



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS
WITHANÓLIDAS DE *Datura ceratocaula* Y *Datura discolor*

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. ULISES GONZÁLEZ MARTÍNEZ

TUTOR

M. en C. EMMA MALDONADO JIMÉNEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS
WITHANÓLIDAS DE *Datura ceratocaula* Y *Datura discolor***

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

QFB. ULISES GONZÁLEZ MARTÍNEZ



Ciudad de México, Diciembre de 2019

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo	Instituto de Química, UNAM
Vocal:	Dr. Leovigildo Quijano	Instituto de Química, UNAM
Vocal:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents	Facultad de Química, UNAM
Vocal:	Dr. Jesús Martín Torres Valencia	ICBI, UAEH
Secretario:	Dr. José Fausto Rivero Cruz	Facultad de Química, UNAM

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

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

ASESORA:

SUSTENTANTE:

M. en C. Emma Maldonado Jiménez

QFB. Ulises González Martínez

Parte de los resultados derivados de este trabajo se presentaron en los siguientes eventos:

- “Withanolides and other constituents from *Datura ceratocaula*”. Cartel. Simposio interno del Instituto de Química 2019. Ciudad Universitaria, 19-21 de junio de 2019.
- “Withanólidas y otros constituyentes de *Datura ceratocaula*”. Cartel. 54° Congreso Mexicano de Química y 38° Congreso Nacional de Educación Química. BUAP, Puebla, 30 de septiembre-3 de octubre de 2019.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a su Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por haber recibido de ellas mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para mis estudios de maestría (CVU 887833).

Al Instituto de Química y a la M. en C. Emma Maldonado por haberme permitido continuar mi formación académica bajo su tutela. Le doy gracias por su interés en el proyecto y por todas sus enseñanzas en el laboratorio.

A las maestras Ana Lidia Pérez y Amira Arciniegas por todas sus observaciones y recomendaciones durante mi estancia en el laboratorio.

A los miembros del jurado: Dr. Alfonso Romo de Vivar, Dr. Leovigildo Quijano, Dra. Isabel Aguilar, Dr. Jesús Martín Torres y Dr. José Fausto Rivero por el tiempo que dedicaron a leer mi manuscrito y por sus acertadas sugerencias que contribuyeron a mejorar este trabajo.

A la Dra. Mahinda Martínez por la recolección de la especie *Datura discolor*, así como por la identificación de las dos especies vegetales empleadas en este estudio.

Al M. en C. Antonio Nieto por la realización del ensayo de actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa.

Al personal técnico del Instituto de Química de la UNAM: Dr. Rubén Gaviño, Q. Ángeles Peña, M. en C. Elizabeth Huerta, M. en C. Héctor Ríos y Dra. Isabel Chávez del laboratorio de resonancia magnética nuclear; QFB. Rocío Patiño del laboratorio de espectroscopia y polarimetría; M. en C. Carmen Márquez y M. en C. Lucero Ríos del laboratorio de cromatografía; IQ. Luis Velasco, Dr. Javier Pérez y Dra. Carmen García del laboratorio de espectrometría de masas.

DEDICATORIAS

A mis padres Rosa Martínez y Fulgencio González, y a mi abuelita Judith Morales porque me han dado todo, la educación que tengo y los valores que poseo son gracias a ellos. A mi hermano Cristian por brindarme su apoyo en las ocasiones que lo he requerido.

A mi amiga Azucena Martínez, has sido mi mejor coincidencia y sin ti, nada hubiera sido lo mismo. Gracias por todos los momentos inolvidables dentro y fuera del laboratorio. Agradezco tu paciencia, confianza, motivación y lo más importante tu amistad.

A mi amiga Fernanda Saldívar, a quien quiero y admiro tanto. Gracias por darme la motivación que necesitaba para decidir entrar a la maestría.

A mis amigos de la maestría por su apoyo, consejos, recomendaciones y tiempo compartido: Frida Herrera, Ana Luisa Chávez, Cecilia Ruiz, Karina Salomón, Sahid Aguilar, Yesica Cruz, Diana Prado, Alejandro Gómez y Karina Zarco.

A mis amigos del laboratorio 2-7 con quienes tuve la fortuna de convivir: Laura Judith Chávez, Diego Sánchez y Óscar Torres.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Familia Solanaceae.....	4
2.2. Género <i>Datura</i>	4
2.3. <i>Datura ceratocaula</i> Ortega.....	6
2.4. <i>Datura discolor</i> Bernh.....	7
2.5. Química del género <i>Datura</i>	8
2.5.1. Withanólidas	9
2.6. Withanólidas y su actividad biológica.....	12
2.7. Estudios químicos y farmacológicos de withanólidas del género <i>Datura</i>	13
2.7.1. Sección <i>Datura</i>	13
2.7.2. Sección <i>Dutra</i>	16
2.8. Generalidades de la enfermedad de Alzheimer	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. OBJETIVOS	26
4.1. Objetivo general	26
4.2. Metas	26
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	27
5.1. Material y equipo.....	27
5.2. Material vegetal.....	27
5.3. <i>Datura ceratocaula</i> Ortega.....	28
5.3.1. Extracción del material vegetal.....	28
5.3.2. Aislamiento y purificación de los compuestos	28
5.4. <i>Datura discolor</i> Bernh.....	32
5.4.1. Extracción del material vegetal.....	32
5.4.2. Aislamiento y purificación de los compuestos	32
5.5. Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) ...	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1. Elucidación estructural de los compuestos aislados	39

6.1.1. Carotenos	39
6.1.2. Fitoesteroles	39
6.1.3. Withanólidas	40
6.2. Actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa.....	58
7. CONCLUSIONES.....	60
8. BIBLIOGRAFÍA.....	61
9. ESPECTROSCOPIA	71

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear (Correlated spectroscopy)
δ	Desplazamiento químico
DEPT	Aumento sin distorsión de la transferencia de polarización (Distortionless enhancement of polarization transfer)
EM-DART	Espectrometría de masas por análisis directo en tiempo real (Direct analysis in real time)
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EMAR-ESI	Espectrometría de masas de alta resolución por ionización por electrospray (Electrospray ionization)
HMBC	Correlación heteronuclear de enlaces múltiples (2J C-H, 3J C-H) (Heteronuclear multiple bond coherence)
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple (1J C-H) (Heteronuclear simple quantum coherence)
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IR	Espectroscopia en el infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
m	Multiplete
m/z	Relación masa/carga
NOESY	Espectroscopia de efecto nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser effect spectroscopy)
ppm	Partes por millón
p.f.	Punto de fusión
RMN	Resonancia magnética nuclear
a	Señal ancha
TMS	Tetrametilsilano

1. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales son compuestos orgánicos que resultan del metabolismo secundario de los organismos vivos y que a diferencia de los metabolitos primarios, no son esenciales para su crecimiento, desarrollo o reproducción y su distribución se restringe a un organismo o a un grupo de organismos para los que son de importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación a su ambiente.¹ Esto último lleva a que exista una enorme diversidad de productos naturales que además de su función en los organismos que los producen, podrían ser importantes desde el punto de vista farmacológico porque presentan actividades biológicas selectivas debido a su interacción con dianas específicas de las diferentes biomoléculas.²

Lo anterior justifica el uso medicinal de las plantas que ha sido documentado a lo largo de la historia por los diferentes grupos étnicos. Estos conocimientos etnobotánicos han sido útiles en la búsqueda de fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades. De hecho, se ha propuesto que la búsqueda de nuevos principios activos de plantas tiene una mayor perspectiva de éxito si las investigaciones toman como base los conocimientos etnobotánicos y etnomedicinales, es decir, si se llevan a cabo con un enfoque etnofarmacológico. Como apoyo a lo anterior, un estudio de 122 fármacos procedentes de plantas mostró que en el 80% de ellos existe correlación entre el uso etnomédico de la planta y el terapéutico.³

El enfoque basado en el uso de las plantas en la medicina tradicional ha permitido descubrir importantes principios activos que después de los correspondientes estudios clínicos y farmacológicos han dado lugar a nuevos fármacos, por ejemplo, los antimaláricos quinina y artemisinina (Figura 1) que se aislaron de la corteza de *Cinchona succirubra* y de *Artemisia annua*, respectivamente. También es frecuente que los fármacos deriven de un producto natural que se modifica químicamente para disminuir sus efectos adversos, tal es el caso del agente antiinflamatorio ácido acetilsalicílico (aspirina[®]) derivado del producto natural salicina, aislado de la corteza del sauce *Salix alba*.⁴ Otras veces el descubrimiento y evaluación biológica de un nuevo producto natural trae consigo la elucidación de un mecanismo de acción novedoso, por ejemplo, el descubrimiento del taxol (Figura 1) permitió establecer que

su actividad citotóxica está relacionada con la estabilización de los microtúbulos celulares.⁵

Sin embargo, sólo alrededor del 20% (60,000 especies) del total de plantas conocidas han sido analizadas y dichas investigaciones han proporcionado 135 fármacos de uso actual. Los números anteriores sugieren que el estudio de las especies restantes podría conducir al descubrimiento de otros 700 fármacos. Además, hay que considerar que la mayoría de las 60,000 plantas investigadas han sido evaluadas en un número limitado de ensayos biológicos por lo que podrían ser activas en otros. Este panorama se vuelve más prometedor si se considera que la biodiversidad total del mundo consta de 2 millones de especies de plantas, animales, hongos y microorganismos, y que más del 95% de la biodiversidad del mundo no ha sido evaluada en ninguna actividad biológica;⁶ por tal motivo, se justifica el estudio de la biodiversidad desde el punto de vista químico para la obtención de nuevos principios activos o el descubrimiento de nuevas actividades biológicas de compuestos conocidos.

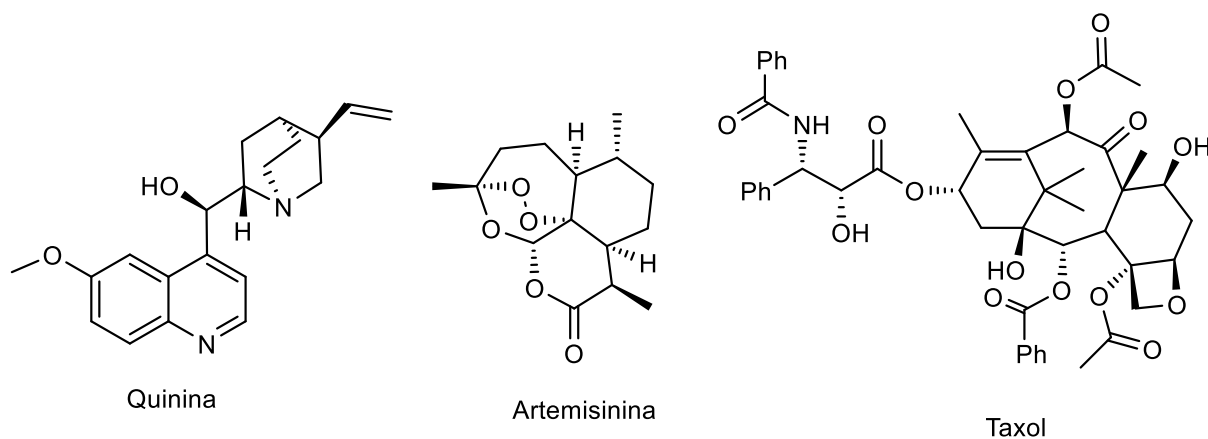


Figura 1. Ejemplos de productos naturales empleados como fármacos.

Por otra parte, México tiene la quinta flora vascular más rica del mundo y el sexto lugar con respecto a endemismos de plantas.⁷ Dentro de las familias de plantas distribuidas alrededor del país, la familia Solanaceae cuenta con 33 géneros y 430 especies, 47% de las cuales son endémicas.⁸ Uno de los géneros de interés químico y medicinal, cuyas especies son conocidas popularmente con los nombres de “toloache” y

“chamico”, entre otros, es *Datura*. Este género está constituido por catorce especies distribuidas principalmente desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de México, y en Sudamérica; en México se encuentran once especies⁹ que, en su mayoría, no han sido objeto de estudios químicos. En este contexto, se llevó a cabo el estudio químico de las especies *Datura ceratocaula* y *Datura discolor* con el objetivo de generar conocimiento relacionado con su composición química y, por consiguiente, con la del género *Datura*, para así enriquecer el entendimiento de la biodiversidad del país. Al mismo tiempo se evaluó la capacidad de los metabolitos aislados para inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa y así contribuir a ampliar el conocimiento del potencial farmacológico de este tipo de productos naturales, a la vez que se procura dar una aplicación práctica a dichos conocimientos. Los resultados de estos estudios se presentan a continuación.

2. ANTECEDENTES

2.1. Familia Solanaceae

La familia Solanaceae se distribuye en casi todo el mundo, pero la mayor diversidad se encuentra en el Neotrópico. Está compuesta por 96 géneros y cerca de 2300 especies.¹⁰ Son plantas herbáceas con hojas simples, lobuladas o pinnadas, sus flores son radiales, generalmente con cinco sépalos fusionados, cinco estambres y dos gineceos, que por lo general se convierten en una baya o cápsula.¹¹ Esta familia contiene muchas especies de importancia económica, tales como aquellas pertenecientes a los géneros *Physalis*, *Solanum* y *Capsicum*, entre las cuales se encuentran las especies productoras de tomate, jitomate, papa, berenjena, chiles y pimientos. Otras especies son ornamentales como *Petunia hybrida*, *Brunfelsia undulata* (dama de noche) o *Cestrum nocturnum* (huele de noche). También existen ciertas especies que son conocidas por sus usos medicinales y por ser tóxicas como *Atropa belladonna* (belladona); *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Datura stramonium* (toloache) y *Nierembergia liniifolia* (chuscho del monte).¹⁰

2.2. Género *Datura*

El género *Datura* L. (tribu Datureae, familia Solanaceae) consta de 14 especies, de las cuales 11 se encuentran en México, sólo *D. ferox*, *D. leichhardtii* y *D. velutinosa* no se distribuyen de manera natural en el país.¹² Las especies de *Datura* son hierbas anuales y arbustos perennes que crecen en suelos ricos en nitrógeno con una sola especie, *D. ceratocaula*, que es semiacuática.¹³ Las especies de *Datura* son nativas de las regiones secas, templadas y subtropicales de las Américas, distribuyéndose principalmente en México, país que se considera el centro de diversificación del género.¹² Aunque a *D. ferox* se le encuentra en Argentina, a *D. metel* en Asia y a *D. leichhardtii* en Australia, probablemente estas especies se introdujeron desde México.¹⁴

Taxonómicamente se distinguen tres secciones de *Datura*: la sección *Datura* agrupa a las especies *D. stramonium*, *D. quercifolia* y *D. ferox*, que son hierbas anuales cuyos

frutos son cápsulas erectas y espinosas que se abren de forma simétrica para formar cuatro valvas; la única especie de la sección *Ceratocaulis*, *D. ceratocaula*, presenta cápsulas colgantes sin espinas, que al madurar se abren de forma irregular para liberar las semillas; la sección *Dutra* agrupa a las especies *D. discolor*, *D. innoxia*, *D. kymatocarpa*, *D. lanosa*, *D. metel*, *D. pruinosa*, *D. reburra*, *D. wrightii*, *D. leichhardtii* y *D. velutinosa* que son hierbas perennes con cápsulas colgantes, espinosas con dehiscencia o apertura irregular o regular.^{9,12}

Todas las especies del género *Datura* son consideradas tóxicas porque tienen un alto contenido de alcaloides de tipo tropano (Figura 2). Estos alcaloides se sintetizan en las raíces, se almacenan en vacuolas¹⁵ y se movilizan hacia las hojas y las estructuras reproductivas. La concentración de alcaloides foliares de *Datura* alcanza su máximo en la floración.¹³ Se han descrito numerosos alcaloides del género, siendo dominantes la hiosciamina y la escopolamina.¹⁶ Estos dos alcaloides afectan negativamente a una variedad de insectos herbívoros y animales vertebrados.¹³ Además de los alcaloides, todas las especies de *Datura* que han sido estudiadas químicamente (*D. ferox*, *D. metel*, *D. quercifolia*, *D. stramonium*, *D. innoxia* y *D. wrightii*) producen withaesteroides.^{17,18} Al igual que los alcaloides, este tipo de compuestos actúan como defensa contra insectos porque promueven una conducta antialimentaria en algunas especies.¹⁹

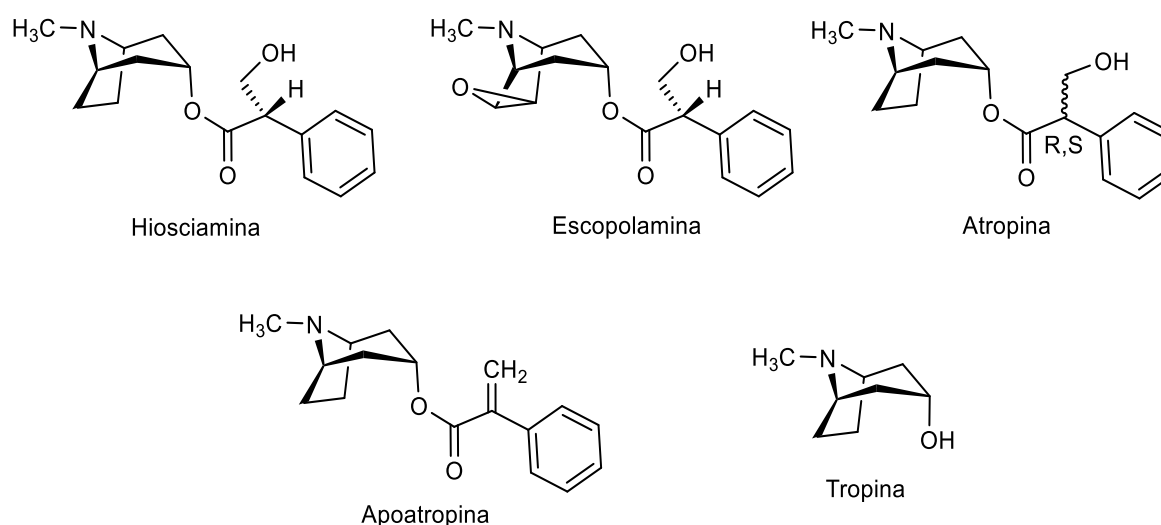


Figura 2. Ejemplos de alcaloides tropanicos aislados del género *Datura*.²⁰

Las diferentes especies del género *Datura* fueron utilizadas por algunas civilizaciones precolombinas, así como en rituales medievales vinculados a la magia y brujería tanto en México como en Europa. El nombre popular más conocido para *D. innoxia* y *D. stramonium* es toloache, aunque este nombre también se aplica a otras especies. Otros sinónimos de toloache utilizados en diferentes regiones son: belladona, ericillo (Puebla); chamico (Tabasco); chanico, chayotillo blanco (Veracruz); flor de muerto, gedionda (Tlaxcala); tapat (Hidalgo); tapate, teloloachtli (Morelos); toloache chaparro, toloachil, cholo (Oaxaca) y torescua (Michoacán).²⁰

Como consta en el Códice De la Cruz-Badiano, escrito en 1552 por Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano, las daturas se han utilizado en México con fines medicinales desde antes de la conquista. En esta obra se representan dos especies de *Datura* a las que se les atribuyen propiedades analgésicas.²⁰ Por la forma de los frutos que carecen de espinas, una de estas representaciones parece corresponder a *Datura ceratocaula* (Figura 3). También se ha documentado el uso de daturas en el tratamiento de diversas enfermedades, especialmente de los sistemas musculoesquelético y respiratorio, así como para tratar algunos de los llamados “padecimientos culturales” como “susto” o “espanto” y para el enamoramiento.²⁰

2.3. *Datura ceratocaula* Ortega

Datura ceratocaula (Figura 3), también conocida como toloache de agua, atlinán y tornaloca, es una especie anual de vida corta. Esta planta llega a medir hasta 1.5 m de altura, tiene un tallo cilíndrico hueco y sin pelos, sus hojas son solitarias, alternas, o un par en cada nudo simulando ser opuestas, sus flores son grandes, vistosas, el cáliz es un tubo angosto con el ápice asimétrico y tiene cápsulas colgantes sin espinas. Crece en terrenos temporalmente inundados o en cuerpos de agua poco profundos enraizada en el suelo y sobrepasando el nivel del agua. Se ha registrado su presencia en la Ciudad de México, Durango, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí y Tlaxcala.²¹ En cuanto a estudios químicos se ha descrito que esta planta contiene diversos alcaloides tropánicos, principalmente hiosciamina y escopolamina.²²⁻²⁴



Figura 3. Imágenes de *Datura ceratocaula* Ortega.

2.4. *Datura discolor* Bernh.

Datura discolor (Figura 4), conocida popularmente con los nombres de chayotillo, hierba hedionda, higuerrilla y manzana del desierto, es una planta anual de hasta 80 cm de altura, es ramosa, tiene hojas pecioladas, sus flores son erectas, corola en forma de trompeta de color blanco con manchas color purpúreo pálido y tiene cápsulas erectas con espinas. Se distribuye en México en los estados de Baja California, Chihuahua, Colima, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas.^{25,26} Al igual que las otras especies de *Datura*, esta especie también produce alcaloides de tipo tropano, principalmente escopolamina.^{26,27}



Figura 4. Imágenes de *Datura discolor* Bernh.

2.5. Química del género *Datura*

Además de los alcaloides, la composición química de las plantas del género *Datura* incluye sesquiterpenos,²⁸⁻³⁰ triterpenos,³¹ saponinas,³² lignanos,³³ flavonoides^{34,35} (Figura 5) y withanólidas. Estos últimos son los metabolitos característicos del género; ya que se han aislado de todas las especies de *Datura* analizadas hasta ahora.^{17,18}

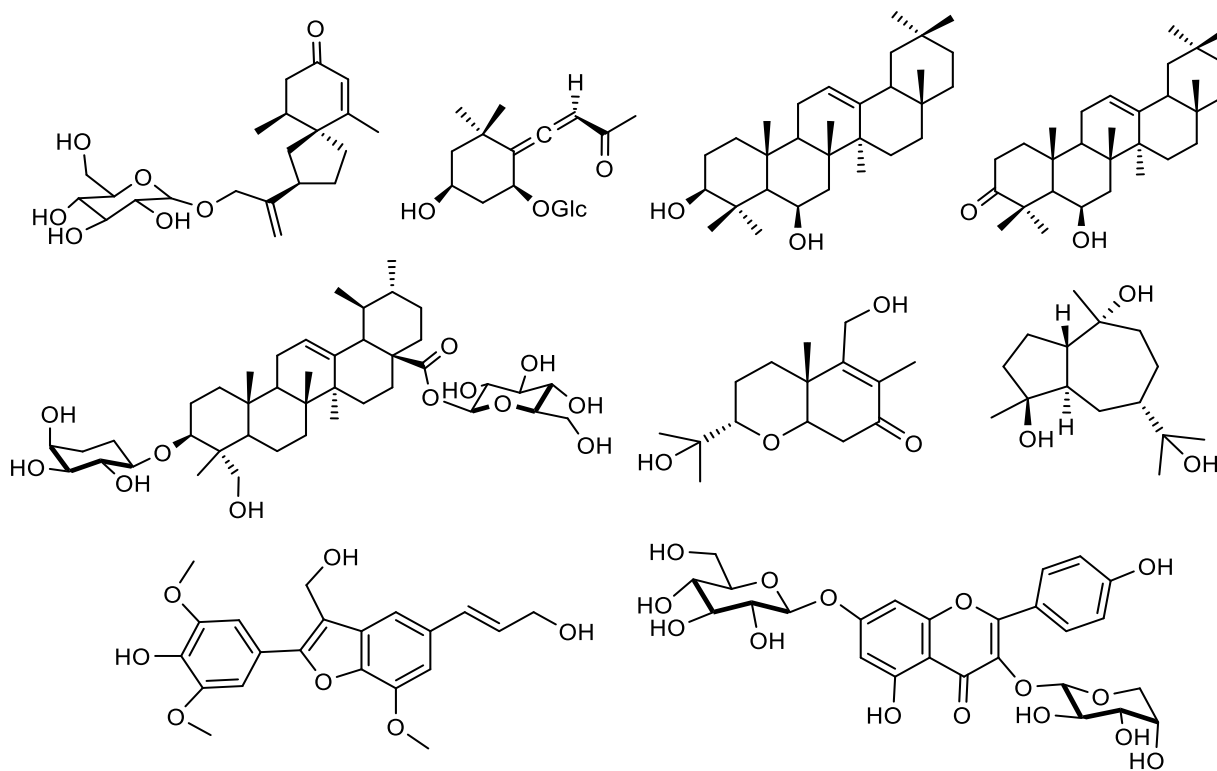


Figura 5. Diversidad de productos naturales del género *Datura*.

2.5.1. Withanólidas

Las plantas de la familia Solanaceae son la principal fuente de withanólidas. Los cuatro principales géneros productores de estos metabolitos son *Datura*, *Jaborosa*, *Physalis* y *Withania*.¹⁷ De este último género es que toman su nombre, ya que la primera withanólida aislada, withaferina A, provino de la especie *Withania somnifera*.³⁶ A la fecha se han aislado cerca de 700 withanólidas pertenecientes a alrededor de 23 géneros.³⁷

Las withanólidas son esteroides polioxigenados con un esqueleto de ergostano (C₂₈), que generalmente contiene funciones oxigenadas en las posiciones C-1, C-22 o C-23, y C-26. Se clasifican como de tipo A si la lactona o lactol que existe en la cadena lateral es δ (C-22 a C-26) y de tipo B si es γ (C23 a C26), (Figura 6). Todas las withanólidas conocidas tienen la misma configuración en C-22, la cual corresponde a 22R.¹⁷

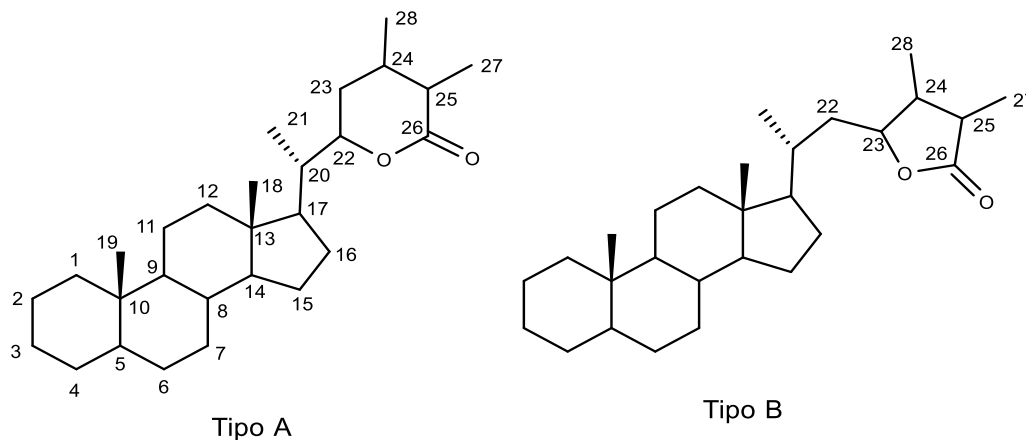


Figura 6. Esqueletos y numeración de los dos tipos de withanólidas.

La mayoría de las withanólidas conocidas pertenecen al grupo A, en el que la δ -lactona se forma entre un grupo carboxilo en C-26 y un grupo hidroxilo en C-22. Los δ -lactoles se forman entre un aldehído en C-26 y un grupo hidroxilo en C-22. El grupo A se puede dividir en trece subgrupos: withanólidas con el esqueleto de la withaferina A, withaphysalinas, physalinas, acnistinas, withajardinas, withametelinas, sativólidas, subtriflora δ -lactonas, espiro- δ -lactonas, withanólidas tipo norborano, withanólidas con el anillo D aromático, withanólidas con el anillo A aromático y tacanólida δ -lactonas

(Figura 7). Las withanólidas más abundantes son aquellas que tienen un esqueleto tipo withaferina A, su variedad estructural radica en las diferentes combinaciones de sustituyentes oxigenados, como hidroxilos, epóxidos o glucósidos. Se ha considerado que este esqueleto es el precursor de los demás metabolitos dentro del mismo grupo.¹⁷

Una subdivisión dentro del grupo está relacionada con la orientación de la cadena lateral. Lo más común es que la cadena lateral tenga una orientación beta, cuando su orientación es alfa es frecuente que exista un grupo 17 β -hidroxi.³⁸

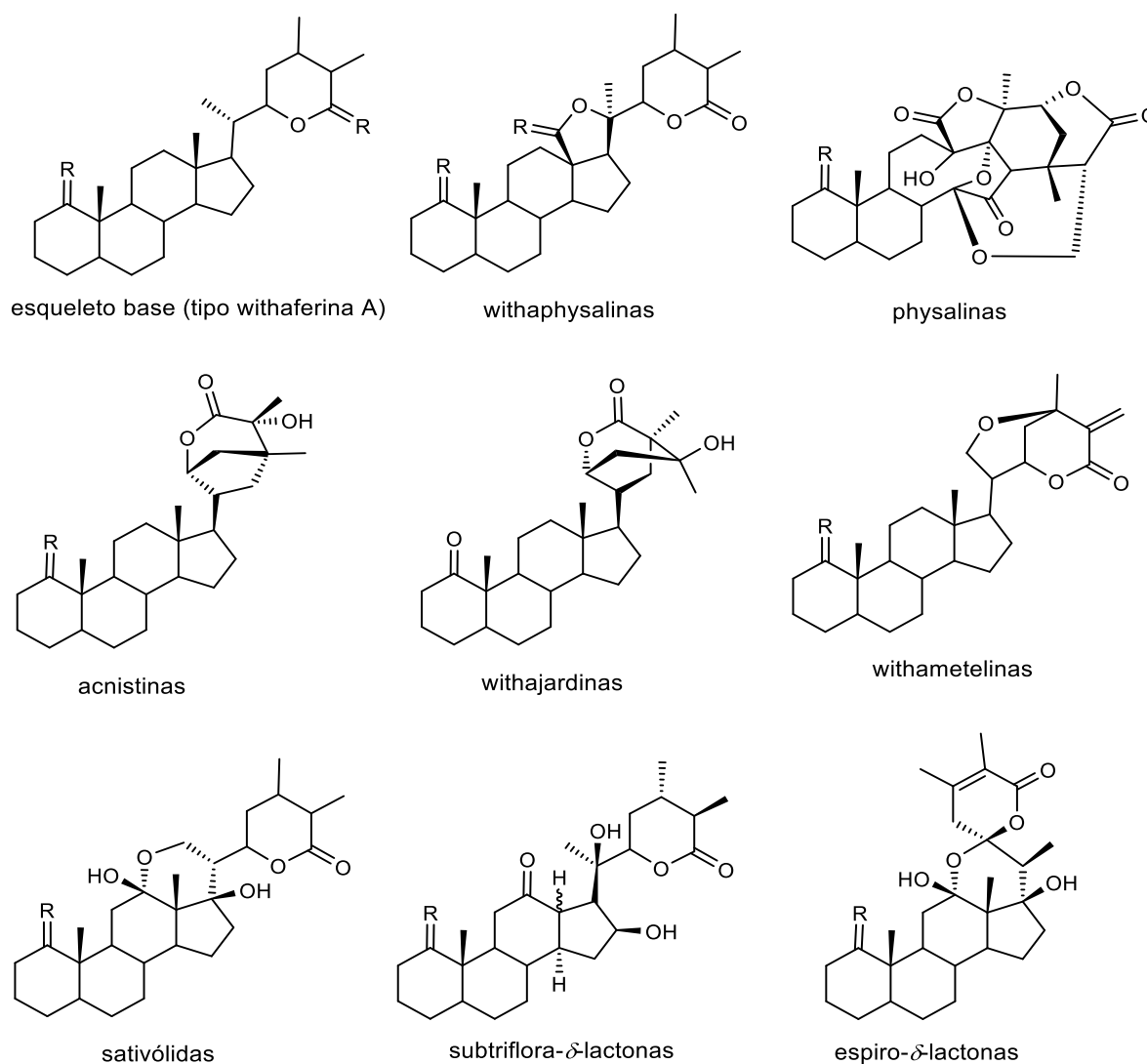


Figura 7. Withanólidas pertenecientes al grupo A.

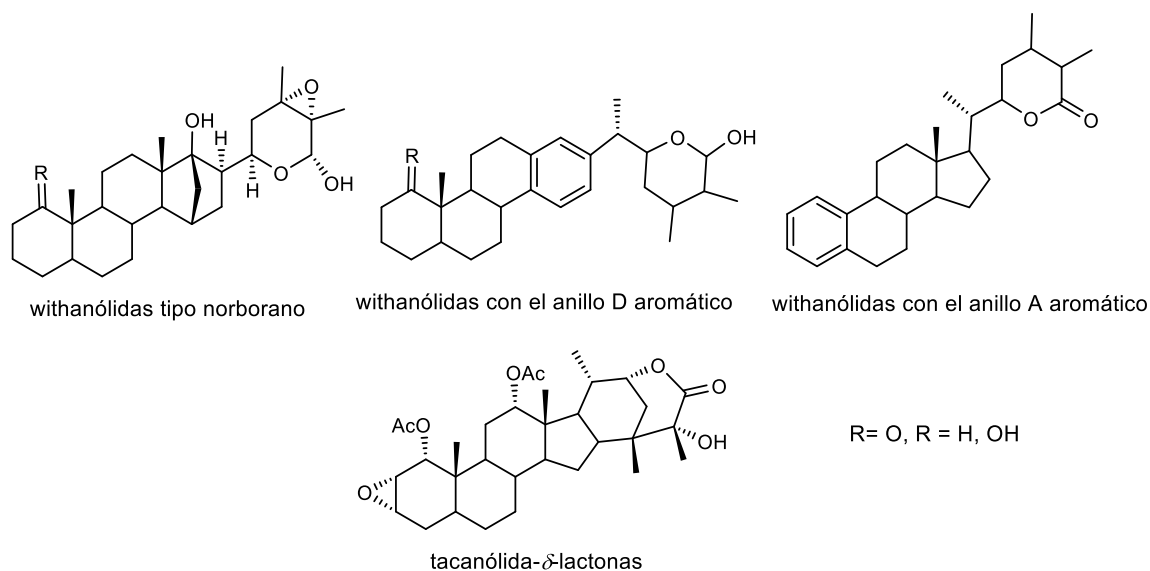


Figura 7. Withanólidas pertenecientes al grupo A (continuación).

La presencia de un hidroxilo en C-23 o C-28 y un carboxilo en C-26, permite la formación de una γ -lactona. Estas γ -withanólidas pueden dividirse en seis subgrupos, withanólidas tipo espiro, treconólidas, subtriflora- γ -lactonas, ixocarpalactonas, tacaonólida- γ -lactonas y perulactonas (Figura 8).¹⁷

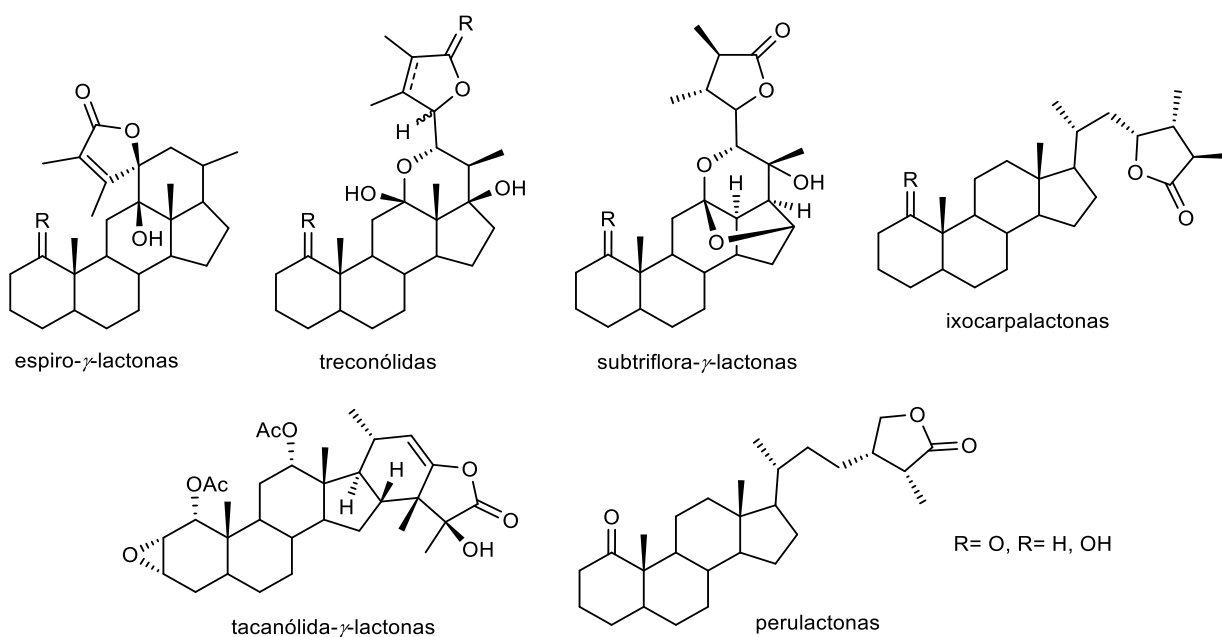


Figura 8. Withanólidas pertenecientes al grupo B.

2.6. Withanólidas y su actividad biológica

En la literatura se describe una gran variedad de actividades biológicas de las withanólidas (Figura 9), que en un futuro podrían tener diferentes aplicaciones, principalmente como fármacos. Entre las actividades biológicas que presentan estos compuestos, destacan sus efectos fitotóxicos,³⁹ insecticidas,⁴⁰ disuasores de la alimentación en insectos,^{41,42} citotóxicos,⁴³ inmunomoduladores,⁴⁴ antiinflamatorios,⁴⁵ antimicrobianos,⁴⁶ antiparasitarios⁴⁷ y en las últimas décadas se ha descubierto que algunas inhiben a la enzima acetilcolinesterasa.⁴⁸

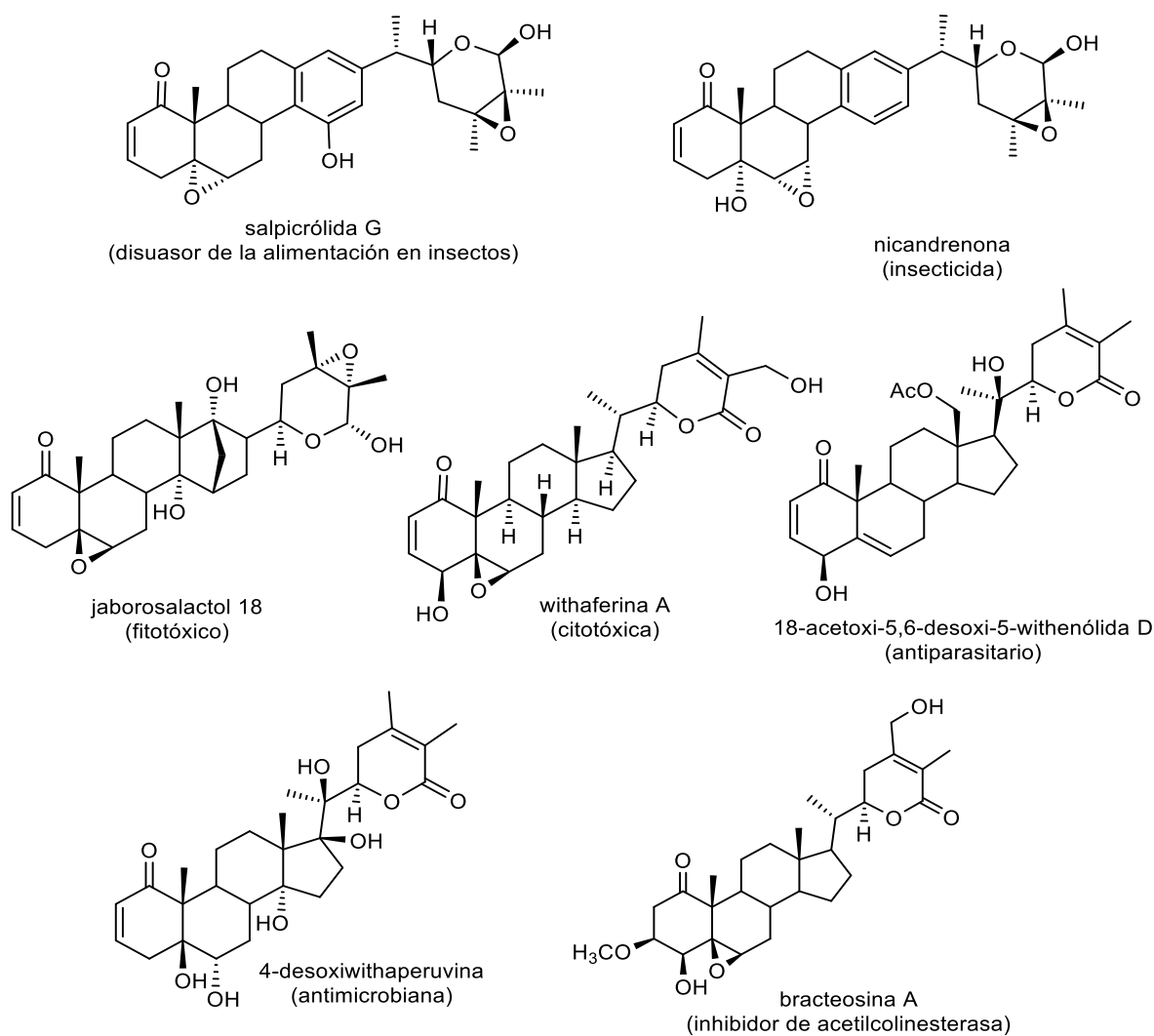


Figura 9. Ejemplos de withanólidas con actividad biológica.

2.7. Estudios químicos y farmacológicos de withanólidas del género *Datura*

En los primeros estudios químicos del género *Datura* se sugirió que la producción de withanólidas estaba restringida a algunas de sus especies,⁴⁹ sin embargo, se han encontrado withanólidas en todas las especies analizadas hasta ahora: *D. quercifolia*, *D. metel* (sin. *D. fastuosa*), *D. stramonium* (sin. *D. tatula*), *D. innoxia*, *D. ferox* y *D. wrightii*.

La primera withanólida aislada en el género *Datura* fue la daturalactona (1), aislada de *D. quercifolia*.⁵⁰ Desde entonces y hasta la actualidad, se han aislado más de cien withanólidas de diferentes especies del género. Algunas de ellas también han sido aisladas de los géneros *Nicandra*, *Lycium* y *Withania*.⁵¹

Además de la cetona α,β -insaturada en el anillo A, las tres funcionalidades que se repiten en muchas de las withanólidas aisladas del género *Datura* son 1) la presencia de un patrón de sustitución 5α -hidroxi- $6\alpha,7\alpha$ -epoxi; 2) funciones oxigenadas en las posiciones C-12, C-21 y C-27; y 3) formación de un anillo de tetrahidropirano adicional (tipo withametelina). El anillo de tetrahidropirano es producido exclusivamente por especies de *Datura* de la sección *Dutra* (*D. metel*, *D. innoxia* y *D. wrightii*) y está presente en alrededor de 30 compuestos. Las especies de la sección *Datura* (*D. quercifolia*, *D. ferox* y *D. stramonium*) se distinguen porque sus metabolitos representativos son 12-hidroxiwithanólidas con un sistema 5α -hidroxi- $6\alpha,7\alpha$ -epoxi y doble enlace o epóxido en C-24 y C-25.

2.7.1. Sección *Datura*

➤ *Datura quercifolia*

Se han realizado varios estudios químicos de esta especie, mediante los cuales se aislaron los compuestos: daturalactona (1),^{50,52} daturalactona 2 (2),^{52,53} daturalactona 3 (4),^{49,54} daturalactona 4 (3),⁵⁵ lycium sustancia B o withanólida B (5),⁴⁹ withanicandrina (6),⁴⁹ withaferoxólida o nicandrina B (7)⁴⁹ y $1\beta,5\alpha,12\alpha$ -trihidroxi- $6\alpha,7\alpha,24\alpha,25\alpha$ -diepóxi-20S,22R with-2-enólida (8),⁴⁴ (Figura 10). Cabe mencionar que

en los dos primeros estudios de este género se aislaron las daturalactonas 1 y 2,^{50,53} pero se propusieron estructuras incorrectas (no se muestran en la Figura 10) que posteriormente se corrigieron.⁵²

Con respecto a la actividad biológica de las withanólidas aisladas, se ha descrito que la mezcla de daturalactona 2 (**2**) y withanicandrina (**6**) promueve una conducta antialimentaria en los insectos *Epilachna varivestis* (conchuela del frijol) y *Tribolium castaneum* (gorgojo rojo de la harina).⁴¹

En otro estudio se evaluaron los efectos inmunomoduladores de los compuestos **1**, **2** y **8**, este ensayo se realizó observando el efecto de los compuestos sobre la producción de anticuerpos, la activación de células T y B, y la producción de citocinas a partir de esplenocitos. Se concluyó que el compuesto **8** es inmunosupresor a dosis bajas, mientras que las daturalactonas 1 (**1**) y 2 (**2**) son inmunoestimulantes.⁴⁴

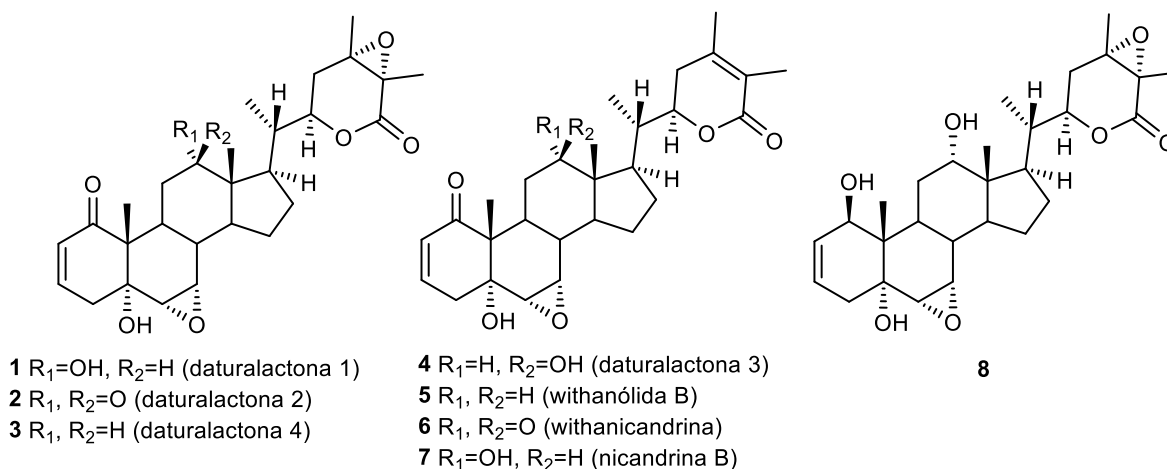


Figura 10. Withanólidas aisladas de *D. quercifolia*.

➤ **Datura ferox**

Los estudios químicos de *Datura ferox* condujeron al aislamiento de 12-O-withanólidas (Figura 11).^{49,56,57} La 15β-hidroxicandrina B (**9**) tiene el patrón de sustitución 5α-hidroxi-6α,7α-epoxi mientras que las daturalactonas 5-7 (**10-12**) tienen arreglos relacionados con la ruptura hidrolítica del epóxido o el reordenamiento del epoxialcohol.¹⁷

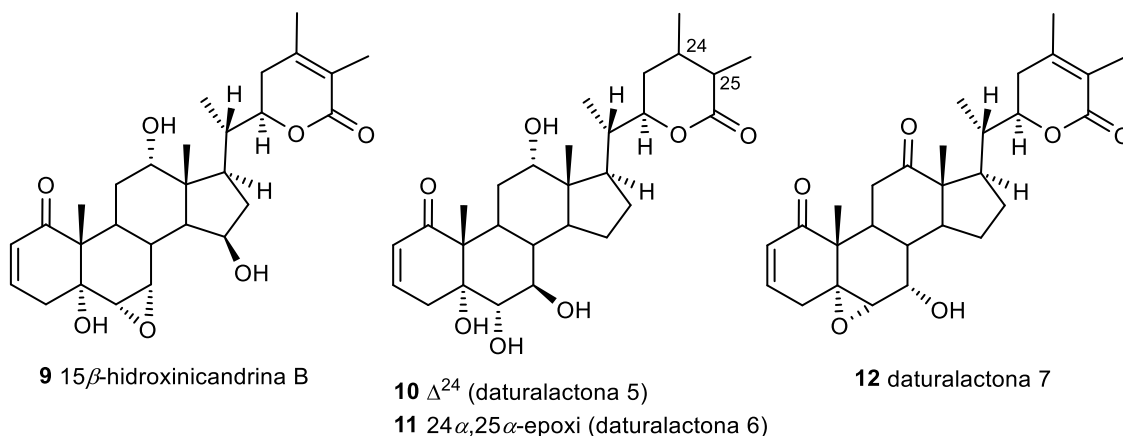


Figura 11. Withanólidas aisladas de *D. ferox*.

➤ *Datura stramonium* (sin. *D. tatula*)

De esta especie se aisló una withanólida hidroxilada en C-12 y C-27 con el patrón de sustitución 5 α -hidroxi-6 α ,7 α -epoxi (**13**),⁵⁸ así como también withanólidas con funciones oxigenadas en C-7 y C-27 (**19-20**, **22-23**)^{59,60} y 21-hidroxiwithanólidas (**14-18**), (Figura 12).⁶¹⁻⁶³ El compuesto **21**,⁶⁰ antes de ser aislado, ya había sido descrito como producto de reacción.⁶⁴

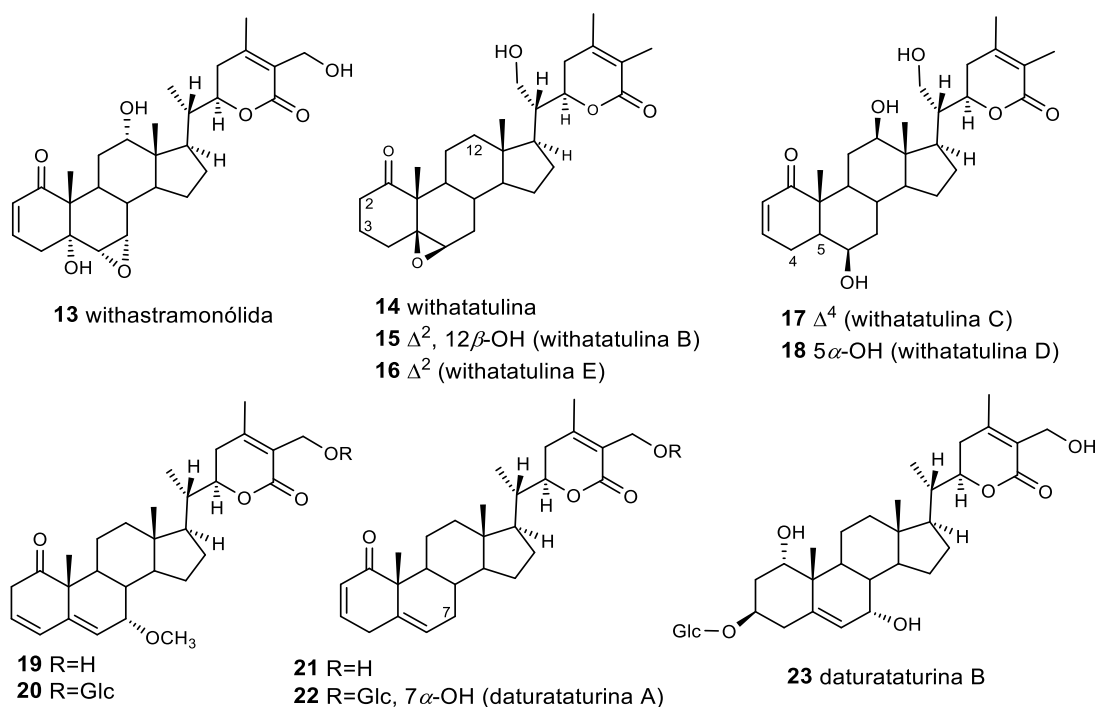


Figura 12. Withanólidas aisladas de *D. stramonium*.

2.7.2. Sección *Dutra*

❖ *Datura metel* (sin. *D. fastuosa*)

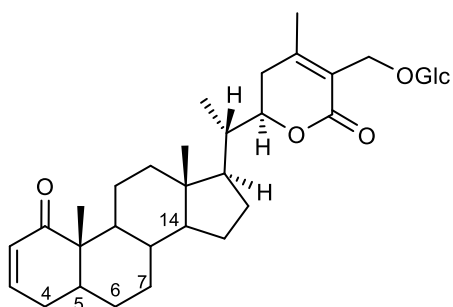
Esta especie ha sido la más estudiada del género desde el punto de vista químico y por ende se han aislado un gran número de withanólidas como las series de withafastuosinas A-F (**55-57**, **62**, **63**, **69**),⁶⁵⁻⁶⁸ daturametelinas A-J (**24-26**, **33**, **50**, **52**, **53**, **58**, **59**, **70**),⁶⁹⁻⁷¹ withametelinas A-Q (**45**, **46**, **54**, **66-68**, **71**, **73-79**, **82**, **89**, **91**),⁷²⁻⁷⁷ baimantuoluósidos A-*H (**27**, **29**, **30-32**, **39**, **83-85**),⁷⁸⁻⁸¹ baimantuoluolinas A-G, I-K (**38**, **47**, **60**, **64**, **80**, **81**, **87**, **88**, **98**, **107**),⁸¹⁻⁸⁴ daturafolisidos A-U (**28**, **34-37**, **41**, **92-97**, **99-103**, **105**, **106**, **108**, **109**)^{45,85} dmetelinas A-D (**40**, **43**, **44**, **104**),⁸⁶ daturanólidas A-C (**48**, **49**, **110**)⁸⁷ y los compuestos datumelina (**111**),⁸⁸ daturilinol (**65**),⁸⁹ datumelina (**61**),⁹⁰ e isowithametelina (**72**),⁹¹ (Figura 13).

En cuanto a ensayos farmacológicos de algunas de las withanólidas mencionadas, se han obtenido los siguientes resultados:

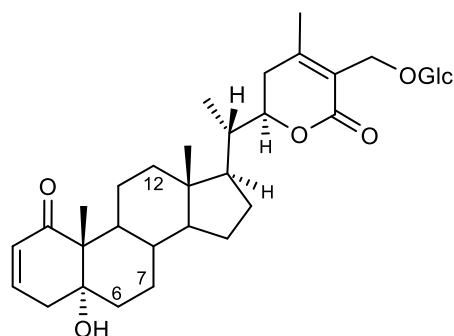
- a) La withafastuosina D (**55**) mantiene constantes los niveles de corticosterona en ratas macho albinas, durante estrés inducido experimentalmente, lo que evidencia su efecto ansiolítico.⁹² La withafastuosina E (**56**) aumenta los niveles de prostaglandinas, las cuales son importantes en la resistencia a la ulceración de la mucosa gastroduodenal.^{93,94}
- b) Se evaluó la actividad antiproliferativa de las daturametelinas H-J (**25**, **33**, **26**), la daturaturina A (**22**) y el compuesto **42** en la línea celular HCT-116 (carcinoma colorrectal). El compuesto no glucosídico (**42**) exhibió los valores más altos de actividad con una IC₅₀ de 3.2 ± 0.2 μM.⁷¹
- c) Las withametelinas I (**67**), K (**76**), L (**77**) y N (**68**) son citotóxicas contra las siguientes líneas celulares cancerosas A59 (pulmón), BGC-283 (estómago) y K562 (leucemia) con valores de IC₅₀ entre 0.05 y 3.5 μM. La withametelina J (**75**) mostró actividad moderada contra las dos últimas líneas celulares.⁷⁶
- d) La actividad citotóxica de la withametelina Q (**91**), daturamalakósido B (**51**), daturametelina B (**50**), withametelina (**71**) y daturametelina A (**24**) fue evaluada en las líneas celulares A549 (carcinoma de pulmón) y DLD-1 (adenocarcinoma colorrectal). Los resultados de los ensayos muestran que el daturamalakósido

B (**51**) tiene actividad citotóxica moderada con valores de IC₅₀ de 7.0 μM (A549) y 2.0 μM (DLD-1). La daturametelina B (**50**) y la withametelina (**71**) fueron los compuestos más activos contra las células DLD-1 con valores de IC₅₀ de 0.6 y 0.7 μM , respectivamente. Ambos compuestos bloquean el ciclo celular en la fase S e inducen apoptosis.⁷⁷

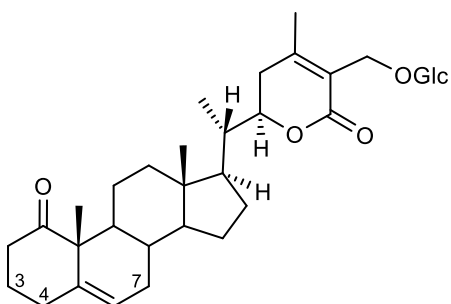
- e) Los daturafolisidos A-I (**92-96**, **34-37**) junto con el compuesto **20**, daturaturina A (**22**), daturametelina J (**26**), daturaturina B (**23**), baimantuoluósido B (**84**) y 12-desoxiwithastramonólida (**86**) fueron evaluados en ensayos antiinflamatorios *in vitro* en macrófagos RAW 264.7 estimulados con lipopolisacárido. Los resultados indican que los daturafolisidos A (**92**) y B (**93**), baimantuoluósido B (**84**) y 12-desoxiwithastramonólida (**86**) presentan una actividad significativa como inhibidores de la producción de nitrito, con valores de IC₅₀ de 20.9, 17.7, 17.8 y 18.4 μM , respectivamente. Los daturafolisidos C (**94**), D (**95**), F (**34**) y daturaturina B (**23**) tienen actividad moderada, mientras que el resto de los compuestos evaluados presentan escasa actividad.⁴⁵
- f) La actividad antiproliferativa del baimantuoluósido *H (**27**), baimantuoluolina K (**98**) y del compuesto **20** frente a las líneas celulares SGC-7901 (adenocarcinoma gástrico), Hepg2 (hepatoma) y MCF-7 (cáncer de mama) resultó escasa.⁸¹
- g) Los daturafolisidos J-U (**105**, **106**, **108**, **28**, **99-103**, **41**, **97**, **109**) y la daturametelina A (**24**) se sometieron a un ensayo para determinar su actividad inhibitoria de la producción de óxido nítrico. Los valores de IC₅₀ de los daturafolisidos L (**108**), M (**28**) y T (**97**) fueron de 9.37 a 18.64 μM , mientras que los daturafolisidos K (**106**), R (**103**) y daturametelina A (**24**) tuvieron valores entre 22.83 y 33.36 μM .⁸⁵
- h) Las daturanólidas A-C (**110**, **48**, **49**), withametelinas C (**45**), G (**74**), E (**82**), withanólida B (**5**), withatatulina (**14**) y 12-desoxiwithastramonólida (**86**) fueron evaluadas en un ensayo de citotoxicidad contra cinco líneas celulares de cáncer (HCT116, U87-MG, NCI-H460, BGC823 y HepG2). Los resultados de las evaluaciones permitieron determinar que la withametelina G (**74**) es la más activa con valores de IC₅₀ de 3.31 a 4.20 μM .⁸⁷



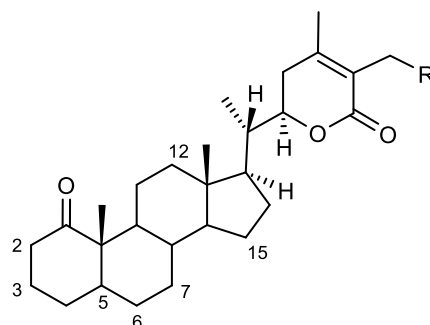
- 24 Δ^5 (daturametelina A)
 25 $\Delta^{4,6}$ (daturametelina H)
 26 Δ^4 , 6 α -OH, 7 α -OH (daturametelina J)
 27 $\Delta^{4,6}$, 14 β -H (baimantuoluósido *H)
 28 4 α ,5 α -epoxi, 6 α -OH, 7 α -OH (daturafolisido M)



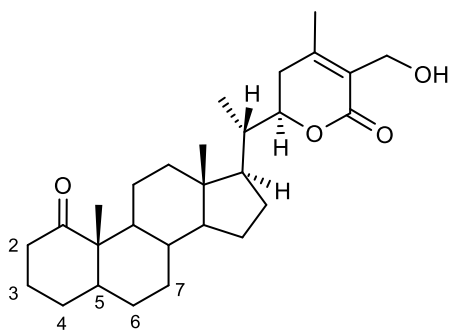
- 29 6 α -OH, 7 β -OH (baimantuoluósido D)
 30 6 β -OH, 7 α -OH (baimantuoluósido E)
 31 6 β -OH, 7 α -OH, 12 β -OH (baimantuoluósido F)
 32 6 β -OH (baimantuoluósido G)



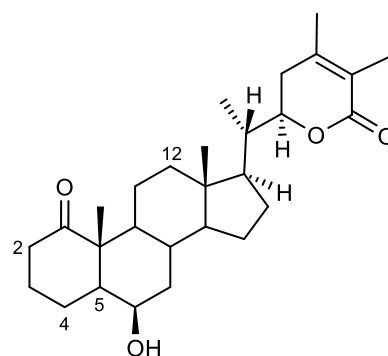
- 33 Δ^3 , 7 α -OH (daturametelina I)
 34 3 α -OH, 7 α -OH (daturafolisido F)
 35 3 β -OCH₃, 7 α -OH (daturafolisido G)
 36 3 β -OBu, 7 α -OH (daturafolisido H)
 37 Δ^3 , 7 β -OH (daturafolisido I)



- 38 R=H, Δ^2 , 5 α -OH, 6,7-epoxi, 12-OH,15-OH (baimantuoluolina A)
 39 R=Oglc, 5 β -OH, 6 α -OH, 7 β -OH (baimantuoluósido H)
 40 R=Oglc6->glc1, $\Delta^{2,5}$, 7 α -OH (dmetelina C)

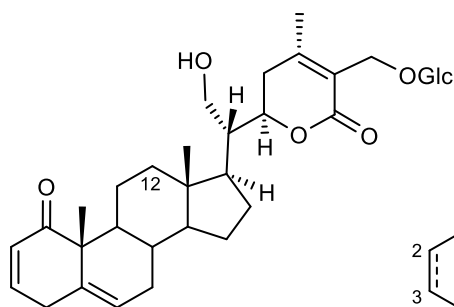


- 41 $\Delta^{2,4}$, 6 α -OH, 7 α -OH (daturafolisido S)
 42 $\Delta^{2,5}$, 7 α -OH
 43 Δ^5 , 7 α -OH (dmetelina A)
 44 $\Delta^{2,5}$, 7 β -OH (dmetelina D)

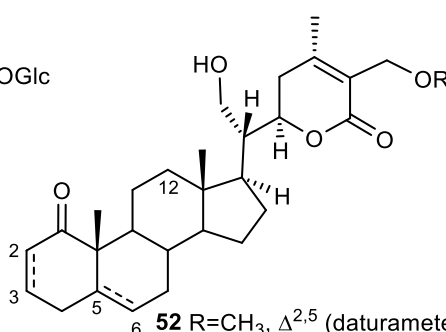


- 45 5 α -OH (withametelina C)
 46 Δ^2 , 5 α -OH (withametelina D)
 47 5 α -OH, 12 β -OH (baimantuoluolina F)
 48 Δ^4 (daturanólida B)
 49 $\Delta^{2,4}$ (daturanólida C)

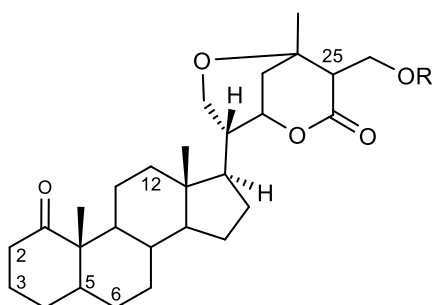
Figura 13. Withanólidas aisladas de *D. metel.*



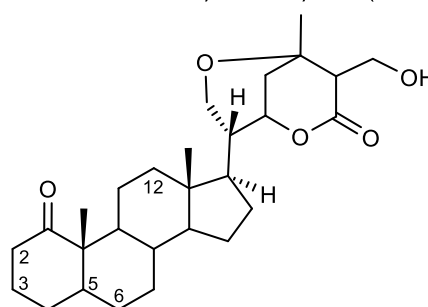
50 daturametelina B
51 12 α -OH (daturamalakósido B)



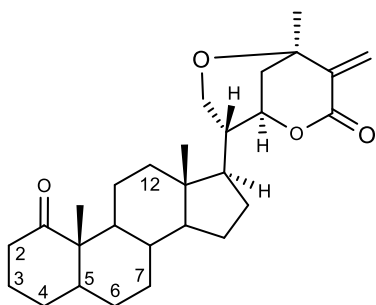
52 R=CH₃, $\Delta^{2,5}$ (daturametelina C)
53 R=CH₃, Δ^5 , 3 β -OSO₃H (daturametelina E)
54 R=CH₃, Δ^2 , 5 α -OH, 6 β -OH (withametelina H)
55 R=H, Δ^2 , 5 β ,6 β -epoxi (withafastuosina D)
56 R=H, Δ^2 , 5 α -OH, 6 β -OH (withafastuosina E)
57 R=H, Δ^2 , 5 α -OH, 6 β -OH, 12 β -OH (withafastuosina F)



58 R=CH₃, $\Delta^{2,5}$, 25 α -H (daturametelina D)
59 R=Glc-Ac, $\Delta^{2,5}$ (daturametelina G-Ac)
60 R=CH₃, Δ^2 , 5 α -OH, 6 β -OH, 12 β -OH (baimantuoluolina D)
61 R=CH₃, $\Delta^{2,5}$, 25-H (datumetelina)

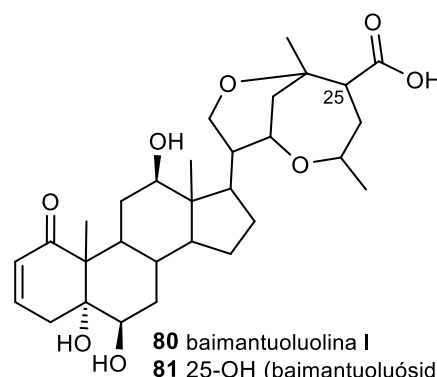
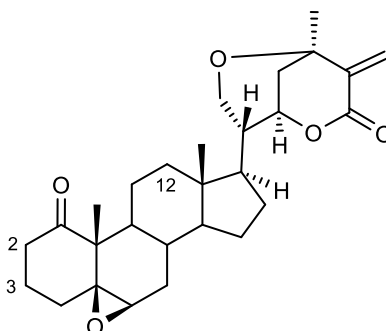


62 5 β ,6 β -epoxi (withafastuosina A)
63 Δ^2 , 5 β ,6 β -epoxi (withafastuosina B)
64 Δ^2 , 5 α -OH, 6 β -OH, 12 β -OH (baimantuoluolina E)
65 $\Delta^{2,5}$ (daturilinol)



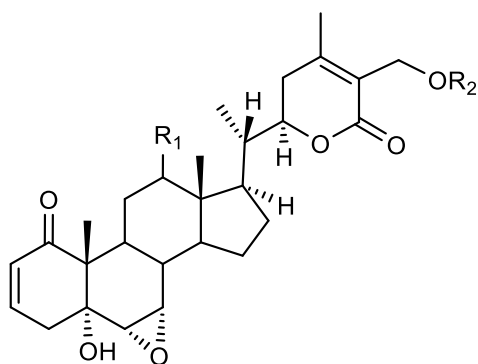
66 Δ^2 (withametelina F)
67 Δ^2 , 12 β -OH (withametelina I)
68 3 α -OH (withametelina N)
69 3 β -OCH₃ (withafastuosina C)

70 Δ^5 , 3 β -OSO₃H (daturametelina F)
71 $\Delta^{2,5}$ (withametelina)
72 $\Delta^{3,5}$ (isowithametelina)
73 $\Delta^{2,4}$, 6 β -OH (withametelina B)
74 Δ^2 , 5 α -OH, 6 β -OH (withametelina G)
75 Δ^2 , 5 α -OH, 6 β -OH, 12 β -OH (withametelina J)
76 $\Delta^{2,4}$, 6 β -OH, 12 β -OH (withametelina K)
77 $\Delta^{2,5}$, 12 β -OH (withametelina L)
78 $\Delta^{3,5}$, 12 β -OH (withametelina M)
79 Δ^2 , 5 β -OH, 6 α -OH (withametelina O)

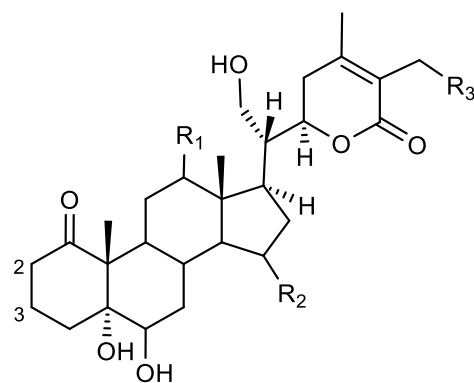


80 baimantuoluolina I
81 25-OH (baimantuoluólido J)

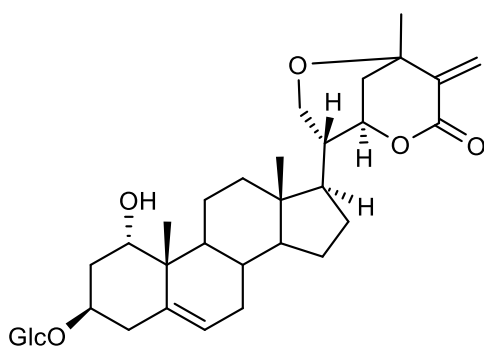
Figura 13. Withanólidas aisladas de *D. metel* (continuación).



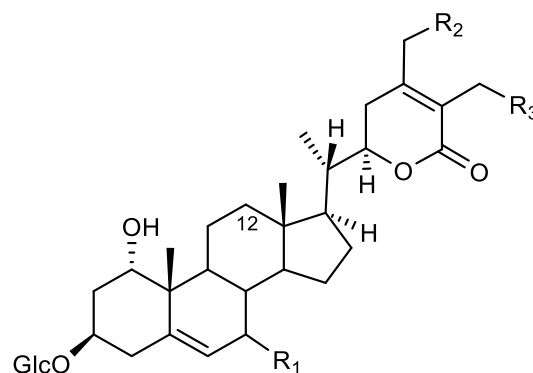
- 82 $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{H}$ (withametelina E)
 83 $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \text{Glc}$ (baimantuoluósido A)
 84 $R_1 = \alpha\text{-OH}$, $R_2 = \text{Glc}$ (baimantuoluósido B)
 85 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Glc}$ (baimantuoluósido C)
 86 $R_1 = R_2 = \text{H}$ (12-desoxiwithastramonólida)



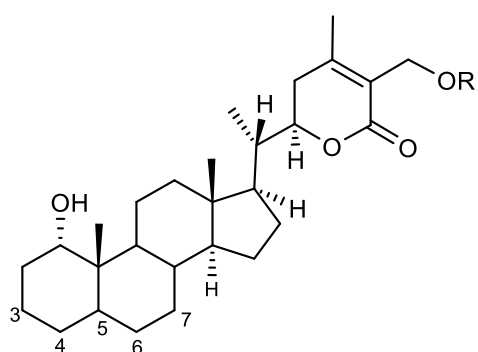
- 87 $R_1 = R_3 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$ (baimantuoluolina B)
 88 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OCH}_3$, Δ^2 (baimantuoluolina C)
 89 $R_1 = R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OGlc}$, Δ^2 , $6\beta\text{-OH}$ (withametelina P)
 90 $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$, Δ^2



91 withametelina Q



- 92 $R_1 = \alpha\text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$ (daturafolisido A)
 93 $R_1 = \alpha\text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$ (daturafolisido B)
 94 $R_1 = \beta\text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$ (daturafolisido C)
 95 $R_1 = \beta\text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OGlc}$ (daturafolisido D)
 96 $R_1 = \beta\text{OBu}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$ (daturafolisido E)
 97 $R_1 = \alpha\text{OH}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$, $12\alpha\text{-OH}$ (daturafolisido T)



- 98 $R = \text{H}$, Δ^5 , $3\beta\text{-OH}$, $7\alpha\text{-OH}$ (baimantuoluolina K)
 99 $R = \text{Glc}$, Δ^5 , $3\beta\text{-OH}$, $7\alpha\text{-OH}$ (daturafolisido N)
 100 $R = \text{H}$, Δ^5 , $3\beta\text{-OEt}$, $7\alpha\text{-OH}$ (daturafolisido O)
 101 $R = \text{Glc}$, Δ^5 , $3\beta\text{-OH}$, $7\beta\text{-OH}$ (daturafolisido P)
 102 $R = \text{Glc}$, Δ^5 , $3\alpha\text{-OH}$ (daturafolisido Q)
 103 $R = \text{Glc}$, $\Delta^{4,6}$, $3\beta\text{-OCH}_3$ (daturafolisido R)
 104 $R = \text{H}$, $\Delta^{4,6}$, $3\beta\text{-OCH}_3$ (dmetelina B)

Figura 13. Withanólidas aisladas de *D. metel* (continuación).

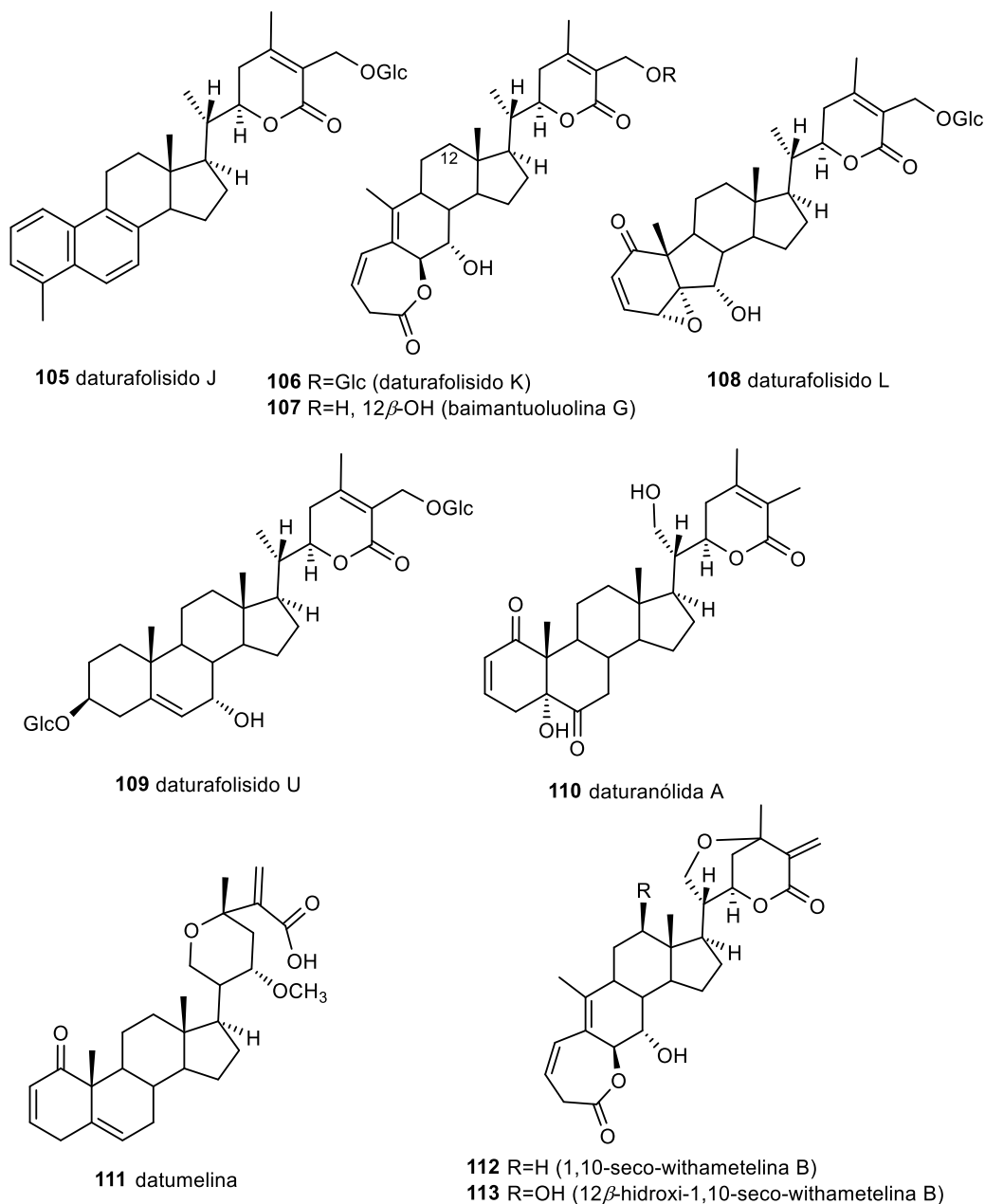


Figura 13. Withanólidas aisladas de *D. metel* (continuación).

❖ *Datura innoxia*

Las withanólidas withametelinol (114), withametelinona (115), withametelinoles A (116) y B (117), witharifeen (118), y daturalicina (119) fueron aisladas de las partes aéreas de *Datura innoxia* colectada en Pakistán (Figura 14).⁹⁵⁻⁹⁷ En otro estudio de esta planta, el compuesto 120, llamado daturacina se describió como la primera withanólida con

configuración 22*S*, esta propuesta se sugirió con base en un efecto *Cotton* negativo a 249.4 nm,⁹⁸ pero la inversión de la configuración, propuesta en C-22 y C-24, con respecto a otras withanólidas requeriría que H-20 ocupe una posición axial en lugar de una ecuatorial. Sin embargo, los datos de RMN de ¹H y ¹³C de la cadena lateral coinciden perfectamente con la de las withanólidas con la configuración “normal” (22*R*), por lo que se ha sugerido que esta estructura debe revisarse.¹⁷

En el último estudio de esta planta se aisló la withanólida dinoxina B (**121**),⁹⁹ este compuesto tiene un hidroxilo libre en C-21, por lo que hasta ahora es el único compuesto de esta especie que no presenta el anillo de tetrahidropirano.

En cuanto a ensayos biológicos, se ha evaluado la capacidad antiproliferativa del extracto metanólico de *D. innoxia*, dinoxina B (**121**) y su aglicona en un panel de células cancerosas. Los resultados mostraron que dinoxina B y su aglicona exhiben valores de IC₅₀ submicromolares contra múltiples líneas de cáncer, siendo las más sensibles las líneas de cáncer de mama.⁹⁹

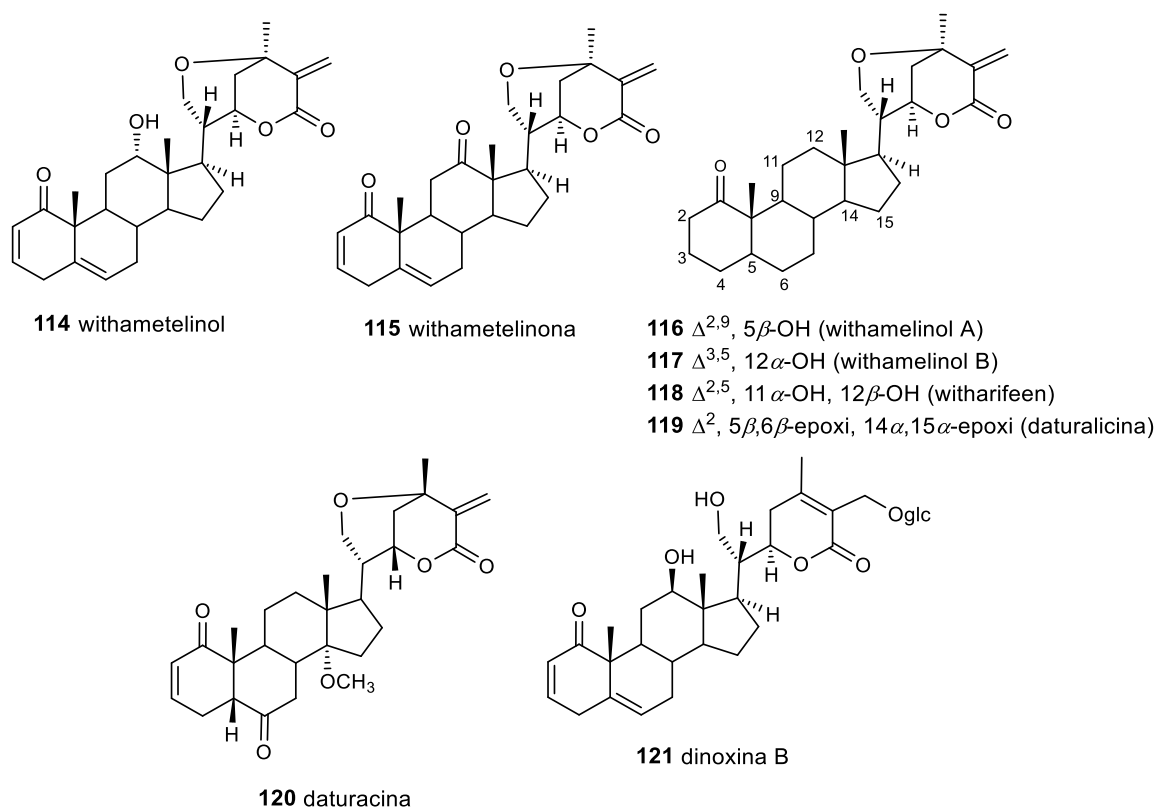
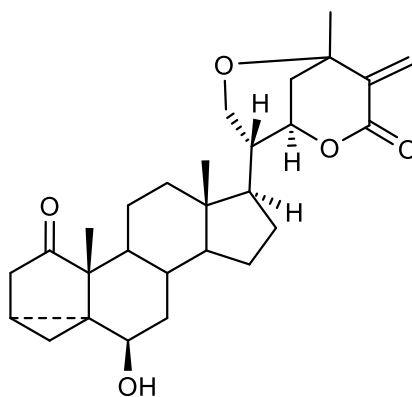


Figura 14. Withanólidas aisladas de *D. innoxia*.

❖ *Datura wrightii*

Existe un solo estudio químico de *D. wrightii*, en el que se aislaron cuatro withanólidas conocidas withametelina L (**77**), withametelina (**71**), withametelina O (**79**), withametelina F (**66**) y una nueva withanólida con un anillo inusual formado entre C-3 y C-5 (**122**).¹⁸

En el mismo estudio se evaluó la actividad antiproliferativa mediante el ensayo colorimétrico MTS de viabilidad celular. Las withanólidas withawrightólida (**122**), withametelina L (**77**), withametelina (**71**), withametelina O (**79**) y withametelina F (**66**) mostraron actividad contra líneas celulares de glioblastoma (U251 y U87), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (MDA- 1986), y células sanas de fibroblastos de pulmón fetal (MRC-5), con valores de IC₅₀ en el rango de 0.56 a 5.6 μ M.



122 withawrightólida

Figura 15. Withanólida aislada de *D. wrightii*.

2.8. Generalidades de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento neurodegenerativo caracterizado por la pérdida progresiva e irreversible de las neuronas del hipocampo y las áreas corticales del cerebro. Lo anterior conlleva a que las funciones cognitivas se vayan deteriorando y a medida que se desarrolla la enfermedad, los pacientes comienzan a tener dificultades con la lectura, el habla, el pensamiento lógico y la

memoria a largo plazo. En las últimas etapas de la EA, los pacientes se vuelven totalmente dependientes de sus cuidadores.^{38,48}

Esta enfermedad supone un gran problema de salud pública debido a su alta incidencia, ya que en países desarrollados es la tercera causa de muerte entre adultos mayores de 65 años, sólo después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Se ha estimado que en la población de edad avanzada esta enfermedad representa del 50% al 60% del total de casos de demencia.¹⁰⁰ A nivel mundial, unos 25 millones de personas sufren de la EA y de acuerdo con las estadísticas este número puede aumentar hasta 114 millones para el año 2050.¹⁰¹

Las bases biológicas de la enfermedad aún no están claras, pero se han propuesto las hipótesis amiloide, colinérgica, glutamatérgica y del estrés oxidativo.⁴⁸ Según la hipótesis colinérgica, el deterioro de la memoria en pacientes con Alzheimer es el resultado de una deficiencia en la función colinérgica en el cerebro. Por lo tanto, la estrategia terapéutica más prometedora para activar la función colinérgica ha sido el uso de agentes colinomiméticos, por ejemplo, los compuestos inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), cuyo objetivo es aumentar los niveles endógenos de acetilcolina en el cerebro y, por ende, aumentar la neurotransmisión colinérgica,¹⁰² por la razón anterior son utilizados los fármacos tacrina, huperzina A, rivastigmina, galantamina y donepezil.⁴⁸

Actualmente, no existe una cura o tratamiento preventivo para la EA; sin embargo, los resultados de algunos estudios epidemiológicos e investigaciones en modelos animales sugieren que el ejercicio, tanto físico como mental, pueden ayudar al cerebro a combatir los cambios patológicos que causa la enfermedad, por lo que una manera de prevenir o retrasar el desarrollo de la EA es realizar ejercicio físico y estar involucrado en actividades intelectuales como leer, resolver crucigramas, jugar ajedrez, etc.¹⁰³

3. JUSTIFICACIÓN

El estudio químico de las diversas especies vegetales es relevante porque contribuye al descubrimiento de compuestos con actividades biológicas importantes sobre todo en el área de la salud humana, ya que los productos naturales son una fuente importante de compuestos bioactivos. Por otro lado, los resultados de dichos estudios químicos aportan información quimiotaxonómica que es de utilidad para conocer las capacidades biosintéticas de un determinado género.

El criterio etnomédico ha servido para seleccionar plantas que resulten de interés con base en el uso que se les ha dado, tal es el caso del género *Datura*, a cuyas especies se les han atribuido propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antiespasmódicas y sedantes, no obstante, también se consideran tóxicas por el contenido de alcaloides tipo tropano que poseen. Sin embargo, este género también produce otros compuestos de interés, como las withanólidas que son metabolitos esteroidales con diversas actividades biológicas de importancia medicinal.

México cuenta con casi toda la diversidad del género *Datura*, por lo que estudiar químicamente a sus especies permitirá conocer el tipo de metabolitos secundarios que producen, mientras que su evaluación biológica permitirá ampliar el conocimiento de su potencial farmacológico. En este contexto se inscriben los análisis químicos de las especies *Datura ceratocaula* y *Datura discolor*, y la evaluación de la capacidad de los compuestos aislados para inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, que se presentan a continuación.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Generar conocimiento relacionado con la química del género *Datura* a través del estudio químico de las especies *Datura ceratocaula* y *Datura discolor*, y aportar datos sobre la capacidad de sus metabolitos para inhibir a la enzima acetilcolinesterasa.

4.2. Metas

- Aislar el mayor número posible de metabolitos secundarios de los extractos orgánicos de *Datura ceratocaula* y *Datura discolor*.
- Llevar a cabo la determinación estructural de los compuestos obtenidos mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos.
- Evaluar la capacidad de los compuestos aislados para inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1. Material y equipo

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher-Johns y no están corregidos. En las cromatografías en columna (CC) se utilizó sílica gel 60 (Macherey-Nagel G/UV₂₅₄) y se eluyeron haciendo vacío. Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizaron en cromatoplasas Macherey-Nagel Sil G/UV₂₅₄ de 0.25 mm de espesor. Las cromatografías en placa preparativa (CPP) se realizaron sobre placas Sil G/UV₂₅₄ de 2.0 mm de espesor. Se utilizó una lámpara de luz ultravioleta Spectroline CX-20 a 254 y 366 nm para visualizar las cromatoplasas. Como revelador se empleó una disolución de sulfato cérico al 3% en ácido sulfúrico 2 N.

Los espectros de RMN se obtuvieron en espectrómetros Bruker Avance (¹H a 300 MHz; ¹³C a 75 MHz), Bruker Avance III (¹H a 400 MHz; ¹³C a 100 MHz), Bruker Avance III HD (¹H a 500 MHz; ¹³C a 125 MHz) y Varian Inova (¹H a 500 MHz; ¹³C a 125 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm con respecto a tetrametilsilano (TMS) que se usó como referencia interna. Los espectros en el infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27. La rotación óptica se determinó en un polarímetro Perkin Elmer 343. Los espectros de masas se obtuvieron en los equipos JEOL AccuTOF JMS-T100LC (EM-DART), JEOL SX102A (EM-IE) y Agilent 6200 series TOF/6500 series (EMAR-ESI).

5.2. Material vegetal

Las partes aéreas de *Datura ceratocaula* Ortega se recolectaron en el Estado de México (colecta EMJ-31), en mayo de 2018 y las de *Datura discolor* Bernh. en San Borja, Baja California (colecta M. Martínez 9453), en agosto de 2018. Ambas especies fueron identificadas por la Dra. Mahinda Martínez y se depositaron en el Herbario de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo los números de colecta mencionados.

5.3. *Datura ceratocaula* Ortega

5.3.1. Extracción del material vegetal

Las partes aéreas de las plantas (tallos, hojas y flores) se dejaron secar a la sombra, ya secas se molieron en un molino de cuchillas. El material vegetal molido (796.46 g) se extrajo con hexano, acetona y metanol mediante percolación.

5.3.2. Aislamiento y purificación de los compuestos

La CCF de los extractos de hexano (14.22 g) y acetona (20.39 g) mostró que poseían un perfil químico similar por lo que fueron reunidos. Del extracto resultante (34.61 g) se tomaron 33.39 g que se fraccionaron por medio de CC (columna A). La columna se eluyó con mezclas de hexano/AcOEt de polaridad creciente (1:0 a 0:1). El orden y la relación de disolventes en las distintas fracciones (de 500 mL) fueron: A1-A21 (1:0), A22-A34 (19:1), A35-A56 (9:1), A57-A73 (17:3), A74-A82 (4:1), A83-A102 (3:1), A103-A108 (7:3), A109-A114 (3:2), A115-A122 (1:1), A123-A127 (3:7), A128 (AcOEt), A129 (acetona) y A130 (MeOH). Se reunieron las fracciones que mediante cromatografía en capa fina evidenciaron tener compuestos similares. De las fracciones A8-A16 se obtuvo el compuesto **I** (42.5 mg), mediante cristalización (acetona). Las fracciones A26-A32 (2.11 g) se sometieron a CC (columna B). La columna se eluyó con hexano/isopropanol 199:1, con lo que se obtuvieron las fracciones B1-B17. Las fracciones A33-A40 y B14-B17 se reunieron (2.64 g) y se sometieron a CC (columna C), como eluyentes se usaron mezclas de hexano/AcOEt 19:1 (frs. C1-C24) y 9:1 (frs. C25-C29). De las fracciones C13-C24 se obtuvieron 578.4 mg de la mezcla de los compuestos **II** y **III** mediante cristalización (EtOH). Las fracciones A88-A114 (2.22 g) se sometieron a CC (columna D). La elución se realizó con mezclas de hexano/isopropanol 97:3 (frs. D1-D23) y 94:6 (frs. D24-D28). De las fracciones D10-D28 se obtuvieron 91.6 mg del compuesto **IV** mediante cristalización (AcOEt/hexano). De la CC (columna E) de las fracciones A129-A130 (8.84 g) que se eluyó con mezclas de CHCl₃/MeOH (97:3→1:1), se obtuvieron las fracciones E1-E66. Las fracciones E1-E9 (3.34 g), eluidas con CHCl₃/MeOH 97:3, se decoloraron con carbón activado y se

sometieron a CC (columna F). La columna se eluyó con hexano/acetona 3:1→3:7, con lo que se obtuvieron las fracciones F1-F31. La fracción F1 (240.0 mg) se sometió a CC (columna G) que se eluyó con hexano/acetona 19:1, con lo que se obtuvieron las fracciones G1-G17. De las fracciones G5-G14 se obtuvieron 17.6 mg del compuesto **V** mediante cristalización (AcOEt/hexano).

El extracto de MeOH (110.72 g) se sometió a partición utilizando MeOH/H₂O 1:30 y CHCl₃. Se obtuvieron 23.72 g de la fracción de CHCl₃ y 84.02 g de la fracción hidroalcohólica. La fracción de CHCl₃ se sometió a CC (columna H). La columna se eluyó con mezclas de CHCl₃/MeOH, con lo que se obtuvieron las fracciones H1-H15 (19:1) y H16-H20 (9:1). El progreso de la CC se monitoreó mediante CCF y se reunieron las fracciones de composición similar. Las fracciones H1-H10 (6.99 g) se sometieron a CC (columna I). La columna se eluyó con hexano/acetona 19:1→3:2, con lo que se obtuvieron las fracciones I1-I25 (24:1), I26-I42 (9:1), I43- I52 (17:3) I53- I60 (4:1), I61- I72 (3:2) e I73 (0:1). De las fracciones I6-I16 se obtuvieron 29.4 mg de la mezcla de los compuestos **II** y **III** mediante cristalización (MeOH). Las fracciones I26-I64 (970.0 mg) se sometieron a CC (columna J). La columna se eluyó con hexano/acetona 19:1→17:3, con lo que se obtuvieron las fracciones J1-J15 (19:1), J16-J21 (9:1) y J22-J32 (17:3). De las fracciones J5-J15 se obtuvieron 676.0 mg del compuesto **V** mediante cristalización (AcOEt/éter isopropílico) y de las fracciones J19-J25 se obtuvieron 21.9 mg del compuesto **VI** mediante cristalización (AcOEt/éter isopropílico). La fracción I73 (1.41 g) se sometió a CC (columna K). La columna se eluyó con mezclas de CHCl₃/MeOH 24:1 (K1-K13) y 23:2 (K14-K26). De las fracciones K5-K13 se obtuvieron 7.7 mg del compuesto **VII** mediante cristalización (AcOEt). Las aguas madre de las fracciones K5-K13 (250.0 mg) se sometieron a CPP (CHCl₃/MeOH 9:1), de la que se obtuvieron cuatro fracciones. La fracción que contenía el compuesto de interés (70.0 mg) se sometió a CC (columna L; hexano/AcOEt 7:3), con lo que se obtuvieron las fracciones L1-L9 y L10-L11 (acetona). Las fracciones L10-L11 (66.4 mg) se purificaron por CC (columna M; benceno/MeOH 93:7), de la que se obtuvieron las fracciones M1-M13. De la fracción M4 se obtuvieron 11.2 mg del compuesto **VIII** mediante cristalización (CHCl₃/hexano). De la fracción K16 se obtuvieron 112.6 mg de

un sólido que se purificó mediante CC (columna N; benceno/MeOH 93:7), con lo que se obtuvieron las fracciones N1-N15. De las fracciones N8-N14 se obtuvieron 104.5 mg del compuesto **IX** mediante cristalización (CHCl₃/hexano). Las fracciones H11-H19, K1-K4 y K14-K21 (6.01 g) se sometieron a CC (columna Ñ). La columna se eluyó con hexano/acetona 9:1→1:4, con lo que se obtuvieron las fracciones Ñ1-Ñ68. Las fracciones Ñ21-Ñ27 (20.0 mg), eluidas con hexano/acetona 4:1, se sometieron a CC (columna O; CHCl₃/AcOEt 17:3), con lo que se obtuvieron las fracciones O1-O14. De las fracciones O5-O17 se obtuvieron 2.5 mg del compuesto **X** mediante cristalización (éter isopropílico/hexano). Los compuestos mayoritarios contenidos en las fracciones Ñ50-Ñ59 (eluidas con hexano/acetona 3:7) no se lograron purificar de forma eficiente, por lo que 117.0 mg de estas fracciones se trataron con 1.5 mL de piridina y 1.5 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó toda la noche a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando hielo. La fase acuosa se extrajo tres veces con 5.0 mL de AcOEt. La fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl (5%), agua, solución saturada de NaHCO₃ y agua. Se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró. Se obtuvieron 151.0 mg de crudo que se sometió a CC (columna P; hexano/AcOEt 7:3), con lo que se obtuvieron las fracciones P1-P27. Las fracciones P7-P12 (93.0 mg) se sometieron a CC (columna Q; hexano/AcOEt 73:27; de la que se obtuvieron las fracciones Q1-Q13. Las fracciones Q6-Q7 se decoloraron con carbón activado (40.0 mg) y se sometieron a CC (columna R). La columna se eluyó con hexano/AcOEt 4:1; con lo que se obtuvieron las fracciones R1-R14 y R15 (eluida con acetona). La fracción R15 (30.0 mg) se sometió a CC (columna S; hexano/AcOEt 19:6), con lo que se obtuvieron las fracciones S1-S16. De la fracción S10 se obtuvieron 9.1 mg del compuesto **XI** mediante cristalización (AcOEt/hexano). La fracción Q8 (50.0 mg) se decoloró con carbón activado y se sometió a CC (columna T; hexano/AcOEt 76:24); con lo que se obtuvieron las fracciones T1-T12. De la fracción T10 se obtuvieron 18.7 mg del compuesto **XII** mediante cristalización (AcOEt/hexano).

β,β -caroteno (I): sólido rojo; p.f. 166-169 °C (acetona); RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃): espectros 1 y 2.

Mezcla de β -sitosterol (II) y estigmasterol (III): cristales blancos; p.f. 135-136 °C (EtOH); RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3): espectros 3 y 4.

Luteína (IV): sólido anaranjado; p.f. 179-181 °C (AcOEt/hexano); RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3): espectros 5 y 6; EM-IE: m/z 568 $[\text{M}]^+$, 550 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 532 $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}]^+$.

Withametelina (V): cristales blancos; p.f. 194-196°C (AcOEt/hexano), 200-202 °C (AcOEt/éter isopropílico); $[\alpha]_D^{20}$ -174 (c 0.21, CHCl_3); IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx}}$: 2981, 2947, 2873, 1715, 1681, 1665, 1235, 1133, 1098 cm^{-1} ; RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3): ver Tablas 1 y 2; EM-DART: m/z 437 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Withametelina F (VI): cristales blancos; p.f. 245-247 °C (AcOEt/éter isopropílico); $[\alpha]_D^{20}$ -53 (c 0.23, CHCl_3); IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx}}$: 2946, 2873, 1717, 1670, 1384, 1241, 1132, 1101 cm^{-1} ; RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3): ver Tablas 1 y 2; EM-DART: m/z 453 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Glucósido de β -sitosterol (VII): sólido blanco; p.f. 282-284 °C (EtOH).

Daturametelina A (VIII): sólido blanco; p.f. 149-152 °C (CHCl_3 /hexano); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$: 3344, 2923, 1682, 1665, 1381, 1070, 1025 cm^{-1} ; RMN ^1H y ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): ver Tablas 3 y 4.

Daturametelina B (IX): sólido blanco; p.f. 152-155 °C (CHCl_3 /hexano); $[\alpha]_D^{20}$ +21 (c 0.21, MeOH); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$: 3389, 2926, 1682, 1664, 1381, 1072, 1024 cm^{-1} ; EMAR-ESI: m/z 639.3134 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{O}_{10}\text{Na}$, 639.3145).

Datucerólida A (X): sólido blanco; p.f. 143-145 °C (éter isopropílico/hexano); $[\alpha]_D^{20}$ -54 (c 0.08, CHCl_3); IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx}}$: 3619, 2946, 2873, 1716, 1690, 1383, 1132, 1056 cm^{-1} ; RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3): ver Tablas 1 y 2; EMAR-ESI: m/z 489.2401 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_5\text{Cl}$, 489.2408).

Tetraacetildatucerólida B (XI): sólido blanco; p.f. 206-209 °C (AcOEt/hexano); $[\alpha]_D^{20}$ -62 (c 0.14, CHCl_3); IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx}}$: 2949, 1755, 1681, 1665, 1371, 1246, 1044 cm^{-1} ; RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3): ver Tablas 3 y 4; EMAR-ESI: m/z 807.3562 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculado para $\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{O}_{14}\text{Na}$, 807.3568).

Pentaacetildaturametelina B (XII): sólido blanco; p.f. 111-113 °C (AcOEt/hexano); $[\alpha]_D^{20} +19$ (c 0.23, CHCl₃); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 2952, 1754, 1711, 1665, 1369, 1194, 1044 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃): ver Tablas 3 y 4; EMAR-ESI: *m/z* 849.3669 [M+Na]⁺ (calculado para C₄₄H₅₈O₁₅Na, 849.3673).

5.4. *Datura discolor* Bernh.

5.4.1. Extracción del material vegetal

Las partes aéreas de las plantas (tallos, hojas y flores) se dejaron secar a la sombra, ya secas se molieron en un molino de cuchillas. El material vegetal molido (1261.0 g) se extrajo con acetona y después con metanol mediante percolación.

5.4.2. Aislamiento y purificación de los compuestos

El extracto de acetona (58.08 g) se fraccionó por medio de CC (columna A), como sistema de elución se usaron mezclas de hexano/AcOEt de polaridad creciente. El orden y la relación de disolventes en las distintas fracciones (de 500 mL) fueron las siguientes: A1-A8 (1:0), A9-A37 (19:1), A38-A43 (17:3), A44-A52 (4:1), A53-A59 (7:3), A60-A65 (3:2), A66-A79 (1:1), A80-A88 (2:3), A89 (0:1), A90 (acetona) y A91 (MeOH). Se reunieron las fracciones que mediante CCF evidenciaron tener compuestos similares. Las fracciones A18-A27 (4.64 g) se sometieron a CC (columna B). La columna se eluyó con hexano/AcOEt 95:5 (frs. B1-B8) y 92:8 (frs. B9-B16). De las fracciones B3-B8 se obtuvieron 313.8 mg de la mezcla de los compuestos II y III mediante cristalización (EtOH). Las fracciones A28-A36 se decoloraron con carbón activado y se reunieron con las fracciones A37-A43 y B17. (2.22 g) para ser sometidas a CC (columna C). La columna se eluyó con hexano/AcOEt 93:7→4:1, con lo que se obtuvieron las fracciones C1-C29. De las fracciones C18-C20 (eluidas con hexano/AcOEt 17:3) se obtuvo el compuesto V (59.0 mg) mediante cristalización (AcOEt/hexano). Las fracciones A44-A57 (5.43 g) se sometieron a CC (columna D; hexano/AcOEt 17:3→3:1) con lo que se obtuvieron las fracciones D1-D26 y D27 (eluida con AcOEt). Las fracciones D2-D9 se reunieron (2.12 g) y se sometieron a CC

(columna E) en la que los eluyentes fueron hexano/acetona 9:1 (E1-E14) y 17:3 (E15-E22). De las fracciones E6-E22 se obtuvieron 2.5 mg del compuesto **IV** mediante cristalización (hexano). Las fracciones D13-D27 (2.05 g), eluidas con hexano/AcOEt 17:3, se sometieron a CC (columna F; hexano/acetona 93:7→4:1), de la que se obtuvieron las fracciones F1-F9 (93:7), F10-F13 (9:1), F14-F22 (17:3) y F23-F28 (4:1). De las fracciones F4-F10 se obtuvieron 14.2 mg del compuesto **VI** mediante cristalización (AcOEt/hexano). De la CC (columna G; CHCl₃/AcOEt 93:7) de las fracciones F18-F28 (230.0 mg) se obtuvieron las fracciones G1-G14. De las fracciones G9-G11 se obtuvieron 9.9 mg del compuesto **XIII** mediante cristalización (AcOEt/hexano). De la CC (columna H; hexano/acetona 3:1→3:2) de las fracciones A73-A81 (2.57 g) se obtuvieron las fracciones H1-H43. De las fracciones H32-H33 (eluidas con hexano/acetona 3:2) se obtuvieron 25.0 mg del compuesto **VII** mediante cristalización (EtOH). Las fracciones A82-A89 (4.74 g) se sometieron a CC (columna I; CHCl₃/MeOH 49:1→9:1) con lo que se obtuvieron las fracciones I1-I11 (49:1), I12-I19 (24:1), I20-I25 (24:1), I26-I35 (47:3), I36- I44 (23:2) e I45-I59 (9:1). De la CC (columna J; hexano/acetona 3:1) de las fracciones I5-I12 (330.0 mg) se obtuvieron las fracciones J1-J23. Las fracciones J5-J13 (100.0 mg) se purificaron por CC (columna K). La columna se eluyó con CHCl₃/acetona 9:1 (K1-K11) y 22:3 (K12-K29). El compuesto **XIV** (15.2 mg) se obtuvo mediante cristalización (AcOEt/hexano) de las fracciones K12-K18. Las fracciones I30-I57 se decoloraron con carbón activado, se cristalizaron (EtOH) y se obtuvieron 82.0 mg del compuesto **VII**. Las fracciones I13-I29 y H3-H17 se reunieron (2.37 g) para ser purificadas por CC (columna L; hexano/acetona 3:1→3:2), con lo que se obtuvieron las fracciones L1-L47. Las fracciones L18-L22 (eluidas con hexano/acetona 13:7) contenían cristales, los cuales se lavaron con AcOEt para obtener 241.7 mg del compuesto **XV**. Se reunieron las fracciones L15-L27 (534.3 mg) y se sometieron a CC (columna M; CHCl₃/AcOEt 1:1), de la que se obtuvieron las fracciones M1-M36. Las fracciones M12-M23 contenían cristales, estos se lavaron con acetona y se obtuvieron 31.7 mg del compuesto **XV**. Las aguas madres de las fracciones M12-M23 (292.6 mg) se sometieron a CC (columna N). De la elución de la columna con benceno/isopropanol 19:1 se obtuvieron las fracciones N1-N34. Las fracciones N5-N9 (37.5 mg) se volvieron a someter a CC

(columna Ñ; hexano/isopropanol 9:1) y se obtuvieron las fracciones Ñ1-Ñ16. De las fracciones Ñ6-Ñ8 se obtuvieron 6.5 mg del compuesto **XVI** mediante cristalización (AcOEt/hexano).

La fracción A90 (12.99 g) y el extracto de MeOH (130.83 g) se reunieron y se sometieron a partición utilizando MeOH/H₂O 1:9 y CHCl₃. Se obtuvieron 30.79 g de la fracción de CHCl₃ y 108.02 g de la fracción hidroalcohólica. La fracción soluble en CHCl₃ se sometió a CC (columna O). La columna se eluyó con CHCl₃/MeOH 1:0→9:1, con lo que se obtuvieron las fracciones O1-O9 (1:0), O10-O15 (39:1), O16-O23 (19:1), O24-O33 (37:3) y O34 (9:1). El progreso de la CC se monitoreó mediante CCF y se reunieron las fracciones con composición similar. Las fracciones O10-O15 (3.22 g) se sometieron a CC (columna P; hexano/AcOEt 1:1→0:1), con lo que se obtuvieron las fracciones P1-P28. De las fracciones P24-P26 (eluidas con hexano/AcOEt 1:4) se obtuvieron 14.3 mg del compuesto **XV** mediante cristalización (acetona y gotas de MeOH). Las fracciones P11-P17 (586.6 mg), (eluidas con hexano/AcOEt 7:13) se sometieron a CC (columna Q; CHCl₃/acetona 9:1→17:3) de la que se obtuvieron las fracciones Q1-Q24. Las fracciones Q11-Q22 (586.6 mg), (eluidas con CHCl₃/acetona 17:3) se sometieron a CC (columna R; hexano/isopropanol 37:3→9:1), con lo que se obtuvieron las fracciones R1-R25. De las fracciones R7-R14 (eluidas con hexano/isopropanol 9:1) se obtuvieron 31.6 mg del compuesto **XIV** mediante cristalización (AcOEt). Las fracciones P18-P22 (210.0 mg), eluidas con hexano/AcOEt 1:4, se sometieron a CC (columna S). La columna se eluyó con CHCl₃/acetona 17:3→4:1, con lo que se obtuvieron las fracciones S1-S24. De las fracciones S17-S19 (eluidas con CHCl₃/acetona 4:1) se obtuvieron 12.6 mg del compuesto **XVI** mediante cristalización (AcOEt). De la CC (columna T; hexano/AcOEt 3:2→1:4) de las fracciones O16-O23 (4.15 g) se obtuvieron las fracciones T1-T8 (3:2), T9-T13 (1:1), T14-T26 (3:7) y T27-T36 (1:4). Las fracciones T5-T11 (173.5 mg) se purificaron mediante CC (columna U; hexano/acetona 7:1) de la que se obtuvieron las fracciones U1-U20. De las fracciones U2-U4 y T2-T4 se obtuvieron 42.5 mg del compuesto **V** mediante cristalización (AcOEt/hexano). Las fracciones T16-T17 contenían cristales, los cuales se lavaron con MeOH para obtener 8.0 mg del compuesto **XVII**. Las fracciones T20-T25 (606.4 mg) se sometieron a CC (columna V; hexano/isopropanol 7:1) de la que

resultaron las fracciones V1-V28. Las fracciones V15-V17 contenían cristales, los cuales se lavaron con MeOH y se obtuvieron 40.1 mg del compuesto **XV**. Las fracciones O24-O33 (5.65 g) se sometieron a CC (columna W). La columna se eluyó con benceno/MeOH 93:7, con lo que se obtuvieron las fracciones W1-W22. Las fracciones W2-W22 (3.65 g) se decoloraron con carbón activado y se volvieron a someter a CC (columna X). La columna se eluyó con CHCl₃/MeOH 19:1 (X1-X15) y 9:1 (X16-X29). Los compuestos mayoritarios contenidos en las fracciones X16-X29 no se lograron purificar, por lo que 745.3 mg de estas fracciones se trataron con 1.0 mL de piridina y 1.0 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó 6 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando hielo. La fase acuosa se extrajo tres veces con 5.0 mL de AcOEt. La fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl (5%), agua, solución saturada de NaHCO₃ y agua. Se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró. Se obtuvieron 761.8 mg de crudo que se sometió a CC (columna Y; hexano/AcOEt 4:1→11:9) de la cual se obtuvieron las fracciones Y1-Y39. De las fracciones Y21-Y23 (eluidas con hexano/AcOEt 13:7) se obtuvieron 6.5 mg del compuesto **XI** mediante cristalización (AcOEt/hexano) y de las fracciones Y24-Y28 (eluidas con hexano/AcOEt 3:2) se obtuvieron 72.6 mg del compuesto **XII** mediante cristalización (AcOEt/hexano).

Datudisólida A (XIII): cristales blancos; p.f. 223-225 °C (AcOEt/hexano); $[\alpha]_D^{20}$ -67 (*c* 0.17, CHCl₃); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3527, 2980, 2946, 1705, 1682, 1666, 1384, 1235, 1037 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃): ver Tablas 1 y 2; EMAR-ESI: *m/z* 455.2787 [M+H]⁺ (calculado para C₂₈H₃₉O₅, 455.2797).

Datudisólida B (XIV): cristales blancos; p.f. 209-211 °C (AcOEt); $[\alpha]_D^{20}$ +68 (*c* 0.20, CHCl₃); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3578, 2948, 2917, 2878, 1688, 1397, 1222, 1207, 1006 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C (CDCl₃): ver Tablas 5 y 6; EMAR-ESI: *m/z* 455.2800 [M+H]⁺ (calculado para C₂₈H₃₉O₅, 455.2797).

Datudisólida C (XV): cristales blancos; p.f. 234-236 °C (acetona-MeOH); $[\alpha]_D^{20}$ +50 (*c* 0.10, MeOH); IR (nujol) $\nu_{\text{máx}}$: 3327, 2924, 2856, 1691, 1665, 1460, 1397, 1378, 1146,

1027 cm^{-1} ; RMN ^1H y ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): ver Tablas 5 y 6; EMAR-ESI: m/z 471.2750 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_6$, 471.2747).

Daturamalakina B (XVI): cristales blancos; p.f. 239-241 °C (AcOEt); $[\alpha]_D^{20}$ +89 (c 0.10, CHCl_3); IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx}}$: 3433, 3009, 2948, 1691, 1398, 1241, 1079, 1029, 1009 cm^{-1} ; RMN ^1H y ^{13}C (CDCl_3): ver Tablas 5 y 6; EMAR-ESI: m/z 471.2759 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_6$, 471.2747).

Datudisólida D (XVII): cristales blancos; p.f. 246-248 °C (MeOH); $[\alpha]_D^{20}$ +57 (c 0.15, MeOH); IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx}}$: 3619, 2928, 2856, 1692, 1463, 1384, 1234 cm^{-1} ; RMN ^1H y ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): ver Tablas 5 y 6; EMAR-ESI: m/z 507.2514 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{Cl}$, 507.2513).

5.5. Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa (AChE)

La inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa se evaluó utilizando el método de Ellman¹⁰⁴ con ligeras modificaciones.

Los reactivos utilizados en el ensayo fueron: buffer salino de fosfatos (PBS, 0.1 M, pH 8.0), acetonitrilo (MeCN) 2 % v/v en PBS, ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico), DTNB; yoduro de acetiltiocolina (YATC) y acetilcolinesterasa (AChE) de anguila eléctrica (*Electrophorus electricus*).

La determinación se llevó a cabo en placas de 96 pozos. Se agregaron 50 μL de una solución del compuesto a evaluar (1, 10 y 100 μM /pozo) en MeCN 2% en PBS y 50 μL de AChE (0.195 U/mL) en PBS. La placa se incubó por 30 min a T. A. (24-26 °C). La reacción se inició al agregar 100 μL de la mezcla YATC (68 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y DTNB (792.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en PBS. Después de incubar la placa con agitación y protegida de la luz durante 5 min a T. A., se determinó la absorbancia a $\lambda = 412$ nm, en un lector de placas (BioTek Synergy HT). El porcentaje de inhibición fue calculado como:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{E-S}{E} \times 100$$

Donde E, es la absorbancia del medio de reacción en ausencia del compuesto a evaluar y S la de la mezcla de reacción en presencia del compuesto a evaluar.

Se determinó la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de los compuestos que mostraron mayor actividad; ésta se define como la concentración de un compuesto necesaria para inhibir en un 50% la hidrólisis enzimática de la acetiltiocolina. Este valor se determinó mediante el efecto del aumento de la concentración del compuesto sobre el porcentaje de inhibición. Se utilizó eserina como control positivo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio químico de una población de *Datura ceratocaula* dio como resultado el aislamiento de los carotenos **I** y **IV**, una mezcla de los fitoesteros **II** y **III**, un glucósido de fitoesterol (**VII**) y las withanólidas **V**, **VI** y **VIII-X**; una de ellas es un nuevo producto natural (**X**). Además, después de acetilar una mezcla compleja, se aisló la nueva withanólida, datucerólida B, como el derivado **XI** y daturametelina B como el derivado **XII** (Figura 16). El estudio químico de la población de *Datura discolor* mostró que su composición es similar a la de *D. ceratocaula*, ya que comparten los compuestos **II-IX** y de ella también se obtuvieron los derivados **XI** y **XII**, así como las nuevas withanólidas **XIII-XVII** (Figura 16). La elucidación estructural de estos compuestos se discute en esta sección.

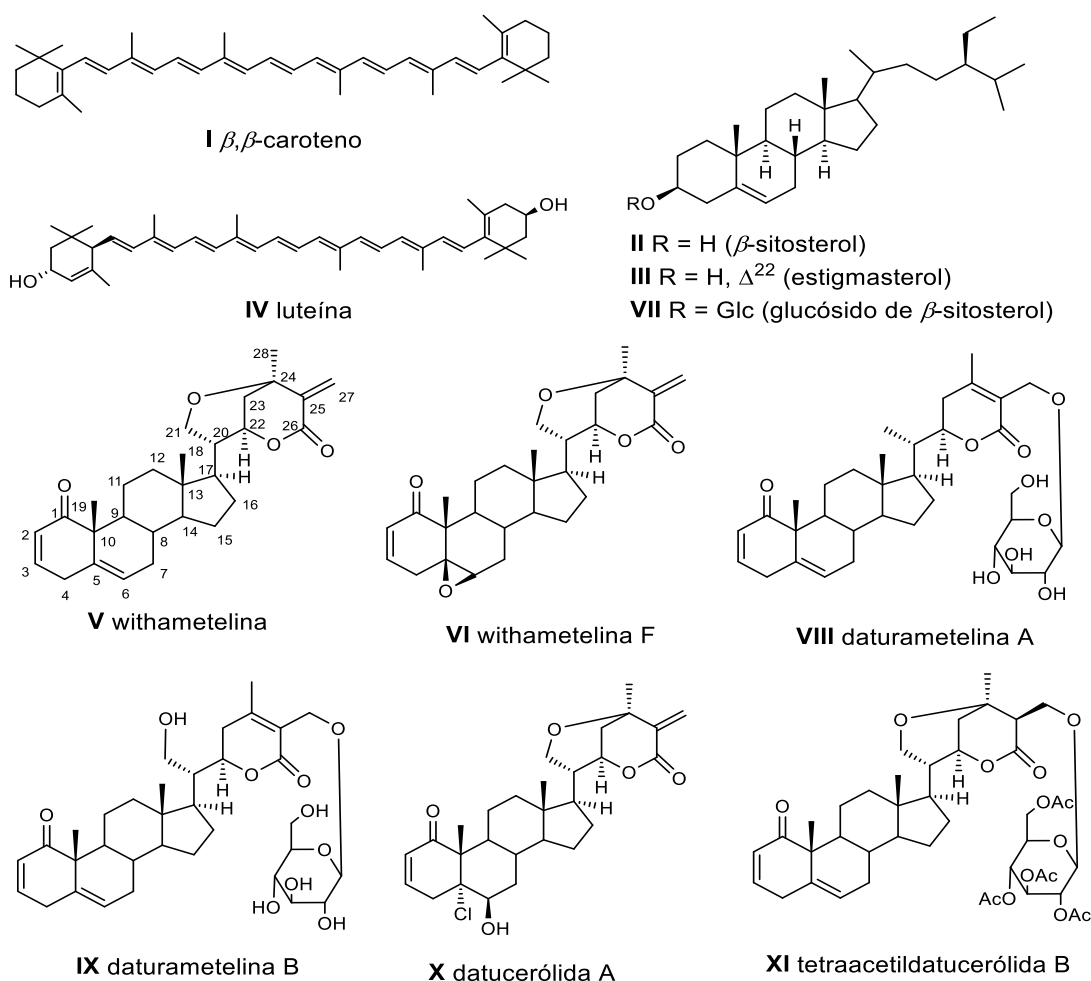


Figura 16. Estructuras de los compuestos aislados de *D. ceratocaula* y *D. discolor*.

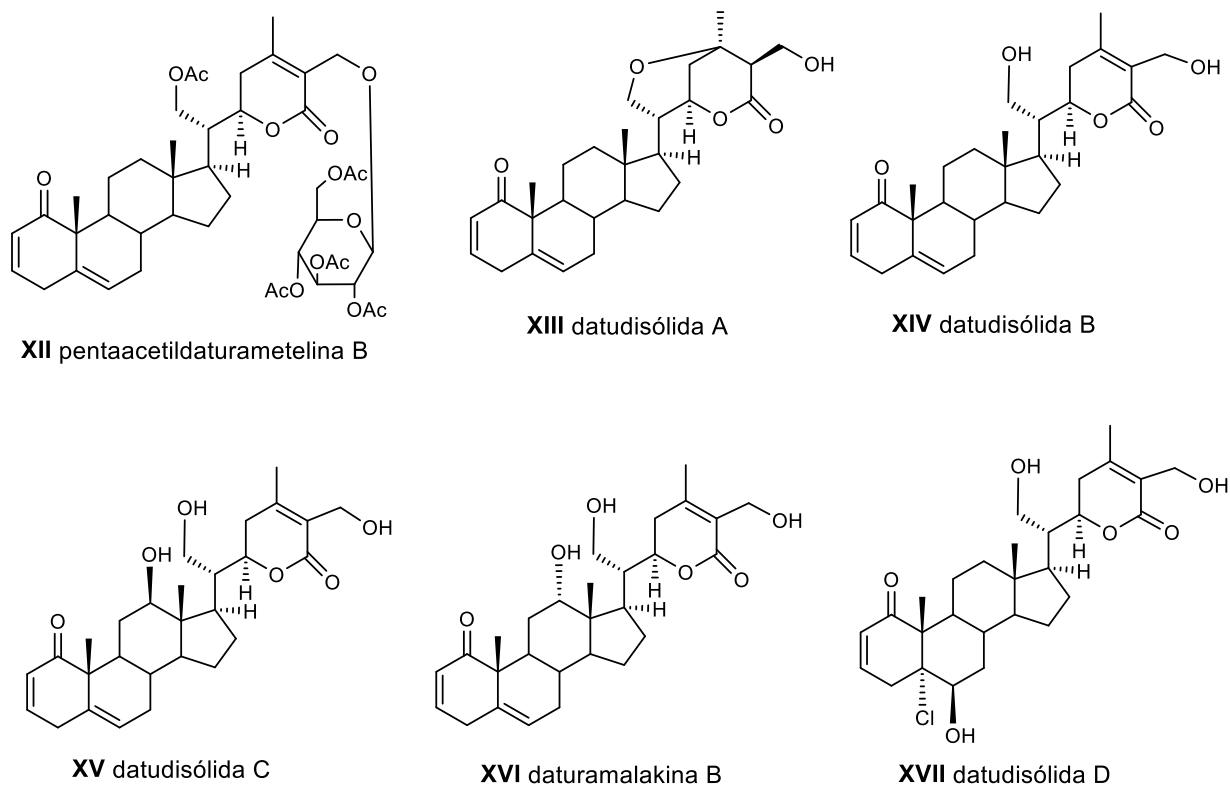


Figura 16. Estructuras de los compuestos aislados de *D. ceratocaula* y *D. discolor* (continuación).

6.1. Elucidación estructural de los compuestos aislados

6.1.1. Carotenos

Los compuestos **I** y **IV** se identificaron como β,β -caroteno y luteína, respectivamente. Sus estructuras se determinaron por comparación de sus datos de RMN ^1H y ^{13}C con los descritos en la literatura.^{105,106} Este es el primer reporte del aislamiento de carotenos en el género *Datura*.

6.1.2. Fitoesteroles

Los compuestos **II** y **III** se aislaron como una mezcla cristalina cuyos espectros de RMN (^1H y ^{13}C) y punto de fusión (135-136 °C) permitieron identificarlos como β -

sitosterol y estigmasterol por comparación con datos de la literatura.¹⁰⁷ En apoyo de lo anterior, la CCF comparativa con una muestra de la mezcla obtenida previamente en el laboratorio mostró los mismos factores de retención.

El compuesto **VII** se identificó como glucósido de β -sitosterol por medio de CCF comparativa con una muestra autenticada anteriormente. Ambos compuestos presentaron el mismo factor de retención y puntos de fusión semejantes.

6.1.3. Withanólidas

▪ Determinación estructural del compuesto V

El espectro en el IR del compuesto **V** muestra bandas de absorción en 1715 y 1681 cm^{-1} . La primera corresponde a una δ -lactona α,β -insaturada, mientras que la segunda corresponde a una cetona α,β -insaturada.

El espectro de RMN ^{13}C (Tabla 1, espectro 8) muestra veintisiete señales, pero el experimento HSQC mostró que una de ellas está traslapada, por lo que el compuesto tiene veintiocho carbonos, número que es congruente con el esqueleto de una withanólida. Los experimentos DEPT permitieron determinar que estas señales corresponden a los carbonos de 3 metilos, 9 metilenos, 9 metinos y 7 carbonos no protonados. De acuerdo con las absorciones en el IR, se puede decir que la señal en δ_{C} 204.3 corresponde al carbonilo de la cetona α,β -insaturada y la de δ_{C} 165.3 al carbonilo de la δ -lactona α,β -insaturada. Las señales en δ_{C} 145.1, 139.0, 136.0, 129.9, 127.9, y 124.6 corresponden a carbonos vinílicos. El experimento DEPT-135 permite distinguir que la señal en δ_{C} 129.9 pertenece a un metileno terminal, las señales en δ_{C} 145.1, 127.9 y 124.6 a metinos vinílicos y las señales en δ_{C} 139.0 y 136.0 a carbonos vinílicos no protonados.

En el espectro de RMN ^1H (Tabla 2, espectro 7) se observan cinco señales de protones vinílicos. Las señales en δ_{H} 6.77 (*ddd*, $J = 10.0, 5.0, 2.5$ Hz) y 5.87 (*ddd*, $J = 10.0, 3.0, 1.0$ Hz) corresponden a los protones del doble enlace conjugado con la cetona, H-3 y

H-2, respectivamente (experimento HSQC). El experimento HMBC muestra las correlaciones del protón de un metileno en $\delta_{\text{H}} 2.83$ (*dd*, $J = 21.0, 5.0$ Hz) con C-2 y C-3, por lo que se asignó a CH₂-4 ($\delta_{\text{C}} 33.5$; $\delta_{\text{H}} 3.29$ y 2.83), también se observa la correlación HMBC del protón de un metino ($\delta_{\text{H}} 5.57$ *d a*, $J = 6.0$ Hz) con C-4, por lo que se asignó a CH-6 ($\delta_{\text{C}} 124.6$, C-6). Los protones H-3 y H-4b correlacionan con la señal de un carbono vinílico no protonado en $\delta_{\text{C}} 136.0$ que se asignó a C-5, lo que indica un doble enlace entre C-5 y C-6. Además, la señal en $\delta_{\text{H}} 1.23$ (*s*, 3H) correlaciona con C-5, por lo que se asignó a H₃-19, que a su vez correlaciona con C-1, con un carbono no protonado ($\delta_{\text{C}} 50.5$, C-10) y con un carbono de metino ($\delta_{\text{C}} 42.8$, C-9). Los datos anteriores sugieren que se trata de una withanólida que tiene los grupos 2,5-dien-1-ona, presentes frecuentemente en este tipo de productos naturales. La señal en $\delta_{\text{H}} 4.66$ (*s a*, H-22) es característica de withanólidas con un anillo de tetrahidropirano en la cadena lateral,⁷⁰ por lo que es muy probable que el compuesto **V**, contenga esta funcionalidad.

El experimento HMBC confirmó lo anterior, ya que muestra las correlaciones de las señales de los protones vinílicos de un metileno terminal en $\delta_{\text{H}} 6.75$ (*s*) y 6.02 (*d*, $J = 0.5$ Hz) con la señal del carbonilo de la lactona en $\delta_{\text{C}} 165.3$ (C-26), por lo que se asignaron a los protones H-27a y H-27b, respectivamente. También se observan las correlaciones de las señales del protón del metino base de oxígeno de la lactona (H-22), con el carbonilo C-26 y con el carbono de un metileno base de oxígeno en $\delta_{\text{C}} 60.5$ (CH₂-21), cuyos protones, lo mismo que los de un metilo en $\delta_{\text{C}} 1.44$ (*s*, 3H, C-28), H-23a, H-27a y H-27b correlacionan con la señal del carbono no protonado en $\delta_{\text{C}} 69.3$ (C-24), (Figura 17). Lo anterior establece que la cadena lateral de la withanólida **V**, está conformada por una δ -lactona α,β -insaturada, un anillo de tetrahidropirano formado entre C-21 y C-24, un metilo unido a C-24 y un metileno terminal (CH₂-27).

En el espectro de masas (EM-DART) se observa el ion de $m/z 437$ [M+H]⁺, consistente con la fórmula molecular C₂₈H₃₇O₄.

Los datos obtenidos permiten proponer la estructura **V** para el compuesto aislado (Figura 17) e identificarlo como la withametelina, una withanólida aislada anteriormente

de *D. metel*,⁷² *D. innoxia*⁹⁵ y *D. wrightii*.¹⁸ La comparación de los datos de RMN ¹H y ¹³C de la withamelina y del compuesto **V** confirmó que se trata del mismo compuesto.

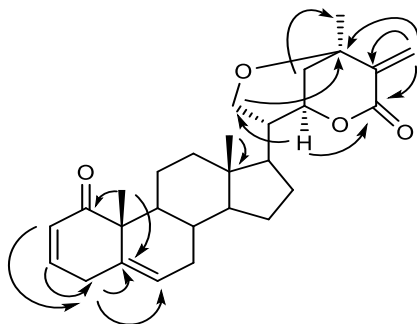


Figura 17. Estructura de la withamelina (**V**) y algunas de sus correlaciones en el espectro HMBC.

▪ **Determinación estructural del compuesto VI**

Los espectros de IR, RMN ¹H y ¹³C del compuesto **VI** son similares a los de la withamelina (**V**), con la diferencia de que en el compuesto **VI**, las señales de C-5 (δ_c 62.1) y CH-6 (δ_c 63.3; δ_H 3.13 d, $J = 2.5$ Hz) en los espectros de RMN (Tablas 1 y 2; espectros 9 y 10) muestran desplazamientos que indican la presencia de un grupo 5 β ,6 β -epoxi, en lugar del doble enlace de la withamelina (**V**). Los datos mencionados, permitieron proponer la estructura que se muestra en la Figura 18. Al revisar la literatura se encontró que este compuesto fue descrito como constituyente de *D. metel*⁷⁵ y *D. wrightii*¹⁸ y recibe el nombre de withamelina F.

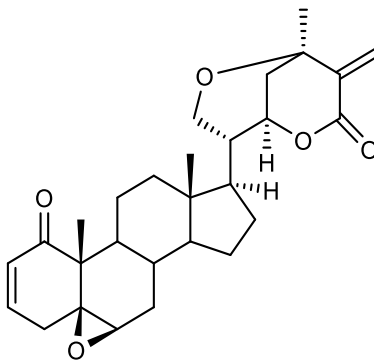


Figura 18. Estructura de la withamelina F (**VI**).

▪ Determinación estructural del compuesto X

En el espectro IR del compuesto **X** se observa una banda de absorción en 3619 cm^{-1} que indica la presencia de grupos hidroxilo en la molécula. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (espectros 13 y 14) también son similares a los de la withametelina (**V**). En el espectro de RMN ^{13}C del compuesto **X** se observan diferencias en los desplazamientos químicos de C-4, C-5, C-6 y C-19 respecto a los de **V**. Los experimentos HSQC y HMBC del compuesto **X** (espectros 15 y 16) permitieron asignar las señales en $\delta_{\text{C}} 80.0$ y 74.6 a los carbonos C-5 y C-6, respectivamente; y las señales en $\delta_{\text{H}} 4.05$ (s a) y 3.53 (dt, $J = 20.1, 2.7$ Hz) en el espectro de RMN ^1H de **X**, a los protones H-6 y H-4a, respectivamente. Los desplazamientos de estos protones, así como los de C-5 y C-6, son característicos de 5α -cloro- 6β -hidroxiwithanólidas.³⁹ El espectro de masas (DART) confirmó lo anterior al presentar los iones de m/z 489 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 491 $[\text{M}+2+\text{H}]^+$ con intensidades relativas 3:1, correspondientes a la contribución isotópica de cloro y que concuerdan con una fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{ClO}_5$.

El análisis de los datos mencionados condujo a determinar la estructura del compuesto **X** como se muestra en la Figura 19. La configuración mostrada se dedujo de la comparación de sus datos de RMN ^1H y ^{13}C , que para la cadena lateral y los anillos C y D, son prácticamente iguales a los de los compuestos **V** y **VI**. De la misma manera, la comparación de los datos de RMN de **X** con los de las 5α -Cl, 6β -OH-withanólidas de *Jaborosa bergii*,³⁹ indican la misma configuración de C-5 y C-6. El compuesto **X** es una nueva withanólida a la que se le dio el nombre de datucerólida A. Cabe mencionar, que es la primera withanólida aislada del género *Datura* que posee un átomo de cloro en su estructura.

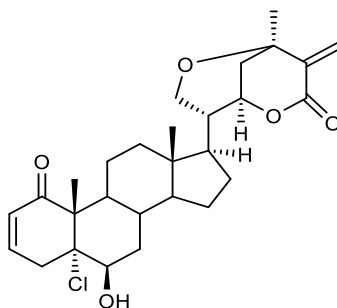


Figura 19. Estructura de la datucerólida A (**X**).

▪ Determinación estructural del compuesto XIII

El análisis y la comparación de los espectros de IR, RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **XIII** con los de la withametelina (**V**) sugieren que las funcionalidades de los anillos A, B, C y D de ambos compuestos son idénticas y que la diferencia radica en la cadena lateral, según se deduce a continuación.

En el espectro IR del compuesto **XIII** se observa una banda de absorción para grupos hidroxilo en 3527 cm^{-1} . En su espectro de RMN ^{13}C (espectro 27) la señal del carbonilo de la lactona se observa en $\delta_{\text{C}} 174.8$, lo que indica que no está conjugada. Esto se confirma por el desplazamiento de las señales de C-24 ($\delta_{\text{C}} 70.7$), C-25 ($\delta_{\text{C}} 51.7$) y C-27 ($\delta_{\text{C}} 59.4$). Los datos del espectro IR y el desplazamiento de las señales del metileno CH_2 -27 ($\delta_{\text{H}} 4.01$ H-27a, 3.93 H-27b) en su espectro de RMN ^1H (espectro 26) permiten proponer que existe un grupo hidroxilo en C-27. También se observa una señal en $\delta_{\text{H}} 2.47$ (*dd*, $J = 8.0, 3.5$ Hz), que en el experimento COSY (espectro 30) correlaciona con los protones de C-27 y en el espectro HMBC (espectro 29) correlaciona con C-24, C-26 y C-27, por lo que se asignó a H-25. La orientación de H-25 se determinó como alfa, debido a que en el espectro NOESY (espectro 31) se observó la interacción de H-21b con H-27a, lo que indica que CH_2 -27 es beta. En el espectro de masas de alta resolución se observa el catión de $m/z 455.2787$, correspondiente a la molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ y consistente con la fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_5$. Con base en lo anterior, se propone la estructura del compuesto **XIII** como se muestra en la Figura 20.

En la literatura se encuentra descrito el compuesto daturilinol con la estructura que se muestra en la Figura 20.⁸⁹ Este compuesto difiere de **XIII** en las señales de los protones de C-27, punto de fusión y rotación específica, por lo que se trata de compuestos diferentes, probablemente epímeros en C-25. Así, el compuesto **XIII** es un nuevo producto natural que se denominó datudisólida A, y es el desmetilderivado de la daturametelina D, cuya configuración se determinó por difracción de rayos X.¹⁰⁸

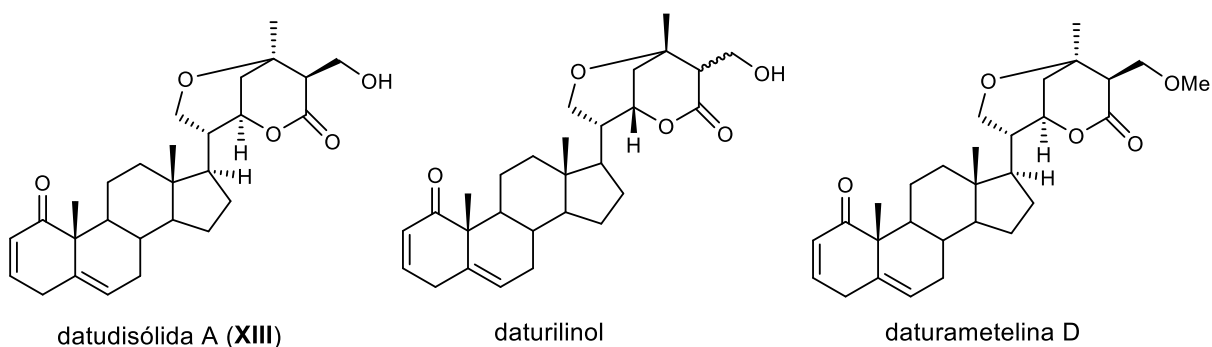


Figura 20. Estructuras de datudisólida A (XIII), daturilinol⁸⁹ y daturametelina D¹⁰⁸

Tabla 1. Datos de RMN ¹³C de las withanólidas V, VI, X y XIII (125 MHz, CDCl₃).

C	δ_c (ppm)			
	V	VI	X ^a	XIII
1 C	204.3	203.4	201.1	204.1
2 CH	127.9	129.4	128.6	128.0
3 CH	145.1	144.2	141.1	145.0
4 CH ₂	33.5	33.0	37.2	33.5
5 C	136.0	62.1	80.0	136.1
6 CH	124.6	63.3	74.6	124.5
7 CH ₂	30.7	31.2	33.6	30.5
8 CH	33.2	29.9	30.2	33.2
9 CH	42.8	44.6	42.0	42.9
10 C	50.5	48.5	52.5	50.5
11 CH ₂	23.6	23.6	23.1	23.6
12 CH ₂	39.7	39.6	39.8	39.7
13 C	42.6	42.6	43.0	42.6
14 CH	56.0	55.7	55.2	56.0
15 CH ₂	24.1	23.9	23.9	24.1
16 CH ₂	26.5	26.5	26.4	26.3
17 CH	47.6	47.6	47.6	47.9
18 CH ₃	12.7	12.6	13.1	12.7
19 CH ₃	19.0	15.0	16.3	18.9
20 CH	39.8	39.7	39.9	40.0
21 CH ₂	60.5	60.5	60.4	60.5
22 CH	75.6	75.5	75.5	76.6
23 CH ₂	33.2	33.3	33.2	33.0
24 C	69.3	69.3	69.3	70.7
25 C	139.0	138.9	139.0	51.7 ^b
26 C	165.3	165.3	165.3	174.8
27 CH ₂	129.9	130.0	129.9	59.4
28 CH ₃	25.6	25.6	25.6	26.1

^aDeterminado a 75 MHz. ^bCH.

Tabla 2. Datos de RMN ¹H de las withanólidas **V**, **VI**, **X** y **XIII** (500 MHz, CDCl₃, *J* en Hz).

H	δ_H (ppm)			
	V	VI	X ^a	XIII
2	5.87 <i>ddd</i> (10.0, 3.0, 1.0)	6.02 <i>dd</i> (10.0, 2.5)	5.93 <i>dd</i> (10.2, 2.7)	5.87 <i>ddd</i> (10.0, 3.5, 1.5)
3	6.77 <i>ddd</i> (10.0, 5.0, 2.5)	6.84 <i>ddd</i> (10.0, 6.0, 2.5)	6.66 <i>ddd</i> (10.2, 5.1, 2.1)	6.77 <i>ddd</i> (10.0, 5.0, 2.5)
4a	3.29 <i>da</i> (21.0)	2.98 <i>dt</i> (19.0, 2.5)	3.53 <i>dt</i> (20.1, 2.7)	3.28 <i>da</i> (21.0)
4b	2.83 <i>dd</i> (21.0, 5.0)	1.90 <i>m</i>	2.51 <i>dd</i> (20.1, 5.1)	2.83 <i>dd</i> (21.0, 5.0)
6	5.57 <i>da</i> (6.0)	3.13 <i>d</i> (2.5)	4.05 <i>sa</i>	5.56 <i>da</i> (6.0)
7a	1.98 <i>da</i> (17.5)	2.05 <i>m</i>	2.03 <i>m</i>	1.98 <i>m</i>
7b	1.57 <i>m</i>	1.29 <i>dd</i> (13.5, 2.5)	1.92 <i>m</i>	1.58 <i>m</i>
8	1.43 <i>m</i>	1.55 <i>m</i>	1.76 <i>m</i>	1.44 <i>m</i>
9	1.68 <i>m</i>	1.16 <i>m</i>	1.95 <i>m</i>	1.69 <i>m</i>
11a	2.24 <i>ddd</i> (13.5, 7.0, 3.5)	2.07 <i>m</i>	2.39 <i>ddd</i> (13.2, 6.9, 3.0)	2.24 <i>ddd</i> (12.5, 6.5, 4.0)
11b	1.49 <i>m</i>	1.45 <i>m</i>	No obs.	1.52 <i>m</i>
12a	1.94 <i>m</i>	1.86 <i>m</i>	1.88 <i>m</i>	1.90 <i>m</i>
12b	1.55 <i>m</i>	1.39 <i>m</i>	1.57 <i>m</i>	1.52 <i>m</i>
14	1.17 <i>m</i>	1.05 <i>ddd</i> (12.5, 11.0, 7.5)	1.38 <i>m</i>	1.21 <i>m</i>
15a	1.68 <i>m</i>	1.66 <i>m</i>	1.70 <i>m</i>	1.71 <i>m</i>
15b	1.20 <i>m</i>	1.18 <i>m</i>	1.16 <i>m</i>	1.19 <i>m</i>
16a	1.76 <i>m</i>	1.72 <i>m</i>	1.73 <i>m</i>	1.74 <i>m</i>
16b	1.38 <i>m</i>	1.39 <i>m</i>	1.38 <i>m</i>	1.38 <i>m</i>
17	1.79 <i>m</i>	1.73 <i>m</i>	1.80 <i>m</i>	1.69 <i>m</i>
18	0.71 <i>s</i>	0.68 <i>s</i>	0.73 <i>s</i>	0.70 <i>s</i>
19	1.23 <i>s</i>	1.25 <i>s</i>	1.38 <i>s</i>	1.23 <i>s</i>
20	1.63 <i>m</i>	1.88 <i>m</i>	1.85 <i>m</i>	1.88 <i>m</i>
21a	3.93 <i>d</i> (13.5)	3.88 <i>d</i> (13.5)	3.92 <i>da</i> (13.2)	3.92 <i>d</i> (13.5)
21b	3.73 <i>dd</i> (13.5, 3.5)	3.72 <i>dd</i> (13.5, 3.5)	3.73 <i>dd</i> (13.2, 2.7)	3.65 <i>dd</i> (13.5, 4.0)
22	4.66 <i>sa</i>	4.63 <i>sa</i>	4.66 <i>sa</i>	4.69 <i>sa</i>
23a	2.04 <i>dd</i> (14.0, 1.5)	2.00 <i>dd</i> (14.0, 2.5)	2.01 <i>m</i>	1.99 <i>dd</i> (14.0, 1.5)
23b	1.90 <i>dd</i> (14.0, 3.5)	1.88 <i>m</i>	1.88 <i>m</i>	1.86 <i>dd</i> (14.0, 4.5)
25	-	-	-	2.47 <i>dd</i> (8.0, 3.5)
27a	6.75 <i>s</i>	6.75 <i>s</i>	6.76 <i>s</i>	4.01 <i>dd</i> (12.0, 8.0)
27b	6.02 <i>d</i> (0.5)	6.01 <i>d</i> (0.5)	6.02 <i>s</i>	3.93*
28	1.44 <i>s</i>	1.43 <i>s</i>	1.45 <i>s</i>	1.33 <i>s</i>

^aDeterminado a 300 MHz. *Señal traslapada.

▪ Determinación estructural del compuesto VIII

El espectro en el IR del compuesto **VIII** muestra bandas de absorción en 3344, 1682 y 1665 cm^{-1} , que corresponden grupos hidroxilo, δ -lactona α,β -insaturada y cetona α,β -insaturada, respectivamente. El espectro de RMN ^{13}C (espectro 12) presenta treinta y cuatro señales (una traslapada con la señal del disolvente). Los experimentos DEPT permitieron determinar que las señales en el espectro de RMN ^{13}C corresponden a 4 metilos, 9 metilenos, 14 metinos y 7 carbonos no protonados. Las señales en el espectro de RMN ^{13}C en δ_{C} 204.3, 128.3 y 146.3 corresponden a los carbonos C-1, C-2 y C-3 de la cetona α,β -insaturada y las de δ_{C} 157.3, 124.2 y 166.4, a C-24, C25 y C-26 de la δ -lactona α,β -insaturada. Las señales en δ_{C} 136.8 (C-5) y 125.2 (C-6), junto con la señal en δ_{H} 5.51 (*d a*, $J = 6.0$ Hz) en el espectro de RMN ^1H (espectro 11), indican un doble enlace entre C-5 y C-6. Lo anterior y las correlaciones observadas en el espectro HMBC (Figura 21) indican que la withanólida **VIII**, presenta los mismos grupos funcionales que los compuestos **V** y **XIII** en los anillos A-D, por lo que las diferencias deben estar en la cadena lateral.

Se encuentra documentado que la señal de H-22 es un singulete ancho cuando existe un anillo de tetrahidropirano en la withanólida (compuestos **V**, **VI**, **X** y **XIII**) y se observa como un doble de triples cuando no existe este anillo,⁷⁰ como es el caso del compuesto **VIII**, en el que H-22 se observa como una señal doble de triples en δ_{H} 4.36 ($J = 13.2$, 3.6 Hz). La señal en δ_{H} 2.13 (*s*, 3H) se asignó al metilo vinílico CH₃-28, debido a que en el experimento HMBC correlaciona con la señal en δ_{C} 157.3 asignada al carbono cuaternario C-24. La señal doble en δ_{H} 0.98 ($J = 6.4$ Hz) se asignó a CH₃-21, debido a sus correlaciones HMBC con las señales en δ_{C} 78.6 (C-22), 52.5 (C-17) y 39.5 (C-20). El par de señales de un sistema AB en δ_{H} 5.09 (*d*, $J = 11.2$ Hz) y 4.87 (*d*, $J = 11.2$ Hz) corresponden a los protones del metileno CH₂-27, cuyos desplazamientos químicos indican que está unido a una función oxigenada; ésta se identificó como un β -glucopiranosilo, debido a las señales en δ_{C} 105.4, 75.7, 79.0, 72.1, 79.1, y 63.2, asignadas a los carbonos C1' a C-6', respectivamente. Las correlaciones de las señales de los protones H-27a y H-27b con las del carbono anomérico C-1', observadas en el experimento HMBC, confirmaron lo anterior. De esta manera se

determinó que la estructura del compuesto **VIII** corresponde a la ilustrada en la Figura 21. La revisión de la literatura mostró que este glucósido ha sido aislado de *D. metel* y recibe el nombre de daturametelina A.⁶⁹

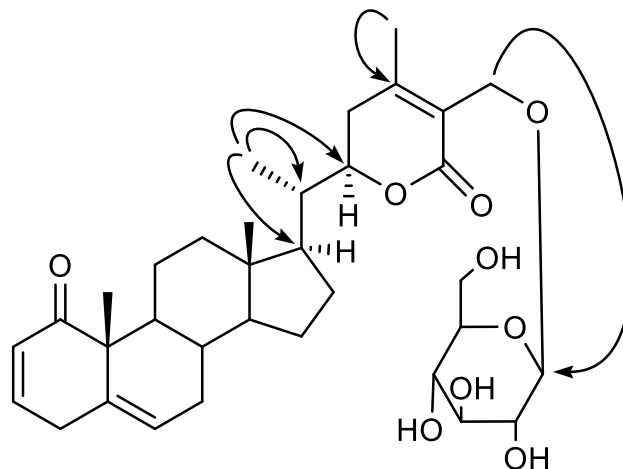


Figura 21. Estructura de la daturametelina A (**VIII**) y algunas de sus correlaciones en el espectro HMBC.

▪ **Determinación estructural de los compuestos IX y XII**

El compuesto **IX** presentó una mancha homogénea en CCF; sin embargo, sus espectros de RMN ¹H y ¹³C revelaron que no se encontraba puro. Lo anterior se atribuye a la inestabilidad del compuesto, ya que durante el proceso de purificación se observó en CCF la formación de productos de descomposición, uno de estos productos se identificó como la withametelina (**V**). En el espectro de masas de alta resolución del compuesto **IX** se observa el aducto de sodio [M+Na]⁺ de *m/z* 639.3134 congruente con la fórmula molecular C₃₄H₄₈O₁₀Na. Lo anterior y la obtención del pentaacetato **XII**, que se obtuvo después de acetilar una mezcla que contenía daturametelina B (**IX**), son congruentes con la estructura propuesta en la Figura 22. Este compuesto se conoce como daturametelina B y ha sido aislado de *D. metel*.⁶⁹

En cuanto a la elucidación estructural del derivado **XII**, en su espectro de RMN ¹³C (espectro 25) se observan cinco señales (una de ellas está traslapada), que son asignables a los carbonilos de los acetatos; cuatro de ellas se deben a los acetilos de

la glucosa y la restante al *O*-acetilo en CH₂-21 (δ_C 61.6; δ_H 4.36 *dd*, $J = 12.4, 2.0$ Hz, H-21a; δ_H 4.19, H-21b). El espectro de masas de alta resolución presentó un ion de m/z 849.3669 [M+Na]⁺ que corresponde a la fórmula molecular C₄₄H₅₈O₁₅Na y confirma la estructura propuesta que se muestra en la Figura 22. Este derivado ha sido obtenido de la daturametelina B y sus datos de RMN ¹H^{69,70} coinciden con los descritos en la Tabla 3 para el compuesto **XII**.

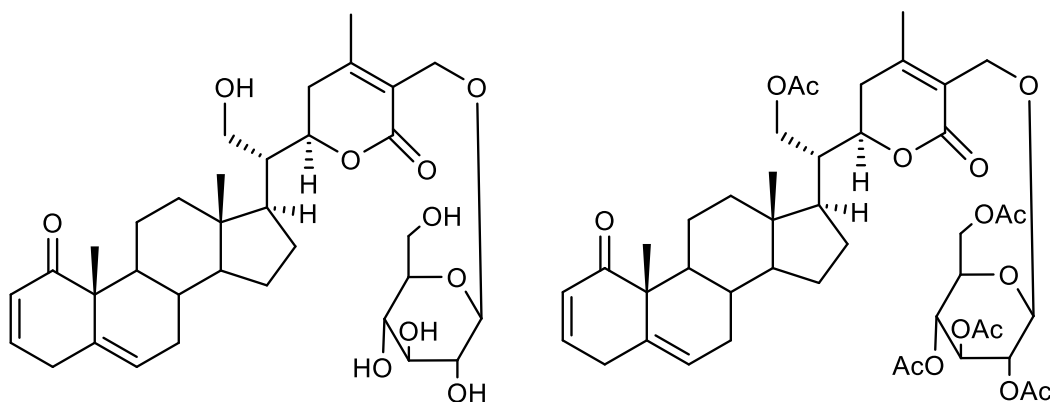
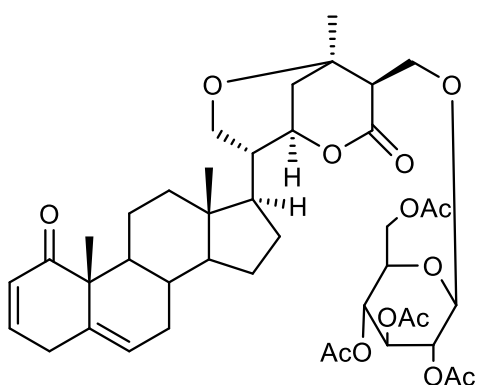


Figura 22. Estructura de la daturametelina B (**IX**) y de su derivado acetilado (**XII**).

▪ **Determinación estructural del compuesto XI**

El compuesto **XI** también se obtuvo después de acetilar una mezcla compleja, sus espectros de RMN ¹H y ¹³C (espectros 18 y 19) muestran la existencia de un tetra-*O*-acetil- β -glucopiranosilo unido a C-27 [CH₃CO (δ_C 8 señales, δ_H 4 señales; Tablas 3 y 4); CH-1' (δ_C 100.7/ δ_H 4.63 *d*, $J = 8.0$ Hz); CH-2' (δ_C 71.2/ δ_H 5.00 *dd*, $J = 9.6, 8.0$ Hz); CH-3' (δ_C 72.8/ δ_H 5.22 *t*, $J = 9.6$ Hz); CH-4' (δ_C 68.5/ δ_H 5.09 *t*, $J = 9.6$ Hz); CH-5' (δ_C 71.8/ δ_H 3.72 *ddd*, $J = 9.6, 4.8, 2.4$ Hz); CH₂-6' (δ_C 61.9/ δ_H 4.29 *dd*, $J = 12.4, 4.8$ Hz, H-6a'/ δ_H 4.14 *dd*, $J = 12.4, 2.4$ Hz, H-6b')]. Los desplazamientos químicos de C-1 a C-28 de **XI**, son casi idénticos a los de la datudisólida A (**XIII**), excepto los de C-25, C-26 y CH₂-27, particularmente los de CH₂-27 debido a la presencia del tetra-*O*-acetil- β -glucopiranosilo en esta posición. La orientación beta de CH₂-27 se dedujo de la interacción entre H-21b y H-27a, que se observa en el experimento NOESY (espectro 23). El análisis anterior permite proponer la estructura del compuesto **XI** como la que

se muestra en la Figura 23. La misma estructura fue asignada a la daturametelina G-Ac,⁷⁰ pero al comparar sus datos se observaron diferencias en las señales de la cadena lateral, en especial en las de H-21b, C-23, C-27 y C-28,⁷⁰ lo que indica que se trata de compuestos diferentes, probablemente epímeros en C-25. Al compuesto **XI** se le dio el nombre de tetraacetildatuceroílida B. Debido a su poca estabilidad, no se logró aislar el nuevo producto natural datuceroílida B que es el 27-O- β -glucopiranosido de la datudisólida A.



	XI	Daturametelina G-Ac
	δ en ppm	
H-21b	3.39 <i>dd</i> (13.6, 3.2)	3.72 <i>dd</i> (13.9, 3.9)
C-23	32.9	30.5
C-27	66.3	70.8
C-28	26.6	24.9

Figura 23. Estructura de la tetraacetildatuceroílida B (**XI**) y algunos datos comparativos de RMN.

Tabla 3. Datos de RMN ¹H de las withanólidas VIII, XI y XII (400 MHz, CDCl₃, J en Hz).

H	δ_H (ppm)		
	VIII ^a	XI	XII
2	6.02 <i>dd a</i> (10.0, 2.0)	5.87 <i>dd a</i> (10.0, 2.0)	5.88 <i>dd a</i> (10.0, 2.4)
3	6.73 <i>ddd</i> (10.0, 4.8, 2.4)	6.77 <i>ddd</i> (10.0, 4.8, 2.4)	6.78 <i>ddd</i> (10.0, 4.8, 2.4)
4a	3.30 <i>d a</i> (21.2)	3.29 <i>d a</i> (21.2)	3.29 <i>d a</i> (21.2)
4b	2.75 <i>dd</i> (21.2, 5.2)	2.83 <i>dd</i> (21.2, 4.8)	2.83 <i>dd</i> (21.2, 4.8)
6	5.51 <i>d a</i> (6.0)	5.56 <i>d a</i> (6.0)	5.57 <i>d a</i> (6.0)
7a	1.88 <i>m</i>	1.99 <i>m</i>	1.97 <i>m</i>
7b	1.53 <i>m</i>	1.57 <i>m</i>	1.60 <i>m</i>
8	1.31 <i>m</i>	1.43 <i>m</i>	1.44 <i>m</i>
9	1.77 <i>td</i> (12.0, 3.6)	1.68 <i>m</i>	1.68 <i>m</i>
11a	2.45 <i>dd a</i> (13.6, 3.6)	2.24 <i>m</i>	2.18 <i>m</i>
11b	1.53 <i>m</i>	1.49 <i>m</i>	**
12a	1.89 <i>m</i>	1.88 <i>m</i>	1.74 <i>m</i>
12b	1.24 <i>m</i>	1.51 <i>m</i>	**
14	0.94 <i>m</i>	1.19 <i>m</i>	1.17 <i>m</i>
15a	1.48 <i>m</i>	1.70 <i>m</i>	1.67 <i>m</i>
15b	1.02 <i>m</i>	1.17 <i>m</i>	1.16 <i>m</i>
16a	1.48 <i>m</i>	1.71 <i>m</i>	**
16b	1.14 <i>m</i>	1.35 <i>m</i>	**
17	1.00 <i>m</i>	1.72 <i>m</i>	1.63 <i>m</i>
18	0.62 <i>s</i>	0.68 <i>s</i>	0.76 <i>s</i>
19	1.22 <i>s</i>	1.22 <i>s</i>	1.23 <i>s</i>
20	1.92 <i>m</i>	1.78 <i>m</i>	1.68 <i>m</i>
21a	0.98 <i>d</i> (6.4)	3.89 <i>d a</i> (13.6)	4.36 <i>dd</i> (12.4, 2.0)
21b	-	3.39 <i>dd</i> (13.6, 3.2)	4.19*
22	4.36 <i>dt</i> (13.2, 3.6)	4.63*	4.45*
23a	2.30 <i>dd</i> (18.0, 13.2)	1.99 <i>m</i>	2.73 <i>dd a</i> (18.0, 14.0)
23b	2.03 <i>dd</i> (18.0, 3.6)	1.82 <i>m</i>	2.16 <i>dd</i> (18.0, 3.2)
25	-	2.46 <i>t</i> (4.0)	-
27a	5.09 <i>d</i> (11.2)	4.22 <i>dd</i> (10.4, 4.8)	4.58 <i>d</i> (10.8)
27b	4.87 <i>d</i> (11.2)	4.08 <i>dd</i> (10.4, 2.7)	4.46 <i>d</i> (10.8)
28	2.13 <i>s</i>	1.28 <i>s</i>	2.05 <i>s</i>
1'	5.07 <i>d</i> (7.6)	4.63 <i>d</i> (8.0)	4.65 <i>d</i> (8.0)
2'	4.09 <i>dd</i> (8.8, 7.6)	5.00 <i>dd</i> (9.6, 8.0)	4.94 <i>dd</i> (9.6, 8.0)
3'	4.30 <i>m</i>	5.22 <i>t</i> (9.6)	5.21 <i>t</i> (9.6)
4'	4.30 <i>m</i>	5.09 <i>t</i> (9.6)	5.08 <i>t</i> (9.6)
5'	4.01 <i>ddd</i> (9.2, 5.2, 2.4)	3.72 <i>ddd</i> (9.6, 4.8, 2.4)	3.69 <i>ddd</i> (9.6, 4.4, 2.8)
6a'	4.61 <i>dd</i> (12.0, 2.4)	4.29 <i>dd</i> (12.4, 4.8)	4.23 <i>dd</i> (12.4, 4.4)
6b'	4.44 <i>dd</i> (12.0, 5.2)	4.14 <i>dd</i> (12.4, 2.4)	4.18 <i>dd</i> (12.4, 2.8)
OAc	-	2.10 <i>s</i> , 2.05 <i>s</i> , 2.03 <i>s</i> , 2.00 <i>s</i>	2.09 <i>s</i> , 2.08 <i>s</i> , 2.03 <i>s</i> , 2.02 <i>s</i> , 2.00 <i>s</i>

^aDeterminado en C₅D₅N. *Señales traslapadas. **Señales no localizadas.

Tabla 4. Datos de RMN ^{13}C de las withanólidas VIII, XI y XII (100 MHz, CDCl_3).

C	δ_{C} (ppm)		
	VIII ^a	XI	XII
1 C	204.3	204.2	204.4
2 CH	128.3	127.9	127.9
3 CH	146.3	145.1	145.2
4 CH ₂	34.0	33.5	33.5
5 C	136.8	136.0	136.0
6 CH	125.2	124.6	124.6
7 CH ₂	31.4	30.7	30.7
8 CH	33.6	33.2	33.3
9 CH	43.8	42.8	42.8
10 C	51.2	50.5	50.5
11 CH ₂	24.4	23.6	23.6
12 CH ₂	40.3	39.6	38.5
13 C	43.0	42.5	42.4
14 CH	56.6	55.9	56.0
15 CH ₂	24.8	24.0	24.2
16 CH ₂	27.5	26.3	27.3
17 CH	52.5	47.7	46.5
18 CH ₃	12.3	12.7	12.1
19 CH ₃	19.4	19.0	19.0
20 CH	39.5	39.9	42.6
21 CH ₂	13.9 ^b	60.2	61.6
22 CH	78.6	76.2	76.9
23 CH ₂	30.3	32.9	32.5
24 C	157.3	70.9	156.8
25 C	124.2	50.7 ^c	122.8
26 C	166.4	171.7	165.1
27 CH ₂	63.9	66.3	63.4
28 CH ₃	20.9	26.6	21.2
1' CH	105.4	100.7	100.8
2' CH	75.7	71.2	71.2
3' CH	79.0	72.8	72.9
4' CH	72.1	68.5	68.4
5' CH	79.1	71.8	71.8
6' CH ₂	63.2	61.9	61.8
OAc	-	170.7, 170.2, 169.5, 169.4, 20.7 (2), 20.6 (2)	170.6 (2), 170.2, 169.6, 169.5, 20.7 (2), 20.6, 20.5 (2)

^aDeterminado en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$. ^b CH_3 . ^cCH.

▪ Determinación estructural del compuesto XIV

El análisis de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **XIV** (Tablas 5 y 6; espectros 32 y 33) mostró que su estructura es la de la aglicona de la pentaacetildaturametelina B (**XII**) con el hidroxilo libre en C-21 (Figura 24), es decir **XIV** es la aglicona de **IX**. En el espectro de RMN ^1H las señales de los protones de CH_2 -27, alílicos y al mismo tiempo geminales a un grupo hidroxilo, se observan en δ_{H} 4.41 (*dd*, $J = 12.5, 7.0$ Hz, H-27a) y δ_{H} 4.35 (*dd*, $J = 12.5, 5.5$ Hz, H-27b). El espectro de masas de alta resolución del compuesto **XIV** mostró un ion de m/z 455.2800 que corresponde a la molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$, que concuerda con la fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_5$. Este compuesto ha sido obtenido como producto de reacción de la hidrólisis enzimática de la daturametelina B,⁷⁰ pero es la primera vez que se aísla como producto natural, por lo que se le dio el nombre de datudisólida B.

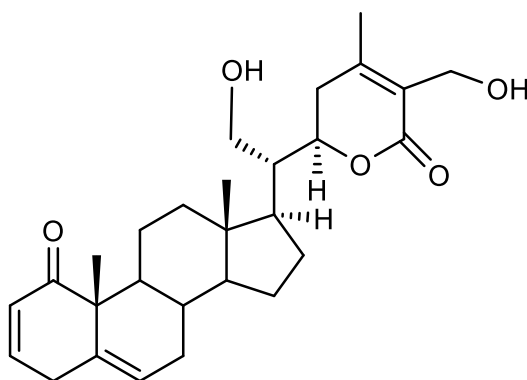


Figura 24. Estructura de la datudisólida B (**XIV**).

▪ Determinación estructural de los compuestos XV y XVI

Los datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C de los compuestos **XV** y **XVI** indicaron que estos compuestos solo difieren del compuesto **XIV**, por la presencia de un grupo hidroxilo en C-12, en cada uno de ellos. En el compuesto **XV** la señal de H-12 es un doble de dobles en δ_{H} 3.81 que en el espectro HMBC (espectro 40) muestra correlaciones con C-17 y C-18, mientras que en el experimento COSY (espectro 41) correlaciona con los protones del metileno CH_2 -11. Los valores de las constantes de acoplamiento de H-12 ($J = 12.0, 3.5$ Hz) indican acoplamientos axial-axial y axial-

ecuatorial con los protones H₂-11, por lo que se deduce que la orientación del hidroxilo es beta. En el compuesto **XVI** la señal de H-12 es una señal triple en δ_H 4.14 y presenta las mismas correlaciones que el compuesto **XV** en los experimentos HMBC y COSY (espectros 45 y 46). Del valor de la constante de acoplamiento de H-12 ($J = 3.0$ Hz) se concluye que este protón debe ser ecuatorial, por lo que su orientación es beta.

Las estructuras propuestas para los compuestos **XV** y **XVI** se muestran en la Figura 25, estos compuestos no han sido aislados como productos naturales, sino como productos de hidrólisis de la dinoxina B (**121**) y del daturamalakósido B (**51**), respectivamente.^{99,77} Sin embargo, los datos espectroscópicos (RMN ¹H y ¹³C) y las constantes físicas (punto de fusión y rotación específica) de la aglicona de la dinoxina B que deberían corresponder a los del compuesto **XV**, no coinciden.* Una explicación es que la reacción de hidrólisis, que se llevó a cabo en condiciones ácidas, no dio el producto esperado por los autores (debido a que este tipo de withanólidas son muy lábiles) y los datos espectroscópicos no se interpretaron correctamente.⁹⁹

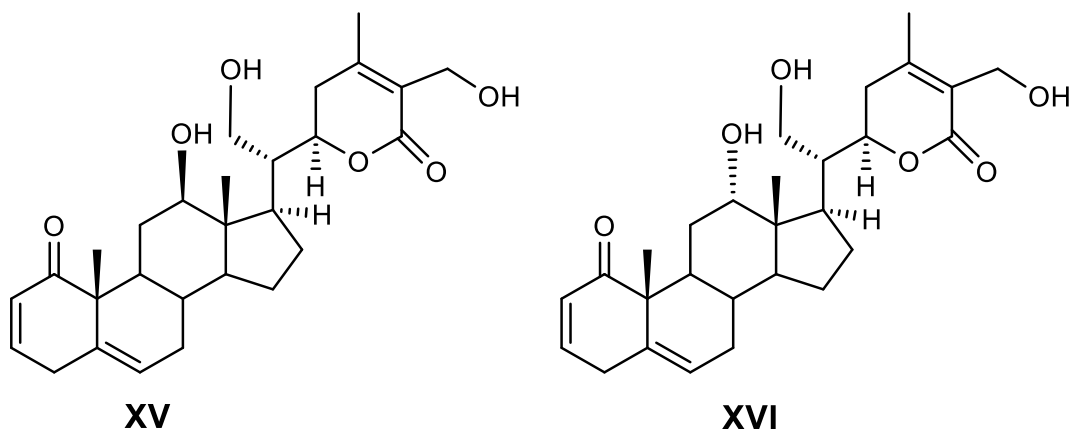


Figura 25. Estructura de la datudisólida C (**XV**) y la daturalamakina B (**XVI**).

*En los espectros que se anexan como material suplementario en la publicación⁹⁹ es evidente que el producto de hidrólisis es una mezcla con predominio de un compuesto con un metileno vinílico terminal.

▪ Determinación estructural del compuesto XVII

Los datos de RMN ^1H y ^{13}C permitieron determinar que el compuesto **XVII** es similar a la datudisólida B (**XIV**), con la diferencia de que los espectros de RMN del compuesto **XVII** (Tablas 5 y 6; espectros 47 y 48) muestran desplazamientos que indican la presencia de sustituyentes en los carbonos C-5 (δ_{C} 83.4) y C-6 (δ_{C} 74.2), en lugar del doble enlace de la datudisólida B (**XIV**). El desplazamiento a campo bajo de la señal de H-4a (δ_{H} 3.88 *dt*, $J = 20.0, 2.5$ Hz), así como el de C-5 indican que, como en el caso del compuesto **X**, este carbono está unido a un átomo de cloro y C-6 a un grupo hidroxilo. La comparación de los datos de RMN de **XVII** con los de **X** indica la misma configuración de C-5 y C-6. Además, el experimento NOESY (espectro 52) indica una correlación de H-4a con H₃-19 (δ_{H} 1.64 *s*) y de H-4b (δ_{H} 2.66 *dd*) con H-6 (δ_{H} 4.28 *s a*), lo que apoya la fusión *trans* de los anillos A y B. Por lo tanto, la orientación del átomo de cloro en C-5 es alfa. El espectro de masas de alta resolución del compuesto **XVII** mostró un ion de m/z 507.2514 que corresponde a la molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ que concuerda con la fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{ClO}_6$.

El análisis anterior permite proponer la estructura que se muestra en la Figura 26. Este compuesto es una nueva withanólida a la que se le dio el nombre de datudisólida D. Esta es la segunda withanólida aislada del género *Datura* que posee un átomo de cloro en su estructura.

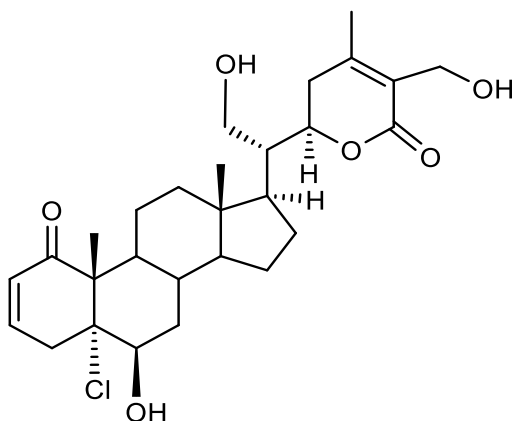


Figura 26. Estructura de la datudisólida D (**XVII**).

Tabla 5. Datos de RMN ^1H de las withanólidas **XIV-XVII** (500 MHz, J en Hz).

H	δ_{H} (ppm)			
	XIV ^a	XV ^b	XVI ^a	XVII ^b
2	5.88 <i>ddd</i> (10.0, 3.0, 1.0)	5.95 <i>dd</i> (10.0, 2.5)	5.88 <i>dd a</i> (10.0, 2.0)	6.10 <i>dd</i> (10.0, 2.5)
3	6.78 <i>ddd</i> (10.0, 5.0, 2.5)	6.69 <i>ddd</i> (10.0, 5.0, 2.5)	6.81 <i>ddd</i> (10.0, 5.0, 2.5)	6.67 <i>ddd</i> (10.0, 5.0, 2.5)
4a	3.29 <i>d a</i> (21.0)	3.18 <i>dd a</i> (21.5, 2.5)	3.30 <i>dd a</i> (21.5, 2.5)	3.88 <i>dt</i> (20.0, 2.5)
4b	2.84 <i>dd</i> (21.0, 5.0)	2.72 <i>dd</i> (21.5, 5.0)	2.86 <i>dd</i> (21.5, 5.0)	2.66 <i>dd</i> (20.0, 5.0)
6	5.57 <i>dt</i> (6.5, 2.0)	5.48 <i>d a</i> (6.0)	5.59 <i>d a</i> (6.0)	4.28 <i>s a</i>
7a	1.98 <i>m</i>	1.85 <i>m</i>	2.00 <i>m</i>	2.12 <i>m</i>
7b	1.55 <i>m</i>	1.46 <i>m</i>	1.63 <i>m</i>	1.85 <i>m</i>
8	1.43 <i>m</i>	1.29 <i>m</i>	1.47 <i>m</i>	2.10 <i>m</i>
9	1.68 <i>m</i>	1.87 <i>m</i>	2.04 <i>m</i>	2.25 <i>m</i>
11a	2.26 <i>m</i>	2.95 <i>dt</i> (12.0, 3.5)	2.44 <i>dt</i> (15.0, 3.5)	2.71 <i>ddd</i> (13.5, 7.0, 3.0)
11b	1.49 <i>m</i>	1.82 <i>m</i>	1.82 <i>m</i>	1.48 <i>m</i>
12a	1.97 <i>m</i>	3.81 <i>dd</i> (12.0, 3.5)	-	2.26 <i>m</i>
12b	1.57 <i>m</i>	-	4.14 <i>t</i> (3.0)	1.69 <i>td</i> (12.5, 4.0)
14	1.18 <i>m</i>	0.99 <i>ddd</i> (16.0, 12.0, 8.0)	1.84 <i>m</i>	1.19 <i>m</i>
15a	1.67 <i>m</i>	1.53 <i>m</i>	1.72 <i>m</i>	1.56 <i>m</i>
15b	1.19 <i>m</i>	1.16 <i>m</i>	1.21 <i>m</i>	1.03 <i>m</i>
16a	1.69 <i>m</i>	1.68 <i>m</i>	1.71 <i>m</i>	1.59 <i>m</i>
16b	1.42 <i>m</i>	1.40 <i>m</i>	1.43 <i>m</i>	1.23 <i>m</i>
17	1.58 <i>m</i>	1.93 <i>t</i> (9.5)	2.17 <i>m</i>	1.81 <i>m</i>
18	0.77 <i>s</i>	0.92 <i>s</i>	0.77 <i>s</i>	0.74 <i>s</i>
19	1.24 <i>s</i>	1.16 <i>s</i>	1.23 <i>s</i>	1.64 <i>s</i>
20	1.96 <i>m</i>	2.12 <i>m</i>	1.84 <i>t a</i> (13.0)	1.96 <i>m</i>
21a	4.08 <i>dd a</i> (11.5, 5.0)	4.34 <i>dd</i> (11.5, 3.5)	4.10 <i>d</i> (12.5)	4.24 <i>dd</i> (11.0, 2.5)
21b	3.84 <i>dt</i> (11.5, 4.0)	4.26 <i>dd</i> (11.5, 2.5)	3.86 <i>dd</i> (12.5, 3.5)	4.02 <i>dd</i> (11.0, 3.5)
22	4.50 <i>dt</i> (13.5, 3.5)	4.65 <i>dt</i> (13.0, 3.5)	4.45 <i>dt</i> (13.5, 3.0)	4.58 <i>dt</i> (13.0, 3.5)
23a	3.05 <i>dd</i> (18.5, 13.5)	3.10 <i>dd</i> (18.0, 13.0)	3.21 <i>dd</i> (18.0, 13.5)	3.18 <i>dd</i> (18.5, 13.0)
23b	2.16 <i>dd</i> (18.5, 3.5)	2.39 <i>dd</i> (18.0, 3.5)	2.19 <i>dd</i> (18.5, 3.0)	2.33 <i>ddd</i> (18.5, 3.5)
27a	4.41 <i>dd</i> (12.5, 7.0)	4.86 <i>d</i> (11.5)	4.41 <i>d</i> (12.5)	4.86 <i>d</i> (11.5)
27b	4.35 <i>dd</i> (12.5, 5.5)	4.73 <i>d</i> (11.5)	4.36 <i>d</i> (12.5)	4.73 <i>d</i> (11.5)
28	2.04 <i>s</i>	2.06 <i>s</i>	2.03 <i>s</i>	2.06 <i>s</i>

^aDeterminado en CDCl_3 . ^bDeterminado en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Tabla 6. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de las withanólidas **XIV-XVII** (125 MHz).

C	δ_c (ppm)			
	XIV ^a	XV ^b	XVI ^a	XVII ^b
1 C	204.3	204.3	204.4	201.6
2 CH	128.0	128.2	127.8	128.7
3 CH	145.2	146.6	145.7	142.4
4 CH ₂	33.5	33.9	33.4	37.9
5 C	136.0	136.7	135.6	83.4
6 CH	124.6	125.2	124.7	74.2
7 CH ₂	30.7	31.2	30.4	34.1
8 CH	33.3	32.8	33.1	30.9
9 CH	42.9	42.9	36.8	43.0
10 C	50.5	51.0	49.7	53.3
11 CH ₂	23.7	34.4	31.4	23.8
12 CH ₂	39.2	79.0 ^c	73.5 ^c	39.6
13 C	42.3	48.8	45.8	43.0
14 CH	56.1	55.2	47.8	55.7
15 CH ₂	24.3	24.6	23.5	24.4
16 CH ₂	27.2	28.6	26.0	27.1
17 CH	46.2	48.2	37.9	47.3
18 CH ₃	12.2	8.4	13.1	12.7
19 CH ₃	19.0	19.3	18.8	16.8
20 CH	45.3	47.3	44.8	46.1
21 CH ₂	59.6	60.0	59.4	58.9
22 CH	78.3	78.8	78.2	78.1
23 CH ₂	32.5	33.5	32.8	33.3
24 C	154.0	155.2	154.4	154.9
25 C	125.4	127.6	125.3	127.2
26 C	166.8	167.0	167.1	166.6
27 CH ₂	57.5	56.6	57.5	56.2
28 CH ₃	19.9	20.5	19.9	20.0

^aDeterminado en CDCl₃. ^bDeterminado en C₅D₅N. ^cCH

6.2. Actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa

Los resultados de la evaluación de la capacidad de siete withanólidas para inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa se presentan en la Tabla 7.

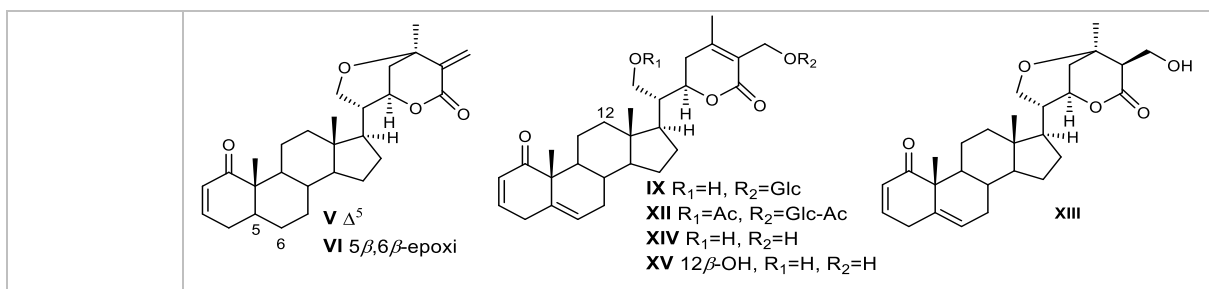


Tabla 7. Porcentajes de inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa e IC₅₀ de los compuestos **V**, **VI**, **IX** y **XII-XV**.

Compuesto	Concentración (μ M)	%Inhibición	Concentración (μ M)	%Inhibición	IC ₅₀ (μ M)
V	1	-1.26			
	10	12.89			
	100	34.29			
VI	1	-0.13			
	10	2.72			
	100	56.61			
IX	1	21.73	0.56	21.07 \pm 3.25	5.32 \pm 0.06
	10	68.37	1.78	29.34 \pm 0.75	
	100	5.62	53.32 \pm 0.13		
		17.78	78.12 \pm 0.53		
		56.23	91.01 \pm 0.17		
XII	1	18.07	1.00	28.82 \pm 1.03	11.83 \pm 0.11
	10	30.23	3.16	30.03 \pm 1.62	
		70.03	10.00	46.93 \pm 0.84	
	100	31.62	71.19 \pm 0.48		
		100.0	75.67 \pm 0.22		
XIII	1	12.56	10.00	31.60 \pm 2.20	21.52 \pm 1.01
	10	14.22	17.78	42.03 \pm 2.63	
		71.76	31.62	71.78 \pm 1.99	
	100	56.23	87.54 \pm 1.06		
		100.00	91.40 \pm 0.94		
XIV	1	20.86	0.56	33.64 \pm 3.79	2.78 \pm 0.23
	10	72.09	1.78	42.24 \pm 1.80	
		92.69	5.62	72.12 \pm 5.19	
	100	17.78	86.28 \pm 0.27		
		56.23	95.12 \pm 0.27		
XV	1	9.83			
	10	3.72			
	100	5.45			
Eserina			0.0001	9.23 \pm 3.31	0.011 \pm 0.001
			0.0003	16.15 \pm 1.28	
			0.001	23.21 \pm 1.23	
			0.003	19.52 \pm 3.09	
			0.01	47.97 \pm 2.48	
			0.03	77.98 \pm 5.02	
			0.1	90.49 \pm 2.81	

Los datos experimentales (Tabla 7) muestran que la mayoría de las withanólidas tienen una moderada capacidad inhibitoria en comparación con el compuesto de referencia. La capacidad de algunas withanólidas de inhibir a la enzima acetilcolinesterasa se encuentra documentado en la literatura³⁸ y el mecanismo de acción se ha estudiado mediante experimentos *in silico* de acoplamiento molecular. Con base en los resultados de dichos experimentos se ha propuesto que la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por este tipo de compuestos, está mediada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con algunos aminoácidos del sitio catalítico de la enzima.¹⁰⁹ Las withanólidas al ser compuestos polioxigenados facilitan la formación de puentes de hidrógeno. En cuanto a la relación estructura-actividad, se observa que los compuestos más activos son aquellos con un grupo hidroxilo en C-21 y una función oxigenada en C-27 (**XIV** y **IX**); también se observó que la acetilación reduce la actividad (**IX** vs. **XII**) y que la presencia de un grupo C-12 β -OH prácticamente la elimina (**XIV** vs. **XV**). Por otra parte, las withanólidas con anillo de tetrahidropirano mostraron una escasa capacidad inhibitoria (**V**, **VI** y **XIII**).

7. CONCLUSIONES

De los extractos orgánicos de *Datura ceratocaula* y *Datura discolor* se aislaron carotenos, fitoesteroles y withanólidas. De este último grupo se aislaron siete nuevas withanólidas, dos de ellas, datucerólida A (**X**) y datudisólida D (**XVII**), poseen un átomo de cloro en su estructura y son las primeras clorhidrinas que se aíslan del género *Datura*. La composición química de ambas especies se asemeja a la de *Datura metel*.

En este trabajo se encontró que algunos de los compuestos aislados de las dos especies de *Datura* son inestables, particularmente los que presentan un grupo hidroxilo en C-21, junto con una lactona α,β -insaturada y un grupo saliente en C-27, como ocurre en la daturametelina B (**IX**), que durante los procesos de separación se transforma en withametelina (**V**).

Los estudios químicos de *Datura ceratocaula* (única especie de la sección *Ceratocaulis*) y de *Datura discolor* (sección *Dutra*) son los primeros descritos para estas especies. Con estos resultados ya es posible hacer una comparación de las características estructurales de las withanólidas de las tres secciones del género *Datura*. Las especies de la sección *Datura* se distinguen porque sus metabolitos representativos son 5α -hidroxi- $6\alpha,7\alpha$ -epoxiwithanólidas, con un grupo 12 -hidroxi y doble enlace o epóxido en C-24 y C-25; en cambio, las withanólidas de las secciones *Dutra* y *Ceratocaulis* generalmente presentan un doble enlace en C-5 o un grupo $5\beta,6\beta$ -epoxi y poseen funciones oxigenadas en las posiciones C-12, C-21 y C-27, además es frecuente que presenten un anillo adicional de tetrahidropirano.

En los ensayos de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, las withanólidas evaluadas resultaron activas, pero la mayor actividad se observó en las que poseen un hidroxilo en C-21 y funciones oxigenadas en C-27, como las withanólidas **IX**, **XII** y **XIV**. Aquellas que poseen un metileno exocíclico en C-25, como las withanólidas **V** y **VI**, presentan escasa actividad inhibitoria.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*. 3rd Ed. John Wiley and Son, Great Britain, pp. 7-8.
2. Hunter, P. (2008). Harnessing nature's wisdom. Turning to nature for inspiration and avoiding her follies. *EMBO Rep.* 9, 838–840.
3. Fabricant, D. S., Farnsworth, N. R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.* 109, 69–75.
4. Dias, D. A., Urban, S., Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites.* 2, 303–336.
5. Shen, B. (2015). A new golden age of natural products drug discovery. *Cell.* 163, 1297-1300.
6. Bernardini, S., Tiezzi, A., Laghezza Masci, V., Ovidi, E. (2018). Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Nat. Prod. Res.* 32, 1926–1950.
7. Llorente-Bousquets, J., Ocegueda, S. (2008). Estado del conocimiento de la biota. En: *Capital Natural de México*, vol. 1: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 283-322.
8. Villaseñor, J. L. (2003). Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia.* 28, 160-167.
9. Jiao, M., Luna-Cavazos, M., Bye, R. (2002). Allozyme variation in Mexican species and clasification of *Datura* (Solanaceae). *Pl. Syst. Evol.* 232, 155-166.
10. Martínez, M., Vargas-Ponce, O., Rodríguez, A., Chiang, F., Ocegueda, S. (2017). Solanaceae family in Mexico. *Bot. Sci.* 95, 131-145.
11. Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E. M. (2012). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 2nd. Ed. Churchill Livingstone, England, p. 44.
12. Luna-Cavazos, M., Bye, R. (2011). Phytogeographic analysis of the genus *Datura* (Solanaceae) in continental Mexico. *Rev. Mex. Biodivers.* 82, 977–988.
13. Kariño-Betancourt, A., Agrawal, A. A., Halitschke, R., Núñez-Farfán, J. (2014). Phylogenetic correlations among chemical and physical plant defenses change with ontogeny. *New Phytol.* 206, 796–806.

14. Geeta, R., Gharaibeh, W. (2007). Historical evidence of *Datura* in the Old World and implications for a first millennium transfer from the New World. *J. Biosci.* 32, 1227–1244.
15. Evans, W. C., Partridge, M. W. (1953). Alkaloid biogenesis. *J. Pharm. Pharmacol.* 5, 293–300.
16. Parr, A. J., Payne, J., Eagles, J., Chapman, B. T., Robins, R. J., Rhodes, M. J. (1990). Variation in tropane alkaloid accumulation within the Solanaceae and strategies for its exploitation. *Phytochemistry.* 29, 2545–2550.
17. Misico, R. I., Nicotra, V. E., Oberti, J. C., Barboza, G., Gil, R. R., Burton, G. (2011). Withanolides and Related Steroids. In *Progress in the chemistry of organic natural products*. Kinghorn, A. D., Falk, H., Kobayashi, J. Eds. Springer-Verlag, Wien. Vol. 94, pp. 127-229.
18. Zhang, H., Bazzill, J., Gallagher, R. J., Subramanian, C., Grogan, P. T., Day, V. W., Kindscher, K., Cohen, M. S., Timmermann, B. N. (2013). Antiproliferative withanolides from *Datura wrightii*. *J. Nat. Prod.* 76, 445-449.
19. Veleiro, A. S., Oberti, J. C., Burton, G. (2005). Chemistry and bioactivity of withanolides from South American Solanaceae. In *Studies in natural products chemistry*. Edited by Atta-ur-Rahman. Elsevier. Amsterdam. Vol. 32 (part L), pp. 1019–1052.
20. Benítez, G., March-Salas, M., Villa-Kamel, A., Cháves-Jiménez, U., Hernández, J., Montes-Osuna, N., Moreno-Chocano, J., Cariñanos, P. (2018). The genus *Datura* L. (Solanaceae) in Mexico and Spain – Ethnobotanical perspective at the interface of medical and illicit uses. *J. Ethnopharmacol.* 219, 133–151.
21. CONABIO. Malezas de México. Página web <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/datura-ceratocaula/fichas/ficha.htm> (consultada Julio 17, 2019).
22. Beresford, P., Woolley, J. (1974). 6-[2-Methylbutanoyloxy]tropane-3 α -ol, a new alkaloid from *Datura ceratocaula*. *Phytochemistry.* 13, 2511-2513.
23. Berkov, S. (2003). Alkaloids of *Datura ceratocaula*. *Z. Naturforsch. C.* 58, 455-458.

24. Doncheva, T., Berkov, S., Philipov, S. (2006). Comparative study of the alkaloids in tribe Datureae and their chemosystematic significance. *Biochem. System. Ecol.* 34, 478-488.
25. Matuda, E. (1952). El género *Datura* en México. *Soc. Bot. Mex.* 14, 1-13.
26. Kalemkarian, P. H., Miller, O. H. (1957). A pharmacognostical study of *Datura discolor* Bernh. *J. Pharm. Assoc.* 46, 393-396.
27. Evans, W. C., Somanabandhu, A. (1974). Alkaloids of *Datura discolor*. *Phytochemistry.* 13, 304-305.
28. Mai, N. T., Cuc, N. T., Anh, H. L. T., Nhiem, N. X., Tai, B. H., Yen, P. H., Quang, T. H., Minh, C. V., Kim, K. W., Kim, Y. C., Oh, H., Kiem, P. V. (2017). Two new guaiane sesquiterpenes from *Datura metel* L. with anti-inflammatory activity. *Phytochem. Lett.* 19, 231–236.
29. Guo, R., Liu, Y., Pan, J., Guan, W., Yang, B. Y., Kuang, H. X. (2019). A new sesquiterpenoid with cytotoxic and antiinflammatory activity from the leaves of *Datura metel* L. *Nat. Prod. Res.* Publicado en línea, DOI: 10.1080/14786419.2019.1590715
30. Liu, Y., Guan, W., Lu, Z. K., Guo, R., Xia, Y. G., Lv, S. W., Yang, B. Y., Kuang, H. X. (2019). New sesquiterpenoids from the stems of *Datura metel* L. *Fitoterapia.* 134, 417–421.
31. Kocór, M., Pyrek, J. S. (1973). Triterpenes of *Datura innoxia* Mill. Structure of daturadiol and daturaolone. *J. Org. Chem.* 38, 3685-3688.
32. Mai, N. T., Cuc, N. T., Anh, H. L. T., Nhiem, N. X., Tai, B. H., Minh, C. V., Quang, T. H., Kim, K. W., Kim, Y. C., Oh, H., Kiem, P. V. (2017). Steroidal saponins from *Datura metel*. *Steroids.* 121, 1–9.
33. Yang, B. Y., Luo, Y. M., Liu, Y., Yin, X., Zhou, Y. Y., Kuang, H. X. (2018). New lignans from the roots of *Datura metel* L. *Phytochem. Lett.* 28, 8–12.
34. Pate, D. W., Averett, J. E. (1986). Flavonoids of *Datura*. *Biochem. System. Ecol.* 14, 647-649.
35. Begum, A. S., Sahai, M., Fujimoto, Y., Asai, K., Schneider, K., Nicholson, G., Suessmuth, R. (2006). A new kaempferol diglycoside from *Datura suaveolens* Humb. & Bonpl. ex. Willd. *Nat. Prod. Res.* 20, 1231-1236.

36. Lavie, D., Glotter, E., Shvo, Y. (1965). Constituents of *Withania somnifera*. IV. The structure of withaferin A. *J. Chem. Soc.* 7517–7531.
37. Yang, B. Y., Xia, Y. G., Pan, J., Liu, Y., Wang, Q. H., Kuang, H. X. (2016). Phytochemistry and biosynthesis of δ -lactone withanolides. *Phytochem. Rev.* 15, 771–797.
38. Khan, S. A., Khan, S. B., Shah, Z., Asiri, A. M. (2016). Withanolides: Biologically active constituents in the treatment of Alzheimer's disease. *Med. Chem.* 12, 238-256.
39. Nicotra, V. E., Gil, R. R., Vaccarini, C., Oberti, J. C., Burton, G. (2003). 15,21-Cyclowithanolides from *Jaborosa bergii*. *J. Nat. Prod.* 66, 1471-1475.
40. Glotter, E. (1991). Withanolides and related ergostane-type steroids. *Nat. Prod. Rep.* 8, 415-440.
41. Ascher, K. R. S., Eliyahu, M., Glotter, E., Goldman, A., Kirson, I., Abraham, A., Jacobson, M., Schmutterer, H. (1987). The antifeedant effect of some new withanolides on three insect species, *Spodoptera littoralis*, *Epilachna varivestis* and *Tribolium castaneum*. *Phytoparasitica.* 15, 15-29.
42. Mareggiani, G., Picollo, M. I., Zerba, E., Burton, G., Tettamanzi, M. C., Benedetti-Doctorovich, M. O. V., Veleiro, A. S. (2000). Antifeedant activity of withanolides from *Salpichroa origanifolia* on *Musca domestica*. *J. Nat. Prod.* 63, 1113-1116.
43. Zhang, H., Cao, C. M., Gallagher, R. J., Timmermann, B. N. (2014). Review. Antiproliferative withanolides from several solanaceous species. *Nat. Prod. Res.* 28, 1941–1951.
44. Bhat, B. A., Dhar, K. L., Puri, S. C., Qurishi, M. A., Khajuria, A., Gupta, A., Qazi, G. N. (2005). Isolation, characterization and biological evaluation of datura lactones as potential immunomodulators. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 6672–6677.
45. Yang, B. Y., Guo, R., Li, T., Wu, J. J., Zhang, J., Liu, Y., Wang, Q. H., Kuang, H. X. (2014). New anti-inflammatory withanolides from the leaves of *Datura metel* L. *Steroids.* 87, 26–34.
46. Abou-Douh, A. M. (2002). New withanolides and other constituents from the fruit of *Withania somnifera*. *Arch. Pharm.* 335, 267-276.

47. Bravo, B. J. A., Sauvain, M., Gimenez, T. A., Balanza, E., Serani, L., Laprevote, O., Massiot, G., Lavaud, C. (2001). Trypanocidal withanolides and withanolide glycosides from *Dunalia brachyacantha*. *J. Nat. Prod.* 64, 720-725.
48. Khatoon, S. S., Rehman, M., Rahman, A. (2018). The role of natural products in Alzheimer's and Parkinson's disease. In *Studies in Natural Products Chemistry*. Edited by Atta-ur-Rahman Ed. Elsevier B.V. Vol. 56, pp. 69-127.
49. Evans, W. C., Grout, R. J., Mensah, M. L. K. (1984). Withanolides of *Datura spp.* and hybrids. *Phytochemistry*. 23, 1717-1720.
50. Dhar, K. L., Raina, M. L. (1973). A novel withanolide from *Datura quercifolia*. *Phytochemistry*. 12, 476-478.
51. Cirigliano, A. M. (2001). Aislamiento y elucidación estructural de withanólidos de *Datura ferox*, *Jaborosa runcinata* y *Jaborosa ordonelliana*. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
52. Kalla, A. K., Raina, M. L., Dhar, K. L., Qurishi, M. A., Snatzke, G. (1979). Revised structures of daturalactone and 12-oxowithanolide. *Phytochemistry*. 18, 637-640.
53. Dhar, K. L., Kalla, A. K. (1976). A 12-oxowithanolide from *Datura quercifolia*. *Phytochemistry*. 15, 339-340.
54. Qurishi, M. A., Dhar, K. L., Atal, C. K. (1979). A novel withanolide from *Datura quercifolia*. *Phytochemistry*. 18, 283-284.
55. Qurishi, M. A., Kalla, A. K., Dhar, K. L. (1979). A novel withanolide from *Datura quercifolia*. *Phytochemistry*. 18, 1756-1757.
56. Cirigliano, A., Veleiro, A. S., Oberti, J. C., Burton, G. (1995). A 15 β -hydroxywithanolide from *Datura ferox*. *Phytochemistry*. 40, 611-613.
57. Veleiro, A. S., Cirigliano, A. M., Oberti, J. C., Burton, G. (1999). 7-Hydroxywithanolides from *Datura ferox*. *J. Nat. Prod.* 62, 1010-1012.
58. Tursunova, R. N., Maslennikova, V. A., Abubakirov, N. K. (1978). Withanolides of *Datura stramonium* II. Withastramonolide. *Khim. Prir. Soedin.* 14, 73-74.
59. Shingu, K., Yahara, S., Nohara, T. (1994). New withanolides, daturaturins A and B from *Datura tatura* L. *Chem. Pharm. Bull.* 42, 3485-3487.

60. Fang, S. T., Liu, X., Kong, N. N., Liu, S. J., Xia, C. H. (2013). Two new withanolides from the halophyte *Datura stramonium* L. *Nat. Prod. Res.* 27, 1965-1970.
61. Manickam, M., Awasthi, S. B., Sinha-Bagchi, A., Sinha, S. C., Ray, A. B. (1996). Withanolides from *Datura tatula*. *Phytochemistry.* 41, 981-983.
62. Manickam, M., Ray, A. B. (1996). Structure of withatatulins E, a minor withanolide of *Datura tatula*. *Indian J. Chem. Sect B.* 35B, 1311-1313.
63. Srivastava, A., Manickam, M., Sinha-Bagchi, A., Sinha, S. C., Ray, A. B. (1996). Novel withanolides from the flowers of *Datura tatula*. *Nat. Prod. Sci.* 2, 9-13.
64. Hirayama, M., Gamoh, K., Ikekawa, N. (1982). Synthesis of jaborosalactone A, B, and D. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 3735-3737.
65. Manickam, M., Sinha-Bagchi, A., Sinha, S. C., Gupta, M., Ray, A. B. (1993). Withanolides of *Datura fastuosa* leaves. *Phytochemistry.* 34, 868-870.
66. Manickam, M., Awasthi, S. B., Oshima, Y., Hisamichi, K., Takeshita, M., Sahai, M., Ray, A. B. (1994). Additional C-21-oxygenated withanolides from *Datura fastuosa*. *J. Chem. Res. (S).* 8, 306-307.
67. Manickam, M., Kumar, S., Sinha-Bagchi, A., Sinha, S. C., Ray, A. B. (1994). Withametelin H and withafastuosin C, two new withanolides from the leaves of *Datura* species. *J. Indian Chem. Soc.* 71, 393-399.
68. Manickam, M., Srivastava, A., Ray, A. B. (1998). Withanolides from the flowers of *Datura fastuosa*. *Phytochemistry.* 47, 1427-1429.
69. Shingu, K., Kajimoto, T., Furusawa, Y., Nohara, T. (1987). The structure of daturametelin A and B. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 4359-4361.
70. Shingu, K., Furusawa, Y., Nohara, T. (1989). New withanolides, daturametelins C, D, E, F and G-Ac from *Datura metel* L. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 2132-2135.
71. Ma, L., Xie, C. M., Li, J., Lou, F. C., Hu, L. H. (2006). Daturametelins H, I, and J: Three new withanolide glycosides from *Datura metel* L. *Chem. Biodivers.* 3, 180-186.

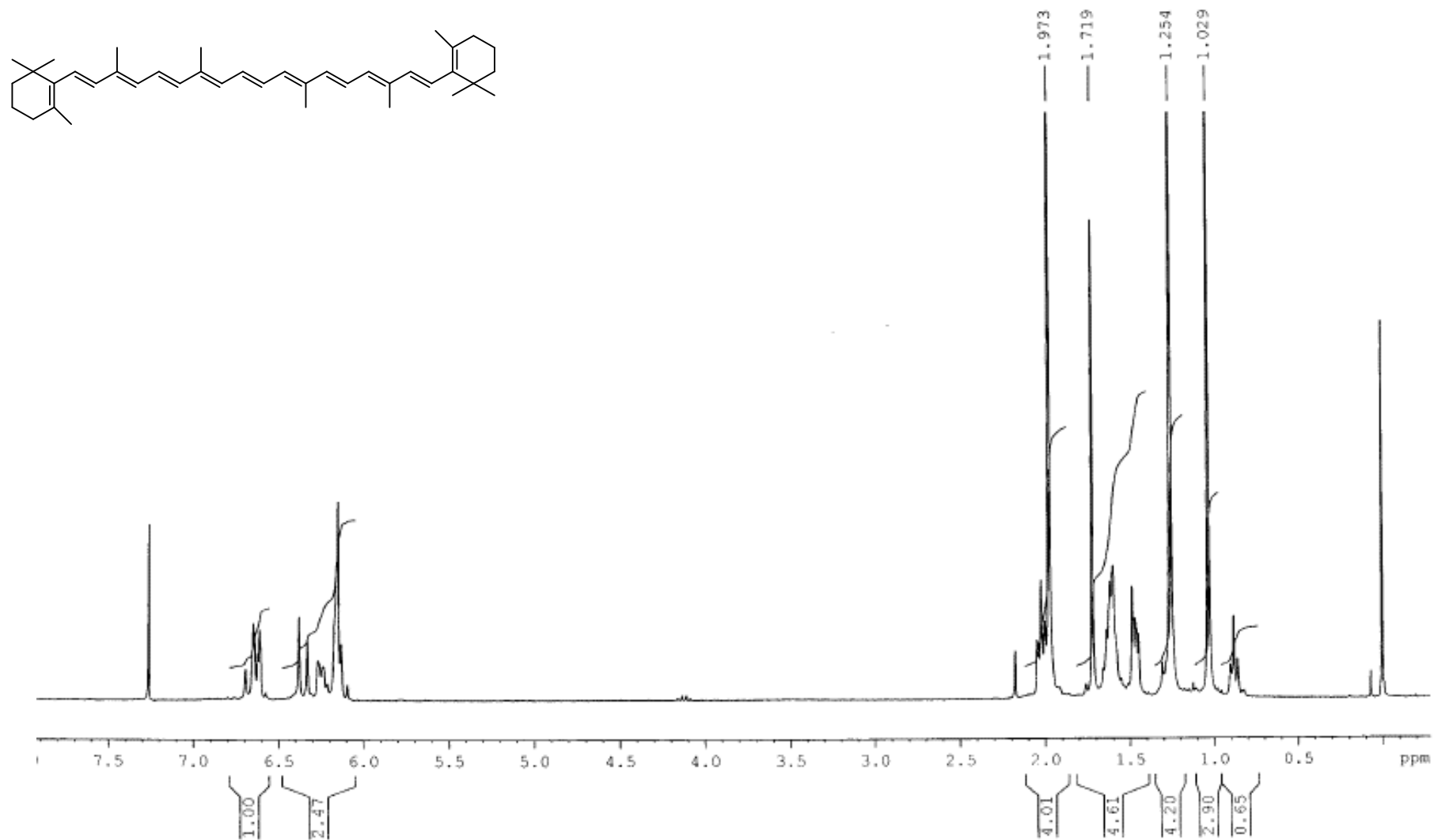
72. Oshima, Y., Bagchi, A., Hikino, H., Sinha, S. C., Sahai, M., Ray, A. B. (1987). Withametelin, a hexacyclic withanolide of *Datura metel*. *Tetrahedron Lett.* 28, 2025-2028.
73. Gupta, M., Bagchi, A., Ray, A. B. (1991). Additional withanolides of *Datura metel*. *J. Nat. Prod.* 54, 599-602.
74. Gupta, M., Manickam, M., Sinha, S. C., Sinha-Bagchi, A., Ray, A. B. (1992). Withanolides of *Datura metel*. *Phytochemistry.* 31, 2423-2425.
75. Jahromi, M. A. F., Manickam, M., Oshima, Y., Hatakeyama, S., Gupta, M., Ray, A. B. (1993). Withametelins F and G, two new withanolides of *Datura metel*. *J. Chem. Res (S)*. 6, 234-235.
76. Pan, Y., Wang, X., Hu, X. (2007). Cytotoxic withanolides from the flowers of *Datura metel*. *J. Nat. Prod.* 70, 1127-1132.
77. Bellila, A., Tremblay, C., Pichette, A., Marzouk, B., Mshvildadze, V., Lavoie, S., Legault, J. (2011). Cytotoxic activity of withanolides isolated from Tunisian *Datura metel* L. *Phytochemistry.* 72, 2031–2036.
78. Kuang, H., Yang, B., Tang, L., Xia, Y., Dou, D. (2009). Baimantuoluosides A - C, three new withanolide glucosides from the flower of *Datura metel* L. *Helv. Chim. Acta.* 92, 1315-1323.
79. Yang, B. Y., Xia, Y. G., Wang, Q. H., Dou, D. G., Kuang, H. X. (2010). Baimantuoluosides D-G, four new withanolide glucosides from the flower of *Datura metel* L. *Arch. Pharm. Res.* 33, 1143-1148.
80. Kuang, H. X., Yang, B. Y., Xia, Y. G., Wang, Q. H. (2011). Two new withanolide lactones from Flos Daturae. *Molecules.* 16, 5833-5839.
81. Yang, B. Y., Xia, Y. G., Liu, Y., Li, L., Jiang, H., Yang, L., Wang, Q. H., Kuang, H. X. (2014). New antiproliferative and immunosuppressive withanolides from the seeds of *Datura metel*. *Phytochem. Lett.* 8, 92–96
82. Yang, B.Y., Xia, Y.G., Wang, Y. Y., Wang, Q. H., Kuang, H. X. (2013). Two novel norwithasteroids with unusual six- and seven-membered ether rings in side chain from Flos Daturae. *eCAM*. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/352019>.

83. Yang, B. Y., Wang, Q. H., Xia, Y. G., Feng, W. H., Kuang, H. X. (2007). Withanolide compounds from the flower of *Datura metel* L. *Helv. Chim. Acta.* 90, 1522-1528.
84. Yang, B. Y., Wang, Q. H., Xia, Y. G., Feng, W. H., Kuang, H. X. (2008). Baimantuoluolines D– F, three new withanolides from the flower of *Datura metel* L. *Helv. Chim. Acta.* 91, 964-971.
85. Guo, R., Liu, Y., Xu, Z. P., Xia, Y. G., Yang, B. Y., Kuang, H. X. (2018). Withanolides from the leaves of *Datura metel* L. *Phytochemistry.* 155, 136–146.
86. Yang, B. Y., Guo, R., Li, T., Liu, Y., Wang, C. F., Shu, Z. P., Wang, Z. B., Zhang, J., Xia, Y. G., Jiang, H., Wang, Q. H., Kuang, H. X. (2014). Five withanolides from the leaves of *Datura metel* L. and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Molecules.* 19, 4548-4559.
87. Wang, X. Y., He, J., Bai, H. J., Gao, P. Y., Gan, H., Yang, T., Zhang, W. K., Xu, J. K. (2019). Daturanolide A–C, three new withanolides from *Datura metel* L. and their cytotoxic activities. *Chem. Biodivers.* Publicado en línea, DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900004>
88. Siddiqui, S., Ahmad, S. S., Mahmood, T. (1987). Datumelin - a new withanolide from *Datura metel* L. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* 30, 567-568.
89. Mahmood, T., Ahmad, S. S., Siddiqui, S. (1988). Daturilinol - a new withanolide from the leaves of *Datura metel*. *Heterocycles.* 27, 101-103.
90. Mahmood, T., Ahmad, S. S., Fazal, A. (1988). A new withanolide datumetelin from the leaves of *Datura metel*. *Planta Med.* 54, 468-469.
91. Sinha, S. C., Kundu, S., Maurya, R., Ray, A. B., Oshima, Y., Bagchi, A., Hikino, H. (1989). Structures of withametelin and isowithametelin, withanolides of *Datura metel* leaves. *Tetrahedron.* 45, 2165-2176.
92. Manickam, M., Padma, P., Chansouria, J. P. N., Ray, A. B. (1997) Evaluation of antistress activity of withafastuosin D, a withanolide of *Datura fastuosa*. *Phytother. Res.* 11, 384-385.
93. Goel, R. K., Maiti, R. N., Manickam, M., Ray, A. B. (1997). Effect of withafastuosin E on prostanoid synthesis by human intestinal mucosa 'in Vitro'. *Fitoterapia,* 68, 345-348.

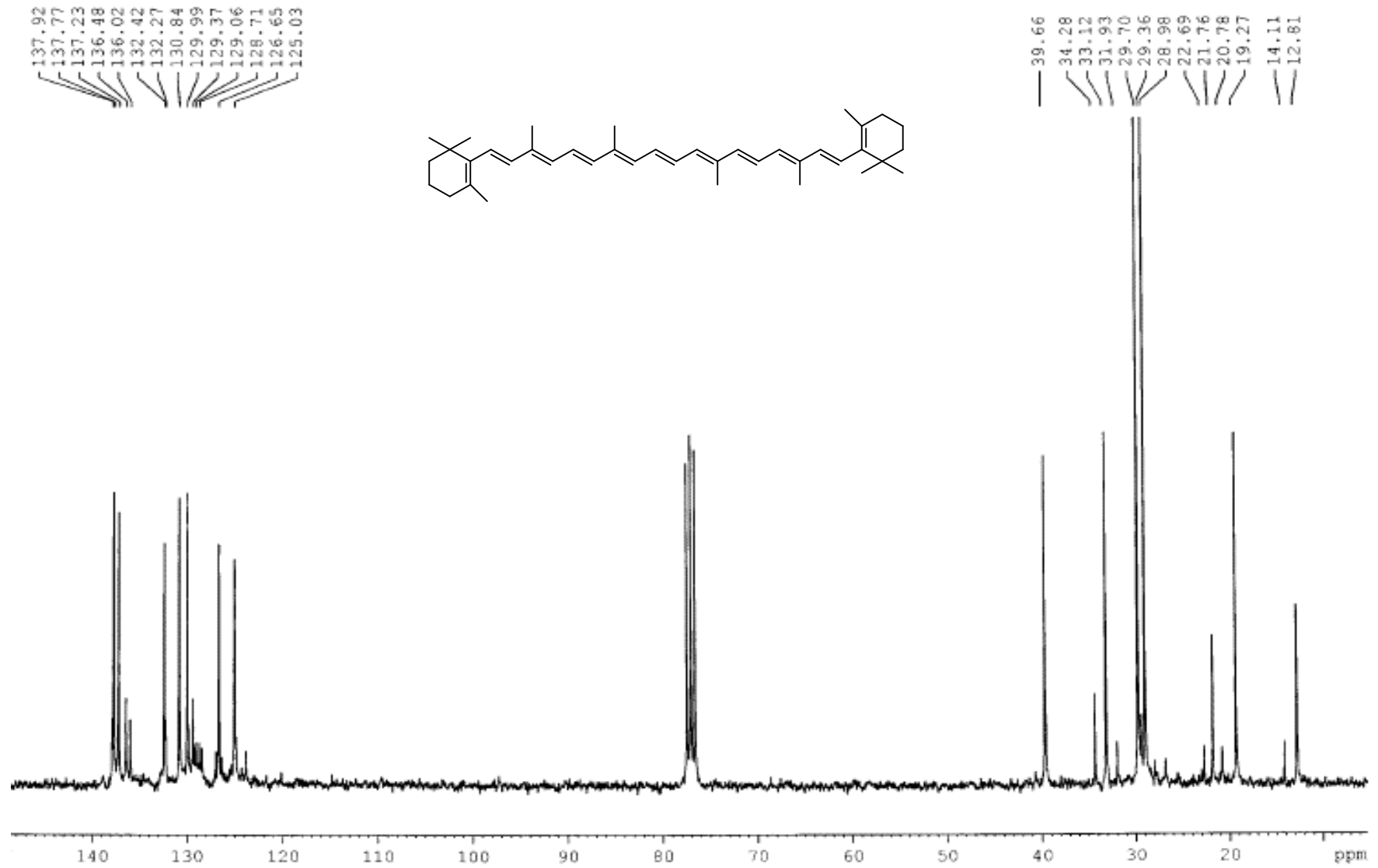
94. Maiti, R. N., Manickam, M., Ray, A. B., Goel, R. K. (1997). Effect of withaferin A on gastric mucosal offensive and defensive factors in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 35, 751-753.
95. Siddiqui, B. S., Afreen, S., Begum, S. (1999) Two new withanolides from the aerial parts of *Datura innoxia*. *Aust. J. Chem.* 52, 905-907.
96. Siddiqui, B. S., Hashmi, I. A., Begum, S. (2002). two new withanolides from the aerial parts of *Datura innoxia*. *Heterocycles.* 57, 715-721.
97. Siddiqui, B. S., Arfeen, S., Afshan, F., Begum, S. (2005). Withanolides from *Datura innoxia*. *Heterocycles.* 65, 857-863.
98. Siddiqui, B. S., Arfeen, S., Begum, S., Sattar, F. A. (2005). Daturacin, a new withanolide from *Datura innoxia*. *Nat. Prod. Res.* 19, 619-623.
99. Vermillion, K., Holguin, F. O., Berhow, M. A., Richins, R. D., Redhouse, T., O'Connell, M. A., Posakony, J., Mahajan, S. S., Kelly, S. M., Simon, J. A. (2011). Dinoxin B, a withanolide from *Datura innoxia* leaves with specific cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* 74, 267–271.
100. Siegfried, K. (1993). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 3, 170–171.
101. Qiu, C., Kivipelto, M., Strauss, E. V. (2009). Epidemiology of Alzheimer's disease: Occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin. Neurosci.* 11, 111-128.
102. Riaz, N., Malik, A., Rehman, A., Ahmad Nawaz, S., Muhammad, P., Iqbal Choudhary, M. I. (2004). Cholinesterase-inhibiting withanolides from *Ajuga bracteosa*. *Chem. Biodivers.* 1, 1289-1295.
103. Marx, J. (2005). Preventing Alzheimer's: A lifelong commitment? *Science.* 309, 864-866.
104. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
105. Hu, Y., Hashimoto, H., Moine, G., Hengartner, U., Koyama, Y. (1997). Unique properties of the 11-cis and 11,11'-di-cis isomers of β -carotene as revealed by electronic absorption, resonance Raman and ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy and

- by HPLC analysis of their thermal isomerization. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 12, 2699-2710.
106. Otaka, J., Seo, S., Nishimura, M. (2016). Lutein, a natural carotenoid, induces α -1,3-glucan accumulation on the cell wall surface of fungal plant pathogens. *Molecules.* 21, 980-989.
107. Zhang, X., Geoffroy, P., Miesh, M., Julien-David, D., Raul, F., Aoudé-Werner, D., Marchioni, E. (2005). Gram-scale chromatographic purification of β -sitosterol. Synthesis and characterization of β -sitosterol oxides. *Steroids.* 70, 886-895.
108. Shingu, K., Furusawa, Y., Marubayashi, N., Ueda, I., Yahara, S., Nohara, T. (1990). The structure of daturametelin D. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 2866-2867.
109. Choudhary, M. I., Nawaz, S. A., Haq, Z., Lodhi M. A., Ghayur, M. N., Jalil, S., Riaz, N., Yousuf, S., Malik, A., Gilani, A. H., Rahman, A. (2005). Withanolides, a new class of natural cholinesterase inhibitors with calcium antagonistic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 276–287.

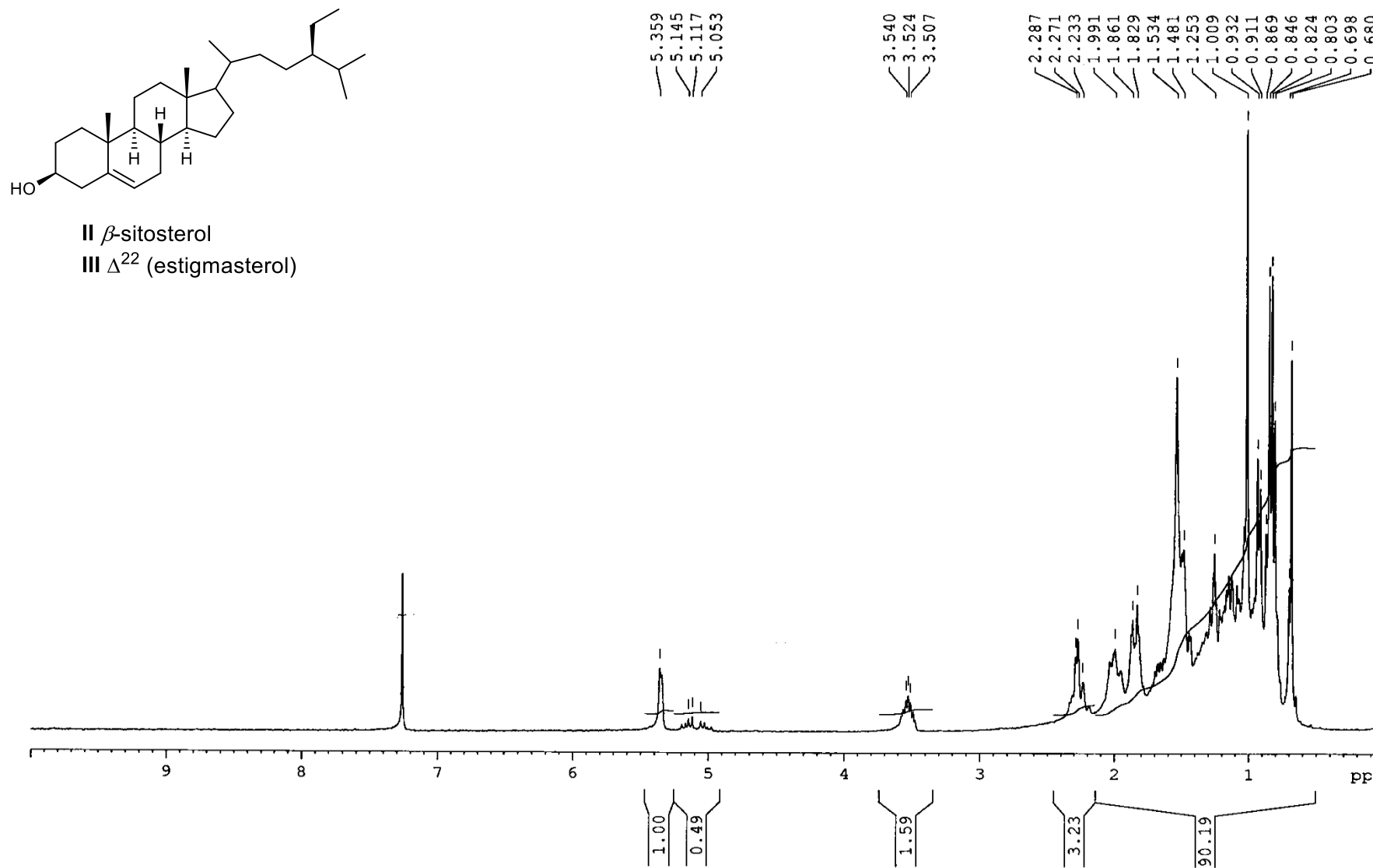
9. ESPECTROSCOPIA



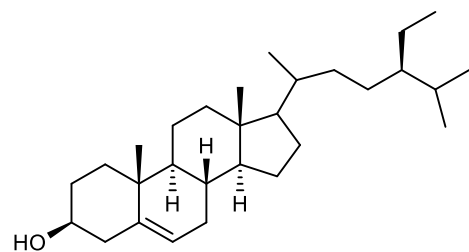
Espectro 1. RMN ^1H del β,β -caroteno (I) (300 MHz, CDCl_3).



Espectro 2. RMN ^{13}C del β,β -caroteno (I) (75 MHz, CDCl_3).

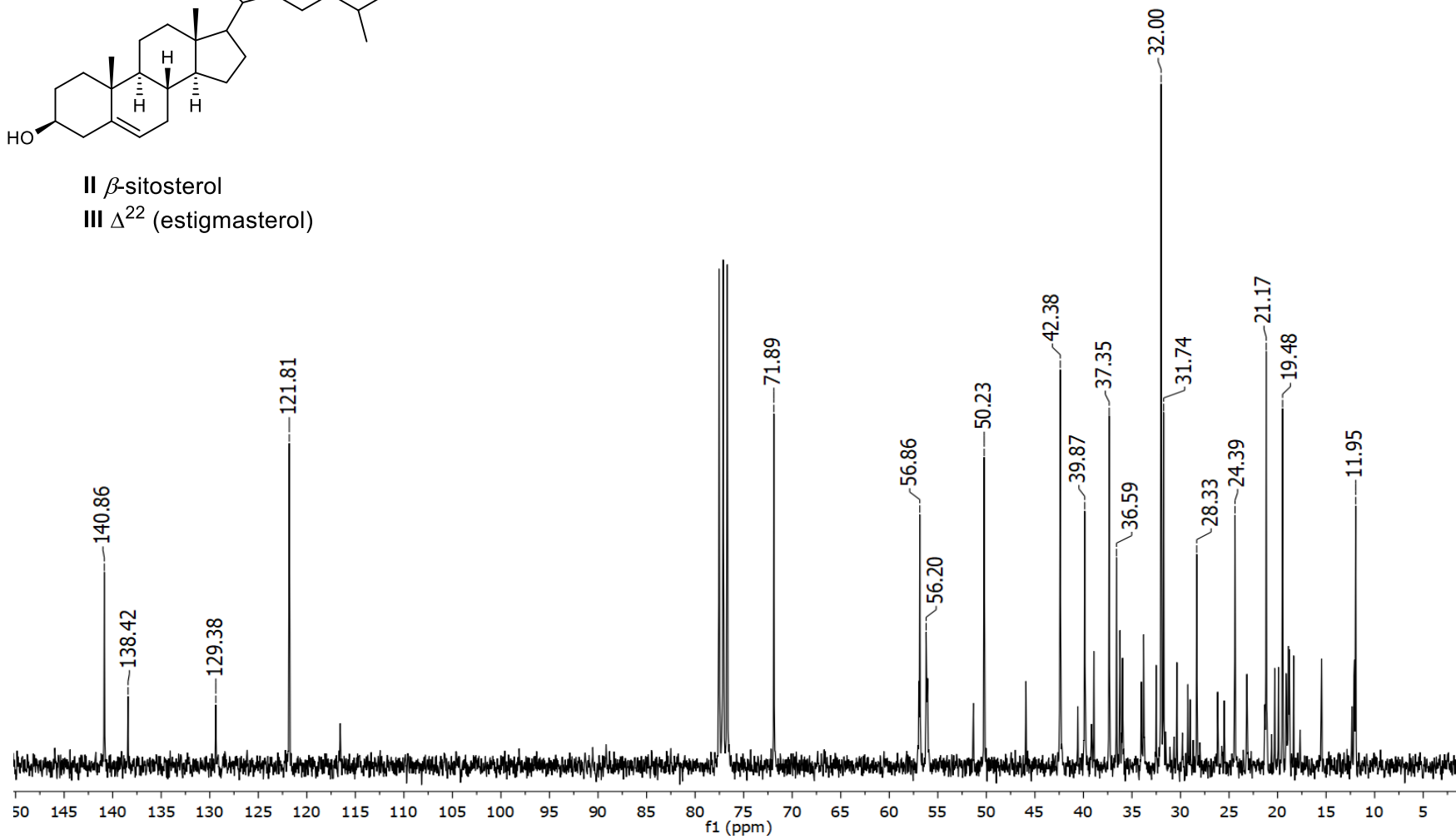


Espectro 3. RMN ^1H de la mezcla de β -sitosterol (II) y stigmasterol (III) (300 MHz, CDCl_3).

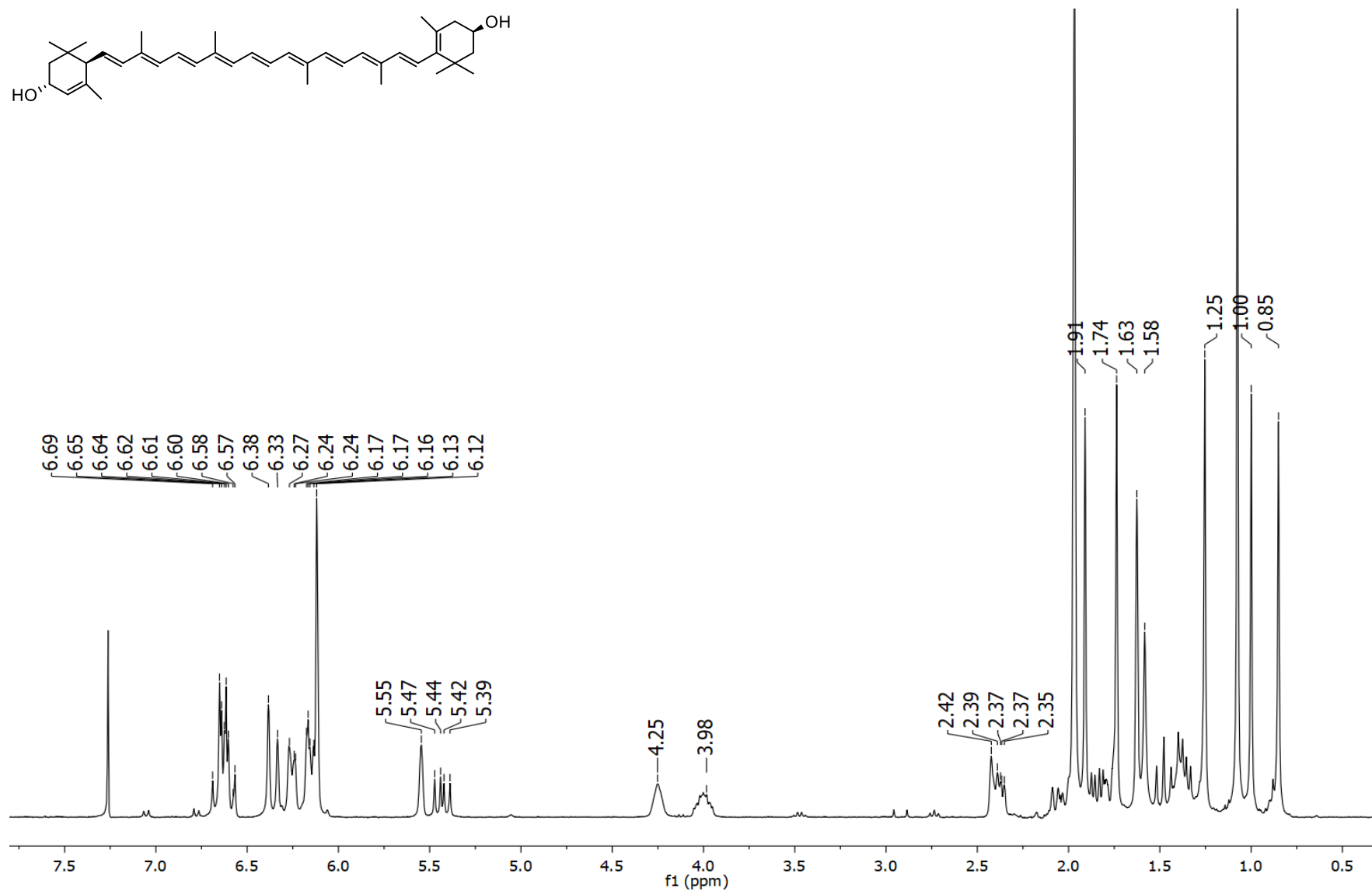
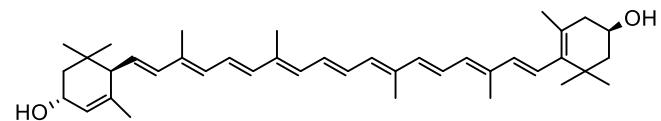


II β -sitosterol

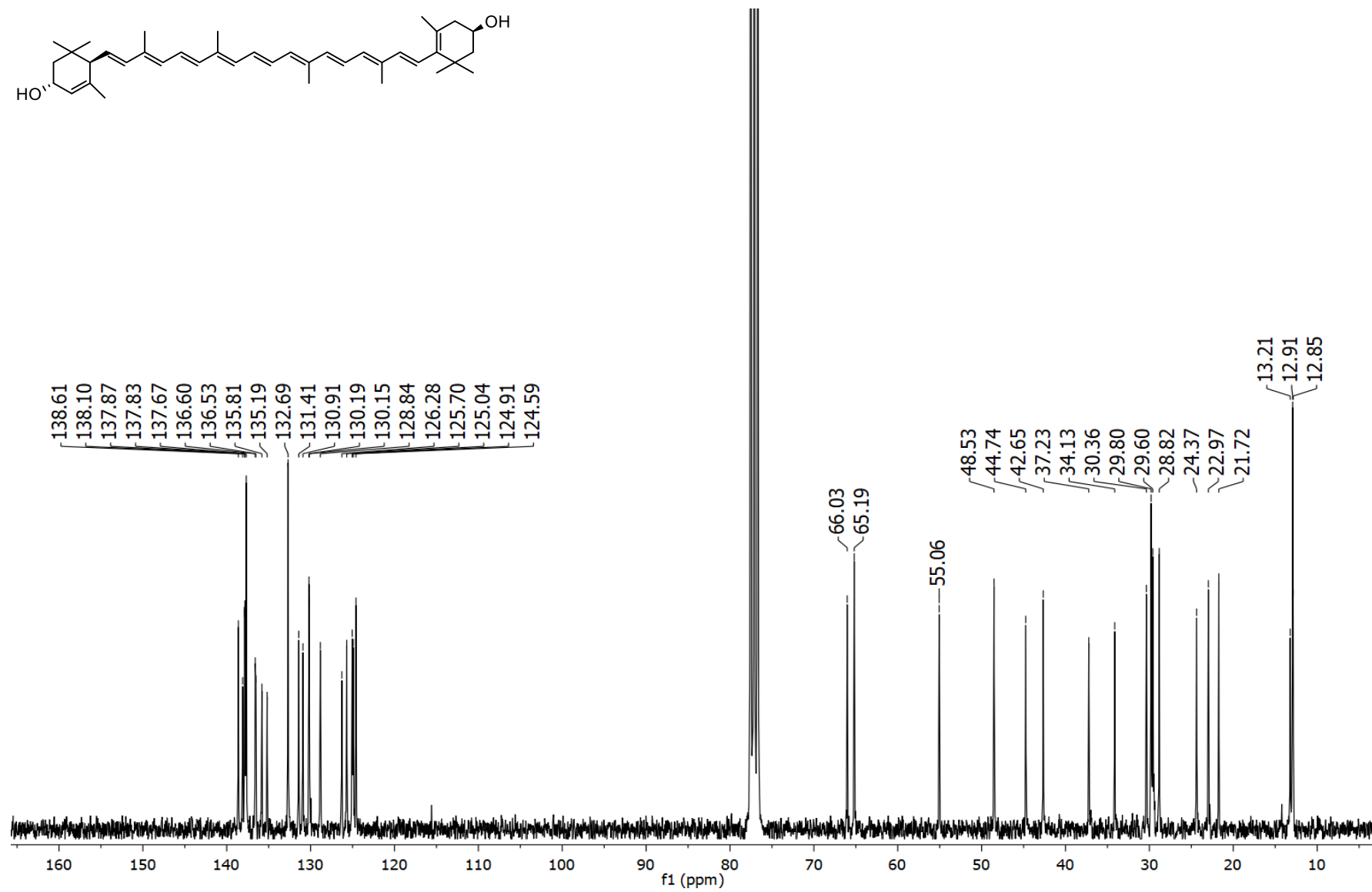
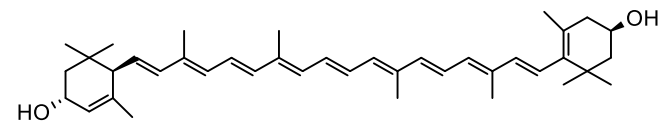
III Δ^{22} (estigmasterol)



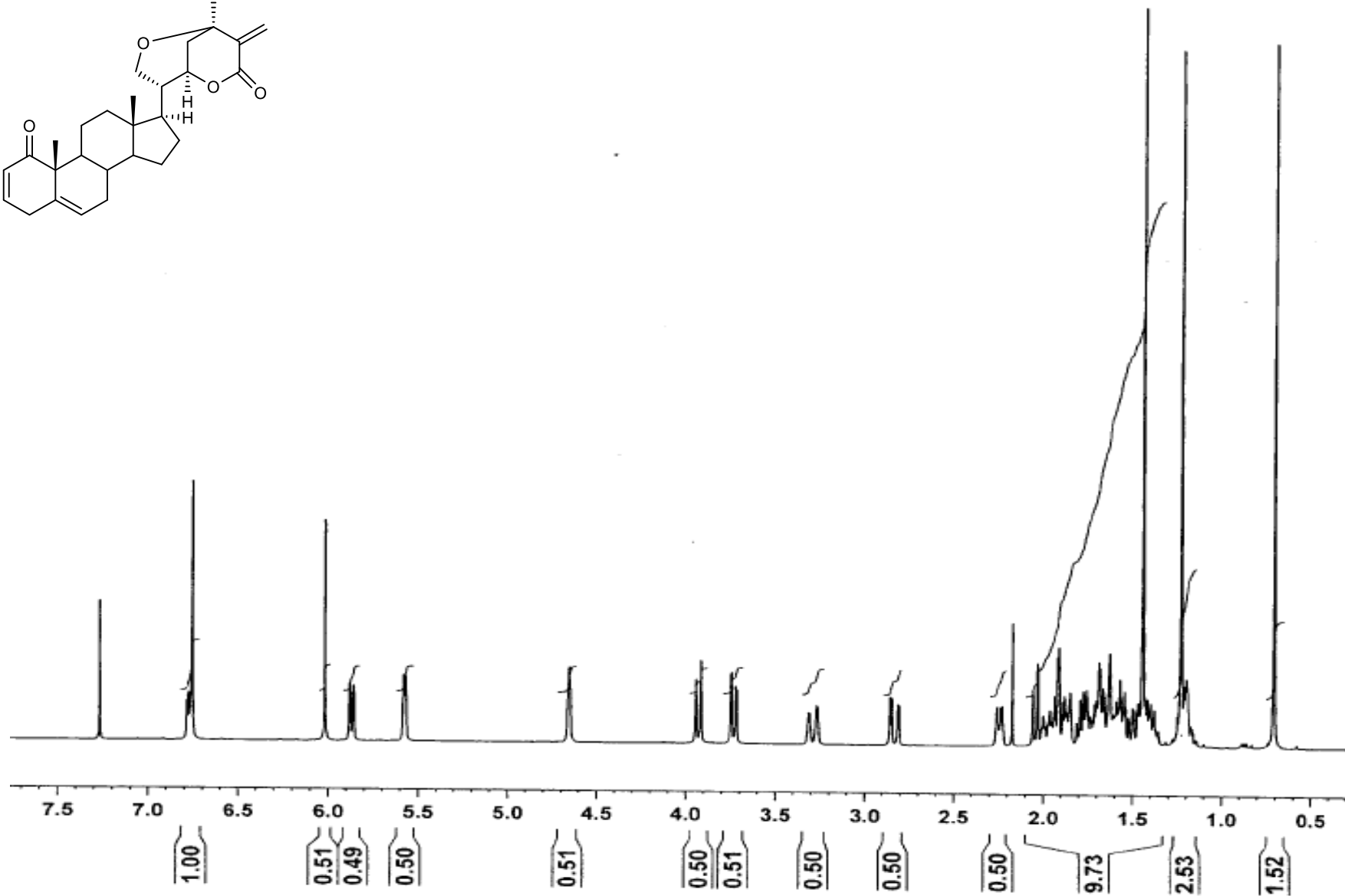
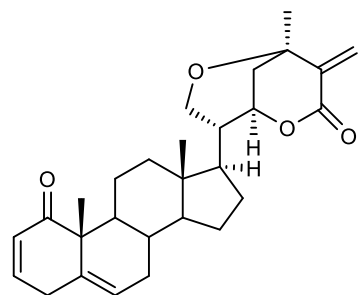
Espectro 4. RMN ^{13}C de la mezcla de β -sitosterol (II) y estigmasterol (III) (75 MHz, CDCl_3).



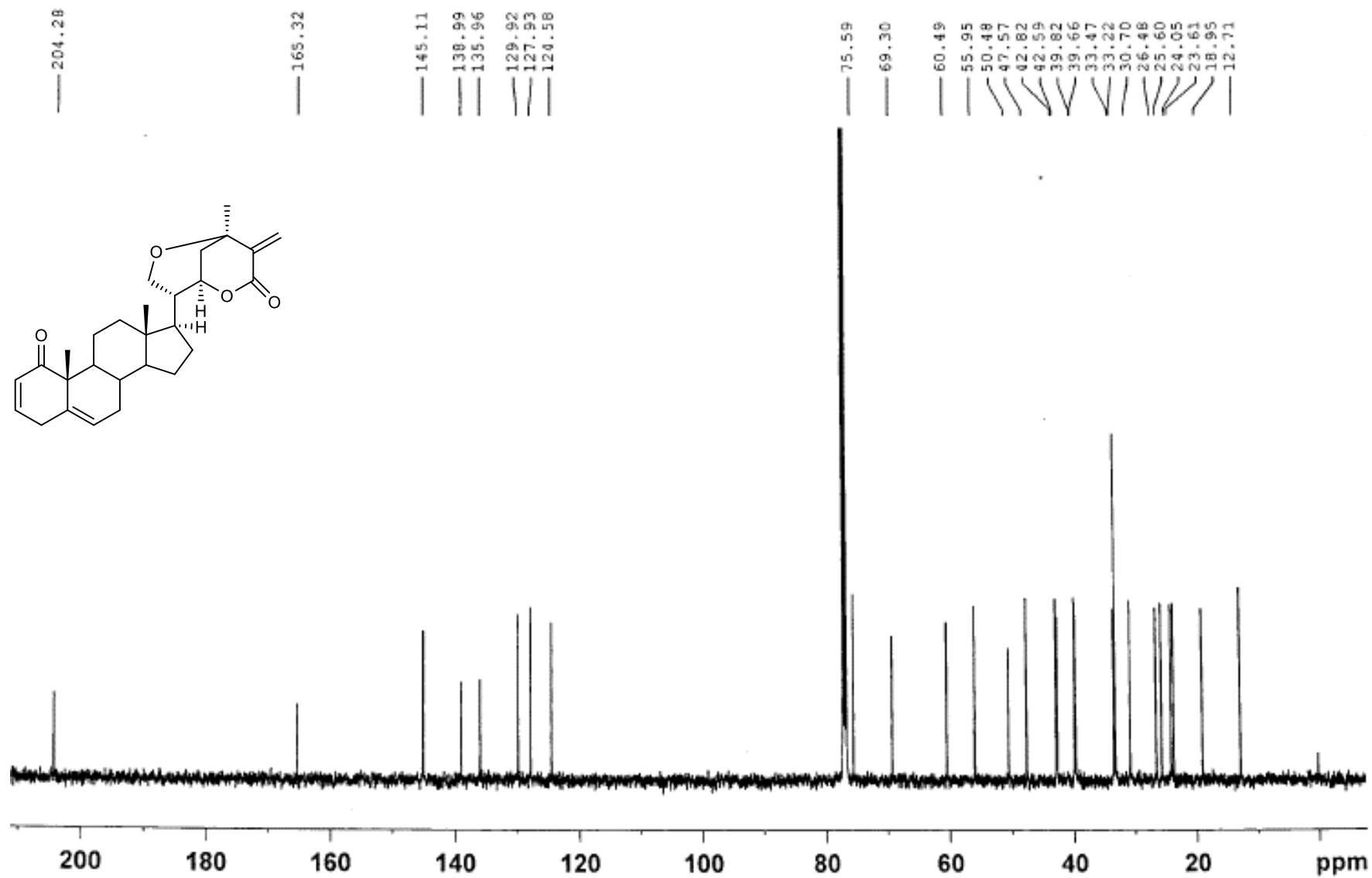
Espectro 5. RMN ^1H de la luteína (IV) (300 MHz, CDCl_3).



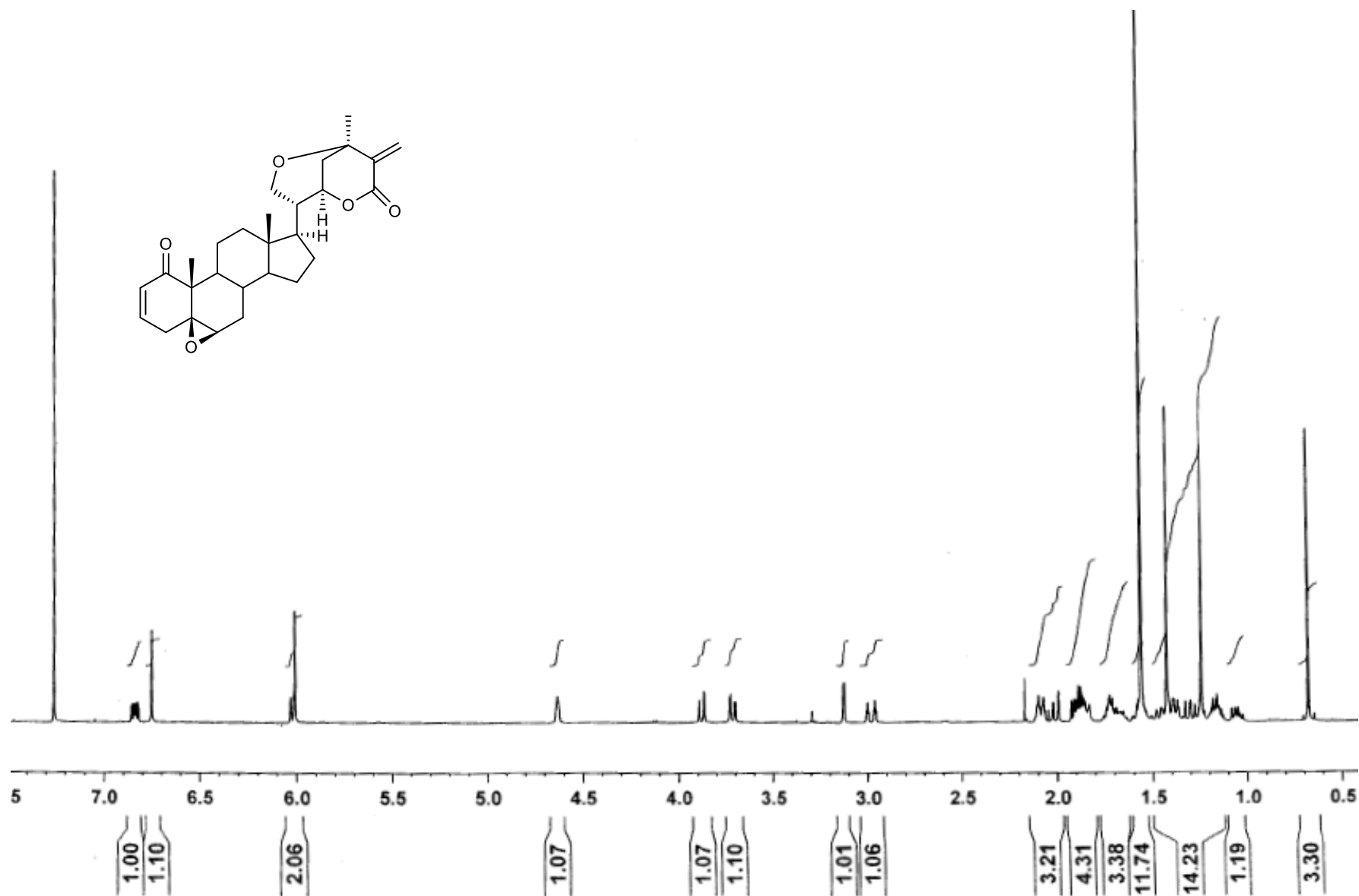
Espectro 6. RMN ^{13}C de la luteína (IV) (75 MHz, CDCl_3).



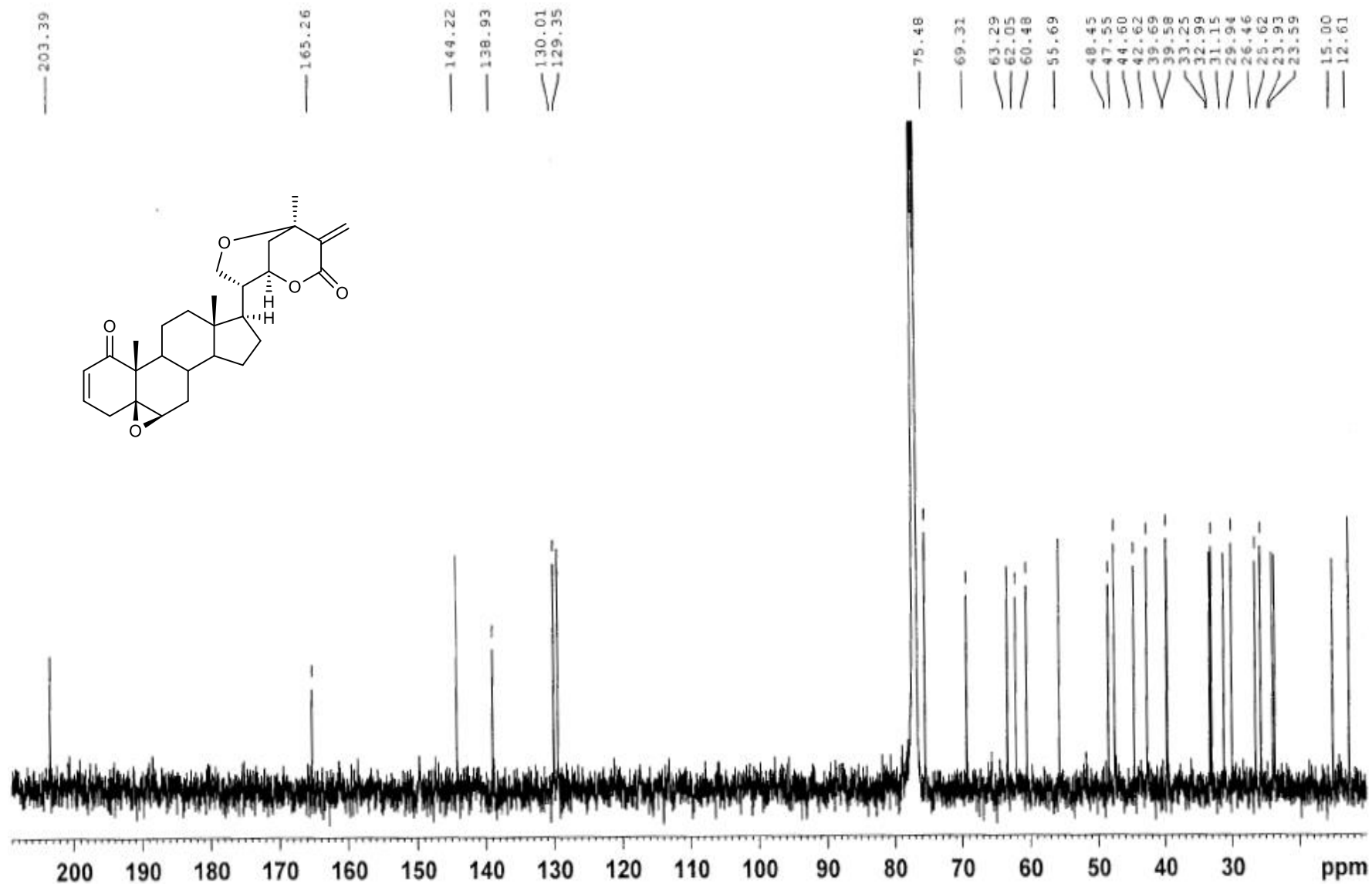
Espectro 7. RMN ^1H de la withametelina (**V**) (500 MHz, CDCl_3).



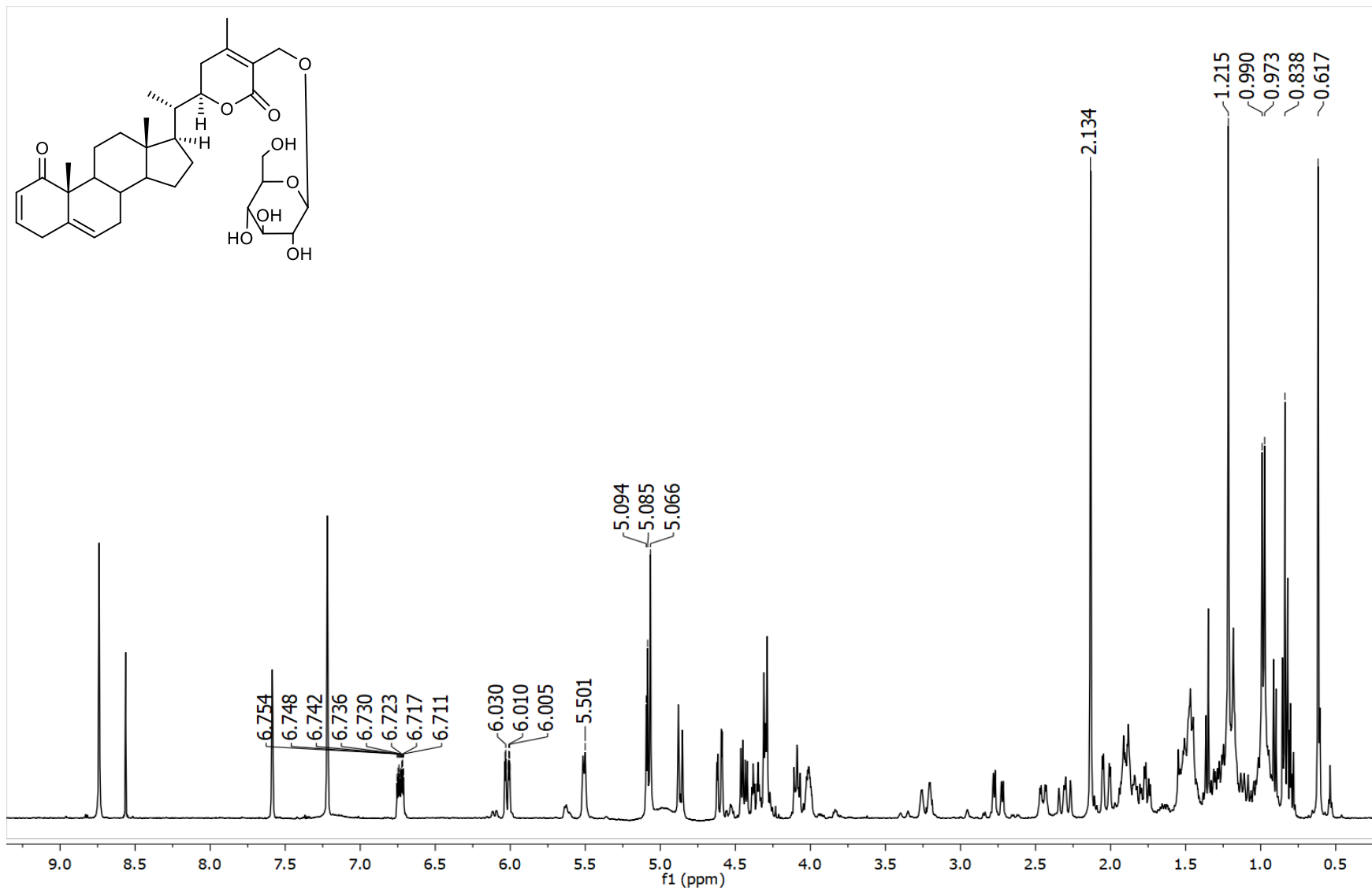
Espectro 8. RMN ¹³C de la withametelina (V) (125 MHz, CDCl₃).



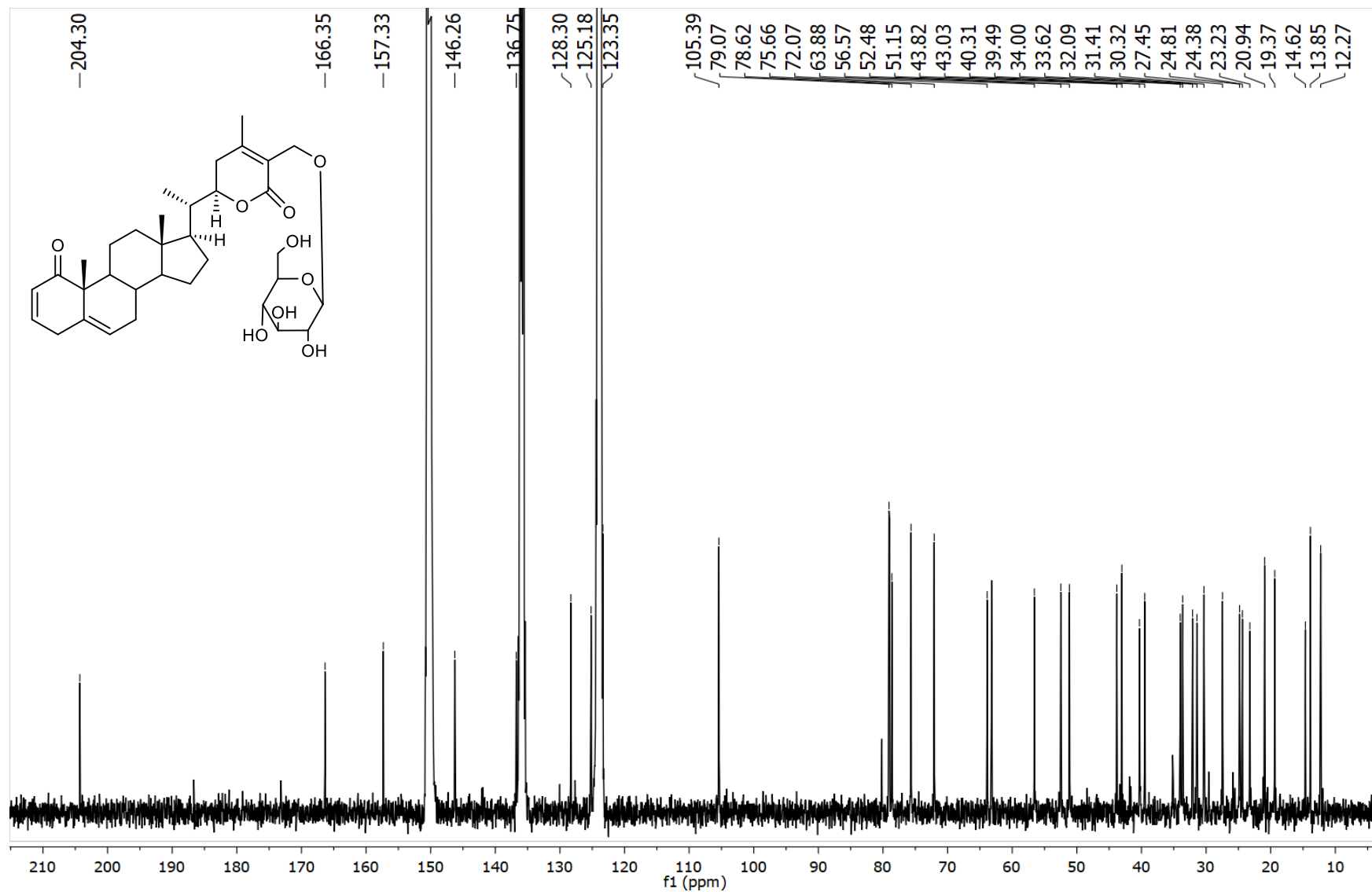
Espectro 9. RMN ^1H de la withametelina F (VI) (500 MHz, CDCl_3).



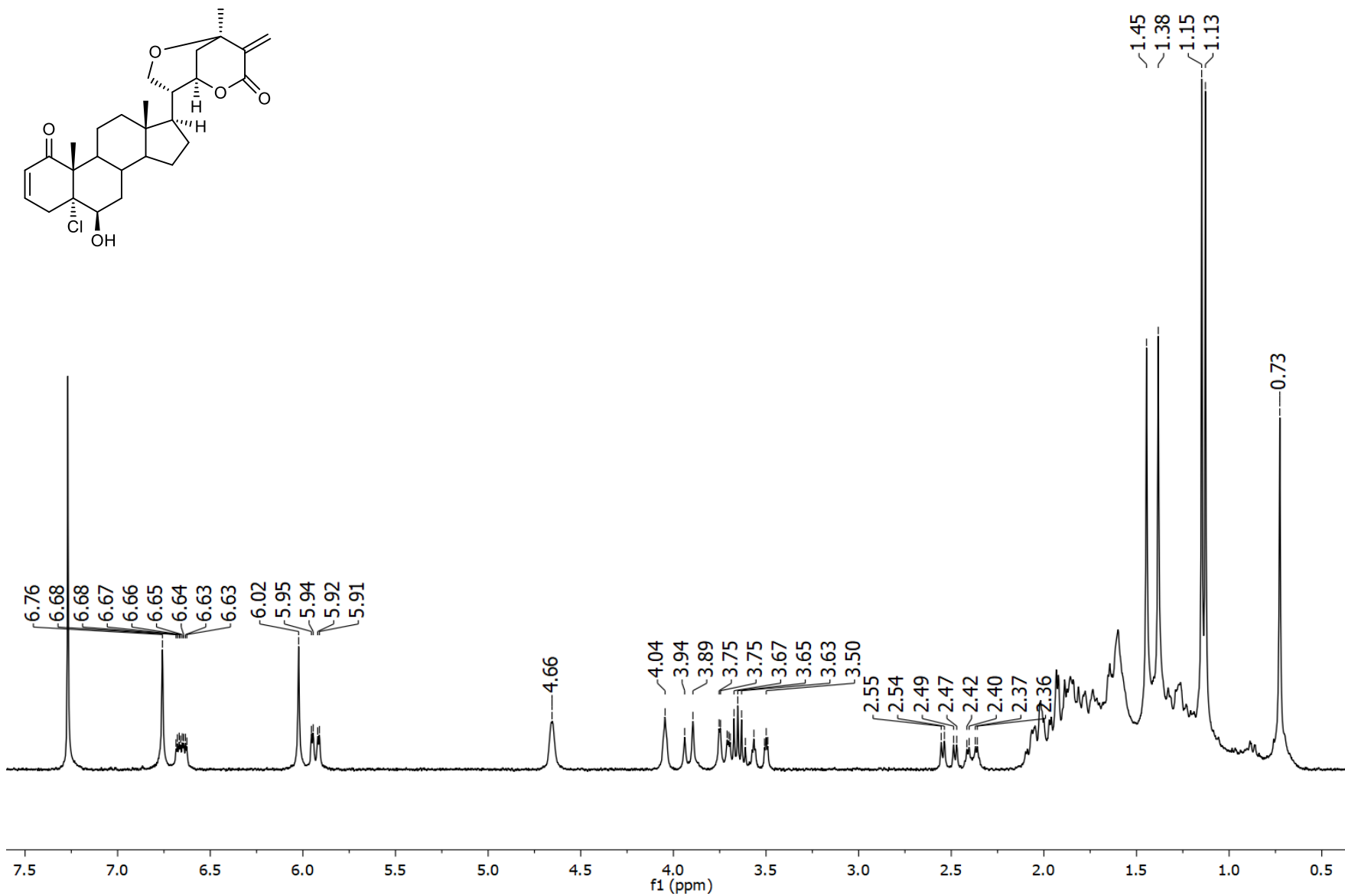
Espectro 10. RMN ^{13}C de la withametelina F (VI) (125 MHz, CDCl_3).



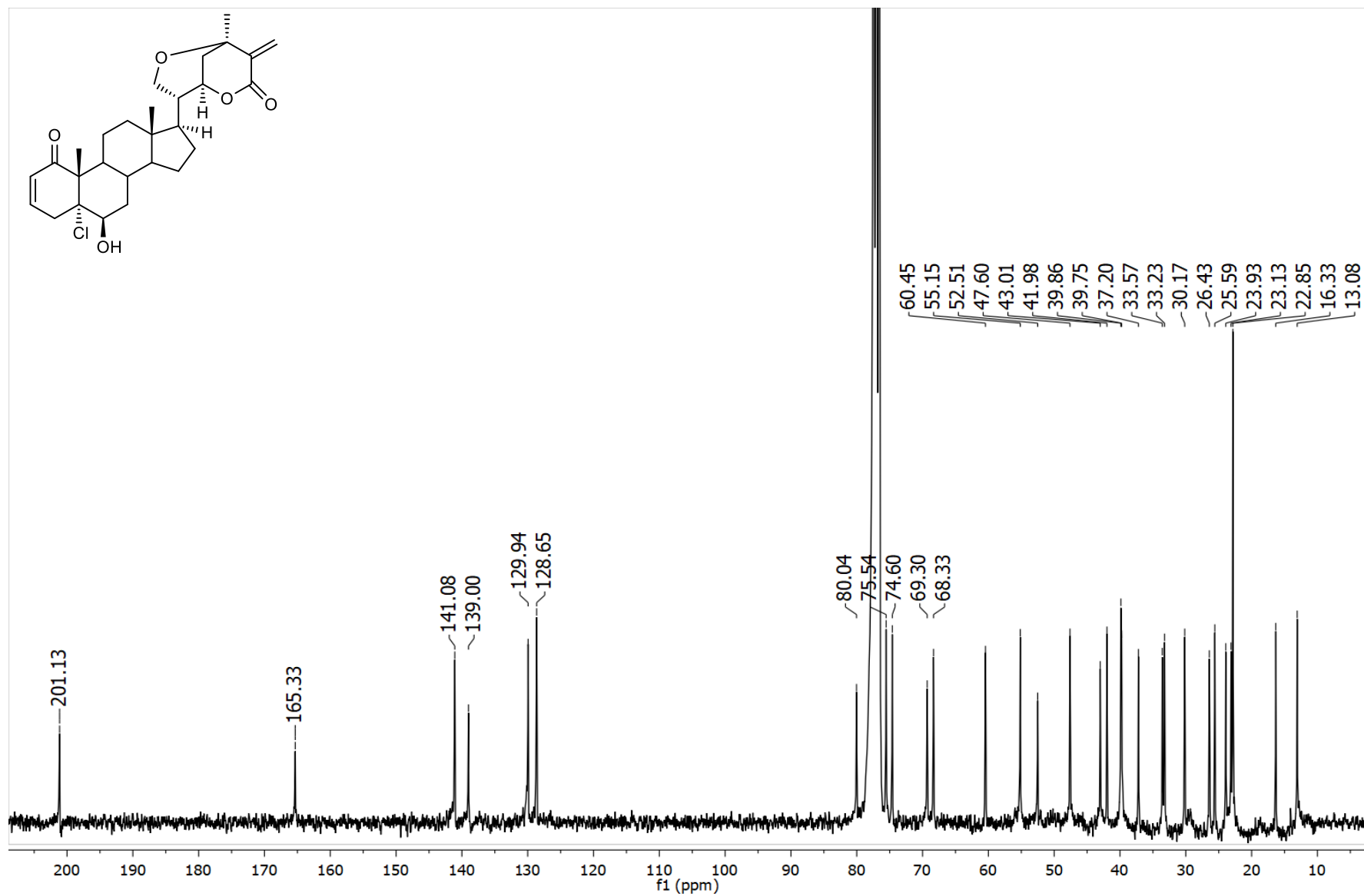
Espectro 11. RMN ¹H de la daturametelina A (VIII) (400 MHz, C₅D₅N).



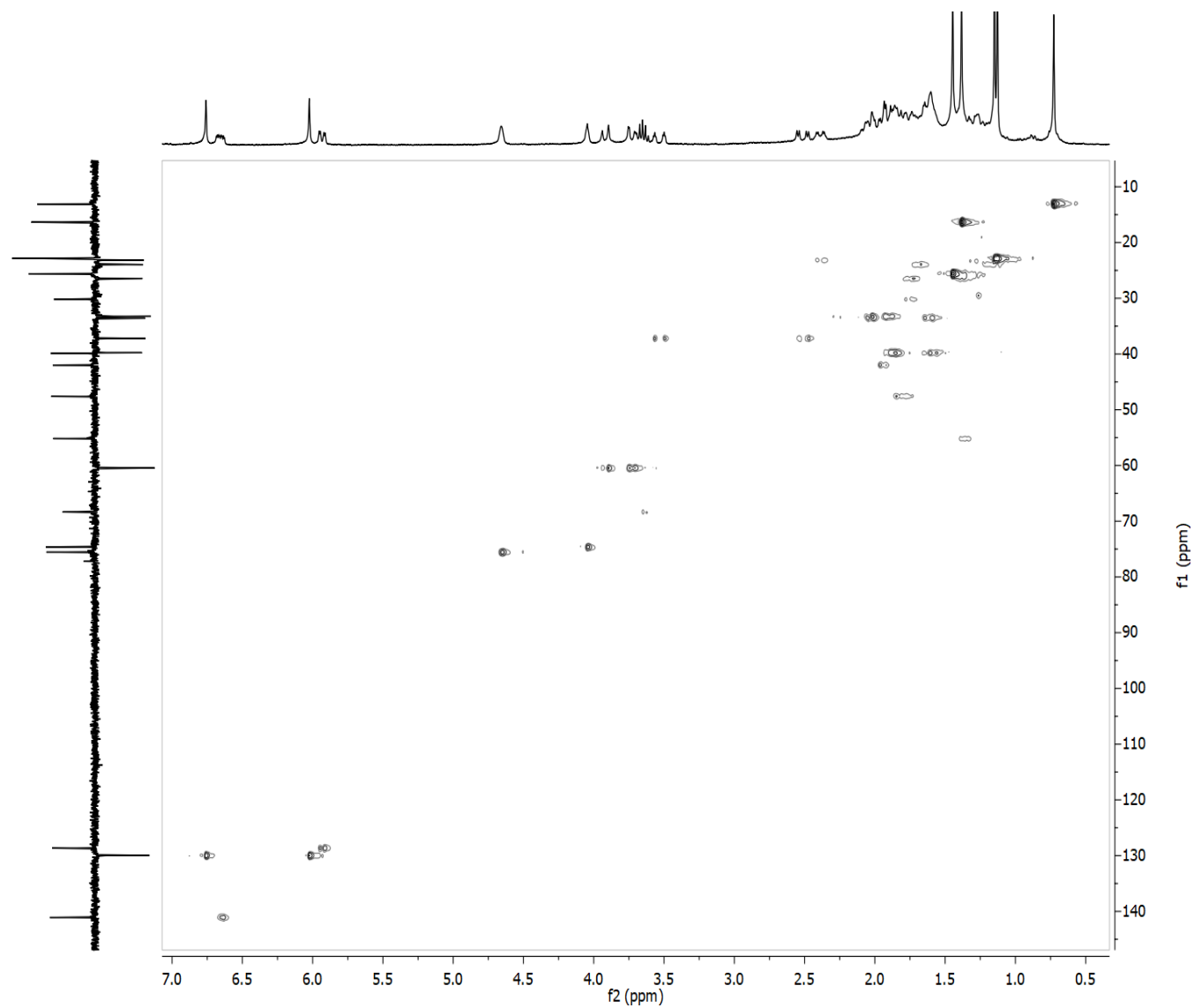
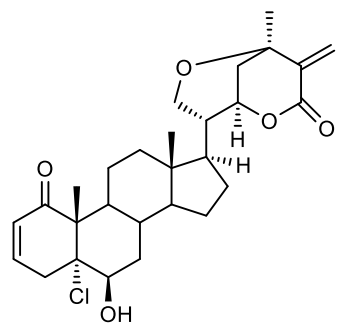
Espectro 12. RMN ^{13}C de la daturametelina A (VIII) (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).



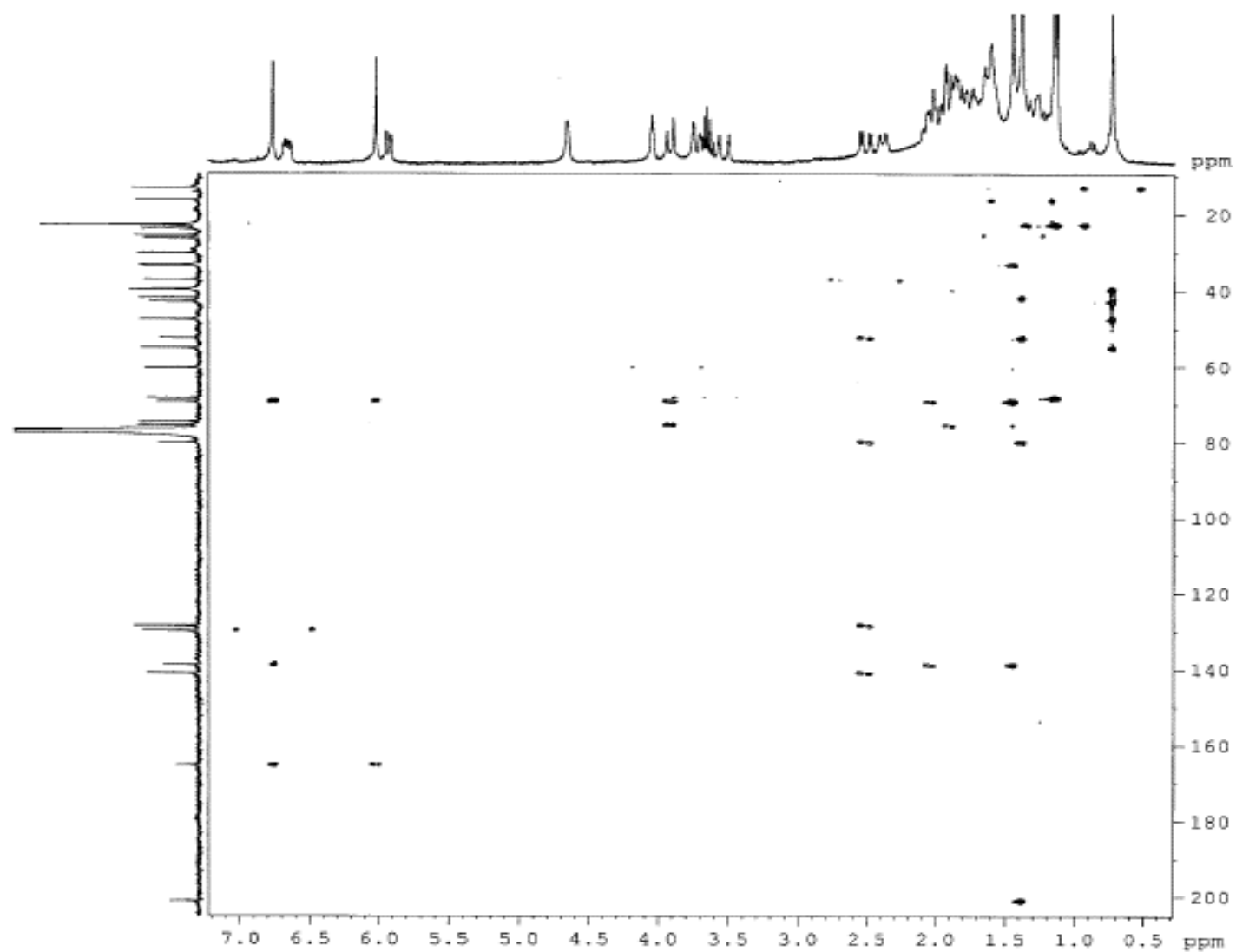
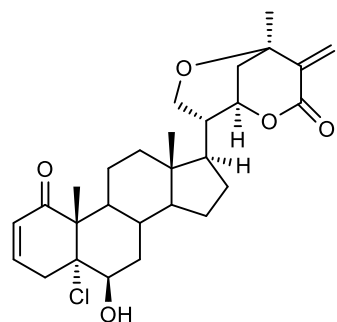
Espectro 13. RMN ¹H de la datucerólida A (X) (300 MHz, CDCl₃).



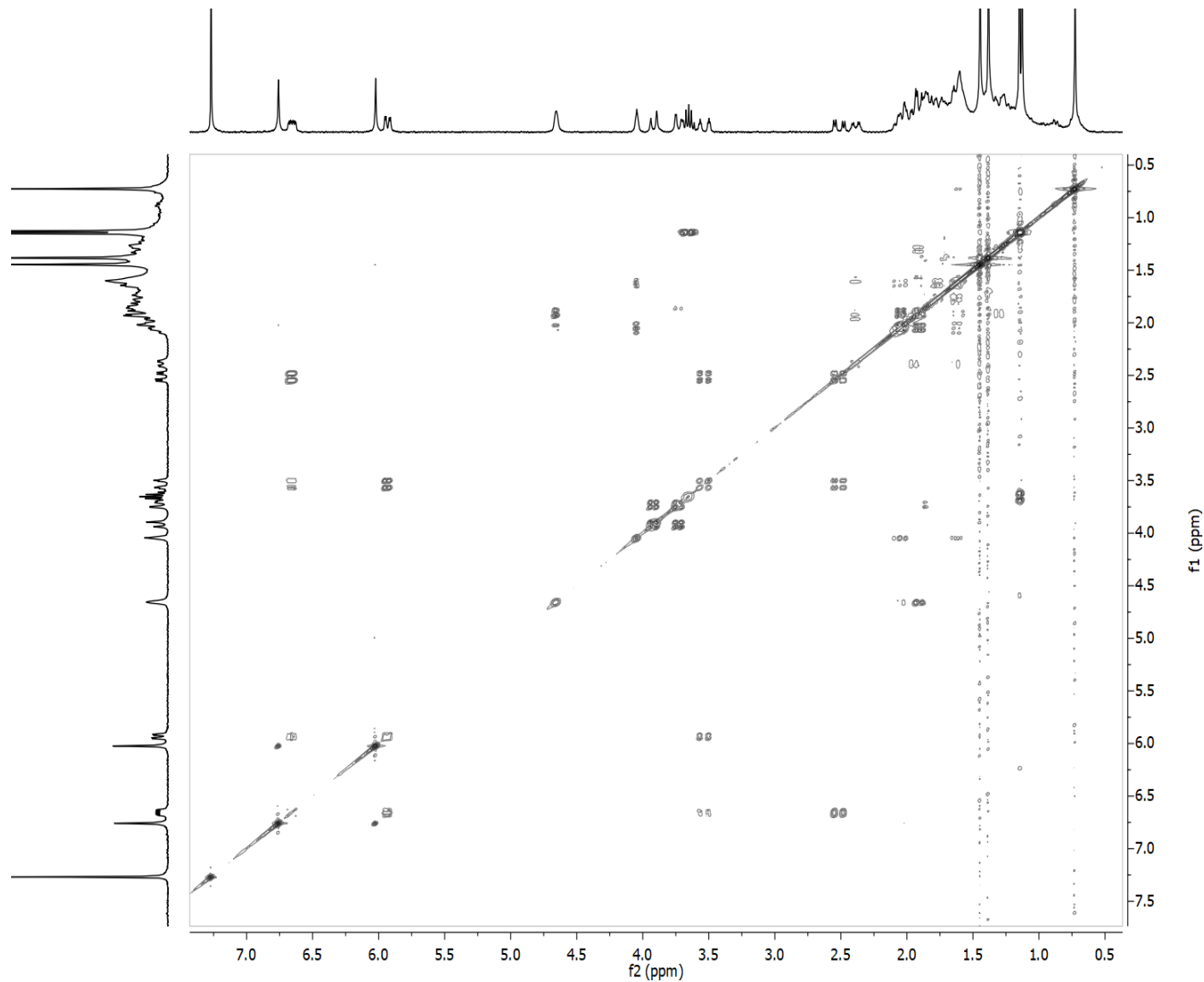
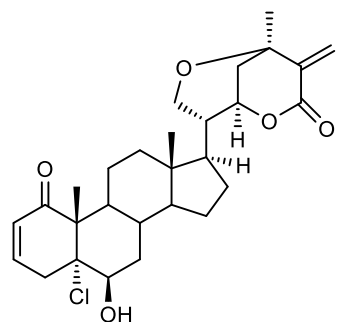
Espectro 14. RMN ^{13}C de la datucerólida A (X) (75 MHz, CDCl_3).



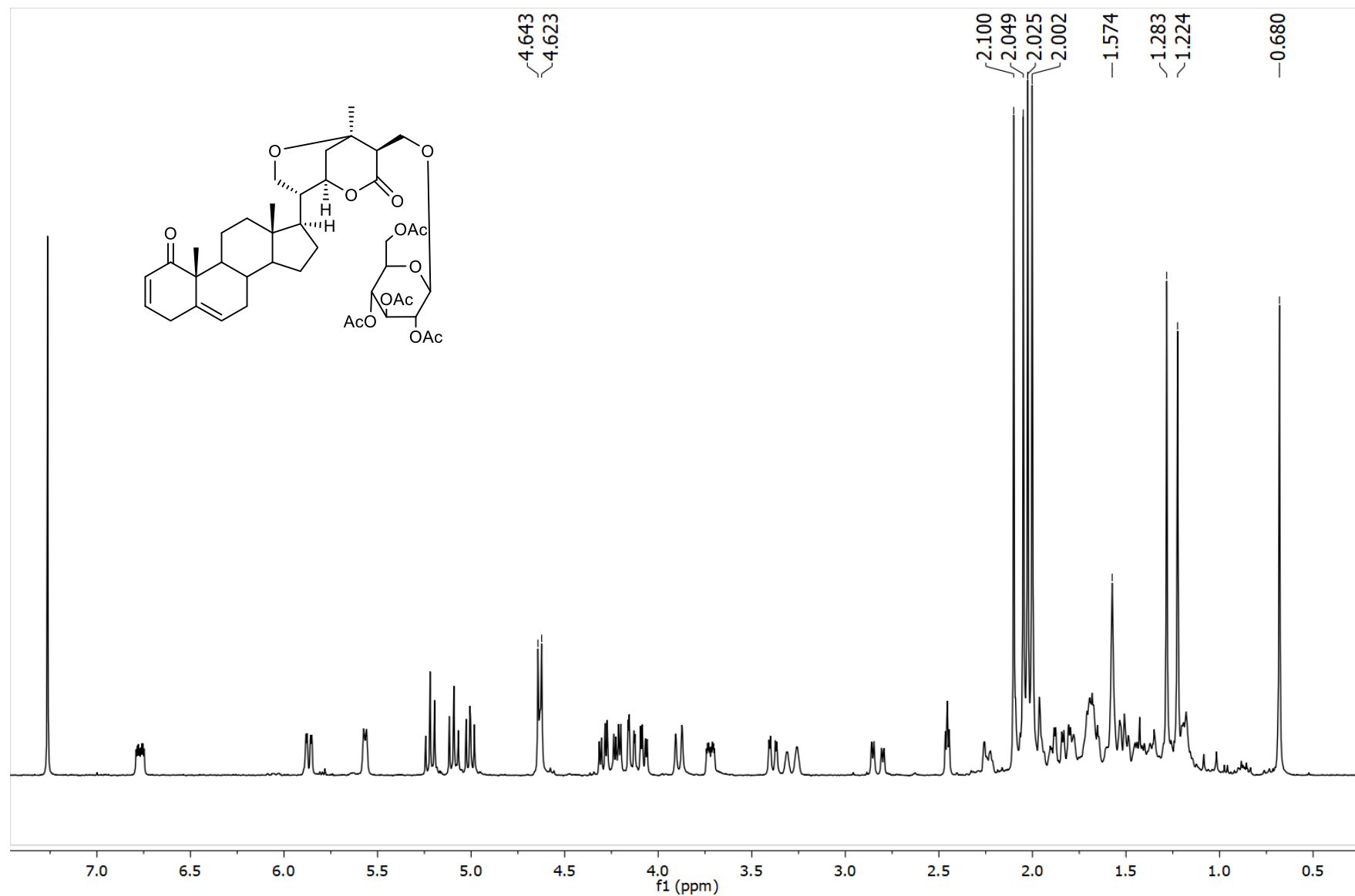
Espectro 15. HSQC de la datucerólida A (X).



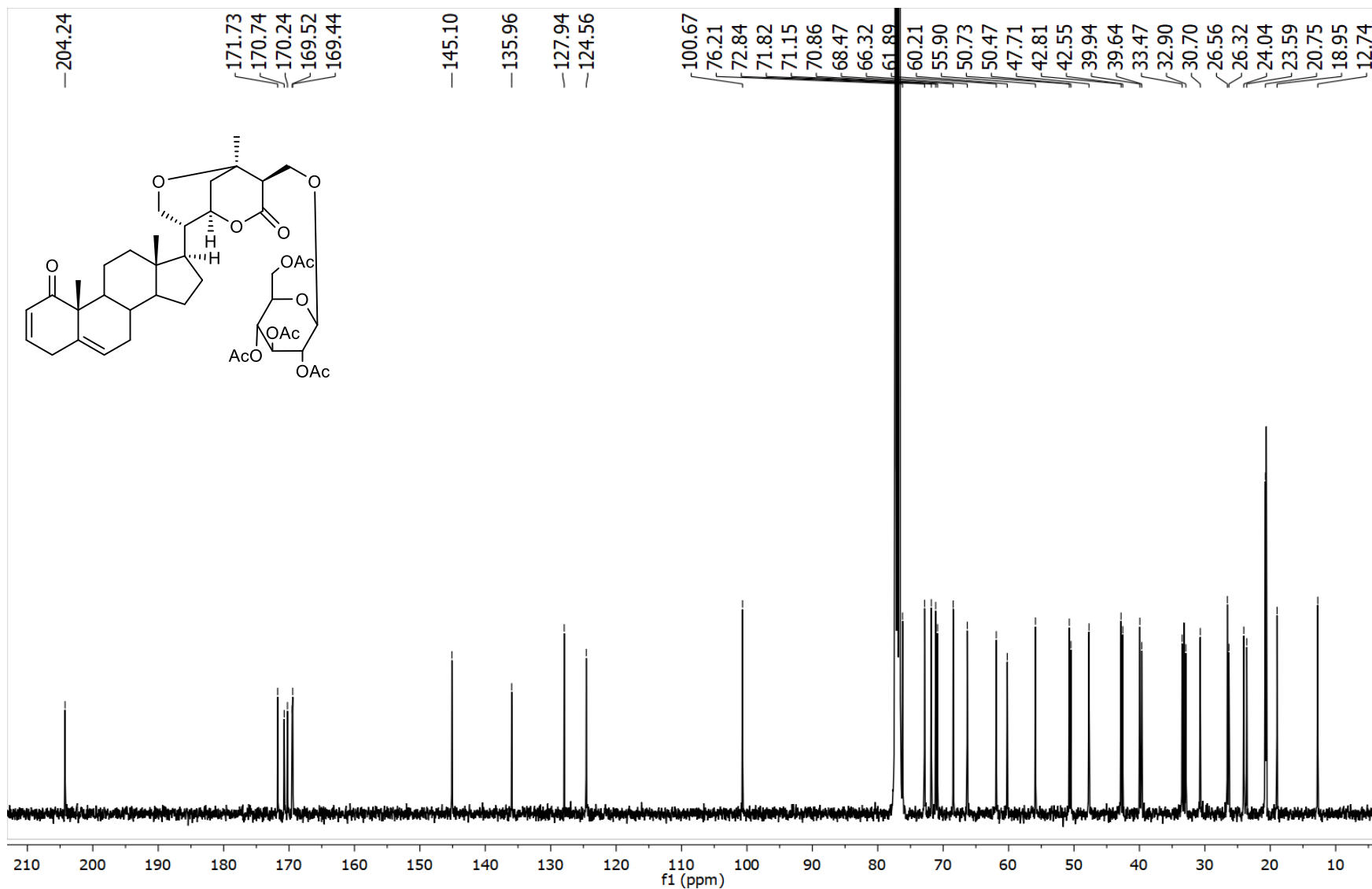
Espectro 16. HMBC de la datucerólida A (X).



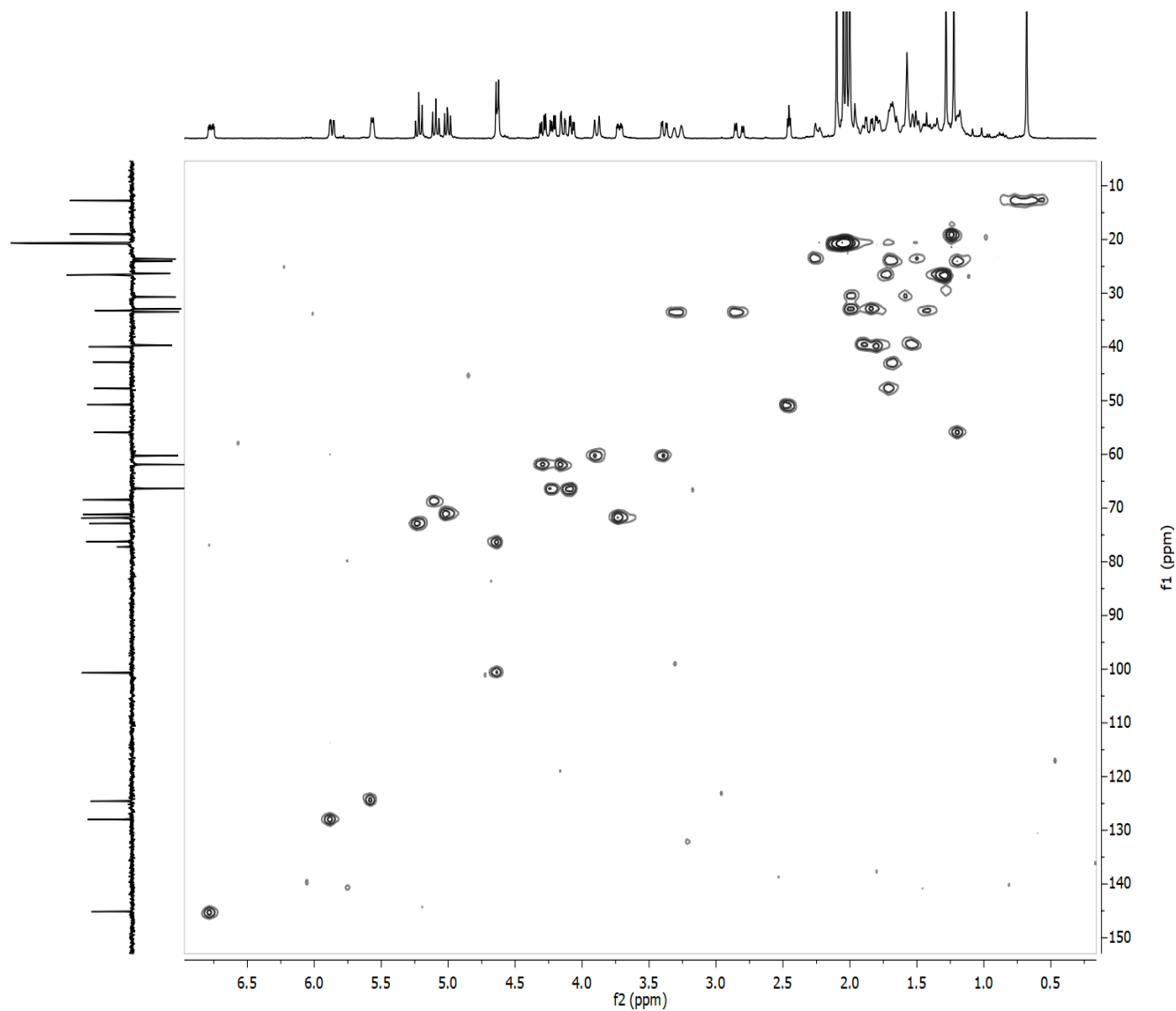
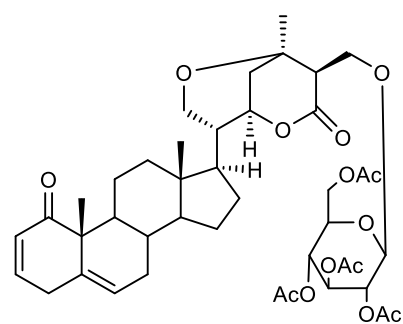
Espectro 17. COSY de la datucerólida A (X).



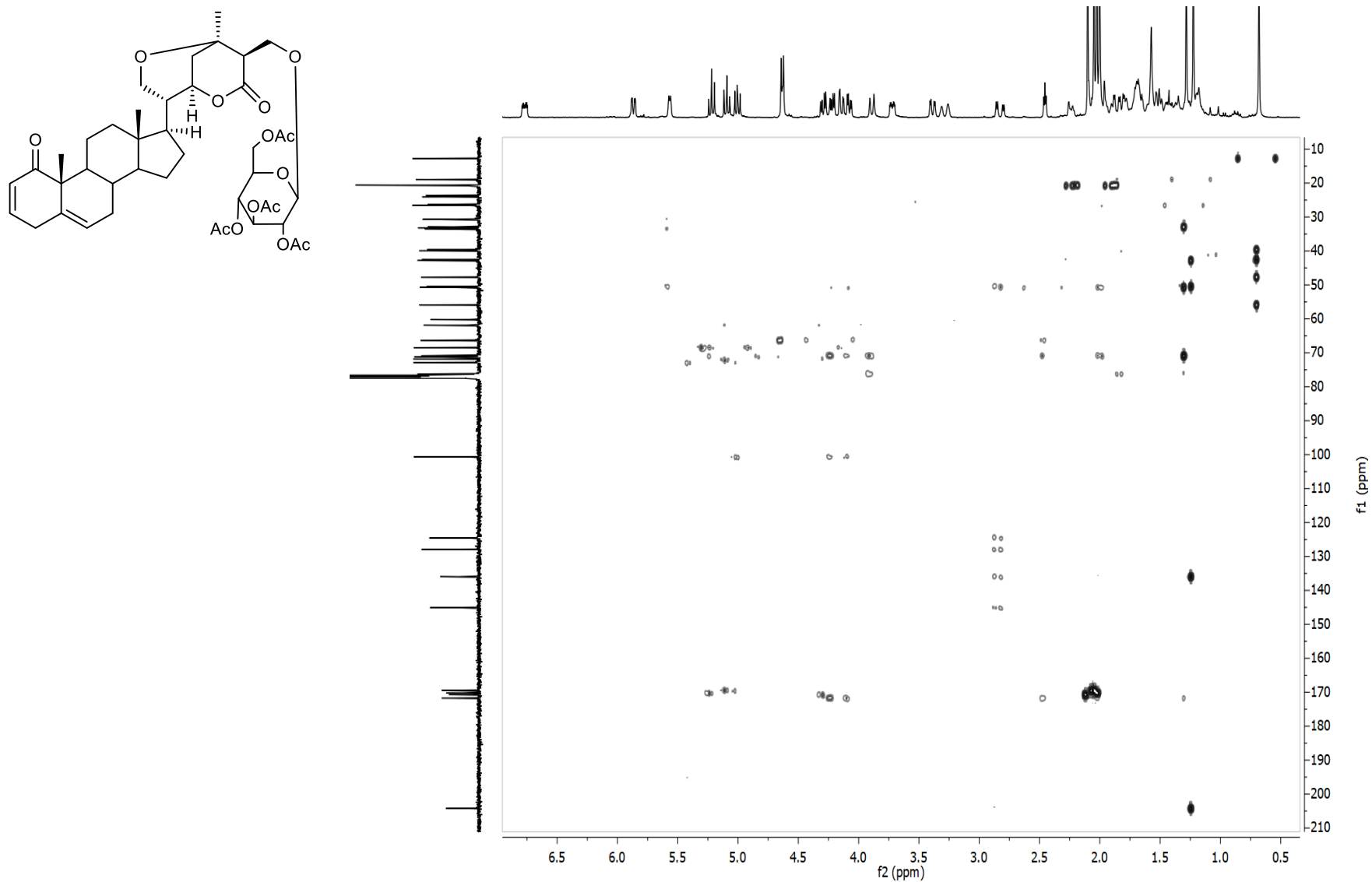
Espectro 18. RMN ¹H de la tetraacetildatucerólida B (XI) (400 MHz, CDCl₃).



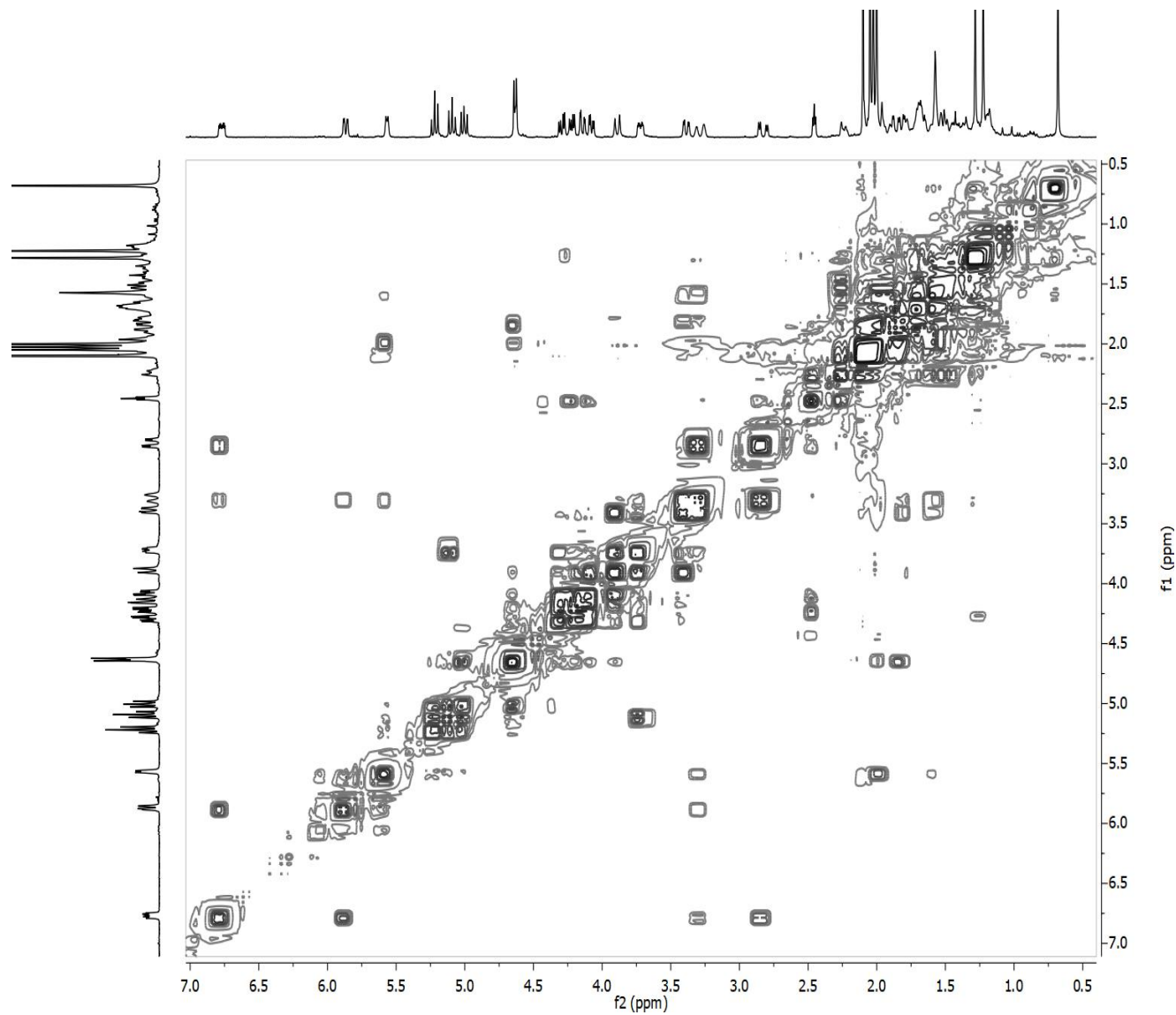
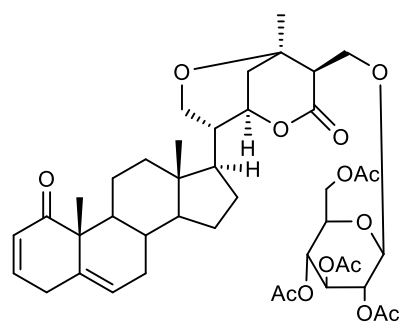
Espectro 19. RMN ^{13}C de la tetraacetildatucerólida B (XI) (100 MHz, CDCl_3).



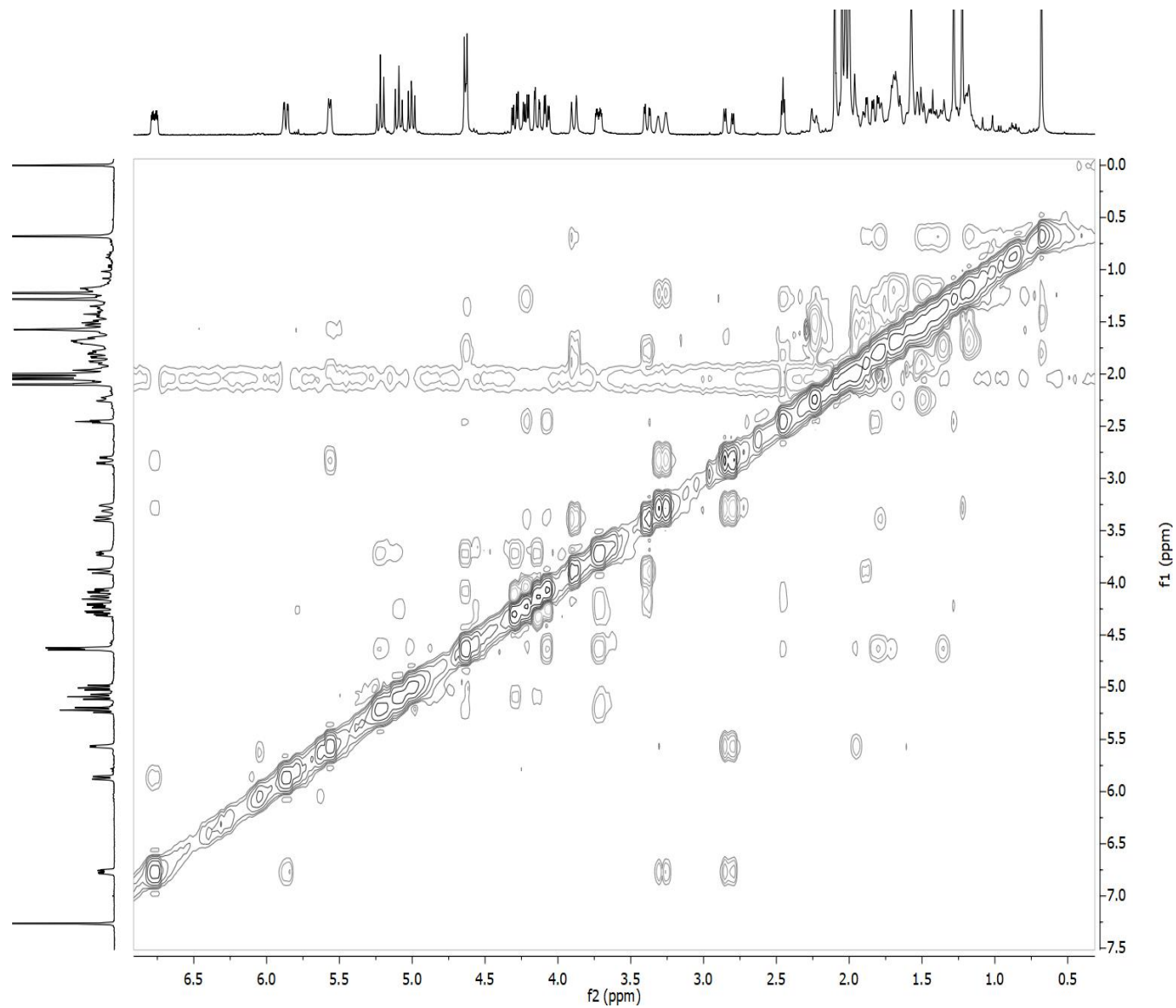
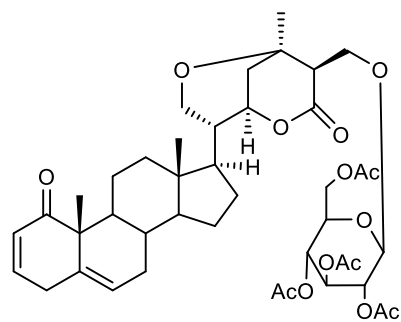
Espectro 20. HSQC de la tetraacetildatucerólida B (XI).



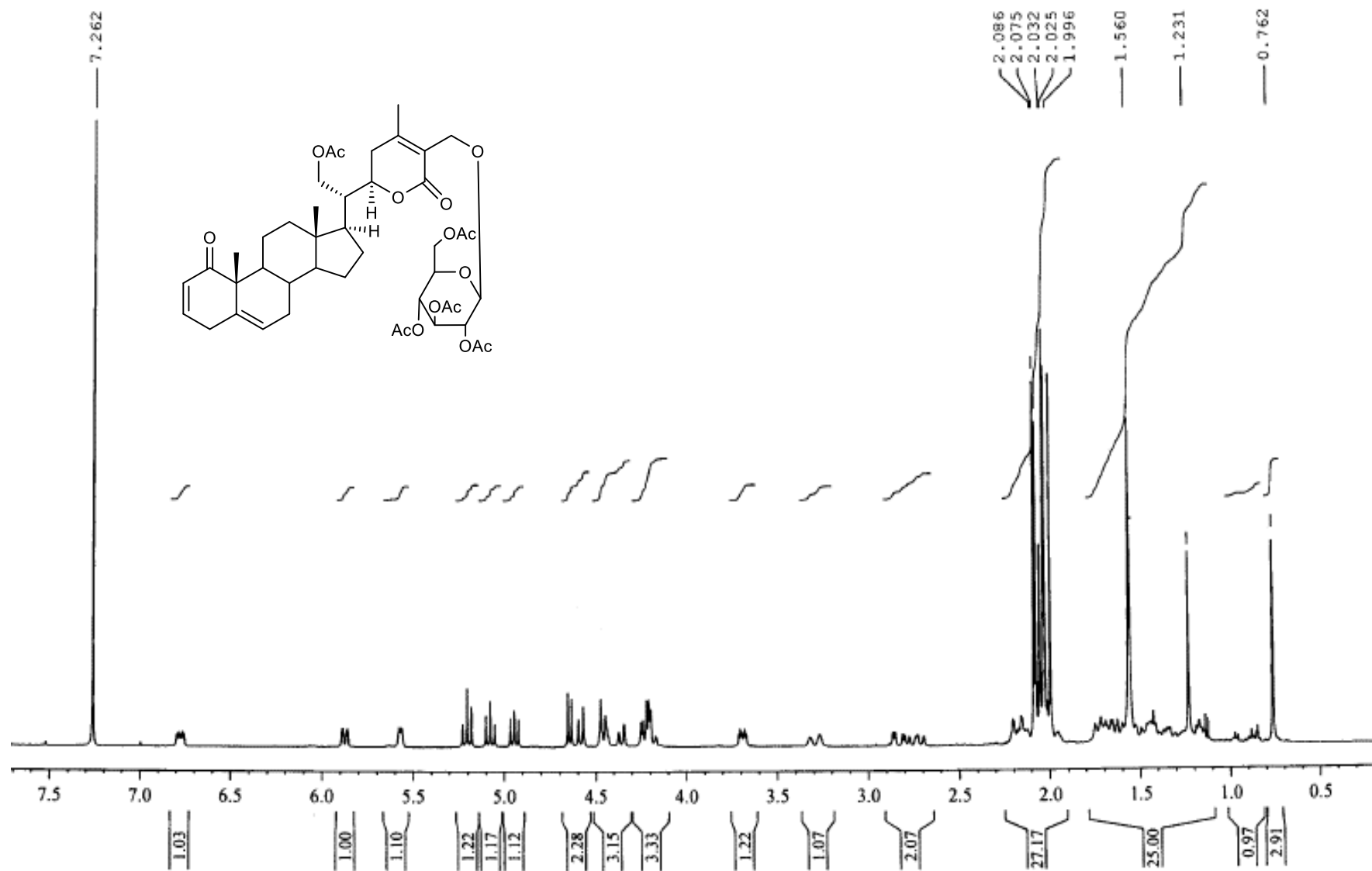
Espectro 21. HMBC de la tetraacetildatucerólida B (XI).



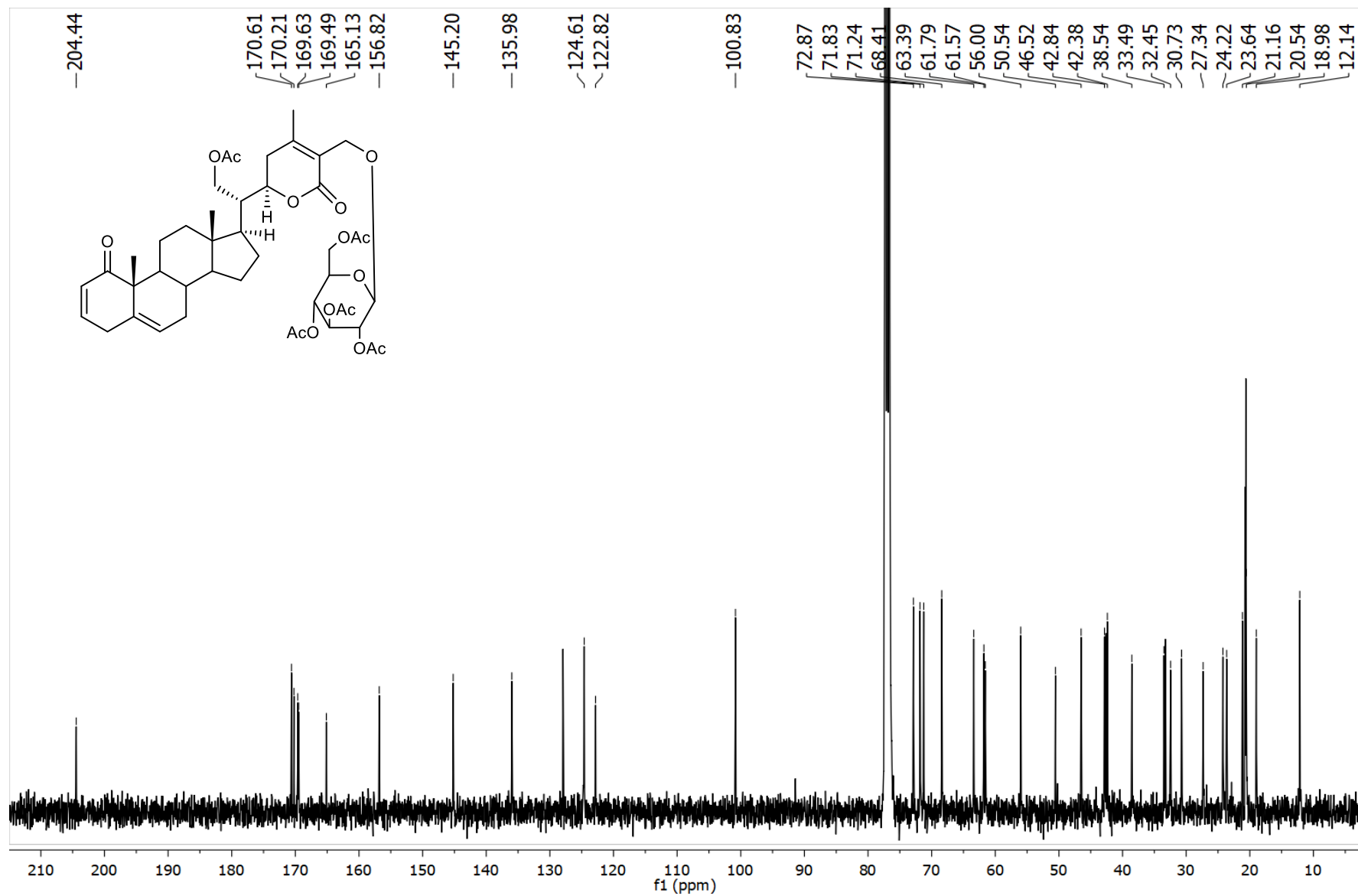
Espectro 22. COSY de la tetraacetildatucerólida B (XI).



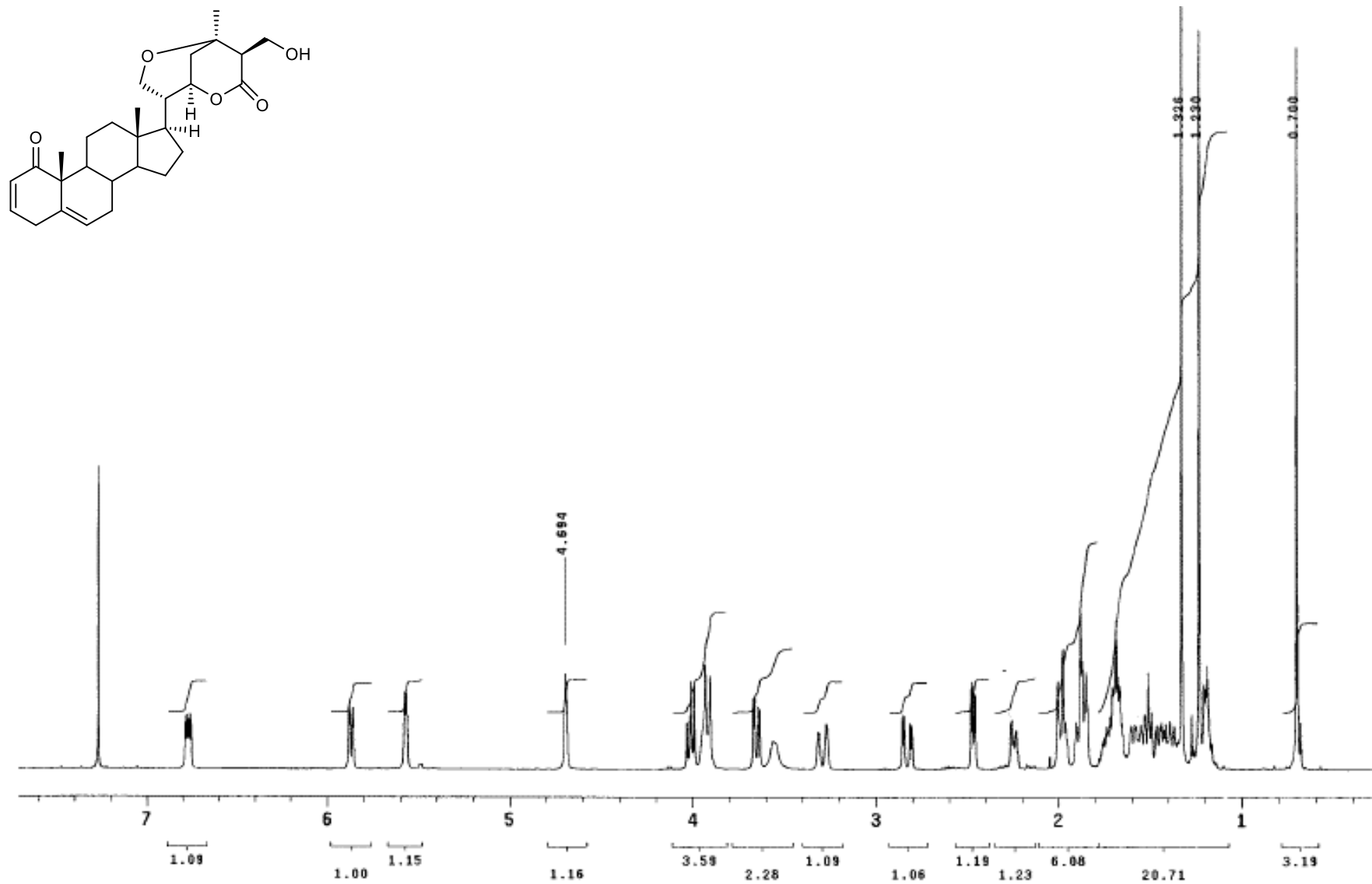
Espectro 23. NOESY de la tetraacetildatuceroída B (XI).



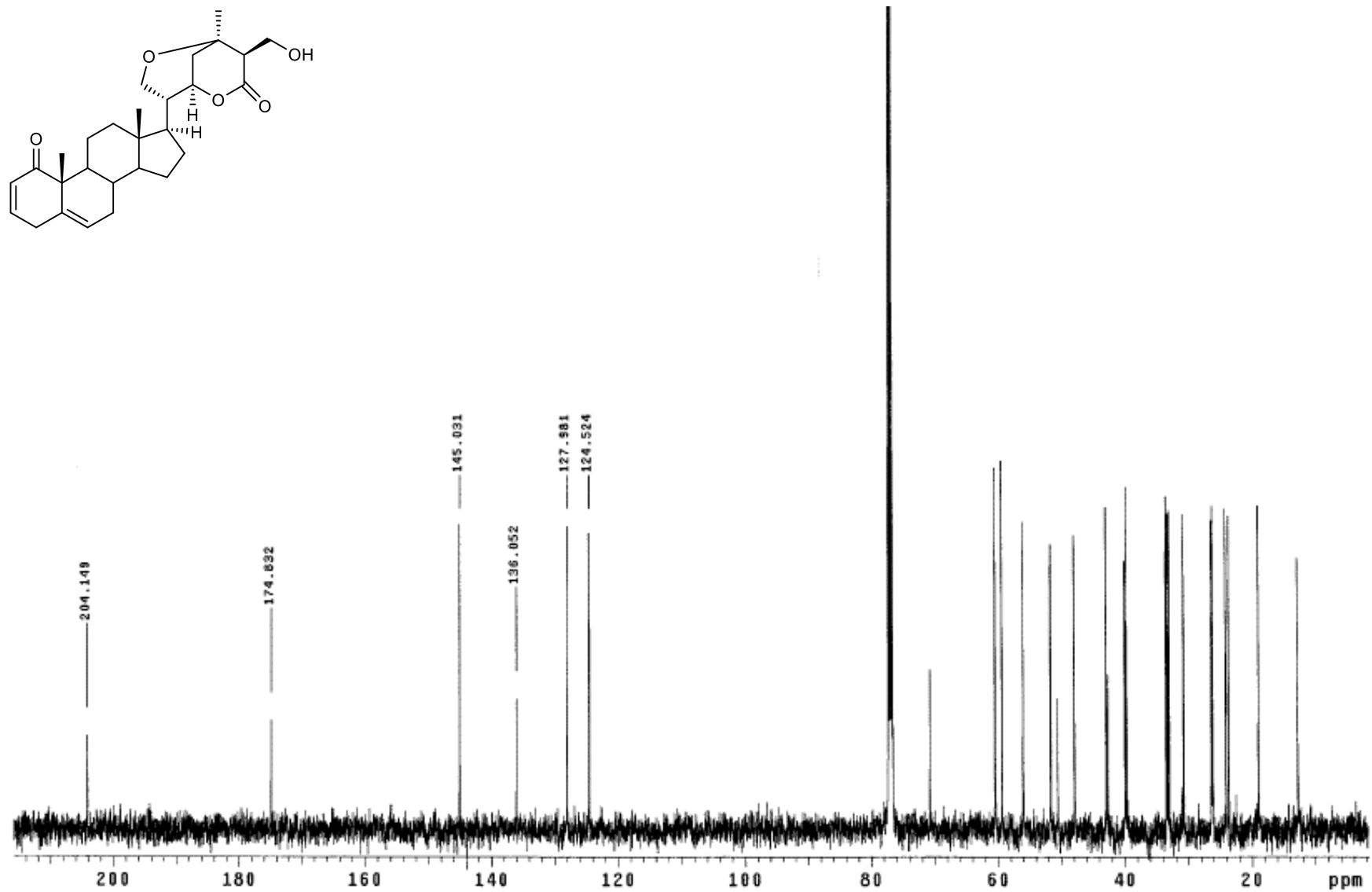
Espectro 24. RMN ¹H de la pentaacetildaturametelina B (XII) (400 MHz, CDCl₃).



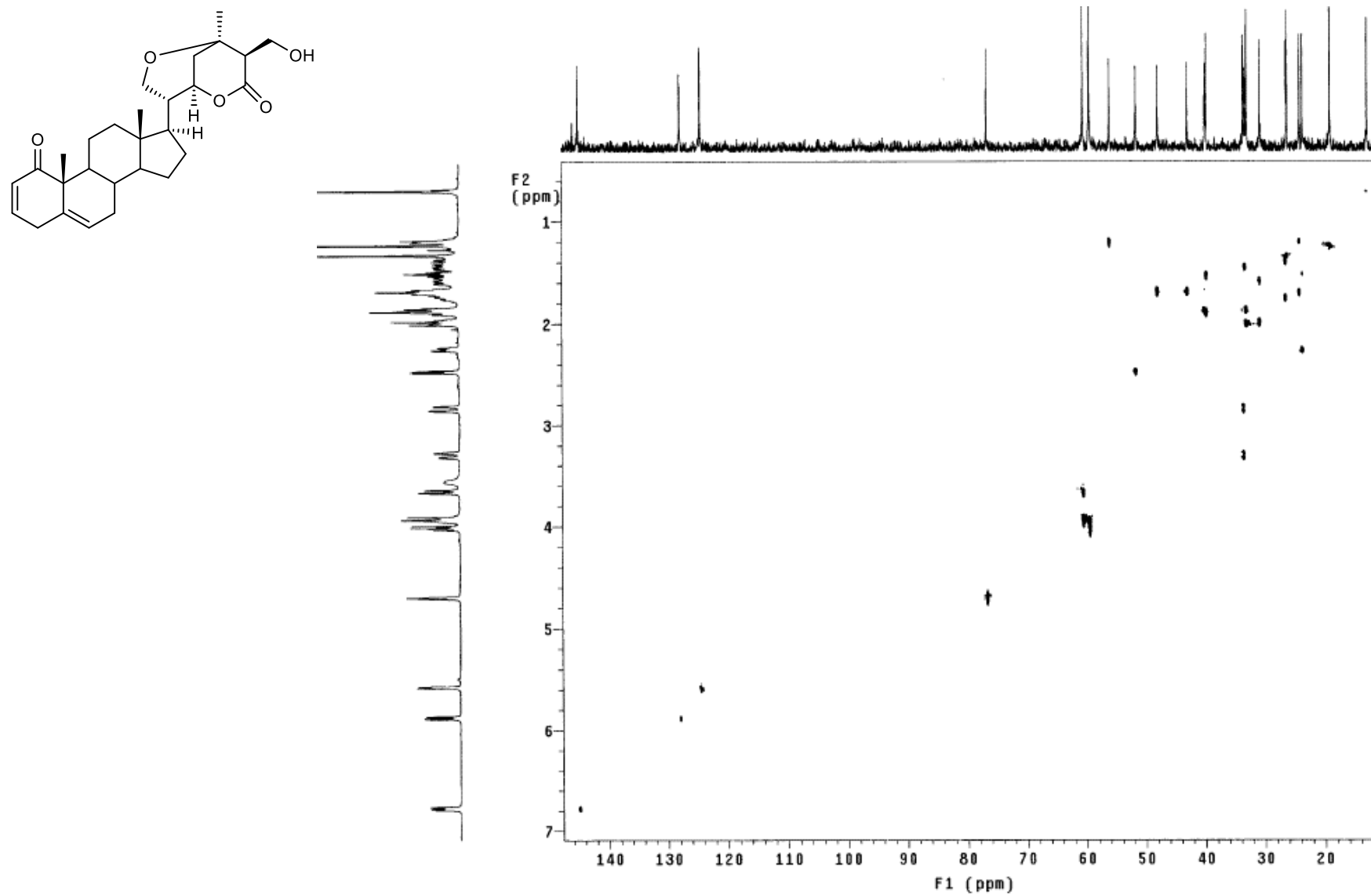
Espectro 25. RMN ^{13}C de la pentaacetildaturametelina B (XII) (100 MHz, CDCl_3).



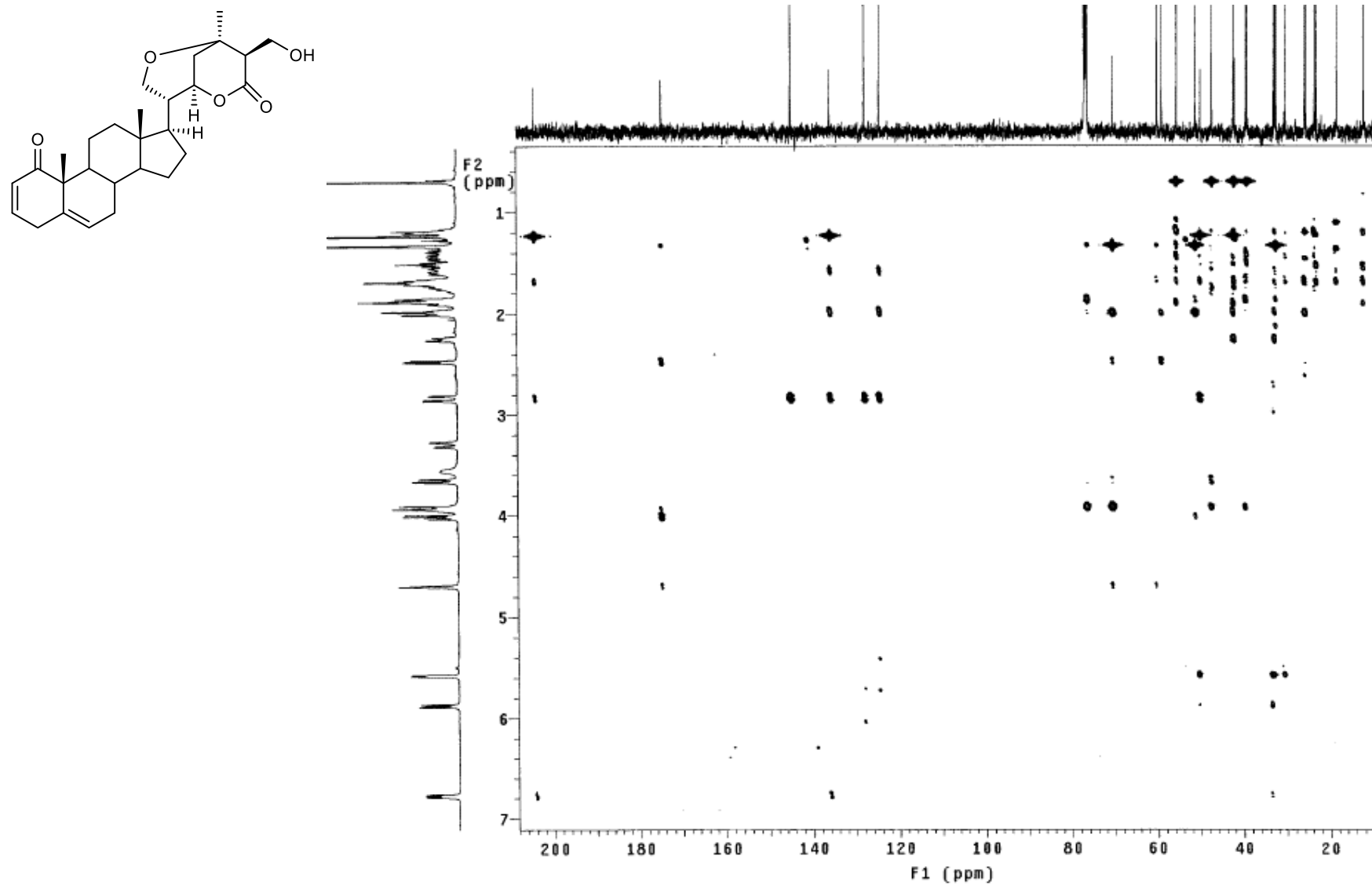
Espectro 26. RMN ¹H de la datudisólida A (XIII) (500 MHz, CDCl₃).



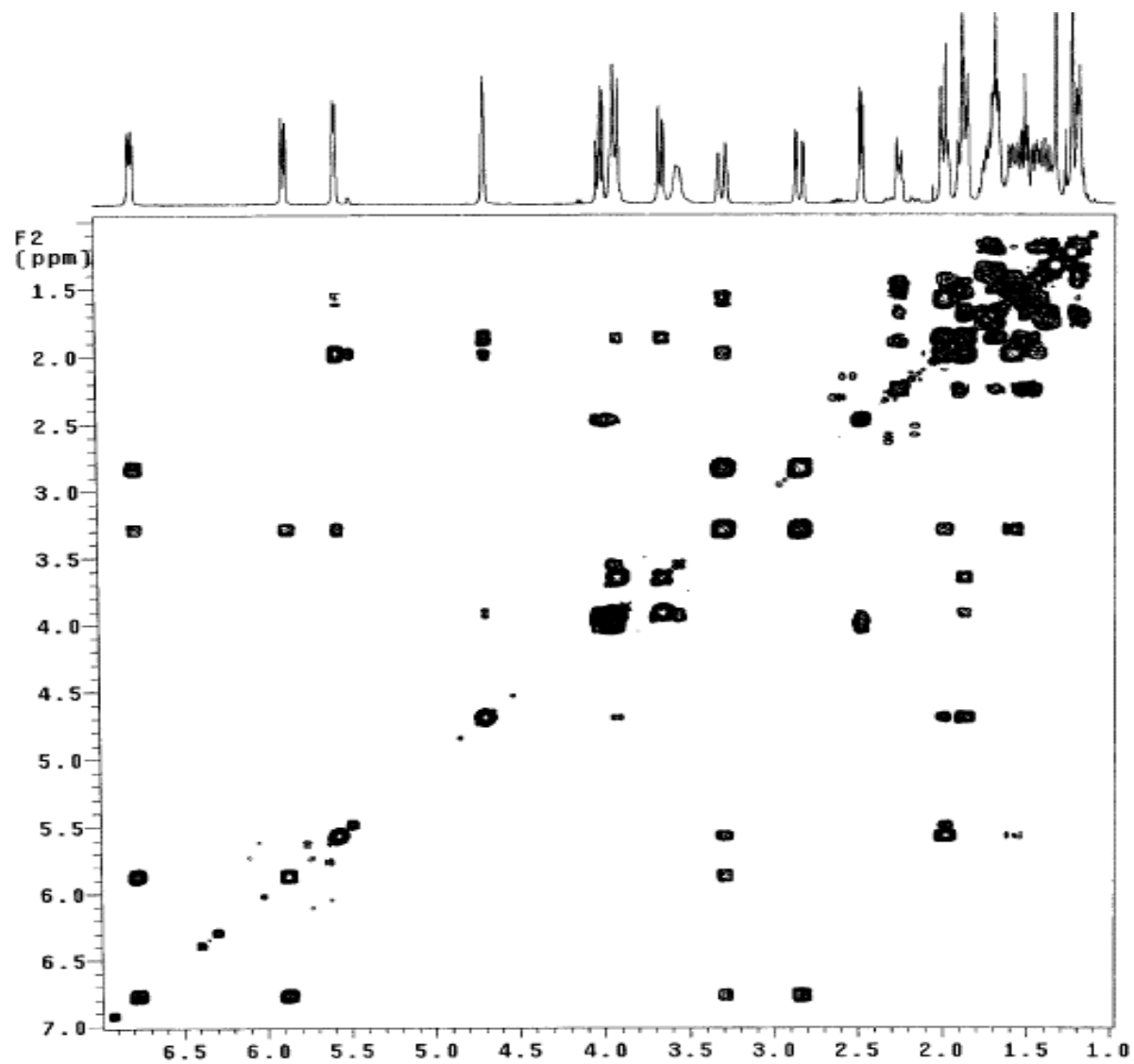
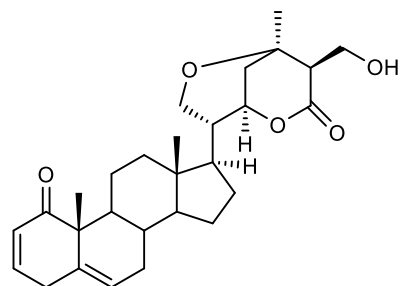
Espectro 27. RMN ^{13}C de la datudisólida A (**XIII**) (125 MHz, CDCl_3).



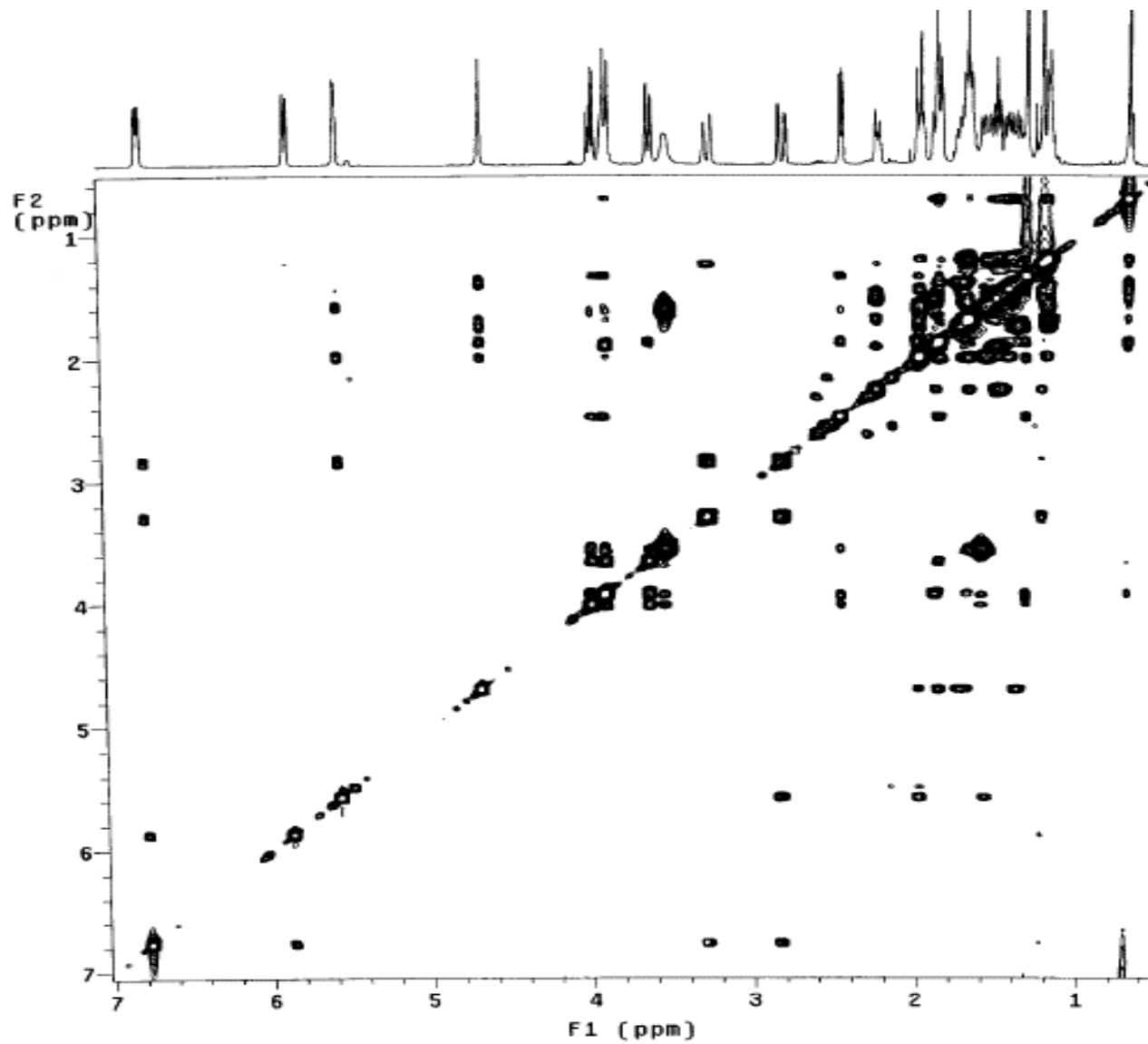
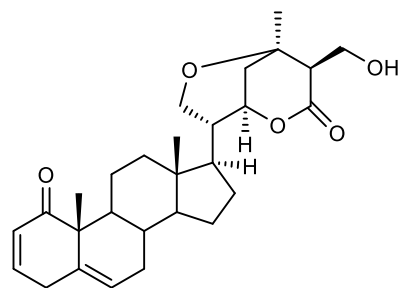
Espectro 28. HSQC de la datudisólida A (XIII).



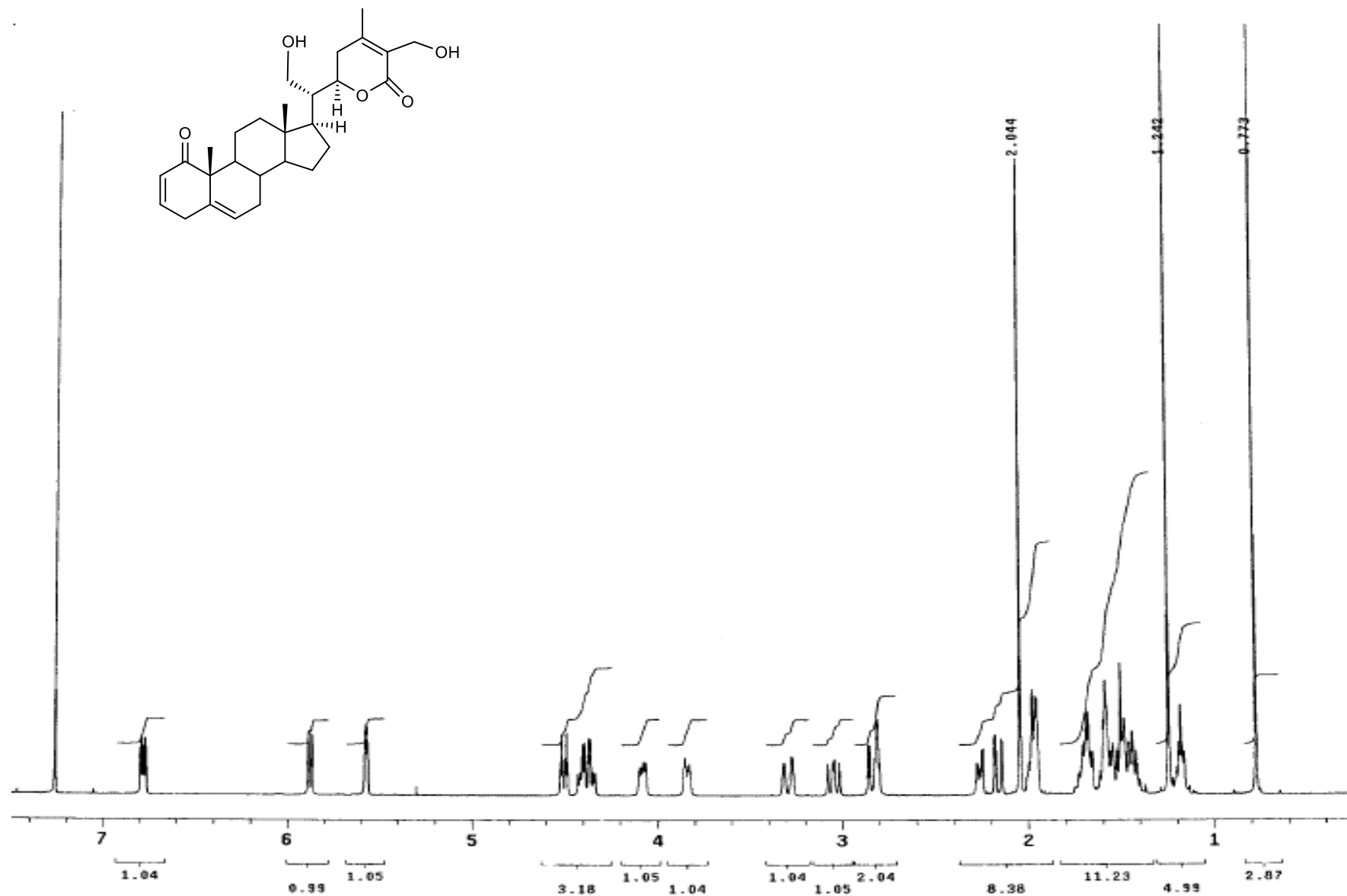
Espectro 29. HMBC de la datudisólida A (XIII).



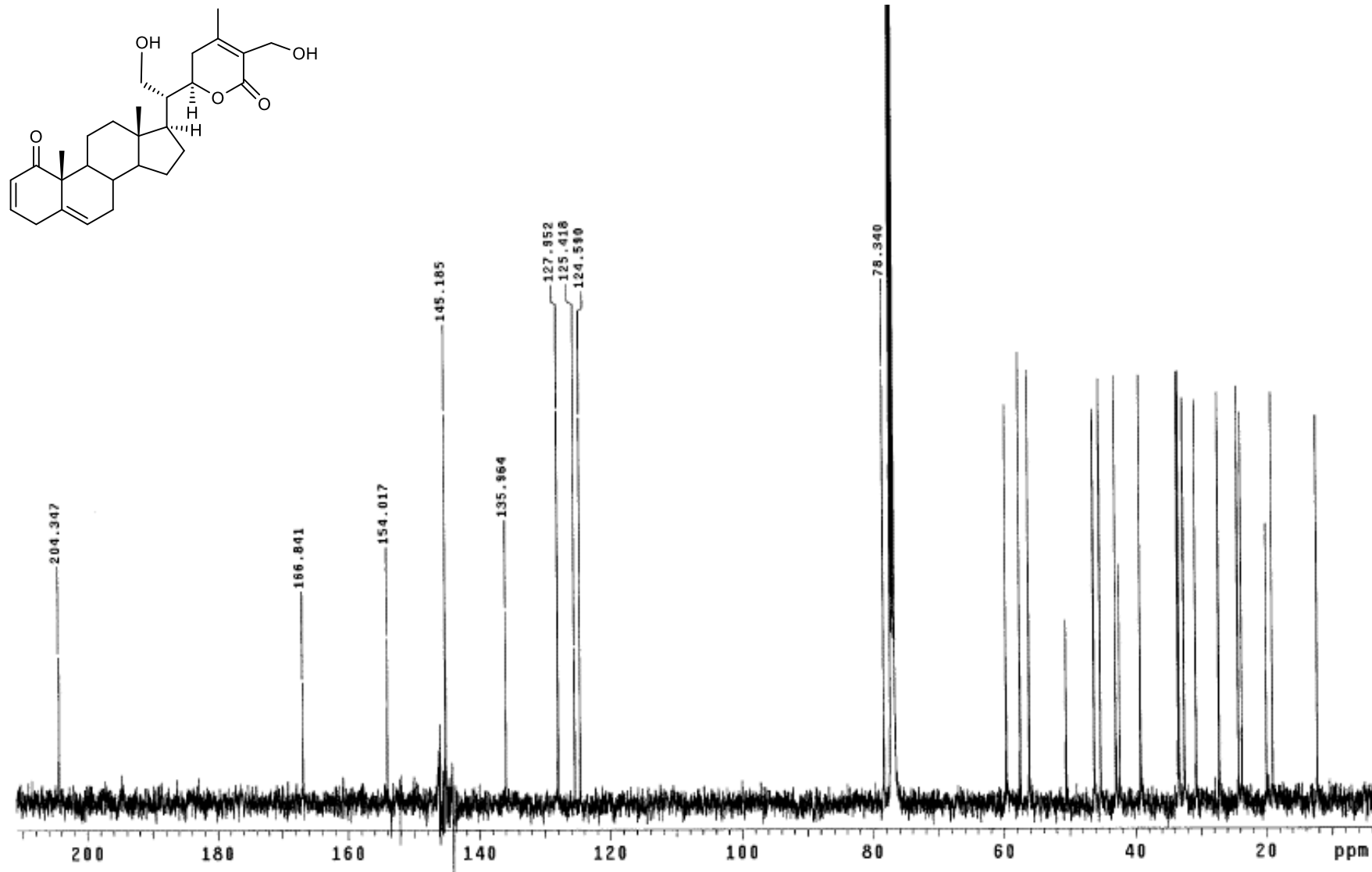
Espectro 30. COSY de la datudisólida A (XIII).



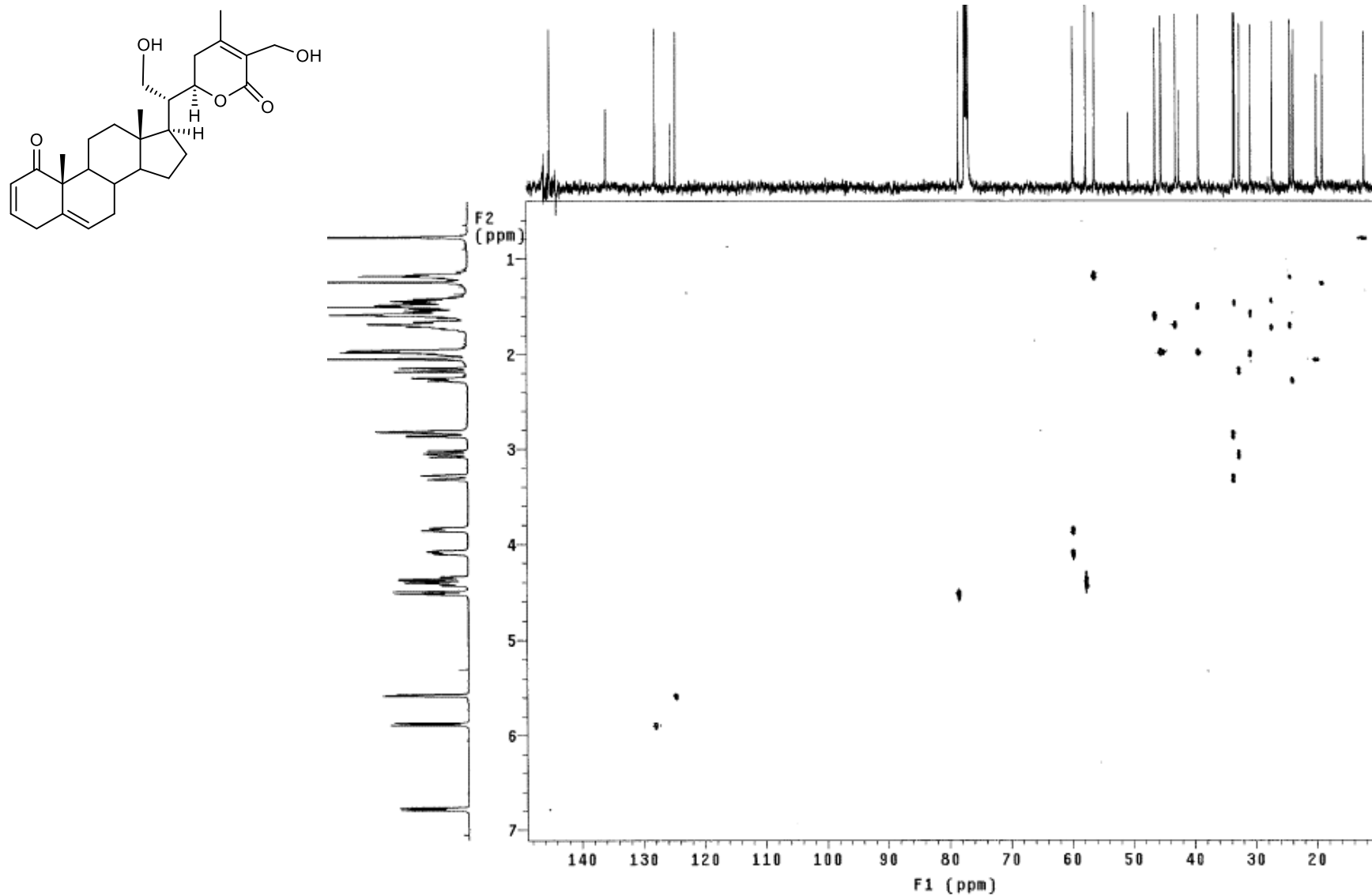
Espectro 31. NOESY de la datudisólida A (XIII).



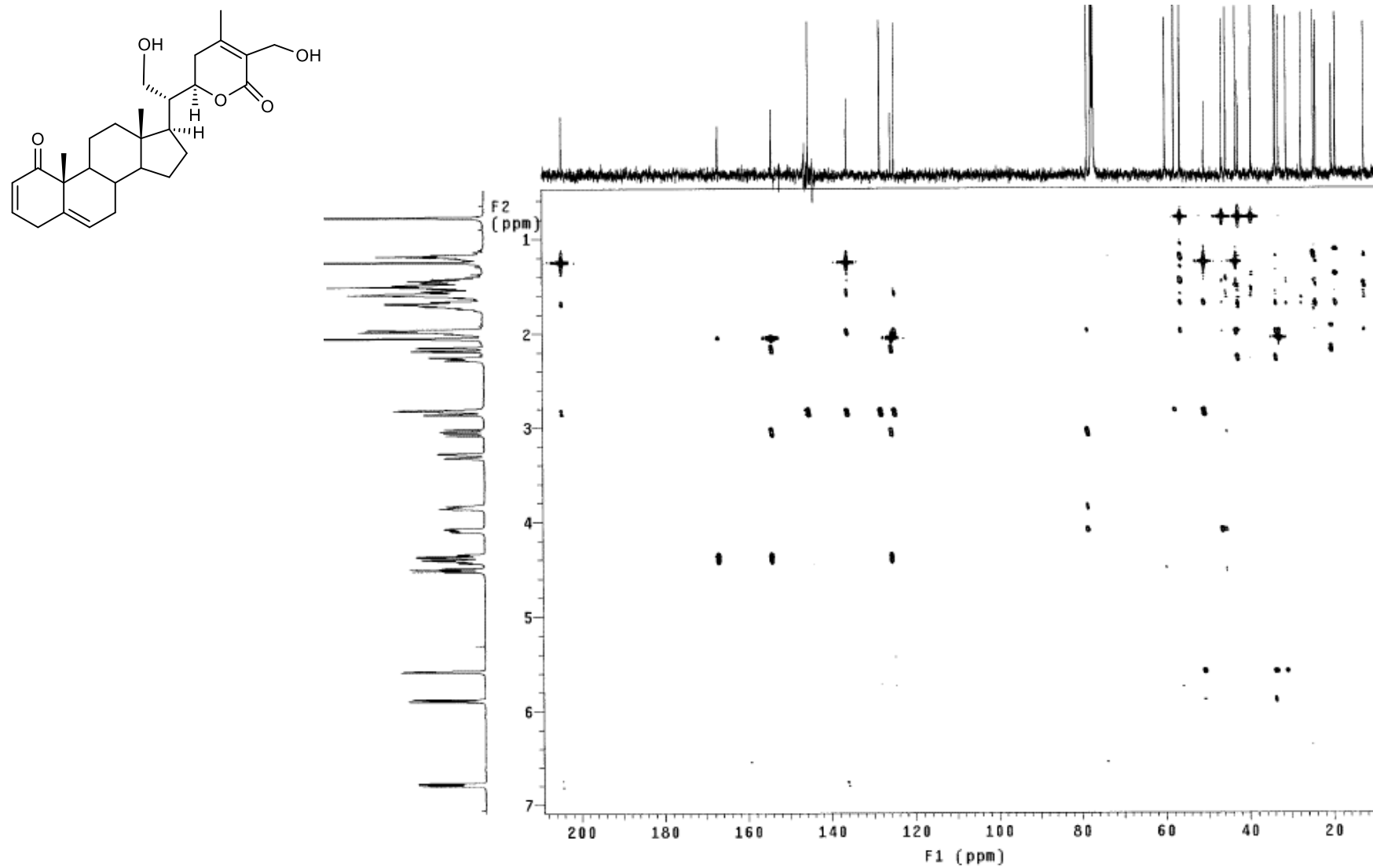
Espectro 32. RMN ^1H de la datudisólida B (XIV) (500 MHz, CDCl_3).



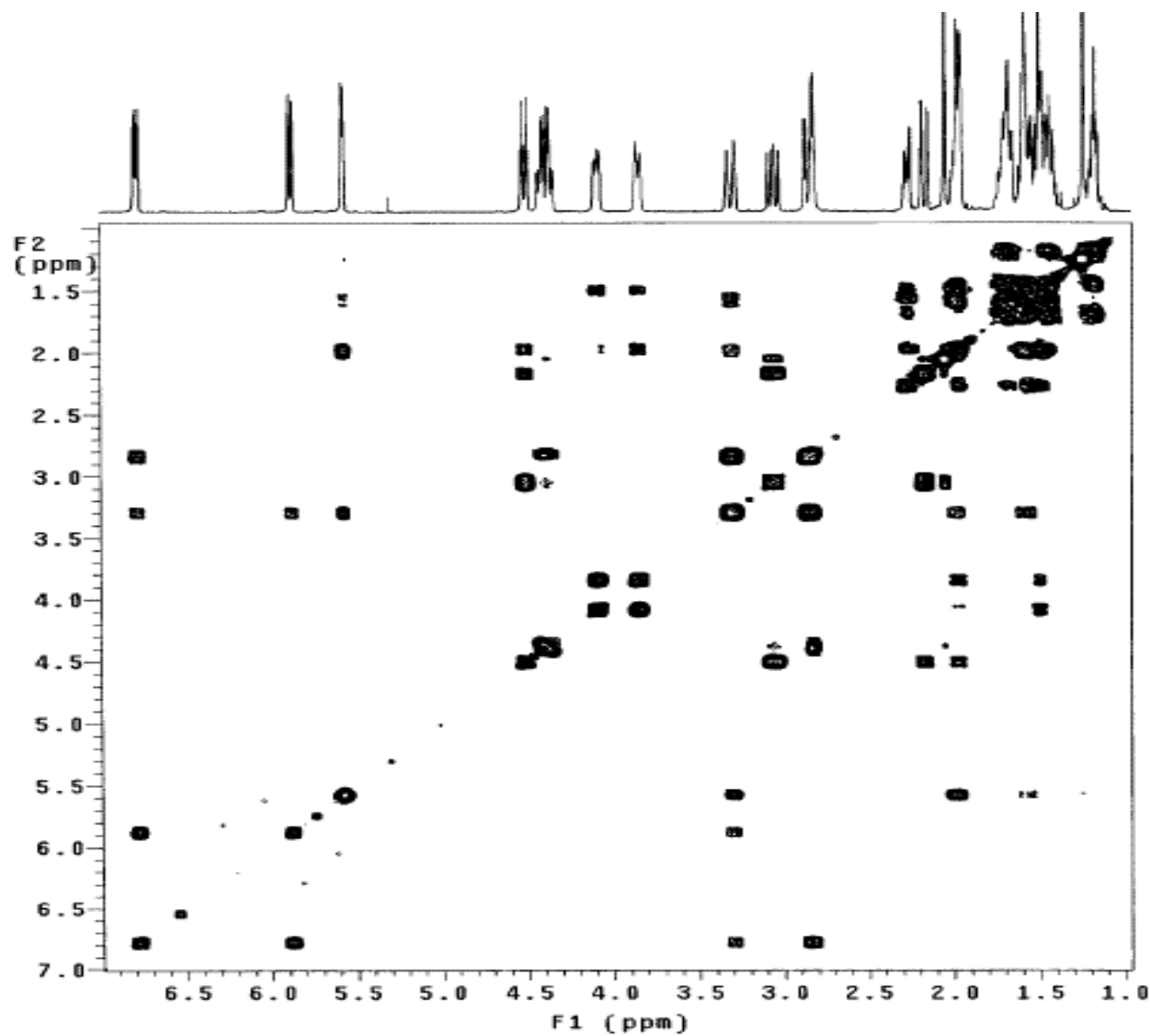
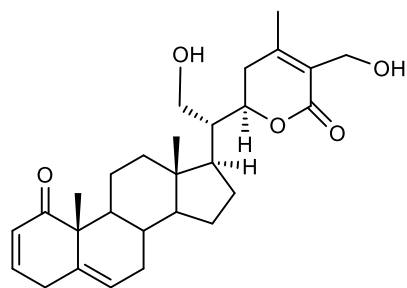
Espectro 33. RMN ¹³C de la datudisólida B (XIV) (125 MHz, CDCl₃).



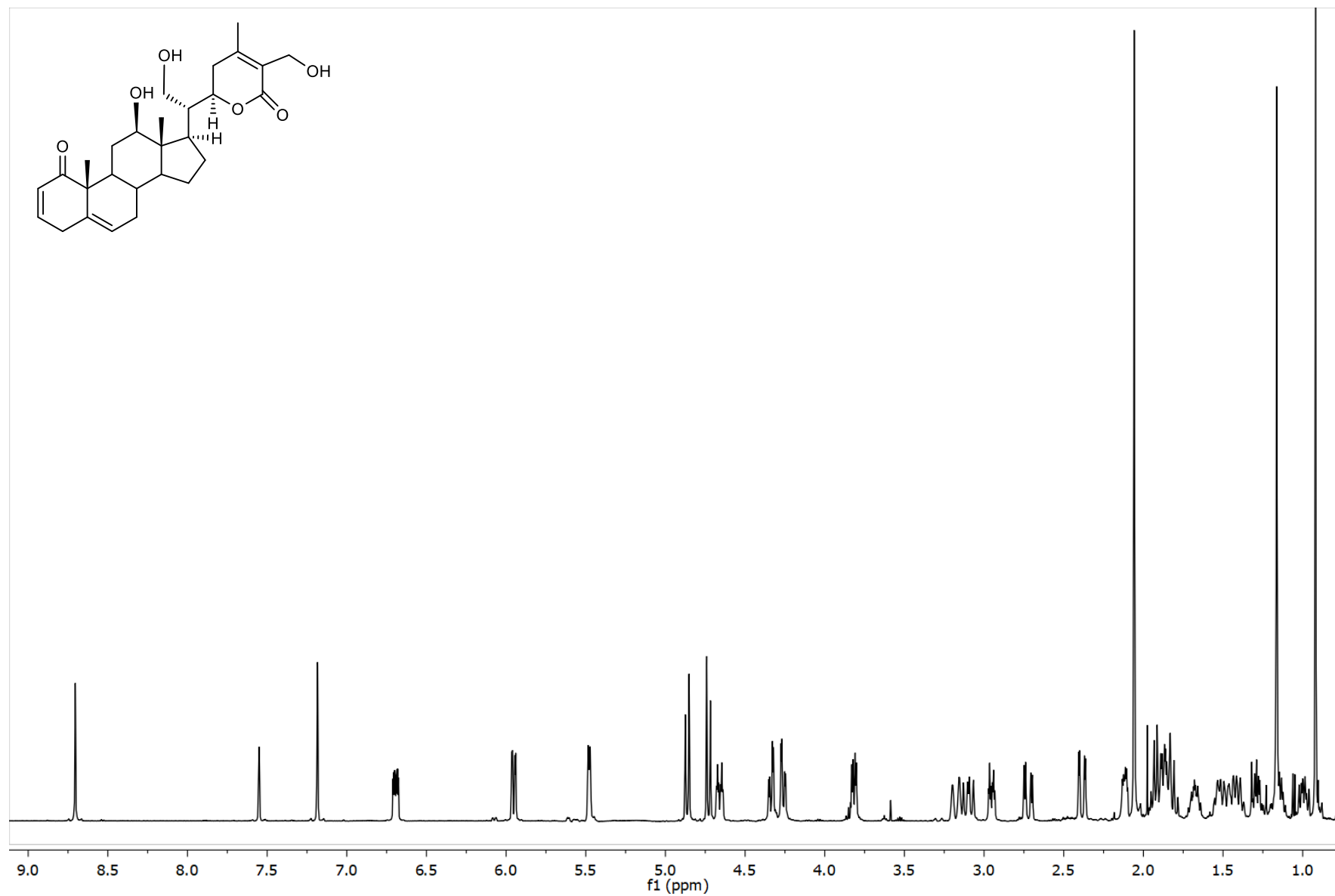
Espectro 34. HSQC de la datudisólida B (XIV).



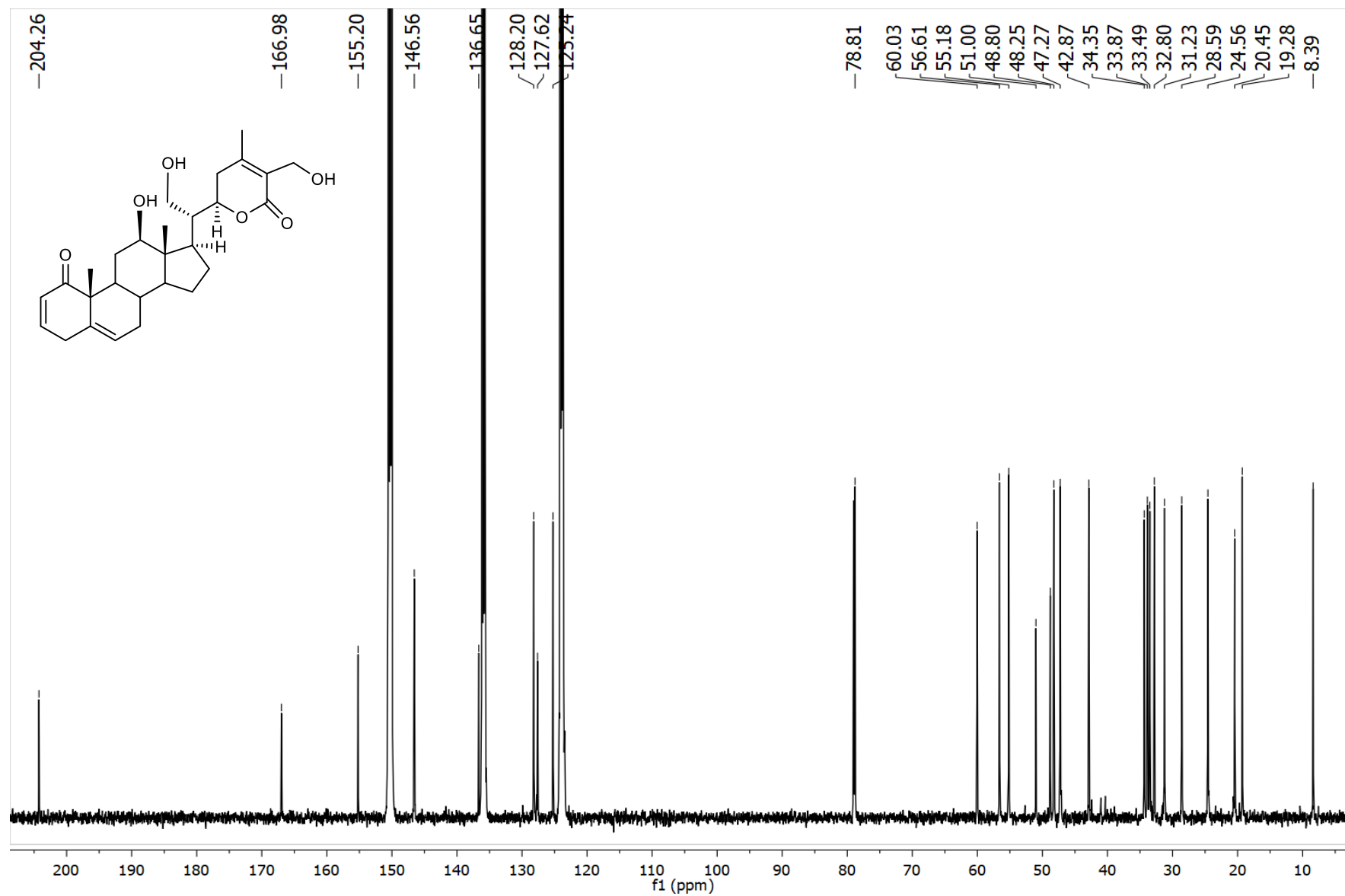
Espectro 35. HMBC de la datudisólida B (XIV).



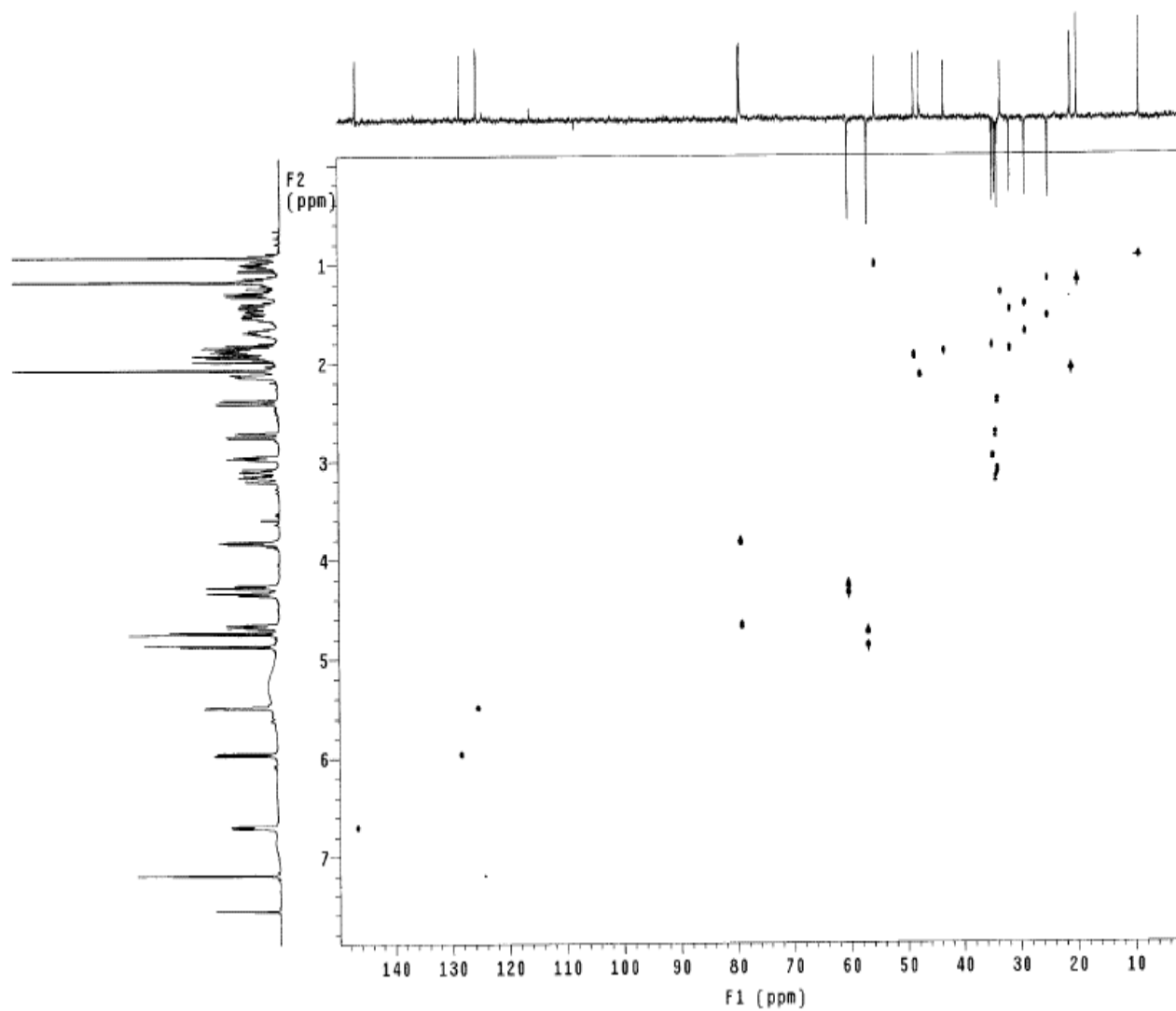
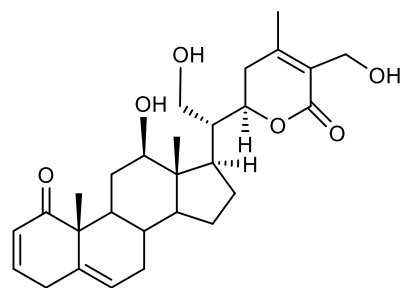
Espectro 36. COSY de la datudisólida B (XIV).



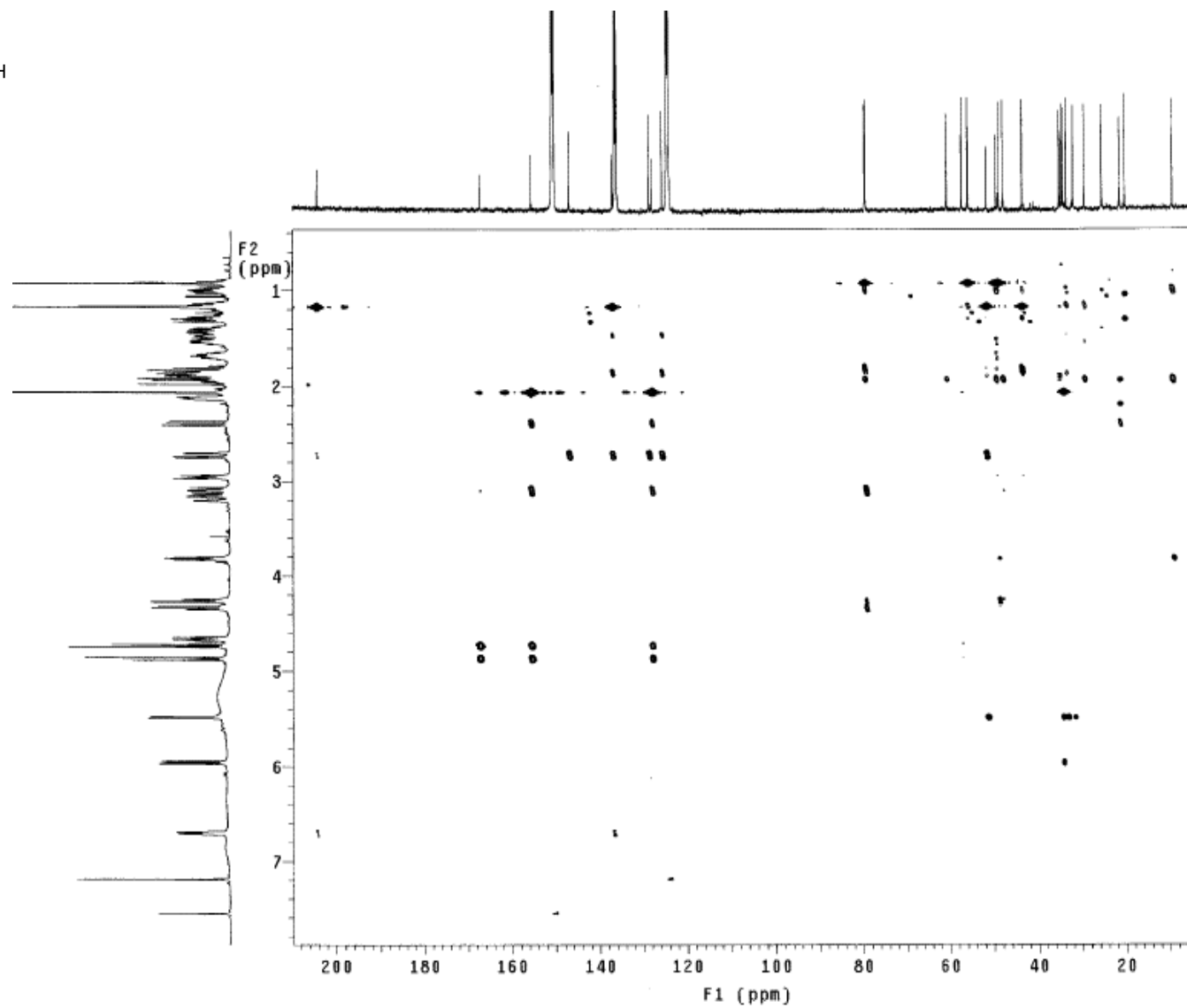
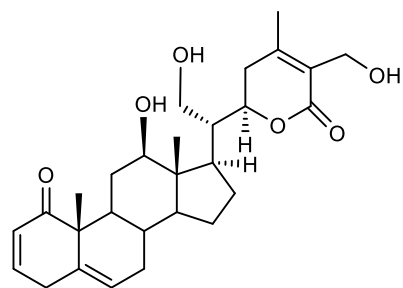
Espectro 37. RMN ^1H de la datudisólida C (XV) (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).



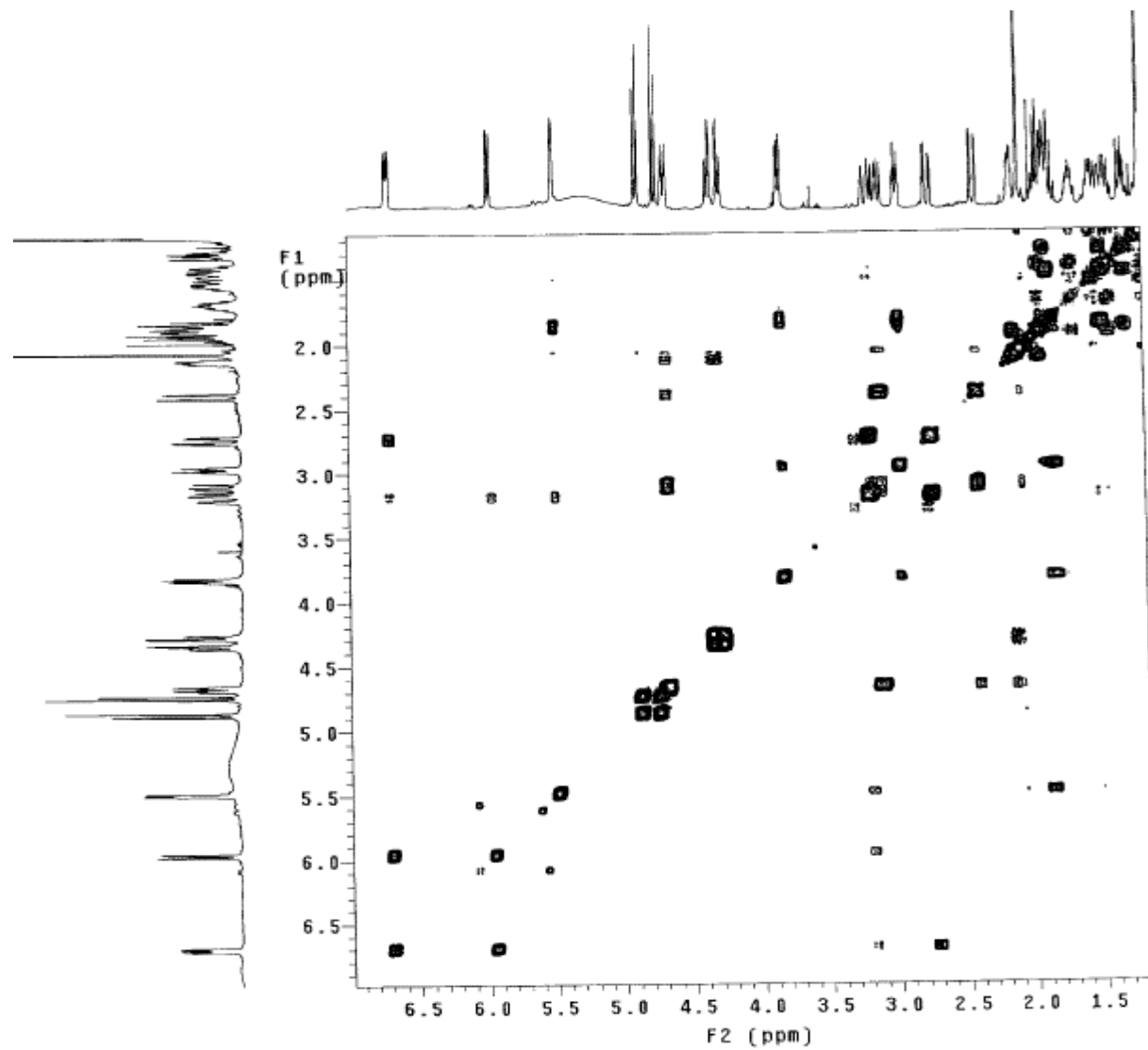
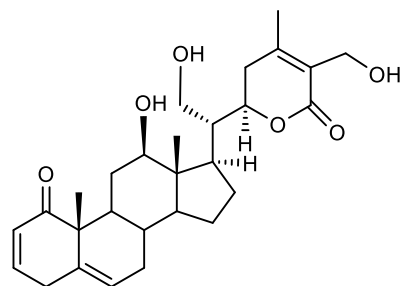
Espectro 38. RMN ^{13}C de la datudisólida C (XV) (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).



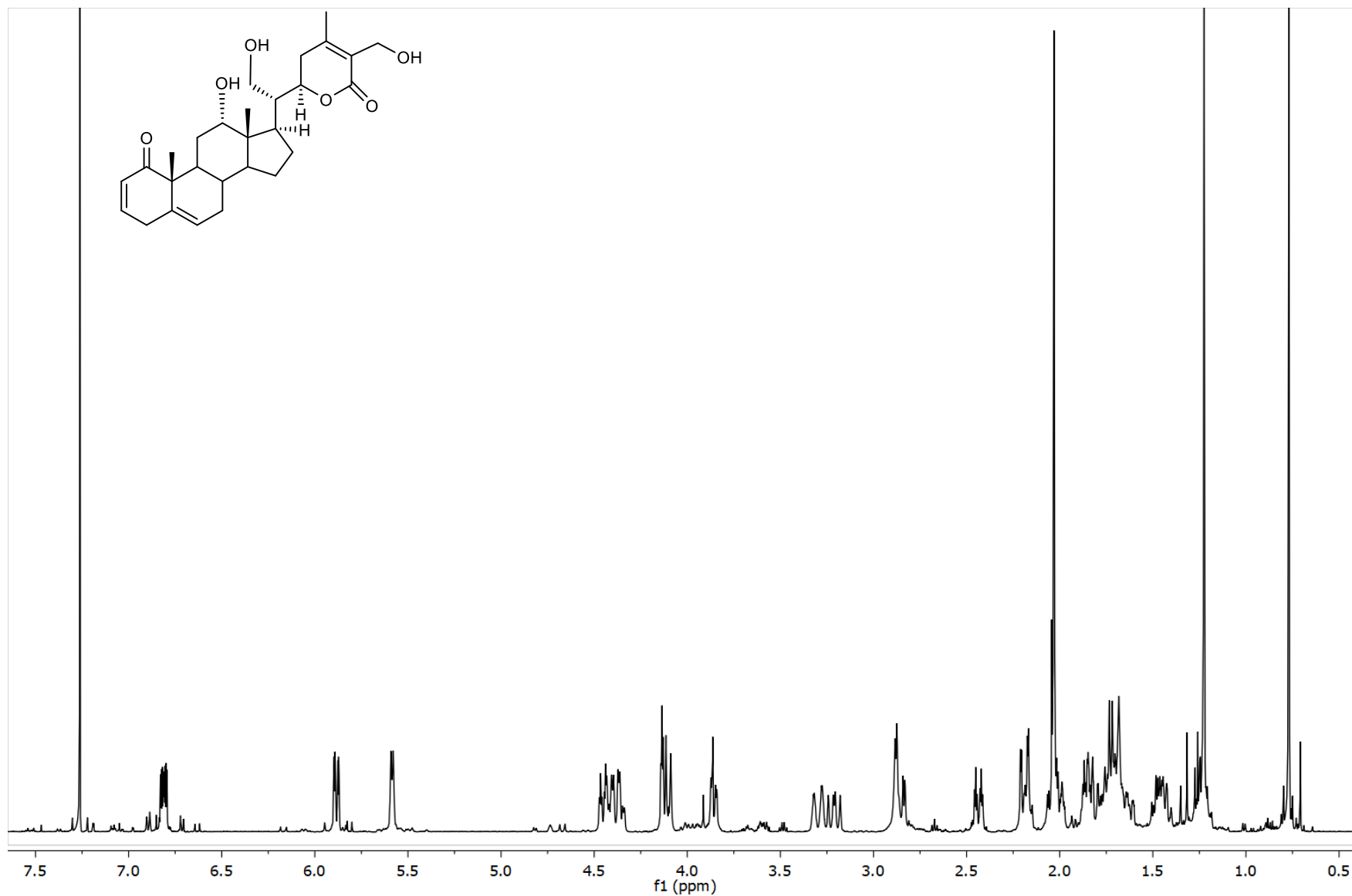
Espectro 39. HSQC de la datudisólida C (XV).



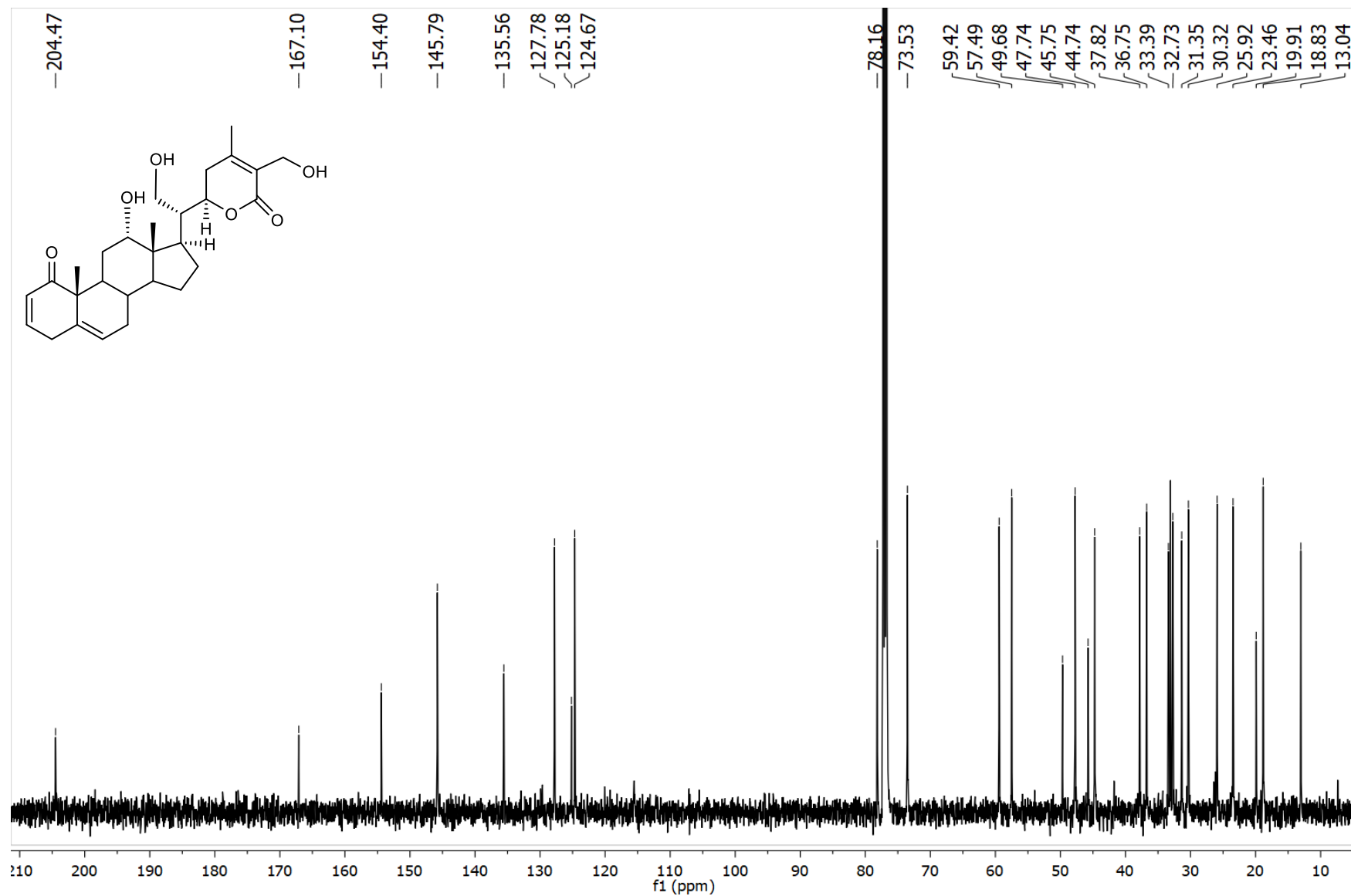
Espectro 40. HMBC de la datudisólida C (XV).



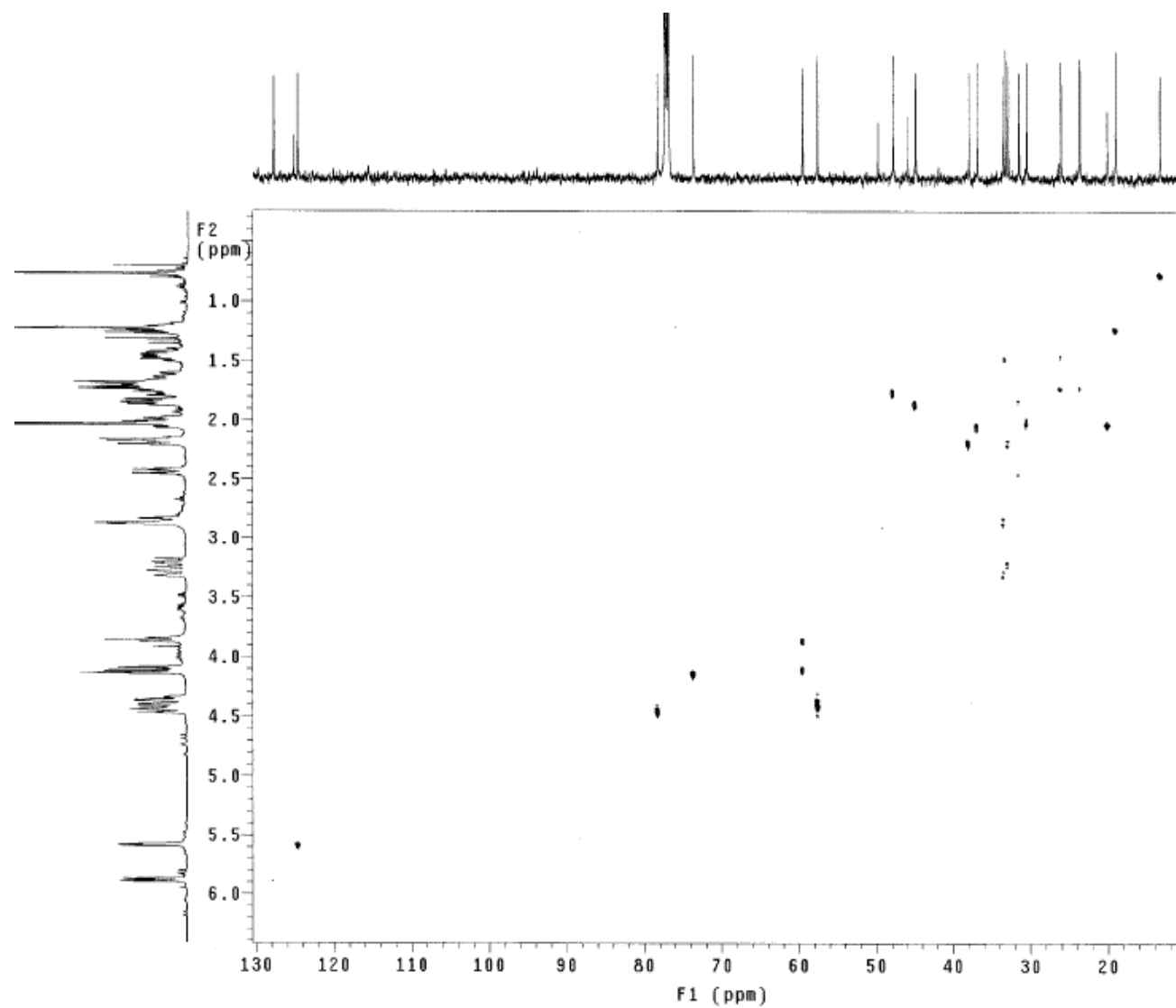
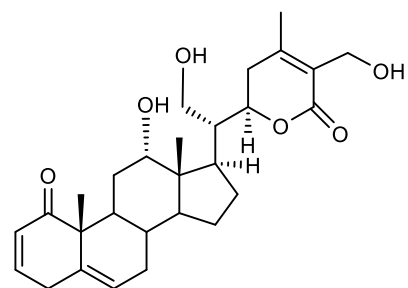
Espectro 41. COSY de la datudisólida C (XV).



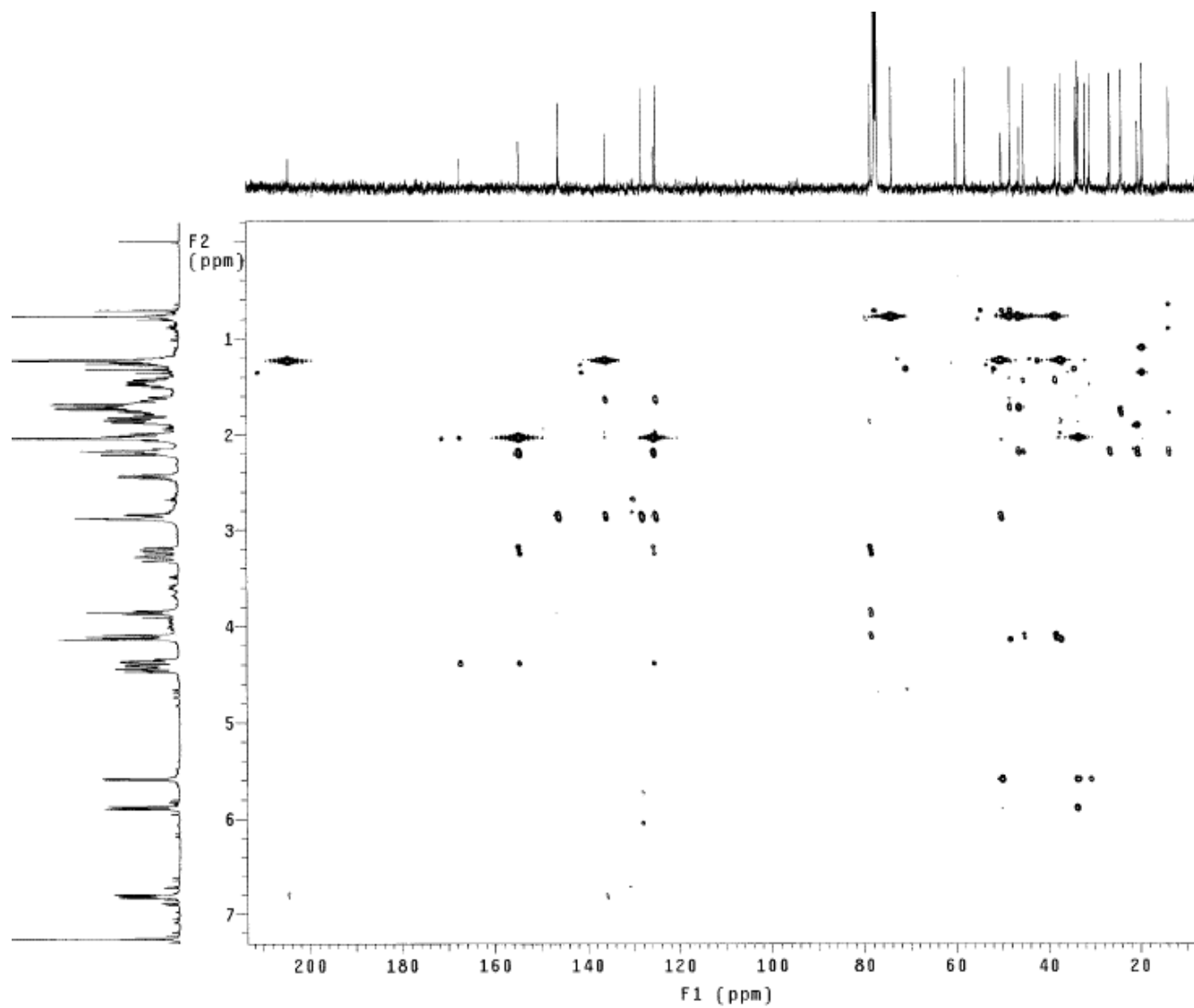
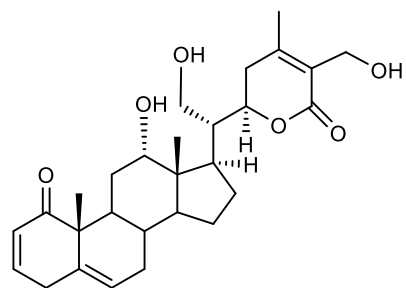
Espectro 42. RMN ¹H de la daturamalakina B (XVI) (500 MHz, CDCl₃).



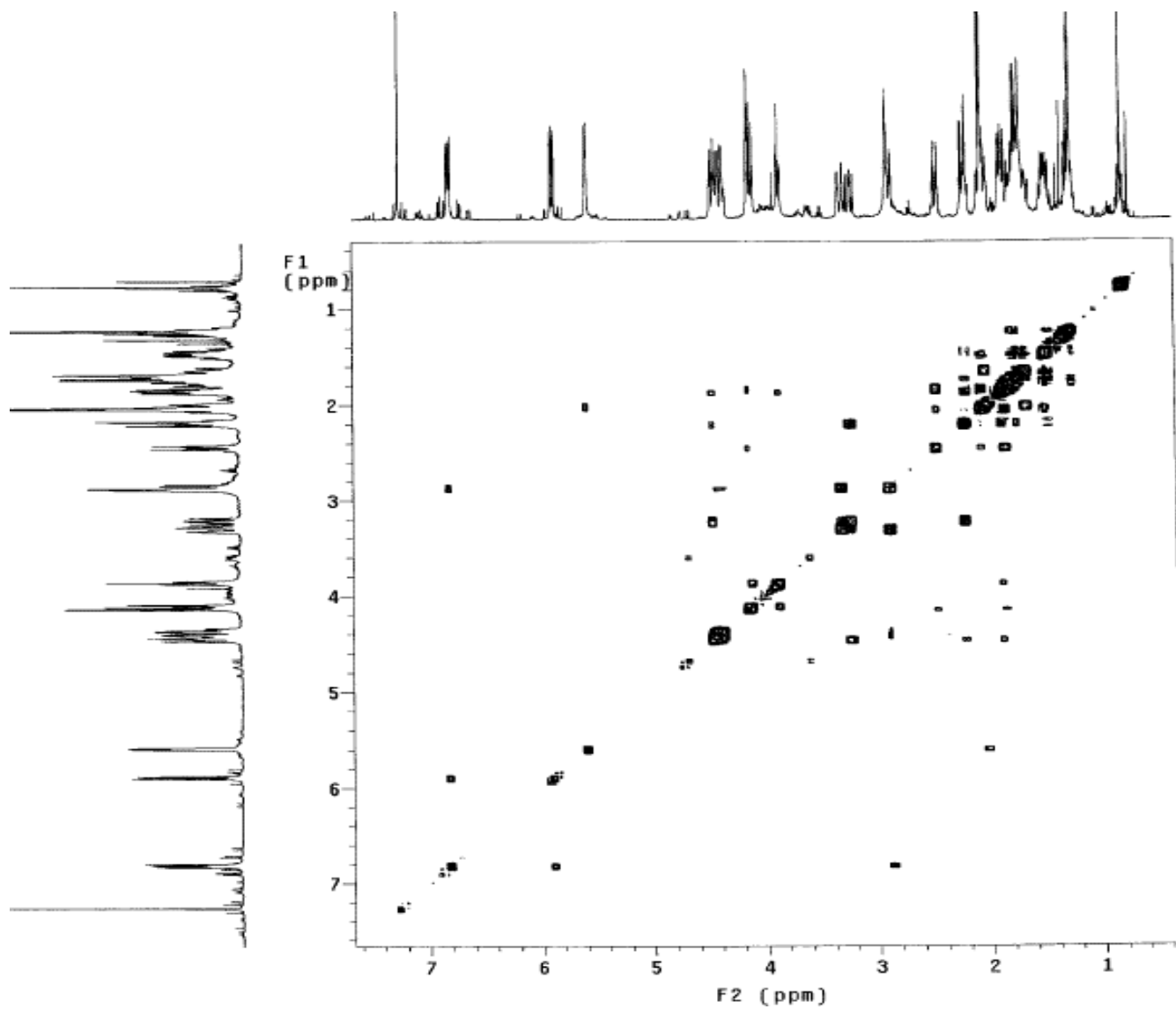
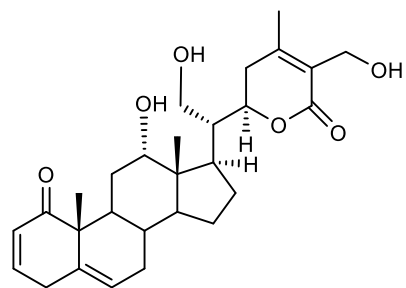
Espectro 43. RMN ¹³C de la daturamalakina B (XVI) (125 MHz, CDCl₃).



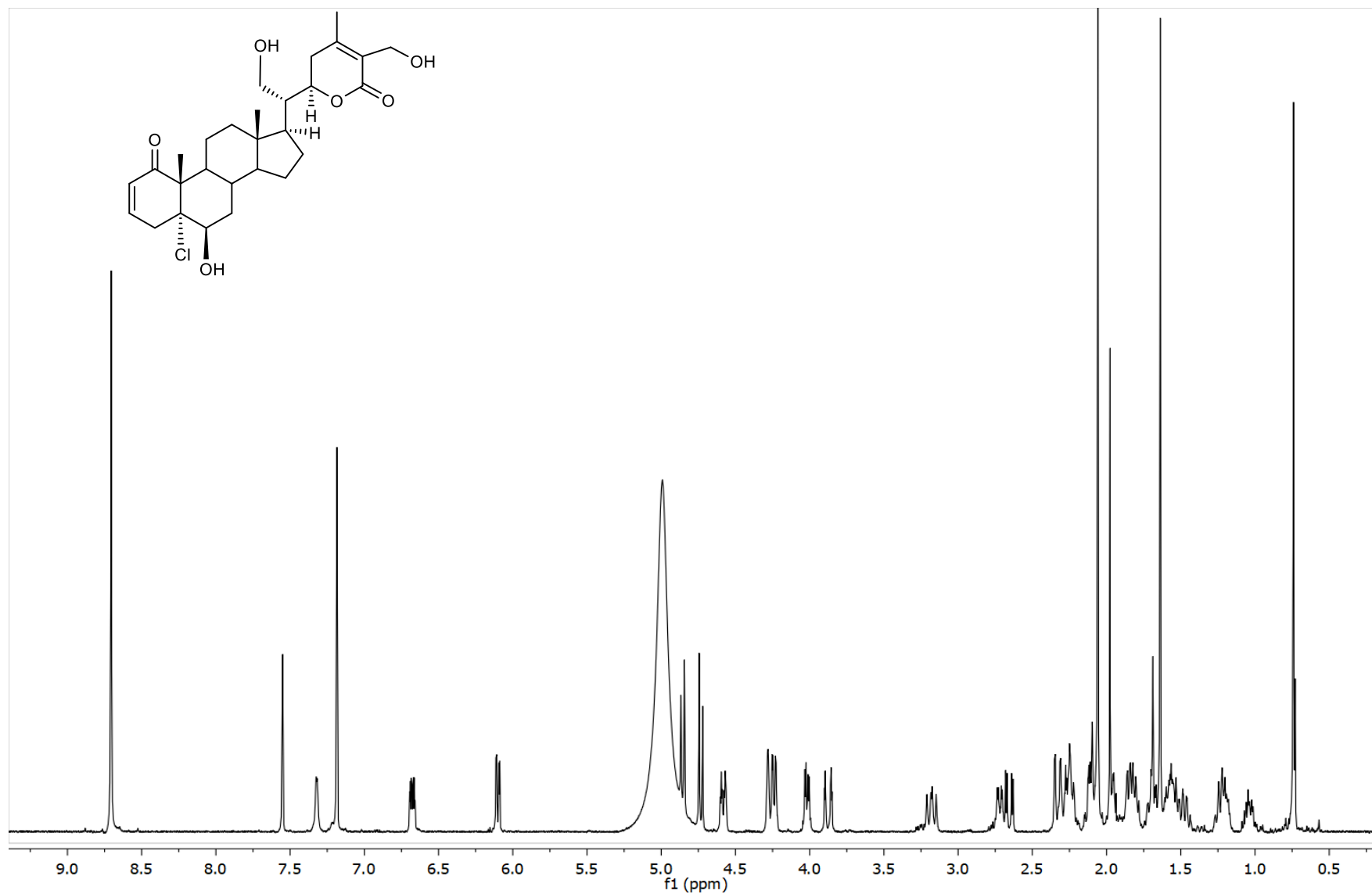
Espectro 44. HSQC de la daturamalakina B (XVI).



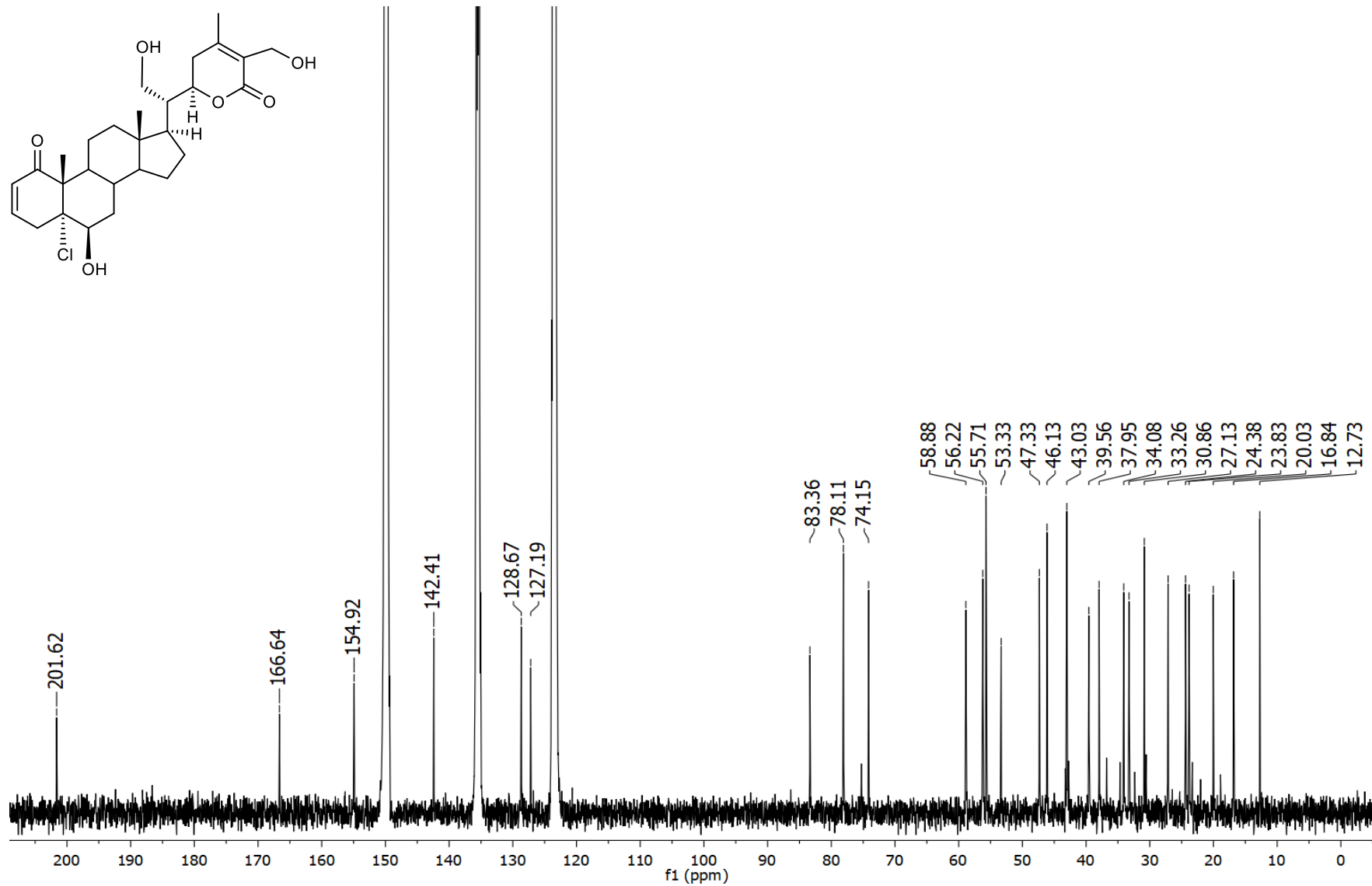
Espectro 45. HMBC de la daturamalakina B (XVI).



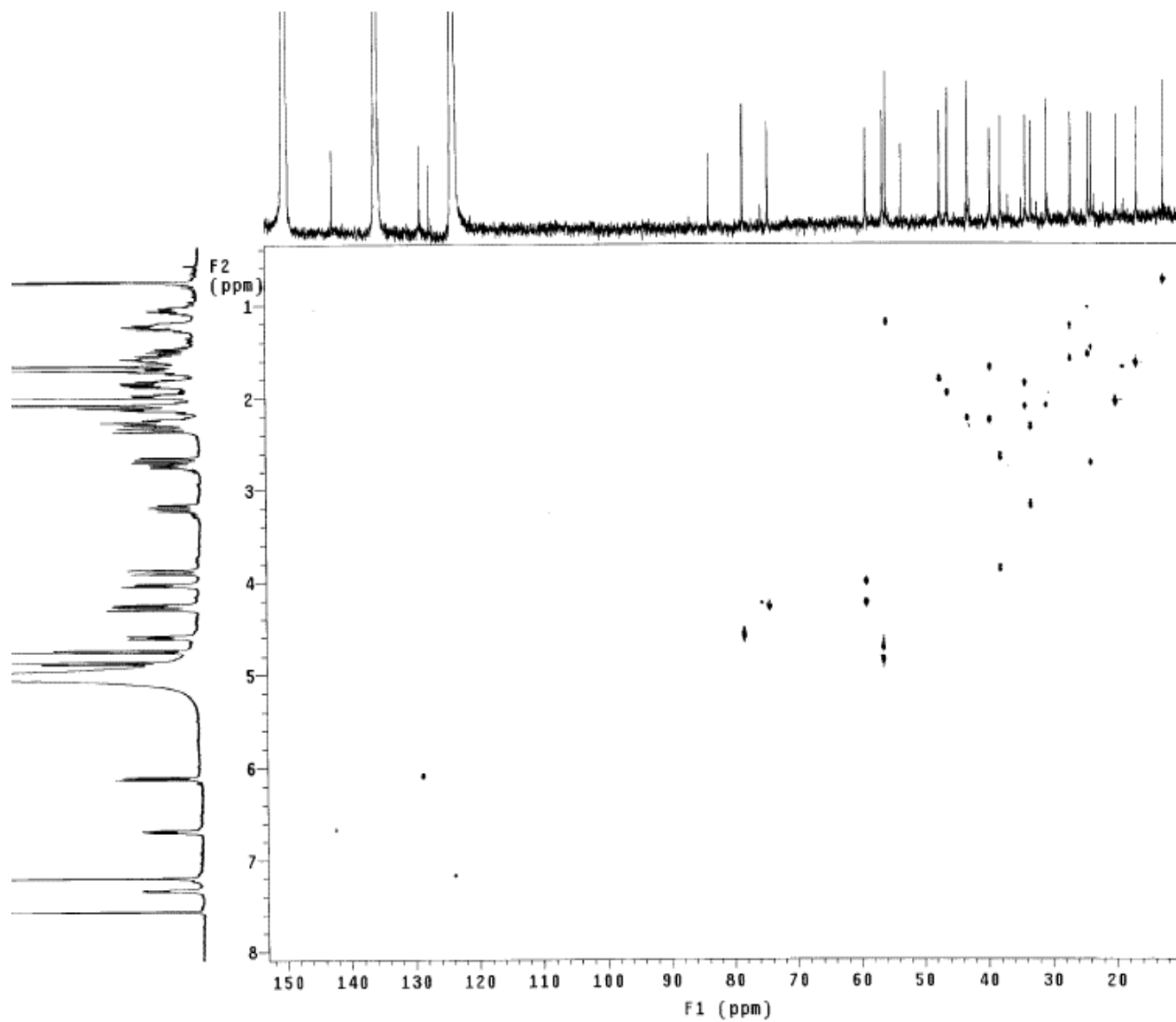
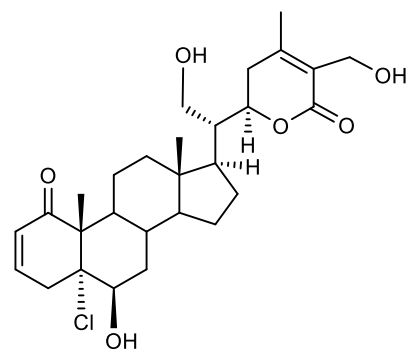
Espectro 46. COSY de la daturamalakina B (XVI).



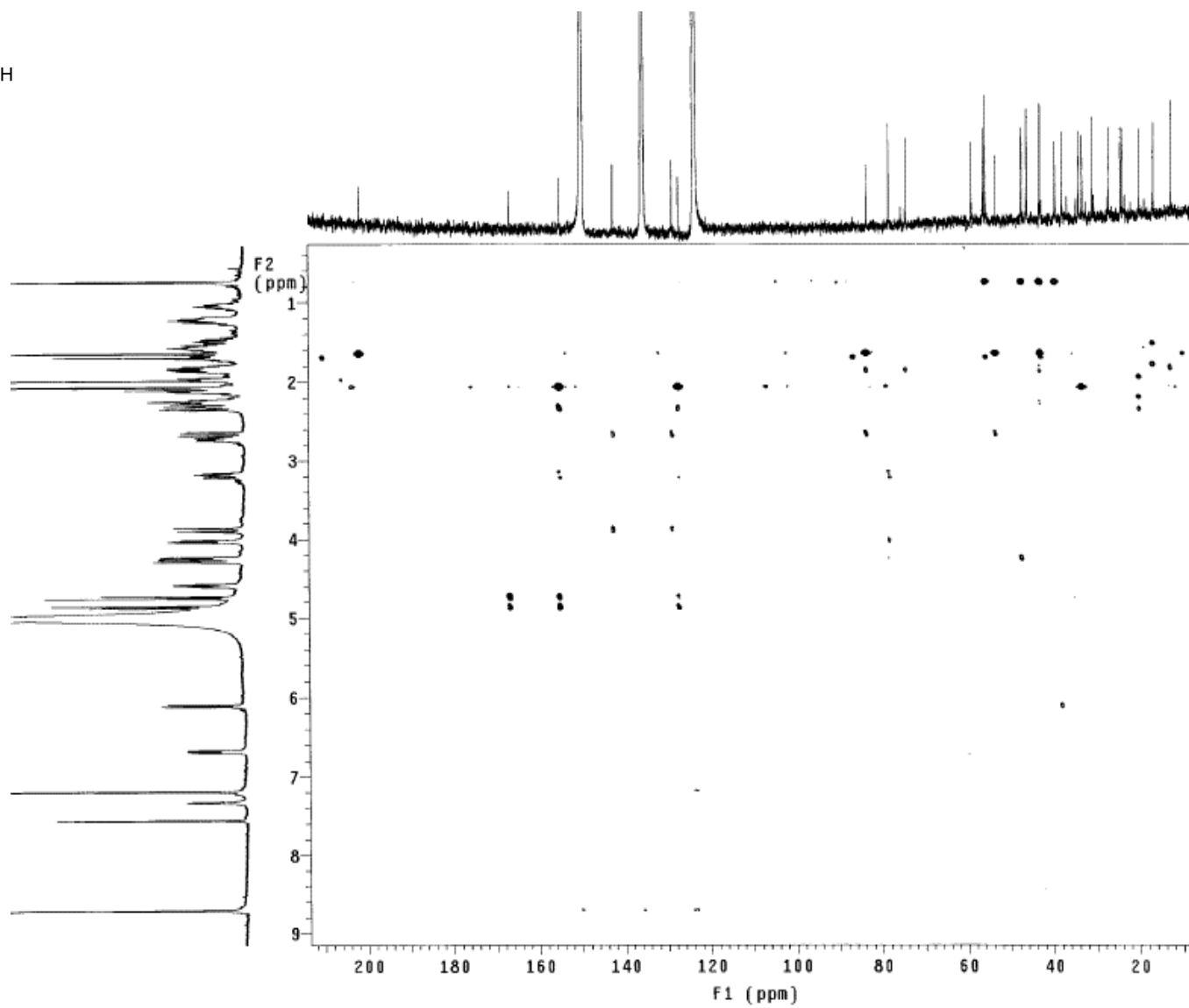
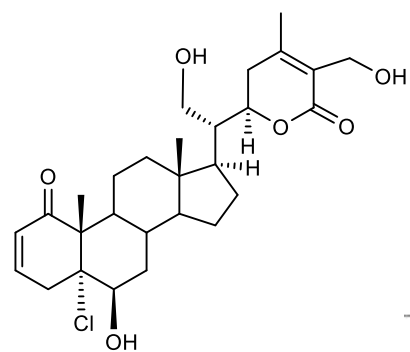
Espectro 47. RMN ^1H de la datudisólida D (XVII) (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).



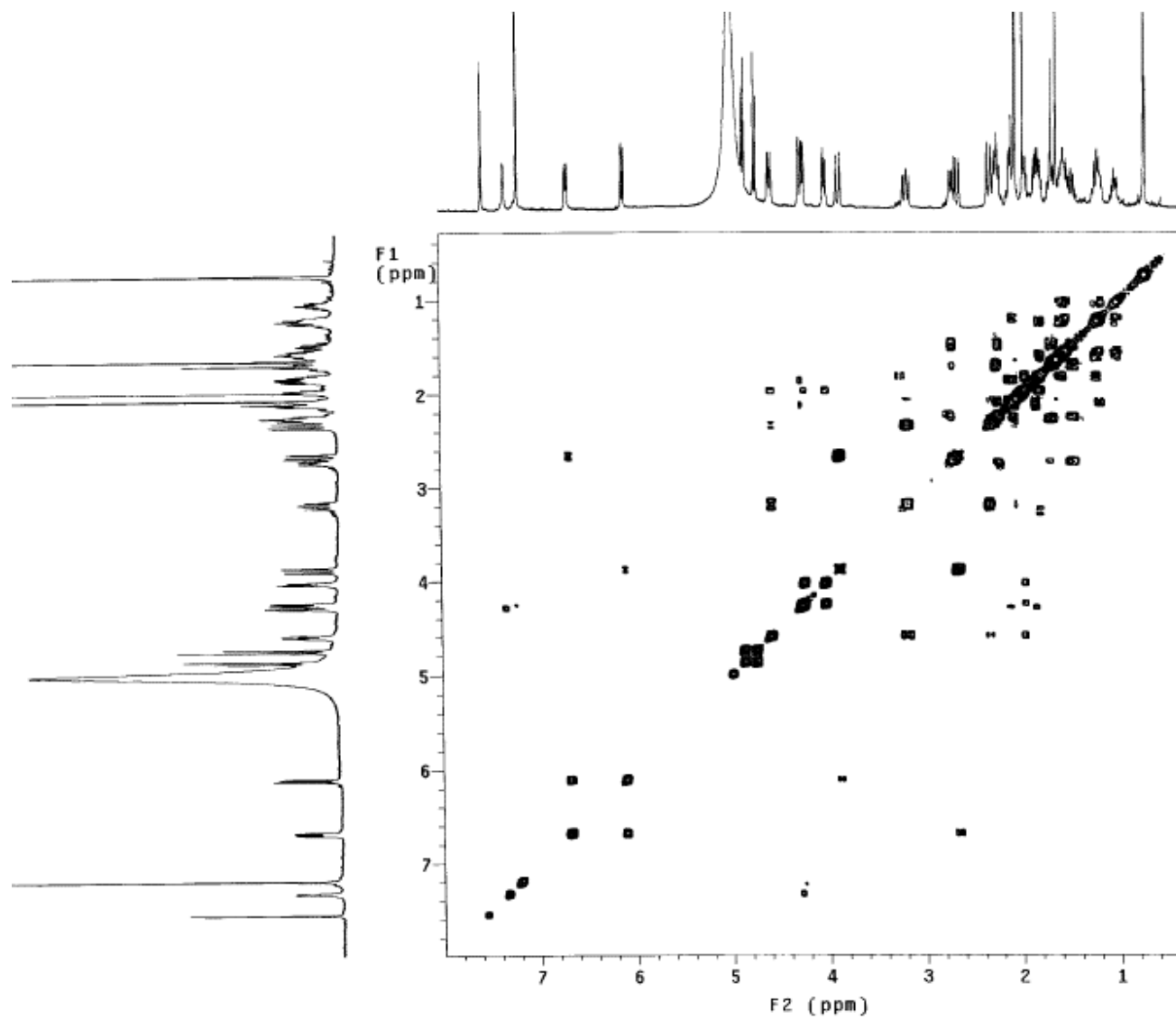
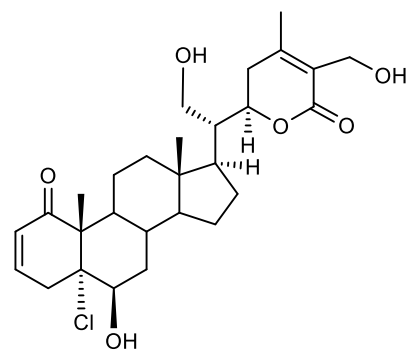
Espectro 48. RMN ^{13}C de la datudisólida D (XVII) (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).



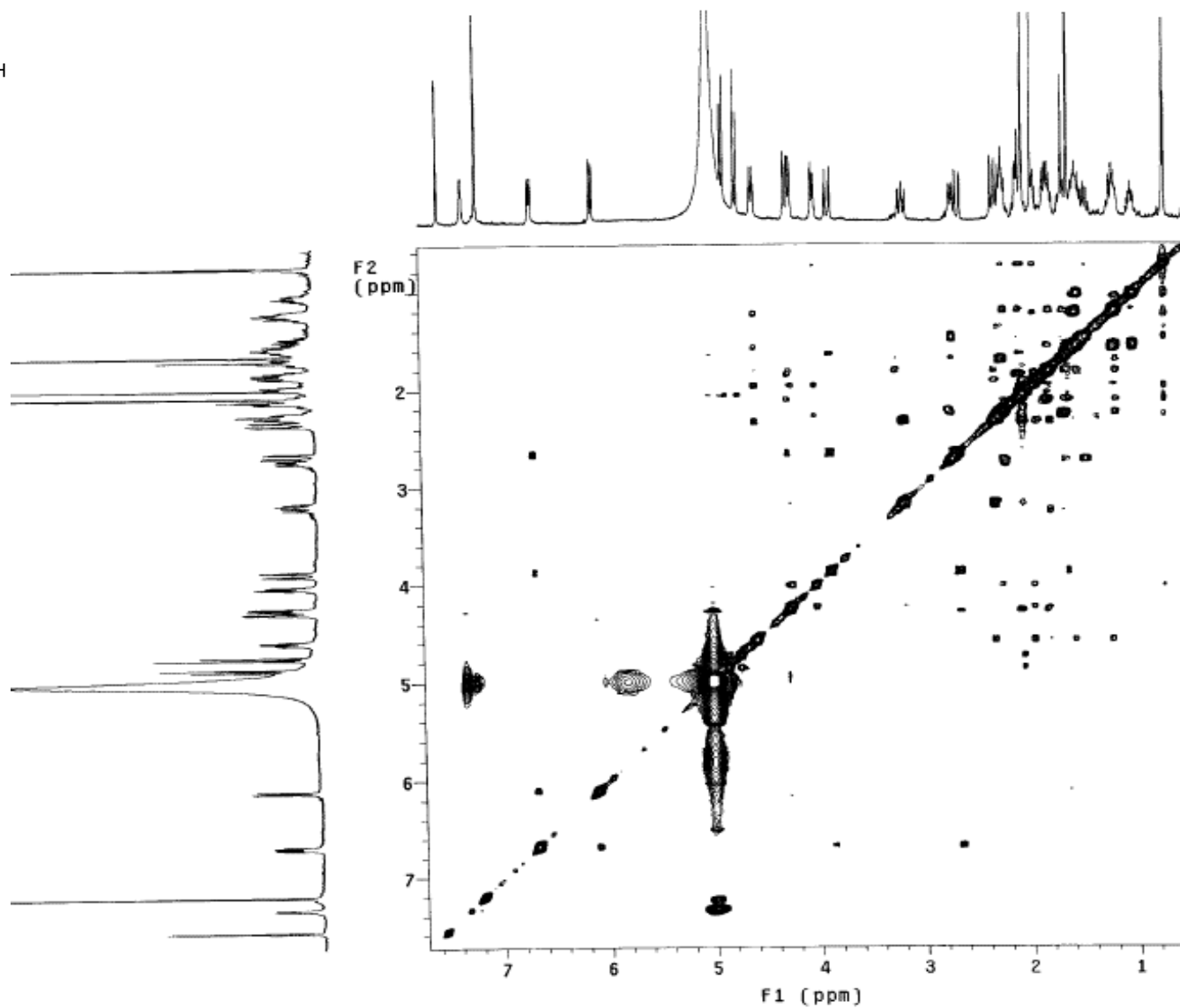
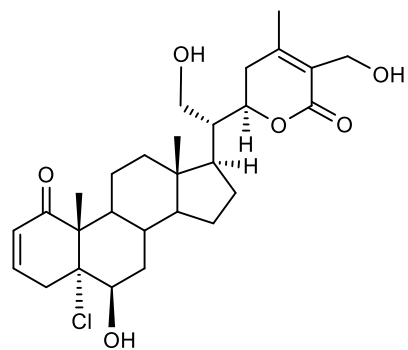
Espectro 49. HSQC de la datudisólida D (XVII).



Espectro 50. HMBC de la datudisólida D (XVII).



Espectro 51. COSY de la datudisólida D (XVII).



Espectro 52. NOESY de la datudisólida D (XVII).