



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**WITHANÓLIDAS DE *Physalis angulata* L.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**NORMA ELIZABETH HURTADO MENDOZA**



**MÉXICO, D.F.**

**2014**



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:**                   **Profesor: Araceli Patricia Peña Álvarez**

**VOCAL:**                           **Profesor: Isabel del Carmen Rivero Cruz**

**SECRETARIO:**               **Profesor: Emma Maldonado Jiménez**

**1er. SUPLENTE:**               **Profesor: Mabel Clara Fragoso Serrano**

**2° SUPLENTE:**               **Profesor: Blas Flores Pérez**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 2-7, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES,  
INSTITUTO DE QUÍMICA.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

**ASESOR:**

-----  
**M. EN C. EMMA MALDONADO JIMÉNEZ**

**SUSTENTANTE:**

-----  
**NORMA ELIZABETH HURTADO MENDOZA**

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| ABREVIATURAS.....  | I  |
| 1. INTRODUCCIÓN.....   | 1  |
| 2. ANTECEDENTES.....   | 3  |
| 2.1 Familia Solanaceae.....  | 3  |
| 2.2 Género <i>Physalis</i> .....   | 4  |
| 2.3 Withaesteroides .....  | 5  |
| 2.3.1 Actividad Biológica de Withaesteroides.....  | 8  |
| 2.4 <i>Physalis angulata</i> L.....  | 9  |
| 3. OBJETIVO Y METAS.....   | 20 |
| 4. METODOLOGÍA.....  | 21 |
| 4.1 Material y Equipo.....   | 21 |
| 4.2 Material Vegetal.....  | 21 |
| 4.3 Obtención de Extractos.....  | 22 |
| 4.4 Aislamiento de Metabolitos.....  | 22 |
| 4.4.1 Aislamiento de Metabolitos de Cálices.....   | 22 |
| 4.4.2 Aislamiento de Metabolitos de Hojas, Ramas y Flores.....                                 | 23 |
| 4.5 Reacciones.....  | 24 |
| 4.5.1 Acetilación de physangúlida B.....   | 24 |
| 4.5.2 Acetilación de las aguas madres obtenidas de la cristalización de<br>physangúlida B..... | 24 |
| 4.6 Evaluación de la Actividad Citotóxica.....   | 25 |
| 4.7 Constantes Físicas y Espectroscópicas de los Compuestos<br>Obtenidos.....                  | 26 |
| 5. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....   | 27 |
| 5.1 Elucidación Estructural.....   | 27 |
| 5.1.1 Caracterización de physangúlida B.....   | 27 |
| 5.1.2 Caracterización de 4-O-acetilphysangúlida B.....   | 31 |
| 5.1.3 Caracterización de 4-O- acetil-24,25-epoxiwithanólida D.....                             | 32 |
| 5.1.4 Caracterización del acetónido de physangúlida.....                                       | 34 |
| 5.2 Actividad Biológica.....   | 40 |
| 6. CONCLUSIONES.....   | 41 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA.....   | 42 |
| 8. ANEXO.....  | 48 |

## ABREVIATURAS

|                |  |
|----------------|--|
| c              | Cuarteto   |
| CC             | Cromatografía en columna   |
| CCF            | Cromatografía en capa fina   |
| COSY           | Espectroscopia de correlación homonuclear (Correlated Spectroscopy)  |
| $\delta$       | Desplazamiento químico   |
| d              | Doblete  |
| DEPT           | Aumento sin distorsión de la transferencia de polarización (Distortionless Enhancement of Polarization Transfer)         |
| EM-IES         | Espectrometría de masas por la técnica de electrospray.  |
| EMAR-BAR       | Espectrometría de masas de alta resolución por la técnica de bombardeo con átomos rápidos                                |
| HMBC           | Espectroscopia bidimensional de correlación heteronuclear de múltiples enlaces (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) |
| HSQC           | Correlación heteronuclear cuántica simple (Heteronuclear Single Quantum Coherence)                                       |
| Hz             | Hertz  |
| IR             | Infrarrojo   |
| <i>J</i>       | Constante de acoplamiento  |
| m              | Multiplete   |
| MHz            | Mega hertz   |
| <i>m/z</i>     | Relación masa carga  |
| M <sup>+</sup> | Ión molecular  |
| NOESY          | Espectroscopia por efecto nuclear de Overhauser (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)                                 |
| RMN            | Resonancia Magnética Nuclear   |
| s              | Singulete  |
| t              | Triplete   |
| $[\alpha]_D$   | Rotación específica  |

## 1. INTRODUCCIÓN

Es muy cierto que las plantas siempre han estado ligadas a la vida del ser humano, ya que éste las ha utilizado como alimento, vestido y medicamento. Sobre todo en este último aspecto, se conoce de la utilización empírica de las plantas como agentes de la salud por diferentes culturas y desde tiempos muy remotos hasta la actualidad.

La utilización de las plantas en la medicina tradicional se ha transmitido de generación en generación a través del tiempo, aunque también mucho del conocimiento acerca de su uso se ha ido perdiendo. Lo anterior ha incrementado la importancia, tanto de preservar la información que existe sobre el uso de las plantas, como la de llevar a cabo estudios químicos y farmacológicos de las mismas; en particular el estudio de los compuestos que biosintetizan para descubrir si estos presentan las propiedades curativas que se le atribuyen a la planta o si, por el contrario, su uso puede resultar perjudicial. Lo anterior llevaría a una utilización de las plantas apoyada en bases científicas y podría incluso aumentar el número de especies útiles que se conocen actualmente, ya que sólo una pequeña parte de estos recursos son utilizados.

El estudio de los productos naturales de plantas se centra principalmente en el aislamiento y la elucidación de los metabolitos secundarios de la planta y en la búsqueda de facilitar dichos procesos se ha llegado al desarrollo de nuevas técnicas. Estas técnicas incluyen cromatografía, espectrometría de masas, espectroscopias de ultravioleta, infrarrojo, y muy especialmente, resonancia magnética nuclear, así como cristalografía de rayos X. En conjunto con el desarrollo de las nuevas tecnologías, en la actualidad existe un amplio conocimiento en lo que respecta a los metabolitos secundarios de las plantas, pero aún con el conocimiento que se tiene sobre éstos, el estudio de los mismos sigue muy vigente y seguirá por mucho tiempo debido a que en cada investigación se generan nuevos y diferentes conocimientos para ampliar la información ya existente.

En este contexto, cabe mencionar que México se encuentra en una situación privilegiada, ya que cuenta con una gran diversidad de especies vegetales, cuyo número se estima en alrededor de 23000, un número importante de las cuales (~ 400) corresponde a la familia Solanaceae. Sin embargo, los estudios químicos de esta familia en el país son escasos, por ello se ha emprendido el estudio de uno de sus géneros, el género *Physalis*. Los resultados que se presentan a continuación son parte de ese proyecto y corresponden al estudio químico de cálices, así como de hojas, ramas y flores de *Physalis angulata* L., una especie que se ha empezado a cultivar en el país.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Familia Solanaceae

Es una familia cosmopolita a la que se le reconocen 94 géneros, entre ellos el género *Physalis*. Esta familia se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales y templadas de todos los continentes, pero se concentra en Australia, Centro y Sudamérica, de donde son endémicos por lo menos 40 géneros. La gran abundancia de esta familia en América del Sur ha dado lugar a la hipótesis de que pudo originarse en este continente [1].

El número de especies que se le reconocen a las solanáceas varía entre 2000 y 3000. Estas plantas pueden ser herbáceas, arbustivas o arbóreas, muchas de ellas de gran interés etnobotánico porque son utilizadas como medicamentos, alimentos o plantas de ornato. Entre las solanáceas utilizadas en alimentación humana están plantas de los géneros *Solanum* (papa y berenjena), *Lycopersicum* (jitomate), *Capsicum* (chiles y pimientos) y *Physalis* (tomate de cáscara). Algunas solanáceas de los géneros *Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus* y *Nicotiana* son conocidas por su contenido de sustancias potencialmente tóxicas como atropina, escopolamina y nicotina que afectan el sistema nervioso central. Otras especies como *Cestrum diurnum* y *Solanum glaucophyllum* producen glicósidos calcinogénicos que son precursores de la vitamina D<sub>3</sub> y de sus derivados hidroxilados. Cuando los animales de pastoreo comen sus hojas se produce una intoxicación (Calcinosis enzoótica) caracterizada por la deposición de sales de calcio en tejidos blandos que conduce a un serio deterioro físico [2].

Por otra parte, la importancia de esta familia para la biodiversidad del país se puede ver reflejada en un estudio reciente sobre las solanáceas en el estado de Jalisco, que dio como resultado el registro de 138 especies y 140 taxones de la familia Solanaceae agrupadas en 20 géneros. Los géneros con el mayor número de especies son *Solanum* (55 especies), *Physalis* (35), *Cestrum* (10) y *Lycianthes* (9).



Estas especies habitan con más frecuencia en bosque de pino y encino (81 especies), seguido de bosque tropical subcaducifolio (57), bosque tropical caducifolio (54) y bosque mesófilo de montaña (43). En áreas perturbadas y vegetación ruderal crecen 51 especies. Existen además cinco especies endémicas de Jalisco como *Lycianthes jalicensis*, *Physalis lignesens*, *P. longipedicellata*, *P. longiloba* y *P. tamayoi*. Lo anterior hace de Jalisco la cuarta entidad más rica en especies de Solanaceae en México, después de Oaxaca, Chiapas y Veracruz [3].

## 2.2 Género *Physalis*

El género *Physalis* incluye alrededor de 90 especies que se han agrupado tentativamente en 4 subgéneros (*Physalis*, *Physalodendron*, *Quincula* y *Rydbergis*). El género se reconoce fácilmente por su cáliz fructífero acrescente que envuelve la baya. Los géneros como *Chamaesaracha*, *Leucophysalis*, *Deprea* y *Larnax* comparten este carácter, pero difieren en la forma de la corola [4].

La forma de vida de *Physalis* puede ser de tres tipos 1) hierbas anuales (ej. *P. missouriensis*), 2) rizomatosa perennes (ej. *P. cinerascens*) y 3) arbustivas o arborescentes perennes (ej. *P. coztomatl* y *P. arborescens*). Las especies de *Physalis* varían en su tamaño desde pocos centímetros hasta dos metros de alto. Los frutos de *Physalis* son bayas con abundantes semillas. El color de las bayas maduras varía de verde-amarillo a naranja o púrpura [4].

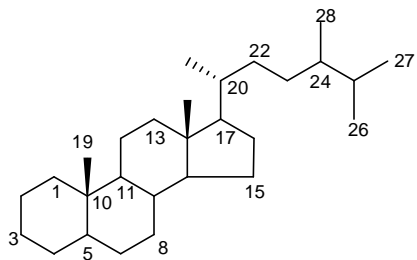
En México, el consumo de frutos de especies del género *Physalis* se remonta hasta la época precolombina cuando se les conocía con el nombre de *tomatl* que significa “fruto gordo”. Entre estos frutos se encuentra *Physalis philadelphica* que es el tomate verde o tomate de cáscara, que en el México actual se sigue consumiendo, principalmente en forma de salsas, y es uno de los cultivos de hortalizas más importantes del país [5]. Sin embargo, se sabe que se consumen los frutos de al menos otras 16 especies silvestres de *Physalis* entre ellos los de *Physalis angulata*

L. y *Physalis peruviana*; la primera ya se cultiva en Jalisco y sus frutos tienen un valor comercial mayor que los de *P. philadelphica* [4].

Muchas especies de *Physalis* se usan en la medicina popular para tratar diferentes padecimientos, ya sea con sus frutos, cálices, hojas o raíces. Por ejemplo, la raíz de *P. philadelphica* se utiliza en Hidalgo para el dolor de estómago, el fruto se usa en el Edo. de México para la calentura, las hojas de *P. nicandriodes* se emplean para baños post-parto en Morelos y las hojas de *P. pubescens* en el Edo. de México se utilizan para tratar heridas [6]. En Taiwan *P. angulata* L. es utilizada como antiinflamatorio y diurético [7], y en Perú, *P. peruviana* se emplea para tratar cáncer, hepatitis, asma, malaria y dermatitis [8]. En cuanto a su química, el género *Physalis* produce diferentes tipos de metabolitos tales como flavonoides, diterpenos, acilsacarosas y withaesteroides de diversos tipos, siendo los últimos los más característicos del género [9,10].

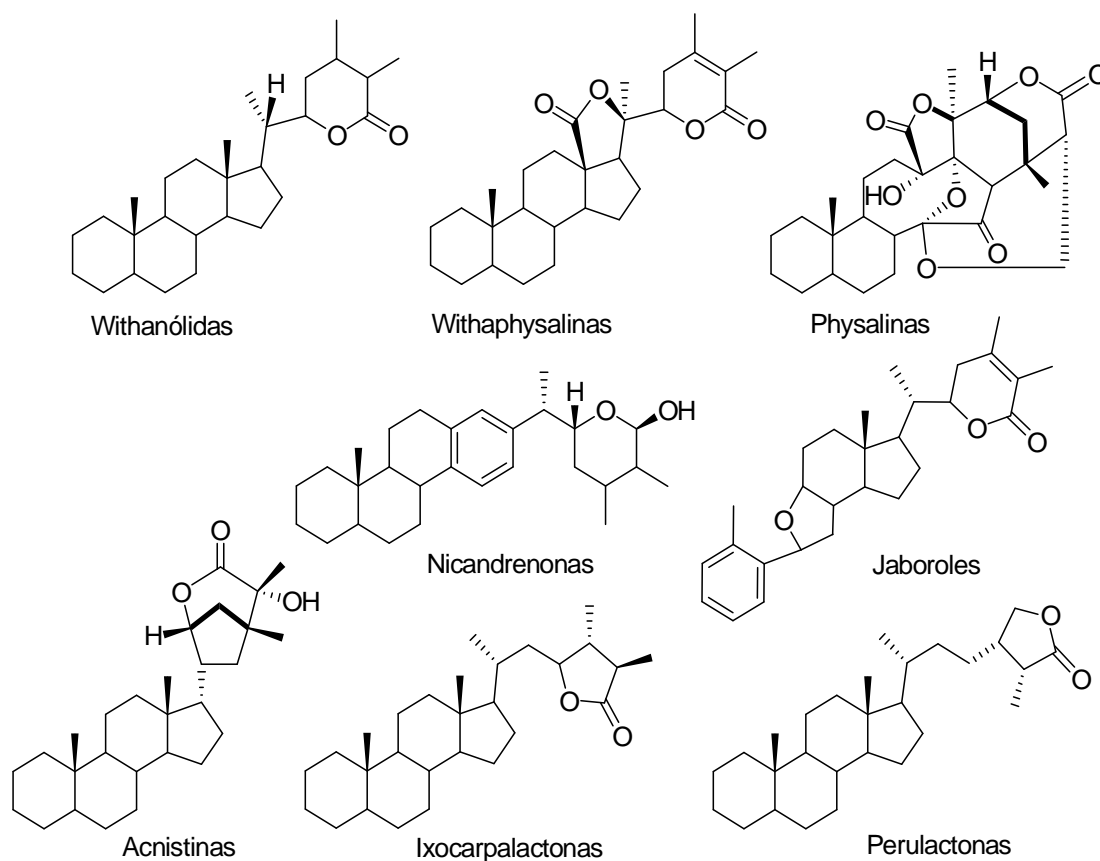
### 2.3 Withaesteroides

A partir del aislamiento de withaferina A de una solanácea medicinal (*Withania somnifera*), se empezaron a aislar compuestos con estructuras análogas, es decir, con un esqueleto de tipo ergostano (Figura 1), cuya cadena lateral contiene una  $\delta$ -lactona. A estos compuestos se les llamo withanólidas. Al paso del tiempo se aislaron compuestos que no cumplían estrictamente con las características de las withanólidas, pero presentaban estructuras muy relacionadas, por lo que para incluirlas en el grupo se propuso el nombre de Withaesteroides [11,12].



**Figura 1. Esqueleto de ergostano.**

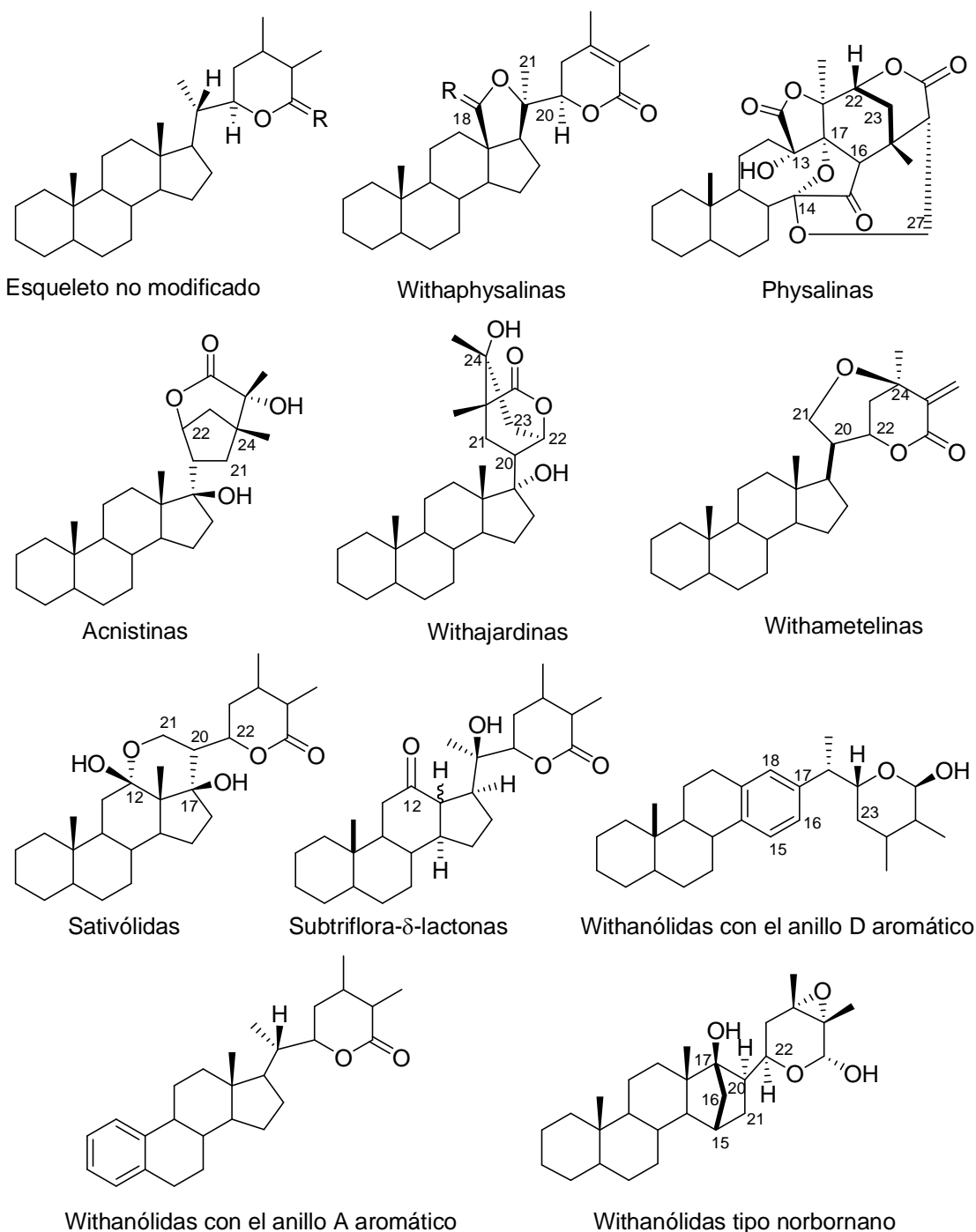
Así, dentro de los withaesteroides se agrupan aquellos compuestos esteroideos con un esqueleto de ergostano, que puede estar o no modificado, y en el cual C-22 o C-23 y C-26 se oxidan para formar una  $\delta$  o  $\gamma$ -lactona. Estos compuestos son generalmente polioxigenados, y esto ha dado lugar a diferentes modificaciones tanto del esqueleto carbocíclico, como de la cadena lateral. Lo anterior ha resultado en compuestos con diferentes características estructurales clasificados como withanólidas, withaphysalinas, physalinas, ixocarpalactonas, perulactonas, y acnistinas, entre otras (Figura 2) [12].



**Figura 2. Tipos de withaesteroides.**

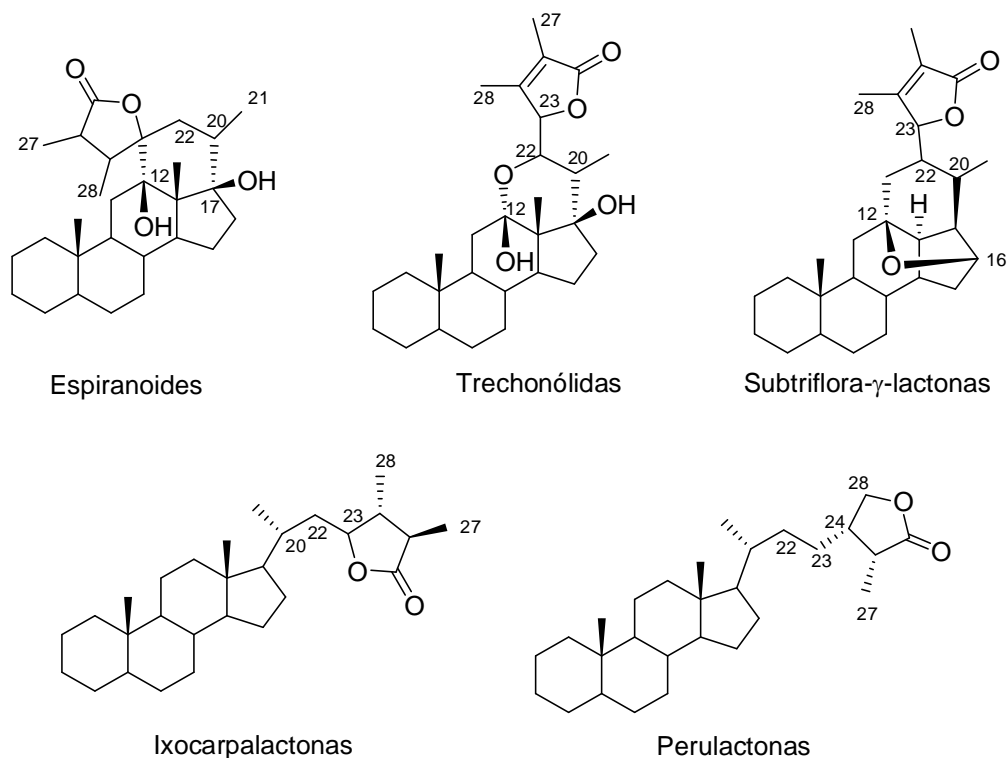
Sin embargo, en otra clasificación de estos compuestos, en la cual se les sigue llamando withanólidas, las clasifican en dos grupos principales, withanólidas con  $\delta$ -lactona o  $\delta$ -lactol en la cadena lateral (grupo A) y aquellas con  $\gamma$ -lactona en la cadena lateral (grupo B). La mayoría de las withanólidas pertenecen al grupo A, el

cual se divide en 11 subgrupos: withanólidas con esqueleto sin modificar, withaphysalinas, physalinas, acnistinas, withajardinas, withametelinas, sativólidas, subtriflora- $\delta$ -lactonas, withanólidas con el anillo-D aromático, withanólidas con el anillo-A aromático y withanólidas tipo norbornano (Figura 3) [13].



**Figura 3. Withanólidas pertenecientes al grupo A.**

En el grupo B la presencia de una función oxigenada en C-23 permite la formación de una  $\gamma$ -lactona en la cadena lateral. Estas withanólidas se dividen en cinco subgrupos: espiranoides, trechonólidas, subtriflora- $\gamma$ -lactonas, ixocarpalactonas y perulactonas (Figura 4) [13].



**Figura 4. Withanólidas pertenecientes al grupo B.**

Las withanólidas o withaesteroides se han aislado de 18 géneros pertenecientes a la familia Solanaceae, subfamilia *Solanoideae*. Además de la familia Solanaceae, se han encontrado withanólidas, así como compuestos estrechamente relacionados en las familias Leguminosae (*Cassia siamea*), Lamiaceae (*Ajuga parviflora*), Taccaceae (*Tacca plantaginea* y *T. chantrieri*) [13].

### 2.3.1 Actividad Biológica de Withaesteroides

Los withaesteroides están presentes en algunas plantas conocidas por su uso en la medicina tradicional para tratar padecimientos como heridas, granos y verrugas en la piel, paperas, inflamación, amigdalitis, diarrea y diabetes, entre otros [6]. El amplio

rango de actividades farmacológicas que presentan estos esteroides se atribuye a su diversidad estructural [14]. Así, diferentes estudios han demostrado que estos compuestos presentan actividad antitumoral, antiestrés, antibacteriana, antitripanosómica, anti-inflamatoria, citotóxica, inmunosupresora, tripanocida, inmunomoduladora, así como inductora de la actividad de quinona reductasa, entre otras [15]. De hecho la actividad antimicrobiana de la primera withanólida aislada, withaferina A, fue descrita en 1956 antes de que su estructura fuera totalmente elucidada [14].

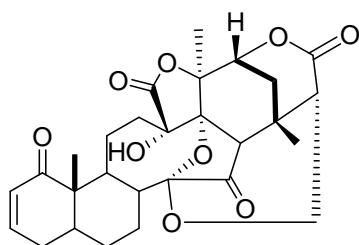
#### 2.4 *Physalis angulata* L.

*Physalis angulata* es una especie nativa de América que fue introducida en el Viejo Mundo. Es un arbusto ramificado que se utiliza en la medicina popular de varios países para el tratamiento de malaria, asma, hepatitis, reumatismo y como diurético, antimicobacteriano, antileucémico y antipirético. En China se conoce como "Kuzhi" y es utilizado en la medicina tradicional como antiinflamatorio, antitusivo, antipirético, diurético y antitumoral. En Taiwan se usan sus extractos para el tratamiento de tumores, y la infusión para tratar inflamación del hígado y malaria [7].

Sus usos parecen estar sustentados en los resultados de estudios farmacológicos de extractos y withaesteroides obtenidos de esta planta, los cuales han mostrado actividad tripanocida, inmunosupresora, bactericida y citotóxica [15-17]. A la fecha se han realizado numerosos estudios fitoquímicos de esta especie, los cuales han dado como resultado el aislamiento de una amplia variedad de withaesteroides, glicósidos de flavonoide y alcaloides. Estos resultados se presentan cronológicamente a continuación.

El primer estudio de *P. angulata* se realizó en la India en 1970, y condujo al aislamiento de physalina B y 5,6-dihidrophysalina B [18]. Otro grupo de la India, en colaboración con investigadores japoneses analizaron poblaciones de invernadero de *P. angulata* y *P. lancifolia* y encontraron una composición similar en ambas

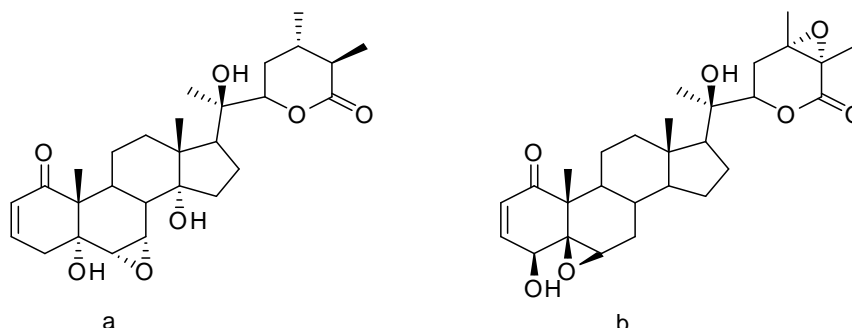
especies; de las hojas de *P. angulata* aislaron las physalinas B, F, y E y de los tallos, las physalinas B, F, H, I y E, mientras que de *P. lancifolia* aislaron las physalinas B, F, G y E de tallos y también de las partes aéreas. Se elucidaron las estructuras de las physalinas E y H [19]. En un trabajo posterior del mismo grupo [20], se determinaron las estructuras de las physalinas F y J. Cabe mencionar que *P. lancifolia* se considera un sinónimo de *P. angulata* [21]. En un tercer trabajo de este grupo sobre las mismas especies se describe la elucidación estructural de las physalinas D, I, G y K [22].



- B**  $\Delta^5$
- D** 5 $\alpha$ -OH, 6 $\beta$ -OH
- E** 5 $\alpha$ -OH, 7 $\alpha$ -OH
- F** 5 $\beta$ ,6 $\beta$  epoxy
- G**  $\Delta^4$ , 6 $\alpha$ -OH
- H**  $\Delta^5$ , 7 $\beta$ -OH
- I** 5 $\alpha$ -OMe, 6 $\beta$ -OH
- J** 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxi
- K** 4 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -epoxi, 6 $\alpha$ -OH
- DpB**  $\Delta^5$ , 5 $\alpha$ -OEt, 6 $\beta$ -OH

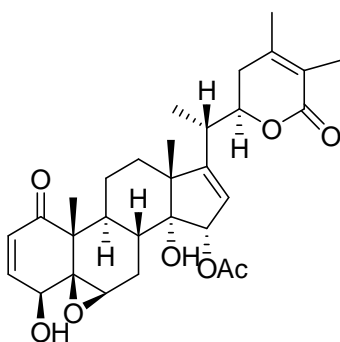
**Figura 5. Estructuras de las physalinas B, D-K y 5,6-dihidrophysalina B (DpB).**

En Uzbekistán, Rusia, se llevó a cabo un estudio de *Physalis angulata* L. que dio como resultado el aislamiento de dos nuevos withaesteroides provenientes de las partes epigeas de la planta. A los compuestos se les dio el nombre de 14 $\alpha$ -hidroxixocarpanólida y 24 $\alpha$ ,25 $\alpha$ -epoxiwithanólida D [23].



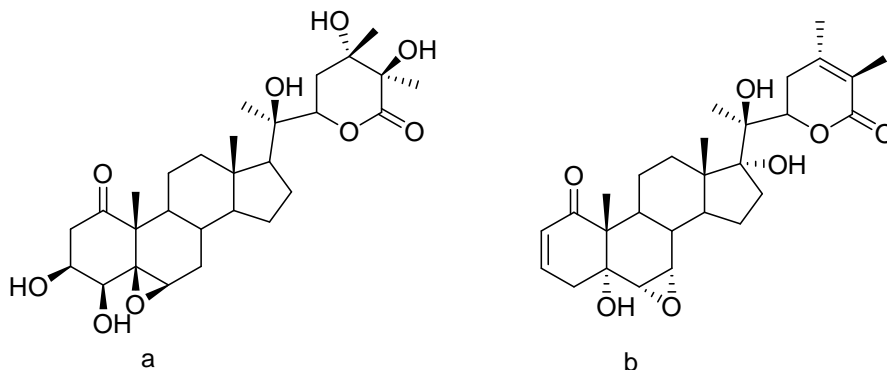
**Figura 6. Estructuras de 14 $\alpha$ -hidroxiixocarpanólida (a) y 24 $\alpha$ ,25 $\alpha$ -epoxiwithanólida D (b).**

Con el fin de aislar compuestos con propiedades antitumorales se investigó una población de *P. angulata* colectada en Taiwan, China. Como resultado se aisló withangulatina A del extracto de MeOH de la planta. Este compuesto actúa sobre la enzima topoisomerasa II para inducir, *in vitro*, daño en DNA mediado por la enzima [24].



**Figura 7. Estructura de withangulatina A.**

En 1991, el grupo de investigadores de Uzbekistán, aisló, de la misma población de su primer estudio de *P. angulata*, pero en esta ocasión de las hojas, un nuevo withaesteroide al que llamaron physangúlida. Los autores describen a este compuesto como la primera 22*S*-withanólida natural [25]. En un estudio posterior el mismo grupo aisló withanólida T de las hojas de *P. angulata*. Además, con base en estudios de dicroísmo circular, los autores confirmaron la configuración *S* en C-22 de la physangúlida [26].

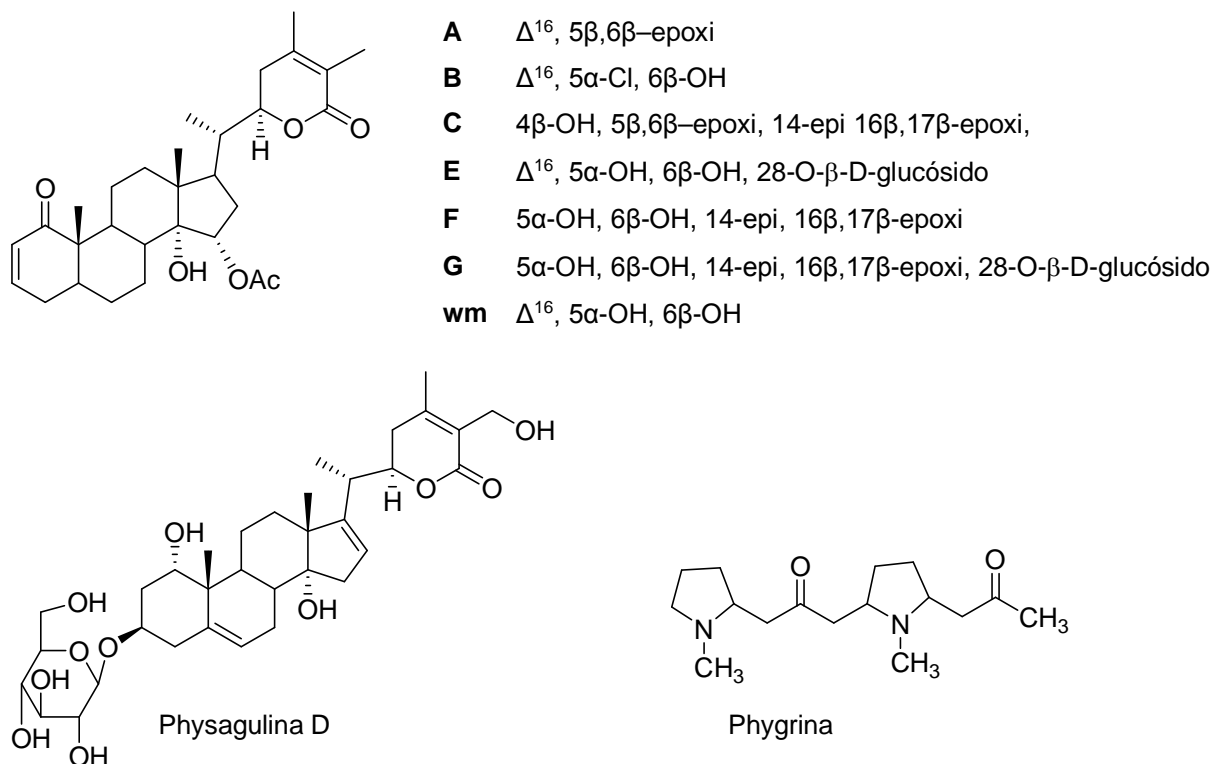


**Figura 8. Estructuras de physangúlida (a) y withanólida T (b).**



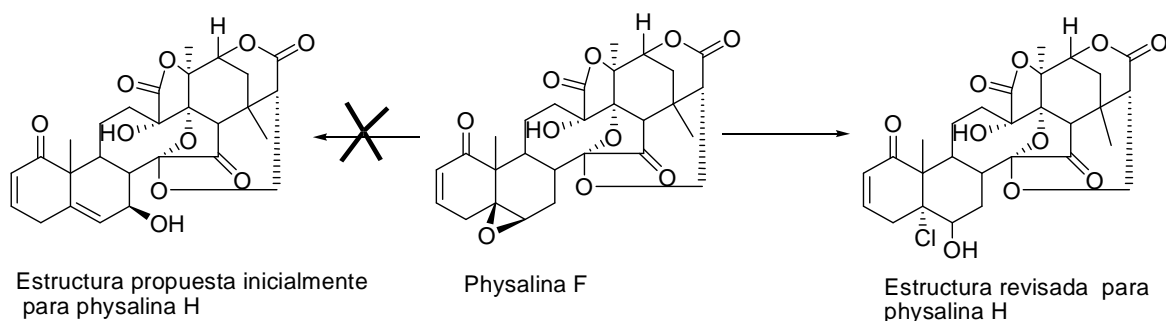
En ese mismo año, un estudio del extracto de metanol de hojas y tallos frescos de *P. angulata* L. resultó en el aislamiento de una nueva withanólida a la que se denominó physagulina C. El material vegetal que se investigó provino de un cultivo en el jardín botánico de una universidad de Japón [27]. Posteriormente y del material botánico anterior, se aislaron junto con physagulina C, tres nuevas withanólidas, las physagulinas A, B y D, además de withangulatina A y withaminimina aislada previamente de *P. minima*. La elucidación estructural de las nuevas physagulinas se publicó en 1992 [28]. Estos autores también analizaron los frutos obtenidos de la misma colecta y de ellos se aislaron las nuevas physagulinas E, F y G. Las physagulinas E y G fueron las primeras withanólidas de naturaleza glicosídica, con un resto de glucosa en C-28 [29].

En una publicación de 1992 se menciona que el alcaloide phygrina está presente en varias especies de *Physalis*, entre ellas *P. angulata* [30].



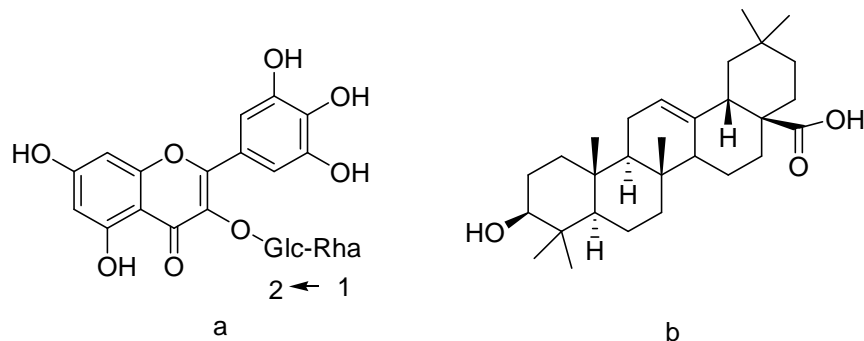
**Figura 9. Estructuras de las physagulinas A-G, withaminimina (wm) y phygrina.**

En 1995 se publicó la corrección de la estructura de la physalina H, cuando este compuesto se obtuvo de forma inesperada mediante el tratamiento de physalina F con HCl, y la estructura propuesta para physalina H (Figura 5) no explicaba esta transformación, es decir un grupo 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxi no formaría las funcionalidades 2,5-dien-7 $\beta$ -hidroxi pero si la clorhidrina (5 $\alpha$ -Cl, 6 $\beta$ -OH) propuesta en este trabajo. En esta investigación también se establece que la physalina E aislada anteriormente [19] es en realidad physalina D [31].



**Figura 10. Revisión de la estructura de physalina H.**

En 2001 se publicó el aislamiento y la elucidación estructural del nuevo flavonoide 3-O-neohesperidósido de miricetina (Figura 11), aislado de las hojas de *P. angulata*. Este compuesto resultó muy activo contra las líneas celulares de cáncer P-388 (leucemia murina), KB-16 (carcinoma epidermoide nasofaríngeo) y A-549 (adenocarcinoma), con DE<sub>50</sub> de 0.048, 0.50 y 0.55  $\mu$ g/mL, respectivamente [32].



**Figura 11. Estructuras de 3-O-neohesperidósido de miricetina (a) y ácido oleanólico (b).**

En el año 2002, se describe el aislamiento del ácido oleanólico. Este es el único reporte de un triterpeno en *Physalis*, sin embargo cabe mencionar que el material usado para este estudio fue comprado en un mercado de Indonesia [33].

Posteriormente, en 2004, fue publicado otro estudio de partes aéreas de *P. angulata* cultivada en el jardín botánico de la universidad Fukuoka de Japón, esta vez en busca de constituyentes con actividad tripanocida. En esta ocasión se aislaron seis withanólidas ya conocidas (physagulina A, B, C y F, withangulatina A y withaminimina) y cuatro nuevas, las physagulinas H – K. De los compuestos aislados aquellos con un grupo 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxi o 5 $\alpha$ -Cl, 6 $\beta$ -OH mostraron actividad tripanocida *in vitro* contra epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, su actividad fue más alta contra tripomastigotes que contra epimastigotes, lo que sugiere su potencialidad como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del mal de Chagas [17].

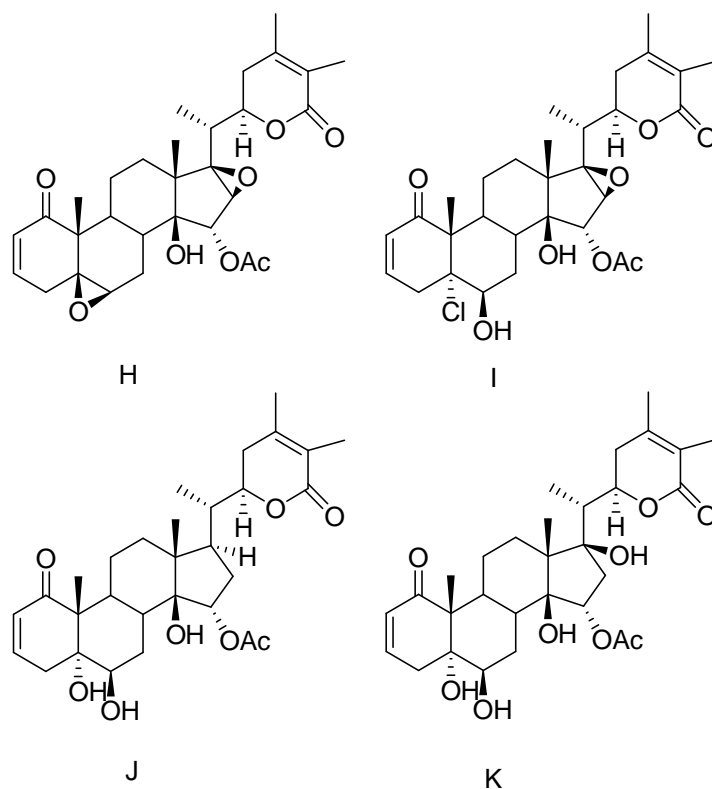
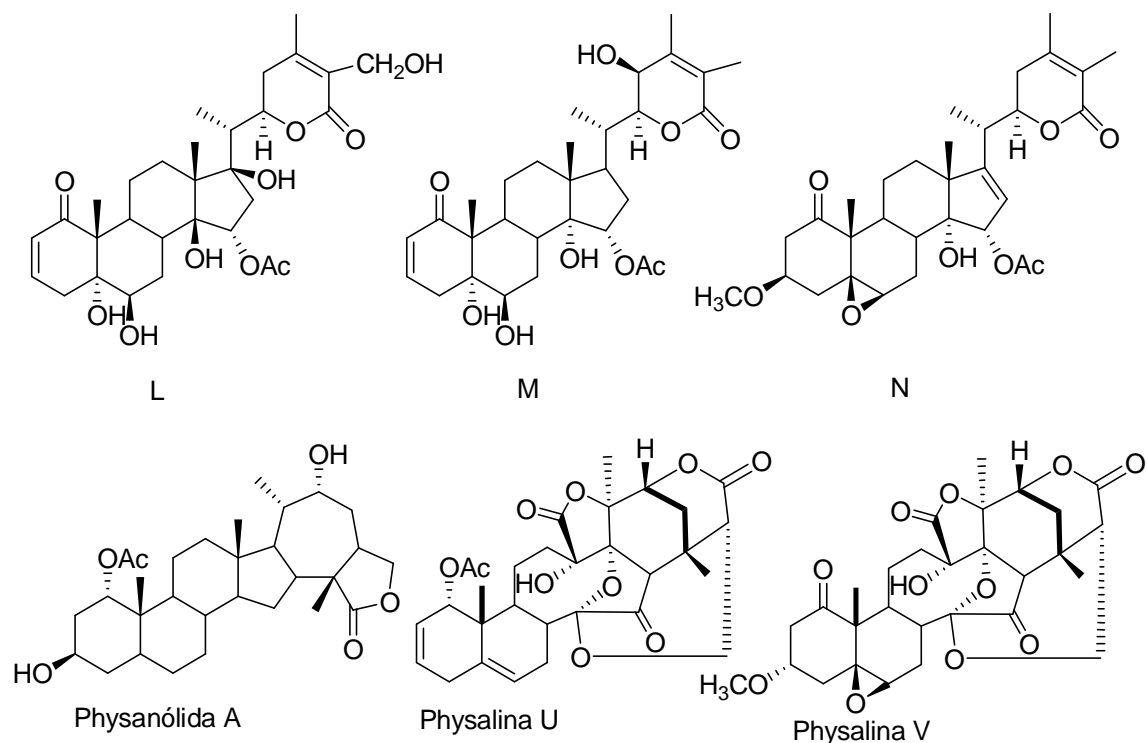


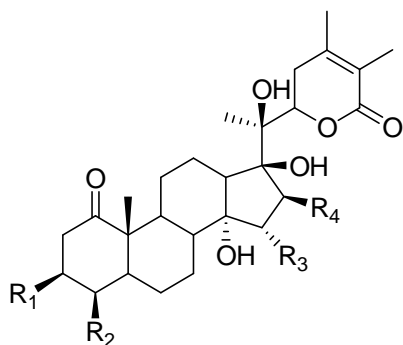
Figura 12. Estructuras de las physagulinas H-K.

En el 2006, se publicaron los resultados de la investigación de otro lote de *P. angulata* de igual procedencia que el último mencionado. En esta ocasión se aislaron tres nuevas withanólidas, designadas con los nombres de physagulinas L, M y N, además de dos compuestos conocidos, physagulina D, y 3-O-ramnosil-(1→6)-galactósido de quercetina. Se evaluó la actividad tripanocida de las nuevas physagulinas, pero ésta resultó muy débil [34]. En este mismo año en China se estudió otro lote de *P. angulata* recolectada en Taiwán. En este caso, la planta entera fue extraída con MeOH y de la fracción soluble en CHCl<sub>3</sub> del extracto se aisló la nueva withanólida, physanólida A, que presentó un esqueleto sin precedentes. Se aislaron también dos nuevas physalinas (U y V), junto con otras siete physalinas (B, D, F, G, I, J y T) ya conocidas (Figura 13). Ocho de los compuestos fueron sometidos a ensayos de citotoxicidad contra varias líneas celulares de cáncer, de éstos, solo las physalinas B, D, F, J y U mostraron una actividad significativa. La physalina F mostró la actividad citotóxica más importante (CI<sub>50</sub> 0.3-1.9 µg/mL) seguida de las physalinas B y D [35].

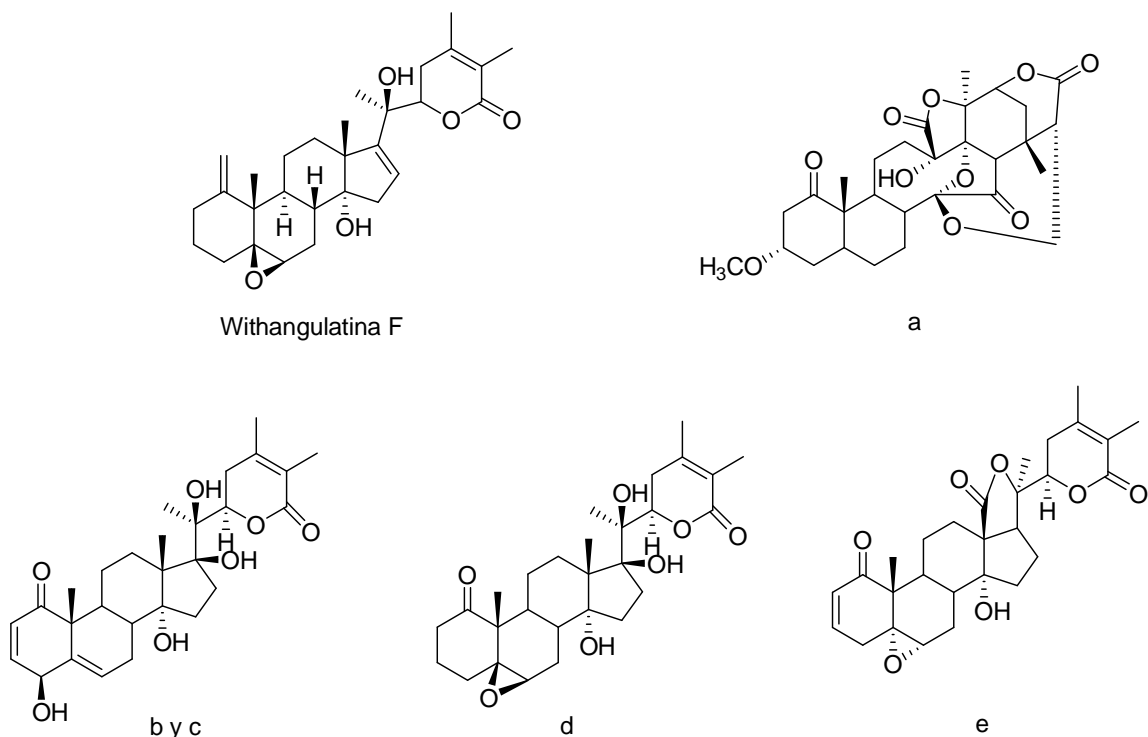


**Figura 13. Estructuras de las physagulinas L, M y N, physanolida A y physalinas U y V.**

En 2007 se publicaron los resultados del estudio de una población de *P. angulata* L. recolectada en Taiwan, China [15]. Esta vez se analizaron las fracciones solubles en  $\text{CHCl}_3$  y en BuOH del extracto de MeOH de toda la planta. Se aislaron siete nuevas withanólidas, las withangulatinas B–H, una nueva physalina, la physalina W, además de 14 compuestos conocidos (physalinas B, D, F, G, I, J, T, U y V, physapruina A, withaphysanólida, physanólida A, dihidrowithanólida E y withaphysalina A) (Figura 14). Cabe mencionar que las estructuras asignadas a physapruina A y withaphysanólida [36] son idénticas, aunque se dice que ambas se aislaron en este estudio. De los estudios de citotoxicidad que realizaron a 10 de los compuestos aislados concluyeron que, como se había propuesto previamente, la presencia de una  $4\beta$ -hidroxi-2-en-1-ona, así como de un grupo  $5\beta,6\beta$ -epoxi son importantes para la actividad biológica de las withanólidas [15].



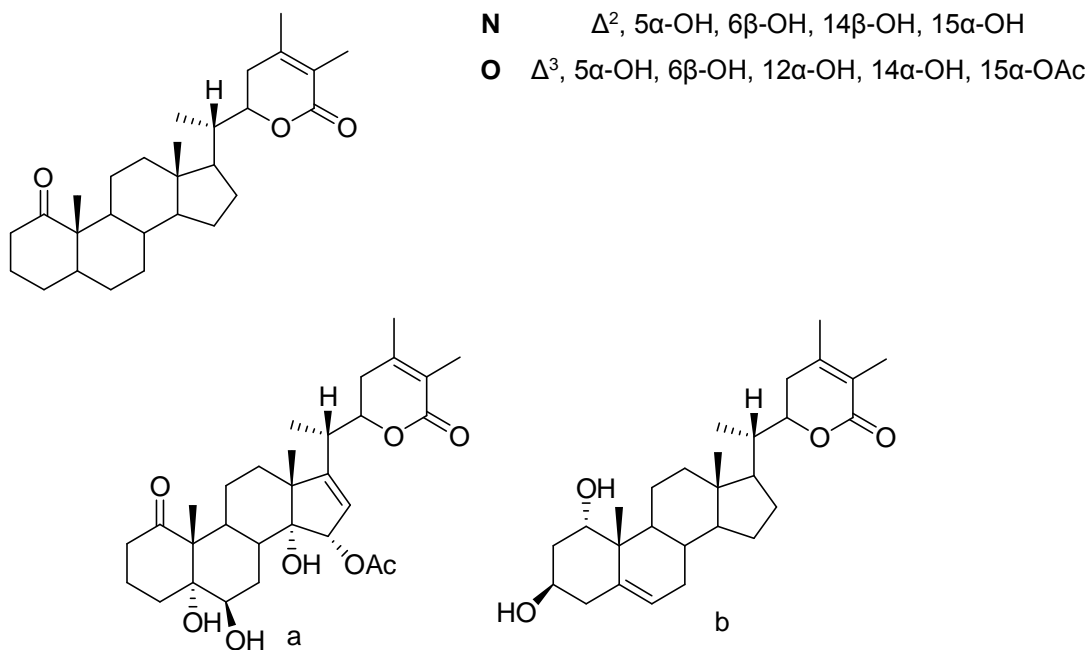
|          |  | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub>   | R <sub>4</sub> |
|----------|--|------------------|------------------|------------------|----------------|
| <b>B</b> | $\Delta^2$ , $5\beta$ , $6\beta$ -epoxi  | H                | OH               | OH               | H              |
| <b>C</b> | $5\beta$ , $6\beta$ -epoxi               | H                | OH               | OCH <sub>3</sub> | H              |
| <b>D</b> | $5\alpha$ -OH, $6\beta$ -OH              | H                | OH               | OCH <sub>3</sub> | H              |
| <b>E</b> | $5\beta$ , $6\beta$ -epoxi               | H                | OCH <sub>3</sub> | H                | H              |
| <b>G</b> | $\Delta^2$ , $5\alpha$ -OH, $6\beta$ -OH | H                | OH               | H                | OH             |
| <b>H</b> | $5\beta$ , $6\beta$ -epoxi               | OCH <sub>3</sub> | H                | H                | OH             |



**Figura 14. Estructuras de withangulatinas B – H, physalina W (a), physapruina A (b), withaphysanolida (c), dihidrowithanolida E (d) y withaphysalina A (e).**

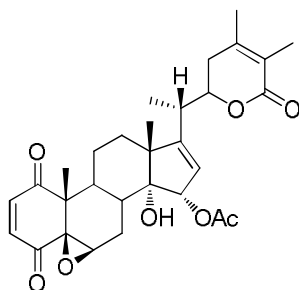
En ese mismo año se realizó el estudio químico del extracto de MeOH de las partes aéreas de *P. angulata* L. recolectadas en Nanchuan, China. El resultado fue el aislamiento de once compuestos, siete de ellos previamente identificados, withangulatin A, physagulinas B, D, J y K, withaminimina y pubescenólida, y cuatro nuevas physagulinas, L–O (Figura 15). Los once compuestos aislados se sometieron a ensayos contra líneas celulares de cáncer colorrectal (HCT-116) y de pulmón (NCI-H460). Withagulatina A y physagulina B presentaron actividad significativa; physagulina L y M una actividad moderada y los demás compuestos resultaron ser inactivos [37]. Cabe mencionar que estas physagulinas L, M y N son diferentes a las reportadas en el estudio anterior con los mismos nombres [34], solo que se publicaron casi simultáneamente.

|          |  |
|----------|--|
| <b>L</b> | $\Delta^{2,4}$ , 6 $\alpha$ -OH, 14 $\alpha$ -OH, 15 $\alpha$ -Oac |
| <b>M</b> | $\Delta^{2,4}$ , 6 $\alpha$ -OH, 14 $\beta$ -OH, 15 $\alpha$ -Oac  |



**Figura 15. Estructuras de physagulinas L-O, withaminimina (a) y pubescenólida (b).**

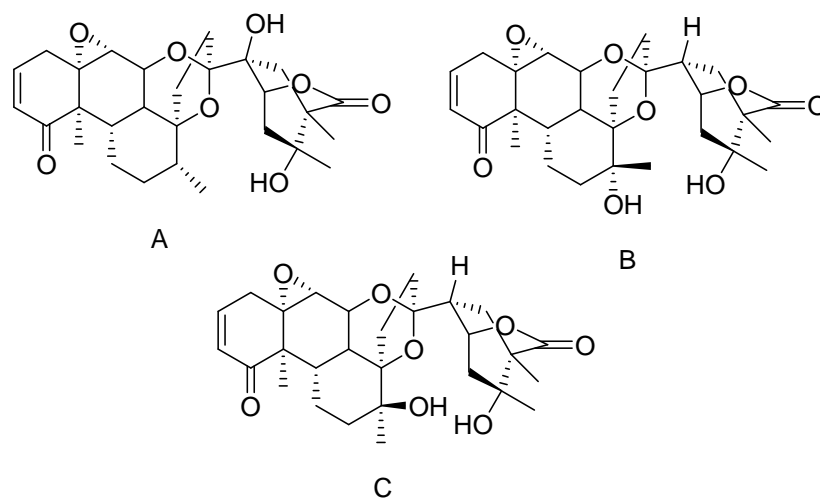
En el año 2008 se publicó el aislamiento de una nueva withanólida denominada withangulatina I (Figura 16), a partir del extracto de MeOH de la planta entera procedente de Taiwan, China. En la evaluación de su actividad citotóxica *in vitro* contra carcinoma colorrectal humano y carcinoma gástrico humano mostró una actividad escasa con  $Cl_{50}$  de  $53.6 \pm 0.5$  y  $65.4 \pm 4.2$   $\mu$ M, respectivamente [7].



**Figura 16. Estructura de withangulatina I.**

Como parte de un programa de búsqueda de productos naturales bioactivos de las plantas de la selva tropical amazónica, se colectó *P. angulata* en el Departamento de Amazonas, Perú. El fraccionamiento biodirigido del extracto de EtOH de las

partes aéreas de la planta condujo al aislamiento de tres nuevas withanólidas, las physangulidinas A, B y C (Figura 17). Estos compuestos presentan un nuevo esqueleto resultante de la ruptura del enlace entre C-13 y C-17 y la formación de un enlace C-C entre C-21 y C-25. Adicionalmente, las tres nuevas withanólidas mostraron actividad antiproliferativa contra dos líneas celulares de cáncer. La más activa fue physangulidina A [38].



**Figura 17. Estructuras de las physangulidinas A, B y C.**



### 3. OBJETIVO Y METAS

Objetivo:

- Incrementar el conocimiento sobre la composición química de la flora mexicana, en particular la del género *Physalis*, a través del estudio químico de la especie *Physalis angulata* L.

Metas:

- Aislar el mayor número de los metabolitos secundarios presentes en *Physalis angulata* L.
- Elucidar la estructura química de los metabolitos secundarios aislados.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Material y Equipo

Para determinar los puntos de fusión se utilizó un aparato de Fisher-Johns. Para la CC operadas con vacío se utilizó como fase estacionaria sílica gel (Macherey Nagel G). Para las CCF se utilizaron cromatofolios Alugram Sil G/UV<sub>254</sub> de 0.25 mm. Se utilizó como revelador sulfato cérico al 3% en ácido sulfúrico 2N y/o lámpara de UV Spectroline modelo CX-20 ( $\lambda$  254 y 366 nm). Los espectros de RMN fueron determinados en espectrómetros Varian Unity Plus (500 MHz <sup>1</sup>H y 125.7 MHz <sup>13</sup>C) y Varian XR-300 (300 MHz <sup>1</sup>H y 75 MHz <sup>13</sup>C). Los espectros de infrarrojo se determinaron en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27. La rotación óptica, se determinó en un polarímetro Perkin Elmer 343. Los espectros de masas obtenidos por la técnica IES (electrospray), fueron adquiridos en un equipo Bruker Daltonics Esquire 6000, y los obtenidos por la técnica BAR en un espectrómetro JEOL JMS SX 102 A.

### 4.2 Material Vegetal

Las partes aéreas de *Physalis angulata* L. proceden de un cultivo en los terrenos del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Guadalajara, Jalisco, de donde fueron recolectadas el 4 de junio de 2012. Un ejemplar de la planta se depositó en el Herbario de la Universidad Autónoma de Querétaro y fue identificado por la Dra. Mahinda Martínez (Mahinda Martínez 8766). Del material vegetal se separaron los cálices, los frutos y el resto de las partes aéreas (hojas, ramas y flores). Los cálices, así como las hojas, ramas y flores, se dejaron secar a la sombra. Los frutos se congelaron a  $-20$  °C.

### 4.3 Obtención de Extractos

Los cálices secos (59.25 g), se maceraron con una mezcla de cloroformo-metanol (7:3), 3 veces por 12 horas y 3 veces por 4 horas. Después de evaporar los disolventes en un rotavapor se obtuvieron 10.23 g del extracto.

Las hojas, ramas y flores se molieron en un molino, el polvo obtenido (266.8 g), se colocó en una columna de vidrio donde se extrajo con acetona, y posteriormente con metanol. Después de eliminar los disolventes por destilación a presión reducida, se obtuvieron 5.41 g de extracto de acetona y 44.78 g de extracto de metanol. Ambos extractos se disolvieron en metanol y se colocaron en un embudo de separación para llevar a cabo una partición con hexano, posteriormente se eliminó el disolvente de la fracción de metanol, se le agregó agua y se extrajo con AcOEt. Después de eliminar los disolventes por destilación a presión reducida se obtuvieron 6.71 g de la fracción de hexano y 8.02g de la fracción de AcOEt. De la fracción acuosa se obtuvieron 32.34 g después de eliminar el agua por medio de una corriente de aire.

### 4.4 Aislamiento de Metabolitos

#### 4.4.1 Aislamiento de Metabolitos de Cálices

El extracto de cálices se disolvió en acetona, se adsorbió en celita, se evaporó el disolvente y se colocó sobre una columna de sílica gel (columna A); la elución se inició con hexano y se aumentó la polaridad con AcOEt. De este proceso se obtuvieron 90 fracciones eluidas con la proporción de disolventes indicada (hexano:AcOEt): A1-A7 (100:0), A8-A16 (95:5), A17-A21 (90:10), A22-A32 (85:15), A33-A42 (80:20), A43-A49 (70:30), A50-A57 (60:40), A58-A63 (50:50), A64-A70 (40:60), A71-A78 (20:80), A79-A90 (0:100). Todas las fracciones se analizaron por medio de CCF y se reunieron las que presentaron un perfil cromatográfico similar. Las fracciones A1-A10 se purificaron por CC (columna B) la cual se comenzó a eluir

con hexano aumentando su polaridad con AcOEt. Se obtuvieron 28 fracciones con la proporción de disolventes indicada: B1-B8 (100:0), B9-B22 (98:2), B23-B28 (96:4). Las fracciones B6-B10 se cristalizaron de AcOEt-hexano con lo cual se aisló la mezcla de  $\beta$ -sitosterol/estigmasterol (65.4 mg). Las fracciones A54-A55 (140.3mg), se sometieron a CC (columna C), que se eluyó con hexano-acetona 60:40. Se obtuvieron 20 fracciones, de las cuales las fracciones C12-C18 se purificaron por cristalización de AcOEt-hexano para obtener 38.3 mg de physangilida B (**1**).

#### 4.4.2 Aislamiento de Metabolitos de Hojas, Ramas y Flores

El extracto de hexano se fraccionó por CC (columna D) eluida con mezclas de hexano-AcOEt, de polaridad creciente, con lo que se obtuvieron 100 fracciones eluidas con la relación de disolventes (hexano:AcOEt) que se indica: D1-D12 (100:0), D13-D25 (95:5), D26-D42 (90:10), D43-D61 (85:15), D62-D65 (80:20), D66-D76 (70:30), D77-D81 (60:40), D82-D90 (40:60), D91-D94 (20:80), D95-D100 (acetona). De las fracciones D16-D21 se obtuvo la mezcla de  $\beta$ -sitosterol/estigmasterol (63.4 mg) después de sucesivas cristalizaciones (AcOEt-hexano).

El extracto de AcOEt se fraccionó mediante CC (columna E) eluida con la relación de disolventes (hexano:AcOEt) que se indica: E1-E9 (90:10), E10-E16 (85:15), E17-E22 (80:20), E23-E34 (70:30), E35-E58 (60:40), E59-E66 (50:50), E67-E75 (40:60), E76-E85 (30:70), E86-E92 (20:80), E93-E98 (0:100). Estas fracciones se analizaron mediante CCF y se reunieron las que presentaron un perfil cromatográfico similar. De las fracciones E32-E35 se aisló physangilida B (**1**), después de repetidas cristalizaciones de AcOEt-hexano. Las aguas madres de la cristalización de **1** fueron reunidas con las fracciones E36-E66 y sometidas a sucesivas CC eluidas con hexano-acetona 70:30 (columnas F-J) y cristalizaciones (AcOEt-hexano:) con lo que se obtuvo una cantidad adicional del compuesto **1** para hacer un total de 160 mg aislados de este extracto.

Las fracciones E67-E98 se sometieron a CC eluida con hexano-acetona 60:40 (columna K, 102 fracciones). Las fracciones K68-K102, se purificaron mediante CC eluida con CHCl<sub>3</sub>-MeOH 90:10 (columna L, 39 fracciones). Las fracciones L5-L15 se purificaron por cromatografía en placa preparativa de fase reversa (MeOH-H<sub>2</sub>O 1:1), seguida de cristalización (AcOEt-hexano). Se aislaron 19.1 mg del compuesto **5**.

## 4.5 Reacciones

### 4.5.1 Acetilación de physangúlida B (**1**).

A 50 mg de physangúlida B (**1**) se le agregaron 0.5 mL de piridina y 0.5 mL de anhídrido acético. La reacción se mantuvo en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente, se retiró de agitación, se agregó hielo, y se colocó en un embudo de separación, para llevar a cabo extracciones sucesivas con 5 mL de AcOEt cada una. La fase orgánica se lavó con HCl 5% hasta pH ácido, posteriormente se lavó con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> hasta pH básico y después se lavó con agua hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Después de eliminar el disolvente por destilación a presión reducida, se obtuvieron 34.7 mg del compuesto acetilado **2** que se purificó por cristalización de AcOEt-hexano.

### 4.5.2 Acetilación de las aguas madres obtenidas de la cristalización de physangúlida B (**1**).

A 94.9 mg de las aguas madres se agregaron 0.5 mL de piridina y 0.5 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó con agitación durante 24 horas a temperatura ambiente, se suspendió la agitación, se agregó hielo, y se colocó en un embudo de separación, para llevar a cabo extracciones sucesivas con 5 mL de AcOEt cada extracción. La fase orgánica se lavó con HCl 5% hasta pH ácido,

posteriormente se lavó con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> hasta pH básico y después se lavó con agua hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Después de eliminar el disolvente por destilación a presión reducida, se obtuvieron 96.8 mg de un mezcla de compuestos entre los que se encontraba el producto acetilado **3**. Este producto se purificó mediante una CC (hexano-acetona 85:15) y cristalización de AcOEt-hexano. Se obtuvieron 47.8 mg del compuesto **3**.

#### 4.6 Evaluación de la actividad citotóxica

La citotoxicidad de los compuestos **1**, **2** y **5** se evaluó por el método de sulforrodamina B [SRB] contra seis líneas celulares de cáncer humano: glía de sistema nervioso central (U-251), próstata (PC-3), leucemia (K-562), colon (HCT-15), mama (MCF-7), y pulmón (SKLU-1). En una placa de microtitulación de 96 pozos se colocaron 100 µL de una suspensión de células y se midió la densidad celular (5000-7500 células/pozo). La placa se incubó a 37 °C durante 24 horas, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. En seguida, se adicionaron 100 µL de las muestras a evaluar en solución (DMSO) y se incubó por 48 h en las mismas condiciones. Las células se fijaron con una solución de ác. tricloroacético al 10% p/v (50 µL/pozo). La placa se incubó por una hora a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, se lavó con agua destilada desionizada y se dejó secar durante 24 h. Al término del proceso de fijación se adicionaron 100 µL de sulforrodamina B al 0.4% en ác. acético a cada pozo y la placa se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la placa cinco veces con ácido acético al 1%. Por último, el colorante se extrajo con solución de base TRIS 10 mM, pH 10.5 y se dejó secar por 24 h. Las absorbancias se determinaron en un lector de placas a  $\lambda = 515$  nm. La intensidad del color es directamente proporcional al número de células vivas. El porcentaje de concentración inhibitoria se calculó por medio de la fórmula: % CI = 100 - [B / A x 100], donde A es el valor de la densidad de las células sin tratar y B el valor de la densidad de las células tratadas [39-40].

#### 4.7 Constantes Físicas y Espectroscópicas de los Compuestos Obtenidos.

Physangúlida B **(1)**: cristales beige (AcOEt-hexano); pf 257-259°C;  $[\alpha]_D -39^\circ$  (C: 0.202, CHCl<sub>3</sub>); IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\text{máx.}}$  3580, 1731, 1680 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) ver Tabla 1; RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) ver Tabla 2; EMAR-IES 509 [M + Na]<sup>+</sup>; EMAR-BAR  $m/z$  487.2706 [M + H]<sup>+</sup> (calculada para C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>O<sub>7</sub>: 487.2696).

4-O-acetil-physangúlida B **(2)**: cristales incoloros (AcOEt-hexano); pf 242-245°C;  $[\alpha]_D +36^\circ$ ; IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\text{máx.}}$  3578, 1735, 1684 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) ver Tabla 1; RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) ver Tabla 2; (C: 0.2, CHCl<sub>3</sub>); EMAR-BAR  $m/z$  528.2728 [M + H]<sup>+</sup> (calculada para C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>O<sub>8</sub>: 528.2723).

4-O-acetil-epoxiwithanolida D **(3)**: cristales incoloros (AcOEt-hexano); pf 255-258°C; IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\text{máx.}}$  3581, 1735, 1683 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) ver Tabla 1; RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) ver Tabla 2; EMAR-BAR  $m/z$  529.2808 [M + H]<sup>+</sup> (calculada para C<sub>30</sub>H<sub>41</sub>O<sub>8</sub>: 529.2801).

Acetónido de physangúlida **(5)**: cristales incoloros (AcOEt-hexano); pf 318-320°C;  $[\alpha]_D -201^\circ$  (C: 0.170; CHCl<sub>3</sub>); IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\text{máx.}}$  3580, 1723 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) ver Tabla 1; RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) ver Tabla 2; EMAR-BAR  $m/z$  544.3032 [M + H]<sup>+</sup> (calculada para C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub>: 544.3036).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado del estudio realizado se encontró que tanto los cálices como las partes aéreas (hojas, ramas y flores) de *Physalis angulata* L. contienen la mezcla de  $\beta$ -sitosterol/estigmasterol y un compuesto nuevo al que se le dio el nombre de physangúlida B (**1**). También se encontró que los cálices contienen mezclas complejas de acilsacarosas, que no fueron separadas debido a que se contaba con muy poca cantidad de cada mezcla. Se encontró también que en las partes aéreas existen, además de physangúlida B, dos compuestos previamente descritos en la literatura, la 24 $\alpha$ ,25 $\alpha$ -epoxiwithanólida D (**4**) y la physangúlida (**6**). El compuesto **4** se aisló como el 4-O-acetil derivado (**3**) y el compuesto **6** como el correspondiente acetónido (**5**)

### 5.1 Elucidación Estructural

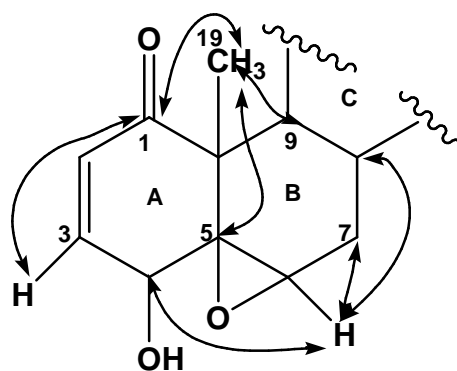
De los extractos de las partes aéreas y de los cálices de *P. angulata* se aisló la mezcla de  $\beta$ -sitosterol/estigmasterol que se identificó por sus propiedades físicas (punto de fusión) y por comparación mediante CCF con una muestra auténtica.

#### 5.1.1 Caracterización de la physangúlida B (**1**).

La physangúlida B (**1**) se aisló en forma de cristales beige claro con un punto de fusión de 257-259 °C. Su rendimiento respecto al peso del material vegetal seco fue de 0.060% en hojas, ramas y flores, y de 0.065% en cálices. Este compuesto presentó en su espectro de IR (Espectro 1) una banda en 3580 cm<sup>-1</sup> representativa de grupos hidroxilo, banda de cetona conjugada en 1680 cm<sup>-1</sup> y de grupo éster o  $\delta$ -lactona saturada en 1731 cm<sup>-1</sup>. Se le asignó la fórmula molecular C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub> debido a que su espectro de masas (EM-IES) presentó un ion pseudomolecular de  $m/z$  509 [M+Na]<sup>+</sup>, además de que en el espectro de alta resolución (EMAR-BAR) presentó un ión pseudomolecular [M+H]<sup>+</sup> de  $m/z$  487.2706 (calculada para C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>O<sub>7</sub>: 487.2696). En el espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro 2) presentó señales para 28



carbonos de los cuales, cinco corresponden a metilos, seis a metilenos, nueve a metinos y ocho a carbonos no protonados; entre estos últimos está C-1 que corresponde a la cetona conjugada ( $\delta_C$  201.6). En el espectro de RMN  $^1H$  (Espectro 3) se observan 2 señales ( $\delta_H$  6.21, d,  $J = 10.0$  Hz;  $\delta_H$  6.92, dd,  $J = 10.0, 6.0$  Hz) que por el desplazamiento observado se atribuyen a los protones vinílicos  $\alpha$  (H-2) y  $\beta$  (H-3) de la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Se observa también una señal en  $\delta_H$  3.74 (d,  $J = 6.0$  Hz) correspondiente a H-4. En el espectro COSY (Espectro 4) se observan las correlaciones de H-4 con H-3 y de H-3 con H-2. En el espectro HMBC (Espectro 5) se observan las correlaciones de C-1 con H-3 y con los protones de un metilo ( $\delta_H$  1.38, CH<sub>3</sub>-19). Estos últimos a su vez correlacionan con C-9 ( $\delta_C$  43.8), C-10 ( $\delta_C$  47.8) y con un carbono no protonado y base de epóxido C-5 ( $\delta_C$  64.0), el otro carbono base de epóxido corresponde a un metino y se atribuyó a C-6 ( $\delta_C$  62.1), al presentar el hidrógeno unido a él, H-6, una señal en  $\delta_H$  3.22 como un triplete ancho. La posición de este hidrógeno se confirma por sus correlaciones con C-4 ( $\delta_C$  70.1), C-7 ( $\delta_C$  31.1) y C-8 ( $\delta_C$  29.3) en el espectro HMBC. Los desplazamientos químicos de C-4 y H-4 indican que existe un grupo hidroxilo en esa posición. Lo anterior permitió establecer que el compuesto **1** contiene un fragmento como el que se ilustra en la Figura 18.

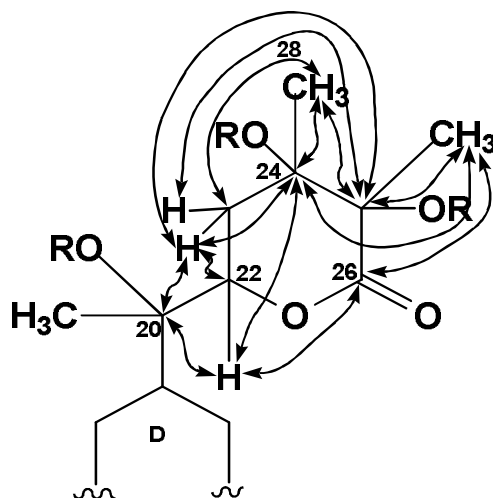


**Figura 18. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para los anillos A y B de physangúlida B (1).**

La orientación del grupo 5,6-epoxi fue establecida como  $\beta$ , al igual que la orientación del hidroxilo en C-4, debido a que en el espectro NOESY (Espectro 6) se observa una fuerte interacción entre las señales de H-4 y H-6, además de que se ha descrito

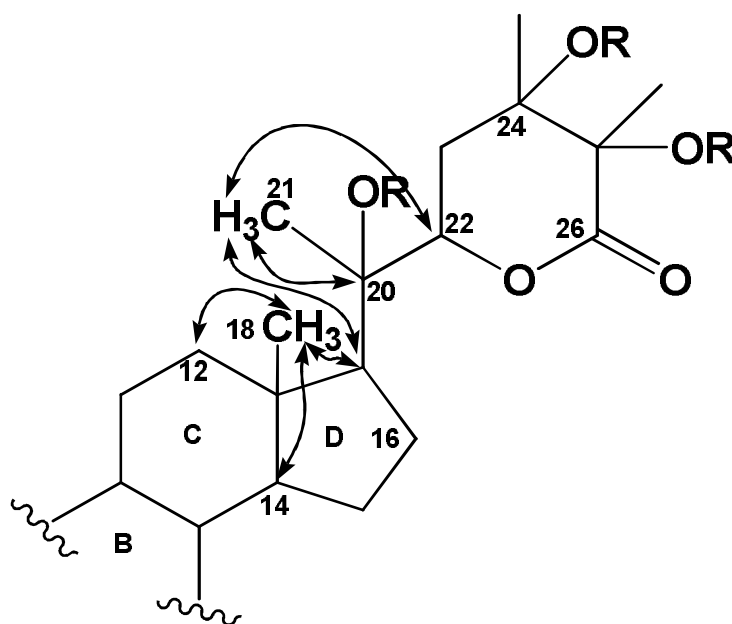
que cuando el epóxido es  $\beta$  las constantes de acoplamiento con H-7 y H-7' son menores de 3 Hz, mientras que cuando su orientación es  $\alpha$  son de 5.0 y 3.6 Hz [41]; como ya se mencionó, en el caso de **1**, la señal de H-6 es un triplete ancho, con constantes de acoplamiento de 2.0 Hz, lo que es congruente con una orientación  $\beta$  del epóxido.

La physangúlida B (**1**) posee una  $\delta$ -lactona cuya presencia se dedujo de la señal de un carbonilo en  $\delta_c$  175.4 que se atribuyó a C-26, así como de la señal de un protón base de lactona (H-22) en  $\delta_H$  4.57; esta última se presentó como una señal doble de doble ( $J = 3.0, 1.5$  Hz) por sus interacciones con los protones de C-23 ( $\delta_H$  2.50, H-23 y  $\delta_H$  2.20, H-23'), observadas en el espectro COSY. En el espectro de RMN  $^{13}C$  se observan señales para cuatro carbonos base de oxígeno, tres no protonados ( $\delta_c$  88.4, C-20;  $\delta_c$  80.6, C-24;  $\delta_c$  77.8, C-25), y uno correspondiente a un metino que se asignó al carbono base de lactona C-22 ( $\delta_c$  84.0); dos carbonos de grupos metilo ( $\delta_c$  19.9, C-27 y  $\delta_c$  19.5, C-28); y un carbono de metileno ( $\delta_c$  37.6, C-23). Estas asignaciones tuvieron como base las correlaciones H-C a dos y tres enlaces, observadas en el espectro HMBC (Espectro 5), de H-22 con C-20, C-24 y C-26; de H-23 con C-20, C-22, C-24 y C-25; de H-23' con C-24 y C-25; de H-28 con C-23, C-24 y C-25; y de H-27 con C-24, C-25 y C-26 (Figura 19).



**Figura 19. . Correlaciones observadas en el espectro HMBC para la cadena lateral de physangúlida B (1).**

Por otro lado, en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se observaron señales para dos grupos metilo adicionales, que fueron asignadas a los metilos 18 ( $\delta_{\text{H}}$  0.70 s,  $\delta_{\text{C}}$  14.7) y 21 ( $\delta_{\text{H}}$  1.23 s;  $\delta_{\text{C}}$  23.3). En el espectro HMBC, los protones de C-18 correlacionaron con el carbono de un metileno cuya señal se observó en  $\delta_{\text{C}}$  38.3 y fue asignada a C-12. Los protones de C-18 también mostraron correlaciones con los carbonos de dos metinos en  $\delta_{\text{C}}$  55.8 (C-14) y  $\delta_{\text{C}}$  54.4 (C-17) y con un carbono cuaternario en  $\delta_{\text{C}}$  41.6 (C-13). A su vez los protones del  $\text{CH}_3$ -21 correlacionaron con C-17, C-20 y C-22 (Figura 20).

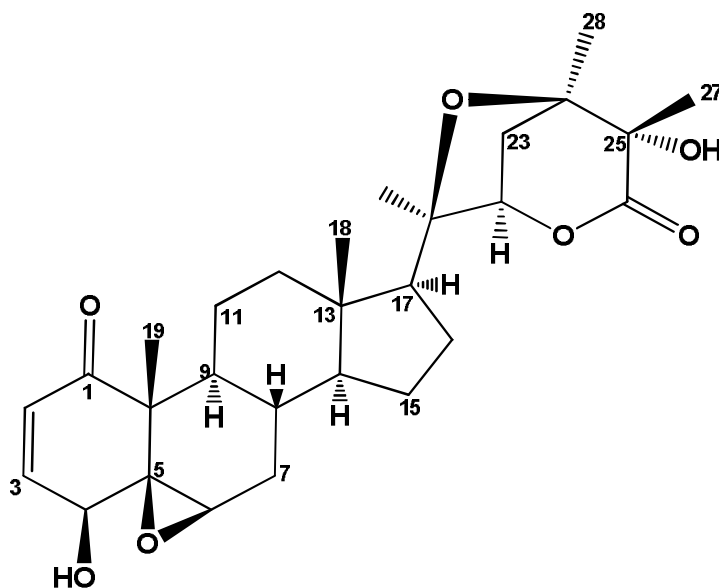


**Figura 20. Principales correlaciones observadas en el espectro HMBC para los anillos C y D y la cadena lateral de physangúlida B (1).**

La existencia de un grupo 20,24-epoxi y con ello de un anillo de tetrahidrofurano en **1**, se dedujo del desplazamiento químico de los carbonos C-20 y C-24, así como de las constantes de acoplamiento de H-22 ( $\delta_{\text{H}}$  4.57,  $J = 3.0, 1.5$  Hz) con H-23 y H-23' ( $\delta_{\text{H}}$  2.50,  $J = 13.5, 1.5$  Hz, H-23;  $\delta_{\text{H}}$  2.19,  $J = 13.5, 3.0$ , H-23'). Estas constantes de acoplamiento son muy parecidas a las que se presentan en withanólidas aisladas del género *Datura* en las que existe un anillo de tetrahidropirano originado por la formación de un grupo 21,24-epoxi [42-43]. Cuando no existe este anillo, H-22 presenta constantes de acoplamiento de alrededor de 12.0 y 4.0 Hz. Además, de la

fórmula molecular de **1** se dedujo un índice de insaturación de 10, lo cual apoya la presencia del anillo.

Por otra parte, las interacciones en el espectro NOESY entre los protones de los metilos 18 y 21 permitieron establecer una orientación beta para la cadena lateral en C-17. Además, se propuso que el oxígeno en C-20 tiene una orientación beta como la que presentan todas las withanólidas con un grupo hidroxilo en dicha posición [12]. La configuración de C-24 y de C-25 se propuso al considerar que biogenéticamente, el compuesto **1** puede provenir del ataque del hidroxilo en C-20 al C-24 de una 24,25-epoxilactona, y en las withanólidas con un grupo 24,25-epoxi aisladas hasta el momento el epóxido presenta una orientación alfa. De este modo se dedujo que la estructura de **1** es la que se muestra en la Figura 21.



**Figura 21. Estructura de la physangúlida B (1).**

#### 5.1.2 Caracterización de la 4-O-acetilphysangúlida B (2).

De la acetilación del compuesto **1** se obtuvo como único producto el derivado **2**. Este producto mostró en el espectro de IR (Espectro 7) una banda en  $3578\text{ cm}^{-1}$  asignada a un grupo hidroxilo, una banda de cetona conjugada en  $1684\text{ cm}^{-1}$  y otra banda en  $1735\text{ cm}^{-1}$  para grupos éster y lactona. Su espectro de masas de alta

resolución presentó un ión molecular de  $m/z$  de 528.2728  $[M]^+$ , el cual es consistente con la fórmula molecular  $C_{30}H_{40}O_8$  (calculada para  $C_{30}H_{40}O_8$ : 528.2723). Los espectros de RMN  $^1H$  (Espectro 8) y  $^{13}C$  (Espectro 9) presentaron señales para un grupo acetato ( $\delta_H$  2.04, s, 3H;  $\delta_C$  170.1, 20.8); además, en el espectro de RMN  $^1H$  se observó que la señal de H-4 se desplazó a campo bajo ( $\delta_H$  4.63, d,  $J = 6.0$  Hz) con respecto a la del compuesto **1**. El resto de las señales y las correlaciones que se observaron en los espectros (Espectros 10-12) son prácticamente iguales a las de **1**. Con lo anterior se llegó a la conclusión de que **2** presenta una estructura como la que se ilustra en la Figura 22.

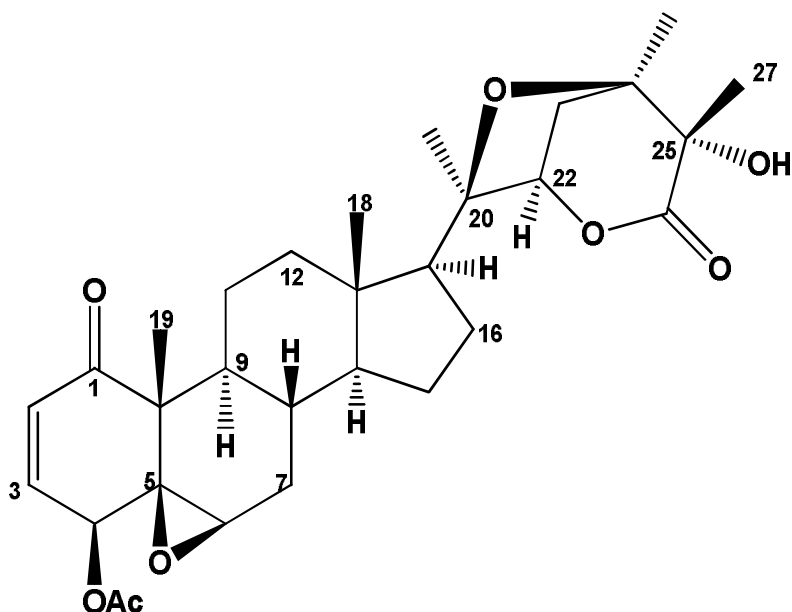
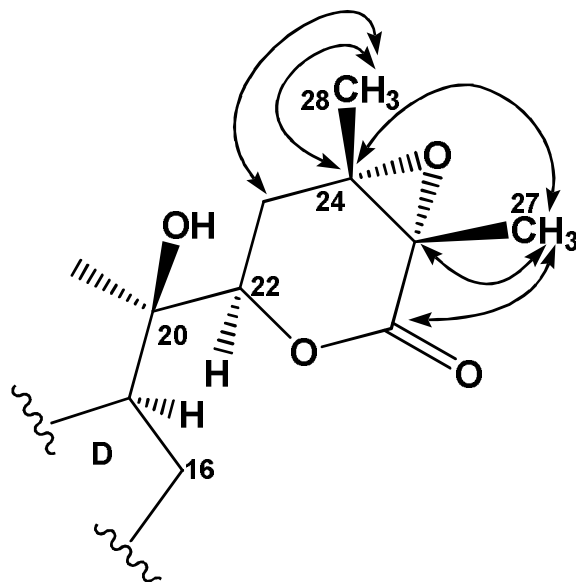


Figura 22. Estructura de la 4-O-acetil physangúlida B (**2**).

### 5.1.3 Caracterización de la 4-O-acetil-24 $\alpha$ ,25 $\alpha$ -epoxiwithanólida D (**3**).

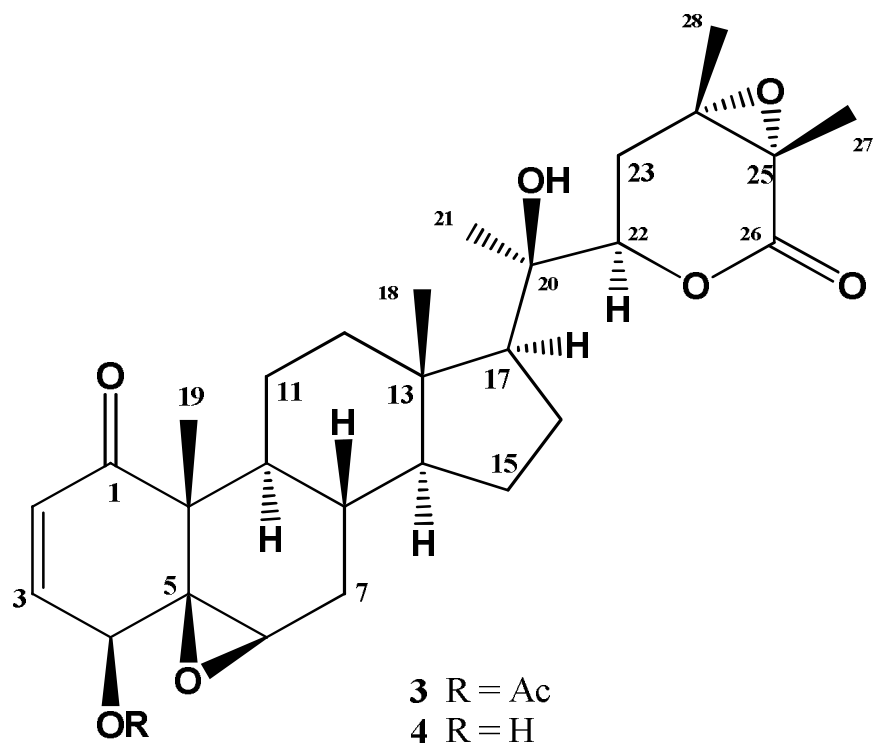
El derivado acetilado **3** se aisló de la mezcla de reacción producto de la acetilación de las aguas madres de **1**. Este producto mostró en el espectro de IR (Espectro 13), una banda para grupo hidroxilo en  $3581\text{ cm}^{-1}$ , una banda de cetona conjugada en  $1683\text{ cm}^{-1}$  y de grupo éster y lactona en  $1735\text{ cm}^{-1}$ . Su fórmula molecular se determinó como  $C_{30}H_{40}O_8$  con base en el ión pseudomolecular  $[M + H]^+$  de  $m/z$  529.2808 (calculada para  $C_{30}H_{41}O_8$ : 529.2801), observado en su espectro de masas

de alta resolución. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 14) y  $^{13}\text{C}$  (Espectro 15) del compuesto **3** mostraron señales que fueron prácticamente iguales a las del derivado **2** (Tablas 1 y 2) en lo que respecta a las señales de los anillos A, B, C y D del esteroide y el grupo 4-O-acetil ( $\delta_{\text{H}}$  2.05, s, 3H;  $\delta_{\text{C}}$  170.1, 20.8;  $\delta_{\text{H}}$  4.65, d,  $J = 6.0$  Hz, H-4), pero mostraron diferencias en las señales de la cadena lateral. Así, en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **3** las señales de C-24 y C-25 se observaron en  $\delta_{\text{C}}$  62.6 y  $\delta_{\text{C}}$  59.2 indicando la presencia de un grupo 24,25-epoxi; la señal de C-20 se observó en  $\delta_{\text{H}}$  75.0, por lo que se propone un grupo hidroxilo en esta posición. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$ ; la señal de H-22 ( $\delta_{\text{H}}$  4.38) es un doble de doble con  $J = 12.5, 3.5$  Hz, lo cual indica acoplamiento de tipo axial-axial y axial-ecuatorial con los hidrógenos de C-23 ( $\delta_{\text{H}}$  2.15 H-23 y  $\delta_{\text{H}}$  2.01 H-23'), En el espectro HMBC (Espectro 17) se observaron las correlaciones de los hidrógenos del  $\text{CH}_3$ -27 ( $\delta_{\text{H}}$  1.57) con C-24, C-25 y C-26 ( $\delta_{\text{C}}$  169.4), así como las de los hidrógenos del  $\text{CH}_3$ -28 con C-23 ( $\delta_{\text{C}}$  30.6), C-24 y C-25 (Figura 22).



**Figura 22. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para la cadena lateral de la 4-O-acetil-24 $\alpha$ ,25 $\alpha$ -epoxiwithanolida D (3)**

Con base en lo anterior, el producto **3** fue caracterizado como la 4-O-acetil-24 $\alpha$ ,25 $\alpha$ -epoxiwithanolida D (Figura 23), un derivado del producto natural 24,25-epoxiwithanolida D (**4**) aislado previamente de *P. angulata* [23].

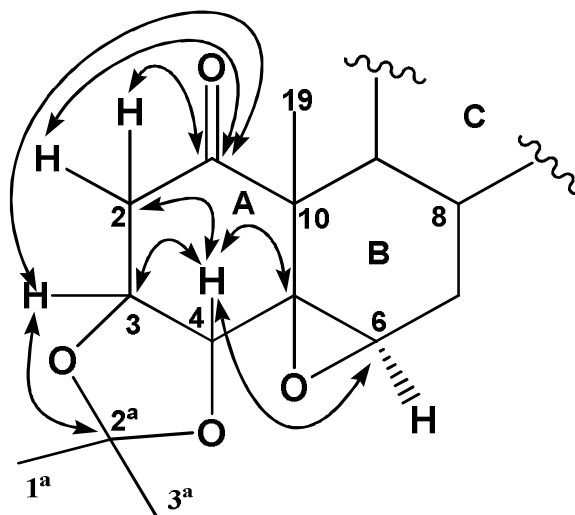


**Figura 23. Estructuras de 4-O-acetil-24 $\alpha$ ,25 $\alpha$ -epoxiwithanólida D (3) y 24 $\alpha$ ,25 $\alpha$ -epoxiwithanólida D (4).**

#### 5.1.4 Caracterización del acetónido de physangúlida (5).

El compuesto (5) se aisló en forma de cristales incoloros con un punto de fusión de 318-320 °C, y con un rendimiento de 0.0071 % respecto al peso del material vegetal seco. Este compuesto presentó en su espectro de IR (Espectro 18) bandas de absorción para grupos hidroxilo en 3580  $\text{cm}^{-1}$  y grupos éster o lactona en 1723  $\text{cm}^{-1}$ . Su espectro de masas de alta resolución presentó un ión molecular  $[\text{M}]^+$  de  $m/z$  544.3032 (calculada para  $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_8$ : 544.3036), con base en el cual se le asignó la fórmula molecular  $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_8$ . En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 19) presentó señales para 31 carbonos, siete de los cuales corresponden a metilos, siete a metilenos, ocho a metinos y nueve a carbonos no protonados. Entre estas últimas se encuentra la señal del carbonilo de una cetona no conjugada, que fue asignada a C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  207.4). En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 20) se observan dos señales ( $\delta_{\text{H}}$  2.80, dd,  $J = 13.5, 5.5$  Hz;  $\delta_{\text{H}}$  2.35, dd,  $J = 13.5, 1.0$  Hz) que por su

desplazamiento químico, se atribuyen a dos protones alfa al grupo carbonilo (H-2 y H-2'). Se observa también una señal en  $\delta_H$  4.64 (ddd,  $J = 6.5, 5.5, 1.0$  Hz), la cual presenta correlaciones en el espectro COSY (Espectro 21) con H-2 y H-4 ( $\delta_H$  3.85 d  $J = 6.5$  Hz) por lo que se asignó a H-3. Los desplazamientos de las señales de H-3 y H-4 indican que ambos carbonos están unidos a oxígeno. Las señales para dos grupos metilo y un cetal ( $\delta_H$  1.39,  $\delta_C$  26.1, CH<sub>3</sub>-1<sup>a</sup>;  $\delta_H$  1.28,  $\delta_C$  24.7, CH<sub>3</sub>-3<sup>a</sup>;  $\delta_C$  110.3, C-2<sup>a</sup>) en los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto **5** revelaron la existencia de un grupo acetónido en la molécula. En el espectro HMBC (Espectro 22) se observan las correlaciones de H-2, H-2' y H-3 con C-1, así como la de H-3 con C-2<sup>a</sup> del grupo acetónido; se observan también las correlaciones de H-4 con C-2, C-3 ( $\delta_C$  75.6), C-5 ( $\delta_C$  61.1), C-6 ( $\delta_C$  57.1) y C-10 ( $\delta_C$  50.3), estableciendo la posición del acetónido en los carbonos 3 y 4 (Figura 25).

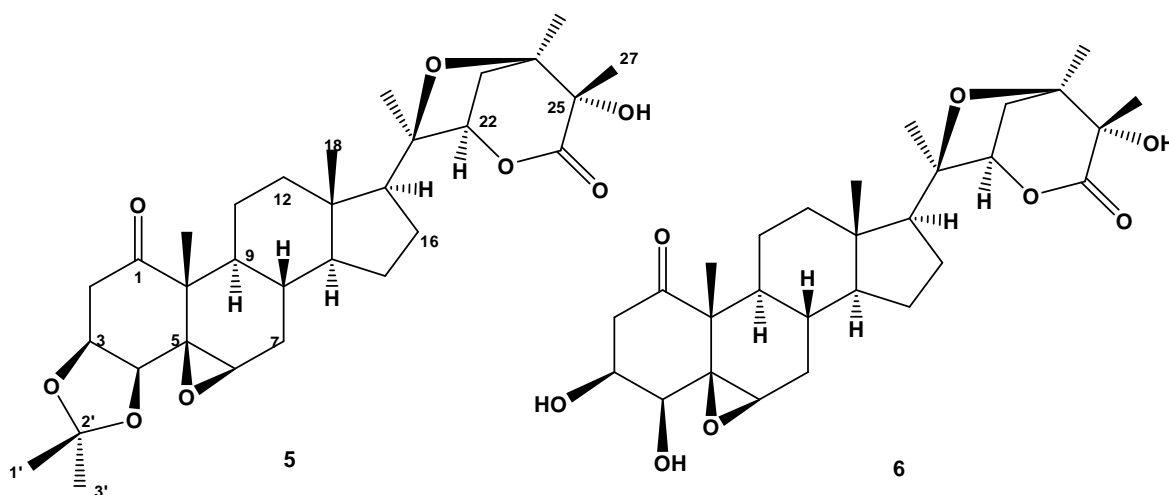


**Figura 25. Correlaciones observadas en el espectro HMBC para los anillos A y B del acetónido de physangúlida (5).**

La configuración de C-3 y C-4 se dedujo de las correlaciones de H-3 con H-2, H-2', H-4 y CH<sub>3</sub>-3<sup>a</sup>, así como las de H-4 con H-3, H-6 y CH<sub>3</sub>-3<sup>a</sup>, observadas en el espectro NOESY (Espectro 23), las cuales indican una orientación beta del grupo acetónido, especialmente la correlación de H-4 con H-6 que solo es posible si la orientación de H-4 es alfa.



Por otra parte, como se puede ver en las tablas 1 y 2 las señales de los hidrógenos y carbonos del resto de la molécula del compuesto **5** son muy similares a las de los compuestos **1** y **2**, por lo que se propone que su estructura es la ilustrada en la Figura 26. El compuesto **5** no es un producto natural sino un artefacto formado durante el proceso de aislamiento a partir del producto natural **6**.



**Figura 26. Estructuras del acetónido de physangúlida (5) y physangúlida (6).**

Existen pocos withaesteroides con un  $3\beta,4\beta$ -diol en el anillo A; al revisar la literatura se encontró que un compuesto con estas características fue aislado de *Physalis angulata* [25]. Este compuesto que fue denominado physangúlida y al que se asignó la estructura **7** (Figura 27), fue proclamado como el primer 22*S*-withaesteroides. Al comparar los datos de RMN del compuesto **5** con los publicados para la physangúlida, se encontró una gran similitud en los correspondientes a los anillos B, C, D y a la cadena lateral (Tabla 1). Por lo anterior, y con base en las evidencias espectroscópicas discutidas en este trabajo para los compuestos **1**, **2** y **5**, la physangúlida debe contener un anillo de tetrahydrofurano y una configuración *R* en C-22; por lo que su estructura se establece como **6** (Figura 26). En consecuencia, al derivado **5** se le denomina acetónido de physangúlida.

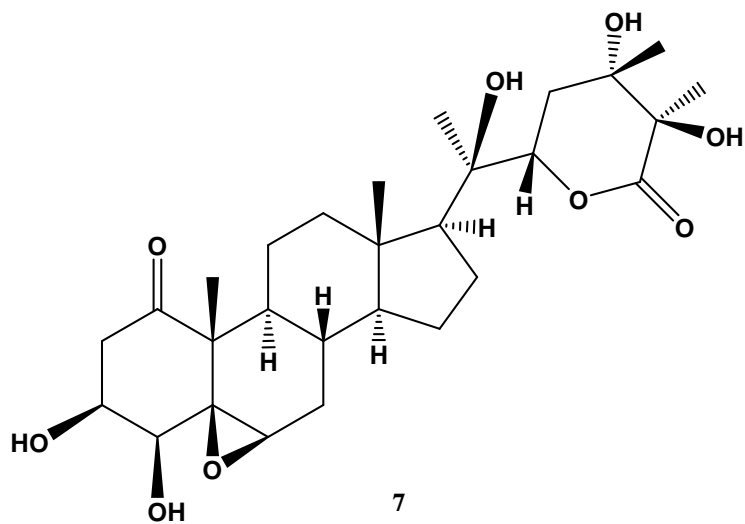


Figura 27. Estructura asignada originalmente a physangúlida [25].

**Tabla 1. Datos espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  de los compuestos 1-3, 5 y 7  
(125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  en ppm)**

| Carbono                                      | 1     | 2              | 3           | 5                    | 5 <sup>a</sup>       | 7 <sup>a</sup> [25] |
|--|-------|----------------|-------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| 1 C  | 201.6 | 200.7          | 201.1       | 207.4                | 208.0                | 210.3               |
| 2 CH   | 132.7 | 134.1          | 133.9       | 41.9 <sup>b</sup>    | 42.6 <sup>b</sup>    | 44.1 <sup>b</sup>   |
| 3 CH   | 141.4 | 139.4          | 139.7       | 72.9                 | 75.6                 | 69.2                |
| 4 CH   | 70.1  | 72.4           | 72.2        | 80.8                 | 81.4                 | 78.8                |
| 5 C  | 64.0  | 61.1           | 61.0        | 61.1                 | 61.3                 | 65.2                |
| 6 CH   | 62.1  | 60.1           | 60.2        | 57.1                 | 57.2                 | 58.7                |
| 7 CH <sub>2</sub>                            | 31.1  | 31.0           | 31.0        | 31.5                 | 31.4                 | 31.6                |
| 8 CH   | 29.3  | 29.1           | 29.0        | 28.9                 | 29.3                 | 29.7                |
| 9 CH   | 43.8  | 43.8           | 44.1        | 43.4                 | 43.6                 | 43.2                |
| 10 C   | 47.8  | 48.2           | 48.2        | 50.3                 | 50.5                 | 51.0                |
| 11 CH <sub>2</sub>                           | 21.4  | 20.7           | 21.1        | 20.2                 | 20.7                 | 21.3                |
| 12 CH <sub>2</sub>                           | 38.3  | 38.2           | 39.3        | 38.0                 | 38.5                 | 38.7                |
| 13 C   | 41.6  | 41.5           | 42.6        | 41.6                 | 41.9                 | 41.9                |
| 14 CH  | 55.8  | 55.9           | 56.5        | 55.9                 | 56.0                 | 56.2                |
| 15 CH <sub>2</sub>                           | 23.8  | 23.8           | 23.7        | 23.7                 | 24.1                 | 24.2                |
| 16 CH <sub>2</sub>                           | 23.2  | 23.2           | 22.0        | 23.2                 | 23.8                 | 23.8                |
| 17 CH  | 54.4  | 54.4           | 54.8        | 54.4                 | 54.9                 | 54.9                |
| 18 CH <sub>3</sub>                           | 14.7  | 14.7           | 13.459      | 14.7                 | 14.7                 | 14.6                |
| 19 CH <sub>3</sub>                           | 17.0  | 15.3           | 15.6        | 13.9                 | 14.5                 | 15.4                |
| 20 C   | 88.4  | 88.3           | 75.0        | 88.3                 | 88.5                 | 78.0                |
| 21 CH <sub>3</sub>                           | 23.3  | 23.2           | 20.3        | 23.2                 | 23.3                 | 20.1                |
| 22 CH  | 84.0  | 83.9           | 79.1        | 83.9                 | 83.9                 | 83.9                |
| 23 CH <sub>2</sub>                           | 37.6  | 37.6           | 30.6        | 37.6                 | 37.4                 | 37.5                |
| 24 C   | 80.6  | 80.6           | 62.6        | 80.6                 | 82.0                 | 81.9                |
| 25 C   | 77.8  | 77.8           | 59.2        | 77.8                 | 78.0                 | 88.5                |
| 26 C   | 175.4 | 175.4          | 169.4       | 175.4                | 175.7                | 175.6               |
| 27 CH <sub>3</sub>                           | 19.9  | 20.0           | 13.517      | 20.0                 | 20.1                 | 19.6                |
| 28 CH <sub>3</sub>                           | 19.5  | 19.5           | 17.6        | 19.5                 | 19.6                 | 23.3                |
| 4-O-Ac                                       | ----  | 20.8,<br>170.1 | 20.8, 170.1 | ----                 | ----                 |                     |
| C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> | ----  | ----           | ----        | 24.7, 26.1,<br>110.3 | 24.9, 26.6,<br>110.0 |                     |

<sup>a</sup> Determinado en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ; <sup>b</sup> CH<sub>2</sub>.

**Tabla 1. Datos espectroscópicos de RMN <sup>1</sup>H de los compuestos 1-3 y 5.  
(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm)**

| H  | 1                          | 2                          | 3                          | 5                          |
|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 2  | 6.21 d (10.0)              | 6.25 d (10.0)              | 6.24 d (10.0)              | 2.80 dd (13.5, 5.5)        |
| 2'   | ----                       | ----                       | ----                       | 2.35 dd (13.5, 1.0)        |
| 3  | 6.92 dd (10.0, 6.0)        | 7.02 dd (10.0, 6.0)        | 7.03 dd (10.0, 6.0)        | 4.64 ddd (6.5, 5.5, 1.0)   |
| 4  | 3.74 d (6.0)               | 4.63 d (6.0)               | 4.65 d (6.0)               | 3.85 d (6.5)               |
| 6  | 3.22 t (2.0)               | 3.21 t (2.0)               | 3.21 t (2.0)               | 3.21 t (2.0)               |
| 7  | 2.14 ddd (15.0, 4.0, 2.0)  | 2.17 ddd (15.0, 4.0, 2.0)  | 2.18 ddd (15.0, 4.0, 2.0)  | 2.28 ddd (15.0, 4.0, 2.0)  |
| 7'   | 1.29 ddd (15.0, 11.5, 1.5) | 1.30 ddd (15.0, 11.0, 1.5) | 1.29 ddd (15.0, 11.0, 1.5) | 1.30 m                     |
| 8  | 1.49 cd (11.5, 4.0)        | 1.46 cd (11.0, 4.0)        | 1.48 m                     | 1.49 cd (11.0, 4.0)        |
| 9  | 0.98 m                     | 0.87 td (11.0, 4.0)        | 0.84 m                     | 0.87 m                     |
| 11   | 1.79 m                     | 1.68 m                     | 1.68 m                     | 1.68 m                     |
| 11'  | 1.38 m                     | 1.40 m                     | 1.46 m                     | 1.28 m                     |
| 12   | 1.69 m                     | 1.70 m                     | 1.94 m                     | 1.68 m                     |
| 12'  | 1.39 m                     | 1.33 m                     | 1.13 m                     | 1.30 m                     |
| 14   | 0.99 m                     | 0.99 ddd (12.0, 11.0, 7.0) | 0.93 ddd (12.5, 11.0, 7.0) | 0.99 ddd (12.5, 11.0, 7.5) |
| 15   | 1.68 m                     | 1.71 m                     | 1.64 m                     | 1.72 m                     |
| 15'  | 1.14 m                     | 1.14 m                     | 1.18 m                     | 1.16 m                     |
| 16   | 1.76 m                     | 1.77 m                     | 1.93 m                     | 1.78 m                     |
| 16'  | 1.76 m                     | 1.77 m                     | 1.60 m                     | 1.78 m                     |
| 17   | 1.64 m                     | 1.63 m                     | 1.53 m                     | 1.64 m                     |
| 18   | 0.70 s                     | 0.70 s                     | 0.81 s                     | 0.68 s                     |
| 19   | 1.38 s                     | 1.37 s                     | 1.38 s                     | 1.28 s                     |
| 21   | 1.23 s                     | 1.22 s                     | 1.18 s                     | 1.22 s                     |
| 22   | 4.57 dd (3.0, 1.5)         | 4.56 dd (3.0, 1.0)         | 4.38 dd (12.5, 3.5)        | 4.55 dd (3.0, 1.5)         |
| 23   | 2.50 dd (13.5, 1.5)        | 2.51 dd (13.5, 1.0)        | 2.15 dd (14.5, 3.5)        | 2.51 dd (13.5, 1.5)        |
| 23'  | 2.19 dd (13.5, 3.0)        | 2.20 dd (13.5, 3.0)        | 2.01 dd (14.5, 12.5)       | 2.20 dd (13.5, 3.0)        |
| 27   | 1.47 s                     | 1.47 s                     | 1.57 s                     | 1.48 s                     |
| 28   | 1.34 s                     | 1.35 s                     | 1.49 s                     | 1.35 s                     |
| 4-OH   | 2.54 s                     |                            |                            |                            |
| 25-OH  | 2.58 s                     |                            |                            | 2.42 s                     |
| 4-OAc  |                            | 2.04 s                     | 2.05 s                     |                            |
| C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> |                            |                            |                            | 1.39 s, 1.28 s             |

## 5.2 Actividad biológica

Se llevó a cabo un ensayo preliminar para evaluar la actividad citotóxica de los compuestos **1**, **2** y **5** contra 6 líneas celulares de cáncer humano: glía de sistema nervioso central (**U251**), próstata (**PC-3**), leucemia (**K562**), colon (**HCT-15**), mama (**MCF-7**) y pulmón (**SKLU-1**) por la técnica de sulforrodamina B (SRB). Los resultados se muestran en la Tabla 3. Como se puede apreciar los compuestos **1** y **2** mostraron un 100 % de inhibición del crecimiento en las seis líneas, mientras que el compuesto **5** presentó una actividad citotóxica escasa.

**Tabla 3. Resultados del ensayo preliminar de la actividad citotóxica de las withanólidas 1, 2 y 5.**

| Compuesto                              | % de inhibición del crecimiento por línea celular (20 $\mu$ M) |      |       |        |       |        |
|--|--|------|-------|--------|-------|--------|
|  | U251   | PC-3 | K562  | HTC-15 | MCF-7 | SKLU-1 |
| Physangúlida B ( <b>1</b> )            | 100  | 100  | 100   | 100    | 100   | 100    |
| 4-O-Physangúlida B ( <b>2</b> )        | 100  | 100  | 100   | 100    | 100   | 100    |
| Acetónido de physangúlida ( <b>5</b> ) | 8.65   | 6.8  | 29.14 | 16.21  | 7.98  | 11.71  |

## 6. CONCLUSIONES

- ✓ Tanto los cálices como las partes aéreas (hojas, ramas y flores) de *Physalis angulata* L. contienen acilsacarosas, esteroles y withanólidas.
- ✓ La población de *Physalis angulata* objeto de este estudio contiene un nuevo withasteroide perteneciente al grupo de las withanólidas al que se le dio el nombre de physangúlida B (1). Esta es la primera withanólida para la que se describe un puente etéreo entre C-20 y C-24.
- ✓ La población de *P. angulata* analizada también biosintetiza dos withanólidas ya descritas en la literatura, 24,25-epoxiwithanólida D (4) y physangúlida (6).
- ✓ El análisis de los datos espectroscópicos del acetónido de physangúlida (5) aislado en este estudio llevó a la corrección de la estructura asignada inicialmente a physangúlida.
- ✓ La población de *Physalis angulata* que se analizó en este trabajo presentó una composición similar a la encontrada en la población de Uzbekistán, pero diferente a la de otras poblaciones que han sido analizadas.
- ✓ Physangúlida B (1) y su derivado acetilado (2) presentaron una actividad citotóxica relevante, mientras que el acetónido de physangúlida (5) presentó una actividad escasa.
- ✓ Las withanólidas que presentaron mayor actividad citotóxica contienen en el anillo A una cetona conjugada, así como un grupo 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxi en el anillo B.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Diversidad Vegetal- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE). **2010**. *CORE EUDICOTILEDÓNEAS- Asterideas-Euasterideas I: Solanales: Solanaceae*. [En línea](Actualizado enero 2010) Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/diversidadv/documentos/ANGIOSPERMAS/Asterideas/Euasterideas%20I%20o%20Lamiideas/Solanales/4-Solanaceae.pdf> [último acceso 15 de mayo de 2013].
- 2 a) Díaz González, G. J. Familia Solanaceae. En: G. Zalamea, J. García, L. Andrade, L. Aguilar. eds. *Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia*, Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. **2010**, 189-200. b) Gimeno, E. J. Calcinosis enzoótica en rumiantes: un problema vigente de la ganadería nacional. *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria* **2000**, 54, 207-234.
- 3 Cuevas-Arias, C. T., Vargas, O., Rodríguez, A. Solanaceae diversity in the State of Jalisco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **2008**, 79, 67-79.
- 4 Martínez, M. Revision of *Physalis* section *Epeteiorhiza* (Solanaceae). *Anales del Instituto de Biología (UNAM)* **1998**, 69, 71-117.
- 5 Coe, S. Los aztecas. En: A. Pulido, ed. *Las primeras cocinas de América*, México: FCE. **2004**, 66-87.
- 6 Aguilar, A., Camacho, J., Chino, S., Jáquez, P., López, M. *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social*. México: IMSS. **1994**.
- 7 Lee, S. W., Pan, M. H., Chen, C. M., Chen, Z. T. Withangulatin I, a New cytotoxic withanolide from *Physalis angulata*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2008**, 56, 234-236.

- 8 Zavala, D., Quispe, A., Posso, M., Rojas, J., Vaisberg, A. Efecto citotóxico de *Physalis peruviana* (capulí) en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica. *Anales de la Facultad de Medicina (UNMSM)*. **2006**, 67, 283-289.
- 9 Maldonado, E., Torres, F. R., Martínez, M., Pérez–Castorena, A.L. Sucrose esters from the fruits of *Physalis nicandroides* var. *attenuata*. *Journal of Natural Products* **2006**, 69, 1511-1513.
- 10 Perez-Castorena, A. L., Martínez, M., Maldonado, E. Labdanes and sucrose esters from *Physalis sordida*. *Journal of Natural Products*. **2010**, 73, 1271-1276.
- 11 Tursunova, R. N., Maslennikova, V. A., Abubakirov, N. K. Withasteroids of *Physalis*. III. Physanolide and 4 $\beta$ -hydroxiwithanolide E. *Chemistry of Natural Compounds* **1981**, 17, 145-149.
- 12 Ray, B., Gupta, M. Withasteroids a Growing group of naturally occurring steroidal lactones. En: Herz, W., Kirby, G., Moore, R., Steglich, W., eds. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. **1994**, 63, 1-106.
- 13 Veleiro, A. S., Oberti, J. C., Burton, G. Chemistry and bioactivity of withanolides from South American Solanaceae. En: Atta-ur-Rahman Ed. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier Science Pub., Amsterdam, **2005**, 32, 1019-1052.
- 14 Tomassini, T. C., Barbi, N., Ribeiro, I., Xavier, D. C. Género *Physalis* - uma revisão sobre vitaesteróides. *Química Nova* **1999**, 23, 47-57.
- 15 Damu, A. G., Kuo, P. C., Su, C. R., Kuo, T. H., Chen, T. H., Bastow, K. F., Lee, K. H., Wu, T. S. Isolation, structures, and structure–cytotoxic activity relationships of withanolides and *physalins* from *Physalis angulata*. *Journal of Natural Products* **2007**, 70, 1146-1152.
- 16 Sun, L., Liu, J., Liu, P., Yu, Y., Ma, L., Hu, L. Immunosuppression effect of withangulatin A from *Physalis angulata* via heme oxygenase 1-dependent pathways. *Process Biochemistry* **2011**, 46, 482-488.



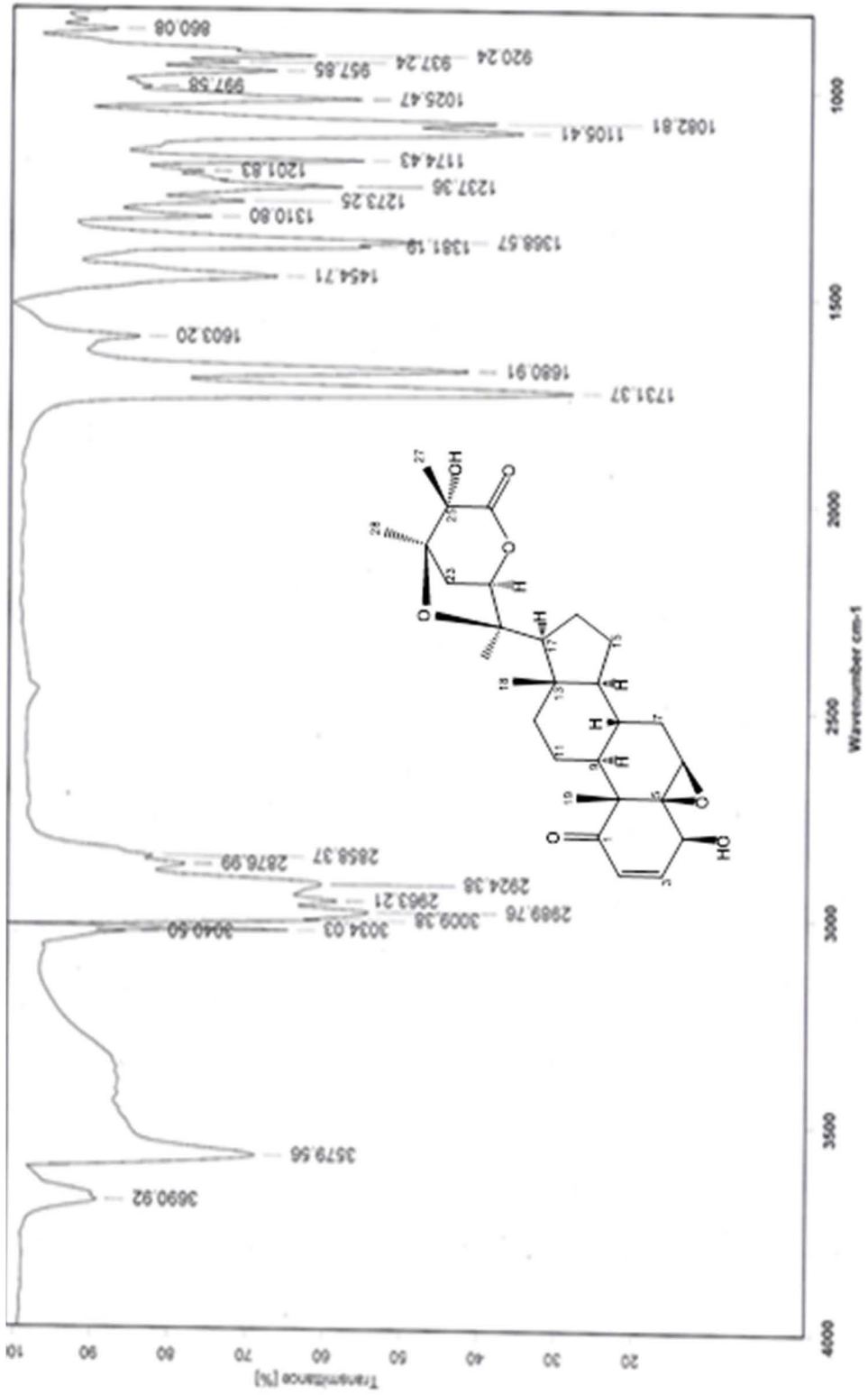
- 17 Nagafuji, S., Okabe, H., Akahane, H., Abe, F. Trypanocidal constituents in plants  
4. Withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2004**, 27, 193-197.
- 18 Subramanian, S. S., Sethi, P. D. Physalin B from *Physalis angulata*. *Indian Journal of Pharmacology* **1970**, 32, 163-164.
- 19 Row, L. R., Sarma, N. S., Matsuura, T., Nakashima, R. Physalins E and H, New physalins From *Physalis angulata* and *P. Lancifolia*. *Phytochemistry* **1978**, 17, 1641-1645.
- 20 Row, L. R., Sarma, N. S., Reddy, K. S., Matsuura, T., Nakashima, R. The structure of physalins F and J from *Physalis angulata* and *P. lancifolia*. *Phytochemistry*. **1978**, 17, 1647-1650.
- 21 Gómez, V., Jardón, O. L., Wegier, A. L., Piñero, D., Instituto de Ecología, UNAM, Martínez, M., Universidad Autónoma de Querétaro. *Recopilación de información acerca de la evolución del género Physalis en México y del origen y diversidad de Physalis philadelphica Lam. (tomate verde)*. [En línea]. (Actualizado al 22 de junio de 2012).  
Disponible en:  
[http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/centrosOrigen/Physalis/1er\\_Informe/Primer%20informe%20Physalis.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/centrosOrigen/Physalis/1er_Informe/Primer%20informe%20Physalis.pdf)
- 22 Row, L. R., Reddy, K. S., Sarma, N. S., Matsuura, T., Nakashima, R. New physalins from *Physalis angulata* and *Physalis lancifolia*. Structure and reactions of physalins D, I, G and K. *Phytochemistry* **1980**, 19, 1175-1181.
- 23 Vasina, O. E., Maslennikova, V. A., Abdullaev, N. D., Abubakirov, N. K. 14 $\alpha$ -hydroxicarpanolide and 24,25-epoxiwithanolide D. *Chemistry of Natural Compounds* **1986**, 22, 560-565.
- 24 Chen, C. M., Chen, Z. T., Hsieh, C. H., Li, W. S., Wen, S. Y., Withangulatin A, a new withanolide from *Physalis angulata*. *Heterocycles*. **1990**, 31, 1371-1375.

- 25 Vasina, O. E., Abdullaev, N. D., Abubakirov, N. K. Withasteroids of *Physalis*. IX. Physangulide, the first natural 22S-withasteroid. *Chemistry of Natural Compounds* **1990**, 26, 304-307.
- 26 Moiseeva, G. P., Vasina, O. E., Abubakirov, A. K., Withasteroids of *Physalis*. X. Circular dichroism of withasteroids from plants of the genus *Physalis*. *Chemistry of Natural Compounds* **1991**, 26, 308-312.
- 27 Shingu, K., Marubayashi, N., Ueda, I., Yahara, S., Nohara, T. Physagulin C, a new withanolide from *Physalis angulata* L. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1991**, 39, 1591-1593.
- 28 Shingu, K., Yahara, S., Nohara, T., Okabe, H. Three new withanolides, physagulins A, B and D from *Physalis angulata* L. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1992**, 40, 2088-2091.
- 29 Shingu, K., Yahara, S., Okabe, H., Nohara, T. Three new withanolides, physagulins E, F and G from *Physalis angulata* L. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1992**, 40, 2448-2451.
- 30 Basey, K., McGraw, B. A., Woolley, J. G. Phygrine, an alkaloid from *Physalis* species. *Phytochemistry* **1992**, 31, 4173-4176.
- 31 Makino, B., Kawai, M., Ogura, T., Nakanishi, M., Yamamura, H., Butsugan, Y. Structural revision of physalin H isolated from *Physalis angulata*. *Journal of Natural Products* **1995**, 58, 1668-1674.
- 32 Ismail, N., Alam, M. A novel flavonoid glycoside from *Physalis angulata*. *Fitoterapia* **2001**, 72, 676-679.
- 33 Shim, J. S., Park, K. M., Chung, J. Y., Hwang, J. K. Antibacterial activity of oleanolic acid from *Physalis angulata* against oral pathogens. *Nutraceuticals and Food* **2002**, 7, 215-218.

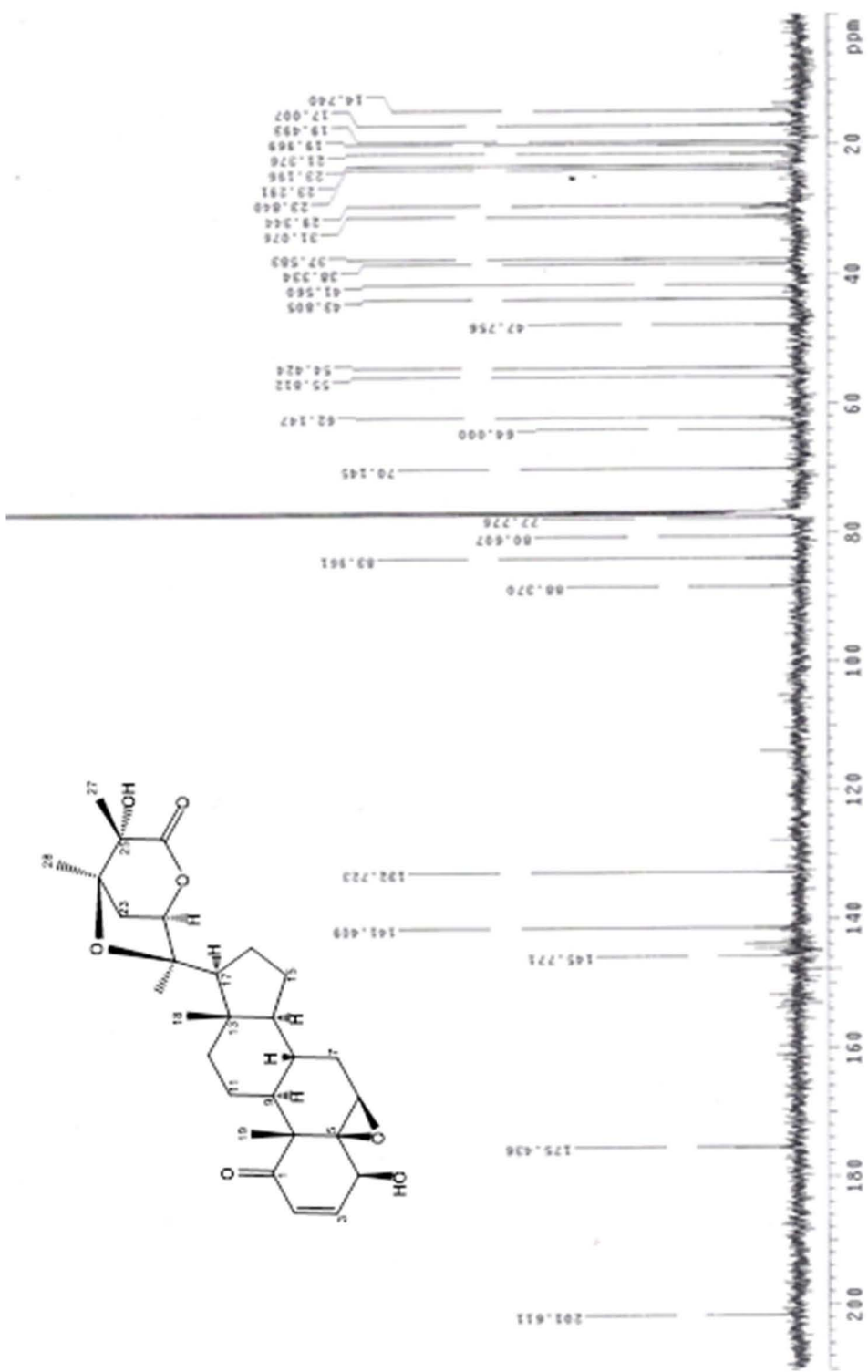
- 34 Abe, F., Nagafuji, S., Okawa, M., Kinjo, J. Trypanocidal Constituents in Plants 6. Minor withanolides from the aerial parts of *Physalis angulata*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2006**, 54, 1226-1228.
- 35 Kuo, P. C., Kuo, T. H., Damu, A. G., Su, C. R., Lee, E. J., Wu, T. S., Shu, R., Chen, C. M., Bastow, K. F., Chen, T. H., Lee, K. H. Physanolide A, a novel skeleton steroid, and other cytotoxic principles from *Physalis angulata*. *Organic Letters* **2006**, 8, 2953-2956.
- 36 Abdullaev, N. D., Maslennikova, E. A., Tursunova, R. N., Abubakirov, N. K., Yagudaev, M. R. Withasteroids from *Physalis*. VIII. Vamonolide. *Chemistry of Natural Compounds* **1984**, 20, 182-191.
- 37 He, Q. P., Ma, L., Lou, J. Y., He, F. Y., Lou, L. G., Hu, L. H. Cytotoxic withanolides from *Physalis angulata* L. *Chemistry & Biodiversity* **2007**, 4, 443-449.
- 38 Jin, Z., Mashuta, M. S., Stolowich, N. J., Vaisberg, A. J., Stivers, N. S., Bates, P. J., Lewis, W. H., Hammond, G. B. Physangulidines A, B and C: Three New Antiproliferative Withanolides from *Physalis angulata* L. *Organic Letters* **2012**, 14, 1230-1233.
- 39 Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., Mc Mahan, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* **1990**, 82, 1107-1112.
- 40 Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paul, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* **1991**, 38, 757-766.
- 41 Veleiro, A. S., Cirigliano, A. M., Oberti, J. C., Burton, G. 7-Hydroxywithanolides from *Datura ferox*. *Journal of Natural Products* **1992**, 62, 1010-1012.

- 42 Shingu, K., Furusawa, Y., Nohara, T. New withanolides, daturametelins C, D, E, F and G-Ac from *Datura metel* L. (Solanaceous Studies. XIV). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1989**, 37, 2132-2135.
- 43 Yang, B., Wang, Q., Xia, Y., Feng, W., Kuang, H.; Baimantuoluolines D-F, Three new withanolides from the flowers of *Datura metel* L. *Helvetica Chimica Acta* **2008**, 91, 964-971.

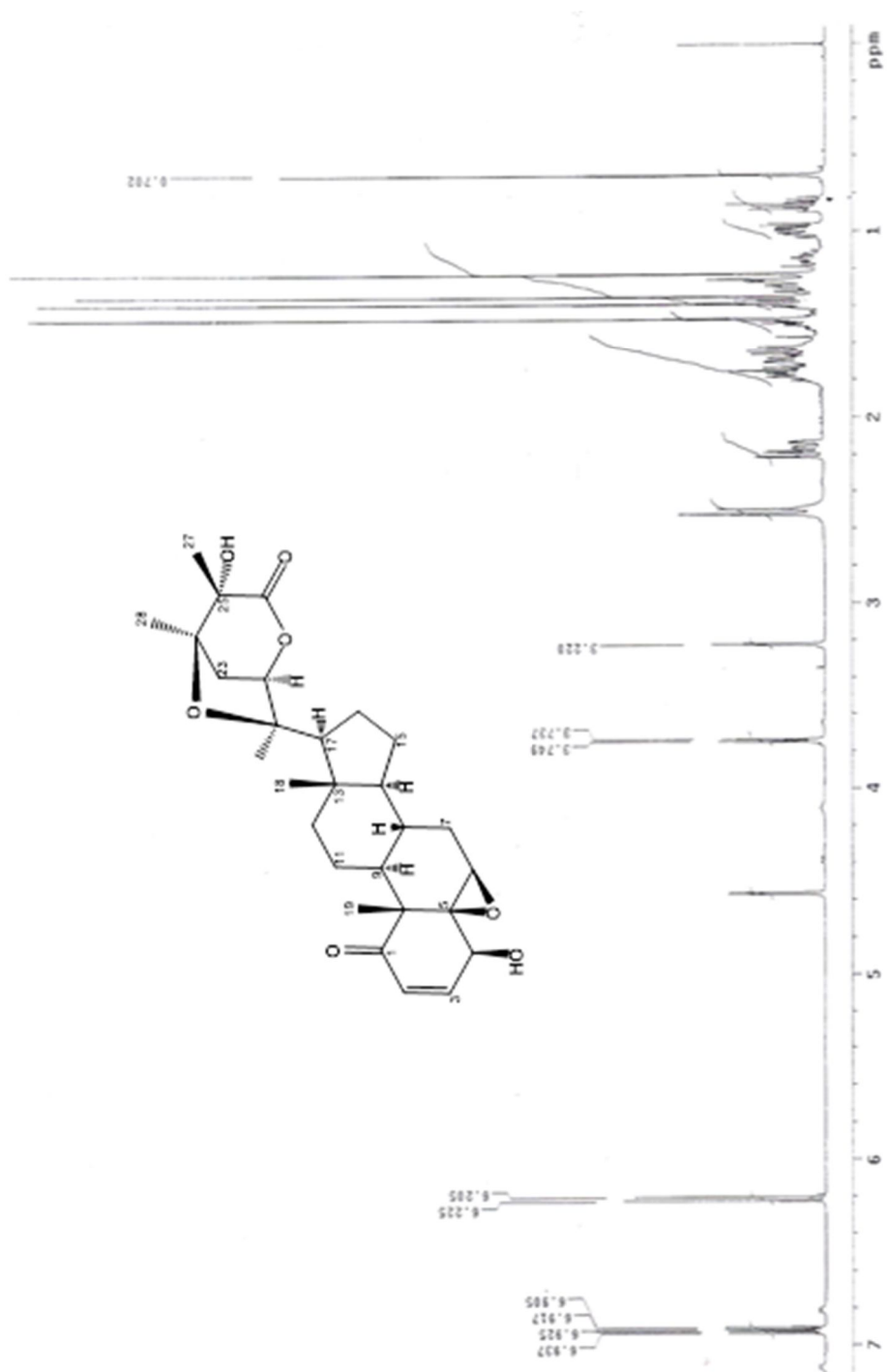
# ANEXO



Espectro 1. IR de physangulida B (1).

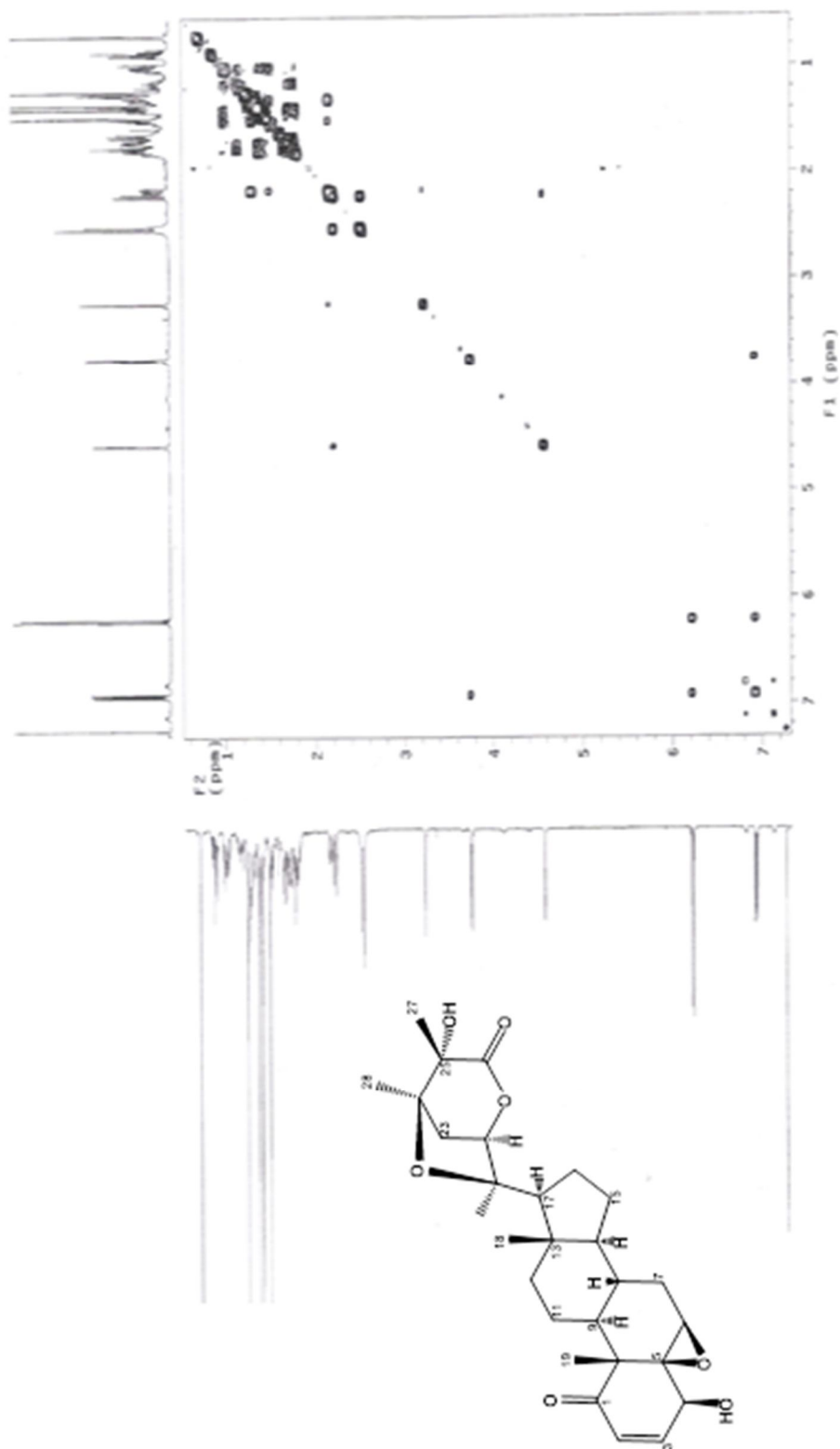


Espectro 2. RMN <sup>13</sup>C de physangulida B (1).

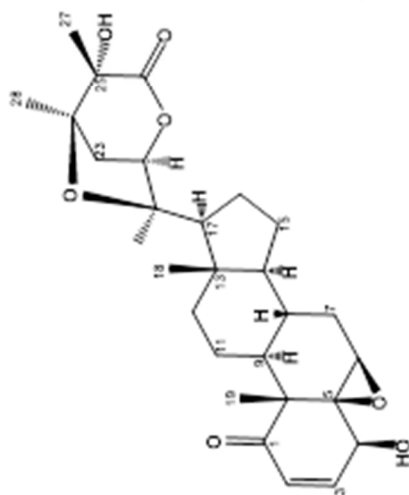
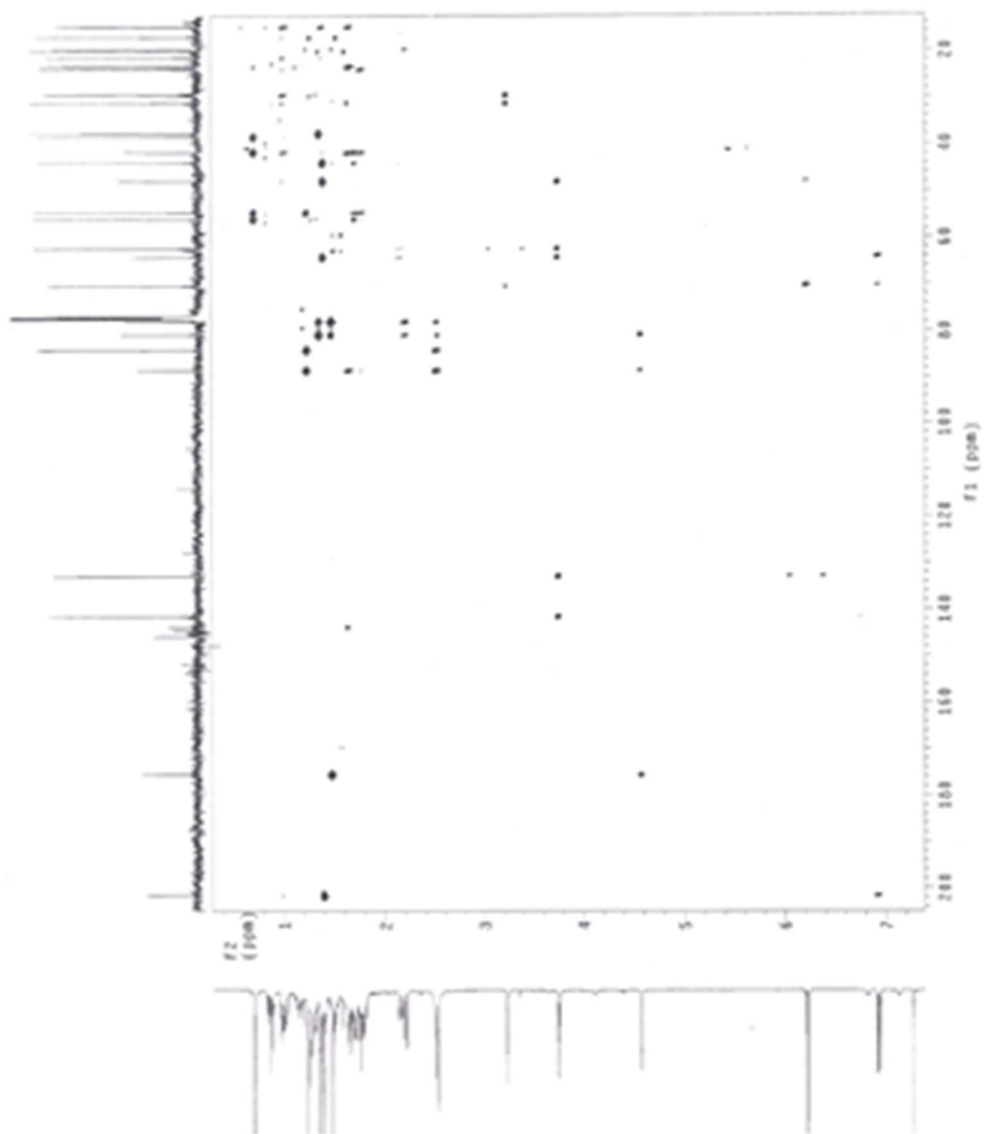


**Espectro 3. RMN <sup>1</sup>H de physangúlica B (1).**

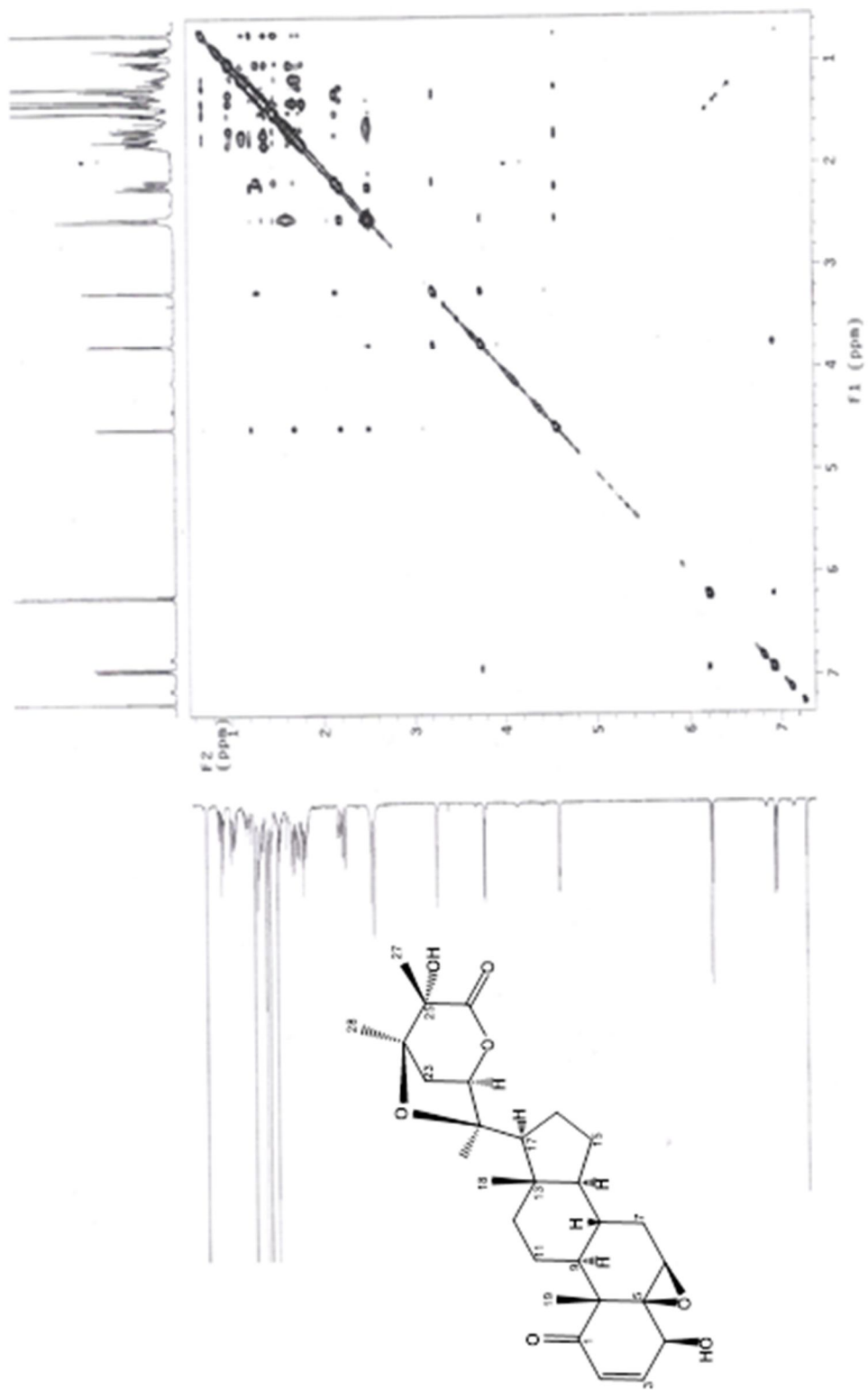




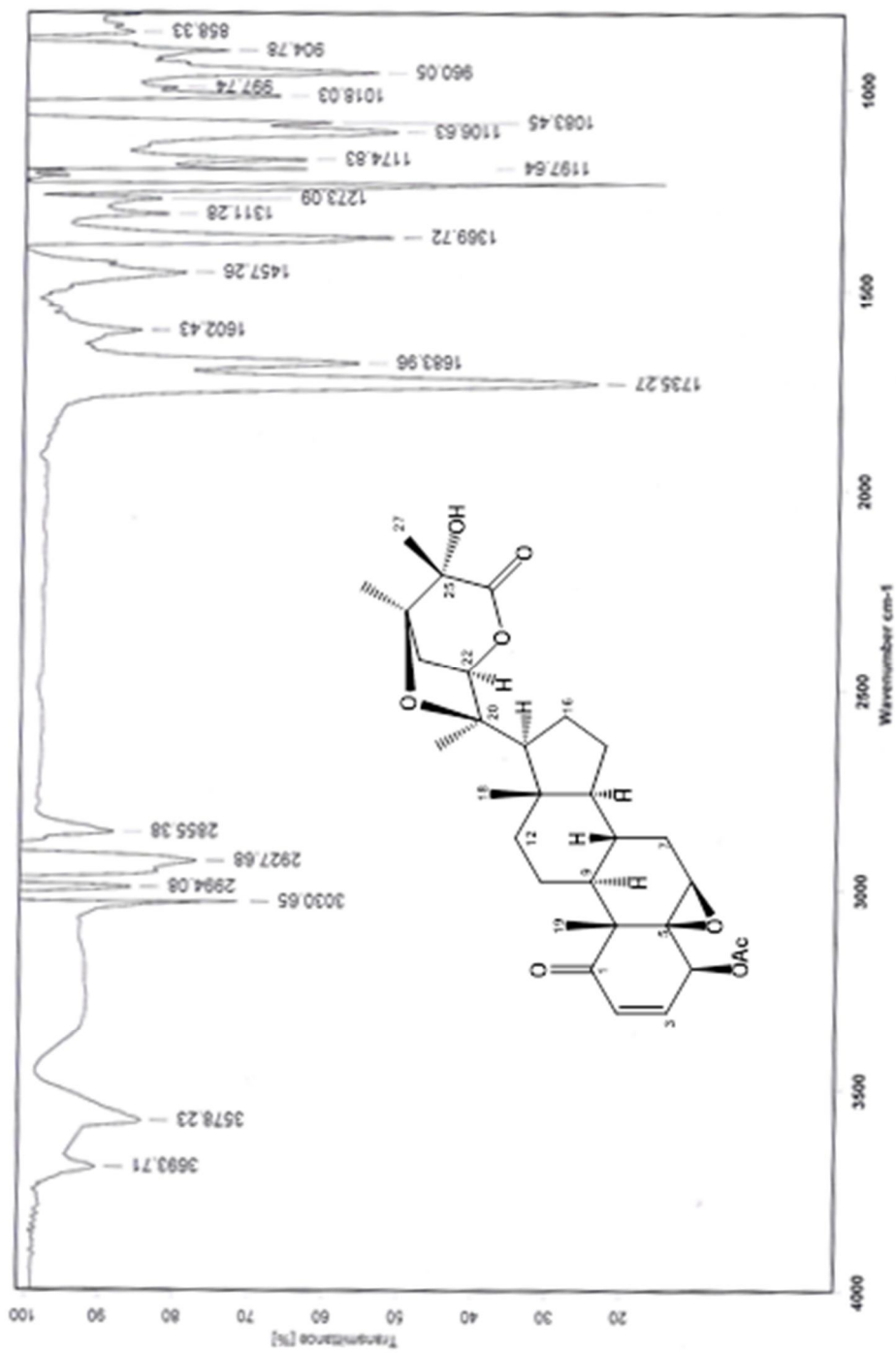
**Espectro 4. COSY de physangulida B (1).**



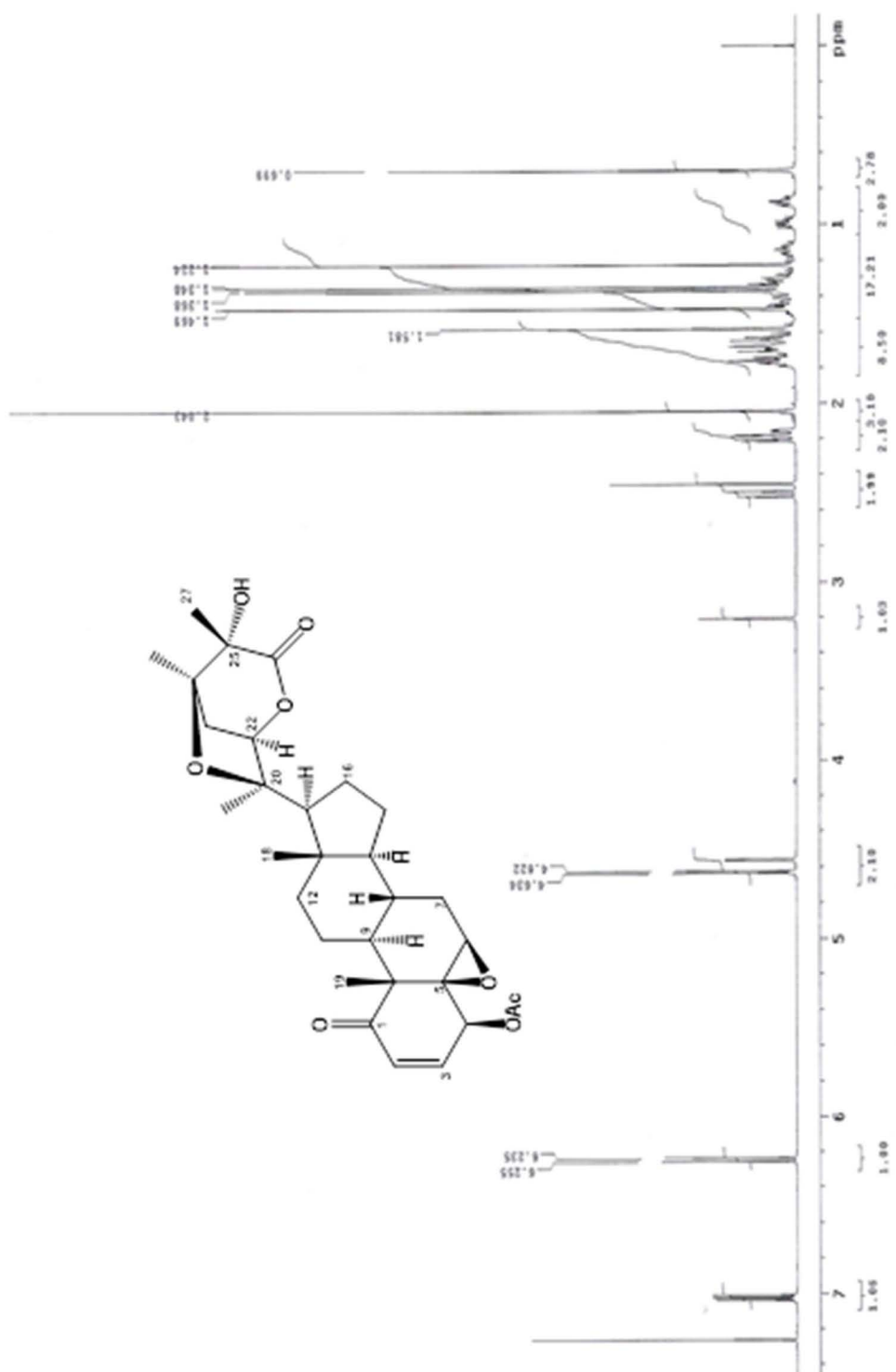
**Espectro 5. HMBC de physangulida B (1).**



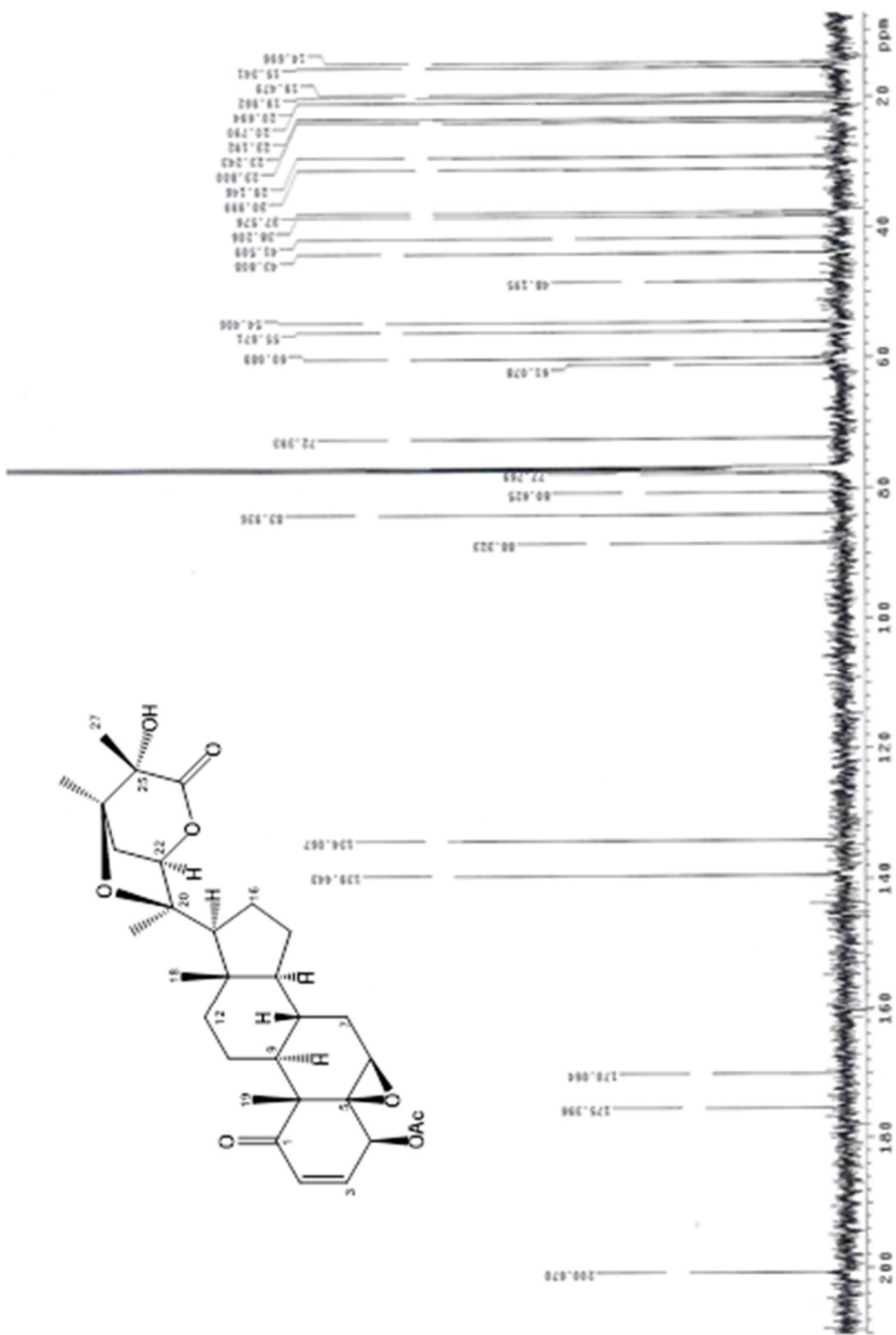
Espectro 6. NOESY de physangulida B (1).



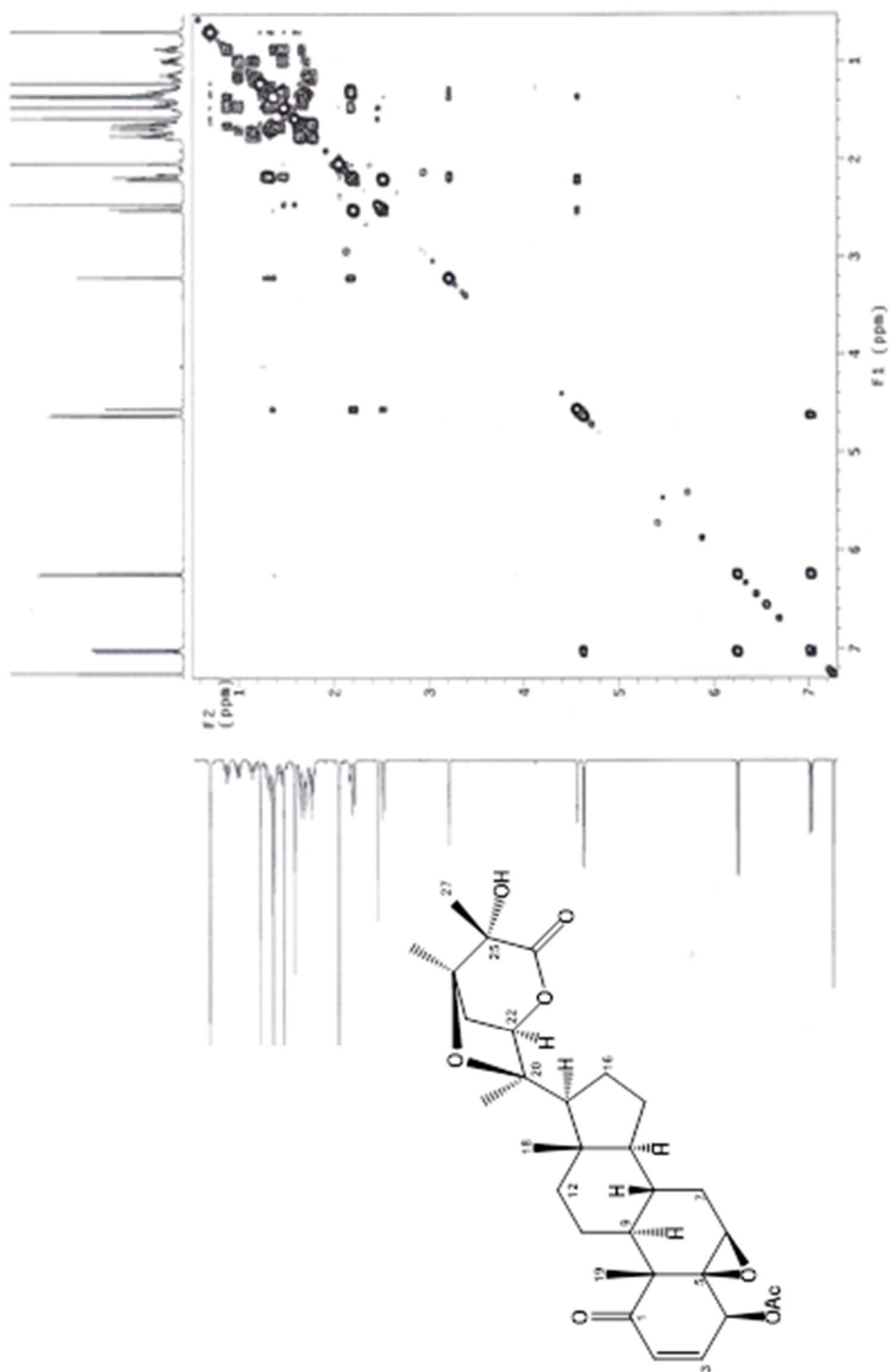
Espectro 7. IR de 4-O-acetilphysangúlida B (2).



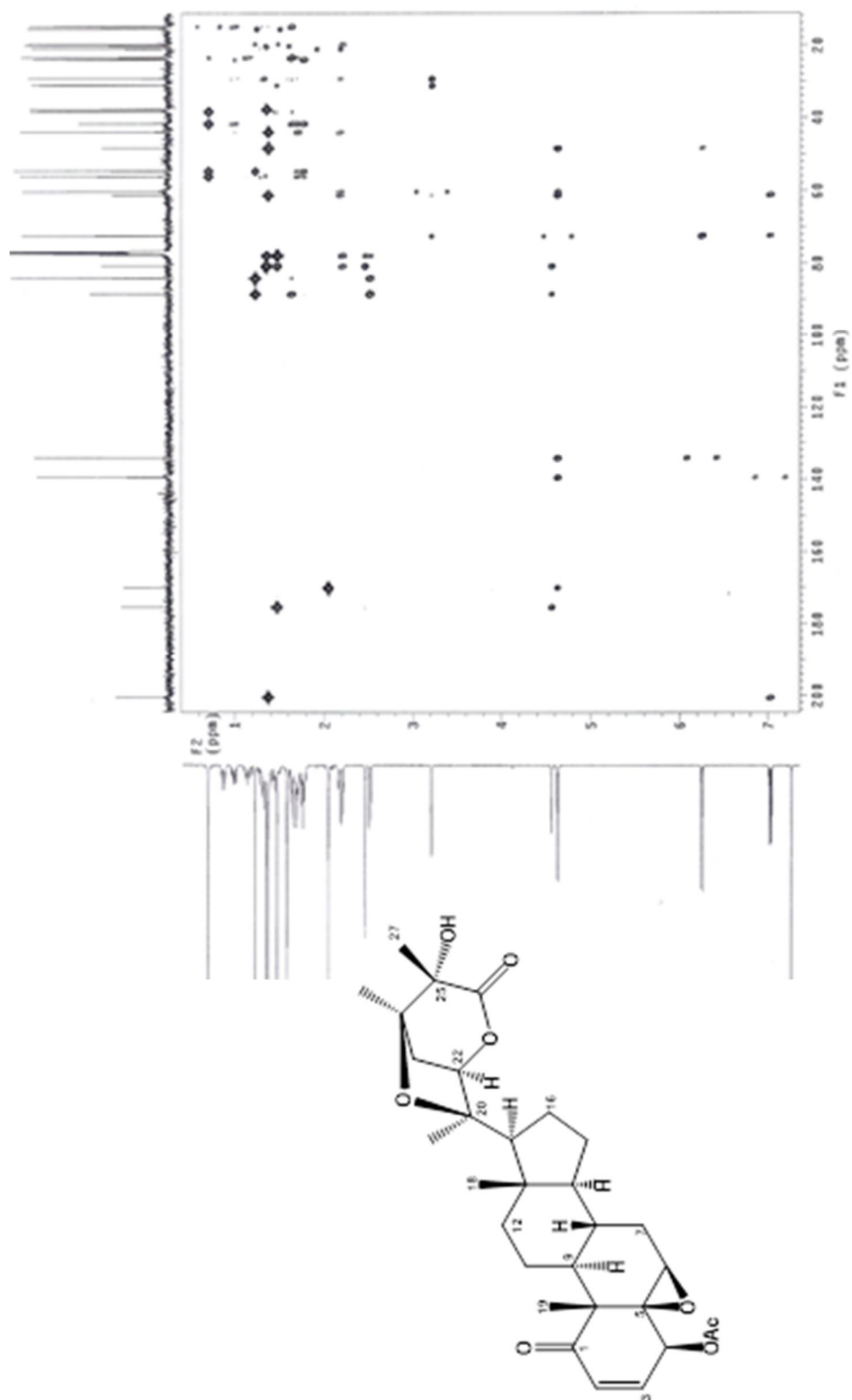
**Espectro 8. RMN <sup>1</sup>H de 4-O-acetilphysangúlida B (2).**



Espectro 9. RMN <sup>13</sup>C de 4-O-acetilphysangúida B (2).

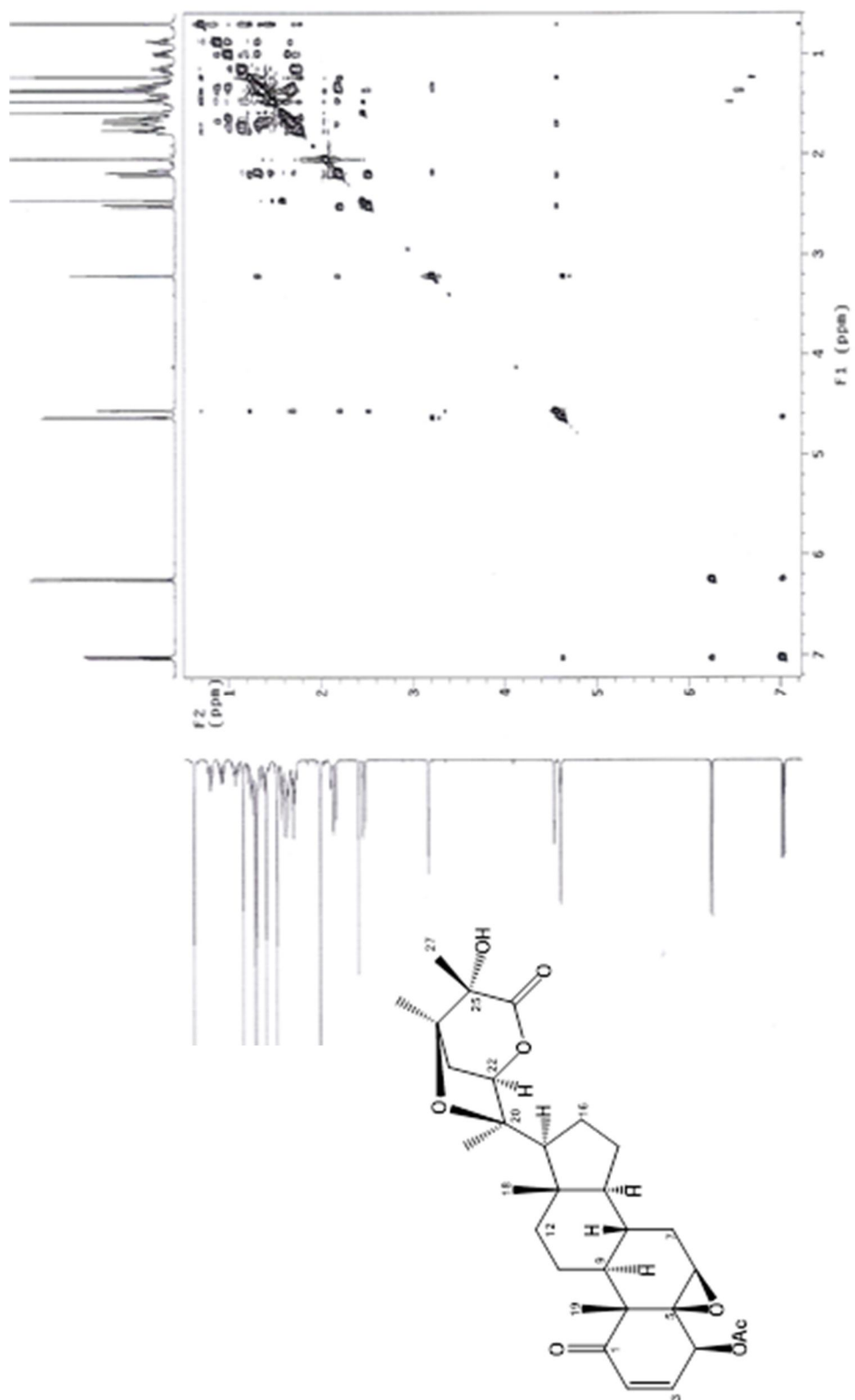


**Espectro 10. COSY de 4-O-acetilphysangulida B (2).**

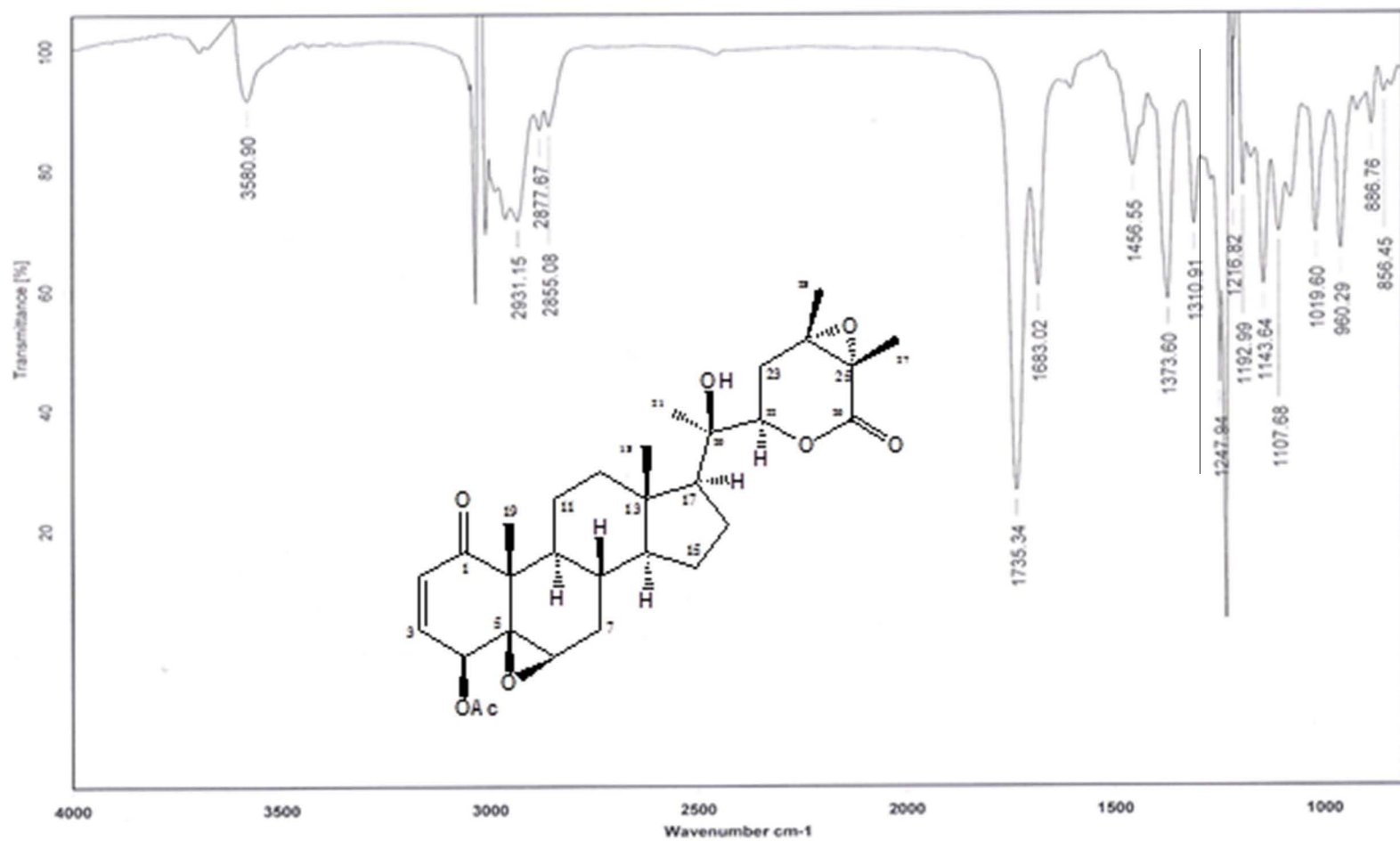


**Espectro 11. HMBC de 4-O-acetilphysangúilda B (2).**

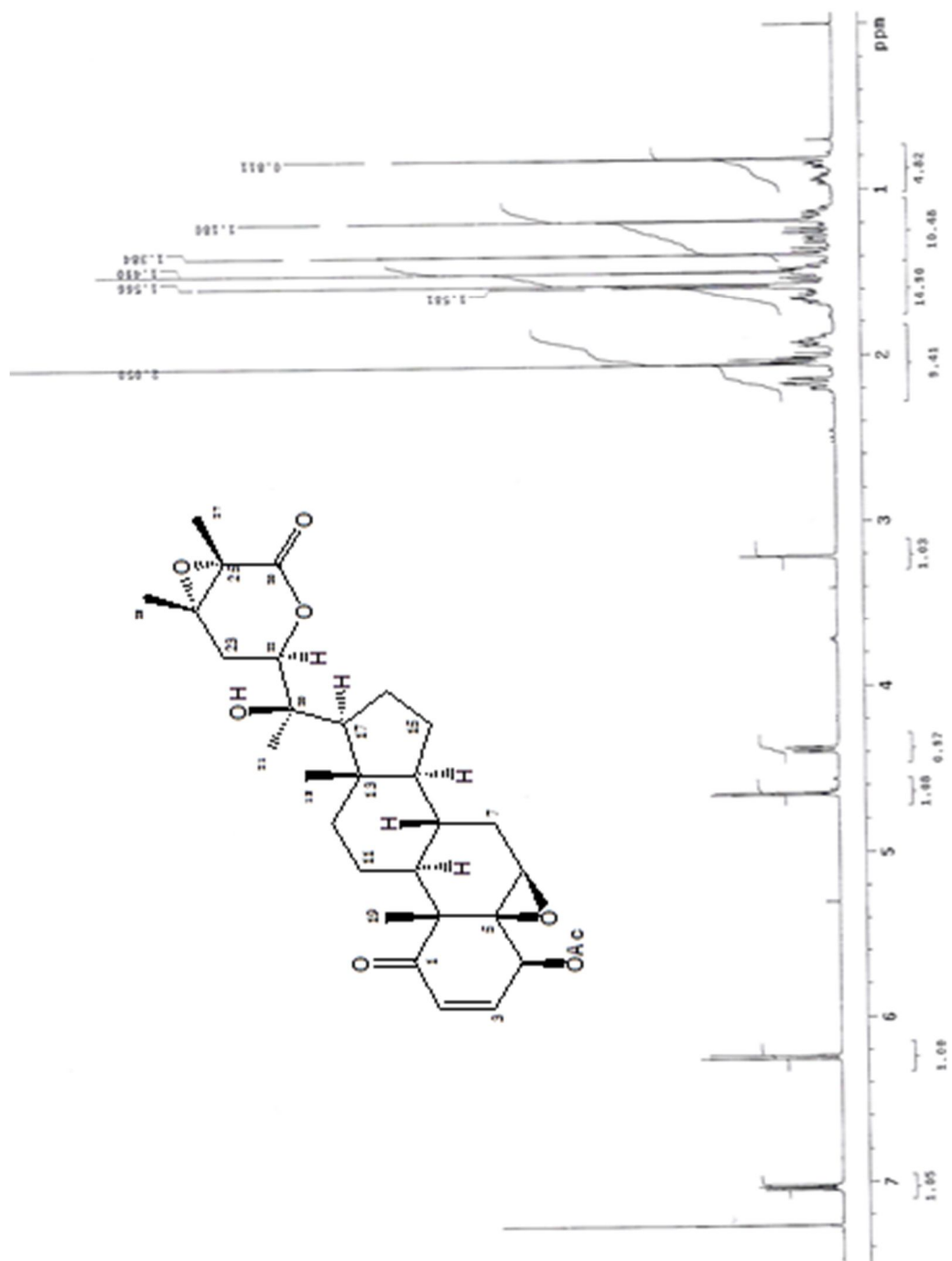




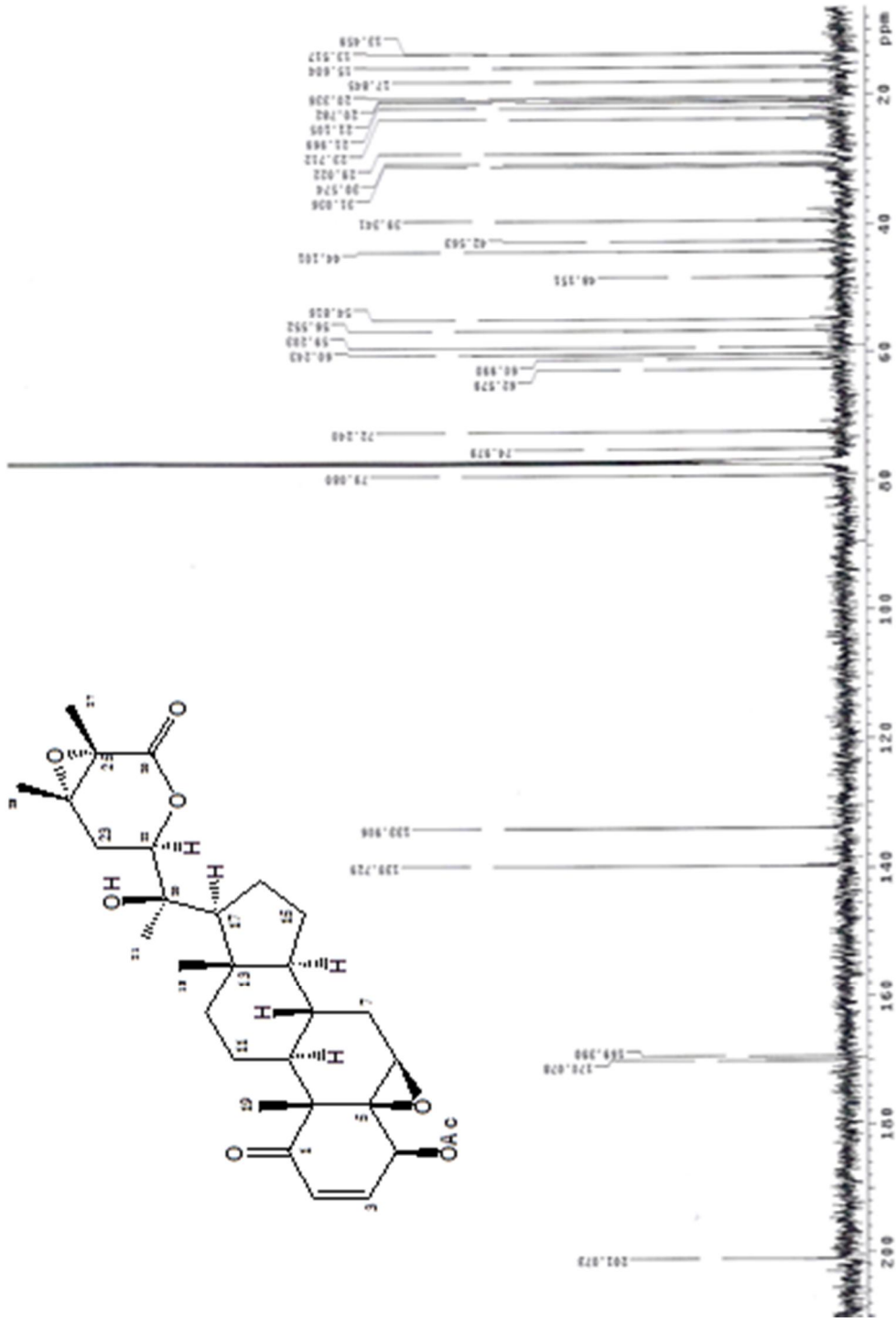
**Espectro 12. NOESY de 4-O-acetilphysangúida B (2).**



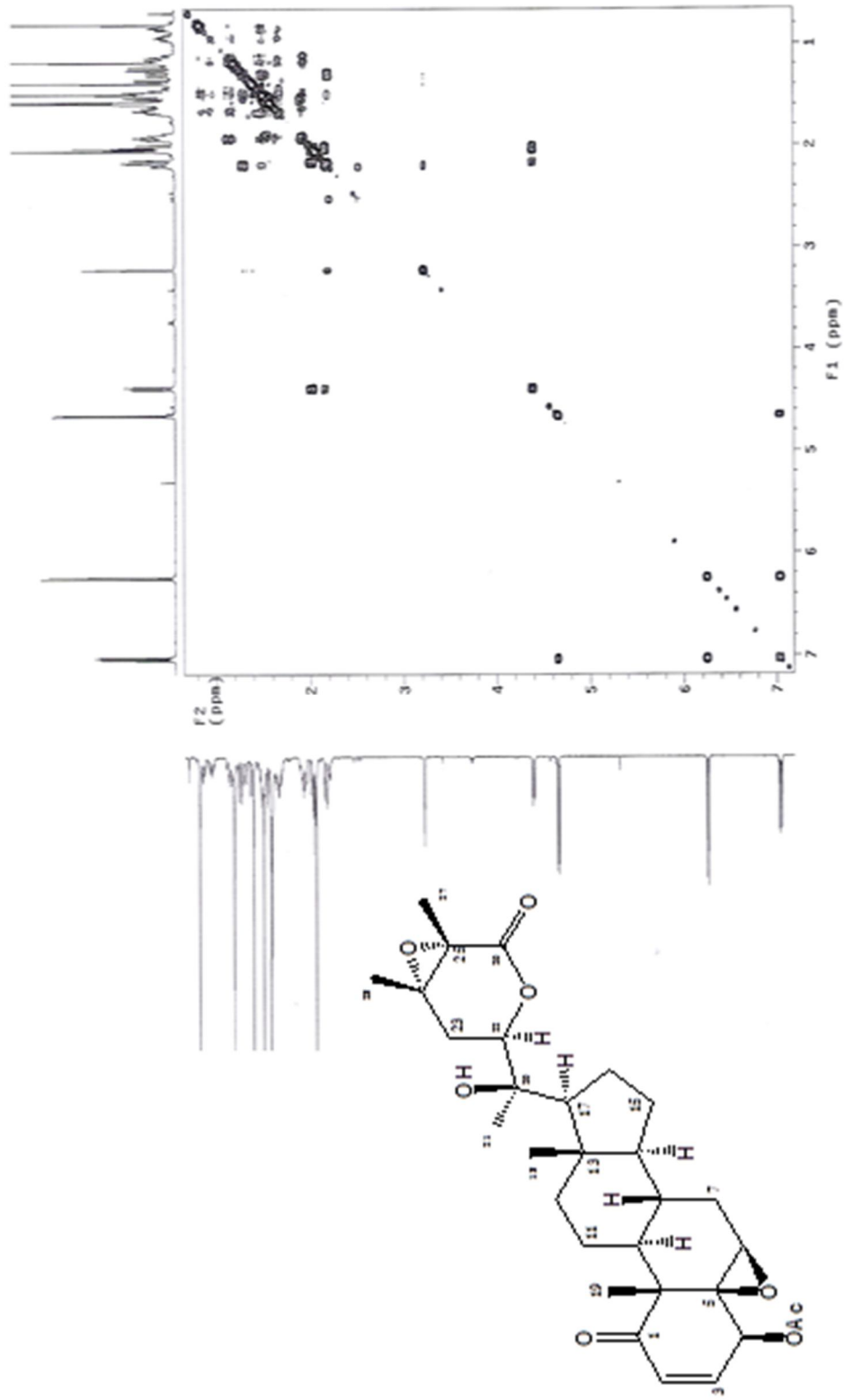
Espectro 13. IR de 4-O-acetil-24 $\alpha$ ,25 $\alpha$ -epoxiwithanolida D (3).



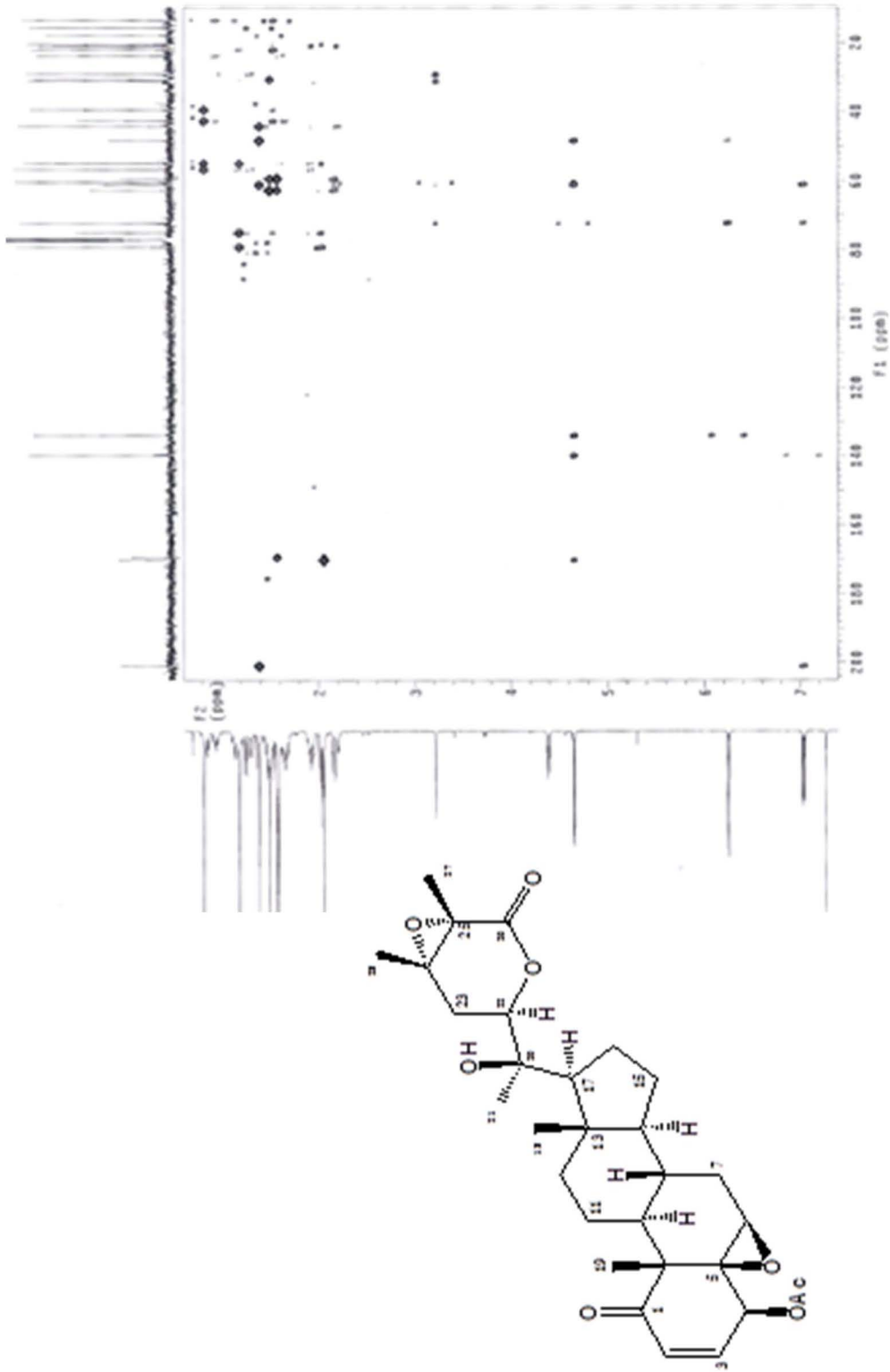
Espectro 14. RMN  $^1\text{H}$  de 4-O-acetil-24 $\alpha$ ,25 $\alpha$ -epoxiwithanólida D (3).



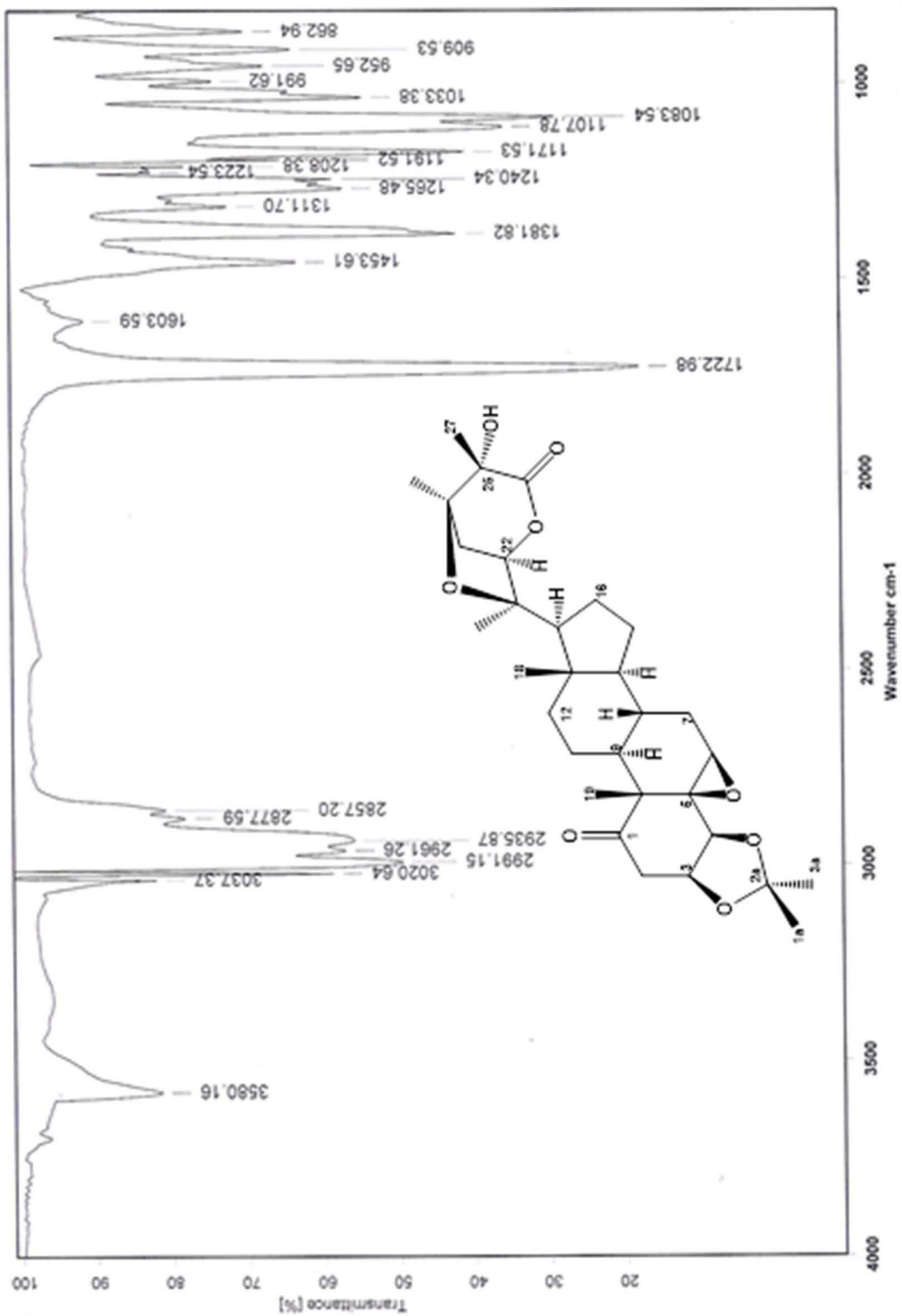
Espectro 15. RMN <sup>13</sup>C de 4-O-acetil-24 $\alpha$ ,25 $\alpha$ -epoxiwithanolida D (3).



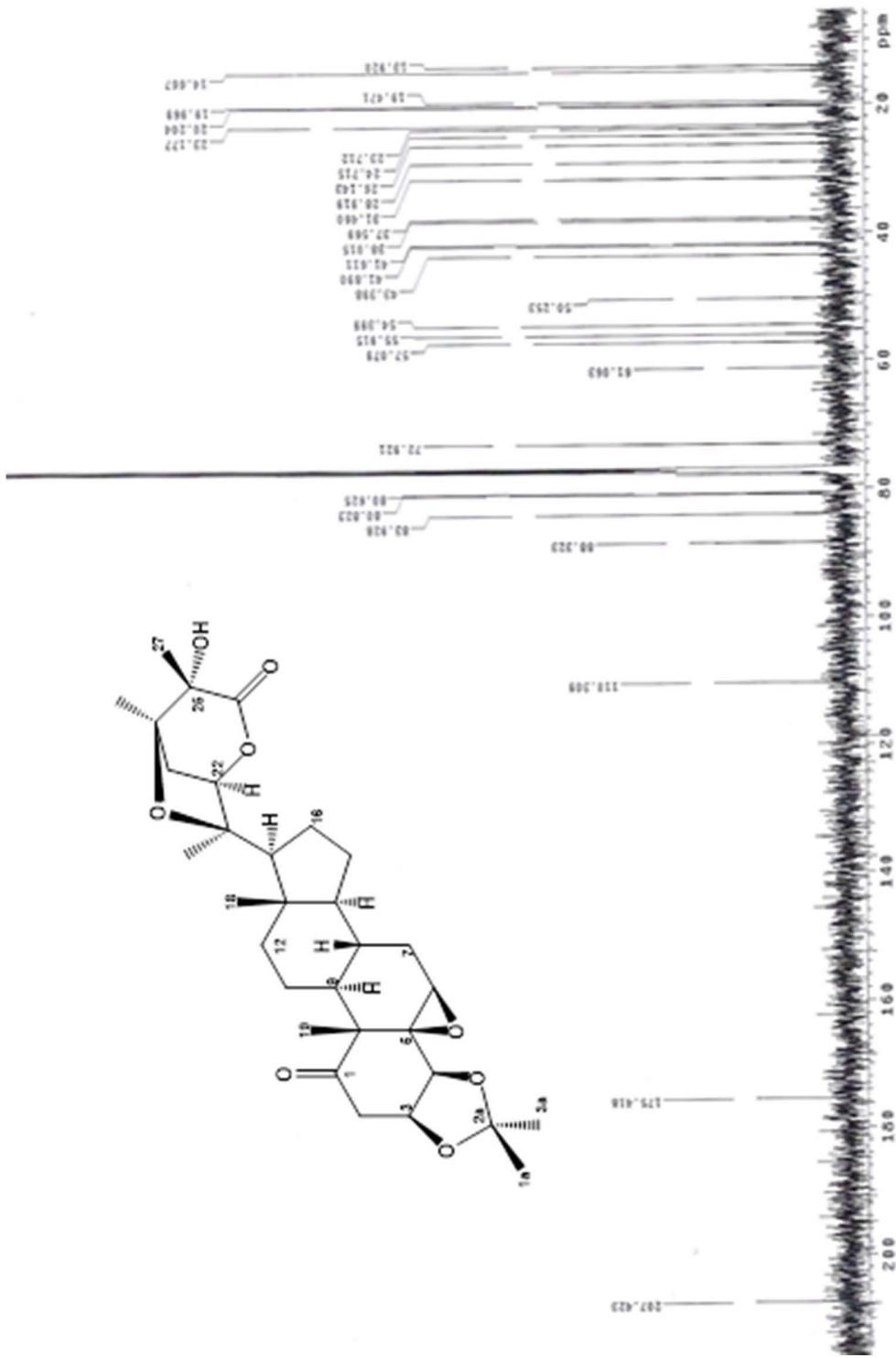
**Espectro 16. COSY de 4-O-acetil-24 $\alpha$ ,25 $\alpha$ -epoxiwithanólida D (3).**



Espectro 17. HMBC de 4-O-acetil-24 $\alpha$ ,25 $\alpha$ -epoxiwithanolida D (3).

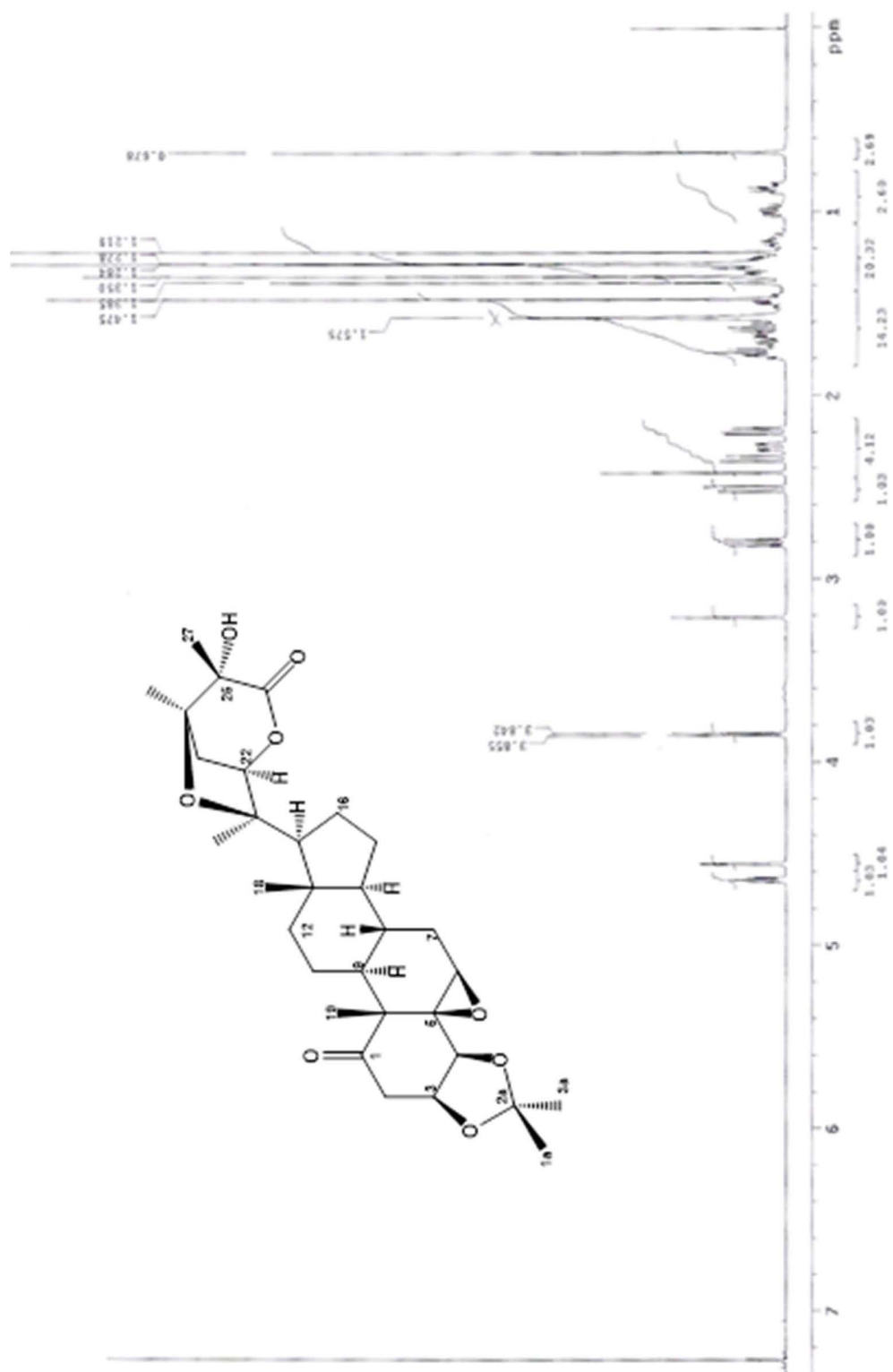


Espectro 18. IR del acetónido de physangulida (5).

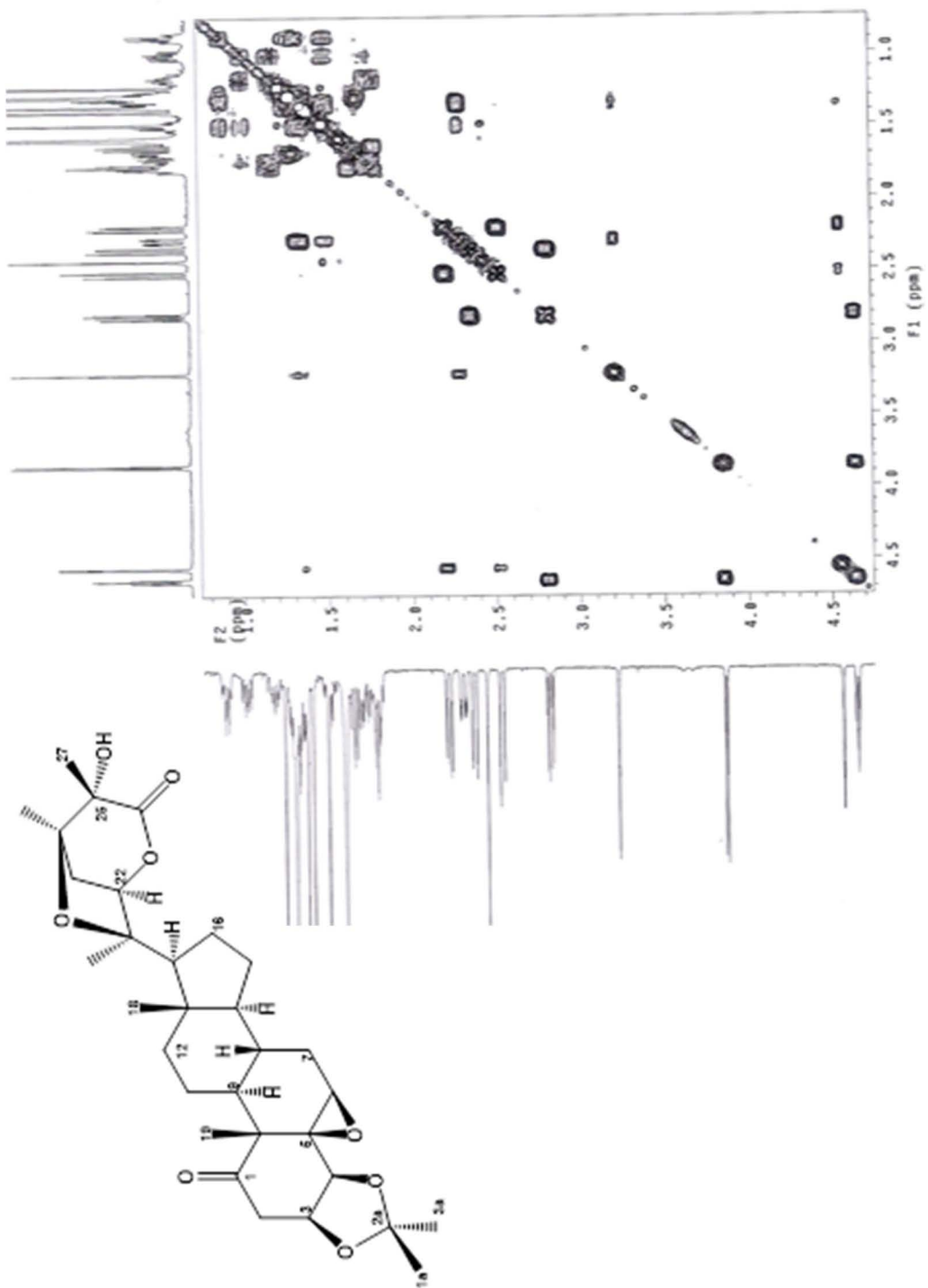


Espectro 19. RMN <sup>13</sup>C del acetónido de physangúlida (5).

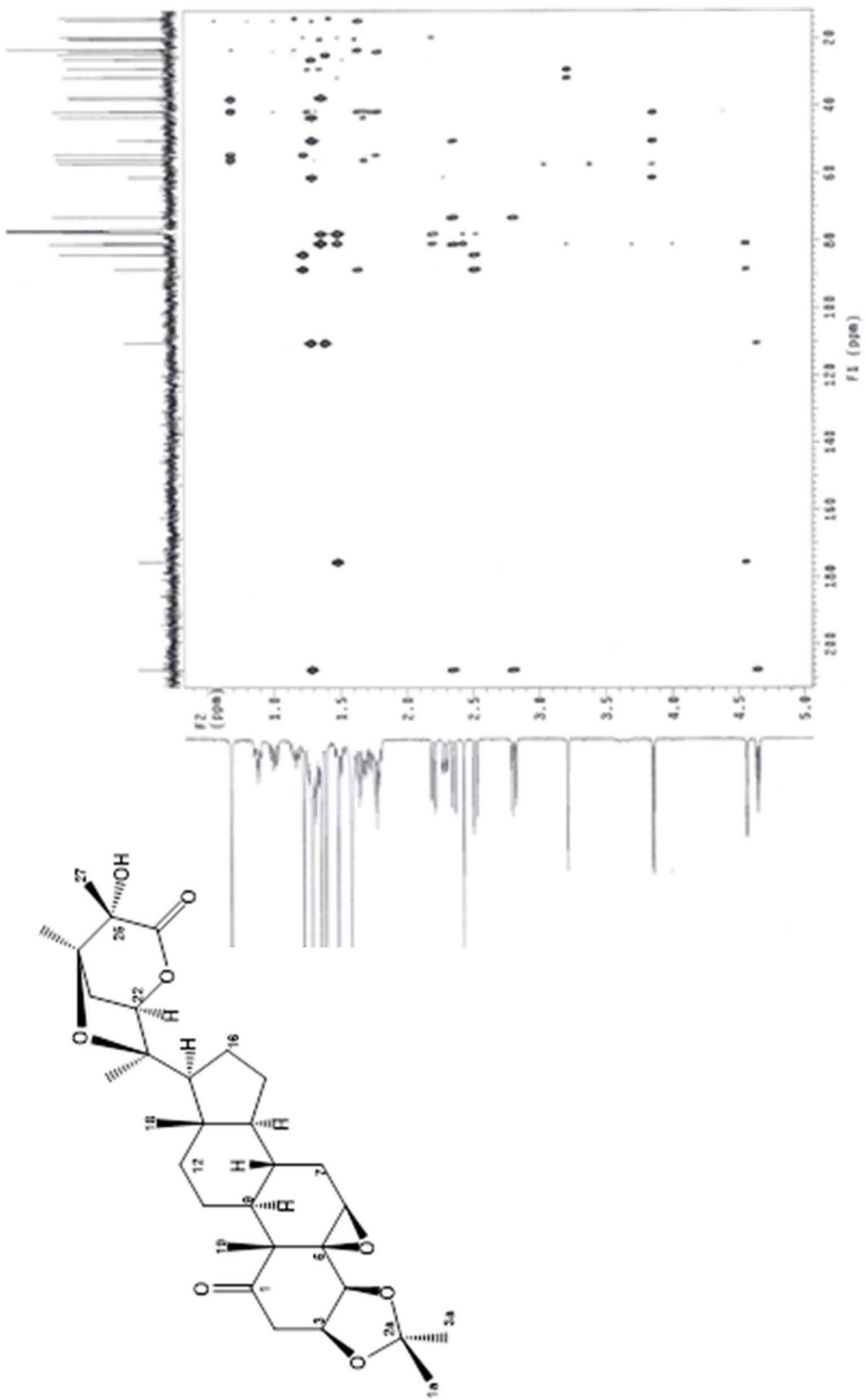




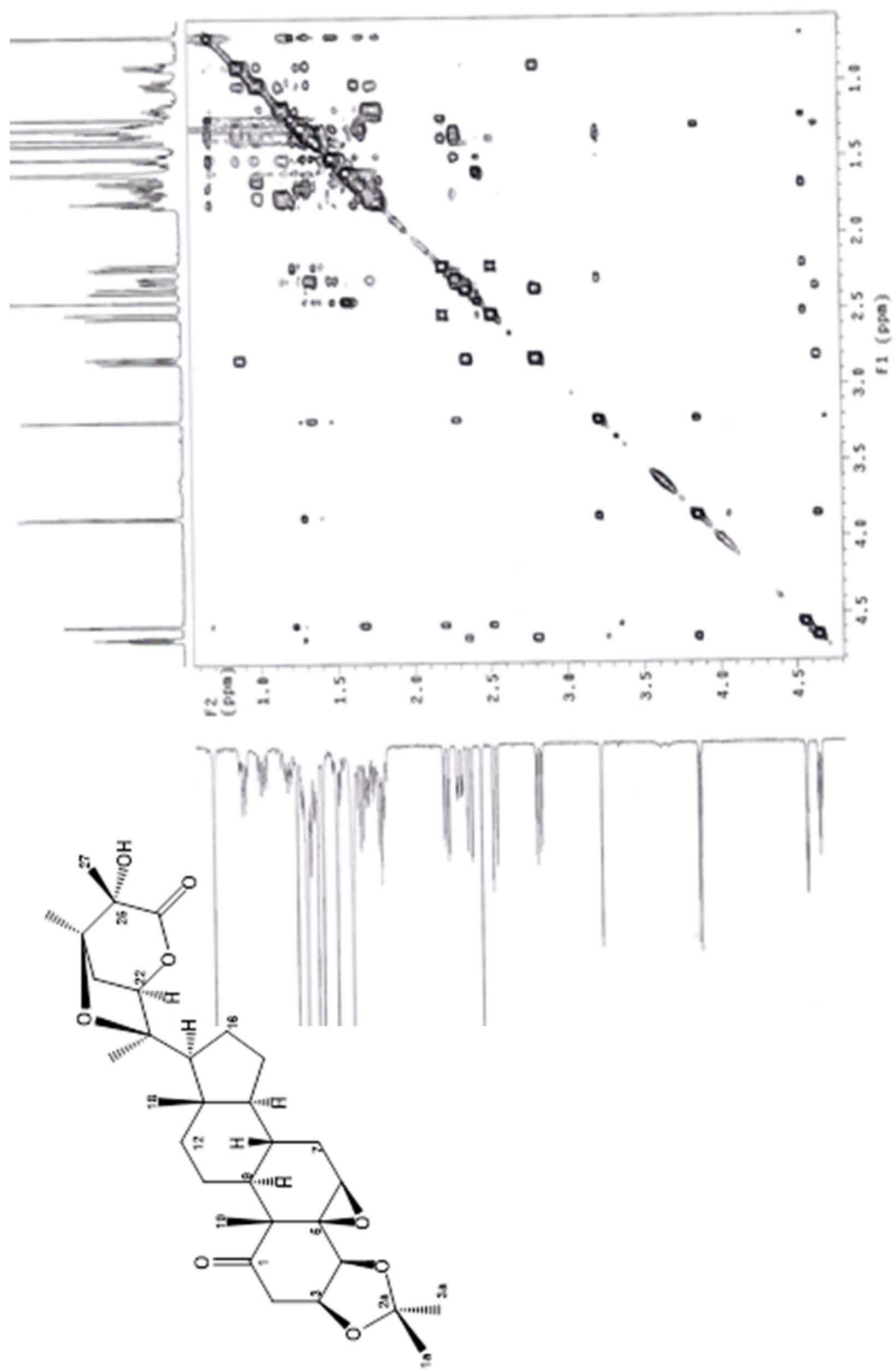
Espectro 20. RMN <sup>1</sup>H del acetónido de physangúlida (5).



**Espectro 21. COSY del acetónido de physangúida (5).**



Espectro 22. HMBC del acetónido de physangulida (5).



Espectro 23. NOESY del acetónido de physangúida (5).