



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

“Withanólidas de *Datura quercifolia* HBK”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

CHRISTIAN JASSO SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	M. en C.	Francisco Rojo Callejas.	.
Vocal	Dra.	María Isabel Aguilar Laurents.	
Secretario	M. en C.	Emma Maldonado Jiménez.	
1er. Suplente	Dr.	José Fausto Rivero Cruz.	
2do. Suplente	M. en C.	Isabel del Carmen Rivero Cruz.	

Sitio en donde se desarrolló el tema:

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

Asesora

M. en C. Emma Maldonado Jiménez

Sustentante

Christian Jasso Sánchez.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por las grandes bendiciones que he recibido a lo largo de este tiempo y que hoy me permite culminar una de las etapas más importantes de mi vida.

A la M en C. Emma Maldonado Jiménez por su valiosísima enseñanza, paciencia, dedicación y continua motivación para el término de este proyecto, del cual puedo asegurar surgió una sincera y gran amistad, muchas gracias!!!!

A los compañeros del laboratorio 2-7 del Instituto de Química, Jonathan, Lulú, Sonia, Humberto, Elíhu, Karina y Jon, gracias por su agradable compañía.

A la UNAM y Facultad de Química, que me brindaron las herramientas y conocimientos necesarios para lograr una formación profesional de excelencia, pero aun más importante por el orgullo que representa formar parte de la máxima casa de estudios.

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents y al M en C Francisco Rojo Callejas por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A la M en C María Teresa Ramírez Apan y al M en C Antonio Nieto Camacho por realizar los ensayos de citotoxicidad y actividad antioxidante respectivamente, y en su momento aclarar las dudas surgidas.

Al personal a cargo de los laboratorios de RMN, IR y EM, ya que la obtención de los espectros fue crucial para el desarrollo de este proyecto.

A mi padre por el apoyo brindado en estos últimos meses.

DEDICATORIAS

A mi familia

Mamá gracias por guiar cada uno de mis pasos, por sacrificar mucho de tu tiempo para poder brindarme una formación profesional pero principalmente humana ya que de ti he aprendido el máximo valor que una persona puede tener, "la humildad", gracias por creer siempre en mí y apoyar cada una de mis decisiones, eres una de mis mayores bendiciones, te quiero y admiro muchísimo. Espero que te sientas orgullosa de mí y de este trabajo ya que también es tuyo.

A mis hermanos Karen, Monse, Giovanni y Jesús, gracias por formar parte de mi vida, pero muy especialmente gracias a mis hermanas que sin duda alguna cada día pasado a su lado han contribuido enormemente a mi felicidad y a ser la persona que hoy soy, espero ser un gran ejemplo para ustedes.

A los cuatro angelitos que llegaron a mi vida y la cambiaron radicalmente, Emiliano, Israel, Betzabeth y Edith, su presencia me ha hecho vivir experiencias jamás imaginadas, son un gran motivo de alegría y festejo en mi vida.

A mi abuelita Teresa, yo se que aunque ya tengas más nietos y bisnietos siempre seré uno de tus consentidos, jeje. Tú siempre serás mi abuelita consentida.

A mi tía Vero que durante mucho tiempo fue como mi segunda mamá, y a lo largo de la carrera mi proveedora particular de fotocopias y engargolados, gracias por tantas cosas buenas que he recibido de ti tía. A mis tías Paty y Rosario.

A mis primos Mariela, Mónica, Iván, Juan y Diego, por el tiempo convivido y el cual espero sea mucho mayor.

A mis amigos

Belén, Jonathan, Adrian (padre), Sofía (chofas), Juan Carlos, Francisco, Lulú (Berenice), Adriana (harris), Tania (ta), Helivier, Tania (taniota), Belén Ramírez, Lili, Cristina, Angélica, Oscar, Alejandro, Claudia, Alexis, Caín.

Con la mayoría de ustedes pase grandes momentos a lo largo de la carrera, algunos mas que amigos se convirtieron en hermanos, pero sin duda cada uno de ustedes apporto cosas nuevas a mi vida, gracias por todos los consejos y las palabras de aliento brindadas que en su momento fueron sumamente reconfortantes.

A todos les deseo el mayor de los éxitos en sus respectivas áreas.

ÍNDICE

Índice.....	1
Abreviaturas.....	3
1. Introducción.....	5
2. Antecedentes	
2.1 Metabolismo.....	7
2.2 Metabolitos secundarios.....	7
2.3 Producto Natural.....	8
2.4 Familia Solanaceae.....	8
2.5 El género <i>Datura</i>	11
2.6 Withaesteroides.....	13
2.6.1 Withanólidas.....	16
2.7 Actividad Biológica de los withaesteroides.....	23
3. Objetivos.....	26
4. Desarrollo experimental	
4.1 Material y equipo.....	27
4.2 Material vegetal.....	27
4.3 Extracción.....	28
4.4 Aislamiento.....	28

4.5 Pruebas biológicas.....	33
4.5.1 Actividad citotóxica.....	33
4.5.2 Actividad antioxidante.....	35
5. Resultados y discusión	
5.1 Elucidación estructural de los compuestos.....	39
5.2 Pruebas biológicas.....	52
5.2.1 Actividad antioxidante.....	52
5.2.2 Actividad citotóxica.....	53
6. Conclusiones.....	57
7. Bibliografía.....	58
Anexo I	
Espectroscopia.....	66

ABREVIATURAS

[α]	Rotación óptica
AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Cloroformo
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear (Correlated Spectroscopy)
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de doble
dddd	Doble de doble de doble de doble
DEPT	Aumento sin distorsión de la transferencia de polarización (Distortionless Enhancement of Polarization Transfer)
DMSO	Dimetil sulfóxido
dt	Doblete de triplete
DO	Densidad Óptica
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EtOH	Etanol
frs	Fracciones
MeOH	Metanol
Me ₂ CO	Acetona
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
Hz	Hertz
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento

m	Multiplete
m/z	Relación masa carga
M ⁺	Ión molecular
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singulete
SRB	Sulforrodamina B
t	Triplete
td	Triplete de doblete
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TPA	Acetato 12-O-tetradecanoilforbol

1.- INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales también se conocen como remedios o productos a base de plantas medicinales, fitomedicamentos, productos fitoterapéuticos y productos fitofarmacéuticos. El uso de plantas medicinales en protocolos basados en evidencias científicas para prevenir y tratar enfermedades se conoce como fitoterapia. Este enfoque del uso de las plantas medicinales contrasta con la herbolaria tradicional, que utiliza las plantas medicinales de forma holística, sobre todo en base a sus usos empíricos y tradicionales. Diferentes culturas de todo el mundo han utilizado las plantas con fines terapéuticos durante miles de años. En algunos países las plantas medicinales siguen siendo una parte importante del sistema médico, como la medicina tradicional china o hindú.

A pesar de que ambos enfoques – tradicional/holístico y racional (fitoterapéutico)/basado en la evidencia – son totalmente diferentes, en algunos casos utilizan la misma terminología. Por ejemplo, la herbolaria tradicional también se describe como <<fitoterapia>> y define a los preparados de material vegetal como <<plantas medicinales>> ⁽¹⁾

En México, las plantas medicinales forman parte esencial de las estrategias generadas por la población para enfrentar sus enfermedades cotidianas. Estas estrategias se dan en nuestro país no solamente en el medio indígena y el rural, sino también entre poblaciones mestizas, y en zonas urbanas y suburbanas. Son resultado de la considerable diversidad biológica del país, de la naturaleza pluriétnica de su población y de la necesidad de recursos accesibles frente a muy diversos padecimientos.

La atracción en ascenso por el uso de plantas medicinales en México, y también su creciente promoción mercantil, no son privativas del país, sino comunes en diversas regiones del mundo, en un momento en el cual ciertos núcleos de población de diferentes estratos sociales expresan la necesidad de tratamientos médicos alternativos. ⁽²⁾

En este sentido, surge la necesidad de realizar estudios químicos y de actividad biológica que nos lleven a descubrir aquellos compuestos que proporcionan las propiedades terapéuticas o curativas a las plantas utilizadas para tal efecto. En el caso de *Datura quercifolia*, esta planta crece en diversos estados de la República Mexicana y es utilizada por varias comunidades para tratar distintos padecimientos como son hemorroides, asma, tensión muscular e incluso para combatir a los piojos. Por otra parte se sabe que las especies del género *Datura* producen withaesteroides y que estos compuestos presentan diversas actividades biológicas, entre las que destaca su actividad citotóxica. Por lo anterior se decidió emprender el estudio químico de los extractos metanólico y acetónico de las partes aéreas de *Datura quercifolia* y evaluar las actividades citotóxica y antioxidante de los compuestos aislados. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

2.- ANTECEDENTES

2.1 Metabolismo

Todos los organismos necesitan transformar e interconvertir un gran número de compuestos orgánicos que les permita vivir, crecer y reproducirse. Deben proveerse de energía en forma de ATP y una serie de “bloques de construcción” para construir sus propios tejidos. Para este propósito se utiliza una red de reacciones químicas mediadas por enzimas que las regulan cuidadosamente, denominadas metabolismo intermediario y las vías implicadas se denominan vías metabólicas.

Algunas de las moléculas de importancia crucial para la vida son carbohidratos, proteínas, grasas y ácidos nucleicos. Estas moléculas o metabolitos primarios derivan en su conjunto del metabolismo primario.

En contraste con las principales vías metabólicas que sintetizan, degradan y en general interconvierten compuestos comúnmente encontrados en todos los organismos, también existe un área del metabolismo (metabolismo secundario) relacionada con compuestos de distribución restringida en la naturaleza, a estos compuestos se les llama metabolitos secundarios. ⁽³⁾

2.2 Metabolitos secundarios

Los compuestos conocidos como metabolitos secundarios sólo se encuentran en organismos específicos, o en grupos de organismos, y son una expresión de la individualidad de las especies. No son necesariamente producidos en todas las condiciones, y en la gran mayoría de los casos su función y los beneficios para el organismo que los produce no se conocen. Algunos son producidos por razones

específicas, por ejemplo, como defensa contra los depredadores o como atrayentes de organismos de la misma especie, sin embargo es lógico suponer que todos juegan un papel vital para el bienestar del organismo productor. En cuanto a su beneficio para el hombre, es el área del metabolismo secundario la que proporciona la mayor parte de los productos naturales farmacológicamente activos. ⁽³⁾

2.3 Producto Natural

Un producto natural se define como un compuesto orgánico cuyo peso molecular se encuentra entre 100 y 2000 uma y es producido por un organismo. En un sentido más amplio, el término producto natural también se puede aplicar a la sustancia natural a granel, tal como material vegetal, productos alimenticios, resinas y exudados crudos de las plantas o a los extractos del material vegetal. ⁽⁴⁾

Los productos naturales son producidos por organismos de distinta naturaleza incluyendo plantas, microorganismos, organismos marinos y algunos animales como ranas e insectos. ⁽⁴⁾

Históricamente los productos naturales han formado la base de diversos medicamentos. Muchos de los compuestos farmacéuticos y medicinales más importantes se derivan de fuentes naturales, de hecho se estima que de 20 a 25% de todas las medicinas son derivadas de tales fuentes. ⁽⁴⁾

2.4 Familia Solanaceae

Esta familia consta de 92 géneros y cerca de 2600 especies, está particularmente bien representada en Centro y Sudamérica, pero se distribuye extensamente en otras partes del mundo. ⁽⁴⁾ Proporciona al hombre numerosos

productos alimenticios: papas y berenjenas (*Solanum tuberosum* y *Solanum melongena*), jitomates y tomates (*Lycopersicon esculentum* y *Physalis philadelphica*), chiles y pimientos (*Capsicum* sp.), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y algunos otros menos conocidos como la naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.).

La industria farmacéutica emplea especies de solanáceas para extraer atropina y escopolamina, inicialmente las especies usadas eran *Atropa belladonna*, *Datura stramonium* e *Hyoscyamus niger* L., pero en la actualidad están siendo sustituidas por otras especies de solanáceas de los géneros *Datura* y *Duboisia*.⁽⁵⁾

La Solanaceae tiene fama de ser una de las familias más ricas en especies peligrosas. Su metabolismo conduce a gran variedad de moléculas tóxicas, principalmente alcaloides tropánicos (atropina y escopolamina, Fig. 2), nortropánicos (calysteginas), esteroidales (solanocapsina), y derivados de la higrina (cuscohigrina) y del tipo de la viertina, entre otros.⁽⁵⁾ Tales alcaloides se encuentran en las raíces, en los tallos, hojas, frutos y semillas; aunque su distribución no es la misma en todas estas plantas. Por lo regular son principios tóxicos, estupefacientes o alucinantes.⁽⁶⁾

Algunas solanáceas productoras de sustancias tóxicas son la belladonna (*Atropa belladonna* L.), el toloache (*Datura stramonium* L.), el beleño negro (*Hyoscyamus niger* L.) y la mandrágora (*Mandragora officinarum* L.). Se conocen desde antaño por su actividad sobre el sistema nervioso autónomo y el sistema nervioso central, y deben su toxicidad a alcaloides tropánicos. Entre las solanáceas tóxicas existen diversas especies de *Solanum* que contienen alcaloides esteroidales que pueden provocar intoxicaciones. La experimentación muestra que algunos de ellos son teratógenos en hámsteres. Aunque no puede hablarse mucho de la

toxicidad del pimiento (*Capsicum*), se sabe que una larga exposición cutánea puede provocar dolorosas reacciones locales. ⁽⁵⁾

Además de alcaloides muchos géneros de la familia Solanaceae producen otros tipos de compuestos. Entre los más comunes están los withasteroides como la withanólida E ^(7, 8), pero también se ha reportado la presencia de glicósidos de hidroxiésteres ⁽⁹⁾, carotenoides como la physoxantina ⁽¹⁰⁾, flavonoides libres o glicosilados como 3-*O*-neohesperidósido de myricetina ⁽¹¹⁾, 6,7-metilendioxi-5-metoxi flavona ⁽¹²⁾ y 5,6,7-trimetoxiflavona ⁽¹²⁾, esteroides libres como el physalindicanol A ⁽¹³⁾, o glicosilados (saponinas) como la laxumina B. ⁽¹⁴⁾

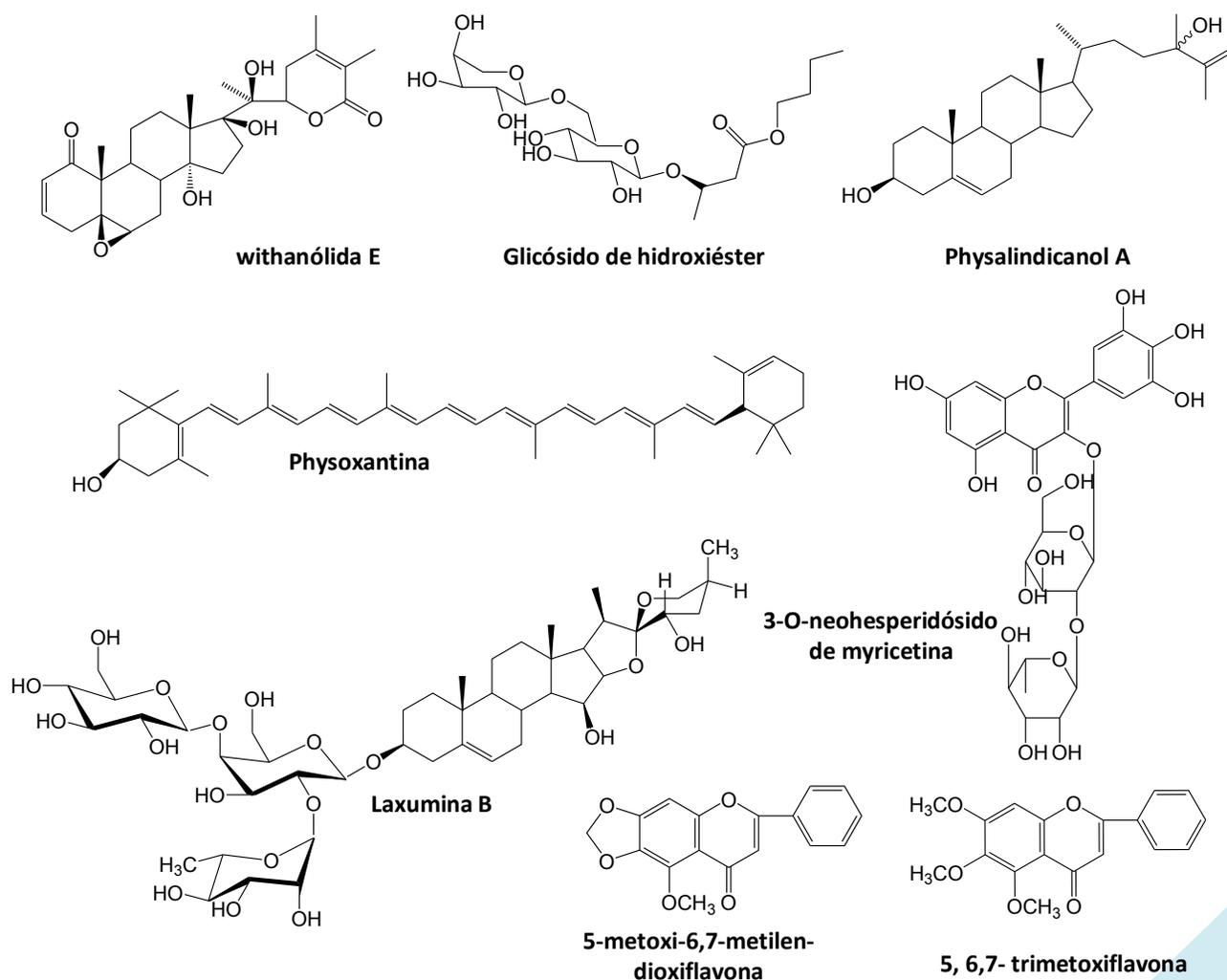


Figura 1. Diversos compuestos obtenidos de distintos géneros de la familia Solanaceae

2.5 El género *Datura*.

Este género está constituido por once especies distribuidas principalmente desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de México, y en Sudamérica. En México podemos encontrar ocho de las once especies a las que se conoce con los nombres de “toloache” y “chamico” entre otros, independientemente de la especie de que se trate.⁽¹⁵⁾

Las especies que crecen en México se enlistan a continuación, junto con algunas de las entidades en las que han sido recolectadas:

- ***Datura ceratocula*** Ort. San Cristóbal Ecatepec y Salazar, Méx.; Distrito Federal, Yurécuaro y Morelia, Mich.
- ***Datura innoxia*** Mill. Muna, Yuc.; San Blas, Nay.; San Bernardo, Son.; Mazatlán, Sin.; Charcas, S.L.P.; Tehuantepec, Oax.
- ***Datura meteloides*** Dunal. San Bernardo, Son.; Cerro del Mercado y Cerrito del Santuario, Dgo.; La Constancia, Sin.; Carretas, Chih.; y Peotillos, S.L.P.; Cuicatlán, Oax.
- ***Datura discolor*** Bernh. Acapulco, Gro.; Habal, Rosario, Sin.; San Blas, Nay.; Tampico, Tamps.; Tonalá, Chis.
- ***Datura pruinosa*** Greenm. Cuicatlán y otros lugares de Oaxaca.
- ***Datura stramonium*** L. Maltrata, Ver.; Amatenango del Valle, Chis.; Zazatlán, Pue.; Huajuapán de León, Oax.; Valle de México, Texcoco e Ixtapan de la Sal, Méx.
- ***Datura quercifolia*** H.B.K. Presente en la sierra del Tigre, Son., y varios lugares de Querétaro, San Luis Potosí, Durango y Chihuahua.

- ***Datura villosa*** Fern. Bolaños, Jal., y varios lugares de San Luis Potosí, Durango y México. ⁽¹⁶⁾

Desde hace mucho tiempo se conoce la toxicidad de las daturas. En el Nuevo Mundo, las daturas eran plantas medicinales y sagradas, cuyas propiedades alucinógenas permitían salir de la realidad y practicar la adivinación. Estas propiedades se deben a que casi todas las plantas de este género contienen una alta concentración de alcaloides tropánicos, tales como escopolamina y atropina, de ahí deriva también su toxicidad. Es sabido que la mayor concentración de estos principios tóxicos se encuentra por lo general en las semillas y, en orden decreciente, en las flores, hojas, tallo y frutos no maduros; su porcentaje varía según la especie de que se trate. ⁽⁵⁾

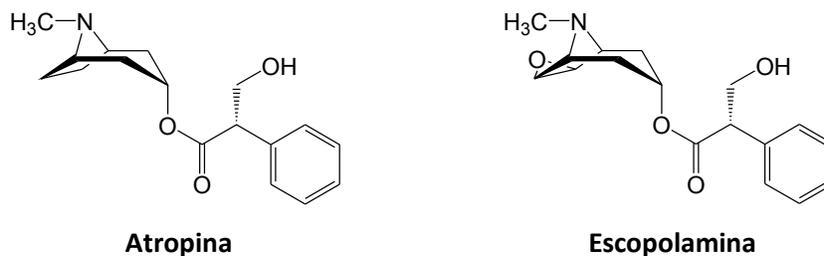


Figura 2. Alcaloides tropánicos

Si bien todas las especies de *Datura* han sido consideradas como tóxicas, pueden observarse variaciones importantes en la concentración de los alcaloides que son debidas a factores climáticos y estacionales. Estas variaciones pueden ser de orden cuantitativo (contenido de alcaloides totales) o cualitativo (cantidades relativas de escopolamina y de atropina). ⁽⁵⁾

Por otra parte las especies de *Datura*, son utilizadas en varias partes del mundo para el tratamiento de diversas enfermedades. Como ejemplo podemos mencionar los siguientes usos: ⁽¹⁷⁾

Continente o País	Especies	Uso
América	<i>Datura ssp.</i>	Anestésico, heridas y contusiones, narcótico, dolor de estómago, artritis, úlceras, hemorroides, neuralgia, fiebre, asma, gripe, tumores.
África	<i>Datura fastuosa</i> <i>Datura stramonium</i>	Problemas auditivos, reumatismo y trastornos de articulaciones, asma, tos, dolor de cabeza, sedante, anestésico, abortivo.
India	<i>Datura metel</i>	Dolor de cabeza, asma, lepra, llagas, enfermedades venéreas, epilepsia, paperas convulsiones.
China	<i>Datura metel</i>	Tos, asma, analgésico.

Cuadro 1. Usos de algunas especies de *Datura* en el mundo

Se han publicado estudios químicos sobre el contenido de alcaloides en especies de *Datura*. En el caso de *Datura quercifolia* se analizaron por separado partes aéreas y raíces, y se encontró que el contenido de alcaloides en partes aéreas va de 0.12 a 0.24 % y en el caso de las raíces es de 0.03% a 0.13% con respecto al peso del material vegetal seco. ⁽¹⁸⁾

Se han realizado otros estudios en los que se ha descrito la presencia de withaesteroides en el género *Datura*, en las especies *Datura quercifolia*, *D. ferox*, *D. metel*, *D. stramonium* y *D. tatula* ^(19, 20)

2.6 Withaesteroides

Las investigaciones de los últimos años han confirmado que los esteroides son componentes obligatorios de todas las plantas, ya que participan en la formación de

membranas celulares y se encuentran en los núcleos, cloroplastos, mitocondrias, y otros organelos de la célula.⁽²¹⁾

Los withaesteroides son un grupo de esteroides naturales constituidos por 28 átomos de carbono con un esqueleto de ergostano que puede o no estar modificado y en el cual los carbonos 22 o 23 y 26 se oxidan para dar lugar a un anillo lactónico, razón por la cual son conocidos también como withanólidas.

La diversidad de grupos funcionales que poseen estos compuestos les permite formar una gran variedad de estructuras las cuales fueron clasificadas en ocho grupos cuyos esqueletos base se encuentran representados a continuación: (Fig. 3)

(22)

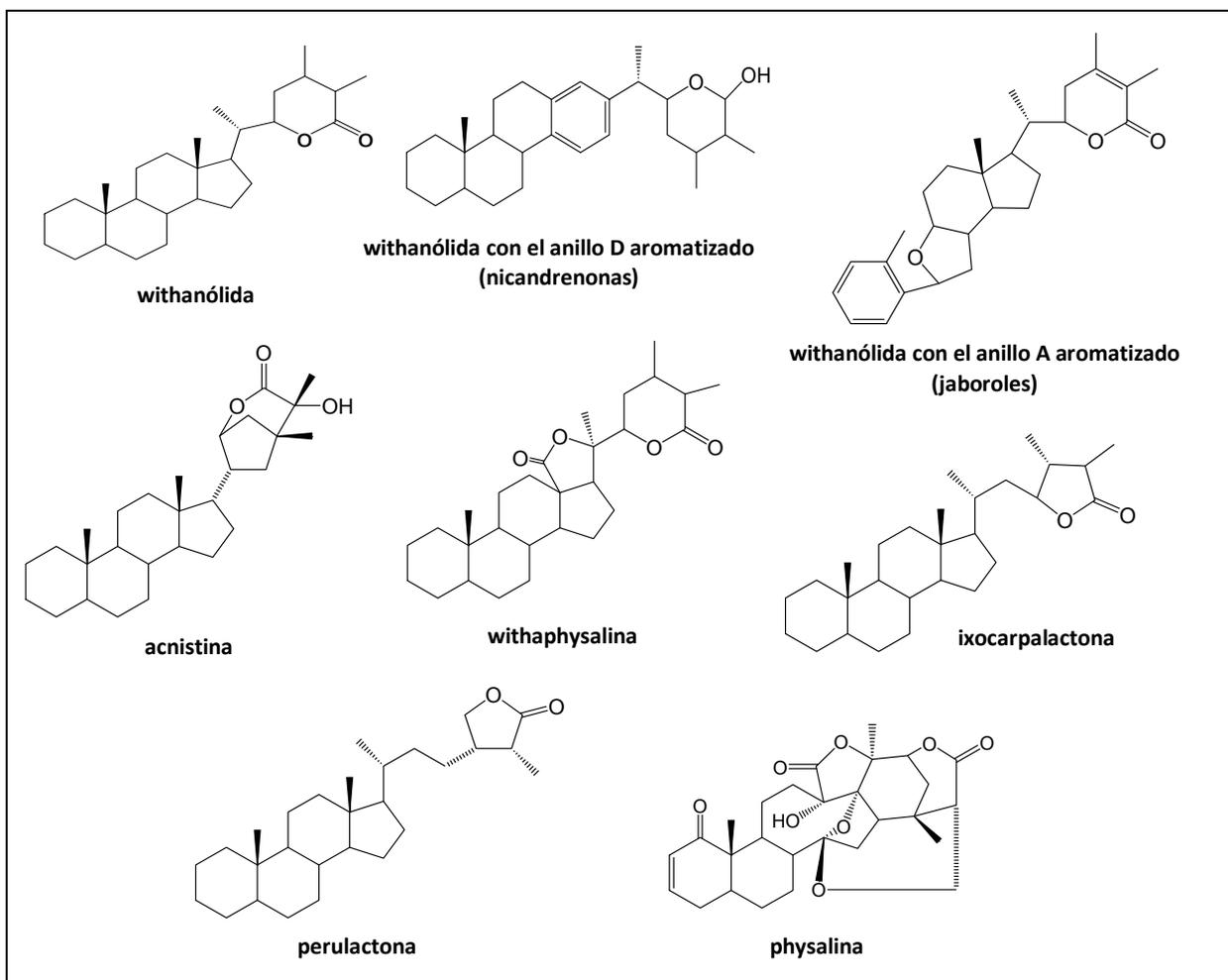


Figura 3. Clasificación de withaesteroides⁽²³⁾

Existe otra clasificación para estos compuestos, la cual los divide en dos grandes grupos: withanólidas que poseen una δ -lactona en la cadena lateral (grupo A –Fig. 4) y withanólidas que poseen una γ -lactona en la cadena lateral (grupo B-Fig. 5).⁽²³⁾

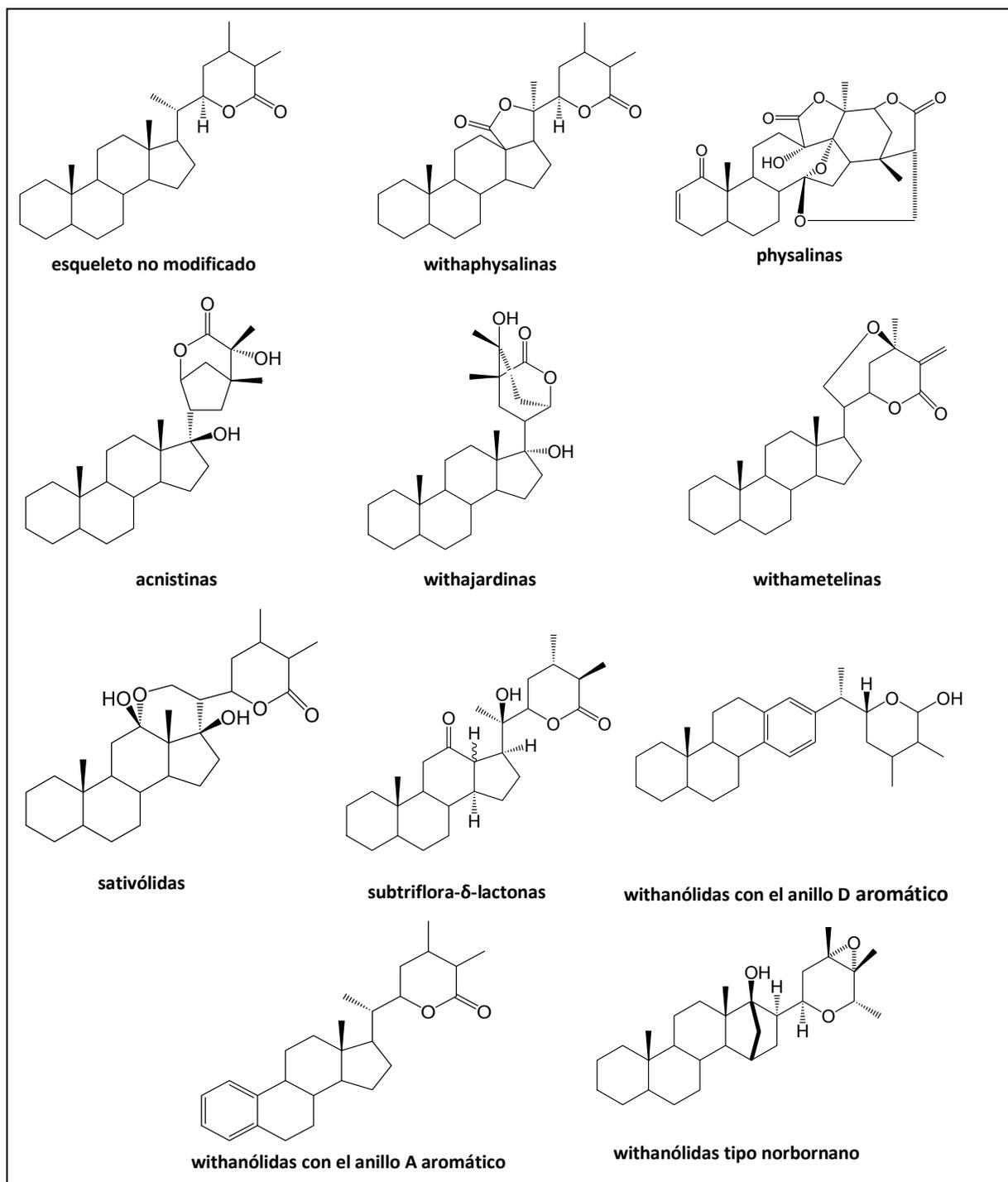


Figura 4. Grupo A (δ -lactonas)

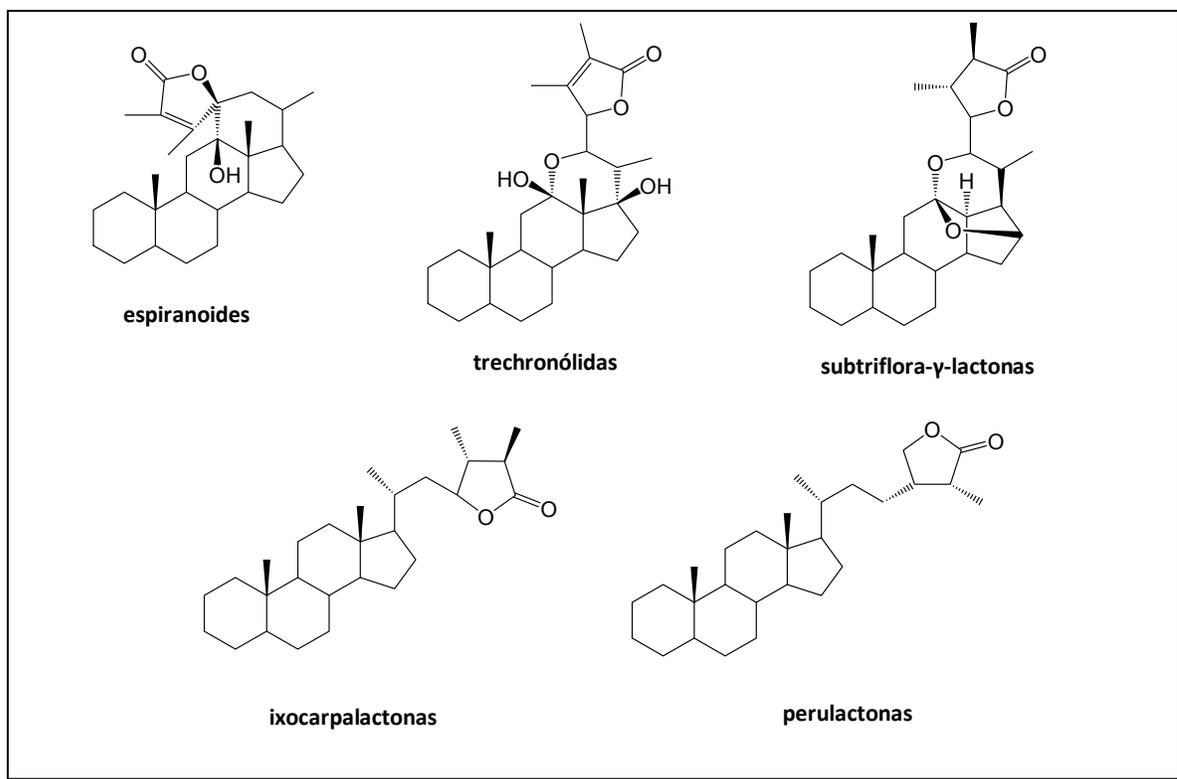


Figura 5. Grupo B (γ -lactonas)

2.6.1 Withanólidas

Las withanólidas son los withaesteroides más abundantes y se subdividen en dos clases principales de acuerdo a la orientación α o β de la cadena lateral. Contienen 28 átomos de carbono y la mayoría son polioxigenadas. Poseen una cadena lateral de nueve átomos de carbono y generalmente presentan una cetona α,β -insaturada-(1-oxo-2-en) en el anillo A y una δ -lactona entre C-22 y C-26. Son lactonas esteroidales de origen natural que se encuentran en las solanáceas y pueden ser aisladas de géneros tales como *Acnistus*, *Datura*, *Dunalia*, *Jaborosa*, *Lycium*, *Physalis* y *Withania*, entre otros (todos pertenecientes a la familia *Solanaceae*, aunque ocasionalmente se han aislado de otras familias (*Labiatae* y

Taccaceae). La primera planta de la que se aislaron fue de *Withania somnifera*, de ahí deriva el nombre de withanólidas.⁽²⁰⁾

Existen estudios químicos de 7 especies de *Datura* en los que se analizaron los componentes no alcaloideos que resultaron ser withaesteroides, específicamente withanólidas y withametelinas. A continuación se mencionan algunos de los estudios químicos y los compuestos aislados en cada uno de ellos.

Datura fastuosa. En la medicina tradicional la decocción de las hojas de esta planta se utiliza para el tratamiento de hepatopatías, palpitations cardiacas, enfermedades mentales y dolor de dientes.⁽²⁴⁾ En cuanto a los compuestos aislados, del extracto metanólico y después de sucesivas CC se han aislado withaesteroides del tipo de las withametelinas. Compuestos como withafastuosina A **(a)** y withafastuosina B **(b)** se aislaron por primera vez de esta planta, al contrario de withametelina que ya había sido aislada de *Datura metel*.⁽²⁵⁾

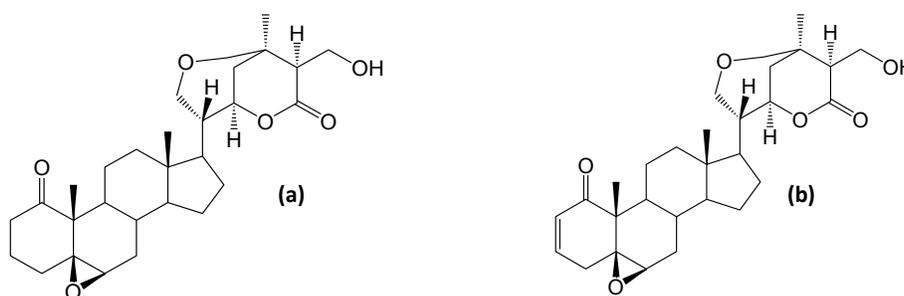


Figura 6. Withaesteroides aislados de *D. fastuosa*

Datura ferox. Esta especie fue descrita por primera vez en 1756 por Linneo. Las espinas de la cápsula de su fruto son una particularidad muy significativa con respecto a las otras especies de *Datura*.⁽²⁶⁾ Se sabe que las semillas de esta planta son muy peligrosas ya que al ser consumidas por humanos o animales pueden

producir un aumento del gasto cardiaco y el ritmo respiratorio, dilatación de pupilas, sequedad de la boca, sed, diarrea, mareo, confusión, alucinaciones y convulsiones.

⁽²⁷⁾ Acerca de los withaesteroides de esta especie, se han hecho estudios químicos en donde se han trabajado las hojas secas y molidas, y entre los compuestos aislados podemos mencionar tres withanólidas nuevas identificadas como daturolactona 5 **(c)**, daturolactona 6 **(d)** y daturolactona 7 **(e)**. Cabe mencionar que a estos compuestos se les llama indistintamente daturalactona o daturolactona. ⁽²⁸⁾

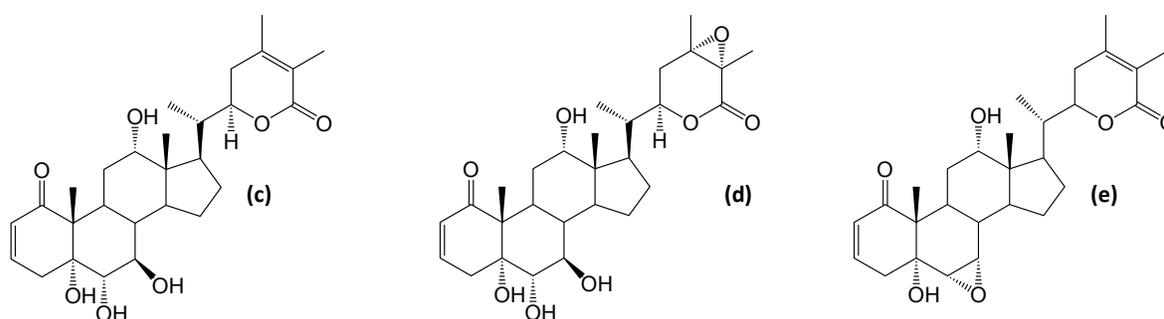


Figura 7. Withaesteroides aislados de *D. ferox*

Datura innoxia. Probablemente esta especie sea originaria de Centro América, lugar donde ha sido utilizada como planta medicinal. Actualmente se encuentra en muchas partes del mundo (Europa, África y Asia) y se ha demostrado que los extractos de sus semillas aglutinan las células de la sangre humana, de hecho se ha purificado una hemaglutinina a partir de las semillas de esta planta. ⁽²⁹⁾

En cuanto a estudios químicos, en uno de estos se aislaron dos nuevas withanólidas: withametelinol **(f)** y withametelinona **(g)**. La planta fue recolectada en Karachi, Pakistán, se trabajaron las partes aéreas y la extracción se realizó con metanol. ⁽³⁰⁾

De otro estudio químico en donde se analizó la misma población de la planta se aisló una withanólida nueva llamada daturacina **(h)**. ⁽³¹⁾

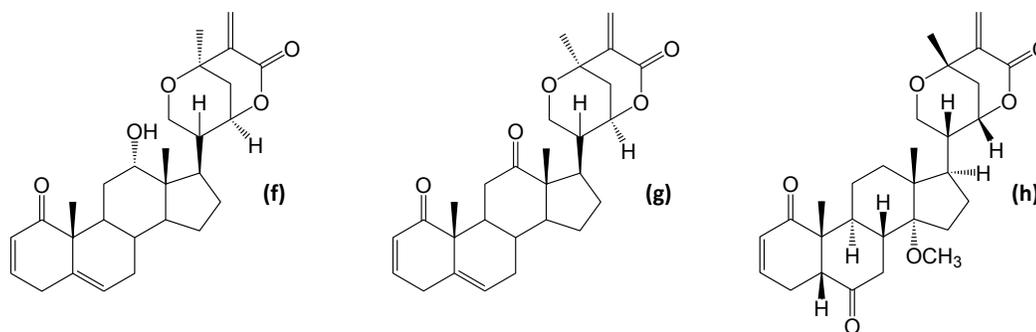
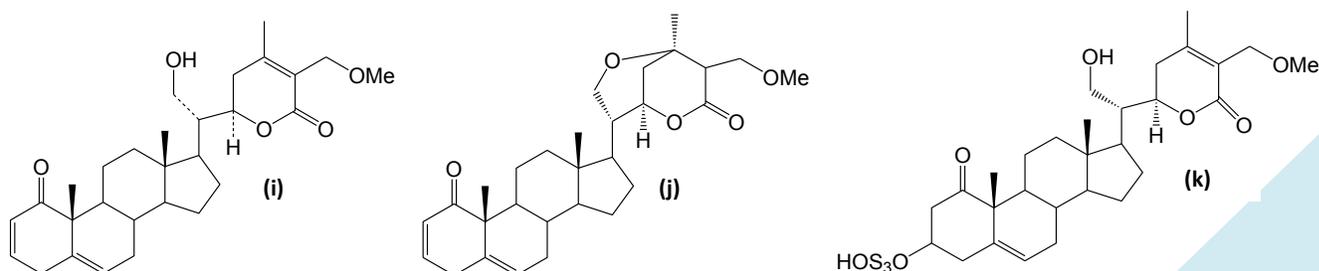


Figura 8. Withaesteroides aislados de *D. innoxia*

Datura metel. Es una planta Nigeriana ampliamente utilizada como un fitomedicamento para curar enfermedades como el asma, también tos, convulsiones y locura. Las hojas y semillas se utilizan ampliamente como anestésico, antiespasmódico, antitusígeno, broncodilatador y como alucinógeno. ⁽³²⁾ De esta especie se han hecho muchos estudios químicos y se han aislado gran cantidad de withaesteroides. Entre estos estudios podemos mencionar uno donde se aislaron 5 nuevos withaesteroides, las daturametelinas C (i), D (j), E (k), F (l) y G (m), esta última aislada como tetraacetato. Estos compuestos fueron aislados del extracto metanólico de partes aéreas frescas. ⁽³³⁾

En otro estudio químico se recolectó la planta en la provincia de Jiangsu, China, se trabajó con las flores secas y del extracto etanólico se aislaron 5 compuestos, tres de ellos nuevos y dos ya reportados en la literatura (withafastuosina E y withametelina C). Los compuestos nuevos fueron identificados como baimantuoluolinas A (n), B (o) y C (p). ⁽³⁴⁾



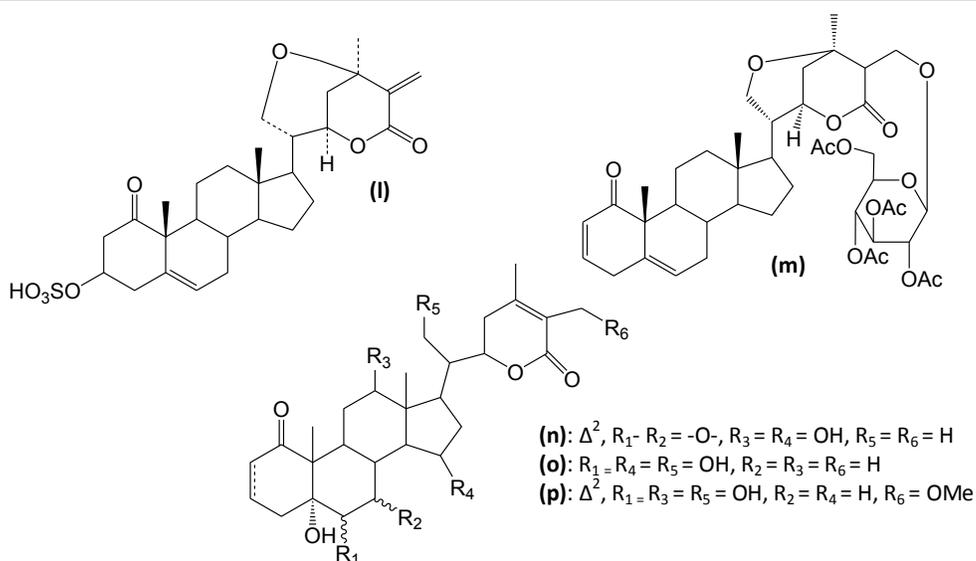


Figura 9. Withaesteroides aislados de *D. metel*

Datura stramonium. Comúnmente llamada estramonio o toloache, esta planta es utilizada para curar úlceras, sarna, lepra, hemorroides, anemia, fiebre, inflamaciones, hinchazones, elefantiasis, asma, reumatismo y dermatitis. ⁽³⁵⁾ Esta es la especie más representativa y conocida del género, y debe su fama al efecto que causa a nivel del SNC. Se ha reportado el aislamiento de un nuevo withaesteroides en dos diferentes estudios, la withastramonólida **(q)**, ^(36, 37) aislada de las hojas de la planta. Adicionalmente en el segundo estudio también se aisló daturalactona, compuesto ya reportado en la literatura.

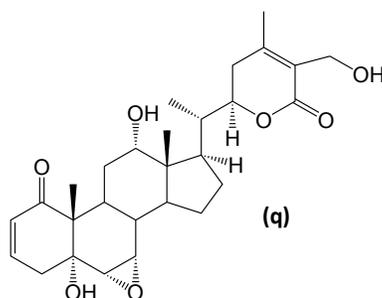


Figura 10. Withaesteroides aislado de *D. stramonium*

Datura quercifolia. La primera descripción de *Datura quercifolia* se realizó en 1818 por Friedrich Wilhelm Heinrich Alexander von Humboldt. ⁽²⁶⁾ *Datura quercifolia* es una especie anual de distribución limitada al suroeste de los Estados Unidos de América y México. Taxonómicamente está estrechamente relacionada con *D. stramonium* y *D. ferox* y junto con estas especies constituye la sección *Stramonium* del género.⁽¹⁸⁾

Conocida también como toloache o hierba del diablo, *Datura quercifolia* es utilizada para matar piojos en localidades del Estado de Nuevo León y para el tratamiento de hemorroides e inflamación en localidades del Estado de Hidalgo. En ambos casos la parte utilizada de la planta son las hojas, las cuales se administran localmente como ungüento o cataplasma ya sea sólo molidas o mezcladas con manteca.⁽¹⁵⁾

En el caso de esta especie se han realizado siete estudios químicos en todos ellos se trabajó con las hojas y en su conjunto los compuestos que se aislaron son los siguientes: lycium sustancia B o withanólida B (**r**) ⁽³⁸⁾, withanicandrina (**s**) ⁽³⁸⁾, daturalactona 3 (**t**) ^(38, 39), withaferoxólida o nicandrina B (**u**) ⁽³⁸⁾ y daturalactona o daturalactona 1 (**v**) ^(38, 40, 41, 42, 43), daturalactona 2 (**w**) ^(38, 43), 1 β ,5 α ,12 α -trihidroxi-6 α ,7 α ,24 α ,25 α -diepoxi-20S,22R with-2-enólida (**x**) ⁽⁴⁴⁾ y daturalactona 4 (**y**) ^(38, 45). Los compuestos **t**, **v** (**w**), **x**, e **y** fueron aislados por primera vez de esta planta.

Cabe mencionar que en los dos primeros estudios se trabajó el extracto bencénico de hojas secas de *D. quercifolia* y se aislaron **v** y **w**, ^(40, 41) a las que se asignaron estructuras incorrectas (no se muestran) que se corrigieron posteriormente en otro estudio químico y son las que se ilustran como **v** y **w**. ⁽⁴³⁾

La investigación sobre la composición química de esta planta continuó y en posteriores estudios químicos en los cuales también se trabajó con el extracto bencénico de hojas secas, se aislaron los compuestos **t** e **y**.^(39, 45)

De una población de esta planta cultivada en Nottingham, se trabajó el extracto de éter etílico y se aislaron los compuestos **r**, **s**, **t**, **u**, **v**, **w**, e **y**⁽³⁸⁾, aunque es importante mencionar que en este trabajo no es claro si se aislaron los compuestos **t** y **v** o son datos de la literatura.

En el último trabajo químico reportado de esta planta, se estudió una población recolectada en Srinagar, India, y se trabajó el extracto bencénico de las hojas secas y molidas. Se aislaron los compuestos **v** y **w** (anteriormente aislados de la misma planta) y una nueva withanólida correspondiente al compuesto **x**⁽⁴⁴⁾, cabe mencionar que es la primera vez que se reporta una withanólida con un grupo hidroxilo en C-1 aislada de *Datura quercifolia*.

(**r**): R₁ = R₂ = H, Δ²⁴

(**s**): R₁ R₂ = O, Δ²⁴

(**t**): R₁ = H; R₂ = OH, Δ²⁴

(**u**): R₁ = OH; R₂ = H, Δ²⁴

(**v**): R₁ = OH; R₂ = H; 24α,25α-epoxi

(**w**): R₁ R₂ = O; 24α,25α-epoxi

(**y**): R₁ = R₂ = H; 24α,25α-epoxi

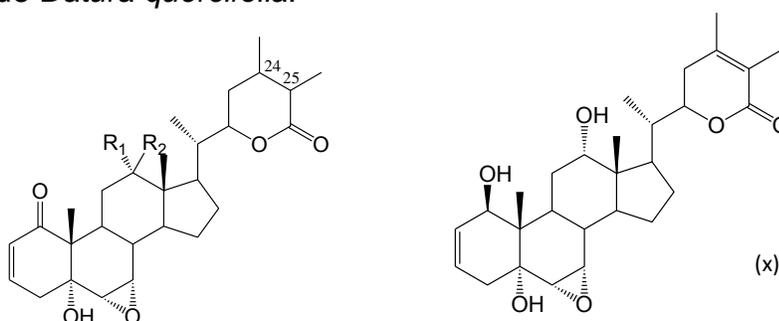


Figura 11. Withaesteroides aislados de *D. quercifolia*

Datura tatula. Al igual que todas las especies mencionadas anteriormente, de ésta también se han realizado estudios químicos mediante los cuales se han obtenido compuestos nuevos como las withatatulinas B (**z**), C (**ab**), D (**ac**)⁽⁴⁶⁾ y las daturaturinas A (**ad**) y B (**ae**).⁽⁴⁷⁾

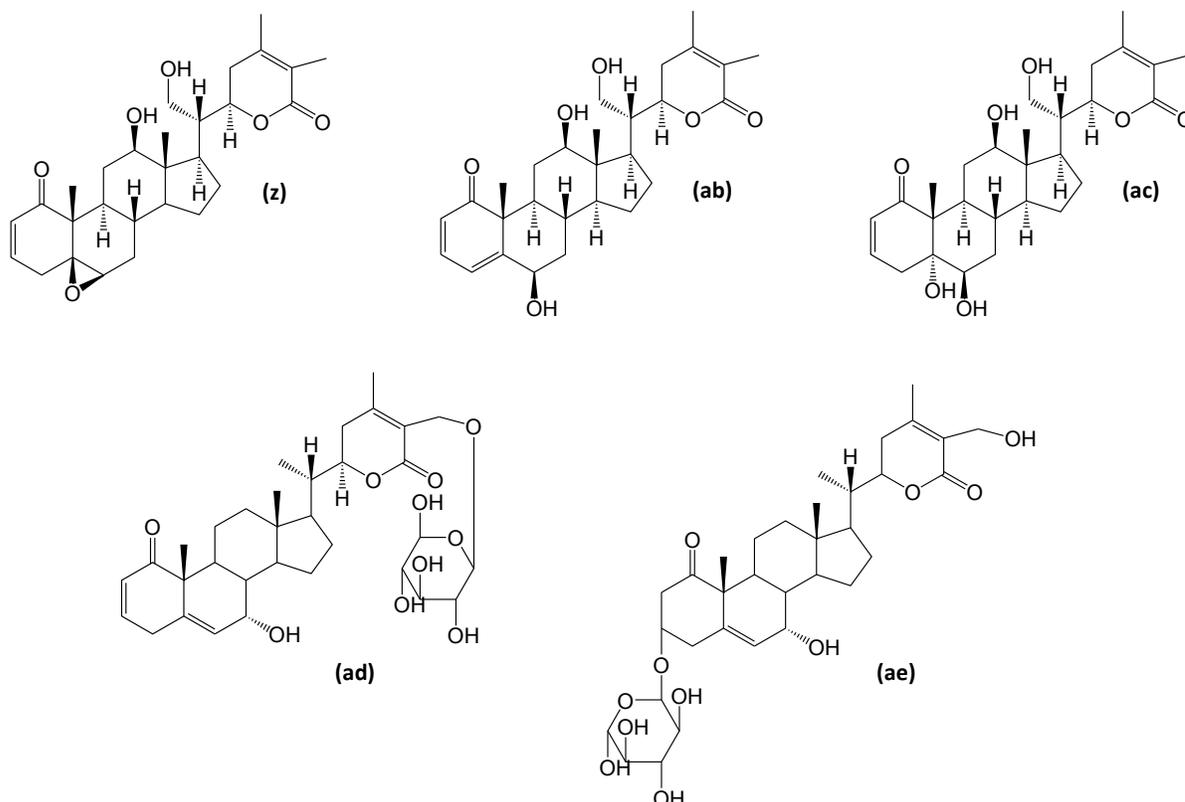


Figura 12. Withaesteroides aislados de *D. tatula*

2.7 Actividad Biológica de los withaesteroides

En cuanto a su actividad biológica, se ha reportado que muchos de estos compuestos poseen actividad antimicrobiana, hepatoprotectora, fitotóxica, antiinflamatoria, antioxidante, antitumoral y propiedades inmunosupresoras, entre otras. ⁽⁴⁸⁾

Por ejemplo se ha descrito que daturalactona posee actividad anti-fertilidad. Esto se determinó mediante un estudio en ratas albinas, en el cual se obtuvo un porcentaje de inhibición del embarazo de 73.3% (el mayor obtenido a lo largo del estudio) con respecto a otros 5 compuestos evaluados, obteniendo tal efecto a una dosis de 100 mg/kg. Es importante mencionar que esta actividad (anti-fertilidad) es

reversible y no teratógena. En el mismo estudio se comprobó que este compuesto también posee actividad estrógena baja la cual fue evidenciada por su efecto uterotrópico. ⁽⁴⁹⁾

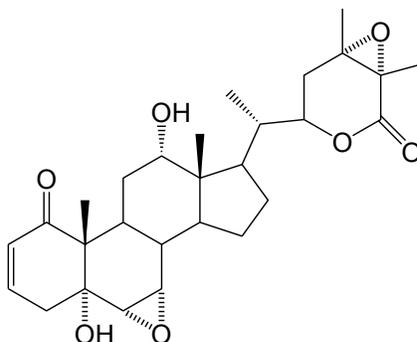


Figura 13. Daturalactona

Por otra parte daturalactona 2 resultó ser un inmunomodulador potencial. Esto se determinó después de realizar una serie de experimentos en los cuales se utilizaron como material biológico ratas y donde los resultados obtenidos mostraron un aumento de los anticuerpos IgM e IgG así como de los subtipos CD4+ de células T con respecto al levamisol (estándar). ⁽⁴⁴⁾

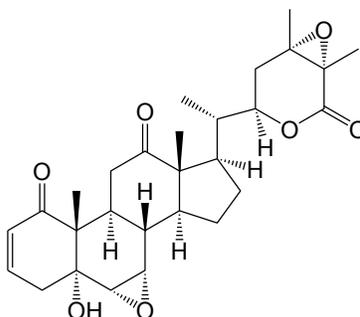


Figura 14. Daturalactona 2

También se ha reportado la actividad citotóxica de algunas otras withanólidas aisladas de la flores de *Datura metel*. Por ejemplo, las withametelinas I, K, L y N, mostraron actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer humano: A549

(pulmón), BGC-823 (gástrico) y K562 (leucemia). El rango de IC_{50} determinada para las cuatro withanólidas fue de 0.05 – 3.5 μM .⁽⁵⁰⁾

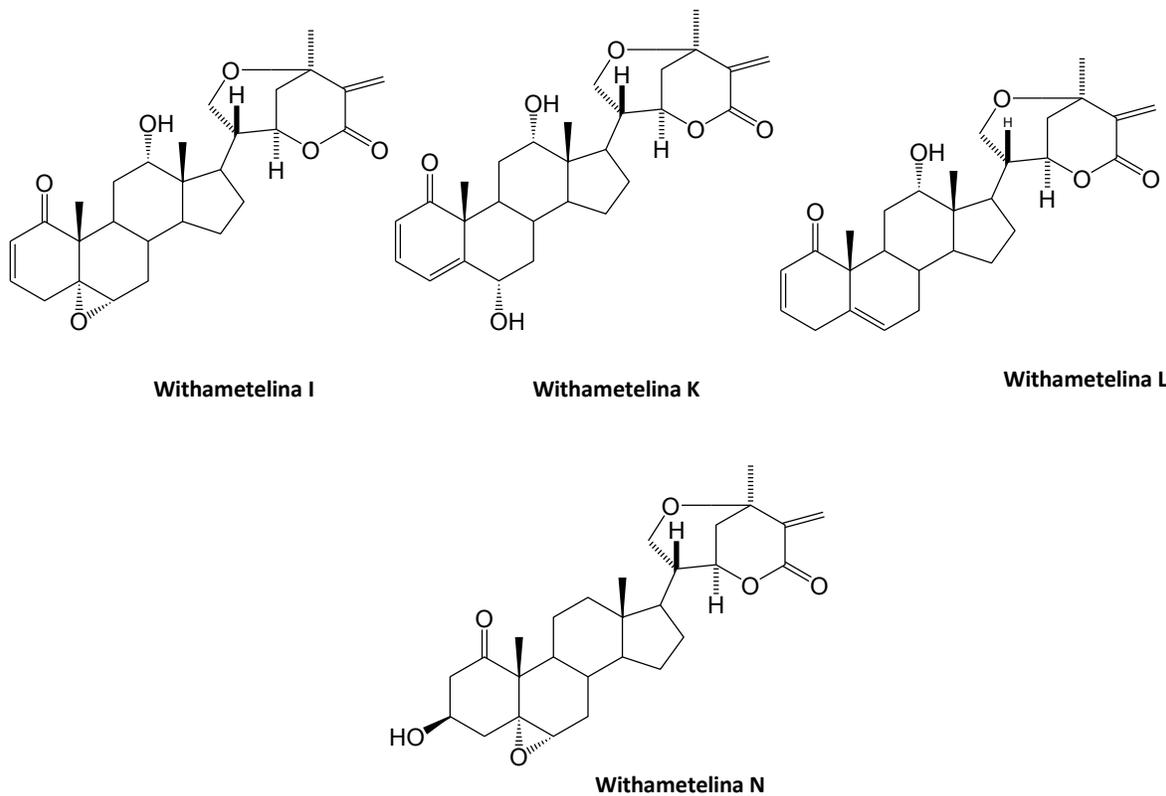


Figura 15. Withametelinas I, K, L, N.

3.- OBJETIVOS

3.1 General

- ❖ Contribuir al conocimiento de la composición química del género *Datura* a través del estudio de *Datura quercifolia*.

3.2 Particulares

- ❖ Aislar y purificar el mayor número de withanólidas de *Datura quercifolia*.
- ❖ Elucidar la estructura molecular de las withanólidas aisladas.
- ❖ Evaluar la actividad citotóxica y antioxidante de los compuestos aislados.

4.1 Material y equipo

Los puntos de fusión se determinaron con un aparato Fisher-Johns y no fueron corregidos. En las cromatografías en columna (CC) se utilizó como fase estacionaria sílica gel (Merck 60 G). Para las cromatografías de filtración en gel se utilizó Sephadex LH-20 (Fluka). Para las cromatografías en capa fina se usaron cromatofolios Alugram Sil G/UV₂₅₄ de 0.25 mm. Para las cromatografías en placa preparativa se emplearon placas Macherey-Nagel SIL G-100 UV₂₅₄ de 2.0 mm. Se empleó 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 mediante la técnica de solución (CHCl₃), en un espectrofotómetro Nicolet FTIR-Magna 750. Los espectros de masas se obtuvieron utilizando la técnica de impacto electrónico (IE) o electrospray en los espectrómetros JEOL JMS-AX505HA y BRUKER SQUIRE 6000 respectivamente. Los espectros de RMN fueron determinados en los espectrómetros Varian XR-300 (300 MHz ¹H, 75 MHz ¹³C) y Varian Unity Plus 500 (500 MHz ¹H, 125 MHz ¹³C). Los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm respecto al tetrametilsilano (TMS) que se usó como referencia interna.

4.2 Material Vegetal

La planta *Datura quercifolia* H.B.K se recolectó en el Estado de Querétaro, el 30 de julio del 2008. Un ejemplar de esta planta está depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y fue identificado por la Dra. Mahinda Martínez. Del material vegetal se separaron

los frutos y raíces del resto de las partes aéreas (hojas, tallos y flores). Las diferentes partes se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se molieron.

4.3 Extracción

Las hojas, tallos y flores secas y molidas (1.130 kg), se empacaron en una columna de vidrio y se extrajeron con acetona y posteriormente con metanol. Ambos disolventes fueron eliminados por destilación a presión reducida, los extractos obtenidos (77.25 y 143.65 g respectivamente) se reunieron y se sometieron a un proceso de partición AcOEt/HCl 0.1 N (~300 mL, 6x:1 L) obteniendo así una fase orgánica y una fase acuosa. Ambas fases se trataron con NaHCO₃. La fase orgánica se lavó con agua y se evaporó el disolvente. Se obtuvieron 46.58 g de extracto de acetato de etilo. La fase acuosa se concentró mediante una corriente de aire para obtener el extracto acuoso (171.91 g).

4.4 Aislamiento

El extracto de acetato de etilo se disolvió en Me₂CO, se adsorbió en celita, se dejó evaporar el disolvente y se colocó en la parte superior de una columna de sílica gel (columna A). La columna se eluyó con una mezcla de hexano-AcOEt en orden creciente de polaridad. Se obtuvieron 209 fracciones, que se concentraron y analizaron por CCF y las fracciones que presentaron una composición similar se reunieron. El orden de elución de la columna fue el siguiente: frs. A1-A18 (100), frs. A19-A41 (95:5), frs. A42-A76 (90:10), frs. A77-A92 (85:15), frs. A93-A102 (80:20), frs. A103-A128 (70:30), frs. A129-A155 (60:40), frs. A156-A170 (55:45),

frs. A171-A173 (50:50), frs. A174-A180 (40:60), frs. A181-A183 (20:80), frs. A184-A209 (100).

Las fracciones A24-A45 (4.03 g) se sometieron a CC de silica gel (columna B) eluida con mezclas de hexano-AcOEt de polaridad creciente. Se obtuvieron 43 fracciones en el siguiente orden de elución: frs. B1-B9 (95:5), frs. B10-B19 (90:10), frs. B20-B34 (85:15), frs. B35-B43 (80:20). Las fracciones B8-B15 se purificaron mediante cristalización de EtOH-AcOEt. Se obtuvieron 431 mg del compuesto **1** (0.0381 % con respecto al peso del material vegetal seco). El compuesto **1** se comparó mediante CCF con una muestra auténtica de β -sitosterol.

Las fracciones A46-A111 se decoloraron con carbón activado y se sometieron a sucesivas CC de silica gel sin que se lograra aislar ningún compuesto.

Los cristales presentes en las fracciones A119-A152 se filtraron y posteriormente se disolvieron en acetona para ser decolorados con carbón activado. Después de la decoloración se purificaron mediante cristalización de AcOEt-hexano, con lo que se obtuvo el compuesto **4**.

Se reunieron todas las aguas madres del compuesto **4** (frs. A119-A152 (3.44 g)) para ser sometidas a CC de silica gel (columna C), eluida con mezclas de hexano-Me₂CO. Se obtuvieron 42 fracciones según lo siguiente: frs. C1-C34 (80:20), frs. C35-C42 (75:25). El compuesto **4** se obtuvo de las fracciones C7-C11 y se purificó mediante cristalización de AcOEt-hexano.

Las fracciones A153-A164 contenían cristales que se filtraron y mediante CCF se observó que se trataba de una mezcla por lo que se sometieron a CC de sílica gel (columna D) eluida con mezclas de CH_2Cl_2 - Me_2CO . Se obtuvieron 26 fracciones en el siguiente orden: frs. D1-D17 (95:5), frs. D17-D24 (96:4), fr. D25 (0:100). De las frs D13-D15 se aisló el compuesto **3** por cristalización de Me_2CO -hexano.

De las aguas madres del compuesto **4** (frs. C7-C11) y de las frs. C12-C31 se obtuvieron cristales que correspondían a una mezcla de compuestos y se dejaron aparte. La misma mezcla cristalina se obtuvo del filtrado de las frs. A153-A164 y de las frs. A165-A172 y D18-D24.

Todas las aguas madres de esta mezcla de cristales (frs. A119-A172) se reunieron (8.16 g) para ser sometidas a CC de sílica gel eluida con mezclas de CH_2Cl_2 - Me_2CO de polaridad creciente (columna E, 85 fracciones) en el siguiente orden: frs. E1-E20 (97.5:2.5), frs. E21-E54 (97:3), frs. E55-E62 (94:4), frs. E63-E82 (95:5), frs. E83-E85 (90:10). De las fracciones E67-E82 se aisló el compuesto **3**. Las frs. E83-E85 (2.813 g) se purificaron por CC de sílica gel (columna F, hexano-AcOEt 7:3). Se obtuvieron las frs. F1-F20. Las frs. F3-F10 se purificaron por CC de sílica gel (columna G) eluida con benceno-AcOEt en el siguiente orden: frs. G1-G13 (85:15), frs. G14-G20 (80:20). De las frs. G8-G19 se obtuvo una cantidad adicional de la mezcla cristalina para hacer un total de 6.84 g. Estos cristales se sometieron a CC de sílica gel (columna H) de la cual se obtuvieron 41 fracciones y la elución se realizó con CH_2Cl_2 - Me_2CO 92.5:7.5. Las fracciones H3-H5 fueron sometidas a CC de sílica gel (columna I; benceno-AcOEt 75:25). Se obtuvieron las frs. I1-I6. Las frs. I3-I6 y la fracción H2 se reunieron y se

sometieron CC de sílica gel (columna J; benceno-AcOEt 9:1). Se obtuvieron las frs. J1-J38. El compuesto **5** se aisló de las frs. J25-J37 y se obtuvieron 32 mg (0.0028% con respecto al peso del material vegetal seco).

Las frs. H6-H18 (3.3 g) fueron sometidas a CC de sílica gel (columna K; CHCl_3 - Me_2CO 90:10; frs. K1-K41). Las frs. K1-K8 (1.44 g) se purificaron por CC de sílica gel (columna L; CHCl_3 -AcOEt 75:25; frs. L1-L18). Las fracciones L8-L12 contenían dos compuestos mayoritarios. Estos se purificaron por CCF preparativa. Para ello se aplicaron 120 mg de la mezcla a 2 placas preparativas que fueron eluidas 3 veces con CHCl_3 - Me_2CO 80:20. La tercera franja de la placa preparativa se purificó por cristalización de CHCl_3 -AcOEt para obtener el compuesto **6**. De la quinta franja de la placa preparativa obtuvo por cristalización de CHCl_3 -AcOEt una cantidad adicional del compuesto **4**.

Se reunieron las frs. J5-J8 y L5-L7 (870.4 mg) para ser sometidas a CC de sílica gel (columna M; benceno-AcOEt 80:20). Se obtuvieron las frs. M1-M39. De la cristalización (CHCl_3 -MeOH-AcOEt) de las frs. M8-M12 se obtuvo el compuesto **2**. Las fracciones M13-M22 (162.3mg) se sometieron a CC de sílica gel (columna N; benceno-AcOEt 80:20). Se obtuvieron las frs. N1-N30. Las frs. J3-J4, J9-J13 y N10 se reunieron (321.9 mg) y se sometieron a CC de sílica gel (columna O; benceno-AcOEt). Se obtuvieron las frs. O1-O25. Las frs. O6-O7 se purificaron por cristalización y se aisló el compuesto **2** del cual se obtuvo un total de 364.4 mg (0.0322% con respecto al peso del material vegetal seco).

De las frs. O9-O25 se obtuvo una cantidad adicional del compuesto **3** por cristalización de CHCl_3 -MeOH-hexano. Se obtuvieron 160.7 mg del compuesto **3** (0.0142 % con respecto al peso del material vegetal seco).

Las frs. M3-M5 y L1-L4 se reunieron (673.3 mg) y se purificaron en columna de sephadex LH-20 (columna P; CHCl₃-MeOH 70:30). Se obtuvieron las frs. P1-P23.

Las frs. H19-H41 y P4-P11 se reunieron (4.5954 g) y se sometieron a CC de sílica gel (columna Q; tolueno-AcOEt 70:30). Se obtuvieron las frs. Q1-Q19. Las fracciones Q14-Q19 (840 mg) se purificaron por CC de sílica gel (columna R; benceno-AcOEt 80:20). Se obtuvieron las frs. R1-R21. De las frs. R9-R17 se aisló el compuesto **6** mediante cristalización de CH₂Cl₂-MeOH-hexano.

Las frs. Q1-Q13, R1-R8, R18-R21 y las aguas madres del compuesto **6** se reunieron (4.270 g) y se sometieron a CC de sílica gel (columna S; benceno-AcOEt 80:20). Se obtuvieron las frs. S1-S39. De S30-S39 se aisló nuevamente el compuesto **6**. En total se obtuvieron 95 mg del compuesto **6** (0.0084% con respecto al peso del material vegetal seco).

Las frs. S9-S29 (3.640 g) se purificaron por CC de sílica gel (columna T; benceno-AcOEt 80:20). Se obtuvieron las frs. T1-T55. De las fracciones T13-T16 se obtuvo una cantidad adicional del compuesto **4** por cristalización de CH₂Cl₂-MeOH-hexano. La cantidad total aislada del compuesto **4** fue de 238.1 mg, (0.0251% con respecto al peso del material vegetal seco).

Compuesto **2**: Cristales blancos; p.f. 315 °C; $[\alpha]_D^{25}$ 58.12° (CHCl₃, c 0.093); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3547, 1725, 1708, 1693 cm⁻¹; RMN ¹H (tabla 2); RMN ¹³C (tabla 3); EM-IE m/z: 484 [M]⁺ (C₂₈H₃₆O₇), 466 [M-H₂O]⁺ (47), 438 [466-CO]⁺ (39), 123 [C₇H₇O₂]⁺ (97), 43 [C₂H₃O]⁺ (100).

Compuesto **3**: Cristales blancos; p.f. >300 °C; $[\alpha]_D$ 111.43° (CHCl₃, c 0.234); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3546, 1694 cm⁻¹; RMN ¹H (tabla 2); RMN ¹³C (tabla 3); EM-IE *m/z* (rel. Int): 468 [M]⁺ (C₂₈H₃₆O₆), 450 [M-H₂O]⁺ (40), 435 [M-H₂O-Me]⁺ (9); 417 [M-2H₂O-Me]⁺ (5); 275 [C₁₆H₁₉O₄]⁺ (15), 191 [C₁₃H₁₉O]⁺ (100), 125 [C₇H₉O₂]⁺ (74), 97 [125-CO]⁺ (18).

Compuesto **4**: Cristales blancos; p.f. 215-217 °C; $[\alpha]_D$ 65° (CHCl₃, c 0.117); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3534, 1725, 1688 cm⁻¹; RMN ¹H (tabla 2); RMN ¹³C (tabla 3); EM-IE *m/z* (rel. Int): 486 [M]⁺ (C₂₈H₃₈O₇), 468 [M-H₂O]⁺ (22), 452 [468-O]⁺ (15), 416 [452-2H₂O]⁺ (6), 125 [C₇H₉O₂]⁺ (100).

Compuesto **5**: Cristales blancos; p.f. 293-296 °C; $[\alpha]_D$ 100.62° (CHCl₃, c 0.161); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3543, 1692 cm⁻¹, RMN ¹H (tabla 2); RMN ¹³C (tabla 3); EM-ESI *m/z* (rel. Int): 477 [M+Na]⁺ (C₂₈H₃₈O₅+Na).

Compuesto **6**: Cristales blancos; p.f. 278-280 °C; $[\alpha]_D$ 100° (CHCl₃, c 0.140); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3538, 1691 cm⁻¹, RMN ¹H (tabla 2); RMN ¹³C (tabla 3); EM-ESI *m/z* (rel. Int): 493 [M+Na]⁺ (C₂₈H₃₈O₆+Na).

4.5 PRUEBAS BIOLÓGICAS

4.5.1 Actividad Citotóxica.

4.5.1.1 Ensayo de Citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano.

Este ensayo se llevó a cabo según el protocolo establecido por el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos de América ^(51, 52). El ensayo se realizó en

seis líneas de cáncer humano: U251 = glía del sistema nervioso central, PC-3 = próstata, K562 = leucemia, HCT-15 = colon, MCF-7 = mama, SKLU = pulmón. Se evaluaron los compuestos 2-6 disueltos en DMSO a una concentración 50 μ M. El ensayo se realizó por triplicado según lo siguiente.

Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SBF inactivado, 100 UI/mL de penicilina G, 100 μ g/mL de sulfato de estreptomicina, 0.25 μ g/mL de anfotericina B (GIBCO) y 2 mM de *L*-glutamina (GIBCO). Se conservaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Después de realizar el cultivo celular, en una placa de 96 pozos se colocaron 100 μ L de suspensión de cada línea celular (densidad de 5000 a 40000 células/pozo dependiendo la línea celular), se midieron las densidades celulares y la placa se incubó a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% por 24 hrs, al cabo de las cuales se adicionaron 100 μ L de la solución de cada uno de los compuestos. La placa se incubó 48 hrs en las mismas condiciones. Se utilizaron placas basal o de tiempo cero que contenían 100 μ L de suspensión de cada línea celular y se incubaron 1 hr. bajo las mismas condiciones.

Pasado el período de incubación se realizó la fijación de proteínas con una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 50% p/v y la placa se incubó a 4°C durante 60 min. Se desecharon los sobrenadantes y la placa se lavó 3 veces con agua destilada desionizada y se dejó secar. Las células se trataron con 100 μ L de sulforrodamina B (SRB) al 0.4 % durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente la placa se lavó tres veces con una solución de ácido acético al 1%. El colorante se extrajo con una solución 10 mM de base Tris no amortiguada

y se dejó secar durante 24 h. Las absorbancias se determinaron en un lector de placas a una λ de 515 nm debido a que la intensidad de color es directamente proporcional al número de células vivas, una mayor coloración corresponde a un menor porcentaje de inhibición del crecimiento celular. ⁽⁵³⁾

La ecuación utilizada para calcular la citotoxicidad fue la siguiente:

$$\% IC = 100 - [B / A \times 100]$$

Donde:

A = valor de DO de células sin tratar

B = valor de DO de células tratadas con los compuestos de prueba.

4.5.2 Actividad Antioxidante.

4.5.2.1 Reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

Para la realización de esta prueba se emplearon microplacas de 96 pozos. De cada uno de los compuestos a evaluar se prepararon soluciones de concentraciones 4, 40 y 400 μ M. Se tomaron 50 μ l de cada una de las soluciones preparadas y se depositaron por triplicado en los pozos de las microplacas. Posteriormente se adicionaron 150 μ l de una solución etanólica de DPPH 133.33 μ M. La concentración final de los compuestos a evaluar fue de 1, 10 y 100 μ M, y la de DPPH fue de 100 μ M. Se preparó un control (C) el cual sólo contenía la solución etanólica de DPPH 100 μ M.

Las mezclas se protegieron de la luz y se mantuvieron durante 30 minutos a una temperatura de 37°C con agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo de

agitación se leyó la densidad óptica (DO) de cada una de las mezclas a 515 nm, para lo cual se usó un lector de microplacas BIO-TEK (ELx808). La actividad de cada uno de los compuestos evaluados (compuestos 2, 3, 4, 5 y 6) sobre la reducción del DPPH, se expresó como el porcentaje de reducción del radical libre, esta determinación se realizó empleando la siguiente fórmula:⁽⁵⁴⁾

$$\% \text{ de reducción} = (C - E / C) 100$$

En donde:

C = DO del control (DPPH 100 μ M).

E = DO del experimento (mezcla:DPPH 100 μ M + compuesto a evaluar).

4.5.2.2 Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata, inducida con FeSO₄. (TBARS)

Disección y homogenizado del cerebro: Para extraer el cerebro, la rata se sacrificó colocándola en una cámara de CO₂. Una vez extraído el cerebro se colocó en solución salina fría al 0.9%. Posteriormente el cerebro se lavó con agua destilada para quitar los restos de sangre y se pesó. Se le adicionaron 10 ml de buffer de fosfato (9.5 mM, pH=7.4) por cada gramo de cerebro (10 ml/g). La muestra se homogenizó durante 60 segundos y luego se centrifugó a 3000 rpm por un periodo de 10 minutos, de este centrifugado se recuperó el sobrenadante.

Cuenta de proteínas empleando el método de Lowry y ajuste a la concentración deseada: Para la realización de la cuenta de proteínas se tomaron por duplicado 5 µl del sobrenadante, colocándolos en microplacas de 96 pozos a los que se adicionaron 20 µl de H₂O destilada y posteriormente 50 µl de una solución preparada mezclando 49 mL de Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0.1 N, 0.5 mL de tartrato de Na/K al 2% y 0.5 mL de CuSO₄ al 1%.

Las placas fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se les adicionaron 25 µl de reactivo de Folin disuelto en agua en una proporción (1:1). Las mezclas se incubaron nuevamente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al término del periodo de incubación se midió la absorbancia a 540 nm. Para obtener el contenido de proteínas presentes en el homogenizado los valores de absorbancia obtenidos fueron sustituidos en la fórmula que se muestra a continuación:

$$\text{Proteína } (\mu\text{g/mL}) = [(A_{540\text{nm}} - 0.05012) / 0.0028]40$$

El contenido de proteínas se ajustó a 2.3529 mg/ml con PBS (9.5 mM, pH=7.4), según la siguiente fórmula.

$$V_2 = (C_1V_1) / C_2$$

Inducción del estrés oxidativo con FeSO₄: Se colocaron 425 µL del sobrenadante (2.3529 mg/mL) en tubos eppendorf de 1.5 mL a los que se adicionaron 25 µL de cada una de las soluciones de los compuestos a evaluar a diferentes concentraciones (20, 200 y 2000 µM). Las muestras fueron incubadas

30 minutos a una temperatura de 37°C con agitación. Al término de este tiempo se agregaron 50 µL de FeSO₄ 100 µM (la concentración final de las muestras fue de 1, 10 y 100 µM, para el caso del FeSO₄ su concentración final fue de 10 µM). Las muestras se incubaron durante 60 minutos a 37°C con agitación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación fueron adicionados 500 µL de reactivo TBA y nuevamente las muestras fueron incubadas, esta vez en baño de hielo durante 10 minutos. Después se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos, a temperatura ambiente y se incubaron nuevamente 30 minutos en baño de agua a 90°C. Posteriormente se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Se tomaron por duplicado 200 µL de cada uno de los tubos, que se colocaron en microplacas. Para obtener la concentración de TBARS se midió la absorbancia a 540 nm de cada una de las soluciones y los valores se interpolaron en la curva estándar de malondialdehído.

$$\text{TBARS } (\mu\text{M}) = (A_{540\text{nm}} + 0.00877) / 0.07558$$

Reactivo TBA (ácido tiobarbitúrico): se mezclan en proporción 1:1 una solución de TBA al 1% en NaOH 0.05 N y ácido tricloroacético al 30 %.⁽⁵⁴⁾

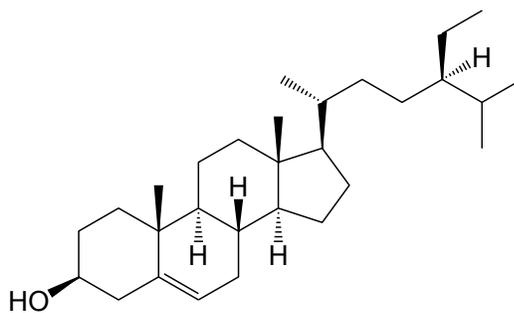
5.1 Elucidación estructural de los compuestos

Como resultado del estudio químico de hojas, tallos y ramas de *Datura quercifolia* H.B.K se aislaron 6 compuestos los cuales fueron identificados como β -sitosterol (**1**), daturalactona 2 (**2**), withanicandrina (**3**), daturalactona (**4**), withanólida B (**5**) y nicandrina B (**6**). Las cantidades aisladas de cada compuesto así como su rendimiento con respecto al peso de la planta seca se presentan en la tabla 1

Tabla 1. Rendimiento de los compuestos aislados.

Compuesto	Rendimiento
1 β -sitosterol	431 mg (0.0381%)
2 Daturalactona 2	364.4 mg (0.0322%)
3 withanicandrina	160.7 mg (0.0142%)
4 Daturalactona	283.1 mg (0.0251%)
5 Withanólida B	32 mg (0.0028%)
6 Nicandrina B	95 mg (0.0084%)

La identificación de β -sitosterol (**1**) se logró mediante la comparación por CCF del compuesto aislado con una muestra auténtica y comparación de su espectro de RMN ^1H con el publicado en la literatura. ⁽⁵⁵⁾



β -sitosterol (1)

El compuesto **2**, se aisló en forma de cristales de color blanco. Su espectro de masas mostró un ión molecular m/z 484, el cual concuerda con la fórmula molecular $C_{28}H_{36}O_7$. En el espectro IR (espectro 7) se observan bandas en 3547, 1725, 1708 y 1693 cm^{-1} , correspondientes a un grupo hidroxilo, una δ -lactona, una cetona y una cetona α,β -insaturada, respectivamente. En su espectro de RMN ^{13}C (espectro 2) presenta 28 señales que corresponden a 5 metilos, 5 metilenos, 10 metinos, y 8 carbonos no protonados, entre estas últimas, tres atribuidas a los carbonilos de cetona (δ 212.0), cetona α,β -insaturada (δ 201.2), y δ -lactona (δ 169.8). La presencia de la cetona conjugada, la δ -lactona, así como de 5 metilos, sugiere que el compuesto **2** es una withanólida.

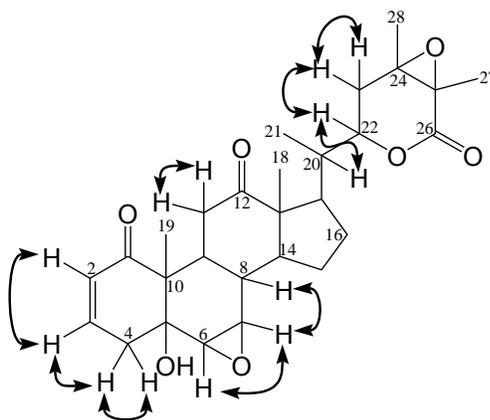
Se propone que la cetona α,β -insaturada se encuentra en el anillo A porque en el espectro HMBC (espectro 4) la señal del carbono del carbonilo en δ 201.2 correlaciona con la señal en δ 1.25 que se asignó a los protones del CH_3 -19 y con un protón vinílico en δ 6.62 (ddd, $J = 10, 5, 2.5\text{ Hz}$) que se atribuye a H-3, por lo que la cetona debe estar en C-1. En el espectro COSY (espectro 3) se puede observar la correlación de H-3 con otro protón vinílico (H-2, δ 5.87, ddd, $J = 10, 2.5, 0.5\text{ Hz}$) y con los protones de un metileno (H-4, H-4'). El espectro HSQC permitió asignar las señales en δ 139.7 y δ 128.7 a los carbonos C-3 y C-2 respectivamente.

En el espectro HMBC se observan las correlaciones de H-2 con la señal de un carbono cuaternario en δ 51.5 (C-10) y con el carbono de un metileno en δ 36.7 (C-4). También se observa la correlación H-3 con la señal de un carbono no protonado en δ 73.2, que se asigna a C-5 y su desplazamiento indica que está unido a una

función oxigenada. En el mismo espectro se observan las correlaciones de C-5 con las señales de CH₃-19, H-4' y con una señal en δ 3.10 (d, J = 4 Hz) que se asigna a H-6. En el espectro COSY H-6 correlaciona con una señal en δ 3.41 (dd, J = 4, 2 Hz) que se asigna a H-7. Los desplazamientos químicos de H-6 y H-7 permiten proponer la existencia de un grupo 6,7-epoxi en la molécula. En el espectro HSQC se observan las correlaciones de H-6 y H-7 con los carbonos en δ 56.2 (C-6) y δ 56.9 (C-7) respectivamente, lo que confirma lo anterior, además, en el espectro HMBC se observa la correlación de H-6 con los carbonos C-4, C-5 y C-10, y las correlaciones de H-7 con los carbonos C-6, C-8 (δ 35.6) y C-9 (δ 37.6). La presencia del hidroxilo en C-5 se establece por las correlaciones en el espectro HMBC, de C-6 y C-4 con el protón de un alcohol en δ 3.03. En el espectro COSY H-7 correlaciona con una señal en δ 2.21 (td, J = 11, 2 Hz), que se atribuye a H-8, la cual a su vez correlaciona con los carbonos C-9, C-13 (δ 57.7), y C-14 (δ 52.8) en el espectro HMBC.

El carbonilo de la cetona saturada (δ 212.0) se situó en C-12 debido a que en el espectro HMBC correlaciona con los protones del CH₃-18 (δ 1.10) y con H-17 (δ 2.02). C-12 también correlaciona con las señales en δ 3.51 (dd, J = 13, 4 Hz) y δ 2.53 (t, J = 13 Hz) que se asignaron a los protones α al carbonilo H-11 y H-11'. En el espectro COSY H-11 y H-11' correlacionan con una señal en δ 1.96 (ddd, J = 13, 4, 2 Hz) atribuida a H-9. Adicionalmente, en el espectro HMBC se observan las correlaciones de H-11 con C-8, C-9 y C-13 y de H-11' con C-8, C-9 y C-10.

En el espectro RMN ^1H (espectro 1) se observa una señal en δ 4.57 (dt, $J = 12$, 3.5 Hz) que se atribuye al protón base de lactona, H-22. La señal de C-22 aparece en δ 76.3 y en el espectro HMBC correlaciona con las señales de los protones de un metileno (CH_2 -23) en δ 2.14 (dd, $J = 15$, 12 Hz, H-23) y δ 2.06 (dd, $J = 15$, 3.5 Hz, H-23') y con H-17, H-20 (δ 1.80) y CH_3 -21 (δ 0.91). En el espectro COSY se observan las correlaciones de H-20 con H-17, CH_3 -21 y H-22. El espectro HSQC (espectro 6) muestra las correlaciones de H-20 y H-23 con los carbonos en δ 39.5 (C-20) y δ 29.1 (C-23), respectivamente. En el espectro HMBC se observa la correlación de C-23 con los protones de un metilo, asignado a CH_3 -28 (δ 1.51).

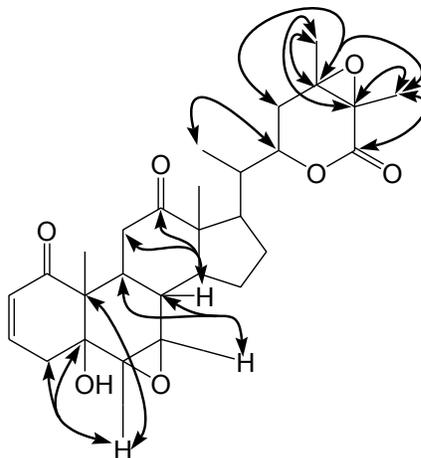


Algunas interacciones observadas en el espectro

COSY del compuesto 2.

La señal en δ 169.8 atribuida al carbonilo de la δ -lactona (C-26) correlaciona en el espectro HMBC con una señal en δ 1.57 correspondiente al metilo 27. El desplazamiento de las señales de los metilos 27 y 28 en el espectro de RMN ^1H y las correlaciones que presentan ambas con las señales de dos carbonos no protonados en δ 59.4 (C-24) y 62.7 (C-25), así como las correlaciones que muestran estas

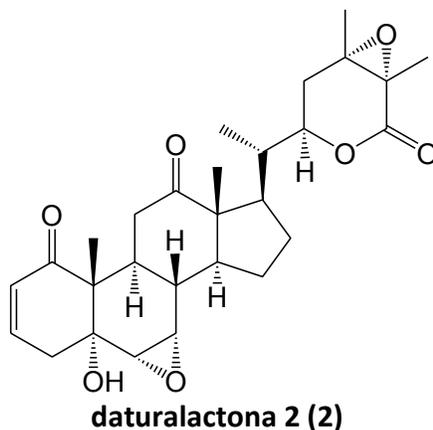
últimas con H-23 y H-23', indican la presencia de un grupo 24,25-epoxi en la molécula.



Algunas correlaciones observadas entre carbono-hidrogeno en el espectro HMBC del compuesto 2

En las withanólidas H-8 y los metilos 18 y 19 presentan una orientación β . Las interacciones de H-8 con H₃-18, H₃-19 y H-7 en el espectro NOESY (espectro 7) confirman lo anterior y establecen una orientación α para el epóxido del anillo B. La orientación del alcohol en C-5 se dedujo de su interacción con H-9 y la orientación β de la cadena lateral se estableció por las interacciones de H-20 con H₃-18 y H₃-21. La configuración de los carbonos 20, 22, 24 y 25 no se pudo determinar pero se asumió que debe ser la misma que la de otras withanólidas con una epoxilactona en la cadena lateral, ^(38, 43) debido a la similitud de sus datos espectroscópicos.

Con base al análisis anterior, se determinó que la estructura del compuesto **2** es la siguiente:



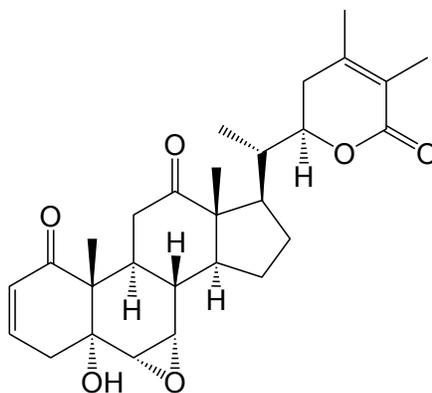
Al revisar la literatura se encontró que un compuesto con la misma estructura, al que llamaron daturalactona 2, ya había sido aislado de *Datura quercifolia*,^(38, 43) así como de *Nicandra physaloides*.^(56, 57) Los datos espectroscópicos y las constantes físicas de **2** son prácticamente iguales a las descritas para daturalactona 2⁽⁴³⁾ (existen diferencias en algunas asignaciones de RMN ¹³C) por lo que se establece que se trata del mismo compuesto.

El **compuesto 3** se aisló en forma de cristales de color blanco. Su espectro de masas presentó un ión molecular m/z 468, el cual concuerda con la fórmula molecular $C_{28}H_{36}O_6$. Su espectro de IR (espectro 10) mostró una banda para grupo hidroxilo en 3546 cm^{-1} y una banda en 1694 cm^{-1} atribuida a la presencia de grupos carbonilo. El espectro de RMN ¹³C (espectro 9) muestra 28 señales correspondientes a los 28 carbonos de la molécula. Las señales en δ 212.1, δ 201.2 y δ 166.9 corresponden a los carbonilos de cetona (C-12), cetona α,β -insaturada (C-1) y al carbonilo de la δ -lactona α,β -insaturada (C-26), respectivamente.

En cuanto a su espectro de RMN ¹H (espectro 8), éste muestra un patrón de señales semejantes al del compuesto **2**, sin embargo se pueden observar algunas

diferencias en cuanto al desplazamiento de las señales de la δ -lactona en la cadena lateral ya que en el compuesto **3** existe un doble enlace en los carbonos 24 y 25, como lo demuestra el desplazamiento químico de estos carbonos (δ 149.3 C-24, 121.9 C-25), así como las señales en δ 1.89 (t J = 0.9 Hz) y δ 1.96 (s), en el espectro de RMN ^1H , que corresponden a los metilos 27 y 28 respectivamente. La señal en δ 4.39 corresponde al protón base de la lactona H-22. En cuanto a los espectros COSY y HMBC, las correlaciones observadas son prácticamente las mismas que las del compuesto **2**. La similitud de las señales de RMN de los carbonos y los hidrógenos 1-22 de los compuestos **2** y **3**, permite proponer que ambos compuestos presentan las mismas configuraciones en los centros estereogénicos.

Con base en el análisis anterior, se determinó que la estructura del compuesto **3** es la siguiente:



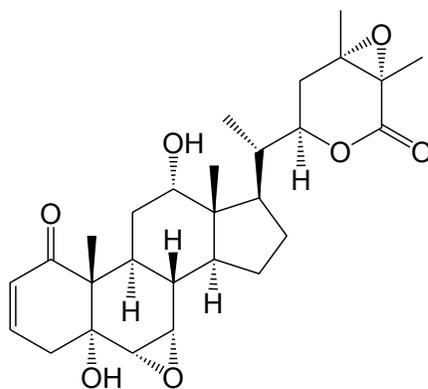
withanicandrina (3)

Al revisar la literatura se encontró que este compuesto ya había sido reportado con el nombre de withanicandrina. Este compuesto ha sido aislado de *Nicandra physaloides*⁽⁵⁸⁾ *Datura ferox*⁽⁵⁹⁾ y *Datura quercifolia*⁽³⁸⁾.

El **compuesto 4** se aisló en forma de cristales de color blanco. Su espectro de masas presentó un ión molecular m/z 486, el cual concuerda con la fórmula molecular $C_{28}H_{38}O_7$. Su espectro de IR (espectro 13) presenta bandas de absorción en 3534, 1725 y 1688 cm^{-1} las cuales corresponden a un grupo hidroxilo, una δ -lactona y una cetona $\alpha\beta$ -insaturada. En cuanto a su espectro de RMN ^{13}C (espectro 12), éste presenta 28 señales correspondientes a los 28 carbonos característicos de las withanólidas. Las señales en δ 203.2 y δ 170.1 corresponden a los carbonilos de la cetona $\alpha\beta$ -insaturada (C-1) y de la δ -lactona (C-26), respectivamente.

Sus espectros de RMN 1H (espectro 11) y ^{13}C muestran un patrón de señales semejante al del compuesto **2**. Las principales diferencias radican en que el compuesto **4** no presenta la señal del carbono de la cetona en C-12 y en su lugar se observa una señal en δ 4.01 (t, $J = 3$ Hz) que corresponde a un protón axial de alcohol (H-12). En el espectro COSY se puede observar la correlación de H-12 con H-11 (δ 2.86 td, $J = 14.5, 3.5$ Hz) y H-11' (δ 1.61, ddd, $J = 14.5, 12.5, 2.5$ Hz). En el espectro HSQC se observa la correlación de H12 con una señal en δ 72.4, la cual corresponde a C-12. Las constantes de acoplamiento de H-12 indican que es un hidrógeno ecuatorial por lo que el alcohol en C-12 debe ser un alcohol α . Las correlaciones observadas en los espectros COSY, HSQC y HMBC, son las mismas que las observadas en los compuestos **2** y **3**.

Con base en el análisis anterior, se determinó que la estructura del compuesto **4** es la siguiente:



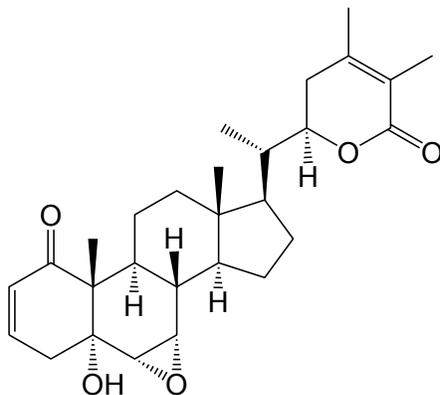
daturalactona (4)

Este compuesto fue aislado con anterioridad de *Datura stramonium* ⁽³⁶⁾ y *Datura quercifolia* ^(38, 40, 42, 43) y se le dio el nombre de daturalactona .

El **compuesto 5** se aisló en forma de cristales de color blanco. Su espectro de masas presentó un ión molecular m/z 454, el cual concuerda con la fórmula molecular $C_{28}H_{38}O_5$. Su espectro de IR (espectro 16) presenta bandas en 3543 y 1692 cm^{-1} correspondientes a grupos hidroxilo y carbonilo. Su espectro de RMN ^{13}C (espectro 15) presenta 28 señales correspondientes a 28 átomos de carbono. Las señales en δ 203.1 y δ 167.0 se asignaron a los carbonilos de una cetona α,β -insaturada (C-1) y una δ -lactona α,β -insaturada (C-26), respectivamente.

Su espectro de RMN 1H (espectro 14) presenta un patrón de señales similar a los de los compuestos **2-4**. El compuesto **5**, como el **3**, presenta una δ -lactona α,β -insaturada como lo indica el desplazamiento químico de los metilos 27 (δ 1.89) y 28 (δ 1.95). El espectro de RMN ^{13}C muestra la señal de C-12 en δ 39.8 y en el espectro HSQC esta señal correlaciona con las señales de 2 hidrógenos en δ 2.01 y δ 1.31. Estas últimas señales corresponden a H-12 y H-12' e indican que en éste caso C-12

no presenta funciones oxigenadas, por lo que se estableció que la estructura molecular del compuesto **5** es la siguiente:



withanolida B (5)

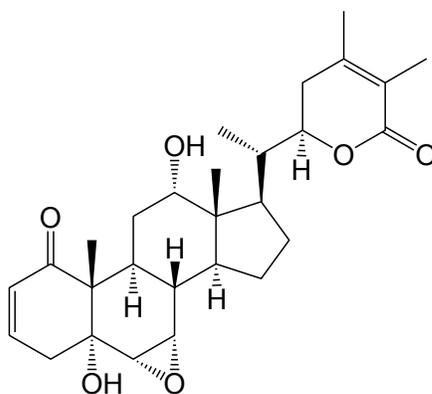
Al revisar la literatura se encontró que este compuesto ya había sido reportado anteriormente con el nombre de sustancia B de *Lycium* o withanolida B y que ha sido aislado de *Datura quercifolia* ⁽³⁸⁾, *Withania coagulans* ⁽⁶⁰⁾ y *Lycium chinense* ⁽⁶¹⁾.

El **compuesto 6** se aisló en forma de cristales de color blanco. Su espectro de masas presentó un ión molecular m/z 470, el cual concuerda con la fórmula molecular $C_{28}H_{38}O_6$. Su espectro de IR (espectro 19) presenta bandas en 3538 y 1691 cm^{-1} correspondientes a grupos hidroxilo y carbonilo. En cuanto a su espectro de RMN ^{13}C (espectro 18), presentó 28 señales correspondientes. Las señales en δ 203.3 y δ 167.1 corresponden al carbonilo de cetona α,β -insaturada (C-1) y al carbonilo de la δ -lactona α,β -insaturada (C-26).

Su espectro de RMN 1H (espectro 17) presenta un patrón de señales similar al del compuesto **5**, con excepción de la señal en δ 4.03 (t, $J = 2.5$ Hz) correspondiente a un protón base de alcohol (H-12), cuyas constantes de acoplamiento indican que el

alcohol en C-12 tiene una orientación alfa. Como apoyo de lo anterior en el espectro HSQC se observa la correlación de H-12 con una señal en δ 72.4 correspondiente a C-12.

Con base en el análisis anterior, se estableció que la estructura molecular del compuesto **6** es la siguiente y corresponde a la nicandrina B, compuesto aislado previamente de *Nicandra physaloides* ⁽⁵⁸⁾, *Datura ferox* ^(38, 59) y *Datura quercifolia* ⁽³⁸⁾ cuyos datos espectroscópicos concuerdan con los de **6**.



nicandrina B (**6**)

Tabla 2. Datos espectroscópicos de RMN ^1H de los compuestos 2-6 (CDCl₃, 500 MHz).

^1H	Compuesto 2	Compuesto 3 ^a	Compuesto 4	Compuesto 5	Compuesto 6
2	5.87 ddd (10, 2.5, 0.5)	5.87 ddd (10.2, 2.7, 1.2)	5.84 ddd (10, 3, 1)	5.86 ddd (10, 3, 0.5)	5.85 ddd (10, 3, 1)
3	6.62 ddd (10, 5, 2.5)	6.62 ddd (10.2, 5.1, 2.4)	6.61 ddd (10, 5, 2.5)	6.59 ddd (10, 5, 2)	6.61 ddd (10, 5.5, 2.5)
4	2.70 dt (18.5, 2.5)	2.71 dddd (19.9, 2.7, 2.4, 1.2)	2.69 dt (19, 2.5)	2.69 br ddd (19, 3, 2)	2.68 dt (19, 2.5)
4'	2.58 ddd (18.5, 5, 0.5)	2.57 ddd (19.9, 5.1, 1.2)	2.54 ddd (19, 5, 1)	2.53 ddd (19, 5, 0.5)	2.54 ddd (19, 5.5, 1)
6	3.10 d (4)	3.09 d (3.6)	3.04 d (4)	3.05 d (4)	3.04 d (3.5)
7	3.41 dd (4, 2)	3.41 dd (3.6, 1.8)	3.31 dd (4, 2)	3.31 dd (4, 2)	3.31 dd (3.5, 2.5)
8	2.21 td (11, 2)	2.22 td (10.8, 1.8)	1.77 td (11, 2)	1.76 td (10.5, 2)	1.77 td (11, 2)
9	1.96 ddd (13, 4, 2)	-----	-----	1.56 m	2.06 m
11	3.51 dd (13, 4)	3.52 dd (12.6, 4.2)	2.86 dt (14.5, 3.5)	2.74 br dt (9, 3)	2.86 dt (14.5, 3.5)
11'	2.53 t (13)	2.55 t (12.6)	1.61 ddd (14.5, 12.5, 2.5)	1.32 m	1.61 ddd (14.5, 13, 2)
12	-----	-----	4.01 br t (3)	H12, 2.10 m H12', 1.31 m	4.38 dt (13, 3.5)
17	2.02 m	-----	1.90 m	1.19 m	1.95 m
18	1.10 s	1.12 s	0.75 s	0.77 s	0.77 s
19	1.25 s	1.25 s	1.19 s	1.19 s	1.18 s
20	1.80 m	-----	1.92 m	2.10 m	1.98 m
23	2.14 dd (15, 12)	2.60 sobrepuesto	2.04 m	2.46 br t (16)	2.50 br t (15)
23'	2.06 dd (15, 3.5)	-----	2.04 m	1.93 m	2.02 m
21	0.91 d (6.5)	0.99 d (6.9)	1.01 d (6)	1.02 d (6.5)	1.10 d (6)
22	4.57 dt (12, 3.5)	4.39 dt (13.2, 3.6)	4.55 dt (11, 3.5)	4.38 dt (13.5, 3.5)	4.38 dt (13, 3.5)
27	1.57 s	1.89 t (0.9)	1.57 s	1.89 br t (1)	1.88 br t (1)
28	1.51 s	1.96 s	1.50 s	1.95 s	1.95 s

^(a)Determinado en CDCl₃ a 300 MHz.

Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de los compuestos 2-6 (CDCl_3 , 125MHz)

^{13}C	Compuesto 2	Compuesto 3 ^(a)	Compuesto 4	Compuesto 5	Compuesto 6
1	201.2	201.2	203.2	203.1	203.3
2	128.7	128.8	128.9	129.0	128.9
3	139.7	139.8	139.9	139.6	139.9
4	36.7	36.6	36.7	36.7	36.7
5	73.2	73.2	73.3	73.2	73.3
6	56.2	56.2	56.1	56.3	56.1
7	56.9	56.9	57.0	57.3	57.0
8	35.6	35.6	36.0	35.8	36.0
9	37.6	37.6	28.7	35.6	28.6
10	51.5	51.4	50.5	51.0	50.5
11	38.3	38.3	30.1	21.9	30.0
12	212.0	212.1	72.4 ^(b)	39.8 ^(c)	72.4 ^(b)
13	57.7	57.6	47.0	43.5	47.0
14	52.8	52.8	43.7	51.4	43.7
15	23.6	23.6	23.0	23.6	23.0
16	27.0	27.1	26.4	27.3	26.5
17	42.6	42.7	42.8	51.9	42.8
18	11.4	12.4	11.4	12.1	12.4
19	14.7	14.7	14.6	14.7	14.6
20	39.5	39.8	38.7	39.0	39.0
21	13.1	13.5	11.6	13.3	11.9
22	76.3	78.4	76.4	78.3	78.4
23	29.1	30.0	28.8	29.6	29.7
24	59.4	149.3	59.3	149.1	149.4
25	62.7	121.9	62.7	122.0	121.8
26	169.8	166.9	170.1	167.0	167.1
27	13.6	12.4	13.6	12.5	12.4
28	17.9	20.5	17.9	20.5	20.5

^(a)Determinado en CDCl_3 a 75 MHz, ^(b)CH, ^(c)CH₂

Los diferentes estudios de partes aéreas de *D. quercifolia* (cuadro 2) muestran que las daturalactonas 1 y 2 están presentes en todas las poblaciones analizadas y

que withanólida B, nicandrina B y withanicandrina, sólo están presentes en la población del Reino Unido y en la que se analizó en este trabajo.

Cuadro 2. Compuestos aislados de los distintos estudios químicos de *Datura quercifolia*

		Compuestos
Estudios	India	Daturalactona 1 ^(40, 41)
		Daturalactonas 1, 2 y 4 ⁽⁴⁵⁾
		Daturalactona 1 y 2, y 1 β ,5 α ,12 α -trihidroxi-6 α ,7 α ,24 α ,25 α -diepoxi-20S,22R-with-2-enolida. ⁽⁴⁴⁾
	Reino Unido	Daturalactonas 1 ^a , 2, 3 ^a y 4, withanólida B, nicandrina B y withanicandrina. ⁽³⁸⁾
	México	Daturalactona 1 y 2, withanólida B, nicandrina B y withanicandrina.

^a No es claro si se aisló en este trabajo o se tomaron los datos de la literatura

5.2 PRUEBAS BIOLÓGICAS

5.2.1 Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante de las withanólidas 2-6, se evaluó mediante dos técnicas: reducción del radical libre DPPH y peroxidación de lípidos en cerebro de rata (TBARS).

Reducción del radical libre DPPH

Para este ensayo, la capacidad antioxidante de las withanólidas, se determinó mediante la medición indirecta del radical libre DPPH (2, 2-difenil-1-picrilhidracilo), ya que éste radical presenta una coloración morada y absorbe a 515 nm y cuando es

reducido a DPPH-H por moléculas donadoras de átomos de hidrógeno la coloración se pierde. Dicha actividad se realizó utilizando tres concentraciones distintas de los compuestos evaluados (1, 10, 100 μM) y el resultado se expresó como porcentaje de reducción del radical. En la siguiente tabla se muestra los resultados obtenidos. Se puede apreciar que ninguno de los compuestos evaluados tiene la capacidad de reducir al 2, 2-difenil-1-picrilhidracilo.

Tabla 4. Actividad antioxidante. % de inhibición del radical libre DPPH por withanólidas.

Compuesto	Concentración (μM)	D.O. 515 nm	% de reducción del DPPH
DPPH (control)	100	0.704	---
Daturalactona 2 (2)	1	0.706	-0.28
	10	0.702	0.24
	100	0.706	-0.33
Withanicandrina (3)	1	0.698	0.85
	10	0.666	5.40
	100	0.697	0.95
Daturalactona (4)	1	0.710	-0.90
	10	0.711	-0.99
	100	0.708	-0.62
Withanólida B (5)	1	0.706	-0.24
	10	0.700	0.52
	100	0.709	-0.76
Nicandrina B (6)	1	0.714	-1.37
	10	0.707	-0.47
	100	0.717	-1.85
Alfa tocoferol	1	0.703	0.19
	10	0.615	12.59
	100	0.018	97.40

Inhibición de la peroxidación de lípidos de cerebro de rata, inducida con FeSO₄

Para realizar este ensayo de actividad antioxidante, los compuestos evaluados se utilizaron a concentraciones de 1, 10 y 100 μM . Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Efecto inhibitorio de las withanólidas de *D. quercifolia* sobre la peroxidación de lípidos de cerebro de rata.

Compuesto	Concentración (μM)	D.O. 540 nm	TBARS (μM)	nmol TBARS/mg prot.	Inhibición (%)
Blanco	----	0.000	----	----	----
Basal	----	0.016	0.331	0.331	95.10
FeSO ₄ (10 μM)	----	0.756	10.112	10.112	-49.78
FeSO ₄ + Vehículo	----	0.502	6.751	6.751	0.00
Daturalactona 2 (2)	1	0.580	7.793	7.793	-15.43
	10	0.550	7.393	7.393	-9.50
	100	0.522	7.0.19	7.0.19	-3.97
Withanicandrina (3)	1	0.588	7.896	7.896	-16.95
	10	0.555	7.456	7.456	-10.44
	100	0.515	6.927	6.927	-2.60
Daturalactona (4)	1	0.597	8.012	8.012	-18.67
	10	0.574	7.711	7.711	-14.21
	100	0.564	7.572	7.572	-12.15
Withanólida B (5)	1	0.565	7.592	7.592	-12.44
	10	0.568	7.631	7.631	-13.03
	100	0.549	7.377	7.377	-9.26
Nicandrina B (6)	1	0.544	7.307	7.307	-8.23
	10	0.574	7.704	7.704	-14.11
	100	0.482	6.493	6.493	3.82
Alfa tocoferol	1	0.433	5.845	5.845	13.42
	10	0.241	3.305	3.305	51.05
	100	0.098	1.416	1.416	79.03

Al igual que en el ensayo anterior, en la tabla 5 podemos apreciar que ningún compuesto mostró actividad antioxidante, es decir, ninguno tuvo la capacidad de inhibir la peroxidación de lípidos del cerebro de rata.

5.2.2 Actividad citotóxica

La actividad citotóxica de las withanólidas se evaluó en 6 líneas celulares de cáncer humano (U251 = glía del sistema nervioso central, PC-3 = próstata, K562 = leucemia, HCT-15 = colon, MCF-7 = mama, SKLU = pulmón) y los resultados obtenidos se muestran en la tabla.

Tabla 6. Efecto inhibitorio de las withanólidas de *D. quercifolia* sobre líneas celulares de cáncer humano.

Compuesto	% de inhibición del crecimiento por la línea celular					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
Daturalactona 2 (2)	SA	13.72	4.78	SA	8.29	SA
Withanicandrina (3)	5.0	7.16	SA	1.31	11.42	1.4
Daturalactona (4)	SA	SA	21.2	6.52	2.66	SA
Withanólida B (5)	17.65	18.58	12.74	SA	SA	SA
Nicandrina B (6)	3.0	6.19	2.9	SA	SA	SA

Los resultados de la tabla 6, nos muestran que prácticamente ningún compuesto inhibió la proliferación de las líneas celulares de cáncer humano, ya que a pesar de que en algunos casos se observó cierta actividad no puede considerarse significativa. Estos resultados los podemos extrapolar con lo reportado en la literatura en cuanto a la actividad citotóxica de las withanólidas, ya que se ha reportado que aquellas withanólidas que poseen un grupo α -hidroxi y α -epoxi en los anillos A o B

muestran una marcada disminución de la actividad citotóxica con respecto a aquellas que contienen un grupo β -hidroxi y β -epoxi, los cuales en general muestran una mayor actividad citotóxica. ⁽⁶⁰⁾

6.- CONCLUSIONES

◆ Como resultado del estudio químico de las partes aéreas (hojas, tallos y ramas) de *Datura quercifolia* H.B.K se aislaron 6 compuestos que se identificaron como β -sitosterol, daturalactona 2, withanicandrina, daturalactona, withanólida B y nicandrina B.

◆ Hasta ahora los withaesteroides aislados del género *Datura*, corresponden a los clasificados como withanólidas y como withametelinas.

◆ La composición química de las diferentes poblaciones de *Datura quercifolia*, que se han analizado hasta ahora, presentan pequeñas variaciones en su contenido de withanólidas.

◆ En los ensayos de actividad citotóxica y actividad antioxidante, las withanólidas aisladas fueron inactivas y esto apoya la hipótesis de que los grupos α -hidroxi y α -epoxi en los anillos A y B de las withanólidas disminuyen su actividad respecto a otros compuestos del mismo tipo que carecen de estas funcionalidades.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Barnes. J., Anderson. L.A., Phillipson. J.D., "Plantas Medicinales", Pharma editores, España, **2005**, pp. 3-7.
- 2.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Secretaria de Salud, México, **2001**, pp. 15-16
- 3.- Dewick, P.M., "Medicinal natural products. A biosynthetic approach", John Wiley and Sons, England, **2008**, pp. 9-12.
- 4.- Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., "Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy". Churchill livingstone, Elsevier, Edimburgo, **2008**, pp. 60-63.
- 5.- Bruneton J., "Plantas tóxicas, vegetales peligrosos para el hombre y los animales", Acribia, S.A., España, **2001**, pp. 447-482.
- 6.- Quer, P., "Plantas medicinales", Labor editorial, México **1985**, pp. 562.
- 7.- Erwin, G., Ariei, A., Gideon, G., Isaac, k., "Naturally occurring steroidal lactones with a 17 α -oriented side chain. Structure of withanolide E and related compounds.", *J. Chem. Soc. Perk. T. 1*, **1977**, 341-346.
- 8.- Perez, M. A., Grieco, P.A., "Synthesis of the highly oxygenated ergostane type steroid (+)- withanolide E", *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 1057-1059.
- 9.- Mayorga, H., Duque, C., Knapp, H., Halter, P. W. "Hydroxyester disaccharides from fruits of cape gooseberry (*Physalis peruviana*)", *Phytochemistry*, **2002**, 59, 439-445.
- 10.- Bodea, C., Andrewes, A. G., Borch, G., Liaaen-Jensen, S., "Carotenoids of higher plants. Part 11. Structure of the carotenoid physoxanthin", *Phytochemistry*, **1978**, 17, 2037-2038.

- 11.- Ismail, N.; Alam, M., "A novel cytotoxic flavonoid glycoside from *Physalis angulata*." *Fitoterapia*, **2001**, *72*, 676-679.
- 12.- Koh, L. L.; Ng, A. S., "Structures of two flavonoids from *Physalis minima*, 5-methoxy-6,7-methylenedioxyflavone (I) and 5,6,7-trimethoxyflavone (II).", *Acta Crystallogr.*, **1993**, *49*, 105-7.
- 13.- Sinha, S. C., Ali, A., Bagchi, A., Sahai, M., Ray, A. B., "Physalindicanols, New Biogenetic Precursors of C28-Steroidal Lactones from *Physalis minima* var. indica.", *Planta med.*, **1987**, *53*, 55-57.
- 14.- Ferreira, F., Soule, S., Vazquez, A., Moyna, P., Kenne, L., "Steroid saponins from *Solanum laxum*", *Phytochemistry*, **1996**, *42*, 1409-1416.
- 15.- Aguilar C. A., Zolla C., "Plantas tóxicas de México" Instituto Mexicano del Seguro Social, **1982**, pp. 83-84.
- 16.- Martínez M., "Las Plantas Medicinales de México" Ediciones Botas, México, **1959**, pp. 325-328.
- 17.- Hawkes J. G., Lester R.N., Nee M., Estrada N., "Solanaceae III: Taxonomy, chemistry and evolution", The Royal Botanic Gardens Kew, UK, **1991**, pp. 1-113.
- 18.- Al-Yahya M. A. I., Evans W. C., "The Alkaloids of *Datura quercifolia* H.B.K.", *Quart. J. Crude Drug Res.*, **1977**, *15*, 131-132.
- 19.- Ray A. y Gupta M., "Withasteroids, a growing group of naturally occurring steroidal lactones". En *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Herz W., Kirby G., Moore R., Steglich W., Tamm C., eds., Springer-Verlag, Wien, **1994**, *63*, 1-106.

- 20.- Anjaneyulu A. S. R., Rao S. D., Lequense W. P., "Withanolides, Biologically Active Natural Steroidal Lactones: A Review". En *Studies in Natural Products Chemistry.*, Atta-ur-Rahman, Elsevier, Pakistan, **1998**, 20, 133-561.
- 21.- Tursunova N. R., Maslennikova, Abubakirov K. N., "Withanolides in the vegetable kingdom", *Chem. Nat. Comp.*, **1977**, 13, 131-138.
- 22.- Therezinha C. B. Tomassini, Nancy S. Barbi, Ivone M. Ribeiro, Deise C. D. Xavier, "Gênero physalis - uma revisão sobre vitaesteróides", *Química Nova*, **2000**, 23, 47-54.
- 23.- Veleiro, A. S., Oberti, J. C., Burton, G. "Chemistry and Bioactivity of Withanolides from South American Solanaceae" , En *Studies in Natural Products Chemistry.*, Atta-ur-Rahman, Elsevier, Pakistan, **2005**, 32, 1019-1052.
- 24.- Abena, A. A., Miguel, L. M., Mouanga, A., Hondi, A. T., Diatwa, M., "Evaluation of analgesic effect of *Datura fastuosa* leaves and seed extracts.", *Fitoterapia*, **2003**, 74, 486-8.
- 25.- Manickam, M., Sinha-Bagchi, A., Sinha, S.C., Gupta, M., Ray, B.A., "Withanolides of *Datura fastuosa* leaves", *Phytochemistry*, **1993**, 34, 868-870.
- 26.- Ulrike., Preissel H., "Brugmansia and Datura: Angel's Trumpets and Thorn Apples", Firefly Books, England, **2002**, 106-127.
- 27.- Kovatsis, A., Flaskos, J., Niolaidis, E., Kotsaki-Kovatsi, V. P., Papaioannou, N., Tsafaris, F., "Toxicity study of the main alkaloids of *Datura ferox* in broilers.", *Fd. Chem. Toxic.*, **1993**, 31, 841-5.
- 28.- Veleiro, A.S, Cirigliano, M.A., Oberti, C.J., Burton, G., " 7-hydroxywithanolides from *Datura ferox*" , *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 1010-1012.

- 29.- Petrescu, S.M., Petrescu, A.J., Ruediger, H.E.F., "Purification and partial characterization of a lectin from *Datura innoxia* seeds.", *Phytochemistry*, **1993**, *34*, 343-348.
- 30.- Siddiqui, S.B., Afreen, S., Begum, S., "Two new withanolides from the aerial parts of *Datura innoxia*", *Aust. J. Chem.*, **1999**, *52*, 905-907.
- 31.- Siddiqui, S.B., Afreen, S., Begum, S., Sattlar, A.F., "Daturacin, a new withanolide from *Datura innoxia*", *Nat. Prod. Res.*, **2005**, *19*, 612-623.
- 32.- Okwu, D.E., Igara, E.C., "Isolation, characterization and antibacterial activity of alkaloid from *Datura metel* Linn leaves.", *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, **2009**, *3*, 277-281.
- 33.- Shingu, K., Furusawa, Y., Nohara, T., "New withanolides, Daturametelins C,D,E,F and G-Ac from *Datura metel* L. (Solanaceous Studies XIV)", *Chem.Pharm.Bull*, **1989**, *37*, 2132-2135.
- 34.- Yang, B., Wan, Q., Xia, Y., Feng, W., Kuang, H., "Withanolide Compounds from the flower of *Datura metel* L.", *Helvetica Chimica Acta*, **2007**, *90*, 1522-1528.
- 35.- Reddy, B.U., "Antimicrobial activity of *Datura stramonium* L. and *Tylophora indica* (Burm.f.) Merr.", *Pharmacologyonline*, **2009**, 1293-1300.
- 36.- Tursunova, R. N.; Maslennikova, V. A.; Abubakirov, N. K. " Withanolides of *Datura stramonium*. II. Withastramonolide", *Chem. Nat Comp.*, **1978**, 73-75.
- 37.- Maslennikova, V. A., Abubakirov, N. K., "Withanolides from *Datura stramonium*", *Chem. Nat. Comp.*, **1976**, *12*, 604.
- 38.- Evans, W.C., Grout, J.R., Mensah, M.L.K., "Withanolides of *Datura* spp. And hybrids", *Phytochemistry*, **1984**, *23*, 1717-1720.

- 39.- Qurishi, M.A., Dhar, K.L., Atal, C.K., "A novel withanolide from *Datura quercifolia*", *Phytochemistry*, **1979**, *18*, 283-284.
- 40.- Dhar, K.L., Raina, M.L., "A novel withanolide from *Datura quercifolia*", *Phytochemistry*, **1973**, *12*, 476-478.
- 41.- Dhar, K.L., Kalla, A.K., "A 12-oxowithanolide from *Datura quercifolia*", *Phytochemistry*, **1976**, *15*, 339-340.
- 42.- Bandhoria, P., Gupta, V.K., Sharma, V.K., Satti, N.K., Dutt, P., Suri, K.A., "Crystal structure of $6\alpha, 7\alpha :24\alpha, 25\alpha$ -diepoxy- $5\alpha, 12\alpha$ -dihydroxy-1-oxo-20S,22R-witha-2-enolide isolated from *Datura quercifolia* leaves", *Anal. Sci.: X-Ray Structure Analysis Online*, **2006**, *22*, x169-x170.
- 43.- Kalla, A.K., Raina, M.L., Dhar, K.L., Qurishi, M.A., Snatzke, G., "Revised structures of daturalactone and 12-oxowithanolide", *Phytochemistry*, **1979**, *18*, 637-640.
- 44.- Bhat B. A., Dhar K. L., Puri S. C., Qurishi M. A., Khajuria A., Gupta A., Qazi G. N., " Isolation, caracterizacion and biological evaluation de datura lactones as potential inmunomodulators", *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 6672 – 6677.
- 45.- Qurishi, M.A., Kalla, A.K., Dhar, K.L., " A novel withanolide from *Datura quercifolia*", *Phytochemistry*, **1979**, *18*, 1756-1757.
- 46.- Sirvastava, A., Manickman, M., Signha-Bagchia, A., Sinha, S.C., Ray, A.B., "Withasteoids. 28. Novel withanolides from the flowers of *Datura tatula*", *Nat. Prod. Sci.*, **1996**, *2*, 9-13.
- 47.- Shingu, K., Yahara, S., Nohara, T., "New withanolides, Daturaturins A and B from *Datura tatula L*", *Chem.Pharm.Bull.*, **1990**, *38*, 3485-3487.

- 48.- Pan, Y., Wang, X., Hu, X., "Cytotoxic withanolides from the flowers of *Datura metel*", *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 1127-1132.
- 49.- Chandhoke N., "Daturalactone (DQ1) isolated from *Datura quercifolia*: A new interceptive agent"., *Indian J. Exp. Biol*, **1978**, *16*, 419-421.
- 50.- Oshima, Y., Bagchi, A., Hikino, H., Sinha, S.C., Shahai, M., Ray, B.A., "Withametelin, a hexacyclic withanolide of *Datura metel*", *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 2025-2027.
- 51.- Monks, A. et al., "Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines", *J. Natl. Cancer. Inst.*, **1991**, *83*, 757-766.
- 52.- Skehan, P. et al., "New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening", *J. Natl. Cancer. Inst.*, **1990**, *82*, 1107-1112.
- 53.- Oviedo, C.I., "Obtención de agentes antiinflamatorios y citotoxicos a partir de modificaciones químicas a los ácidos maticadienoico y 3-epimaticadienolico", Tesis de doctorado, UNAM, Facultad de Química, México, D.F., **2007**.
- 54.- Amador, M.S., "Metabolitos secundarios de *Lippia graveolens*", Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., **2007**.
- 55.- Vazquez, M.A.R., "Componentes quimicos de baja polaridad en tallos y hojas de *Physalis coztomatl*", Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F., 2006.
- 56.- Bagchi, A., Sahai, M.; Ray, A. B., "C28-steroidal lactones of the seeds of *Nicandra physaloides*", *J. Indian. Chem. Soc.*, **1984**, *61*, 173-174.
- 57.- Begley, M.J., Crombie, L., Ham, P.J., Whiting, D.A., "Structures of three oxygenated 24-methyl steroids (Nic-3, -7, and -11) from the insect repellent plant

Nicandra physaloides (Solanaceae). X-ray analysis of Nic-3 acetate and Nic-11 ethyl ether", J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 , **1976**, 296-304.

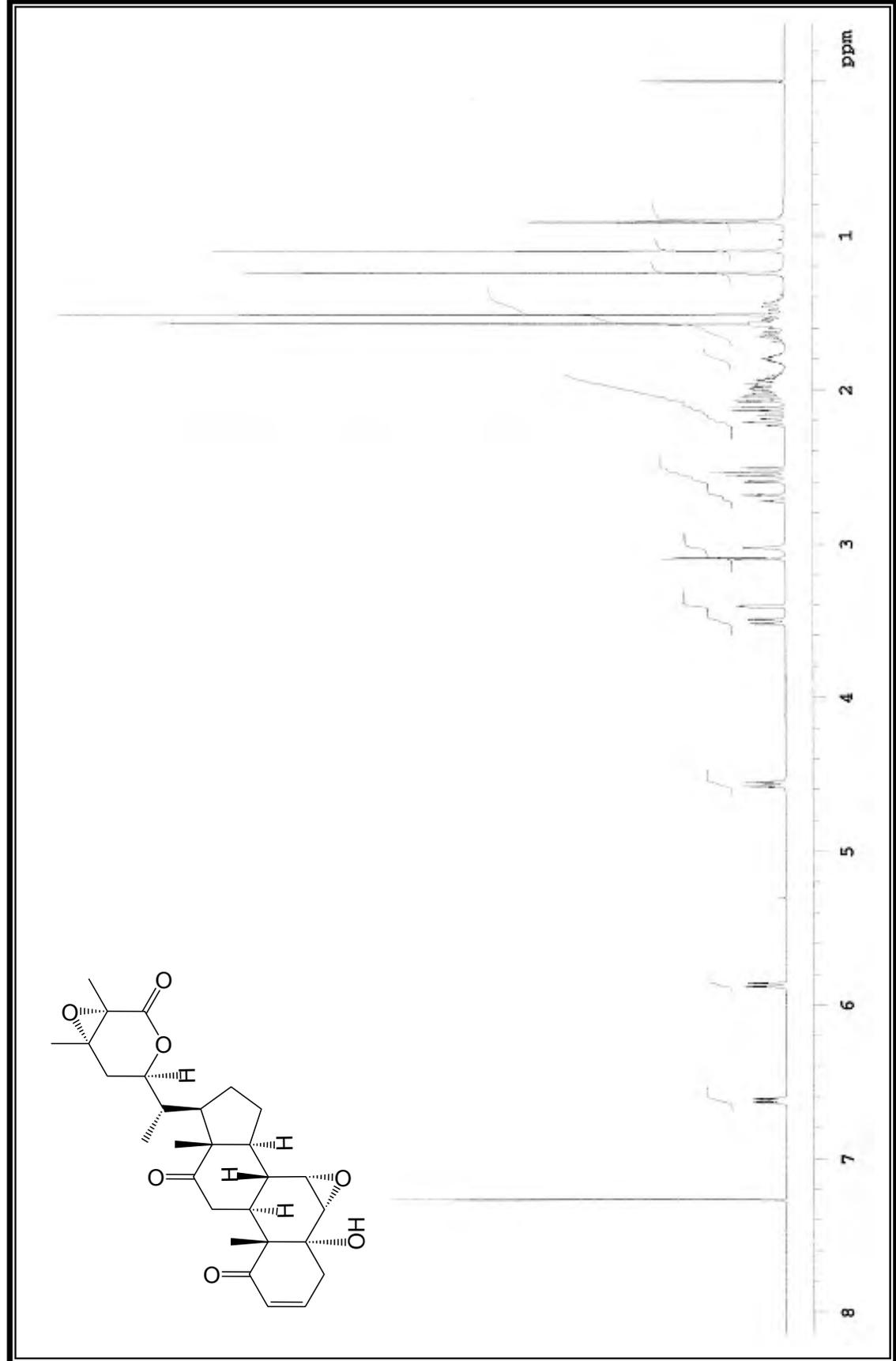
58.- Bagchi, A., Neogi, P., Sahai, M., Ray, A.B., Oshima, Y., Hikino, H., "Steroids. Part 33. Withaperuvin E and nicandrin B, withanolides from *Physalis peruviana* and *Nicandra physaloides*", *Phytochemistry*, **1984**, 23, 853-855.

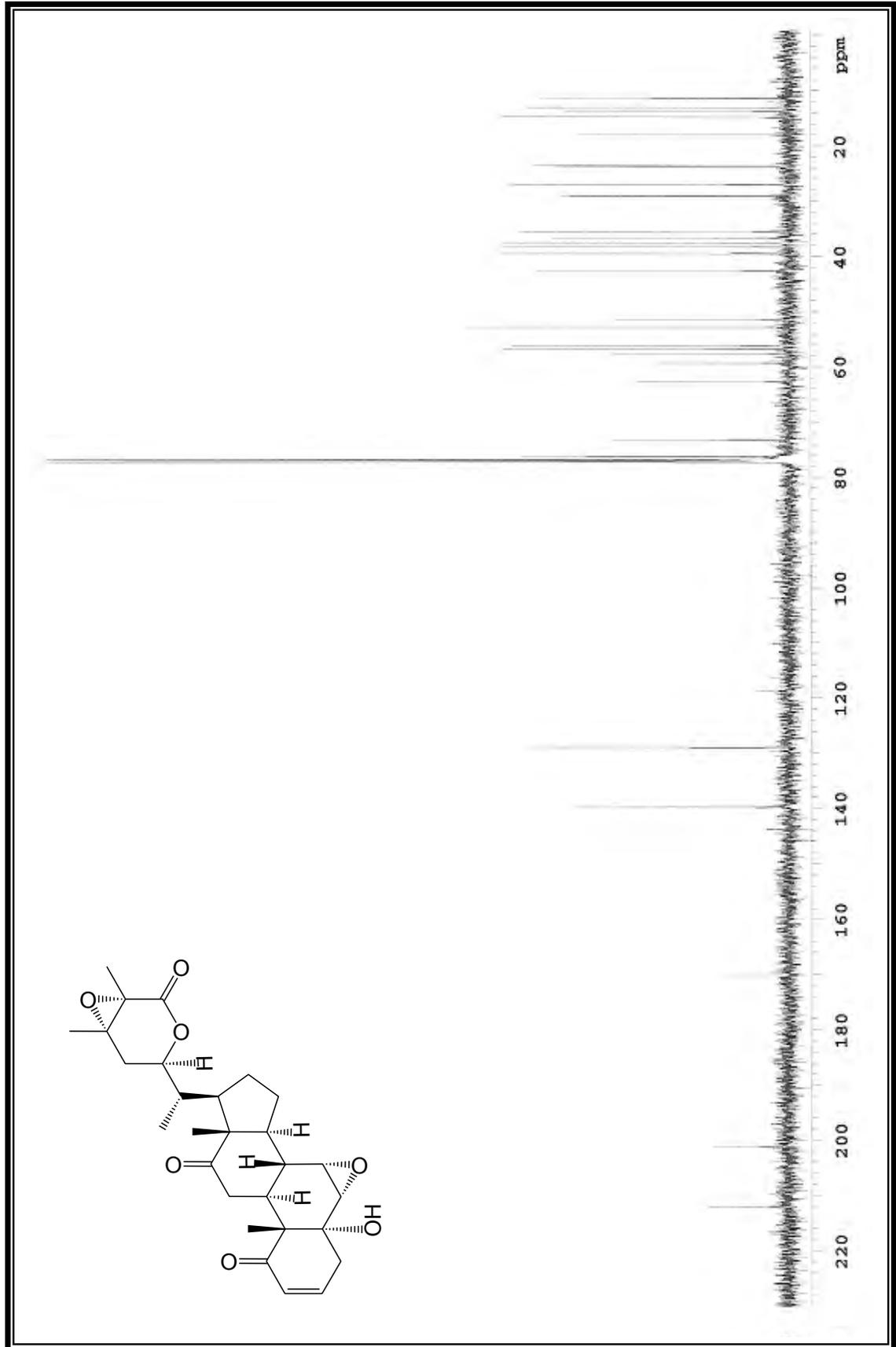
59.- Cirigliano, A., Veleiro, A.S., Oberti, J.C. Burton, G., "A 15 β -hydroxywithanolide from *Datura ferox*", *Phytochemistry*, **1995**, 40, 611-613.

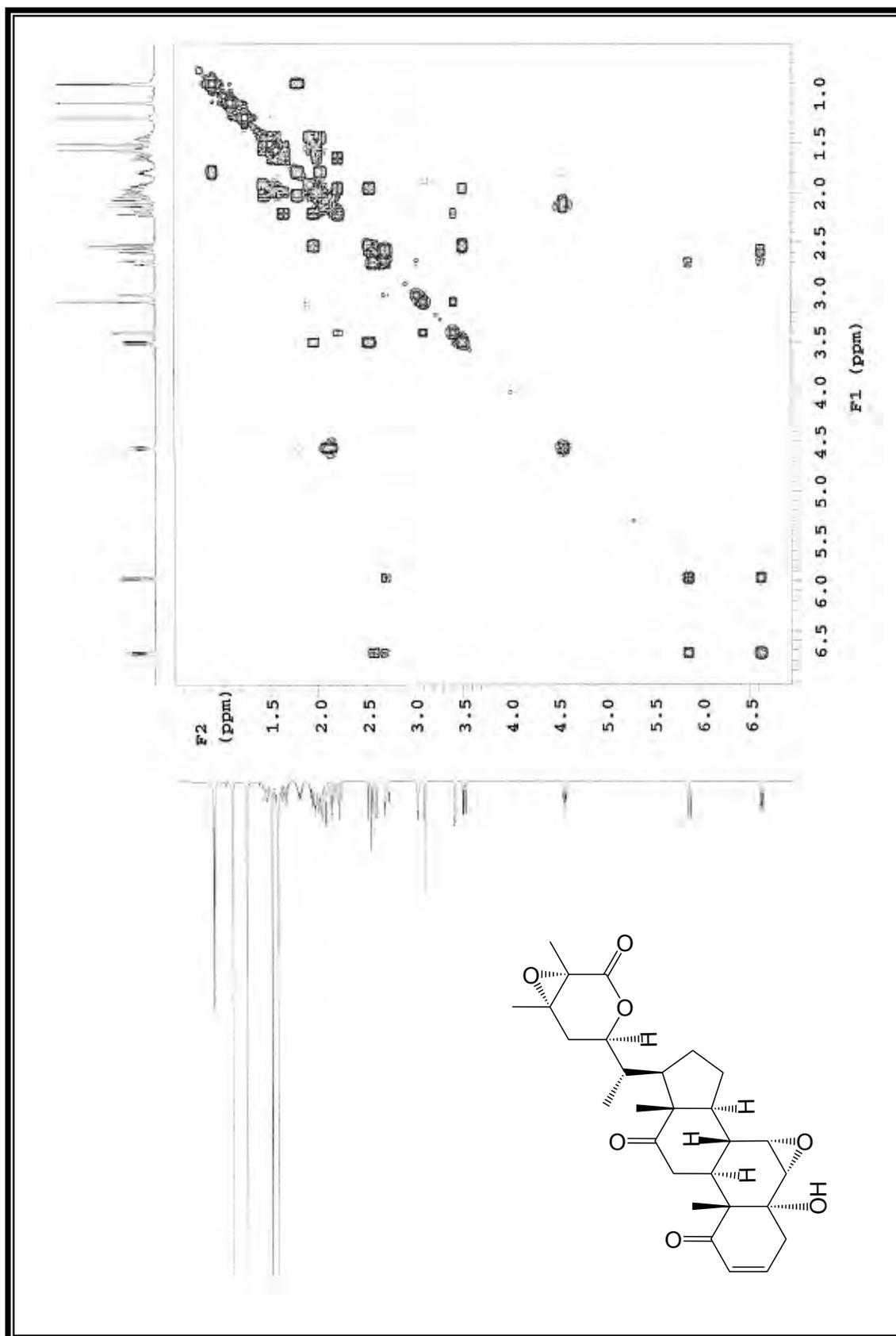
60.- Neogi, P., Kawai, M., Butsugan, Y., Mori, Y., Suzuki, M., "Withacoagin, a new withanolide from *Withania coagulans* roots", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1988**, 61, 4479-81.

61.- Haensel, R., Huang, J., "Lycium chinense, II. Semiquantitative determination of withanolides", *Arch. Pharm.*, **1977**, 310, 35-8.

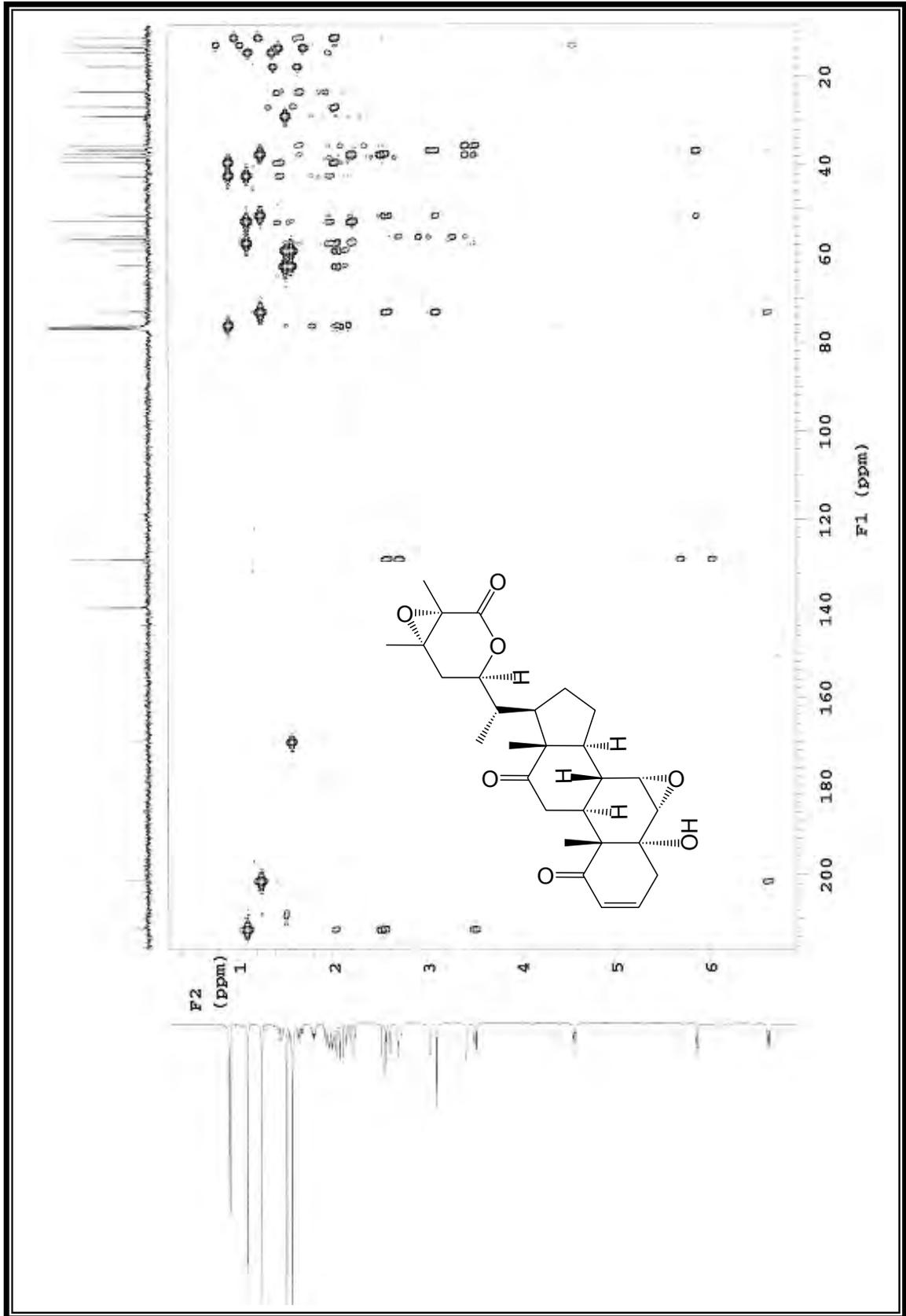
ANEXO I

Espectro 1. RMN ^1H compuesto 2

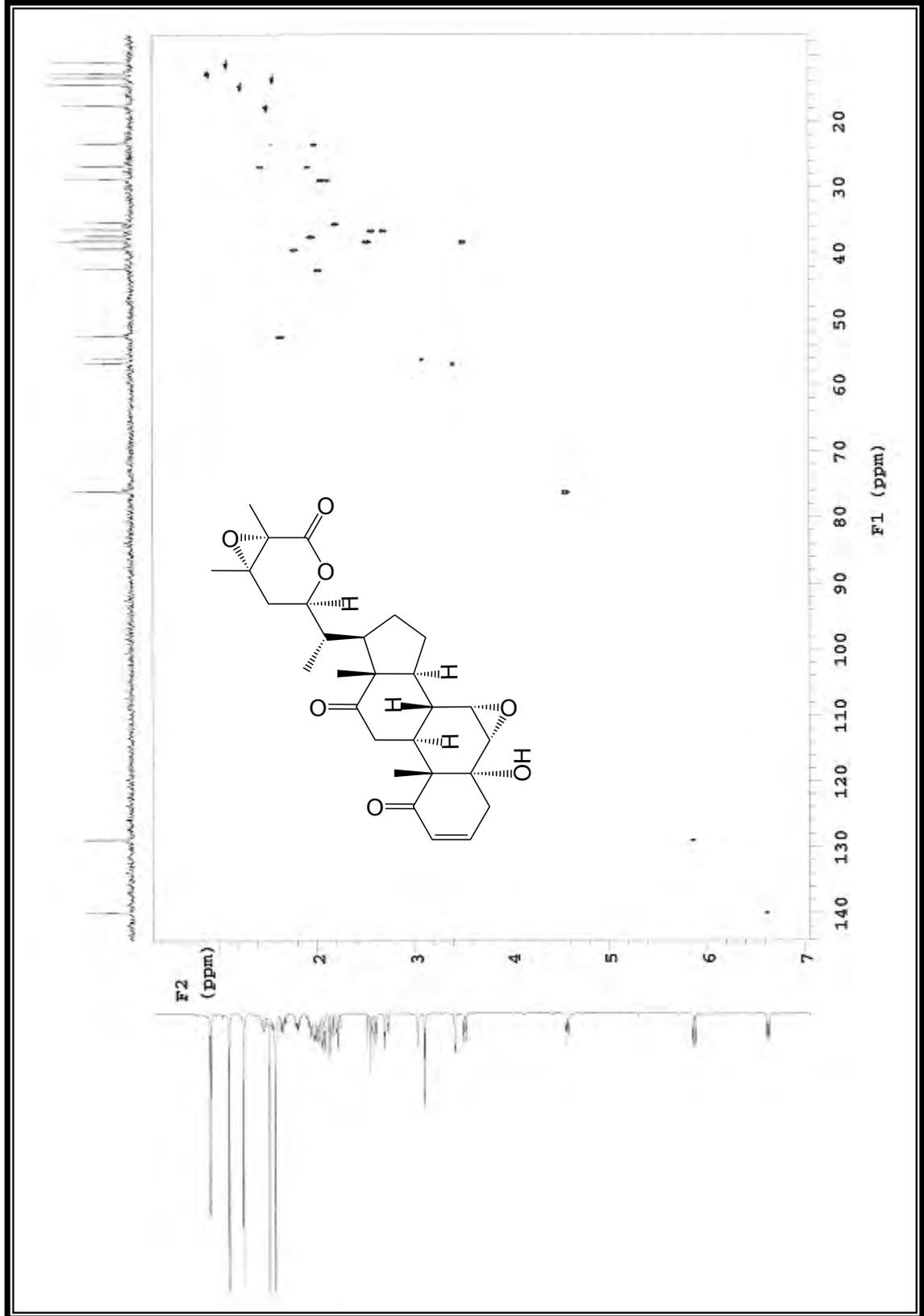
Espectro 2. RMN ^{13}C compuesto 2



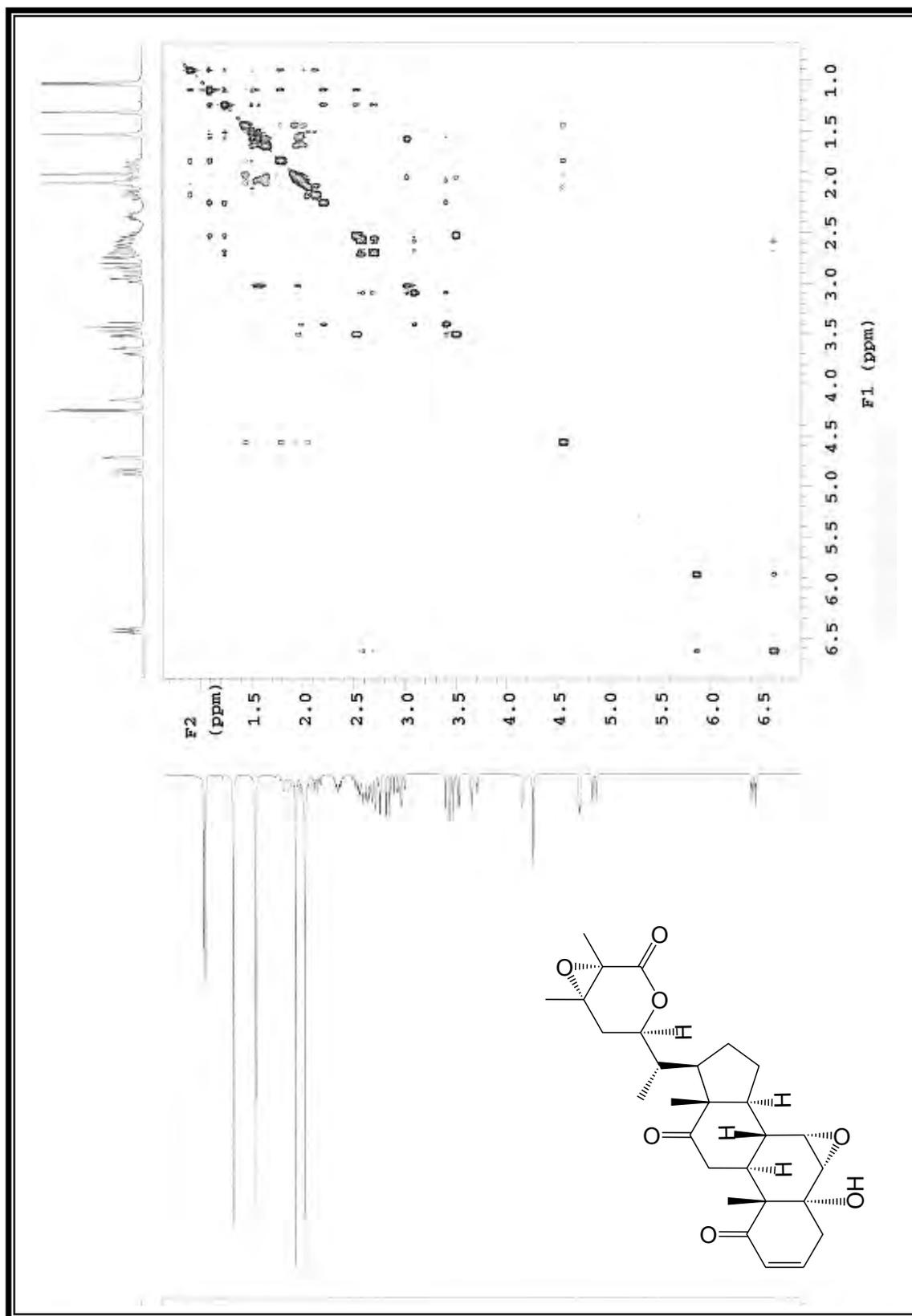
Espectro 3. COSY compuesto 2



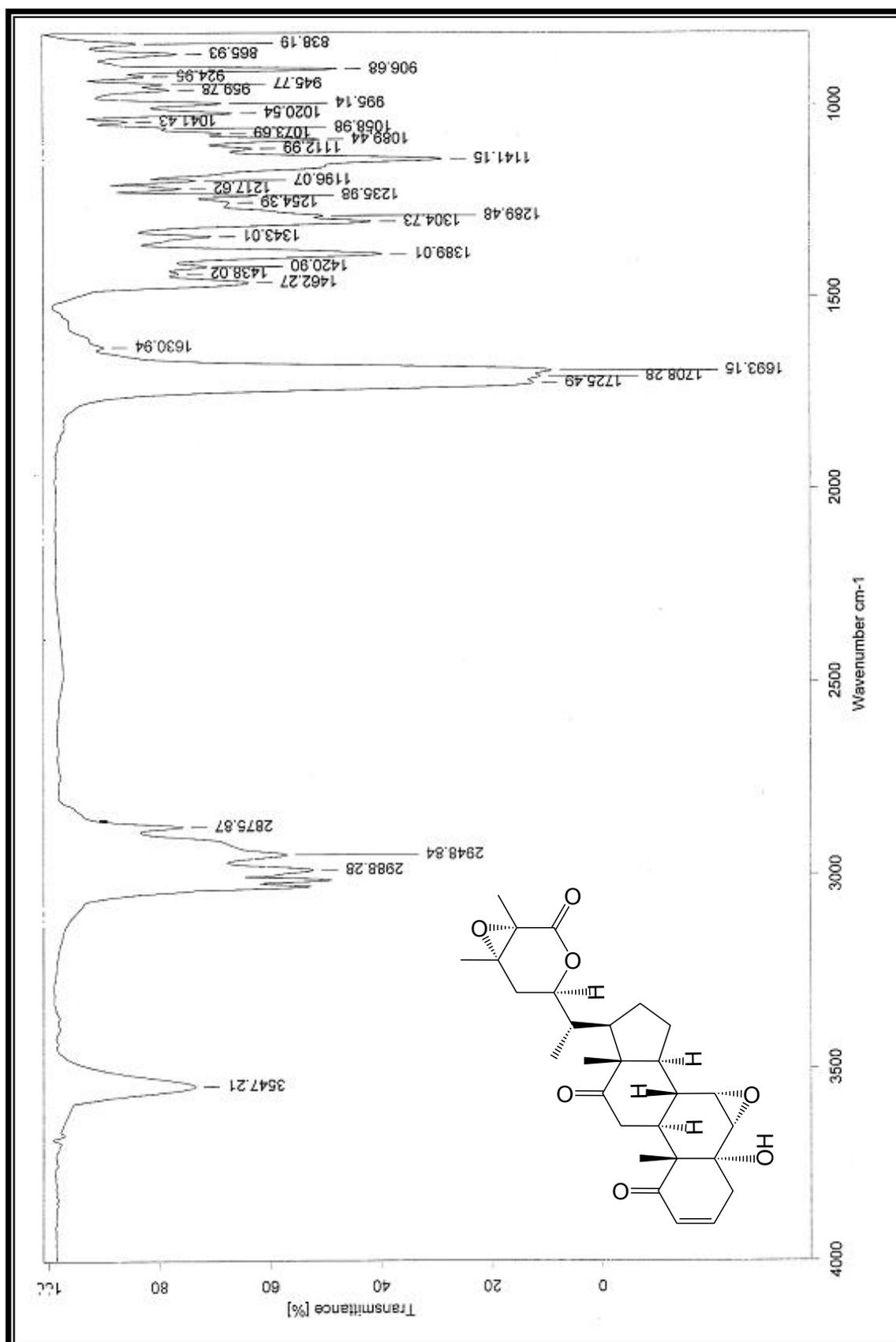
Espectro 4. HMBC compuesto 2



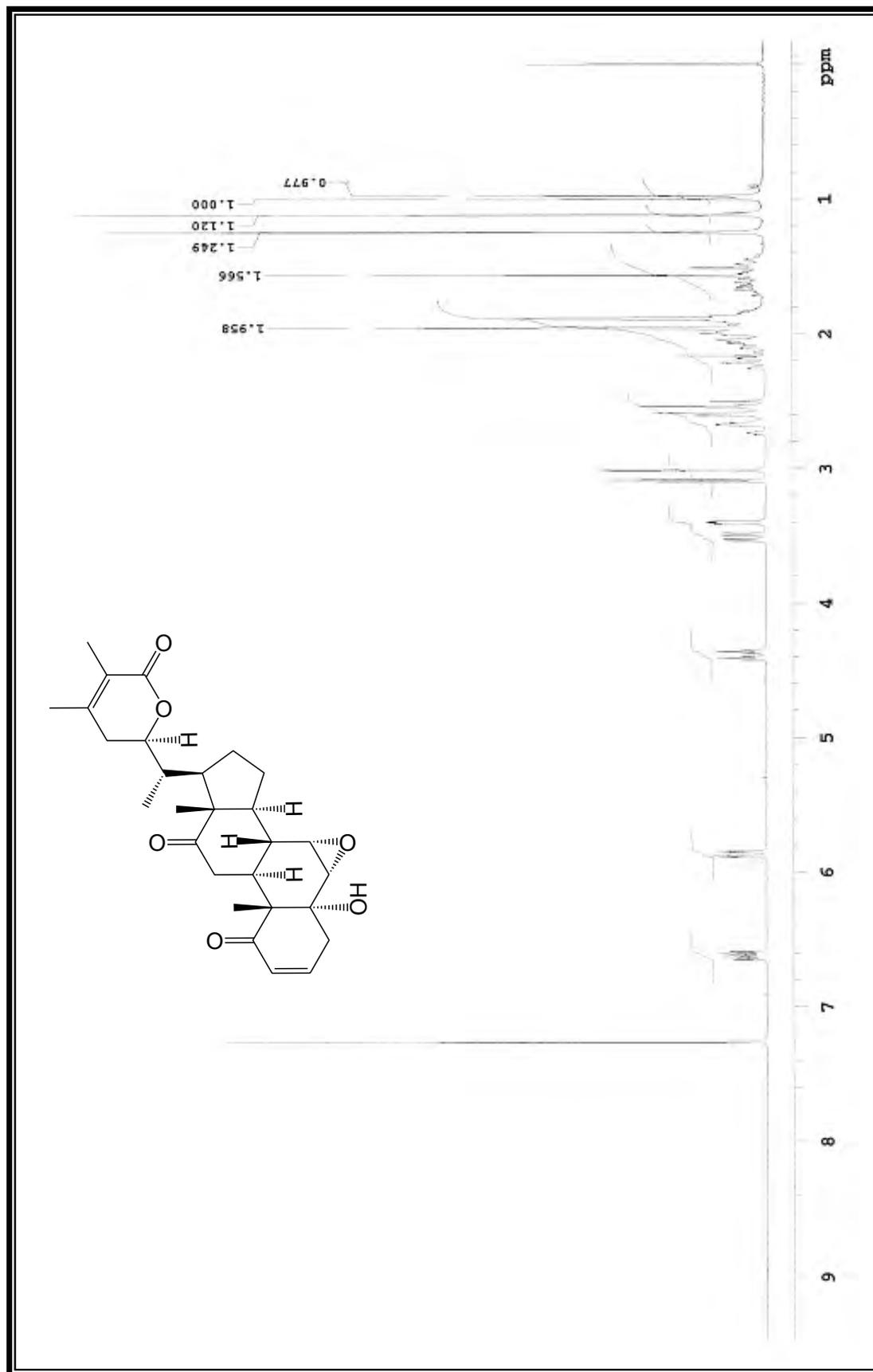
Espectro 5. HSQC compuesto 2

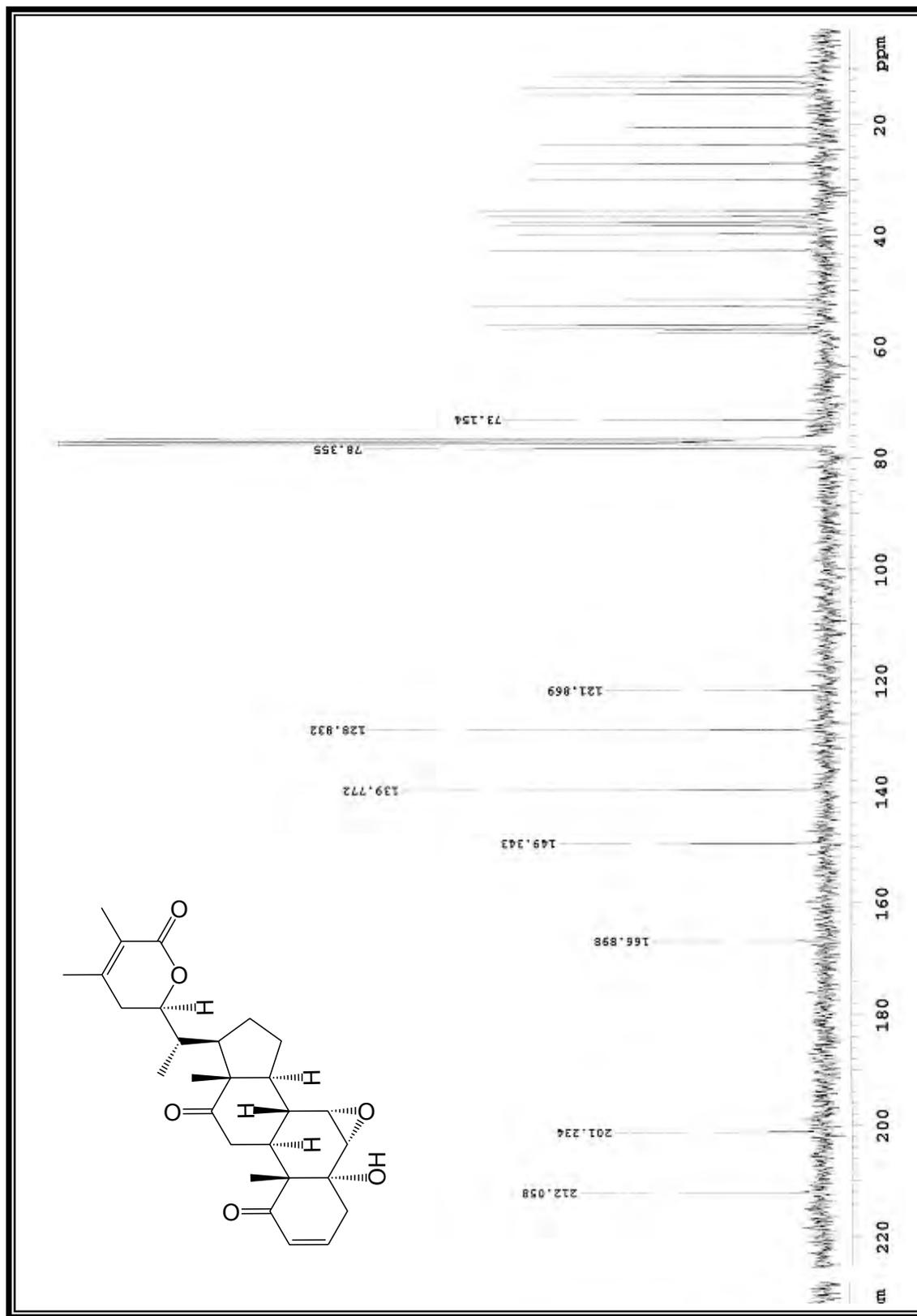


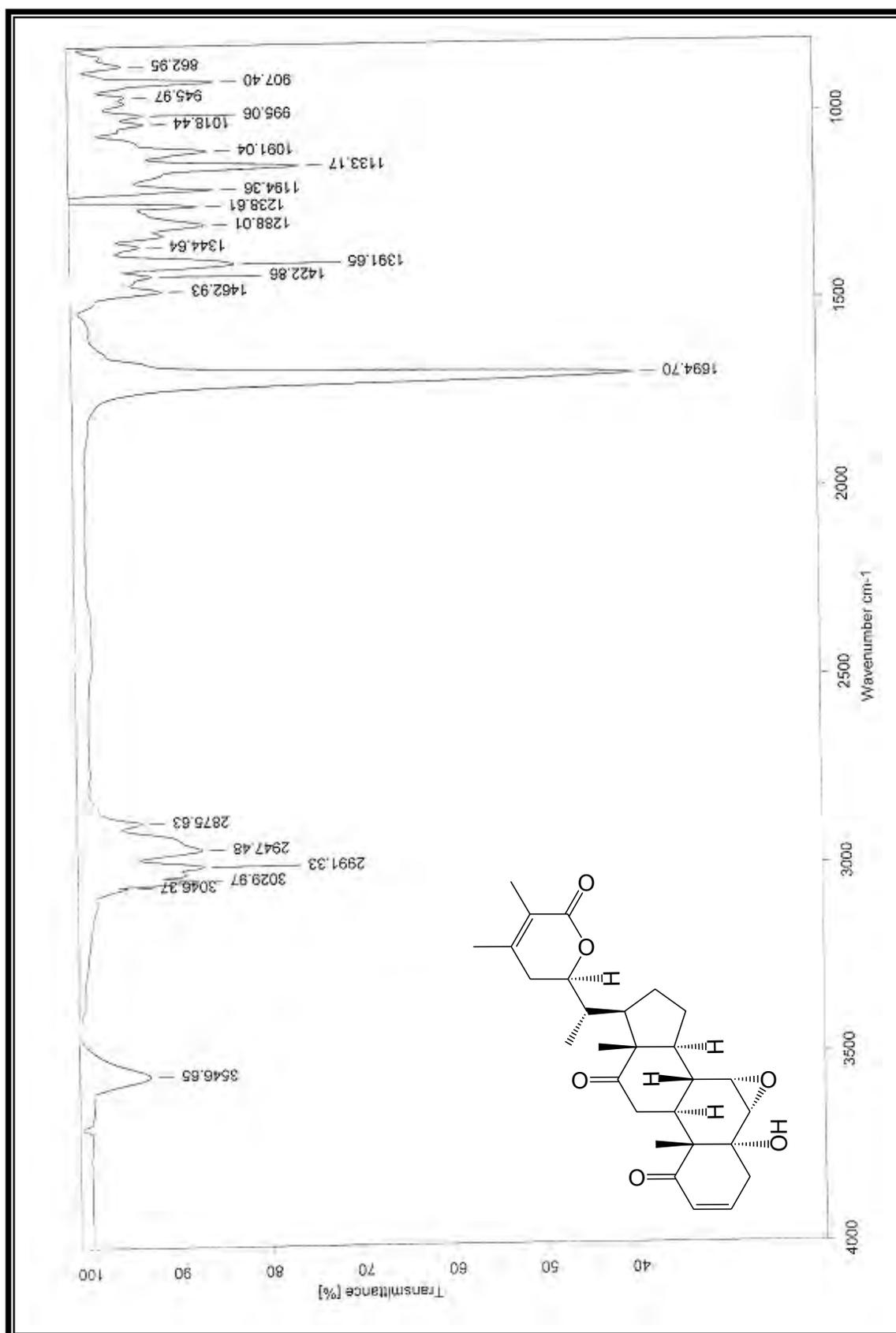
Espectro 6. NOESY compuesto 2



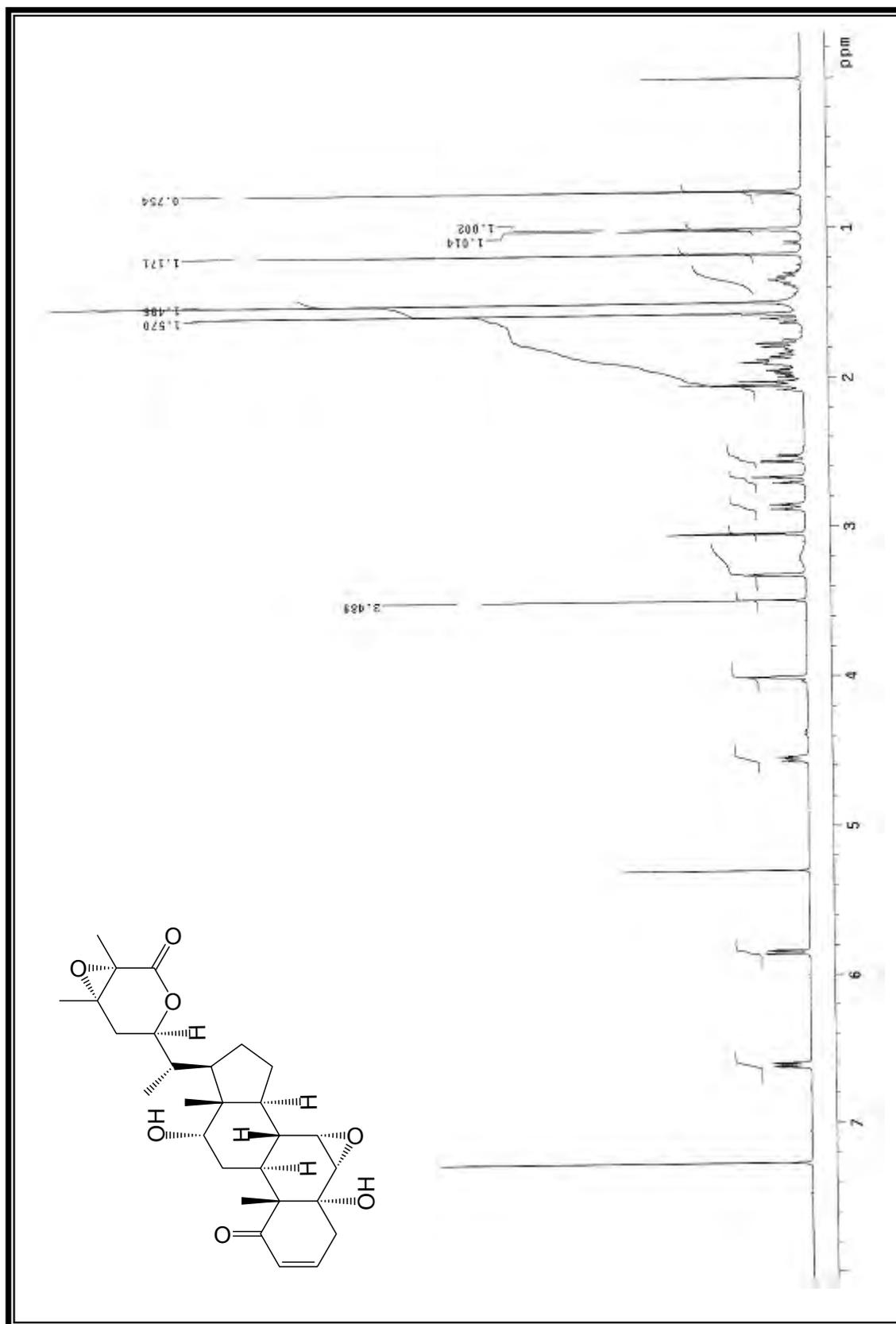
Espectro 7. IR compuesto 2

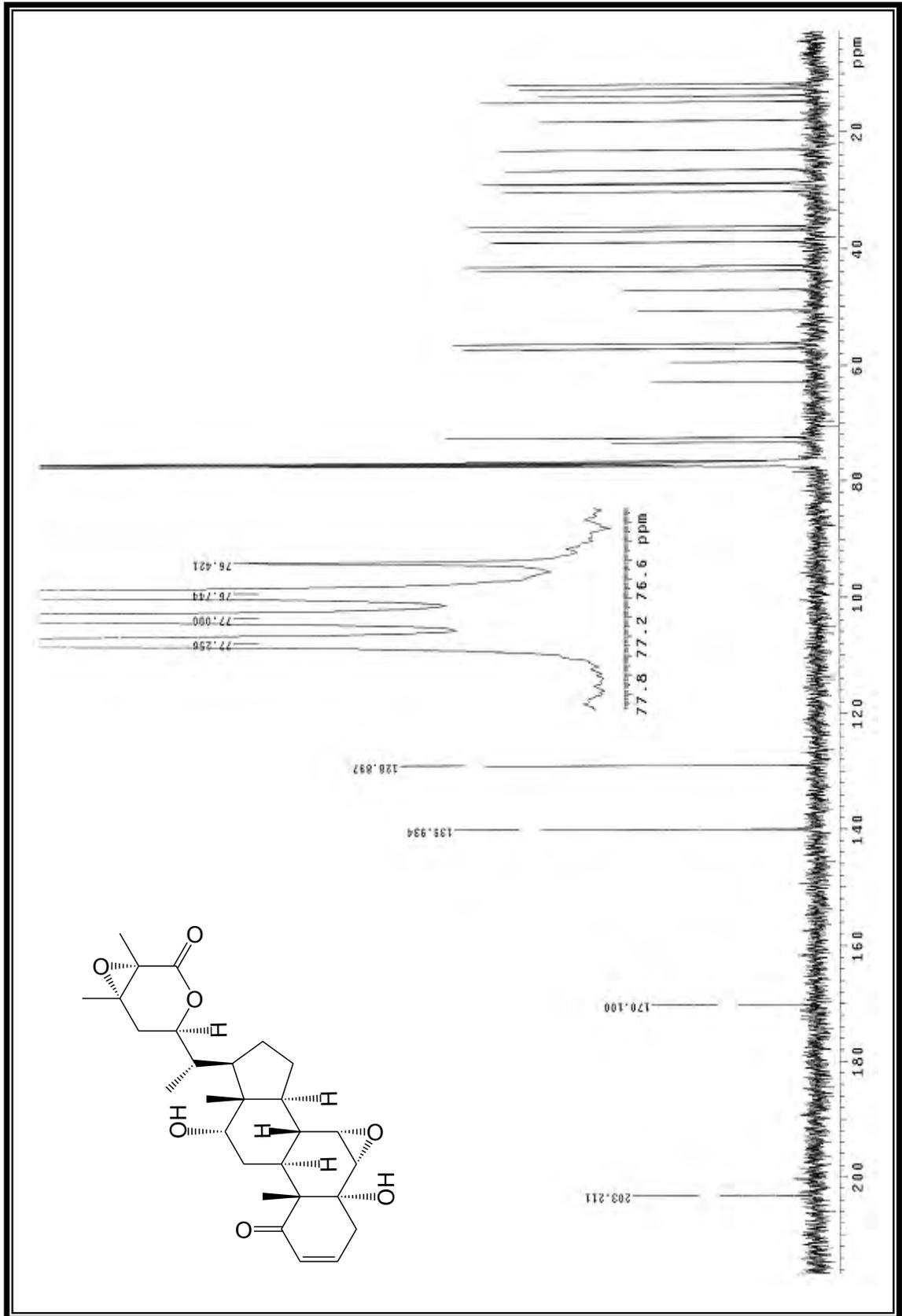
Espectro 8. RMN ^1H compuesto 3

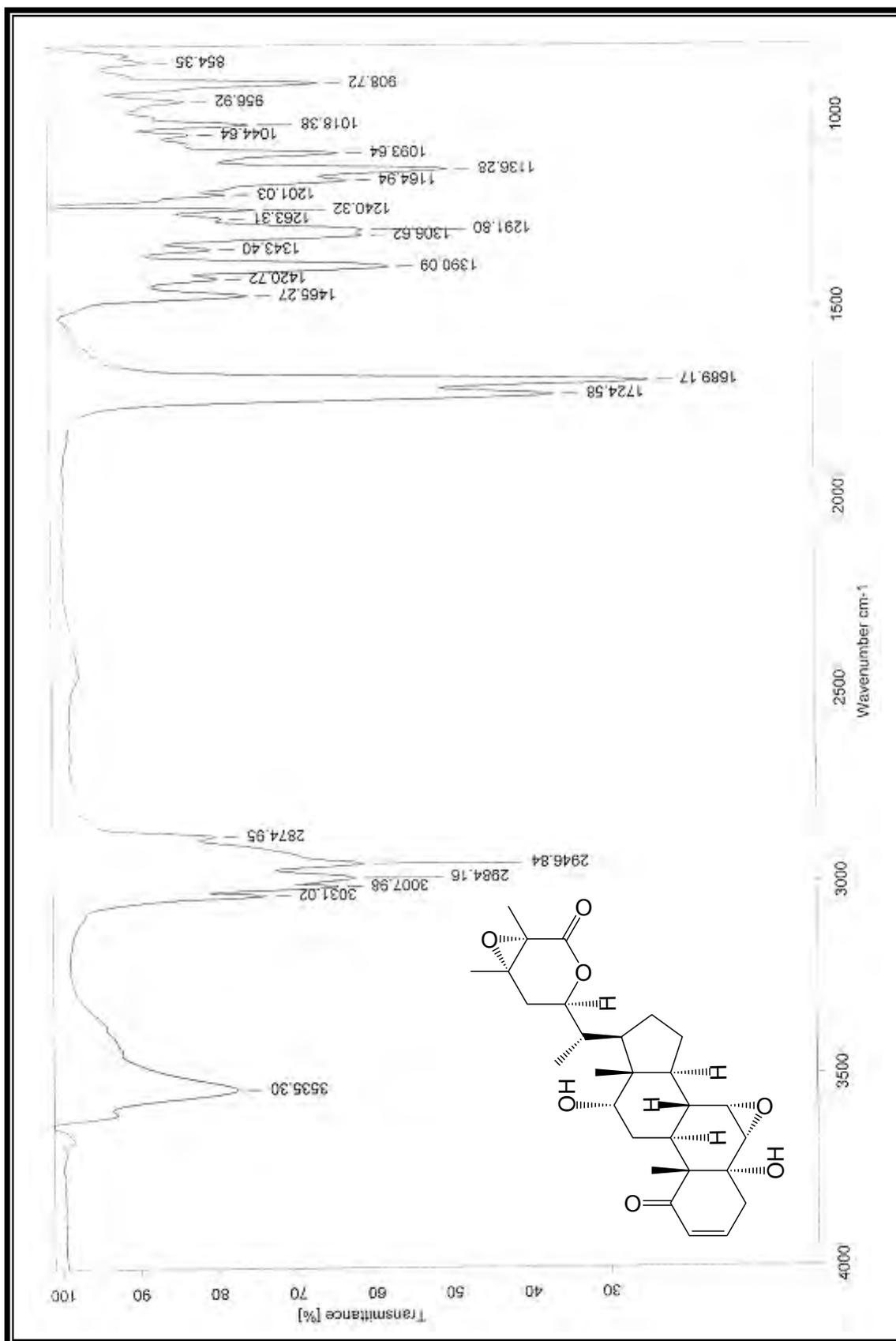
Espectro 9. RMN ^{13}C compuesto 3



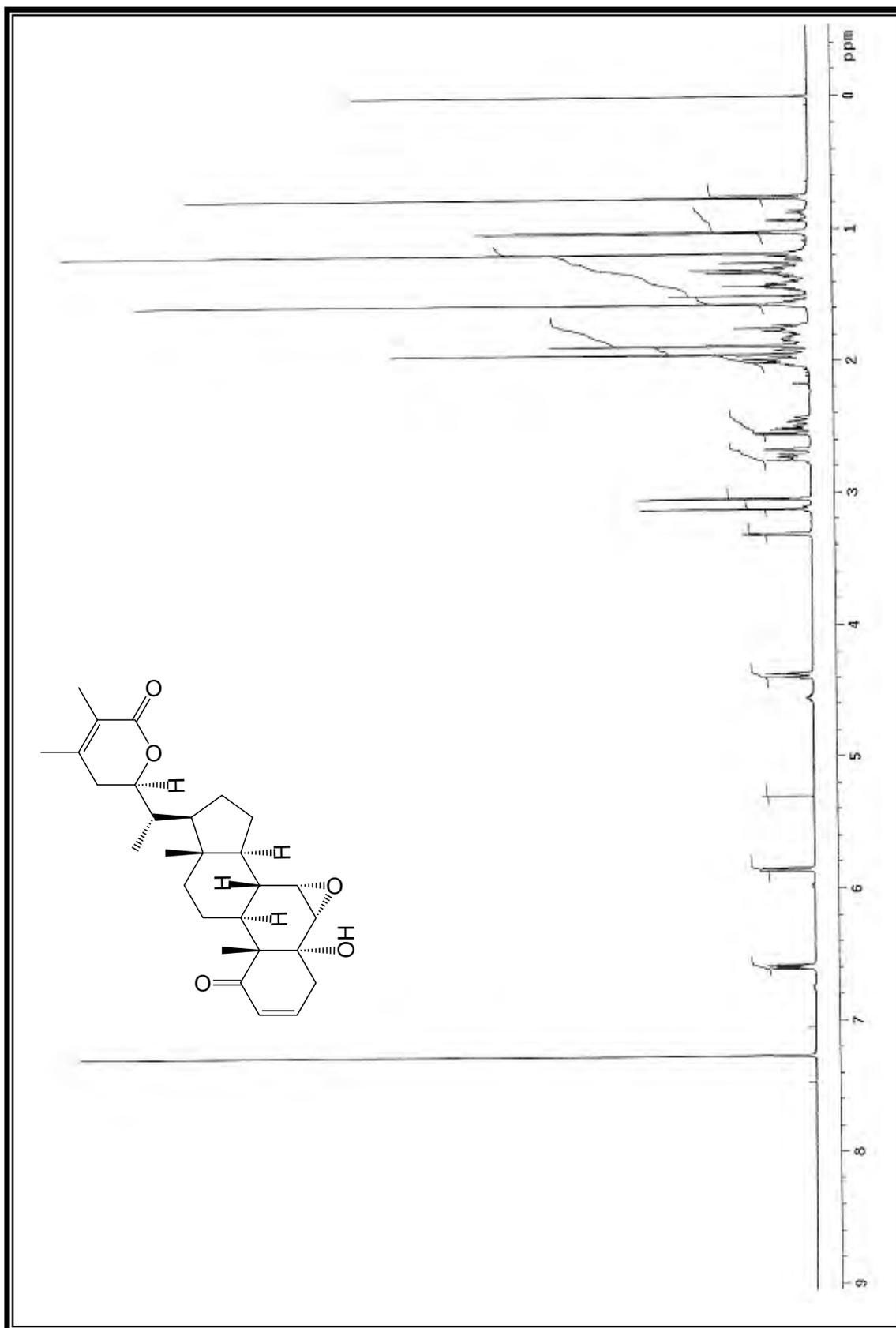
Espectro 10. IR compuesto 3

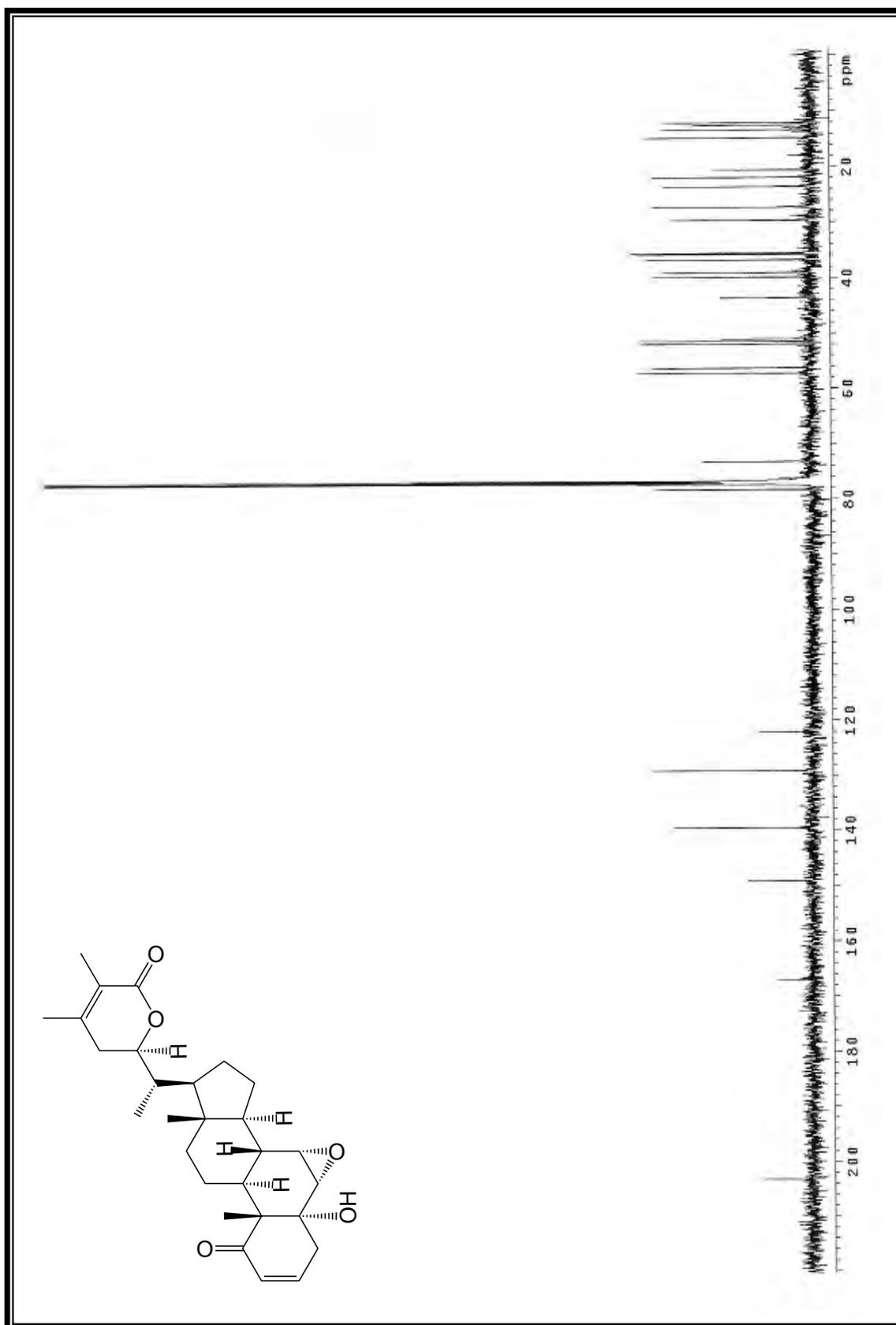
Espectro 11. RMN ^1H compuesto 4

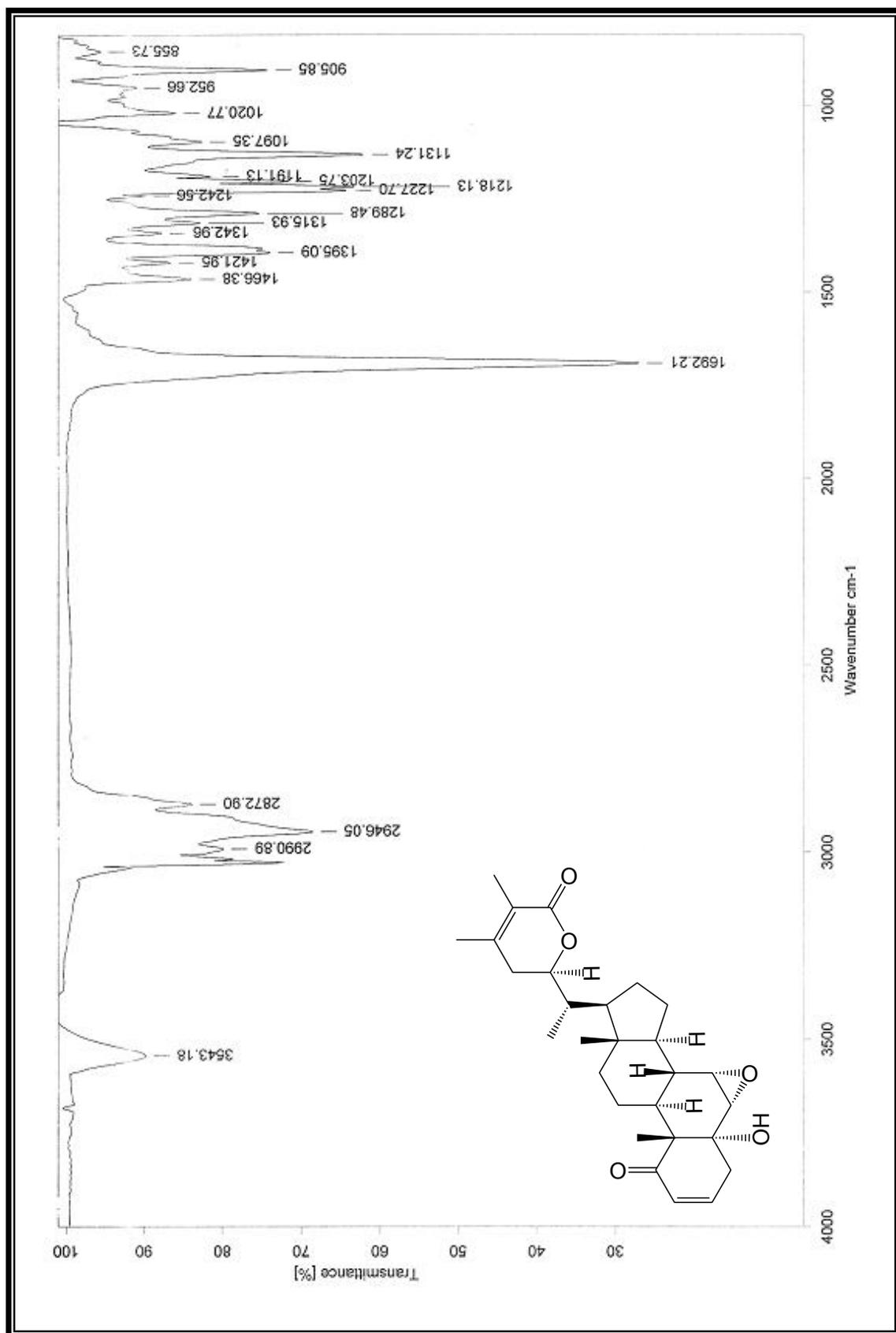
Espectro 12. RMN ^{13}C compuesto 4



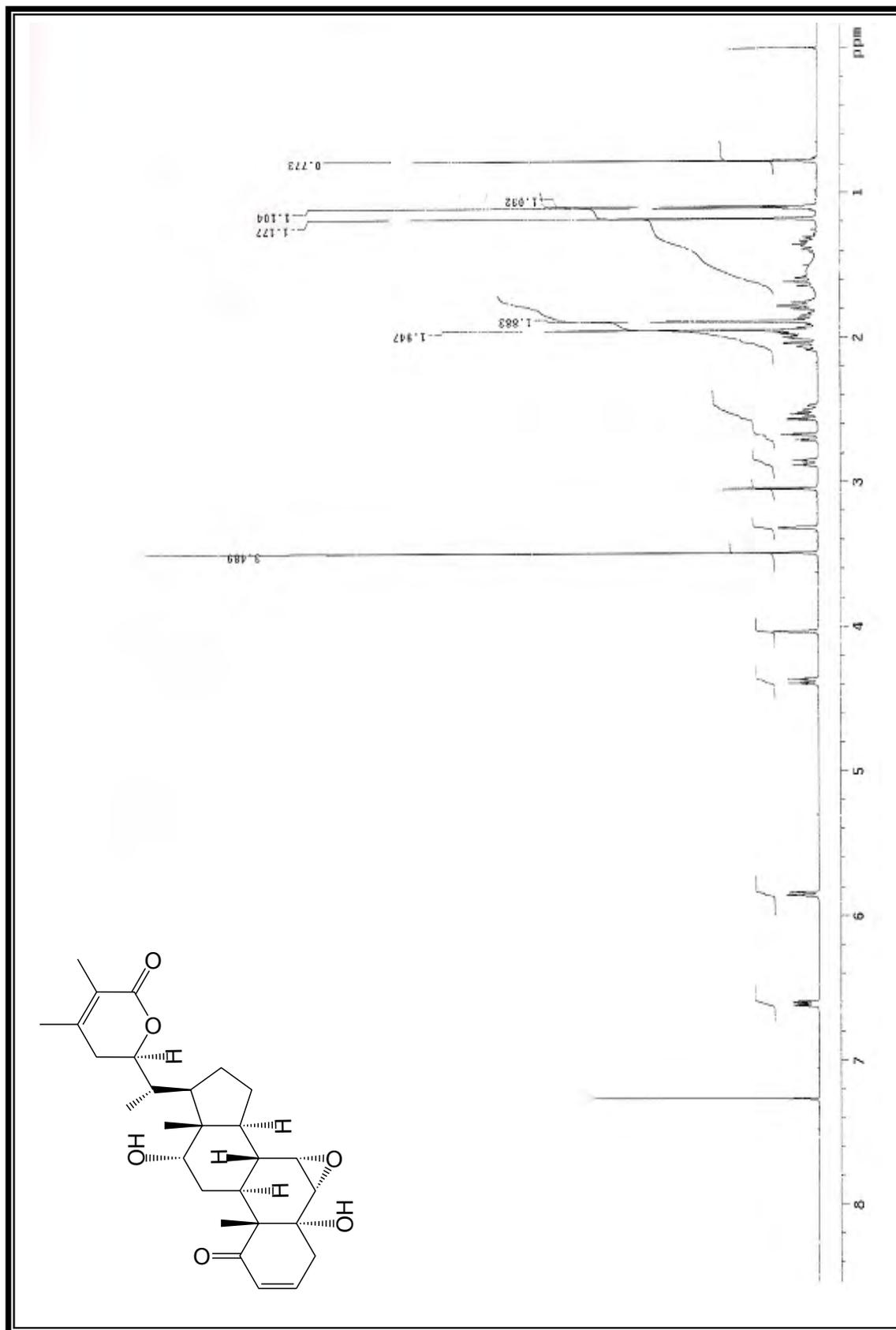
Espectro 13. IR compuesto 4

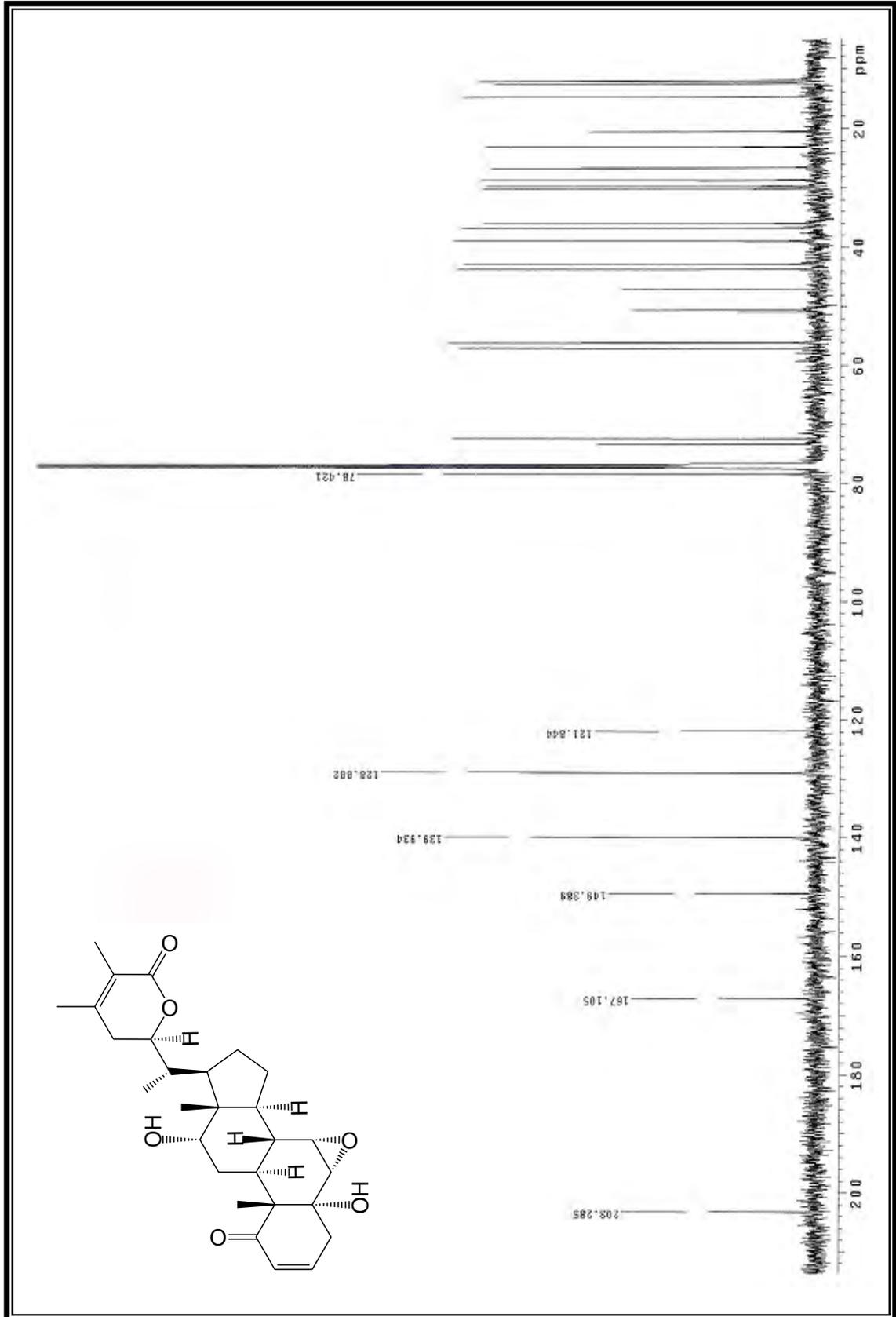
Espectro 14. RMN ^1H compuesto 5

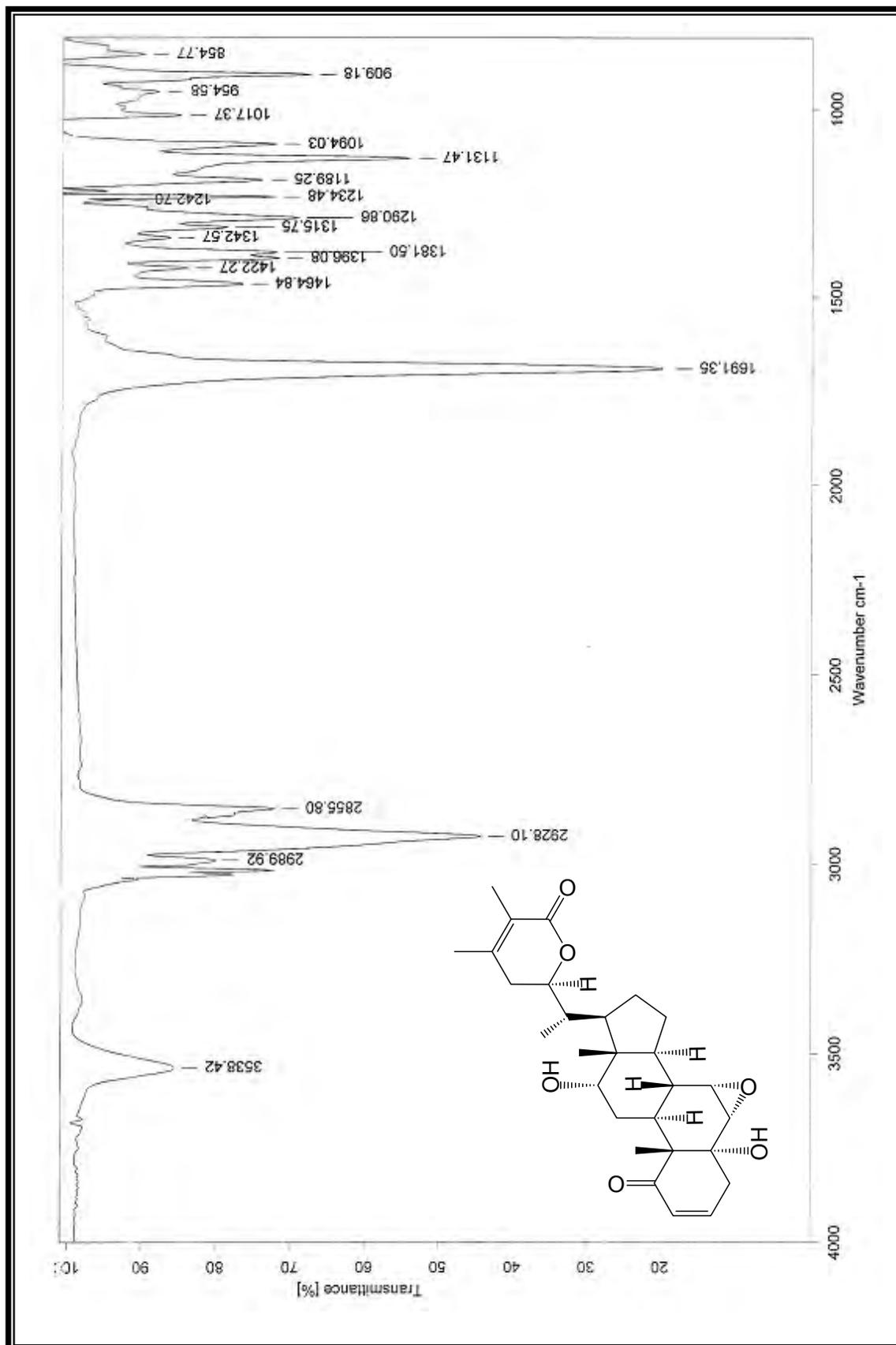
Espectro 15. RMN ^{13}C compuesto 5



Espectro 16. IR compuesto 5

Espectro 17. RMN¹H compuesto 6

Espectro 18. RMN ^{13}C compuesto 6



Espectro 19. IR compuesto 6