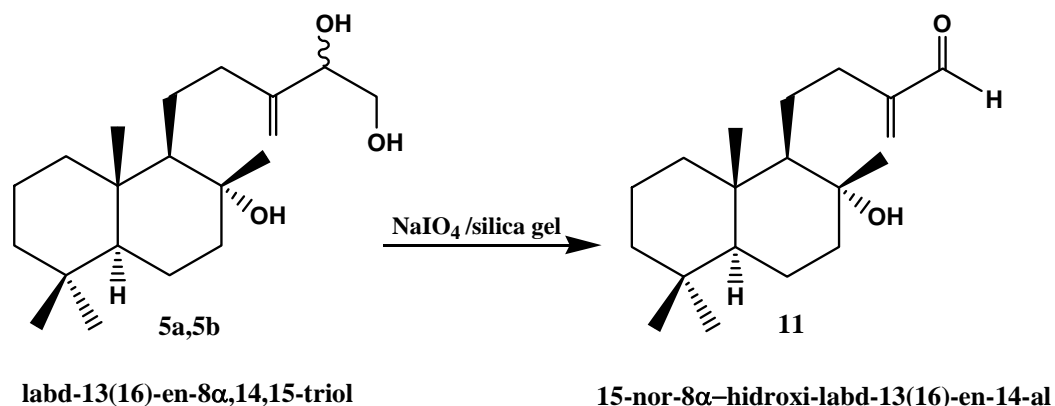


Figura D. Algunas correlaciones observadas en el espectro HMBC de 5a,5b

Con lo expuesto se establece que los dos compuestos tienen la misma estructura (**5a,5b**) y se pensó que lo más probable era que fueran epímeros en C-14. Esto se demostró al tratar el par **5a,5b** con NaIO_4 soportado en sílica gel y obtener el correspondiente aldehído (compuesto **11**).



El compuesto **11** es un aceite amarillo claro. En su espectro de masas (EM-IE) presenta un ión molecular de m/z 292 (espectro 14), el cual es congruente con la fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_2$. Su espectro de IR (espectro 15) mostró bandas para grupos hidroxilo en 3591 cm^{-1} (libre) y 3492 cm^{-1} (asociado); para carbonilo de aldehído α,β -no saturados ($1719, 1687\text{ cm}^{-1}$) y doble enlace ($1628, 910\text{ cm}^{-1}$). En el espectro de RMN ^1H (espectro 16), la señal del protón aldehídico aparece en δ 9.53 y las señales de H-16 y H-16' en δ 6.29 y 5.98, respectivamente. En el espectro de RMN ^{13}C (espectro 17) se observa la señal del carbono aldehídico en δ 195.1. Las señales de C-13 y C-16 se desplazan a campo bajo y aparecen en δ 150.9 y 134.1, respectivamente.

De las fracciones menos polares (hexano-AcOEt 95:5) de la columna A, se aisló un aceite (**1a,1b**) que en CCF presentaba una mancha homogénea con todos los eluyentes que se ensayaron. Su espectro de IR mostró absorciones para grupo hidroxilo (3411 cm^{-1}) y doble enlace terminal (3079 , 1643 y 895 cm^{-1}) y su espectro de masas (EM-IE) presentó un ión molecular de m/z 320, que es congruente con la fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$. En el espectro de RMN ^1H (espectro 18) se observan señales para seis grupos metilo como cuatro singuletes en δ 0.87 (6H), 0.80 (6H), 0.69 (3H) y 0.68 (3H). En el espectro HSQC (espectro 19), la señal en δ 0.87 correlaciona con la señal del carbono en δ 33.6 (C-18), la de δ 0.80 con la del carbono en δ 21.7 (C-19) y las señales en δ 0.69 y 0.68 con la del carbono en δ 14.4 (C-20). Lo anterior y el hecho de que el espectro de RMN ^{13}C (espectro 20) presente 28 señales indican que se trata de una mezcla de dos labdanos muy semejantes. Doce de las señales de carbono son comunes a los dos compuestos, mientras que las ocho restantes aparecen duplicadas. Los intentos de separar estos compuestos fueron infructuosos, de tal modo que, como en los casos anteriores, la asignación estructural se hizo a partir de los datos espectroscópicos de la mezcla **1a,1b**.

La presencia de un doble enlace 8(17) en ambos compuestos, se dedujo de tres señales para protones vinílicos en δ 4.84 (m, 2H), 4.57 (da, $J = 1\text{ Hz}$, 1H) y 4.53 (da, $J = 1.5\text{ Hz}$, 1H). En el espectro COSY (espectro 21) la primera señal correlaciona con las otras dos y en el espectro HSQC la señal en δ 4.84 correlaciona con el carbono de un metileno en δ 106.6 y lo mismo ocurre con la señal en δ 4.57, mientras que las señales en δ 4.84 y 4.53 correlacionan con el carbono de otro

metileno en δ 106.5. Estas señales se atribuyen a los grupos CH_2 -17 de cada uno de los compuestos. En el espectro HMBC (espectro 22) se observan las interacciones de los protones H-17ab con los carbonos en δ 38.3 (C-7ab) y 56.8, 56.5 (C-9ab).

En el espectro de RMN ^1H se observan dos singuletes en δ 5.34 y 5.31, ambas señales integran para un protón. En el espectro HSQC, la señal en δ 5.34 correlaciona con la señal en δ 96.5 y la señal en δ 5.31 correlaciona con la señal en δ 96.7. Los desplazamientos químicos de estas señales indican que se trata de carbonos hemiacetálicos y se asignan a CH-16ab ya que en el espectro HMBC se observan las interacciones de los protones de H-16ab con los carbonos en δ 66.3 (C-15ab) y δ 58.7, 58.3 (C-14ab), cuyo desplazamiento indica que son carbonos base de éter, lo mismo que el carbono cuya señal aparece en 67.7 y que se asignó a C-13ab. De lo anterior se dedujo la presencia de un epoxi γ -lactol en cada una de las moléculas. Las asignaciones de los carbonos 12-16 se dedujeron de las correlaciones que se muestran en la figura E.

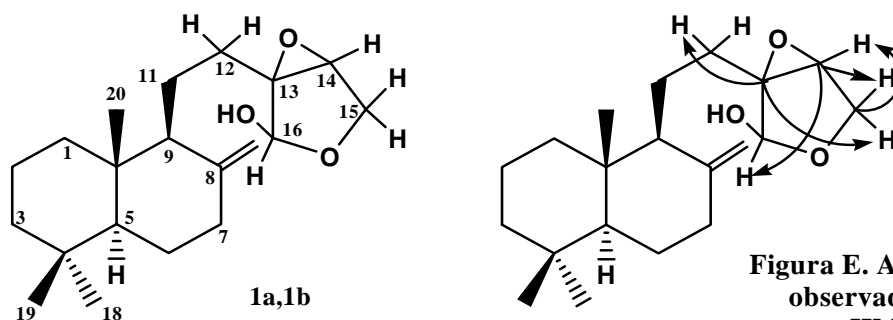
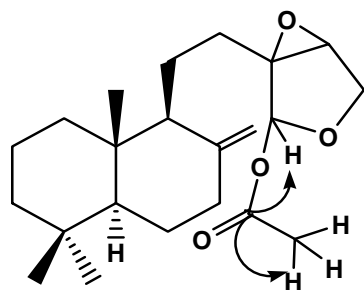


Figura E. Algunas correlaciones observadas en el espectro HMBC de 1a,1b

13,14:15,16-diepoxi-labd-8(17)-en-16-ol

Así se propone la estructura **1a,1b** para ambos compuestos y se pensó que lo más probable era que fueran epímeros en C-16.

En un intento por separar estos compuestos se obtuvieron los derivados acetilados (**8a,8b**), sin embargo éstos presentaron, al igual que la mezcla original, una sola mancha en CCF y en sus espectros de RMN ^1H (espectro 23) y ^{13}C (espectro 24) se observaron señales que indicaron la presencia de dos grupos acetilo (uno para cada compuesto). Estas señales son dos singuletes en δ 2.09 y 2.08, asignados a los hidrógenos de los grupos metilo; dos señales en δ 169.71 y 169.73 para los carbonos de los carbonilos, así como una señal en δ 21.1 para los carbonos de los dos metilos de los acetilo. A pesar de que con esta reacción no se logró obtener derivados que permitieran la separación de los componentes de la mezcla, las correlaciones observadas en el espectro de HMBC (espectro 25) entre los carbonos de los carbonilos de los acetatos con los protones H-16ab (figura F) y las de éstos protones con C-14 y C-15, así como los de C-13ab con H-15ab, H-15'ab y H-14ab y de C-14ab con H-15ab, H-15'ab confirmaron la presencia del lactol y la posición de los grupos acetilo en las moléculas **8a,8b**.



16-O-acetil-13,14:15,16-diepoxi-labd-8(17)-en

Figura F. Algunas correlaciones observadas en el espectro HMBC de **8a,8b**

Con el objetivo de establecer si la diferencia entre **1a** y **1b** reside en la configuración de C-16 se llevó a cabo una reacción de oxidación de **1a,1b**. El producto de la reacción, aunque presentó una mancha homogénea en CCF, corresponde a dos compuestos (**9a,9b**). Su espectro de IR mostró bandas para γ -lactona (1784 cm^{-1}) y doble enlace terminal ($3079, 1643$ y 895 cm^{-1}) y su espectro de masas (EM-IE) (espectro 26) presentó un ión molecular de m/z 318, el cual es congruente con la fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$. En el espectro de RMN ^{13}C (espectro 27) se puede observar la señal del carbonilo de la lactona en δ 172.0 (C-16) y en el espectro HMBC (espectro 28) se pueden observar sus correlaciones con los protones de C-12 y C-15 (figura G).

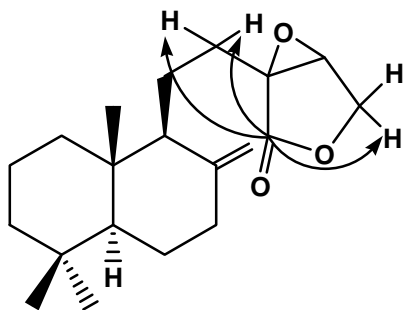


Figura G. Algunas correlaciones observadas en el espectro HMBC de **9a,9b**

13,14-epoxi-labd-8(17)-en-15,16-olida

El hecho de que de la oxidación de **1a,1b** se hayan obtenido dos lactonas anula la posibilidad de que estos compuestos sean epímeros en C-16 (**9a,9b**). Probablemente estos compuestos difieren en la orientación del grupo epoxi, esto es en la configuración de C-13 y C-14, aunque esto aún no ha sido demostrado.

Tabla 5. Datos espectroscópicos de RMN ^1H de los compuestos 2a,2b; 5a,5b; 10 y 11**

^1H	2a,2b	10	5a,5b	11
1	1.75 m*	1.72 m*	1.66 m*	1.69 m*
1'	1.02 tt 13, 3	0.99 td 13, 4	0.95 tda* 13, 3.5	0.95 tda 13, 4
2	1.56 tt 13.5, 3.5	1.54 tt 13.5, 3.5	1.59 m*	1.58 tt 13.5, 3.5
2'	1.48 m*	1.48 m*	1.44 m*	1.42 m*
3	1.39 dddd 13.5, 5, 3, 1.5	1.38 dtd 13, 3, 1.5	1.38 m*	1.38 m*
3'	1.17 td 13.5, 4	1.17 td 13, 4	1.15 m*	1.15 m*
5	1.09 dd 13, 2.5	1.08 dd 13, 3	0.93 dd 12.5, 3	0.93 dd 12.5, 2.5
6	1.73 m*	1.72 m*	1.65 m*	1.64 m
6'	1.32 dtd 13, 13, 4.5	1.32 dtd 13, 13, 4	1.26 m*	1.26 dtd 13.5, 12, 3.5
7	2.39 dta 12.5, 3	2.39 ddd 13, 4, 2.5	1.85 ddd 12.5, 6, 3	1.87 dt 12, 3
7'	1.97 td 13, 5	1.97 dta 13, 5	1.40 m*	1.41 m*
9	1.63 m* 1.61 m*	1.62 m*	1.13 t 4	1.12 t 4
11	1.69 m* 1.66 m*	1.64 m*	1.58 m* 1.63 m*	1.49 dt 10, 4
11'	1.48 m* 1.51 m*	1.48 m*	1.46 m 1.46 m	1.42 m*
12	2.23 ddd 15, 11, 4.5 2.14 ddd 15, 10, 4.5	2.43 m*	2.24 ddd 14.5, 9, 5.5 2.13 t 8	2.36 m
12'	1.78 m* 1.88 ddd 15, 9, 7	2.03 m*	2.09 m*	2.36 m
14	4.19 dd 7, 3.5 4.18 dd 7, 3.5	9.54 s	4.23 dda 8, 3	9.53 s
15	3.69 dd 11.5, 3.5 3.68 dd 11.5, 3.5	-----	3.67 dd 11, 3.5 3.65 dd 11, 3	-----
15'	3.51 dd 11.5, 7 3.50 dd 11.5, 7	-----	3.60 dd 11, 8 3.55 dd 11, 8	-----
16	5.13 sa 5.12 sa	6.23 dt 1.5, 1	5.11 dda 1.5, 1	6.29 dt 1, 1
16'	4.98 sa 4.97 sa	5.97 sa	4.97 da 1.5	5.98 sa
17	4.83 dt 1.5, 1.5	4.85 dt 1.5, 1	1.15 s 1.14 s	1.15 d 0.5
17'	4.50 da 1.5 4.48 da 1.5	4.58 dt 1, 1	-----	-----
18	0.87 s	0.87 s	0.87 s	0.87 s
19	0.80 s	0.80 s	0.79 s	0.79 s
20	0.69 s	0.67 s	0.80 s 0.796 s	0.77 s

**Determinado en CDCl_3 a 500 MHz; s = singulete, d = doblete, t = triplete, c = cuarteto, m = multiplete, a = señal ancha. *Señal sobrepuesta

Tabla 6. Datos espectroscópicos de RMN ¹H de los compuestos 1a,1b; 8a,8b y 9a,9b **

¹ H	1a,1b	8a,8b		9a,9b	
1	1.76 m*	1.73 m*		1.74 m*	
1'	1.03 tt 13,4	1.03 dtd 12.5, 12.5, 3.5		1.03 tt 13, 4	
2	1.56 tt 13.5, 3.5	1.56 m*		1.57 m*	
2'	1.50 m*	1.48 m*		1.50 m*	
3	1.39 da 13.5	1.39 da 13.5		1.40 da 13.5	
3'	1.18 td 13.5, 4	1.17 td 13.5, 4.5		1.17 td 13.5, 4	
5	1.10 dd 12.5, 2.5 1.09 dd 12.5, 2.5	1.09 dd 12.5, 2.5 1.08 dd 12.5, 2.5		1.09 dd 13, 3 1.08 dd 13, 3	
6	1.73 m*	1.73 m*		1.73 m*	
6'	1.32 dtd 13, 13, 4	1.32 dtd 13, 13, 4.5		1.32 dtda 13, 13, 4	
7	2.39 ddd 13, 4.5, 2.5	2.39 dddd 13, 4.5, 2, 2		2.40 da 13	
7'	1.98 m*	1.96 m*		1.96 ta 13	
9	1.66 m* 1.63 m*	1.63 m*	1.59 m*	1.63 m*	1.61 m*
11	1.68 m*	1.64 m*		1.74 m*	
11'	1.44 m*	1.44 m*		1.67 m*	
12	2.36 m*	2.27 m*	1.93 m*	2.23 m*	2.13 m
12'	1.94 m*	1.81 m*	1.46 m*	1.80 m	
14	3.63 s 3.60 s	3.68 s 3.64 s		4.03 d 1.5 4.01 d 1.5	
15	3.96 s 3.95 s	4.01 d 10.5		4.38 d 11.5 4.37 d 11.5	
15'	3.96 s 3.95 s	3.95 d 10.5		4.23 dd 11.5, 1.5 4.22 dd 11.5, 1.5	
16	5.34 s 5.31 s	6.20 s	6.17 s	-----	
16'	-----	-----		-----	
17	4.84 m	4.83 m		4.85 sa	
17'	4.57 da 1 4.53 da 1.5	4.49 da 1.5 4.42 da 1.5		4.55 sa 4.53 da 1	
18	0.87 s	0.87 s		0.87 s	
19	0.80 s	0.80 s		0.80 s	
20	0.69 s 0.68 s	0.67 s		0.68 s 0.67 s	
OAc	-----	2.09 s 2.08 s		-----	

** Determinado en CDCl₃ a 500 MHz; s = singlete, d = doblete, t = triplete, c = cuarteto, m = multiplete, a = señal ancha. *Señal sobrepuesta

Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN ¹³C de las mezclas aisladas y de los derivados de reacción *

C	1a,b	8a,8b	9a,9b	2a,2b	10	5a,5b	11
1	39.2 t 39.1 t	39.0 t 39.1 t	39.2 t 39.0 t	39.1 t	39.1 t	39.8 t 39.7 t	39.7 t
2	19.4 t	19.3 t	19.3 t	19.4 t	19.4 t	18.4 t	18.5 t
3	42.1 t	42.1 t	42.1 t	42.2 t	42.2 t	41.9 t	42.0 t
4	33.6 s	33.6 s	33.6 s	33.6 s	33.6 s	33.2 s	33.3 s
5	55.5 d	55.6 d 55.5 d	55.6 d	55.57 d 55.56 d	55.6 d	56.13 d 56.1 d	56.1 d
6	24.4 t	24.4 t	24.4 t	24.5 t	24.4 t	20.5 t	20.5 t
7	38.3 t	38.3 t	38.3 t	38.3 t	38.3 t	44.5 t 44.3 t	44.2 t
8	148.2 s 148.1 s	148.3 s 148.2 s	148.0 s 147.9 s	148.6 s	148.2 s	74.7 s 74.6 s	74.2 s
9	56.8 d 56.5 d	56.7 d 56.6 d	56.9 d 56.6 d	56.7 d 56.4 d	56.5 d	60.6 d 60.4 d	61.6 d
10	39.8 s 39.7 s	39.8 s	39.9 s 39.8 s	39.8 s 39.7 s	39.6 s	39.2 s	39.0 s
11	18.9 t	18.9 t	18.3 t 18.2 t	22.3 t 22.0 t	22.0 t	24.4 t 23.97 t	23.9 t
12	25.0 t	24.9 t 24.6 t	24.2 t	31.59 t 31.57 t	27.3 t	36.3 t 35.5 t	31.6 t
13	67.7 s	66.8 s	59.8 s	149.3 s 149.1 s	151.0 s	149.5 s 149.3 s	150.9 s
14	58.7 d 58.3 d	58.5 d 58.2 d	59.3 d 59.2 d	75.2 d 74.9 d	194.8 d	75.6 d 74.5 d	195.1 d
15	66.3 t	67.4 t	67.2 t	65.7 t 65.6 t	-----	65.8 t 65.7 t	-----
16	96.7 d 96.5 d	95.7 d 95.4 d	172.0 s	110.5 t 110.3 t	133.8 t	112.2 t 111.7 t	134.1 t
17	106.6 t 106.5 t	106.4 t 106.1 t	106.7 t	106.3 t 106.2 t	106.5 t	24.1 c 24.03 c	24.0 c
18	33.6 c	33.6 c	33.6 s	33.6 c	33.6 c	33.4 c	33.4 c
19	21.7 c	21.7 c	21.7 s	21.7 c	21.7 c	21.5 c	21.5 c
20	14.4 c	14.4 c 14.3 c	14.4 s 14.3 s	14.52 c 14.48 c	14.5 c	15.51 c 15.47 c	15.4 c
AcO	-----	169.71 s 169.73 s 21.1 c	-----	-----	-----	-----	-----

* Determinados a 125 MHz, multiplicidad deducida del espectro DEPT. Los desplazamientos están dados en ppm, referidos al CDCl₃. s = singulete (C), d = doblete (CH), t = triplete (CH₂), c = cuarteto (CH₃).

7.2 PRUEBAS BIOLÓGICAS

El interés en la investigación de plantas medicinales radica en que representan una fuente de nuevas estructuras químicas y de sustancias con posible potencial farmacológico. No se puede ignorar el hecho de que muchos de los compuestos naturales se usan como medicamentos o sirven como prototipos para la elaboración de medicamentos sintéticos, además se han sintetizado muchos cientos de agentes quimioterápicos contra el cáncer consistentes en modificaciones de fármacos conocidos, sin embargo, ha habido pocas novedades, por lo que existe la necesidad de contar con nuevas estructuras y es en los productos naturales donde más probablemente se las puede encontrar (Trease y Evans, 1991), así, al analizar una planta es de gran importancia el empleo de ensayos biológicos, ya que constituyen la estrategia de selección más apropiada de materias idóneas para el descubrimiento de principios activos.

7.2.1 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA, MODELO DE EDEMA INDUCIDO CON TPA

Para fines de la presente investigación se utilizó el modelo de edema inducido por TPA, el cual se caracteriza por inducir una respuesta local que consiste en eritema, edema e infiltración de LPMN (leucocitos polimorfo nucleares). La inhibición del edema es un indicativo del efecto antiinflamatorio de la sustancia que se evalúa.

En el ensayo biológico únicamente se evaluó la actividad antiinflamatoria de los compuestos **3** y **4**, ya que la cantidad obtenida de los demás diterpenos y de las

acilsacarosas, no fue la suficiente para efectuar la prueba. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Efecto antiinflamatorio de los compuestos 3 y 4 en el modelo de edema inducido por TPA en oreja de ratón

Muestra	Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	Edema (mg)	Inhibición (%)
Control	---	12.33 \pm 0.82	---
3	1	7.23 \pm 1.55	41.35 *
4	1	4.40 \pm 1.20	64.32 *

Los datos representan el promedio de tres animales \pm el error estándar de la media (media \pm EEM). Los resultados se analizaron mediante una prueba de *t* de Student y los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

De estos dos compuestos, sólo el labdenodiol (**4**) mostró un porcentaje de inhibición del edema mayor al 50%. Así que, a este compuesto se le determinó la IC_{50} que fue de 0.67 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$.

La IC_{50} de la indometacina, fármaco indicado como antiinflamatorio, es 0.30 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$, esto es 2.3 veces menor que la del compuesto **4**, lo cual indica que la indometacina tiene una mejor actividad antiinflamatoria que el compuesto **4**.

7.2.2 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER HUMANO

La tabla 9 muestra los resultados del % de inhibición del crecimiento celular producidos por los compuestos **3** y **4** en las líneas de cáncer humano U251= glía de

sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama y SKLU= pulmón.

Tabla 9. % de inhibición del crecimiento celular en líneas de cáncer humano

Compuesto	% de inhibición del crecimiento por la línea celular (50 μ M)					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU
3	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	69.78	84.56	100

Como se puede observar, tanto el compuesto **3** como el **4** son muy activos, el que resultó más activo fue el compuesto **3**, ya que presentó un 100% de inhibición en el crecimiento celular de todas las líneas de cáncer humano en las que se llevó a cabo este estudio. Sin embargo, los resultados experimentales del compuesto **3** no fueron reproducibles, de tal modo que sólo fue posible construir una curva dosis-respuesta para el labdenodiol (**4**), de la que se obtuvieron las IC_{50} que se muestran en la tabla 10 y que indican una actividad citotóxica pobre.

Tabla 10. IC_{50} del compuesto 4 en el ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano

Compuesto	IC_{50} (μ M)				
	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU
4	30.41 \pm 2.1	32.29 \pm 0.13	57.77 \pm 4.1	22.71 \pm 1.8	44.81 \pm 4.1

Los datos representan la $IC_{50} \pm$ el error estándar de la media (media \pm EEM).

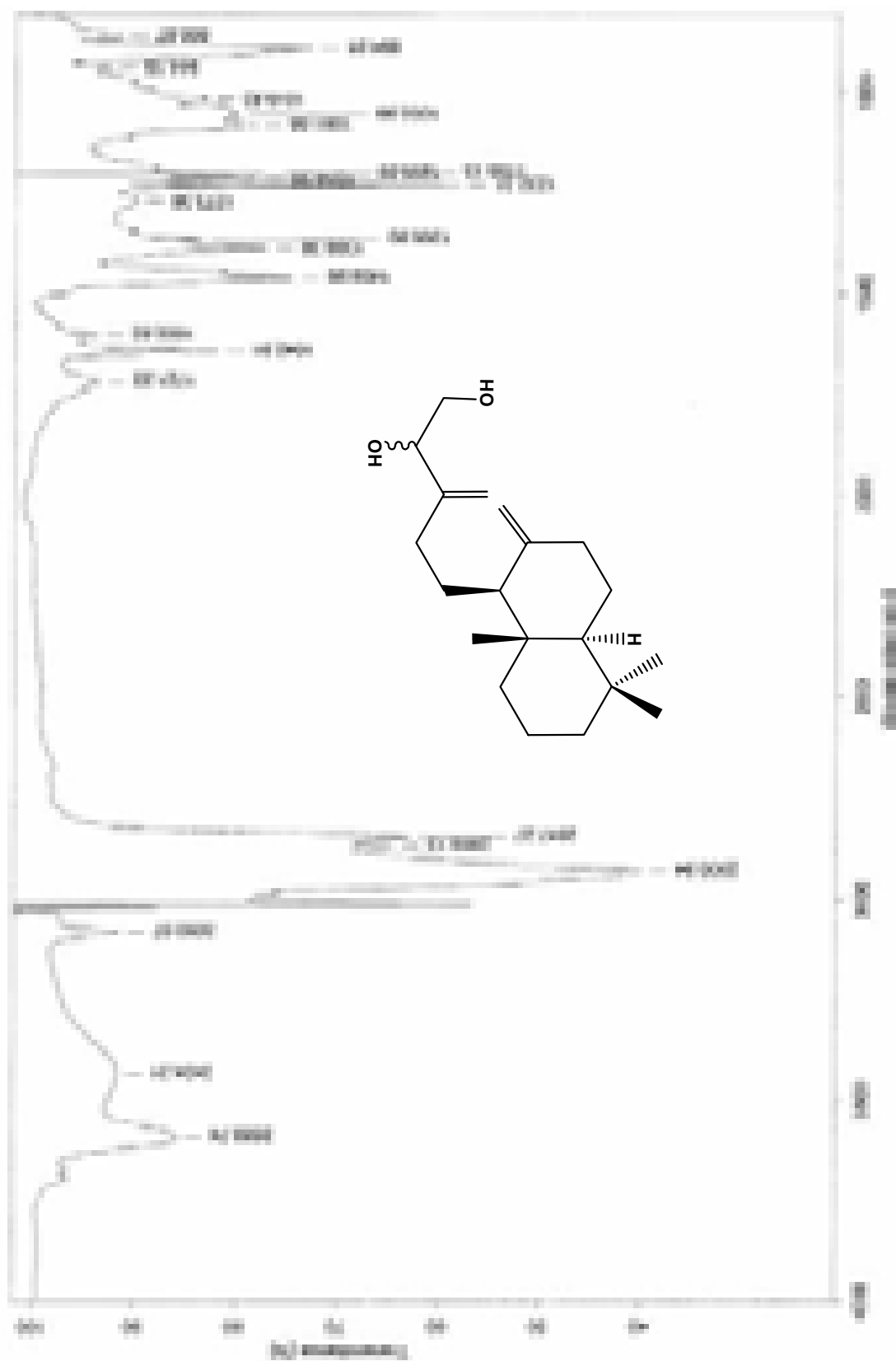
8. CONCLUSIONES

- Como resultado del estudio químico de hojas, tallos y flores de *Physalis nicandroides* Schltdl. se aislaron 8 diterpenos tipo labdano y dos acilsacarosas.
- *Physalis nicandroides* Schltdl. es la primera especie de *Physalis* de la que no se aíslan withanólidas.
- *Physalis nicandroides* Schltdl. es la quinta especie del género *Physalis* (*P. patula*, *P. coztomatl*, *P. pruinosa* y *P. nicandroides* Schltdl. var. *attenuata* Waterf) de la que se han aislado diterpenos de tipo labdano.
- Los diterpenos **2a** y **2b**, así como **5a** y **5b** fueron aislados como mezclas epiméricas no separables por los métodos cromatográficos utilizados. Por un método de degradación química se logró saber que los constituyentes de ambas mezclas son epímeros en C14.
- De acuerdo a la experimentación química sobre la mezcla estereoisomérica de **1a,1b**; se presume que estos compuestos difieren en la orientación del grupo epoxi.

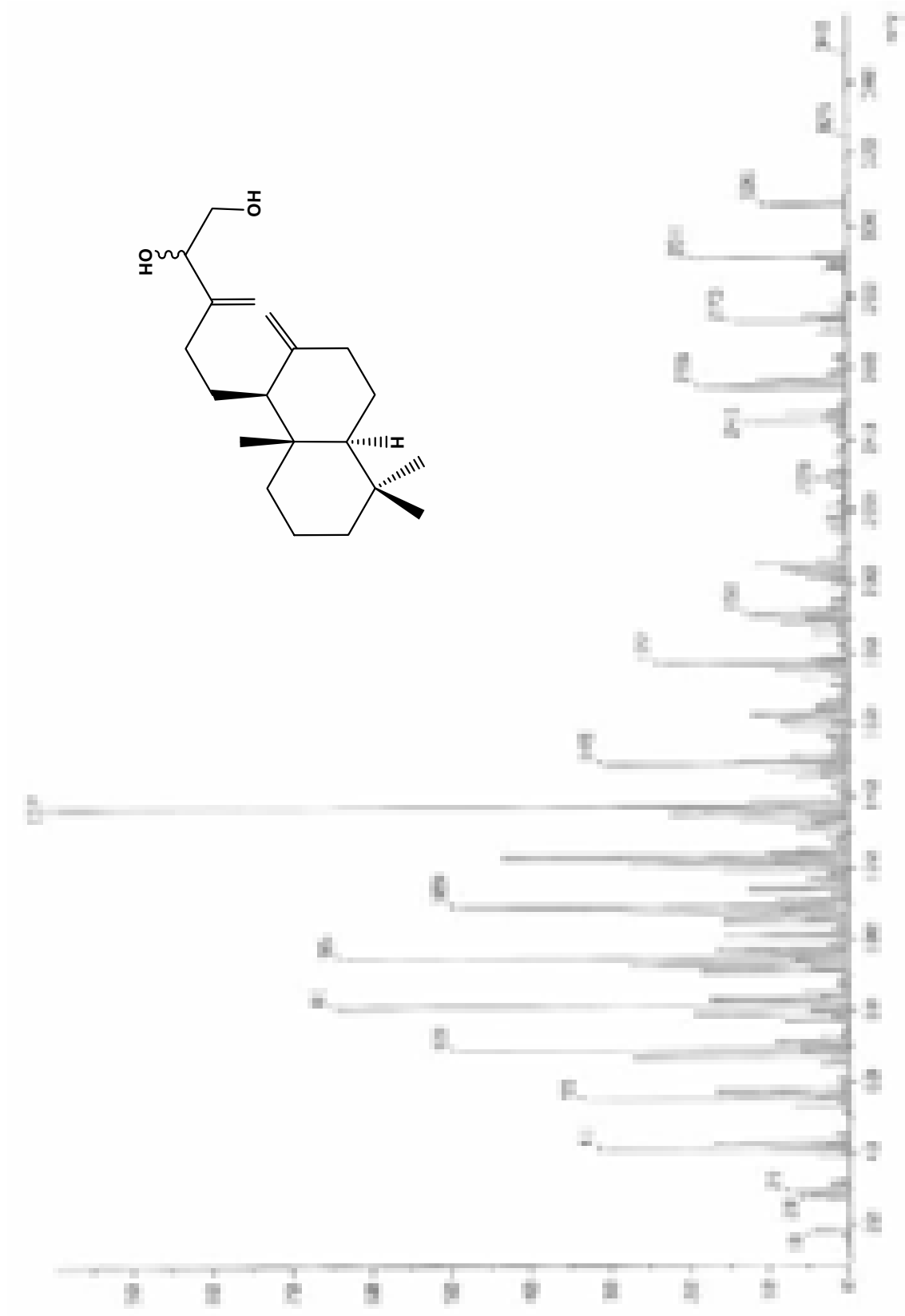
- En el ensayo de actividad antiinflamatoria, el labdenodiol (**4**) fue el que mejor actividad presentó, sin embargo, su IC_{50} resultó ser mayor que la indometacina que se empleó como referencia.

- En el ensayo de actividad citotóxica el compuesto **4** mostró una actividad moderada en las líneas ensayadas.

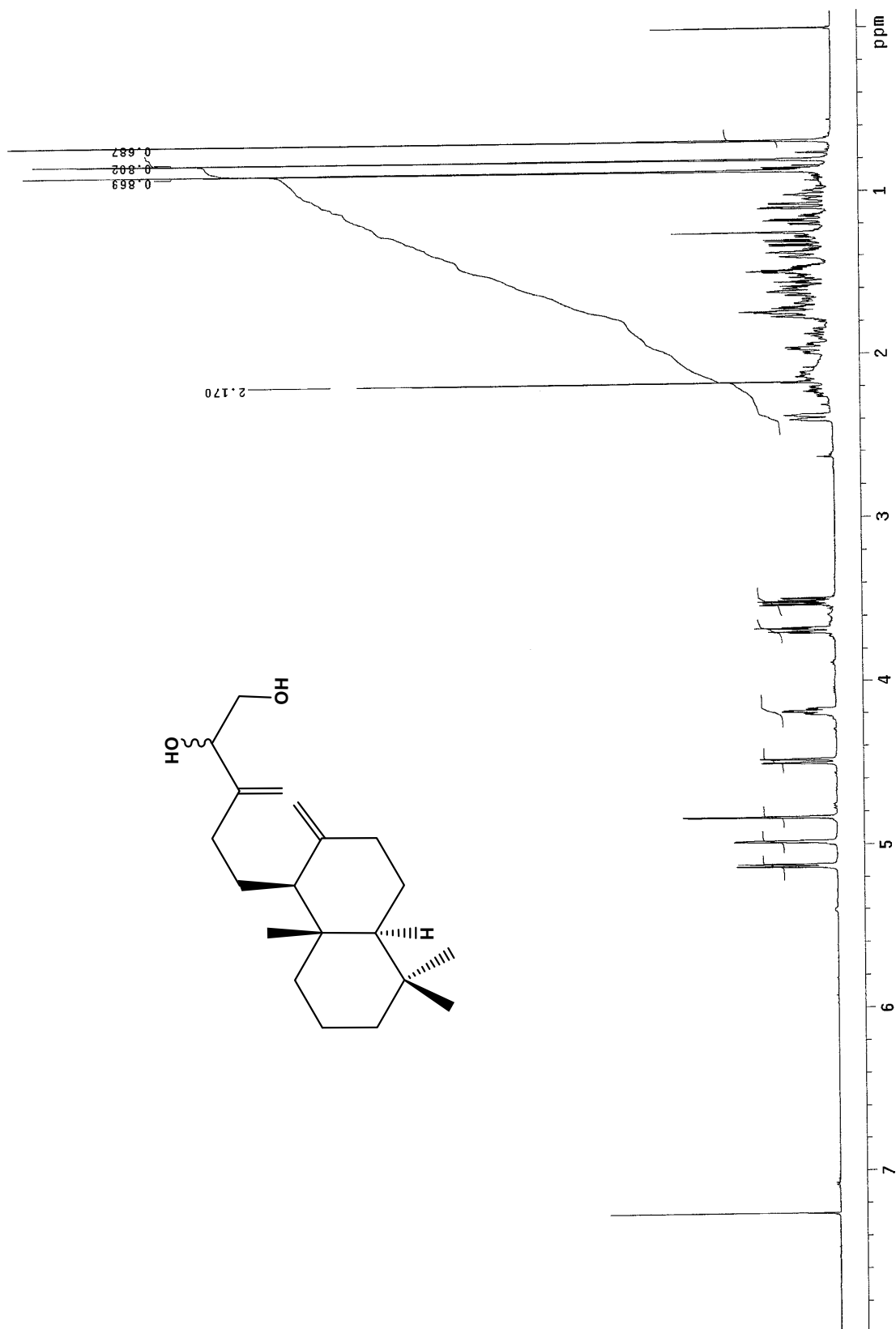
ANEXO I

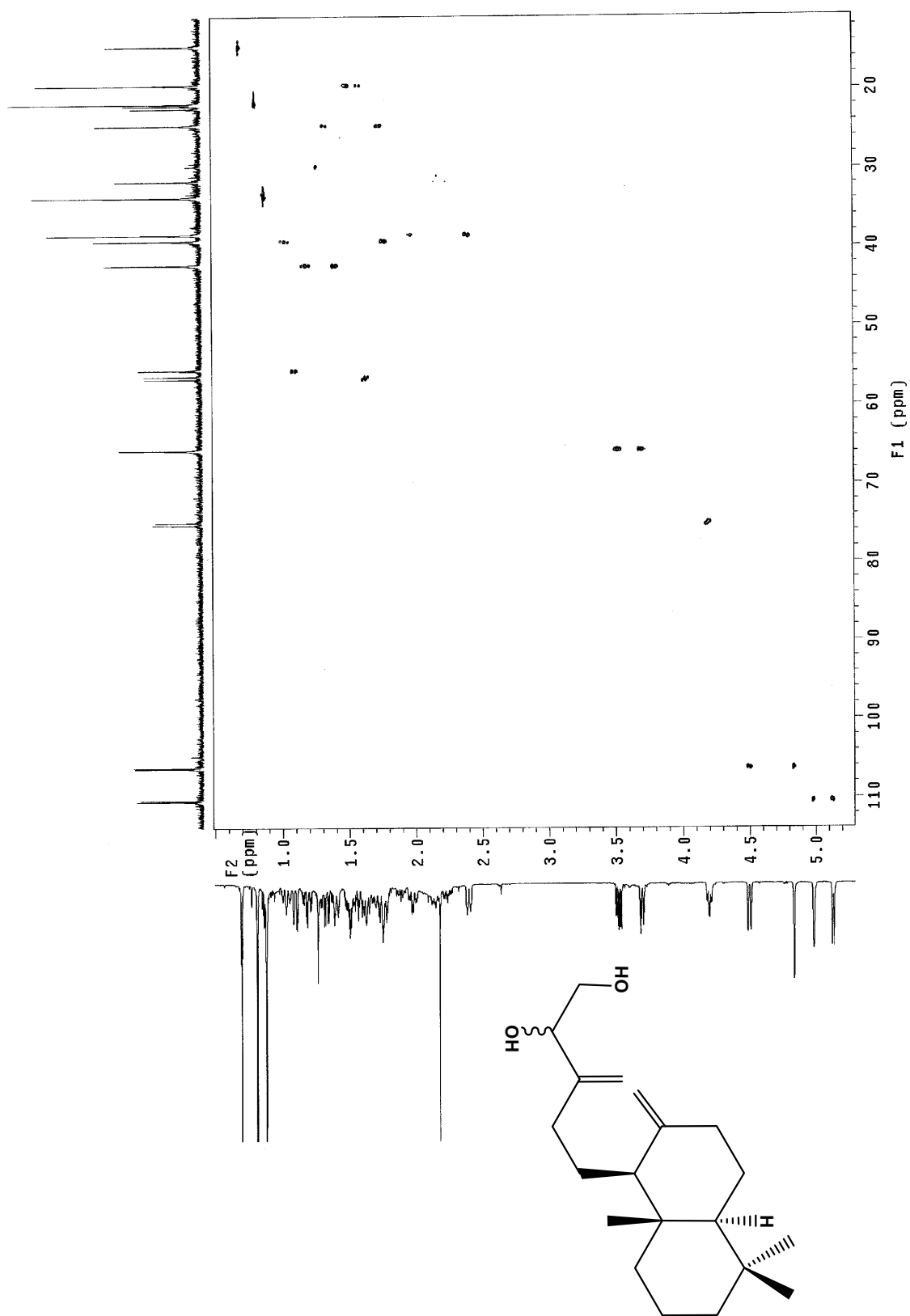


ESPECTRO 1: IR de labda-8(17),13(16)-dien-14,15-diol (2a,2b)

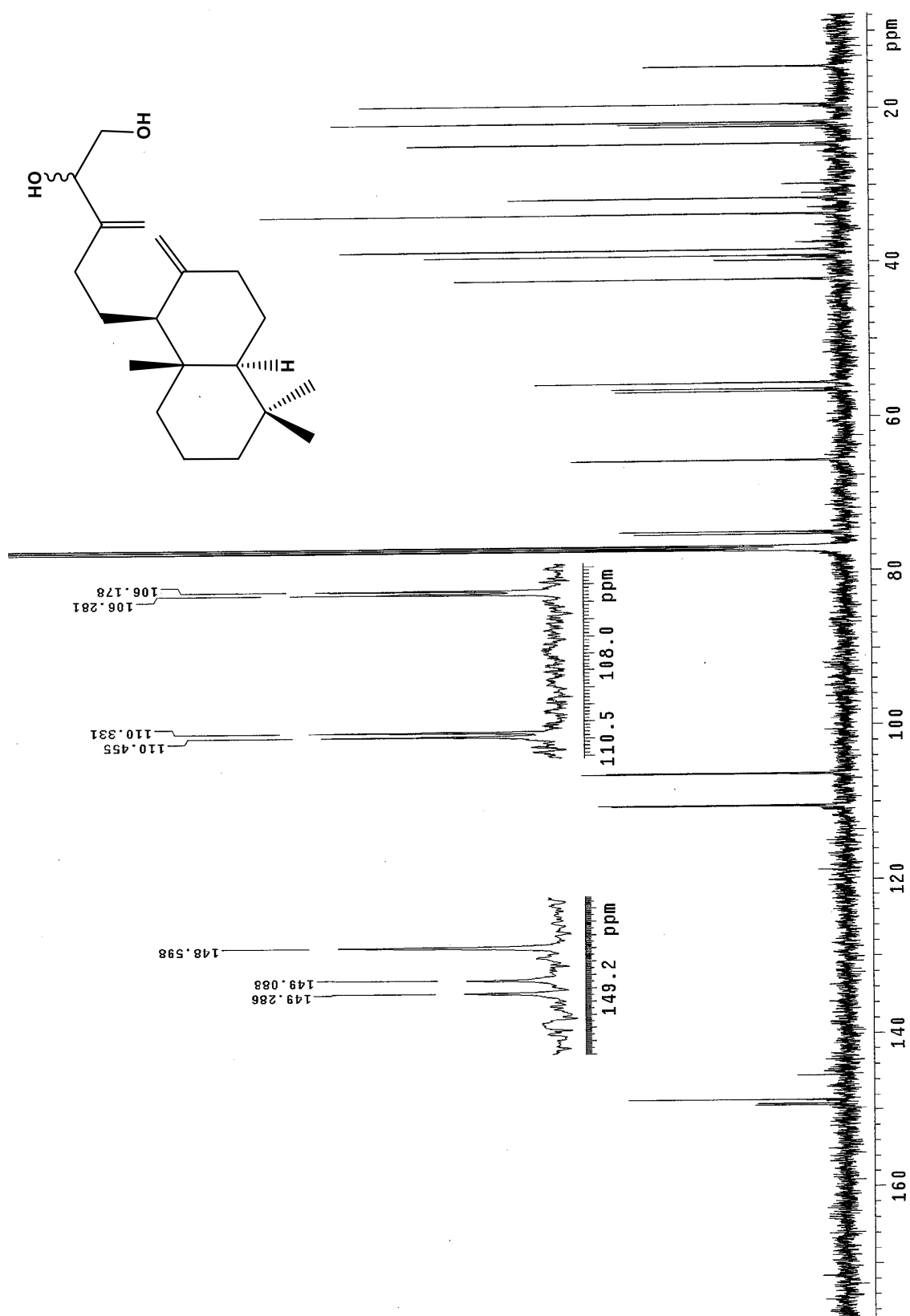


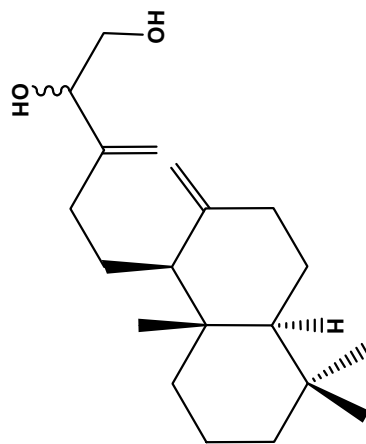
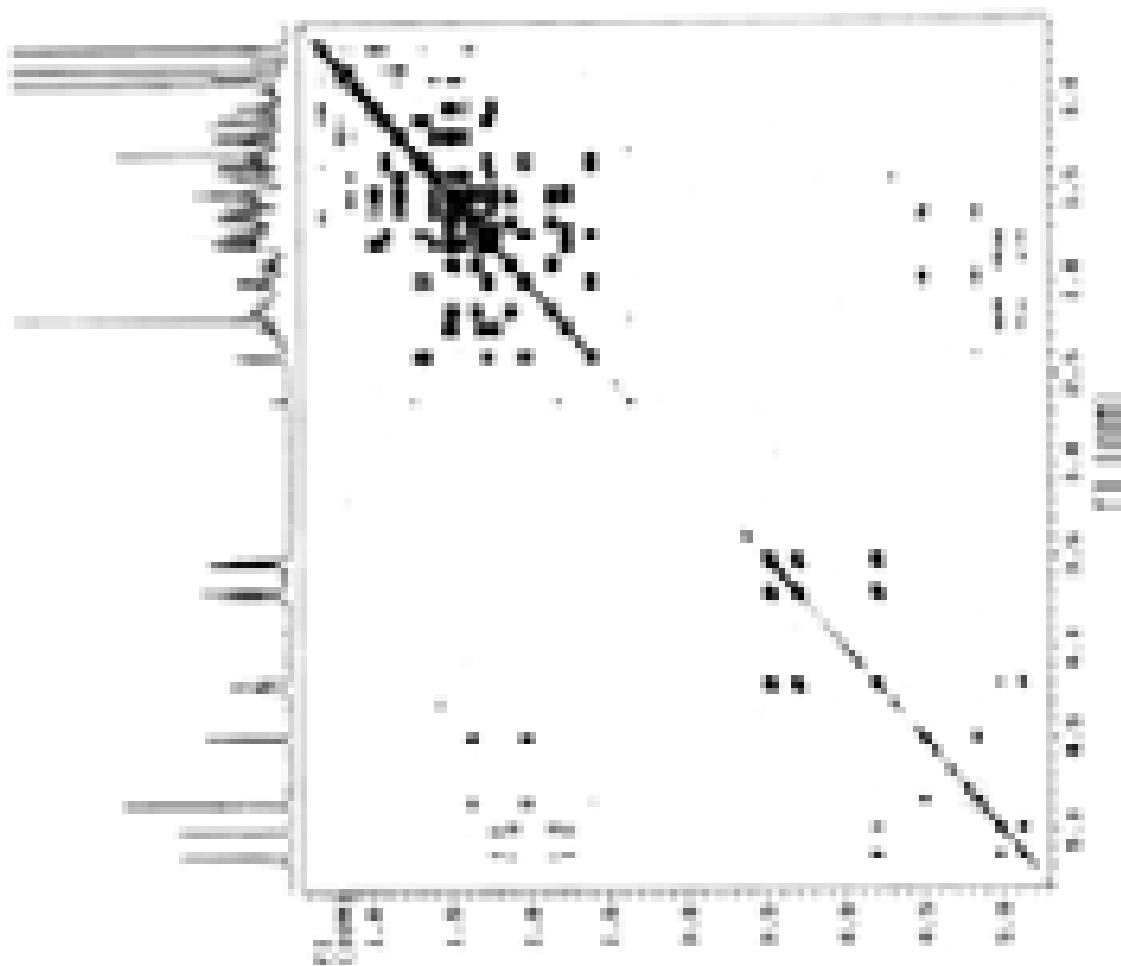
ESPECTRO 2: EM-IE de labda-8(17),13(16)-dien-14,15-diol (2a,2b)

ESPECTRO 3: RMN ^1H de labda-8(17),13(16)-dien-14,15-diol (2a,2b)

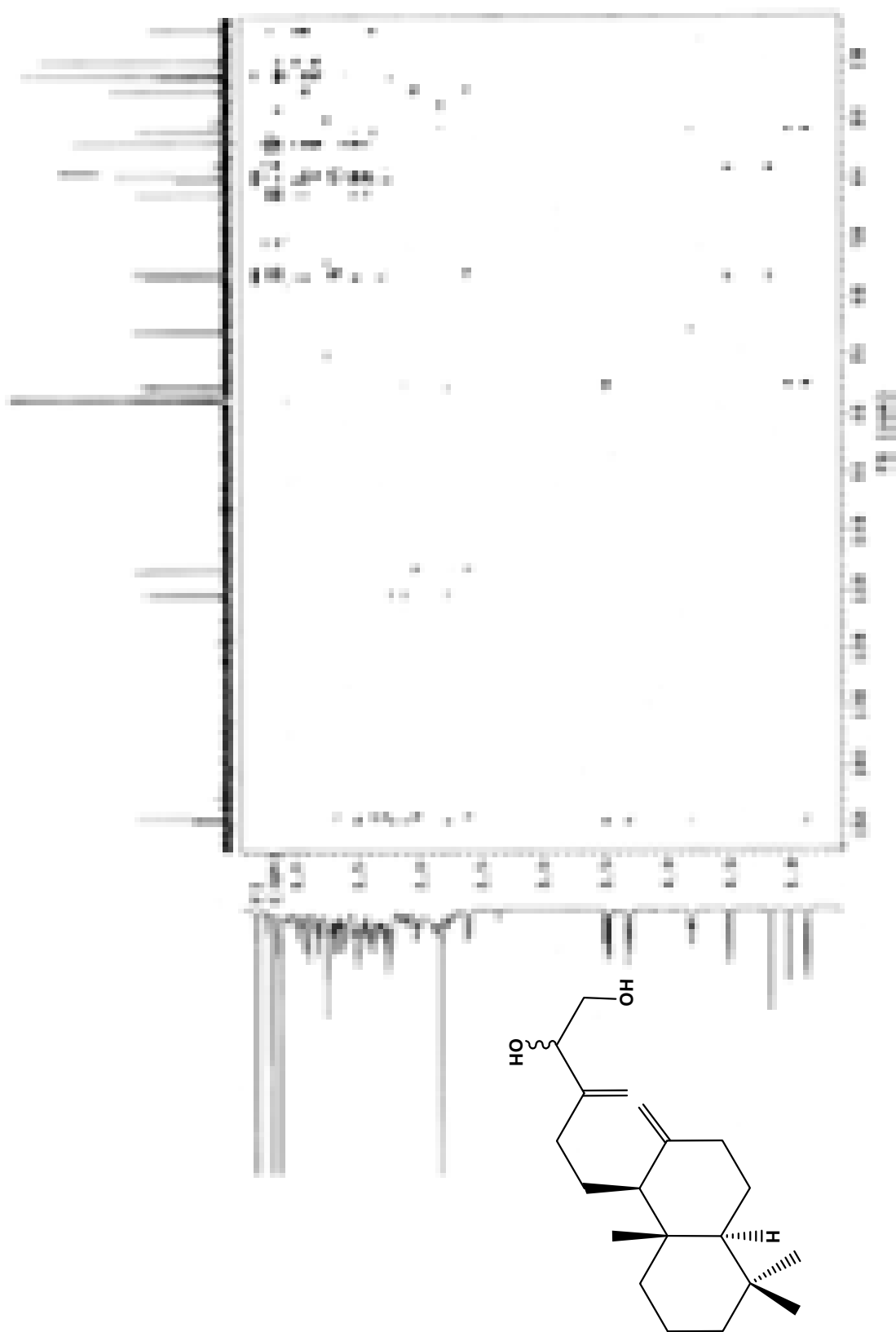


ESPECTRO 4: HSQC de labda-8(17),13(16)-dien-14,15-diol (2a,2b)

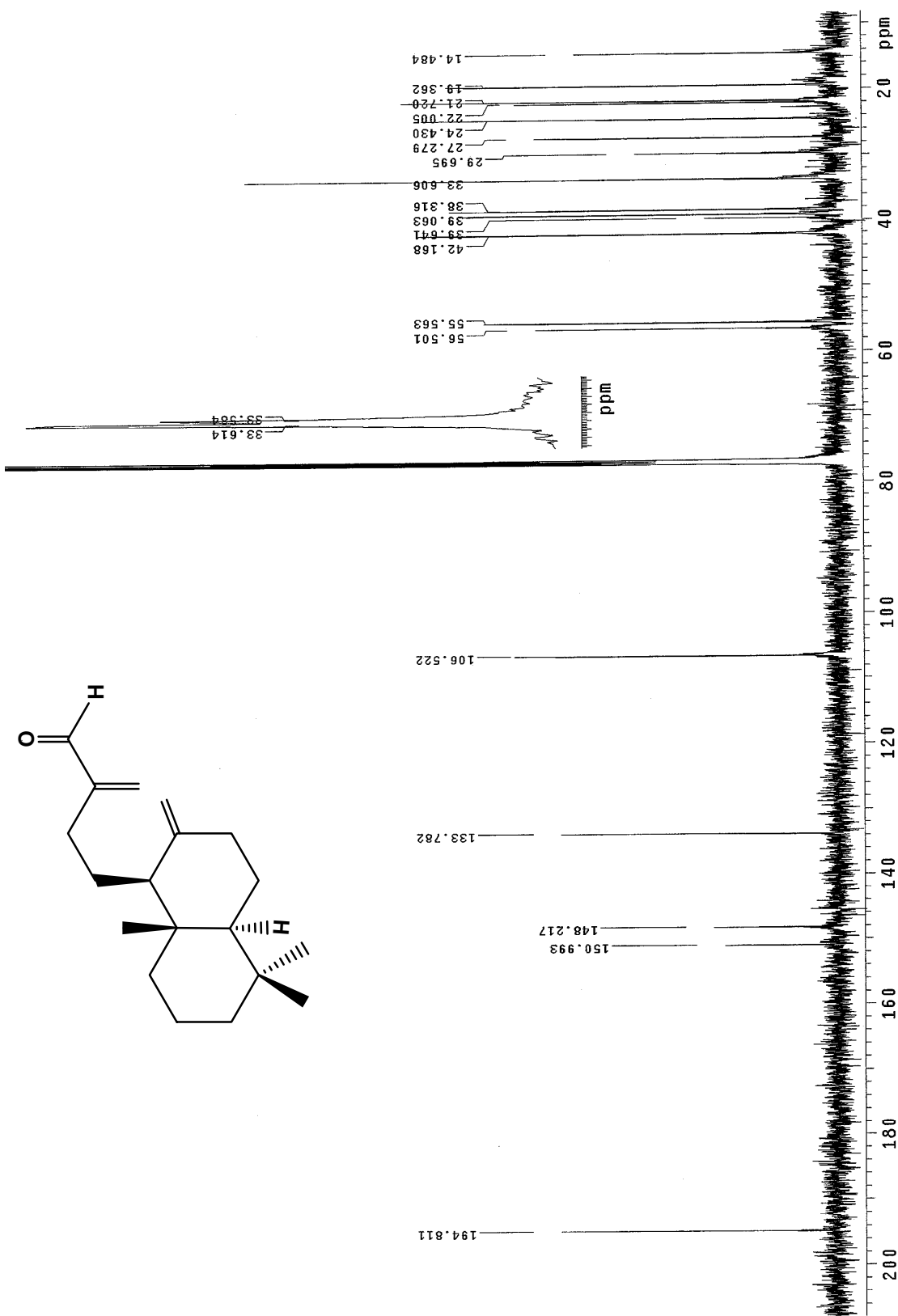
ESPECTRO 5: RMN ^{13}C de labda-8(17),13(16)-dien-14,15-diol (2a,2b)



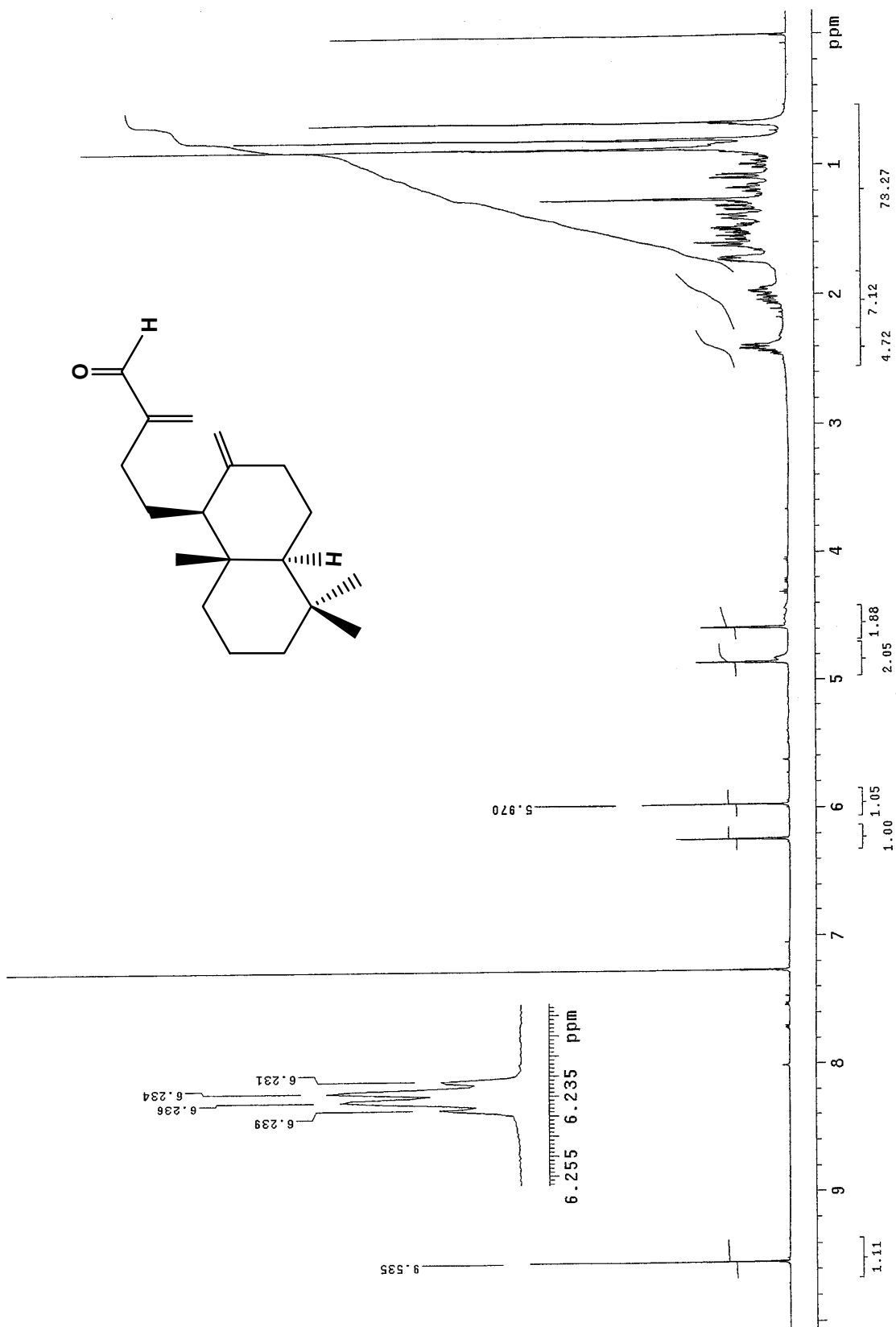
ESPECTRO 6: COSY de labda-8(17),13(16)-dien-14,15-diol (2a,2b)



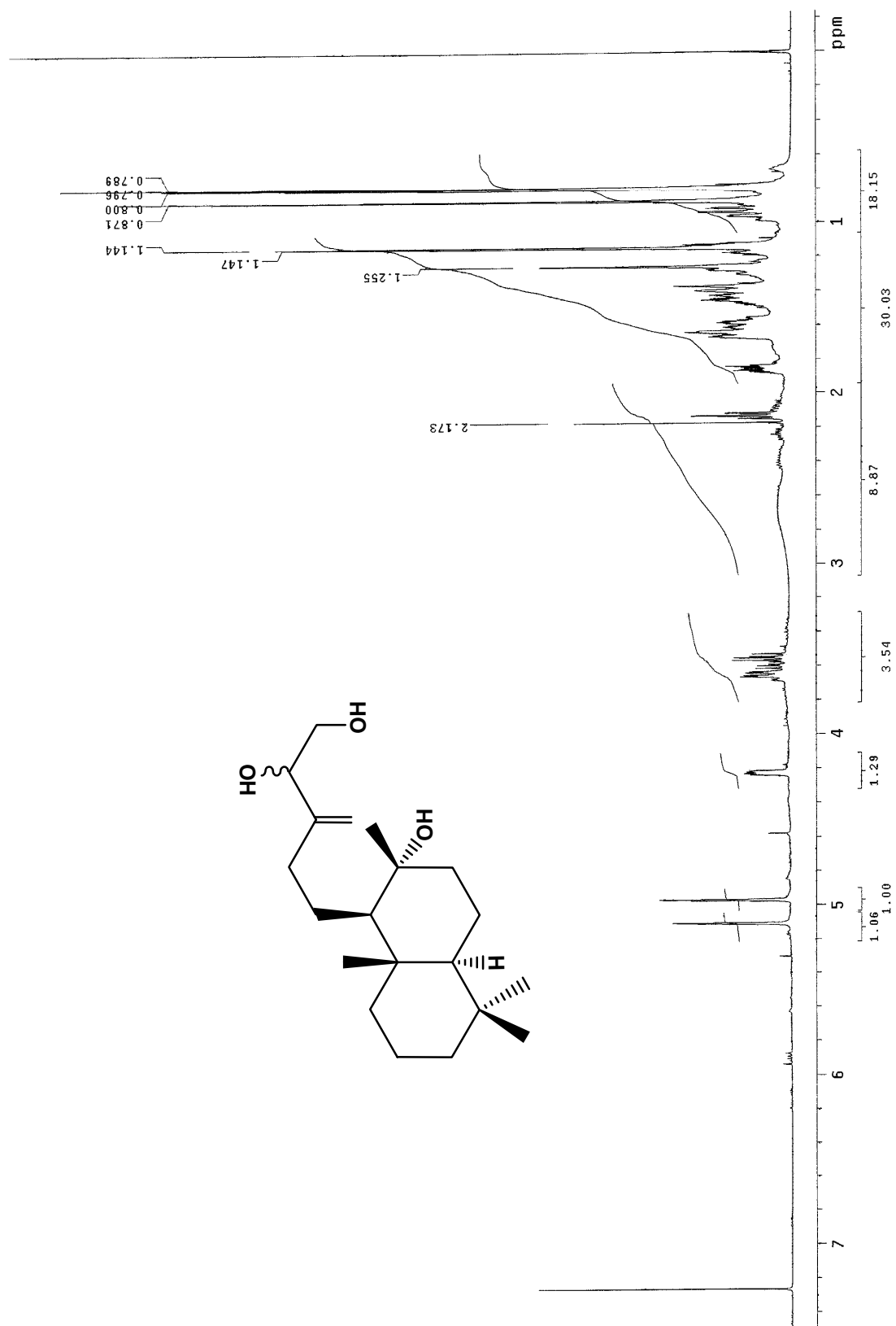
ESPECTRO 7: HMBC de labda-8(17),13(16)-dien-14,15-diol (2a,2b)



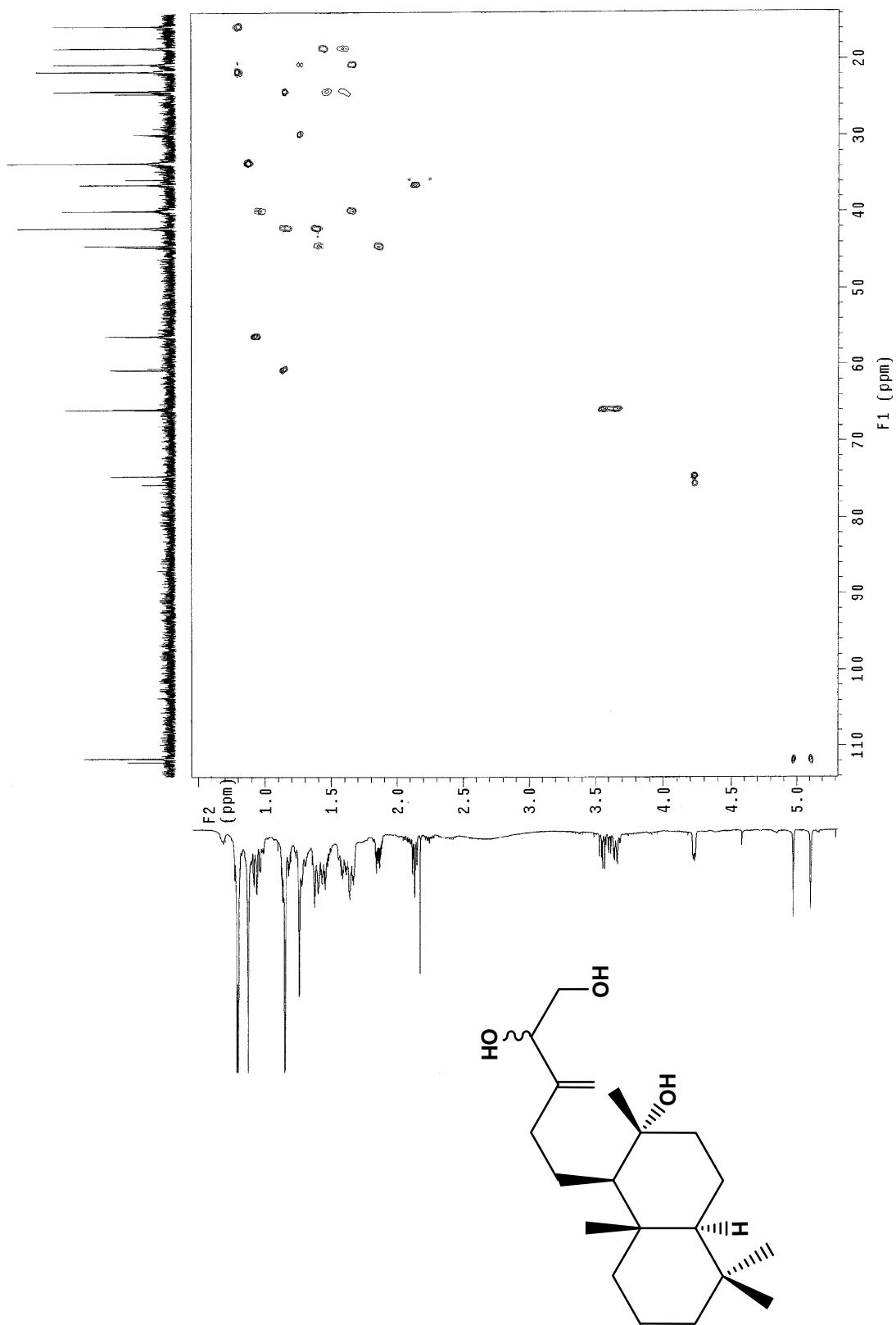
ESPECTRO 8: RMN ^{13}C de 15-nor-labda-8(17),13(16)-dien-14 al (10)

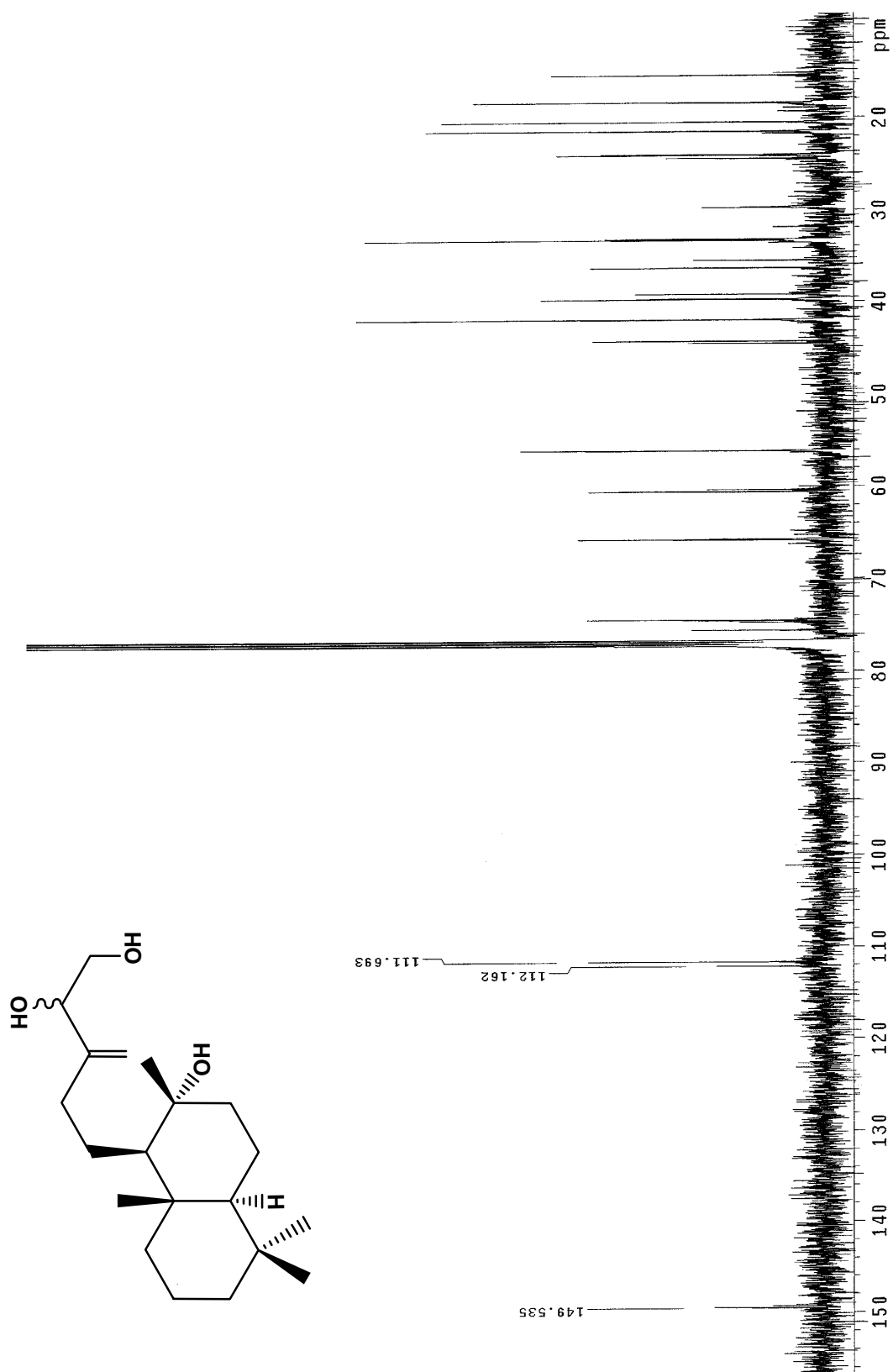


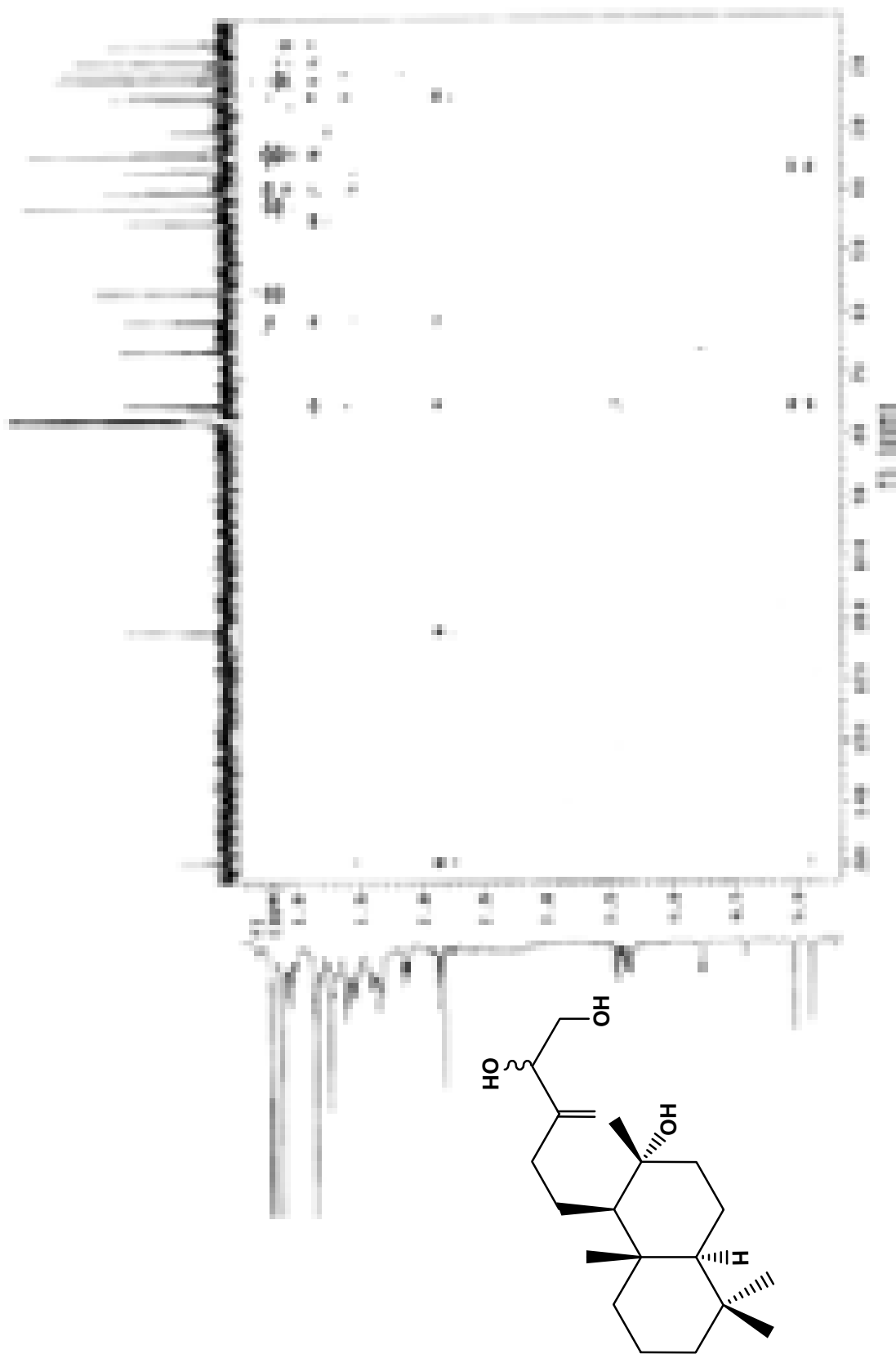
ESPECTRO 9: RMN ¹H de 15-nor-labda-8(17),13(16)-dien-14 al (10)

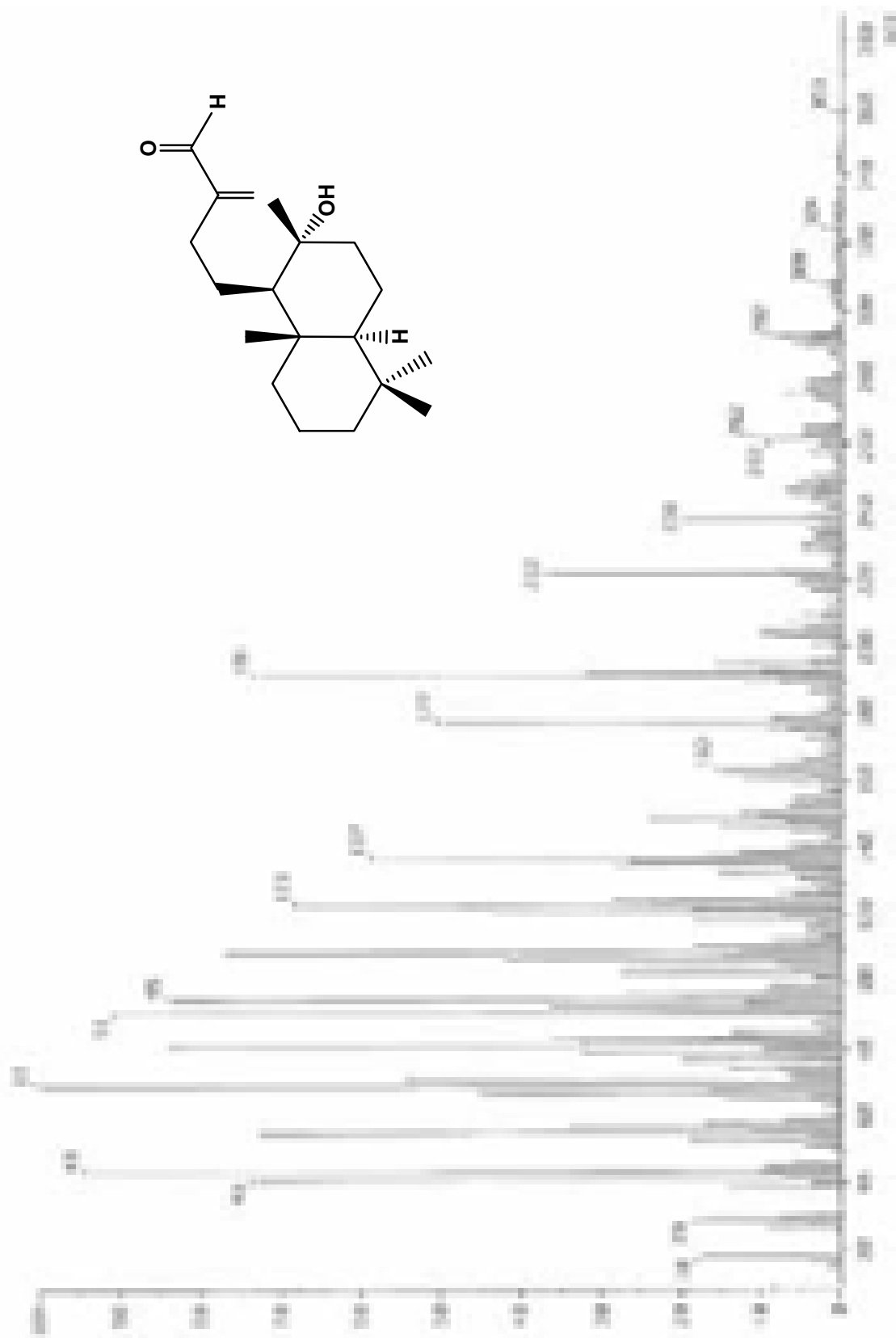


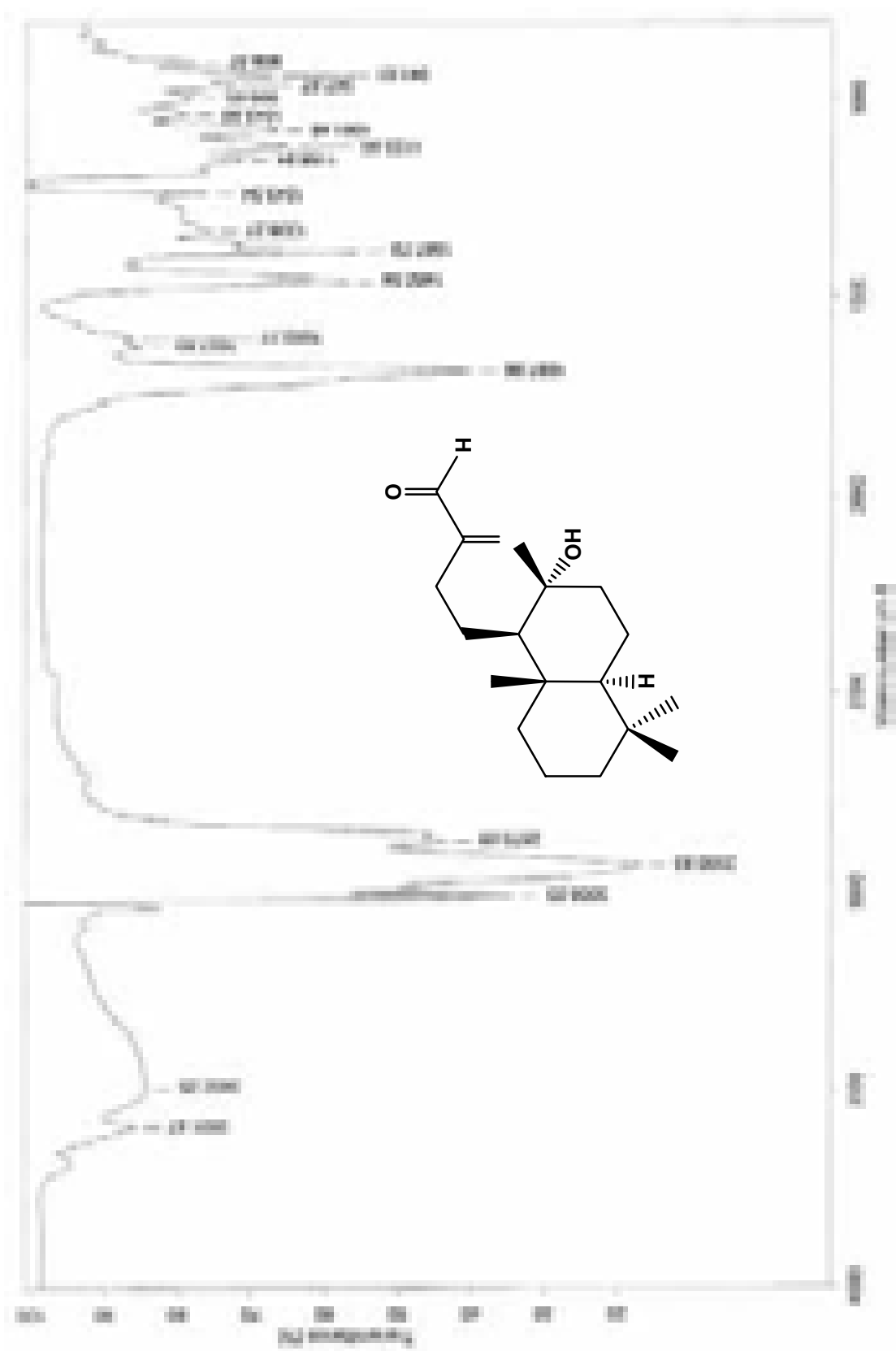
ESPECTRO 10: RMN ¹H de labd-13(16)-en-8 α .14.15 triol (5a.5b)

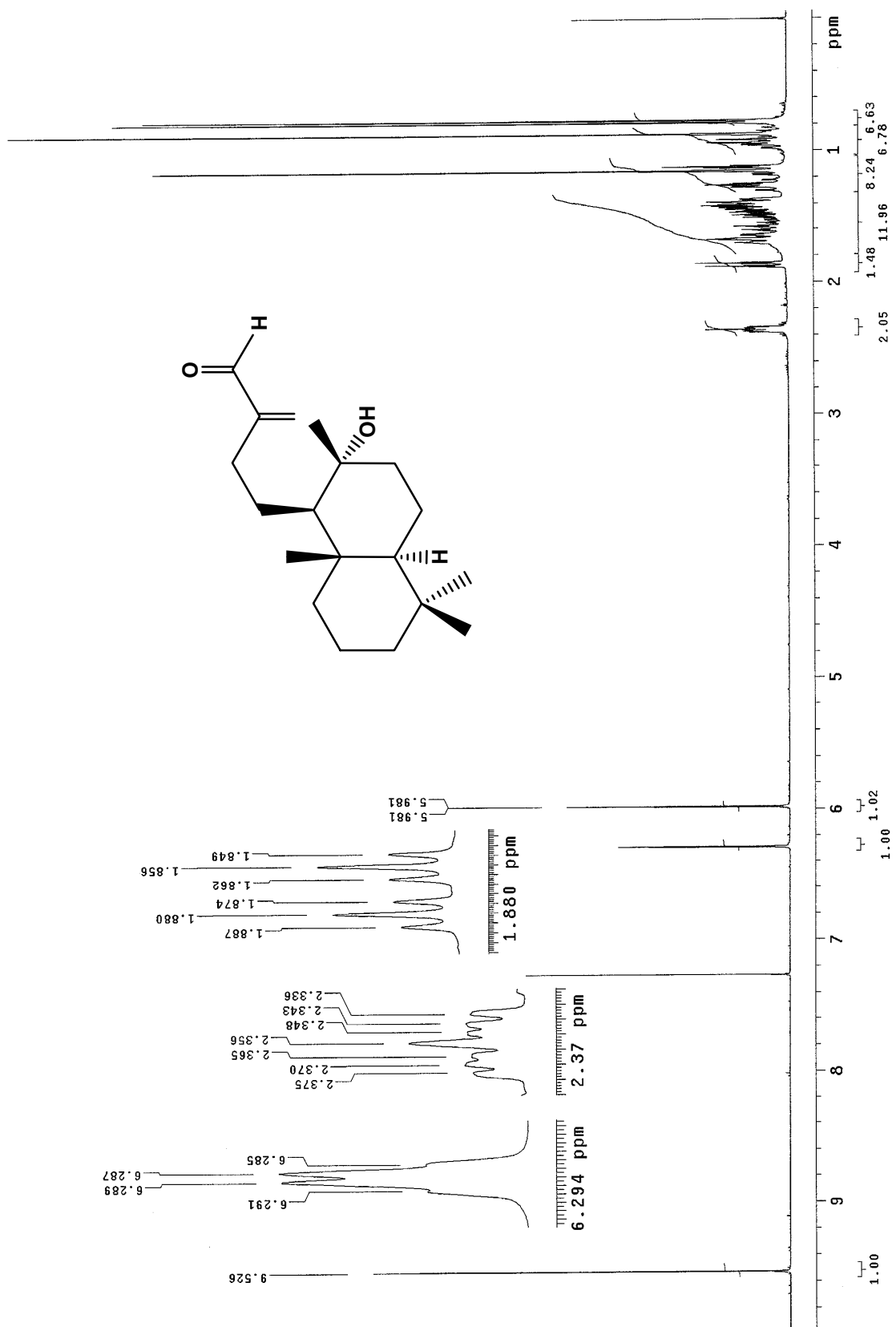
ESPECTRO 11: HSQC de labd-13(16)-en-8 α .14.15 triol (5a.5b)

ESPECTRO 12: RMN ^{13}C de labd-13(16)-en-8 α ,14,15 triol (5a,5b)

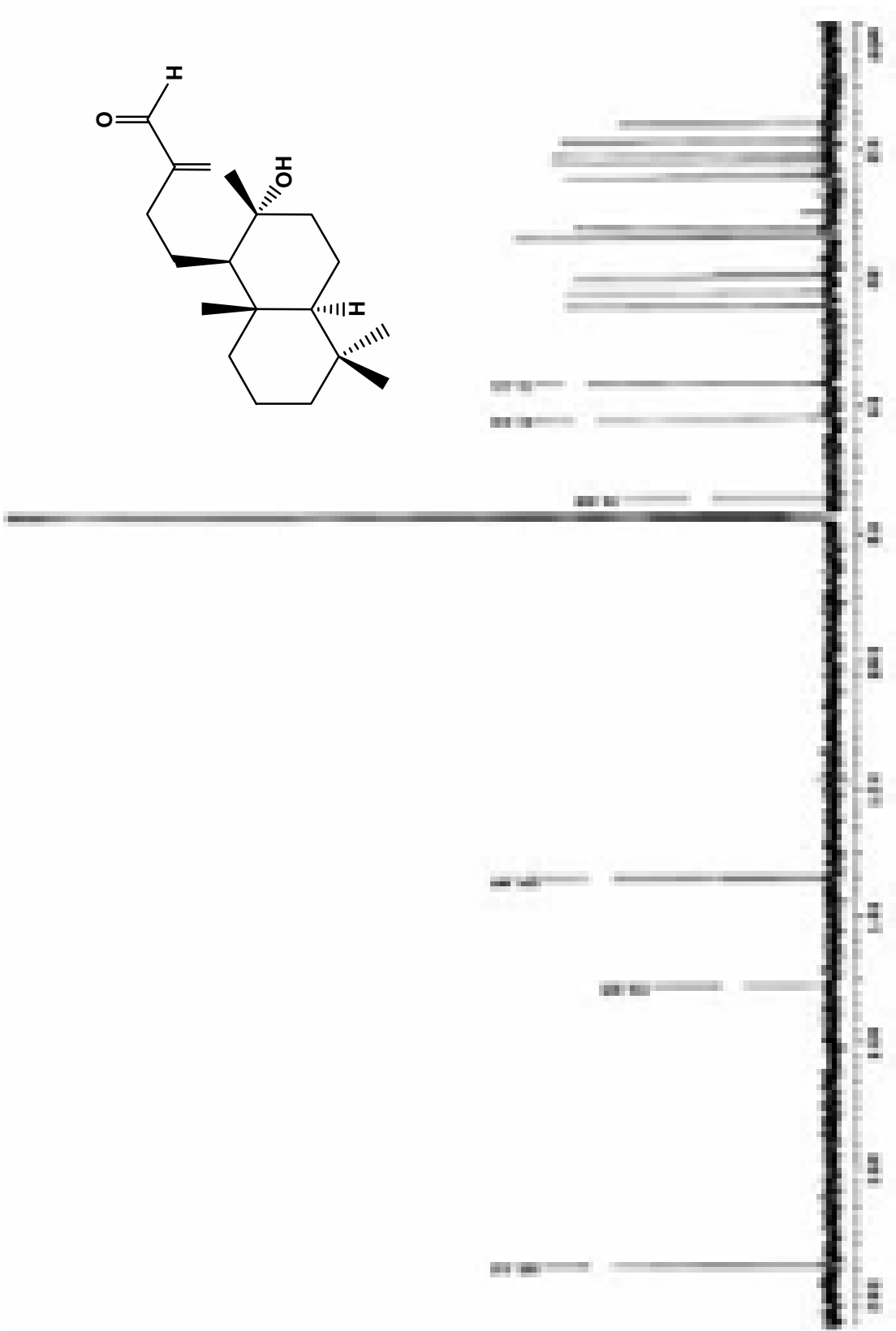
ESPECTRO 13: HMBC de labd-13(16)-en-8 α .14.15 triol (5a.5b)

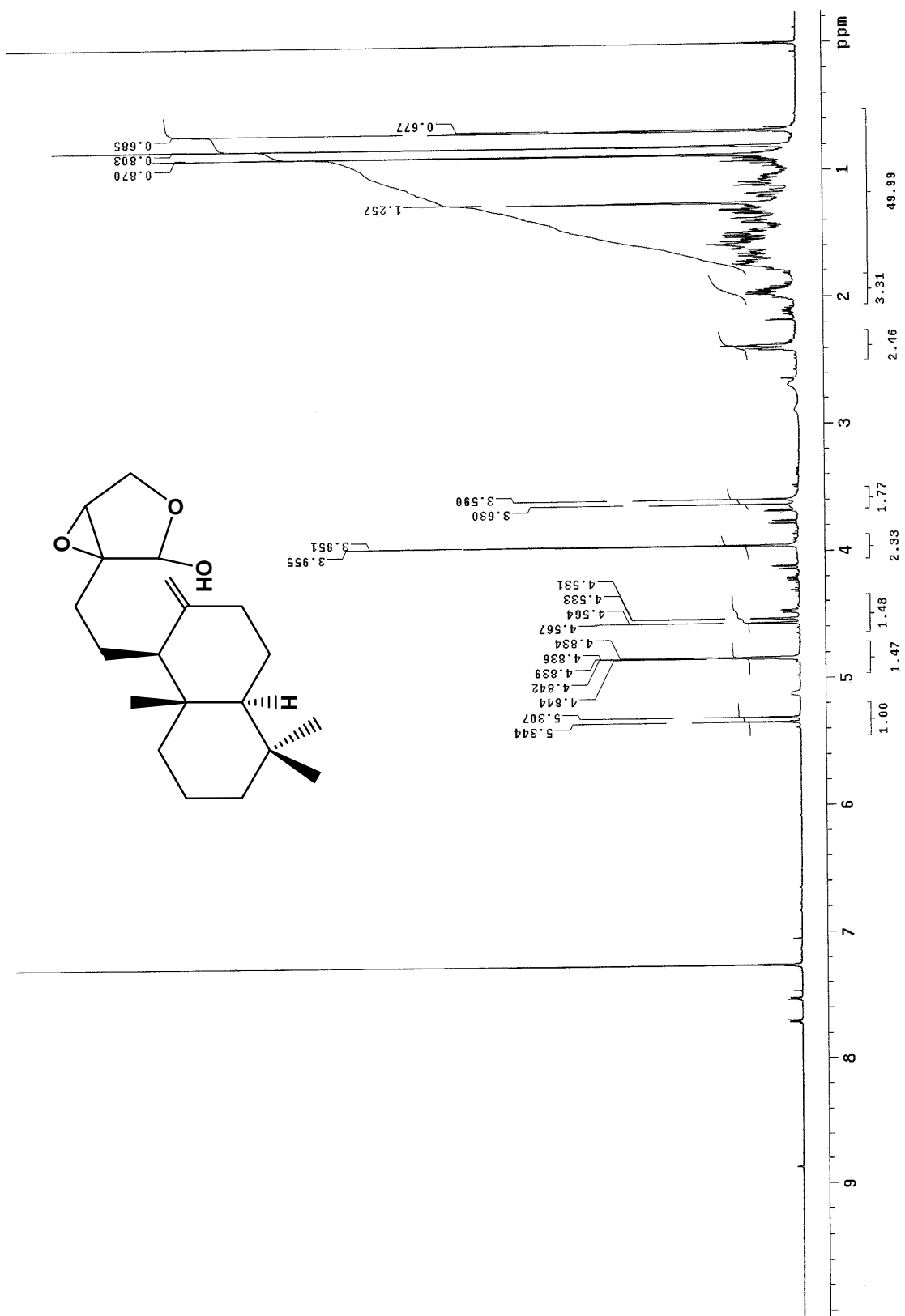
ESPECTRO 14: EM-IE de 15-nor-8 α -hidroxi-labd-13(16)-en-14-al (11)

ESPECTRO 15: IR de 15-nor-8 α -hidroxi-labd-13(16)-en-14-al (11)

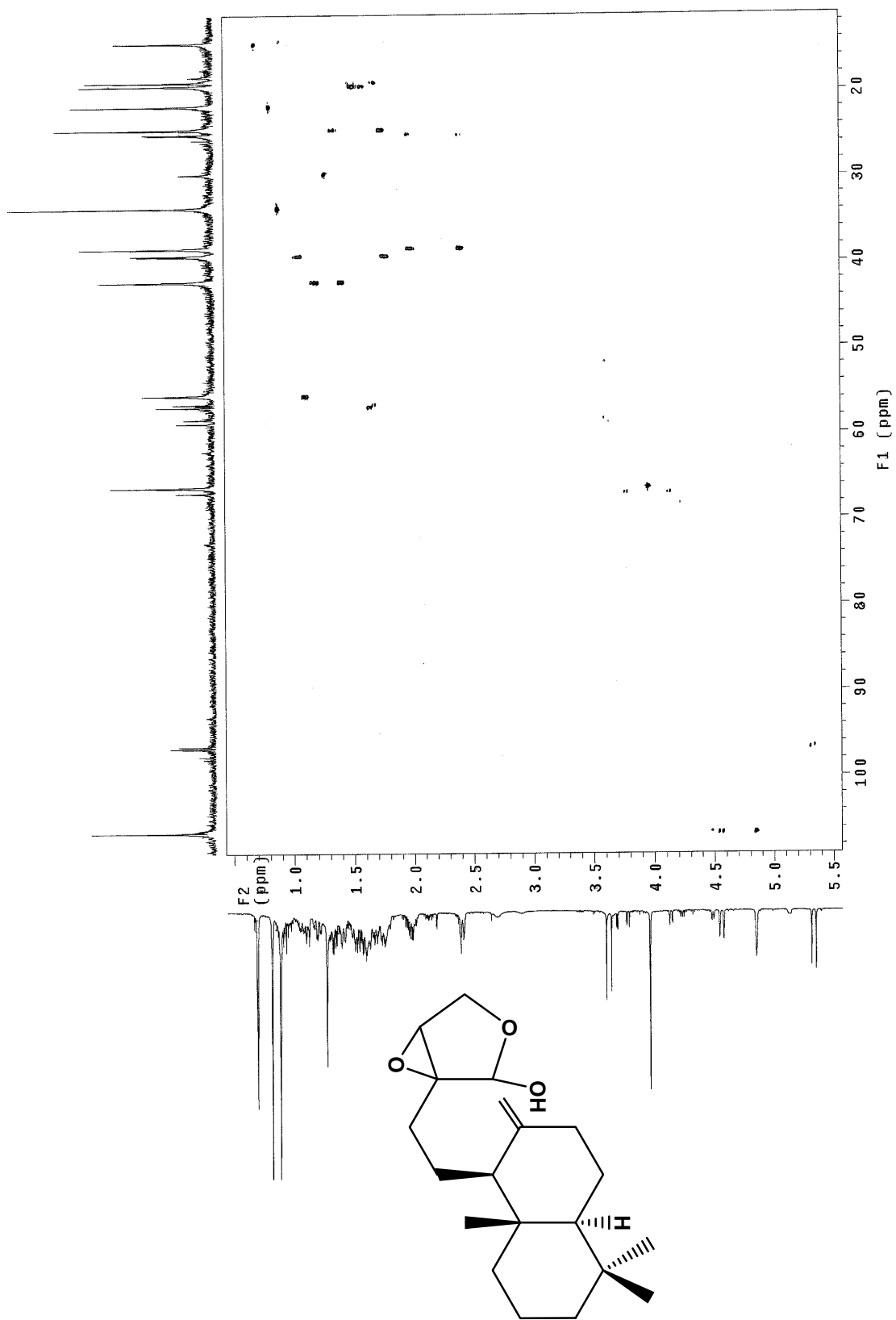


ESPECTRO 16: RMN ¹H de 15-nor-8α-hidroxi-labd-13(16)-en-14-al (11)

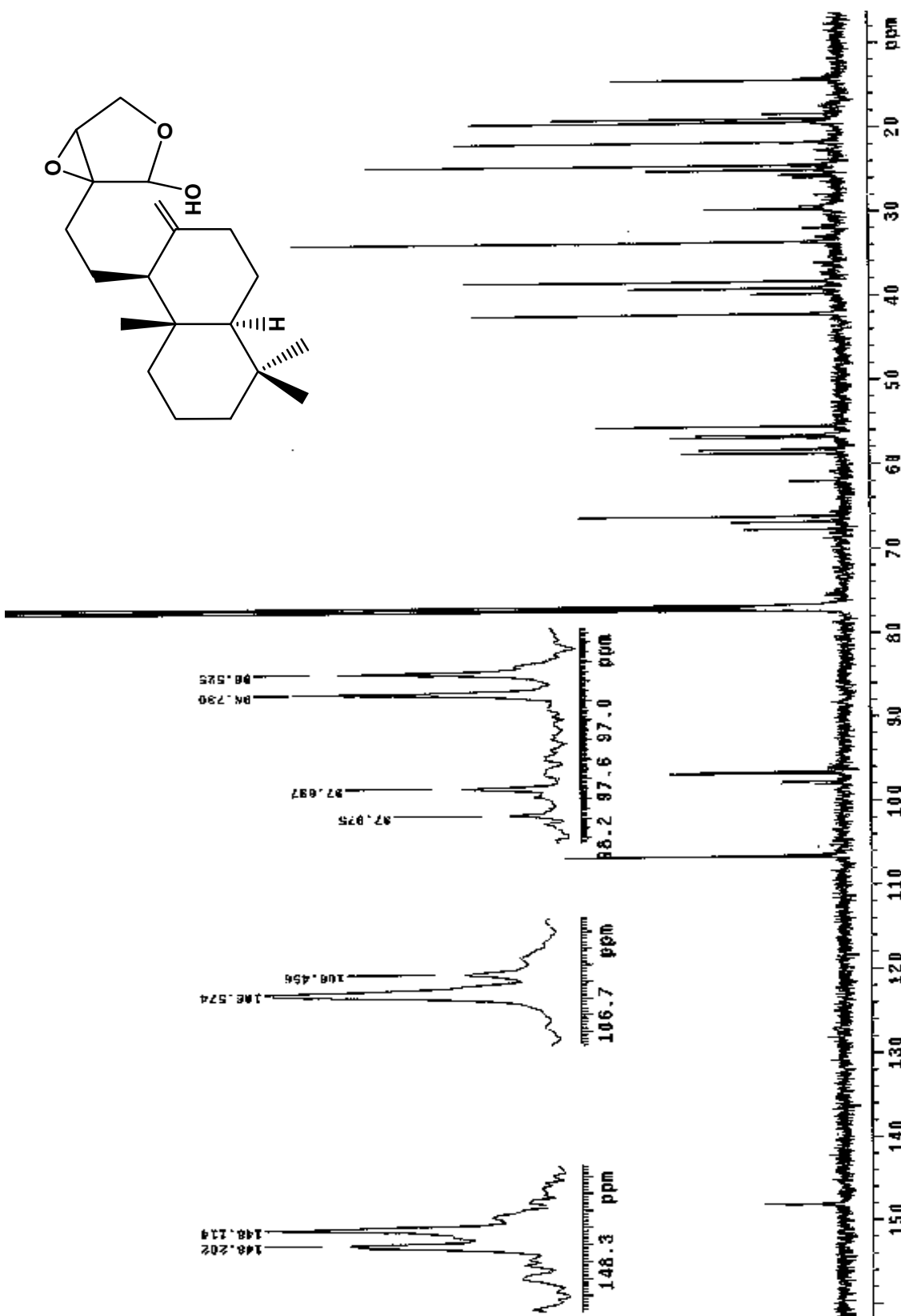
ESPECTRO 17: RMN ^{13}C de 15-nor-8 α -hidroxi-labd-13(16)-en-14-al (11)

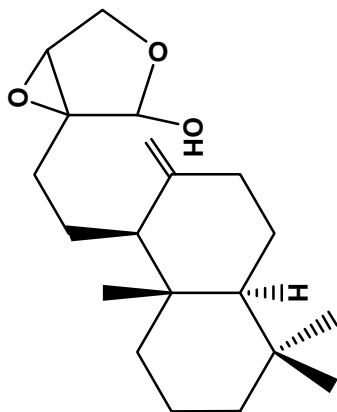
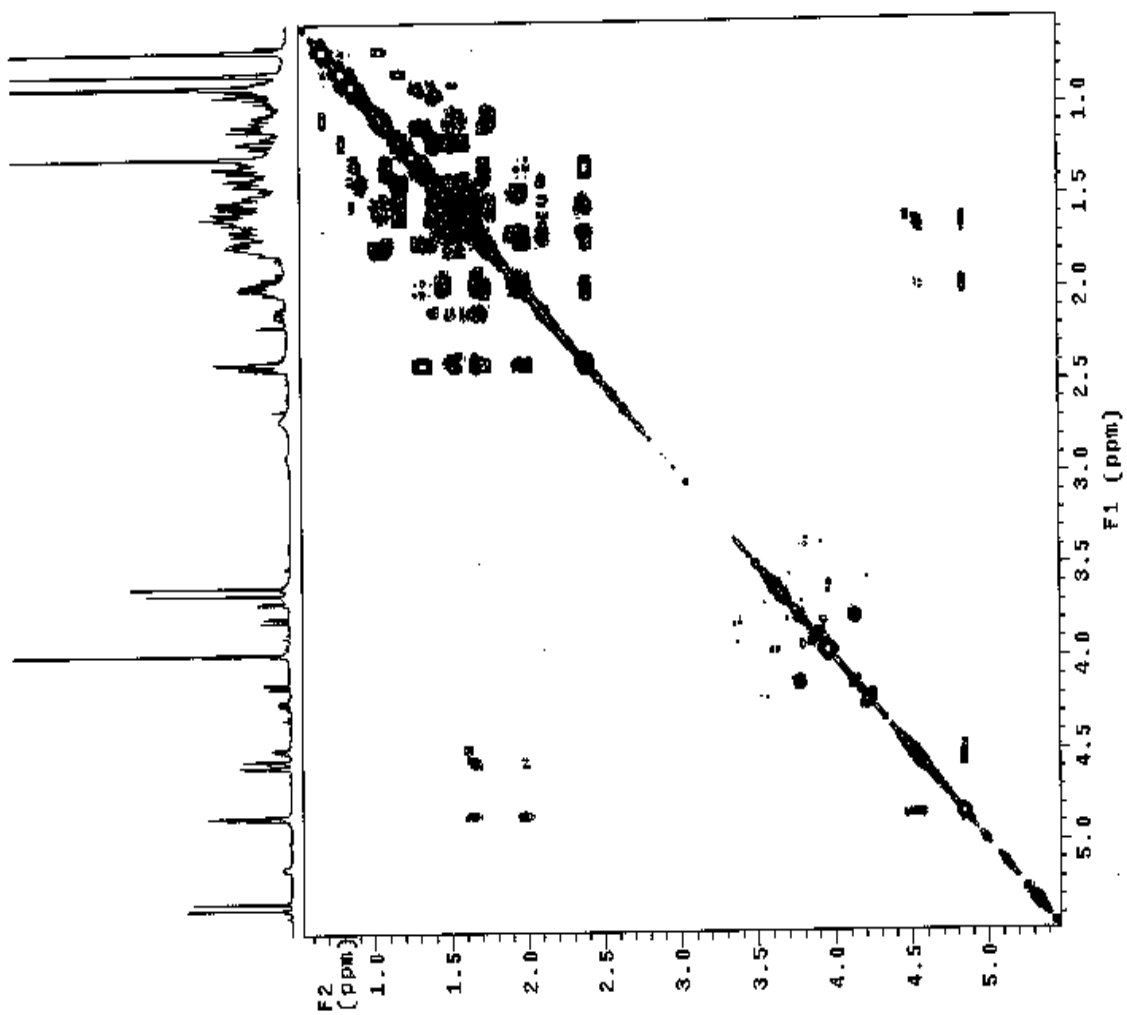


ESPECTRO 18: RMN ¹H de 13,14:15,16-diepoxi-labd-8(17)-en-16-ol (1a,1b)

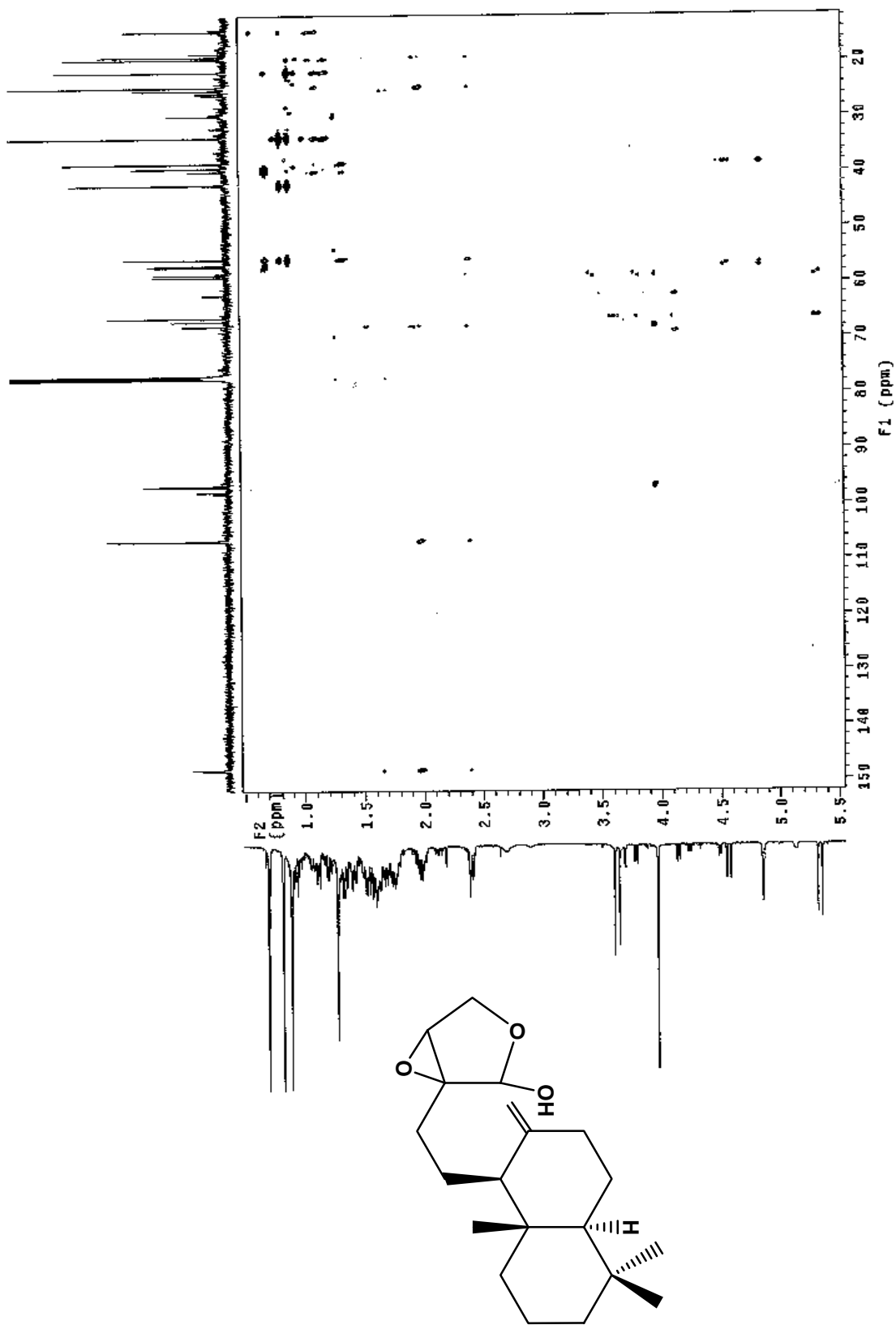


ESPECTRO 19: HSQC de 13,14:15,16-diepoxi-labd-8(17)-en-16-ol (1a,1b)

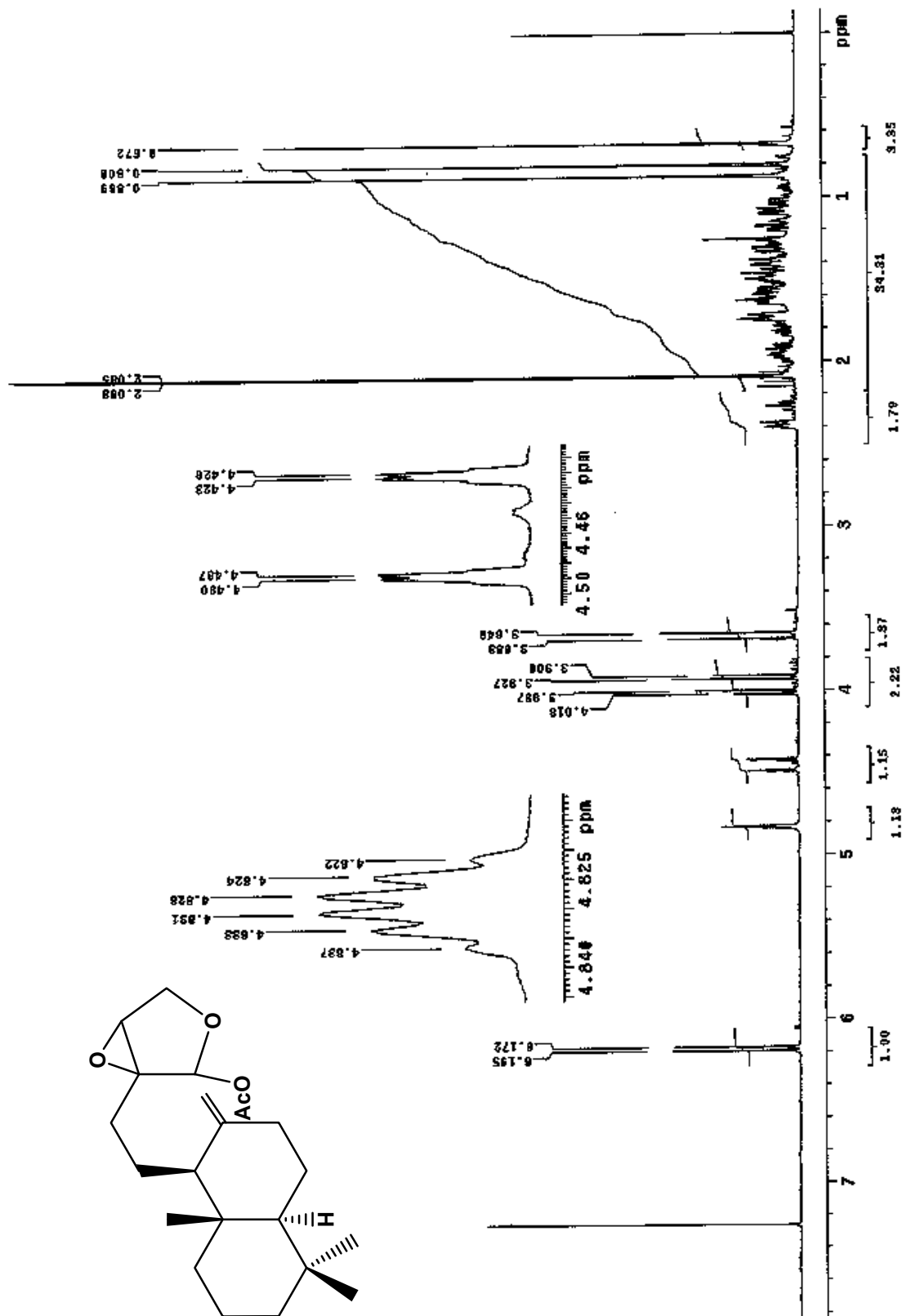
ESPECTRO 20: RMN ^{13}C de 13,14:15,16-diepoxi-labd-8(17)-en-16-ol (1a,1b)

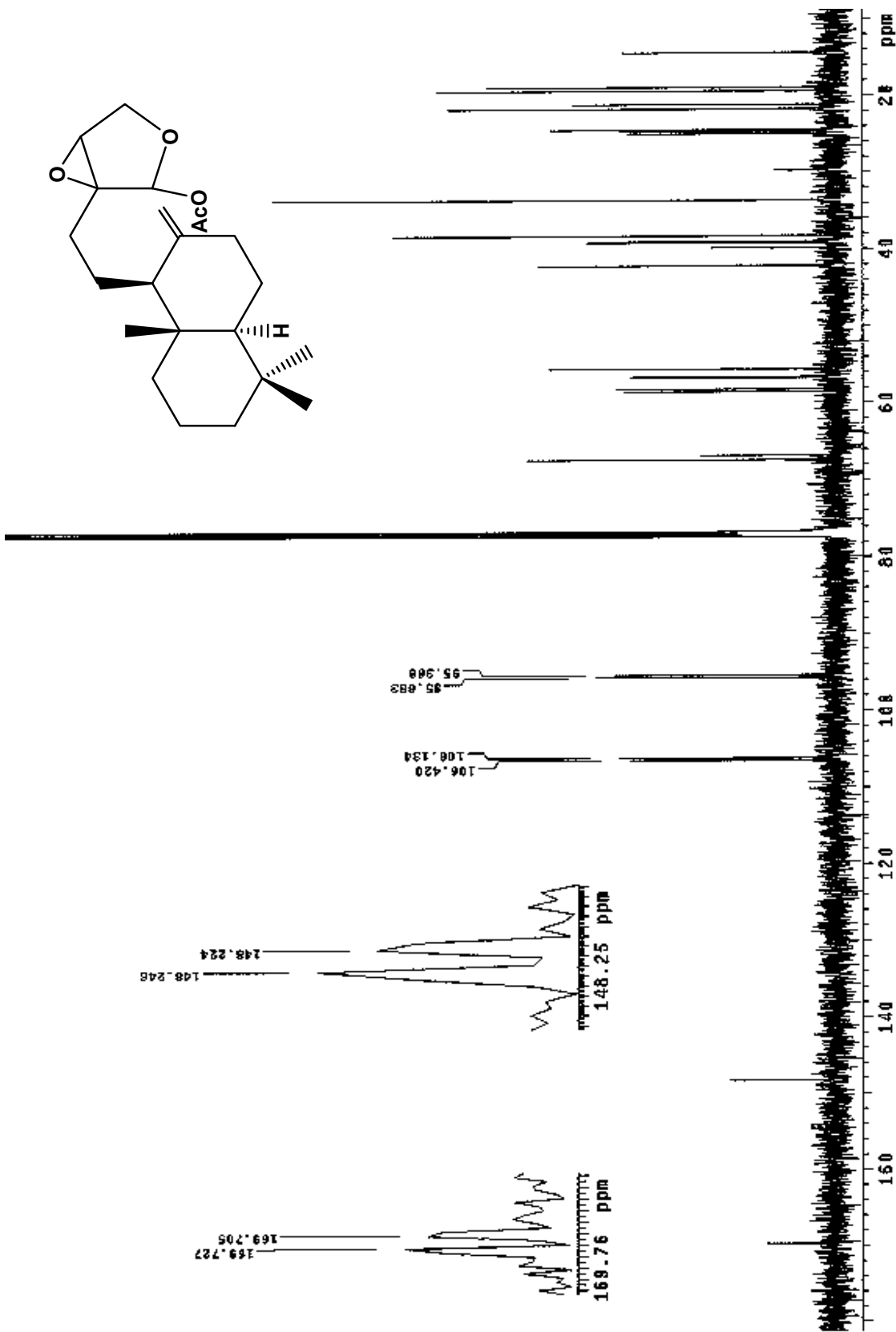


ESPECTRO 21: COSY de 13,14:15,16-diepoxi-labd-8(17)-en-16-ol (1a,1b)

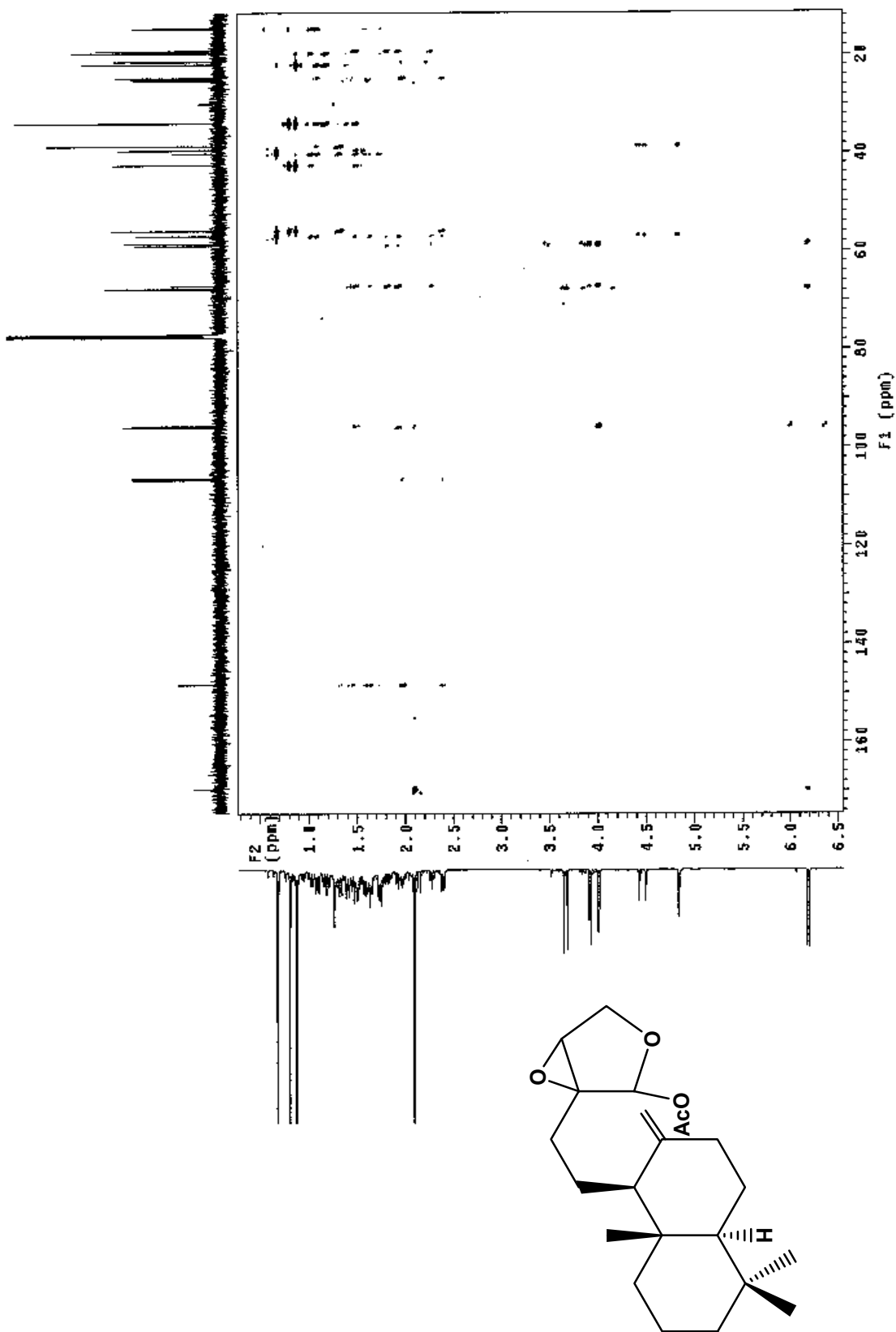


ESPECTRO 22: HMBC de 13,14:15,16-diepoxi-labd-8(17)-en-16-ol (1a,1b)

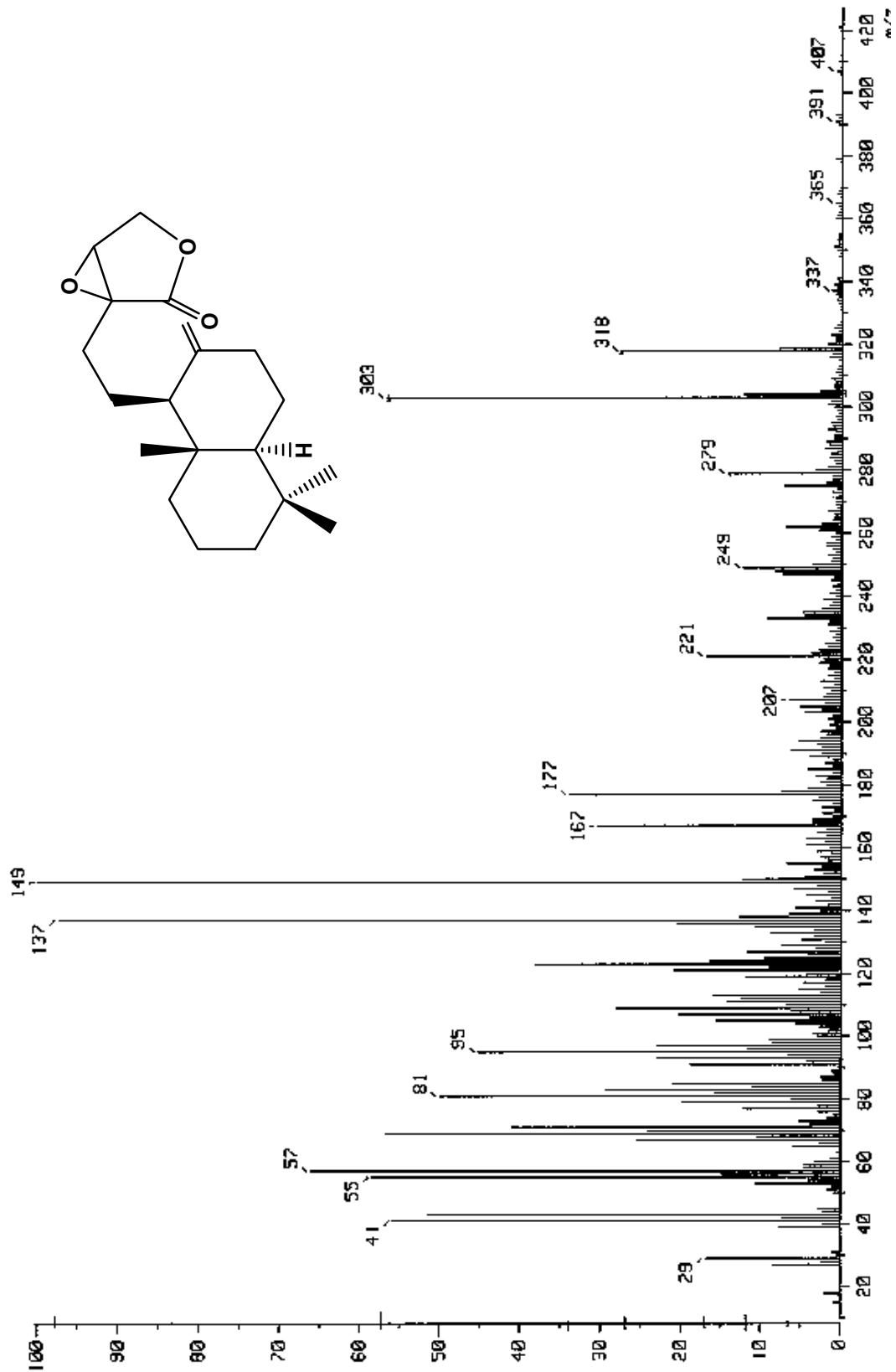




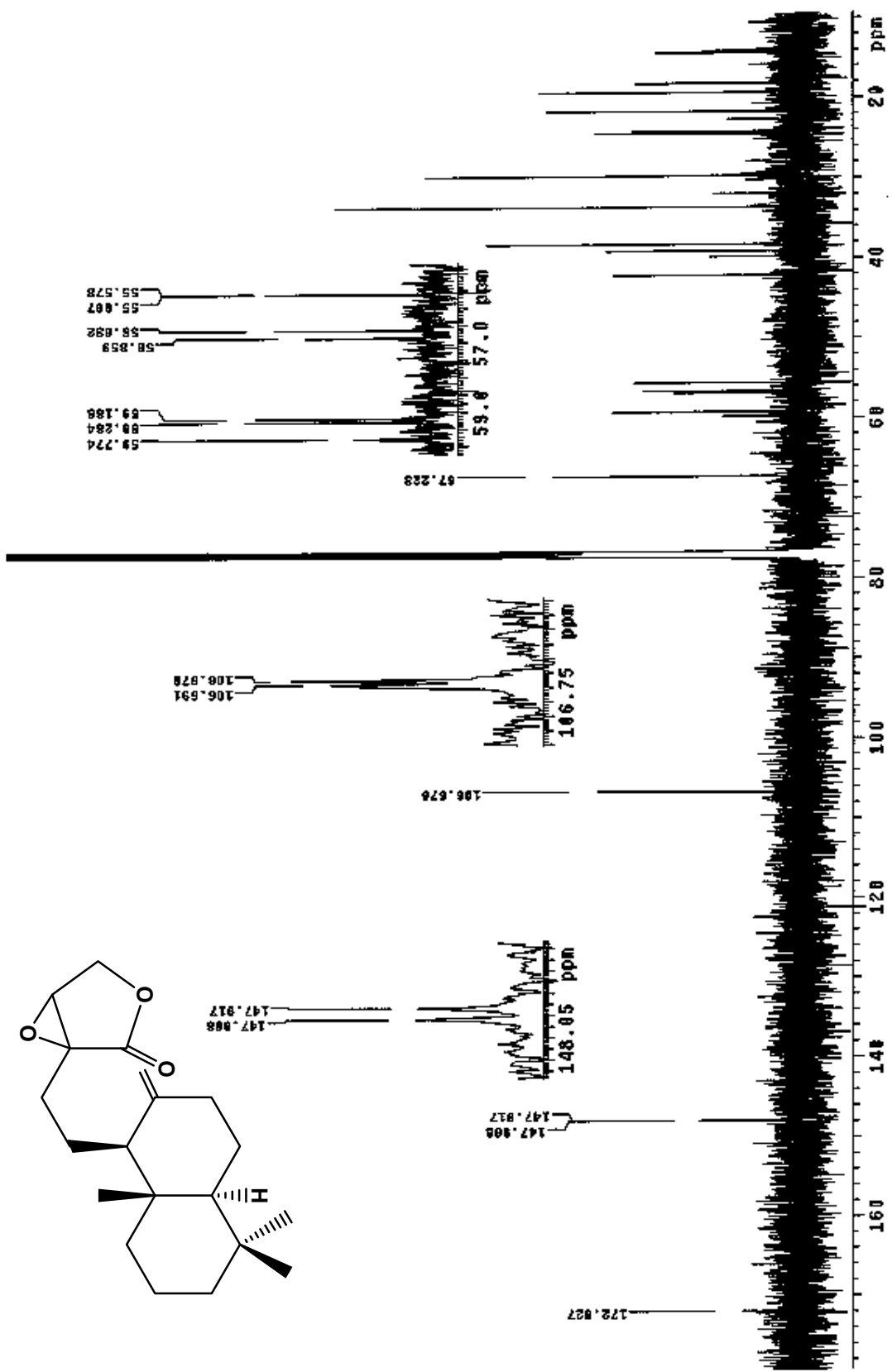
ESPECTRO 24: ^{13}C de 16-O-acetil-13,14:15,16-diepoxi-labd-8(17)-en (8a,8b)



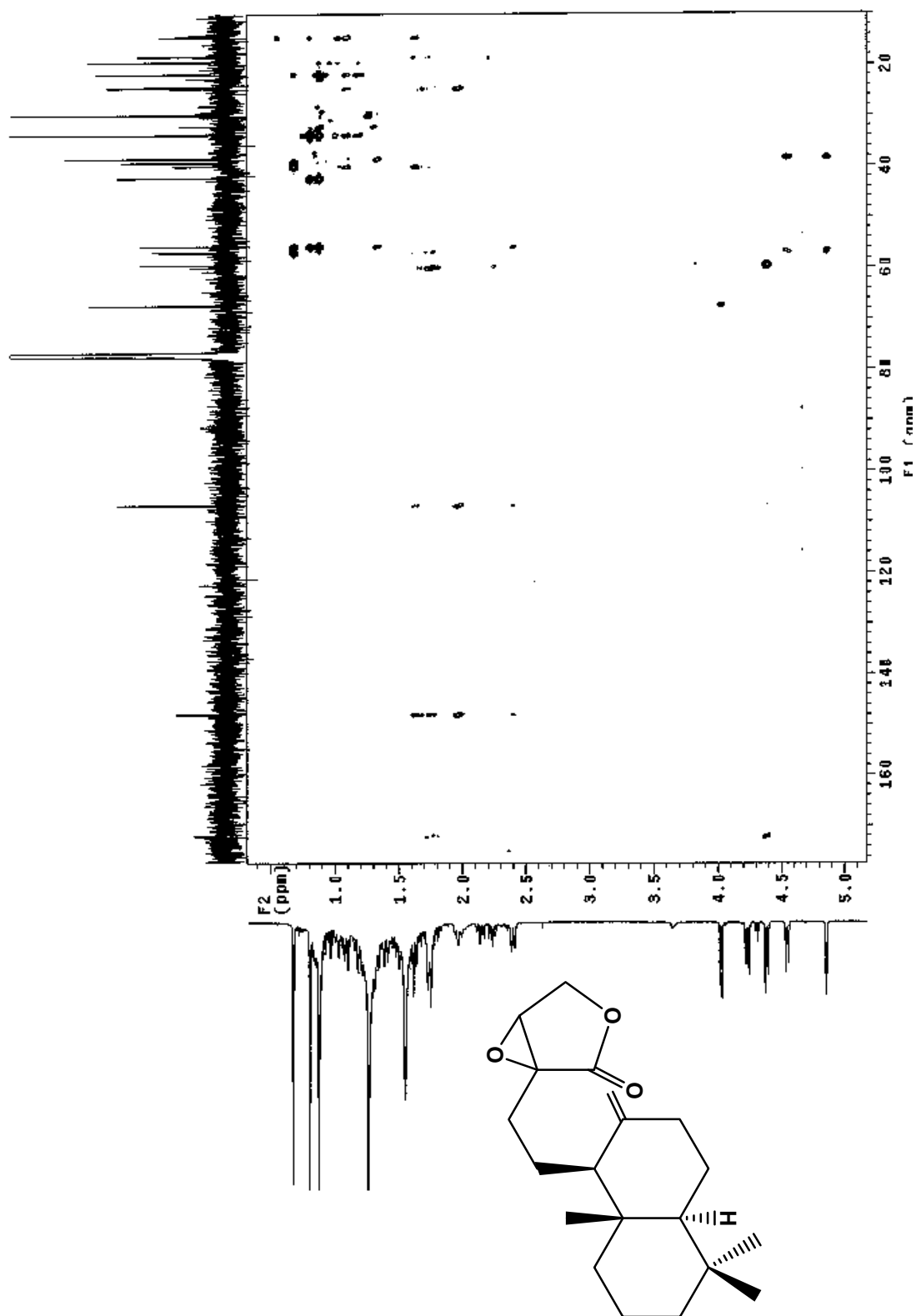
ESPECTRO 25: HMBC de 16-O-acetil-13,14:15,16-diepoxi-labd-8(17)-en (8a,8b)



ESPECTRO 26: EM-EI de 13,14-epoxi-labd-8(17)-en-15,16-olida (9a,9b)



ESPECTRO 27: RMN ^{13}C de 13,14-epoxi-labd-8(17)-en-15,16-olida (9a,9b)



9. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, F., Nagafuji, S., Okawa, M., Kinjo, J. Trypanocidal Constituents in Plants 6. Minor Withanolides from the Aerial Parts of *Physalis angulata*. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**; 54: 1226-1228.
- Ahmad, S., Malik, A., Yasmin, R., Ullah, N., Gul, W., Khan, P. M., Nawaz, H. R., Afza, N. Withanolides from *Physalis peruviana*. *Phytochemistry.* **1999**; 50: 647-651.
- Argueta V. A. (Coordinador). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Vol. III. México, D.F. Instituto Nacional Indigenista. **1994**, 1329-1351.
- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jácquez, P., López, M. E. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. México, **1994**, pp. 196.
- Barton, D. H. R., Beloeil, J. C., Billion, A., Boivin, J., Lallemand, J. Y., Lelandais, P., Mergui, S. Oxidation of Cedrol, β - and γ -Eudesmol, Sclareol, Manoyl Oxide, 1,9-Dideoxyforskolin, Methyl *trans*-Dihydrojasmonate, and Tetrahydrolinalool by the 'Gif System'. *Helv. Chim. Acta.* **1987**; 70: 2187-2200.
- Baumann, T. W., Meier, C.M. Chemical defence by withanolides during fruit development in *Physalis peruviana*. *Phytochemistry.* **1993**; 33: 317-321.
- Blom, A. G., Hilgers, L.A. Th. Sucrose fatty acid sulphate esters as novel vaccine adjuvants: effect of the chemical composition. *Vaccine.* **2004**; 23: 743-754.

- Boalino, D. M., Tinto, W. F. A new Diterpene of *Leonotis nepetaefolia*. *Heterocycles*. **2004**, 63: 383-387.
- Boonkaewwan, C., Ao, M., Toskulkao, C., Rao, M. C. Specific Immunomodulatory and Secretory Activities of Stevioside and Steviol in Intestinal Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2008**; 56: 3777-3784.
- Bruneton, J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2ª ed. Ed. Acriba, S.A. España, **2001**, pp. 455-761.
- Chinou, I., Demetzos, C., Harvala, C., Roussakis, C., Verbist, J. F. Cytotoxic and Antibacterial Labdane-Type Diterpenes from the Aerial Prts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Planta Med.* **1994**; 60: 34-36.
- Choudhary, M. I., Yousuf S., Samreen; Ahmed, S., Atta-Ur-Rahman. New leishmanicidal physalins from *Physalis minima*. *Nat. Prod. Res.* **2007**; 21: 877-883.
- Damu, A. G., Kuo, P. C., Su, C. R., Kuo, T. H., Chen, T. H., Bastow, K. F., Lee, K. H., Wu, T. S. Isolation, Structures and Structure-Cytotoxic Activity Relationships of Withanolides and Physalins from *Physalis angulata*. *J. Nat. Prod.* **2007**; 70: 1146-1152.
- Demetzos, C., Dimas, K. S. Labdane-Type Diterpenes: Chemistry and Biological Activity en: *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 25. Pakistan, **2001**, pp. 235-292.
- Dewick, P. M. The biosynthesis of C₅-C₂₅ terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.* **2002**; 19: 181-222.

- De Young, L. M., Kheifets, J. B., Ballaron, S. L., Young, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents and Actions*. **1989**; 26: 335-341.
- Forster, P. G., Ghisalberti, E. L., Jefferies, P. R. Labdane Diterpenes from an *Acacia* species. *Phytochemistry*. **1985**; 24: 2991-2993.
- Fox, M. A., Whitesell, J. K. Química orgánica. 2ª ed. Ed. Addison Wesley Longman. México, **2000**, Capítulo: 17-36.
- Giang, P. M., Son, P. T., Matsunami, K., Otsuka, H. New Labdane-Type Diterpenoids from *Leonurus heterophyllus* Sw. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**; 53: 938-941.
- Gu, J. Q., Li, W., Kang, Y. H., Su, B. N., Fong, H. H. S., van Breemen, R. B., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. Minor Withanolides from *Physalis philadelphica*: Structures, Quinone Reductase Induction Activities and Liquid Chromatography (LC)-MS-MS Investigation as Artifacts. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**; 51: 530-539.
- Hernández, F. Historia de las plantas de Nueva España. Tomo III (libros 5º, 6º y 7º). Instituto de Biología, UNAM. Imprenta Universitaria, México, **1946**, pp. 704-706.
- King, R. R., Singh, R. P. Elucidation of structures for a unique class of 2,3,4,3'-tetra-O-acylated sucrose esters from the type B glandular trichomes of *Solanum neocardenasii* Hawkes & Hjerting. *Carbohydr. Res.* **1988**; 173: 235-241.

- King, R. R., Calhoun, L. A., Singh, R. P., Boucher, A. Characterization of 2,3,4,3'-Tetra-O-acylated Sucrose Esters Associated with the Glandular Trichomes of *Lycopersicon typicum*. *J. Agric. Food Chem.* **1993**; 41: 469-473.
- Knöss, W., Reuter, B. Biosynthesis of isoprenic units via different pathways: Occurrence and future prospects. *Pharmaceutica Acta Helvetiae.* **1998**; 73: 45-52.
- Kobayashi, W., Miyase, T., Suzuki, S., Noguchi, H., Chen, X. M. Oligosaccharide Esters from the Rotos of *Polygala arillata*. *J. Nat. Prod.* **2000**; 63:1066-1069.
- Koh, L. L., Ng, A. S. Structures of Two Flavonoids from *Physalis minima*, 5-Methoxy-5,7-methylene-dioxyflavone (I) and 5,6,7-Trimethoxyflavone (II). *Acta Cryst.* **1993**; 49: 105-107.
- Kubwabo, C., Rollmann, B., Tilquin, B. Analysis of Alkaloids from *Physalis peruviana* by Capillary GC, Capillary GC-MS, and GC-FTIR. *Planta Med.* **1993**; 59: 161-163.
- La Jornada: <http://www.jornada.unam.mx/1998/06/29/cien-panorama.html>
- Latza, S., Ganber, D., Berger R. G. Carbohydrate esters of cinnamic acid from fruits of *Physalis peruviana*, *Psidium guajava* and *Vaccinium vitis-IDAEA*. *Phytochemistry.* **1996**; 43: 481-485.
- Lichtenthaler, H. K.: <http://www.mete.mtesz.hu/pls/proceedings/eloadasok-pdf/o-0-1-lichtenthaler.pdf>

- Ma, L., Ali, M., Arfan, M., Lou, L. G., Hu, L. H., Withaphysanolide A, a novel C-27 norwithanolide skeleton and other cytotoxic compounds from *Physalis divericata*. *Tetrahedron lett.* **2007**; 48: 449-452.
- Makino, B., Kawai, M., Ogura, T., Nakanishi, M., Yamamura H., Butsugan, Y. Structural revision of physalin H isolated from *Physalis angulata*. *J. Nat. Prod.* **1995**; 58: 1668-1674.
- Maldonado, E., Torres, F. R., Martínez, M., Pérez-Castorena, A. L. 18-Acetoxywithanolides from *P. chenopodifolia*. *Planta Med.* **2004**; 70: 59-64.
- Maldonado, E., Alvarado, V.E., Torres, F. R., Martínez, M., Pérez-Castorena, A. L. Androstane and Withanolides from *Physalis cinerascens*. *Planta Med.* **2005**; 71: 548-553.
- Maldonado, E., Torres, F. R., Martínez, M., Pérez-Castorena, A. L. Sucrose Esters from the Fruits of *Physalis nicandroides* var. *attenuata*. *J. Nat. Prod.* **2006**; 69: 1511-1513.
- Martínez, M. Anales del Instituto de Biología. UNAM: Serie botánica 69 (2), **1998**, pp. 71-117.
- Mata, R., Rivero, J. F. Curso Teórico de Farmacognosia. Material Didáctico. Segunda Versión. UNAM, México, **2001**, pp. 140
- Miyase, T., Noguchi, H., Chen, X. M. Sucrose Esters and Xanthone C-Glycosides from the *Polygala sibirica*. *J. Nat. Prod.* **1999**; 62: 993-996.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paul, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug

- screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**; 38: 757-766.
- Ovenden, S. P. B., Yu, J., Bernays, J., Wan, S. S., Christophidis, L. J., Sberna, G., Tait, R. M., Wildman, H. G., Lebeller, D., Lowther, J., Walsh, N. G., Meurer-Grimes, B. M. Physalosite A, an Acylated Sucrose Ester from *Physalis viscosa*. *J. Nat. Prod.* **2005**; 68: 282-284.
 - Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M. Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine.* **2004**; 11: 432-445.
 - Pérez-Castorena, A. L., García, M., Martínez, M., Maldonado, E. Physalins from *Physalis solanaceus*. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**; 32: 1231-1234.
 - Pérez-Castorena, A. L., Oropeza, R. F., Vázquez, A. R., Martínez, M., Maldonado, E. Labdanes and Withanolides from *Physalis coztomatl.* *J. Nat. Prod.* **2006**; 69: 1029-1033.
 - Qiu, L., Zhao, F., Jiang, Z. H., Chan, L. X., Zhao, Q., Liu, H. X., Yao, X. S., Qiu, F. Steroids and Flavonoids from *Physalis alkekengi* var. *franchetii* and their Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production. *J. Nat. Prod.* **2008**; 71: 642-646.
 - San Feliciano, A., Caballero, E., Del Rey, B., Sancho, I. Diterpene Acids from *Juniperus communis* susp. *Hemisphaerica*. *Phytochemistry.* **1991**; 30: 3134-3136.
 - Singh, M., Pal, M., Sharma, R. P. Biological Activity of the Labdane Diterpenes. *Planta Med.* **1999**; 65: 2-8.

- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., Mc Mahan, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**; 82: 1107-1112.
- Takasaki, M., Kuroki, S., Kozuka, M., Konoshima, T. New Phenylpropanoid Esters of Sucrose from *Polygonum lapathifolium*. *J. Nat. Prod.* **2001**; 64: 1305-1308.
- Tchinda, A. T., Tane, P., Ayafor, J. F., Connolly, J. D. Stigmastane derivatives and isovaleryl sucrose esters from *Vernonia guineensis* (Asteraceae). *Phytochemistry.* **2003**; 63: 841-846.
- Torres, F. R. Aislamiento y caracterización de los constituyentes de *Physalis nicandroides* Schlttdl. var. *attenuata* Waterf. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México D. F. **2006**.
- Trease-Evans. Farmacognosia. 13a edición. Ed. Interamericana McGraw-Hill. México **1991**, pp 231-232, 692-707.
- Vargas, P. O., Martínez, M., Dávila, P. A. La familia *Solanaceae* en Jalisco. El género *Physalis*. Universidad de Guadalajara, México, **2003**.
- Villamizar, J., Fuentes, J., Salazar, F., Tropper, E., Alonso, R. Facile Access to Optically Active Labdane-Type Diterpenes from (+)-Manool. Synthesis of (+)-Coronarín E, (+)-15,16-Epoxy-8(17),13(16),14-labdatriene, and (+)-Labda-8(17),13(Z)-diene-15,16-diol. *J. Nat. Prod.* **2003**; 66: 1623-1627.
- Wang, N., Yao, X., Ishii, R., Kitanaka, S. Bioactive sucrose esters from *Bidens parviflora*. *Phytochemistry.* **2003**; 62: 741-746.

- Willoughby, D. A. In vivo models of inflammation. En: Inflammation protocols. Methods in Molecular Biology. Editado por Willouhby, D. A. and Winyard, P. G. Humana Press. Totowa, EUA. **2003**; 109-138.
- Zhong, Y. L., Tony, K. M. Efficient and facile glycol cleavage oxidation using improved silica gel-supported sodium metaperiodate. *J. Org. Chem.* **1997**; 62: 2622-2624.