

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE QUÍMICA**

**WITHANÓLIDAS DEL EXTRACTO DE ACETONA DE *PHYSALIS*  
*VOLUBILIS* WATERF.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**MARTÍNEZ RODRÍGUEZ MARÍA AZUCENA**

**TUTOR**

**M. EN C. ANA LIDIA PÉREZ CASTORENA**

**INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

**Cd. MÉXICO**

**2021**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente: Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

Vocal: Dra. Josefina Elizalde Torres

Secretario: M. en C. Ana Lidia Pérez Castorena

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

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

ASESORA

SUSTENTANTE

---

M. en C. Ana Lidia Pérez Castorena

---

María Azucena Martínez Rodríguez

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la facultad de Química por haber recibido de ellas mi formación profesional.

Al Instituto de Química y particularmente a la M. en C. Ana Lidia Pérez Castorena, por brindarme su interés, apoyo y enseñanzas para el desarrollo del proyecto.

A las maestras en C. Emma Maldonado y Amira Arciniegas, y al Dr. Alfonso Romo por sus observaciones y sugerencias dentro del laboratorio.

A los miembros del jurado: Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio y Dra. Josefina Elizalde Torres por su tiempo y sugerencias para mejorar mi manuscrito.

A la Dra. Mahinda Martínez por la recolección de la especie de *Physalis volubilis* Waterf.

Al M. en C. Antonio Nieto por la realización de los ensayos de actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa, enzimas  $\alpha$ -glucosidasa de levadura y de rata, y actividad antiinflamatoria, en el Instituto de Química.

A la Dr. Mayra Silva Miranda por la realización de los ensayos de actividad antimicobacteriana, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

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, Dra. Isabel Chávez y Dr. Beatriz Quiroz García del laboratorio de resonancia magnética nuclear; QFB. Rocío Patiño del laboratorio de espectroscopia y polarimetría; Dra. Carmen García del laboratorio de espectrometría de masa; M. en C. Carmen Márquez y M. en C. Lucero Ríos del laboratorio de cromatografía y M. en C. Everardo Tapia por su asistencia técnica.

## ABREVIATURAS

CC	Cromatografía en columna
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear (Correlated spectroscopy)
$\delta$	Desplazamiento químico
d	Doblete
da	Doblete ancho
dd	Doble de dobletes
ddd	Doble de doble de dobletes
dt	Doble de tripletes
DEPT	Aumento sin distorsión de la transferencia de polarización (Distortionless enhancement of polarization transfer)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM-DART	Espectrometría de masas por análisis directo en tiempo real (Direct analysis in real time)
EMAR-ESI	Espectrometría de masas de alta resolución por ionización por electro spray (Electrospray ionization)
EtOH	Etanol
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 single quantum coherence)
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
IR	Espectroscopia en el infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
m	multiplete
<i>m/z</i>	Relación masa/carga

MeCN	Acetonitrilo
MIC <sub>100</sub>	Concentración mínima inhibitoria
NOESY	Espectroscopia de efecto nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser effect spectroscopy)
PBS	Solución buffer de fosfato
PVA-3	Mezcla compleja que contiene al compuesto <b>IV</b>
PVA-4	Mezcla compleja que contiene al compuesto <b>V</b>
ppm	Partes por millón
p.f.	Punto de fusión
REMA	Ensayo de microtitulación de resazurina
RMN	Resonancia magnética nuclear
SI	Índice de selectividad
s	Señal simple
sa	Señal ancha
ta	Triplete ancho
td	Triplete de doblete
TMS	Tetrametilsilano

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	2
2.1. Familia Solanaceae	2
2.2. Género <i>Physalis</i>	2
2.2.1 Metabolitos en el género <i>Physalis</i>	3
2.2.2 Estudios farmacológicos de extractos y withanólidas obtenidas de especies del género <i>Physalis</i>	14
2.3. <i>Physalis volubilis</i>	19
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	20
<b>4. HIPÓTESIS</b>	20
<b>5. OBJETIVO</b>	21
5.1. Objetivos específicos	21
<b>6. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	22
6.1. Material y equipo	22
6.2. Material vegetal	23
6.3. Metodología	23
6.3.1 Aislamiento y purificación de los compuestos	23
6.3.2 Reacciones de acetilación	25
6.3.3 Ensayo de citotoxicidad	29
6.3.4 Actividad antimicrobacteriana	30
6.3.5 Inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa de levadura y de rata	31
6.3.6 Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa de <i>Electrophorus electricus</i> (anguila eléctrica)	32
6.3.7 Actividad antiinflamatoria utilizando el modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón	33
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	34
7.1. Identificación de los compuestos aislados	34
7.2. Actividad anti-inflamatoria de <b>IV</b> y <b>V</b>	53
7.3. Actividades antimicrobacteriana y citotóxica de <b>III</b> y <b>V</b>	53

7.4. Inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa, enzima $\alpha$ -glucosidasa de levadura y de rata de <b>III</b> y <b>V</b>	54
<b>8. CONCLUSIONES</b>	55
<b>9. REFERENCIAS</b>	56
<b>10. ANEXO</b>	62

## 1. INTRODUCCIÓN

En el mundo las plantas juegan un papel importante entre sus pobladores debido a sus diferentes usos como: medicinales, alimenticios, ceremoniales, agronómicos, cosméticos, etc. En México, las plantas son utilizadas con fines terapéuticos desde tiempos prehispánicos, como lo evidencian los textos más antiguos de la medicina tradicional Mexicana: “Códice de La Cruz-Badiano”, escrito en náhuatl por Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano, en el que se describe 251 plantas y “La Historia de las cosas de la Nueva España”, escrita por Fray Bernardino de Sahagún, que incluye 123 plantas (Del Pozo, 1991).

Entre los géneros de plantas relevantes en la medicina popular Mexicana, se encuentra el género *Physalis*, puesto que varias de sus especies han sido utilizadas para tratar diversos padecimientos así, *P. gracilis* se ha empleado para tratar algunos tipos de colecistopatía, *P. nicandroides* para reducción de síntomas y signos de edemas, *P. orizabae* como antidiarreico y para contrarrestar la colecistopatía, *P. ixocarpa* como diurético y para tratamientos de cefalea, dolor estomacal, dolor de amígdalas, entre otros y *P. cinerascens* es utilizada para disminuir padecimientos gastrointestinales e infecciones cutáneas (Santiaguillo y Blas, 2009). *Physalis* pertenece a la familia Solanaceae y agrupa alrededor de 84 especies. En México es el segundo género con mayor número de especies (65) de las cuales 37 son endémicas (Martínez *et al.*, 2017).

Con estos antecedentes, diversos investigadores han tenido interés en el estudio químico de *Physalis* para poder constatar sus usos tradicionales, por ejemplo, Huang *et al.* (2020) consideran a las withanólidas como las principales sustancias biológicas que sustentan el uso tradicional de especies del género *Physalis*, ya que investigaciones farmacológicas de algunos de estos metabolitos secundarios han mostrado que ellos presentan actividades biológicas como antiinflamatoria, antimicrobiana, inmunoreguladora, anticáncer, etc.

El presente proyecto comprende el primer estudio químico de *Physalis volubilis* Waterf., especie endémica de nuestro país, cuya investigación ampliará el conocimiento químico del género.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Familia Solanaceae

La familia Solanaceae reúne 96 géneros y alrededor de 2,300 taxones, sus especies se distribuyen en regiones tropicales, subtropicales y zonas templadas. La principal importancia de esta familia radica en su uso como fuente de alimento, por ejemplo: la papa, el tomate, el jitomate, la berenjena y el chile. Otras especies son de uso industrial como el tabaco o bien ornamentales como la petunia, el floripondio, la copa de oro y el huele de noche.

Entre los géneros importantes de Solanáceas se encuentran *Solanum*, *Lycianthes*, *Cestrum*, *Datura*, *Capsicum* y *Physalis* (Vargas *et al.*, 2003), ya que varias de sus especies son de uso medicinal, ceremonial o estimulante.

### 2.2. Género *Physalis*

El género *Physalis* incluye alrededor de 90 especies distribuidas principalmente en Estados Unidos, México, Centroamérica, Sudamérica y las Antillas (Whitson y Manos, 2005).

La importancia del género *Physalis* radica en el uso culinario de los frutos de algunas de sus especies, así como en su uso en la medicina tradicional. Un ejemplo del alto potencial económico y biológico del género es la especie *Physalis philadelphica* (tomate de cáscara, verde o de fresadilla) cuyo fruto es ampliamente consumido, por tal motivo su cultivo comercial es importante, y la existencia de variedades criollas o autóctonas en diversas regiones del país es aún más relevante, ya que podrían ser consideradas, al menos, como un recurso genético de gran potencial (Vargas *et al.*, 2003).

Entre las especies utilizadas para fines alimenticios se encuentran: *P. peruviana*, *P. pubescens*, *P. minima*, *P. chenopodifolia*, *P. angulata*, *P. philadelphica*, *P. coztomatl*, *P. gracilis*, *P. pruinosa* y *P. nicandroides*. Generalmente sus frutos son conocidos como tomates, nombre popular que deriva del náhuatl “tomatl” (Montes y Aguirre, 1994; Santiaguillo y Blas, 2009).

En la medicina tradicional algunas especies de *Physalis* son utilizadas para aliviar dolores de cabeza, de estómago, infecciones de garganta, asma, problemas urinarios, reumatismo y tumores (Montes y Aguirre, 1994; Rengifo-Salgado y Vargas-Arana, 2013).

Por mencionar algunos ejemplos, la especie *P. coztomatl* (tomate agrio o tomate amarillo) esta descrita en el código florentino donde se menciona su uso como antidiarreico, antipirético, diurético y para el tratamiento de cataratas, manchas hepáticas en la cara, dolor de estómago, absceso nasal, asma y flatulencia (Pérez-Castorena *et al.*, 2006). Otra especie que posee propiedades curativas es *P. angulata* (bolsa mullaca), utilizada ampliamente por grupos nativos de Perú, la maceración e infusión de sus raíces son usadas para la diabetes y hepatitis, la trituración de su fruto para la sarna, la cocción de sus hojas y frutos para la inflamación y la desinfección (Mejía y Rengifo, 2000).

### 2.2.1 Metabolitos en el género *Physalis*

En esta sección se mencionan de manera general algunos de los metabolitos secundarios aislados de especies del género *Physalis*, entre los que destacan las withanólidas, diterpenos tipo labdano, ésteres de sacarosa y flavonoides (Zhang y Tong, 2016).

- Withanólidas

Las withanólidas son los metabolitos aislados con mayor frecuencia de *Physalis*, aunque también se han encontrado en otros géneros de la familia Solanaceae (*Acnistus*, *Datura*, *Deprea*, *Dunalis*, *Discopodium*, *Exodeconus*, *Hyoscyamus*, *Ioichroma*, *Jaborosa*, *Larnax*, *Lycium*, *Nicandra*, *Salpichroa*, *Trechonaetes*, *Tubocapsicum*, *Vassobia*, *Withania* y *Witheringia*) e incluso se han reportado en algunas leguminosas como *Cassia siamea* (Chen *et al.*, 2011).

Aproximadamente se han identificado 351 withanólidas en el género *Physalis* (Huang *et al.*, 2020) y algunas de ellas han sido objeto de diversos estudios de actividad biológica, por ejemplo, withaferina A (1), aislada por primera vez de la planta medicinal de la india *Withania somnifera* (Lavie *et al.*, 1965), presenta actividad antimicobacteriana, antimicrobiana contra bacterias *Gram*-positivas y *Gram*-negativas, antiinflamatoria, neuroprotectora y actividad citotóxica en células de cáncer de próstata, de mama, de leucemia y de melanoma (Patel *et al.*, 2013).

Químicamente las withanólidas son esteroides tipo ergostano (28 átomos de carbonos) y su cadena lateral de nueve carbonos puede estar oxidada en C-22 y C-26 o en C-23 y C-26 para formar un anillo de  $\delta$ - o  $\gamma$ -lactona. Las withanólidas que contienen una  $\delta$ -lactona o  $\delta$ -lactol son tipo A, y si contienen una  $\gamma$ -lactona o  $\gamma$ -lactol son tipo B (figura 1).

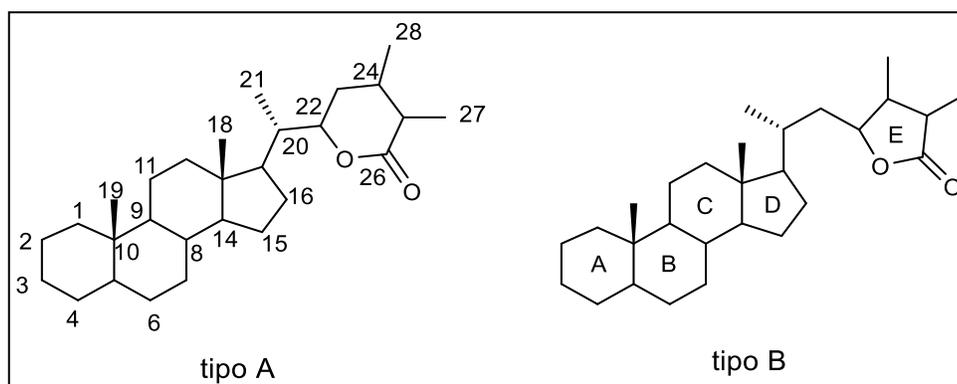


Figura 1. Esqueletos de withanólidas tipo A y tipo B.

Las withanólidas tipo A son los componentes predominantes en el género *Physalis* y se subdividen en dos grupos: grupo 1, esqueleto no modificado y grupo 2, esqueleto modificado.

Las withanólidas con esqueleto no modificado, grupo 1, figura 2, se caracterizan por poseer un doble enlace en C-5 o un epóxido en las posiciones C-5 y C-6 o C-6 y C-7. También al grupo 1 pertenecen las withanólidas intermedias, las cuales se forman a partir de la apertura del anillo epóxido de  $5\beta,6\beta$ - o  $6\alpha,7\alpha$ -epoxiwithanólidas y por reacciones de adición al doble enlace de C-5 (Chen *et al.*, 2011), un ejemplo de withanólida intermedia es el compuesto **2**.

Del género *Physalis* se han aislado alrededor de 209 withanólidas con esqueleto no modificado, *verbi gratia*, withaneomexólida D (**2**) aislada de *P. neomexicana* (Cao *et al.*, 2015),  $16\beta$ -hidroxiixocarpanólida (**3**) aislada de *P. philadelphica*, peruvianólida A (**4**) obtenida de *P. peruviana* y salpichrólida N (**5**) aislada de *P. hispida* (Huang *et al.*, 2020) (figura 3).

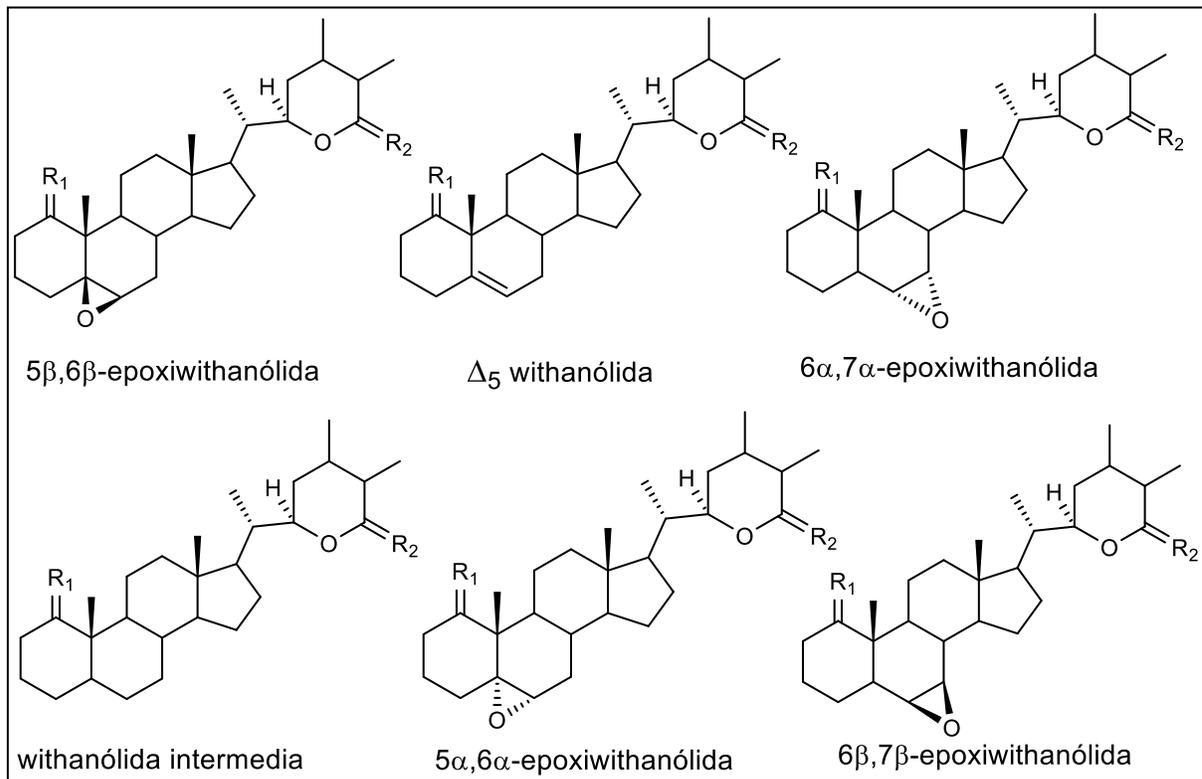


Figura 2. Estructuras generales de withanólidas tipo A, grupo 1 ( $R_1 = R_2 = O$  u OH, H).

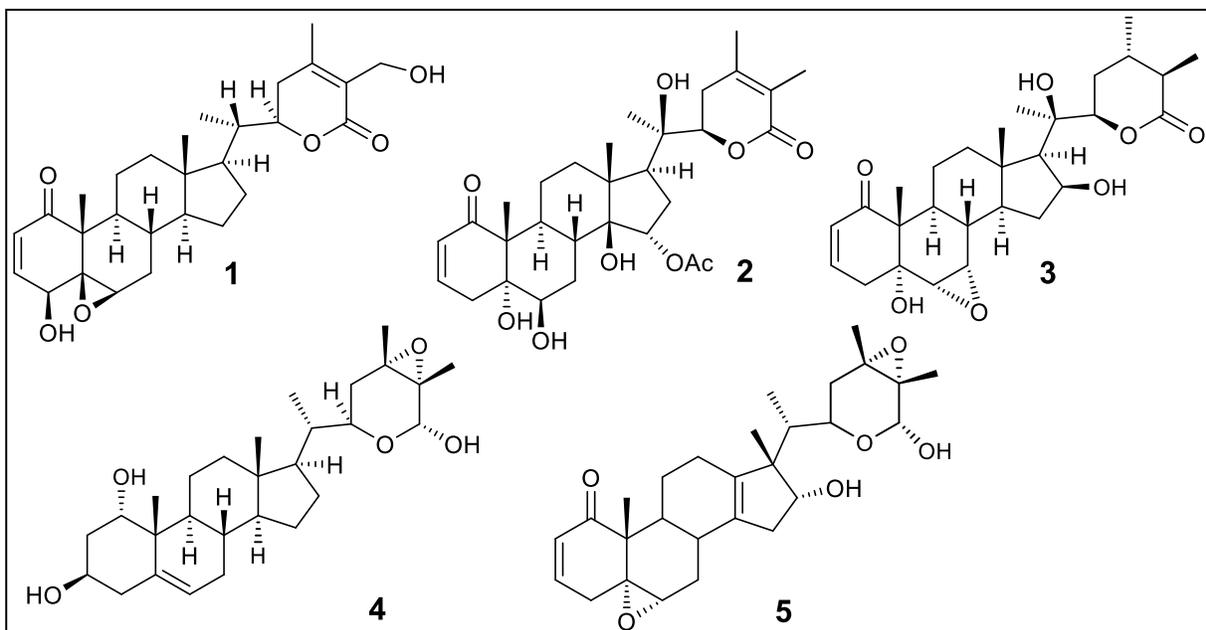


Figura 3. Withanólidas tipo A, grupo 1, aisladas del género *Physalis*.

En cuanto a las withanólidas con esqueleto modificado, grupo 2, figura 4, éstas presentan estructuras más complejas con modificaciones principalmente en los anillos C, D y E. El grupo incluye physalinas, neophysalinas, withaphysalinas, acnistinas y epiacnistinas, withajardinas, withametelinas, withanólidas de tipo norbornano, sativólidas,  $\delta$ -lactonas espiranoides,  $14\alpha,20\alpha$ -epoxiwithanólidas, subtriflora- $\delta$ -lactonas, nicandrenonas (withanólidas con anillo D aromático) y jaboroles (withanólidas con anillo A aromático) (Chen *et al.*, 2011).

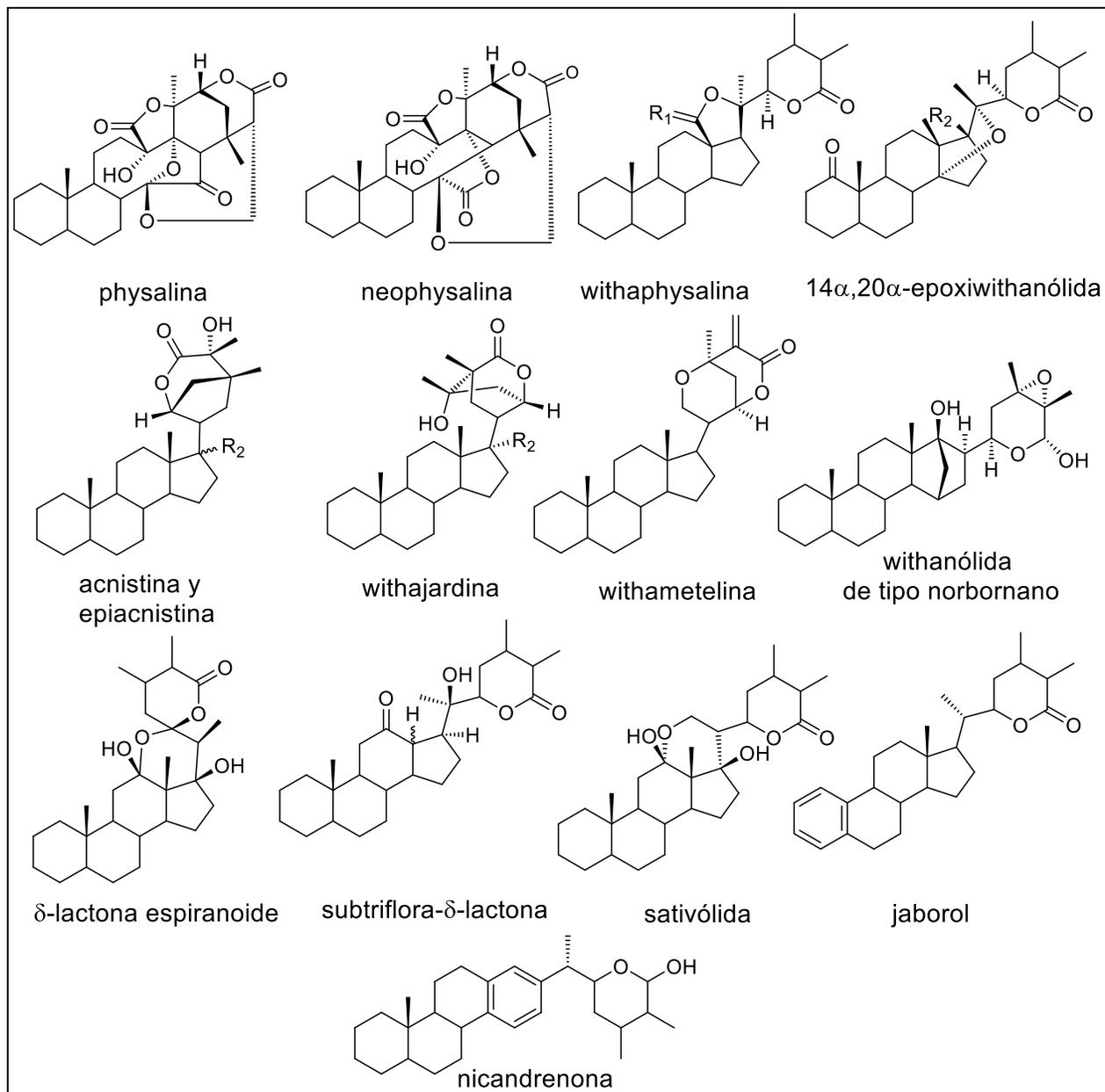


Figura 4. Estructuras generales de withanólidas tipo A, grupo 2 ( $R_1 = \text{OH}$  y  $\text{H}$ , u  $\text{O}$ ;  $R_2 = \text{OH}$  o  $\text{H}$ ).

Del género *Physalis* se han identificado aproximadamente 104 withanólidas con esqueleto modificado, correspondientes a physalinas [aromaphysalina A (**6**) aislada de *P. angulata*], neophysalinas [physalinol A (**7**) aislada de *P. alkenkeg*], withaphysalinas [withaphysalina Y (**8**) aislada de *P. angulata*], nicandrenonas [withahisólida I (**9**) aislada de *P. hispida*] y 14 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -epoxiwithanólidas [17 $\beta$ -hidroxi-14,20-epoxi-1-oxo-(22R)-witha-3,5,24-trienólida (**10**) derivada de *P. peruviana*] (figura 5).

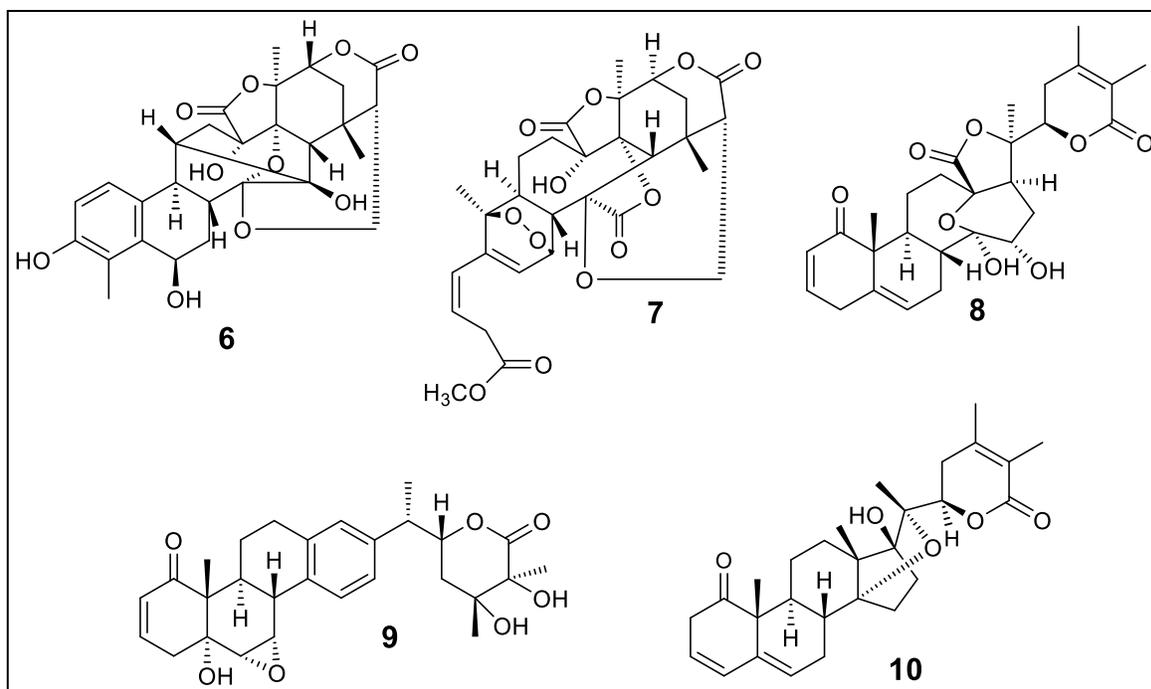


Figura 5. Withanólidas tipo A, grupo 2, aisladas del género *Physalis*.

Por último, las withanólidas tipo B se dividen en dos categorías: ixocarpalactonas [ixocarpalactonas A (**11**) y B (**12**), y 2,3-dihidro-3 $\beta$ -metoxiixocarpalactona (**13**) aisladas de *P. philadelphica*] y perulactonas [perulactonas E-G (**14-16**) aisladas de *P. peruviana*] (Zhang y Tong, 2016) (figura 6). En las ixocarpalactonas el núcleo del esteroide y el anillo  $\gamma$ -lactona están unidos por un enlace sencillo entre C-20 y C-22, y las perulactonas poseen una cadena conformada por los carbonos C-19, C-21 y C-22 que conecta el núcleo del esteroide y con el anillo  $\gamma$ -lactona (Huang *et al.*, 2020).

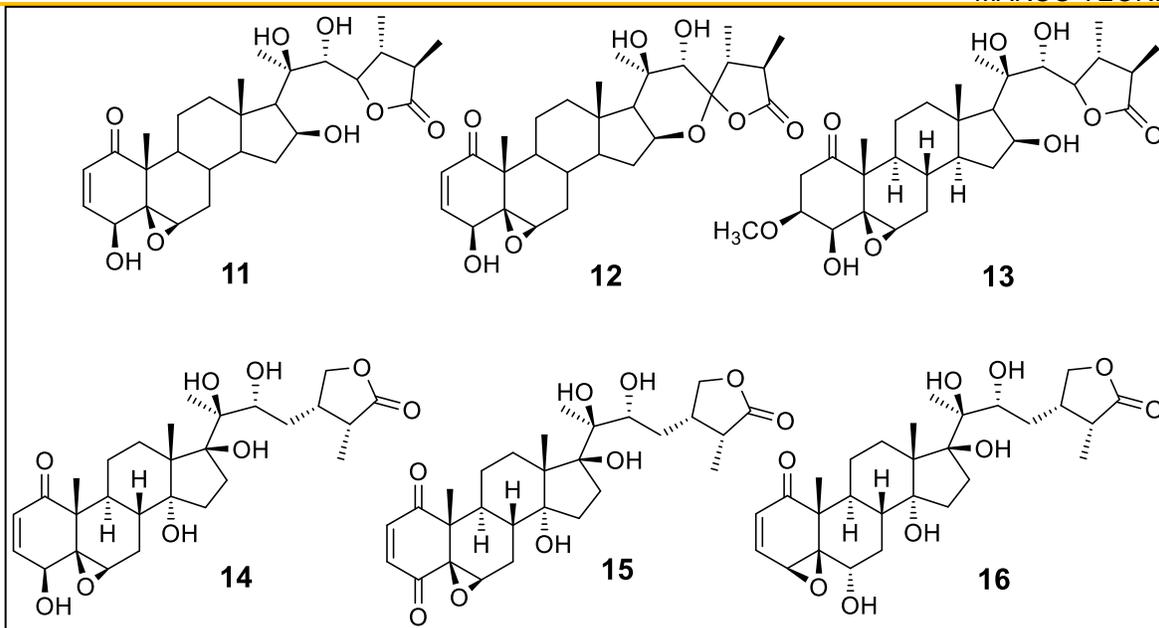


Figura 6. Ixocarpalactonas (11-13) y perulactonas (14-16) aisladas de *Physalis*.

- Terpenos

Los terpenos generalmente son aislados de plantas, pero también se han identificado en insectos, flora marina y fauna. Estos metabolitos están constituidos por unidades de isopreno y se forman en la naturaleza a partir de la biosíntesis del ácido mevalónico (Krishnaswamy, 2010).

Los terpenos se clasifican de acuerdo con el número de unidades de isopreno que conforman sus estructuras en:

1. Monoterpenos, contienen dos unidades de isopreno, por lo tanto 10 átomos de carbono.
2. Sesquiterpenos, contienen tres unidades de isopreno, por lo tanto 15 átomos de carbono.
3. Diterpenos, contienen cuatro unidades de isopreno, por lo tanto 20 átomos de carbono.
4. Sesterterpenos, contienen cinco unidades de isopreno, por lo tanto 25 átomos de carbono.
5. Triterpenos, contienen seis unidades de isopreno, por lo tanto 30 unidades de carbono.
6. Tetraterpenos, contienen ocho unidades de isopreno, por lo tanto 40 unidades de carbono.
7. Politerpenos, contienen más de ocho unidades de isopreno.

Del género *Physalis* se han aislado diterpenos tipo labdanos, por ejemplo de las partes aéreas de *P. coztomatl* se aisló physacoztomatina (**17**) y de las partes aéreas de *P. sordida* se obtuvo 12-O-acetilphysacoztomatina (**18**), 12,15-di-O-acetilphysacoztomatina (**19**) y physordina (**20**) (Pérez-Castorena *et al.*, 2006; Pérez-Castorena *et al.*, 2010) (figura 7).

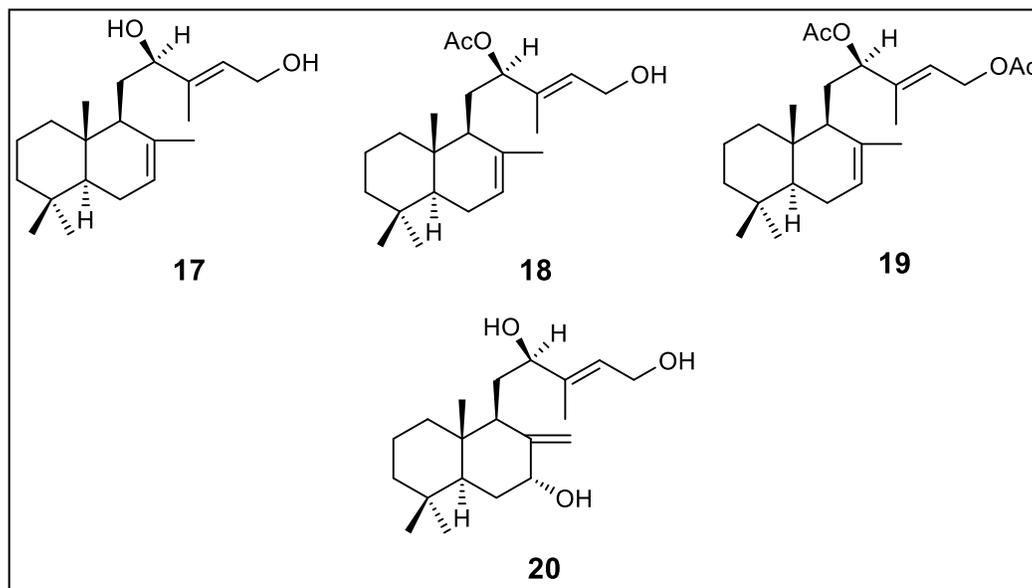


Figura 7. Diterpenos tipo labdano aislados de *Physalis coztomatl* y *Physalis sordida*.

Otro tipo de terpenos que se han encontrado en especies del género *Physalis* (*P. peruviana*) son los carotenoides (figura 8), compuestos que contienen ocho unidades de isopreno con uno o dos ciclos e insaturaciones. Los carotenoides son colorantes naturales de amplia distribución en la naturaleza (Ramadan, 2011).

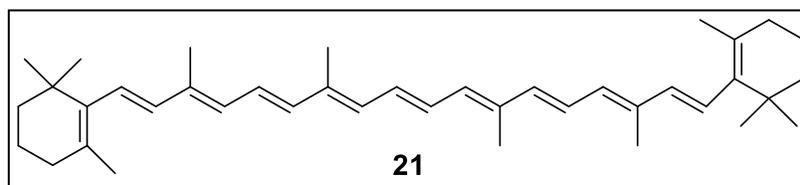


Figura 8.  $\beta$ -caroteno.

- Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos que se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). Se clasifican, dependiendo de la posición a la que se une el anillo B al anillo C y del grado de insaturación y oxidación del anillo C, en: antocianinas, chalconas, flavanonas, flavonas, flavonoles e isoflavonas (figura 9). Estos metabolitos secundarios presentan diversas actividades biológicas, por ejemplo: antiinflamatoria, antioxidante, antimicrobiana y algunos inhiben a la enzima  $\alpha$ -acetilcolinesterasa. Además, son responsables del color y aroma de las flores, y en los frutos juegan un papel importante para atraer polinizadores y así favorecer la germinación de las plantas (Panche *et al.*, 2016).

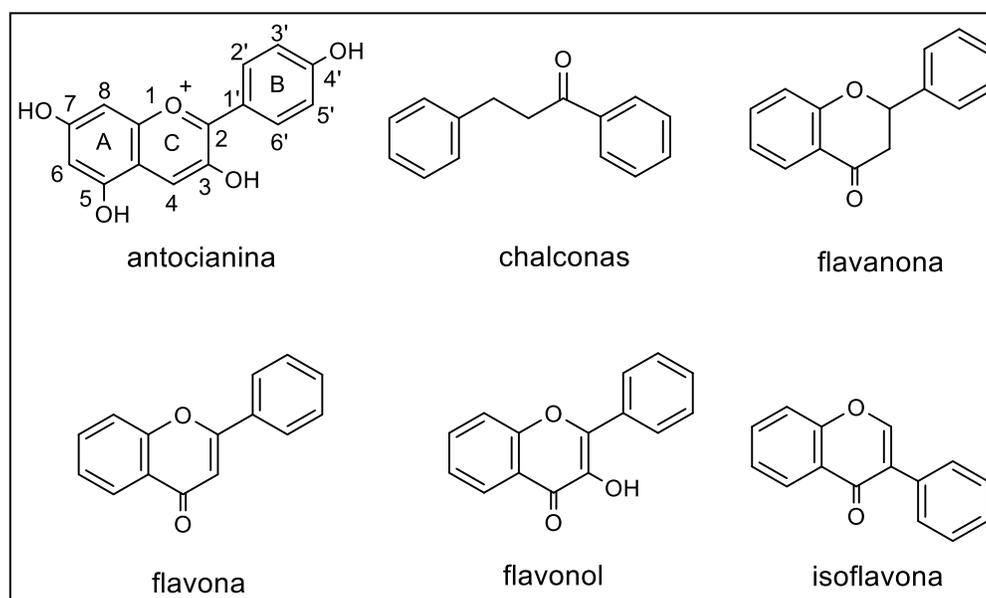


Figura 9. Algunos tipos de flavonoides.

Los flavonoides se han obtenido de diversas especies de *Physalis* como por ejemplo: *P. alkekengi*, *P. angulata*, *P. ixocarpa*, *P. peruviana*, *P. solanaceus* y *P. minima*. Una de las especies más analizadas es *P. peruviana*, de la que se aislaron los flavonoles rutina (**22**), miricetina (**23**) y kaempferol (**24**) de los cálices y frutos. También se identificó el flavonol **22** en las raíces y cálices de *P. solanaceus* y en *P. minima* se identificó 5,6,7-trimetoxiflavona (**25**) (Ser *et al.*, 1988; Drost-Karbowska *et al.*, 1993; Medina-Medrano *et al.*, 2014) (figura 10).

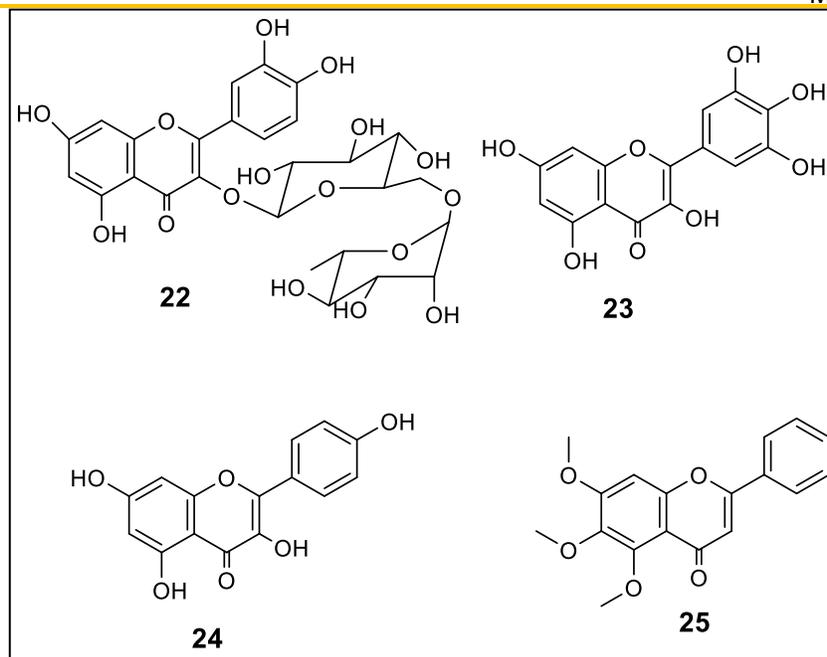


Figura 10. Flavonoides aislados de *Physalis*.

- Ésteres de sacarosa

Los ésteres de sacarosa son considerados agentes tensoactivos no iónicos que poseen un lado hidrofílico (sacarosa) y otro lipofílico (ácido graso). Dependiendo del grado de esterificación son utilizados como emulsificantes y estabilizantes en industrias de alimentos, de fármacos y cosméticos (Szüts y Szabó-Révész, 2012).

Del género *Physalis* se han aislado ésteres de sacarosa de los frutos de *P. nicandroide* [nicandrosas A-E (**26-30**)] y *P. solanaceus* [solanosas A-C (**31-33**)], de las partes aéreas de *P. sordida* [physordinosas A-D (**34-37**)] y de los cálices de *P. peruviana* [peruviosa A (**38**) y B (**39**)] (Maldonado *et al.*, 2006; Pérez-Castorena *et al.*, 2010; Pérez-Castorena *et al.*, 2012; Franco *et al.*, 2014) (figura 11).

Cabe mencionar que en el estudio de *P. sordida*, las acilsacarosas **34** y **37** mostraron actividad antiinflamatoria con una  $IC_{50}$  similar a la de indometacina, compuesto de referencia. Por otro lado, Franco *et al.* (2014) mencionan que la mezcla de peruviosa A y B (**38** y **39**) también es activa y sugieren que los ésteres de sacarosa son importantes compuestos antiinflamatorios en el género *Physalis*.

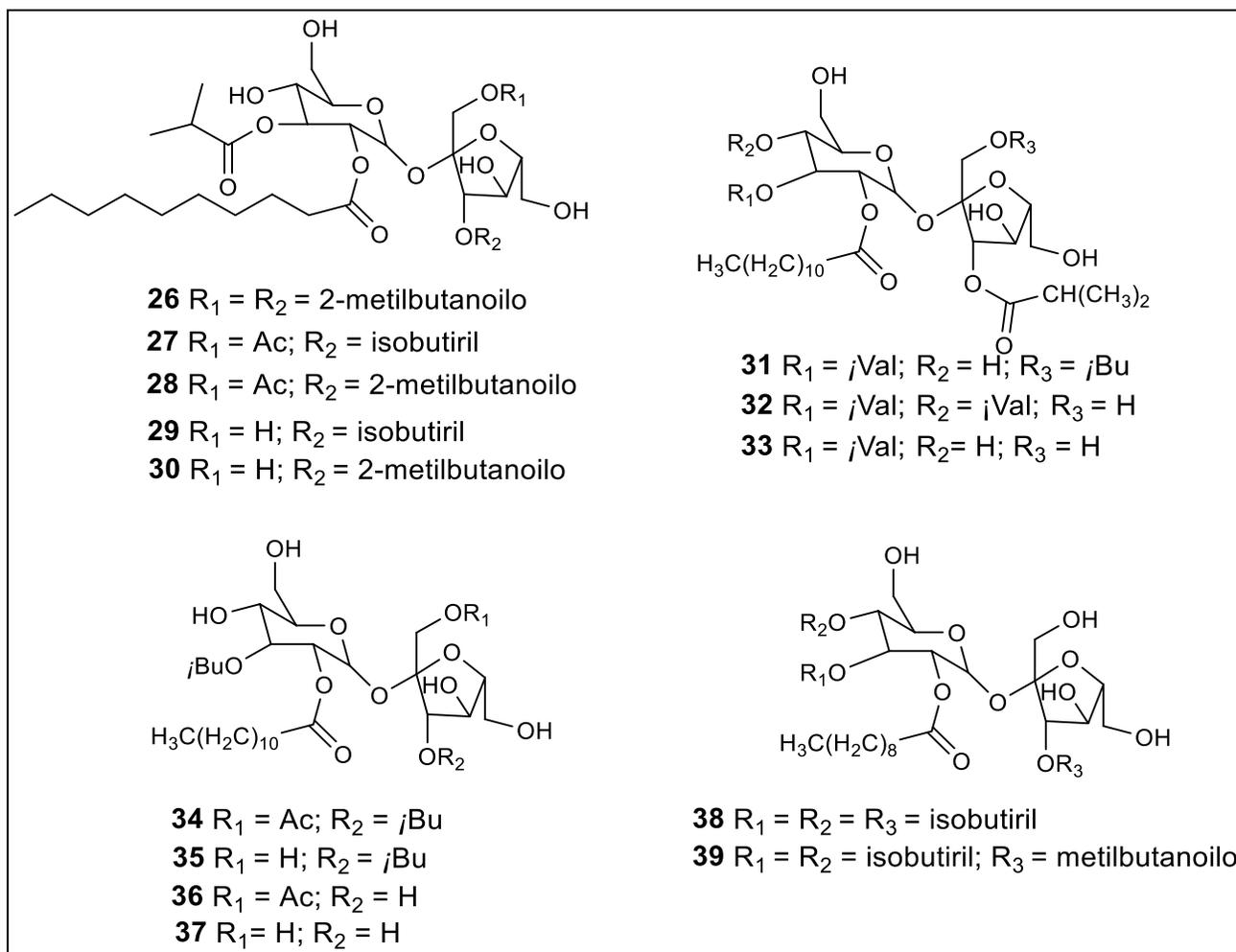


Figura 11. Ésteres de sacarosa del género *Physalis*.

- Alcaloides

Los alcaloides se encuentran ampliamente distribuidos en las familias Apocyanaceae, Ranunculaceae, Papaveraceae, Solanaceae y Rutaceae. Se clasifican en alcaloides heterocíclicos y no heterocíclicos. Los primeros son aquellos que contienen nitrógeno como heteroátomo en el anillo heterocíclico y los segundos poseen un átomo de nitrógeno que no forma parte de ningún sistema de anillos. (Wansi *et al.*, 2013).

En algunas especies de *Physalis* se han identificado alcaloides como higrina (**40**), cuscohigrina (**41**) y phygrina (**42**) (figura 12). Los dos primeros alcaloides se aislaron de las raíces de *P. ixocarpa* y el tercero se obtuvo de raíces y partes aéreas de *P. angulata*, *P. philadelphica*, *P. ixocarpa*, *P. edulis*, *P. peruviana*, *P. minima*, *P. pubescens*, *P. viscosa*, *P. pruinosa* y *P. alkekengi* (Basey *et al.*, 1992; Drost-Karbowska *et al.*, 1993).

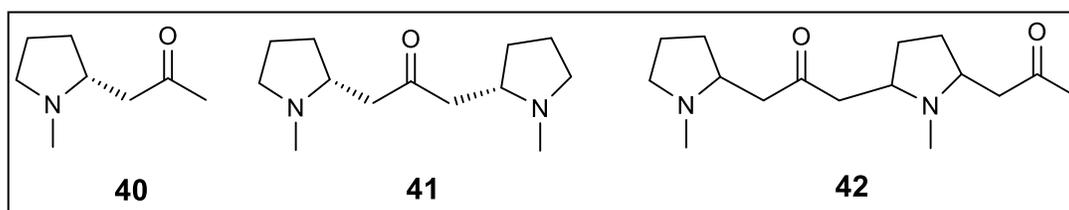


Figura 12. Alcaloides aislados en *Physalis*.

- Fitoesteroles

Los fitoesteroles son esteroides de origen vegetal que se encuentran en los frutos, semillas, hojas y tallos de casi todos los vegetales. Su estructura química es muy similar a la del colesterol, sin embargo, la diferencia estructural entre los fitoesteroles y el colesterol radica en la cadena lateral, que en el caso de los fitoesteroles suele presentar como arborescencias adicionales un metilo o un etilo y también puede presentar insaturaciones (López, 2005) (figura 13).

Un estudio realizado por Puente *et al.*, 2011, describe que el aceite extraído de la piel y pulpa de los frutos de *Physalis peruviana* posee un alto contenido de esteroides, entre ellos campesterol (**43**),  $\beta$ -sitosterol (**44**) y estigmasterol (**45**). Además, los autores sugieren que los esteroides **44** y **45** pueden ser los responsables de la capacidad de la fruta para reducir niveles de colesterol.

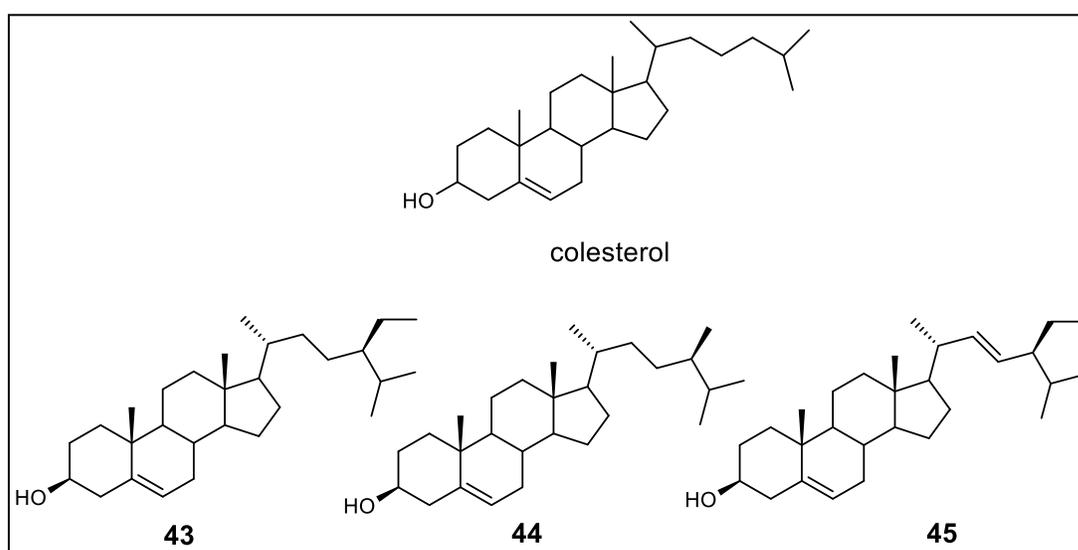


Figura 13. Estructuras del colesterol y de fitoesteroles.

## 2.2.2 Estudios farmacológicos de extractos y withanólidas obtenidas de especies del género *Physalis*

En esta sección se describen brevemente los resultados obtenidos de algunas pruebas farmacológicas que se han realizado a extractos y withanólidas de diferentes especies del género *Physalis*.

- Actividad Antiinflamatoria

La inflamación es una respuesta frecuente e inmediata a estímulos perjudiciales externos e internos incluyendo infecciones, sustancias químicas, estrés físico y patologías inmunes. Es un fenómeno complejo e involucra la activación de muchos tipos de células como granulocitos, monocitos, macrófagos, linfocitos y mastocitos resultantes en la síntesis y/o liberación de una variedad de mediadores, tales como prostaglandinas, citoquinas, quimiocinas, histamina, etc (Sobolewski *et al.*, 2010).

Estudios de actividad antiinflamatoria han dado resultados positivos para el extracto de metanol de *P. alkekengi* (Zhang y Tong, 2016) y para el extracto acuoso de las raíces de *P. angulata*, cabe mencionar que ambas especies se han utilizado como anti-inflamatorias en la medicina popular (Bastos *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha descrito actividad antiinflamatoria de 2,3-dihidrowithaphysalina C (**46**) y withaphysalina A (**47**) aisladas de *P. minima*; 4 $\beta$ -hidroxewithanólida E (**48**), withaperuviana C (**49**), physalactona (**50**) y phyperunólida F (**51**) aisladas de *P. peruviana*; physalina E (**52**) aislada de *P. angulata* (Huang *et al.*, 2020) y physalinas A, B y O (**53-55**) aisladas de *P. alkekengi* (Chen *et al.*, 2011) (figura 14). En este último trabajo, los autores proponen a las physalinas como los principales constituyentes activos de *P. alkekengi* var. *franchetii*. Además, sugieren que las características estructurales como una enona en el anillo A y un doble enlace o un epóxido en C-5 y C-6 son importantes para que las physalinas presenten actividad antiinflamatoria.

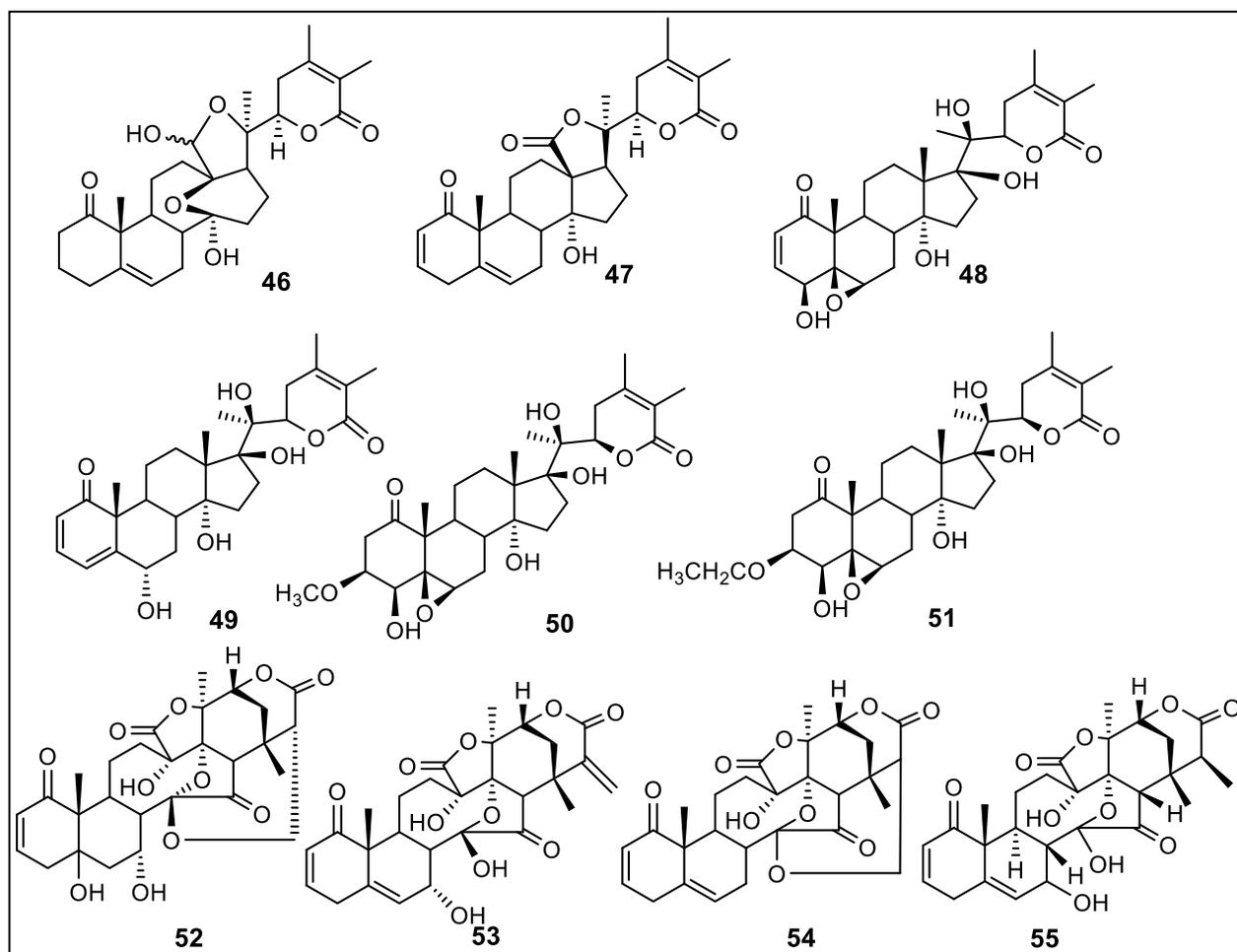


Figura 14. Withanólidas con actividad antiinflamatoria aisladas de *Physalis*.

- Actividad antimicrobiana

Estudios realizados a algunas especies de *Physalis* han mostrado actividad antimicrobiana de extractos y compuestos aislados, por ejemplo, el extracto de CHCl<sub>3</sub> de *P. angulata* mostró inhibición de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense* y *Mycobacterium intracellulare* (Pietro *et al.*, 2000). Otro ejemplo, es el extracto de metanol de las partes aéreas y cálices de *P. alkekengi*, que presentó inhibición de bacterias *Gram*-positivas, principalmente *B. cereus*, *B. subtilis* y *E. faecalis* (zonas de inhibición que van desde  $28.2 \pm 1.8$  a  $31.8 \pm 1.9$  a 500  $\mu\text{g/mL}$ /disco), asimismo, presentó inhibición de bacterias *Gram*-negativas como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli* (zonas de inhibición de  $14.6 \pm 1.1$  a  $16.6 \pm 3.2$  a 500  $\mu\text{g/mL}$ /disco) (Helvacı *et al.*, 2010). En este último trabajo, también se aisló physalina D (**56**) (figura 15),

que mostró inhibición de bacterias Gram-positivas como *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *S. aureus* y *B. subtilis*. Physalina D (**56**) también se aisló de las partes aéreas de *P. angulata* y presentó inhibición de *Mycobacterium tuberculosis* (Januario *et al.*, 2002). En cuanto a los frutos de *P. angulata*, de estos se aisló physalina B (**54**) y presentó inhibición de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (Silva *et al.*, 2005).

Por último, 4-desoxiwithaperuviana (**57**) aislada de *P. minima* (Canh *et al.*, 2019) y de *Withania somnifera* presentó actividad antimicrobiana contra *Bacillus cereus*, *Streptomyces species* y *Pseudomonas fluorescens*, aunque la actividad inhibitoria fue menor a la del fármaco de referencia, cloranfenicol (Abou-Douh, 2002) (figura15).

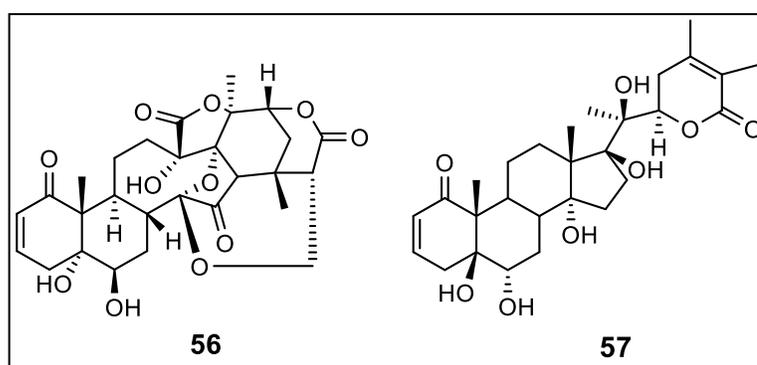


Figura 15. Withanólidas con actividad antimicrobiana.

- Actividad citotóxica

Entre las withanólidas que han presentado actividad citotóxica se encuentran las withalongólidas A, B, C y G (**58-61**), withaferina A (**1**) y 3 $\beta$ -O-sulfato de 2,3-dihidrowithaferina A (**62**) aisladas de las partes aéreas de *Physalis longifolia* (Zhang *et al.*, 2011). Estos metabolitos secundarios mostraron citotoxicidad potente contra carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (JMAR y MDA-1986), melanoma (B16F10 y SKMEL-28) y células fibroblásticas fetales (MRC-5).

Damu *et al.* (2007) reportan a withangulatina B (**63**), physalina D (**56**) y physalina F (**64**) de *Physalis angulata* con actividad citotóxica en diversas líneas celulares de cáncer humano. También, proponen una relación estructura-actividad, esto es, que la actividad citotóxica es favorecida para withanólidas que poseen un grupo hidroxilo en posición 4 $\beta$ , una enona en el anillo A y un grupo 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxi en el anillo B.

En un estudio de *P. minima*, Ma *et al.* (2007) aíslan withaphysalina C (**65**) (figura 16) y describen su actividad citotóxica frente a líneas celulares de cáncer de colon (HCT-116) y de pulmón (NCI-H46), los autores también sugieren que la enona del anillo A y un doble enlace o un epóxido en las posiciones 5 y 6 en el anillo B son características estructurales que favorecen la actividad citotóxica de las withanólidas.

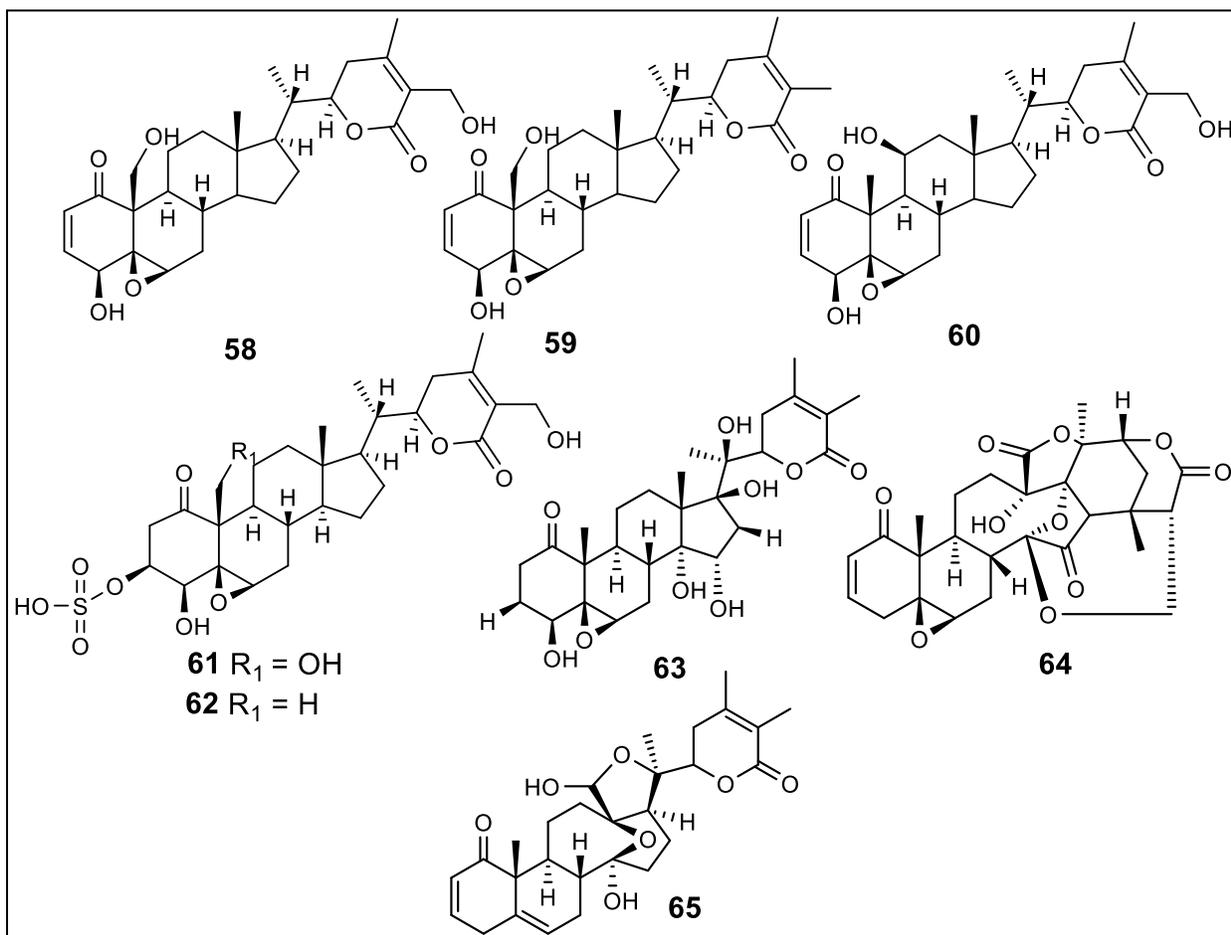


Figura 16. Withanólidas con actividad citotóxica del género *Physalis*.

- Actividad inhibidora de acetilcolinesterasa

La enzima acetilcolinesterasa (AChE) es la responsable de la regulación y degradación del neurotransmisor acetilcolina, el cual es importante en la sinapsis colinérgica en el sistema nervioso (Castellanos, 2014).

Yu *et al.* (1999) señalan que el sistema colinérgico es el sistema neurotransmisor más temprano y más profundo afectado en la enfermedad de Alzheimer (EA), con pérdidas sustanciales en el cerebro anterior, la corteza y el hipocampo. Asimismo,

mencionan que los inhibidores de colinesterasa son los agentes que han demostrado la mayor actividad en la EA.

Por otro lado, Nogales *et al.* (2005) aluden que la EA se produce precozmente por una pérdida de neuronas colinérgicas y que los inhibidores de la acetilcolinesterasa intentan compensar este defecto.

El metabolito secundario ampliamente distribuido en el género *Physalis*, withaferina A (**1**), se ha aislado de *P. longifolia* y *P. angulata* (Zhang *et al.*, 2011; Brar y Gupta, 2017), y ha mostrado capacidad de inhibir a las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE) (Choudhary *et al.*, 2004).

- Actividad antioxidante

Las reacciones de óxido-reducción son esenciales en los procesos metabólicos celulares, sin embargo, el exceso de O<sub>2</sub> favorece la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que producen daño celular, no obstante, existen sustancias llamadas antioxidantes, encargadas de reducir el daño oxidativo, mantener el equilibrio oxido-reducción y la sobrevivencia celular. Por ejemplo, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, α-tocoferol, carotenoides como el β-caroteno, clorofila, flavonoides, taninos y ciertos micronutrientes, reducen el daño oxidativo, mantienen el equilibrio oxido-reducción y la sobrevivencia celular (Wu *et al.*, 2005; Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2013).

De acuerdo con el estudio realizado por Wu *et al.* (2005), de los extractos de la planta entera *P. peruviana*, obtenidos con etanol a diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80 y 95 %), aquél obtenido con etanol al 95% mostró la más potente y excelente actividad antioxidante en tejido de hígado de rata. Además, sugieren que el extracto de EtOH de *P. peruviana* es un excelente inhibidor de la enzima xantina oxidasa, la cual está asociada con la producción de especies reactivas de oxígeno.

### 2.3. *Physalis volubilis*

*P. volubilis* pertenece a la sección Lanceolatae, a la que también pertenecen *P. gracilis*, *P. hastula*, *P. hederifolia*, *P. sordida* y *P. virginiana*. Estas especies se caracterizan por ser plantas herbáceas perennes y se distribuyen en Estados Unidos y México (Vargas *et al.*, 2003).

*P. volubilis* es endémica de México y se localiza en los estados de Michoacán y Jalisco. La especie crece en laderas, márgenes o claros de bosques de pino-encino o bosques mesófilos de montaña, y florece entre los meses de junio a marzo (Vargas *et al.*, 2003).



Figura 17. *Physalis volubilis*.

[Fotografías de Mahinda Martínez, Michoacán, 2018]

### 3. JUSTIFICACIÓN

Diversas especies del género *Physalis* se han empleado en la medicina tradicional, lo que ha inducido a realizar estudios químicos y farmacológicos de especies de *Physalis*. Hasta este momento, algunas especies del género han mostrado actividades biológicas importantes, entre dichas especies se pueden mencionar a *P. alkekengi*, *P. angulata*, *P. ixocarpa*, *P. minima*, *P. peruviana* y *P. philadelphica*, sin embargo, de otras especies del mismo género se desconoce su composición química y por ende sus actividades biológicas.

Cabe destacar que de las cinco especies de *Physalis* que pertenecen a la sección Lanceolatae, solo se han estudiado químicamente *P. gracilis*, *P. sordida* y *P. virginiana*, de manera que no existe ningún estudio químico de *Physalis volubilis*. Por lo que la presente investigación ampliará el conocimiento del perfil químico del género *Physalis* a través del estudio de *Physalis volubilis*.

### 4. HIPÓTESIS

De *P. gracilis*, *P. sordida* y *P. virginiana*, especies que pertenecen a la misma sección que *Physalis volubilis*, Lanceolatae, se han aislado withanólidas, acilsacarosas, diterpenos de tipo labdano y fitoesteroles (Maldonado *et al.*, 2010; Pérez-Castorena *et al.*, 2010; Padierna, 2014). Por lo tanto, *Physalis volubilis* deberá contener metabolitos secundarios similares a los de las especies estudiadas de la sección Lanceolatae.

## 5. OBJETIVO

Este proyecto tiene como objetivo aportar conocimiento químico del género *Physalis*, a través del estudio del extracto de acetona de la planta entera, excepto frutos y cálices, de *Physalis volubilis*.

### 5.1. Objetivos específicos

- Aislar y purificar los metabolitos secundarios presentes en cantidades apreciables (mayores a 10 mg) en la planta entera sin frutos ni cálices de *Physalis volubilis* Waterf.
- Determinar las estructuras de los compuestos aislados y realizar, cuando la cantidad obtenida de los metabolitos lo permita, pruebas de actividad antiinflamatoria, antimicobacteriana, citotóxica e inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa y  $\alpha$ -glucosidasa de levadura y de rata.

## 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 6.1. Material y equipo

Las cromatografías en columna a baja presión se realizaron con gel de sílice 60 G (Merck) como fase estacionaria y las cromatografías en columnas flash se llevaron a cabo con gel de sílice 230-400 mesh (Macherey-Nagel).

Las cromatografías analíticas en capa delgada (CCD) se realizaron en cromatofolios Macherey-Nagel Alugram SIL G/UV<sub>254</sub> de 0.20 mm de grosor de la capa de gel de sílice.

Las cromatografías preparativas en placa se realizaron en placas SIL G/UV<sub>254</sub> de 10 x 20 cm y de 1.0 ó 2.0 mm de grosor la capa de gel de sílice.

Para visualizar las cromatografías analíticas se utilizó una lámpara de luz ultravioleta Spectroline CX-20 a una longitud de onda de 254 nm y como revelador químico se empleó una disolución de sulfato de cérico [(Ce<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O] en ácido sulfúrico y agua al 4.40 %.

Los espectros en el infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27 y la rotación óptica de los compuestos se determinó en un polarímetro Perkin Elmer 343.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se obtuvieron en los siguientes espectrómetros: Bruker Avance 300 MHz (<sup>1</sup>H a 300 MHz, <sup>13</sup>C a 75 MHz), Bruker Avance III 400 MHz (<sup>1</sup>H a 400 MHz, <sup>13</sup>C a 100 MHz), Bruker Avance III HD 500 MHz (<sup>1</sup>H a 500 MHz, <sup>13</sup>C a 125 MHz) y Varian Inova 500 MHz (<sup>1</sup>H a 500 MHz, <sup>13</sup>C a 125 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm y como referencia se usó tetrametilsilano (TMS).

Los espectros de masas se obtuvieron en los equipos JEOL The AccuTOF JMS-T100LC (EM-DART) y Agilent 6200 series TOF/6500 series (EMAR-ESI).

## 6.2. Material vegetal

El material vegetal fue recolectado en el Estado de Michoacán en mayo de 2018 por la Dra. Mahinda Martínez quien lo identificó como *Physalis volubilis* Waterf. Una muestra del material vegetal fue depositada en el herbario de la Universidad Autónoma de Querétaro (colecta 9447, voucher 810).

## 6.3. Metodología

### 6.3.1 Aislamiento y purificación de los compuestos

La planta entera, excepto frutos y cálices, se secó a temperatura ambiente y se molió en un molino de cuchillas. Posteriormente, el material vegetal (828 g) se extrajo mediante percolación con hexano, acetona y metanol. Después de eliminar los disolventes por destilación se obtuvieron 32.07, 31.49 y 100.21 g de los extractos correspondientes.

El extracto de acetona se fraccionó por cromatografía a baja presión (CC-1) usando como sistema de elución hexano/acetona 97:3 al que gradualmente se le fue aumentando la polaridad hasta llegar al 100 % de acetona. Las fracciones se analizaron por cromatografía en capa delgada y se reunieron aquellas que mostraron un perfil similar.

De las fracciones 143 a 156 eluidas con hexano/acetona 50:50 se obtuvo un sólido blanco (compuesto I, 1.72 g) que se purificó por cromatografía en columna flash (CC-2) usando como eluyente diclorometano/metanol 97:3. De las fracciones 11 a 13 se obtuvieron 303.3 mg del compuesto I por cristalización en hexano/acetona.

Las fracciones de 157 a 159 de CC-1, eluidas con hexano/acetona 50:50, se purificaron (382.3 mg) por cromatografía en columna flash (CC-3) utilizando como sistema de elución diclorometano/metanol 97:3; de las fracciones 15 a 17 se obtuvo el compuesto I, sin embargo una cromatografía analítica mostró que estaba impuro, por lo que se reunió con las aguas madres de este compuesto obtenido de CC-2 y con las fracciones 14 a 19 también de CC-2. Todo fue recrystalizado obteniendo 89.4 mg de I.

De las fracciones 161 a 162 de CC-1 (eluidas con hexano/acetona 50:50) se filtró un sólido blanco amorfo (compuesto II). Una cromatografía analítica de glucósido de  $\beta$ -

sitosterilo y del compuesto **II** mostró el mismo Rf para ambos compuestos, por lo que se identificó al sólido como  $\beta$ -D-glucopiranosido de  $\beta$ -sitosterilo.

Las fracciones 160, 163 a 172 de CC-1 (eluidas con hexano/acetona 50:50) incluyendo las aguas madres del compuesto **II**, las fracciones 173 a 179 (eluidas con acetona/hexano 60:40) y las fracciones 180 a 187 (eluidas con acetona/hexano 80:20, CC-1) fueron reunidas y decoloradas con carbón activado. Posteriormente, fueron purificadas (6.78 g) por cromatografía en columna flash (CC-4) usando como sistema de elución diclorometano/metanol 95:5. De las fracciones 20 a 33 se obtuvo un sólido blanco amorfo (794.3 mg) que se purificó mediante cromatografía en columna flash (CC-5) usando como sistema de elución diclorometano/metanol 90:10; de las fracciones 10 a 21 se obtuvo una mezcla denominada PVA-3.

Las fracciones 188 a 206 de CC-1 (eluidas con acetona) se reunieron y decoloraron con carbón activado, posteriormente se purificaron (6.27 g) por cromatografía en columna a baja presión (CC-6) utilizando como eluyente diclorometano/metanol 85:15. De las fracciones 3 a 5 por cristalización en metanol/acetona se obtuvo un sólido blanco amorfo (**III**), pero una cromatografía analítica mostró la presencia de impurezas. Los sólidos se lavaron con hexano, diclorometano y metanol, del lavado con metanol se obtuvieron 77.6 mg del compuesto **III**. Las fracciones vecinas 6 y 7 también presentaron el compuesto **III**, por lo que se reunieron con las aguas madres de este compuesto y se recrystalizaron en metanol/acetona obteniendo 106.3 mg de **III**. Las aguas madres junto con las fracciones 8 a 19 de CC-6 se purificaron (4.83 g) por una cromatografía en columna flash (CC-7) usando como sistema de elución diclorometano/metanol 85:15; de las fracciones 10 a 23 se obtuvieron 480.1 mg de **III**.

Las fracciones 24 a 33 de CC-7 se reunieron con las fracciones 207 a 222 de CC-1 (eluidas con acetona) y se purificaron (3.96 g) por cromatografía en columna flash (CC-8) usando un sistema de elución de acetato de etilo/metanol 85:15. Las fracciones 6 a 15 se reunieron (442.3 mg) y purificaron por cromatografía en columna flash (CC-9) la cual fue eluida con diclorometano/metanol 95:5. De las fracciones 9 a 10 se obtuvieron 18.0 mg del compuesto **I**.

Las fracciones 35 a 41 de CC-9 se purificaron (210.2 mg) por cromatografía en columna flash (CC-10) eluida con diclorometano/metanol 93:7; de las fracciones 37 a 52 se obtuvo la mezcla PVA-3.

Las fracciones 26 a 52 (CC-8) se reunieron y purificaron (1.99 g) por cromatografía en columna flash (CC-11) eluida con diclorometano/metanol 85:15; de las fracciones 17 a 25 se obtuvieron 85.6 mg de **III**.

De las fracciones 26 a 28 de CC-11 se obtuvo un sólido amorfo que se purificó (142.1 mg) por cromatografía en columna flash (CC-12) eluida con diclorometano/metanol 87:13. De las fracciones 31 a 39 y del lavado de la cromatografía en columna con metanol se obtuvo una mezcla de compuestos denominada PVA-4.

De las fracciones 31 a 33 de CC-11 se obtuvo un sólido blanco amorfo (391.6 mg) que se purificó por cromatografía en columna flash (CC-13) usando como sistema de elución diclorometano/metanol 80:20. De las fracciones 13, 15 a 19 y del lavado de la cromatografía en columna con metanol se obtuvo la mezcla PVA-4. Una cromatografía analítica de las fracciones 34 a 46 de CC-11 mostró que contenían PVA-4.

### 6.3.2 Reacciones de acetilación

- Primera acetilación del compuesto **III**

A 100.9 mg del compuesto **III** se le adiciono 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se le adicionó hielo. La mezcla se extrajo 4 veces con diclorometano y la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de HCl al 5 % hasta llegar a pH 4, se lavó con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> hasta llegar a un pH 7, se lavó 2 veces con agua, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el disolvente.

La mezcla cruda de reacción (104.5 mg) se purificó por cromatografía en columna flash (CC-14) usando como sistema de elución diclorometano/acetona 50:50. De las fracciones 22 a 23 se obtuvieron 63.4 mg de **III A** como sólidos amorfos.

- Primera acetilación de la mezcla **PVA-3**

A 103.2 mg de PVA-3 se les adiciono 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético. La mezcla se dejó 52 min a temperatura ambiente y posteriormente se le adicionó hielo. La mezcla se trabajó de manera similar a la descrita anteriormente.

- Segunda acetilación de la mezcla **PVA-3**

A 511.6 mg de PVA-3 se les adicionaron 5 mL de piridina y 5 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó 70 min a temperatura ambiente, se le adiciono hielo y se trabajó de manera similar a la acetilación de **III**.

Las mezclas crudas de reacción de ambas acetilaciones se reunieron (625.6 mg) y purificaron mediante una cromatografía en columna flash (CC-15) usando como sistema de elución hexano/acetona 80:20; de las fracciones 13 a 14 se obtuvo un sólido blanco amorfo, posteriormente se cristalizó con hexano/acetona, obteniéndose 11.7 mg del compuesto **IV**.

Las fracciones 12 y 15 a 23 junto con las aguas madre de **IV** (78 mg) se purificaron por dos sucesivas cromatografías preparativas en placa (eluidas 4 veces con hexano/acetona 65:35) y por una cromatografía en columna a baja presión usando como sistema de elución hexano/acetato de etilo 70:30 (disolventes grado HPLC) para obtener 19.3 mg del compuesto **IV**.

- Tercera acetilación de la mezcla **PVA-3**

A 5.8 mg de la mezcla PVA-3 se le añadió 0.1 mL de anhídrido acético y 0.1 mL de piridina. Después de 5:30 h a temperatura ambiente, la mezcla se secó con una corriente de nitrógeno. El crudo de la reacción (9.7 mg) se purificó por cromatografía en columna flash (CC-16) usando como sistema de elución hexano/acetona 70:30. De las fracciones 18 a 22 se obtuvieron 2.3 mg del compuesto **IV A**.

Una muestra no pura del compuesto **IV A** (16.3 mg) obtenida de la acetilación de la mezcla PVA-3 del extracto de metanol de *P. volubilis*, fue proporcionada para la continuación de este proyecto y se reunió con los 2.3 mg obtenidos de la tercera reacción de acetilación de PVA-3 para su purificación por dos sucesivas cromatografías en columna flash (CC-17 y CC-18) eluidas con hexano/acetona 70:30. Finalmente, las

fracciones 7 a 11 de CC-18 se purificaron (7.0 mg) por cromatografía en placa preparativa (hexano/acetona 70.5: 29.5) y se obtuvieron 3.9 mg del compuesto **IV A**.

- Primera acetilación de la mezcla **PVA-4**

A 140 mg de PVA-4 se les adicionó 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente 60 min y se trabajó de manera similar a las acetilaciones descritas anteriormente.

El crudo de reacción (166.8 mg) se purificó por cromatografía en columna flash (CC-19) usando como sistema de elución hexano/acetona 68:32. De las fracciones 33 a 40 se obtuvieron 10.3 mg de un sólido blanco amorfo (compuesto **V**). Una cromatografía analítica mostró que las fracciones 27 a 32 y 41 a 51 también contenían el compuesto **V**, por lo que se reunieron y purificaron (10.7 mg) por cromatografía en columna flash (CC-20) usando como sistema de elución hexano/acetona 65:35; de las fracciones 7 a 8 se obtuvieron 3.2 mg de **V**.

- Segunda acetilación de la mezcla **PVA-4**

A 400.3 mg de PVA-4 se les adicionaron 4 mL de piridina y 4 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó 65 min a temperatura ambiente, se añadió hielo y se trabajó de manera similar a las descritas anteriormente.

La mezcla cruda (407.3 mg) se purificó por cromatografía en columna flash (CC-21) usando como sistema de elución hexano/acetona 65:35; de las fracciones 25 a 28 se obtuvieron 37.3 mg de un sólido blanco amorfo (compuesto **VI**). Posteriormente, 29.0 mg de **VI** se purificaron por dos sucesivas cromatografías en columna flash (CC-22 y CC-23) utilizando los sistemas de elución hexano/acetona 65:35 y 70:30. De las fracciones de 8 a 11 de CC-23 se obtuvieron 17.4 mg de **VI**.

De las fracciones 33 a 35 de CC-21 se obtuvo un sólido blanco amorfo (89.1 mg) que se purificó por cromatografía preparativa en placa, eluida 3 veces con hexano/acetona 65:35. El sólido obtenido (52.6 mg) se purificó por cromatografía en columna flash (CC-24) eluida con hexano/acetona 65:35. De las fracciones 7 a 10 se obtuvieron 3.4 mg del compuesto **V**. Este compuesto también se obtuvo de las fracciones 36 a 40 de CC-21.

**Compuesto I:** Sólido blanco; p.f. 245-249 °C (hexano/acetona); IR (espectro 1) (CHCl<sub>3</sub>/solución)  $\nu_{\max}$  3576 y 1691 cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (espectro 2) y RMN-<sup>13</sup>C (espectro 3) datos en la tabla 1; EM-DART<sup>+</sup>:  $m/z$  471 [M+H]<sup>+</sup>, correspondiente a la fórmula molecular C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>O<sub>6</sub>.

**Compuesto III:** Sólido blanco amorfo: IR (espectro 4) (KBr/pastilla)  $\nu_{\max}$  3442, 1703 y 1678 cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (espectro 5) datos en la tabla 3 y RMN-<sup>13</sup>C (espectro 6) datos en la tabla 2; EMAR-ESI:  $m/z$  567 [M-1]<sup>-</sup>, correspondiente a la fórmula molecular C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>O<sub>10</sub>S; RO;  $[\alpha]_D$  9.16°.

**Compuesto III A:** Sólido blanco amorfo: IR (espectro 9) (CHCl<sub>3</sub>/solución)  $\nu_{\max}$  1735, 1711 y 1240 cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (espectro 10) datos en la tabla 3 y RMN-<sup>13</sup>C (espectro 11) datos en la tabla 2; EMAR-ESI:  $m/z$  651 [M-1]<sup>-</sup>, correspondiente a la fórmula molecular C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>O<sub>12</sub>S.

**Compuesto IV:** Sólido blanco amorfo: IR (espectro 12) (CHCl<sub>3</sub>/solución)  $\nu_{\max}$  3467, 1755 y 1739 cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (espectro 13) datos en la tabla 5 y RMN-<sup>13</sup>C (espectro 14) datos en la tabla 4; EMAR-ESI:  $m/z$  869 [M+Na]<sup>+</sup>, correspondiente a la fórmula molecular C<sub>44</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>Na; RO:  $[\alpha]_D$  35.7°.

**Compuesto IV A:** Sólido blanco amorfo: IR (espectro 18) (CHCl<sub>3</sub>/solución)  $\nu_{\max}$  3589 y 1754 cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (espectro 19) datos en la tabla 5 y RMN-<sup>13</sup>C (espectro 20) datos en la tabla 4; EMAR-ESI:  $m/z$  906 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, correspondiente a la fórmula molecular C<sub>46</sub>H<sub>68</sub>O<sub>17</sub>N.

**Compuesto V:** Sólido blanco amorfo: IR (espectro 21) (CHCl<sub>3</sub>/solución)  $\nu_{\max}$  1755, 1243 y 1191 cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (espectro 22) y RMN-<sup>13</sup>C (espectro 23) datos en la tabla 6; EMAR-ESI:  $m/z$  1183 [M+Na]<sup>+</sup>, correspondiente a la fórmula molecular C<sub>58</sub>H<sub>80</sub>O<sub>24</sub>Na; RO:  $[\alpha]_D$  13.0°.

**Compuesto VI:** Sólido blanco amorfo: IR (espectro 26) (CHCl<sub>3</sub>/solución)  $\nu_{\max}$  1756, 1195 y 1243 cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (espectro 27) y RMN-<sup>13</sup>C (espectro 28) datos en la tabla 7; EMAR-ESI:  $m/z$  1125 [M+Na]<sup>+</sup>, correspondiente a la fórmula molecular C<sub>56</sub>H<sub>78</sub>O<sub>22</sub>Na.

### 6.3.3 Ensayo de citotoxicidad

Los reactivos utilizados fueron: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), solución buffer de fosfato (PBS), soluciones Stock de los compuestos a evaluar en DMSO (10 mg/mL), solución Stock del fármaco de referencia rifampina (64 µg/mL). Ambas soluciones Stock fueron refrigeradas a una temperatura de -20°C.

Cultivo celular: Se utilizaron células de la línea celular Vero ATTC de riñón de *Cercopithecus aethiops*, conocido como mono verde africano. Las células fueron cultivadas en el medio RPMI 1640 complementada con una solución buffer de fosfato salino al 10 % (PBS) y aminoácidos no esenciales.

En cada ensayo se utilizaron 10,000 células Vero en placas de 96 pozos. Se adicionaron 100 µL del medio RPMI y posteriormente se incubaron las placas un periodo de 24 horas. Terminado el tiempo de incubación las placas fueron lavadas y se les adiciono la solución del compuesto a evaluar. Posteriormente, se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Después, 10 µL de la solución MTT (5 mg/mL en PBS estéril) se añadieron a cada pocillo y la incubación continuó durante otras 4 horas. El medio fue eliminado con 100 µL de DMSO (Trenado-Uribe *et al.*, 2018) y finalmente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un lector de placas (Plate reader Multiskan Go, Thermo).

El porcentaje de toxicidad fue calculado con la siguiente ecuación [Ec. 1]:

$$\% \text{ Toxicidad} = [1 - (Z_M / Y_C)] \times 100$$

Donde Y<sub>c</sub>, es la absorbancia del control (células sin tratamiento) y Z<sub>M</sub> es la absorbancia del compuesto evaluado, ambas determinadas a una longitud de onda de 570 nm.

### 6.3.4 Actividad antimicobacteriana

Los reactivos utilizados fueron: solución estéril de buffer de fosfato salino (PBS), medio 7H9-ADC (albúmina-dextrosa-catalasa) sin tiloxapol, 7H9-glicerol, medio RPMI 1640, resazurina 0.01 %, soluciones Stock de los compuestos a evaluar en DMSO (10 mg/mL) y una solución Stock del fármaco rifampina (64 µg/mL).

Cultivo celular: células de la línea celular Vero ATTC cultivadas en las condiciones anteriormente descritas.

Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*: Las cepas utilizadas para esta evaluación fueron *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), H37Ra y 209 (aislado clínico), y fueron cultivadas en un medio de ADC 0.01 % con tiloxapol y 7H9-glicerol 10 % hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a una longitud de onda de 600 nm. La solución bacteriana se obtuvo por dilución 1:25 en 7H9 ADC 10 %.

La inhibición de *Mycobacterium tuberculosis* fue evaluada por medio del método REMA (Ensayo de Microtitulación de Resazurina) usando placas de 96 pozos. A cada pocillo fueron adicionados 200 µL de PBS estéril para evitar deshidratación y se incubaron en un periodo de 8 días. El fármaco rifampina fue usado como referencia en cada placa (16 a 0.001 µg/mL disoluciones dobles en serie) y como controles se utilizaron DMSO, DMSO con *Mycobacterium tuberculosis*, medio de cultivo (RPMI 1640), medio de cultivo con *Mycobacterium tuberculosis* y los compuesto para validar las placas también se incluyeron. Las concentraciones de los compuestos a evaluar fueron desde 0.98 µg/mL hasta 250 µg/mL, los ensayos se realizaron por triplicado. Las placas fueron incubadas durante 6 días, posteriormente se les adiciono a cada pocillo 30 µL de resazurina 0.01 % m/v y nuevamente fueron incubadas durante dos días. Después de incubar, se observó el cambio de coloración, la permanencia de una tonalidad azul indicó un resultado negativo (no hubo crecimiento bacteriano) y un cambio de coloración azul a rosa, un resultado positivo (crecimiento bacteriano). Finalmente, se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC<sub>100</sub>) de *Mycobacterium tuberculosis*, que correspondió a la concentración en la que se observó por última vez la coloración (Martínez *et al.*, 2019). El índice de selectividad (SI) fue calculado a través de la siguiente ecuación [Ec. 2]:  $SI = IC_{50}/MIC_{100}$

Donde IC<sub>50</sub> es la concentración media inhibitoria en células Vero.

### 6.3.5 Inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa de levadura y de rata

La inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura fue evaluada usando una adaptación de los métodos descritos por Xiao-Ping *et al.*, 2010 y Zhou *et al.*, 2010, mientras que para la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de rata fue evaluada con una adaptación del método descrito por Jo *et al.*, 2010.

Los reactivos utilizados para estas evaluaciones fueron: una solución buffer de fosfatos de potasio (PBS) 67 mM con un pH de 6.8; solución de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 1 M; DMSO 50 % en agua desionizada y  $\alpha$ -D-glucopiranosido de 4-nitrofenilo (PNP-G, Cat. SIGMA N1377-1G) 23.2 mM. Las soluciones del compuesto a evaluar se preparan en DMSO 50 %.

Para el ensayo de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura, también se utilizó glutatión reducido (GSH) 3 mM en buffer de fosfatos, una solución Stock de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa Tipo I de levadura de panadería (No. Cat. SIGMA: G5003-100UN) 20 U/mL y una solución de trabajo 0.2 U/mL [10  $\mu\text{L}$  de solución Stock en 990  $\mu\text{L}$  de buffer (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ )].

En el ensayo de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de rata se utilizó el sobrenadante de una solución homogenizada (3 min a 4 °C) y centrifugada (10 min a 12,000 rpm a 4 °C) de polvo intestinal de rata (No. Cat. SIGMA: I1630-10G) 25 mg/mL.

- Inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura

Se llevó a cabo en placas de 96 pozos y se les adicionaron 25  $\mu\text{L}$  del compuesto a evaluar (1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) en una solución de DMSO 50 %. Posteriormente, se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de PBS (67 mM) a una temperatura de 37 °C, en seguida se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de GSH (3 mM), 25  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -glucosidasa 0.2 U/L (excepto a los pozos control) y 25  $\mu\text{L}$  de PNP-G (23.2 mM). Las placas se incubaron durante 15 min a una temperatura de 37 °C. Finalmente, se detuvo la reacción con 50  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1 M) y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en un lector de placas (Bio Tek Synergy HT).

- Inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de rata

A placas de 96 pozos se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  del compuesto a evaluar (1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) en una solución de DMSO 50 %. A continuación se añadieron 175  $\mu\text{L}$  de PBS (67 mM) a una temperatura de 37 °C. Después, se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de la enzima  $\alpha$ -

glucosidasa de rata (25 mg/mL) y se agitaron las placas 10 min a una temperatura de 37°C. Posteriormente, se añadieron 25 µL de PNP-G (23.2 mM) y se incubaron las placas durante 15 min con agitación a una temperatura de 37 °C. Finalmente, se detuvo la reacción con 50 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (23.2 mM) y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en un lector de placas (Bio Tek Synergy HT).

El porcentaje de inhibición para ambos ensayos se calculó con la siguiente ecuación [Ec. 3]: % Inhibición=  $[(Y_C - Z_M) / Y_C] \times 100$

Donde Y<sub>C</sub>, es la absorbancia del control (ausencia del compuesto a evaluar) y Z<sub>M</sub> es la absorbancia del compuesto a evaluar, ambas determinadas a una longitud de onda de 405 nm.

### **6.3.6 Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* (anguila eléctrica)**

El ensayo se basó en la metodología descrita por Ellman *et al.*, 1961.

Los reactivos utilizados fueron solución buffer de fosfatos salinos (PBS) 1M, MeCN 2 %, glicerol 50 %, ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) 5.046 mM y yoduro de acetiltiocolina (ATC) 29.39 mM. Las muestras a evaluar se disuelven con MeCN 2 %.

Dos soluciones de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) fueron utilizadas, la primera fue una solución Stock de 345.33 U/mL en glicerol 50 % y la segunda fue una solución 0.195 U/m en PBS.

La evaluación se realizó en placas de 96 pozos. Se adicionaron 50 µL de la solución del compuesto a evaluar (1, 10 y 100 µM) en MeCN 2 % en PBS y 50 µL de la enzima AChE (0.195 U/m) en PBS. Las placas tuvieron un periodo de incubación de 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la reacción se inició al añadir 100 µL de la mezcla ATC+DTNB [ATC (29.39 mM) y DTNB (5.046 mM) disueltos en PBS], en seguida las placas se incubaron con agitación constante, protegidas de la luz y a temperatura ambiente, durante 5 min. Para finalizar se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm en un lector de placas (Bio Tek Synergy HT) y como control positivo se utilizó Eserina. Se calculó el porcentaje de inhibición con la ecuación Ec. 3.

### 6.3.7 Actividad antiinflamatoria utilizando el modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón

Para evaluar la actividad antiinflamatoria se empleó una adaptación del modelo descrito por Young *et al.*, 1983.

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 de 25 a 30 g. Los animales (n= 3 a 5) se colocaron en cajas de acrílico transparente a una temperatura constante de  $22 \pm 4$  °C, con fotoperíodos de 12 horas luz/oscuridad y con agua y alimento *ad libitum* siguiendo las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” de la Norma Oficial Mexicana **NOM-062-ZOO-1999**.

Bajo anestesia con pentobarbital sódico (63 mg/kg, vía intraperitoneal, calibre de aguja 27G), en la oreja derecha se aplicaron 10 µL de una solución etanólica 0.25 µg/mL de TPA (13-acetato de 12-tetradecanoilforbol). Diez minutos más tarde, en la misma oreja se aplicaron 0.031, 0.1, 0.31 o 1 µmoles del compuesto a evaluar disueltos en 20 µl del vehículo (metanol).

La oreja izquierda se empleó como control y se aplicaron 10 µL de etanol y 20 µL del vehículo (metanol). Cuatro horas después a la aplicación del TPA los animales se sacrificaron con CO<sub>2</sub> y se realizaron biopsias de 7 mm de diámetro de ambas orejas. La diferencia en peso entre la biopsia derecha con respecto a la izquierda representó el edema.

La inhibición del edema se calculó con la siguiente ecuación [Ec. 4]:

$$\% \text{ Inhibición} = [(D_C - D_R) / D_C] \times 100$$

Donde  $D_C$  es el edema del grupo control (tratado con TPA) y  $D_R$  es el edema del grupo experimental (TPA mas el compuesto).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Identificación de los compuestos aislados

A partir del estudio químico del extracto de acetona de *Physalis volubilis* se obtuvieron cinco withanólidas, dos nuevas obtenidas como derivados acetilados (compuestos **IV** y **V**), tres conocidas [withaferina A (**I**), 3 $\beta$ -O-sulfato de 2,3-dihidrowithaferina A (**III**), y el peracetato de withanósido V (**VI**)], y el fitoesterol glucósido de  $\beta$ -sitosterilo (**II**) (figura 18). Adicionalmente, se obtuvieron los acetatos de los compuestos **III** y **IV** (**III A** y **IV A**) para corroborar sus estructuras.

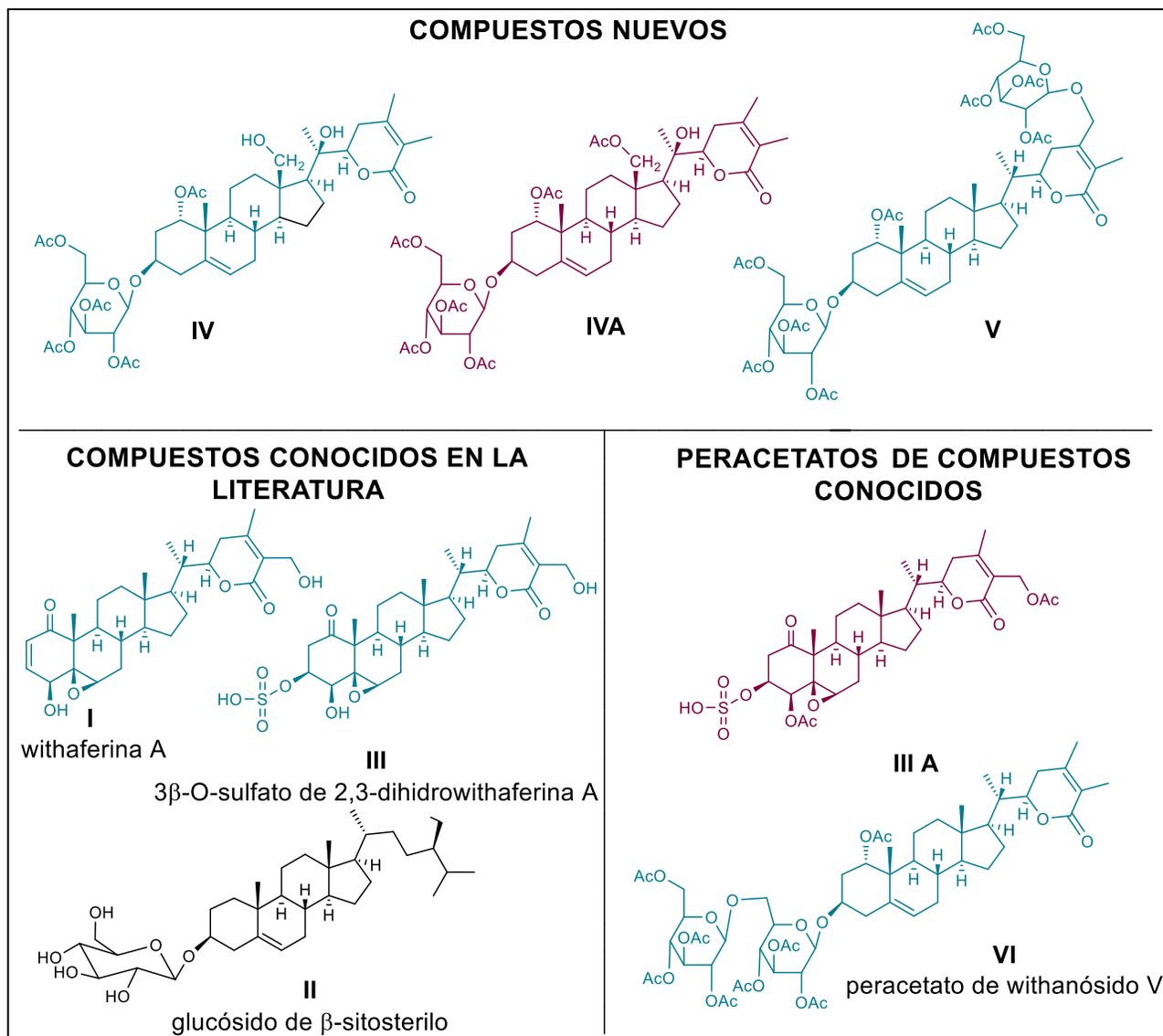


Figura 18. Metabolitos aislados de *Physalis volubilis*.

- Compuesto I, withaferina A

El compuesto I presentó en el experimento de IR (espectro 1) bandas de absorción en 3576 y 1691  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a grupos hidroxilo y grupos carbonilo, respectivamente.

En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (tabla 1, espectro 3) fueron observadas 28 señales correspondientes a 4 metilos, 7 metilenos, 10 metinos y 7 carbonos no protonados, de éstas, aquellas en  $\delta$  167.0 (C-26), 152.8 (C-24) y 125.7 (C-25) fueron asignadas a los carbonos de una  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada presente en varias withanólidas. Las señales en  $\delta$  202.2 (C-1), 132.3 (C-2) y 141.9 (C-3), junto con aquellas observadas en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (tabla 1, espectro 2) en  $\delta$  6.94 (dd,  $J=10.0, 5.7$  Hz, H-3) y 6.20 (d,  $J= 10.0$  Hz, H-2) indicaron la presencia de una enona, común en el anillo A de este tipo de withaesteroides. Lo anterior y las señales de cuatro metilos ( $\delta_{\text{C}}$  11.6, C-18; 17.4, C-19; 13.3, C-21 y 20.0, C-28) indicaron que el compuesto I correspondía a una withanólida.

En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  se observó una señal en  $\delta$  4.42 (dt,  $J=13.5, 3.3$  Hz) que fue asignada al hidrógeno del cierre de la  $\delta$ -lactona H-22. En este mismo espectro, fueron observadas las señales de un sistema ABX que correspondió al metileno  $\text{CH}_2$ -27 [ $\delta$  4.42 (dd,  $J=13.2, 6.0$  Hz) y 4.34 (dd,  $J=12.3, 6.0$  Hz)] unido a un OH [ $\delta$  2.9 (t,  $J=6.9$  Hz)]. La presencia de un epóxido en las posiciones 5 y 6 se dedujo de los desplazamientos químicos de las señales de C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  63.8) y CH-6 ( $\delta_{\text{C}}$  62.5,  $\delta_{\text{H}}$  3.24 s) observadas en los espectros de resonancia de hidrógeno y carbono 13.

El espectro de masas mostró un pseudo ion molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de  $m/z$  471 correspondiente a la fórmula molecular  $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_6$ . Considerando el análisis anterior y de acuerdo con la literatura química, se identificó al compuesto I como withaferina A (Pelletier *et al.*, 1981; Zhang *et al.*, 2011) (figura 19).

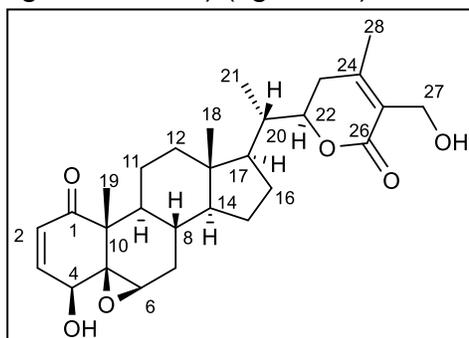


Figura 19. Estructura del compuesto I.

Tabla 1. Datos de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz) y de <sup>13</sup>C (75 MHz) en CDCl<sub>3</sub> del compuesto I.

Posición	$\delta_C$	$\delta_H$
1	202.2	-----
2	132.3	6.20 d (10.0)
3	141.9	6.94 dd (10.0, 5.7)
4	69.9	3.76 dd (5.7, 2.4)
5	63.8	-----
6	62.5	3.24 s
7	31.1	2.15 ddd (14.7, 4.1, 2.5), 1.27 m
8	29.8	1.39 m
9	44.1	1.15 m
10	47.7	-----
11	22.3	1.30 m, 1.17 m
12	39.5	1.84 d (14.1, 7.9, 3.5), 1.07 m
13	42.6	-----
14	56.1	0.95 m
15	24.2	1.60 m, 1.12 m
16	27.3	1.65 m, 1.40 m
17	52.0	1.10 m
18	11.6	0.71 s
19	17.4	1.42 s
20	38.8	2.0 m
21	13.3	1.06 d (6.9)
22	78.7	4.42 dt (13.5, 3.3)
23	29.8	2.5 dd (17.4, 13.2), 1.97 m
24	152.8	-----
25	125.7	-----
26	167.0	-----
27	57.4	4.34 dd (12.3, 6.0), 4.42 dd (13.2, 6.0) OH 2.9 t (6.9)
28	20.0	2.04 s

- Compuesto II, glucósido de  $\beta$ -sitosterilo

Una cromatografía analítica en capa delgada del compuesto II y de una muestra original de  $3\beta$ -O-glucopiranosido de sitosterilo (figura 20), compuesto ubicuo en el reino vegetal, permitió su identificación como dicho glucósido al presentar el mismo Rf ambas muestras.

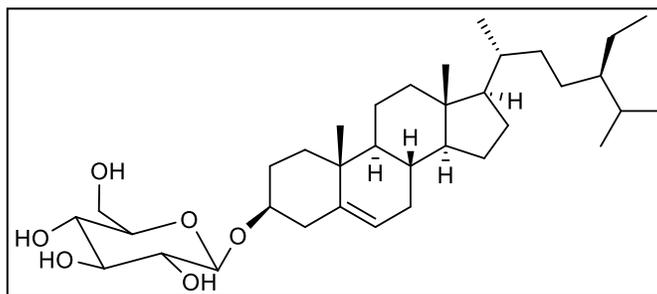


Figura 20. Estructura del compuesto II.

- Compuesto III,  $3\beta$ -O-sulfato de 2,3-dihidrowithaferina A

En el experimento de IR (espectro 4) se observó una banda ancha en  $3442\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a grupos hidroxilos, una banda de absorción en  $1703\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a carbonilos de  $\delta$ -lactona y una banda en  $1678\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a carbonilos de cetona.

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (tabla 2, espectro 6) mostró 28 señales correspondientes a 4 metilos, 8 metilenos, 9 metinos y 7 carbonos no protonados, concordantes con un esqueleto de withanólida.

Las señales en  $\delta_{\text{C}}$  78.8 (CH), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 154.3 (C), 127.8 (C) y 166.8 (C=O) fueron asignadas a los carbonos 22 a 26 que conforman una  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -no saturada. La presencia de este grupo funcional se corroboró en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (tabla 3, espectro 5) que mostró la señal de H-22 como un doblete de tripletes en  $\delta_{\text{H}}$  4.40 ( $J=13.5, 3.0\text{ Hz}$ ), ya que se encuentra acoplada con los hidrógenos de C-23 ( $\delta_{\text{H}}$  2.37, dd,  $J=18.0, 13.5\text{ Hz}$  y  $\delta_{\text{H}}$  2.05, dd,  $J=18.0, 3.0\text{ Hz}$ ) y con el hidrógeno de C-20 ( $\delta$  1.91 m). Adicionalmente, en el espectro bidimensional COSY (espectro 7) se observó el acoplamiento de H<sub>2</sub>-23 con H-22. La presencia del hidroximetileno H<sub>2</sub>-27 (sistema AB,  $\delta_{\text{H}}$  4.88 y 4.77 d,  $J=11.5\text{ Hz}$ ) y del metilo H<sub>3</sub>-28 ( $\delta_{\text{H}}$  2.11 s) fue apoyada por las correlaciones

de H<sub>2</sub>-27 con los carbonos 24 a 26 y de H<sub>3</sub>-28 con C-26 observadas en el espectro HMBC (espectro 8).

Con base en los espectros de resonancia de hidrógeno y carbono, para la withanólida **III** se propuso una cetona en C-1 ( $\delta_C$  209.1) y dos funciones oxigenadas, una en C-3 ( $\delta_C$  74.3,  $\delta_H$  5.7 sa) y la otra en C-4 ( $\delta_C$  75.7 y  $\delta_H$  4.47 s). La vecindad de los carbonos unidos a oxígeno fue corroborada en el espectro bidimensional HMBC que mostró la correlación de H-4 con C-3. Las señales en  $\delta_H$  3.62 m y 3.30 (da, J=14.0 Hz) fueron asignadas a los hidrógenos H<sub>2</sub>-2 debido a que en el espectro COSY se observó su acoplamiento con H-3, y el espectro HMBC mostró correlación con la señal de C-1.

En cuanto a la presencia del grupo 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epóxido, este se dedujo a partir de los desplazamientos químicos de las señales de C-5 ( $\delta_C$  65.4) y de CH-6 ( $\delta_C$  57.4,  $\delta_H$  3.46 s).

Con relación a los singuletes observados en  $\delta_H$  0.53 y 1.67, estos fueron asignados a H<sub>3</sub>-18 y H<sub>3</sub>-19, respectivamente, ya que en el espectro HMBC la primera señal correlacionó con C-13 ( $\delta_C$  43.1), C-14 ( $\delta_C$  56.4) y C-17 ( $\delta_C$  52.4), y la segunda correlacionó con C-1 ( $\delta_C$  209.1), C-5 ( $\delta_C$  65.4) y C-10 ( $\delta_C$  49.8).

A partir de una revisión bibliográfica se encontraron dos withanólidas con características espectroscópicas muy similares a las del compuesto **III**. La primera, viscosalactona B (**VII**) (figura 21), presenta grupos hidroxilo en C-3, C-4 y C-27, un grupo epoxi en C-5 y C-6, y una  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -no saturada. La segunda withanólida, 3 $\beta$ -O-sulfato de 2,3-dihidrowithaferina A (figura 21) se diferencia de la anterior en tener un grupo sulfato unido a C-3 en lugar de un grupo hidroxilo. A pesar de la similitud entre las estructuras, son evidentes las diferencias en sus datos de RMN, sobre todo en el desplazamiento químico del metino de la posición 3 ( $\delta_H$  5.7 sa para el sulfato y  $\delta_H$  4.67 s para **VII**). Al comparar los datos de RMN de estos compuestos con los de **III**, se observó una gran concordancia entre los del sulfato de withanólida y los de **III**. Por lo tanto, la withanólida **III** se identificó como 3 $\beta$ -O-sulfato de 2,3-dihidrowithaferina A (figura 21), lo que fue apoyado en el espectro de masas de alta resolución en modo negativo (EMAR-ESI). Este espectro mostró un pseudo ion molecular [M-1]<sup>-</sup> de *m/z* 567 que correspondió con la fórmula molecular C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>O<sub>10</sub>S.

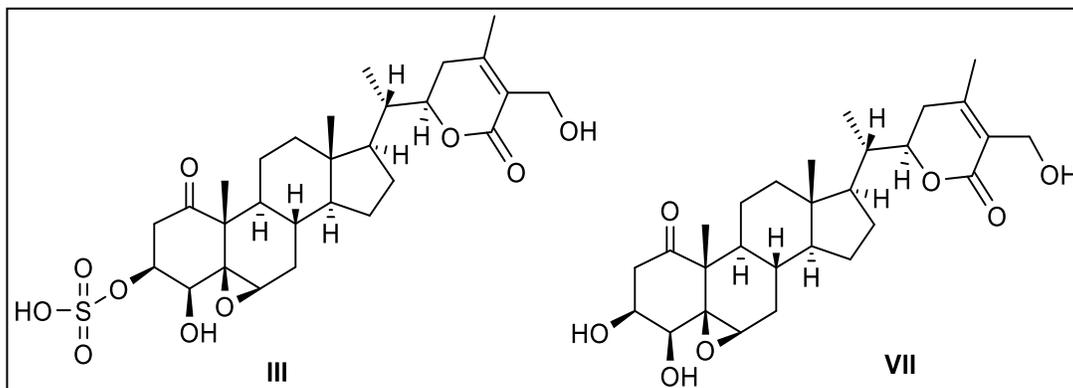


Figura 21. Estructuras de 3 $\beta$ -O-sulfato de 2,3-dihidrowithaferina A (III) y viscosalactona B (VII).

Para corroborar la estructura del compuesto III, se le realizó una reacción de acetilación y se obtuvo el derivado III A.

En el experimento de IR (espectro 9) del compuesto III A mostró bandas de absorción en 1735, 1711 y 1240  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a carbonilos de  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada, de ésteres y la tercera banda a grupos sulfatos (Turvey, 1965).

El compuesto III A, mostró en los espectros de RMN- $^1\text{H}$  (tabla 3, espectro 10) y  $^{13}\text{C}$  (tabla 2, espectro 11) las señales del metino de la posición 4 ( $\delta_{\text{H}}$  5.12 s y  $\delta_{\text{C}}$  77.3) y del metileno de la posición 27 [ $\delta_{\text{H}}$  4.91 y 4.87 (d,  $J = 14.0$  Hz), y  $\delta_{\text{C}}$  57.6] desplazadas a campo bajo y también fueron observadas las señales características de los grupos acetatos en  $\delta_{\text{C}}$  172.1, 170.9, 20.9 y 20.6. Finalmente, el espectro de masas mostró el pseudo ion molecular  $[\text{M}-1]^-$  de  $m/z$  651 correspondiente con la fórmula molecular  $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_{12}\text{S}$ , en concordancia con la estructura del diacetato de 3 $\beta$ -O-sulfato de 2,3-dihidrowithaferina A (III A).

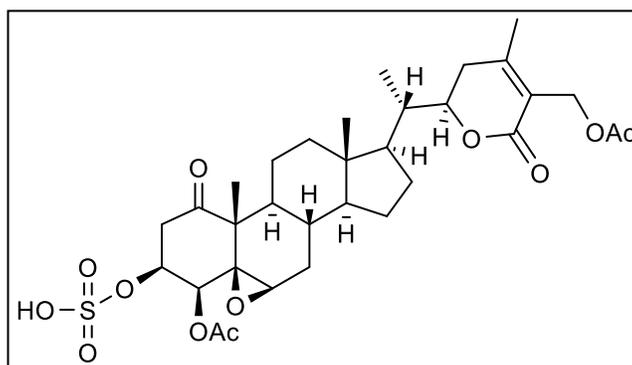


Figura 22. Estructura del compuesto III A.

Cabe mencionar que la withanólida **III** se transformó en withaferina A (**I**), esto fue observado con ayuda de una cromatografía analítica de una muestra que se dejó disuelta en piridina durante varios días. La transformación puede explicarse de la siguiente manera:

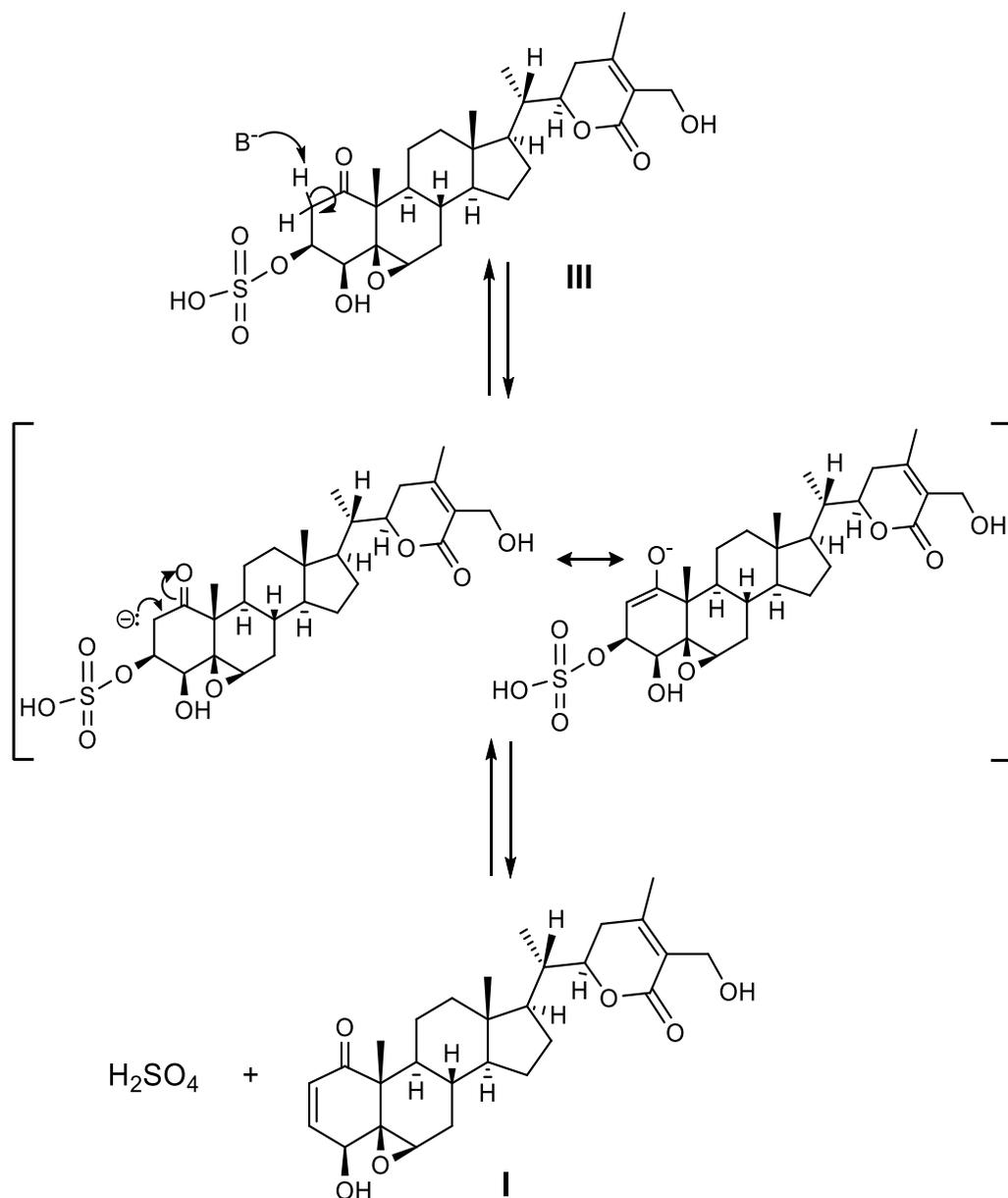


Tabla 2. Datos de RMN-<sup>13</sup>C de los compuestos **III**, **VII** (125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) y **III A** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

Posición	<b>III</b> δ	<b>III A</b> δ	<b>VII<sup>a</sup></b> δ
1	209.1	207.8	210.4
2	44.0	40.2	44.4
3	74.3	78.1	67.1
4	75.7	77.3	78.7
5	65.4	61.1	65.5
6	57.4	58.1	57.4
7	31.7	30.6	32.3
8	30.3	29.1	30.5
9	42.9	42.2	43.7
10	49.8	49.6	49.7
11	21.7	21.1	21.8
12	39.5	*	39.7
13	43.1	42.6	43.2
14	56.4	55.8	56.6
15	24.9	24.4	24.9
16	27.6	27.3	27.7
17	52.4	51.7	52.4
18	11.9	11.6	11.9
19	15.9	15.9	16.1
20	39.5	38.7	39.5
21	13.9	13.6	14.0
22	78.8	78.1	78.8
23	30.3	30.3	30.4
24	154.3	156.9	154.3
25	127.8	121.9	127.9
26	166.8	165.1	166.8
27	56.6	57.6	56.6
28	20.5	20.6	20.6
<b>Acetatos</b>			
<b>III A</b> CO: 172.1 y 170.9; CH <sub>3</sub> 20.9 y 20.6.			

<sup>a</sup> Datos de la literatura, Zhang *et al.*, 2011. \* Señal no localizada.

Tabla 3. Datos de RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos **III**, **VII** (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) y **III A** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

Posición	<b>III</b> δ	<b>III A</b> δ	<b>VII</b> δ
2	3.62 m 3.30 da (14.0)	3.27 m 2.61 dd (17.6, 5.9)	Hβ 3.62 dd (17.1, 10.0) Hα 3.02 dd (17.1, 5.5,)
3	5.7 sa	5.07 m	4.67 s
4	4.47 s	5.12 s	4.05 s
6	3.46 s	3.40 sa	3.30 s
7	2.24 dd (15.0, 5.0) 1.34 dd (14.0, 11.5)	*	2.22 ddd (15.0, 4.3, 1.7) 1.40 ddd (15.0, 10.2, 2.0)
8	1.42 m	1.35 m	1.50 m
9	1.18 m	1.15 m	1.17 m
11	1.51 m, 1.44 m	1.94 m	1.52 m
12	1.85 da (12.5) 1.10 m	*	1.85 m, 1.05 m
14	0.95 m	1.0 m	0.93 m
15	1.50 m, 0.94 m	*	1.54 m, 0.96 m
16	1.57, 1.15 m	*	1.54 m, 1.15 m
17	1.15 m	1.17 m	1.07 m
18	0.53 s	0.67 s	0.55 s
19	1.67 s	1.22 s	1.76 s
20	1.91 m	1.97 m	1.90 m
21	0.98 d (6.5)	0.99 d (7.4)	0.97 d (6.6)
22	4.40 dt (13.5, 3.0)	4.41 d (12.4)	4.39 dt (13.2, 3.5)
23	2.37 dd (18.0, 13.5) 2.05 dd (18.0, 3.0)	2.52 t (15.2)	2.35 dd (17.7, 13.4) 2.01 dd (17.7, 3.3)
27	4.88 d (11.5) 4.77 d (11.5)	4.91 d (14.0) 4.87 d (14.0)	4.80 d, 4.78 d (11.8)
28	2.11 s	2.10 s	2.01 s

<sup>a</sup> Datos de la literatura, Zhang *et al.*, 2011. \* Señales no localizadas.

- **Compuesto IV**

El compuesto **IV** se obtuvo después de acetilar y purificar la mezcla denominada PVA-3, y presentó en IR (espectro 12) bandas de absorción en 3467, 1755 y 1739  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a grupos hidroxilos, carbonilos de  $\delta$ -lactona y de acetato.

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (tabla 4, espectro 14) mostró las señales características de una withanólida, como lo son aquellas de la  $\delta$ -lactona en  $\delta_{\text{C}}$  165.5 (C-26), 122.2 (C-25), 148.5 (C-24), 31.6 (C-23) y 80.5 (C-22). A su vez, el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (tabla 5, espectro 13) mostró las señales de dos metilos vinílicos en  $\delta_{\text{H}}$  1.89 s y 1.95 s, la primera de ellas correlacionó en el espectro HMBC (espectro 15) a tres enlaces con C-26 y C-24, y a dos enlaces con C-25, por lo que se asignó a H<sub>3</sub>-27, mientras que la señal en  $\delta$  1.95 s mostró correlación con C-25 y C-24, asignándose a H<sub>3</sub>-28.

En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  se observó la señal de un carbono terciario base de oxígeno en  $\delta_{\text{C}}$  75.5 que se asignó a C-20, ya que en el experimento HMBC mostró correlación con la señal de H-22 [ $\delta_{\text{H}}$  4.29 (dd, J= 13.4, 3.5 Hz)] y con la señal del metilo 21 ( $\delta_{\text{H}}$  1.44 s).

En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  se observó una señal ancha en  $\delta_{\text{H}}$  3.62 que mostró, en el experimento HMBC, correlación con la señal del carbono cuaternario C-13 ( $\delta_{\text{C}}$  47.9), por lo que se asignó a H<sub>2</sub>-18.

Otras señales características de una withanólida fueron aquellas de CH-6 [ $\delta_{\text{C}}$  124.2,  $\delta_{\text{H}}$  5.52 (da, J= 6.2 Hz)], C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  136.9), CH-1 ( $\delta_{\text{C}}$  74.8,  $\delta_{\text{H}}$  5.08 sa) y CH<sub>3</sub>-19 ( $\delta_{\text{C}}$  19.5,  $\delta_{\text{H}}$  1.08 sa). La posición del grupo acetato en C-1 se dedujo de la correlación observada en el espectro HMBC de H-1 con el carbonilo del acetato ( $\delta_{\text{C}}$  169.9). Adicionalmente, en el espectro NOESY (espectro 17) fue observado un efecto NOE de H-1 con H<sub>3</sub>-19, indicando una orientación alfa para el grupo acetato.

También fueron observadas las señales características de un metino anomérico en  $\delta_{\text{H}}$  4.58 (d, J = 8.0 Hz) y  $\delta_{\text{C}}$  99.4, lo que indicó que una aldosa se encontraba unida a la withanólida.

La aldosa fue identificada como  $\beta$ -glucopiranososa con base en la conectividad observada de las señales de H-1', H-2', H-3', H-4', H-5' y H<sub>2</sub>-6' en el espectro

bidimensional COSY (espectro 16), y con el valor de las constantes de acoplamiento de las señales de H-1' a H-5' (entre 8 y 12 Hz) (Duddeck *et al.*, 2000). Los desplazamientos químicos de las señales de los metino 2', 3', 4' y del metileno 6' (tabla 5) indicaron que la glucosa se encontraba peracetilada. Adicionalmente, en el espectro HMBC se observó la correlación entre las señales de H-1' y C-3 ( $\delta_c$  74.7), por lo que se propuso al monosacárido unido a la posición 3.

El espectro de masas mostró un pseudo ion molecular de  $m/z$  869  $[M+Na]^+$ , correspondiente a la fórmula molecular  $C_{44}H_{62}O_{16}$  concordante con la estructura propuesta para **IV**. Ya que el compuesto **IV** presenta el hidroxilo de la posición 18 libre, otra porción de la mezcla PVA-3 fue acetilada, pero prolongando el tiempo de reacción. El compuesto obtenido, **IV A**, presentó espectros de RMN- $^{13}C$  (tabla 4, espectro 20) y RMN- $^1H$  (tabla 5, espectro 19) similares a los del compuesto **IV**, pero en el espectro de carbono se observaron a campo bajo, las señales de seis grupos acetilo ( $\delta_c$  171.0, 170.7, 170.3, 170.0, 169.4 y 169.2) y en el espectro de hidrógeno, las señales del metileno CH<sub>2</sub>-18 se observaron como un sistema AB en  $\delta$  4.17 y 4.12 (d,  $J = 11.6$  Hz), desplazamientos químicos concordantes con la presencia de un grupo acetato en esta posición.

El espectro de masas (EMAR-ESI) permitió confirmar que el compuesto **IV A** posee la fórmula molecular  $C_{46}H_{64}O_{17}$ , dado que presentó un pseudo ion molecular  $[M+NH_4]^+$  de  $m/z$  906.

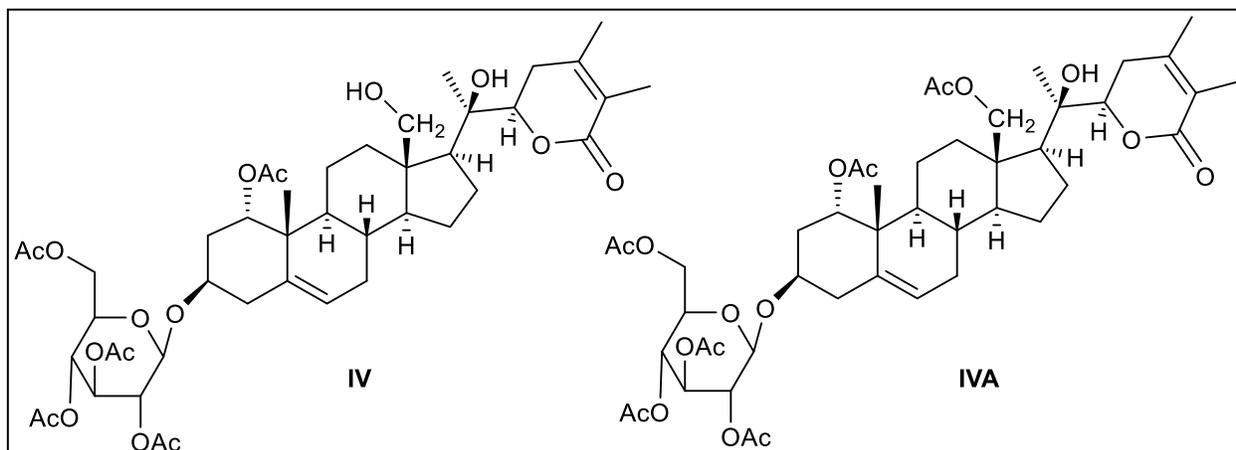


Figura 23. Estructuras de los compuesto **IV** y **IVA**.

Tabla 4. Datos de RMN-<sup>13</sup>C de los compuestos **IV** (125 MHz) y **IV A** (100 MHz) en CDCl<sub>3</sub>.

Posición	<b>IV</b> δ	<b>IV A</b> δ
1	74.8	74.65
2	33.5	33.6
3	74.7	74.72
4	38.0	38.0
5	136.9	136.8
6	124.2	124.2
7	31.7	31.7
8	31.5	31.8
9	42.4	42.3
10	40.6	40.5
11	20.0	*
12	35.0	35.1
13	47.9	45.5
14	56.2	56.5
15	23.6	23.7
16	22.0	*
17	55.0	54.8
18	58.9	61.8
19	19.5	19.4
20	75.5	74.72
21	21.5	20.7
22	80.5	80.9
23	31.6	31.9
24	148.5	148.3
25	122.2	122.2
26	165.6	165.9
27	12.5	12.5
28	20.6	20.6
<b>β-glucopiranososa</b>		
1'	99.4	94.5
2'	71.4	71.4

3'	72.8	72.8
4'	68.4	68.5
5'	71.8	71.8
6'	62.0	62.0
<b>Acetatos</b>		
IV CO: 170.7, 170.3, 169.9, 169.4, 169.2. CH <sub>3</sub> : 21.1 y 20.7.		
IV A CO: 171.0, 170.7, 170.3, 170.0, 169.4 y 169. 2. CH <sub>3</sub> : 20.6 y 20.5.		

\* Señales no localizadas.

Tabla 5. Datos de RMN-<sup>1</sup>H de los compuestos **IV** (500 MHz) y **IV A** (400 MHz) en CDCl<sub>3</sub>.

Posición	IV δ	IV A δ
1	5.08 sa	5.06 sa
2	2.15 m 1.83 ddd (14.0, 11.6, 2.5)	2.14 m 1.82 m
3	3.83 m	3.82 m
4	2.38 ddd (13.8, 5.5, 2.2) 2.27 td (13.5, 1.8)	2.38 m 2.26 m
6	5.52 da (5.5)	5.52 da (5.6)
7	2.02 m 1.51 m	2.06 m 1.58 m
8	1.54 td (10.5, 5.0)	*
9	1.30 m	1.30 m
11	1.54 m 1.43 m	1.42 m 1.32 m
12	2.6 dt (12.5, 3.5) 0.95 td ( 13.5, 5.0)	2.45 m
14	1.16 dd (10.5, 7.5)	1.20 m
15	1.67 m 1.27 m	1.68 m
16	2.01 m 1.55 m	1.57 m
17	1.39 dd (10.0, 9.5)	1.53 m
18	3.62 sa	4.17 d (11.6) 4.12 d (11.6)

<b>19</b>	1.08 s	1.05 s
<b>21</b>	1.44 s	1.39 s
<b>22</b>	4.29 dd (13.4, 3.5)	4.24 m
<b>23</b>	2.37 m	2.55 m
	2.12 m	1.29 m
<b>27</b>	1.89 s	1.89 s
<b>28</b>	1.95 s	1.94 s
<b>β-glucopiranososa</b>		
<b>1'</b>	4.58 d (8.0)	4.58 d (8.0)
<b>2'</b>	4.95 dd (10.0, 8.0)	4.94 dd (9.6, 8.0)
<b>3'</b>	5.20 t (9.5)	5.20 t (9.6)
<b>4'</b>	5.06 d (10.0, 9.5)	5.06 t (9.8)
<b>5'</b>	3.67 ddd (10.0, 5.0, 2.5)	3.67 ddd (10.0, 4.8, 2.4)
<b>6'</b>	4.24 dd (12.0, 5.0)	4.24 m
	4.09 dd (12.0, 2.5)	4.09 dd (12.0, 2.4)
<b>Acetatos</b>		
IV CH <sub>3</sub> : 2.08, 2.05, 2.04, 2.02, 2.0. IV A CH <sub>3</sub> : 2.08, 2.05, 2.02, 2.0.		

\* Señal no localizada.

- **Compuesto V**

El compuesto **V** también fue obtenido después de acetilar una mezcla compleja, en este caso PVA-4. En el experimento de IR (espectro 21) de **V** mostró bandas de absorción en 1755, 1243 y 1191 cm<sup>-1</sup> correspondientes a carbonilos de δ-lactona α,β-insaturada y a grupos acetatos.

Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de **V** (tablas 6, espectros 22 y 23) fueron muy similares a los de la withanólida **IV**, por lo que se propuso la estructura de **V** con una lactona α,β-insaturada, un doble enlace en C-5 y CH-6, un grupo acetato unido al metino CH-1, y con una β-glucopiranososa acetilada unida a C-3.

El análisis de los espectros de resonancia del compuesto **V** permitió proponer la presencia de una segunda unidad de β-glucopiranososa acetilada, siendo una de las señales clave aquella del metino anomérico (δ<sub>C</sub> 100.0).

En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  de **V** se observó un singulete en  $\delta$  1.88 atribuido a un metilo, y un sistema AB en  $\delta_{\text{H}}$  4.43 y 4.39 (d,  $J=13.5$  Hz) asignado a un metileno base de oxígeno. Ya que en el experimento HMBC (espectro 24) el singulete correlacionó con C-24, C-25 y C-26, fue asignado a  $\text{H}_3$ -27. En el mismo espectro, el sistema AB correlacionó con C-24, C-25 y con el carbono anomérico de la segunda aldohexosa, por lo que el metileno fue identificado como  $\text{H}_2$ -28.

Otras diferencias del compuesto **V** con relación al compuesto **IV** fueron los carbonos de las posiciones 18 y 20. Con base en los espectros de resonancia de hidrógeno y de carbono, el primero se identificó como metilo ( $\delta_{\text{H}}$  0.70 s y  $\delta_{\text{C}}$  11.7) y el segundo como metino ( $\delta_{\text{H}}$  1.99 m y  $\delta_{\text{C}}$  38.9). Por lo tanto, se propuso al compuesto **V** como una withanólida unida a dos monosacáridos, uno de ellos en la posición 3 y el otro en la posición 28. El espectro de masas (EMAR-ESI) (espectro 25) corroboró la estructura propuesta, ya que presentó un pseudo ion molecular  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  de  $m/z$  1183 congruente con su fórmula molecular  $\text{C}_{58}\text{H}_{80}\text{O}_{24}$ .

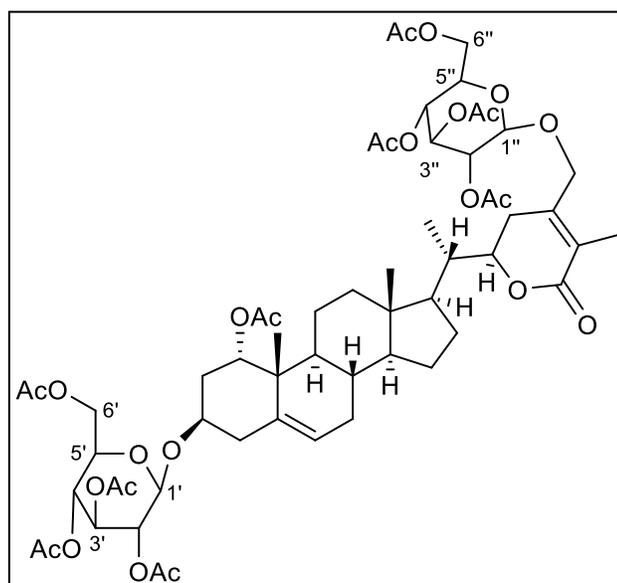


Figura 24. Estructura del compuesto **V**.

Tabla 6. Datos de RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz) y de <sup>13</sup>C (125 MHz) del compuesto **V** en CDCl<sub>3</sub>.

Posición	<b>V</b> δ <sub>C</sub>	<b>V</b> δ <sub>H</sub>
1	74.8	5.05 ta
2	33.6	2.14 m 1.81 td (11.5, 2.5)
3	74.9	3.81 m
4	38.0	2.37 ddd (13.5, 5.0, 2.0) 2.25 m
5	136.7	-----
6	124.5	5.51 da (5.5)
7	31.6	1.99 m, 1.55m
8	31.7	1.47 td (10.5, 5.0)
9	42.1	1.28 m
10	40.5	-----
11	20.3	1.37 m
12	39.4	1.99 m, 1.11 m
13	42.7	-----
14	56.3	1.03 m
15	24.3	1.64 m, 1.15 m
16	27.1	1.37 m, 1.66 m
17	51.4	1.16 m
18	11.7	0.70 s
19	19.4	1.05 s
20	38.9	1.99 m
21	13.4	0.99 d (6.5)
22	79.2	4.35 dt (13.0, 3.5)
23	24.3	2.28 m 2.22 da (16.0)
24	147.0	-----
25	123.8	-----
26	166.5	-----
27	12.2	1.88 sa
28	67.6	4.43 d (13.5) 4.39 d (13.5)

<b><math>\beta</math>-glucopiranosas</b>		
<b>1'</b>	99.5	4.57 d (8.0)
<b>2'</b>	71.3	4.94 dd (10.0, 8.0)
<b>3'</b>	72.8	5.19 dd (9.5, 8.5)
<b>4'</b>	68.2	5.05 dd (10.0, 9.5)
<b>5'</b>	71.1	3.67 ddd (10.0, 5.0, 2.5)
<b>6'</b>	61.9	4.23 dd (12.5, 2.5) 4.08 dd (12.5, 2.5)
<b>1''</b>	100.0	4.51 d (8.0)
<b>2''</b>	71.1	5.05 ddd (10.0, 8.0)
<b>3''</b>	72.6	5.21 t (9.5)
<b>4''</b>	68.4	5.08 dd (10.0, 9.5)
<b>5''</b>	72.1	3.70 ddd (10.0, 5.0, 2.5)
<b>6''</b>	62.0	4.24 dd (12.5, 2.5) 4.14 dd (10.5, 2.5)
<b>Acetatos</b>		
$\delta_C$ CO: 170.7, 170.5, 170.3, 170.2, 170.0, 169.4, 169.2, 169.1. CH <sub>3</sub> : 20.7, 20.6, 20.6. $\delta_H$ CH <sub>3</sub> : 2.08, 2.07, 2.05, 2.04, 2.03, 2.02, 2.01, 2.0, 1.99.		

- **Compuesto VI**

En el experimento de IR (espectro 26) de **VI**, al igual que aquel de la withanólida **V**, mostró bandas de absorción de  $\delta$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas y de grupos acetato: 1756, 1195 y 1243  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (tabla 7, espectros 27 y 28) del compuesto **VI** fueron muy similares a los de la withanólida **IV**, pero con señales de dos glucopiranosas como en el caso del compuesto **V**. En los espectros de RMN de **VI** se observaron las señales de dos metinos anoméricos en  $\delta_H$  4.58 (d, J=8.0 Hz),  $\delta_C$  98.8 y  $\delta_H$  4.52 (d, J=8.0 Hz),  $\delta_C$  100.7.

El experimento bidimensional HMBC (espectro 29) del compuesto **VI** mostró la correlación del protón anomérico de la segunda unidad de glucosa (CH-1'',  $\delta_H$  4.52) con

la señal de C-6' ( $\delta_c$  68.3) de la glucopiranosita unida a CH-3. Por lo tanto, la estructura de la withanólida **VI** se propuso como aquella de la figura 25.

El espectro de masas (EMAR-ESI) mostró un pseudo ion molecular  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  1125 congruente con la fórmula molecular  $C_{56}H_{78}O_{22}$ . Una revisión de la literatura química permitió identificar al compuesto **VI** como el peracetato de withanósido V (Matsuda *et al.*, 2001).

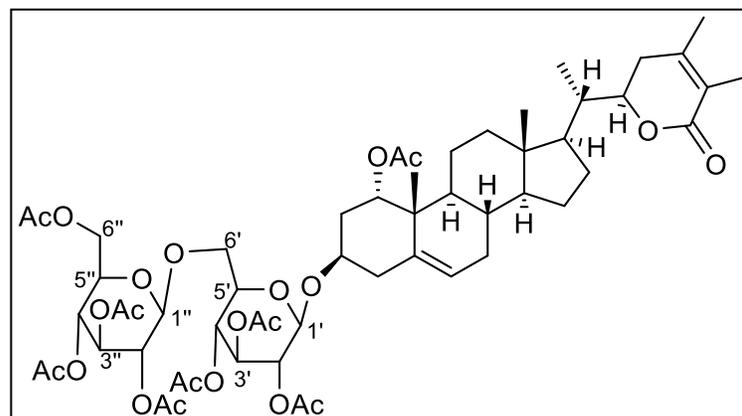


Figura 25. Estructura del compuesto **VI**.

Tabla 7. Datos de RMN- $^1H$  (500 MHz) y de  $^{13}C$  (125 MHz) del compuesto **VI** en  $CDCl_3$ .

Posición	<b>VI</b> $\delta_c$	<b>VI</b> $\delta_H$
1	74.7	5.08 ta (2.5)
2	33.4	2.14 m, 1.79 ddd (14.0, 11.5, 2.5)
3	74.1	3.86 m
4	38.1	2.41 ddd (13.5, 5.5, 2.5) 2.22 m
5	136.7	-----
6	124.6	5.52 d (5.5)
7	31.6	2.0 m, 1.55 m
8	31.7	1.48 m
9	42.3	1.27 m
10	40.5	-----
11	20.3	1.40 m
12	38.1	1.08 m
13	42.7	-----

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

14	56.5	1.02 m
15	27.3	1.68 m, 1.37 m
16	24.3	1.63 m, 1.15 m
17	52.0	1.12 m
18	11.7	0.70 s
19	19.4	1.06 sa
20	38.8	1.99 d (4.0)
21	13.4	1.0 d (6.3)
22	78.3	4.37 dt (13.5, 3.5)
23	29.6	2.43 dd (14.0, 3.0), 1.91 m
24	148.9	-----
25	121.9	-----
26	167.1	-----
27	12.5	1.93 s
28	21.2	1.88 s
<b>β-glucopiranasas</b>		
1'	98.8	4.58 d (8.0)
2'	70.9	4.90 dd (9.5, 8.0)
3'	72.9	5.18 t (9.5)
4'	69.1	4.91 dd (10.0, 9.5)
5'	72.0	3.62 m
6'	68.3	3.84 dd (10.5, 2.0) 3.63 dd (10.5, 4.0)
1''	100.7	4.52 d (8.0)
2''	71.4	4.97 dd (9.5, 8.0)
3''	72.9	5.18 t (9.5)
4''	68.3	5.06 dd (10.0, 9.5)
5''	72.7	3.70 ddd (9.0, 5.0, 2.5)
6''	61.8	4.26 dd (12.5, 5.0) 4.12 dd (12.5, 2.5)
<b>Acetatos</b>		
δ <sub>C</sub> CO: 170.6, 170.3, 170.1, 169.5, 169.4, 169.2, 169.2. CH <sub>3</sub> : 20.7, 20.7, 20.6, 20.6, 20.5.		
δ <sub>H</sub> CH <sub>3</sub> : 2.10, 2.07, 2.04, 2.03, 2.0.		

## 7.2. Actividad anti-inflamatoria de IV y V

Se evaluó la actividad anti-inflamatoria de los compuestos nuevos, **IV** y **V** pero, solamente el metabolito **IV** presentó una moderada actividad antiinflamatoria, con un porcentaje de inhibición del edema de 43.38 %, mientras que aquel del compuesto de referencia, indometacina, fue de 81.36 %.

Tabla 8. Actividad antiinflamatoria de los compuestos **IV** y **V**

Compuesto	Dosis μmol/oreja	Inhibición %
<b>IV</b>	1	43.38
<b>V</b>	1	---
Indometacina	1 μmol/oreja	81.36

## 7.3. Actividades antimicobacteriana y citotóxica de III y V

Se evaluó la actividad antimicobacteriana de los metabolitos **III** y **V** a través del ensayo REMA (tabla 9), desafortunadamente las concentraciones mínimas inhibitorias ( $MIC_{100} = 250$  y  $> 500$  μg/mL, respectivamente) fueron superiores a la  $MIC_{100}$  del fármaco de referencia rifampina (0.06 μg/mL), por lo que ambos compuestos se consideran inactivos frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

Por otra parte, fue determinada la toxicidad de **III** y **V** en células Vero mediante el ensayo MTT. La concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) del compuesto **III** fue menor a 20 μg/mL, bastante inferior a la del fármaco de referencia ( $>1000$  μg/mL), por lo que el compuesto **III** fue considerado tóxico. En relación con el compuesto **V** su  $IC_{50}$  fue de 387 μg/mL, lo que indicó una toxicidad moderada.

Tabla 9. Evaluaciones de las actividades antimicobacterianas (*M. tuberculosis*) y niveles de citotoxicidad de los compuestos **III** y **V**.

Compuesto	$MIC_{100}$ (μg/mL)	$IC_{50}$ , en células Vero (μg/mL)	Índice de selectividad (SI) $IC_{50}/MIC_{100}$
<b>III</b>	250	Menor a 20	-----
<b>V</b>	> 500	387	0.774
Rifampina	0.06	>1000	>16,666

#### 7.4. Inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa, enzima $\alpha$ -glucosidasa de levadura y de rata de III y V

Choudhary *et al.*, describieron en el 2004 la capacidad de withaferina A de inhibir a la enzima acetilcolinesterasa, este hecho indujo a evaluar a los compuestos **III** y **V** como inhibidores de la misma enzima. Las concentraciones utilizadas de los compuestos fueron de 1 a 100  $\mu$ M (tabla 10) y los porcentajes de inhibición variaron desde 4.86 % hasta 9.13 %, muy por debajo al porcentaje de inhibición del control positivo, eserina (47.97 %, 0.01  $\mu$ M), por lo que **III** y **V** son considerados inactivos.

En la prueba de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de levadura (tabla 10), los porcentajes de inhibición variaron de 4.05 a 8.05 %, muy por debajo del resultado obtenido por el control positivo, quercetina (42.70 %, 15  $\mu$ M), de modo que **III** y **V** fueron considerados inactivos.

Los compuestos **III** y **V** también fueron evaluados como inhibidores de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de rata, en este caso el compuesto de referencia fue acarbosa (49.19 %, 45  $\mu$ M), y una vez más, los compuestos **III** y **V** fueron inactivos. Adicionalmente, el extracto de acetona fue evaluado en la inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa,  $\alpha$ -glucosidasa de levadura y de rata, pero los resultados nuevamente fueron negativos.

Tabla 10. Inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa,  $\alpha$ -glucosidasa de levadura y de rata.

Compuesto	Concentración $\mu$ M	Inhibición de las enzimas		
		acetilcolinesterasa	$\alpha$ -glucosidasa de levadura	$\alpha$ -glucosidasa de rata
		Inhibición (%)		
<b>III</b>	1	7.21	4.05	0.30
	10	7.54	4.82	1.34
	100	4.86	4.41	0.99
<b>V</b>	1	5.59	-5.09	3.32
	10	7.02	-9.31	2.97
	100	9.13	8.05	-0.54

## 8. CONCLUSIONES

Del extracto de acetona de la planta entera sin frutos ni cálices de *P. volubilis* Waterf. se aislaron e identificaron seis metabolitos secundarios, dos de ellos nuevos (**IV** y **V**) y aislados como derivados acetilados. Los cuatro compuestos restantes son conocidos y fueron identificados como withaferina A (**I**), glucósido de  $\beta$ -sitosterilo (**II**),  $3\beta$ -O-sulfato de 2,3-dihidrowithaferina A (**III**) y peracetato de withanósido V (**VI**).

Como parte de la elucidación estructural se obtuvieron los derivados acetilados de  $3\beta$ -O-sulfato de 2,3-dihidrowithaferina A (**III A**) y del nuevo metabolito **IV** (**IV A**).

Considerando a los compuestos aislados de *P. volubilis*, su perfil químico coincide con el de las especies estudiadas de la sección Lanceolatae, género *Physalis*.

Respecto a los diferentes ensayos de actividad biológica realizados a algunos de los metabolitos aislados de *P. volubilis*, el compuesto **IV** mostró actividad antiinflamatoria moderada y los metabolitos **III** y **V** presentaron citotoxicidad en células Vero sanas. En las pruebas de actividad antimicobacteriana e inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa,  $\alpha$ -glucosidasa de levadura y de rata de los compuestos **III** y **V**, y el extracto de acetona mostraron ser inactivos.

## 9. REFERENCIAS

1. Abou-Douh, A. M. (2002). New withanolides and other constituents from the fruit of *Withania somnifera*. *Archiv Der Pharmazie-Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*, 335, 267-276.
2. Basey, K., McGaw, B. A., Woolley, J. G. (1992). Phygrine, an alkaloid from *Physalis* species. *Phytochemistry*, 31, 4173–4176.
3. Bastos, G. N. T., Silveira, A. J. A., Salgado, C. G., Picanço-Diniz, D. L. W., Do Nascimento, J. L. M. (2008). *Physalis angulata* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 246–251.
4. Brar, R., Gupta, R. C. (2017). Phytochemical analysis of two cytotypes (2x and 4x) of *Physalis angulata* an important medicinal plant, collected from Rajasthan. *Biochemistry & Molecular Biology Journal*, 3, 3:15.
5. Canh, V. C. L., Ba, V. L., Yen, P. T. H., Thi, L. L., Hoai, P. T. T., Dat, T. T. H., Thao, D. T., Bach, L. G., Kim, Y. H., Anh, H. L.T. (2019). Identification of potential cytotoxic inhibitors from *Physalis minima*. *Natural Product Research*. Publicado en línea, DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1650360>
6. Cao, C.-M., Wu, X., Kindscher, K., Xu, L., Timmermann, B. N. (2015). Withanolides and sucrose esters from *Physalis neomexicana*. *Journal of Natural Products*. 78, 2488-2493.
7. Castellanos, C. F. A. 2014. *Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura-actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del caribe colombiano*. Tesis de Magister en Ciencias-Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
8. Chen, L-X., He, H., Qiu, F. (2011). Natural withanolides: an overview. *Natural Product Reports*, 28, 705-740.
9. Choudhary, M. I., Yousuf, S., Nawaz, S. A., Ahmed, S., Atta-Ur-Rahman. (2004). Cholinesterase inhibiting withanolides from *Withania somnifera*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 52, 1358–1361.
10. Damu, A. G., Kuo, P.-C., Su, C.-R., Kuo, T.-H., Chen, T.-H., Bastow, K. F., Lee, K.-H., Wu, T.-S. (2007). Isolation, structures, and structure–cytotoxic activity relationships of

- withanolides and physalins from *Physalis angulata*. *Journal of Natural Products*, 70, 1146–1152.
11. Del Pozo, E. C. 1991. Capítulo VII. Valor médico y documental del manuscrito. En *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis. Manuscrito Azteca de 1552, según traducción latina de Juan Badiano. Versión Española con estudios y comentarios por diversos autores*. 2a ed. Fondo de Cultura Económica, Instituto Mexicano del Seguro Social, México.
12. Drost-Karbowska, K., Ellnain-Wojtaszek, M., Gawron-Gzella, A., Kowalewski, Z., Jankiewicz, L. S., Matlawska, I., Sikorska, M., Szauffer-Hajdrych, M., Walkowiak, A., (1993). Phytochemical investigation of the tomatillo fruit (*Physalis ixocarpa* Brot., Solanaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 62, 155-159.
13. Duddeck, H., Dietrich, W., Tóth, G. 2000. *Elucidación estructural mediante RMN, ejercicios y problemas*. 3a ed. Springer-Verlag Ibérica, España.
14. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.
15. Franco, L. A., Ocampo, Y. C., Gómez, H. A., De la Puerta, R., Espartero, J. L., Ospina, L. F. (2014). Sucrose esters from *Physalis peruviana* calyces with anti-inflammatory activity. *Planta Medica*, 80, 1605-1614.
16. Helvacı, S., Kökdil, G., Kawai, M., Duran, N., Duran, G., Güvenç, A. (2010). Antimicrobial activity of the extracts and physalin D from *Physalis alkekengi* and evaluation of antioxidant potential of physalin D. *Pharmaceutical Biology*, 48, 142–150.
17. Huang, M., He, J-X., Hu, H-X., Zhang, K., Wang, X-N., Zhao, B-B., Lou, H-X., Ren, D-M., Shen, T. (2020). Withanolides from the genus *Physalis*: a review on their phytochemical and pharmacological aspects. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72, 649-669.
18. Januário, A. H., Rodrigues-Filho, E., Pietro, R. C. L. R., Kashima, S., Sato, D. N., França, S. C. (2002). Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Phytotherapy Research*, 16, 445–448.

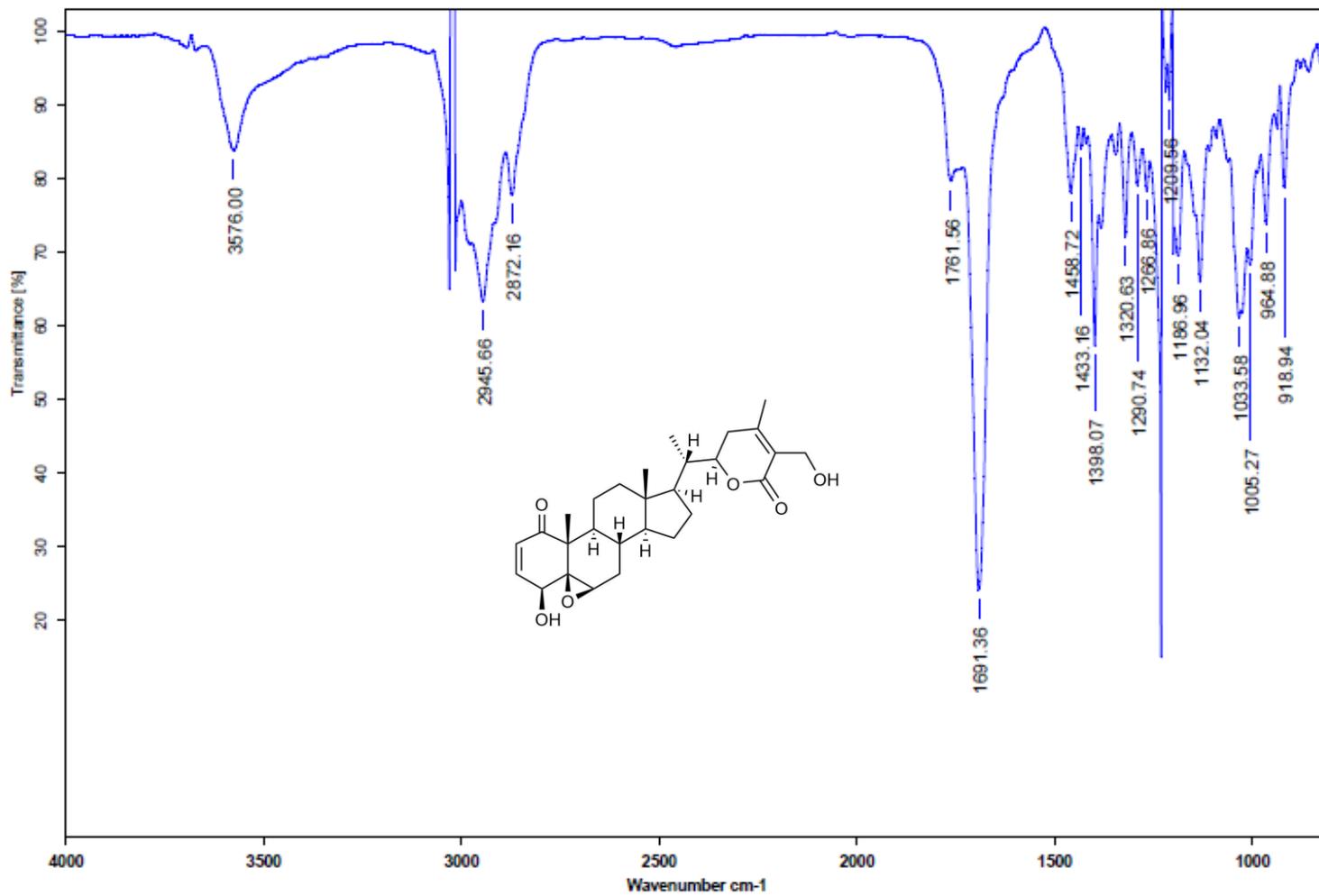
19. Jo S-H, Ka E-H, Lee H-S, Apostolidis E, Jang H-D, Kwon Y-I. (2010). Comparison of antioxidant potential and rat intestinal  $\alpha$ -glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 2, 52-60.
20. Krishnaswamy, N. R. 2010. *Chemistry of natural products*. 2a ed. Universities Press, India.
21. Lavie, D., Glotter, E., Shvo, Y. (1965). Constituents of *Whitania somnifera* Dun. III. The side chain of withaferin A. *Journal Organic Chemistry*, 30, 1774-1778.
22. López Luengo, M. T. (2005). Fitoesteroles y fitoestanoles. *Ámbito Farmacéutico Fitoterapia*, 24, 90-94.
23. Ma, L., Gan, X.-W., He, Q.-P., Bai, H.-Y., Arfan, M., Lou, F.-C., Hu, L.-H. (2007). Cytotoxic withaphysalins from *Physalis minima*. *Helvetica Chimica Acta*, 90, 1406–1419.
24. Maldonado, E., Torres, F. R., Martínez, M., Pérez-Castorena, A. L. (2006). Sucrose esters from the fruits of *Physalis nicandroides* var. *attenuata*. *Journal of Natural Products*, 69, 1511-1513.
25. Maldonado, E., Amador, S., Martínez, M., Pérez-Castorena, A. L. (2010). Virginols A-C, three new withanolides from *Physalis virginiana*. *Steroids*, 75, 346-349.
26. Martínez, M., Vargas-Ponce, O., Rodríguez, A., Chiang, F., Ocegueda, S. (2017). Solanaceae family in México. *Botanical Sciences*, 95, 131-145.
27. Martínez, R., Nieves, Z. G. J., Pretelin-Castillo, G., Torres-Ochoa, R. O., Medina-Franco, J. L., Espitia, P. C. I., Silvia, M. M., Hernández, E., Alanís-Garza, B. (2019). Synthesis and antitubercular activity of new N-[5-(4-chlorophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]-(nitroheteroaryl)carboxamides. *Heterocyclic Communications*, 25, 52–59.
28. Matsuda, H., Murakami, T., Kishi, A., Yoshikawa, M. (2001). Structures of withanosides I, II, III, IV, V, VI, and VII, new withanolide glycosides, from the roots of Indian *Withania somnifera* DUNAL. and inhibitory activity for tachyphylaxis to clonidine in isolated Guinea-Pig ileum. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9, 1499–1507.
29. Medina-Medrano, J. R., Aviña-Martínez., G. N., García-Pereyra, J. (2014). Revisión de flavonoides identificados en el género *Physalis* (Solanaceae), su capacidad

- antioxidante e importancia como marcadores químicos. *Naturaleza y Desarrollo*, 12, 16-24.
30. Mejía, K., Rengifo, E. 2000. *Plantas medicinales de uso popular en la amazonía Peruana*. 2a ed. Agencia Española de Cooperación Internacional, Lima, Perú.
31. Montes, H. S., Aguirre, R. J. R. (1994). Etnobotánica del tomate mexicano (*Physalis philadelphica* Lam.). *Revista de Geografía Agrícola*, 20, 163-172.
32. Nogales-Gaete, J., Donoso, S. A., Verdugo, L. R. J. 2005. *Tratado de neurología clínica*. Editorial Universitaria, Santiago de Chile, Chile.
33. Padierna, J. G. 2014. *Estudio químico de Physalis gracilis*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
34. Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47.
35. Patel, K., Singh, R. B., Patel, D. K. (2013). Pharmacological and analytical aspects of withaferin A: A concise report of current scientific literature. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2, 238–243.
36. Pelletier, S. W., Gebeyehu, G., Nowacki, J., Mody, N. V. (1981). Viscosalactone A and viscosalactone B, two new steroidal lactones from *Physalis viscosa*. *Heterocycles*, 15, 317-320.
37. Pérez-Castorena, A.-L., Luna, M., Martínez, M., Maldonado, E. (2012). New sucrose esters from the fruits of *Physalis solanaceus*. *Carbohydrate Research*, 352, 211-214.
38. Pérez-Castorena, A.-L., Martínez, M., Maldonado, E., (2010). Labdanes and sucrose esters from *Physalis sordida*. *Journal of Natural Products*, 73, 1271–1276.
39. Pérez-Castorena, A.-L., Oropeza, R. F., Vázquez, A. R., Martínez, M., Maldonado, E. (2006). Labdanes and withanolides from *Physalis coztomatl*. *Journal of Natural Products*, 69, 1029-1033.
40. Pietro, R. C. L. R., Kashima, S., Sato, D. N., Januário, A. H., França, S. C. (2000). In vitro antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. *Phytomedicine*, 74, 335–338.

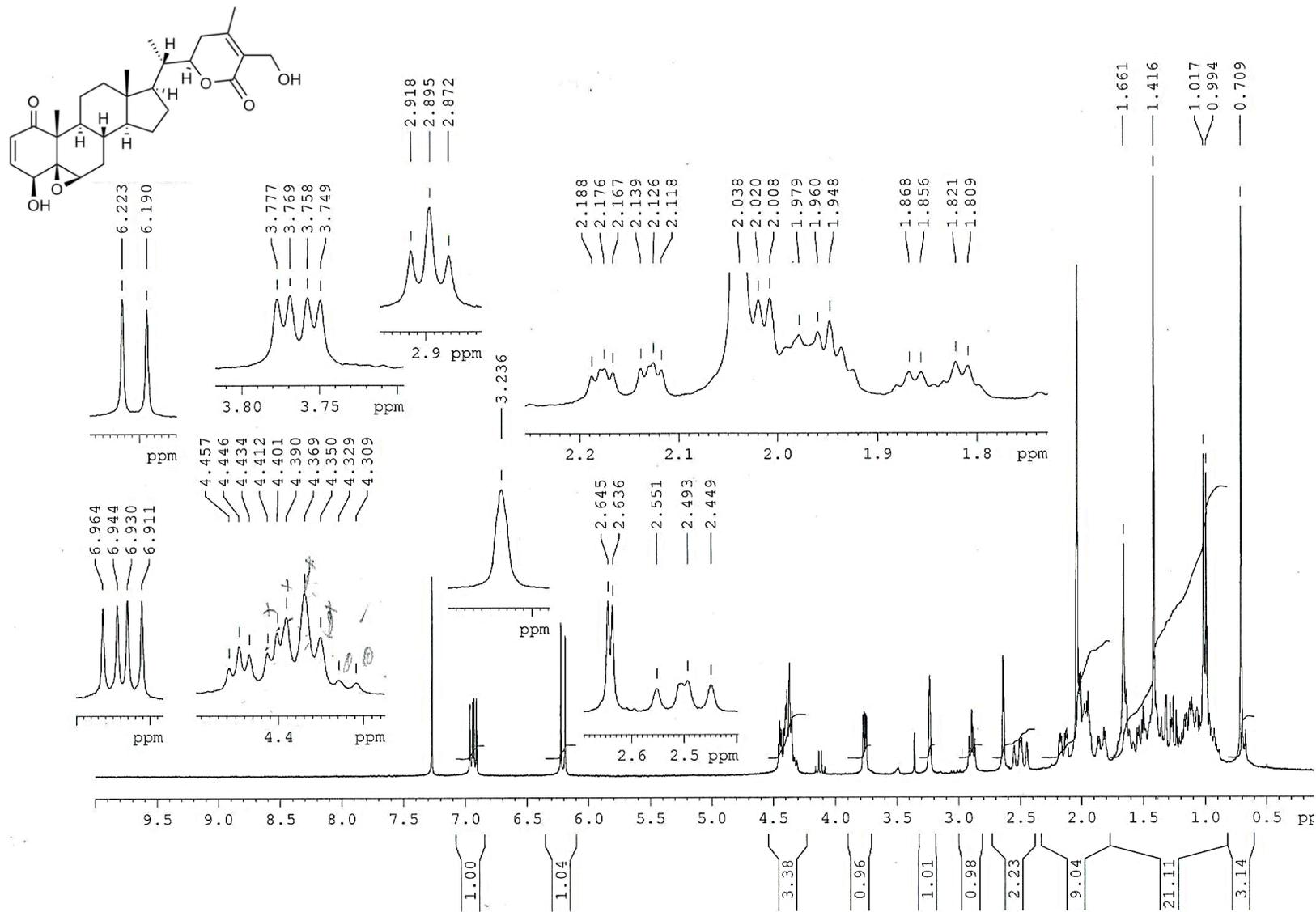
41. Puente, L. A., Pinto-Muñoz, C. A., Castro, E. S., Cortés M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: a review. *Food Research International*, 44, 1733-1744.
42. Ramadan, M. F. (2011). Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): an overview. *Food Research International*, 44, 1830-1836.
43. Rengifo-Salgado, E., Vargas-Arana, G., (2013). *Physalis angulata* L. (Bolsa mullaca): a review of its traditional uses, chemistry and pharmacology. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12, 431–445.
44. Sánchez-Valle, V., Méndez-Sánchez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Revista de Investigación Médica Sur*, 20, 161-168.
45. Santiaguillo, H. J. F., Blas, Y. S. (2009). Aprovechamiento tradicional de las especies de *Physalis* en México. *Revista de Geografía Agrícola*, 43, 81-86.
46. Ser, N. A. (1988). Flavonoids from *Physalis minima*. *Phytochemistry*, 27, 3708–3709.
47. Silva, M. T. G, Simas, S. M., Batista, T. G. F. M., Cardarelli, P., Tomassini, T. C. B. (2005). Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 779–782.
48. Sobolewski, C., Legrand, N., Morceau, F., Diederich, M. (2010). Inflammation: Novel arrows for an ancient target. *Biochemical Pharmacology*, 80, 1769–1770.
49. Szüts, A., Szabó-Révész, P. (2012). Sucrose esters as natural surfactants in drug delivery systems- A mini-review. *International Journal of Pharmaceutics*, 433, 1–9.
50. Trenado-Uribe, M., Silva-Miranda, M., Rivero-Cruz, J. F., Rodríguez-Peña, K., Espitia-Pinzón, C. I., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S. (2018). Antimycobacterial activity of an anthracycline produced by an endophyte isolated from *Amphipterygium adstringens*. *Molecular Biology Reports*, 45, 2563-2570.
51. Turvey, J. R. (1965). Sulfates of the simple sugars. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 20, 183–218.
52. Vargas, P. O., Martínez, D. M., Dávila, A. P. 2003. *La familia Solanaceae en Jalisco. El género Physalis*. Universidad de Guadalajara, México.

53. Wansi, J. D., Devkota, K. P., Tshikalange, E., Kuete, V. (2013). Alkaloids from the medicinal plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa*, 557–605.
54. Whitson, M., Manos, P. S. (2005). Untangling *Physalis* (Solanaceae) from the physaloids: a two-gene phylogeny of the physalinae. *Systematic Botany*, 30, 216–230.
55. Wu, S.-J., NG, L.-T., Huang, Y.-M., Lin, D.-L., Wang, S.-S., Huang, S.-N., Lin, C.-C. (2005). Antioxidant activities of *Physalis peruviana*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28, 963–966.
56. Xiao-Ping, Y., Chun-Qing, S., Ping, Y., Ren-Gang, M. (2010).  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of common constituents from traditional Chinese medicine used for diabetes mellitus. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 8, 0349–0352.
57. Young, J. M., Wagner, B. M., Spires, D. A. (1983). Tachyphylaxis in 12-O-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. *Journal of Investigative Dermatology*, 80, 48–52.
58. Yu, Q.-S., Holloway, H. W., Utsuki, T., Brossi, A., Greig, N. H. (1999). Synthesis of novel phenserine-based-selective inhibitors of butyrylcholinesterase for Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 1855–1861.
59. Zhang, H., Samadi, A. K., Gallagher, R. J., Araya, J. J., Tong, X., Day V. W., Cohen, M. S., Kindscher, K., Gollapudi, R., Timmermann, B. N. (2011). Cytotoxic withanolide constituents of *Physalis longifolia*. *Journal of Natural Products*, 74, 2532-2544.
60. Zhang, W.-N., Tong, W.-Y. (2016). Chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Physalis*. *Chemistry and Biodiversity*, 13, 48-65.
61. Zhou, T., Zhang, S.-W., Liu, S.-S., Cong, H.-J., Xuan, L.-J. (2010). Daphnodorin dimers from *Edgeworthia chrysantha* with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Phytochemistry Letters*, 3, 242–247.

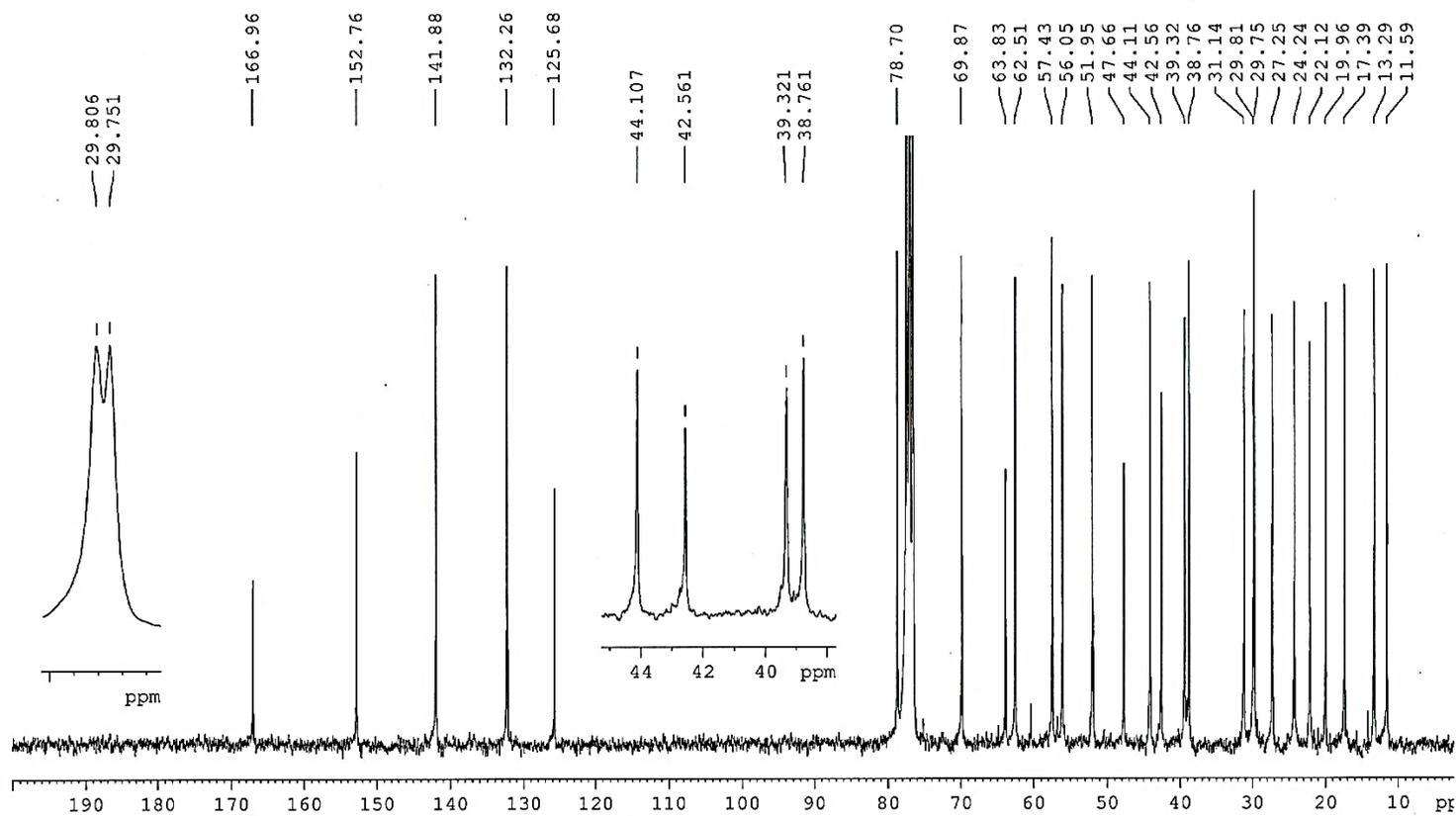
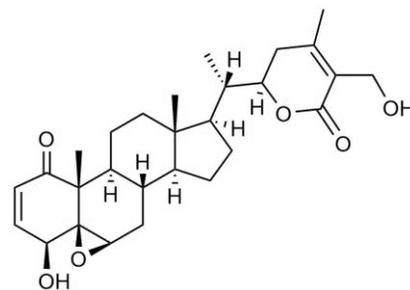
## 10. ANEXO



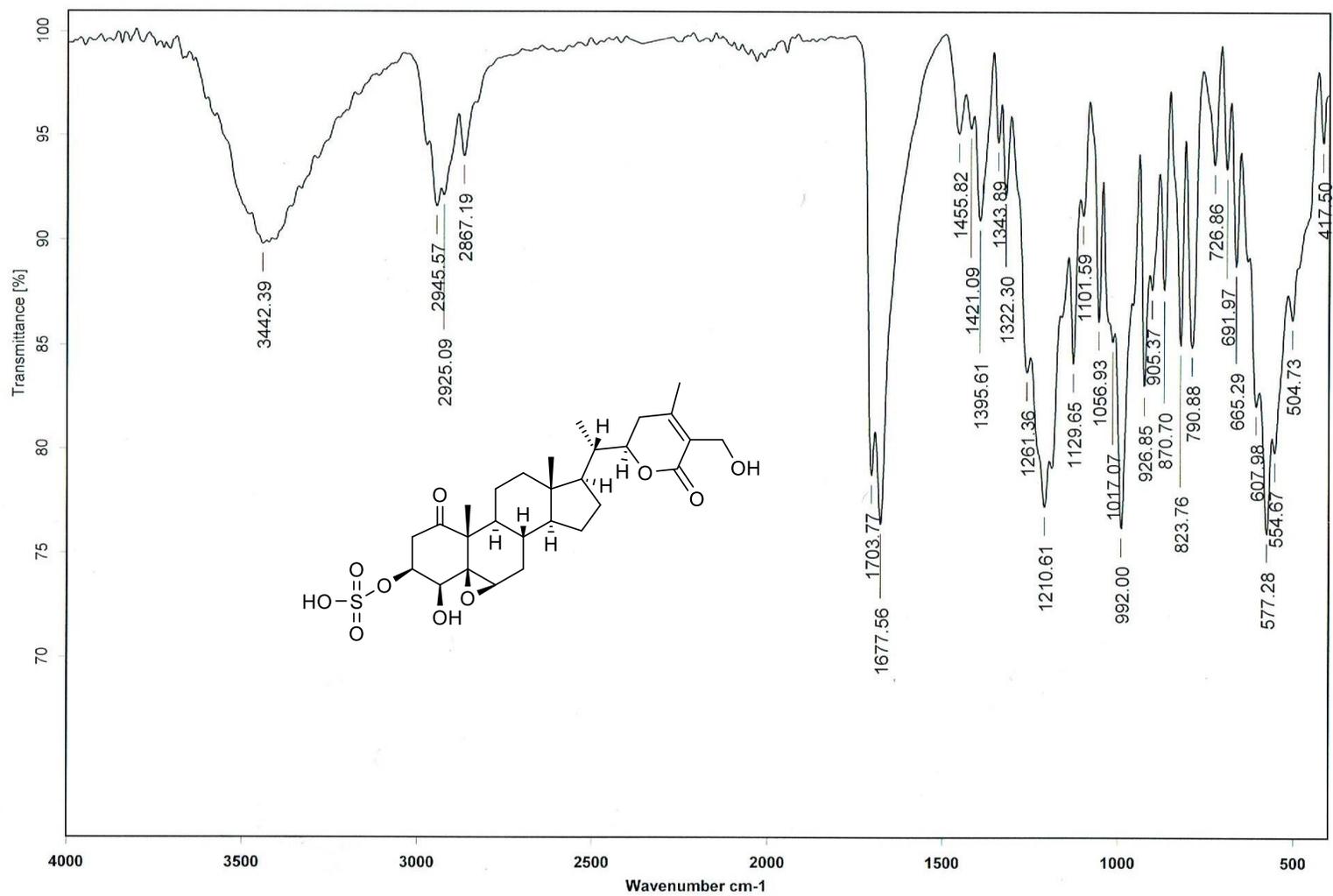
Espectro 1. IR del compuesto I (Solución en CHCl<sub>3</sub>).



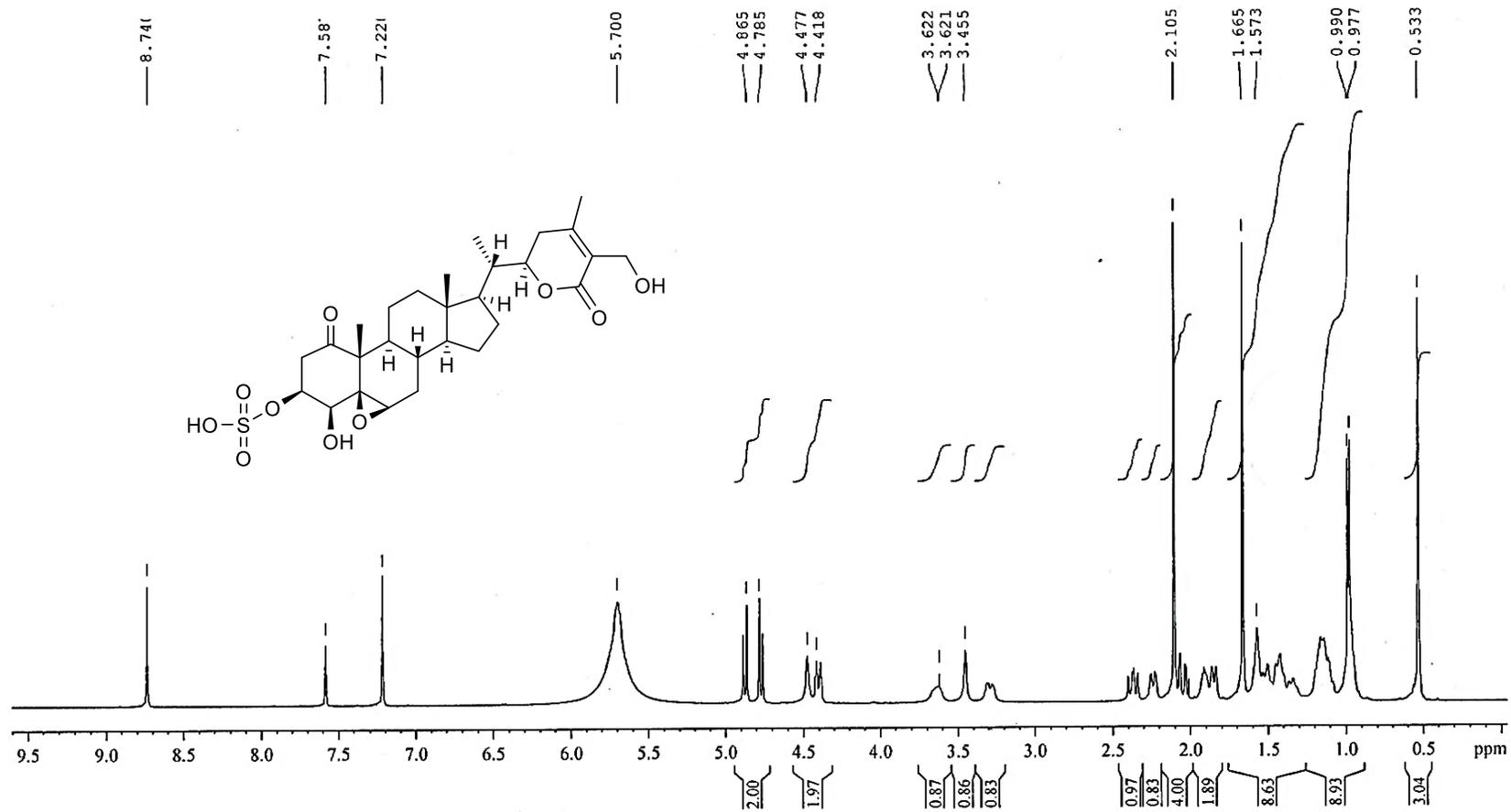
Espectro 2. RMN-<sup>1</sup>H del compuesto I (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



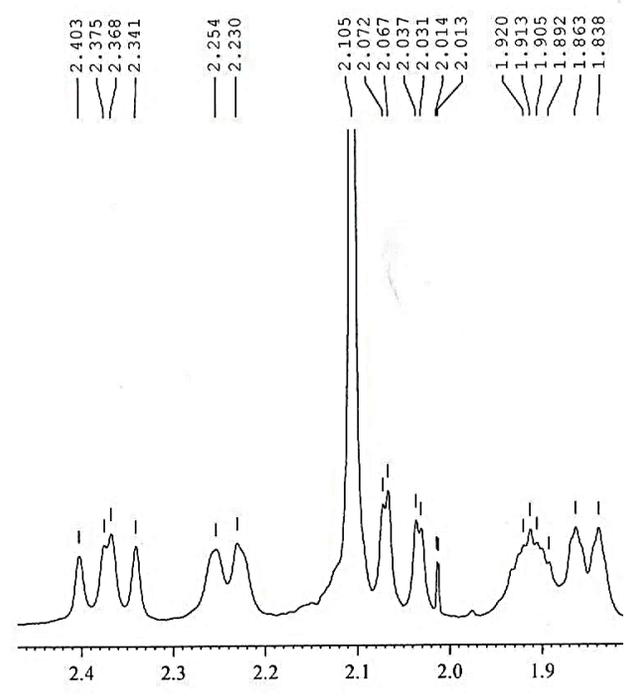
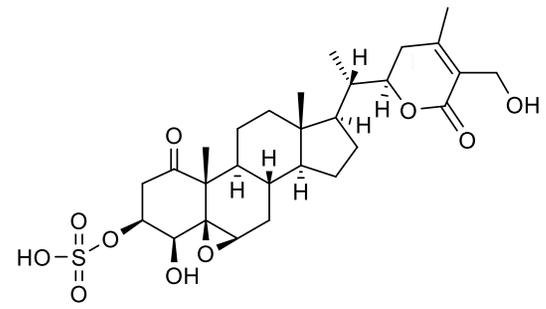
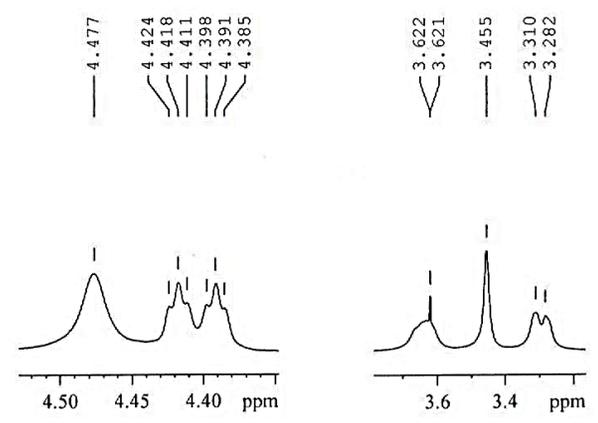
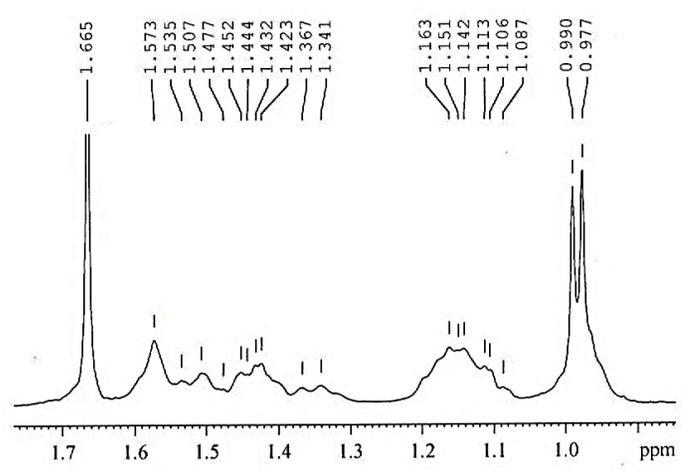
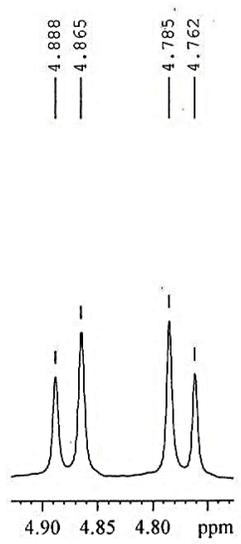
Espectro 3. RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto I (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



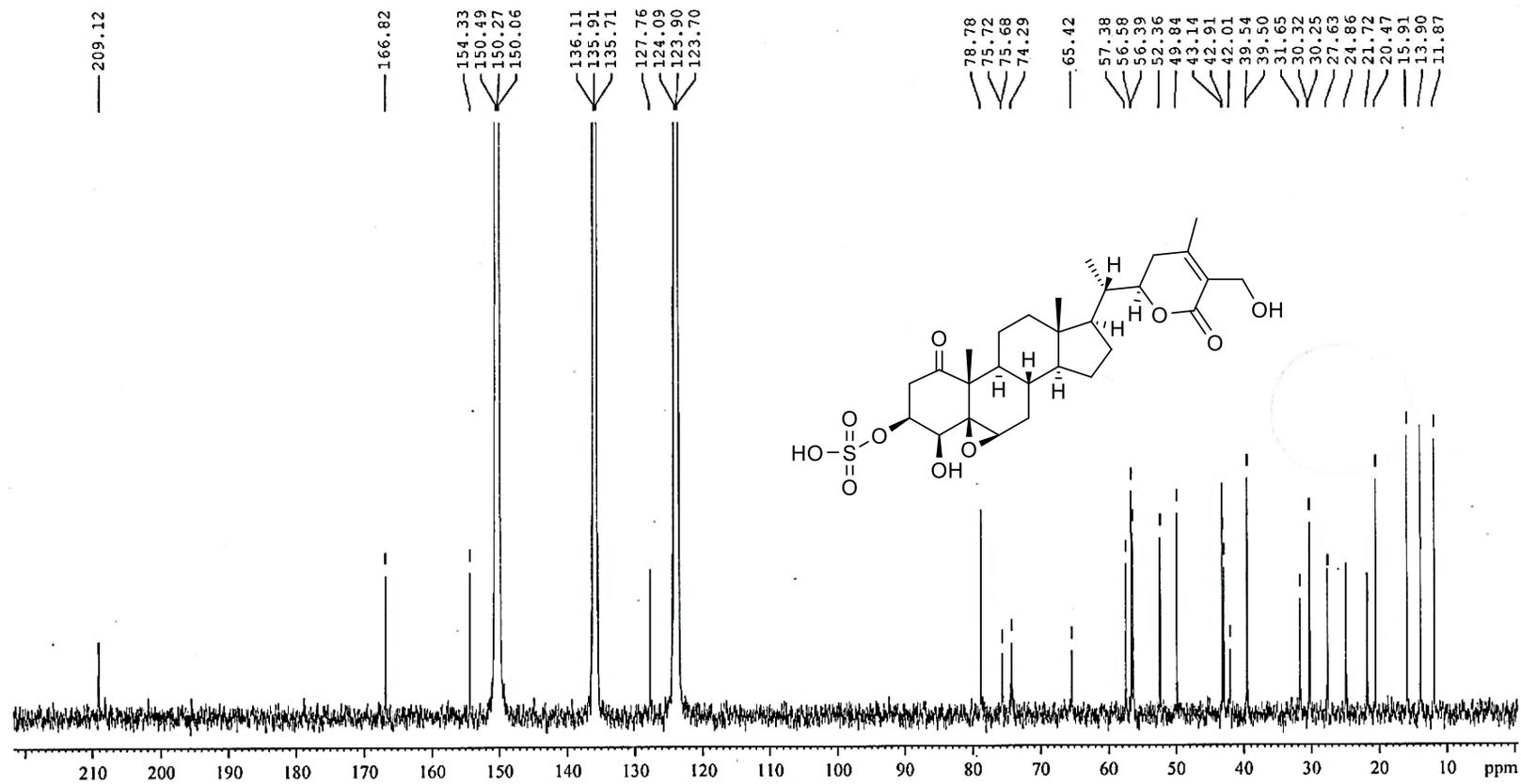
Espectro 4. IR del compuesto III (KBr/Pastilla).



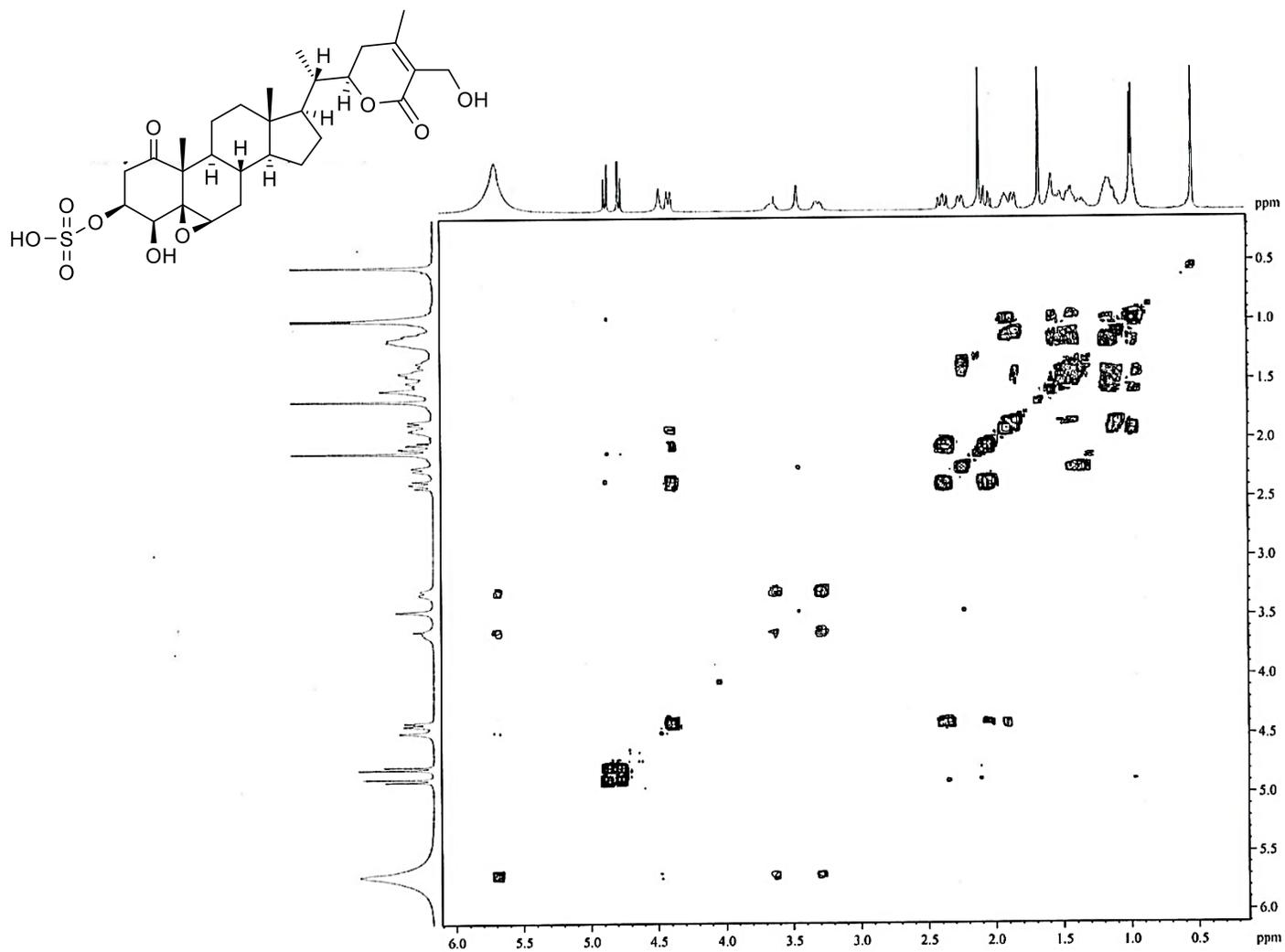
Espectro 5. RMN-<sup>1</sup>H del compuesto III (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N).



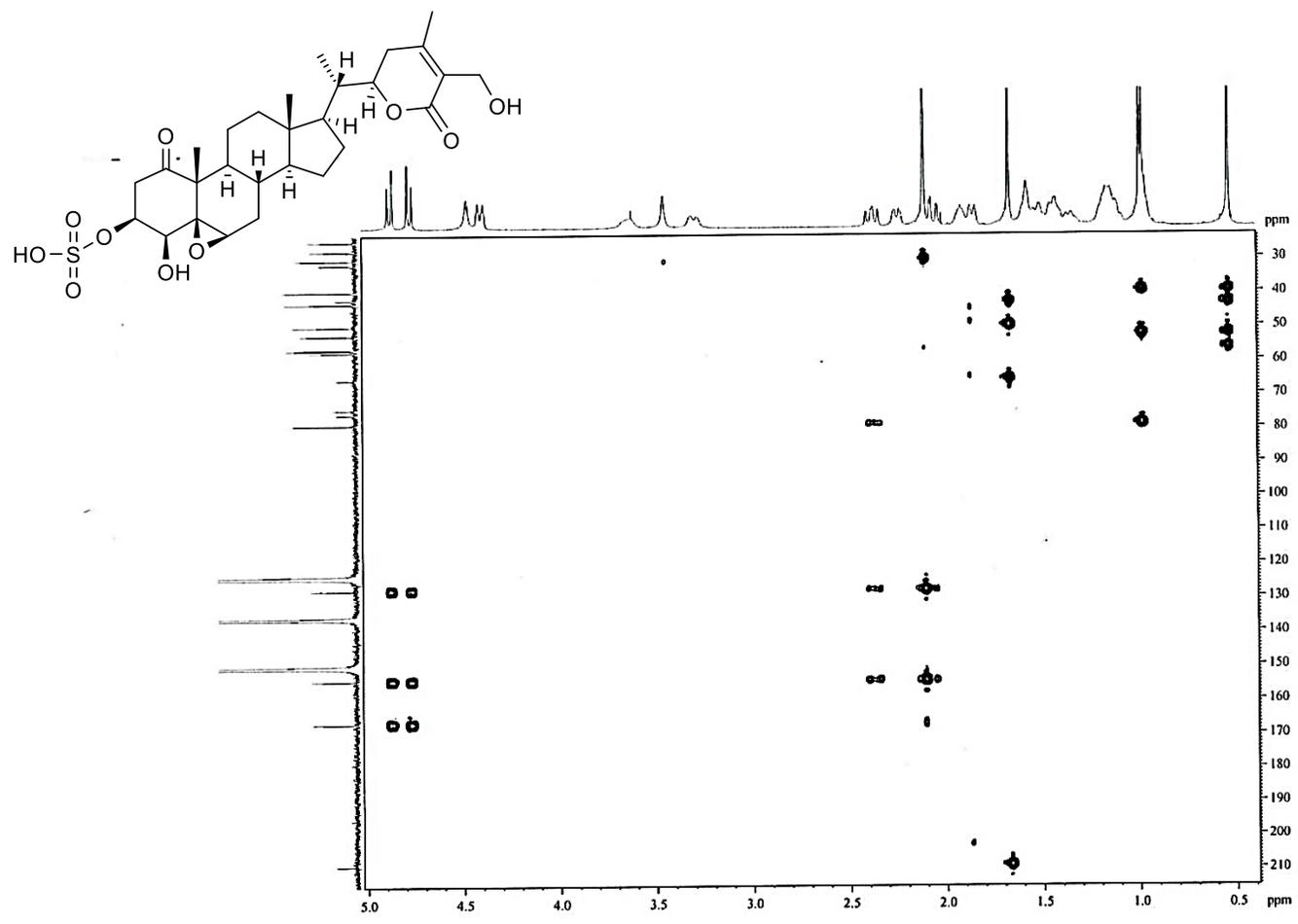
Espectro 5.1 RMN-<sup>1</sup>H del compuesto III (500 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N).



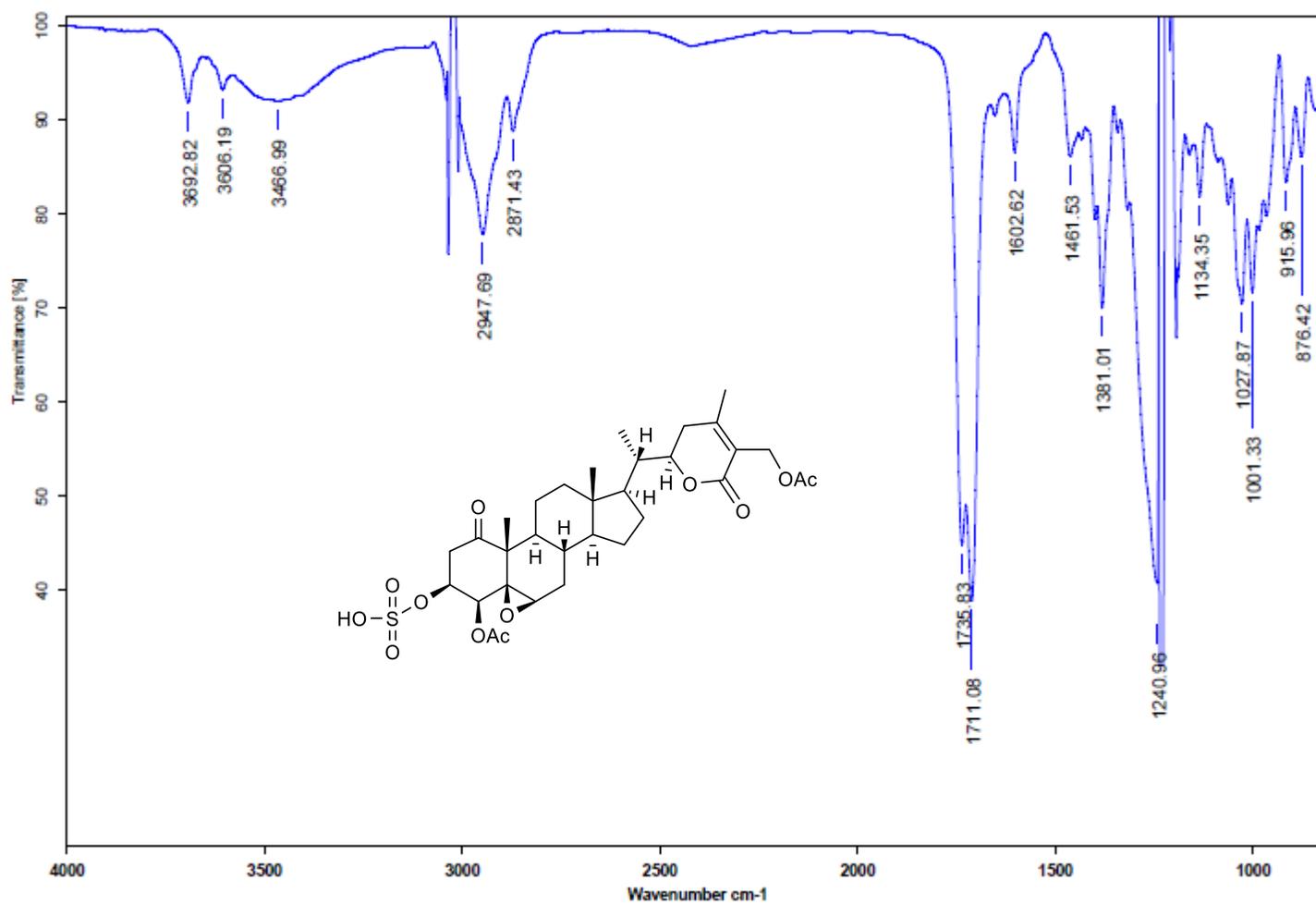
Espectro 6. RMN-<sup>13</sup>C del compuesto III (125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N).



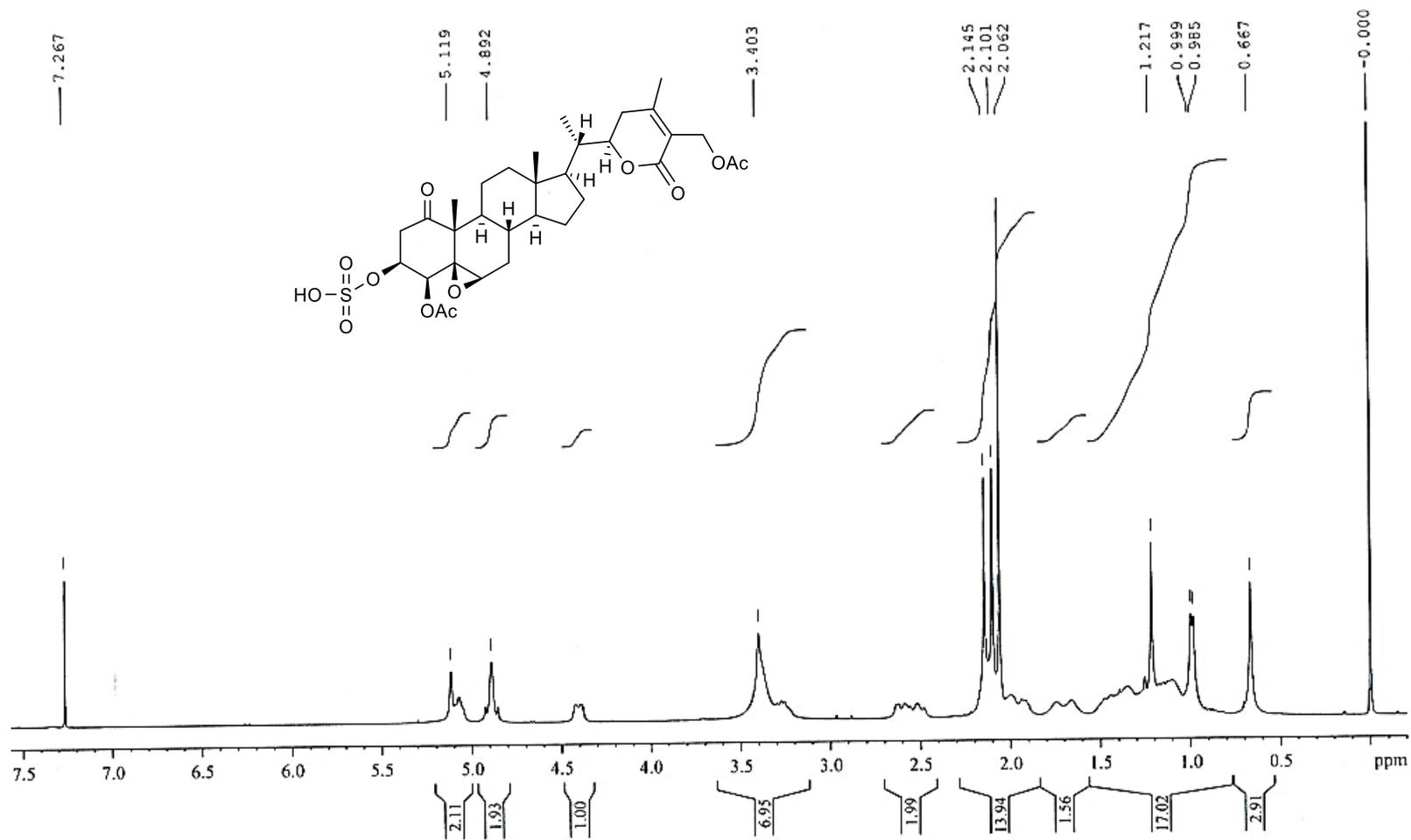
Espectro 7. COSY del compuesto III.



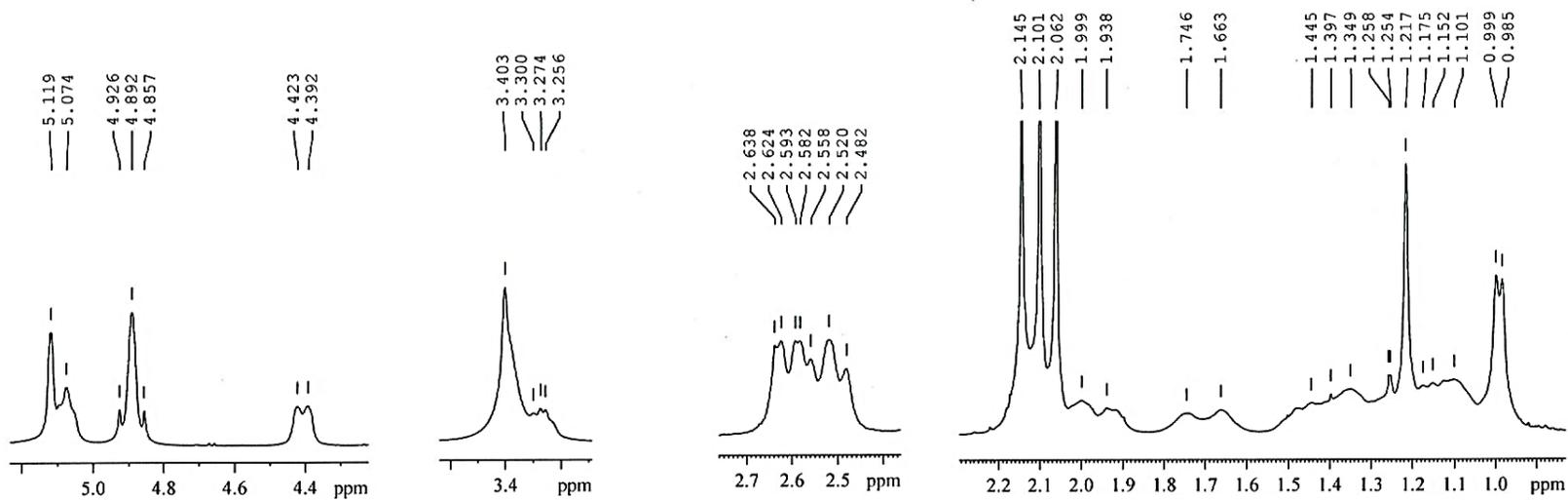
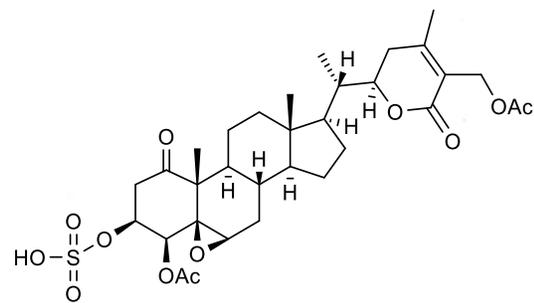
Espectro 8. HMBC del compuesto III.



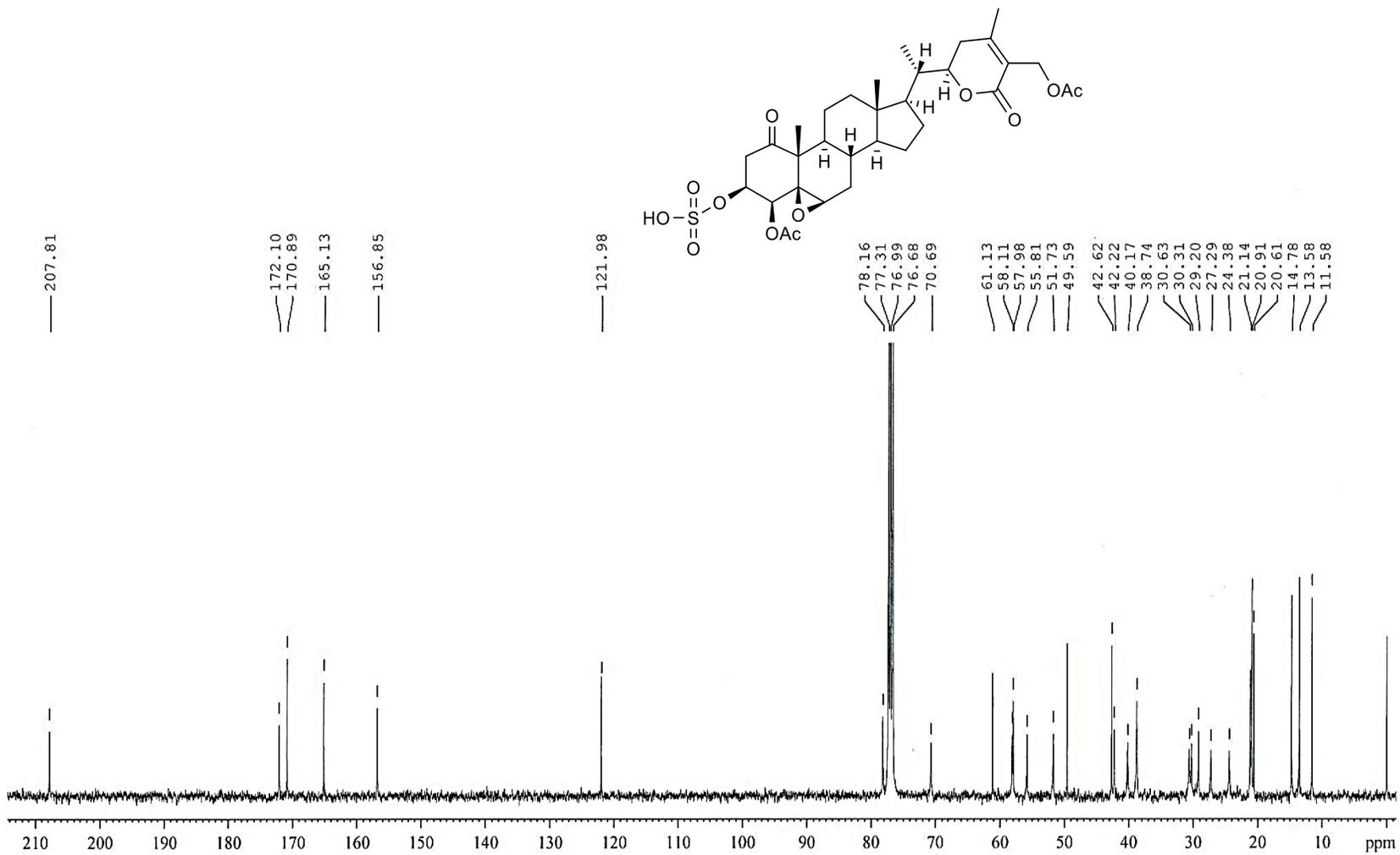
Espectro 9. IR del compuesto III A (Solución en CHCl<sub>3</sub>).



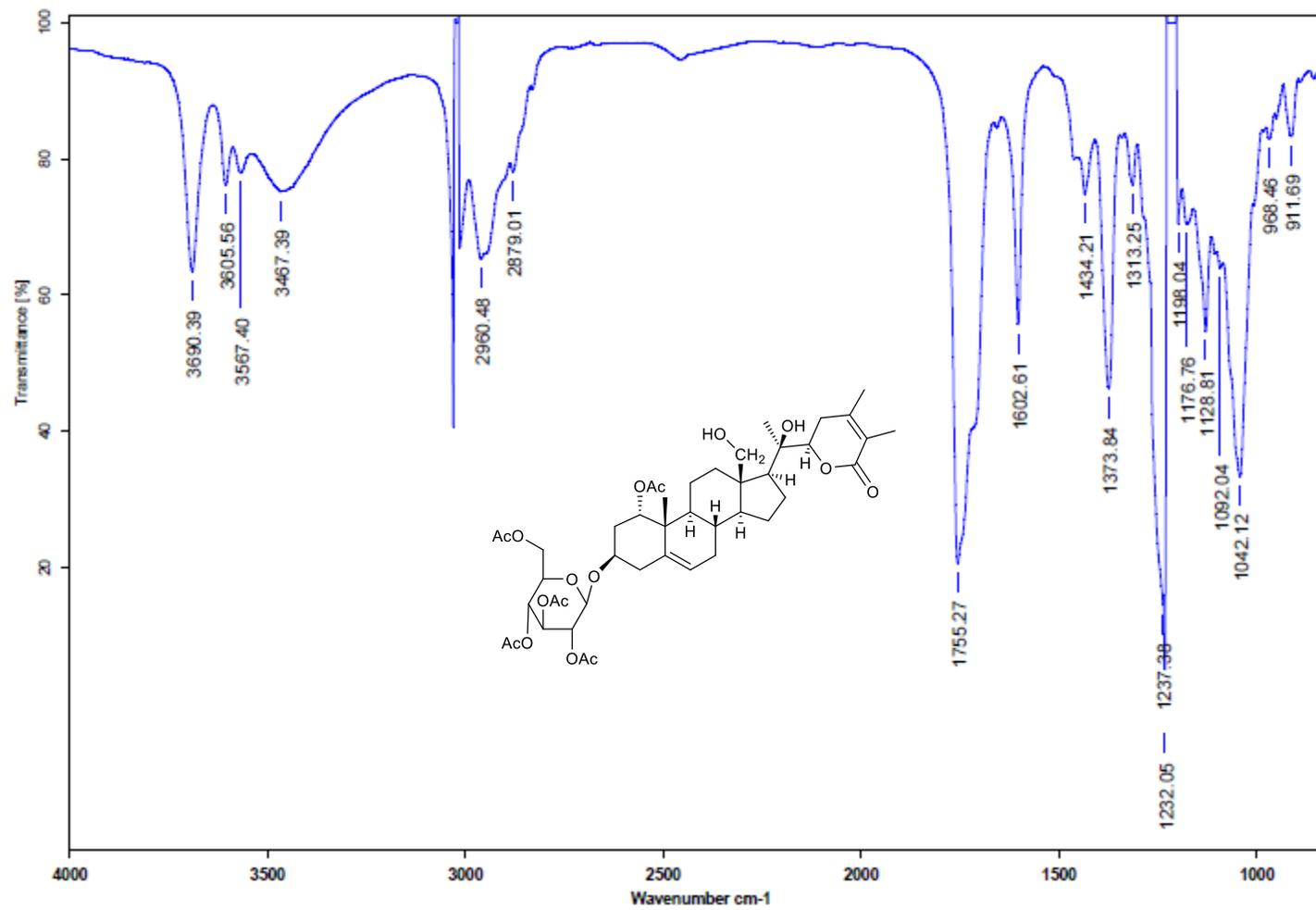
Espectro 10. RMN-<sup>1</sup>H del compuesto III A (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



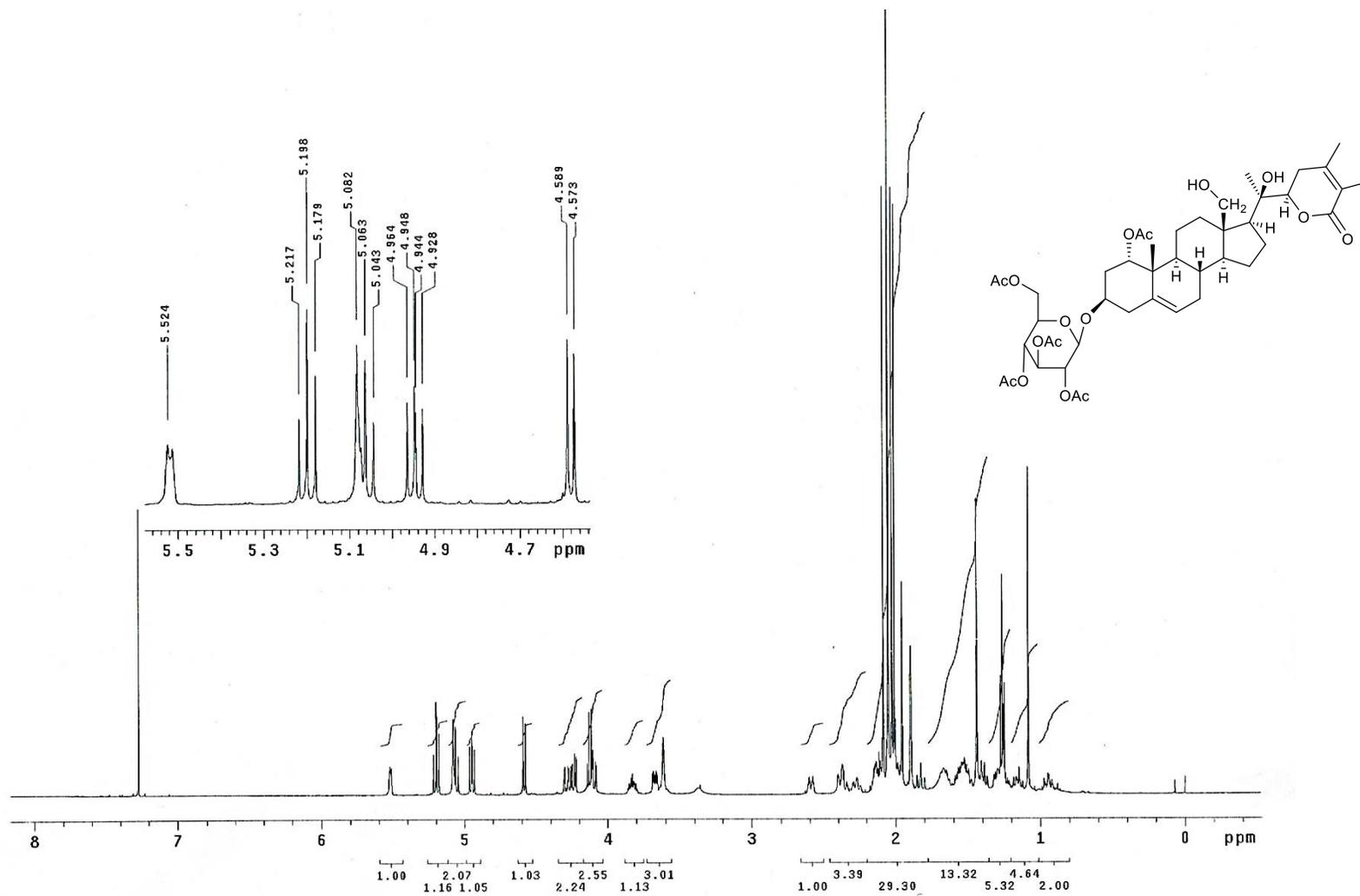
Espectro 10.1 RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **III A** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Espectro 11. RMN-<sup>13</sup>C del compuesto III A (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

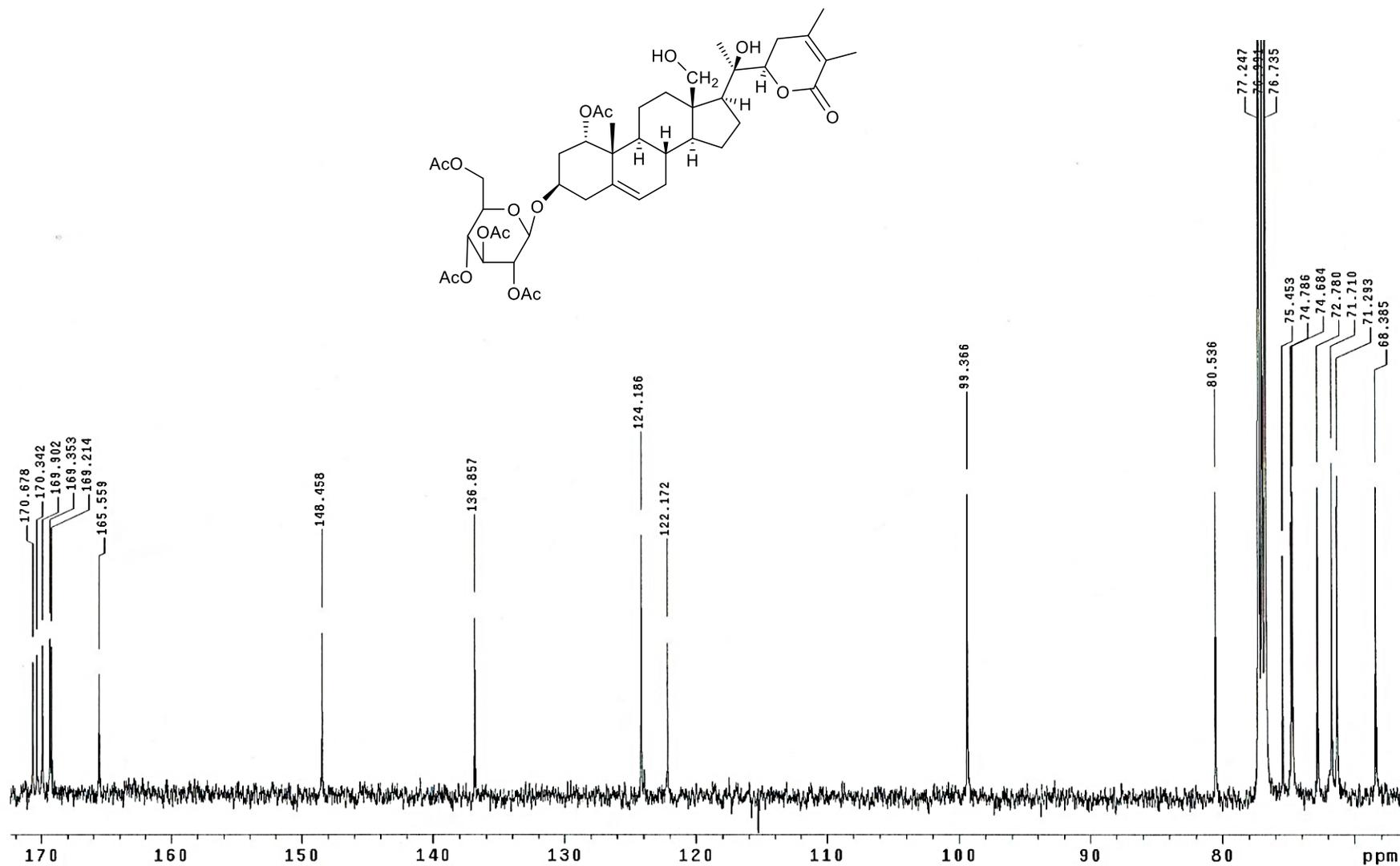


Espectro 12. IR del compuesto **IV** (Solución en CHCl<sub>3</sub>).

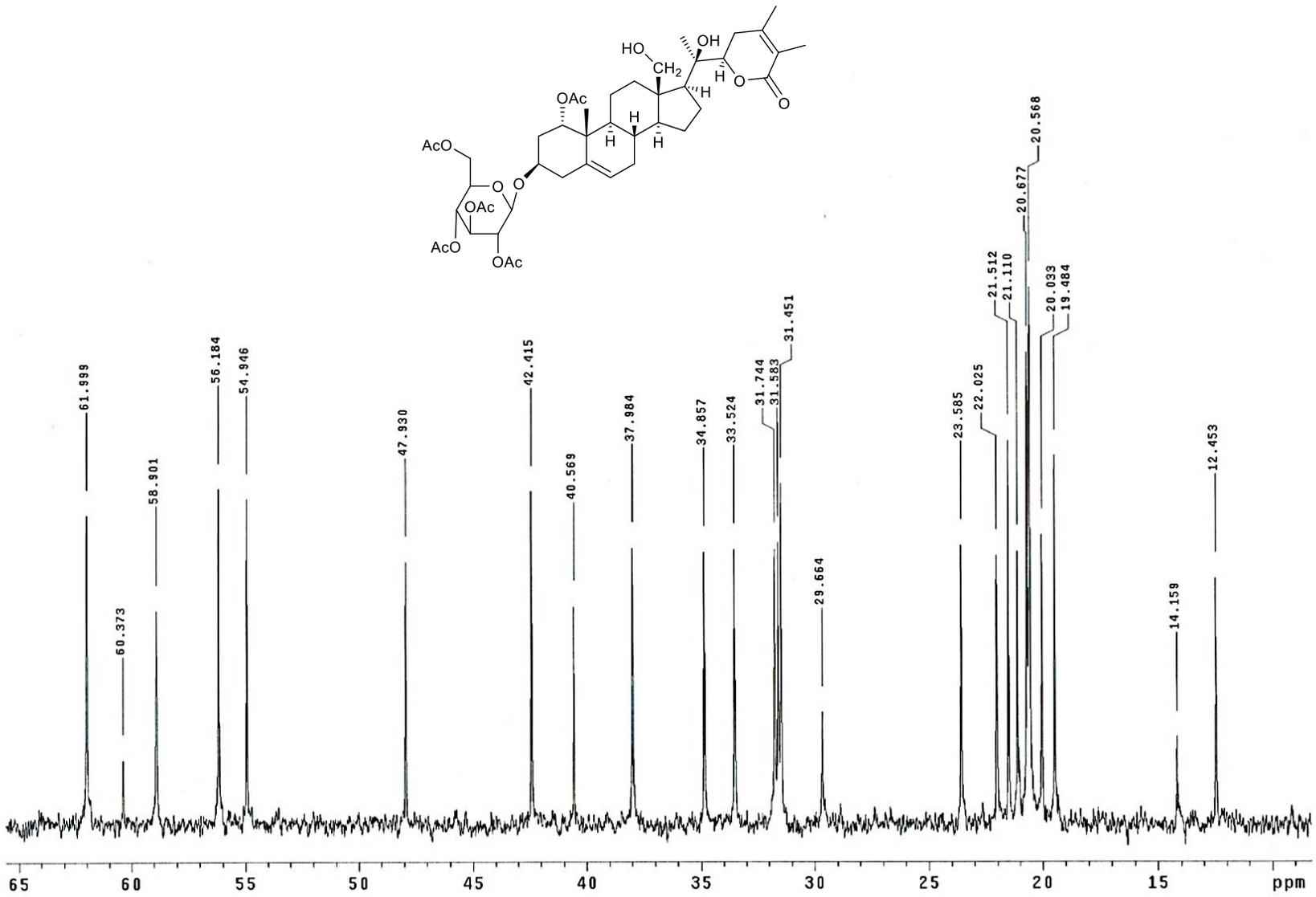


Espectro 13. RMN-<sup>1</sup>H del compuesto IV (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

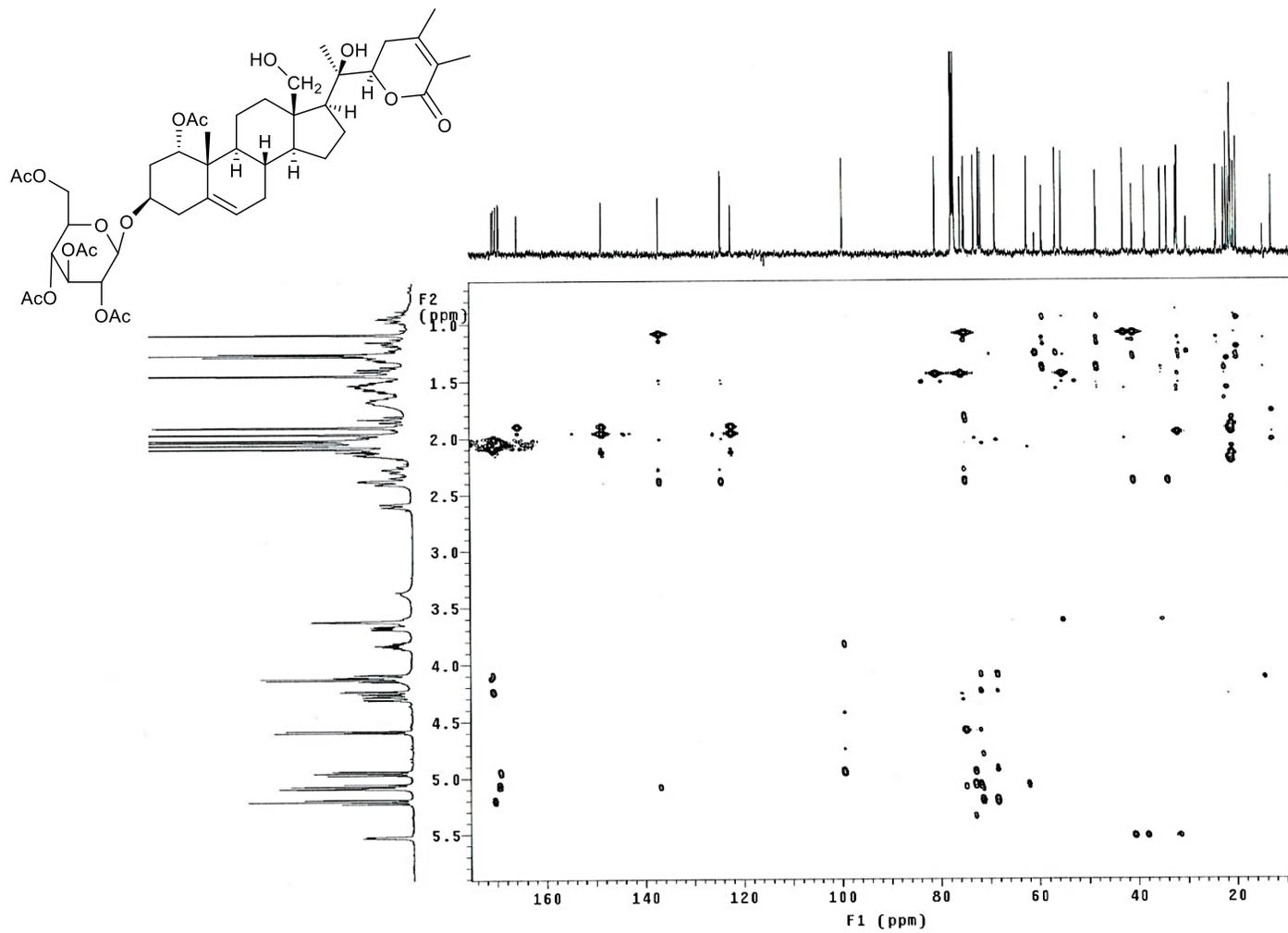




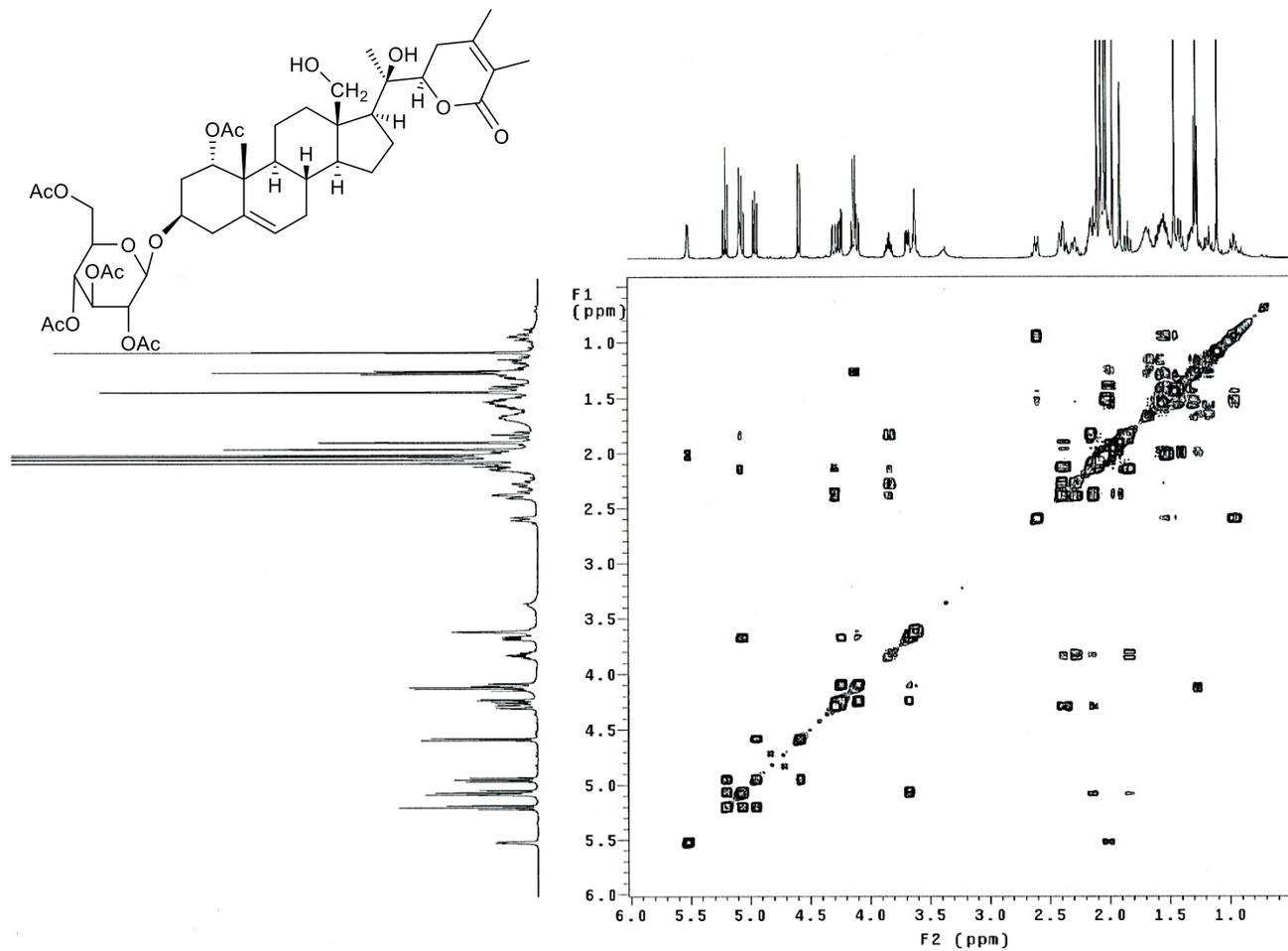
Espectro 14. RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **IV** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



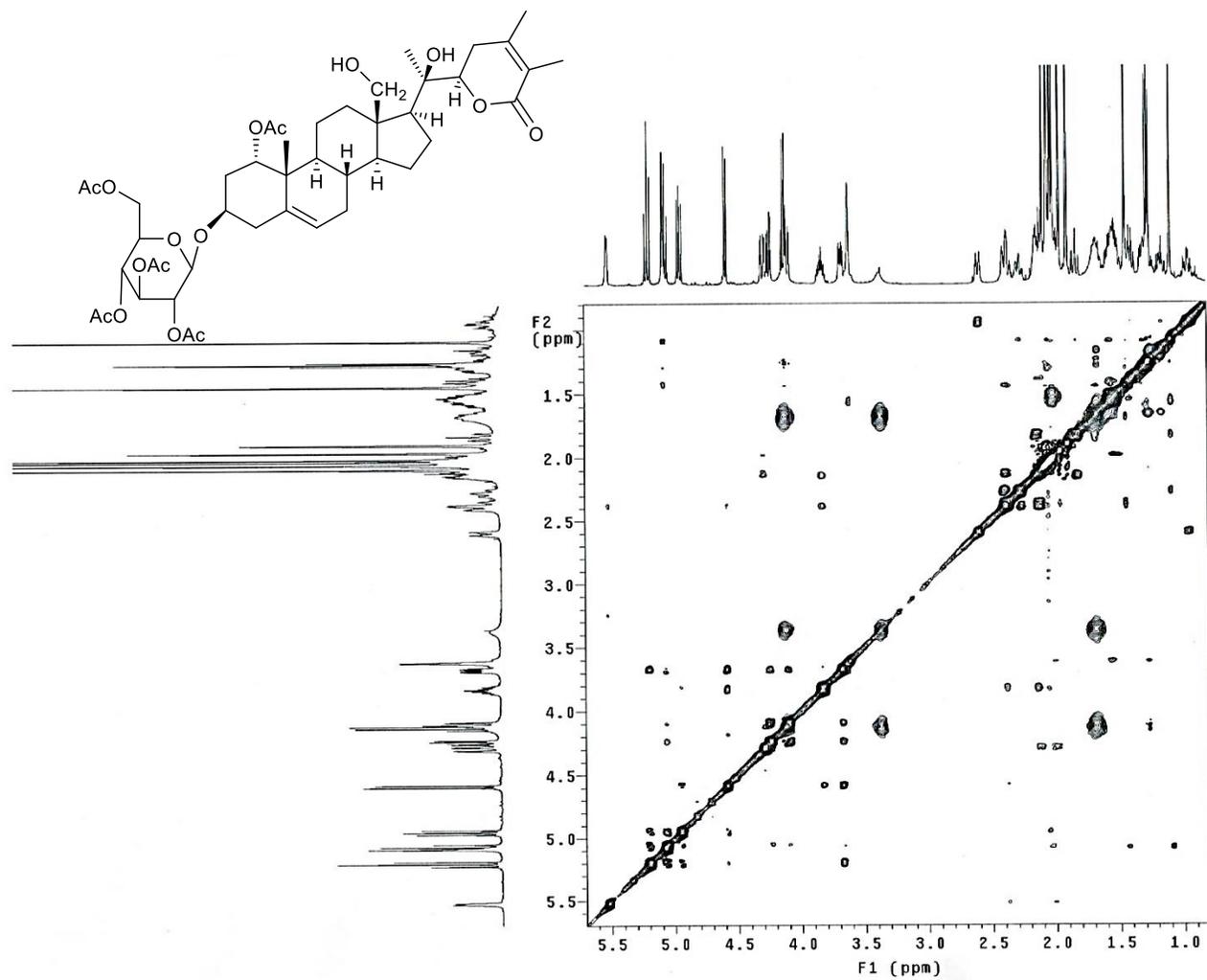
Espectro 14. RMN-<sup>13</sup>C del compuesto **IV** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



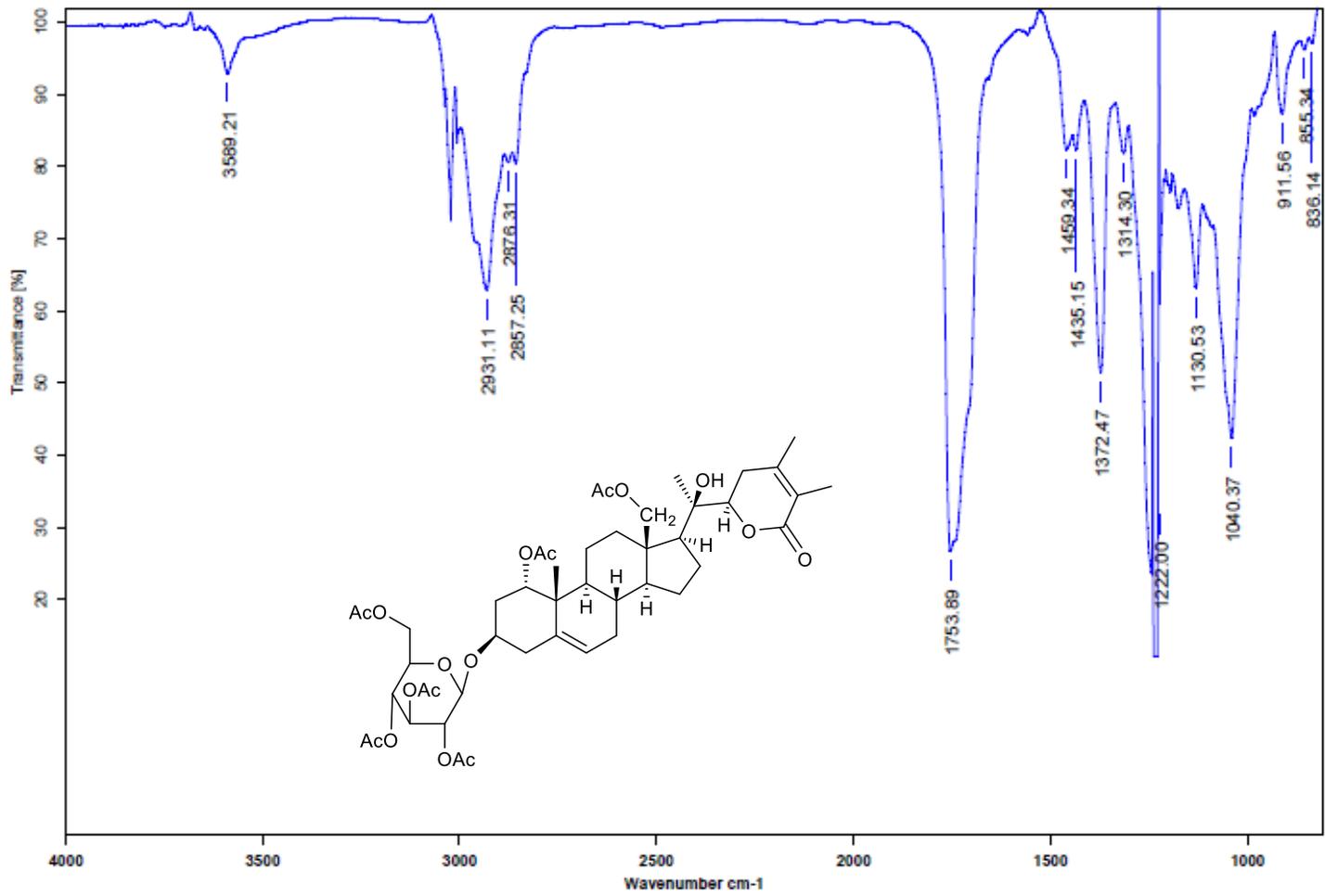
Espectro 15. HMBC del compuesto IV.



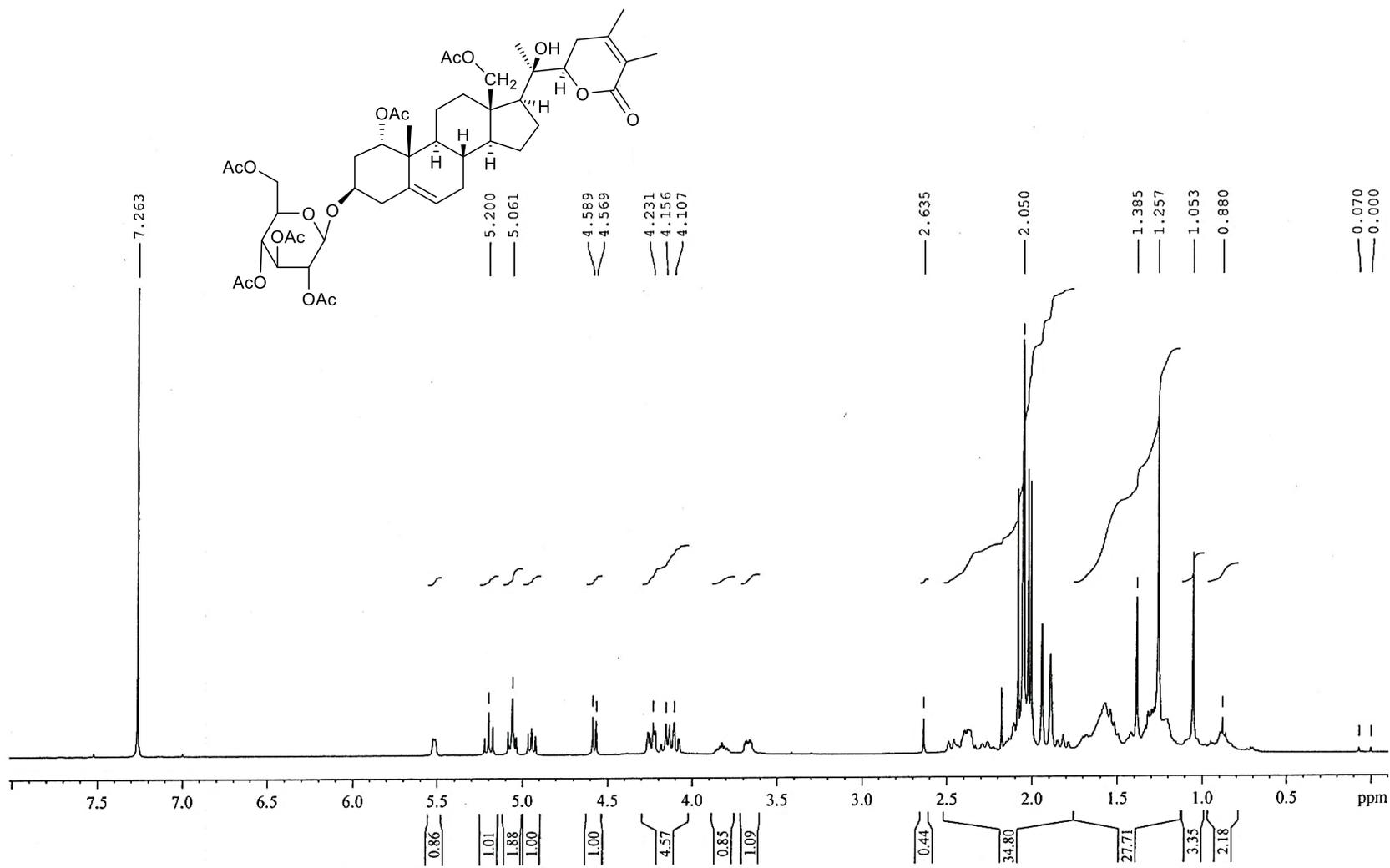
Espectro 16. COSY del compuesto IV.



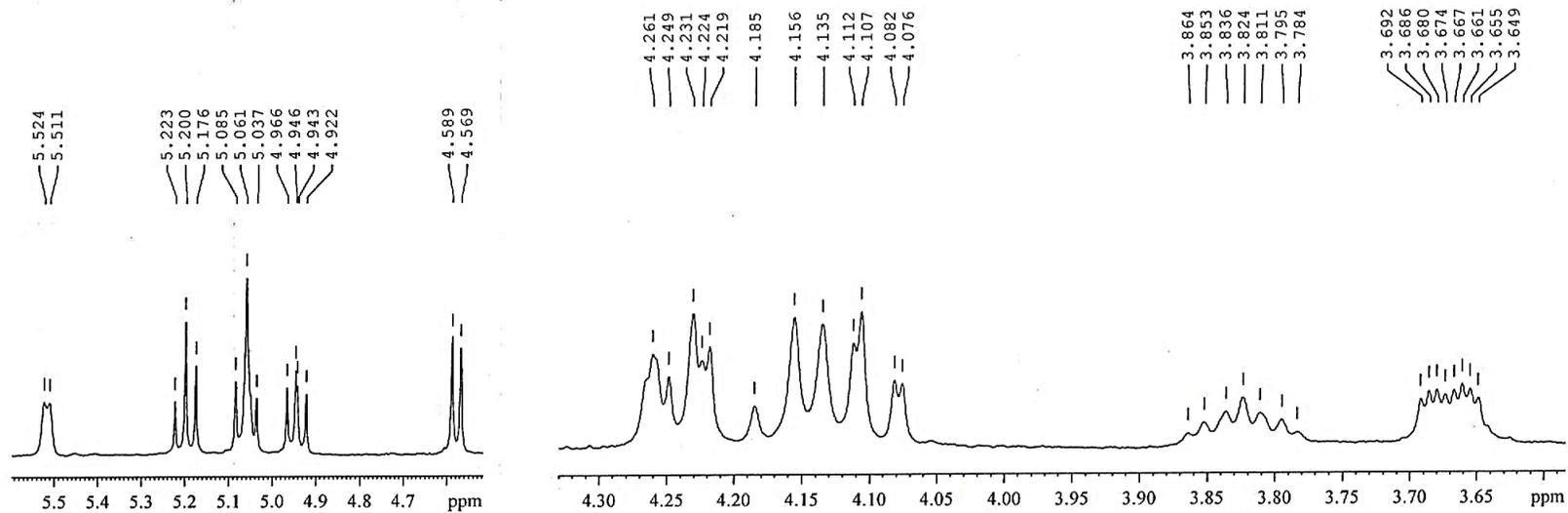
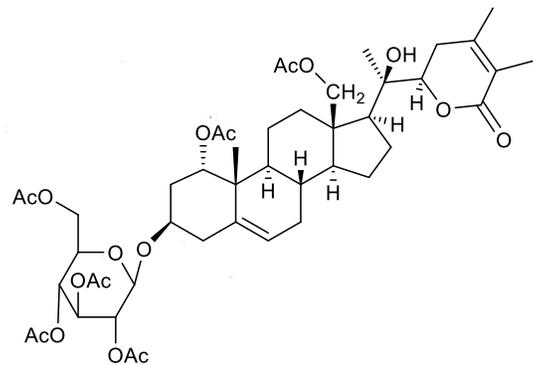
Espectro 17. NOESY del compuesto IV.



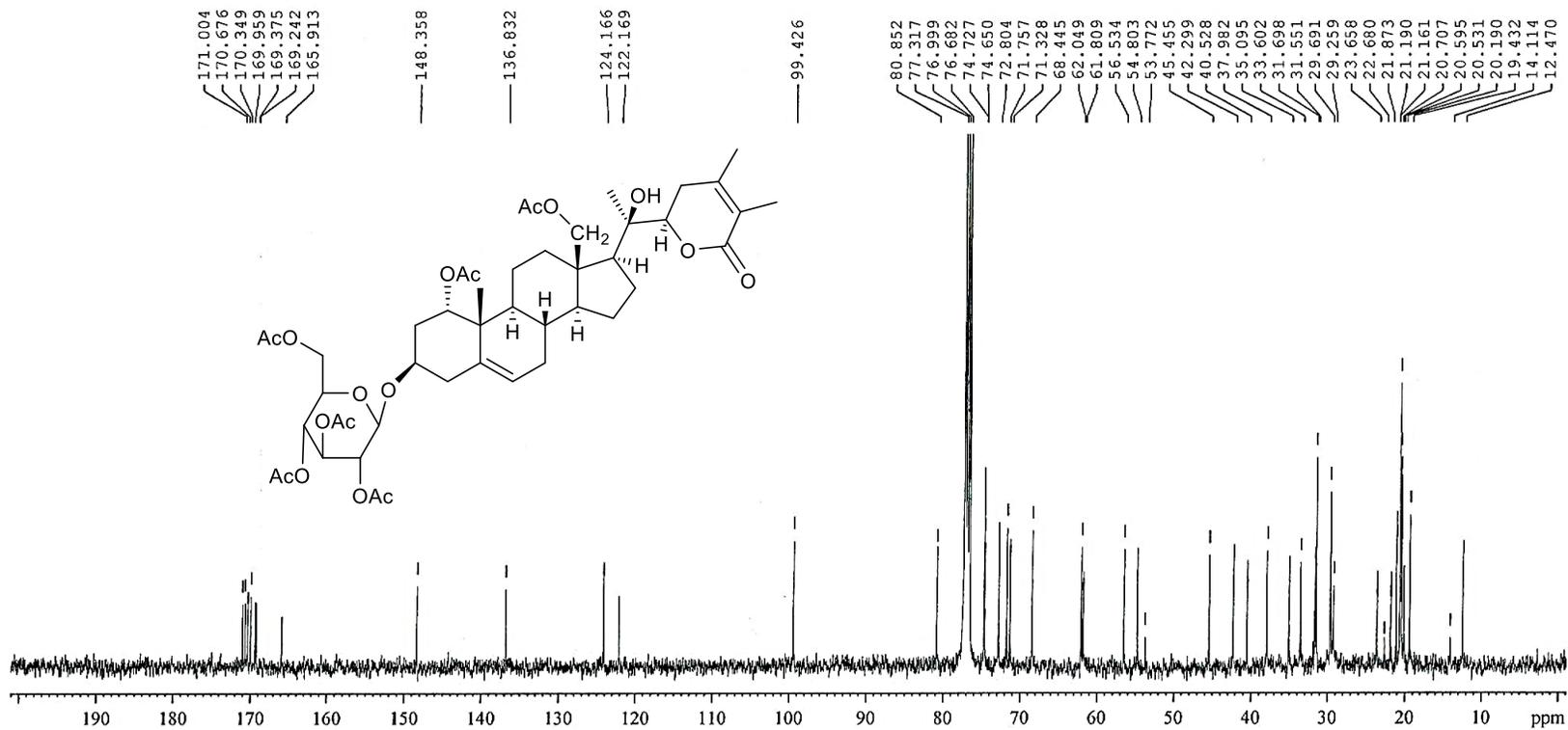
Espectro 18. IR del compuesto IV A (Solución en CHCl<sub>3</sub>)



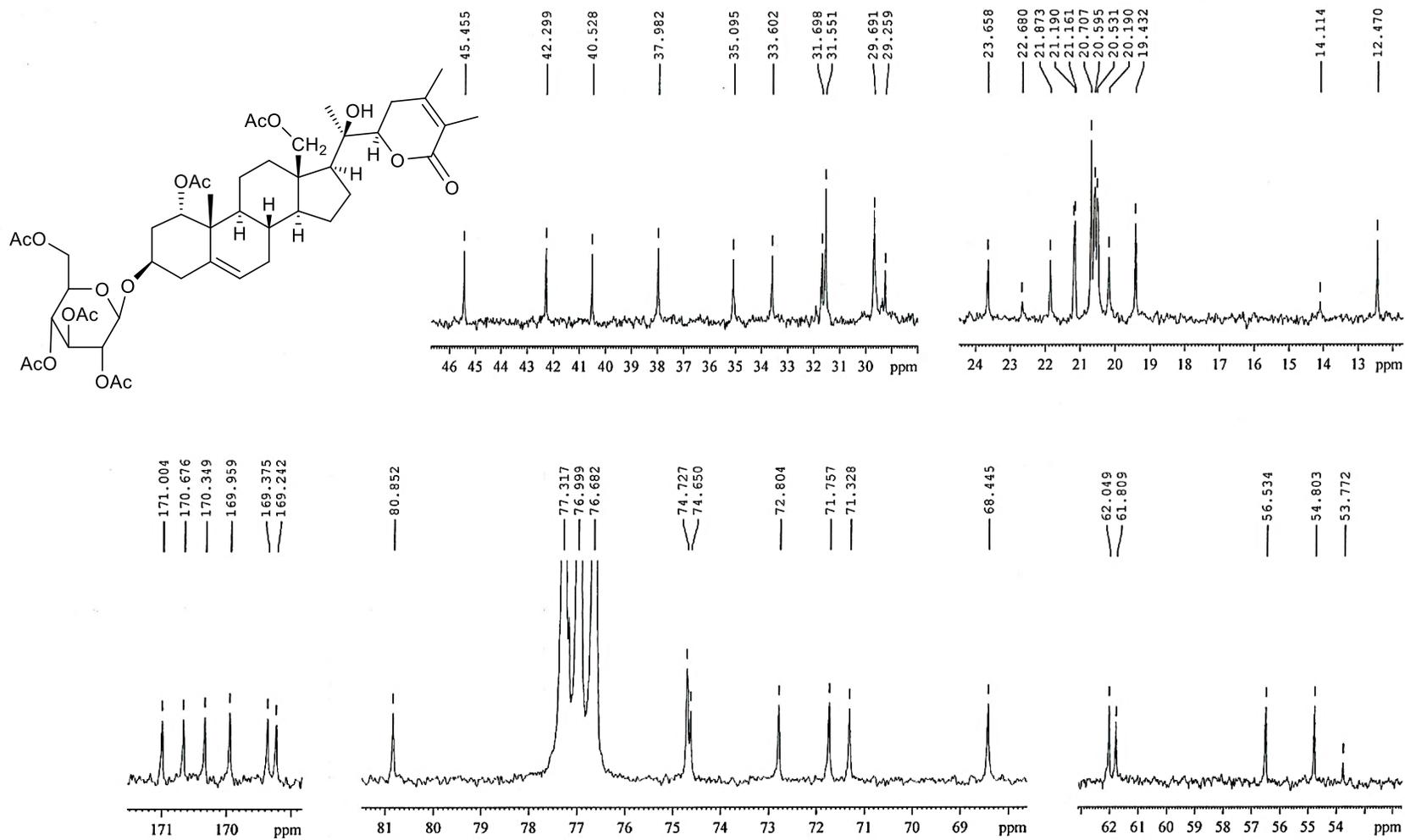
Espectro 19. RMN-<sup>1</sup>H del compuesto IV A (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



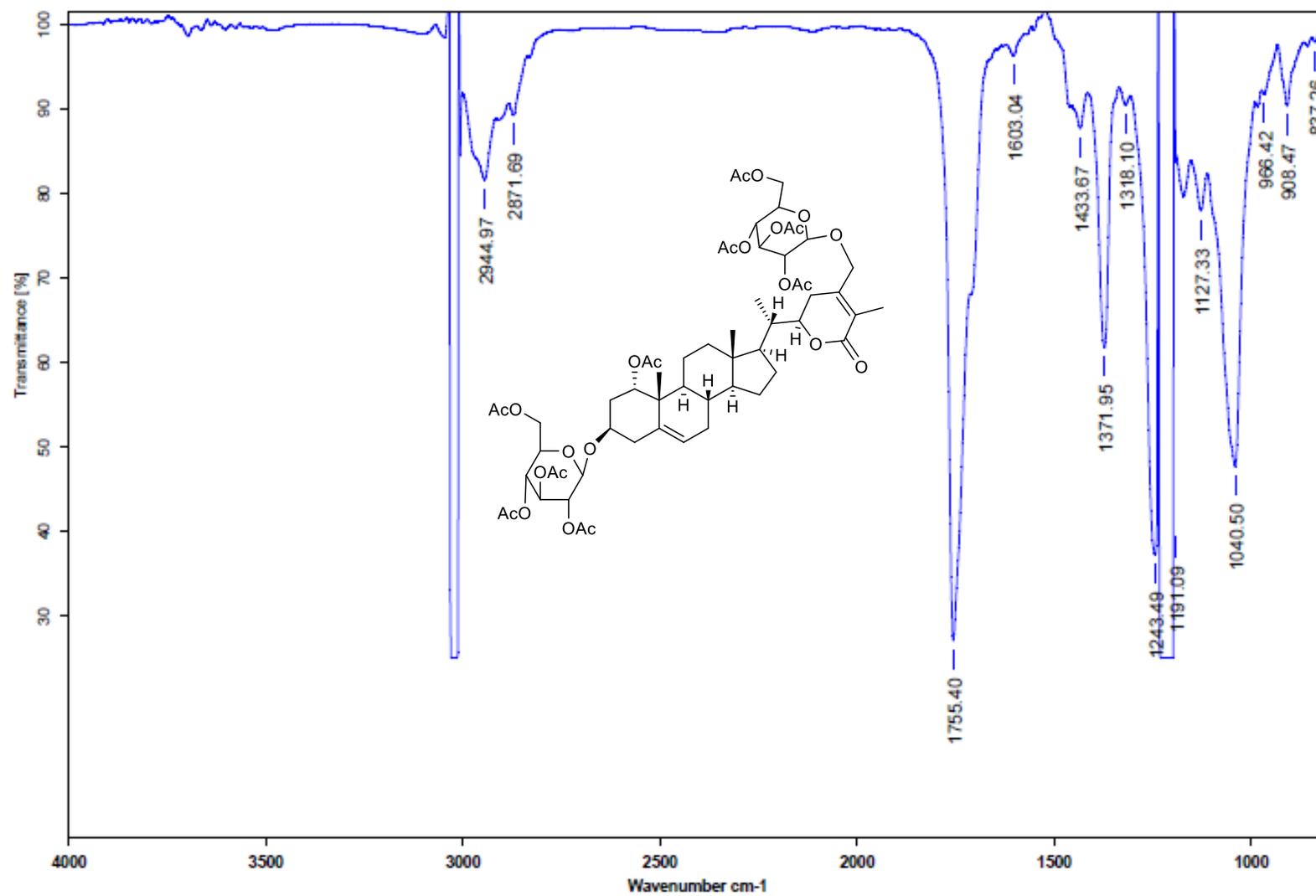
Espectro 19.1 RMN- $^1\text{H}$  del compuesto IV A (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



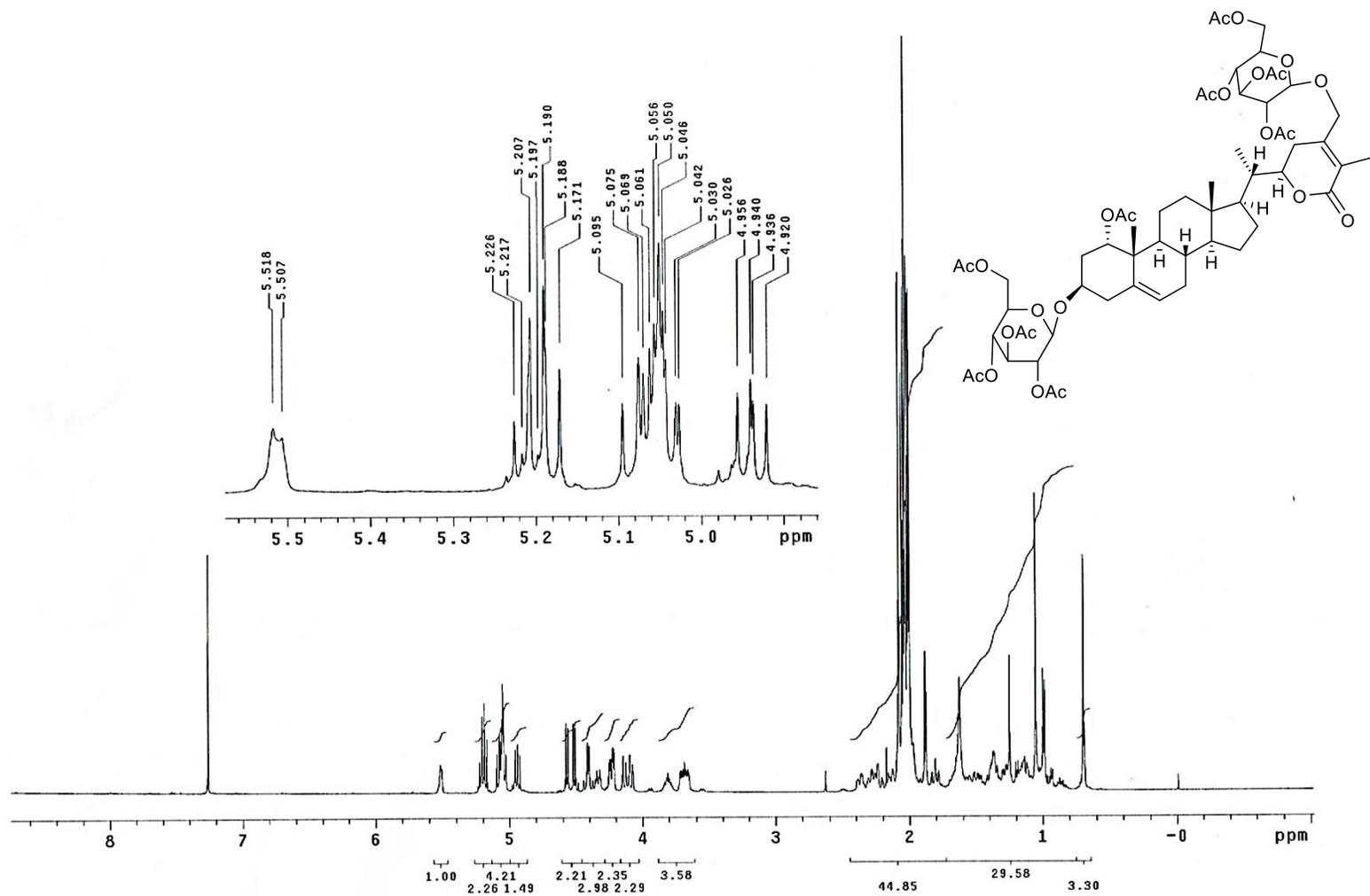
Espectro 20. RMN-<sup>13</sup>C del compuesto IV A (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



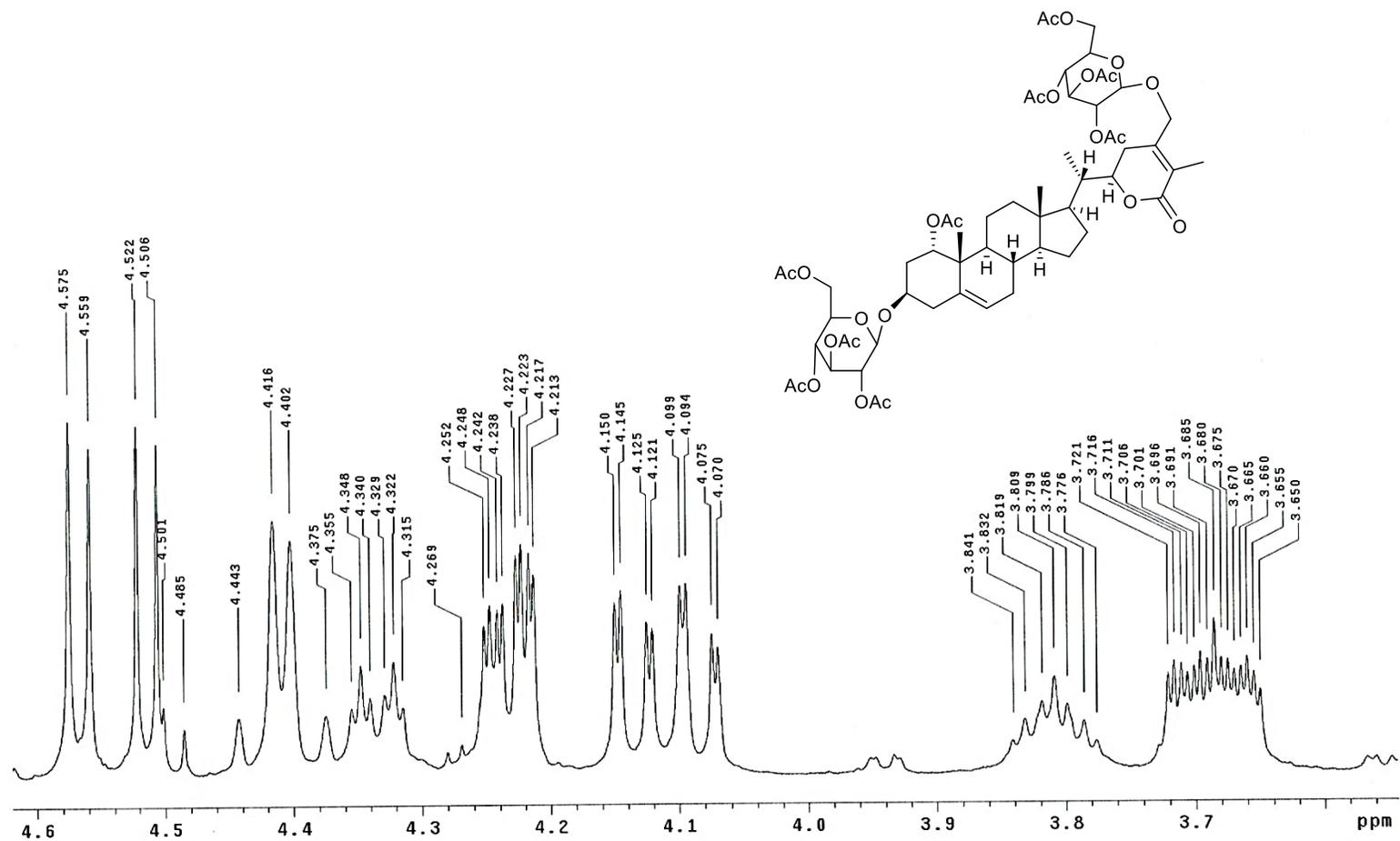
Espectro 20. RMN- $^{13}\text{C}$  del compuesto **IV A** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



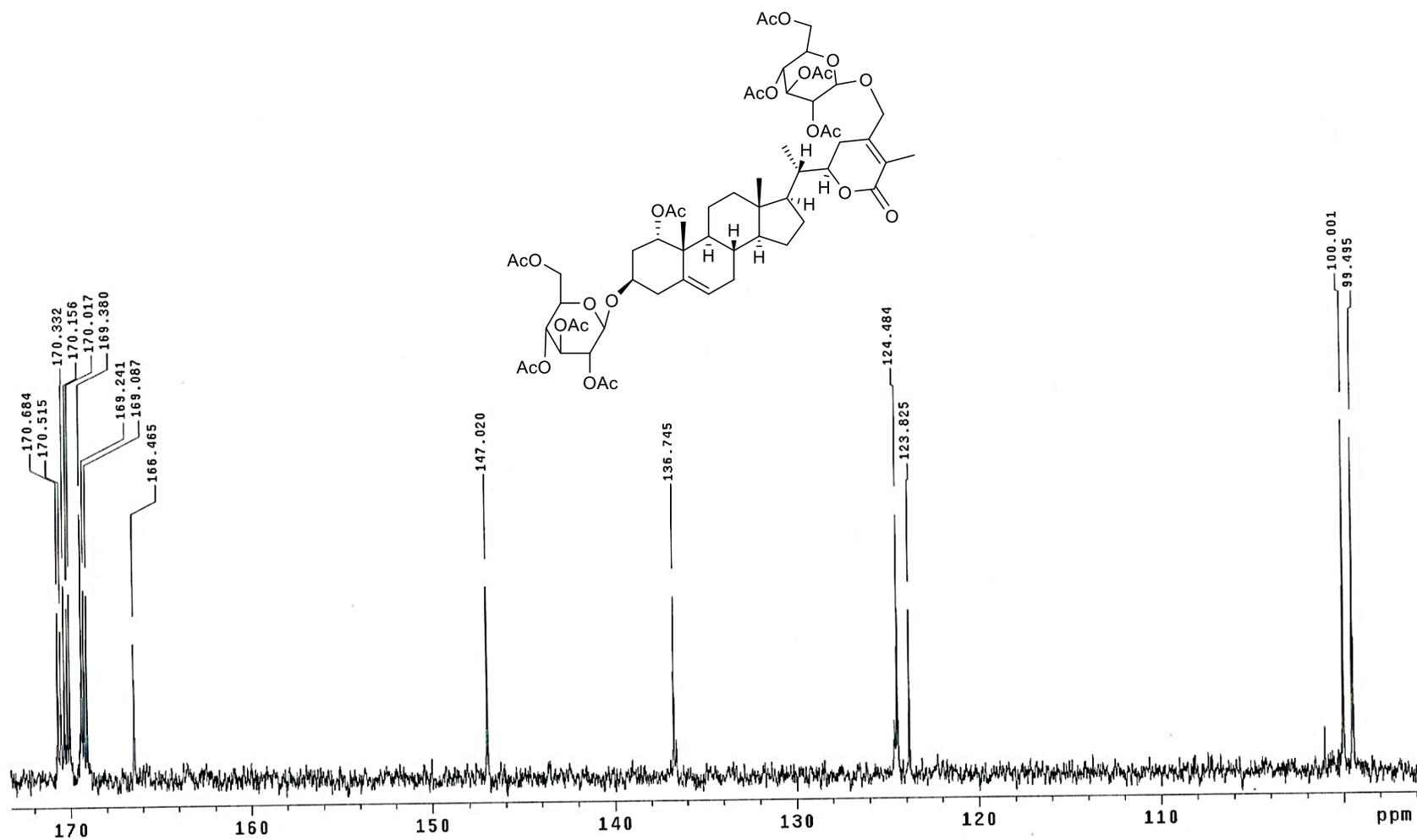
Espectro 21. IR del compuesto **V** (Solución en  $\text{CHCl}_3$ ).



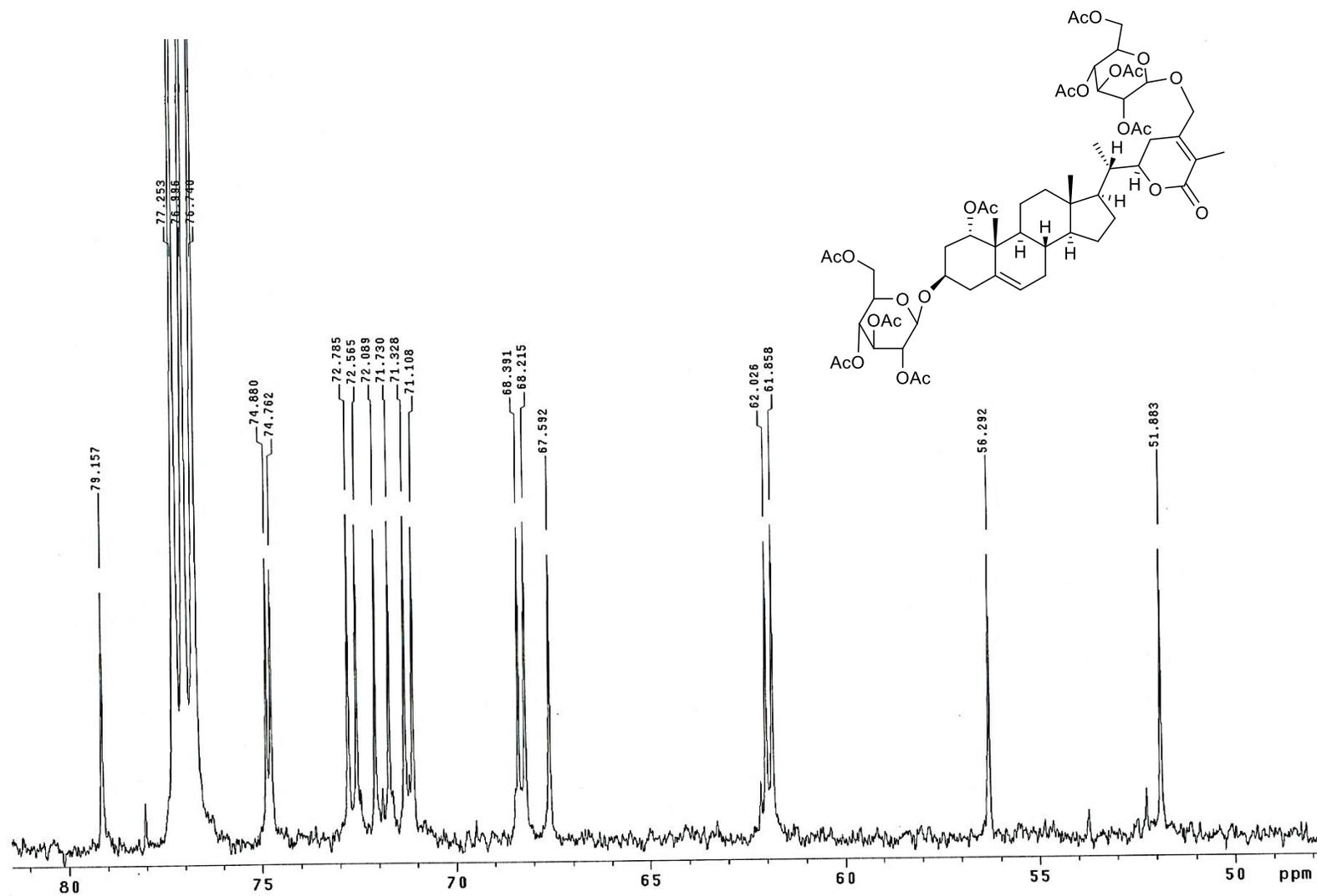
Espectro 22. RMN-<sup>1</sup>H del compuesto V (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



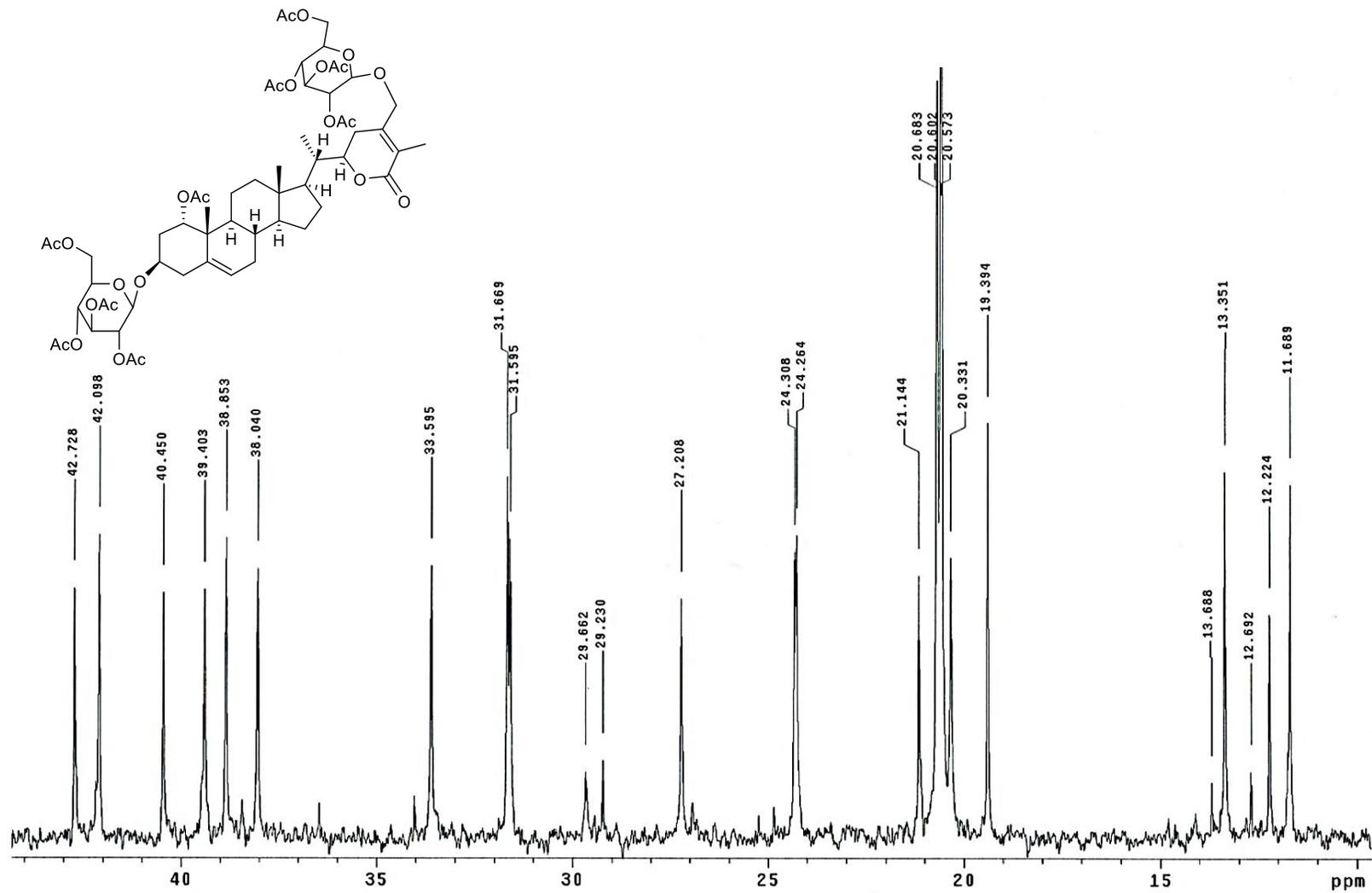
Espectro 22.1 RMN-<sup>1</sup>H del compuesto V (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



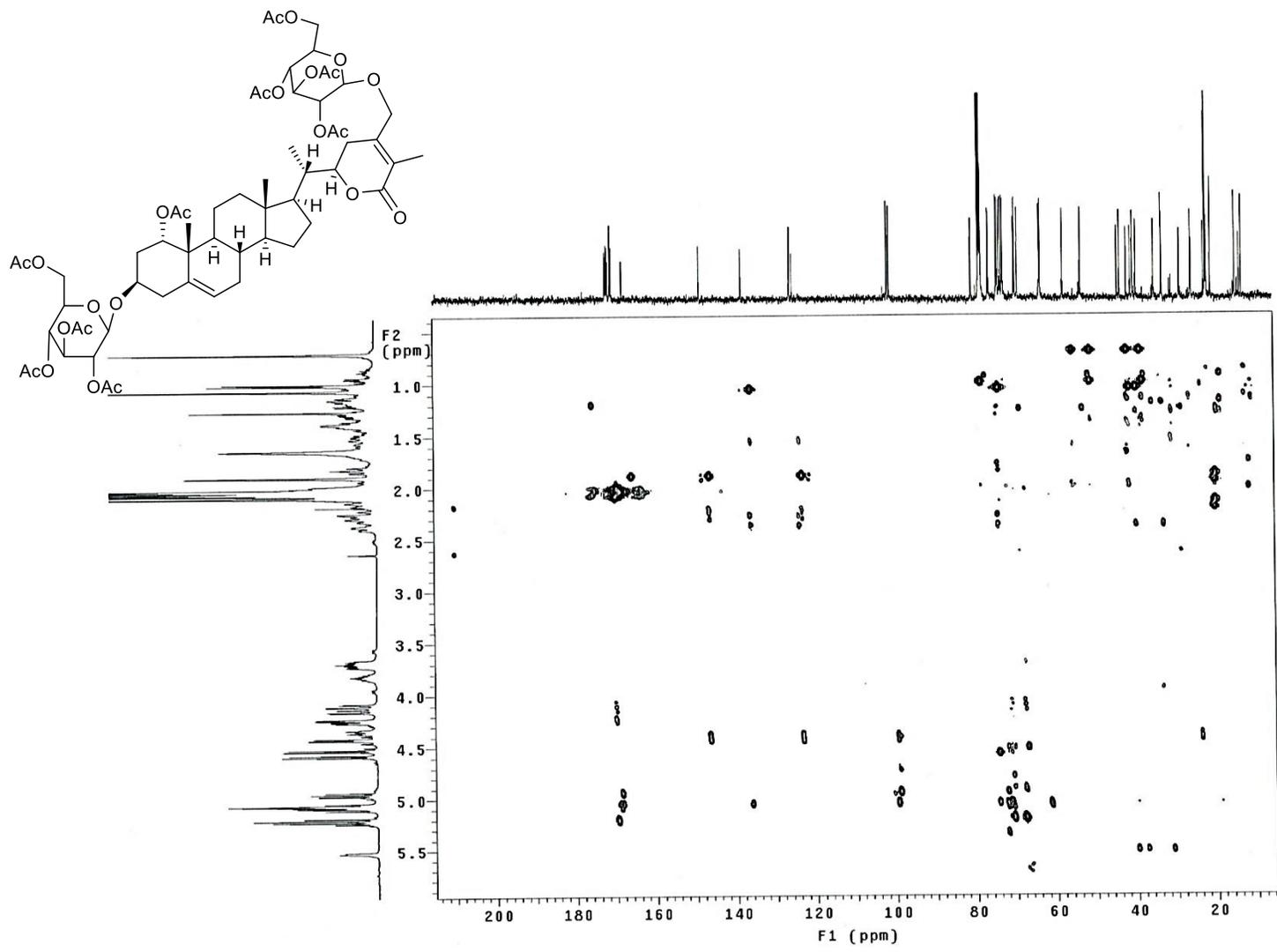
Espectro 23. RMN-<sup>13</sup>C del compuesto V (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



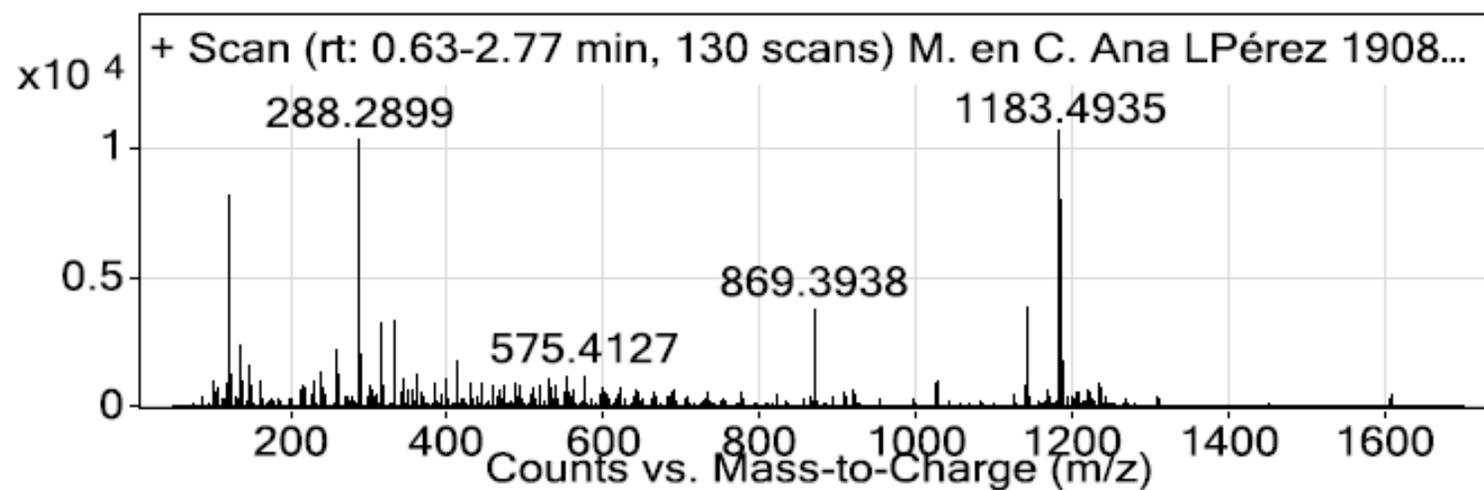
Espectro 23. RMN-<sup>13</sup>C del compuesto V (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Espectro 23. RMN-<sup>13</sup>C del compuesto V (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



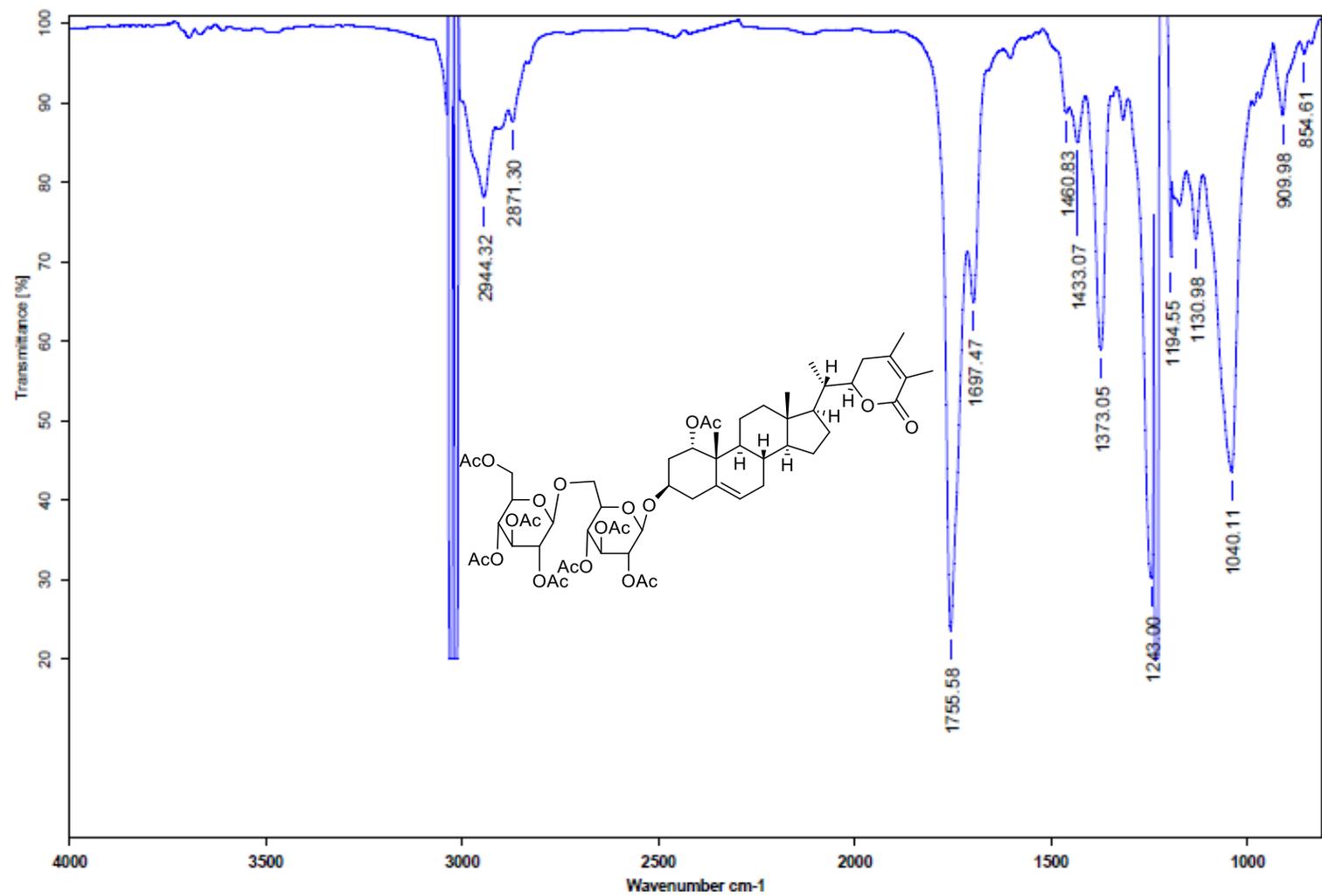
Espectro 24. HMBC del compuesto V.



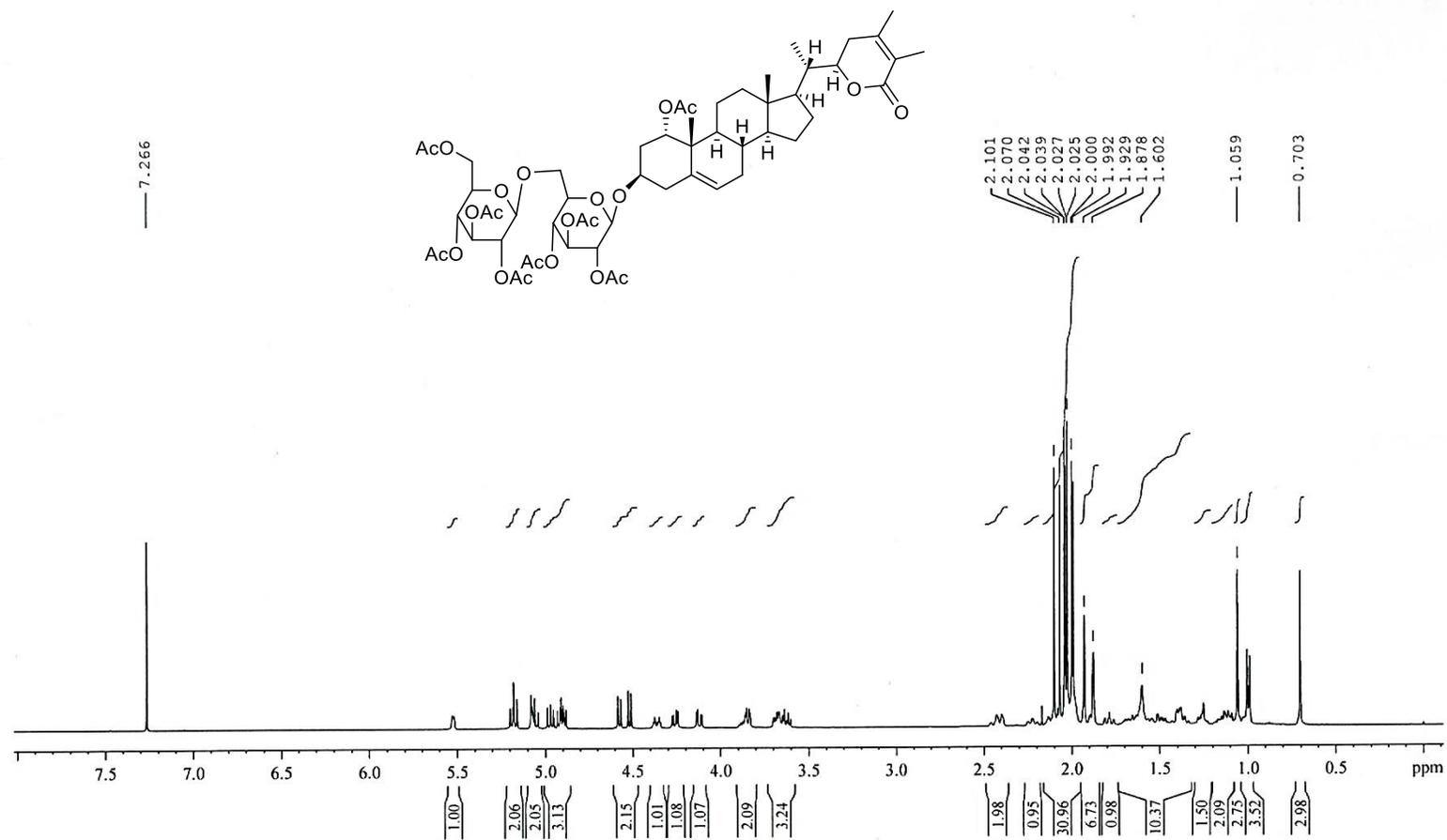
Peak List

<i>m/z</i>	<i>z</i>	Abund
122.0965	1	8185.28
288.2899	1	10295.95
316.3211	1	3187.89
332.3308	1	3276.79
869.3938	1	3749.12
1141.4829		3878.07
1183.4935	1	10726.12
1184.497	1	7344.87
1185.5061	1	7989.2
1186.5108	1	4312.39

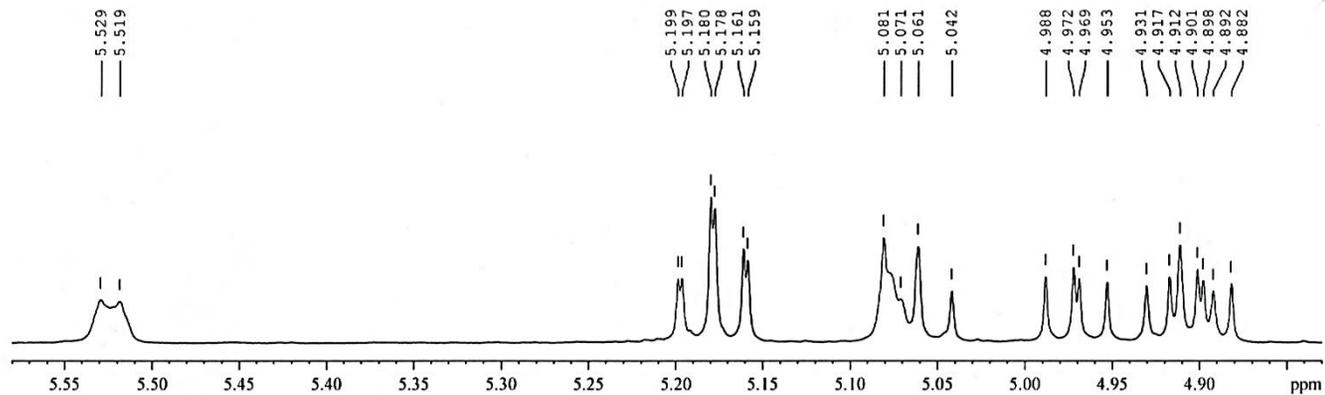
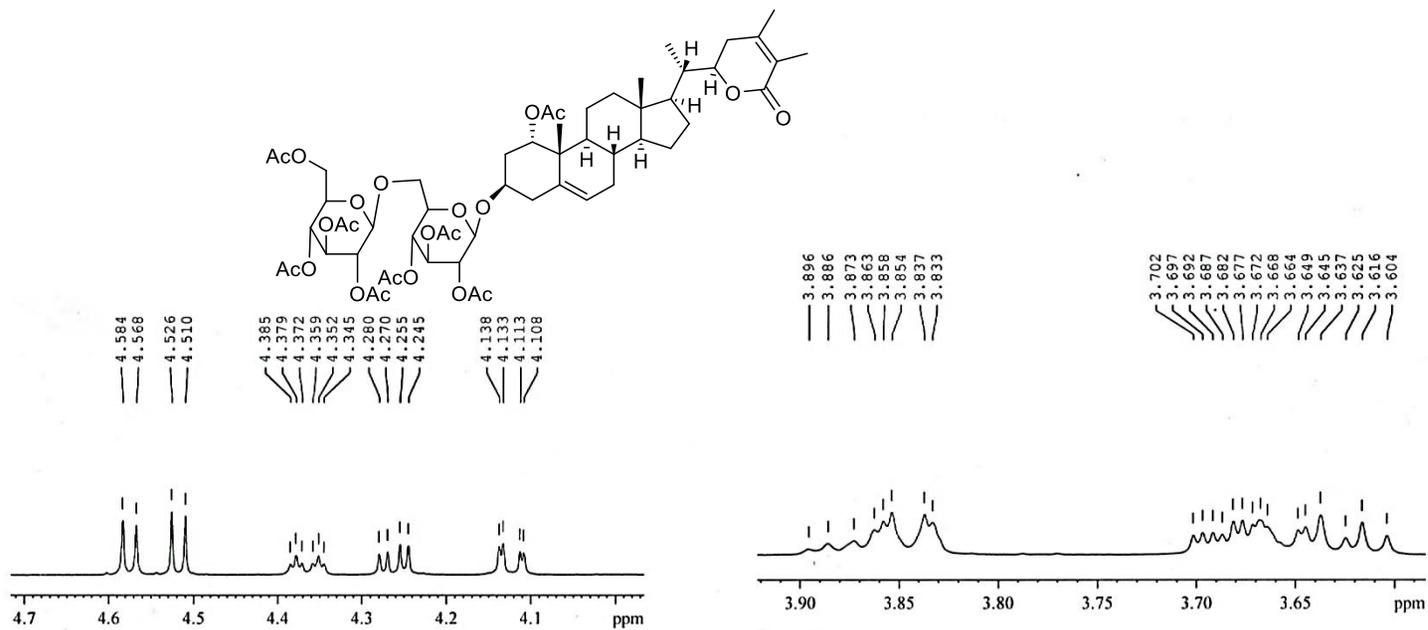
Espectro 25. EM del compuesto V.



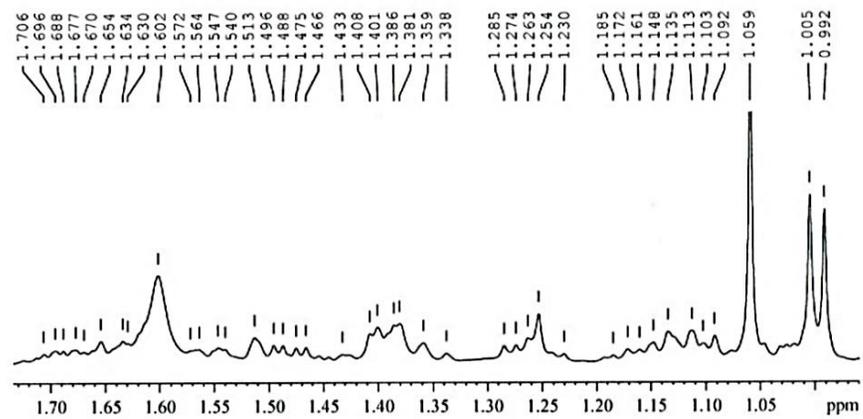
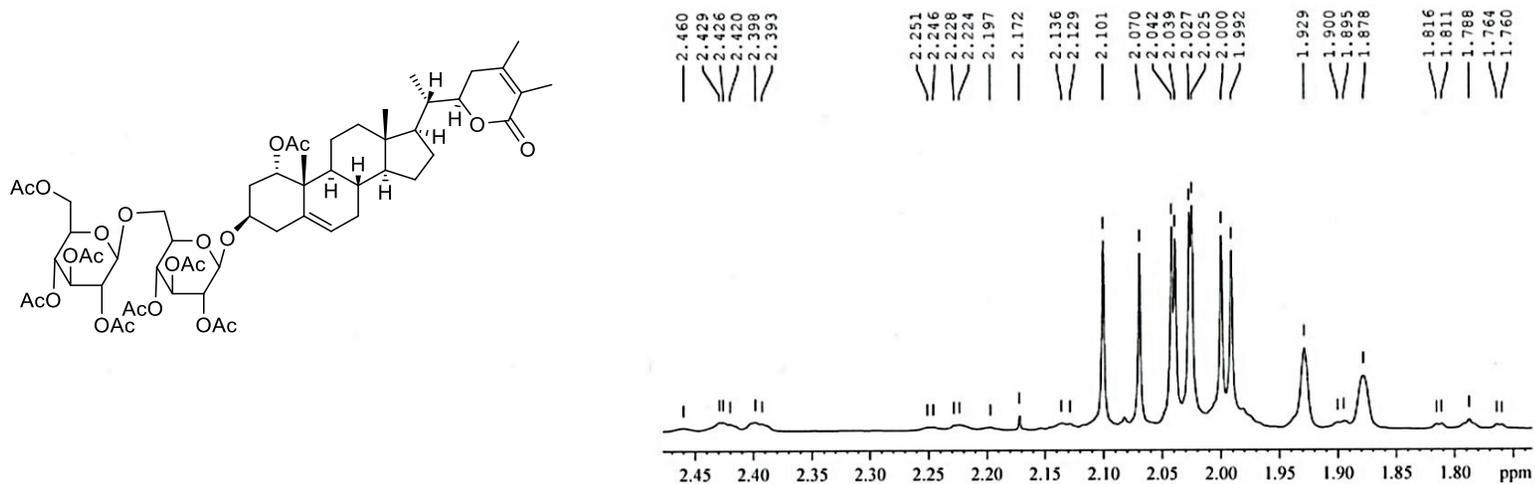
Espectro 26. IR del compuesto **VI** (Solución en CHCl<sub>3</sub>).



Espectro 27. RMN-<sup>1</sup>H del compuesto VI (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

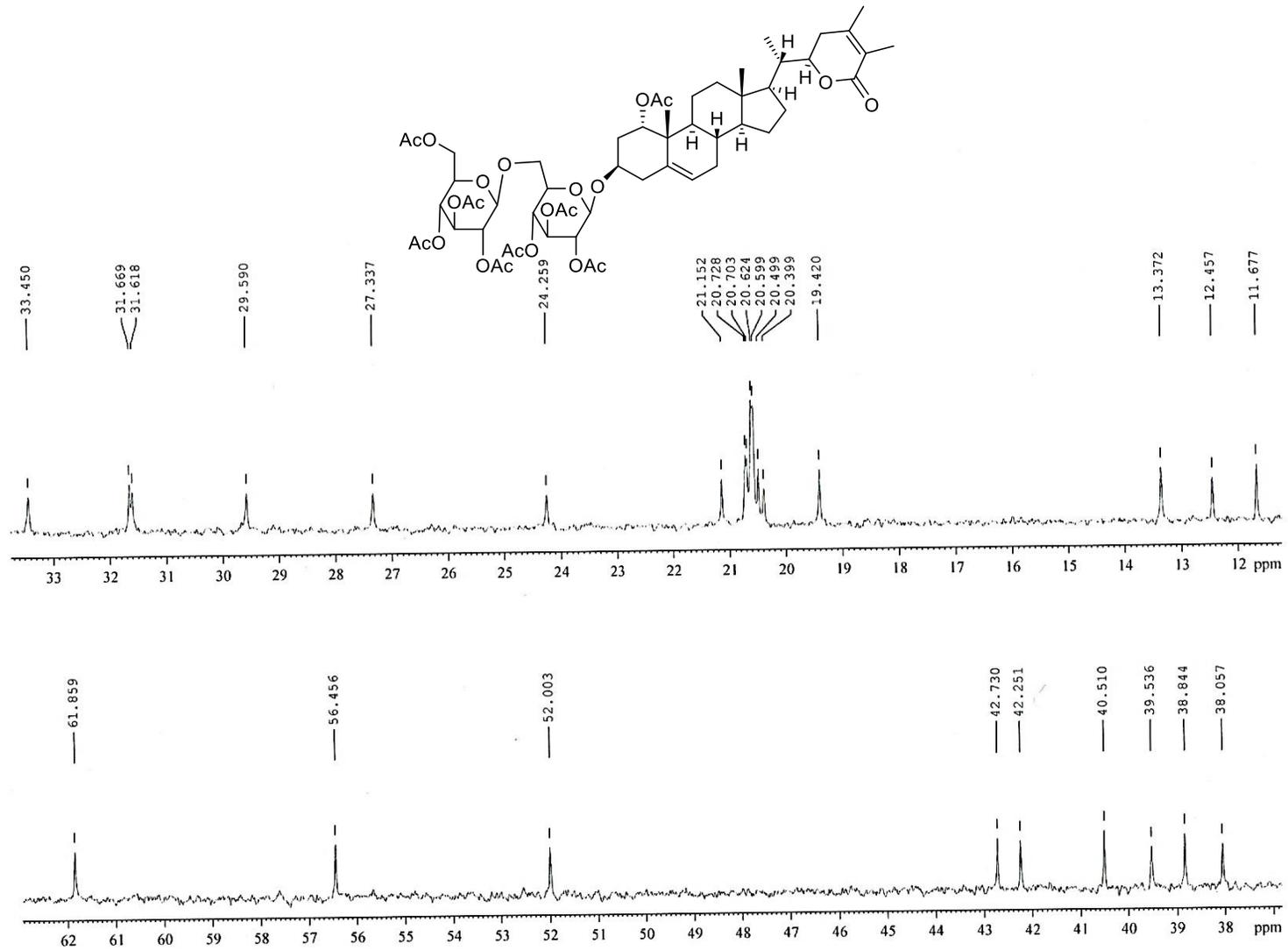


Espectro 27.1 RMN- $^1\text{H}$  del compuesto VI (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

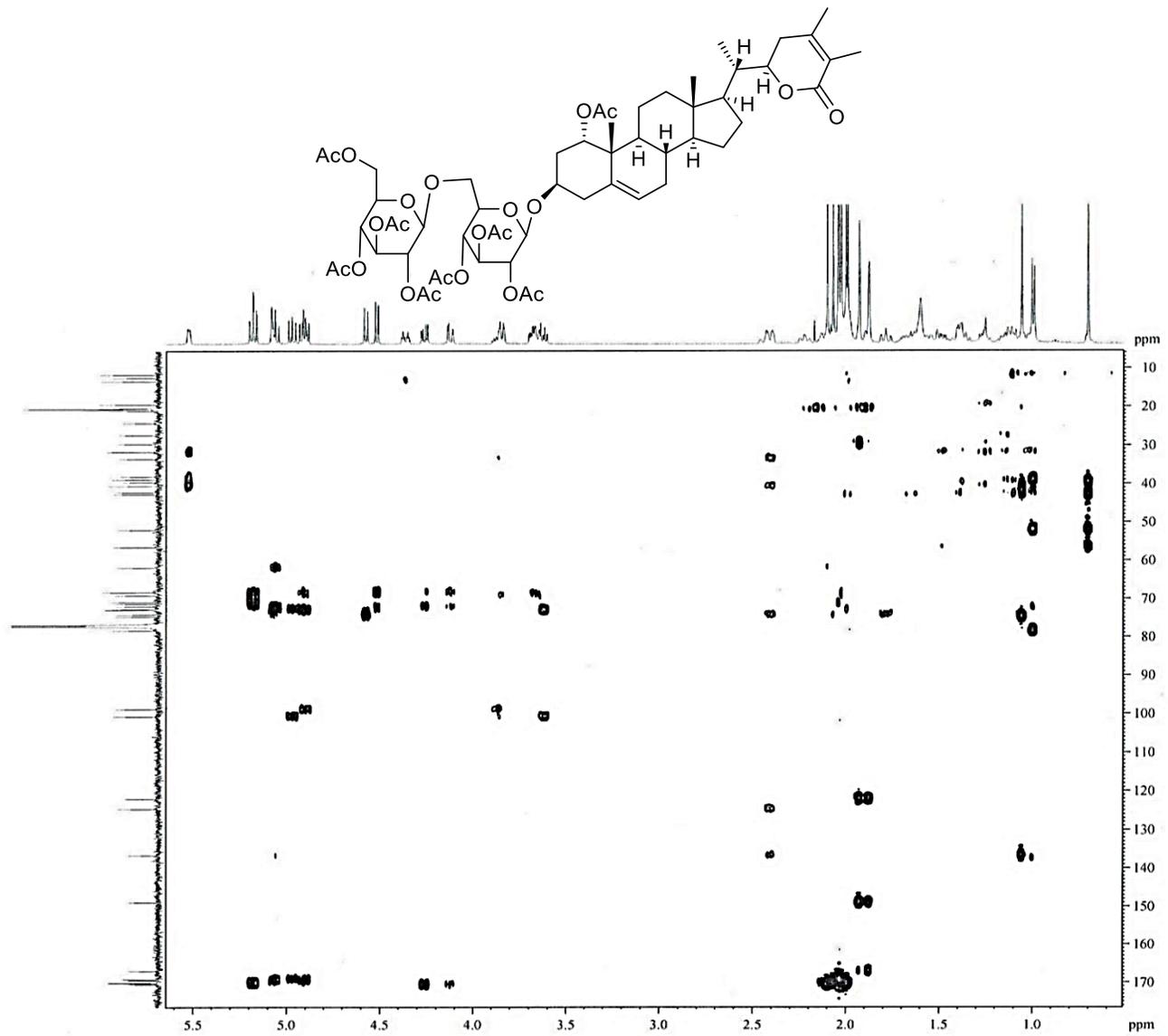


Espectro 27.2 RMN- $^1\text{H}$  del compuesto VI (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).





Espectro 28. RMN-<sup>13</sup>C del compuesto VI (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Spectro 29. HMBC del compuesto VI.