



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS

**Estudio Químico de *Asclepias otarioides* y *Physalis virginiana***

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. SONIA AMADOR MOLINA



TUTOR: M. en C. Emma Maldonado Jiménez

2009



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.

*Este trabajo se realizó en el Laboratorio 2-7, Departamento de Productos Naturales*

*Instituto de Química, UNAM.*

**Jurado Asignado:**

Presidente	Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo
Vocal	Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas
Vocal	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Vocal	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Secretario	Dra. Laura Patricia Álvarez Berber

Sustentante

---

Q.F.B. Sonia Amador Molina

Asesora

---

M. en C. Emma Maldonado Jiménez

*Este trabajo fue presentado en la 5ª Reunión de la Academia Mexicana  
de Química Orgánica, Realizada en Zacatecas, Zacatecas,  
Mayo del 2009.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la UNAM, por darme la oportunidad de ser parte de esta gran institución..*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado durante la realización de mis estudios de Maestría.*

*A la M. en C. Emma Maldonado Jiménez por el apoyo, la confianza, el tiempo que me brindó en el cual aprendí muchas cosas y por darme esta gran oportunidad de trabajar a su lado.*

*A mi familia por el apoyo que me dieron para que pudiera concluir con una etapa más en mi vida profesional. Especialmente mis padres Francisco y Clementina a los que les estaré siempre agradecida.*

*A los miembros de mi jurado por haber revisado mi trabajo.*

*Al M. en C. Antonio Nieto Camacho por la realización de las pruebas biológicas y a los técnicos del Instituto de Química que realizaron los espectros empleados en este trabajo.*

## ÍNDICE

Abreviaturas .....	1
<b>1. Introducción .....</b>	<b>2</b>
<b>2. Antecedentes</b>	
2.1 <i>Physalis</i> y <i>Asclepias</i> en la medicina tradicional .....	4
2.2 Familia Solanaceae .....	5
2.3 Género <i>Physalis</i> y <i>Physalis virginiana</i> Miller .....	6
2.4 Química del género <i>Physalis</i> .....	8
2.5 Familia Apocynaceae <i>sensu lato</i> .....	10
2.6 Subfamilia <i>Asclepiadoideae</i> R. Br. y el Género <i>Asclepias</i> .....	11
2.7 Química del género <i>Asclepias</i> .....	12
2.8 <i>Asclepias otarioides</i> Fourn. ....	13
2.9 Withaesteroides .....	14
2.10 Triterpenos .....	19
2.11 Glicósidos cardiotónicos .....	21
2.12 Biosíntesis de Withaesteroides, Triterpenos y Esteroides Cardenólidos: Rutas Acetato- Mevalonato y 1-Desoxi-D-Xilulosa-5-Fosfato (DOXP) .....	23
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>26</b>
<b>4. Resultados y discusión</b>	
4.1 <i>Physalis virginiana</i> Mille .....	27
4.1.1 Elucidación estructural de los compuestos aislados .....	27

4.1.2	Actividad Antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA .....	38
4.2	<i>Asclepias otarioides</i> Fourn. ....	40
4.2.1	Elucidación estructural de los compuestos aislados.....	40
<b>5.</b>	<b>Parte experimental</b>	
5.1	Material y equipo .....	52
5.2	<i>Physalis virginiana</i> Miller	
5.2.1	Material vegetal.....	53
5.2.2	Extracción del material vegetal.....	53
5.2.3	Aislamiento y purificación de compuestos.....	54
5.3	<i>Asclepias otarioides</i> Fourn.	
5.3.1	Material vegetal.....	58
5.3.2	Extracción del material vegetal.....	58
5.3.3	Aislamiento y purificación de compuestos.....	59
5.4	Determinación de la actividad Anti-inflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA.....	66
<b>6.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>69</b>
	Anexo 1	
	Espectroscopia.....	74



ABREVIATURAS

CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear (Correlated Spectroscopy)
$\delta$	desplazamiento químico
d	doblete
dd	doble de doble
ddd	doble de doble de doble
DEPT	Aumento sin distorsión de la transferencia de polarización (Distortionless Enhancement of Polarization Transfer)
EM-ES	Espectrometría de Masas por Electro-Atomización (Electro-Spray)
EM-IE	Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces ( $^2\text{JC-H}$ , $^3\text{JC-H}$ ) (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
HRFABMS	Espectrometría de Masas de alta Resolución por Bombardeo de Átomos Rápidos
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple ( $^1\text{JC-H}$ ) (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria Cincuenta
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
m	multiplete
m/z	relación masa carga
M <sup>+</sup>	Ión molecular
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	singulete
t	triplete
td	triplete de doblete
TPA	13-acetato 12-O-tetradecanoilforbol

## **1. INTRODUCCIÓN**

Por muchos años los productos naturales y la medicina han estado estrechamente relacionados, principalmente a través de la herbolaria, que históricamente ha sido el componente principal de los sistemas de medicina en todo el mundo y en todos los tiempos, sistemas que ahora llamamos de medicina tradicional. Por lo tanto no es extraño que en los últimos 100 años, los estudios químicos, farmacológicos y clínicos de medicinas tradicionales (principalmente plantas) condujeran al descubrimiento de medicamentos como la aspirina, la quinina y la digitoxina y que las grandes compañías farmacéuticas crearan programas de investigación de productos naturales como fuentes de nuevos medicamentos.

Así, los productos naturales han jugado un papel central en el descubrimiento de nuevos fármacos, tanto que en la actualidad cerca del 40% de los medicamentos que se consumen derivan directa o indirectamente de productos naturales.<sup>1,2</sup>

Durante un tiempo el fraccionamiento biodirigido de extractos fue uno de los métodos más empleado en la industria farmacéutica para la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos. Más tarde, la química combinatoria ofreció la posibilidad de obtener miles de compuestos cuya actividad podía ser evaluada por métodos automatizados y fue entonces cuando muchas compañías farmacéuticas redujeron o abandonaron sus investigaciones en productos naturales, a pesar de que los fármacos derivados de éstos se encuentran entre los más vendidos a nivel mundial. Sin embargo, ni la química

combinatoria, ni otros métodos de descubrimiento de fármacos (modelado de fármacos, exploración virtual de actividad) han dado los resultados esperados. Esto ha hecho resurgir el interés en los productos naturales y ha dado lugar a que se valore su importancia como fuente de nuevos compuestos bioactivos. Lo anterior se debe a que los productos naturales, respecto a los obtenidos en síntesis combinatorias, tienen las ventajas de una mayor diversidad estructural, aún no totalmente explorada, y también de una mayor complejidad.<sup>1,3,4</sup>

Aunque México no cuenta con una industria farmacéutica sólida, sí es poseedor de una de las floras más diversas del mundo y una de las más ricas en especies medicinales, en las que sin duda deben existir compuestos que pueden ser aprovechados para enfrentar los numerosos problemas de salud que aquejan a la población, problemas que en muchos casos se encuentran asociados a situaciones económicas adversas que hacen difícil o imposible la adquisición de fármacos de patente, que generalmente son de un alto costo.<sup>5</sup>

Por lo anterior es necesario realizar estudios que permitan un mayor conocimiento de los recursos asociados a la flora del país y que sienten las bases para su posible explotación. En este contexto se inscribe el presente trabajo, en el que se presentan los resultados de los estudios químicos de las plantas *Physalis virginiana* Miller y *Asclepias otarioides* Fourn., así como los resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria de tres de los compuestos aislados.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Physalis* y *Asclepias* en la medicina tradicional

México posee una flora muy abundante en especies medicinales, la cual a partir de la conquista y debido al fuerte intercambio de especies vegetales entre América y Europa, se encuentra representada no sólo por plantas nativas sino también por plantas introducidas. Desde tiempos prehispánicos y hasta nuestros días estas plantas medicinales han jugado un papel muy importante en la medicina tradicional,<sup>6</sup> que en muchos lugares del país es prácticamente la única opción para el tratamiento de diversos padecimientos.

Muchas especies de los géneros *Physalis* y *Asclepias*, son empleadas en la medicina tradicional debido a las diferentes actividades biológicas que presentan. En el caso de *Asclepias*, las principales propiedades que se atribuyen a las especies del género son analgésicas, dermatológicas, antiinflamatorias, purgantes y contra infecciones respiratorias, aunque también algunas especies son consideradas tóxicas. Entre las especies que son empleadas con fines curativos están *A. contrayerba*, *A. curassavica*, *A. glaucescens*, *A. linaria*, *A. similis*, *A. lynchiana*, *A. mexicana*, *A. albicans*, *A. oenotheroides* y *A. tuberosa*.<sup>7</sup>

El género *Physalis* también cuenta con un número importante de especies consideradas medicinales. En nuestro país por ejemplo, especies como *P. philadelphica*, *P. chenopodifolia*, *P. coztomatl* y *P. aequata* son utilizadas en el tratamiento de diversos padecimientos, pero principalmente en casos de desórdenes digestivos, diabetes e

infecciones en las vías respiratorias.<sup>8</sup> *P. peruviana*, una especie nativa de Sudamérica, se emplea para tratar malaria, asma, dermatitis, reumatismo y como diurético.<sup>9</sup> *Physalis alkekengi* se emplea en la medicina China por sus propiedades expectorantes, diuréticas y oxitócicas.<sup>10</sup> Asimismo, *P. angulata* se emplea en Taiwan para el tratamiento de tumores.<sup>10</sup> *P. pubescens* se usa en Puerto Rico contra la indigestión y en la India *P. minima* es empleada en el tratamiento de hepatitis, gonorrea, enfermedades urinarias y gota.<sup>11</sup>

## 2.2 Familia Solanaceae

En esta familia se encuentra incluido el género *Physalis*. La familia Solanaceae cuenta con cerca de 90 géneros y alrededor de 2500 especies. Sus especies presentan una gran diversidad de hábitos de vida, entre ellas se encuentran hierbas, lianas terrestres o epífitas y árboles. Las solanáceas se encuentran distribuidas en todo el mundo, pero principalmente en zonas tropicales y templadas. Se cree que su centro de diversificación se sitúa en Sudamérica.<sup>12-14</sup>

Desde un punto de vista antropocéntrico, la importancia de esta familia radica en que a ella pertenecen muchas especies que son benéficas para el hombre. Entre ellas están varias plantas que se cultivan para obtener alimentos como la papa (*Solanum tuberosum*), jitomate o tomate rojo (*Lycopersicon esculentum*), el chile (*Capsicum annum*), el tomate de cáscara (*P. philadelphica*), la uchuva (*P. peruviana*) y la berenjena (*Solanum melonogena*); plantas ornamentales como el floripondio (*Brugmansia arborea*, *B. sanguinea*), huele de noche (*Cestrum nocturnum*), copa de oro (*Solandra grandiflora*) y alquequenje (*P. alkekengi*).

Además existen otras solanáceas que aunque se utilizan como especies medicinales, su empleo resulta muy peligroso debido al tipo de alcaloides que poseen, tal es el caso de *Atropa belladonna* (belladona), *Datura stramonium* (toloache) y *Mandragora officinarum* (mandrágora), plantas que también se asocian a rituales mágicos y brujería.

Al hablar de solanáceas no se debe dejar de mencionar a *Whitania somnifera* (ashwagandha), una de las especies más importantes en los sistemas de medicina Ayurvédica y tradicional de la India, al punto de que se le conoce también como “ginseng de la India”.<sup>15</sup> Tampoco se puede pasar por alto a *Nicotiana tabacum* que al ser empleada para la elaboración de cigarros y puros, ha dado origen a una de las industrias más rentables, pero también una de las más controvertidas desde el punto de vista ético.<sup>14,16</sup>

### **2.3 Género *Physalis* y *Physalis virginiana* Miller**

*Physalis virginiana* Miller pertenece al género *Physalis* que comprende cerca de 90 especies distribuidas en México, América Central, América del Sur, Estados Unidos y el Viejo Mundo. Sin embargo, debido a que en México es donde se encuentra el mayor número de especies de *Physalis*, y también a que gran parte de ellas son endémicas, se considera que nuestro territorio es el centro de diversificación del género.<sup>17,18</sup>

En la clasificación más reciente de *Physalis* se divide al género en cuatro subgéneros, *Physalis*, *Physalodendron*, *Quincula* y *Rydbergis*, y a este último, que es el que contiene el mayor número de especies, se le divide en las secciones *Epeteiorhiza*,

*Campanulae, Coztomate, Lanceolatae, Carpenteriae, Angulatae, Viscosa, Rydbergae, y Tehuacanae.*<sup>19</sup>

Dentro del género *Physalis* encontramos especies herbáceas, sufrútices\* y arbustivas, las cuales pueden ser anuales o perennes, con flores solitarias, axiales, hojas que suelen ser ovadas, enteras o dentadas. Los frutos se presentan como bayas carnosas con colores que van del verde o amarillo hasta el púrpura y están rodeados por el cáliz. Se sabe que los frutos de muchas especies de *Physalis* son comestibles, pero sólo se ha documentado este uso para catorce de ellas; de éstas únicamente *P. philadelphica*, *P. peruviana*, *P. grisea* y *P. alkekengi* son cultivadas para obtener dichos frutos y los del resto de las especies se colectan de poblaciones silvestres.<sup>18,20</sup>

En México *P. philadelphica* es la especie más conocida del género. Esto se debe a que sus frutos (tomates verdes o de cáscara) se conocen desde tiempos prehispánicos. Ya Francisco Hernández en su “Historia de las plantas en la Nueva España” consigna que “se hacen de ellos, molidos y mezclados con *chilli*, una salsa muy agradable que mejora el sabor de casi todas las viandas y alimentos y estimula el apetito”, y describe una serie de usos medicinales, tanto para las hojas como para los frutos de esta planta.<sup>21</sup>

Por otra parte, *Physalis virginiana* Miller está incluida en la sección *Lanceolatae* del subgénero *Rydbergis*. Es una planta herbácea perenne de aproximadamente 40 cm de altura, de tallo leñoso, con flores hermafroditas. Es característica de zonas secas, se distingue por las hojas enteras, casi siempre angostas, el aspecto glabro y el color

\*Sufrútice: Planta de tallo leñoso en la base y herbácea en la parte superior, subarbusto.

glauco. Las flores presentan máculas casi negras, que contrastan con el color amarillo de la corola. El cáliz presenta diez costillas en el fruto. Su hábitat comprende el Noreste y Sureste de Estados Unidos y en México los Estados de Sonora, Durango, Guanajuato y San Luis Potosí. Por otro lado, *Physalis virginiana*, ha sido introducida en algunas regiones del viejo mundo.<sup>17,22</sup>

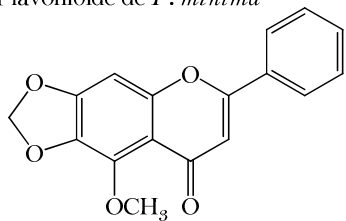
#### 2.4 Química del género *Physalis*

Del género *Physalis*, se han aislados diversos tipos de metabolitos secundarios. Por ejemplo de especies como *P. minima*<sup>23</sup> y *P. alkekengi var franehetti*,<sup>24</sup> se aislaron flavonoides. De esta última y de *P. peruviana* se aislaron alcaloides derivados del tropano (calisteginas)<sup>24</sup> y de la higrina,<sup>25</sup> así como monosacáridos esterificados.<sup>26</sup>

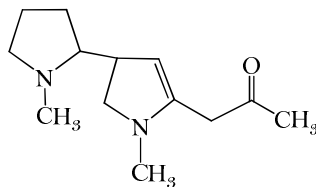
De *P. coztomatl*, *P. patula*, *P. pruinosa* y *P. nicandroides var. attenuata*,<sup>27,28</sup> se obtuvieron diterpenos labdánicos. De esta última y de *P. viscosa* se aislaron acilsacarosas<sup>28,29,30</sup> Sin embargo, los metabolitos más característicos del género son los withaesteroides que se han aislado de casi todas las especies que se han analizado (excepto de *P. nicandroides*)<sup>31</sup>. De *Physalis* se han aislado 6 (withanólidas, withaphysalinas, physalinas, neophysalinas, perulactonas e ixocarpalactonas) de los 16 tipos de withaesteroides que se conocen hasta ahora.<sup>32</sup>



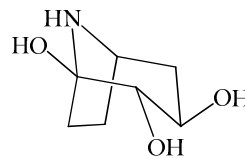
Flavonoide de *P. minima*



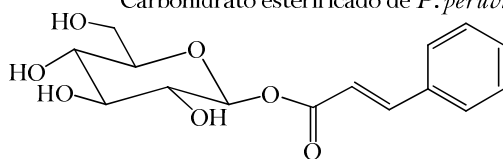
Alcaloide de *P. peruviana*



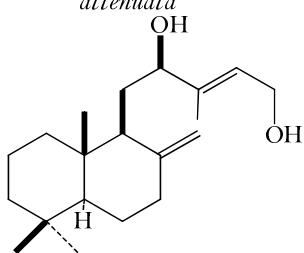
Calystegina de *P. alkekengi* var. *f. ranchetti*



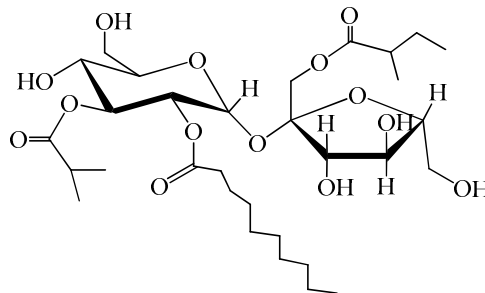
Carbohidrato esterificado de *P. peruviana*



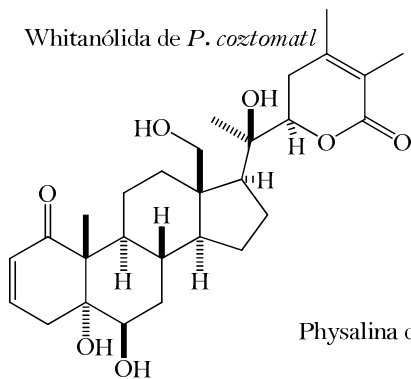
Labdano de *P. nicandroides* Schltdl. var. *attenuata*



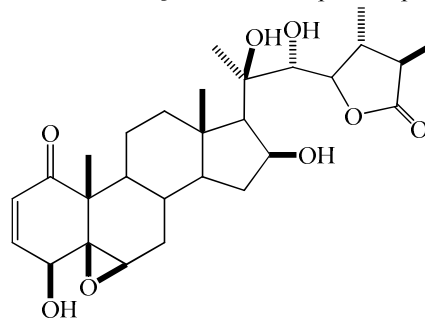
Acilsacarosa de *P. nicandroides* Schltdl. var. *attenuata*



Whitanólida de *P. coztomatl*



Ixocarpalactona de *P. philadelphica*



Physalina de *P. angulata*

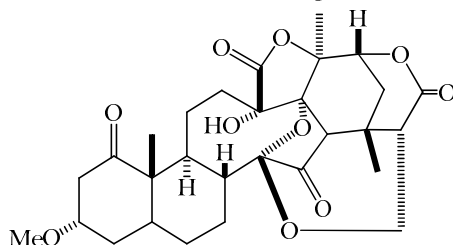


Figura 1: Algunos ejemplos de metabolitos aislados del género *Physalis*.

## 2.5 Familia Apocynaceae *sensu lato*

Por mucho tiempo Asclepiadaceae y Apocynaceae han sido consideradas familias relacionadas pero independientes. Recientemente y con base en información morfológica y filogenética se ha propuesto unificar estas familias en una sola: Apocynaceae *sensu lato* para tener una familia monofilética. Tomada en este sentido la Apocynaceae *s. l.* incluye aproximadamente 5100 especies, agrupadas en 424 géneros y cinco subfamilias: Apocynoideae, Asclepiadoideae, Periplocoideae, Rauvolfioideae y Secamonoideae.<sup>33-35</sup>

Esta familia incluye plantas anuales y perennes, entre las que destacan hierbas erectas o trepadoras y con menos frecuencia árboles y arbustos. La mayoría de sus integrantes producen látex lechoso, rojizo (*Aspidosperma*) o transparente (*Thenardia*). Las especies de esta familia se encuentran principalmente en bosques tropicales caducifolios, matorrales xerófilos, bosques de coníferas y bosques templados. Estudios fitoquímicos han mostrado que la familia está caracterizada químicamente por biosintetizar glicósidos cardiotónicos, flavonoides, cumarinas, iridoides, triterpenos y alcaloides de diversos tipos. Se ha encontrado que muchos de estos metabolitos son biológicamente activos y entre las actividades que presentan se pueden mencionar antibacteriana, leishmanicida, antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica, entre otras.<sup>34</sup>

## 2.6 Subfamilia *Asclepiadoideae* R. Br. y el Género *Asclepias*

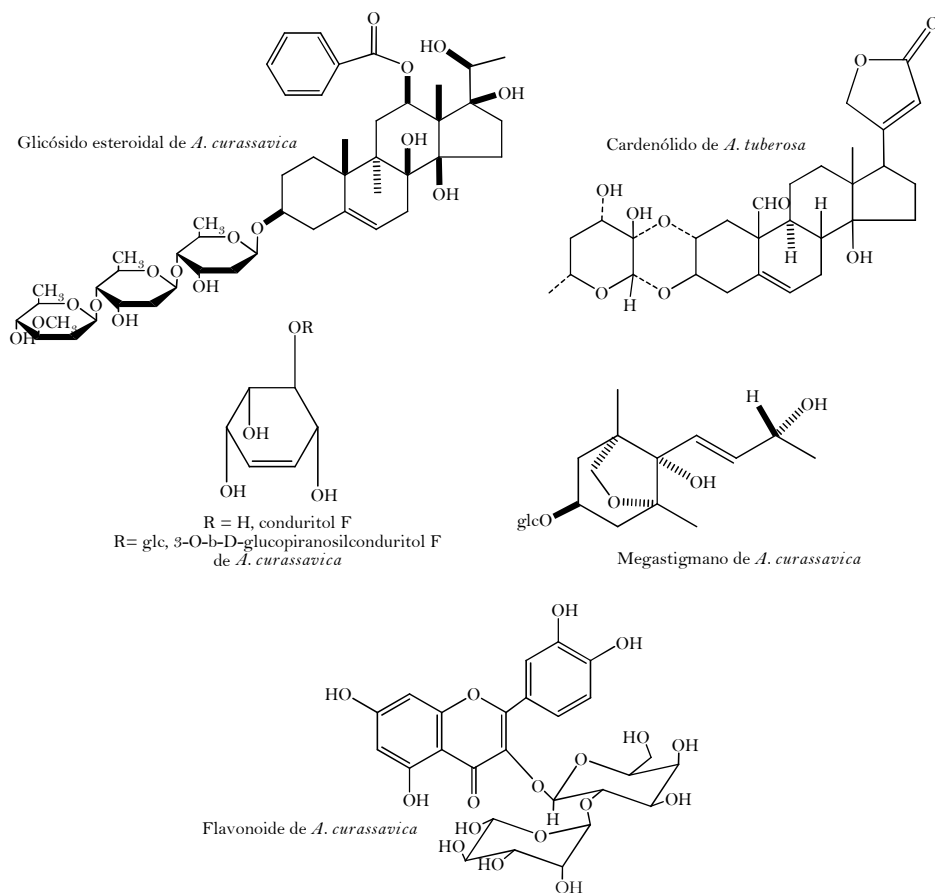
La subfamilia *Asclepiadoideae*, incluye el mayor porcentaje de diversidad tanto en géneros como en especies, cuenta con aproximadamente 2000 especies distribuidas en 200 géneros.<sup>36</sup> En México los géneros con mayor número de taxones endémicos pertenecientes a esta subfamilia son *Matelea* y *Asclepias* con más de 60 especies y *Gonolobus* y *Marsdenia* con 14 o más especies.

El género *Asclepias* incluye plantas herbáceas y con menor frecuencia especies decumbentes (de tallos rastreros) o arbustos. Estas plantas poseen tallos glabros, hojas opuestas, raramente alternadas o verticiladas, con inflorescencias umbeliformes, corolas rotadas o campanuladas. *Asclepias* es un género Americano con alrededor de 150 especies, de las cuales 68 se encuentran distribuidas en nuestro país. De éstas 14 son empleadas en la medicina tradicional. Las principales propiedades medicinales que se le atribuyen al género son analgésicas, para quitar el dolor de muelas (*A. curassavica*, *A. oenotheroides*), estómago y cabeza (*A. albicans* y *A. subulata*), dermatológicas (*A. curassavica*), para curar granos (*A. lynchiana*), verrugas (*A. mexicana*), heridas superficiales e infecciones (*A. glaucescens*, *A. linaria* y *A. similis*), purgantes (*A. glaucescens*, *A. curassavica* y *A. linaria*), contra infecciones respiratorias tales como neumonía, gripes y catarros (*A. curassavica*, *A. tuberosa* y *A. quinquedentata*) y efecto cardiotónico para tratar la insuficiencia cardiaca (*A. woodsoniana*, *A. curassavica*, *A. tuberosa*), aunque hay algunas que se consideran tóxicas.<sup>7</sup>

## 2.7 Química de género *Asclepias*

*Asclepias* presenta una amplia gama de compuestos (Figura 2) entre los que podemos mencionar alcaloides, taninos, flavonoides, glicósidos cardiotónicos (cardenólidas) y glicósidos esteroidales.

Los glicósidos cardenólicos han sido aislados de especies como *Asclepias curassavica*, *Asclepias fruticosa*, *Asclepias incarta*, entre otras. Este tipo de compuestos también se ha encontrado en *Danaus plexippus*, la mariposa monarca, la cual se alimenta de plantas del género *Asclepias* incluyendo *A. curassavica*.<sup>37,38</sup> Además de glicósidos de cardenólidas, de *A. curassavica* y *A. tuberosa* se aislaron glicósidos esteroidales<sup>37-40</sup>, de tipo pregnano de la primera y de tipo androstano de la segunda. De *A. curassavica* se han aislado androstanos. De estas plantas también se han aislado conduritoles, megastigmanos libres y como glicósidos,<sup>41</sup> también triterpenos<sup>38</sup> y flavonoides.<sup>42</sup>



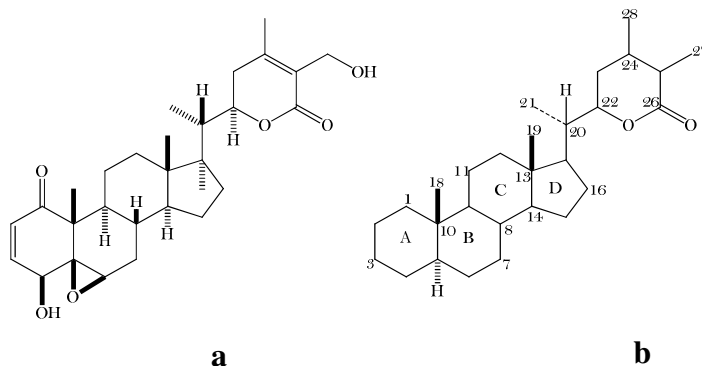
**Figura 2:** Ejemplos de algunos metabolitos aislados del género *Asclepias*.

## 2.8 *Asclepias otarioides* Fourn

*Asclepias otarioides* Fourn. es una hierba erecta de 0.8 a 1.0 m, con tallos densamente tomentosos, hojas opuestas, sésiles o corto-pecioladas. Presenta inflorescencia umbeliforme y flores que van de un color rojo a morado. *A. otarioides* Fourn es endémica de México, crece en los Estados de Durango, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, San Luis Potosí y Tlaxcala, así como en el Distrito Federal.<sup>43</sup>

## 2.9 Withaesteroides

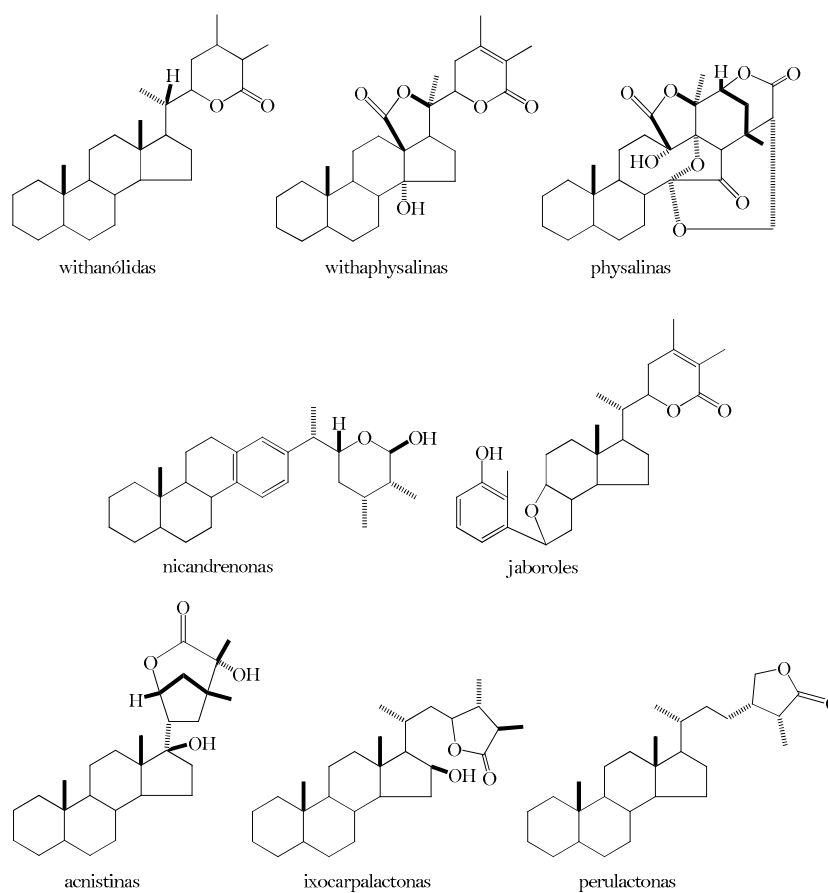
En los años 60 del siglo pasado se aisló withaferina A de una solanácea medicinal (*Withania somnifera*). Se estableció que este compuesto tiene 28 átomos de carbonos en un esqueleto tipo ergostano cuya cadena lateral contiene una  $\delta$ -lactona. A partir del aislamiento de withaferina A (figura 3a) se empezaron a aislar compuestos del mismo tipo de otras solanáceas y fue entonces que se propuso el nombre de withanólidas para estos compuestos y todos aquellos que posean un esqueleto como el que se muestra en la figura 3b.<sup>15,44,45</sup>



**Figura 3:** a) withaferina A, b) Esqueleto de withanólida.

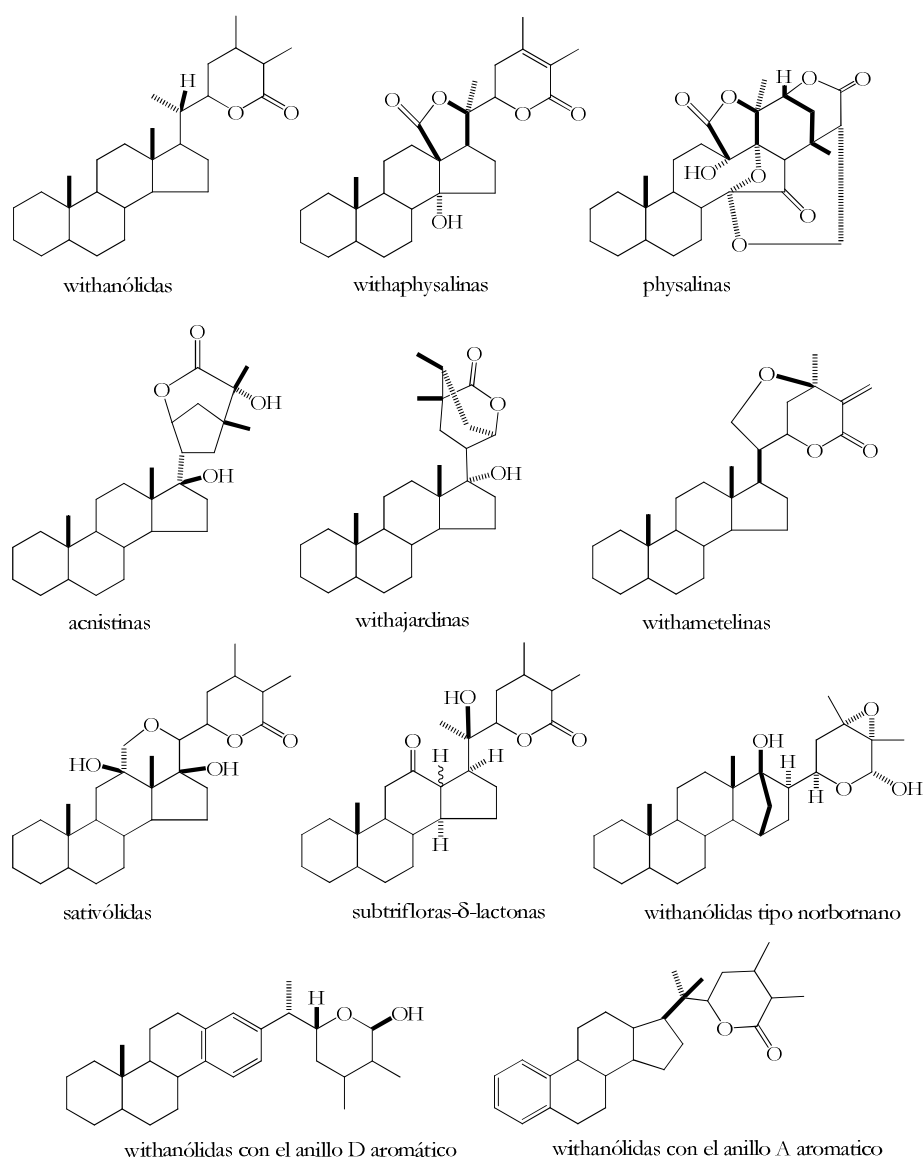
Al paso del tiempo se aislaron compuestos con esqueleto de ergostano modificado que no cumplían con las características de las withanólidas, pero que por presentar estructuras obviamente relacionadas a las de éstas, deberían entrar en este grupo. Así surge el término withaesteroide para incluir a todos los compuestos esteroidales de 28 carbonos con esqueleto de ergostano el cual puede o no estar modificado y que además

cuentan con una lactona en la cadena lateral. Los withaesteroides se clasifican en ocho grupos: withanólidas, withaphysalinas, physalinas, nicandrenonas, jaboroles, acnistinas, ixocarpalactonas, perulactonas y misceláneos (figura 4.)<sup>46</sup>



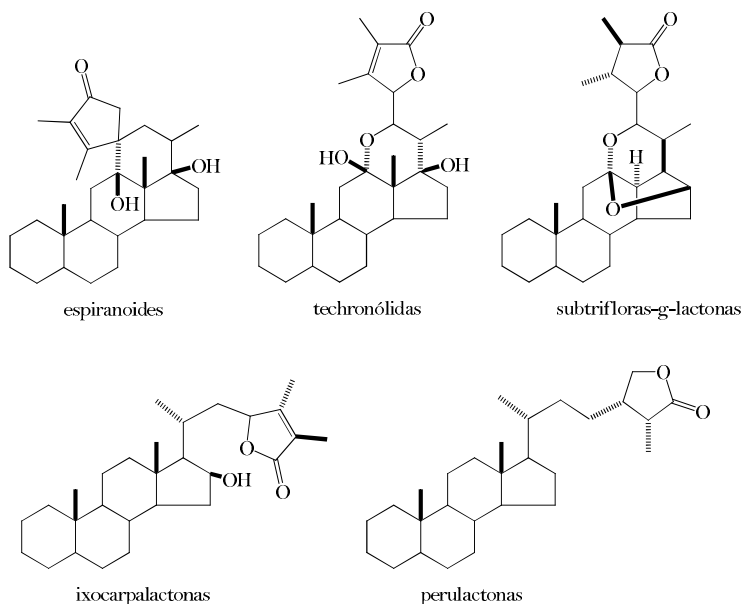
**Figura 4:** Estructura de los diferentes withaesteroides.

Sin embargo, no se ha podido alcanzar un acuerdo para nombrar a estos compuestos y el término withanólida se sigue empleando. En la clasificación más reciente se mantiene esta denominación, pero ahora se divide a las withanólidas en dos grupos, el grupo A que se subdivide en 11 subgrupos y está conformado por compuestos con una  $\delta$ -lactona o  $\delta$ -lactol (Figura 5) y el grupo B con 5 subgrupos los cuales presentan una  $\gamma$ -lactona (Figura 6).<sup>32</sup>



**Figura 5:** Withanólidas del grupo A.





**Figura 6:** Withanólidas del grupo B.

Los withaesteroides son compuestos muy funcionalizados y de esto deriva la gran diversidad de estructuras que presentan. Además de la lactona o lactol de la cadena lateral, la mayoría de los withaesteroides presentan un sistema 2-en-1-ona en el anillo A. Un gran número de ellos presenta un grupo  $\beta$ -OH en C-4 y doble enlace o un grupo  $\beta$ -epoxi en C-5,C-6. También es frecuente la existencia de un grupo  $\alpha$ -OH en C-5, acompañado de un epóxido  $\alpha$  en C-7, C-8. Muchos withaesteroides presentan grupos hidroxilo en C-14, C-17 y /o C-20. La presencia de grupos hidroxilo o cetona en C-12 es menos frecuente. En la figura 7 se presentan algunos ejemplos.

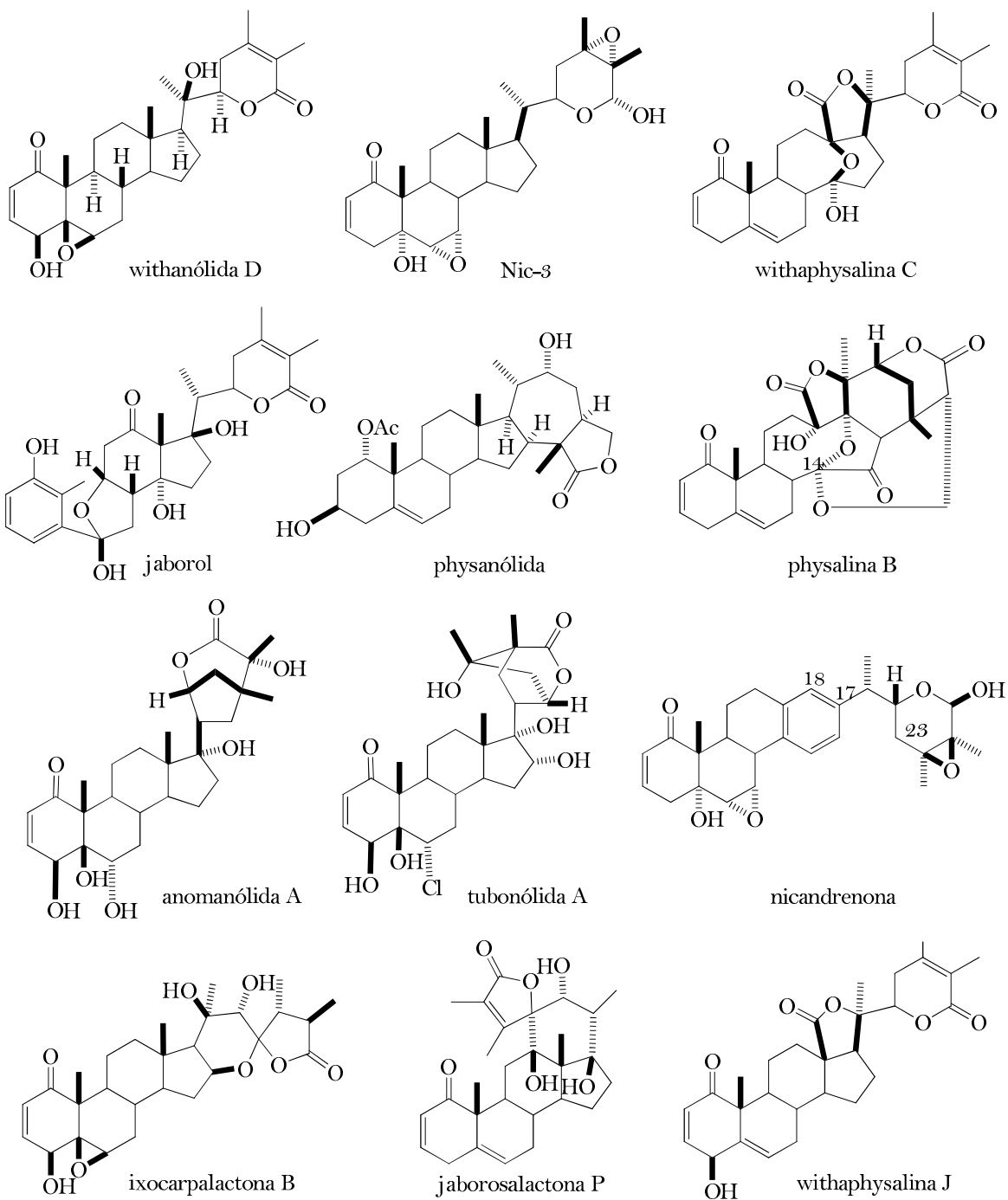


Figura 7. Algunos ejemplos de withaesteroides

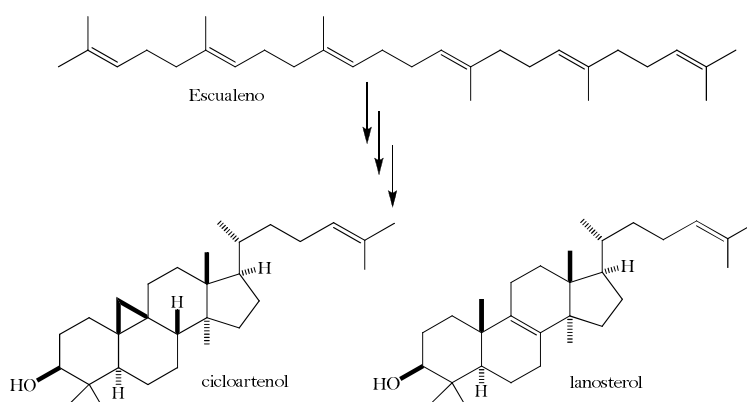
Si bien es cierto que las estructuras de los withaesteroides resultan interesantes desde el punto de vista químico, también lo son las diversas actividades biológicas que presentan. Muchos withaesteroides han mostrado una o varias de las siguientes actividades: antibacteriana, antiestresante, antiinflamatoria, antitumoral, antiulcerante, hepatoprotectora, anticonvulsiva, inmunomoduladora y quimiopreventiva.<sup>47,48,49</sup>

## 2.10 Triterpenos

Los terpenos son compuestos que se encuentran ampliamente distribuidos en plantas, microorganismos y animales. Tienen una gran importancia económica debido a su uso como aditivos de alimentos y de cosméticos. Debido a que presentan una gran variedad de funciones biológicas varios de ellos son empleados como fármacos. Los terpenos se clasifican en hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) y tetraterpenos ( $C_{40}$ ), de acuerdo al número de unidades isoprenoides involucradas en su biosíntesis. Los isoprenoides corresponden a unidades de cinco átomos de carbono, las cuales son originadas mediante las rutas de acetato-mevalonato (AMV) o DOXF (1-Desoxi-D-Xilulosa-5-Fosfato).<sup>50,51,52</sup>

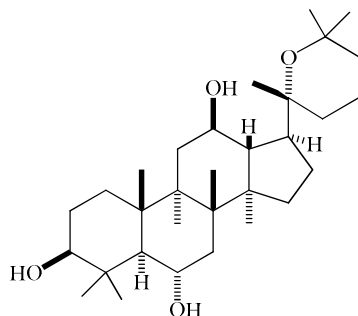
Aunque las plantas superiores poseen ambas rutas (AMV y DOXF), éstas no participan en la biosíntesis de los mismos terpenos. Hemiterpenos, diterpenos, carotenoides y plastoquinonas son biosintetizados en los cloroplastos por la ruta DOXF, mientras que en el citoplasma se originan sesquiterpenos, politerpenos, esteroides y triterpenos por la ruta AMV.<sup>53</sup> Estos últimos son de gran importancia tanto en plantas

como en animales, debido a que partir del triperpeno lineal escualeno se origina en los mamíferos el lanosterol que es el precursor estructural de todos los esteroides, mientras que en las plantas en lugar de lanosterol se encuentra el cicloartenol, precursor de los esteroides vegetales (figura 8).



**Figura 8:** Estructuras de los precursores de triterpenos en plantas y animales.

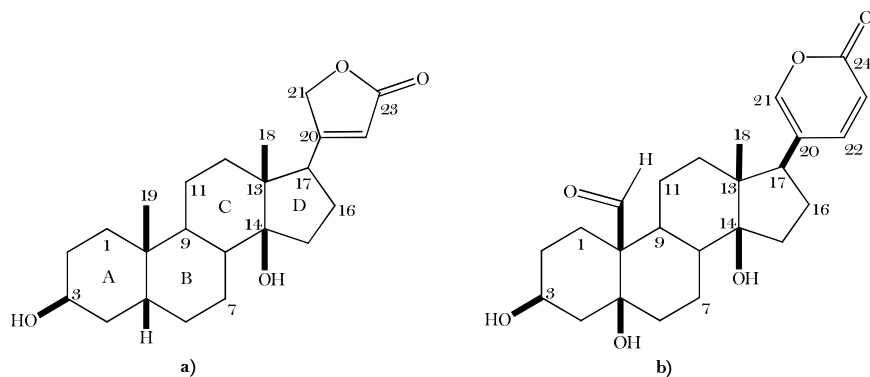
Diversos triterpenos naturales, así como sus derivados presentan actividad antiinflamatoria,<sup>54</sup> citotóxica<sup>55,56</sup> y como agentes anti-VIH,<sup>57</sup> entre otras. Algunos otros son empleados como agentes emulsificantes en la industria farmacéutica.<sup>58</sup> Se ha observado también que este tipo de compuestos son los responsables de las diferentes actividades que presenta el Ginseng (*Panax ginseng*) que es empleado para tratar anemia, diabetes, gastritis, insomnio y como tranquilizante. Los triterpenos que dan estas características al Ginseng son los ginsenósidos o panóxidos, uno de los cuales es el panaxatriol (figura 9).<sup>58</sup>



**Figura 9:** Panaxatriol

### 2.11 Glicósidos cardiotónicos

Los esteroides cardiotónicos cuyo precursor es el colesterol, se caracterizan por presentar una lactona con orientación  $\beta$  en C-17, un grupo hidroxilo en la posición C-14, también con orientación  $\beta$  y un grupo hidroxilo  $\beta$ -axial en C-3. Los glicósidos cardiotónicos presentan uno o más azúcares unidos al hidroxilo en C-3, además presentan una fusión *cis* de los anillos A/B y de los anillos C/D. En la naturaleza todos los esteroides cardiotónicos son derivados de dos estructuras básicas. Las cardenólidas ( $C_{23}$ ) que presentan una lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada de cinco miembros ( $\gamma$ -lactona), como la digitoxigenina, y las bufadienólidas ( $C_{24}$ ) que presentan dos dobles enlaces en la lactona de seis miembros ( $\delta$ -lactona), como la hellebrigenina (figura 10.).<sup>58,59</sup>



**Figura 10:** Estructuras: **a)** cardenólida: digitoxigenina  
**b)** bufadienólida: hellebrigenina

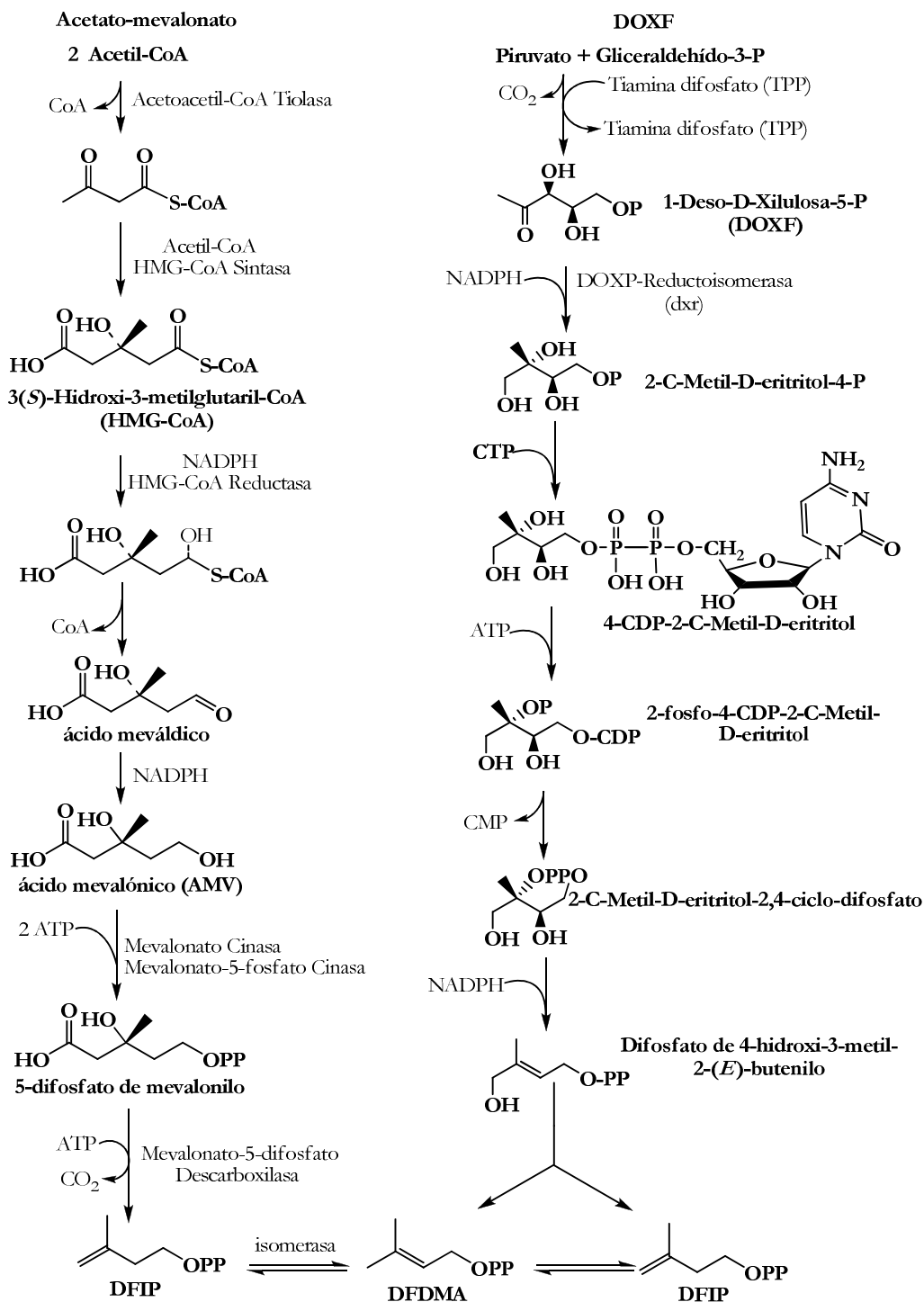
Muchas de las plantas que contienen cardenólidas o glicósidos cardenólicos son empleadas como veneno en las puntas de las flechas y en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades del corazón. Se ha observado que la acción terapéutica de los glicósidos cardenólicos depende de la estructura de la aglicona, de la estereoquímica del compuesto y del tipo y número de unidades de azúcar que presente. Las cardenólidas son muy comunes en las familias Apocynaceae, Liliaceae y Scrophulariaceae. De especies como *Asclepias curassavica*, *Asclepias fruticosa*, *Asclepias incarta*, entre otras, se han aislado glicósidos cardenólicos, también se les ha encontrado en insectos que, como la *Danaus plexippus* (Mariposa Monarca), se alimentan de plantas del género *Asclepias*.<sup>38, 60-62</sup>

### **2.12 Biosíntesis de Withaesteroides, Triterpenos y Esteroides Cardenólidos: Rutas Acetato-Mevalonato y 1-Desoxi-D-Xilulosa-5-Fosfato.**

Los principales productos de estas dos rutas son el isoprenoide difosfato de isopentenilo (DFIP) y su isómero difosfato de dimetilalilo (DFDMA). Durante varias décadas se creyó que estas unidades de isopreno sólo eran biosintetizadas a partir de la ruta de acetato mevalonato, sin embargo, en la década de los 90's del siglo pasado, se observó que dichas unidades de isopreno pueden ser sintetizadas por una ruta diferente y ésta fue denominada vía mevalonato-independiente. En la actualidad se le conoce también como vía no-mevalonato, vía metileritritol-fosfato o ruta 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato.<sup>58,63,64</sup>

La ruta AMV (esquema 1) comienza con tres moléculas de acetil-coenzima A para formar el intermediario ácido mevalónico, siendo el producto final de esta vía el difosfato de isopentenilo, el cual mediante la IPP-isomerasa es transformado al isómero difosfato de dimetilalilo.

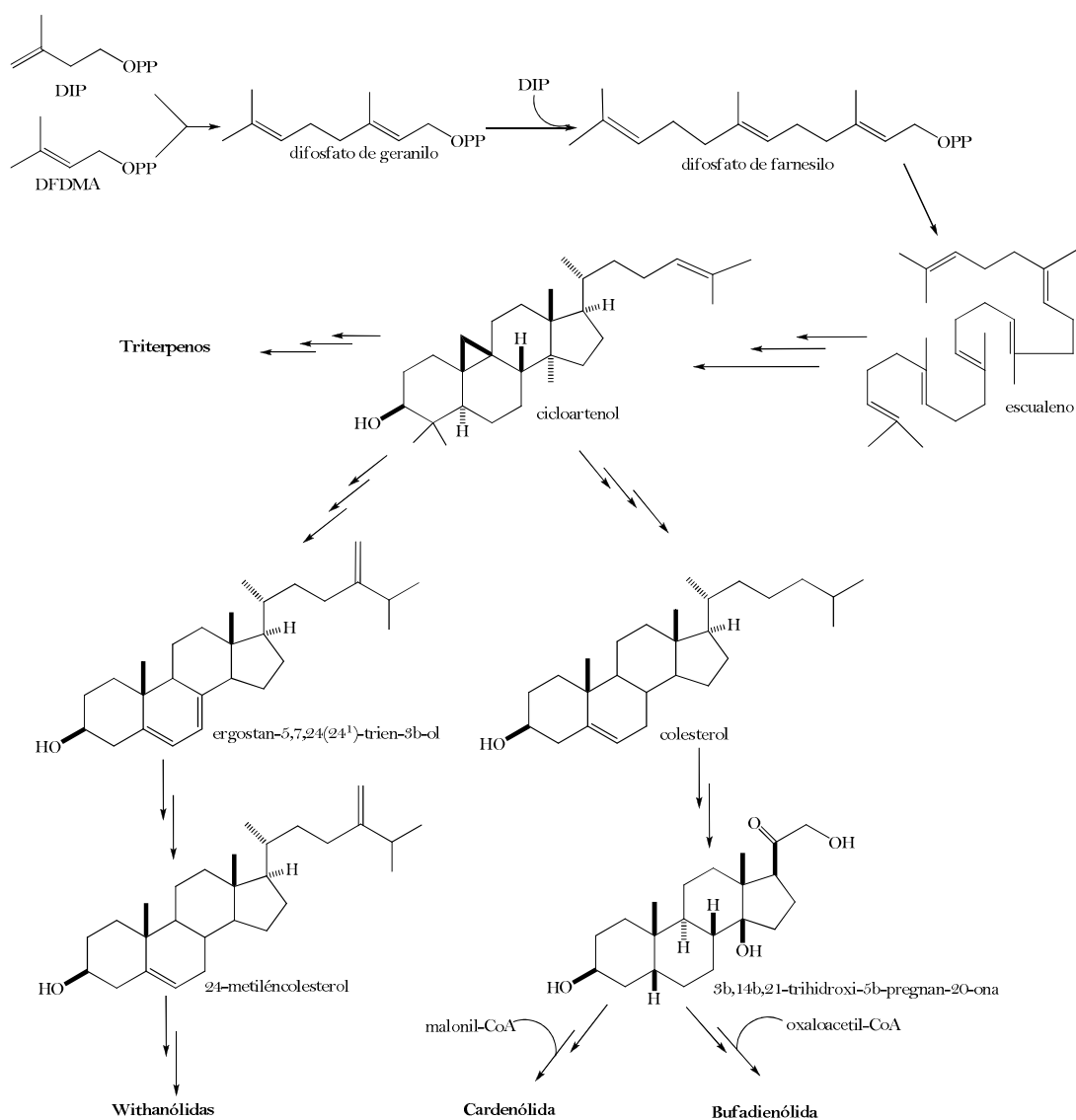
A diferencia de la ruta AMV, la ruta DOXF (esquema 1) tiene como sustratos gliceraldehído-3-fosfato y piruvato, que forman al precursor 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato, el cual mediante subsecuentes reacciones, genera difosfato de isopentenilo y difosfato de dimetilalilo.<sup>57</sup>



Esquema 1: Biosíntesis del difosfato de isopentenilo y difosfato de dimetilalilo.



La condensación de difosfato de isopentenilo y difosfato de dimetilalilo da origen a difosfato de geranilo, el cual por la condensación con otra unidad de difosfato de isopentenilo genera difosfato de farnesilo ( $C_{15}$ ). La unión de dos moléculas de difosfato de farnesilo da origen al escualeno ( $C_{30}$ ), que es el precursor del cicloartenol, el cual mediante diversas reacciones e intermediarios da origen a los triterpenos, withaesteroides y esteroides cardiotónicos (esquema 2).<sup>58,65</sup>



**Esquema 2:** Biosíntesis de withanólidas, cardenólidas y triterpenos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **General**

- Contribuir al conocimiento de la composición química de los géneros *Physalis* y *Asclepias* mediante el estudio químico de *Physalis virginiana* Miller y *Asclepias otarioides* Fourn.

#### **Particulares**

- Aislar los metabolitos secundarios presentes en los extractos de ambas plantas.
- Determinar la estructura de los metabolitos secundarios aislados.
- Determinar si los metabolitos aislados de *Physalis virginiana* Miller presentan actividad antiinflamatoria.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 *Physalis virginiana* Miller

#### 4.1.1 Elucidación estructural de los compuestos aislados

Del extracto de partes aéreas de *P. virginiana* se aislaron los whitaesteroides **1-3** con rendimientos respecto al peso de la planta seca de 0.0028 %, 0.0943 % y 0.0035 %, respectivamente. A estos compuestos se les asignaron los nombres triviales de virginoles A (**1**), B (**2**) y C (**3**).

El primero de estos compuestos, virginol A (**1**), presenta en su espectro de IR (espectro 1), bandas para grupos hidroxilo (3402, 3367  $\text{cm}^{-1}$ ) y cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -no saturada (1668  $\text{cm}^{-1}$ ). Se le asignó la fórmula molecular  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_6$  debido a que en su espectro de masas presentó iones pseudomoleculares de  $m/z$  511  $[\text{M}+\text{K}]^+$  y  $m/z$  495  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , mientras que en su espectro de masas de alta resolución (HRFAB<sup>+</sup>) mostró un ión de  $m/z$  495.2723 (calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{Na}$ , 495.2723). En su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 2) presenta señales para 28 carbonos, cinco de las cuales corresponden a metilos, seis a metilenos, once a metinos y seis a carbonos no protonados, entre estos últimos se encuentra el carbono de un carbonilo de cetona conjugada ( $\delta$  202.3, C-1). En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 3) se observan dos señales ( $\delta$  6.20, *d*,  $J=10$  Hz;  $\delta$  6.92, *dd*,  $J=10, 6$  Hz) que por su desplazamiento se atribuyen a los protones vinílicos  $\alpha$  (H-2) y  $\beta$  (H-3) de la cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -no saturada. Se observa también una señal en  $\delta$  3.76 (*dd*,  $J=6, 2.5$  Hz) cuyo desplazamiento indica que es geminal a un grupo hidroxilo cuyo protón genera la señal en  $\delta$  2.46 (*d*,  $J=2.5$  Hz). El hidroxilo se situó en C-4 debido a que en el espectro COSY (espectro 4) se observan las correlaciones de H-4 con H-3 y de H-3 con H-2. En el

espectro HMBC (espectro 5) se observan las correlaciones de C-1 con H-3, con el protón de un metino ( $\delta$  1.00, H-9) y con los protones de un metilo ( $\delta$  1.40, CH<sub>3</sub>-19). Estos últimos a su vez correlacionan con C-9 ( $\delta$  44.2), C-10 ( $\delta$  47.7) y con un carbón no protonado y base de epóxido ( $\delta$  63.9) que se asignó a C-5. El otro carbono base de epóxido corresponde a un metino y se atribuyó a C-6 porque el hidrógeno unido a él (H-6) es un singulete ancho en  $\delta$  3.23 que muestra correlaciones con C-4, C-7 ( $\delta$  31.2) y C-8 ( $\delta$  29.8), en el espectro HMBC. Con lo anterior se establece que el compuesto **1** contiene un fragmento como el que se ilustra en la figura 11.

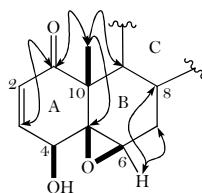


Figura 11: Correlaciones HMBC del compuesto **1**.

La orientación del epóxido en C5 y C6 quedó establecida como  $\beta$ , al igual que la orientación del hidroxilo en C4, ya que en el espectro Noesy (espectro 6) se observa una fuerte interacción entre las señales de H-4 y H-6. Se ha descrito que cuando la orientación del epóxido es  $\beta$  la señal H-6 se localiza a campo más bajo ( $\delta \sim 3.16$ ) que cuando el epóxido tiene una orientación  $\alpha$  ( $\delta \sim 3.04$ ).<sup>51</sup> En el caso del compuesto **1**, H-6 aparece en  $\delta$  3.23, lo que es congruente con una orientación  $\beta$  del epóxido.

El compuesto **1** posee un epoxi-lactol cuya presencia se deduce de las señales en  $\delta$  3.70 y en  $\delta$  4.99 que se asignaron, respectivamente, al protón base de lactol H-22 y al protón hemiacetálico H-26. Esta última señal es un doblete ( $J=10.5$  Hz) por interacción con el protón de un grupo hidroxilo cuya señal aparece en  $\delta$  3.51 (*d*,  $J=10.5$  Hz, C26-OH). La señal de C-26 aparece en  $\delta$  91.8. En el espectro COSY H-22 correlaciona con una señal en  $\delta$  1.66 que se asignó a los protones de C-23. En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observan señales para dos carbonos base de epóxido ( $\delta$  65.2, C-24 y  $\delta$  63.9, C-25), y dos carbonos de metilo ( $\delta$  16.6, C-27 y  $\delta$  19.0, C-28); para el carbono base de lactol ( $\delta$  64.9, C-22) y para el carbono del metileno ( $\delta$ -29.4, C-23). Estas asignaciones tuvieron como base las correlaciones C-H a dos y tres enlaces de H-26 con C-22, C-24 y C-25; del protón del hidroxilo en C-26 con C-25 y C-26; de C-23 con H<sub>3</sub>-28 y de C-26 con H<sub>3</sub>-27. Estas correlaciones se ilustran en la figura 12.

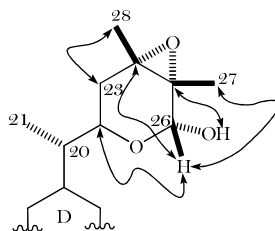
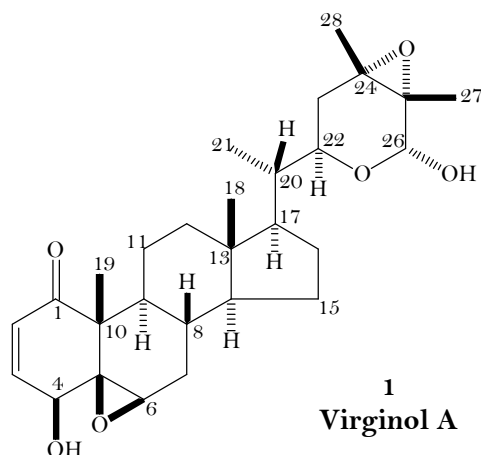


Figura 12: Correlaciones HMBC del compuesto **1**.

Por otro lado, en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se observan señales para dos grupos metilo adicionales. Estas señales fueron asignadas a los metilos 18 ( $\delta_{\text{H}}$  0.67 s,  $\delta_{\text{C}}$  11.7) y 21 ( $\delta_{\text{H}}$  0.88 d,  $\delta_{\text{C}}$  12.7). En el espectro HMBC, los protones de C-18 correlacionan con el carbono de un metileno cuya señal aparece en  $\delta$  39.5 y se asignó a C-12. Los protones del metilo 18 también mostraron correlaciones con los carbonos de dos metinos en  $\delta$  56.1 (C-14) y  $\delta$  52.6 (C-17) y con un carbono no protonado en  $\delta$  42.5 (C-13). A su





El compuesto **2** (virginol B) presenta en su espectro de IR (espectro 7) bandas para hidroxilo ( $3549\text{ cm}^{-1}$ ), éster ( $1726\text{ cm}^{-1}$ ) y cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -no saturada ( $1679\text{ cm}^{-1}$ ). Su espectro de masas (EM-ES) presentó iones pseudomoleculares de  $m/z$  569  $[\text{M}+\text{K}]^+$  y 553  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , que corresponden a un peso molecular de 530 uma, del que se deduce la fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{O}_8$ . Su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 8) presentó 30 señales con lo cual se corrobora la fórmula molecular propuesta. Las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para los átomos en las posiciones 1-12 de los compuestos **1** y **2** son muy semejantes (tablas 1 y 2), lo mismo sucede con los de la cadena lateral en C-17 (átomos 21-28). Esto indica la misma funcionalización de ambos compuestos en los anillos A, B y C y en la cadena lateral, por lo que las diferencias entre ellos deben radicar en el anillo D. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **2** muestra, con respecto al compuesto **1**, dos señales más para carbono en  $\delta$  170.7 y  $\delta$  21.2. Estas señales corresponden a los carbonos de un carbonilo (C-1') y un metilo (C-2') de un grupo acetato. La señal para los protones del metilo ( $\text{H}_3\text{-2}'$ ) aparece en  $\delta$  2.06 como un singulete. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 9) se observa un triplete ancho ( $\delta$  4.99,  $J=7\text{ Hz}$ ). Esta señal se atribuye al protón base de éster H-16, debido

a que en el espectro HMBC (espectro 10) correlaciona con los carbonos C-1', C-14 ( $\delta$  53.7) y C-20 ( $\delta$  37.6), mientras que C-16 correlaciona con H-15 ( $\delta$  1.49) y H-17 ( $\delta$  1.33). Con lo anterior se propone que en el compuesto **2** existe un grupo acetoxi en C-16.

La similitud de los datos espectroscópicos de **1** y **2** sugiere que poseen la misma configuración en los centros estereogénicos que les son comunes. En cuanto a la configuración de C-16 en **2**, se propone como *R* tomando en consideración el valor de la constante de acoplamiento  $J_{16-17}$  que es de 7 Hz, lo que indica una relación *trans* y por lo tanto una orientación  $\alpha$  del grupo acetato. El espectro NOESY (espectro 11) muestra interacciones de H-16 con H<sub>3</sub>-18 y H-20, que apoyan lo anterior, sin embargo, la sobreposición parcial de las señales H-16 y H-26 y de H-12 ( $\delta$  1.94), H-20 ( $\delta$  1.87) y H-23 ( $\delta$  1.88), hace que esta apreciación sea ambigua. Por esta razón se decidió someter al compuesto **2** a un análisis de difracción de rayos-X (figura 14), cuyos resultados confirmaron una configuración *R* para C-16, esto es una orientación  $\alpha$  para el grupo acetoxi. También se confirma la configuración asignada a los otros centros estereogénicos de la molécula. Con lo anterior, la estructura de virginol B quedó establecida como se muestra en **2**.

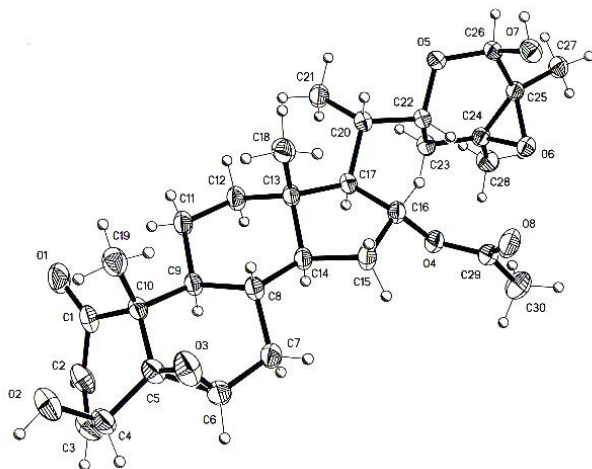
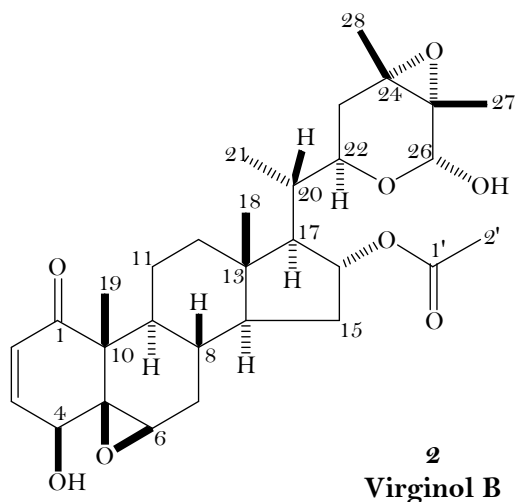


Figura 14: Difracción de Rayos X del compuesto **2**.





Los espectros de masas (EM-ES y HRFABMS) del compuesto **3** (virginol C), presentan un ión pseudomolecular  $m/z$  537  $[M+Na]^+$ , mientras que su espectro de RMN  $^{13}C$  (espectro 13) presenta señales para 30 carbonos, con lo cual quedó establecida su fórmula molecular como  $C_{30}H_{42}O_7$ . En su espectro de IR (espectro 12) presenta señales para hidroxilo ( $3506\text{ cm}^{-1}$ ), así como para éster ( $1722\text{ cm}^{-1}$ ) y cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ - no saturada ( $1669\text{ cm}^{-1}$ ).

En el espectro de RMN  $^1H$  (espectro 14) se observan dos señales en  $\delta$  6.02 (*dd*,  $J=10, 2.5\text{ Hz}$ ) y  $\delta$  6.85 (*ddd*,  $J=10, 6.5, 2.5\text{ Hz}$ ) asignadas a los protones  $\alpha$  (H-2) y  $\beta$  (H-3) de una cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -no saturada. En el espectro COSY (espectro 15) la señal de H-3 además de correlacionar con la señal de H-2, correlaciona con las señales en  $\delta$  2.98 (*dt*,  $J=19, 2.5\text{ Hz}$ ) y  $\delta$  1.90 (*dd*,  $J=19, 6.5\text{ Hz}$ ), las cuales se atribuyen a los protones del metileno alílico  $CH_2$ -4. En el espectro de RMN  $^{13}C$  se observa la señal de C-4 en  $\delta$  33.0 y una señal en  $\delta$  203.5 (C-1) que confirma la existencia de la cetona conjugada. Esta última señal

correlaciona con el protón H-3 y con los protones de un metilo  $\delta$  1.24 (H<sub>3</sub>-19), en el espectro HMBC (espectro 16).

De lo anterior se deduce que a diferencia de los compuestos **1** y **2**, el compuesto **3** no posee un grupo hidroxilo en C-4, sin embargo, sí posee un grupo 5 $\beta$ , 6 $\beta$ -epoxi. Esto se deduce a partir de que en el espectro HMBC se observan correlaciones de los protones del metilo 19 con un carbono no protonado ( $\delta$  62.0), asignado a C-5, y con el carbono de un metino ( $\delta$  63.2), atribuido a C-6. El desplazamiento de C-5 y C-6 corresponde a carbonos base de epóxido. La presencia del epóxido se corrobora con el desplazamiento de la señal de H-6 ( $\delta$  3.12, *d*,  $J=3$  Hz) que es característico de un protón base de dicho grupo funcional. Las señales en  $\delta_C$  170.7 (C-1'),  $\delta_C$  21.2 (C-2') y  $\delta_H$  2.06 (*s*, H<sub>3</sub>-2') indican la presencia de un acetato en la molécula. Las correlaciones observadas en el espectro HMBC de C-1' con la señal de un protón en  $\delta$  4.99 (H-16), que a su vez correlaciona con C-14 ( $\delta$  53.5), C-15 ( $\delta$  34.4), C-17 ( $\delta$  58.2) y C-20 ( $\delta$  37.7) permiten establecer que el acetato se encuentra unido a C-16.

En el compuesto **3**, al igual que en **2**, H-16 es un triplete con  $J=7$  Hz, lo que establece la misma orientación del grupo acetato en ambos compuestos. De hecho las señales para los carbonos e hidrógenos de las posiciones 12-28 (excepto 19) son prácticamente iguales en estos compuestos, lo que indica que presentan la misma estructura y estereoquímica en esa parte de la molécula, por lo que la estructura de virginol C quedó establecida como se muestra en **3**.

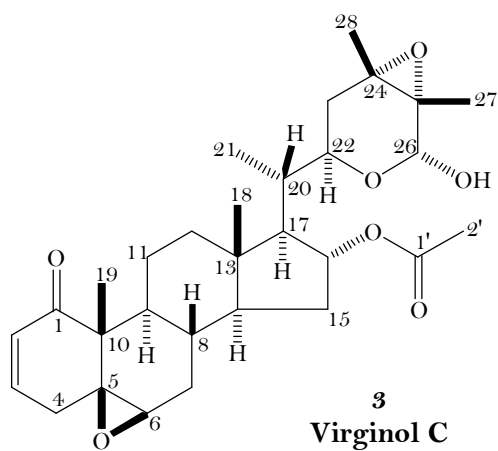


Tabla 1: Datos espectroscópicos de RMN <sup>13</sup>C de los compuestos 1-3.

Carbono		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
1	C	202.3	202.2	203.5
2	CH	132.4	132.2	129.3
3	CH	141.7	142.0	144.4
4	CH o CH <sub>2</sub>	70.4	69.8	33.0
5	C	63.9	63.8	62.0
6	CH	62.7	62.5	63.2
7	CH <sub>2</sub>	31.2	31.1	31.1
8	CH	29.8	29.2	29.3
9	CH	44.2	44.0	44.6
10	C	47.7	47.6	48.4
11	CH <sub>2</sub>	22.2	21.9	23.3
12	CH <sub>2</sub>	39.5	39.4	39.7
13	C	42.5	43.2	43.3
14	CH	56.1	53.7	53.5
15	CH <sub>2</sub>	24.3	34.4	34.4
16	CH o CH <sub>2</sub>	27.2	78.8	78.9
17	CH	52.6	58.1	58.2
18	CH <sub>3</sub>	11.7	13.0	13.0
19	CH <sub>3</sub>	17.4	17.5	15.0
20	CH	39.0	37.6	37.7
21	CH <sub>2</sub>	12.7	12.7	12.8
22	CH	65.0	65.0	65.0
23	CH <sub>2</sub>	29.4	29.6	29.6
24	C	65.2	65.0	65.0
25	C	63.9	63.8	63.8
26	CH	91.8	91.8	91.8
27	CH <sub>3</sub>	16.6	16.5	16.5
28	CH <sub>3</sub>	19.0	18.9	18.9
1'	C	-----	170.7	170.7
2'	CH <sub>3</sub>	-----	21.2	21.2

<sup>a</sup>Determinado en CDCl<sub>3</sub> a 125 MHz.

Tabla 2: Datos espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H de los compuestos 1-3.

<sup>1</sup> H	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
<b>2</b>	6.20 <i>d</i> (10)	6.20 <i>d</i> (10)	6.02 <i>dd</i> (10, 2.5)
<b>3</b>	6.92 <i>dd</i> (10, 6)	6.94 <i>dd</i> (10, 5.5)	6.85 <i>ddd</i> (10, 6, 2.5)
<b>4</b>	3.76 <i>dd</i> (6, 2.5)	3.78 <i>d</i> (5.5)	2.98 <i>dt</i> (19, 2.5)
<b>4'</b>	-----	-----	1.90 <i>dd</i> (19, 6)
<b>6</b>	3.23 <i>brs</i>	3.24 <i>brs</i>	3.12 <i>d</i> (3)
<b>7</b>	2.15 <i>ddd</i> (14.5, 4, 2.5)	2.08 <i>ddd</i> (15, 4, 2.5)	2.00 <i>dt</i> (14.5, 3.5)
<b>7'</b>	1.27 <i>ddd</i> (14.5, 12.5, 1)	1.30 <i>m</i>	1.31 <i>m</i>
<b>8</b>	1.50 <i>m</i>	1.52 <i>m</i>	1.55 <i>dtd</i> (11, 11, 4)
<b>9</b>	1.00 <i>td</i> (12, 4)	1.07 <i>td</i> (11.5, 4)	1.19 <i>td</i> (12, 4)
<b>11</b>	1.81 <i>ddd</i> (14.5, 8.4)	1.84 <i>m</i>	2.07 <i>m</i>
<b>11'</b>	1.45 <i>m</i>	1.44 <i>m</i>	1.45 <i>m</i>
<b>12</b>	1.93 <i>dt</i> (13, 3.5)	1.94 <i>dt</i> (12.5, 3.5)	1.94 <i>dt</i> (12, 3.5)
<b>12'</b>	1.11 <i>m</i>	1.23 <i>m</i>	1.28 <i>m</i>
<b>14</b>	0.92 <i>m</i>	1.24 <i>m</i>	1.25 <i>m</i>
<b>15</b>	1.57 <i>m</i>	1.76 <i>td</i> (14, 9)	1.75 <i>dt</i> (14, 9)
<b>15'</b>	1.12 <i>m</i>	1.49 <i>m</i>	1.48 <i>m</i>
<b>16</b>	1.70 <i>m</i>	4.99 <i>brt</i> (7)	4.99 <i>t</i> (7)
<b>16'</b>	1.38 <i>m</i>	-----	-----
<b>17</b>	1.05 <i>m</i>	1.33 <i>dd</i> (11, 7)	1.35 <i>m</i>
<b>18</b>	0.67 <i>s</i>	0.72 <i>s</i>	0.73 <i>s</i>
<b>19</b>	1.40 <i>s</i>	1.40 <i>s</i>	1.24 <i>s</i>
<b>20</b>	1.73 <i>m</i>	1.87 <i>m</i>	1.87 <i>m</i>
<b>21</b>	0.88 <i>d</i> (6.5)	0.90 <i>d</i> (7)	0.91 <i>d</i> (7)
<b>22</b>	3.70 <i>td</i> (10, 4)	3.52 <i>ddd</i> (11.5, 3.5, 2.5)	3.52 <i>dt</i> (11.5, 3)
<b>23</b>	1.66 <i>m</i>	1.88 <i>m</i>	1.89 <i>m</i>
<b>23'</b>	1.66 <i>m</i>	1.61 <i>dd</i> (14, 11.5)	1.61 <i>dd</i> (14, 11.5)
<b>26</b>	4.99 <i>d</i> (10.5)	4.97 <i>s</i>	4.97 <i>sa</i>
<b>27</b>	1.42 <i>s</i>	1.40 <i>s</i>	1.40 <i>s</i>
<b>28</b>	1.40 <i>s</i>	1.39 <i>s</i>	1.39 <i>s</i>
<b>2'</b>	-----	2.06 <i>s</i>	2.06 <i>s</i>
<b>4-OH</b>	2.46 <i>d</i> (2.5)	2.58 <i>br</i>	-----
<b>26-OH</b>	3.51 <i>d</i> (10.5)	No observada	No observada

<sup>a</sup>Determinado en CDCl<sub>3</sub> a 500 MHz.

#### 4.1.2 Actividad Antiinflamatoria de los compuestos 1-3 en el modelo de edema inducido con TPA.

La capacidad de los virginoles A, B y C (1-3) para inhibir el edema inducido con TPA en oreja de ratón, se presenta en el cuadro 1. Como se puede observar, en todos los casos el porcentaje de inhibición fue mayor al 50 %.

**Cuadro 1: Efecto antiinflamatorio de los virginoles A-C. % de inhibición del edema en oreja de ratón inducido con TPA.**

Compuesto		Dosis ( $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ )	Edema (mg)	Inhibición (%)
Control		-----	14.13 $\pm$ 1.17	-----
Virginol A	1	1	4.76 $\pm$ 1.64 **	59.93
Virginol B	2	1	6.28 $\pm$ 1.87 *	55.60
Virginol C	3	1	5.70 $\pm$ 1.50 **	62.15

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

A pesar de que por las cantidades obtenidas sólo se pudo determinar la  $\text{IC}_{50}$  del compuesto 2 (cuadro 2), los valores obtenidos muestran que éste resultó tener la misma actividad que la indometacina, un fármaco indicado para el tratamiento de la inflamación,<sup>67</sup> que en este caso se empleó como referencia.

Como el porcentaje de inhibición de los tres virginoles es muy parecido se cree que la  $\text{IC}_{50}$  de los compuestos 1 y 3, debe ser similar a la que presenta el compuesto 2.

**Cuadro 2: Efecto antiinflamatorio. Determinación de la IC<sub>50</sub> en edema en oreja de ratón inducido con TPA.**

Compuesto	Dosis (μmol/oreja)	Edema (mg)	Inhibición (%)	IC <sub>50</sub> (μmol/oreja)
<b>2</b>	0.18	9.56 ± 1.00**	37.57	0.27 r=0.99
	0.32	6.70 ± 1.30**	56.25	
	0.56	4.88 ± 0.64**	68.17	
<b>Indometacina</b>	0.1	11.83 ± 0.70*	21.11	0.27 r=0.999
	0.31	6.82 ± 1.27*	54.53	
	1	1.99 ± 0.68*	83.73	

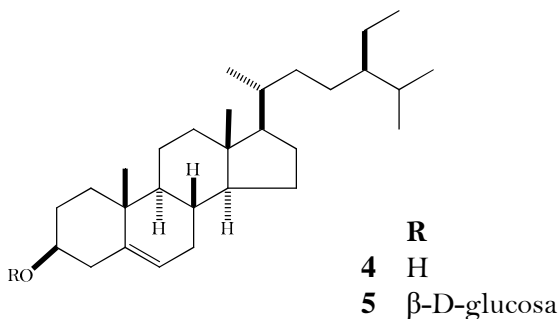
Los datos representan el promedio de cinco a siete animales ± el error estándar de la media ( $x \pm EEM$ ). Los resultados se analizaron mediante una ANOVA seguida de una prueba de Dunnett. Los valores  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideran como diferencia significativa con respecto al control.

## 4.2 *Asclepias otarioides* Fourn.

### 4.2.1 Elucidación estructural de los compuestos aislados

Como resultado del estudio químico de la fracción de AcOEt de partes aéreas de *Asclepias otarioides* Fourn. se aislaron  $\beta$ -sitosterol (**4**), glucósido de  $\beta$ -sitosterol (**5**) y 4 triterpenos (**6-9**), cuya elucidación estructural se describe a continuación.

El compuesto **4**, se identificó como  $\beta$ -sitosterol mediante el análisis de sus datos físicos y por comparación, mediante ccf, con una muestra auténtica. El glucósido de  $\beta$ -sitosterol (**5**) se identificó por análisis de sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación con una muestra auténtica.



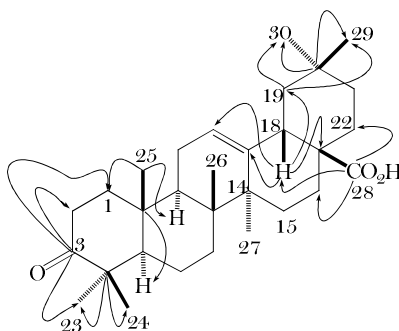
El compuesto **6** mostró en su espectro de IR una banda ancha en  $3325\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al grupo hidroxilo de un ácido carboxílico, la absorción en  $1734\text{ cm}^{-1}$  se atribuye al grupo carbonilo (C=O) de un ácido carboxílico, mientras que la absorción en  $1701\text{ cm}^{-1}$  fue asignada a una cetona saturada.



En su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 17) presenta 30 señales que corresponden a siete metilos, diez metilenos, cinco metinos y ocho carbonos no protonados. Su espectro de masas (IE) presenta un ión molecular  $m/z$  454, consistente con una fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$ , que indica un índice de insaturación de ocho. De lo anterior se deduce que se trata de un triterpeno pentacíclico con tres insaturaciones adicionales, dos de las cuales corresponden a los carbonilos de una cetona y de un ácido carboxílico y la tercera a un doble enlace trisustituido, ya que en el espectro de  $^1\text{H}$  se observa un triplete en  $\delta$  5.30 ( $J=3.5$  Hz) para un protón vinílico y en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN dos señales para carbonos vinílicos en  $\delta$  122.4 (CH) y 143.6 (C). Las 7 señales para grupos metilo en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (espectro 18) son singuletes, lo que permite suponer que el compuesto **6** presenta un esqueleto de oleanano, con el octavo metilo oxidado a ácido.

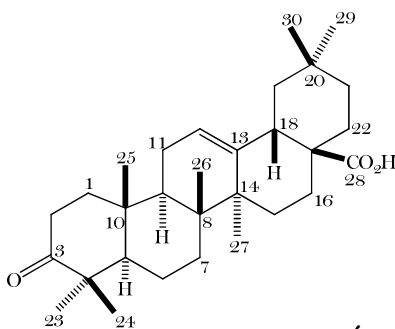
La posición de la cetona saturada en el carbono 3 de la molécula se dedujo de las correlaciones que presenta en el espectro HMBC el carbono de la cetona ( $\delta$  217.6) con dos multipletes en  $\delta$  1.88 (H-1) y  $\delta$  1.41(H-1'), así como con 2 señales *ddd* ( $\delta$  2.54,  $J= 16, 11, 7$  Hz y  $\delta$  2.36,  $J= 16, 7, 3.5$  Hz), que por su desplazamiento corresponden a protones alfa a un grupo carbonilo, por lo que se asignaron a H-2 y H-2'. Además C-3 correlaciona con los protones de dos grupos metilo cuyas señales aparecen  $\delta$  1.08 y  $\delta$  1.03. Dichas señales fueron asignadas a los protones de los metilos 23 y 24, respectivamente. Éstos a su vez mostraron correlaciones con un carbono cuaternario cuya señal aparece en  $\delta$  47.4 (C-4) y con el carbono de un metino en  $\delta$  55.3 (C-5). La propuesta de que la cetona está en C-3 se confirmó por las correlaciones del carbono del  $\text{CH}_3$ -25 con H-1', H-5 ( $\delta$  1.33) y H-9 ( $\delta$  1.65). Por otra parte en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observa una señal *dd* en  $\delta$  2.84 ( $J= 14, 4$  Hz) que se asignó a H-18 y fue clave para determinar la posición del ácido carboxílico y del doble enlace en la molécula, ya que en el espectro HMBC presenta correlaciones con

las señales de dos carbonos vinílicos ( $\delta$  122.4, C-12 y  $\delta$  143.6 C-13), también con las de los carbonos de dos metilenos ( $\delta$  23.0, C-16 y  $\delta$  45.8, C-19), así como con las de dos carbonos no protonados ( $\delta$  41.8, C-14 y  $\delta$  46.6, C-17) y con el carbono del carbonilo del ácido ( $\delta$  183.4, C-28).



Algunas correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto **6**

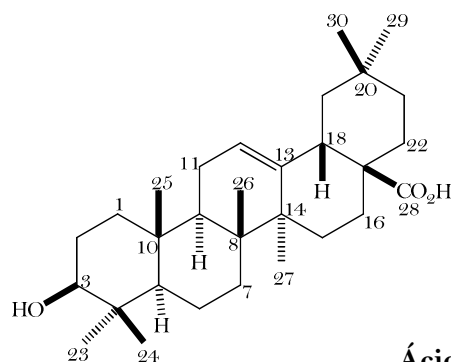
De esta forma la estructura del compuesto **6** quedó establecida como la del ácido oleanónico, compuesto que ya ha sido descrito en la literatura.<sup>55,68</sup> Para confirmar la identidad de **6** y ácido oleanónico se compararon sus constantes físicas y espectroscópicas con las de la literatura. Como se puede apreciar en la tabla 7, sus señales de RMN  $^{13}\text{C}$  son prácticamente iguales y lo mismo sucede con las de RMN  $^1\text{H}$  (no mostradas) lo cual indica que son idénticos. Sin embargo la rotación específica de **6** ( $[\alpha]_D^{20} + 93.53$  ( $\text{CHCl}_3$ , c 0.23)) no concordaba con la reportada ( $[\alpha]_D^{20} + 101$  ( $\text{CHCl}_3$ , c 1.63)),<sup>55</sup> por lo que para disipar cualquier duda se decidió correlacionar químicamente a **6** con ácido oleanólico (**7**). Para ello **7** se oxidó con reactivo de Jones, con lo que se obtuvo el ácido oleanónico idéntico en todos los aspectos (ccf, pf,  $[\alpha]_D^{20}$ , RMN) a **6**.



**6**  
**Ácido oleanónico**  
**(Ácido olean-12-en-3-oxo-28-oico)**

El espectro de masas (EM-IE) del compuesto **7** presenta un ión molecular  $m/z$  456, consistente con una fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O_3$ , que indica un índice de insaturación de siete, con lo que se deduce que se trata de un triterpeno pentacíclico con 2 insaturaciones adicionales. Una de las insaturaciones corresponde al carbonilo de un ácido carboxílico y la segunda a un doble enlace trisustituido, ya que en el espectro de  $^1H$  RMN (espectro 20) se observa un triplete en  $\delta$  5.49 ( $J=3.6$  Hz) que se asignó a un protón vinílico y en el espectro de  $^{13}C$  RMN (espectro 19) se observan dos señales para carbonos vinílicos en  $\delta$  122.6 (CH) y 144.9 (C). Lo anterior y el análisis de los espectros de RMN mono y bidimensionales del compuesto **7** muestran que éste presenta un esqueleto de oleanano y una estructura muy semejante a la del compuesto **6**.

La diferencia entre **6** y **7** radica en que el compuesto **7** no presentó la señal para el carbono de la cetona saturada, pero sí una señal para metino base de oxígeno en  $\delta$  78.1 (C-3). De esta forma el compuesto **7** se identificó como ácido oleanólico, un triterpeno ya conocido. La comparación de los datos físicos y espectroscópicos de **7** con los ya reportados para ácido oleanólico,<sup>55,69</sup> confirman lo anterior.

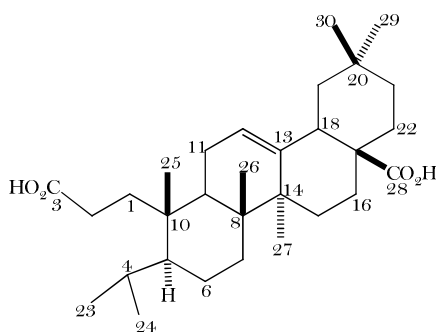


7  
**Ácido oleanólico**  
 (Ácido 3β-hidroxiolean-12-en-28-oico)

El espectro de masas del compuesto 8, presenta un ión molecular  $m/z$  472 consistente con la fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O_4$ . En su espectro de RMN  $^{13}C$  (espectro 21) presenta señales para 30 carbonos. La presencia de dos bandas en su espectro de IR, una en  $1705\text{ cm}^{-1}$  y otra ancha ( $2500\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ ) con máximos en  $2721$  y  $2664\text{ cm}^{-1}$ , así como de dos señales en  $\delta$  183.3 y  $\delta$  179.2 en el espectro de RMN  $^{13}C$  indican la existencia de dos carboxilos de ácido en la molécula. La señal en  $\delta$  183.3 fue asignada a C-28 por las correlaciones que presenta en el espectro HMBC, con las señales en  $\delta$  1.97 (H-16),  $\delta$  2.83 (H-18) y  $\delta$  1.77 (H-22). La señal en  $\delta$  179.2 fue asignada a C-3, debido a que en el espectro HMBC presenta correlaciones con la señal en  $\delta$  2.21, atribuida a los protones H-2 y H-2', misma que en el espectro COSY correlaciona con un multiplete en  $\delta$  1.66 asignado a H-1 y H-1'. En el espectro HMBC la señal en  $\delta$  1.66 correlaciona con C-2 ( $\delta$  28.2), C-3, C-5 ( $\delta$  47.5), C-9 ( $\delta$  38.9) y C-10 ( $\delta$  39.9). Lo anterior indica que el anillo A sufrió una ruptura entre los carbonos 3 y 4. Esto se confirma por la presencia de un grupo isopropilo que origina las señales en  $\delta$  1.85 ( $m$ , 1H, H-4),  $\delta$  0.92 ( $d$ ,  $J=6.5\text{ Hz}$ , 3H, H-23) y  $\delta$  0.80 ( $d$ ,  $J=6.5\text{ Hz}$ , 3H, H-24) en el espectro de RMN  $^1H$ .

La presencia de un doble enlace entre los carbonos 12 y 13 se dedujo de las señales en  $\delta_H$  5.29 (*t*,  $J=3.5$  Hz, H-12),  $\delta_C$  122.7 (CH-12) y  $\delta_C$  143.3 (C-13), observadas en los espectros de RMN  $^1H$  (espectro 22) y  $^{13}C$ .

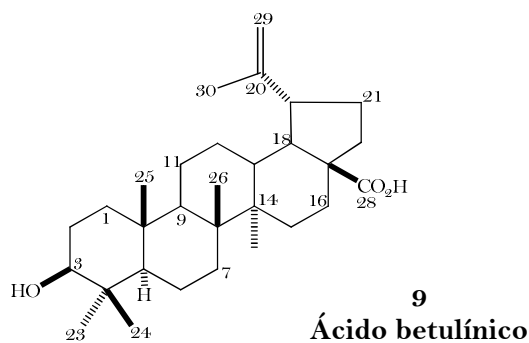
De esta forma la estructura del compuesto **8** fue establecida como la del ácido 3,4-seco-olean-12-en-3,28-dioico, compuesto ya descrito en la literatura. La gran similitud observada al comparar los datos de RMN de **8** con los reportados<sup>70</sup> (tabla 4), confirmó su identidad.



**8**  
**Ácido 3,4-seco-olean-12-en-3,28-dioico**

El compuesto **9** presentó treinta señales en su espectro de RMN  $^{13}C$  y en su espectro de masas el ión molecular  $m/z$  456, por lo que se le asignó la fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O_3$ . Su espectro de IR muestra señales para ácido carboxílico ( $3456, 1692\text{ cm}^{-1}$ ) y doble enlace ( $1642, 885\text{ cm}^{-1}$ ). En su espectro de RMN  $^1H$  (espectro 23) se observan las señales de un metilo vinílico ( $\delta$  1.79) y un doble enlace terminal ( $\delta$  4.96, *d*,  $J=2.5$  Hz;  $\delta$  4.78, *dd*,  $J=2.5, 1.5$  Hz). Estas señales indican la existencia de un grupo isopropileno en la molécula. Lo anterior, sumado a la presencia de señales para cinco metilos terciarios y para un protón geminal a un grupo hidroxilo ( $\delta$  3.47, *dd*,  $J=9, 7$  Hz) en el espectro de RMN  $^1H$ , así como de una señal para el carbono de un grupo carboxilo ( $\delta$  179.2) en el

espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 24), llevaron a suponer que la estructura del compuesto **9**, correspondía a la del ácido betulínico. Lo anterior se confirmó por la similitud observada al comparar los datos físicos y espectroscópicos de **9** con los publicados para el ácido betulínico.<sup>56,71</sup>



Así, de la fracción de AcOEt del extracto de *Asclepias otarioides* se lograron aislar seis compuestos, cuatro de los cuales son triterpenos. En la tabla 3 se muestran las cantidades aisladas de cada uno de estos compuestos.

**Tabla 3:** Rendimiento de los compuestos **4-9** aislados de *Asclepias otarioides*.

	Compuesto	Rendimiento
<b>4</b>	$\beta$ -Sitosterol	0.2986 g
<b>5</b>	Glucósido $\beta$ -sitosterol	0.0532 g
<b>6</b>	Ácido oleanónico	3.8757 g
<b>7</b>	Ácido oleanólico	0.5688 g
<b>8</b>	Ácido 3,4-seco-olean-12-eno-3,28-dioico	0.0210 g
<b>9</b>	Ácido betulínico	0.0412 g

Tabla 4: Datos espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  de los compuestos 6-9 (125 MHz).

	$^{13}\text{C}$	6 <sup>a</sup>	6 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup> (lit) <sup>68</sup>	7 <sup>c</sup>	8 <sup>a</sup>	8 <sup>c</sup>	8 <sup>c</sup> (lit) <sup>70</sup>	9 <sup>d</sup>
1	CH <sub>2</sub>	39.1	40.2	40.24	39.0	32.7	33.9	34.4	39.7
2	CH <sub>2</sub>	34.1	35.0	35.08	28.1	28.2	29.4	29.9	28.7
3	C o CH	217.6	220.5	220.46	78.1	179.2	176.6	177.1	78.5
4	C o CH	47.4	48.6	48.51	39.4	25.4	25.4	25.9	39.9
5	CH	55.3	56.5	56.55	55.9	47.5	47.9	48.4	56.3
6	CH <sub>2</sub>	19.6	20.7	20.74	18.8	18.1	18.5	19.0	19.2
7	CH <sub>2</sub>	32.2	33.5	33.48	33.3	31.7	32.2	32.7	35.2
8	C	39.3	40.5	40.53	39.8	39.2	39.6	40.0	41.3
9	CH	46.9	48.2	48.19	48.2	38.9	38.4	38.9	51.5
10	C	36.8	37.9	37.93	37.4	39.9	40.2	40.6	37.9
11	CH <sub>2</sub>	23.5	24.6	24.60	23.9	23.7	24.1	24.6	21.6
12	CH o CH <sub>2</sub>	122.4	123.5	123.49	122.6	122.7	122.7	123.2	26.5
13	C o CH	143.6	145.3	145.25	144.9	143.4	144.7	145.1	39.0
14	C	41.8	43.0	43.04	42.2	42.2	42.7	43.2	43.2
15	CH <sub>2</sub>	27.7	28.8	28.86	28.4	27.7	28.3	28.8	30.7
16	CH <sub>2</sub>	23.0	24.1	24.08	23.7	22.9	23.8	24.3	33.3
17	C	46.6	47.7	47.67	46.7	46.6	46.7	47.2	57.0
18	CH	41.1	42.8	42.82	42.1	41.4	42.1	42.6	50.2
19	CH o CH <sub>2</sub>	45.8	47.2	47.21	46.5	45.8	46.4	46.9	48.2
20	C	30.7	31.6	31.62	31.0	30.7	31.0	31.5	151.7
21	CH <sub>2</sub>	33.8	34.9	34.9	34.3	33.8	34.2	34.8	31.6
22	CH <sub>2</sub>	32.4	33.8	33.80	33.2	32.4	33.2	33.7	38.0
23	CH <sub>3</sub>	26.5	27.0	27.02	28.8	24.8	24.9	25.4	29.0
24	CH <sub>3</sub>	21.4	21.9	21.90	16.6	18.8	19.1	19.6	16.7
25	CH <sub>3</sub>	15.0	15.5	15.52	15.6	19.2	19.5	20.0	16.8
26	CH <sub>3</sub>	17.0	17.6	17.60	17.5	17.1	17.5	18.0	16.8
27	CH <sub>3</sub>	25.8	26.3	26.29	26.2	25.7	25.9	26.4	15.3
28	C	183.4	181.9	181.77	180.2	183.3	180.2	180.6	179.2
29	CH <sub>2</sub> o CH <sub>3</sub>	33.0	33.6	33.56	33.3	33.0	33.3	33.8	110.3
30	CH <sub>3</sub>	23.3	23.9	23.96	23.8	23.6	23.8	24.2	19.9

<sup>a</sup>Determinado en CDCl<sub>3</sub>; <sup>b</sup>Determinado en CD<sub>3</sub>OD; Determinado en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N a 75 MHz, <sup>c</sup>Determinado en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N; (\*) Nótese que entre los datos de 8 y los de la referencia 53 hay una diferencia constante de ~0.5 ppm.

Tabla 5: Datos espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H de los compuestos 6, 8 y 9.

<sup>1</sup> H	6 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	9 <sup>b</sup>
1	1.88 <i>m</i>	1.66 <i>m</i>	0.98 <i>m</i>
1'	1.39-1.43 <i>m</i>	1.66 <i>m</i>	1.67 <i>dt</i> (13, 3.5)
2	2.54 <i>ddd</i> (16, 11, 7)	2.21 <i>m</i>	1.87 <i>td</i> (11, 3.5)
2'	2.36 <i>ddd</i> (16, 3.5, 7)	2.21 <i>m</i>	1.87 <i>td</i> (11, 3.5)
3	-----	-----	3.47 <i>dd</i> (8.7, 7.5)
4	-----	1.85 <i>m</i>	-----
5	1.33 <i>m</i>	0.98 <i>d</i> (9.5)	0.84 <i>t</i> (5.7)
6	1.48 <i>d</i> (6)	1.37 <i>m</i>	1.57 <i>m</i>
6'	1.48 <i>d</i> (6)	1.30 <i>m</i>	1.40 <i>m</i>
7	1.48 <i>d</i> (6)	1.35 <i>m</i>	1.45 <i>m</i>
7'	1.35 <i>m</i>	1.29 <i>m</i>	1.39 <i>m</i>
9	1.65 <i>m</i>	1.75	1.38 <i>m</i>
11	1.95 <i>m</i>	1.93 <i>dd</i> (11.5, 3.5)	1.44 <i>m</i>
11'	0.95 <i>m</i>	1.80 <i>m</i>	1.22 <i>m</i>
12	5.30 <i>t</i> (3.5)	5.29 <i>t</i> (3.5)	1.22 <i>m</i>
12'	-----	-----	1.96 <i>m</i>
13	-----	-----	2.75 <i>td</i> (12.5, 3.5)
15	1.22 <i>t</i> (3.5)	1.68 <i>t</i> (6.5)	1.27 <i>dt</i> (13.5, 3)
15'	1.09 <i>t</i> (3.5)	1.09 <i>m</i>	1.91 <i>d</i> (3)
16	2.01 <i>t</i> (3.7)	1.97 <i>ddd</i> (7, 3.5)	1.56 <i>m</i>
16'	1.62 <i>m</i>	1.61	2.64 <i>dt</i> (12.5, 3.5)
18	2.48 <i>dd</i> (14, 4)	2.83 <i>dd</i> (13.7, 4.5)	1.78 <i>t</i> (11.5)
19	1.63 <i>m</i>	1.66	3.55 <i>td</i> (10.5, 5.5)
19'	1.17 <i>dd</i> (4.5, 2)	1.18 <i>t</i> (2.5)	-----
21	1.35 <i>m</i>	1.31 <i>t</i> (4.5)	1.54 <i>m</i>
21'	1.24 <i>t</i> (2)	1.23	2.26 <i>m</i>
22	1.76 <i>ddd</i> (14, 4.5)	1.77 <i>d</i> (4.5)	1.59 <i>m</i>
22'	1.57 <i>t</i> (3.5)	1.56 <i>t</i> (3.5)	2.27 <i>m</i>
23	1.08 <i>s</i>	0.92 <i>d</i> (6.5)	1.24 <i>s</i>
24	1.03 <i>s</i>	0.80 <i>d</i> (6.5)	1.02 <i>s</i>
25	1.05 <i>s</i>	0.89 <i>s</i>	0.84 <i>s</i>
26	0.81 <i>s</i>	0.78 <i>s</i>	1.07 <i>s</i>
27	1.15 <i>s</i>	1.32 <i>s</i>	1.08 <i>s</i>
29	0.91 <i>s</i>	0.91 <i>s</i>	4.96 <i>d</i> (2.5)
29'	-----	-----	4.78 <i>dd</i> (2.5, 1.5)
30	0.93 <i>s</i>	0.93 <i>s</i>	1.81 <i>s</i>

<sup>a</sup>Determinado en CDCl<sub>3</sub> a 500 MHz, <sup>b</sup>Determinado en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N a 500 MHz



La fracción de BuOH (8.1 g) del extracto de partes aéreas de *A. otarioides* se sometió a CC. Las fracciones eluidas con CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1 contenían una mezcla compleja que no se logró separar por lo que se acetiló y se sometió a CC después de lo cual se aisló el compuesto **10** con un rendimiento de 71.5 mg.

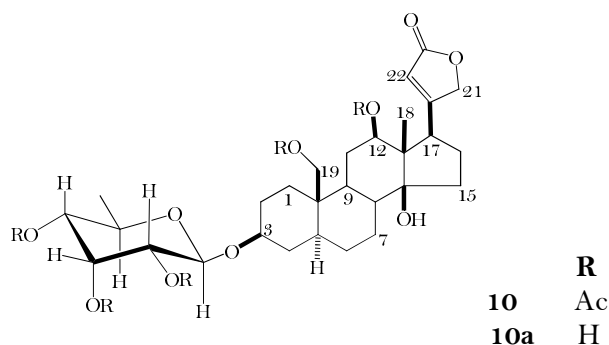
En su espectro de masas (FAB<sup>+</sup>), el compuesto **10** presenta el ión pseudomolecular de  $m/z$  763, congruente con la fórmula molecular C<sub>39</sub>H<sub>54</sub>O<sub>15</sub>. Se observa además el fragmento de  $m/z$  473 [C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>O<sub>7</sub>]<sup>+</sup> que proviene de la pérdida del fragmento C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub> correspondiente a un monosacárido. En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (espectro 26) este azúcar presenta una señal doble en  $\delta$  4.84 para el protón anómero (H-1'), tres señales para protones geminales a grupo acetato ( $\delta$  4.97, H-2',  $\delta$  5.60, H-3',  $\delta$  4.66, H-4'), un doblete de cuarteto para un protón base de éter (H-5') en  $\delta$  3.54 y una señal doble asignada a un grupo metilo en  $\delta$  1.21. Las constantes de acoplamiento ( $J_{1-2}=8$  Hz,  $J_{2-3}=J_{3-4}=3$  Hz,  $J_{4-5}=10$  Hz) permitieron identificar a este azúcar como alometilosa. La posición de este grupo fue establecida en el carbono 3 de la aglicona por las correlaciones del C-3 ( $\delta$  77.6) con el protón anómero H-1', así como con H-1, H-2 y H-4, observadas en el espectro HMBC.

La porción correspondiente a la aglicona del compuesto **10** se identificó como una cardenólida porque en su espectro de RMN <sup>1</sup>H presenta señales para una  $\delta$ -lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ -no saturada, como son un singulete ancho en  $\delta$  5.85 asignado al protón vinílico CH-22 y dos señales doble de doble ( $\delta$  4.86 y  $\delta$  4.77) para los protones base de lactona CH<sub>2</sub>-21, mientras que en el espectro de RMN <sup>13</sup>C (espectro 25) se observan las señales para el carbono del carbonilo de la lactona ( $\delta$  174.1, C-23), para los carbonos vinílicos C-20 ( $\delta$  172.9) y CH-22

( $\delta$  118.2) y para el CH<sub>2</sub>-21 ( $\delta$  73.2). Además en el espectro de RMN <sup>1</sup>H se observan señales para un metilo angular ( $\delta$  1.21, CH<sub>3</sub>-18), para los protones de un metileno ( $\delta$  4.86 y  $\delta$  4.77, CH<sub>2</sub>-19) y un metino ( $\delta$  4.53, CH-12) base de éster. La señal del protón geminal a la alometilosa (H-3) aparece en  $\delta$  3.65. En el espectro de RMN <sup>13</sup>C se observan las señales de un carbono no protonado y base de alcohol en  $\delta$  85.6. Esta señal se atribuye a C-14.

Por otro lado, en la región de campo bajo del espectro de RMN <sup>13</sup>C se observan cinco señales alrededor de 170 ppm que corresponden a los carbonilos de los acetatos presentes en las molécula y cuyos metilos aparecen en el espectro de RMN <sup>1</sup>H en  $\delta$  2.10,  $\delta$  2.05,  $\delta$  2.02,  $\delta$  2.15 y  $\delta$  2.01 y que de acuerdo al análisis del espectro HMBC se ubican en los carbonos 12, 19, 2', 3' y 4' respectivamente.

Así la estructura del compuesto **10** se estableció como el pentaacetil 3-O- $\beta$ -alometilósido de 12- $\beta$ -hidroxicoroglaucigenina. Puesto que el compuesto se aisló después de acetilar, el producto natural debe ser el 3-O- $\beta$ -alometilósido de 12- $\beta$ -hidroxicoroglaucigenina (**10a**) compuesto que fue aislado previamente de *Asclepia curassavica*.<sup>72</sup>



\* Se puede asegurar que el producto natural no contenía acetato porque antes de acetilar la mezcla que lo contenía se obtuvieron espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C en los que no se observan las señales características de grupos acetato.

Tabla 6: Datos espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  del compuesto 10.

	$^{13}\text{C}^a$	$^1\text{H}^b$
<b>CH<sub>2</sub>-1</b>	31.9	2.20 <i>dt</i> (14, 3.5); 0.91 <i>td</i> (14, 3.5)
<b>CH<sub>2</sub>-2</b>	29.2	1.92 <i>m</i> ; 1.40 <i>m</i>
<b>CH-3</b>	77.6	3.65 <i>ddd</i> (16, 11, 5)
<b>CH<sub>2</sub>-4</b>	34.4	1.73 <i>dt</i> (10, 2.5); 1.37 <i>m</i>
<b>CH-5</b>	44.6	1.26 <i>m</i>
<b>CH<sub>2</sub>-6</b>	27.9	1.29 <i>m</i>
<b>CH<sub>2</sub>-7</b>	27.4	2.17 <i>m</i> ; 1.92 <i>m</i>
<b>CH-8</b>	41.7	1.67 <i>td</i> (12, 3.5)
<b>CH-9</b>	45.9	2.87 <i>dd</i> (10, 6)
<b>C-10</b>	38.1	-----
<b>CH<sub>2</sub>-11</b>	27.4	2.03 <i>m</i> , 1.88 <i>m</i>
<b>CH-12</b>	77.1	4.53 <i>dd</i> (12, 4)
<b>C-13</b>	53.9	-----
<b>C-14</b>	85.6	-----
<b>CH<sub>2</sub>-15</b>	33.0	1.90 <i>m</i> , 1.76 <i>m</i>
<b>CH<sub>2</sub>-16</b>	27.1	1.43 <i>dt</i> (6, 3.5), 1.25 <i>m</i>
<b>CH-17</b>	45.9	2.87 <i>dd</i> (10, 6)
<b>CH<sub>3</sub>-18</b>	10.5	0.88 <i>s</i>
<b>CH<sub>2</sub>-19</b>	61.7	4.32 <i>d</i> (12.5); 4.12 <i>d</i> (12.5)
<b>C-20</b>	172.9	-----
<b>CH<sub>2</sub>-21</b>	73.2	4.86 <i>dd</i> (18, 2); 4.77 <i>dd</i> (18, 2)
<b>CH-22</b>	118.1	5.85 <i>sa</i>
<b>C-23</b>	174.1	-----
<b>CH-1'</b>	96.1	4.84 <i>d</i> (8)
<b>CH-2'</b>	69.5	4.79 <i>dd</i> (3, 8)
<b>CH-3'</b>	68.8	5.60 <i>t</i> (3)
<b>CH-4'</b>	71.4	4.66 <i>dd</i> (10, 3)
<b>CH-5'</b>	68.1	3.94 (10, 6.5)
<b>CH<sub>3</sub>-6'</b>	17.5	1.21 <i>d</i> (6.5)
<b>12-OCOMe</b>	170.9	2.10, 2.05, 2.02, 2.15, 2.01
<b>19-OCOMe</b>	170.7	
<b>2'-OCOMe</b>	169.8	
<b>3'-OCOMe</b>	169.3	
<b>4'-OCOMe</b>	169.0	
<b>OCOMe</b>	21.3, 21.1, 20.7 (2C), 20.6	

<sup>a</sup>Determinado en  $\text{CDCl}_3$  a 125 MHz, <sup>b</sup>Determinado en  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Material y equipo

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no fueron corregidos. Para las cromatografías en columna se utilizó como fase estacionaria sílica gel para cromatografía en capa fina (Merck 60 G). Para las cromatografías en capa fina se usaron cromatofolios Alugram Sil G/UV<sub>254</sub> de 0.25 mm. Para las cromatografías en placa preparativa se emplearon placas Sil G-100 UV<sub>254</sub> de 1.0 mm. Se utilizó como revelador sulfato cérico al 3% en ácido sulfúrico 2N y/o lámpara de UV Spectroline modelo CX-20 a 254 y 366 nm. Los espectros de IR se determinaron en un espectrófotometro Nicolet FTIR-Magna 750, mediante la técnica de pastilla. Los espectros de masas se obtuvieron utilizando las técnicas IE, ES y HR-FAB en los espectrómetros JEOL JMS-AX505HA, JEOL JMS-SX102A y Bruker Esquire 6000 con trampa de iones y electro-spray. Los espectros de RMN fueron determinados en los espectrómetros Varian XR-300 (300 MHz <sup>1</sup>H, 75 MHz <sup>13</sup>C) y Varian Unity Plus 500 (500 MHz <sup>1</sup>H, 125 MHz <sup>13</sup>C). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están dados en ppm respecto al tetrametilsilano (TMS) que se usó como referencia interna.

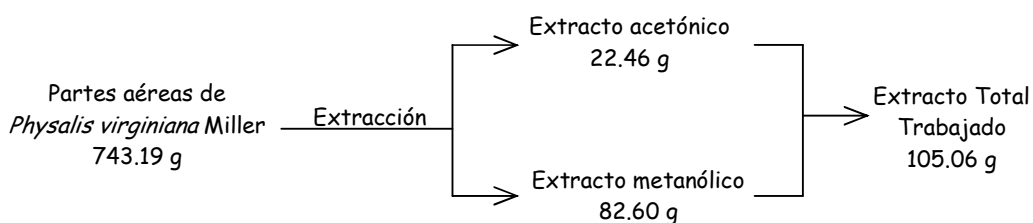
## 5.2 *Physalis virginiana* Miller

### 5.2.1 Material vegetal

Las partes aéreas de *Physalis virginiana* Miller fueron recolectadas e identificadas por la Dra. Mahinda Martínez. La recolección se realizó el 20 de septiembre del 2007 en el Estado de Guanajuato, entre Jerécuaro y Apaseo el Alto. Un ejemplar de esta planta se depositó en el Herbario de la Universidad Autónoma de Querétaro (M. Martínez 6969).

### 5.2.2 Extracción del material vegetal

La planta se dejó secar y posteriormente se molió. Se obtuvieron 743.19 g de material vegetal que se colocó en una columna de vidrio para ser extraído con acetona y MeOH. Se obtuvieron 22.46 g de extracto acetónico y 82.60 g de extracto metanólico, que fueron reunidos (105.06 g) debido a que presentaban compuestos en común.



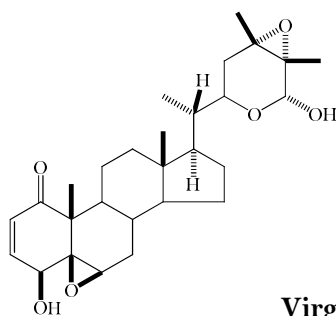
**Esquema 3:** Extracción del material vegetal.

### 5.2.3 Aislamiento y purificación de compuestos

El extracto de *Physalis virginiana* Miller se adsorbió en celita, se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente y se colocó en la parte superior de una columna de sílica gel 60 G de 13.0 cm de altura por 10.5 cm de diámetro (columna A). La elución de la columna se inició con hexano y se fue incrementando la polaridad con AcOEt hasta llegar a un 100% de éste. Se obtuvieron 77 fracciones (A1-A77) de 500 mL cada una, recolectadas de la siguiente manera: A1 (100:0), A2-A20 (90:10), A21-A32 (80:20), A33-A36 (70:30), A37-A43 (60:40), A44-A48 (50:50), A49-A52 (40:60), A53-A57 (20:80), A58-A63 (0:100), A64-A71 (acetona).

Las fracciones A40-A43 presentaban un compuesto en común por lo que se reunieron, se adsorbieron en celita y se fraccionaron mediante cromatografía columna de sílica gel (columna B), la cual se eluyó con mezclas de hexano/AcOEt de polaridad creciente y se obtuvieron 56 fracciones (B1-B56). De las fracciones B34-B47 eluidas con hexano/AcOEt 60:40, se aisló por cristalización, el compuesto **1**.

**Virginol A (1):** cristales blancos; pf 234-236°C;  $[\alpha]_D^{20} + 48.6^\circ$  (c 0.22, CHCl<sub>3</sub>), IR (pastilla)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3403, 3367, 1668 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H tabla 1 y 2; EM-ES  $m/z$  : 511  $[M+K]^+$ , 495  $[M+Na]^+$ ; HRFABMS  $m/z$  : 495.2723 (calculado para C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub>Na, 495.2723).



**1**  
**Virginol A**

El compuesto **2** se aisló de las fracciones A44-A57 mediante sucesivas cristalizaciones de hexano/AcOEt.

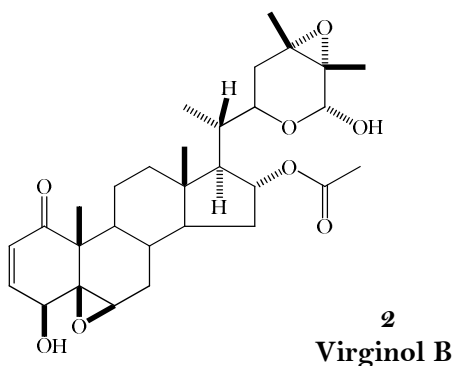
Las aguas madres de A44-A57 se reunieron con las fracciones A58-A66 ya que presentaban otros compuestos en común. Estas fracciones se adsorbieron en celita se purificaron por medio de cromatografía en columna (columna C), eluida con mezclas de hexano/AcOEt de polaridad creciente (70:30→0:100). Se obtuvieron 52 fracciones (C1-C52). Las fracciones C18-C22 (eluidas con hexano/AcOEt 60:40) se adsorbieron en celita para realizar una nueva columna (columna D) que se eluyó con mezclas de hexano-acetona de polaridad creciente. Se obtuvieron 20 fracciones (D1-D20). De las fracciones D15-D19 (eluidas con hexano/acetona 80:20) se aisló, por cristalización, el compuesto **1**, con lo que la cantidad total aislada llegó a 20.6 mg, (0.0028 % con respecto al peso de la planta seca).

Las fracciones C23-C26 (eluidas con hexano/AcOEt 60:40) se decoloraron con carbón activado y se cristalizaron para obtener el compuesto **2**, con un rendimiento total de 700.5 mg ( 0.0943 % con respecto al peso de la planta seca).

**Virginol B (2)**: cristales blancos; pf 235-237°C;  $[\alpha]_D^{20} + 3.18^\circ$  (c 0.22, CHCl<sub>3</sub>), IR (pastilla)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3549, 1726, 1679 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H tabla 1 y 2; EM-ES  $m/z$ : 569 [M+K]<sup>+</sup>, 553 [M+Na]<sup>+</sup>. Análisis calculado para C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>O<sub>8</sub>: C, 67.90%; H, 7.98%. Encontrado: C 67.83%; H 7.99%.

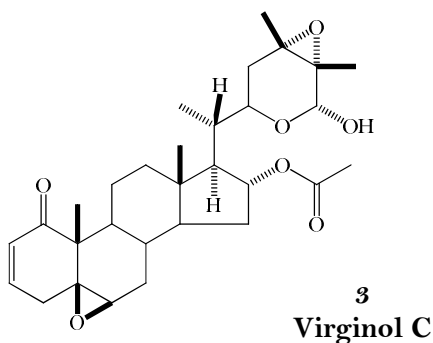
**Análisis cristalográfico de rayos-X de virginol B (2)**. Datos de los cristales: Fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>O<sub>8</sub>, peso molecular 530.64, dimensiones del cristal 0.418x0.378x0.186 mm, sistema cristalino ortorrómbico, grupo espacial P 2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub> 2<sub>1</sub>,  $a = 8.813(1) \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $b = 11.885(1) \text{ \AA}$ ,  $\beta = 90^\circ$ ,  $c = 26.986(2) \text{ \AA}$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ,  $V = 2826.6(4) \text{ \AA}^3$ ,  $Z = 4$ ,  $D_{\text{calc}} = 1.247 \text{ Mg/m}^3$ ,  $F(000) = 1144$ . Reflexiones colectadas 28240, reflexiones independientes 3803 [ $R(\text{int})=0.0446$ ]. Las unidades de celda y los datos de intensidad fueron colectados en un difractómetro Bruker Smart Apex CCD, con radiación de MoK $\alpha$  ( $\lambda$  0.71073 Å),  $\mu = 0.089 \text{ mm}^{-1}$ . La estructura fue resuelta por métodos directos y refinada por el método de matriz-total de mínimos cuadrados sobre F<sup>2</sup>. Los datos finales para  $R$  y  $wR$  con  $I > \sigma(I)$  fueron 0.0520 y 0.01251, respectivamente.





Las fracciones C16-C17 y D3-D10 fueron reunidas y sometidas a una CC de sílica gel, eluida con mezclas de hexano/AcOEt (columna E). De las fracciones E9-E15, que se eluyeron con hexano-AcOEt 80:20, se aisló el compuesto **3**, por cristalización. Las fracciones A35-A39 se sometieron a cromatografía en columna (columna F, hexano-AcOEt 70:30). Las fracciones F5-F10 se purificaron por cromatografía en columna (columna G, hexano-AcOEt 85:15). Las fracciones G9-G16 contenían el compuesto **3** que se purificó por CPP eluída con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 98:2. El rendimiento total del compuesto **3** fué de 26.2 mg (0.0035 % con respecto al peso de la planta seca).

**Virginol C (3)**: cristales blancos; pf 202-204°C;  $[\alpha]_D^{20}$  - 6.84° (c 0.19, CHCl<sub>3</sub>), IR (pastilla)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3506, 1722, 1669 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H tabla 1 y 2; EM-ES  $m/z$ : 553 [M+K]<sup>+</sup>; 537 [M+Na]<sup>+</sup>. HRFABMS  $m/z$ : 537.2835 (calculado para C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>O<sub>7</sub>Na, 537.2828).



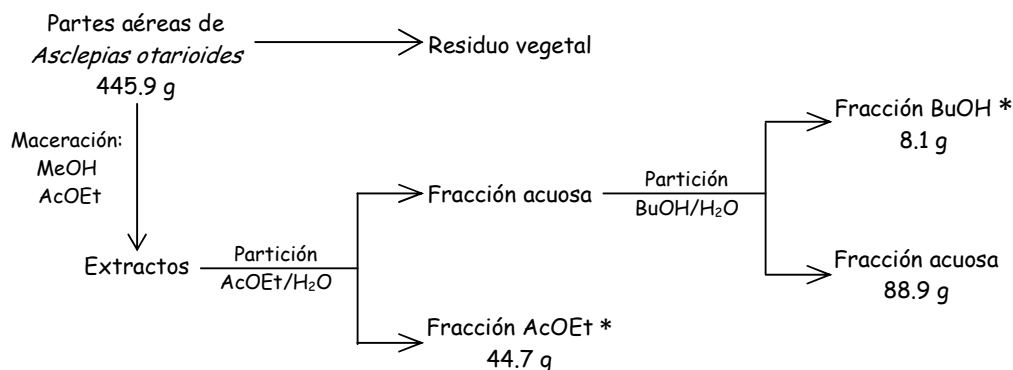
### 5.3 *Asclepias otarioides* Fourn.

#### 5.3.1 Material vegetal

La especie *Asclepias otarioides* Fourn. fue recolectada e identificada por la Bióloga Verónica Juárez Jaimes. La planta se recolectó en la Carretera Picacho-Ajusco, México D. F., el 9 de julio de 2006. Parte de este material se depositó en el Herbario Nacional (MEXU 1248428), Instituto de Biología, UNAM.

#### 5.3.2 Extracción del material vegetal

Las partes aéreas (hojas y ramas) frescas de *Asclepias otarioides* Fourn. (445.9 g) se maceraron con MeOH y posteriormente con AcOEt, ambos extractos se concentraron, combinaron y se sometieron a partición con AcOEt/H<sub>2</sub>O. A la fracción acuosa se le realizó una partición con BuOH/H<sub>2</sub>O. Se obtuvieron 44.7 g de la fracción de AcOEt, 8.1 g de la fracción BuOH y 88.9 g de la fracción acuosa.



\* Fracciones que se trabajaron

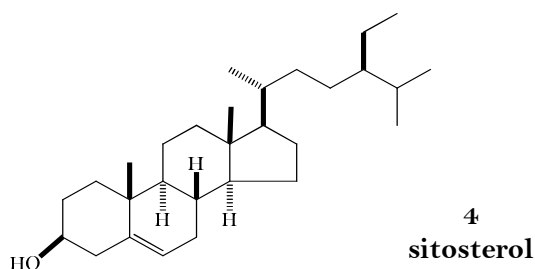
Esquema 4: Extracción del material vegetal y fraccionamiento de extractos.

### 5.3.3 Aislamiento y purificación de compuestos

#### Fracción de AcOEt

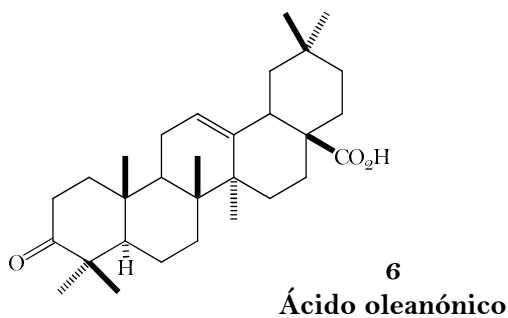
La fracción de AcOEt se disolvió y fue adsorbida en celita, se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente y se colocó en la parte superior de una columna de sílica gel 60 G de 13.0 cm de altura por 8.5 cm de diámetro (columna A). La columna se comenzó a eluir con hexano y se fue aumentando la polaridad gradualmente con AcOEt hasta llegar a 100% de éste. Posteriormente se eluyó con MeOH. Se recolectaron 206 fracciones de acuerdo al siguiente orden: A1-A35 100:0; A36-A75 95:5; A76-A146 90:10; A147-A169 85:15; A170-A181 80:20; A182-A188 70:30; A189-A191 60:40; A192-A194 40:60; A195-A197 20:80; A198-A205 0:100; A206 MeOH. El desarrollo de la columna se siguió por cromatografía en capa fina (ccf) y se reunieron las fracciones de composición semejante.

Se reunieron las fracciones A40-A106 y se fraccionaron mediante CC, eluida con mezclas de hexano/AcOEt. (95:5→0:10). Se obtuvieron 77 fracciones de 100 ml cada una (B1-B77). De las fracciones B6-B15 eluidas con hexano/AcOEt 95:5, se obtuvo el compuesto **4** que fue identificado como  $\beta$ -sitosterol. El rendimiento fue de 0.2986 g (0.0670 % respecto al peso de la planta).



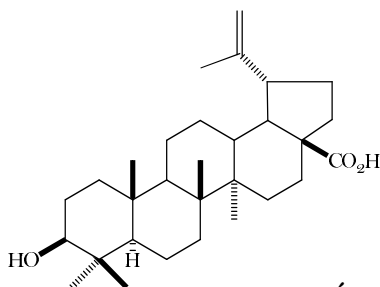
El compuesto **6** se aisló mediante cristalización de las fracciones B16-B36, eluidas con mezcla de hexano/AcOEt 90:10.

**Ácido oleanónico (6):** cristales blancos; pf 167-169°C;  $[\alpha]_D^{20} + 93.53$  (CHCl<sub>3</sub>, c 0.23), IR (pastilla)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3325, 2945, 1733, 1700, 1385 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H tabla 4 y 5; EM-IE 70 eV,  $m/z$ : 454 [M]<sup>+</sup> (4), 410 [M-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (4), 248 [C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (100), 233 [C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (10), 203 [C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>]<sup>+</sup> (85).



Las aguas madres de **6** se reunieron con las fracciones B37-B52 (eluidas con mezcla hexano/AcOEt 95:5), ya que presentaban un compuesto en común. De estas fracciones se aisló el compuesto **9** por medio de cristalización. Sus aguas madres se purificaron por CC (eluida con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), seguida de otra CC (hexano/isopropanol 98:2) y CPP eluida con hexano/isopropanol 95:5. Se obtuvieron 41.2 mg de este compuesto (0.0092 % con respecto al peso de la planta).

**Ácido betulínico (9):** cristales blancos; pf 285-287°C;  $[\alpha]_D^{20} +7^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, c 0.20), IR (pastilla)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3456, 2943, 1692, 1642, 1234, 1187, 885 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>13</sup>C y <sup>1</sup>H tabla 4 y 5; EM-IE 70 eV,  $m/z$ : 456 [M]<sup>+</sup> (2), 438 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 246 [C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (2), 202 [C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>]<sup>+</sup> (100), 176 [C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>]<sup>+</sup> (20), 139 [C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>]<sup>+</sup> (80).



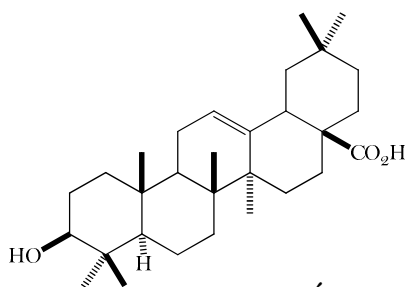
**9**  
**Ácido betulínico**

La ccf de las fracciones A107-A193 y B53-B69, mostró, que contenían compuestos en común, por lo que se reunieron, se adsorbieron en celita y una vez que se les evaporó el disolvente, se colocaron en la parte superior de una columna de vidrio empacada con silica gel. La elución de la columna se realizó con mezclas de polaridad creciente de hexano/AcOEt. Se obtuvieron 54 fracciones de 100 ml cada una (C1-C54).

De las fracciones C16-C21 eluidas con hexano/AcOEt 98:2 se aisló el compuesto **6**, para obtener un total de 3.8757 g de este compuesto (0.8692 % respecto al peso de la planta).

El compuesto **7** se obtuvo mediante cristalización (AcOEt/hexano) de las fracciones C27-C38 que fueron eluidas con hexano/AcOEt 90:10. Se aislaron 568.8 mg (0.1276 % con respecto al peso de la planta seca) de este compuesto.

**Ácido oleanólico (7):** cristales blancos; pf 297-299°C;  $[\alpha]_D^{20} +70.8^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>, c 0.226), IR (pastilla)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3445, 2944, 1696, 1463, 1207, 1184 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 300 MHz): 5.49 (1H, t, J=3.6 Hz, H-12), 3.44 (1H, dd, J=6.6, 9.5 Hz, H-3), 3.31 (1H, dd, J=4, 14 Hz, H-18), 1.56 (1H, m, H-1'), 1.24 (3H, s, H-23), 1.28 (3H, s, H-27), 1.03 (6H, s, H-24 y H-30), 1.02 (1H, m, H-1), 1.00 (3H, s, H-29), 0.95 (3H, s, H-25), 0.87 (1H, d, J=13 Hz, H-5); RMN <sup>13</sup>C tabla 4; EM-IE 70 eV,  $m/z$ : 456 [M]<sup>+</sup> (3), 455 [M-H]<sup>+</sup> (4), 439 [C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (15), 248 [C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (35), 207 [C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>O]<sup>+</sup> (5), 203 [C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>]<sup>+</sup> (15), 189 [C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>]<sup>+</sup> (10), 154 [C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>]<sup>+</sup> (100), 136 [C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>]<sup>+</sup> (62), 69 [C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup> (14).

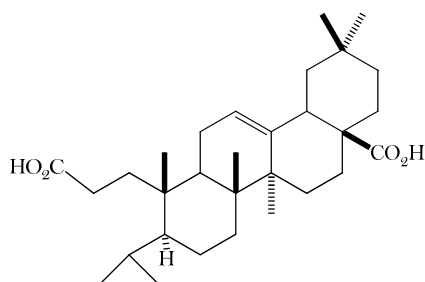


**7**  
**Ácido oleanólico**

**Oxidación del ácido oleanólico (7).** A una solución de ácido oleanólico (30.1 mg) en acetona, mantenida en baño de hielo, se agregaron 3 gotas del reactivo de Jones ( $\text{CrO}_3$  en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  acuoso) y se dejó reaccionar por 10 minutos. Posteriormente se agregó hielo y la mezcla se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y después con  $\text{H}_2\text{O}$ . Se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró. Mediante cristalización se obtuvo el compuesto **6**.

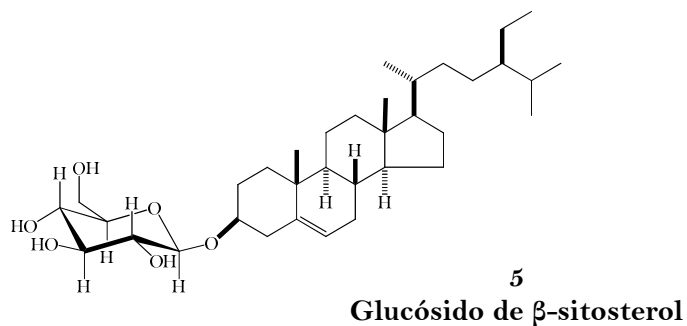
Se reunieron las fracciones A194-A202 y fueron sometidas a CC de silica gel; ésta se eluyó con mezclas de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (95:5  $\rightarrow$  85:15). Se obtuvieron 25 fracciones de 100 ml cada una (D1-D25). Las fracciones D2-D5 se purificaron por cromatografía en columna eluida con  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  de polaridad creciente. Se obtuvieron 47 fracciones (E1-E47). De las fracciones E16-E37, eluidas con  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  98:2, se obtuvieron por cristalización 21.0 mg del compuesto **8** (0.0047 % con respecto al peso de la planta).

**Ácido 3,4-seco-olean-12-en-3,28-dioico (8):** cristales blancos;  $\text{pf } 268\text{-}270^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +60$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c$  0.21); IR (pastilla)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3500-2500, 2952, 2870, 2721, 2663, 1706, 1304, 1273  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  tabla 4 y 5; EM-IE 70 eV,  $m/z$ : 472  $[\text{M}]^+$  (10), 426  $[\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_2]^+$  (12), 248  $[\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2]^+$  (100), 224  $[\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_2]^+$  (6), 203  $[\text{C}_{15}\text{H}_{23}]^+$  (75), 189  $[\text{C}_{14}\text{H}_{21}]^+$  (23).



**8**  
**Ácido 3,4-seco-olean-12-en-3,28-dioico**

De las fracciones D8-D11 eluidas con CH<sub>3</sub>Cl/MeOH 95:5 se obtuvieron por cristalización 53.2 mg (0.0119 % con respecto al peso de la planta) del compuesto **5**, que fue identificado como el glucósido de β-sitosterol.



### Fracción de BuOH

La fracción de BuOH (8.1 g) provenientes de la partición, se disolvió, fue adsorbida en celita y colocada en la parte superior de una columna de sílica gel G (columna F). La elución de la columna se inició con CHCl<sub>3</sub> y se fue incrementando la polaridad con MeOH. Se obtuvieron 108 fracciones (F1-F108) que fueron recolectadas en el siguiente orden: F1-F18 100:0; F9- F30 95:5; F31-F52 90:10; F53-F98 85:15; F99-F106 80:20; F107-F108 70:30.

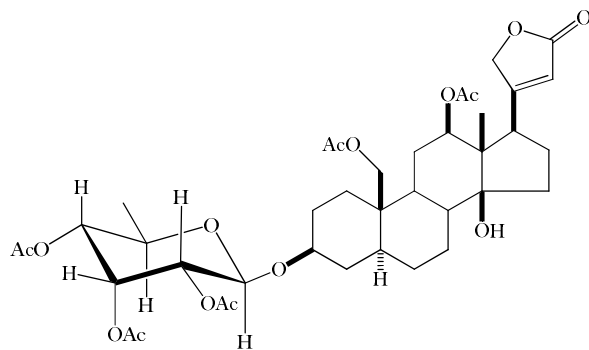
Las fracciones F41-F60 fueron sometidas a CC (columna G), eluida con mezclas de CHCl<sub>3</sub>/MeOH de polaridad creciente. Se obtuvieron 29 fracciones (G1-G29). Las fracciones G22-G25 (476.6 mg) eluidas con CHCl<sub>3</sub>/MeOH 90:10 contenían una mezcla



compleja de compuesto que después de varias CC no fue posible separar por lo que fue acetilada.

La reacción se llevó a cabo empleando 64.4 mg de la mezcla a la cual se agregaron 0.5 ml de piridina y 0.7 ml de anhídrido acético. La solución se dejó reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se trabajó del modo usual, se agregó hielo, posteriormente se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con solución de 5% HCl, después con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y finalmente con agua. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró. Se obtuvieron 110.5 mg de producto crudo. Este se purificó por medio de una cromatografía en columna, eluida con hexano/acetona 80:20, de la cual se aisló el compuesto **10** (71.7mg).

**Pentacetil 3-O-β-alometilósido de 12-β-hidroxicoroglaucigenina (10):** RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C tabla 6; EM-FAB+ *m/z*: 763 [M+1]<sup>+</sup> (2), 762 [M]<sup>+</sup> (0.5), 473 [C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>O<sub>7</sub>]<sup>+</sup> (2), 289 [C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>O<sub>8</sub>]<sup>+</sup> (4), 273 [C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>O<sub>7</sub>]<sup>+</sup> (85), 111 [C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (37).



**10**

**Pentacetato de 3-O-β-alometilósido de 12β-hidroxicoroglaucigenina**

#### 5.3.4 Determinación de la actividad Antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA (acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol).<sup>73,74</sup>

La prueba fue realizada empleando ratones macho de la cepa CD1, con un peso entre 25-30 g. (n=5) Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de 24 °C, con fotoperiodos de 12/12 horas luz/oscuridad, con agua y alimento *ad libitum*. Los animales se sometieron al siguiente tratamiento:

**Tratamiento de la oreja derecha:** A los animales anestesiados por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (3.5 mg/kg), se les administraron 10 µl de solución etanólica de TPA (0.25 mg/ml) por vía tópica. Diez minutos después se les aplicaron 0.031, 0.1, 0.31 o 1 µmoles de los compuestos **1**, **2** o **3**, disueltos en 20 µl del vehículo (diclorometano/acetona 2:1). Al grupo control (C) sólo se le administró la solución etanólica de TPA (0.25 mg/kg).

**Tratamiento de la oreja izquierda (oreja control):** Empleando la misma vía de administración se aplicaron 10 µl de etanol y 20 µl de diclorometano/acetona 2:1.

Cuatro horas después de haber realizado la aplicación del TPA, los animales fueron anestesiados con éter y sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente, se tomó una muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas. El incremento del peso de la muestra derecha con respecto a la izquierda representa el edema.

La inhibición del edema se calculó con fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = [(C-E) / C] \cdot 100$$

En donde:

C= Edema del grupo control (tratado con TPA).

E= Edema del grupo experimental (TPA mas el compuesto).

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), seguida de una prueba de Dunnett de comparación múltiple para aislar los grupos con diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ).<sup>75</sup>

## 6. CONCLUSIONES

- ❖ Como resultado del estudio químico de *Physalis virginiana* Miller se aislaron 3 nuevos withaesteroides a los cuales se les dieron los nombres de virginoles A, B y C. Los withaesteroides aislados pertenecen al grupo de las withanólidas.
- ❖ *Physalis virginiana* Miller es otra de las especies de *Physalis* de la cual se aíslan withaesteroides
- ❖ Los virginoles A, B y C presentaron actividad anti-inflamatoria en el modelo de Inhibición del edema en oreja de ratón. La IC<sub>50</sub> de virginol B (0.27 μmol/oreja) resultó igual a la de la Indometacina que se empleó como referencia.
- ❖ En el estudio químico de *Asclepias otarioides* Fourn. se observa que al igual que otras especies de este género, contiene glicósidos cardíacos, pero sus componentes mayoritarios son triterpenos con esqueleto de oleanano o de lupano. Todos los compuestos aislados de esta especie ya han sido descritos en la literatura.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Potterat, O., Hamburger, M. Natural Products in Drug Discovery - Concepts and Approaches for Tracking Bioactivity. *Curr. Org. Chem.* **10**, 899-920, **2006**.
2. Zerikly, M., Challis, G. L., *Chem. Bio. Chem.* **10**, 625-633, 2009.
3. Barba de Piña, C. B., *Ciencia*, 18-23, Julio-Septiembre 2002.
4. Butler, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J. Nat. Prod.* **67**, 2141-2153, **2004**.
5. <http://www.jornada.unam.mx/1998/06/29/cien-panorama.html>
6. Zepeda, G. C., White, O. L., *Polibotánica* **25**, 173-199, 2008.
7. Fernández, B. A. M., Juárez, J. V., Cortés, Z. L., *Polibotánica* **25**, 155-171, 2008.
8. Argueta, V. A. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. México, D.F. Instituto Nacional Indigenista. Vol. I: pp 27; Vol. III: 1350-1351, 1994.
9. Wu, S. J., Hg, L. T., Huang, Y. M., Lin, D. F., Wang, S. S., Huang, S. N., Lin, C. C., *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 963-966, 2005.
10. Basey, K., McGaw, B. A., Woolley, J. G., *Phytochemistry* **31**, 4173-4176, 1992.
11. Alluri, R. R., Miller, R. J., Shelver, Khalid, W., *Lloydia* **34**, 405-408, 1976.
12. Brown, K. S. Jr., Henriques, S. A., 1991. Chemistry, Co-evolution and Colonisation of Solanaceae Leaves by *Ilhomiine* Butterflies. In: Solanaceae III. Taxonomy, Chemistry and Evolution. Hawkes, J. G., Lester, R. N., Nee, M., Estrada, N., Eds. Royal Botanic Gardens, Kew-The Linnean Society of London. pp. 1, 7, 13-16, 51, 365-366. 1991.
13. Ruíz, O. M., Nieto, R. D., Larios, R. I., Tratado Elemental de Botánica. 3era. Edición, Editorial Porrúa, México. pp 656-661, 1950.
14. D'Arcy, W. G., **1979**. The Classification of the Solanaceae. In: The Biology and Taxonomy of the Solanaceae. Hawkes, J. G., Lester, R. N, Skelding, A. D. (eds.) The Linnean Society of London-Academic Press. New York, pp 1-47.
15. Gupta, G. L., Rana, A. C., *Phcog. Rev.* **1**, 129-136, 2007.
16. Frederick, H. W., *Am. J. Bot.* **62**, 198-202, 1975.
17. Vargas, P. O., El Género *Physalis* (Solanaceae) en Nueva Galicia. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F. 1998.

18. Vargas, P. O., Martínez, M., Dávila, P. A. "El género *Physalis* (Solanaceae) en el Edo. de Jalisco" Bol. Inst. Bot. Universidad de Guadalajara **5**, 395-401, 1998.
19. Martínez, M. **1999**. Infrageneric Taxonomy of *Physalis* In: Solanaceae IV: Advances In Biology and Utilization. Nee, M., Symon, D. E., Lester R. N., Jessop, J. P. (eds.). The Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 275-283.
20. Vázquez, M. A. R., Componentes Químicos de Baja Polaridad en Tallos y Hojas de *Physalis coztomatl*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F. 2006.
21. Hernández, F. Historia de las plantas de Nueva España. Tomo III (libros 5°, 6° y 7°). Instituto de Biología, UNAM. Imprenta Universitaria, México, pp. 700-704, 1946.
22. <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=PHVI5#>, Agosto 2009.
23. Koh, L. L., Ng, A. S., *Acta Crystallogr.* **C49**, 105-107, 1992.
24. Qui, L., Zhao, F., jiang, Z. H., Chan, L. X., Zhao, Q., Liu, H. X., Yao, X. S., Qui, F., *J. Nat. Prod.* **71**, 642-646, 2008.
25. Kubwabo, C., Rollmann, B., Tilquin, B., *Planta Medica* **59**, 161-163, 1993.
26. Latza, S., Ganber, D., Berger, R. G., *Phytochemistry* **43**, 481-485, 1996.
27. Pérez-Castorena, A. L., Oropeza, R. F., Vázquez, A. R., Martínez, M., Maldonado, E., *J. Nat. Prod.* **69**, 1029-1033, 2006.
28. Torres, F. R., Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, México D. F., 2006.
29. Maldonado, E., Torres, F. R., Martínez, M., Pérez-Castorena, A. L. *J. Nat. Prod.* **69**, 1511-1513, 2006.
30. Avendan, S. P. B., Yu, S., Bernays, J., Wan, S. S., Christophidis, L. J., Sberna, G., Murray Tait, R., Wildman, H. G., Libeller, J., Walsh, N. G., Meurer-Grimer, B. M., *J. Nat. Prod.* **68**, 282-284, 2005.
31. Romero, G. Y., Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM, México D. F., 2008.
32. Veleiro, S. A., Oberti, J. C., Burton, G., Chemistry and Bioactivity of Withaesteroides from South American Solanaceae. En: Atta-ur-Rahaman Ed. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier Science Pub., Amsterdam, **32**, 1019-1052, 2005.
33. Juaréz-Jaimes, V., Alvarado-Cárdenas, L. O., Villaseñor, J. L., *Rev. Mex. Biod.* **78**, 459-482, 2007.

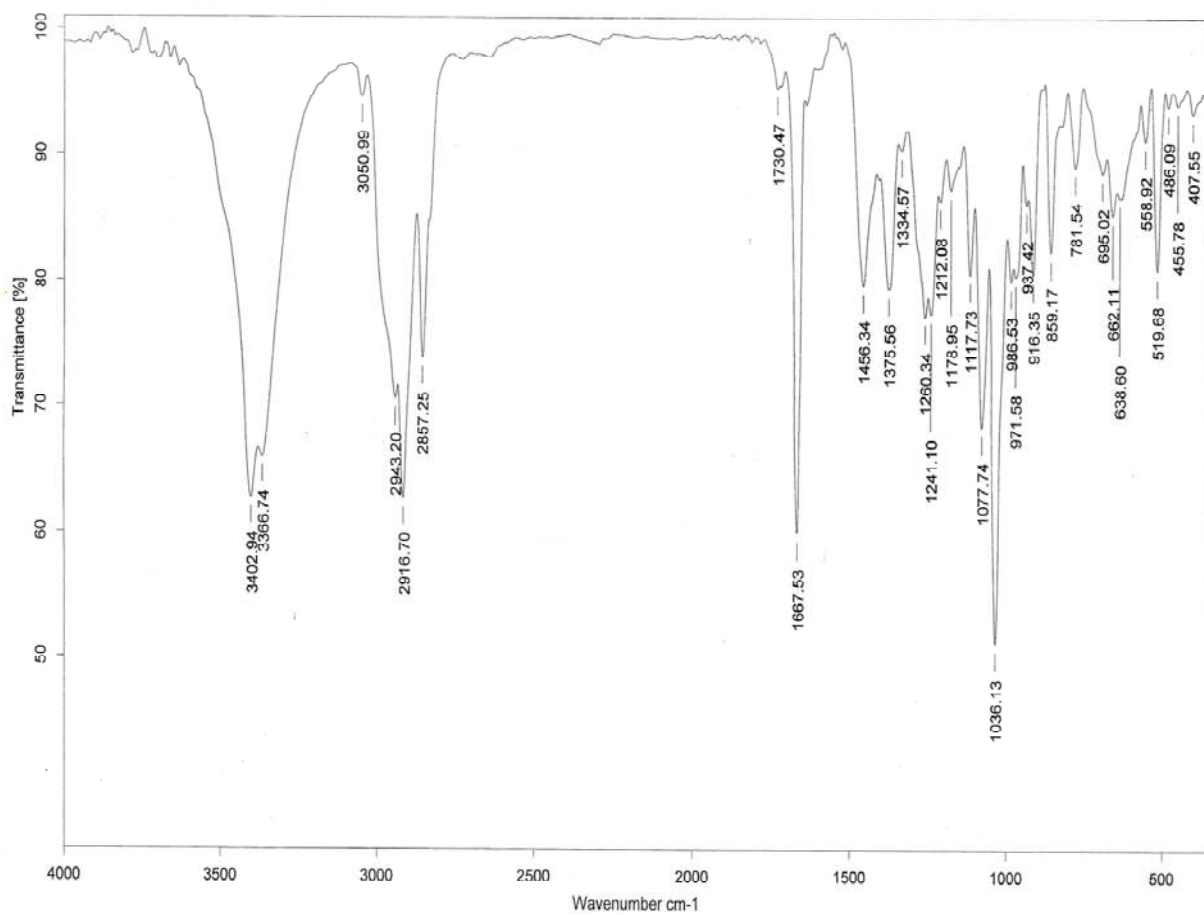
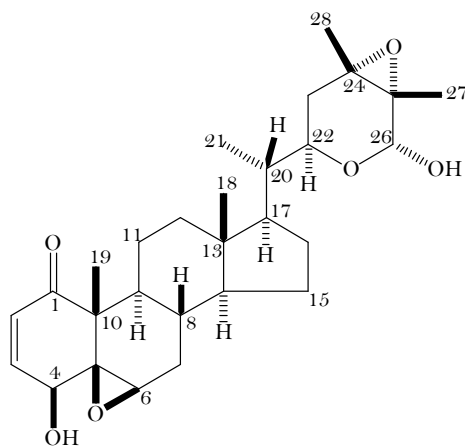
34. Endress, M. E., *Telopea* **10**, 525-545, 2004.
35. Abad-Reyes, A., Bahsas, A., Delgado-Méndez, P., Amaro-Luis, J. M., Neil, T. G. H., *Av. Quím.* **1**, 29-34, 2006.
36. Alvarado-Cardenas, L. O., Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Fascículo 38: Apocynaceae, Instituto de Biología, UNAM, 1-57, 2004.
37. Warashina, T., Noro, T., *Phytochemistry* **53**, 485-498, 2000.
38. Roy, M. C., Chang, F.-R., Huang, H.C., Chiang, M. Y.-N., Wu, Y.-C., *J. Nat. Prod.* **68**, 1494-1499, 2005.
39. Warashina, T., Noro, T., *Chem. Pharm. Bull.* **56**, 315-322, 2008. 39b.
40. Abe, F., Yamauchi, T., Honda, K., Hayashi, N. *Chem. Pharm. Bull.* **48**, 991-993, 2000.
41. Yamauchi T., Honda K., Hayashi N. *Chem. Pharm. Bull.* **48**, 1090-1092 2000.
42. Haribal M., Renwick A. A. *Phytochemistry* **41**, 139-144 (1996).
43. Juárez-Jaimes, V., Lozada, L., Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Fascículo 37: Asclepidaceae, Instituto de Biología, UNAM, 1-57, 2003.
44. Glotter, E., Waitman, R., Lavie, D., *J. Chem. Soc. C*, 1765-1766, 1965.
45. Lavie, D., Greenfield, S., Glotter, E., *J. Chem. Soc. C*, 1753-1756, 1966.
46. Ray, A. B., Gupta, E., Withaesteroids a Growing of Naturally Occurring steroidal Lactones. En: Herz W., Kirby, G. W., Moore, R. E., Steglich W., Tamm Ch. Eds. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer-Verlag, Wien, **63**, 1-106, 1994.
47. Su B. N., Park E. J., Nikolic D., Santarsiero B. D., Mesecar A. D., Vigo J. S., Graham J. G., Cabieses F., van Bremen R. B., Fong H. H. S., Farnsworth N. R., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D. *J. Org. Chem.* **68**, 2350-2361 (2003).
48. Kennelly, E. J., Gerhäuser, C., Song, L. L., Graham, J. G., Beecher, C. W. W., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D., *J. Agric. Chem.* **45**, 3771-3777, 1997.
49. Misico, R. I., Song, L. L., Veleiro, A. S., Cirigliano, A. M., Tettamanzi, M. C., Burton, G., Bonetto, G. M., Nicotra, V. E., Silva, G. L., Gil, R. R., Oberti, J. C., Kinghorn, D., Pezzuto, J. M., *J. Nat. Prod.* **65**, 677-680, 2002.
50. Knöss, W., Reuter, B., *Pharm. Acta Helv.* **73**, 45-52, 1998.

51. Demetzos, C., Dimas, K. S. Labdane-Type Diterpenes: Chemistry and Biological Activity en: Atta-ur-Rahaman Ed. *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier Science Pub., Pakistan, , **25**, 235-292, **2001**.
52. Mata, R., Rivero, J. F. Curso Teórico de Farmacognosia. Material Didáctico. Segunda Versión. UNAM, México, **2001**, pp. 140
53. Lichtenthaler, H. K., <http://www.mete.mtesz.hu/pls/proceedings/eloadasok-pdf/o-0-1-lichtenthaler.pdf>, Agosto 2009.
54. Robles, J., Torrenegra, R., Gray, A. I., Piñeros, C., Ortiz, L., Sierra, M., *B. J. Pharm.* **15**, 283-286, 2005.
55. Myung, L. S., Sun, M. B., Lee, Ch.-G., Kim, K.-S., Hee, K. Y., *Planta Medica* **69**, 1051-1054, 2003.
56. Urban, M., Sarek, J., Klinot, J., Korinkova, G., Hajduch, M., *J. Nat. Prod.* **67**, 1100-1105, 2004.
57. Fujioka, T., Kashiwada, Y., *J. Nat. Prod.* **57**, 243-247, 1994.
58. Dewick, P. M., Medicinal Natural Products, 2da Edición, John Wiley and Sons, LTD, University of Nottingham, UK, 506 pp, 2002.
59. Albrecht, H. P., Cardiac Glycosides, En: *Naturally Occurring Glycosides*, Editado por Raphael Ikan, John Wiley & Sons Ltd, 83-87, 1999.
60. Civeyrel, L., Le Thomas, A., Ferguson, K., Chases, M., *Mol. Phyl. and Evol.* **9**, 517-527, 1998.
61. Hamed, A., Plaza, A., Balestrieri, M. L., Springuel, I. V., Oleszek, W., Pizza, C., Piacente, S., *J. Nat. Prod.* **69**, 1319-1322, 2006.
62. Singh, B., Rastogi, R.P., *Phytochemistry* **9**, 315-331, 1970.
63. Dewick, P. M., *Nat. Prod. Rep.* **19**, 181-222, 2002.
64. Lichtenthaler, H. K., *Plant Biol. Mol.* **50**, 47-65, 1999.
65. Veleiro, A. S., Burton, G., Gross, E. G., *Phytochemistry* **24**, 2263-2265, 1985.
66. Nawas, H. R., Malik, A., Khan, M. P., Ahmed, S., *Phytochemistry* **52**, 1357-1360, 1999.
67. Goodman & Gilman, A., Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Décima Edición, Vol. 1, Cap. 27, MacGraw Hill, 2003.
68. Shirane, N., Hashimoto, Y., Ueda, K., Takenaka, H., Katoh, K., *Phytochemistry* **43**, 99-104, 1996.

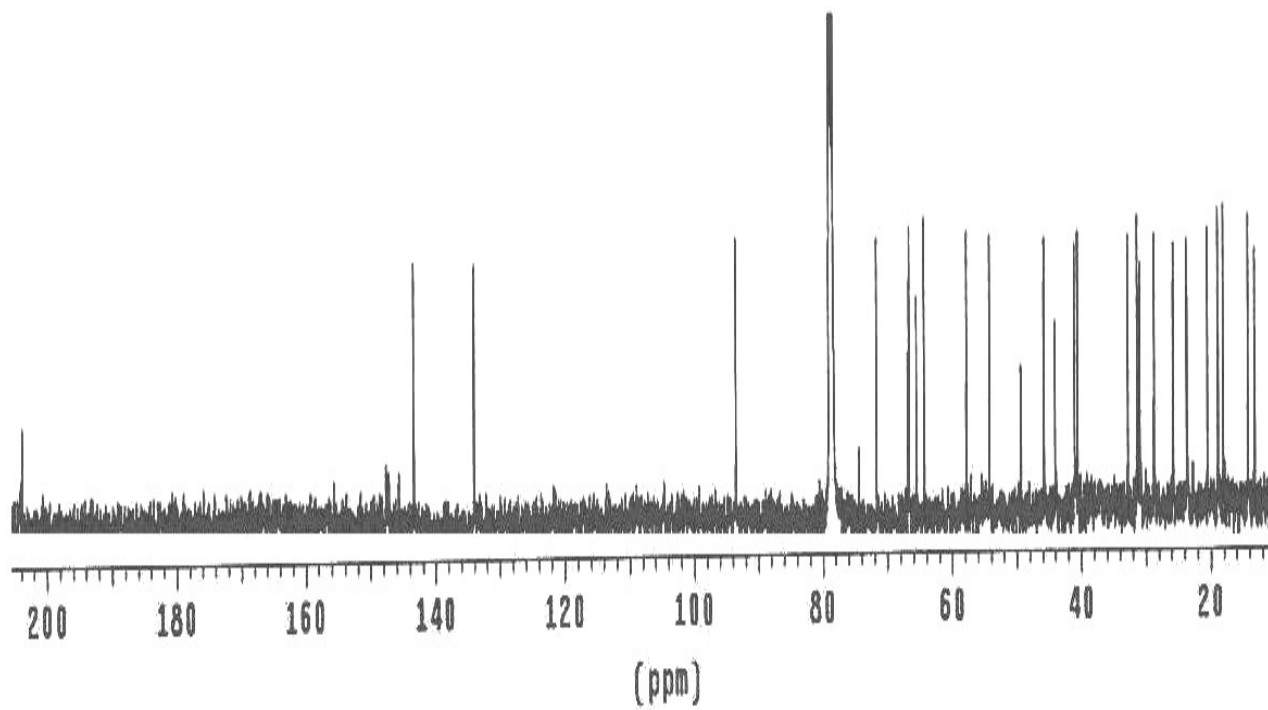
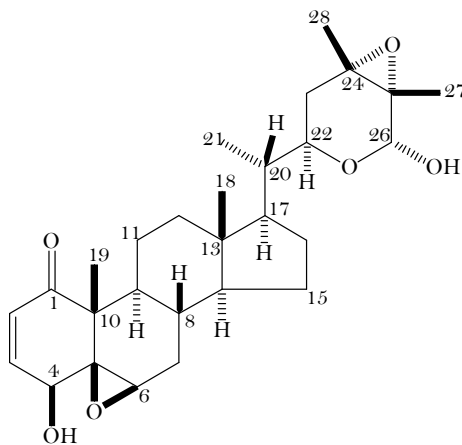


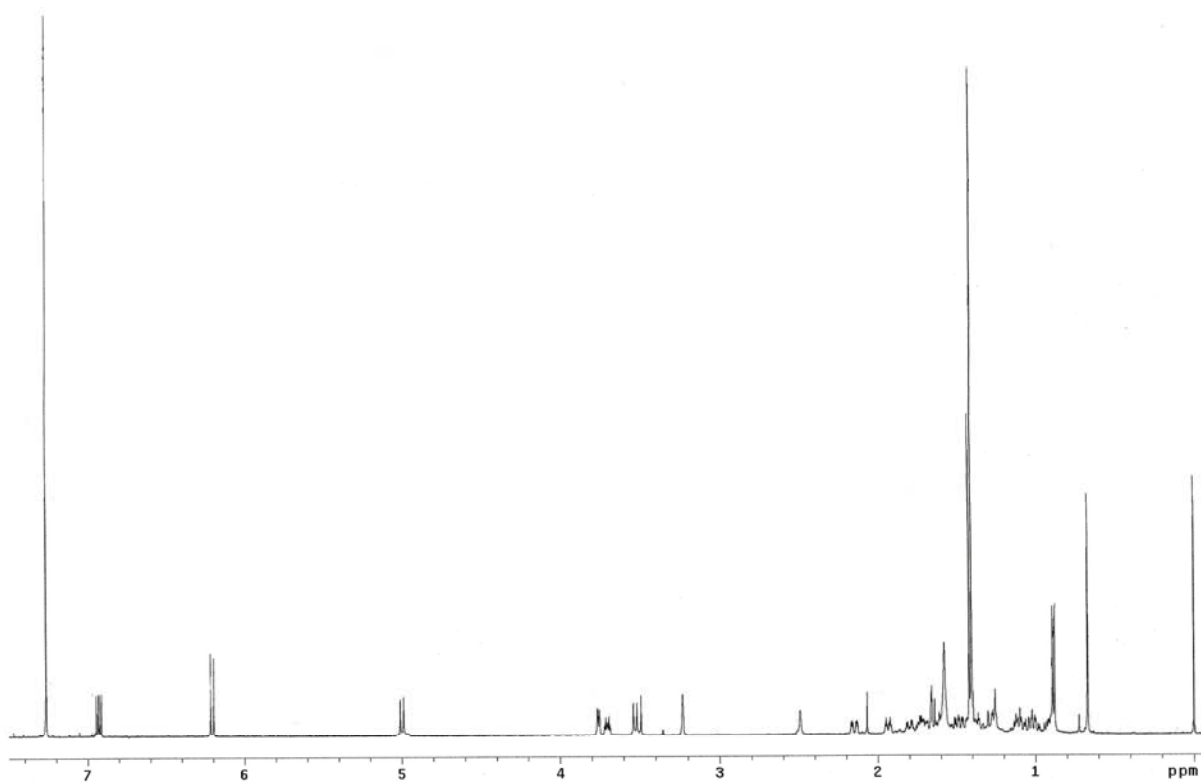
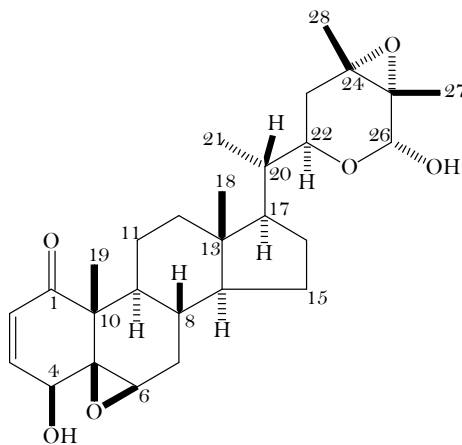
69. Fukuda, Y., Sakai, K., Matsunaga, S., Tokuda, H., Tanaka, R., *Cancer Letters* **240**, 94-101, 2006.
70. Caldwell, C. G., Franzblau, S. G., Suarez, E., Timmermann, B. N., *J. Nat. Prod.* **63**, 1611-1614, 2000.
71. Peng, C., Bodenhausen, G., Qui, S., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., Yuan, S., Zheng, C., *Mag. Res. Chem.* **36**, 267-278, 1998.
72. Abe, F., Mori, Y., Yamauchi, T., *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2917-2920, 1992.
73. Rao, T. S., Currie, J. L., Shaffer, A. F. and Isakson, P., *Inflammation* **10**, 723-741, 1993.
74. Payá, M., Ferrándiz, M. L., Erradi, F., Terencio, M. C., Kijjoa, A., Pinto, M., and Alcaraz, M. J., *E. J. Pharm.* **312**, 97-105, 1996.
75. Tallarida, R., J., Murray, R. B., Manual of pharmacologic calculation with computer programs. II Edition, Springer Verlag, New York, pp. 145-148, 1987.

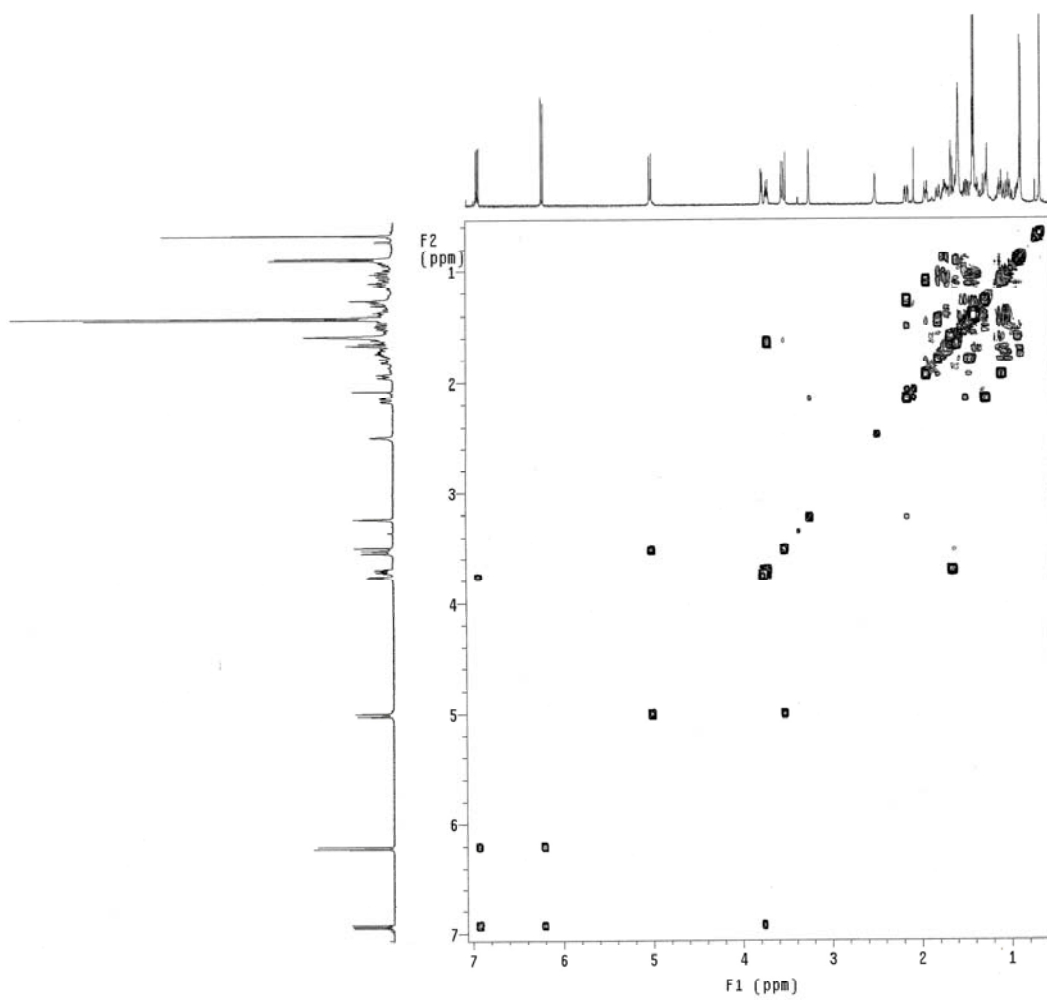
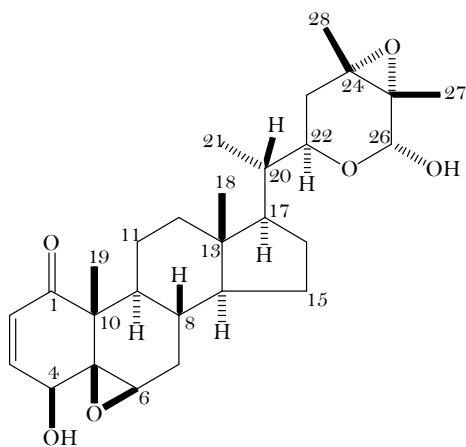
# ANEXO 1



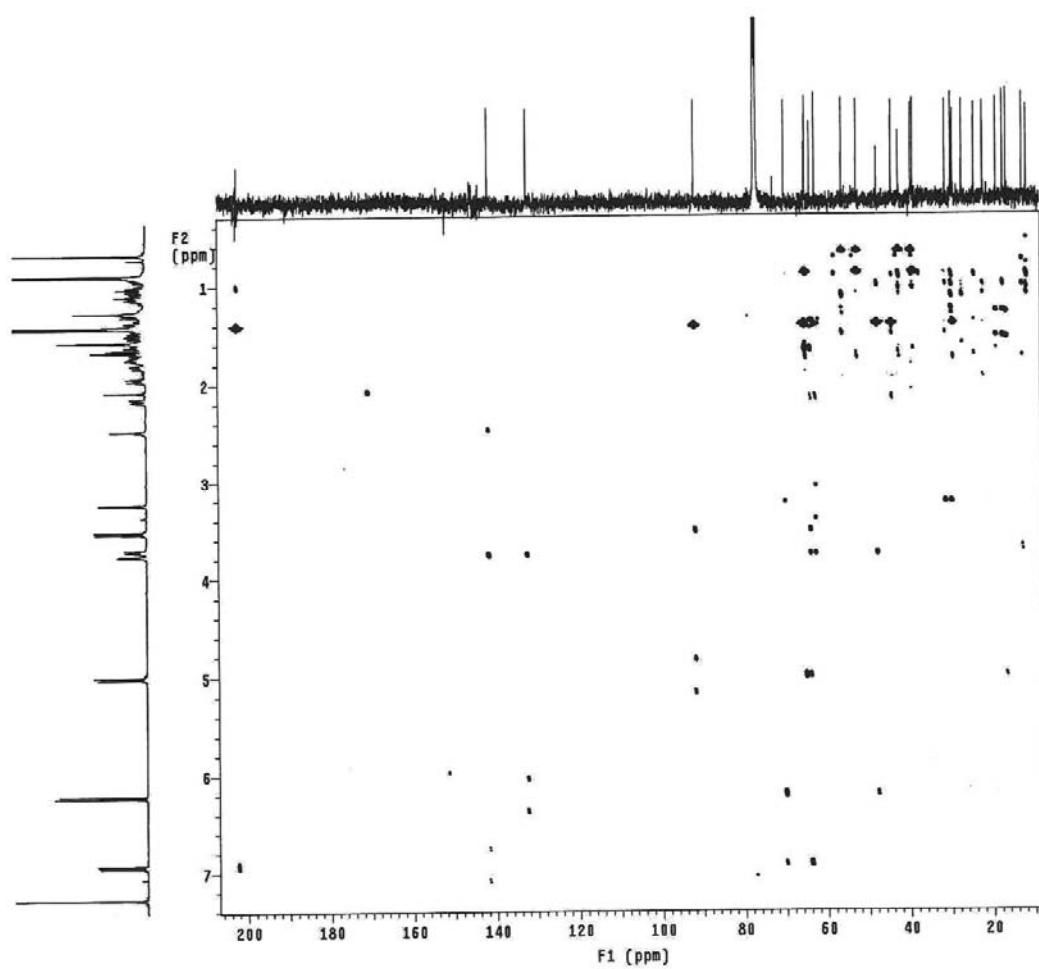
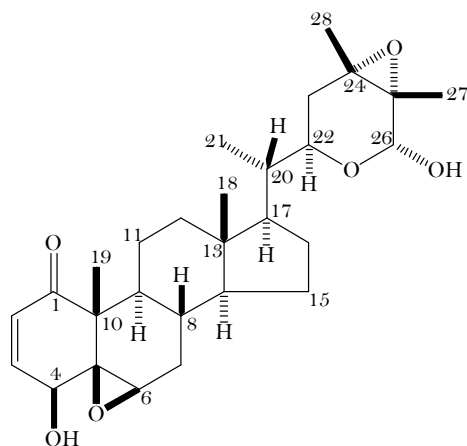
Espectro 1: IR de Virginol A (1)

Espectro 2: RMN  $^{13}\text{C}$  de Virginol A (1)

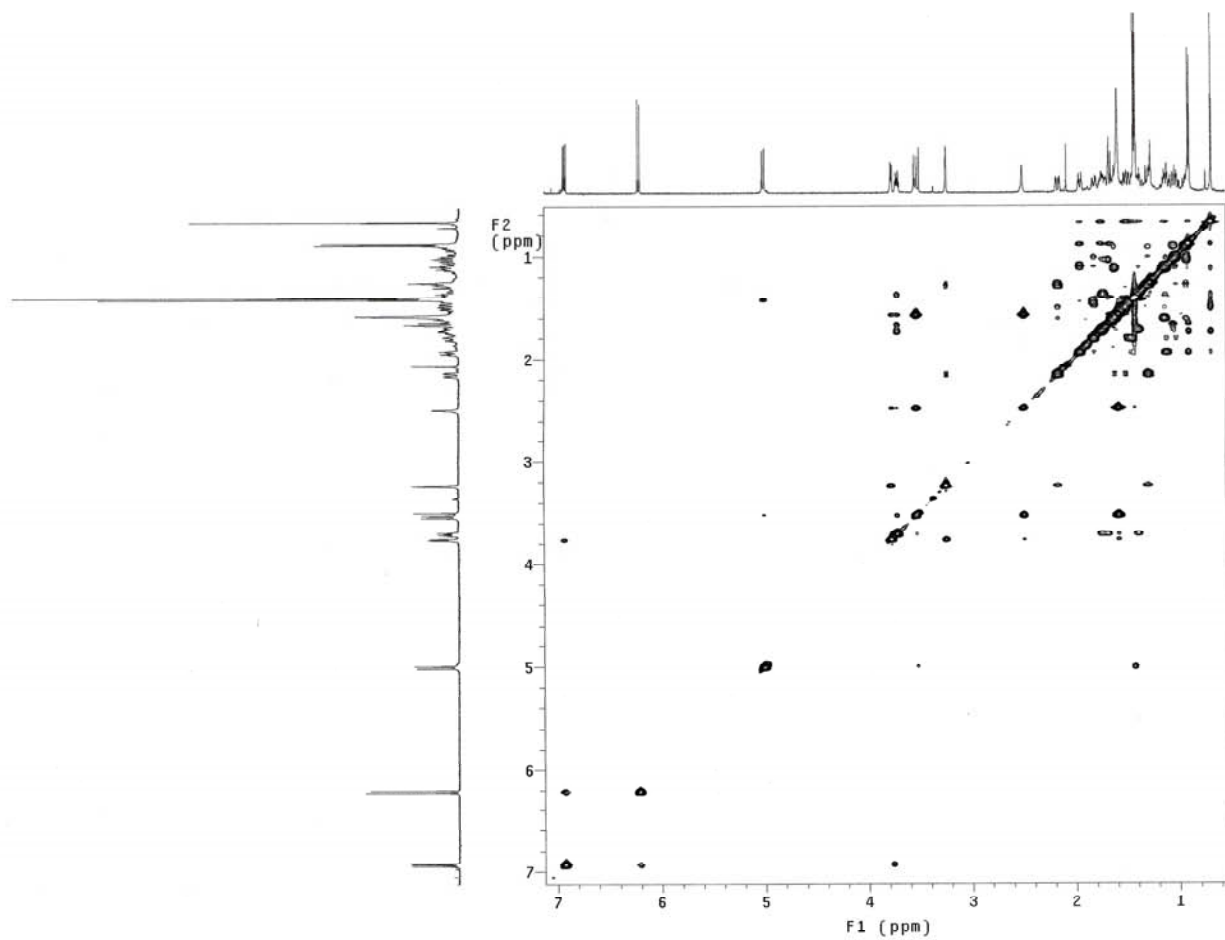
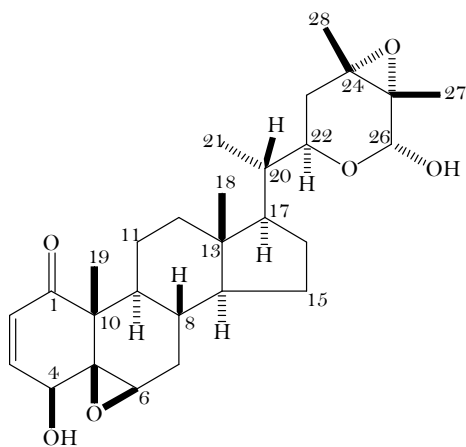
Espectro 3: RMN <sup>1</sup>H de Virginol A (1)



Espectro 4: COSY de Virginol A (1)

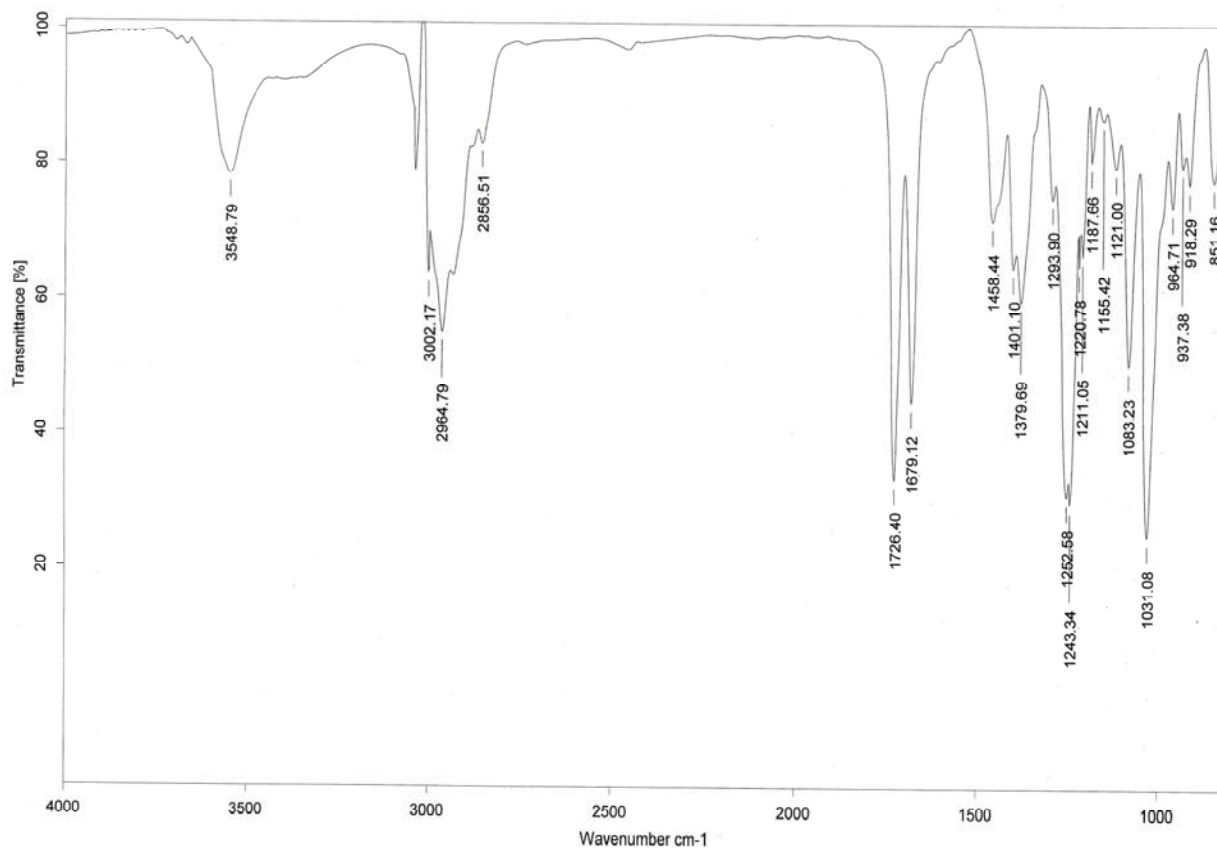
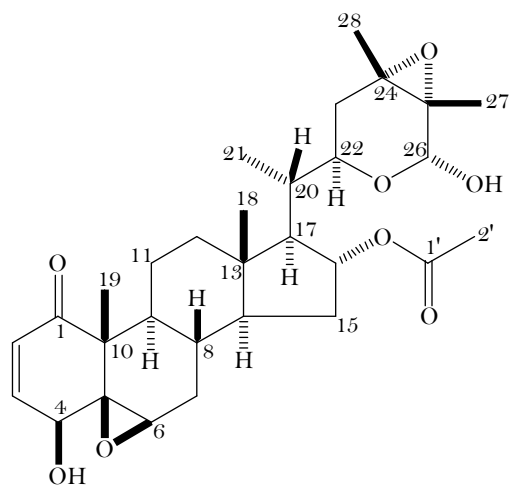


Espectro 5: HMBC de Virginol A (1)

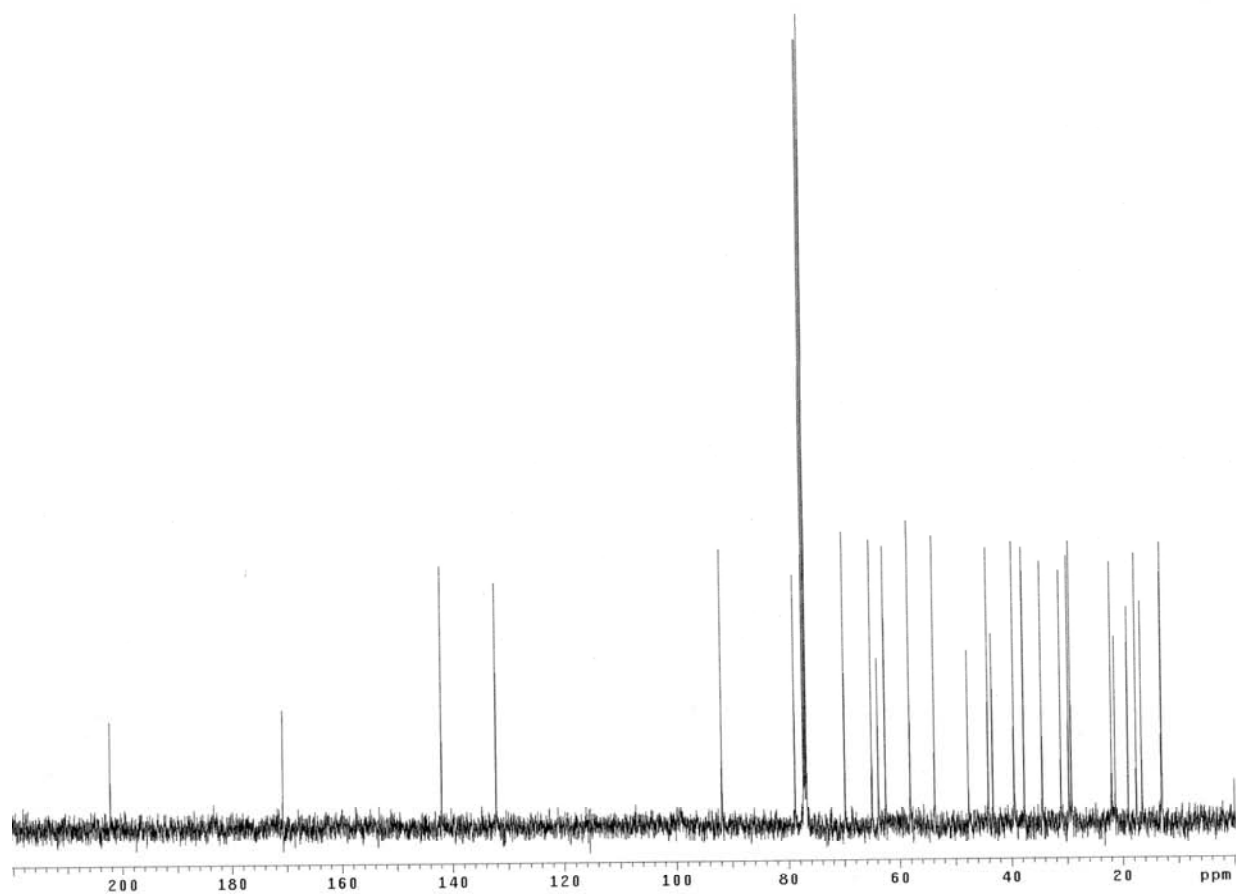
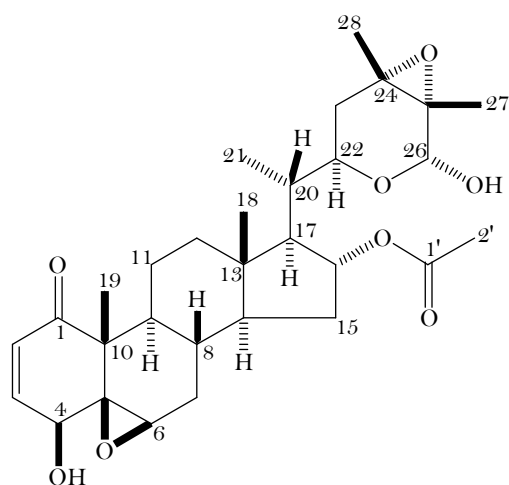


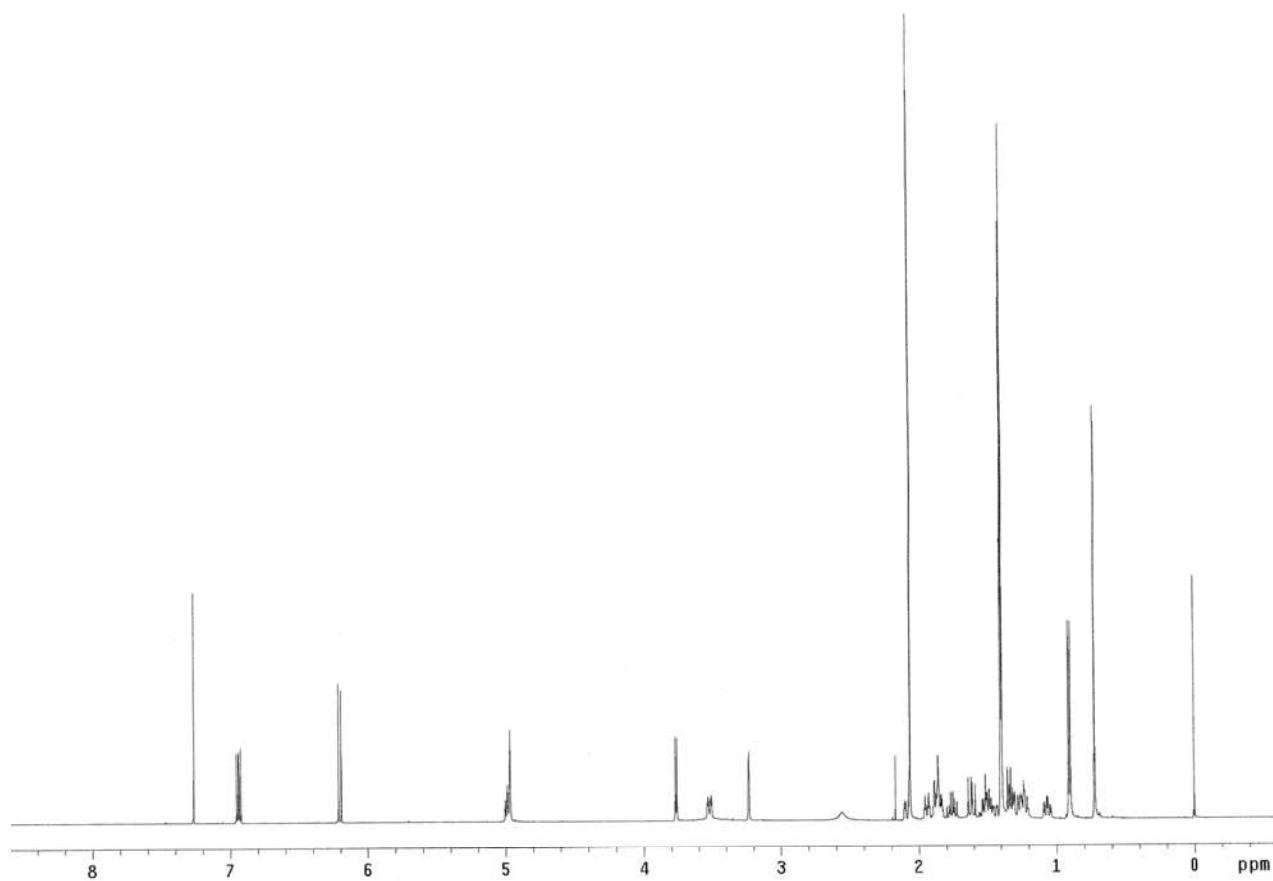
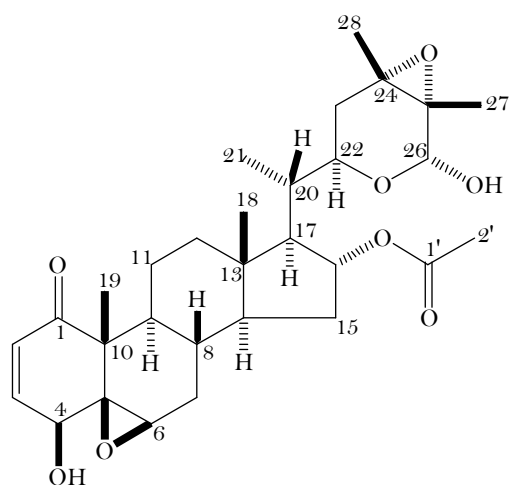
Espectro 6: NOESY de Virginol A (1)

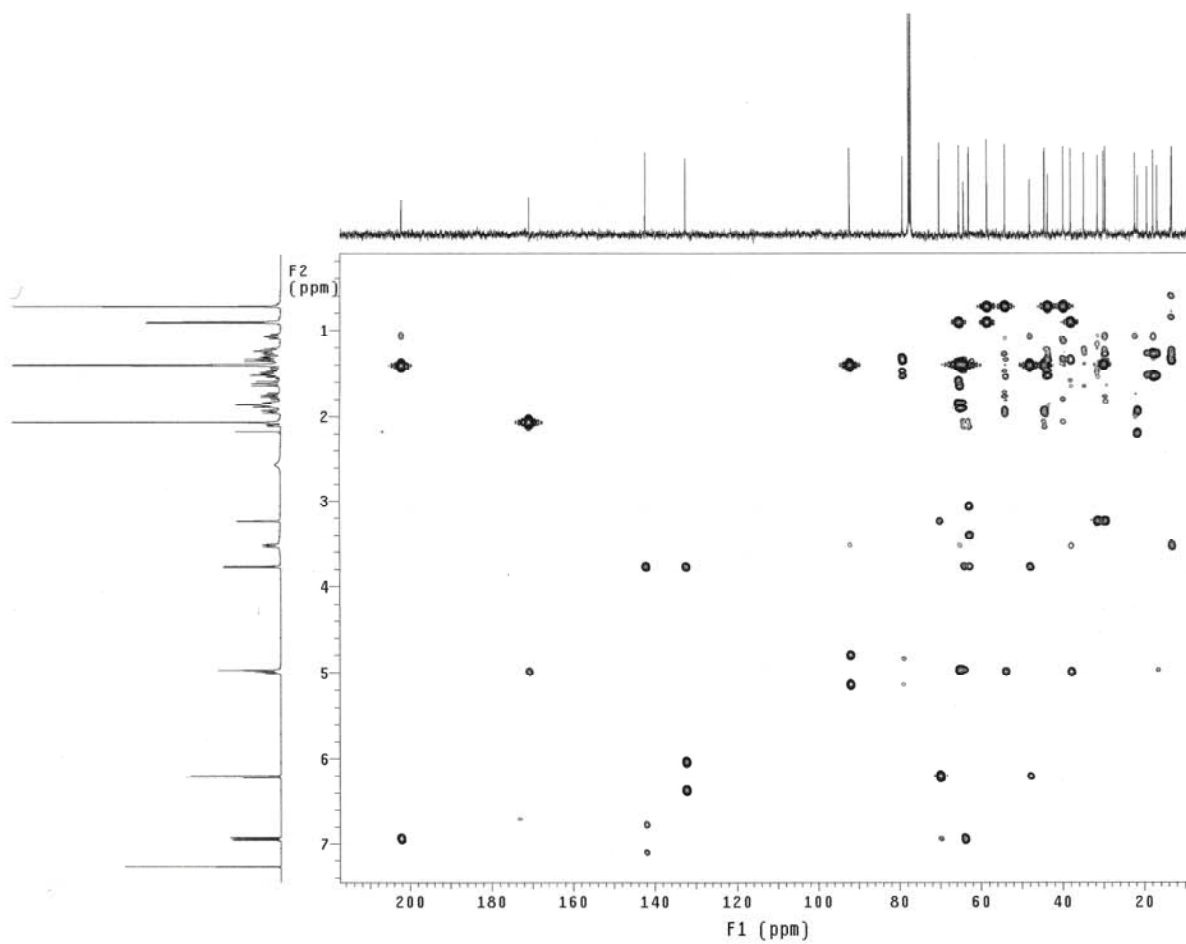
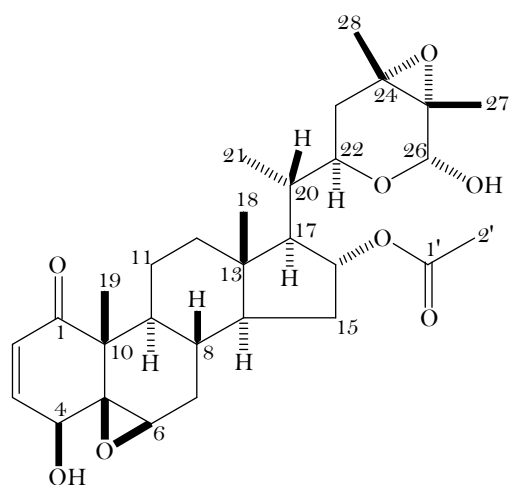




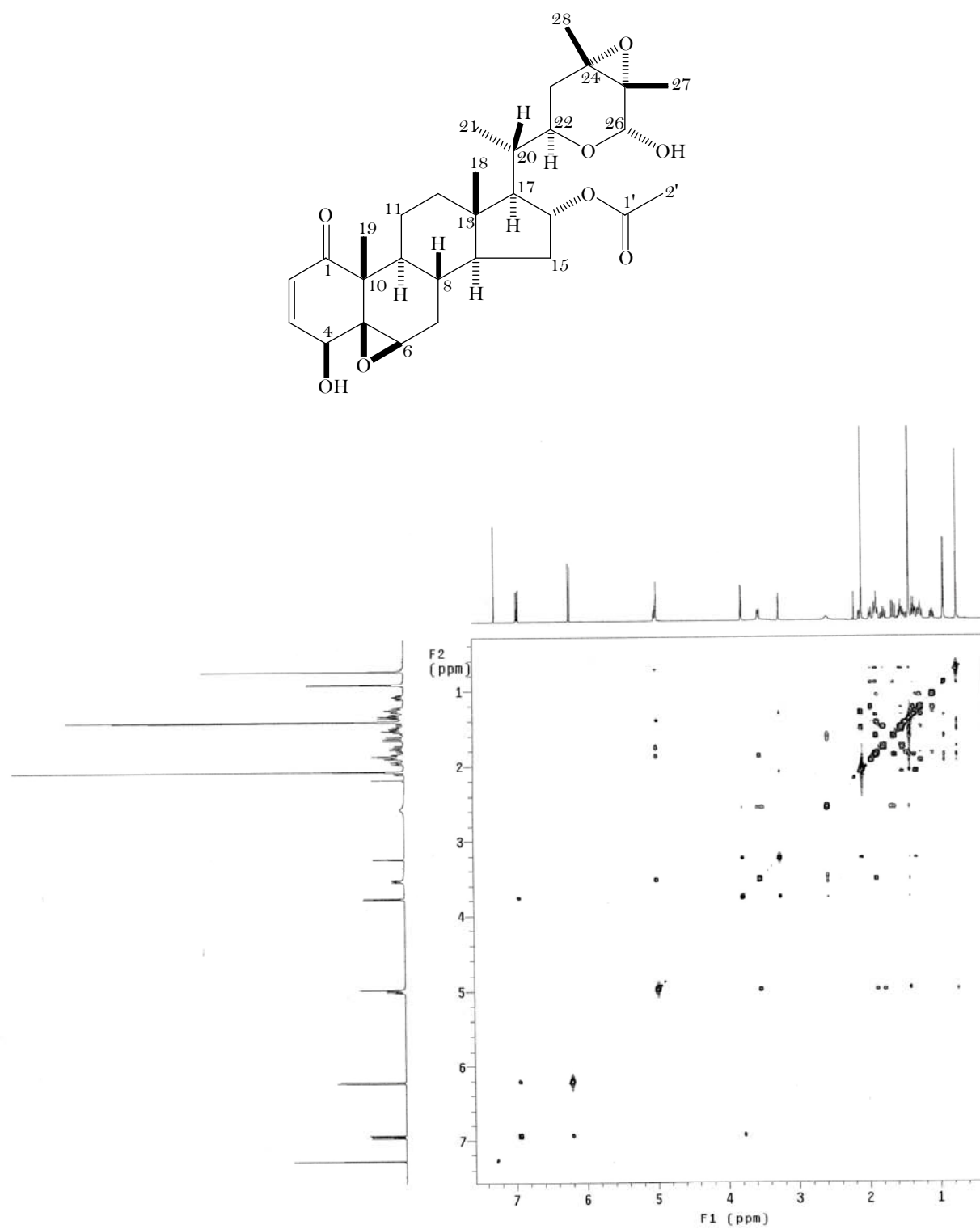
Espectro 7: IR de Virginol B (2)

Espectro 8: RMN  $^{13}\text{C}$  de Virginol B (2)

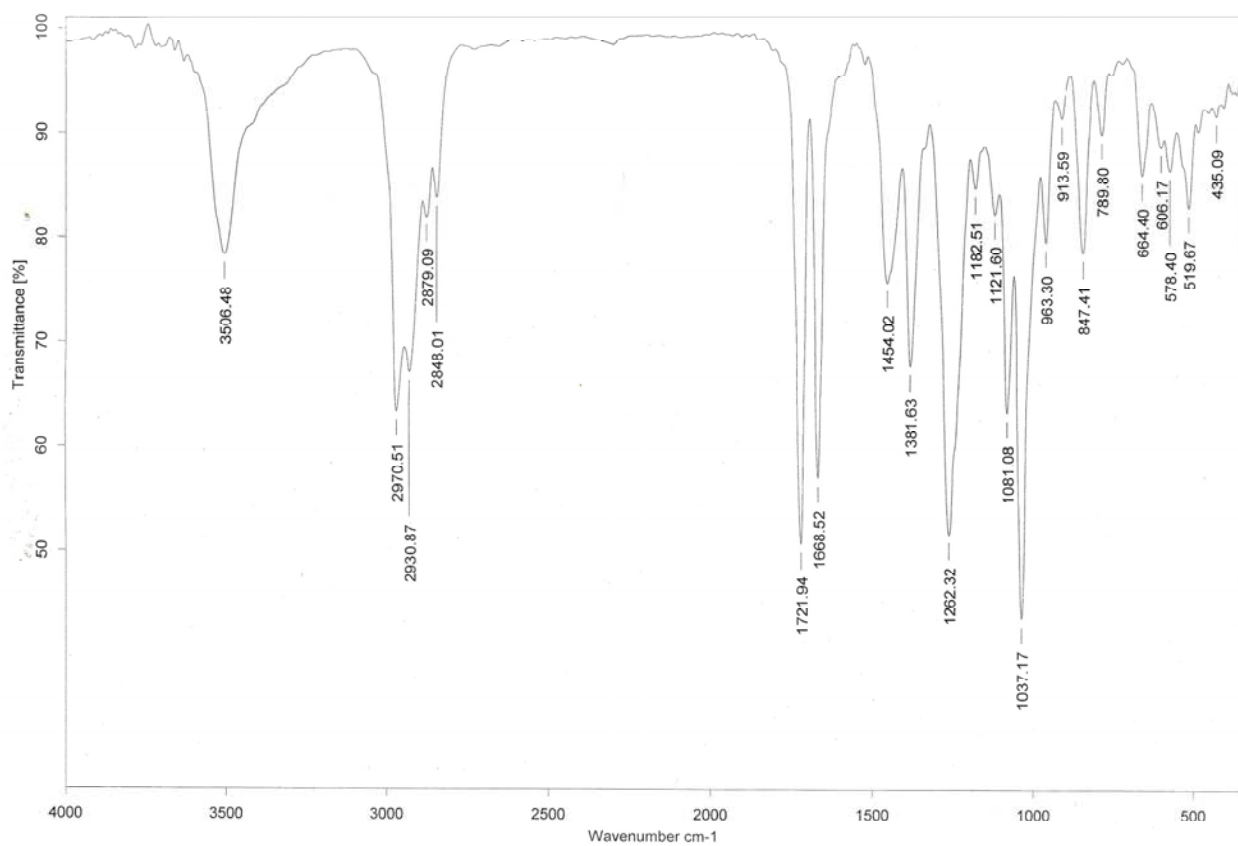
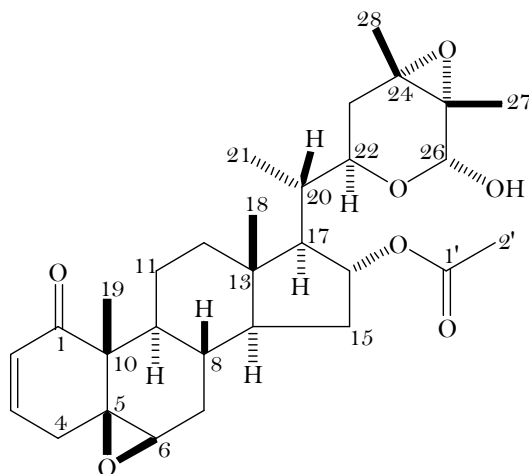
Espectro 9: RMN  $^1\text{H}$  de Virginol B (2)



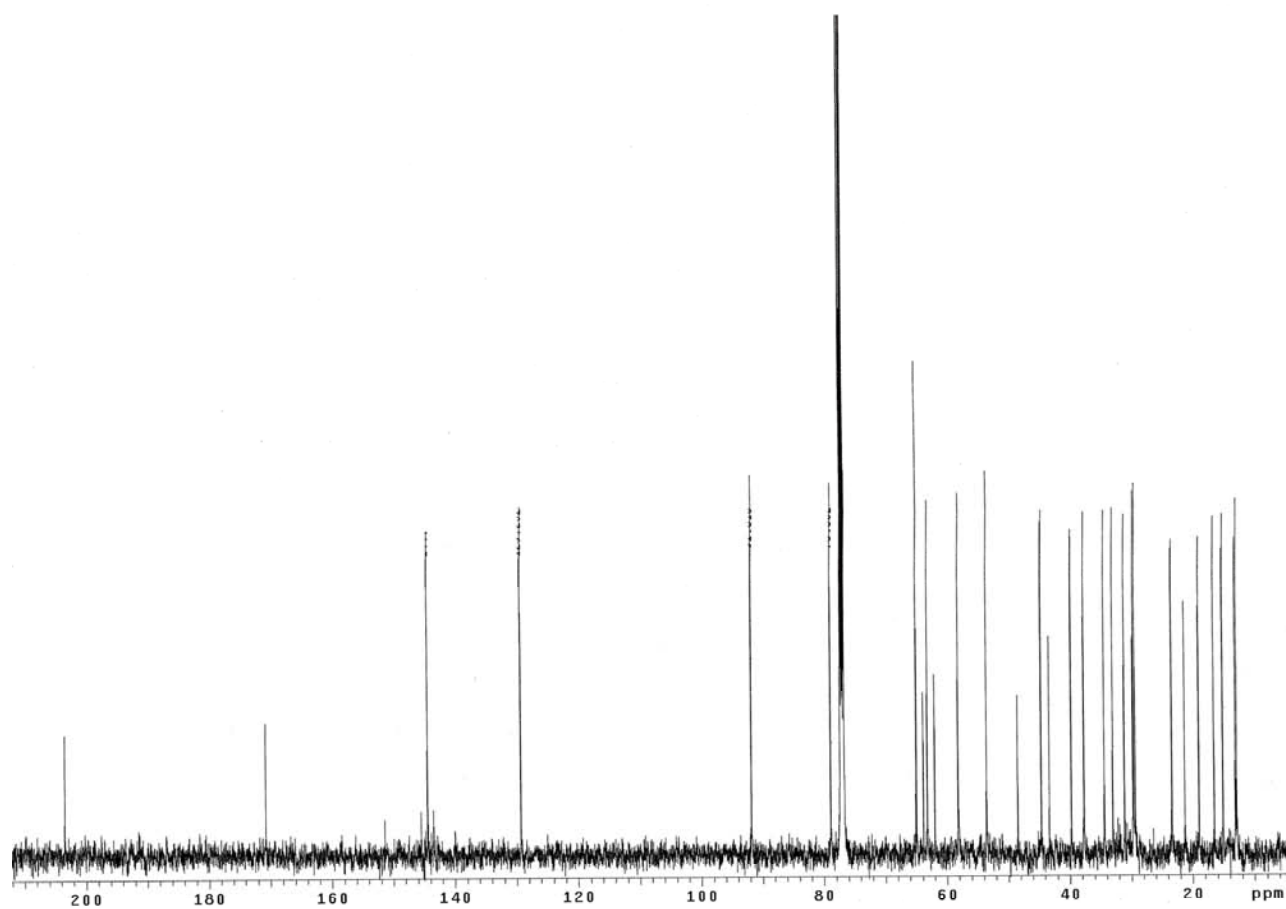
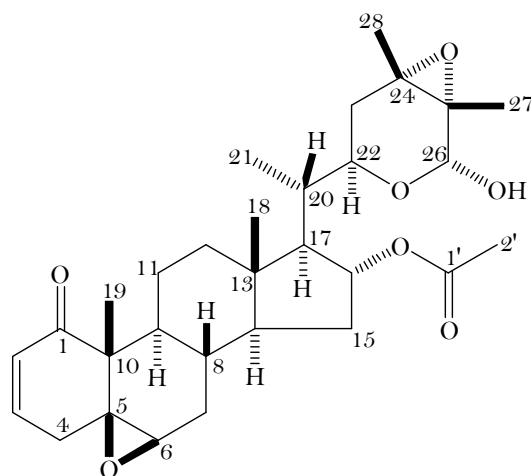
Espectro 10: HMBC de Virginol B (2)

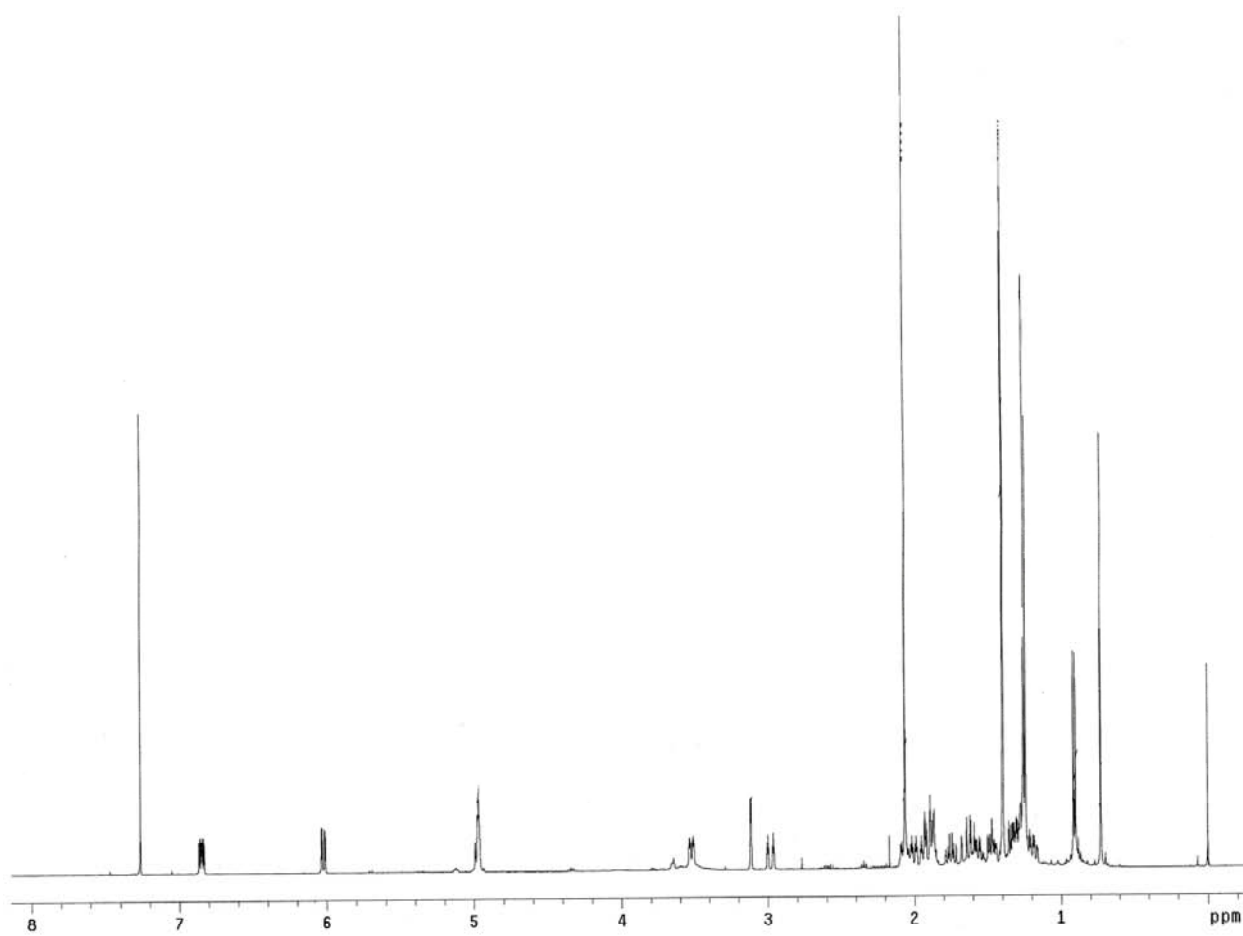
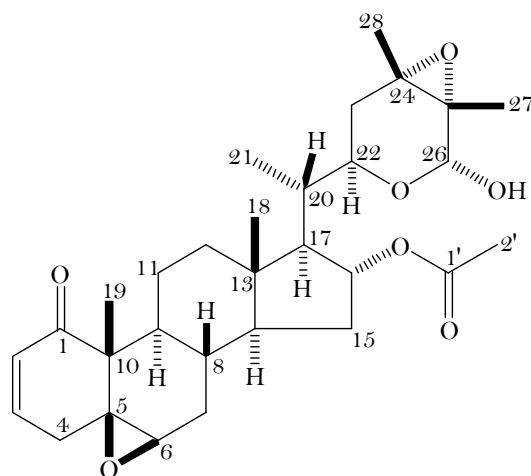


Espectro 11: NOESY de Virginol B (2)

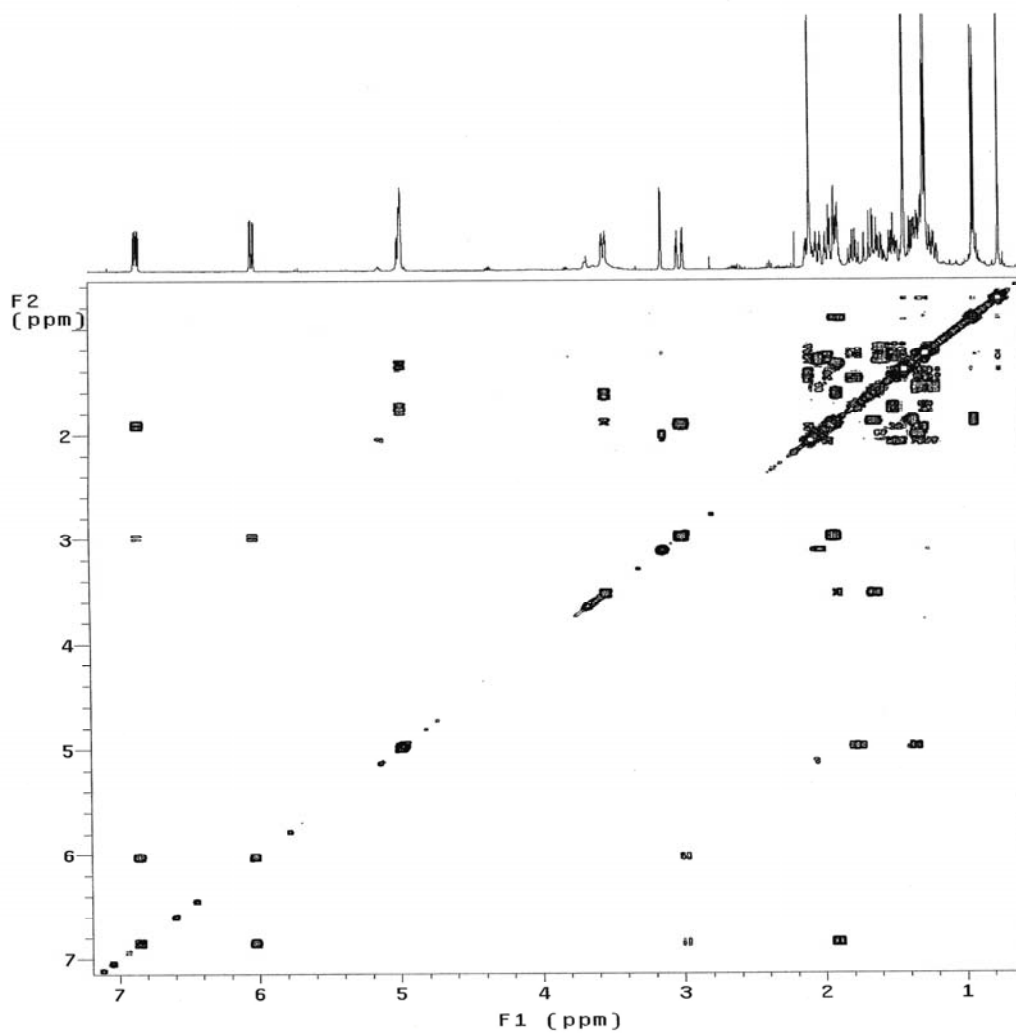
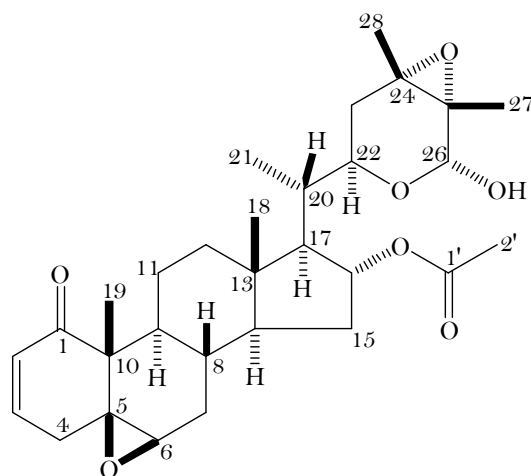


Espectro 12: IR de Virginol C (3)

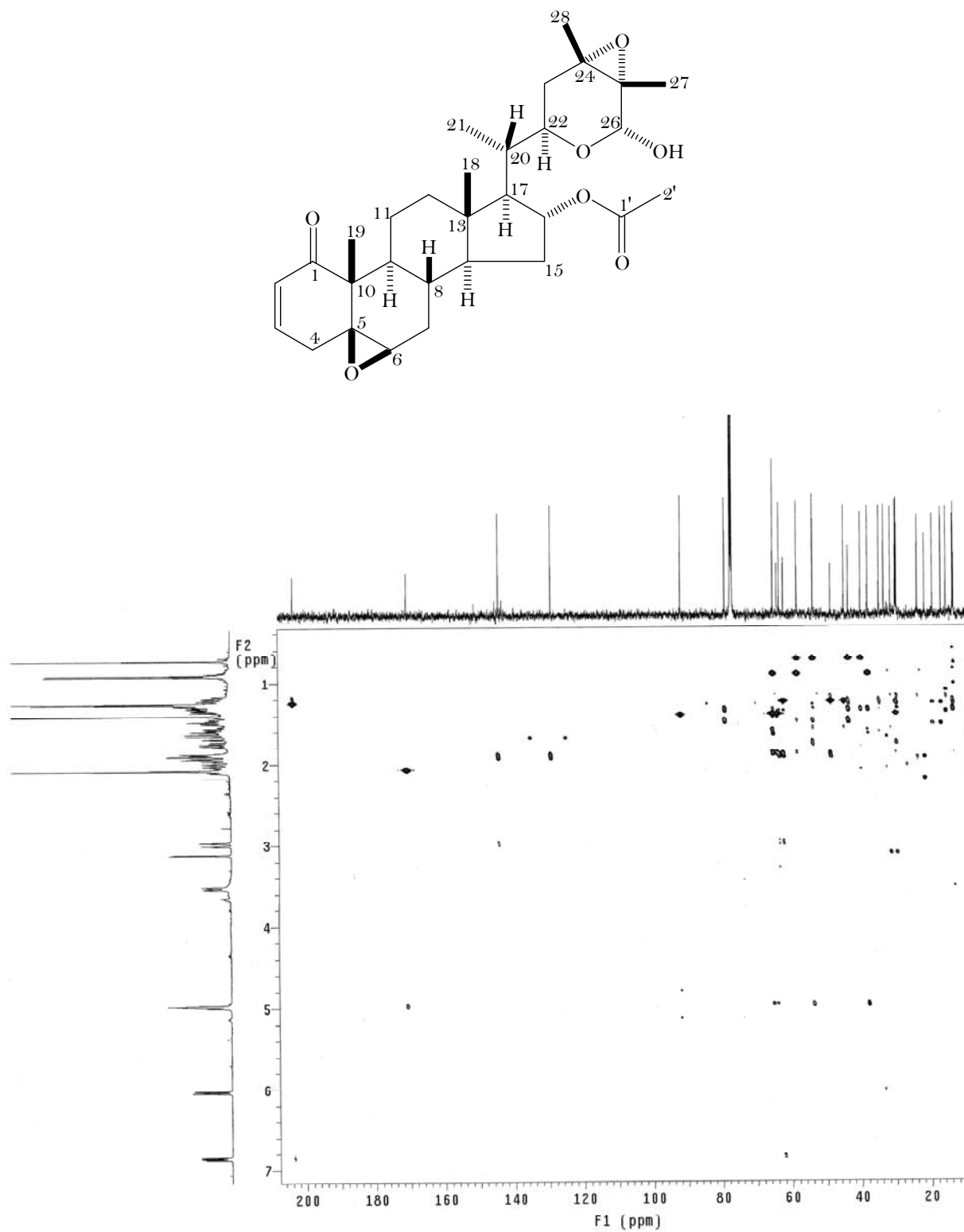
Espectro 13: RMN  $^{13}\text{C}$  de Virginol C (**3**)

Espectro 14: RMN  $^1\text{H}$  de Virginol C (**3**)

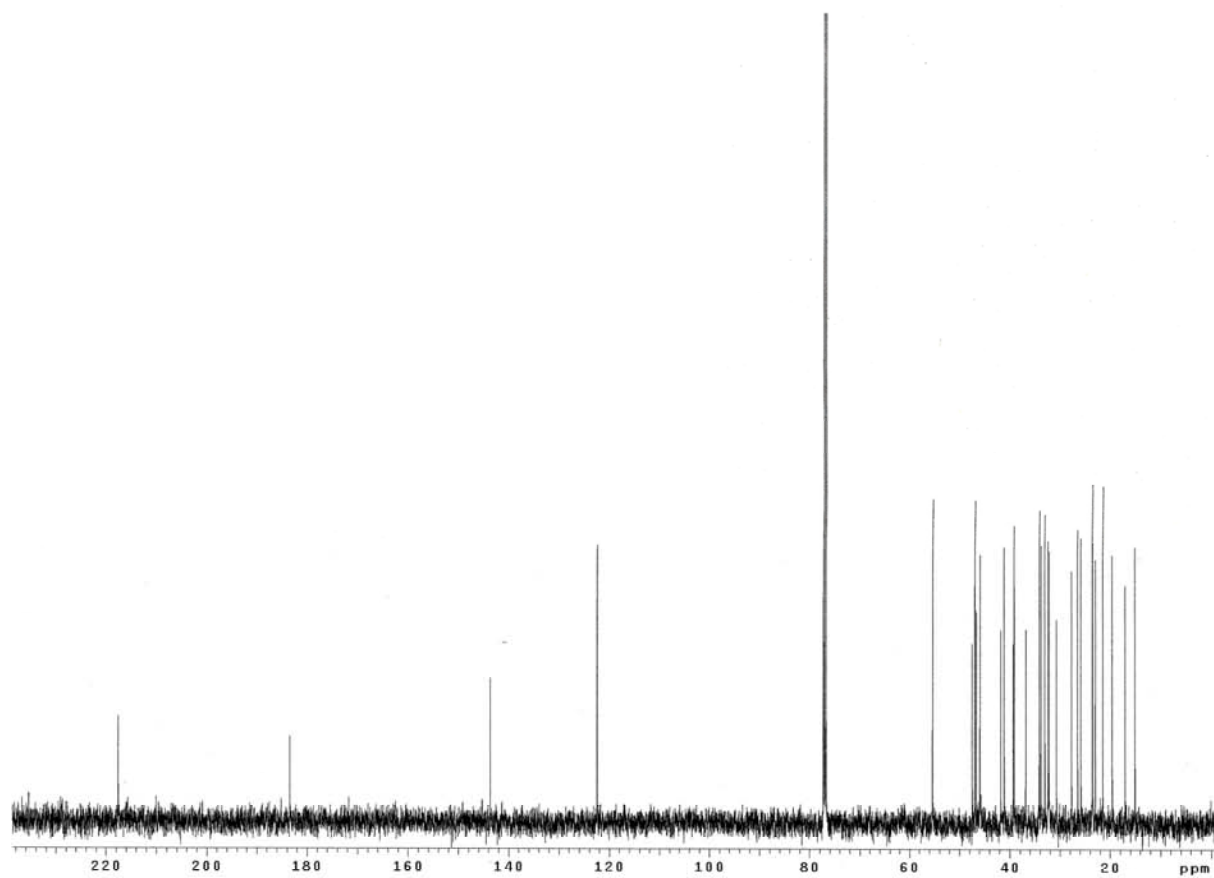
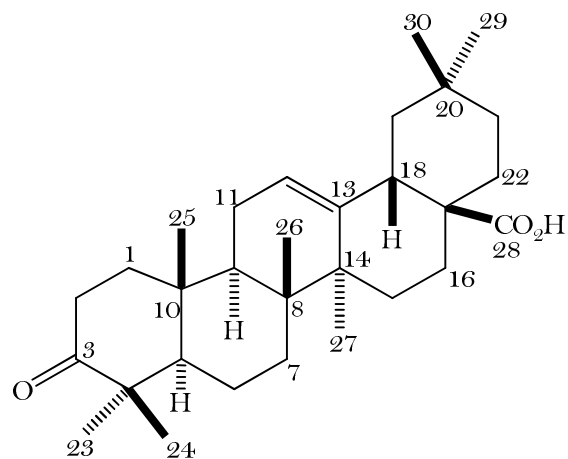


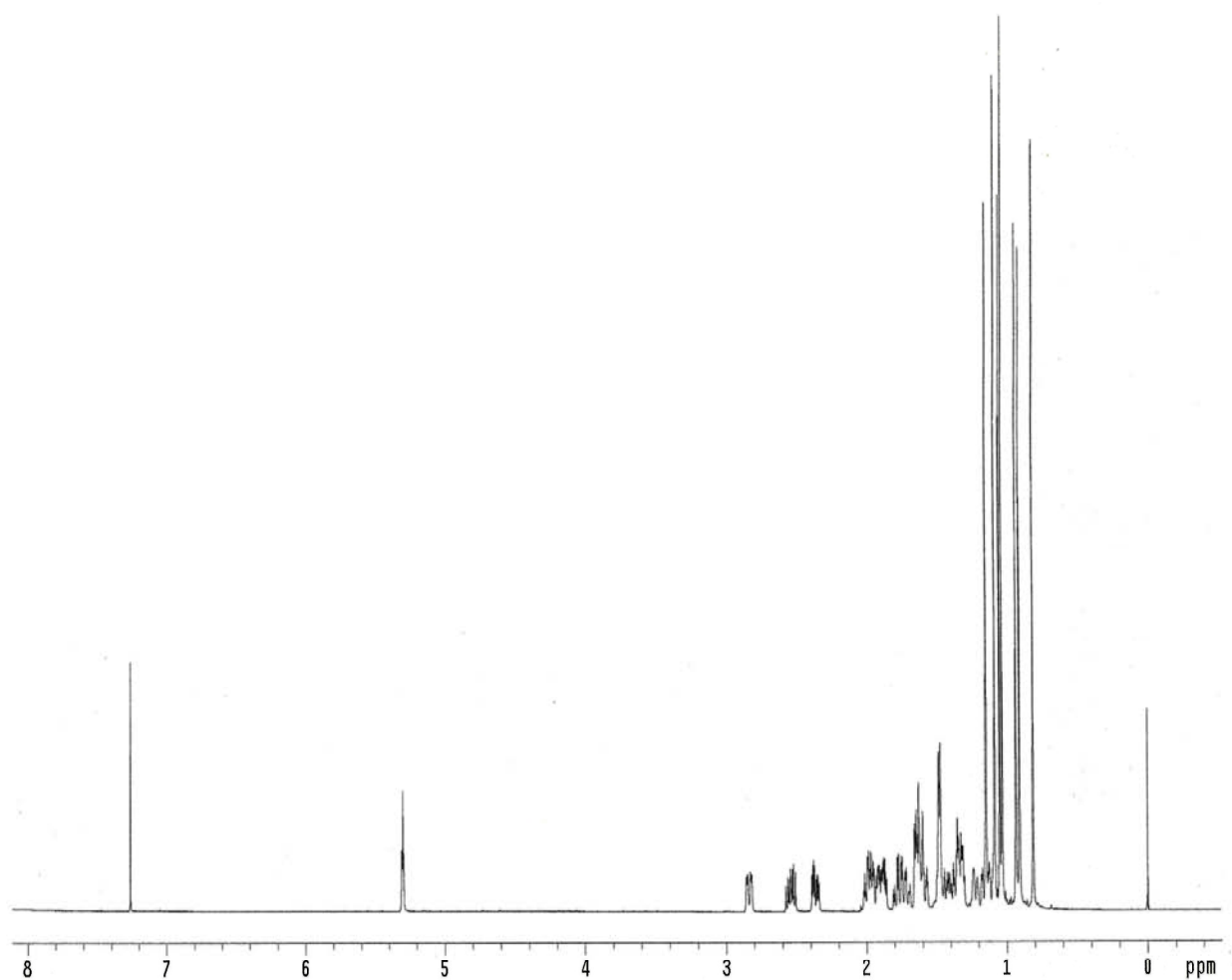
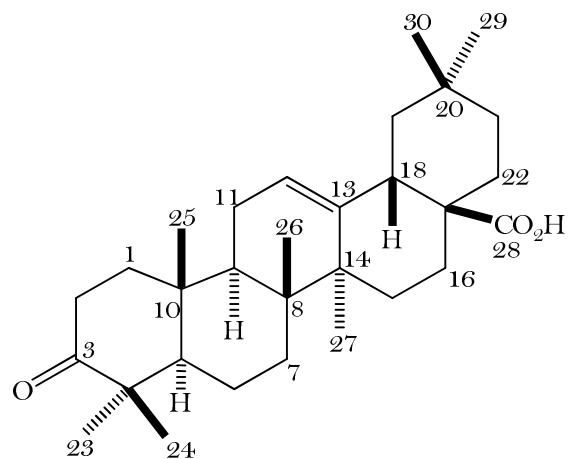


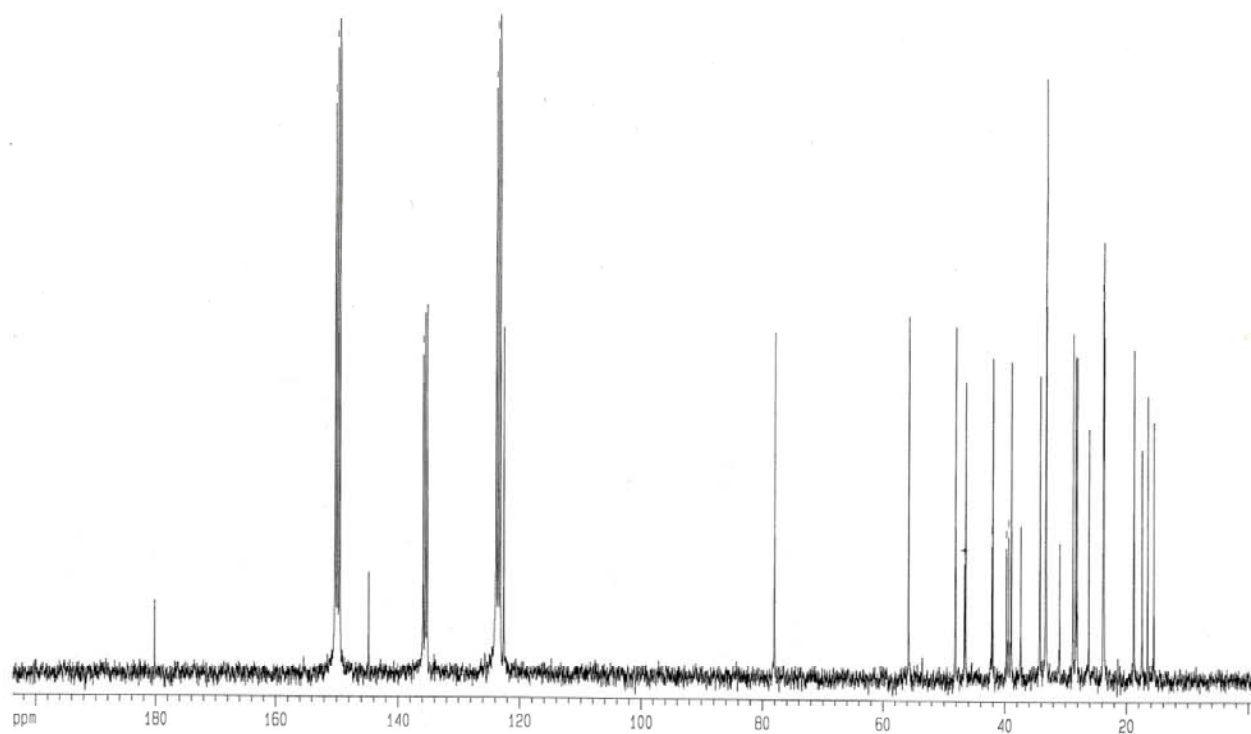
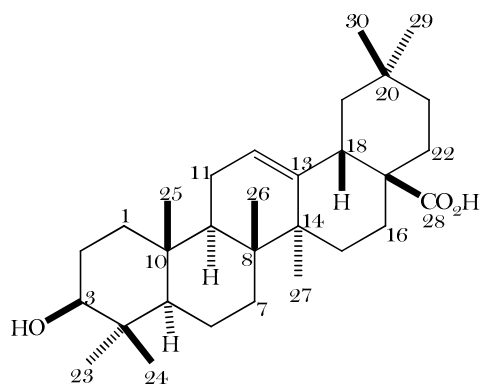
Espectro 15: COSY de Virginol C (3)

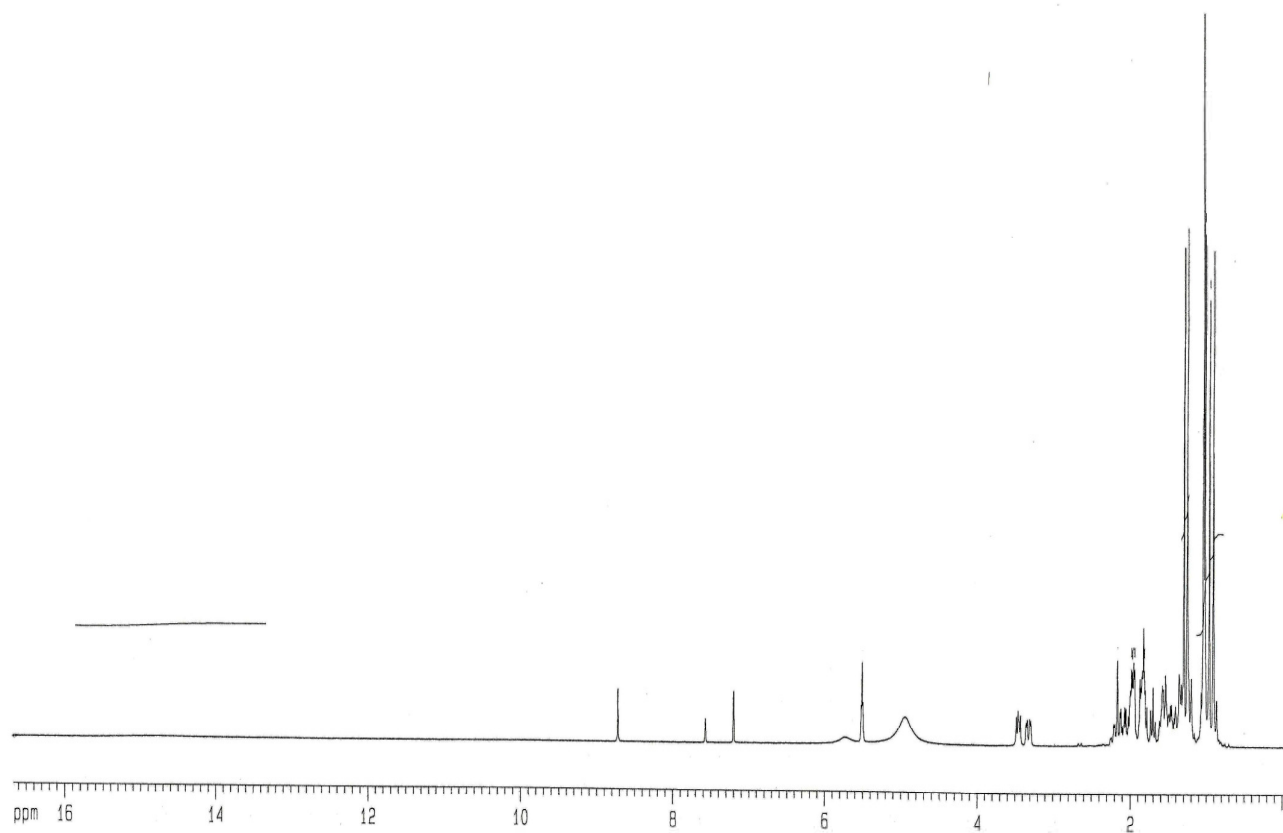
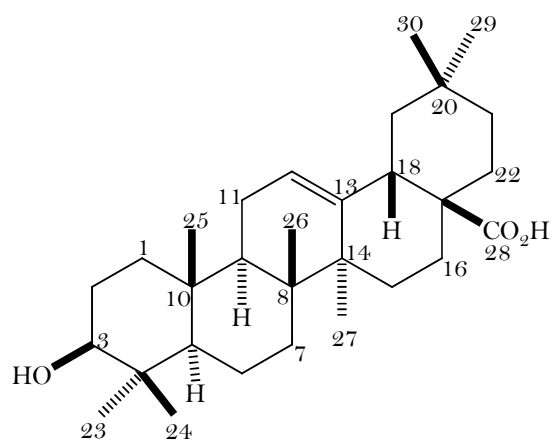


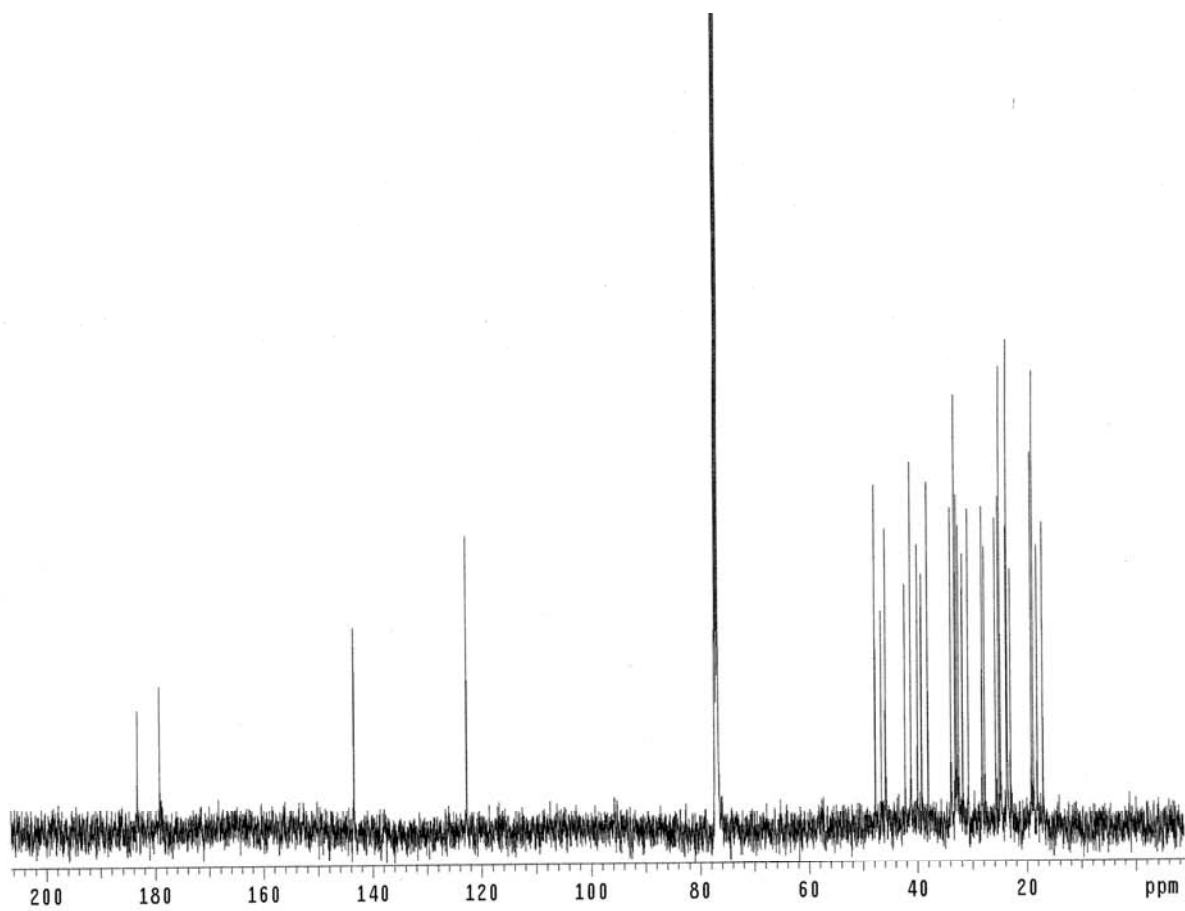
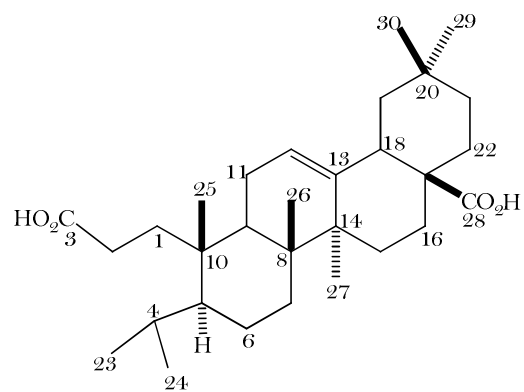
Espectro 16: HMBC de Virginol C (3)

Espectro 17: RMN  $^{13}\text{C}$  del Ácido Oleanónico (**6**)

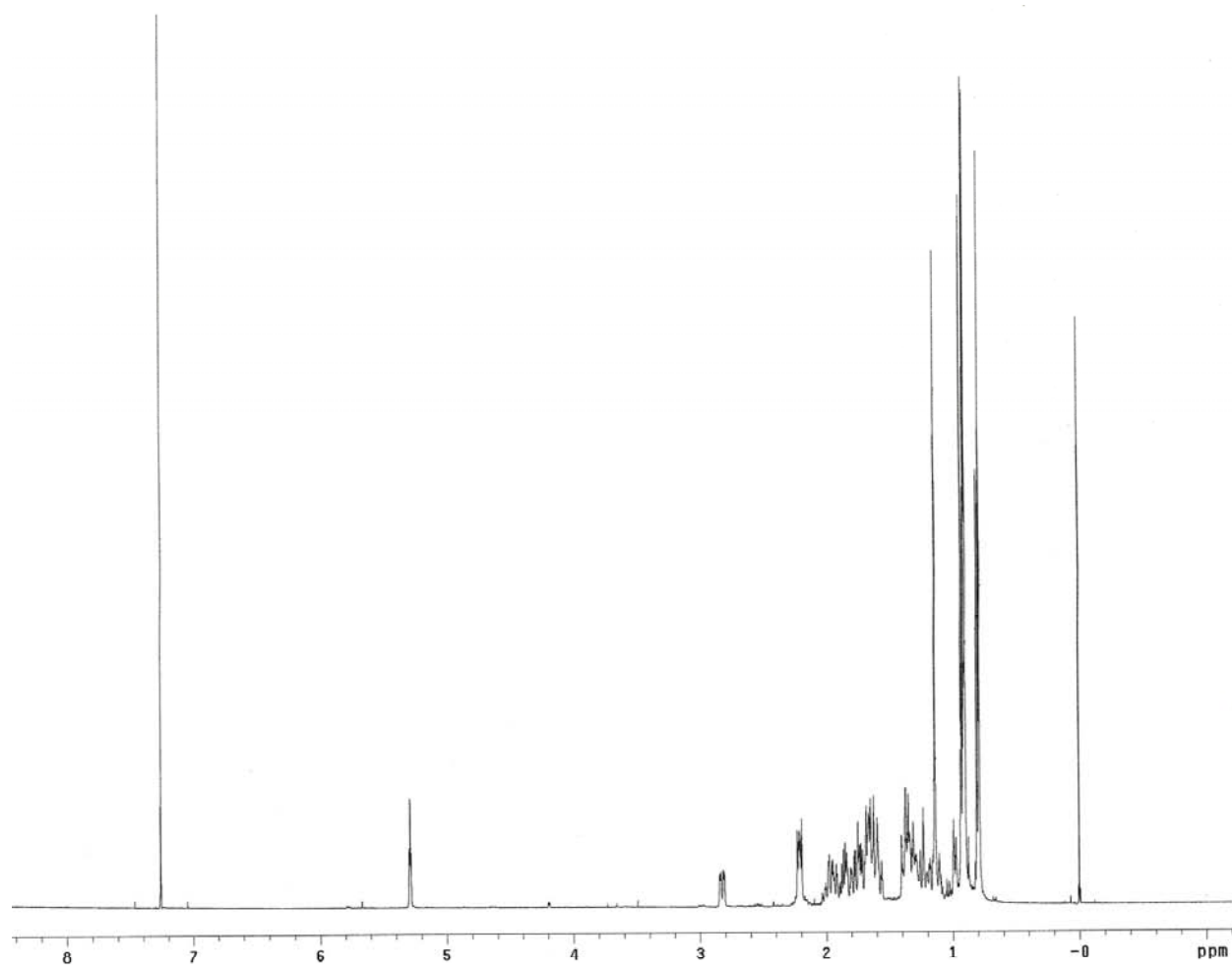
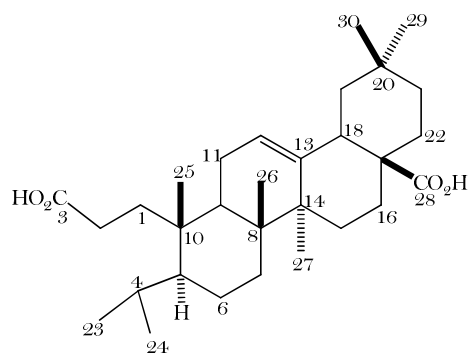
Espectro 18: RMN  $^1\text{H}$  del Ácido Oleanónico (**6**)

Espectro 19: RMN  $^{13}\text{C}$  del Ácido Oleanólico (7)

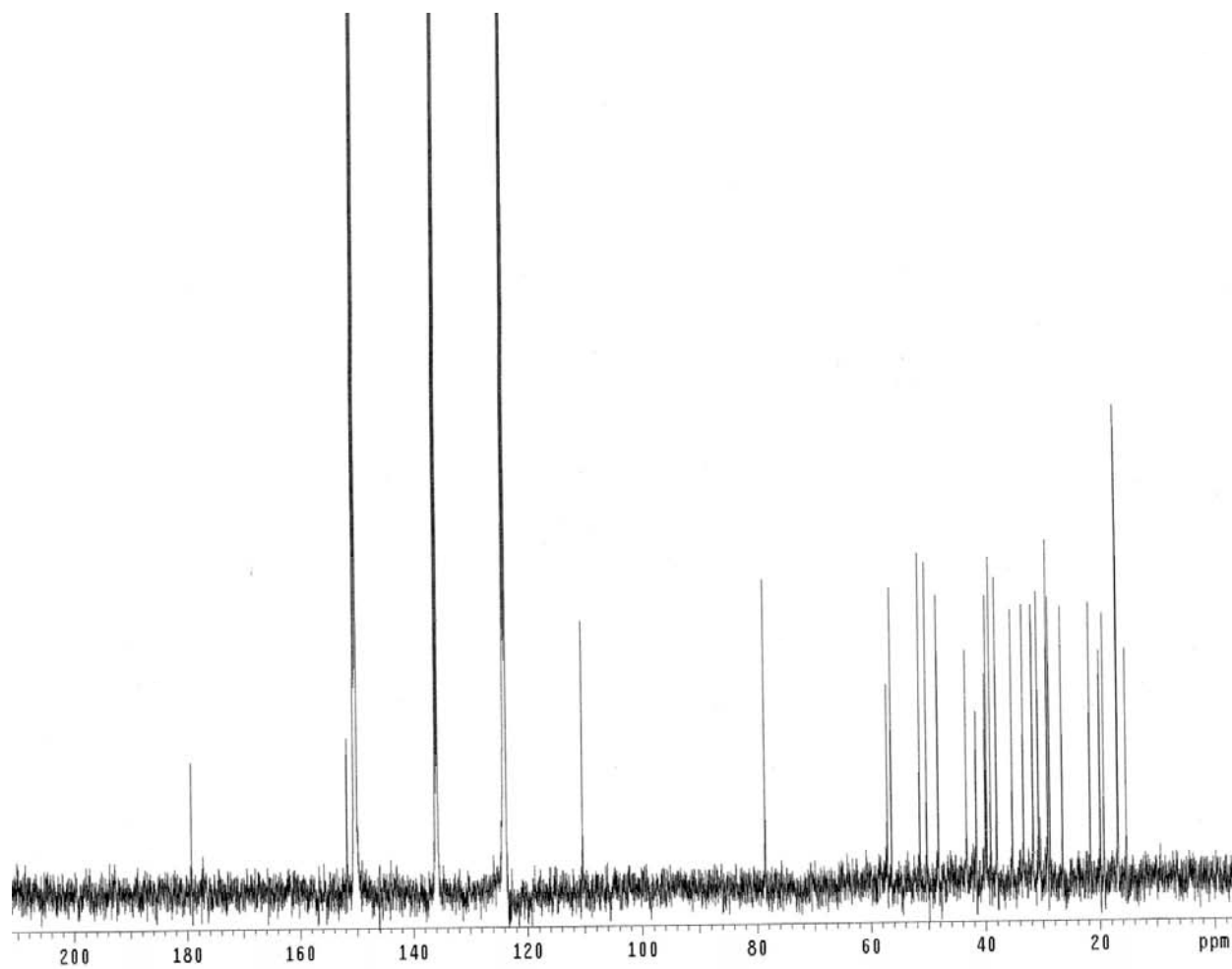
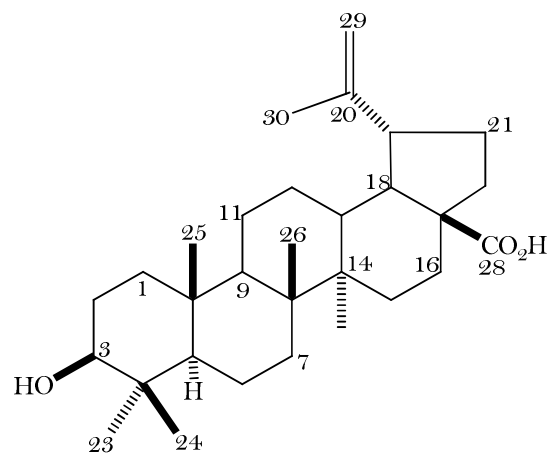
Espectro 20: RMN <sup>1</sup>H del Ácido Oleanólico (7)

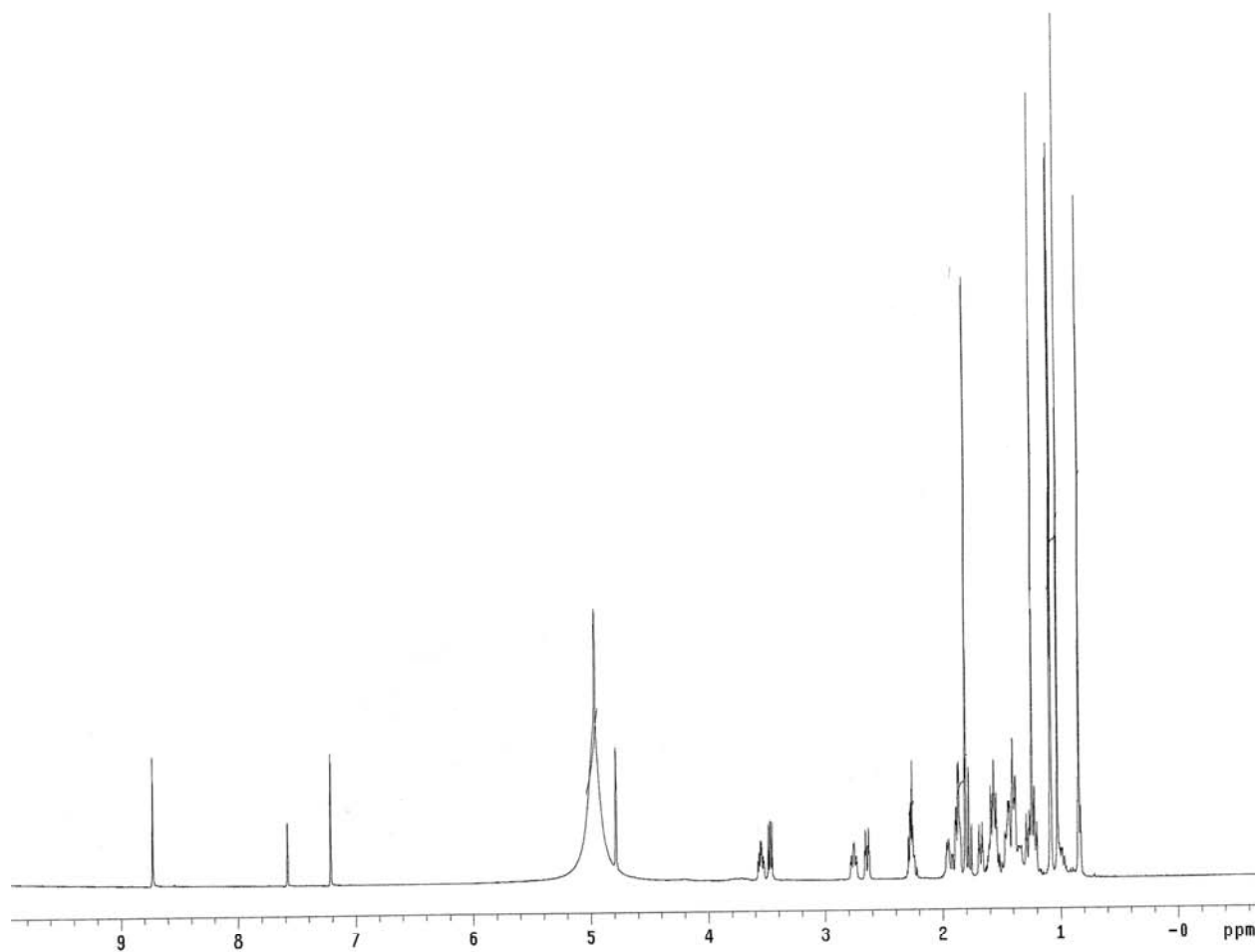
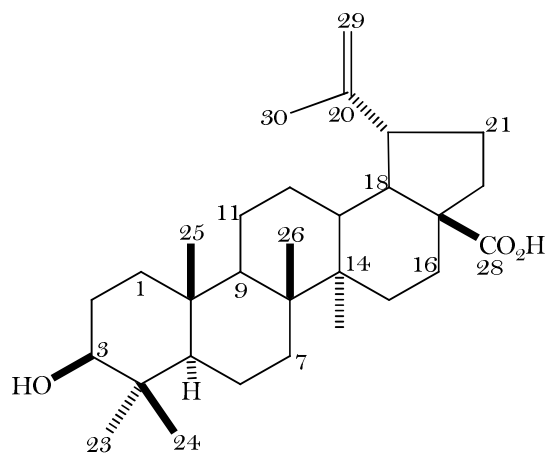


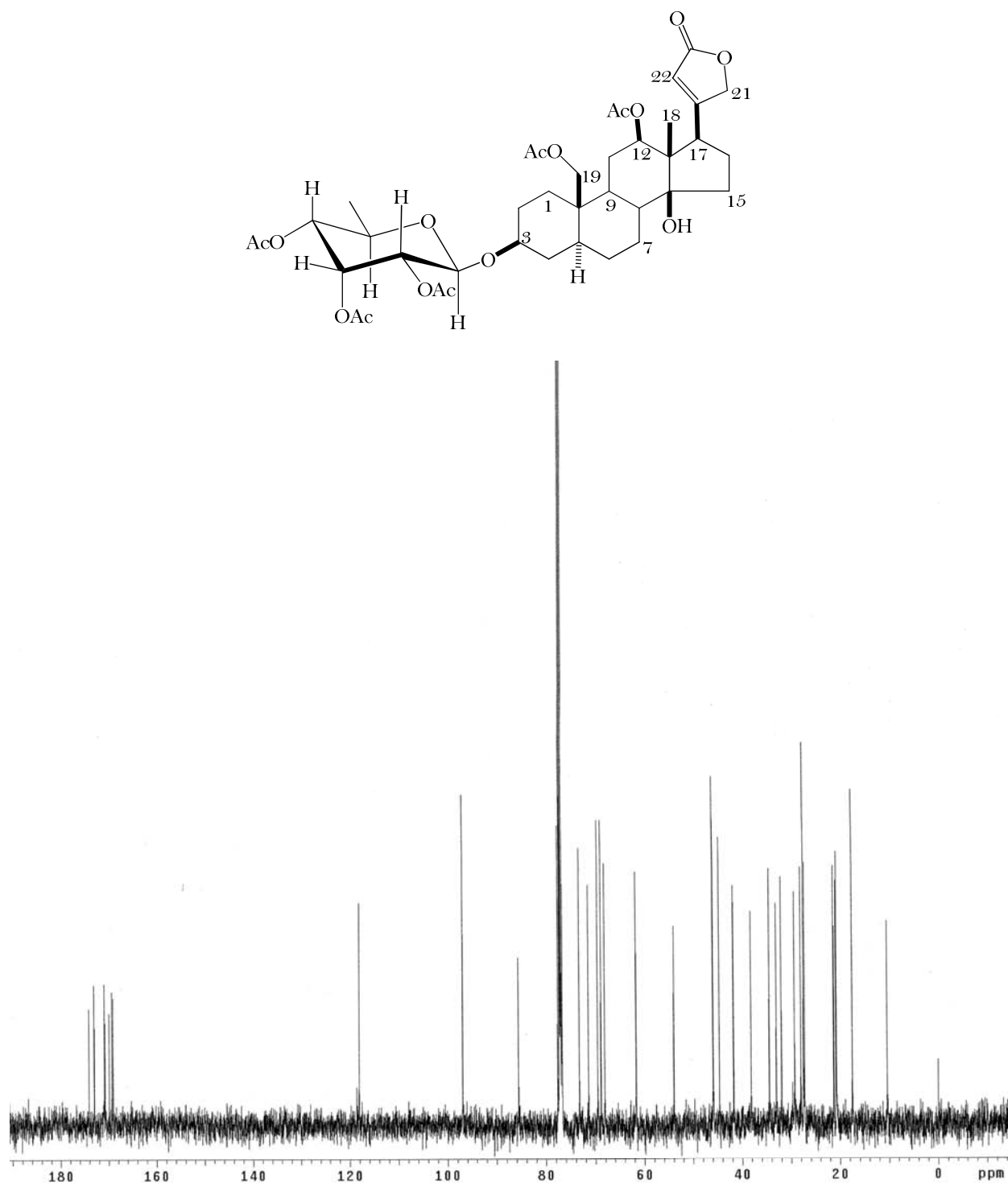
Espectro 21: RMN  $^{13}\text{C}$  del Ácido 3,4-seco-olean-12-en-3,28-dioico (8)

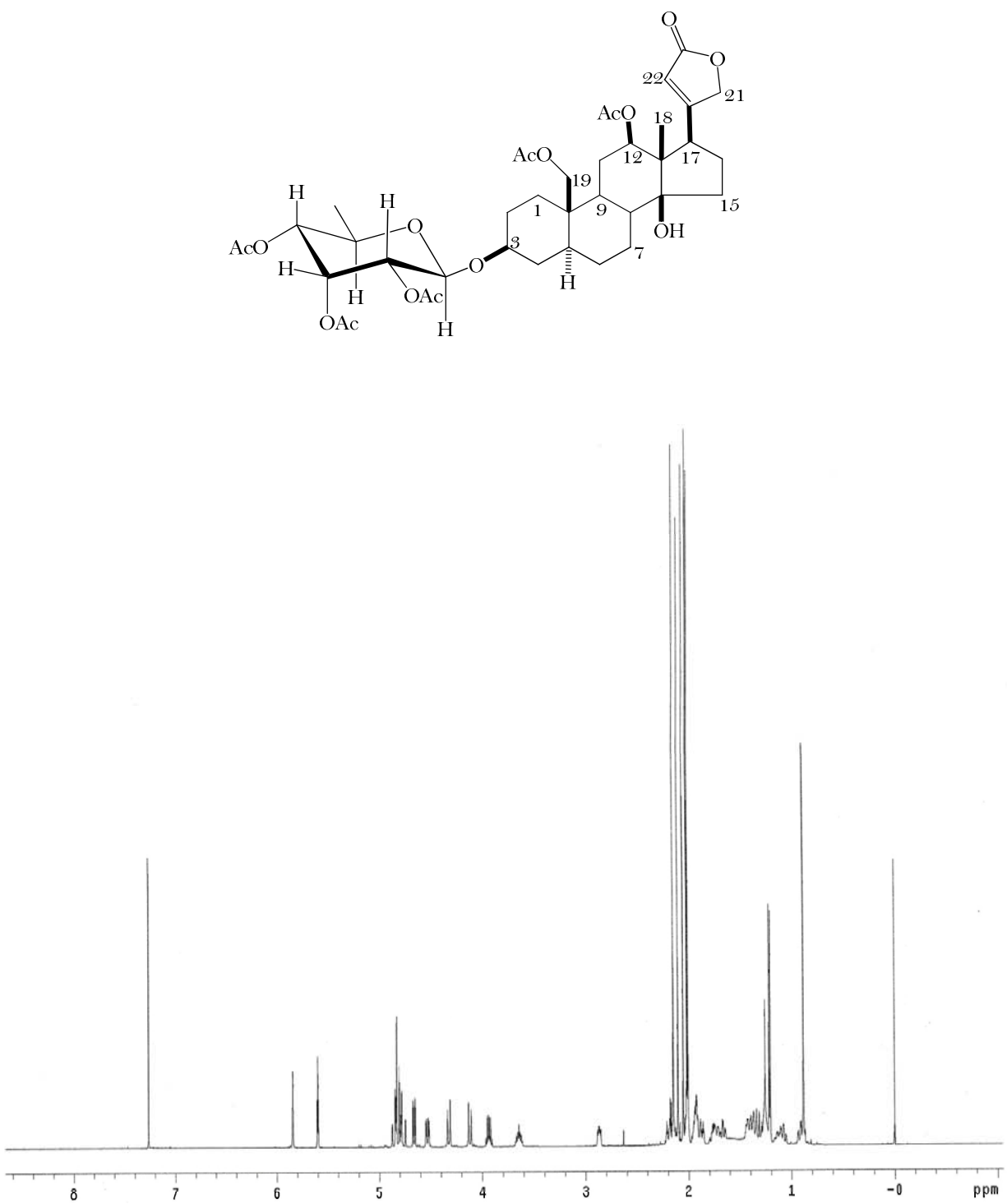
Espectro 22: RMN  $^1\text{H}$  del Ácido 3,4-seco-olean-12-ene-3,28-dioico (8)



Espectro 23: RMN  $^{13}\text{C}$  del Ácido Betulínico (9)

Espectro 24: RMN <sup>1</sup>H del Ácido Betulínico (9)

Espectro 25: RMN <sup>13</sup>C del Pentacetil 3-O-β-1-metilósido de 12-β-hidroxicoroglaucigenina (10)



Espectro 26: RMN  $^1\text{H}$  del Pentacetil 3-O- $\beta$ -alometilósido de 12- $\beta$ -hidroxicoroglaucigenina (10)