



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

“NUEVA WITHANÓLIDA AISLADA DE  
*Physalis orizabae*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

RODRIGO GUTIÉRREZ GARCÍA



MÉXICO D.F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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. Rachel Mata Essayag
VOCAL	Dra. Lucía Hernández Garciadiego
SECRETARIO	M. en C. Emma Maldonado Jiménez
PRIMER SUPLENTE	Dr. Jose Fausto Rivero Cruz
SEGUNDO SUPLENTE	Prof. Minerva Carrasco Fuentes

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

Asesor del tema

---

M. en C. Emma Maldonado Jiménez

Sustentante

---

Rodrigo Gutiérrez García

*Cuando la vida te presente razones para llorar, demuéstrale que tienes mil y una razones para reír*

*Por una mirada, un mundo;  
por una sonrisa, un cielo;  
por un beso... yo no sé  
qué te diera por un beso.  
Gustavo Adolfo Bécquer*

*La muerte es una vida vivida. La vida es una muerte que viene*  
**Jorge Luis Borges**

*No solo es culpable aquel que comete un crimen, también es el  
que no hace por evitarlo*

# *AGRADECIMIENTOS*

Quiero dar gracias a

**Dios** por haberme obsequiado este lapso de vida y las barreras que me ha ayudado a cruzar y por todo lo que me ha dado, padres, familia y amistades

Mi **segunda madre (Remedios)** por ser un apoyo en los momentos difíciles que me a impuesto

La **Universidad** por concederme estos años maravillosos dentro de sus instalaciones

La **Facultad de Química** por dejarme estar dentro de sus aulas y poder obtener una formación profesional

Mi asesora de tesis la maestra **Emma Maldonado** por el tiempo y dedicación a esta tesis

Mi jurado maestra **Rachel** y **Lucia**, por revisar este trabajo de investigación

Todos mis **profesores** a lo largo de mi vida académica que además de su educación académica me encaminaron y orientaron con su experiencia, además de ofrecerme su amistad

Al personal del **Instituto de Química** por los espectros para este trabajo de investigación y con el que compartí buenos momentos

Mis compañeros del Instituto, **Sonia, Luís Barrientos, Eliu, Yunuen, Humberto, John, Luis**

## *DEDICATORIAS*

Dedico esta tesis a

Mis padres Fran y Mago que son la luz en mi vida. Mama gracias por el apoyo recibido y por no dudar de mi aún en los momentos difíciles, son lo que más quiero en la vida

Mis hermanos Marcelo, Aarón, Paty, Marlen y Elí, gracias por el apoyo recibido durante mi carrera, los quiero mucho

Mis cuñadas Mary y Maty, cuñados Martín y Marcos son parte importante en mi vida

Por los que la familia están unida, mis sobrinos: Mis, Yayo, Bebe, Flaca, Patricio, Gera, Jap-jap, Boo, Jesusin y Maxi

Mis amigos con los que crecí jugando fútbol y ahora lo cambiamos por convebios nocturnos y los que nos faltan Troll, Beto, Gus, Arturo, Lalo, Julio, Bomba

Los que me prodigan su amistad y compañía Noel, Viry, Mel (fresa), Anaid, Juan, Jorge, Lily, Andrade, Roger, Liz, Lupe, Lulu

Mis compañeros de mi primer grupo de la Facultad Angela, David, Chivis, Manuel, Alejandro Velásquez, Natzul, Héctor, Evelin, Ana, Víctor, Lupe, Norma, Reyes, Luís

Mis amigos con los que compartí las aulas, angustias y que conocí en la carrera Alfredo, Dragon, Ame, Berni, Master, Angélica, Blanca, Rodrigo Frausto, Selene, Adris, Pablito, Enrique, Arac, Mayell, Garfías, Eli, Eunice, Cristian, Claudia, Gabriel, Gaby, Serch, Juanro, Priscila, Nadia, Lucero, Sara, Laura, Nayelli, Brenda, Karina, uff y los que me faltaron gracias por esos buenos momentos que no olvidare

**INDICE**

Indice.....	I
Abreviaturas.....	III
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Familia Solanaceae.....	3
2.2 Género <i>Physalis</i> .....	4
2.3 Composición Química.....	8
2.4 Withaesteroides.....	9
2.5 Withanólidas.....	11
2.6 Propiedades Biológicas.....	12
2.7 Flavonoides.....	16
2.8 Flavonoides en el Género <i>Physalis</i> .....	18
2.9 Métodos espectroscópicos en la determinación de estructuras químicas.....	22
3. Objetivo.....	29
4. Parte experimental.....	30
4.1 Material y Equipo.....	30
4.2 Material vegetal.....	30
4.3 Extracción del material vegetal.....	31
4.4 Aislamiento de compuestos.....	32
4.5 Datos espectroscópicos y físicos.....	34
5. Resultados y Discusión.....	36

6. Conclusiones.....	55
7. Bibliografía.....	56
Apéndice	
Espectros.....	62



**ABREVIATURAS**

AcOEt	Acetato de etilo
c	Cuarteto
C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O	Acetona deuterada
CCl <sub>4</sub>	Tetracloruro de carbono
CCF	Cromatografía en placa fina
CCV	Cromatografía en Columna al vacío
CD <sub>4</sub> O	Metanol deuterado
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
COSY	Espectroscopía de Correlación Homonuclear
δ	Desplazamiento químico
d	doble
dd	doble de doble
da	doble ancho
diám	Diámetro
DEPT	Ampliación sin distorsión por transferencia de polarización
EM	Espectro de masas
h	Altura
IES	Ionización por electrospray
fr	Fracción
HMBC	Correlación Heteronuclear de Enlaces Múltiples
HSQC	Correlación Heteronuclear Cuántica Simple
IE	Impacto electrónico
IR	Infrarrojo
J	Constante de Acoplamiento
msnm	Metros sobre el nivel del mar
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singlete
t	Triplete
UV	Ultravioleta

### 1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la ciencia en los últimos siglos ha sido importante para la sociedad y ha cumplido el objetivo de mejorar en muchos aspectos la calidad de vida del ser humano.

Durante los últimos cien años la medicina y la farmacología han experimentado avances notables. En la medicina, se han logrado realizar transplantes y cirugías a corazón abierto, por el lado de la farmacología, se han podido sintetizar hormonas (cortisona, progesterona, etc.) y se han producido fármacos que se liberan en sitios específicos. Sin embargo, la búsqueda de nuevos fármacos más específicos y con menores efectos secundarios continúa. Un recurso importante para enfocar esta búsqueda lo constituyen las plantas, ya que éstas producen, metabolitos secundarios que, por las actividades farmacológicas que presentan, pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades o padecimientos determinados.

Los países como México que cuentan con una gran diversidad florística y con un acervo de conocimientos acerca de su uso, están en una situación privilegiada respecto a esta búsqueda, de la cual se pueden obtener beneficios, si se consigue, por ejemplo, obtener un nuevo medicamento o cualquier otra sustancia que contribuya al bienestar de la población.

En la familia *Solanaceae* se encuentra un género llamado *Physalis*. De este género se han aislado diferentes tipos de metabolitos, sin embargo, los que se han aislado de la mayoría de las especies estudiadas son compuestos esteroidales conocidos como

withanólidas o withaesteroides, compuestos que por su estructura compleja muestran una variedad de actividades farmacológicas de gran interés; así estos compuestos son atractivos tanto desde el punto de vista químico como del farmacológico.

Lo anterior y el hecho de que un gran número de las especies de *Physalis* crecen en México y de que la mayoría de ellas son endémicas fueron las razones por las que se decidió emprender el estudio de estas plantas. Como parte de este proyecto se llevó a cabo el estudio químico de *Physalis orizabae* L., cuyos resultados se presentan a continuación.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 FAMILIA SOLANACEAE**

Más de 2000 especies forman esta familia cosmopolita que proporciona al hombre una droga letal –el tabaco (*Nicotiana tabacum*)- y numerosos productos alimenticios: papas (*Solanum tuberosum*), berenjenas (*Solanum melongena*), jitomates (*Lycopersicon esculentum*), tomates (*Physalis philadelphica*), chiles y pimientos (*Capsicum nahum*, *Capsicum frutescens*), entre otros. La industria farmacéutica emplea especies de *Datura spp.* y *Duboisia spp.*, para extraer atropina y hioscina.<sup>1</sup>

La familia *Solanaceae* es una de las familias más ricas en especies peligrosas. El metabolismo de muchas de sus especies produce una gran variedad de compuestos tóxicos. La belladona (*Atropa belladonna*), el estramonio (*Datura stramonium*), el beleño negro (*Hyoscyamus niger*) y la mandrágora (*Mandragora officinarum*) se conocen desde antaño por su actividad sobre el sistema nervioso autónomo y el sistema nervioso central, por lo que además de emplearse como medicinas, algunas fueron utilizadas con fines criminales.<sup>1</sup> En tiempos del imperio Romano y en la edad Media la belladona se empleó para producir un envenenamiento de lenta evolución.<sup>2</sup> Las solanáceas también entraron en la composición de ungüentos con los que las “brujas” de la época medieval se untaban las mucosas y las axilas para provocar estados letárgicos. Estas plantas deben su toxicidad a alcaloides tropánicos, frecuentes en la familia.<sup>1</sup>

En la familia *Solanaceae* se sintetizan además de alcaloides<sup>3</sup> una amplia variedad de metabolitos secundarios entre los que se encuentran, flavonoides,<sup>4</sup> diterpenos,<sup>5</sup> y withaesteroides.<sup>6</sup>

## **2.2 GÉNERO *PHYSALIS***

*Physalis* es uno de los 85 géneros agrupados en la familia *Solanaceae*. Este género incluye cerca de 90 especies que se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo,<sup>7</sup> principalmente a lo largo del continente americano. México es considerado el centro de diversidad de este género, ya que cuenta con cerca de 70 especies, en su mayoría endémicas.<sup>8</sup>

Varias especies de *Physalis* están integradas en la medicina tradicional de muchos países, entre las más conocidas están *P. philadelphica*, *P. angulata*, *P. peruviana* y *P. alkekengi*.

### ***Physalis philadelphica***

Es una solanácea originaria de Mesoamérica, cultivada en México y Guatemala, para obtener sus frutos, llamados tomates (del náhuatl *tomatl*). Estos frutos son consumidos principalmente como salsas que condimentan una gran cantidad de platillos de las cocinas de estos países. Diversos hallazgos arqueológicos prueban que su uso en la alimentación de la población mexicana se remonta a tiempos precolombinos. En las excavaciones del valle de Tehuacán (900 a.C.-1540 d.C.) se han encontrado vestigios de la utilización de *Physalis* como alimento.

Se cree que *P. philadelphica* es originaria de la parte central de México, donde fue domesticada y de ahí llevada a Europa y a otras partes del mundo.<sup>9</sup>

*P. philadelphica* se emplea en la medicina tradicional, principalmente para tratar problemas respiratorios y dolor de amígdalas. Sus frutos se usan para aliviar la tos, y para ello se prepara una decocción del fruto junto con semillas de tamarindo y se administra por vía oral. También se utilizan los frutos que se untan alrededor del cuello para aliviar la amigdalitis.

Por otra parte asado se unta en la piel afectada por el “chincual”. Se aplica como chiquiadores en la cabeza y en las “coyunturas”, o se aplica tibio o casi frío en la planta de los pies y el abdomen para bajar la fiebre. Se machaca y el jugo así obtenido se aplica en gotas, cuando hay dolor en el oído.

Esta planta se emplea además para tratar afecciones digestivas, bilis, inflamación de estómago y “latido”, contra la caída del pelo, en el tratamiento de la presión alta, diabetes (controla la sed del diabético) y para la vista.<sup>10</sup>

Por otra parte, a varios de los compuestos aislados del extracto de acetato de etilo de hojas y tallos se les atribuyen propiedades quimiopreventivas, porque inducen la actividad de la quinona reductasa en células hepa1c1c7 y además inhiben la transformación de células JB6 epidérmicas de ratón.<sup>11</sup>

### ***Physalis peruviana***

Es originaria de los Andes (Colombia, Perú, Ecuador y Chile) es conocida como uchuva, capulí y aguaymanto. Crece en forma silvestre y semisilvestre, entre los 1500-3000 msnm. Es una planta perenne y arbustiva que normalmente alcanza una altura de 1 a 1.5 m.<sup>12,13</sup>. Su fruto es dulce, de sabor agradable, comestible y tiene un buen contenido de vitaminas A y C, además de hierro y fósforo.<sup>14</sup>

Esta especie ha sido domesticada y actualmente se cultiva en África, India y Colombia para aprovechar su fruto, que es muy apreciado en Europa. De hecho, el cultivo de *P. peruviana* es uno de los más importantes para Colombia que en el año 2000 exportó 6335 toneladas de uchuva.<sup>12</sup> Su papel en la medicina tradicional varía en los diferentes países, así mientras que en Colombia se emplea para purificar la sangre, aliviar problemas en la garganta, fortificar el nervio óptico, limpiar las cataratas, ser un calcificador y controlar la amibiasis,<sup>14</sup> en Perú se utiliza para tratar cáncer, hepatitis, asma, malaria y

dermatitis.<sup>13</sup> Además sus frutos son usados como antiparasitarios, y para ello generalmente se ingieren de 10 a 15 frutos diarios en ayunas por espacio de 8 días y luego un purgante. También se usan en forma de jarabe contra la tosferina. Los frutos contienen ácido cítrico, de ahí sus propiedades diuréticas, también se dice son narcóticos.<sup>15</sup>

Se ha demostrado que extractos etanólicos y acuosos de *P. peruviana* y *P. angulata* inhiben el crecimiento de líneas celulares tumorales como Hep G2, Hep3B y PLC/PRF/5 (hepatoma humano), e inducen apoptosis en las células.<sup>16,17</sup>

### ***Physalis angulata***

Es una planta anual distribuida en regiones tropicales y subtropicales del mundo, en China se le conoce con el nombre de “Kuzhi”. Sus extractos o infusiones se utilizan en la medicina popular de varios países. Así en Taiwán se utiliza para el tratamiento de tumores, para combatir enfermedades como malaria, asma, hepatitis, dermatitis, desórdenes del hígado y reumatismo. Se usa también como anticancerígeno, antibacteriano y antipirético.<sup>18,19</sup> Las hojas y los frutos se tienen como narcóticos, y su decocción es útil como antiinflamatorio y desinfectante en enfermedades de la piel.<sup>15</sup>

A través de un estudio biodirigido del extracto metanólico de *Physalis angulata* se aislaron nueve withaesteroides y la citotoxicidad de ocho de ellos fue evaluada frente a ocho líneas celulares de cáncer, lo que reveló que tres de estos compuestos tienen una fuerte actividad citotóxica. Además se evaluó la actividad tripanocida contra epimastigotos y tripomastigotos de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas y se encontró que cinco de los compuestos poseen una buena actividad.<sup>19</sup>

***Physalis alkekengi***

Es originaria de China se distribuye en la región noreste de Asia. Se cultiva en la India donde sus frutos son vendidos bajo el nombre de “Kaknaj”, y son utilizados en la medicina tradicional como estimulante diurético, antihelmíntico, expectorante, antitusivo y ocitóxico. Los nativos de Ainu, utilizan semillas frescas de *P. alkekengi* como analgésico.<sup>20,21</sup> En Japón se le conoce con el nombre “Hozuki”. Se cultiva en Europa y sus frutos son utilizados en el centro y sur de dicho continente para la eliminación del ácido úrico (afecciones renales, de vías urinarias, gota y reumatismo), además se emplea en personas convalecientes por su gran contenido en vitamina C. Las hojas y tallos se han usado como depurativos del riñón y del hígado y como tónicos generales después de procesos febriles.<sup>22</sup>

De los frutos de *P. alkekengi* se aisló un heteropolisacárido que mostró actividad hipoglucemiante en ratones diabetizados con aloxana. Este polisacárido, constituido por arabinosa (Ara), galactosa (Gal), glucosa (Glc), ácido galacturónico (GalA), no solo redujo los niveles de glucosa en sangre en los animales de prueba, sino que también produjo un incremento en su peso corporal.<sup>23</sup> Además de este compuesto, se han aislado physalinas, alcaloides y flavonas con diferentes actividades.<sup>23</sup>

***Physalis orizabae***

Esta especie pertenece a la sección *Coztomatae*, se distribuye en los Estados de México, Ags., Dgo., Gto., Hgo., Jal., Mich., Mor., Nay., N.L., Oax., Ver., Zac. y D.F. Se localiza en un intervalo altitudinal de 1850-2 700 m.



La especie habita en laderas, márgenes de encinares perturbados y claros adyacentes a bosques de pino-encino, en ocasiones se presenta en pastizales secundarios y en matorrales subtropicales. Florece y fructifica de junio a septiembre.

*Physalis orizabae* se caracteriza por las hojas enteras, corolas grandes, amplias, con máculas contrastantes y anteras púrpuras o azules, así como por el cáliz grande y los pedicelos en la flor y el fruto cerca de 2 cm de largo.

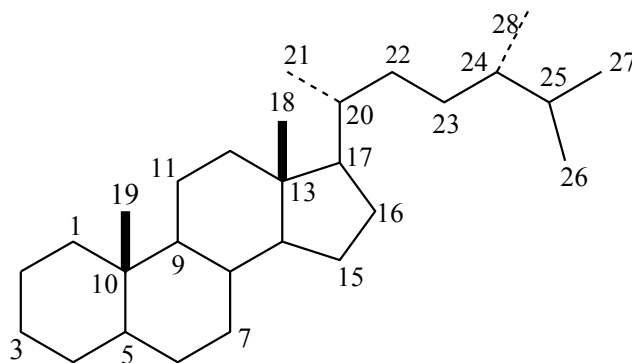
La especie varía en la densidad de la pubescencia y en la forma de las hojas. Aunque las corolas de ordinario son grandes y amplias, de hasta de 26 mm de diámetro, rotado reflejas cuando están extendidas, hay algunas muestras en las que miden 10 mm de diámetro como máximo y entonces resulta más difícil su ubicación dentro del taxón. *Physalis orizabae* se puede confundir con *P. chenopodifolia*.<sup>24</sup>

### **2.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO *PHYSALIS***

Del género *Physalis* se han aislado metabolitos de muy diversos tipos tales como flavonoides simples y glicosilados,<sup>25</sup> alcaloides,<sup>21</sup> diterpenos de tipo labdano,<sup>5</sup> acilsacarosas<sup>26</sup> y withaesteroides,<sup>27</sup> pero sólo estos últimos se han aislado de todas las especies de *Physalis* estudiadas hasta ahora.

## 2.4 WITHAESTEROIDES

Los withaesteroides son un grupo de esteroides naturales con una estructura basada en el esqueleto de ergostano (Figura 1). Son metabolitos que en su mayoría se han aislado de la familia *Solanaceae*.



**Figura 1.** Ergostano

Estos metabolitos tienen características particulares, además de que su estructura base es el ergostano que contiene 28 átomos de carbono, la cadena lateral forma un anillo lactónico de cinco o seis miembros o un lactol.<sup>28</sup> Estos metabolitos presentan patrones de oxidación muy variables, lo que indica que las plantas que los elaboran contienen sistemas enzimáticos capaces de oxidar prácticamente todos los átomos de carbono del núcleo esteroidal con excepción de C-8 y C-10. Lo anterior da como resultado estructuras desde simples hasta muy complejas. Esta variación estructural da lugar a las diferentes actividades biológicas que presentan.<sup>7</sup>

Los withaesteroides se han dividido en ocho grupos (Figura 2), de los cuales el de las withanólidas es el que contiene el mayor número de los withaesteroides que se han aislado.<sup>8</sup> Se considera que las withanólidas son precursoras de los grupos 2-8. Actualmente se conocen otros tipos de withaesteroides que no fueron incluidos en esta clasificación.

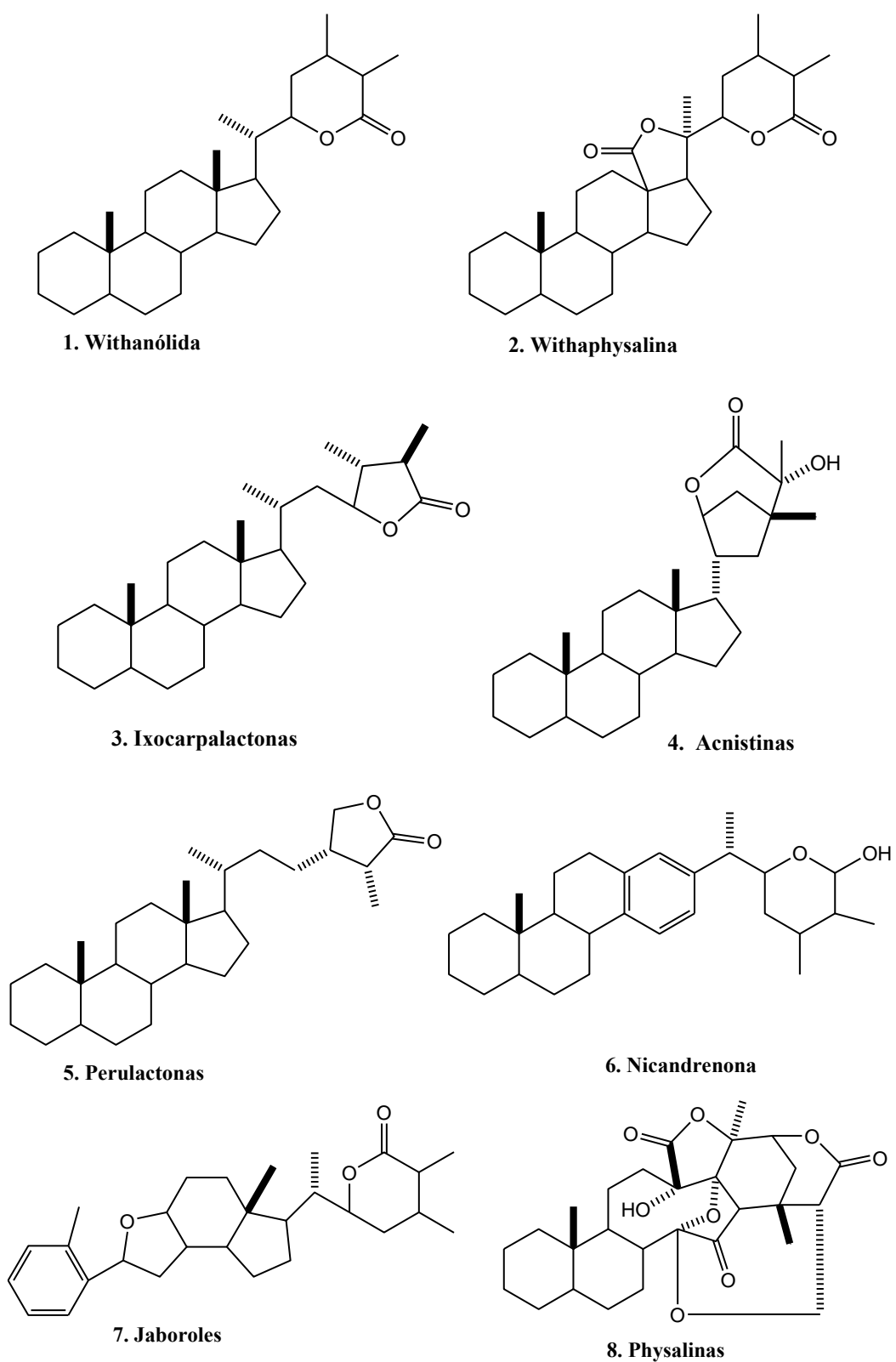
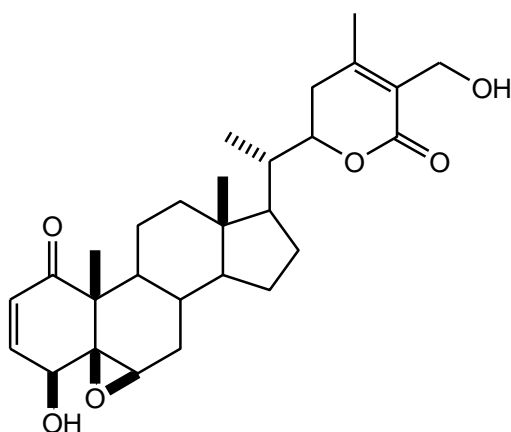


Figura 2. Tipos de withaesteroides

## 2.5 WITHANÓLIDAS

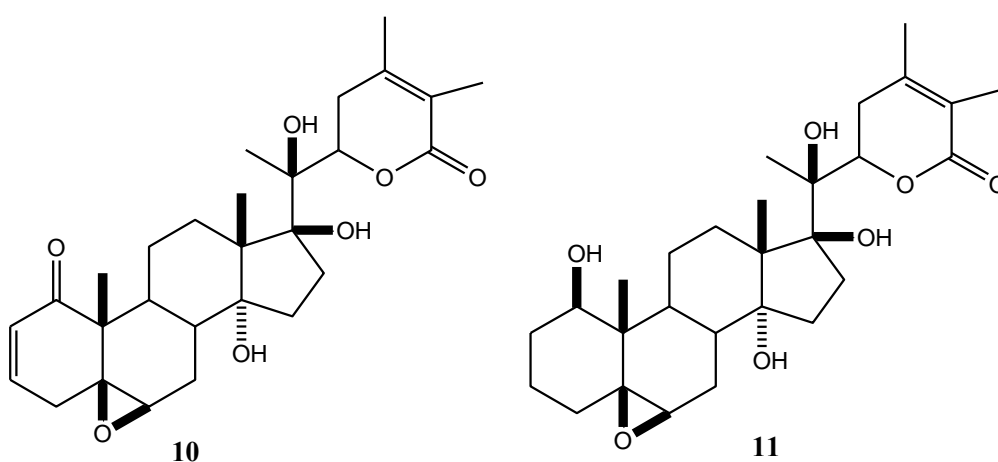
Su nombre se debe a que la primera withanólida descrita fue la *withaferina A* (9), aislada de *Withania somnifera*, en 1965. Esta planta crece en una vasta región que va desde Europa Meridional hasta la India y África. Se cultiva principalmente en la India donde se emplea en la medicina tradicional para tratar artritis, asma, dispepsia, hipertensión, reumatismo y sífilis. Esta planta ha sido objeto de un sinnúmero de estudios que revelaron sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, inmunomoduladoras e inhibidoras de la proliferación celular entre otras.<sup>29</sup>



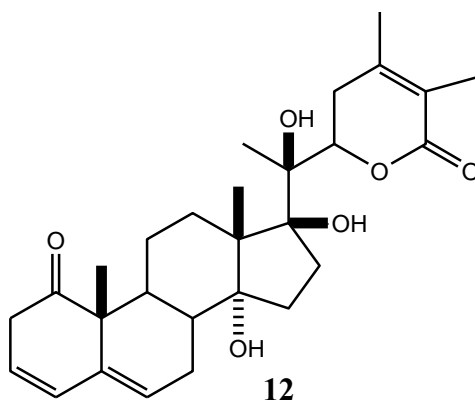
**Withaferina A (9)**

## 2.6 PROPIEDADES BIOLÓGICAS

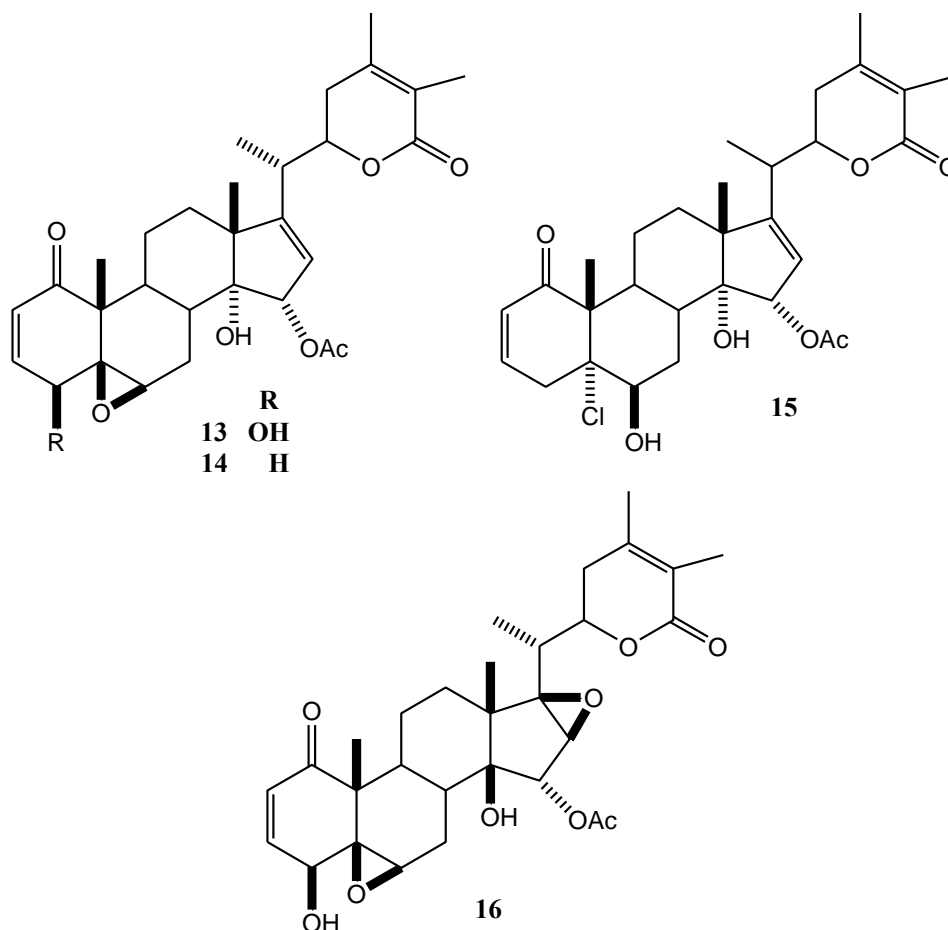
La actividad biológica de muchas de las withanólidas aisladas de diferentes especies de *Physalis* ha sido evaluada. Tal es el caso de las withanólidas aisladas de *P. peruviana* cuya actividad antialimentaria fue determinada y se encontró que la withanólida E (**10**) y su tetrahydroderivado (**11**) son activos contra la larva de *Spodoptera littoralis* que afecta al gusano de la hoja del algodón egipcio.<sup>30</sup>



Otra propiedad biológica que se ha estudiado en las withanólidas es la antifúngica. La 17 $\beta$ -hidroxiwithanólida K (**12**) aislada de *Withania coagulance* es activa contra una serie de hongos patógenos para el humano, entre ellos las especies *Aspergillus niger* y *Nigrospora oryzae*. De igual manera presenta actividad en contra de *Staphylococcus aureus*.<sup>31</sup>

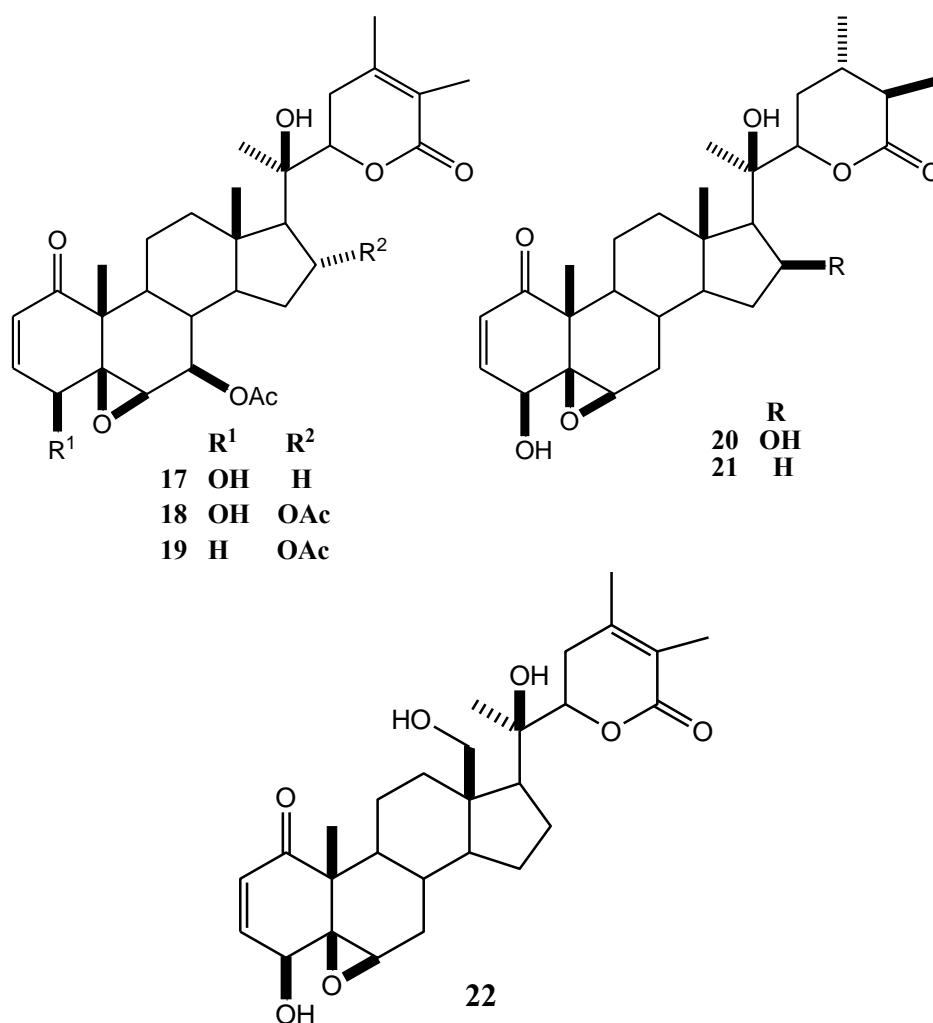


Se ha encontrado que tanto la withangulatina A (**13**) como las physagulinas A (**14**), B (**15**) y C (**16**) son activas contra *Tripanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas.<sup>19</sup>

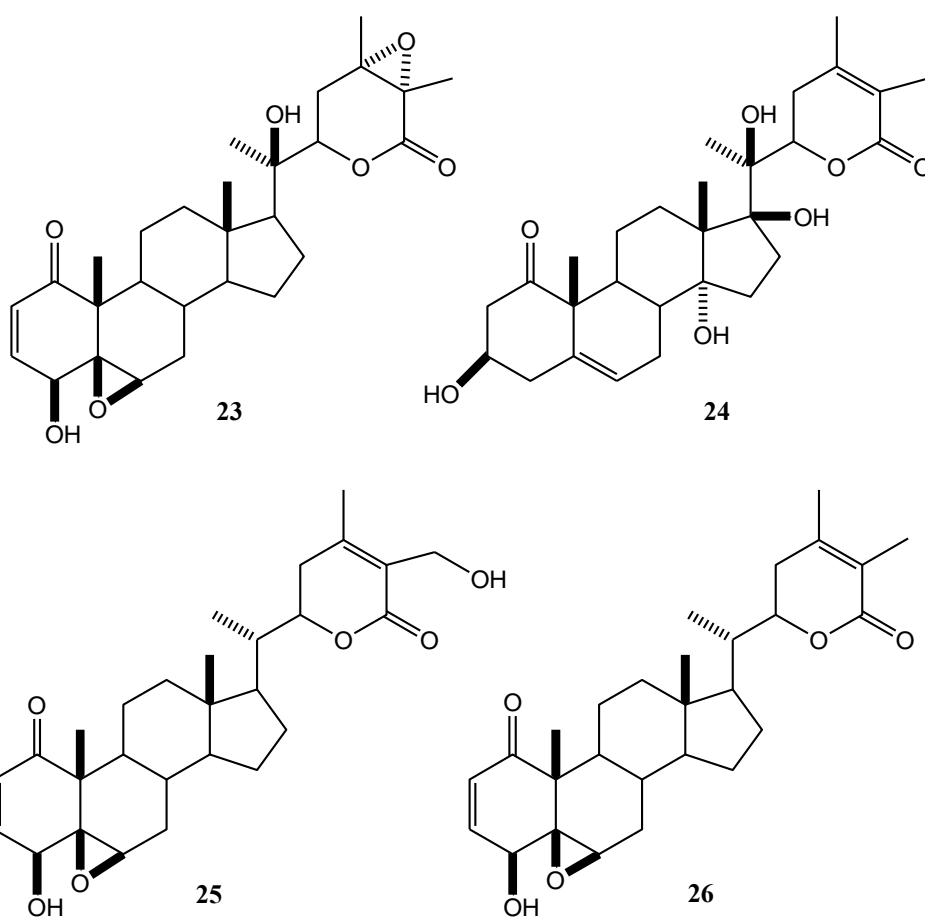


Las withanólidas aisladas de *Acnistus arborescens*, 7 $\beta$ -acetoxiwithanólida D (**17**), 7 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diacetoxiwithanólida D (**18**) y la 4-deoxi-7 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diacetoxiwithanólida D (**19**) mostraron una potente actividad citotóxica contra un panel de líneas celulares de cánceres de mama (BC-1), colon (Col2), pulmón (Lu1) y próstata (LNCaP), entre otros. También resultaron activas como inductoras de la actividad de la quinona reductasa,<sup>32</sup> una de las enzimas de la fase II del metabolismo (glutación transferasa, NADPH quimiocina oxidoreductasa (QR), UDP-glucoronosil transferasa, etc., enzimas que convierten a los compuestos reactivos potencialmente carcinógenos, en especies menos tóxicas y más fácilmente excretables.

Muchos compuestos que protegen de la carcinógenesis química, son inductores de las enzimas de la fase II del metabolismo, por lo que se cree que existe una relación entre la activación de estas enzimas y la quimioprevención).<sup>33</sup> Otras withanólidas cuya actividad es inducir a la quinona reductasa son withaphysacarpina<sup>33,34</sup> (**20**) y 24,25 dihidrowithanólida D<sup>33,34</sup> (**21**), aisladas de *P. philadelphica* y 18-hidroxiwithanólida D<sup>33</sup> (**22**) aislada de *Vassobia lorentzii*.



La actividad antiinflamatoria se presenta en los compuestos 24,25-epoxiwithanólida D<sup>27</sup> (**23**) y la 3 $\beta$ -hidroxi-2,3-dihidrowithanólida F<sup>35</sup> (**24**). Este último compuesto presentó además actividad hepatoprotectora cuando el daño al hígado fue inducido por CCl<sub>4</sub>.<sup>36</sup> La withaferina A (**25**) y la 27-deoxiwithaferina A (**26**) presentan actividad antimicrobiana.<sup>27</sup> La withaferina A (**25**) y la withanólida E (**10**) también han mostrado actividad inmunosupresora en linfocitos humanos T y B y en timocitos de ratón.<sup>28</sup>



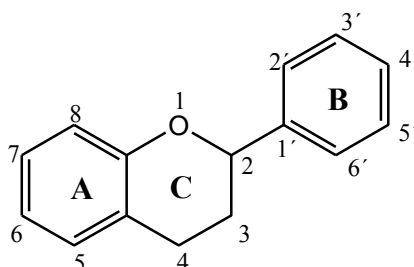


## 2.7 FLAVONOIDES

Los flavonoides representan una importante clase de productos naturales. Se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas superiores, sobre todo en partes aéreas (hojas, flores y frutos). Hasta el momento se conocen cerca de 4000 flavonoides.<sup>37</sup>

Los flavonoides proceden del metabolismo secundario de los vegetales a través de las rutas del ácido siquímico y del acetato-malonato.<sup>37</sup> Los flavonoides exhiben un gran rango de funciones en la bioquímica, la fisiología y la ecología de las plantas, por ejemplo en la coloración de los pétalos de las flores y en la protección contra la luz ultravioleta. Además los flavonoides actúan como reguladores del crecimiento de las plantas, inhibidores de enzimas y antialimentarios en contra de insectos.<sup>38</sup>

Los flavonoides son estructuras del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, constan de dos anillos aromáticos unidos entre si por una cadena de 3 carbonos. Esta cadena puede formar anillos de 5 o 6 miembros a través de un átomo de oxígeno unido a un grupo fenilo, para dar arreglos de tres anillos denominados A, C y B (Figura 3). Los anillos aromáticos generalmente están hidroxilados y por lo tanto, son polifenólicos. Los flavonoides se pueden encontrar como agliconas libres o en forma de O-heterósidos o C-heterósidos, unidos generalmente a glucosa.<sup>37</sup>



**Figura 3.** Estructura de Flavano

Los flavonoides se clasifican de la siguiente manera con base en las variaciones estructurales del anillo C.<sup>37</sup> (Figura 4)

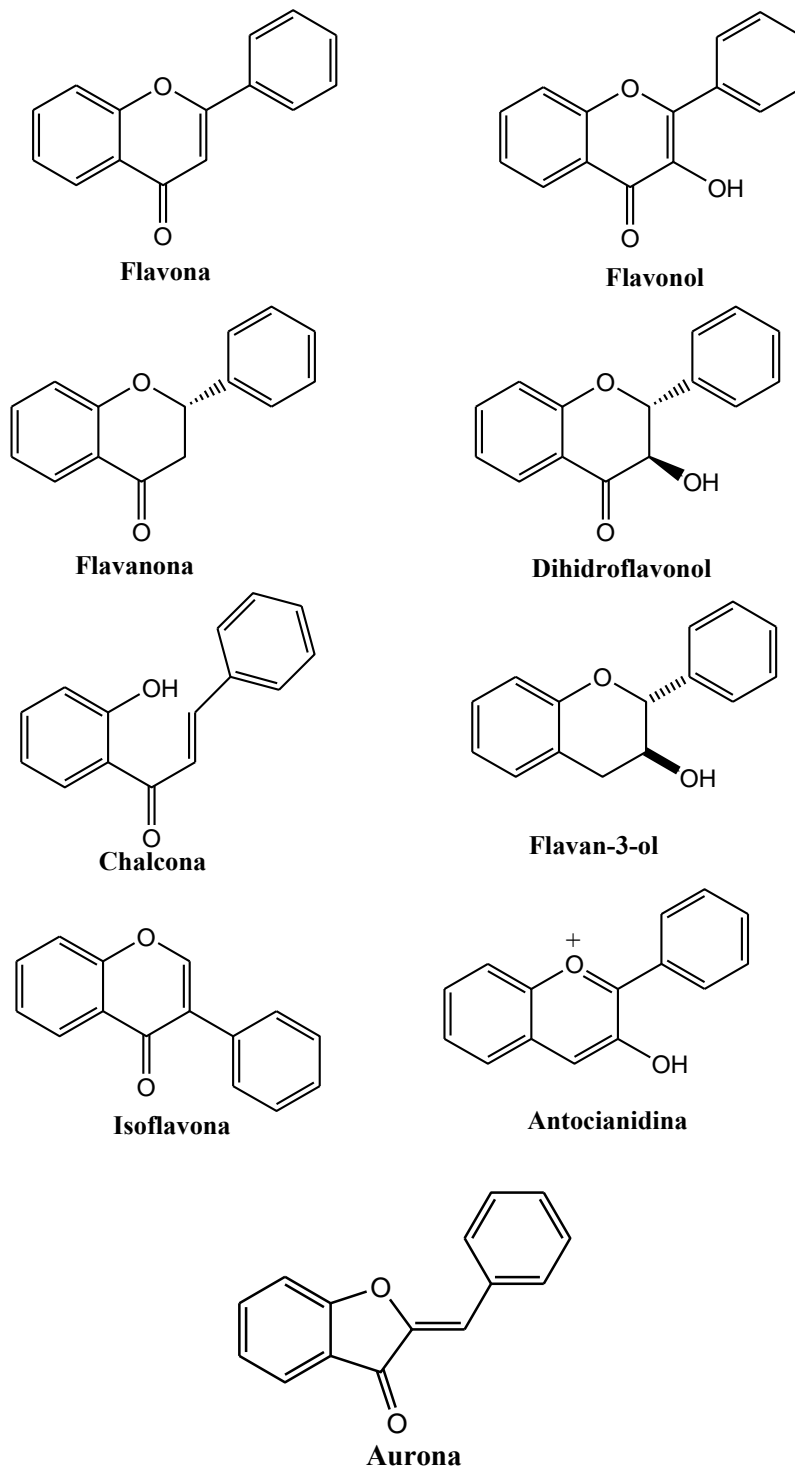


Figura 4. Tipos de flavonoides

## **2.8. FLAVONOIDES EN EL GÉNERO *Physalis***

Los flavonoides aislados hasta ahora del género *Physalis*, son flavonas y flavonoles, con predominancia de flavonoles en forma de glicósidos. A continuación se dan los nombres y estructuras de los flavonoides aislados, así, como de la especie de *Physalis* de donde fueron obtenidos.

*Physalis peruviana* (hojas) <sup>25,39</sup>

- 3-O-rutinósido de kaempferol (**27**)
- 3-O-robinobiósido de kaempferol (**28**)
- 3-O-rutinósido-7-glucósido de kaempferol (**29**)
- 3-O-robinobiósido-7-glucósido de kaempferol (**30**)
- 3-O-rutinósido de quercetina (**31**)
- 3-O-robinobiósido de quercetina (**32**)
- 3-O-rutinósido-7-glucósido de quercetina (**33**)
- 3-O-robinobiósido-7-glucósido de quercetina (**34**)

*Physalis minima var indica* <sup>40</sup>

- 3-O-glucósido de kaempferol (**35**)
- 3-O-glucósido de quercetina (**36**)

*Physalis minima* (Frutos, hojas) <sup>41,42,43</sup>

- 5,6,7-trimetoxiflavona (**37**)
- 5-metoxi-6,7-metilendioxi-flavona (**38**)
- 3-O-galactósido de quercetina (**39**)

*Physalis angulata* (hojas) <sup>44</sup>

- 3-O-neohesperidósido de myricetina (**40**)

*Physalis alkekengi*<sup>45</sup>

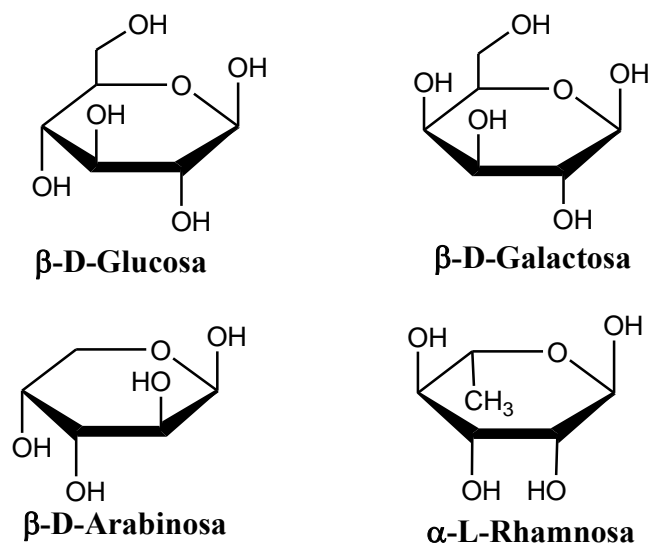
- luteolina (41)
- 7-O-β-D-glucósido de luteolina (42)

*Physalis ixocarpa*<sup>46</sup>

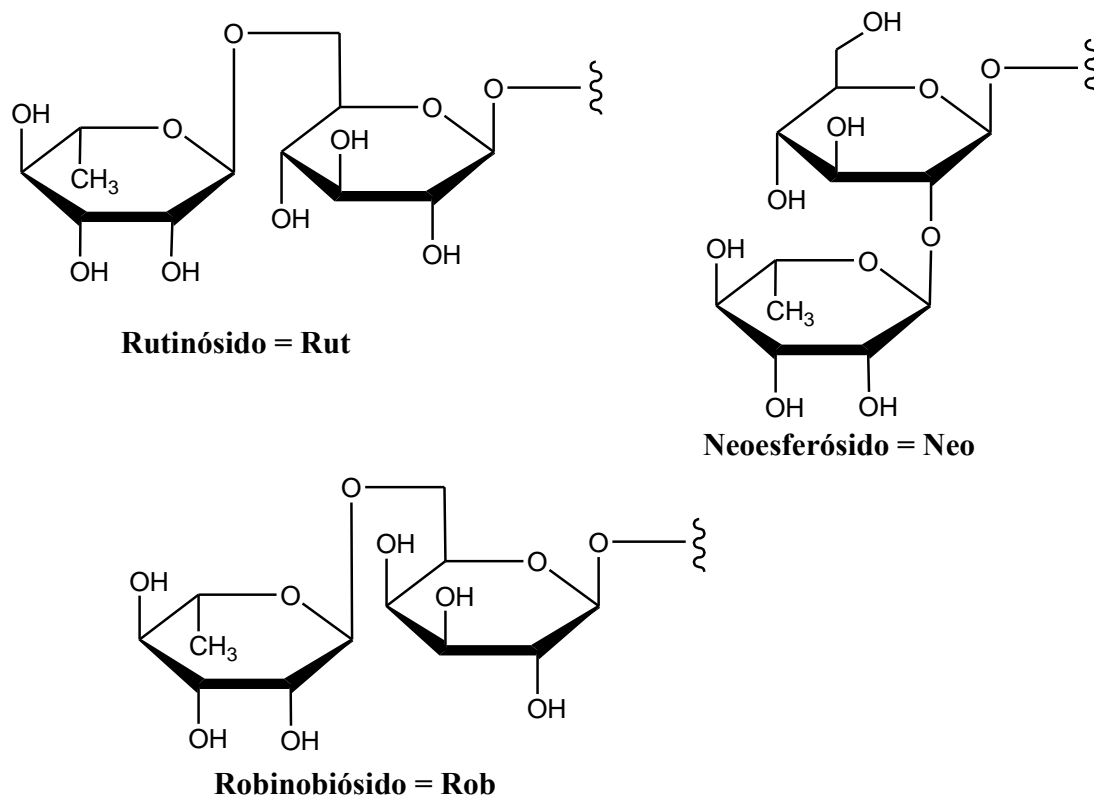
- quercetina (43)
- 3-O-glucósido de quercetina (36)
- 3-O-(2-O-β-galacto-β-glucósido) de quercetina (44)
- 3-O-(2-O-α-arabino-β-glucósido) de quercetina (45)

*Physalis coztomatl*<sup>47</sup>

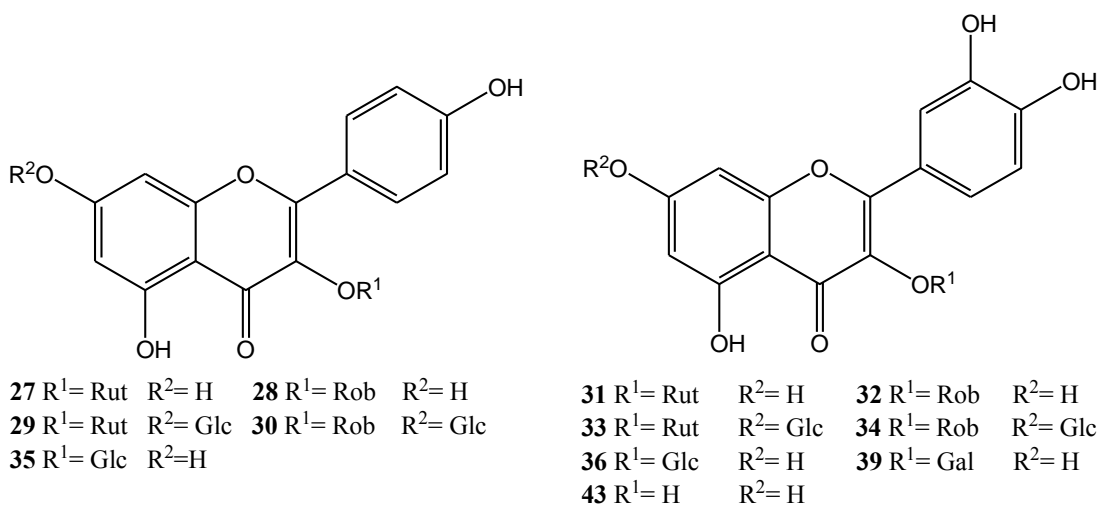
- pachypodol (46)
- retusina (47)

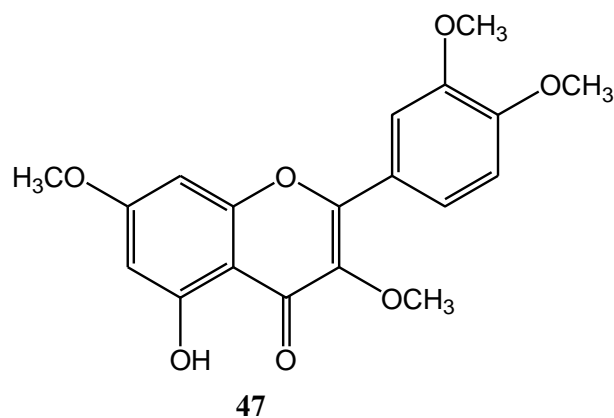
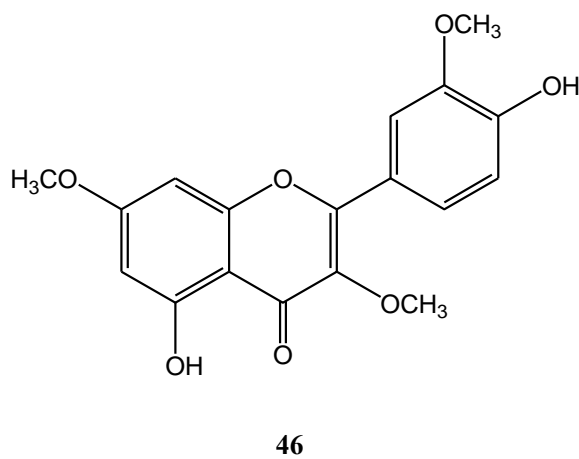
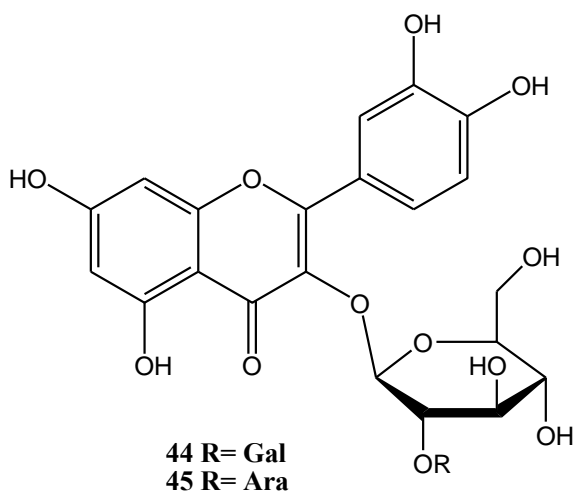
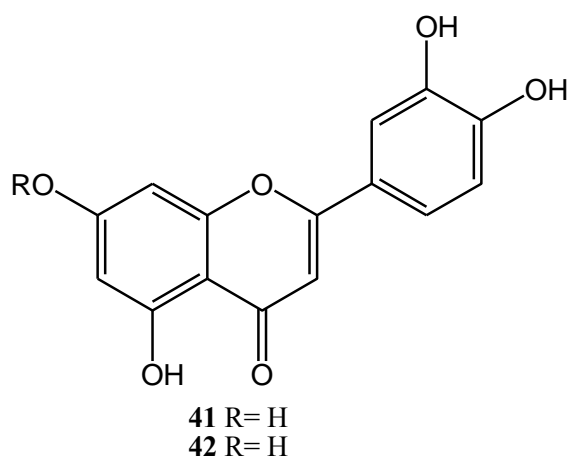
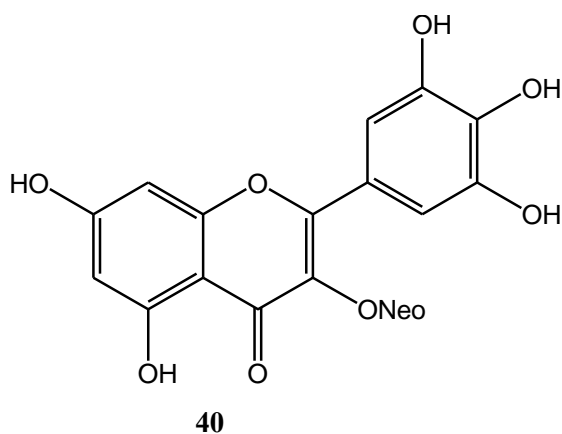
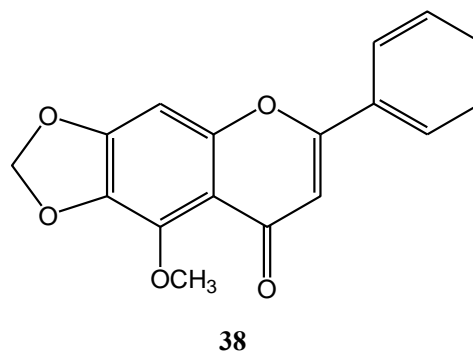
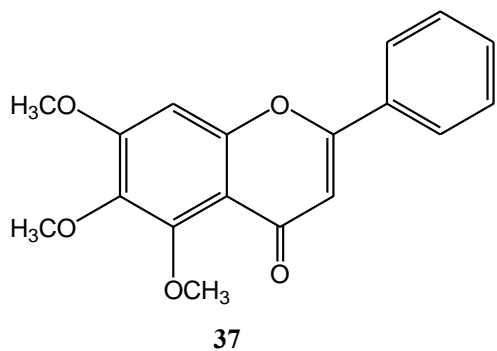


**Figura 5.** Estructura de monosacáridos presentes en los flavonoides aislados de *Physalis*.



**Figura 6.** Estructura de disacáridos presentes en los flavonoides aislados de *Physalis*.





## **2.9 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS EN LA DETERMINACIÓN DE ESTRUCTURA QUÍMICA**

En la actualidad la determinación de la estructura química de un compuesto se lleva a cabo de manera rápida y con cantidades de muestra, del orden de miligramos. Esto es posible porque se cuenta con diferentes técnicas espectroscópicas entre las se encuentran la espectroscopia de infrarrojo (IR), ultravioleta (UV), resonancia magnética nuclear (RMN), así como espectrometría de masas (EM) y difracción de rayos X.

La espectroscopia es el estudio de la interacción de la energía electromagnética con la materia. Cada técnica espectroscópica emplea un tipo distinto de radiación electromagnética que al interaccionar con un compuesto puede producir transiciones rotacionales, vibracionales o electrónicas, que llevan a las moléculas a un estado excitado que decae rápidamente por emisión de la energía absorbida o por relajación y estos cambios son registrados con ayuda de un sistema de cómputo.<sup>48</sup>

### **ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA Y VISIBLE (UV/Vis)<sup>49</sup>**

La radiación de las regiones ultravioleta (UV) y visible (Vis) del espectro electromagnético proporciona energía capaz de excitar electrones de una molécula desde su estado fundamental hasta un estado excitado.

Dado que los espectros UV de los compuestos dependen solamente del grupo o sistema que absorbe radiación (cromóforo) y se ven poco influenciados por el resto del esqueleto molecular, compuestos diferentes que poseen el mismo cromóforo muestran espectros UV similares.

La porción de la región ultravioleta de interés se extiende entre las longitudes de onda de 200 y 400 nm, mientras que la región visible se extiende de las longitudes de onda de 400 nm hasta cerca de los 800 nm. Ambas regiones corresponden a los niveles energéticos

característicos de la excitación de electrones  $\pi$  y no enlazantes y en la mayoría de los casos se encuentran asociados con moléculas conjugadas.

### **ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR)**<sup>50</sup>

La espectroscopia infrarroja ha llegado a ser una de las técnicas más importantes para la determinación de una estructura molecular. La región del infrarrojo es una determinada zona de la radiación electromagnética, situada a menor energía que la de la región visible.

Un espectro de absorción infrarroja presenta picos característicos de grupos funcionales específicos y puede utilizarse como instrumento de diagnóstico en análisis estructural.

La radiación infrarroja no posee energía suficiente para provocar la excitación de los electrones, pero si ocasiona que los átomos y los grupos de átomos de los compuestos químicos vibren mas rápido en torno a los enlaces covalentes que los conectan. Estas vibraciones están cuantizadas y se presentan cuando los compuestos absorben energía infrarroja en regiones específicas del espectro.

En sus vibraciones los enlaces covalentes se comportan como si fueran resortes diminutos. Cuando los átomos vibran nada mas lo pueden hacer a ciertas frecuencias, como si los enlaces estuvieran “sintonizados”. Debido a esto, los átomos con enlaces covalentes poseen únicamente niveles específicos de energía vibracional.

Cada vibración de flexión o estiramiento de un enlace determinado sucede con una frecuencia característica y la radiación infrarroja (de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ ) tiene las mismas frecuencias que estas vibraciones, de tal modo que si un compuesto se irradia con energía de una frecuencia que coincida con la de uno de sus modos de vibración, absorberá energía y con ello incrementará la amplitud de vibración del enlace. Al determinar un espectro de IR lo que se hace es irradiar la muestra y medir la frecuencia o longitud de



onda de la energía absorbida por el compuesto y esto indica que clase de enlaces posee dicho compuesto.

### **RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR<sup>51</sup>**

Se basa en la absorción de radiación que da lugar a transiciones entre las distintas orientaciones del spin del núcleo en un campo magnético. Sus aplicaciones más características son la detección de ciertos grupos funcionales, información de la zona que rodea a un núcleo y en el caso de la resonancia magnética protónica, el conocimiento del número de protones de las moléculas.

Los núcleos de ciertos elementos e isótopos se comportan como si giraran en torno a un eje. Los núcleos como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$  poseen esta propiedad. Cuando se coloca un compuesto que contienen estos núcleos e isótopos en un campo magnético muy intenso y se irradia simultáneamente con energía electromagnética, los núcleos pueden absorber energía mediante un proceso llamado resonancia magnética. La absorción de la energía no tiene lugar a menos que la intensidad del campo magnético y la frecuencia de la radiación electromagnética se encuentren en valores específicos.

### **ESPECTROS DE RMN $^1\text{H}$ .<sup>52</sup>**

En un espectro de RMN  $^1\text{H}$  cada protón en un ambiente químico diferente generará una señal con cierto desplazamiento químico. Las señales de RMN  $^1\text{H}$  normalmente aparecen entre 0 y 13 ppm. Si existen varios protones en el mismo ambiente (químicamente equivalentes) generarán una sola señal. Las señales pueden consistir de un sólo pico (singulete) si el protón o protones que la producen no tienen protones vecinos, en general a dos o tres enlaces; si los tienen, sus campos magnéticos interaccionan en lo que se llama acoplamiento espín-espín y esto lleva a que la señal se desdoble.

**ESPECTROS de RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT.** <sup>52</sup>

El número de señales en un espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  indica el número de carbonos que tiene el compuesto. La posición relativa de las señales en el espectro de  $^{13}\text{C}$  depende de los mismos factores que en el caso de hidrógeno. Las señales de  $^{13}\text{C}$  son débiles porque este isótopo constituye sólo el 1.11 % del carbono natural y a esto se debe también que las señales de  $^{13}\text{C}$  no presenten multiplicidad, porque la probabilidad de que dos  $^{13}\text{C}$  sean vecinos es muy baja. Las señales de  $^{13}\text{C}$  aparecen en general de 0 a 220 ppm.

Actualmente para distinguir si una señal de carbono corresponde a un metino (CH), metileno ( $\text{CH}_2$ ) o metilo ( $\text{CH}_3$ ) se usa una técnica llamada DEPT (distortionless enhancement by polarization transfer, ampliación sin distorsión por transferencia de polarización), en la cual se obtiene un espectro de carbono en condiciones en las que sólo los carbonos de metinos generan señales; después un segundo en el que las señales de metilos y metinos aparecen como señales positivas, las de metilenos como señales negativas y las señales de carbono no protonado no aparecen, por lo que se puede saber por comparación cuales señales corresponden a carbonos no protonados.

**RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR BIDIMENSIONAL (RMN-2D).** <sup>48, 52</sup>

Permite determinar estructuras de moléculas complejas. Los espectros bidimensionales tienen dos ejes de frecuencia y uno de intensidad por lo que aparecen como una gráfica de superficie (como montañas), pero se acostumbra representarlos como una gráfica de contorno (como una vista aérea) Entre las técnicas bidimensionales más comunes están COSY, HSQC y HMBC.

**ESPECTRO COSY** <sup>52</sup>

(Correlation spectroscopy, Espectroscopia de correlación homonuclear)

Este tipo de espectro muestra que protones están acoplados entre sí. Es un espectro simétrico en el que se muestra el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto en el eje X y también en el Y. Muestra además una serie de picos (contornos) en la diagonal y fuera de ella. Los picos fuera de la diagonal aparecen en la posición (cruce de picos) donde hay acoplamiento entre un protón del eje X y uno del Y.

**ESPECTRO HSQC** <sup>52</sup>

(Heteronuclear single quantum coherence, Espectroscopia de correlación heteronuclear cuántica simple).

El espectro HSQC es el análogo heteronuclear del espectro COSY. Se usa para identificar qué protones están unidos a cada carbono. En el espectro HSQC se grafica en un eje el espectro de  $^1\text{H}$  y en el otro eje el de  $^{13}\text{C}$  y en el espectro aparece un pico en la posición en que un protón se acopla con un carbono a un enlace.

**ESPECTRO HMBC** <sup>52</sup>

(Heteronuclear multiple bond correlation, Espectroscopia de correlación heteronuclear a múltiples enlaces).

Esta técnica es adecuada para determinar conectividades  $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$  a larga distancia (a dos y tres enlaces). Por lo anterior resulta muy útil en la asignación de señales, incluyendo las de carbonos no protonados, y también en la elucidación estructural, porque permite conectar fragmentos moleculares. En un espectro HMBC se grafica en un eje el espectro de  $^1\text{H}$  y en el otro eje el de  $^{13}\text{C}$ . El espectro se adquiere de tal modo que se genera un pico en la posición donde un núcleo de  $^1\text{H}$  se acopla a uno de  $^{13}\text{C}$  (o viceversa) a través de más de un enlace, generalmente dos o tres.

### ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)<sup>48</sup>

Esta técnica permite determinar la masa molecular de un compuesto y también proporciona información de algunas de sus características estructurales. A diferencia de las anteriores, esta es una técnica destructiva.

Consiste en introducir una pequeña cantidad de muestra en el espectrómetro de masas, donde se vaporiza y después es ionizada (se elimina un electrón de cada molécula) con lo que se produce un ion molecular que es un catión radical (especie con un electrón desapareado y carga positiva). Con la energía suministrada al sistema, muchos de los iones moleculares se fragmentan en otros cationes radicales, cationes, moléculas neutras o radicales más pequeños. Los fragmentos generados por ionización de la muestra se hacen pasar entre dos placas con carga negativa que aceleran a los que tienen carga positiva y los mandan al tubo analizador que está rodeado de un electroimán cuyo campo magnético los desvía y los hace seguir una trayectoria curva. El grado con que se desvía la trayectoria depende de la relación masa/carga ( $m/z$ ) del fragmento y de este modo se separan todas las partículas con un mismo valor  $m/z$  de las demás. Finalmente los fragmentos salen por la rendija de salida y el detector registra la cantidad relativa de fragmentos con determinada  $m/z$ .

La ionización de la muestra puede hacerse de diferentes técnicas, una de ellas es por impacto electrónico (IE). En esta técnica las moléculas vaporizadas se bombardean con un haz de electrones de alta energía ( $\sim 70\text{eV}$ ) que cuando choca con una molécula, expulsa un electrón y forma el ion molecular. Otro método de ionización es la ionización química (IQ) en la cual se introduce una sustancia ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ) con una concentración mucho mayor que la de la muestra. Esta sustancia se ioniza por impacto electrónico y cuando los iones generados chocan con las moléculas de la muestra las ionizan. Una tercera técnica es la de ionización por electro spray (IES) y consiste en que la muestra disuelta en disolvente

polar y volátil se bombea a través de una boquilla metálica cuya punta se carga con alto voltaje y esto produce gotas cargadas de las que se evapora el disolvente dejando iones desnudos que entran al espectrómetro de masas.

En un espectro de masas el ion molecular es el pico con el valor máximo de  $m/z$  y corresponde a la masa molecular del compuesto. Los picos con valores de  $m/z$  menores se llaman picos de fragmentación y su análisis proporciona información de la estructura del compuesto. El pico más alto del espectro es el pico base y se le asigna una abundancia relativa del 100 %.

**OBJETIVO GENERAL**

- Contribuir al conocimiento de la composición química del género *Physalis* a través del estudio químico de las partes aéreas de *Physalis orizabae* L.

**OBJETIVOS PARTICULARES**

- Aislar el mayor número de los metabolitos secundarios presentes en las partes aéreas de *Physalis orizabae* L.
- Determinar las estructuras químicas de los compuestos aislados.

#### **4. PARTE EXPERIMENTAL**

##### **4.1 MATERIAL Y EQUIPO**

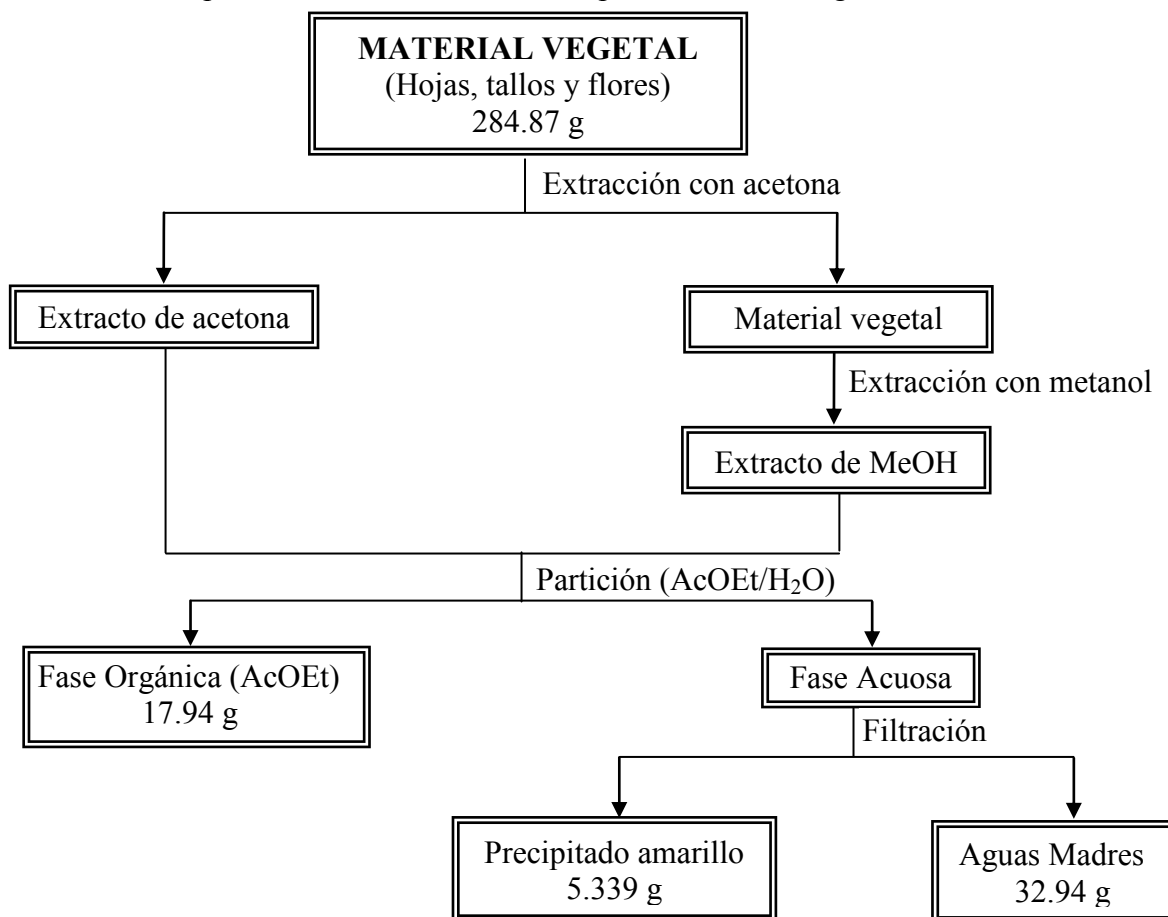
Los puntos de fusión (no corregidos) fueron determinados en un aparato Fisher-Johns. Para las cromatografías en columna operadas con vacío (CCV) se utilizó como fase estacionaria sílica gel (Merck 60 G). Para las cromatografías en capa fina se utilizaron cromatofolios Alugram Sil G/UV<sub>254</sub> de 0.25 mm. Se utilizó como revelador sulfato cérico al 3 % en ácido sulfúrico 2N y/o lámpara de UV Spectroline modelo CX-20 ( $\lambda$  254 y 366 nm). Los espectros de RMN fueron determinados en espectrómetros Varian Unity Plus (500 MHz <sup>1</sup>H y 125.7 MHz <sup>13</sup>C) y Varian MHz (300 MHz <sup>1</sup>H y 75 MHz <sup>13</sup>C). Los espectros de infrarrojo se determinaron en un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 27. La rotación óptica, así como el espectro de UV se determinaron en un espectrofotómetro UV-Vis Shimatzu U160. Los espectros de masas se determinaron por la técnica ESI (electrospray) en un equipo Bruker Esquire 6000.

##### **4.2 MATERIAL VEGETAL**

La planta *Physalis orizabae* L. se recolectó en el Valle del Conejo, Mpio. de Ocoyoacac, Estado de México, el 27 de agosto del 2006. Un ejemplar de la planta se depositó, para su resguardo, en el Herbario de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ, con la clave EMJ-8). La especie fue identificada por la Dra. Mahinda Martínez.

### 4.3 EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las partes aéreas (hojas, tallos y flores) secas y molidas (284.87 g) se colocaron en una columna de vidrio (diám. 8 cm; h 60 cm) y se extrajeron con acetona (8 L) y posteriormente con MeOH (5 L). Los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida. Estos extractos mostraron una composición similar por CCF por lo que se combinaron y el extracto obtenido (60.94 g) se sometió a un proceso de partición (AcOEt-H<sub>2</sub>O), para lo cual el extracto suspendido en agua (500 mL) se extrajo seis veces con AcOEt (250 mL) en un embudo de separación. Las fracciones de AcOEt (fase orgánica) se reunieron y el disolvente que contenían se eliminó por destilación a presión reducida, con lo que se obtuvieron 17.94 g de residuo. En la fase acuosa se formó un precipitado amarillo que se filtró (5.339 g) y sus aguas madres se concentraron a sequedad haciéndoles pasar una corriente de aire. Su peso fue de 32.94 g.





#### **4.4 AISLAMIENTO DE COMPUESTOS**

La fase orgánica, se disolvió en acetona, se adsorbió en celita, se evaporó el disolvente y se colocó en la parte superior de una columna de sílica gel (diám. 8.5 cm; h 9.5 cm). La columna (columna A) se comenzó a eluir con hexano y se continuó la elución con mezclas de hexano-AcOEt de polaridad creciente.

Se obtuvieron 153 fracciones de 500 mL cada una, según lo siguiente: frs 1A-10A (hexano-AcOEt 100:0); frs 11A-27A (hexano-AcOEt 95:5); frs 28A-45A (hexano-AcOEt 90:10); frs 46A-57A (hexano-AcOEt 85:15); frs 58A-82A (hexano-AcOEt 80:20); frs 83A-98A (hexano-AcOEt 70:30); frs 99A-112A (hexano-AcOEt 60:40); frs 113A-125A (hexano-AcOEt 40:60); frs 126A-140A (hexano-AcOEt 20:80); frs 141A-150A (hexano-AcOEt 0:100); frs 151A-153A (MeOH). Las fracciones obtenidas se analizaron mediante cromatografía en capa fina y las que mostraron una composición similar se reunieron.

Las fracciones 12A-29A, (2.81 g) se sometieron a cromatografía en columna (columna B; diám. 4.6 cm; h 6.5 cm), eluida con mezcla de hexano-AcOEt. Se obtuvieron 85 fracciones de 50 mL como sigue: frs 1B-18B (hexano-AcOEt 97:3); frs 19B-39B (hexano-AcOEt 95:5); frs 40B-60B (hexano-AcOEt 90:10); frs 61B-72B (hexano-AcOEt 85:15); frs 73B-81B (hexano-AcOEt 80:20); frs 82B-84B (AcOEt 100); frs 85B MeOH. Las fracciones que mostraron una composición similar por CCF se reunieron.

Las frs 7B-8B (0.64 g) se purificaron mediante cromatografía en columna (columna C; diám 2.0 cm; h 5.5 cm), eluida con hexano-AcOEt (99:1). Se obtuvieron 26 fracciones de 25 mL cada una. Las fracciones 8C-12C se cristalizaron de etanol. Se obtuvieron cristales color blanco con un punto de fusión 135-137 °C, éstos se identificaron como la mezcla de  $\beta$ -sitosterol (**I**) y estigmasterol (**II**).

Cada uno de los siguientes grupos de fracciones: 30A-42A, 43A-87A, y 88A-109A fue sometido a diferentes procesos de purificación (CC y CCF preparativa) sin que se lograra obtener algún compuesto puro.

Las fracciones 110A-121A (2.0789 g) se decoloraron con carbón activado y se sometieron a cromatografía en columna (columna D; diám. 4.6 cm; h 9 cm) eluida con mezclas de hexano-acetona. Se obtuvieron 133 fracciones de la siguiente manera: frs 1D-31D (hexano-acetona 80:20) frs 32D-92D (hexano-acetona 75:25); frs 93D-109D (hexano-acetona 70:30); frs 110D-124D (hexano-acetona 60:40); frs 125D-133D (hexano-acetona 50:50). Las fracciones 38D-42D (0.1874g) contenían el compuesto **III**, el cual se purificó por medio de cromatografía en columna de sílica gel (columna E; diam 2.6 cm; h 8.5 cm), eluida con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona, frs 1E-22E (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona 80:20); frs 23E-29E (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona 25:75); frs 30E-31E (acetona). El compuesto **III** eluyó en las fracciones 7E-15E (0.106 g), pero aún contenía impurezas por lo que se purificó mediante cromatografía en placa preparativa de sílica gel, eluida 3 veces con hexano-AcOEt (80:20), y posterior cristalización de AcOEt-hexano. Se obtuvieron 12.7 mg del compuesto **III** (0.004 % respecto al peso de la planta seca).

El precipitado amarillo (5.339 g) que se obtuvo de la fase acuosa durante el proceso de partición, contenía mayoritariamente al compuesto **IV**. Este compuesto se purificó por cristalización de metanol-AcOEt. Se obtuvieron 3.97g del compuesto puro.

#### **4.5 DATOS ESPECTROSCÓPICOS Y FÍSICOS**

##### **COMPUESTO (III)**

###### **Orizabólida**

Cristales blancos, **pf** 174-176 ° C;  $[\alpha]_D = +38.1^\circ$  (MeOH, c 2.1); **IR**  $\lambda_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$  (pastilla): 3369, 1710 (segunda derivada 1734, 1711, 1686, 1659); **RMN**  $^1\text{H}$ : Ver tabla 3; **RMN**  $^{13}\text{C}$ : Ver tabla 3. **EM IES**: m/z 567.3  $[\text{M}+\text{Na}^+]$

##### **COMPUESTO (IV)**

###### **3-O-rutinósido de quercetina (rutina)**

Sólido amarillo, **pf** 192-195 ° C;  $[\alpha]_D$  2.95°. (MeOH, c 0.71); **IR**  $\lambda_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$  (nujol): 3422, 2953, 1655, 1295, 1205, 1065; **UV**  $\lambda_{\max}$  (MeOH) nm: 358 (log  $\epsilon$  4.44), 258 (log  $\epsilon$  4.53); **RMN**  $^1\text{H}$ : Ver tabla 4; **RMN**  $^{13}\text{C}$ : Ver tabla 5. **EM IES**: m/z 611  $[\text{M}+\text{H}^+]$

###### **Acetilación de 3-O-rutinósido de quercetina (rutina)**

A 74.5 mg de rutina (**4**) disueltos en 0.5 mL de piridina, se agregaron 0.5 mL de anhídrido acético. La solución se dejó reaccionar durante 6 hr a 50 ° C. Al término de este tiempo se adicionó agua y se extrajo con AcOEt. La solución orgánica se lavó con agua, después se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró. Se obtuvieron 123 mg. Los productos de la reacción se separaron por medio de una cromatografía en columna de silica gel eluida con AcOEt-hexano (1:1). Se obtuvieron 96.9 mg de rutina decaacetilada (**V**) y 12.2 mg de rutina nonacetilada (**VI**).

**COMPUESTO (V)**

**Decaacetilrutina**

Sólido blanco, **pf** 120-122 °C, **IR**  $\lambda_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CHCl}_3$ ): 1754, 1646, 1627; **RMN**  $^1\text{H}$ : Ver tabla 6; **RMN**  $^{13}\text{C}$ : Ver tabla 6. **EM IES**:  $m/z$  1031.6  $[\text{M}+\text{H}^+]$

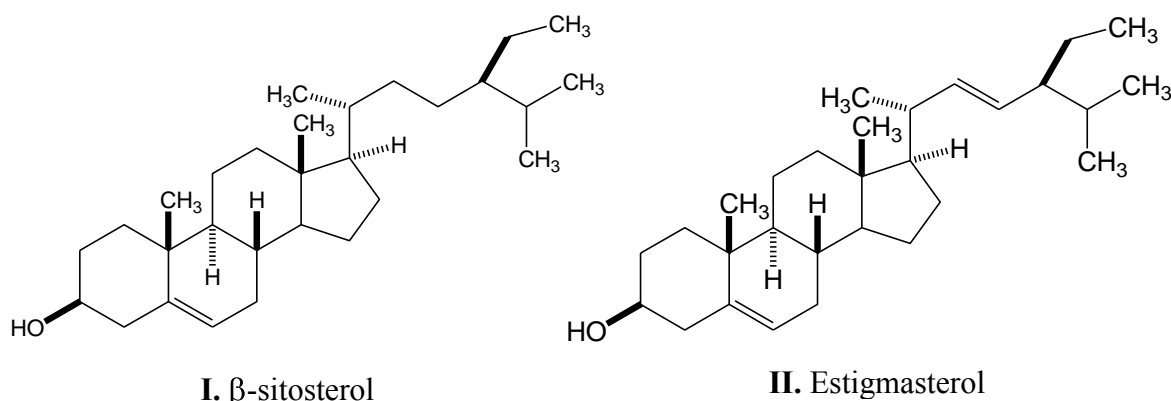
**COMPUESTO (VI)**

**Nonaacetilrutina**

Sólido blanco, **pf** 113-116 °C **RMN**  $^1\text{H}$ : Ver tabla 7; **RMN**  $^{13}\text{C}$ : Ver tabla 7. **EM IES**:  $m/z$  989.5  $[\text{M}+\text{H}^+]$

## 5. RESULTADOS

De la fracción de AcOEt se aislaron, la mezcla de  $\beta$ -sitosterol (**I**) y estigmasterol (**II**), el withaesteroide orizabólida (**III**) y el flavonoide rutina (**IV**). La mezcla de  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol, fue identificada por análisis de su espectro de RMN  $^1\text{H}$  y comparación mediante cromatografía en capa fina, con una muestra auténtica. El punto de fusión de la mezcla fue 135-137 °C. El  $\beta$ -sitosterol es el fitoesterol más abundante en la naturaleza y se ha encontrado que posee actividad anti-inflamatoria, analgésica y antipirética. Recientemente se ha descrito que la mezcla de  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol (en relación 3:1) neutraliza el veneno de dos serpientes muy peligrosas de la India.<sup>53</sup>



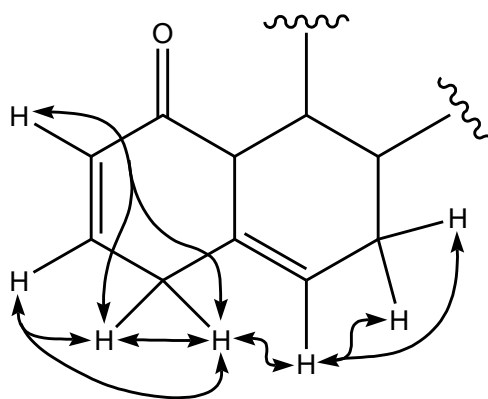
El compuesto **III** (orizabólida), se aisló en forma de cristales de color blanco. Su espectro de masas (espectro 1) presenta un ion pseudomolecular de  $m/z$  567  $[\text{M}+\text{Na}^+]$  que concuerda con la fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_9+\text{Na}$ . El espectro de IR (espectro 2) muestra bandas de absorción en  $3369\text{ cm}^{-1}$  (banda ancha,  $-\text{OH}$ ) y en  $1710\text{ cm}^{-1}$  (banda ancha,  $\text{C}=\text{O}$ ). La segunda derivada de la última banda mostró absorciones en  $1734\text{ cm}^{-1}$  (éster),  $1711\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -no saturada),  $1686\text{ cm}^{-1}$  (cetona  $\alpha,\beta$ -no saturada) y  $1659\text{ cm}^{-1}$  (dobles enlaces).

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 3) se observan 30 señales que indican la presencia del mismo número de carbonos en la molécula. Del análisis del espectro DEPT (espectro 4), se logró determinar que de estos 30 carbonos, 11 corresponden a carbonos no protonados, 6 a metinos (CH), 9 a metilenos ( $\text{CH}_2$ ) y 4 a metilos ( $\text{CH}_3$ ).

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 5) muestra señales en  $\delta$  5.76 (ddd,  $J= 10, 3, 1.5$  Hz) y 6.85 (ddd,  $J= 10, 5, 2.5$  Hz), que son características de los protones vinílicos, H-2 y H-3 del sistema 2-en-1-ona del anillo A de las withanólidas.

La presencia de la enona se confirma al observar en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 3), una señal en  $\delta$  204.1 que se asignó al carbono del carbonilo de una cetona (C-1), así como las señales de los carbonos vinílicos C-2 y C-3 en  $\delta$  128.2 y 146.4 respectivamente.

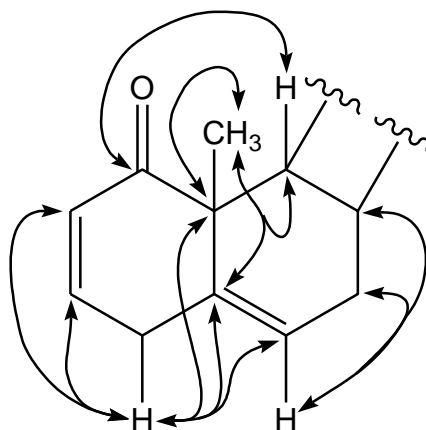
En el espectro COSY (espectro 6) se observa que las señales de H-2 y H-3 están acopladas con las de los protones de un metileno en  $\delta$  3.32 (brd  $J=21.5$  Hz) y 2.86 (dd  $J=21.5, 5$  Hz), por lo que estas últimas se atribuyen a H-4a y H-4b (Figura 5). En el espectro HSQC (espectro 7) estas señales correlacionaron con la señal en  $\delta$  34.0 que se asigna a C-4.



**Figura 5.** Estructura parcial de la orizabólida, en la que se muestran algunas correlaciones observadas en el espectro COSY.

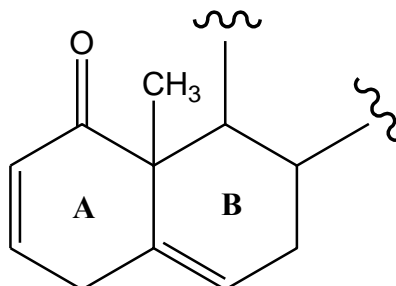
El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  muestra otras dos señales para carbonos vinílicos, una corresponde a un carbono no protonado ( $\delta$  136.5) y la otra a un CH ( $\delta$  125.8). La señal del protón unido a este carbono aparece en  $\delta$  5.71 (dt  $J=6, 2$  Hz) y en el espectro COSY correlaciona con H-4a, por lo que se establece que el doble enlace se encuentra entre los C-5 y C-6, y que el protón vinílico corresponde a H-6 (Figura 6). En el espectro COSY (Figura 5), H-6 correlaciona con las señales en  $\delta$  2.26 y 1.82 que se asignan a H-7a y H-7b, respectivamente.

El espectro HMBC (espectro 8) mostró las correlaciones de C-1 con los protones del metilo en  $\delta$  1.19 ( $\text{CH}_3$ -19) y con un multiplete en  $\delta$  2.36 (H-9); así como las de los protones de C-19 con C-5 ( $\delta$  136.5), C-9 ( $\delta$  36.9) y C-10 ( $\delta$  51.5), las de H-6 con C-4, C-7 ( $\delta$  26.5), C-8 ( $\delta$  38.5) y C-10, y las de H-4b con C-2, C-3, C-5, C-6 y C-10 (Figura 6).



**Figura 6.** Estructura parcial de la orizabólida, en la que se muestran algunas correlaciones observadas en el espectro HMBC.

Estas correlaciones establecen la sustitución de los anillos A y B de la orizabólida como se muestra en la figura 7.

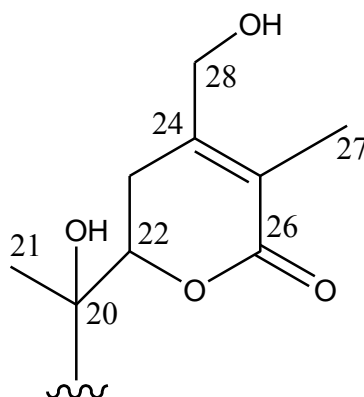


**Figura 7.** Estructura parcial de la orizabólida.

Como se ha comentado, las withanólidas generalmente poseen una  $\delta$ -lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ - no saturada. En el caso de la orizabólida, el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  muestra una señal en  $\delta$  166.4 que se atribuye al carbonilo de la lactona (C-26). La presencia de un doble enlace conjugado con la lactona se dedujo de las señales para dos carbonos vinílicos en  $\delta$  153.4 (C-24) y  $\delta$  121.6 (C-25). En el espectro HMBC los C-24 y C-25 correlacionan con el protón de un metileno ( $\delta$  3.23) que se asigna a H-23a, ya que en el espectro COSY correlaciona con las señales en  $\delta$  2.39 (H-23b) y 4.92 (H-22). Esta última señal corresponde al cierre lactónico. En el espectro HMBC se observa que los protones de un metilo vinílico ( $\delta$  1.82, d,  $J= 1.5$  Hz) correlacionaron con C-24, C-25 y C-26, mientras que los de un metileno base de función oxigenada ( $\delta$  4.41 y 4.28) sólo correlacionan con C-24 y C-25, lo que indica que el metilo corresponde a CH<sub>3</sub>-27 y el metileno a CH<sub>2</sub>-28. Los protones H-28a ( $\delta$  4.41, dd,  $J= 14.5, 6$  Hz) y H-28b ( $\delta$  4.28, dd,  $J= 14.5, 6$  Hz) interaccionan en el espectro COSY, con el protón de un grupo hidroxilo en  $\delta$  4.28 (t,  $J= 6$  Hz, C-28-OH). La multiplicidad de H-22 (dd,  $J= 13, 3$  Hz) y las correlaciones que muestra en el espectro HMBC con un carbono no protonado y base de oxígeno ( $\delta$  79.7, C-20) y con el carbono de un metilo ( $\delta$  19.4, C-21) permiten proponer la presencia de un

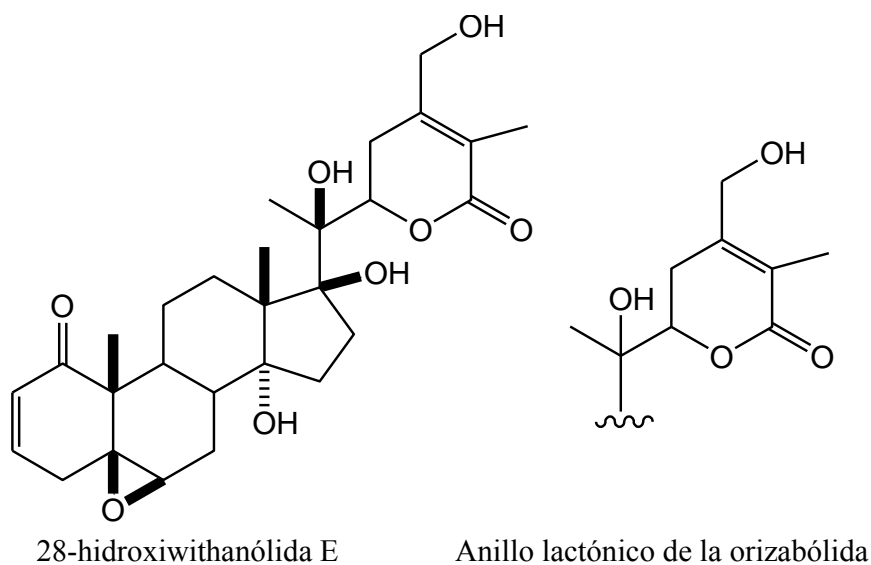


grupo hidroxilo en C-20. Con lo anterior se establece que la orizabólida contiene el fragmento que se muestra en la figura 8.



**Figura 8.** Estructura parcial de la orizabólida.

Lo anterior se confirma al comparar los desplazamientos químicos de la orizabólida con los de la 28-hidroxiwithanólida E (tabla 1) un compuesto de estructura conocida.<sup>54</sup>



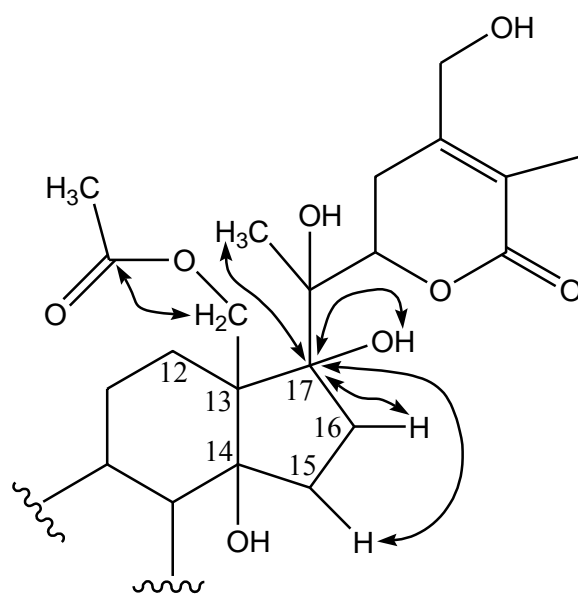
**Tabla 1.** Datos seleccionados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de la orizabólida y 28-hidroxiwithanólida E.

$^{13}\text{C}$	Orizabólida <sup>a</sup>	28-hidroxiwithanólida E <sup>a</sup>
20	79.7	79.2
21	19.4	20.0
22	82.1	80.7
23	29.7	28.7
24	153.4	151.7
25	121.6	121.8
26	166.4	165.8
27	11.9	11.9
28	61.7	62.1

<sup>a</sup>Determinado en  $\text{CDCl}_3$ .

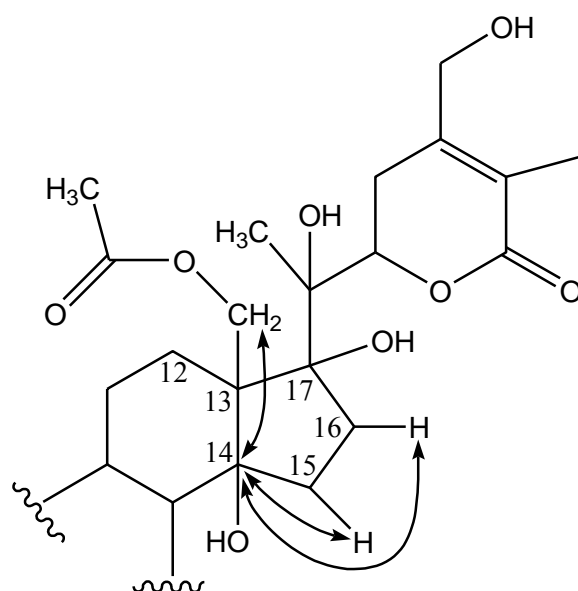
En la región de carbonos base de función oxigenada del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , se observan otras dos señales para carbonos no protonados en  $\delta$  88.9 y 81.7. La primera se atribuye al carbono base de alcohol C-17 (Figura 9), porque en el espectro HMBC correlaciona con las señales de los protones de C-21, de C-15 ( $\delta$  1.61, m, 2H), de C-16 ( $\delta$  2.66 y 1.72), de un grupo hidroxilo ( $\delta$  3.93, C-17-OH) y de un metileno base de oxígeno ( $\delta$  4.38, s, 2H, H-18a, H-18b).

Esta última señal correlaciona con la de un carbonilo de acetato ( $\delta$  171.2), cuya presencia se confirma por las señales en  $\delta_{\text{C}}$  21.0 y  $\delta_{\text{H}}$  2.08.



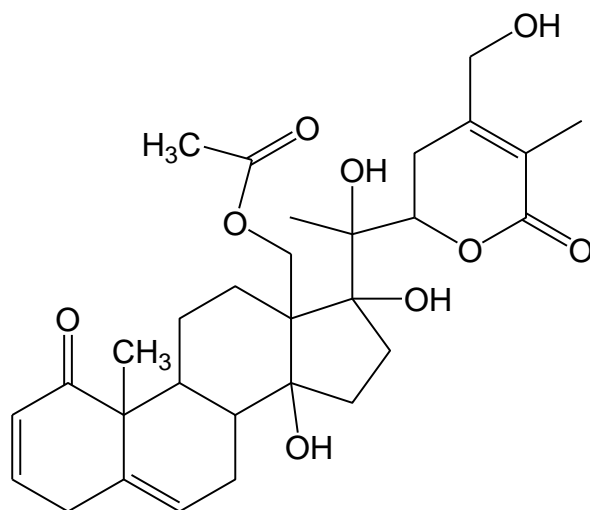
**Figura 9.** Estructura parcial de la orizabólida en la que se muestran algunas interacciones C-H observadas en el espectro HMBC.

La señal en  $\delta$  81.7 (Figura 10) se asignó por su desplazamiento, a un carbono base de alcohol y se atribuyó a C-14 por las correlaciones que presenta con H-15a, H-15b, H-16a, H-16b, H-18a y H-18b, en el espectro HMBC.



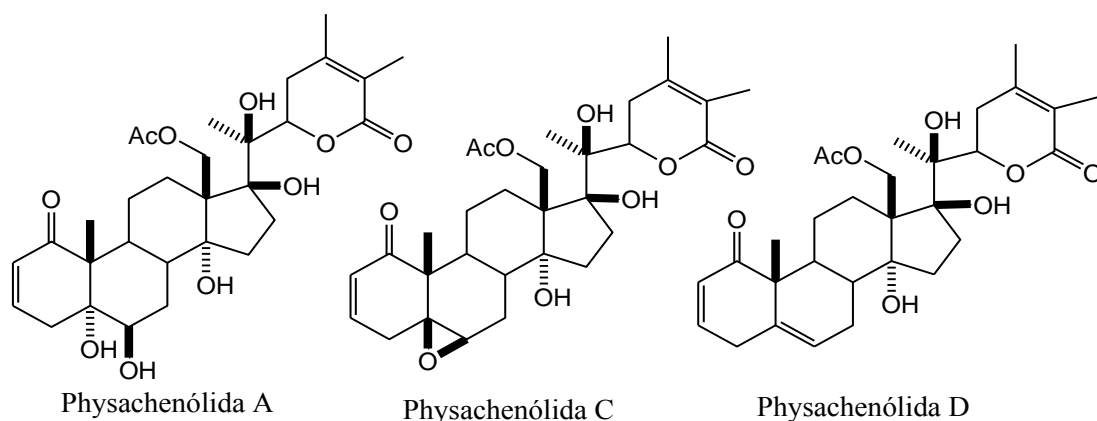
**Figura 10.** Estructura parcial de la orizabólida en la que se muestran algunas interacciones C-H observadas en el espectro HMBC.

Así, se establece que la estructura de la orizabólida, sin estereoquímica, es la siguiente.



En cuanto a la estereoquímica, se propone que en la orizabólida, como en todas las withanólidas aisladas hasta ahora, la orientación de C-18, C-19 y H-8 es beta, mientras que la de H-9 es alfa y la configuración de C-22 es *R*.

La orientación de los hidroxilos en C-14, C-17 y la configuración de C-20 se dedujeron de las comparaciones de los datos de RMN  $^{13}\text{C}$  de la orizabólida con los de compuestos similares descritos en la literatura. Se encontró una gran semejanza entre los datos de la orizabólida y de los compuestos con C-14  $\alpha$ -OH, C-17  $\beta$ -OH y configuración *S* en C-20, como las physachenólidas A, C y D<sup>55</sup> (tabla 2). La estructura de la physachenólida A se confirmó por difracción de rayos X.<sup>55</sup>

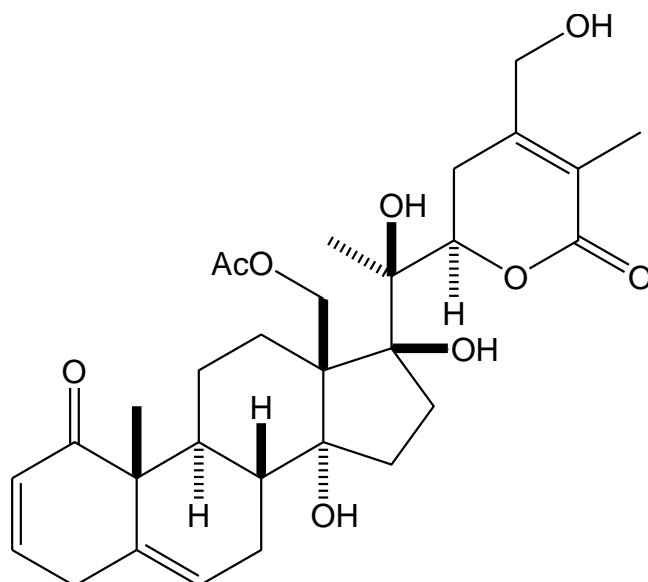


**Tabla 2.** Datos seleccionados de RMN  $^{13}\text{C}$  orizabólida y de las physachenólidas A, C y D.

$^{13}\text{C}$	Orizabólida <sup>a</sup>	Physachenólida A <sup>b</sup>	Physachenólida C <sup>a</sup>	Physachenólida D <sup>a</sup>
13	58.2	56.9	57.5	57.6
14	81.7	81.7	81.4	81.4
15	33.7	32.1	32.8	33.0
16	37.9	36.2	38.1	38.0
17	88.9	87.5	88.0	88.3
18	65.2	64.9	65.1	65.3
20	79.7	77.9	78.8	78.8
21	19.4	18.4	19.1	19.3
22	82.1	80.8	79.5	79.7

<sup>a</sup> Determinado en  $\text{CDCl}_3$     <sup>b</sup> Determinado en  $\text{CDCl}_3\text{-DMSO-d}_6$

Por lo anterior se propone que la orizabólida presenta la configuración que se muestra en **III**.



**Orizabólida (III)**

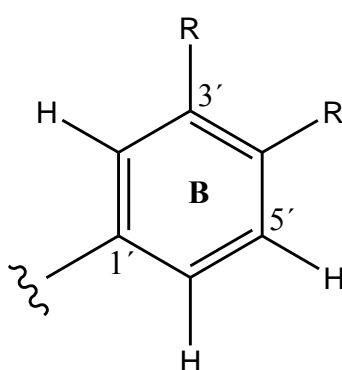
**Tabla 3.** Datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la orizabólida (III).

Posición	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	$^1\text{H}$ ( $\delta$ , m, J en Hertz)
1	204.1	
2	128.2	5.76 ddd 10, 3, 1.5
3	146.4	6.85 ddd 10, 5, 2.5
4	34.0	3.32 d a 21.5 2.86 dd 21.5, 5.0
5	136.5	
6	125.8	5.71 dt 6, 2
7	26.5	2.26 m 1.82 m
8	38.5	1.82 m
9	36.9	2.36 m
10	51.5	
11	24.0	2.25 m 1.43 m
12	26.5	2.38 m 1.96 dt a 12, 3.5
13	58.2	
14	81.7	
15	33.7	1.61 m 2H
16	37.9	2.66 m 1.72 dd a 14, 8
17	88.9	
18	65.2	4.38 s 2H
19	18.9	1.19 s
20	79.7	
21	19.4	1.44 s
22	82.1	4.92 dd 13, 3
23	29.7	2.39 m 3.23 d a 18, 3
24	153.4	
25	121.6	
26	166.4	
27	11.9	1.82 d 1.5
28	61.7	4.41 dd 14.5, 6 4.28 dd 14.5, 6
29 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ )	171.2	
30 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ )	21.0	2.09 s
17-OH		3.93 s
28-OH		4.28 t 6

Determinado en  $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$  <sup>a</sup> señal ancha

El compuesto **IV** se aisló en forma de un sólido amarillo. El espectro de masas presenta un ion pseudomolecular de  $m/z$  611  $[M+H]^+$  que concuerda con la fórmula molecular  $C_{27}H_{30}O_{16}$ . Su espectro en el IR (espectro 9) muestra las siguientes bandas de absorción en 3422 (ancha, -OH), 2953 (aromático), 1655 (cetona), 1295 (éter), 1205 (éter), 1065 (aromático)  $cm^{-1}$ .

El espectro de RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , espectro 10) presenta señales características para un flavonoide, ya que muestra un sistema AB formado por las señales en  $\delta$  6.20 (d,  $J= 2.1$  Hz) y 6.39 (d  $J= 2.1$  Hz). Estas señales integran para un protón cada una y su constante de acoplamiento indica una relación meta, por lo que fueron asignadas a los protones H-6 y H-8 de un anillo aromático de una flavona (Anillo A), sustituido en las posiciones 5 y 7. Se observan también tres señales que integran para un protón cada una en  $\delta$  7.66 (d,  $J= 2.4$  Hz), 7.62 (dd,  $J= 8.4, 2.4$  Hz) y 6.87 (d,  $J= 8.4$  Hz). Sus constantes de acoplamiento sugieren una relación meta entre los dos primeros y orto entre los dos últimos. Lo anterior está de acuerdo con un anillo B, 3',4'-disustituido (Figura 11) y por lo tanto las señales antes mencionadas se asignan a H-2' ( $\delta$  7.66), H-5' ( $\delta$  6.87) y H-6' ( $\delta$  7.62).

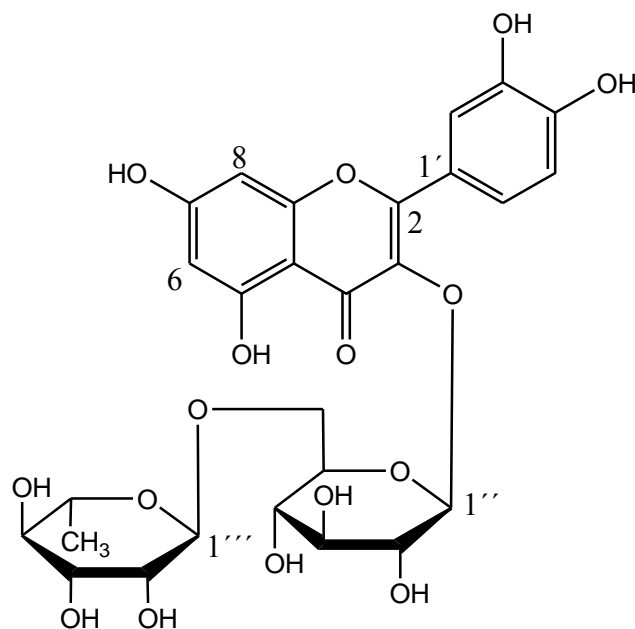


**Figura 11.** Estructura parcial del flavonoide.  
(Anillo B)



En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 11) se observa una señal en  $\delta$  179.4 que se asigna al carbonilo de la  $\gamma$ -pirona (anillo C, C-4). Se observan también dos señales para los carbonos vinílicos del doble enlace entre C-2 y C-3 ( $\delta$  158.5 y 135.6, respectivamente). La ausencia de una señal para H-3 indica que se trata de un flavonol. Con lo anterior se propone que en la posición C-3 del flavonol se encuentra sustituido.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  muestra señales para dos protones anoméricos en  $\delta$  5.10 (d,  $J= 7.2$  Hz) y 4.51 (d,  $J= 1.8$  Hz); muestra también un conjunto de señales entre  $\delta$  3.20 y  $\delta$  3.80 que se atribuyen a protones base de oxígeno y a campo alto se observa un doblete que se asigna a un metilo ( $\delta$  1.11, d  $J= 6.3$  Hz). Lo anterior permite proponer que en la molécula existe un disacárido, tipo rutinosa. Al revisar la literatura se encontró una gran similitud entre los datos espectroscópicos y propiedades físicas del compuesto **IV** y de rutina (Tablas 4 y 5).



**Rutina (IV)**

**Tabla 4.** Tabla comparativa entre los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  de RMN de la Rutina y el compuesto **IV**.

$^1\text{H}$	RUTINA <sup>a,56</sup> ( $\delta$ , m, J en Hz)	IV <sup>a</sup> ( $\delta$ , m, J en Hz)	RUTINA <sup>b,57</sup> ( $\delta$ , m, J en Hz)	IV <sup>b</sup> ( $\delta$ , m, J en Hz)
6	6.21 d 2	6.20 d 2.1	6.06 s	6.18 d 2.1
8	6.40 d 2	6.39 d 2.1	6.25 s	6.38 d 2.1
2'	7.66 d 2.1	7.66 d 2.4	7.47 d 2	7.52 d 1.8
5'	6.87 d 8.5	6.87 d 8.4	6.78 d 8	6.83 d 9
6'	7.62 dd 8.5, 2.1	7.62 dd 8.4, 2.4	7.54 dd 8, 2	7.54 dd 9, 1.8
1''	5.10 d 7.7	5.10 d 7.2	5.26 d 8	5.34 d 7.2
2''	3.46 dd 8.9, 7.7	3.20-3.80 m	3.01- 3.30 m	3.00-3.50 m
3''	3.40 t 8.9	3.20-3.80 m	3.01- 3.30 m	3.00-3.50 m
4''	3.26 t 8.9	3.20-3.80 m	3.01- 3.30 m	3.00-3.50 m
5''	3.32 ddd 8.9, 6.1,	3.20-3.80 m	3.01- 3.30 m	3.00-3.50 m
6''	3.80 dd 11, 1.2	3.80 da 10.2	3.70 dd 12	3.69 d 10
6''	3.38 dd 11, 6.1	3.20-3.80 m	3.35 dd 12, 6	3.28 m
1'''	4.51 d 1.5	4.51 d 1.8	4.40 br. s,	4.37 s
2'''	3.62 dd 3.4, 1.5	3.62 dd 3.5, 1.5	3.01- 3.30 m	3.00-3.50 m
3'''	3.53, dd 9.6, 3.4	3.20-3.80 m	3.01- 3.30 m	3.00-3.50 m
4'''	3.27 t 9.6	3.20-3.80 m	3.01- 3.30 m	3.00-3.50 m
5'''	3.44 dc 9.6, 6.2	3.20-3.80 m	3.01- 3.30 m	3.00-3.50 m
6'''	1.11 d 6.2	1.11 d 6.3	1.00 d 6	0.98 d 6.3

<sup>a</sup> Determinado en  $\text{CD}_3\text{OD}$

<sup>b</sup> Determinado en  $\text{DMSO-d}_6$

**Tabla 5.** Tabla comparativa entre los datos espectroscópicos de  $^{13}\text{C}$  RMN de la Rutina y el compuesto IV.

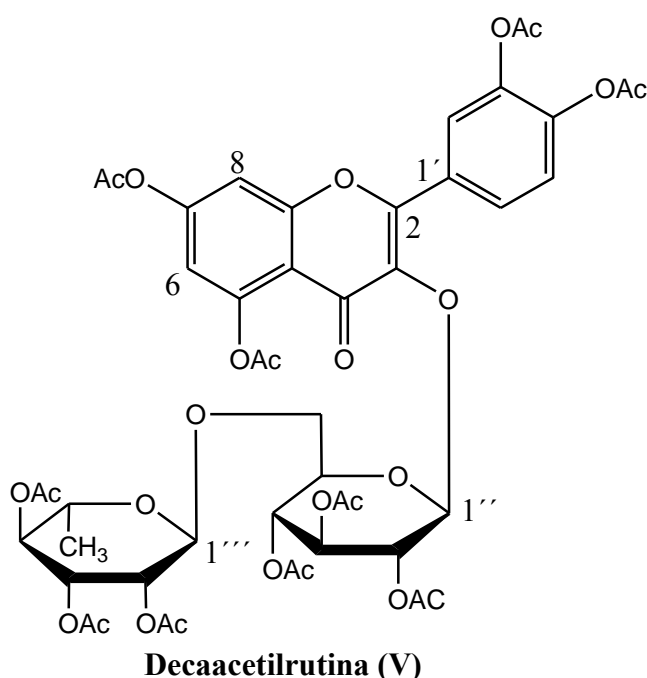
$^{13}\text{C}$	RUTINA <sup>a, 56</sup> ( $\delta$ )	IV <sup>a</sup> ( $\delta$ )	RUTINA <sup>b, 58</sup> ( $\delta$ )	IV <sup>b</sup> ( $\delta$ )
2	158.5	158.5	156.7	156.6
3	135.6	135.6	133.3	133.3
4	179.4	179.4	177.4	177.4
5	163.0	163.0	161.2	161.2
6	99.9	100.0	99.0	98.7
7	166.0	166.1	164.1	164.1
8	94.9	94.9	93.7	93.6
9	159.3	159.4	156.4	156.4
10	105.7	105.6	104.0	103.9
1'	123.1	123.1	121.7	121.6
2'	117.7	117.7	115.3	115.2
3'	145.8	145.8	144.7	144.7
4'	149.8	149.8	148.3	148.4
5'	116.1	116.1	116.4	116.2
6'	123.6	123.6	121.2	121.2
1''	104.7	104.7	101.3	101.2
2''	75.7	75.7	74.1	74.1
3''	78.2	78.2	76.4	76.4
4''	71.4	71.4	70.0	70.4
5''	77.2	77.2	75.8	75.9
6''	68.6	68.6	67.0	67.0
1'''	102.4	102.4	100.7	100.7
2'''	72.1	72.1	70.4	70.5
3'''	72.3	72.2	70.0	70.0
4'''	73.9	73.9	71.9	71.8
5'''	69.7	69.7	70.0	68.2
6'''	17.9	17.9	17.7	17.7

<sup>a</sup> Determinado en  $\text{CD}_3\text{OD}$     <sup>b</sup> Determinado en  $\text{DMSO-d}_6$

Sin embargo, debido a que en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 10) del compuesto **IV** las señales del disacárido aparecen sobrepuestas, no se pudieron asignar con certeza, por lo que existía cierta duda en cuanto a su naturaleza. Por lo anterior, se decidió obtener un derivado del compuesto **IV** que permitiera observar con mayor claridad las señales de los carbohidratos en los espectros de RMN. En consecuencia el compuesto **IV** fue acetilado y de la reacción se aislaron dos productos **V** y **VI**.

El espectro de masas del producto **V** presenta un ion pseudomolecular de  $m/z$  1031  $[\text{M}+\text{H}^+]$  que concuerda con la fórmula molecular  $\text{C}_{47}\text{H}_{50}\text{O}_{26}$ . El espectro de IR muestra bandas en 1646 (cetona) y 1242 (éter)  $\text{cm}^{-1}$  y una banda ancha en 1754  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a los carbonilos de los acetatos formados. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 12) se observan señales para diez metilos de acetato entre  $\delta$  1.94 y  $\delta$  2.44 (tabla 6). Las señales de los protones aromáticos aparecen desplazadas a campo bajo respecto a las del compuesto original, lo mismo que las de los protones de los azúcares. Así, el protón anomérico de la glucosa aparece como un doblete en  $\delta$  5.43 ( $J= 8$  Hz). Su constante de acoplamiento indica una relación axial-axial con H-2'' ( $\delta$  5.17, dd,  $J= 9.5, 8$  Hz). En el espectro COSY (espectro 13) se observa que la señal de H-2'' correlaciona con el triplete de H-3'' en  $\delta$  5.28 ( $J= 9.5$  Hz) que a su vez correlaciona con H-4'' ( $\delta$  4.94, t,  $J= 9.5$  Hz), éste con H-5'' ( $\delta$  3.57, ddd,  $J= 9.5, 5.5, 3.5$  Hz) y esta última señal con dos señales, doble de doble en  $\delta$  3.53 ( $J= 11, 3.5$  Hz) y 3.27 ( $J= 11, 5.5$  Hz), que se atribuyen a H-6a'' y H-6b''. Las señales de los carbonos C-1''-C-6'' se localizaron por medio del espectro HSQC (espectro 14) y se muestran en la tabla 6.

En el espectro HMBC (espectro 15), el protón anomérico de la glucosa (H-1'') correlaciona con C-3, mientras que C-6'' correlaciona con el protón anomérico de la ramnosa, cuyas señales en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se asignaron (tabla 6) por las correlaciones observadas en el espectro COSY. Con lo anterior se confirma que el disacárido presente en el compuesto **IV** es rutinosa y que el compuesto **IV** es rutina, por lo tanto, la estructura del producto **V** corresponde a la decaacetilrutina.



Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 16) y  $^{13}\text{C}$  (espectro 17) del producto **VI**, muestran señales para nueve grupos acetato. El espectro de masas presenta un ion pseudomolecular de  $m/z$  989  $[\text{M}+\text{H}^+]$  que concuerda con la fórmula molecular  $\text{C}_{45}\text{H}_{48}\text{O}_{25}$ . Lo anterior indica que existe un hidroxilo de la rutina sin acetilar. Al comparar los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto **V** con los del **VI**, se observa que los correspondientes a los anillos B, C y el disacárido son similares, por lo que se propone que la diferencia está en el anillo A.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **VI** se observa que el desplazamiento de C-5 es semejante al que presenta el mismo carbono del compuesto **V**, es decir, el hidroxilo en C-5 se encuentra acetilado. Con lo anterior, resulta evidente que el hidroxilo que no está acetilado es el de C-7. En apoyo de esta hipótesis se observó que las señales de C-6 ( $\delta$  108.9) y C-8 ( $\delta$  101.4) de **VI**, aparecen a campo más alto, respecto a las que presentan C-6 ( $\delta$  113.4) y C-8 ( $\delta$  109.0) en el compuesto **V**. Además, la señal de C-7 del compuesto **VI** se encuentra a campo más bajo ( $\delta$  160.6) que la del mismo carbono en **V** ( $\delta$  153.9). Por lo anterior se propone la siguiente estructura para el compuesto **VI**.

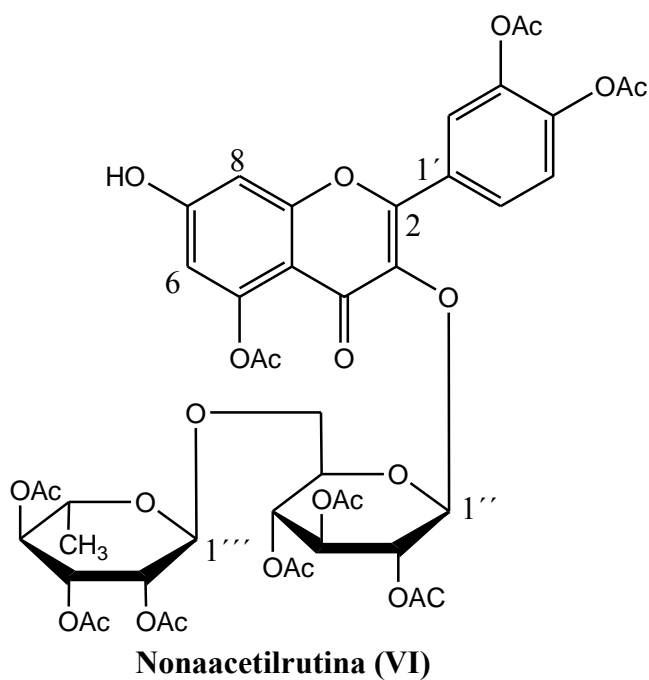


Tabla 6. Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de RMN de los compuestos V y VI.

$^{13}\text{C}$	V <sup>a</sup> ( $\delta$ )	VI <sup>a</sup> ( $\delta$ )	$^1\text{H}$	V <sup>a</sup> ( $\delta$ , m, J en Hz)	VI <sup>a</sup> ( $\delta$ , m, J en Hz)
2	154.6	154.0			
3	136.9	136.6			
4	171.9	172.0			
5	150.5	150.7			
6	113.4	108.9	6	6.83 d 2.0	6.51 d 2.4
7	153.9	160.6			
8	109.0	101.4	8	7.31 d 2.0	6.73 d 2.4
9	156.6	157.7			
10	115.1	111.2			
1'	128.6	128.9			
2'	124.7	124.6	2'	7.90 d 2.0	7.88 d, 2.1
3'	141.8	141.7			
4'	144.1	143.9			
5'	123.4	123.3	5'	7.34 d 8.5	7.31 d 9.0
6'	127.2	127.1	6'	7.95 dd 8.5, 2.0	7.89 dd 9.0, 2.1
1''	99.6	99.8	1''	5.43 d 8.0	5.36 d 7.5
2''	71.4	71.5	2''	5.17 dd 9.5, 8.0	5.17 dd 9.6, 7.8
3''	72.6	72.6	3''	5.28 t 9.5	5.27 t 9.6
4''	69.5	69.5	4''	4.94 t 9.5	4.92 t 9.6
5''	72.8	72.8	5''	3.57 ddd 9.5, 5.5, 3.5	3.57 ddd 9.6, 6.0, 3.3
6''	67.0	67.1	6'' 6''	3.53 dd 11, 3.5 3.25 dd 11, 5.5	3.51 dd 11.4, 3.3 3.25 dd 11.4, 6.0
1'''	97.8	97.8	1'''	4.51 brs	4.52 brs
2'''	69.4	69.5	2'''	5.09 d 3.5	5.11 d 3.3
3'''	69.0	69.1	3'''	5.08 dd 9.5, 3.5	5.08 dd 9.9, 3.3
4'''	70.9	71.0	4'''	4.94 t 9.5	4.95 t 9.9
5'''	66.3	66.3	5'''	3.64 dc 9.5, 6.5	3.66 m 6.3
6'''	17.2	17.1	6'''	1.06 d 6.5	1.14 d 6.3
5-OAc	169.2, 21.0	169.5, 21.1	5-OAc	2.44 s	2.42
7-OAc	167.8, 21.1		7-OAc	2.33 s	
3'-OAc	168.0, 20.6	168.2, 20.6	3'-OAc	2.34 s	2.35
4'-OAc	167.7, 20.6	167.8, 20.6	4'-OAc	2.30 s	2.30
2''-OAc	169.8, 20.8	170.0, 20.8	2''-OAc	2.14 s	2.15
3''-OAc	170.1, 20.6	170.1, 20.6	3''-OAc	2.02 s	2.03
4''-OAc	169.5, 20.6	169.6, 20.6	4''-OAc	2.02 s	2.03
2'''-OAc	169.8, 20.8	169.8, 20.8	2'''-OAc	2.08 s	2.11
3'''-OAc	169.7, 20.6	169.7, 20.6	3'''-OAc	1.94 s	1.94
4'''-OAc	170.0, 20.7	170.1, 20.6	4'''-OAc	1.94 s	1.97

<sup>a</sup> Determinado en  $\text{CDCl}_3$

### CONCLUSIONES

- El estudio químico del extracto orgánico de las partes aéreas de *Physalis orizabae* L. dio como resultado el aislamiento de orizabólida, que es un nuevo withaesteroide del tipo de las withanólidas. Se aisló también la mezcla de los esteroides  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol, así como el flavonoide rutina. Los tres últimos compuestos son de amplia distribución en la naturaleza.
- Los resultados del presente estudio son congruentes con los de trabajos previos de otras especies de *Physalis*, que han mostrado que los withaesteroides son los metabolitos secundarios mas comunes del género y que la presencia de flavonoides, especialmente flavonoides glicosilados, es frecuente en estas plantas.



**7. BIBLIOGRAFIA**

1. Bruneton, J. Plantas Tóxicas, Vegetales peligrosos para el hombre y los animales. Edit. Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp. 447-455, **2005**.
2. Goodman, Louis Sanford. Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9<sup>a</sup> Ed. Vol I. **2000**. pp. 157-158.
3. Muñoz, O., Piovano, M., Garbarino, J., Hellwing, V., Breitmaier, E. *Phytochemistry* **43**, 709-713, **1996**.
4. Mimaki, Y., Watanabe, K., Ando, Y., Sakuma, Ch., Sashida, Y., Furuya, S., Sakagami, H. *J. Nat. Prod.* **64**, 17-22, **2001**.
5. Perez-Castorena, A. L., Oropeza, R. F., Vázquez, A. R., Martínez, M., Maldonado, E. *J. Nat. Prod.* **69**, 1029-1033, **2006**.
6. Lavie, D., Bessalle, R., Pestchanker, M. J., Gottlieb, H. E., Frolow, F., Giordano, O. S. *Phytochemistry* **26**, 1791-1795, **1987**.
7. Damu, A. G., Kuo, P-C., Su, C. R., Kuo, T. H., Chen, T-H., Bastow, K. F., Lee, K-H., Wu, T-S. *J. Nat. Prod.* **70**, 1146-1152, **2007**.
8. Torres Manriquez, Rodrigo Fernando. Aislamiento y Caracterización de los constituyentes de *Physalis nicandroides* Schltdl.var *attenuata* Waterf. UAM Xochimilco. **2006**.
9. Montes, H. S., Aguirre, R. R., La agricultura de Mesoamérica, Tomate de Cáscara (*Physalis philadelphica* Lam). Cultivos marginados otra perspectiva de 1492. Colección FAO. **1992**.
10. Argueta, V. A. Ed, “Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana”, Instituto Nacional Indigenista. Vol. 3, pp.1351. **1994**.

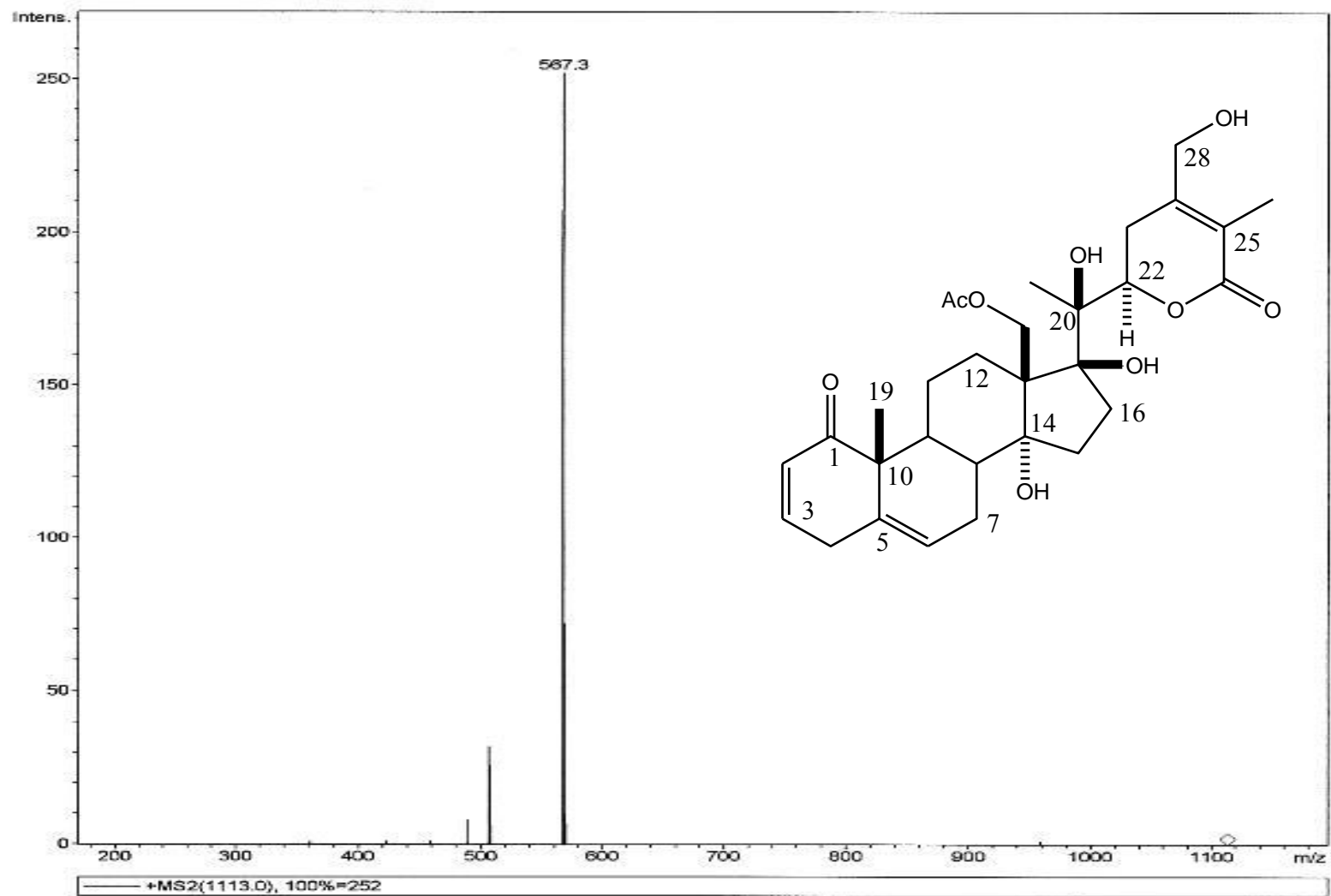
11. Su, B. N., Misico, R., Park, E. J., Santarsiero, B. D., Mesecar, A. D., Fong, H. H. S., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. *Tetrahedron* **58**, 3453-3466, **2002**.
12. Rodríguez, N. C., Bueno, A. M. L., Estudio de la diversidad citogenética de *Physalis peruviana* L. Fac. de Ciencias, Colombia, **2006**.
13. Zavala, D., Quispe, A., Posso, M., Rojas, J., Vaisberg, A. *An. Fac. Med. Lima* **67**, 283-289, **2006**.
14. Rodríguez U., Sheila, L., Elika, M. *Rev. Med. Vallejana* **4**, 43-53, **2007**.
15. García, H. Flora Medicinal de Colombia. Botánica Médica. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Bogotá. 81-83, **1975**.
16. Wu, S. J., Ng, L. T., Chen, C. H., Lin, D. L., Wang, S. S., Lin, C. C. *Life Sciences* **74**, 2061-2073, **2004**.
17. Wu, S., Ng, L., Lin, D., Huang, S., Wang, S. *Cancer Lett.* **215**, 199-208, **2004**.
18. Kuo, P. C., Kuo, T. H., Damu, A. G., Su, C. R., Lee, E. J., Wu, T. S., Shu, R., Chen, C. M., Bastow, K. F., Chen, T. H., Lee, K. H. *Org. Lett.* **8**, 2953-2956. **2006**.
19. Nagafuji, S., Okabe, H., Akahane, H., Abe, F. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 193-197, **2004**.
20. Sharma, N. K., Kulshreshtha, D. K., Tandon, J. S., Bhakuni, D. S., Dhar, M. M. *Phytochemistry* **13**, 2239-2245, **1974**.
21. Basey, K., McGaw, B. A., Woolley, J. G. *Phytochemistry*, **31**, 4173-4176, **1992**
22. [www.rjb.csic.es/fichaplanta](http://www.rjb.csic.es/fichaplanta)
23. Tong, H., Liang, Z., Wang, G. *Carbohydrate Polymers* **71**, 316-323, **2008**.
24. Vargas, P. O., Martínez, D. M., Dávila, A. P. La familia *Solanaceae* en el estado de Jalisco. El Género *Physalis*. Universidad de Guadalajara, 1 ed. **2003**.

25. Elliger, C. A., Eash, J. A., Waiss, A. C. Jr. *Biochem. System. Ecol.* **20**, 268, **1992**.
26. Maldonado, E., Torres, F. R., Martínez, M., Perez-Castorena, A. L. *J. Nat. Prod.* **69**, 1511-1513, **2006**.
27. Gottlieb, H. E., Cojocar, M., Sinha, S. C., Saha, M., Bagchi, A., Ali, A., Ray, A. B. *Phytochemistry* **26**, 1801-1804, **1987**.
28. Glotter, E., Withanolides and Related Ergostane type Steroids. *Nat. Prod. Rep.* **8**, 415-440, **1991**.
29. Subbaraja, G. V., Vanisree, M., Rao, C. V., Siravama Rishna, C., Sridhar, P., Payaprakasain, B., Nair, N.G. *J. Nat. Prod.* **69**, 1790-1792, **2006**.
30. Ascher, K. R. S., Nemny, N. E., Eliyahu, M., Kirson, I., Abraham, A., Glotter, E. *Experientia* **36**, 998-999, **1980**.
31. Choudhary, M., I. Shahwar D. E., Parveen, Z., Jabbar, A., Ali, I., Rahman A. U. *Phytochemistry* **40**, 1243-1246, **1995**.
32. Minguzzi, S., Barata, E. S., Shin, Y. G., Jonas, P. F., Chai, H. B., Park, E. J., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A. *Phytochemistry* **59**, 635-641, **2002**.
33. Misico, R. I., Song, L. L., Veleiro, A. S., Cirigliano, A. M., Tettamanzi, M. C., Burton, G., Bonetto, G. M., Nicotra, V. E., Silva, G. L., Gil, R. R., Oberti, J. C., Kinghorn, A. D., Pezzuto, J. M. *J. Nat. Prod.* **65**, 677-680, **2002**.
34. Kennelly, E.J., Gerhaeuser, C., Song, L.L., Graham, J.G., Beecher, C.W.W., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A. D. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3771-3777, **1997**.
35. Budhiraja, R. J., Sudhir, S., Garg, K. N. *Planta Medica* **50**, 134-136, **1984**.
36. Budhiraja, R. J., Sudhir, S., Garg, K. N., Arora, B. *Planta Medica* **52**, 28-29, **1986**.
37. Kuklinski, Claudia. *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural.* 2 ed. 106-109, **2005**.

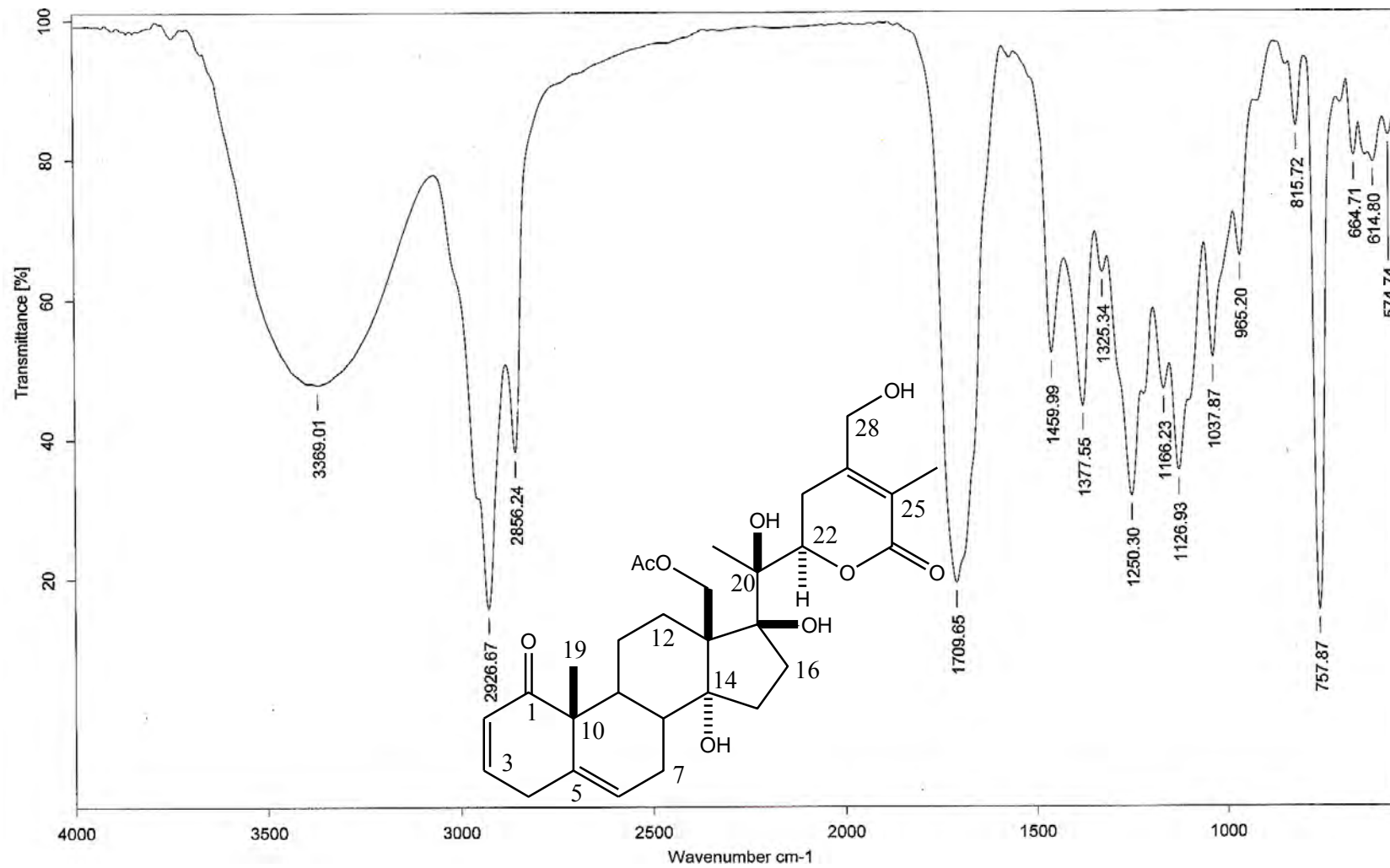
38. Forkmann, G., Heller, W. *Comprehensive Natural Products Chemistry, Biosíntesis of Flavonoids*. Elsevier. New York, 743-718, **1998**.
39. Sahai, M., Neogi, P. *J. Indian Chem. Soc.* **61**, 171-172, **1984**.
40. Sinha, S.C., Ray, A.B. *J. Indian Chem. Soc.* **65**, 740-741, **1988**.
41. Ser, N. A. *Phytochemistry* **27**, 3708-3709, **1988**.
42. Koh, L. L., Ser N. A. *Acta Cryst. Sect. C.* **C49**, 105-107, **1993**.
43. Sethuraman, V., Sulochana, N. *Fitoterapia* **59**, 335-336, **1988**.
44. Ismail, N., Alam, M. *Fitoterapia* **72**, 676-679, **2001**.
45. Jana, M., Raynaud. *Plant. Med. Phytother.* **5**, 301-304, **1971**.
46. Matlawska, I., Wojcinska, M., Jankiewicz, L. S., Kowalewski, Z. *Acta Pol. Pharm.* **51**, 263-265, **1994**.
47. Vázquez Montes Alma Rosa. Componentes Químicos de Baja Polaridad en Tallos y Hojas de *Physalis coztomatl*. Fac. de Ciencias. UNAM. **2006**.
48. Bruice, P. Y. *Química Orgánica*. 5ª. Ed. Pearson. Education-Prentice Hall, México, 511-638, **2007**.
49. Pine, S.H., et all. *Química Orgánica*. 2ª. Ed. McGraw Hill, México, 609-612, **1999**.
50. Solomons. T. W. G. *Química Orgánica*. 2ª. Ed. Limusa-Wiley, 683-687, **1999**.
51. Marcilla, R. J. *Espectroscopía*. 1ª. Ed. Alhambra, 45-52, **1972**.
52. a) Bigler, Meter. *NMR Spectroscopy. Processing Strategies*. 2da Ed. Wiley VCH, 60-61, 66-73, **2000**. b) Field, L. D., Sternhell, S., Kalman, J. R. *Organic Structures from Spectra*. 4ª. Ed. J.Wiley & Sons, Great Britain, 2008.
53. Gomes, A., Saha, A., Chatterjee, I., Chakravarty, A. K. *Phytomedicine* **14**, 637-643, **2007**.

54. Dinan, L. N., Sarker, S. D., Sik, V. *Phytochemistry* **44**, 509-512, **1997**.
55. Maldonado, E., Torres, F. R., Martinez, M., Perez-Castorena, A. L. *Planta Medica* **70**, 59-64, **2004**.
56. Kazuma, K., Noda, N., Suzuki, M. *Phytochemistry* **62**, 229-237, **2003**.
57. Sawabe, A., Nesumi, C., Morita, M., Matsumoto, S., Matsubara, Y., Komemushi, S. *J. Oleo Sci.* **54**, 185-191, **2005**.
58. El- Seedi, H. R., Sobaih, S. A. M. *Rev. Latinoamer. Quím.* **27**, 17-21, **1999**.
59. Beck, M. A., Häberlein, H. *Phytochemistry* **50**, 329-332, **1999**.
60. Harborne, J. B., Mabry, T. J. *The Flavonoids: Advance in Research*. Chapman and Hall, **1982**.
61. Mabry, T. J. *The systematic identification of flavonoids*. Berlin: Springer **1970**, pp 268-272, 296.
62. Khan, P. M., Ahmad, S., Rubnawaz, H., Malik, A. *Phytochemistry* **51**, 669-671, **1999**.

# *APÉNDICE*

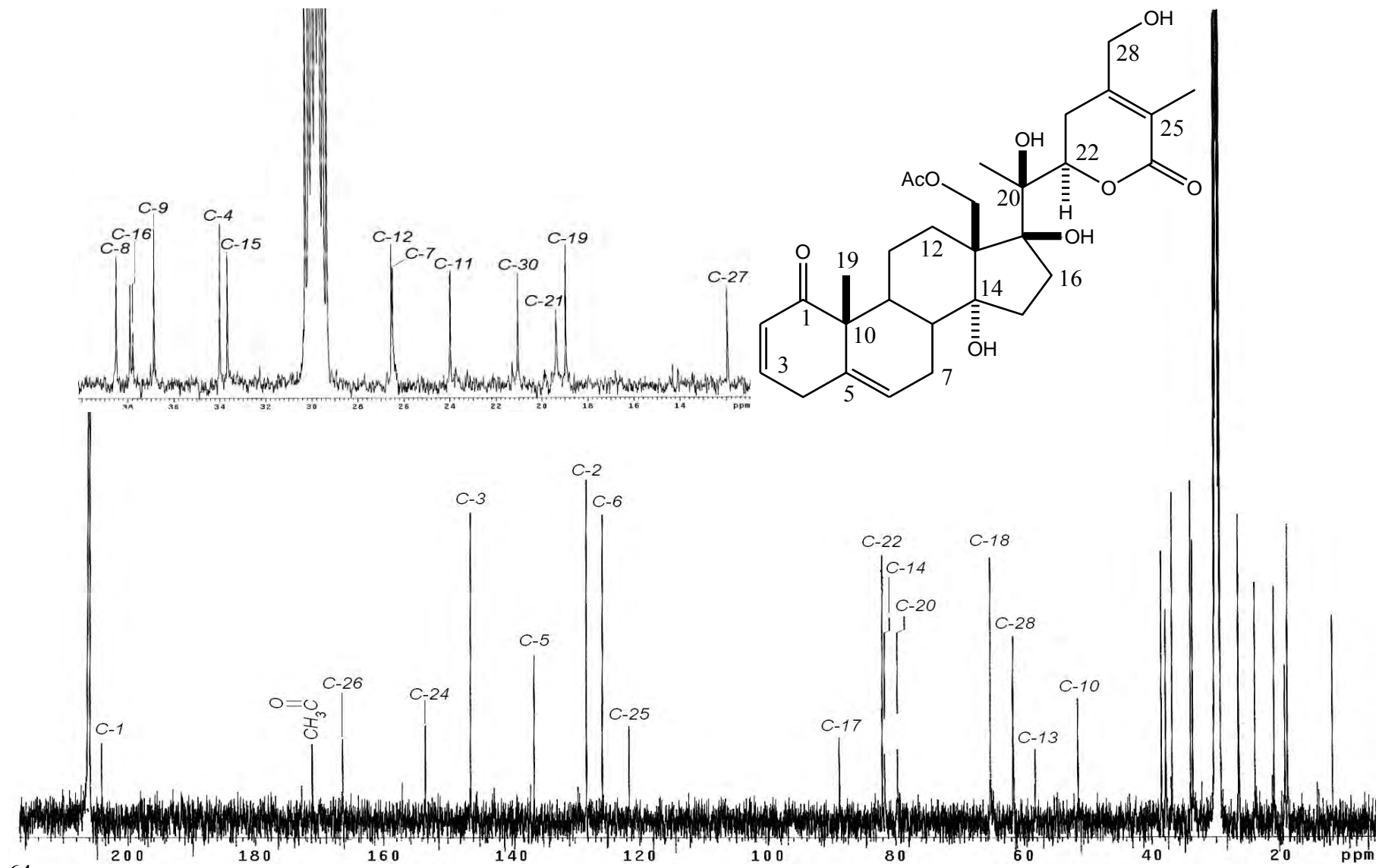


**ESPECTRO No. 1** Espectro de masas de orizabólida (III) obtenido por la técnica de electrospray.

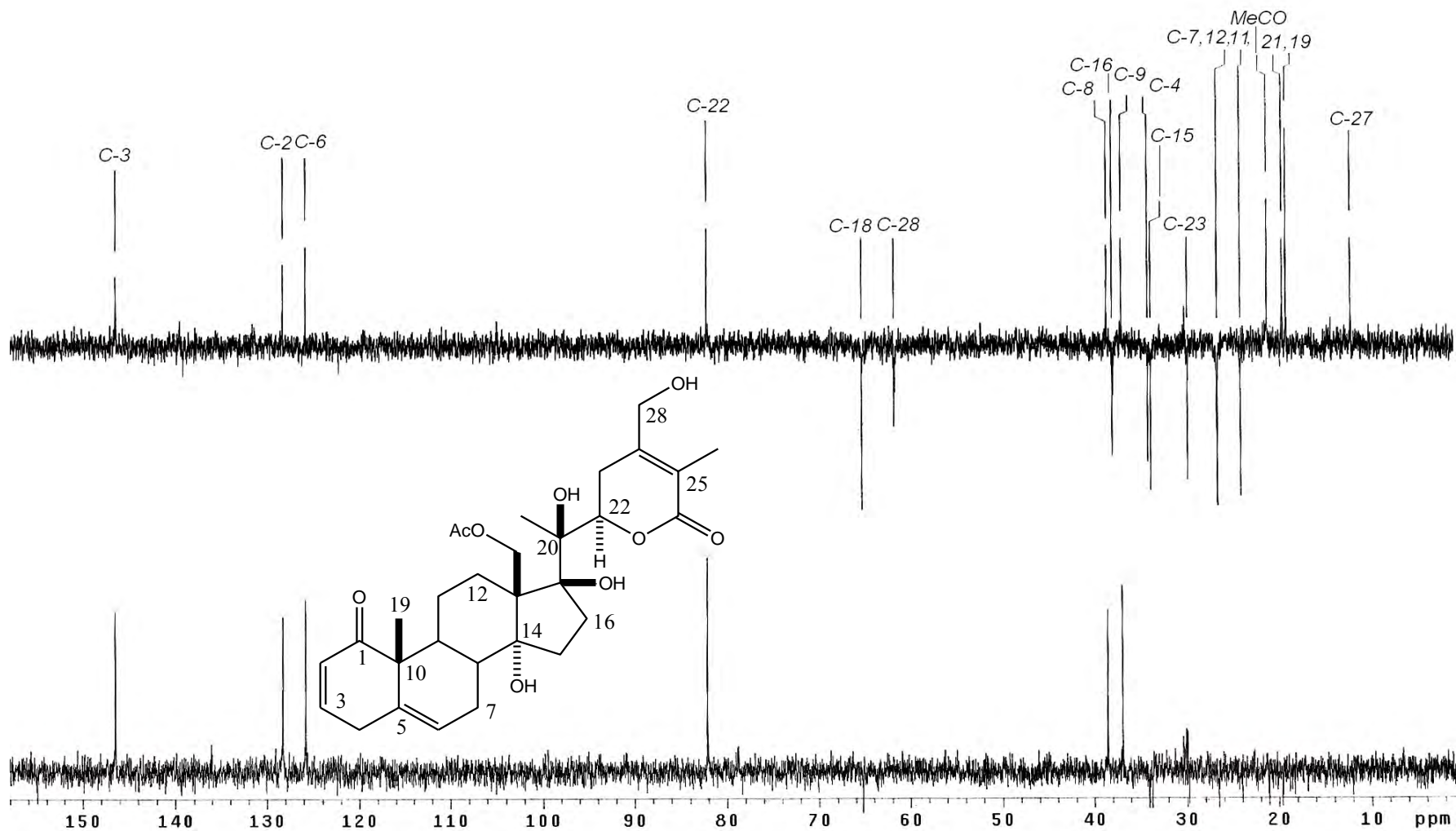


**ESPECTRO No. 2** Espectro Infrarrojo (pastilla) de orizabólida (III).

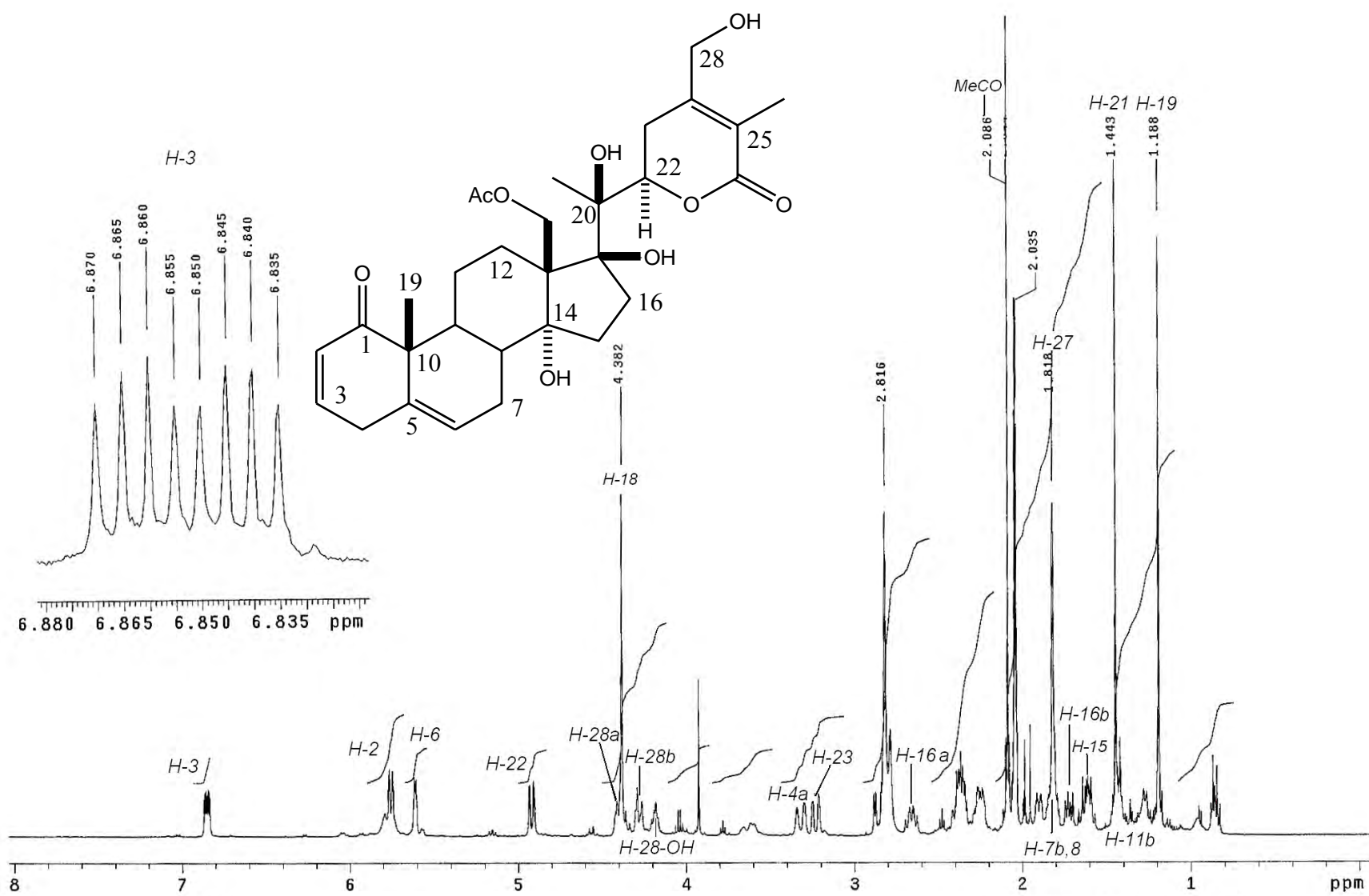




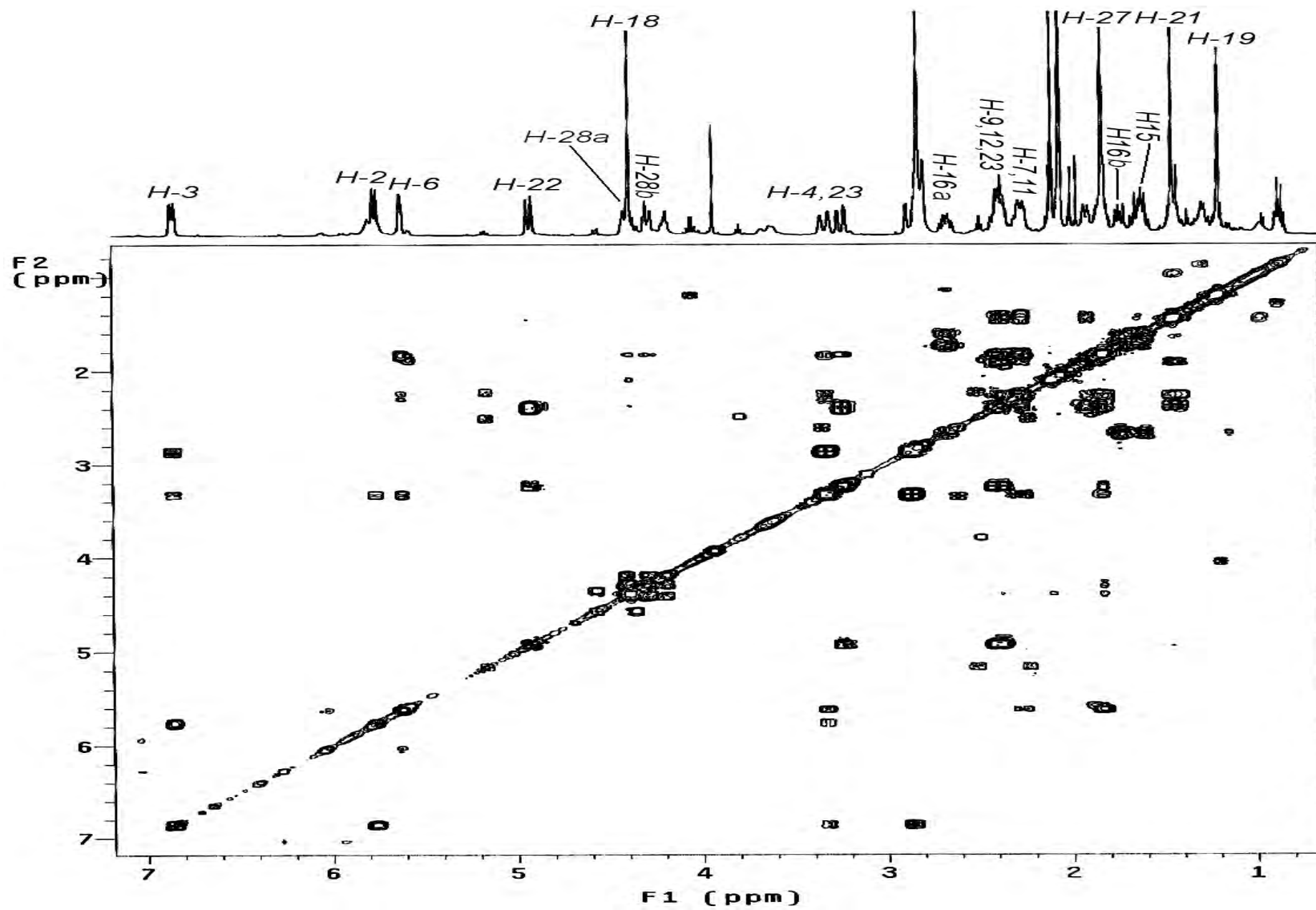
ESPECTRO No. 3 Espectro de RMN <sup>13</sup>C de orizabólida (III)  
(Determinado en Me<sub>2</sub>CO-d<sub>6</sub>).



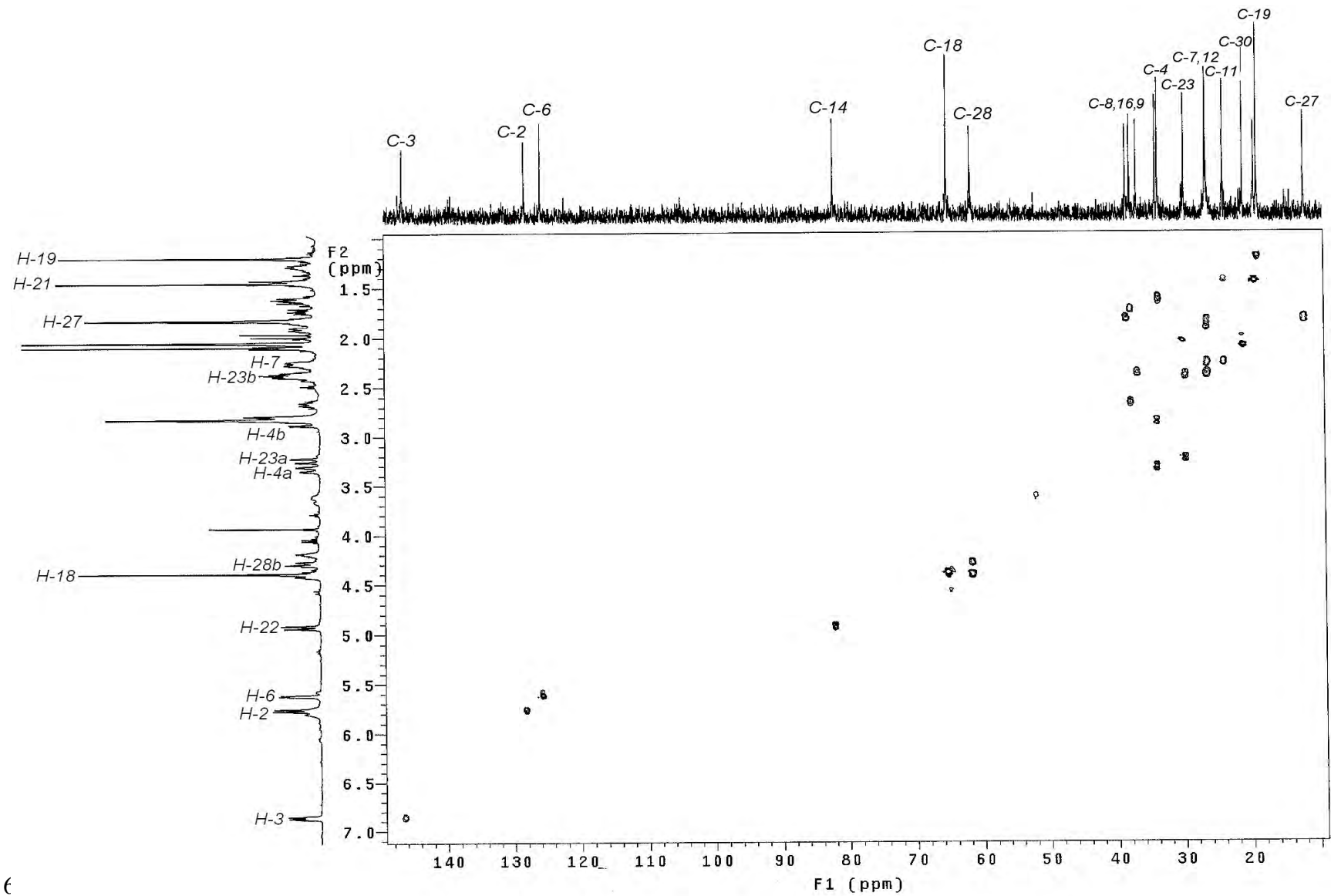
ESPECTRO No. 4 Espectro DEPT de orizabólida (III).



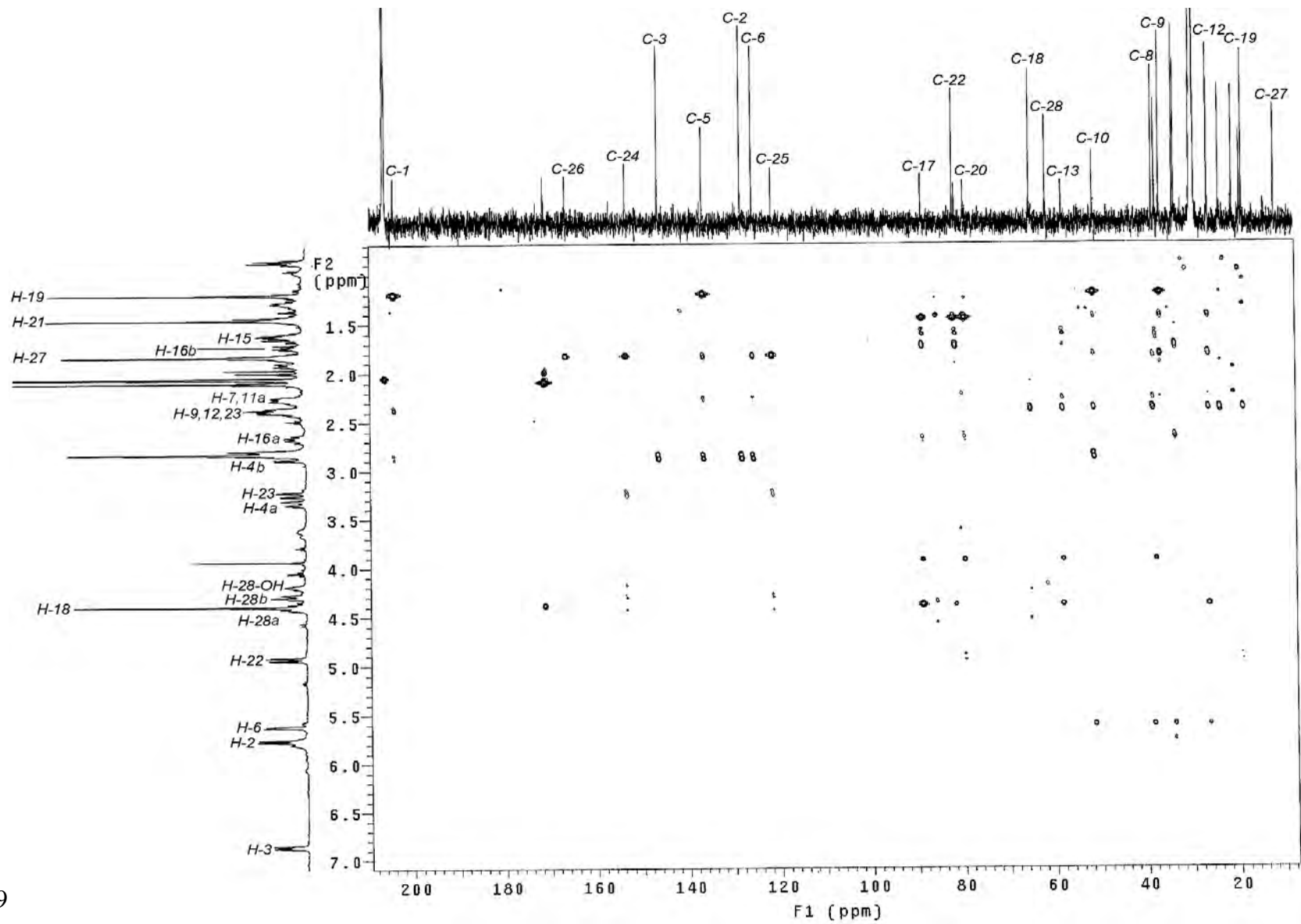
**ESPECTRO No. 5** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de orizabólida (III).  
(Determinado en Me<sub>2</sub>CO-d<sub>6</sub>)



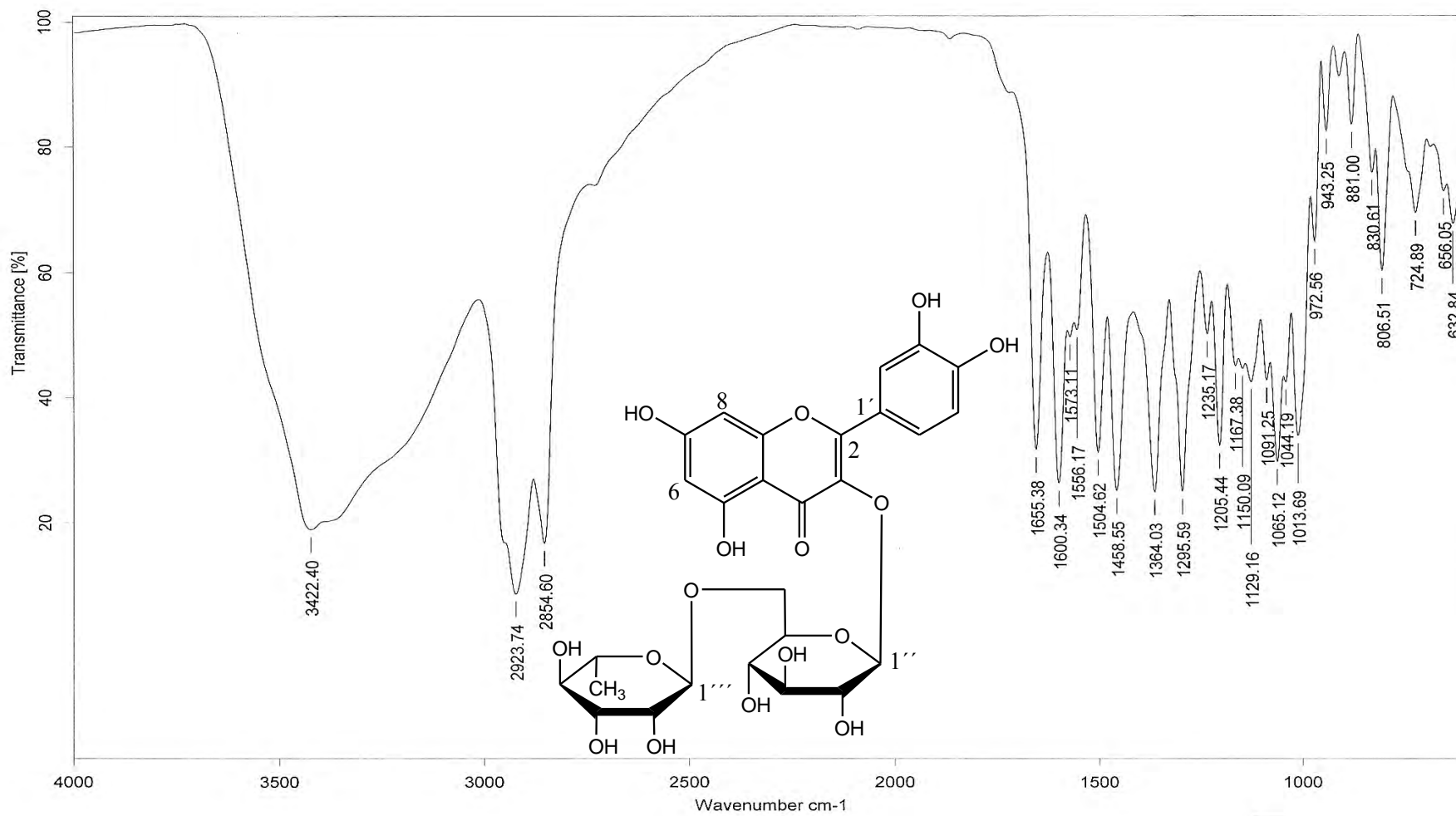
ESPECTRO No. 6 Espectro COSY de orizabólida (III).



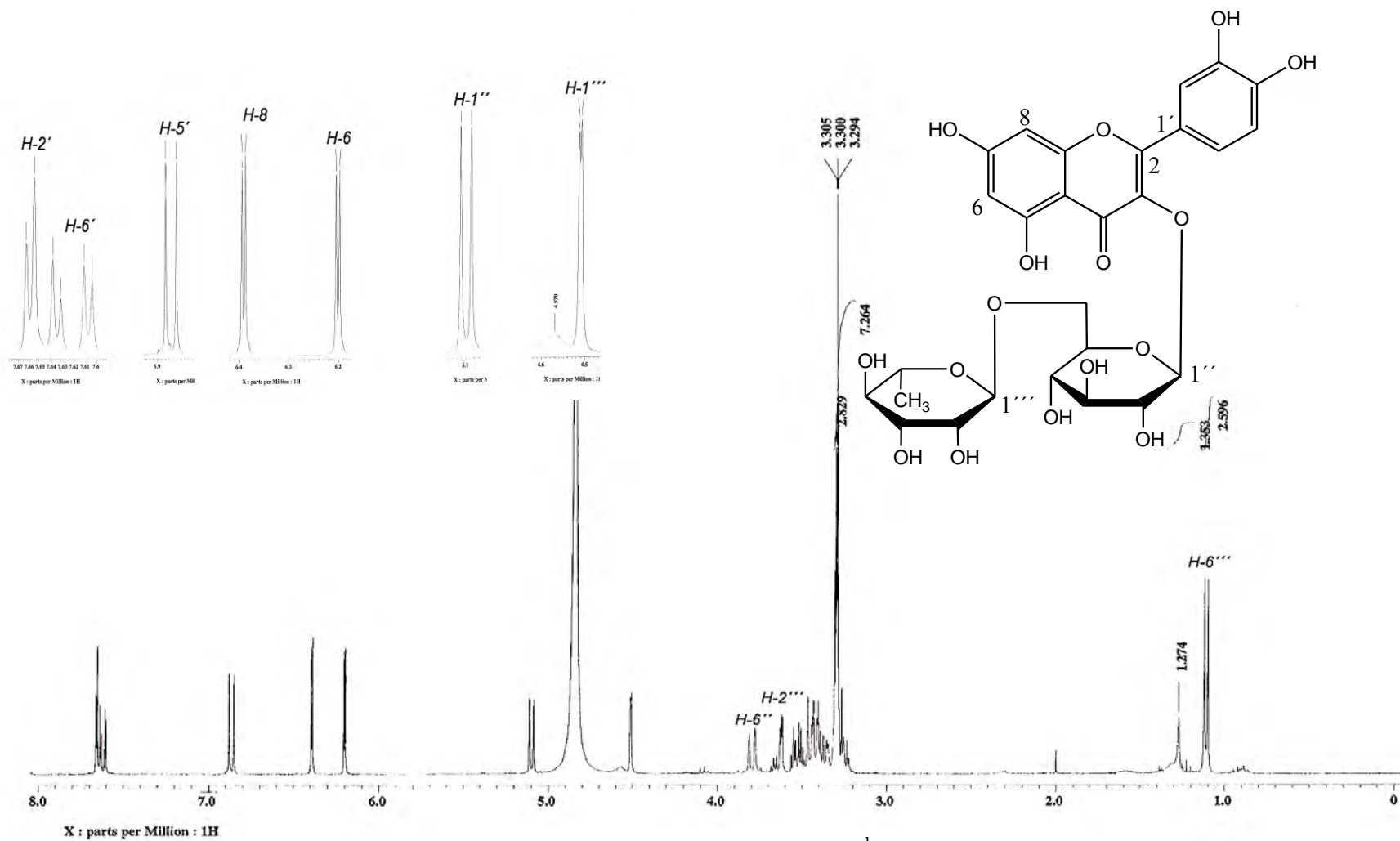
ESPECTRO No. 7 Espectro HSQC de orizabólida (III).



ESPECTRO No. 8 Espectro HMBC de orizabólida (III).

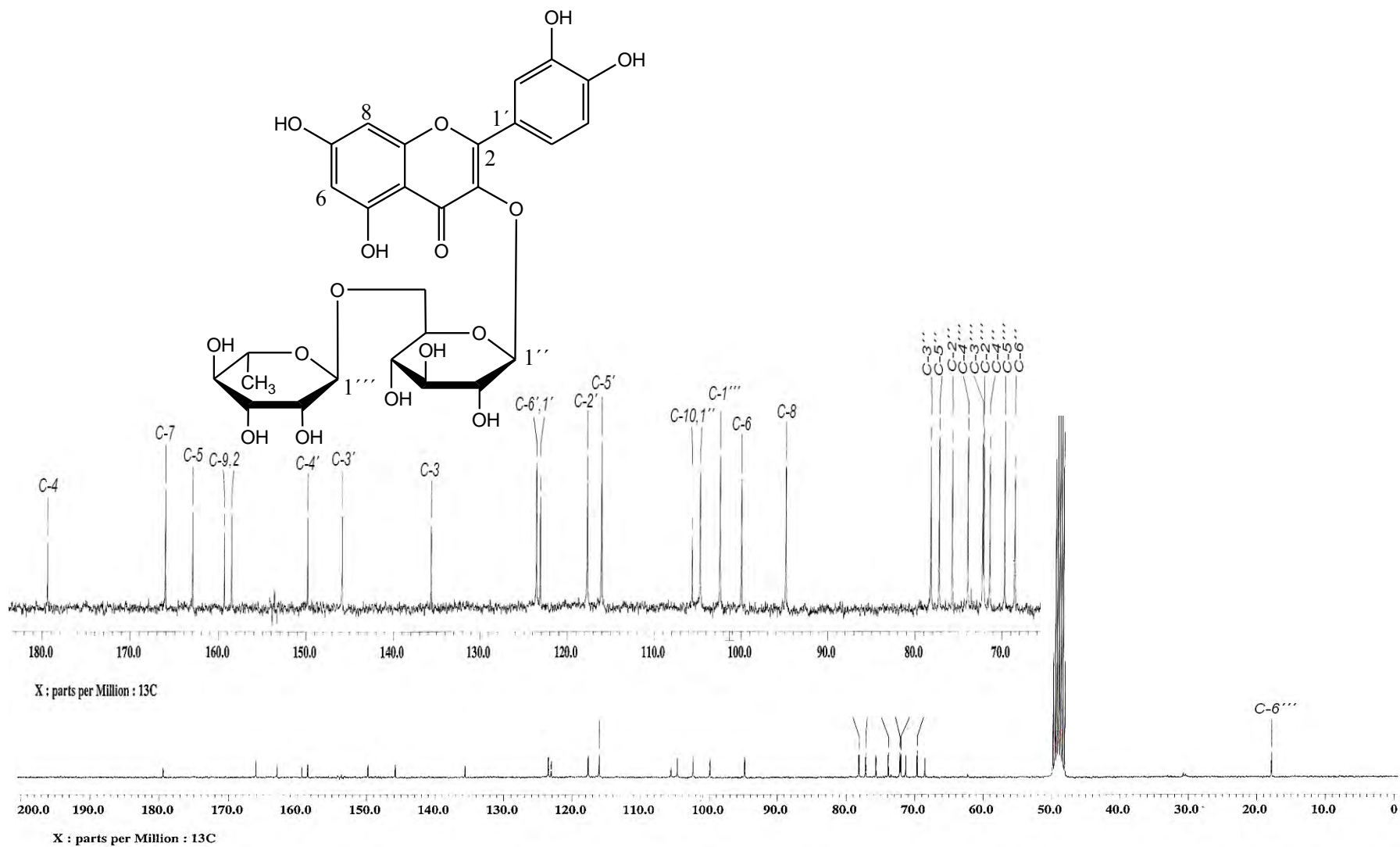


**ESPECTRO No. 9** Espectro de infrarrojo de rutina (IV).

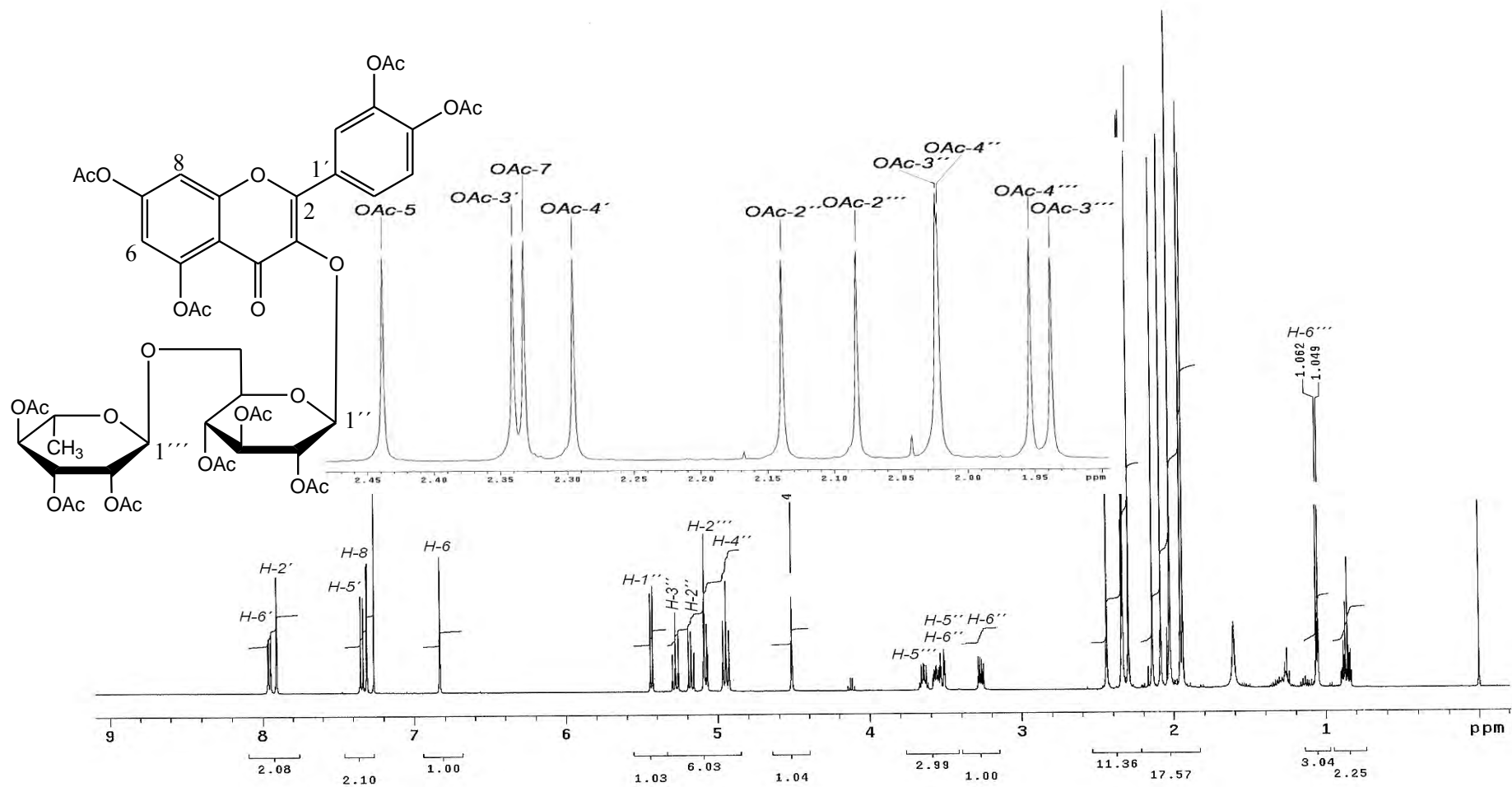


**ESPECTRO No. 10** Espectro RMN  $^1\text{H}$  de rutina (IV)  
(determinado en  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

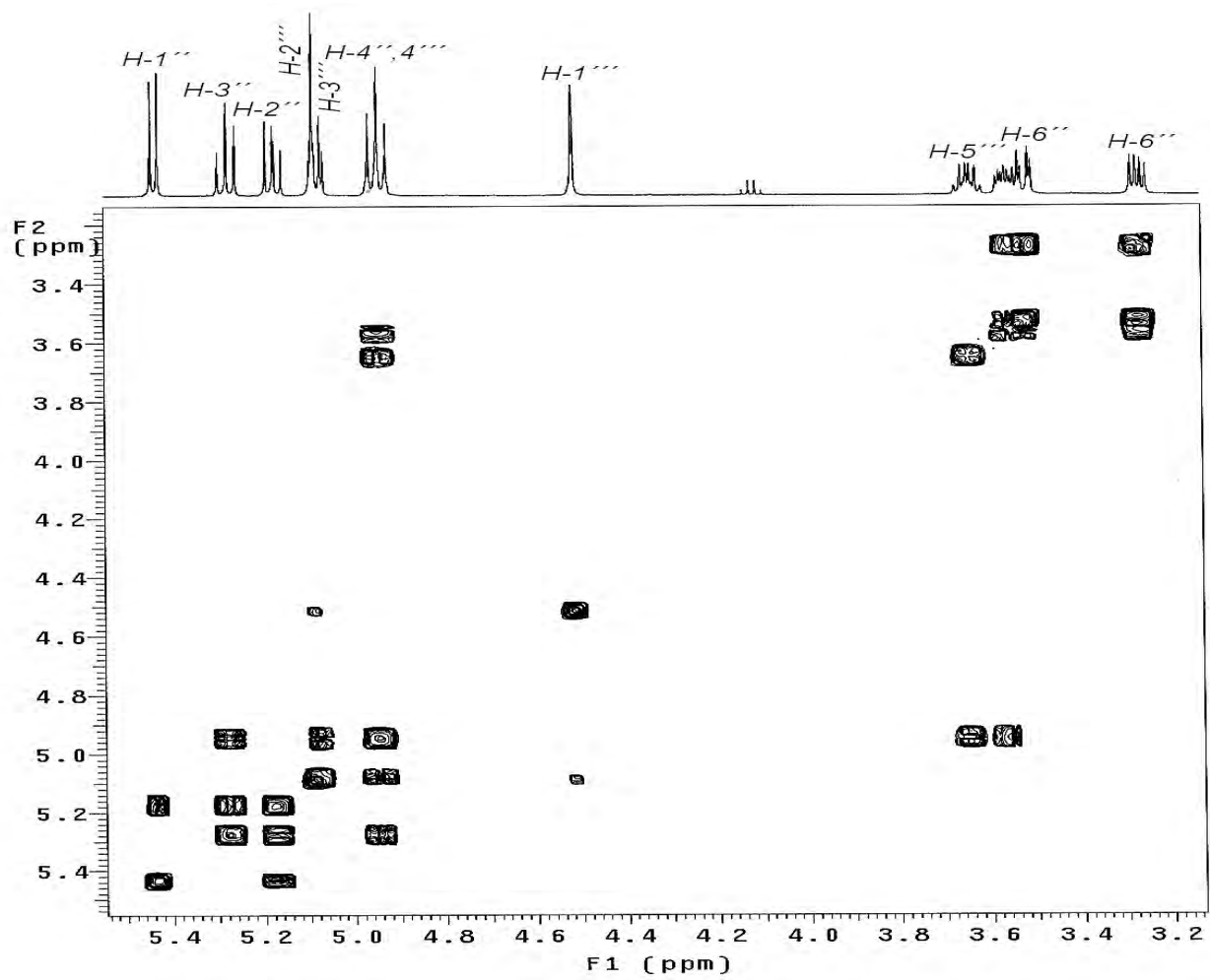




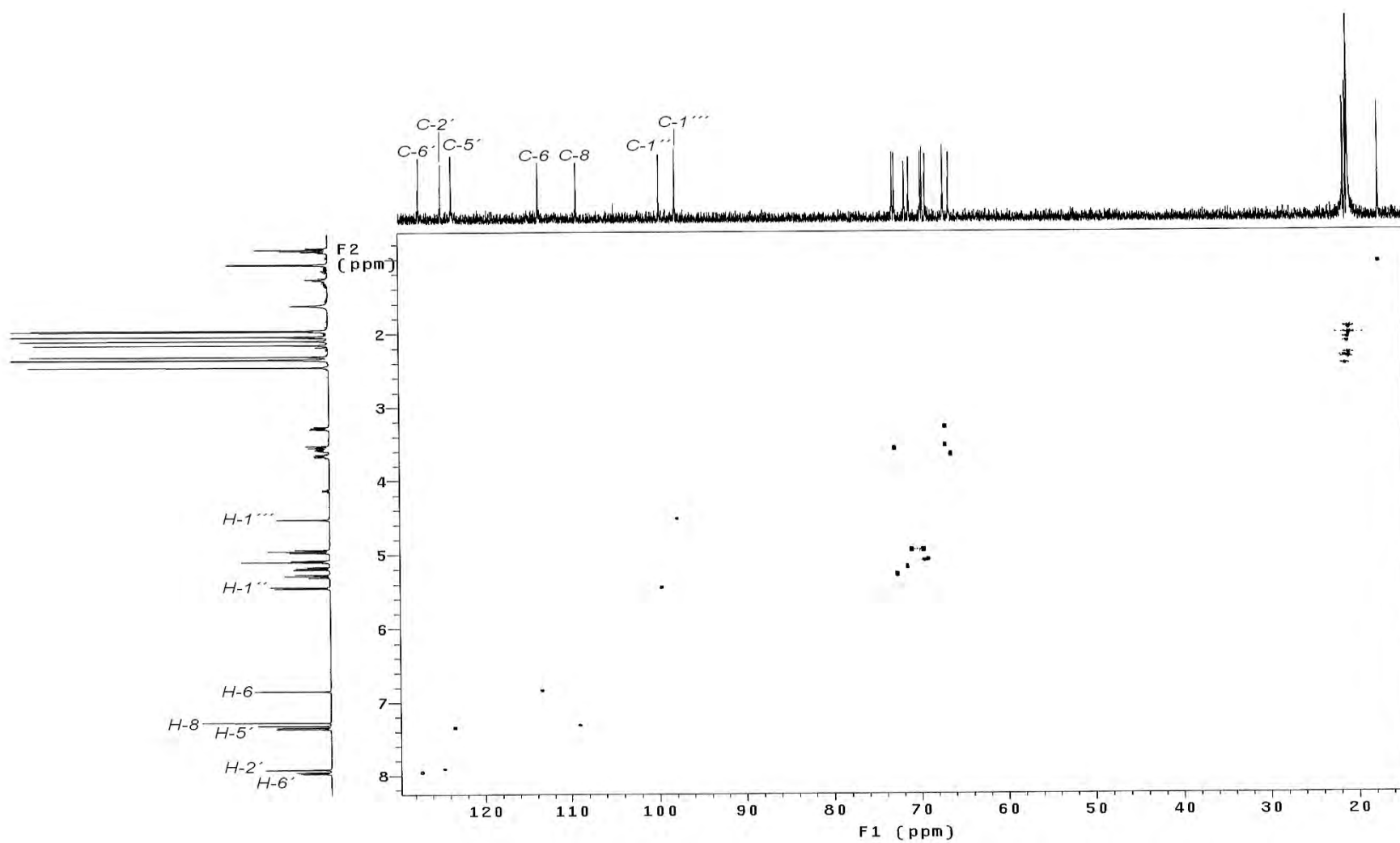
**ESPECTRO No. 11** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de rutina (IV)  
(determinado en  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



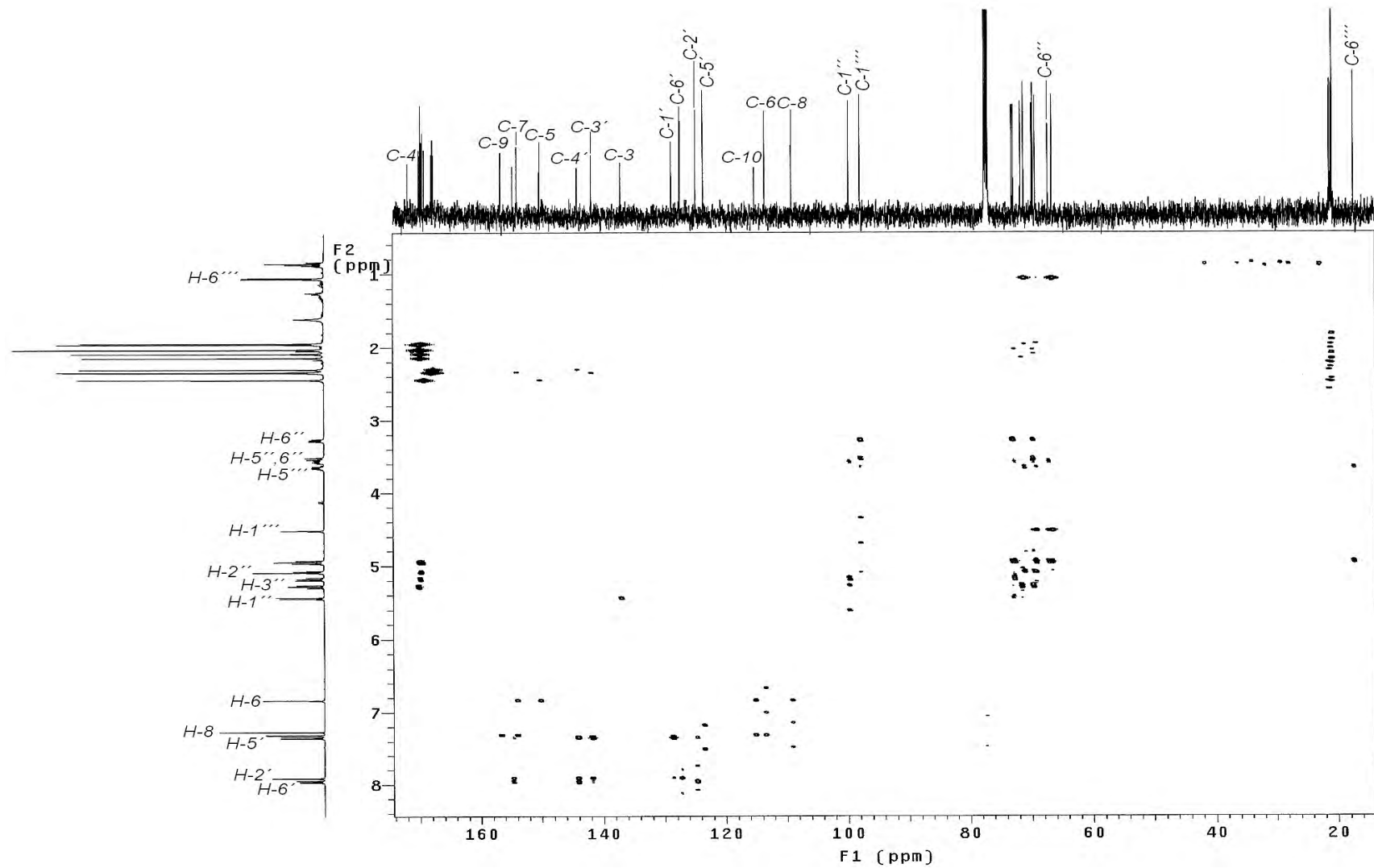
**ESPECTRO No. 12** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de rutina decaacetilada (V)  
(determinado en  $\text{CDCl}_3$ ).



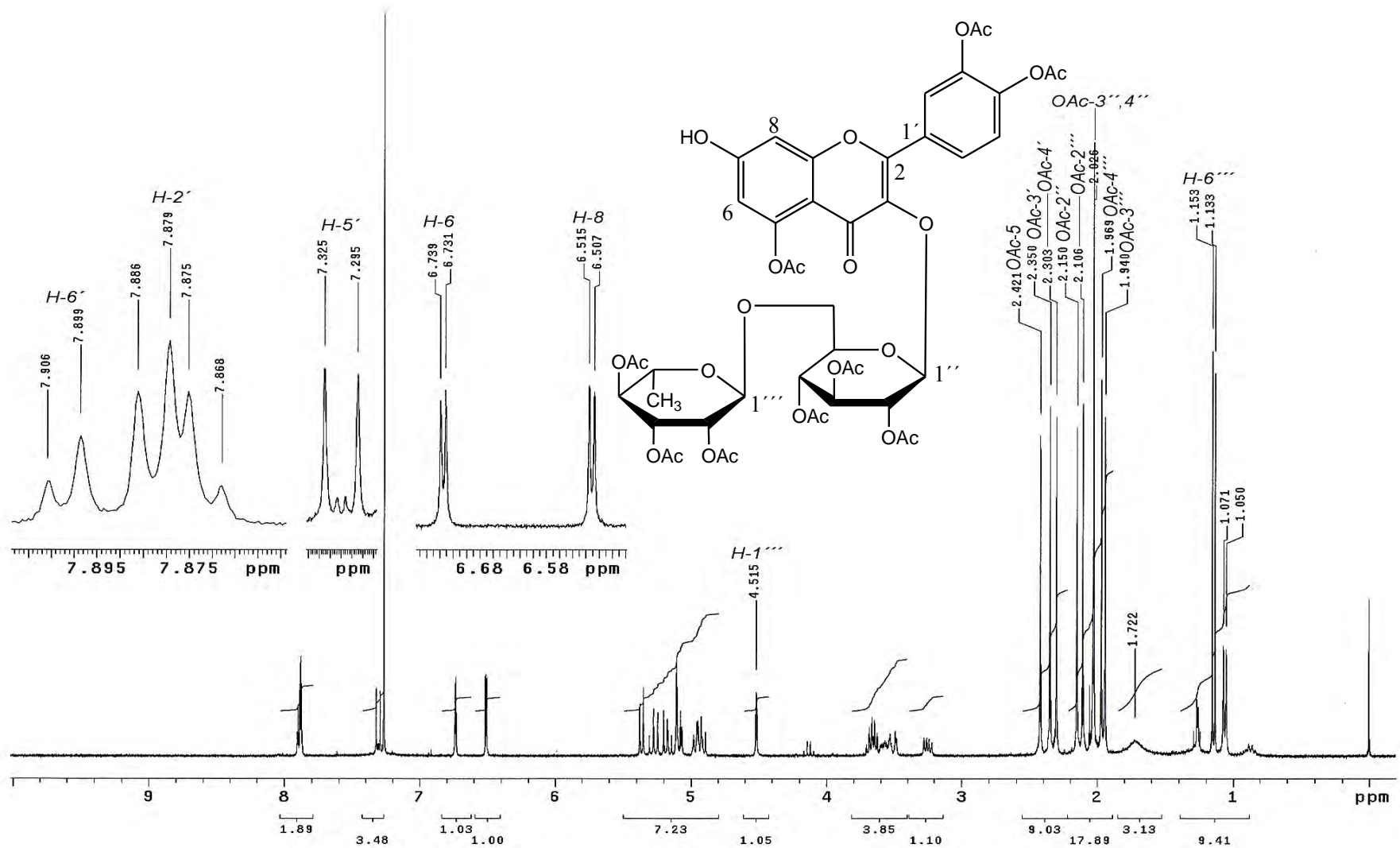
ESPECTRO No. 13. Espectro COSY de rutina decacetilada (V).



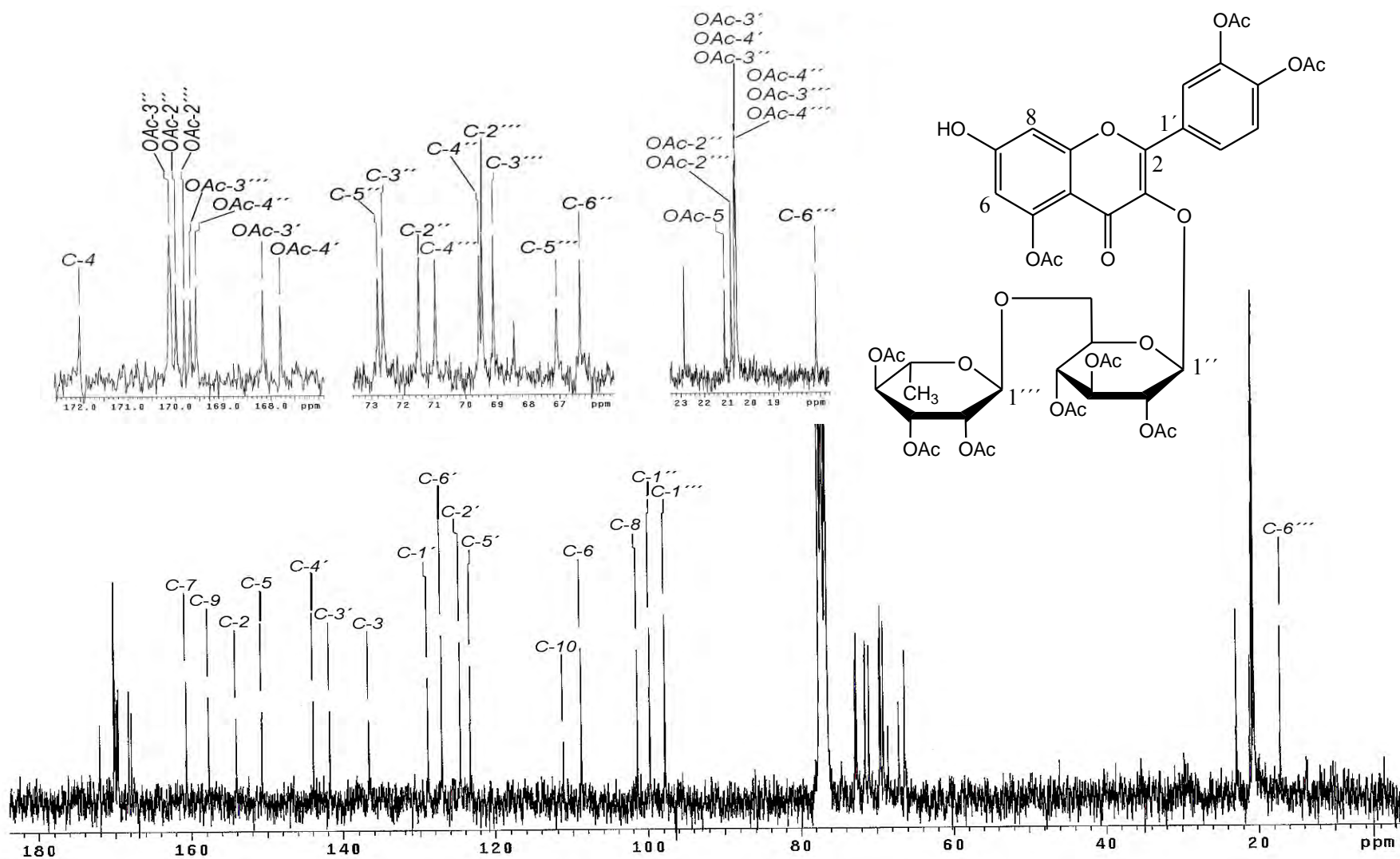
ESPECTRO No. 14. Espectro HSQC de rutina decacetilada (V).



ESPECTRO No. 15. Experimento HMBC de rutina decacetilada (V).



ESPECTRO No. 16. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de rutina nonacetilada (VI).  
(Determinado en  $\text{CDCl}_3$ )



ESPECTRO No. 17. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de rutina nonacetilada (VI)  
(determinado en  $\text{CDCl}_3$ ).