



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

METABOLITOS SECUNDARIOS
DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE
HOJAS RAMAS Y FLORES DE
Physalis pruinosa.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
LAURA ARREDONDO HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS: M. EN C. EMMA MALDONADO JIMENEZ

ASESOR: Q.F.B. ÁNGEL TLAPANCO OCHOA



MÉXICO, DISTRITO FEDERAL.

ENERO DE 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Toda la felicidad que he recibido en mi vida te la debo sin duda alguna. No ha habido ocasión en que no estés conmigo. Gracias Dios mío por estar siempre a mi lado.

A mi mamá:

Tus brazos siempre se abren cuando necesito un abrazo. Tu corazón sabe comprender cuando necesito una amiga. Tu mirada se endurece cuando necesito una lección. Tu fuerza y tu amor me han dirigido por la vida y me han dado las alas que necesitaba para volar.

A la M. en C. Emma Maldonado Jiménez:

Que me permitió desarrollar esta investigación en el laboratorio 2-7 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Por su gran apoyo, valiosos consejos e invaluable enseñanzas.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
INDICE DE ESPECTROS.....	2
ABREVIATURAS.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. RESUMEN.....	5
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
4. ANTECEDENTES.....	7
4.1 FAMILIA SOLANACEAE.....	7
4.2 GÉNERO <i>PHYSALIS</i>	9
4.3 WITHAESTEROIDES.....	12
4.3.1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	14
4.4 DITERPENOS.....	18
4.4.1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DITERPENOS LABDÁNICOS.....	23
4.5 <i>PHYSALIS PRUINOSA</i>	30
5. OBJETIVOS.....	32
6. HIPÓTESIS.....	32
7. METODOLOGÍA.....	33
7.1 MATERIAL Y EQUIPO.....	33
7.2 MATERIAL VEGETAL.....	33
7.3 EXTRACCIÓN.....	34
7.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN.....	39
7.5 REACCIONES.....	41
7.6 DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS.....	42
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
9. CONCLUSIONES.....	66
10. APÉNDICE	
ESPECTROSCOPIA.....	67
11. REFERENCIAS.....	90

ÍNDICE DE ESPECTROS

ESPECTRO 1.....	RMN ¹³ C de pumilóxido (I)
ESPECTRO 2.....	DEPT de pumilóxido (I)
ESPECTRO 3.....	RMN ¹ H de pumilóxido (I)
ESPECTRO 4.....	RMN ¹ H de pruinonal (II)
ESPECTRO 5.....	RMN ¹³ C de pruinonal (II)
ESPECTRO 6.....	IR de pruinonal (II)
ESPECTRO 7.....	IR de pruinolona (III)
ESPECTRO 8.....	RMN ¹ H de pruinolona (III)
ESPECTRO 9.....	RMN ¹³ C pruinolona (III)
ESPECTRO 10.....	COSY de pruinolona (III)
ESPECTRO 11.....	RMN ¹ H de pruinotriol (IV, V)
ESPECTRO 12.....	RMN ¹³ C de pruinotriol (IV, V)
ESPECTRO 13.....	RMN ¹ H de pruinósido (VI)
ESPECTRO 14.....	RMN ¹³ C de pruinósido (VI)
ESPECTRO 15.....	HMBC de pruinósido (VI)
ESPECTRO 16.....	NOESY de pruinósido (VI)
ESPECTRO 17.....	RMN ¹ H de tetracetilpruinósido (VIa)
ESPECTRO 18.....	NOESY de tetracetilpruinósido (VIa)
ESPECTRO 19.....	RMN ¹³ C de physapruina C (VII)
ESPECTRO 20.....	RMN ¹ H de physapruina C (VII)
ESPECTRO 21.....	COSY de physapruina C (VII)
ESPECTRO 22.....	HMBC de physapruina C (VII)

1. INTRODUCCION

La herbolaria es una práctica que consiste en el conocimiento y uso de las plantas para la prevención y cura de enfermedades, práctica que ha sido habitual en casi todas las comunidades humanas desde la antigüedad, ya que constituye la forma de tratamiento más económica y por ello, la más arraigada en las culturas populares. La herbolaria ha sido el principal recurso de la medicina tradicional; sin embargo en el siglo XX, con la introducción de fármacos de origen sintético, se generó un cierto desprecio hacia ella, mismo que más tarde se revirtió mediante un proceso de revaloración, que ha conducido a que en la actualidad, ésta goce de gran popularidad.

El interés en las propiedades terapéuticas atribuidas a las plantas y a sus componentes, ha llevado a los investigadores al descubrimiento de una gran variedad de sustancias con actividad biológica, las cuales, en algunos casos, han sido empleadas en el desarrollo de nuevos fármacos de gran potencia y baja toxicidad.

Contrario a lo que mucha gente piensa, los tratamientos herbolarios no son seguros ni inocuos, ya que las plantas producen una gran cantidad de metabolitos entre los cuales puede haber un fármaco útil el cual puede estar acompañado de algún compuesto tóxico o más aún, el propio fármaco ser tóxico a dosis altas o repetidas. Por esto es necesario conocer la composición química de las plantas empleadas en la medicina tradicional. En México, país que combina la cuarta

flora más rica del mundo con una vasta diversidad étnica, existe una gran tradición herbolaria. Esto es particularmente importante, pues constituye una base para la búsqueda de compuestos con una determinada actividad biológica.

En México existen miles de plantas que se usan en la medicina tradicional. Una de estas plantas es *Physalis philadelphica*, que se usa para combatir diferentes padecimientos infecciosos, fiebre, diabetes e hipertensión, propiedades que son compartidas por otras especies del género.

Lo anterior y el hecho de que en nuestro país no existieran estudios químicos del género y que los farmacológicos fueran escasos, motivó que se emprendiera el estudio sistemático del género *Physalis*, del que esta tesis forma parte.

2. RESUMEN

Diversos estudios químicos de especies de *Physalis* mostraron que estas plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios, entre los que destacan los withaesteroides que han sido considerados los compuestos característicos del género. Sin embargo, en estudios recientes efectuados en nuestro laboratorio se aislaron diterpenos labdánicos de los extractos hexánicos de *Physalis patula* y *P. coztomatl*.

En la presente tesis y como parte del estudio sistemático de los metabolitos secundarios del género *Physalis*, se analizó el extracto hexánico de hojas, ramas y flores de *Physalis pruinosa* L. Este análisis reveló que *P. pruinosa* L. posee además de una withanólida, physapruina C (VII), seis diterpenos labdánicos: pumilóxido (I), pruinonal (II), pruinolona (III), pruinotrioles (IV y V), y pruinósido (VI). Lo anterior sugiere que los labdanos pueden ser junto con los withaesteroides marcadores químicos del género.

Las estructuras de los compuestos aislados fueron determinadas mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos (RMN IR y EM) y en el caso del pruinósido, la estructura propuesta se confirmó mediante el estudio de difracción de rayos X.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta ahora se ha encontrado que los compuestos característicos del género *Physalis* son los withaesteroides. Sin embargo, en estudios efectuados en el Instituto de Química de la UNAM, se aislaron diterpenos labdánicos de los extractos hexánicos de *Physalis coztomatl* y *P. patula*. En la literatura no se ha descrito la presencia de este tipo de compuestos dentro del género. Por ello es necesario un estudio minucioso del extracto hexánico de *P. pruinosa* para determinar si en esta especie existe esta clase de compuestos y de este modo ir conformando un perfil químico más completo del género. Cabe mencionar que en los estudios de *Physalis* descritos en la literatura, siempre se han estudiado los extractos más polares, es decir, los de AcOEt, BuOH y MeOH y no los poco polares.

4. ANTECEDENTES

4.1 FAMILIA SOLANACEAE

La familia Solanaceae comprende 85 géneros y 2300 especies, de las cuales cerca de 100 pertenecen al género *Physalis*. Las solanáceas se caracterizan por ser hierbas o arbustos con las hojas alternas y las flores solitarias o en inflorescencias cimosas; las flores son actinomorfas o algo simétricas. El cáliz es persistente y de cinco sépalos y el fruto es una cápsula o baya.⁽¹⁾

Algunas especies de solanáceas son económica y farmacológicamente importantes, entre ellas se pueden citar:⁽²⁾

- Papa o patata (*Solanum tuberosum*), cuyos tubérculos desempeñan un papel muy importante en la alimentación de muchos pueblos y son usados en la obtención de almidón y en la fabricación de alcohol.
- Chile o pimiento (*Capsicum annum* y *C. frutescens*), planta originaria de México, cultivada por los antiguos mexicanos desde antes de la conquista y utilizada como parte de su alimentación.

- Jitomate (*Lycopersicum esculentum*), planta herbácea cultivada abundantemente en México y en el mundo. Sus frutos son empleados en la preparación de diversos platillos.

- Tomate verde (*Physalis philadelphica*), otra de las plantas mexicanas que se cultivan en todo el mundo. Su nombre deriva del vocablo náhuatl “tomatl”.

- Tabaco (*Nicotiana tabacum*), tiene gran importancia económica ya que las hojas fermentadas y preparadas (cuyo principio activo es la nicotina, un alcaloide excitante) son la base de la industria tabacalera.

- Toloache (*Datura stramonium*), contiene varios alcaloides tóxicos entre los que se encuentran principalmente: escopolamina, hiosciamina o atropina y derivados.

- Belladona (*Atropa belladonna*), planta originaria del antiguo continente, de la cual se extrae la atropina, alcaloide con propiedades antieméticas y antiespasmódicas. Se usa en el tratamiento del asma.

4.2 GÉNERO *PHYSALIS*

Este género está incluido en la familia Solanaceae y es de origen americano aunque cuenta con una especie nativa del Viejo Mundo. Se distribuye en zonas templadas, principalmente en México, Centro y Sudamérica. El número de especies incluidas en el género varía entre 90 y 120, según los diferentes autores. Alrededor de 70 de estas especies crecen en nuestro país y la mayoría son endémicas, razón por la que México es considerado el centro de diversificación del género.⁽³⁾

La importancia de las especies de *Physalis* radica principalmente en que algunas de ellas son comestibles, entre éstas la más importante es *P. philadelphica*, productora del tomate verde, que es un fruto indispensable en la comida mexicana. También es relevante el uso de especies de este género en la medicina tradicional, ya que varias de ellas son utilizadas para tratar desórdenes digestivos, infecciones de las vías respiratorias, hipertensión y diabetes. Las especies utilizadas con estos fines en México son:⁽⁴⁾

Physalis aequata Jacq. En general esta planta es empleada para tratar desórdenes digestivos, como dolor de estómago, “empacho,”¹ estreñimiento, “bilis”² y “latido.”³ El tomate es usado en la curación de la disentería, por los grupos Mixe, Zapoteco y Totonaco. De igual forma se le utiliza contra la tos, dolor de

¹ Trastorno ocasionado por un exceso de alimentos en el estómago, que se identifica por hinchazón del vientre y diarrea.

² Desorden estomacal, a veces acompañado de hipo, fiebre y diarrea, se atribuye a un trastorno emotivo, como un coraje.

³ Padecimiento con los siguientes síntomas: el estómago se siente hueco; el vientre se endurece y sufre un agudo cólico (dolor), a veces acompañado de diarrea, el oblio “salta” (late). Se atribuye a no comer con regularidad o a comer alimentos fríos.

amígdalas, calentura y en algunos padecimientos culturales como “susto”⁴ o “espanto,”^d para las ampollas o el calor de la lengua.

Physalis philadelphica Lam. Se refiere que se usa en problemas respiratorios y dolor de amígdalas, tosferina y tos. Por otra parte, asado se unta en la piel afectada por el “chincual.”⁵ Se aplica como chiquiadores en la cabeza y en las coyunturas, para bajar la fiebre. Otros usos medicinales que presenta esta planta son para tratar afecciones digestivas, “bilis,”^b inflamación de estómago y “latido,”^c contra la calvicie y para el nacimiento de pelo, en el tratamiento de la presión alta, diabetes (controla la sed del diabético) y para mejorar la vista. Para las ampollas o el calor de la lengua. Las hojas y los frutos son muy eficaces contra los fuegos, curan las fístulas lagrimales y los dolores de cabeza, alivian los ardores de estómago, resuelven las paperas. Su jugo es bueno contra las inflamaciones de garganta, cura las úlceras reptantes, contra los flujos agudos y alivia el dolor de oídos. Detiene los flujos menstruales excesivos, cura el “empacho,”^a quita la flatulencia, provoca la orina, alivia el asma aplicado al pecho, quita el dolor de vientre, aplicada a los pechos seca la leche.

Physalis pubescens L. Esta documentado que esta planta se emplea en tratamientos contra la “bilis,”^b “la recaída de las señoras,”⁶ la calentura y las heridas. También se menciona que puede ser útil en enfermedades respiratorias

⁴ Padecimiento provocado por una impresión súbita del miedo. Cuando se golpea frecuentemente a un niño para castigarlo padecerá de susto.

⁵ En los niños erupción que sale alrededor del ano.

⁶ Malestar general y sensación de debilidad después del parto, puede durar varias semanas acompañado de dolor de huesos y cabeza.

como tos o “k’ujchakua,”⁷ así como para tratar las nubes de los ojos, “postemas”⁸ de la nariz, dolor de estómago y diarrea. Al igual que *Physalis philadelphica*, es eficaz contra las fístulas lagrimales, dolores de cabeza, ardores de estómago y paperas, así como para curar inflamaciones de garganta, úlceras reptantes, flujos agudos, dolor de oídos, y para detener los flujos menstruales excesivos. También cura el “empacho,”^a el dolor de vientre y la flatulencia, provoca la orina y alivia el asma.

Physalis gracilis Miers. Se usa contra padecimientos digestivos e intestinales, tales como vómito, diarrea, “empacho”^a de los niños o “latido.”^c Por otra parte, se usa cuando se padece dolor de amígdalas. Se recurre a ella para regular la presión.

Physalis coztomatl Moc. & Sessé. Se refiere que se utiliza para detener el “pujo.”⁹ Para otros padecimientos intestinales, como la diarrea. Por lo que respecta a padecimientos dentales se le usa en caso de pulpitis. Se usa para las nubes de los ojos, las “postemas”^h de la nariz, el dolor de estómago, diarrea, para el paño y manchas de la cara, digestión, fiebre y recaídas de enfermos. Cura el “empacho,”^a quita la flatulencia, provoca la orina, alivia el asma aplicada al pecho, quita el dolor de vientre, aplicada a los pechos seca la leche.

⁷ Amígdalas inflamadas por ingerir bebidas frías después de haber permanecido mucho tiempo expuesto a los rayos del sol.

⁸ Absceso abierto y en supuración.

⁹ Una diarrea con sangre causada por una probable infección amibiana u otros parásitos

En cuanto a la composición química del género *Physalis* se han aislado alcaloides,⁽⁵⁾ flavonoides, esteroides, ácidos grasos de cadena lineal, carotenoides, ácido ascórbico, triterpenos⁽⁶⁾ y withaesteroides.⁽⁷⁾ Estos últimos son los compuestos más característicos del género, ya que se han aislado de todas las especies de *Physalis* estudiadas hasta ahora. Sin embargo, en estudios recientes efectuados en nuestro laboratorio, se ha encontrado que los diterpenos de tipo labdánico son abundantes en estas plantas y se les ha aislado de *Physalis coztomatl* y *P. patula*.

4.3 WITHAESTEROIDES

Se encuentran casi exclusivamente en la familia Solanaceae, en los géneros *Acnistus*, *Datura*, *Deprea*, *Dunalia*, *Iochroma*, *Jaborosa*, *Lycium*, *Nicandra*, *Physalis*, *Salpichroa*, *Trechonantes*, *Tubocapsicum*, *Withania* y *Witheringia*; pero *Physalis* y *Withania* son los principales productores de este tipo de compuestos.

Los withaesteroides son sustancias que derivan del ergostano y poseen una lactona o un lactol en su cadena lateral de 9 átomos de carbono. Estos grupos funcionales se producen por oxidación de los carbonos 22 y 26. A partir de este arreglo se pueden generar una gran variedad de estructuras en las que por lo general, están presentes varios grupos funcionales. Entre éstos los más comunes son hidroxilo, cetona, éter, éster y doble enlace. Debido a su diversidad estructural los withaesteroides se clasificaron en los ocho grupos que se presentan en la Figura 1.⁽⁸⁾

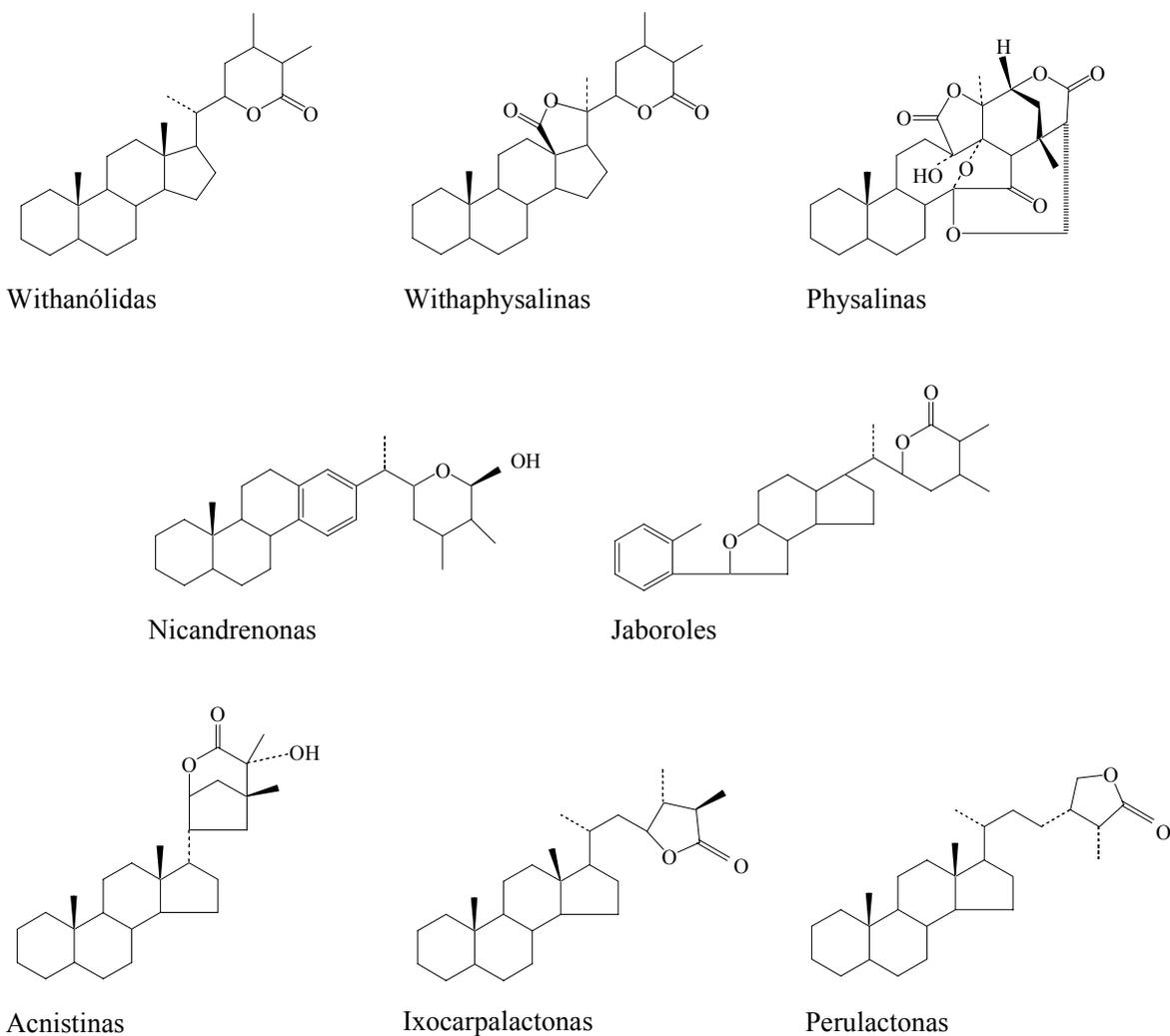


Figura 1. Tipos de Withaesteroides

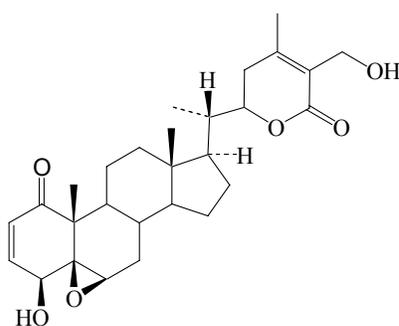
Dentro de los withaesteroides, las withanolidas son los compuestos más abundantes y se les considera precursores de los demás tipos de withaesteroides.

4.3.1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

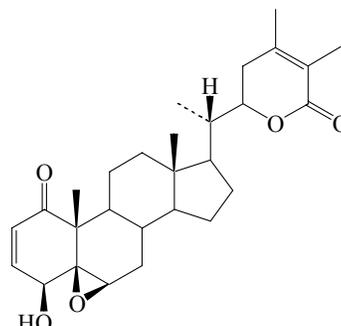
La actividad biológica de los withaesteroides ha sido estudiada ampliamente y se ha encontrado que muchos de ellos presentan una o varias de las siguientes actividades: antibacteriana, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antitumoral y tripanocida, entre otras. Lo anterior está justificado como consecuencia de la gran diversidad de estructuras que este tipo de compuestos presentan.⁽⁹⁾ A continuación se presentan algunos ejemplos.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La withaferina A posee actividad contra bacterias gram positivas. Los extractos etanólicos de *Physalis angulata* L. (que contienen withaesteroides) demostraron actividad contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. A su vez la 27-desoxiwithaferina A también presenta esta actividad.⁽⁸⁾



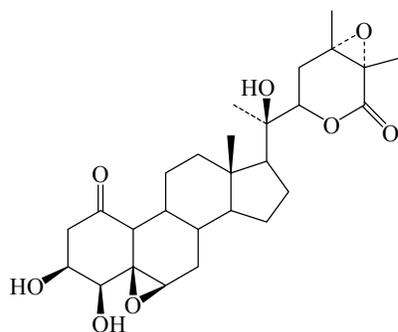
Withaferina A



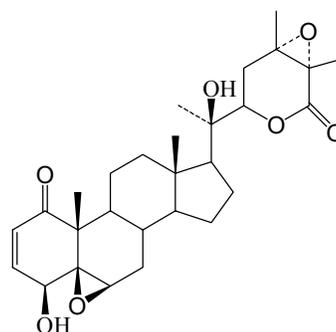
27-Desoxywithaferina A

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

La epoxiwithanólida D y la physangúlida producen efectos antiinflamatorios administradas por vía intraperitoneal en ratas. Su actividad es comparable con la de la hidrocortisona.⁽¹⁰⁾



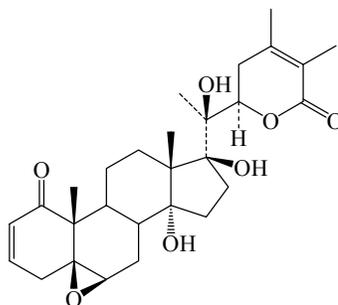
Physangúlida



24,25-Epoxiwithanólida D

ACTIVIDAD INMUNMODULADORA

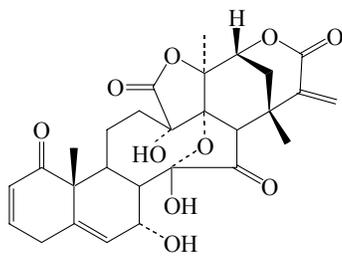
La withaferina A y la withanólida E han mostrado tener una actividad inmunosupresora de los linfocitos B y T, mientras que los extractos de *P. angulata* poseen actividad estimulante de los mismos.⁽⁸⁾



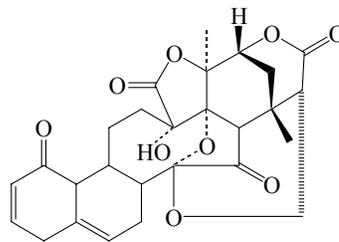
Withanólida E

ACTIVIDAD CITOTÓXICA

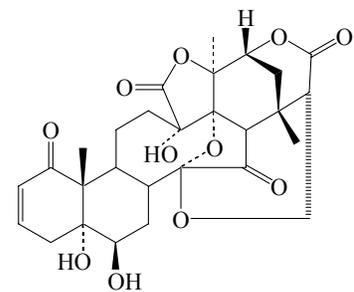
La actividad antitumoral de las physalinas ha sido motivo de muchas investigaciones, la physalina B por ejemplo, presenta actividad citotóxica para las células de cáncer de nasofaringe 9KB. En cuanto a la physalina D, mostró ser activa para carcinoma B-16. La physalina A es moderadamente activa contra células de cáncer cérvico-uterino HeLa.⁽⁸⁾



Physalina A

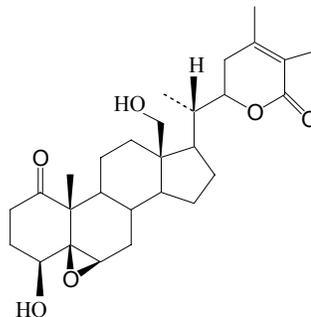


Physalina B



Physalina D

La withaferina A y la withacnistina presentan actividad citotóxica *in vitro* en carcinoma nasofaríngeo. La withanólida E llegó hasta fase preclínica en el Centro Nacional de Cáncer (EUA) para el tratamiento de leucemia L-1210 y melanoma B-16, pero no resultó suficientemente activa para su evaluación en la fase clínica.⁽¹⁰⁾



Withacnistina

ACTIVIDAD TRIPANOCIDA

Extractos de *P. angulata* fueron probados frente a *Trypanosoma brucei* mostrando un índice de selectividad superior a los productos farmacéuticos empleados como tripanocidas.⁽⁸⁾

4.4 DITERPENOS

Los diterpenos son por definición compuestos de 20 átomos de carbono formados por cuatro unidades de isopreno C_5H_8 . Los compuestos isoprenoides se biosintetizan a partir de los pirofosfatos de dimetilalilo e isopentenilo, compuestos que pueden provenir de acetil coenzima A por la vía del ácido meválonico o de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato por la ruta de la 1-deoxixilulosa (figura 2).⁽¹¹⁾

Los diterpenos se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos vegetal y animal, en organismos tanto terrestres como marinos. En el reino vegetal se encuentran en plantas superiores. Las resinas de coníferas (*Pinaceae*, *Araucariaceae*, *Taxodiaceae*, *Cupressaceae*, y *Podocarpaceae*) son fuentes especialmente ricas en diterpenos. Igualmente ricas son algunas resinas de angiospermas de las familias *Cistaceae*, *Leguminosae*, y *Burseraceae*. Los diterpenos son además propios de las familias *Labiatae* y *Euphorbiaceae*. Los diterpenos alcaloideos están extensamente distribuidos en los géneros, *Aconitum* y *Delphinium*, de la familia *Ranunculaceae*.⁽¹²⁾ En años recientes se ha encontrado un gran número de diterpenos tanto en animales marinos del orden *Aleyonacea* (coral blando) como en esponjas. Además se ha descubierto que ciertas especies de termitas (*Nasutitermes exitiososis*, *Trinervitermes gratiosus*) y abejas (*Bombus terrestris*) los elaboran como mensajeros químicos. Un gran número de diterpenos presentes en la naturaleza poseen el esqueleto de labdano.

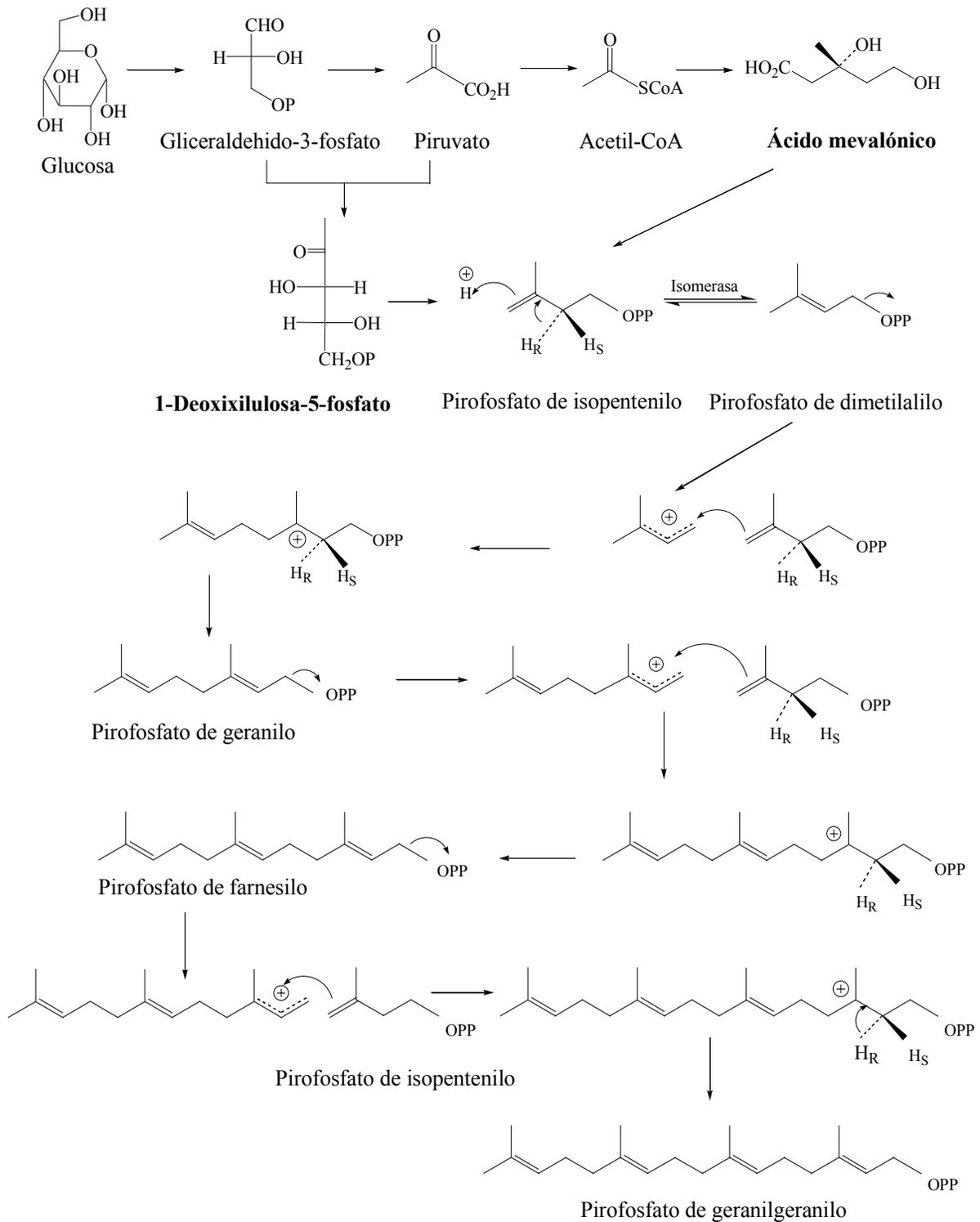


Figura 2. Biosíntesis de diterpenos

Existe una gran variedad estructural dentro de los diterpenos como se muestra en la figura 3.

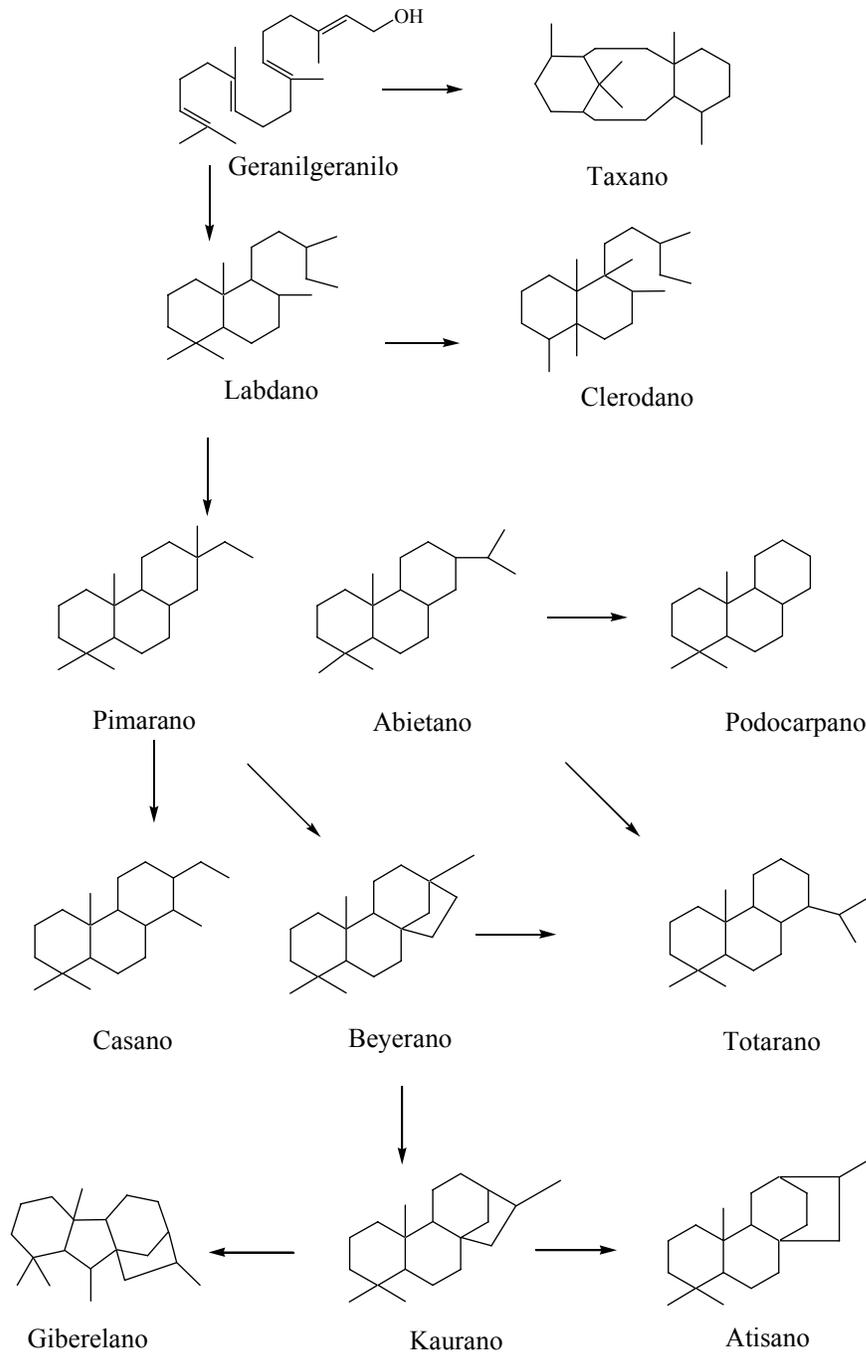
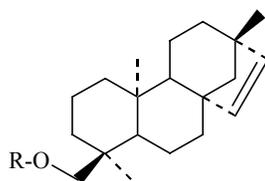


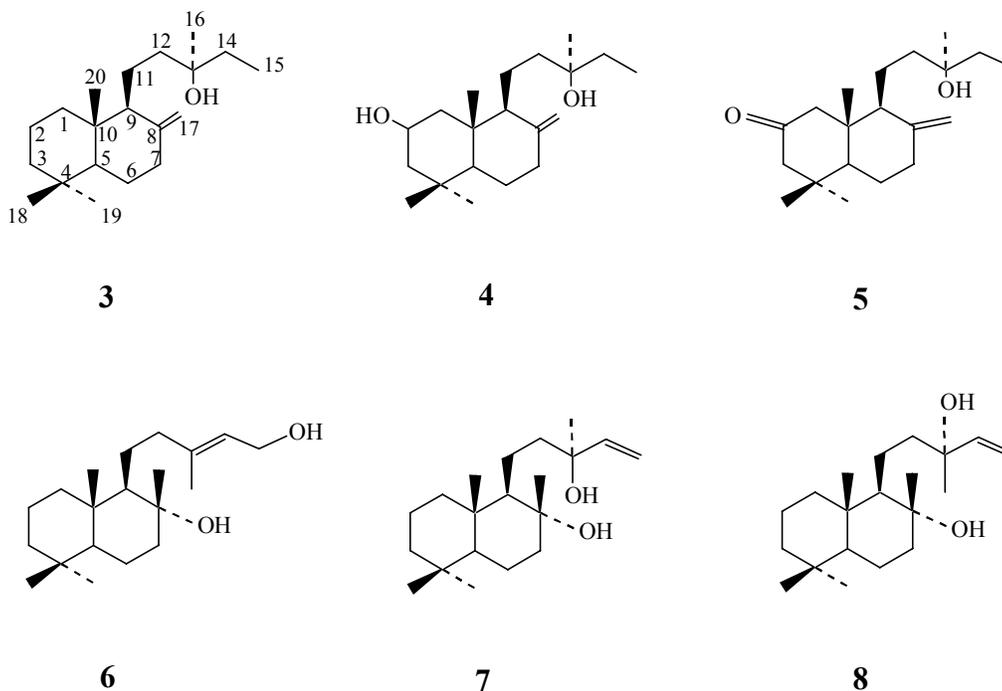
Figura 3. Principales tipos de diterpenos

Por otra parte, en la familia Solanaceae sólo se ha descrito la presencia de tres tipos de diterpenos: beyeranos, labdanos y duvanos. Así, de la resina de *Fabiana densa* Remy var. *ramulosa* Wedd ⁽¹³⁾ se aislaron 18-O-succinato de *ent*-beyer-15-eno (**1**) y 18-O-oxalato de *ent*-beyer-15-eno (**2**).

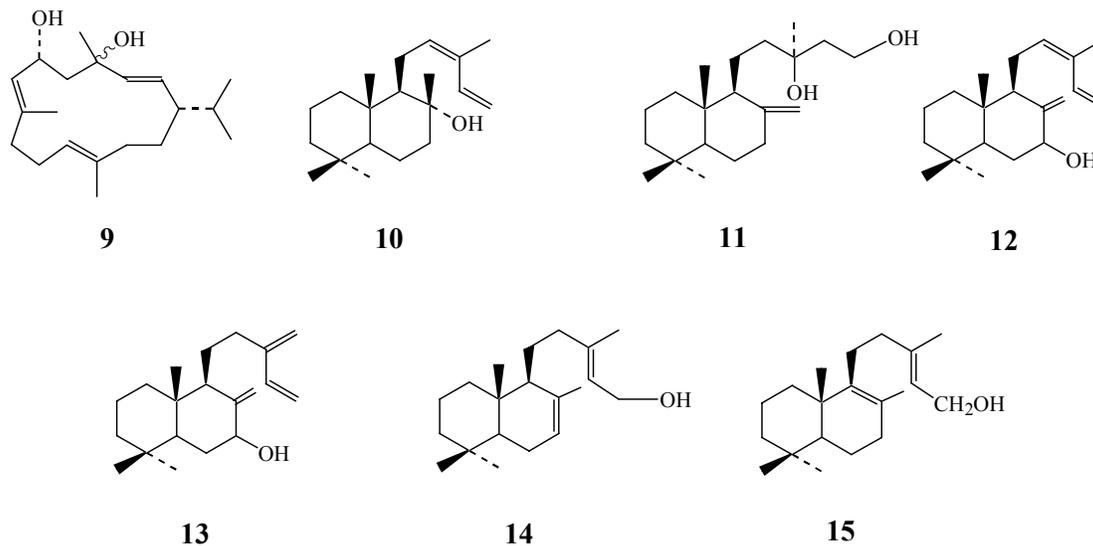


1. R = CO-CH₂-CH₂-COOH
2. R = CO-CO₂H

Dada la gran importancia económica de *Nicotiana tabacum*, se ha puesto especial empeño en el estudio de los componentes de los diferentes cultivares y de otras especies del género, con el objetivo de establecer qué compuestos las hacen susceptibles o resistentes al ataque de insectos. Una investigación en este sentido, reveló que los componentes cuticulares de *Nicotiana glutinosa* son acilsacarosas y los diterpenos labdánicos manool (**3**), 2-hidroximanool (**4**), 2-oxo-manool (**5**), labda-13-en-8 α ,15-diol (labdenodiol) (**6**) y la mezcla de esclareol (**7**), epiesclareol (**8**).^(14, 15)



En un trabajo similar, se analizó un gran número de especies de *Nicotiana* y se encontró que solo *N. tabacum* y *N. sylvestris* producen cantidades significativas de diterpenos de tipo duvano. Los duvanos aislados de estas especies son α y β 4,8,13-duvatrien-1,3-diol (**9**). *N. tabacum* cv *samsun* produce cis-abienol (**10**) y labdenodiol (**6**). Los principales labdanos del cultivar *N. glutinosa* 24 fueron manool (**3**), labdenodiol (**6**), esclareol (**7**), 13-epiesclareol (**8**) y 15-hidroxi-manool (**11**). De *N. raimondii* se aislaron raimonol (**12**) e isoraimonol (**13**) y de *N. setchellii* setchelol (**14**) e iso-setchelol (**15**).⁽¹⁶⁾



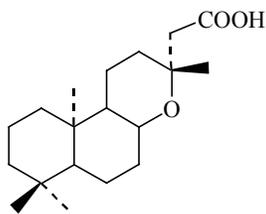
Se encontró que los divatriendoles y en menor medida manool y labdenodiol estimulan la oviposición de *Heliothis virescens*, el gusano cogollero del tabaco.

4.4.1 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DITERPENOS LABDÁNICOS

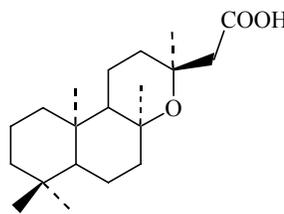
Estudios recientes han demostrado que muchos diterpenos labdánicos poseen actividad biológica. Las actividades que se han descrito para labdanos son antibacteriana, antifúngica, inmunomoduladora, antiparasitaria, de inducción enzimática, antiinflamatoria, citotóxica y citostática en líneas celulares leucémicas de humano.⁽¹²⁾

ACTIVIDADES ANTIBACTERIANA, FUNGICIDA Y ANTIPARASITARIA

El ácido epigomérico (**16**) y el ácido gomérico (**17**), fueron probados contra bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus*) y bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) mostrando actividad contra las Gram positivas.⁽¹⁷⁾

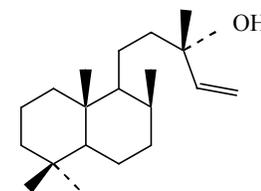
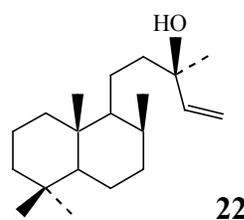
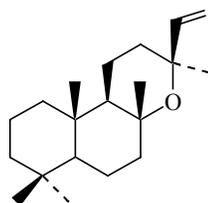
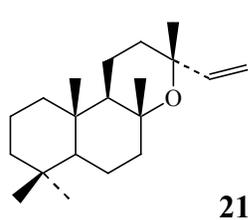
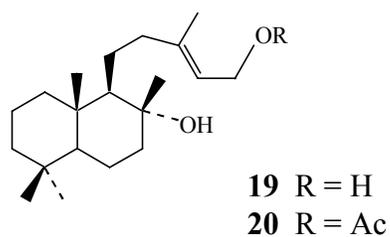
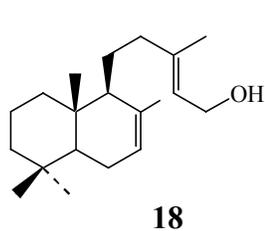


16

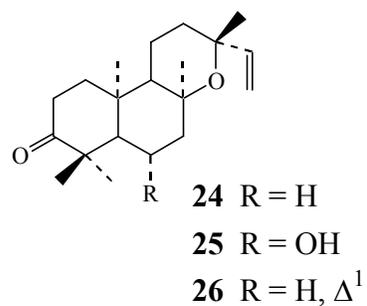
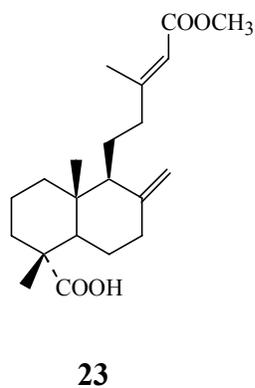


17

Siete diterpenos labdánicos aislados de las hojas de *Cistus incanus* subs. *creticus* (Cistaceae) se probaron contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* así como contra los hongos *Candida albicans*, *Torulopsis glabrata* y *Saccaromyces cerevisiae*. Las sustancias **19** y **20** y las mezclas epiméricas **21** y **22** resultaron activas contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, y *K. pneumoniae* mostrando zonas de inhibición comparables con los antibióticos netilmicina y ceftazidima.⁽¹⁷⁾



Los labdanos **23-26** mostraron actividad contra *Leishmania donovani*.^(18, 19) El primero (**23**) fue aislado de *Polyalthia macropoda* (Annonaceae) y resultó activo contra la forma de promastigote.⁽¹⁹⁾

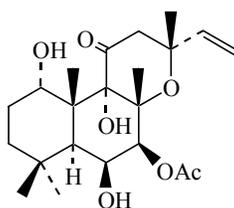


ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Se han realizado diversos estudios sobre la actividad citotóxica de los labdanos y varios de ellos han resultado activos, mostrando una actividad citotóxica selectiva contra diversas líneas celulares cancerosas humanas.

Algunos de los diterpenos labdánicos aislados de *Cistus incanus* subs. *creticus* resultaron activos contra la proliferación de las líneas celulares: P-388 (leucemia), células KB (cáncer rinofaríngeo de humano) y NSCLCN6 (carcinoma bronquial). Los más activos fueron **20** y la mezcla **22**.⁽¹⁸⁾

Entre las muchas propiedades farmacológicas descritas para la forskolina (**27**) se ha encontrado que, combinada con la mitomicina C, aumenta significativamente la citotoxicidad de ésta.⁽²¹⁾

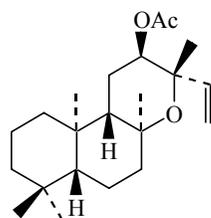


27

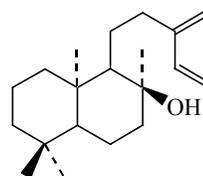
ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA Y ANTIINFLAMATORIA

Se ha encontrado que algunos diterpenos labdánicos ejercen diversos efectos sobre la función de los linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, células NK, basófilos, neutrófilos, eosinófilos y plaquetas, células involucradas en la inmunidad y los procesos inflamatorios. Además los labdanos pueden afectar enzimas críticas como la adenilciclasa, proteincinasas y la fosfolipasa A₂, que están íntimamente relacionadas con la transducción de señales en la activación de procesos celulares.

Dos diterpenos aislados del extracto hexánico de *Sideritis javalambrensis* (Lamiaceae): óxido de *ent*-13-*epi*-12 α -acetoximanoilo (**28**) y *ent*-8 α -hidroxilabda-13(16)14-dieno (**29**) poseen actividad antiinflamatoria.⁽²²⁾



28

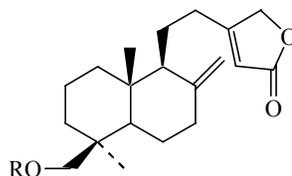


29

OTROS EFECTOS DE LOS LABDANOS

La forskolina (**27**), aislada de *Coleus forskohlii* (Labiatae), por sus características de ser un potente activador de la adenilclicasa y tener efectos dependientes e independientes del monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), es la base para el desarrollo de un agente antiglaucoma y de un agente cardiotónico.⁽¹²⁾ Además, posee actividad antihipertensiva, disminuyendo la presión arterial en diferentes especies de animales. Este compuesto actúa como vasodilatador y produce un efecto inotrópico positivo en el músculo cardíaco,⁽²³⁾ actúa también como un broncodilatador.⁽¹²⁾

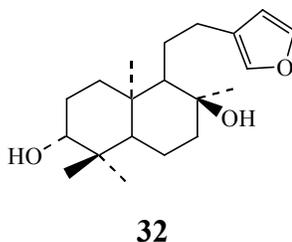
La medigenina (**30**) y el acetato de medigenina (**31**) fueron aislados de *Melodinus monogynus* (Apocyanaceae). Ambos compuestos mostraron actividad cardiotónica tanto en corazón de mamíferos como de rana.⁽²⁴⁾



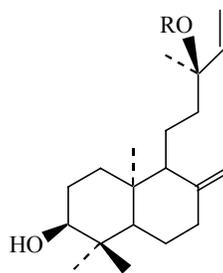
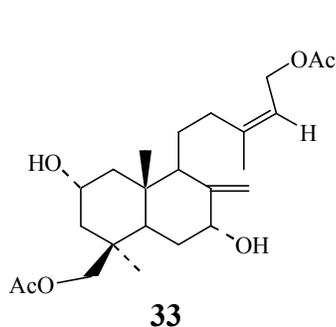
30 R = H

31 R = Ac

Un labdano aislado de *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae) ejerce propiedades relajantes en músculo liso. Este compuesto (*ent*-15,16-epoxi-9 α -labdane-13(16)14-dien-3 β , 8 α -diol, **32**) inhibe las contracciones del ileon de cobayo.⁽²⁵⁾



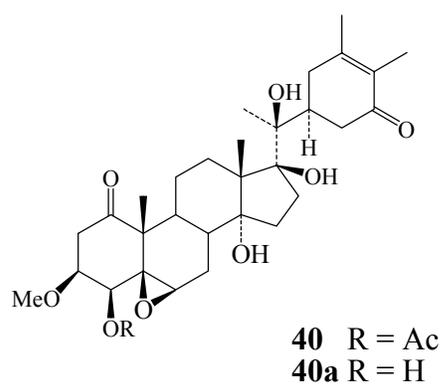
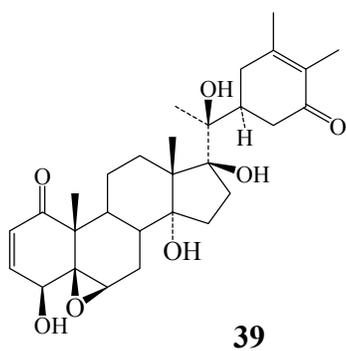
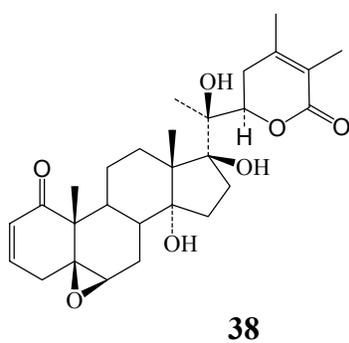
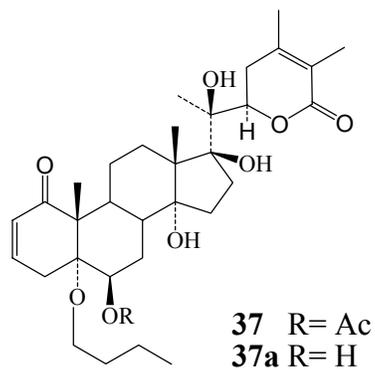
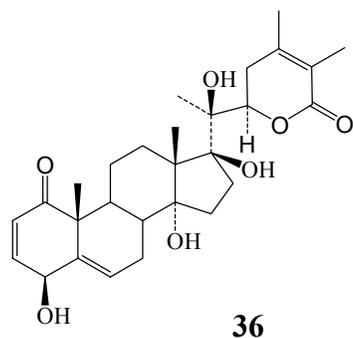
Uno de los diterpenos labdánicos aislados de *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) (**33**) mostró propiedades insecticidas. Este compuesto inhibe el crecimiento de las larvas de *Ostrinia nubilalis*, un insecto que parasita el maíz.⁽²⁶⁾ Varios glicósidos de la serie del manool, entre ellos **34**, fueron aislados de las raíces de *Gleichenia japonica* (Gleicheniaceae). El glicósido **34** inhibió el crecimiento de lechuga mientras que la aglicona **35** lo estimula.⁽²⁷⁾



4.5 *PHYSALIS PRUINOSA* L.

Se trata de una planta herbácea anual, erecta, ramificada, glutinosa y fétida, mide hasta 80 centímetros de alto; es pubescente y su corola es amarilla con máculas simples de color castaño rosado claro, difusas y alcanzan casi el borde de la corola que es de hasta 6 mm de largo. El fruto es una baya que puede alcanzar un diámetro de hasta 1.5 cm de diámetro. Florece y fructifica de junio a noviembre y se distribuye desde Estados Unidos hasta el sur de Argentina, excepto en el Salvador y Panamá.

Existe un estudio químico de *Physalis pruinosa* ⁽²⁸⁾ en el que se describe que del extracto metanólico de las partes aéreas de la planta se aislaron dos nuevas withanólidas, las physapruinas A (**36**) y B (**37**), además de withanólida E (**38**), 4 β -hidroxewithanólida E (**39**) y 2,3-dihidro-3-metoxi-4 β -acetoxiwithanólida E (**40**). Los compuestos **37** y **40** se aislaron después de acetilar, por lo que los productos naturales deben ser **37a** y **40a**. Los compuestos **37** y **40** parecen ser artefactos.



Compuestos aislados de *Physalis pruinosa*.

5. OBJETIVOS

- Aislar el mayor número de los metabolitos secundarios del extracto hexánico de hojas, ramas y flores de *Physalis pruinosa* y determinar su estructura
- Determinar si existen diterpenos labdánicos en el extracto hexánico de *Physalis pruinosa*.

6. HIPÓTESIS

A pesar de que los diterpenos labdánicos no se han descrito como constituyentes del género *Physalis*, recientemente han sido aislados de los extractos hexánicos de *P. coztomatl* y *P. patula*. En consecuencia, es muy probable que estos diterpenos existan en *Physalis pruinosa* y de ser así, podrían, si su presencia es constante en el género, constituirse como uno de sus marcadores taxonómicos

7. METODOLOGIA

7.1 MATERIAL Y EQUIPO

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns. En las cromatografías en columna con vacío (CCV) se utilizó como fase estacionaria silica gel (Merck G). Para las cromatografías en capa fina se usaron cromatofolios Alugram Sil G/UV₂₅₄ de 0.25 mm. Se empleó como revelador sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N y/o lámpara de UV Spectroline modelo 7924T. Los espectros de IR se obtuvieron por las técnicas de solución (CHCl₃) o suspensión (nujol), en un espectrofotómetro Nicolet FTIR-Magna 750. Los espectros de masas por ionización química (IQ), impacto electrónico (IE) o FAB⁺ fueron determinados en los espectrómetros Jeol JMS-AX505HA o JEOLJMS-SX102A y los espectros de RMN se determinaron en los espectrómetros Varian XR-300 (300 MHz ¹H, 75 MHz ¹³C) y Varian Unity Plus 500 (500 MHz ¹H, 125 MHz ¹³C), los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

7.2 MATERIAL VEGETAL

Las partes aéreas de *Physalis pruinosa* L. fueron recolectadas en Pantitlán, Municipio de Tlayacapan, Estado de Morelos, en julio de 2001. Un ejemplar de la planta se depositó en el Herbario de la Universidad Autónoma de Querétaro y fue clasificado por la Dra. Mahinda Martínez (M. Martínez s/n). El material vegetal se dividió en frutos, cálices y hojas, ramas y flores

7.3 EXTRACCIÓN

Las hojas, ramas y flores secas (1.555 kg) se molieron, se empacaron en una columna de vidrio y se extrajeron con metanol hasta agotar el material vegetal. El metanol se eliminó a presión reducida y el extracto obtenido se sometió a un proceso de partición en un embudo de separación al que se agregó el extracto metanólico disuelto en metanol-agua 4:1 y se extrajo repetidamente con hexano. Los extractos hexánicos se concentraron a presión reducida para obtener la fracción hexánica (178.36 g). De la fase metanol-agua se eliminó el metanol y se agregó agua. La fase acuosa resultante se extrajo con acetato de etilo. Se obtuvieron después de evaporar el disolvente 23.81g de extracto de acetato de etilo.

Por último la fase acuosa se concentró con una corriente de aire para obtener el extracto acuoso 143.37 g. Figura 4.

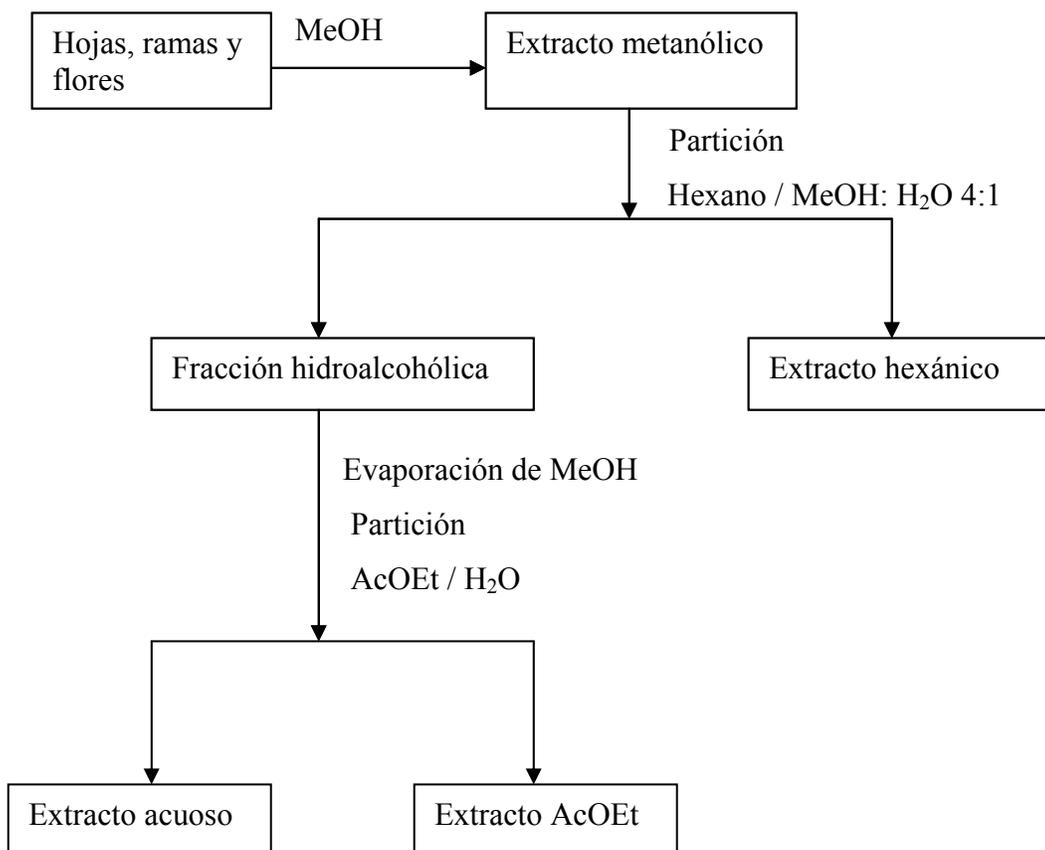


Figura 4.

7.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

El extracto hexánico de hojas, ramas y flores (170 g) se disolvió en hexano-AcOEt, se adsorbió en celita y se colocó en la parte superior de una columna cromatográfica de silica gel (columna A) para proceder a su fraccionamiento. La columna se comenzó a eluir con hexano y la polaridad se aumentó gradualmente adicionando acetato de etilo. Se obtuvieron 119 fracciones, las cuales fueron

analizadas por cromatografía en capa fina y se reunieron las que mostraron una composición semejante.

Los compuestos **I-III** fueron eluidos de la columna A con hexano/AcOEt 95:5 (fracciones 11A-25A). La mezcla de **I-III** se purificó por CCV de silica gel eluida en mezclas de hexano/AcOEt de polaridad creciente. Los compuestos **I-III** eluyeron en hexano/AcOEt 9:1, pero aún contenían algunas impurezas que se eliminaron al someter la mezcla de **I-III** a dos sucesivas CCV. La primera eluida con hexano/AcOEt 9:1. La segunda con CHCl₃/AcOEt 99:1. La mezcla de **I-III** se aplicó a cuatro placas preparativas de silica gel que se eluyeron con CH₂Cl₂ (4x). De aquí se aisló el compuesto **I** (Rf 0.28) 10 mg. y la mezcla de **II** y **III**. Esta mezcla se separó en sus componentes por cromatografía en placa preparativa eluida en hexano/AcOEt 4:1. Se obtuvieron 40.3 mg de **II** (Rf 0.57) y 42.5 mg de **III** (Rf 0.42).

De las fracciones 26A-47A, eluidas con hexano/AcOEt 4:1, se aisló la mezcla de los pruinotrioles **IV** y **V** después del siguiente proceso de purificación: CCV (silica gel, CH₂Cl₂-acetona 95:5) seguida de CCV (silica gel, CH₂Cl₂-acetona 95:5) para finalmente obtener, después de CCV eluida con hexano/AcOEt 1:1, la mezcla de **IV** y **V** (372.5 mg) libre de impurezas. Esta mezcla no pudo ser separada en sus componentes.

Las fracciones 54A-87A, eluidas con hexano/AcOEt 4:6, contenían los compuestos **VI** y **VII**. Éstos se purificaron por sucesivas cromatografías en columna. Las fracciones 54A-87A se reunieron y se preparó la columna B eluida con (hexano/acetona 7:3). De ésta se obtuvieron las fracciones 1B-51B. Las fracciones 2B-10B se reunieron y fraccionaron en la columna C, eluida con hexano/acetona 7:3. Las fracciones 19C-26C contenían al compuesto **VI** (3.6413 g). Con las fracciones 2C-7C se preparó la columna D (eluida con hexano/acetona 7:3) para obtener las fracciones 1D-50D. Las fracciones 31D-40D contenían más compuesto **VI** (4.6013 g). Con las fracciones 2D-9D se preparó la columna E, que se eluyó con CH₂Cl₂/acetona 8:2, y se obtuvieron las fracciones 1E-33E. Las fracciones 2E-5E se reunieron y fraccionaron en la columna F, eluida con hexano/acetona 3:7. Las fracciones 8F-11F contenían al compuesto **VII**, el cual se purificó por cristalización de hexano/AcOEt (41.2 mg).

7.5 REACCIONES

Obtención de pumilóxido (I). A una solución de 39.9 mg del compuesto **III** en 5 mL de cloroformo se adicionaron 0.1 mL de HCl y se dejó reaccionar por 2 horas. El producto de la reacción, **I**, se purificó por cristalización (hexano/acetato de etilo). Se obtuvieron 16 mg del compuesto **I**.

Acetilación de pruinotrioles IV y V. A una solución de 100.6 mg de la mezcla **IV-V** en 0.5 mL de piridina, se adicionaron 0.5 mL de anhídrido acético. La reacción se siguió por cromatografía en capa fina y al cabo de 2 h fue completa. Entonces se adicionó hielo a la mezcla de reacción y se extrajo con acetato de etilo. La solución orgánica se lavó con HCl al 5% y después con solución saturada de NaHCO₃ hasta pH básico y finalmente con H₂O. Se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró. Se obtuvieron 100 mg de la mezcla acetilada que se purificó por CC (hexano/CHCl₂ 1:3). Se obtuvieron 32.5 mg de la mezcla de **IVa** y **Va**.

Acetilación de pruinósido (VI). A una solución de 62 mg del compuesto **VI** en 0.5 mL de piridina, se agregaron 0.5 mL de anhídrido acético. Se dejó reaccionar por 1 hora. El producto de la reacción recibió el mismo tratamiento descrito para los compuestos **IVa** y **Va**. El producto **VIa** se purificó por cristalización (hexano/AcOEt). Se obtuvieron 55.3 mg del compuesto puro.

7.6 DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS

Pumilóxido (I). Cristales incoloros, pf 86-90 °C. $[\alpha]_D - 20.5^\circ$ (c 2.0, CHCl₃), (literatura⁽²⁹⁾ pf 88-89 °C; $[\alpha]_D - 20.0^\circ$ (C 2.20, CHCl₃)). IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹: 1643 (C=C) 1460, 1443, 966, 890 (furano). EMIE 70 eV, m/z (int rel): 286 [M, C₂₀H₃₀O]⁺ (47); 271 [M-CH₃]⁺ (8); 191 [M-C₆H₇O]⁺ (48); 95 [C₆H₇O]⁺ (100); 81 [C₅H₅O]⁺ (18). RMN ¹H y ¹³C ver tablas 1 y 2.

Pruinonal (II). Aceite amarillo, $[\alpha]_D - 10.86^\circ$ (c 2.3, CHCl_3). IR (película) $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$: 1728 (C=O) cetona α,β -no saturada, 1682 (C=O) aldehído α,β -no saturado, 1644 (C=C). EMIE 70 eV, m/z (int rel): 302 [M, $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$]⁺ (21); 287 [M- CH_3]⁺ (9); 273 [M-CHO]⁺ (34); 205 [M- $\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_2$]⁺ (23); 190 [205- CH_3]⁺ (54); 137 [$\text{C}_{10}\text{H}_{17}$]⁺ (100). RMN ^1H y ^{13}C ver tablas 1 y 2.

Pruinolona (III). Aceite amarillo, $[\alpha]_D - 4.28^\circ$ (c 2.1, CHCl_3). IR (película) $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$: 3443 (OH), 1672 (C=O), 1644 (C=C). EM FAB⁺ m/z : 327 [M + Na, $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$ + Na]⁺; 305 [M+H]⁺. RMN ^1H y ^{13}C ver tablas 1 y 2.

Pruinotrioles (IV y V). Aceite amarillo claro. IR (película) $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$: 3377 (OH), 1642 (C=C). EMIE 70 eV, m/z (int rel): 322 [M, $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$]⁺ (1); 304 [M- H_2O]⁺ (7); 291 [M- CH_2OH]⁺ (32); 273 [291- H_2O]⁺ (16); 255 [273- H_2O]⁺ (7); 206 [M- $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_3$]⁺ (10); 191 [206- CH_3]⁺ (30); 177 [191- CH_2]⁺ (29); 137 [$\text{C}_{10}\text{H}_{17}$]⁺ (100). RMN ^1H y ^{13}C ver tablas 1 y 2.

Triacetilpruinotrioles (IVa y Va). Aceite amarillo claro. IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$: 1746 (ester), 1646 (C=C). EMIE 70 eV, m/z (int rel): 448 [M, $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_6$]⁺ (1); 388 [M-AcOH]⁺ (4); 328 [M-2AcOH]⁺ (30); 286 [328- CH_2CO]⁺ (36); 268 [M-3AcOH]⁺ (42); 190 [$\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_2$ - CH_3]⁺ (22); 137 [$\text{C}_{10}\text{H}_{17}$]⁺ (175); 43 [Ac]⁺ (100); RMN ^1H 200 MHz, CDCl_3 (IVa): (δ 5.10 dda 7.5, 5, H12; δ 5.38 dda 8, 2.6, H14; δ 4.40 dd, 12, 3

H15; δ 4.10 dd, 12, 8 H15'; δ 5.25 sa H16; δ 5.22 sa H16'; δ 4.89 sa, H17; δ 4.59 sa, H17'; δ 0.88 s, H18; δ 0.80 s H19; δ 0.68 s H20; δ 2.09, 2.07 y 2.06 s, CH₃COO). RMN ¹H 200 MHz, CDCl₃ (**Va**): (δ 5.34 sobrepuesta H12; δ 5.56 dda, 8, 2.6, H14; δ 4.30 dd, 12, 3.5, H 15; δ 4.12 dd, 12, 8, H15'; δ 5.33 sa H16; δ 5.29 sa H16'; δ 4.87 sa H17; δ 4.51 sa, H17'; δ 0.88s H18; δ 0.80 s H19; δ 0.67 s H₂O; δ 2.10, δ 2.07, δ 2.05s, CH₃COO)

Pruinosido (VI). Cristales blancos, pf 90-92 °C. $[\alpha]_D - 29.52^\circ$ (c 2.1, CHCl₃). IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹: 3415 (OH), 1725 (éster), 1642 (C=C). EM FAB⁺ m/z : 575 [M+Na, C₃₁H₅₂O₈ +Na]⁺. RMN ¹H y ¹³C ver tabla 3.

Tetraacetilpruinosido (VIa). Cristales blancos, pf 110-113 °C. $[\alpha]_D - 31.6^\circ$ (c 2.5, CHCl₃). IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹: 1755 (éster), 1643 (C=C). EM FAB⁺ m/z : 743 [M+Na, C₃₉H₆₀O₁₂ + Na]⁺ (100); 701 [743-CH₂CO]⁺ (7); 659 [701-CH₂CO]⁺ (14); 617 [659- CH₂CO]⁺ (34); 575 [617- CH₂CO]⁺ (100). RMN ¹H y ¹³C ver tabla 3.

Physapruina C (VII). Cristales blancos, pf 197-200 °C. $[\alpha]_D + 67.72^\circ$ (c 2.2, CHCl₃). IR (película) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹: 3412 (OH), 1725 (δ -lactona α,β -no saturada), 1689 (cetona α,β -no saturada). EMIE 70 eV m/z (int rel): 546 [M⁺, C₃₀H₄₂O₉]⁺ (no observado); 528 [M-H₂O]⁺ (1); 510 [M-2H₂O]⁺ (8); 492 [M-3H₂O]⁺ (5); 468 [528-CH₃CO₂H]⁺ (25); 450 [468-H₂O]⁺ (10); 432 [450- H₂O]⁺ (22); 414 [432- H₂O]⁺ (19);

169 [C₉H₁₃O₃]⁺ (54); 152 [C₉H₁₂O₂]⁺ (41); 125 [C₇H₉O₂]⁺(82); 43 [CH₃CO]⁺(100).

RMN ¹H y ¹³C ver tabla 4.

8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

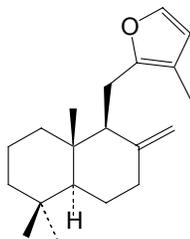
Como resultado del estudio químico del extracto hexánico de hojas, ramas y flores de *Physalis pruinosa* se aislaron e identificaron seis compuestos, cinco de ellos nuevos. Sus estructuras fueron determinadas mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos. Cinco de ellos son diterpenos labdánicos y el sexto una withanólida.

El compuesto menos polar (**I**) es un furanoditerpeno. Su espectro de masas presenta un ión molecular de m/z 286 el cual es congruente con una fórmula molecular $C_{20}H_{30}O$. Su espectro de RMN ^{13}C (espectro 1) presenta 20 señales correspondientes a 4 metilos, 7 metilenos, 4 metinos y 5 carbonos no protonados.

Su espectro de RMN 1H (espectro 2) presenta las señales características de un diterpeno labdánico como son 3 singuletes, que integran para tres protones cada uno, en δ 0.89, 0.83 y 0.77, que se asignan a los metilos 18, 19 y 20, respectivamente. Las señales de estos metilos aparecen en el espectro de RMN ^{13}C en δ 33.6 (C18), δ 21.8 (C19) y δ 14.2 (C20). La presencia de 2 señales para protones vinílicos en 4.76 (dd, $J = 3, 1$ Hz) y 4.57 (da, $J = 3$ Hz), así como para 2 carbonos vinílicos, uno metilénico (δ 148.7) y otro no protonado (δ 106.8), establecen la presencia de un metileno exocíclico en la molécula. Este se sitúa en C8 tomando en consideración

que los desplazamientos químicos de las señales de H7 (δ 2.34), H7' (δ 2.05) y H9 (δ 2.30) corresponden a hidrógenos alílicos.

La existencia de un furano disustituído en el compuesto **I** se dedujo de la presencia en el espectro de RMN ^1H de 2 dobletes con $J = 2$ Hz en δ 6.11 (H14) y δ 7.17 (H15); así como de las señales de 2 carbonos no protonados (δ 151.0, C12; δ 113.0 C13) y 2 metinos (δ 112.8, C14; δ 139.3, C15) en el espectro de RMN ^{13}C . Las señales para el metilo vinílico 16 son δ_{H} 1.97, δ_{C} 10.1. En el espectro de RMN ^{13}C se observaron además las señales para los restantes 6 metilenos de la molécula (tabla 1), así como para los carbonos cuaternarios C4 (δ 33.6) y C10 (δ 39.6) y los terciarios C5 (δ 55.4) y C9 (δ 54.4). Todo lo anterior condujo a formular la estructura de este compuesto como **I**. Al revisar la literatura se encontró que éste ya había sido aislado de *Pinus pumila* ⁽²⁸⁾ y *Solidago chilensis* ⁽²⁹⁾ y se le llamó pumilóxido. La comparación de las rotaciones ópticas de ambos compuestos permitió establecer que poseen la misma configuración y en consecuencia la estereoquímica del furanoditerpeno quedó establecida como se muestra en **I**.

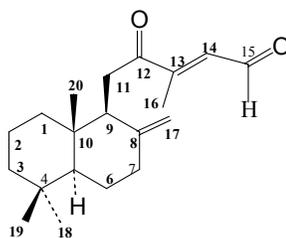


Pumilóxido (I)

El segundo compuesto aislado, pruinonal, también es un diterpeno labdánico, al que se asignó la estructura **II**. En el espectro de RMN ^1H se observan tres singuletes en δ 0.89, 0.82 y 0.73, asignados por su desplazamiento a los metilos terciarios 18, 19 y 20, se observan también dos señales en δ 4.72 (dd $J = 4, 1.5$ Hz) y δ 4.20 (dd $J = 4, 1.5$ Hz), para los protones de un metileno exocíclico, H-17 y H-17'. En el espectro de RMN ^{13}C (espectro 5) se observan cinco señales que confirman lo anterior: tres de ellas (δ 33.5, 21.7 y 14.7) fueron asignadas a los carbonos de los metilos terciarios y las dos restantes (δ 149.2 y 106.4) a los carbonos del metileno exocíclico, C8 y C-17. Las señales para los carbonos 1-10 son prácticamente iguales a las del compuesto **I**. Esto permite suponer que la diferencia entre ambos compuestos reside en la cadena lateral.

El espectro de IR del compuesto **II** (espectro 6) muestra bandas de absorción para aldehído conjugado (1682 cm^{-1}), cetona conjugada (1728 cm^{-1}) y doble enlace (1644 cm^{-1}). El espectro de RMN ^{13}C muestra la señal del carbono de la cetona en δ 202.8 y la del aldehído en δ 192.6. El protón del aldehído aparece como una señal doble ($J = 7.5$ Hz) en δ 10.27. Esta señal correlaciona en el espectro COSY (espectro 7) con la señal de un protón vinílico en δ 6.60 (dc $J = 7.5, 1.5$ Hz) que a su vez correlaciona con la señal de un metilo vinílico en δ 2.25 (d, $J = 1.5$ Hz). Lo anterior permite situar al aldehído en C15 y al doble enlace en C13.

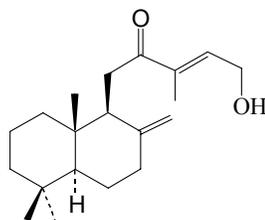
La interacción observada en el espectro NOESY entre el protón vinílico (H14) y el protón aldehídico (H15) confirmó lo anterior. Además la interacción de H15 con los protones del metilo vinílico (H16) establece la geometría del doble enlace como *E*. El carbono de la cetona conjugada (δ 202.89) mostró correlaciones a tres enlaces con los protones 14 y 16, estableciendo que se trata de C12. Con esto la estructura del pruinonal quedó establecida como se muestra en **II**. El peso molecular de 302 obtenido por EM, es congruente con la fórmula molecular de $C_{20}H_{30}O_2$.



Pruinal (II)

El compuesto **III**, pruinolona, presentó en su espectro de IR bandas para hidroxilo (3442 cm^{-1}), cetona conjugada (1672 cm^{-1}) y doble enlace (1644 cm^{-1}). Su espectro de masas presenta un ión molecular de 304, consistente con una fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_2$. Sus espectros de RMN tanto de ^1H (espectro 8) como de ^{13}C (espectro 9) son muy parecidos a los del compuesto **II**; con la diferencia de que en los espectros de **III** no se observan las señales del aldehído y en cambio, en el

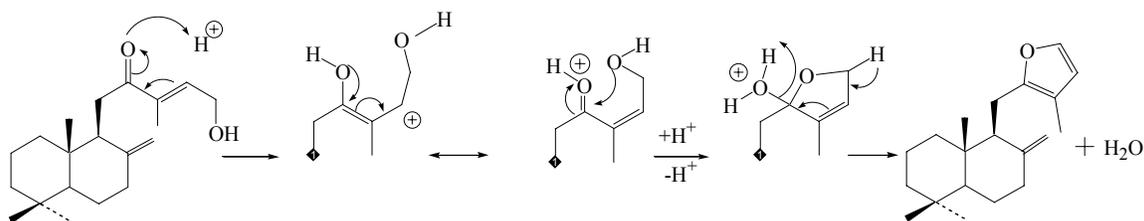
espectro de RMN de ^1H aparece un doblete de quinteto en δ 4.44 ($J = 5.5, 1.5$ Hz), que integra para dos protones, y cuyo desplazamiento permite suponer que se trata de los protones de un metileno alílico base de alcohol. Este se sitúa en C15 por las correlaciones observadas en el espectro COSY (espectro 10) entre los protones del metileno (H15, H15') con un protón vinílico (H14) cuyo desplazamiento (δ 6.73) indica que se encuentra β a un carbonilo. Las señales en el espectro de RMN ^{13}C para los carbonos de un metileno (δ 60.1, C15), un doble enlace trisustituido (δ 137.7, C13; δ 138.8, C14), un metilo vinílico (δ 11.9, C16) y un carbonilo cetónico (δ 201.1, C12) confirman lo anterior y establecen que la estructura de este compuesto es la representada en **III**. La geometría *E* del doble enlace en C13 se dedujo del efecto NOE entre los protones 15 y 16.



Pruinolona (III)

La pruinolona (**III**) es un compuesto sensible a ácidos. Así, durante la obtención de sus espectros de RMN en solución de CDCl_3 que contenía trazas de

DCl, se observó la transformación de **III** en **I**. Esta misma transformación se reprodujo en el laboratorio, al agregar HCl a una solución clorofórmica de **III**. Esta transformación puede explicarse mediante el mecanismo que se muestra a continuación.

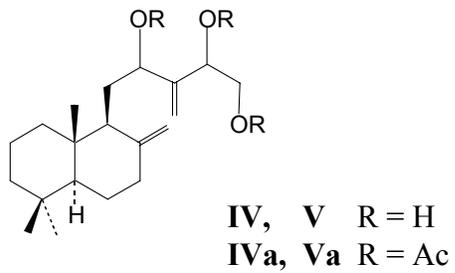


La facilidad con que ocurre esta transformación crea la incertidumbre de si el compuesto **I** es un producto natural de la planta o se formó a partir de **III**, durante el proceso de aislamiento.

Después de sucesivos procesos de purificación, se logró aislar una sustancia que con todos los eluyentes ensayados presentaba una mancha homogénea en CCF. Sin embargo, sus espectros de RMN revelaron que se trataba de una mezcla de 2 compuestos **IV** y **V**, a los que denominamos pruinotrioles. Debido a que todos los intentos de separar estos compuestos fallaron, la asignación estructural se hizo con base en los datos espectroscópicos de la mezcla (tablas 1 y 2). Esto fue posible porque los compuestos **IV** y **V** se encontraban en una proporción aproximada de 3:2. En el espectro de RMN 1H (espectro 11) se puede apreciar que, con la excepción de

las señales de H-17, H-17' y H-20, las señales asociadas a la decalina, aparecen con el mismo desplazamiento en los 2 compuestos. En cambio, las señales de la cadena lateral aparecen con la misma multiplicidad y prácticamente con las mismas constantes de acoplamiento, pero con desplazamientos diferentes para cada uno de los compuestos. En el espectro de RMN ^{13}C (espectro 12) sólo las señales de los carbonos 9 y 11-17 aparecen duplicadas. Así, la diferencia entre ambos compuestos debe residir en la cadena lateral, cuya estructura se determinó como sigue: la existencia del doble enlace 13(16) se dedujo de la presencia de 2 dobletes anchos asignados a los protones 16 y 16' en δ 4.85 y 4.42 para **IV** y en δ 4.87 y 4.45 para **V**, así como por las señales para C13 y C16 en δ 151.1 y 111.9 para **IV** y δ 151.6 y 112.5 para **V**. Ambas moléculas poseen un alcohol primario en C15 (δ 66.7 (**IV**); δ 66.2 (**V**)) y alcoholes secundarios en C12 (δ 72.1 (**IV**); δ 71.6 (**V**)) y C14 (δ 73.3 (**IV**); δ 73.2 (**V**)). De lo anterior se establece que la estructura de estos compuestos es la misma y que deben diferir en la configuración de C12 o C14, configuraciones que no se lograron determinar.

En un intento de separar estos compuestos se obtuvieron los derivados triacetilados **IVa** y **Va**. La mezcla de los triacetatos tampoco se pudo resolver. Sus datos de RMN ^1H se presentan en la sección 5.6.



Pruinotrioles (IV y V)

Tabla 1. Datos espectroscópicos de RMN ¹H de los compuestos I-V*

¹ H	I ^a	II ^a	III ^a	IV ^b	V ^b
1	1.71 d 12.5	1.52 m	1.53 m	1.75 m	1.75 m
1'	1.16 td 12.5, 4	1.09 td 12.5, 3.5	1.08 td 12, 2.5	1.09 tt 13, 3.5	1.09 tt 13, 3.5
2	1.58 tt 14, 3.5	1.57 dt 13.5, 3.5	1.56 m	1.56 t 13.5	1.56 t 13.5
2'	1.50 dc 14 3.5	1.48 dt 13.5, 3.5	1.46 m	1.51 m	1.51 m
3	1.41 dddd 13, 3.5, 3.5, 1.5	1.41 m	1.39 m	1.40 d 13.5	1.40 d 13.5
3'	1.2 tc 13, 3.5	1.20 td 14, 3.5	1.19 td 13.5, 4.5	1.21 td 13.5, 4	1.21 td 13.5, 4.5
5	1.20 dd 13, 3	1.33 dd 12.5, 2.5	1.23 dd 12.5, 2	1.18 dd 12.5, 2.5	1.18 dd 12.5, 2.5
6	1.73 m	1.75 dddd 12.5, 5, 2.5, 2.5	1.73 dddd 12.5, 5, 2.5, 2.5	1.75 m	1.75 m
6'	1.33 cd 13, 4.5	1.32 cd 12.5, 4.5	1.31 cd 12.5, 4	1.34 cd 13, 4.5	1.34 cd 13, 4.5
7	2.34 ddd 13, 4.5, 2.5	2.39 ddd 13, 4.5, 2.5	2.37 ddd 13, 4.2	2.41 ddd 13, 4, 2	2.41 ddd 13, 4.2
7'	2.05 td 13, 5	2.11 td 13, 5.5	2.12 td 13, 5	2.05 m	2.05 m
9	2.30 d 10	2.52 d 10	2.54 d 10	2.02 m	2.02 m
11	2.62 dd 15, 10	2.95 dd 17, 10	2.98 dd 17, 10	1.76 m	1.76 m
11'	2.73 dd 15, 3.5	2.68 dd 17, 3.5	2.59 dd 17, 3.5	1.65 m	1.65 m
12				4.20 dd 10, 1	4.24 dd 10, 2
14	6.11 d 2	6.60 dc 7.5, 1.5	6.73 tc 5.5, 1.5	4.38 dd 7, 3.5	4.40 dd 7, 4
15	7.17 d 2	10.27 d 7.5	4.44 dc 5.5, 1.0	3.73 dd 11, 3.5	3.75 dd 11, 4
15'				3.66 dd 11, 7	3.68 dd 11, 7
16	1.97 s	2.25 d 1.5	1.75 dc 1.5, 1.0	5.20 s	5.20 s
16'				5.14 s	5.17 s
17	4.76 dd 3, 1	4.72 dd 4, 1.5	4.68 dd 3, 1.5	4.85 d 1.5	4.87 d 1.5
17'	4.57 d 1	4.20 dd 4, 1.5	4.24 dd 3, 1.5	4.42 d 1	4.45 d 1.5
18	0.89 s	0.89 s	0.88 s	0.88 s	0.88 s
19	0.83 s	0.82 s	0.81 s	0.81 s	0.81 s
20	0.77 s	0.73 s	0.73 s	0.68 s	0.69 s

*Los espectros se determinaron en CDCl₃; s = singulete, d = doblete, t = triplete, c = cuarteto, a = señal ancha, m = multiplete.

^aDeterminados a 500 MHz, ^bDeterminados a 300 MHz.

Tabla 2. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de los compuestos I-V*

C	I ^a	II ^a	III ^a	IV ^b	V ^b
1	39.0 t	39.4 t	39.3 t	39.1 t	39.1 t
2	19.4 t	19.3 t	19.3 t	19.3 t	19.3 t
3	42.1 t	42.0 t	42.1 t	42.1 t	42.1 t
4	33.6 s	33.5 s	33.5 s	33.6 s	33.6 s
5	55.4 d	55.2 d	55.1 d	55.5 d	55.5 d
6	24.3 t	24.0 t	24.0 t	24.4 t	24.4 t
7	38.1 t	37.5 t	37.6 t	38.3 t	38.3 t
8	148.7 s	149.2 s	149.6 s	149.1 s	149.0 s
9	54.4 d	51.9 d	51.7 d	52.5 d	52.6 d
10	39.6 s	39.0 s	39.0 s	39.4 s	39.4 s
11	21.5 t	34.5 t	33.0 t	31.0 t	30.6 t
12	151.0s	202.8 s	201.1 s	72.1 d	71.6 d
13	113.0 s	152.9 s	137.7 s	151.1 s	151.6 s
14	112.8 d	131.2 d	138.8 d	73.3 d	73.2 d
15	139.3 d	192.6 d	60.1 t	66.7 t	66.2 t
16	10.1 c	12.5 c	11.9 c	111.9 t	112.5 t
17	106.8 t	106.4 t	106.2 t	106.4 t	106.6 t
18	33.6 c	33.5 c	32.6 c	33.6 c	33.6 c
19	21.8 c	21.7 c	21.8 c	21.7 c	21.7 c
20	14.2 c	14.7 c	14.8 c	14.6 c	14.6 c

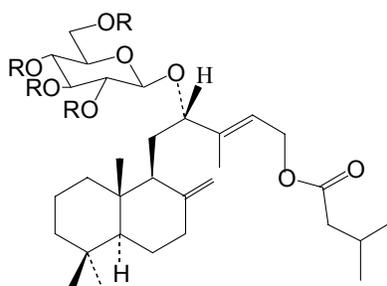
*Multiplicidad deducida del espectro DEPT. Los desplazamientos están dados en ppm, referidos al CDCl_3 .
s = singulete (C), d = doblete (CH), t = triplete (CH_2), c = cuarteto (CH_3).

^aDeterminados a 125 MHz; ^bDeterminados a 75 MHz.

El más abundante de los compuestos aislados, fue el 3-metilbutirato de un glicósido labdánico al que llamamos pruinósido **VI**. Su fórmula molecular es $C_{31}H_{52}O_8$ y es congruente con el ión molecular de m/z 552 obtenido por FAB⁺. Sus espectros de RMN ¹H y ¹³C (espectros 13 y 14)* mostraron que posee la misma estructura en el núcleo de labdano que los compuestos **I-V**. El compuesto **VI** posee un doble enlace en C13 como lo indican las señales en δ_H 5.38 t, $J = 7$ Hz (H14), δ_C 138.5 s (C13) y δ_C 125.2 d (C14). Posee también un 3-metilbutanoato identificado por las señales en δ 2.19 d, $J = 7$ Hz, (H2^E), δ 2.10 hept $J = 7$ Hz (H3^E) y δ 0.97 d, $J = 7$ Hz, (H4^E, H5^E); así como por las señales en δ 173.0, 43.5, 25.7 y 22.5 para los carbonos 1^E a 5^E, respectivamente. Las correlaciones en el espectro HMBC (espectro 15) entre C1^E y H15, H15' indicaron que este grupo está unido a C15. Las señales en δ 99.3 (C1^G), 73.5 (C2^G), 76.6 (C3^G), 70.2 (C4^G), 75.2 (C5^G) y 62.2 (C6^G) establecieron la presencia de una glucosa en la molécula. La constante de acoplamiento de 7.5 Hz de la señal del protón anomérico (δ 4.15 d, H1^G) reveló que se trata de una β -D-glucopiranososa. Su posición en la molécula se dedujo de la correlación en el espectro de HMBC (espectro 15) entre el protón anomérico y la señal en δ_C 82.3 que se asignó a C12 por las correlaciones con H14 y H16 que se observaron en el mismo espectro. Las interacciones de H12 (δ 4.24 dd, $J = 11, 4$ Hz) con H14 y H1^G observadas en el espectro NOESY (espectro 16), confirmaron lo anterior y además

* El compuesto **VI** es poco estable y durante la determinación de sus espectros de RMN se transformó parcialmente.

establecieron que la geometría del doble enlace en C13 es *E* y la estructura del compuesto, la que se representa en **VI**.



VI R = H
VIa R = OAc

De la acetilación del pruinósido se obtuvo el derivado tetraacetilado VIa. En el espectro de RMN ^1H (espectro 17) se observan los singuletes para los protones de los acetatos en δ 1.99, 2.0, 2.01 y 2.07. Los protones de la β -D-glucopiranososa se ven con mayor detalle en δ 4.35 (d, $J = 8$ Hz, H1^{G}), δ 4.98 (dd, $J = 9, 5.8$ Hz, H2^{G}), δ 5.15 (t, $J = 9.5$ Hz, H3^{G}), δ 5.05 (t, $J = 9.5$ Hz, H4^{G}), δ 3.61 (ddd, $J = 9.5, 5.5, 2.5$ Hz, H5^{G}) y δ 4.23 (dd, $J = 12, 5.5$ Hz, H6^{G}), δ 4.10 (dd, $J = 12, 2.5$ Hz, H6^{G}). Estas señales aparecen a campo más bajo que las del compuesto original. Por otra parte los protones unidos a C15 no modifican su desplazamiento (δ 4.65 dd $J = 13, 7$ Hz, 4.61 dd $J = 13, 7$ Hz), lo que confirma la posición del éster. En este derivado la geometría *E* del doble enlace en C13 se corrobora por la correlación que presentan los protones H15 y H16 en el espectro NOESY (espectro 18). Con la obtención del derivado acetilado, que es cristalino, fue posible realizar el estudio de difracción de rayos X.

Los resultados (figura 5) confirmaron la estructura propuesta y establecieron la configuración en C12 como *S*.

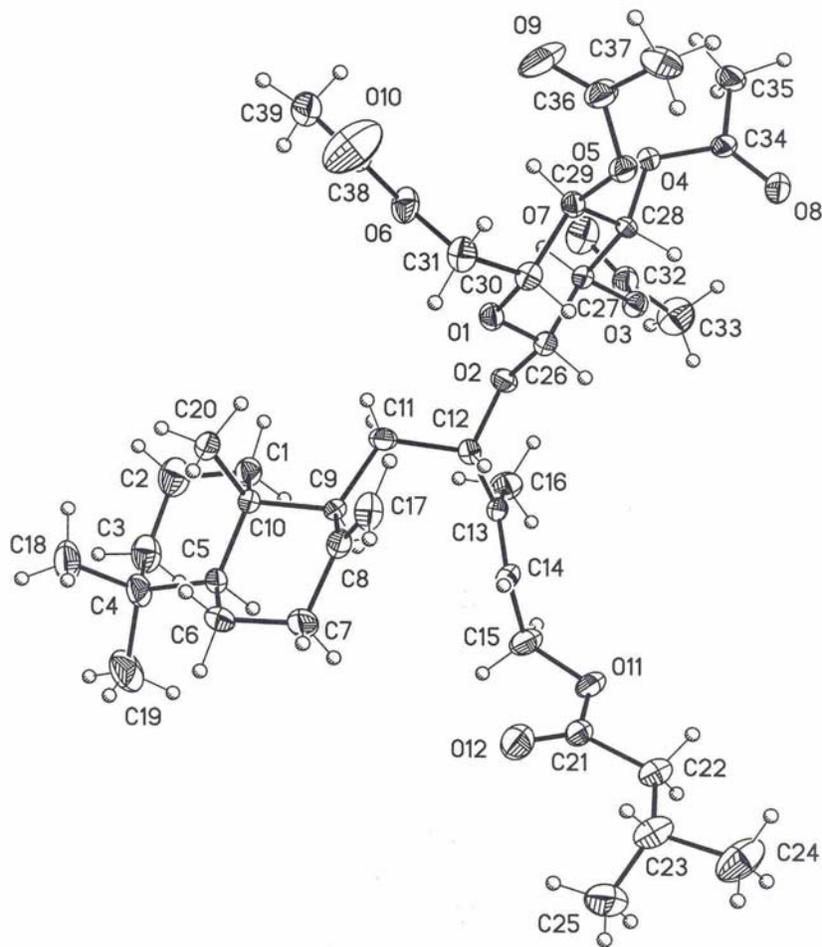


Figura 5. Vista estereoscópica de tetracetilpruinósido (VIa).

Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C de los compuestos VI y VIa*

	VI		VIa			VI		VIa	
	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^b$	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^b$		$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^b$	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^b$
1	1.70 m	39.0 t	1.69 m	39.0 t	15	4.67 dd 13, 7	60.4 t	4.65 dd 13, 7	60.2 t
1'	0.86 m	-	0.85 m	-	15'	4.60 dd 13, 7	-	4.61 dd 13, 7	-
2	1.55 ta 13.5	19.4 t	1.54 m	19.4 t	16	1.66 s	10.5 c	1.56 s	10.1 c
2'	1.48 m	-	1.45 m	-	17	4.83 s	106.7 t	4.82 s	106.9 t
3	1.39 m	42.1 t	1.37 ta 13.5	42.1 t	17'	4.65 s	-	4.63 s	-
3'	1.15 m	-	1.14 td 13.5, 4	-	18	0.86 s	33.5 c	0.85 s	33.5 c
4	-	33.6 s	-	33.6 s	19	0.79 s	21.7 c	0.78 s	21.7 c
5	1.01 dd 12, 2.5	55.6 d	0.99 m	55.6 d	20	0.88 s	14.6 c	0.67 s	14.5 c
6	1.70 m	24.4 t	1.65 m	24.3 t	1^G	4.15 d 7.5	99.3 d	4.35 d 8	97.8 d
6'	1.29 dtd 13, 13, 4	-	1.29 dtd 13, 13, 4	-	2^G	3.39 dd 9, 7.5	73.5 d	4.98 dd 9.5, 8	71.3 d
7	2.35 da 12.5	38.2 t	2.34 ddd 13, 4, 2.5	38.2 t	3^G	3.48 t 9	76.6 d	5.15 t 9.5	73.1 d
7'	1.85 td 12.5, 4.5	-	1.84 td 13, 4.5	-	4^G	3.61 t 9	70.2 d	5.05 t 9.5	68.8 d
8	-	148.3 s	-	148.0 s	5^G	3.21 da 9	75.2 d	3.61 ddd 9.5, 5.5, 2.5	71.7 d
9	1.37 m	52.5 d	1.32 m	52.4 d	6^G	3.83 dd 12.5, 3.5	62.2 t	4.23 dd 12, 5.5	
10	-	39.3 s	-	39.3 s	6'^G	3.83 dd 12.5, 3	-	4.10 dd 12, 2.5	62.3 t
11	1.76 m	27.0 t	1.69 m	26.9 t	1^E	-	173.0 s	-	172.8 s
11'	1.65 m	-	1.69 m	-	2^E	2.19 d 7	43.5 t	2.20 d 7	43.5 t
12	4.24 dd 11, 4	82.3 d	4.19 dd 9.5, 7.5	82.9 d	3^E	2.10 hept 7	25.7 d	2.11 hept 7, 6.5	25.7 d
13	-	138.5 s	-	138.6 s	4^E 5^E	0.97 d 7	22.5 c	0.98 d 6.5	22.5 c
14	5.38 t 7	125.2 d	5.38 dd 7, 1.5	124.9 d	OAc			2.08 s 2.01 s 2.01s 1.99 s	169.2 170.3 169.4 170.6

*Los desplazamientos están dados en ppm relativas al TMS. Los espectros se determinaron en CDCl_3 , s = singulete, d = doblete, t = triplete, c = cuarteto, a = señal ancha, m = multiplete.

^aDeterminados a 500 MHz, ^bDeterminados a 125 MHz.

El último de los compuestos aislados (**VI**) resultó una withanólida, en su espectro de RMN ^{13}C (espectro 19) se observan señales para 30 carbonos, dos de ellas asignadas por su desplazamiento químico a grupos carbonilo, las restantes 28 a 6 metilos, 6 metilenos, 9 metinos y 7 carbonos no protonados

En el espectro de RMN ^1H (espectro 20) se observan dos señales en δ 5.91 (dd $J = 10, 2$ Hz) y δ 6.67 (ddd $J = 10, 5, 2$, Hz) que se atribuyen por su desplazamiento a los protones H-2 y H-3 de una cetona α,β -insaturada. Se observan también 2 señales en δ 2.54 (dd $J = 20, 5$ Hz) y δ 3.57 (dt $J = 20, 2.5$ Hz) que deben ser parte de un metileno. Estas señales se asignaron a H4 y H4'. En el espectro de RMN ^{13}C se observan las señales que confirman lo anterior. La primera un singulete en δ 201.5 atribuido al carbonilo de la cetona, C1. Se observan dos dobletes en δ 128.5 y δ 141.7 así como un triplete en δ 37.3. Estas señales se asignaron a C2, C3 y C4 respectivamente.

El compuesto **VI** contiene una δ -lactona α,β -no saturada, la presencia de esta funcionalidad se confirma en su espectro de RMN ^1H , que muestra una señal doble de doble en δ 4.30 asignada al protón base de lactona, H22. Se observan además dos singuletes en δ 1.89 y δ 1.97, éstos se atribuyen por su desplazamiento químico a los protones de los metilos vinílicos 27 y 28 respectivamente.

En el espectro de RMN ^{13}C se observa la señal del carbonilo de la δ -lactona α,β -no saturada, C26, en δ 166.2, mientras que las señales de los carbonos vinílicos, C25 y C24, aparecen en δ 122.2 y δ 148.9, respectivamente. Se observan las señales de dos metilos en δ 12.4 y 20.6 señales asignadas a los carbonos 27 y 28. La señal del carbono base de lactona, C22, aparece en δ 81.4 y la del metileno alílico, C23, en δ 31.6.

La señal (t, $J = 2.5$ Hz) en δ 4.09 se atribuye a un protón base de alcohol y se asignó a H6 por las interacciones con H7 y H7' observados en el espectro COSY (espectro 21), así como por las correlaciones hidrógeno-carbono a 2 y 3 enlaces observados en el espectro HMBC (espectro 22) con C8, C10 y C5. La señal de este último carbono (C5) aparece en δ 80.5 y corresponde a un carbono no protonado, lo que indica que debe estar unido a un segundo grupo hidroxilo. Las señales para carbonos no protonados en δ_c 75.1 y 83.3 revelaron la presencia de otros dos alcoholes terciarios en la molécula. El primero se situó en C20 (δ 75.1) por las correlaciones con H22, H21 y H16 β . El segundo se localizó en C14 (δ 80.5) por las correlaciones que presenta este carbono con H12, H12' H16 α , H17, H18 y con un doblete en δ 5.06 ($J = 6.5$ Hz) que se atribuye a H15 y que por su desplazamiento se asigna a un protón base de éster.

El éster en C15 fue identificado como un acetato por las señales en δ_c 170.1, δ_c 21.7 y δ_H 2.07. Las correlaciones de H15 con H16 β y H16 α observadas en el espectro COSY, confirmaron lo anterior.

Tabla 4. Datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto VII*

	$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^b$		$^1\text{H}^a$	$^{13}\text{C}^b$
1	-	201.5 s	15	5.06 d 6.5	80.4 d
2	5.91 dd 10, 2	128.5 d	16	2.42 dt 15, 8	31.3 t
3	6.67 ddd 10, 5, 2	141.7 d	16'	1.64 dd 15, 10	-
4	3.57 dt 20, 2.5	37.3 t	17	1.85 dd 10, 8	54.2 d
4'	2.54 dd 20, 5	-	18	1.39 s	15.6 c
5	4.09 t 2.5	80.8 s	19	1.39 s	19.6 c
6	2.10 m	74.6 d	20	-	75.1 s
7	2.15 m	28.7 t	21	1.45 s	21.2 c
8	2.76 td 12, 4	33.6 d	22	4.30 dd	81.4 d
9	2.29 ddd 13.5, 7, 3.5	36.2 d	23	13.5, 3.5	31.6 t
10	-	53.2 s	23'	2.09 m	-
11	2.29 ddd 13.5, 7, 3.5	21.9 t	24	-	148.9 s
11'	1.33 m	-	25	-	122.2 s
12	2.12 m	40.3 t	26	-	166.2 s
12'	1.54 dt 13, 3.5	-	27	1.89 s	12.4 c
13	-	49.0 s	28	1.97 s	20.6 c
14	-	83.3 s	OAc	2.07 s	170.1 s 21.7 c

*Los desplazamientos están dados en ppm relativas al TMS. Los espectros se determinaron en CDCl_3 , s = singulete, d = doblete, t = triplete, c = cuarteto, a = señal ancha, m = multiplete.

^aDeterminados a 500 MHz, ^bDeterminados a 125 MHz.

La estereoquímica de la physapruina C se formuló con base en las interacciones observadas en el espectro NOESY. En la figura 6 se muestran las más significativas.

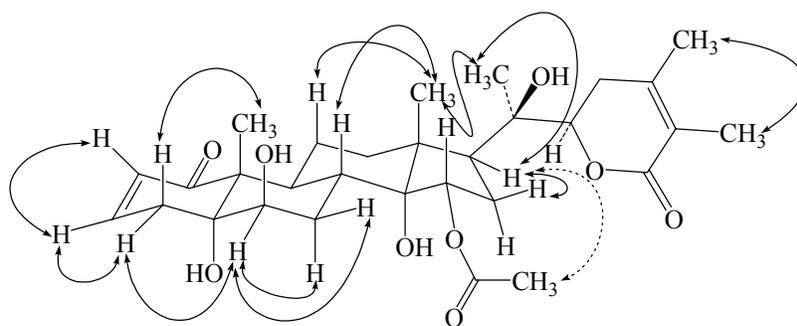
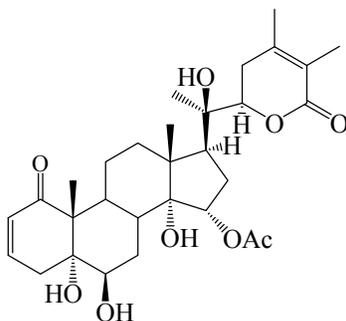


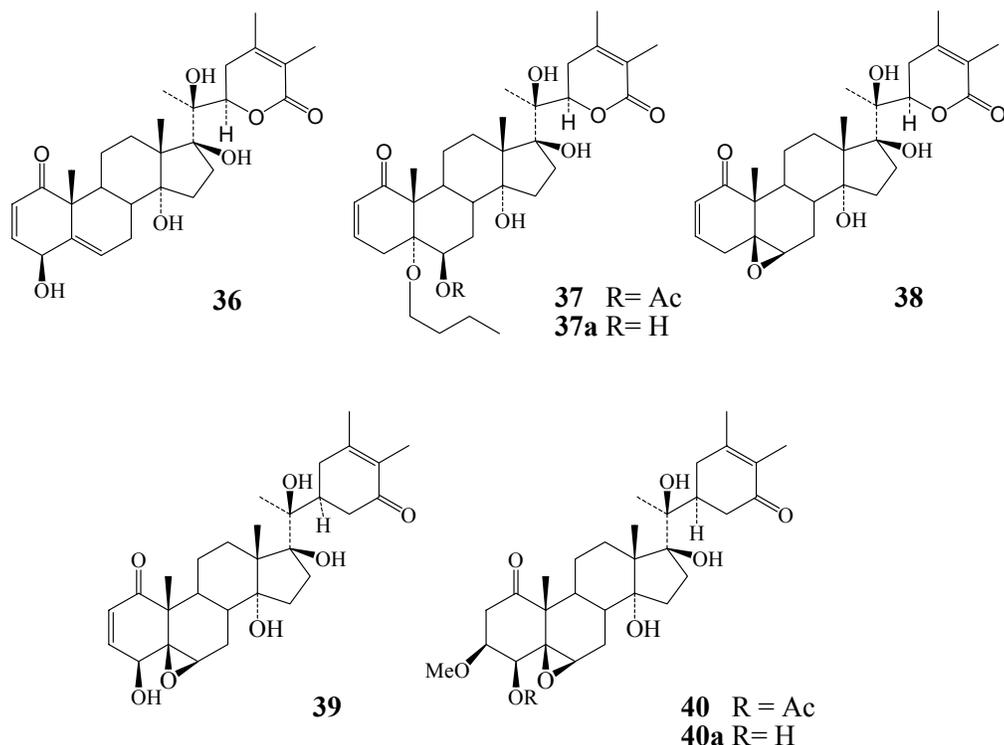
Figura 6. Estructura de la physapruina C en la que se muestran las principales interacciones observadas en el espectro NOESY.

De esta forma se propone la estructura **VII** para la physapruina C.



Physapruina C (VII)

En esta investigación se analizó el extracto hexánico de las partes aéreas de *Physalis pruinosa* L. Los compuestos aislados fueron siete, seis de ellos diterpenos labdánicos. Este tipo de sustancias no han sido reportadas en la literatura como constituyentes del género *Physalis*, sin embargo, en estudios recientes efectuados en nuestro laboratorio, se aislaron varios labdanos de *P. patula* y *P. coztomatl*. Lo anterior es relevante porque apunta a que los labdanos pueden ser, junto con los withaesteroides, marcadores químicos del género *Physalis*. Por otra parte, en este estudio también se aisló una withanólida, diferente a las aisladas de las partes aéreas de una población de *Physalis pruinosa*⁽²⁸⁾ cultivada en Japón. En ese estudio se analizó el extracto de BuOH-AcOEt y se aislaron physapruina A (**36**), physapruina B (**37**), withanólida E (**38**), 4 β -acetoxiwithanólida E (**39**) y 2,3-dihidro-3-metoxi-4 β -hidroxiwithanólida E (**40**).



En nuestro caso el estudio realizado corresponde a la fracción hexánica, por lo que aún resta establecer la composición química de la fracción de acetato de etilo y una vez hecho esto comparar la composición de las dos poblaciones.

Cabe mencionar que en otro estudio⁽³¹⁾ se analizó la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos y acuosos de diferentes partes de *P. pruinosa* por el método de difusión en disco. Los extractos probados fueron (1) metanólico de cálices, (2) AcOEt de frutos, (3) acuoso de frutos, (4) AcOEt de resina de frutos, (5) hexánico de hojas, ramas y flores, (6) AcOEt de hojas, ramas y flores, (7) acuoso de hojas, ramas y flores. Las bacterias blanco fueron cepas clínicas y de referencia de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*.

La actividad se concentró en los extractos orgánicos de polaridad media, es decir los extractos 4 y 6, mientras que los que mostraron menor actividad fueron los acuosos y el hexánico. Fue posible establecer que existen compuestos con actividad antibacteriana en todas las partes de la planta que fueron evaluadas.

9. CONCLUSIONES

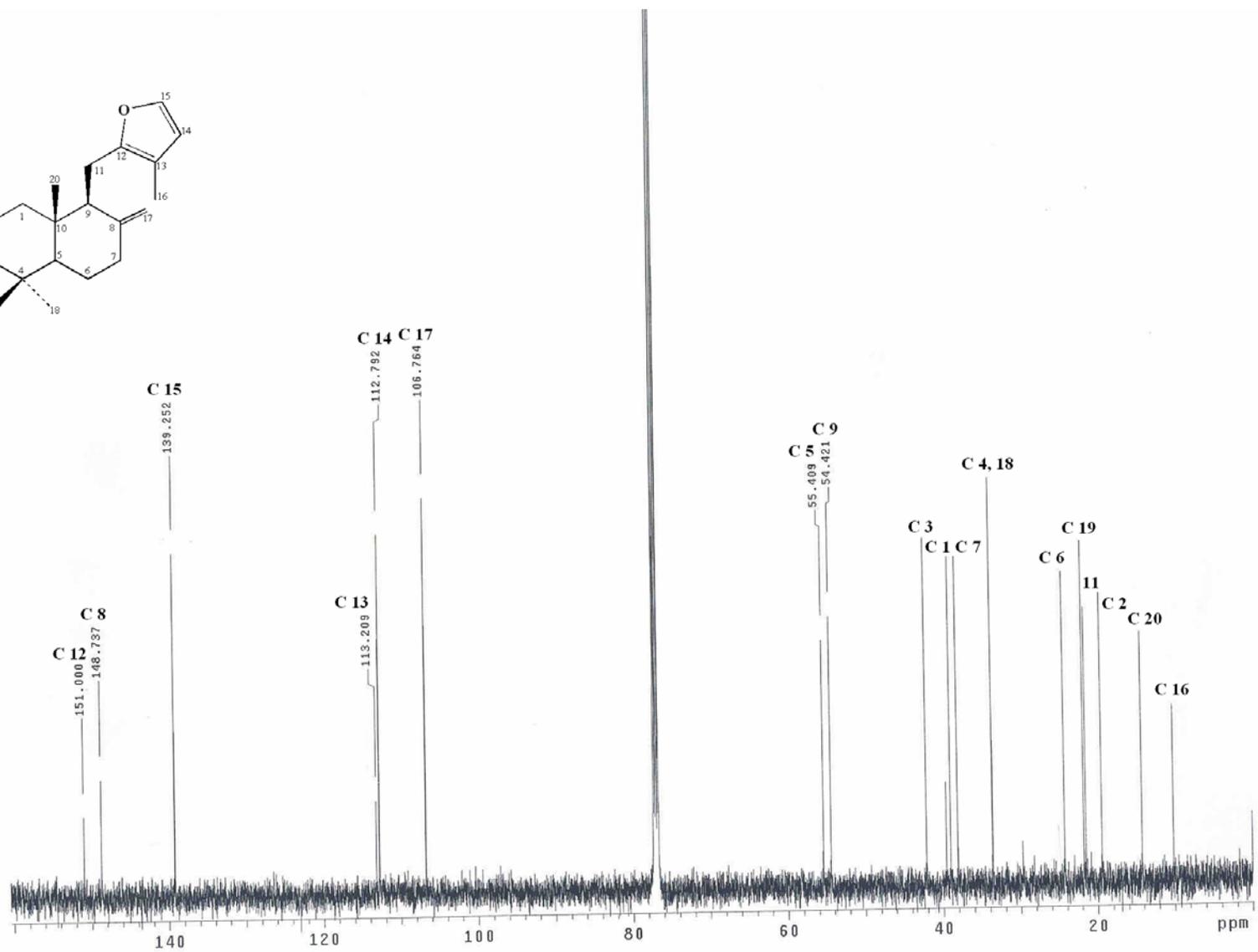
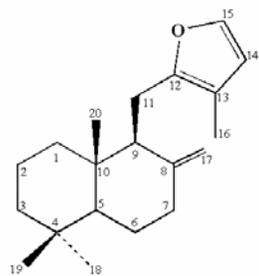
Del extracto hexánico de hojas, ramas y flores de *Physalis pruinosa* L. se aislaron seis diterpenos labdánicos y una withanólida. Todos los labdanos aislados presentan oxidado el carbono 12, hecho que no es frecuente en este tipo de compuestos y que parece ser característico de los aislados de *Physalis*.

La presencia de diterpenos labdánicos se observó en las especies *P. coztomatl* y *P. patula* estudiadas también en nuestro laboratorio. Lo anterior, de ser constante en otras especies del género, sugeriría que los labdanos junto con los withaesteroides son los marcadores químicos del género *Physalis*.

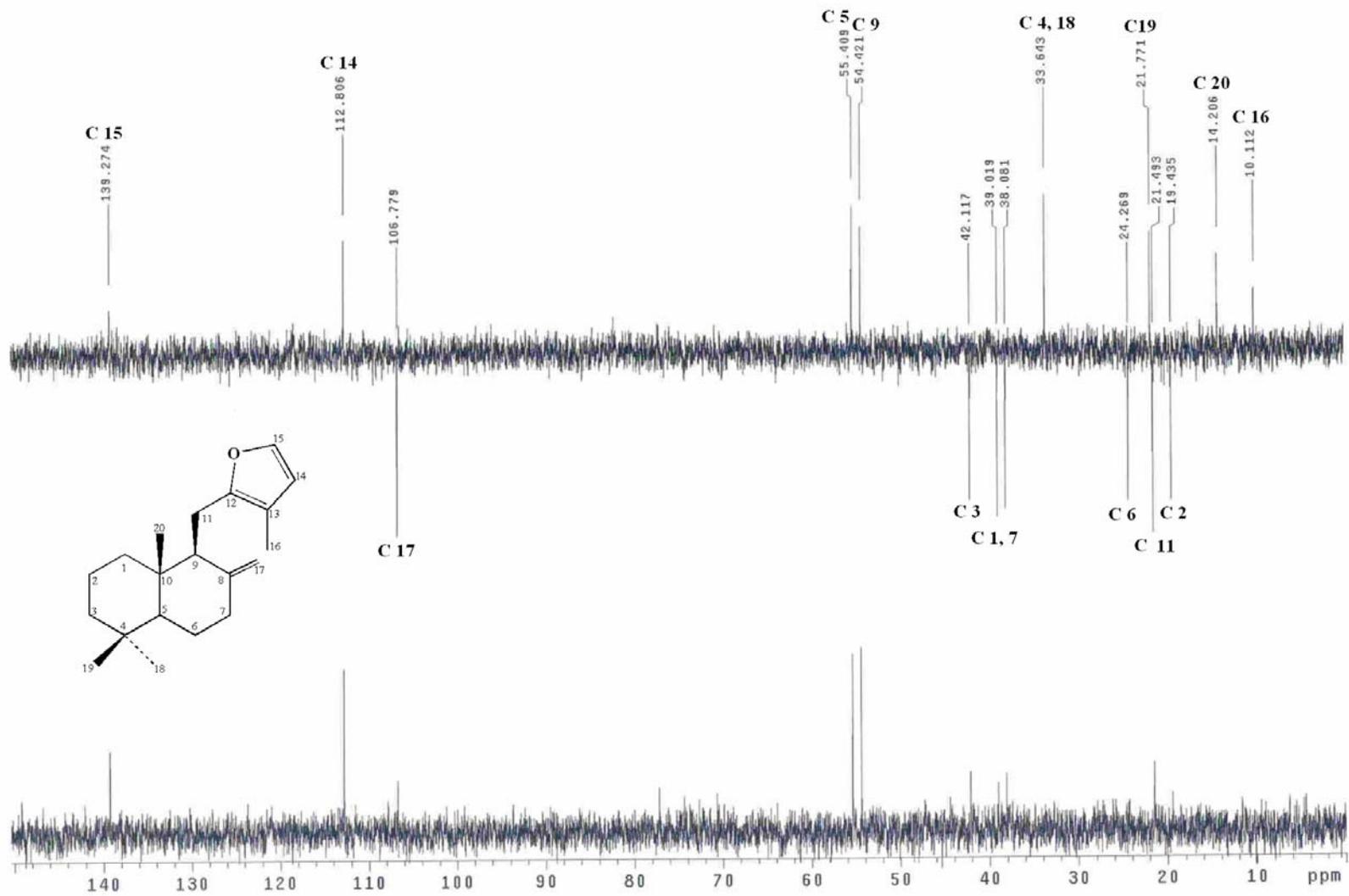
El aislamiento y elucidación estructural de los diterpenos labdánicos, cinco de ellos nuevos, y la withanólida también nueva, son una aportación al conocimiento del género *Physalis*.

APÉNDICE

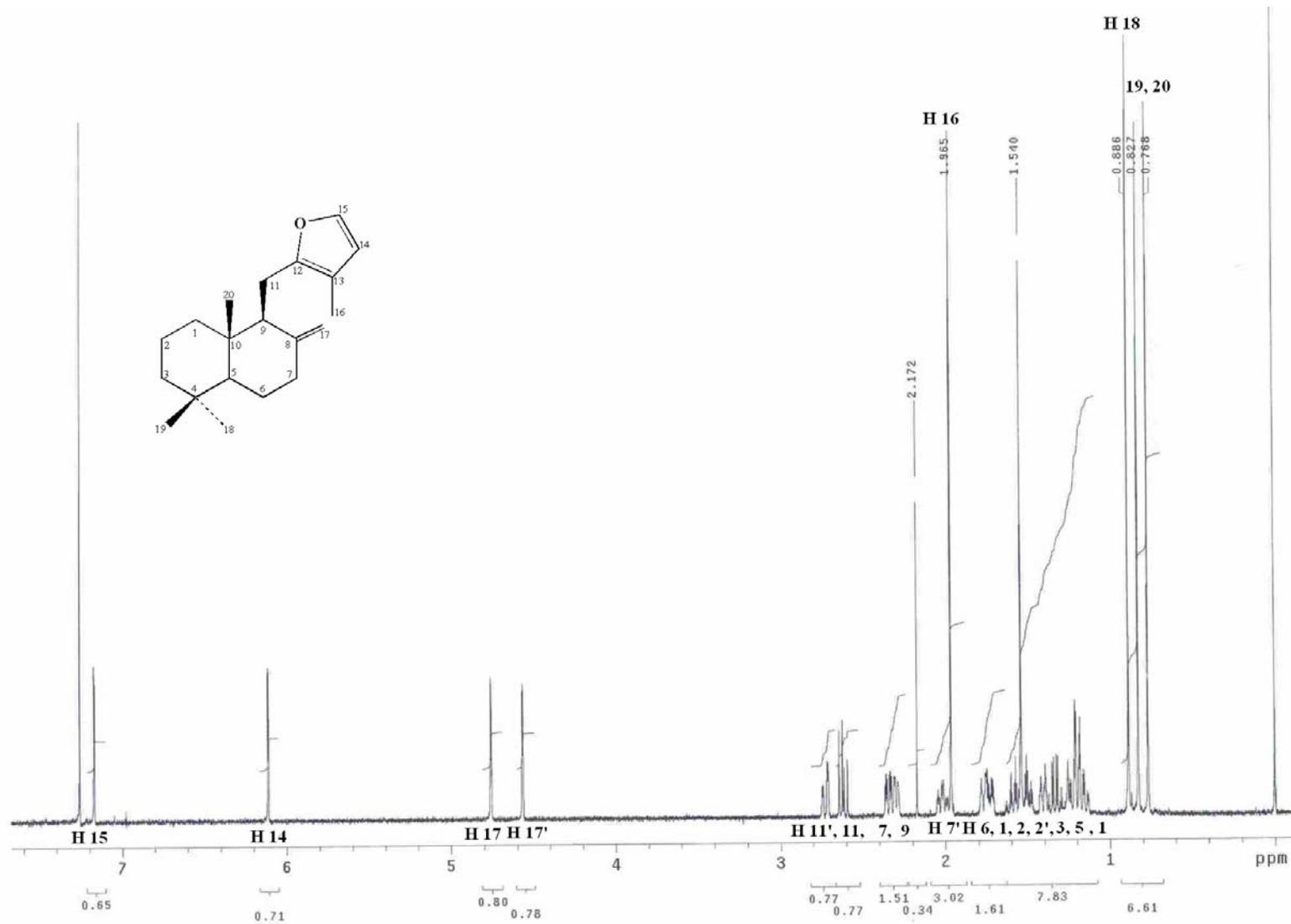
ESPECTROS



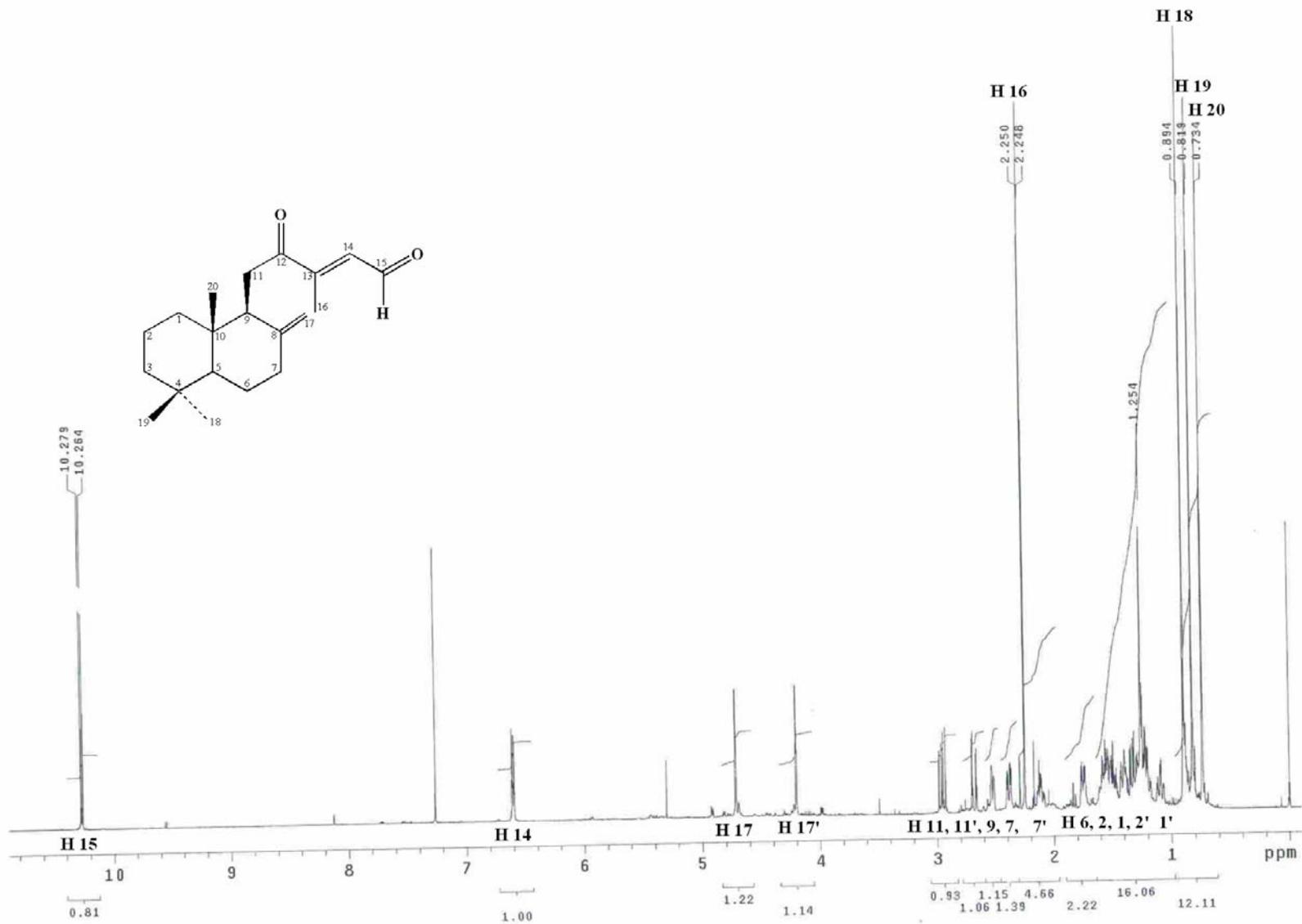
ESPECTRO 1. RMN ^{13}C de pumilóxido (I)



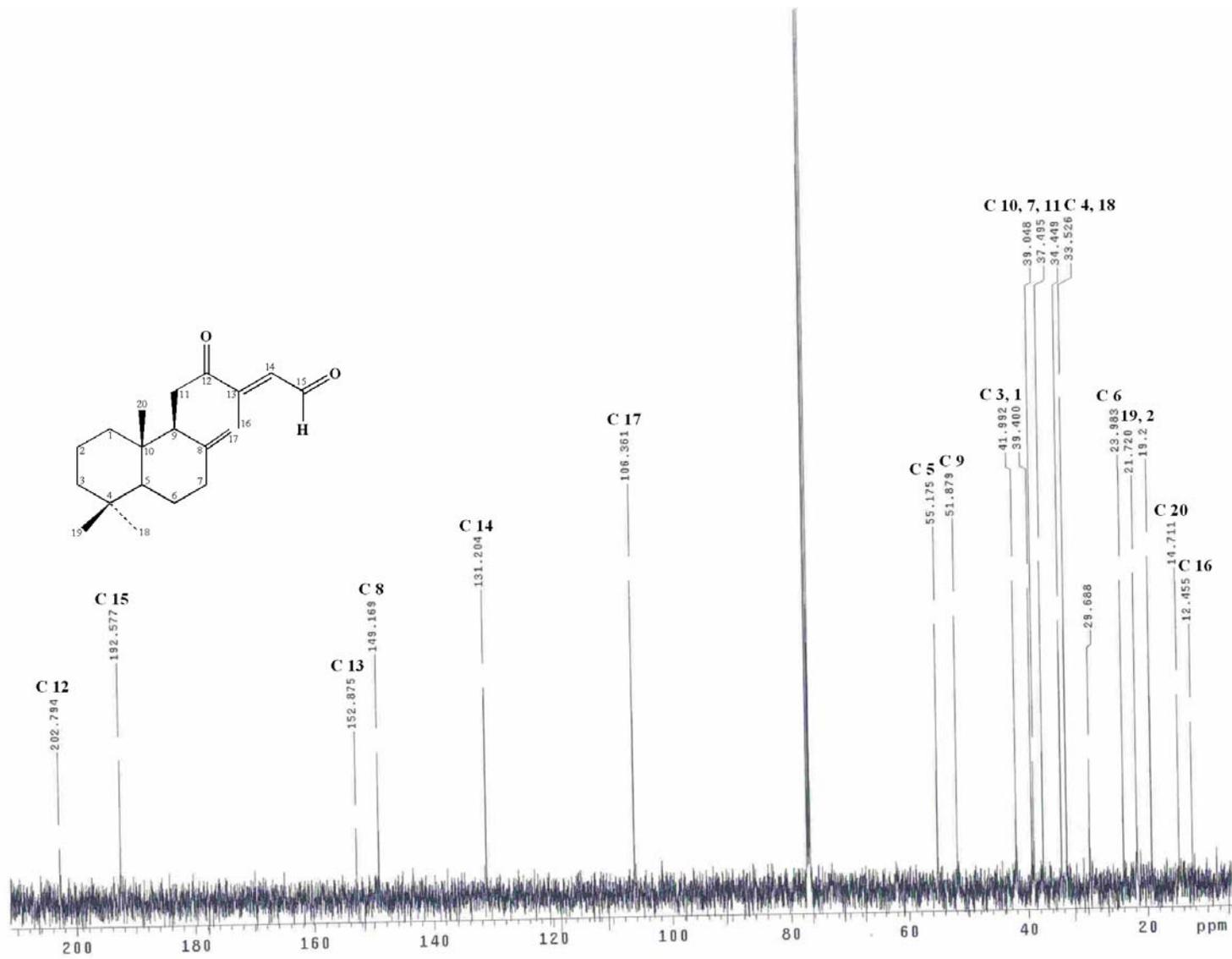
ESPECTRO 2. DEPT de pumilóxido (I)



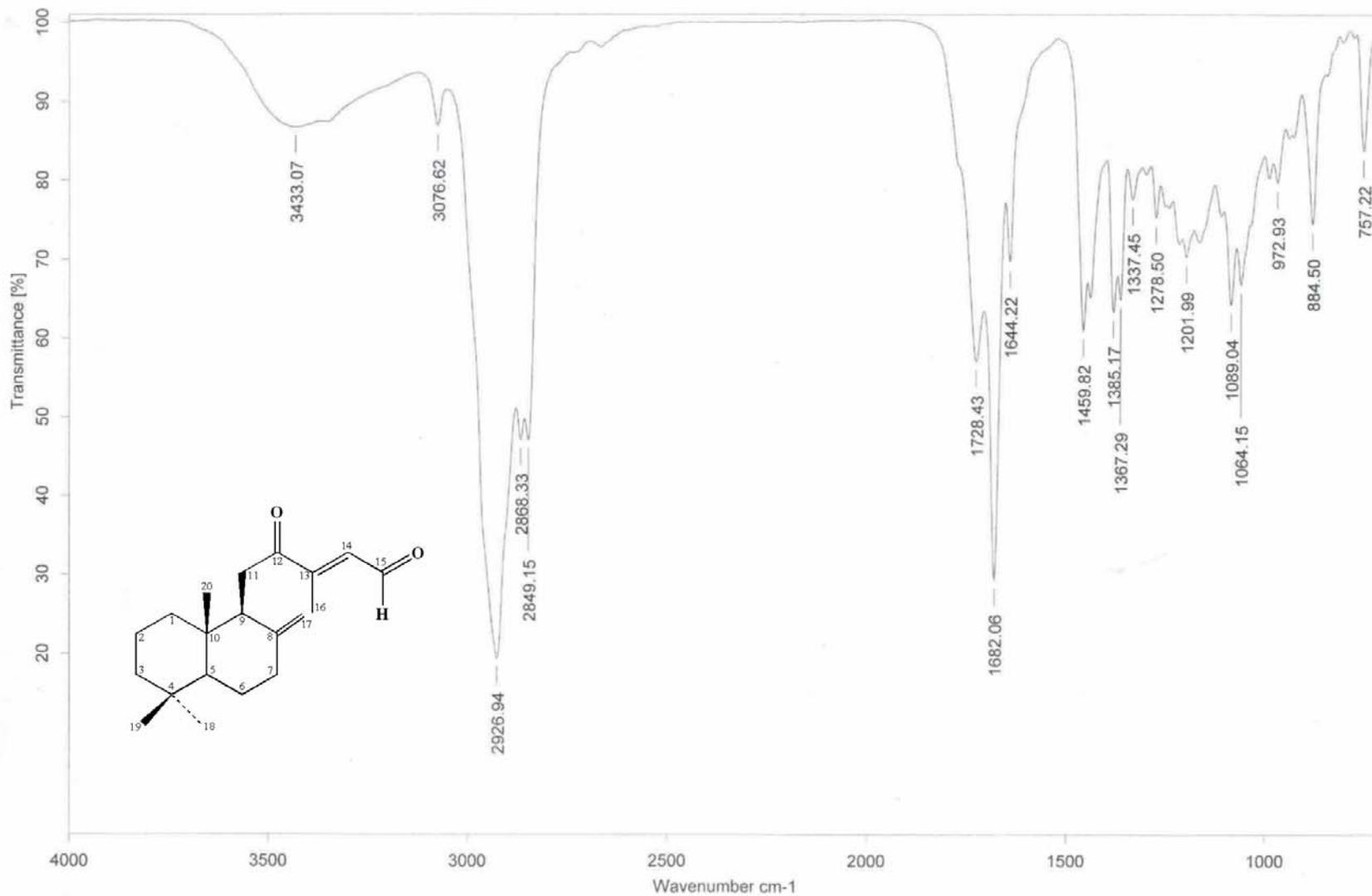
ESPECTRO 3. RMN ¹H de pumilóxido (I)



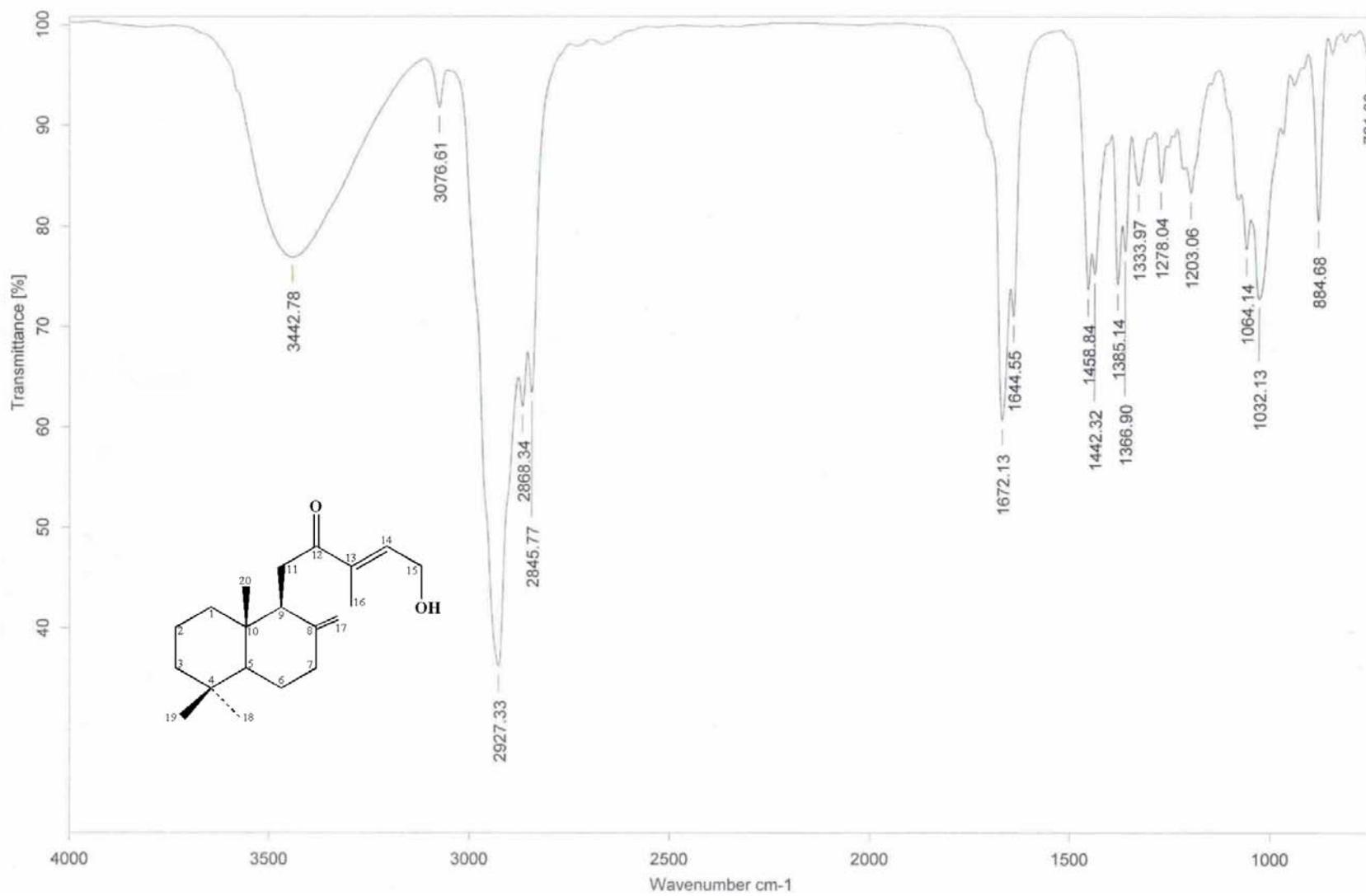
ESPECTRO 4. RMN ¹H de pruinonal (II)



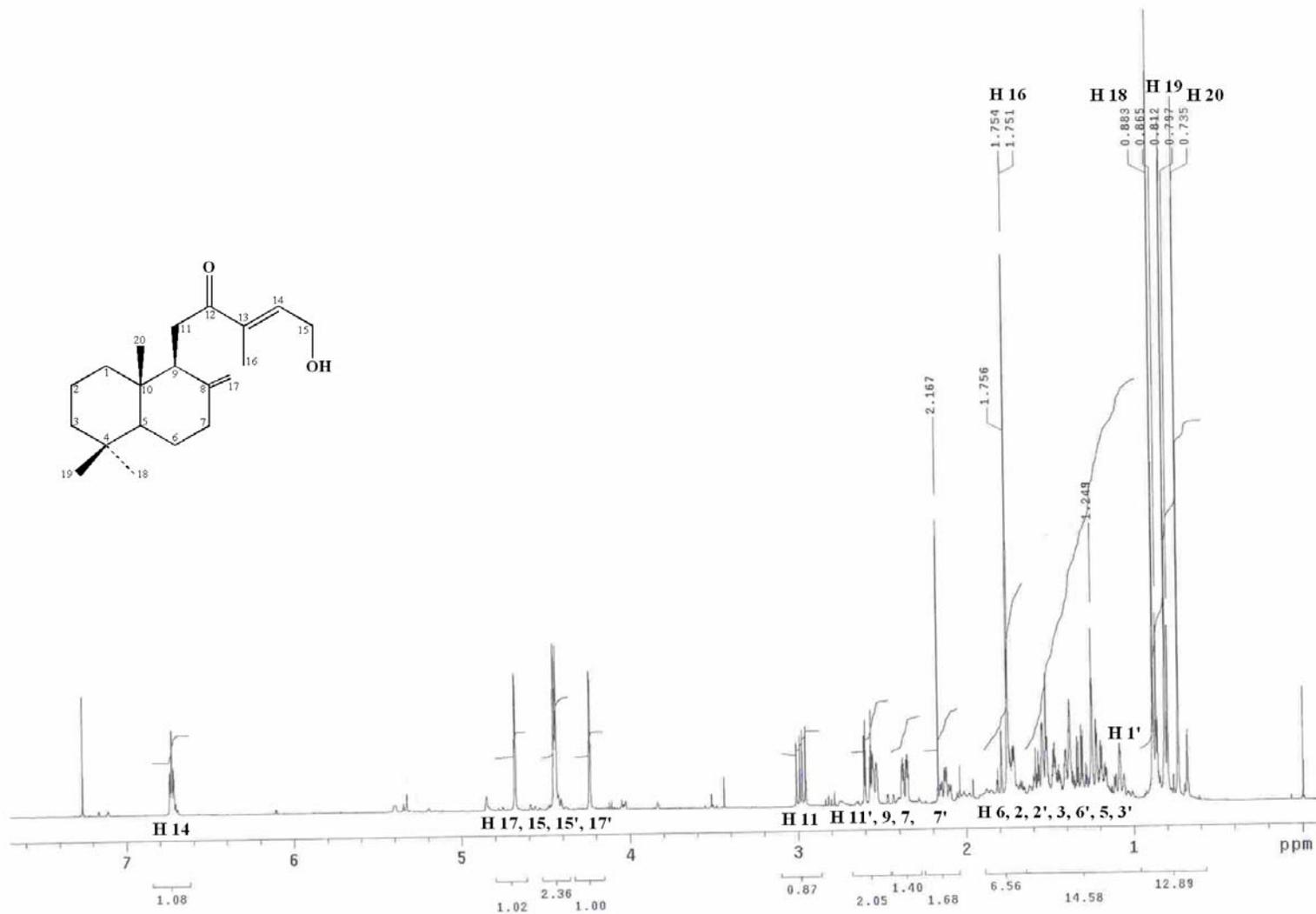
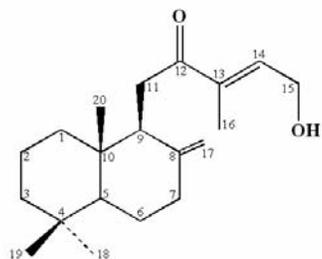
ESPECTRO 5. RMN ¹³C de pruinonal (II)



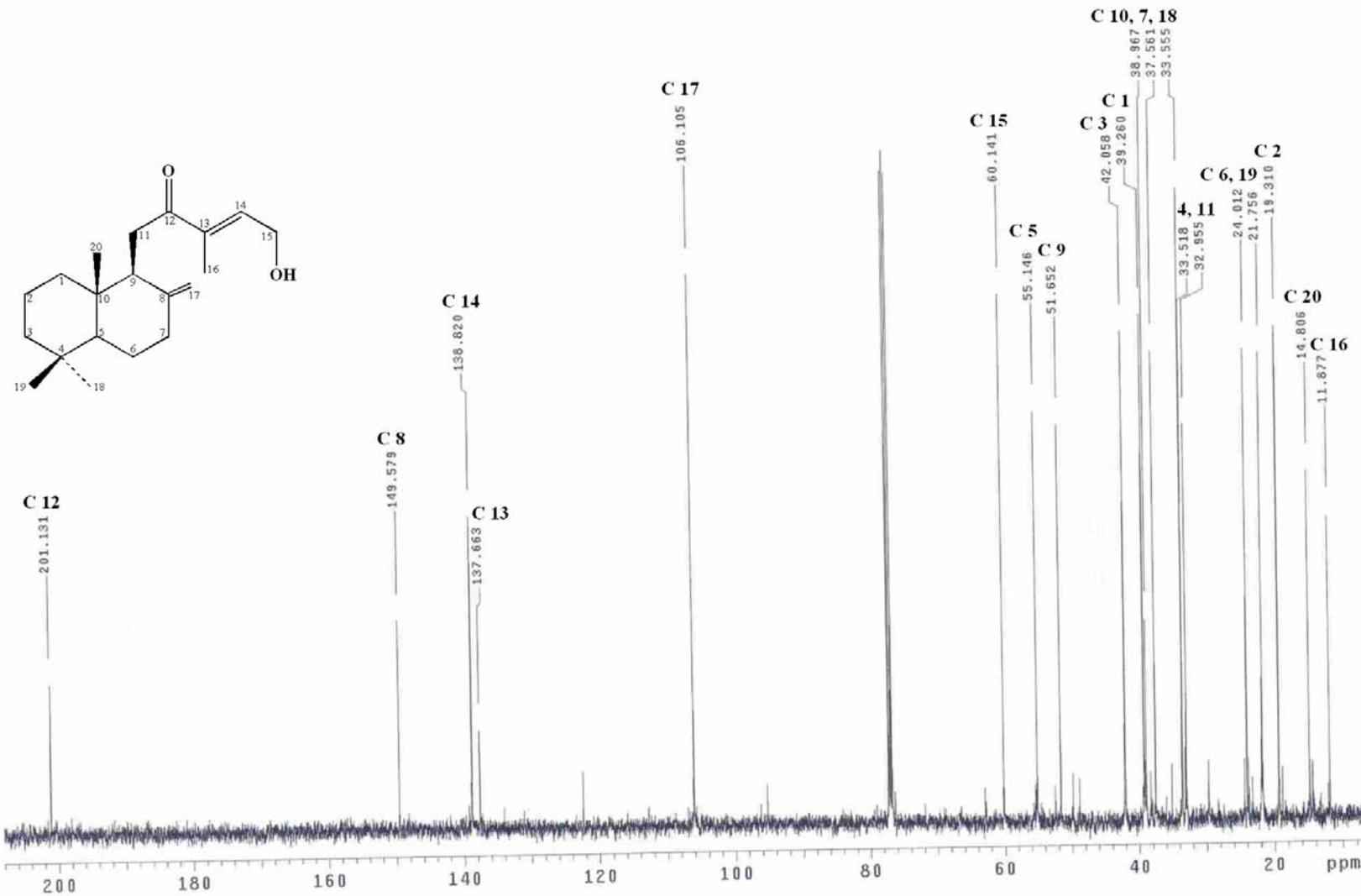
ESPECTRO 6. IR de pruinonal (II)



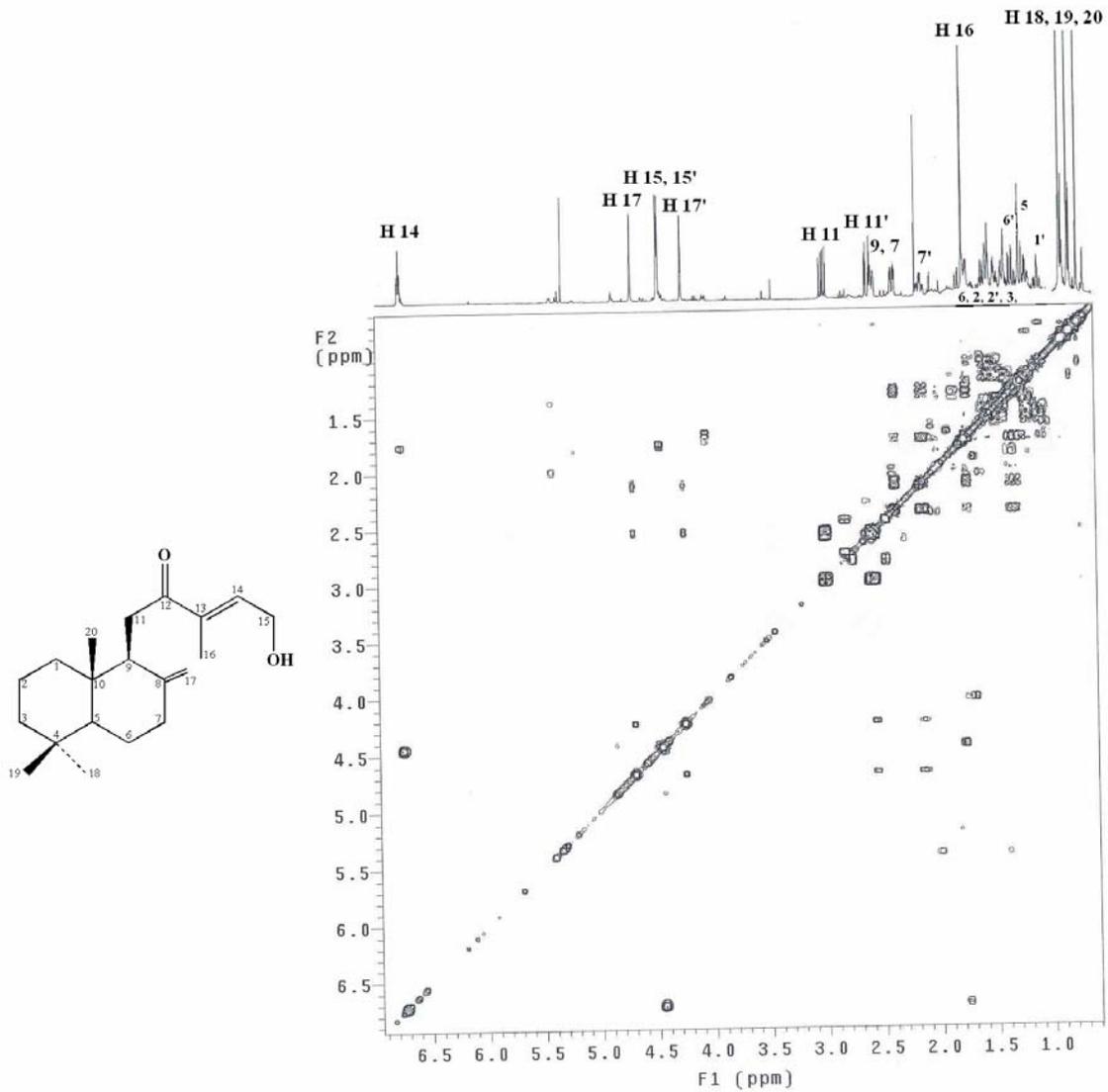
ESPECTRO 7. IR de pruinolona (III)



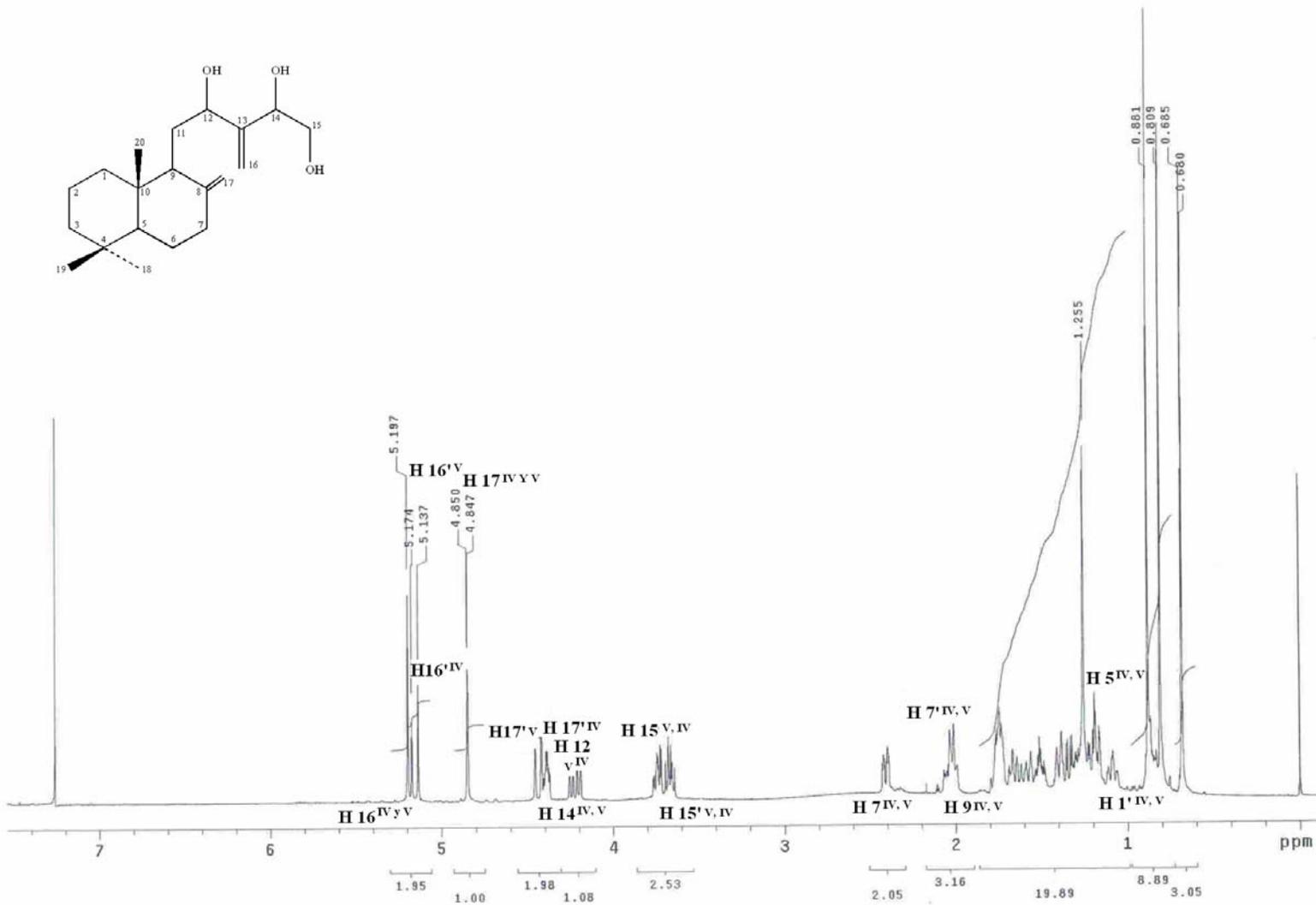
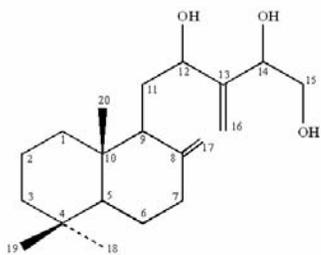
ESPECTRO 8. RMN ^1H de pruinolona (III)



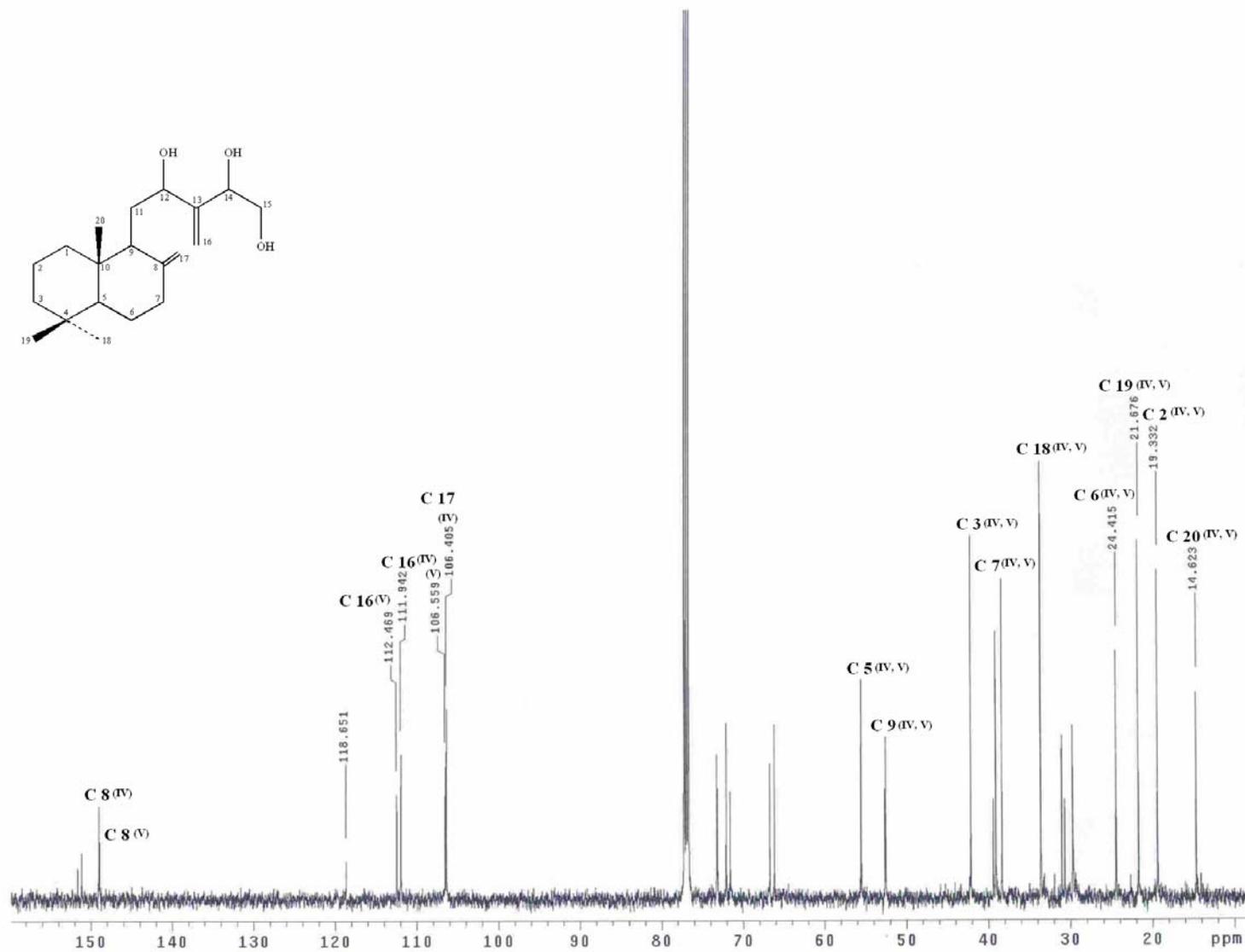
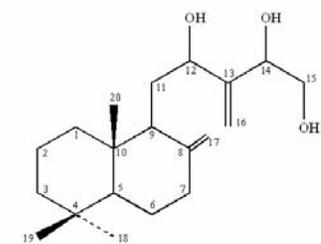
ESPECTRO 9. RMN ¹³C de pruinolona (III)



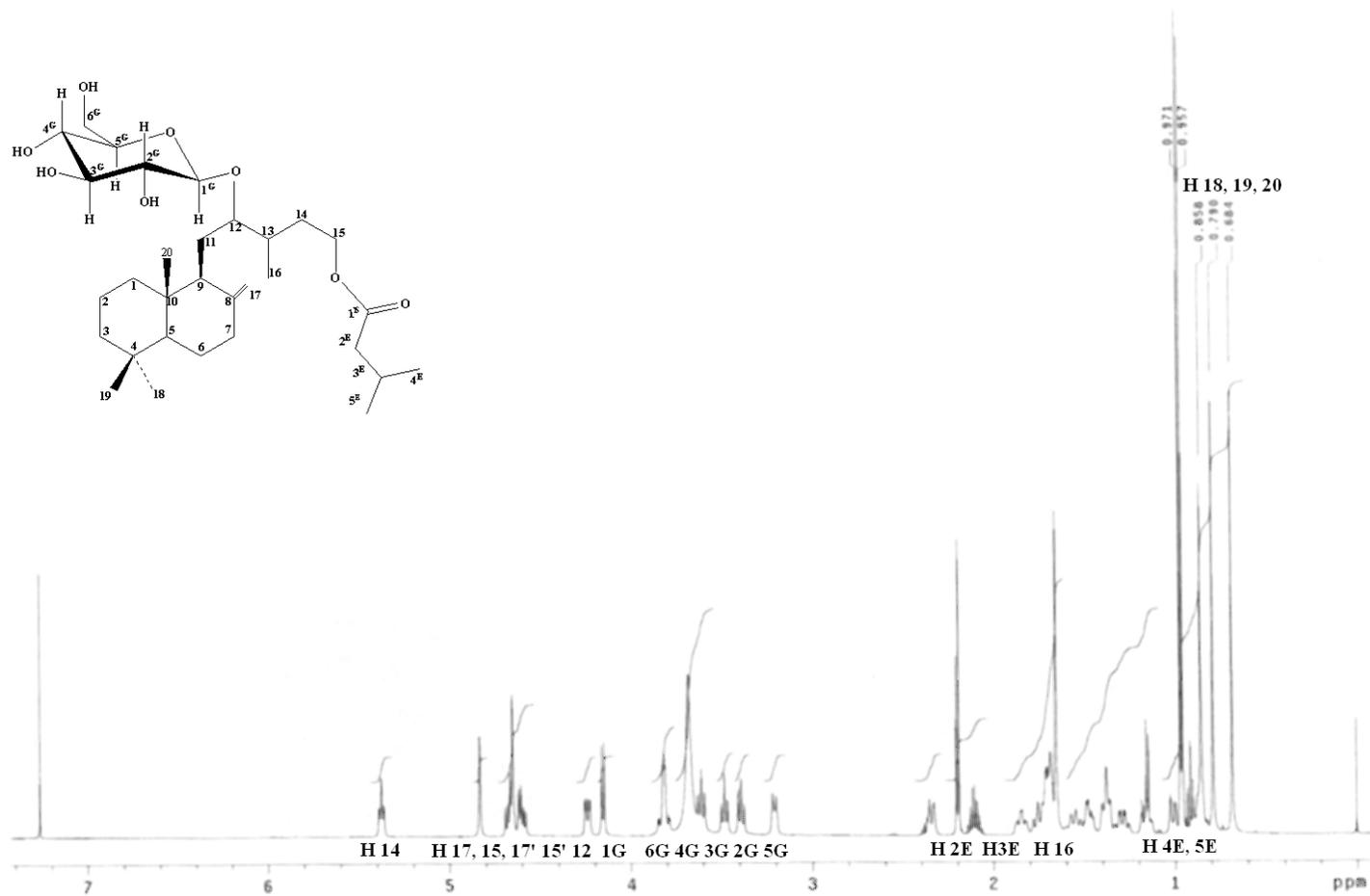
ESPECTRO 10. COSY de pruinolona (III)



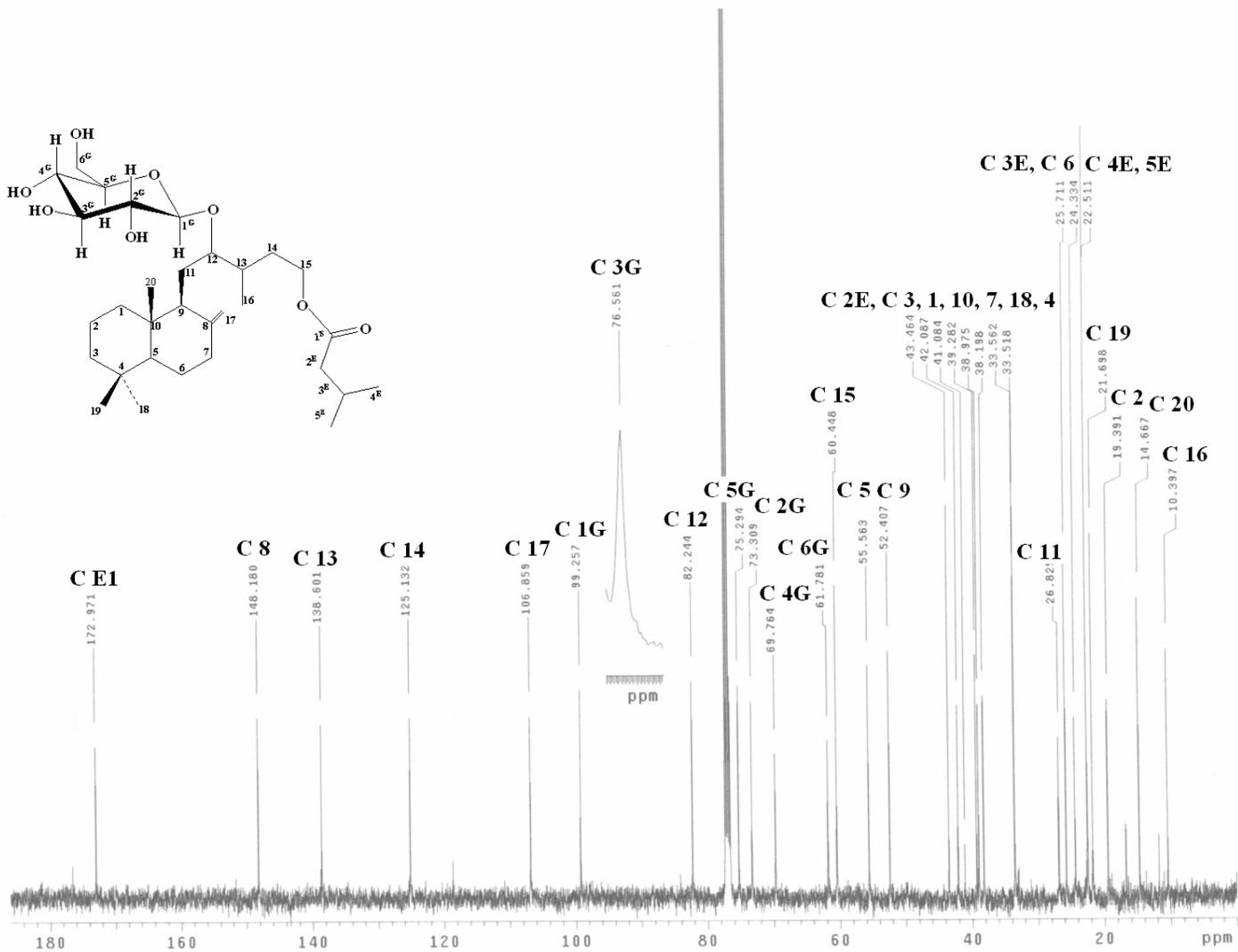
ESPECTRO 11. RMN ¹H de pruinotriol (IV, V)



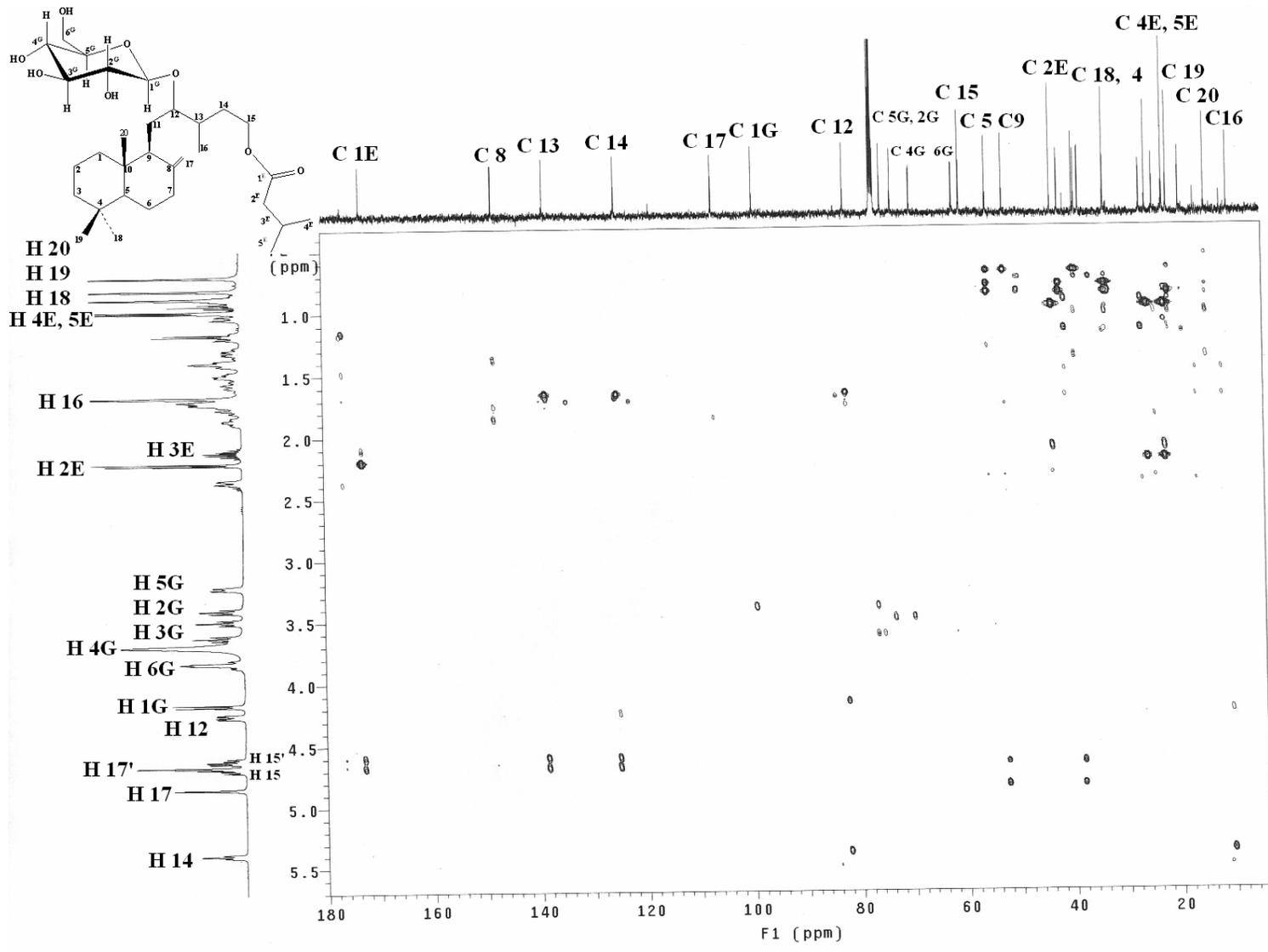
ESPECTRO 12. RMN ^{13}C de pruinotriol (IV, V)



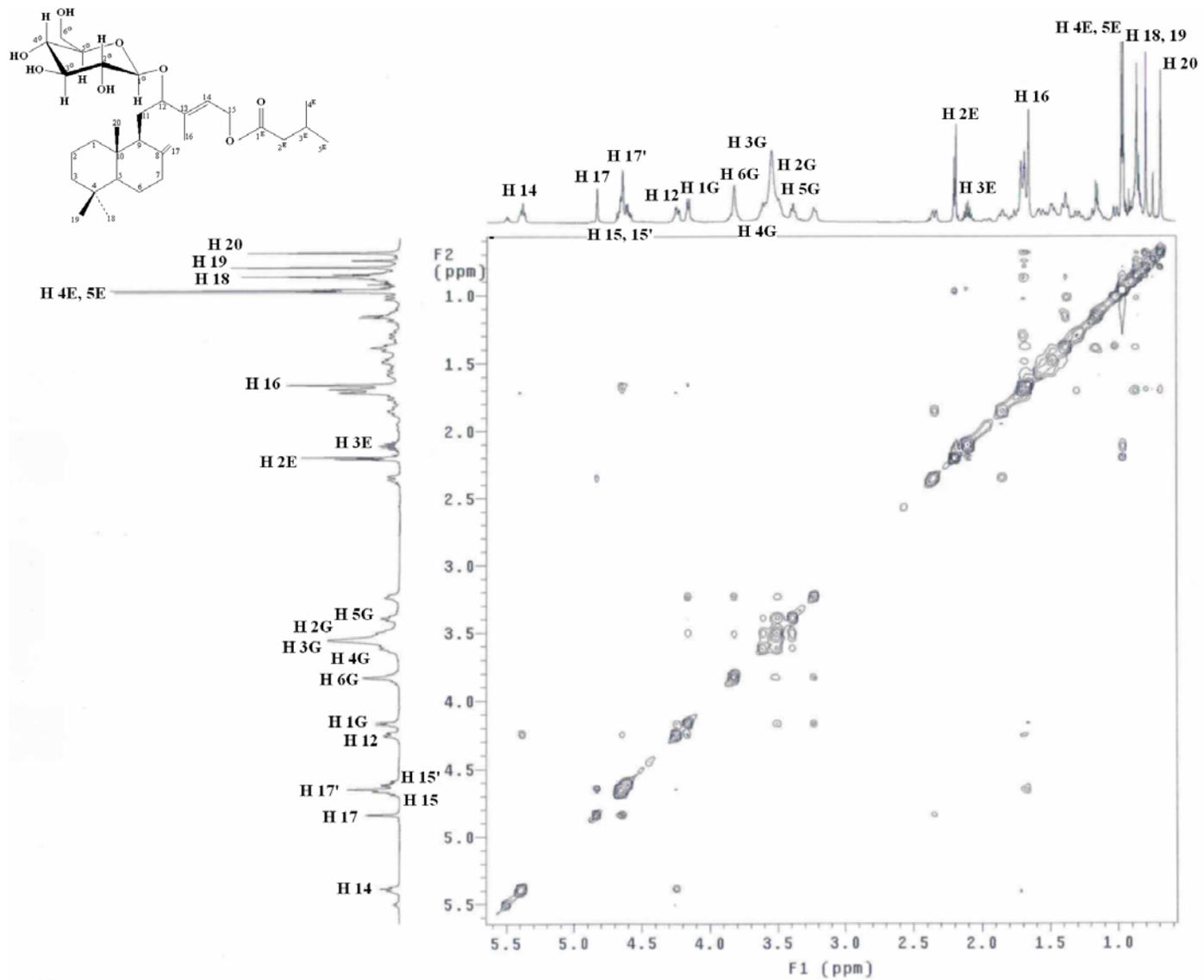
ESPECTRO 13. RMN ¹H de pruinósido (VI)



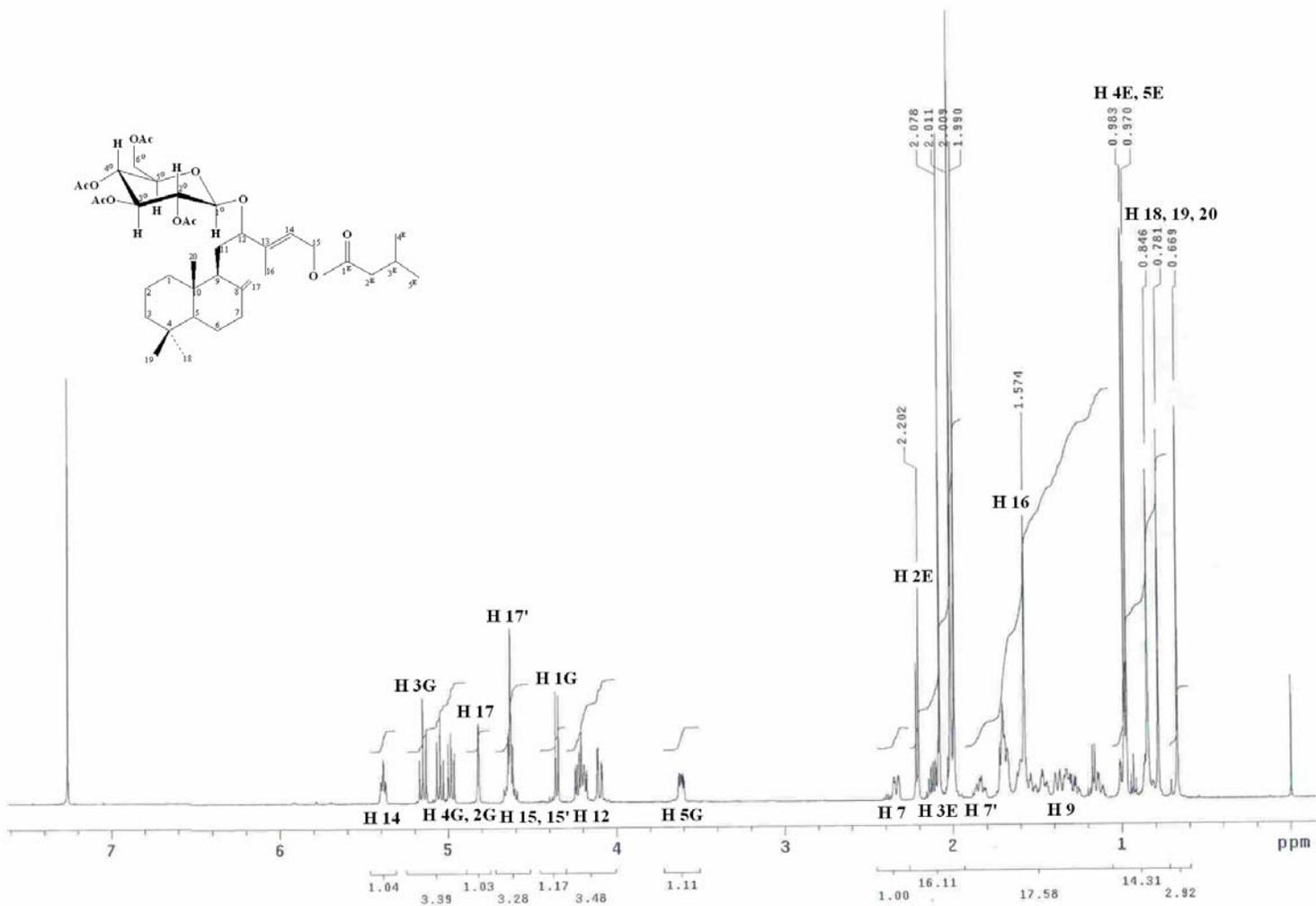
ESPECTRO 14. RMN ^{13}C de pruinósido (VI)



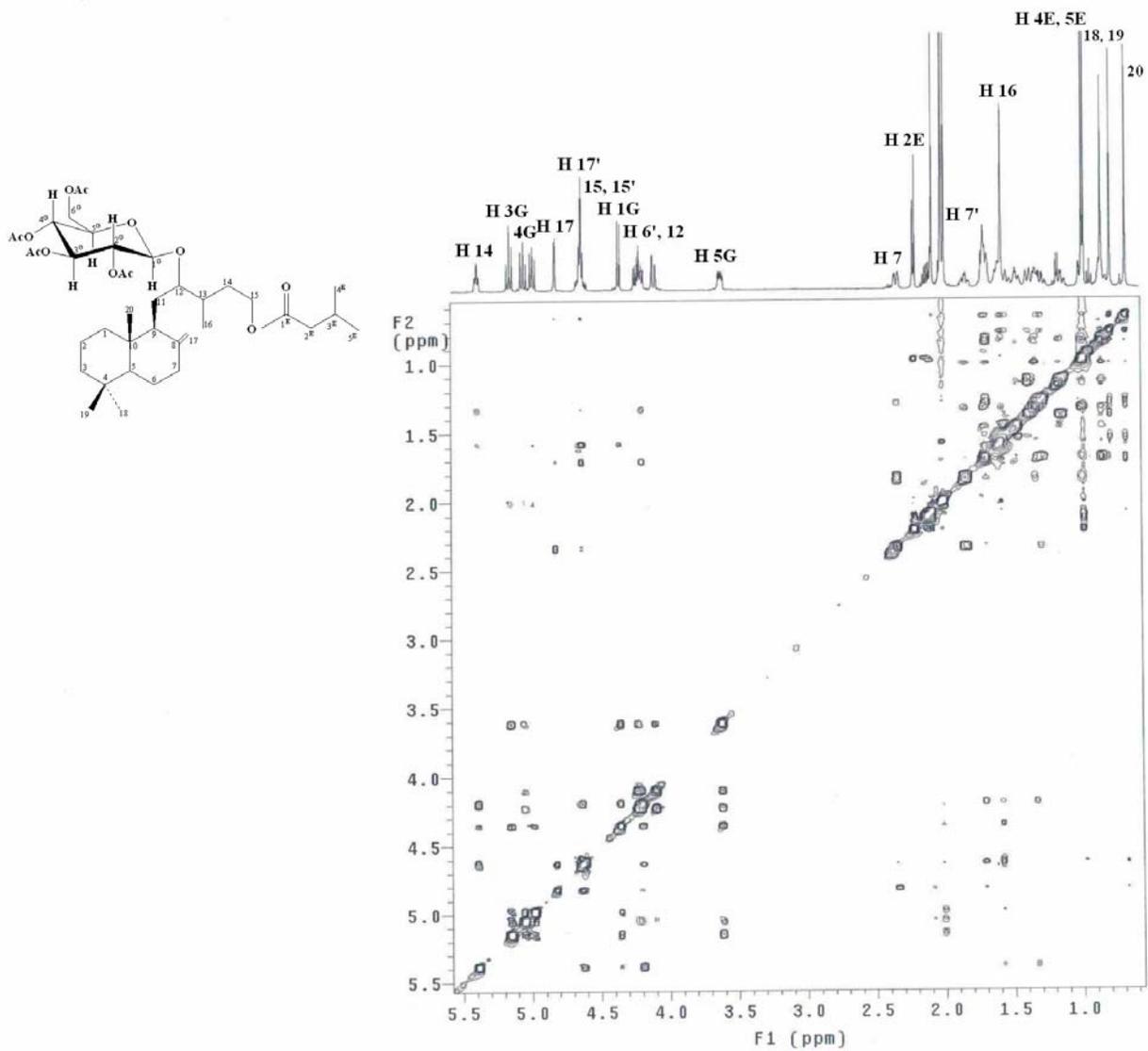
ESPECTRO 15. HMBC de pruinósido (VI)



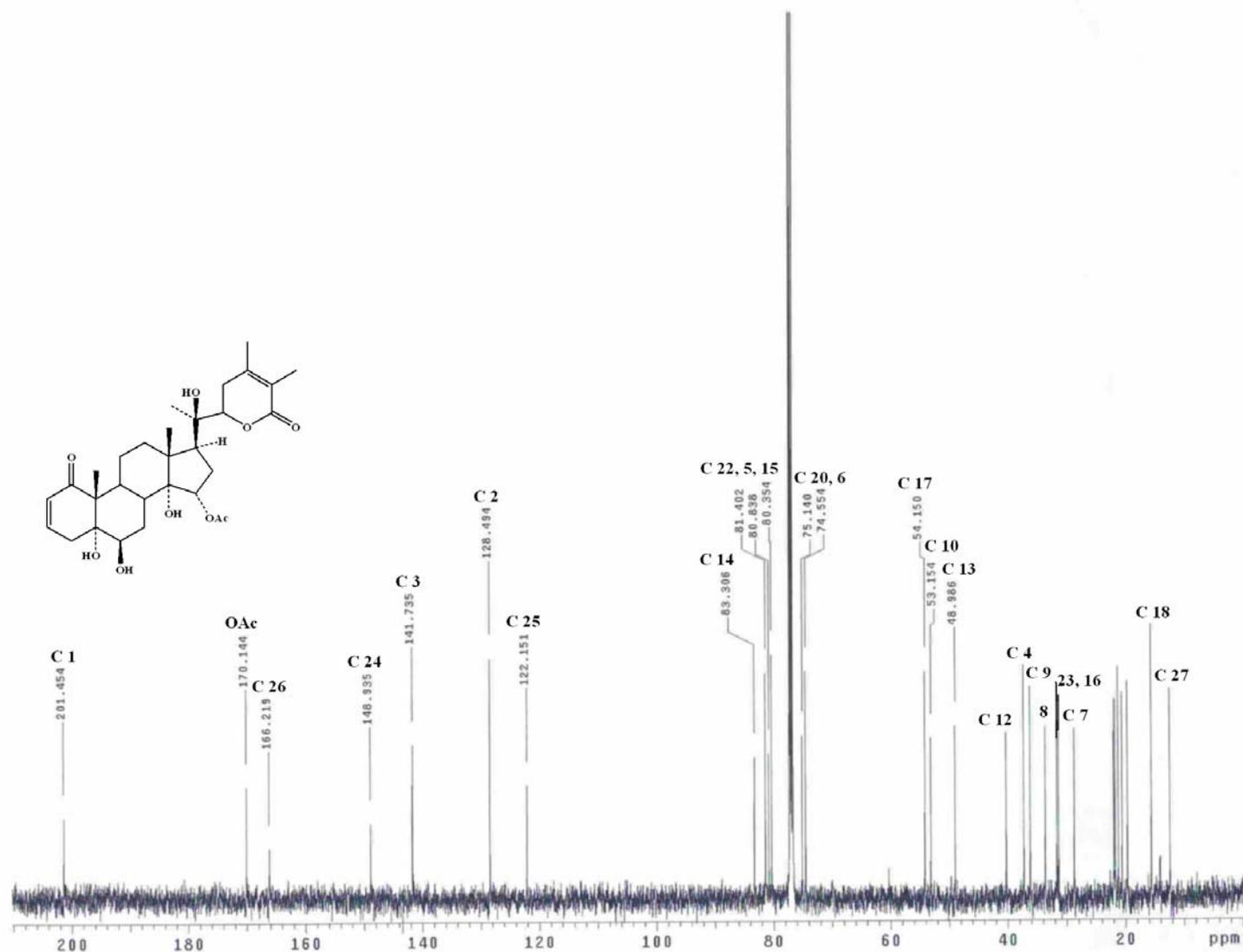
ESPECTRO 16. NOESY de pruinósido (VI)



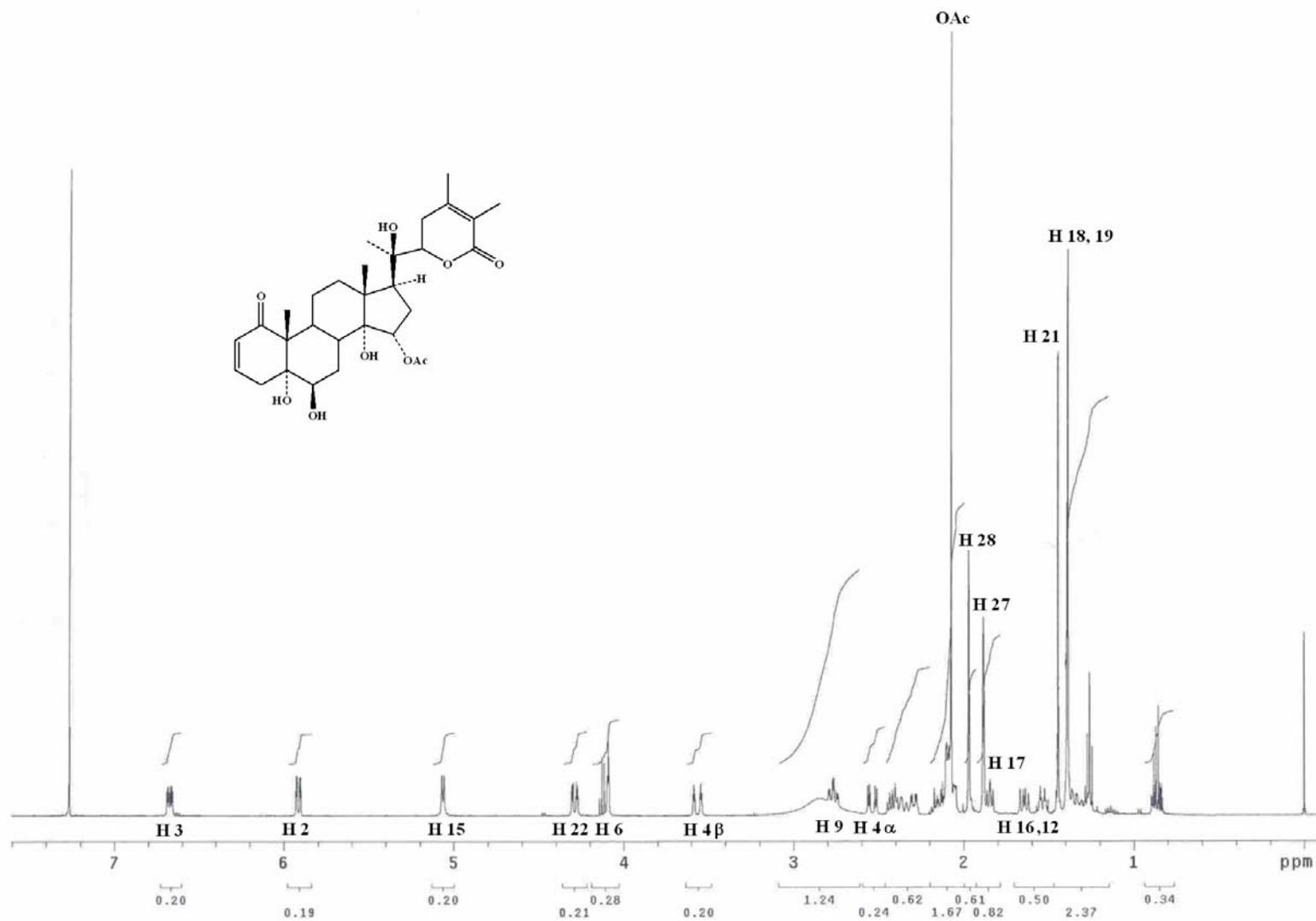
ESPECTRO 17. RMN ¹H de tetracetilpruinósido (VIa)



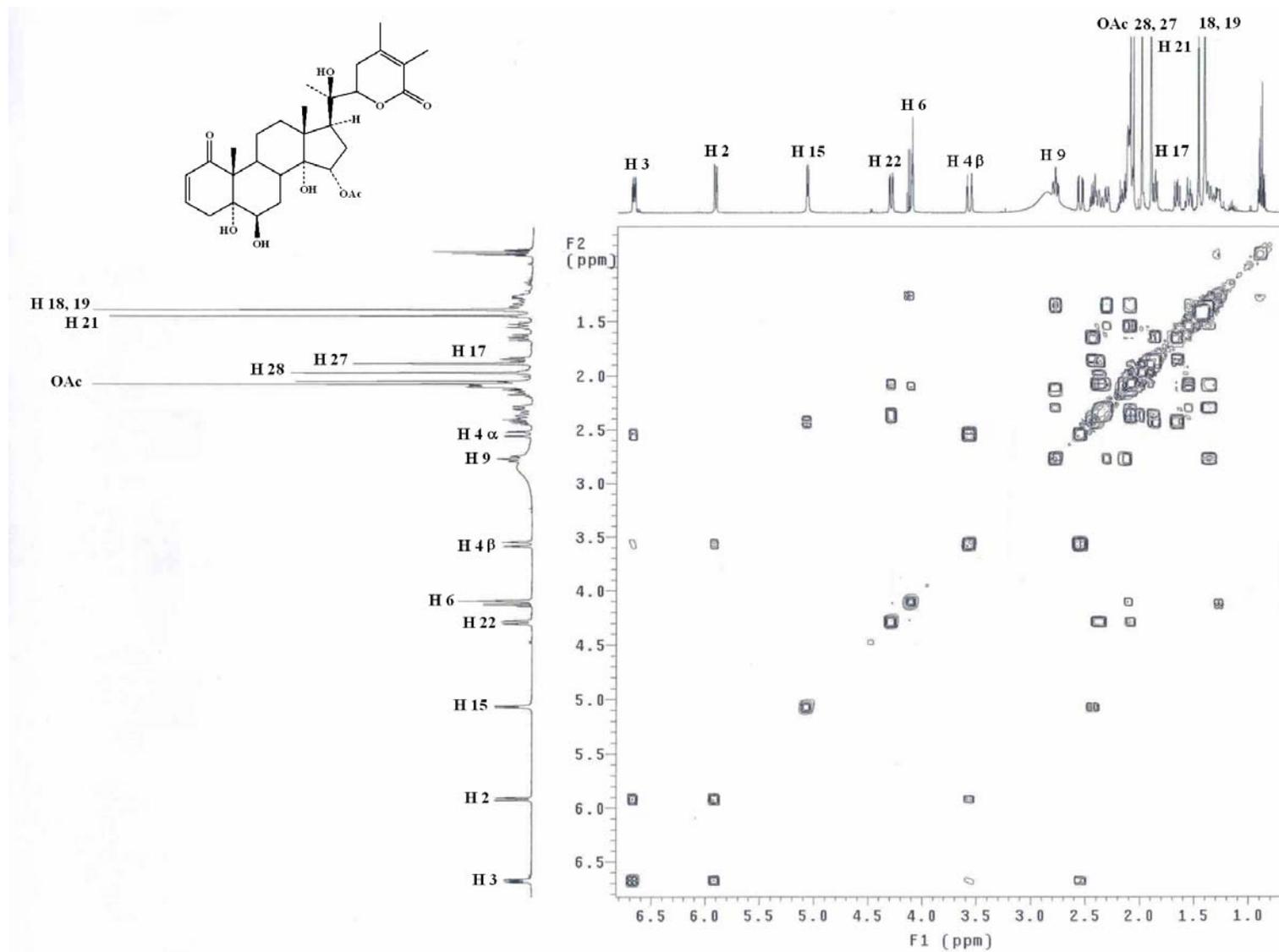
ESPECTRO 18. NOESY de tetracetilpruinósido (VIa)



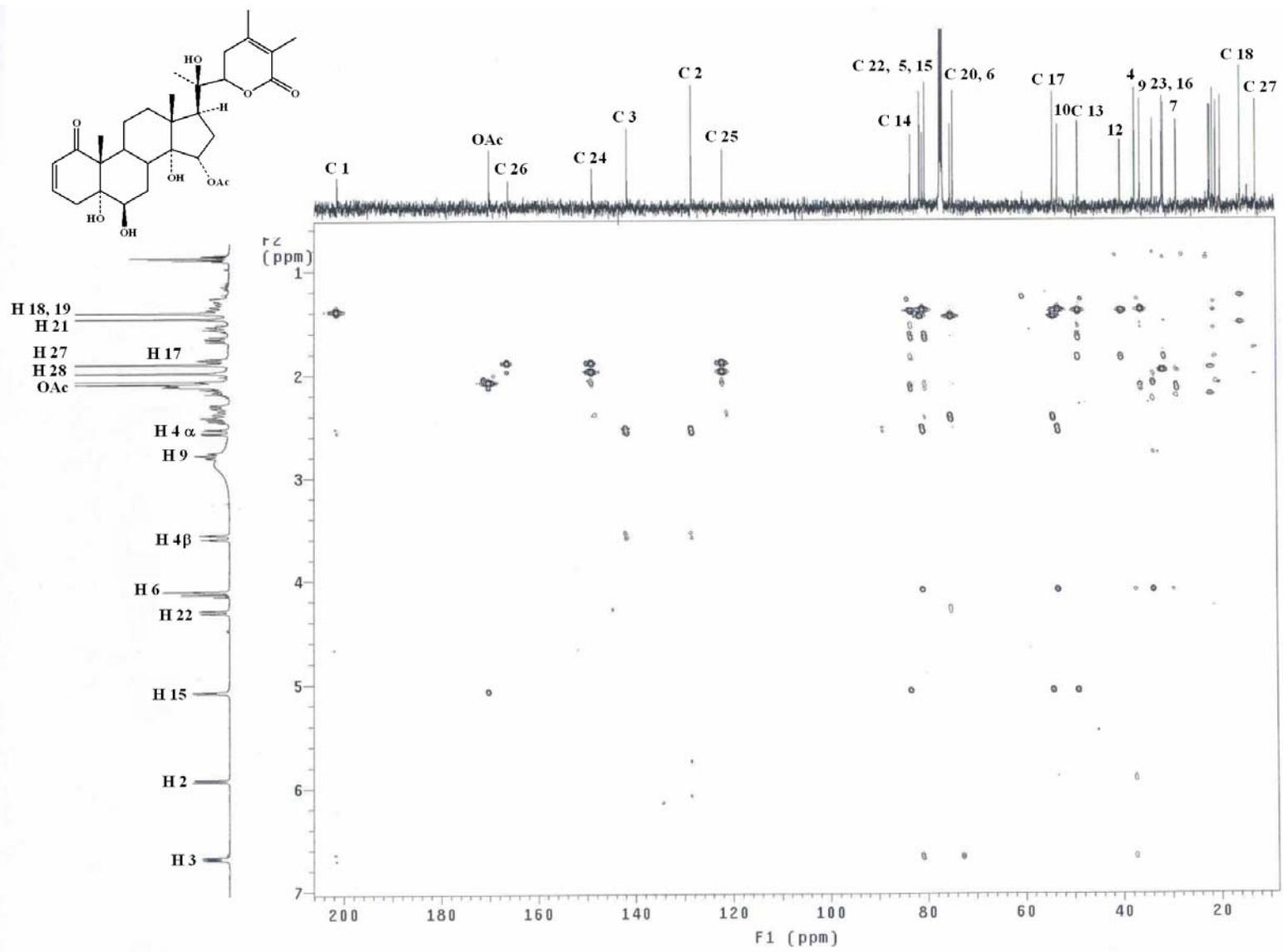
ESPECTRO 19. RMN ¹³C de physapruina C (VII)



ESPECTRO 20. RMN ^1H de physapruina C (VII)



ESPECTRO 21. COSY de physapruina C (VII)



ESPECTRO 22. HMBC de physapruina C (VII)

11. REFERENCIAS

1. Weier TE, Stocking CR, Barbour MG. Botany. An introduction to plant biology. Fifth edition. USA: John Wiley & Sons, 1974: 602-606.
2. Ruiz OM. Tratado elemental de botánica. Décima cuarta edición. México DF: ECLALSA, 1997: 656-663.
3. Martínez M. Infrageneric taxonomy of *Physalis*. En: Nee M, Simon DE, Lester RN, Jessop JP. Solanaceae IV. Advances in biology and utilization. Eds The Royal Botanic Garden Kew. 1999:275-283.
4. Argueta VA. Coordinador Gral. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. 1994. México DF. Vol. III: 1350-1351
5. Basey K, Mc Gaw BA, Wooley JG. Phygrine and alkaloids from *Physalis* species. *Phytochemistry*. 1992; **31**: 4173-4176
6. Sinha SC, Ali A, Bagchi A, Sarahi M, Ray AB. Physalindicanols, new biogenetic precursors of C28-steroidal lactones from *Physalis minima* var. *indica*. *Planta Medica*. 1986; **53**: 55-57.
7. Ray BA, Gupta M. Withasteroids, a growing group of naturally occurring steroidal lactones. En Herz W, Kirby GN, Moore RE, Steglivh W, Tamm Ch. Progress in the chemistry of organic natural products. Eds. Springer Verlag, Wien, 1994: 2-106.
8. Tomassini TCB, Barbi NS, Ribeiro IM, Xavier DCD. Genero *Physalis*. Uma revisao sobre vitaesteroides. *Quimica Nova*. 2000; **23** (1): 47-57.
9. Budhiraja RD, Krishan P, Sudhir S. Biological activity of withanolides. *J. Sci. Ind. Res. India*. 2000; **59**: 904-911.
10. Glotter E. Withanolides and related ergostane-type steroids. *Nat. Prod. Rep.* 1991: 418-440.
11. Knöss W, Reuter B. Biosynthesis of isoprenic units via different pathways: Occurrence and future prospects. *Pharm. Acta. Helv.* 1998, **73**: 45-52.
12. Demetzos C, Dimas KS. Labdane-type diterpenes. Chemistry and biological activity. En Atta-ur-Rahman Ed. Studies in Natural Products Chemistry. Netherlands: Elsevier science, 2001: vol. 25: 235-292.

13. Erazo S, Zaldivar M, Delporte C y col. Antibacterial diterpenoids from *Fabiana densa* var. *ramulosa*. *Planta Medica*. 2002, **68**: 361-363.
14. Jackson MD, Severson RF, Sisson VA, Stephenson MG. Ovipositional response of tobacco budworm moths (Lepidoptera: noctuidae) to cuticular labdanes and sucrose esters from the green leaves of *Nicotiana glutinosa* L. (Solanaceae). *J. Chem. Ecol.* 1991, **17**: 2489-2506.
15. Reid WW. The diterpenes of *Nicotiana* species and *N. tabacum* cultivars. In: Hawkes JG, Lester RN and Skelkin AD. The biology and taxonomy of the Solanaceae. Great Britain: Academic Press Inc, 1979: 273-278.
16. Severson RF, Jackson DM, Johnson AW, Sisson VA and Stephenson MG. Ovipositional behavior of tobacco budworm and tobacco hornworm. Effects of cuticular components from *Nicotiana* species. En Hedin PA. Naturally occurring pest bioregulators. Washintong DC. American Chemical Society, 1991: vol. 449: 264-277.
17. Darías V, Bravo L, Rabanal R, Sánchez-Mateo CC, Martín-Herrera DA. Cytostatic and antibacterial activity of some compounds isolated from several Lamiaceae species from the Canary Islands. *Planta Medica*. 1990, **56**: 70-72.
18. Chinou I, Demetzos C, Harvala C, Roussakis C, Verbist JF. Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Planta Medica*. 1994, **60**: 34-36.
19. Richome P, Godet MC, Foussard F, Toupet L, Sevenet T, Bruneton J. A novel leishmanicidal labdane from *Polyalthia macropoda*. *Planta Medica*. 1991, **57**: 552-554.
20. García-Granados A, Jiménez MB, Martínez A, Parra A, Rivas F, Arias JM. Chemical-microbiological synthesis of *ent*-13-*epi*-manoyl oxides with biological activities. *Phytochemistry*. 1994, **37**: 741-747.
21. Miyamoto K, Matsunoya T, Koshiura R, Tagaki K, Satake T, Hasegawa T. Comparative studies on the combined cytotoxic effect of forskolin with mitomycin C and responsiveness to forskolin in rat ascites hepatoma AH66 cells and AH66F cells. *Pharmacobiodyn.* 1987, **10** (7): 246-252.
22. De las Heras B, Hoult JRS. Non cytotoxic inhibition of macrophage eicosanoid biosynthesis and effects on leukocyte functions and reactive

- oxygen species of two novel anti-inflammatory plant diterpenoids. *Planta Medica*. 1994, **60**: 501-506.
23. De Souza NJ. Rohitukine and Forskolin. Second-generation immunomodulatory, intraocular-pressure-lowering, and cardiotoxic analogues. En Kinghong AD and Balandrin MF. Human medicinal agents from plants. Washintong DC: ACS Symposium Series. 1993: vol. 534: 331-340.
24. Sethi A, Khare A, Khare MP. A labdane diterpene and its glycoside from *Melodinus monogynus*. *Phytochemistry*. 1988, **27**: 2255-2259
25. Rojas A, Cruz S, Ponce-Monter H. Mata R. Smooth muscle relaxing compounds from *Dodonaea viscosa*. *Planta Medica*. 1996, **62**: 154-159.
26. Fragoso-Serrano M, González-Chimeo E, Pereda-Miranda R. Novel labdane diterpenes from the insecticidal plant *Hyptis spicigera*. *J. Nat. Prod.* 1999, **62**: 45-50.
27. Munesada K, Siddiqui HL, Suga T. Biologically active labdane-type diterpene glycosides from the root-stalks of *Gleichenia japonica*. *Phytochemistry*. 1992, **31**: 1533-1536.
28. Shingu K, Miyagawa M, Yahara S, Nohara T. Physapruins A y B, two new withanolides from *Physalis pruinosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 1993, **41**: 1873-1875.
29. Radulgin VA, Demenkova LI, Pentegova VA. New diterpenoid components of the oleoresin of *Pinus pumila*. *Chem. Nat. Compounds*. 1978, **14**: 286-289.
30. Vila R, Mundina M, Tomi F y col. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. *Planta Medica*. 2002. **68**: 164-167.
31. Fiallega G. Guadalupe B. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de *Physalis pruinosa*. UNAM, Facultad de Ciencias. 2004, México DF.

ABREVIATURAS

CCV	Cromatografía en columna con vacío
CCF	Cromatografía en capa fina
δ	Desplazamiento químico
COSY	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear (^1H - ^1H)
DEPT	Distorsión reducida por transferencia de polarización
EM	Espectrometría de masas
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
eV	Electron volts
FAB ⁺	Espectrometría de masas mediante bombardeo de átomos rápidos
HMBC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear múltiple (^1H - ^{13}C)
HMQC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear (^1H - ^{13}C)
Hz	Hertz
int. rel.	Intensidad relativa
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
IE	Impacto electrónico
J	Constante de acoplamiento
λ	Longitud de onda
m/z	Relación masa carga
M ⁺	Ión molecular
NOESY	Espectroscopía bidimensional por efecto nuclear Overhauser (^1H - ^1H)
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Rf	Factor de retención
TMS	Tetrametilsilano