



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO QUÍMICO DE *Physalis gracilis*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Q U Í M I C O
P R E S E N T A
GERARDO PADIERNA JIMÉNEZ



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: DR. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA
VOCAL: DR. AGUSTÍN PALMA DE LA CRUZ
SECRETARIO: M. EN C. EMMA MALDONADO JIMÉNEZ
1ER. SUPLENTE: DRA. NURIA ESTURAU ESCOFET
2° SUPLENTE: M. EN C. PAOLA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 2-7. DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES DEL
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.
CIRCUITO EXTERIOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, DELEGACIÓN COYOACÁN.
C.P. 04510, MÉXICO D.F.**

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. EMMA MALDONADO JIMÉNEZ

SUSTENTANTE:

GERARDO PADIERNA JIMÉNEZ

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II. 1. Familia Solanaceae.....	3
II. 2. Género <i>Physalis</i>.....	5
II. 3. Especie <i>Physalis gracilis</i>.....	7
II. 4. Withanólidas y withaesteroides.....	8
II. 5. Biosíntesis de withaesteroides.....	11
II. 6. Clasificación de los withaesteroides.....	20
II. 7. Actividad biológica de los withaesteroides.....	25
III. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÈTRICAS.....	33
III. 1. Espectroscopia de absorción en el infrarrojo.....	33
III. 2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear...35	
III. 3. Espectrometría de masas.....	37

IV. OBJETIVO.....	40
V. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	41
V. 1. Material y equipo.....	41
V. 2. Material vegetal.....	42
V. 3. Extracción del material vegetal.....	42
V. 4. Aislamiento y purificación de compuestos.....	43
V. 5. Evaluación de la inhibición de la actividad de la enzima α-glucosidasa.....	47
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
VI. 1. Elucidación estructural de los compuestos.....	49
VI. 2. Pruebas biológicas.....	60
VI. 2. 1. Inhibición de la actividad de la enzima α-glucosidasa.....	60
VII. CONCLUSIONES.....	62
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	63
ANEXO.....	74

ABREVIATURAS

∅	Diámetro
a	Señal ancha
c	Cuarteto
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear (Correlated spectroscopy)
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dc	Doble de cuarteto
dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de doble
dt	Doble de triple
DEPT	Aumento sin distorsión de la transferencia de polarización (Distortionless enhancement of polarization transfer)
EM-DART	Espectrometría de masas por análisis directo en tiempo real (Direct analysis in real time)
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
h	Altura

HMBC	Correlación heteronuclear de enlaces múltiples (2J C-H, 3J C-H) (Heteronuclear multiple bond coherence)
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple (1J C-H) (Heteronuclear simple quantum coherence)
IR	Espectroscopia de infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
m	Multiplete
m/z	Relación masa y carga
M^+	Ion molecular
NOESY	Espectroscopia de efecto nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser effect spectroscopy)
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singulete
t	Triplete
td	Triplete de doble

I. INTRODUCCIÓN

La naturaleza es la fuente primordial que ha permitido al hombre asegurar su supervivencia, primero como proveedora de alimento y luego como origen de diversos elementos que le permiten mejorar su calidad de vida; entre éstos, los que sirven para combatir enfermedades y aliviar padecimientos. La medicina tradicional es consecuencia de este aprovechamiento de los recursos naturales y aún ahora es una opción importante, y en algunos casos la única, para el tratamiento y la prevención de enfermedades.

Las sustancias medicinales, ya sea las empleadas en medicina tradicional o resultado de la medicina moderna, están constituidas por uno o varios *principios activos* o *fármacos*. Los fármacos son sustancias biológicamente activas, sintetizadas por el hombre o bien producidas por otros organismos: plantas, hongos o bacterias. Cuando son producidos por organismos, resultan de procesos metabólicos secundarios: se sintetizan a partir de metabolitos primarios y, contrario a éstos, no son indispensables para la vida del organismo.

La diversidad de la flora mexicana implica no sólo una abundancia de especies de plantas medicinales, sino también una amplia variedad de compuestos con diversas actividades biológicas. Esto se traduce en una gran riqueza desde el punto de vista químico: innumerables grupos y tipos de compuestos, con estructuras novedosas y con propiedades químicas y farmacológicas desconocidas, que son potencialmente aprovechables.

Particularmente, México cuenta con la segunda o tercera flora medicinal más rica del mundo. Esta comprende no sólo plantas endémicas, sino también otras de origen extranjero introducidas desde el período de colonización. Esto se refleja en las especies consideradas medicinales y empleadas con esos fines por distintas comunidades a lo largo de la república. Debido a su arraigo popular, así como a su disponibilidad física y accesibilidad económica, cerca de 20 millones de personas en el país recurren a este tipo de medicina para tratar sus padecimientos.^{1,2}

La caracterización química de especies vegetales empleadas medicinalmente es un área relativamente poco desarrollada dentro de la investigación científica, mas su campo de acción es importante y sus resultados relevantes. Un número importante de los fármacos producidos por la industria moderna provienen de fuentes naturales y en muchos casos se tiene conocimiento de ellos gracias a referencias de su uso tradicional. Por ejemplo, de 1981 a 2010 el 26,83 % de los nuevos medicamentos aprobados por la FDA de los Estados Unidos (*Food and Drug Administration*) fueron obtenidos de fuentes naturales.³

Las plantas del género *Physalis* son de marcada importancia pues además de que la mayoría de sus especies son endémicas del país, muchas de ellas son utilizadas en la medicina tradicional mexicana. En este marco se inscribe el presente trabajo, en el que se presentan los resultados del estudio químico de la especie *Physalis gracilis* Miers, como una contribución al conocimiento de la planta desde un enfoque químico. Adicionalmente, se presentan los resultados de la evaluación de dos de los compuestos aislados como inhibidores de la actividad de la enzima α -glucosidasa.

II. ANTECEDENTES

II. 1. Familia Solanaceae

Las solanáceas son una familia de plantas dicotiledóneas pertenecientes al orden de las Solanales. Son hierbas, arbustos, árboles e incluso lianas, con hojas alternadas, simples y sin estípulas. Esta familia comprende cerca de 98 géneros y 2700 especies;⁴ está presente en todos los continentes, salvo la Antártida. La mayor diversidad se concentra en América del Sur y América Central, seguida de Australia y África. Ocupan una gran variedad de ecosistemas, desde desiertos a selvas tropicales. Se les encuentra, incluso, como parte de la vegetación secundaria en zonas con asentamientos humanos.

Diversas especies pertenecientes a esta familia poseen importancia económica. Algunas son alimenticias como la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate verde (*Physalis philadelphica*), el jitomate (*Lycopersicon esculentum*), la berenjena (*Solanum melongena*) y los chiles (*Capsicum*). Otras son plantas de ornato como *Petunia schizanthus*, *Salpiglossis* y *Datura*.

Algunas especies más son fuente de sustancias con propiedades farmacéuticas útiles, como la escopolamina, la atropina, la hiosciamina y la nicotina (Figura 1). Estas sustancias se encuentran en plantas como la jusquiama (*Hyoscyamus albus*), la belladona (*Atropa belladonna*), el estramonio (*Datura stramonium*), la mandrágora (*Mandragora autumnalis*) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*).⁵

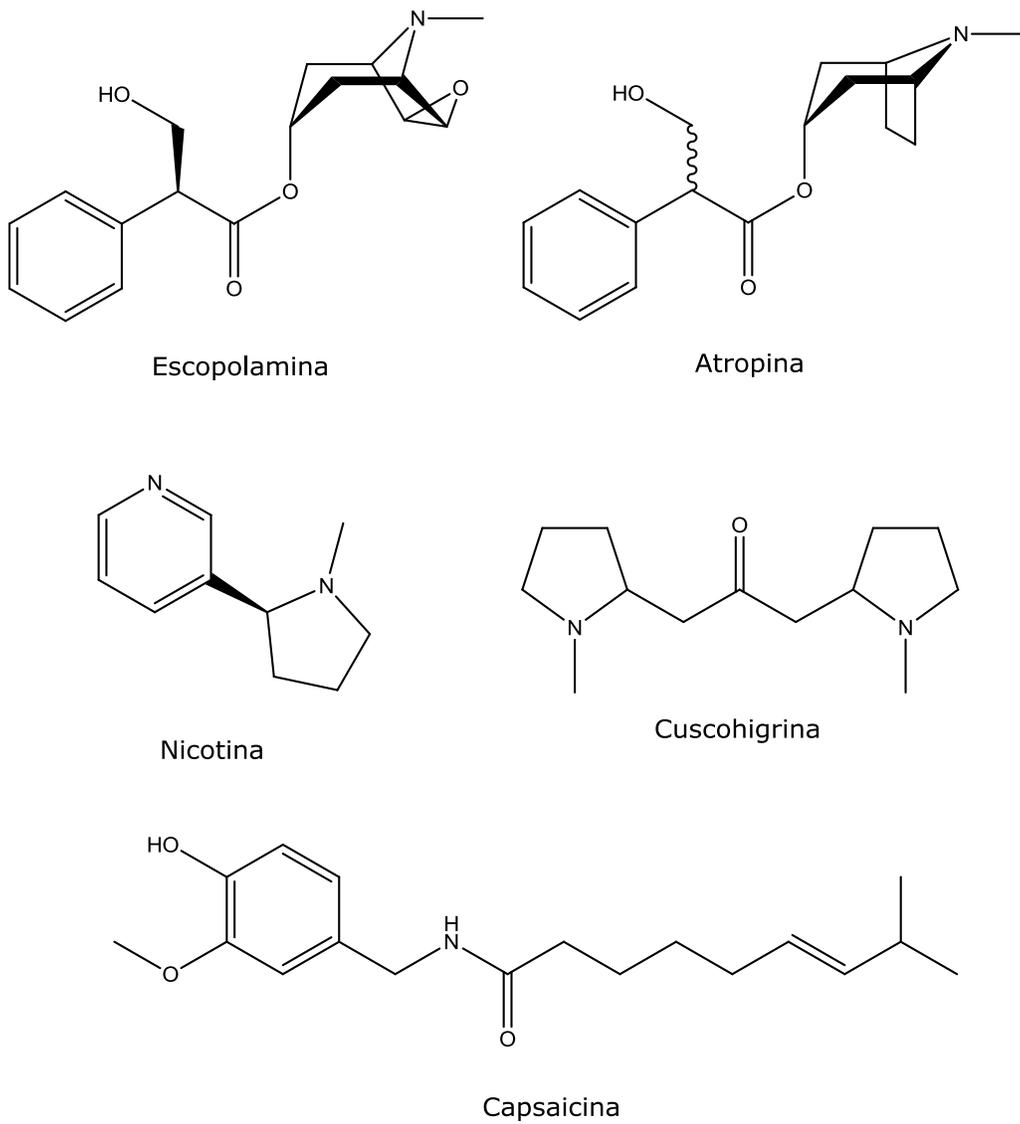


Figura 1. Algunos compuestos obtenidos de las solanáceas.

II. 2. Género *Physalis*

El género *Physalis* pertenece a la familia de las solanáceas y agrupa 75 a 90 especies.⁶ Son originarias de regiones con clima templado y subtropical. Todas las especies son nativas de América, excepto *Physalis alkekengi*. Son plantas herbáceas que crecen de cuarenta centímetros a tres metros de alto y pueden ser anuales o perennes. La mayoría requieren luz solar completa y temperaturas de templadas a cálidas. Algunas especies son sensibles al frío, mientras que otras como *P. alkekengi* toleran el frío severo durante el invierno. Crecen en todo tipo de suelo e incluso en macetas.

Este género se caracteriza por dar frutos pequeños de diversos colores (amarillo, naranja y morado oscuro) semejantes en forma y estructura a los del jitomate, aunque generalmente son de menor tamaño. Se encuentran cubiertos parcial o completamente por una cáscara fina (cáliz) y son ricos en criptoxantina, un colorante carotenoide. Los frutos comestibles pueden ser ingeridos crudos o en ensaladas. Algunas variedades se usan como saborizantes en postres por su gama de sabores: agrios, dulces o salados. También contienen pectina, por lo que se emplean como gelificantes.

Algunas *Physalis* son importantes económicamente, como *P. philadelphica* en México y *P. peruviana* en Colombia; otras son plantas de ornato, como *P. alkekengi* en China y en Japón. Muchas de las especies de *Physalis* presentan diversas actividades biológicas, por lo que son comúnmente empleadas en la medicina tradicional para tratar padecimientos gastro-intestinales y respiratorios. En la medicina tradicional china las *Physalis* se emplean como remedio para diferentes padecimientos como abscesos, tos, fiebres y dolor de garganta.⁷

México cuenta con al menos 70 especies del género *Physalis* y sus usos varían según los diferentes estados de la república.⁸ Por ejemplo, *P. aequata*, es empleada en Morelos, Puebla y Veracruz para tratar desórdenes digestivos: dolor de estómago, empacho, estreñimiento y bilis. El fruto de *P. philadelphica* es comúnmente usado en el tratamiento de problemas respiratorios y dolor de amígdalas en Veracruz y Morelos; en Michoacán se emplea contra la tos ferina, para controlar la hipertensión e incluso para tratar la calvicie.⁹

En Zacatecas se emplea *P. hederifolia* para tratar la colecistopatía, mientras que *P. nicandroides* se emplea en Guerrero para tratar edemas y en Puebla contra la conjuntivitis. En Hidalgo, *P. orizabae* se utiliza como antidiarréico. *P. ixocarpa* se emplea en Chiapas como diurético y contra la amigdalitis, mientras que en Jalisco se emplea para tratar la cefalea, la gastroenteritis y la alopecia. *P. angulata* es usada en diferentes regiones para tratar las pústulas, la malaria y padecimientos hepáticos.⁹

II. 3. Especie *Physalis gracilis*

Physalis gracilis es una hierba que mide de veinticinco centímetros a un metro de altura; a veces se encuentra reclinada en otras plantas o en el suelo. Las hojas son alargadas y miden hasta siete centímetros de largo. Las flores son amarillas o amarillo-verdosas, con unas manchas de color morado. Los frutos son carnosos, verdes y tienen semillas amarillas. Es originaria de Mesoamérica, habita en clima cálido desde el nivel del mar hasta los 2250 m. Crece en bosque tropical perennifolio, bosque mesófilo de montaña y bosque de pino.⁶

En los estados de Veracruz y Puebla, los frutos de esta especie se consumen como fruta pues resultan dulces incluso crudos. En Jalisco se consume como *quelite*: se ingieren tallos y follaje. En la costa del golfo de México se emplea medicinalmente: se ingieren infusiones de la raíz para tratar algunos tipos de cálculos en la vesícula biliar. La raíz se emplea como carminativo, antidiarréico, para aliviar cólicos por indigestión y otros trastornos gastro-hepáticos. De igual forma, se bebe la decocción de las hojas para tratar padecimientos como vómito, diarrea o empacho de los niños. En Puebla se recurre a ella para regular la presión. Se emplea, además, para mitigar el dolor de amígdalas. En Guerrero es común su uso ornamental.⁹

II. 4. Withanólidas y withaesteroides

Las solanáceas son la principal fuente de un tipo de compuestos llamados *withaesteroides*, aunque no todas ellas los producen. Hasta ahora, se han identificado diecinueve géneros que presentan estos compuestos, siendo *Withania* y *Physalis* aquellos donde ocurren con mayor frecuencia.¹⁰ El primer withaesteroide aislado fue la withaferina A (Figura 2) y se obtuvo de una conocida planta medicinal india: *Withania somnifera*.¹¹ En 1965 se elucidó por primera vez su novedosa estructura¹² y sus interesantes actividades biológicas promovieron el estudio de esta planta, aislándose así diversos compuestos con estructuras similares.

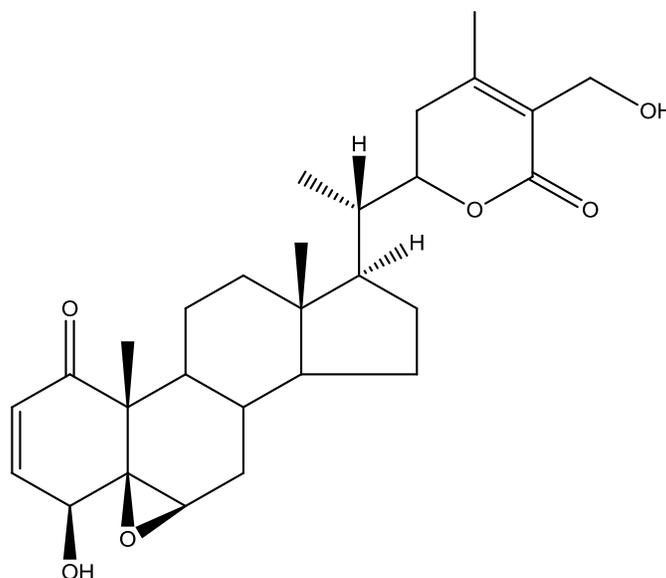


Figura 2. Withaferina A.

Los withaesteroides son esteroides de veintiocho carbonos (C₂₈) con esqueleto de ergostano, intacto o con arreglos. Se caracterizan por poseer una cadena lateral de nueve carbonos con una δ -lactona (entre C-22 y C-26) o bien con una γ -lactona (entre C-23 y C-26).¹⁰ En un principio se les denominó *withanólidas*, por haber sido aisladas del

género *Withania*. El esqueleto de las withanólidas se describe entonces como ácido 22-hidroxiergostan-26-óico 26,22-lactona (Figura 3). La nomenclatura adoptada comúnmente se deriva del nombre trivial withanólida: así, para withaferina A se tiene 4 β ,27-dihidroxi-5 β ,6 β -epoxi-1-oxowitha- 2,24-dienólida.

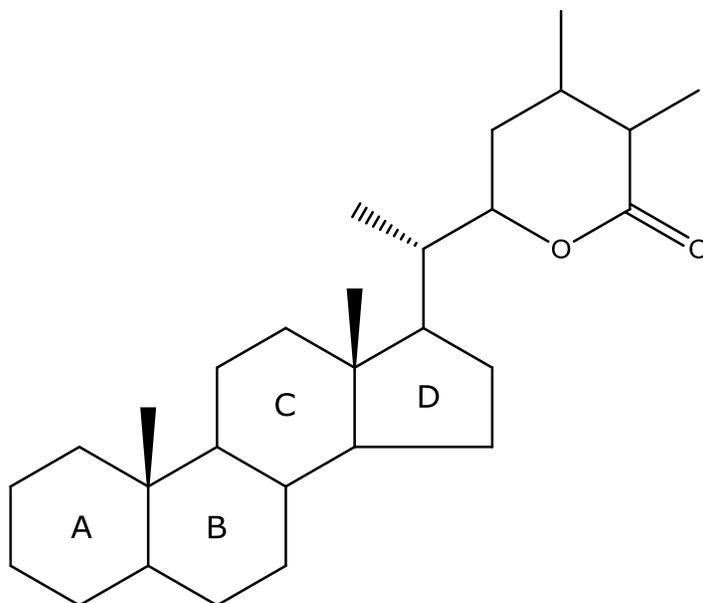


Figura 3. Esqueleto de las withanólidas.

Diversos compuestos C_{28} con estructuras semejantes que no cumplen estrictamente con las características anteriores han sido, pese a esto, llamados withanólidas, generando confusión.¹³ Existen muchos compuestos con variantes estructurales de las withanólidas, ya sea sobre el esqueleto carbocíclico o bien sobre la cadena lateral. Estos han sido descritos como *withanólidas modificadas* o esteroides tipo ergostano. Fue por esto que en 1981 se propuso el término *withaesteroide*, que incluye a los compuestos C_{28} de tipo ergostano, modificado o no, con una lactona en cadena lateral.¹⁴

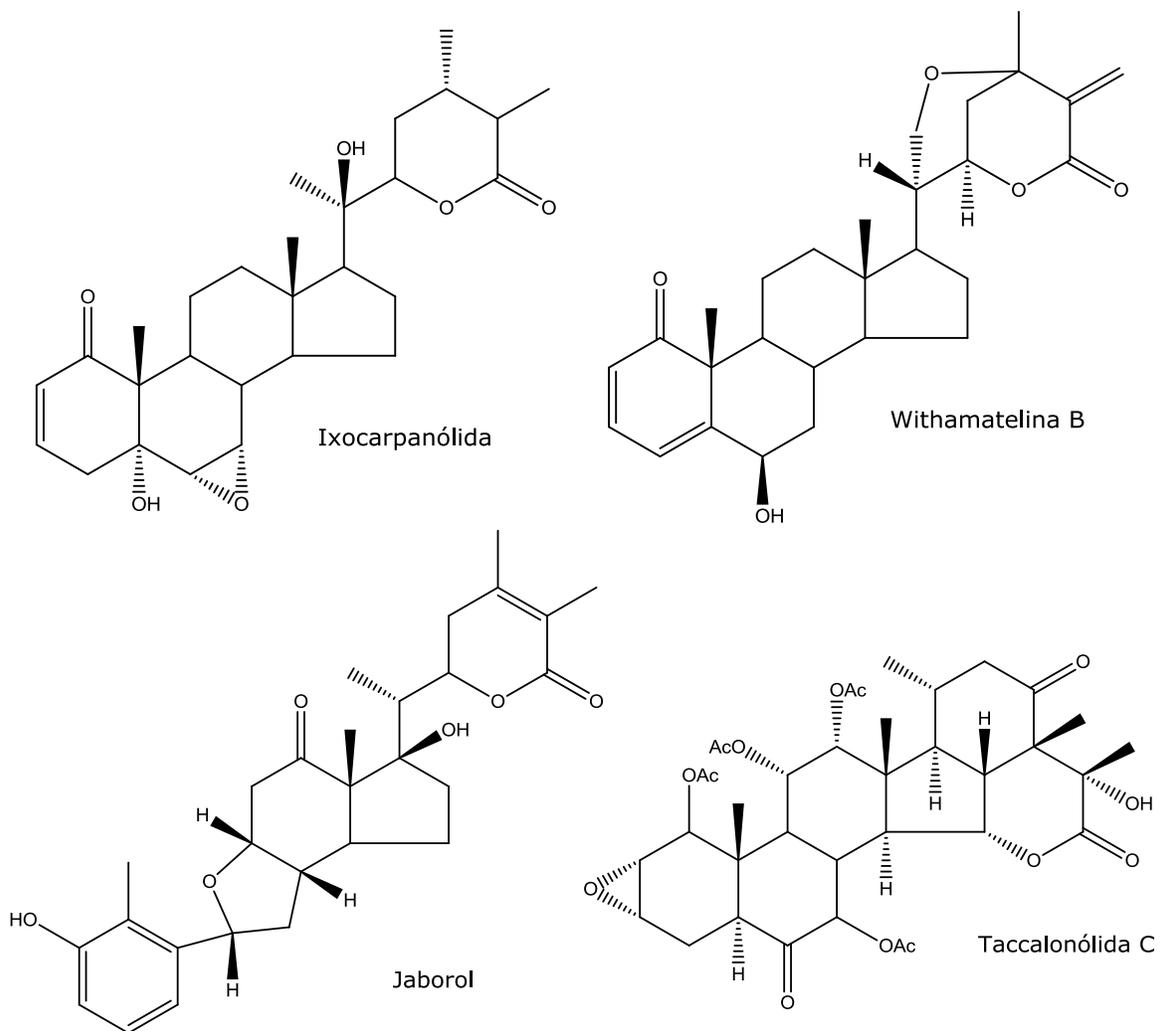


Figura 4. Diversos withaesteroides.

II. 5. Biosíntesis de withaesteroides

En las plantas es común encontrar esteroides C₂₈. Aquellos con una cadena lateral C₉ insaturada son precursores de lactonas esteroidales. Se ha reportado la presencia de tales compuestos en diversas plantas ricas en withaesteroides.

La ruta biosintética de las withanólidas comienza con la formación de pirofosfato de 3,3-dimetilalilo (DMAPP), que resulta de dos rutas metabólicas: la ruta del ácido mevalónico (MVA) y la ruta independiente de mevalonato o ruta del fosfato de desoxixilulosa (DOXP).

La ruta MVA comienza con la activación de acetato por su conversión a acetil coenzima A (acetil-CoA). Dos de estas unidades se combinan y son convertidas en ácido mevalónico mediante procesos metabólicos. Sólo el isómero (*R*) de este ácido es usado por los organismos para producir terpenos; el isómero (*S*) es metabólicamente inerte. Así, el ácido mevalónico es convertido en pirofosfato de isopentenilo (IPP) por pérdida de un átomo de carbono.

La ruta DOXP comienza con la formación del 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato. Para esto se requiere la reacción entre ácido pirúvico y pirofosfato de tiamina. El derivado enamina formado reacciona a su vez con D-gliceraldehído-3-fosfato y genera el DOXP. Este es convertido en 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) mediante rearrreglos catalizados por enzimas. Al reaccionar con citidina trifosfato (CTP) forma un derivado (CDP-metil-D-eritritol-2-fosfato, CDP-ME) que luego es fosforilado dando un fosfoanhídrido cíclico (2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclo-difosfato, MEcPP). Finalmente, la reducción de MEcPP produce un compuesto isoprenoide (4-hidroxi-3-metil-2-(*E*)-butenil-difosfato, HMBPP) que forma DMAPP (Figura 5).

La molécula de IPP puede condensarse (cabeza a cola) con su isómero, el pirofosfato de 3,3-dimetilalilo (DMAPP). Esto forma pirofosfato de geranilo (GPP). Enseguida, tiene lugar la condensación de GPP con otra molécula de IPP para formar pirofosfato de farnesilo (FPP). La escualeno sintasa cataliza la condensación de dos moléculas de FPP (cabeza a cabeza) para dar escualeno. Este es oxidado a la forma 2,3-epóxido, donde los anillos se cierran para formar cicloartenol (Figura 6).^{5,15,16}

El cicloartenol es convertido en episterol por procesos metabólicos. Este esteroide es el precursor de los 24-metilesteroles (Figura 7). Entre ellos se encuentra el 24-metilencolesterol, precursor biosintético de las lactonas esteroidales. La bioconversión de cicloartenol a 24-metilencolesterol aún no es completamente comprendida, la secuencia de reacciones e intermediarios difiere según los organismos.¹⁷

La investigación sobre la biosíntesis de las withanólidas se inició en la década de los setenta. En 1976 se concluyó que 24-metilencolesterol era el precursor de las withanólidas y no el isómero 24-metilcolesta-5,24-dien-3 β -ol.¹⁸ Investigaciones posteriores demostraron que ambos compuestos toman parte en la síntesis de withaesteroides.¹⁹ Esto lo apoya el aislamiento de 24-metilencolesterol y de 24-metilcolesta-5,24-dien-3 β -ol de *Withania somnifera*.²⁰

Otros precursores de las withanólidas como el physalindicanol B han sido aislados de *Physalis minima* var. *indica*²¹, mientras que el ergosta-5,25-dien-3 β ,24 ξ -diol (physalindicanol A) se ha aislado tanto de *Withania coagulans*,²² como de *Physalis minima* var. *indica* y de *Datura metel*.²³

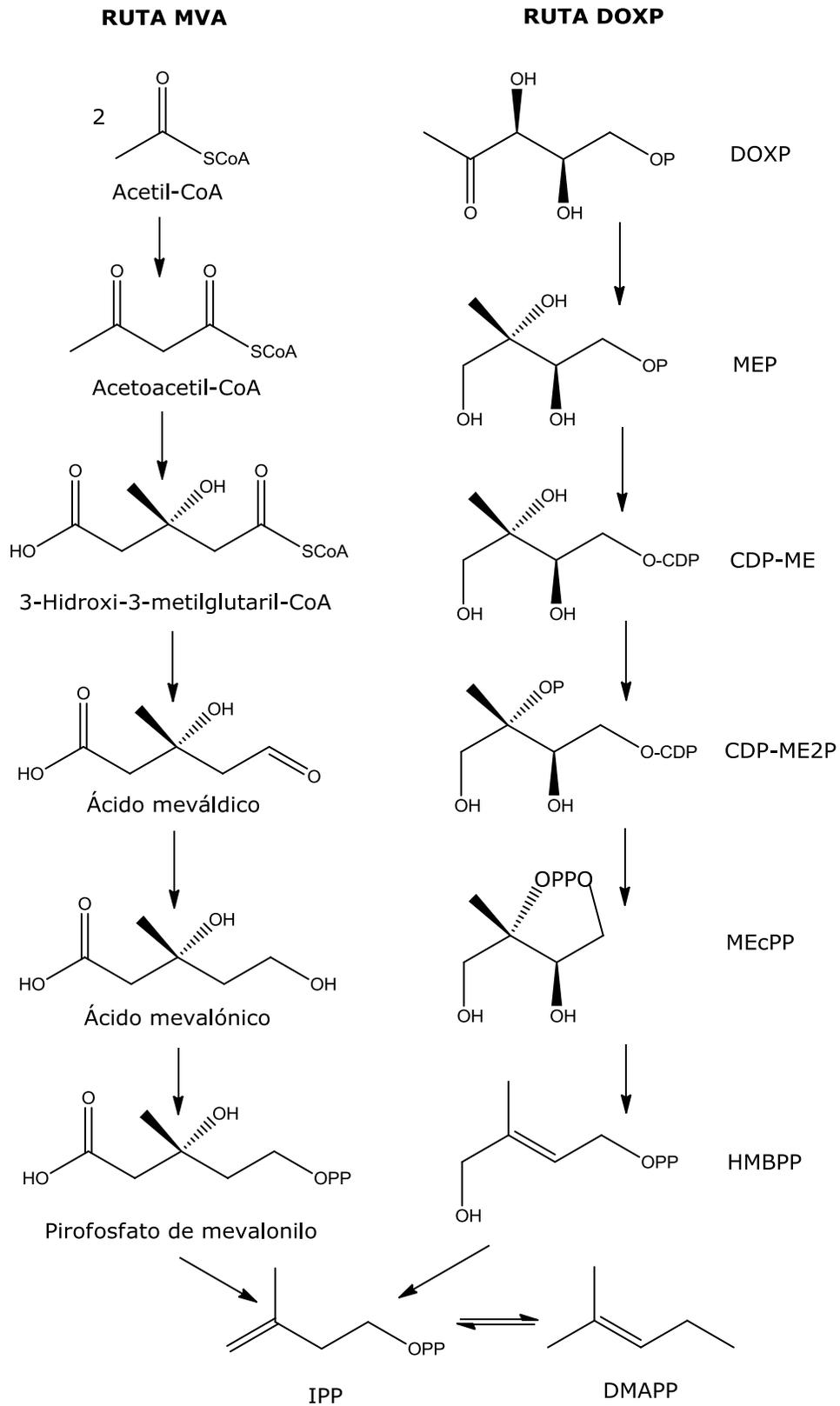


Figura 5. Formación de IPP por la ruta MVA y la ruta DOXP.

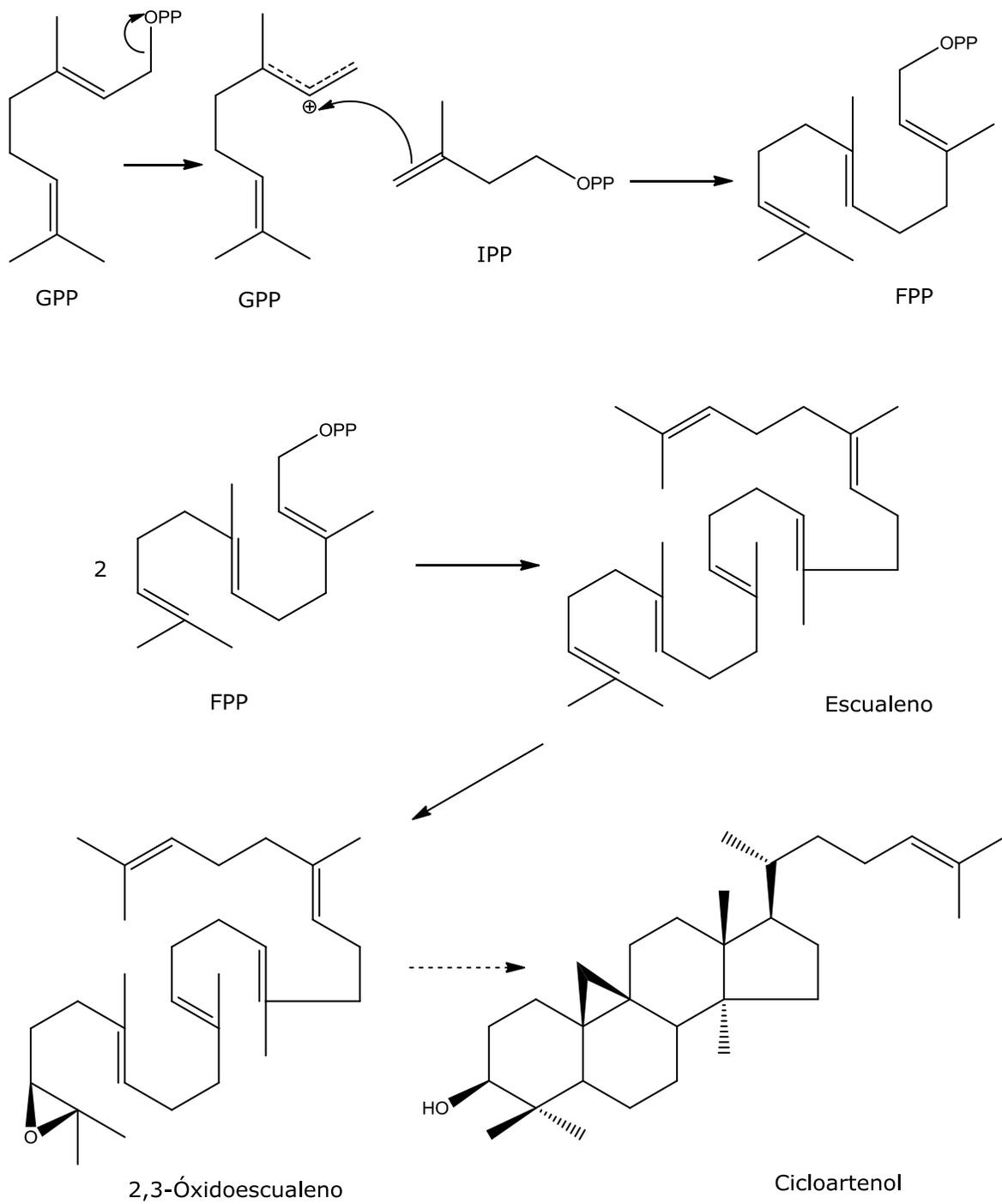


Figura 6. Biosíntesis de cicloartenol.

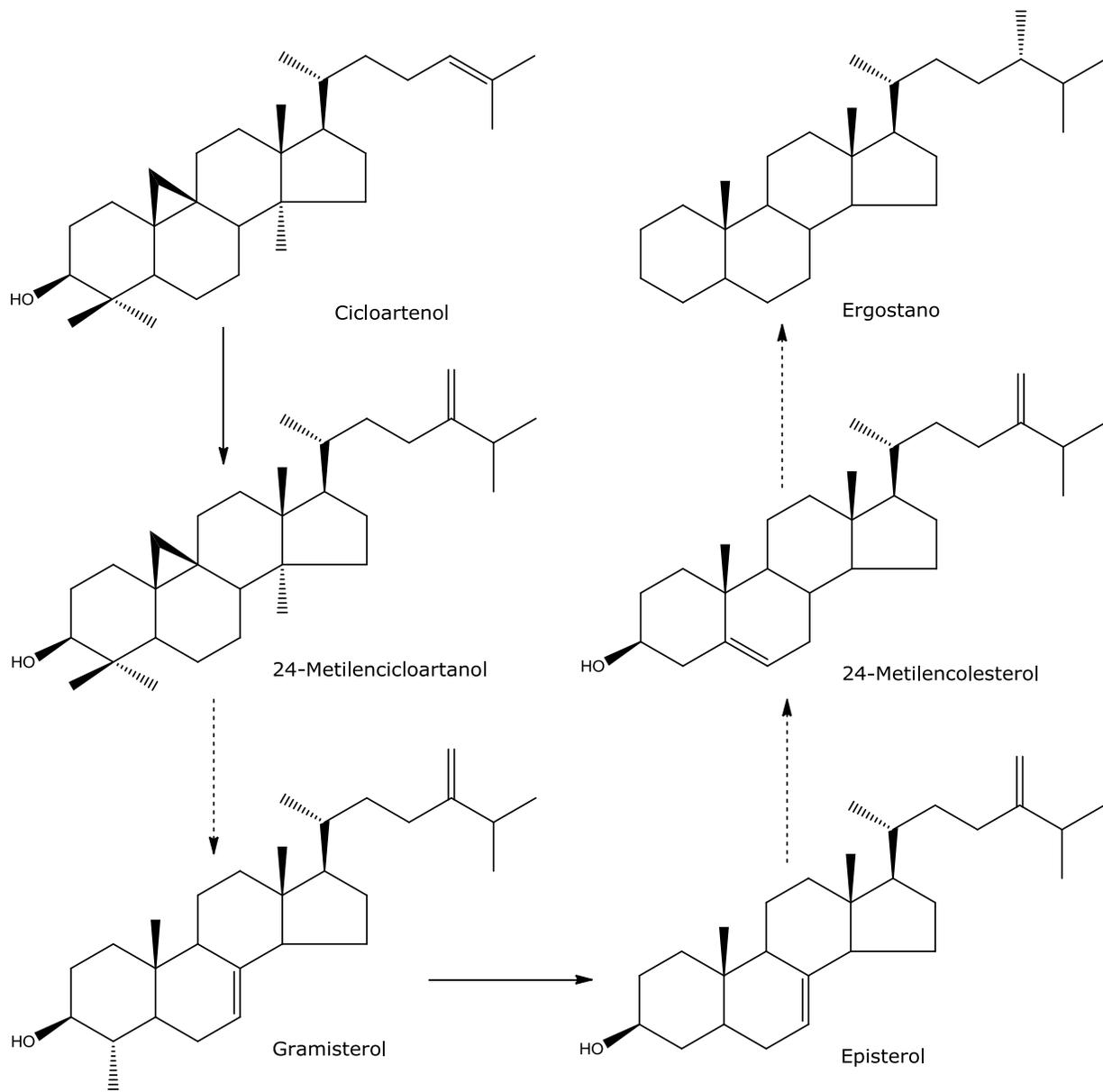


Figura 7. Biosíntesis de ergostano.

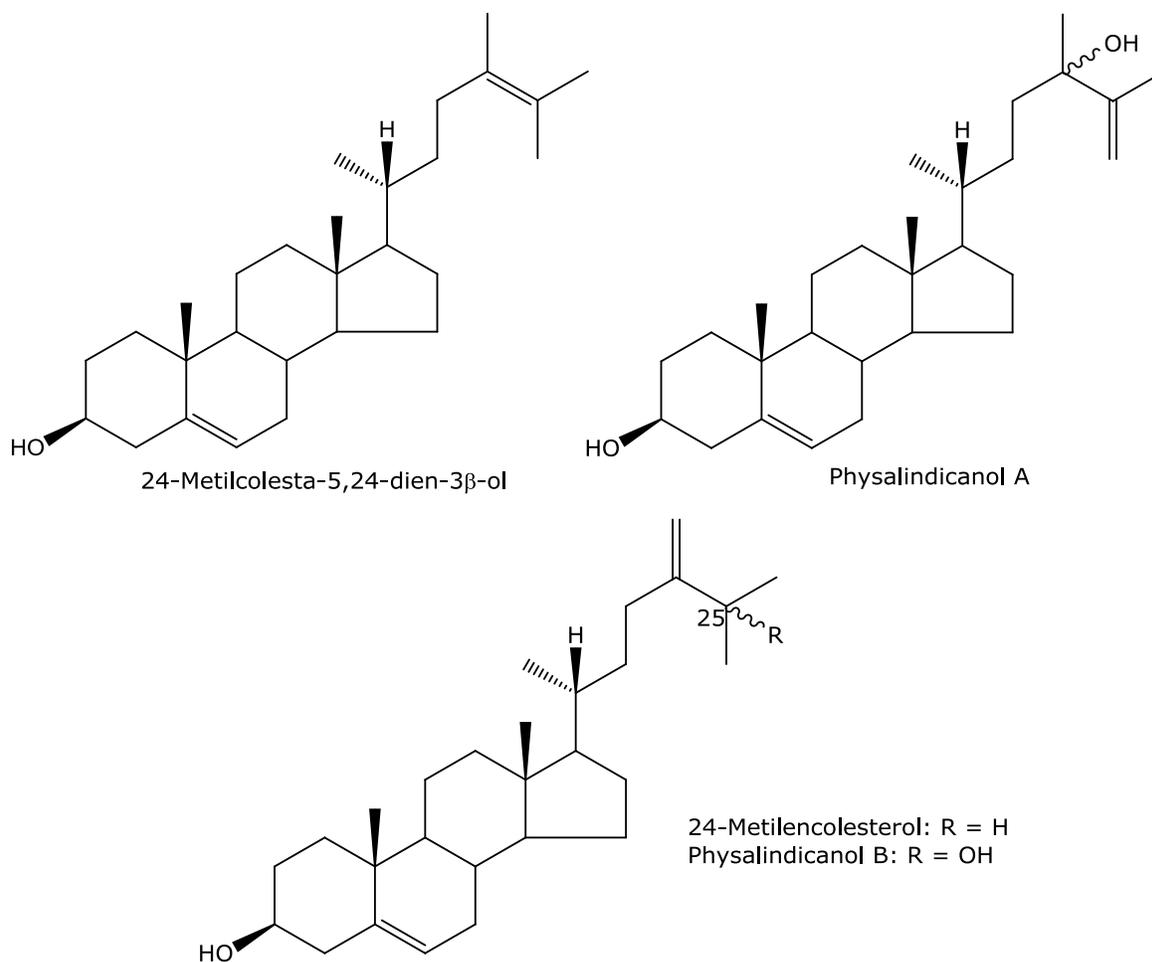


Figura 8. Precursores de lactonas esteroidales.

Modificaciones estructurales en las withanólidas

En 1978 se propuso un mecanismo que explica la funcionalización de los anillos A y B (Figura 9). Este involucra la hidroxilación en C-1 del precursor esteroide 5-en-3-ol, seguida de la oxidación selectiva del intermediario 1-hidroxi para terminar con una deshidratación y generar la 2,5-dien-1-ona. Esto se apoya en la presencia, en la misma planta, de withaesteroides que contienen el sistema $1\alpha,3\beta$ -dihidroxi-5-eno, así como de los que presentan un sistema 2,5-dien-1-ona.^{17,24}

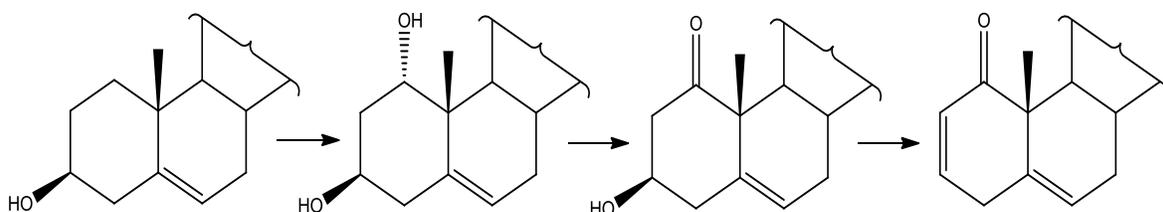


Figura 9. Funcionalización de los anillos A y B en withaesteroides.

En años subsecuentes se estudió el origen de la cadena lateral 17α en withaesteroides.²⁵ Se propuso a las withanólidas Δ^{16} como precursores de aquellas con cadenas laterales 17α . La presencia de withanólida E y de $14\alpha,20$ -dihidroxi-1-oxo-witha-2,5,16,24-tetraenólida en *W. somnifera* permitió proponer que este último es precursor del primero (Figura 10).

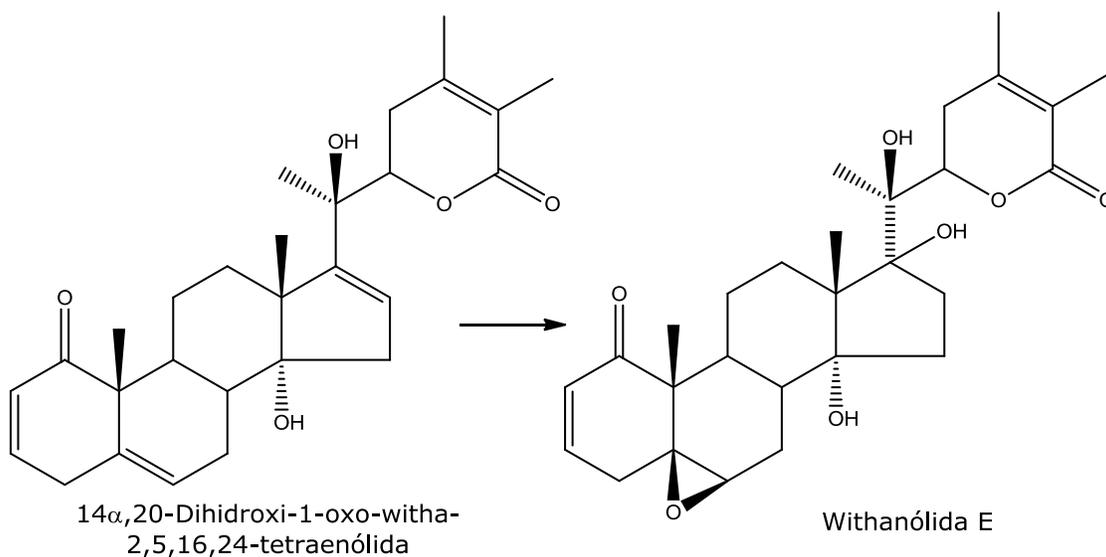


Figura 10. Withanólida E y su precursor.

La biosíntesis de physalina D se estudió en 1974. Para esto se administraron acetato y ácido mevalónico radioactivos a *P. minima* y se observó la formación de physalina D radioactiva²⁶. El mismo resultado

se obtuvo al administrar Lycium A tritado a la planta. Esto comprueba que las withanólidas son precursores de las physalinas (Figura 11).²⁷

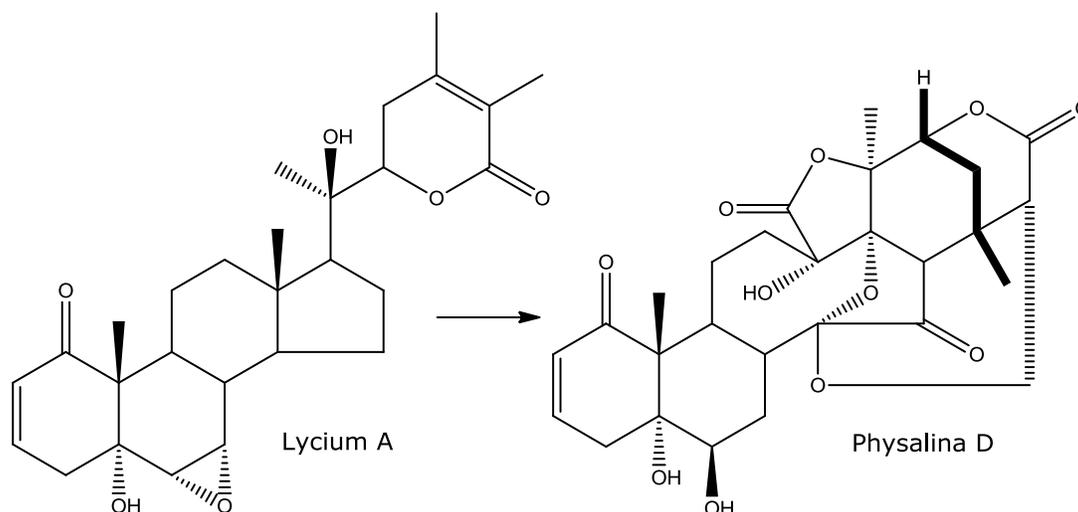


Figura 11. Physalina D y su precursor.

El origen biosintético de las nicandrenonas se estudió por primera vez en 1976.²⁸ Se especuló que el anillo aromático D deriva de withanólidas regulares y que la expansión y aromatización del anillo ocurre por inclusión del metilo-18. Otra vía posible es la eliminación oxidativa del metilo-18 y la inserción de un carbono de S-adenosilmetionina (SAM), seguida de la aromatización del anillo (Figura 12).

En 1986 se demostró²⁹ que la ruta biosintética involucra la oxidación del metilo-18 y su incorporación al anillo D reteniendo un hidrógeno.

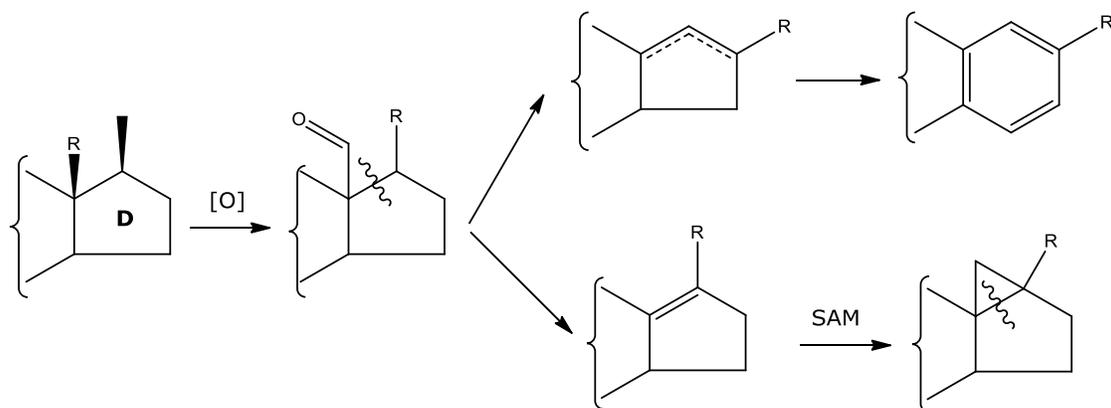


Figura 12. Aromatización del anillo D en withaesteroides.

Desde los años noventa se han postulado rutas biosintéticas de withaesteroides complejos,³⁰ como jaboroles, acnistinas y withametelinas. Pese a esto aún se requiere de estudios ulteriores que permitan verificar o refutar tales postulados.

II. 6. Clasificación de los withaesteroides

Los withaesteroides son compuestos polioxigenados. Se cree que las plantas que los producen poseen enzimas capaces de oxidar todos los átomos de carbono en el núcleo esteroide. En efecto, se han encontrado withaesteroides con funciones oxigenadas en todos los carbonos, salvo C-8 y C-10. Esto tiene como consecuencia modificaciones de la parte carbocíclica así como de la cadena lateral, generados por ruptura de enlaces, formación de nuevos enlaces, aromatización de anillos y otros tipos de arreglos.

La diversidad de withaesteroides hace necesaria su clasificación. Se consideran dos tipos de estos compuestos: el tipo A, que comprende aquellos que poseen una δ -lactona o un δ -lactol; y el tipo B, que comprende aquellos que poseen una γ -lactona o un γ -lactol (Figura 13). La orientación de la cadena lateral es comúnmente β . Cuando esta ocurre en α , se tiene la presencia de un hidroxilo 17β .

La mayoría de los withaesteroides aislados pertenecen al tipo A y se distinguen aquellos con esqueleto intacto y modificado. Los primeros son conocidos como withanólidas y son los más abundantes. Los demás son diversos y se dividen en physalinas, neophysalinas, withaphysalinas, acnistinas y epiacnistinas, withajardinas, withametelinas, withanólidas de tipo norbornano, sativólidas, δ -lactonas espiranoides, $14\alpha,20\alpha$ -epoxiwithanólidas, subtriflora δ -lactonas, nicandrenonas (withanólidas con anillo D aromático) y jaboroles (withanólidas con anillo A aromático) (Figura 14).

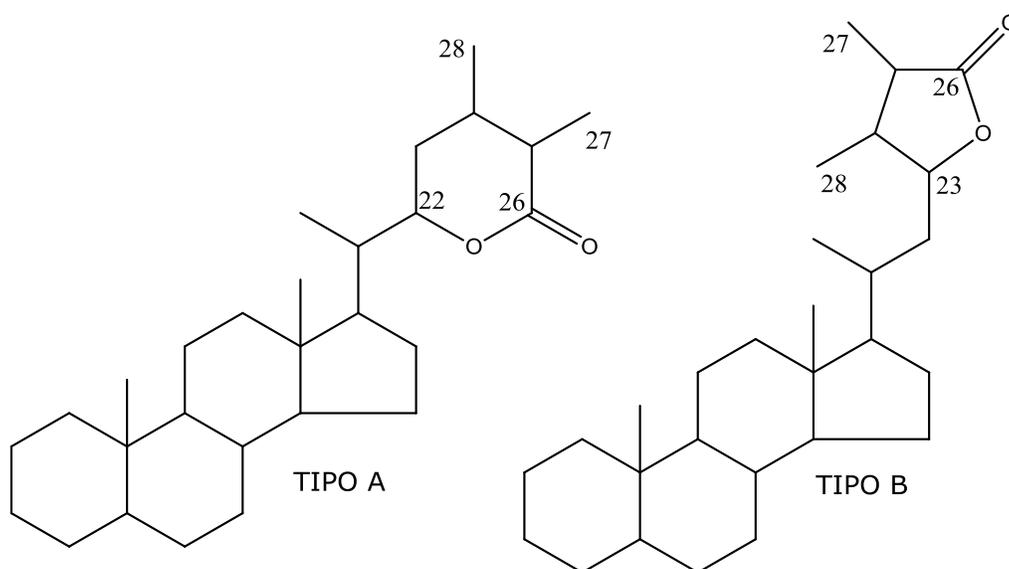


Figura 13. Tipos de withaesteroides.

Los withaesteroides de tipo B se dividen en cinco grupos: ixocarpalactonas, γ -lactonas espiranoides, treconólidas, subtriflora- γ -lactonas y perulactonas. No obstante, se ha aislado e identificado withaesteroides con estructuras novedosas, que no pueden ser clasificados de esta forma (Figura 15).^{31,32,33}

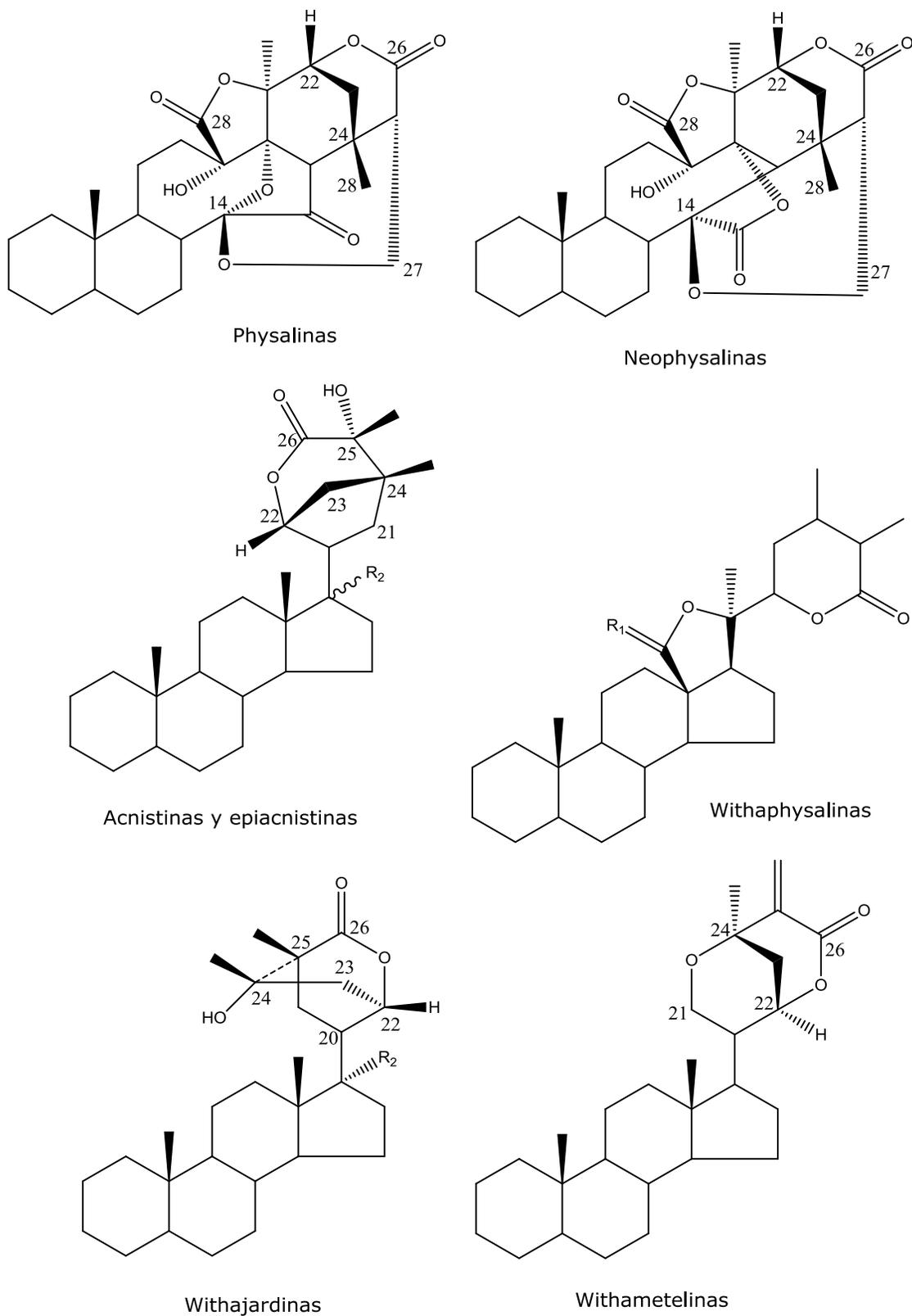


Figura 14. Estructuras de los withaesteroides tipo A.
($R_1 = O; OH, H$. $R_2 = OH, H$).

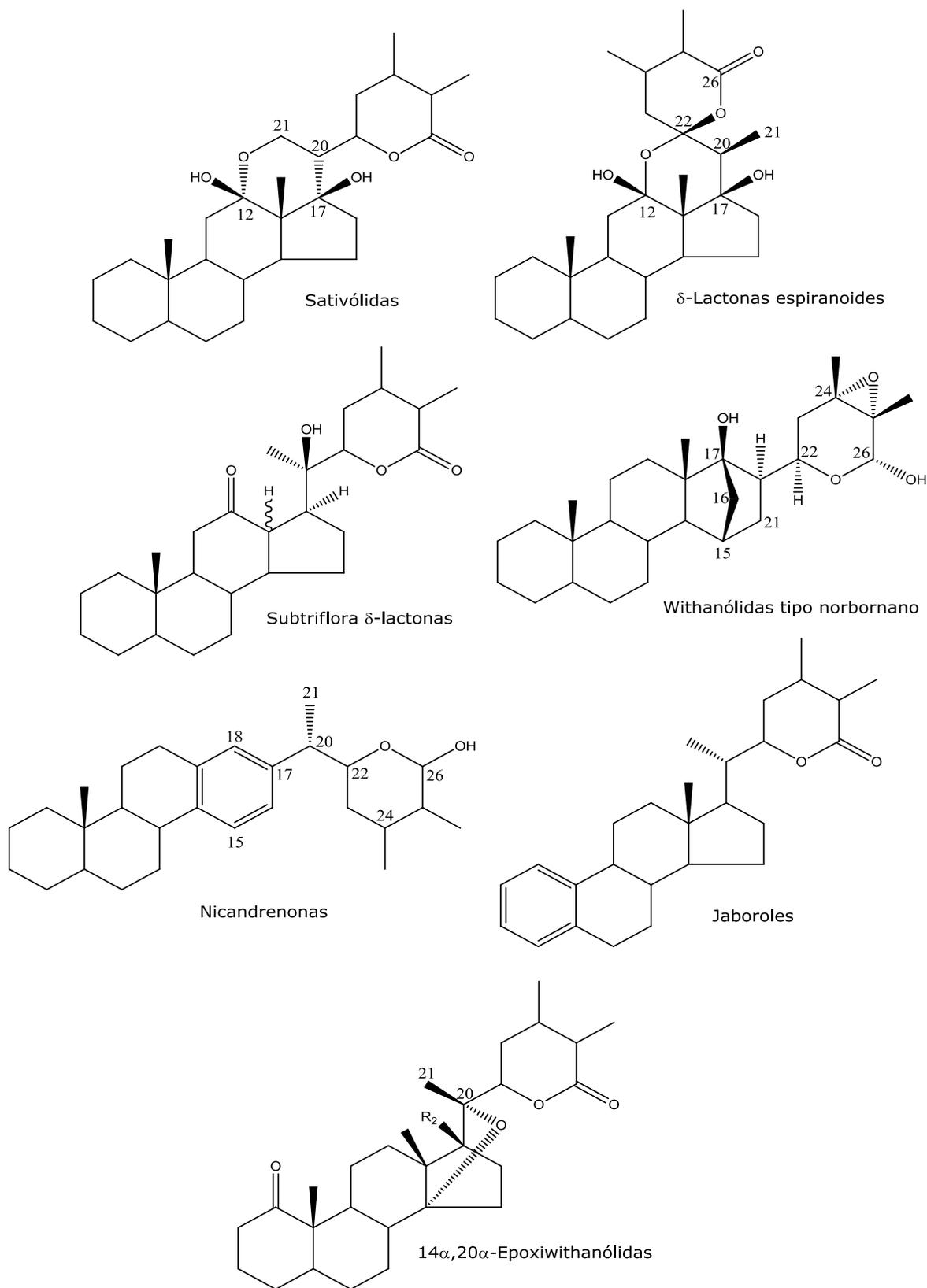


Figura 14 (continuación).

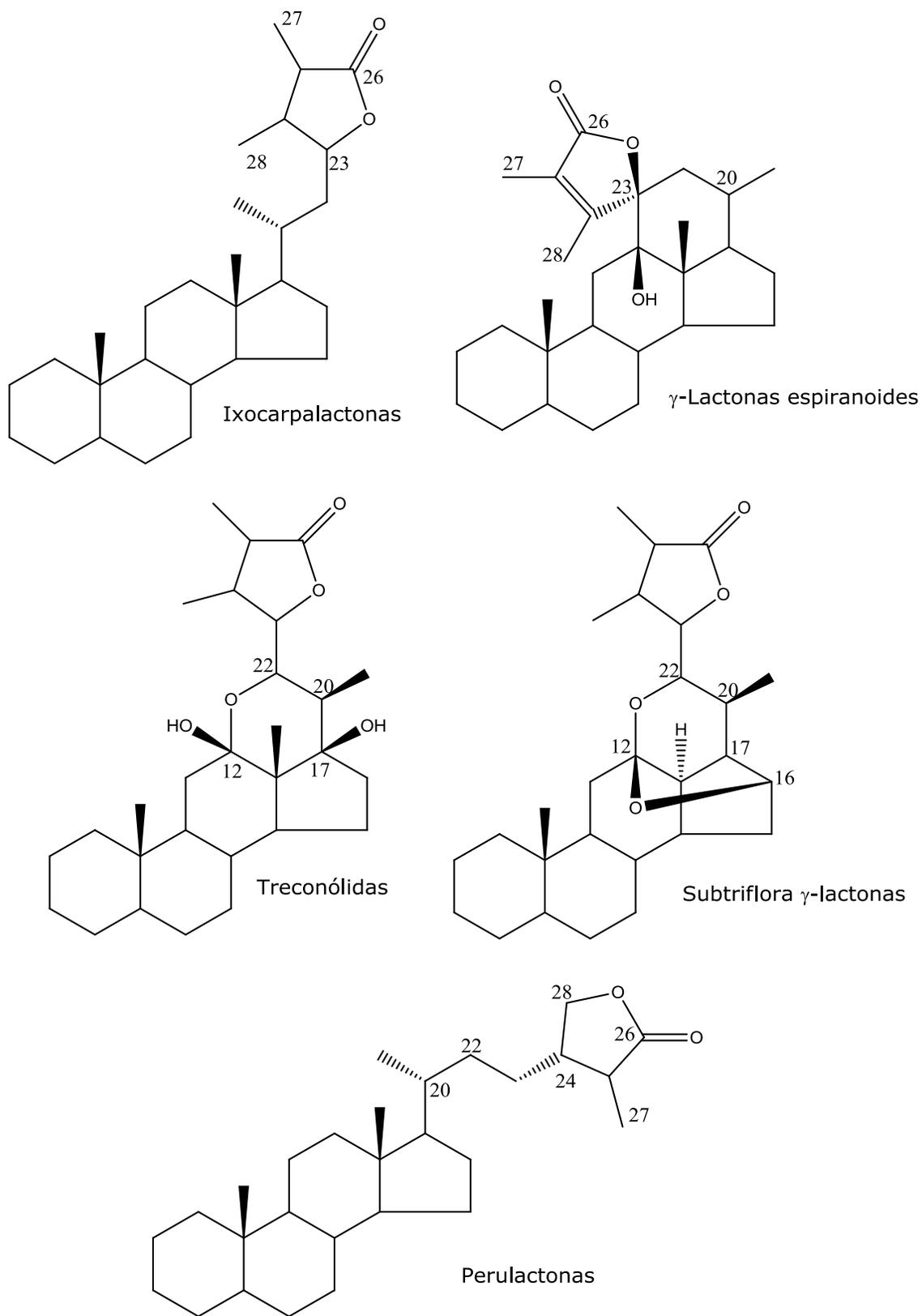


Figura 15. Estructuras de los withaesteroides tipo B.

II. 7. Actividad biológica de los withaesteroides

Los withaesteroides son uno de los grupos de compuestos con mayor variedad de actividades biológicas. Se han estudiado dichas actividades y se han reportado sus efectos diasuasores de la alimentación en insectos³⁴, antimicrobianos³⁵, citotóxicos³⁶, antiinflamatorios³⁷, diuréticos³⁸, abortivos³⁹ e inmunomoduladores⁴⁰, entre otros. A continuación se presentan algunos resultados de estudios de actividades biológicas en withaesteroides.

Actividad fitotóxica

Un estudio realizado en el año 2000 mostró que withaesteroides obtenidos de *Iochroma australe* y de *Jaborosa bergii* presentan actividad fitotóxica contra especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas. El componente mayoritario del extracto de *I. australe*, (17S,20R,22R)-4 β ,7 β ,20-trihidroxi-1-oxowitha-2,5,24-trienólida redujo el crecimiento de la radícula de *Sorghum halepense* (monocotiledónea) y de *Chenopodium album* (dicotiledónea), mientras que el jaborosalactol 18, obtenido de *J. bergii* se mostró como un regulador selectivo del crecimiento (Figura 16). Este inhibió de forma importante el crecimiento de *Chenopodium album*, de *Ipomea purpurea* y de *Lactuca sativa*, especies dicotiledóneas, mientras que estimuló el crecimiento de *Zea mays* y de *Sorghum halepense*, especies monocotiledóneas.⁴¹

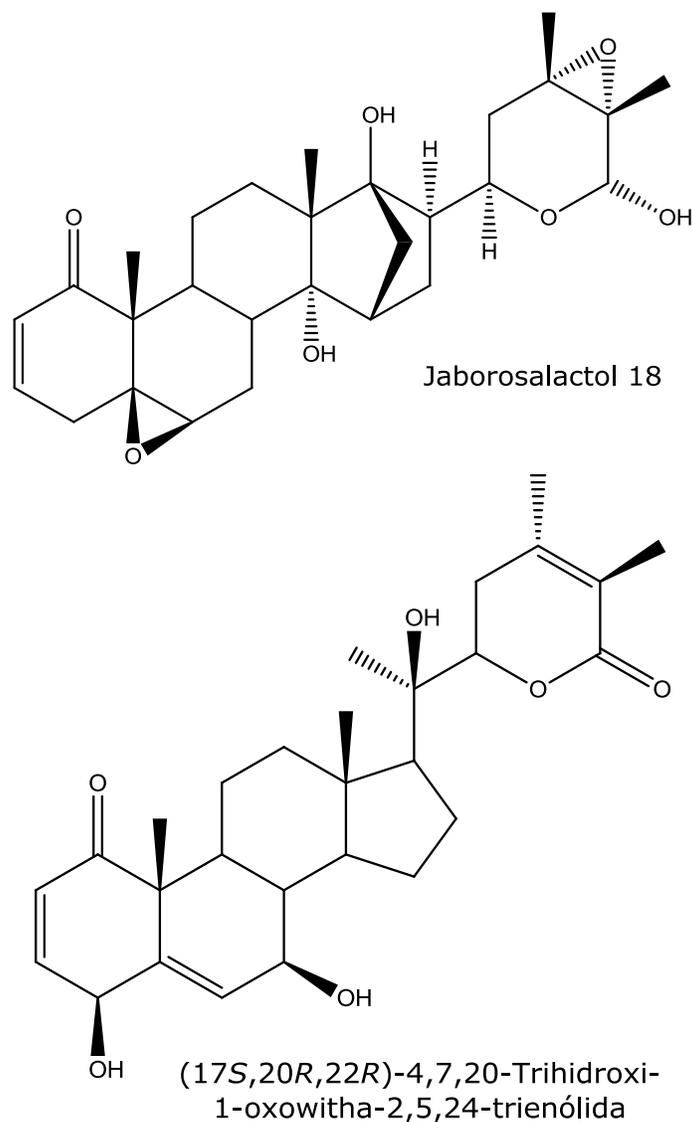


Figura 16. Withaesteroides con actividad fitotóxica.

Actividad quimiopreventiva frente al cáncer

Los withaesteroides presentan actividad quimiopreventiva frente al cáncer. El ensayo empleado comúnmente para la determinación de la actividad quimiopreventiva consiste en evaluar el potencial de los compuestos para inducir la actividad de la quinona reductasa. Los primeros estudios con withaesteroides sobre esta actividad fueron realizados en 1997 con *Physalis philadelphica*⁴².

En estudios publicados en 2002 se encontró que los compuestos más potentes poseen la unidad estructural 4 β -hidroxi-2-en-1-ona. Entre ellos están la ixocarpalactona A, la philadelphicalactona A y la ixocarpalactona B.⁴³

En otro estudio del mismo año se reportó la evaluación del potencial de treinta y siete withaesteroides de solanáceas sudamericanas para inducir la actividad de la quinona reductasa⁴⁴. Se encontró que algunos sustituyentes contribuyen o bien, obstaculizan, la actividad de estos compuestos. La funcionalización del metilo-18 aumenta la inducción de la actividad de la quinona reductasa; la presencia de sustituyentes 5 α la disminuye. De forma general, los withaesteroides tipo espiranoide y treconólida presentan una buena actividad de inducción.

Con este mismo ensayo se evaluó en 2004 la actividad de compuestos solubles en cloroformo aislados de *Deprea subtriflora*. Seis de los compuestos activos presentan una cetona α,β insaturada en el anillo A, lo que sugiere que este tipo de estructura es importante para la inducción de la actividad de la quinona reductasa. Sin embargo, compuestos con cetona doblemente insaturada en el anillo A no resultaron activos (Figura 17).⁴⁵

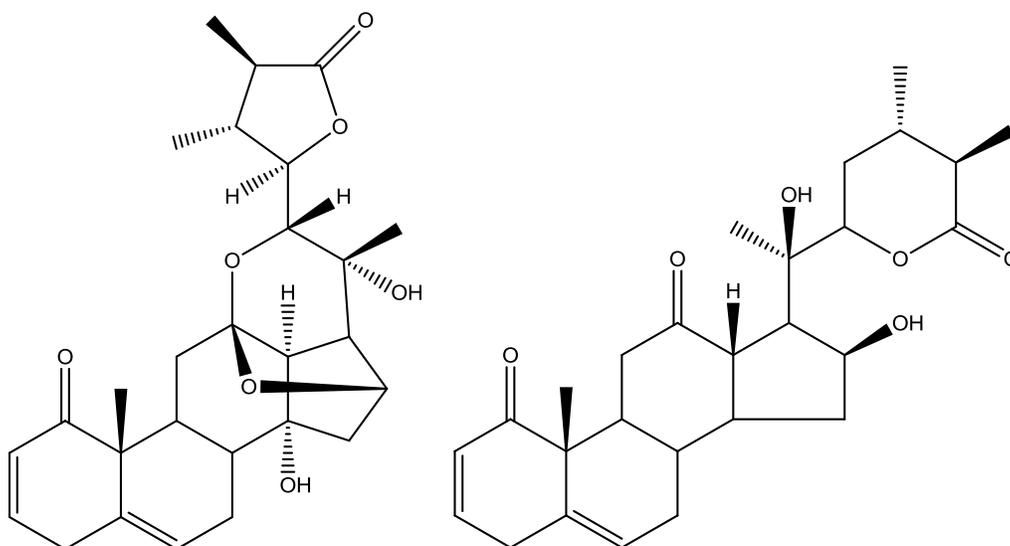


Figura 17. Withaesteroides con actividad quimiopreventiva obtenidos de *Deprea subtriflora*.

Actividad inductora de la diferenciación celular

Los compuestos inductores de la diferenciación celular representan un nuevo tipo de agente antitumoral. Muchos de estos compuestos, tales como lignanos, diterpenos, triterpenos, flavonoides y esteroides, han sido aislados de fuentes vegetales.^{46,47,48} En un estudio de 1999 se evaluó la actividad inductora de la diferenciación celular de dieciséis withanólidas, aisladas del extracto de metanol de *Withania somnifera*, contra la línea celular M1 (leucemia mieloide de ratón). De estos withaesteroides la withanólida D, la withaferina A, la 24,25-dihidrowithanólida D y la 27-hidroxiwithanólida D mostraron actividad importante (Figura 18). Estos compuestos comparten la unidad 4 β -hidroxi-5 β ,6 β -epoxi-2-en-1-ona pero difieren en la cadena lateral. Esto sugiere que dicha unidad es esencial para esta actividad. La presencia del grupo 20-OH o de la δ -lactona α,β -insaturada no son relevantes.⁴⁹

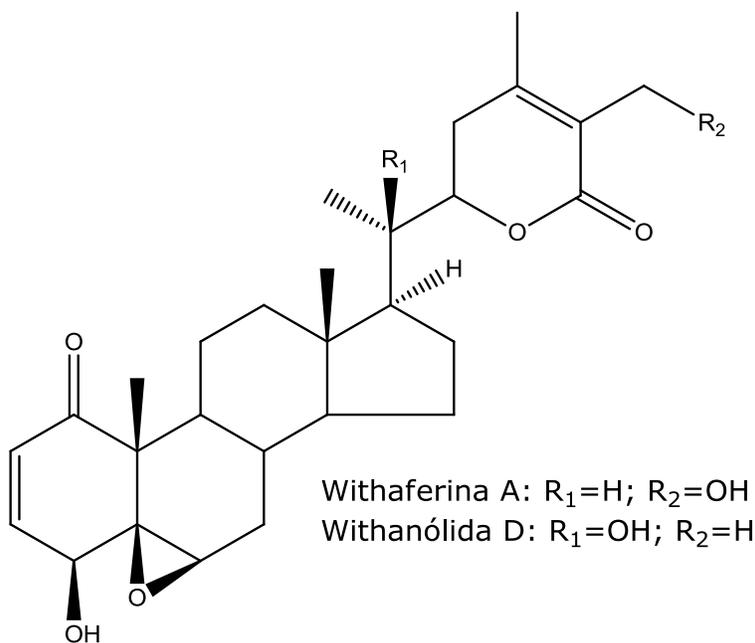


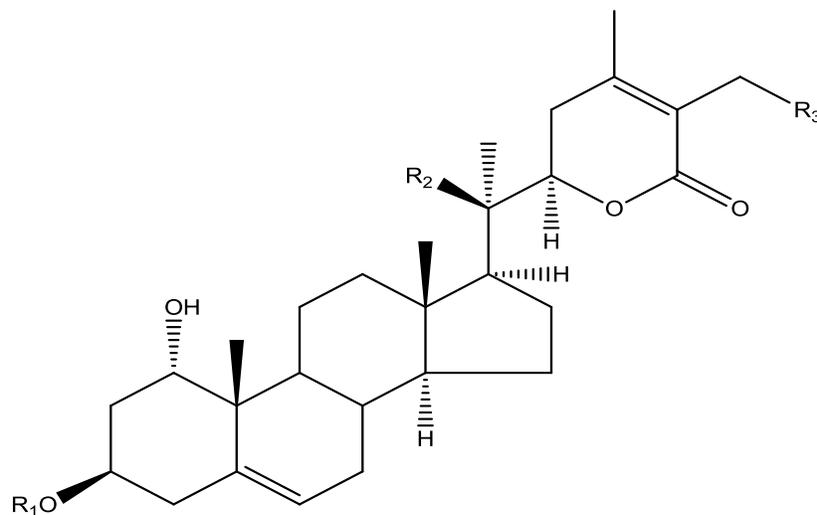
Figura 18. Withaesteroides con actividad inductora de la diferenciación celular.

Efecto de reconstrucción de sinapsis y desarrollo de neuritas

El desarrollo de neuritas y la reconstrucción de sinapsis son criterios empleados durante el desarrollo de fármacos para la prevención, tratamiento y cura de enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer, de Huntington o de Parkinson.⁵⁰

Durante un estudio en 2002 se investigó la actividad de dieciséis withanólidas aisladas de *Withania somnifera* en cuanto al efecto de desarrollo de neuritas en una línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y. Los withanósidos IV y VI, la coagulina Q, la (20*S*,22*R*)-3 α ,6 α -epoxi-4 β ,5 β ,27-trihidroxi-1-oxowitha-24-enólida, la (20*S*,22*R*)-4 β ,5 β ,6 α ,27-tetrahidroxi-1-oxowitha-2,24-dienólida y la withanólida A mostraron una actividad significativa a una concentración 1.0 μ M.⁵¹

Estudios posteriores mostraron que la withanólida A induce la recuperación de un déficit de memoria inducido en ratones. Se observó el restablecimiento casi completo de axones, dendritas y sinapsis en la corteza cerebral y en el hipocampo. Así, la withanólida A se muestra como un candidato importante para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas pues es capaz de reconstruir redes neuronales.^{52,53}



Coagulina Q: R1=β-D-Glc; R2=H; R3=OH

Withanósido VI: R1=β-D-Glc-(1,6)-β-D-Glc; R2=H; R3=OH

Withanósido IV: 1-Oxo; R1=β-D-Glc; R2=R3=OH

Withanólida A

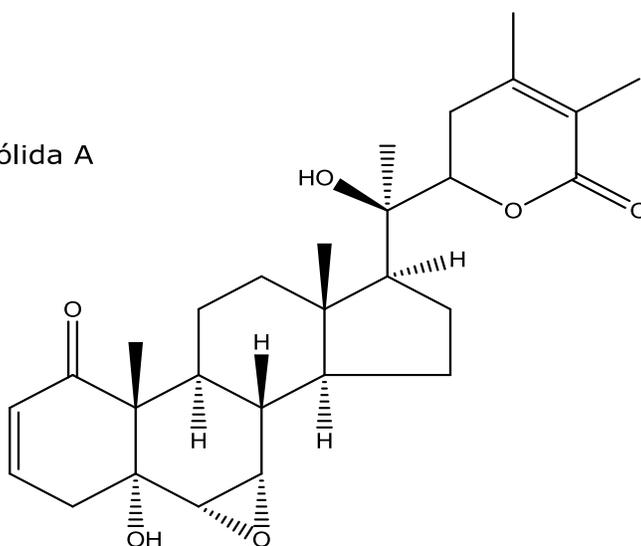


Figura 19. Withanólidas con actividad de reconstrucción neuronal.

Actividad citotóxica

En un estudio realizado en 2004 se evaluó la actividad citotóxica de diversos withaesteroides aislados de *Acnistus arborescens*. Se encontró que la withaphysalina M así como la (17*S*,20*R*,22*R*)-5 β ,6 β ;18,20-diepoxi-4 β ,18-dihidroxi-1-oxowitha-24-enólida poseen una actividad citotóxica importante frente a un grupo de líneas celulares cancerígenas humanas.⁵⁴ Se concluyó que la actividad de la diepoxiwithanolida está relacionada con la síntesis de ADN. La withaphysalina M presentó actividad citotóxica promoviendo la necrosis y la apoptosis de células tumorales, no así de células normales.⁵⁵

En un estudio de 2007 se evaluó la actividad citotóxica de withaesteroides aislados de *Physalis angulata*. La withangulatina B y las physalinas B, D, F y U mostraron actividad importante contra múltiples líneas de células tumorales humanas.⁵⁶ En otro estudio del mismo año se evaluó la misma actividad en withaesteroides aislados de *Physalis minima* contra células cancerígenas. La withaphysalina C mostró una actividad importante.⁵⁷ Se han empleado extractos e infusiones de estas plantas en la medicina tradicional de diversos países como agentes contra el cáncer. Tomando esto como base, es posible concluir que la presencia de una cetona α,β -insaturada y de un grupo 5 β ,6 β -epoxi es necesaria para la actividad citotóxica de dichos withaesteroides.

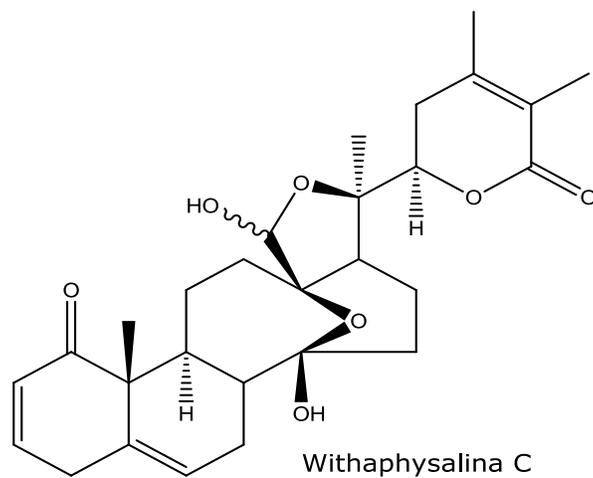
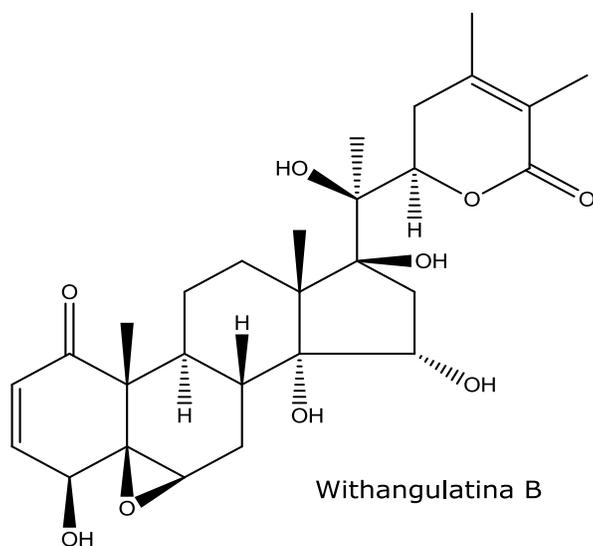
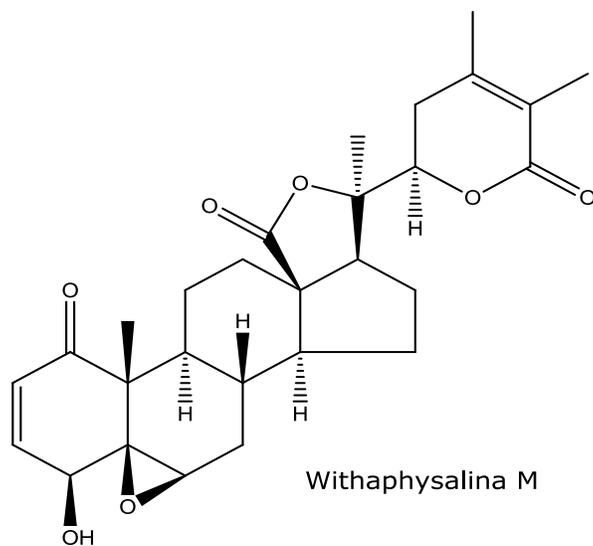


Figura 2. Algunos withaesteroides con actividad citotóxica.

III. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS

III. 1. Espectroscopia de absorción en el infrarrojo^{58,59}

La región del infrarrojo del espectro electromagnético abarca las radiaciones con longitudes de onda de 0.78 a 1000 μm . Se divide convencionalmente en tres regiones denominadas infrarrojo cercano, medio y lejano. La región más utilizada para aplicaciones analíticas es la del infrarrojo medio, que va de los 2.5 a 10 μm (4000 a 625 cm^{-1}) y que corresponde a la separación entre estados energéticos vibracionales en moléculas.

Esta técnica se basa en los cambios del momento dipolar de las moléculas cuando vibran o rotan, lo que les permite absorber radiación infrarroja. Las moléculas homonucleares no absorben en el infrarrojo: no sufren un cambio neto durante la vibración o la rotación. En el estado basal, las moléculas presentan dos tipos de movimientos: de estiramiento (a lo largo de los enlaces) y de flexión (fuera de los enlaces). Ambos tipos de movimientos pueden ser simétricos o asimétricos y tener lugar en o fuera del plano.

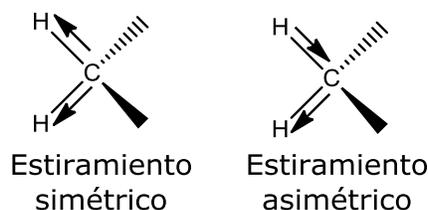
Cuando la frecuencia de la radiación coincide con la frecuencia de vibración natural de la molécula, tiene lugar una transferencia neta de energía (absorción) que produce un cambio en la amplitud de los movimientos moleculares. Al determinar experimentalmente los números de onda (o bien, las longitudes de onda) de la energía absorbida por un compuesto, se puede saber el tipo de enlaces que posee.

En la región de 4000 a 1400 cm^{-1} se encuentran los picos de absorción característicos de grupos funcionales particulares. Las

frecuencias de absorción de cada grupo rara vez son invariables, debido a interacciones pequeñas con otras vibraciones moleculares. En consecuencia es posible establecer un intervalo de frecuencia donde es probable encontrar la banda de absorción para un grupo funcional determinado. En la región de 1400 a 625 cm^{-1} el patrón de absorción varía de un compuesto a otro, por lo que se le conoce como *zona de la huella dactilar*.

Si bien las frecuencias de grupo permiten hacer estimaciones sobre los grupos funcionales presentes en una molécula, es imposible identificar sin ambigüedad el origen de todas las bandas presentes en un espectro o establecer la identidad exacta de la molécula. Sin embargo, sirven como punto de partida para el proceso de identificación.

Vibraciones de estiramiento



Vibraciones de flexión

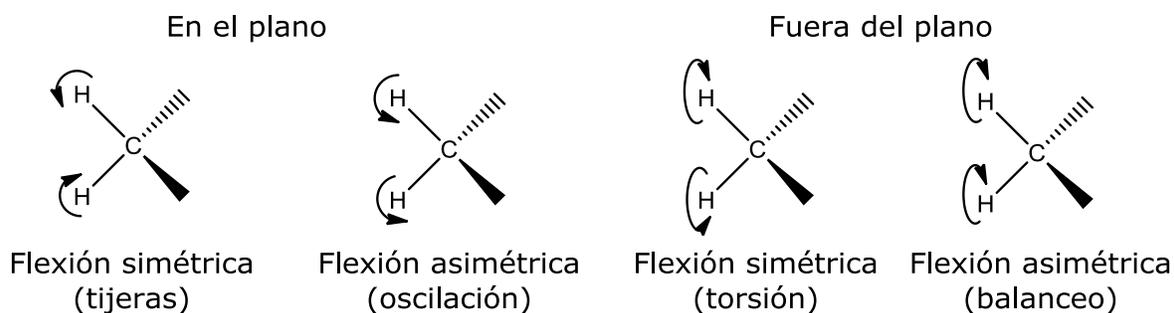


Figura 3. Vibraciones de enlaces en moléculas orgánicas.

III. 2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear^{58,59}

Esta técnica se basa en la absorción de energía por núcleos atómicos que presentan un momento magnético diferente de cero. Cuando los núcleos son sometidos a un campo magnético, los momentos magnéticos nucleares se alinean ya sea a favor (estado α , de menor energía) o en contra (estado β , de mayor energía) del campo aplicado.

La diferencia energética entre dichos estados es directamente proporcional a la intensidad del campo aplicado. Cuando un núcleo es sometido a impulsos de radiación cuya frecuencia corresponde a la diferencia de energía entre los estados, los núcleos en el estado α son elevados al estado β , lo que se conoce como *inversión de espín*. Al absorber esta radiación, que se encuentra en la región de las radiofrecuencias, los núcleos invierten rápidamente su espín. Esto se repite de forma incesante, por lo que se dice que están en *resonancia*. Por este proceso se generan señales cuya frecuencia depende del entorno nuclear, lo que permite determinar la estructura de la molécula de la que forma parte. El espectrómetro detecta estas señales y las muestra en función de la intensidad.

Los núcleos más estudiados son ^1H , ^{13}C , ^{31}P y ^{19}F de número cuántico de espín 1/2, así como ^{17}O de espín 5/2 y ^{14}N de espín 1. En la práctica se prefiere aquellos con número cuántico de espín 1/2, pues no producen ensanchamiento de las señales. Las muestras pueden estar en disolución o en estado sólido. Para los análisis en disolución se emplea un disolvente deuterado (como CDCl_3 o DMSO-d_6) de forma que sea invisible en RMN ^1H .

El espectro de ^1H proporciona información sobre el número y el tipo de hidrógenos presentes en la molécula. El entorno químico del

núcleo determina el desplazamiento químico de cada resonancia, informando así sobre los grupos funcionales cercanos. De la multiplicidad de la señal se obtiene información sobre los protones cercanos acoplados. Por su parte, el espectro de ^{13}C indica el tipo y número de los carbonos de un compuesto y, cuando se analiza el desplazamiento químico de las resonancias, es posible identificar grupos funcionales.

La RMN de ^{13}C presenta menos solapamiento de los picos en los espectros que la RMN ^1H , pues el intervalo de desplazamiento químico para el ^{13}C es alrededor de 220 ppm. Adicionalmente, el tiempo de adquisición de un espectro de ^{13}C es mayor que el de ^1H debido a la abundancia natural de dicho isótopo ($\sim 1,1\%$).

Para complementar la elucidación estructural, se recurre a experimentos de correlación, que pueden ser *bidimensionales* (2D) o *multidimensionales* (nD). Estos experimentos se basan en la posibilidad de introducir pulsos de radiofrecuencia durante el experimento de RMN, cada uno aplicado con una potencia, duración, frecuencia, fase y en una secuencia determinadas. Se clasifican en dos tipos: homonucleares y heteronucleares. Los primeros son aquellos en que los que todas las dimensiones corresponden al mismo núcleo; los segundos corresponden a aquellos espectros cuyas dimensiones pertenecen a diferentes núcleos.

De forma general, las interacciones que pueden detectarse por RMN son de dos tipos: a través de enlaces y a través del espacio. Con los experimentos COSY y NOESY se obtienen espectros bidimensionales homonucleares. En COSY se observan las relaciones entre los protones de la molécula a dos y tres enlaces, mientras que en NOESY se observan correlaciones entre protones a través del espacio por acoplamiento

dipolar. Con los experimentos HMBC Y HSQC se obtienen espectros bidimensionales heteronucleares. En HSQC se observa el acoplamiento entre cada hidrógeno y el carbono al que está unido, mientras que en HMBC se aprecian las correlaciones entre protones y carbonos a dos y tres enlaces.

En el experimento DEPT se aplica una secuencia de pulsos con diferentes ángulos de incidencia sobre la muestra. La respuesta de los núcleos a este estímulo permite diferenciar los carbonos. Existen tres tipos de experimentos DEPT, según el ángulo que se emplea. En el DEPT-135° las señales de los grupos CH y CH₃ son positivas mientras que las de los grupos CH₂ son negativas. Los carbonos no protonados no aparecen. El DEPT-90° muestra sólo los grupos CH, mientras que el DEPT-45° muestra todos los carbonos hidrogenados como señales positivas.

III. 3. Espectrometría de masas^{58,60}

Esta técnica proporciona información sobre la composición elemental de las muestras, la estructura de las moléculas, la composición cualitativa y cuantitativa de analitos en mezclas complejas, la estructura y composición de superficies sólidas y las relaciones isotópicas de átomos en las muestras.

El análisis de una muestra por espectrometría de masas está condicionado por el proceso de ionización en el que la muestra es bombardeada con electrones, iones, moléculas o fotones. Por ejemplo, en uno de los métodos de ionización más utilizados, impacto electrónico, la muestra se bombardea con un haz de electrones de alta energía (~70 eV) y se genera el ion molecular M⁺, un catión radical que tiene el

mismo peso molecular que el analito. Esta colisión deja a las moléculas en estado excitado. La energía recibida es tan grande que al regresar al estado basal, los iones moleculares se fragmentan y dan lugar a iones, moléculas y radicales de masas más pequeñas.

Los fragmentos con carga positiva producidos son atraídos por placas de carga negativa que los aceleran y los dirigen hacia un tubo analizador curvo rodeado de un electroimán; éste desvía los fragmentos y los hace tomar una trayectoria curva. El grado de desviación de la trayectoria depende de la relación masa-carga (m/z) del fragmento. Siguiendo esta trayectoria pasan por un detector, que registra la cantidad relativa de los fragmentos.

El espectro de masas suele representarse como gráfico de barras, donde cada una muestra la intensidad relativa del pico de masa (abundancia relativa) con respecto a su relación de masa y carga. El aspecto de los espectros de masas depende del método de ionización empleado. Existen dos categorías de métodos de ionización: fuentes de fase gaseosa y fuentes de desorción. Las primeras volatilizan la muestra para luego ionizarla, lo que limita su empleo a compuestos con pesos moleculares inferiores a 10^3 Da. Las segundas transforman la muestra líquida o sólida directamente a iones gaseosos y son aplicables a compuestos con pesos moleculares superiores a 10^5 Da.

Las fuentes de iones se clasifican en *duras* y *blandas*. Las fuentes duras producen numerosos iones fragmentados. El espectro de una fuente dura proporciona información estructural de los analitos. Las fuentes blandas dan lugar a poca fragmentación. En el espectro resultante se observa el pico del ion molecular y sólo alguno o incluso ningún otro pico. Esto permite la determinación del peso molecular exacto.

La espectrometría de masas proporciona información sobre la fórmula de un compuesto mediante el análisis de las alturas de los picos de los isótopos $(M+1)^+$ y $(M+2)^+$ respecto a la altura del pico M^+ . Se han compilado tablas que relacionan todas las combinaciones razonables de C, H, N y O de un peso molecular.

La detección y estimación del número de átomos de S, Cl y Br en una molécula es posible analizando el patrón de formación de $(M+2)^+$. Además, el estudio sistemático de fragmentación de sustancias puras ha permitido establecer modelos de fragmentación para diversos grupos moleculares, culminando en tablas de valores de masa correspondientes a pérdidas razonables del ion molecular.

Tabla 1. Espectrometría de masas.

Fuente	Nombre	Agente ionizante
Fase gaseosa	Impacto electrónico IE	Electrones energéticos
	Ionización química CI	Iones gaseosos reactivos
	Ionización por campo FI	Electrodo de elevado potencial
Desorción	Desorción de campo FD	Electrodo de elevado potencial
	Ionización por electronebulización ESI	Campo eléctrico elevado
	Ionización asistida por matriz (MALDI)	Haz de láser
	Desorción por plasma PD	Fragmentos de fisión de ^{252}Cf
	Bombardeo con átomos rápidos FAB	Haz de átomos energéticos
	Espectrometría de masas de iones secundarios SIMS	Haz de iones energéticos
	Ionización por termonebulización TS	Elevada temperatura

IV. OBJETIVO

Este trabajo tiene como objetivo contribuir a la generación de conocimiento relativo al género *Physalis*, a través del estudio químico de las partes aéreas de *Physalis gracilis* Miers.

Para esto se buscó aislar el mayor número posible de metabolitos secundarios presentes en el extracto de la planta, así como determinar la estructura de los compuestos mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos

V. DESARROLLO EXPERIMENTAL

V. 1. Material y equipo

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher-Johns y no fueron corregidos. Las cromatografías en columna (CC) se realizaron con sílica gel 60 (Merck G) como fase estacionaria. Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizaron sobre cromatofolios Macherey-Nagel Sil G/UV₂₅₄ de 0.25 mm de espesor. Las cromatografías en placa preparativa se realizaron sobre placas Sil G/UV₂₅₄ de 1.0 mm y 2.0 mm de espesor. Como revelador se empleó disolución de sulfato de cerio (IV) al 3 % en ácido sulfúrico 2 N, así como lámpara de luz ultravioleta Spectroline CX-20 a 254 y 366 nm.

Los espectros de RMN se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Avance III (¹H a 400 MHz; ¹³C a 100 MHz) y en un Varian Unity Plus 500 (¹H a 500 MHz; ¹³C a 125 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm con tetrametilsilano como referencia interna. Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27. La rotación óptica se determinó en un polarímetro Perkin Elmer 343. Los espectros de EM-IE fueron obtenidos en un equipo JEOL JMS-AX505HA mientras que los espectros de EM-DART se obtuvieron en un equipo JEOL AccuTOF JMS-T100LC.

V. 2. Material vegetal

El material vegetal de *Physalis gracilis* Miers empleado en este trabajo proviene del municipio de Jalpan, Querétaro y fue identificado por la doctora Mahinda Martínez. El material vegetal se recolectó el 3 de octubre de 2012 en El Pocito, a 4.8 km al noroeste de La Parada. Una muestra se depositó en el Herbario de la Universidad Autónoma de Querétaro (M. Martínez 8768).

V. 3. Extracción del material vegetal

Las partes aéreas de la planta fueron molidas en un molino de cuchillas. Se obtuvieron 303.7 g de material vegetal molido que se colocó en una columna para llevar a cabo una extracción por percolación. En primer lugar se empleó acetona y se obtuvieron 7.72 g de extracto. En segundo lugar se usó metanol y se obtuvieron 42.65 g de extracto. Ambos extractos fueron reunidos y se llevó a cabo una partición con acetato de etilo y agua. De esto se obtuvieron 11.63 g de materia soluble en acetato de etilo.

V. 4. Aislamiento y purificación de compuestos

La fracción de acetato de etilo se disolvió y se adsorbió en celita. Se dejó evaporar el disolvente y se colocó sobre una columna cromatográfica de sílica gel (columna A; $\varnothing = 8$ cm, $h = 11$ cm). Se eluyó con mezclas de acetato de etilo y hexano de polaridades crecientes. Se obtuvieron 96 fracciones de 500 mL cada una. El orden y la relación de disolventes fueron los siguientes: 1A-4A (0:1); 5A-15A (1:19); 16A-19A (1:9); 20A-39A (1:4); 40A-45A (3:7); 46A-64A (2:3); 65A-74A (1:1); 75A-87A (7:3); 88A-89A (4:1); 90A-91A (0:1); 92A-95A Me₂CO; 96A MeOH.

El progreso de la cromatografía en columna se monitoreó mediante cromatografía en capa fina de las fracciones y con base en esto se reunieron aquellas que mostraron un perfil similar: 1A-3A; 4A; 5A-6A; 7A-8A; 9A-10A; 11A-15A; 16A-19A; 20A-21A; 22A-25A; 26A-30A; 31A-39A; 40A-44A; 45A-50A; 51A; 52A-59A; 60A-70A; 71A; 72A-75A; 76A-80A; 81A-88A; 89A-90A; 91A-95A; 96A.

De las fracciones 11A-15A se aisló una mezcla de β -sitosterol (compuesto **4**) y de estigmasterol (compuesto **5**) por cristalizaciones con etanol, obteniéndose 0.0382g. Las aguas madres se reunieron con las fracciones 9A-10A. El conjunto se adsorbió en celita y se llevó a cabo una CC (columna B; $\varnothing = 3$ cm, $h = 7$ cm). Se eluyó con mezclas de acetato de etilo y hexano de polaridades crecientes. Se obtuvieron treinta fracciones (1B-30B). De las fracciones 13B-19B (AcOEt-hexano 1:9) se obtuvieron 0.0651 g de la mezcla de estos compuestos. Así, se aislaron 0.1033 g de β -sitosterol y de estigmasterol, correspondiente a 0.034 % de la masa vegetal seca.

Se reunieron y se decoloraron con carbón activado los grupos de fracciones 26A-30A, 31A-39A y 40A-44A. Se fraccionaron por

cromatografía en columna eluyendo con mezclas de acetona y hexano de polaridades crecientes. Se obtuvieron veintiún fracciones en el orden y con la relación de disolventes siguientes: 1C-13C (1:9); 14C-21C (3:17). De las fracciones 14C-19C se obtuvo una mezcla de triacilgliceroles que no fue analizada.

Posteriormente, fueron reunidos los grupos 45A-51A y 60A-70A. Se concentraron las fracciones y fueron adsorbidas en celita. Se realizó una CC en sílica gel (columna D; $\varnothing = 5$ cm, h = 7 cm), eluída con mezclas de acetona y hexano de polaridades crecientes. Se obtuvieron setenta y tres fracciones (1D-73D) y con las fracciones 25D-50D (Me₂CO-hexano 1:4) se realizó una nueva cromatografía (columna E; $\varnothing = 1$ cm, h = 4 cm). De las fracciones 2E-3E (AcOEt-hexano 45 %) se obtuvo la 24,25-dihidrowithanólida D (compuesto **2**).

Del grupo de fracciones 52A-59A se obtuvo la withanólida D (compuesto **3**) mediante cristalización con acetato de etilo y hexano. Así se aislaron 0.0167 g, que representan 0.0055 % de la masa vegetal seca.

Las fracciones 72A-75A fueron disueltas en metanol y se cristalizaron con éter diisopropílico varias veces. Se obtuvieron entonces 0.0398 g de withaphysacarpina (compuesto **1**). Las aguas madres se reunieron con las fracciones 71A-88A, se concentraron y precipitó un sólido. La disolución se decantó y el sólido se recrystalizó con acetona y hexano. Se aislaron 0.0721 g de compuesto **1**. De la disolución se obtuvieron 0.1063 g del mismo compuesto por cristalización con acetona y éter diisopropílico.

Se reunieron las fracciones 89A-95A y se adsorbieron en celita. El conjunto se fraccionó por CC de sílica gel (columna F; $\varnothing = 3$ cm, h = 7 cm). Se emplearon mezclas de acetona y hexano de polaridades

crecientes para eluir. Se obtuvieron entonces sesenta y una fracciones (1F-61F). De las fracciones 27F-40F (Me₂CO-hexano 3:7) se aislaron 0.1028 g de compuesto **1**.

Con las aguas madres y las fracciones 41F-51F (acetona-hexano 3:7) se realizó una nueva cromatografía en columna (columna G; $\varnothing = 3$ cm, h = 6 cm). De las fracciones 12G-22G (Me₂CO-hexano 3:7) se aislaron 0.0327 g de compuesto **1**. Las fracciones 23G-35G se reunieron con las fracciones 52F-60F y se realizó una CC en sílica gel (columna H; $\varnothing = 3$ cm, h = 6 cm). Se obtuvieron veinticinco fracciones (1H-25H). De 6H-7H (Me₂CO-CHCl₃ 1:3) se aislaron 0.0122 g de compuesto **1**. Así, la cantidad total obtenida de compuesto **1** fue 0.3659 g, correspondiente a 0,12 % de la masa vegetal seca.

Las fracciones 8F-16F se reunieron con 3G-4G y se aplicaron sobre placa preparativa. Se eluyó con mezcla de acetato de etilo y benceno 1:1. Se obtuvieron 0.0229 g de una mezcla de withaesteroides cuyos componentes no fueron separados.

Por último, la fracción 96A se adsorbió en celita y se colocó sobre una columna de sílica gel (columna J; $\varnothing = 1$ cm, h = 4 cm) que fue eluída con mezclas de acetona y hexano de polaridades crecientes. De las fracciones 1J-2J (Me₂CO-hexano 3:7) se obtuvieron 0.0087 g de una mezcla de acilsacarosas y de otros compuestos. Esta mezcla representa 0.0029 % de la masa vegetal seca.

Withaphysacarpina (1): Cristales blancos; p.f. 288-290 °C (Me₂CO-hexano), 277-279 °C (CH₂Cl₂-hexano)(*lit.*: 275-278 °C); $[\alpha]_D^{20} +17.1^\circ$ (c. 0.24, CHCl₃)(*lit.*: +20.0°); IR (KBr): $\nu_{\text{máx}}$ 3510, 3470, 1744, 1715, 1677, 1453, 1349, 1187, 1084, 921 cm⁻¹; RMN ¹³C (CDCl₃): ver tabla 3; RMN ¹H (DMSO-d₆) ver tabla 4; EM-IE: *m/z* (rel. int.) 489 [M+H]⁺ (1), 471 [M+H-H₂O]⁺ (3), 361 [M-C₇H₁₁O₂]⁺ (100).

24,25-Dihidrowithanólida D (2): Cristales blancos; p.f. 275-276 °C (Me₂CO-hexano)(*lit.*: 275 °C); $[\alpha]_D^{20} +13.3^\circ$ (c. 0.27, CHCl₃)(*lit.*: +14.0°); IR (CHCl₃): $\nu_{\text{máx}}$ 3577, 3339, 1735, 1679, 1457, 1381, 1363, 1225, 1194, 1097, 920 cm⁻¹; RMN ¹³C (DMSO-d₆): ver tabla 3; RMN ¹H (DMSO-d₆): ver tabla 4; EM-DART: *m/z* (rel. int.) 473 [M+H]⁺ (17), 455 [M+H-H₂O]⁺ (100), 437 [M+H-2H₂O]⁺ (44).

Withanólida D (3): Cristales blancos; p.f. 260-263 °C (AcOEt-hexano)(*lit.*: 253-255 °C); $[\alpha]_D^{20} +72.0^\circ$ (c. 0.20, CHCl₃)(*lit.*: +80.0°); IR (CHCl₃): $\nu_{\text{máx}}$ 3693, 3575, 1701, 1453, 1384, 1237, 1132, 1099, 1027, 964, 919 cm⁻¹; RMN ¹³C (CDCl₃): ver tabla 3; RMN ¹H (CDCl₃): ver tabla 4; EM-DART: *m/z* (rel. int.) 471 [M+H]⁺ (75), 453 [M+H-H₂O]⁺ (100), 435 [M+H-2H₂O]⁺ (29), 345 [M-C₇H₉O₂]⁺ (16).

V. 5. Evaluación de la actividad inhibitoria de la α -glucosidasa

Se empleó la enzima α -glucosidasa tipo I de levadura para pan (No. Cat. SIGMA G5003-100UN) y su sustrato, 4-nitrofenil α -D-glucopiranosido (PNP-G, No. Cat. SIGMA N1377-1G).

Las muestras de los compuestos **1** y **3** se disolvieron en DMSO (en 50% de agua desionizada). Se agregaron 25 μ L de disolución de muestra a 150 μ L de disolución amortiguadora de fosfatos (DAF) (67 mM, pH 6.8) y se incubó hasta 37 °C. Manteniendo la temperatura, se agregaron 25 μ L de glutatión reducido (GSH) (3 mM en DAF).

Enseguida se agregaron 25 μ L de la enzima ($0.2 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se agitó durante diez minutos a 37 °C. Luego se adicionaron 25 μ L del sustrato, PNP-G (23.2 mM en DAF). Se incubó durante quince minutos en agitación constante y a 37 °C. Posteriormente se detuvo la reacción con 50 μ L de carbonato de sodio (1 M), agitando durante cinco minutos. Finalmente se determinó la densidad óptica de la mezcla a 405 nm. Como control se empleó una mezcla idéntica en ausencia de la enzima.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado del estudio químico del extracto de acetato de etilo de *Physalis gracilis* se aislaron tres withaesteroides, que se identificaron como withaphysacarpina (**1**), 24,25-dihidrowithanólida D (**2**) y withanólida D (**3**). Se aisló además una mezcla de β -sitosterol (**4**) y de estigmasterol (**5**), así como mezclas de acilgliceroles y de acilsacarosas cuyos componentes no fueron aislados. En la tabla 2 se presentan los rendimientos de cada uno de los compuestos aislados.

Tabla 2. Rendimiento de los compuestos aislados.

Compuesto	Rendimiento (g)	Porcentaje*
1 Withaphysacarpina	0.3659	0.1205
2 24,25-Dihidrowithanólida D	0.0027	0.0009
3 Withanólida D	0.0167	0.0055
4 β -Sitosterol y estigmasterol	0.1033	0.0340

*Respecto a la masa vegetal seca.

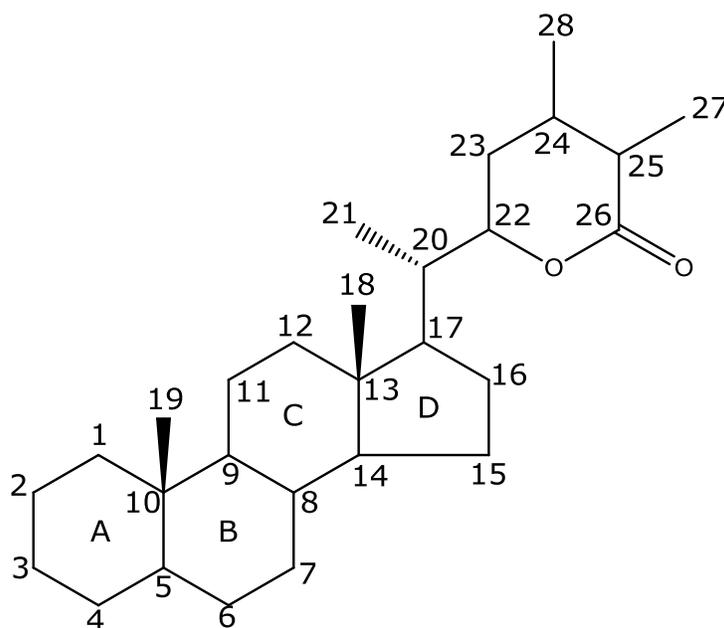


Figura 4. Numeración de los carbonos en withanólidas

VI. 1. Elucidación estructural de los compuestos aislados

La elucidación estructural de los compuestos aislados se llevó a cabo analizando los datos obtenidos de los espectros de IR, de EM (IE, DART) y de RMN (^1H y ^{13}C), así como de los experimentos DEPT, HSQC, HMBC, COSY y NOESY.

El espectro de infrarrojo del compuesto **1** muestra bandas en 3510 y 3470 cm^{-1} que corresponden a grupos hidroxilo. Se observan dos bandas características de grupo carbonilo en 1677 y 1743 cm^{-1} . La primera corresponde a una cetona α,β -insaturada; la segunda corresponde a una δ -lactona.

El espectro de RMN ^{13}C del compuesto **1** presenta veintiocho señales, lo que es congruente con un esqueleto de withanólida. Estos carbonos corresponden a cinco metilos, cinco metilenos, doce metinos y seis carbonos no protonados (experimento DEPT). La señal en δ_{C} 201.6 corresponde a un carbono de cetona, por lo que se asignó a C-1. Las señales en δ_{C} 131.2 y δ_{C} 145.2 pertenecen a carbonos vinílicos: se asignaron a C-2 y C-3 respectivamente. Los desplazamientos de estos tres carbonos sugieren la presencia de una cetona α,β -insaturada.

En el espectro de RMN ^1H se observan dos señales en δ_{H} 6.10 (d) y δ_{H} 7.06 (dd) que, por las correlaciones en el experimento HSQC (espectro 6), corresponden a los protones vinílicos H-2 y H-3 respectivamente. La constante de acoplamiento ($J = 10.0$ Hz) indica que se encuentran en relación *cis*. Se trata entonces de un doble enlace disustituido entre C-2 y C-3. El experimento HMBC muestra la correlación de C-2 y C-3 con la señal de un hidrógeno. Esta señal se asignó a H-4, cuyo desplazamiento (δ_{H} 3.53 dd, $J = 6.5; 4.5$ Hz) indica que es geminal a un grupo hidroxilo. Esto se confirma por las

correlaciones de H-4 con H-3 y con el hidrógeno de un grupo hidroxilo en δ_H 5.57 (d, $J = 4.5$ Hz).

De igual forma, se muestra la correlación de H-4 con el carbono de un metino (δ_C 58.7) y con dos carbonos no protonados (δ_C 63.2 y δ_C 47.2). Estas señales se asignaron a C-6, C-5 y C-10 respectivamente. Los desplazamientos de C-5, C-6 y H-6 (δ_H 3,15 s) indican la presencia de un grupo 5,6-epóxido. Todo esto sugiere que se trata de una withanólida que contiene en los anillos A y B los grupos $5\beta,6\beta$ -epoxi- 4β -hidroxi-2-en-1-ona, presentes con frecuencia en este tipo de compuestos.

En el experimento HMBC se observan las correlaciones entre tres señales de hidrógeno y C-10. Una de ellas corresponde a H-4 (δ_H 3.53); otra es un singulete en δ_H 1.26 que integra para tres hidrógenos y corresponde a H₃-19, como lo confirma su correlación con C-1. El experimento HSQC permitió asignar la señal en δ_C 16.1 a C-19. La tercera señal corresponde a H-9 (δ_H 0.74), que también muestra en el experimento HMBC correlación con las señales de C-19 y de un carbono terciario (δ_C 28.4) que se asignó a C-8.

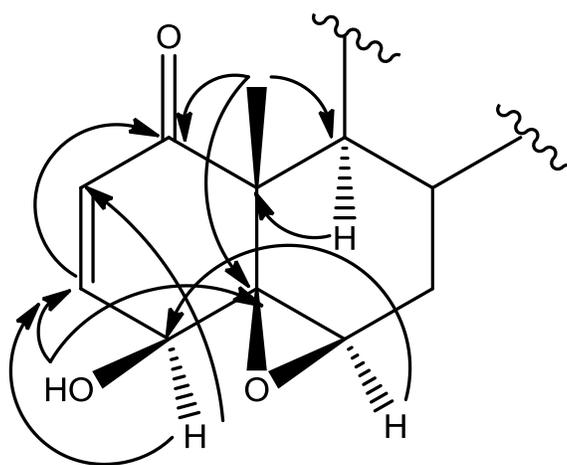


Figura 5. Algunas correlaciones observadas en el experimento HMBC para los anillos A y B del compuesto **1**.

Lo anterior se confirmó por la correlación entre H-9 y H-8 (δ_H 1.40) observada en el experimento COSY. En este espectro, se observa la correlación de H-8 con una señal en δ_H 1.99 (ddd, $J = 15.0; 4.0; 2.5$ Hz), correspondiente a uno de los hidrógenos en C-7. En consecuencia el experimento HSQC permitió identificar la señal de C-7 en δ_C 30.6 y la señal de H'-7 en δ_H 1.20. La constante de acoplamiento geminal ($J = 15.0$ Hz) corrobora esta asignación.

En el experimento COSY se observa la correlación de la señal de H-9 con las señales en δ_H 1.38 y δ_H 1.50 que se asignaron a los hidrógenos del metileno C-11. De forma análoga, las correlaciones de los H-11 permitieron identificar los hidrógenos de C-12. Las señales en δ_C 20.3 y δ_C 39.1 se asignaron a C-11 y C-12 respectivamente. Todo esto indica la presencia de un ciclo de seis miembros, congruente con el anillo C de una withanólida.

En el experimento HMBC se observan las correlaciones de la señal de H-8 con C-9 y C-10 y con la señal de un carbono terciario en δ_C 53.1. Esta señal se asignó a C-14. Se aprecia entonces la correlación de H-14 con un carbono no protonado (δ_C 42.3) y con un carbono secundario (δ_C 36.9) que se identificaron como C-13 y C-15, respectivamente. En el experimento COSY se observa la correlación de H-15 (δ_H 1.17) y H'-15 (δ_H 2.14) con la señal en δ_H 4.38 (ddd, $J = 12.0; 8.0; 4.5$ Hz), que se asignó a H-16. El desplazamiento de esta señal y su correlación con la señal del protón de un grupo hidroxilo en δ_H 6.10, indican la presencia de un grupo hidroxilo en C-16. El desplazamiento de C-16 (δ_C 71.6) apoya lo anterior.

En el espectro de RMN 1H se observa un singlete en δ_H 1.03 que integra para tres hidrógenos. En el espectro HMBC esta señal interactúa con C-17 (δ_C 56.2), C-14, C-13 y C-12, por lo que se asignó a H₃-18. En

consecuencia se asignó la señal en δ_C 14.3 a C-18. En el espectro de RMN 1H se observa el singulete de un grupo metilo en δ_H 1.11. En el experimento HMBC esta señal correlaciona con las señales de C-17 y de dos carbonos base de oxígeno en δ_C 76.8 (C) y δ_C 79.6 (CH) que se asignaron a C-20 y C-22 respectivamente. Por consiguiente, este último singulete debe ser H₃-21. Se asignó entonces la señal en δ_C 20.9 a C-21.

En el espectro de RMN ^{13}C se observa una señal en δ_C 175.7 que se asignó al carbono del carbonilo de una δ -lactona saturada (C-26). El experimento HMBC muestra las correlaciones de las señales en δ_H 2.23 (dc, $J = 9.5; 7.0$ Hz) y δ_H 1.05 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H) con la señal de C-26, lo que permitió identificarlas como H-25 y H₃-27. En respuesta, se asignó a C-25 la señal de carbono terciario en δ_C 39.3 y a C-27 la señal de carbono primario en δ_C 13.9. La correlación entre H-25 y una señal en δ_H 1.60 en el experimento COSY permitió asignar la última a H-24. Lo anterior corrobora que la δ -lactona es saturada, con lo que se confirma que la propuesta de que el compuesto **1** es una withanólida.

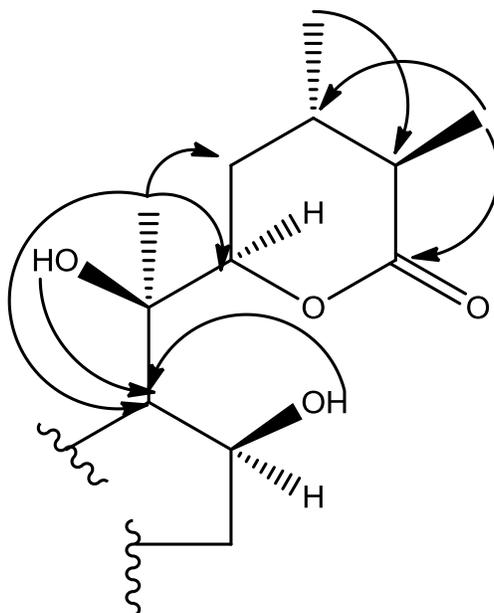


Figura 6. Algunas correlaciones observadas en el experimento HMBC para el anillo D y la δ -lactona del compuesto **1**.

En el experimento NOESY se observa la correlación entre H-4 y H-6, lo que confirma la orientación β para el grupo hidroxilo en C-4 y para el grupo 5,6-epóxido. En el mismo espectro, se observan las correlaciones entre H₃-18 y H₃-21, que permiten establecer una orientación β para la cadena lateral. Además, las correlaciones entre H-22 y H-25 indican que ambos hidrógenos poseen una orientación α . Por lo tanto, se propone la orientación β del metilo-25 (Figura 24).

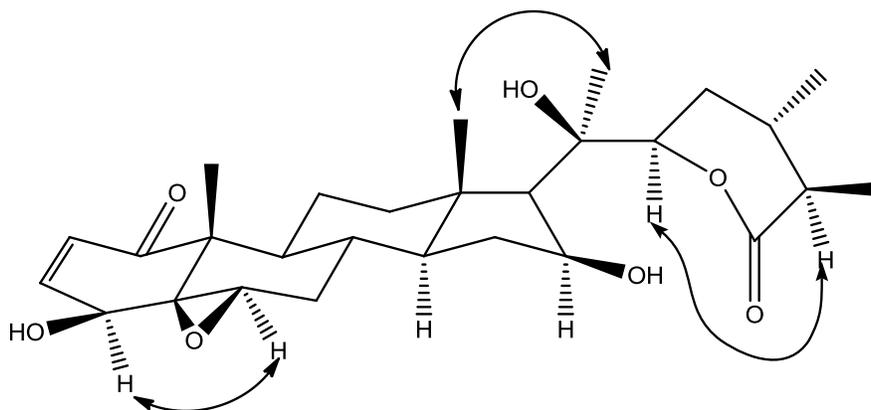
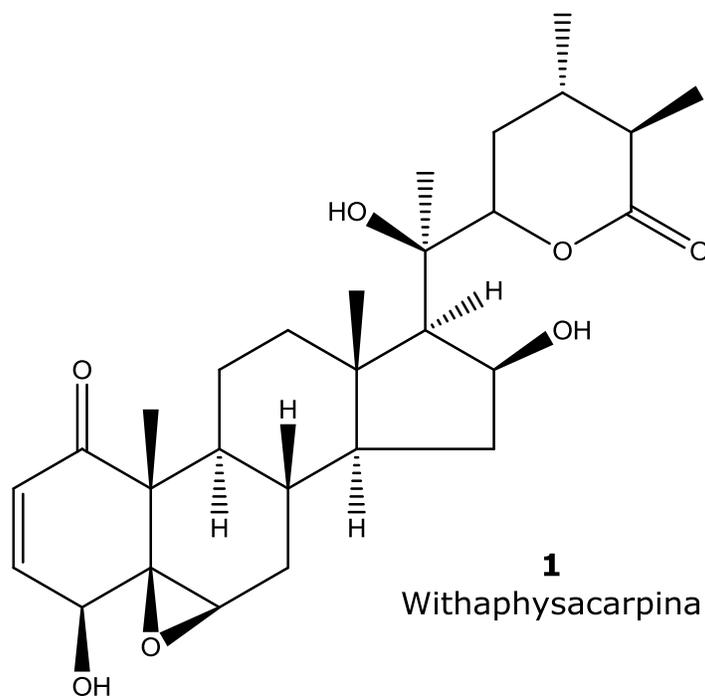


Figura 7. Algunas correlaciones observadas en el experimento NOESY para el compuesto **1**.

Así, se propone para el compuesto **1** la estructura 4 β ,16 β ,20 R -trihidroxi-5 β ,6 β -epoxi-1-oxowitha-2-enólida. En el espectro de EM-IE se aprecia un ion pseudomolecular $[M+H]^+$ de valor m/z 489, consistente con la fórmula molecular C₂₈H₄₀O₇. Se observan los fragmentos correspondientes a las pérdidas de un grupo agua (m/z 471 $[M+H-H_2O]^+$) y del anillo de la δ -lactona (m/z 361 $[M-C_7H_{11}O_2]^+$).

El compuesto **1** ya ha sido descrito anteriormente y se conoce como withaphysacarpina. La comparación de los datos obtenidos de punto de fusión y de rotación óptica, así como los desplazamientos químicos en RMN de ¹³C y ¹H con los descritos en la literatura confirmó su identidad.^{61,42} La withaphysacarpina ha sido aislada de *P. ixocarpa*⁶² y de *P. philadelphica*.^{63,64}

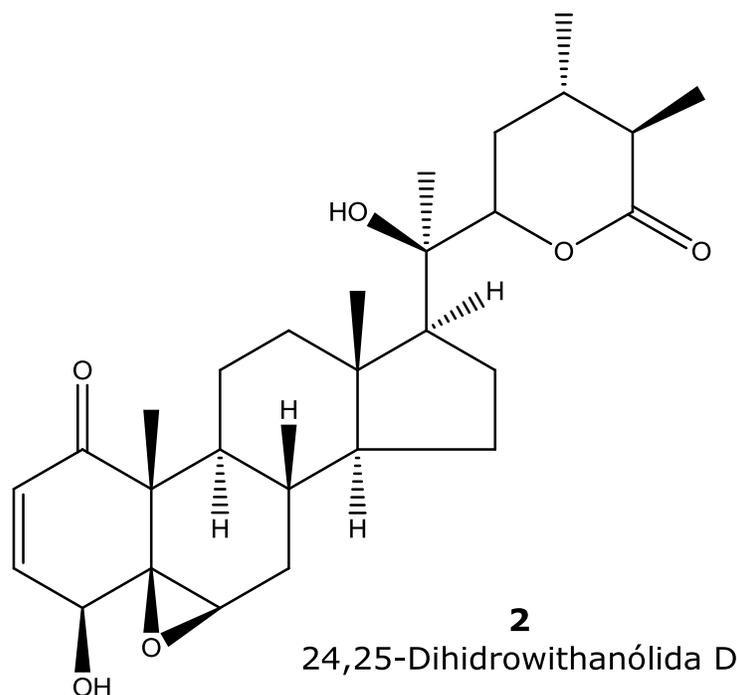


Las señales observadas en los espectros de RMN así como en los espectros de IR de los compuestos **2** y **3** son muy semejantes a los observados para el compuesto **1**, por lo que se propone una estructura similar para ambos compuestos.

Para el compuesto **2**, el espectro de RMN ^{13}C indica la presencia de veintiocho carbonos en la estructura, congruente con un esqueleto de withanólida. El experimento DEPT permite diferenciar estos carbonos en cinco metilos, seis metilenos y once metinos. De esta forma se tienen, además, seis carbonos no protonados.

Las principales diferencias respecto al compuesto **1** radican en los desplazamientos de C-15 y C-16. En el espectro de RMN ^{13}C la señal correspondiente a C-16 es de metileno y no de metino. Esto significa que no existe sustitución en C-16. En consecuencia se observan dos señales en el espectro de RMN ^1H de los hidrógenos en C-16 (δ_{H} 1.50 y δ_{H} 1.81,) y el desplazamiento químico de C-15 se modifica hacia campo alto (δ_{C} 23.5).

Por esto, se propone la estructura 4 β ,20 β -dihidroxi-5 β ,6 β -epoxi-1-oxowitha-2-enólida. Este withaesteroide ya ha sido descrito como componente de *Physalis minima*⁶⁵ y se conoce como 24,25-dihidrowithanólida D. La comparación de los datos obtenidos de punto de fusión y de rotación óptica, así como los de desplazamientos químicos en RMN de ¹³C y ¹H con los descritos en la literatura confirmó su identidad.^{62,66,42}

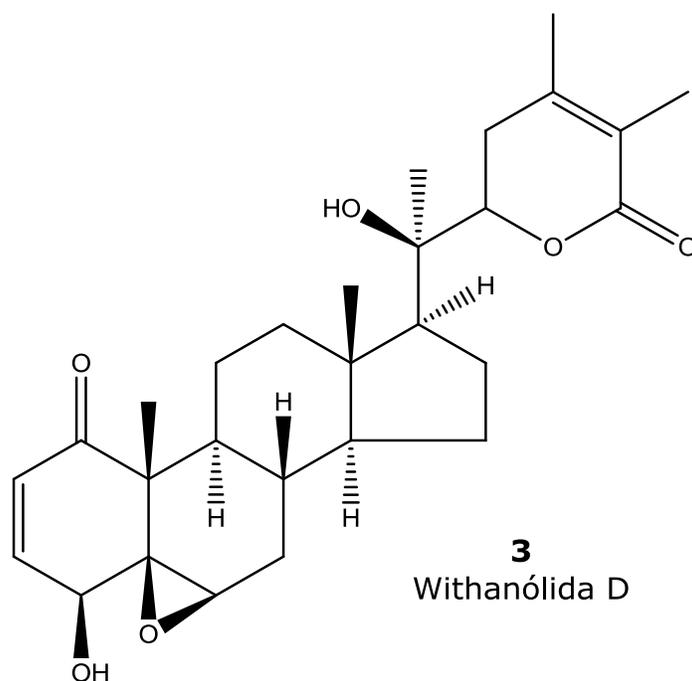


Para el compuesto **3**, el espectro de RMN ¹³C indica la presencia de veintiocho carbonos en la estructura, lo que es congruente con un esqueleto de withanólida. El experimento DEPT permite diferenciar estos carbonos en cinco metilos, seis metilenos, nueve metinos y ocho carbonos no protonados.

Las principales diferencias respecto al compuesto **2** observados en los espectros de RMN ¹³C radican en las señales de la lactona. En ese espectro se observa la señal para el carbono del carbonilo de la lactona en δ_c 166.0, lo que indica que se trata de una δ -lactona α,β -insaturada.

Se observan además dos señales en la región de los carbonos vinílicos (δ_C 148.9 y δ_C 122.0) que se asignaron a los carbonos del doble enlace conjugado con la lactona. En el espectro de RMN 1H se observaron las señales de dos metilos vinílicos en δ_H 1.88 (H₃-27) y δ_H 1.95 (H₃-28).

En consecuencia se propone la estructura 4 β ,20 β -dihidroxi-5 β ,6 β -epoxi-1-oxowitha-2,24-dienólida. La comparación de los datos obtenidos de punto de fusión y de rotación óptica, así como los desplazamientos químicos en RMN de ^{13}C y 1H con los descritos en la literatura confirmó su identidad.^{62,67,68} Este compuesto ya ha sido descrito como componente de *Withania somnifera*, de *Physalis viscosa* y de *Physalis peruviana*.^{69,70}



La identidad de los compuestos **4** y **5** se determinó comparando la mezcla aislada con una muestra de β -sitosterol por CCF; se tomó el punto de fusión y se comparó con valores reportados. Se obtuvo el espectro de RMN ^1H y se compararon los valores de desplazamiento químico de los protones con valores reportados.⁷¹ Tanto los factores de retención en CCF como el punto de fusión y los desplazamientos químicos en RMN ^1H permiten identificar la mezcla de los compuestos **4** y **5** como β -sitosterol y estigmasterol, esteroides abundantes en plantas.

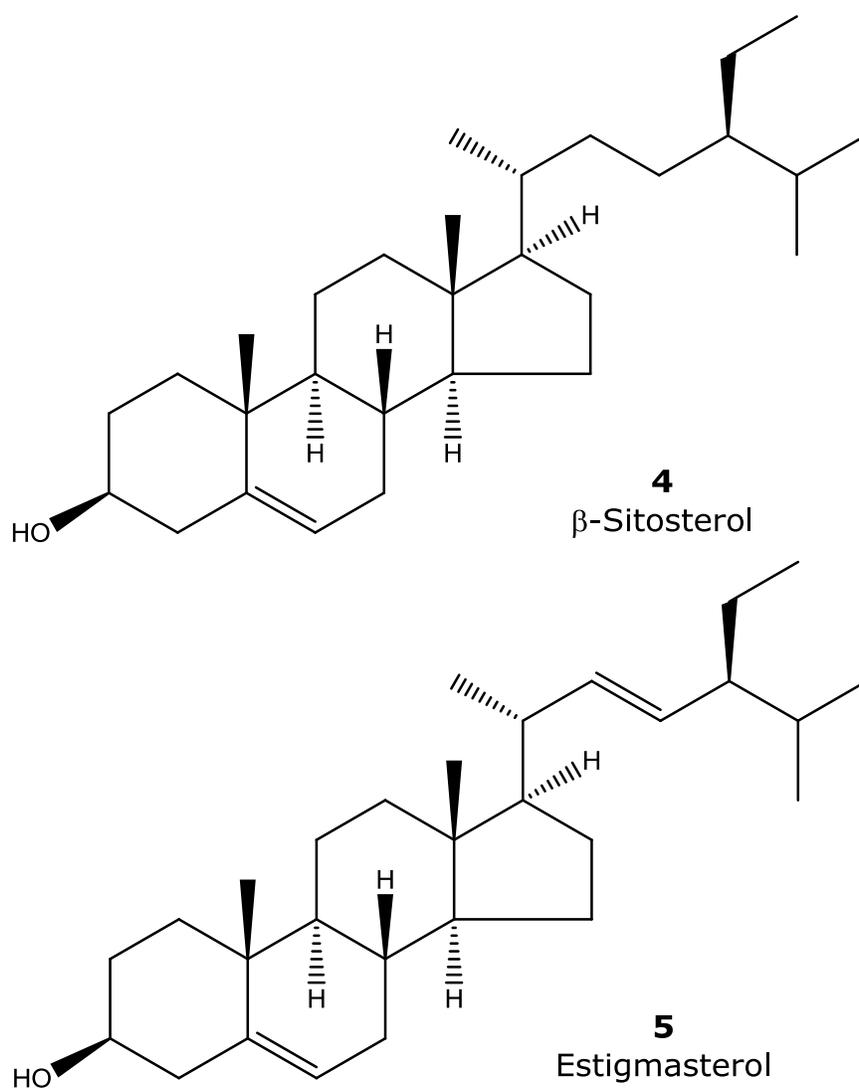


Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de los compuestos 1, 2 y 3.

^{13}C		1^a	2^b	3^c
1	C	201.6	201.7	202.2
2	CH	131.2	131.2	132.4
3	CH	145.2	145.1	141.8
4	CH	68.6	68.6	70.0
5	C	63.2	63.2	63.9
6	CH	58.7	58.7	62.5
7	CH ₂	30.6	30.7	31.1
8	CH	28.4	28.7	29.2
9	CH	43.4	43.4	44.1
10	C	47.2	47.2	47.7
11	CH ₂	20.3	20.6	22.0
12	CH ₂	39.1	38.8	39.7
13	C	42.3	42.0	42.8
14	CH	53.1	55.7	56.6
15	CH ₂	36.9	23.5	23.8
16	CH ₂	71.6 ^d	21.4	21.9
17	CH	56.2	54.1	54.7
18	CH ₃	14.3	13.2	13.5
19	CH ₃	16.1	16.1	17.4
20	C	76.8	74.0	75.1
21	CH ₃	20.9	20.3	20.7
22	CH	79.6	79.7	80.9
23	CH ₂	31.7	30.8	31.5
24	CH	30.7	30.7	148.9 ^e
25	CH	39.3	39.2	132.4 ^e
26	C	175.7	175.7	166.0
27	CH ₃	13.9	13.9	12.4
28	CH ₃	20.9	20.8	20.5

^aDeterminado en DMSO-d₆ a 125 MHz. ^bDeterminado en DMSO-d₆ a 100.6 MHz. ^cDeterminado en CDCl₃ a 125.71 MHz. ^dCH. ^eC.

Tabla 4. Datos espectroscópicos de RMN ^1H de los compuestos 1, 2 y 3.

^1H	1^f	2^g	3^h
2	6.10 d (10.0)	6.10 d (9.6)	6.20 d (10.0)
3	7.06 dd (10.0; 6.5)	7.06 dd (9.6; 6.4)	6.93 dd (10.0; 6.0)
4	3.53 dd (6.5; 4.5)	3.52 dd (6.4; 4.4)	3.46 dd (6.0; 2.5)
6	3.15 sa	3.14 sa	3.23 sa
7	1.20 m	1.40 m	1.28 m
7'	1.99 ddd (15.0; 4.0; 2.5)	1.99 d (14.0)	2.16 ddd (15.0; 4.0; 2.5)
8	1.40 m	1.28 m	1.54 m
9	0.74 m	0.73 m	1.00 ddd (12.0; 11.0; 4.0)
11	1.38 m	1.31 m	1.47 m
11'	1.50 m	1.48 m	1.81 ddd (14.0; 7.5; 4.0)
12	1.02 m	1.02 m	1.21 m
12'	1.94 dt (9.0; 3.5)	1.84 m	1.97 m
14	0.76 m	0.90 m	0.96 m
15	1.17 m	1.03 m	1.18 m
15'	2.14 dt (15.0; 8.0)	1.57 m	1.64 m
16	4.38 ddd (12.0; 8.0; 4.5)	1.50 m	1.52 m
16'	-	1.81 m	1.94 m
17	1.14 m	1.46 m	1.51 m
18	1.03 s	0.74 s	0.86 s
19	1.26 s	1.24 s	1.41 s
21	1.11 s	1.09 s	1.26 s
22	4.49 dd (11.5; 3.0)	4.08 dd (11.6; 3.2)	4.20 dd (13.0; 3.5)
23	1.50 dt (14.0; 3.5)	1.40 dt (14.0; 3.6)	2.43 ta (17.0)
23'	1.73 ddd (14.0; 11.5; 9.0)	1.75 ddd (14.0; 12.0; 9.0)	2.10 dd (17.0; 3.5)
24	1.60 m	1.57 m	-
25	2.23 dc (9.5; 7.0)	2.28 dc (9.6; 6.5)	-
27	1.05 d (7.0)	1.03 d (6.5)	1.88 s
28	1.06 d (7.0)	1.03 d (6.5)	1.95 s
4-OH	5.57 d (4.5)	5.58 d (4.4)	2.56 d (2.5)
16-OH	6.10 d (10.0)	-	-
20-OH	5.12 s	4.22 s	2.25 s

^fDeterminado en DMSO- d_6 a 500 MHz. ^gDeterminado en DMSO- d_6 a 400 MHz. ^hDeterminado en CDCl_3 a 500 MHz.

VI. 2. Pruebas biológicas

Las actividades biológicas de los withaesteroides aislados ya han sido sujeto de estudio. Por ejemplo, la withanólida D ha mostrado actividad citotóxica⁷² y de inducción de la diferenciación celular⁵⁰. La withaphysacarpina y la 24,25-dihidrowithanólida D han mostrado actividad quimiopreventiva.⁴³

VI. 2. 1. Inhibición de la actividad de la enzima α -glucosidasa

La diabetes mellitus tipo 2 es un desorden metabólico crónico que afecta a más de 171 millones de personas en el mundo⁷³. Se caracteriza por niveles altos de glucosa en la sangre (hiperglucemia). Esto es resultado de la disminución de la secreción de insulina, así como de la resistencia a la insulina por parte de tejidos periféricos como los del hígado, los músculos esqueléticos y los tejidos adiposos⁷⁴.

Las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa son clave en el metabolismo de los glúcidos. La α -amilasa los degrada a oligosacáridos y disacáridos, que la α -glucosidasa convierte en monosacáridos. La glucosa libre es entonces absorbida por el intestino y una posible consecuencia es la hiperglucemia.

Existen compuestos capaces de inhibir la actividad de la α -glucosidasa. Estos limitan así los niveles de glucosa en la sangre y resultan útiles como agentes para el control de la diabetes tipo 2. Evitan, además, complicaciones posteriores como retinopatía, nefropatía, neuropatía o microangiopatía.

Las plantas y microorganismos son fuentes de inhibidores de la α -glucosidasa. Por ejemplo, la acarbosa⁷⁵, la 1-desoxinojirimicina⁷⁶ y la genisteína⁷⁷ han sido aisladas de fuentes naturales.

En este trabajo se evaluó la capacidad de la withaphysacarpina (**1**) y de la withanólida D (**3**) para inhibir la actividad de la α -glucosidasa. En la tabla 4 se muestran los resultados de esta determinación.

Tabla 5. Inhibición de la actividad de la α -glucosidasa.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Densidad óptica (405 nm)	Inhibición (%)
α -Glucosidasa	-	2.023	-
1	1	2.205	-9.00
	10	2.157	-6.62
	100	1.539	23.91
3	1	2.091	-3.34
	10	2.009	0.68
	100	1.530	24.37

El porcentaje de inhibición se determinó con la relación:

$$\% Inh = \frac{C - E}{C} * 100$$

Donde C y E son las densidades ópticas del control y de la muestra, respectivamente. Ninguno de los compuestos evaluados presenta porcentajes de inhibición superiores al 50 %. La capacidad de inhibir la actividad de la enzima no es significativa y en consecuencia no se determinó la CI_{50} .

VII. CONCLUSIONES

Como resultado del estudio químico realizado al extracto de acetato de etilo de partes aéreas de *Physalis gracilis* Miers se obtuvieron tres withaesteroides y una mezcla de esteroides.

Los compuestos aislados se identificaron como withaphysacarpina, 24,25-dihidrowithanolida D, withanolida D, β -sitosterol y estigmasterol.

Estos compuestos ya han sido descritos como componentes de otras especies del género *Physalis*. La composición química de *Physalis gracilis* resulta semejante a la de *Physalis philadelphica*.

La withanolidas withaphysacarpina y withanolida D mostraron una escasa capacidad para inhibir la actividad de la enzima α -glucosidasa.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

¹ HERNÁNDEZ T., CANALES M., ÁVILA J. G., DURÁN A., CABALLERO J., ROMO DE VIVAR A., LIRA R.: Antifungal activity of the essential oils of two Verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *J. Ethnopharmacol.* **88**, 181-188 (2003).

² BARBOSA E., CALZADA F., CAMPOS R.: *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *J. Ethnopharmacol.* **19**, 552-554 (2007).

³ NEWMAN D.J., CRAGG G.M.: Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **75**, 311–335 (2012).

⁴ OLMSTEAD, R.G., BOHS, L.: A Summary of molecular systematic research in Solanaceae: 1982-2006. *Acta Horticulturae.* **745** (2007).

⁵ DEWICK, P. M.: *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. 3rd Edition.* John Wiley & Sons, 2009.

⁶ WHITSON M.: Untangling *Physalis* (Solanaceae) from the physaloids: a two-gene phylogeny of the Physalinae. *Syst. Bot.* **30**, 216-230 (2005).

⁷ RASHEED N.M.A., SHAREEF M.A., AAHMAD M., GUPTA V.C., ARFIN S., SHAMSHAD A.K.: HPTLC finger print profile of dried fruit of *Physalis alkekengi* Linn. *Pharma. J.* **2**, 12, 464-469 (2010).

-
- ⁸ Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Universidad Nacional Autónoma de México, 2009. Tomado de la red, 2013. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>
- ⁹ SANTIAGUILLO J.F., BLAS S.: Aprovechamiento tradicional de las especies de *Physalis* en México. *Rev. Geo. Agric.* **43**, 81 (2009).
- ¹⁰ ZHANG H., SAMADI A.K., COHEN M.S., TIMMERMANN B.N.: Antiproliferative withanolides from the Solanaceae: A structure-activity study. *Pure Appl. Chem.* **84**, 6, 1353 (2012).
- ¹¹ KURUP P.A.: Antibiotic principle of the leaves of *Withania somnifera*. *Indian Current Sci.* **25**, 57 (1956).
- ¹² LAVIE D., GLOTTER E., SHVO Y.: Constituents of *Withania somnifera* Dun. The structure of withaferin A. *J. Chem. Soc.* 7517 (1965).
- ¹³ FAJARDO V., PODESTA F., SHAMMA M., FREYER A.J.: New withanolides from *Jaborosa magellanica*. *J. Nat Prod.* **54**, 554 (1991).
- ¹⁴ TURSUNOVA R.N., MASLENNIKOVA V.A., ABUBAKIROV N.K.: Withasteroids of *Physalis*. Physanolide and 4 β -Hydroxy-withanolide E. *Khim. Prir. Soedin.* **17**, 187 (1981).
- ¹⁵ MANITTO P.: *Biosynthesis of Natural Products*. Ellis Howard Limited, 1981. Pp 267, 279.
- ¹⁶ DANISHEFSKY I.: *Biochemistry for Medical Sciences*. Little, Brown and Company: Boston, MA, USA, 1980. Pp 232.

-
- ¹⁷ VELDE V.V., LAVIE D.: New withanolides of biogenetic interest from *Withania somnifera*. *Phytochem.* **20**, 1359-1363 (1981).
- ¹⁸ LOCKLEY W.J.S., REES H.H., GOODWIN T.W.: Biosynthesis of steroidal withanolides in *Withania somnifera*. *Phytochem.* **15**, 937 (1976).
- ¹⁹ ANDREWS-SMITH W., GILL H.K., SMITH R.W., WHITING D.A.: Stages in the biosynthesis of the epoxy-lactol side chain in Nic-1, insect-antifeedant steroid of *Nicandra physaloides*. *J. Chem. Soc. Perkin.* **I**, 291 (1991).
- ²⁰ LOCKLEY W.J.S., ROBERTS D.P., REES H.H., GOODWIN T.W.: 24-Metilcolesta-5,24(25)-dien-3 β -ol, a new sterol from *Withania Somnifera*. *Tetrahedron Letters.* **43**, 3773 (1974).
- ²¹ 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.* **53**, 55 (1987).
- ²² VELDE V.V., LAVIE D., BUDHIRAJA R.D., SUDHIR S., GARG K.N.: Potential biogenetic precursors of withanolides from *Withania coagulans*. *Phytochem.* **22**, 2253 (1983).
- ²³ GUPTA M., BAGCHI A., RAY A.B.: Additional withanolides of *Datura metel*. *J. Nat. Prod.* **54**, 599 (1991).

-
- ²⁴ GOTTLIEB H.E., KIRSON I., GLOTTER E., RAY A.B., SAHAI M., ALI A.: Perulactone, a new ergostane-type steroid from *Physalis peruviana*. *J. Chem. Soc. Perkin. I*, 2700 (1980).
- ²⁵ VELDE V.V., LAVIE D.: A Δ^{16} -Withanolide in *W. somnifera* as a possible precursor for α -side chain. *Phytochem.* **2**, 731 (1982).
- ²⁶ MULCHANDANI N.B., IYER S.S., BADHEKA L.P.: Biosynthesis of physalin D. *Bhabha At. Res. Cent.* **764**, 27 (1974).
- ²⁷ GLOTTER E., KIRSON I., LAVIE D., ABRAHAM A.: The Withanolides – A group of natural steroids. In *Bioorganic Chemistry Vol. 2* (E. E. VAN TAMELEN Ed. NY). 1978.
- ²⁸ BEGLEY M.J., CROMBIE L., HAM P.J., WHITING D.A.: A new class of natural steroids, with ring D aromatic, from *Nicandra physaloides*. *J. Chem. Soc. Perkin. I*, 304 (1976).
- ²⁹ GILL H.K., SMITH R.W., WHITING D.A.: Biosynthesis of the insect antifeedant steroid Nic-1: origins of the aromatic ring D. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1457 (1986).
- ³⁰ RAY A.B.: Recent progress in withaesteroids. In: *Frontiers in Applied Chemistry*. A.K. BISWAS, ed. New Delhi: Narosa, 1989.
- ³¹ ATTA-UR-RAHMAN M.I., CHOUDHARY S., QURESHI W.G., YOUSAF M.: Two new ergostane-type steroidal lactones from *Withania coagulans*. *J. Nat. Prod.* **61**, 812 (1998).

- ³² ZHU X.H., ANDO J., TAGAKI M., IKEDA T. YOSHIMITSU A., NOHARA T.: Four novel withanolide-type steroids from the leaves of *Solanum cilistum*. *Chem. Pharm. Bull.* **49**, 1440 (2001).
- ³³ MISRA L., LAL P., SANGWAN R.S., SANGWAN N.S., UNIYAL G.C., TULI R.: Unusually sulfated and oxygenated steroids from *Withania somnifera*. *Phytochem.* **66**, 2702 (2005).
- ³⁴ YAMAMOTO R.T., FRAENKEL G.S.: Assay of the principal gustatory stimulant for the tobacco hornworm, *Protoparce sexta*, from solanaceous plants. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **53**, 503 (1960).
- ³⁵ QURESHI S., AKHTER F., JAMAL A., ABBAS S., ATTA-UR-RAHMAN, IQBAL CHOUDHARY M. 8th International Symposium on Natural Products, Karachi, 1996. Cf *Abstracts*, 117.
- ³⁶ SHOHAT B., GITTER S., ABRAHAM A., LAVIE D.: Antitumor activity of withaferin A. *Cancer Chemother. Rep.* **51**, 271 (1967).
- ³⁷ SYROV V.N., KHUSHBAKTOVA Z.A., VASINA O.E. *Khim. Pharm. Zh.* **23**, 610 (1989). Cf *Chem. Abstr.*, 111.
- ³⁸ CHOPRA R.N., NAYER S.L., CHOPRA I.C.: *Glossary of Indian Medicinal Plants*. C.S.I.R. New Delhi, 1956. Pp 192.
- ³⁹ MOHANA K., UMA R., PURUSHOTHAMAN K.K.: Abortifacient activity of physalin X. *Indian J. Exp. Biol.* **17**, 690-691 (1979).

-
- ⁴⁰ BAEHR V., HAENSEL R.: Immunomodulating properties of 5,20 α (R)-dihydroxy-6 α ,7 α -epoxy-1-oxo-(5 α)-witha-2,24-dienolide and solasodine. *Planta Medica*. **44**, 32-33 (1982).
- ⁴¹ VACCARINI C.E., BONETTO G.M.: Selective phytotoxic activity of withanolides from *Iochroma australe* to crop and weed species. *J. Chem. Ecol.* **26**, 2187-2193 (2000).
- ⁴² KENNELLY E.J., GERHAUSER C., SONG L.L., GRAHAM J.G., BEECHER C.W.W., PEZZUTO J.M., KINGHORN D.: Induction of quinone reductase by withanolides isolated from *Physalis philadelphica* (Tomatillos). *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3771-3777 (1997).
- ⁴³ SU B.N., MISICO R., PARK E.J., SANTARSIERO B.D., MESECAR A.D., FONG H.H.S., PEZZUTO J.M., KINGHORN A.D.: Isolation and characterization of bioactive principles of the leaves and stems of *Physalis philadelphica*. *Tetrahedron*. **58**, 3453-3466 (2002).
- ⁴⁴ MISICO R.I., SONG L.L., VELEIRO A.S., CIRIGLIANO A.M., TETTAMANZI M.C., BURTON G., BONETTO G.M., NICOTRA V.E., SILVA G.L., GIL R.R., OBERTI J.C., KINGBORN A.D., PEZZUTO J.M.: Induction of quinone reductase by withanolides. *J. Nat. Prod.* **65**, 677-680 (2002).
- ⁴⁵ SU B., GU J., KANG Y., PARK E., PEZZUTO J.M., KINGHORN A.D.: Induction of the phase II enzyme, quinone reductase, by withanolides and norwithanolides from Solanaceous species. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. **1**, 115-123 (2004).

-
- ⁴⁶ UMEHARA K., SUGAWA A., KUROYANAGI M., UENO A., TAKI T.: Studies on differentiation-inducers from *Arctium Fructus*. *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 1774 (1993).
- ⁴⁷ MATSUDA T., KUROYANAGI M., SUGIYAMA S., UMEHARA K., UENO A., NISHI K.: Cell differentiation-inducing diterpenes from *Andrographis paniculata* Nees. *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 1216 (1994).
- ⁴⁸ UMEHARA K., TAKAGI R., KUROYANAGI M., UENO A., TAKI T., CHEN Y.J.: Studies on differentiation-inducing activities of triterpenes. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 401 (1992).
- ⁴⁹ KUROYANAGI M., SHIBATA K., UMEHARA K.: Cell differentiation-inducing steroids from *Withania somnifera* L. (Dun.). *Chem. Pharm. Bull.* **47**, 1646 (1999).
- ⁵⁰ TOHDA C., NAKAMURA N., KOMATSU K., HATTORI M.: Trigonelline-induced neurite outgrowth in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 679 (1999).
- ⁵¹ ZHAO J., NAKAMURA N., HATTORI M., KUBOYAMA T., TOHDA C., KOMATSU K.: Withanolide derivatives from the roots of *Withania somnifera* and their neurite outgrowth activities. *Chem. Pharm. Bull.* **50**, 760 (2002).
- ⁵² KUBOYAMA T., TOHDA C., KOMATSU K.: Neuritic regeneration and synaptic reconstruction induced by withanolide A. *Br. J. Pharmacol.* **144**, 961 (2005).

- ⁵³ LIFFERT R., HOECKER J., JANA C.K., WOODS T.M., BURCH P., JESSEN H.J., NEUBURGER M., GADEMANN K.: Withanolide A: synthesis and structural requirements for neurite outgrowth. *Chem. Sci.* **4**, 2851 (2013).
- ⁵⁴ VERAS M.L., BEZERRA M.Z.B., LEMOS T.L.G., UCHOA D.E.A., BRAZ-FILHO R., CHAI H.B., CORDELL G.A., PESSOA O.D.L.: Cytotoxic withaphysalins from the leaves of *Acnistus arborescens*. *J. Nat. Prod.* **67**, 710-713, (2004).
- ⁵⁵ ROCHA D.D., MILITAO G.C.G., VERAS M.L., PESSOA O.D.L., SILVEIRA E.R., ALVES A.P.N.N., DE MORAES M.O., PESSOA C., COSTA LOTUFO L.V.: Selective cytotoxicity of withaphysalins in myeloid leukemia cell lines versus peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci.* **79**, 1692 (2006).
- ⁵⁶ 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*. *J. Nat. Prod.* **70**, 1146 (2007).
- ⁵⁷ MA L., GAN X.W., HE Q.P., BAI H.Y., ARFAN M., LOU F.C., HU L.H.: Cytotoxic withaphysalins from *Physalis minima*. *Helv. Chim. Acta.* **90**, 1406 (2007).
- ⁵⁸ SKOOG D.A., HOLLER F.J., NIEMAN T.A.: Principles of instrumental analysis. 5th Ed. Harcourt Brace & Company. EU, 1998.

- ⁵⁹ BRUCE P.Y.: Organic Chemistry. 5th Ed. Pearson Education. EU, 2007.
- ⁶⁰ CAREY F.A.: Organic Chemistry. 6th Ed. McGraw-Hill. EU, 2006.
- ⁶¹ SUBRAMANIAN S.S., SETHI P.D.: Steroidal lactones of *Physalis ixocarpa* leaves. *Indian J. Pharma.* **35**, 1, 36-38 (1973).
- ⁶² KIRSON I., GLOTTER E., ABRAHAM A., LAVIE D.: Constituents of *Withania somnifera*. XI. Structure of three withanolides. *Tetrahedron.* **26**, 2209-19 (1970).
- ⁶³ MALDONADO E., PEREZ-CASTORENA A.L., GARCES C., MARTINEZ M.: Philadelphicalactones C and D and other cytotoxic compounds from *Physalis philadelphica*. *Steroids.* **76**, 724-728 (2011).
- ⁶⁴ CHOI J.K., MURILLO G., SU B.N., PEZZUTO J.M., KINGHORN A.D., MEHTA R.G.: Ixocarpalactone A isolated from the Mexican tomatillo shows potent antiproliferative and apoptotic activity in colon cancer cells. *FEBS Journal.* **273**, 5714-5723 (2006).
- ⁶⁵ GLOTTER E., KIRSON I., ABRAHAM A., SETHI P.D., SUBRAMANIAN S.S.: Steroidal constituents of *Physalis minima*. *J. Chem. Soc. Perkin.* **I**, 1370 (1975).
- ⁶⁶ EASTWOOD F.W., KIRSON I., LAVIE D., ABRAHAM A.: Analysis of hybrids of *Withania somnifera*. Part 2. New withanolides from a cross of South African chemotype by chemotype II (Israel) in *Withania somnifera*. *Phytochem.* **19**, 1503 (1980).

- ⁶⁷ GOTTLIEB H.E., KIRSON I.: ¹³C NMR Spectroscopy of the withanolides and other highly oxygenated C₂₈ steroids. *Organic Magnetic Resonance*. **16**, 1, 20 (1981).
- ⁶⁸ LAVIE D., KIRSON I., GLOTTER E.: Constituents of *Withania somnifera*. X. Structure of withanolide D. *Isr. J. Chem.* **6**, 671 (1968).
- ⁶⁹ SILVA G.L., PACCIARONI A., OBERTI J.C., VELEIRO A.S., BURTON G.: A pregnane structurally related to withanolides from *Physalis viscosa*. *Phytochem.* **34**, 3, 871-873 (1993).
- ⁷⁰ ZAKI A.Y., EL-ALFY T.S.M., EL GOHARY H.M.A.: Study of withanolides, physalins, antitumor and antimicrobial activity of *Physalis peruviana*. *Egyptian J. Pharma. Sci.* **28**, 1-4, 235-245 (1987).
- ⁷¹ Sadtler Research Laboratories: *Nuclear Magnetic Resonance spectra*. Sadtler Researches, Ed. & Pub. Stigmast-5-en-3 β -ol (**47770**). EU, 1998.
- ⁷² DAS H., DUTTA S.K., BHATTACHARYA B., CHAKRABORTI S.K.: Antineoplastic agents from plants; antitumor activity of withanolide D. *Indian J. Cancer Chemother.* **7**, 59 (1985).
- ⁷³ WILD S., ROGLIC G., GREEN A., SICREE R., KING H. *Diabetes Care*. **27**, 1047-1053 (2004).
- ⁷⁴ DEFRONZO R.A.: Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev.* **5**, 177-269 (1997).

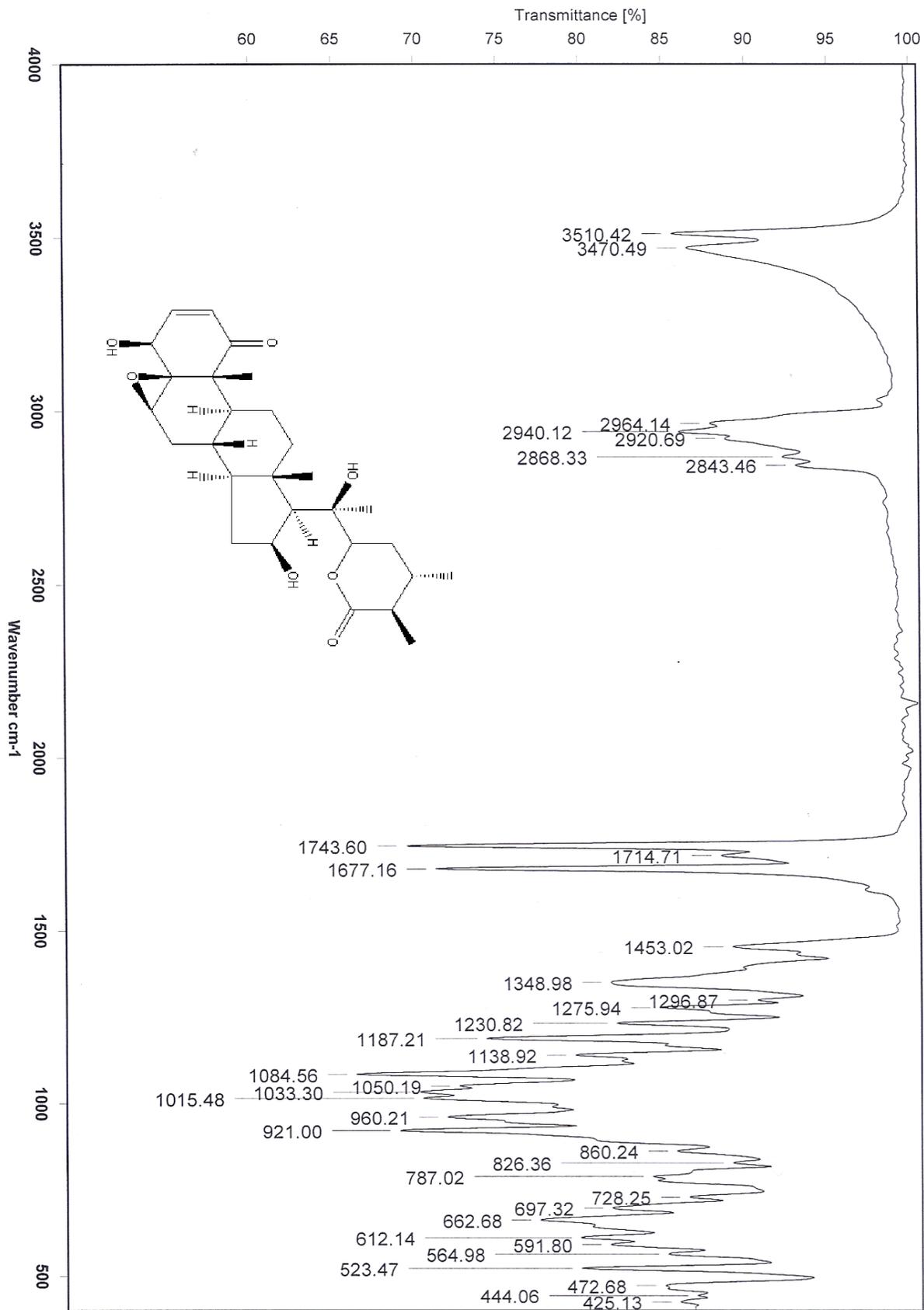
⁷⁵ SCHMIDT D.D., FROMMER W., JUNGE B., MULLER L., WINGENDER W., TRUSCHEIT E., SCHAFER D.: α -Glucosidase inhibitors: new complex oligosaccharides of microbial origin. *Naturwissenschaften*. **64**, 535–536 (1977).

⁷⁶ ASANO N., TOMIOKA E., KIZU H., MATSUI K.: Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis*. *Carbohydr. Res.* **253**, 235–245 (1994).

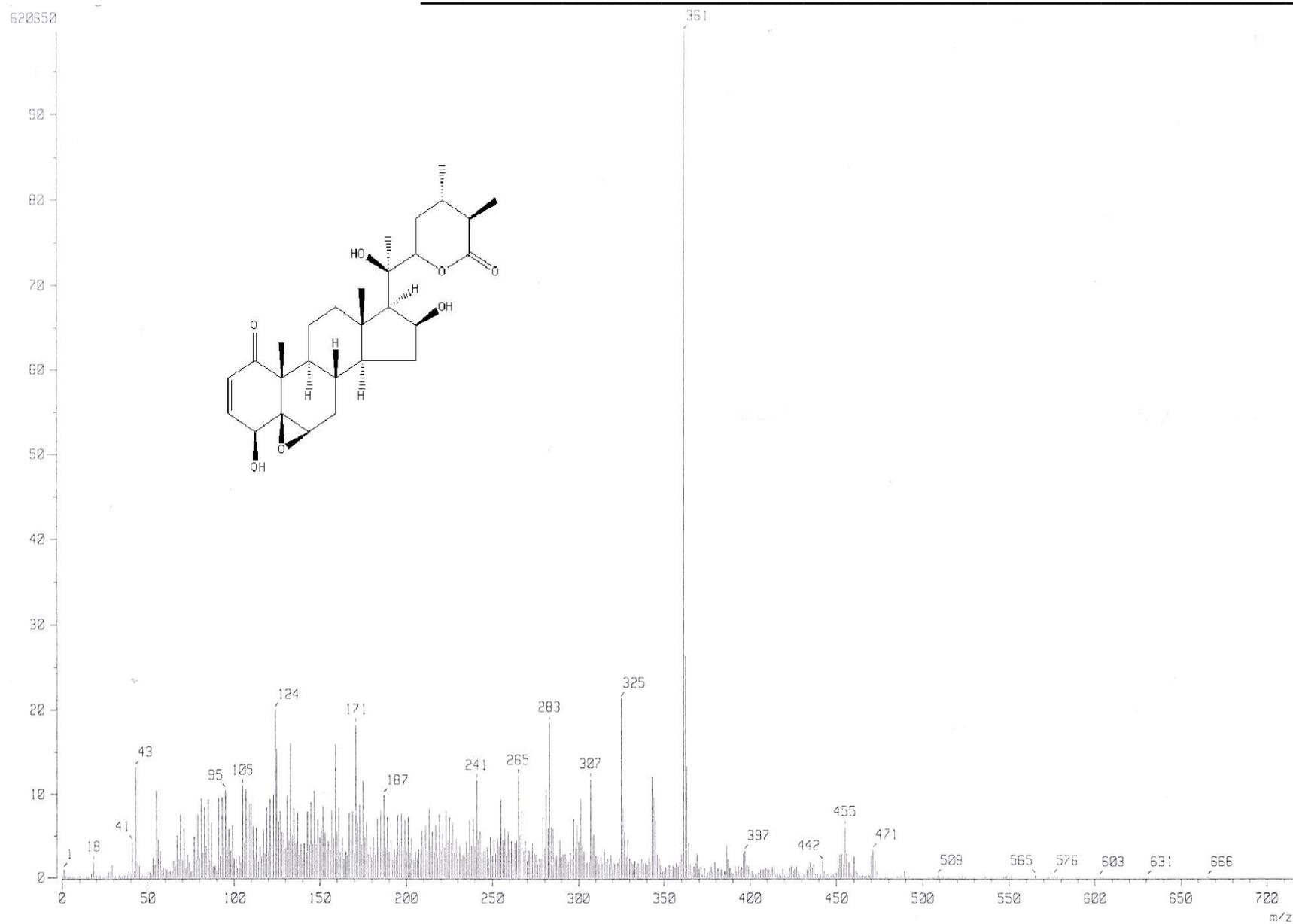
⁷⁷ LEE D.S., LEE S.H.: Dibutyl phthalate, an α -glucosidase inhibitor from *Streptomyces melanosporofaciens*. *FEBS Lett.* **501**, 84–86 (2001).

ANEXO I – ESPECTROSCOPIA

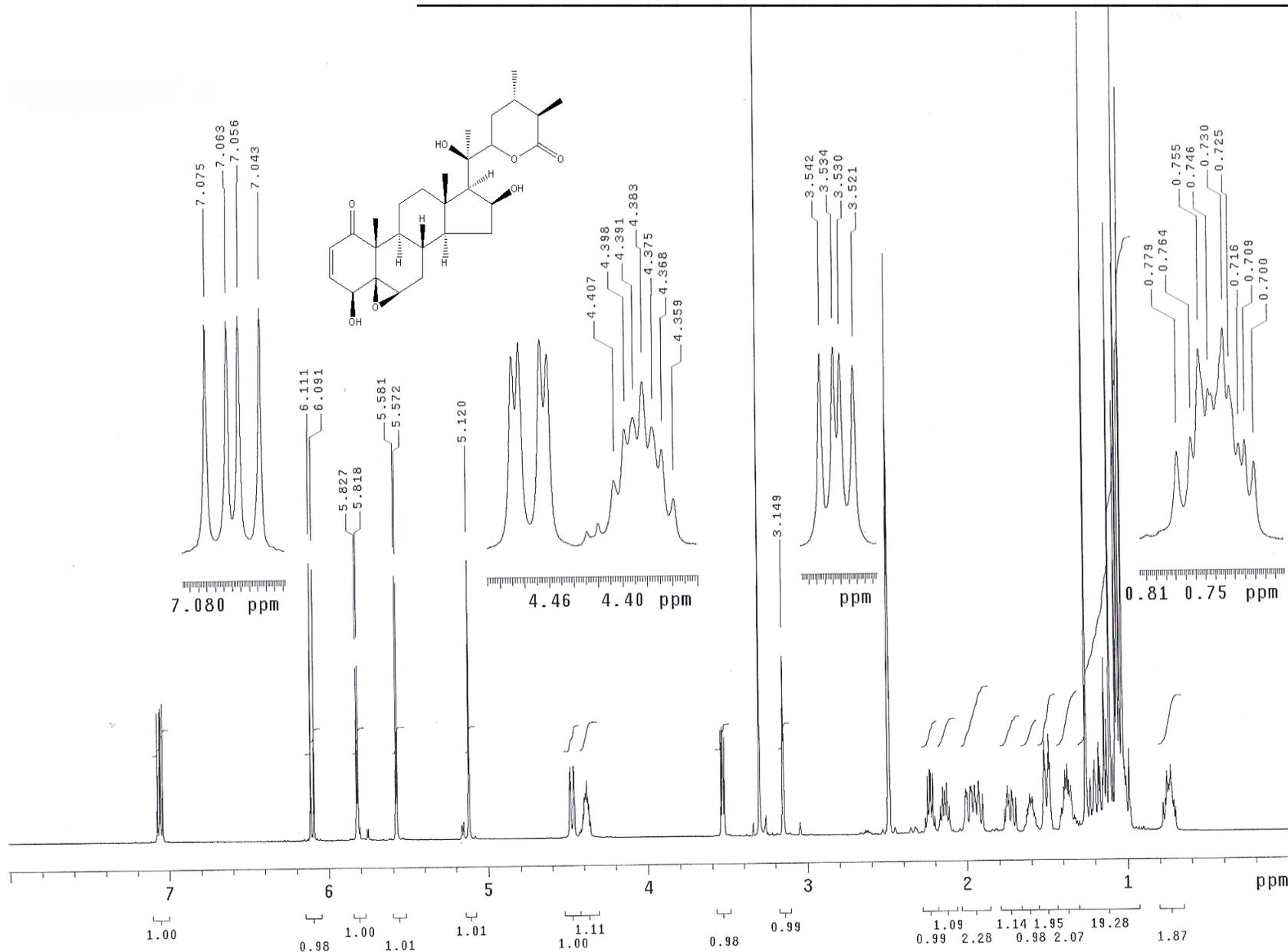
Compuesto	Espectro	Página
Withaphysacarpina (1)	1. IR	75
	2. EM-IE	76
	3. RMN ¹ H	77
	4. RMN ¹³ C	78
	5. Experimento DEPT	79
	6. Experimento HSQC	80
	7. Experimento HMBC	81
	8. Experimento COSY	82
	9. Experimento NOESY	83
24,25-Dihidrowithanólida D (2)	10. IR	84
	11. EM-DART	85
	12. RMN ¹ H	86
	13. RMN ¹³ C	87
	14. Experimento DEPT	88
	15. Experimento HSQC	89
	16. Experimento HMBC	90
	17. Experimento COSY	91
	18. Experimento NOESY	92
Withanólida D (3)	19. IR	93
	20. EM-DART	94
	21. RMN ¹ H	95
	21. RMN ¹³ C	96
	22. Experimento DEPT	97
	23. Experimento HSQC	98
	24. Experimento HMBC	99
	25. Experimento COSY	100
	26. Experimento NOESY	101
Mezcla de β-sitosterol (4) y de estigmasterol (5)	27. RMN ¹ H	102



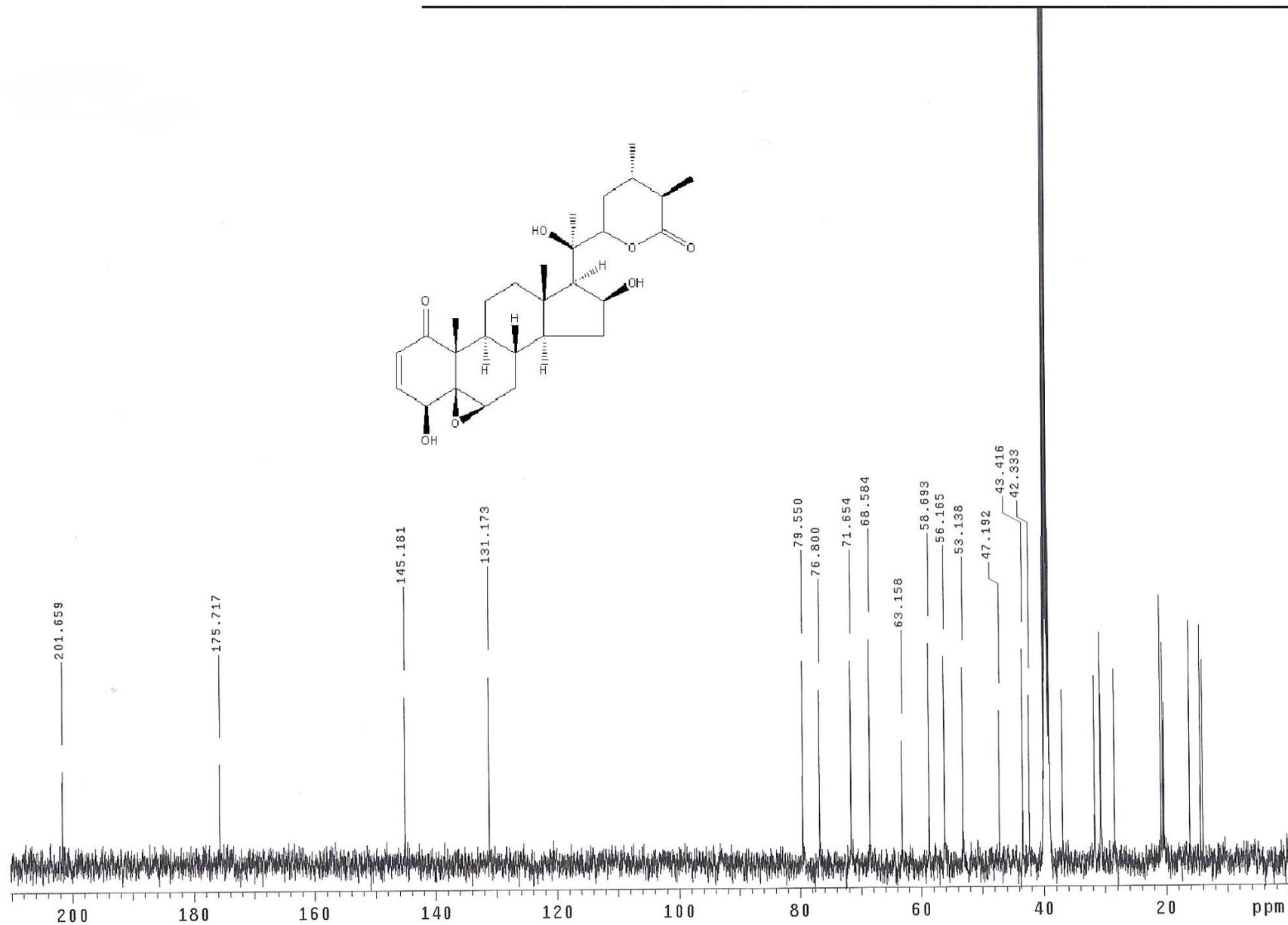
Espectro 1. Espectro IR de la withaphyscarpina (1).



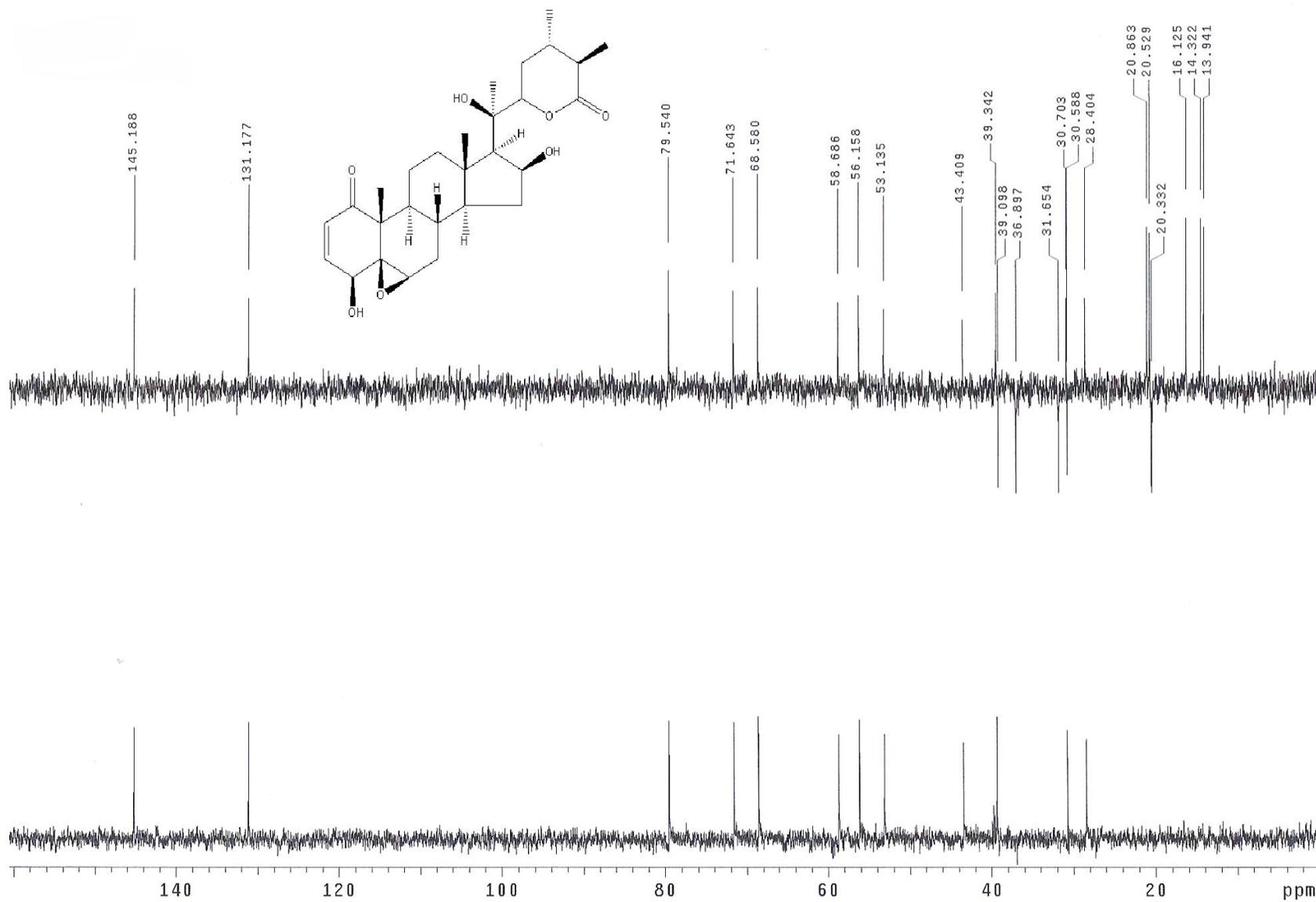
Espectro 2. EM-IE de la withaphysarpina (**1**).



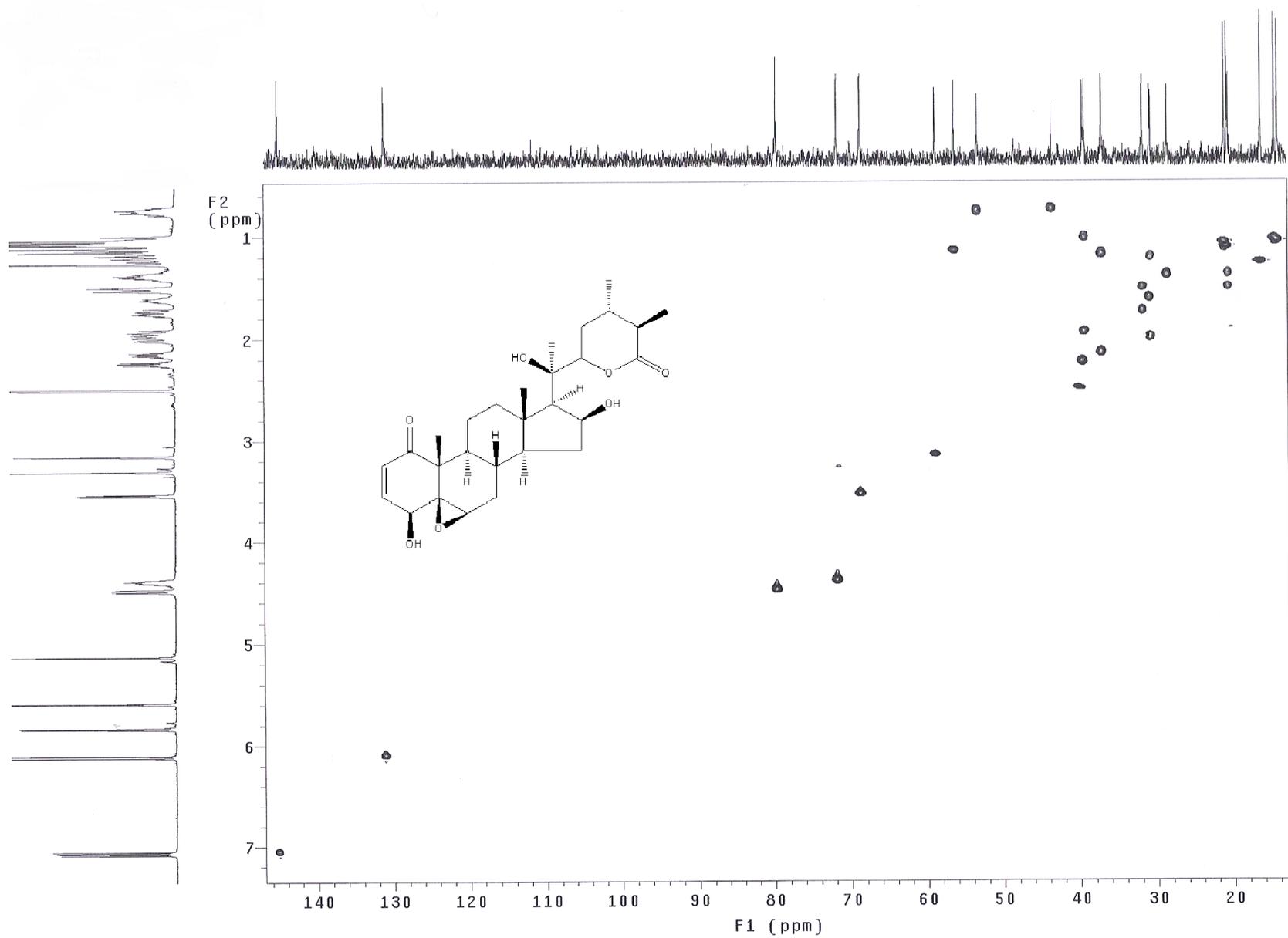
Espectro 3. Espectro de RMN ^1H de la withaphysacarpina (**1**).



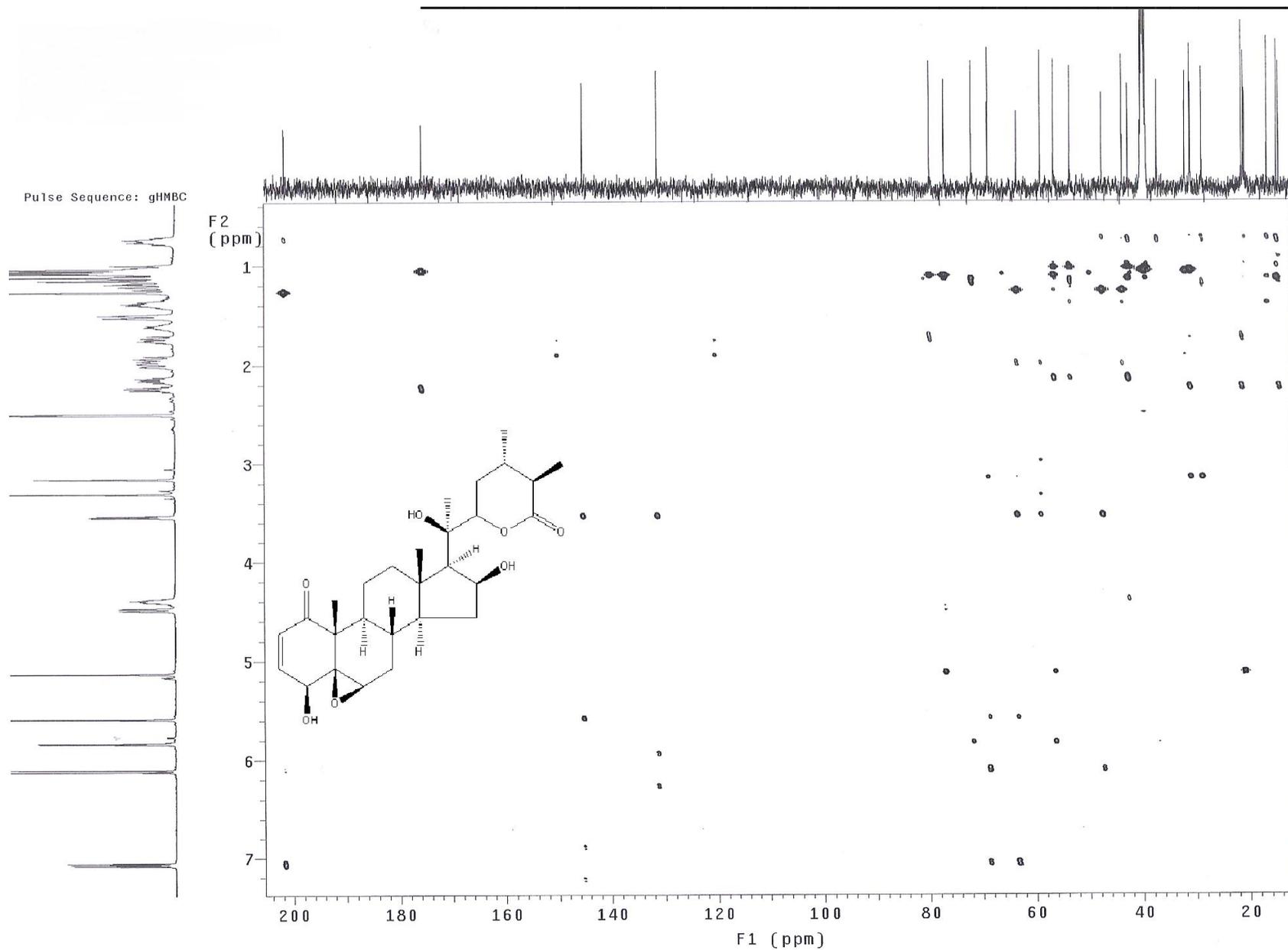
Espectro 4. RMN ^{13}C de la withaphysarpina (**1**).

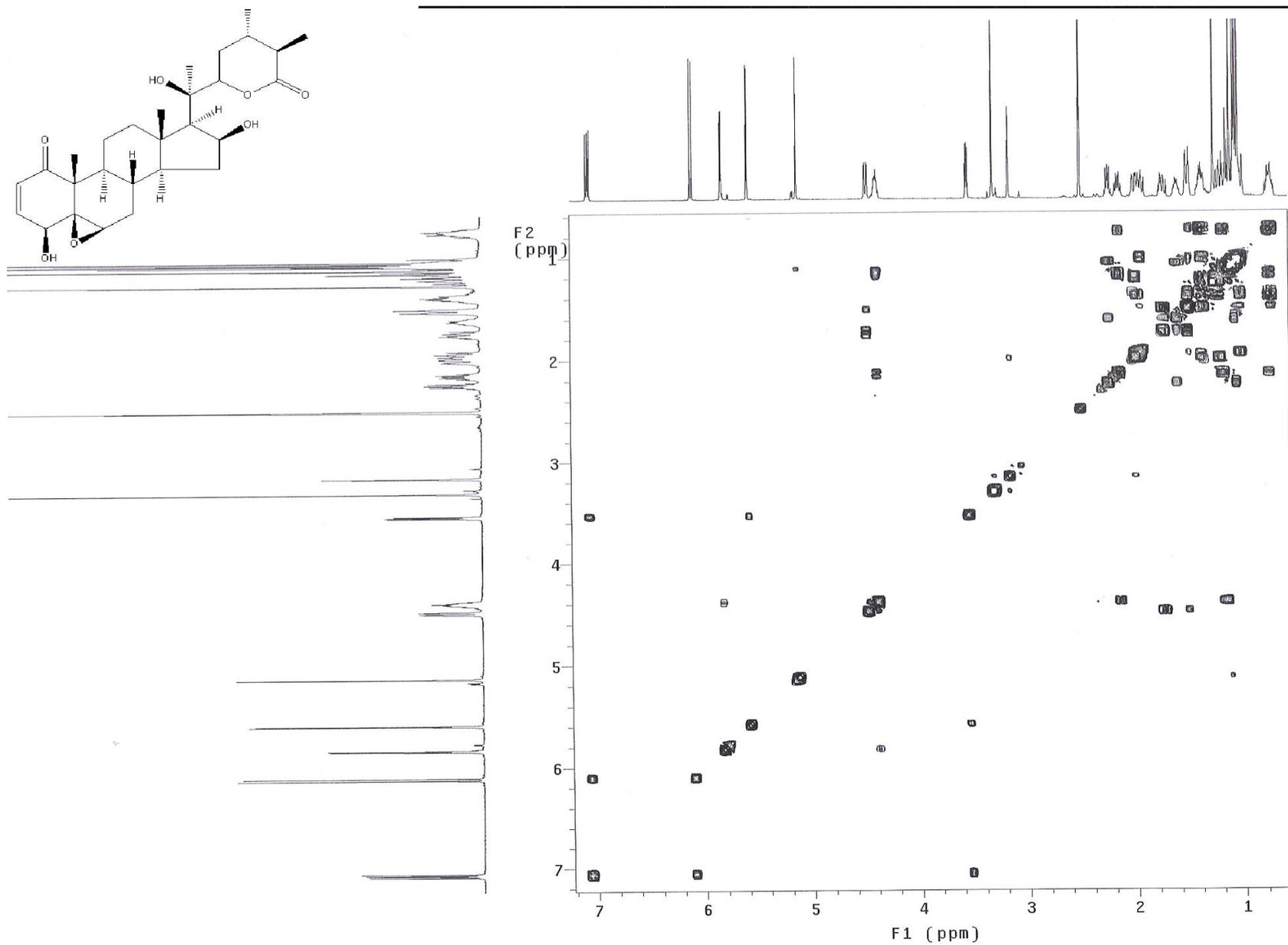


Espectro 5. Experimento DEPT para la withaphyscarpina (**1**).

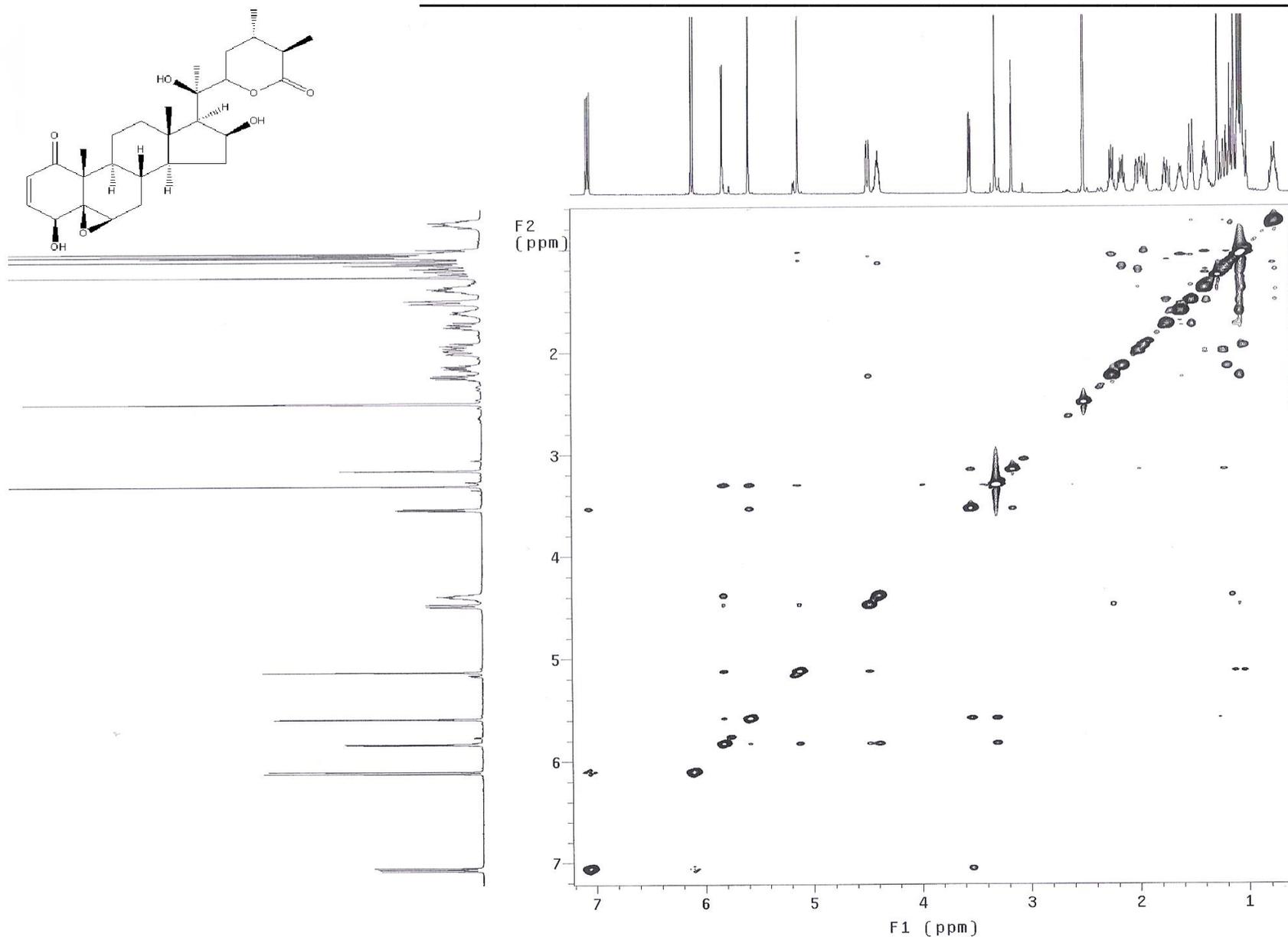


Espectro 6. Experimento HSQC para la withaphysacarpina (**1**).

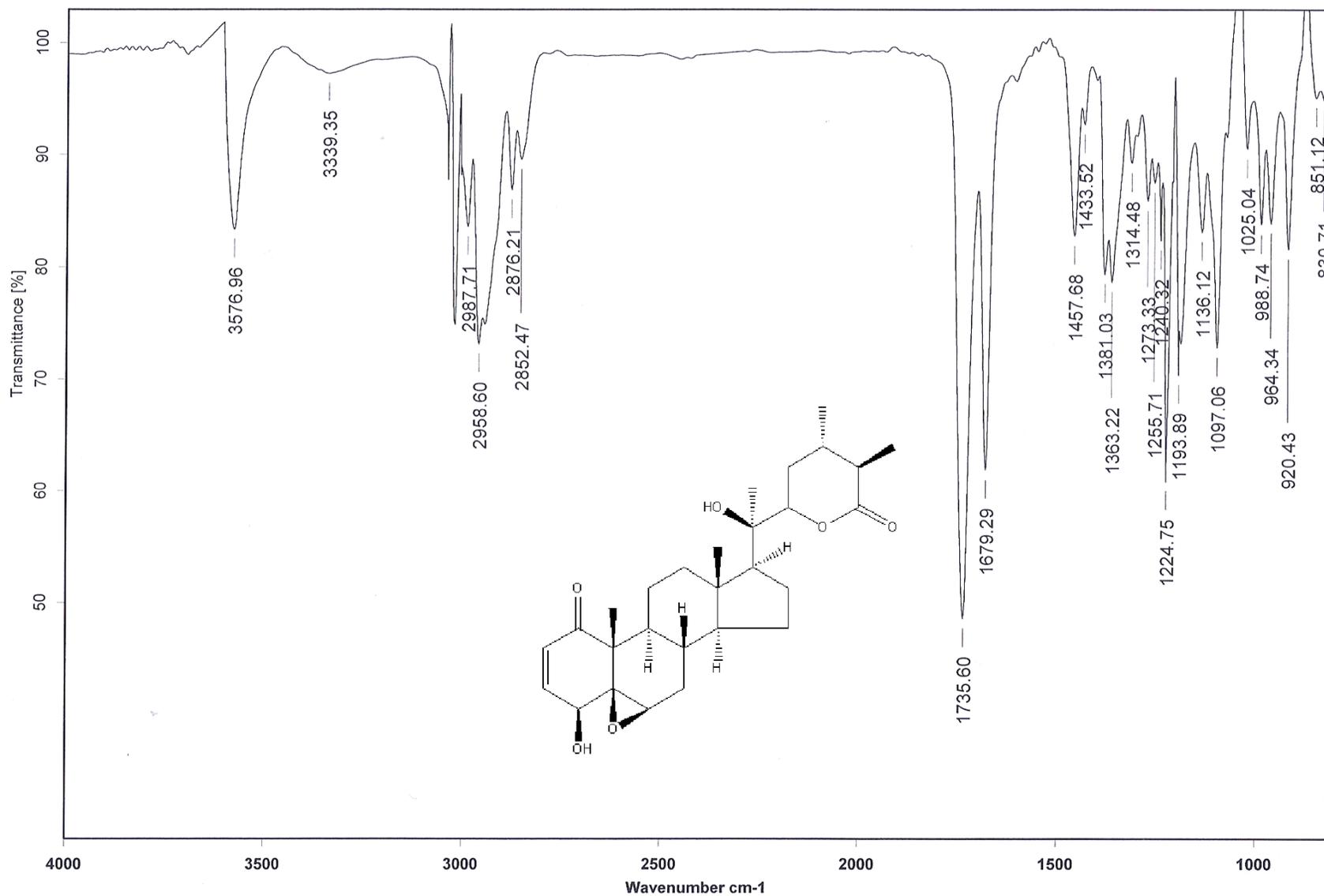




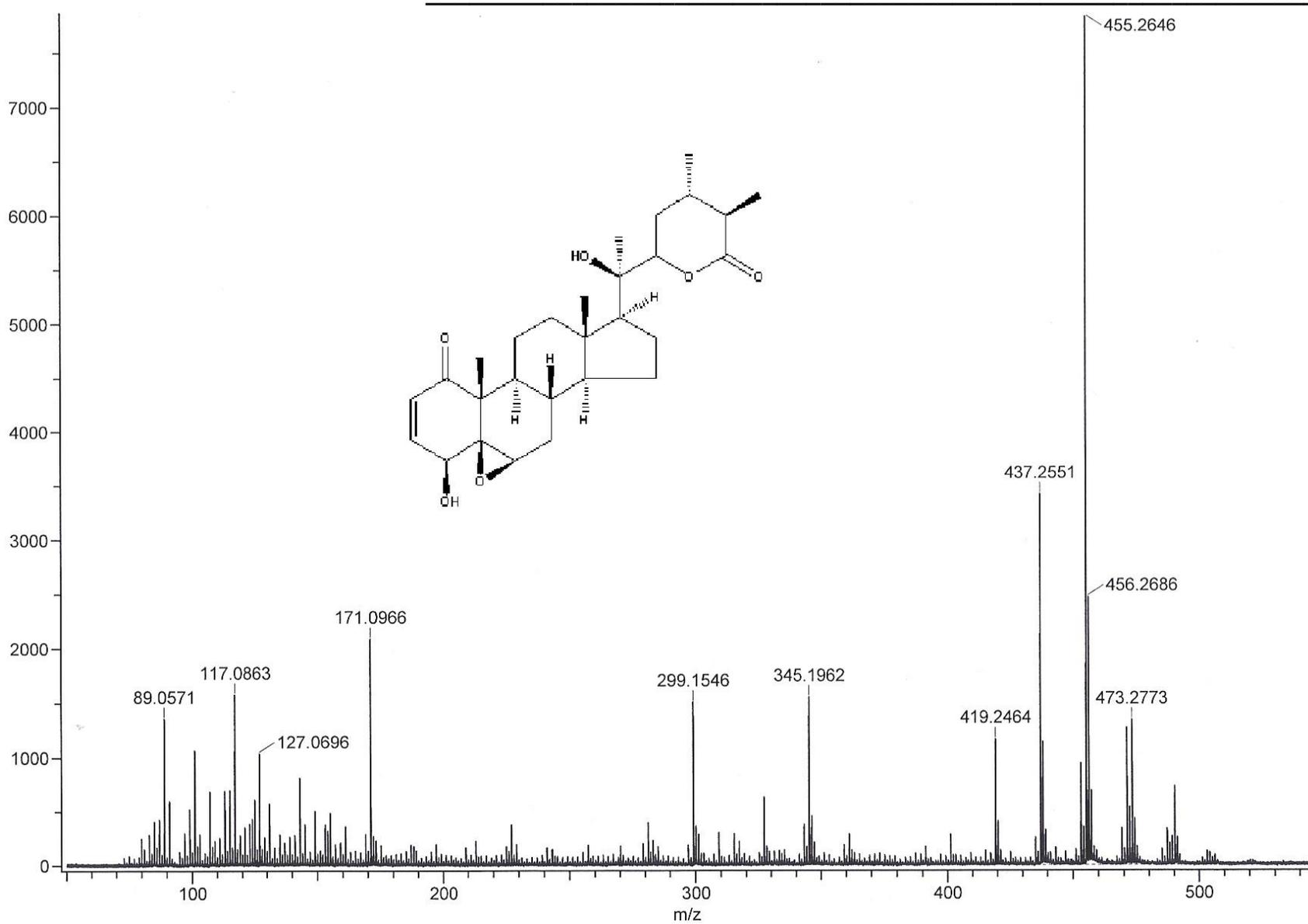
Espectro 8. Experimento COSY para la withaphysacarpina (**1**).



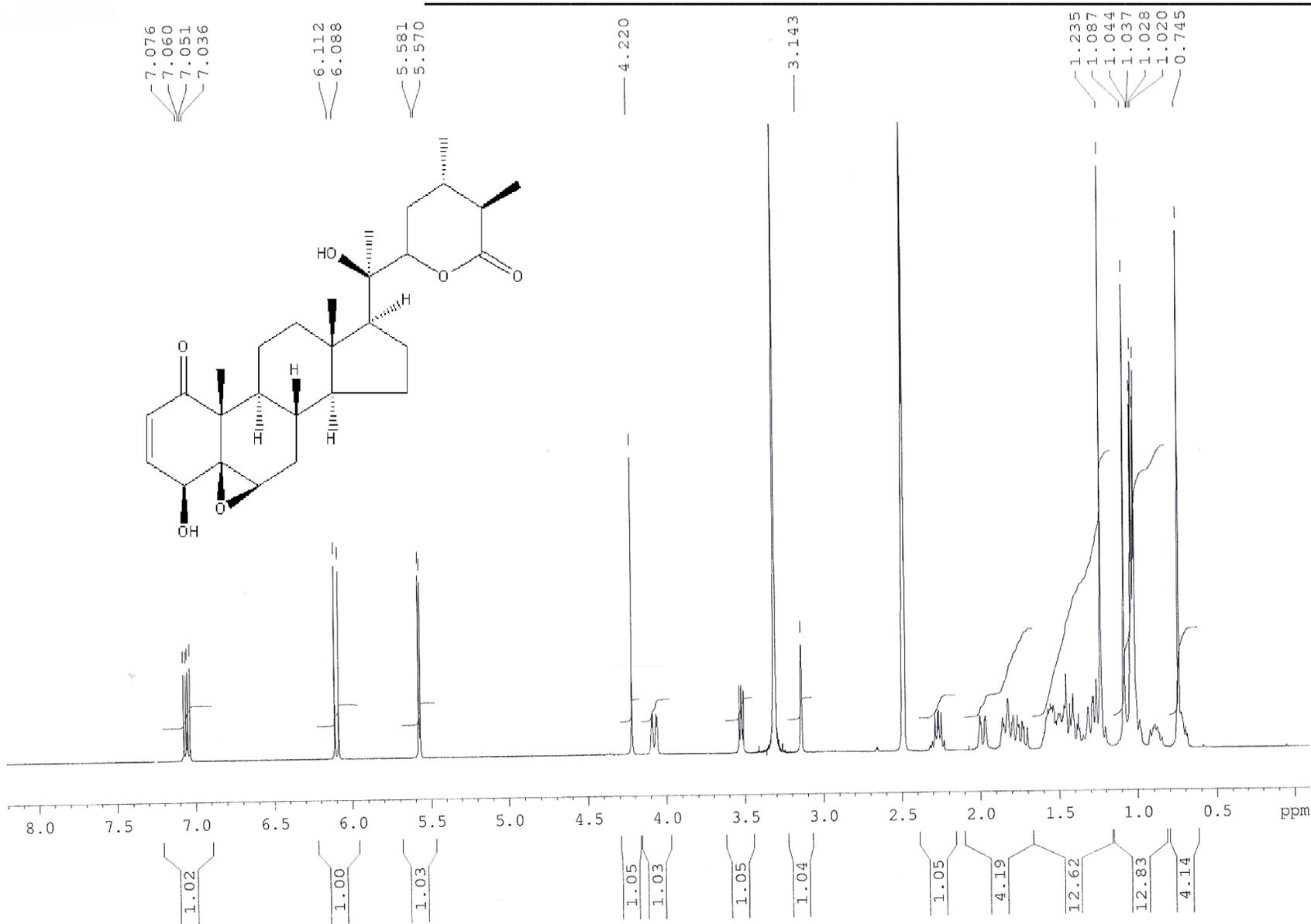
Espectro 9. Experimento NOESY para la withaphysarpina (**1**).



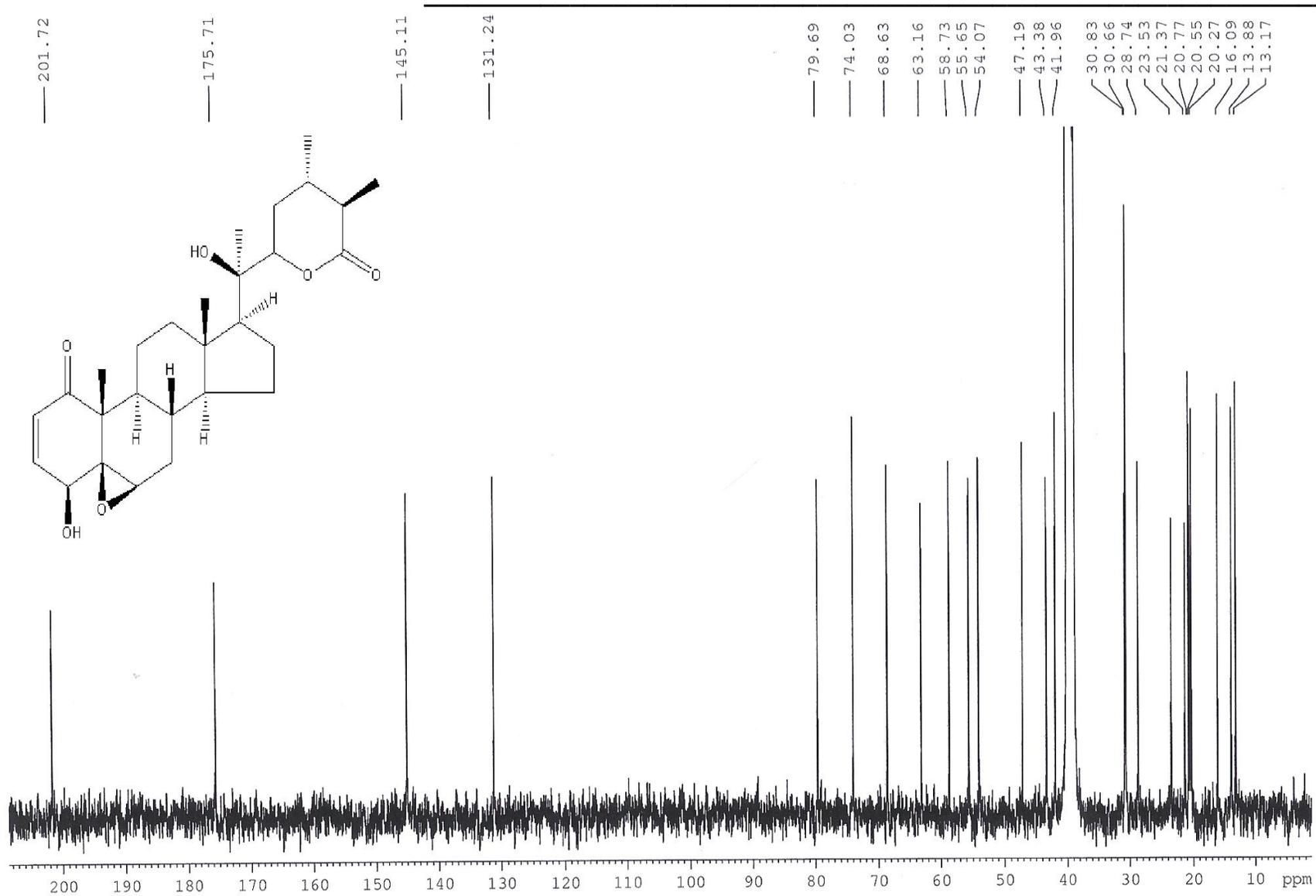
Espectro 10. Espectro IR de la 24,25-dihidrowithanólida D (**2**).



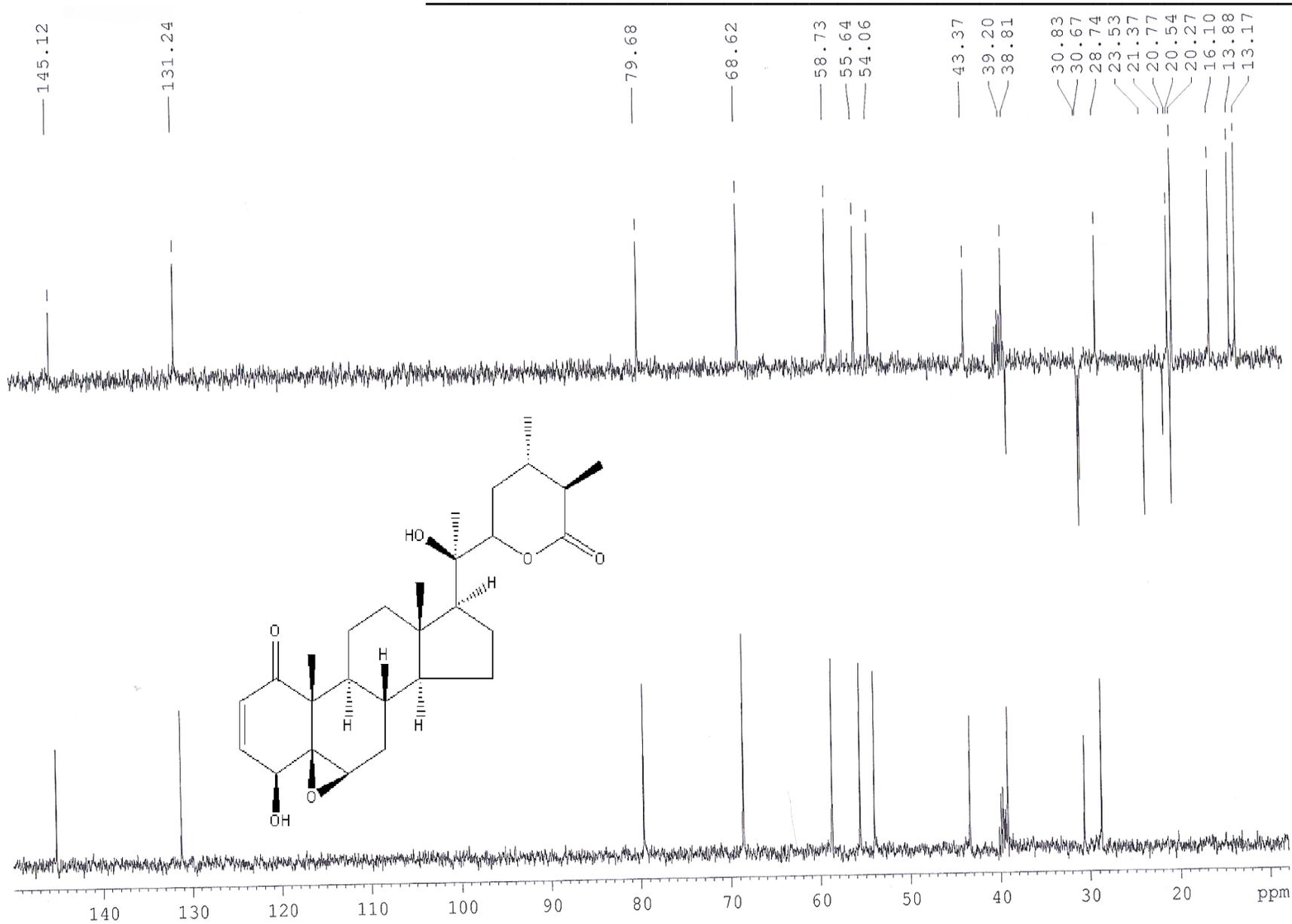
Espectro 11. Espectro EM-DART de la 24,25-dihidrowithanólida D (2).



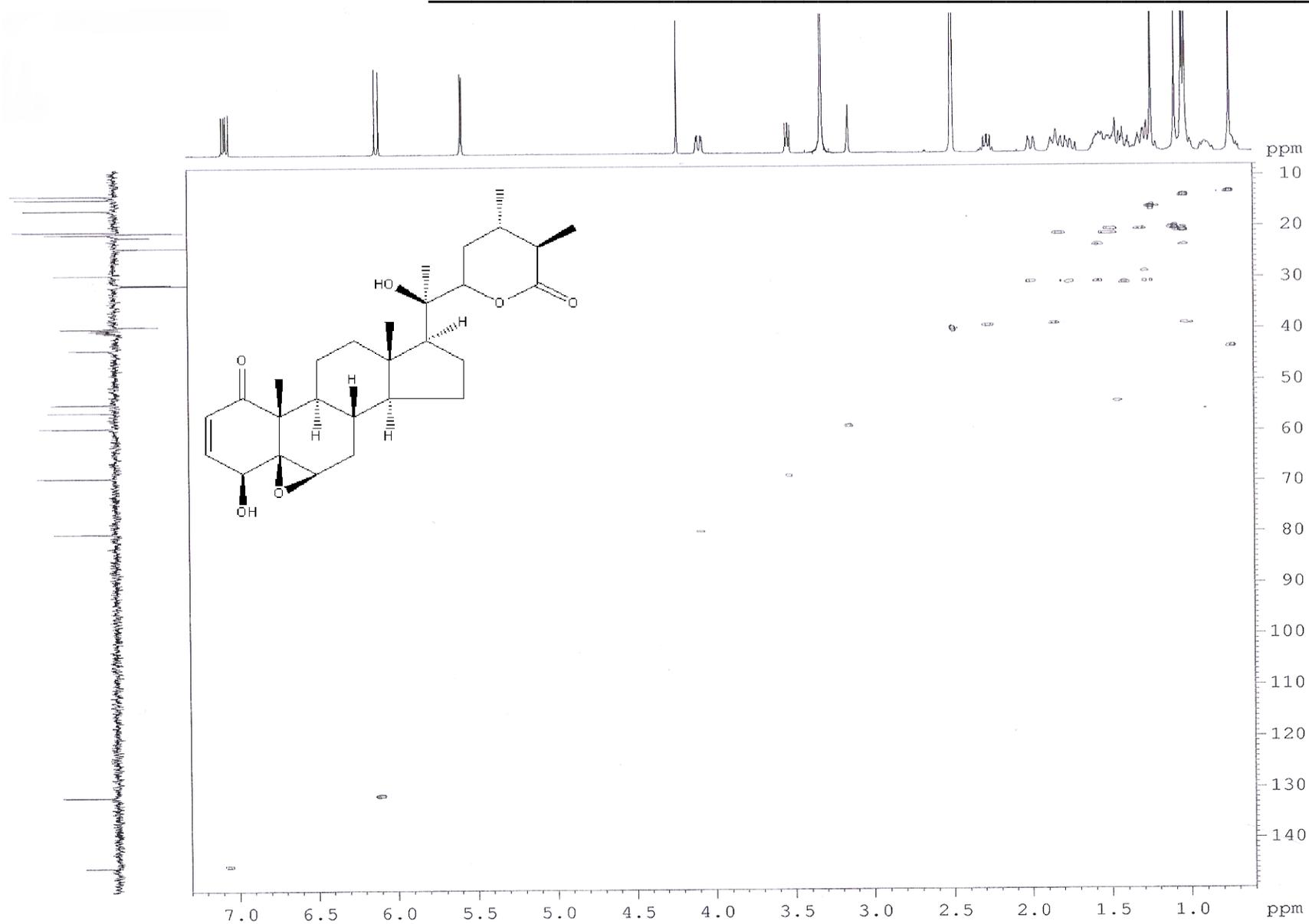
Espectro 12. Espectro de RMN ¹H de la 24,25-dihidrowithanólida D (2).



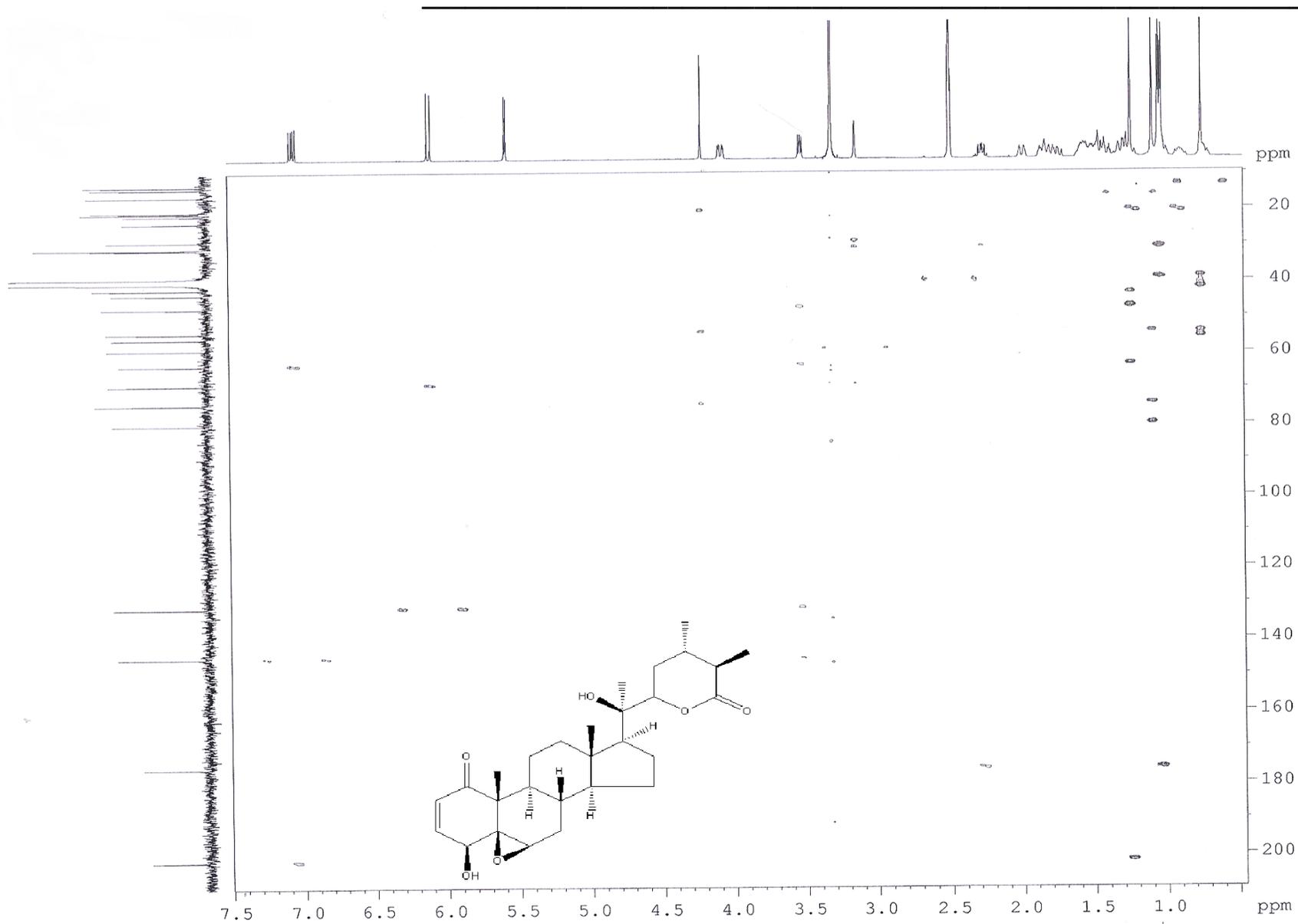
Espectro 13. Espectro de RMN ^{13}C de la 24,25-dihidrowithanolida D (2).



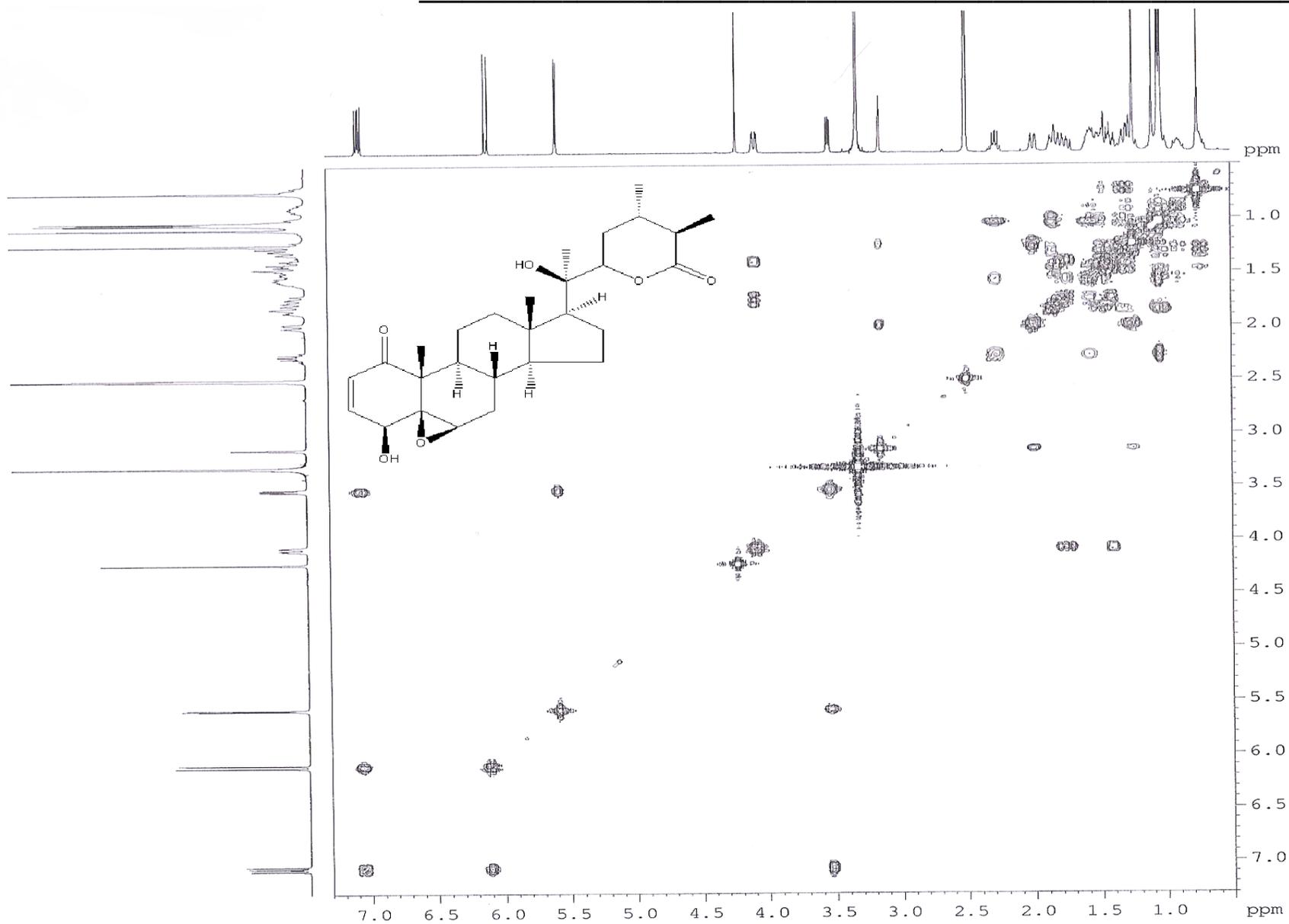
Espectro 14. Experimento DEPT para la 24,25-dihidrowithanolida D (2).



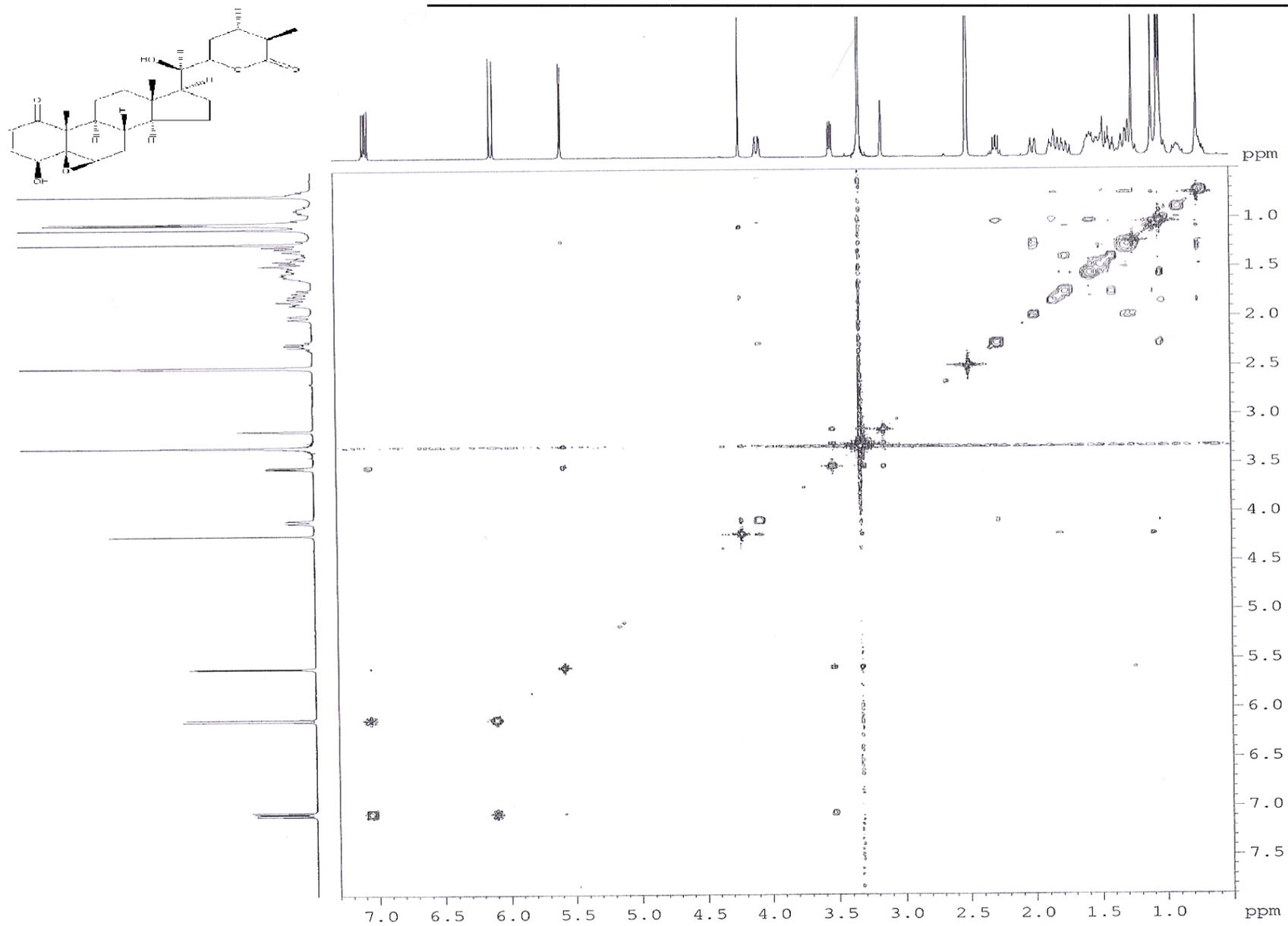
Espectro 15. Experimento HSQC para la 24,25-dihidrowithanolida D (2).



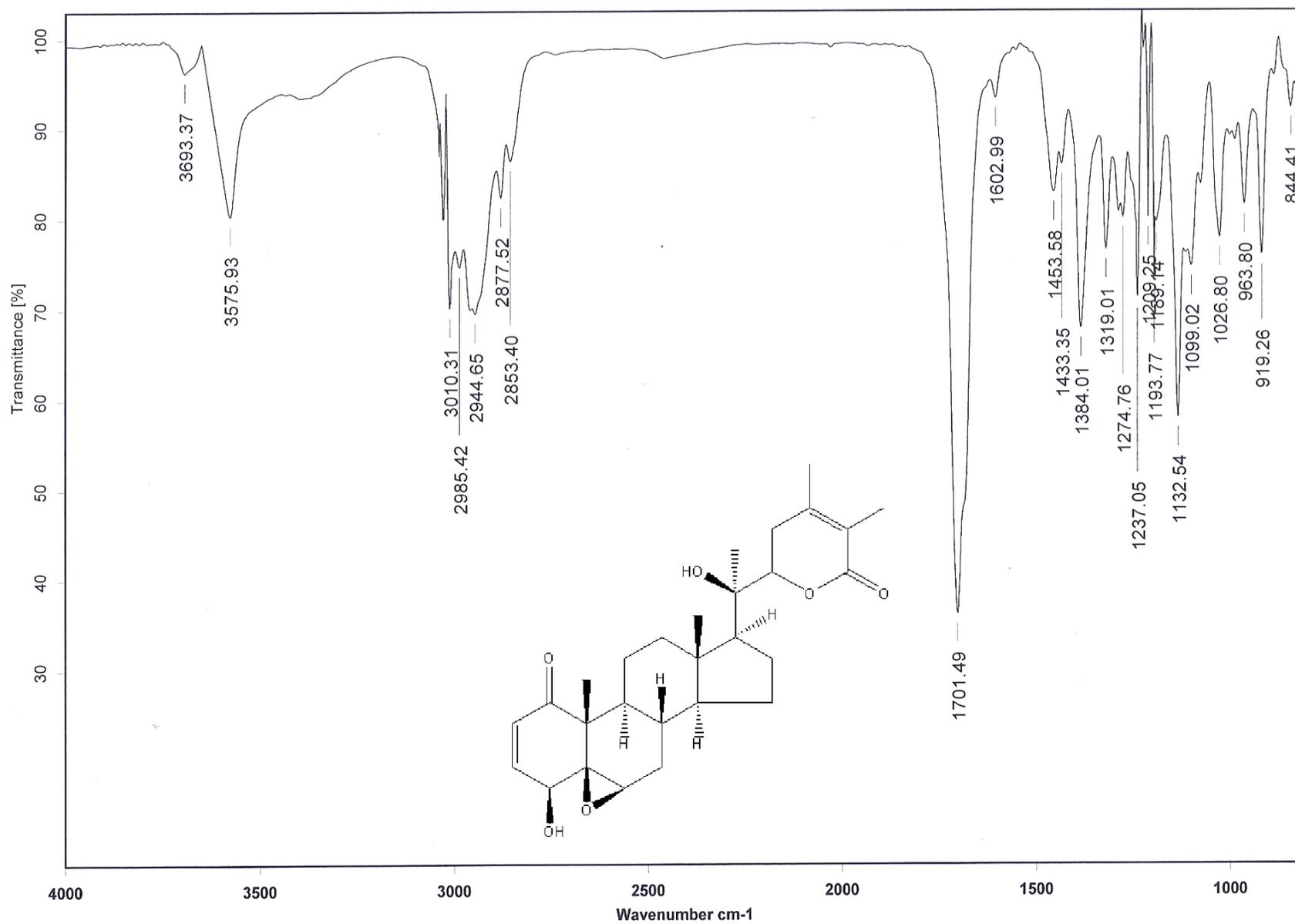
Espectro 16. Experimento HMBC para la 24,25-dihidrowithanólida D (2).



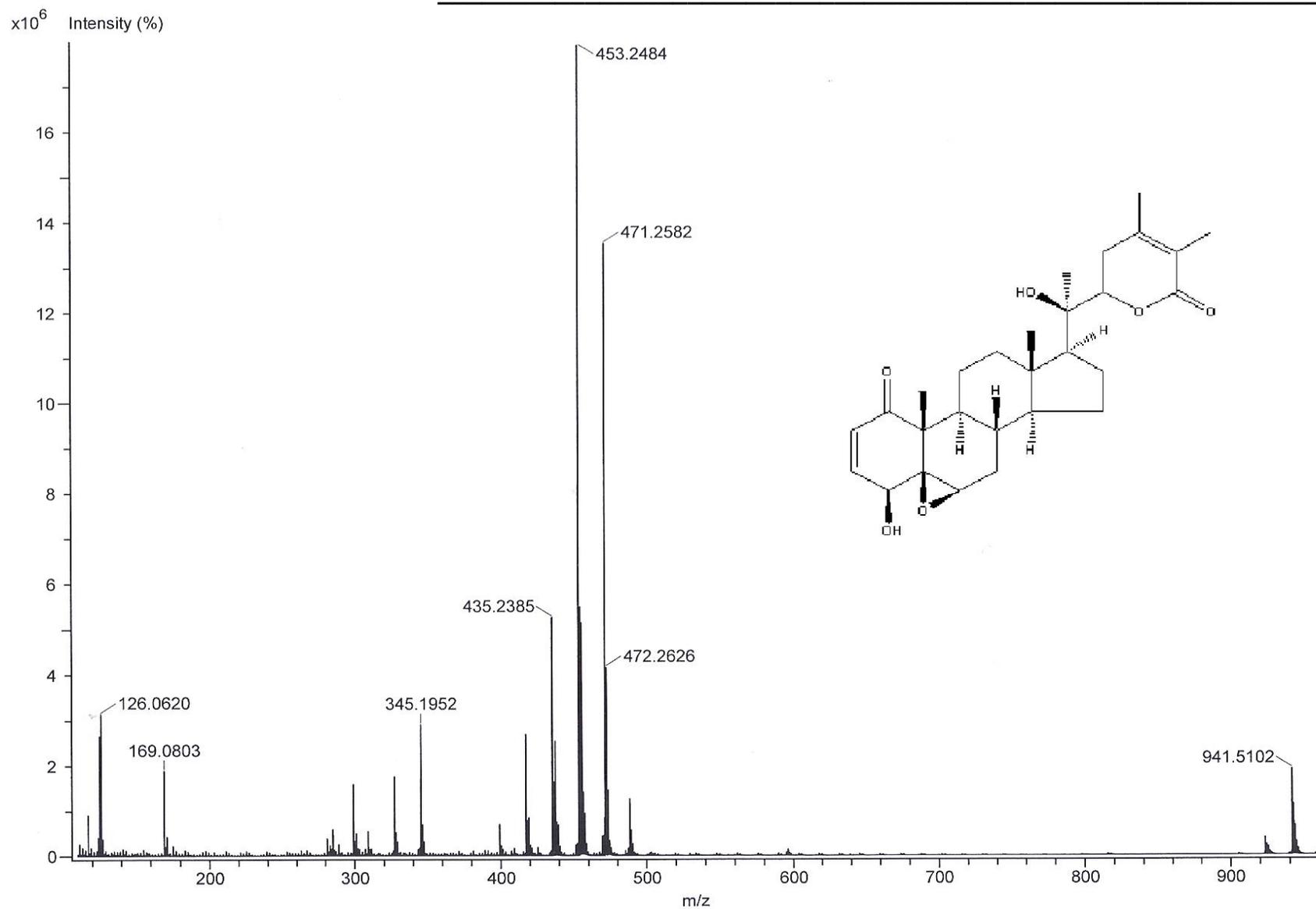
Espectro 17. Experimento COSY para la 24,25-dihidrowithanolida D (2).



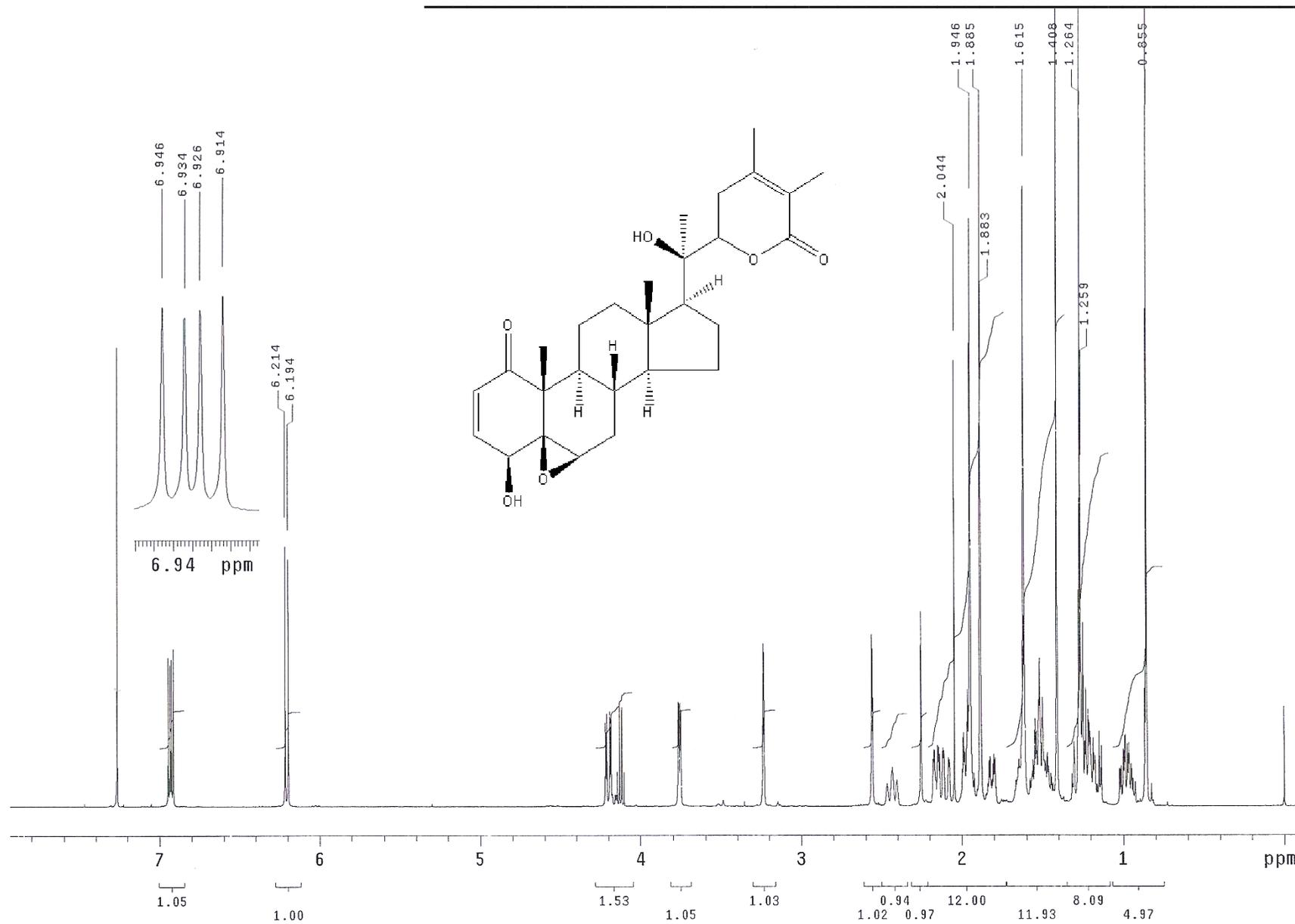
Espectro 18. Experimento NOESY para la 24,25-dihidrowithanólida D (2).



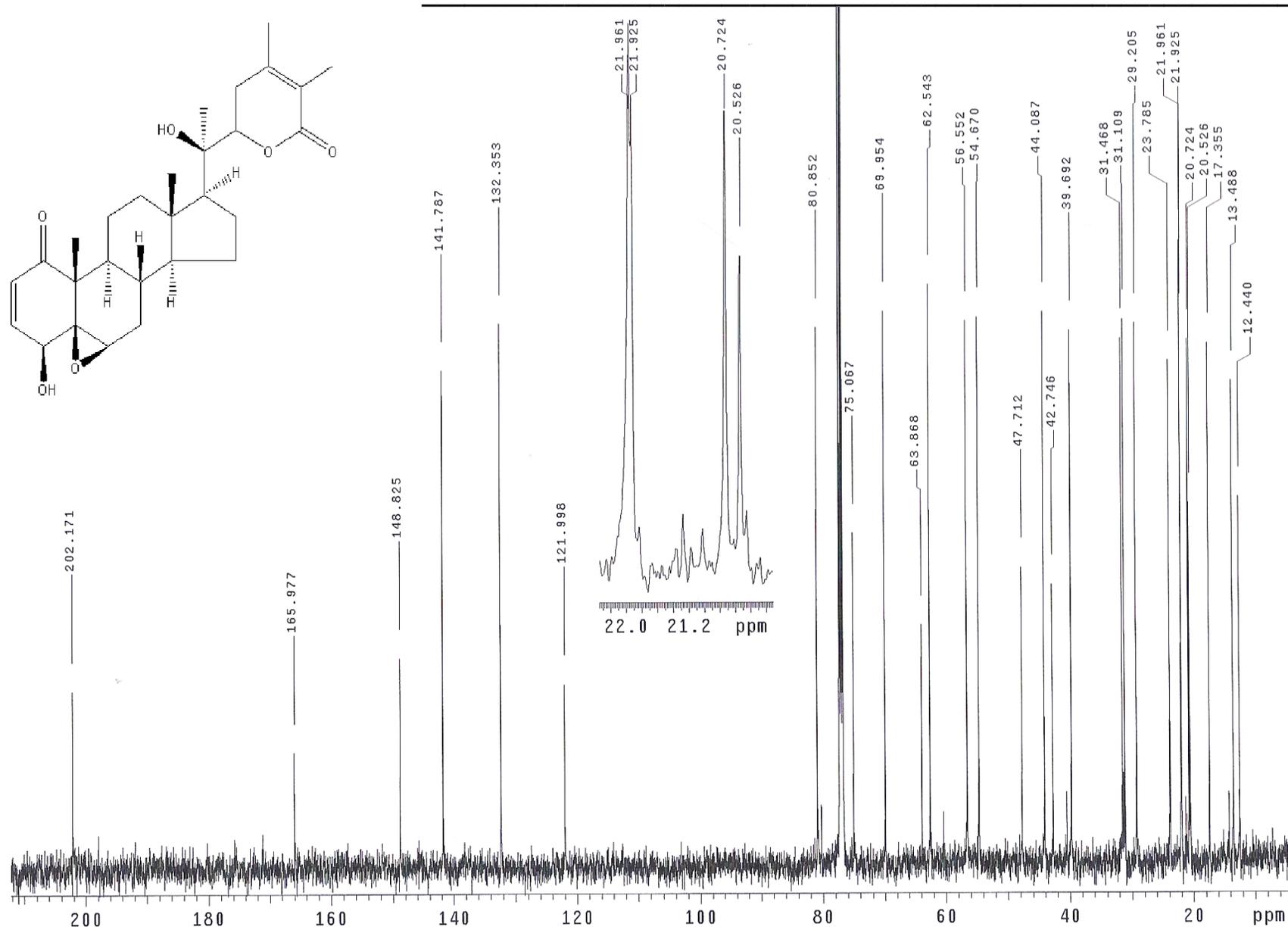
Espectro 19. Espectro IR de la withanólida D (3).



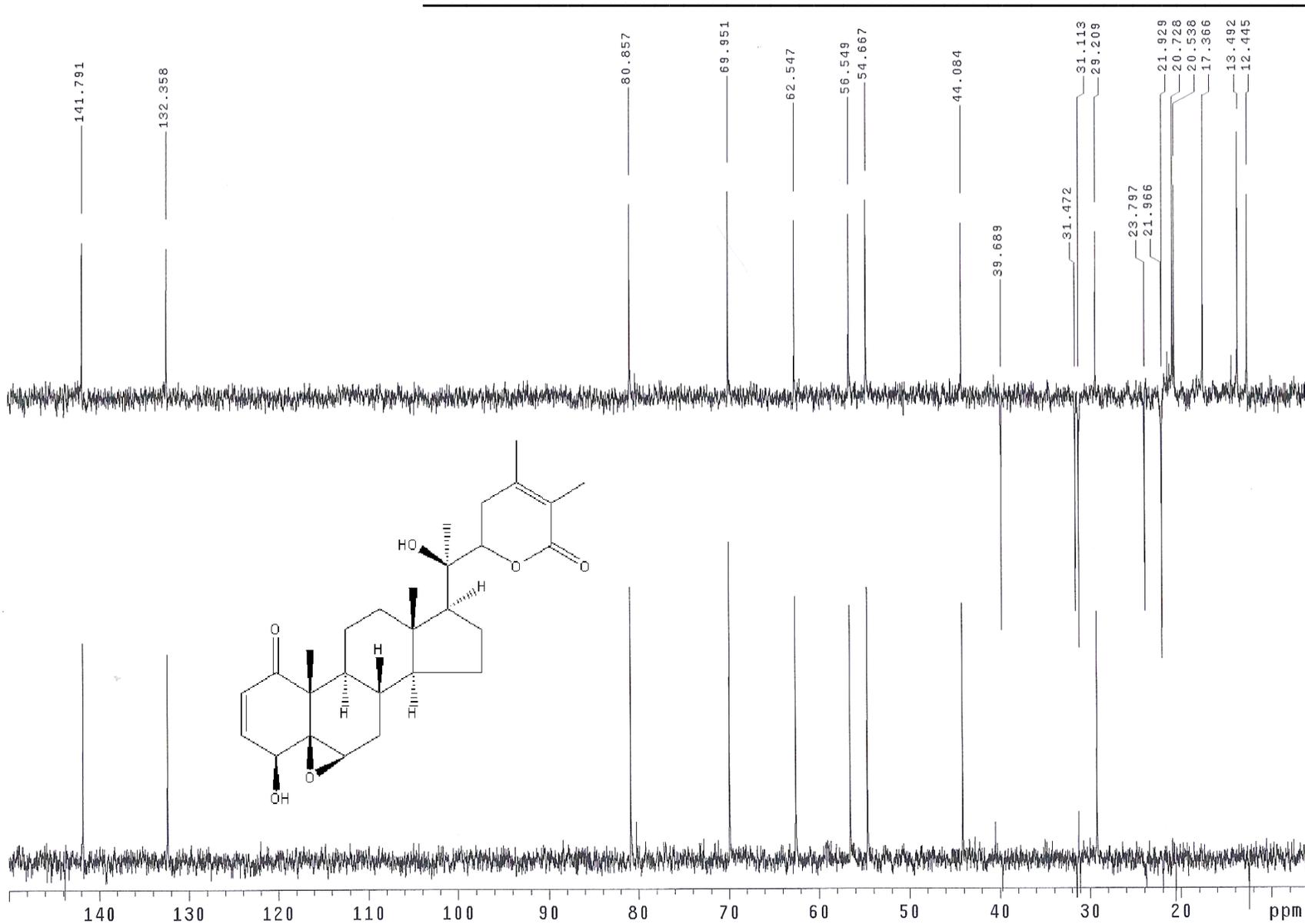
Espectro 20. EM-DART de la withanólida D (3).



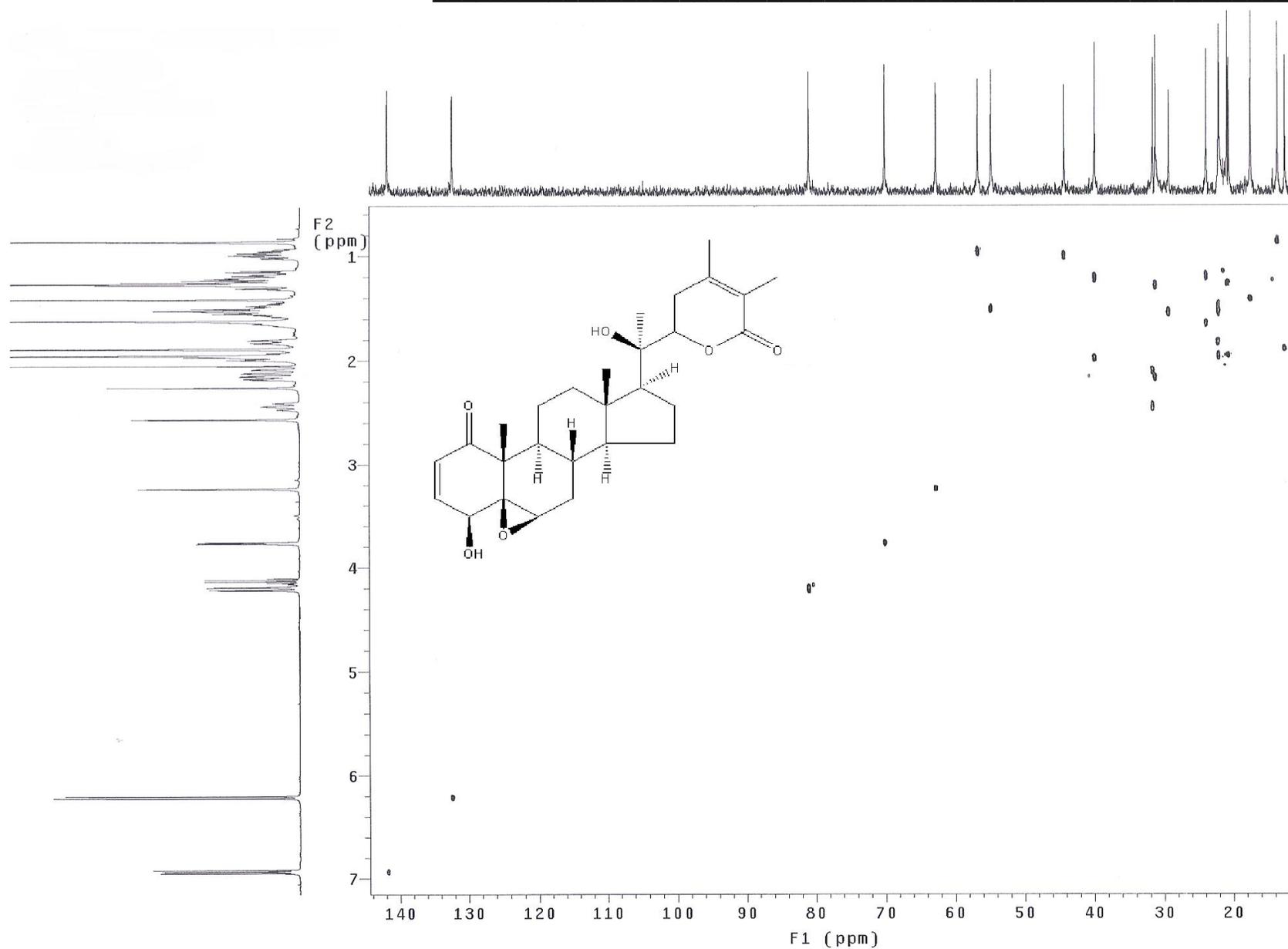
Espectro 21. RMN ^1H de la withanólida D (3).



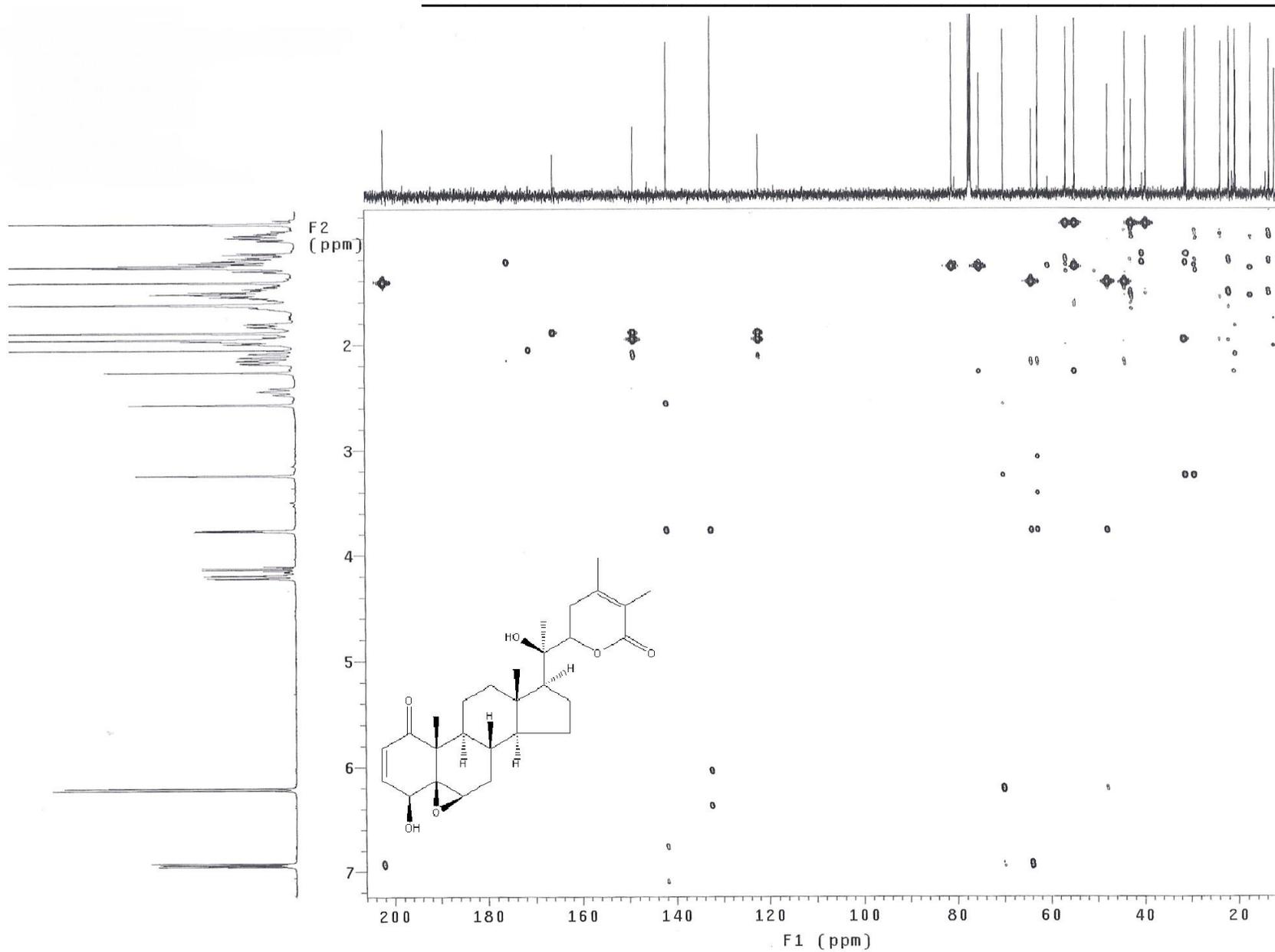
Espectro 22. RMN ^{13}C de la withanólida D (3).



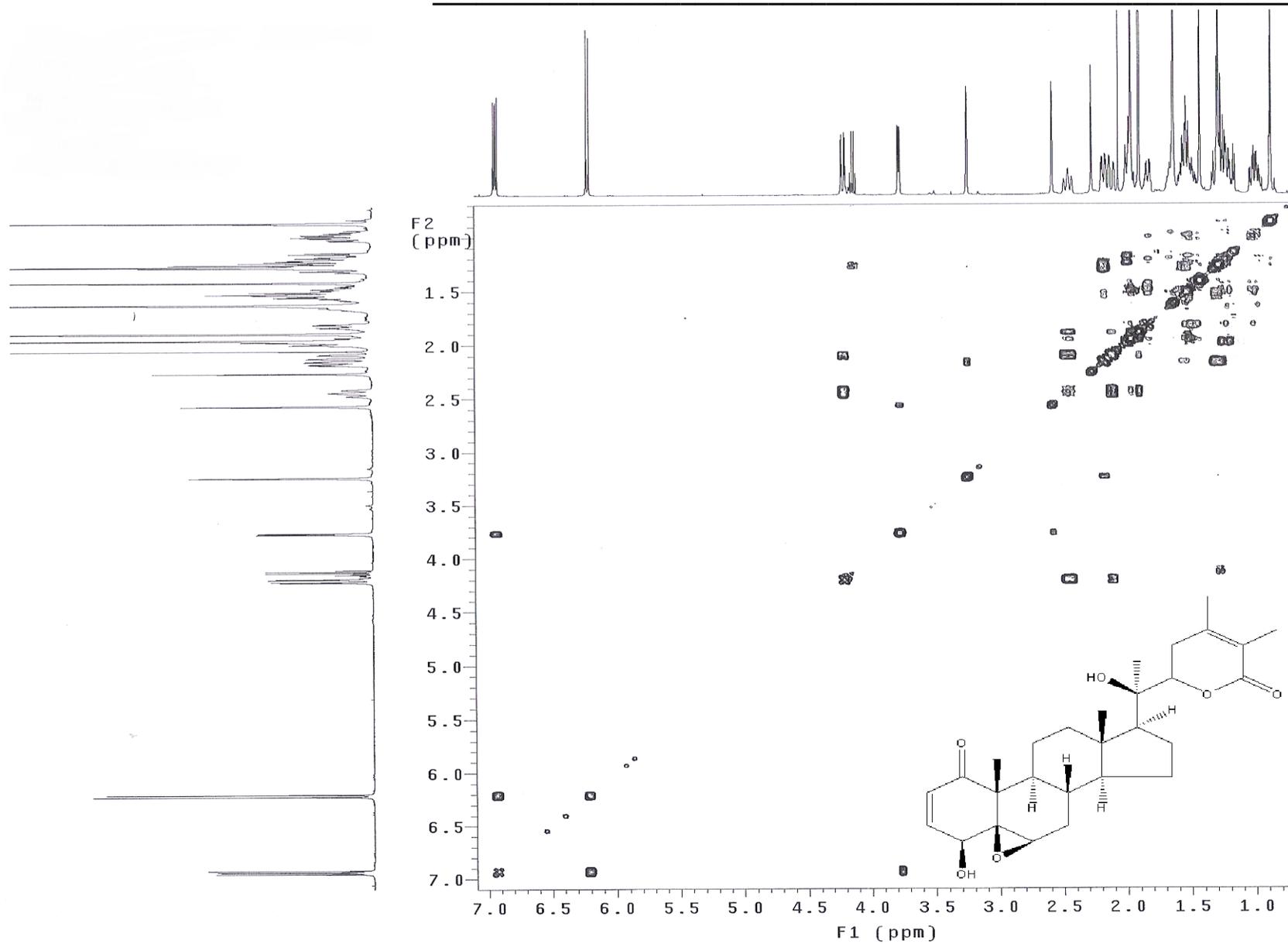
Espectro 23. Experimento DEPT para la withanólida D (3).



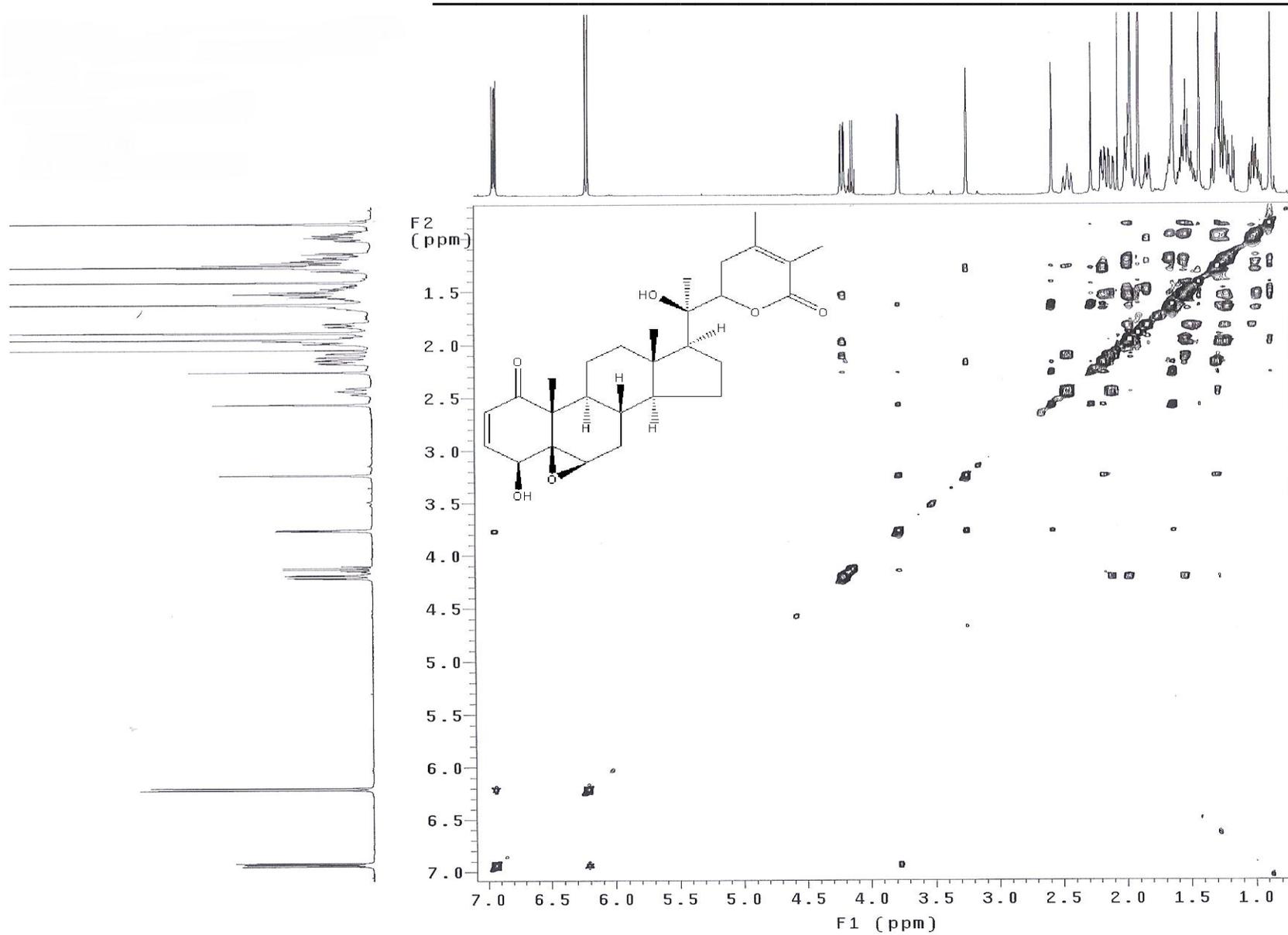
Espectro 24. Experimento HSQC para la withanólida D (3).



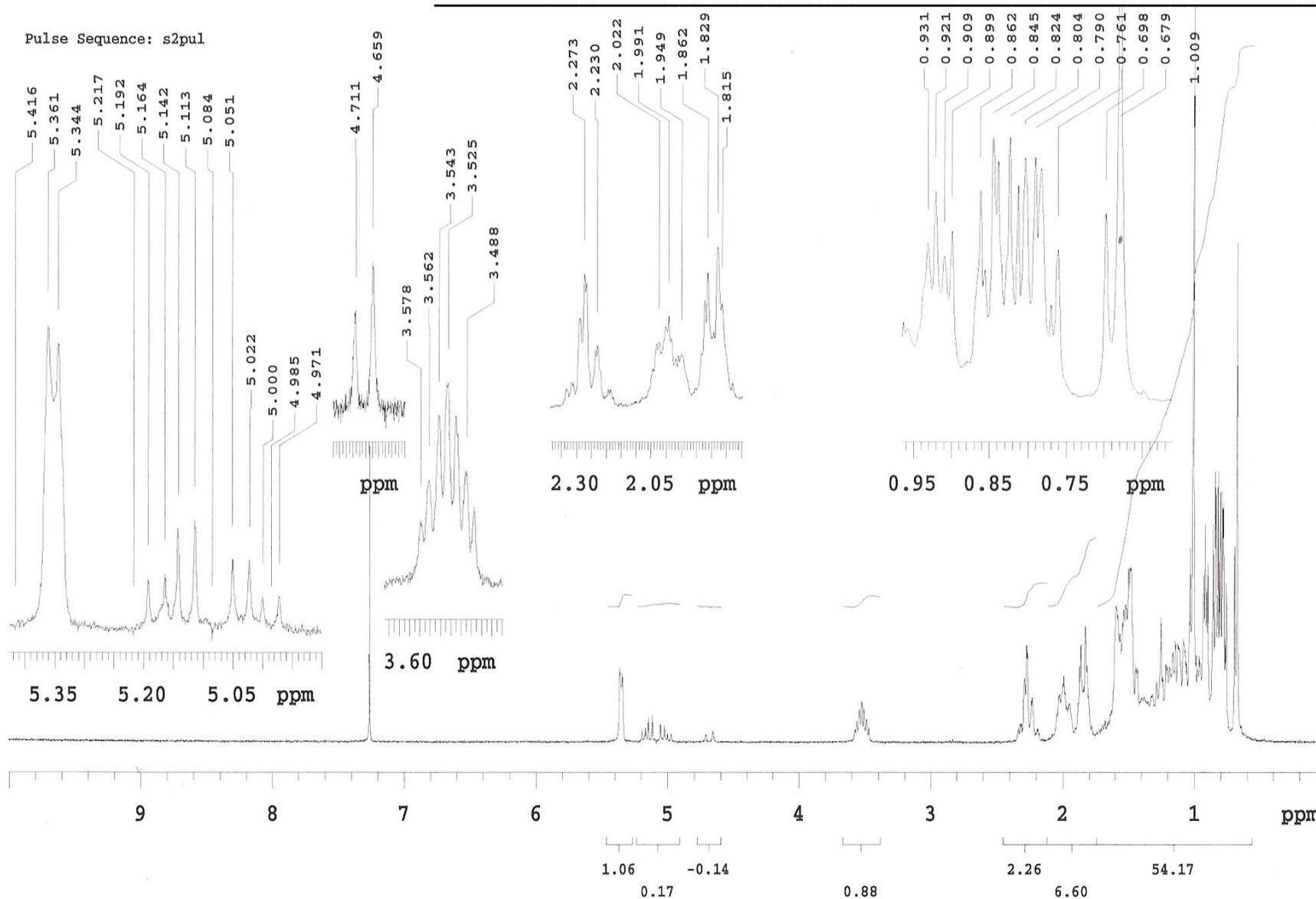
Espectro 25. Experimento HMBC para la withanólida D (3).



Espectro 26. Experimento COSY para la withanólida D (**3**).



Espectro 27. Experimento NOESY para la withanólida D (3).



Espectro 28. RMN ^1H de la mezcla de β -sitosterol (**4**) y de estigmasterol (**5**).